

計畫編號：MOHW104-CDC-C-114-114901

衛生福利部疾病管制署 104 年委託科技研究計畫

計畫名稱：登革熱防治研究中心

## 104 年度/全程 研究報告

執行機構：高雄醫學大學

計畫主持人：楊俊毓

協同主持人：蔡季君、彭貴春、黃志中、王維恭、劉立德、戴淑美、蔡坤憲、陳彥旭、蕭信宏、張科、陳宜民、許超群

研究人員：

執行期間：104 年 7 月 23 日至 105 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意\*

# 目 錄

	頁 碼
一、摘要	
中文摘要.....	(4-26)
英文摘要.....	(27-48)
二、前言.....	(48-91)
三、研究目的.....	(92-106)
四、材料與方法.....	(107-160)
五、計畫執行情形說明.....	(160-174)
六、結果.....	(174-269)
七、討論.....	(269-291)
八、結論與建議.....	(291-317)
九、重要研究成果及具體建議.....	(317-327)
十、計畫成果自評.....	(327-334)
十一、可供推廣之研發成果資料表.....	(335-340)
十二、主要績效指標表.....	(341-357)
十三、參考文獻.....	(358-389)
十四、圖.....	(390-462)

十五、表.....(463-489)

十六、附錄.....(490-538)

共(538)頁

## 一、摘要

### 中文摘要

#### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

全球超過 120 國家會受到登革熱的威脅。登革熱因為早期的癥狀類似於其他感染疾病引起的發燒現象，往往無法即時的診斷出登革熱的發生，通常到了退燒期後會有嚴重的登革熱的發生，如登革出血熱或登革休克症候群，患者此時已著受生命的威脅。即時和準確地診斷出早期的登革熱病患是非常地重要的。目前市面上有許多已發展好的登革熱快篩試劑，然而這些試劑的準確的約之有百分之 65-75。因此發展對登革熱具有高敏感度和專一性的試劑是必須的。臨床上會看到不同的病毒會引起一些獨特的臨床特徵，顯示病毒們會引起一些獨特的宿主蛋白的表現。蛋白質體學初步篩選的結果顯示登革熱患者血清有免疫球蛋白分子輕鍊 lambda 1、mutant NADH-cytochrome b5 reductase, PR1，補體相關蛋白分子 C4A3, Chain F, 和 C3b 的特異性表現。因為 PR1 是不同於其他免疫反應相關的因子，所以本計畫著重於 PR1 對於登革熱診斷試劑研發的潛能。PR1 目前有五個 isoform 組成。利用西方墨點法分析登革熱患者、健康人血清或登革熱感染的臍帶血細胞上清液結果發現，全部 PR1 只會表現於登革熱患者體內。利用酵素免疫分析法分析 PR1 的 isoform1 在健康人或不同發燒日的登革熱患者血清中的表現，結果顯示 isoform1 會再登革熱患者發燒第五天和第六天表現量為最多。然而我們也發現健康人體內也會有 isoform1 的表現。所以 PR1 的 isoform1 對於登革熱的診斷，將不是一個登革病毒感染引起的特異性宿主生物標的。因此將利用可以專一性辨識不同 PR1 isoform 的抗體建立酵素免疫分析法定義特異性因登革病毒感染引起的宿主生物標的。

關鍵字：登革熱診斷試劑、PR1、宿主生物標的

## (子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色

登革熱為重要的病媒蚊傳播的人類流行性疾病。登革熱患者在臨床上伴隨骨頭疼痛會有骨髓細胞數量受到抑制的現象，且可以從因登革熱致死個體的骨髓細胞中萃取出登革病毒的遺傳物質，並體外培養出病毒顆粒。人類的周邊血細胞是骨髓內豐富的造血幹細胞分化而來，而這群造血幹細胞已知容易受到登革病毒的感染。登革熱病患個體周邊血細胞的組成，已知會登革病毒的感染，而使得一些細胞的數量會下降，這可能是因為造血幹細胞受到登革病毒感染後所造成。我們利用造血幹細胞的細胞群落試驗，觀察到骨髓細胞受到登革病毒的感染後會影響其前趨巨核細胞的分化，而巨核細胞已知是血小板細胞的母細胞，所以臨床上登革病患的血小板低下可能是因為巨核前趨母細胞受到登革病毒的感染而減少導致的。目前疫苗預防效果多是以對抗體外病毒的效果作為評估，之前的研究顯示體內的登革型態可能與體外的病毒型態是有所不同，此也影響目前疫苗在第二期試驗的預期效果不佳的因素之一。我們利用電子顯微鏡和金原子標定免疫染色和低溫電顯分析登革熱患者體內的病毒型態，結果發現體內登革病毒會由一層膜所包覆，而這層膜會表現高量的巨核細胞表面標誌。此外，生化試驗的研究也顯示此病毒科粒缺乏病毒殼膜的表現，這樣的特殊的病毒顆粒我們將其定義為病毒微囊泡，這也解釋為何現行疫苗的預防效果不如預期的因素。不顯性感染者被認為促進登革熱傳播的因子，我們的結果顯示幹細胞和前趨細胞對於登革病毒的感染扮演重要的角色，替用體外病毒感染模式，發現這些細胞在周邊血的比例與登革病毒的產量呈現正相關性，顯示不顯性感染者體內的幹細胞和前趨細胞可能是登革病毒感染的主要細胞群。未來我們將可以利用這樣體內登革病毒型態來評估現行疫苗的預防效

果，此外也可利用這樣的造血幹細胞感染的模式，了解造成登革病患血小板低小的因素。

關鍵字:人類造血幹細胞、體內登革病毒型態、不顯性感染者

### (子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探--某醫學中

#### 心照護病例對照研究

近年來登革熱傳播主要發生在城市和半城市地區，已成為一個主要國際公共衛生關切問題，登革病毒的感染，臨床的表現可從症狀感染不明顯、發燒、登革熱，最嚴重的會有登革出血熱甚至導致死亡；世界衛生組織有別與 1997 年所提出登革出血熱的臨床分類，於 2009 年臨床分類主要分為登革熱無警示徵象、登革熱有警示徵象和登革熱重症三大分類，以提供此類個案適當的檢傷分類並引導臨床處置；有越來越多的文獻進行探討 2009 年版的臨床分類對於照護登革病毒感染病患的臨床使用與限制。

本研究以單一醫學中心-高雄醫學大學附設中和紀念醫院於 2014 年 1 月 1 日至 2014 年 12 月 31 日通報確診的登革熱病患為研究對象，期間共收集 1822 名登革熱確診個案。符合登革熱重症定義的病例，共有 35 名(即病例組)。再由非登革熱重症病例配對性別及年齡以 1:4 隨機抽取 140 名對照組個案。病例組與對照組在臨床檢驗數據上，白血球數、血紅素量、血球容積比、血小板數、淋巴球、C-活性蛋白、血中尿素氮、血清肌酸酐、凝血酶原時間、部份凝血活酶時間、部份凝血活酶時間等變數具有統計意義；在調整可能的干擾因素後，發現十二指腸潰瘍與慢性腎衰竭病史是登革熱重症的危險因子，其危險對比值分別是 4.89 倍(95%信賴區間為 1.55-20.55)與 4.04 倍(95%信賴區間為 1.64-14.61)。

關鍵詞：登革熱、登革熱重症、危險因子、性別分析

#### (子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

##### 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

**研究目的:**登革熱是南台灣常見的疾病，歷年來資料以高雄市為最嚴重，以往研究認為溫度、濕度、雨量、布氏指數等因素是重要的成因。但 103 年高雄市爆發近十年來大規模的一次登革熱疫情，出現超過 15,043 例登革熱個案，其中登革出血熱 132 例且有 20 例死亡。除上述已知因素外，103 年 7 月 31 日在前鎮及苓雅區發生的氣爆事件，導致 32 人死亡，321 人受傷，氣爆後連續大雨，也使登革熱疫情雪上加霜，是否因氣爆造成疫情擴大？若能釐清這些因素彼此的關聯性，必能有助於日後防疫政策的制定與推動。

**研究方法:**本計畫由高市政府衛生局處提供布氏指數資料，將溫度、濕度、雨量、布氏指數、氣爆等因素置入廣義估計方程式時間延遲的卜瓦松迴歸分析 (Generalized estimating equations with lagged-time Poisson regression)。

**主要發現:**結果發現最低溫的提升對於登革熱的發生率有 2-3 個月的延遲效應(正面效應)及雨量提升則有 1-2 個月延遲效應(負面效應)。2014 年登革熱發生率相較於 2002 年而言，在氣爆後 5 週至 22 週增加了 2.0 至 8.0 倍，氣爆區與鄰近氣爆區登革熱的發生率有顯著相關係數達統計上意義( $r_s = 0.956, P < 0.001$ )。與參考年份(2000 to 2014 年資料，但去掉 2002 及 2014 年，計 13 個年份)相比較，最低溫、雨量及氣爆事件解釋了 2014 年的 75.1%變異量。

**結論及建議:**此特殊處理經驗，除了能作為國內參考，對於國外類似災害事

件也有參考價值。最低溫及雨量相關於早期、鄰近環境加速登革熱傳遞，意外事件如氣爆事件與氣候及其對人蚊的動態交互作用在登革熱防治不應忽略。

### (子計畫五) 重症登革熱之流行病學及免疫反應研究

登革熱是目前全球最重要的蚊蟲媒介病毒傳染病，其發生率在過去數十年仍持續上升，為全球重要的公共衛生議題。南台灣位居登革熱流行地區，每年均有登革熱病例，尤其在 2014 及 2015 年有較大的流行。依據國外的研究，登革熱重症(severe dengue)多發生於兒童及青少年，且死亡率不高。然而在台灣 2015 年的登革熱大流行共造成 209 人死亡，我們觀察到的是一個以老年人為主、有極高死亡率的登革熱重症族群。本研究的目的是在深入研究這個登革熱重症族群的流行病學，並希望找到可供臨床應用的登革熱重症死亡預測指標。

我們回溯性地回顧 2015 年因登革熱重症住院至高雄醫學大學附設醫院(KMUH)加護病房(ICU)的 49 位病人，這些病人均經由血清 NS1 抗原檢驗確診有登革熱病毒感染。我們設定「加護病房死亡率」為最重要的預後，比較存活和死亡兩組病人的臨床特性。我們同時以一年齡、性別及疾病嚴重度配對的加護病房嚴重肺炎族群做為對照組，比較兩組病人的死亡率。這 49 位登革熱重症病人的平均年齡是 69.3 歲，其中 61.2%為女性，有 8.2%

病人是由安養中心的住民。共有 22 位病人(44.9%)於 ICU 中死亡，死亡原因如下：八位病人(36%)死於嚴重出血；七位病人(32%)死於登革休克；五位病人(23%)死於繼發的敗血症；兩位病人(9%)死於併發的心肌炎。存活組和死亡組病人的共病症並無明顯差異，但入住 ICU 時的疾病嚴重度指標 APACHE II 則有顯著的不同(28.8 vs 14.1,  $p < 0.001$ )。死亡組亦顯著地有較高的序貫器官衰竭評估(Sequential Organ Failure Assessment, SOFA)分數(13.6 vs 7.3,  $p < 0.001$ )。多變異數分析結果顯示 SOFA score 是唯一一個與死亡相關的獨立危險因素。ROC curve 分析亦顯示 SOFA score 在預測登革熱重症死亡有極佳的表現(AUC = 0.872)。SOFA score 個別器官的分析則指出，死亡組在心血管系統、呼吸系統及神經系統有較高的分數。我們把這三個系統的分數加總為「三項目 SOFA」(SOFA-3)，發現 SOFA-3 在死亡組和存活組有顯著的不同，ROC curve 分析亦顯示 SOFA-3 score 在預測登革熱重症死亡有極佳的表現(AUC = 0.821)。和加護病房另一配對的嚴重肺炎族群相較，此登革熱重症有較高的死亡率，但未達統計學上顯著差異(44.9% vs 32.7%,  $p = 0.149$ )。

我們觀察到一個主要發生於老年人且有著極高死亡率的登革熱重症族群，且發現目前 ICU 中常用的 SOFA score 在這個族群為極佳的死亡預測指標。其中心血管系統、呼吸系統及神經系統的器官衰竭程度尤其重要，這

三個項目正是用於床邊評估敗血症的快速 SOFA (quick SOFA)組成分，或許未來 quick SOFA 亦能有效運用於登革熱重症病人的床邊評估。

### (子計畫六)抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然

#### 藥物研發

登革熱病毒(dengue virus; DENV)是導致登革熱、出血性登革熱以及登革休克症候群的主因，每年於全球近 100 個熱帶及亞熱帶國家約有 4 億人口受登革病毒感染，並且每年高達五十萬人發生致命性的出血性登革熱。但目前並無有效治療藥物或有效疫苗可以對抗四型登革病毒感染。因此在本計畫中，我們期望開發新的藥物標靶及篩藥平台，並以此來篩選抗病毒天然物或小分子藥物。在先前我們已先建立可用於分析登革病毒蛋白酶及聚合酶活性的細胞內報導基因系統。藉由這些報導基因系統，本計畫發現兩個具有抗登革病毒活性的專一性抑制病毒蛋白質的小分子藥物。此外我們也發現提高第一型血紅素氧化酶(heme oxygenase-1, HO-1)表現及抑制第二型環氧合酶(cyclooxygenase-2, COX-2)表現可抑制細胞內病毒複製。我們也發現 HO-1 下游產物膽綠素(biliverdin)可抑制登革病毒蛋白酶並誘導抗病毒干擾素反應；而 cox-2 下游產物 prostaglandin E2 則會藉由提高病毒聚合酶活性而達到促進病毒複製的效果。這兩個細胞因子都可作為有潛力的藥物標的。我們也初步發現一個 HO-1 促效劑 Compound L 及一個 COX-2 抑制劑 GS 可於細胞內抑制病毒複製，更可於 ICR 登革感染小鼠模式內抑制登革病毒複製。

關鍵字：登革病毒、次世代定序、第一型血紅素氧化酶、第二型環氧合酶、ICR 小鼠登革感染模式。

### (子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查

#### 目的

於 1970 年代，登革病毒疫苗已經開始研究，但尚未有經人體試驗證實安全、有效的疫苗上市。在本計畫中，進行高雄市登革血清陽性率的血清學調查，於高盛行區與低盛行區中各自進行社區收案，該年度有登革熱大流行，則於下一年度的登革熱流行季前對同一受試者再次進行登革熱抗體追蹤並比較兩次血清盛行率之變動，本計畫的結果可提供關鍵訊息用來評估是否在不久的將來可以在高雄市使用合格的登革疫苗來保護市民免於登革熱的威脅。

#### 方法

收集高雄市登革熱高盛行區(三民區)與低盛行區(楠梓區)健康人血清，兩區各收案 200 人，因 2015 年秋季，高雄市登革熱大爆發，於 2016 年，針對同一志願者，再次進行成對血清採集。成對血清採集數量不足，則對該地區再次進行志願者收案，直至收案 400 人為止。檢驗健康人血清中的登革熱 IgG 抗體，計算登革血清陽性率，並將檢驗陽性檢體進行抗體中和試驗。

## 結果

2015 年收集三民區健康人血清 202 人、楠梓區收案 215 人。2016 年，三民區成對血清收案 50 人與額外收案 161 人，共 211 人，楠梓區成對血清收案 77 人與額外收案 131 人，共 208 人。進行初步登革熱抗體檢驗，2015 年登革熱抗體血清陽性率為 5.95% (12/202)，楠梓區陽性率為 3.26% (7/215)；2016 年三民區登革熱抗體陽性率為 5.68% (12/211)，楠梓區陽性率為 4.8% (10/208)。針對成對血清部分，經過 2015 年登革熱大爆發後，Dengue IgG 抗體陽轉率，三民區 2 人(2/50, 陽轉率 4%)；楠梓區 1 人(1/77, 陽轉率 1.29%)。

## 結論

計畫執行期間，共收集 836 支血清，收案人數達到 709 人(初次採血)，於三民區與楠梓區各收案 300 至 400 人，相較於整個高雄市的人口，收案的人數仍不足以代表各地區的結果，但是仍可初步了解高雄市的登革熱血清陽性率，並且也有一些基本資料可供參考，期望可以幫助其他相關研究。

## 建議

由於本計畫前進社區進行健康人採血，僅限定志願者須來自三民與楠梓兩區，分析資料後發現年齡層與性別不平均，比對高雄市人口大數據，研究結果可能會因研究方法、人口數等因素，產生偏差。希望於將來擴大採血與選用更適當的檢驗方法(Dengue indirect IgG ELISA)，得到更準確的結

果。

關鍵字；性別分析、登革熱

### (子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗

登革熱是藉由病媒蚊傳染的疾病，病媒蚊的控制是目前執行的主要方法，但效果不彰。因此可減緩疾病症狀的抗登革藥物且可以相對的減低登革病毒的傳染是目前急需的。這些抗登革藥物的測試需要有很好的動物模式，然而，目前能夠被登革病毒感染且能引起登革疾病的動物模式是不存在的，人類為登革病毒的天然宿主之一，且是唯一可明顯表現登革熱症狀的宿主。基於經濟效益的考量，因此建立擬人化的小鼠能仿人類的登革感染及疾病是迫切急需的。為了能夠有效地開發新抗登革病毒的藥物，下列是此研究的目標：**目標一：尋找具有保護作用的免疫因子。**此研究主要是尋找在人體具有保護作用的抗體，利用被感染過的病患血清加上由人類造血幹細胞生產出的病毒來尋找此因子。**目標二：抗登革病毒藥物的開發。**此研究主要是利用由牛樟芝分離出的成分來測試其對登革病毒抑制的效果，登革病毒感染人類造血幹細胞為主要藥物開發的依據。**目標三：登革熱擬人化老鼠的開發。**此研究主要是移植人類造血幹細胞到免疫缺失的老鼠身上，此擬人化的老鼠可用來作為抗登革藥物的有效性測試及登革保護作用免疫因子的評估。從我們研究結果發現牛樟芝可以藉由引起細胞的先天免疫反應來對抗登革病毒的複製。從抗體中合反應或是辨識能力可以了解體內病毒引起的免疫反應是不同於體外病毒顆粒。登革病毒可以在我們所建立的擬人化小鼠體內複製，顯示我們所建立的擬人化小鼠可以作為抗登革藥物開發的前臨床試驗。

關鍵詞：登革疫苗、登革藥物、擬人化小鼠、先天免疫系統

### (子計畫九)台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析

登革熱是一種藉由節肢動物傳染的疾病 (arthoborne disease)，也是世界上重要的再浮現傳染病 (re-emerging disease) 之一，登革熱主要盛行的地區為熱帶及亞熱帶區域，全球約有二十五億的人口居住在登革熱的高風險區內。登革熱感染主要是藉由帶有登革病毒的白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 或埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 叮咬導致。根據疾病管制署資料指出，台灣地區每年都有登革熱案例出現，主要集中在台灣南部的台南、高雄與屏東地區。在 2014 年及 2015 年台灣地區爆發兩次大規模的登革熱疫情，根據統計 2014 年總計有 15,732 登革熱感染案例，2015 年則更高達 43,522 例感染案例。為了瞭解 2014 年及 2015 年登革熱爆發大規模流行的原因與了解該年登革病毒的特性，本傳染病與癌症研究中心與本校登革熱防治及研究中心及高雄醫學大學附設醫院合作，收集 2014-2016 年以及回溯性的登革熱患者血清以進行病毒血清型與基因型的鑑定，以系統發生演化樹分析病毒傳播的來源，並比較感染不同型別登革病毒患者於急性期及恢復期時其血清中抗病毒抗體表現量之差異。

血清型與血清抗病毒抗體分析結果發現，2015 年高雄地區之次級感染之比率為 36.67% (22/60)，高於 2014 年的 24.44% (11/45)。演化樹分

析的結果則顯示 2014 年台灣高雄地區流行之第一型登革病毒株可能源自印尼地區，而 2015 年在台灣台南與高雄地區流行的第二型登革病毒株則可能由中國大陸傳入台灣，兩者皆為境外移入株。此外我們也發現登革病毒感染者在康復後的半年至九個月間仍可在血中偵測到一定濃度的抗登革病毒 IgG。另一方面，次級感染第二型登革病毒的患者，其急性期血中抗登革病毒 IgG 與 IgM 皆顯著高於次級感染第一型登革病毒的患者 ( $p=0.042$ ;  $p=0.0014$ )。我們期望透過本研究可增進對於登革病毒在台灣地區的傳播模式、以及患者對於不同型別之登革病毒所產生免疫反應上之差異的了解，以做為未來相關醫療衛生單位針對登革熱疫情防治與控制之政策制訂上的重要參考資訊。

關鍵字：登革熱、血清型、基因型、高雄、基因演化樹、體液免疫、IgM、IgG

#### (子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫

「污水下水道排放系統」是城市進步相當重要的指標，高雄市政府近年來積極推動建設下，2013 年全市污水下水道排放系統完成率已突破百分之八十。洗衣排水及油污廢水往下水道匯流，以往排放家庭污廢水的屋後溝，也隨之清澈不再惡臭。隨之而來，屋（前）後溝污水、雨水分離後，水溝

環境將更有利於登革熱病媒蚊（埃及斑蚊）生長。在乾季期，清澈不流通的水溝儼然形成另類隱藏性大型孳生源，成為登革熱疫情擴散之主要病媒源。

控制水溝孳生病媒蚊如常規使用殘效噴藥，長久而言不僅造成環境負擔，龐大的藥品成本更加重公部門經費負擔，高雄市政府於 102 年運用各類創新的化學、物理或生物防治法，擇定孳生病媒蚊之水溝里段，以漂白水、粗鹽、乳膏塊、劍水蚤及防蚊溝板等物理、化學及生物防治等方法進行分組實驗，實驗結果 4% 鹽水能有效遏止埃及斑蚊幼蟲生長羽化，防治效果可長達 21 天。

鑑於乾季期水溝溝底坑洞積水導致病媒蚊孳生，經由水溝蓋板投擲防治物，無法經由水流擴散至溝底坑洞，導致防治效果受限。為克服乾季期水溝坑洞導致溝底隱藏性積水，本研究擬分階段完成下列四項測試，期透過創新策略及實驗分析佐證可行性，在成本及防治成效間取得最大利益，以做為日後登革熱防治政策參考及實務運用。

1. 海水梯度濃度有效性測試。
2. 海水及清水輔以添加蘇力菌、有機磷防治有效期評估試驗（以六種不同成分之溶液實驗其滅子成效。六種溶液分別為粗鹽、清水+有機磷、清水+蘇力菌、海水（30 psu）、海水+有機磷、海水+蘇力菌。

先以實驗室測試之，再選擇適當地點進行水溝實地測試。 )。

3. 擇定排水溝渠孳生病媒蚊之溝段區里，進行引海水防制病媒蚊實地測試確認有效性。

擇定高流行風險區行政區里及疫情發生之陽性溝段，實地測試防治效果。

實驗結果顯示海水混合各種溶液有限防護期限依序分別為清水+有機磷劑、海水+有機磷劑、清水+生物製劑、海水+生物製劑、粗鹽及純海水。海水灌流防治在期效內(約 5~7 天)有其防治效果，不僅可以抑制蚊蟲的孳生，亦可彌補防疫人員無法調查及處理之水溝凹洞處之缺失，逕而爭取防疫人員處理非水溝孳生源的時效(如家戶內孳生源、屋簷排水溝及積水地下室等)，達到防止登革熱疫情擴散及蔓延效果。登革熱防治並非採取單一的防治策略可克盡其功，海水灌流防治水溝除應配合生物、物理、化學等各種防治方法並進外，更應定期疏浚維持水流暢通，方可達到多方面預防及防治效果。

關鍵詞：登革熱、海水、埃及斑蚊、水溝

(子計畫十一)應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的

### 斑蚊孳生源

登革熱病媒蚊控制的複雜性在於蚊蟲含蓋幼蟲期和成蟲期二個階段。

蚊幼蟲期的孳生源類型多樣，包括居家的人工容器或天然的孳生源，有時

甚至找不到明確的孳生源地點。而成蟲的生態特性獨特且不易掌握，包括其日行性行為、棲息環境和叮咬型式等。當前登革熱防治根本的行動以孳生源清除管理為主，疫情來臨時則在短期間內使用化學殺蟲劑來進行防治，及時消滅帶病毒蚊蟲。然而，連年的登革疫情以及密集的使用殺蟲劑，業已導致嚴重的蚊蟲抗藥性，進而造成疫情防治的窘境。百利普芬是一種傳統使用的昆蟲生長調節劑，它主要作用在幼蟲發育過程中的青春賀爾蒙激素。該成份與一般化學殺蟲劑殺滅成蟲的作用機制不同，至今尚未發現有抗藥性的現象，堪稱為生態友善防治蚊蟲的方法之一。根據近期研究指出：蚊蟲直接接觸百利普芬後，其成蟲壽命減短、生殖能力降低。加上蚊蟲接觸百利普芬後，其身體會被動式的沾黏而攜帶這些百利普芬的顆粒，透過飛行而將這些百利普芬攜帶至產卵水域或幼蟲孳生源，進而抑制幼蟲和蛹的生長發育，同時兼具控制成蟲和幼蟲的功效。本研究結合實驗室與戶外實地評估蚊蟲自動傳播百利普芬至隱藏或不明的積水處的效率，以解決當前隱藏性孳生源的問題。在實驗室測試中，先行使用螢光粉 (*Luminous Powder Kit*) 確認蚊蟲具有黏附攜帶百利普芬顆粒的能力，再進行模擬蚊蟲自動散播試驗，並使用 UPLC-MS-MS 與生物性分析確認百利普芬劑量與成蚊羽化失敗率 (IE%)。結果顯示埃及斑蚊雌蚊暴露於有效成分為  $18.3\text{mg}/\text{m}^2$  的濾紙 1 小時後，每隻成蚊可攜帶、散播  $0.04\text{--}0.27\text{ ng}$  的百利

普芬至 25 ml 的水體並造成  $90\pm 0.73\%$  蚊幼蟲無法成功羽化。戶外實地試驗中，選擇以高雄市兩區五里為試驗區（四里為實驗組，一里為控制組），共設置 20 個百利普芬散播站與 100 個監測站，定期回收監測站內的水樣並使用生物性分析計算 IE% 後再使用 UPLC-MS-MS 量測水體內的百利普芬劑量。結果顯示在設置完百利普芬散播站後的一個月內有 20% 的回收水樣其  $IE\% > 50$ ，經 UPLC-MS-MS 檢測確認水體內有百利普芬訊號並成功定量（9.5-10.83ng/L）。於實務應用上建議在已完成孳生源清除的區域，若斑蚊族群數持續偏高，則可挑選適當地點設置百利普芬散播站，藉由蚊蟲自動散播以滅除該範圍內的 20% 隱藏性孳生源，為期一個月。該結果在戶外實務防治工作上可行性高、也不會衍生抗藥性或造成生態上的危機，為病媒蚊生態友善控制的創新性方法之一，符合整合性病媒管理之策略。

**關鍵詞：**登革熱、百利普芬、自動散佈、青春激素

### (子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究

近幾十年來革熱的流行與威脅越趨嚴重，目前大約有一半的世界人群暴露在登革熱的風險中。由於現在仍沒有專一、有效的治療劑，因此登革熱疫情的控制主要仍仰賴病媒防治。然而有效的病媒防治必須奠基於對病媒蚊的發生、習性、孳生源、生態等方面有深入的了解，才能確實掌握病

媒蚊動態，並給予適切的防治。埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)與白線斑蚊(*Aedes albopictus*)是台灣南部地區主要的登革熱病媒蚊，傳統上多以積水容器為其幼蟲孳生源，惟近年在政府單位與民眾的共同執行容器減量與孳生源清除的努力下，懷卵雌蚊已經不容易找到可供產卵的積水容器。在蚊蟲族群的生存壓力下，替代性的幼蟲棲地，例如：下水道、工地積水、污水池、臨時積水等非傳統認知之病媒斑蚊孳生水域，均已經發現埃及斑蚊幼蟲的孳生；顯示南部地區的登革熱病媒蚊已經因現行防疫措施，改變其生態與習性。因此有必要重新審視登革熱疫區的病媒蚊空間分佈、產卵習性與幼蟲棲地變遷的問題，以瞭解並掌握現在南部地區登革熱病媒蚊的發生情形，並提供登革熱防疫對策評估或重新研擬的正確資訊。根據上述問題的研究結果顯示：(一) 針對病媒蚊成蟲的空間分佈調查，在住宅區中成蚊多分佈於室外，但是也可以在室內與屋頂被捕獲，同時也可以在 15 層以上的公寓大樓地下室、第 5, 10, 15 層樓與屋頂被捕獲。在戶外的灌木、三與五公尺喬木中，以灌木中所捕獲的成蚊最多。整體而言，住宅區所捕獲的成蚊遠比公園多。三個調查區中，2015 年秋季以苓雅區正心里的成蚊捕獲量與容器指數最高，病媒蚊密度最高超過第 8 級，且多為埃及斑蚊。2106 年冬季與春季的登革熱病媒蚊數量銳減，夏季數量逐漸增加，但是多為白線斑蚊。(二) 關於懷卵登革熱病媒蚊的產卵行為，白線斑蚊的產卵分

散度遠大於埃及斑蚊。在大空間中，此二種病媒蚊的產卵分散度均較小空間大。(三) 幼蟲孳生地仍以積水容器為主，陽性率為 3.5%；只有極少數以水溝為棲地，陽性率為 0.3%。這些成果後有助於登革熱病媒蚊的防治管理。

關鍵詞：登革熱、病媒蚊、埃及斑蚊、白線斑蚊、孳生源、空間分布、產卵行為

### (子計畫十三)建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略

登革熱為全世界最重要的病媒傳染疾病之一，世界衛生組織估計全世界超過兩億人口暴露在感染登革熱的危險之下。而台灣南部地區近來年均有登革熱疫情之發生，其中 2015 年更超過 4 萬例病例，創有史以來新高。近年來，國際間許多實驗團隊致力於開發登革熱疫苗以及抗登革熱藥物，但是都未能有突破性的結果。因此，積極的建立創新性防治病媒疾病之替代策略是我們的當務之急。針對近年來頗受重視的以立克次菌(Wolbachia)作為防治病媒蚊的方式，過去研究顯示，利用果蠅內生性的立克次菌感染斑蚊，會迅速在斑蚊族群內擴散並造成病媒蚊壽命減短，並影響病媒蚊生殖能力造成傳病能力下降。因 Wolbachia 僅感染節肢動物和絲蟲，因此，台灣引進 Wolbachia 對於台灣的生態及人體健康不會有影響。有鑒於我國

過去對於登革病媒蚊之控制，較依賴化學防治，經常造成抗藥性之發生，且有污染環境之虞，因此本計畫針對病媒蚊之控制著重於非化學農藥之生物防治，尤其針對立克次菌對於病媒蚊之防治應用。本計畫擬先引進國際團隊已建立之立克次菌品系，以及建立立克次菌感染實驗室及田間試驗之標準流程。此外，我們將於實驗室建立立克次菌感染之台灣本土埃及斑蚊品系，並測試病媒蚊之平均壽命，以及其對於登革病毒之感受性，本計畫同時將進行本土立克次菌品系之鑑定及建立。建立之立克次菌感染病媒蚊後，初期預計配合地方政府或里長及志工於校園內進行野放試驗，並評估及檢驗立克次菌在高雄之斑蚊族群內擴散情形，以及對病媒蚊壽命之影響，並評估及檢驗其抗登革病毒效果。此外，本計畫將利用具偵測與灑藥功能之多軸無人飛行載具，進行環境中登革熱病媒蚊孳生源的偵測與防治作業，本計畫僅針對人力不易執行清除的灰色地帶進行測試，初期計畫將利用多軸無人飛行載具於小區域斑蚊孳生源之監控、防治與成效評估並建立其標準作業程序。

#### (子計畫十四) 登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫

登革熱是一種「社區病」、「環境病」，如能有效減少社區中病媒蚊孳生源，則外來登革病毒的影響性將大幅降低。防治工作涉及全方位、多面向領域，透

過本計畫除可積極監控病媒蚊密度及遷徙生態，有效降低疫病流行風險，亦可透過客製化、電子化的零距離衛教宣導，提升本市高風險地區民眾對登革熱認知程度，並賡續透過認知改變行為。藉由多元化衛教宣導，結合各行政區環保志工、滅蚊志工及社區發展協會等同質性民間團體，自發性動員投入登革熱防治工作、維護自家周圍的環境。計畫中亦藉由人員聘用與培訓，培育本市全方位的登革熱社區衛教種子師資及病媒蚊密度調查人員，提升防疫機動性及公權力落實度，期能減緩登革熱疫情發生及蔓延，避免登革熱疫情跨年度及本土化流行，進而達成降低登革熱年平均致死率成效。

本計畫依計畫期程完成客製化組裝課程設計、辦理多元化衛教宣導、講師人員培訓及協助開立舉發單等作業，另課程張貼於登革熱防疫資訊平台，供本市民眾自行下載閱讀，逕而提升本市市民登革熱知能。本計畫建請中央政府應重視衛教重要性，研議每年固定編列相關衛教講師薪資可行性，藉以培育優秀講師人才，擴大宣導登革熱/茲卡防疫作為，以提升南部地區民眾及政府部門對於熱帶疾病知能。

關鍵詞：登革熱、傳染病、病媒蚊、社區動員、衛教宣導

### **(子計畫十五) 血液製品之登革病毒偵測調查**

2015年在高雄市及台南市發生嚴峻的登革熱疫情，國外已有數例因輸血而感染登革熱之案例，因此登革熱流行期間的輸血安全性值得探討。本研究預

計使用醫療財團法人台灣血液基金會台南及高雄捐血中心之去連結之血液檢體，樣本分別包含 2015 年 9-11 月流行期的血清，以疾病管制署公佈的傳染病統計資料來選定特定區域的捐血中心的血液製品，由捐血中心留存流行區的檢體，由捐血中心提供去連結之血液檢體，整個研究將分析 8000 個血品樣本，包含台南與高雄捐血中心在 2015 年 9-11 月登革熱流行季節的血品樣本各 4000 個。。本計畫預計以登革熱快篩試劑檢驗與即時反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real-time RT-PCR) 偵測登革病毒作，以檢驗登革熱流行期在流行區之捐血中心血液製品中的登革病毒陽性率，以做為日後登革熱流行期間血液是否需篩檢登革病毒與選擇篩檢工具之參考。目前已分析 6050 個樣本，檢驗結果為：NS1 皆為陰性，一例為 RT-PCR 陽性，該檢體為 NS1/IgM/IgG 陰性，另有四例 IgM 陽性與八例 IgM/IgG 陽性，因此血袋中的確可能存在登革病毒，在所研究的樣本中登革病毒陽性率為 0.017% (1/6050)。

關鍵詞：登革病毒、輸血、登革熱、快篩、即時反轉錄聚合酶鏈鎖反應

### (平台一)行政暨教育資源平台

本計劃涵蓋 15 個子計劃，故有必要設立一行政暨教育資源平台，此行政平台將負責各子計畫間之聯繫、互相協調支援，及相關計劃行政事務。已於 2015 年及 2016 年舉辦兩場登革熱國際學術研討會，含學術交流及成果分享。

將與高雄市政府衛生局及環保局定期開會討論，了解實務面與隨時修正研究與防治方向。同時將重要研究訊息即時反應給衛生局及環保局等防疫單位，以為防治時參考，平台一同時扮演研究及防疫間之橋樑。

於登革熱國際學術研討會中，學者提出民眾對登革熱的了解程度、如何看待登革熱、是否支持登革熱預防做法、尋求治療行為、社會人口統計學、地理空間和環境屬性都對登革熱流行有所影響。登革熱威脅全球一半人口，在許多地區已知多數為兒童受到感染。近年來，向成人感染的轉變正被廣泛報導。而台灣比較出血性登革熱患者中，年齡超過 65 歲的與 19-64 歲的患者表現，老年人發熱、腹痛和皮疹的發生率較低，但併發菌血症、胃腸道出血、急性腎功能衰竭、住院時間延長和死亡率有較高的發生率。波多黎各的一份報告顯示，與青年人相比，老年人登革熱死亡的風險增加了 6 倍。即時了解登革熱對老年人的影響。針對老年弱勢族群，以更多的研究來評估免疫反應。

### (平台二) 蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

登革熱是全世界及台灣目前最重要的病媒蚊所傳染的急性發燒疾病，初期的臨床症狀與其他常見的發燒疾病，譬如其他蟲媒病毒 (例如日本腦炎病毒屈公病毒與茲卡病毒) 感染所造成的症狀非常類似，因此在臨床正確診斷登革熱使病患接受正確的治療，可以減少因登革熱重症死亡的機率。登革病毒、屈公病毒、

茲卡病毒這三種黃熱病毒感染臨床症狀非常相似，而傳播病媒蚊是台灣也存在的埃及斑蚊。蟲媒病毒感染往往常因臨床症狀相似、抗體的交叉反應等等因素導致鑑別診斷上的困難甚至誤診，因此登革病毒以及相關蟲媒病毒的標準鑑定方法之建立是非常重要的。

本平台以設立標準鑑定蟲媒病毒感染鑑定實驗室為主；截至今為止，除以達成基本目標：建立三項登革熱標準檢驗方法外(登革病毒 NS1 蛋白檢驗、登革病毒核酸檢驗、抗登革病毒抗體 IgM/G 檢驗)，並以此通過疾病管制署登革熱能力試驗、全國認證基金會(TAF)醫學實驗室認證。本平台也建立茲卡病毒核酸檢驗方法、並通過疾病管制署能力試驗；除發展檢驗技術外，也將此技術推廣至其他檢驗機構：如索羅門群島、高雄市立民生醫院、高雄市立小港醫院；協助方式有建立登革熱標準檢驗實驗室、訓練檢驗人才、技術諮詢等。並且協助檢驗 104 年登革熱檢體 3894 例、105 年檢體 407 例(截至 105 年 10 月統計)；並進行 104-105 年度高雄市登革熱爆發之陽性檢體回溯性型別分析，截至報告繳交期限分析進度為 28.85%(583/2021) Real-Time RT PCR 確認結果陰性為 94 例(16.12%)、第一型 43 例(7.38%)、第二型 442 例(75.81%)、第三型 4 例(0.69%)，惟無法添購自動化儀器及人力、費用不足，故施作進度略為緩慢。

## 英文摘要

### (子計畫一) **Evaluation of host factors as a potential biomarker for Dengue diagnosis**

It is estimated that dengue affects more than 120 countries globally. The severe dengue disease, hemorrhagic fever and/or shock, often occurs at the end of febrile subsided. The initial symptoms of dengue are very similar to most of common febrile illness, and hence to make a right diagnosis of dengue is a challenging task. Timing and accurate diagnosis of dengue becomes very critical in patient treatment and recovery. Currently, there are many varieties of dengue rapid test available; however, the overall sensitivity is about 65-75%. As such, development of high sensitivity and specific diagnosis kit for dengue is urgently needed. Since unique clinical manifestations seen in subjects infected by different virus, suggesting unique host factors could be induced by particular virus. Pilot investigations with proteomic approach in sera from acute dengue patients revealed that a few factors were uniquely observed in serum of dengue patient, for example immunoglobulin lambda 1 light chain, mutant NADH-cytochrome b5 reductase, PR1, C4A3, Chain F, C3b in complex With A C3b Specific Fab. In this particular report, we focused on host factor PR1 based upon the higher frequency of proteomic data. Comparing specimens from other febrile illnesses, healthy individuals, and supernatants from infected Vero and cord blood cells, we found that PR1 was apparently expressed in sera of dengue patients by Western blot. As such, ELISA base-test was set up for screening isoform1 of PR1 in sera from dengue patient or healthy individuals. Results showed that the highest amount of isoform1 of PR1 in sera was on days 5 and 6

after onset of fever. However, we also observed isoform1 of PR1 in serum of healthy donors, suggesting that the antibody specificity of PR1 in ELISA assay required being fine-tuned. However, we further learned that there are known 5 isoforms for PR1 in humans. Hence, isoform1 of PR1 was not a perfect candidate for dengue rapid diagnosis.

Key words: Dengue viral diagnosis reagent, PR1, host biological factor.

### **(子計畫二) Role of Hematopoietic Stem Cells in Asymptomatic and Pathogenic Dengue Virus Infection**

Dengue is important vector-borne human viral disease. Bone marrow suppression and excruciated bone pain are salient clinical features in dengue patients. Dengue viral RNA and infectious virus can be detected and recovered from autopsy bone marrows of subjects dying of dengue. Human hematopoietic stem cells are highly permissive for dengue virus infection and are rich in bone marrow. Peripheral blood cells are originated from differentiation of bone marrow stem cells. Dengue virus infected bone marrow cells may cause the dysregulated homeostasis of peripheral blood cells. Our results revealed that stem and megakaryocytic progenitor cells were decreased in colony-forming unit assays after dengue viral infection, suggesting that thrombocytopenia could be a consequence of reducing production due to the megakaryocytic progenitor cells infected by dengue virus infection. The morphology of virions dictated by the infected host and may constitute the poor protective efficacy of current dengue vaccine in vivo since the assay dominantly relies upon utilizing in vitro virions for the evaluation, indicating in vivo virions could be presented with

different morphology. In vivo investigations with TEM, immunoEM, and Cryo-EM demonstrated a unique viral morphology, mosaic viral virions encapsulated with CD61 membrane, in plasma of acute dengue patients. In addition, biological study showed that the in vivo virions did not contain viral capsid protein. Hence, we termed the unique in vivo virions as dengue vesicles. This difference may be one of reasons to explain the poor protective efficiency of dengue vaccine in vivo. Asymptomatic individuals are a risk for dengue spread and dissemination. Cumulative results demonstrated that the levels of stem and progenitor cells plays important role in dengue virus infection; the higher amounts of these cells, the more permissive to dengue virus infection. Hence, a positive correlation of these cells in number correlated with viral titers after these cells submitted to dengue virus infection.

Key words: hematopoietic stem cells, in vivo viral morphology, inapparent individuals

### **(子計畫三) Study on the Risk Factors of Severe Dengue Fever in South**

#### **Taiwan in 2014**

Case - control study of a medical center Dengue is a major public health problem worldwide and continues to increase in incidence. Dengue virus (DENV) infection leads to a range of outcomes, including subclinical infection, undifferentiated febrile illness, Dengue Fever (DF), life-threatening syndromes with fluid loss and hypotensive shock, or other severe manifestations such as bleeding and organ failure. The long-standing World Health Organization (WHO) dengue classification and management scheme was recently revised, replacing DF, Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), and Dengue Shock Syndrome

(DSS) with Dengue without Warning Signs, Dengue with Warning Signs and Severe Dengue; dengue with severe plasma leakage, severe bleeding, or organ failure). The classification into levels of severity has a high potential for being of practical use in the clinician's decision as to where and how intensively the patient should be observed and treated. There is increasing number of studies that explored the utilities of the WHO 2009 revisions of Dengue classification.

A hospital-based case-control study was performed in Kaohsiung Medical University Chung-Ho Memorial Hospital, between Jan. 1 and Dec. 31 of 2014, that included 1822 dengue cases diagnosed by this University Hospital. Cases (n=35) were severe dengue cases (dengue with severe plasma leakage, severe bleeding, or organ failure) defined by WHO 2009 revisions. Four Control patients per case patients were selected from dengue cases that did not have a diagnosis of a severe dengue. Control patients (n=140) were matched to the cases by age ( $\pm 5$  years) and gender. All medical information was obtained retrospectively from medical chart. Adjusted odds ratio (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were estimated by multiple logistic regression. Of the many medical history included in this study, only duodenal ulcer and chronic renal failure showed association with severe dengue. Compared with no medical history, the adjusted odds ratio were 4.89 (95% CI 1.55-20.55) and 4.04 (95% CI 1.64-14.61), respectively.

Key words: Dengue fever, severe Dengue, hospital-based, Gender Analysis

#### **(子計畫四) Kaohsiung Medical University Kaohsiung Municipal**

##### **Hsiao-Kang Hospital**

Dengue fever is an infectious tropical disease spread by mosquitoes in southern Taiwan. In previous study, the epidemic behavior of dengue virus seemingly

correlates closely with fluctuations in temperature, humidity, rainfall, Breteau index. However, there were 15,732 reported dengue fever infections in 2014, including 15,492 indigenous and 240 imported cases. Among them, 15,043 cases (95.6%) occurred in Kaohsiung city and led to 20 (15.2%) reported DHF/DSS caused deaths. In addition, the environmental factors associated with this large outbreak of dengue fever in Kaohsiung, an underground gas explosion occurred in Qianzhen and Lingya Districts of Kaohsiung at midnight of July 31, 2014. It caused 32 deaths and injured 321 persons. Subsequently, continuous rain fell for several days and water accumulated in trenches caused by the gas explosion. Combined with the hot weather, the Breteau Index of mosquitos increased dramatically in Kaohsiung. Weather factors combined with an accidental petrochemical gas explosion (PGE) may affect mosquito–human dynamics in 2014. Generalized estimating equations with lagged-time Poisson regression analyses were used to evaluate the effect of meteorological/mosquito parameters and PGE on dengue incidences (2000–2014) in Kaohsiung. Increased minimum temperatures rendered a 2- and 3-month lagging interactive effect on higher dengue risks, and higher rainfall exhibited a 1- and 2-month lagging interplay effect on lower risks (interaction,  $P \leq 0.001$ ). The dengue risk was significantly higher than that in a large-scale outbreak year (2002) from week 5 after PGE accident in 2014 (2.8–8.0-fold for weeks 5–22). The greatest cross-correlation of dengue incidences in the PGE-affected and PGE-neighboring districts was identified at weeks 1 after the PGE ( $r_s = 0.956$ ,  $P < 0.001$ ). Compared with the reference years, the combined effect of minimum temperature, rainfall, and PGE accounted for 75.1% of excess dengue risk in 2014. In conclusion, time-lagging interplay effects from minimum temperature and rainfall may be respectively

associated with early and near environments facilitating dengue transmission. Events that interact with weather and influence mosquito–human dynamics, such as PGEs, should not be ignored in dengue prevention and control.

keywords : dengue fever, Taiwan, gas explosion, temperatue, Breteau index

### **(子計畫五) Epidemiology and Challenge of Severe Dengue**

Dengue fever is the most important mosquito-borne viral disease in the world. Severe dengue viral infection occurs mostly in children, and the reported mortality rate is not high. We observed a high mortality rate of severe dengue during the outbreak over southern Taiwan in 2015. The aims of this study were to report the epidemiology and to find useful predictors for severe dengue mortality.

We retrospectively reviewed the clinical information of 49 patients admitted to the medical ICU of a university hospital for severe dengue, confirmed by serum nonstructural protein 1 (NS1) antigen test. We used ICU mortality as the primary outcome and compared clinical characteristics between survivors and non-survivors. We also compared this severe dengue cohort to an age-, sex-, APACHE II-matched cohort of severe pneumonia.

The mean age of the study patients was 69.3 years. Among them, 61.2 % were women and 8.2% were from nursing home. Twenty-two (44.9%) patients died in the ICU. The causes of death included major bleeding in 8 (36%), dengue shock in 7 (32%), secondary bacterial sepsis in 5 (23%) and myocarditis (9%) in 2 patients. There were no differences of comorbidities between survivors and non-survivors. The APACHE II score was significantly higher in non-survivors

(28.8 vs 14.1,  $p < 0.001$ ). The admission Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score was also significantly higher in non-survivors (13.6 vs 7.3,  $p < 0.001$ ). In multivariate analysis, SOFA score was the only independent predictor of ICU mortality. The ROC curve analysis demonstrated a good performance of SOFA score in predicting ICU mortality (AUC = 0.872). The analysis of SOFA individual components showed that non-survivors had higher scores in cardiovascular system, respiratory system, and central nervous system, which were then used to calculate the 3-item SOFA (SOFA-3) score. SOFA-3 score was also a good mortality predictor in severe dengue (7.5 in non-survivors vs 2.9 in survivors,  $p = 0.0001$ ; AUC = 0.8214). Compared to the matched ICU cohort of severe pneumonia, severe dengue tended to have a higher ICU mortality (44.9% vs 32.7%,  $p = 0.149$ ).

We observed a high mortality rate in an ICU cohort of severe dengue, with most of them being elderly. We found SOFA score as a good predictor for ICU mortality. The good predicting performance of 3-item SOFA, using same components as in quick SOFA, suggested a potential role of quick SOFA in bedside evaluation of severe dengue.

### **(子計畫六) Discovery of antivirals and drug targets against dengue virus infection**

Dengue virus (DENV) infection causes dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Approximately 400 million people are infected with DENV every year across approximately 100 countries in tropical and subtropical areas, which leads to 500 thousand deaths annually. To date, there is still no approved drugs or effective vaccines against four serotypes of DENV

infection. Therefore, we aim to discover new drug target and develop platform to screen antivirals from natural products and synthetic small molecules. In the present study, we have established cell-based reporter system to measure DENV protease and polymerase activity. Based on these reporter systems, we identified two specific small molecules with anti-DENV activity by targeting viral protein. In addition, we found that induction of cellular heme oxygenase-1 (HO-1) and suppression of cyclooxygenase-2 (COX-2) can effectively inhibit DENV replication. The HO-1 metabolite biliverdin targets DENV protease and induces antiviral interferon responses. COX-2 metabolite prostaglandin E2 contributes to viral replication by enhancement of viral polymerase activity. Both of cellular genes can serve as potential drug targets. Finally, we identified compound L, a HO-1 inducer, and GS, a COX-2 inhibitor, as promising antivirals against DENV infection in vitro and in DENV-infected ICR sucking mouse model.

keywords : Dengue virus, next generation sequencing, heme oxygenase-1, cyclooxygenase-2, ICR dengue infected suckling mice

### **(子計畫七) Study of human antibodies bound to dengue virus particles with different maturation status**

The four serotypes of dengue virus (DENV) are the leading cause of mosquito-borne viral disease in humans. The envelope (E) protein is the major target of neutralizing (NT) antibody. The ectodomain of E protein contains 3 domains (DI, DII and DIII). Previous studies have reported several human monoclonal antibodies (mAbs) recognizing either DIII, E-dimer epitope or quaternary epitope are more potent neutralizing (NT) compared with those recognizing the

fusion-loop (FL) of DII. During the maturation process of DENV particles, the cleavage of precursor membrane (prM) protein by furin is insufficient, leading to a mixture of mature, immature and partially immature particles in the culture supernatants. We studied the relationships between epitope accessibility, binding avidity and NT potency of different human mAbs on DENV particles with differential maturation status. Using a capture-ELISA based-binding assay, the maximum binding ( $B_{max}$ ) and dissociation constant ( $K_d$ ) were determined. The NT potency, accessibility and avidity were assessed by  $1/FRNT50$ ,  $B_{max}$  and  $1/K_d$ , respectively. Anti-DIII mAbs showed significantly lower  $K_d$  to mature virions than anti-FL mAbs, suggesting the higher binding avidity on the infectious virions may contribute to stronger NT activities of anti-DIII mAbs compared with anti-FL mAbs. These findings have implications for immunogen design to induce more potent NT antibodies against DENV.

Keywords :Gender Analysis

### **(子計畫八) Novel Antiviral Drugs Development to Dengue Virus**

Dengue has been recognized as the most important vector-borne human viral disease. Currently, palliative care is current practice to care dengue patients and vector control is the major preventive measure to contain dengue but the effectiveness is not very significant. Therefore, alternative method to mitigate the disease is to develop a potential anti-dengue drug to treat dengue. In addition, a good animal model that can be useful for evaluation of the efficacy effect of medical drugs for dengue treatment is needed. Although dengue disease exclusively occurs in humans, a couple of features can be reproduced in animal models, such as animal model for dengue persistent viremia which can be a

good tool to explore the efficacy of an anti-viral drug against dengue. The following aims were proposed to achieve our goals:

**Aim1: Characterization of the immune factors which may help to prevent dengue.** In this aim, we focused on identifying high neutralizing and broad capacity antibodies. Patient sera from convalescent stage were utilized to identify and study the neutralizing antibody with dengue virus from infected human hematopoietic stem cells.

**Aim2: Therapeutic drug/agent development.** In this study, we intend to screen and isolate compounds that have the ability to reduce the infection rate of dengue virus in humans. The compounds will be from extract of Chinese herb, *Antrodia cinnamomea*. We evaluated the effect by analyzing the inhibition rate of dengue replication in human hematopoietic stem cells with the isolated compounds. In addition, the mode of action of inhibition by these compounds will be investigated.

**Aim3: Dengue infection/disease in humanized mice model.** The humanized mice model is established by transplantation with fresh human hematopoietic stem cells. In this aim, we intend to use this model to explore the effect of the anti-viral agents/compounds to prevented or inhibit dengue virus infection.

We identified compound C extracted from *Antrodia cinnamomea* could inhibit the replication of dengue virus through the activation of innate immune response. In addition, results of antibody neutralizing for dengue virions showed that the immune recognition for dengue virion in vivo was different from that of virions in vitro. High viral dengue virus in blood stream of established humanized mice could be observed, suggesting that the humanized mouse model can be a tool for testing

effectiveness of medical drug for dengue virus infection.

Keywords: Dengue vaccine, Dengue medical agent, humanized mice, innate immune system.

### **(子計畫九) Virological Characterization and Molecular Epidemiology of Dengue Virus Infection in Taiwan**

Dengue virus (DENV) disease is the most prevalent arthropod-borne viral infection of humans in tropical and subtropical countries worldwide. Around 2.5 billion people have been reported to live in dengue high risk regions. Taiwan is located in southeastern coast of mainland China in the western Pacific Ocean with a warm tropical and subtropical climate. The DENVs are transmitted to humans through the bite of an infective female *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. According to Taiwan CDC, reports indicated that dengue virus epidemics occurred annually in Taiwan in past decade, and the main focus of activity has been in Tainan, Kaohsiung and Pintong. During 2014 to 2015, Taiwan has experienced its largest dengue virus (DENV) outbreak since 1981 the first introduction into the southern off-islet of Hsaio-Liu-Chu. According to the surveillance conducted by Taiwan CDC, there were 15,732 reported DENV infections in 2014, and 43,522 reported DENV infections in 2015.

In order to improve the understanding of the pathogenesis and virological characteristics of the epidemic DENV strain during 2014-2015 outbreak, we have collaborated with Kaohsiung Medical University Chung-Ho Memorial Hospital to collect plasma sample from dengue infected patients, and to conduct home visits for convalescence phase patients. We've identified the serotype and genotype of the DENV strains isolated from plasma samples, and analyzed the

dissemination source via phylogenetic method. Otherwise, we've also used ELISA to detect the anti-dengue antibody level in patient blood, and compared the difference of humoral immunity between DENV-I and DENV-II infected patient during acute and convalescence phase. The genotypic assay and phylogenetic analysis results have shown that the DENV strain associated with 2014 outbreak is DENV-I Genotype-I and homologous with the isolate from 2013 Indonesia, and the strain associated with 2015 outbreak is belong to DEN-II Cosmopolitan Genotype and homologous with the isolate from 2014 China. Furthermore, the results of anti-dengue antibody ELISA indicated that the anti-dengue IgM and IgG serum level in the patients secondary infected with DENV-II is specific higher than the patients secondary infected with DENV-I.

**Keywords :** Dengue 、serotype、genotype、Kaohsiung、phylogenetic analysis, humoral immunity, IgM, IgG

### (子計畫十) **Dengue fever mosquito research program**

“Management of Sewage Systems” is the important index for the progress of cities. In recent years, Kaohsiung City Government implements the construction actively. In 2013, the completion rates of the management of sewage systems have broken through 80%. In the past, the domestic wastewater vents in the ditch behind the house, but now the laundry and oil wastes is confluent on the ditch which causes the ditch not stench anymore. However, the sewage of the ditch in front/back of the house and the segregation of the rain water later, the ditch environment will be more conducive to the growth of *Aedes aegypti*. During the dry season, The Stagnant ditches become breeding sources of a hidden

large-scale and it is also the major vector source of the extension for Dengue fever epidemic.

To control the vector mosquitoes of breeding in the ditch, it used to use residual spray. It not only causes the environmental burden but the huge cost of drugs increase city expenses heavier. In 2013, Kaohsiung City Government uses all kinds of innovative chemical, physical or the Biological Control Act to fix vector mosquitoes of breeding for the segment of ditches proceeding grouping experiment with bleach water, coarse salt, cream block, Cyclops and anti-mosquito trench boards and physical, chemical and biological prevention. From the experimental results, 4% saline water can dampen effectively the growth of *Aedes aegypti* larvae and the effect can last up to 21 days.

In view of the dry season, under the ditches have a concave with stagnant water causing vector mosquitoes breeding. Through the ditch cover, the effect of throwing control agents is limited and it can't spread through water under the ditches. To overcome the ditch structure in a dry season causing concave with stagnant water under the ditches, the research was completed in phases by following four tests. To prove the feasibility through innovative strategies and experimental analysis and get the best interests between the cost and prevention as the reference and the use for the prevention of Dengue fever in the future.

1. The validation test of seawater concentration gradient.
2. Seawater and water supplement with *Bacillus thuringiensis* and organophosphate to test the validity period of valuation of prevention which is six different of components of solution experiments to eliminate larvae. The six kinds of solutions are salt water, water with organophosphate, water with *Bacillus thuringiensis*, seawater (30 psu), seawater with

organophosphate and seawater with *Bacillus thuringiensis*. At first, we experimented in the laboratory and then select the appropriate location to proceed the test in the ditch.

3. Select the segment of ditches for vector mosquitoes of breeding proceeding the introduction of seawater to prevent and control vector mosquitoes and the validity of the experiment.

Select a high-risk area and the epidemic occurrence of the positive ditches to test the controlling effect.

keywords : Dengue fever, sea water, *Aedes aegypti*, ditch

### **(子計畫十一) Applications of ovi-trap and auto-dissemination of**

#### **pyriproxyfen to control cryptic source of dengue vectors**

Dengue vector control is complicated by the difficulty in targeting both larvae and adults. Juvenile larvae are distributed to diverse small habitats including artificial and natural water containers while adult *Aedes* mosquitoes are hard to trap due to their diurnal behavior, resting sites and biting patterns. Other than source reduction, the current vector control strategy relies on the use of chemical pesticides, which is highly likely to induce resistance among the vector populations. Pyriproxyfen (PPF) is a conventional mosquito pupicide that has a unique mode of action on mosquito's juvenile hormone system, and there is no record of insecticide resistance in mosquitoes to date. This study took advantage of the character of *Aedes* mosquito oviposition behavior by exposing the adult females to PPF at their resting sites to autodisseminate PPF to the following breeding sources and eventually kill both larvae and pupae. In the

laboratory tests, the ability of PPF particles to adhere to the tarsi and be carried by mosquitoes was first confirmed by the use of luminous powder kit. In the simulation of autodissemination effect, we used UPLS-MS-MS to quantify the dosage of PPF carried by mosquitoes, and the inhibition of adult emergence (IE%) were analyzed by bioassays. The results showed that female *Ae. aegypti* could carry and spread 0.04 ~ 0.27ng of PPF to 25ml of water after being exposed to 18.3 mg/m<sup>2</sup> of active ingredient on filter paper for 1 hour. The IE% was 90 ± 0.73%. In the field trials, 5 Lis in 2 districts of Kaohsiung were chosen for the study (4 experimental group and 1 control group). PPF-containing containers were placed in 20 positions and another 100 sites were selected for effect observation. After 1 month of study, 20% of the retrieved water samples exhibited IE% > 50, and the concentration of PPF was 9.5 -10.83ng/L. Our results have proved the feasibility of using PPF to reach to unknown breeding sources and control cryptic *Aedes* populations. The methods derived from this proposal project could be combined with the current “Integrated Vector Management” interventions to help to combat dengue.

**Keywords:** Dengue, Pyriproxyfen, auto-dissemination, juvenile hormone

### (子計畫十二) **Spatial distribution, oviposition behavior and larval**

#### **breeding habitats of dengue vectors in southern Taiwan**

Dengue has emerged as a worldwide problem only since the 1950s and the global incidence of dengue has grown dramatically in recent decades. About half of the world's population is now at risk. Since there are no specific medications to treat a dengue infection, dengue prevention and control mainly depends on

effective vector control measures. To successfully control of epidemic dengue fever, it is necessary to understand the ecology of vector mosquitoes, including the oviposition behavior, distribution habitat etc. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, two main dengue vectors in south Taiwan, are key factors of an outbreak of dengue fever. The larvae of these two vectors were detected mainly in water-filled containers. In recent years, both government and residents have worked hard to removed all kinds of containers and eliminate source so that female mosquitoes cannot easily find water-filled containers to lay eggs. *Ae. aegypti* has therefore changed its larval breeding sites to alternative larval habitats, *i.e.*, drains, water-filled building sites, sewage pools and puddles of water. It implies that current strategy for dengue prevention has changed the ecology and habits of vector. Therefore it is necessary to investigate the spatial distribution, oviposition behavior and larval breeding habitats of dengue vectors in southern Taiwan. For the spatial distribution, more adult dengue-vectors were caught outside of house and 5-floor apartment and first floor of condominium. However, both adult vectors could be found above the 15-floor of condominium and 5-meter-tall tree. More *Ae. aegypti* adults were caught around (inside or outside of) the building and only few were caught from outdoor bushes or trees in the parks, and vice versa for *Ae. albopictus*. For oviposition behavior, both vectors may lay eggs in outdoor and indoor, e.g. living room, bedroom and kitchen, breeding-sites. *Ae. aegypti* mostly laid the eggs indoors, while *Ae. albopictus* laid the eggs outdoors. The eggs laid by *Ae. albopictus* was more dispersed than that of *Ae. aegypti*. However, both vectors spread out their eggs more in the large area than small area. All of these results are useful for management of dengue vectors.

Keywords: dengue fever, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, larval breeding sites, spatial distribution, oviposition behavior

**(子計畫十三) Establishment of the Wolbachia-based approaches for dengue vector control**

Taiwan located in Subtropics area which is the endemic zone for many disease vectored by mosquito, such as dengue fever. Dengue is transmitted by several species of mosquito within the genus *Aedes*, principally *A. aegypti* and *A. albopictus*. Prevention thus depends on control of and protection from the bites of the mosquito that transmits it. The previous method of controlling *A. aegypti* is by eliminating its habitats. However, those control strategies were thought not to be so effective. In addition, insecticide application also given the concerns of negative health effects. Therefore, these projects aim to develop non-chemical strategies for dengue vectors. *Wolbachia* is a genus of bacteria which infects arthropod species and has been linked to viral resistance in *Drosophila melanogaster* and mosquito species. *Wolbachia* is also found to decrease the mosquito fecundity. *Wolbachia* strains that are able to reduce dengue transmission include wAllbB and wMelPop with *Aedes aegypti* have been tested and released in several countries. In this project, we will make use of the well-established *Wolbachia* strains and establish the standard protocol in Taiwan both in the laboratory and field. We will build up a local *Aedes aegypti* strain infected with *Wolbachia* and examine the effect on the life span and susceptibility to dengue infection. In addition, we will collaborate with local volunteer to perform the initial small scale release. The effect on the life span

and susceptibility to dengue infection will be evaluated. In addition, we will make use of unmanned aerial vehicles to give assistance for the breeding sites detection and insecticide spray. In this project, we will only focus on the sites where is not capable for the traditional human pray technique. The standard operation procedures for the use of unmanned aerial vehicles in the breeding sites detection and insecticide spray will be established.

#### **(子計畫十四) Dengue education and training program**

Dengue Fever is a kind of Environmental Disease and Community Disease. If we can reduce the dengue fever mosquito breeding sources effectively in the communities, the effect on foreign dengue virus would decrease sharply. The prevention works involves comprehensive and multi-dimensional realm. Through this proposal, it not only monitors the density of vector mosquitoes and their ecology but also decreases the epidemic risk effectively. Through the health education and promotion of customization and electronization, it increases the cognition of Dengue Fever for people in the high-risk area and changes their behavior by the cognition. With the diversified health education and promotion, the combination of environmental volunteers in each administrative district, anti-mosquito volunteers and the community development associations to join in the prevention work of Dengue Fever spontaneously and maintain their own surroundings of the house. By the contract employee and the cultivation in the proposal, we cultivate the seed teachers for the health education of Dengue Fever in the community and the investigators of the density of vector mosquitoes to enhance the mobility of epidemic prevention and the implementation of public power. It not only slows down the spread and the

outbreak of Dengue Fever but avoids Dengue Fever having the multi-year and localizable prevalence to reach to lower the average fatalities of Dengue Fever per year.

keywords : Dengue fever, Communicable disease, Vector mosquito, Community mobilization, Health education and promotion

### **(子計畫十五) Detection of dengue virus in blood products**

There were 43,784 dengue fever cases in Taiwan in 2015, being the most dengue fever cases reported in single year in the history. It is estimated that 50-85% dengue virus infections were asymptomatic infections. It is suggested that these asymptomatic dengue virus-infected people contributed to dengue virus transmission more than those who developed dengue fever. It is important to understand whether dengue virus was presented in the blood samples from donors in dengue fever endemic season in Taiwan, since many transfusion-transmitted dengue fever cases and the presence of dengue virus genome in blood samples from “healthy” donors had been reported (0.04-0.4%). We plan to detect whether dengue virus presents in the blood samples from donors by using NS1 rapid diagnostic kit and RT-PCR. Eight thousand blood samples will be analyzed for the presence of dengue virus. Among these blood samples, 4,000 samples were collected by Tainan blood center and another 4,000 samples were collected by Kaohsiung blood center, Taiwan Blood Services Foundation, during September to November in 2015. We used both the SD NS1 Combo rapid test and ELISA test to detect antigen and antibody, and used real-time PCR to detect dengue virus. Totally we screened 6050

samples for dengue infection from the blood donors of Kaohsiung and Tainan, and we found one blood donor containing DENV-II. Plaque assay showed 50 pfu/ml. The dengue NS1 antigen rapid test (RDT) of this case was negative and the antibody for dengue was also negative. All the other samples were NS1 RDT negative. There were 8 samples containing both IgM and IgG, and 4 samples containing only IgM. But these antibody positive samples failed to be detected dengue virus from the real-time RT-PCR. The confirmed dengue infection from the blood donors was 0.17 ‰ in 2015. This is the first time we detected dengue virus of blood donors in Taiwan. Whether the blood bank should screen the dengue virus infection during the big dengue outbreak warranted more consideration from this pilot study in Taiwan.

keywords : Dengue virus, transfusion-transmitted dengue fever, NS1, RT-PCR

#### (平台一) Administrative and educational resources platform

(1). We helped appropriate budget of stage 1 and 2 to each PI. (2) Helped PIs of subproject 5 and 15 for application for changing the research aims. (3). Organized the reports of every subprojects monthly and quarterly. (4). Hold the progress reports for this CDFCR project (on 9.21.2015 and 12.25.2015) (5). Hold the international symposium in Solomon Islands on 26 November 2015; and discussed with WHO staff for the dengue control.

## (平台二) Standard Laboratory of Arbovirus Infections

Dengue fever is caused by dengue virus infection and is the most important vector-borne acute febrile illness in Taiwan and in the world. Early clinical manifestation of dengue fever is indistinguishable from fever caused by the infection of other arthropod-borne viruses (e.g. Japanese encephalitis virus, chikungunya virus and Zika virus). Hence, correct diagnosis of dengue virus infection is important for clinical management of the disease. Death from severe dengue fever can be declined by early diagnosis of dengue virus infection. It's very similar between clinical symptoms and vectors of dengue, chikungunya, Zika virus infection. Because of similar clinical symptoms, antibody cross reaction, that's the reason why it's difficult in diagnosis of arbovirus infection. So Set up the standard operation procedure of how to identify arbovirus infection in laboratory is very important part.

The major goal of this project is to set up a standard arbovirus infection identification laboratory. We have set up standard operator procedure of arbovirus, including dengue NS1 test, Real-Time RT PCR of dengue virus and Zika virus, anti-dengue virus antibody (IgM/G) test. And our laboratory through certification by Taiwan CDC and Taiwan Accreditation Foundation. We promote this technology to other inspection agency, including National Referral Hospital in Solomon Islands, Kaohsiung Municipal Min-Sheng Hospital, Kaohsiung Municipal Hsiao-Kang Hospital.

There are 3894 dengue cases in 2015, 407 cases in 2016 which were checked by the standard arbovirus infection identification laboratory. And there are 94 negative cases, 43 dengue serotype 1 cases, 442 dengue serotype 2 cases, 4

dengue serotype 3 cases dengue NS1 positive retrospective analysis using Real-Time RT PCR as gold standard. Unfortunately, we just finish 28.85%(583/2021) in this retrospective analysis because of lacking manpower and cost in this project.

## 二、前言

### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

每年約有 120 個國家受到登革熱的肆虐，全球一年多達三億人口的新案例，約有 0.01% 的人因登革熱致死，其中多數為代表社會未來的童齡族群，登革熱未有良好預期效果的疫苗或是藥物可以治療，多依照密切的醫護照護來緩解病症，通常是早期發現早期治療可以降低過多死亡案例。目前對登革熱的診斷方式，除了臨床上疾病徵兆外也需仰賴試劑或病毒純化的判斷，多因登革熱的臨床特徵與感冒太過於類似，容易受到病患的忽略。針對登革熱的試劑，多是偵測登革病毒的非結構蛋白 1 和抗登革病毒的抗體的表現，然而以登革熱病毒的病程來分析，當病人受到登革病毒感染時，通常會潛伏 5-6 天後，血液中開試有病毒的出現至到病毒血症時病患才會有發燒等不舒服症狀才就醫，此時他的血液中將會有非結構蛋白的表現，隨後 4-5 天後便會有抗體的表現。市面上對於登革熱的診斷方式，多只能診斷出體內有登革病毒非結構蛋白表現和抗體呈現的病患，對於只有病毒血症的個體多只能利用診斷速度慢的遺傳物質定性或是病毒培養的方式，往往這些方式都會讓病人無法接受立即的治療而導致病情加重或是依感冒症狀提前出院導致登革熱快速於病患周圍開始傳播。此外，試劑對於登革病毒的診斷準確度也是無法達到百之百，依照下圖所示大多是 70% 左右的準確度 [1]，約可能以 30% 的人會失去黃金治療時期。

Device sensitivity and specificity: Numbers of samples tested for RDTs and ELISAs, to show serotype-specific as well as overall sensitivity and specificity.

Assay type	Rapid diagnostic test				ELISA format assays			
	Manufacturer	BioRad	InBios	Panbio	SD	BioRad	InBios	Panbio
DENV1		95.2% (40/42)	91.4% (32/35)	92.9% (39/42)	92.9% (39/42)	100.0% (45/45)	93.8% (30/32)	96.4% (53/55)
DENV2		76.9% (20/26)	83.3% (5/6)	80.8% (21/26)	69.2% (18/26)	80.0% (12/15)	100.0% (6/6)	94.1% (16/17)
DENV3		85.7% (36/42)	87.5% (7/8)	73.8% (31/42)	73.2% (30/41)	96.3% (26/27)	100.0% (5/5)	89.7% (26/29)
DENV4		58.1% (25/43)	42.1% (8/19)	44.2% (19/43)	53.5% (23/43)	75.0% (27/36)	100.0% (6/6)	65.9% (29/44)
Overall sensitivity		79.1% (121/153)	76.5% (52/68)	71.9% (110/153)	72.4% (110/152)	89.4% (110/123)	95.9% (47/49)	85.5% (124/145)
Overall specificity		100.0% (0/40)	97.4% (1/38)	95% (2/40)	100.0% (0/40)	97.4% (1/38)	100.0% (0/36)	95.0% (2/40)

目前對於快篩試劑能是著重於專一性且不會與其他疾病有交互作用的抗體作為優化市面上登革熱快篩的方式，然而有需宿主本身的分子會與疾病的發展有相關性，這大多以被用來作為癌症和代謝疾病的篩檢。對於登革熱而言可能也會有一些宿主本身的分子會受到登革病毒的感染而特異性表現，然而目前對於登革熱的特異性生物標誌的研究多是著重於尋找與重症有相關的標誌[2]，如下圖，對於早期會表現在登革熱體內的宿主得特異性蛋白卻很少被著墨，這些分子大多是與免疫反應相關或是皮下細胞相關的因子，對其他感染疾病而言這些因子可能也扮演相同的角色，所以要尋找登革熱專一表現的因子是非常地重要的，且此分子能否用於診斷早期登革熱是重要的。

Biomarkers in Dengue

	HC (n = 15)	Dengue	
		DF (n = 65)	DHF/DSS (n = 46)
<b>Inflammation</b>			
CRP <sup>a</sup>	1.8 (2.3-6.1)***	18.7 (9.2-41.3)	21.0 (6.4-41.4)
IP-10	0.2 (0.2-0.4) ***	2.8 (1.0-4.4)	3.6 (1.8-5.0) †
IL-18 BP	5.8 (4.3-8.3) ***	62.3 (36.4-97.0)	75.9 (52.8-90.6)
IL-10 <sup>b</sup>	0.03 (0.02-0.2)	145.2 (19.5-390.9)	58.0 (19.5-357.9)
CHI3L1	44.5 (35.8-61.3)*	61.6 (44.6-81.2)	57.3 (40.3-78.3)
<b>Complement System</b>			
CSa	18.5 (13.8-22.1) ***	53.8 (33.9-62.8)	52.5 (35.3-67.4)
Factor D <sup>a</sup>	1.1 (1.0-1.3)**	1.4 (1.1-1.6)	1.3 (1.2-1.6)
<b>Endothelium</b>			
Ang-1	44.9 (33.0-53.6)*	32.2 (25.6-43.9)	31.6 (22.3-47.0)
Ang-2	1.4 (1.0-2.6)	1.7 (1.3-2.4)	2.1 (1.3-2.9)
sTie-1	8.3 (6.8-12.7)	10.5 (8.1-12.9)	9.6 (8.1-13.5)
sTie-2	8.7 (6.4-9.7)	7.3 (5.5-8.9)	8.1 (6.0-9.9)
Angptl3	108.4 (82.3-117.5) ***	164.0 (140.6-192.9)	170.8 (146.5-196.3)
Angptl4	44.7 (30.2-90.9)	37.8 (29.3-56.3)	41.7 (33.6-64.2)
VEGF <sup>b</sup>	0.2 (0.2-0.3)	128.2 (48.8-291.9)	124.3 (48.8-321.5)
sFlt-1 <sup>b</sup>	39.1 (39.1-343.5)	39.1 (39.1-863.3)	94.6 (39.1-1074)
sKDR	5.3 (4.5-6.0) *	6.1 (5.5-7.1)	6.1 (5.5-7.1)
sEng	6.6 (5.7-8.4) ***	11.0 (9.2-13.2)	12.8 (10.3-14.7) †
sICAM-1	169.3 (135.8-287.3) ***	329.1 (284.1-467.1)	399.9 (323.0-539.0) ††
<b>Coagulation</b>			
Platelet factor 4 <sup>a</sup>	18.5 (15.6-27.1)	25.7 (16.2-41.2)	23.8 (15.6-37.7)

Healthy controls (HC), Participants with dengue that did not develop complications (DF), participants with dengue that developed DHF/DSS (DHF/DSS).

Biomarker concentration in ng/mL unless otherwise indicated, <sup>a</sup> µg/mL, <sup>b</sup> pg/mL.

\*\*\* p < 0.001 (HC vs. all dengue), \*\* p < 0.01 (HC vs. all dengue), \* p < 0.05 (HC vs. all dengue).

†† p < 0.01 (DF vs. DHF/DSS), † p < 0.05 (DF vs. DHF/DSS).

PR1 是利用蛋白質體學從登革病患體內分析出具有特異性表現的分子，此分子以被認為可以調控發炎反應[3]，且於表現於男性或是女性的生殖器官，以被認為是男性睪丸癌相關生物標誌[4]。早期的研究發現登革病毒可以長期在恆河猴的睪丸細胞進行複製[5]，顯示睪丸細胞容易受到登革病毒的感染。臨床報告中也發現有些登革熱病患會有急性陰囊炎的現象[6]。這暗示著 PR1 可以作為登革熱誘導的宿主特異性蛋白。

### (子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色

歷年來，登革熱在台灣都隨著病媒蚊活動能力上升而開始流行起來。病毒必須要有活體細胞才能夠生存下來，而病媒蚊的壽命只有短短的數個星期到數個月而已[1]，且伴隨著冬天的到來，病媒蚊的活動甚至降得更低。以這樣的情況看來，登革病毒 (Dengue virus, DENV) 難以及在病媒蚊的體內度過一個週期(一年)，但是每年到了夏天的時候，都會看到許多登革熱病患，原本應該消失的登革病毒如何造成這樣的現象呢？登革熱的症狀包括不顯性感染、登革發燒和致死率相當高的登革出血熱伴隨著登革休克症，且前兩者的比例相當高。以不顯性感染者及登革發燒患者來說，登革病毒曾經進入到宿主體內，或許曾經有些類似感冒的症狀但並不會造成很嚴重的登革熱出血熱亦或是更嚴重的登革熱休克症，其不發病的原因有可能是登革病毒潛伏在環境較好的宿主體內，潛伏在某些細胞族群內並持續釋出少量的病毒。然而這些不顯性感染者在沒有發病的情況下會到處移動、旅遊，讓病媒蚊有機會在叮咬宿主時，將病毒從宿主體內帶走，通過叮咬健康的他人而達到傳播的作用。此外，為了補充國家血庫，大部分國家機關都會呼籲民眾積極參與捐血活動，這個時候若不顯性感染者在不知道自己血液中含有病毒的情況下捐了血，則會將登革病毒透過血液傳輸的方式直接感

染接受血液的病人。在波多黎各 (Puerto Rico) 的報告中指出，他們在血庫中有篩選到含有登革病毒的血液[2]，很有可能很多人因為接受輸血而發病，存在著極大的隱憂。

雖然登革熱疫苗已在世界其他國家上市，雖然第一至第四型的登革病毒的預防效果大約是百分之 60-100。然而，對於容易在台灣流行的第二型和第一型的預防效果不符合預期結果，約百分之四十。此外這些疫苗都以小孩為試驗的族群[3]，是否適用於台灣老年人感染族群能是不可知的。此外，登革疫苗引起的抗體保護能力，多以體外病毒進行中和反應來評估，之前的研究結果發現體外偵測到的中和性抗體的量無法準確的預知在人體的保護效力。因為體內的登革病毒具有不同密度，顯示病毒可能具有多樣的型態[4]，所以實際上登革疫苗所引起的免疫反應是否能有效抵抗體內的登革病毒仍是需要被探究的。病毒的型態和結構對於刺激免疫反應的發生是很重要的，因此利用病人血清來解出體內病毒的型態，將可以優化現行疫苗的預防效果。通過瞭解登革病毒在體內的流向，例如感染的細胞族群、感染後協助病毒複製的細胞族群等，來解釋感染機制還不明確的登革熱症，藉此可以發現更有效治療登革熱的方法。不顯性感染者體內的病毒，會以少量的情況存在，其來源是哪些細胞群亦或者是病毒在哪些細胞群默默的複製並且不造成體內劇烈的免疫反應。找出這些細胞族群是個重要的環節，在確定是哪些細胞族群過後，可以利用分選的方式單獨將該細胞族群分出來，來確認登革熱潛伏或是類似機制的整個流程及其關係。

### (子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探--某醫學中心 照護病例對照研究

登革熱 (Dengue fever) 為登革病毒所引起的急性傳染病，經由蚊子傳播給人類，依據不同的血清型病毒，分為 I、II、III、IV 四種型別，而

每一型都具有能感染致病的能力；病例發生主要位於全球熱帶和亞熱帶氣候地區(1)。近年來登革熱傳播主要發生在城市和半城市地區，近幾十年全球登革熱發病率大幅度增長，約有一半世界人口面臨登革熱的危險，有約 25 億人面臨罹患登革熱危險。世衛組織現在估計，每年世界上可能有 5000 萬至 1 億登革熱感染病例，登革病毒感已成為一個主要國際公共衛生關切問題(2)。

登革熱影響嬰兒、幼兒和成人，但極少引起死亡，感染登革病毒後，症狀通常在被感染蚊子叮咬之後經 4-10 天潛伏期後出現，持續 2-7 天。臨床表現可從無症狀感染至較為嚴重的出血熱甚至休克、死亡；於 1997 年世界衛生組織(WHO)登革熱感染的臨床分類主要區分為登革熱、登革出血熱、登革休克症候群(3)，在臨床病人嚴重程度分類使用非常廣泛用以引導病人臨床體液補充治療，但因其登革病毒感染其臨床表現的複雜性高且有許多嚴重表現的病患並無法適用於上述分類(4-10)，有別於 1997 年所提出較嚴重臨床表現-登革出血熱，於 2009 年臨床分類主要分為登革熱及登革熱重症，以提供此類個案適當的檢傷分類並引導臨床處置(表一)；登革熱重症的定義，主要為符合下列一項以上的條件：1. 嚴重的血漿滲漏導致呼吸窘迫；2. 嚴重出血；3. 嚴重器官受損（如肝臟受損(GOT/GPT $\geq$ 1000 IU/L)、意識受損，心臟或是其他器官衰竭，此類病人並須儘速給予適當治療，否則未來發生併發症或死亡之機率極高(11)。感染一種病毒並恢復後，對該病毒具有終生免疫，此後感染其他三種病毒只有部分和短暫的交叉免疫，隨後感染其它種類病毒會增加罹患重症登革熱的危險。相較於其他病毒型別，登革病毒感染第二型(DEN-II)是最多研究所提及(13-15)。重症登革熱影響到大多數亞洲和拉丁美洲國家，已成為上述地區兒童住院和死亡一個主要病因。對登革熱/重症登革熱沒有特異治

療辦法，但及早發現和適宜的醫護可將死亡率降到 1%以下。

登革熱重症是一種有可能因血漿滲漏、積液、呼吸窘迫、嚴重出血或器官損傷導致死亡；最初症狀出現 3-7 天後，會在溫度（38°C/100°F）下降的同時出現一些預警跡象，包括：嚴重腹痛、持續嘔吐、呼吸急促、牙齦出血、全身乏力、煩躁不安、嘔吐物帶血，隨後 24-48 小時為治療關鍵階段，患者可能死亡，需要進行適當醫護處理以避免併發症和死亡風險。據估計，每年約有 50 萬人因患重症登革熱需住院治療，約 2.5% 感染者死亡（16-17）。

目前沒有專門針對登革熱的藥物特異治療方法，主要還是以病人生命徵象的支持性療法為主。對於重症登革熱，具有經驗，並且了解病程的醫療人員可以挽救生命-把死亡率從 20% 降低到不足 1%，越來越多的文獻探討 2009 年版的臨床分類對於登革病毒感染病患的臨床照護運用，將病人適度分流並發現臨床表現較為嚴重的感染個案，以利於醫療處置介入（18-22）。

登革熱為台灣第二類法定傳染病，由臨床醫師進行個案通報，經實驗室檢驗呈陽性者，則判定為確診個案，在臺灣每年皆有疫情大小不一的登革熱，圖一為 1987-2013 年全國登革熱確診病例數統計圖，2014 年的登革熱疫情為近十幾年來疫情規模最大(圖二)，主要的流行地區為南台灣三個縣市（高雄市、台南市和屏東縣)(圖三)，確診登革熱病例數高達 1 萬 5 千多例，登革熱本土確診病例其年齡主要介於 30 歲至 70 歲、性別則是男女約各佔一半(圖四)，其中 9 成 5 的病患集中於高雄市，高雄醫學大學附設中和紀念醫院為高雄地區的醫學中心，在 2014 年為向高雄市通報登革熱確診病例數最高的醫院。

## (子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

### (1) 政策或法令依據

登革熱為目前重要的國際公共衛生問題，主要影響地區為東南亞及拉丁美洲及西太平洋地區[1, 2]，之後每年均出現大小不一的登革熱流行，其中高雄市於近 10 年中，以 2010 年(990 例)及 2011 年(1,168 例)的本土疫情較高[3, 4]，2014 年高雄市確定本土病例共 1 萬 4999 例，登革出血熱發生率為 0.88%，其中因登革出血熱死亡者有 20 人，是有史以來最大規模的登革熱大流行。為發展登革熱防治在地化模式，培育我國專業人才，增進防治及研究量能，高雄醫學大學在中央協助下於 2015 年 2 月 5 日，成立「登革熱防治研究中心」，希望未來能有效遏阻疫情，此計畫其中的子計畫之一主題為”103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析”。

### (2) 問題狀況或發展需求

隨著地球暖化，地球的溫度不斷上升，自 2000 年起，這近 10 年是有氣候紀錄的 134 年中，氣候最炎熱的十年(除了 1998 年外)，尤其是 2014 年，氣溫為最高的一年[5]，鄰近的日本也爆發了近 70 年來的首見的 160 例本土登革熱病例[6]，另外在中國廣東省也出現了 42,000 多例的個案[7]，可見登革熱，已由東南亞及拉丁美洲，隨著氣候變遷地球不斷暖化，不斷的擴散及增加嚴重度，氣候與登革熱發生率的相關研究實為重要。登革熱是南台灣常見的疾病，就歷年來的資料而言，以高雄市為最嚴重，民國 2002 年高雄市曾有過大流行，當時約有本土病例 5336 人感染，之後陸續在 2006 年出現 942 例個案、2010 年 990 例個案、2011 年有 1168 例個案，但 2014 年在高雄市爆發近十年來規模最大的一次登革熱疫情，出現共 1 萬 4999 例本土登革熱個案，其中登

革出血熱 132 例且有 20 例死亡；此外在 2014 年發生了石化氣爆事件，造成 32 人死亡、321 人受傷[4, 8]，接續著接連數天的下雨，雨水累積在氣爆處形成河渠且妨礙了登革熱的病媒蚊清除的工作，也導致布氏指數增加的現象[4]；2014 年恰好也是高雄市建案容積獎勵年限的最後一年，建商紛紛推出建案，在建築工地也有發現多處的孳生源未清除，是否因氣爆或是建案因素等原因造成疫情擴大？目前並不清楚，這些種種因數，都有可能導致 2014 年登革熱的大爆發。

### (3) 國內外相關研究之文獻探討

國內一些相關研究 [9]指出登革熱的發生率與每月平均氣溫的差異值及相對溼度有負相關，且此兩種因素與登革熱的爆發會有呈現兩個月的延遲現象；且每個月平均氣溫增加 1°C，總人口數中登革熱傳遞的風險會增加 1.95 倍。[10]在另一篇研究指出[11]，高雄地區，降雨量、最小氣溫、相對溼度可顯著預測登革熱的發生率且呈現出三個月的延遲效應，而布氏指數的百分比大於 2 級以上可以顯著預測登革熱的發生率並呈現出 1 個月的延遲效應；另有相關的研究指出溫度是重要的因素，會影響病媒蚊及宿主的交互作用而呈現一種動態平衡的模式，由模擬可得知在溫度 28°C 時登革熱的傳播具最大的危險性 [12]。此外還有一些研究市探討登革熱個案與都市水利工程如高雄市愛河、溝渠，及住宅土地分區使用(住宅區、商業區、住商混合)有關[13]，另有一些研究指出民眾的家戶收入、居民的認知程度[14]、都市化[10]及社經地位與社會人口因素(年紀、教育程度、婚姻狀況)都與登革熱發生率及防治有關[14, 15]，以上雖有研究與登革熱及氣候因子的關係，但所採用的資料較久遠，未包括高雄市 2014 年登革熱大爆發的資料，也較少提及高雄市居民社經地位與登革熱發生率的關係。另有關蚊子方面的研究指出氣

溫影響蚊子的繁殖，母蚊在接近 25°C 時存活率超過公蚊 [16]；也發現蚊子在 20°C 至 30°C 時具有最大存活率 88-93%，最低溫扮演重要的角色 [17]。至於石化氣爆對高市登革熱疫情的影響，在文中[4]指出因氣爆對災區主客觀環境造成的影響，於第 32-33 週確實對登革熱疫情造成衝擊，所幸防治得宜，災區疫情及時獲得控制，且該項影響除非能及時偵測到指標病例，並進行詳細疫調後始能確認與氣爆災區之關聯性。但該項氣爆研究範圍較窄，只有限於氣爆區的 13 里，未擴及鄰近區域，此為該論文之限制。

#### (4)本計畫與防疫工作之相關性等

上述這些因素目前雖有相關研究，但所採用的資料較久遠，未包括2014年疫情，若能釐清這些因素包括溫度、濕度、雨量、布氏指數、氣爆因素、社經狀況彼此的關聯性，及這些因素與登革熱何者相關性最為強烈；同時了解2014年高市登革熱的發生個案數與建案因素之間的關係為何；得知高雄市登革熱其周期性為何？同時有了社區居民因社經狀況、城鄉差距、教育程度及環境病媒密度等之因子不同的基礎資料之後，能更進一步去分析不同社區 或行政區其民眾對登革熱瞭解及參與防治程度之差異性，藉以擬訂不同之防治方法及策略。

上述結果，對於人力的配置與防疫工作的推展、規劃及疫情的研判有很大的幫助。鑑往知來，必能有助於日後防疫政策的制定。此研究除了能作為高雄市防治參考，也可以將此模式運用於國內其他地區，將危機化為轉機，對於國外類似工安或氣爆災害事件也有參考價值。

### (子計畫五) 重症登革熱之流行病學及免疫反應研究

登革熱是目前全球最重要的蚊蟲媒介病毒傳染病，其發生率在過去數十年仍持續上升，為全球重要的公共衛生議題。南台灣位居登革熱流行地區，每年均有登革熱病例，尤其在 2014 及 2015 年有較大的流行。依據國外的研究，登革熱重症(severe dengue)多發生於兒童及青少年，且死亡率不高。然而在台灣 2015 年的登革熱大流行共造成 209 人死亡，我們觀察到的是一個以老年人為主、有極高死亡率的登革熱重症族群。

縱使國內外已有不少針對登革熱之研究，目前依然有許多臨床疑慮有待解決，尤其在重症登革熱的中老年族群更是缺少實證資料，並且少有研究探討在重症登革熱後所併發之感染症對臨床預後的影響性，因此本研究計畫希望針對高學醫學大學附設醫院內科加護病房登革熱病患，執行前瞻性與回溯性的流行病學調查。

### (子計畫六) 抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然藥物研發

登革病毒(dengue virus, DENV) 藉由白線斑蚊(Aedes albopictus)及埃及斑蚊(Aedes aegypti)傳播，當蚊子叮咬登革病患，體內便終生帶有登革病毒，並且將病毒傳給下一個被叮咬的人。當被登革病毒感染時，大部分人會產生典型登革熱症(dengue fever, DF)狀如發燒、骨頭疼痛、出疹等症狀，通常約一個禮拜痊癒。但有部分病患會產生更加嚴重的出血及休克症狀，稱為登革出血熱(dengue hemorrhagic fever, DHF)及登革休克症候群(dengue shock syndrome, DSS)。登革熱是一個熱帶傳染病，每年造成約 390 萬人感染，其中約 10 至 50%的病患會死亡。台灣位處熱帶及亞熱帶交界，每年都有登革熱疫情，甚至於 2014 年台灣通報了超過一萬例登革病例，

其中死亡 13 例，刷新以往的紀錄。但是目前臨床上尚未有有效預防登革之疫苗以及治療登革熱之藥物，對於登革出血熱僅能採取支持性療法。因此，本計畫提出登革病毒之藥物標靶基因及抗病毒天然藥物或小分子藥物之研發策略，同時探索與病毒致病有關的分子機轉。本計畫達成目標如下：

1. 建立高通量篩選第一型血紅素氧化酶(heme oxygenase-1, HO-1)促效劑之篩選平台並篩選 HO-1 促效劑。透過次世代定序(next generation sequencing, NGS)分析，本實驗室發現 HO-1 於登革病毒感染時表現量下降，若提高 HO-1 活性或者增加 HO-1 表現量，則登革病毒複製會受到抑制。本計畫首先建立由 HO-1 啟動子驅動之冷光報導基因系統(HO-1 promoter-driven luciferase reporter system)，接著透過此報導系統從中草藥、海洋物等萃取出之天然物以及小分子藥物兩方面進行高通量篩選，結果篩選出 HO-1 促效劑 Compound L 具有潛力成為抗登革藥物。
2. 建立高通量篩選第二型環氧化酶(cyclooxygenase-2, COX-2)抑制劑之篩選平台並篩選 COX-2 抑制劑。從 NGS 分析中得知登革感染時第二型環氧化酶(cyclooxygenase-2, COX-2)表現量上升，本實驗室已證實 COX-2 可提高病毒複製量，若 COX-2 被抑制則登革病毒複製也跟著下降。本計畫首先建立由 COX-2 啟動子驅動之冷光報導基因系統(COX-2 promoter-driven luciferase reporter system)，接著藉由此報導系統從中草藥、海洋物等萃取出之天然物及小分子藥物兩方面進行高通量篩選，結果篩選出 COX-2 抑制劑 GS 有潛力成為抗登革病毒藥物。
3. 建立高通量抗登革病毒蛋白藥物篩選平台以篩選直接抗病毒藥物(direct antiviral agents, DAAs)。除了以宿主基因作為目標，直接抑制病毒本身蛋白質活性也是一個有效的抗病毒策略。本實驗室挑選了登革病毒 NS3 蛋白酶(NS3 protease)及 NS5 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA

polymerase)作為抗病毒藥物的標的，並建構針對 NS3 及 NS5 的高通量藥物篩選平台。同樣地，本實驗室將藉由此兩種高通量篩選系統對天然物及小分子藥物進行篩選，期望能篩選出具潛力之抗登革病毒藥物

4. 於登革小鼠感染模式評估篩選出之抗病毒藥物效果。為了評估上述平台所篩選出之潛力藥物是否能於活體內抑制登革病毒，本計畫利用 ICR 登革感染小鼠模式來進行試驗，結果顯示以上藥物皆可於活體內抑制登革病毒複製。此結果也為這些藥物提供更進一步的數據，作為將來藥物開發或輔助治療佐劑開發之基礎。

綜合上述目標，本計畫初步篩選出具潛力的抗登革病毒藥物，並且於活體內測定其抗病毒活性，對於無論是未來的抗登革藥物開發、輔助性治療佐劑或者保健食品都能提供一定的數據支持其開發。

5. 透過次世代定序(next generation sequencing, NGS)篩選具潛力之抗病毒基因以及微型核糖核酸(micro RNA, miRNA)以作為未來抗病毒藥物篩選之標的。本實驗室先前已整理完成 NGS 之結果，並從中證實了兩種宿主基因與病毒複製息息相關。尚未確認的基因及 miRNA 仍有許多，本實驗室將繼續研究，期望能從中發掘出新穎的具潛力之抗病毒藥物標靶，以提供開發新穎性及有效之抗登革病毒藥物或者輔助性治療佐劑。

#### **(子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查**

目前已有數個登革病毒疫苗進入臨床試驗。之前，一份賽諾菲巴斯德(Sanofi-Pasteur)2b 期臨床試驗報告顯示，具有活性之減毒嵌合黃熱病毒與登革病毒(chimeric yellow fever-dengue; CYD)四價疫苗可達到 30.2% 的保護效果(9.2%可對抗登革病毒第二型)。最近，又有報告顯示相同的疫苗在第 3 期試驗中，具有 56.5-60.8%的保護效果(35.0-42.3%可對抗登革

病毒第二型) (Sabchareon, Wallace et al. 2012, Capeding, Tran et al. 2014, Villar, Dayan et al. 2015)。此外，使用疫苗後的保護效果，對原本病人血清呈現登革病毒陰性者只有 35.5-43.2%的保護效果，但是對原本病人血清呈現登革病毒陽性者可達到 74.3-83.7%的保護效果，顯示有追加接種疫苗 (booster) 的效果 (Wilder-Smith 2014)。總結上述，這些研究指出 CYD 疫苗並非是一種有效的疫苗，特別對於未曾被登革病毒感染，也需要更了解免疫相關的保護作用。鑒於未被感染與曾被感染之間疫苗效力的差異，針對高雄市的登革血清陽性率的血清學調查，其結果將提供關鍵訊息來評估是否在不久的將來，可以在高雄市使用合格的登革疫苗來保護市民免於登革熱的威脅。

#### (子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗

##### 登革熱

登革熱最早是在西元 1779 年由 David Bylon 在爪哇島首先描述。由於可引起很厲害的高燒及肌肉疼痛，猶如裂骨一般，又俗稱「斷骨熱」或「天狗熱」[1]。它必須藉由「蚊子」叮咬患者，成為病媒蚊，當病媒蚊再叮咬健康的人，才會使人致病。所以此病多分布在熱帶及亞熱帶蚊子易滋生的地區，尤其以東南亞、非洲及印度為最多台灣中南部夏季酷熱也易成為疫區。傳播媒介主要是埃及斑蚊及白線斑蚊這兩種蚊子，登革熱病毒必須藉由這些蚊子的叮咬，才可能傳播出來，而依其抗原性的不同，登革熱病毒又可分為 1、2、3 和 4 共四型[2]。人若感染其中一型，其在體內產生的抗體並無法防護另外三型，以感染第 2 型最危險，易發生出血性登革熱[3, 4]。登革病毒(dengue virus, DENV)屬於黃熱病毒科(flaviviridae)黃病毒屬(flavivirus)，病毒顆粒直徑約 50nm，是帶有套膜(enevelope)病毒，其基

因組為一條約 11Kb 大小的正股核糖核酸(single-strand positive-sense RNA)，當病毒感染細胞後，RNA 在細胞內轉譯成一條多聚蛋白質(polyprotein)，整個過程共可產生 10 種功能互異的蛋白質，其中含三個結構性蛋白體，包括：核蛋白(capsid; C)、膜(前膜)蛋白(membrane; prM/M)、套膜蛋白(envelope; E) 為組合病毒的結構蛋白，尤以套膜蛋白在病毒感染細胞及誘發抗體上，扮演相當重要的角色。另外七個非結構蛋白體，包括：NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及 NS5 則為非結構性蛋白，它們是病毒複製及組裝時所需的酵素。登革病毒可以藉由吞噬作用(Phagocytosis)，囊泡介導的融合作用(Vesicle-mediated fusion)以及接受器介導的胞吞作用(Receptor-mediated endocytosis)幾種方式進入細胞，之後病毒 RNA 會搶劫宿主細胞機制去複製病毒 RNA 的基因組和病毒蛋白，進一步產生病毒顆粒。不成熟的病毒會到高基氏體中轉換成熟變成具有感染力的病毒顆粒，之後釋出細胞外再去感染下一顆細胞[5, 6]。整個登革熱的病程大約 2 周，一旦人類被帶有登革病毒的蚊子叮咬後 3-7 天內開始有發燒、臉部紅腫的症狀，但是大部分的人往往都是發燒到第 4 天才就醫，可是這個時間已經過了 NS1 蛋白表達及病毒血症(viremia)的高峰期，接著進入關鍵期，病情惡化，開始有血漿滲漏、器官損壞、出血甚至休克的現象，在這個時期發現到有血小板低下及嗜中性球低下的情形。然後進入回復期[7, 8]，病患皮膚開始出現全身性的皮疹。登革熱是藉由病媒蚊傳染的疾病，病媒蚊的控制是目前執行的主要方法，但效果不彰，因此需找具有保護作用的免疫因子是最具有效減低疾病的傳播。

## 尋找具有保護作用的免疫因子

主要是尋找在人體具有保護作用的抗體，血清中的抗體是多種抗體分子的混合物，它們的化學結構是不均一的，而且含量很少，不易純化，是抗體分子結構分析的困難處。但是若能從病人體中找到抗登革病毒的抗體，對於治療登革熱就是一大福音，因此儘管技術層面上有一定的難度，但還是有繼續發展尋找抗登革病毒抗體的重要性。在診斷時要測定標本中是否有病毒抗原或要測定病人血清中是否有抗病毒的抗體存在，都要先有可辨認病毒抗原所必須的試劑—病毒抗原特異性抗體。初次感染登革熱可在症狀出現後 3-5 天測得 DENV IgM 抗體，此抗體在血中可持續 30-60 天(DENV IgG 則在 10-14 天出現，持續終身)，重複感染登革熱時，DENV IgM 出現時間比初次感染來的慢，且強度也較弱，反而 IgG 抗體會隨症狀開始後 1-2 天快速明顯上升(Fig. 1)。根據統計，住院的登革熱患者大約 20%在第一次採血檢驗 DENV IgM 時得到陰性反應，此情形通常是採血時間過早，若間隔 3-5 天後再複檢，大部分會偵測到陽性反應。是以檢測 Dengue IgM 可得知是否患者近期內感染登革熱，而 IgG 可以證實是否患者曾經感染登革病毒(Fig.1 )。

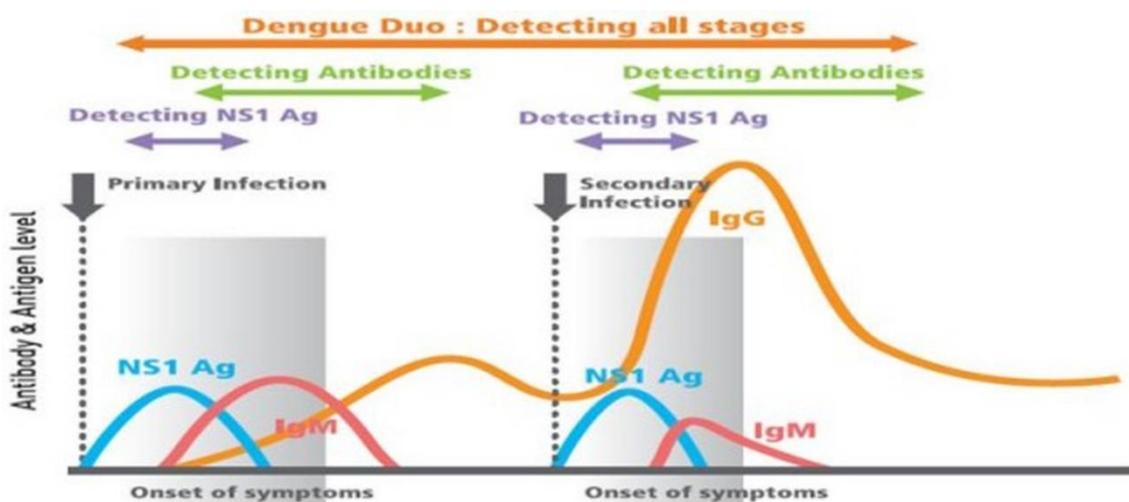


Figure 1. 初次以及再次感染登革病毒時人體中 IgG 及 IgM 的波動情形

而要減少登革熱錯誤診斷，就必須使用背景值極低的病毒抗原特異性純化單株抗體。血清中的每一種抗體是由單一個漿細胞所分泌產生，若能把此漿細胞由脾臟中挑出來，單獨培養成細胞株，則可得單一類型的抗體，只會對一種抗原決定基反應，其專一性極高。大量培養此細胞株，即可有品質一定、純度均一的抗體，此即為單株抗體。然而漿細胞不易在培養基中生長，雖然有人一直努力，想找出在體外培養脾臟細胞的條件，但結果均不甚理想，因此上述想法不易達成。若把癌細胞永續生長的特性，利用細胞融合法導入可生產有用抗體的漿細胞中，則得到可在培養基中永久生長的漿細胞株，此即融合瘤細胞株。NS-1 是穩定的小白鼠 BALB/c 癌細胞株(骨髓瘤細胞 NS-1)，除了能在培養基中永續生長外，其細胞缺乏兩種核酸代謝的重要酵素胸苷激酶(TK, thymidine kinase)及次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核苷轉移酶(HGPRT, hypoxanthine-guanine phospho ribosyltransferase)。而脾臟細胞中含有 TK 及 HGPRT 兩酵素，與融合瘤細胞株融合後導入 TK 及 HGPRT 兩酵素的基因，就可以代謝核酸物質了，之後進一步幫助抗體的產生 [9, 10]。

### 抗登革藥物

文獻報導指出被登革病毒感染的不顯性健康者很可能是登革熱的散播者，因此可減緩疾病症狀的抗登革藥物且可以相對的減低登革病毒的傳染是目前急需的。已有研究顯示，在登革病毒 RNA 的蛋白體結構中，其非結構蛋白中的 NS3 絲氨酸蛋白酶需要 NS2B 輔酶來活化，才能行病毒的複製功能。而在 Frimayanti(2011)等人的研究發現，從薑族薑荷科(Zingiberaceae)的一種香料-圓形植物凹唇(Boesenbergiarotunda 中萃取出的一種成分，有抑制第二血清型登革病毒蛋白酶(serine protease)的功能，其五配體的複合物可競爭並抑制第二型登革病毒 NS2B 和 NS3 絲氨酸蛋白酶的活性。這些

配體可結合受體之作用部位，形成複合物後飽和了受體使病毒蛋白酶之效能降低 [11]。目前雖然已找到關鍵的 NS2B 及 NS3 在登革病毒複製的重要位置，但治療登革熱的藥物尚在研發中。

牛樟芝(*Antrodia camphorata*)又名「牛樟菇」、「樟菇」、「窟內菰」、「紅樟芝」、「神明菇」…等稱謂。牛樟芝外型呈板狀或鐘狀，表面呈鮭紅色，用於養生保健，類似靈芝，只生長在高海拔的常綠闊葉大喬木的牛樟樹(*Cinnamomum kanehirae*)上，是一種寄生真菌。台灣原住民早期喜食用牛樟芝解宿醉。牛樟芝富含三萜類化合物 (triterpenoids)、多醣體 (polysaccharides, 如  $\beta$ -D-葡聚糖)、腺苷(adenosine)、維生素(如維生素 B、菸鹼酸)、蛋白質(含免疫球蛋白)、超氧歧化酵素(superoxide dismutase, SOD)、微量元素(如：鈣、磷、鋅)、核酸、固醇類以及血壓穩定物質(如 antodia acid)等，具多項功效，包含抗癌、抗過敏及止癢，治療腹瀉，後來又發現在糖尿病、高血壓等慢性疾病上也有相當好的改善作用。而野生牛樟芝子實體酒精萃取物被證實為極具發展潛力的抗癌佐劑，野生牛樟芝子實體水萃取物則有免疫調節的作用，野生牛樟芝中最值得注意的是三萜類化合物，其中分離自子實體的萃取物中 Compound B 除了對於大腸癌、肝癌、乳癌、肺癌細胞株具有毒殺作用，而 Compound C (fig. 2) 也有抗發炎的功能 [12, 13]。進一步有文獻指出牛樟芝的多醣體 (polysaccharides) 具有抑制 B 型肝炎病毒(hepatitis B virus) 的效果 [14]，牛樟芝的成分中是否可以抑制登革病毒目前為止仍未知，可減緩疾病症狀的抗登革藥物且可以相對的減低登革病毒的傳染是目前急需的，加上先前實驗結果顯示人體中的造血幹細胞可能是登革病毒感染的對象，因此欲以人體中的造血幹細胞為基礎，探討牛樟芝的成分是否可以抑制登革病毒的感染，希望未來可以做為減緩疾病症狀的抗登革藥物。

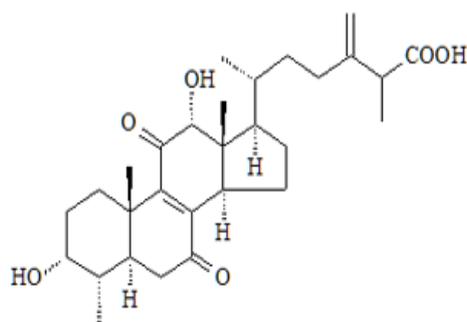


Figure 2. Compound A 的結構式

## 擬人化小鼠

小鼠體內藉由轉殖技術帶有人體的組織或是細胞等稱為擬人化小鼠，為了能使小鼠能更易接受異體的組織多是利用嚴重免疫缺陷的小鼠，如 NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCr1, NOD/SCID 小鼠。隨著基因轉殖小鼠的技術進步和成熟，目前已發展出體內缺乏 T、B 和 NK 細胞的 NOD-scid IL2R  $\gamma$  null, NSG 小鼠。此小鼠可以高度接受人類的周邊血細胞或是 CD34<sup>+</sup>人類前驅幹細胞，並且可以讓這些細胞在小鼠體內發育和建立人類的周邊血系統，已被用來研究血癌致病機轉、人體血液疾病或是幹細胞的發育和分化的相關研究。同時，人類細胞在小鼠體內的日漸成熟也發應出異體移植的排斥反應，因此現象的產生被作為一個研究此排斥反應的小鼠模式。

免疫缺陷的小鼠容易受到登革病毒的感染，相較於免疫健全的小鼠而言，可以產生較高的登革病毒，已被認為可以作為藥物或是疫苗的臨床前試驗 [15]。最近，有研究指出利用人類 CD34<sup>+</sup>前趨細胞於 NSG 小鼠所建立的擬人化小鼠能被登革病毒所感染 [16, 17]，這顯示擬人化小鼠能建立登革病毒複製的小鼠模式。

## (子計畫九)台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析

世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 於 2013 年宣佈登革熱為全球傳播最為快速之蟲媒傳染病，於過去五十年間其發病數量急遽增加三十倍之多，其快速傳播之主要原因包括貿易全球化、人口跨境移入與

氣候變化等環境因素(1)。台灣地處熱帶及亞熱帶氣候區之交界，為登革熱的傳播媒介埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 及白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 之生長分佈區域，而在病媒蚊生長條件限制之下，台灣登革熱疫情好發於夏季 5 月至 8 月，冬季則由於氣候因素不利於病媒蚊生長，促使登革熱疫情逐漸趨於緩和；因此，登革熱並非台灣終年流行之傳染病，其主要感染病例以境外移入個案為主 (2, 3)。

在 2014 年台灣地區爆發大規模的登革熱疫情，根據台灣 CDC 統計 2014 年總計有 15,732 登革熱感染案例，包括：15,492 例的本土個案與 240 例的境外移入個案。其中 15,043 例 (約 95%) 發生在大高雄地區。此外，2014 年 8 月 1 日的凌晨在高雄地區的前鎮區與苓雅區的交界處產生地底管線的氣爆，造成 26 人死亡 296 人受傷。而氣爆的產生對於登革熱大流行的影響目前仍不清楚。根據我們目前尚未發表的資料顯示這波高雄地區流行的登革熱主要是第一型的登革熱病毒 (DENV-1)。根據過去的研究指出高雄地區在 2010-2012 四型登革熱都有在該地區流行 (DENV-1,-2,-3 and-4)。目前對於整個登革熱流行型別的轉變 (shift) 與造成大流行的原因仍不清楚。由於登革熱病毒的感染主要是藉由攜帶登革熱病毒的斑蚊 (*Aedes mosquitoes*) 叮咬與傳播，因此登革熱的流行與斑蚊的指數息息相關。2014 年的 8 月 1 號凌晨高雄地區前鎮區與苓雅區發生地底管線氣爆事件，造成 26 人死亡，296 人受傷。從台灣 CDC 的統計資料發現，氣爆發生後登革熱感染案件數迅速增加。目前氣爆事件的發生對於登革熱感染人數的增加也仍不清楚。因此，本研究計畫欲了解 2014 年登革熱爆發大規模流行的原因，同時也會持續監控 2015 年登革熱流行的概況。一方面也回溯性的分析 2010-2013 年高雄地區流行的登革熱型別。此外，本計畫也欲發展登革熱的人類單株抗體，可以運用於登革熱的病毒的檢驗、免疫治療及尋找

重要的抗原決定位。配合患者恢復期的採血了解抗體產生的情況與進行家訪便於研究患者與家屬間的登革熱傳播影響模式。因此，本計畫欲進行登革熱病毒之病毒學與分子流行病學的統計分析。

登革熱是一種藉由節肢動物傳染的疾病(arthoborne disease)，也是世界上重要的再浮現傳染病(re-emrging disease)之一(4)，登革熱主要盛行的地區為全球熱帶及亞熱帶區域，目前發現共超過一百個國家皆有登革熱的流行，約有二十五億的人口(全球的 40%)居住在登革熱的高風險區內，其中有 70%皆位於亞洲地區，例如:日本、泰國、泰國、菲律賓、印尼等。登革熱由黃病毒科黃病毒屬中的登革病毒亞屬所引起，在登革病毒亞屬裡共有四種登革病毒，它們依抗原性的不同分別稱為第一、二、三、四型，然而，近期報導指出有登革熱第五型(5, 6)。一般而言，登革出血熱或登革休克症候群，是因同一病患在不同時間受到不同抗原型的登革病毒感染，產生強烈的免疫反應所致(7, 8)。

根據世界衛生組織(WHO)所公佈的資料顯示，1998 至 2012 年間，平均每年皆有五千萬至一億的人被登革病毒所感染，其中約有五十萬的感染者發展為症狀較為嚴重的登革出血熱，甚至有 12,500 個病例死於登革熱(4, 9)。登革熱 (Dengue fever, DF) 為第二類法定傳染病，主要是藉由帶有登革病毒的斑蚊叮咬人類而傳播的病媒傳染病，登革熱的傳播媒介主要為埃及斑蚊(*Aedes aegypti*) 和白線斑蚊 (*Aedes albopictus*)。埃及斑蚊分佈在北回歸線以南，主要在熱帶及亞熱帶國家，包括亞洲、中南美洲、非洲、澳洲北部以及部分太平洋地區島嶼(4, 10)。根據疾病管制局資料指出，台灣地區登革熱病媒蚊幼蟲密度之布氏指數(級數)報告於台灣地區南、北之病媒蚊幼蟲密度均有漸增之趨勢，而登革熱的盛行率與布氏指數呈現高度的正相關性(11)。在過去 25 年，登革熱不僅向新的地理區域蔓延，流行疫情發生的頻次及病例數也大幅增加，伴隨登革出血熱 (Dengue haemorrhagic fever, DHF) 發生地區及病例數也日漸增加。世界衛

生組織（WHO）認為登革熱是被忽略的疾病(Neglected tropica; disease, NTD)之一(12)。高雄市地處北迴歸線以南，為埃及斑蚊好發孳生地，根據台灣地區埃及斑蚊和白線斑蚊分布調查統計分析初步結果顯示，高雄市埃及斑蚊與白線斑蚊分布比例位居全台之冠，且明顯高於南部其他縣市，加上人口較多、住宅密集，空運、港埠等對外交通經商往來頻繁以及外來的流動性人口眾多等因素，促成病媒蚊孳生源以及人蚊間互動俱增，一旦登革病毒入侵，其擴散蔓延速度將較鄉村型地區快速，感染人數也會大幅增加(13, 14)。根據疾病管制署資料顯示，台灣地區早在 1915、1931、1942 年便出現三次全島性之登革熱流行；文獻也指出 1981 年屏東縣琉球鄉亦爆發登革熱病毒第二型之流行(15)。1987 年屏東東港及高雄市爆發登革熱病毒第一型流行及少數登革熱病毒第二、四型流行；1988 年~1989 年高雄市及屏東縣又爆發登革熱病毒第一型及少數登革熱病毒第二、三、四型流行；1991 年、1994 年至 2001 年於台南縣市、高雄縣市及屏東縣市均陸續有登革熱之疫情傳出(16)。

從登革熱病毒基因之序列分析發現，台灣地區歷年來之登革熱流行，絕大多數源自境外移入，再經由本地病媒斑蚊傳播開來，境外國包括：菲律賓、泰國、印尼、馬來西亞、新加坡、越南、緬甸等(13, 14, 17)。因此推論台灣地區，尤其是南部地區，可能多次發生混合不同病毒型別之流行而且極有可能重覆再感染，典型之原發性登革熱死亡率 $<1\%$ ，但更危險的出血性登革熱或休克性登革熱死亡率高達 15~50%。因此，持續的監控與追蹤登革熱病毒的血清型與基因型的改變是非常重要的，若發現不同血清型登革熱開始流行就可能造成出血性登革熱或休克性登革熱的案例增加。這都是登革熱在治療時要特別注意的訊息。

不同血清型的登革病毒具有相同的型態、特徵、基因結構和轉譯方式。登革病毒的直徑大約為 30 nm，是具有套膜的正性單股核酸病毒 (positive-strand RNA

virus)。登革病毒基因體全長約為 11 kbps，其 5'端具有 cap 結構，而 3'端無 poly A 序列，其基因體只含有一個 open reading frame (ORF)，且可以轉譯出三種結構性蛋白質與七種非結構性蛋白質。ORF 的兩端分別含有一段 5'端和 3'端的非轉譯區域(untranslated region, UTR)，整個基因組的順序為：5'-cap-UTR-AUG-C-prM-NS1- NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-UTR-3'(17, 18)。轉譯出來的多聚蛋白質(polyprotein)約有 3000 個胺基酸，經由特異性蛋白質酵素切割形成各個病毒蛋白質成分(19, 20)。登革病毒的結構性蛋白質包含：殼蛋白質(Capsid protein, C)，膜蛋白質(Membrane protein, M)及外套膜蛋白質 (Envelope protein, E)。殼蛋白質是組成病毒蛋白質外鞘 (nucleocapsid)的重要成分，其功能是保護病毒核酸 RNA 基因體。殼蛋白質生成時，其 N 端具有 nuclear localization sequence (NLS)序列，因此病毒殼蛋白質能進入宿主細胞核的核仁區域，並且與宿主核仁中的 hnRNP 蛋白質結合。另外，登革熱病毒膜蛋白質(Membrane protein, M)是由前基質膜蛋白質(prM)經由特異性酵素(furin)切割後形成分子量為 8 之蛋白質，為病毒顆粒的表面結構。前基質蛋白質(prM)與外套膜蛋白質(E)會形成 heterodimer，避免病毒顆粒在細胞內的與內質網作用，當病毒到達細胞膜時，經特異性酵素(furin)切割後形成 pr-peptide 與 M 蛋白質。pr-peptide 會被釋放到細胞外，M 蛋白質則呈現在登革熱病毒顆粒上(21)。登革熱外套膜蛋白質大小約為 60 kDa，是病毒形成外套膜的主要蛋白質成分。M 蛋白質可分為三個區段(domain I-III)：domain III 負責與宿主細胞受器辨識相關；domain II 則是催化病毒膜和宿主細胞膜的融合；而 domain I 則是負責組成 E 蛋白質的結構。病毒顆粒上的套膜蛋白質是以 trimer 的形式存在，當套膜蛋白與宿主受器結合後，可在細胞表面催化病毒包膜與細胞膜的融合，以促進病毒顆粒進入細胞而感染 (22)。

登革病毒之非結構性蛋白質(Nonstructural protein, NS)包括七種：NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及 NS5。Nonstructural protein1 (NS1)是一

種醣蛋白質，其氨基酸序列具有高度恆定性 (highly conserved sequence)，其中包括 12 個恆定性的 cysteine 殘基以及 1-3 個 N-linked 醣化序列(23)。一般而言，NS1 蛋白質可以被區分為兩部分，一為表現於被宿主的細胞膜表面的 mNS1 蛋白質；另一則為被分泌出細胞外的 sNS1 蛋白質。在哺乳動物細胞模式中，sNS1 會緩慢的分泌出細胞，但蚊子細胞則不會將 sNS1 蛋白質分泌出去 (24)。當感染登革病毒時，NS1 蛋白質會誘發宿主產生 anti-NS1 抗體，並且活化補體免疫反應 (25, 26)。NS3 蛋白質為第二大的登革病毒蛋白質，分子量約為 70，其氨基酸序列在大部分的黃熱病毒科中具有高度恆定性。NS3 蛋白質主要為參與 RNA 基因體複製的酵素成分。NS3 蛋白質具有三個功能，包括：蛋白酶 (protease)、螺旋酶 (helicase) 及 RNA 三磷酸活性酶(triphosphates activitase)(27)。NS5 蛋白質大小約 103kDa，主要功能與登革熱病毒核酸複製有關，具有二個功能，RNA 依賴性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase) 及甲基轉移酶(methyltransferase)(28)。其他的非結構性蛋白質 NS2A、NS2B、NS4A 以及 NS4B 蛋白質，主要是扮演 cofactor 或 coenzyme 的角色，參與病毒蛋白質切割、複製或幫助病毒存活等過程。

過去的研究認為人與病媒蚊間的傳播循環為是登革熱唯一的傳染途徑。但是後來的研究指出在馬來西亞與西非，另有猴子與病媒蚊間的傳播循環報告。此外，埃及斑蚊可在自然狀況下將登革熱病毒經卵傳至下一代，孵化後新登革熱斑紋體內也可偵測到病毒，的顯示登革病毒在自然界可以經卵傳遞(7-9)。此外，當登革熱患者回家休養後與家庭成員的互動性以及家庭成員得到登革熱的機率是否因此而提高，目前仍無類似的研究報導。

從疾病的症狀來觀察 (A)典型的登革熱(dengue fever; DF)將會顯現下列的臨床症狀以及病程：當人被帶有登革病毒的斑蚊叮咬而受到感染，潛伏期約 3-4 天，發病前 1 天至發病後 5 天間，病人血液中有病毒活動，稱之為病毒血

症期。在發燒的數小時至 12 小時前，可能有頭痛、厭食、背痛、僵硬、違和、臉部潮紅、蕁麻疹等前驅症狀，也會伴隨發燒、疼痛(包括：骨痛、關節痛、肌肉痛、背痛，而這些疼痛會使病患極為難受。所謂斷骨熱(breakbone fever)之稱就是為了形容這種劇型的疼痛而來)。發病後約 4-7 天，患者有明顯的疹子出現，先從手腳開始，進而擴散至軀幹。有些病患會有非典型的發疹，也有不發疹的。皮疹將於發燒末期，或退燒後消退，此時患者已經進入恢復期，體內產生抗體來中和該型別之病毒(8)。(B)登革出血熱(dengue hemorrhagic fever, DHF)與登革休克症候群(dengue shock syndrome, DSS): 當病人過去曾經感染過其它型別之登革熱病毒，再次感染時可能因抗體依賴的促進感染(antibody dependent enhancement, ADE)引起急遽的病況惡化(4, 8)。此外，登革病毒突變，也可能使毒性增加，導致登革出血熱或登革休克症候群。這時候病人出現不安、腹痛、四肢冰冷和發紺，並且出現明顯的出血現象，脈搏加快、血壓下降、甚至休克。根據高雄市衛生局統計在高雄地區 2011-2014 的登革出血熱的發生率為 1.83%, 5.91%, 5.71% 與 0.88%。根據世界衛生組織的定義，DHF 主要的特徵為 3-7 天的持續發燒、有出血、血小板低下(thrombocytopenia,  $PLT < 100,000$  per  $mm^3$ )和紅血球濃縮的現象(haematocrit increased by 20%)。由歸納統計的結果顯示，登革出血熱/登革休克症候群主要造成三個身體系統的異常，包含血管內皮系統、血球細胞系統及肝臟系統。但是登革熱病毒誘這三個系統異常的致病機制仍然不清楚，目前也沒有適當的疫苗來預防登革熱病毒的感染(8)。近年來登革熱病毒已經本土化且四型病毒都出現過，由於不同的登革熱病毒型交叉感染有較高的機率發展成登革出血熱，因此對登革熱病毒致病機轉的研究非常重要。

目前常用分子生物學的技術來鑑定登革熱病毒屬哪種血清型(serotype)與基因型(genotype)。血清型鑑定方面:常利用 RT-PCR 或 Real-time PCR 來增幅每種

血清型在 NS1 基因的高度保留區域，來判斷該病毒屬於哪種血清型(17, 18)。對於基因型(genotype)的鑑定常用的是 E (Env 套膜蛋白質)基因區域，利用 RT-PCR 以特定的引子增幅該基因全長再利用演化樹分析來判斷屬於哪一種基因型(29)。目前不同血清型可以進一步區分出不同的基因型，而同一種基因型又可以再區分為不同的次基因型(subgenotype)或是基因群(cluster)(17, 18)。欲了解患者之間傳播的關係與患者體內病毒的類種(quasispecies)的分佈，目前可以採用次世代基因定序(Next Generation Sequencing, NGS)的方式從 RT-PCR 增幅的大量基因片段中來找出具有意義的病毒基因片段(30)。

人類的單株抗體目前常使用 EBV 病毒來感染分泌抗體的 B 細胞，使其 immortalization，再利用連續稀釋法 (serial dilution)挑到 single clone 來產生單株抗體。EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)屬於人類皰疹病毒第四型(herpesvirus family, type IV)，其基因組是包裹在核殼體(nucleocapsid)中，病毒外膜上的醣蛋白質 gp350/220 會結合到 B 細胞膜上 CR2 受體進而感染 B 細胞(31)，當 EB 病毒進行複製時，會自發性的活化小部分潛伏感染狀態的 B 細胞產生具感染性的病毒顆粒。當 EBV 感染 B 細胞後，EB 病毒在細胞內則會呈現潛伏感染的狀態，EBV 的 DNA 會形成環狀(episome)，且鑲嵌入 B 細胞的染色體 DNA 中，並且與宿主 B 細胞共存形成“不死化”(immortalization)(32)。一般認為，休眠狀態的記憶性 B 細胞(Resting memory B cells)是 EB 病毒潛伏生存的地點。在正常的人體內，每百萬個 B 細胞中含有 1~50 個受到 EB 病毒感染的 B 細胞。在潛伏感染的 B 細胞中，只有大約 10 個病毒蛋白質會被表現出來，主要是為了幫助 EB 病毒在宿主 B 細胞內建立穩定的潛伏循環(latent infection)，跟隨著宿主染色體的複製而複製自己的基因體。本研究的主要目的為藉由 EB 病毒感染曾經感染過登革熱病毒後痊癒病人的記憶 B 細胞。藉由 EB 病毒促使 B 細胞不死化(immortalization) 進而建立 LCL 細胞株(lymphoblastoid cell line,

LCL)。LCL 可以被用來大量且沒有限制的產生人類單株抗體 (human monoclonal antibody, hMAb)，以提供後續的研究、治療或減輕登革熱病毒的感染症狀。

### **(子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫**

登革熱疫情流行有多項促發因素，影響因子包括：社區蚊子種類、埃及斑蚊密度、人口住宅密度、住屋及社區環境型態、氣溫雨量、大型孳生源多寡…等，高雄市位居南部熱帶氣候地區，人口、住宅密集，空運、港埠等對外交通經商往來頻繁以及外來的流動性人口眾多等因素，促成病媒蚊孳生源以及人蚊間互動俱增，一旦登革病毒入侵，疫情擴散速度總是較其他縣市快速，造就每年高雄市本土登革熱病例數約佔全國 9 成以上，隨著海溫增高、聖嬰現象及氣候暖化等全球性病媒版圖擴增，登革熱在高雄市已然成為每年必然需要面對的「地方流行病」。

克服前述防疫死角，高雄市政府擬定「高雄市都會區排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊計畫」，於 103 年 11 月分別取得本市 6 處海港海水，經實驗室先期試驗確定 15-30psu 的海水可於 3 小時內滅殺斑蚊幼蟲，並開始著手進行社區田間試驗，經初步研判，注入海水處約可維持一週不孳生斑蚊幼蟲，達到疫情發生時，即時、全面扼殺病媒幼蟲孳生之防疫目標。

### **(子計畫十一) 應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的斑蚊孳生源**

#### **(1) 政策或法令依據**

疾病管制局擬訂「重要急性傳染病防治」是為了要進行傳染病防治政策的效益評估，同時也透過發展防疫技術、傳染病病原及其防範機制之探研，

參考並運用先進國家經驗與作法，以達防疫專業化及資訊化，並配合傳染病防治法規之制（修）訂與管理制度之需要，以期望提升防疫服務之品質，並改善解決國內防疫工作的問題。

## (2) 問題狀況或發展需求

### a. 全球氣候溫暖化和蟲媒傳染病日益嚴重

全球溫暖化的趨勢，現在全球有將近半數的人口深受昆蟲傳播疾病的威脅，臺灣也遭受嚴重的蚊蟲孳擾與蟲媒傳染病的困擾。蚊蟲是全球目前危害最嚴重的病媒，它媒介了瘧疾、登革熱、日本腦炎、西尼羅、屈公病、裂谷熱和黃熱病等疾病。根據 2008 年統計指出，全球有 2 億 4 千 5 百萬的人口感染瘧疾，有將近 100 萬人因此死亡。計有 109 個國家的 33 億人口有被傳染瘧疾的危險，目前這些國家沒有疫苗可預防，藥物抗藥性的現象也極為嚴重。而登革熱部分，每年約有 5 千萬到 1 億的人口受感染，全球有 25 億人口飽受感染的威脅。這些疾病的盛行不僅重創國家的經濟發展，更造成人類生命的威脅。近來來，氣候溫暖化已造成的全球生態異常變化，包括美國本土家蚊媒介的西尼羅熱疫情和國內本土埃及斑蚊媒介的登革熱疫情等都揭櫫了蚊蟲媒介傳染病的重要性 (Githeko et al. 2000, 賴政宗、黃凱宏、許麗卿、舒佩芸、許昭純、吳和生 2008)。臺灣目前仍有埃及斑蚊、三斑家蚊和微小瘧蚊等重要病媒族群的分布，相關蚊媒傳染病不容小覷 (Wu et al. 2009)。此外，具次要病媒角色的白線斑蚊，已被證實能有效媒介屈公病，已知造成非洲留尼旺群島 255,000 人疑似感染和 200 人死亡；臺灣近年來也有 30 多例境外移入的屈公病病例 (Josseran et al. 2006, Huang et al. 2009)。

### b. 密集使用化學性殺蟲劑與蚊蟲產生抗藥性的警示與限制

化學殺蟲劑是滅除危害農業及公共衛生害蟲最立即且有效的方法。但是，長期倚賴、密集、廣泛且毫無限制地濫用殺蟲劑已經危害到環境中有益於花粉傳媒的昆蟲，並且篩選出殺蟲劑多重抗藥系性的蚊蟲。根據國內研究報告已證實蚊蟲已經產生了嚴重的抗藥性，九種常用的殺蟲劑成分已有八種產生程度不等的抗藥性（徐爾烈，2007；委託研究報告）。臺灣登革熱的本土病例與埃及斑蚊的分布有關，埃及斑蚊主要分布於南臺灣的都會區，若能根除埃及斑蚊族群，則本土登革熱幾乎不會發生；白線斑蚊則是全臺分布。臺灣由於經常性的久旱不雨、水資源系統分配不均、農務澆灌需要，民眾經常有蓄積雨水的美德和生活習慣，這些雨水收集容器往往成為人工的蚊蟲孳生源。另一方面，過度都市化的結果，民眾習慣性地在住家的室內和週圍擺設盆栽，一但疏於照料和管理，積水花器也會成為另一種蚊蟲孳生源。目前登革熱尚無四價的疫苗，主要以環境整理、孳生源清除為主要預防手段，一有疫情發生則啟動緊急噴藥的機制。

### c. 生物防治或生態控制蚊媒傳染病的策略與發展趨勢

蚊蟲的生物性控制方法並非速效，但可以達到環境永續、生態友善性的目標。利用病毒，細菌、真菌和魚類等提供新的生物防治，但效率上仍須評估。使用蘇力桿菌以色列變種 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) 來防治蚊蟲具顯著專一性成效，但因為菌體效力持續性不長，需耗費人力、重覆施用才能達到預期功效。微生物蘇力桿菌以色列品系 (*Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*, *Bti*) 已被證實具有良好的瘧疾病媒控制成效 (Fillinger et al. 2003, Fillinger and Lindsay 2006)。蘇力桿菌屬於微生物殺蟲劑，主要殺蟲機制為利用細菌體內產生的內毒素作為殺害蚊蟲幼蟲的工具。*Bti* 被活化後的毒素對於蚊蟲的毒害作用呈現高度專一性 (WHO 1999)。利用 *Bti* 僅針對雙翅目蚊蟲、

黑蚋、葷蚋之幼蟲，對其他生物並不會有不良影響，可維持穩定的生態平衡，且不會產生抗藥性 (Klowden et al. 1983, Becking and Chen 1998, Mulla et al. 2003)，目前已有國家在社區內推動 (Mukabana et al. 2006, Vanek et al. 2006, Majambere et al. 2007)。在國家瘧疾控制計畫中加入幼蟲防治方法，經證實在城市型的瘧疾防治是符合成本效益 (Maheu-Giroux and Castro 2014)。此外，生物性防治的概念在過往已有成功使用孔雀魚或蓋斑鬥魚的案例。

使用橈足類劍水蚤也是一項創新的生態防治工作。橈足類捕食蚊蟲的現象和特性早在二十世紀初期即被描述 (Daniels 1901, Hurlbut 1938)。科學家曾經在法屬波里尼西亞進行野外釋放中劍水蚤的實驗，結果顯示埃及斑蚊的幼蟲密度降低了 91%~100%，而釋放在人工水桶內的族群歷經五年仍然存活，樹洞或人工水井內的中劍水蚤也分別有 17% 和 48% 的存活率；此外，釋放於螃蟹洞內的中劍水蚤可以存活至少 47 個月以上，並使蚊蟲幼蟲密度降低了 90% 以上，成蚊密度也降低 75.6% (Riviere et al. 1987)。在澳洲的野外試驗也證實了中劍水蚤能有效防除蚊蟲的效果 (Brown et al. 1991)。在美國紐奧良的田間試驗中，以輪胎為孳生源的野外試驗也證實橈足類確實能降低或消滅白線斑蚊的族群 (Marten 1990b, a)。越南的實地防治經驗即是一個成功的案例 (Kay et al. 2002, Kay and Nam 2005, Nam et al. 2005a)。由於橈足類的生態棲息地 (habitat) 和小生境 (niche) 與蚊蟲的孳生地相互重疊，因此室內和野外的蚊幼蟲評估實驗相對重要 (Torres-Estrada et al. 2001, Nam et al. 2005b)。目前已知約有 15 屬 48 種的橈足類曾經在實驗室內進行試驗和評估，試驗對象多以孳生於容器的斑蚊或媒介重要疾病的蚊種，例如傳播登革熱的埃及斑蚊和白線斑蚊、傳播瘧疾的瘧蚊等，亞洲、大洋洲和澳洲一帶的研究論

文約有 20 篇，野外試驗也有 25 篇以上的研究報告 (Marten and Reid 2007)。生物性橈足類的防治方法使用簡單、作用專一性高，蚊蟲不會產生抗藥性、費用便宜、對其他生態物種傷害小、本身繁殖力強、建立當地的族群容易，可節省噴藥所需的藥費和人力，尤其適合發展中國家 (Williamson 1983)。使用當地的中劍水蚤種類既不破壞生態，也不會污染環境，相對人力、物力的投資都比較少。據估算：在越南進行 10 年的橈足類生物防治，平均每人每年的防治費用僅需美金 1.20 - 1.50 美金即可達到無埃及斑蚊的成效，反觀越南花在登革熱病患的經費則較高，二者相差約 150 - 500 倍。臺灣大學公共衛生學院已經在高雄地下室積水處展開劍水蚤先驅試驗，初步成效良好。

### (3) 本研究國內外相關研究之文獻探討

本研究在整合性病媒防治的架構下，規劃使用不會產生抗藥性的殺幼蟲劑或殺蛹劑，這類名為百利普芬 (2-[1-methyl-2-(4-phen-oxyphenoxy)ethoxy]) 的物質是一種穩定的芳香族化合物，結構類似昆蟲的一種生長調節賀爾蒙，它對哺乳類動物的傷害和毒性極其微弱 (FAO 1999)。因為青春激素類似物的穩定度比青春激素來的高，有更高的競爭力去競爭青春激素受體位置，百利普芬模擬青春激素在昆蟲體中的生理過程，並且為強勢有效的抑制了昆蟲的胚胎形成、幼蟲變態以及成蟲形成作用 (Dhadialla et al. 1998)。過往普遍使用在登革熱病媒蚊幼蟲的防治，緩效性釋放藥效且效果穩定持久良好，雙翅目蚊蟲尚未有抗藥性的報告 (Lee et al. 2005, Sihuinchá et al. 2005, Vythilingam et al. 2005, Nauen 2007, Ritchie et al. 2013, Suman et al. 2013)。

1994 年至 2009 年期間，泰國和秘魯的研究分別多次提及透過埃及斑蚊的接觸可以有效傳遞百利普芬至幼蟲的棲所，進而達到運送殺蟲劑至水體

而抑制蚊蟲發育羽化的功效 (Itoh et al. 1994, Dell Chism and Apperson 2003, Sihuincha et al. 2005, Devine et al. 2009, Gaugler et al. 2012)。在坦尚尼亞的瘧疾防治研究中，科學家首次發現喜戶外居的阿拉伯瘧蚊能有效將百利普芬藥劑顆粒攜帶至積水的環境，進而達到自動散佈百利普芬，進而消滅瘧蚊幼蟲的功效 (Lwetoijera et al. 2014)。日本科學家和義大利科學家分別證實白線斑蚊可以有效媒介百利普芬，並且應用在都市型的環境中，例如花店和垂直式墓園花台，目前實驗室和戶外研究工作都已有相當進展 (Itoh et al. 1994, Dell Chism and Apperson 2003, Sihuincha et al. 2005, Caputo et al. 2012, Gaugler et al. 2012)。尤其在顯微鏡下的超微結構，亦可觀察到百利普芬黏附於足部的現象 (Caputo et al. 2012, Ohba et al. 2013)。由於斑蚊喜好躲藏的環境已有詳盡研究 (Edman et al. 1997, Perich et al. 2000)，加上埃及斑蚊遷移距離有限 (Harrington et al. 2005)，是否能應用於人口集中的都會區？哪一類的都會區？值得進一步嘗試和開發。

事實上，百利普芬不只作用在幼蟲，成蟲暴露在百利普芬的環境中也會造成不孕 (Itoh et al. 1994)。在瘧疾防治的方法中發現：岡比亞瘧蚊接觸浸泡百利普芬的蚊帳後，成蚊壽命將縮短，甚至造成不孕的現象 (Ohashi et al. 2012)。這類效果在阿拉伯瘧蚊也有類似的成效 (Harris et al. 2013)。至於百利普芬對埃及斑蚊或白線斑蚊生殖和壽命的影響則尚未有論文報告！

病媒綜合防治管理主要是結合孳生源清除和管理，以及各類是地勢性的生物防治技術來達到降低蚊蟲密度的目的。自 1987 年以降，推拉策略 (Push-Pull strategies) 首次由澳洲學者 Pyke 等人 (1987) 提出，應用在病蟲害綜合防治 (Insect Pest Management, IPM) 上，發現成效良好。

近期科學家強調使用推拉理論來強化病媒控制效果，廣義的推拉策略除了應用在害蟲之外，同時也能應用在益蟲之上。透過使用不同使行為改變的多種刺激組合方式，來操控害蟲（或益蟲）的分佈和數量來達到蟲害管理的功能（Samantha et al., 2007）。害蟲被以刺激物掩蓋搜尋宿主的能力、以忌避劑及遏制劑使遠離宿主（推-Push），並佐以高度吸引物質誘引至他處（例如：trap 或 trap crops）使遠離宿主（拉-Pull）進而將之撲滅。推拉策略的防治方法除了實施在農業生產之外，近三十年來學者專家更試圖拓展在具有傳播人類疾病風險的獸醫昆蟲學及醫學昆蟲之上，例如瘧蚊、斑蚊及吸血蠓。使用誘卵器符合”拉”的策略，而運送百利普芬至水體更符合”推”的精神（Caputo et al. 2012）。

本研究應用在整合性的病媒管理技術中，不僅可防治幼蟲（Estrada and Mulla 1986, Amalraj et al. 1988, Xie et al. 2015），還可以防治成蟲，可以說是兼具雙重功效，預期可以有效降低病媒蚊密度，減少感染登革的風險（Killeen et al. 2000, Morrison et al. 2008）。

#### **(4) 本計畫與防疫工作之相關性**

消滅登革熱必先消滅或降低病媒蚊密度，臺灣的埃及斑蚊族群主要侷限分布於嘉義布袋以南（或北回歸線以南），登革熱防治單靠個人是無法成功的，必須透過國人和社區全體動員才有辦法達成。生活是一種體驗，全球氣候異變，乾旱和缺水逐漸成為趨勢，民眾因為生活需要而有儲水的習慣，但無意間讓儲水容器成了孳生源。地方政府該協助民眾改善水資源分配和儲水系統，讓在地生活更正常化、更精緻化（蔡坤憲 2008）。近幾年南臺灣孳生源清除似乎已見成效，斑蚊因為找不到人工容器產卵，進而轉向地下室積水、工地積水或隱藏性的孳生源。有鑑於積水地下室和田間農用儲水器的斑蚊孳生情況，目前已可透過中劍水蚤生物防治斑蚊幼蟲，降

低斑蚊族群，本研究團隊過往已有成功防治經驗。然而針對隱藏性孳生源，目前暫時無有效對應策略。

過往針對病媒蚊 ” 幼蟲” 防治所使用的昆蟲生長調節劑 (Insect growth regulator; IGR)，近來已有研究指出：昆蟲生長調節劑在 “成蟲” 也扮演角色，一方面降低蚊蟲成蟲壽命，另一方面減少其產卵的數量。中央、地方衛生單位與學術機構應支持深入研究分析其應用性與評估其可行性，同時透過相關實務親身力行之過程，於登革流行區奠基基礎登革知識。以強化『整合性病媒防治』理論、研究、實務、育成和政策之連貫性和發揮效益 (Foster 1996)

#### (子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究

登革熱 (dengue fever) 是一種僅次於瘧疾的重要蟲媒傳染病，流行於熱帶及亞熱帶地區。罹患登革熱時症狀類似感冒，有發燒、骨骼肌肉酸痛、胃口不佳、出疹等症狀；而嚴重的登革出血熱 (dengue haemorrhagic fever, DHF) 或登革休克症候群 (dengue shock syndrome, DSS) 除了具有上述症狀之外，還有致命的危險；目前每年約有五十萬個出血性登革熱病例和超過約兩萬五千個死亡案例。其主要流行區為南、北回歸線間的熱帶地區，高風險流行區則為包括台灣在內的東南亞與中南美洲等國家。二次世界大戰後登革熱疫情急速加劇，過去 50 年間增加約 30 倍的罹患人數 (WHO, 2012)。根據文獻的記載，台灣地區曾在 1915、1931 與 1942 年發生全島性登革熱流行。1981 年因缺水儲水與漁船往返菲律賓頻繁等問題再度於在屏東縣琉球鄉爆發第二型流行，並於 1986 年蔓延至台灣南部，從此之後南部地區每年都有登革熱病例發生，至 2014 年更出現高達 15,732 例患者的嚴重疫情 (Anonymous, 2003)，使得登革熱防治成為台灣必要的防疫課題。

由於目前並無預防登革熱的疫苗與治療處方藥劑，且人與病媒蚊間的都市型傳播循環並無其他儲備宿主，因此登革熱的防疫只能仰賴病媒蚊的管理與控制。登革熱病毒主要藉由埃及斑蚊與白線斑蚊所傳播 (Scott et al., 1993; 2000; Gubler, 1998; Hamington et al., 2005)。Kay and Nam (2005)指出越南防治登革熱策略為衛教宣導、幼蟲棲地管理、劍水蚤生物防治、志工參與等。綜合目前針對登革熱病媒蚊的防治策略大抵有：(一)環境管理，例如病媒蚊孳生源清除；(二)生物防治，例如利用箭水蚤與食蚊魚捕食病媒蚊幼蟲(Riviere and Thirel, 1981; Ram and Hwang, 2006)；(三)物理防治，例如裝置紗窗紗門；(四)化學防治，例如預防性投藥(intermittent preventive treatment) (Vashishtha, 2008)與緊急噴藥等；其中又以化學防治最常使用。然而長期仰賴藥劑防治，已使得傳播登革熱與出血性登革熱(dengue haemorrhagic fever, DHF)的主要病媒蚊埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)對亞培松、安丹與百滅寧等常用防治藥劑產生抗藥性(Mazzarri and Georghiou, 1995; Lima et al., 2003; Lin et al., 2003; Somboon et al., 2003; Luna et al., 2004)，嚴重威脅登革熱的防疫效果。因此，各國病媒蚊防治學家均致力於研發新的防治技術或替代方案，包括以基因改造蚊蟲降低病媒蚊密度或抑制傳毒能力、利用含有產卵刺激物的誘蚊產卵器誘殺懷卵雌蟲(Ponnusamy et al., 2007; Barbosa et al., 2010b) 或含有毒餌的誘蚊器誘殺雄蟲或剛羽化的雌蟲 (The 58th annual meeting of ESA, 2010) 以及推拉系統 (push-pull system) 降低室內的病媒蚊成蟲 (Menger et al., 2014)等。

埃及斑蚊與白線斑蚊懷卵雌蚊多於傍晚產卵，性喜分粒單產，產於水面上緣約1~2公分處之粗糙器物表面，即為容器內壁處。成蚊之飛行範圍多於孳生地附近50-150公尺間。其中白線斑蚊多於戶外活動，常選擇於天然積水容器中產卵，如積水之樹洞、竹筒、葉鞘、窪地等，亦可產卵於其

他戶外積水容器中。埃及斑蚊則多選擇人工積水容器產卵，也比較具有室內產卵的習性。在巴西一處登革熱疫區的市區住宅，進行住家內的病媒蚊種類調查，結果在所捕獲的 1320 隻雌蟲中，埃及斑蚊有 1311 隻，只有 9 隻白線斑蚊，顯示該都會區埃及斑蚊為一種習性偏好進入室內的蚊種 (Rodrigues, et al., 2015)。Koh et al. (2008)指出登革熱病媒蚊幼蟲孳生地有一半在戶外，幼蟲孳生源主要為廢棄容器、溢流水、結構物積水等，主要 5 種埃及斑蚊幼蟲孳生源為居家盛水容器、花瓶、廢棄容器、花盆盛水盤、屋頂排水溝；白線斑蚊幼蟲孳生源前 5 名依序為廢棄容器、居家盛水容器、花瓶、凹處積水、帆布/塑膠布積水；病媒蚊指數則以獨立院落式住宅較高，大廈、公寓次之。其中屋頂可能也已經成為斑蚊幼蟲的主要孳生源之一 (Saleeza et al., 2011)，Gustave et al. (2012) 在 Guadeloupe 的監測調查指出，屋頂排水溝槽已經成為埃及斑蚊幼蟲重要孳生源，且其幼蟲陽性率可以從雨季時的 17.2%，上升到乾季的 37.5%。

因此在斑蚊偏好產卵的適當地點擺放可供雌蚊產卵的積水容器，即可發揮誘引懷卵雌蚊前往產卵的功效，繼而發揮降低病媒蚊棲群密度的防治目的。有效運用懷卵雌蟲誘捕的滅蟲技術可以是有效的登革熱病媒蚊防治技術，其優點為施做簡單、成本花費不高、施行技術門檻低、可具體發揮防治功效、且現階段立即可行的方法等，尤其適合都會區的埃及斑蚊防治 (Reiter, et al., 1991; Regis et al., 2008; Morrison et al., 2008; Zhang and Lei, 2008)。利用產卵誘集器添加有利幼蟲生存的氣味，可有效誘引雌蚊前往產卵，Reiter et al. (1991)進一步於誘集容器水中添加稻草浸液，亦可發揮更佳的誘集效果。然傳統的產卵誘集器，雖可以誘集蟲卵，降低田間蚊蟲密度，但多無防止產過卵之雌蟲飛出的設計，造成雌蟲快速將卵產出，容易進行下一次吸血，不但減短雌蚊營養生殖週期的時間，促進蚊蟲增殖、密度增加；在

有疫情發生時反倒成為助長登革熱流行的幫兇。因此產卵誘集器若能增設防止雌蚊脫出之設置，可防止雌蚊飛出而於他處產卵，如此可達到降低登革熱病媒蚊在環境中的蔓延孳生，繼而達到阻止疫病傳播的效果(Russell and Ritchie, 2004; Morrison et al., 2008; Regis et al., 2008)。Ritchie et al. (2003) 於田間的比較性試驗顯示，黏性產卵誘集器相較於傳統產卵誘集器有更多的優點，如誘捕蟲體有效性、可由蟲體立即辨識蚊種而非經由卵或幼蟲期辨識的快速性、管理方便、順道捕捉熱帶家蚊等。他們進一步指出這套系統除可做為社區蚊病媒蚊密度監測與防治之外，上可應用於港口、機場、甚至交通工具上做為關口檢疫之利器。另一種 autocidal gravid ovitrap (AGO) 被設計成可在田間使用至少 8 週，且不用任何管理的黏性/誘卵容器，由於加大容器尺寸、改變誘集裝置顏色、誘集器開口處加大、增加裝置內水表面積、添加誘引氣味等；報告指出 AGO 在環境中對於埃及斑蚊捕捉率可增加為 3.7 倍(Andrew et al., 2013)。然 Chade and Ritchie (2010) 則指出使用黏性產卵誘集器會因為死亡壓力性產卵，而增加埃及斑蚊產卵量。有鑑於此，應用黏性產卵誘集器，應設計阻隔裝置，避免蚊卵掉落至水中，形成另一個孳生源之虞。此外，斑蚊雌成蟲具分散產卵的習性，懷卵雌蚊通常不會將所有的卵產於同一地區，而會逐次於合適之處將體內的卵分批產完；其中白線斑蚊的產卵分散性較白線斑蚊為高(杜，私人通訊)。亦即懷卵雌蚊產卵時具有積水容器分散性，Reiter (1996)指出懷卵埃及斑蚊會以少量產卵方式將卵產在許多積水容器中，田間懷卵雌蚊的產卵行為出現在吸血後第七天，相較於實驗室的 3 天結果顯示田間雌蚊營養生殖週期較印象中的長，且一隻懷卵雌蚊於一次營養生殖週期間其產卵範圍可達 800 公尺遠。

基於以上論述，在登革熱疫區施以雌蚊/產卵誘集器的滅蚊策略，再配合環境孳生源減量、清除的管理手段，即可具體發揮雌蟲誘殺功效，達到降低

田間病媒蚊密度，有效防止疫情之目的。然而好的防治策略與技術，仍有賴施行層面的良善管理，為達到誘集器施放數量最經濟、方便管理又能發揮最大防治成效，有必要對誘卵容器的施放數量、施放地點、施放範圍等，進行基礎研究，讓此防治技術施行時能有所依據；如此方可發揮最佳的防治功效。而台灣在這方面的研究並不多，因此本計畫擬在高雄、台南、屏東等地區對於懷卵雌蚊產卵習性、產卵場所偏好、分布的瞭解，結果將有助於防治技術之提昇，同時發展適合台灣登革熱病媒蚊蟲防治的具體方法。

產卵誘集器在台灣南部地區的應用多為學術研究單位進行登革熱病媒蚊棲群密度監測，而除特定大型活動外，並無系統性的採用於登革熱病媒蚊的防治。而即便是如此，亦經常有產卵誘集筒遺失、被移位、民眾誤會是人為製造孳生源等缺點。顯示要在台灣南部地區施行產卵誘殺筒防治病媒蚊，仍有改進與努力的空間。因此，本計畫依對埃及斑蚊習性之瞭解，擬在容器空間、容器尺寸、容器隔區、容器色彩、容器外型等進行設計改進，尤其是加入都會區文創元素，朝向研發既具滅蚊功效、可被民眾接受、又可成為新都市景觀的複式雌蚊/懷卵雌蚊產卵誘集器；以期發揮長期防治登革熱病媒蚊蟲的具體功效。

### **(子計畫十三)建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略**

台灣地處亞熱帶地區，高溫潮濕環境，更利於蚊蟲滋生繁衍；尤其南部地區，終年可見蚊蟲傳播疾病的發生，近來年埃及斑蚊及白線斑蚊所媒介之登革熱更是年年發生，且有越來越為嚴重的趨勢，為了有效遏止蚊蟲的族群密度，每年環保、衛生單位皆須定期全面噴灑化學殺蟲劑劑，然而化學合成殺蟲劑具有危害人畜健康，污染破壞環境之缺點；隨著化學農藥

的開發與利用，雖然解決一部份的蟲害問題，但長久使用化學藥劑以後——害蟲抗藥性、食物殘毒、生態污染等副作用陸續發生；對地球永續利用與生物多樣性的傷害，已到令人瞠目結舌的地步，如何善後，已經是刻不容緩的問題。台灣由於地理環境及氣候因素，成為病媒蚊之溫床，導致多種病媒蚊媒介之傳染疾病，成為公共衛生之重要問題，威脅民眾健康甚巨；尤其是埃及斑蚊及白線斑蚊媒介之登革熱成為每年流行之傳染病；雖然每年防疫單位動員相當多之資源，還是無法有效降低登革熱之流行風險，因此，必須尋求其它更為有效之防治方法。

過去，登革熱病媒蚊之防治，主要著重於環境整頓，清除積水容器等，藉以減少蚊蟲幼蟲之滋生場所；在疫情發生時，亦會針對成蟲，噴施化學藥劑，然化學藥劑容易造成環境污染，防治成效亦有限。因此，本計畫擬參酌國外研究趨勢與成果，研擬登革熱病媒蚊之非農藥防治新技術，提供防疫單位作為病媒蚊防除之依據，期能有效降低登革熱之流行。

未來利用蚊蟲共生細菌 *Wolbachia* 及基因轉殖蚊皆是新穎生物防治方法。利用蚊蟲共生細菌 *Wolbachia*，目前東南亞登革熱流行地區包含 越南，印尼及澳大利亞皆已進行田野試驗。基因轉殖蚊技術已有報告指出在大開曼群島 (Grand Cayman)、馬來西亞 (Malaysia) 以及巴西 (Brazil) 等登革熱盛行地區進行田野釋放，其近期施放實驗對環境衝擊與埃及斑蚊族群的動態監測。且巴拿馬 (Panama)、菲律賓 (Philippine) 以及美國佛羅里達州 (Florida) 等防治相關單位，皆對此防治策略提出研究計劃。

利用蚊蟲共生細菌 *Wolbachia* 的策略，乃利用共生細菌 *Wolbachia* 感染宿主對生殖細胞有一細胞質不容性，即僅有同為感染的生殖配子結合才會產生子代。理論上可將原有病媒蚊族群依此機制置換成同為被感染的族群。由於報導指出感染的埃及斑蚊同時會降低登革熱病毒複製效率，所以可

以利用此方法降低登革熱流行風險。所謂 *Wolbachia* 感染宿主產生的細胞質不親和性，是指感染 *Wolbachia* 的雄性個體的配子，與未受感染雌性個體的卵子結合後，結合的胚胎無法孵化成蟲。根據已的資料顯示，細胞質不親和性形成的方式有單向性 (unidirectional) 以及雙向性 (bidirectional) 兩種。單向性指的是細胞質不親和性的形成由單一品系 (群或亞群) 所決定，亦即只有被感染的雄性與未感染的雌性交配，才會出現細胞質不親和性，反之則可得到有存活能力的子代。若是由於雄性及雌性個體分別感染不同品系 *Wolbachia* 而導致的細胞質不親和性，則稱之為雙向性不親和性。

過去有兩種 Strain 為 wMelPop 及 wMel 廣為應用於田野試驗。wMelPop 從它的原來自自然界中的宿主果蠅所純化及培養，再轉移到另類宿主埃及斑蚊，*Wolbachia* 得連續通過為期 4 年體外細胞培養加以馴化，待於適應蚊子細胞內環境，再以注射方式移植於蚊體內轉染。但每十萬埃及斑蚊胚胎，經微量注射後僅得到兩個穩定 wMelPop-CLA 品系，但穩定 wMelPop-CLA 品系可產生近 100% 的母系垂直傳染能力。值得注意的是，wMelPop-CLA 感染的蚊子壽命減少大約 50%，顯示感染此品系會造成極強的體適能耗損。但感染也會造成蟲媒疾病控制上的一個優勢，就是感染 *Wolbachia* 同時也會引發自體的抗病毒反應。某些 *Wolbachia* 菌株可以引發對抗昆蟲病毒的反應。如果蠅病毒 (DCV)。*Wolbachia* 的感染被證實也會干擾了包括線蟲和細菌，病毒如登革病毒和曲弓病毒的複製，甚至也可對抗瘧原蟲。對登革病毒的抑制效果已有多篇報導。是極具發展優勢兼具可行性的新興防治方法。*Wolbachia* 菌株干擾多種病原體的機制尚不清楚。推測和上調抗微生物肽和先天免疫反應有關。但由於 wMelPop-CLA 感染的蚊子體適能耗損過大，再利用此品系以置換族群，在施行上恐有困難。澳

洲研究人員於 2011 改以另一較低體適能耗損品系 wMel，以取代原有的 wMelPop-CLA。希望能兼具 Wolbachia 的感染引發的抗病毒特性，且 wMel 相對較低體適能耗損，來提高轉換抗病族群的效力。其結果顯示 wMel 確實有雙重效果；既可轉換族群也具抗病能力。目前由 Dr. Scott O' neill 團隊所組成的國際團隊皆以此品系為施放材料。

近幾年另有一國際團隊，主持人為美國密西根州立大學(Michigan State University)微生物與分子遺傳學系(Department of Microbiology and Molecular Genetics)的奚志勇教授(Prof. Zhiyong Xi)，該團隊使用分離自白線斑蚊(*Aedes albopictus*)的 Wolbachia (wAlbB strain)，近幾年在田野試驗中的結果，發現對病媒蚊的族群降低有非常顯著的效果，尤其是 2014 年起在廣州沙仔島的野放，在 2016 年初的評估，已造成該島白線斑蚊族群降低 95%，另外該團隊已跟墨西哥政府簽訂野放計畫，將進行埃及斑蚊的田野試驗，因此，我們引進奚志勇教授團隊所使用的 Wolbachia (wAlbB strain)，應用在埃及斑蚊體內，希望能在台灣建立 Wolbachia 應用的標準流程。

另外，本計畫將利用具高解析與多光譜偵測功能之多軸無人飛行載具(UVA)，進行都市生態系中病媒生物孳生源的偵測作業，並配合都市規劃發展的發生熱區進行評估與預測，以協助整體防治策略的擬定。台灣都會人口集中的現象即隨經濟發展而漸趨明顯，近 40 年來，人口淨增約 1400 多萬人，且大多數是都市人口增加；因此，各大小城市往郊區膨脹，甚至大量開發山坡地。目前城市人口佔全部人口高達 80%以上，城市發展至今，台灣地區的人口大量集中於台灣西部地區，並集中在城市地區，又逐漸發展出六大都會區（台北市、新北市、桃園市、台中市、台南市、高雄市），六大都會區的面積約占台灣地區的 30%，但居住人口高達 70%，其都市發展、產業、經濟活動、人口密度之高，為台灣之最。但因應城市規模不斷變更

與擴張（老舊社區更新、重劃、衛星新市鎮開發等），提供足夠的生活空間與機能（衛生下水道、都市生態綠帶、資源回收等）更是台灣目前主要都市發展非常重要的課題。另因都市化發展人口集中，都市新興(再現)有害生物與病媒傳染病的問題也需要更積極面對。這些都市生態系(Urban Ecosystem)中病媒生物(Vector)，往往會伴隨這都市化的發展系統潛伏拓展與爆發，而提早建立偵測與預警的系統是需提早建立。在台灣與都市化極為密切相關病媒生物，就以傳染登革熱的埃及斑蚊與白線斑蚊最為重要。而埃及斑蚊與白線斑蚊均有依附人類都會發展的特性，其拓展與爆發的原因除環境因子(環境變遷暖化)外人為因子的影響更為顯著與密切，這些都市生態系統包括：都市生態綠帶(公園、行道樹、綠帶)、都市排水系統（污水系統、雨水排水系統）、都市資源管理系統（土地開發與營建土方、垃圾、資源回收、閒置空地）、都市氣候（都市熱島、都市微氣候）及都市人口結構（夜市、老人社區、加工區）。登革熱病媒蚊埃及斑蚊於都市環境中滋生源的清除是登革熱防治的根本，孳生源便是滋長斑蚊的積水容器，斑蚊孳生源的清除是需要民眾與政府共同配合執行才有成效的，但環境中除居家內外環境、公共環境(如學校、廟宇、公園等)與建築基地等環境能有效執行外，仍有許多不容易以人力執行清除的灰色地帶，如有圍籬阻隔荒地、竹林、樹林、邊坡地、溪邊等，往往成為隱藏性且重要的斑蚊孳生源。但這些地區都有環境複雜、雜草叢生、環境阻隔、地形較為崎嶇，而使人員難以到達或耗費人力。

以多軸無人飛行器上之高解析影像與視傳系統及紅外線、多光譜儀(Multispectral)與高光譜儀(Hyperspectral)接收裝置於低空對大範圍孳生源進行偵察與監測，如透過HD畫質與高光譜裝備之影像辨識，是可以大大的解決這些都市生態系(Urban Ecosystem)中複雜且不易處理病媒生

物 (Vector) 的孳生源環境的偵測監測與預測。目前已應用多軸無人飛行載具(UAV)搭載輕量化多光譜相機(light-weighted multispectral camera, MicaSane 公司出產之 RedEdge) 進行都市生態系(Urban Ecosystem)中複雜且不易處理病媒蚊孳生源積水容器偵測的模擬測試。一般而言，水體會吸收近紅外線以及中紅外線(NIR, MIR)，而在可見光區則有較高的反射率；此外，濁水的高反射區間偏向於紅光區而清水則在綠光區有較高的反射率。而利用水對綠光區以及近、中紅外光區的反射率的差異，目前我們可以透過以「歸一化水體指數 (Normalized Difference Water Index, NDWI)」來進行水體位置及範圍的提取。另外，我們還會可以利用「歸一化濁度指數(Normalized Difference Turbidity Index, NDTI)」來區分清水以及濁水。

#### (子計畫十四) 登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫

登革熱疫情主要發生於熱帶及亞熱帶地區，且以都市或都市周邊地區為主，目前全球約有 25 億人口居住在此區域而受到登革熱的威脅，其中約 70%集中在亞太地區。在過去 25 年，登革熱不僅向新的地理區域蔓延，流行疫情發生的頻次及病例數也大幅增加，伴隨登革熱重症發生地區及病例數也日漸增加。高雄市地處北迴歸線以南，為埃及斑蚊好發孳生地，根據台灣地區埃及、白線斑蚊分布調查統計分析初步結果顯示，高雄市埃及斑蚊密度位居全台之冠，且明顯高於南部其他縣市，加上本市為國際性港都，因異國聯姻、外勞引進、觀光旅遊、商務往來等因素，致使國際間交流頻繁以及人蚊間互動俱增，讓登革病毒侵入的危險性相對提高。一旦登革病毒入侵，擴散蔓延速度將較鄉村型地區快速，感染人數也會大幅增加，因此，高雄市每年都必須面對大小不等規模的登革熱疫情挑戰。

去(103)年全球 4 至 9 月平均氣溫及海溫皆創下 134 年以來的同期新高，

由於海溫增高、聖嬰現象及全球暖化導致高溫破百年紀錄，嚴重影響全球動植物生態及氣候環境，日本東京在睽違 70 年後再次爆發本土登革熱群聚疫情，一海之隔的廣東省病例數也突破 4.5 萬大關，本市同樣也受到影響，面臨前所未有的嚴峻疫情考驗。世界衛生組織表示，登革熱是全球傳播最快速的熱帶疾病，在全球暖化影響下，登革熱防治儼然已成為全球共同面臨的挑戰。

登革熱是一種「社區病」、「環境病」，如能有效減少社區中病媒蚊孳生源，則外來登革熱病毒的影響性將大幅降低。防治工作涉及全方位、多面向領域，透過本計畫除可積極監控病媒蚊密度及遷徙生態，有效降低疫病流行風險，亦可藉由多元化衛教宣導，結合各行政區環保志工、滅蚊志工及社區發展協會等同質性民間團體，自發性動員投入登革熱防治工作、維護自家周圍的環境。如此，才能達到事半功倍成效，使市民免於感染登革熱之恐懼。

#### **(子計畫十五) 血液製品之登革熱病毒偵測調查**

2015 年台灣發生 43784 個登革熱案例，是有史以來單一年度最多案例的一年。數個國外研究報告已指出多例因輸血而感染登革熱的個案，其中包含登革熱與出血熱(1, 2)，此外多個報告也指出在登革熱流行季節捐血者的血液樣品可以偵測到登革熱病毒的基因(0.06-0.4%)(2-5)，因此對於本土登革熱季節捐血中心血液樣品是否可能存在登革熱病毒顯得特別需要釐清。我們計畫以登革熱病毒快篩檢驗試劑與 RT-PCR 偵測血品中是否存在登革熱病毒 NS1/IgM/IgG 與病毒核酸等，整個研究將分析 8000 個血品樣本，包含台南與高雄捐血中心在 2015 年 9-11 月登革熱流行季節的血品樣本各 4000 個。

### (平台一)行政暨教育資源平台

本計劃涵蓋 15 個子計劃，故有必要設立一行政暨教育資源平台，此行政平台將負責各子計畫間之聯繫、互相協調支援，及相關計劃行政事務。已於 2015 年及 2016 年月舉辦兩場登革熱國際學術研討會，含學術交流及成果分享。將與高雄市政府衛生局及環保局定期開會討論，了解實務面與隨時修正研究與防治方向。同時將重要研究訊息即時反應給衛生局及環保局等防疫單位，以為環境防治時參考，平台一同時扮演研究及防疫間之橋樑。因此教育平台執行重點工作為：(一)子計畫連結平台；(二)病媒監測相關專業人員培訓；(三)國際研討會；(四)研究及防疫間之橋樑；(五)專業技術交流。

### (平台二)蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

子計畫(17 平台二)以設立標準蟲媒病毒感染鑑定實驗室為主要目標，內容包含設立標準作業流程與人才培訓，以取得疾病管制署與 TAFS 登革熱鑑定實驗室之認證，並提供登革熱疑似案例確診的技術平台作為協助國家登革熱疫情鑑定與防疫的一環。此外，本計畫還包含輸出登革熱診斷實驗室標準流程至國內外需要這些技術的單位，也藉由建立的方法執行 2015-2016 年回溯性與前瞻性的登革熱病毒型別之流行病學調查，最終本計畫還肩負協助其他子計畫人員訓練、技術與人力支援等任務。

### 三、研究目的

#### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

為了能發展由登革熱引起的人體特異性分子作為檢測和確認快篩的準確度。將以之目標進行此研究：

目標一：測試 PR1 蛋白的專一性。此研究由篩選登革病患的血清來執行，其他常見的發燒疾病的血清及正常的血清為控制及比較組。

我們會利用西方墨點法確認登革病患血清和健康人血清中 PR1 的表現是否專一表現於登革病患內，並進一步利用西方墨點法分析 PR1 是否會由登革病毒感染細胞群所表現。

目標二：臨床試驗登革快篩 PR1 蛋白的試劑。此臨床試驗是為了比較 PR1 蛋白的快篩試劑的準確性及和其他目前市面上快篩試劑的比較。

我們將以照醫療診斷或市面已快診斷之試劑相互比較 PR1 的準確性，進一步以統計分析的方式確認 PR1 偵測登革熱的準確度相較於市面上之試劑為高。

目標三：製造初期的登革快篩診斷模組。此研究世界由西方墨點原理來製造快篩模組，此模組會有 PR1 蛋白的抗體及登革病毒的抗原和登革病毒專一性的抗體。

我們將會製作初步快篩片，大量診斷臨床上疑似登革熱之病患血清，並統計和分析 PR1 試劑具有臨床診斷上的意義，進一步將洽談技術技轉的可能性。

## (子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色

目標一：登革病毒如何造成人類造血幹細胞功能性的喪失。此研究主要是用健康者捐贈的骨髓或者是臍帶造血幹細胞來做分析及機制的研究。

利用流式細胞儀分析登革病毒感染與分感染組幹細胞的細胞表面蛋白的變化，如 CD34,CD61,CD41a 等。並與病毒複製的情況一起評估幹細胞受到何種改變。

目標二：人體登革病毒型態的解析。此研究主要是用來自於登革病患者的檢體及直接在低溫電子顯微鏡來探討登革病毒在人體的病毒型態。

利用蔗糖梯度離心分離來至與登革病患體內的病毒和體外培養的登革病毒，進一步利用低溫電子顯微鏡來探討登革病毒的型態。

目標三：探討在不顯性感染者中人類造血幹細胞所扮演的角色。此研究主要是篩選人類造血幹細胞被登革病毒感染之後會繼續存活下來的細胞及其功能性的研究。

定期追蹤不顯性感感染者的周邊血液中易受到登革病毒感染的細胞群，並以流式細胞儀分選出這群細胞並進一步利用登革病毒感染後，觀察這群細胞的功能性和特性。

## (子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探—某醫學中心照護病例對照研究

本研究即是以單一醫學中心-高雄醫學大學附設中和紀念醫院，收集其 2014 年所收治登革熱確診個案為對象，進行前驅性探討，主要目的有三：

1. 比較登革熱確診輕症個案（非重症個案）與登革熱重症病患的人口學、臨床特徵以及實驗室的臨床特徵是否有差異。

2. 分析登革熱重症與非重症病患之臨床表現，包括是否有嚴重的血漿滲漏導致呼吸窘迫、嚴重出血、意識受損，心臟或其他器官衰竭等臨床症狀。
3. 了解感染登革熱重症患者的可能危險因子，以提供未來照護感染登革熱重症病患的預警措施。

#### (子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

本研究目的主要在於探討歷年來高雄市登革熱發生率與氣候因素及社經因素之間的關係及彼此的交互作用，同時釐清高雄市 2014 年氣爆因素或建案因素對登革熱的影響，建立分析模式，以利登革熱防疫決策的參考。

本計畫所要達成的目標如下：

1. 探討高雄市歷年來登革熱發生的規律性及週期性。
2. 藉由高雄市歷年來登革熱的發生個案數資料，釐清高雄市登革熱發生率與溫度包括最低溫度，最高溫度，平均溫度之間的關係。
3. 藉由高雄市歷年來登革熱的發生個案數資料，釐清高雄市登革熱發生率與濕度之間的關係。
4. 藉由高雄市歷年來登革熱的發生個案數資料，釐清高雄市登革熱發生率與雨量之間的關係。
5. 藉由高雄市歷年來登革熱的發生個案數資料，釐清高雄市登革熱發生率與布氏指數之間的關係。
6. 探討 2014 年高雄市登革熱發生率與 溫度、濕度、雨量、布氏指數、氣爆因素之間彼此的影響。
7. 藉由高雄市歷年來登革熱的發生個案數資料，來釐清氣爆因素對 2014 年登革熱的影響。
8. 討論 2014 年高雄市登革熱的發生個案數與社經因素之間的關係。

9. 探討不同社區 或行政區的居民是否因社經情況、城鄉差距、教育程度及環境病媒密度等之因子不同，而對登革熱瞭解及參與防治程度有差異性，藉以擬訂不同之防治方法及策略。

所要完成之工作項目如下：

1. 取得歷年 2000~2014 氣象學資料包括最低溫度，最高溫度，平均溫度，濕度，雨量，布氏指數。
2. 取得歷年 2000~2014 布氏指數資料且轉為 excel 檔。
3. 針對 2000~2014 年登革熱發生率資料進行分析，找出規律性與週期性。
4. 取得 2000~2014 年高雄市年終人口數，計算出登革熱的發生率。
5. 取得 2014 年高雄市社經因素的資料(經濟情況、城鄉差距、教育程度等資料)。
6. 針對不同社區 或行政區的居民進行問卷調查或電話調查，分析這些民眾是否因社經情況、城鄉差距、教育程度及環境病媒密度等之因子不同，而對登革熱瞭解及參與防治程度有差異性，藉以擬訂不同之防治方法及策略。
7. 進行統計分析
  - (1) 以 Spearman's rank correlation tests 計算出登革熱發生率與 氣候變項 (最低氣溫、平均氣溫、最高氣溫)、雨量、濕度、布氏指數的相關性。
  - (2) 以 Durbin-Watson test 去測試是否有週期性(autocorrelation)。
  - (3) 再以 spectral analysis techniques (periodograms)去評估約幾月為登革熱的一個循環。
  - (4) 最後以 harmonic regression with backward selection method 去驗證這些週期，決定以何種週期具有循環性 (SAS version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 。

(5) 以氣爆時間點前後切割，計算其氣爆前後之 Incidence rate ratios (IRR) 為何？

(6) GEE poisson regression models 去計算氣候變項包括（最低氣溫、平均氣溫、最高氣溫）、雨量、濕度、布氏指數、氣爆事件與登革熱發生率 Incidence rate ratios (IRR)，在不同年度間其 excess risks explained 為何？

(7) 分析不同社區 或行政區的居民是否因社經情況、城鄉差距、教育程度及環境病媒密度等之因子不同，而對登革熱瞭解及參與防治程度有差異性。

8. 成果報告的撰寫。

9. 進行文章的撰寫與投稿。

### (子計畫五) 重症登革熱之流行病學及免疫反應研究

本研究的具體目的如下：第一，探討重症登革熱不良預後之危險因子及所併發的感染症對於臨床預後之影響。第二，探討在重症登革熱病人族群預後預測因子與存活量表之開發。第三探討登革熱病毒感染對於免疫系統之影響性。希望可以提供臨床醫師具實證且精準之台灣當地的流行病學資訊，作為臨床決策之依據，藉此提升登革熱的治療成效。

### (子計畫六) 抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然藥物研發

1. 研究計畫之重要性及目的

研究計畫之重要性：

登革熱每年於全球感染病例不斷提升，從 2008 年到 2013 年為止，每年

感染人口從一億[1]到 3.9 億人口[2]，並且有隨著全球氣溫上升而往較高緯度擴散的趨勢，例如 2014 於台北市就通報了首例本土登革熱病例。但目前臨床上尚未有針對登革熱的藥物或疫苗[3]，因此開發可抑制病毒感染及紓緩登革熱症狀之藥物刻不容緩。

研究計畫之目的：

- (1) 建立高通量藥物篩選平台並尋找可影響 HO-1 及 COX-2 活性之天然物或小分子藥物，以篩選具潛力之抗病毒藥物。
- (2) 建立高通量藥物篩選平台並尋找可抑制登革病毒蛋白酶及聚合酶之天然物或小分子藥物，以篩選具潛力之直接抗病毒藥物(direct antiviral agents)。
- (3) 於 ICR 登革感染動物模式中探討上述天然物及小分子藥物於活體中的抗病毒活性。

## 2. 研究計畫背景

### (1) 登革病毒及登革熱簡介：

登革病毒(Dengue virus, DENV) 是黃熱病毒科 (Flaviviridae family) 黃熱病毒屬 (Flavivirus)的病毒，又可分為四種血清型：genotype 1，genotype 2, genotype 3 及 genotype 4[4]。登革病毒基因體 RNA 長度約 11kb，兩端各有 5' 端及 3' 端非轉譯區，中間則是單一開放閱讀區 (single open reading frame, ORF)，可被轉譯成一條長條多胜肽鍊 (polypeptide)，接著再被宿主或病毒本身的蛋白酶切割成不同功能的蛋白質：結構蛋白 (structural protein)及非結構蛋白 (non-structural protein)。結構蛋白為：核蛋白 (core, C)、前驅膜蛋白 (pre-membrane, prM)、套膜蛋白 (envelope)；非結構蛋白為：NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5。5' 端非轉譯區 (5' UTR)及 3' 端非轉譯區 (3' UTR)在病毒 RNA 的複製及轉譯扮演了重要角

色[5]。其中，NS3 與 NS5 對於病毒複製非常重要。NS3 具有蛋白酶活性，NS2B 為其輔助因子(cofactor)，主要功能為將轉譯出來的長條多肽鍊切割形成不同的成熟病毒蛋白質，對於病毒蛋白質成熟非常重要[6]。NS5 則具有 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)的功能，能將病毒 RNA 大量複製以製造更多可供轉譯病毒蛋白質的模板(template)以及形成新病毒顆粒所需之病毒基因體 RNA，對於病毒複製非常重要[7]。C 型肝炎病毒新型藥物 Sofosbuvir 即是 C 型肝炎病毒 RdRp 抑制劑，目前已通過美國 FDA 認證投入臨床治療[8]，因此，於本計畫中將以 NS3 及 NS5 做為抗病毒藥物標靶進行藥物篩選。

## (2) 登革病毒臨床症狀及治療：

登革熱又稱天狗熱或斷骨熱，被帶有病毒的蚊子叮咬後，症狀出現前二天至發病後五天，血液中可偵測到登革病毒，此階段稱為「病毒血期 (viremia)」，此時若被蚊子叮咬，則病毒就會在蚊子體內複製，八至十五天後此蚊子終身都具有傳染力[9]。典型登革熱的症狀為發燒、頭痛、後眼窩痛（轉動眼球或按壓眼睛，眼窩會劇烈疼痛）、關節肌肉痠痛、噁心、皮膚出疹子等症狀。通常第一次感染症狀為典型登革熱，臨床上醫師會採取支持性療法，通常兩週後會自行痊癒，並產生抗體，終身對該型登革病毒具有免疫力(但對其他型病毒無保護作用)[10]。大部分第一次感染登革熱的病人只會有典型登革熱，能自行痊癒，但有少部分第一次感染的病人即出現了登革出血熱症狀。當感染過登革熱的病人再次被不同型登革病毒感染，多半會惡化形成登革出血熱。登革出血熱症狀除了典型登革熱的發燒、眼窩痛等症狀外，還併有出血傾向如止血帶試驗陽性、瘀斑、黏膜出血、血小板數量減少以及因血管通透性增加而導致的血漿滲漏。若出血症狀嚴重，則可能演變成登革休克症候群，

病人脈博微弱、血壓過低、四肢冰冷、皮膚濕冷甚至休克[11]。目前臨床上並無治療登革熱之藥物或療法，對於登革出血熱/登革休克症候群皆只採用支持性療法。

(3) 第一型血紅素氧化酶(HO-1)簡介及病毒誘導氧化壓力對病毒複製之影響：

血紅素(heme)在體內會透過血紅素氧化酶代謝分解。當細胞內氧化壓力提高時，HO-1 會被誘導大量表現並降低細胞內氧化壓力，保護細胞不受氧化壓力的傷害。對於 HO-1 抑制病毒的相關研究中，有文獻指出與登革病毒同為黃熱病毒科的 C 型肝炎病毒患者肝臟的 HO-1 表現量與正常人相比有顯著差異[12]，且 HO-1 也被證實能夠抑制由 C 型肝炎病毒誘導之氧化壓力所造成之肝臟受損[13]。HO-1 會將血紅素分解並產生三個產物：膽綠素(biliverdin)、一氧化碳(CO)及鐵離子( $Fe^{3+}$ )，膽綠素會接著被膽綠素還原酶(biliverdin reductase, BVR)轉成膽紅素。其中，膽綠素及一氧化碳已經有文獻指出可抑制發炎且為有效抗氧化劑[14]，並且也被報導可直接與 C 型肝炎病毒的 NS3 蛋白酶結合而抑制 NS3 蛋白酶活性，進而達到抑制病毒的效果[15]。於本計畫中，我們藉由 NGS 分析，發現 HO-1 的表現於登革感染的細胞內有被抑制的狀況，且本實驗室已初步證實 HO-1 對於病毒複製之調控機制，於本計畫中將進一步以 HO-1 做為抗登革病毒藥物之標靶進行藥物篩選。

(4) 第二型環氧合酶(COX-2)簡介及病毒誘導發炎反應對病毒複製之影響：

當細胞受到刺激而產生發炎反應，COX-2 會被大量誘導表現並產生 prostaglandin 2 (PGE2)，同時使細胞大量表現細胞激素(cytokines) [16]。根據前人文獻指出許多病毒感染時會誘使 COX-2 大量表現，使細胞產生發炎反應以及使 iNOS 及許多 cytokines 大量表現，進而使病毒複製提高

[17]。本實驗室已發表論文證實 C 型肝炎病毒會誘導 COX-2 表現且 COX-2 幫助 C 型肝炎病毒複製，若將 COX-2 基因表現降解或以抑制劑抑制其活性，則 C 型肝炎病毒複製會跟著降低[18]。此外，根據文獻，登革病毒患者體內血液充滿高濃度的各種細胞激素，使病人血管通透性增加，目前被認為是造成出血症狀的原因，此現象又稱之為細胞激素風暴 (cytokine storm)，同時高濃度細胞激素也使病人各器官及血液中免疫細胞處於發炎狀態而導致損傷[19]，例如登革熱病患即有肝指數上升及血小板數量降低的情形。雖然目前尚未有文獻報導登革病毒與 COX-2 之間的作用，但本實驗室藉由 NGS 及相關實驗已初步證實 COX-2 與登革病毒複製息息相關，因此本計畫中將 COX-2 做為抗登革病毒藥物之標靶進行藥物篩選。

#### **(子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查**

目前有數種登革疫苗正在研發中，這些疫苗將由世界衛生組織評估效能，之後可被其他國家認可。疫苗的選擇與使用需要經過審慎評估，例如 Sanofi Pasteur's vaccine (dengvaxia)，建議在血清陽性率高於 50% 的國家使用。在本研究中，進行高雄市兩個行政區血清陽性率調查，可用於將來選擇引進疫苗種類的依據。

期望了解高雄市居民的登革熱感染盛行率與釐清初次感染者的四種不同血清型別的盛行率。並預期可以了解抗體陽性率與出生世代關係。於本研究中，也對受試者進行登革疫苗試驗意願調查，如將來高雄市進行登革疫苗試驗，期望可提供一些有用訊息。

### (子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗

對於登革熱的預防對於降低登革病毒的傳播是重要的，所以找尋具有引起保護能力的免疫因子對於登革熱的預防是一個值得被發展的策略，所以第一個目標便是尋找具有保護能力的免疫因子。因此本計畫第二個目標抗登革病毒藥物的開發。先天免疫反應是防禦病毒感染的第一道防線，許多研究也指出此免疫反應可以抑制登革病毒在細胞內的複製能力。牛樟芝是台灣天然獨特的植物，具有活化人體免疫能力，以抑制肝炎病毒的環狀cDNA的表現而對於肝癌是具有療效的功能，然而對於此藥物對於登革病毒的複製或感染是否具有抑制的功能，是值得被探討的，最後期望該藥物可以作為開發抗登革病毒藥物的標的，需要具有登革病毒能長期複製的小動物模式來評估前期臨床試驗的結果，然而現在缺乏能監測到登革病毒長期複製的小動物模式，最近擬人化小鼠已被作為對一些人類特有疾病的動物模式，因此第三個目標就是進行登革熱擬人化小鼠的開發。

### (子計畫九) 台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析

1. 從登革熱患者的血中分離出產生抗體的 B 細胞，利用 Epstein-Barr virus (EBV) 病毒使其不死化 (immortalized) 後，挑選出具有中和能力的人類單株抗體。
2. 分析 2014 高雄地區登革熱病毒的血清型與基因型。
3. 利用基因演化樹來了解登革熱病毒的來源與本土株/境外移入株的相關性。
4. 進行登革熱病患之家訪，以了解病患與家屬在同一個居住環境下的互動性與感染登革熱的相關性。
5. 分析登革熱患者恢復期血清的抗體持續的情形。
6. 回溯性與持續性的監控分析登革熱病毒的演化情形。

## (子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫

本計畫係為精益求精，考量以「引海水防治登革熱病媒蚊」之防治方法，若能將不孳生幼蟲的期間延長，可在長達數月的疫情期間，減少灌注的次數，將可有效節省防疫成本，並提高防治成效，爰計畫之構想，以海水搭配不同的防疫藥品，測試其滅蚊效果及最長有效期，實驗結果據以提供本市防疫策略制定之參考。

完成六種溶液扼殺登革熱病媒蚊成效測試，透過實驗分析佐證可行性，在成本及防治成效間取得最大利益，以做為日後登革熱防治政策參考及實務運用，並有效應用於防疫工作中。

階段性工作目標與工作項目

第一階段：完成實驗室之有效性測試

1. 海水梯度濃度滅孑孓有效性測試
2. 種不同成分之溶液滅孑孓效果測試
  - (1) 清水與生物製劑 BTI 或昆蟲生長調節劑、
  - (2) 清水與有機磷劑、
  - (3) 30psu 海水
  - (4) 海水與生物製劑 BTI 或昆蟲生長調節劑
  - (5) 海水與有機磷劑
  - (6) 對照組粗鹽

第二階段：擇定適當行政區進行分組有效性實地測試

人口密集度、社區型態等各項條件相似的環境中，擇定結構性積水排水渠或孳生病媒蚊之溝段，分組進行五種不同成分之溶液引海水防制病媒蚊實地測試，據以評估各種溶液實際放流之滅蚊效果並確認防治有效期。

**(子計畫十一)應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的  
斑蚊孳生源**

**(1) 評估蚊蟲生態防治新技術 (前六個月)**

- a. 掌握國際研究趨勢，建立『野生科技』和『推拉理論』之可行性做法，謹慎評估避免其對生態可能造成的衝擊和影響；
- b. 實驗室和戶外小規模試驗評估蚊蟲自動散播百利普芬的效率及其對蚊蟲壽命和繁殖的影響；
- c. 建立適地適性的標準作業操作流程。

**(2) 實務試驗落實『野生科技』和『推拉理論』的試驗和規劃 (第七月到第十八月)**

- a. 綜整評估實務試驗的成效與試驗過程阻力分析；
- b. 定期監測並透過第一線傳達孳生源管理及生態防治的訊息；
- c. 有效彙整成果供主管機關訂定試辦計畫之參酌。

**(一) 計畫要完成之工作項目**

**1. 評估國外蚊蟲生態防治新技術 (前六個月)**

- (1) 分析蚊成蟲接觸不同濃度百利普芬後，對登革熱病媒蚊成蟲壽命和生殖力所造成的影響；
- (2) 分析蚊成蟲吸食含不同濃度百利普芬糖水溶液後，對登革熱病媒蚊成蟲壽命和生殖力所造成的影響；
- (3) 分析蚊成蟲接觸時間與攜帶百利普芬的關係、攜帶能力和可滅殺幼蟲的劑量；

(4) 評估不同披覆材質黏附百利普芬的能力。

## 2. 實務試驗落實『野生科技』和『推拉理論』的規劃 (第七月到第十八月)

(1) 於高雄市三民區德智里 (實驗組) 和楠梓區加昌里 (控制組) 實地操作含百利普芬之蚊蟲誘卵桶；

(2) 監測和統計分析斑蚊幼蟲密度和蟲卵密度之變化；

(3) 建立完整工作內容之操作手冊，提供地方衛生單位參考使用。

### (子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究

Honorio *et al.*, (2009) 調查都市與其鄰近林區的埃及斑蚊與白線斑蚊的空間分布，指出埃及斑蚊為都會區優勢蚊種。Carbajo *et al.*, (2006) 進一步指出埃及斑蚊的空間分布與住宅密度相關，但並未針對都會區埃及斑蚊垂直空間分布進行研究，因此本計畫首先擬針對高雄市埃及斑蚊與白線斑蚊在都會區中的垂直空間分布，包括大樓公寓不同樓層與不同高度樹叢，進行不同季節的調查分析。另外，也針對懷卵雌蚊的產卵習性進行戶內模擬試驗與居家環境的實地調查研究。最後則進行幼蟲棲地調查，以確認登革熱病媒蚊以水溝或下水道為棲所的比例。相關結果將可提供都會區登革熱病媒蚊新監測方式，並作為研擬防治策略之依據。

### (子計畫十三) 建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略

1. 引進國際團隊已建立之立克次菌品系，以及建立立克次菌感染實驗室及田間試驗之標準流程。

2. 建立立克次菌感染之台灣本土埃及斑蚊品系

3. 測試病媒蚊感染立克次菌後之平均壽命，以及其對於登革病毒之感受性

4. 本土立克次菌品系之鑑定及建立

5. 利用多軸無人飛行載具（UVA）於小區域斑蚊孳生源防治與成效評估
6. 多軸無人飛行載具（UVA）於斑蚊孳生源防治上建立

#### （子計畫十四）登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫

高雄市每年都必須面對大小不等規模的登革熱疫情挑戰，為維護市民健康不受登革熱侵襲之威脅，本市在過去 10 年間，致力於各項環境整頓工作，並透過跨局處防疫資源整合及任務編組分工，成功建立市府登革熱跨局處運作機制，在嚴峻的境外疫情挑戰下，將疫情所致之衝擊降至最低。本計畫目標為：

1. 透過客製化、電子化的多元化衛教宣導，提升本市高風險地區民眾對登革熱認知程度，並賡續透過認知改變行為，以促達成降低病媒蚊密度及環境自我管理之目標。
2. 藉由人員聘用與培訓，培育本市登革熱社區衛教種子師資及病媒蚊密度調查人員，提升防疫機動性。
3. 減緩登革熱疫情發生及蔓延，避免登革熱疫情跨年度及本土化流行。

#### （子計畫十五）血液製品之登革病毒偵測調查

本研究預計使用醫療財團法人台灣血液基金會台南及高雄捐血中心之去連結之血液檢體，樣本分別包含 2015 年 9-11 月流行期的血清，以疾病管制署公佈的傳染病統計資料來選定特定區域的捐血中心的血液製品，由捐血中心留存流行區的檢體，由捐血中心提供去連結之血液檢體，整個研究將分析 8000 個血品樣本，包含台南與高雄捐血中心在 2015 年 9-11 月登革熱流行季節的血品樣本各 4000 個。本計畫預計以登革熱快篩試劑檢驗與即時反轉錄聚合酶鏈鎖反應（real-time RT-PCR）偵測登革病毒作，以檢驗登革熱流行期在流行區之捐血中心血液製品中的登革病毒陽性率，以

做為日後登革熱流行期間血液是否需篩檢登革病毒與選擇篩檢工具之參考。

### (平台一)行政暨教育資源平台

- 1.子計畫連結平台。
- 2.舉辦國際研討會暨國際合作平台。
- 3.研究及防疫間之橋樑與專業技術交流。
- 4.協助訓練國外醫檢人員登革病毒檢驗鑑定。
- 5.與友邦索羅門群島進行合作與交流：高醫熱帶疾病醫療暨防治中心於 103 年在索羅門群島設立南太平洋第一個 P2 等級登革熱診斷實驗室，我們將協助該實驗室診斷登革病毒感染，以達到防疫時效及適當的醫療處置。一方面訓練當地醫檢師有能力檢驗及維護使用此實驗室，以達專業技術轉移與交流，首次將 TAF 財團法人全國認證基金會 (Taiwan Accreditation Foundation; TAF)，帶進索羅門群島，訓練當地醫檢師能有品質管理概念，提升實驗室品質。

### (平台二)蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

1. 建立標準蟲媒病毒感染鑑定實驗室。
2. 登革熱疫情流行時，協助防疫單位登革熱確診。
3. 登革熱檢驗量能之國際推廣。
4. 將輔導至少 2 家相關機構成立登革熱檢驗實驗室，並申請疾病管制署認可通過。
5. 支援其他子計畫技術平台。

## 四、材料與方法

### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

#### 檢體來源

登革熱病人檢體的取得都已經通過高雄醫學大學附設中和紀念醫院所屬的人體試驗委員會 (960195)，對象為曾經到高雄醫學大學附設中和紀念醫院就診且被確診為登革熱病毒感染的 15 歲以上的患者。健康人檢體已經通過國立成功大學醫學院附設醫院所屬的人體實驗委員會 (B-ER-104-178)，對象為 20 歲以上成人。臍帶血細胞的取得通過國立成功大學醫學院附設醫院所屬的人體實驗委員會(A-ER-103-184)。所有的捐獻者都已經簽署人體試驗同意書。

#### 蛋白質體學分析

來至健康人或是登革熱患者的血清以 Amicon® Ultra Centrifugal filters, Millipore 將血清內的蛋白濃縮後，以定量 50ug 的濃度進行一維電泳的分析 ()，隨後利用 coomassie blue (Thermo,USA)室溫染色 1 小時後，以過濾水將染劑清洗掉，將需要進行分析的片段切下來後，將蛋白質從膠體內被分離出來，將利用 Trypsin 將蛋白質水解成小片段的胺基酸後，以 Q-TOF-MS (貴重儀器實驗室，成功大學)進行分析，資料庫利用 NCBI 建立的蛋白質資料庫比對。

#### 西方墨點法

健康人或是登革熱患者的血清，以 40ug 的濃度定量進行一維蛋白質電泳後，利用 PR1 抗體 1:5000 進行分析。最後蛋白質的表現以 UVP 進行截取。

#### 酵素免疫分析法

以 MyBioSource.Inc 購買的 PR1 isoform1 酵素免疫分析試劑組，以照廠商提供的步驟，將健康人或是登革熱病患的血清以 1:4 的比例進行分析。結果以

光譜分析法截取 OD450 nm 的吸收光。

## **(子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色**

### **檢體來源**

從國立成功大學醫學院的血液與腫瘤部門取得的骨髓幹細胞，並遵從國立成功大學人體試驗委員會通過的流程（A-ER-102-199）進行相關的實驗。登革熱病人檢體的取得都已經通過高雄醫學大學附設中和紀念醫院所屬的人體試驗委員會（960195）及國立成功大學醫學院附設醫院所屬的人體實驗委員會（A-BR-101-156）。對象為曾經到高雄醫學大學附設中和紀念醫院或國立成功大學醫學院附設醫院就診且被確診為登革熱病毒感染的 15 歲以上的患者。所有的捐獻者都已經簽署人體試驗同意書。

### **檢體的處置過程**

新鮮的檢體從先前的敘述中的來源取得，將其從抽取的容器中移到已滅菌的乾淨容器，並從中取出少許的血液或骨髓做血球抹片，來確保細胞的活性。在骨髓檢體中加入紅血球裂解液（QIAGEN #386516），放在溫和振盪器上作用 10 分鐘後，用 300g 6 分鐘的離心條件，將細胞分離出來。細胞在計數後分配到適合實驗需求的管數，感染組用 Vero 產出的第二型登革熱（16681 品系）以 MOI=0.1 的條件感染兩個小時，並且每 20 分鐘輕輕搖晃均勻。接著用不含血清的 RPMI 加入裝有感染後細胞的管子後離心並移除上清液，重複三次上述步驟，將多餘的病毒清除。隨後把細胞分成不同的時間點並加入 2ml 含有 10% 血清的 RPMI（Gibco #11875-093）進行培養，且在特定的時間收集上清液，用病毒斑測試得出病毒量。

## 病毒斑測試

事先將  $1 \times 10^6$  的 BHK21 種到含有 1.5 毫升 5% FBS DMEM 的六孔盤中，放入培養箱中培養 16 到 20 小時。用序列稀釋的方式，將待測樣品適量的稀釋到 2% FBS DMEM 中，並加入到細胞已貼附的六孔盤中作用兩個小時，且在每個 15 分鐘均勻搖晃一次。接著從六孔盤移除病毒液後，加入含有 1% 甲基纖維素的 2% FBS DMEM，靜置 5 到 7 天。用 PBS 將多餘的培養液移除後，用結晶紫染色並計數病毒斑。

## 電子顯微鏡

使用標準的負染流程。將 4 $\mu$ l 的濃縮病毒樣本滴上具親水性電漿的碳膜銅網上，再用 4 $\mu$ l 2% 醋酸鈾染色並等候風乾。影像由最高電壓為 120kV 的穿透式電子顯微鏡 JEM1400 並搭配擁有 14 $\mu$ m 像素大小 4k x 4k Gatan 895 的攝像機拍攝。

## 冷凍低溫電子顯微鏡

將 4 $\mu$ l 的濃縮病毒樣本滴上具有親水性多孔碳薄膜塗層銅網格上，並利用帶有液態乙烷的冷凍置換系統 Gatan Cp3 置備成低溫樣本。樣本成果以 200kV 加速電壓的 JEOL2100F 穿透式電子顯微鏡操作，並全程以低電子量(每次曝光  $\sim 10 \text{ e}/\text{\AA}^2$ )的條件且搭配 14 $\mu$ m 像素大小及 3k x 4k DE-12 攝像機所拍攝。

## 免疫標定電子顯微鏡

親水性碳網事先放在潮濕及低溫的環境。4 $\mu$ l 的濃縮病毒樣品放入碳網後與標記登革熱外膜(clone 4G2, CTK B7052 USA)或人類 CD61 蛋白(AbD serotec MCA2588GA)的單株抗體一同靜置 15 分鐘後，清洗數次，並加入帶有 18nm 金原子標記的二抗(ABcam ab105278)。靜置 15 分鐘後，清洗數次，再用醋酸鈾染上一分鐘，用濾紙將多餘的液體吸乾後等候風乾。影像由 120kV 的穿透式電子顯微鏡 JEM1400 拍攝。

## 登革熱病毒 RNA 雜交作用以及套膜蛋白雙重標記

我們用等離子體層化預處理鎳網格，然後將濃縮和純化後的患者血漿樣品直接添加到網格上，然後如上所述對登革熱病毒顆粒進行表面染色。在使用 0.25% 戊二醛溶液 (sigma # G5882) 固定樣品並用 0.1% triton-X100 (sigma # T7878) 破壞病毒外殼以暴露病毒 RNA。然後我們用先前文獻中使用的 cDNA 探針探測登革熱病毒，其中我們將生物素結合到探針的 3' 端，並使用 6nm 金原子標記生物素 (EMS # 25244) 鑑定登革熱病毒的 RNA。

## 測量電子顯微鏡圖像中的病毒顆粒與膜的比例。

使用 Image J (免費軟件) 進行測量。我們使用來自原始 EM 圖像 (分析/設置刻度) 的比例尺來標準化和校準像素長度。我們選通病毒囊泡的外邊界或僅內部病毒顆粒，然後測量其值用於後續的計算。

## 人類骨髓 CD61+ 細胞的純化

通過磁珠分選工具 (MACS # 130-051-101) 分離 CD61 + 細胞。計數裂解紅血球後的細胞後，用符合適合的抗體體積染色，廠商建議用量為每  $1 \times 10^7$  顆細胞用 20  $\mu$ l。在冰上染色 30 分鐘後，用洗滌緩衝液 (MACS # 130-091-221) 洗滌細胞，並重新回溶於 500  $\mu$ l 洗滌緩衝液中，隨後將細胞置於預先洗滌的 LS 管柱 (MACS # 130-042-401) 連接到磁性支架和鋼板 (MACS # 130-090-976)。用洗滌緩衝液沖洗柱子 3 次後，流出液含有 CD61- 或抗體未結合的細胞。然後我們從磁性支架中取出 LS 管柱，以釋出 LS 管柱被抗體捕獲的 CD61 + 細胞。

## 西方墨點法

將相同 pfu 的病毒上清液分別加載到預製凝膠 (BioRad # 456-1084) 的孔中，執行標準的西方墨點法。然後我們檢測膜特異性病毒外膜蛋白 (Envelope, Clone 4G2, CTK B7052 USA)，prM (Genetex gtx108092)，NS1 (Genetex，

gtx103346) 和Capsid (由Dr.John G Aaskov提供, Clone 6F3-1)。

### **純化病毒**

將血漿病毒合併在一起之後, 在離心管柱 (amicon ultra 100 kd Millipore # UFC910096) 中用Tris緩衝液 (Ambion # AM9850G) 1:1稀釋病毒液, 並在4°C下以4000g離心10至20分鐘。重複該流程, 直到使用所有病毒上清液並濃縮至原始體積的1%。接著除去管柱中剩餘的液體, 用200  $\mu$ l Tris緩衝液沖洗濾膜後, 直至進行使用和分析前, 這些製備完成的樣品會先儲存在-80°C。

### **流式細胞儀分析**

取用適量的細胞, 在300g離心8分鐘並重新回溶於100 $\mu$ l染色緩衝液(1%FBS和0.1% NaN<sub>3</sub>的PBS溶液)中, 根據抗體製造商的說明書向每個管中加入所需的抗體, 並在避光的冰上染色1小時。然後將染色緩衝液加入每個管中, 在300g下離心8分鐘洗滌過量的抗體, 重複洗滌的步驟3次。再將細胞重新回溶於300 $\mu$ l至1ml染色緩衝液中。如果需要進行細胞內染色, 在細胞表面染色完成後, 將細胞在PBS中的100 $\mu$ l 4%多聚甲醛中在冰上固定30分鐘。在固定後用染色緩衝液洗滌細胞, 再向每個管子中加入100 $\mu$ l破膜緩衝液 (PBS中的1%皂苷), 並根據製造商的說明書加入適量抗體。將混合物在冰上靜止1小時, 然後用染色緩衝液洗滌3次後, 用流式細胞儀分析細胞上熒光的表現。

### **細胞聚落的製備 (Colony forming unit)**

將含甲基纖維素的培養基和細胞懸浮液在室溫下靜止解凍約30分鐘。計數細胞的總數, 並容許每個35mm培養盤上需要有 $1 \times 10^5$ 顆細胞。將含有細胞的培養基轉移到新的15ml離心管中, 並在300g離心10分鐘。除去上清液後, 用0.3ml細胞懸浮液回溶細胞, 並直接加入到含甲基纖維素的培養基中, 過程中需確保移液管中沒有殘留的細胞。劇烈地震蕩使細胞與培養基充分

混合，並且在繼續讓氣泡逸出，等待約20分鐘。使用裝有16號針頭的3ml注射器將1.1ml最終細胞混合物加入到35mm培養盤中，讓細胞在37°C和5%二氧化碳下培養14-16天。避免在孵育期間干擾培養盤，以預防細胞聚落的移動。在結束時，使用配備有刻痕網格的倒置顯微鏡鑑定和計數細胞聚落。

### 幹細胞分化實驗

獲得新鮮人類骨髓檢體後，用紅血球裂解液處理，取得細胞並計數。將 $1 \times 10^7$ 顆細胞種到75T培養盤並根據廠商的建議加入適量的巨核細胞分化培養基（stem cell # 09655）和分化補充物（stem cell # 02696）培養7天。細胞在顯微鏡下評估分化形態，然後分離 $1 \times 10^6$ 顆細胞用於細胞形態的流式細胞儀分析。一旦分化條件成熟後，開始進行感染的動作，隨後搭配流式細胞儀分析和病毒斑測定。

## (子計畫三) 2014年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探--某醫學中心 照護病例對照研究

### (一) 研究設計

本研究以單一醫學中心-高雄醫學大學附設中和紀念醫院於2014年1月1日至2014年12月31日通報確診的登革熱病患為研究對象，回溯個案病歷，收集基本人口學資料、慢性疾病史、登革熱臨床症狀表現、過去有無感染登革熱病史、住院情形等資料，進行病例對照研究。研究方法以回溯個案病歷，收集病例組與對照組基本人口學資料、慢性疾病史、登革熱臨床症狀表現、過去有無感染登革熱病史、住院情形等進行分析。

### (二) 病例組與對照組之選取

研究對象來源：2014年1月1日至同年12月31日於高雄醫學大學附設中和紀念醫院登革熱確診並通報之個案。

1.病例組：為 2014 年 1 月 1 日至同年 12 月 31 日期間所有符合登革熱重症的病例。

登革熱重症之定義為主要為符合下列一項以上的條件：

- (1) 嚴重的血漿滲漏導致呼吸窘迫。
- (2) 嚴重出血。
- (3) 嚴重器官受損（如肝臟受損 (GOT/GPT $\geq$ 1000 IU/L)、意識受損或是心臟或是其他衰竭。

2.對照組：以非登革熱重症病例為對照組配對抽樣來源，配對條件為對照組與病例組有相同性別且年齡相差 5 歲以內 ( $\pm 5$  歲)，其配對方式是以 1：4 的比例進行隨機抽樣。

### (三) 收集之變數

變數包含基本人口學變數、臨床症狀、疾病史與臨床檢驗數據資料包括白血球數、血紅素量、血球容積比、平均紅血球容積、血小板數、分葉型嗜性白血球、淋巴球、嗜酸球、單核球、血糖、血清麩胺酸苯醋酸轉氨基酶、血清麩胺酸丙酮酸轉氨基酶、C-活性蛋白、血中尿素氮、血清肌酸酐、血清鈉、血清鉀、凝血酶原時間、部份凝血活酶時間、部份凝血活酶時間等，其中白血球數、血紅素量、血球容積比、血小板數、淋巴球、C-活性蛋白、血中尿素氮、血清肌酸酐、凝血酶原時間、部份凝血活酶時間、部份凝血活酶時間等。

### (四) 統計分析方法

病例組與對照組之比較，若屬類別變數，用卡方檢定或百分比檢定；若屬連續變數，則以 t 檢定。最後並以多變數邏輯斯迴歸分析法，找出登革熱重症之危險因子，統計分析軟體使用 SPSS 16.0 版，檢定採雙尾檢定，p 小於 0.05 即有統計顯著意義。

## (子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

(一)第一部份:探討 2014 年氣象學資料與氣爆事件對登革熱發生率的影響

1. 研究設計:取得歷年 2000~2014 氣象學資料與布氏指數及登革熱發生率資料  
進行分析

2. 研究族群

高雄市有 38 個行政區，人口有 278 萬人，為台灣第 2 大都會區，是南台灣的工業城，位於北迴歸線以南，每月均溫在 18°C-31°C，相對溼度為 63%-85%，本研究對象為居住在高雄市的居民。

本文中登革熱的個案是以本土個案 2000 年 1 月至 2014 年 12 月依照疾病管制署資料來源為準，包括每此段期間每 年、月、週。人口資料則由高市民政局取得。因為無每週人口數的資料，若計算到該月份不同週數的人口數時，會以對應的每月中旬估計人口數作為該週人口的估計值。

3. 氣象資料與病媒蚊資料

為評估氣象資料(包括每日最高溫、最低溫、平均溫、雨量、相對溼度)與登革熱發生率的相關性，氣象資料由中央氣象局前鎮觀測站取得 2000 年 1 月至 2014 年 12 月資料。

每月最高溫(最低溫)數值是用每日最高溫(最低溫)的月平均值做計算。每月溫差值(每月最高溫與最低溫的溫差)是以每月最高溫與最低溫的差值做計算。布氏指數是用以評估每 100 被訪家戶發現陽性容器(容器中有登革熱蚊蟲幼蟲)數目。將每月布氏指數超過 2 級天數的百分比(布氏指數超過 2 級:即每日每 100 被訪家戶，發現大於或等於 10 個陽性容器)作為評估埃及斑蚊影響登革熱發生率的變項。所有布氏指數資料來自高雄市衛生局及疾管署。

4. 統計方法

- (1) 以 Durbin-Watson test 檢試 2000-2014 年，登革熱發生率是否具有週期循環性。
- (2) 以 spectral analysis techniques (periodograms) 評估登革熱發生率週期性之最佳解釋模式。使用 harmonic regression with backward selection method 驗證這些週期的統計學顯著，並決定以何種週期循環性解釋 2000-2014 年高雄市登革熱發生率之週期性 (SAS version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).
- (3) 以 廣義估計方程式 Generalized estimating equations (GEEs) with a lagged-time Poisson regression analysis 被用來評估氣象學與蚊蟲因素對登革熱發生率的影響，同時依不同年份但同一月份調整登革熱發生率相關性。因為在同一地點，不同年份的同一月份會具有可以比較的類似基礎，故使用 GEE 分析，所用的多變項波瓦松方程式的模式如下：

$$\ln(DC_t) = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_{11}(T_{min,t-i}) + \sum_{i,j=1}^k \beta_{12}(T_{min,t-i} \times T_{min,t-j}) + \sum_{i=1}^k \beta_{21}(T_{max,t-i}) + \sum_{i,j=1}^k \beta_{22}(T_{max,t-i} \times T_{max,t-j}) + \sum_{i=1}^k \beta_{31}(T_{avg,t-i}) + \sum_{i,j=1}^k \beta_{32}(T_{avg,t-i} \times T_{avg,t-j}) + \sum_{i=1}^k \beta_{41}(T_{range,t-i}) + \sum_{i,j=1}^k \beta_{42}(T_{range,t-i} \times T_{range,t-j}) + \sum_{i=1}^k \beta_{51}(RH_{t-i}) + \sum_{i,j=1}^k \beta_{52}(RH_{t-i} \times RH_{t-j}) + \sum_{i=1}^k \beta_{61}(RF_{t-i}) + \sum_{i,j=1}^k \beta_{62}(RF_{t-i} \times RF_{t-j}) + \sum_{i=1}^k \beta_{71}(BI_{t-i}) + \sum_{i,j=1}^k \beta_{72}(BI_{t-i} \times BI_{t-j}) + \ln(PY_t) + \varepsilon_t$$

$t$  表示被觀察的月份， $DC_t$  表示該月份登革熱被觀察的個案數， $T_{min}$ ,  $T_{max}$ ,  $T_{avg}$ ,  $T_{range}$  代表每月最低溫(°C) (用每日最低溫的月平均值)、每月最高溫(用每日最高溫的月平均值)、每月平均溫度、每月溫差(每月最高溫與最低溫的溫差)， $RH$  relative humidity (%) 表示相對溼度， $RF$  rainfall (100 mm) 表示降雨量， $BI$  表示在某個月布氏指數

>2的天數的百分比。 $i$ 、 $j$ 表示延遲的月份， $k$ 代表最大延遲， $t-i$  and  $t-j$  denote the analyzed month;  $\beta_0$  denotes the intercept;  $\beta_{11-71}$  and  $\beta_{12-72}$  represent the main and interaction effect coefficients of the covariates, respectively; and  $PY_t$  is an offset used to control for person-years at month  $t$ .

- (4)為評估單變項時間延遲效應對登革熱發生率的影響，單一的氣象學與布氏指數及其交互作用以 GEE 方式計算。作多變項分析時，將所有的具時間延遲效應的環境因子及其交互作用以 complete GEE model 先評估，之後無統計意義變項，藉由 backward elimination and stepwise regression modeling 移除。我們使用了 quasi-likelihood-based information criterion (QICu) 來決定最簡約回歸模型(the most parsimonious regression model) (即最小值的 QICu value 為較佳的選擇)。另使用 2000-2014 年 1-6 月布氏指數的資料，以 GEE 模式進行 linear link function，來評估經最適模式(best-fitting model)所得的共變數與登革熱蚊媒密度指數相關性(第 II 部份的 Table 4)。
- (5)在台灣因為登革熱個案發生後，地方衛生環保行政單位與民眾孳生源的清除行動，會使得布氏指數數值受影響，本研究中布氏指數對登革熱的發生率會有 1 個月的負向延遲效應， $\beta=-0.017$  (第 II 部份的 Table 4)。因新一波的登革熱感染大都規則出現在 7 月份，因此計算每年 1 月份到 6 月份的布氏指數，比較能適當地反應出登革熱病媒蚊幼蟲的滋生狀況。
- (6)Incidence rate ratios (IRRs)伴隨著 95%信賴區間可以由 GEE 獲得，此數據可用來評估氣爆事件(發生於 2014 年第 31 週)的可能效應。2014

年每週登革熱發生率和 2002、2006、2010、2011 年相比較 (2014 及 2002 年為大規模登革熱流行，2006、2010、2011 年為中等程度登革熱流行)，年度發生率(見下方 Supplementary Information Figure 1)。

(7)在氣爆前 5-30 週及 1-4 週 及氣爆後 1-4, 5-8, 9-12, 13-16, 17-20, 21-22 週 這段期間均作評估，adjusted IRRs (aIRRs)則是指已調整過所有的氣象學及布氏指數變數的(IRRs) (第 IV 部份的 Figure 1)。

(8)我們接著比較 2002 年 (登革熱大流行，但無氣爆事件) 與 2014 年 (登革熱大流行但有氣爆事件) 資料，採用 Spearman's rank correlation coefficient ( $r_s$ ) with Bonferroni-adjusted  $P$  value 時間的序列橫斷相關 (time cross-correlations)，來評估每週登革熱發生率在三個地區 1) 氣爆區(前鎮、苓雅區) 2) 氣爆鄰近區(三民、小港、鳳山區) 及 3) 扣除上述區域的高雄市其他行政區的變化。(第 IV 部份的 Figure 1)

(9) GEE models with Poisson distribution 被用來評估不同年份及環境因素對登革熱發生率的影響(SAS version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)，2000 至 2014 年但除去 2002 及 2014 年 (計有 13 年份) 做為參考年，在 2002 年至 2014 年的氣象學及布氏指數資料會與參考年份作比較，用  $(IRR_1 - IRR_2) / (IRR_1 - 1)$  作計算，當作是 excess risk of dengue incidence， $IRR_1$  代表 IRR for 2002 or 2014 obtained from the base model,  $IRR_2$  代表 the corresponding IRR after additional adjustment for environmental factors,  $IRR_1 - 1$  代表 the excess risk of dengue in 2002 or 2014 versus the reference years。

(二) 第二部份：登革熱感染者問卷調查

為了解登革熱感染者對此疾病認知程度，因此進行問卷了解病患的想法，以做為未來社區衛生教育及政府登革熱防疫的參考。我們以 2015 年確診為登革熱個案且在小港醫院就醫的個案為對象，進行問卷調查，

#### 1. 材料與方法：

此為一橫斷面的調查，問卷受訪者為 104 年小港醫院感染登革熱病患，住院病患佔 84%，門診病患佔 15%，限成人(年紀超過 18 歲)。時間自 104 年 6 月 1 日至 104 年 12 月 31 日。問卷共有 15 題，問卷主要是針對三方面

- (1)第一部份為病患對登革熱病媒蚊的認識評估
- (2)第二部份為病患對登革熱臨床症狀的認識評估
- (3)第三部份為對社區環境、登革熱出血熱、登革熱重症的認識評估其中
  - 第 1~3 題 為對登革熱病媒蚊的認識與防疫概念評估
  - 第 4~10 題 為對登革熱疾病知識的評估
  - 第 11~13 題 為對登革熱防疫概念與最新分類的評估
  - 第 14~15 題 為自身環境與認知的評估

#### 問卷題目

題號	題目	答案
1	登革熱是一種藉由蚊子所傳播的疾病	(○)
2	登革熱在南台灣主要是由白線斑蚊所傳播	(X)
3	孳生源的清除如積水容器的去除對於登革熱防治很重要	(○)
4	得過一次登革熱會終身具有免疫力，不會再得其他型登革熱	(X)
5	感染登革熱時，除了發燒也會有頭痛、背痛、皮膚出疹子	(○)
6	得登革熱最嚴重可能會死亡	(○)

7	登革熱的確定診斷是靠抽血來檢驗	(○)
8	目前市面上已經有有效的疫苗可預防登革熱的感染	(X)
9	登革熱病人發燒頭痛可以用阿斯匹靈來退燒，不一定要用普拿疼	(X)
10	目前無特效藥可用來治療登革熱	(○)
11	登革熱被通報者依傳染病防治法規定需接受疫情調查、社區居家環境強制性噴藥、孳生源清除工作	(○)
12	我聽過登革出血熱	
13	我聽過登革熱重症	
14	我家裡的環境算是乾淨	
15	我覺得我應該不會再得登革熱	

### (子計畫五) 重症登革熱之流行病學及免疫反應研究

#### (一) 研究設計

本研究將以回溯性世代研究與前瞻性世代研究的方式探討登革熱對於免疫系統之影響性與在重症登革熱病人族群預後之影響因子。我們將分別以回溯性方法蒐集 2015 年的重症登革熱病人資訊，以前瞻性方法蒐集 2016 至 2017 年的重症登革熱病人之資訊，包括：病人基本資料、生活習慣、疾病嚴重程度、典型症狀、非典型症狀、共病症、心電圖是否顯示心律不整、併發症、登革熱相關資訊、疼痛指數、生命跡象、肝臟相關檢驗數據、腎臟相關檢驗數據、凝血相關檢驗數據、新陳代謝疾病相關檢驗數據、發炎指標、體液補充治療之相關資訊、電腦斷層檢查、胸部 X 光。

**研究對象：**納入條件：1. 年紀大於等於 20 歲；2. 病人住院至加護病房；3. 血清免疫學檢查為陽性。排除條件：無法獲得必要研究變項，導致無法

進行統計分析之病人。

## (二) 研究指標與研究變項

1. 本研究的研究指標(outcome)：主要的預後指標為加護病房死亡，另亦會分析 28 天死亡率、90 天死亡率、住院天數、加護病房住院天數、嚴重併發症等指標。
2. 研究變項：病人基本資料(包括：性別、年齡、體重)、生活習慣、疾病嚴重程度(包括：APACHE II、進入 ICU 時的血管加壓劑與呼吸器使用狀況、是否需要透析)、典型症狀、非典型症狀、共病症(包括：心血管疾病、中風、其他神經系統疾病、肝硬化、慢性腎臟疾病、肺結核、慢性肺部阻塞性肺病、氣喘、消化性疾病、糖尿病、血脂異常、退化性關節炎、自體免疫疾病、癌症)、心電圖是否顯示心律不整、併發症(次發性感染、急性腎臟受損、急性呼吸窘迫症候群、肺水腫)、登革熱相關資訊(是否第一次感染登革熱、登革熱的血清型)、疼痛指數、生命跡象、肝臟相關檢驗數據(包括：AST、ALT…等)、腎臟相關檢驗數據(包括：BUM、serum creatinine…等)、凝血相關檢驗數據(包括：platelet、PT、aPTT、HbA1c、LDL、HDL…等)、新陳代謝疾病相關檢驗數據(包括：glucose、HbA1c、LDL、HDL…等)、發炎指標(包括：WBC、CRP…等)、體液補充治療之相關資訊(包括：input/output、CVP…等)、電腦斷層檢查(包括：膽囊膽道之大小、腹水)和胸部 X 光(包括：有無肺炎、有無急性呼吸窘迫症候群、有無肺水腫)。

## (三) 檢體和臨床資料收集方法

### 1. 回溯性世代研究之臨床資料蒐集

在本研究的回溯性世代將蒐集 2015 年入住加護病房的嚴重登革熱病人之資訊，主要是利用電子病歷回顧的方法來蒐集資料。

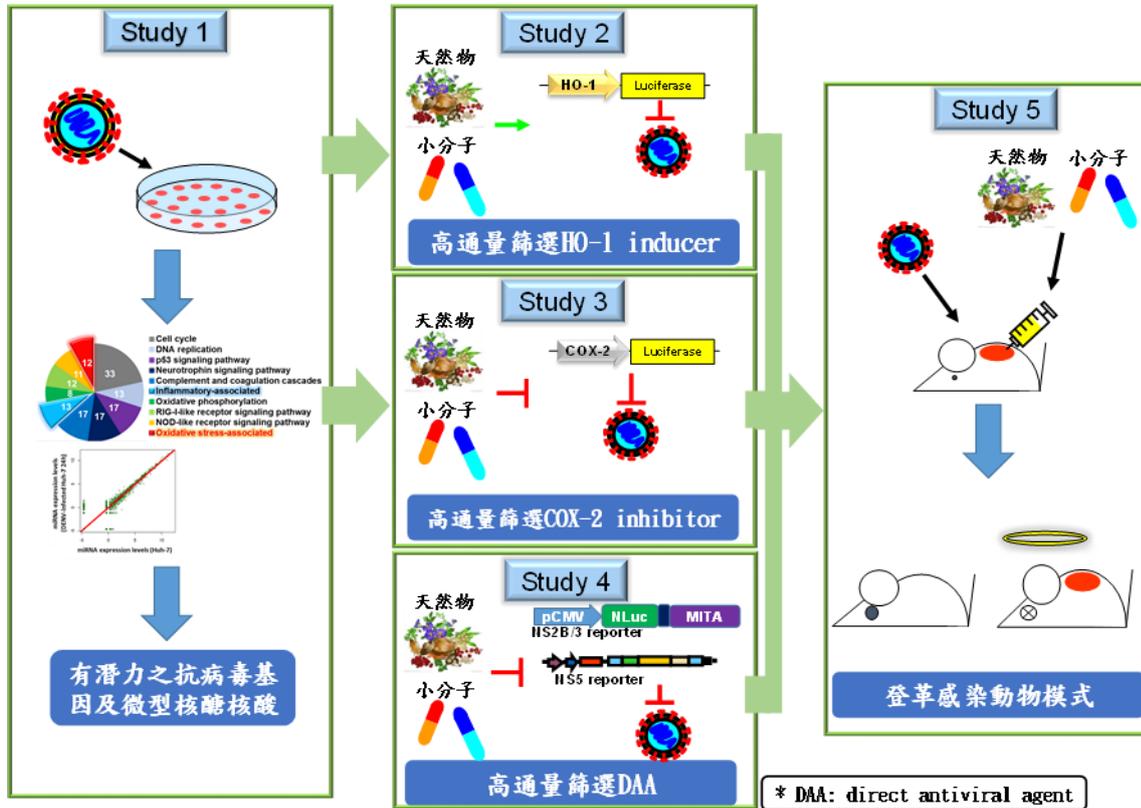
## 2. 前瞻性世代研究之檢體和臨床資料蒐集

本研究將前瞻性的蒐集於 2016 年入住加護病房之嚴重登革熱病人的臨床資料。

針對肝臟相關檢驗數據、腎臟相關檢驗數據、凝血相關檢驗數據、發炎指標將會固定在進入病房後的第 1 天、第 3 天、第 7 天和第 14 天進行抽血檢驗，其餘研究變項則在加護病房住院過程中，逐一完成資料的蒐集與登入。上述資料的資訊蒐集與登入，將以 Access 登入系統且由特定之資料蒐集者執行。本研究同時計劃於病人轉入病房後的第 1 天、第 3 天、第 7 天和第 14 天收集其周邊血液檢體 20 cc，以測量其各種細胞激素濃度的變化，白血球和淋巴球的功能及登革熱病毒檢驗鑑定。

(子計畫六)抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然藥物研發

流程圖：



1. 利用次世代定序尋找參與登革病毒複製與致病有關的宿主基因與 miRNA

實驗設計：

目前對於登革病毒調控之宿主基因及機制尚不清楚，僅知登革病毒會誘導細胞氧化壓力、發炎反應及細胞自噬(autophagy)[19, 20]，但詳細作用機制尚未全盤了解。我們於初步研究發現登革病毒感染會誘導細胞發炎及氧化壓力相關基因及 miRNA 表現，因此於本計畫中我們將繼續釐清這些發炎及氧化壓力相關之基因及 miRNA 對於病毒複製的關聯性，同時也期望可以從中發現具潛力之抗病毒藥物標靶以提供藥物開發使用。

實驗方法：

(1)以 qRT-PCR 確認 NGS 之結果。

NGS 之結果有可能會有假陽性，因此必須先以 qRT-PCR 再次確認是否為假陽性，之後才能繼續後續探討研究。我們首先對 NGS 結果進行初步分類，接著逐一挑選出與氧化壓力或發炎相關基因及 miRNA 進行探討。首先將 Huh-7 貼附於 24 孔盤上，隔天感染 0.2 M.O. I. 病毒，兩小時後換成新鮮培養液，接著三天後收取細胞 RNA，並以 qRT-PCR 分析挑選出之基因及 miRNA 表現量是否符合 NGS 之結果，若不符合則視為假陽性。

## 2. HO-1 促效劑藥物篩選平台開發及篩選抗登革病毒藥物

實驗設計：

我們於初步研究已證實 HO-1 活化可抑制登革病毒複製[21]，並且也利用從天然物萃取出之 HO-1 inducer 於細胞內成功抑制登革病毒複製。細胞基因突變率較病毒基因突變率低，因此針對細胞因子之標靶藥物不僅不容易產生抗藥性，且有較高機率能夠同時抑制不同型的病毒，此為針對細胞因子之標靶藥物的優勢。此外，本實驗室於先前發研究也發現可提高 HO-1 活性之天然物能夠成功抑制 C 型肝炎病毒複製[22]，綜合上述結論可知透過調控細胞因子抑制病毒是可行的。因此，本計畫希望進一步篩選更多 HO-1 inducer 以尋找具潛力之抗病毒藥物。冷光報導基因因其可用機器讀取數值且非常敏感，因此非常適合用於建構高通量細胞篩選平台。本實驗室先前也已成功建立 C 型肝炎病毒 RNA 聚合酶冷光報導篩選系統，並成功將其運用於高通量篩選[23]，因此本計畫也利用冷光報導基因建立此細胞因子篩選平台。我們首先建立一個可篩選出誘導 HO-1 表現之載體並建立穩定表現細胞株，接著利用此平台進行高通量藥物篩選。藥物材料預計自天然物資料庫及小分子藥物資料庫訂購。

實驗方法：

(1) 建構高通量篩選 HO-1 促效劑細胞平台。

我們建構一個由 HO-1 啟動子所驅動之冷光報導基因載體 (pHO-1-Luc)。接著將其轉染進細胞並篩選出穩定表現細胞株。此穩定表現細胞株即可用於高通量篩選。

(2) 以 HO-1 細胞篩選平台進行高通量篩選。

將此穩定表現細胞株貼附於 96 孔盤上，接著加入欲篩選之天然物或小分子藥物，三天後測量細胞內冷光表現量。冷光表現量高於兩倍者認為可能之抗登革藥物。

(3) 以細胞感染系統進行驗證。

前述項目所得之天然物或小分子藥物接著以細胞感染系統進行確認是否可抑制病毒複製。Huh-7 細胞先感染病毒後以藥物處理，三天後收取 RNA 及蛋白質分析病毒複製量、HO-1 表現量及計算 EC<sub>50</sub>。若能成功抑制病毒且於有效濃度無細胞毒性，則接著進行 MTS 以測定其 CC<sub>50</sub>。

### 3. COX-2 抑制劑藥物篩選平台開發及篩選抗登革病毒藥物

實驗設計：

我們於初步研究中已證實抑制 COX-2 可抑制登革病毒複製，也發現可抑制 COX-2 活性之小分子也可抑制病毒複製，而本實驗室先前研究也發現天然物透過抑制 COX-2 而達到抑制 C 型肝炎病毒複製之效果[18]。因此，本計畫希望同樣篩選出 COX-2 抑制劑以作為抗登革病毒藥物之備選。

實驗方法：

(1) 建構高通量篩選 COX-2 抑制劑細胞平台

我們建構一個由 COX-2 啟動子所驅動之冷光報導基因載體 (pCOX-2-Luc)。接著將其轉染進細胞並篩選出穩定表現細胞株。此穩定

表現細胞株即可用於高通量篩選。

(2)以 COX-2 細胞篩選平台進行高通量篩選。

將此穩定表現細胞株貼附於 96 孔盤上，接著加入欲篩選之天然物或小分子藥物，三天後測量細胞內冷光表現量。冷光表現量高於兩倍者認定為可能之抗登革藥物。

(3)以細胞感染系統進行驗證。

前述項目所得之天然物或小分子藥物接著以細胞感染系統進行確認是否可抑制病毒複製。Huh-7 細胞先感染病毒後以藥物處理，三天後收取 RNA 及蛋白質分析病毒複製量、COX-2 表現量及計算 EC<sub>50</sub>。若能成功抑制病毒且於有效濃度無細胞毒性，則接著進行 MTS 以測定其 CC<sub>50</sub>。

#### 4. 登革病毒之蛋白酶及聚合酶標靶藥物篩選平台開發

實驗設計：

根據文獻，黃熱病毒的蛋白酶及 RNA 聚合酶是常用且普遍之抗病毒藥物標的[3]。本實驗室已建構針對 NS3 蛋白酶報導系統並初步證實可運用於高通量篩選，先前我們也已成功發表登革病毒 NS5 報導基因系統[24]。於本計畫中我們進一步開發針對 NS3 蛋白酶之報導系統[21]，並且運用這兩個系統進行高通量藥物篩選。

實驗方法：

(1)建立穩定表現 NS3 及 NS5 藥物篩選質體之細胞株。

Huh-7 先轉染進這兩種質體，接著篩選出穩定表現細胞株。

(2)以 NS3 及 NS5 藥物篩選平台進行高通量篩選。

將此兩種穩定表現細胞株貼附於 96 孔盤上，接著加入欲篩選之天然物或小分子，三天後測量細胞冷光基因表現。

(3)以細胞感染系統進行驗證。

前述項目所得之天然物或小分子藥物接著以細胞感染系統進行確認是否可抑制病毒複製。Huh-7 細胞先感染病毒後以藥物處理，三天後收取 RNA 及蛋白質分析病毒複製量、COX-2 表現量及計算 EC<sub>50</sub>。若能成功抑制病毒且於有效濃度無細胞毒性，則接著進行 MTS 以測定其 CC<sub>50</sub>。

## 5. 抗病毒藥物在老鼠模式之效果評估

實驗設計：

細胞實驗因為環境單純，且藥物能直接接觸細胞因此容易得到有效藥物。但活體動物體內環境複雜，且藥物進入生物體內首先不一定會被生物吸收利用，或者有可能被代謝成其他未知分子使其失效或甚至造成毒性。因此，藥物於細胞內篩選過後，通常必須進行動物實驗以確認藥物是否能在活體內作用，也順便測試藥物是否會造成生物毒性。為了確認前述所得之天然物或小分子藥物能夠於活體內作用並抑制登革病毒複製且不造成生物毒性，我們使用 ICR 登革感染小鼠模式[25]進行試驗。

實驗方法：

(1) 登革病毒感染 ICR 小鼠並給予藥物。

6 日齡 ICR 乳鼠經過平均亂數分組(組別 1：給予 heat-inactive 病毒+saline；組別 2：給予有活性病毒液+saline；組別 3：給予有活性病毒液+低濃度藥物；組別 4：給予有活性病毒+高濃度藥物；每組 5 隻)後由腦內注射給予  $2.5 \times 10^5$  PFU/20  $\mu$ l 病毒液，接著於感染後 1、3、5 天由腦內注射給予藥物，同時每天紀錄乳鼠生存率、體重及 clinical scores。感染後六天犧牲乳鼠，取出乳鼠腦部分成三部分並均質化，分別用於萃取 RNA、回收腦部病毒及萃取蛋白質。Clinical score 定義如下：0=健康、1=輕微不適（活動力下降）、2=體重下降及行動困難、3=無食欲、4=癱瘓及瀕死狀態、5=死亡，乳鼠體重低於該組平均值 50%則

視同死亡予以犧牲。

(2)測定藥物抑制病毒效果。

前述鼠腦樣品分別測定其腦部病毒效價(virus titer)、病毒及細胞因子 RNA 表現量及蛋白質表現量。

## 6. 建立 AG129 登革出血小鼠模式

實驗設計：

AG129 小鼠為目前唯一公認的登革出血小鼠模式。細胞實驗及 ICR 登革感染動物模式只能夠證明藥物可抑制登革病毒複製，但無法確認藥物對於登革出血症狀的抑制效果，因此本實驗室引進 AG129 小鼠並建立完整實驗流程。此小鼠為干擾素受器  $\alpha/\beta$  及  $\gamma$  (interferon receptor- $\alpha/\beta$  and  $\gamma$ ) 剔除小鼠，可被登革病毒感染並產生與人類類似的體內出血症狀。

實驗方法：

以 AG129 八週大實驗模式，A 組腹腔注射 heat shock 去活性之登革病毒，B 組腹腔注射登革病毒液(第二型 strain 16681,  $2.5 \times 10^7$  PFU)，C 組及 D 組腹腔注射登革病毒液，接著 C、D 組於感染後每天腹腔注射試驗樣品(低劑量：C 組；高劑量：D 組)，於 15 天開始犧牲收取檢體，共約為期二週之久。當小鼠呈現瀕死狀態，則將小鼠犧牲並利用 Evan's blue dye 分析小鼠體內器官及腸道出血狀況。當實驗進行中動物出現體重過低(與正常對照組相比低於 20%)、無法進食、對外界刺激無反應等狀況，終止該動物實驗予以人道安樂死。

## (子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查

### 1. 血清檢體收集

2015 年 8 月至 10 月，針對高雄市登革熱高盛行區(三民區)與低盛行區(楠梓區)，收案 400 人，並進行登革疫苗試驗意願調查。中心分別與高雄市衛生局、兩區衛生所、兩區區公所、高雄醫學大學、楠梓加昌里與楠梓翠屏里里長合作並搭配活動，以 100 元商品卡或免費檢驗肝腎功能做為誘因，讓民眾了解登革熱，理解後參與本研究，收案的志願者皆是無發燒的居民。中心與楠梓區加昌里、翠屏里里長合作，於里民活動中心舉辦活動合併志願者收案，並麻煩里長與志工宣傳，因活動在平日白天，於活動中所收案的民眾，大部分為住在附近退休或無工作者。與衛生所合作，參與社區癌症篩檢與登革熱防治宣導活動；與區公所合作，搭配敬老節活動與區公所外設攤，所收案的志願者大部分為老年人與區公所辦事之民眾。參與高雄醫學大學校慶活動，所收案的志願者大部分為住在附近的民眾與學生。因 2015 年秋季，高雄市登革熱大爆發，有近 2 萬名的高雄民眾感染登革熱，於是於 2016 年 2 至 5 月，針對 2015 年所收案的同一志願者，再次進行成對血清採集。成對血清採集數量不足，則對該地區再次進行志願者收案，直至收案 400 人為止。於 2015 年，三民區共收案 202 人、楠梓區共收案 215 人。2016 年，三民區成對血清收案 50 人與額外收案 161 人，共 211 人，楠梓區成對血清收案 77 人與額外收案 131 人，共 208 人。

### 2. 初步登革熱抗體檢驗(ELISA)

我們使用速帝登革熱免疫球蛋白 M 檢驗試劑(SD Dengue IgM Capture ELISA)與速帝登革熱免疫球蛋白 G 檢驗試劑(SD Dengue IgG Capture ELISA)，測定血清檢體中，登革病毒的 IgM 與 IgG 抗體。針對檢驗結果任一陽性之血清檢體，將寄送至夏威夷大學進行中和抗體檢驗。

### 3. 中和試驗(Neutralization assay)

針對ELISA陽性血清檢體，進一步以中和試驗(Neutralization assay)測定，我們所利用之中和試驗是FRNT (focus reduction neutralization test)來確認之前是否有感染過任一種血清型或多種型別的登革病毒。

#### (子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗

##### 單株抗體的製備

利用磁珠接上由人類造血幹細胞生產出之登革病毒的RNA，之後加入到病患血清中的漿細胞，誘導其產生抗體後再和骨髓瘤細胞在含有聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)之溶液中融合，操作在 10 min 內完成，隨即把細胞平均分配在 96 well 細胞培養盤中。進行單株抗體的培養，隨後利用酵素免疫分析法篩選出具有辨識單一抗原的單株抗體融合瘤細胞。 $1 \times 10^7$  個融合瘤細胞注射入經 Freund's 不完全佐劑刺激過的多產免疫缺陷的母鼠腹腔中，等待腹腔漲大時，定時抽取腹水。收集起來的含單株抗體腹水將經含蛋白 A (Protein A)或蛋白 G (Protein G)之親和性層析管柱吸附後沖下，純化之單株抗體以抗體純化液相層析系統 (AKTA Prime System) 收集後，再以光譜儀及蛋白質分析法定量保存於 $-80^{\circ}\text{C}$  凍箱中。

##### 登革病毒

將  $4 \times 10^6$  恆河猴細胞株(Veo)繼代於 75T 細胞培養盤內，於隔天移除培養基後，將入 2mL 內含 1MOI 的第二型登革病毒 (strain:16681)的 2% DMEM 感染該細胞株後，病毒吸附時間為兩個小時，每半個小時進行搖盤，隨後加入 18mL 的 2% DMEM 放至細胞病變明顯時收集上清液，以 3000 rcf 旋轉 30min 後，將上清液收集並定量後凍存於負 80 度 C，直至進行藥物試驗時使用。 $1 \times 10^7$  的骨髓細胞用 1MOI 的第二型登革病毒感染後，於感染後第三天收集上清液並定量登革病毒的含量，作為感染擬人化小鼠使用。

### 細胞毒性測試

將牛樟芝拆成兩份，分別溶於 1 倍的磷酸鹽緩衝生理鹽水(1xPBS)及二甲基亞砷(DMSO)中，加入不同劑量又溶於不同溶劑的牛樟芝各自加到裝有  $1 \times 10^5$  人類造血幹細胞的試管當中(fig. 8)，再補培養液(10%RPMI)到 1mL。37°C 培養 7 天後以台盼藍(trypan blue)染色，計算細胞存活率，依據細胞存活率取得對細胞不造成損傷的有效劑量。

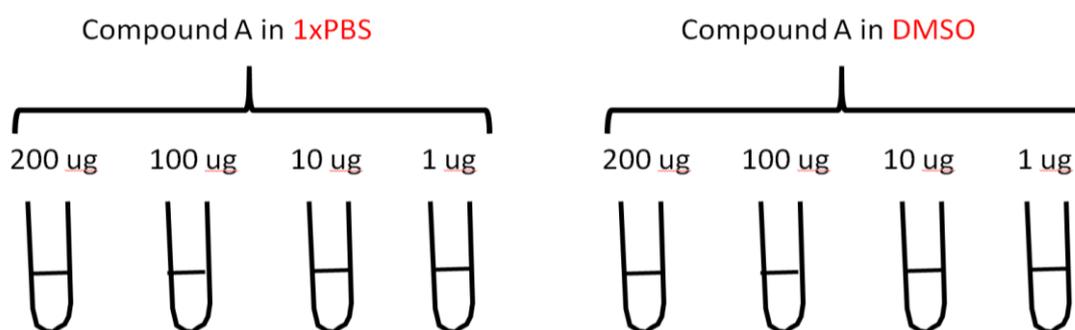


Figure 3. 不同劑量的牛樟芝溶於不同溶劑示意圖

取 1-200 ug 的牛樟芝分別溶於 1 倍的磷酸鹽緩衝生理鹽水(1xPBS)及二甲基亞砷(DMSO)中加入到人類造血幹細胞中，37°C 培養 7 天後以台盼藍(trypan blue)染色，計算細胞存活率

### 藥物抑制試驗

依據細胞毒性測試結果取得合適的有效藥物劑量後，將該劑量的牛樟芝與登革病毒(MOI=1)同時加入巨核細胞中，混和均勻後分成 8 個時間點 (Day0-3,5, 7, 10, 14)，根據不同時間點收上清液，暫時冷凍於-80°C 冰箱中，準備做病毒斑測試。

### 細胞激素分析

先天免疫反應細胞激素 IFN-beata 和 alpha，利用 ebioscience 所提供的酵素免疫分析試劑和步驟，分析藥物抑制試驗後該相關酵素的濃度。

### 登革病毒定量

先種  $8 \times 10^6$  BHK21 於 6 well 中，細胞貼附後，再將先前收的上清液取出解凍稀釋 10 倍, 100 倍及 1000 倍 3 種稀釋倍數，從中各取 0.4mL 加入到有 BHK21 的 6 孔盤中(需先移除培養液)，每種稀釋倍數 2 重複，使 DENV 感染  $37^\circ\text{C}$ ，2 小時(期間每 15min 搖盤一次避免細胞乾掉)，之後抽掉病毒液加入 3mL 1% 甲基纖維素(methylcellulose)(含 2%FBS)限制住病毒感染細胞的範圍， $37^\circ\text{C}$  培養 4-7 天待病毒斑出現後，再以 1xPBS 洗 2 次以後再加入結晶紫染色 2 小時之後使病毒斑更為清晰，即可計算病毒效價。

### NSG 小鼠

6-8 week 小鼠購買至國家動物中心，並飼養於有獨立氣壓控制系統，無感染原的成功大學小動物室，實驗動物的照護完全準守動物照護規則，並受到成功大學動物中心照護委員會核准 (IACUC#105085)，進行相關研究。

### 登革病毒感染小鼠模式

NSG 小鼠先利用化療藥去除體內的骨髓細胞後，利用尾靜脈方式打入  $1 \times 10^6$  骨髓細胞，於人類細胞移植後 8 周，臉頰採血採取血液，利用流式細胞儀分析周邊血液中成熟的人類細胞，並於利用  $1 \times 10^4$  pfu 骨髓細胞產出的登革病毒，以尾靜脈的方式感染擬人化小鼠，於感染後定期觀察血液中登革病毒的變化。

### (子計畫九)台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析

研究方法與進行步驟：

**\*登革病毒培養與分離：**將白線班蚊中腸細胞株 C6/36 培養於 96 孔盤中，隔日取病患血漿檢體以培養液 (RPMI1640) 分別做 20 倍、40 倍、80 倍、160 倍之稀釋，以稀釋後之病患血漿檢體置換 96 孔盤中原有之培養液，於恆溫培養箱 ( $5\% \text{CO}_2$ ,  $28^\circ\text{C}$ ) 培養五天後，取上清液抽取病毒 RNA 做血清抗原型判定。

**\*建立EB病毒轉化之記憶B細胞株**：首先利用EDTA管抽取10 ml感染過登革熱且已經痊癒之病人全血。利用Ficoll-Hypaque gradient centrifugation 純化出人類週邊血單核球細胞 (human peripheral blood mononuclear cell, PBMC)，以 $2 \times 10^5$ 的細胞密度培養在含20% FBS之RPMI 1640培養液中。先加入20nM FK506至培養液中，一小時後加入EB病毒 (MOI=50~100)感染B細胞，培養在37°C且含有5% CO<sub>2</sub>的環境。14天後即可得到不死化之EB病毒感染的B細胞株。序列稀釋不死化之B細胞株，並且以10-50 cells/well 的比例培養在96孔盤。細胞培養液需含有2.5 mg/ml CpG 2006及 irradiated之人類單核球細胞。5天後，該細胞培養上清液即含有人類單株抗體。

**\*篩選人類單株抗體**：酵素連結免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)篩選人類單株抗體。將使用8% PEG8000純化過之DENV1、DENV2、DENV3及DENV4病毒顆粒加入24% sucrose cushion，利用SW-41Ti轉子在32000 rpm的條件下進行90分鐘之超高速離心後，隨後用35% potassium sodium tartrate step density gradient以SW-41Ti轉子在32000 rpm的條件下進行2小時之超高速離心後即可獲得可用來進行ELISA分析之DENV病毒抗原蛋白質。首先將ConA (25µg/ml in 0.01M HEPES) coating 在ELISA用之96孔盤一個小時。使用PBS清洗96孔盤後，加入DENV病毒抗原，一小時後移除上清液。再以PBS清洗後，加入新鮮的RPMI-1640細胞培養液進行blocking。最後加入含有人類單株抗體之細胞培養上清液靜置一個小時，利用PBS清洗完畢後加入帶有peroxidase之抗人類免疫球蛋白G之二級抗體靜置一個小時。完成最後的清洗步驟後加入tetramethylbenzidine peroxide (TMB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 呈色，然後測量 optical density (OD) 450 nm吸收光數值。

**\*中和性分析(neutralization assay)**：將LLC-MK2細胞培養在12 wells 培養盤 ( $5 \times 10^5$  cells/wells)中，以 0.04, 0.4, 2, 4, 20, 40 µg/ml 之濃度序列稀釋人

類單株抗體後 加入100FFU之登革熱病毒。最後將抗體-DENV混合物加入 LLC-MK2細胞中，然後加入1% carboxymethyl cellulose overlay。兩天後移除上清液，並且加入1% paraformaldehyde固定細胞。然後以PBS清洗後加入 cross-reactive mouse WNV E60單株抗體，最後加入horseradish peroxidase anti-mouse 二級抗體以及加入 tetramethylbenzidine peroxide (TMB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 呈色，然後測量 optical density (OD) 450 nm吸收光數值。

**\*抗體依靠性增強分析(Antibody-dependent enhancement assay):** 將250 FFU的DENV病毒與不同濃度之hMAbs在37°C的環境下混合在一起。一小時後，將抗體-DENV混合物加入300 µl K562細胞 (cell density = 2.7 x 10<sup>5</sup>)培養三天。最終的抗體濃度應為 0.04, 0.4, 2, 4, 20, 40 mg/ml。最後利用 RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA)抽取細胞RNA，並且進行 quantitative reverse transcription (qRT)-聚合酵素鏈鎖反應分析。

**\*檢體採集:** 利用 EDTA 管抽 7~10 ml 的血液，保存於4°C，三天內分離血漿及白血球。血漿保存於-80°C，白血球保存於-20°C，依據實驗需要萃取病毒 RNA 與淋巴球 DNA。

**\*淋巴球 DNA 萃取:** 將 EDTA 管分離出的週邊血液單核球(PBMCs)，利用 酚(Phenol)及氯仿(Chloroform)萃取淋巴球 DNA，經由酒精沉澱後存放於-20°C 冰箱，待進行聚合酵素鏈鎖反應分析時再取出使用。

**\*登革病毒 RNA 萃取:** 將 EDTA 管分離出的血漿，利用 QIAamp Viral RNA Kit 抽取血漿中登革病毒之 RNA。最後的 RNA 產物保存於-80°C。將病毒 RNA 利用 random hexamer 與 oligo(dT)18 進行反轉錄步驟(25°C 10 分鐘，45°C 60 分鐘，85°C 5 分鐘)，最後的 cDNA 產物保存於-20°C。

**\*病毒血清抗原型分析:** 即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction)：利用 TaqMan 系統針對目標產物序列設計一段

互補特殊探針(probe)，藉由激發螢光物質產生可偵測的訊號，作為即時且專一性較高之檢測。透過此方法分析登革病毒之血清型別，以利進行後續病毒基因型之研究。

引子與探針序列如下：

引 子 序 列	
D1ST-F	5'- CAAAAGGAAGTCGYGCAATA-3'
D1ST-R	5'- CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC-3'
D1ST-p	5'- CATGTGGYTGGGAGCRCGC-3'
D2ST-F	5'- CAGGCTATGGCACYGTCACGAT-3'
D2ST-R	5'- CCATYTG CAGCARCACCATCTC-3'
D2ST-p	5'- CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTTCAA-3'
D3ST-F	5'- GGACTRGACACACGCACCCA-3'
D3ST-R	5'- CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT-3'
D3ST-p	5'- ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG-3'
D4ST-F	5'-TTGTCCTAATGATGCTRGTCG-3'
D4ST-R	5'- TCCACCYGAGACTCCTTCCA-3'
D4ST-p	5'- TYCCTACYCCTACGCATCGCATTCCG-3'

**\*病毒基因型分析：**聚合酶連鎖反應(PCR)：本計畫基因型分析主要是以 env 基因為主，並進行基因演化樹分析。第一次 PCR 利用原病毒 DNA 當模板，所使用的引子針對不同病毒血清型而有所差異，主要目的為擴增 DENV env 區基因片段；第二次 PCR 則是以第一次 PCR 的產物為模板進行複製，而後取 5 µl 第二次 PCR 產物以 1.2 % 洋菜凝膠電泳分析，以確定複製後產物大小同預期的 DNA 片段(2Kb)。

進行 PCR 反應時，反應溫度如下：

引子	反應溫度	循環
第一次 PCR		
DEN-1 : DN_5UTRF/D1_2630R	95°C 3 分鐘	1
DEN-2 : D2_14F/D2_2610R	95°C 20 秒	
DEN-3 : DN_5UTRF/D3_2621R	50°C 30 秒	
DEN-4 : DN_5UTRF/D4_2609R	72°C 2 分鐘 30 秒	35
	72°C 10 分鐘	1
第二次 PCR		
DEN-1 : D1_545F/ D1_2583R	95°C 3 分鐘	1
DEN-2 : D2_556F/ D2_2610R	95°C 20 秒	
DEN-3 : D3_541F/ D3_2621R	50°C 30 秒	
DEN-4 : D4_540F/ D4_2609R	72°C 2 分鐘	35
	72°C 10 分鐘	1

引子序列如下：

引子	序列
DN_5UTRF	5'-AGTTGTTAGTCTACGTGGACCG-3'
D1_545F	5'-ATTGCGATGGATTTGGGAGAG-3'
D1_2583R	5'-CACACACCCTCCTCCCATGCC-3'
D1_2630R	5'-TTTGYTTCCACATGATGTTCTC-3'
D2_14F	5'-ACGTGGACCGACAAAGACAGATTC-3'
D2_556F	5'-GACCTTGGTGARTTGTGTGAAG-3'
D2_2610R	5'-CARTCTTGTTACTGAGCGGA-3'
D3_541F	5'-CAACATGTGCACACTCATAGC-3'
D3_2621R	5'-GCTTCCACAAGAGGTTCTCCATTC-3'
D4_540F	5'-TGCACTCTCATTGCCATGGAC-3'
D4_269R	5'-CCTCGTGGTTGATCTAATTCC -3'

**\*基因演化樹分析**：在本研究中，我們預計將所得之 env 片段 PCR 產物送陽明基因體定序中心，進行基因序列分析。其所得到的序列經由 BioEdit 軟體排序後，再進行基因序列系統發生學的分析，經過 1,000 次 bootstrapping 的重覆取樣後，使用 Kimura's 2-parameter 模式計算距離，接著以 MEGA 5 軟體進行 Neighbor-joining (NJ) method 來建立 consensus 基因序列系統發生演化樹。為確認 NJ 法所作演化樹之穩定度及合理性，我們將利用 Phylip 3.6 軟體套件，執行依據 Maximum likelihood (ML) 統計方式所建立的 ML tree。對照兩方法所分析之結果用以確定 DENV 的基因型，並深入研究過去台灣 DENV 流行病株之基因差異性，以期能與臨床症狀之診斷交互分析。所使用來互相比較之各基因型病毒株取自 GeneBank 資料庫。

**\*登革熱病患癒後採血與家訪**：在個案出院後，一個月至一年期間視為恢復期，為了瞭解抗體產生與持續的情形，本研究與高雄醫學大學附設醫院包括：中和、大同與小港醫院，與登革熱患者聯繫告知本中心愈評估其體內抗體情況以及欲進行家訪以了解家中成員是否也有感染登革熱，以了解患者與家人互動於家庭中是否與登革熱的傳播與感染有相關性。同時若家屬同意讓採血，我們也給予營養津貼。一切的流程均遵守 IRB 的規範。

**\*家訪問卷**：使用之家訪問卷表列於附錄一。

## **(子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫**

### **(一) 實驗斑蚊來源**

自本市十大高流行風險行政區(鳳山、三民、新前埕、苓雅、鼓山、左營、旗津、前鎮、楠梓、小港區等)採集埃及斑蚊野外品系與自全高雄不分區採集白線斑蚊野外品系，經由衛生局疾病管制處養蚊室進行飼養及繼代培育。

台糖公司出品之維他命酵母粉作為斑蚊幼蟲飼料如圖 1、2 所示，每日餵食 1~2 次，將飼料粉至於盆中角落，每日清除水面的水膜，待子化蛹後取出至於水杯中，再放入蚊籠中(45x45x45cm)，待羽化成蚊後，以 10%之糖水作為其基本養份來源；另將小白鼠固定供雌蚊吸血，待兩日後以水杯(直徑 6.5 公分，高 7 公分)內沿杯壁鋪入擦手紙後加水至八分滿供其產卵，兩日後收起產卵之擦手紙陰乾後，再將產卵擦手紙放入水盆中孵化，供試驗斑蚊幼蟲為三齡至四齡為主。

## (二)實驗藥品及器材

### 1. 品名:蚊必滅粒劑 VectoBac

成份: *Bacillus thuringiensis* Serotype H-14 0.2%

(以下以 BTI 稱之)。

使用方法:

(1)戶外大面積:每公頃使用 2.8-11.2 公斤，每 7-14 天使用一次。

(2)室內小面積:每平方公尺約使用 1 公克，每 100 平方公分約 1-2 粒。

本計畫第二階段現地水溝溝渠灌流以此為劑量投放標準:

例如鳳山區漢慶街 82 巷 16 號面積為 37.8 m<sup>2</sup>(長 90m 寬 0.42m)，使用劑量 38 克；而前鎮區瑞隆路 194 巷 4 弄 40 號面積為 20.8 m<sup>2</sup>(長 52m 寬 0.41m)，劑量為 21 克。

(3)花瓶、冰箱聚水盤及幼蟲孳生容器:每 100 平方公分約 1-2 粒。

### 2. 學名:蛀蟲斃

成份:撲滅松 Fenitrothion 25.5% w/w

### 3. 學名:艾克特乳劑

成份:亞特松 Pirimiphos-methyl 25% w/w

4. 為檢驗現地水溝溝渠灌流後，水溝內有機磷劑(上述第 2、3 項)殘留量，

將撈取水溝水送上準環境科技股份有限公司檢驗。

### (三)分析儀器

#### 1. 鹽度計:

型號:MA887; 廠牌:Milwaukee

數位測量顯示光學儀器,可簡易測得三種測量單位,實際鹽度單位(PSU),千分之鹽度(PPT),或比重(S.G.(20/20)),如圖 3。

#### 2. 微量吸管:

型號:Nr.115; 廠牌:Assistant-assipette digital

數值可測得 10-100  $\mu$ l, 如圖 4。

### (四)實驗器材

1. PPE 容器(700ml):盛裝有機磷、BTI、海水、粗鹽水六項檢測溶液之容器。
2. 量筒(1000ml):測量海水或除氯自來水用。
3. 滴管:吸取實驗進行之子子,用來確認是否已死亡。
4. 摺疊紙巾:杯壁鋪入紙巾後加水至八分滿供斑蚊產卵,陰乾後作為卵條。
5. 酵母粉:台糖公司出品之維他命酵母粉作為幼蟲飼料,每日餵食 1-2 次。
6. 計時器:計時現地灌流水溝溝渠時間。
7. 沙包:現地灌流水溝渠時,阻擋水溝渠前後段,透過引流佈滿水溝坑洞。
8. 棉線及絲襪:垂釣放入子子的絲襪於灌流水溝中、下游處,作為海水灌流測試指標。
9. 玻璃瓶:灌流後水溝水取樣器皿。

(五)第一階段測試:測試六種溶液與子子致死率評估,以(1)清水與生物製劑 BTI、(2)清水與有機磷劑、(3)海水、(4)海水與生物製劑 BTI、(5)海水與有機磷劑及(6)對照組粗鹽,進行以下一系列實驗。

#### 1. 海水梯度濃度:

(1)前鎮漁港取回之海水鹽度為 30psu 加入除氯清水，再以濃度梯度稀釋成 20psu、15psu、10psu、5psu，各組實驗容器中置入培育的第一子代埃及斑蚊之幼蟲 20 隻，並以除氯之水為對照組。觀察並計數 2 小時、4 小時、8 小時、10 小時、…、120 小時、144 小時後斑蚊幼蟲存活個數。

(2)經 144 小時後存活的子子，持續供應酵母粉及豬肝粉混合飼料餵食，觀察不同海水濃度是否影響其成蛹乃至羽化；另實驗過程為確定子子是否真正死亡，以滴管輕微滴水於子子確認之

2. 埃及斑蚊、白線斑蚊子子在六種溶液中存活率：

將埃及(白線)斑蚊蟲卵致於清水與生物製劑 BTI、清水與有機磷劑-撲滅松 25% 0.1cc、海水 34psu 500cc、海水 34psu 與生物製劑 BTI、海水 34psu 與有機磷劑-撲滅松 25% 0.1cc 及粗鹽 15g 500cc 清水(30psu)觀測 7、9、12、30、33、36 及 48 小時間，幼蟲孵化後生存情況。

3. 淡海水(8psu)誘引埃及斑蚊產卵率：

蚊籠分成三組各放入養蚊室飼養 20 隻埃及斑蚊及產卵器，產卵器分別裝入 8psu 淡海水及除氯清水。第一組同時置放淡海水(8psu)及除氯清水，另兩組蚊籠各別放入淡海水(8psu)及對照組除氯清水之產卵器，並提供 10%糖水供成蚊吸食。

產卵器中盛水(淡海水、清水)後內壁襯以擦手紙，加入水量約至容器之三分之二，誘引斑蚊吸血後至產卵器產卵，蚊子所產之卵會黏附在擦手紙上，分別觀察三天、五天、七天產卵紙上產卵數量。

4. 六種溶液濃度稀釋成 1/2、1/4、1/8 致死率：

為模擬第二階段現地測試可能因下雨及其他未預期因素稀釋溶

液，因此將六種溶液設定濃度稀釋比例為 1/2、1/4、1/8，PPE 容器分別盛入清水與 BTI、有機磷劑；清水與 BTI 溶液放置兩顆藥劑，再加入除氯清水依濃度梯度稀釋濃度為 1/2、1/4、1/8；有機磷劑使用蛀蟲斃(撲滅松)100 $\mu$ l，再加入除氯清水依濃度梯度稀釋濃度為 1/2、1/4、1/8，前鎮漁港海水濃度為 33psu，再加入除氯清水依濃度梯度稀釋濃度為 16psu、8psu、4psu，粗鹽先檢測為 30psu，再加入除氯清水依濃度梯度稀釋濃度為 15psu、8psu、4psu；各組試驗容器內置入 20 隻培養之埃及斑蚊之第一子代幼蟲，實驗過程如圖 5。

#### 5. 十大行政區致死率測試

為了解各行政區子子是否有不同之生物特性，因此選定十個高流行風險行政區(鳳山區、三民區、新前程區、苓雅區、鼓山區、左營區、旗津區、前鎮區、楠梓區及小港區等)進行 3 重複致死率測試；實驗容器分別先裝除氯清水及前鎮漁港海水各 500ml，並於檢測當下再將 BTI 藥劑 2 粒、有機磷劑量 100 $\mu$ l 溶於清水或海水中，對照組以粗鹽溶於水中並檢測鹽度為 30psu；各容器中置入 20 隻培育之第一子代斑蚊幼蟲，每組行政區重複測試三次，並觀察其平均致死率。另為觀察白線斑蚊於六種溶液中是否與埃及斑蚊有所不同，因此使用培育白線斑蚊第一子帶幼蟲重複執行上述實驗流程，分別觀察 10 分鐘、20 分鐘、30 分鐘、1 小時、2 小時、...；直至幼體死亡並統計其致死效率，實驗過程中不再進行餵食，以避免因營養或水質偏差等造成的變異。

#### (六)第二階段:

1. 實驗地點:選定五條陽性水溝進行海水灌流現地測試，分別為(1)鳳山

區漢慶街 82 巷 16 號、(2) 鳳山區漢慶街 80 巷 21 號、(3) 前鎮區瑞隆路 194 巷 4 弄 40 號、(4) 前鎮區瑞隆路 208 巷 12 號、(5) 前鎮區武慶一路 194 巷 1 號(5 條實驗水溝組) 及前鎮區班超路 72 巷 2 弄 2 號(1 條對照水溝組)。

## 2. 實驗步驟：

- (1) 測試前先調查水溝孑孓孳生狀況及社區成蚊密度。
- (2) 測試組水溝分別灌入清水與昆蟲生長調節劑、清水與有機磷劑、海水與昆蟲生長調節劑、海水與有機磷劑及海水等 5 種溶液，另對照組為現地陽性水溝。
- (3) 養蚊室培養之孑孓放入絲襪並用綿繩垂釣至水溝積水上、中、下游處，作為海水灌流測試指標。
- (4) 記錄海水灌流前鹽份濃度、灌流海水量、施作溝渠長度、灌流時間、施藥劑量等灌流基本資料。
- (5) 海水灌流後三日、五日、一週及一個月後，調查水溝內孑孓孳生狀況、海水濃度、藥物濃度及社區成蚊密度等，以評估其灌流溶液殘效性。

3. 選定三民、前鎮、鳳山、苓雅及鼓山區分別灌流 9 條陽性水溝，灌流內容依序為清水與有機磷劑、海水與有機磷劑、海水、清水與生物製劑、海水與生物製劑；灌流後三日、五日、一週及一個月後，調查水溝內孑孓孳生狀況、海水濃度、藥物濃度及社區成蚊密度等，以評估其灌流溶液殘效性。

(子計畫十一)應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的  
斑蚊孳生源

**(一) 實驗室內的測試評估**

**A. 蚊蟲飼養**

於臺灣大學公共衛生學院 9 樓養蚊室步入式生長箱內 (27°C, 75% 相對溼度, 光週期 12 小時) 繼代培養埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 和白線斑蚊 (*Ae. albopictus*) 等蚊蟲。蚊幼蟲以適量酵母粉加以飼養, 待幼蟲化蛹後, 將蛹移入 32\*32\*32 立方公分的訂製壓克力養蚊籠中, 羽化為成蟲後以 5% 的蔗糖溶液飼養。成蚊交配後以人工餵血器供應雌蚊吸血, 並以 150 毫升燒杯供蚊蟲產卵, 產卵時需於燒杯內緣內加附濾紙供其產卵。

**B. 評估百利普芬對蚊成蟲壽命和生殖力的影響**

a. 佈置黏附百利普芬的材質

[百利普芬]

**商品一** Sumilarv (Sumitomo Chemical Co. Ltd.; 0.5G; 泡製(w/v); (Devine et al. 2009, Ohashi et al. 2012, Harris et al. 2013, Ohba et al. 2013)  
(臺灣中西化學; 「駐樂寶」昆蟲生長調節粒劑)

**商品二** 「駐有效」昆蟲生長調節液劑 (臺灣中西化學; 0.01 %w/w)

配置 1.0 % 百利普芬溶液, 取 1.0 克百利普芬粒劑加入 100.0 ml 異丙醇中並使其混合均勻和溶離釋出百利普芬藥劑, 並噴灑披覆於使用材質上。

b. 百利普芬對生物特性的影響

將 20 隻已交配吸血的埃及斑蚊或白線斑蚊母蚊放入燒杯, 燒杯中

含有百利普芬藥劑的材質，強迫接觸 1 小時後，釋放至一般的養蚊籠中 (30\*30\*30 cm<sup>3</sup>)，觀察記錄蚊成蟲壽命以及產卵數量，並以統計分析。

### C. 評估成蟲吸食含百利普芬糖水溶液 (誘引毒糖水餌站; Attractive toxic solution bait; ATSB) 後之影響

- (i) 取百利普芬粒劑加入 100.0 ml 7.0 % 糖水溶液中，分別配置 0.05、0.5、5ppm 的百利普芬糖水溶液，並使其混合均勻。
- (ii) 將 20 對埃及斑蚊或白線斑蚊放入具有不同濃度的百利普芬糖水溶液飼養籠中，使母蚊吸食 48 小時後，將百利普芬糖水溶液取出，提供人工血源，待吸血後，持續提供百利普芬糖水溶液，並觀察記錄蚊成蟲壽命及產卵數量。
- (iii) 使用 R 或 SPSS 套裝軟體統計分析。

### D. 評估蚊成蟲接觸兩種不同百利普芬產品後自動散播成效與攜帶百利普芬的劑量

#### a. 評估蚊成蟲接觸兩種不同百利普芬產品後自動散播成效

評估兩種市售之百利普芬劑型，分別為百利普芬粒劑型 Sumilarv 0.5 G (Sumitomo Chemical Co., Ltd.)，及百利普芬液劑型-駐有效昆蟲生長調節液劑 0.01% (Chung Hsi Chemical Plant, Ltd.)。百利普芬粒劑會預先泡丙酮攪拌隔夜，使有效成分充分溶出成 0.01% 的百利普芬丙酮溶液。實驗組之暴露材料為將定量 (2 mL) 的百利普芬粒劑丙酮溶液，及駐有效百利普芬液劑，分別均勻滴加在濾紙上 (單位面積百利普芬有效成分 = 18.3 mg/m<sup>2</sup>)。而同體積 (2 mL) 的純丙酮和純二次水溶液滴加於濾紙上是為控制組 (單位面積百利普芬有效成分 = 0 mg/m<sup>2</sup>)。將濾紙抽氣乾燥後，放進養蟲管內，每管皆置入 10 隻埃及斑蚊雌蚊與濾紙接觸一小時。接觸完畢後，再將蚊蟲

自養蟲管移至 25 mL 的二次水，均勻搖晃。自 25 mL 的水體取出 5 mL 的水溶液進行極致液相層析搭配三段四極棒串聯式質譜儀 (Ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometer, UPLC-MS-MS) 分析、定量；剩餘 20 mL 水溶液放入 10 隻 3 - 4 齡埃及斑蚊幼蟲，並加入酵母粉做為蚊幼蟲之營養來源，觀察其羽化抑制率 (圖一)。

b. 蚊蟲攜帶百利普芬的劑量 (極致液相層析搭配三段四極棒串聯式質譜儀 UPLC-MS-MS 分析)

實驗水樣先行添加 1/4 倍體積之 HPLC 分析級乙腈 (acetone nitrile, ACN) 以提升感度，並於進樣前經 0.20  $\mu\text{m}$  孔徑之 PTFE 過濾頭過濾。參照 Pengqiang et al. (2013) 之研究方法，實驗使用之分析儀器為 Waters Acquity UPLC 極致液相層析儀與 Waters Quattro Premier XE 三段四極棒串聯式質譜儀。使用之層析管柱為 Waters Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) 極致效能液相層析管柱，管柱溫度設定為 55 $^{\circ}\text{C}$ ，流速為 0.6 mL/min。水性動相為 5 mM ammonium acetate (pH=6.61-6.81)，有機動相為甲醇 (methanol)。樣品槽溫度為 4 $^{\circ}\text{C}$ ，水樣進樣體積為 40  $\mu\text{L}$ 。層析梯度為：起始動相 50% 有機相 / 50% 水相，2.5 分鐘後變為 90% 有機相 / 10% 水相，維持 0.3 分鐘，再降回 50% 有機相 / 50% 水相，總層析時間為 4.5 分鐘，百利普芬波峰滯留時間為 2.41-2.42 分鐘 (圖二)。

質譜儀方面則使用電灑法正離子模式 (positive ion electrospray ionization, ESI+)，利用多重反應監測 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式執行百利普芬的定性及定量。前趨離子百利普芬之  $m/z = 322.1$ ，進入第二段碰撞室被氮氣碰撞解離後產生之第一產物離子  $m/z = 95.7$  (定量用)、第二產物離子  $m/z = 184.9$  (圖二)，最佳化撞擊能量及電壓參數條件詳見表一。

百利普芬之定量使用外標準品校正法，將百利普芬標準品（純度=98.9%，購自 AccuStandard, Inc.）添加於與待測物相同條件之水與乙腈(4:1, v/v)，配置一 x 軸為已知濃度之百利普芬，y 軸為濃度相對應波峰面積之檢量線。樣品中百利普芬濃度之計算，係將測得的樣品中百利普芬波峰面積，代入當次上機配置之檢量線以求得濃度（圖三）。

## **(二) 半戶外 (semi-field) 的測試評估**

### **A. 成蟲接觸與攜帶百利普芬的半戶外 (semi-field) 的測試評估**

試驗方式參考與修改 Devi et al. (2014) 的方法（圖四）。於臺大公衛學院樹林下方空地選擇一處陰暗潮濕半開放有圍牆圍繞的區域中間放置兩個輪胎，使用噴霧罐噴灑百利普芬液劑至輪胎與圍牆壁面上，製造百利普芬散播站，後於周邊放置誘卵監測桶模擬隱藏性孳生源，桶內放置一個 250ml 燒杯，杯內加入劍水蚤水樣（藉由使用具有捕食斑蚊幼蟲能力的劍水蚤來避免此誘卵桶形成孳生源）與適量地下水，並於桶身做清楚標示。

#### **a. 定期收取監測桶內水樣**

收取水樣前先行記錄監測桶周遭環境（環境濕度、有無蚊成蟲、幼蟲活動..等等）、桶內蚊蟲跡象、蚊卵、蚊幼蟲、蛹的生長變化情形，後收取水樣。並依實際需要或現況發展調整監測時間頻率、百利普芬散播站、誘卵監測桶之位置。

#### **b. 水樣進行生物性分析測試**

誘蚊產卵桶內所殘留的水將帶回實驗室進行生物性分析，使用三、四齡埃及斑蚊幼蟲進行生物性分析，並觀察記錄其 adult emergence inhibition (IE%)，若  $IE\% > 50$  則會再使用 UPLC-MS-MS 儀器確認水樣內的百利普芬濃度。

$$IE(\%) = 100 - \left( \frac{T \times 100}{C} \right) \quad \begin{array}{l} T = \text{percentage survival or emergence in treated batches and} \\ C = \text{percentage survival or emergence in the control.} \end{array}$$

### (三) 野外實務試驗與建立標準操作流程

#### A. 實務評估樣區選擇

預計實驗樣區將選擇高雄市三民區的德智里、寶安里、寶獅里和楠梓區的加昌里、金田里 (圖五)，根據疾病管制署的疫情統計資料顯示，樣區所在的行政區去年皆有登革熱的個案發生 (圖六)。

#### B. 實務操作規劃

##### a. 試驗準備

在進行野外試驗前先行與地方衛生單位人員討論野外工作相關事宜並實地至南部樣區勘查。

##### b. 設置百利普芬散播站

在高雄市三民區、楠梓區試驗樣區內選擇合適的百利普芬噴灑點 (以 103、104 年高雄市衛生局及環保局所查報的陽性點為主)，後將駐有效液劑 (有效成分: Pyriproxyfen 0.01% w/w) 均勻噴灑至蚊蟲喜愛停棲處，像是地下室的牆壁接縫處，水溝內側邊壁，花園的花盆週邊、樹葉底部等處。

#### C. 實務操作監測與分析

於高雄市三民區、楠梓區樣區內的百利普芬散播站週邊挑選蚊蟲喜愛的點 (陰暗潮濕處) 佈置誘蚊產卵桶，以誘卵桶模擬隱藏性孳生源。桶內配置為：放置一個 250ml 燒杯，杯內加入劍水蚤水樣 (藉由使用具有捕食斑蚊幼蟲能力的劍水蚤來避免此誘卵桶形成孳生源) 與適量地下水。放置誘卵桶前會在桶身做清楚標示並告知附近住戶，避免造成民眾恐慌；放置後使用 GPS 標定、拍照紀錄周遭環境。預計共於樣區內設置 100 個誘卵桶。

每個月噴灑一次百利普芬，並記錄監測桶周遭環境、桶內蚊卵、蚊幼蟲與蛹的生長變化情形，並依實際需要或現況發展調整監測時間頻率、百利普芬散播站、誘卵監測桶之位置。實地監測內容如下：

(a) 監測桶周遭環境

環境濕度、有無蚊成蟲、幼蟲活動等等。

(b) 監測桶內蚊蟲跡象

檢視誘蚊產卵桶內水體中生物，若有蚊蟲屍體則藉由型態特徵辨識物種。卵片則帶回實驗室孵化辨認蚊種若無法成功孵化則藉由分子生物學技術確認物種，其 PCR 條件與引子設計均參考 Yukiko et al. (2010) 的研究。

(c) 誘蚊產卵桶內水體

a. 生物性分析

誘蚊產卵桶內所殘留的水將帶回實驗室進行生物性分析。於藥杯內倒入 20 mL 野外水樣後放入 10 隻 3-4 齡埃及斑蚊幼蟲，並加入酵母粉做為蚊幼蟲之營養來源，觀察其 adult emergence inhibition (IE%)，而後再使用 UPLC-MS-MS 儀器測量水樣內的百利普芬濃度。

$$IE(\%) = 100 - \left( \frac{T \times 100}{C} \right) \quad \begin{array}{l} T = \text{percentage survival or emergence in treated batches and} \\ C = \text{percentage survival or emergence in the control.} \end{array}$$

b. 極致液相層析搭配三段四極棒串聯式質譜儀 UPLC-MS-MS 分析

實驗水樣先行添加 1/4 倍體積之 HPLC 分析級乙腈(acetone nitrile, ACN)以提升感度，並於進樣前經 0.20 μm 孔徑之 PTFE 過濾頭過濾。實驗使用之分析儀器為 Waters Acquity UPLC 極致液相層析儀與 Waters Quattro Premier XE 三段四極棒串聯式質譜儀。參照 Pengqiang et al. (2013)

之研究方法，使用之層析管柱為 Waters Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m)極致效能液相層析管柱，管柱溫度設定為 55°C，流速為 0.6 mL/min。水性動相為 5 mM ammonium acetate (pH=6.61-6.81)，有機動相為 甲醇 (methanol)。樣品槽溫度為 4°C，水樣進樣體積為 40  $\mu$ L。層析梯度為：起始動相 50% 有機相 / 50% 水相，2.5 分鐘後變為 90% 有機相 / 10% 水相，維持 0.3 分鐘，再降回 50% 有機相 / 50% 水相，總層析時間為 4.5 分鐘，百利普芬波峰滯留時間為 2.41-2.42 分鐘 (圖二)。

質譜儀方面則使用電灑法正離子模式 (positive ion electrospray ionization, ESI+)，利用多重反應監測 (multiple reaction monitoring, MRM)模式執行百利普芬的定性及定量。前趨離子百利普芬之  $m/z=322.1$ ，進入第二段碰撞室被氮氣碰撞解離後產生之第一產物離子  $m/z=95.7$  (定量用)、第二產物離子  $m/z=184.9$  (圖二)，最佳化撞擊能量及電壓參數條件列於表一。

百利普芬之定量使用外標準品校正法，將百利普芬標準品 (純度 =98.9%，購自 AccuStandard, Inc.)添加於野外之控制組水樣與乙腈(4:1, v/v)，配置一 x 軸為已知濃度之百利普芬，y 軸為濃度相對應波峰面積之檢量線。樣品中百利普芬濃度之計算，係將測得的樣品中百利普芬波峰面積，代入當次上機配置之檢量線以求得濃度 (圖三)。

#### (d) 後續補充

收樣後的誘卵桶將補充劍水蚤水樣 (藉由使用具有捕食斑蚊幼蟲能力的劍水蚤來避免此誘卵桶形成孳生源)與適量地下水並放回原位持續監測。

(e) 使用 R 或 SPSS 套裝軟體統計分析。

### D. 建立試驗標準操作流程

將 18 個月的工作內容統整並系統化列出使用百利普芬防治蚊蟲的操

作方法，其標準操作流程可提供地方衛生單位再進行蚊蟲防治參考使用。

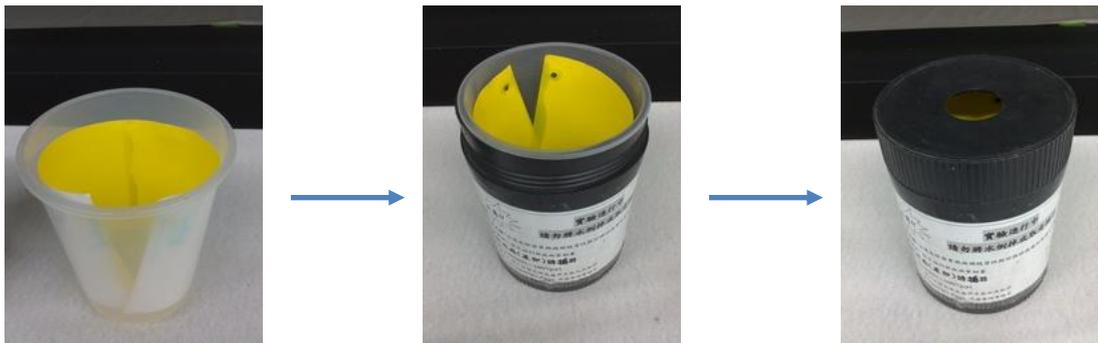
## (子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究

### (一)台灣南部地區登革熱病媒蚊空間分布調查

#### 1. 病媒蚊於建築物內外之空間分布

##### (1) 成蟲誘殺器製備 (請見下面附圖)

將裁剪好的黃色誘蟲黏紙(10.5\*15cm)(高冠牌) 2張，貼妥於塑膠杯內壁(960 胖杯，直徑 12cm\*高 14cm)，緩慢加入 300 ml 逆滲透水，將塑膠杯移至黑色誘殺桶(直徑 13cm\*高 17cm)內，蓋上桶蓋，即可進行誘殺。



(2) 調查區：高雄市苓雅區正心里、三民區鼎泰里與楠梓區翠屏里。

(3) 房型：每個里選擇平房區、五樓公寓區、高於 15 層樓高之大樓公寓等三種房型，每種房型各選 5 棟做為試驗樣點。

(4) 平房區於房舍外周邊置放三個成蟲誘殺器，室內與屋頂亦選擇合適地點各置放三個成蟲誘殺器。

(5) 五樓公寓區除了在室外地面放置三個誘殺器外，於室內 1F、3F、5F 的樓梯間各置放一個誘殺器，屋頂亦選擇合適地點置放三個成蟲誘殺器。

(6) 大樓區除在室外地面、地下室與屋頂各放置三個誘殺器外，以每五

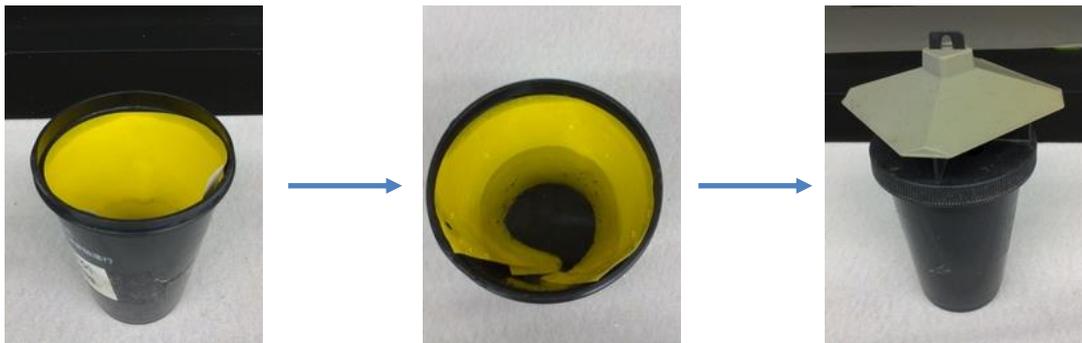
層樓為單位(1F、5F、10F、15F、20F、25F)選擇室內公共區域空間(如電梯口、樓梯間)，每平面單位各放置三個誘殺器。

(7)以上三種建築物房型每週進行一次蚊蟲種類與密度調查。總計調查104年10-12月(秋季)、105年1-3月(冬季)、105年4-6月(春季)、105年7-9月(夏季)共四梯次，每梯次進行為期三週的調查。

## 2. 病媒蚊於戶外樹叢的中空間分布

(1)小型成蟲誘殺器製備(請見下面附圖)

將裁剪好的黃色誘蟲黏紙(7.5\*21.5cm)2張，貼妥於小型誘殺器內壁(直徑9cm\*高13.5cm)，緩慢加入300ml逆滲透水，蓋上桶蓋，即可進行誘殺。



(2)樹種：灌木叢、3公尺以下小樹與5公尺以上大樹。分別於各對應高度放置10個小型成蟲誘殺器，每週記錄一次誘殺蚊蟲種類與蟲數，每季3次，總計調查104年9月、12月、105年3月、6月等四個季節。

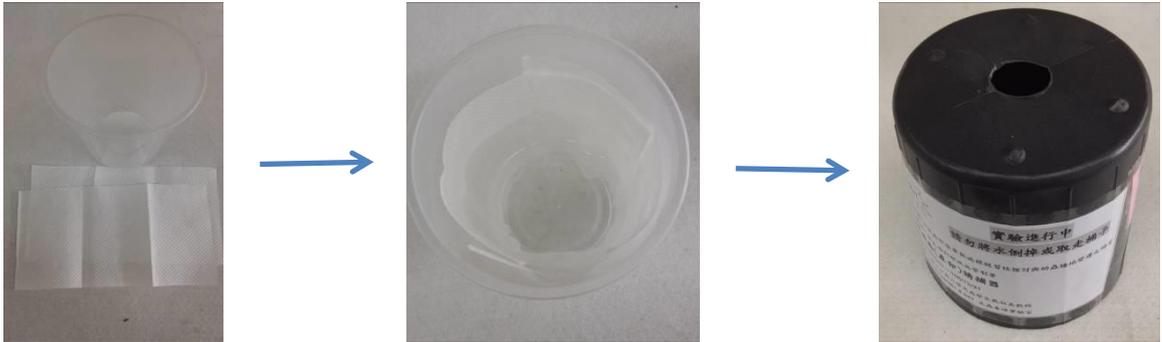
## (二)懷卵斑蚊產卵行為探討

1. 懷卵斑蚊於住家內外的產卵習性比較：

(1)懷卵雌蚊產卵誘集器製備(請見下面附圖)

將裁剪好的摺疊紙巾(11.5\*23cm)2張，沿塑膠杯內壁(960胖杯)貼妥，緩慢加入300ml逆滲透水，使摺疊紙巾緊貼杯子內壁，蓋上

裁剪好的黑色育苗盆(直徑 10.5cm\*高 14cm)進行誘捕。



(2)於高雄市選擇苓雅區舞服、福海與尚義三個里，每里徵得 20 戶人家同意，於其室外、客廳、廚房、臥室各置放一個產卵誘集器，進行每週一次病媒蚊室內、室外產卵比較調查。本試驗於 105 年 2 月、5 月、8 月、11 月進行四梯次調查，每梯次進行三次調查，每次調查，回收與更換摺疊紙巾並將有產卵的紙巾孵化，進行蚊種鑑定。

(3)於台南市選擇南區田寮、新興與文華三個里，每里徵得 20 戶人家同意，於其室外、客廳、廚房、臥室各置放一個產卵誘集器，於 105 年 6 月 28 日起，每週進行一次調查，連續調查 12 週，每次調查，回收與更換摺疊紙巾並將有產卵的紙巾孵化，進行蚊種鑑定。

## 2. 懷卵雌蚊於不同大小空間的產卵分散性探討

(1) 積水產卵容器製備 (請見下面附圖)

將裁剪好的摺疊紙巾(3\*20cm)置於 120ml 量杯(底 6\*高 7cm)內，緩慢加入 30ml 逆滲透水(高度約 1cm)，並使摺疊紙巾緊貼量杯內壁。

(2) 產卵空間：在長、寬、高分別為 60 x 60 x 60 cm 與 200 x 180 x 120 cm 的蚊帳空間進行試驗，每個空間均做好防蚊蟲進出之隔離措施。

(3) 試驗方法：每個空間各放置 30 個積水產卵容器，以 5 行 6 列方式平均擺放，再將飽血 3 天後之懷卵雌蟲，以單隻方式置入該空間內，令雌蚊產卵。除積水產卵容器外，室內不提供糖水給予雌蚊。3 天

後以酒精噴灑方式殺死雌蚊，同時記錄積水容器中產卵陽性率與卵數。本試驗對象為埃及斑蚊與白線斑蚊，每空間、每蚊種各測試 10 重複。

### (三) 埃及斑蚊幼蟲棲地調查與分析

在高雄市苓雅區正心里，於 105 年 8 至 10 月，每一個月針對該里進行一次地毯式巡視，除地面之積水容器外，針對高雄地區斑蚊是否已經產生以水溝、排水系統為孳生源進行調查。

## (子計畫十三) 建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略

### (一) 埃及斑蚊飼養

本計畫以埃及斑蚊(*Aedes aegypt*)為對象進行研究，此種衛生害蟲為登革熱傳播媒介。其生長週期在 25-28°C 條件下，將卵浸於水面下經數小時即開始孵化，幼蟲經 7-10 天化蛹，蛹經 1-2 天羽化成蟲，成蟲羽化經 4-7 天後供應吸血，吸血後 3-4 天產卵，卵經 5-7 天胚胎發育完成並進入休眠，遇水即孵化。

其飼養方法為：

1. 飼養室條件：溫度 25-28°C，相對溼度 60-70%，12 小時光照，12 小時黑暗。
2. 成蟲飼養：約 200 個蛹置於小水杯內(120ml)，放入 30cm×30cm×30cm 之紗網箱中，成蟲羽化 7-10 內可供忌避試驗，或於羽化 3-7 內天以 Hemotek 薄膜餵飼系統(Hemotek membrane feeding system) (Discovery Workshop, Accrington, Lancashire, UK) 進行人工餵血([Zeichner and Perich, 1999](#))，血液來源主要於屠宰場取得豬血供給血餐，使雌蚊充份吸血。

3. 蚊卵之收集：吸血後第三天將擦手紙巾沿布丁杯緣鋪平，並加入 100 ml 清水，經過 3-4 天後，收集產卵紙，晾乾後並標示日期置放於陰涼處之密閉盒內，以防蟲蟻嚙食，或晾乾後直接進行孵化繼代飼養。
4. 幼蟲之飼養：飼養水 2.5 公升先加 50mg 幼蟲食物，發酵使水中缺氧（可刺激孵化幼蟲破卵而出）。取一定卵數之卵紙，沉於水盤（33cm×25cm×5cm）底部，卵於數小時內即孵化，取出卵紙，每日清除水面浮膜，並給予定量食物（酵母粉+粒狀狗飼料=1:1），約 7~10 天後化蛹，逐日吸出新蛹移於小杯內，放入成蚊籠內等待羽化。

## （二）立克次體 Wolbachia

### 立克次菌對病媒斑蚊之影響

不同物種間立克次菌的感染能成功的要件，必須是兩物種在演化上及分類上接近，本計畫使用來感染埃及斑蚊作為疾病控制的立克次菌，來源為白線斑蚊(*Aedes albopictus*)的 Wolbachia (wAlbB strain)。立克次菌分離出後，必須先培養於白線斑蚊的細胞株(C6/36)中，繼代培養一段時間後，才能順利感染埃及斑蚊。自白線斑蚊細胞株分離的立克次菌，再以顯微注射方式打入埃及斑蚊胚胎，篩選方式為利用 wAlbB 立克次菌之專一性引子，進行 PCR 分析並確認埃及斑蚊成蟲各主要器官皆有感染。

## （子計畫十四）登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫

### （一）客製化組裝課程設計

將與登革熱防治有關聯的內容，依據綜合、防治、噴藥、病媒及醫療等類別規劃課程，並依衛教宣導對象的不同，將前述課程客製化成組裝課程，相關課程列表如下：

編號	類別	課程內容	時數
1	綜合	登革熱防治簡介	1
2	綜合	登革熱防治政策與跨局處溝通協調	1
3	綜合	社區動員與登革熱	1
4	防治	登革熱流行疫情處理機制	1
5	防治	疫情調查與溝通技巧	1
6	防治	如何落實公權力	1
7	防治	噴藥領隊訓練	1
8	噴藥	環境衛生用藥安全使用、防護及中毒急救	2
9	噴藥	噴藥機具使用、操作、維護	2
10	噴藥	噴藥機具使用、操作、維護（實務研習）	1
11	病媒	病媒蚊密度調查概要	1
12	病媒	病媒蚊密度調查概要（實務研習）	4
13	病媒	病媒蚊密度調查指數計算及報表整理	1
14	病媒	蚊種採集及鑑定（含標本鑑別）	1
15	醫療	登革熱臨床診治	1
16	醫療	登革熱與屈公症鑑別診斷	1

## （二）辦理多元化衛教宣導

依衛教宣導對象的不同，將前述課程客製化成組裝課程，並深入各機關組織、社區辦理衛教宣導講習，本計畫預計辦理 10 場次以上多元化衛教宣導講習。

組裝課程	時數	宣導對象
1、2、3、4、5、6、7、 11	6	1. 社區衛教種子師資 2. 衛生機關基層防疫人員
1、2、3、4	4	1. 里鄰長 2. 里幹事 3. 校護及衛生組長 4. 清潔隊員
1、2、15、16	4	醫事人員
1、2、4、6、8、9、10、 11、12、13、14	16	1. 衛生局防疫機動隊 2. 衛生局監測人員 3. 登革熱防治大隊成員
1、2、3	3	1. 社區民眾 2. 宗教寺廟人員 3. 市場從業人員、管理員 4. 資源回收業者 5. 環保志工 6. 建商及營造商 7. 公寓大廈管理委員會 8. 新移民 9. 人民團體 10. 港埠管理人員 11. 漁業從業人員及外籍漁 工 12. 勞工安全衛生管理人員

		13. 外籍勞工 14. 領隊、導遊 15. 風景區管理人員 16. 巡守隊志工 17. 公教退休人員 18. 其他
--	--	---

### (三) 病媒蚊密度調查暨社區衛教專業人員聘用與培訓

#### 1. 人員聘用

本計畫需聘用 4 名人員，每人每月薪資 31,560 元（含勞健保及勞退金），晉用後協助執行病媒蚊密度調查暨社區衛教等工作項目，聘用時間自聘用日起計 16 個月(3 人)及 18 個月(1 人)。

#### 2. 人員培訓：

本計畫人員進用後，先辦理 16 小時登革熱教育訓練，接著進行 1 個月病媒蚊密度調查實務研習，訓練完成後即執行以下工作項目。

#### 3. 人員工作項目：

自聘用日起計 16 個月協助執行病媒蚊密度調查暨社區衛教等工作項目，

(1) 病媒蚊密度調查：針對高雄市登革熱高風險流行區進行病媒蚊密度調查，每次以 1 個里為範圍採抽樣式調查，每里至少 50 戶（含）以上，查核指標包含：住宅指數、幼蟲指數、布氏指數、成蟲指數及容器指數等。

(2) 大型孳生源與髒亂點查報：執行病媒蚊密度調查時，如發現社區有大型孳生源與髒亂點，依程序轉知轄區區公所處理並

鍵入列管點系統。

(3)協助緊急防疫工作：本計畫聘用人員為防疫機動隊，必要時在衛生局、所領隊指揮下，協助防治範圍內家戶孳生源檢查及緊急噴藥防治（含噴藥機具操作）。

(4)社區衛教：本計畫人員經培訓後列為登革熱社區衛教種子師資，擔任本計畫多元化衛教宣導之授課講師。

(5)協助公權力執行：協助緊急防疫時，防治範圍內如發現登革熱病媒蚊孳生源，配合開立「違反傳染病防治法案件舉發通知書」，預估每月至少開立4件，預估本計畫期程開立約72張。

(6)本計畫各類報表彙整及資料建檔。

(7)其他臨時交辦事項。

(四)高雄市政府衛生局聘用人員運作模式、定期訓練、考評與平時工作稽核制度：

1. 人員管理：

(1)進用人員由本局面試後與進用人員訂定契約。

(2)進用人員每日依派工內容及工作進度，撰寫工作日誌，並於早中晚簽到各乙次，同時依相關規定辦理請假手續。

(3)本局辦理工作指派及督導管理，按日詳實記錄以備查驗。

2. 督導方式：

(1)由本局疾病管制處不定期於工作時間內至現場抽查工作狀況，並不定期辦理工作檢討會。

(2)由本局疾病管制處專案管理人員彙整相關執行資料作為績效管理考核。

### 3. 計畫結束後之就業輔導：

- (1)參加公立機構推介求職及參加相關就業說明會，出示證明者另予公假，以增加人員後續工作機會。
- (2)表現優良之進用人員，由用人單位視內部用人需求、適當職缺、預算經費運用狀況等予以留用；或日後相關臨時人力方式之優先進用考量，以促進後續就業機制。

### (子計畫十五) 血液製品之登革病毒偵測調查

#### (一)血品樣本來源

本計畫預計採用 2015 年 9-11 月登革熱疫情流行期醫療財團法人台灣血液基金會台南及高雄捐血中心去連結之血品樣本(台南 4000 個樣品及高雄 4000 個樣品)，樣本取用適量體積做檢驗後將把剩餘檢體歸還血液基金會保存。

- (二)所有血品樣本均以登革病毒 NS1/IgM/IgG 快篩試劑檢測血清中是否有登革熱的抗原與抗體。
- (三)並以即時反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 檢驗是否有登革熱病毒之 RNA 存在。
- (四)將數個 (例如 10 個) 檢體做混樣，若確定為陽性，將逐一重做 10 個檢體，同時將結果立即通知捐血中心。

### (平台一)行政暨教育資源平台

平台一部分，我們

1. 協助進行各子計畫第一、二、三期款撥付。
2. 進行子計畫五、十五計畫內容變更事宜。

3. 整合各子計畫月報表內容。
4. 整合各子計畫三個月進度、期中、期末報告。
5. 於 104 年 9 月 21 日、12 月 25 日及 105 年 3 月 24 日、6 月 24 日舉辦登革熱防治研究中心計畫進度報告會議，追蹤各子計畫進度。
6. 於 104 年 11 月 26 日至索羅門群島辦理登革熱國際研討會，並與 WHO 代表討論與報告疫情防治。
7. 105 年 10 月 23 日~24 日於高雄蓮潭國際會館，舉辦第五屆登革熱國際研討會，邀請新加坡、馬來西亞及美國，4 位外賓蒞臨學術交流，並舉辦子計畫成果發表，兩天與會學員為 353 人次。其中第一天 226 人，第二天 127 人。兩天 287 人中，醫療人員 273 人(95%)，其他 14 人(5%)；醫療人員分為，醫師:52 人(19%)、護理:90 人(33%)、醫檢:130 人(47.6%)、藥師:1 人(0.4%)。

### (平台二)蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

1. 建立標準檢驗流程，含病毒之核酸檢測分析(Real-Time RT PCR)、抗體檢測及快篩試劑檢測標準作業流程，進行除登革病毒外也包含其他黃熱病毒篩檢(如：茲卡病毒、日本腦炎病毒等)，並建立試劑平行比對、陽性與陰性品管方法以確保檢驗品質。
2. 協助臨床檢體檢驗已進行登革熱疑似案例之鑑別診斷，包含登革 NS1 蛋白檢驗、抗登革病毒抗體 IgM/IgG 檢驗與登革病毒核酸檢驗 (Real-Time RT-PCR)等。
3. 利用 Real-Time RT-PCR 標準檢驗方法輔以基因定序進行 2015 年高雄市登革熱爆發之陽性檢體回溯性病毒型別分析。

4. 提供本計畫新進人員訓練，含標準作業流程、檢驗操作及結果登錄、品質管理政策、實驗室規範及緊急應變流程等。
5. 提供南太平洋索羅門群島登革熱分生實驗室必需技術諮詢、標準作業流程建立、及耗材採買資訊。
6. 協助子計劃七，利用 ELISA((enzyme-linked immunosorbent assay, 酵素免疫分析法)進行社區型健康者採血進行抗登革熱抗體社區血清盛行率分析。
7. 協助支援「登革熱防治研究中心計劃」中各子計劃之執行；收案檢體之病毒檢測(子計劃一、二)；登革熱重症死亡病例回溯性病毒血清型別及抗體鑑定(子計劃五)；外展收案人力支援、檢體分類、收集、儲存與檢測抗體(子計劃七)；提供快篩試劑檢測蚊體(子計劃十三)；檢體分類、收集、儲存與檢測人力支援(子計劃十五)。

## 五、計畫執行情形說明

### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行 (%)	總支用數 (千元)	經費使用率 (%)
90%	80%	920(千元)	80%

#### (一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形

依照實驗設計各項運用符合實驗規劃。

#### (二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因

原本計畫於此時將進行廠商合作製造初步的快篩試劑，但因 PR1 的分子是非常嶄新的蛋白質，根據 Uniport 資料庫認為人體具有五個 isoform，所以需要逐一尋找專一性辨識這五個 isoform 的抗體，可能會協尋五個 isoform 專一辨識的抗體，確認登革熱病患特異性表現的 isoform 為何。

**(子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色**

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數 (千元)	經費使用率(%)
90%	90%	1,169(千元)	80%

**(一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形**

經費規劃和人力運用與工作匹配都符合規劃。

**(二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因**

執行結果與原計畫規劃是一致。

(子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探--某醫學中心  
 照護病例對照研究

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數(千元)	經費使用率(%)
95%	100%	444.6(千元)	63.51%

(一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形

本計畫配有研究助理一名,協助臨床醫師整理病歷資料(收集與建檔),所給予之工作量符合計畫原先需求預估。

(二)執行結果與原計畫規劃是否一致,如有差異並請說明重點及原因

計畫執行成果與原計畫規劃具高度一致性,以台灣地區人口學資料所分析出,具胃潰瘍、十二指腸潰瘍、糖尿病、鬱血性心衰竭、末期腎病及慢性腎衰竭等疾病史之群眾,易罹患登革熱重症之危險性比其他不具上述病史的人高出許多,將可為台灣地區醫護人員未來在治療照護具上述病史之登革熱患者時,於提供臨床醫療照護時能夠給予更多的關心與警覺,並在臨床上對於此類重症病患能有進一步的預警及適當的臨床處置。

(子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數(千元)	經費使用率(%)
80%	80%	501.5(千元)	71.6%

(一) 計畫經費、人力運用與工作匹配情形

人事費	72,000	54,000(75%)
業務費	462,750	412,481(89.1%)
管理費	35,000	35,000(100%)
總計	700,000	501,481(71.6%)

(二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因：

在執行上與原計畫規劃大致上一致，但在以下三點有所差異

1. 針對居民社經地位等因子未納入材料與方法及結果之原因

說明如下：

在高雄市社區居民社經狀況部分料的取得，如年收入等資料，是依”101 年高雄市家庭收支調查報告年刊”取得其資料，但公告資料只有分 10 大區域，如區域一：鳳山區、林園區、大寮區、大樹區、仁武區；區域二：包括了左營區、三民區、鳥松區這三區；區域三：前鎮區、小港區；區域四：新興區、苓雅區等共十區，並無單一行政區的資料可取得，如單獨是三民區或小港區或是前鎮區的資料。因疾管署的資料是以個別行政區做基礎，與社經狀況的分類的大區是不同的。登革熱每年流行區不同，例如三民區常有登革熱流行，但左營區及鳥松區較少有登革熱個案，硬是以區域二：左營區、三民區、

烏松區 的社經資料，來對比這三區的登革熱的發生率，統計上會失真。又如區域五：鹽埕區、鼓山區、前金區、旗津區，其中旗津區社經狀況較差，但登革熱發生率在特定年份很高，因統計時用的社經資料是屬於區域五，會拉高其社經階層，導致計算登革熱發生率也會失真。故綜合考量後，並未將居民社經地位因子納入分析。

2. 針對“前言中所提有關建案因素、居民社經地位等因子未納入材料與方法及結果之原因”

說明如下：

高雄市各地雖有新建案，並不代表所有新建案均有孳生源，依高市建管處資料顯示，高雄市在 2014 年 9 月至 11 月由衛生局及工務局巡查高雄市市建築工共 567 處；另邀集高雄市府衛生局、環保局、勞工局、勞工局、區公所等單位聯合稽查共 39 處，其中 7 處工地（小港區 4 處，苓雅區、鳳山區、左營區各一處）發現病媒蚊，依法開罰，另 3 處工地（苓雅區、鳳山區、左營區）勒令停工；若要以這 7 處不合格建案，去推估 103 年整個高雄市登革熱疫情，樣本數過小，統計上有困難。又依疾管署資料，103 年高市三民區有大量登革熱案例，但並未見到有新建案被發現有病媒蚊孳生源，而遭開罰，故要用建案因素去解釋登革熱發生率較高是有疑問的。

其次因建案旁邊有民宅，實際分析這些建案所在地時，發現建案旁的民宅也被舉發有病媒蚊孳生源，而建案所在的”里”的登革熱病患，究竟是因此建案所造成 或者是因為鄰近建案的民宅的孳生源所引發，在統計分析上無法分辨，也只能視建案為一處孳生源而已。但因建案有孳生源的總數，遠小於民宅有孳生源的總數，故使用建案有病媒蚊孳的資料，去分析高雄市 103 年登革熱大爆發其意義不大。

3. 而藉由問卷分析不同社區或行政區其民眾對登革熱瞭解及參與防治程度之差異性，藉以擬訂不同之防治方法及策略部份，因收案的對象來源以高雄市南區為主，進行比較分析，較不易看出小港區與前鎮區的差異，若有機會和高雄其他區域如三民區進行比較，較有機會看出不同社經階層或不同區域對登革熱的認知是否有差異。

### (子計畫五) 重症登革熱之流行病學及免疫反應研究

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數 (千元)	經費使用率(%)
80%	50%	291(千元)	32.3%

#### (一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形

本計劃的第一部份「回溯性世代研究」是由參與此計劃的醫師自行做病歷回顧並抄錄資料，資料的分析亦是由醫師完成，不需要研究助理。本計劃的第二部份「前瞻性世代研究」預定需要一名助理及實驗室耗材，才會動用到經費。由於高雄地區的登革熱並非每年都有大流行，因此我們預定在出現第一名登革熱重症病人，開始執行第二部份「前瞻性世代研究」時才開始動用研究經費。然而今年至11月初本院尚無任何登革熱重症病人住院至加護病房，故第二部份「前瞻性世代研究」無法進行，研究經費亦未動用。

#### (二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因

第一部份「回溯性世代研究」有不錯的成果，我們將於此報告的結果、討論、結論與建議中做說明。第二部份「前瞻性世代研究」因今年本

院尚無任何登革熱重症病人住院至加護病房故無法進行，研究經費亦未動用。

**(子計畫六)抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然藥物研發**

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數 (千元)	經費使用率(%)
100 (%)	100 (%)	1012 (千元)	96.40 (%)

**(一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形**

本計畫預定聘用專任助理一名，實際聘任一名，並且執行計畫工作項目與實驗。計畫主持人執行實驗進度監督與論文撰寫，協同主持人協助計畫進度監督與論文撰寫。計畫經費核定金額 1,050,000 元，總支用金額 1,012,000 元，經費使用率 96.4%。

**(二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因**

本計畫結果：

發現 HO-1 inducer、COX-2 inhibitor、登革病毒蛋白酶 inhibitor 及聚合酶 inhibitor 各一，並且皆於細胞及小鼠實驗模式確認其具有抑制登革病毒活性，而 NGS 分析與假陽性確認也持續進行中。此外本計畫更額外建立了 AG129 登革出血小鼠模式，預期將來能投入測試新藥是否可用於治療登革出血熱。總體而言，計畫執行結果與原計畫規劃一致。

### (子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數(千元)	經費使用率(%)
80%	80%	1384(千元)	78%

#### (一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形

計畫經費部分，僅花費收案與初步抗體檢驗等相關耗材，夏威夷大學方面，與當地廠商購買耗材，無法在本計畫中經費核銷，因此，編列用於中和抗體試驗的實驗耗材費無法使用，只能由夏威夷大學實驗室自行吸收。本計畫聘請一名專任助理，執行收案與抗體檢驗作業。收案時，因為需要較多人力，因此由平台一、二支援，其他部分，人力運用與工作匹配適當。

#### (二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因

在原計畫中，如當年度登革熱大流行，於隔年對同一受試者進行成對血清採檢。2016年再度收案，成對血清採檢不如預期，三民區的再檢率為25%(50/202)，楠梓區的再檢率為36%(77/215)，主要原因為初次採檢時，搭配其他活動聚集人潮，進行志願者收案，但隔年再採時，因為無相同的活動聚集人潮、再採的資訊不發達、採檢時間與地點的限制等原因，而導致再採率不高。雖然，為了解決這個問題，我們以電話通知、傳單寄送等方法，希望志願者再次參與，最後結果仍如前述，達到25%與36%。其餘的名額則由初次採血的志願者補齊400人。

於抗體檢驗方面，健康人血清的收案與初步抗體檢驗皆在台灣操作，陽性檢體再寄往夏威夷大學進行進一步的抗體中和試驗，由於運費限制，期望僅寄一次國際快遞，因此在2016年5月再採收案完畢後，進

行初步抗體檢驗與檢體出關同意申請等事務，於8月底將陽性檢體寄出。中和試驗需共同培養病毒與細胞，為了釐清志願者曾感染何種血清型，因此需要更多時間，分別與1~4型登革病毒共同測定，目前還在檢驗中。

#### (子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數(千元)	經費使用率(%)
80%	74%	1,221(千元)	74%

##### (一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形

項目	本年度核撥經費	經費使用情況
人事費	758,565	573,852(75.64%)
業務費	808,935	647,148(80%)
管理費	82,500	0(0%)
總計	1,650,000	1,221,000 (74%)

##### (二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因

目前執行的結果與原計畫規劃的大方向是一致的，唯有一些小細節因材料，如NSG小鼠最近才開始販售，進度尚有些緩慢。

**(子計畫九)台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析**

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數 (千元)	經費使用率(%)
90%	90%	1,021.7 (千元)	97.3%

(一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形

本計畫於使用計畫經費及人力運用與工作之調配均相符

(二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因

本計畫執行結果與原計畫規劃相符

**(子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫**

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數 (元)	經費使用率(%)
100%	100%	1,465.9(千元)	100%

(一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形

本計畫於使用計畫經費及人力運用與工作之調配均相符

(二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因

本計畫執行結果與原計畫規劃相符

**(子計畫十一) 應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的斑蚊孳生源**

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數 (千元)	經費使用率(%)
90%	90%	1,349(千元)	87%

(一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形

計畫經費、人力運用與本計畫工作執行上相互匹配。

(二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因

執行結果符合原計畫規劃。

**(子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究**

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數 (千元)	經費使用率(%)
100%	100%	1,408(千元)	80%

(一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形

經費、人力與工作配合良好

(二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因

執行結果與原計畫規劃一致

**(子計畫十三)建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略**

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數 (千元)	經費使用率(%)
90%	90%	1,600(千元)	84%

**(一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形**

本計畫於使用計畫經費及人力運用與工作之調配均相符

**(二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因**

本計畫執行結果與原計畫規劃相符

**(子計畫十四) 登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫**

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數 (元)	經費使用率(%)
100%	100%	2,403.9(千元)	100%

**(一)計畫經費、人力運用與工作匹配情形**

本計畫於使用計畫經費及人力運用與工作之調配均相符

**(二)執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因**

本計畫執行結果與原計畫規劃相符

### (子計畫十五) 血液製品之登革病毒偵測調查

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數(千元)	經費使用率(%)
85%	85%	400 千元	80%

#### (一) 計畫經費、人力運用與工作匹配情形

子計畫 15 研究經費運用於快篩試劑與相關耗材之採購，因沒有專用助理費用與 RT-PCR 試劑費，本計畫之執行不足之人力與經費皆仰賴平台二、子計畫 1/5/7 等協助，特此致謝。

#### (二) 執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因

執行結果與原計畫規劃是一致的，將在計畫截止日前盡力完成所有樣本之分析(除少數樣本體積原由血液基金會取得時即已不足以分析者)。

### (平台一)行政暨教育資源平台

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數(千元)	經費使用率(%)
100%	100%	1974(千元)	50.6%

#### (一) 計畫經費、人力運用與工作匹配情形

經費、人力與工作配合良好

#### (二) 執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因

執行結果與原計畫規劃一致

## (平台二) 蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

計畫執行		經費使用	
預定進度 (%)	實際執行(%)	總支用數(千元)	經費使用率(%)
80%	80%	2,944(千元)	75%

### (一) 計畫經費、人力運用與工作匹配情形：

因 104 年高雄市登革熱爆發之陽性檢體本中心收集約 2000 餘例，人力於上半年多花於檢體歸檔、整理收集，因此施作 Real-Time RT PCR 分型實驗進度較為落後，且本計畫(子計畫十七)經費即將用罄，恐無法以目前經費完成實驗操作，需其他子計畫經費支援。

### (二) 執行結果與原計畫規劃是否一致，如有差異並請說明重點及原因

原計畫規劃為建立登革熱標準檢驗實驗室及協助推廣檢驗量能，本中心完成標準作業流程之建立且遇登革熱疫情期，因此除協助臨床檢驗外，並進行 2015 年高雄市登革熱爆發之陽性檢體回溯性型別分析；且於 2016 年中遇新興傳染病茲卡病毒感染症，因而除原先登革病毒檢驗目的外，另新增其他黃熱病毒篩檢(如：茲卡病毒、日本腦炎病毒等)檢驗目的。

於輔導醫院申請認可實驗室項次，疾病管制署已輔導高雄市部分醫院成立登革熱實驗室，且其餘醫院意願不高，然而本中心仍提供技術諮詢服務。

1. 已於索羅門群島當地協助成立登革熱診斷實驗室，並培訓四位醫事檢驗師登革熱相關檢驗技術，包含在台訓練來台索國醫事檢驗師、於當地開設登革熱工作坊、以及於索羅門當地登革熱實驗室

建立登革熱檢驗標準作業流程。

2. 民生醫院及小港醫院曾諮詢本中心，小港醫院因缺乏檢驗儀器，暫無法設置。民生醫院之後直接找 CDC 舒博士指導。其他醫院因健保給付問題，皆是諮詢後便無意願。

## 六、結果

### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

目標一：測試 PR1 蛋白的專一性

#### 1.1 PR1 會專一性表現在登革病毒血清

初步結果顯示 PR1 會表現於登革熱患者體內，我們又增加檢體個數後，利用蛋白質體學分析健康者 (N=3) 和登革熱患者 (N=6)，結果如表一所示可以發現 PR1 非屬於其他蛋白免疫系統或是氧化壓力的蛋白分子，且只表現於登革熱患體內，進一步利用西方墨點法，確認此蛋白會表現於登革熱患者內，相較於健康者或是登革病毒感染的 Vero 細胞上清液，PR1 只表現於登革患者血清內(圖一)。

#### 1.2 臍帶血細胞非分泌 PR1 的主要細胞

想了解 PR1 的表現是由何種細胞所分泌或是只有在體內特異表現，臍帶血細胞已知容易收到登革病毒的感染，我們利用會受到登革病毒感染的臍帶血細胞的上清液，以西方墨點法進行 PR1 表現的分析，結果發現登革病毒感染的臍帶血細胞不會分泌 PR1(圖二)

目標二：臨床試驗登革快篩 PR1 蛋白的試劑。

#### 2.1 PR1 敏感度與市售 SD 或 Drop- NS-1 快篩的比較

進入臨床檢驗前，我們需要了解 PR1 對偵測登革病患的專一性和敏感度，才能知曉此 PR1 能否作於診斷使用。從目標 1.1 的結果中發現

PR1 只會表現在登革病患血清中，Uniport 蛋白質工程資料庫提供的資訊庫進行比對，結果發現 PR1 在人類族群會有五個 isoform，進一步我們利用酵素免疫分析法先進行登革熱患者 PR1 isoform1 的表現，結果發現登革熱患者體內的 PR1 isoform1 可以在病程第二天便被偵測到，之後到第五和第六天達到最高峰(圖三)，隨後與市售的 SD 或是 CTK 的快篩進行敏感度的比較，可以發現全部的登革熱確診病患都具有 PR1 的表現(圖四)，顯示 PR1 的敏感度很高。

## 2.2 PR1 專一性的分析

利用 PR1 isoform1 的酵素免疫分析法分析是健康人的血清，來比較登革熱患者體內的 PR1 表現的差異，結果如圖五所示，健康者體內的血清都能偵測 PR1 的表現，顯示 PR1 isoform1 並不專一性表現於登革熱患者體內。

目標三：製造初期的登革快篩診斷模組。

從 Uniport 資料庫中發現 PR1 具有五個 isoform，從我們的初步結果發現 isoform1 並不特異性表現於登革熱患者體內，進一步我們將利用五個 isoform 胺基酸序列進行比對後，特別尋找特異性的抗體進行分析，確認何種 isoform 會特異性表現在登革熱患者體內後，將會聯繫廠商進行初步的快篩平台建立。

## (子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色

本計畫藉由三個目標來了解造血幹細胞在登革病毒感染後扮演的角色，和對登革熱致病機轉的相關性，同時了解不顯性感染者在登革病毒傳播的角色，因每個目標需要許多實驗的結果才能完成，實驗結果呈現如下：

## 目標一、登革病毒如何造成人類造血幹細胞功能性的喪失

### 1.1 探討巨核細胞世系在登革病毒感染的角色

#### 1.1.1 登革病毒感染的巨核細胞世系的細胞量的變化

#### 1.1.2 表現登革病毒非結構蛋白 1(NS-1)的巨核細胞世系的表面標誌

#### 1.1.3 登革病毒對從造血幹細胞中純化的巨核細胞世系的感染率

#### 1.1.4 登革病毒對造血幹細胞趨化的巨核細胞世系的感染能力

## 目標二、人體內登革病毒型態的解析

### 1.1 探討人體內登革病毒和體外培養病毒的型態差異

#### 1.1.1 體內外登革病毒的型態差異

#### 1.1.2 體內登革病毒顆粒的生物特性

## 目標三、探討在不顯性感染者中人類造血幹細胞所扮演的角色

### 3.1 不顯性感染者周邊造血幹細胞的組成

#### 3.1.1 不顯性感感染者的收案情形

#### 3.1.2 登革病毒對不顯性感染者周邊血細胞的感染率

#### 3.1.3 不顯性感染者周邊血幹細胞分佈情形

## 目標一、登革病毒如何造成人類造血幹細胞功能性的喪失

### 1.1 探討巨核細胞世系在登革病毒感染的角色

#### 1.1.1 登革病毒感染的巨核細胞世系的細胞量的變化

人類造血幹細胞主要有兩大類，一類為淋巴細胞的前驅細胞-共同淋巴前驅造血幹細胞，另一類為巨核細胞、紅血球、血小板和單核球的前驅細胞-共同血球前驅細胞。可以利用幹細胞聚落測試，將共同血球前驅細胞以聚落型態不同可以期區分為顆粒細胞聚落 CFU-G (Colony forming unit-granulocyte)、巨嗜細胞與顆粒細胞聚落 CFU-GM (Colony forming unit-granulocyte, macrophage)、巨嗜細胞聚落 CFU-M (Colony forming

unit-macrophage)、紅血球細胞聚落 CFU-E (Colony forming unit-erythroid)、顆粒細胞聚落、紅血球、巨嗜細胞和巨核細胞聚落 CFU-GEMM (Colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte)，所以我們利用幹細胞聚落測試登革病毒感染後的骨髓幹細胞聚落的變化，相較與沒有感染的組別，結果發現巨核細胞相關的聚落，如 CFU-E 和 CFU-GEMM 都有明顯的減少 (Fig1A)

### 1.1.2 表現登革病毒非結構蛋白 1(NS-1)的巨核細胞世系的表面標誌

利用細胞染色登革病毒非結構蛋白 1 (ns-1)的表現在何種骨髓幹細胞世系中，結果顯示巨核細胞世系 (CD61+CD41a+) 的前驅細胞 (CD133+CD34+CD61+CD41a+)在登革感染後第一天會表現很高的 ns-1，隨後於感染後第二天可以偵測高表現量的病毒顆粒，這暗示巨核細胞世系可能為登革熱感染的宿主細胞。

### 1.1.3 登革病毒對從造血幹細胞中純化的巨核細胞世系的感染率

Fig2.的結果暗示著骨髓細胞中的巨核細胞世系可能為登革病毒的宿主細胞，而骨髓細胞中巨核細胞世系是由巨核前趨細胞或成熟的巨核細胞所組成，進一步我們利用磁珠分選系統，將骨髓細胞中的巨核前趨細胞 (CD133+CD34+CD61+) 或成熟的巨核細胞 (CD61+)純化出來，利用 1MOI 登革病毒感染後於不同時間點收集感染後的上清液，之後以病毒斑偵測法偵測每個時間點登革病毒的含量，相較於登革病毒感染 CD133-CD34-CD61-的組別而言，登革病毒會在 CD133+或 CD34+或 CD61+細胞所產生的病毒大於非 CD133CD34CD61 的細胞。這結果暗示巨核前驅幹細胞容易受到登革病毒的感染產生出病毒顆粒。

此外骨髓細胞純化出的成熟巨核細胞也與巨核前驅幹細胞的結果相同，相較於非成熟巨核細胞，其受登革病毒感染的成熟巨核細胞能產生較高的

登革病毒量(Fig4.)。這些結果暗示骨髓細胞內的巨核細胞世系容易受登革病毒感染並複製出病毒。

#### 1.1.4 登革病毒對造血幹細胞趨化的巨核細胞世系的感染能力

Fig3 和 Fig4 的結果顯示著巨核世系的細胞容易受登革病毒的感染，因此我們利用磁珠分化系統，從臍帶血細胞中純化出 CD133+造血幹細胞後，依照巨核細胞分化試所建議的細胞量，將固定的 CD133+細胞與巨核細胞分化培養基培養 14 天。利用流式細胞儀偵測培養 14 天的細胞表現巨核細胞(CD61+)的比例，結果顯示相較於未分化前，分化後的巨核細胞和幹細胞的比例是明顯增加(Fig.5A)且登革病毒感染分化後的巨核細胞世系所產生的病毒量相較於分化前為高(Fig5B)。

### 目標二、人體內登革病毒型態的解析

#### 2.1 探討人體內登革病毒和體外培養病毒的型態差異

##### 2.1.1 確認人體內病毒顆粒和體外培養之病毒型態不同

登革熱的預防和治療是登革熱在臨床上相當重要且急迫的議題，因為對登革病毒在引起疾病和感染機制上的不了解，使得臨床上抗病毒藥物和疫苗的開發頻頻受阻，目前臨床上對於登革熱病患只能透過支持性的治療來幫助患者度過重症的危險期。然而目前用於研究抗登革病毒的藥物和疫苗所使用的登革病毒多來自體外培養的登革病毒，而現下根據體外病毒的特性所設計的抗病毒藥物和病毒並不能有效地在人體內清除登革病毒，且無法在人體內對四種不同血清型的登革病毒達到有效且廣泛的保護作用，因此了解登革病毒在人體內的型態和組成對於登革病毒的感染機制和抗病毒疫苗藥物的開發是其必要的。為有效的研究人體內的登革病毒型態，首先我們透過直接濃縮登革熱病患血清，透過電子顯微鏡的技術直接觀察血清中的登革病毒型態，並利用西方墨點法(Western blotting)的技術來分析人體

內和體外 Vero 細胞株培養的登革病毒的病毒蛋白組成差異(Fig 6.)。

透過電子顯微鏡我們發現人體內所產生的登革病毒型態上不像體外產生的登革病毒來的固定，且在病毒顆粒外膜處存在著類似宿主細胞外膜的結構；然而在進一步利用西方墨點法分析體內外登革病毒的病毒蛋白組成後更發現，人體內的病毒不帶有登革病毒莢膜(capsid)的結構蛋白，這也許可以解釋我們在人體內病毒中所看到大小不固定的病毒顆粒型態。在了解體內外登革病毒的型態不同之後，我們再進一步透過分析體內病毒顆粒內外膜的大小比例將體內的登革病毒細分成 6 個不同的病毒群(Fig 7.)，並統計其所占比例。

### 2.1.2 觀察體內登革病毒內的遺傳物質，確立病毒完整性

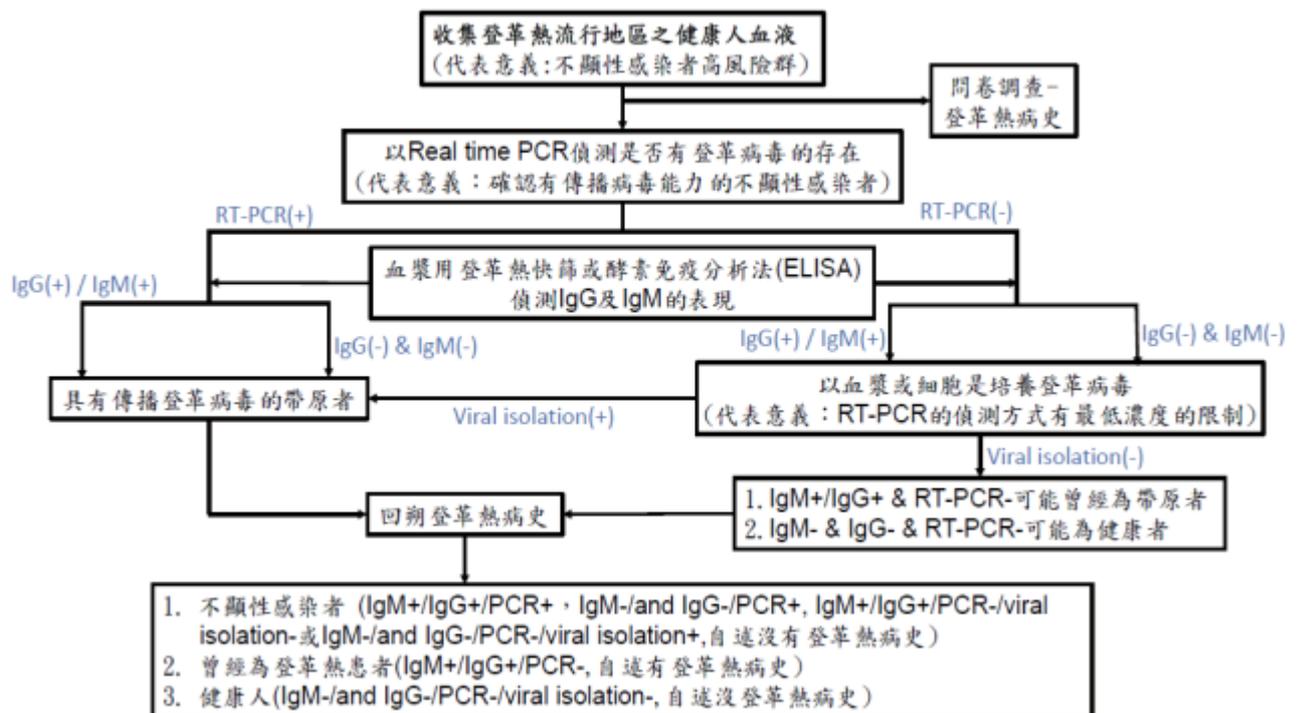
一個完整的病毒除了型態和病毒蛋白能被分析觀察到之外，其感染和複製的能力更是一個完整病毒必須具備的生物特性。而登革病毒為單股正股的 RNA 病毒，即便在沒有完整病毒結構的時候，只要登革病毒的遺傳物質能成功被轉錄轉譯，即能產生具有感染性的完整登革病毒顆粒，因此我們進一步的透過觀察體內登革病毒的遺傳物質存在，並以病毒斑試驗(plaque assay)來證實我們所觀察到的體內登革病毒是完整且具感染性的。首先我們根據先前所發表的文獻<sup>1</sup>設計一段能標定登革病毒遺傳物質的 DNA 序列(5'-GCT GTG TCA CCC AGA ATG GCC AT-3) [5]，來專一性的標定病毒顆粒中的病毒遺傳物質，並利用免疫金原子標定的技術在電子顯微鏡下觀察病毒遺傳物質和病毒顆粒的位置(Fig 8a.)。而後再以病毒斑試驗來分析體內分離出的登革病毒之感染性(Fig 8b.)。

## 目標三、探討在不顯性感染者中人類造血幹細胞所扮演的角色

### 3.1 不顯性感染者周邊造血幹細胞的組成

#### 3.1.1 不顯性感感染者的收案情形

目前我們收集到 18 個健康者血液，因不顯性感染者是指一群本身未有登革熱病史，在受到登革病毒感染後也無明顯的登革熱臨床症狀但血液樣品能檢測出登革病毒的健康者，暗示需利用 Laboratory test 才能偵測不顯性感染者的存在。在登革熱流行地區中已發現不顯性感染者相較已確定為登革熱患者的比例大約是 1 到 13 比 1[6]，暗示登革熱流行地區有大多數人為不顯性感染者。依照這些研究的背景顯示出來的不顯性感染者可能的收案地區和偵測方式，設計以下的方法來偵測不顯性感染者：



此外利用 10% PRMI 培養每位捐贈者 PBMC 於不同時間點收集上清液後以病毒斑偵測從 PBMC 釋放出來的登革病毒的含量，每位健康捐贈者的結果例於表一，我們目前收集到兩位可能是登革熱不顯性感染者，我們將定期對這兩位不顯性感染者進行抽血了解兩位的周邊血細胞的組成差異及兩者的周邊血是否容易被登革病毒感染，至於康復但仍檢出病毒的登革

熱病患再傳播疾病之可能性，目前沒有直接的研究顯示出這類型的病患傳播登革病毒的比例為多少，依照舊有的文獻顯示登革病患在發病就醫後的4-5天都可以藉由蚊子傳播病毒，就醫前病毒其實已在該病患身體內流竄，這時期也是具有將病毒傳播出去的能力[7]，這表示只要體內具有登革病毒的個體都是具有將登革病毒傳播給其他人的可能性。

### 3.1.2 登革病毒對不顯性感染者周邊血細胞的感染率

我們定期抽取不顯性感染者周邊血液，利用登革病毒體外感染 Donor1 周邊血液細胞，結果發現 Donor1 的周邊血細胞易受登革病毒感染並且產生出病毒顆粒，暗示 Donor1 周邊血液內有一群容易受到登革病毒感染的細胞群，且不同時間點所收集到的周邊血細胞受到登革病毒感染所產出來的登革病毒的量也有所不同，這暗示可能受到登革病毒感染並產生病毒顆粒的細胞族群的表現量有所不同且周期性的存在(Fig10)。

### 3.1.3 不顯性感染者周邊血幹細胞分佈情形

從 Fig10 的結果顯示不顯性感染者周邊血液中有一群細胞族群容易受到登革病毒的感染，在 Fig1-5 的結果暗示巨核細胞世系可能是登革病毒的宿主細胞，因此我們將會利用流式細胞儀分析不顯性感染者周邊血液巨核細胞世系的組成比例的狀況。

根據登革病毒在周邊血球的感染性，我們將不顯性感染者的周邊血球數據分成可被登革病毒感染(PFU+)及不可被登革病毒感染(PFU-)兩組，利用抗體免疫染色的方式，分別將細胞標定（血球幹細胞標記、巨核細胞世系標記、吞噬細胞標記）後，透過流式細胞儀分析。Figure 11 中，我們將細胞分成血球幹細胞(Hematopoietic Stem Cell-HSC, Multi-Potent Progenitor cell-MPP)、巨核前驅細胞(Early Megakaryocyte Progenitor-EMP)、巨核細胞世系(Megakaryocytic lineage cell)和成熟的巨核細胞(Megakaryocyte)。從圖中

可以觀察到 PFU+的細胞百分比都比 PFU-的組別來得高，並且巨核細胞世系以及成熟的巨核細胞都有顯著性的差異。這暗示著我們登革熱的感染性與血球幹細胞及巨核細胞世系在血液中的含量有一定的關係，同時也與 Figure1-5 的實驗結果相互呼應。

### 3.1.4 不顯性感染者周邊血球細胞與病毒量變化的關係

我們追蹤登革病毒在同一個不顯性感染者周邊血球的感染性與其細胞組成之間的動態關係。因登革病毒需要依賴宿主細胞來產生後代，而在一定濃度的病毒感染下，細胞的數量的多寡影響病毒的產量，代表登革病毒可能的宿主細胞數量在不同時間的分佈會與病毒產生量是相似的曲線，所以我們觀察到從 Fig10 所推論出來的細胞族群的細胞含量變化，與病毒的生產量曲線圖的變化(Fig11)。大部分兩點之間的細胞含量變化（藍線）與病毒生產量（紅線）是相似的，顯示個體周邊血前趨巨核細胞世系是登革病毒的主要宿主細胞並且細胞數量會影響病毒的產量。由於周邊血球的細胞族群相當複雜，細胞與細胞之間會互相影響，是實驗結果差異的其中一個可能性。為了克服這樣的困難，接下來的實驗將會利用磁珠分選的方式，將特定的細胞取出並且單獨的進行登革熱感染能力實驗。

## (子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探--某醫學中心

### 照護病例對照研究

本研究以單一醫學中心-高雄醫學大學附設中和紀念醫院於 2014 年 1 月 1 日至 2014 年 12 月 31 日通報確診的登革熱病患為研究對象，期間共收集 1822 名登革熱確診個案。符合登革熱重症定義的病例，共有 35 名(即病例組)。再由非登革熱重症病例配對性別及年齡，以 1：4 隨機抽取 140 名對照組個案。

表二為病例組與對照組之基本人口學資料，其中病例組男性為 20 名 (57.1%)，女性為 15 名(42.9%)；病例組的平均年齡為 67.8 歲±19.69 歲，身高為 160.06 公分±8.76 公分，體重為 62.32 公斤±11.49 公斤，BMI 值為 24.32±4.01，有 34 位住院；對照組的平均年齡為 66.92 歲±18.75 歲，身高為 161.30 公分±9.08 公分，體重為 63.83 公斤±12.89 公斤，BMI 值為 24.51±4.40，有 109 位住院；病例組與對照組之基本人口學資料，除了有無住院以外，其他變數並無統計上之顯著性差異。

表三為病例組與對照組之臨床症狀，本研究所收集之臨床症狀資料，病例組與對照組有統計顯著差異之症狀包括：骨頭痛(8.6% vs 27.1%)、肌肉痠痛(31.4% vs 60.0%)、皮疹(17.1% vs 40.0%)、黃疸(5.7% vs 0.0%)、腸胃道出血(60.0% vs 20.0%)、血漿滲漏(94.3% vs 32.1%)、出血徵候(80.0% vs 50.0%)、血小板小於 10 萬(97.1% vs 82.9%)、登革出血熱(68.6% vs 19.3%)、血紅素量(62.9% vs 26.4%)、血球容積比(65.7% vs 29.3%)、C-活性蛋白(8.6% vs 69.8%)、血中尿素氮(46.4% vs 26.2%)、血清肌酸酐(45.7% vs 18.3%)等臨床症狀。

表四為病例組與對照組之臨床檢驗數據，本研究所收集之檢驗數據資料包括：白血球數、血紅素量、血球容積比、平均紅血球容積、血小板數、分葉型嗜性白血球、淋巴球、嗜酸球、單核球、血糖、血清麩胺酸苯醋酸轉氨基酶、血清麩胺酸丙酮酸轉氨基酶、C-活性蛋白、血中尿素氮、血清肌酸酐、血清鈉、血清鉀、凝血酶原時間、部份凝血活酶時間、部份凝血活酶時間等資料。統計結果顯示白血球數、血紅素量、血球容積比、血小板數、淋巴球、C-活性蛋白、血中尿素氮、血清肌酸酐、凝血酶原時間、部份凝血活酶時間、部份凝血活酶時間等變數，病例組與對照組有統計顯著差異。

表五為病例組與對照組之疾病史單變數分析結果，有胃潰瘍(危險對比值為 2.89, 95%信賴區間為 1.14-7.30)、十二指腸潰瘍(危險對比值為 4.89, 95%信賴區間為 1.69-14.17)、糖尿病(危險對比值為 2.13, 95%信賴區間為 1.00-4.53)、鬱血性心衰竭(危險對比值為 3.25, 95%信賴區間為 1.14-9.28)、末期腎病(危險對比值為 13.03, 95%信賴區間為 1.31-129.40)、慢性腎衰竭(危險對比值為 4.04, 95%信賴區間為 1.69-9.66)等疾病史為登革熱重症之危險因子。

表六為登革熱重症危險因子之多變數邏輯式迴歸分析結果，在調整年齡、性別、BMI 值及表中的疾病史後(包括胃潰瘍、十二指腸潰瘍、糖尿病、鬱血性心衰竭、末期腎病、慢性腎衰竭)，發現十二指腸潰瘍(危險對比值為 4.89, 95%信賴區間為 1.55-20.55)與慢性腎衰竭(危險對比值為 4.04, 95%信賴區間為 1.64-14.61)在控制其他疾病史危險因子後仍具有統計意義。

#### **(子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析**

##### **(一) 第一部份結果**

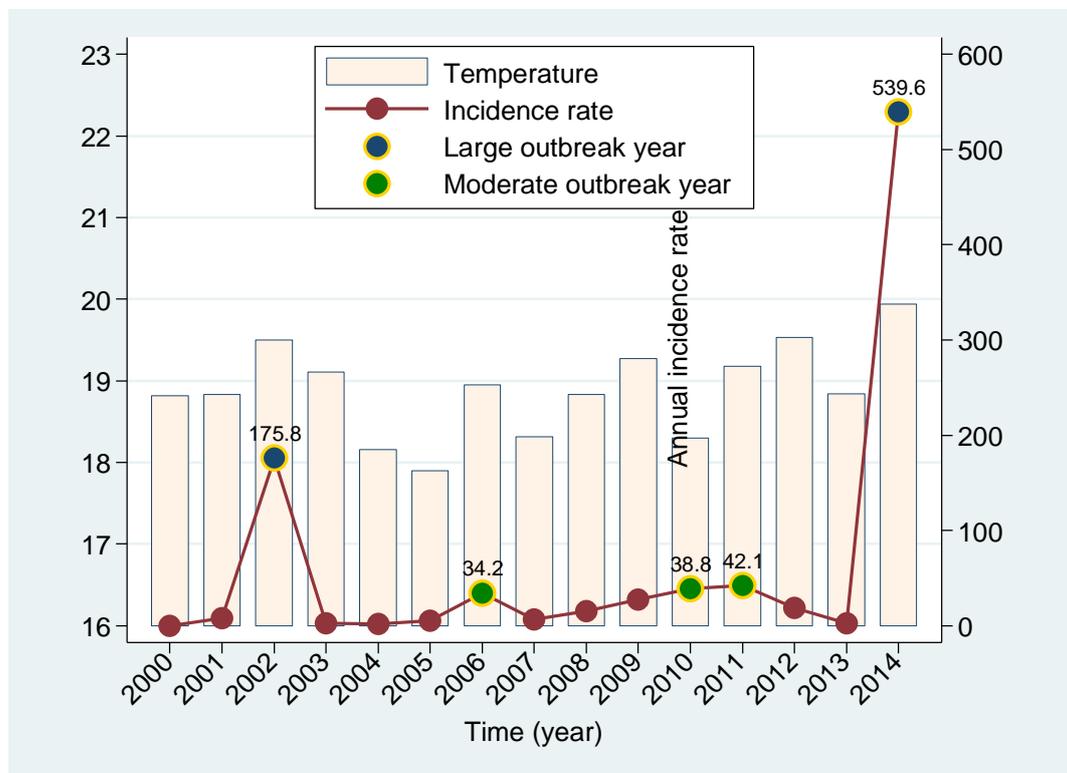
- I. 因本研究主體為高雄市，故以高雄市感染登革熱的人口做統計。其中人口數與登革熱人數計算方式如下，2000~2010 年在高雄縣、高雄市(舊)未合併前，會將高雄縣與高雄市(舊)兩者登革熱感染人數與人口數合併計算；2011 年高雄縣市合併後，則計算高雄市的人口數與登革熱人數。由上述這些數據可求得每 10 萬人之感染登革熱之個案數。

##### **(Supplementary Information Figure 1)**

該年度高雄市發生登革熱個案超過 900 例的年份有，包括了 2002 年(4,811 例登革熱；登革熱年度發生率 175.8/100,000)，2006 年(942

例登革熱；34.2/100,000)，2010年(1,075例登革熱；38.8/100,000)，2011年(1,168例登革熱；42.1/100,000)，2014年(14,999例登革熱；539.6/100,000)；而大規模流行定義是指高雄市發生登革熱個案有近5,000例，舉如2002與2014年這兩年全國登革熱個案均大於5,000例，2002年全國有5,336例登革熱個案，高雄縣市共有4811例；2014年高雄市有14,999例，稱為大規模流行。其餘2006、2010、2011這三年稱為中等程度流行。

而下圖 **Supplementary Information Figure 1** 為登革熱年度發生率(Incidence rates of dengue fever ( $100,000^{-1}$ ) for annual)與每月最低溫的年平均平均值(mean minimum temperatures)的關係圖，主要是去看2000至2014年登革熱流行是否有規律，其中2002，2006，2010，2014這幾年似乎是四年一個週期，有待下方驗證。



**Supplementary Information Figure 1.** Annual dengue incidence rates ( $100,000^{-1}$ ) and average minimum temperatures ( $^{\circ}\text{C}$ ) in Kaohsiung, Taiwan, 2000-2014 (Spearman's rank

correlation ( $r_s$ ) between annual dengue incidences and annual average minimum temperatures is 0.611,  $P = 0.016$ ; 2002 and 2014 are large-scale outbreak years, and 2006, 2010 and 2011 are moderate-scale outbreak years, all have dengue incidence rates  $>30$  per 100,000 person-years).

為驗證上述觀察是否正確

(1) 首先看 2000 至 2014 年登革熱年度發生率是否有週期性：

下圖 Figure 1 是以 Durbin-Watson test 統計法呈現出 2000 年至 2014 年高雄市登革熱發生會以週期性方式呈現(下方 Figure 1); 且以每 6、7、9、12、18、30、36、46 個月做為週期 9 (table 1)。

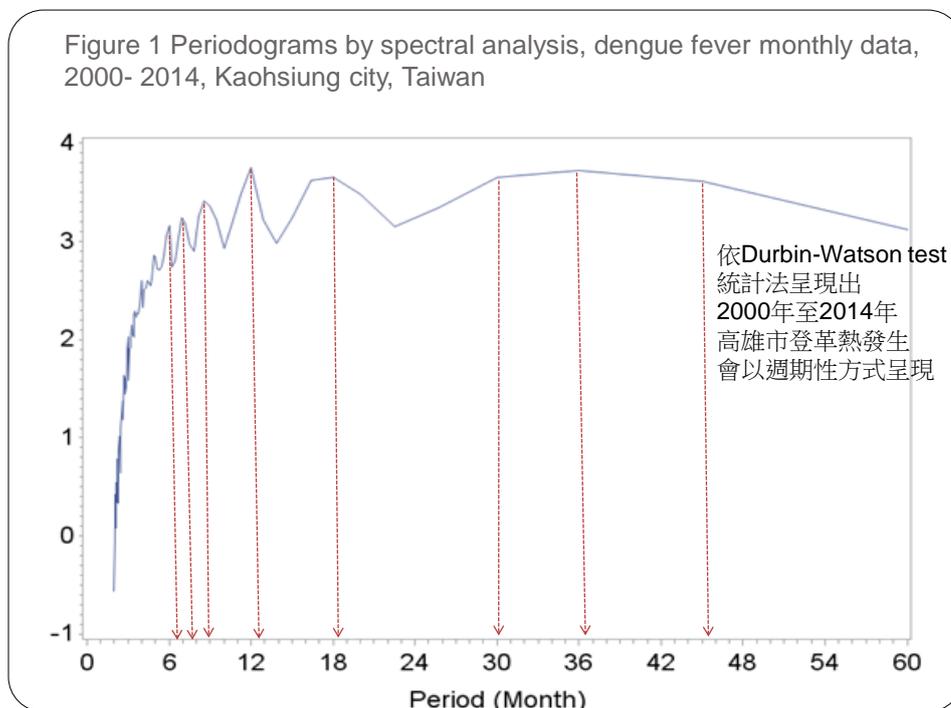


Table 1. Testing periods by harmonic regression, dengue fever monthly data, 2000-2014, Kaohsiung city, Taiwan - (A) Full model.

Period (Months)	Sin/Cosin covariate	Estimate	Standard error	P value
6	Sin	-2.691	1.854	0.149
	Consin	-2.668	1.852	0.152
7	Sin	-1.797	1.849	0.333
	Consin	-2.769	1.864	0.139
9	Sin	-4.949	1.852	0.008*
	Consin	-0.966	1.852	0.603
12	Sin	7.489	1.851	<.0001*
	Consin	-2.019	1.851	0.277
18	Sin	-5.467	1.852	0.004*
	Consin	4.035	1.851	0.031
30	Sin	-1.552	1.864	0.406
	Consin	6.424	1.856	0.001*
36	Sin	1.986	1.889	0.295
	Consin	-6.475	1.874	0.001*
48	Sin	-5.889	1.868	0.002*
	Consin	2.723	1.929	0.160

\*P<0.05; R-square=0.362

再經由Harmonic regression models 分析後(full model)，在每9、12、18、30、36、48個月呈現週期性，且均具有統計上的意義。

(2)再經由下方 table 2.Harmonic regression models 分析後

(Final model by backward selection)，在每9月、12月、18月、30月、36月、48月呈現出週期性且均具有統計上的意義，2002至2014每四年會有一週期性的流行，在學理上是可接受的，故2002，2006，2010，2014這幾年具有四年為一個週期性的觀察與統計模式計算出來的結果相符；但我們Table 2. 12個月的部份可看到P值<0.001\*，若是單純的講登革熱在2000~2014年是否呈現出流行趨勢，用每年(每12月)就具有一個流行的週期性也是說的通，統計學上是吻合的，故高雄市每年均有一個登革熱週期性或約每四年會有一個週期性流行在統計學上均呈現有意義。

Table 2. Periodicities accounting for monthly dengue fever incidences during 2000 and 2014<sup>a</sup>, Kaohsiung city, Taiwan

Period (Months)	Sine/Cosine covariate	Estimate	Standard error	P value
9	Sine	-4.880	1.871	0.010
	Consine	-0.829	1.871	0.658
12	Sine	7.457	1.872	<0.001

	Consine	-2.102	1.871	0.263
<b>18</b>	Sine	-5.448	1.873	0.004
	Consine	4.099	1.871	0.030
<b>30</b>	Sine	-1.535	1.885	0.417
	Consine	6.481	1.877	0.001
<b>36</b>	Sine	1.966	1.911	0.305
	Consine	-6.530	1.895	0.001
<b>48</b>	Sine	-5.956	1.889	0.002
	Consine	2.743	1.950	0.161

<sup>a</sup>The periodicity for dengue fever incidences was evaluated using harmonic regression with backward selection method. The  $R^2$  for the final model shown in the table was 0.331.

II. 就氣候相關性研究而言，登革熱年度發生率與氣象資料之間關連性而言，發現每日最低溫的月平均值與登革熱發生率最有關，相關係數最高。其中的“每日最低溫的月平均值”就是 Table 3（見下方表）中的 Temperature Minimum (°C)。舉如 2014 年 1 月最低溫的平均值，是由 2014 年 1 月 1 日至 1 月 31 日每天的最低溫加總除以 31，而得到 2014 年 1 月的最低溫的平均值，也就是該月每日最低溫的平均值。而 Temperature Maximum"每月最高溫"是指該月“每日最高溫的月平均值”。

在進行登革熱每月發生率與氣候變項(最低氣溫、平均氣溫、最高氣溫)、雨量、濕度、布氏指數的相關性分析時，是以 Spearman' s rank 方法得到 **Table 3**，表中 Temperature (°C) Minimum 中的 0.676 > 0.672 表示“每日最低溫的月平均值”相關性高於“每日最高溫的月平均值”；而前方有 3-month lag 則代表“每日最低溫的月平均值”與登革熱的發生率相關性會有時間差(意味著每日最低溫的月平均值不會立即影響登革熱的發生率，而會有延後一段時間才發生影響的延遲效應)，舉如 2014 年 1 月的每日最低溫的月平均值會影響到 2014 年 4 月的登革熱發生率，此即為 3-month lag 效應。同樣表中 Temperature (°C) Minimum 中的 1-month lag 的相關係數只有 0.498，小於 3-month lag Temperature

(°C) Minimum 中的 0.676，代表就”每日最低溫的月平均值”與登革熱的發生率相關性而言，三個月的延遲效應的相關性(0.676) 高於一個月的延遲效應的相關性(0.498)。

**Table 3.** Time-lagging correlations ( $r_s$ )<sup>a</sup> of and mosquito factors with monthly dengue fever incidence, Kaohsiung city, Taiwan, 2000-2014

Time status	Temperature (°C)			Relative humidity (%)	Rainfall (mm)	Breteau index level >2 (%)
	Minimum	Maximum	Average			
0-month lag	0.171*	0.042	0.116	0.042	0.023	0.360***
1-month lag	0.498***	0.378***	0.462***	0.294***	0.264***	<b>0.554***</b>
2-month lag	0.665***	0.598***	0.656***	0.456***	0.469***	0.552***
3-month lag	<b>0.676***</b>	<b>0.672***</b>	<b>0.693***</b>	<b>0.504***</b>	<b>0.551***</b>	0.403***
4-month lag	0.527***	0.568***	0.561***	0.383***	0.483***	0.129

<sup>a</sup>Correlations were assessed using Spearman’s rank correlation coefficients (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.005$  and \*\*\*:  $P < 0.001$ ).

Boldface represents the largest correlation among the lagged statuses.

下方 Table 4 為更進一步分析

Factors	Temperature (°C)								Relative humidity (%)		Rainfall (100 mm)		Breteau index value > 2 (%)	
	Minimum		Maximum		Average		Range		$\beta$	$P$	$\beta$	$P$	$\beta$	$P$
	$\beta$	$P$	$\beta$	$P$	$\beta$	$P$	$\beta$	$P$						
Single factor model <sup>b</sup>														
Main effect														
1-month lag	0.142	0.011	1.052	0.059	0.254	0.015	-0.201	0.051	-0.067	0.074	0.078	0.369	-0.017	0.435
2-month lag	0.109	0.079	1.024	0.008	0.293	0.256	-0.255	0.410	0.267	<0.001	0.219	0.001	0.030	0.340
3-month lag	0.300	<0.001	0.384	0.058	0.391	0.004	-0.554	0.002	0.301	<0.001	0.197	<0.001	-0.002	0.931
Interaction effect														
1-month lag x 2-month lag			-0.395	0.017	-0.112	0.003					-0.028	0.027	-0.002	0.027
1-month lag x 3-month lag											-0.074	0.037		
2-month lag x 3-month lag	0.064	0.004			0.067	0.006			-0.028	0.005				
Model QICu:	1709.0		2083.9		1985.1		2212.0		2788.1		2708.8		2560.0	
Multiple factor model <sup>c</sup>														
Main effect														
1-month lag	<b>0.251</b>	0.018									-0.194	<0.001		
2-month lag	0.151	0.192									-0.069	0.233		
3-month lag	0.289	0.002												
Interaction effect														
1-month lag x 2-month lag											<b>0.046</b>	<0.001		
2-month lag x 3-month lag	<b>0.080</b>	0.001												
Model QICu:											1536.8		(total) <sup>d</sup>	

**Table 4.** Time-lagging effects ( $\beta$ )<sup>a</sup> of meteorological and mosquito factors on monthly dengue incidence, Kaohsiung, Taiwan, 2000-2014

<sup>a</sup>GEE regression coefficient ( $\beta$ ) denotes adjusted effect of covariates on dengue incidence and  $\exp(\beta)$  expresses adjusted incidence rate ratio.

<sup>b</sup>Single environmental factor with all time-lagging effects (including interactions) were evaluated simultaneously in a regression model.

<sup>c</sup>Multiple environmental factors with all time-lagging effects (including interactions) were evaluated simultaneously in a regression model. Only the best-fitting regression model was shown in the table.

<sup>d</sup>The model QICu for the best-fitting multiple factor regression model.

Table 4 代表氣候及蚊蟲因子在登革熱的發的時間延遲效應，以單一因子分析來看，所有環境因子均和登革熱發生率有關，其中每月最低溫(即每日最低溫的月平均值)因為有最小的 QICu 1709.0 值，故在最適合模式(greatest model fit) 中，在上述環境因素子及蚊媒因素中為最具有影響力的變項。同時在 complete GEE regression 分析經由最適合多變項模式(The best-fitting multivariate model)驗證也是有最小的 QICu of 1536.8 值。

較高的”每月最低溫”，此因素使得登革熱發生率有 1 個月的延遲效應( $\beta = 0.251$ ,  $P=0.018$ )，且 2-3 個月的交互作用的延遲效應會有( $\beta = 0.080$  for interaction,  $P=0.001$ )。降雨量這項因素的增加則和登革熱的發生率會有 1 個月的負相關的延遲效應( $\beta = -0.194$ ,  $P < 0.001$ ) 且有 2 個月交互作用的延遲效應( $\beta = 0.046$  for interaction,  $P < 0.001$ )(Table 4).

Table 5 代表最低溫與雨量對登革熱蚊子密度的延遲效應，在 2000-2014 年的前六個月(即 1-6 月)，最低溫與雨量對布氏指數而言，分別呈現 1 個月及 2 個月的延遲效應(數值分別是  $\beta = 0.204$  and  $0.462$ ,  $P = 0.001$  and  $0.029$ )。

**Table 5. Time-lagging effects ( $\beta$ )<sup>a</sup> of minimum temperature and rainfall on <sup>b</sup>, Kaohsiung, Taiwan, 1-6 months, 2000-2014**

Factors	$\beta$	(95% CI)	P value
---------	---------	----------	---------

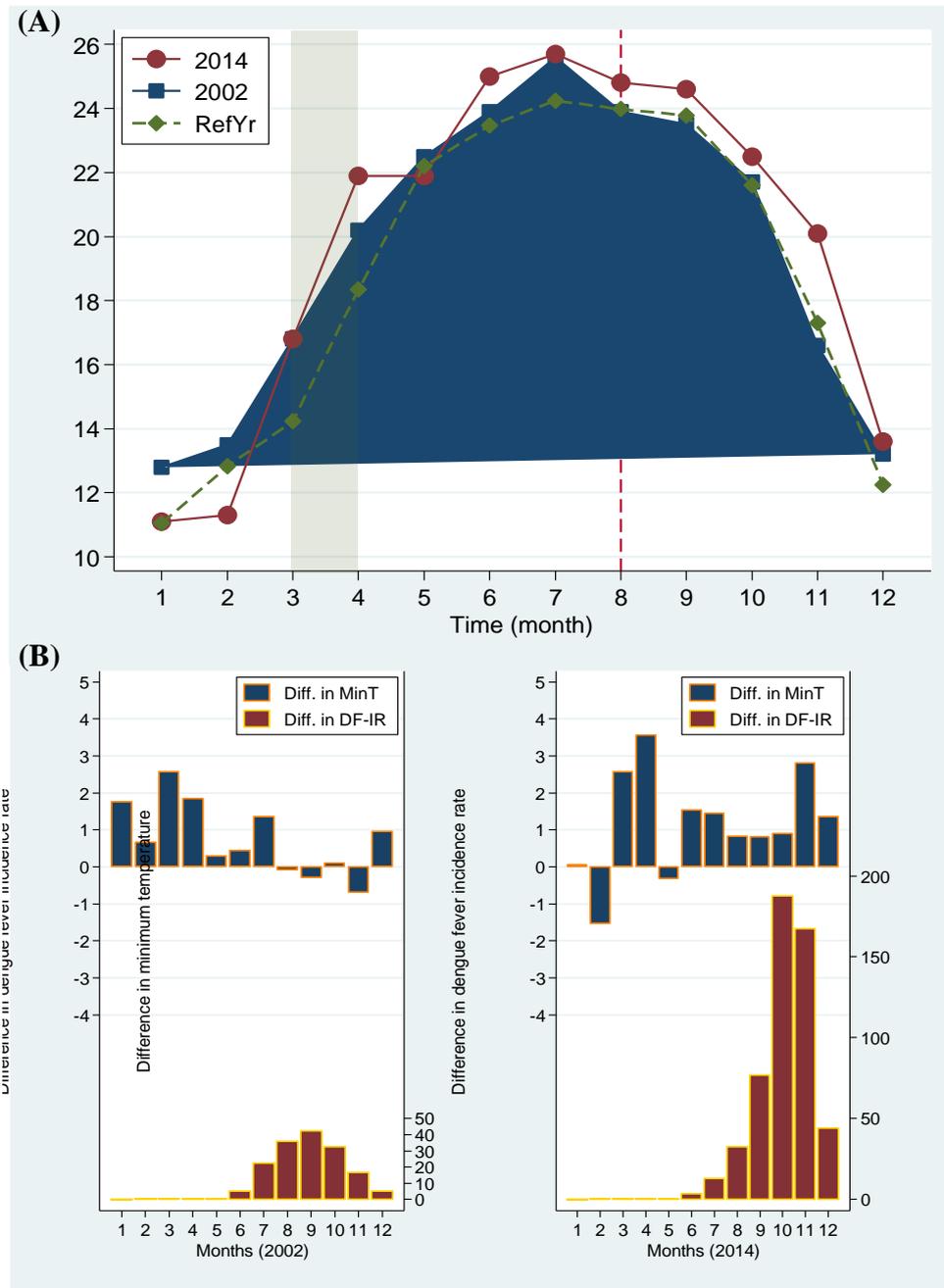
<b>Minimum temperature (°C)</b>			
Concurrent	0.046	(-0.045, 0.137)	0.317
1-month lag	<b>0.204</b>	(0.081, 0.328)	0.001
2-month lag	-0.080	(-0.166, 0.006)	0.069
3-month lag	0.065	(-0.001, 0.131)	0.052
<b>Rainfall (100 mm)</b>			
Concurrent	0.007	(-0.048, 0.063)	0.793
1-month lag	0.047	(-0.110, 0.204)	0.556
2-month lag	<b>0.462</b>	(0.047, 0.878)	0.029
3-month lag	-0.727	(-1.821, 0.368)	0.193

<sup>a</sup>GEE regression coefficient ( $\beta$ ) was adjusted for all time-lagging effects for minimum temperature and rainfall in the Table.

<sup>b</sup>The proportion of the days with a Breteau index level >2 in a month was used as dengue vector mosquito density index.

**Table 5.** Time-lagging effects ( $\beta$ )<sup>a</sup> of minimum temperature and rainfall on<sup>b</sup>, Kaohsiung, Taiwan, 1-6 months, 2000-2014. <sup>a</sup>GEE regression coefficient ( $\beta$ ) was adjusted for all time-lagging effects for minimum temperature and rainfall in the Table. <sup>b</sup>The proportion of the days with a Breteau index level >2 in a month was used as dengue vector mosquito density index.

III. 以各個月份去統計計算 mean minimum temperature，求出四月份的每日最低溫的月平均值 >22°C，能作為推估該年有登革熱大流行的重要參考指標，以下為推論說明。



**Figure 3.** Distributions of monthly average minimum temperature (MinT) (°C) in 2002, 2014 and reference years (RefYr, all years except 2002 and 2014) (**Fig-A**); and MinT differences (Diff.) and dengue fever incidence rates (DF-IR, 100,000<sup>-1</sup>), compared 2002 and 2014 with reference years (**Fig-B**), Kaohsiung, Taiwan. **Note:** The notable difference in MinT starting from March to April was consistently found for 2002 and 2014 (shaded area), a period of 2 to 3 months before the hot period of dengue occurrence (June to December). The PGE event occurred at July 30 in 2014 (shown in a red dashed line).

在上述 2002， 2006， 2010， 2014 年中，其中 2002 年與 2014 年是大流行，假設這兩年高雄市人口分布類似，其他變數(如登革熱防疫的行政介入措施等因素)也類似，若能找到參考年(2000 年至 2014 年所有年份，但去掉 2002 年與 2014 年)年當作基準年，就可以 2002 對比參考年及 2014 對比參考年這兩大組資料進行分析，更進而找出高雄市 2014 年與 2002 年流行的差異點所在(如 2014 年氣溫較熱，2014 年高雄也有氣爆事件發生等因素，是否會對登革熱造成不同於 2002 年的影響，而導致 2014 年個案比 2002 年多)。

依下圖 Figure 3(A)可以看出 2014 與 2002 年，在 3 月、4 月、6 月、7 月、8 月時縱軸的”每日最低溫的月平均值(mean minimum temperature)”均高於 2006 年，而四月份時 2014 年溫度高於 2002 年，依前面 3-month lag 概念，溫度上升後三個月，與登革熱發生率的相關性最高，而歷年來高雄市大流行開始均在 6 月開始登革熱流行，故關鍵月份應回推前二至三個月，就是三月或四月”每日最低溫的月平均值”溫度會影響登革熱的發生率。

這而到底是三月或是四月何者較具有關鍵的影響力，應該是四月份的”每日最低溫的月平均值”有較大的影響力。

理由一、相對於參考年的 3-4 月，在 2002 及 2014 最低溫的平均值約高了 2 °C- 4 °C (相對於參考年的 3-4 月，2002 年及 2014 年 3 月份最低溫的平均值均為 16.8 °C，4 月份則是 2002 年為 20.2 °C，2014 年為 21.9 °C；參考年的 3、4 月最低溫的平均值為 14.2 °C、18.3 °C Fig. 3 A)。最低溫的平均值在 2002 年及 2014 年三月均為 16.8 °C 是在最適合存活的溫度範圍內(15 °C- 35 °C) 且 2002 年四月與 2014 年四月(20.2 °C- 21.9 °C) 亦是在最高存活率的溫度範圍內(20 °C- 30 °C);此點情形在

參考年無此現象。因此三月與四月每日最低溫平均的上升是影響登革熱大流行的重要決定因素。

下圖 Figure 3 (A)觀察到四月份時”每日最低溫的月平均值” 2014 年溫度高於 2002 年，又高於參考年，但在三月份 2002 與 2014 年雖然高於參考年溫度，但是 2002 與 2014 縱軸的溫度幾乎相同，如此用四月份 2014 年”每日最低溫的月平均值”較 2002 高，而 2014 年高雄市個案(14,999)比 2002 年個案多(4,811 例)這樣解釋較合理。

理由二、見下圖 Figure 3 (B)，參考年為基準，對比 2002 年與 2014 年，去計算出”每日最低溫的月平均值”的差值[2002vs 參考年(左圖藍色柱狀圖)，2014vs 參考年(右圖藍色柱狀圖)]與每月”登革熱發生率”的差值[(2002 vs 參考年(左圖紅色柱狀圖)，2014 vs 參考年(右圖紅色柱狀圖)]，在三月份的溫度差(藍色柱狀圖)(2002 vs 參考年對比上 2014 vs 參考年 是  $2.6^{\circ}\text{C}$  (即  $16.8^{\circ}\text{C} - 14.2^{\circ}\text{C}$ ) 與  $2.6^{\circ}\text{C}$ )，代表 2002 對比參考年與 2014 對比參考年，在三月份具有相同的溫度差；但圖 Figure 3 (B)右方藍色的溫度差在四月份溫度差 (2002 vs 參考年:  $2014$  vs 參考年  $= 1.9^{\circ}\text{C}$  ( $20.2^{\circ}\text{C} - 18.3^{\circ}\text{C}$ ) vs  $3.6^{\circ}\text{C}$  ( $21.9^{\circ}\text{C} - 18.3^{\circ}\text{C}$ ))，後者 2014 vs 參考年較 2002 vs 參考年差值較大，此溫度差愈大，代表對每月的登革熱發生率差值影響會愈大，在三月份(B)左方藍色的溫度差與右方無差異 ( $2.6^{\circ}\text{C}$  對上  $2.6^{\circ}\text{C}$ )，四月份(B)左方與右方差異大( $1.9^{\circ}\text{C}$  對上  $3.6^{\circ}\text{C}$ )，導致下方紅色柱狀圖每月”登革熱發生率”的差值，在七月份的時候突然變高[七月份陡度(斜率)較六月份陡度(斜率)高]，故其七月份登革熱發生率差值大，應該還是四月份溫度急升所致。

而四月份”每日最低溫的月平均值”為  $22^{\circ}\text{C}$  [Figure 3 (A)]，故有”依上述推論計算，可得出四月份的每日最低溫的平均值  $> 22^{\circ}\text{C}$ ，可能會

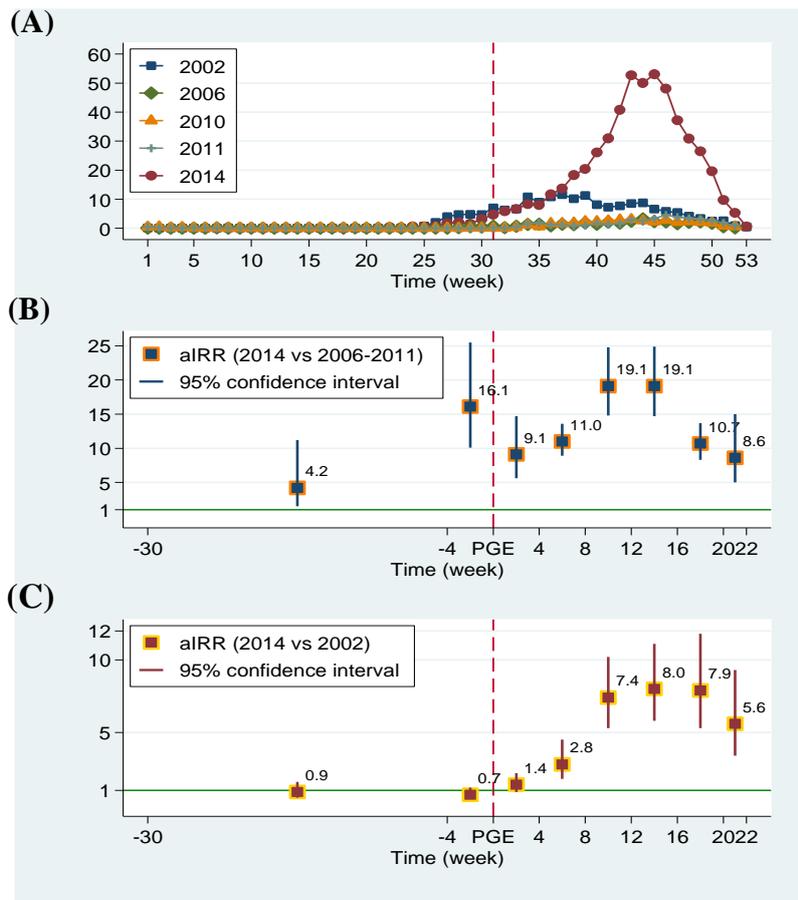
有助於預測該年高市有登革熱的大流行（估計約可超過 5,000 例登革熱個案）的預測。不過此研究論點仍有其侷限，過去防疫的措施如登革熱快篩試劑未廣泛運用，診斷或有延遲，或者登革熱防治方式未如此多元，登革熱會呈現明顯之週期，但以今日行政與居民蚊蟲防治行動多樣化，加上登革熱快篩試劑取得容易，且投入大量的行政資源，登革熱個案是否仍符合此週期性則有待觀察，在 2015 年高雄有登革熱大流行，但並未在 4 年週期性之中，而是受 2015 年台南的影響較大，如此也會使得此結論的應用有所限制。

註：在最近即將發表的論文中提及（見附件 2 第三、四段, Wang SF et al. *Emerging Microbes & Infections* (2016) 5, e123; doi:10.1038/emi.2016.124; published online 7 December 2016），2014 年高雄市是第一型登革熱，而 2015 年台灣計有 43,784 例登革熱，台南市有 22,777 例 (52%)、高雄市則佔 19,784 例 (45%)，2015 年主要流行的是登革熱第二型。自 2015 年五月份由台南市開始流行登革熱，型別為第二型登革熱，一直到 9 月達最高峰，至 10 月份則漸漸減少；而依照高雄市高醫中和紀念醫院所收集到的檢體資料顯示，高雄市在 105 年 7 月份之前是第一型登革熱，從 8 月至 9 月份變成第一型佔 20%、第二型登革熱佔 80%，但是 10 月份之後則全部為第二型登革熱。

再由此篇論文的樹狀圖演化分析 (Figure 1A) 可得知，高雄市 2015 年 8 月份之後登革熱第二型病毒株與 2015 年台南病毒株是同屬一群，且和先前在台灣所流行的第二型登革熱是不同群，而和 2014 年中國流行病毒株及 2015 年印尼株同屬一群，故高雄市 2014 年登革熱持續存在到 2015 年 9 月，自 2015 年 10 月後高雄市就幾乎可說是台南所流行的第二型登革熱。

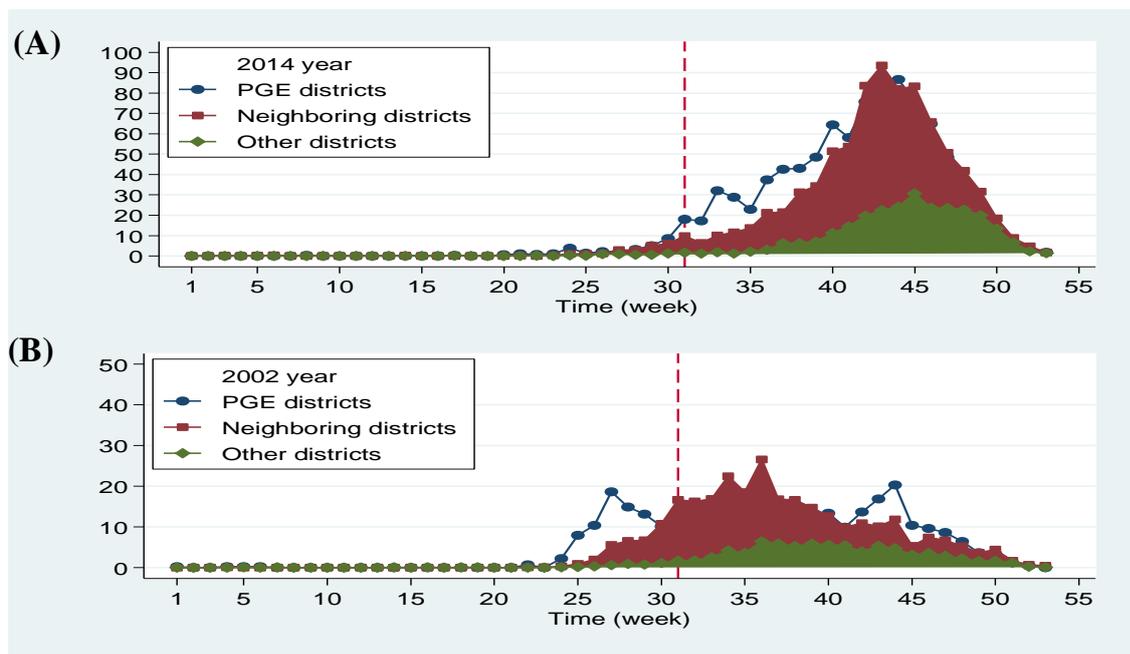
因此文中有陳述「2015 年高雄有登革熱大流行，但並未在 4 年週期性之中，而是受到 2015 年台南的影響較大，...」。

IV.因高雄市在 2014 年 7 月 31 日發生氣爆，依照下圖(Figure 1)(A) 可看出 2002、2014 年有大規模的登革熱發生， 2006、2010、2011 年則有中等規模的登革熱發生，(B)圖以 2014 和 2006-2011 年做比較，計算 incidence rate ratio，(C)圖為 2014 和 2002 年相比，氣爆當週為第 31 週，(B)圖在氣爆前幾週就已有登革熱發生，但(C)圖在氣爆前幾週沒有登革熱發生，而在氣爆後才有登革熱發生，故用 2014 年資料比對 2002 年，在氣爆後是否會受到氣爆的影響，會比用 2014 年比對 2006-2011 年較為適當。



**Figure 1.** Distributions of weekly dengue incidences ( $100,000^{-1}$ ) in large-scale (2002 and 2014) and moderate-scale (2006, 2010 and 2011) outbreak years (A), and adjusted incidence rate ratios (aIRR) of dengue for the periods before and after petrochemical gas explosion (PGE) occurred at the 31th week (shown in a red dashed line), compared 2014 with 2006+2010+2011 (B) and with 2002 (C), Kaohsiung, Taiwan. **Note:** aIRRs were adjusted for maximum, minimum, average temperatures, relative humidity, rainfall and the percentage of Breteau index level  $>2$  in a month.

在下圖 2 (Figure 2)每週登革熱發生率，細分為氣爆區(前鎮區、苓雅區)，氣爆鄰近區(三民、小港、鳳山)及其他區(其他行政區)三條曲線。(A)圖：在 2014 年發現在氣爆事件(第 31 週)過後，氣爆區及氣爆鄰近區登革熱週發生率有上升趨勢，但在其他區上升幅度小。(B)圖：2002 年在第 31 週後，氣爆區、氣爆鄰近區、及其他區這三條曲線則無此趨勢，顯示氣爆事件對 2014 年的登革熱發生率可能會有影響。



**Figure 2.** Distributions of weekly dengue incidences ( $100,000^{-1}$ ) in petrochemical gas explosion (PGE) affected districts (Qianzhen and Lingya), PGE neighboring districts (Sanmin, Xiaogang and Fengshan) and the other administrative districts (33 districts in total) in 2014 (**Fig-A**) and in 2002 (**Fig-B**), Kaohsiung, Taiwan. **Note:** The PGE event occurred at the 31th week (July 30) in 2014, as shown in a red dashed line.

Table 3 顯示，在 2014 年氣爆區與氣爆鄰近區，每週登革熱發生率在氣爆後第 1、2、3 週有 0.956、0.916、0.822 的相關性；而 2014 年氣爆區與其他區，每週登革熱發生率在氣爆後第 1、2、3 週，有 0.866、0.959、0.963 的相關性。但在 2002 年則無此現象。

**Table 3. Cross-correlations ( $r_s$ )<sup>a</sup> between weekly dengue incidences in petrochemical gas explosion-affected districts and subsequent weekly dengue incidences in the other districts, Kaohsiung, Taiwan, 2002 and 2014**

Time status	2014		2002	
	PGE-AD and PGE-ND	PGE-AD and Others	PGE-AD and PGE-ND	PGE-AD and Others
Concurrent	0.939***	0.711*	0.419	<b>0.670*</b>
<b>Time after the PGE</b>				
1-week	<b>0.956***</b>	0.866***	0.272	0.499
2-week	0.916***	0.959***	0.201	0.286
3-week	0.822***	<b>0.963***</b>	0.102	0.207
4-week	0.672*	0.894***	-0.076	-0.111
5-week	0.513	0.757**	-0.274	-0.310
6-week	0.375	0.600	-0.406	-0.383
7-week	0.226	0.404	-0.446	-0.615

**Table 3. Cross-correlations ( $r_s$ )<sup>a</sup> between weekly dengue incidences in petrochemical gas explosion-affected districts and subsequent weekly dengue incidences in the other districts, Kaohsiung, Taiwan, 2002 and 2014.** PGE: petrochemical gas explosion; PGE-AD: PGE-affected districts; PGE-ND: PGE-neighboring districts; Others: the other administrative districts. <sup>a</sup>Spearman's rank correlation coefficients ( $r_s$ ) with Bonferroni-adjusted  $P$  values were used to evaluate time cross-correlations; Only incidence data after the PGE was assessed (a total of 23 weeks after 31 July, \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.005$  and \*\*\*:  $P<0.001$ ).

下方 Table 4

以 2014 年與參考年(參考年是由 2000 年到 2014 年,但去掉 2002、2014 年,計 13 個年份)相比且考量的月份為 1 至 12 月,則最低溫可以解釋 42.9%變異量,最低溫與雨量可以解釋 44.1%變異量,最低溫、雨量、氣爆則可以解釋 75.1%變異量;而 2002 年與參考年相比,最低溫可以解釋 18.0%變異量,最低溫與雨量可以解釋 32.4%變異量。因每個月可以解釋的變異量均不相同,若只考慮一年的後半段(即 6 月至 12 月),此時以 2014 與參考年相比,最低溫可以解釋 43.1%變異量,最低溫與雨量可以解釋 47.7%變異量,最低溫、雨量、氣爆則可以解釋 76.5%變異量;而 2002 與參考年相比,最低溫可以解釋 18.0%變異量,最低溫與雨量可以解釋 34.1%變異量。

Models	1-12 months					6-12 months				
	RefYr	2002		2014		RefYr	2002		2014	
	Ref.	IRR	ERE <sup>b</sup>	IRR	ERE <sup>b</sup>	Ref.	IRR	ERE <sup>b</sup>	IRR	ERE <sup>b</sup>
Base model (BM) <sup>a</sup>	1.0	11.2*		34.5*		1.0	11.5*		35.3*	
Model 1: BM + MinT ( <i>i</i> -month lag, positive effect)										
MinT: 1-m lag + 2-m lag + 3-m lag + 2-m lag x 3-m lag	1.0	9.4*	18.0%	20.1*	42.9%	1.0	9.6*	18.0%	20.5*	43.1%
Model 2: Model 1 + Rainfall ( <i>i</i> -month lag, negative effect)										
Rainfall: 1-m lag + 2-m lag + 1-m lag x 2-m lag	1.0	7.9*	32.4%	19.7*	44.1%	1.0	7.9*	34.1%	18.9*	47.7%
Model 3: Model 2 + PGE										
PGE: occurred on July 31, 2014	1.0	7.8*	-	9.3*	75.1%	1.0	8.0*	-	9.1*	76.5%

**Table 4. Incidence rate ratios of dengue fever and excess risks in 2002 and 2014 explained by time-lagging effect of environmental factors and petrochemical gas explosion event in diverse time periods, Kaohsiung, Taiwan**

**Note:** \* $P<0.05$ ; IRR: incidence rate ratio; MinT: minimum temperature; PGE: petrochemical gas explosion;

RefYr: reference years (the period during 2000 to 2014, but beyond 2002 and 2014; a total of 13 years).

<sup>a</sup>Base model measured the IRRs of 2002 and 2014 as compared to the reference years.

<sup>b</sup>Excess risks explained (ERE) by covariates additionally added to the study model.

## (二)第二部份為問卷研究結果

1. 問卷初步結果(1):總計有 99 分有效問卷 有 3 位拒填，拒填率 3%。  
有 99 位病患完成問卷，女性有 63 位(63.6%)，男性有 36 位(36.3%)。

### (1)年紀方面：

18~19 歲有 7 位，20~29 歲有 7 位，30~39 歲有 10 位，40~49 歲有 20 位，50~59 歲有 18 位，60~69 歲有 17 位，70~79 歲有 19 位，80~89 歲有 1 位。年紀大於或等於 50 歲以上有 55 位(37.3%)，小於 50 歲有 44 位(62.6%)；年紀大於或等於 60 歲以上有 37 位(37.3%)，小於 60 歲有 62 位(62.6%)。

### (2)教育程度方面：

不識字有 19 位，國小學歷 21 位，國中學歷 15 位，高中學歷 30 位，大學有 14 位；教育程度為高中以上有 44 位(44.4%)；教育程度為大學以上有 14 位(14.1%)。

(3)民眾的來源(以戶籍地為準)：以小港區佔 51 位、前鎮區 10 位、鳳山區 9 位，旗津區 9 位、林園區 3 位、岡山區 2 位、大寮區 2 位、其他佔 8 位(屏東、台南)；以小港區最多佔 51.5%最多、其次為前鎮區 10.1%、再其次為鳳山區 9.09%。

(4)第 1 次看診後被醫師告知患有登革熱佔 56.5%、第 2 次看診後被告知佔 37.4%、第 3 次看診後被告知佔 5.05%、第 4 次看診後被告知佔 0%、第 5 次看診後被告知佔 1%、第 6 次以上看診後被告知佔 0%。

### (5)問卷題目答對率

- 第 1 題答對率 97%
- 第 2 題答對率 82.8%

- 第 3 題答對率 98%
- 第 4 題答對率 80%
- 第 5 題答對率 95%
- 第 6 題答對率 96%
- 第 7 題答對率 96%
- 第 8 題答對率 83.8%
- 第 9 題答對率 73.7%
- 第 10 題答對率 86.9%
- 第 11 題答對率 97%
- 第 12 題答對率 90.9%
- 第 13 題答對率 85.9%
- 第 14 題答是 95%
- 第 15 題答是 60.6%
- 第 1~3 題 為對登革熱病媒蚊的認識與防疫概念評估，答對率為 82.8~ 98%；平均答對率為 92.6%。
- 第 4~10 題 為對登革熱疾病知識的評估，答對率為 73.7~ 96%；平均答對率為 87.3%。
- 第 11~13 題 為對登革熱防疫概念與登革熱最新分類的評估，答對率為 85.9~97%；平均答對率為 91.3%。
- 第 14~15 題 為自身環境與認知的評估
- 以第 4 題，第 9 題答對率較低。

## 2.問卷分析結果(2)；再進一步分析

- (1)以性別或年齡群 $\geq 60$  歲或 $<60$  歲做區分，若分為此兩群個案，所有的問卷題目在此兩群病患做比較，均無統計上差異。

- (2)若以教育程度分為大學以上與大學以下，則問題 15 有差異，(85.7% vs 57.6%, $p=0.045$ ) (第 15 題目:”我覺得我應該不會再得登革熱”)，大學學歷以上者，較有信心覺得我應該不會再得登革熱。
- (3)若以教育程度若區分為高中以上與高中以下，第 9 題答對率有差異 (第 9 題題目:”為登革熱病人發燒頭痛可以用阿斯匹靈來退燒，不一定要用普拿疼”)( 84.1% vs 65.5%, $p=0.036$ )，高中以上學歷者，較能了解登革熱病人發燒頭痛應用普拿疼，不要用阿斯匹靈來退燒。
- (4)若以居住區域分為小港區與非小港區，則第 2 題有差異，(75% vs 94.1%, $p=0.008$ )，(第 2 題題目:”登革熱在南台灣主要是由白線斑蚊所傳播”)，表示住在小港區的病患第 2 題答對率較差。
- (5)若病患分為我看過第 1 次醫師後，才被告知說可能感染登革熱與我看過第 2 次以上醫師後，才被告知說可能感染登革熱這兩群，則在(1)高中以上學歷與否，(2) 大學以上學歷與否，(3) 男、女，(4) 年紀>60 與否 5)年紀>50 與否，均無統計上差異。

### 3.問卷分析結果(3)

- (1)以下三題答對率均達 95% 以上，表示民眾對登革熱有基本的認識
- 第 1 題題目:”登革熱是一種藉由蚊子所傳播的疾病”(97%)
  - 第 3 題題目:”孳生源的清除如積水容器的去除對於登革熱防治很重要”(98%)
  - 第 11 題題目:”登革熱被通報者依傳染病防治法規定需接受疫情調查、社區居家環境強制性噴藥、孳生源清除工作”(97%)
  - 可是基本題目第 2 題題目:“登革熱在南台灣主要是由白線斑蚊所傳播”只有 82.8%的答對率，表示民眾不清楚埃及斑蚊才是引發高

雄登革熱爆發的主因，這點應加強宣導。

- (2)第 1 次看診後被告知可能患有登革熱佔  $56/99=56.5\%$   
第 2 次看診後被告知可能患有登革熱佔  $37/99=37.4\%$ ，  
第 3 次看診後被告知可能患有登革熱佔  $5/99=5.05\%$ ，  
代表說有一半的民眾很快就得到適當的醫療，被延誤就醫的機會是少的。
- (3)第 4 題題目：“得過一次登革熱會終身具有免疫力，不會再得其他型登革熱”此部份有 80% 民眾正確答對。而知道第 9 題題目：“登革熱病人發燒頭痛可以用阿斯匹靈來退燒，不一定要用普拿疼”是錯的只有 73.7%，稍嫌不足，此觀念應該多多導正。
- (4)第 12、13 題題目：對於“是否有聽過登革出血熱 或登革熱重症”，將近有 90.9% 及 85.9% 聽過登革出血熱及登革熱重症，表示政府此部份的登革熱宣導成效不錯。
- (5)而針對登革熱病患自我的認知方面，可從以下這 2 題目略窺一二，第 14 題題目：“我家裡的環境算是乾淨”有 94.2%，即大部分的民眾認為自己的家算乾淨，但第 15 題題目：“我覺得我應該不會再得登革熱”有 60.6% 答是，表示有將近 40% 覺得有可能再得登革熱，這是否代表對公共環境或鄰居沒有信心，此部分需要再探討。

(子計畫五) 重症登革熱之流行病學及免疫反應研究

(一) 登革熱重症病人特性及基本資料

**Table 1. Baseline characteristics of study patients and the comparisons between survivors and non-survivors.**

	All Patients N = 49	Survivors N=27	Non-survivors N = 22	P-value
Age (mean ± SD)	69.3	70.0 ± 13.5	68.5 ± 13.4	0.6995
Male gender	19 (38.8)	9 (33.3)	10( 45.5)	0.5562
Nursing home	4 (8.2)	1 ( 3.7)	3 (13.6)	0.3136
Foley	1 (2.0)	1 ( 3.7)	0 (0.0)	0.3136
Bedridden	2 (4.1)	1 ( 3.7)	1 (4.5)	0.3136
Smoking	14 (28.6)	5 (18.5)	9 (40.9)	0.1161
Drinking alcohol	9 (18.4)	5 (18.5)	4 (18.2)	1
DM	19 (39.6)	9 (34.6)	10 (45.5)	0.557
Heart Failure	8 (16.7)	5 (19.2)	3 (13.6)	0.7102
Old strokes	6 (12.5)	3 (11.5)	3 (13.6)	1
Chronic lung disease	8 (16.3)	2 (7.4)	6 (27.3)	0.1172
Chronic liver disease	4 (8.2)	3 (11.1)	1 (4.5)	0.6173
Chronic renal disease	9 (18.4)	5 (18.5)	4 (18.2)	1
Cancer	9 (18.8)	6 (23.1)	3 (13.6)	0.4783

\*Data were presented as number (%) unless otherwise specified.

(二) 登革熱重症病人入院至加護病房時之各項生物指標

**Table 2. Biomarkers on ICU admission and the comparisons between survivors and non-survivors.**

	All Patients	Survivors N=27	Non-Survivors N = 22	P-value
WBC	10.62	9.6 ± 7.1	11.9 ± 7.7	0.29321
RBC	3.81	3.8 ± 1.0	3.8 ± 1.1	0.93481
PLT	74.61	80.1 ± 81.5	67.9 ± 63.9	0.57199
INR	1.37	1.2 ± 0.4	1.5 ± 0.5	<b>0.03428</b>
CRP	61.65	41.4 ± 51.8	87.7 ± 107.5	0.08019
Lactate	6.22	3.8 ± 5.1	9.7 ± 9.1	<b>0.01522</b>
Urea	44.95	41.4 ± 35.3	49.1 ± 32.7	0.44217
Creatinine	2.95	2.4 ± 2.4	3.5 ± 3.2	0.17601
SGOT	2710.56	878.1 ± 1575	4979 ± 7915	<b>0.02926</b>
SGPT	735.35	355.7 ± 613.8	1205 ± 1634	<b>0.03308</b>
Bilirubin	1.72	1.3 ± 0.7	2.3 ± 1.5	<b>0.01652</b>

Albumin	3.03	3.2 ± 0.5	2.8 ± 0.6	0.05815
HbA1C	6.91	6.8 ± 1.6	7.1 ± 1.3	0.50738

\*Data were presented as mean ± SD unless otherwise specified.

### (三) 登革熱重症病人死亡原因分析

**Table 3. Cause of death in 22 severe dengue patients**

Cause of death	Number (%)
Major bleeding	8 (36%)
Dengue shock	7 (32%)
Secondary sepsis	5 (23%)
Myocarditis	2 (9%)

### (四) 登革熱重症病人存活族群及死亡族群之嚴重度指標分析

#### 1. APACHE II Score

**Table 4. APACHE II scores between survivors and nonsurvivors.**

	All	Survivors	Non-survivors	p value
APACHE II (Total)	20.8	14.1	29.0	< 0.0001
Temperature	0.2	0.1	0.3	0.3174
Mean Arterial BP	1.2	0.5	2.2	<b>0.0018</b>
Heart Rate	0.8	0.6	1.2	0.1346
Respiratory Rate	0.3	0.1	0.4	<b>0.0228</b>
PaO <sub>2</sub> /AaDO <sub>2</sub>	1.2	0.6	2.2	<b>0.0014</b>
pH	1.3	0.9	2.0	<b>0.0208</b>
Na	0.3	0.1	0.5	0.0707
K	0.8	0.4	1.5	<b>0.0162</b>
Creatinine	3.9	3.0	5.3	<b>0.0203</b>
Hematocrit	1.0	0.9	1.3	0.3585
WBC	0.6	0.5	0.7	0.4301
GCS	3.5	1.1	7.4	< <b>0.0001</b>
Age adjustment	4.8	4.8	4.9	0.8460
Chronic health adjustment	1.1	0.8	1.6	0.1867

## 2. SOFA score

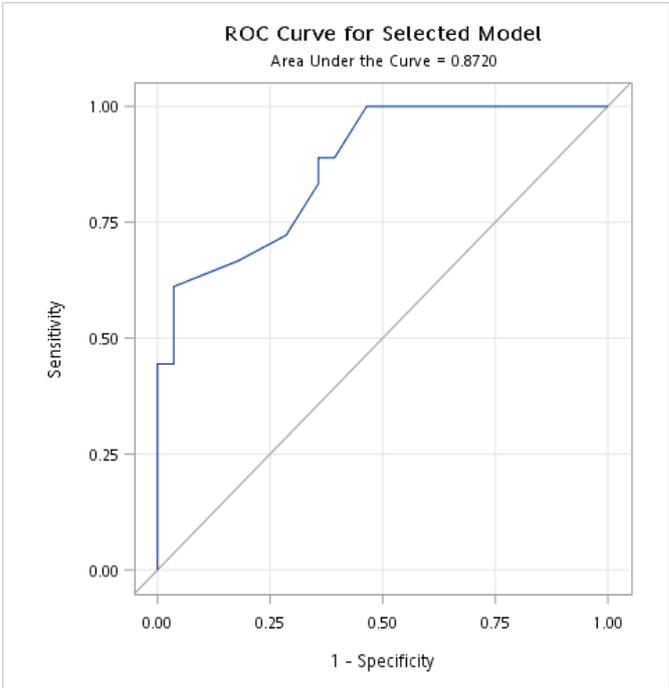
**Table 5. SOFA scores between survivors and nonsurvivors**

	All	Survivors	Non-survivors	p value
SOFA (Total)	9.72	7.1 ± 3.7	13.4 ± 4.1	< <b>0.0001</b>
Central Nervous System	1.33	0.4 ± 0.8	2.6 ± 1.7	< <b>0.0001</b>
Coagulation	2.54	2.4 ± 1.5	2.8 ± 1.1	0.2972
Cardiovascular System	1.3	0.6 ± 1.2	2.3 ± 2.0	<b>0.0036</b>
Liver	0.8	0.7 ± 0.7	1.0 ± 1.0	0.1986
Renal System	1.7	1.4 ± 1.5	2.2 ± 1.5	0.1261
Respiratory System	2.0	1.6 ± 1.0	2.6 ± 1.1	<b>0.0027</b>

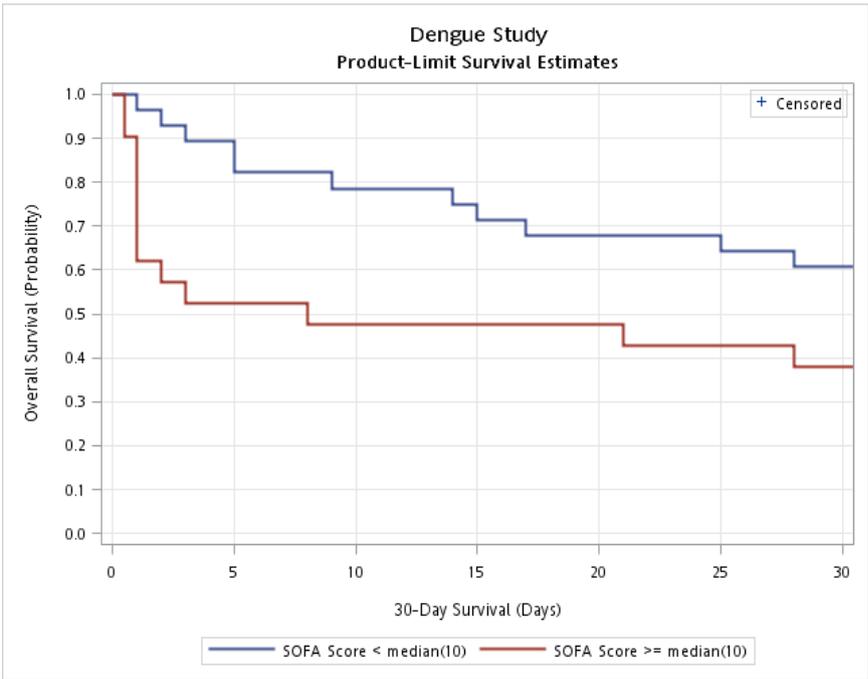
**Table 6. Mortality rate of severe dengue in different categories of SOFA scores**

	All	Survivors	Non-survivors	P-value
By median				0.0096
SOFA Score < 10	24	18 (75%)	6 (25%)	
SOFA Score ≥ 10	25	9 (36%)	16 (64%)	
By quartiles				0.0021
SOFA Score < 6	12	9 (75%)	3 (25%)	
6 ≤ SOFA Score < 10	12	9 (75%)	3 (25%)	
10 ≤ SOFA Score < 13	13	8 (61.5%)	5 (38.5%)	
SOFA Score ≥ 13	12	1 (8.3%)	11 (91.7%)	

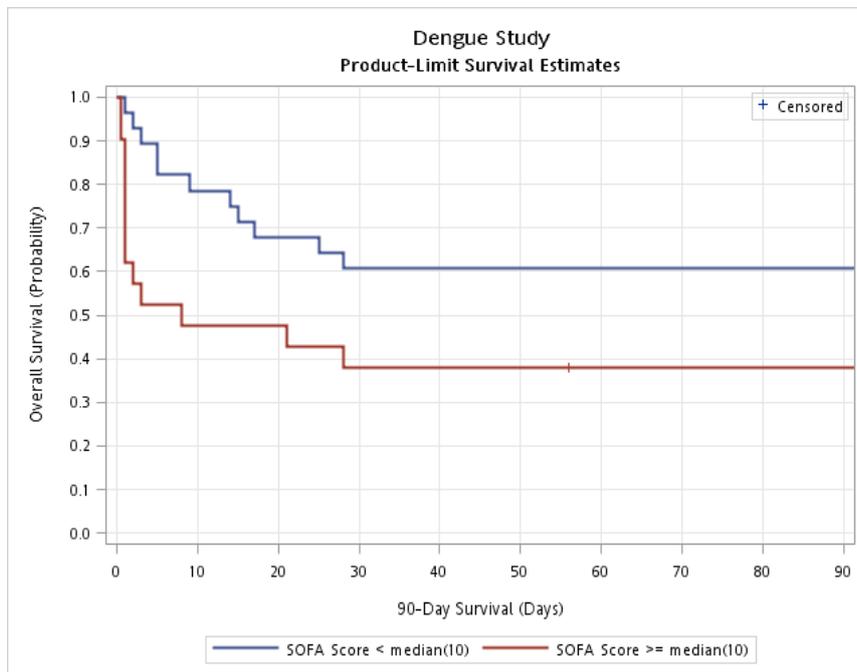
**Figure 1. ROC curve analysis of SOFA score in ICU mortality of severe dengue patients. AUC = 0.872**



**Figure 2. 30-day survival of severe dengue patients with SOFA score < 10 vs SOFA score ≥ 10. Log-Rank P = 0.0167**



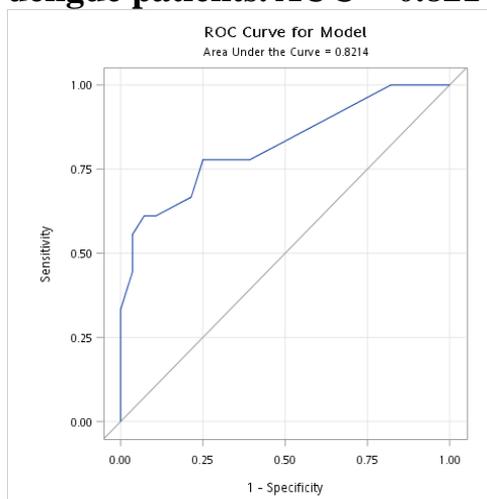
**Figure 3. 90-day survival of severe dengue patients with SOFA score < 10 vs SOFA score  $\geq$  10. Log-Rank P = 0.009**



### 3. Modified 3-item SOFA (SOFA-3) Score

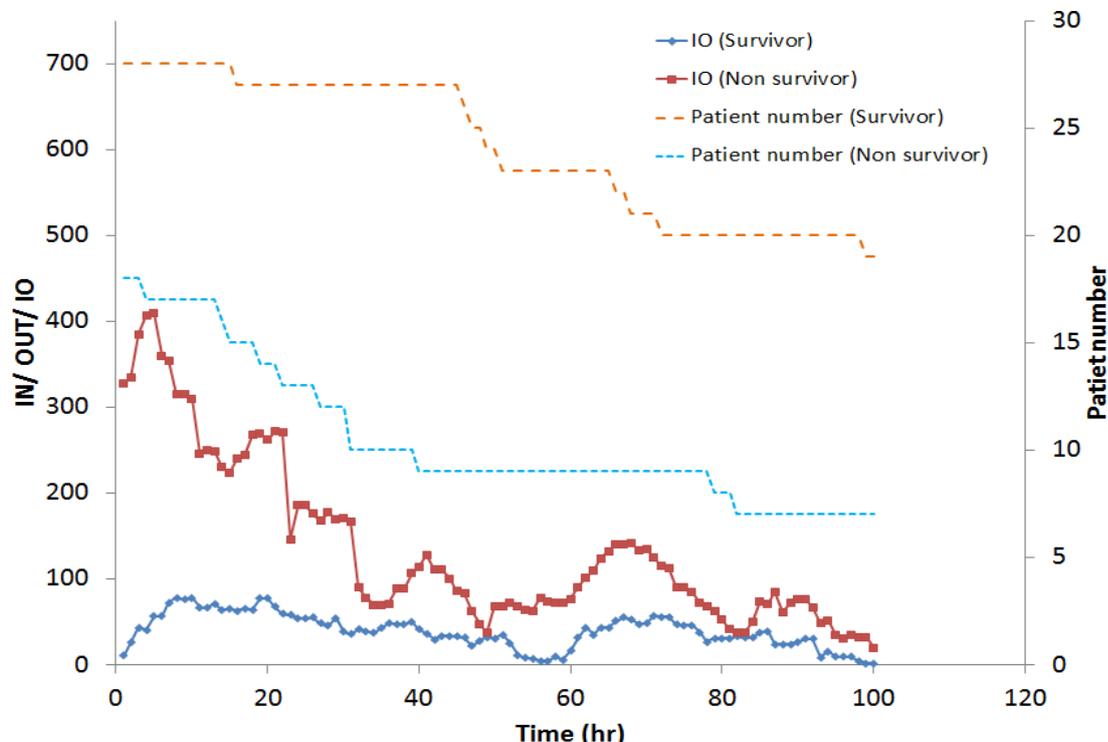
The mean SOFA-3 scores (sum of the scores from cardiovascular system, respiratory system, and central nervous system) were  $2.9 \pm 2.3$  in survivors and  $7.5 \pm 3.9$  in nonsurvivors ( $P = 0.0001$ ). The AUC of SOFA-3 in ROC curve analysis was 0.8214.

**Figure 4. ROC curve analysis of SOFA-3 score in ICU mortality of severe dengue patients. AUC = 0.8214**



(五) 登革熱重症病人體液平衡分析

Figure 5. Fluid balance in survivors and nonsurvivors



(六) 登革熱重症病人與嚴重肺炎病人之比較

1. 基本特性及入院至加護病房時之生物指標比較

Table 7. Characteristics between patients with severe dengue and severe pneumonia

	Pneumonia (N = 98)	Severe Dengue (N = 49)	P-Value
Age	73.7	73.0	0.9525
Male gender	38 (38.8)	19 (38.8)	1.0000
APACHE II Score	18.0	18.0	0.7765
Nursing home	17 (17.3)	4 (8.2)	0.2101
Bedridden	21 (21.4)	2 (4.1)	<b>0.0070</b>
Chronic lung disease	16 (16.3)	7 (14.3)	0.8143
Heart failure	17 (17.3)	7 (14.3)	0.8135
Hypertension	58 (59.2)	38 (77.6)	<b>0.0291</b>
Old Stroke	29 (29.6)	6 (12.2)	<b>0.0236</b>
Liver cirrhosis	4 (4.1)	1 (2.0)	0.6651
Chronic kidney disease	15 (15.3)	9 (18.4)	0.6422
TB	10 (10.2)	1 (2.0)	0.1004

Diabetes	36 (36.7)	19 (38.8)	0.8575
Cancer	30 (30.6)	9 (18.4)	0.1647
WBC	13800	12000	0.2663
PLT	191.5	21.0	< <b>0.001</b>
INR	1.1	1.3	<b>0.0091</b>
CRP	113.5	42.13	<b>0.0002</b>
Lactate	2.1	3.0	<b>0.0003</b>
Blood Urea Nitrogen	21.8	35.3	<b>0.0027</b>
Creatinine	0.9	2.0	< <b>0.001</b>
SGOT	45	334	< <b>0.001</b>
SGPT	28	124	< <b>0.001</b>
Bilirubin	1.0	1.4	<b>0.0005</b>
Albumin	2.8	2.9	0.1960
HbA1C	5.9	6.6	<b>0.0018</b>

\*Data were presented as number (%) or median unless otherwise specified.

## 2. 死亡率比較

	<b>Pneumonia (N = 98)</b>	<b>Severe Dengue (N = 49)</b>	<b>P-Value</b>
ICU mortality	32 (32.7)	22 (44.9)	0.2039

本研究病人的平均年齡高達 69 歲，有極高的比率是具有慢性疾病的老年人，這群病人的死亡率高達 44.9%，甚至比配對的嚴重肺炎病人死亡率更高。病人死亡的原因最多為嚴重出血(36%)，亦有極高比率死於登革休克(32%)。這 15 位死於嚴重出血或登革休克的病人中有 12 位在轉入加護病房後 3 日內死亡，顯示高危險的登革熱重症病人惡化的速度極為快速。有 25 位病人在臨床上有繼發的敗血症，其中五位病人(23%)死亡。我們發現登革熱重症病人在轉入加護病房第一天的 SOFA score 對死亡有極好的預測效果，甚至 SOFA score > 13 的病人死亡率高達 91%。

## (子計畫六)抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然藥物研發

### 1. 建立 HO-1 高通量篩選平台：

我們首先建立了 HO-1 的報導基因質體 pHO-1-Luc，其中冷光報導基因 firefly luciferase (luciferase) 受 HO-1 啟動子調控。接著送入 Huh-7 細胞中，再以特定抗生素篩選出穩定表現細胞株。接著，為了驗證此平台是否可反映細胞內 HO-1 啟動子活性，我們將此細胞株感染登革病毒後加入已知 HO-1 促效劑 (CoPP)，三天後收取細胞測定細胞內冷光基因表現量。由圖一結果可知無感染之細胞內 HO-1 啟動子活性正常，而感染登革病毒使 HO-1 啟動子活性下降，加入已知 HO-1 促效劑後可使 HO-1 啟動子活性回升，代表本計畫成功建立 HO-1 報導基因平台。

### 2. 篩選 HO-1 促效劑並於細胞內及活體內測試抗病毒活性：

接著進行天然萃取出物及小分子藥物篩選。經過初步篩選後得到一個可有效提升 HO-1 表現量之天然物 Compound L，此為樟科植物萃取出之純天然化合物，同時於抗病毒試驗中證實 Compound L 可以有效抑制登革病毒複製且無細胞毒性，顯示 Compound L 值得進一步研究及評估 Compound L 是否可成為抗登革病毒之先導試劑。(圖 2A)。首先以西方墨點法分析 compound L 是否可於細胞內抑制登革病毒蛋白質生合成以確定 Compound L 之抗病毒活性。結果發現 Compound L 可有效抑制病毒蛋白質生合成。我們也進一步檢測 Compound L 是否可同時抑制四型登革病毒(圖二 B)，結果確認 Compound L 可同時抑制四型病毒 RNA 複製，並且於有效濃度內無細胞毒性(圖二 C)，因此確認 Compound L 可成為有潛力之抗登革病毒先導化合物。為了確認 Compound L 是否可於活體內抑制登革病毒

複製，我們使用 ICR 登革感染小鼠模式進行測試。結果顯示 Compound L 可維持受登革感染之小鼠的體重(圖三 A)、降低症狀嚴重程度(圖三 B)並提高生存率(圖三 C)。

此外，我們也進一步確認 Compound L 之抗病毒機轉是否透過提高 HO-1 表現達到抑制病毒效果。我們首先以 HO-1 的 shRNA 降低 HO-1 表現量，結果顯示，隨著加入的 HO-1 shRNA 越多，Compound L 抑制登革病毒蛋白質生合成(圖四 A)及 RNA 複製(圖四 B)的效果越低。這些結果證實 Compound L 確實透過提高 HO-1 表現量而達到抑制登革病毒複製效果。

### 3. 建立 COX-2 抑制劑高通量篩選平台：

我們首先建立了 COX-2 的報導基因質體 pCox-2-Luc，其中冷光報導基因 firefly luciferase (luciferase) 受 COX-2 啟動子調控。接著送入 Huh-7 細胞中，再以特定抗生素篩選出穩定表現細胞株。接著，為了驗證此平台是否可反映細胞內 COX-2 啟動子活性，我們將此細胞株感染登革病毒後加入已知 COX-2 抑制劑 (NS398)，三天後收取細胞測定細胞內冷光基因表現量。由圖五結果可知感染登革病毒使 COX-2 啟動子活性上升，加入已知 COX-2 抑制劑後可使 COX-2 啟動子活性下降，代表本計畫成功建立 COX-2 報導基因平台。

### 4. 篩選 COX-2 抑制劑並於細胞內及活體內測試抗登革病毒效果：

我們接著利用 COX-2 高通量篩選平台篩選 COX-2 抑制劑，通過此平台篩選得到一個水果萃取物 GS 可以抑制細胞內 COX-2 表現量。為了確認 GS 是否可以抑制登革病毒複製，我們進一步於登革病毒細胞感染系統內驗證 GS 的抗病毒效果。首先以登革病毒感染 Huh-7 細胞株，接著分別處理不同濃度的 GS，三天後收取細胞蛋白質。我們分別利用西方墨點法分析 GS 是否可抑制病毒蛋白質生成及病毒 RNA 複製。結果如圖六 A 顯示，

GS 可以抑制登革病毒蛋白質生成。為了進一步確認 GS 是否可以同時抑制 4 型登革病毒，細胞先分別感染不同型的登革病毒後以 GS 處理，三天後收取細胞 RNA 以即時定量 PCR 分析病毒 RNA 複製量。結果如圖六 B 所示，GS 可以同時抑制 4 型登革病毒 RNA 複製。我們也以 MTS assay 分析確定 GS 於有效濃度無細胞毒性(圖六 C)。綜合以上結果，確認 GS 可成為有潛力之抗病毒先導藥物。我們也利用 ICR 登革感染小鼠模式測試 GS 於活體內之抑制病毒複製效果，結果顯示 GS 可維持受登革感染之小鼠的體重(圖七 A)、降低症狀嚴重程度(圖七 B)並提高生存率(圖七 C)。

此外，我們也進一步確認 GS 之抗病毒機轉是否透過抑制 COX-2 表現達到抑制病毒效果。Huh-7 首先送入不同量之 COX-2 表現載體，接著以登革病毒感染細胞後加入 GS，結果顯示，隨著送入的 COX-2 表現載體越多，GS 抑制登革病毒蛋白質生合成(圖八 A)及 RNA 複製(圖八 B)的效果越低。這些結果證實 Compound L 確實透過提高 HO-1 表現量而達到抑制登革病毒複製效果。

#### 5. 建立登革病毒聚合酶高通量篩選平台：

我們首先建構了一個登革病毒聚合酶雙報導基因系統載體並命名為 pDV-RLuc-(-)UTR $\Delta$ C-FLuc(圖九 A)[24]。其中 RLuc 代表 renilla luciferase，受 CMV promoter 調控，因此會一直穩定表現轉譯成蛋白質，所以 RLuc 活性可代表細胞毒性。FLuc 則代表 firefly luciferase，兩端被登革病毒的 5' 及 3' untranslated region (UTR)包夾。當此質體送入細胞之後會被細胞的 PolIII 轉錄成 mRNA，質體上的 HDV ribozyme 會形成二級結構並自切，使中間的 5' UTR-FLuc-3' UTR 反股片段裸露出來，此時 NS5 蛋白才會辨認到 UTR 結構並與之結合轉錄出正股的片段，接著此正股片段才會轉譯出具功能的 FLuc 蛋白質。因此，FLuc 活性可代表

NS5 蛋白 RdRp 活性。為了確認 FLuc 是否有正確地被 NS5 複製出正股，我們利用專一性辨認正股或反股序列的引子來進行反轉錄作用（圖九 B）。我們將 pDV-RLuc(-)UTR $\Delta$ C-FLuc 與具有功能的 NS5 表現質體 (pCMV-NS5-myc) 轉染進 Huh-7 細胞內，三天後收取細胞 RNA 並以不同引子進行反轉錄作用，接著以即時定量 PCR 偵測是否有 FLuc 片段（圖九 B）。Huh7 表示 Huh-7 細胞只送入 pDV-RLuc(-)UTR $\Delta$ C-FLuc 質體，NS5 表示 Huh-7 細胞同時送入 pDV-RLuc(-)UTR $\Delta$ C-FLuc 及 NS5 表現質體，DENV infect 表示 Huh-7 細胞只送入 pDV-RLuc(-)UTR $\Delta$ C-FLuc 質體後以登革病毒感染。Huh-7 在此實驗中做為負對照組，DENV infect 做為正對照組。從結果中我們可以看到，在 NS5 存在的環境下才有正股片段產生。我們同時也檢測了 FLuc 活性是否可反應 NS5 活性，我們於細胞中送入了固定量的報導載體以及不同量的 NS5 表現載體，結果顯示隨著送入的 NS5 越高存在，則 FLuc 活性也跟著提高（圖九 C）。因此，我們確認此雙表現報導基因系統質體可用於偵測 NS5 活性。

#### 6. 篩選登革病毒聚合酶抑制劑並於細胞內及活體內測試抗登革病毒效果：

我們與義大利羅馬大學教授 Romano Silvestri 合作，由 Silvestri 實驗室提供化合物，於本實驗室利用上述雙報導基因系統篩選病毒聚合酶抑制劑。結果篩選得到一個化合物 Compound 17 可有效抑制登革病毒聚合酶活性，並可於細胞感染系統中抑制登革病毒 RNA 複製且於有效濃度內無細胞毒性(圖十)。我們也於 ICR 登革感染小鼠模式中測試 Compound 17 是否可於活體內抑制登革病毒複製，結果顯示 Compound 17 可維持受登革感染之小鼠的體重(圖十一 A)、降低症狀嚴重程度(圖十一 B)並提高生存率(圖十一 C)。

#### 7. 建立登革病毒蛋白酶高通量篩選平台：

我們建構了一個登革病毒蛋白酶雙報導基因系統載體，此載體帶有綠螢光蛋白(enhanced green fluorescence protein, eGFP)及冷光報導基因 Nano luciferase (NLuc)融合，中間則由可被登革病毒蛋白酶辨認並切割的胜肽連接(圖十二 A)。EGFP 本身會留存於細胞質中，而 NLuc 則是分泌型蛋白，當折疊完成後就會被分泌到胞外。當此報導載體送入細胞表現時，會先表現出 eGFP(切位)NLuc 的融合蛋白，此時登革病毒蛋白酶會辨認融合蛋白中的胜肽切位並將其切割，獨立的 NLuc 就可被分泌至細胞外，因此只需收取上清液並偵測 NLuc 冷光活性即可代表登革病毒蛋白酶活性。我們測試了四種不同蛋白酶切位的報導系統，此系統載體建構完成後，我們將此載體與登革病毒蛋白酶表現載體(pNS2B/NS3)一起送入細胞，結果發現  $\Delta$ MITA 切位的蛋白酶報導系統作用最好(圖十二 B)，因此我們往後將以此作為登革病毒蛋白酶抑制劑快速篩選平台。

#### 8. 篩選登革病毒聚合酶抑制劑並於細胞內及活體內測試抗登革病毒效果：

我們與義大利羅馬大學教授 Romano Silvestri 合作，由 Silvestri 實驗室提供化合物，於本實驗室利用上述系統篩選病毒聚合酶抑制劑。結果篩選得到一個化合物 Compound 21 可有效抑制登革病毒聚合酶活性，並可於細胞感染系統中抑制登革病毒 RNA 複製且於有效濃度內無細胞毒性(圖十二)。我們也於 ICR 登革感染小鼠模式中測試 Compound 17 是否可於活體內抑制登革病毒複製，結果顯示 Compound 17 可維持受登革感染之小鼠的體重(圖十三 A)、降低症狀嚴重程度(圖十三 B)並提高生存率(圖十三 C)。我們也於 ICR 登革感染小鼠模式中測試 Compound 17 是否可於活體內抑制登革病毒複製，結果顯示 Compound 21 可維持受登革感染之小鼠的體重(圖十四 A)、降低症狀嚴重程度(圖十四 B)並提高生存率(圖十四 C)。

#### 9. 建立 AG129 登革出血小鼠模式：

為了能進一步測試上述藥物是否可於活體內抑制登革出血症狀，本實驗室建立登革感染 AG129 小鼠完整實驗流程，期望能用於分析藥物抑制登革出血症狀之活性，提供更進一步的數據作為將來藥物開發或輔助治療佐劑開發之基礎。本實驗室先前已發現一個天然物 AP 可抑制 C 型肝炎病毒及登革病毒複製[21]，於本實驗中初步利用 AG129 測試 AP 是否可於活體內抑制登革病毒感染引起之出血症狀。結果顯示，受登革病毒感染之 AG129 小鼠若給予 AP 則可有效降低病毒引起之腸道出血(圖十五)。綜合上述結果，本實驗室成功建立登革感染出血小鼠模式。

#### 10. 利用 NGS 尋找參與登革病毒複製與致病有關的 miRNA：

本實驗室於先前研究中證實提高 HO-1 表現量可抑制登革病毒複製，並且也將相關實驗結果發表於國際期刊[21]；而抑制 COX-2 表現量可抑制登革病毒複製，而本實驗室也詳細研究證實 COX-2 與病毒複製息息相關。此外近幾年研究都顯示血液中 miRNA 變化可作為一靈敏快速之疾病診斷指標。因此，本實驗室也利用 NGS 初步發現幾個與 HO-1 及 COX-2 有關之 miRNA，並進行相關實驗排除假陽性(圖十六)。

#### (子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查

針對 2015 年高雄市登革熱高盛行區(三民區)與低盛行區(楠梓區)，各案 200 人，並於 2016 年，再度對同一受試者進行成對血清採集。成對血清採集數量不足，則對該地區再次進行志願者收案，直至收案 400 人為止。於 2015 年，三民區共收案 202 人、楠梓區共收案 215 人。2016 年，三民區成對血清收案 50 人與額外收案 161 人，共 211 人，楠梓區成對血清收案 77 人與額外收案 131 人，共 208 人。

我們使用速帝登革熱免疫球蛋白 G 檢驗試劑(SD Dengue IgG Capture ELISA)進行初步登革熱抗體檢驗。2015 年的登革血清盛行率調查，登革 IgG 抗體檢驗結果為三民區陽性有 12 人，陽性率為 5.95% (12/202)，楠梓區陽性有 7 人，陽性率為 3.26% (7/215)；2016 年的登革血清盛行率調查，登革 IgG 抗體檢驗結果為三民區陽性有 12 人，陽性率為 5.68% (12/2011)，楠梓區陽性有 10 人，陽性率為 4.8% (10/208)，如表一。針對成對血清部分，三民區成對血清共有 50 人，楠梓區成對血清收案共有 77 人，其中經過 2015 年登革熱大爆發後，Dengue IgG 抗體陽轉率，三民區 2 人(2/50，陽轉率 4%)；楠梓區 1 人(1/77，陽轉率 1.29%)。2016 年新收案一採部分，三民區共 161 人，Dengue IgG 抗體陽性 11 人(11/161，陽性率 6.8%)；楠梓區共 131 人，Dengue IgG 抗體陽性 6 人(6/131，陽性率 4.6%)，如表二。進一步分析，登革 IgG 抗體陽性之性別分佈，於 2015 年收案，三民區男性共 80 人，其中有 8 人為陽性，陽性率 10%，女性收案 122 人，其中有 4 人為陽性，陽性率 3.27%；楠梓區男性共 74 人，其中有 1 人為陽性，陽性率 1.35%，女性收案 141 人，其中有 6 人為陽性，陽性率 4.25%。成對血清中的抗體轉陽檢體也列入 2016 年初次採血統計，三民區男性共 44 人，其中 2 人為陽性，陽性率 4.5%，女性收案 119 人，其中有 9 人為陽性，陽性率 7.6%；楠梓區男性共 43 人，其中有 1 人為陽性，陽性率 2.3%，女性收案 89 人，其中有 5 人為陽性，陽性率 2.6%，如表三。針對成對血清的檢驗結果，三民區 2 人登革 IgG 抗體轉陽，各為一名男性與一名女性；楠梓區 1 人登革 IgG 抗體轉陽，為一名男性。年齡層分佈，年齡區間為<19 歲、20~29 歲、30~39 歲、40~49 歲、50~59 歲、60~69 歲、70~79 歲、80~89 歲，於 2015 年，三民區 20~29 歲共收案 104 人，其中有 2 人為登革 IgG 抗體陽性，陽性率為 1.9% (2/104)；50~59 歲共收案 11 人，其中有 2 人為抗體陽性，陽

性率為 18.2% (2/11)；60~69 歲共收案 29 人，其中有 2 人為抗體陽性，陽性率為 6.9% (2/29)；70~79 歲共收案 24 人，其中有 5 人為抗體陽性，陽性率為 20.8% (5/24)；80~89 歲共收案 2 人，其中有 1 人為抗體陽性，陽性率為 50% (1/2)）。楠梓區 40~49 歲共收案 29 人，其中有 2 人為登革 IgG 抗體陽性，陽性率為 6.9% (2/29)；50~59 歲共收案 66 人，其中有 1 人為抗體陽性，陽性率為 1.5% (1/66)；60~69 歲共收案 55 人，其中有 2 人為抗體陽性，陽性率為 3.6% (2/55)；70~79 歲共收案 13 人，其中有 2 人為抗體陽性，陽性率為 15.4% (2/13)。2016 年初次採血統計，如表四。比對檢驗結果與問卷調查是否有感染過登革熱，發現於 2015 年，三民區登革 IgG 抗體陽性 12 人，其中有 8 人曾經感染登革熱，4 人回答不曾感染登革熱。楠梓區登革 IgG 抗體陽性 7 人，其中有 1 人曾經感染登革熱，6 人回答不曾感染登革熱；於 2016 年，三民區登革 IgG 抗體陽性 11 人，其中有 3 人曾經感染登革熱，7 人回答不曾感染登革熱，1 人回答不確定。楠梓區登革 IgG 抗體陽性 6 人，6 人皆回答不曾感染登革熱。

#### **(子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗**

本計畫依照三個目標進行，希望找到能做為辨識或是對登革病毒有保護作用的免疫因子，此外尋求可能對抗登革病毒藥物的標的。未來這些可能尋找的保護因子或是藥物將會希望可以運用於動物實驗中確認可能的效果，所以本計畫也著手建立可以支持登革病毒複製的小動物模式。目前仍是著手在於尋找或測試可以做為抗登革病毒的保護因子或是藥物的試驗和擬人化小鼠的開發

#### **目標一、尋找具保護作用的免疫因子**

##### **1.1 對抗登革病毒的單株抗體的開發**

對登革熱治療仍是以輔助性療法為主，目前沒有有效的登革熱疫苗運

用於臨床治療，找尋可以對抗登革病毒的保護因子將可以作為抑制或是準確偵測登革病毒的平台，首先利用可以有效對抗登革病毒的抗體 4G2 和 3H5 測試其對巨核細胞株產生的登革病毒顆粒的中和反應，登革病毒中和試驗結果顯示 4G2 和 3H5 中和來至巨核細胞株的病毒顆粒為弱(圖一)，可能需要尋找可以中和與體內病毒結構相似的巨核細胞株產生的病毒顆粒的抗體，可能是能尋找中和體內病毒抗體的候選者。

目前所篩選出來可以對抗登革病毒的單株抗體如表一所述，進一步我們利用抗體中和反應測試 2C7 和 2D22 對於從巨核細胞株(Meg01)或非洲綠猴腎細胞株(vero)產生的登革病毒顆粒的中和能力。

## 1.2 可能的候選抗體對登革病毒的中和反應

利用不同濃度的 2C7 和 2D22 的抗體評估對巨核細胞株或非洲綠猴細胞株產生的病毒顆粒中和能力達百分之九十或百分之五十的濃度，如表二所示，結果發現 2C7 或是 2D22 對於巨核細胞株產生的病毒顆粒的中和能力，相較於非洲綠猴細胞株所產生的病毒顆粒為低，暗示者這兩株抗體對於中和體內病毒顆粒的能力是較為低，需要在另外需找其他抗登革病毒的抗體進行測試。

## 1.3 新的 NS-1 抗體對登革病毒液內的 NS-1 辨識能力

此外，NS-1 已知是引起登革熱致病因子之一，因此能辨識 NS-1 的專一性抗體可能對於治療登革熱有能有所幫助，如表一所以有篩選出幾個能辨識登革病毒 ns-1 的抗體，進一步利用 ELISA 系統確認其辨識人類造血幹細胞產出的登革病毒液中的 NS-1 的能力(圖二)。

## 目標二、抗登革病毒藥物的開發

### 1.1 牛樟芝萃取物對登革病毒的抑制能力

樟芝萃取物能抑制肝炎病毒的複製。對於登革病毒的治療效果目前沒

有詳細的研究。巨核細胞株已知容易被登革病毒感染並複製出很高的病毒含量，能作為試驗牛樟芝對登革病毒複製影響的體外平台。

### 1.1.1 牛樟芝萃取物對巨核細胞株產生的病毒顆粒的抑制能力

傳統醫學中認為牛樟芝具有活化免疫能力，減輕疲勞的功效。體外試驗顯示牛病毒斑試驗先初步檢測牛樟芝萃取物 A、B、C、D、E、F 對登革病毒複製的情形，比較未受到藥物處理的組別，發現牛樟芝 C 可以達到百分之九十抑制登革病毒在巨核細胞株複製的能力（圖三）。

## 1.2 牛樟芝抑制登革病毒複製的可能機制

人體的先天免疫為第一防線抵禦和清除病毒，藉由在細胞表面的先天免疫受體或是細胞內的受體辨識病毒的遺傳物質或是醣蛋白，啟動一連串訊號傳遞讓受到病毒感染的細胞可以表現出第一型干擾素清除或是防禦病毒的入侵、複製或是感染。圖一的結果顯示牛樟芝萃取物 C 能有效抑制登革病毒在巨核細胞株中複製，是否因該藥物能刺激巨核細胞株產生第一型干擾素所造成。

### 1.2.1 牛樟芝進巨核細胞株表現第一型干擾素

首先利用酵素免疫聯結分析法分析牛樟芝萃取物 C 處理的巨核細胞株表現第一型干擾素的能力，結果顯示相較於未受到牛樟芝萃取物 C 處理的巨核細胞株，能發現藥物處理組別的巨核細胞株表現高量的 Type IFN-a (圖四)，同樣地也發現 Type IFN-b 也是藥物處理組別高於未處理組別 (圖五)。

## 目標三、擬人化小鼠的開發

### 1.1 優化擬人化小鼠的建立

人類造血幹細胞是作為人類周邊免疫系統的來源，轉殖入 NSG 小鼠體內後能讓其帶有人類的免疫系統的擬人化小鼠。登革熱為人類免疫失調的疾病，擬人化小鼠也被使用在登革病毒感染的模式，然而人類造血幹細胞

的來源有成人的骨髓細胞，胎兒的臍帶血細胞和肝臟細胞。何種來源所建立的擬人化小鼠對於登革病毒感染是否有所影響，對於此模式的建立是重要的。在我們之前的研究發現登革病毒會感染整個人類造血幹細胞的前趨細胞世系，因此我們將利用人類骨髓細胞和臍帶血幹細胞作為建立擬人化小鼠的前趨細胞來源，以轉殖後小鼠周邊血液中人類 CD45 的表現量，來評估何種細胞較易建立具有人類免疫系統的擬人化小鼠。結果顯示利用胎兒臍帶血細胞所建立的擬人化小鼠表現人類 CD45 的量，相較於骨髓細胞所建立的為多(圖六)。

## 1.2 登革病毒能長期感染擬人化小鼠

分別利用登革病毒感染臍帶血建立的擬人化小鼠 (CBT-humice)和骨髓細胞建立的擬人化小鼠(BMT-humice)後六天，每隔四天進行臉頰採血直到第 21 天後，在每隔兩個星期採血一次直到小鼠自然死亡。每次採血的樣品以病毒斑偵測小鼠周邊血的登革病毒的含量。登革病毒在 BMT-humice 的複製曲線圖如圖七右圖，而 CBT-humice 在登革病毒感染後的複製曲線圖如圖七左圖，不論是 BMT-humice 或是 CBT-humice 都可以支持登革病毒的感染，且在感染登革病毒後大約會潛伏 6-10 天才會在血液中偵測到登革病毒的表現。這顯示此動物模式所呈現的登革病毒早期複製曲線與在人體所觀察到的是類似的。將可以作為登革病毒感染前或感染後的藥物前臨床試驗的模式。

## (子計畫九)台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析

### 中和性人類單株抗體之製備與篩選

利用 EBV (Epstein-Barr virus) 感染自登革熱痊癒者全血中純化之人類周邊血液單核球細胞 (human peripheral blood mononuclear cell, PBMC)，經過兩周的培養後篩選出不死化的 B 細胞株 (見圖一，感染 EBV 後可見 B

細胞產生聚集現象)，便可收取可能含有抗登革熱病毒抗體之上清液。進一步進行序列稀釋後加入 Coated 有一至四型登革熱病毒抗原之 96 孔盤中，並進行酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 以篩選對登革熱病毒抗原具有特異性之人類單株抗體。經測試，本計畫期間採樣之受測者其不死化 B 細胞株均無法產出對登革熱病毒抗原具特異性之中和性人類單株抗體。

### 2014-2015 高雄地區登革熱病毒之血清型分析

本團隊於 2014 與 2015 年兩次台灣南部地區登革熱疫情爆發期間皆與小港醫院感染科張科醫師合作，收取登革熱確診患者血漿檢體共 1,950 份，並完成其中 339 份血清型分析，分析實驗流程請見圖二；取得登革熱病人血漿檢體後，部分檢體進行 RNA 萃取，另一部分則與白線斑蚊幼體細胞株 C6/36 進行共培養，使細胞株受可能存在於檢體中之仍具活性之病毒感染，待病毒在細胞中複製擴增後便可取得足以進行血清型分析之病毒量。經過五天培養後收取細胞上清液並進行 RNA 萃取，並與自血漿檢體萃取之 RNA 同時進行實時定量聚合酶鏈鎖反應以偵測 RNA 樣本中可被登革熱一至四型特異性引子與探針擴增之訊號片段，以決定 RNA 樣本之登革熱血清型別。

經檢驗後共檢出登革熱病毒感染者共 133 名，其中為登革熱病毒一型感染者共 60 名 (自血漿檢體檢出者 55 名 [91.7%, 55/60]，細胞感染培養後上清液檢出者 54 名 [90%, 54/60]，兩種檢測途徑均檢出者 49 名 [81.7%, 49/60])，為登革熱病毒二型感染者 73 名 (自血漿檢體檢出者 70 名 [95.1%, 70/60]，細胞感染培養後上清液檢出者 62 名 [84.9%, 62/73]，兩種檢測途徑均檢出者 59 名 [80.8%, 59/73]，詳見表一至表三)，並冷凍保存 102 份病毒 isolates 供後續研究使用。

## 基因演化樹分析

針對血清型分析為陽性結果者，依照登革熱血清型別結果使用具型別特異性之引子針對病毒 *env* 基因序列進行巢式聚合酶鏈鎖反應 (Nest Polymerase Chain Reaction, Nest PCR) 擴增 *env* 基因片段，所取得特異性高之 PCR 產物皆送至陽明大學榮陽基因體中心進行基因定序，取得序列後以 BioEdit 軟體進行序列校直，並以 MEGA 6 軟體進行 bootstrapping 1000 次取樣的 Neighbor-Joining (NJ) method 與 Maximum-Likelihood (ML) method 系統發生演化樹分析。經由分析可見，2015 年登革熱第一型的感染者其感染之病毒在 *env* 序列上與 2014 年大流行之登革熱第一型患者之病毒序列形成一叢集，表其具有同源性。此外，此一叢集又進一步與 2013 年分離自印度尼西亞登革熱流行病毒株具有同源性 (詳見圖三)。在基因型分型分析部份，2014 及 2015 年感染登革熱第一型患者之病毒 *env* 序列與參考株中的 Genotype I 叢聚在一起，表其應皆屬於該基因型。而在登革熱第二型病毒之相關分析部分，自 2015 年感染者檢體分離之登革熱第二型病毒基因序列經系統發生演化樹分析其 *env* 序列後發現其與 Cosmopolitan 基因型之參考株產生叢聚，表其應屬於 Cosmopolitan 基因型。而我們分別在台南地區及高雄地區取得的病毒基因序列亦歸屬於同一叢聚，顯示兩地之疫情有直接的關聯性。此外，亦發現其與 2014 年的中國大陸與 2015 年的印度尼西亞流行之參考病毒株具有較近之同源性，但在與 2010 年及 2014 年台灣地區流行的病毒株在親源上反而有較遠的演化距離。

## 登革熱癒後家訪

本團隊自 2015 年起 4 月份起與小港醫院感染科合作，透過感染科個案管理師的協助，與 2014 年級 2015 年登革熱疫情爆發期間於小港醫院

就診之登革熱患者聯繫，並在個案同意下由本團隊專業之護理師或醫檢師於志工陪同下至個案家中、或於小港院中進行訪問，訪問內容包括瞭解個案於疫情爆發期間的登革熱感染情形、病程發展，及其個人病史、家族病史，與家庭組成等項目（見附表一），並採取全血一管約 10 c.c. 作為康復期血液檢體以進行後續相關分析。

本計畫執行期間共完成 73 次訪問，除患者本人外亦收取部分患者之居家同住者數名共計 80 人。收取患者中屬 2014 年感染者為 56 人，2015 年感染者為 24 人，分別各有 2 位 (3.57%, 2/56) 及 3 位 (12.5%, 3/24) 為登革出血熱之患者。若依地區分類，2014 年共收取 36 位來自小港區之患者，另有 3 位來自前鎮區，8 位來自鳳山；2015 年則收取 18 位小港區患者，及鳳山區、苓雅區、美濃區患者各一名（見表四）。

#### **患者急性期及恢復期血清中抗登革熱病毒抗體之分析**

為了解感染不同型別登革熱病毒之患者其體液免疫反應之差異，我們利用 Human Anti-Dengue virus IgM ELISA Kit (abcam) 及 Human Anti-Dengue virus IgG ELISA Kit (abcam) 試劑套組，針對 133 位血清型分析結果為登革熱病毒一型或二型感染者進行其急性期及恢復期血清中抗登革熱病毒抗體之測定。急性期血清抗體分析結果如圖五，並依照其 IgG 檢測結果是否為陽性者，以及 IgM/IgG 之比值是否小於 1.2 判斷其為初級感染或次級感染。又由於無論患者是初級或次級感染者，其血中抗登革熱病毒抗體無論是 IgM 或 IgG 皆會在發病後第五至第六天後開始顯著出現，是以我們以「採檢日期在發病時間起算四天內」此一條件作為個案納入條件。檢測結果發現，46 位登革熱病毒一型病毒感染者中有 11 位為次級感染者；而在 58 位登革熱二型病毒感染者中，則有 22 位為次級感染者。依登革熱疫情爆發年度分析，2014 年檢出之 44 位登革熱一型病

毒感染者中有 11 位為次級感染者，佔了全體的 244.44%。2015 年所檢出的 2 位登革熱一型病毒感染者中並無次級感染者檢出，而 58 位登革熱二型病毒感染者中則檢出 22 位次級感染者，該年度之次級感染率為 36.37% (22/60)。

比對 104 位取得急性期抗登革熱病毒血清 IgM 與 I gG 檢驗結果者及癒後家訪與恢復期採血資料庫，篩選出 19 位患者，包括登革熱一型病毒感染者 9 位，及登革熱二型病毒感染者 10 位（患者人口學資料詳見表五），進行恢復期血清中抗登革熱病毒抗體之測定，以比較其急性期與恢復期體液免疫反應之差異（見圖六）。患者採血區間落於發病後 3.1 至 8.6 個月間，男女比例約略各半（DENV-I, Female/Male=0.8; DENV-II, Female/Male=1）。在次級感染登革熱一型病毒者中，有一位為登革出血熱之患者。而在次級感染登革熱第二型病毒者中，則有三位有登革熱一型病毒的疾病史，且在本次感染期間皆表現有登革出血熱之症狀。恢復期血清抗登革熱病毒抗體之檢驗結果顯示，即使在疾病康復後的半年至九個月期間，不論患者為初級或次級感染，兩型別登革熱病毒感染者其抗登革熱病毒 IgG 之血中濃度皆仍在可偵測範圍中，維持著一定水準；相較之下，此四種分組個案（登革熱第一型極地二型病毒感染/初級感染與次級感染）之恢復期血中 IgM 則有較大的個體差異而沒有一致的趨勢。

為了解兩型別登革熱病毒之感染者在其為初級或次級感染的情況下體液免疫反應之差異，我們將 104 位患者急性期血清 IgM 及 IgG 資料，以及 19 位患者恢復期血清抗體資料加總後進行統計分析，結果見圖七。使用 Student's *t*-test 比較各組差異，可見次級感染登革熱第二型病毒者其急性期血中 IgM 及 IgG 之濃度皆顯著高於次級感染登革熱第一型病毒者 ( $p=0.0420$ ;  $p=0.0014$ , Student's *t*-test)。此外，次級感染登革熱第二型病

毒者其恢復期血中之 IgG 濃度亦有高於次級感染登革熱第一型病毒者之趨勢，但統計結果尚未達顯著水準 ( $p=0.0673$ , Student's  $t$ -test)。

### (子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫

#### 1. 第一階段(實驗室測試階段)

##### (1) 海水梯度濃度測試：

以埃及斑蚊幼蟲(子孓)進行海水鹽度階梯實驗，當海水鹽度為 30psu 時，24 小時內即可導致斑蚊幼蟲全數死亡，且發現斑蚊幼蟲無法於海水鹽度大於 15psu 以上存活，但當鹽度低於 10psu 以下即無致死效力；當海水鹽度為 10psu 存活率高達 90%，蛹孵出 4 隻，而鹽度降至 5psu 蛹孵出 19 隻，存活率達 95%，凡存活下來之蛹皆能順利化蛹成蚊(見表 1)。

##### (2) 埃及斑蚊、白線斑蚊子孓在六種溶液中存活率：

實驗結果發現埃及斑蚊幼蟲在六種溶液中孵化後不久即死亡，表示斑蚊幼蟲無法在六種溶液中存活，白線斑蚊實驗結果亦同。

##### (3) 淡海水(8psu)誘引埃及斑蚊產卵率測試：

誘蚊產卵測試第 3 天清水為淡海水(8psu)的 10 倍，第 5 天差異 2 倍，第 7 天降至 1.8 倍。實驗結果顯示環境中若只有清水或淡海水(8psu)，其產卵量幾乎相似(測試第 3 天清水約 180 顆、海水約 165 顆，測試第 5 天清水約 480 顆、海水約 560 顆，測試第 7 天清水約 590 顆、海水約 510 顆)；但若環境中有清水及淡海水可供選擇時，依本次觀察顯示斑蚊會優先選擇清水產卵孵化下一代，產卵情形及數量如圖 6。

##### (4) 六種溶液稀釋成 1/2、1/4、1/8 測試致死率測試：

清水與生物製劑(BTI)依濃度比例稀釋 1/2、1/4、1/8 濃度，3~24 小時內可導致斑蚊幼蟲死亡，另海水與生物製劑(BTI) 依濃度比例稀釋 1/2、1/4、1/8 濃度，5~9 小時內可導致斑蚊幼蟲死亡，清水與有機磷劑依濃度比例稀釋 1/2、1/4、1/8 濃度，30 分鐘至 6 小時內可導致斑蚊幼蟲死亡，海水與有機磷劑依濃度比例稀釋 1/2、1/4、1/8 濃度，30 分鐘至 4 小時內可導致斑蚊幼蟲死亡，而海水及粗鹽降低 1/2 濃度(約 15psu)，48 小時內仍有幼蟲致死能力，若濃度低於 1/4(約 8psu) 或 1/8(約 4psu)，48 小時內致死率急速降至 0~55%(見表 2)。

(5)十大行政區致死率測試：

高流行風險行政區埃及及白線斑蚊幼蟲於各種溶液致死率測試結果如下：(1)清水與有機磷劑-埃及斑蚊平均 33 分鐘後全數死亡，白線斑蚊平均 50 分鐘後全數死亡；(2)海水與有機磷劑-埃及斑蚊平均 44 分鐘後全數死亡，白線斑蚊平均 60 分鐘後全數死亡；(3)清水與昆蟲生長調節劑(BTI)埃及斑蚊平均 4.8 小時後全數死亡，白線斑蚊 3 小時後全數死亡；(4)海水與昆蟲生長調節劑(BTI)埃及斑蚊平均 5.5 小時後全數死亡，白線斑蚊平均 3 小時後全數死亡；(5)粗鹽水埃及斑蚊平均 5.7 小時後全數死亡，白線斑蚊平均 5 小時後全數死亡；(6)純海水埃及斑蚊平均為 7.2 小時後全數死亡，白線斑蚊平均 5.6 小時後全數死亡。

綜上觀察得之，埃及斑蚊或白線斑蚊致死時間依序為(1)清水+有機磷劑、(2)海水+有機磷劑、(3)清水+生物製劑、(4)海水+生物製劑、(5)粗鹽及(6)純海水；換句話說，清水與有機磷劑或海水與有機磷劑約 0.5~1 小時立即殺死斑蚊幼蟲，粗鹽、海水與生物製劑、清水與生物製劑需 6~7 小時方能殺死斑蚊幼蟲，而純海水約需 8~9 小時才能殺死斑蚊幼蟲(詳細見圖 7、8)。

## 2. 第二階段(現地海水灌流階段)

現地陽性水溝溝渠及對照組之灌流及社區觀察自 2 月 15 日至 6 月 18 日止。實驗區未灌流施藥之前社區布氏指數(2 月 15 日及 16 日調查)如下：鳳山區武慶里布氏指數 6、級數 2、成蚊指數 0，前鎮區瑞昌里布氏指數 2、級數 1、成蚊指數 0，前鎮區瑞祥里布氏指數 0、級數 0、成蚊指數 0(詳如附圖 9、10、11)。

本局請前鎮區清潔隊於 2 月 19 日協助本局實施灌流水溝溝渠，其中水溝溝渠以含有機磷劑灌流者(鳳山區漢慶街 80 巷 21 號-亞特松(Pirimiphos-methyl)25% 1000 CC 及前鎮區瑞隆路 208 巷 12 號-亞特松(Pirimiphos-methyl)25% 1000 CC)，陽性水溝灌流四週後有機磷劑濃度檢測降至 0.0253ppm、甚至已無法測知(見表 3)，且其中清水與有機磷劑灌流之水溝已孳生斑蚊幼蟲。

水溝溝渠使用 BTI(鳳山區漢慶街 82 巷 16 號-BTI 38 克、前鎮區瑞隆路 194 巷 4 弄 40 號-BTI 21 克)灌流者，其中清水與 BTI 灌流之水溝八週後已孳生斑蚊幼蟲，推測藥效已消失，病媒蚊重新孳長。

陽性水溝於海水灌流後 5 天，鹽度已下降至 0~4psu，已無法再抑制斑蚊幼蟲孳生，但現地灌流溝內仍未發現度孳生病媒蚊幼蟲，推測灌流後不定期有豪大雨或是陰雨情形發生，且平時轄區清潔隊及里民有不定期投(噴)藥來控制病媒蚊孳長，逕而影響實驗結果觀測(見表 4)。

觀察三民、前鎮、鳳山、苓雅及鼓山區不同溶劑灌流後，鹽分濃度同樣於灌流後 5~7 天下降至 0~4psu，已達無法抑制斑蚊幼蟲孳生程度；另清水與生物製劑約有 2 條(25%)於 7 天後再度發現病媒蚊孳生，海水灌流區域約有 4 條(50%)於 4 週後再度發現病媒蚊孳生，清水+有機磷僅有 1 條(12.5%)於 8 週後再度發現病媒蚊孳生，海水與生物製劑或海水+有

機磷尚未發現有病媒蚊再度孳生，由此推測海水防護有效期限相對於其他溶液較短。(見表 5)

## (子計畫十一)應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的斑蚊孳生源

### 1. 實驗室評估

#### A. 評估百利普芬對蚊成蟲壽命和生殖力的影響

0.1%百利普芬會造成埃及斑蚊幼蟲不自然生長並導致死亡、蛹無法順利羽化成蚊(圖七)。吸血後一天的埃及斑蚊雌蚊暴露於 4 種濃度百利普芬(0.1%、0.01%、0.006%、0.001%)後其產卵量相較於控制組低，以濃度 0.1% 差距最為顯著，達統計上顯著差異(圖八)。

上述所生產的蚊卵型態異常，有些卵粒無黑化現象(圖九)，經後續觀察飼養後發現：暴露過 0.1%百利普芬的雌蚊所產下的卵粒孵化率低、幼蟲發育速度慢、幼蟲間齡期差異大。

#### B. 評估成蟲吸食含百利普芬糖水溶液(誘引毒糖水餌站; Attractive toxic solution bait; ATSB)後之影響

白線斑蚊雌蚊吸食含 0.1%百利普芬糖水後，吸血後第三天解剖檢視卵巢，控制和實驗組均可觀察到發育與未發育的卵細胞，差異不明顯，需再進行細部觀察。

#### C. 評估蚊成蟲接觸百利普芬後攜帶百利普芬的劑量

為了驗證蚊蟲是否具有攜帶百利普芬顆粒的能力，本研究使用螢光粉(Luminous Powder Kit)混合百利普芬(圖十)，將埃及斑蚊雌蚊暴露於沾有螢光粉與百利普芬的濾紙後，將蚊蟲凍昏再使用 UV 燈照射，結果發現：

多數雌蚊腳節有螢光反應，確認蚊蟲具有黏附攜帶百利普芬顆粒的能力（圖十一）。後續進行模擬蚊蟲自動散播實驗，讓蚊蟲停留在乾淨水杯中，結果顯示：蚊蟲停留過的水體導致水體內蚊幼蟲成功羽化失敗率較高（圖十二、圖十三）。

因應之後的野外試驗需求，測試百利普芬液劑（駐有效昆蟲生長調節液劑）與粒劑（駐樂寶昆蟲生長調節粒劑）自行泡製對於蚊蟲自動散播的影響，根據 UPLC MS-MS 儀器檢測結果，駐有效昆蟲生長調節液劑純度和濃度較高，較適合後續之實地應用。評估試驗結果顯示：埃及斑蚊雌蚊暴露於含有 0.01% 百利普芬溶液（有效成分為  $18.3\text{mg}/\text{m}^2$ ）的濾紙 1 小時後，碰觸含有四齡埃及斑蚊幼蟲的水體可造成水體內  $90\pm 0.73\%$  蚊幼蟲無法成功羽化，再經 UPLC MS-MS 儀器檢測發現：每隻成蚊可攜帶、散播 0.04-0.27 ng 的百利普芬至 25 ml 的水體內（表二）。

#### D. 評估不同披覆材質黏附百利普芬的能力

評估固定時間內，斑蚊停棲和黏附百利普芬顆粒的能力比較，UPLC MS-MS 儀器檢測發現：蚊蟲黏附百利普芬的濃度以黑色的輪胎和誘卵桶較佳，葉片底部次之，濾紙、水泥牆壁較差。觀察後判斷蚊蟲多數停棲於黑色顏色及光滑的介面。

## 2. 半野外評估

於國立臺灣大學公共衛生學院外圍進行百利普芬半野外測試（圖十四、圖十五）。監測區域常見蚊蟲活動，作法為：在一處陰暗潮濕半開放有圍牆圍繞的區域中間放置兩個輪胎，使用噴霧罐噴灑百利普芬液劑至輪胎與圍牆壁面上，後放置誘卵監測桶，定期收取桶內水樣進行生物性分析確認水體內有無百利普芬。經過一個月的回收水樣後發現誘卵桶內有斑蚊卵（比例

=55.6%；5/9)，但計算卵量少（10~20 顆之間），水體進行生物性分析後僅發現一個容器能造成斑蚊幼蟲羽化失敗（IE>50%）的水樣，推測為蚊蟲密度較低與當週氣候寒冷等有關。後續實驗移至高雄戶外樣區進行示範區現地實驗時需再評估是否有是當的散佈站和散播足夠量的百利普芬至隱藏性孳生源。

### 3. 實地評估

#### A. 實務操作監測與分析

戶外試驗自 105 年 1 月開始執行，現已執行共 5 次百利普芬噴灑、8 次觀察與收樣，其執行時間軸情見圖十六，詳細出差報告請見附錄一。

在野外試驗開始前先行至高雄試驗樣區勘查（勘查樣點數 N=57），與高雄市衛生局人員討論野外工作並獲得共識（圖十七、圖十八）。戶外實驗樣區以高雄市楠梓區金田里、加昌里和三民區德智里、寶安里為試驗組，三民區寶獅里為控制組。共選定 19 處陰暗潮濕處設置百利普芬散播站及設置 100 個誘蚊產卵監測桶（圖十九、圖二十）。其百利普芬散播站位置及誘蚊產卵監測桶會依實際民眾反應來做微調，其分布示意圖詳見圖二十。

在戶外試驗開始前期（1/27-6/20），共執行兩次百利普芬噴灑四次收樣。收樣過程發現誘卵桶內有斑蚊產卵的密度逐漸上升，但都還低於 30%，其中有發現斑蚊卵又孳生蚊幼蟲的誘卵桶從一開始的 0% 緩慢上升至 26%。回收水樣帶回實驗室經生物性分析檢測發現：2/17-2/18 回收水樣其 IE%>50 的比例為 19.6%，3/2-3/3 回收水樣其 IE%>50 的比例為 20.0%，4/12-4/14 回收水樣其 IE%>50 的比例為 3.5%，隨後在 4/12-4/14 進行第二次百利普芬噴灑後，5/11-5/12 回收水樣其 IE%>50 的比例為 22.0%（圖二十三 B）。可得知：百利普芬散播站的效用在野外可穩定維持一個月後，

受到複雜環境因素干擾，其 IE50 逐漸下降，再進行補充後即可回復效用。

戶外試驗中段 (6/21-7/22)，共執行一次百利普芬噴灑兩次觀察。發現誘卵桶內有斑蚊產卵的密度上升，平均在 43-44%，其中有發現斑蚊卵又孳生蚊幼蟲的誘卵桶急遽攀升至 60% 後下降至 24% (圖二十三 A)。經由這六次觀察結果發現：在小型誘卵桶內投入的劍水蚤而未提供食物的情況下，觀察無法順利撐過一個月的時間 (加入食物會影響後續 UPLC MS-MS 的分析)。考量疫情期間，當蚊蟲密度逐漸升高之時，為避免造成製造孳生源的疑慮，本計畫調整將誘卵桶內水樣更換為 1% 硼酸溶液 (已測試於誘卵桶中分別放入濃度 0%、0.5% 與 1% 的硼酸溶液進行實驗室和半野外試驗，結果發現：硼酸溶液濃度不同對於斑蚊雌蚊的誘引無明顯之差異，1% 濃度之硼酸溶液可以完全滅殺新孵出之一齡幼蟲。UPLC MS-MS 之分析條件亦完成)。

於桶內放置襯布，蚊蟲來棲息時會將百利普芬送到監測桶，若此刻蚊蟲吸食到硼酸溶液會導致死亡，若蚊蟲完成產卵且孵出幼蟲，則蚊幼蟲也會死於硼酸溶液內。可謂兼具滅殺成蚊與幼蟲的功能，並可藉由觀察襯布上的蚊卵來評估當地的蚊蟲密度 (圖二十二)。

戶外試驗後期 (7/23-10/4)，共執行兩次百利普芬噴灑兩次觀察。發現硼酸誘卵桶內有斑蚊產卵的密度平均在 48-52%，其中有發現斑蚊卵又孳生蚊幼蟲的硼酸誘卵桶為 7-15% (圖二十四 B)。少數硼酸桶孳生蚊幼蟲的原因為：桶子被雨水淋到造成硼酸濃度不足而孳生斑蚊屬幼蟲，為避免此情形再度發生，硼酸桶位置有再經過調整。

過程中共挑選 20 片斑蚊屬蚊卵密度高的卵片將其帶回實驗室分析確認蚊種，參考 Yukiko et al. (2010) 的實驗方法，可藉由於辨別洋菜膠片上的基因片段大小直接分辨蚊卵是否為登革熱病媒蚊 (圖二十五)。結果顯示：20

個卵片中有 10 個 (50%) 為埃及斑蚊，7 個 (35%) 為白線斑蚊，3 個 (15%) 未跑出結果 (圖二十六)。

為了確認百利普芬散播站在戶外的殘效性，利用潤濕的濾紙 (Advantec No.2，面積約 63.62cm<sup>2</sup>) 沾黏牆壁、花圃內側邊壁等前次噴灑百利普芬位置 (除水溝，圖二十七)，並將濾紙個別使用夾鏈袋收納帶回實驗室進行生物性分析，得知百利普芬散播站在戶外設置 33 天後仍有 47.1% 的散播站其 IE%>50 (表三)。

### **B. 使用 UPLC-MSMS 分析野外樣本之百利普芬濃度**

挑選 20 個已先經生物性分析 IE%>50 的野外樣本進行微量分析，儀器成功將部分水樣內的百利普芬定量，濃度分別為 9.5ng/L 與 10.83ng/L。詳細結果請見圖二十九。

### **C. 蚊蟲自動傳播百利普芬技術之標準作業流程**

優先清除可見的孳生源，換人再次評估清除孳生源。

#### **(1.) 操作概念**

蚊蟲接觸百利普芬後，其身體會被动式的沾黏而攜帶這些百利普芬的顆粒，透過飛行而將這些百利普芬攜帶至產卵水域或幼蟲孳生源，進而抑制幼蟲和蛹的生長發育，同時兼具控制成蟲和幼蟲的功效。

#### **(2.) 散播站選擇**

建議挑選孳清後仍具高密度蚊成蟲活動之區域

#### **(3.) 噴灑位置選擇**

蚊蟲喜歡停留與棲息之處多為陰暗潮濕，如：地下室的牆壁接縫處，水溝內側邊壁，花圃的花盆週邊、樹葉底部等處。(主要施用於居家範圍和建物內，避免在自然郊區無限制使用！)

(4.) 藥劑噴灑濃度

有效成分之百利普芬濃度 0.01% w/w。

(5.) 噴灑機具

個人背負式動力噴霧機 (SOLO)。

(6.) 效期

陰暗或低光照環境下約 45 天，戶外或光照較強環境則約 30 天。

(7.) 效果

效期內可滅除噴灑範圍內約 20% 隱藏性孳生源。

**(子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究**

(一) 登革熱病媒蚊空間分布調查

本試驗從去年 9-10 月至今年 9 月在高雄市苓雅區正心里、三民區鼎泰里與楠梓區翠屏里分別進行四季、每季連續三週的住宅內外、上下空間與戶外樹叢上下空間的病媒蚊分布調查。

1. 住宅內外上下空間分佈

在平房區、五樓公寓區、高於 15 層樓高之大樓公寓等三種房型的空間分佈調查中發現：(1) 整體而言，無論哪一種房型在住宅室外面捕獲的登革熱病媒成蚊比室內與屋頂多。但是苓雅區正心里的一棟 15 層公寓因社區中有一處大孳生源，導致 2015 年秋季一樓室內的成蟲數量比其他調查區高。另外，15 層以上的大樓公寓地下室也相當高，樓高至 15、20 層與高於 20 層的樓頂都可以捕獲病媒成蚊(圖一)。(2) 以不同季節而言，登革熱病媒蚊在夏季與秋季的數量較多，冬季與春季幾乎沒有捕獲斑蚊(圖二 A)，相反的家蚊數量大幅增加。2015 年秋季埃及斑蚊被捕獲的數量遠高於白線斑蚊(120:5)，但是在 2016 夏季

則有出乎意料的結果，埃及斑蚊被捕獲的數量遠低於白線斑蚊(13:48)(圖二 B)。(3)就地域特性不同，埃及與白線斑蚊的分佈也有差異。從傳統密集住宅多的苓雅區，經較後發展的三民區，再到相對較新發展且近郊區的楠梓區，埃及斑蚊的數量逐漸降低，白線斑蚊的數量逐漸增加(圖三)。楠梓區登革熱病媒蚊種類隨季節的變化也最大，2015年秋季埃及斑蚊被捕獲的數量高於白線斑蚊(34:2)，但是在2016夏季白線斑蚊則高於埃及斑蚊(31:1)。(4)就容器指數而言，2015年秋季高於2016夏季，2016年春季最低。2015年秋季苓雅正心里大樓公寓一樓與2016夏季楠梓翠屏里大樓公寓外面的每週平均容器指數均高達第八級，前者多為埃及斑蚊後者則多為白線斑蚊(圖四)。

## 2. 戶外樹叢上下空間分佈

相對於住宅內外，戶外灌木叢與3-5公尺高的樹上所捕獲的登革熱病媒成蚊數目較少，且白線斑蚊遠多於埃及斑蚊。雖然灌木叢與3-5公尺高的樹上均捕獲病媒成蚊，但是灌木叢捕獲的數量比3-5公尺高的樹高，尤其是2015年秋季於楠梓翠屏里與2016夏季於苓雅區正心里分別每週平均可捕獲6.7與13.3隻白線斑蚊(圖五)，容器指數分別高達第8與9級(圖六)。埃及斑蚊在戶外樹叢的數量相對低，最高平均每週僅可捕獲一隻，容器指數均 $\leq 10\%$  ( $\leq$ 第4級)。

## (二)懷卵登革熱病媒蚊的產卵行為探討

### 1. 實驗室內不同空間模擬

分別將埃及斑蚊及白線斑蚊飢餓24小時。其次，將血餐後的斑蚊置於 $20 \times 20 \times 25 \text{cm}^3$ 的壓克力箱中3天，並供以10%糖水。待卵發育成熟後，再將單隻待產卵的雌蚊放入 $60 \times 60 \times 60 \text{cm}$ 或是 $200 \times 180 \times 120 \text{cm}$ 規格的帳篷測試空間。測試空間中分別擺放30個產卵裝置，以5行6

列的方式平均擺放，產卵裝置則為 6x7cm (底 x 高) 的透明塑膠杯，杯內放入貼近杯底的 3x20 cm 長條紙巾與 30 ml 的過濾水 (高度約 1cm) 供雌蚊產卵。每種測試空間各進行進行 10 個重複，三天後記錄產卵分散行為。結果如圖七所示：(1) 埃及斑蚊與白線斑蚊均具產卵分散行為，然而白線斑蚊無論在小帳篷或大帳篷的空間中產卵分散度遠大於埃及斑蚊。(2) 兩種病媒蚊在大帳篷空間環境產卵分散度都高於小帳篷空間環境。

## 2. 住家內外產卵習性比較

登革熱病媒蚊實際於戶內外環境的產卵習性調查分別在高雄市與臺南市各選一區三個里進行；高雄市選擇苓雅區福海、尚義、五福三個里，分別於 2016 年二月、五月、八月、十一月，每月連續三週，每週收集觀察病媒蚊於住家戶外、客廳、廚房與臥室產卵的情形；在臺南市則選擇男曲新興、田寮與文華里，從 2016 年 6 月 28 日起連續 12 週進行相同的產卵習性調查。

高雄市的調查結果如圖八所示：三個里的病媒蚊均偏好於住家外面與客廳產卵，但是夏季曾觀察到五福里的病媒蚊會進入廚房產卵、福海裡的病媒蚊產卵於臥室，秋季則觀察到五福里的病媒蚊會於臥室產卵。整體而言，埃及與白線斑蚊均會於戶外產卵，容器指數可達 10% (第四級)，只有埃及斑蚊進入住家室內產卵，容器指數 $\leq$ 4% (第二級)。唯一例外是五月曾在五福里客廳觀察到白線斑蚊所產的卵。雖然住宅指數與布氏指數僅達第四級，五福里在五月與八月的幼蟲指數均高達需注意防範的第六級(圖九)。

在台南是連續 12 週的觀察結果與高雄市雷同，三個里的病媒蚊均偏好於住家外面與客廳產卵(圖十)，容器指數可達 16% (第五級)。

例外情形也發生於新興區與田寮里，田寮里在第五週曾觀察到白線斑蚊進入客廳產卵、埃及斑蚊進入臥室產卵，新興里則常見埃及斑蚊進入廚房與臥室產卵。整體而言，新興里的住宅指數、布氏指數與幼蟲指數均高於其他兩里，分別高達第四、五、六級(圖十一)。

### (三)幼蟲棲地調查

從 105 年 8 至 10 月在高雄市苓雅區正心里，每一個月一次地毯式巡視，針對地面之積水容器與水溝、排水系統為孳生源進行調查。結果發現在每次的調查中，陽性積水容器陽性率大約占 2.7 - 4%，且埃及、白線斑蚊皆有；至於水溝，只有在第一次調查時出現陽性率，約為 0.83% (2/241)，皆為埃及斑蚊或家蚊(圖十二)。第二、三次調查的 191、217 處的水溝與排水系統則為發現任何病媒蚊幼蟲。

### (四)都會文創之複合式產卵誘集容器研發

本複合式產卵誘集器融合雌蚊誘集與產卵誘集器概念，設計具有誘引病媒雌蚊進入產卵卻不易再飛出的病媒雌蚊誘集。基本概念如圖十三所示：在一般常用的誘卵桶中進行三項改良，一是誘卵桶蓋上的入口以直筒向下延伸或口徑逐漸縮小至外桶的一半高；二是在誘卵桶最上面約 1/5 以透光材質製作，以誤導產完卵或誤入的雌蚊，減少從入口在飛出的機率；三是在由底部往上約 1/4 高處，左右邊各鑽一小洞，讓下雨後過多的水可以流出。初步於實驗室中進行誘引與逃離試驗發現：在 200 x 180 x 120 cm 的大帳篷中分別放入此複合式產卵器與 30 隻吸血雌蚊，24 小時後平均有  $92.2 \pm 1.9\%$  懷卵雌蚊被誘入產卵器。相反的，在產卵器中放入 30 隻未吸血雌蚊，再將此產卵器放入 60 x 60 x 60 cm 小帳篷中，24 小時後只有  $4.4 \pm 1.9\%$  的雌蚊從產卵器中逃出到帳篷內。顯示此複合式產卵誘集器在實驗室內的測試效果良好，具有田間大量推廣使用潛力。

**(子計畫十三)建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略**

1. 為了確認自密西根大學引進之 *Wolbachia*(wAlbB) 感染菌株詳細序列，我們先利用 wAlbB 專一性引子(primer)以 PCR 方式增幅放大並定序分析。分析結果如附，經詳細比對後，確認為 wAlbB 品系。

		Download		GenBank		Graphics	
Wolbachia endosymbiont of Aedes albopictus isolate GC_2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence							
Sequence ID: <a href="#">gb X611380.1</a> Length: 896 Number of Matches: 1							
Range 1: 38 to 882				<a href="#">GenBank</a>		<a href="#">Graphics</a>	
		▼ Next Match		▲ Previous Match			
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
1544 bits(836)	0.0	842/845(99%)	2/845(0%)	Plus/Plus			
Query	9	TGAGT-ATGTATAGG-ATCTACCTAGTAGTACGGGAATAATTGTTGGAAACGGCAACTAAT		66			
Sbjct	38	TGAGTAATGTATAGGAATCTACCTAGTAGTACGGGAATAATTGTTGGAAACGGCAACTAAT		97			
Query	67	ACCGTATACGCCCTACGGGGGAAAAATTTATTGCTATTAGATGAGCCTATATTAGATTAG		126			
Sbjct	98	ACCGTATACGCCCTACGGGGGAAAAATTTATTGCTATTAGATGAGCCTATATTAGATTAG		157			
Query	127	CTAGTTGGTGGAGTAATAGCCTACCAAGGCAATGATCTATAGCTGATCTGAGAGGATGAT		186			
Sbjct	158	CTAGTTGGTGGAGTAATAGCCTACCAAGGCAATGATCTATAGCTGATCTGAGAGGATGAT		217			
Query	187	CAGCCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT		246			
Sbjct	218	CAGCCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT		277			
Query	247	TGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGATGAGTGAAGAAGGCCCTTTGGGTT		306			
Sbjct	278	TGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGATGAGTGAAGAAGGCCCTTTGGGTT		337			
Query	307	GTAAGCTCTTTTAGTGAGGAAGATAATGACGGTACTCACAGAAGAAGTCTTGGCTAACT		366			
Sbjct	338	GTAAGCTCTTTTAGTGAGGAAGATAATGACGGTACTCACAGAAGAAGTCTTGGCTAACT		397			
Query	367	CCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGGAGAGGGCTAGCGTTATTTCGGAATTATTGGGCGTA		426			
Sbjct	398	CCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGGAGAGGGCTAGCGTTATTTCGGAATTATTGGGCGTA		457			
Query	427	AAGGGCGCGTAGGCTGGTTAATAAGTTAAAAGTGAAATCCCGAGGCTTAACCTTGGAAAT		486			
Sbjct	458	AAGGGCGCGTAGGCTGGTTAATAAGTTAAAAGTGAAATCCCGAGGCTTAACCTTGGAAAT		517			
Query	487	GCTTTTAAAACCTATTAACTAGAGATTGAAAAGAGGATAGAGGAATTCCTGATGTAGAGGT		546			
Sbjct	518	GCTTTTAAAACCTATTAACTAGAGATTGAAAAGAGGATAGAGGAATTCCTGATGTAGAGGT		577			
Query	547	AAAAATTCGTAATAATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGTCTATCTGGTTCAAATCTG		606			
Sbjct	578	AAAAATTCGTAATAATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGTCTATCTGGTTCAAATCTG		637			
Query	607	ACGCTGAAGCGCGAAGGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTG		666			
Sbjct	638	ACGCTGAAGCGCGAAGGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTG		697			
Query	667	TAAACGATGAATGTTAAATATGGGAAGTTTACTTTCTGTATTACAGCTAACGCGTTAAAC		726			
Sbjct	698	TAAACGATGAATGTTAAATATGGGAAGTTTACTTTCTGTATTACAGCTAACGCGTTAAAC		757			
Query	727	ATTCGCCTGGGGACTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCA		786			
Sbjct	758	ATTCGCCTGGGGACTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCA		817			
Query	787	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCTTYTTGAC		846			
Sbjct	818	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCTTYTTGAC		877			
Query	847	ATGAA 851					
Sbjct	878	ATGAA 882					

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Wolbachia sp. wDry gene for cell division protein ftsZ, partial cds

Sequence ID: [dbj|AB039280.1](#) Length: 1060 Number of Matches: 1

Range 1: 363 to 1060 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1262 bits(683)	0.0	693/698(99%)	0/698(0%)	Plus/Plus
Query 11	AATACGTAGATACACTTATTGTCATTCCCTAATCAAAATTTATTTAGAATTGCTAACGAGA			70
Sbjct 363	AATACGTAGATACACTTATTGTCATTCCCTAATCAAAATTTATTTAGAATTGCTAACGAGA			422
Query 71	AAACTACATTTGCTGACGCATTTCAACTCGCCGATAATGTTCTGCATATTGGCATAAGAG			130
Sbjct 423	AAACTACATTTGCTGACGCATTTCAACTCGCCGATAATGTTCTGCATATTGGCATAAGAG			482
Query 131	GAGTAACTGATTTGATGATCATGCCAGGACTGATTAATCTTGATTTTGCTGATATAGAAA			190
Sbjct 483	GAGTAACTGATTTGATGATCATGCCAGGACTGATTAATCTTGATTTTGCTGATATAGAAA			542
Query 191	CAGTAATGAGTGAGATGGGTAAGCAATGATTGGTACTGGAGAGGCAGAGGGAGAAGATA			250
Sbjct 543	CAGTAATGAGTGAGATGGGTAAGCAATGATTGGTACTGGAGAGGCAGAGGGAGAAGATA			602
Query 251	GGGCAATTAGTGCTGCAGAAGCTGCGATATCTAATCCATTGCTTGATAATGTATCAATGA			310
Sbjct 603	GGGCAATTAGTGCTGCAGAAGCTGCGATATCTAATCCATTGCTTGATAATGTATCAATGA			662
Query 311	AAGGCGCACAAAGGAATATTGATTAATATTACTGGTGGTGGAGATATGACTCTATTTGAAG			370
Sbjct 663	AAGGCGCACAAAGGAATATTGATTAATATTACTGGTGGTGGAGACATGACTCTATTTGAAG			722
Query 371	TTGATTCTGCAGCAAAATAGAGTGCGTGAAGAAGTGGATGAAAATGCAAATATAATATTTG			430
Sbjct 723	TTGATTCTGCAGCCAATAGAGTGCGTGAAGAAGTGGATGAAAATGCAAATATAATATTTG			782
Query 431	GTGCCACTTTTGATCAGGCGATGGAGGGAAGAGTTAGAGTTTCTGTTCTTGCAACTGGCA			490
Sbjct 783	GTGCCACTTTTGATCAGGCGATGGAGGGAAGAGTTAGAGTTTCTGTTCTTGCAACTGGCA			842
Query 491	TTGATAGCTGTAACAACAATTCATCTGTTAATCAAAACAAGATCCCAGCAGAGGaaaaaa			550
Sbjct 843	TTGATAGCTGTAACGACAATTCATCTGTTAATCAAAACAAGATCCCAGCAGAGGAAAAAA			902
Query 551	aTTTTAAATGGCCTTATAATCAAATTCGAATATCAGAAACAAAAGAAATATGCTTCAACTG			610
Sbjct 903	TTTTAAATGGCCTTATAATCAAATTCGAATATCAGAAACAAAAGAAATATGCTTCAACTG			962
Query 611	AGCAAAACAAATGAAAGAGTTAAGTGGGGCAGCAATGTTTATGATATACCAGCTTATTTAA			670
Sbjct 963	AGCAAAACAAATGAAAGAGTTAAGTGGGGCAGCAATGTTTATGATATACCAGCTTATTTAA			1022
Query 671	GAAGaaaaaaaaTAATGCAATTTTGCTACTAAAGTCAG			708
Sbjct 1023	GAAGAAAAAAAAAATGCAATTTTGCTACTAAAGTCAG			1060

2. 利用 wAlbB 專一性引子(primer)以 RT-PCR 方式測試第一代到第四代已感染之埃及斑蚊，其體內感染之 Wolbachia 比例。結果顯示每一代之埃及斑蚊，其體內感染 Wolbachia 之比例均為 100%，表示該菌株能在實驗室內穩定繼代。

Maternal transmission rates of wAlbB in *Aedes aegypti*

Generation	Positive progeny wAlbB
G1	51/51 (100%)
G2	32/32 (100%)
G3	48/48 (100%)
G4	95/95 (100%)

Females of the Wolbachia (wAlbB) infected line were collected for examination for the presence of wAlbB by RT-PCR

3. 為確認該品系之 Wolbachia(wAlbB) 是否能在埃及斑蚊族群內造成 Cytoplasmic incompatibility (細胞質不相容性)，我們將 Wolbachia(wAlbB) 感染或野生種的雌蚊，分別與 Wolbachia(wAlbB) 感染或野生種的雄蚊交尾，經人工吸血後使其自然產卵再測試不同組別之蚊卵孵化率。分析結果如附，結果顯示 Wolbachia(wAlbB) 感染的雄蚊與野生種的雌蚊交尾後，其蚊卵孵化率均為 0% 亦即證明其細胞質不相容性之效果。

Cytoplasmic incompatibility (CI) between wild type and Wolbachia infected mosquitoes

		Males	
		WT (UGAL)	wAlbB
Females	WT (UGAL)	94.2 ± 1%	0%
	wAlbB	81.2 ± 4%	77.5 ± 4%

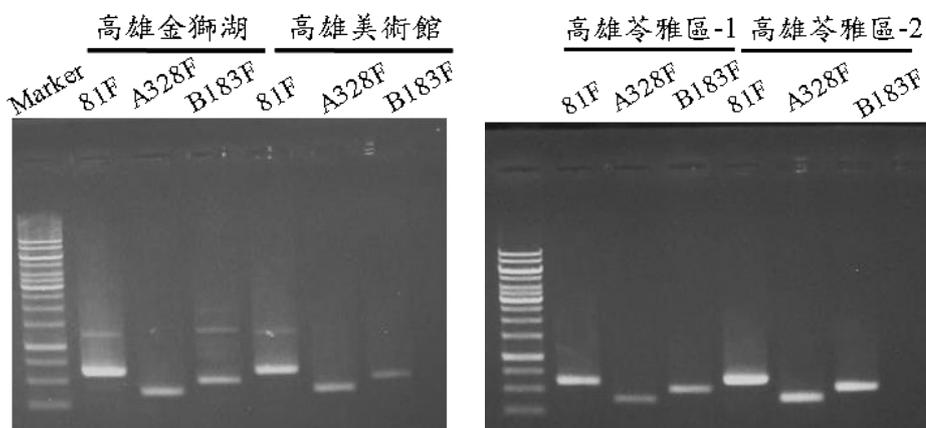
CI was determined by quantifying viable eggs resulting from a series of crosses between Wolbachia infected and wild type mosquito. Mean hatching rates are reported and standard error of the mean is indicated.

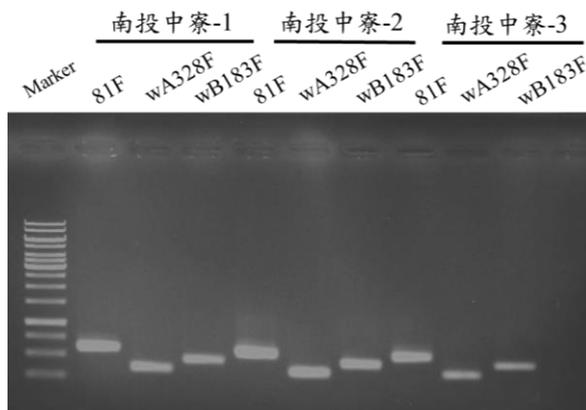
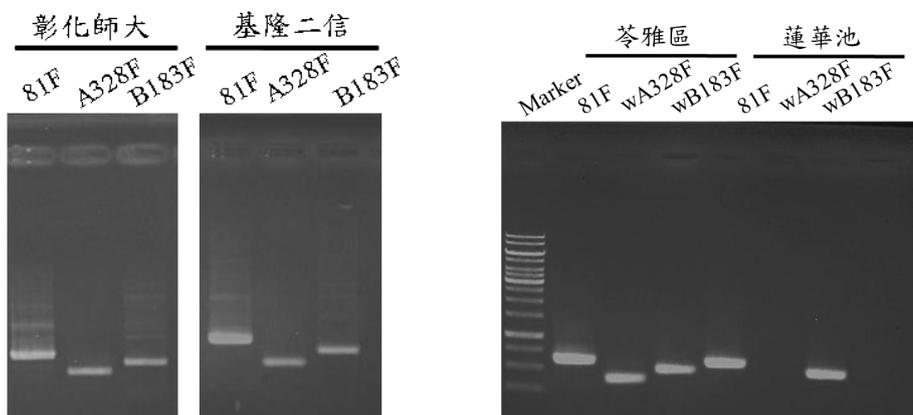
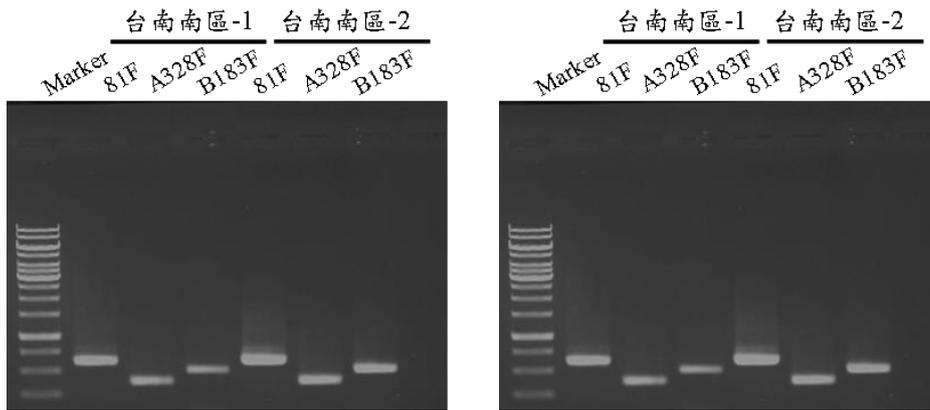
4. 台灣本土白線斑蚊體內的沃爾巴氏菌檢測：

萃取單一隻雌成蚊體內的染色體 DNA，以 PCR 增幅沃爾巴氏菌表面蛋白基因 (*Wolbachia* surface protein: *wsp*)。將 PCR 產物進行基因定序，比對其序列，確定是否為 *wsp*。使用的 PCR 引子包含：

- (1) 81F, 691R：廣用型引子，可增幅不同 supergroup 的 *wsp*
- (2) A328F, 691R：*Wolbachia* supergroup A (wAlbA)專用引子。
- (3) B183F, 691R：*Wolbachia* supergroup B (wAlbB)專用引子。

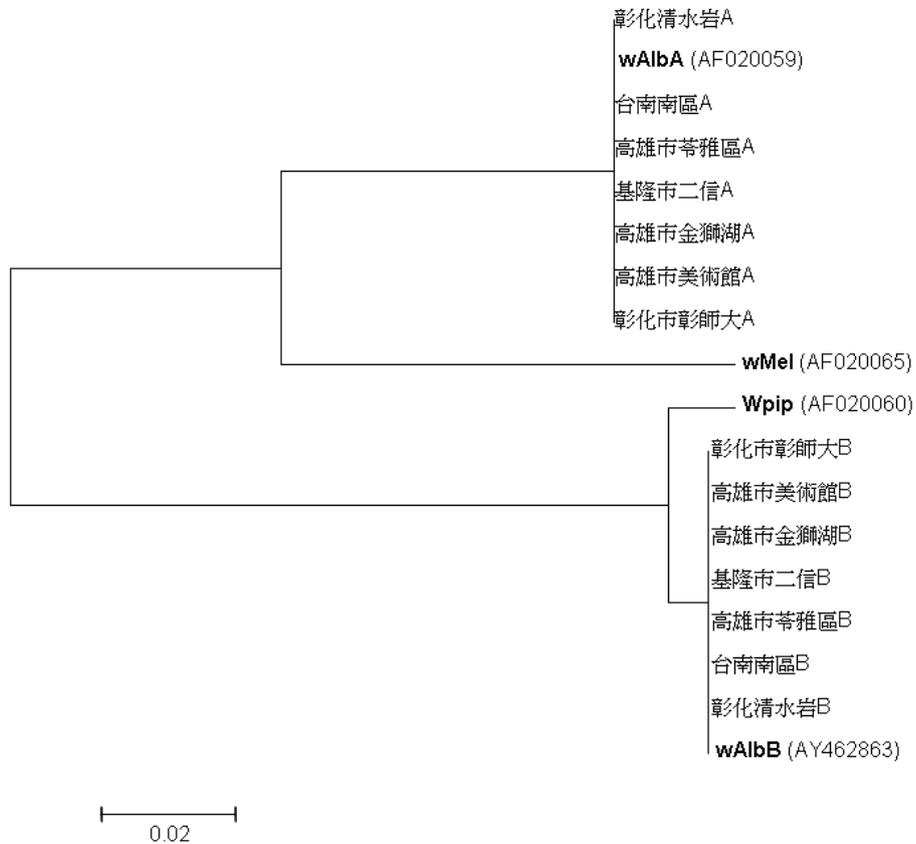
檢測結果如下圖所示，試驗樣本皆可利用廣用型引子對(81F, 691R)，增幅出 *wsp*，因此可以確定所採集在白線斑蚊體內皆含有沃爾巴氏菌。進一步以專用引子對(A328F, B183F)進行 PCR，其結果顯示，除了南投縣魚池鄉蓮華池的白線斑蚊僅含有 wAlbB，其他地區的白線斑蚊皆含有 wAlbA 與 wAlbB 兩個 *Wolbachia* strains。





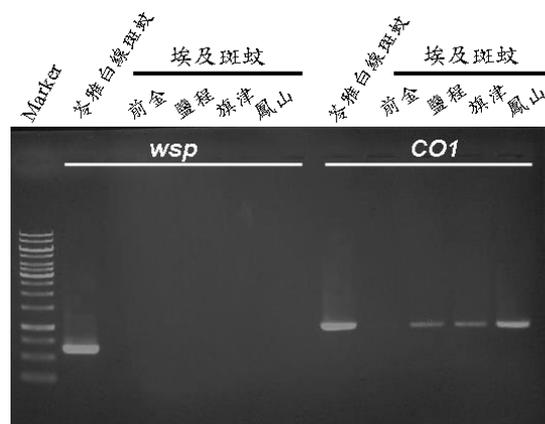
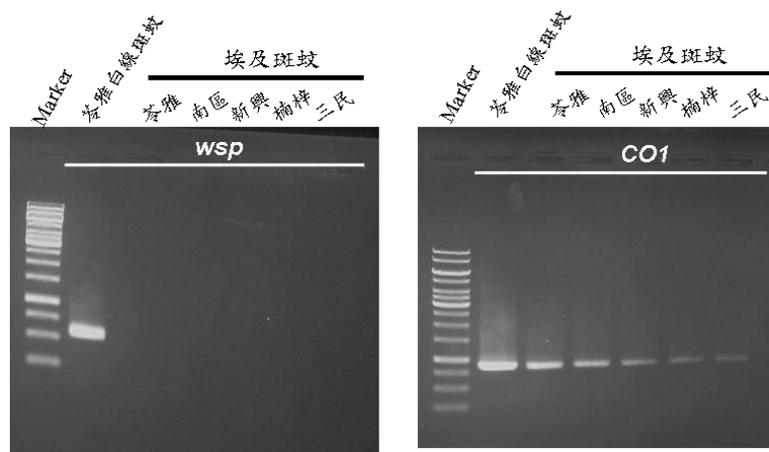
5. 台灣本土白線斑蚊體內的沃爾巴氏菌親緣關係：

將上述 PCR 產物進行 DNA 定序，再以 MEGA6 軟體建構親緣關係樹。結果顯示白線斑蚊體內的沃爾巴氏菌 DNA 序列分別與 wA1bA 以及 wA1bB 相同。此一結果與使用專用引子對(A328F, B183F)的 PCR 檢測結果相同。

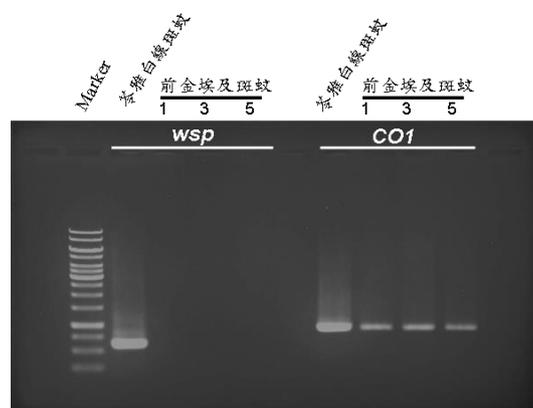


## 6. 台灣本土埃及斑蚊體內的沃爾巴氏菌檢測：

利用廣用型引子 (81F, 691R)，進行 PCR 檢測埃及斑蚊體內是否帶有的沃爾巴氏菌。以高雄市苓雅區白線斑蚊做為正對照組。結果顯示，高雄市苓雅區、新興區、楠梓區、三民區、前金區、鹽程區、旗津區、鳳山區、以及台南市南區 10 個樣點的埃及斑蚊體內並未含有的沃爾巴氏菌。

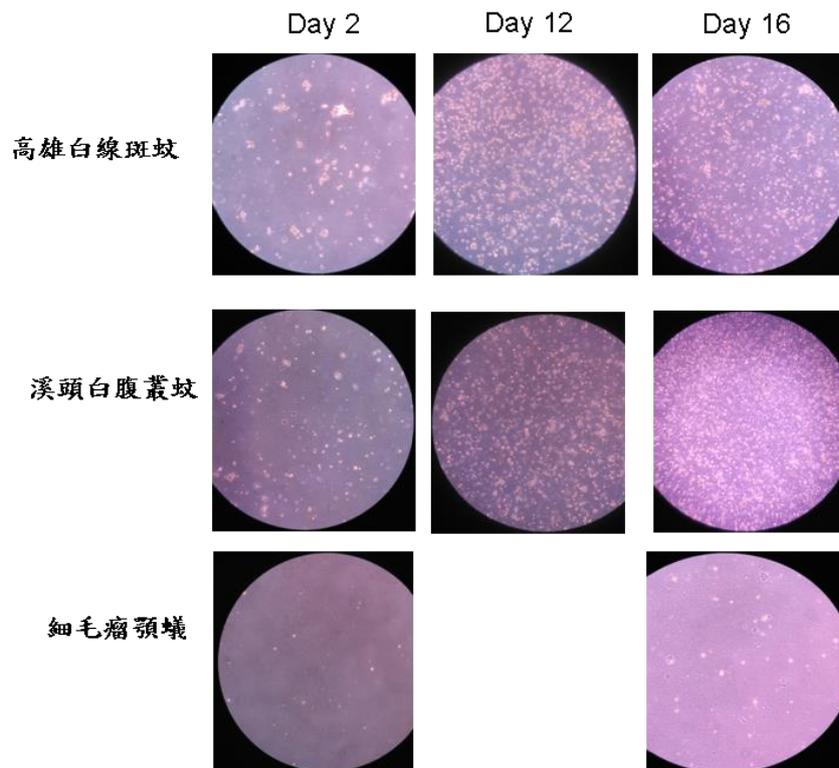


由於第一次的 PCR 並未做出前金區埃及斑蚊的 *CO1*，因而進行第二次實驗。分別取 1, 3, 5 隻雌成蟲，再做一次 PCR，結果顯示前金區埃及斑蚊可以增幅 *CO1*，但是仍然沒有 *wsp*。再次確定所採集的埃及斑蚊體內沒有沃爾巴氏菌。



## 7. 含有沃爾巴氏菌的野外昆蟲的初代細胞培養(primary cell culture)

將同一採集點所收集的雌蚊，以 75%酒精進行表面消毒，將 3~ 5 隻蟲體磨碎後，放入一個培養皿中，加入 MM 培養液，進行培養。如下圖所示，高雄白線斑蚊與溪頭白腹叢蚊的初代細胞，生長情形良好。在培養 2 週之後，細胞數目明顯增多。而細毛瘤顎蟻的初代細胞生長較為緩慢，細胞數目增加不多。可能是 MM 培養液，較不適合用來養螞蟻初代細胞。細毛瘤顎蟻是行孤雌生殖的螞蟻，其體內的 Wolbachia 經過定序鑑定，與目前已知造成孤雌生殖的 Wolbachia 相近。因此值得進一步研究、保存。

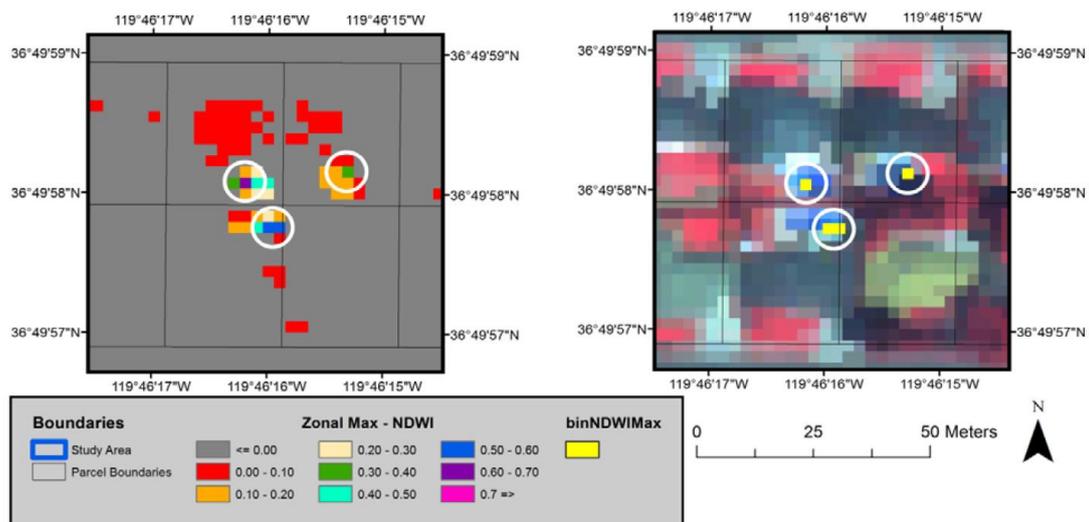


## 8. 多軸無人飛行載具偵測病媒蚊孳生源

以多軸無人飛行器上之高解析影像與視傳系統及紅外線、多光譜儀 (Multispectral) 與高光譜儀 (Hyperspectral) 接收裝置於低空對大範圍孳生源進行偵察與監測，如透過 HD 畫質與高光譜裝備之影像辨識，是可以大大的解決這些都市生態系 (Urban Ecosystem) 中複雜且不易處理病媒生物 (Vector) 的孳生源環境的偵測監測與預測。目前已應用多軸無人飛行載具 (UAV) 搭載輕量化多光譜相機 (light-weighted multispectral camera, MicaSane 公司出產之 RedEdge) 進行都市生態系 (Urban Ecosystem) 中複雜且不易處理病媒蚊孳生源積水容器偵測的模擬測試。一般而言，水體會吸收近紅外線以及中紅外線 (NIR, MIR)，而在可見光區則有較高的反射率；此外，濁水的高反射區間偏向於紅光區而清水則在綠光區有較高的反射率。而利用水對綠光區以及近、中紅外光區的反射率的差異，目前我們可以透過以「歸一化水體指數 (Normalized Difference Water Index, NDWI)」來進行水體位置及範圍的提取。另外，我們以「歸一化水體指數 (Normalized Difference Water Index, NDWI)」來進行都市環境中水體位置及範圍的提取。圖一右所示為測試都市可見光影像圖 (SP 為被植被所遮蔽的水體)，圖一左為 NDWI 所呈現水體結果，數值越高(紅色塊以上)則是積水可能區塊。圖二所示以「歸一化水體指數 (Normalized Difference Water Index, NDWI)」分級進行統合成總水體指數(binNDWIMax)，更能呈現病媒蚊孳生源積水高風險區。



圖一 以「歸一化水體指數 (Normalized Difference Water Index, NDWI)」來進行都市環境中水體位置與範圍(植被遮蔽水體)。



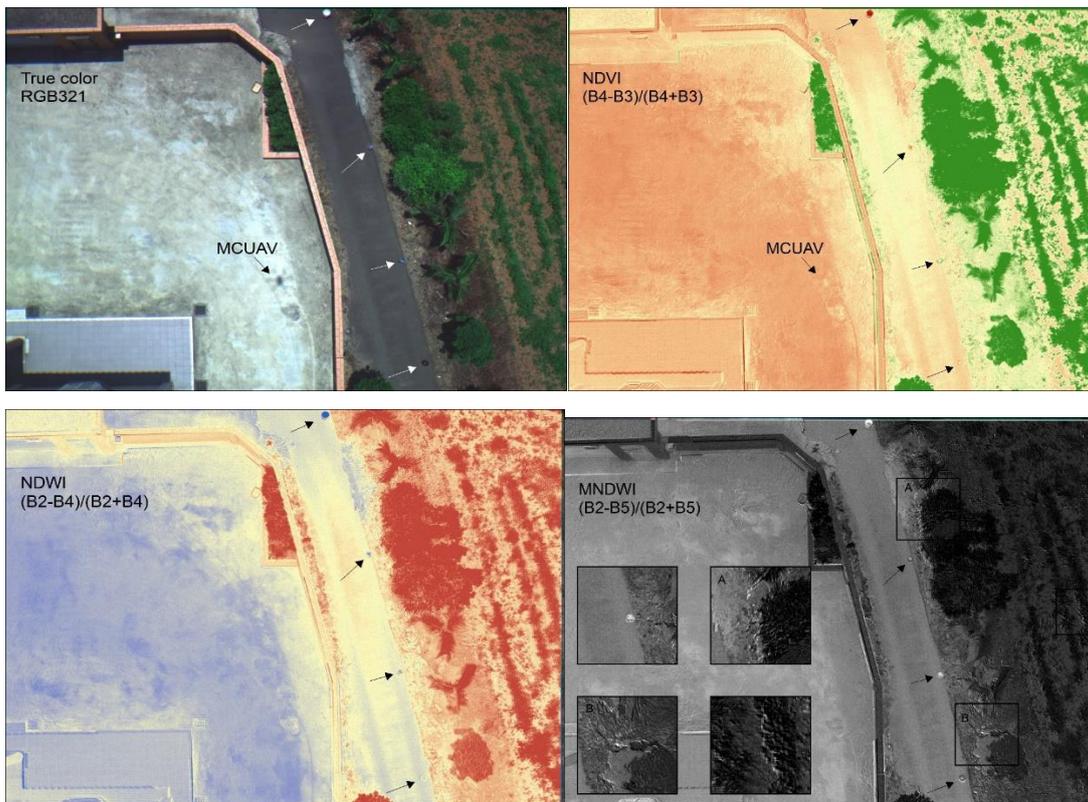
圖二 將「歸一化水體指數 (Normalized Difference Water Index, NDWI)」分級進行統合成總水體指數(binNDWIMax) 呈現都市環境水體。

對於實地環境區域中低空(距離偵測區域 10 公尺數)偵測孳生源的試驗中的四個模擬積水處(直徑 20 公分水桶, 積水 5 公分), 以試驗開發 6 軸無人飛行載具(UAV)搭載輕量化多光譜相機 (light-weighted multispectral camera, MicaSane 公司出產之 RedEdge)(圖三) 進行實

地偵測可以由圖四結果顯示經由「歸一化水體指數 (Normalized Difference Water Index, NDWI)」便可清楚偵測出模擬滋生源積水。



圖三 多軸無人飛行載具 (UAV) 搭載輕量化多光譜相機 (右圖)。



圖四 多軸無人飛行載具(UAV)搭載輕量化多光譜相機偵測模擬積水處(直徑 20 公分水桶，積水 5 公分)以「歸一化水體指數 NDWI)」呈現結

果箭頭所標示為模擬積水處。

## 9. 多軸無人飛行載具病媒蚊防治

利用飛行載具優越的酬載能力及操控性來攜帶各類防治藥劑並在低空中均勻、精確地撒佈，其能適用於各種都市 3D 環境空間中人力難至之處。多軸無人飛行器在判斷都市生態環境中病媒蚊孳生源位置後，可以多軸灑藥機進行施藥藥劑防治，如此不但可以即時清除孳生源，更可取代大面積噴藥的防治方式。開發針對成蚊防治裝載液態設備(圖五)與超低容量煙霧機(ULV)(圖六)設備之灑佈機，與防治幼蟲裝載粒狀灑佈機(圖七)之設計、測試飛行投藥，並完成多軸機防治登革熱病媒蚊灑佈標準作業規劃。在以多軸無人偵測機(酬載高解析影像、多光譜儀)確定環境較高處(都市建築積水天溝、位置較高的樹洞等)具有高風險病媒蚊幼蟲孳生源(積水處)後，將以多軸無人空載機裝載液態或粒狀病媒蚊幼蟲防治藥劑(如百利普芬 pyriproxyfen)，飛至都市建築孳生源或有積水樹洞的樹上方約 5-10 公尺進行定點性的防治粒劑撒佈，幼蟲防治粒劑將會直接掉落至都市建築積水處，或由葉片縫隙掉落至積水樹洞。未直接撒入積水處的粒劑爾後也可隨雨水，而流入積水處達到防治病媒蚊幼蟲的效果。另外，若於都市環境較高處偵測到有病媒蚊成蚊容易聚集的位置(都市建築積水附近、都市綠帶等)，將可以以裝載液態設備與超低容量煙霧機(ULV)設備之灑佈機飛至病媒蚊容易聚集的位置上方約 10 公尺處，進行定點性成蟲藥劑之灑佈，以降低病媒蚊成蟲密度。



圖五 病媒蚊成蚊與幼蟲防治設計之多軸無人液態撒藥機。



圖六 針對病媒蚊成蚊防治設計之多軸無人超低容量煙霧機(ULV)。



圖七 病媒蚊幼蟲防治之多軸無人粒劑撒藥機。

## 附表

### 多軸無人機防治登革熱病媒蚊灑佈標準作業程序

- (一)目的：鑑於登革熱病媒蚊會於屋頂排水管及樹洞產卵，為達防治目的，建立無人機防治登革熱病媒蚊灑佈標準化作業程序，以確保防治效果。
- (二)適用範圍：凡屬登革熱疫區均適用之。
- (三)權責單位：各防治權責單位執行。
- (四)依據：
1. 傳染病防治法。
  2. 行政院環境保護署許可或核准之病媒蚊防治用藥規定。
- (五)作業說明：
1. 防治時機：經通報或醫院確診個案為登革熱，即進行防治。
  2. 防治範圍：以病例可能感染地點或病毒血症期間停留達2小時之活動地點（如工作地、學校、補習班）為中心，依登革熱確診個案數目，於個案發生地點半徑400公尺範圍內之屋頂排

水溝及樹木，進行下列防治工作。

### 3. 防治原則：

(1) 確診個案及通報個案：以個案為中心半徑400公尺，範圍內之屋頂及樹木灑佈粒劑。

(2) 確診個案2例以上：以各病例分布之里別為中心，劃定該里及周圍 6-8 里防治範圍（各病例邊界，向外延伸 400公尺）

### (六) 無人機控制及防治藥劑施用法：

1. 屋頂排水溝施作方法：於防治範圍內之屋頂中央上方5公尺，以4公尺/秒之速度進行灑佈。

2. 樹木施作方法（依樹冠直徑區分）：

(1) 樹冠直徑小於3公尺：於樹木上方1公尺處，開啟落藥口，停留1秒

(2) 樹冠直徑3—6公尺：於樹木上方1公尺處，開啟落藥口，停留2秒

(3) 樹冠直徑大於6公尺：於樹木上方1公尺處，開啟落藥口，停留3秒

### 附錄一、使用藥品

1. 藥品名稱：「駐樂寶」昆蟲生長調節粒劑 Sumilarv® 0.5G

2. 有效成分及含量：百利普芬0.5 % w/w

3. 介紹：駐樂寶是一種沙粒狀，會在水中緩慢釋放出有效成分的長效型產品。昆蟲生長調節劑(IGR)模擬昆蟲體內的青春激素，使接觸到的昆蟲之發育機制受到誤導，進而產生害蟲羽化失敗，或是繁殖力降低等長期性影響，抑制害蟲的族群數量的同時對環境善。沒有魚毒性，對哺乳動物而言安全性也高，是綜合防治不可或缺的一環。

4. 性能：防治蚊子幼蟲（孑孓）

5. 施用範圍：適合施用於各種水域、化糞池、積水容器等，以防治子子。

6. 建議用量：2公克/立方公尺

附錄二、無人機灑藥設定

無人機灑藥設定

離地高度（米） 20 10 5

地面藥寬（米） 12.5 4 2

飛行速度（米/秒） 2 2 2

落藥速度（公克/分鐘） 900-1000 900-1000 900-1000

落藥速度（公克/秒） 15 15 15

#### **(子計畫十四) 登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫**

- (一) 登革熱防治客製化組裝課程及數位電子化，透過網際網路及多媒體方式達到零距離衛教宣導成效。
- (二) 協助本局落實公權力，本計畫期程內開立違反傳染病防治法第 25 條舉發案件 82 件。(如表一)
- (三) 辦理多元化登革熱衛教宣導 20 場次以上，總計約 1,319 人次參與。(如表二)
- (四) 透過臨床醫師診斷教育訓練及社區民眾衛教宣導，將登革熱年平均致死率降至 0.4% (含) 以下。(本年度致死率為 0%)

#### **(子計畫十五) 血液製品之登革病毒偵測調查**

目前已分析 6050 個樣本，檢驗結果為：NS1 皆為陰性，一例為 RT-PCR 陽性，該檢體為 NS1/IgM/IgG 陰性，另有四例 IgM 陽性與八例 IgM/IgG 陽

性，因此血袋中的確可能存在登革病毒，在所研究的樣本中登革病毒陽性率為 0.017% (1/6050)。

預計將在計畫截止日前盡力完成所有樣本之分析(除少數樣本體積原由血液基金會取得時即已不足以分析者)。

### (平台一)行政暨教育資源平台

#### 檢附兩場研討會成果資料

#### 檢附索羅門群島辦理登革熱國際研討會之成果

#### 索羅門群島辦理登革熱國際研討會之議程

### International Dengue Fever Symposium

**Date:** 2015/11/26 (W4)

**Location:** Conference Room, National Referral Hospital, Solomon Islands

**Organizer:** Center for Dengue Fever Control and Research, Kaohsiung Medical University

Tropical Medicine Center, Kaohsiung Medical University (KMU)/

Kaohsiung Medical University Hospital (KMUH)

**Co-organizer:** Taiwan Health Center, Kaohsiung Medical University Hospital

Time	Topic	Speaker	Moderator
8:30-9:00 AM	Registration		
9:00-9:10 AM	Opening	1. HE Ambassador Victor Yu, Taiwan 2. Dr. Tenneth Dalipanda, PS, MHMS, SIG 3. NRH CEO Dr. Steve Aumanu, 4. Dr. Seyha Ros , Dr. Matt Shortus, WHO medical officer,	Dr. Tsai, Jih-Jin (Ruby), Director, Tropical Medicine Center, KMU/KMUH

		Solomon Islands	
9:10-9:40	Dengue outbreak surveillance in the Solomon Islands.	Dr. Alison Ricipapu, Director, Surveillance and Epidemiology Unit, MHMS, SIG	Dr. Tsai, Jih-Jin (Ruby), Director, Tropical Medicine Center, KMU/KMUH
9:40-10:10 AM	Vector survey of dengue fever in Solomon Islands	Dr. Albino Bobogare, National Vector Borne Disease Control Program, MHMS, SIG	Dr. Tsai, Jih-Jin (Ruby), Director, Tropical Medicine Center, KMU/KMUH
10:10-10:40 AM	Dengue Fever: Factors which makes it a threat in the Solomon Islands.	Dr. Charles Butafa, National Vector Borne Disease Control Program, MHMS, SIG	Dr. Tsai, Jih-Jin (Ruby), Director, Tropical Medicine Center, KMU/KMUH
10:40-10:55 AM	<b>Break</b>		
10:55-11:25 AM	Outbreak of dengue fever in Taiwan	Dr. Tsai, Jih-Jin (Ruby), Director, Tropical Medicine Center, KMU/KMUH	Prof. Perng, Guey-Chuen, National Cheng Kung University
11:25-11:55 AM	Molecular medical Mechanism of dengue fever	Prof. Perng, Guey-Chuen (Oscar), National Cheng Kung University	Dr. Tsai, Jih-Jin (Ruby), Director, Tropical Medicine Center, KMU/KMUH
11:55-12:15 PM	Panel Discussion	All attendees	Dr. Tenneth Dalipanda, PS, MHMS, SIG
12:15-1:00 PM	<b>Lunch</b>		
1:00-2:00 PM	ISO15189 Guideline Quality assurance of Laboratory	Mr. Lin, Shih-Wei, Accreditation Officer, Taiwan Accreditation Foundation	Mr. Shih, Chao-Ping, Vice CEO, TAF Taiwan Accreditation Foundation
2:00-3:00 PM	Interpretation of the dengue tests	Mt. Lin, Ping-Chang, Medical Technician, Tropical Medicine Center, KMUH	Mt. Chen, Po-Chih, Director, Medical Diagnostic Department, KMUH
3:00-3:20 PM	Break		
3:20-4:00 PM	Cooperative Research Discussion	All attendees	Prof. Perng, Guey-Chuen, National Cheng Kung University

## 出席專家學者名單

1. HE Ambassador Victor Yu, Taiwan (台灣駐索國于德勝大使)
2. Dr. Seyha Ros, WHO medical officer, Solomon Islands
3. Dr. Matt Shortus, WHO medical officer, Solomon Islands
4. Dr. Tenneth Dalipanda, PS, MHMS, SIG (索國衛生部次長)
5. Dr. Steve Aumanu, NRH CEO (索國中央醫院執行長)
6. Dr. Alison Ripiapu, Director, Surveillance and Epidemiology Unit, MHMS, SIG (索國衛生部流病監測組主任)
7. Dr. Albino Bobogare, Director, National Vector Borne Disease Control Program, MHMS, SIG (索國國家病媒疾病防治計畫主任)
8. Dr. Charles Butafa, National Vector Borne Disease Control Program, MHMS, SIG
9. Dr. Tsai, Jih-Jin (Ruby), Director, Tropical Medicine Center, KMUH (蔡季君)
10. Prof. Perng, Guey-Chuen (Oscar), National Cheng Kung University(彭貴春)
11. Mt. Chen, Po-Chih, Director, Medical Diagnostic Department, KMUH(陳柏志)
12. Mt. Lin, Ping-Chang, Medical Technician, Tropical Medicine Center, KMUH
13. Mr. Shih, Chao-Ping, Vice CEO, TAF (Taiwan Accreditation Foundation)(石兆平)
14. Mr. Lin, Shih-Wei, Accreditation Officer, TAF(林思瑋)
15. Miss Chiu, Man-Tzu, Accreditation Officer, TAF(邱曼慈)
16. Miss Wang, Yuh-Suan, Leader of Taiwan Health Center in Solomon Island
17. Dorald Tahani, Leader ,Medical Lab ,NRH
18. Miss Brenda Launiri Laurii, Medical Technician, Medical Lab ,NRH
19. Mr. Anthony Tabotabo , Medical Technician, Medical Lab, NRH

20. Miss Roselyn Livae, Medical Technician, Medical Lab ,NRH
21. Miss Angella Margaret Manele, Medical Technician, Medical Lab ,NRH
22. Roy Roger Maraka ,NRH
23. Aaron Oritaimae, NRH
- 24.Oecil Wilson, Path Lab ,NRH
- 25.Dr. Cynthia Joshua, Surveillance and Epidemiology Unit, MHMS, SIG
- 26.Jaied Koli, Island Sun News paper
- 27.Solomon Lofana, Solomon Star News paper

研討會簽到表(請見附錄 1)

### 研討會照片及辦理成果





6 The Island Sun Friday 27 November 2015 theislandnews.com

---

**NEWS LOCAL**

## Taiwan specialists here on special medical missions

**BY JARED KOLI**

A TEAM of Republic of China (ROC), Taiwan, dengue fever experts is here again for special medical missions.

The team consists of medical specialists led by Dr Ruby Tsai, who first initiated the project of Dengue Fever Laboratory Project of the National Referral Hospital (NRH).

They include doctors, dengue and laboratory experts, and clinical laboratory experts from Kaohsiung Medical University (KMU), Kaohsiung Medical University Hospital (KMUH) and a Professor from National Cheng Kung University.

They are here on two missions, one is the dengue laboratory workshop training and the other is to hold the International Dengue Symposium, which has been conducted yesterday at the Taiwanese Health Embassy in Honiara.

Opening the symposium yesterday, Taiwan Ambassador to Solomon Islands, HE Victor Yu, said the medical and health assistance constitutes an extremely important part of Taiwan's development assistance provided for SI.

"It encompasses a lot of capacity building effort in both hardware and software of the health and medicine field."

"The Kaohsiung Medical University and its teaching hospital are playing instrumental roles in this bilateral cooperation between our two countries."

"And the Dengue Fever Laboratory project is one of the salient examples," Ambassador Yu said.

National Referral Hospital (NRH) Chief Executive Officer, Steve Avramov, expressed appreciation to the Government of the Republic of China (ROC) for opportunities and assistance in contributing to NRH.

He stressed the ongoing cooperation between Taiwan and the Solomon Islands Government, saying NRH values this opportunity.

Big dengue outbreak in Solomon Islands in 2013 and even larger scale of dengue outbreak in Taiwan during 2014 and 2015 are presented and compared in yesterday's symposium.

Speakers are from the National Referral Hospital staff, Ministry of Health and Medical Services (MHMS), National Vector Borne Disease Control Programme and MIMMS Director of Surveillance and Epidemiology Unit, who raised an overview of Dengue fever in the country.

Dr Tsai, Jen-Jin (Jin-Jin), Director, Tropical Medicine Center of Kaohsiung Medical University (KMU) and Kaohsiung Medical University Hospital (KMUH) spoke on the outbreak of dengue fever in Taiwan.

Professor Peng, Gary-Chen of the National Cheng Kung University spoke on Molecular medical mechanisms of dengue fever.

Meanwhile, Taiwan Ambassador, HE Yu said it is very opportune for Dr Tsai to organize this International Dengue Fever Symposium.

"It is very nice to see a good mix of specialists in connection with the Dengue Fever gathering here to exchange useful knowledge and practical experiences."

"I hope the Dengue Lab and this International Symposium will lead to more cooperation in the tropical disease research and epidemic control between our two countries," he said.



Taiwan medical specialists with Republic of China (ROC) Taiwan Ambassador to Solomon Islands, HE Victor Yu, MHMS staff and MIMMS Doctors at the Taiwan Health Center yesterday

檢附第五屆登革熱國際研討會之成果  
第五屆登革熱國際研討會議程

第五屆登革熱國際研討會

5th International Dengue Conference

日期: 2016/10/23 -10/24 (Sunday-Monday)

地點: 台灣高雄蓮潭國際會館 B1F 國際一廳  
(高雄市左營區崇德路 801 號)

主辦單位: 高雄醫學大學 登革熱防治研究中心

高醫附院 熱帶疾病醫療暨防治中心

高醫醫學大學 熱帶醫學研究中心

協辦單位: 國家衛生研究院-國家蚊媒傳染病防治研究中心

指導單位: 衛生福利部疾病管制署

Date: 2016/10/23 -10/24 (Sunday-Monday)

Location: Meeting room No.1, B1F, Garden Villa, Kaohsiung, Taiwan

Organizer:

Center for Dengue Fever Control and Research, Kaohsiung Medical  
University, Taiwan (CDFCR, KMU)

Tropical Medicine Center, Kaohsiung Medical University/Kaohsiung  
Medical University Hospital (TMC, KMU/KMUH)

Co-organizer:

National Mosquito-Borne Diseases Control Research Center,  
National Health Research Institutes, Taiwan

Advisor: Centers for Disease Control, Taiwan

**2016/10/23 (Sunday)**

<b>Time</b>	<b>Topic / Speaker</b>	<b>Moderator</b>
<b>08:30-08:50</b>	<b>Registration</b>	
<b>08:50-09:00</b>	<b>Opening remarks</b> 高醫大代表 KMU representative 疾病管制署代表 CDC representative 國家衛生研究院 NHRI representative	Director Jih-Jin Tsai 蔡季君主任 TMC, KMU/KMUH CDFCR, KMU, Taiwan 高醫 熱帶疾病醫療暨防治中心 高醫大熱帶醫學研究中心 高醫大登革熱防治研究中心
<b>09:00-09:50</b>	<b>Dengue Prevention Practices and Factors Affecting Spread of Dengue: Malaysia Experience</b> Prof. Sazaly AbuBakar 【Tropical Infectious Diseases Research & Education Centre (TIDREC); Faculty of Medicine, University of Malaysia】	Director Jih-Jin Tsai 蔡季君主任 TMC, KMU/KMUH CDFCR, KMU, Taiwan
<b>09:50-10:40</b>	<b>Increasing recognition of dengue virus infection in the elderly</b> Prof. Yee-Sin Leo 【Institute of Infectious Diseases and Epidemiology, Communicable Disease Centre, Tan Tock Seng Hospital, Singapore】	Director Ko Chang 張科主任 Infection control office, Kaohsiung Municipal Hsiao-Kang Hospital CDFCR, KMU 高雄市立小港醫院 感染控制室 高醫大 登革熱防治研究中心
<b>10:40-11:00</b>	<b>Break / Group Photo</b>	
<b>11:00-11:50</b>	<b>Dengue prevention and control in Taiwan</b> Director Chin-Hui Yang 楊靖慧組長 【Centers for Disease Control, Taiwan 疾病管制署】	Prof. Chun-Hong Chen 陳俊宏教授 Institute of Molecular and Genomic Medicine, National Health Research Institutes, Taiwan 國家衛生研究院
<b>11:50-12:10</b>	<b>Panel discussion</b>	Prof. Chun-Hong Chen 陳俊宏教授 NHRI, Taiwan 國家衛生研究院
<b>12:10-13:00</b>	<b>Lunch</b>	
<b>13:00-13:40</b>	<b>Establishment of the Wolbachia-based approaches for dengue vector control</b> Prof. Shin-Hong Shiao 蕭信宏教授 【Department of Parasitology, National Taiwan University; CDFCR, KMU Taiwan 國立台灣大學醫學院 寄生蟲學科；高醫大登革熱防治研究中心】	Prof. Chun-Hong Chen 陳俊宏教授 NHRI, Taiwan 國家衛生研究院

13:40-14:30	<b>Immunopathogenesis of dengue virus infection: Implication for the discovery of potential biomarkers for severe dengue</b> Prof. Jang-Hann Chu 【Laboratory of Molecular RNA Virology and Antiviral Strategies; Department of Microbiology, National University of Singapore】	Director Chau-Chyun Sheu 許超群主任 Critical Care Center, KMUH, Taiwan CDFCR, KMU 高醫 重症加護醫學中心 高醫大 登革熱防治研究中心
14:30-15:10	<b>Effects of temperature, rainfall and petrochemical gas explosion on dengue incidence in Kaohsiung city</b> Director Ko Chang 張科主任 【Infection control office, Kaohsiung Municipal Hsiao-Kang Hospital; CDFCR, KMU Taiwan 高雄市立小港醫院 感染控制室；高醫大登革熱防治研究中心】	Director Chau-Chyun Sheu 許超群主任 Critical Care Center, KMUH, Taiwan CDFCR, KMU
15:10-15:30	<b>Break</b>	
15:30-16:10	<b>Epidemiology and Immune Response of Severe Dengue</b> Director Chau-Chyun Sheu 許超群主任 【Critical Care Center, Kaohsiung Medical University Hospital; CDFCR, KMU Taiwan 高雄醫學大學附設醫院 重症加護醫學中心；高醫大登革熱防治研究中心】	Director Ko Chang 張科主任 Infection control office, Kaohsiung Municipal Hsiao-Kang Hospital CDFCR, KMU
16:10-16:50	<b>Virological Characterization and Molecular Epidemiology of Dengue Virus Infection in Taiwan</b> Prof. Yi-Ming Chen 陳宜民教授 【Center for Infectious Disease and Cancer Research (CICAR), Kaohsiung Medical University; CDFCR, KMU Taiwan 高雄醫學大學 傳染病與癌症研究中心；高醫大登革熱防治研究中心】	Prof. Shin-Hong Shiao 蕭信宏教授 Department of Parasitology, National Taiwan University 國立台灣大學醫學院 寄生蟲學科
16:50-17:30	<b>Investigation of spatial distribution, oviposition behavior and larval breeding habitats of dengue vectors in southern Taiwan</b> Prof. Shu-Mei Dai 戴淑美教授 【Entomology, National Chung Hsing University; CDFCR, KMU Taiwan 中興大學 昆蟲學系；高醫大登革熱防治研究中心】	Prof. Shin-Hong Shiao 蕭信宏教授 Department of Parasitology, National Taiwan University 國立台灣大學醫學院 寄生蟲學科
17:30-17:40	<b>Panel discussion</b>	Prof. Shin-Hong Shiao 蕭信宏教授 Department of Parasitology, National Taiwan University 國立台灣大學醫學院 寄生蟲學科

**2016/10/24 (Monday)**

<b>Time</b>	<b>Topic / Speaker</b>	<b>Moderator</b>
<b>08:30-09:00</b>	<b>Registration</b>	
<b>09:00-09:50</b>	<b>Study of human antibodies bound to dengue virus particles with different maturation status</b> Prof. Wei-Kung Wang 王維恭教授【Department of Tropical Medicine, Medical Microbiology and Pharmacology, University of Hawaii at Manoa, USA; CDFCR, KMU Taiwan 夏威夷大學 熱帶醫學系；高醫大登革熱防治研究中心】	Prof. Guey Cheun Perng 彭貴春教授 Department of Microbiology & Immunology of National Cheng Kung University, Taiwan 國立成功大學 醫學院&微生物及免疫學研究所
<b>09:50-10:40</b>	<b>Role of Hematopoietic Stem Cells in Pathogenesis of Dengue Virus Infection &amp; Novel antiviral drugs development to dengue virus</b> Prof. Guey-Cheun Perng 彭貴春教授【Department of Microbiology & Immunology of National Cheng Kung University; CDFCR, KMU Taiwan 國立成功大學 醫學院&微生物及免疫學研究所；高醫大登革熱防治研究中心】	Prof. Wei-Kung Wang 王維恭教授 Department of Tropical Medicine, Medical Microbiology and Pharmacology, University of Hawaii at Manoa, USA 夏威夷大學 熱帶醫學系
<b>10:40-11:00</b>	<b>Break</b>	
<b>11:00-11:40</b>	<b>Prevention and control of Dengue in Kaohsiung</b> Senior Technical Specialist Chiu-Wen Chang 張秋文簡技【Center for Disease Control, Public Health Department, Kaohsiung City Government, Taiwan 高雄市政府衛生局 疾病管制處】	Executive Secretary Chia-Yu Chi 齊嘉鈺副所長 National Mosquito-Borne Diseases Control Research Center, National Health Research Institute, Taiwan 國家蚊媒傳染病防治研究中心
<b>11:40-12:20</b>	<b>Applications of ovi-trap and auto-dissemination of pyriproxyfen to control cryptic source of Dengue vectors</b> Prof. Kun-Hsien Tsai 蔡坤憲教授【Institute of Environmental Health College of Public Health, National Taiwan University; CDFCR, KMU Taiwan 國立台灣大學 環境衛生研究所；高醫大登革熱防治研究中心】	Executive Secretary Chia-Yu Chi 齊嘉鈺副所長 NHRI, Taiwan 國家衛生研究院
<b>12:20-12:30</b>	<b>Panel discussion</b>	Executive Secretary Chia-Yu Chi 齊嘉鈺副所長 NHRI, Taiwan 國家衛生研究院
<b>12:30-13:30</b>	<b>Lunch</b>	
<b>13:30-14:10</b>	<b>Genetically Modified Mosquitoes: An alternative way for Dengue Fever Prevention</b> Prof. Chun-Hong Chen 陳俊宏教授【Institute of Molecular and Genomic Medicine, National Health Research Institutes, Taiwan 國家衛生研究院】	Prof. Kun-Hsien Tsai 蔡坤憲教授 Institute of Environmental Health College of Public Health, National Taiwan University 國立台灣大學 環境衛生研究所

<b>14:10-14:50</b>	<b>Discovery of antivirals and drug targets against dengue virus infection</b> Director Jin-Ching Lee 李景欽主任【Department of Biotechnology, Kaohsiung Medical University; CDFCR, KMU Taiwan 高雄醫學大學 生物科技學系；高醫大登革熱防治研究中心】	Prof. Li-Teh Liu 劉立德教授 Department of Medical Technology, Chung Hwa University of Medical Technology CDFCR, KMU 中華醫事科技大學 醫學檢驗生物技術系 高醫大登革熱防治研究中心
<b>14:50-15:10</b>	<b>Break</b>	
<b>15:10-15:50</b>	<b>Evaluation of host factors as a potential biomarker for Dengue diagnosis and Detection of dengue virus in blood products</b> Prof. Li-Teh Liu 劉立德教授【Department of Medical Technology, Chung Hwa University of Medical Technology, Tainan; CDFCR, KMU Taiwan 中華醫事科技大學 醫學檢驗生物技術系；高醫大登革熱防治研究中心】	Prof. Guey Cheun Perng 彭貴春教授 Department of Microbiology & Immunology of National Cheng Kung University, Taiwan 國立成功大學 醫學院&微生物及免疫學研究所
<b>15:50-16:30</b>	<b>International cooperative research</b> All Speakers and Moderators 所有演講者與主持人	Prof. Guey Cheun Perng 彭貴春教授 Director Jih-Jin Tsai 蔡季君主任

### 高醫大登革熱防治研究中心研究團隊 CDFCR KMU Research Team

楊俊毓 Chun Yuh Yang, 蔡季君 Jih-Jin Tsai, 張科 Ko Chang,  
許超群 Chau-Chyun Sheu, 陳宜民 Yi-Ming Chen, 李景欽 Jin-Ching Lee,  
彭貴春 Guey-Cheun Perng, 劉立德 Li-Teh Liu, 何啟功 Chi-Kung Ho,  
黃志中 Joh-Jong Huang, 張秋文 Chiu-Wen Chang, 王維恭 Wei-Kung Wang,  
蕭信宏 Shin-Hong Shiao, 陳俊宏 Chun-Hong Chen, 戴淑美 Shu-Mei Dai,  
蔡坤憲 Kun-Hsien Tsai

研討會簽到表(請見附錄 1)

研討會及晚宴照片









## (平台二) 蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

1. 平台二(子計畫 17)協助臨床檢體檢驗，104 年收檢量為 3894 例、105 年至 10 月份收檢量為 407 例，除協助確診疑似案例外，並間接協助登革熱疫情之防治工作。本中心於 2015 年與 2016 年收集疑似登革熱案例與經檢驗判定為陽性、陰性與未確定的結果如十五、表之表一與表二所示。因為 2015 年 9 月之後高雄市爆發登革熱疫情，因此 9 月至 12 月本中心收到需確認登革病毒感染的檢驗需求高達 3894 個檢體，經確診共 1985 個陽性(50.98%)、1904 個陰性(48.90%)以及 5 個未確定案例(0.13%)。該次登革熱疫情跨冬至 2016 年 2 月才完全結束，本中心在 2016 年 1-2 月仍收到 142 個疑似登革熱案例檢體，經確診共 32 個陽性(22.5%)與 110 個陰性(77.4%)，從這些數據可以看出疫情降溫的趨勢。以上案例皆為高醫附院各單位判定疑似登革熱個案並經高醫感染管制中心轉介到本中心進行登革病毒確診之案例。

2. 2015 年 9 月至 2016 年 1 月高雄市登革熱疫情之陽性檢體回溯性病毒型別分析預計分析 2132 例，目前進度為 583 例(27.46%)，Real-Time RT-PCR 確認結果陰性為 94 例(16.12%)、第一型 43 例(7.38%)、第二型 442 例(75.81%)、第三型 4 例(0.69%)(表三)。
3. 本計劃提供登革熱防治研究中心登革熱檢驗研究新進人員訓練，共完成 4 人次，研究人員 3 名、醫事檢驗師 1 名，訓練內容含標準作業流程、檢驗操作及結果登錄、品質管理政策、實驗室規範及緊急應變流程等(佐證資料請參考十四、圖附件一)。
4. 訓練南太平洋索羅門群島醫事檢驗師共四名，為適應當地檢驗環境，訓練內容含跑膠式登革病毒核酸檢驗(PCR)、登革 NS1 蛋白檢驗、抗登革病毒抗體 IgM/G 檢驗(佐證資料請參考十四、圖附件二)。
5. 建立標準檢驗流程，含病毒之核酸檢測分析(Real-Time RT-PCR)、抗體檢測及快篩試劑檢測標準作業流程，進行除登革病毒外，其他黃熱病毒篩檢(如：茲卡病毒、日本腦炎病毒等)，並建立試劑平行比對、陽性陰性品管方法以確保檢驗品質；登革熱標準檢驗方法(三項)已通過疾病管制署登革熱檢驗認可實驗室、全國認證基金會醫學實驗室認證通過、疾病管制署能力試驗通過；茲卡病毒檢驗已完成疾病管制署能力試驗通過(佐證資料請參考十四、圖附件三)。
6. 本計畫平台(子計畫十七)使用 147 例檢體進行登革病毒 NS1 蛋白快篩檢驗試劑偽陽及偽陰性分析，使用登革病毒核酸檢驗 Real-Time RT-PCR 當作標準(Gold Standard)，得出登革病毒 NS1 蛋白檢驗快篩試劑偽陽性(False Positive):14.6%、偽陰性(False Negative):3%、靈敏度(Sensitivity):93.2%、特異性(Specificity):93.2%、陽性預測值(PPV):85.4%、陰性預測值(NPV):97%。

7. 本計畫平台(子計畫十七)支援子計畫五，分析高雄醫學大學附設醫院加護病房(ICU)2015年登革熱重症病例共37例，其中存活24例，初次感染佔91.6%，登革熱第一型佔4.5%、第二型佔95.5%；死亡13例，初次感染佔84.6%、登革熱第一型佔10%、第二型佔90%。重症或死亡仍以初次感染及第二型為主。

## 七、討論

### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

PR1 已知是睪丸癌的生物標誌，在臨床上也觀察到登革熱患者會有陰囊炎的現象，除了男性以外，此蛋白也會表現在女性的生殖器官，我們利用可以便是五個 isoform 的抗體，以西方墨點法的分析登革熱患者或健康人血清中的 PR1 表現，我們發現 PR1 或特異性表現於登革熱患者體內，且符合我們於蛋白質體學的結果，顯示 PR1 能作為偵測登革熱患者的生物標誌。同時我們也發現 PR1 的五個 isoform 中 isoform1 不具有代表專一性偵測登革熱患者的生物標誌，隨著對每一型的抗體被尋找到，將可以預期找尋到能作為偵測登革熱患者的 PR1 的 isoform 為何。

### (子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色

臨床上會觀察到登革熱病患會有骨頭疼痛的現象，如今本計畫的實驗結果發現骨髓幹細胞受到登革病毒的感染，暗示著骨頭的疼痛可能與病毒感染骨髓細胞有關係。

電子顯微鏡的結果顯示人體的登革病毒的結構的特殊性，將可以做為

解釋抗體對於體外病毒的中和反應會比體內病毒好。

從不顯性感染者者長期追蹤血液細胞組群的變化和病毒感染後的結果，顯示周邊血幹細胞與登革病毒的產量是有相關性。同時在健康人身上也是發現到此一情形，這表示周邊血幹細胞的數量會影響病毒的產量。

### (子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探--某醫學中心 照護病例對照研究

本研究結果顯示，在病例組與對照組之臨床症狀分析呈現包含骨頭痛、肌肉痠痛、皮疹、黃疸、腸胃道出血、血漿滲漏、出血徵候、血小板小於 10 萬、登革出血熱、血紅素量、血球容積比、C-活性蛋白、血中尿素氮、血清肌酸酐等臨床症狀表現具有顯著性，除了符合登革熱重症的臨床症狀表徵外，也與台灣 2014 年登革熱出血熱患者死亡率的特徵和危險因子研究結果具一致性(23)，Wei 等人之研究結果顯示在 2014 年於台灣所收集的 136 個登革出血熱患者中(平均年齡為 71 歲)，多數具有 Hypertension、DM、Cardiovascular disease、Gastrointestinal ulcerative disease、Neurological disease、Liver disease、Chronic kidney disease、Active malignancy 及 Chronic pulmonary disease 等症狀。

過去的登革熱研究顯示登革熱患者在臨床表現上，常出現上消化道疾病(24-25)包括胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃食道逆流與腎臟衰竭(26-27)及糖尿病(23,28)等症狀，而本研究疾病史單變數檢定分析結果顯示胃潰瘍、十二指腸潰瘍、糖尿病、鬱血性心衰竭、末期腎病、慢性腎衰竭等病史具統計意義。

另外，在控制可能的干擾因素後，登革熱患者惡化成登革熱重症的危險因素，曾經罹患十二指腸潰瘍的患者是無相關病史患者的 4.89 倍(95%

信賴區間為 1.55-20.55)，而曾經罹患慢性腎衰竭的患者是無相關病史患者的 4.04 倍(95%信賴區間為 1.64-14.61)。這顯示曾罹患十二指腸潰瘍與慢性腎衰竭疾病的患者，在感染登革熱後具有較高危險性轉變成登革熱重症。

#### (子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

1. 類似的研究，在孟加拉發現氣溫與濕度和登革熱的發生率有關，且有兩個月的延遲效應[18]，在印尼的研究氣溫有一個月的延遲效應，雨量則有兩個月的延遲效應[19]。在波多黎各平均氣溫及 Caribbean islands of Barbado 的最低氣溫被觀察到有 3 個月的延遲效應[20, 21]。在此研究則是以長時間(2000-2014) 藉由完整的環境參數模式，得到了此一發現即最低溫的提升對於登革熱的發生率有 2-3 個月的延遲效應交互作用(正面效應)及雨量提升則有 1-2 個月的延遲效應(負面效應)。此外，最低溫及雨量對布氏指數有明顯的延遲效應。在氣候、病媒蚊及宿主等因素彼此間有不同程度的相關性與作用下，可部分解釋不同區域的環境因素延遲效應的差異，然而我們發現登革熱發生前最低溫的上升，使得環境因素較適合蚊媒生長、存活及散佈，且在登革熱發生前 1-2 個月，有較乾燥的氣候狀況(即少的降雨量)，會影響到鄰近的環境而增加高雄市登革熱的散佈。
2. 氣爆事件本身並不會引起登革熱的感染，但是蚊子與人類受到此事件直接間接影響易促進登革熱的傳播，此可能傳播力增加可能的原因有(1)排水溝因氣爆而受破壞，登革熱的病媒蚊易藉由被破壞的坑洞、廢棄物易形成孳生源，且加上門窗建物受破壞，易增加蚊子叮咬的機會 (2) 因為氣爆發生後，氣爆區被圍起來，清除孳生源的與噴藥工作在氣爆之後的

一週受阻，(3)氣爆後接著下雨，接下來炎熱的天氣易導致病媒蚊的孳生，(4)受登革熱感染病患的移動，可能使得登革熱病毒得以散佈到鄰近區域，而病患在氣爆後第五週左右使登革熱發生率會急速上升，也提供了當發生類似事件時，人類蚊蟲間互動與應影響到疾病控制的資訊。

3. 本研究也發現登革熱的發生率在氣爆後的 a) 氣爆區(前鎮區、苓雅區)， b) 氣爆鄰近區(三民、小港、鳳山)及 c) 其他區(其他行政區)均有上升，且在氣爆後的第 1-3 週 氣爆區與氣爆鄰近區及氣爆區與其他區均有高度的相關性，但 2002 年則無此現象。台灣登革熱的蚊媒偵測是以”里”為單位進行監控，有其他文獻指出[22]，位於氣爆區但未受爆炸波及的里，氣爆事件發生後，自第 31 週原本有 5 個里的布氏指數超過 2 級，但到第 35 週則上升到 15 個里。此發現也支持受氣爆所影響的環境可能和攜帶病毒的病媒蚊散佈及登革熱的發生有關。蚊蟲的研究指出，幼蟲存活率、成蚊生長速度、繁殖週期、與埃及斑蚊的吸血方式都和溫度有關 [23, 24, 25]。溫度相關的斑紋死亡率在水生期及成蚊期(aquatic and adult phases)階段是呈現 U 型，最適合的溫度分別是 15 °C– 35 °C 及 15 °C– 30 °C [23]。溫度範圍介於 20 °C– 30 °C 和自第一階幼蟲到成蚊期 88%– 93% 存活率有相關 [24]。溫度 < 15 °C 與 > 36 °C 則使得蚊子停止吸血[25]。本研究分析出在 2002 及 2014 年最低溫引起的 2-3 個月的延遲效應與 1 個月的延遲效應可以解釋 18% 及 42.9% excess dengue risk。在高雄市三月與四月較登革熱流行開始的 6 月早了 2 至 3 個月。我們的研究發現，相對於參考年的 3-4 月，在 2002 及 2014 最低溫的平均值約高了 2 °C– 4 °C (相對於參考年的 3-4 月，2002 年及 2014 年 3 月份最低溫的平均值均為 16.8 °C，4 月份則是 2002 年為 20.2 °C，2014 年為 21.9 °C；參考年的 3、4 月最低溫的平均值為 14.2 °C、18.3 °C

Fig. 3)。最低溫的平均值在 2002 年及 2014 年三月均為 16.8 °C 是在最適合存活的溫度範圍內(15 °C– 35 °C) 且 2002 年四月與 2014 年四月(20.2 °C– 21.9 °C) 亦是在最高存活率的溫度範圍內(20 °C– 30 °C); 但是參考年則無此現象，此一發現強調高雄市登革熱的大爆發前的 2-3 月的最低溫的上升是扮演一個關鍵的角色，此現象也反映地球的暖化，夜間溫度上升比白天來的快 [26]。雖然雨量提供了蚊子 aquatic stages 時期重要的棲息地，較乾燥情況可能增加蚊子覓食的活動時間，也因此增加了蟲媒傳染力[10]。我們的研究也顯示較高的降雨對較高的布氏指數有兩個月的延遲效應(Table 5)，但是較低的雨量對較高的登革熱發生率，呈現 1-2 個月的延遲效應(Table 4)。這些發現表示氣象學的變數經由複雜的機轉影響登革熱的傳播。另此研究說明了最低溫的上升、雨量、氣爆效應對 2014 年整年可以解釋 75.1% excess dengue risk，但是 2014 年的 6-12 月則可以解釋 76.5%，因為氣爆發生在登革熱流行期(6-12 月)，衝擊可能會超過最低溫、雨量對登革熱的影響，2014 一整年 excess dengue risk 的 98.2% (75.1%/76.5%)和這三因素相關(最低溫、雨量、氣爆)。

#### 4. 此研究的優勢是

- (1) 提供了長期詳細的(2000 到 2014 年)資料分析，強調氣象學、蚊子及氣爆事件等因素在都會區形成登革熱大流行，對登革熱的發生率所產生的影響效應分析。
- (2) 此時間延遲效應包含了環境因子間的交互作用，本研究是以短周期如：月份與每週的資料來進行作分析，而非以年來做分析的。

#### 5. 然而此研究仍有其限制，

- (1) 此為生態上關聯性的研究，無法提供感染個案者個人層次的因果推理評估。

- (2) 在非氣象學資料，如群體免疫力、病媒蚊防治措施的介入資料取得困難，這些因素所產生的干擾效應，在此研究中無法被控制。
- (3) 此研究模式可運用在具有可比較氣候與社會生態學的區域上，對於在特定地區，想運用此一模式評估登革熱的發生率受何種因素影響，需考量當地特定的決定因素。

## 第二部份：

### 問卷調查部份

1. 整體上，病患除了第九題題目正確率為73.7%外，民眾對登革熱相關知識答對率超過80%，此點出乎意料之外，或許是連年登革熱疫情高漲，民眾接受了相當多的登革熱訊息所致。而登革熱病人發燒頭痛應用來普拿疼退燒，此觀念應該多多導正。
2. 先前依疾管署 2015 年 04 月 21 日資料，呈現登革熱病患就醫次數達 3 至 4 次才會被醫師通報，但本研究資料則顯示在前兩次就醫看診後，即被告知得登革熱比率達 93.9% (第 1 次看診後被醫師告知患有登革熱佔 56.5%、第 2 次看診後被告知佔 37.4%)，顯示該年看診醫師對登革熱的敏感度已提高，延遲診斷的比例顯著減少，此部分推測與登革熱快篩試劑廣泛使用，及在大量登革熱個案出現時民眾與醫師會有相當的警覺性有關。
3. 不同的社經階層對登革熱的認識也許不同，此次收集資料有些匆忙，只收集到本院的資料，個案來源以高雄市南區為主，若有機會和高雄市其他區域如三民區進行比較，應可看出不同社經階層或不同區域對登革熱的認知是否有差異。若單就本院個案進行研究調查，只要日後收案總數更多，就可針對前鎮區與小港區兩區做比較，同時也可以區分門診、住院病患來比較，如此資料會比較全面，能提供更多訊息。
4. 在資料的收集上也有改進空間，可聯合高醫其他體系醫院共同合作進行

較大規模的調查，或是在其他縣市進行調查，擴大收案數。

5. 登革熱這種環境疾病，近兩年在南台灣個案數目超乎預期，而此先驅計畫顯現出小港醫院感染者的想法與特點，可做為未來的研究及社區衛生教育的參考。唯有從多個面向一一釐清，特別是正確觀念的導入，增進民眾對此病的認識，才能減少此病的發生率與死亡率。

### (子計畫五) 重症登革熱之流行病學及免疫反應研究

1. 依據國外的研究，登革熱重症(severe dengue)多發生於兒童及青少年，且死亡率不高。然而我們的資料顯示在台灣發生的登革熱重症與國外有極大的不同。本研究病人的平均年齡高達 69 歲，有極高的比率是具有慢性疾病的老年人，這群病人的死亡率高達 44.9%，甚至比配對的嚴重肺炎病人死亡率更高。
2. 病人死亡的原因最多為嚴重出血(36%)，亦有極高比率死於登革休克(32%)。這 15 位死於嚴重出血或登革休克的病人中有 12 位在轉入加護病房後 3 日內死亡，顯示高危險的登革熱重症病人惡化的速度極為快速。臨床上對於登革熱病人出現休克或出血情形時應更積極處理，各加護病房也應將此類病人視為優先轉入個案。
3. 有 25 位病人在臨床上有繼發的敗血症，其中五位病人(23%)死亡。登革熱病毒感染後引發的免疫機能下降極可能是原因之一，然而目前相關研究仍極欠缺。登革熱重症病人亦存在休克、意識不清、插管使用呼吸器、洗腎等一般重症病人產生感染高風險的因素，也是登革熱重症病人有極高比率發生繼發性感染的主要原因。原本計劃以 2016 年個案之檢體(週邊血液之細胞及血清)來進行登革熱感染後之免疫反應研究，探討登革熱感染如何影響人類的免疫系統而造成繼發的感染甚至敗血症，然因

2016 無登革熱重症個案，未能收集到病人檢體，此部份之計劃無法進行。

4. SOFA score 在加護病房已使用多年，今年因第三版的敗血症定義將之納入，未來其使用會更為普遍。我們發現登革熱重症病人在轉入加護病房第一天的 SOFA score 對死亡有極好的預測效果，甚至 SOFA score > 13 的病人死亡率高達 91%。這也暗示登革熱重症病人的死亡主要與其器官衰竭程度有關，尤其是心血管、呼吸及中樞神經這三個系統，當我們把這三個系統的分數加總為「三項目 SOFA」(SOFA-3)，發現 SOFA-3 score 在預測登革熱重症死亡亦有極佳的表現(AUC = 0.821)。這三個項目正是用於床邊評估敗血症的快速 SOFA (quick SOFA) 組成分，quick SOFA 是否能運用於登革熱重症病人的快速床邊評估是個非常值得探討的議題。

#### (子計畫六) 抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然藥物研發

一般來說臨床藥物分類主要有幾種：蛋白質藥物、中草藥以及小分子藥物等。目前市佔率最高的為蛋白質藥物，但其缺點為開發成本高昂且開發時程久，上市之後的價格也不便宜。登革熱主要流行區域為熱帶及亞熱帶區域，其中東南亞病例數最高，但這些地方的人口並不一定有能力負擔高昂的藥物，連帶使藥物銷售受到影響。中草藥主要來源為使用已久之傳統植物藥，其生物吸收利用性及生物毒性已經過篩檢可放心使用。同時其開發成本較蛋白質藥物低，開發時程較短，同時又廣為人知，因此更有利於登革熱流行區域推廣及銷售。至於化學合成小分子藥物，雖有生物毒性、生物吸收利用性等考量，但若成功通過臨床前及臨床測試仍不失為一有潛力之抗病毒藥物。近期新上市之抗 HCV

藥物 Sofosbuvir 即為化學合成藥物，目前臨床上使用尚未有任何副作用或者產生抗藥性的報告出現，同時此藥物可有效提高 HCV 治癒率，顯示小分子藥物於抗病毒藥物開發的重要性。台灣為登革熱主要流行區域，不僅已有本土化病毒株，每年通報病例數逐年提高，甚至於去年突破萬人。但臨床上目前並沒有任何可有效治療登革熱的藥物，也無進入臨床試驗的藥物，僅有幾篇學術論文發表[24, 26, 27]。國衛院於國際期刊曾發表過兩篇登革病毒蛋白酶抑制劑，但並沒有進入臨床試驗，而雖然有國內生技藥廠投入開發抗登革蛋白藥物 (CLEC5A) 蛋白藥物開發，但是蛋白質藥物開發曠日廢時且成本高昂，而天然藥，又稱植物藥，開發時程較短且成本較低。綜合上述觀點，透過中草藥萃取天然物及利用小分子開發抗登革病毒藥物極具潛力。

因此，本計畫鎖定中草藥萃取之天然物及小分子藥物雙管齊下，天然物因其為使用已久的中草藥，安全性無虞，因此可以放心使用，特別是 Compound L 及 GS 透過調控細胞內訊息傳遞路徑而達到抑制病毒複製效果，並且我們於計畫中也證實 Compound L 及 GS 可以同時抑制四型登革病毒複製，具有廣效型抗登革病毒效果；小分子藥物則可用於開發直接抗病毒藥物，直接針對病毒蛋白質活性以抑制病毒複製也是抗病毒藥物篩選的方向之一。因此，本計畫針對天然物及化學合成小分子藥物進行高通量抗登革藥物篩選，並且得到兩個天然物 Compound L、GS 及兩個小分子藥物 Compound 17、Compound 21 可於細胞內及活體動物內有效抑制登革病毒複製，並且於有效濃度內無細胞毒性，代表這些藥物具有潛力成為新興抗登革病毒藥物先導化合物，也可申請專利後嘗試應用於登革熱患者的保健食品或食品添加物。特別是植物藥開發時程短，本計畫發現的兩個天然物或許可於較短時程進入臨床測試。

但登革熱真正造成死因是因為產生出血症狀，而本計畫初步先使用 ICR 登革感染小鼠系統進行試驗尚不足以證實這些藥物是否可用於治療登革出血症

狀。因此本計畫額外建立了 AG129 登革感染出血小鼠模式，並初步利用先前已發表之具有抑制登革病毒複製效果的天然物 AP 進行抗出血測試，結果顯示此系統的確可用於測試藥物的抗登革出血效果，並且初步證實 AP 不僅可抑制登革病毒複製，更可抑制登革病毒感染引起之內出血症狀。未來本實驗室將繼續利用 AG129 登革感染出血小鼠系統測試 Compound L、GS、Compound 17 及 Compound 21 之抗登革出血效果。

除了利用已知之細胞因子進行藥物篩選外，本實驗室也持續收集並分析 NGS 之結果，並初步尋找到幾個 miRNA 與病毒複製息息相關。MiRNA 目前於臨床上的應用最廣被討論的即是作為早期診斷的依據，特別是登革出血症狀發生非常快速常使醫院措手不及，也因此本實驗室未來將朝向此方向發展，收集並分析 NGS 數據，期望能從中尋找到更多與病毒複製相關的 miRNA 並嘗試應用於早期診斷，讓登革出血患者能於早期就被診斷後給予妥適治療，提高存活率。

### **(子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查**

我們於兩區中收案，採取與當地的里長或搭配學校、衛生所、區公所活動，以招募志願者的方式，只要沒有發燒，並且了解研究內容志願參與者，皆可收案。在三民區收案，因靠近大學校園，所以在三民區中，20~29 歲年齡層的比率較高。在楠梓區中，較常與當地里長合作，進行社區收案，因此在楠梓區的年齡層則集中在退休後的年齡。兩區的年齡層分布，並不平均，因此在分析時，有些落差。在我們的研究中發現，使用速帝登革熱免疫球蛋白 G 檢驗試劑(SD Dengue IgG Capture ELISA)進行初步登革熱抗體檢驗。2015 年的登革血清盛行率調查，登革 IgG 抗體檢驗結果為三民區陽性有 12 人，陽性率為 5.95% (12/202)，楠梓區陽性有 7 人，陽性率為 3.26% (7/215)；2016 年的登革血清盛行率調查，登革 IgG 抗體檢驗結果為三民區陽性有 12 人，陽性率為 5.68% (12/211)，楠梓區陽性有 10

人，陽性率為 4.8% (10/208)，如表一。經過 2015 年登革熱大爆發後，高雄市的登革血清陽性率些微增加大約 1~2%。在性別分布方面，於 2015 年三民區，男性共收案 80 人，其中就有 8 人為抗體陽性，陽性率為 10%，顯示於三民區中，男性的陽性率異常偏高，但 2016 年初次收案的結果，男性的陽性率下降至 4.5%，觀察三民區兩年間性別分佈結果，發現不論性別，兩年間的陽性率變動及大，由於 2016 年所收案的男性僅有 44 位，且三民區的地域廣闊，人口稠密，又為登革熱盛行區，可能因收案數太少與收案地點的不同而造成此種結果，反觀楠梓區，不論性別經過大爆發後比較兩次收案的結果約增加 1%(表三)，與登革熱轉陽的比例是相符的。

登革抗體 IgG 陽性的年齡層分布，於三民區中，20~29 歲與 50~89 歲皆有陽性的結果，30~49 歲的結果反而皆為陰性，可能與收案的個案數太少和所收案的族群剛好為陰性有關，關於此部分，需要增加此年齡層的收案數，才可進一步了解其陽性率。

同時比對檢驗結果與問卷調查(表五)，發現三民區中約有 30~60%的人、楠梓區 80~100%的志願者不知道自己曾經感染過登革熱，其中有些可能為不顯性的感染或無症狀，但因民眾的警覺心不夠，才沒有意識到自己已經被感染，由於三民區為登革熱的高盛行區，居民們對登革熱的警覺心相較於楠梓區(低盛行區)高。楠梓區中，不知道自己曾經感染登革熱的陽性個案，大部份為 40 歲以上的壯老年人，可能以為是感冒而忽略了真正的病因。

比對檢驗結果與問卷調查，也有發現一些曾經感染過但檢驗出來是陰性的結果，這些人的問卷調查說明感染登革熱的時間約在 10 年以前甚至更久遠，顯示血清中登革 IgG 抗體的效價，因體質與時間久遠的關係或是所使用的市售 ELISA kit 敏感度稍低，而造成此種結果。

### (子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗

藥物試驗結果顯示牛樟芝萃取出物 C 能於體外抑制登革病毒的複製，在登革病毒感染前處理此藥物仍是可以抑制登革病毒的複製(結果未呈現)，酵素免疫分析發現牛樟芝萃取出物 C 可以引起細胞第一型免疫反應的產生，暗示牛樟芝萃取出物可以藉由活化細胞先天免疫反應的產生而抑制登革病毒的感染。

登革病毒複製動物模式的結果發現雖然 CBT-humice 可以增加小鼠擬人化的成功率，但是不論是 BMT-humice 或是 CBT-humice 都可以支持登革病毒的感染，且複製的曲線與自然界中人類受到病媒蚊叮咬後病毒複製的曲線是相似的，約在第 6-10 天血液中都有病毒血症的現象，表示我們所建立的動物模式可以作為對抗登革病毒藥物發展的前臨床試驗平台。

我們之前的研究顯示登革病患體內的病毒型態類似於人類造血幹細胞所產生的病毒顆粒，所以我們製備了 2 個抗登革病毒膜蛋白的單株抗體，但對於能產生類似體內登革病毒顆粒的巨核細胞產出的病毒不具有中和反應，此外 20 個 NS-1 的單株抗體對於辨識由臍帶血產生的登革病毒 NS-1 的能力也較 vero 為低，這都暗示這人體造血幹細胞所產生的登革病毒可能不同於體外培養的登革病毒型態。

### (子計畫九) 台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析

原計畫預定利用 EBV 感染致使不死化之人類 B 細胞株製備對登革病毒具有中和性的抗體，惟試驗後仍無法取得足夠濃度的中和性抗體，可能與患者在體液免疫反應上的個體差異有關。未來或能先針對不同感染階段之登革病毒感染患者檢驗其恢復期血清中是否確實具有中和性抗體，以增進成功製備具登革熱病毒中和性之人類單株抗體的可能性。

透過血清型分析與系統發生演化樹分析，我們得以了解 2014 年於台

灣高雄地區流行之登革病毒株屬第一型登革病毒 Genotype 1，並且其 *env* 基因與 2013 年分離自印尼地區的流行病毒株具有高度同源性，顯示其應為境外移入株，且疫情一直持續至 2015 年中方止息（圖三）；而 2015 年時起源於台南地區登革熱疫情是由第二型登革病毒 Cosmopolitan 基因型的病毒株引起的，且與時序上較晚爆發的高雄地區流行病毒株在 *env* 基因序列上有高度同源性，可見其應是自台南地區爆發後再傳播至高雄地區。若往前追溯其傳播方向性，可見此群病毒株之 *env* 基因列與 2015 年印尼地區具有同源性，再往前則可溯及 2014 在中國地區流行之具有同源性的病毒株，推測此株可能病毒先自 2014 年的中國地區流行，隔年再分別平行傳播至台灣地區以及印尼地區（圖四）。

在登革病毒感染患者血清抗病毒抗體之測定分析中，我們發現 2015 年高雄地區之次級感染之比率為 36.67% (22/60)，高於 2014 年的 24.44% (11/45)，但尚未達到統計上的顯著差異 ( $p=0.2684$ , Chi-square test)。在患者登革熱感染的急性期間，我們發現次級感染第二型登革病毒之患者血中的抗病毒 IgM 與 IgG 之濃度皆顯著高於次級感染第一型登革病毒之患者 ( $p=0.0420$ ;  $p=0.0014$ , Student's *t*-test, 圖七)。而不論患者是感染第一型或第二型登革病毒，且是否為次級感染，其抗登革病毒 IgG 可持續存在於血液中達半年以上（圖六）。欲進一步了解抗登革熱病毒抗體於恢復期病人血中的濃度變化、以及是否有型別或感染型態上的差異，我們也希望未來能持續追蹤此群恢復期病人，並定期進行訪問與採檢。此外，這些存在於血清中長達半年以上的抗病毒抗體，是否對於該型登革病毒、甚或其他型登革病毒具有中和力，亦是我們想進一步探討的課題。

## (子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫

本次海水與環境藥劑混合研究實驗顯示，實驗六種溶液皆可達到抑制斑蚊幼蟲孳生，其中清水與有機磷劑或海水與有機磷劑約 0.5~1 小時即可殺死斑蚊幼蟲，粗鹽、海水與生物製劑、清水與生物製劑需 6~7 小時方能殺死斑蚊幼蟲，而純海水約需 8~9 小時才能殺死斑蚊幼蟲。另外埃及斑蚊較喜愛產卵於清水容器中(相對海水容器而言)，且當鹽份低至 8 psu 或 4 psu 時，致死率將明顯降低至 0~55%，亦表示海水或粗鹽鹽度必須達 10 psu 以上，方能達到遏止斑蚊幼蟲孳生之防治效果。

海水如同一般環境用藥有其防治有效期限，在水溝本體結構或洩水坡度未改善情況下，當水溝水所含鹽度低於 10 psu 以下仍有機會再度孳生。本次現地海水灌流觀察發現，溝內因民眾日常生活排放廢水等外在不可控制因素稀釋鹽度後，灌流後 3~5 日溝內鹽度即降至 10psu 以下，約 4 週後調查即發現部份水溝已再度孳生病媒蚊幼蟲。

## (子計畫十一) 應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的斑蚊孳生源

### 1. 實驗室評估

實驗室評估斑蚊成蟲暴露於何種濃度百利普芬的環境下，會影響其產卵的量。實際評估後，顯示於 0.1% w/w 濃度的環境下，斑蚊雌蟲產卵量明顯降低且產出的卵粒異常(圖八、圖九)，其結果與 Devi et al. (2015) 之研究結果相符。推測可能是百利普芬對斑蚊雌蚊的卵巢發育產生影響，進而導致蚊卵的數量與品質。然而，另一個觀察：吸食含百利普芬糖水是否影響斑蚊成蟲的產卵量實驗中，分別觀察吸食含百利普芬糖水與否的斑蚊雌蚊的卵巢發育情形；結果顯示不論是否有吸食到百利普芬，兩組皆發現有

卵巢發育與未發育的斑蚊雌蚊，顯示百利普芬對於卵巢發育可能沒有直接的關係。也可能是透過其他機制使百利普芬間接影響斑蚊雌蚊產卵的數量與品質。

除了產卵量與卵粒品質異常之外，卵粒孵化率與孵化速度，經觀察較未暴露百利普芬的雌蚊所產下的卵粒要低與緩慢，而孵化出的幼蟲齡期也差異大。這部分可能與實驗操作上，將暴露百利普芬後的雌蚊直接移到養蚊籠中使其產卵，產卵過程中讓蚊體上的百利普芬藥劑轉移到產卵杯內的水體，因而影響到蚊卵的發育。

Devine et al. (2009) 研究中以電子顯微鏡確認百利普芬藥劑顆粒能沾附於蚊體上，為蚊蟲具有自動傳播百利普芬的能力提供一個有力的證據。然而鑒於百利普芬藥劑顆粒微小，僅能在電子顯微鏡等設備上觀察，本研究提供一個間接方法：將百利普芬藥劑混合肉眼可見的螢光粉粒（圖十），透過紫外光的照射，黏附百利普芬混合螢光粉劑的蚊蟲將更容易被觀察到（圖十一）。

在確認蚊蟲具有黏附攜帶百利普芬顆粒的能力後，本研究預先測試蚊蟲暴露於兩種不同濃度（0.01%、0.001%）的百利普芬後可否攜帶至水體並對水內的蚊幼蟲產生影響。結果顯示：水體內的蚊幼蟲成功羽化率低，且以0.01% 效果最為顯著（圖十二、圖十三），在確認蚊蟲確實可黏附攜帶百利普芬顆粒至水體並造成水內幼蟲羽化率低之後。因應未來野外試驗、後續推廣應用需求，本研究測試使用丙酮泡製粒劑（駐樂寶昆蟲生長調節劑）與市面販售且有清楚標示成分濃度的百利普芬液劑（駐有效昆蟲生長調節劑）對於蚊蟲自動散播有無影響，結果顯示：埃及斑蚊雌蚊暴露於含有0.01%百利普芬溶液（有效成分為18.3mg/m<sup>2</sup>）的濾紙1小時後，碰觸含有四齡埃及斑蚊幼蟲的水體可造成水體內90±0.73%蚊幼蟲無法成功羽化，再經

UPLC-MS-MS 儀器檢測發現：每隻成蚊可攜帶、散播 0.04-0.27ng 的百利普芬至 25ml 的水體內 (表二)。比較兩者經 UPLC-MS-MS 儀器分析結果發現：使用丙酮泡製百利普芬粒劑的蚊蟲自動散播效果較液劑來的好，但在相同濃度及相同分析方法下，駐有效液劑的訊號都會比粒劑高約 7 倍 (圖三十)，推測可能和液劑內的溶劑成分可提升訊號表現有關。又考慮到實務大量使用的便利性與未來推廣至衛生機關使用的容易性，且生物性分析顯示兩者均可造成水體內 90% 蚊幼蟲無法順利羽化，故決定於戶外實驗使用百利普芬液劑評估蚊蟲自動散播的效果。

在固定時間內，評估斑蚊停棲和黏附百利普芬顆粒的能力比較中，得到輪胎和誘卵桶較佳，葉片底部次之，濾紙、水泥牆壁較差的結果。光滑的表面效果較粗糙具有吸水性的表面好，其結果與 WHO (2015) 研究相符。廢棄積水的輪胎是斑蚊喜歡產卵的場所之一，且其吸引斑蚊停棲並黏附百利普芬的能力是最佳的，但是考量到南部實驗區實務使用角度，其體積較大不容易找到適合的地方放置且當社區執行孳生源清除時容易被誤認為孳生源引起不必要的麻煩。而誘卵桶則容易與在樣區進行其它試驗的研究團隊、衛生機關產生衝突。經討論後決定在半野外評估中使用已披覆百利普芬的輪胎吸引斑蚊停棲和散播百利普芬顆粒，而戶外實地實驗則是尋找現地有的材料，避開開花植物本體，並盡可能挑選樹葉、花盆、花圃邊壁等陰暗潮濕且光滑的表面上噴灑百利普芬，藉由陰暗潮濕的環境吸引斑蚊來停棲、休息後將百利普芬顆粒黏附並攜帶出去。

## 2. 半野外評估

於台大公衛周圍半野外測試中，蚊蟲自動散播百利普芬的能力較弱，推測原因為：百利普芬散播站大小不夠，不足以吸引足夠量的蚊蟲前來碰觸並攜帶百利普芬至隱藏性的孳生源內，雖然僅有一個誘卵監測站內有發

現百利普芬的藥劑，但仍顯示其傳播之功能。是否為接觸百利普芬劑量不足而無法廣泛分佈而造成水體內 50% 以上的蚊幼蟲羽化失敗？抑或附近有其他潛藏孳生源？或受當時寒流氣候之干擾等。

### 3. 實地評估

戶外實驗開始前期，為了驗證實務上蚊蟲是否具有自動散播百利普芬的能力，本研究在百利普芬散播站周遭 10-20 公尺處挑選陰暗潮濕點放置誘卵監測桶（模擬隱藏性孳生源），藉由定期（半個月~一個月）觀察監測桶內蚊蟲密度、回收水樣進行生物性分析來確認蚊蟲是否能夠散播足量的百利普芬至隱藏性孳生源而造成水體內的蚊幼蟲無法順利羽化。後續經由四次收樣並經生物性分析檢測發現：在噴灑百利普芬後 21 天所回收的水樣 IE%>50 的比例有 19.6%，35 天為 20%，而到了 76 天後則只剩 3.5%；隨即再噴灑百利普芬，噴灑後 30 天所回收的水樣 IE%>50 的比例為 22%（圖二十三 B）。這個結果顯示：在戶外選擇合適地點設置百利普芬散播站後，可以滅除周遭 20% 隱藏性孳生源，並可維持 1 個月的時間，與 Suman et al. (2014) 結果一致，同時為了確認水體內造成蚊幼蟲無法順利羽化的物質是否為百利普芬，本研究使用 UPLC-MS-MS 儀器分析野外樣本，得到百利普芬訊號並成功定量（圖二十八、圖二十九），再次驗證蚊蟲自動散播百利普芬的能力。

為避免誘卵監測桶形成孳生源，起初在桶內投入具捕食性的劍水蚤，但隨逐次觀測發現小容器中劍水蚤存活比例會隨著監測時間增加而減少，甚至有孳生蚊幼蟲的情形（圖二十四 A）。推測劍水蚤死亡原因為：水體內沒有提供足夠的養分供給劍水蚤存活，又或因為連續大雨使誘卵桶內水位滿溢，劍水蚤流失。因應日漸攀升的蚊卵比例（圖二十三 A）、即將進入登

革熱疫期且回收水樣經生物性分析檢測已得到明確結果 (圖二十三 B)，決定置換誘卵監測桶內溶液。

根據 Xue & Barnard (2003) 報導，1% 硼酸溶液可以導致 98% 斑蚊屬蚊蟲死亡，於是本研究先行在實驗室改裝設計、測試不同濃度 (0%、0.5%、1%) 的硼酸溶液對於斑蚊雌蚊的誘引效果及滅殺水體內子子的成效。結果顯示：誘引效果無明顯之差異，且 1% 濃度之硼酸溶液可以完全滅殺新孵出之一齡幼蟲。於是將野外試驗的誘卵桶內水樣置換為 1% 硼酸溶液且桶壁加入不織布內襯，蚊蟲來棲息時若吸食到硼酸溶液會死亡，若產卵則孵出的蚊幼蟲也會死於硼酸溶液內，同時兼具滅殺成蚊與幼蟲的功能，並可藉由觀察襯布上的蚊卵來評估當地的蚊蟲密度。後續評估發現硼酸誘殺桶應用於野外環境下確實可以減少孳生蚊蟲的風險 (圖二十四)。雖然又一二個硼酸桶內有孳生蚊蟲，檢討原因為：桶子放置位置不佳，在連日大雨後易被雨水侵入，造成桶內水位滿溢，硼酸濃度不足而孳生蚊蟲，後續透過調整誘卵桶的放置位置來避免此情形再度發生。硼酸誘殺桶相較於試驗前期所使用的傳統誘卵桶而言，在無外力影響下，硼酸誘殺桶同時整合誘殺成蚊、撲滅幼蟲及觀測蚊蟲密度等效用，且不會有孳生蚊蟲的疑慮。

### (子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究

1. 本計劃第一部分的研究「登革熱病媒蚊空間分布調查」選擇高雄市苓雅區正心里、三民區鼎泰里與楠梓區翠屏里分別進行三種房型與不同高度的樹種在四個季節的消長變化比較。

就房型而言，病媒蚊的分佈性差異不大，成蚊多出現於室外，但是可以在大樓公寓的 15, 20 層高，甚至於頂樓發現成蚊蹤跡。在住宅內外出現的病媒成蚊大多為埃及斑蚊，四季捕獲總數是白線斑蚊的 2.6 倍。然

而住家或公園中的樹叢則是白線斑蚊居多，四季捕獲總數是埃及斑蚊的 7.4 倍。

就地域性而言，在調查期間苓雅區正心里住宅內外所捕獲的埃及斑蚊與白線斑蚊數量差異懸殊(96:10)，三民區鼎泰為 15:10，楠梓區翠屏里則數量相當(40:38)。

就季節性而言，2015 年秋季無論哪一里，住宅內外所捕獲的登革熱病媒蚊大多均為埃及斑蚊，苓雅區正心里、三民區鼎泰里與楠梓區翠屏里的埃及白線比例分別為 77:2, 9:1 與 34:2。2016 年冬季與春季仍以埃及斑蚊為多，但因數量均為個位數差異不顯著。比較特別的是 2016 年夏季，在苓雅區正心里住宅內外所捕獲的埃及斑蚊與白線斑蚊數量相當(9:8)，但是三民區鼎泰里與楠梓區翠屏里的白線斑蚊均多於埃及斑蚊，比例分別為 9:3 與 31:1。此結果說明 2016 年夏季的氣候環境與 2015 年秋季有很大差異，以至於所調查的三個里當中的埃及斑蚊與白線斑蚊相對數量變化極大，尤其是楠梓區翠屏里的埃及白線比例由 34:2 變成 1:31。

2. 第二部分的產卵習性調查中的產卵分散性結果顯示：埃及斑蚊與白線斑蚊均具產卵分散行為，但是在大空間環境的產卵分散度都高於小空間環境，且白線斑蚊的產卵分散度遠大於埃及斑蚊。

在高雄市苓雅區正心里的產卵習性調查顯示登革熱病媒雌蚊偏好產卵於住宅外的積水容器，二月、五月與八月戶外與室內陽性容器比例分別為 5:1, 28:15, 17:8，內含埃及斑蚊或白線斑蚊的陽性容器比例大約為 3:1(平均每週容器指數比為 3.2%:1%)。此部分結果與住宅區內外的空間分佈調查一致，成蚊多於室外被捕獲且埃及斑蚊多於白線斑蚊。

在臺南市從六月底到十月連續 12 週的調查則顯示登革熱病媒雌蚊在戶

外與室內產卵的機率相當接近，在新興區、田寮里與文華里的戶外與室內陽性容器比例分別為 7:9, 7:5, 2:2。

3. 第三部分的幼蟲棲地調查結果顯示：高雄市苓雅區正心里的登革熱病媒蚊幼蟲幾乎仍然以積水容器為孳生地，只有極少的情形以水溝或下水道為棲地。在地毯式巡視所發現的 256 個積水容器與檢視的 649 個水溝中，具有登革熱病媒蚊幼蟲的陽性積水容器與水溝分別為 3.5% 與 0.3%。顯示登革熱病媒蚊仍偏好產卵於積水容器，以此為幼蟲孳生地。

### (子計畫十三)建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略

未來利用蚊蟲共生細菌 Wolbachia 是新穎生物防治方法。利用蚊蟲共生細菌 Wolbachia，目前登革熱流行地區包含新加坡、中國、越南、巴西、印尼及澳大利亞皆已進行田野試驗。利用蚊蟲共生細菌 Wolbachia 的策略，乃利用共生細菌 Wolbachia 感染宿主對生殖細胞有一細胞質不容性，即僅有同為感染的生殖配子結合才會產生子代。理論上可將原有病媒蚊族群依此機制置換成同為被感染的族群。由於報導指出感染的埃及斑蚊同時會降低登革病毒複製效率，所以可以利用此方法降低登革熱流行風險。所謂 Wolbachia 感染宿主產生的細胞質不親和性，是指感染 Wolbachia 的雄性個體的配子，與未受感染雌性個體的卵子結合後，結合的胚胎無法孵化成蟲。本計畫執行後已順利引進 Wolbachia wAlbB 菌株，試驗後證實可以在台灣的埃及斑蚊體內穩定繼代，也確認能造成細胞質不相容性之預期效果，我們同時也確認穩定繼代之標準流程，未來若主管單位計畫推行如新加坡之野放試驗，具有此 Wolbachia wAlbB 菌株的埃及斑蚊隨時可提供試驗。

此外，本計畫利用飛行載具優越的酬載能力及操控性，來攜帶各類防治藥劑並在低空中均勻、精確地撒佈，其能適用於各種都市 3D 環境空間中人

力難至之處。多軸無人飛行器在判斷都市生態環境中病媒蚊孳生源位置後，可以多軸灑藥機進行施藥藥劑防治，如此不但可以即時清除孳生源，更可取代大面積噴藥的防治方式。目前已開發完成液態藥劑灑佈機與粒狀粉狀灑佈機之設計、測試飛行與投藥，並完成多軸機防治登革熱病媒蚊灑佈標準作業規劃。

#### **(子計畫十四) 登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫**

本局透過本計畫培育 4 位登革熱衛教講師及 4 位登革熱衛教助教，透過平時社區衛教宣導(平時社區病媒調查)、校園走動式病媒教學及各單位登革熱衛教講座等，將登革熱病徵、孳生處所及防疫重點等傳達給本市校園、各單位及社區民眾，另將相關登革熱防治資訊張貼於登革熱防疫資訊平台及高雄市登革熱民眾及時通 APP，供本市民眾自行下載閱讀，進而提升本市市民登革熱知能。

去(104)年茲卡病毒來勢洶洶，自 2015 年迄今累計 70 國家/屬地出現本土病例，臺灣亦已出現 9 例境外移入個案，茲卡病毒傳播路徑之一亦透過斑蚊叮咬，雖然人感染茲卡症狀較登革熱輕微，然會造成孕婦生出小頭畸形症的小孩，進而傷害小孩智力及視力，危害國家下一代甚鉅，因此本局登革熱衛教宣導人員於執行衛教宣導時，亦同步進行茲卡衛教宣導，藉由動員本市全體市民力量，共同防禦斑蚊所攜帶病毒的危害。

本局於 105 年 5 月 1 日動員局內各科室成立登革熱衛教推動小組，於本局辦理各種衛教場合加強宣導登革熱及茲卡相關資訊，截至 105 年 9 月 30 日止，總計辦理 84 場次，衛教 22,955 人；另於 105 年 9 月 5 日再度成立整合式教育訓練(全方位講師)，期望全面提升本市市民登革熱及茲卡知能，並主動清除孳生源，避免登革熱及茲卡疫情發生與蔓延。

### (子計畫十五) 血液製品之登革病毒偵測調查

數個國外研究報告已指出多例因輸血而感染登革熱的個案，其中包含登革熱與出血熱，此外多個報告也指出在登革熱流行季節捐血者的血液樣品可以偵測到登革病毒的基因(0.06-0.4%)，因此對於本土登革熱季節捐血中心血液樣品是否可能存在登革病毒顯得特別需要釐清。目前已分析 6050 個樣本中，檢驗結果為: NS1 皆為陰性，一例為 RT-PCR 陽性，該檢體為 NS1/IgM/IgG 陰性，另有四例 IgM 陽性與八例 IgM/IgG 陽性，因此血袋中的確可能存在登革病毒，在所研究的樣本中登革病毒陽性率為 0.017% (1/6050)。

研究結果顯示在登革熱流行期間的確可能會有些被攜帶登革病毒的病媒蚊叮咬的捐血者因為沒有登革熱的症狀而至捐血中心捐血，雖然這個可能性早已被許多人提出，但本研究計劃可能是我國第一個有系統地進行大量樣本分析的研究。然而因為研究經費與技術的限制，本研究並無法對單一檢體進行篩檢，此外雖然 RT-PCR 可以增幅微量的登革病毒 RNA，但若可能的話應可以用 transcription-mediated amplification 來偵測登革病毒核酸，因其靈敏度比 RT-PCR 高上 20-100 倍。

### (平台一)行政暨教育資源平台

登革熱目前仍是大多數東南亞國家主要的健康威脅，亦是全球重要健康威脅，重要性如下:1.登革熱大爆發的國家，全世界超過 125 個。2. 3.6 萬人具有感染的高風險。3.全世界 9600 萬人口有明顯登革熱感染。4.全世界有 294(213-392)萬人有輕微或無症狀的感染。經由辦理兩場國際研討會，邀起多國專家學者，分享登革熱流行病學、蟲媒疾病環境控制方法、各國登革熱預防及控制策略，期能對未來登革熱預防、治療、研究方向等面向，有所助益。

## (平台二) 蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

2015 年登革熱爆發，本計畫鑑定超過四千例疑似登熱病例，確診病例超過兩千例，對於防疫有極大的貢獻。2016 年至今雖並無本土疫情的爆發，但有境外移入案例，尤其今年全球茲卡疫情升溫緊張，本計畫即時建立與鑑定茲卡與屈公病毒感染，對於防疫及臨床診治，發揮極大的功能。除建立登革熱及相關蟲媒病毒的標準檢驗流程外，考量過去台灣本土登革熱案例登革熱病毒血清型別分析對於流行病學預測的重要地位，本計劃針對 2015 疫情進行流行病學回溯分析，提供防疫及臨床病情重要參考根據。

## 八、結論與建議

### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

登革熱的即時診斷和早期發現對於降低登革熱傳播或是患者致死率都是有所幫助的，然而目前的診斷方式對於只有病毒血症或是無症狀患者的診斷通常是沒有預期中的效果，我們本計畫所發現的 PR1 是具有新穎性且與登革熱患者臨床疾病的徵兆是有關聯的，除了發展試劑以外，其原本具有調節發炎反應的能力也是另一個可以被討論的重點，或許可以姐是臨床上有些登革熱患者有陰囊炎的現象。

### (子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色

#### 結論

1. 造血幹細胞或是前趨細胞容易受到登革病毒的感染
2. 登革病毒的形態是多元和缺乏殼膜的結構。
3. 周邊血幹細胞的數量影響登革病毒感染後的產量

## 建議

對於長期收集或是規劃的實驗，計畫分別以月、季進度報告呈現，太過於頻乃，如需了解計畫的進度，以季為彙整可能更符合計畫運行的實際狀況。

### (子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探—某醫學中心 照護病例對照研究

本研究發現台灣登革熱重症臨床表現與相關研究結論相符，另外在控制可能的干擾因素後，發現具有十二指腸潰瘍與慢性腎衰竭病史的登革熱患者是登革熱重症的高危險群，但胃潰瘍、糖尿病、鬱血性心衰竭、末期腎病等其他研究中曾出現之危險因子並無統計上之差異，可能的原因可能是病例組樣本數太少，或是與其他危險因子間具有共線性。期待未來能有更多相關流行病學研究，以了解民眾感染登革熱重症的危險因子，以提供未來照護感染登革熱病患的預警與適當的臨床處置建議。

本研究以單一醫學中心之醫院病歷資料分析危險因子，可能發生某些登革熱重症患者會到其他醫院就診，故本研究的外推性有其限制。

### (子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

1. 最低溫與雨量及其交互作用造成的時間延遲效應，分別和早期與最近時期環境因素有關且會促進登革熱的傳播，特殊突發事件如氣爆，先前的氣候因素，也會影響到蚊蟲與人類動態變化，在登革熱的防疫上也應考量此點，因為它會和氣候因素互動，影響到登革熱的疫情傳播。
2. 先前研究並未聚焦於 在特定城市且未考慮到特殊性如氣爆事件。可試用此模式套用在台灣其他地方，舉如分析台南市 2015 年登革熱大流行的原因。

### 3. 在問卷研究方面

- (1) 此次問卷個案來源以高雄市南區為主，若有機會和高雄市其他區域或是其他縣市進行調查，共同合作進行較大規模的調查會更有機會看出看出不同區域對登革熱的認知是否有差異。
- (2) 問卷顯示，此區域(小港區、前鎮區)看診醫師對登革熱的敏感度已提高，延遲診斷的比例顯著減少，此部分推測與登革熱快篩試劑廣泛使用，及在大量登革熱個案出現時民眾與醫師會有相當的警覺性有關，建議應持續提供登革熱快篩試劑做為第一線診所或醫院輔助診斷工具。

#### (子計畫五) 重症登革熱之流行病學及免疫反應研究

我們觀察到台灣的登革熱重症主要發生於老年人，且有極高的死亡率，這和發生於小孩且死亡率極低的國外登革熱重症有很大的不同。我們亦發現目前 ICU 中常用的 SOFA score 在這個族群為極佳的死亡預測指標。其中心血管系統、呼吸系統及神經系統的器官衰竭程度尤其重要，這三個項目正是用於床邊評估敗血症的快速 SOFA (quick SOFA) 組成分，或許未來 quick SOFA 亦能有效運用於登革熱重症病人的床邊評估。

#### (子計畫六) 抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然藥物研發

1. 透過次世代定序(next generation sequencing, NGS)篩選具潛力之抗病毒基因以及微型核糖核酸(micro RNA, miRNA)以作為未來抗病毒藥物篩選之標的。

2. 建立並透過不同篩藥平台得到具潛力之抗病毒先導化合物 Compound L、GS、Compound 17 及 Compound 21。
3. 於登革小鼠感染模式評估篩選出之抗病毒藥物效果。

### (子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查

計畫執行 1 年多期間，共收集 836 支血清，收案人數達到 709 人(初次採血)，進行登革抗體 IgG 檢驗後，將陽性血清寄往夏威夷大學進行中和試驗，來確認所感染的血清型，目前試驗仍未完成。

在此研究中，於三民區與楠梓區各收案 300 至 400 人，相較於整個高雄市的人口，收案的人數仍不足以代表各地區的結果，但是回顧新加坡於 2004 年與 2015 年血清陽性率相關文獻(Yew et al. Ann Acad Med Singapore 2009; Ang et al. Epidemiol Infect 2014)，採樣率 0.000952 ~0.000648(2004 年，4168 位志願者/4375000 新加坡人口；2010 年，3293 位志願者/5078000 新加坡人口)。在我們的研究中，三民區採樣率為 0.00105(365 位志願者/346540 三民區人口)；楠梓區採樣率為 0.00193(346 位志願者/179629 楠梓區人口)。顯示在我們的研究中，以三民與楠梓區而言，採樣率比新加坡更好。我們的結果仍可初步了解高雄市的登革血清陽性率，並且也有一些基本資料可供參考，期望可以幫助其他相關研究。

由於在兩區中較缺乏小於 19 歲與 30~49 歲年齡層之志願者，在分析登革抗體陽性率時，此兩種年齡層之陽性個案皆偏少，於三民區甚至無出現陽性的結果。由於，小於 19 歲加入研究需經過法定代理人同意，因此在收案時，增加了難度，30~49 歲年齡層皆為社會主要勞動力，因此在收案時，此年齡層因為上班的緣故，無法參與研究。將來，有機會再次進行收案研究時，期望可再增加這兩個年齡層的收案數，檢驗登革抗體陽性率，使大家更加了解陽性率的年齡分布。

於本研究中，使用速帝登革熱免疫球蛋白 G 檢驗試劑(SD Dengue IgG Capture ELISA)進行初步登革熱抗體檢驗，由於 Capture ELISA 比較適合用於急性期的抗體檢驗。本研究中抗體檢驗結果，三民區初次採血登革熱抗體 IgG 陽性率 6.34% (23/363)，楠梓區初次採血登革熱抗體 IgG 陽性率 3.76% (13/346)，因使用 Capture ELISA kit，可能導致檢驗出的陽性率偏低。為了確認此結果，在將來使用 indirect IgG ELISA kit 再次檢驗，期望可提高登革熱抗體 IgG 陽性。

我們發現許多的民眾對於自身感染登革熱的警覺性並不高，依據我們的問卷調查與檢驗結果(如表五)，有 30% 以上的民眾並不知道自己曾經感染過登革熱，我們無法僅以問卷詢問有無感染過登革熱來判斷，這些可能為不顯性的感染或無症狀，但有些或許是自覺只是感冒發燒而忽略了真正的病因，使登革熱的防治出現漏洞，因此對於登革熱衛教的普及，提升對於疾病的發現與診斷，將可使登革熱防治更加有效。

#### **(子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗**

我們的結果顯示要測試抗登革熱病毒藥物或是疫苗需要利用能產生出類似於體內的登革熱病毒型態的細胞作為這些試劑的測試平台。

#### **(子計畫九) 台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析**

綜觀過去台灣地區的登革熱病毒疫情紀錄，可發現登革熱疫情多以每四年爆發一次的頻率侵襲南台灣，但近年來卻接連在 2014 年的高雄地區以及 2015 年的台南地區發生了兩次疫情爆發，總計之病例數甚至遠遠超過過去十年之病例總數，使之一躍成為公共衛生與疾病控制上難以忽視的威脅。為此，深入了解登革熱病毒在台灣本土的流行模式便是一項重要的

課題。經由系統發生演化樹分析，我們得以了解 2014 年及 2015 年在台灣地區流行的登革熱病毒株皆為境外移入株，其中 2014 年之流行病毒株可能自印尼傳播而來，2015 年之第二型病毒株則可能由中國大陸同時傳入台灣及印尼，可供有關單位在針對登革熱疫情防治與控制政策之制訂上作為參考。而在次級感染不同型別的登革熱病毒的患者在急性期間血清中抗登革熱病毒抗體的濃度中觀察到的差異，以及恢復期患者血清中抗登革熱病毒 IgG 之持續時間，皆是十分值得深入探討的現象。更甚者，對於初級與次級感染階段上的不同、抑或所感染病毒型別的不同是否也會影響中和性抗體產生此一課題，亦是我們意欲進一步研究探討的。

#### (子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫

每次溶劑灌流陽性水溝約需動員 8 人(以每日薪資新台幣 1,210 元整計算)，人力薪資每日約需新台幣 9,680 元整，租借一輛水車一日約需新台幣 5,000 元整，而購買一罐(1 公升)有機磷劑平均約新台幣 300 元整、一公斤昆蟲生長調節劑(BTI)平均約新台幣 2,000 元整，平均使用 20 克約需新台幣 40 元整；總此，灌流有機磷劑約需花費新台幣 14,980 元整，灌流生物製劑約需花費新台幣 14,720 元整，灌流海水約需花費新台幣 14,680 元整。

在物理與化學防治的成本效益綜合評估下，海水灌流進行防治比有機磷劑、昆蟲生長調節劑(BTI)進行化學防治所的成本相較為低，然所能抑制病媒蚊幼蟲孳生的時間雖較為短暫，卻是目前能有效處理溝底坑洞不完全積水導致病媒蚊孳生較為有效可行的防治方法(以殘效噴藥或投藥無法直接處理凹槽積水)。海水灌流防治在期效內(約 5~7 天)有其防治效果，不僅可以抑制蚊蟲的孳生，亦可彌補防疫人員無法調查及處理之水溝凹

洞處之缺失，逕而爭取防疫人員處理非水溝孳生源的時效(如家戶內孳生源、屋簷排水溝及積水地下室等)。以鳳山區海水灌流為例，該次灌流合計動員清潔隊人員 8 人、2 輛車，共計執行 8 趟車次 2 日，總計一次區域性海水灌流動員約 16 人日，約莫同等於一次緊急防疫動員清潔隊 12~16 人日(執行 1 日)執行戶外殘效噴藥作業；若以海水灌流有效期 5~7 天所能執行緊急防疫觀之(同樣區域約平均 2 日執行緊急防疫一次，7 日約可執行 3 至 4 次緊急防疫作為)，亦即區域性海水灌流後，同樣區域約可減少 2 至 3 次執行殘效噴藥作業人力(約 24~48 人日)，節省之人力將可轉往重點區域(如室內、列管場域及屋簷溝等處)執行防疫，以利儘早控制疫情蔓延。

海水灌流對於水溝內生態環境及管線設備等是否造成一定程度之影響，此項研究需動用國家研究力量，結合生態、地質、結構工程等方面專家學者進行綜合探討研究方能得知。總之，登革熱防治並非單一防治策略可善盡遏止效果，海水灌流防治水溝除應配合生物、物理、化學等各種防治方法並進外，更應定期疏浚維持水流暢通，方可達到多方面預防及防治效果。

未來都會區排水溝渠海水引入抑制斑蚊幼蟲防治策略，將可參照公園綠地自動灑水系統、社區影像監視系統、污水下水道排放系統、石化管線輸送系統及腸胃道內視鏡檢視系統等系統原理，依都會區下水道鋪設路線(以里鄰或區域為單位範圍)，沿著排水溝渠加掛如塑膠 PE 等管線，該管線具有放流或噴灑出特定口徑之液體及氣體，並於管路源頭設置一座汲水(氣)槽，需求時可加壓噴灑海水或水噴有機磷劑或熱煙除蟲菊酯等環境用藥。

海水管道系統可鋪設於登革熱病媒蚊陽性水溝及高風險流行里別排水溝渠執行定期消毒，亦可同步運用於公園、市場、學校等排水溝渠；利用

定點(期)自動流放或噴灑，減少環保劑消毒及戶外緊急防疫之載運海水車輛及環境用藥人力及配合緊急防疫實施，並布設影像監測站，以利觀察排水溝渠設施及生態變化。

### (子計畫十一) 應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的斑蚊孳生源

#### 1. 百利普芬對蚊蟲的影響

百利普芬會造成蚊幼蟲不自然生長並導致死亡、蚊蛹無法順利羽化成蚊、蚊成蟲接觸百利普芬後會造成其生產的卵粒形態上異常並可將百利普芬帶至水體造成水體內幼蟲成功羽化率低。

#### 2. 百利普芬自動散播的評估

野外試驗所回收的水樣經生物性分析確認，蚊蟲自動散播百利普芬的技術可以滅除周遭 20% 隱藏性孳生源，同時經由 UPLC-MS-MS 分析顯示水樣內確實具有百利普芬並成功定量 (9.5、10.83 ng/L)。

#### 3. 硼酸誘卵桶應用

相較於傳統誘卵桶，硼酸誘卵桶在無外在因素 (颱風、大雨..等) 影響硼酸溶液濃度的情況下，可以兼具監測當地的蚊蟲密度與滅殺前來棲息吸食溶液的蚊成蟲，沒有成為孳生源的疑慮。

### (子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究

根據本計劃的研究結果顯示：(一) 針對病媒蚊成蟲的空間分佈調查，在住宅區中成蚊多分佈於室外，但是也可以在室內與屋頂被捕獲，同時也可以在 15 層以上的公寓大樓地下室、第 5, 10, 15 層樓與屋頂被捕獲。在戶外的灌木、三與五公尺喬木中，以灌木中所捕獲的成蚊最多。整體而言，

住宅區所捕獲的成蚊遠比公園多。三個調查區中，2015年秋季以苓雅區正心里的成蚊捕獲量與容器指數最高，病媒蚊密度最高超過第8級，且多為埃及斑蚊。2106年冬季與春季的登革熱病媒蚊數量銳減，夏季數量逐漸增加，但是多為白線斑蚊。(二)關於懷卵登革熱病媒蚊的產卵行為，白線斑蚊的產卵分散度遠大於埃及斑蚊。在大空間中，此二種病媒蚊的產卵分散度均較小空間大。(三)幼蟲孳生地仍以積水容器為主，只有極少數以水溝為棲地。

### **(子計畫十三)建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略**

本計畫已完成能造成細胞質不相容性之 *Wolbachia wAlbB* 菌株的埃及斑蚊，順利與國際接軌，同時，已開發完成液態藥劑灑佈機與粒狀粉狀灑佈機之設計、測試飛行與投藥，並完成多軸機防治登革熱病媒蚊灑佈標準作業規劃。本計畫所建立之標準作業流程隨時可提供相關單位參考。

### **(子計畫十四)登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫**

政府公部門防疫速度遠跟不上民眾製造孳生源速度，惟由透過民眾及政府共同攜手合作，方是防治斑蚊病毒對人類的威脅。防治登革熱/茲卡病毒最有效的方法是清除孳生源，清除孳生源有賴民眾及政府共同努力，而教育正是提升民眾主動清除孳生源方法之一。

本計畫培育專業講師授課任務至本計畫終止即結束，隔年政府又得重新撰擬計畫及編列相關預算再度重新培訓專業講師，爰每年皆有中斷之空窗期；本局建議中央政府應重視衛教重要性，研議每年固定編列相關衛教講師薪資可行性，藉以培育優秀講師人才，擴大宣導登革熱/茲卡防疫作為。

### (子計畫十五) 血液製品之登革病毒偵測調查

本研究結果顯示在登革熱疫情期間的確可能有經攜帶登革病毒的病媒蚊叮咬的無登革熱症狀捐血者至捐血中心捐血，雖然登革病毒在捐血者血液中的盛行率可能因為檢驗樣本數量與使用技術的靈敏度不同而有高低的差異，但是這個事實應讓我們面對以往的猜測已經成為事實，接下來應進一步思考是否在登革熱疫情時期對血袋進行登革病毒的篩檢或是提出其他策略避免潛在的登革病毒無症狀感染者捐血，甚至是對其他與登革病毒具同樣病媒的病毒進行篩檢，例如茲卡病毒。

### (平台一)行政暨教育資源平台

索羅門群島辦理登革熱國際研討會重要結論

#### 1. Dengue outbreak surveillance in the Solomon Islands.(Dr. Alison Ripiapu)

利用分析統計國際登革熱疑似病例流行病學分佈，進而推演至索羅門群島當地的醫療發展；希望藉由國際經驗推展至索羅門群島，包括醫療人員以及診斷、檢驗技術的衛教、訓練，藉以得到更正確的登革熱統計數據分佈，以及使患者得到更好的照護。

#### 2. Influence of environmental factors on proliferations of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Dr. Albino Bobogare)

講題著重在於環境控制對於蟲媒疾病的影響，深入探討不同的防治病媒蚊方法對於不同種類蚊種以及實際病例數的影響，除人為的防治方法外，更統計自然環境(如：溫度等)對於病媒蚊的影響，藉由分析討論數據，藉以找出最佳的蟲媒疾病環境控制方法。

#### 3. Dengue Fever: Factors which makes it a threat in the Solomon Islands.(Dr. Charles Butafa)

除統計近年來索羅門群島登革熱疑似病例外，更專注於探究 2013 年索羅門群島登革熱的爆發，包括爆發的原因、如何確診的困難、新興傳染病的威脅等，並提出未來可能解決方案，包括 Wobachia 生物防治等要項。

#### 4. Outbreak of dengue fever in Taiwan(Dr. Tsai, Jih-Jin)

介紹 2014-2015 年度臺灣地區的登革熱流行狀況，分析病例統計數據、地理條件、實例個案症狀分享等，希望藉由臺灣地區防治登革熱的經驗分享，能提供索羅門群島衛生部作為參考，並善加利用他國經驗作好傳染病控制。

#### 5. Molecular Medical Mechanism of Dengue Fever(Oscar Guey Chuen Perng, Ph.D.)

從各國的登革疫情切入，進而進入登革熱型別、症狀探討，深入解釋登革病毒與宿主、蟲媒間的相關性，最後再以分子醫學的角度進行登革熱病毒的相關實驗得出結論，並解釋登革病毒的病理及分生機轉。

#### 6. ISO15189 Guideline Quality assurance of Laboratory(Mr. Lin, Shih-Wei)

將醫學實驗室認證制度 ISO 15189 作詳細的介紹，並說明全世界各地認證組織所遵行的認證規範；除介紹認證規範外，並強調實驗室品管、品質、技術、管理需同時並行才能擁有健全的醫學實驗，並給予使用者最佳的保障。

#### 7. Interpretation of dengue related tests(Mt. Lin, Ping-Chang)

解釋登革熱相關檢驗，包括抗原、抗體、病原檢驗的原理以及如何將這些檢驗進行綜合判讀，並探討運用索羅門群島登革熱實驗室內的分生診斷技術拓展其他疾病檢驗的可能性。

## 第五屆登革熱國際研討會重要結論

### 1. Dengue Prevention Practices and Factors Affecting Spread of Dengue:

#### Malaysia Experience (Prof. Sazaly AbuBakar)

登革熱仍然是大多數東南亞國家主要的健康威脅(1.登革熱大爆發的國家，全世界超過 125 個。2. 3.6 萬人具有感染的高風險。3.全世界 9600 萬人口有明顯登革熱感染。4.全世界有 294(213-392)萬人有輕微或無症狀的感染。)。不論該區域各個國家的經濟狀況如何，登革熱病例記錄的數量正在增加。控制登革熱的努力大部份沒有成功。這些努力包括通過對抗登革熱運動，強調調控蚊子族群，包括消滅登革熱的主要媒介-埃及斑蚊；行為影響的溝通(COMBI)方案介紹和積極應用蚊子殺滅幼蟲和殺蟲劑。一般來說，在大多數（假如不是所有）登革熱流行國家中，實施具有微小變化和複雜性的類似方法。有鑑於登革熱繼續擴散到非流行國家和地區以及茲卡病毒感染的出現，人們如果繼續實施類似的遏制辦法，結果將是非常可預測的。

馬來西亞已經面臨登革熱三十多年，但報告的登革熱病例數量從幾十年前的 40 多起病例中逐步增加到每 100,000 人 400 多例。我們進行研究以檢查馬來西亞人口不同的部分，以確定有助於應付登革熱傳播及挑戰的可能因素。這些包括確定大眾對登革熱的了解程度，以及他們如何看待登革熱以及影響登革熱預防做法和尋求治療行為的因素。並研究了社會人口統計學，地理空間和環境屬性對登革熱流行的影響。

### 2. Increasing recognition of dengue virus infection in the elderly (Prof. Yee-Sin Leo)

登革熱威脅全球一半人口，在許多地區已知會導致嚴重的兒童疾病。近年來，向成人感染的轉變正被廣泛報導。在新加坡和台灣，登革熱病毒

感染在老年人族群中造成顯著的疾病負擔。

古巴在 2002 年報告了年齡對繼發性登革熱 2 次感染結果的影響，證明了 U 形死亡率曲線對於年輕人和老年人具有最壞的結果。

台灣比較出血性登革熱患者，年齡超過 65 歲的與 19-64 歲的患者表現，老年人發熱，腹痛，皮疹的發生率較低，但併發菌血症，胃腸道出血，急性腎功能衰竭，住院時間延長和死亡率有較高的發生率。

在新加坡的一項具前瞻性大型社區團隊研究清楚地顯示，56 歲及以上的老年人比世衛組織公布的登革熱病例可能更少。老年人經歷較少的疼痛和酸痛，較少的粘膜出血，但老年人的住院治療比率並沒有增加。一項關於住院治療的隨訪研究證實了應用世界衛生組織對於老年患者可能在登革熱的診斷中具有不太明確的結果，老年人傾向於具有較少的疼痛和酸痛，較少的皮疹，較少的白血球細胞減少，60 歲以上的人更有可能具有肝腫大，不適或昏睡，較少粘膜出血，較高比例具有嚴重出血性登革熱和嚴重疾病分類的重症，需要較長的住院時間且有醫院相關感染的風險。

同樣地，波多黎各的一份報告顯示，與青年人相比，老年人登革熱死亡的風險增加了 6 倍。

即時了解登革熱對老年人的影響。針對老年弱勢族群，以更多的研究來評估免疫反應，並以開發疫苗為主要目標。

### 3. Dengue prevention and control in Taiwan (Director Chin-Hui Yang)

台灣自二戰後於 2015 年經歷了最嚴重的登革熱流行，共有 4319 例本土登革熱確診個案。隨著地區不斷擴大及登革熱個案增加，台灣預計將有越來越嚴重的流行病。

為加強登革熱預防和控制工作，降低大規模爆發的風險，台灣疾病控制

中心（台灣 CDC）除密切監控登革熱疫情外，亦已決定在計畫前實施四項主要的登革熱預防及控制策略。策略如下：

- (1) 今年年初（2016 年），已批准 4300 萬新台幣資助“高危險城市/縣的登革熱防範計劃”，試圖積極監督這些地方政府更早實施相關防護工作。
- (2) 向地方政府提供 2016 年 2 月 1 日修訂的“登革熱診斷，治療，預防和控制指南”，作為疾病管控人員的參考標準。
- (3) 放鬆對登革熱 NS1 快速檢測的使用的限制，以便於早期診斷和實施防止疾病進一步傳播的後續措施。
- (4) 建立國家級媒介傳播疾病研究所，協助地方政府在前線展開預防工作。

#### 4. Establishment of the Wolbachia-based approaches for dengue vector control(Prof. Shin-Hong Shiao)

登革熱由斑蚊屬（主要是埃及斑蚊和白線斑蚊）中的幾種蚊子傳播。因此預防取決於對蚊子的叮咬的保護和控制。以前控制埃及斑蚊的方法是通過消除其棲息地。對於幼蟲控制，應用有機磷酸酯或擬除蟲菊酯殺蟲劑定期且廣泛的噴灑於流行地區。然而，那些控制策略被認為不具效果。此外，殺蟲劑的應用也出現了對健康有負面的影響和增加抗藥性的作用。因此，需要開發非化學的登革熱載體策略。沃爾巴克氏菌是感染節肢動物物種，並且在一些蚊子物種中與病毒抗性相關的細菌屬。也發現沃爾巴克氏菌能降低蚊子繁殖力。

經果蠅內生性的立克次菌（Wolbachia）感染後的斑蚊，會迅速在斑蚊族群內擴散並造成病媒蚊壽命減短，降低登革熱的傳播，具有 wAlbB 和 wMelPop 的埃及斑蚊已經在幾個國家釋放和測試。在本計畫中，實驗室

將利用成熟的立克次菌 (Wolbachia) 菌株，並在台灣在實驗室建立標準方法。實驗室將建立一個局部感染了 Wolbachia 的埃及斑蚊菌株，並檢查其對壽命和對登革熱感染的敏感度的影響。將評估對登革熱感染的壽命和敏感度的影響。

#### 5. Immunopathogenesis of dengue virus infection: Implication for the discovery of potential biomarkers for severe dengue(Prof. Jang-Hann Chu)

儘管登革熱病毒感染的普遍性和其對盛行國家造成的沉重的經濟負擔，但登革熱病毒感染的免疫發病機制仍不清楚。出血性登革熱 (DHF) 的血漿滲漏不是在感染患者中達到高峰值時發生的病毒血症，而是當病毒血症顯著減少或清除時發生。這顯示宿主免疫與負責對應出血性登革熱 (DHF) 之間的關聯。病毒因子與引發宿主免疫反應的宿主因子之間的相互作用可能在登革熱疾病的發展中起重要作用，因此具有很大的利益。在本研究中，使用免疫螢光染色，流式細胞儀技術和蛋白質轉漬法 (Western blot analyses) 發現病毒識別受體，類鐸受體 2 (TLR2) 和類鐸受體 6 (TLR6) 在登革熱病毒感染的病人、其周邊血液單核細胞 (PBMC) 中呈現上升。使用酵素結合免疫吸附分析法 (ELISA)，IL-6 和 TNF- $\alpha$ ，也發現 TLR2 和 TLR6 信號通到下游的細胞因子在登革熱病毒感染的周邊血液單核細胞 (PBMC) 中呈現上升。當在登革熱病毒感染期間使用 TLR2 和 TLR6 中和抗體阻斷 TLR2 和 TLR6 時，周邊血液單核細胞 (PBMC) 的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  產生減少。這些結果表示 TLR2 和 TLR6 的信號通道在登革熱病毒感染期間被活化，其活化促成 IL-6 和 TNF- $\alpha$  產生。發現登革熱病毒 NS1 蛋白在加入周邊血液單核細胞 (PBMC) 時顯著增加 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的產生。由登革熱病毒 NS1 蛋白的刺激，IL-6 和 TNF- $\alpha$  的量在 TLR2 和 TLR6 被阻斷時降低，表示登革熱病毒 NS1 蛋白是在登革熱病毒感染期間負責活化 TLR2 和 TLR6 的病毒蛋白。使用分泌型鹼性磷酸酶 (SEAP) 進一步證

實登革病毒 NS1 蛋白對 TLR2 和 TLR6 產生活化。此外，與感染登革病毒和經登革病毒 NS1 蛋白處理的野生型小鼠相比，登革病毒感染的和經登革病毒 NS1 蛋白處理的 TLR6 -/- 小鼠具有更高的存活率。因此，經過登革病毒 NS1 蛋白活化 TLR6 可能在登革病毒感染的免疫發病中起重要作用。此外，本實驗室還將在這次演講中，討論關於登革熱和其他蚊子傳播相關病毒的最新分子和生物標誌物診斷技術。

## 6. Effects of temperature, rainfall and petrochemical gas explosion on dengue incidence in Kaohsiung city(Director Ko Chang)

背景：

天氣影響登革熱生態和載體 - 人類相互作用影響登革熱傳播。在高雄，台灣的一個登革熱流行高風險的大城市，在 2014 年，天氣因素加上偶發的石油化工氣體爆炸 (PGE)，可能影響蚊子-人類動態。這項研究評估了後期氣象/蚊子變數和 PGE 的相互作用的對高雄登革熱發病率的影響。

方法：

由高雄氣象站（前鎮站）取得高雄市歷年來 2000 至 2014 年的氣象資料包括每日的氣溫（最低氣溫、平均氣溫、最高氣溫）、雨量、濕度；由高市疾管處與疾管署網站上取得布氏指數資料，接著將上述資料轉為每周及每月的資料；登革熱個案數資料可由疾管署網站上獲得；高雄市年終人口數可由高市民政局取得，如此可計算出登革熱的發生率使用遲滯時間卜瓦松回歸分析(lagged-time Poisson regression analyses)的廣義估計方程來評估環境因素和 PGE 對登革熱發病率的影響（2000-2014）。

結果：

最低溫度的增加相對登革熱風險增加了 2 到 3 個月的滯後互動效應，較高的降雨量對較低的風險具有 1 到 2 個月的遲滯效應的交互作用（相互

作用的  $P \leq 0.001$ )。在 2014 年的 PGE 之後，登革熱風險顯著高於該事故發生後第 5 週的大規模爆發年 (2002 年) (5-22 週，2.9-8.3 週的調整後的發病率)。在 PGE 後的第 1 週和第 3 週確定 PGE-感染區域中的登革熱發生率與 PGE-相鄰區域和其他區域中的登革熱發生率最大相互相關 (分別為  $r_s = 0.956$  和  $0.963$ ;  $P < 0.001$ )。與參考年份相比，2014 年最低氣溫，降雨量和 PGE 的聯合效應佔登革熱風險的 75.1%。

結論：

來自最低溫度和降雨的時間遲滯效應相互作用可分別與早期和鄰近環境促進登革熱傳播的關聯。與天氣相互作用並影響蚊子-人類動力學的事件，例如 PGEs，在登革熱預防和控制中不應被忽略。

## 7. Epidemiology and Immune Response of Severe Dengue (Director Chau-Chyun Sheu)

2015 年共有 49 例登革熱患者入住醫療 ICU，22 例死亡 (44.9%)；27 例存活 (55.1%)。許主任分析了病例的數據，以調查嚴重登革熱死亡的原因和危險因素。並將重症登革熱病例與 98 名相對應之肺炎病例進行了比較。大部分的重症登革熱患者會發生續發性細菌感染。假設登革熱病毒感染能干擾並保護免受細菌感染的正常免疫系統。

全國登革熱本土型病例及境外移入病例趨勢：

1998~2016 年數據顯示，2014 及 2015 年確診病例為最高；其中皆以 8~12 月病例數最高。

以臨床症狀 (出血性、嘔吐/噁心、腹痛、肝腫大、皮疹) 等表現分析其趨勢。

全國登革熱本土病例及境外移入病例地理分佈情形：

2014 年高雄比例為 0.13%。

2015 年台南病例數較高，但本土病例與境外移入病例比例卻相同

(0.49%)。

對於世衛組織之登革熱指南對登革熱重症和臨床問題上的缺失討論。

## 8. Virological Characterization and Molecular Epidemiology of Dengue Virus Infection in Taiwan(Prof. Yi-Ming Chen)

登革熱 (DF) 是由登革熱病毒 (DENV) 引起的屬於黃病毒科黃病毒屬的載體傳播疾病。世界衛生組織 (WHO) 最近提出警告，許多國家登革熱流行或爆發。2014 年台灣發生嚴重的登革熱爆發。據報導共有 15,732 例登革熱病例。在高雄市報告的共有 15,043 例 (96%)。不幸的是，2015 年台灣南部發生更嚴重的登革熱爆發，台灣疾病管制局(CDC)報導了 4384 例登革熱病例。大多數登革熱病例分佈在南台灣的兩個城市台南 (22,777; 52%) 和高雄 (19,784; 45%)。這項研究的目的是找出導致這些爆發的潛在因素。

根據本實驗室數據顯示，地下管道洩漏氣體爆炸事件(其後是連續大雨)與高雄 2014 年登革熱爆發的相關性 ( $p < 0.0001$ ;  $r = 0.87$ )。爆炸造成的空洞可能導致適合作為斑蚊的棲息地和繁殖地的停滯水的增加。本實驗室使用測量蚊子密度的 Breteau index (BI) 發現，在高雄 7 月到 9 月從 10%-19% 增加到 35%-49%。對於 2015 年 index 爆發，我們發現氣候變化在誘發這次大爆發起了重要作用。使用即時逆轉錄聚合酶鏈反應 (即時 RT-PCR) 進行的 NS5 基因擴增和用特異型引物和探針檢測的血清型分別顯示在 2014 和 2015 年，DENV-1 和 DENV-2 是主要病毒株，而在登革病毒 IgM、IgG 分別表示的意義:初次感染=>IgM 上升；二次感染=>IgG 上升。

使用全長套膜基因 (E) 進行的發育系統分析顯示，2014 年和 2015 年爆發的 DENVs 分別與 2013 年印度尼西亞和 2014-2015 年印度尼西亞及中國分離病毒株具相關性。暗示兩種疫情都是由移入病例引發的，地下管

道爆炸和氣候變化可能會促進台灣登革熱大爆發。

9. Investigation of spatial distribution, oviposition behavior and larval breeding habitats of dengue vectors in southern Taiwan(Prof. Shu-Mei Dai)

為了成功控制流行性登革熱，必須要了解病媒蚊的生態學，包括產卵行為，分佈棲息地等。埃及斑蚊和白線斑蚊是台灣南部的兩種主要登革熱媒介，為登革熱爆發的關鍵因素。這兩個媒介的幼蟲主要在積水的容器中被檢測。近年來，政府和居民都努力消除各種積水容器，消除源頭，使母蚊不容易找到積水的容器產卵。因此，埃及斑蚊將其幼蟲繁殖地點改為其他幼蟲棲息地，即下水道，積水的建築工地，污水池和水坑。這意味著目前的預防登革熱防疫改變了病媒蚊的生態和習慣。因此，有必要調查台灣南部登革熱病媒蚊的空間分佈，產卵行為和幼蟲繁殖棲息地。對於空間分佈，更多登革熱的成熟病媒蚊在房子外面被捕獲，5層公寓和公寓一樓。然而，成熟的病媒蚊也可以在15層的公寓和5米高的樹上面兩邊被找到。更多成熟埃及斑蚊被捕獲（建築物內部或外部），只有少數在戶外灌木或公園裡的樹木被捕獲，白線斑蚊對於產卵行為則相反，兩種病媒蚊繁殖地點都可以在室外和室內產卵，客廳，臥室和廚房。埃及斑蚊大多將卵產在室內，而白線斑蚊則將卵產在戶外。由白線斑蚊產卵的分佈位置比埃及斑蚊更分散。然而，兩種病媒蚊的卵在大面積上散佈會比小面積更多。所有這些結果都可用於登革熱病媒蚊的管理。

10. Study of human antibodies bound to dengue virus particles with different maturation status(Prof. Wei-Kung Wang)

登革熱病毒（DENV）的四種血清型是蚊子病毒性導致人類疾病的主要原因。套膜蛋白（E protein）是中和（NT）抗體的主要靶標。E蛋白的胞外域含有3個結構域（DI，DII和DIII）。以前的研究報導，與識別DII的融合環（FL）的那些相比，識別DIII，E-膜二聚體抗原決定位置或四

元表位的幾種人類單克隆抗體(mAb)是為更有效的中和(NT)。在DENV顆粒的成熟過程中，前驅膜蛋白(prM)蛋白被弗林蛋白酶切割不足，導致培養的上清液中，成熟、未成熟和部分未成熟顆粒的混合物。我們研究了表面可接觸性，結合活性與親合力和不同人類mAbs對具有不同成熟狀態的DENV顆粒的NT效力之間的關係。使用ELISA對於抗體捕獲結合測定為基礎，測定最大結合(Bmax)和解離常數(Kd)。NT效力，可接觸性和親合力分別通過 $1/FRNT50$ ， $B_{max}$ 和 $1/Kd$ 評估。抗DIII mAb顯示比抗FL mAb顯著更低的Kd至成熟病毒體，表明與抗FL mAb相比，感染性病毒粒子的更高的結合親合力可能有助於抗DIII mAb的更強的NT活性。這些發現意味著免疫原設計以針對誘導DENV的更有效的NT抗體。

## 11. Role of Hematopoietic Stem Cells in Pathogenesis of Dengue Virus Infection & Novel antiviral drugs development to dengue virus(Prof. Guey-Cheun Perng)

### 造血幹細胞在登革熱病毒感染的發病機制中的作用

登革熱目前是最重要的蚊子傳播的病毒疾病，影響人類許多世紀。動態臨床表現，從無症狀感染，輕度發熱到嚴重出血熱，偶爾伴有高致命性休克綜合徵候群。儘管經過幾十年的努力，導致嚴重登革熱的機制仍不清楚。在登革熱患者中，骨頭疼痛是顯著的臨床描述，並且登革熱可以發生在骨髓移植以及輸血中，然而登革熱病毒和骨髓細胞之間的物理相互作用還沒有被全面研究。以前的調查顯示，在登革熱患者中看到的血小板減少症的可能原因之一是登革熱病毒感染血小板原始巨核細胞的可能結果。這些結果表明骨髓中的細胞可能被登革熱病毒感染。目前的工作進一步定義了登革熱病毒在骨髓中感染的細胞的表型。用  $MOI = 1$  的登革熱病毒感染新鮮骨髓細胞具有 CD133，CD117，CD34 或 CD61 標記

物的磁性分選的細胞，通過標準噬菌斑測定法滴定上清液中病毒產量的動力學，並將相對應的細胞多色 FACS 分析。結果顯示：(1)骨髓細胞高度耐受登革熱病毒感染，(2)具有 CD34，CD133 和 CD117 標記的幹細胞對登革熱病毒感染高度敏感，(3)登革熱病毒在 CD61，原始巨核細胞。為了進一步證實巨核細胞譜系之細胞支持登革熱病毒感染，用商業分化培養基將新鮮骨髓細胞分化成巨核細胞譜系細胞。分化的巨核細胞譜系細胞是高度允許登革熱病毒感染。此外，我們發現健康捐贈的周邊血液單核細胞中的原始細胞的水平與登革熱病毒生產顯著相關。因此，結果顯示登革熱病毒直接靶向骨髓中的幹細胞和巨核細胞譜系細胞，引發登革熱患者的骨痛感和血小板減少。

### **針對登革熱病毒開發新型抗病毒藥物**

登革熱嚴重威脅公眾健康和增加社會負擔。截至今天，儘管登記了登革熱疫苗，但其在疫苗中的有限功效和潛在風險引起了對預防措施的關注。因此，迫切需要可有效治療並減輕疾病傳播的抗病毒藥物。此外，最近的證據顯示，病毒形態在體內獨特性不同於那些獲得體外細胞培養系統。體外登革熱病毒的識別包膜蛋白的抗登革熱抗體 2C7 和 2D22 的抑制率通過來自 3 種不同來源的病毒，Vero 細胞，巨核細胞-MgO11 和原代臍帶血的中和試驗進行評價。結果表明，這兩種抗體中和病毒產生有效，但在病毒從 Meg01 和原發性臍帶血細胞，暗示病毒複製的途徑是細胞型依賴。因此，我們測試了 *Anthodia cinnamomea* 的萃取物，該中藥廣泛用於治療包括癌症在內的幾種疾病，用於在 Meg01 細胞中對登革病毒的抑制作用。我們發現，來自萃取物的幾組純化的化合物具有抑制登革病毒複製的能力，在 Meg01 細胞中達到 90% 的抑制。發現抑制中的作用模式與化合物在處理的細胞中誘導干擾素  $\alpha$  產生的效力相關。因此，本實驗

室得出結論，巨核細胞譜系細胞，Meg01 可以是一個平台，篩選抗病毒藥物登革熱病毒，純化的化合物的抑製作用的作用模式是干擾素的誘導，純化的化合物從樟芝可以是治療藥物登革熱病毒。

## 12.Prevention and control of Dengue in Kaohsiung(Senior Technical Specialist Chiu-Wen Chang)

在台灣，有 90% 以上的登革熱個案在高雄市發現。在 2001 - 2013 年期間，每年在高雄市確認數百，甚至數千的登革熱病例。在 2002 年，報告多達 4,811 宗。在 2010 年和 2011 年，報告的登革熱病例數也超過了一千。相比之下，2010 年報告了 1,075 例，2011 年報告了 1,168 例。2014 年，報告的登革熱病例達 14,999 例，其中登革熱出血熱死亡佔 20 例。此外，報告了 19,723 例登革熱病例，包括 2015 年登革熱共有 112 人死亡。

有效預防和控制登革熱需要每位公民和所有政府機構的協調努力，減少充水容器的數量和消除病媒蚊繁殖地。然而，高雄市的下水道系統建成，將房屋前面和後面的溝渠的下水道水分分離會促進向量生長。在旱季，清澈，停滯的水成為隱藏的大型病媒蚊繁殖地，促進登革熱傳播。2014 年，疾病控制人員大膽的實施了“都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫”。截至 2014 年 12 月 31 日，在 43 個村落實施“都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫”，海水誘發的溝渠總長 38291 米。實驗監測和持續再檢查活動的統計分析發現，只有實用鹽度單位 (PSU) 為 15 及以上的海水才能有效阻止幼蟲的生長。目前，我們將在旱季每年繼續實施海水侵入項目。

雖然高雄市政府在控制和預防登革熱方面積累了超過 15 年的經驗，但氣候變化仍然面臨著新的公共衛生挑戰。因此，控制和預防登革熱將變得越來越具有挑戰性。重要的是在可持續環境管理的概念與打擊傳染病的實踐之間找到良好的平衡，確保公民的健康和福祉，同時確保大多數公

眾的支持，公認和自願合作。

### 13.Applications of ovi-trap and auto-dissemination of pyriproxyfen to control cryptic source of Dengue vectors (Prof. Kun-Hsien Tsai)

登革熱病媒蚊控制由於針對幼蟲和成蟲的困難且複雜化。孑孓幼蟲被分散到各種小的棲息地，包括人工和天然水容器，而成年斑蚊蚊子由於其晝夜行為，休息地點和叮咬模式而難以捕獲。除了來源減少，目前總量控制策略依賴於使用化學農藥，其很可能在病媒蚊群體中誘導出其抗藥性。百利普芬（PPF）是一種常規的蚊蟲藥，對蚊子的保幼激素系統具有獨特的作用模式，迄今為止在蚊子中沒有殺蟲劑抗性的記錄。這項研究利用了伊蚊蚊子產卵行為的性質，在其休息地點自動傳播 PPF，通過將成年母蚊曝露於 PPF 到下一個育種源頭，並最終殺死幼蟲和蛹。在實驗室測試中，首先通過使用發光粉末試劑盒證實 PPF 顆粒粘附到蚊子並攜帶的能力。在自動擴散效應的模擬中，我們使用 UPLS-MS-MS 定量蚊子攜帶的 PPF 的劑量，並通過生物測定分析成熟蚊子出現的抑制(IE%)。結果顯示，雌性埃及斑蚊。在濾紙上暴露於 18.3mg / m<sup>2</sup> 的活性成分後，埃及斑蚊可以攜帶並將 0.04~0.27ng 的 PPF 擴散到 25ml 的水中 1 小時。IE% 為 90±0.73%。在田間試驗中，選擇高雄 2 個地區的 5 個里（4 個實驗組和 1 個對照組）進行研究。將含 PPF 的容器置於 20 個位置，選擇另外 100 個位點用於效果觀察。在研究 1 個月後，20% 的回收水樣品顯示 IE% > 50，PPF 的濃度為 9.5-10.83ng / L。我們的結果證明了使用 PPF 達到未知的繁殖來源和控制隱藏的斑蚊群體的可行性。從這個提案項目得到的方法可以與當前的“綜合媒介管理”相互結合，以幫助打擊登革熱。

### 14.Genetically Modified Mosquitoes: An alternative way for Dengue Fever Prevention(Prof. Chun-Hong Chen)

世界衛生組織估計全世界每年登革熱感染的發病率為 5 000 萬例。與其他媒介傳播疾病相比，只有每年導致超過一百萬人死亡的瘧疾的發病率高於登革熱感染的發病率。在過去十年中，許多研究人員集中在轉基因蚊子的發展，用於替代的病媒蚊控制策略，主旨在減少蚊子過度或防止病原體的傳播。轉基因方法通過操縱昆蟲媒介種群的基因組創造了預防傳染病的新機會。全球登革熱的主要載體，通過在埃及斑蚊的基因組中，整合抗病原體效應基因，在臺灣國家衛生研究所 (NHRI) 的研究小組已經開發了轉基因蚊子的菌株，其中 DENV-1, -2, -3 和 -4 通過基於 RNA 干擾的機制被阻止。我們將進一步優化抗病原體效應基因以標靶對向這些 DENV 血清型和屈公病毒 (CHIKV) 中的基因組序列。我們研究的總體目標是通過利用遺傳工程的方式，易受疾病影響的的蚊子替代野生的蚊子，易受感染的蚊子群體來預防登革熱和屈公病。實施我們的人口替代策略的一個重要步驟是開發和適應基因驅動系統 (Medea)，其驅動抗病原體基因的遺傳，維持 100% 的易受疾病影響的表現型的頻率來替換蚊子群體。我們提出的研究結果將減少全世界威脅國家中病媒蚊傳播疾病的威脅，並在全球範圍內對公共衛生產生積極影響。

#### 15. Discovery of antivirals and drug targets against dengue virus infection (Director Jin-Ching Lee)

登革熱病毒 (DENV) 感染引起登革熱 (DF)，登革熱出血熱 (DHF) 和登革熱休克症候群 (DSS)。每年約有 4 億人感染 DENV，跨越約 100 個熱帶和亞熱帶地區的國家，每年導致 50 萬人死亡。到目前為止，仍然沒有批准的藥物或針對 DENV 感染的四種血清型的有效疫苗。因此，我們的目標是發現新的標靶藥物並開發平台來篩選天然產物及合成小分子的抗病毒藥物。在本研究中，我們建立了基於細胞的報告系統來測量 DENV 蛋白酶和聚合酶活性。基於這些報告系統，我們通過靶向病毒蛋白鑑定

了兩種具有抗 DENV 活性的特異性小分子。此外，我們發現誘導細胞血紅素加氧酶-1 (HO-1) 和抑制環氧合酶-2 (COX-2) 可以有效抑制 DENV 複製。HO-1 代謝物轉運蛋白靶向 DENV 蛋白酶並誘導抗病毒干擾素反應。COX-2 代謝物前列腺素 E2 通過增強病毒聚合酶活性來促進病毒複製。兩種細胞基因都可以作為潛在的藥物靶點。最後，我們確定化合物 L(compound L)，HO-1 誘導劑和 GSE，COX-2 抑制劑，作為有希望的抗病毒體外 DENV 感染和 DENV 感染的 ICR 吸吮小鼠模型。

#### 16.Evaluation of host factors as a potential biomarker for Dengue diagnosis and Detection of dengue virus in blood products(Prof. Li-Teh Liu)

##### (1) 用於登革診斷評估宿主因子的潛在生物標誌

據估計，登革熱影響全球 128 多個國家，約有五分之二的世界人口面臨登革熱病毒感染的風險。嚴重的登革熱病，出血熱和(或)休克常常發生在發熱的症狀結束時。登革熱的最初症狀與大多數常見的發熱性疾病非常相似，因此對登革熱做出正確診斷是一項具有挑戰性的任務。登革熱的感染時間和準確診斷在患者治療和恢復中變得非常關鍵。目前，登革熱快速檢測有許多種類;然而，總靈敏度為約 65-85%。因此，迫切需要開發高靈敏度和用於登革熱的特異性診斷試劑盒。由於在受不同病毒感染的受試者中看到的獨特的臨床表現，顯示獨特的宿主因子可以被特定病毒誘導。在來自急性登革熱患者的血清中的蛋白質組學方法的初步研究顯示，在登革熱患者的血清中唯一觀察到幾個因子，例如免疫球蛋白  $\lambda$ 1 輕鏈，突變體 NADH-細胞色素 b5 還原酶，PR1，C4A3，鏈 F，複合物中的 C3b 具有 C3b 特異性 Fab。在這個特定的報告中，我們專注於宿主因子 PR1。比較來自其他發熱性疾病，健康個體和來自受感染的 Vero 和骨髓細胞的上清液標本，我們發現 PR1 在登革熱患者的血清中通過蛋白質轉漬法(Western blot)明顯表現。為了進一步確認，建立了 ELISA

鹼基檢驗。將動力學樣品進行 ELISA 測定。結果顯示，血清中 PR1 的最高量是在發熱後第 5 天和第 6 天。然而，我們還觀察到健康檢體血清中的 PR1。問題分析發現有 PR1 的五種亞型，用於 PR1 的蛋白質轉漬法(Western blot)中的抗體是與 ELISA 中使用的抗體不同的同種型。因此，在 ELISA 測定中 PR1 的抗體特異性需要精細調節。同時，我們將探討其他宿主因素，以進一步評估登革熱疾病的診斷潛力。

## (2) 對於血液製品中登革熱病毒的檢測

2015 年台灣有登革熱 43784 例，是歷史上一年內登革熱最多的個案。據估計，50-85% 的登革熱病毒感染是無症狀的感染。顯示這些無症狀的登革熱病毒感染人比登革熱病例發熱時更有助於登革熱病毒傳播。重要的是要了解在台灣登革熱流行季節來自捐贈者的血液樣本中是否存在登革熱病毒，因已報導了許多輸血傳播的登革熱病例和來自“健康”提供者的血液樣本中存在登革熱病毒基因組 (0.01-0.4%)。我們計劃通過使用 NS1 快速診斷試劑盒和 RT-PCR 來檢測登革熱病毒是否存在於來自提供者的血液樣本中。將對 8000 個血液樣本進行登革熱病毒的存在分析。在這些血樣中，台南血液中心收集了 4000 份樣本，2015 年 9 月至 11 月，則由台灣血液服務基金會的高雄血液中心收集了 4000 份樣本。

## (平台二) 蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

本中心目標為建立登革熱標準檢驗實驗室，以及協助其他子計劃之執行、防疫檢驗量能推廣，因正遇登革熱疫情爆發及國際新興傳染病-茲卡病毒感染的威脅；除原先目標外，更致力於流行病學探討及發展其他病毒篩檢，唯登革熱疫情一旦爆發，檢體量是日以倍計增加，以致檢驗人力不足，計劃預算並未支援自動化檢驗儀器等儀器設備費添購實屬可惜，若能擁有

較快速之自動化檢驗儀器可更加節省人力及資源，提供更多即時防疫與臨床資訊。

## 九、重要研究成果及具體建議

### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

PR1 可以被預期作為登革熱患者的生物標誌。當確認 PR1 何種 Isoform 會專一性表現在登革熱患者體內後，我們未來也可以了解 PR1 在不顯性感感染者的表現，除了診斷外也可以對登革熱傳播有一定的預防功效。

### (子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感感染者在疾病傳播所扮演之角色

對於登革病毒的宿主細胞的來源仍是有很多不同的想法，已周邊血幹細胞的角度看待登革病毒感染的情形，是在目前登革熱領域上一個創新的概念。最近的期刊發現因登革熱致死的病患，其骨髓內帶有的登革病毒的濃度比周邊血要高，顯示登革病毒會至骨髓中生存。骨髓細胞已知是周邊血免疫細胞的前驅細胞，所以在一些登革病毒體內都會看到血小板或是嗜鹼性球的表現會降低，可能跟骨髓細胞受到登革病毒感染所影響，造成周邊血球細胞的平衡失衡導致後續在登革熱病患在臨床上觀察到的一些免疫失控的狀況。體外登革病毒的結構已被解析多年，然而對於體內的登革病毒的結構，因受限於很難測量登革熱病患體內的病毒含量，而遲未有更進一步的分析，隨著技術的進步，我們的研究團隊首先了解到登革熱病毒體內的病毒顆粒的狀態有別於體外用來製造疫苗的病毒型態，這要的發現將可以解釋為何疫苗的保護力效果不盡理想。

### (子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探--某醫學中心 照護病例對照研究

計畫執行成果與原計畫規劃具高度一致性，以台灣地區人口學資料所分析出，具胃潰瘍、十二指腸潰瘍、糖尿病、鬱血性心衰竭、末期腎病及慢性腎衰竭等疾病史之群眾，易罹患登革熱重症之危險性比其他不具上述疾病史的人為高，在控制可能的干擾因素後，登革熱患者惡化成登革熱重症的危險因素，曾經罹患十二指腸潰瘍的患者是無相關病史患者的 4.89 倍(95%信賴區間為 1.55-20.55)，而曾經罹患慢性腎衰竭的患者是無相關病史患者的 4.04 倍(95%信賴區間為 1.64-14.61)。這顯示曾罹患十二指腸潰瘍與慢性腎衰竭疾病的患者，在感染登革熱後具有較高危險性轉變成登革熱重症。

本研究之成果將可為台灣地區醫護人員未來在收治具上述疾病史之登革熱患者時，在提供臨床醫療照護時能夠給予更多的關心與警覺，並在臨床上對於此類重症病患能有進一步的預警及適當的臨床處置。

### (子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

1. 高雄市每年均有一個登革熱週期性或約每四年會有一個週期性流行在統計學上均呈現有意義。
2. 最低溫的提升對於登革熱的發生率有 2-3 個月的延遲月數效應(正面效應)及雨量提升則有 1-2 個月延遲月數(負面效應)。
3. 2014 年登革熱發生率相較於 2002 年而言，在氣爆後 5 週至 22 週增加了 2.0 至 8.0 倍，氣爆區與鄰近氣爆區登革熱的發生率有顯著相關係數達( $r_s = 0.956, P < 0.001$ )。如此訊息告訴我們在氣爆後的 5 週開始登革熱就會上升了，故若是有類似事件發生時，這事發後的 5 週是關鍵的時刻，應該

善用此段時間盡量減少孳生源，降低登革熱傳播的機會。

4. 比較參考年份(2000 to 2014 年資料，但去掉 2002 及 2014 年，計 13 個年份)相比較，最低溫、雨量及氣爆事件解釋了 2014 年的 75.1% 變異量。
5. 而四月份”每日最低溫的月平均值”為 22°C，此點可推測該年高市有登革熱的大流行機會較高。且因四月份最低溫度上升和孳生源增加與登革熱大流行有關係，因此在登革熱流行期的前幾個月左右，進行登革熱孳生源的清除動作，舉如提早到每年的 3-4 月進行，如此對登革熱防治較能發揮功效，若是等到七月份登革熱流行時再開始做孳生源的清除已較慢。
6. 最低溫及雨量會影響到環境因素而加速登革熱傳遞，意外事件如氣爆事件與氣候及其對人蚊的動態交互作用造成的影響，在登革熱防治上不應忽略。

#### 7. 問卷研究方面

1) 對於登革熱病人發燒頭痛應使用普拿疼退燒，此觀念應

多多宣導，避免在登革熱發燒病患使用非類固醇性消炎藥。

2) 此區域看診醫師對登革熱的敏感度已提高，延遲診斷的比例顯著減少，此部分推測與登革熱快篩試劑廣泛使用，及在大量登革熱個案出現時民眾與醫師會有相當的警覺性有關，建議應持續提供登革熱快篩試劑做為第一線診所或醫院輔助診斷工具。

8. 此研究的部份成果，已被scientific report雜誌接受。

**Chang K**, Chen CD, Shih CM, Lee TZ, Wu MT, Wu DC, Chen YH, Hung CH, Wu MC, Huang CC, Lee CH, Ho CK

Effects of Temperature, Rainfall and Petrochemical Gas Explosion on Dengue Incidence: Assessment of Time-

Lagging Effect and Excess Risk of Dengue Infection in a Principal Urban Epid

### (子計畫五) 重症登革熱之流行病學及免疫反應研究

1. 本國研究顯示年長者為登革熱死亡之高危險族群，與國外報告死亡個案多是年輕人及小孩有很大的不同，我們應結合南台灣的重症醫師從事本土登革熱重症的研究。我們建議台灣登革熱防疫措施應特別著重於高齡社區及養護之家。
2. 登革熱重症病人之死亡原因主要是登革熱所導致的休克及出血，且有極高的比率是在三日內快速死亡。臨床上對於登革熱病人出現休克或出血情形時應更積極處理，各加護病房也應將此類病人視為優先轉入個案，未來研究應嘗試建立重症登革熱的 bundle care，以期能增加這群病人的存活率。
3. 器官衰竭之綜合指標 SOFA 為登革熱重症極佳之預後指標，可供家屬和臨床醫師在做重要決策時參考。登革熱重症病人應以 SOFA 評估其器官衰竭情形，特別是心、肺、腦三個系統，與病人之預後有高度的相關。

### (子計畫六) 抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然藥物研發

本計畫成功建立了四種高通量藥物篩選系統，並且已利用其中兩種高通量篩選系統篩選出兩個有潛力的抗病毒藥物 compound L 及 GS。這兩種藥物對於登革病毒能夠有效的抑制其複製能力，並且在動物模式中進行生物安全、抑制登革病毒活性之相關測試後，有相當大的機率可以快速進入臨床階段的相關測試，並且快速地投入目前沒有有效藥物治療的登革病毒感染相關疾病之臨床治療以及運用，對於登革病毒日趨嚴重的台灣地區也可

以提供除了公衛管理以外另一個對付登革病毒之解決方案。此外為了提高此四種藥物的臨床應用價值，本計畫更初步建立了 AG129 登革感染出血小鼠模式，將來可進一步應用於藥物開發上。並且本實驗室也分析 NGS 數據並初步尋找到三個與登革病毒複製相關之 miRNA，期望將來能夠將這些結果應用於登革出血熱早期診斷上，讓出血熱病患能夠早期接受治療提高生存率。

### **(子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查**

在本研究中，進行高雄市兩個行政區血清陽性率調查，可用於將來選擇引進疫苗種類的依據。

我們針對計畫中所參與的志願者進行登革疫苗試驗的意願調查，發現於三民區中有 30 人與楠梓區中有 80 人願意參與登革疫苗試驗，年齡 20~70 歲不等，將來如果在高雄市要進行登革疫苗試驗，將可提供相關志願者的資訊。

### **(子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗**

1. 尋找到天然可以對抗登革病毒感染的中草藥-牛樟芝，為台灣特有的牛樟芝界定新的研究價值。
2. 雖然此模式是建立在具有免疫不全的小鼠體內，但在植入人體的幹細胞後，可以部份的回復免疫的功能。相較於現行的體外細胞培養方式，單純觀察細胞與病毒之間的感互作用，然而登革熱感染的擬人化小鼠模式，可以提供新的疫苗和藥物研發的臨床前導試驗，並確認安全性才能擴展到人體。

### (子計畫九)台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析

我們發現 2014 年台灣高雄地區流行之第一型登革病毒株可能源自印尼地區，其疫情延續至 2015 年中仍有零星病例；而 2015 年在台灣台南與高雄地區流行的第二型登革病毒株則可能由中國大陸傳入台灣，兩者皆為境外移入株。

再者，我們發現不論患者感染的型別為第一型或第二型登革病毒，或者其是否為次級感染，在感染並康復後的半年至九個月間仍可在血中偵測到一定濃度的抗登革病毒 IgG。此外，我們也發現了次級感染第二型登革病毒的患者在急性期的 IgG 與 IgM 皆顯著高於次級感染第一型登革病毒的患者，此一體液免疫反應在不同登革病毒型別感染者上的差異值得我們進一步探討。我們期望透過本研究可增進人們對於登革病毒在台灣地區的傳播模式、以及患者對於不同型別之登革病毒所產生免疫反應上之差異的了解，以做為未來相關醫療衛生單位針對登革熱疫情防治與控制之政策制訂上的重要參考資訊。

### (子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫

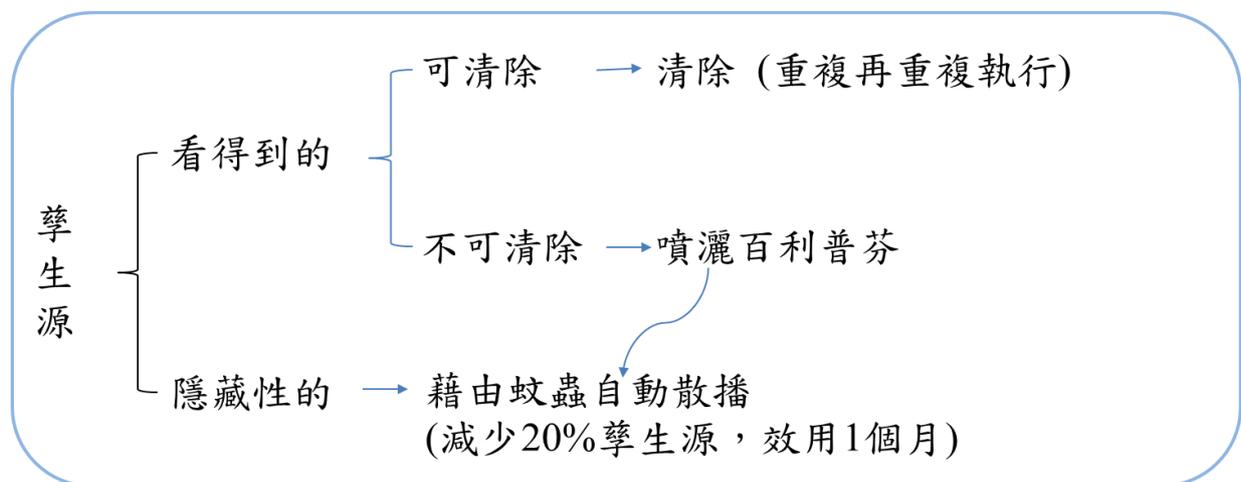
防治登革熱孳生最主要方法是避免積水及清除孳生源，水溝要避免積水的方法，除了注意水溝本身的洩水坡度外，亦需避免水溝內因日久遭外物碰撞所產生之凹洞；若無法改善水溝實體狀態，僅能透過定期清除水溝內淤積物及積水處，方是避免蚊蟲於水溝內大量孳生作法。

中央應動用國家資源成立衛教及研究等相關部門(如國家病媒蚊研究中心)，由專業講師負責衛教、研究人才負責研發及地方政府負責執行，透過各自專業分工及聯合作戰方式，方能打造熱帶地區最先進的防疫城市。

## (子計畫十一)應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的 斑蚊孳生源

為避免蚊蟲孳生，首要執行孳生源清除，清除肉眼可見、人類可以尋找到的孳生源，並重複操作，而無法清除的區域則應妥善管理。若是區域內已有定期全面性的執行孳生源清除但斑蚊數量還持續偏高，則可挑選適當地點（蚊蟲頻繁活動、喜愛棲息、陰暗潮濕處..等）範圍性的噴灑百利普芬，藉由蚊蟲自動散播以滅除該區域內的 20% 隱藏性孳生源，為期一個月。

硼酸誘殺桶整合誘殺成蚊、撲滅幼蟲及觀測蚊蟲密度等功能，建議可將放置在地下室、半開放區域等較少外力影響地點的傳統誘卵桶更換為硼酸誘卵桶，將可減少觀測誘卵桶所需的人力成本、工作時間且沒有孳生蚊蟲的疑慮。



圖、實務操作使用蚊蟲自動散播百利普芬技術以滅除隱藏性孳生源流程圖

## (子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究

### 重要研究成果

1. 登革熱病媒蚊成蚊比較常在住宅外面活動，但是高樓公寓的一樓與地下室也常見埃及斑蚊，第 5, 10, 15, 20 層與頂樓偶而也會捕獲病媒成蚊。
2. 住宅內外所捕獲的登革熱病媒蚊成蚊以埃及斑蚊居多，但此現象會因地域性與季節性變化而有所不同。例如：苓雅區正心里的埃及斑蚊明顯多於白線斑蚊，在調查期間所捕獲的數量比為 96:10；2015 年秋季楠梓區翠屏里所捕獲的埃及白線斑蚊的比例為 34:2，但是 2016 年夏季變成 1:31。
3. 在高雄市苓雅區正心里進行的病媒蚊空間分布調查與產卵習性調查結果相當一致，即成蚊比較常在住宅外面活動，也偏好產卵於住宅外的積水容器；但是也會進入室內，在客廳、廚房與臥室產卵，尤其在二月到五月調查期間均有埃及斑蚊與白線斑蚊進入客廳、廚房或臥室產卵。臺南市南區新興區、田寮里與文華里的調查結果與高雄市苓雅區正心里大致相同。
4. 高雄市苓雅區正心里的登革熱病媒蚊仍偏好以積水容器為幼蟲孳生地，只有極小的比例(0.3%)以水溝或下水道為棲地。

### 具體建議

1. 由於相對較多的登革熱病媒蚊成蚊在住宅外面被捕獲，尤其是夏季與秋季期間，意味著登革熱流行熱期戶外病媒蚊較多，因此在應減少在戶外被叮咬。
2. 登革熱病媒蚊除了在住宅外面活動，也會進入大樓地下室、不同樓層與屋頂樓頂，因此除了清除地面上的積水容器，也應注意各樓層，甚至於樓頂的積水容器或適合病媒蚊產卵孳生的環境。

3. 在冬季與春季期間，登革熱病媒蚊於住宅外面與公園樹叢中的數量雖然大幅降低，卻會進入室內吸血或產卵，所以應注意室內防範。
4. 登革熱病媒蚊基本上仍以積水容器為幼蟲孳生地，所以積水容器清除仍是撲滅病媒蚊的首要工作之一。

### (子計畫十三)建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略

1. 已確認 Wolbachia(wAlbB) 菌株能在實驗室內穩定繼代，同時也確認 Wolbachia(wAlbB) 能在實驗室埃及斑蚊族群內造成 Cytoplasmic incompatibility (細胞質不相容性)，並已建立該埃及斑蚊族群。
2. 已利用多軸無人飛行載具吊掛誘集器，於高雄市楠梓區翠屏里、三民區鼎泰里以及苓雅區正心里調查環境中病媒蚊分布。此外，已成功調整多軸無人飛行載具，可施作幼蟲生長抑制劑之噴灑。同時已建立多軸無人飛行載具施作之標準流程建立，以提供未來衛生局或環保局等相關單位實施之參考。

### (子計畫十四) 登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫

臺灣位處熱帶及亞熱帶區域，登革熱/茲卡非唯一威脅臺灣南部地區民眾健康疾病，爰建議動用國家資源培育多位熱帶疾病全方位講師人才，並專職負責巡迴於南臺灣地區(如臺南、高雄及屏東等)行政區里講授熱帶疾病相關資訊及防治方法，以提升南部地區民眾及政府部門對於熱帶疾病知能。

中央應動用國家資源成立衛教及研究等相關部門(如國家病媒蚊研究中心)，由專業講師負責衛教、研究人才負責研發及地方政府負責執行，透過各自專業分工及聯合作戰方式，由民眾、地方政府及中央政府等各單位動

員合作執行各項防疫工作，期望能將南台灣各縣市打造成最幸福健康的城市之一。

### (子計畫十五) 血液製品之登革病毒偵測調查

1. 確認我國在登革熱疫情期間的確可能有經攜帶登革病毒的病媒蚊叮咬的無登革熱症狀捐血者至捐血中心捐血，雖然登革病毒在捐血者血液中的盛行率可能因為檢驗樣本數量與使用技術的靈敏度不同而有高低的差異
2. 登革病毒在捐血者血液中的盛行率可能因為檢驗樣本數量與使用技術的靈敏度不同而有高低的差異，但本研究的結果應讓我們面對以往的猜測已經成為事實，接下來應進一步思考是否在登革熱疫情時期對血袋進行登革病毒的篩檢或是提出其他策略避免潛在的登革病毒無症狀感染者捐血，甚至是對其他與登革病毒具同樣病媒的病毒進行篩檢，例如茲卡病毒。

### (平台一)行政暨教育資源平台

針對第五屆登革熱國際研討會進行學員滿意度分析，其滿意度問卷內容請參考附錄 3，關於研討會的滿意度調查，以很好為 5 分、好為 4 分、普通為 3 分、需改進為 2 分、不理想為 1 分評估結果，參與人員對這場研討會有將近九成以上覺得好，結果請參考表 1。另外，有少數意見針對會場的環境、研討會舉辦的時間、訊息公布、講題多樣化、建議能用中文演講等方面希望再做改進，這些意見能做為將來再次舉辦研討會時，於籌備過程中多加留意並改進的部分。

## (平台二) 蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

建立標準檢驗流程，含病毒之核酸檢測分析(Real-Time RT-PCR)、抗體檢測及快篩試劑檢測標準作業流程，茲卡病毒、屈公病毒標準檢驗流程，2015 年登革熱檢驗收檢量為 3894 例，陽性 1985 例(50.98%)、陰性 1904 例(48.90%)、未確定 5 例(0.13%)、105 年至 10 月份收檢量為 407 例，陽性 36 例(8.85%)、陰性 361 例(88.70%)、未確定 10 例(2.46%)。本計畫並執行 2015-2016 年高雄市登革熱爆發之陽性檢體回溯性病毒型別分析目前進度為 583 例(27.46%)，Real-Time RT PCR 確認結果陰性為 94 例(16.12%)、第一型 43 例(7.38%)、第二型 442 例(75.81%)、第三型 4 例(0.69%)。

## 十、計畫成果自評

### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

本計畫找尋到的 PR1 有別於目前所認為與登革熱病程有相關的免疫反應因子或是上皮細胞受損因子，是一個嶄新由登革病毒刺激而產生的宿主蛋白分子，所以作為偵測登革熱患者具有潛在價值。

### (子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色

本計畫的研究成果有兩篇期刊已撰寫，登革熱病患體內病毒結構解析已投稿於 Scientific Reports: Infectious dengue vesicles derived from CD61+ cells in acute patient plasma exhibited a diaphanous appearance. Scientific Reports 5, Article number: 17990 (2015). 造血幹細胞或是前趨細胞可能是登革病毒的宿主細胞的期刊已進行審委的意見回覆。

### (子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探--某醫學中心 照護病例對照研究

本研究計畫執行成果與原計畫規劃具高度一致性，以高雄地區某醫學中心之登革熱患者資料分析顯示，具有胃潰瘍、十二指腸潰瘍、糖尿病、鬱血性心衰竭、末期腎病及慢性腎衰竭等疾病史之登革熱患者，可能較易轉變成登革熱重症，未來台灣地區醫護人員在治療照護具有上述病史之登革熱患者時，應提供更多的關心與警覺。

本研究未來將投稿到學術期刊，將可提供其他研究人員在進行登革熱重症研究時重要的參考，台灣的疾病管制署亦可將此研究結果，提供給台灣醫護人員在臨床照護登革熱患者時作為參考。

### (子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

此研究的優勢是

1. 提供了長期詳細的(2000 到 2014 年)資料分析，強調氣象學、蚊子及氣爆事件等因素在都會區形成登革熱大流行，對登革熱的發生率所產生的影響效應分析。
2. 此時間延遲效應包含了環境因子間的交互作用，本研究是以短周期如：月份與每週的資料來進行作分析，而非以年來做分析的。  
然而此研究仍有其限制，
  - a. 此為生態上關聯性的研究，無法提供感染個案者個人層次的因果推理評估。
  - b. 在非氣象學資料，如群體免疫力、病媒蚊防治措施的介入資料取得困難，這些因素所產生的干擾效應，在此研究中無法被控制。
  - c. 而在取得高雄市社區居民社經狀況資料部分，因高雄市的社經狀況如年收入，依 102 年高雄市家庭收支調查報告年刊取得資料，但公告資

料只有分 10 大區域，如區域二:左營區、三民區、鳥松區；區域三為小港區加前鎮區整體的資料，但無單一行政區的資料，如單獨小港區的年收入資料或是單獨前鎮區的資料，如此在分析上有困難。

3. 在問卷研究的設計上，個案來源以高雄市南區為主，若有機會和高雄其他區域如三民區進行比較，應可看出不同社經階層或不同區域對登革熱的認知是否有差異。

4. 此份研究部份成果已刊登在 Scientific report . 2016 Oct 13;6:35028.

可讓國際上有興趣的學者專家作參考。

#### (子計畫五) 重症登革熱之流行病學及免疫反應研究

我們在第一部份「回溯性世代研究」有不錯的成果，如上述說明。至於第二部份「前瞻性世代研究」，因今年本院尚無任何登革熱重症病人住院至加護病房故無法進行，研究經費亦未有任何動支。

高雄地區幾乎每年或多或少都會有登革熱重症病患，我們結合高雄市主要醫院的內科加護病房重症醫師，預定前瞻性、有計劃性的收集這些個案的臨床資訊和檢體，希望能更加瞭解這個疾病，預期除了能改善台灣本地的登革熱重症病人的照護水準，亦能對其他國家地區的登革熱照護做出貢獻。今年因為沒有登革熱重症病人，尚無法測試 Kaohsiung Severe Dengue Consortium (KSDC) 的收案能力，但多中心的前瞻性流行病學研究有其挑戰性，一般要在計劃經費有能力聘請多名助理的情況下才容易完成。未來若能順利申請到相關經費我們會持續在登革熱重症的臨床及研究上努力。

## (子計畫六)抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然藥物研發

原計畫規劃為：

1. 透過次世代定序(next generation sequencing, NGS)篩選具潛力之抗病毒基因以及微型核糖核酸(micro RNA, miRNA)以作為未來抗病毒藥物篩選之標的。
2. 建立高通量篩選第一型血紅素氧化酶(heme oxygenase-1, HO-1)促效劑之篩選平台並篩選 HO-1 促效劑。
3. 建立高通量篩選第二型環氧化酶(cyclooxygenase-2, COX-2)抑制劑之篩選平台並篩選 COX-2 抑制劑。
4. 建立高通量抗登革病毒蛋白藥物篩選平台以篩選直接抗病毒藥物(direct antiviral agents, DAAs)。
5. 於登革小鼠感染模式評估篩選出之抗病毒藥物效果。

本計畫結果：

發現 HO-1 inducer (Compound L)、COX-2 inhibitor (GS)、登革病毒蛋白酶 inhibitor (Compound 21)及聚合酶 inhibitor (Compound 17)各一，並且皆於細胞及小鼠實驗模式確認其具有抑制登革病毒活性，而 NGS 分析與假陽性確認也持續進行中，並初步發現了三個 miRNA 與病毒複製相關。此外本計畫更額外建立了 AG129 登革出血小鼠模式，預期將來能投入測試新藥是否可用於治療登革出血熱。總體而言，計畫執行結果與原計畫規劃一致，甚至額外建立一個動物平台。

## (子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查

這一年多期間，收集共 836 支血清，收案人數達到 709 人(初次採血)，進行登革抗體 IgG 檢驗，三民區初次採血登革抗體 IgG 陽性率 6.34%

(23/363)，楠梓區初次採血登革抗體 IgG 陽性率 3.76% (13/346)，陽性檢體寄往夏威夷進行中和試驗，目前仍在進行中。

對於民眾感染登革熱的認知，兩區中有 30% 以上的比率，不知道自己罹患過登革熱，除去不顯性感染或無症狀感染，民眾對於發燒或登革熱其他症狀(起疹、噁心嘔吐、頭痛..等)的警覺心不夠，易造成防疫漏洞。

本計畫收集了願意參與登革疫苗臨床試驗之志願者，在將來開始進行疫苗試驗時，可提供這方面的資訊當作臨床試驗對象參考。

#### **(子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗**

本次計畫的研究成果可以延伸新的研究計畫，探討牛樟芝抑制登革病毒的機致和實際的應用層面辨識登革病毒感染的擬人化小鼠在轉譯醫學應用。此外發現登革病毒會長期於擬人化小鼠體內複製，暗示登革病毒在自然界存在的長期潛伏的現象。所以將可以討論登革病毒長期潛伏的可能性。

#### **(子計畫九) 台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析**

本計畫之研究成果提供了分子流行病學上的證據，可協助我們了解 2014 年及 2015 年於台灣南部地區爆發之登革病毒株其來源與傳播途徑，以作為衛生相關單位制訂防治策略的重要參考資訊。此外，我們也發現登革熱患者其急性期間的體液免疫反應會隨著所感染之登革病毒型別不同，及其為初級或次級感染狀態的不同而產生差異。此結果不僅是過去研究者較少著重之處，同時也具有作為疾病鑑別及治療策略擬定等面向之參考的潛力，值得進一步深入研究。綜上所述，本計畫之執行成果應符合預期成效。

### (子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫

本計畫已階段性知海水引流約有 5~7 天有其防治效果，其防治時效最長為清水與有機磷劑或海水與有機磷劑，其次是粗鹽、海水與生物製劑、清水與生物製劑，最短則為海水；本局將賡續執行相關登革熱防治研究，期望能透過各種方式防治登革熱病媒蚊孳生。

### (子計畫十一) 應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的斑蚊孳生源

本研究團隊先行使用螢光粉 (*Luminous Powder Kit*) 確認蚊蟲具有黏附攜帶百利普芬顆粒的能力，再進行百利普芬對蚊成蟲生殖力、模擬自動傳播等試驗，實驗室模擬結果顯示：蚊蟲確實會攜帶百利普芬至水體並造成水內蚊幼蟲成功羽化率低。隨後應用到戶外實地試驗，經由多次收樣觀測發現：在噴灑百利普芬一個月內可以滅除環境周遭 20% 的隱藏性孳生源。藉由 UPLC-MS-MS 微量分析技術成功量測單隻蚊蟲可攜帶 0.04-0.27 ng 的百利普芬至 25 ml 的水體並定量野外樣本內的百利普芬劑量 (9.5-10.83 ng/L)。

硼酸誘殺桶整合多項特點 (觀測環境蚊蟲密度、誘殺成蚊、撲滅幼蟲..等)，在沒有其他因素干擾的情況下不會形成孳生源，可以取代傳統誘卵桶使用。

總結以上：本研究團隊根據長期百利普芬野外試驗經驗撰寫標準作業流程，並且開發測試新興誘卵誘殺桶，可直接提供給衛生單位實務操作使用，其應用難度低、易於推廣、效果顯著、可望解決現階段所面對的隱藏性孳生源問題。

### (子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究

1. 依計劃規劃依序完成各項工作。
2. 相關成果已先在 10 月 23-24 日的第五屆國際登革熱研討會發表。
3. 目前所彙整的結果，除了寫成期末報告，也將於近期內發表於國際相關知名期刊。
4. 本計劃設計之複合式產卵誘集器在實驗室內的測試效果良好，具有田間大量推廣使用潛力。

### (子計畫十三) 建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略

本計畫已完成能造成細胞質不相容性之 *Wolbachia* wAlbB 菌株的埃及斑蚊，順利與國際接軌，同時，已開發完成液態藥劑灑佈機與粒狀粉狀灑佈機之設計、測試飛行與投藥，並完成多軸機防治登革熱病媒蚊灑佈標準作業規劃，皆已達成預計目標。

### (子計畫十四) 登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫

本計畫已階段性完成衛教專業講師的培訓，並將客製化組裝課程數位電子化，提供本市市民下載閱讀，同時亦完成計畫所訂之落實公權力及衛教場次目標，本局將廣續執行相關防疫作為及衛教宣導，以提升高雄市全體市民防疫知能，動員全市力量抵禦熱帶疾病的威脅，創造最美好的城市。

### (子計畫十五) 血液製品之登革病毒偵測調查

本計畫雖然尚未將預定的 8000 個血液樣本分析完畢，但執行至今已經發現有登革病毒 RNA 陽性血袋以及登革病毒 IgM 陽性血袋，顯示部分無登革熱症狀的病毒感染者會至捐血中心捐血，希望這些結果可以得到相關

單位的重視，擬定相關策略來避免或降低潛在的登革病毒無症狀感染者捐血可能導致的輸血傳染登革熱或其他共同蟲媒疾病，例如茲卡病毒。

### (平台一)行政暨教育資源平台

計畫管考注意事項提及應辦理至少 2 場學術活動(國內外學術研討會或成果發表會)，本平台一於 104 年 11 月 26 日至索羅門群島辦理登革熱國際研討會，並與 WHO 代表討論與報告疫情防治。且於 105 年 10 月 23 日~24 日於高雄蓮潭國際會館，舉辦第五屆登革熱國際研討會，邀請新加坡、馬來西亞及美國，4 位外賓蒞臨學術交流，並舉辦子計畫成果發表，總計辦理兩場國際研討會，完成預訂目標。

### (平台二)蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

原定建立登革熱標準檢驗實驗室及推廣檢驗技術至海外目標均有達成，檢驗量能推廣部分由於疾病管制署也正大力推廣，本中心適時提供支援；流行病學研究部分因經費及人力限制，尚待更多經費以進一步完成，希望結果能提供防疫所需參考；其他病毒檢驗部分，由於已有登革熱檢驗實驗室創立經驗，因此茲卡病毒 Real-Time RT-PCR 檢驗已於今年度通過疾病管制署能力試驗，目前仍致力於完善的人員訓練機制以及標準品管流程的建立，日後與屈公病毒標準檢驗方法將申請全國認證基金會醫學實驗室認證並成為疾病管制署認可檢驗實驗室。

## 十一、可供推廣之研發成果資料表（附表一）

(子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探--某醫學中心

### 照護病例對照研究

可申請專利     可技術移轉

日期：105 年 11 月 10 日

<p><b>補助計畫</b></p>	<p>計畫名稱：2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探-某醫學中心照護病例對照研究 計畫主持人：楊俊毓 計畫編號：MOHW104-CDC-C-114-114901 學門領域：流行病學</p>
<p><b>技術/創作名稱</b></p>	<p>醫療照護</p>
<p><b>發明人/創作人</b></p>	<p>楊俊毓</p>
<p><b>技術說明</b></p>	<p>中文： 具胃潰瘍、十二指腸潰瘍、糖尿病、鬱血性心衰竭、末期腎病及慢性腎衰竭等疾病史之群眾，易罹患登革熱重症之危險性較高。</p>
	<p>英文： Patients with gastric ulcer, duodenal ulcer, diabetes, congestive heart failure, end stage renal disease and chronic renal failure and other disease history of the masses, susceptible to high risk of dengue fever.</p>
<p><b>可利用之產業 及 可開發之產品</b></p>	<p>醫療照護業。</p>
<p><b>技術特點</b></p>	<p>易罹患登革熱重症之疾病史危險因子。</p>
<p><b>推廣及運用的價值</b></p>	<p>本研究成果未來將投稿到學術期刊，將可提供其他研究人員在進行登革熱重症研究時重要的參考，台灣的疾病管制署亦可將此研究結果，提供給台灣醫護人員在臨床照護登革熱患者時作為參考。</p>

### (子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

可申請專利

可技術移轉

日期：105 年 11 月 1 日

<b>補助計畫</b>	計畫名稱：103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析 計畫主持人：張科 計畫編號： MOHW104-CDC-C-114901  學門領域：生物醫學領域
<b>技術/創作名稱</b>	以 GEE 方式分析氣候因素、氣爆因素及布氏指數對登革熱發生率的影響
<b>發明人/創作人</b>	張科
<b>技術說明</b>	<p>中文：</p> <p>我們將溫度、濕度、雨量、布氏指數、氣爆等因素置入廣義估計方程式時間延遲的卜瓦松迴歸分析 (Generalized estimating equations with lagged-time Poisson regression)。發現最低溫的提升對於登革熱的發生率有 2-3 個月的延遲效應(正面效應)及雨量提升則有 1-2 個月延遲效應(負面效應)。2014 年登革熱發生率相較於 2002 年而言，在氣爆後 5 週至 22 週增加了 2.0 至 8.0 倍，氣爆區與鄰近氣爆區登革熱的發生率有顯著相關係數達統計上意義(<math>r_s = 0.956</math>, <math>P &lt; 0.001</math>)。與參考年份(2000 to 2014 年資料，但去掉 2002 及 2014 年，計 13 個年份)相比較，最低溫、雨量及氣爆事件解釋了 2014 年的 75.1%變異量。此統計方式模式的運用之特殊處理經驗，除了能作為國內參考，對於國外類似災害事件也有參考價值。最低溫及雨量相關於早期、鄰近環境加速登革熱傳遞，意外事件如氣爆事件與氣候及其對人蚊的動態交互作用在登革熱防治不應忽略。</p> <p>(100~500 字)</p>

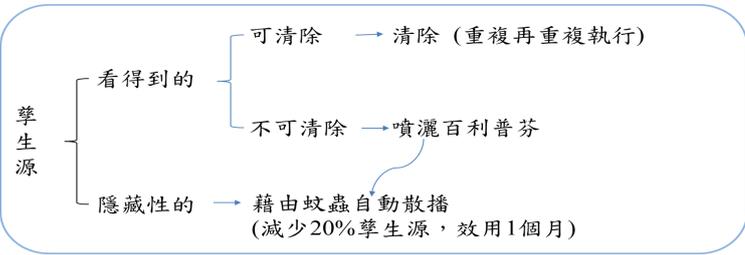
	<p>英文： Weather factors combined with an accidental petrochemical gas explosion (PGE) may affect mosquito–human dynamics in 2014. Generalized estimating equations with lagged-time Poisson regression analyses were used to evaluate the effect of meteorological/mosquito parameters and PGE on dengue incidences (2000–2014) in Kaohsiung. Increased minimum temperatures rendered a 2- and 3-month lagging interactive effect on higher dengue risks, and higher rainfall exhibited a 1- and 2-month lagging interplay effect on lower risks (interaction, <math>P \leq 0.001</math>). The dengue risk was significantly higher than that in a large-scale outbreak year (2002) from week 5 after PGE accident in 2014 (2.8–8.0-fold for weeks 5–22). The greatest cross-correlation of dengue incidences in the PGE-affected and PGE-neighboring districts was identified at weeks 1 after the PGE (<math>r_s = 0.956</math>, <math>P &lt; 0.001</math>). Compared with the reference years, the combined effect of minimum temperature, rainfall, and PGE accounted for 75.1% of excess dengue risk in 2014. In conclusion, time-lagging interplay effects from minimum temperature and rainfall may be respectively associated with early and near environments facilitating dengue transmission. Events that interact with weather and influence mosquito–human dynamics, such as PGEs, should not be ignored in dengue prevention and control.</p>
<p>可利用之產業 及 可開發之產品</p>	<p>此文章所描述的統計模式，可運用在其他國家或本國其他城市。</p>
<p>技術特點</p>	<p>利用統計模式去估算氣候因子與登革熱之間的關聯性</p>
<p>推廣及運用的價值</p>	<p>此文章所描述的統計模式，可運用在其他國家或本國其他城市或類似的情境。</p>

**(子計畫十一)應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的  
斑蚊孳生源**

□ 可申請專利

▣ 可技術移轉

日期： 105 年 10 月 28 日

<p align="center"><b>補助計畫</b></p>	<p>計畫名稱：應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的斑蚊孳生源</p> <p>計畫主持人：蔡坤憲 副教授</p> <p>計畫編號：MOHW104-CDC-C-114-114901 學門領域：</p>
<p align="center"><b>技術/創作名稱</b></p>	<p>使用蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的孳生源</p>
<p align="center"><b>發明人/創作人</b></p>	<p>蔡坤憲</p>
<p align="center"><b>技術說明</b></p>	<p>中文：為避免蚊蟲孳生，首要執行孳生源清除，清除肉眼可見、人類可以尋找到的孳生源，並重複操作，而無法清除的區域則應妥善管理。若是區域內已有定期全面性的執行孳生源清除但斑蚊數量還持續偏高，則可挑選適當地點 (蚊蟲頻繁活動、喜愛棲息、陰暗潮濕處..等)範圍性的噴灑百利普芬，藉由蚊蟲自動散播以滅除該區域內的 20% 隱藏性孳生源，為期一個月。</p> <p>圖、實務操作蚊蟲自動散播百利普芬滅除隱藏性孳生源流程圖</p>  <p align="center">( 100~500 字 )</p>
<p align="center"><b>可利用之產業 及 可開發之產品</b></p>	<p>全臺各地衛生單位</p>
<p align="center"><b>技術特點</b></p>	<p>應用難度低、易於推廣、效果顯著</p>
<p align="center"><b>推廣及運用的價值</b></p>	<p>解決實務蚊蟲防疫上所面對的隱藏性孳生源問題</p>

(子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究

可申請專利

可技術移轉

日期：105 年 10 月 30 日

<p><b>補助計畫</b></p>	<p>計畫名稱：台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究 計畫主持人：戴淑美 計畫編號：H105012 學門領域：</p>
<p><b>技術/創作名稱</b></p>	<p>複合式懷卵雌蚊誘集器</p>
<p><b>發明人/創作人</b></p>	<p>計畫團隊成員</p>
<p><b>技術說明</b></p>	<p>中文： 本複合式產卵誘集器融合懷卵雌蚊誘集與產卵誘集器概念，設計具有誘引病媒雌蚊進入產卵卻不易再飛出的病媒雌蚊誘集器。基本設計三項特點，一是誘卵桶蓋上的入口以直筒向下延伸或口徑逐漸縮小至外桶的一半高；二是在誘卵桶最上面約 1/5 以透光材質製作，以誤導產完卵或誤入的雌蚊，減少從入口在飛出的機率；三是在由底部往上約 1/4 高處，左右邊各鑽一小洞，讓下雨後過多的水可以流出。此複合式產卵誘集器在實驗室內的測試效果良好，具有田間大量推廣使用潛力。</p> <p>英文： A complex of adult mosquito trap and ovitrap has been designed for multiple functions, e.g. to catch and kill the gravid female vectors, to conduct mosquito surveillance. The basic design includes three features: (1) an tubular entrance from top of cap to the half height of the trap, (2) a transparent material was used for the upper part of trap (<math>\leq 1/5</math> height of trap) to attract the female vectors and reduce them flying out through the entrance, (3) two small holes located at 1/4 height of trap from bottom to allow excessive water flowing out after raining or storm. This complex has been tried in the lab with good performance that has potential to apply in the field.</p>
<p><b>可利用之產業 及 可開發之產品</b></p>	<p>登革熱病媒蚊成蚊誘殺與密度調查</p>
<p><b>技術特點</b></p>	<p>受誘引進入誘集器的的病媒雌蚊不易再飛出</p>
<p><b>推廣及運用的價值</b></p>	<p>田間登革熱病媒蚊成蚊誘殺與密度調查</p>

**(子計畫十三)建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略**

可申請專利

可技術移轉

日期：105年11月5日

<p><b>補助計畫</b></p>	<p>計畫名稱：建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略 計畫主持人：蕭信宏 計畫編號： MOHW104-CDC-C-114-114901 學門領域：</p>
<p><b>技術/創作名稱</b></p>	<p>利用高解析與多光譜偵測功能之多軸無人飛行載具進行都市生態系病媒孳生源偵測作業</p>
<p><b>發明人/創作人</b></p>	<p>林宗岐</p>
<p><b>技術說明</b></p>	<p>中文： 以多軸無人飛行器上之高解析影像與視傳系統及紅外線、多光譜儀與高光譜儀接收裝置於低空對大範圍孳生源進行偵察與監測，可解決都市生態系中複雜且不易處理病媒的孳生源環境的偵測監測。</p> <p>英文： The application of Unmanned Aerial Vehicle (UAV) with multispectral and hyperspectral receivers are significantly beneficial to the surveillance of the unreachable breeding sources of vectors and complicated urban ecosystem.</p>
<p><b>可利用之產業及可開發之產品</b></p>	<p>病媒蚊孳生源偵測及投藥</p>
<p><b>技術特點</b></p>	<p>使用多軸無人飛行器可協助人力不易處理之病媒蚊孳生偵測及投藥</p>
<p><b>推廣及運用的價值</b></p>	<p>可應用於病媒蚊幼蟲與成蟲的防治</p>

由於沒有研發新的技術及時間上的限制，因此剩餘子計畫尚未有可申請專利之技術或能技術轉移之成果。

## 十二、主要績效指標表（附表二）

### （子計畫一）快篩試劑研發及相關臨床試驗

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環境 建構(改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成	1									
C 博碩士培育										
D 研究報告	1									
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

**(子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色**

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環境 建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文	1 (國際研討會論文和口頭報告、期刊論文)									
B 研究團隊養成	1									
C 博碩士培育	1									
D 研究報告	2									
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

(子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探--某醫學中心

照護病例對照研究

計畫類別 \ 績效指標	1 學術研究	2 創新前瞻	3 技術發展 (開發)	4 系統發展 (開發)	5 政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	6 研發環境 建構 (改善)	7 人才培 育 (訓練)	8 研究計 畫管理	9 研究調 查	99 其他
A 論文										
B 研究團隊養成										
C 博碩士培育										
D 研究報告	1									
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										1

(子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環 境建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文	1									
B 研究團隊養成	1									
C 博碩士培育										
D 研究報告										
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動	1									
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

(子計畫五) 重症登革熱之流行病學及免疫反應研究

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環 境建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成	1									
C 博碩士培育										
D 研究報告	1									
E 辦理學術活動	1									
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果	1									
AA 決策依據	1									

(子計畫六)抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然

藥物研發

計畫類別	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環境 建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
績效指標										
A 論文	1									
B 研究團隊養成	1									
C 博碩士培育										
D 研究報告										
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

(子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環境 建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成										
C 博碩士培育										
D 研究報告	1									
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

**(子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗**

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環 境建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成	1									
C 博碩士培育	1									
D 研究報告										
E 辦理學術活動	1									
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

(子計畫九)台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展(開發)	系統發展(開發)	政策、法規、制度、規範、系統之規劃(制訂)	研發環境建構(改善)	人才培育(訓練)	研究計畫管理	研究調查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成	2									
C 博碩士培育										
D 研究報告	1									
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業							1			
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

(子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展(開發)	系統發展(開發)	政策、法規、制度、規範、系統之規劃(制訂)	研發環境建構(改善)	人才培育(訓練)	研究計畫管理	研究調查	其他 無
A 論文										
B 研究團隊養成										1
C 博碩士培育										
D 研究報告										1
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

(子計畫十一)應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的

斑蚊孳生源

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環境 建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成							1			
C 博碩士培育										
D 研究報告										
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動	1									
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業							1			
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

**(子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究**

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環 境建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成									<b>1</b>	
C 博碩士培育							<b>2</b>			
D 研究報告	<b>1</b>									
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

(子計畫十三)建立以立克次菌模式及多軸無人飛行載具之病媒蚊防治策略

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環 境建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成	3									
C 博碩士培育							5			
D 研究報告					1					
E 辦理學術活動	1									
F 形成教材					1					
G 專利										
H 技術報告					1					
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂					2					
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務					1					
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率					1					
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

(子計畫十四) 登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展(開發)	系統發展(開發)	政策、法規、制度、規範、系統之規劃(制訂)	研發環境建構(改善)	人才培育(訓練)	研究計畫管理	研究調查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成										1
C 博碩士培育										
D 研究報告										1
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

**(子計畫十五) 血液製品之登革病毒偵測調查**

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環 境建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成										
C 博碩士培育										
D 研究報告	2									
E 辦理學術活動										
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據	1									

(平台一)行政暨教育資源平台

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環 境建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成										
C 博碩士培育										
D 研究報告										
E 辦理學術活動								2		
F 形成教材										
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動										
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業								3		
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

(平台二) 蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、 制度、規範、 系統之規劃 (制訂)	研發環 境建構 (改善)	人才培 育 (訓練)	研究計 畫管理	研究調 查	其他
A 論文										
B 研究團隊養成	2									
C 博碩士培育										
D 研究報告										
E 辦理學術活動										
F 形成教材	1									
G 專利										
H 技術報告										
I 技術活動							4			
J 技術移轉										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提升我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測 技術服務										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
S 技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究										
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提升公共服務										
X 提高人民或業者收入										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

由於時間上的限制，因此發表論文篇數及研究報告未達原訂目標

### 十三、參考文獻

#### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

1. Pal, S., et al., Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples. PLoS One, 2014. 9(11): p. e113411.
2. Conroy, A.L., et al., Host biomarkers are associated with progression to dengue haemorrhagic fever: a nested case-control study. Int J Infect Dis, 2015. 40: p. 45-53.
3. Lambert, B., et al., Protein interactions of the transcription factor Hoxa1. BMC Dev Biol, 2012. 12: p. 29.
4. Kaczmarek, K., et al., Ccdc33, a predominantly testis-expressed gene, encodes a putative peroxisomal protein. Cytogenet Genome Res, 2009. 126(3): p. 243-52.
5. Hotta, S. and C.A. Evans, Cultivation of mouse-adapted dengue virus (type 1) in rhesus monkey tissue culture. J Infect Dis, 1956. 98(1): p. 88-97.
6. Shamim, M. and S.Z. Naqvi, Dengue fever associated with acute scrotal oedema: two case reports. J Pak Med Assoc, 2011. 61(6): p. 601-3.

#### (子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色

1. Zettel, C. and P. Kaufman, Yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. University of Florida, 2010.
2. Mohammed, H., et al., Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. Transfusion, 2008. 48(7): p. 1348-54.
3. Hsu, A.Y., et al., Infectious dengue vesicles derived from CD61+ cells in acute patient plasma exhibited a diaphanous appearance. Sci Rep, 2015. 5: p. 17990.

4. Villar, L., et al., Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med*, 2015. 372(2): p. 113-23.
5. Noisakran, S., et al., Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2009. 40(2): p. 253-62.
6. Chastel, C., Eventual role of asymptomatic cases of dengue for the introduction and spread of dengue viruses in non-endemic regions. *Front Physiol*, 2012. 3: p. 70.
7. Gubler, D.J., et al., Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull World Health Organ*, 1981. 59(4): p. 623-30.

(子計畫三) 2014 年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探—某醫學中心  
照護病例對照研究

1. World Health Organization (2002) Weekly epidemiological record. World Health Organization.
2. Vijayakumar TS, Chandy S, Sathish N, Abraham M, Abraham P, et al. (2005) Is dengue emerging as a major public health problem? *Indian J Med Res* 121: 100–107.
3. WHO (1997) Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention, and control. Geneva: World Health Organization.
4. Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, et al. (2006) The WHO dengue classification and case definitions: Time for a reassessment? *The Lancet* 368: 170–173.
5. Phuong CXT, Nhan NT, Kneen R, Thuy PT, van Thien C, et al. (2004) Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the World Health Organization classification system helpful? *Am J Trop Med Hyg* 70: 172–179.

6. Balmaseda A, Hammond SN, Perez MA, Cuadra R, Solano S, et al. (2005) Assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 73: 1059–1062.
7. Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A (2006) Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health* 11: 1238–1255.
8. Rigau-Perez JG (2006) Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis* 6: 297–302.
9. Kabra SK, Jain Y, Pandey RM, Madhulika, Singhal T, et al. (1999) Dengue haemorrhagic fever in children in the 1996 Delhi epidemic. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 93: 294–298.
10. Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, et al. (2011) Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Trop Med Int Health*. May 30, 2011.
11. WHO (2009) Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Third edition. Geneva: World Health Organization.
12. Harris E, Videz E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, et al. (2000) Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 63: 5–11.
13. Balmaseda A, Hammond S, Pe´rez L, Tellez Y, Saboria S, et al. (2006) Serotypespecific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg* 74: 449–456.
14. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, et al. (2000) Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181: 2–9.
15. Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Thisyakorn U, et

- al. (2003) Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg* 68: 191–202.
16. Beatty ME, Stone A, Fitzsimons DW, Hanna JN, Lam SK, Vong S, Guzman MG, Mendez-Galvan JF, Halstead SB, Letson GW, Kuritsky J, Mahoney R, Margolis HS. Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards Surveillance Working Group. Best practices in dengue surveillance: a report from the Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e890.
  17. Viennet E, Ritchie SA, Faddy HM, Williams CR, Harley D. Epidemiology of dengue in a high-income country: a case study in Queensland Australia. *Parasit Vectors*. 2014;7:379.
  18. Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, et al. (2011) Dengue—how best to classify it. *Clin Infect Dis* 53: 563–567.
  19. Barniol J, Gaczkowski R, Barbato EV, da Cunha RV, Salgado D, Martínez E, Segarra CS, Pleites Sandoval EB, Mishra A, Laksono IS, Lum LC, Martínez JG, Balsameda A, Allende I, Ramírez G, Dimaano E, Thomacheck K, Akbar NA, Ooi EE, Villegas E, Hien TT, Farrar J, Horstick O, Kroeger A, Jaenisch T. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC Infect Dis*. 2011;11:106.
  20. Horstick O, Jaenisch T, Martinez E, Kroeger A, See LL, Farrar J, Ranzinger SR. Comparing the usefulness of the 1997 and 2009 WHO dengue case classification: a systematic literature review. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91(3):621–34.
  21. Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, Harris E. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(11):e1397

22. Horstick O, Farrar J, Lum L, Martinez E, San Martin JL, Ehrenberg J, Velayudhan R, Kroeger A. Reviewing the development, evidence base, and application of the revised dengue case classification. *Pathog Glob Health*. 2012;106(2):94–101.
23. Wei HY, Shu PY, Hung Min-Nan. Characteristics and risk factors for fatality in patients with dengue hemorrhagic fever, Taiwan, 2014. *Am J Trop Med Hyg*, 95(2), 2016, pp. 322–327.
24. Tsai CJ, Kuo CH, Chen PC, Changcheng CS. Upper gastrointestinal bleeding in dengue fever. *Am J Gastro*. Jan 1991, Vol. 86 Issue 1, p33-35. 3p. 4 Charts.
25. Chiu YC, Wu KL, Kuo CH, Hu TH, Chou YP, Chuah SK, Kuo CM, Kee KM, Changchien CS, Liu JW, Chiu KW. Endoscopic findings and management of dengue patients with upper gastrointestinal bleeding. *Am J Trop Med Hyg*, 73(2), 2005, pp. 441–444.
26. Lee IK, Liu JW, Yang K D. Clinical characteristics, risk factors, and outcomes in adults experiencing dengue hemorrhagic fever complicated with acute renal failure. *Am J Trop Med Hyg*, 80(4), 2009, pp. 651–655.
27. Kuo MC, Lu PL, Chang JM, Lin MY, Tsai JJ, Chen YH, Chang K, Chen HC, Hwang SJ. Impact of Renal Failure on the Outcome of Dengue Viral Infection. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Sep; 3(5): 1350–1356.
28. Wiwanitkit V. Glycosylation, diabetes and dengue: Effect on severity? *Diabet Meta Syn: Clin Res Rev* 5 (2011) 158–159.

(子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析

1. Stewart Ibarra AM, Ryan SJ, Beltrán E, Mejía R, Silva M, Muñoz A. Dengue vector dynamics (*Aedes aegypti*) influenced by climate and social factors in Ecuador: implications for targeted

- control.2013Nov12;8(11):e78263.
2. Lee MS, Hwang KP, Chen TC, Lu PL, Chen TP. Clinical characteristic of dengue and dengue hemorrhagic fever in a medical center of southern Taiwan during the 2002 epidemic. *J Microbiol Immunol Infect* 2006;39:121-9.
  3. 衛生福利部疾病管制署：登革熱/屈公病防治工作指引。第七版。  
台北衛生福利部疾病管制署，2014；9-10。Centers for Disease Control, Ministry of Health and Welfare, R.O.C. (Taiwan). Guidelines for Dengue / Chikungunya Control. 7ed., Taipei: Centers for Disease Control, Ministry of Health and Welfare, R.O.C. (Taiwan),
  4. 陳秋美，郭宏偉，劉定萍 高雄市石化氣爆災害對登革熱疫情之影響  
評析台灣衛誌 2014, Vol.33, No.6
  5. <http://data.giss.nasa.gov/gistemp>
  6. Kutsuna S, Kato Y, Moi ML, Kotaki A, Ota M, Shinohara K, Kobayashi T, Yamamoto K, Fujiya Y, Mawatari M, Sato T, Kunimatsu J, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Takasaki T, Ohmagari N. Autochthonous dengue fever, Tokyo, Japan, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015 Mar;21(3):517-20.
  7. Jin X, Lee M, Shu J Dengue fever in China: an emerging problem demands attention *Emerging Microbes & Infections* (2015) 4, e3
  8. 臺灣高雄地方法院檢察署檢察官起訴書。第 17 頁。2014-12.
  9. Wu PC, Guo HR, Lung SC, Lin CY, Su HJ. Weather as an effective predictor for occurrence of dengue fever in Taiwan. *Acta Trop.* 2007 Jul;103(1):50-7.
  10. Wu PC, Lay JG, Guo HR, Lin CY, Lung SC, Su HJ. Higher temperature and urbanization affect the spatial patterns of dengue fever transmission in subtropical Taiwan. *Sci Total Environ.* 2009 Mar 15;407(7):2224-33.

11. Chen SC, Liao CM, Chio CP, Chou HH, You SH, Cheng YH.  
Lagged temperature effect with mosquito transmission potential explains dengue variability in southern Taiwan: insights from a statistical analysis. *Sci Total Environ*. 2010 Sep 1;408(19):4069-75.
12. Chen SC, Hsieh MH. Modeling the transmission dynamics of dengue fever: implications of temperature effects. *Sci Total Environ*. 2012 Aug 1;431:385-91.
13. Chiu CH, Wen TH, Chien LC, Yu HL. A Probabilistic Spatial Dengue Fever Risk Assessment by a Threshold-Based-Quantile Regression Method *PLoS One*. 2014; 9(10): e106334.
14. Wong LP, Shakir SM, Atefi N, AbuBakar S. Factors affecting dengue prevention practices: nationwide survey of the Malaysian public. *PLoS One*. 2015 Apr 2;10(4):e0122890.
15. Al-Dubai SA, Ganasegeran K, Mohanad Rahman A, Alshagga MA, Saif-Ali R. Factors affecting dengue fever knowledge, attitudes and practices among selected urban, semi-urban and rural communities in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2013; 44(1):37–49.
16. Yang HM, Macoris MLG, Galvani KC, Andrighetti MTM, Wanderley DMV. Assessing the effects of temperature on dengue transmission. *Epidemiol Infect* 2009b;137:1179–87.
17. Tun-Lin W, Burkot TR, Kay BH. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Med Vet Entomol* 2000;14:31–7.
18. BanuS, Hu W, Guo Y, Hurst C, Tong S. Projecting the impact of climate change on dengue transmission in Dhaka, Bangladesh. *Environ Int* 2014;63:137–142.
19. Arcari, P, Tapper N, Pfueller S. Regional variability in relationships between climate and dengue/DHF in Indonesia. *Singapore J Trop*

- Geo2007; 28: 251–272.
20. Keating J. An investigation into the cyclical incidence of dengue fever. *Soc Sci Med* 2001;53: 1587–1597.
  21. Depradine C, Lovell E. Climatological variables and the incidence of Dengue fever in Barbados. *Int J Environ Health Res* 2004; 14: 429–441.
  22. Dengue Information. Disease Control Bureau, the Department of Health, Kaohsiung City Government. Kaohsiung, 2000–2014. (2015).
  23. Yang HM, Macoris ML, Galvani KC, Andrighetti MT, Wanderley DM. Assessing the effects of temperature on the population of *Aedes aegypti*, the vector of dengue. *Epidemiol Infect* 2009;137: 1188–1202.
  24. Tun-Lin W, Burkot TR, Kay BH. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Med Vet Entomol* 2000;14:31–37.
  25. Morin CW, Comrie AC, Ernst K. Climate and dengue transmission: evidence and implications. *Environ Health Perspect* 2013;121: 1264–1272.
  26. Xia, J, Chen J, Piao S, Ciais P, Luo Y, Wan S. Terrestrial carbon cycle affected by non-uniform climate warming. *Nature Geoscience* 2014; 7: 173–180.

(子計畫六)抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然藥物研發

1. Gould EA, Solomon T (2008) Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 371: 500-509.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, et al. (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504-507.

3. Lim SP, Wang QY, Noble CG, Chen YL, Dong H, et al. (2013) Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral Res* 100: 500-519.
4. Friebe P, Pena J, Pohl MO, Harris E (2012) Composition of the sequence downstream of the dengue virus 5' cyclization sequence (dCS) affects viral RNA replication. *Virology* 422: 346-356.
5. Villordo SM, Gamarnik AV (2009) Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res* 139: 230-239.
6. Arias CF, Preugschat F, Strauss JH (1993) Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology* 193: 888-899.
7. Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE, et al. (1995) Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem* 270: 19100-19106.
8. Vionnet J, Pascual M, Chtioui H, Giostra E, Majno PE, et al. (2015) Sofosbuvir and ribavirin before liver re-transplantation for graft failure due to recurrent hepatitis C: a case report. *BMC Gastroenterol* 15: 38.
9. Gubler DJ (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.
10. Sabin AB (1952) Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1: 30-50.
11. McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H (2000) Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2: 1041-1050.
12. Abdalla MY, Britigan BE, Wen F, Icardi M, McCormick ML, et al. (2004) Down-regulation of heme oxygenase-1 by hepatitis C virus infection in

- vivo and by the in vitro expression of hepatitis C core protein. *J Infect Dis* 190: 1109-1118.
13. Zhu Z, Wilson AT, Mathahs MM, Wen F, Brown KE, et al. (2008) Heme oxygenase-1 suppresses hepatitis C virus replication and increases resistance of hepatocytes to oxidant injury. *Hepatology* 48: 1430-1439.
  14. Lehmann E, El-Tantawy WH, Ocker M, Bartenschlager R, Lohmann V, et al. (2010) The heme oxygenase 1 product biliverdin interferes with hepatitis C virus replication by increasing antiviral interferon response. *Hepatology* 51: 398-404.
  15. Zhu Z, Wilson AT, Luxon BA, Brown KE, Mathahs MM, et al. (2010) Biliverdin inhibits hepatitis C virus nonstructural 3/4A protease activity: mechanism for the antiviral effects of heme oxygenase? *Hepatology* 52: 1897-1905.
  16. Ribeiro D, Freitas M, Tome SM, Silva AM, Laufer S, et al. (2015) Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood. *Inflammation* 38: 858-870.
  17. Steer SA, Corbett JA (2003) The role and regulation of COX-2 during viral infection. *Viral Immunol* 16: 447-460.
  18. Lee JC, Chen WC, Wu SF, Tseng CK, Chiou CY, et al. (2011) Anti-hepatitis C virus activity of *Acacia confusa* extract via suppressing cyclooxygenase-2. *Antiviral Res* 89: 35-42.
  19. Jaiyen Y, Masrinoul P, Kalayanarooj S, Pulmanausahakul R, Ubol S (2009) Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol* 53: 442-450.

20. Olnagier D, Peri S, Steel C, van Montfoort N, Chiang C, et al. (2014) Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. *PLoS Pathog* 10: e1004566.
21. Tseng CK, Lin CK, Wu YH, Chen YH, Chen WC, et al. (2016) Human heme oxygenase 1 is a potential host cell factor against dengue virus replication. *Sci Rep* 6: 32176.
22. Lee JC, Tseng CK, Young KC, Sun HY, Wang SW, et al. (2014) Andrographolide exerts anti-hepatitis C virus activity by up-regulating haeme oxygenase-1 via the p38 MAPK/Nrf2 pathway in human hepatoma cells. *Br J Pharmacol* 171: 237-252.
23. Lee JC, Tseng CK, Chen KJ, Huang KJ, Lin CK, et al. (2010) A cell-based reporter assay for inhibitor screening of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Anal Biochem* 403: 52-62.
24. Lee JC, Tseng CK, Wu YH, Kaushik-Basu N, Lin CK, et al. (2015) Characterization of the activity of 2'-C-methylcytidine against dengue virus replication. *Antiviral Res* 116: 1-9.
25. Lee YR, Hu HY, Kuo SH, Lei HY, Lin YS, et al. (2013) Dengue virus infection induces autophagy: an in vivo study. *J Biomed Sci* 20: 65.
26. Yang CC, Hsieh YC, Lee SJ, Wu SH, Liao CL, et al. (2011) Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 229-238.
27. Yang CC, Hu HS, Wu RH, Wu SH, Lee SJ, et al. (2014) A novel dengue virus inhibitor, BP13944, discovered by high-throughput screening with

dengue virus replicon cells selects for resistance in the viral NS2B/NS3 protease. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 110-119.

(子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查

1. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckenooghe A, Viviani S, Tornieporth NG, Lang J. 2012. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *The Lancet*, Volume 380, Issue 9853, 3–9 November 2012, Pages 1559–1567
2. Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, Luong CQ, Rusmil K, Wirawan DN, Nallusamy R, Pitisuttithum P, Thisyakorn U, Yoon IK, van der Vliet D, Langevin E, Laot T, Hutagalung Y, Frago C, Boaz M, Wartel TA, Tornieporth NG, Saville M, Bouckenooghe A; CYD14 Study Group. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014 Oct 11;384(9951):1358-65
3. Luis Villar, M.D., Gustavo Horacio Dayan, M.D., José Luis Arredondo-García, M.D., Doris Maribel Rivera, M.D., Rivaldo Cunha, M.D., Carmen Deseda, M.D., Humberto Reynales, M.D., Maria Selma Costa, M.D., Javier Osvaldo Morales-Ramírez, M.D., Gabriel Carrasquilla, M.D., Luis Carlos Rey, M.D., Reynaldo Dietze, M.D., Kleber Luz, M.D., Enrique Rivas, M.D., Maria Consuelo Miranda Montoya, M.D., Margarita Cortés Supelano, M.D., Betzana Zambrano, M.D., Edith Langevin, M.Sc., Mark Boaz, Ph.D., Nadia Tornieporth, M.D., Melanie Saville, M.B., B.S.,

and Fernando Noriega, M.D., for the CYD15 Study Group\*.Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *N Engl J Med* 2015; 372:113-123

4. Wilder-Smith A. Dengue vaccines: dawning at last? *Lancet*. 2014 Oct 11;384(9951):1327-9.
5. Lai CY, Williams KL, Wu YC, Knight S, Balmaseda A, Harris E, Wang WK. Analysis of cross-reactive antibodies recognizing the fusion loop of envelope protein and correlation with neutralizing antibody titers in Nicaraguan dengue cases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2451
6. Tsai WY, Durbin A, Tsai JJ, Whitehead S, Wang WK. 2015. Complexity of neutralization antibodies against multiple dengue viral serotypes after heterotypic immunization and secondary infection revealed by in-depth analysis of cross-reactive antibodies. *J Virol* 89:7348-7362.
7. Yik Weng Yew, Tun Ye, Li Wei Ang, Lee Ching Ng, Grace Yap, Lyn James, Suok Kai Chew, Kee Tai Goh. Seroepidemiology of Dengue Virus Infection Among Adults in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*. 2009 38:667-75
8. L.W.Ang, J. Cutter, L. James, K. T. Goh.. Seroepidemiology of dengue virus infection in the adult population in tropical Singapore. *Epidemiol. Infect.* 2014 Jun 143: 1585-1583

#### (子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗

1. Halstead, S.B., Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. *Emerg Infect Dis*, 2015. 21(4): p. 557-61.
2. Holmes, E.C. and S.S. Twiddy, The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*, 2003. 3(1): p. 19-28.

3. Halstead, S.B., Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, 1988. 239(4839): p. 476-81.
4. Thein, S., et al., Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg*, 1997. 56(5): p. 566-72.
5. Ma, L., et al., Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(10): p. 3414-9.
6. Rodenhuis-Zybert, I.A., J. Wilschut, and J.M. Smit, Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*, 2010. 67(16): p. 2773-86.
7. Hotta, S., Pathogenesis and immunity of dengue infection in man. *Kobe J Med Sci*, 1972. 18(4): p. 199-210.
8. Fischer, D.B. and S.B. Halstead, Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. V. Examination of agspecific sequential infection rates using a mathematical model. *Yale J Biol Med*, 1970. 42(5): p. 329-49.
9. Power, D.A., V. Gerkis, and A.J. d'Apice, Production of human monoclonal antibodies to B lymphocyte cell surface antigens by in vitro immunization and human-human hybridoma technology. *Hum Antibodies Hybridomas*, 1990. 1(1): p. 34-41.
10. Epstein, N. and M. Epstein, The hybridoma technology: I. Production of monoclonal antibodies. *Adv Biotechnol Processes*, 1986. 6: p. 179-218.
11. Frimayanti, N., et al., Design of new competitive dengue NS2B/NS3 protease inhibitors-a computational approach. *Int J Mol Sci*, 2011. 12(2): p. 1089-100.
12. Lee, C.I., et al., Anticancer effects on human pancreatic cancer cells of triterpenoids, polysaccharides and 1,3-beta-D-glucan derived from the fruiting body of *Antrodia camphorata*. *Food Funct*, 2014. 5(12): p. 3224-32.

13. Chang, J.S., et al., Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells Induced by Nanoencapsulated Polysaccharides Extracted from *Antrodia Camphorata*. *PLoS One*, 2015. 10(9): p. e0136782.
14. Lee, I.H., et al., *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiol Lett*, 2002. 209(1): p. 63-7.
15. Wu, S.J., et al., Evaluation of the severe combined immunodeficient (SCID) mouse as an animal model for dengue viral infection. *Am J Trop Med Hyg*, 1995. 52(5): p. 468-76.
16. Jaiswal, S., et al., Dengue virus infection induces broadly cross-reactive human IgM antibodies that recognize intact virions in humanized BLT-NSG mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015. 240(1): p. 67-78.
17. Jaiswal, S., et al., Enhanced humoral and HLA-A2-restricted dengue virus-specific T-cell responses in humanized BLT NSG mice. *Immunology*, 2012. 136(3): p. 334-43.

#### (子計畫九)台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析

1. 2013. Website of World Health Organization. Available at: [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/ntds\\_report\\_20130116/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/ntds_report_20130116/en/).
2. Lin CC, Huang YH, Shu PY, Wu HS, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Liu CC, Lei HY. 2010. Characteristic of dengue disease in Taiwan: 2002-2007. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 82:731-739.
3. 郭俊賢、賴淑寬、陳主慈、吳智文、顏哲傑. 2014. 2008-2011 年國際港埠篩檢疑似登革熱症狀個案之流行病學分析.
4. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martinez E, Nathan MB,

- Pelegriño JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology* 8:S7-16.
5. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. 2015. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical journal, Armed Forces India* 71:67-70.
  6. Normile D. 2013. First New Dengue Virus Type in 50 Years.
  7. Roopashri G, Vaishali MR, David MP, Baig M, Navneetham A, Venkataraghavan K. 2015. Clinical and oral implications of dengue Fever: a review. *Journal of international oral health : JIOH* 7:69-73.
  8. Sam SS, Omar SF, Teoh BT, Abd-Jamil J, AbuBakar S. 2013. Review of Dengue hemorrhagic fever fatal cases seen among adults: a retrospective study. *PLoS neglected tropical diseases* 7:e2194.
  9. Mangold KA, Reynolds SL. 2013. A review of dengue fever: a resurging tropical disease. *Pediatric emergency care* 29:665-669; quiz 670-661.
  10. Chang K, Lu PL, Ko WC, Tsai JJ, Tsai WH, Chen CD, Chen YH, Chen TC, Hsieh HC, Pan CY, Harn MR. 2009. Dengue fever scoring system: new strategy for the early detection of acute dengue virus infection in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 108:879-885.
  11. Taiwan Center for Disease Control-Dengue virus reports 2010-2015. <http://www.cdc.gov.tw/>.
  12. Bowman LR, Runge-Ranzinger S, McCall PJ. 2014. Assessing the relationship between vector indices and dengue transmission: a systematic review of the evidence. *PLoS neglected tropical diseases* 8:e2848.
  13. Lin CH, Schioler KL, Jepsen MR, Ho CK, Li SH, Konradsen F. 2012. Dengue outbreaks in high-income area, Kaohsiung City, Taiwan, 2003-2009. *Emerging infectious diseases* 18:1603-1611.

14. Wen TH, Lin NH, Chao DY, Hwang KP, Kan CC, Lin KC, Wu JT, Huang SY, Fan IC, King CC. 2010. Spatial-temporal patterns of dengue in areas at risk of dengue hemorrhagic fever in Kaohsiung, Taiwan, 2002. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 14:e334-343.
15. Chao DY, Lin TH, Hwang KP, Huang JH, Liu CC, King CC. 2004. 1998 dengue hemorrhagic fever epidemic in Taiwan. *Emerging infectious diseases* 10:552-554.
16. 段延昌、洪敏南、陳美珠、邱鴻英、黃啟泉、林建州、舒佩芸、張朝卿、楊國禧、施文儀、林立人. 2007. 2006 年高高屏本土性登革熱疫情因應與結果. *疫情報導* 24:3-21.
17. Huang JH, Su CL, Yang CF, Liao TL, Hsu TC, Chang SF, Lin CC, Shu PY. 2012. Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2008-2010. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 87:349-358.
18. Chu PY, Ke GM, Chen PC, Liu LT, Tsai YC, Tsai JJ. 2013. Spatiotemporal dynamics and epistatic interaction sites in dengue virus type 1: a comprehensive sequence-based analysis. *PloS one* 8:e74165.
19. Henchal EA, Putnak JR. 1990. The dengue viruses. *Clinical microbiology reviews* 3:376-396.
20. Monath TP. 1996. Stability of yellow fever vaccine. *Developments in biological standardization* 87:219-225.
21. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. 2003. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature structural biology* 10:907-912.

22. Zhang W, Singam R, Hellermann G, Kong X, Juan HS, Lockett RF, Wu SJ, Porter K, Mohapatra SS. 2004. Attenuation of dengue virus infection by adeno-associated virus-mediated siRNA delivery. *Genetic vaccines and therapy* 2:8.
23. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual review of microbiology* 44:649-688.
24. Lee JM, Crooks AJ, Stephenson JR. 1989. The synthesis and maturation of a non-structural extracellular antigen from tick-borne encephalitis virus and its relationship to the intracellular NS1 protein. *The Journal of general virology* 70 ( Pt 2):335-343.
25. Falkler WA, Jr., Diwan AR, Halstead SB. 1973. Human antibody to dengue soluble complement-fixing (SCF) antigens. *Journal of immunology* 111:1804-1809.
26. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. 1987. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *The Journal of general virology* 68 ( Pt 3):853-857.
27. Benarroch D, Selisko B, Locatelli GA, Maga G, Romette JL, Canard B. 2004. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg<sup>2+</sup>-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology* 328:208-218.
28. Benarroch D, Egloff MP, Mulard L, Guerreiro C, Romette JL, Canard B. 2004. A structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2'-O-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate. *The Journal of biological chemistry* 279:35638-35643.

29. Wang CC, Lee IK, Su MC, Lin HI, Huang YC, Liu SF, Wu CC, Lin MC. 2009. Differences in clinical and laboratory characteristics and disease severity between children and adults with dengue virus infection in Taiwan, 2002. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103:871-877.
30. Cabannes E, Hebert C, Eloit M. 2014. Whole genome: next-generation sequencing as a virus safety test for biotechnological products. *PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA* 68:631-638.
31. Young KA, Herbert AP, Barlow PN, Holers VM, Hannan JP. 2008. Molecular basis of the interaction between complement receptor type 2 (CR2/CD21) and Epstein-Barr virus glycoprotein gp350. *J Virol* 82:11217-11227.
32. Amon W, White RE, Farrell PJ. 2006. Epstein-Barr virus origin of lytic replication mediates association of replicating episomes with promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies and replication compartments. *J Gen Virol* 87:1133-1137.

(子計畫十一)應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的  
斑蚊孳生源

**Amalraj, D., V. Vasuki, M. Kalyanasundaram, B. K. Tyagi, and P. K. Das. 1988.** Laboratory & field evaluation of three insect growth regulators against mosquito vectors. *Indian J Med Res* 87: 24-31.

**Becking, G. C., and B. H. Chen. 1998.** International Programme on Chemical Safety (IPCS) environmental health criteria on boron human health risk assessment. *Biological trace element research* 66: 439-452.

**Brown, M. D., B. H. Kay, and J. K. Hendrikz. 1991.** Evaluation of Australian *Mesocyclops* (Cyclopoida: Cyclopidae) for mosquito control. *J Med*

Entomol 28: 618-623.

**Caputo, B., A. Ienco, D. Cianci, M. Pombi, V. Petrarca, A. Baseggio, G. J. Devine, and A. della Torre. 2012.** The "auto-dissemination" approach: a novel concept to fight *Aedes albopictus* in urban areas. PLoS Negl Trop Dis 6: e1793.

**Daniels, C. W. 1901.** Reports of the Malaria Commission of the Royal Society. Series 5: 28-33.

**Dell Chism, B., and C. S. Apperson. 2003.** Horizontal transfer of the insect growth regulator pyriproxyfen to larval microcosms by gravid *Aedes albopictus* and *Ochlerotatus triseriatus* mosquitoes in the laboratory. Med Vet Entomol 17: 211-220.

**Devi, S. S., A. Farajollahi., S. Healy., G. M. Williams., Y. Wang., G. Schoeler, and R. Gaugler. 2014.** Point-source and area-wide field studies of pyriproxyfen autodissemination against urban container-inhabiting mosquitoes. Acta Tropica 135: 96-103.

**Devine, G. J., E. Z. Perea, G. F. Killeen, J. D. Stancil, S. J. Clark, and A. C. Morrison. 2009.** Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 11530-11534.

**Devi S. S., Y. Wang, and R. Gaugler. 2015.** The insect growth regulator pyriproxyfen terminates egg diapause in the asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. PLoS One. June 19,2015

**Dhadialla, T. S., G. R. Carlson, and D. P. Le. 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. Annu Rev Entomol 43: 545-569.

**Edman, J., P. Kittayapong, K. Linthicum, and T. Scott. 1997.** Attractant resting boxes for rapid collection and surveillance of *Aedes aegypti* (L.)

inside houses. *J Am Mosq Control Assoc* 13: 24-27.

**Estrada, J. G., and M. S. Mulla. 1986.** Evaluation of two new insect growth regulators against mosquitoes in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc* 2: 57-60.

**Fillinger, U., and S. W. Lindsay. 2006.** Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 11: 1629-1642.

**Fillinger, U., B. G. Knols, and N. Becker. 2003.** Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 8: 37-47.

**Foster, S. O. 1996.** Malaria in the pregnant African woman: Epidemiology, practice, research, and policy. *Am J Trop Med Hyg* 55: 1-1.

**Gaugler, R., D. Suman, and Y. Wang. 2012.** An autodissemination station for the transfer of an insect growth regulator to mosquito oviposition sites. *Med Vet Entomol* 26: 37-45.

**Githeko, A. K., S. W. Lindsay, U. E. Confalonieri, and J. A. Patz. 2000.** Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bulletin of the World Health Organization* 78: 1136-1147.

**Harrington, L. C., T. W. Scott, K. Lerdthusnee, R. C. Coleman, A. Costero, G. G. Clark, J. J. Jones, S. Kitthawee, P. Kittayapong, R. Sithiprasasna, and J. D. Edman. 2005.** Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *Am J Trop Med Hyg* 72: 209-220.

**Harris, C., D. W. Lwetoijera, S. Dongus, N. S. Matowo, L. M. Lorenz, G. J.**

- Devine, and S. Majambere. 2013.** Sterilising effects of pyriproxyfen on *Anopheles arabiensis* and its potential use in malaria control. *Parasit Vectors* 6: 144.
- Huang, J. H., C. F. Yang, C. L. Su, S. F. Chang, C. H. Cheng, S. K. Yu, C. C. Lin, and P. Y. Shu. 2009.** Imported chikungunya virus strains, Taiwan, 2006-2009. *Emerg Infect Dis* 15: 1854-1856.
- Hurlbut, H. S. 1938.** Copepod observed preying on first instar larva of *Anopheles quadrimaculatus* Say. *J Parasitol* 24: 281.
- Itoh, T., H. Kawada, A. Abe, Y. Eshita, Y. Rongsriyam, and A. Igarashi. 1994.** Utilization of bloodfed females of *Aedes aegypti* as a vehicle for the transfer of the insect growth regulator pyriproxyfen to larval habitats. *J Am Mosq Control Assoc* 10: 344-347.
- Josseran, L., C. Paquet, A. Zehgnoun, N. Caillere, A. Le Tertre, J. L. Solet, and M. Ledrans. 2006.** Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. *Emerg Infect Dis* 12: 1994-1995.
- Kay, B., and V. S. Nam. 2005.** New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *Lancet* 365: 613-617.
- Kay, B. H., V. S. Nam, T. V. Tien, N. T. Yen, T. V. Phong, V. T. Diep, T. U. Ninh, A. Bektas, and J. G. Aaskov. 2002.** Control of *Aedes* vectors of dengue in three provinces of Vietnam by use of *Mesocyclops* (Copepoda) and community-based methods validated by entomologic, clinical, and serological surveillance. *Am J Trop Med Hyg* 66: 40-48.
- Killeen, G. F., F. E. McKenzie, B. D. Foy, C. Schieffelin, P. F. Billingsley, and J. C. Beier. 2000.** The potential impact of integrated malaria transmission control on entomologic inoculation rate in highly endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 62: 545-551.

- Klowden, M. J., G. A. Held, and L. A. Bulla, Jr. 1983.** Toxicity of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* to adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Applied and environmental microbiology* 46: 312-315.
- Lee, Y. W., J. Zairi, H. H. Yap, and C. R. Adanan. 2005.** Integration of *Bacillus thuringiensis* H-14 formulations and pyriproxyfen for the control of larvae of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 21: 84-89.
- Lwetoijera, D., C. Harris, S. Kiware, S. Dongus, G. J. Devine, P. J. McCall, and S. Majambere. 2014.** Effective autodissemination of pyriproxyfen to breeding sites by the exophilic malaria vector *Anopheles arabiensis* in semi-field settings in Tanzania. *Malar J* 13: 161.
- Maheu-Giroux, M., and M. C. Castro. 2014.** Cost-effectiveness of larviciding for urban malaria control in Tanzania. *Malaria journal* 13.
- Majambere, S., S. W. Lindsay, C. Green, B. Kandeh, and U. Fillinger. 2007.** Microbial larvicides for malaria control in The Gambia. *Malaria journal* 6: 76.
- Marten, G. G. 1990a.** Elimination of *Aedes albopictus* from tire piles by introducing *Macrocyclus albidus* (Copepoda, Cyclopidae). *J Am Mosq Control Assoc* 6: 689-693.
- Marten, G. G. 1990b.** Evaluation of cyclopoid copepods for *Aedes albopictus* control in tires. *J Am Mosq Control Assoc* 6: 681-688.
- Marten, G. G., and J. W. Reid. 2007.** Cyclopoid copepods. *J Am Mosq Control Assoc* 23: 65-92.
- Morrison, A. C., E. Zielinski-Gutierrez, T. W. Scott, and R. Rosenberg. 2008.** Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Med* 5: e68.

- Mukabana, W. R., K. Kannady, G. M. Kiama, J. N. Ijumba, E. M. Mathenge, I. Kiche, G. Nkwengulila, L. Mboera, D. Mtasiwa, Y. Yamagata, I. van Schayk, B. G. Knols, S. W. Lindsay, M. Caldas de Castro, H. Mshinda, M. Tanner, U. Fillinger, and G. F. Killeen. 2006.** Ecologists can enable communities to implement malaria vector control in Africa. *Malaria journal* 5: 9.
- Mulla, M. S., U. Thavara, A. Tawatsin, J. Chomposri, and T. Su. 2003.** Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 19: 39-46.
- Nam, V. S., N. T. Yen, T. V. Phong, T. U. Ninh, L. Q. Mai, L. V. Lo, L. T. Nghia, A. Bektas, A. Briscombe, J. G. Aaskov, P. A. Ryan, and B. H. Kay. 2005a.** Elimination of dengue by community programs using *Mesocyclops* (copepoda) against *Aedes aegypti* in central Vietnam. *Am J Trop Med Hygiene* 72: 67-73.
- Nam, V. S., N. T. Yen, T. V. Phong, T. U. Ninh, L. Q. Mai, L. V. Lo, L. T. Nghia, A. Bektas, A. Briscombe, J. G. Aaskov, P. A. Ryan, and B. H. Kay. 2005b.** Elimination of dengue by community programs using *Mesocyclops* (copepoda) against *Aedes aegypti* in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 72: 67-73.
- Nauen, R. 2007.** Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Manag Sci* 63: 628-633.
- Ohashi, K., K. Nakada, T. Ishiwatari, J. Miyaguchi, Y. Shono, J. R. Lucas, and N. Mito. 2012.** Efficacy of pyriproxyfen-treated nets in sterilizing and shortening the longevity of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J*

Med Entomol 49: 1052-1058.

- Ohba, S. Y., K. Ohashi, E. Pujiyati, Y. Higa, H. Kawada, N. Mito, and M. Takagi. 2013.** The effect of pyriproxyfen as a "population growth regulator" against *Aedes albopictus* under semi-field conditions. PLoS One 8: e67045.
- Perich, M. J., G. Davila, A. Turner, A. Garcia, and M. Nelson. 2000.** Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. J Med Entomol 37: 541-546.
- Ritchie, S. A., C. Paton, T. Buhagiar, G. A. Webb, and V. Jovic. 2013.** Residual treatment of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in containers using pyriproxyfen slow-release granules (Sumilarv 0.5G). J Med Entomol 50: 1169-1172.
- Riviere, F., B. H. Kay, J. M. Klein, and Y. Sechan. 1987.** *Mesocyclops aspericornis* (Copepoda) and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the biological control of *Aedes* and *Culex* vectors (Diptera: Culicidae) breeding in crab holes, tree holes, and artificial containers. J Med Entomol 24: 425-430.
- Sihuincha, M., E. Zamora-Perea, W. Orellana-Rios, J. D. Stancil, V. Lopez-Sifuentes, C. Vidal-Ore, and G. J. Devine. 2005.** Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. J Med Entomol 42: 620-630.
- Suman, D. S., Y. Wang, L. Dong, and R. Gaugler. 2013.** Effects of larval habitat substrate on pyriproxyfen efficacy against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 50: 1261-1266.
- Torres-Estrada, J. L., M. H. Rodriguez, L. Cruz-Lopez, and J. I.**

- Arredondo-Jimenez. 2001.** Selective oviposition by *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) in response to *Mesocyclops longisetus* (Copepoda: Cyclopoidea) under laboratory and field conditions. J Med Entomol 38: 188-192.
- Vanek, M. J., B. Shoo, D. Mtasiwa, M. Kiama, S. W. Lindsay, U. Fillinger, K. Kannady, M. Tanner, and G. F. Killeen. 2006.** Community-based surveillance of malaria vector larval habitats: a baseline study in urban Dar es Salaam, Tanzania. BMC public health 6: 154.
- Vythilingam, I., B. M. Luz, R. Hanni, T. S. Beng, and T. C. Huat. 2005.** Laboratory and field evaluation of the insect growth regulator pyriproxyfen (Sumilarv 0.5G) against dengue vectors. J Am Mosq Control Assoc 21: 296-300.
- WHO. 1999.** International programme on chemical safety (IPCS): Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria 217: 1-105.
- WHO. 2015.** Indoor residual spraying: An operational manual for IRS for malaria transmission, control and elimination. Second edition
- Williamson, C. E. 1983.** Behavioral interactions between a cyclopoid copepod predator and its prey. J Plankton Res 5: 701-711.
- Wu, J. W., H. J. Teng, C. Lin, C. Y. Wang, D. P. Liu, and H. S. Wu. 2009.** Recent distribution of vector mosquitoes and epidemiology of the diseases they transmitted in Taiwan Med. Entomol. zool. 60: 241-252.
- Xie, Y., L. Zhang, C. Zhang, X. Wu, X. Deng, X. Yang, and S. S. Tobe. 2015.** Synthesis, biological activity, and conformational study of N-methylated allatostatin analogues inhibiting juvenile hormone biosynthesis. J Agric Food Chem 63: 2870-2876.

**Xue, R. D., and Barnard, D .R. 2003.** Boric acid bait kills adult mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Econ. Entomol.* 96(5): 1559-1562.

**Yukiko H., Takako T., Toshio T. and Ichiro M. 2010.** A multiplex PCR-based molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus *Stegomyia* mosquitoes from the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 63, 312-316.

**蔡坤憲. 2008.** 登革熱防疫與划船競賽, pp. 19-22. In 行政院衛生署疾病管制局 (ed.), 滅蚊特攻防疫總動員：全國運動會現場防疫官支援心得, vol. 防疫風雲系列 002. 行政院衛生署疾病管制局, 台北市.

**賴政宗、黃凱宏、許麗卿、舒佩芸、許昭純、吳和生. 2008.** 2005-2007 年台灣登革熱確認個案之分析. *疫情報導* 24: 538-549.

**(子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究**

1. Baak-Baak, C.M., A.D. Rodríguez-Ramírez, J.E. García-Rejón, S. Ríos-Delgado, and J.L. Torres-Estrada. 2013. Development and laboratory evaluation of chemically-based baited ovitrap for the monitoring of *Aedes aegypti*. *J Vector Ecol.* 38: 175-181.
2. Carbajo, A.E., S.I. Curoto, and N. J. Schweigmann. 2006. Spatial distribution pattern of oviposition in the mosquito *Aedes aegypti* in relation to urbanization in Buenos Aires: southern fringe bionomics of an introduced vector. *Medical and Veterinary Entomology* 20: 209–218.
3. Chadeea, D.D., and S.A. Ritchie. 2010. Oviposition behaviour and parity rates of *Aedes aegypti* collected in sticky traps in Trinidad, West Indies. *Acta Tropica.* 116: 212-216.

4. David J Menger, Bruno Otieno, Marjolein de Rijk, W Richard Mukabana, Joop JA van Loon and Willem Takken. 2014. A push-pull system to reduce house entry of malaria mosquitoes. *Malaria Journal* 13:119.
5. Gubler D: Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998, 11:480–496.
6. Gustave, J., F. Fouque, S. Cassadou, L. Leon, G. Anicet, C. Ramdini, and F. Sonor. 2012. Increasing Role of Roof Gutters as *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Breeding Sites in Guadeloupe (French West Indies) and Consequences on Dengue Transmission and Vector Control. *J Trop Med* doi:10.1155/2012/249524. 3pages.
7. Hamington LC, Scott TW, Lerdthusnee K, Coleman RC, Costero A, Clark GG, Jones JJ, Kitthawee K, Kittayapong P, Sithiprasasna R, Edman JD: Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *AmJTrop Med Hyg* 2005, 72:209–220.
8. Honório, N.A., R.M.R. Nogueira, C.T. Codeço, M.S. Carvalho, Cruz, M.A.F.M. Magalhães, J.M.G. de Araújo, E.S.M. de Araújo, M.Q. Gomes, L.S. Pinheiro, C.S. Pinel, R.L. Oliveira. 2009. Spatial Evaluation and Modeling of Dengue Seroprevalence and Vector Density in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Vol. 3 Issue e545. 11 pages.
9. Kay, B., and V.S. Nam. 2005. New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *Lancet*. 365: 613-617.
10. Koh, B.K.W., L.C. Ng, Y. Kita, C.S. Tang, L.W. Ang, K.Y. Wong, L. James, K.T. Goh. 2008. The 2005 dengue epidemic in Singapore epidemiology prevention and control. *Ann Acad Med Singapore*. 37: 538-545.
11. Lima J.B., Da-Cunha M.P., Da Silva R.C., Galardo A.K., Soares Sda S., Braga I.A., Ramos R.P., and Valle D. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to

- organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 68(3):329-333.
12. Luna J.E., Martins M.F., Anjos A.F., Kuwabara E.F. and Navarro-Silva M.A. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. *Rev Saude Publica.* 38(6):842-843. in Portuguese.
  13. Mazzarri, M.B. and Georghiou, G.P. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc.* 11(3):315-322.
  14. Morrison, A.C., E. Zielinski-Gutierrez, T.W. Scott, and R. Rosenberg. 2008. Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector *Aedes aegypti*. *PloS Medicine.* Vol. 5 Issue 3 e68. 0362-0366.
  15. Ram K. and J.S. Hwang 2006. Larvicidal efficiency of aquatic predators: A perspective for mosquito biocontrol. *Zoologica Studies* 45: 447-466.
  16. Regis, L., A.M. Monteiro, M.A.V. de Melo-Santos, J.C. Silveira Jr, A.F. Furtado, R.V. Acioli, G.M. Santos, M. Nakazawa, M. Sá Carvalho, P.J. Ribeiro Jr, W.V. de Souza. 2008. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 103: 50-59.
  17. Reiter P. 1996. Oviposition and dispersion of *Aedes aegypti* in an urban environment. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 89: 120-122.
  18. Reiter, P., M.A. Amador, and N. Colon. 1991. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. *J. Amer. Mosquito Control Assoc.* 7: 52-55.
  19. Riviefe F., Thirel R. 1981. La pré-dation du cope-pode *Mesocyclops leuckarti pilosa* (Crustacea) sur les larves de *Aedes (Stegomyia) aegypti* et *Ae. (St.)*

- polynesiensis (Dip.: Culicidae): essais préliminaires d'utilisation comme agent de lutte biologique. [Predation of the copepod *Mesocyclops leuckarti pilosa* (Crustacea) on the larvae of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Ae.* (*St.*) *polynesiensis* (Dip.: Culicidae): preliminary trials of its use as a biological control agent.] *Entomophaga* 26:427–439.
20. Ritchie, S.A., S. Long, A. Hart, C.E. Webb, R.C. Russell. 2003. An adulticidal sticky ovitrap for sampling container-breeding mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 19: 235-42.
  21. Rodrigues, M.M., G.R.A.M. Marques, L.L.N. Serpa, M.B. Arduino, J.C. Voltolini, G.L. Barbosa, V.R. Andrade, and V.L.C. Lima. 2015. Density of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and its association with number of residents and meteorological variables in the home environment of dengue endemic area, São Paulo, Brazil. *Parasites & Vectors.* 8: 115. 9 pages.
  22. Russell, R.C., S.A. Ritchie. 2004. Surveillance and behavioral investigations of *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* in Moorea, French Polynesia, using a sticky ovitrap. *J. Amer. Mosquito Control Assoc.* 20: 370-375.
  23. Saleeza, S.N.R., et al., 2011. Mosquito larval breeding habitat in urban and suburban areas Peninsular Malaysia. *International J. Biol. Food Veteri. Agricul. Engin.* 5: 72-76.
  24. Scott TW, Chow E, Strickman D, Kittayapong P, Wirtz RA, Lorenz LH, Edman JD: Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *J Med Entomol* 1993, 30:922–927.
  25. Scott TW, Amerasinghe PH, Morrison AC, Lorenz LH, Clark GG, Strickman D, Kittayapong P, Edman JD: Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Blood feeding frequency. *J Med Entomol* 2000, 37:89–101. doi:full/10.1603/0022-2585-37.1.89.

26. Somboon P., Prapanthadara, L.A. and Suwonkerd, W. 2003. Insecticide susceptibility tests of *Anopheles minimus* s.l., *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 34: 87–93
27. Vashishtha VM. World Malaria Report 2008: a billion-dollar moment for a centuries old disease? *Indian Pediatr* 45:985–986.
28. Williams, C., S.A. Long, R. Russell, and S.A. Ritchie. 2006. Optimizing ovitrap use for *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia: effects of some abiotic factors on field efficacy. *J. Amer. Mosquito Control Assoc.* 22:6 35-640.
29. Zhang, L.Y., C.L. Lei. 2008. Evaluation of sticky ovitraps for the surveillance of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) and the screening of oviposition attractants from organic infusions. *Maney Online* 102: 399-407.

#### (子計畫十五) 血液製品之登革病毒偵測調查

1. Chuang V, Wong TY, Leung YH, Ma E, Law YL, Tsang O, et al. Review of dengue fever cases in Hong Kong during 1998 to 2005. *Hong Kong Med J.* 2008;14(3):170-7.
2. Tambyah PA, Koay ES, Poon ML, Lin RV, Ong BK, Transfusion-Transmitted Dengue Infection Study G. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med.* 2008;359(14):1526-7.
3. Linnen JM, Vinelli E, Sabino EC, Tobler LH, Hyland C, Lee TH, et al. Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia. *Transfusion.* 2008;48(7):1355-62.

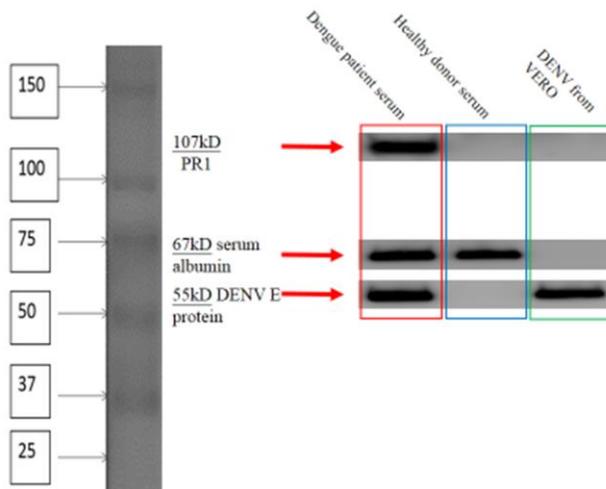
4. Mohammed H, Linnen JM, Munoz-Jordan JL, Tomashek K, Foster G, Broulik AS, et al. Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. *Transfusion*. 2008;48(7):1348-54.
5. Seed CR, Kiely P, Hyland CA, Keller AJ. The risk of dengue transmission by blood during a 2004 outbreak in Cairns, Australia. *Transfusion*. 2009;49(7):1482-7.

### (平台二) 蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

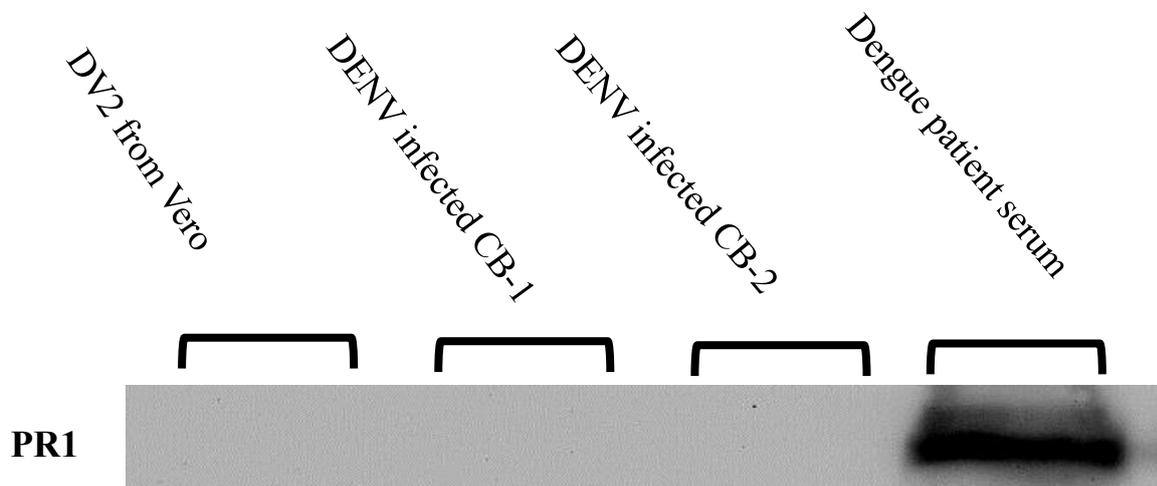
1. Development of Group- and Serotype-Specific One-Step SYBR Green I-Based Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Dengue Virus; *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, June 2003, p. 2408–2416.
2. Enzyme-linked immunosorbent assay to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.* 40:376–381.
3. Development and evaluation of serotype and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J. Clin. Microbiol.* 39:4119–4124.
4. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1232-1239.
5. Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005: A molecular epidemiologic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77: 903-9.

#### 十四、圖

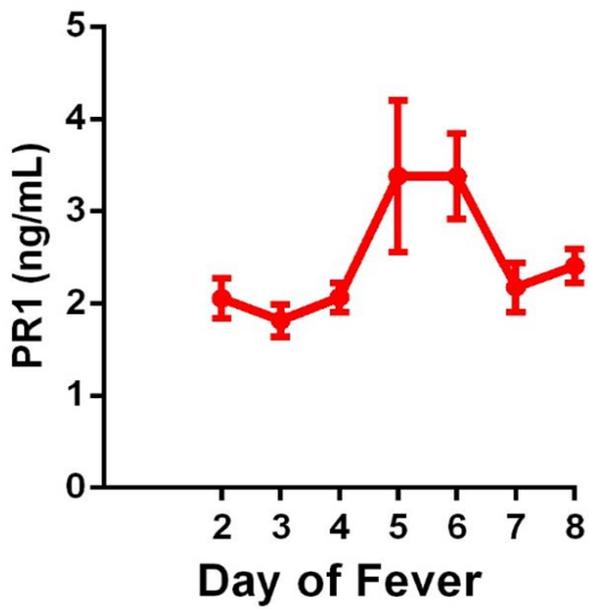
##### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗



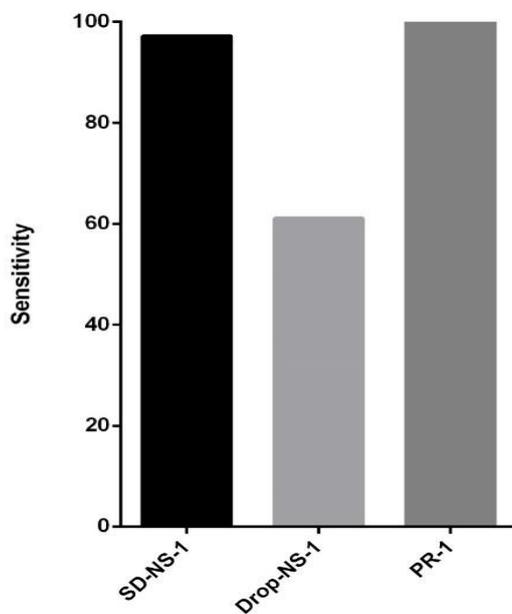
圖一、不同來源的檢體或登革感染細胞上清液中 PR1 的表現



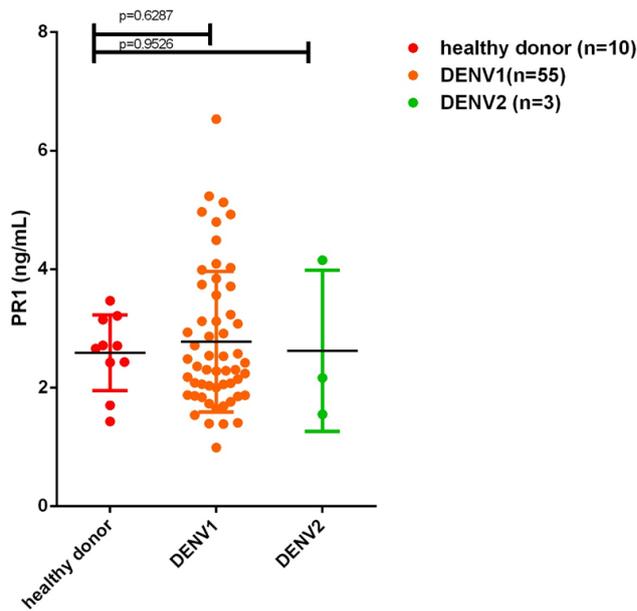
圖二、臍帶血受到登革熱感染後的 PR1 蛋白表現量



圖三、PR1 在登革熱不同病程的表現量



圖四、PR1 isoform1 與其他快篩對登革熱患者敏感度的比較圖



圖五、PR1 isoform1 的專一性表現

(子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色

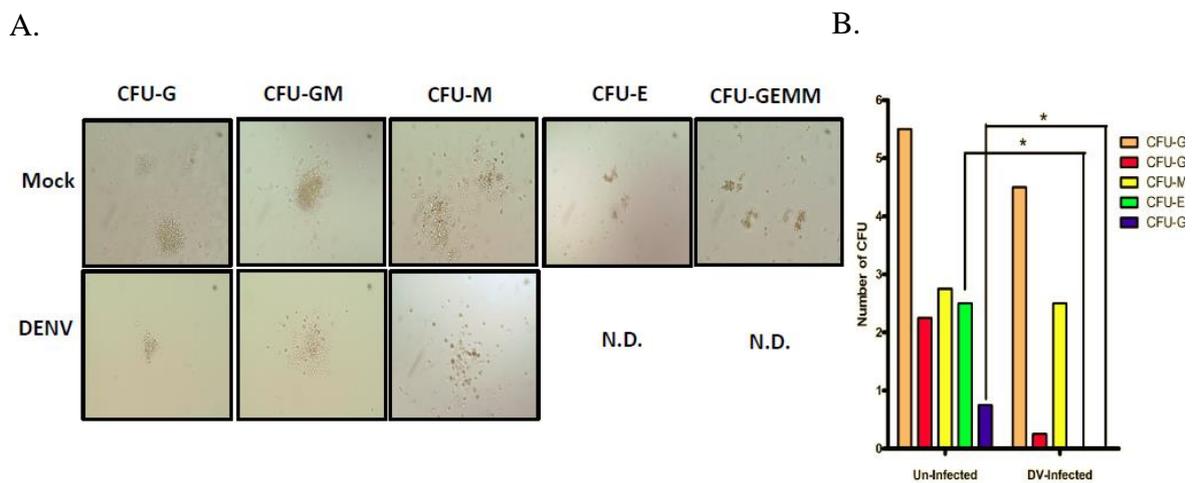


Fig1 巨核細胞聚落在登革病毒感染後會明顯減少。(A)登革病毒感染骨髓幹細胞後巨核細胞聚落的型態。(B)登革病毒感染及未感染的骨髓幹細胞的巨核細胞聚落的數量變化

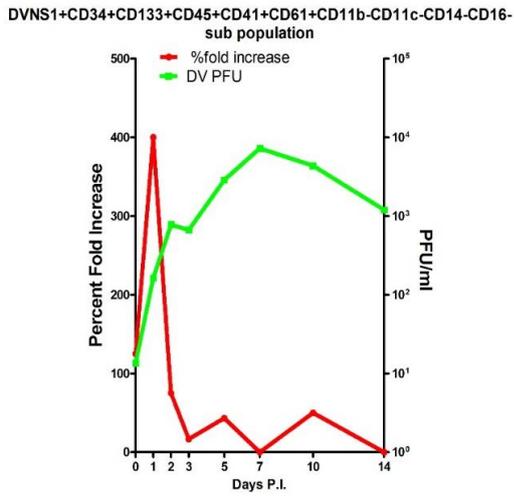


Fig2. 表現登革病毒非結構蛋白 1 的骨髓造血幹細胞世系

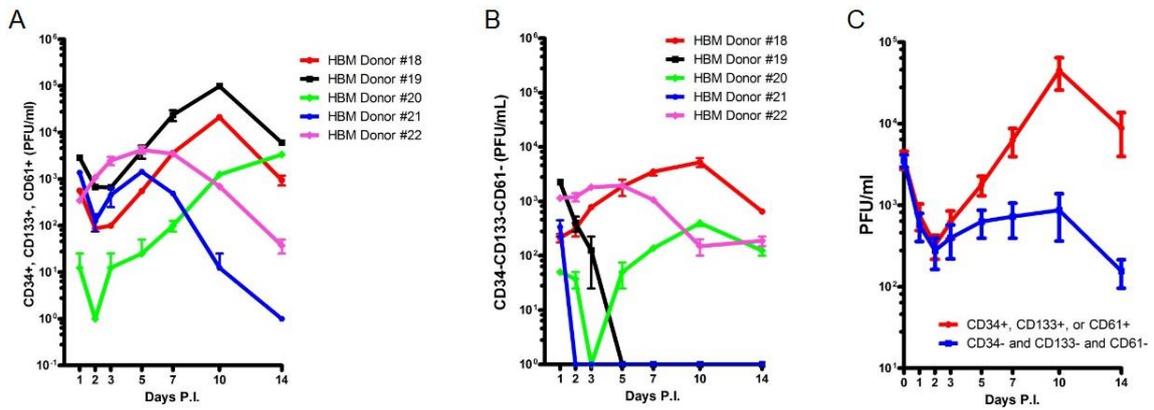


Fig3. 登革病毒對巨核前趨細胞的感染率。(A)登革病毒在 CD133+或 CD34+或 CD61+細胞的產生病毒的能力。(B)登革病毒在 CD133-CD34-CD61-細胞的產生病毒的能力。(C)登革病毒在 CD133+或 CD34+或 CD61+及 CD133-CD34-CD61-的產生的病毒含量的比較圖

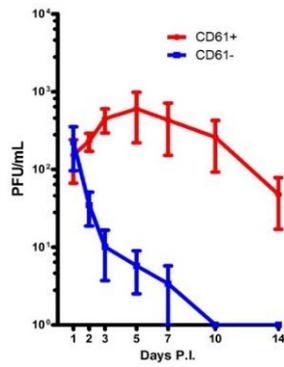


Fig4. 登革病毒在成熟的巨核細胞的感染力

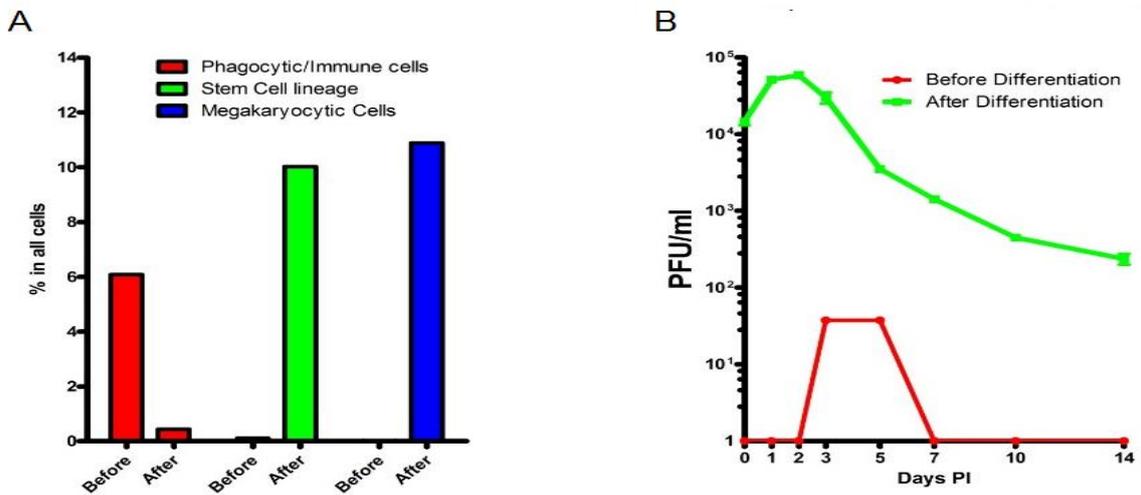
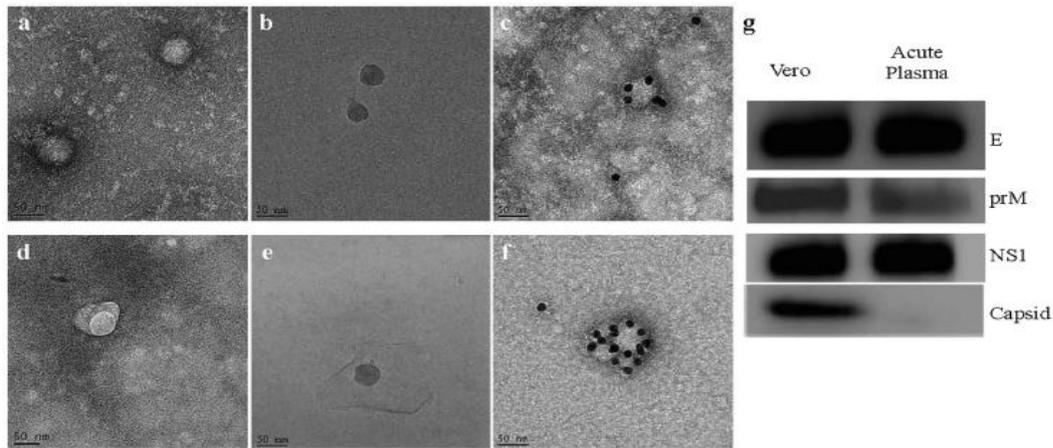
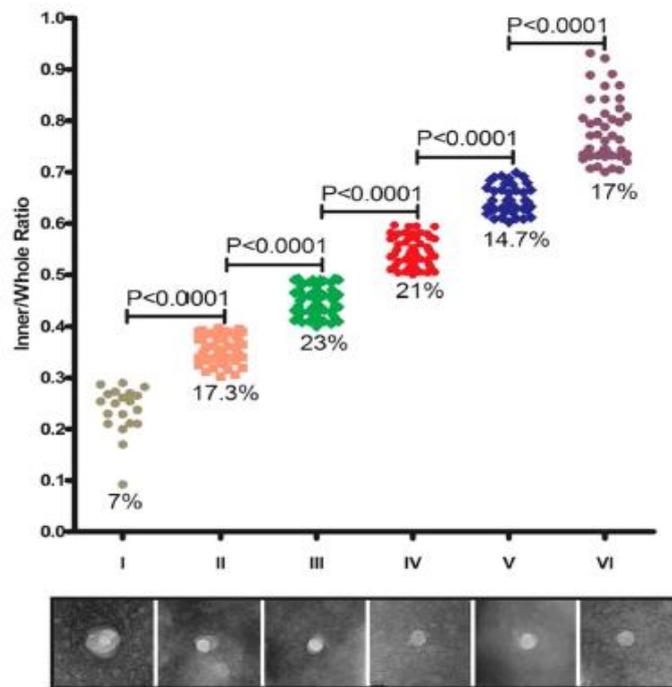


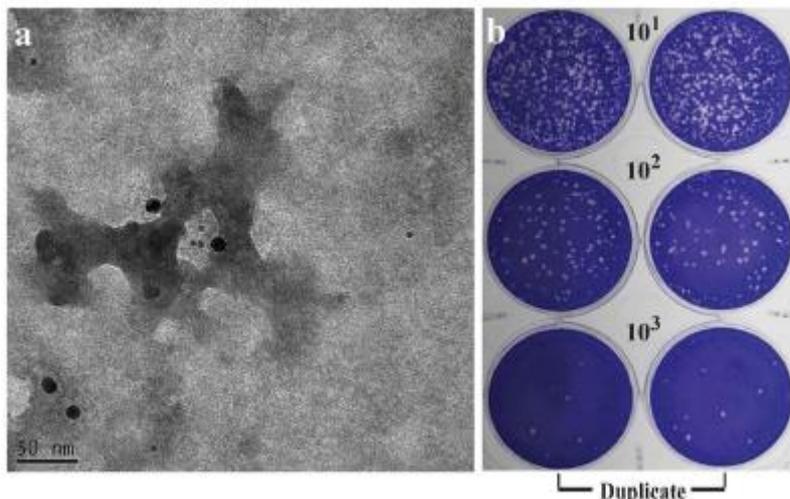
Fig5. 登革病毒在造血幹細胞分化後的巨核細胞世系的感染力。(A)造血幹細胞分化成的巨核細胞的比例。(B)登革病毒感染分化前後的細胞所產生的病毒量。



**Fig6.** 人體內登革病毒和體外培養病毒的型態差異。體外 Vero 細胞株分離的登革病毒(a)負染(Negative stain) (b)冷凍電子顯微技術(c) 免疫金原子標定技術，以 18nm 金原子標定登革病毒外膜(Envelope)蛋白的體外登革病毒顆粒；病患血清中分離出的登革病毒型態(d)負染(e)冷凍電子顯微技術(f)免疫金原子標定技術。(g)西方墨點法分析體內外登革病毒的病毒蛋白組成差異。



**Fig7. 人體內登革病毒族群分布。**利用體內登革病毒顆粒內外膜比例的不同，將體內登革病毒細分成 6 個不同的病毒族群和其所占比例的比較分析。



**Fig8. 體內培養分離之登革病毒具感染複製的能力。**(a)利用攜帶有金原子標記的病毒遺傳物質 DNA 探針序列(5'-GCT GTG TCA CCC AGA ATG GCC AT-3)專一性的標定病毒遺傳物質(6 nm)，觀察其和登革病毒外膜蛋白(18 nm)的位置。(b)利用病毒斑試驗來證實人體內發現的登革病毒之感染複製能力。

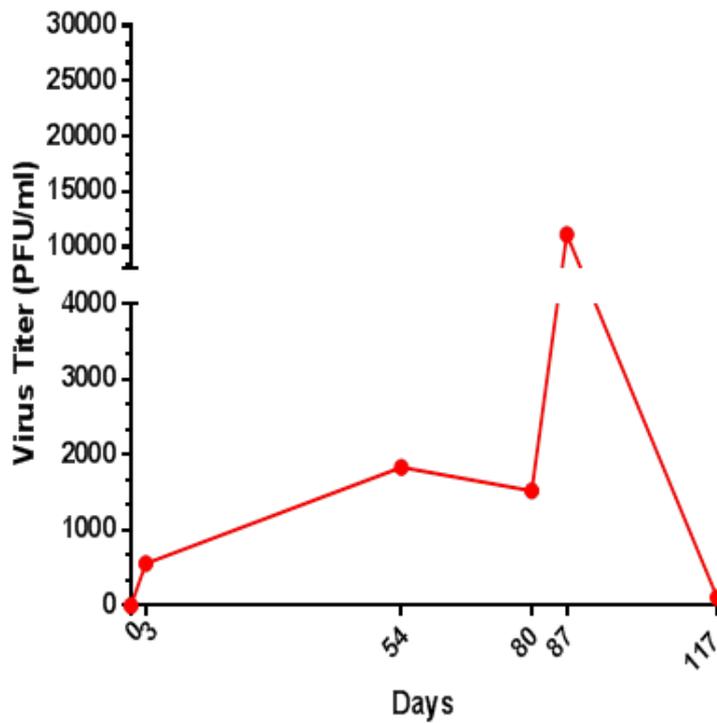


Fig9. 登革病毒在不同抽血時間所得到的不顯性感染者周邊血細胞的感染能力

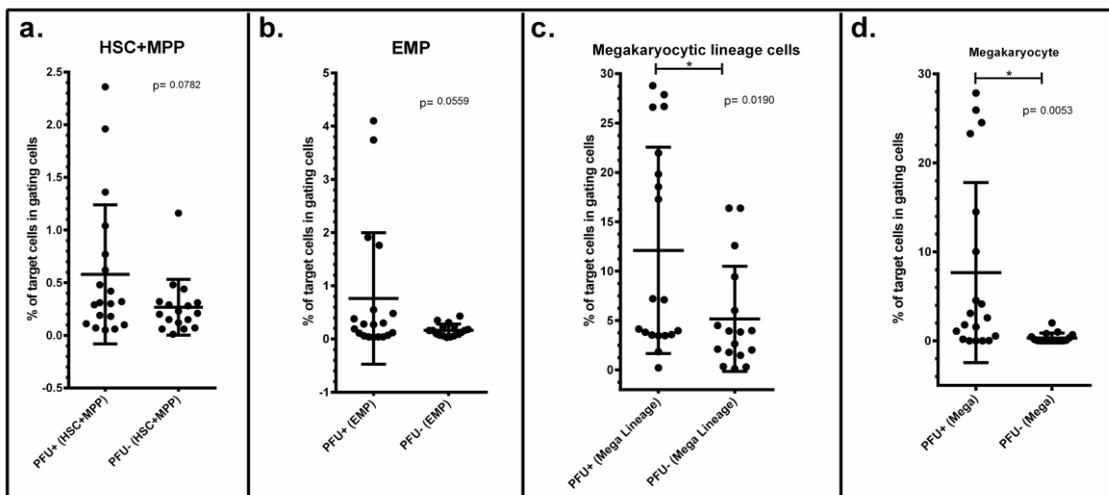
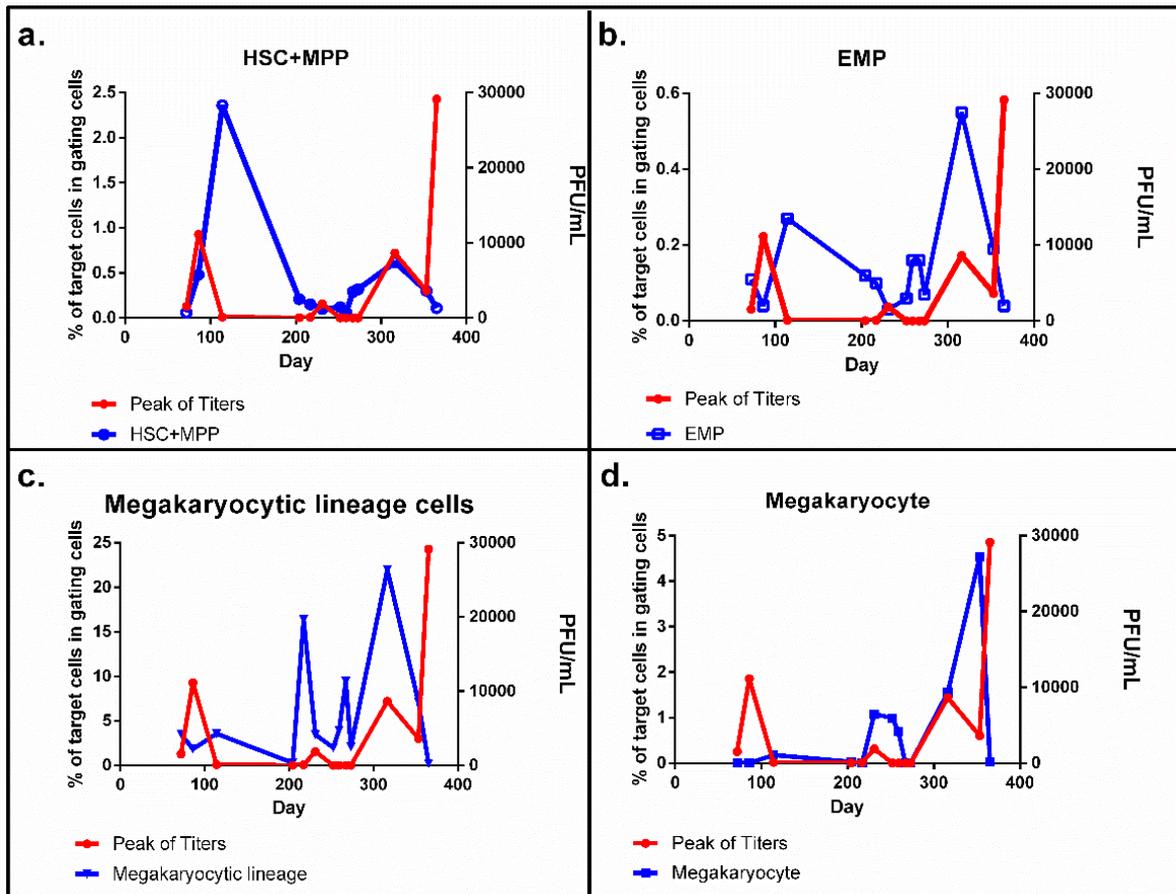


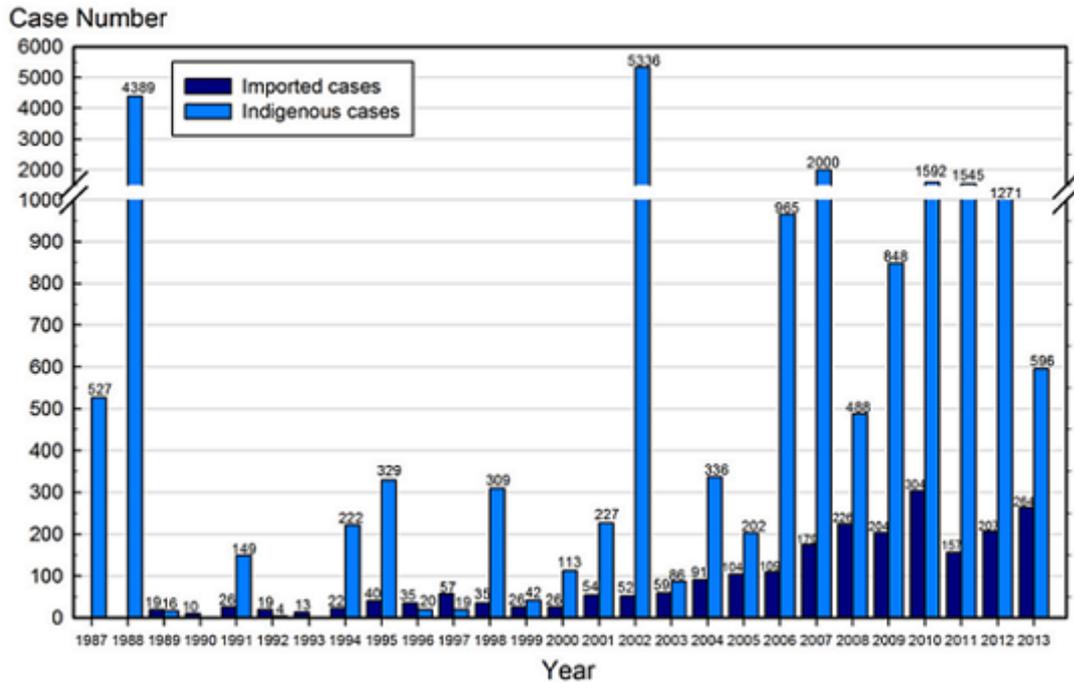
Fig10. 登革病毒在不顯性感染者周邊血球的感染性組別與細胞族群的含量百分比。a.)血球幹細胞(Hematopoietic Stem Cell-HSC, Multi-Potent Progenitor cell-MPP)。b.)巨核前驅細胞(Early Megakaryocyte Progenitor-EMP)。c.)巨核細胞世系(Megakaryocytic lineage cell)。d.)成熟的巨核細胞(Megakaryocyte)



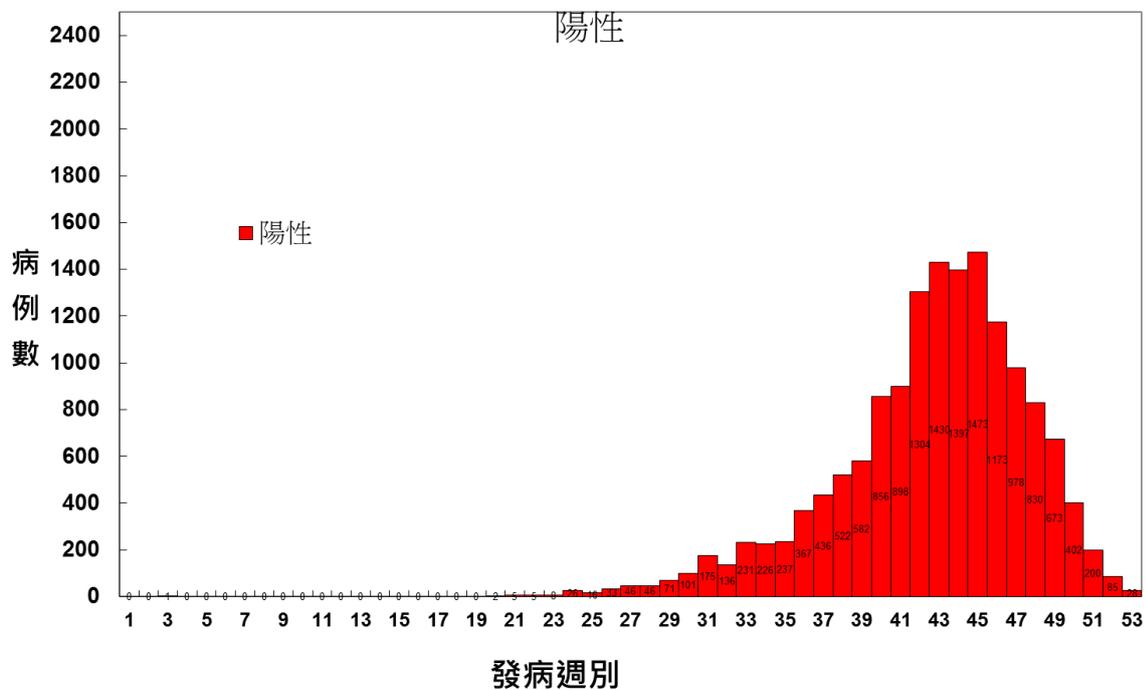
**Fig11.** 不顯性感染者的特定細胞含量變化以及病毒產生量變化。

a.)血球幹細胞(Hematopoietic Stem Cell-HSC, Multi-Potent Progenitor cell-MPP)。b.)巨核前驅細胞(Early Megakaryocyte Progenitor-EMP)。c.)巨核細胞世系(Megakaryocytic lineage cell)。d.)成熟的巨核細胞(Megakaryocyte)

(子計畫三) 2014年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探--某醫學中心  
 照護病例對照研究

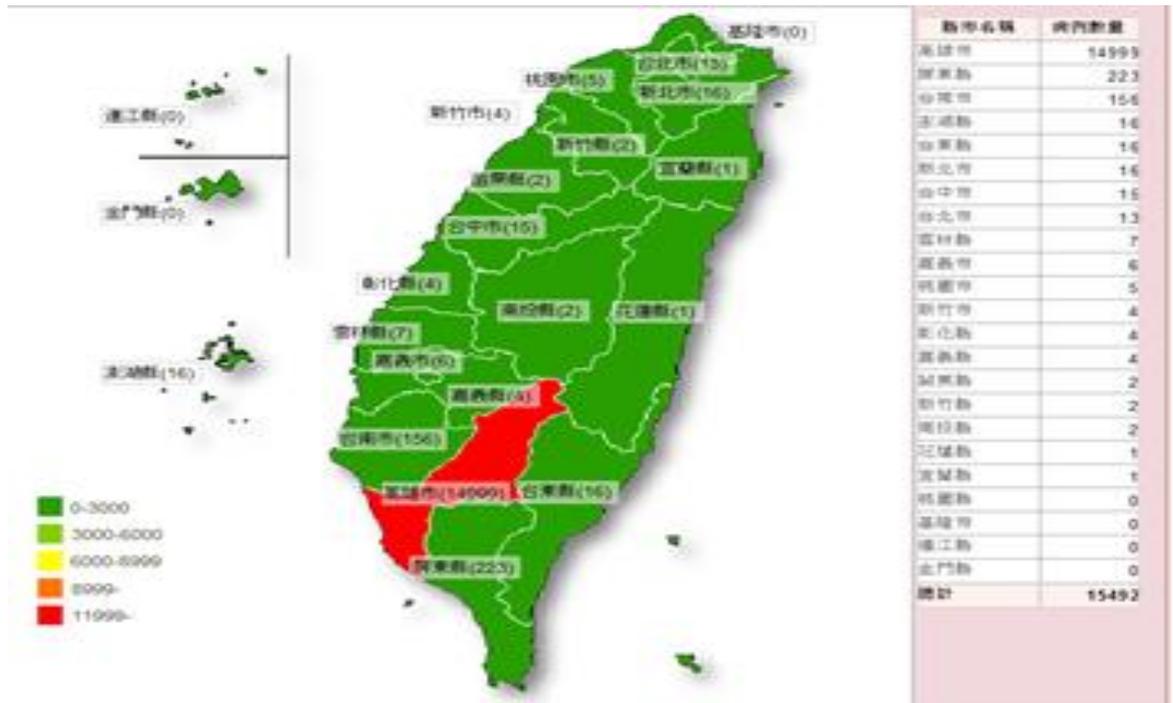


圖一、1987-2013 年全國登革熱確診病例數統計圖

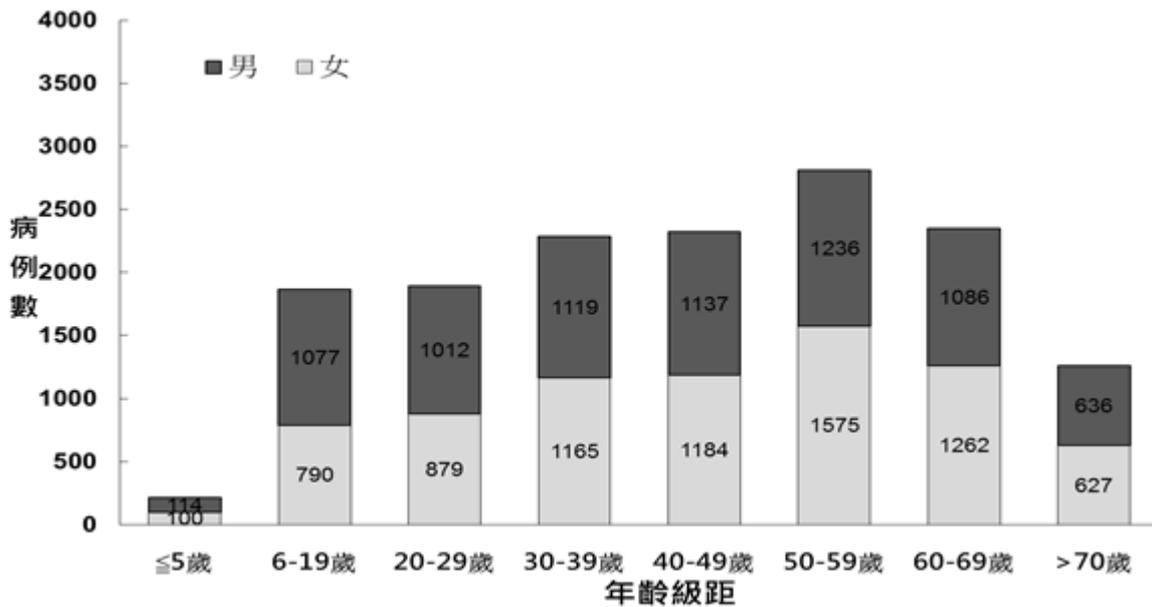


圖二、2014 年全國登革熱確診病例之流行曲線圖 (資料來源: 疾病管制署)

法定傳染病統計資料)



圖三、2014 年全國登革熱本土確診病例居住縣市分布圖

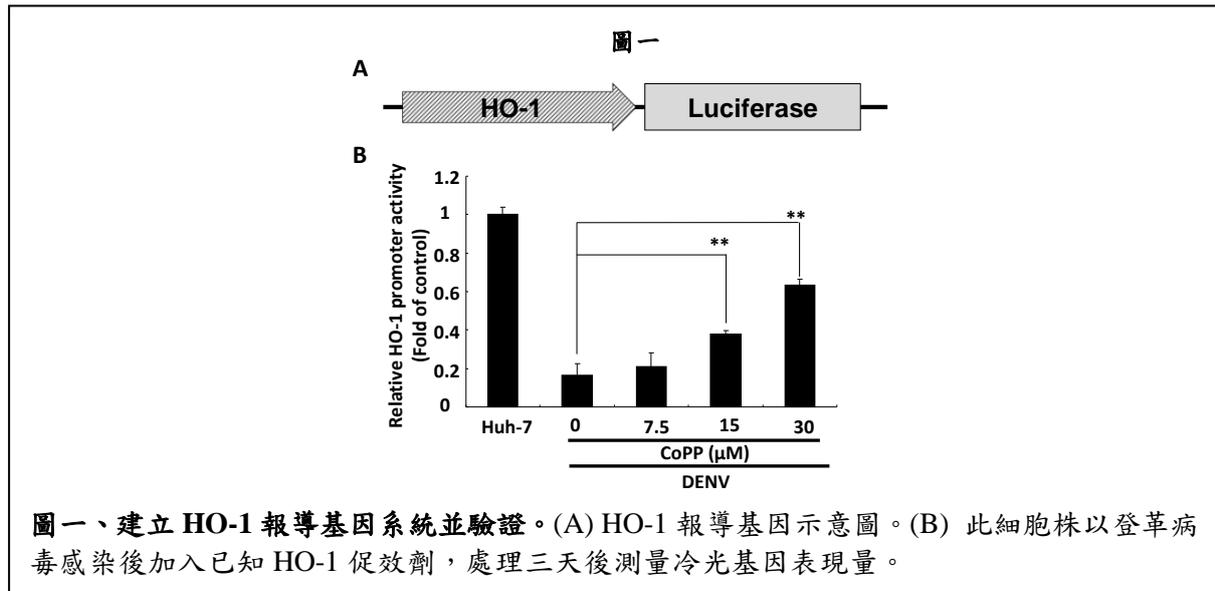


圖四、2014 年全國登革熱本土確診病例年齡與性別分布圖

(子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析(詳見內文)

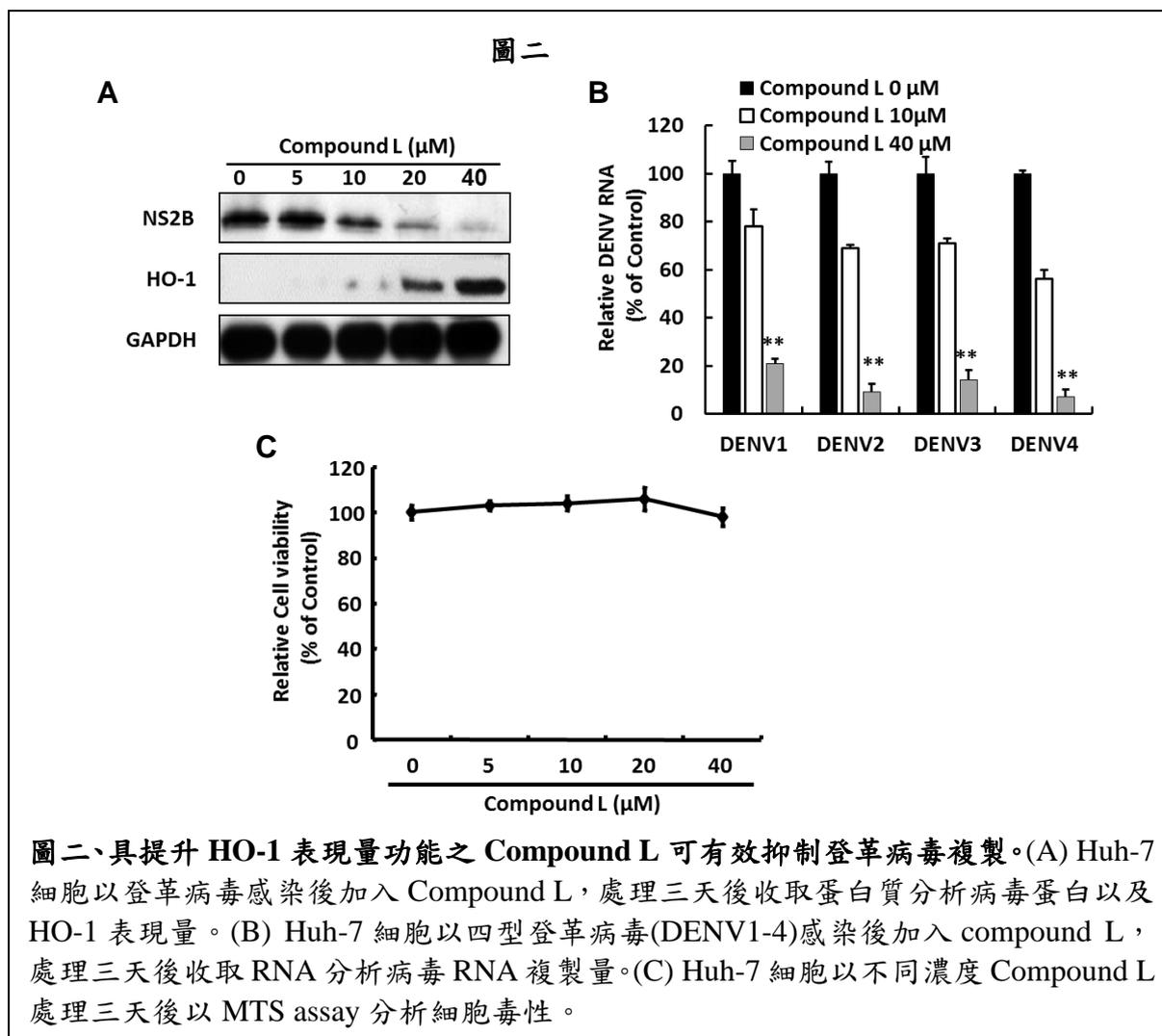
(子計畫六) 抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然  
藥物研發

14-1. 圖一

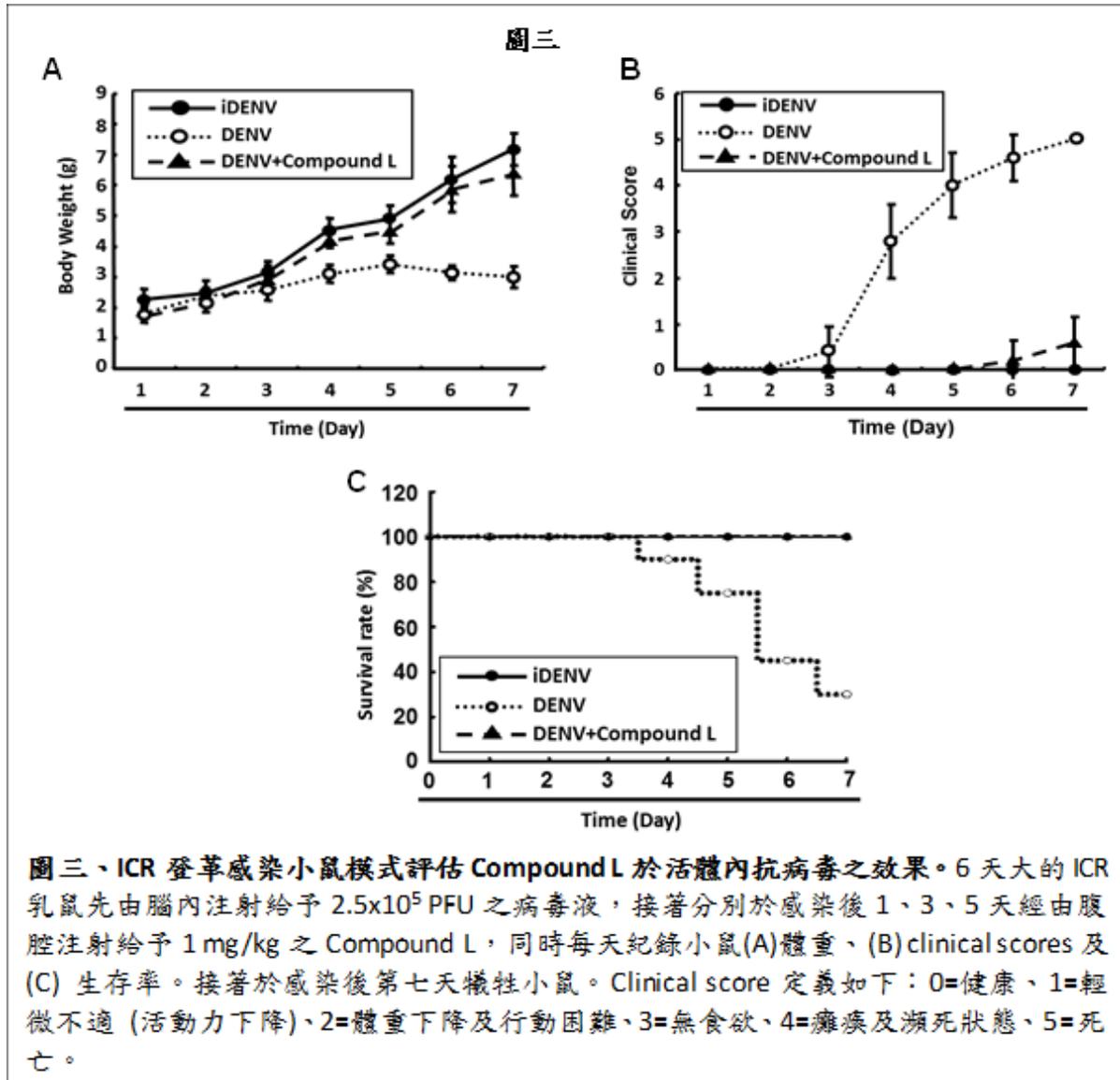


圖一、建立 HO-1 報導基因系統並驗證。(A) HO-1 報導基因示意圖。(B) 此細胞株以登革病毒感染後加入已知 HO-1 促效劑，處理三天後測量冷光基因表現量。

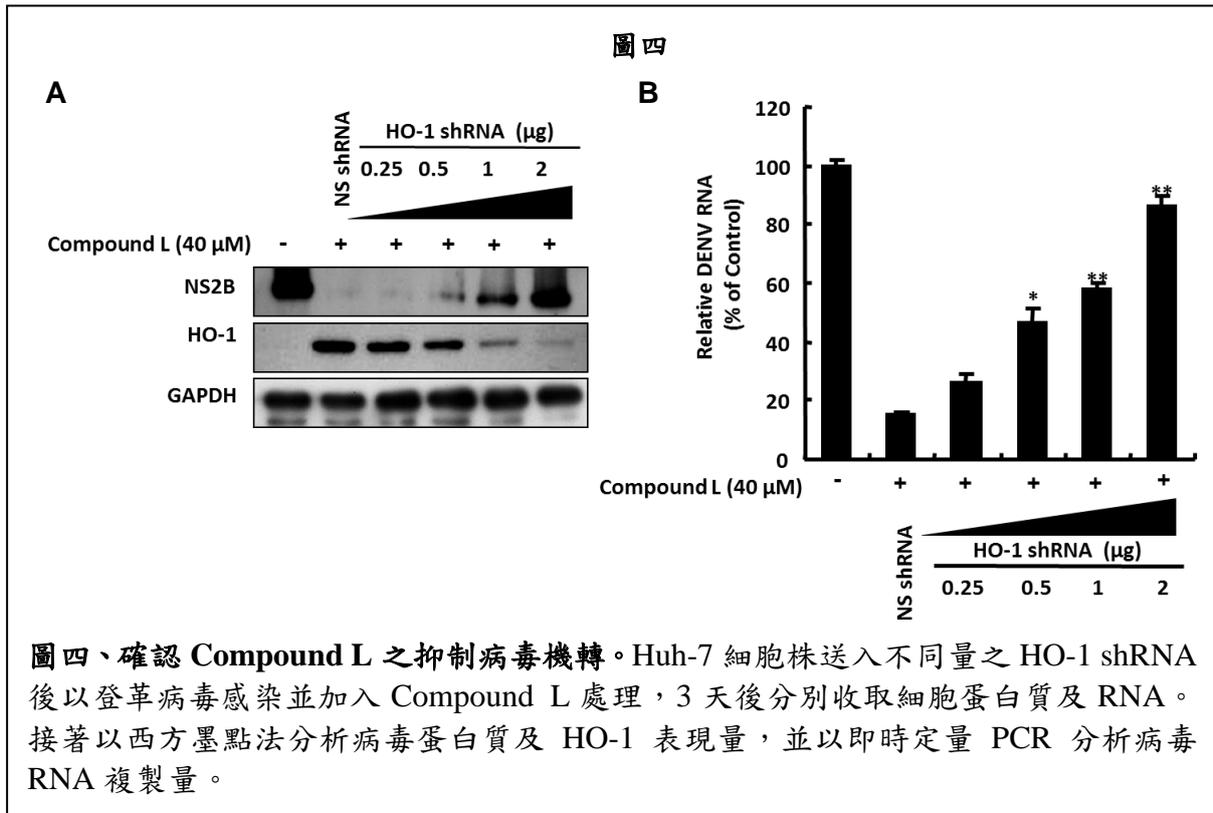
14-2. 圖二



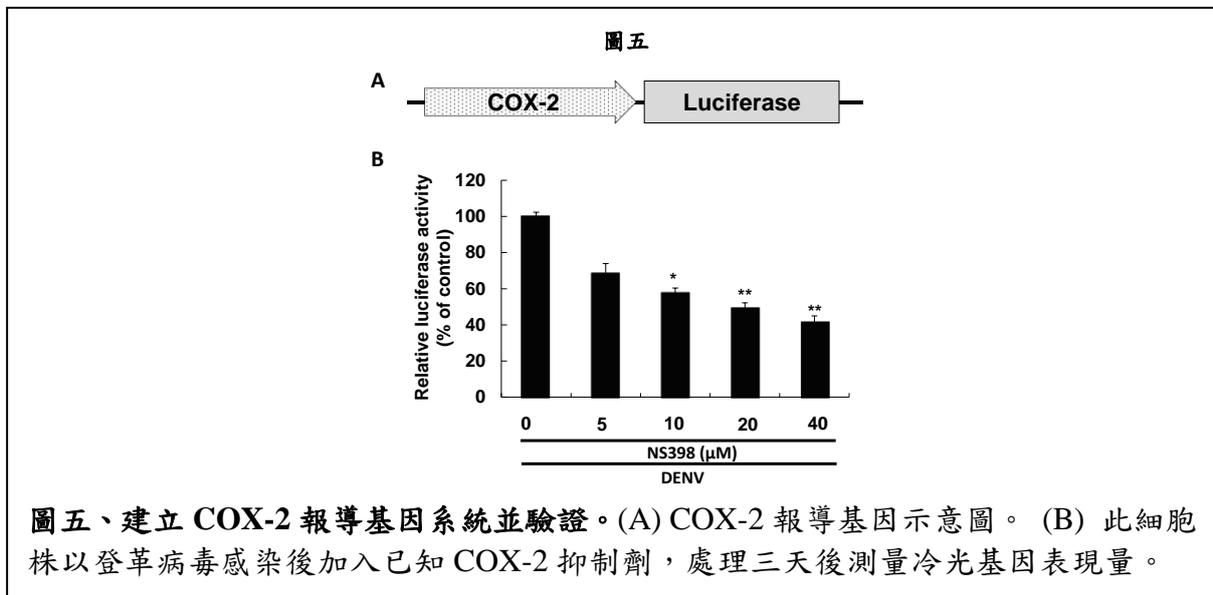
14-3. 圖三



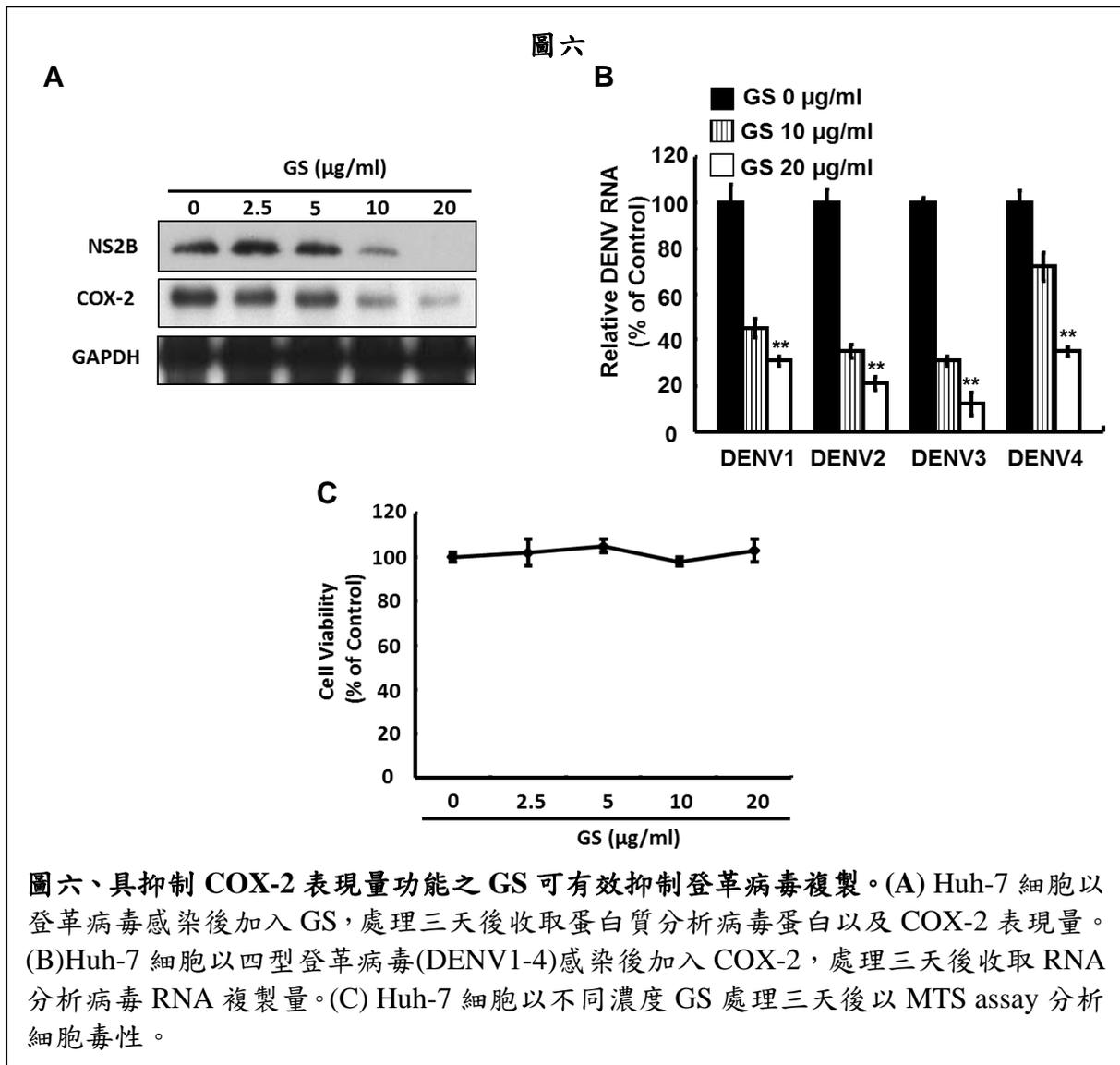
14-4. 圖四



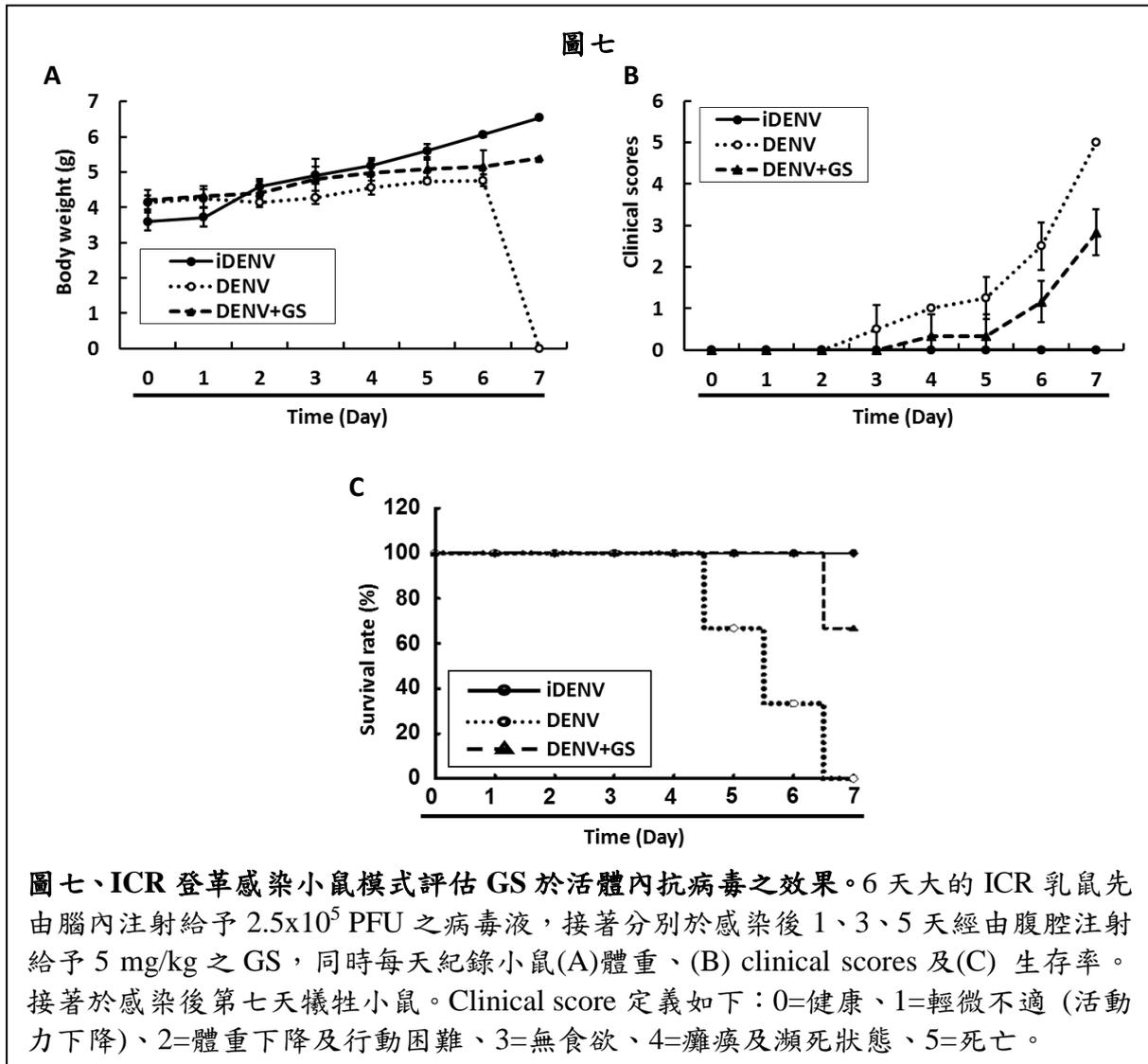
14-5. 圖五



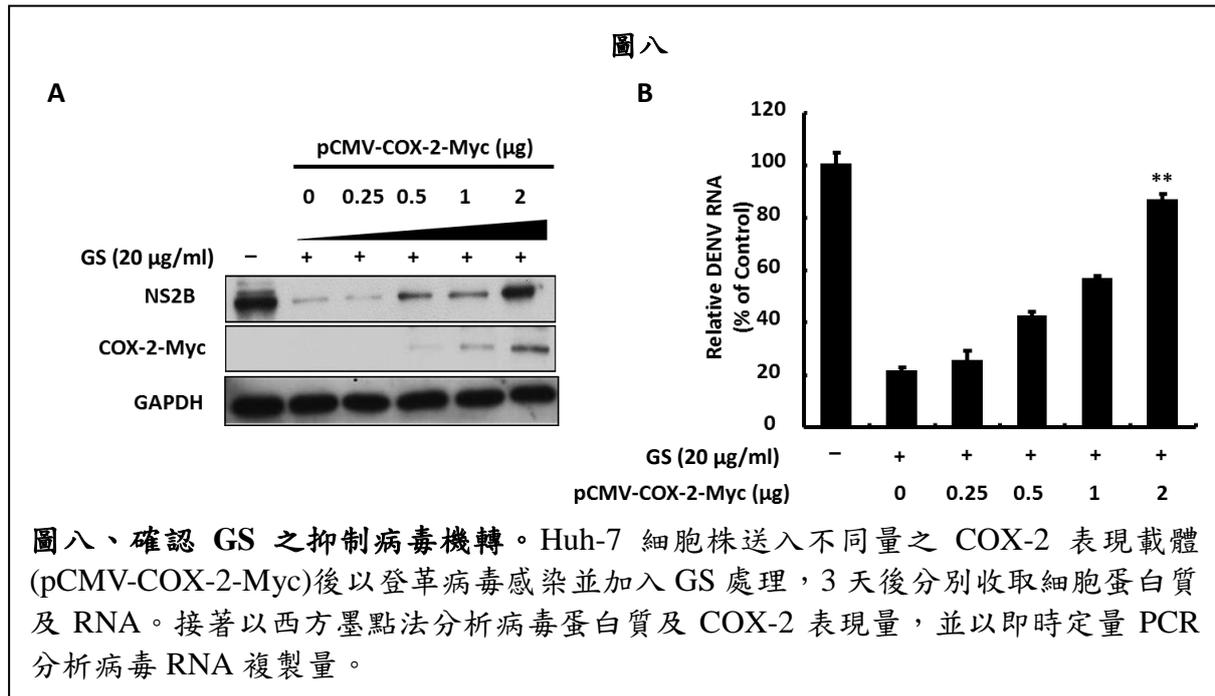
14-6. 圖六



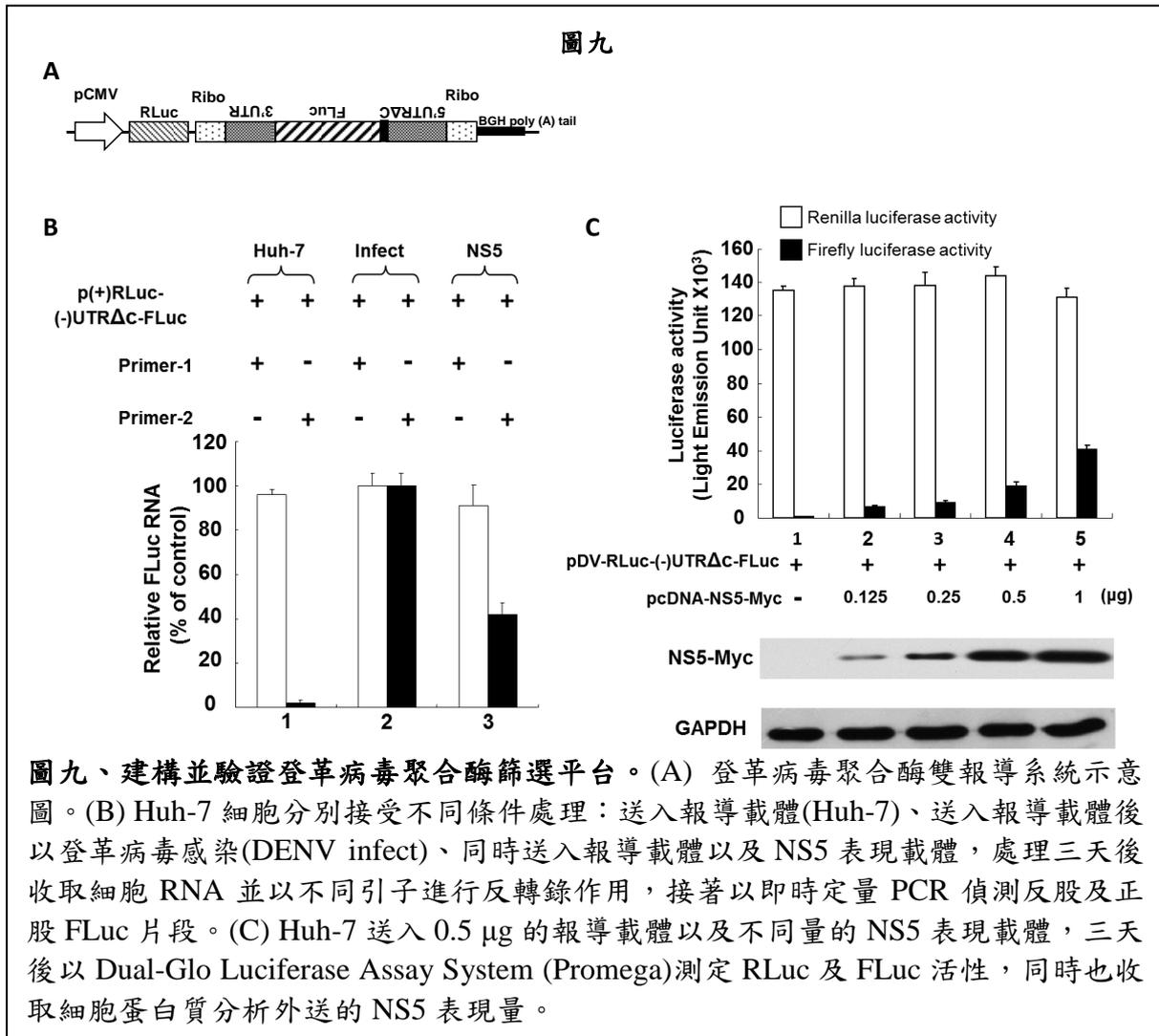
14-7. 圖七



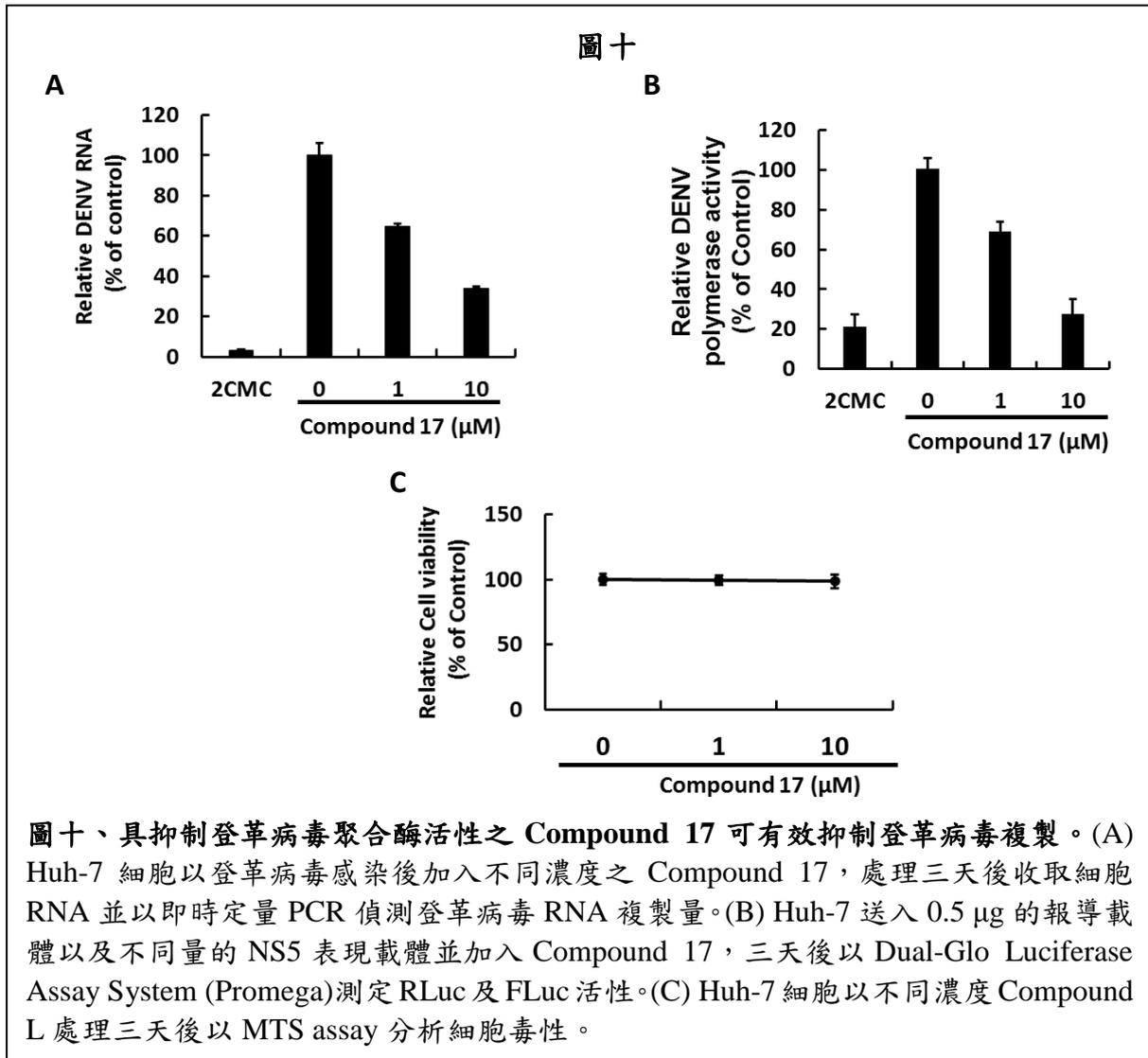
14-8. 圖八



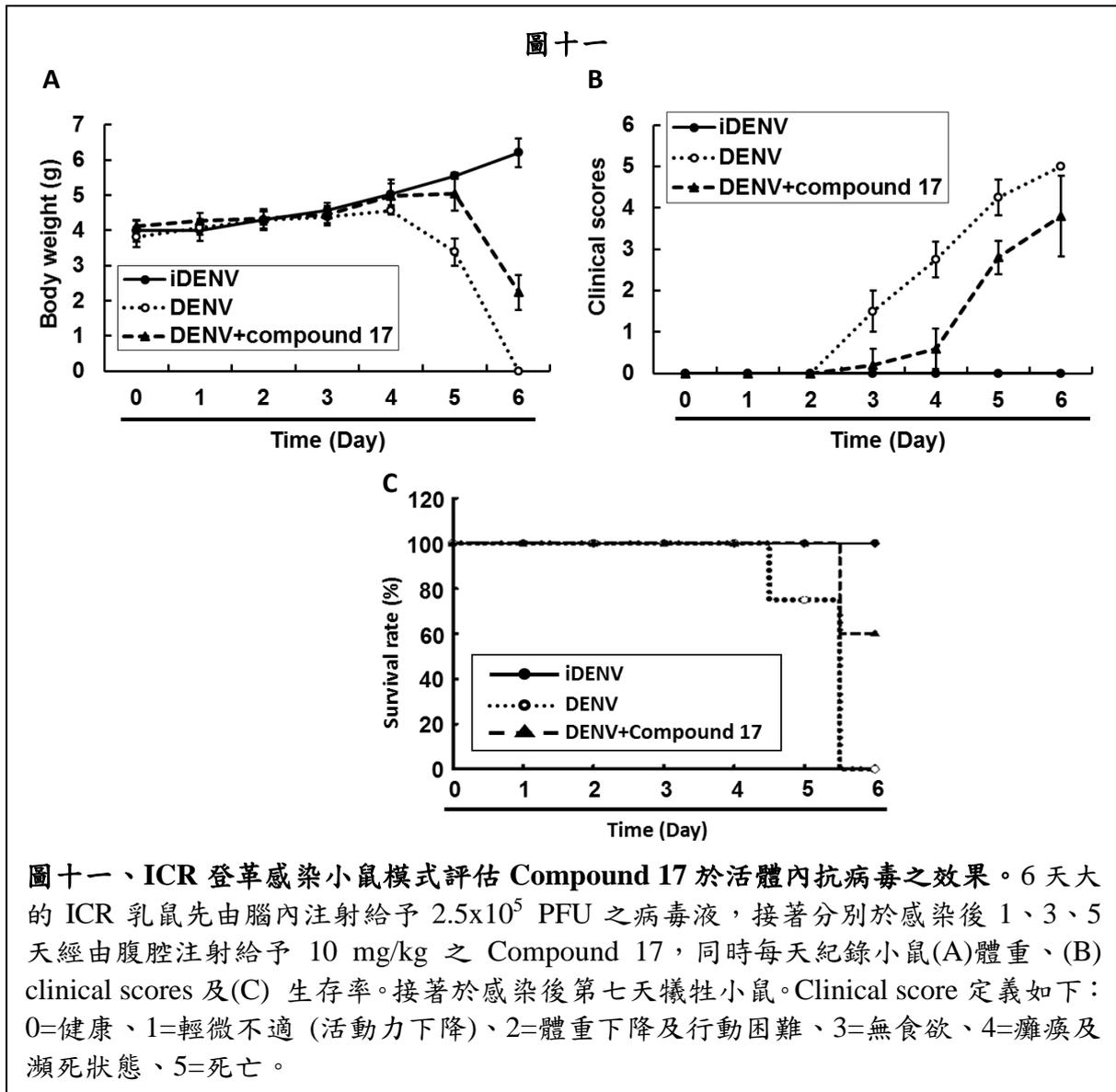
14-9. 圖九



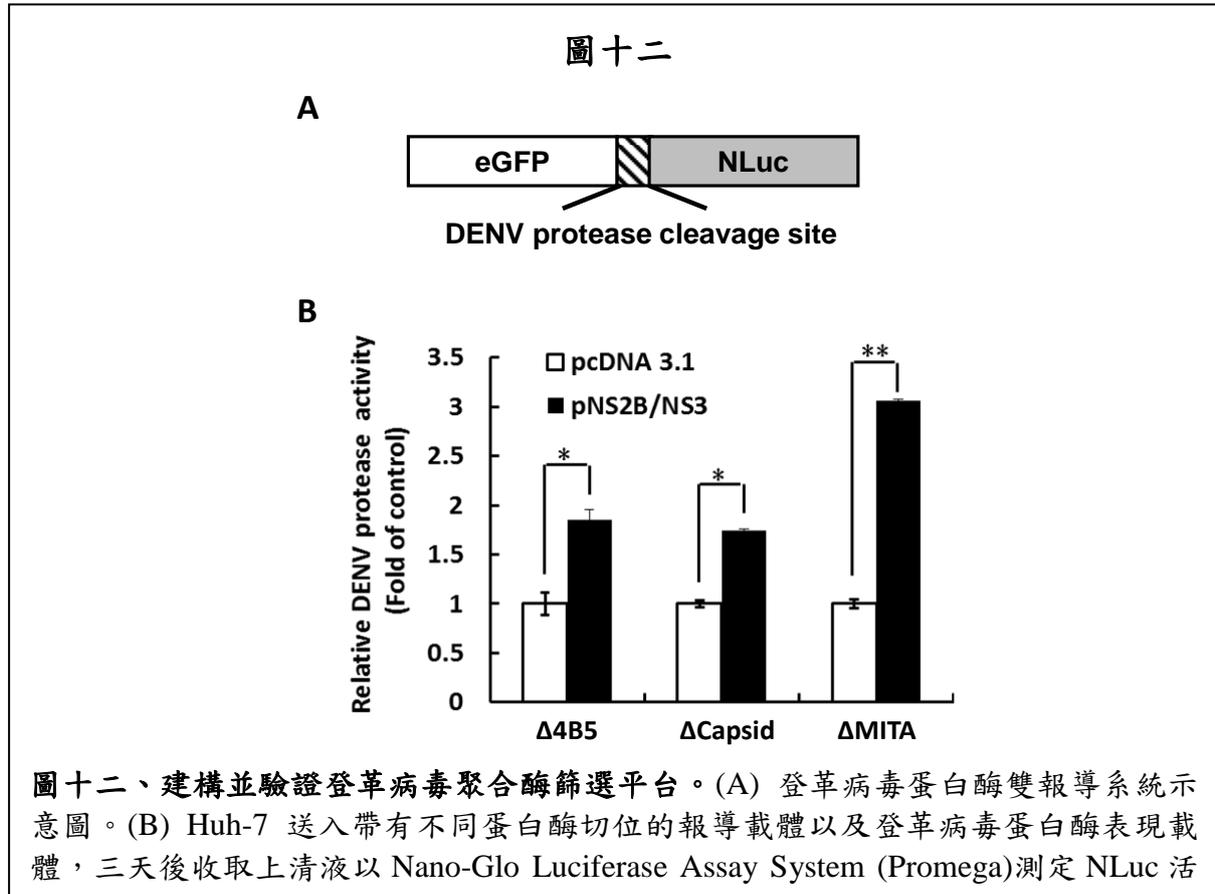
14-10. 圖十



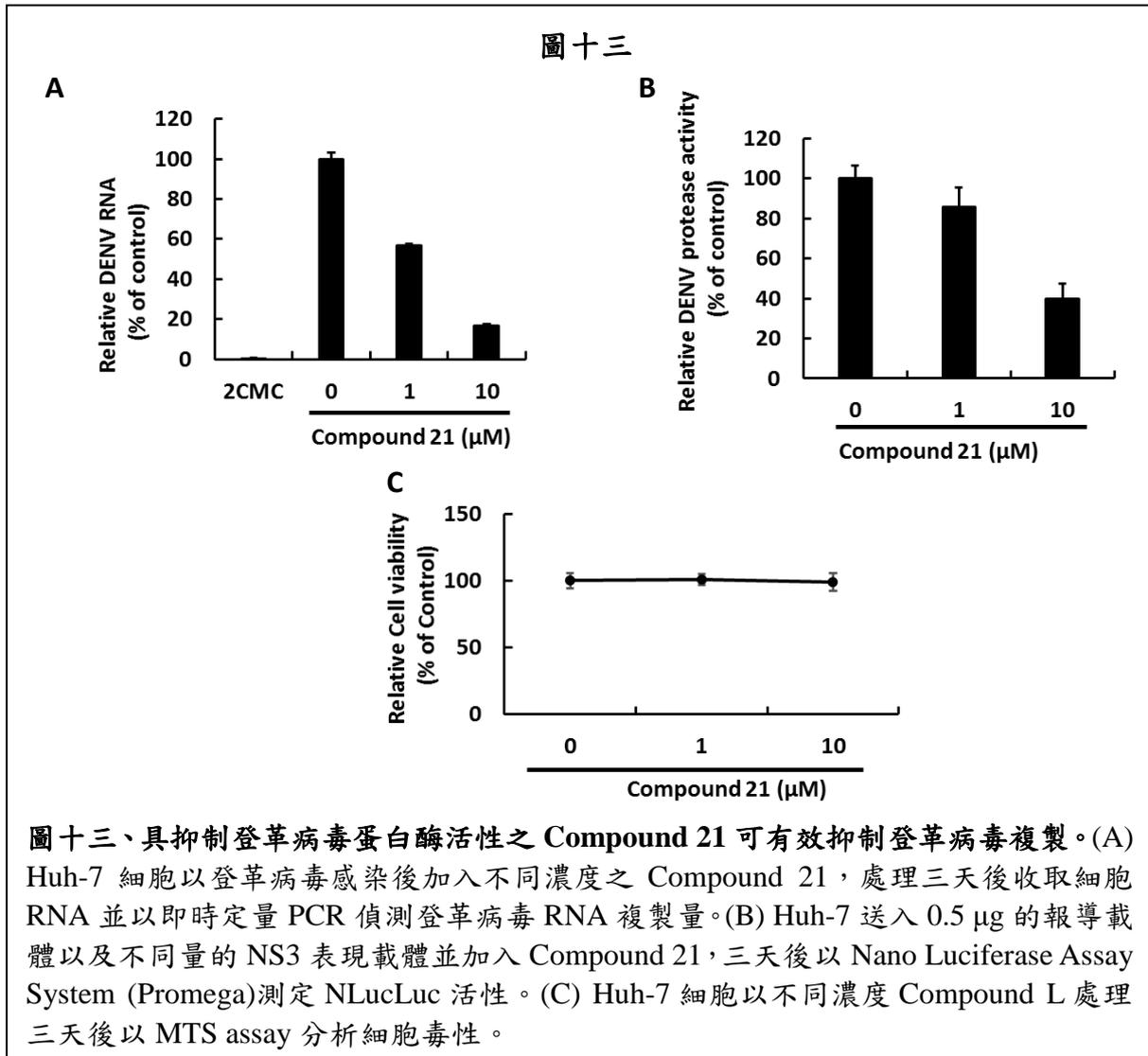
14-11. 圖十一



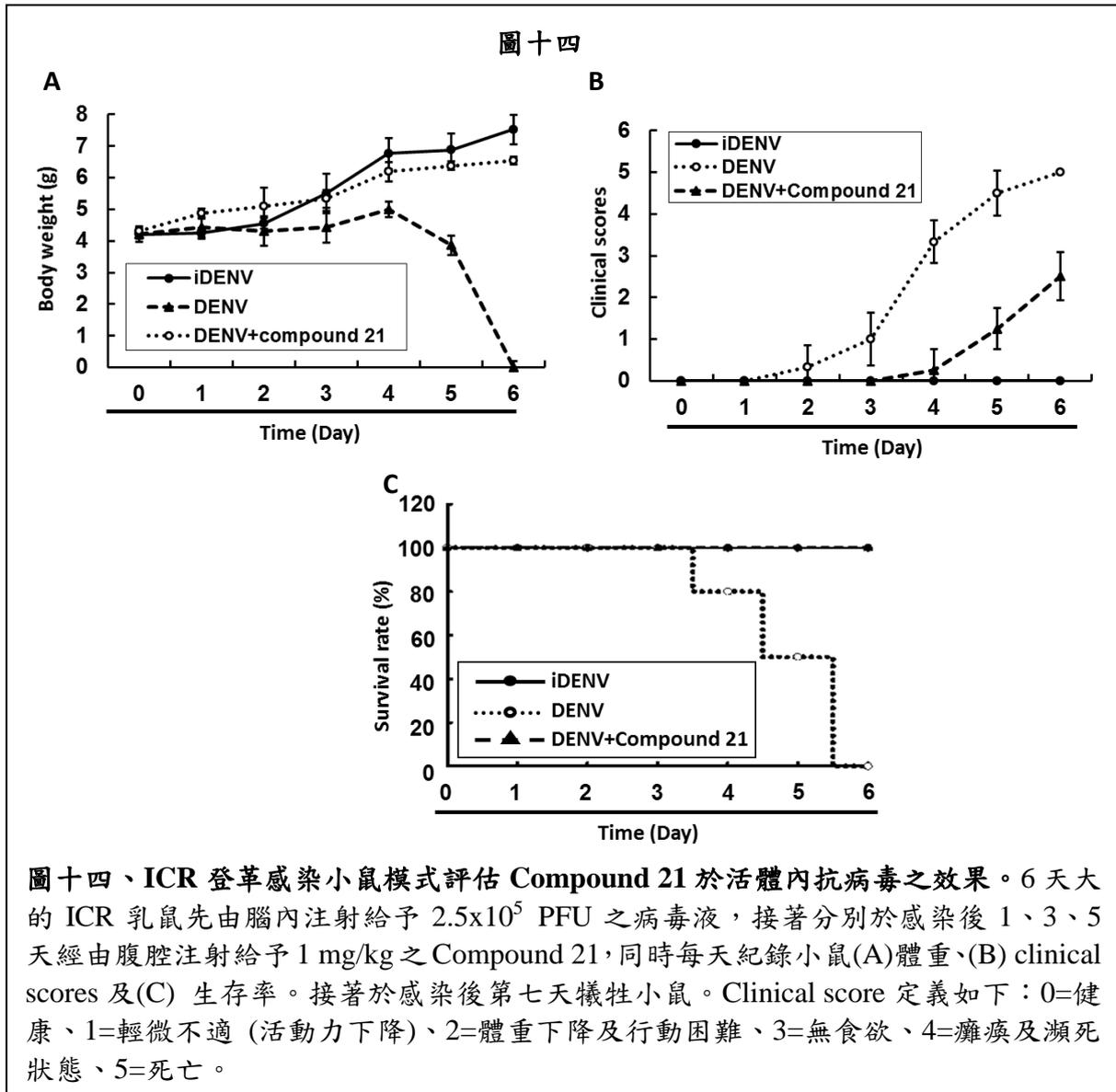
14-12. 圖十二



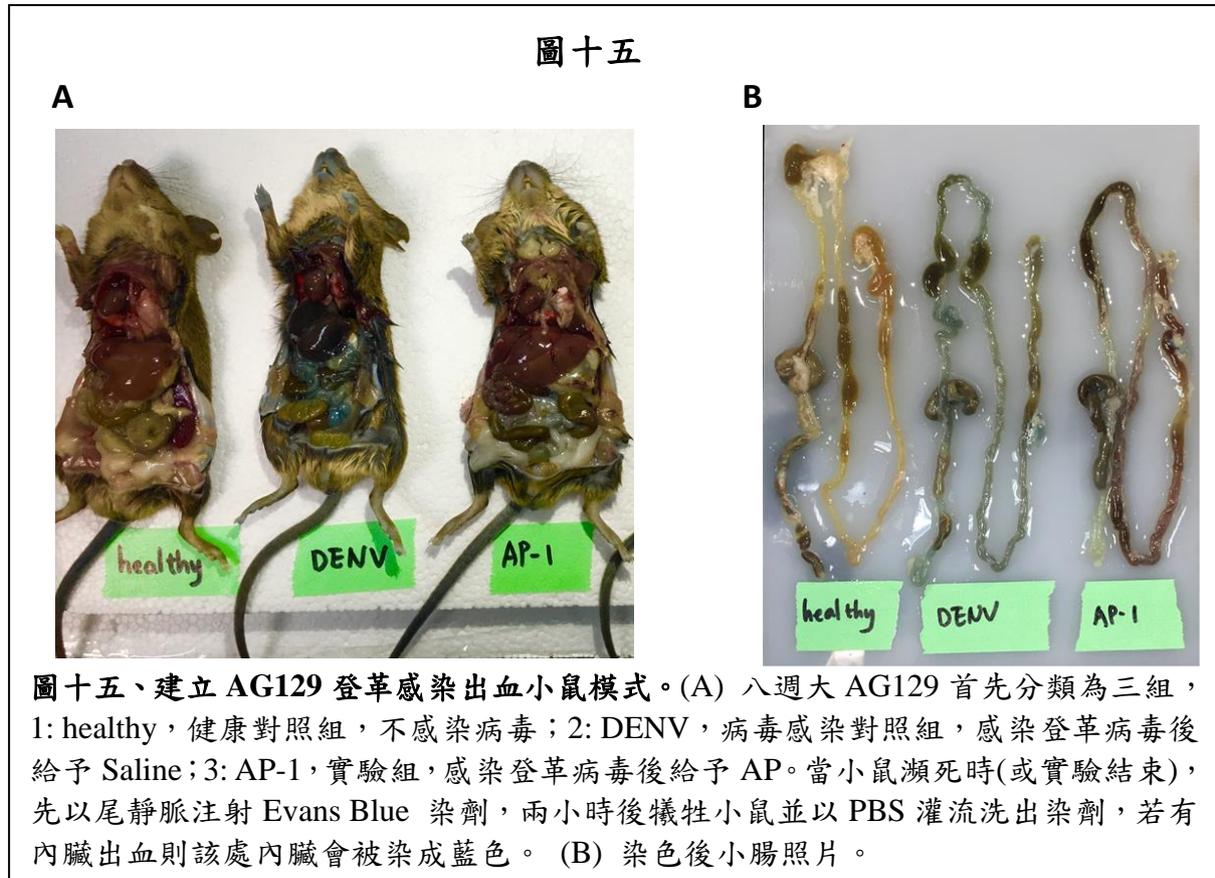
14-13. 圖十三



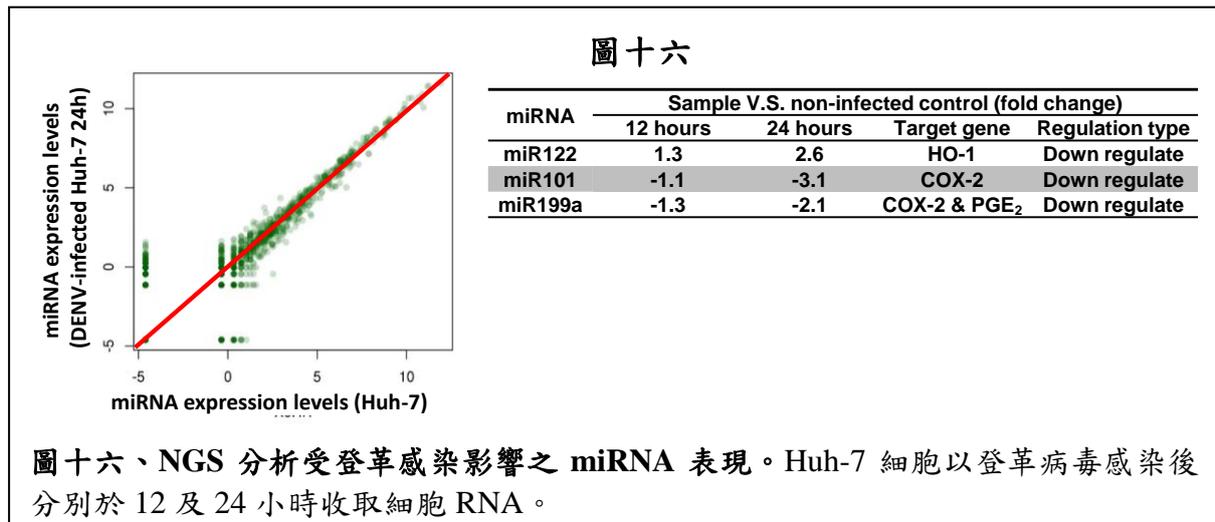
14-14. 圖十四



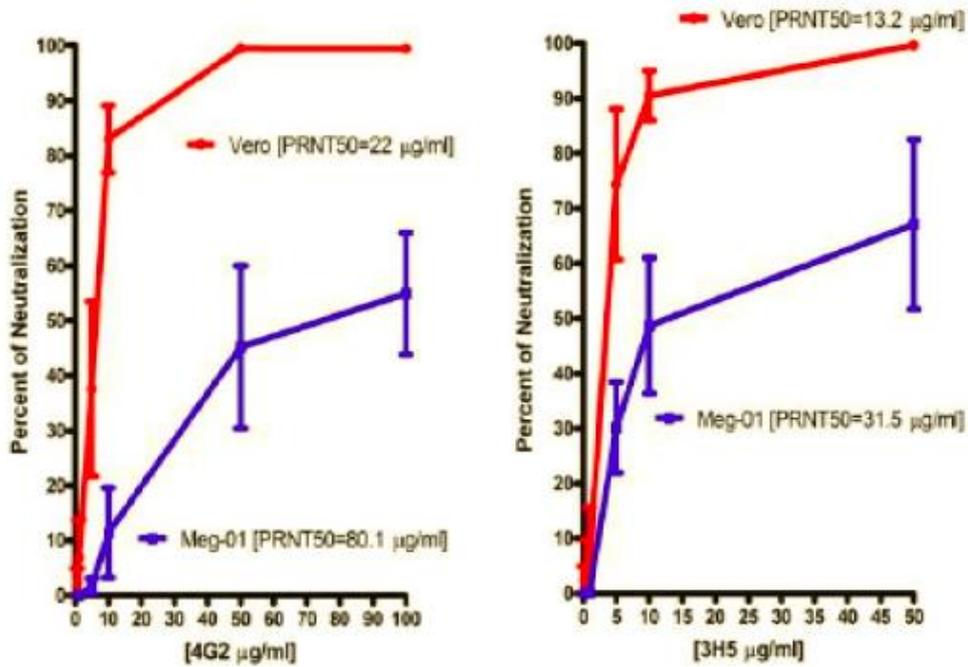
14-15. 圖十五



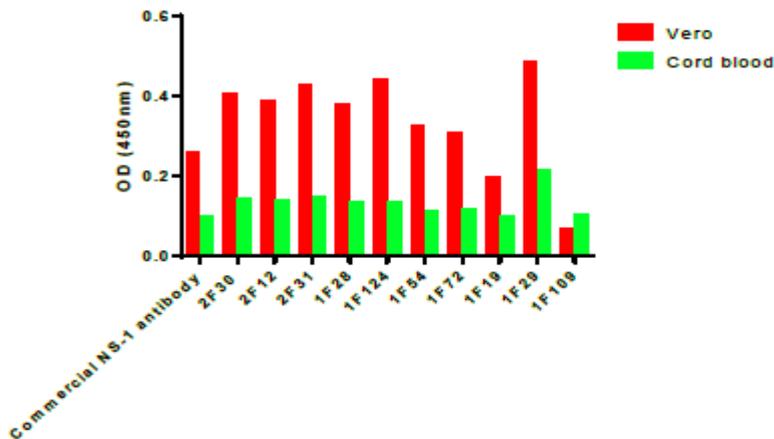
14-16. 圖十六



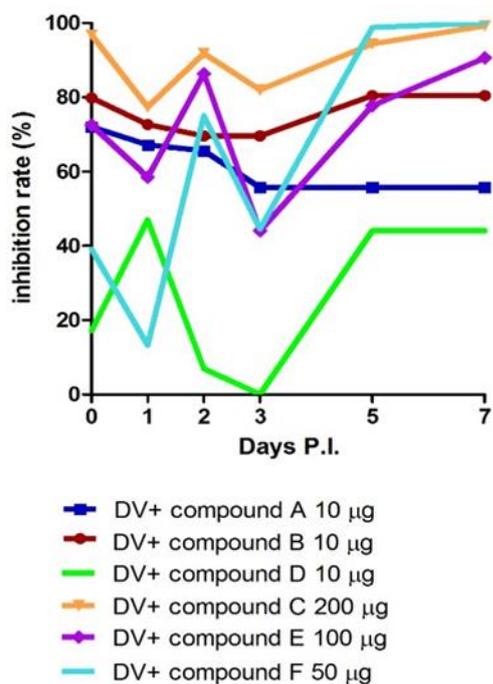
(子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗



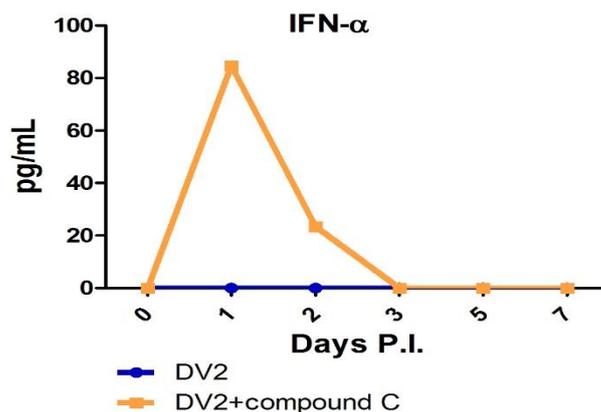
圖一、4G2 和 3H5 抗體中和巨核細胞株表現的病毒顆粒能力為弱



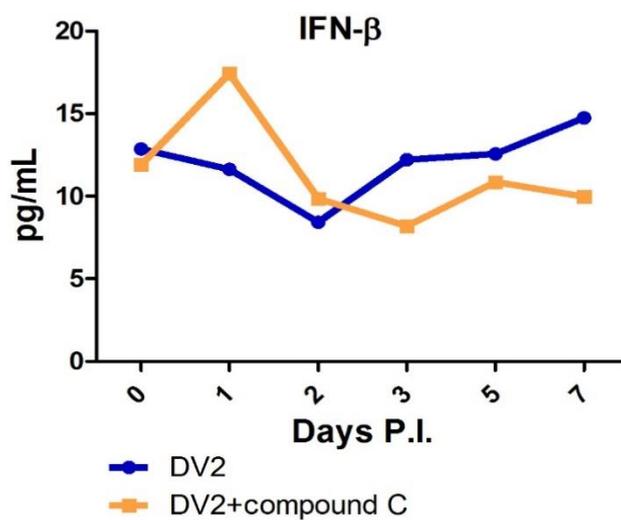
圖二、抗體辨識產至人類臍帶血細胞(cord blood)或非洲綠猴細胞株(vero)的登革病毒液中 NS-1 的能力



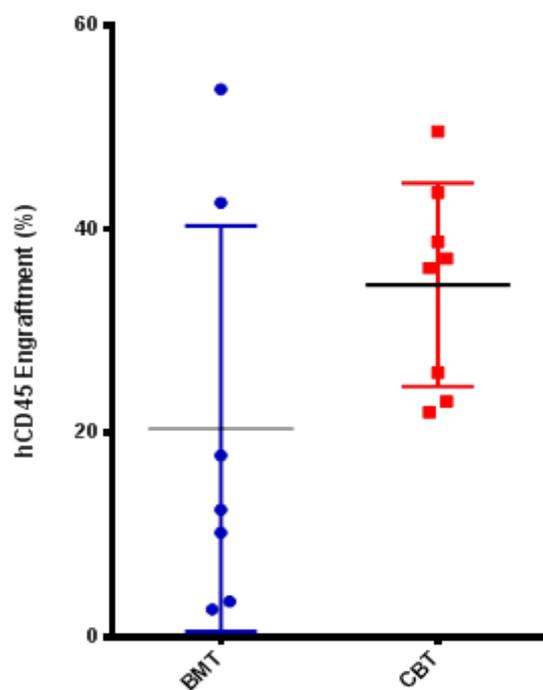
圖三、牛樟芝萃取物抑制登革病毒複製的比例。巨核細胞株同時加入登革病毒與各濃度芝牛樟芝萃取物。以病毒斑偵測不同時間點登革病毒含量，分析藥物處理組和藥物未處理組的病毒含量，計算藥物對登革病毒抑制能力的差別。



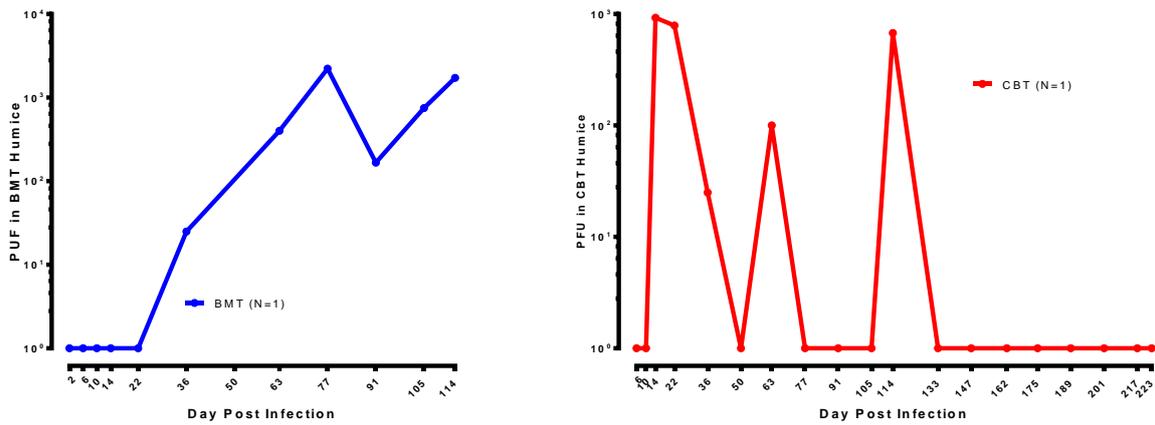
圖四、牛樟芝萃取物 C 處理的巨核細胞株能表現高量的 Type I IFN-a



圖五、牛樟芝萃取物 C 處理的巨核細胞株能表現高量 Type I IFN-b



圖六、人類 CD45 在臍帶血細胞或骨髓細胞所建立擬人化小鼠體內的表現量

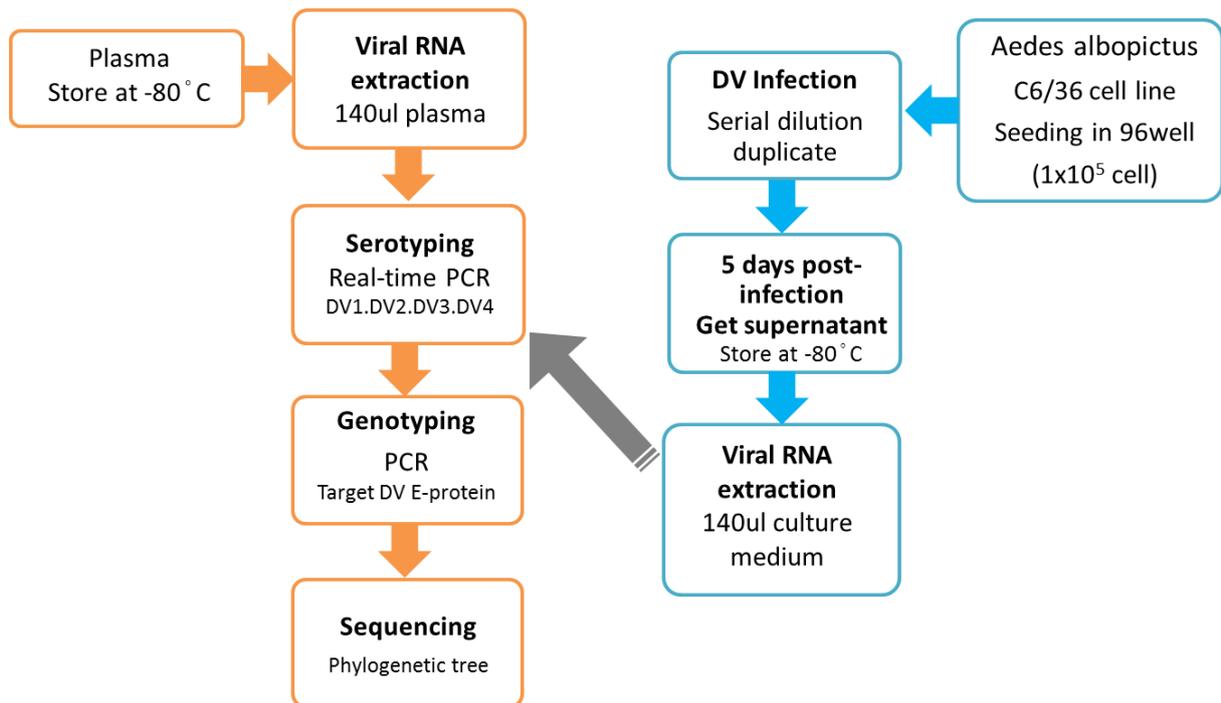


圖七、登革病毒在 CBT 或 BMT-humice 體內病毒複製的曲線圖

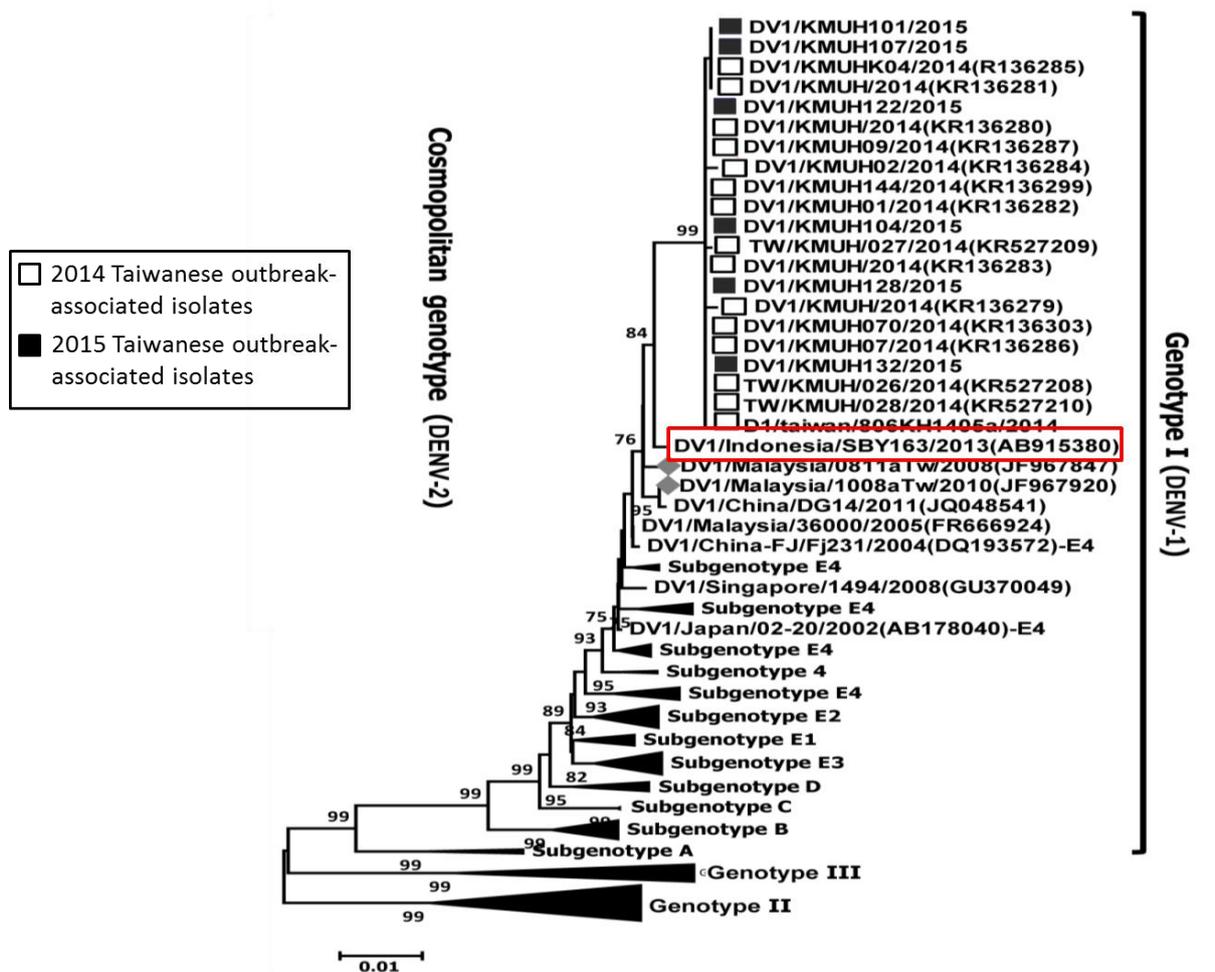
(子計畫九)台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析



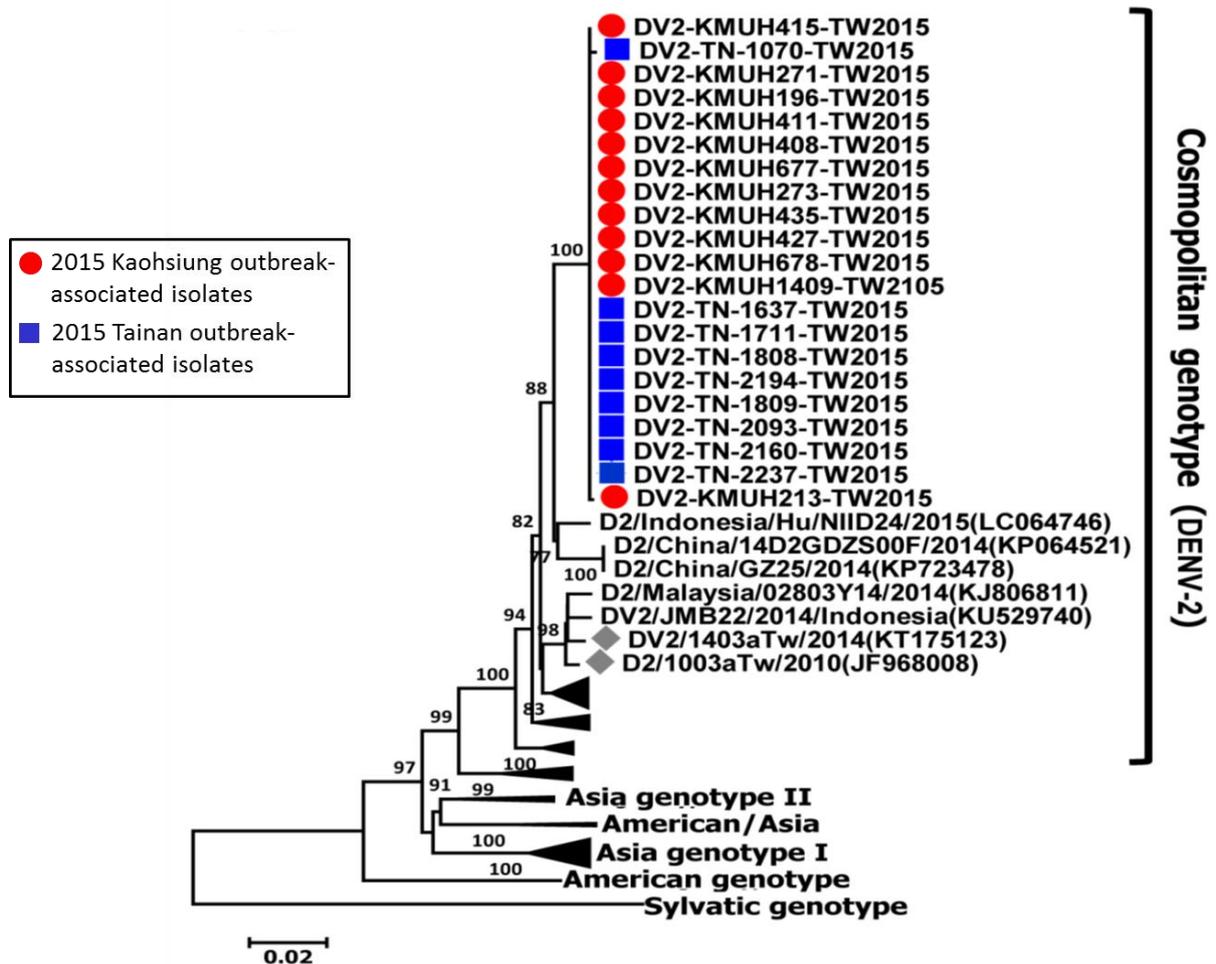
圖一、受 EBV 感染致使不死化之人類 B 細胞株表現出聚集現象



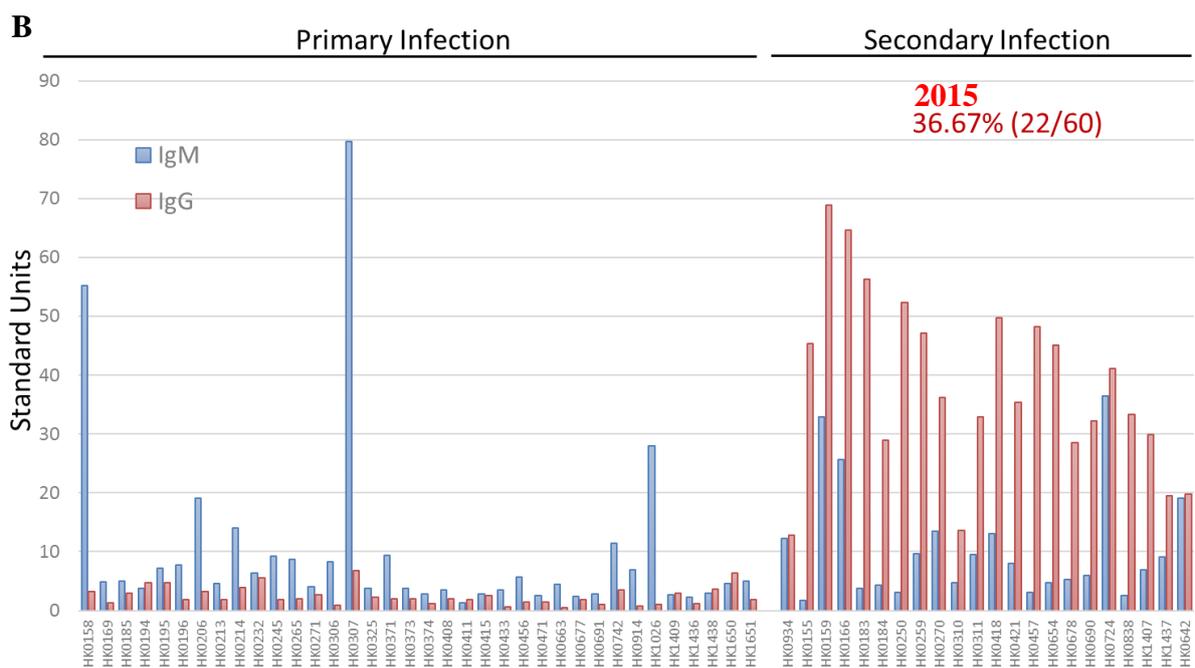
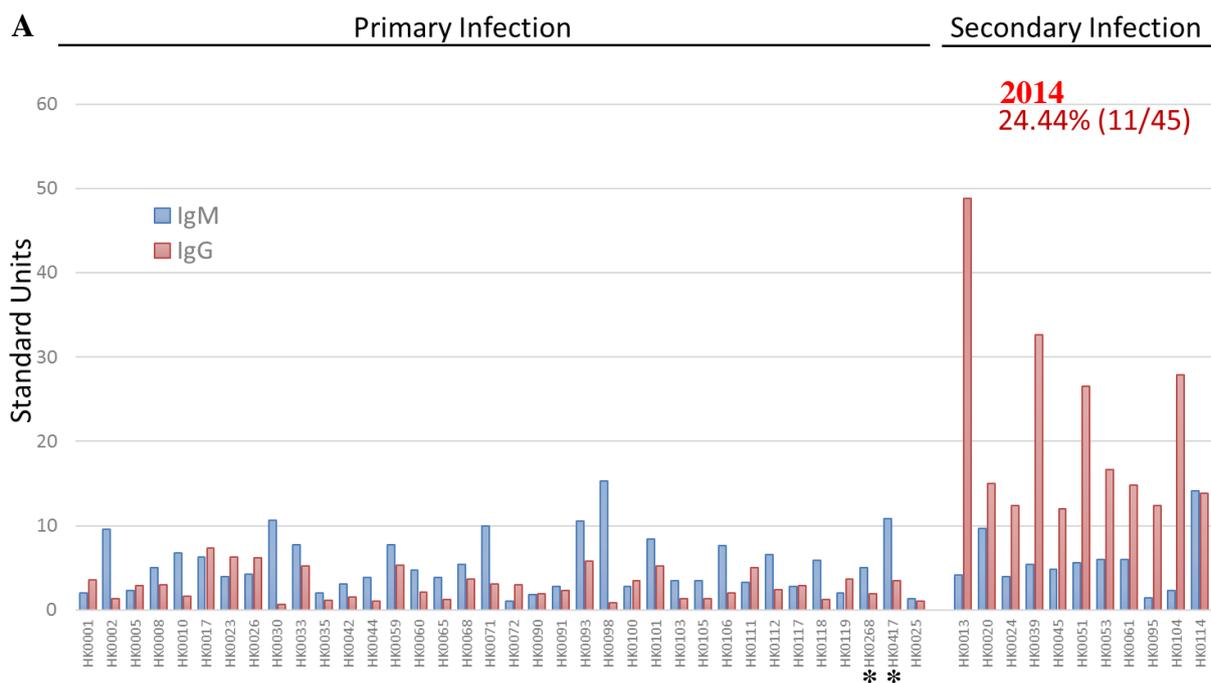
圖二、登革熱患者血漿檢體之RNA萃取與病毒感染C6/36細胞培養擴增之流程圖



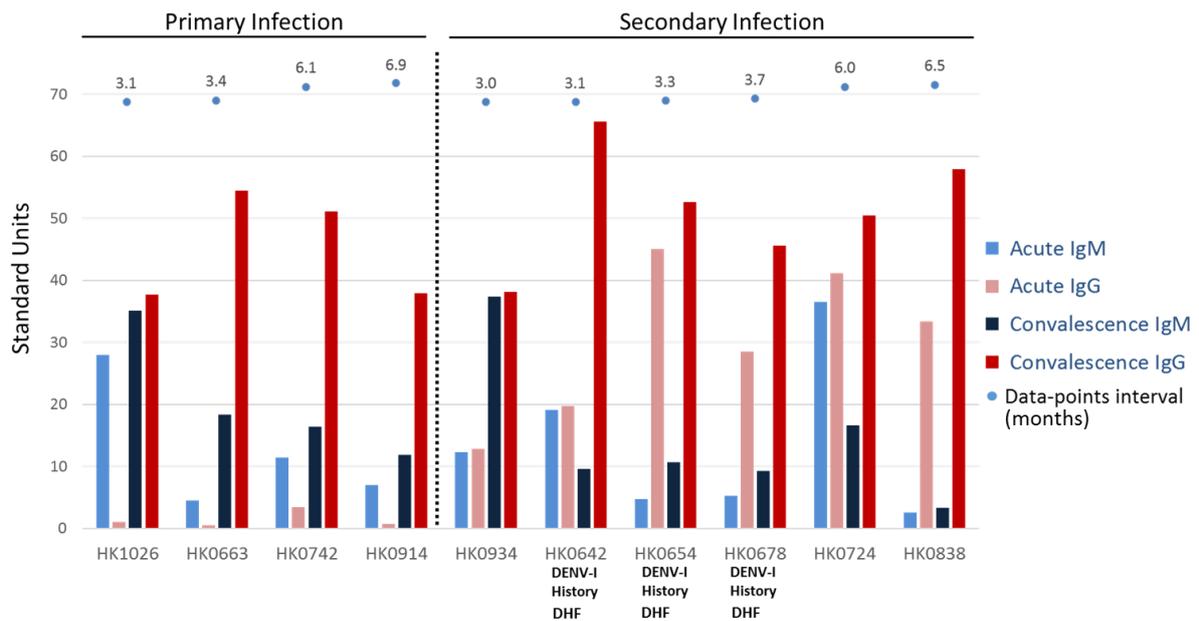
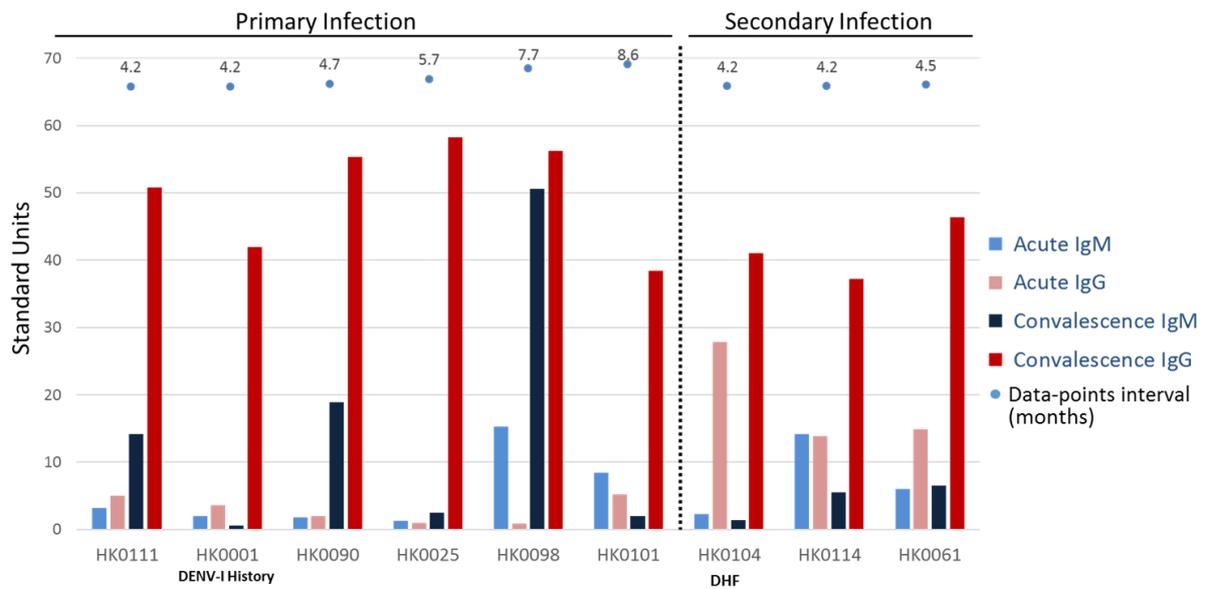
圖三、2014 及 2015 年感染登革熱一型病毒患者之病毒 *env* 序列 Neighbor-Joining method 演化樹分析 (Blank square: 2014 Taiwanese outbreak-associated isolates; Dark square: 2015 Taiwanese outbreak-associated isolates. MEGA 6.06, Bootstrapping 1000)



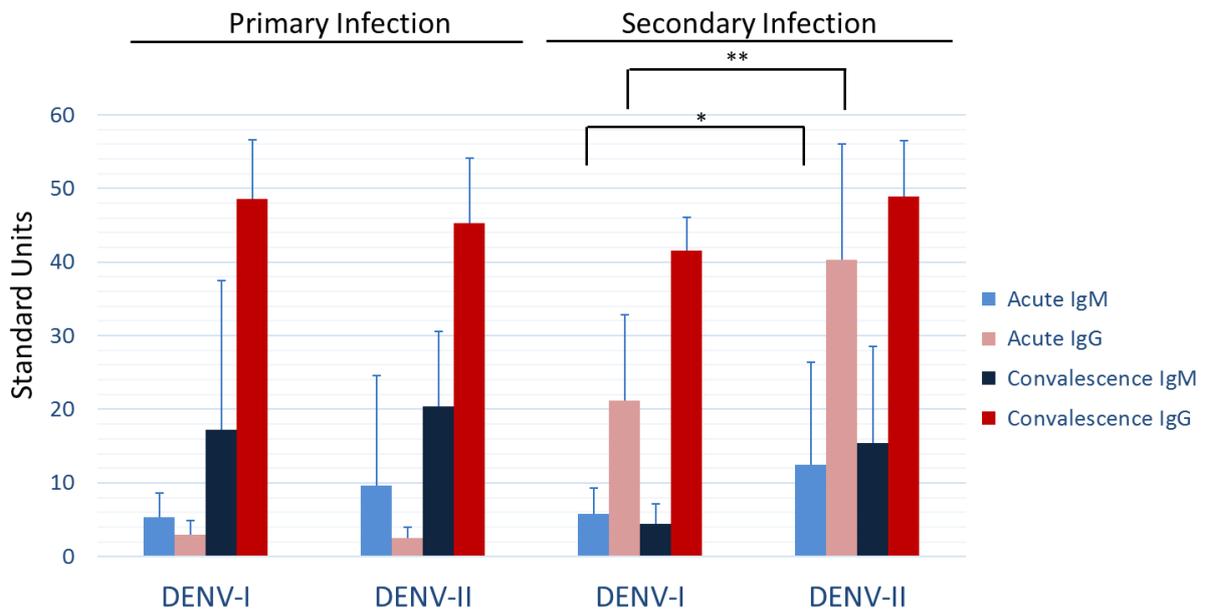
圖四、2015 年感染登革熱二型病毒患者之病毒 *env* 序列 Neighbor-Joining method 演化樹分析 (Red circle: 2015 Kaohsiung outbreak-associated isolates; Blue square: 2015 Tainan outbreak-associated isolates. MEGA 6.06, Bootstrapping 1000)



圖五、登革熱患者急性期血清抗登革熱病毒 IgM 及 IgG 測定結果 A)登革熱第一型感染者 B)登革熱第二型感染者 (Positive: Standard Unit>11; Negative: Standard Unit<9; Gray-Zone: 9~11; 次級感染指標：抗登革熱病毒 IgG 檢測結果為陽性者，且 IgM/IgG <1.2；\*號表 2015 年患者)



圖六、登革熱患者急性期及恢復期血清抗登革熱病毒 IgM 及 IgG 之比較  
 A) 登革熱第一型感染者 B) 登革熱第二型感染者 (Positive: Standard Unit>11; Negative: Standard Unit<9; Gray-Zone: 9~11; 次級感染指標: 急性期血清抗登革熱病毒 IgG 檢測結果為陽性者, 且 IgM/IgG <1.2)



圖七、初級與次級之登革熱第一型及第二型病毒感染者其急性期與恢復期血清抗登革熱病毒 IgM 及 IgG 之比較 (Positive: Standard Unit>11; Negative: Standard Unit<9; Gray-Zone: 9~11;次級感染指標：急性期血清抗登革熱病毒 IgG 檢測結果為陽性者，且 IgM/IgG <1.2)

(子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫



圖 1 幼蟲飼料維他命酵母粉(正)

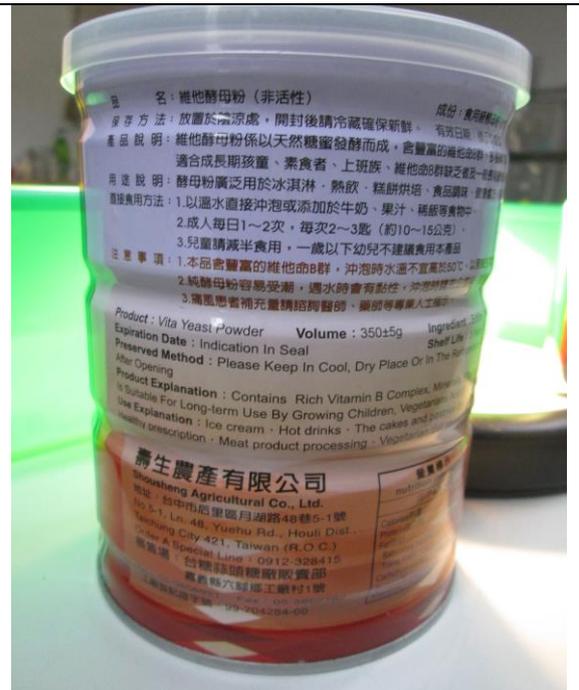


圖 2 幼蟲飼料維他命酵母粉(反)



圖 3 分析儀器鹽度計



圖 4 微量吸管



圖5. 溶液稀釋實驗過程照片



圖5 溶液稀釋實驗過程照片

圖6. 海水(8psu)誘引埃及斑蚊產卵率

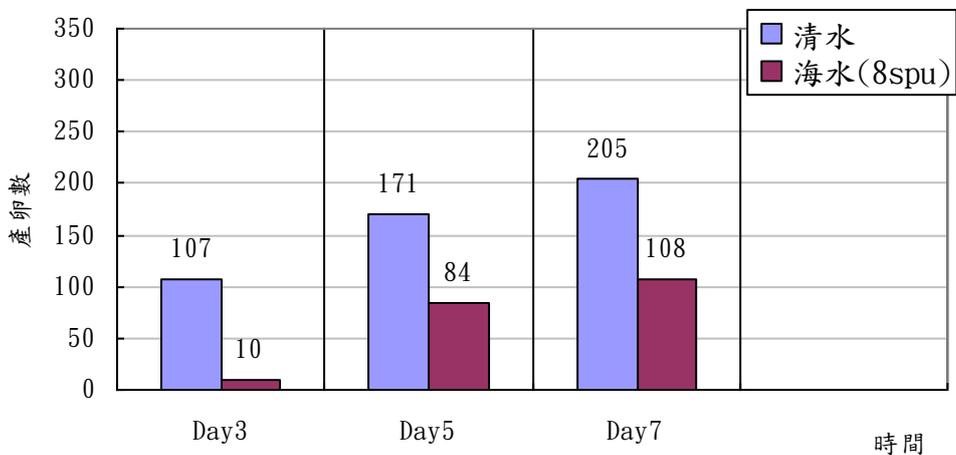


圖6 海水(8psu)誘引埃及斑蚊產卵率

圖7.高流行風險行政區致死率

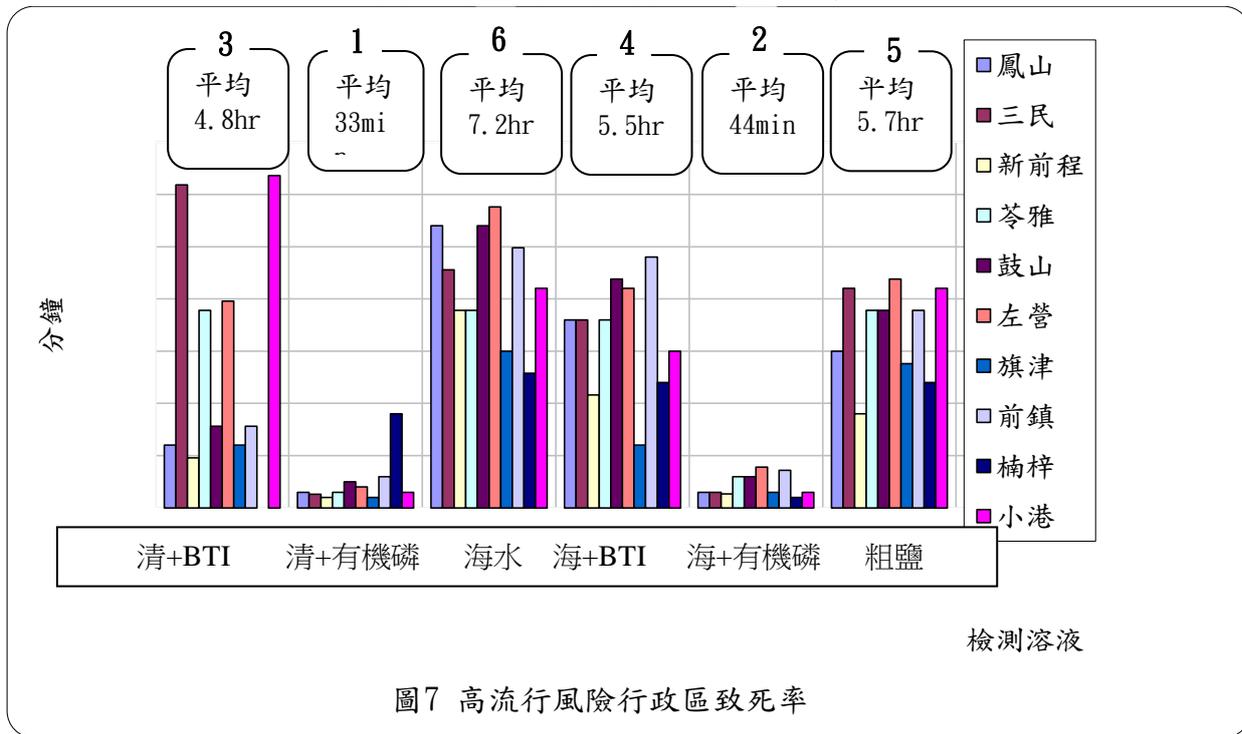


圖8. 白線斑蚊致死率

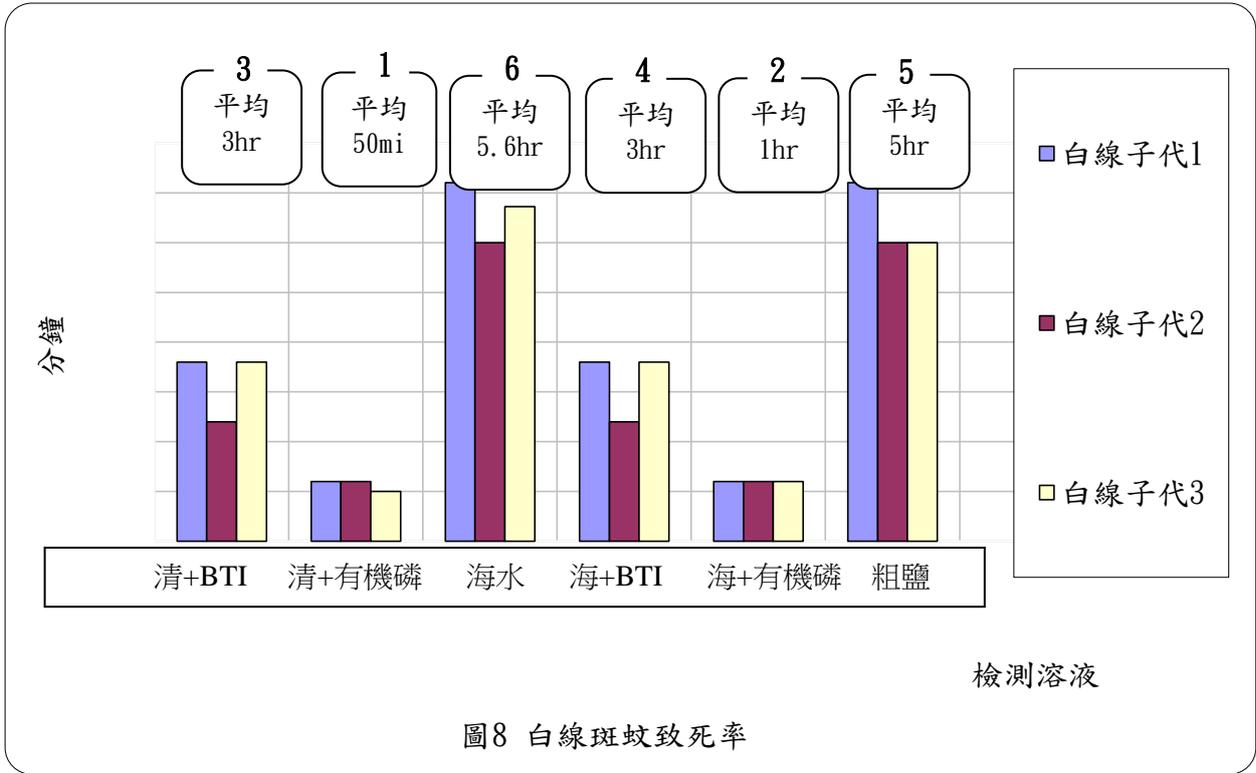


圖9. 鳳山區武慶里病媒報表(2/15)

學區第1 成蚊0

調查類別: 一般型別(物\*) 高雄市登革熱病媒蚊密度調查結果 通報病例編號: \_\_\_\_\_

105年 2月 週 回報單 改善單 舉發單 第 \_\_\_\_\_ 組 調查人員: \_\_\_\_\_

日期	區別	里別	調查地區分類	調查戶數	陽性戶數(含埃及斑蚊)	調查容器數			陽性容器數				發現病媒蚊數				孳生地數(孳)	布氏指數	成蚊指數					
						戶內	戶外	合計	戶內	戶外	合計	戶內	戶外	戶內	戶外	埃及				白線	孳及	白線		
2/15	鳳山	武慶	住宅	50	3	3	19	3	22	0	3	3	0	0	0	0	14	0	0	0	6	2	0	0

等級	1	2	3	4	5	6	7	8	9
布氏指數	1-4	5-9	10-19	20-34	35-49	50-74	75-99	100-199	≥200
成蚊指數	1-3	4-10	11-30	31-100	101-300	301-1000	1001-3000	3001-10000	≥10001
容器指數	1-2	3-5	6-9	10-14	15-20	21-27	28-31	32-40	≥41
住宅指數	1-3	4-7	8-17	18-28	29-37	38-49	50-59	60-76	≥77

布氏指數 =  $\frac{\text{陽性容器數}}{\text{調查戶數}} \times 100$       成蚊指數 =  $\frac{\text{成蚊數}}{\text{調查戶數}}$

成蚊指數 =  $\frac{\text{成蚊數}}{\text{調查戶數}} \times 100$       容器指數 =  $\frac{\text{陽性容器數}}{\text{調查容器數}} \times 100$       住宅指數 =  $\frac{\text{陽性戶數}}{\text{調查戶數}} \times 100$

鳳山武慶里 布氏指數

高雄市登革熱病媒蚊孳生源統計表

調查日期	區別	里別	調查戶數	容器種類	花瓶	各式盆盤	水溝	水塔、井、抽水機	帆布、塑膠桶、紅藍布	飲料罐、瓶蓋、塑膠瓶	馬糞水缸	杯底碟、碟盆	地下室防空洞	輪胎	其他
					(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
2/15	鳳山	武慶	50	積水容器 陽性容器	7	1			11						2
															2

圖10. 前鎮區武昌里病媒報表(2/15)

調查類別：一般監測 水溝 高雄市登革熱病媒蚊密度調查結果 通報病例編號：                    

105年2月 週 回報單 改善單 舉發單 第          組 調查人員：                    

日期	區別	里別	調查地區分類	調查戶數	陽性戶數	陽性戶數(有埃及斑蚊)	調查容器數			陽性容器數			採獲成蚊幼蟲數				孳生源數			布氏指數		成蟲指數(%)	
							戶內	戶外	合計	戶內	戶外	合計	埃及	白蟻	未分類	埃及	白蟻	未分類	指數	蚊數	埃及	白蟻	
2/15	前鎮	武昌	住宅	50	1	1	5	1	6	0	1	1	0	0	0	0	4	0	0	2	1	0	0

等級	1	2	3	4	5	6	7	8	9
布氏指數	1-4	5-9	10-19	20-34	35-49	50-74	75-99	100-199	≥200
幼蟲指數	1-3	4-10	11-30	31-100	101-300	301-1000	1001-3000	3001-10000	≥10001
容器指數	1-2	3-5	6-9	10-14	15-20	21-27	28-31	32-40	≥41
住宅指數	1-3	4-7	8-17	18-28	29-37	38-49	50-59	60-76	≥77

布氏指數 =  $\frac{\text{陽性容器數}}{\text{調查戶數}} \times 100$       成蟲指數 =  $\frac{\text{總蚊數}}{\text{調查戶數}}$

幼蟲指數 =  $\frac{\text{幼蟲數}}{\text{調查戶數}} \times 100$       容器指數 =  $\frac{\text{陽性容器數}}{\text{調查容器數}} \times 100$       住宅指數 =  $\frac{\text{陽性戶數}}{\text{調查戶數}} \times 100$

高雄市登革熱病媒蚊孳生源統計表

調查日期	區別	里別	調查戶數	容器種類	花瓶	各式	水溝	水塔、冷	帆布、塑膠	紅豆、	飲料罐	馬桶水箱	紅豆罐	地下室	狗窩	其他
					(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
2/15	前鎮	武昌	50	積水容器						4	1		1			
				陽性容器							1					

圖11. 前鎮區瑞祥里病媒報表(2/16)

調查類別：一般監測 水溝 高雄市登革熱病媒蚊密度調查結果 通報病例編號：                    

105年2月 週 回報單 改善單 舉發單 第          組 調查人員：                    

日期	區別	里別	調查地區分類	調查戶數	陽性戶數	陽性戶數(有埃及斑蚊)	調查容器數			陽性容器數			採獲成蚊幼蟲數				孳生源數			布氏指數		成蟲指數(%)	
							戶內	戶外	合計	戶內	戶外	合計	埃及	白蟻	未分類	埃及	白蟻	未分類	指數	蚊數	埃及	白蟻	
2/16	前鎮	瑞祥	住宅	50	0	0	13	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

等級	1	2	3	4	5	6	7	8	9
布氏指數	1-4	5-9	10-19	20-34	35-49	50-74	75-99	100-199	≥200
幼蟲指數	1-3	4-10	11-30	31-100	101-300	301-1000	1001-3000	3001-10000	≥10001
容器指數	1-2	3-5	6-9	10-14	15-20	21-27	28-31	32-40	≥41
住宅指數	1-3	4-7	8-17	18-28	29-37	38-49	50-59	60-76	≥77

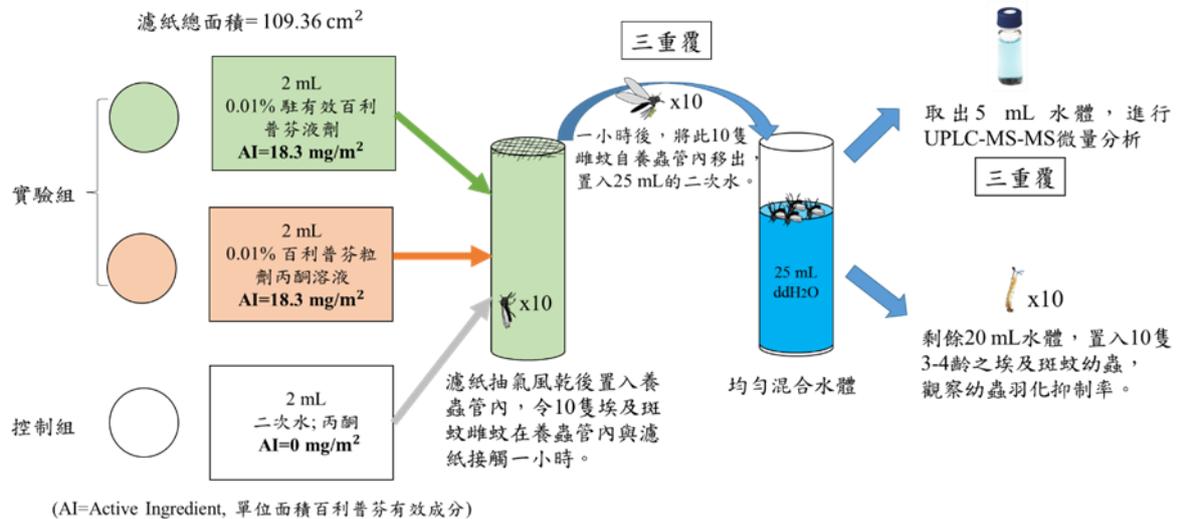
布氏指數 =  $\frac{\text{陽性容器數}}{\text{調查戶數}} \times 100$       成蟲指數 =  $\frac{\text{總蚊數}}{\text{調查戶數}}$

幼蟲指數 =  $\frac{\text{幼蟲數}}{\text{調查戶數}} \times 100$       容器指數 =  $\frac{\text{陽性容器數}}{\text{調查容器數}} \times 100$       住宅指數 =  $\frac{\text{陽性戶數}}{\text{調查戶數}} \times 100$

高雄市登革熱病媒蚊孳生源統計表

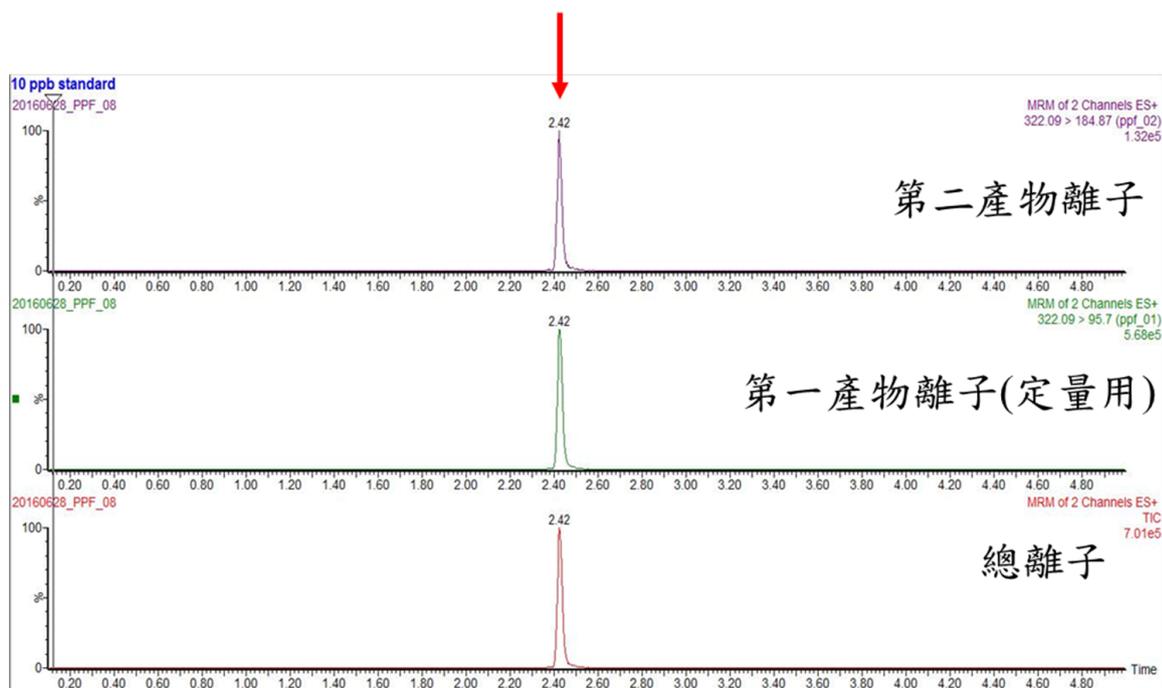
調查日期	區別	里別	調查戶數	容器種類	花瓶	各式	水溝	水塔、冷	帆布、塑膠	紅豆、	飲料罐	馬桶水箱	紅豆罐	地下室	狗窩	其他
					(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
2/16	前鎮	瑞祥	50	積水容器	2	2				6	1		1			
				陽性容器												

(子計畫十一)應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的  
斑蚊孳生源



圖一、實驗室模擬埃及斑蚊雌蚊暴露百利普芬後自動散播之流程圖

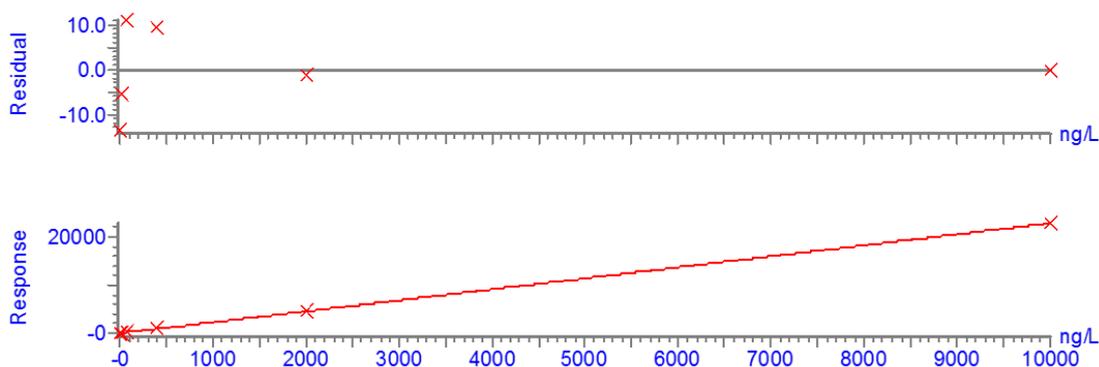
百利普芬波峰滯留時間=2.41-2.42



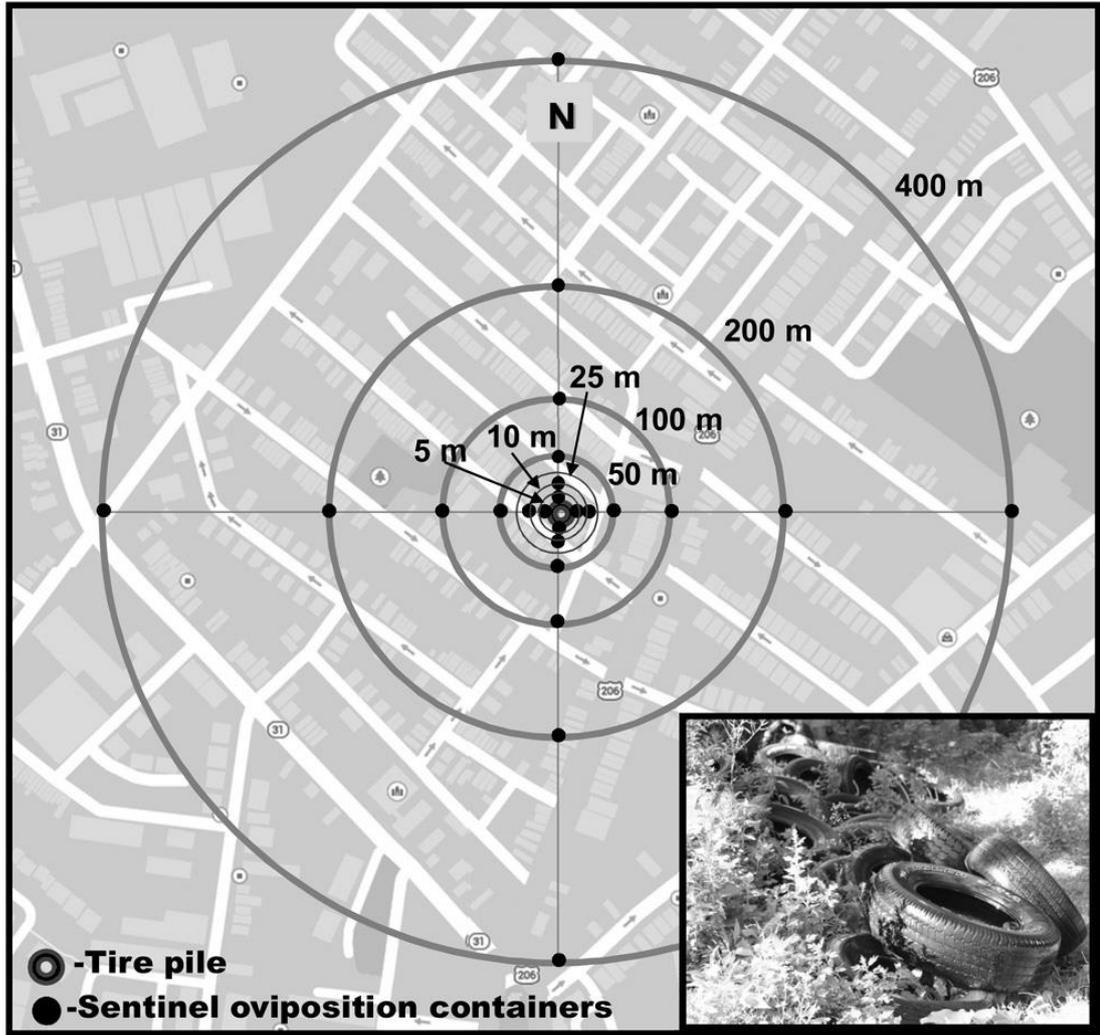
圖二、UPLC-MS-MS 百利普芬波峰圖

Name	Std. Conc (ng/L)	Retention time	Response	ng/L	%Dev	S/N
3.2 ppt standard	3.2	2.41	10.00	2.8	-13.6	41.22
16 ppt standard	16	2.41	38.21	15.1	-5.7	203.61
80 ppt standard	80	2.41	206.88	88.8	11	1141.11
400 ppt standard	400	2.41	1006.46	438.4	9.6	1277.38
2000 ppt standard	2000	2.41	4527.45	1977.6	-1.1	4004.75
10000 ppt standard	10000	2.41	22824.74	9976.5	-0.2	8443.36

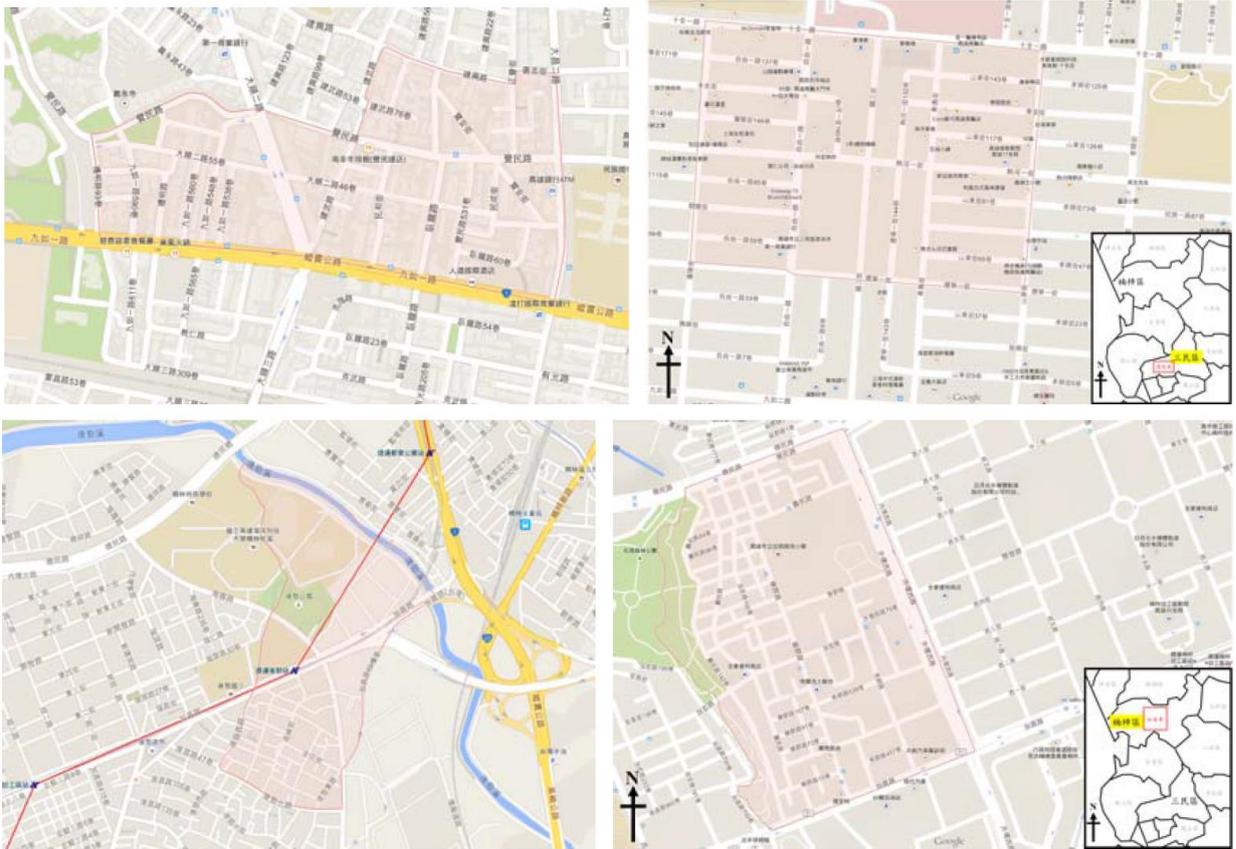
Compound name: Pyriproxyfen  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999796$ ,  $r^2 = 0.999591$   
 Calibration curve:  $2.28748 * x + 3.67978$   
 Response type: External Std, Area  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



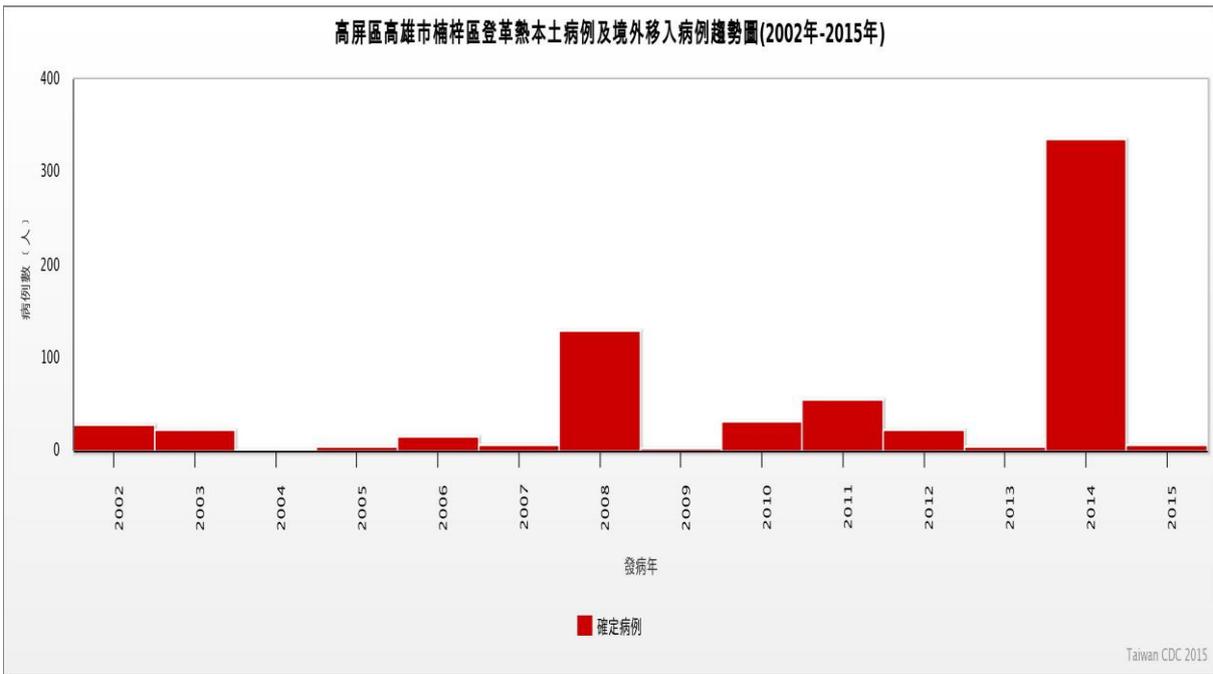
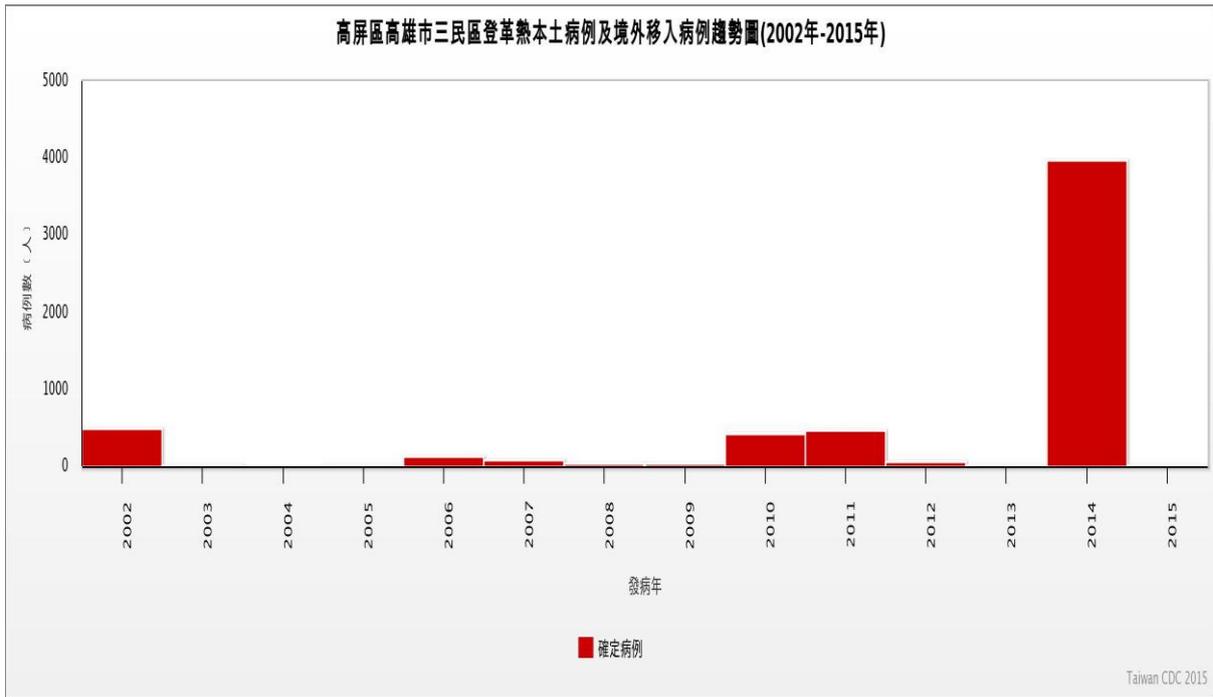
圖三、檢量線圖及表格範例



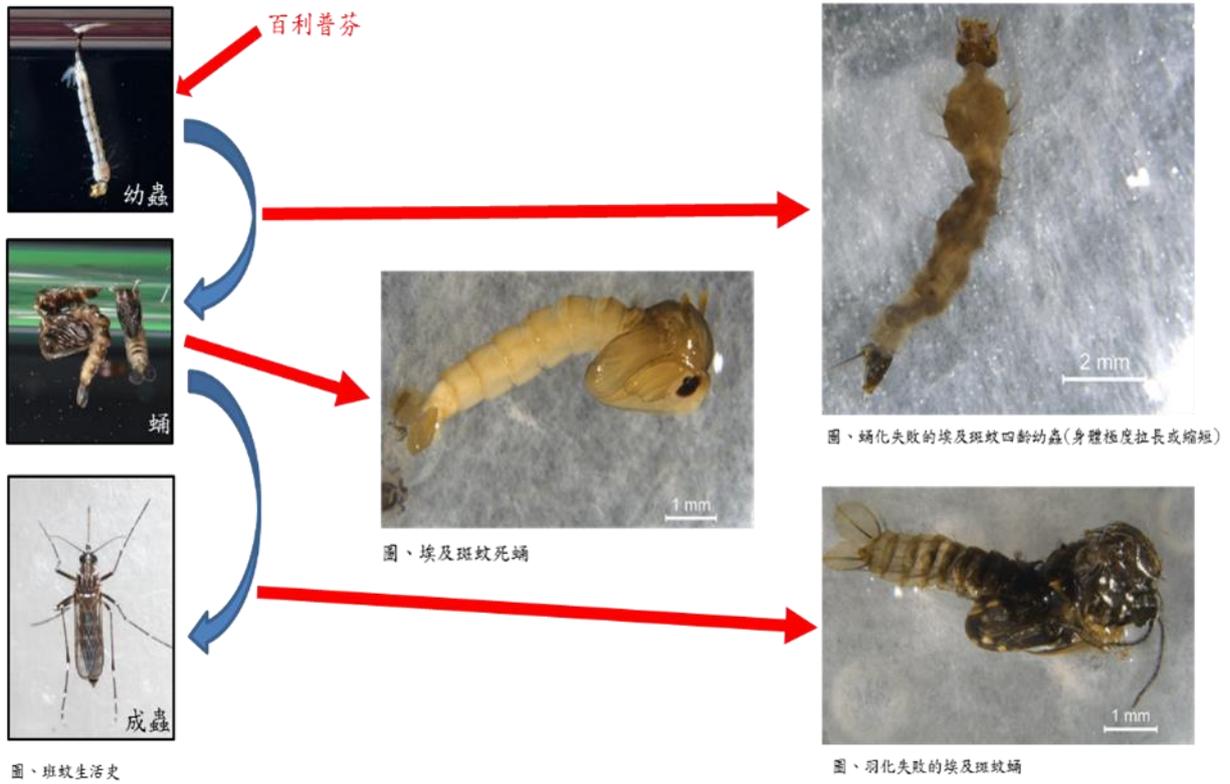
圖四、成蟲接觸與攜帶百利普芬的半戶外的測試評估 (Devi et al., 2014)



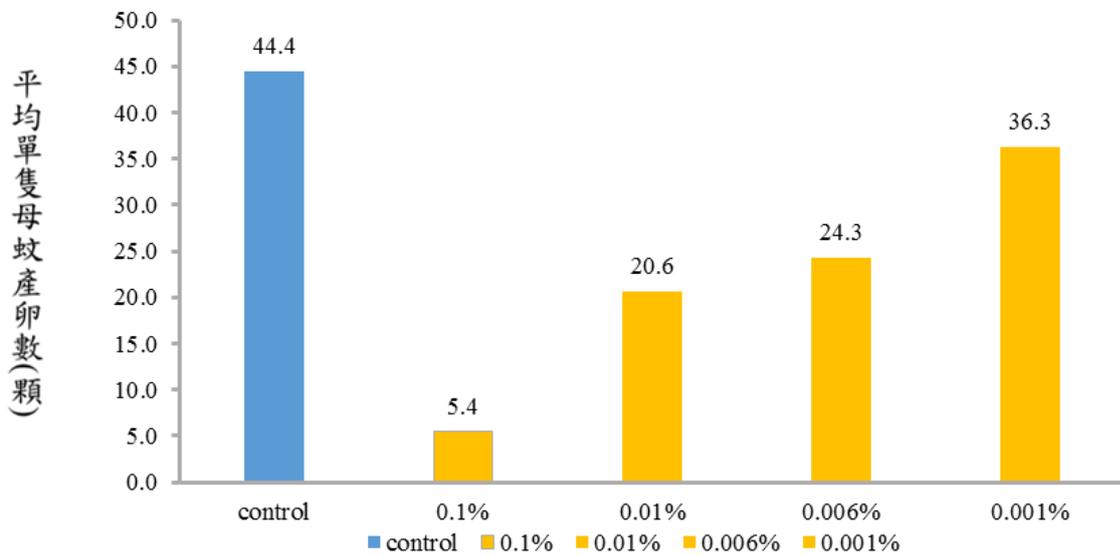
圖五、高雄市三民區寶安里 (左上)、德智里 (右上) 和楠梓區金田里 (左下)、加昌里 (右下) 行政區圖



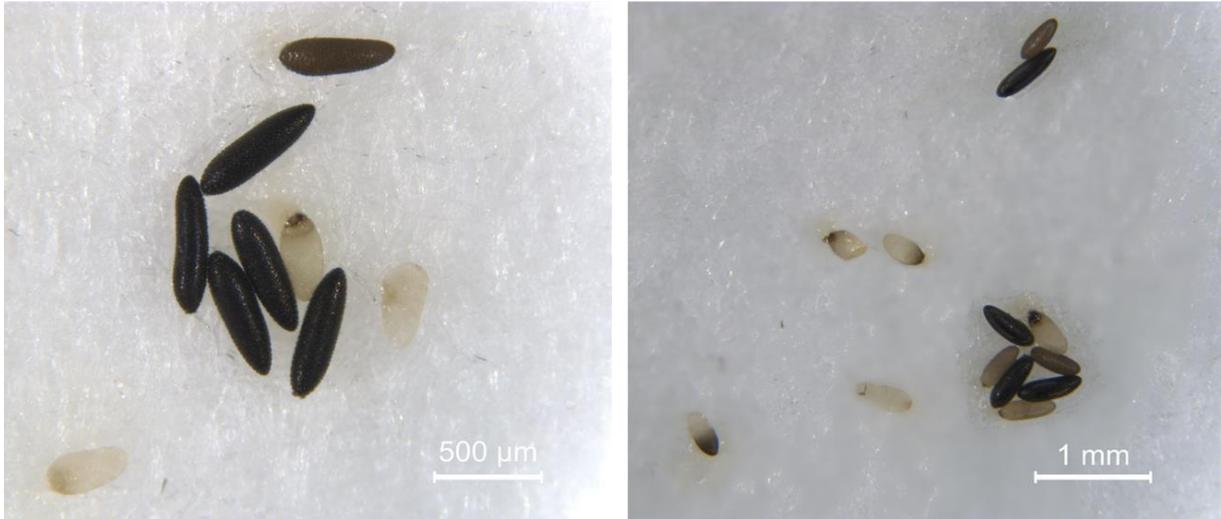
圖六、高雄市三民區和楠梓區歷年來登革病例數 (2002~2015)



圖七、暴露 0.01% 百利普芬後斑蚊的異常現象



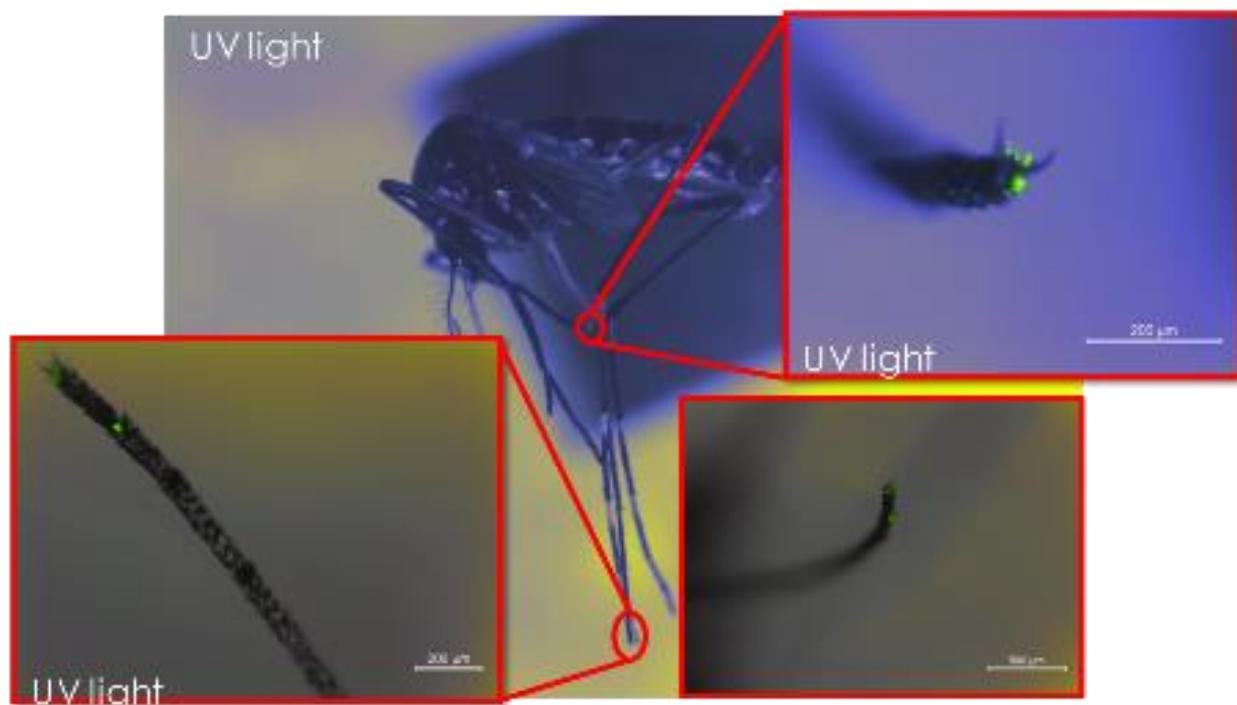
圖八、將吸血後一天埃及斑蚊雌蚊暴露四種濃度 (0.1%、0.01%、0.006%、0.001%) 百利普芬後計算其五日後的平均單隻母蚊產卵數



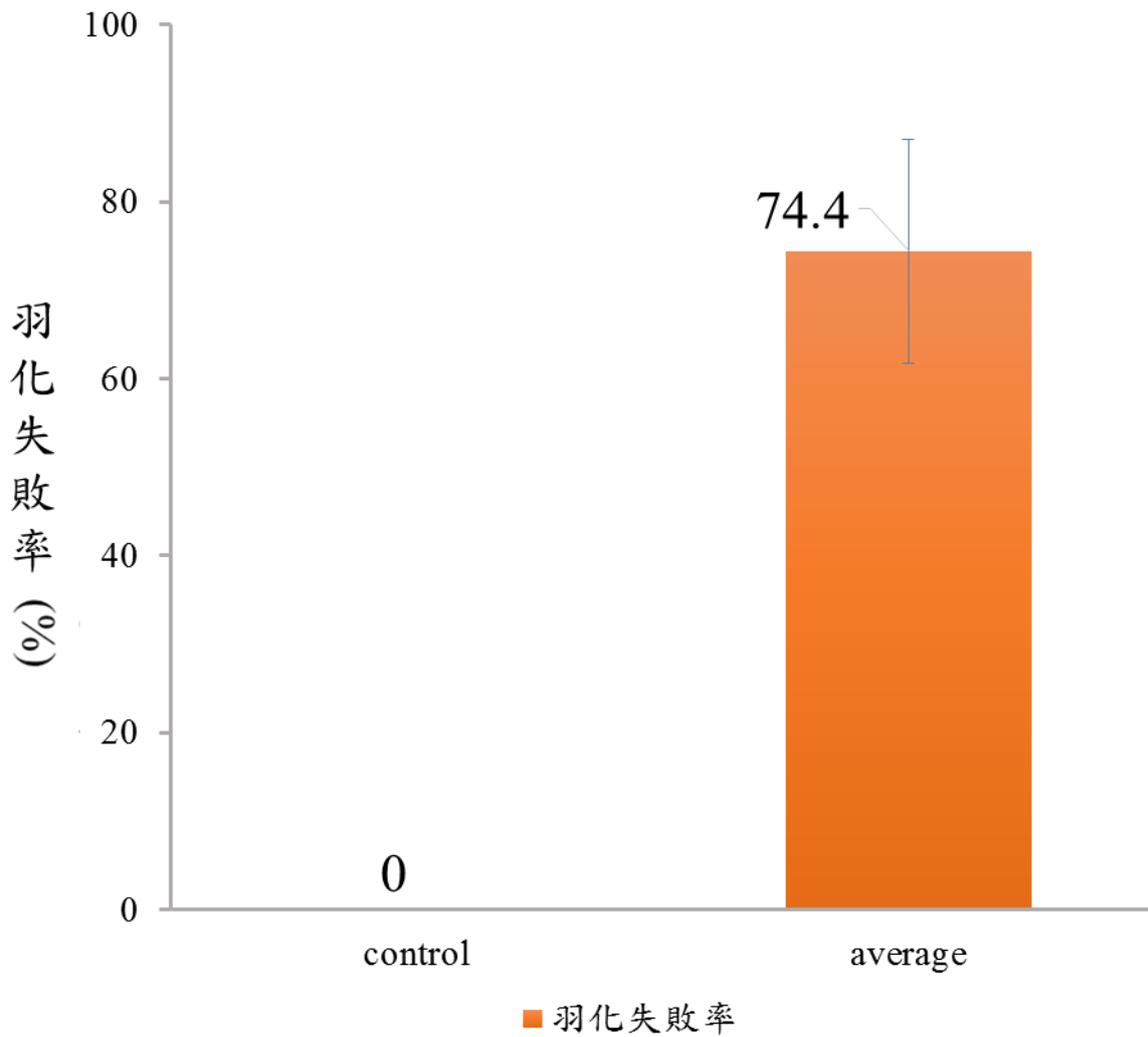
圖九、將 5-8 日齡吸血後一天的埃及斑蚊雌蚊強迫暴露於濃度 0.01% (左圖) 和 0.1% (右圖) 的百利普芬後，其產下的卵粒有形態上的異常



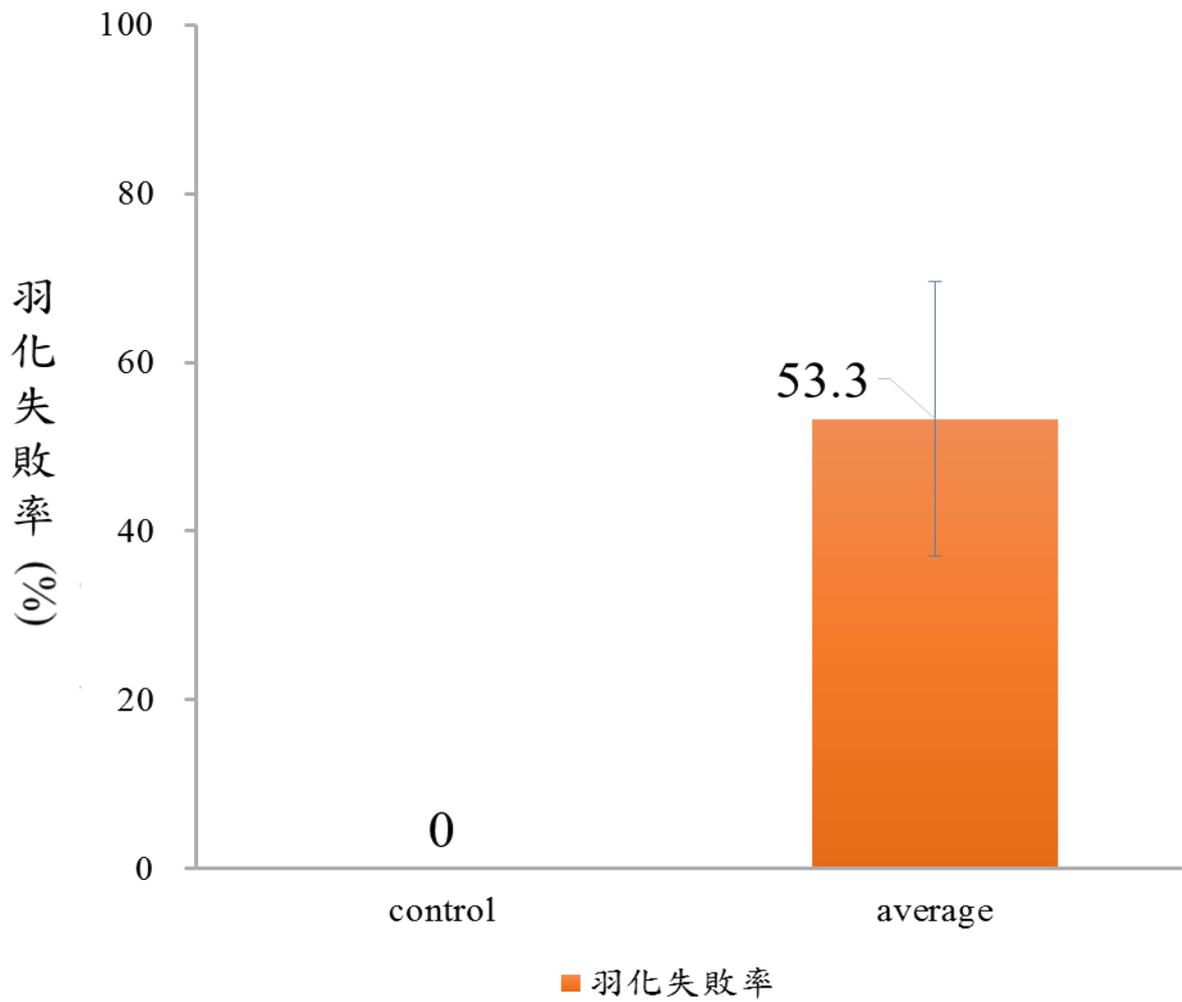
圖十、螢光粉 (*Luminous Powder Kit*)



圖十一、使用螢光粉混合百利普芬顆粒，圖中蚊蟲腳節部分有沾黏到螢光粉。印證蚊蟲確實能夠黏附百利普芬顆粒



圖十二、埃及斑蚊雌蚊暴露 0.01% 百利普芬後碰觸內含四齡埃及斑蚊幼蟲的水體對其羽化率的影響 (羽化失敗率經 Abbott's formula 校正)



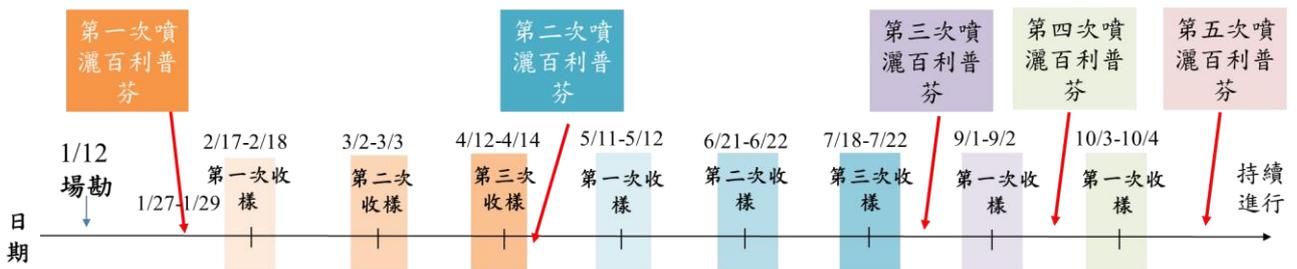
圖十三、埃及斑蚊雌蚊暴露 0.001%百利普芬後碰觸內含四齡埃及斑蚊幼蟲的水體對其羽化率的影響 (羽化失敗率經 Abbott's formula 校正)



圖十四、百利普芬野外測試樣點分布圖。(紅點為百利普芬散播站、黃點為監測站)



圖十五、監測站內含物配置圖



圖十六、百利普芬野外試驗時間軸



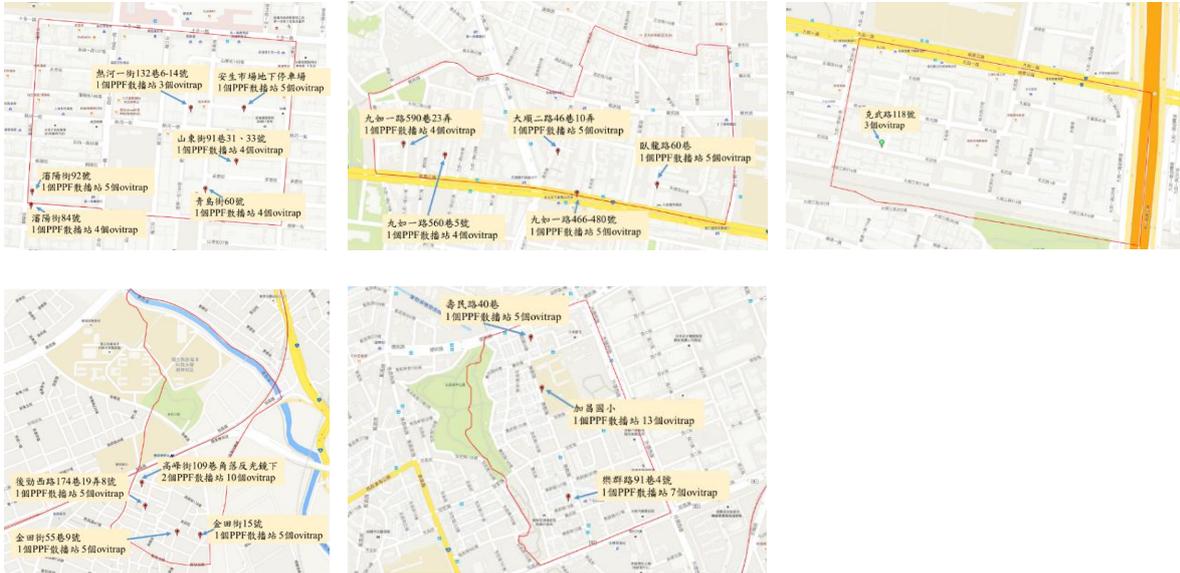
圖十七、與高雄市衛生局人員討論



圖十八、高雄樣區場勘



圖十九、戶外試驗工作照



圖二十、百利普芬散播站與誘卵監測桶分布圖



圖二十一、使用生物性分析確認水體有無百利普芬

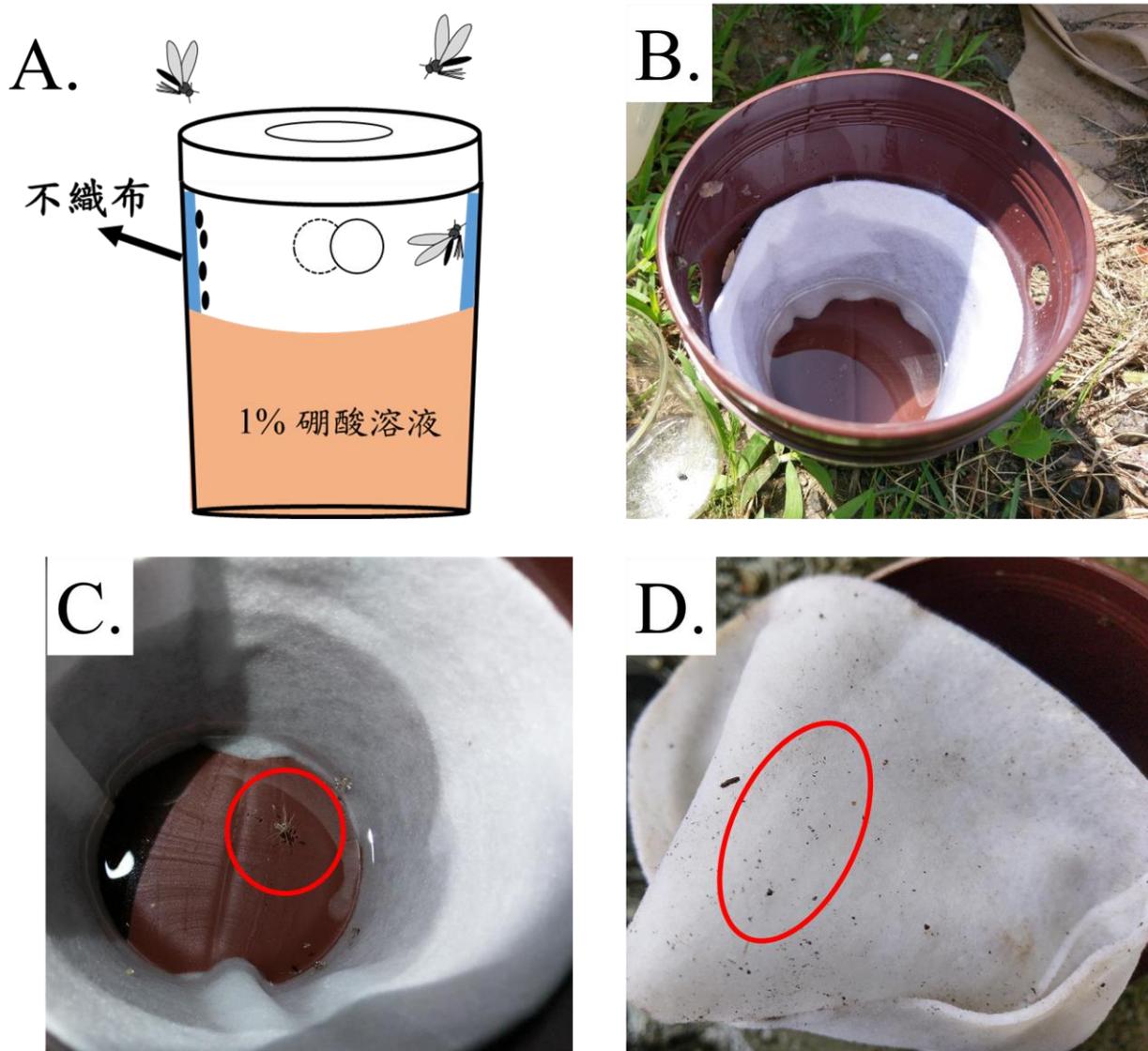
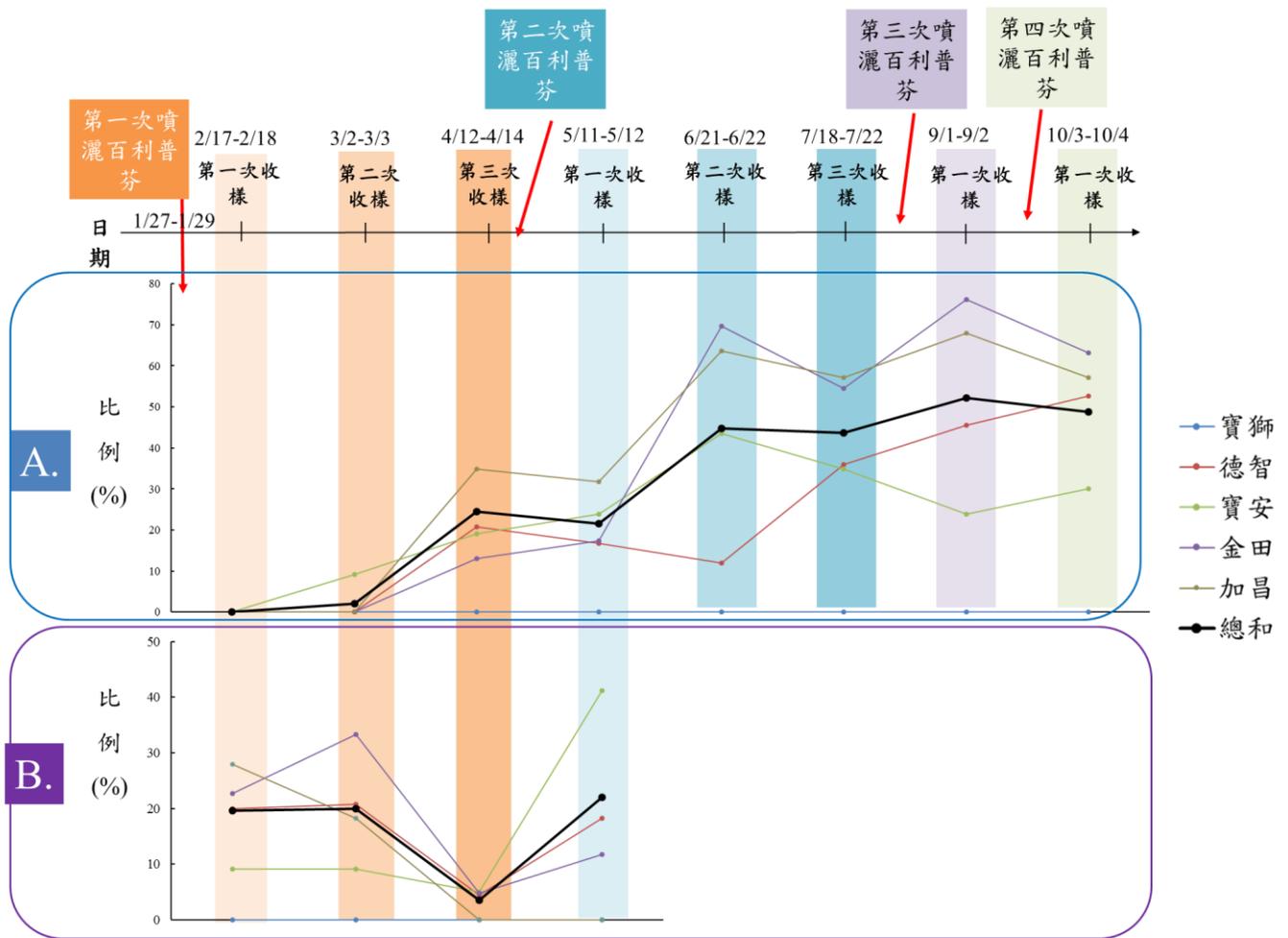


圖 二十二、 A) 硼酸誘卵桶配置示意圖；

B) 硼酸誘卵桶於戶外實地使用圖；

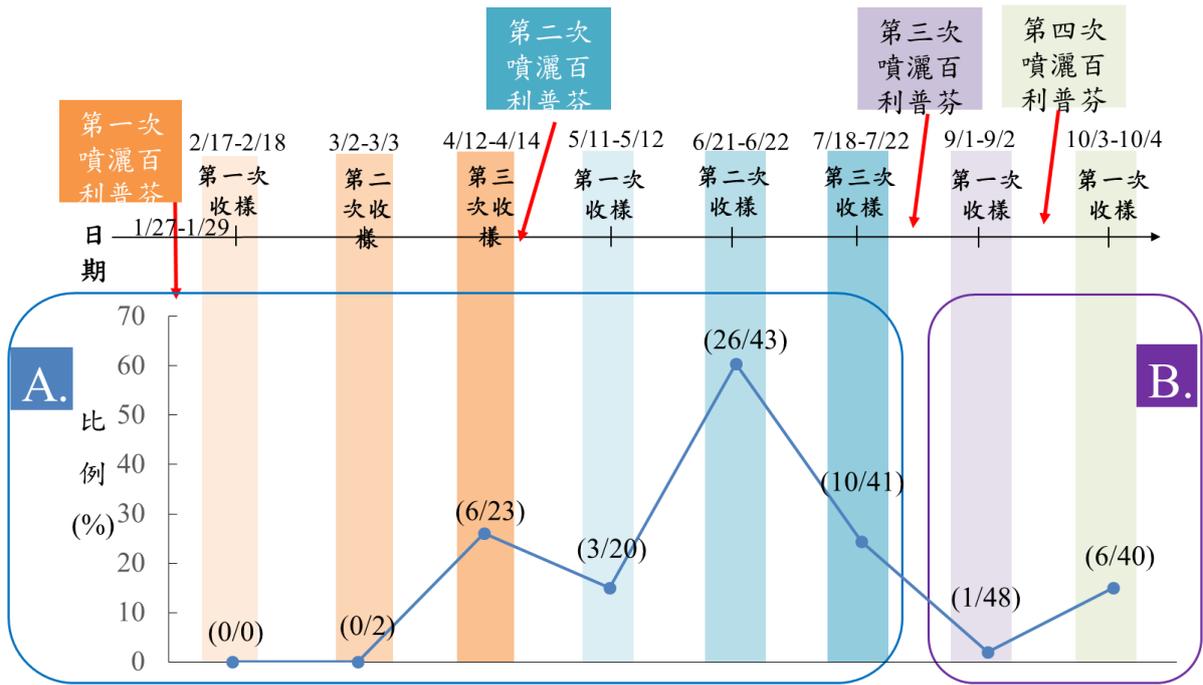
C) 於硼酸誘卵桶內發現埃及斑蚊雌蚊屍體；

D) 於硼酸誘卵桶內側不織布上發現斑蚊屬蚊卵跡象且硼酸溶液內無孳生斑蚊屬幼蟲



圖二十三、 A) 各區里誘卵桶(監測站)內發現斑蚊卵粒之比例；

B) 野外樣本經生物性分析結果IE%>50所佔回收樣本之比例



圖二十四、誘卵桶內發現孳生蚊幼蟲佔蚊卵之比例

B) 使用硼酸前 (以劍水蚤預防孳生蚊蟲)； B) 使用硼酸後

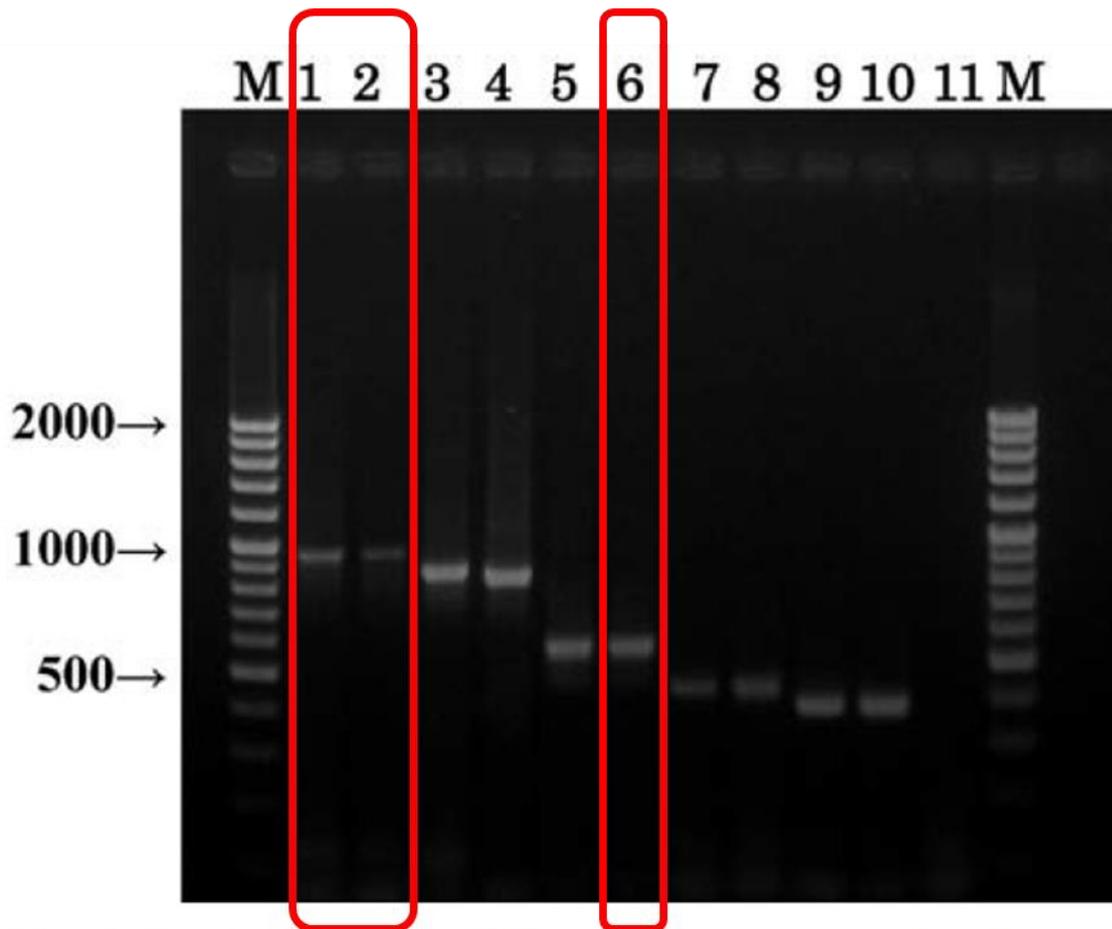
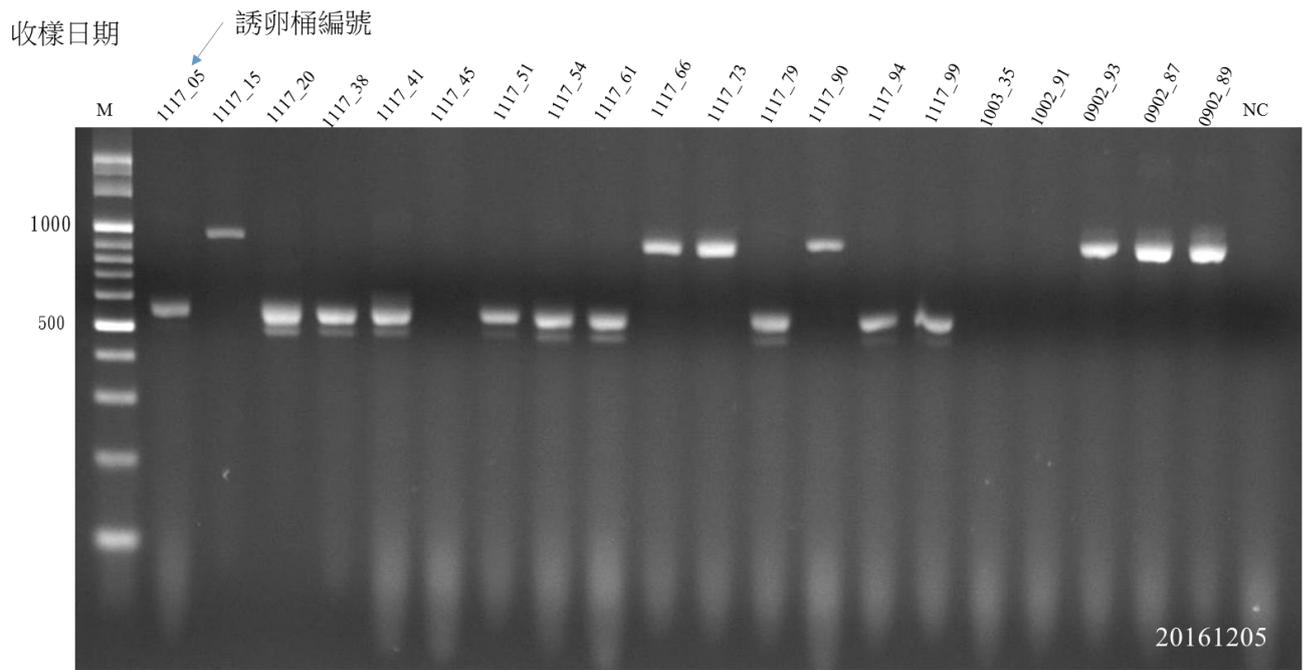


Fig. 2. Species-diagnostic PCR for five species of the subgenus *Stegomyia* in the Ryukyu Archipelago and mainland Japan. Lane 1, *Ae. albopictus* (Nagasaki); 2, *Ae. albopictus* (Okinawa); 3, *Ae. riversi* (Nagasaki); 4, *Ae. riversi* (Ishigaki Island); 5, *Ae. aegypti* (Thailand); 6, *Ae. aegypti* (Thailand); 7, *Ae. flavopictus* (Saga); 8, *Ae. flavopictus* (Okinawa); 9, *Ae. daitensis* (Minami-Daito Island); 10, *Ae. daitensis* (Minami-Daito Island); 11, Negative control. M, size marker. Females were used.

Yukiko et al. (2010)

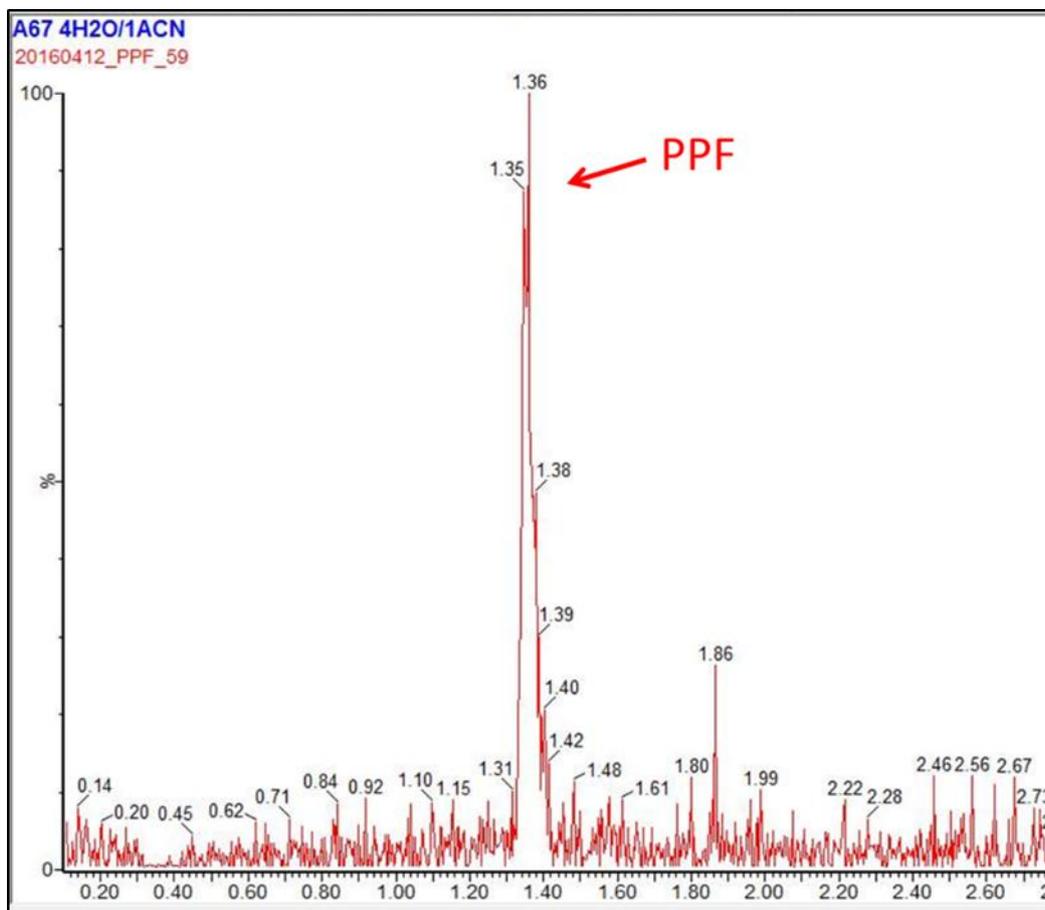
圖二十五、藉由於洋菜膠片上的基因片段大小分辨斑蚊屬蚊種（白線斑蚊約為 950bp、埃及斑蚊約為 550bp）



圖二十六、誘卵桶內卵片分子生物學鑑定結果



圖二十七、使用濾紙沾黏百利普芬散播站，以便後續確認百利普芬之殘效性



圖二十八、野外試驗水樣經儀器測試後出現百利普芬訊號，此水樣為  
2/17-2/18 第一次收樣 (編號:67)經生物性分析 IE% 為 100%

2/17-2/18第一次收樣水樣  
(編號:67)  
經生物性分析EI%為100%

Name	Type	Area	ng/L
A67 4H2O/1ACN	Analyte	169.3	11.7
A67 4H2O/1ACN	Analyte	144.0	6.5
A67 4H2O/1ACN	Analyte	134.5	4.6
1.25X dilute		149.3	7.6
Original (x1.25)			9.5

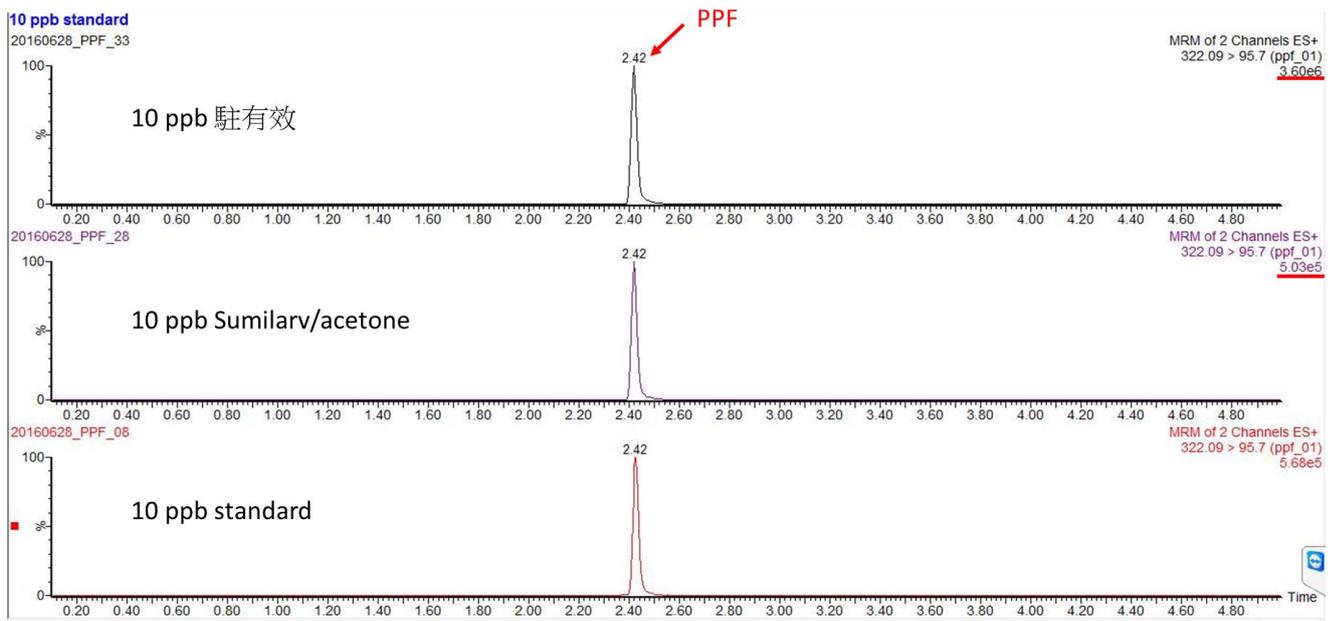
9.5ppt

2/17-2/18第一次收樣水樣  
(編號:79)  
經生物性分析EI%為100%

Name	Type	Area	pg/mL
A79 4H2O/1ACN	Analyte	145.7	6.9
A79 4H2O/1ACN	Analyte	158.8	9.6
A79 4H2O/1ACN	Analyte	158.5	9.5
1.25X dilute		154.3	8.67
Original (x1.25)			10.83

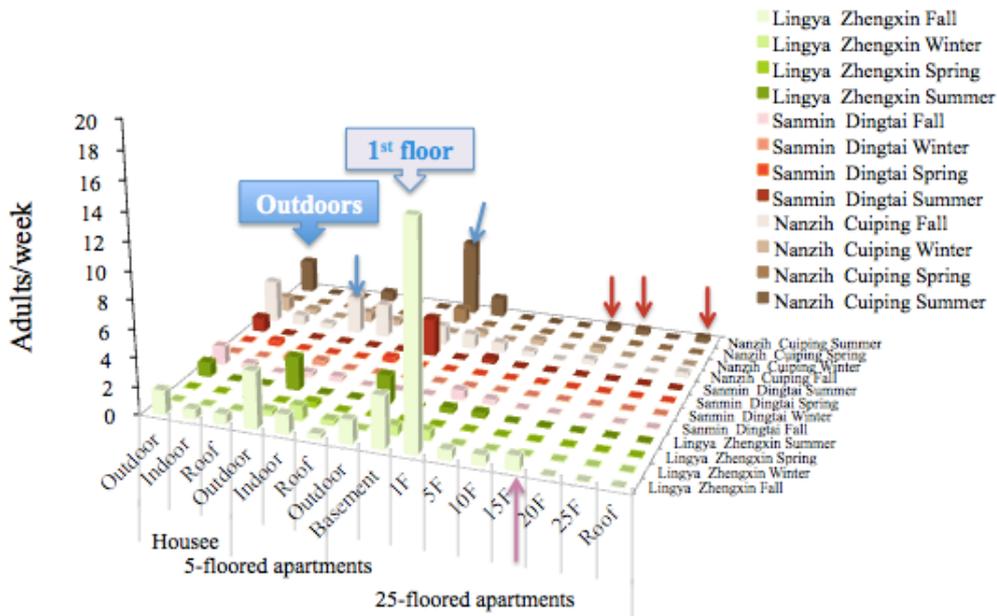
10.83ppt

圖二十九、確認野外試驗水樣之百利普芬濃度

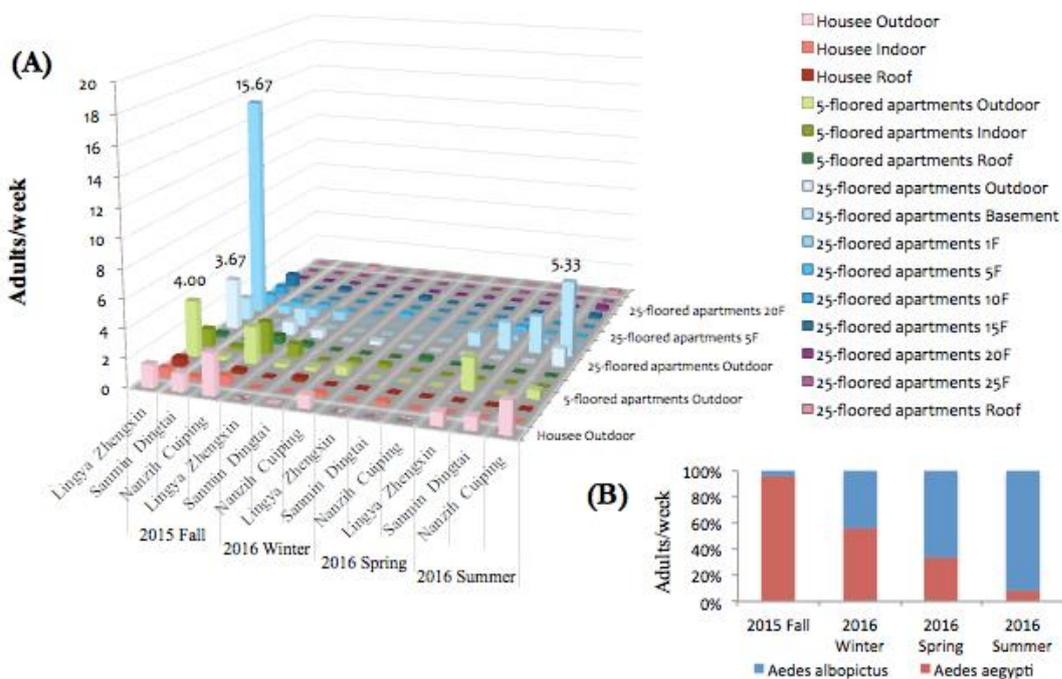


圖三十、不同百利普芬經 UPLC-MS-MS 分析後所產生訊號強度差異

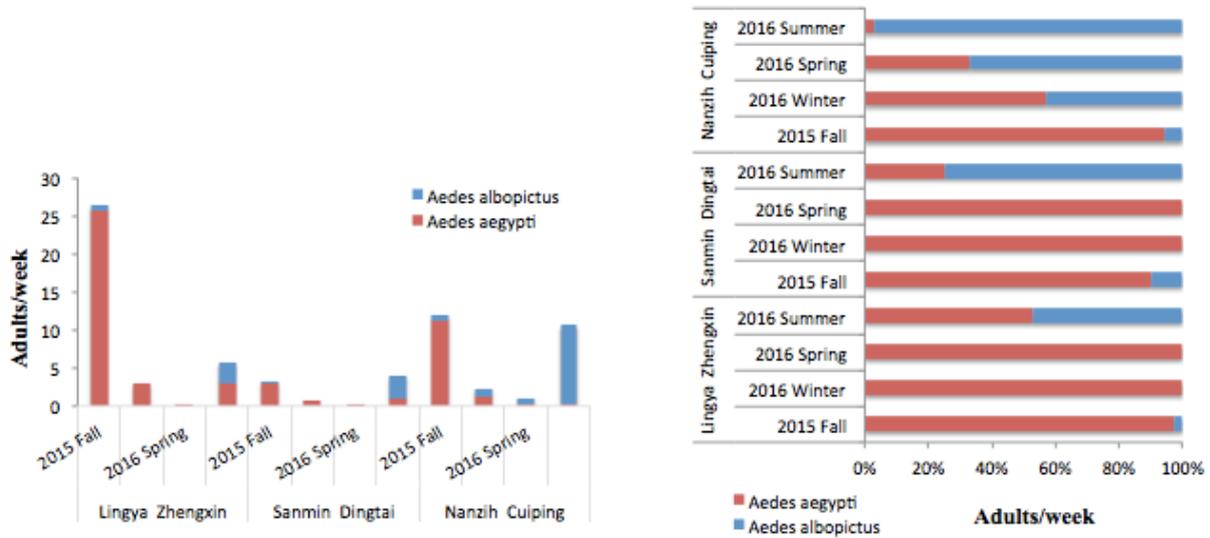
(子計畫十二) 台灣南部登革熱病媒蚊習性探討與幼蟲棲地變遷之研究



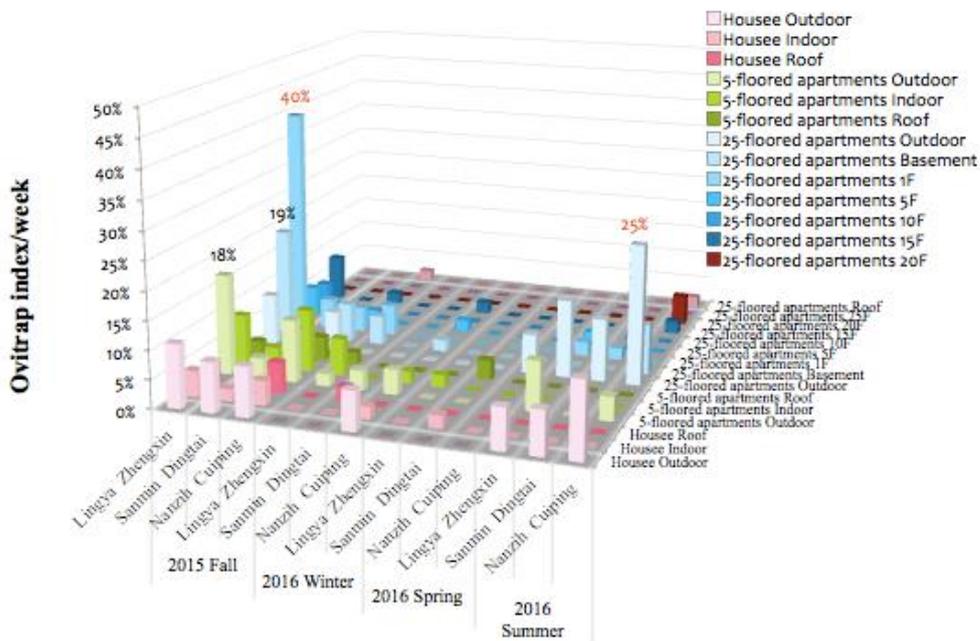
圖一、高雄市登革熱病媒蚊成蚊於三種房型內外高低空間之分佈。



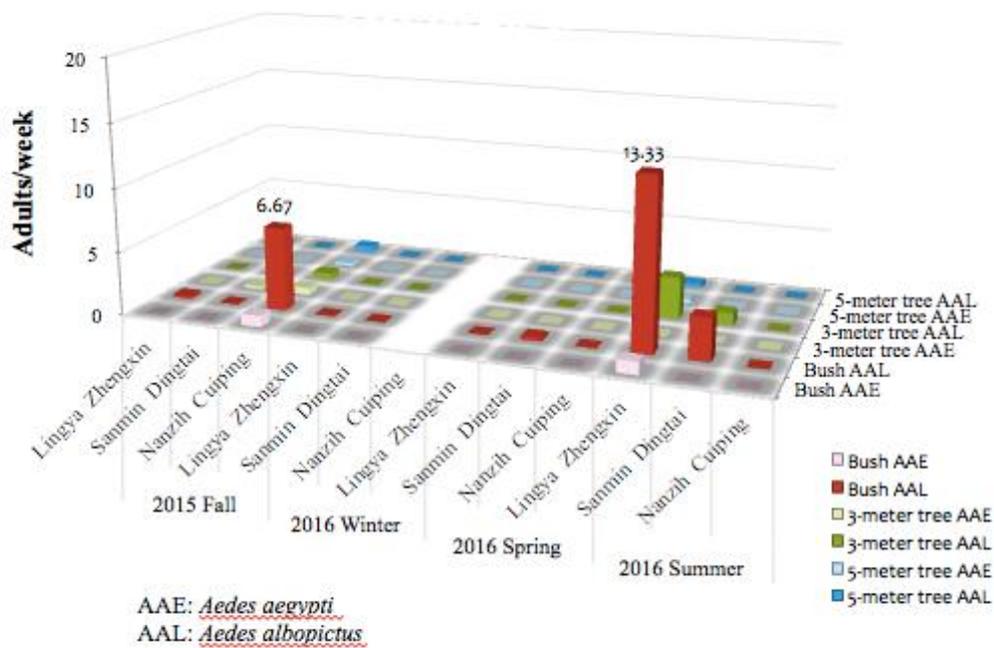
圖二、高雄市登革熱病媒蚊成蚊於不同季節出現的數量比較。



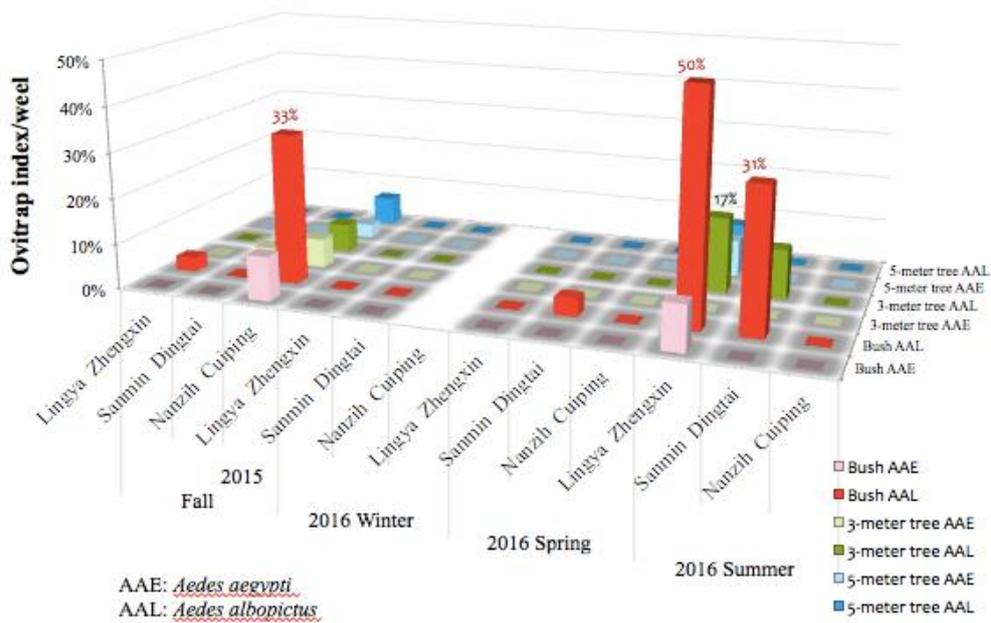
圖三、兩種登革熱病媒蚊成蚊在不同季節每週被捕獲數量與百分比。



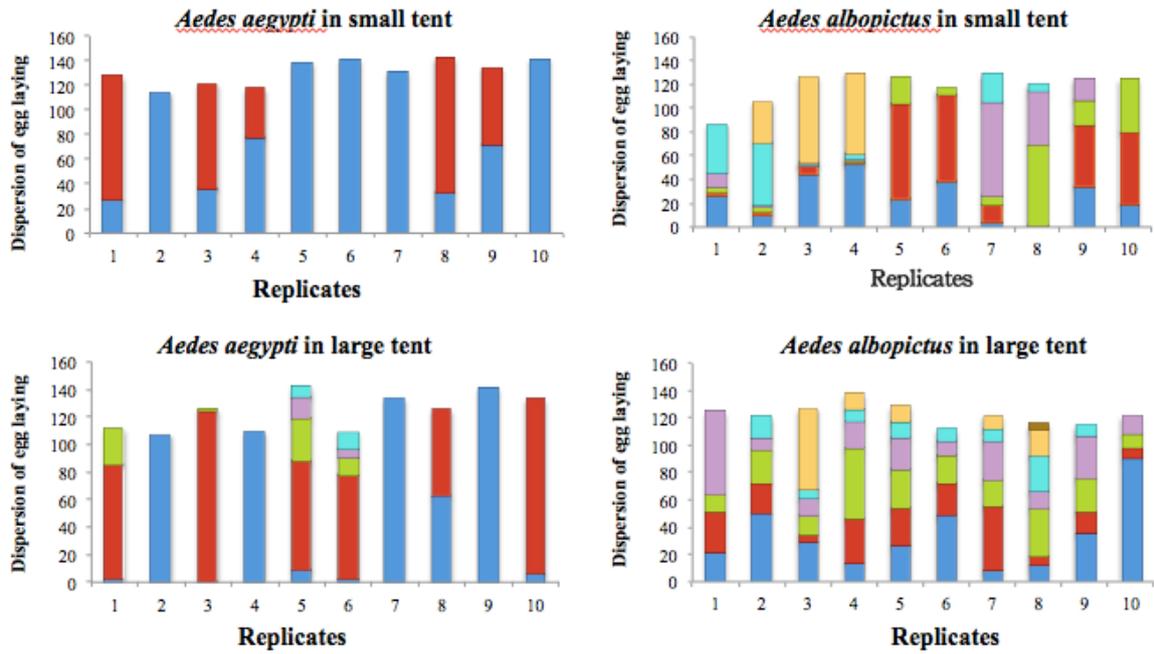
圖四、高雄市登革熱病媒蚊成蚊於不同季節出現於住宅內外的容器指數比較。



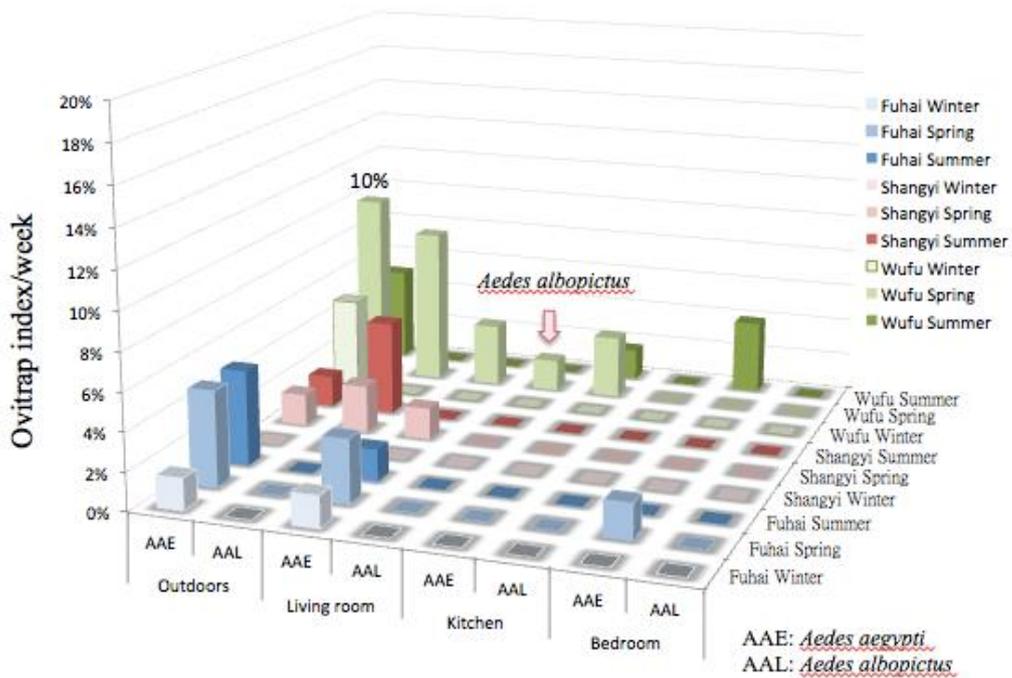
圖五、高雄市登革熱病媒蚊成蚊於戶外不同樹種、高度被捕獲的數量。



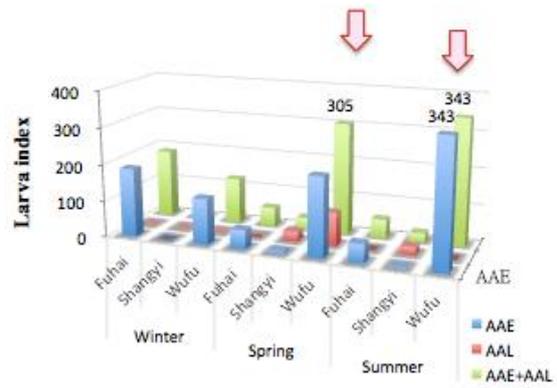
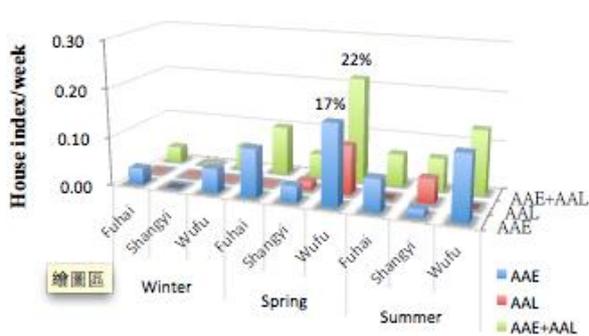
圖六、高雄市登革熱病媒蚊成蚊於戶外不同樹種、高度的容器指數。



圖七、登革熱病媒蚊於不同大小空間中的產卵分散性比較。

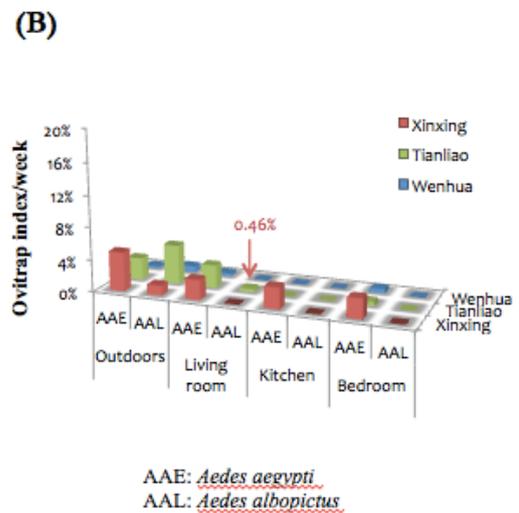
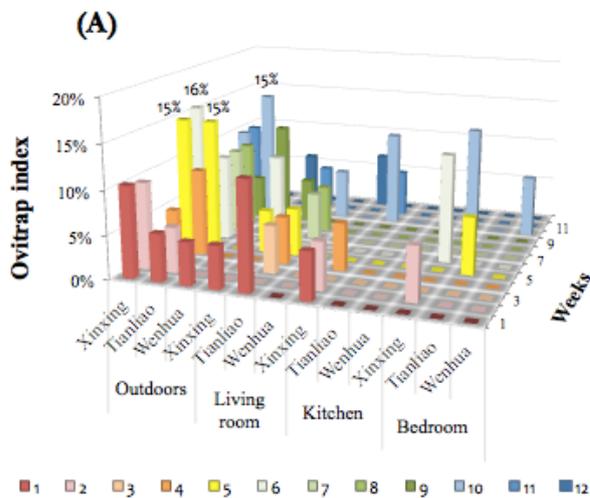


圖八、高雄市登革熱病媒蚊成蚊於住家戶內外的產卵習性比較。

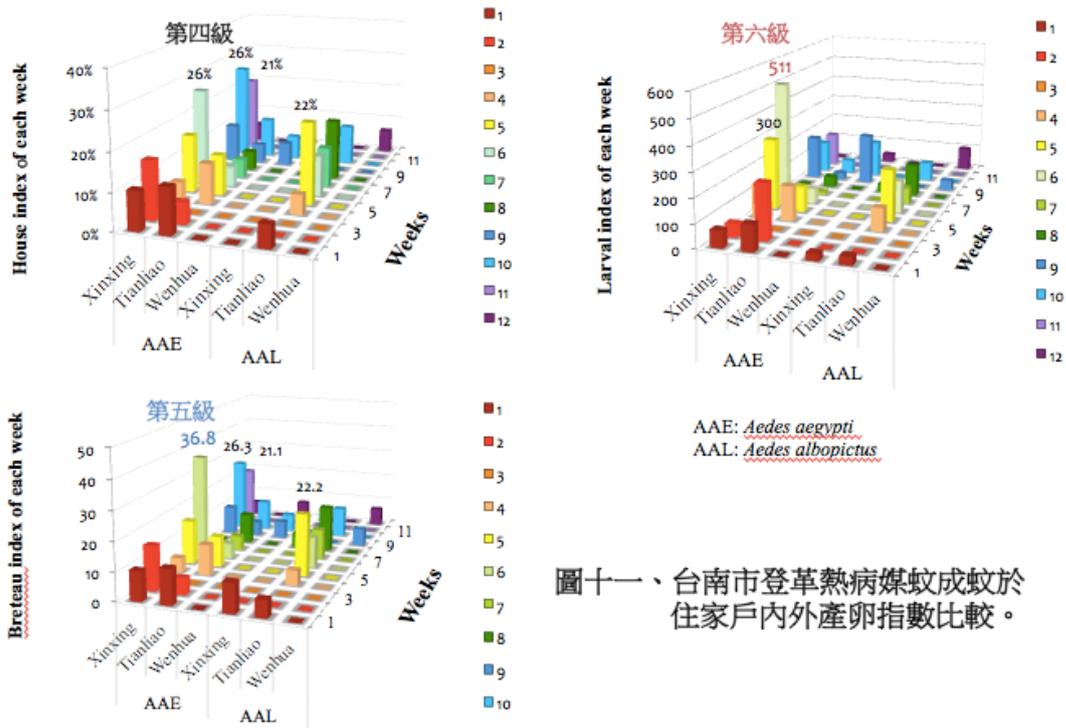


AAE: *Aedes aegypti*  
AAL: *Aedes albopictus*

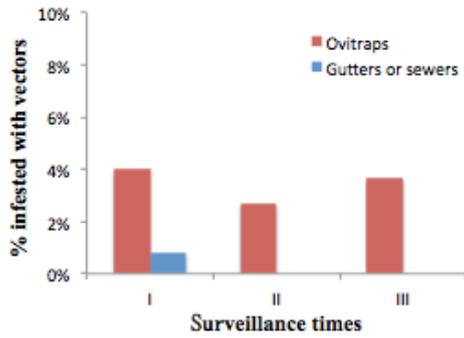
圖九、高雄市登革熱病媒蚊成蚊於住家戶內外產卵指數比較。



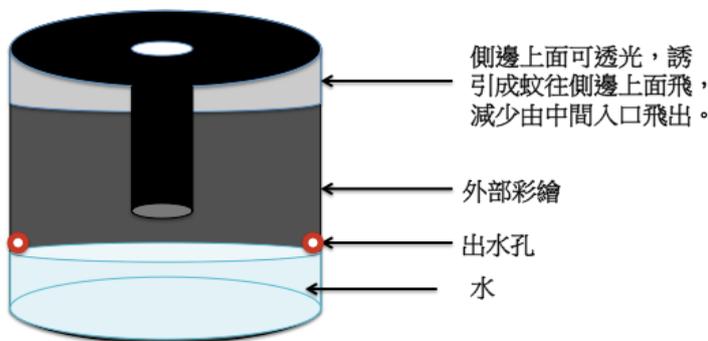
圖十、台南市登革熱病媒蚊成蚊於住家戶內外的產卵習性比較。



圖十一、台南市登革熱病媒蚊成蚊於住家戶內外產卵指數比較。



圖十二、登革熱病媒蚊幼蟲孳生地調查。

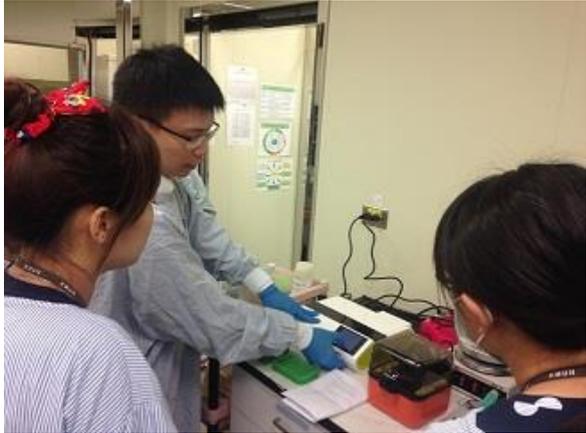


圖十三、都會文創複合式產卵誘集器概念圖。

# (平台二) 蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

## 附件一

1. 本計劃提供登革熱防治研究中心登革熱檢驗研究新進人員訓練共完成 4 人次，研究人員 3 名、醫事檢驗師 1 名

實驗室訓練	緊急事故演練																																																																																													
																																																																																														
訓練證明	訓練證明-2																																																																																													
<p style="text-align: center;">表單編號：TMC-SOP-02A</p> <p style="text-align: center;"><b>登革病毒 Real-Time RT-PCR 檢驗紀錄表單</b></p> <p>檢驗日期: 105 年 09 月 23 日      檢驗人員: 楊廷偉</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">病人姓名</th> <th rowspan="2">病歷號碼</th> <th rowspan="2">收件日期</th> <th rowspan="2">Barcode</th> <th rowspan="2">Lab NO.</th> <th colspan="3">檢驗結果</th> </tr> <tr> <th>Ct 值</th> <th>Tm 值(°C)</th> <th>檢驗結果</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Emuh2224</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>24.53</td> <td>78.88</td> <td>Positive</td> </tr> <tr> <td>Emuh28325</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>31.57</td> <td>79.07</td> <td>Negative</td> </tr> <tr> <td>NC1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>31.98</td> <td>74.07</td> <td>Negative</td> </tr> <tr> <td>PC1 (CV2)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>22.46</td> <td>81.25</td> <td>Positive</td> </tr> <tr> <td>PC2 (CV2)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>23.91</td> <td>78.85</td> <td>Positive</td> </tr> <tr> <td>NC2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>31.67</td> <td>74.05</td> <td>Negative</td> </tr> </tbody> </table> <p>結果確認人員:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>批號/配製(開封)日期</th> <th>反應試劑</th> <th>Volum(μl)</th> <th>Mix × <u>0.5</u> μl</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6061257007/105.08.04</td> <td>2× SYBR QRT-PCR Master Mix</td> <td>12.5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>6061243903/105.08.08</td> <td>RT-Block Enzyme Mixture</td> <td>1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>05105571/103.09.06</td> <td>10 μM Forward primer (R36)</td> <td>0.5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>10236576/105.08.07</td> <td>10 μM Reverse primer (R169)</td> <td>0.5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>10236577/105.08.07</td> <td>10 μM Reverse primer (R170)</td> <td>0.5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>105.09.19</td> <td>ddH<sub>2</sub>O</td> <td>5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>PC1</td> <td>檢體 RNA/PC/NC</td> <td>5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>PC2</td> <td>檢體 RNA/PC/NC</td> <td>5</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Total</td> <td>25</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Real time PCR machine: <u>Stratagene Mx3000P™</u>          Protocol Name: <u>Dengue RT-PCR program</u>          Program:          (1) (25°C, 30s)→(50°C, 30min)→(95°C, 15min)          (2) (94°C, 25s)→(55°C, 30s)→(72°C, 20s)→(77°C, 54s)/45 cycles          (3) melting: (95°C, 1min)→(68°C, 33s)→(95°C, 30s)</p> <p>Real-Time RT-PCR 結果判定: <u>Emuh2224 Positive</u>  <u>Emuh28325 Negative</u>          陽性結果判定: Tm 值為 79-82°C 之產物, 且 Ct 值需小於 35 (若為 35-40 則須再次確認 Dissociation Curve 曲線結果, 必要時須重新操作), 則可判定為陽性。          陰性結果判定: Tm 值落於 79-82°C 範圍之外, 無 Ct 值或有 Ct 值 ≥ 35.00 則為陰性。          (備註: 若有介於臨界值之案例, 以 Dissociation Curve 判讀為準, 必要時須重新操作)          品質主管簽核:</p>	病人姓名	病歷號碼	收件日期	Barcode	Lab NO.	檢驗結果			Ct 值	Tm 值(°C)	檢驗結果	Emuh2224				24.53	78.88	Positive	Emuh28325				31.57	79.07	Negative	NC1				31.98	74.07	Negative	PC1 (CV2)				22.46	81.25	Positive	PC2 (CV2)				23.91	78.85	Positive	NC2				31.67	74.05	Negative	批號/配製(開封)日期	反應試劑	Volum(μl)	Mix × <u>0.5</u> μl	6061257007/105.08.04	2× SYBR QRT-PCR Master Mix	12.5		6061243903/105.08.08	RT-Block Enzyme Mixture	1		05105571/103.09.06	10 μM Forward primer (R36)	0.5		10236576/105.08.07	10 μM Reverse primer (R169)	0.5		10236577/105.08.07	10 μM Reverse primer (R170)	0.5		105.09.19	ddH <sub>2</sub> O	5		PC1	檢體 RNA/PC/NC	5		PC2	檢體 RNA/PC/NC	5			Total	25		<p style="text-align: center;">表單編號：TMC-QP-02J (page 5/5)</p> <p>評估結果:          合格標準: 筆試 80 分, 口試應答正確率 80%, 盲測結果正確。  <input type="checkbox"/> 筆試 <u>        </u> 分 / <input type="checkbox"/> 口試正確達 <u>        </u> % / <input type="checkbox"/> 盲測結果正確。          完成訓練並通過驗收  <input type="checkbox"/> 筆試 <u>        </u> 分 / <input type="checkbox"/> 口試正確達 <u>        </u> % 僅部分及格 / <input type="checkbox"/> 盲測結果錯誤。          需加強訓練部分: <u>檢體處理後檢驗程序</u></p> <p>由 (授權人) 指派該員 <u>楊亞娟</u> 於中心在職日 <u>105</u> 年 <u>10</u> 月 <u>7</u> 日至離職日止可執行登革病毒檢驗試驗(包含 Stratagene Mx3000P 儀器操作)之檢驗業務, 於此期限屆滿前, 需再次授權才可繼續執行此項業務。</p> <p>教育訓練管理人員: <u>        </u> 日期: <u>105/10/7</u>          主任簽核: <u>        </u> 日期: <u>105/10/7</u></p>
病人姓名						病歷號碼	收件日期	Barcode	Lab NO.	檢驗結果																																																																																				
	Ct 值	Tm 值(°C)	檢驗結果																																																																																											
Emuh2224				24.53	78.88	Positive																																																																																								
Emuh28325				31.57	79.07	Negative																																																																																								
NC1				31.98	74.07	Negative																																																																																								
PC1 (CV2)				22.46	81.25	Positive																																																																																								
PC2 (CV2)				23.91	78.85	Positive																																																																																								
NC2				31.67	74.05	Negative																																																																																								
批號/配製(開封)日期	反應試劑	Volum(μl)	Mix × <u>0.5</u> μl																																																																																											
6061257007/105.08.04	2× SYBR QRT-PCR Master Mix	12.5																																																																																												
6061243903/105.08.08	RT-Block Enzyme Mixture	1																																																																																												
05105571/103.09.06	10 μM Forward primer (R36)	0.5																																																																																												
10236576/105.08.07	10 μM Reverse primer (R169)	0.5																																																																																												
10236577/105.08.07	10 μM Reverse primer (R170)	0.5																																																																																												
105.09.19	ddH <sub>2</sub> O	5																																																																																												
PC1	檢體 RNA/PC/NC	5																																																																																												
PC2	檢體 RNA/PC/NC	5																																																																																												
	Total	25																																																																																												

附件二

2. 2015 年 7-8 月於臺灣代訓索羅門來台醫檢師四名，包含登革熱檢驗操作、判讀、醫學實驗室管理等相關課程。

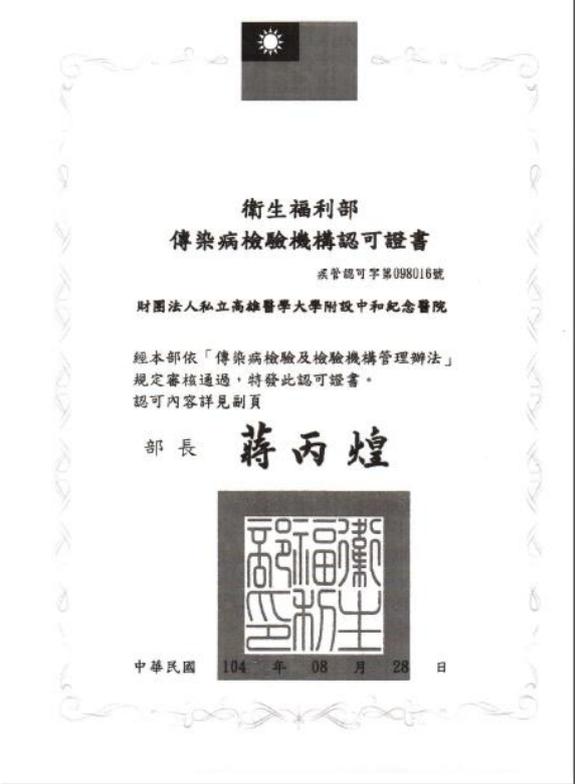
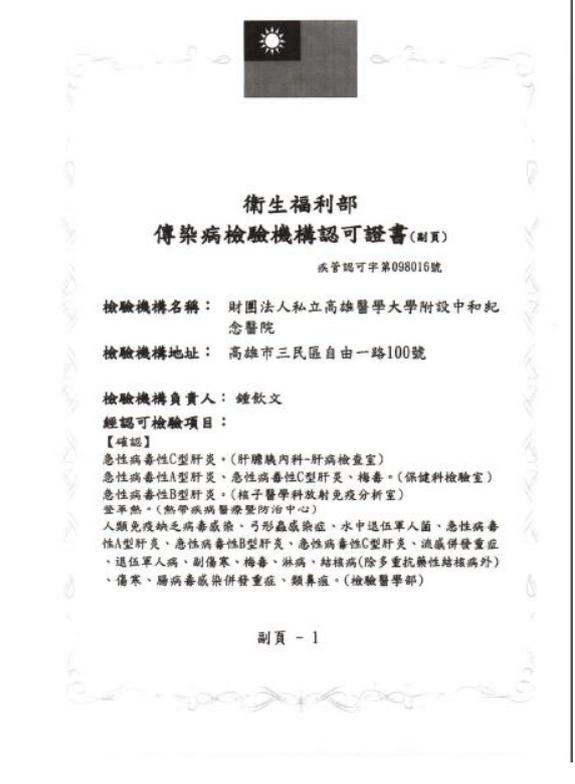
<p>醫學實驗室管理課程</p>	<p>登革熱檢驗相關課程</p>
	
<p>登革熱展覽館導覽</p>	<p>登革熱相關檢驗操作</p>
	

3. 2015/11/16-2015/11/27至索羅門群島訓練南太平洋群島醫事檢驗師共四名，為適應當地檢驗環境，訓練內容含跑膠式登革病毒核酸檢驗(PCR)、登革NS1蛋白檢驗、抗登革病毒抗體IgM/G檢驗。

工作簡介	試劑配置
	
膠體電泳	登革病毒核酸檢驗
	
設定登革抗體檢驗儀器	登革核酸檢驗-3
	

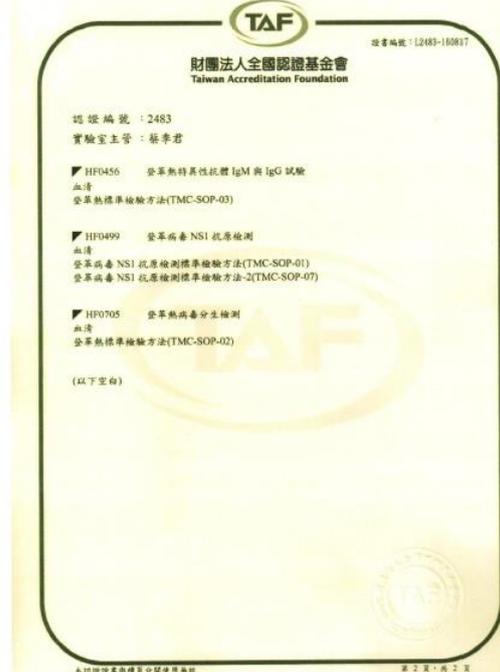
附件三

4. 登革熱標準檢驗方法(三項)已通過疾病管制署登革熱檢驗認可實驗室、全國認證基金會醫學實驗室認證通過、疾病管制署能力試驗通過；茲卡病毒檢驗已完成疾病管制署能力試驗通過

疾病管制署登革熱檢驗認可實驗室	疾病管制署登革熱檢驗認可實驗室-2
 <p>衛生福利部 傳染病檢驗機構認可證書</p> <p>疾管認可字第098016號</p> <p>財團法人私立高雄醫學大學附設中和紀念醫院</p> <p>經本部依「傳染病檢驗及檢驗機構管理辦法」規定審核通過，特發此認可證書。 認可內容詳見副頁</p> <p>部長 <b>蔣丙煌</b></p> <p>中華民國 104 年 08 月 28 日</p>	 <p>衛生福利部 傳染病檢驗機構認可證書(副頁)</p> <p>疾管認可字第098016號</p> <p>檢驗機構名稱：財團法人私立高雄醫學大學附設中和紀念醫院 檢驗機構地址：高雄市三民區自由一路100號</p> <p>檢驗機構負責人：鍾敦文 經認可檢驗項目： 【確認】 急性病毒性C型肝炎。(肝臟內科-肝病檢查室) 急性病毒性A型肝炎、急性病毒性C型肝炎、梅毒。(保健科檢驗室) 急性病毒性B型肝炎。(核子醫學科放射免疫分析室) 登革熱。(熱帶疾病醫療暨防治中心) 人類免疫缺乏病毒感染、弓形蟲感染症、水中退伍軍人菌、急性病毒性A型肝炎、急性病毒性B型肝炎、急性病毒性C型肝炎、流感併發重症、退伍軍人病、副傷寒、梅毒、結核病(除多重抗藥性結核病外)、傷寒、腸病毒感染併發重症、類鼻疽。(檢驗醫學部)</p> <p>副頁 - 1</p>
全國認證基金會醫學實驗室認證通過	全國認證基金會醫學實驗室認證通過-2



登革病毒檢驗能力試驗通過公文



茲卡病毒檢驗能力試驗通過公文

副本

衛生福利部疾病管制署 函  
 機關地址：10050台北市中正區林森南路6號  
 承辦人：張淑芬  
 電話：27850513#316  
 電子信箱：vivi@cdc.gov.tw

80756  
 高雄市三民區自由一路100號  
 受文者：財團法人私立高雄醫學大學附設中和紀念醫院

發文日期：中華民國105年5月17日  
 發文字號：疾管檢字第1051300336號  
 送別：普通件  
 密等及解密條件或保密期限：  
 附件：如文附件1-0254\_001-高醫.pdf、附件2-105年能力試驗受測單位實驗室間比對-高醫 (2).xls

主旨：檢送本署「105年登革熱能力試驗」測試結果乙份，請查照。

說明：  
 一、本年度測試檢體共21支，分別測試登革病毒核醣(RT-PCR)、抗體(ELISA)及抗原(NS1 Ag)之檢測能力。  
 二、測試合格標準為正確檢出率80%以上(即至少檢出17支)，貴實驗室本次檢出率為90%，達合格標準。

正本：財團法人私立高雄醫學大學附設中和紀念醫院熱帶疾病醫防治中心  
 副本：財團法人私立高雄醫學大學附設中和紀念醫院

署長 郭旭崧

第1頁 共1頁

正本

衛生福利部疾病管制署 函  
 機關地址：10050台北市中正區林森南路6號  
 承辦人：羅正宇  
 電話：27850513#316  
 電子信箱：joyceyang@cdc.gov.tw

80708  
 高雄市三民區自由一路100號  
 受文者：財團法人高雄醫學大學附設中和紀念醫院

發文日期：中華民國105年8月22日  
 發文字號：疾管檢字第1051300543A號  
 送別：普通件  
 密等及解密條件或保密期限：  
 附件：  
 主旨：檢送本署「105年茲卡病毒核醣檢驗能力試驗」測試結果，請查照。

說明：  
 一、能力試驗檢體共6支，測試合格標準訂為正確檢出率80%以上，即至少需檢出5支檢體。貴院微生物科與熱帶疾病醫防治中心檢出率均達合格標準，均通過能力試驗。  
 二、本署將於近日發函辦理指定作業。

正本：財團法人高雄醫學大學附設中和紀念醫院  
 副本：

署長 郭旭崧 請假  
 副署長 周志浩 代行

第1頁 共1頁

## 十五、表

### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

表一、利用蛋白質體學標定特異性表現於登革熱血清中宿主蛋白質分子

human protein name	Healthy donors			Dengue patient donors					
	1	2	3	1	2	3	4	5	6
immunoglobulin lambda 1 light chain			+++		++++ +	++		+	++++ ++++ +
mutant NADH-cytochrome b5 reductase				+	+	+			
<b>PR1</b>				+		+	+		
C4A3					++++ +	+	+		
Chain F, C3b In Complex With A C3b Specific Fab					++	+			

### (子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色

表一 捐獻者血清內抗體及病毒抗原表現

Donor ID	Dengue rapid test			DENV secreted from PBMC
	NS-1	IgG	IgM	
Donor 1	-	+	-	+
Donor 2	-	-	-	-
Donor 3	-	-	-	-
Donor 4	-	-	-	-
Donor 5	-	-	-	-
Donor 6	-	-	-	-
Donor 7	-	-	-	-
Donor 8	-	-	-	-
Donor 9	-	+	-	+
Donor 10	-	-	-	-
Donor 11	-	-	-	-
Donor 12	-	-	-	-
Donor 13	-	-	-	-
Donor 14	-	-	-	-
Donor 15	-	-	-	-
Donor 16	-	-	-	-
Donor 17	-	-	-	-
Donor 18	-	-	-	-

(子計畫三) 2014年南台灣登革熱重症個案的危險因子之初探—某醫學中心

照護病例對照研究

表一、世界衛生組織於1997年和2009年登革熱臨床分類

<p><b>世界衛生組織於1997年登革熱臨床分類</b></p> <p>登革熱的臨床表現分為：</p> <ol style="list-style-type: none"><li><b>1.無或輕微發燒或急性發燒表現</b> 其臨床表現也大多數以輕微的症狀或以急性發燒來表現</li><li><b>2.典型登革熱(classic dengue)</b> 典型登革熱是以急性高燒，頭部、肌肉、骨頭、關節酸痛、後眼窩痛以及皮疹為主要症狀。發燒通常持續5到7天；血液檢查會發現血小板及白血球低，肝功能異常等。</li><li><b>3.登革出血熱和登革休克症候群(dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome; DHF/DSS)</b> 登革出血熱與典型登革熱主要差別在於前者會造成微血管的滲透性增加、導致血漿滲漏；登革出血熱必須符合以下四種條件：<ol style="list-style-type: none"><li>(1)發燒</li><li>(2)出血表現或止血帶測試(tourniquet test)陽性</li><li>(3)血小板低下至10萬以下</li><li>(4)血漿滲漏(例如血比容增加20%以上或血清白蛋白低下或臨床上出現肋膜積水或腹水)。</li></ol></li></ol>
<p><b>世界衛生組織於2009年登革熱臨床分類</b></p> <p>登革熱的臨床表現分為：</p> <ol style="list-style-type: none"><li><b>1.登革熱無警示徵象</b> 登革熱病人合併有下列兩種臨床症狀：噁心/嘔吐、頭痛/後眼窩痛/肌肉痛/關節痛/骨頭痛、出疹、白血球減少、血壓帶試驗陽性</li><li><b>2.登革熱有警示徵象</b> 腹部疼痛及壓痛、持續性嘔吐、臨床上體液蓄積、黏膜出血、嗜睡、躁動不安、肝臟腫大超過肋骨下緣2公分及實驗室檢出血比容增加伴隨血小板急速下降</li><li><b>3.登革熱重症</b> 主要為符合下列一項以上的條件：<ol style="list-style-type: none"><li>(1)嚴重的血漿滲漏導致呼吸窘迫；</li><li>(2)嚴重出血</li><li>(3)嚴重器官受損(如肝臟受損(GOT/GPT<math>\geq</math>1000 IU/L)、意識受損或是心臟或是其他衰竭</li></ol></li></ol>

表二、病例组与对照组基本人口学资料

	病例组 (n=35)	对照组 (n=140)	p 值
性别			
男	20(57.1%)	80(57.1%)	-
女	15(42.9%)	60(42.9%)	
年龄	67.80±19.69	66.92±18.75	0.806
身高	160.06±8.76	161.30±9.08	0.474
体重	62.32±11.49	63.83±12.89	0.535
BMI	24.32±4.01	24.51±4.40	0.825
有无住院			
有	34(97.1%)	109(77.9%)	0.008*
无	1(2.9%)	31(22.1%)	

\* : p 值小于 0.05

表三、病例组与对照组之临床症状

	病例组 (n=35)	对照组 (n=140)	p 值
發燒			
有	33(94.3%)	134(95.7%)	0.661#
無	2(5.7%)	6(4.3%)	
寒顫			
有	11(31.4%)	34(24.3%)	0.387
無	24(68.6%)	106(75.7%)	
頭痛			
有	8(22.9%)	54(38.6%)	0.082
無	27(77.1%)	86(61.4%)	
後眼窩痛			
有	1(2.9%)	5(3.6%)	1.000#
無	34(97.1%)	135(96.4%)	
背痛			
有	1(2.9%)	17(12.1%)	0.129#
無	34(97.1%)	123(87.9%)	
骨頭痛			
有	3(8.6%)	38(27.1%)	0.020*
無	32(91.4%)	102(72.9%)	
關節痛			
有	3(8.6%)	18(12.9%)	0.771#
無	32(91.4%)	122(87.1%)	
肌肉痠痛			
有	11(31.4%)	84(60.0%)	0.002*
無	24(68.6%)	56(40.0%)	
皮疹			
有	6(17.1%)	56(40.0%)	0.011*
無	29(82.9%)	84(60.0%)	

\*：p 值小於 0.05；#：期望值 ≤ 5

表三(續)

	病例組 (n=35)	對照組 (n=140)	p 值
出血點			
有	9(25.7%)	28(20.0%)	0.459
無	26(74.3%)	112(80.0%)	
腹瀉			
有	12(34.3%)	63(45.0%)	0.252
無	23(65.7%)	77(55.0%)	
肚子痛不舒服			
有	16(45.7%)	61(43.6%)	0.819
無	19(54.3%)	79(56.4%)	
噁心			
有	12(34.3%)	50(35.7%)	0.874
無	23(65.7%)	90(64.3%)	
嘔吐			
有	14(40.0%)	36(25.7%)	0.094
無	21(60.0%)	104(74.3%)	
喉嚨痛			
有	4(11.4%)	18(12.9%)	1.000#
無	31(88.6%)	122(87.1%)	
咳嗽			
有	13(37.1%)	43(30.7%)	0.466
無	22(62.9%)	97(69.3%)	
黃疸			
有	2(5.7%)	0(0.0%)	0.039*#
無	33(94.3%)	140(100.0%)	
流汗			
有	1(2.9%)	8(5.7%)	0.690#
無	34(97.1%)	132(94.3%)	

\*：p 值小於 0.05；#：期望值 $\leq 5$

表三(續)

	病例組 (n=35)	對照組 (n=140)	p 值
全身無力			
有	20(57.1%)	86(61.4%)	0.643
無	15(42.9%)	54(38.6%)	
嗜睡			
有	3(8.6%)	2(1.4%)	0.055#
無	32(91.4%)	138(98.6%)	
腸胃道出血			
有	21(60.0%)	28(20.0%)	0.000*
無	14(40.0%)	112(80.0%)	
血尿			
有	10(28.6%)	25(17.9%)	0.156
無	25(71.4%)	115(82.1%)	
牙齦出血			
有	1(2.9%)	11(7.9%)	0.464#
無	34(97.1%)	129(92.1%)	
流鼻血			
有	1(2.9%)	4(2.9%)	1.000#
無	34(97.1%)	136(97.1%)	
血漿滲漏			
有	33(94.3%)	45(32.1%)	0.000*
無	2(5.7%)	95(67.9%)	
出血徵候			
有	28(80.0%)	70(50.0%)	0.001*
無	7(20.0%)	70(50.0%)	
血小板小於 10 萬			
有	34(97.1%)	116(82.9%)	0.031*
無	1(2.9%)	24(17.1%)	

\* : p 值小於 0.05 ; # : 期望值  $\leq 5$

表三(續)

	病例組 (n=35)	對照組 (n=140)	p 值
登革出血熱			
有	24(68.6%)	27(19.3%)	0.000*
無	11(31.4%)	113(80.7%)	
白血球數			
異常	11(31.4%)	57(40.7%)	0.313
正常	24(68.6%)	83(59.3%)	
血紅素量			
異常	22(62.9%)	37(26.4%)	0.000*
正常	13(37.1%)	103(73.6%)	
血球容積比			
異常	23(65.7%)	41(29.3%)	0.000*
正常	12(34.3%)	99(70.7%)	
血小板數			
異常	32(91.4%)	117(83.6%)	0.242
正常	3(8.6%)	23(16.4%)	
淋巴球			
異常	24(70.6%)	73(54.5%)	0.089
正常	10(29.4%)	61(45.5%)	
C-活性蛋白			
異常	30(8.6%)	90(69.8%)	0.030*
正常	4(91.4%)	39(30.2%)	
血中尿素氮			
異常	13(46.4%)	27(26.2%)	0.039*
正常	15(53.6%)	76(73.8%)	
血清肌酸酐			
異常	16(45.7%)	24(18.3%)	0.001*
正常	19(54.3%)	107(81.7%)	

\*：p 值小於 0.05；#：期望值 $\leq 5$

表四、病例組與對照組之臨床檢驗數據

	病例組 (n=35)	對照組 (n=140)	p 值
白血球數	6.24±3.30	4.81±2.16	0.019*
血紅素量	11.31±2.01	13.19±1.59	0.000*
血球容積比	33.93±5.99	39.31±4.45	0.000*
平均紅血球容積	90.25±5.84	89.50±7.63	0.588
血小板數	90.30±41.58	113.05±53.10	0.019*
分葉型嗜性白血球	60.88±18.29	60.67±15.23	0.948
淋巴球	16.87±9.85	21.41±10.45	0.023*
嗜酸球	0.84±1.51	0.79±1.01	0.841
單核球	10.27±5.02	11.55±4.01	0.116
血糖	143.62±47.20	155.18±61.88	0.358
血清麩胺酸苯醋酸轉氨基酶	163.53±292.74	83.00±53.35	0.114
血清麩胺酸丙酮酸轉氨基酶	85.57±121.72	60.69±43.61	0.242
C-活性蛋白	27.44±26.77	13.40±14.44	0.005*
血中尿素氮	25.83±25.21	13.54±6.31	0.016*
血清肌酸酐	1.92±2.17	0.98±0.53	0.016*
血清鈉	136.58±5.41	135.49±3.17	0.267
血清鉀	4.34±2.95	3.76±0.41	0.262
凝血酶原時間	11.68±1.90	10.63±1.80	0.009*
部份凝血活酶時間	1.15±0.18	1.05±0.17	0.009*
部份凝血活酶時間	37.54±7.96	33.23±6.54	0.005*

\*：p 值小於 0.05

表五、病例组与对照组之疾病史(单变数分析结果)

	病例组 (n=35)	对照组 (n=140)	危险对比值 (Odds Ratio)	95%信赖区间
胃溃疡				
有	9(25.7%)	15(10.7%)	2.89	1.14-7.30*
无	26(74.3%)	125(89.3%)		
十二指肠溃疡				
有	8(22.9%)	8(5.7%)	4.89	1.69-14.17*
无	27(77.1%)	132(94.3%)		
胃食道逆流				
有	7(20.0%)	14(10%)	2.25	0.83-6.09
无	28(80.0%)	126(90%)		
酗酒				
有	2(5.7%)	1(0.7%)	8.42	0.74-95.72
无	33(94.3%)	139(99.3%)		
肺结核病史				
有	3(8.6%)	3(2.1%)	4.28	0.83-22.20
无	32(91.4%)	137(97.9%)		
B型肝炎				
有	2(5.7%)	9(6.4%)	0.88	0.18-4.28
无	33(94.3%)	131(93.6%)		
C型肝炎				
有	1(2.9%)	5(3.6%)	0.79	0.09-7.02
无	34(97.1%)	135(96.4%)		
肝硬化				
有	1(2.9%)	2(1.4%)	2.03	0.18-23.04
无	34(97.1%)	138(98.6%)		
高血压				
有	23(65.7%)	74(52.9%)	1.71	0.79-3.70
无	12(34.3%)	66(47.1%)		

\*：卡方检定其 p 值小于 0.05

表五(續)

	病例組 (n=35)	對照組 (n=140)	危險對比值 (Odds Ratio)	95%信賴區間
糖尿病				
有	17(48.6%)	43(30.7%)	2.13	1.00-4.53*
無	18(51.4%)	97(69.3%)		
鬱血性心衰竭				
有	7(20.0%)	10(7.1%)	3.25	1.14-9.28*
無	28(80.0%)	130(92.9%)		
慢性阻塞性肺病				
有	3(8.6%)	2(1.4%)	6.47	1.04-40.33
無	32(91.4%)	138(98.6%)		
中風				
有	3(8.6%)	10(7.1%)	1.22	0.32-4.69
無	32(91.4%)	130(92.9%)		
末期腎病				
有	3(8.6%)	1(0.7%)	13.03	1.31-129.40*
無	32(91.4%)	139(99.3%)		
慢性腎衰竭				
有	12(34.3%)	16(11.4%)	4.04	1.69-9.66*
無	23(65.7%)	124(88.6%)		
血液腫瘤				
有	0(0.0%)	3(2.1%)	0.80	0.74-0.86
無	35(100%)	137(97.9%)		
實質腫瘤				
有	3(8.6%)	16(11.4%)	0.73	0.20-2.65
無	32(91.4%)	124(88.6%)		
自體免疫疾病				
有	0(0.0%)	2(1.4%)	0.80	0.74-0.86
無	35(100%)	138(98.6%)		

\*：卡方檢定其 p 值小於 0.05

表六、登革熱重症危險因子之多變數邏輯式迴歸分析

	病例組	對照組	粗危險對 比值	調整後危險對比值 (95%信賴區間)
胃潰瘍				
有	9(25.7%)	15(10.7%)	2.89	2.05(0.62-6.75)
沒有	26(74.3%)	125(89.3%)	1.0	
十二指腸潰瘍				
有	8(22.9%)	8(5.7%)	4.89	5.65(1.55-20.55)*
沒有	27(77.1%)	132(94.3%)	1.0	
糖尿病				
有	17(48.6%)	43(30.7%)	2.13	2.37(0.92-6.14)
沒有	18(51.4%)	97(69.3%)	1.0	
鬱血性心衰竭				
有	7(20.0%)	10(7.1%)	3.25	3.32(0.95-11.61)
沒有	28(80.0%)	130(92.9%)	1.0	
末期腎病				
有	3(8.6%)	1(0.7%)	13.03	11.52(0.94-141.52)
沒有	32(91.4%)	139(99.3%)	1.0	
慢性腎衰竭				
有	12(34.3%)	16(11.4%)	4.04	4.90(1.64-14.61)*
沒有	23(65.7%)	124(88.6%)	1.0	

備註：調整年齡、性別、BMI 及表中的疾病史

\*：p 值小於 0.05

(子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析(詳見內文)

(子計畫七)登革熱疫苗臨床試驗之血清盛行率前驅調查

表一、SD Dengue IgG Capture ELISA 檢驗結果

	Year	IgG positive	IgG negative	Total
三民區 (Sanmin Dist)	2015	12 (5.94%)	190 (94.06%)	202
	2016	12 (5.68%)	199 (94.32%)	211
楠梓區 (Nanzih Dist)	2015	7 (3.26%)	208 (96.74%)	215
	2016	10 (4.8%)	198 (95.2%)	208

表二、成對血清陽轉與2016年初次採檢ELISA 檢驗結果

	Year	Primary sampling		Repeat sample		Total
		IgG positive	Primary sampling	IgG seroconversion	Repeat sampling	
三民區 (Sanmin Dist)	2015	12 (5.94%)	202			202
	2016	11 (6.8%)	161	2 (4%)	50	211
楠梓區 (Nanzih Dist)	2015	7 (3.26%)	215			215
	2016	6 (4.6%)	131	1 (1.29%)	77	208

表三、登革 IgG 抗體陽性之性別分佈(初次採檢)

Primary sampling	Year	男 (Male)	女 (Female)	Total
三民區 (Sanmin Dist)	2015	8/80 (10%)	4/122 (3.27%)	12/202 (5.94%)
	2016	2/44 (4.5%)	9/119 (7.6%)	11/163 (6.7%)
楠梓區 (Nanzih Dist)	2015	1/74 (1.35%)	6/141 (4.25%)	7/215 (3.25%)
	2016	1/43 (2.3%)	5/89 (5.6%)	6/132 (4.5%)

表四、登革IgG抗體陽性之年齡層分佈(初次採檢)

Primary Sampling	Year	<19	20~29	30~39	40~49	50~59	60~69	70~79	80~89	total
三民區 (Sanmin Dist)	2015	0/1	2/104 (1.9%)	0/21	0/10	2/11 (18.2%)	2/29 (6.9%)	5/24 (20.8%)	1/2 (50%)	12/202 (5.9%)
	2016	0/6	6/80 (7.5%)	0/39	0/14	3/17 (17.6%)	1/5 (20%)	1/2 (50%)	0/0	11/163 (6.75%)
楠梓區 (Nanzih Dist)	2015	0/2	0/23	0/27	2/29 (6.9%)	1/66 (1.5%)	2/55 (3.6%)	2/13 (15.4%)	0/0	7/215 (3.3%)
	2016	0/1	1/30 (3.3%)	1/23 (4.3%)	0/19	1/24 (4.2%)	0/24	3/10 (30%)	0/1	6/132 (4.5%)

表五、登革抗體陽性與問卷調查是否感染過登革熱

Primary sampling	year	有 (known)	無 (unknown)	不確定	Total
三民區 (Sanmin Dist)	2015	8 (66.7%)	4 (33.3%)	0	12
	2016	3 (27.3%)	7 (63.6%)	1 (9.1%)	11
楠梓區 (Nanzih Dist)	2015	1 (14.3%)	6 (85.7%)	0	7
	2016	0	6 (100%)	0	6

(子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗

表一、候選抗體列表

Group	Number
Anti Envelope	2C7
	2D22
Anti NS-1	2F30
	2F12
	2F31
	1F28
	1F124
	1F54
	1F72
	1F19
	1F29
	1F109

表二、中和登革病毒效率的抗體濃度

病毒來源	中和百分之 90 <sup>a</sup>		中和百之 50 <sup>b</sup>	
	2C7	2D22	2C7	2D22
Meg01-DENV2	5ug/mL	8ug/mL	1ug/mL	1ug/mL
Vero-DENV2	5ug/mL	5ug/mL	0.05ug/mL	1ug/mL

<sup>a</sup> 中和百分之九十從 Meg01 或 Vero 產生的病毒的抗體濃度

<sup>b</sup> 中和百分之五十從 Meg01 或 Vero 產生的病毒的抗體濃度

(子計畫九)台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析

DENV-I	Plasma		Total
	+	-	
Culture +	49 (81.7%)	5 (8.3%)	54 (90%)
Culture -	6 (10%)	0	6 (10%)
<b>Total</b>	<b>55 (91.7%)</b>	<b>5 (8.3%)</b>	<b>60 (100%)</b>

表一、登革熱病毒一型感染者血清型分析檢出方式之 Two-by-Two 比較表

DENV-II	Plasma		Total
	+	-	
Culture +	59 (80.8%)	3 (4.1%)	62 (84.9%)
Culture -	11 (15.1%)	0	11 (15.1%)
<b>Total</b>	<b>70 (95.1%)</b>	<b>3 (4.1%)</b>	<b>73 (100%)</b>

表二、登革熱病毒二型感染者血清型分析檢出方式之 Two-by-Two 比較表

DENV (I, II)	Plasma		Total
	+	-	
Culture +	108 (81.2%)	8 (6%)	116 (87.2%)
Culture -	17 (12.8%)	0	17 (12.8%)
<b>Total</b>	<b>125 (94%)</b>	<b>8 (6%)</b>	<b>133 (100%)</b>

表三、一型及二型登革熱病毒感染者血清型分析檢出方式之 Two-by-Two 比較表

Years	Total	DHF	Gender	District of Kaohsiung city
-------	-------	-----	--------	----------------------------

		Male	Female	Xiaogang	Qianzhen	Fengshan	Lingya	Meinong	
2015	56	2 (3.57%)	31 (55.36%)	25 (44.64%)	36 (64.29%)	3 (5.36%)	8 (15.29%)	0 (0%)	0 (0%)
2016	24	3 (12.5%)	10 (41.67%)	14 (58.33%)	18 (75.00%)	0 (0%)	1 (4.17%)	1 (4.17%)	1 (4.17%)

表四、2014-2015 年高雄地區登革熱疫情爆發期間登革熱患者癒後家訪及恢復期採檢一覽表

	Infection	Gender	Age	Interval of acute and convalescence phase (months)	Notes
<b>DENV-I</b>	HKMU001	M	71.0	4.2	<b>DHF</b> , HTN
	HKMU002	F	51.4	4.5	
	HKMU004	F	49.2	4.2	
	HKMU006	F	19.8	4.2	
	HKMU009	F	16.9	4.6	
	HKMU012	M	12.5	4.7	
	HKMU022	M	55.7	5.7	HTN
	HKMU030	M	43.1	8.2	DENV-1 history, HBV, HTN
<b>DENV-II</b>	HKMU043	M	69.9	8.6	Solid tumor, HTN, DM
	HKMU058	F	54.9	3.1	<b>DHF</b> , DENV-1 history, Hyperthyroidism
	HKMU059	M	65.9	3.1	<b>DHF</b> , DENV-1 history, HTN
	HKMU060	M	62.9	3.0	<b>DHF</b> , DENV-1 history
	HKMU061	M	68.9	3.4	HTN, DM, CVA
	HKMU062	F	41.0	3.3	
	HKMU063	M	37.3	3.7	
	HKMU064	F	48.7	6.5	HBV
	HKMU065	F	77.3	6.2	HTN, CVA
	HKMU066	F	45.9	6.0	
HKMU067	M	27.4	6.1		

表五、登革熱一型及二型病毒感染者人口學資料與恢復期採血間隔區間

(子計畫十) 都會城鎮排水溝渠引入海水防制登革熱病媒蚊研究計畫

表 1 海水鹽度階梯實驗結果表

鹽度 時間 累死數	30psu	20psu	15psu	10psu	5psu	對照組
2 小時	0	0	0	0	0	0
4 小時	2	1	1	0	0, 蛹 3	0
6 小時	13	0	1	0	0, 蛹 4	0
8 小時	16	2	2	0	0, 蛹 4	0
10 小時	19	2	2	0	0, 蛹 5	0
12 小時	19	2	2	0	0, 蛹 5	0
24 小時	20	16	3	0	0, 蛹 7	0
48 小時		20	17	0, 蛹 1	0, 蛹 14	0, 蛹 2
72 小時			18	0, 蛹 2	0, 蛹 16	0, 蛹 2
96 小時			19	0, 蛹 3	0, 蛹 16	0, 蛹 2
120 小時			20	2, 蛹 3	1, 蛹 17	0, 蛹 2
144 小時				2, 蛹 4	1, 蛹 19	0, 蛹 2
存活率	0%	0%	0%	90%	95%	100%

表 2 濃度稀釋測試結果表(以鳳山、旗津區觀察 48 小時為例)

項 目 檢 測 累 死 率	鳳山區			旗津區		
	溶質	死亡時間(hr)	死亡率	溶質	死亡時間(hr)	死亡率
清水+BTI	1/2	3	100%	1/2	4	100%
	1/4	5	100%	1/4	4	100%
	1/8	24	100%	1/8	3	100%
清水+有機磷	1/2	0.5	100%	1/2	0.5	100%
	1/4	2	100%	1/4	1	100%
	1/8	6	100%	1/8	1	100%
海水 33psu	1/2	48hr 後	65%	1/2	48hr 後	100%
	1/4	48hr 後	0%	1/4	48hr 後	40%
	1/8	48hr 後	10%	1/8	48hr 後	40%
海水+BTI	1/2	5	100%	1/2	5	100%
	1/4	9	100%	1/4	5	100%
	1/8	8	100%	1/8	5	100%
海水+有機磷	1/2	0.5	100%	1/2	0.5	100%
	1/4	2	100%	1/4	1	100%

	1/8	4	100%	1/8	1	100%
粗鹽 30psu	1/2	36	100%	1/2	48hr 後	100%
	1/4	48hr 後	10%	1/4	48hr 後	55%
	1/8	48hr 後	0%	1/8	48hr 後	50%

表 3. 水溝灌流後-有機磷劑殘留量檢測結果

地點 項目	清水+有機磷劑(亞特松) 檢驗值(ppm)	海水+有機磷劑(亞特松) 檢驗值(ppm)
	鳳山區	前鎮區
	漢慶街 80 巷 21 號	瑞隆路 208 巷 12 號
105/2/20(Day1)	21.7	5.66
105/2/22(Day3)	3.78	1.01
105/2/24(Day5)	2.8	0.397
105/2/26(Day7)	1.19	0.490
105/3/18(四週)	0.0253	ND(極低值)

表 4. 現地水溝海水灌流後，社區病媒調查紀錄表

項目 日期	清水+ BTI	清水+ 有機磷	海水 +BTI	海水+ 有機磷	海水	對照組	
	鳳山區		前鎮區				
	漢慶街 82 巷 16 號	漢慶街 80 巷 21 號	瑞隆路 194 巷 4 弄 40 號	瑞隆路 208 巷 12 號	武慶一 路 194 巷 1 號	斑超路 72 巷 2 弄 2 號	
灌流量	4 噸	4 噸	4 噸	4 噸	4 噸	×	
灌流長度	90m	90m	52m	102m	70m	57m	
灌流時間	2 分 5 秒	1 分 36 秒	3 分 5 秒	3 分 55 秒	2 分 45 秒	×	
未灌流前	鹽度	33psu	33psu	33psu	33psu	33psu	×
	布氏 指數	2	2	1	1	1	0
	成蚊 指數	0	0	0	0	0	0
	孳生 情況	有	有	有	有	有	有
105/2/22 (3 天後)	鹽度	2psu	1psu	2psu	10psu	3psu	0psu
	布氏 指數	0	0	0	0	0	0
	成蚊 指數	0	0	0	0	0	0
	孳生	無	無	無	無	無	無

	情況						
105/2/24 (5 天後)	鹽度	1psu	1psu	1psu	0psu	4psu	0psu
	布氏指數	0	0	0	0	0	0
	成蚊指數	0	0	0	0	0	0
	孳生情況	無	無	無	無	無	無
105/2/26 (1 週後)	鹽度	0psu	0psu	1psu	0psu	4psu	0psu
	布氏指數	0	0	0	0	0	0
	成蚊指數	0	0	0	0	0	0
	孳生情況	無	無	無	無	無	無
105/3/18 (4 週後)	鹽度	0psu	0psu	0psu	0psu	0psu	0psu
	布氏指數	0	0	0	0	0	0
	成蚊指數	0	0	0	0	0	0
	孳生情況	無	無	無	無	無	無
105/4/18 (8 週後)	鹽度	0psu	0psu	0psu	0psu	0psu	0psu
	布氏指數	2	2	0	0	0	2
	成蚊指數	0	0	0	0	0	0
	孳生情況	有 5 隻	有 5 隻	無	無	無	有 20 隻
105/5/16 (12 週後)	鹽度	0psu	0psu	0psu	0psu	0psu	0psu
	布氏指數	0	0	2	2	2	1
	成蚊指數	0	0	0	0	0	0
	孳生情況	無	無	無	有 11 隻	有 1 隻	有 12 隻
105/6/18 (16 週後)	鹽度	0psu	0psu	0psu	0psu	0psu	0psu
	布氏指數	1	1	0	0	0	0
	成蚊指數	0.02 (捕獲 1)	0.02 (捕獲 1)	0	0	0	0

		公1母)	公1母)				
	孳生 情況	無	無	無	無	無	無

表5.

灌流 分析表	清水+有機磷 (三民區) 執行日期： 105/7/25.26	海水+有機磷 (前鎮區) 執行日期： 105/8/9.10	海水 (鳳山區) 執行日期： 105/8/25	清水與生物製劑 (苓雅區) 執行日期： 105/9/9	海水與生物製劑 (鼓山區) 執行日期： 105/9/22
1 重複					
2 重複					
3 重複				7 天後孳長	
4 重複					
5 重複			4 週後孳長		
6 重複	8 週後孳長		4 週後孳長	7 天後孳長	
7 重複			4 週後孳長		
8 重複			4 週後孳長		
9. 對照組		1~5 天孳長		3 天後孳長	
平均天數					

(子計畫十一)應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的  
斑蚊孳生源

表一、質譜儀 ESI 離子源及電壓參數

Ionization mode	ESI+
Source T	120°C
Capillary V	3.0 kV
Cone V	25 V
MRM channel	322.1 → 95.7, CE <sub>1</sub> =15 V 322.1 → 184.9, CE <sub>2</sub> =25 V
Desolvation T	450°C
Desolvation gas flow	900 L/hr
Cone gas flow	100 L/hr
Resolution	Q <sub>1</sub> =13; Q <sub>3</sub> =15

表二、實驗室內模擬埃及斑蚊雌蚊自動散播百利普芬之實驗

	蚊蟲羽化抑制率 (%)	UPLC-MS-MS 定量 (ng/L) (外標準品校正法)	25ml水體內百利普芬劑量 (ng)	平均每隻蚊蟲可攜帶並散播之百利普芬劑量 (ng)
控制組 (二次水)	0	N/A	N/A	N/A
百利普芬液劑-1	90	17.71 ± 0.38	0.44 ± 0.01	0.04 ± 0.001
百利普芬液劑-2	90	33.63 ± 2.63	0.84 ± 0.07	0.08 ± 0.01
百利普芬液劑-3	90	16.08 ± 1.45	0.40 ± 0.04	0.04 ± 0.004
控制組 (丙酮)	0*	N/A	N/A	N/A
百利普芬粒劑-1	90.74*	84.38 ± 8.22	2.11 ± 0.21	0.21 ± 0.02
百利普芬粒劑-2	88.89*	109.75 ± 4.39	2.74 ± 0.11	0.27 ± 0.01
百利普芬粒劑-3	88.89*	101.92 ± 2.02	2.55 ± 0.05	0.26 ± 0.01

表三、使用生物性分析測試百利普芬散播站在野外放置33天後之殘效性

樣區	百利普芬散播站數量*	IE%	
		> 50	≤ 50
三民區	德智里	5	0
	寶安里	5	4
楠梓區	金田里	4	2
	加昌里	3	3
總和	17	8	9
%	100.0	47.1	52.9

\*扣除水溝類型的散播站

(子計畫十四) 登革熱多元化教育宣導暨人才養成培訓計畫

表一：衛教講師協助本局開立舉發單一覽表

項次	開立日期	舉發地址	舉發單流水號
1	1050104	前鎮區鎮北里臨水南路 8 號	004225
2	1050107	苓雅區廣澤里興中一路 453 巷 34 號	006216
3	1050108	三民區港西里同愛街 68 號-神農本舖	008426
4	1050108	小港區桂林里桂陽路 257 巷 25 弄 2~22 號屋後果園	004218
5	1050108	前鎮區鎮北里新生路 9-2 號旁輪渡站	004009
6	1050109	旗津區通山路 94 之 1 號	006247
7	1050111	前鎮區竹北里和平二路 254 號	008427
8	1050111	鳳山區武慶里漢慶街 130 號	008428
9	1050111	鳳山區和興里五甲一路 451 號	006124
10	1050112	三民區安吉里民族一路 100 號-台灣電力公司	008423
11	1050112	三民區安吉里民族一路 100 號	008424
12	1050112	鹽埕區育仁里新樂街 46 號-鹽埕國中	006095
13	1050112	三民區寶民里水源路 8~12 號-龍騰大亨大廈	006246
14	1050113	苓雅區正言里武廟路 105~107 號-王象東督大樓	008429
15	1051121	鼓山區正德里青泉街 28 號	008430
16	1051121	鼓山區正德里鼓山三路 5 巷 17 號	006248
17	1051122	鼓山區維生里濱海一路 88 巷 58 號-崑武殿	008417
18	1050201	苓雅區華堂里興中一路 226 之 1 號-光陽機車行	008411
19	1050215	鳳山區武慶里輜汽路 12 號-名乙實業有限公司	008412
20	1050217	旗津區北汕里北汕路 72 之 33 號	008418
21	1050303	新興區德旺里達仁街 17.19 號空地	008413
22	1050307	前鎮區瑞祥里班超路 72 巷 6 弄 23 號左側空地	008416
23	1050307	楠梓區錦屏里後勁南路 35 巷 12 弄 20 號	008419
24	1503008	楠梓區瑞屏里加昌路 359 號	008414
25	1050308	楠梓區瑞屏里後昌路 96 巷 28 之 1 號對面菜園	008420
26	1050309	旗津區北汕里北汕巷 83 之 8 號廢棄空屋	006249
27	1050309	旗津區永安里吉祥巷 44 之 1 號廢棄空屋	006250
28	1050309	旗津區旗下里廟前路一巷 82 弄 11 號	008415
29	1050311	楠梓區福昌里右昌一巷 148 弄 30 之 2 號	008606
30	1050315	楠梓區慶昌里後昌路 590 巷 132 號左側菜園	008611
31	1050317	旗津區旗下里文正巷 59 號	008613
32	1050317	旗津區復興里復興巷 9 之 2 附 1	008612
33	1050317	旗津區振興里廟前路 42 巷 8 號	008607
34	1050318	苓雅區苓洲里允文街 122 號-承泰土木包工業	008614
35	1050321	楠梓區錦屏里後昌路 325 巷 17 號	008608
36	1050321	楠梓區錦屏里後勁南路 149 巷 39 弄 16 號左側廢棄	008609

		屋	
37	1050321	楠梓區錦屏里後昌路 325 巷 7 號	008615
38	1050322	楠梓區金田里學專路 741 之 3 號左側工廠-凱晴有限公司	008610
39	1050328	楠梓區秀昌里後昌路 874 巷 1 之 3 號頂樓	008632
40	1050330	楠梓區興昌里右昌街 337 巷 24 號	008633
41	1050401	楠梓區享平里楠梓東街 64 巷 7 號	008634
42	1050401	楠梓區享平里楠梓東街 72 巷 1 弄 18 號	008635
43	1050418	三民區灣成里鼎金國民中學校舍改建第一期工程	006099
44	1050424	鼓山區綠川里綠川街 29 巷 1 號五樓	008488
45	1050509	三民區灣中里順昌街 80 號	015375
46	1050517	鼓山區裕豐里華豐街 45 巷 16 號	C012303
47	1050519	苓雅區正義里中正一路 2 號	006164
48	1050523	苓雅區苓雅里華新街 86 號	006204
49	1050523	新興區長譯里七賢二路 97 號	006205
50	1050524	鼓山區民強里鼓山三路 128 之 9 號	008641
51	1050524	三民區同德里民族一路 45 號	006189
52	1050525	旗山區瑞吉里延平一路 408、412 號	004034
53	1050525	小港區港南里小港路 246 號	006820
54	1050526	苓雅區林德官段一小段 3275 地號等 10 筆	006064
55	1050526	岡山區仁壽里民族二路 1 號	006052
56	1050527	前鎮區新街里新街路 296 巷 70 號	004055
57	1050527	前鎮區明孝里興漁四路 2 號	008638
58	1050530	前鎮區西山里台鋁十一巷 17、18 號、台鋁南巷 14 號及台鋁 10 巷 21, 22, 23 共同地下室	004056
59	1050607	旗津區南汕里立吉勝號 CT3-5222 號漁船	004035
60	1050607	旗津區南汕里金佶發 CT4-1602 號漁船	004036
61	1050608	旗津區南汕里金佶利 CT4-1326 號漁船	004037
62	1050608	旗津區南汕里順滿載 BK-7073 號漁船	004038
63	1050608	旗津區南汕里新日財 CT4-1515 號漁船	004057
64	1050613	旗津區南汕里慶奇豐 CT2-4295 號漁船	006109
65	1050613	旗津區南汕里海環 CT3-5310 號漁船	006110
66	1050613	旗津區南汕里安吉勝 CT3-5243 號漁船	006070
67	1050616	鳳山區武慶里武慶街 80 巷 25 號	006134
68	1050617	鼓山區前峰里葆禎路 163 號	006135
69	1050622	鳳山區瑞興里瑞興路 253 號	008494
70	1050622	鳳山區瑞興里瑞興路 249 巷 1~31 號	008495
71	1050712	苓雅區正心里正大路 80 號	004062
72	1050714	前鎮區盛興里三多三路 155 號	008603
73	1050831	岡山區介惠路 10 巷 27 弄 37 號	008604
74	1051005	鳳山區和興里五甲一路 451 號	016472

75	1051005	楠梓區中陽里南都段三小段 1067 地號	016452
76	1051005	楠梓區中陽里朝仁路 55 號	016453
77	1051006	大樹區統領里統領路 1 號	016496
78	1051007	前鎮區建隆里獅甲段一小段 526 地號	016487
79	1051013	三民區本安里黃興路 336 號	016475
80	1051013	三民區立業里自立一路 226 號 1~3 樓	016493
81	1051013	前鎮區建隆里獅甲段一小段 526 地號	016490
82	1051014	楠梓區宏昌里德民路 797 號	016459
83			

表二：登革熱多元化衛教宣導場次一覽表

項次	日期	衛教地點	時間	型式	衛教重點	衛教人員	人數
1	104/12/29	高雄市立高雄師範學院	16:00 至 17:30	走動教學	複查該校陽性點是否改善、雨後 24 小時巡視校園、檢視校園是否有漏水及積水處、注意校園施工工地、校園四周圍水溝及陰井及所有積水容器。	蔡怡芳	100
2	105/1/20	高雄市政府衛生局 8 樓會議室	09:00 至 12:00	工地衛教	工地登革熱防治及教育、環境用藥操作及使用、蚊種採樣及鑑定。	翁豫嫻	30
3	105/2/20	高雄市立高雄師範學院	09:00 至 12:00	走動教學 (各學校代表)	蚊種採樣及鑑定、登革熱防治及教育、環境用藥操作及使用、校園水溝登革熱防治實務演練。	翁豫嫻 黃志監 王旗海華 蔡怡芳 杜家惠 林世賢 謝麗雀	120
4	105/2/24	高雄市政府衛生局 8 樓會議室	09:00 至 12:00	工地衛教	工地登革熱防治及教育、環境用藥操作及使用、蚊種採樣及鑑定。	翁豫嫻	93
5	105/3/16	高雄市政府衛生局 8 樓會議室	09:00 至 12:00	工地衛教	工地登革熱防治及教育、環境用藥操作及使用、蚊種採樣及鑑定。	謝麗雀	71
6	105/4/13	高雄市政府衛生局 8 樓會議室	09:00 至 12:00	工地衛教	工地登革熱防治及教育、環境用藥操作及使用、蚊種採樣及鑑定。	蔡怡芳	39
7	105/5/18	高雄市政府衛生局 8 樓會議室	09:00 至 12:00	工地衛教	工地登革熱防治及教育、環境用藥操作及使用、蚊種採樣及鑑定。	黃登麟	48

8	105/5/18	高雄市政府 衛生局 8 樓 會議室	14:30 至 17:00	養工處 衛教	登革熱防治簡介、 病媒蚊生態及孳生 源檢查要領、環境 用藥簡介及病媒蚊 辨識。	翁豫嫻	145
9	105/5/26	凱旋醫院 3 樓凱旋廳	09:00 至 12:00	校長及教 職員	登革熱防治簡介、 病媒蚊生態及孳生 源檢查要領、環境 用藥簡介及病媒蚊 辨識。	翁豫嫻	170
10	105/5/31	四維行政中 心六樓會議 室	15:00 至 17:00	市場管理 處	登革熱病媒蚊介 紹、市集防疫注意 事項、茲卡病毒介 紹	翁豫嫻	106
11	105/6/7	凱旋醫院 3 樓凱旋廳	09:00 至 12:00	校長及教 職員	登革熱防治簡介、 病媒蚊生態及孳生 源檢查要領、環境 用藥簡介及病媒蚊 辨識。	翁豫嫻	177
12	105/6/15	高雄市政府 衛生局 8 樓 會議室	09:00 至 12:00	工地衛教	工地登革熱防治及 教育、環境用藥操 作及使用、蚊種採 樣及鑑定。	詹秀珍	32
13	105/6/30	高雄市政府 衛生局 8 樓 會議室	14:00 至 17:00	各局處	高雄市登革熱疫情 簡介、緊急防疫領 隊職責實務及登革 熱常用化學防治機 具簡介與操作實務	翁豫嫻	89
14	105/7/13	高雄市政府 衛生局 8 樓 會議室	09:00 至 12:00	工地衛教	工地登革熱防治及 教育、環境用藥操 作及使用、蚊種採 樣及鑑定。	謝麗雀	31
15	105/8/17	高雄市政府 衛生局 8 樓 會議室	09:00 至 12:00	工地衛教	工地登革熱防治及 教育、環境用藥操 作及使用、蚊種採 樣及鑑定。	蔡怡芳	37
16	105/10/12	高雄市政府 衛生局 8 樓 會議室	09:00 至 12:00	工地衛教	工地登革熱防治及 教育、環境用藥操 作及使用、蚊種採 樣及鑑定。	黃登麟	31
17	105/11/15	高雄市苓雅 區衛生所	14:00 至 16:00	登革熱衛 教	登革熱衛教	白秀華	
18	105/11/22	高雄市苓雅 區衛生所	14:00 至 16:00	登革熱衛 教	登革熱衛教	白秀華	
19	105/12/14	高雄市政府 衛生局 8 樓 會議室	09:00 至 12:00	工地衛教	工地登革熱防治及 教育、環境用藥操 作及使用、蚊種採 樣及鑑定。	詹秀珍	

20	105/12/30 105/12/31	高雄市政府 衛生局地下 一樓會議室	08:00 至 17:30	年終研討 會	年終病媒防疫研討	翁豫嫻	
總計人數							1319

### (平台一)行政暨教育資源平台

表 1:第五屆登革熱國際研討會之滿意度調查

	score Median(min- max)	Score>=4 (%)	score=3 (%)	Score<=2 (%)
研討會報名方式	5(1-5)/46	95.6	2.2	2.2
研討會之會場	5(2-5)/46	95.6	2.2	2.2
研討會提供的服務	5(4-5)/46	100	0	0
研討會提供的手冊內容	5(1-5)/46	89.1	6.5	4.4
研討會演講與討論的時間安排	5(1-5)/46	91.3	6.5	2.2
研討會主講人整體表現	5(4-5)/46	100	0	0
研討會主持人整體表現	5(4-5)/46	100	0	0
研討會的演講內容	5(4-5)/46	100	0	0
研討會工作人員的服務態度	5(3-5)/46	97.8	2.2	0
參加本次研討會的整體收穫	4(4-5)/46	100	0	0

(平台二) 蟲媒病毒感染鑑定標準實驗室

表一、登革熱防治研究中心2015年度收檢量統計

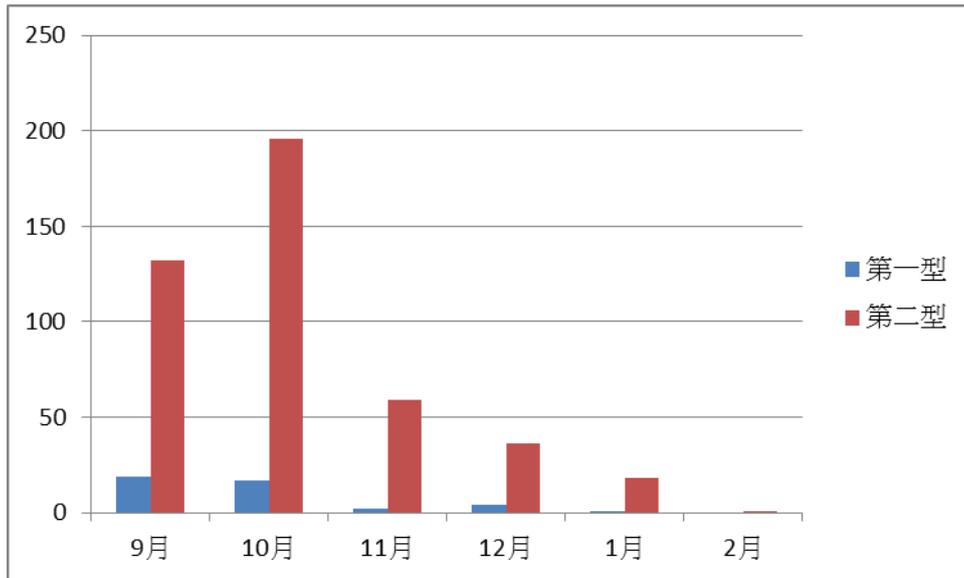
年度/ 月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	收檢 總量
2015 年總收 檢量	7	7	8	0	0	0	0	0	317	1129	1600	826	3894
陽性	0	1	2	0	0	0	0	0	165	630	856	331	1985
陰性	6	5	3	0	0	0	0	0	152	499	744	495	1904
未確定	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5

表二、登革熱防治研究中心2016年度收檢量統計

年度/月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	收檢 總量
2016年 總收檢量	126	16	19	27	34	32	42	35	49	27	407
陽性	29	3	0	1	0	0	0	2	0	1	36
陰性	97	13	19	26	30	32	42	33	44	25	361
未確定	0	0	0	0	4	0	0	0	5	1	10

表三、2015-2016年登革陽性檢體回溯性型別分析結果(截至10月底進度)

	第一型	第二型	陰性	第三型	total
9月	19(11.2%)	132(77.6%)	19	0	170
10月	17(6.6%)	196(76%)	44	1	258
11月	2(2.9%)	59(84.2%)	9	0	70
12月	4(7.8%)	36(70.5%)	11	0	51
1月	1(3.3%)	18(60%)	11	0	30
2月	0	1(25%)	0	3	4
total	43(7.4%)	442(75.8%)	94	4	583
%	7.38	75.81	16.12	0.69	100



## 十六、附錄

### (子計畫一) 快篩試劑研發及相關臨床試驗

#### 第五屆登革熱國際研討會

#### 5th International Dengue Conference

日期: 2016/10/23 -10/24 (Sunday-Monday)

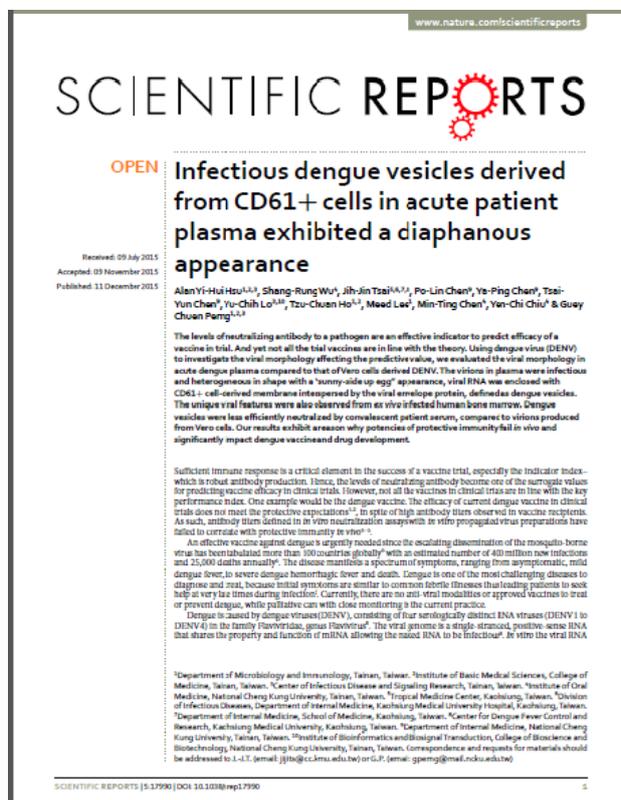
地點: 台灣高雄蓮潭國際會館 B1F 國際一廳

### 附件一、報告用簡報資料

### (子計畫二) 造血幹細胞在登革熱感染的致病機轉和在不顯性感染者在疾病傳播所扮演之角色

#### 附件一

Infectious dengue vesicles derived from CD61+ cells in acute patient plasma exhibited a diaphanous appearance. [Sci Rep.](#) 2015 Dec 11;5:17990



Revised paper:

1 **Infection of stem and progenitor cells by dengue virus**

2

3 Alan Yi-Hui Hsu<sup>1,2\*</sup>, Jih-Jin Tsai<sup>3,4,5,6\*</sup>, Po-Lin Chen<sup>7</sup>, Tzu-Chuan Ho<sup>1,2</sup>, Sia Seng Tan<sup>1</sup>,

4 Ko-Lun Yen<sup>1</sup>, Yu-Clin Fong<sup>1</sup>, Ya-Ping Chen<sup>7</sup>, Tsai-Yun Chen<sup>7</sup>, Meed Lee<sup>1</sup>, Yi Ju Chen<sup>1</sup>,

5 Ping-Chang Lin<sup>3,6</sup>, Yu-Chih Lo<sup>3,6</sup>, Shang-Rung Wu<sup>2,8</sup>, Guey Chuen Perng<sup>1,2,10,1</sup>

6 \*These authors contributed equally to this study.

7 <sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, National Cheng Kung

8 University, Tainan, Taiwan; <sup>2</sup>Institute of Basic Medical Sciences, College of Medicine,

9 National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan; <sup>3</sup>Tropical Medicine Center, Kaohsiung

10 Medical University Hospital, Kaohsiung, Taiwan; <sup>4</sup>Division of Infectious Diseases, Department

11 of Internal Medicine, Kaohsiung Medical University Hospital, Kaohsiung, Taiwan;

12 <sup>5</sup>Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kaohsiung Medical University,

13 Kaohsiung, Taiwan; <sup>6</sup>Center for Dengue Fever Control and Research, Kaohsiung Medical

14 University, Kaohsiung, Taiwan; <sup>7</sup>Department of Internal Medicine, College of Medicine,

15 National Cheng Kung University Hospital, Tainan, Taiwan; <sup>8</sup>Department of Biotechnology and

16 Bioindustry Sciences, College of Bioscience and Biotechnology, National Cheng Kung

17 University, Tainan, Taiwan; <sup>9</sup>Institute of Oral Medicine, College of Medicine, National Cheng

18 Kung University, Tainan, Taiwan; <sup>10</sup>Center of Infectious Disease and Signaling Research,

19 National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan

20

21 \*Corresponding author: Guey Chuen Perng, PhD, Department of Microbiology and

22 Immunology,

23 College of Medicine, National Cheng Kung University, No. 1 University Road, Tainan City 701,

24 Taiwan. Tel: (+886) 6-235-3535, ext. 5626; E-mail: [gperng@mail.ncku.edu.tw](mailto:gperng@mail.ncku.edu.tw)

25

26 Running title: Stem cells in dengue infection

27 Keywords: DENV, stem cells, progenitor cells, flavivirus, vaccine, dengue, immunity

# Characterization of Infectious Dengue microparticles in infected human

Ko-Lun Yen<sup>1</sup>, Alan Yi-Hui Hsu<sup>1</sup>, Meed Lee<sup>2</sup>, Shang-Rung Wu<sup>3</sup>, Guey Chuen Perng<sup>1,2,4</sup>



<sup>1</sup>Institute of Basic Medical Sciences, <sup>2</sup>Department of Microbiology and Immunology, <sup>3</sup>Department of Oral Medicine, and <sup>4</sup>Center of Infectious Disease and Signaling Research, College of Medicine, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan

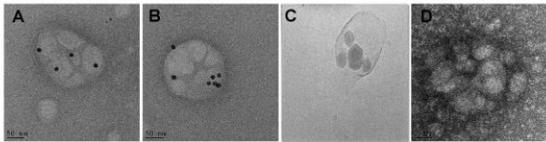


Dengue is a self-limiting acute febrile illness, caused by dengue virus (DENV), followed by a phase of critical defervescence such as dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Thrombocytopenia and platelet dysfunction are the most salient feature in clinical laboratory findings in dengue patients. Although different hypothesis have been hypothesized to explain DENV-associated thrombocytopenia, including the suppression of bone marrow and the peripheral destruction of platelets, the actual mechanism remains to be further explored. Bone marrow hypocellularity, especially loss of megakaryocytes, the progenitor cells for platelets, in the early stage of DENV infection is a common observation. Recent evidence suggests that DENV can be found in platelets isolated from patients and that DENV infects megakaryocytes efficiently. Two mechanisms by which megakaryocytes produce platelets have been suggested. One of which is similar to apoptotic cell death and cellular activation resulting in shedding platelet in the form of microparticles (MPs). Recent studies have found that MPs are involved in virus infection, for example it can enhance the efficacy of hepatitis C virus (HCV) entry and eschew immune surveillance [1]. But only a few researches discussed about the microparticles in dengue, even DENV particles have been observed to exist in different size in patient serum [2]. In our recent observation, the infectious dengue particles are various in size and appear as microvesicles surrounding with human host membrane [3]. As such, we further characterized the properties of dengue-derived microparticles and their role in dengue pathogenesis.

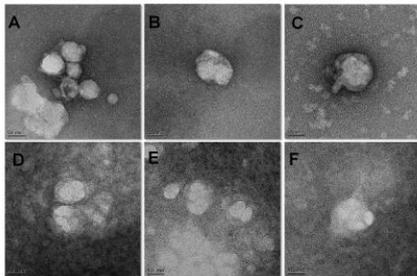
### [Specific Aim]

1. To establish protocol in isolation and purification of DENV-MPs.
2. To understand the biological properties and composition of dengue microparticles.

### [Result]

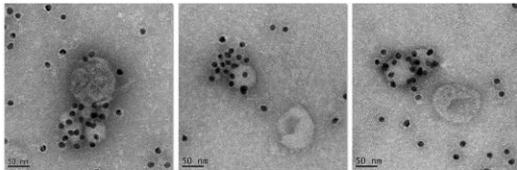


**Dengue virions exist as microparticles (MPs).** DENV MPs could be observed under electron microscopy (EM). (A)(B) DENV MPs derived from acute dengue plasma and labeled with anti-DENV Env. (C) DENV MPs from acute dengue plasma under Cryo-EM. (D) Observation of MPs in ex vivo infected HBM. (Data contributed by Yi-Hui Hsu)

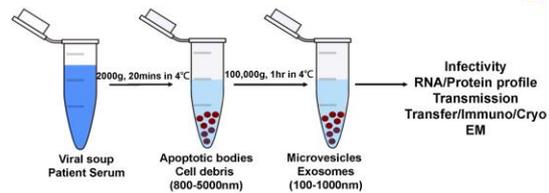


### Existence of MPs in different cell types during DENV infection.

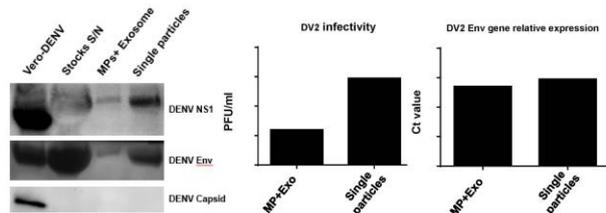
Meg01 (A)(B) and Vero (C) cells derived MPs could be observed by TEM after fractionation by sucrose gradient. MPs isolated from DENV infected HBM (D)(E) and hepatoma cells (F) could be observed by TEM after concentrated by 30kDa centricon (Millipore Amicon Ultra-0.5).



**DENV virions could be shed from membrane-like structure.** Env protein could be seen in every fraction of MPs derived from DENV infected Meg01 cells. Confirmation of fractionated MPs derived from DENV infected Meg01 cells by immuno-EM, DENV virions appeared to move away from MPs-like membrane structure.



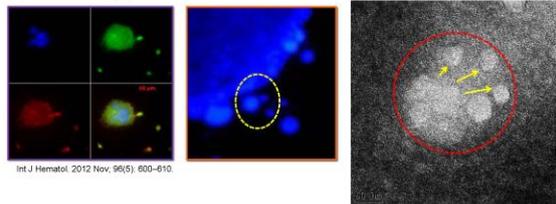
**Protocol for DENV-MPs isolation.** To understand the biological properties of DENV MPs, we modified the MPs isolation protocol described previously [4]. The DENV-MPs and single DENV virions could be separated at 25,000 rpm in sucrose gradient. Fractionated DENV MPs and virions were subjected to further biological analysis.



### Capacity of infectivity in single DENV particles and DENV-MPs.

Comparison of the infectivity and DENV proteins between MPs and single particles. Capsid protein did not associate with both DENV-MPs and single particles. DENV-MPs formed fewer viral plaque and carried fewer viral proteins, comparing with single particles. However, after analyzed DENV genome RNA contents, lower Ct value was noticed in DENV-MPs, indicating higher viral RNA copies.

### [Summary]



We observed a microparticle encapsulated with many DENV virions in different cell types. Previous report has shown that DENV in platelets isolated from acute dengue patient's PBMC. Recent evidence suggests that human megakaryocytic lineage cells in HBM are highly permissive to DENV infection. Current results suggested that DENV microparticle may play a role in dengue pathogenesis, to much extent to DENV induced thrombocytopenia.

### [Future work]

1. To isolate DENV-MPs from pooled infected bone marrow to perform biological assays.
2. To test neutralization properties of DENV-MPs against Vero derived DENV virions
3. To dissect the mechanism involving in the formation of DENV-MPs in infected cells.

### [Reference]

1. Masciopinto F, Giovanni C, Campagnoli S, Galli-Stampino L, Colombatto P, Brunetto M, et al. Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur J Immunol* 2004 Oct;34(10):2834-42.
2. Sabin, A. B. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hy* 1952 Jan;1(1):30-50.
3. Alan Hsu YH, Wu SR, Tsai JJ, et al. Infectious dengue vesicles derived from CD61+ cells in acute patient plasma exhibited a diaphanous appearance. *Sci Rep* 2015 Dec(11):5:17990.
4. Bobis-Wozowicz S, Kmiotek K, Sekula M, Zuba-Surma EK, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived microvesicles transmit RNAs and proteins to recipient mature heart cells modulating cell fate and behavior. *Stem cell*. 2015 Sep;33(9):2748-61.

The work is in part supported by MOST.



# Phenotypes of Cells Infectable by Dengue Virus in PBMC of Healthy Donors

Sia-Seng Tan<sup>1</sup>, Alan Hsu<sup>1</sup>, Jane Ho<sup>1</sup>, and Guey Chuen Perng<sup>1</sup>

Department of Microbiology and Immunology, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan



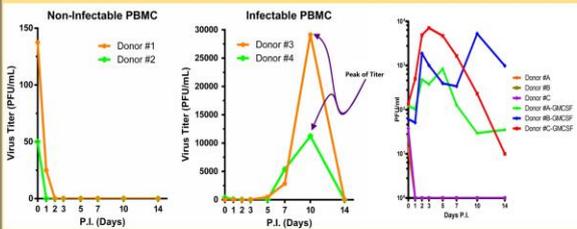
Dengue is currently the most important mosquito-borne human viral disease and has been cohabitated with human beings for many centuries. Dynamic clinical manifestations, ranging from asymptomatic infection, mild fever, to severe hemorrhagic fever that occasionally accompanies with a high fatality shock syndrome, have been the salient characteristics of the disease. Previous investigations reveal that one of likely cause of thrombocytopenia seen in dengue patients is a likely consequence of dengue virus infecting platelet progenitor cells, megakaryocytes and bone marrow cells associated with this lineage. With its easy access, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) become the major resource for investigation of cells permissive for dengue virus (DENV) infection. Despite many decades of intensive efforts, the actual phenotypes of cells accounting for the source of the virus in circulation of affected subjects remain unclear. Freshly obtained PBMC from healthy donors were subjected to multicolor flow cytometry (FACS) analysis prior to infection. Profiling of cells in PBMC by FACS with markers, such as CD34, CD133, and CD117 for hematopoietic stem cells (HSC), CD61 and CD41a for megakaryocytic lineage cells, and CD14 for phagocytic cells were performed. The PBMC was then infected with DENV at MOI=1 and infectious virus in supernatants were evaluated by standard plaque assay. Results showed that 21/40 (52.5%) of PBMC were infectable by DENV, but varying in viral titers, and that the percentage of HSC and Megakaryocytic lineage cells in the infectable PBMC were significantly higher than those non-infectable PBMC. In contrast, there was no difference in the levels of phagocytic cells in infectable and non-infectable PBMC. The levels of HSC and megakaryocytic lineage cells in PBMC may prerequisite for the DENV infection and the disease outcomes upon acquiring the DENV.

**Table 1. Dengue Virus production in PBMC of healthy subjects.**

Groups	Donor ID	Peak Of Titer	Groups	Donor ID	Peak Of Titer
PFU+	Donor 37	29125	PFU-	Donor 4	0
	Donor 17	11250		Donor 14	0
	Donor 7	11125		Donor 13	0
	Donor 32	8625		Donor 21	0
	Donor 35	3625		Donor 24	0
	Donor 30	2450		Donor 8	0
	Donor 18	2312.5		Donor 12	0
	Donor 16	1887.5		Donor 22	0
	Donor 3	1837.5		Donor 23	0
	Donor 33	1575		Donor 25	0
	Donor 5	1525		Donor 26	0
	Donor 31	875		Donor 27	0
	Donor 1	562.5		Donor 28	0
	Donor 41	300		Donor 29	0
	Donor 6	225		Donor 34	0
	Donor 11	200		Donor 36	0
	Donor 19	187.5		Donor 38	0
	Donor 20	175		Donor 39	0
	Donor 2	137.5		Donor 40	0
Donor 9	137.5				
Donor 15	137.5				
Donor 10	112.5				

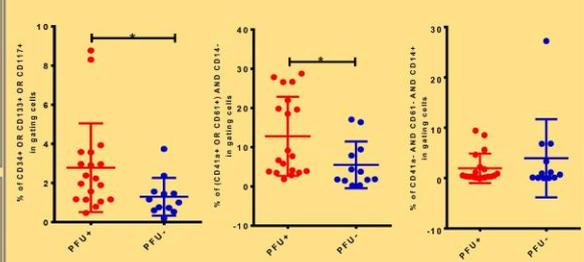
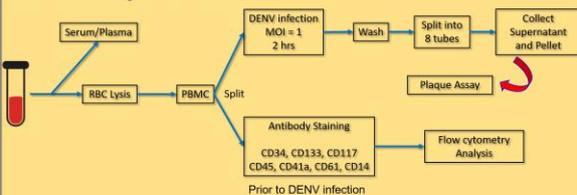
Table indicates that 21/40 PBMCs were infectable by dengue virus, some of which could produce high viral titers to 2X10<sup>4</sup> PFU/ml. While there were 19/40 PBMCs did not support dengue virus infection.

## Introduction



**Figure 1. Stem Cells plays important role in permissiveness to dengue virus infection in PBMC.** PBMCs obtained from healthy volunteer donors demonstrated differential permissiveness to dengue virus infection. PBMC from Donors 1 and 2 did not support dengue virus infection, while PBMC from Donors 3 and 4 were susceptible to dengue virus infection. PBMCs from Donor A, B, and C were not infectable by dengue virus, but after the GM-SCF induction, these PBMCs were highly permissive to dengue virus infection. We therefore hypothesized that the levels of stem cells in PBMC dictates the infectivity of PBMC to dengue virus.

To test the hypothesis, we set up a study in which we collected PBMCs from healthy subjects. These PBMCs were subjected to FACS analysis prior to infection with dengue virus at MOI=1. The kinetics viral titers in collected soups from each infected PBMC were performed with standard plaque assay. The peak of viral titers from each infected PBMC was correlated with corresponding FACS results. The flow setting for the FACS and dengue virus infection was below.



**Figure 2. Significant higher percentage of Stem and megakaryocytic cells in DENV infectable PBMC.** PBMCs were stained with multiple cell surface markers prior to DENV infection and subjected to multi-colors flow cytometry (FACS) analysis. The FACS data were correlated with peak of viral titers produced in PBMC after infection. Significantly higher percentage of stem cell and megakaryocytic lineage cells in PBMC in PFU+ group, comparing to PFU- group. In contrast, percentage of cells with markers for phagocytic property were not different between PFU+ and PFU- groups.

## Conclusion

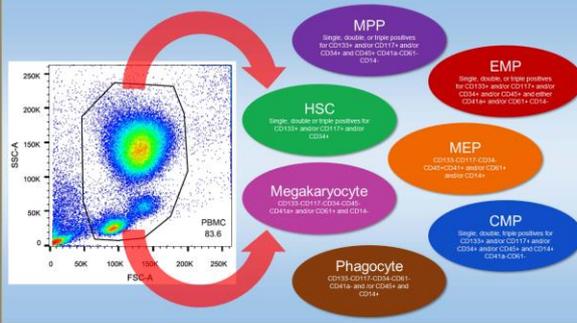
HSC and megakaryocytic lineage cells in PBMC may prerequisite for the DENV infection and the disease outcomes upon acquiring the DENV.

## Future Works

Stem, megakaryocytic lineage, and phagocytic cells will be sorted out from PBMC and infected with dengue virus. The viral titers in each population will be measured and the viral RNA genome will be quantified. The efficiency of infectious virus production will be calculated by the viral RNA copies over PFU.

## Acknowledgements

- The research was supported in part by MOST and MOHW grants.
- The healthy PBMC volunteers
- All laboratory members from Oscar's Lab



(子計畫四) 103 年高雄市登革熱疫情爆發原因分析(詳見內文)

附件 1. 布氏指數、氣象學、與人口資料以週為單位 Excel 檔

附件 2. 布氏指數、氣象學、與人口資料以月為單位 Excel 檔

附件 3. 布氏指數、氣象學、與人口資料以年為單位 Excel 檔

附件 4. 登革熱研究調查問卷統計資料 Excel 檔

附件 5. 發表論文 PDF 檔

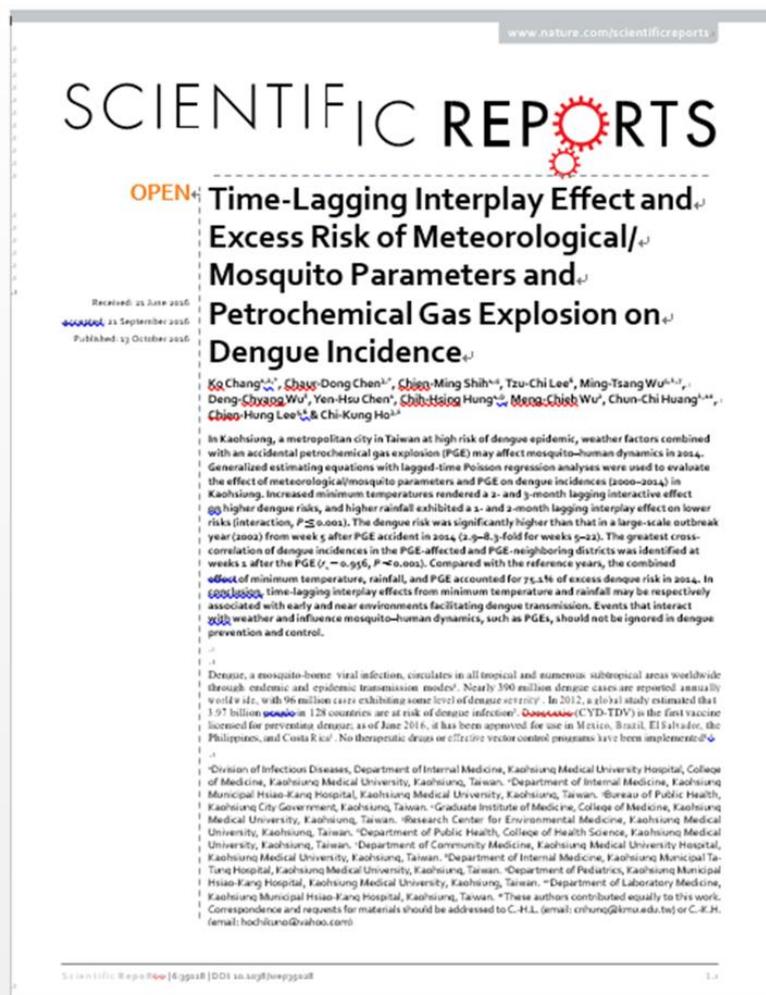
Chang K, Chen CD, Shih CM, Lee TZ, Wu MT, Wu DC, Chen YH, Hung CH, Wu MC, Huang CC, Lee CH, Ho CK

Effects of Temperature, Rainfall and Petrochemical Gas Explosion on

Dengue Incidence: Assessment of Time-

lagging Effect and Excess Risk of Dengue Infection in a Principal Urban Epidem

ic Area of Tropical Taiwan Scientific report . 2016 Oct 13;6:35028.



(子計畫六)抗登革病毒藥物標靶之開發及抗登革病毒感染及登革熱之天然  
藥物研發

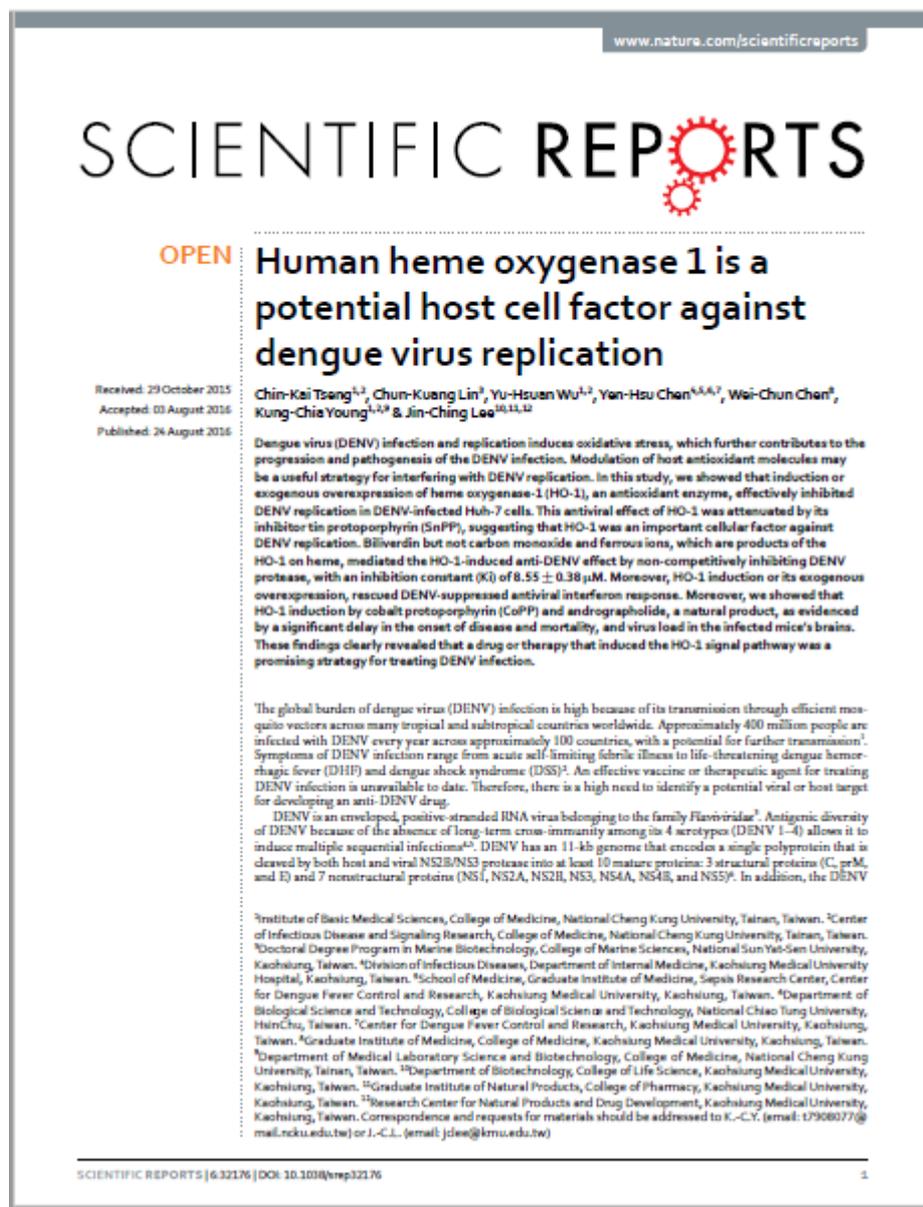
附件一、發表論文

Human heme oxygenase 1 is a potential host cell factor against dengue virus replication.

Received: 29 October 2015

accepted: 03 August 2016

Published: 24 August 2016



# (子計畫八) 新藥研發及相關臨床試驗

Jane Ho, Wen Hui Ma and Guey Chuen Perng

## Dengue Viral Persistent Infection. 2016 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction 2016 Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation. Oct. 22nd -23rd, 2016

### 附件一

#### 753 Dengue Viral Persistent Infection

Hsin Ho, Wen Hui Ma, Alan Hsu, Chun-Kang Yu and Guey Chuen Perng  
Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, and Institute of Basic Science, National Cheng Kung University, Taiwan, Taiwan

The density of mosquito number is highly correlated to a dengue outbreak, and yet how does the cycling pattern occurs repeatedly remains a mystery. In early days, evidence suggests that persistent dengue virus (DENV) infection and viral latency may possibly exist in human populations. Recently, it has been reported that infectious DENV can be recovered from healthy blood donors and that asymptomatic human beings could be accounted for the spread of dengue. This line of evidence implies that persistent DENV infection may exist in the natural setting. Investigation of the persistent scenario has been hampered by the lack of a suitable animal model to replicate the counter part of human dengue. However, recent evidence shows that freshly obtained human bone marrow (HBM) cells or cord blood (CB) cells are highly permissive to DENV infection, and that viremia in humanized mice model can be observed that the long term outcomes have not been documented. We therefore utilized freshly obtained HBM or CB to establish humanized model to investigate the persistent infection of DENV. Two types of viral replication curve were found in dengue infected humanized mice, one is a persistent infection that shows viral loads went up and down, but maintained at a detectable level. The other is a latent infection, viral titer was cleared after acute infection, but re-emerged in month later in the collected peripheral blood. Viral titers were detected in all of DENV infected humanized mice for 3 months or more until the mouse died, suggesting that it could go longer if mice health conditions sustained. The phenotypes of cells harvesting the dengue viral NS1 antigen were those megakaryocyte lineage, CD45<sup>+</sup>CD11a<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>, by FACS analysis. Autopsy on the DENV infected deceased mice revealed that infectious DENV was present in multiple organs, including liver, spleen, bone marrow, and brain by plaque assay. The highest viral titer was observed in the brain and especially in the region of hippocampus by IHC staining. The results indicated that DENV could become persistent or latent infection after acute stage. The mice that sustained acute viral infection eventually succumbed to death due to the accumulation of DENV in the brains of infected humanized mice. The data, to some extent, implied that persistent or latent DENV infection may exist in the natural life cycle of DENV infection and that those of the megakaryocyte lineage cells in asymptomatic individuals may become a DENV carrier.

#### Introduction

Dengue is very important vector-borne human infectious disease globally. The disease is caused by dengue virus (DENV) introduced to human beings mainly by the bite of infected anopheles mosquitoes, and is mainly distributed in tropical and subtropical temperate zone. Recently, with factors, such as the climate changes, increase of human migration, and unplanned urban development, dengue has been reported in more than 130 countries in the world. Wide spectral clinical states of the disease are documented, ranging from asymptomatic/latent to severe and lethal syndromes. Most of new dengue cases are asymptomatic, but about 1% of the cases are potential life-threatening. Mosquito control is the current practice in mitigation of DENV spread, but the effectiveness is very limited since dengue outbreaks are happening every year. Cycling pattern of a dengue outbreak is a hallmark in dengue endemic zones, but the reasons remain a mystery. Recent reports show that asymptomatic dengue cases are a potential risk factor in promoting the DENV dissemination. The density of mosquitoes is critical element for the dengue outbreak, while the source of the DENV culprit remains unknown. Interestingly, persistent DENV infection has been noticed in cell cultures and ex vivo primary hematopoietic stem and primitive testicular cells. Furthermore, in preliminary data, we demonstrated that the same serotype of DENV could persist and circulate in the peripheral blood of healthy blood donor who lives in the dengue epidemic area (Fig. 1). The evidence indicates that DENV may be persistent in healthy subjects for a period of time. It is very difficult to trace the viral titer in the blood of healthy individuals recovered from DENV infection. As such, in order to dissect the persistent aspect of the DENV infection, we set out to investigate the scenario with humanized mouse model.

#### Materials and Methods

**Mice.** NOD.Cg-Prlk<sup>tm1</sup>NSG (NSG) mice were purchased from the National Laboratory animal center (Taipei, Taiwan) and housed in a specific-pathogen-free room at animal center in National Cheng Kung University (Tainan, Taiwan).

**Cell preparation.** Bone marrow (IRBA-ER-102-199) or cord blood (IRBA-ER-103-184) were freshly obtained from National Cheng Kung University Hospital and approved by Institutional Review Board.

#### Established humanized mice

**Bone marrow cells transplantation.** Newborn NSG mice were injected with 15mg/kg Busulfan at 24 hr before infusion of human cells. 1\*10<sup>6</sup> fresh bone marrow cells were transplanted into recipient mice by intrathoracic injection.

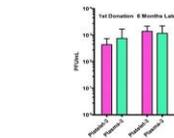
**Cord blood cells transplantation.** 8 week old NSG mice were intraperitoneal injection with 25mg/kg Busulfan. After 24hr busulfan injection, 1\*10<sup>6</sup> cord blood cells were transplanted into recipient mice by tail vein injection.

**DENV infected humanized mice model.** Peripheral blood mononuclear cells were analyzed by FACS for the expression of human CD45 in the recipient mice at 8 weeks after transplantation. Humanized mice were infected with 1\*10<sup>6</sup> pfu DENV or saline water treatment by intrathoracic or tail vein injection. Information of all humanized mice used in this study was shown in Table 1.

**Viral load monitoring.** Blood collected from humanized mice at days 6, 10, 14, 21, and every 2 weeks thereafter post DENV infection or saline water treatment. Viral load of blood were detected by standard plaque assay.

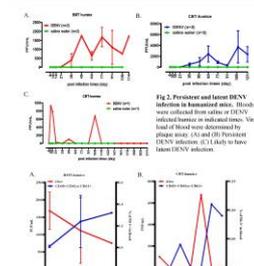
**FACS analysis.** Bloods were collected from indicated days of HBM/Bone marrow or HCB/Bone marrow and followed by the treatment of RBC lysis buffer. The peripheral mononuclear cells were stained with antibodies to the corresponding cell surface markers, anti-CD45, NG2A and ICAM1, fixed, and then intracellular staining with DENV non-structural protein (NS1) antibody. The stained samples were subjected to FACS analysis.

#### Results



**Fig. 1. DENV in plasma and platelets of healthy blood donor.** Standard plaque assay was performed to evaluate the amount of DENV in healthy donor's blood. A very similar DENV titer in donated bloods was observed in the same donor, even 8 months apart. The results suggested the presence of DENV infection by asymptomatic individual in healthy.

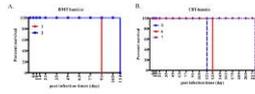
Transplanted Cell type	inoculation route	Mice number	Experimental Outcome (%)
Human Bone marrow cells (BM)	DENV infection	3	100
	saline water treatment	3	100
	total	6	100
Human Cord Blood cells (CB)	DENV infection	3	33.3
	saline water treatment	3	100
	total	6	66.7



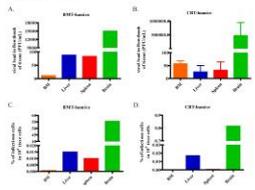
**Fig. 2. Persistent and latent DENV infection in humanized mice.** Blood were collected from saline or DENV-infected humanized mice in indicated times. Viral load of blood were determined by plaque assay. (A) and (B) Persistent DENV infection; (C) Latent DENV infection.



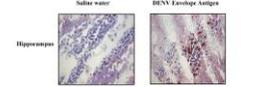
**Figure 3. Kinetic profiles of NS1-associated cell populations in bone with DENV replication curve.** The cells of NS1-containing cell lineage was collected with provided FACS software. The cells of NS1+ cells was gated with viral data to compare the DENV presence cell population. Potential megakaryocyte lineage cells for DENV infection in HBM/Bone marrow (A) or HCB/Bone marrow.



**Fig. 3. Survival kinetics of humanized mice after DENV infection.** Percent of survival rate in infected humanized mice was recorded at indicated time for the survival time of DENV-infected HBM/Bone marrow or HCB/Bone marrow. (A) All BM1/Bone marrow died at 3 month after infection. (B) DENV-infected CB1/Bone marrow survived more than 4 months after infection. The number indicated the mouse number shown in Table 1.



**Fig. 4. Detection of DENV antigen in tissues of infected humanized mice.** The organs of bone marrow, liver, spleen and brain were harvested from BM1/Bone marrow or CB1/Bone marrow at time of death. DENV virus were detected in the preparation of cell flow through from BM1/Bone marrow (A) or CB1/Bone marrow (B) by plaque assay. Histology counter stain for cells derived from tissue of BM1/Bone marrow (C) or CB1/Bone marrow (D). Terminal serial dilutions of those cells in single cell suspension were cocultured with HEp2C cell to measure the number of infectious cells in each dilution.



**Fig. 5. Immunohistochemistry staining of DENV Envelope protein in brains of infected humanized mice.** Brains were harvested from infected BM1/Bone marrow at time of death on day 114 post infection. Tissue was embedded with OCT and stored at -80°C. Five serial brain sections were mounted on slide for standard IHC staining. Briefly, the tissue slides were incubated with biotinylated rabbit anti-dengue viral envelope antibody, followed by secondary antibody (DAP), avidin, and the brown signal was visualized. Dengue viral envelope antigen was seen mainly in the hippocampus of brain from DENV-infected BM1/Bone marrow.

#### Conclusion

- Persistent DENV infection was observed in the infected humanized mice.
- Megakaryocyte lineage cells were potential for DENV infection.
- DENV could be recovered from major organ of persistent DENV-infected humanized mice.
- Encephalopathy was observed in brain of humanized mice died from persistent DENV infection.



# Dengue Viral Persistent Infection

Jane Ho<sup>1</sup>, Wen Hui Ma<sup>1</sup> and Guey Chuen Peng<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan and <sup>2</sup>Institute of Basic Science, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan and <sup>3</sup>Center of Infectious Disease and Signaling Research, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan

## Introduction

Dengue is very important vector-borne human infectious disease globally. The disease is caused by dengue virus (DENV) introduced to human beings mainly by the bite of infected *aedes* mosquitoes, and is mainly distributed in tropical and subtropical temperate zone. Recently, with factors, such as the climatic changes, increase of human migration, and unplanned urban development, dengue has been reported in more than 130 countries in the world. Wide spectral clinical states of the disease are documented, ranging from asymptomatic/mild to severe and lethal symptoms. Most of new dengue cases are asymptomatic, but about 1% of the cases are potential life-threatening. Mosquito control is the current practice in mitigation of DENV spread, but the effectiveness is very limited since dengue outbreaks are happening every year. Cycling pattern of a dengue outbreak is a hallmark in dengue endemic zones, but the reasons remain a mystery. Recent reports show that asymptomatic dengue cases are a potential risk factor to promote the DENV dissemination. The density of mosquitoes is critical element for the dengue outbreak, while the source of the DENV culprit remains unknown. Interestingly, persistent DENV infection has been noticed in cell cultures, and *in vivo* primary hematopoietic stem and primitive testicular cells. Furthermore, in preliminary data, we demonstrated that the same serotype of DENV could prolong and circulate in the peripheral blood of healthy blood donor who lives in the dengue epidemic area (Fig. 1). The evidence indicates that DENV may be persistent in healthy subjects for a period of time. It is very difficult to trace the viral titer in the blood of healthy individuals recovered from DENV infection. As such, in order to dissect the persistent aspect of the DENV infection, we set out to investigate the scenario with humanized mouse model.

## Hypothesis

Dengue virus



## Material and Methods

**Mice.** NOD.Cg-Pdx1cre11.2gmi1WJ/SJL (NSG) mice were purchased from the National laboratory animal center (Taipei, Taiwan) and housed in a specific-pathogen-free room at animal center in National Cheng Kung University (Tainan, Taiwan).

**Cell preparation.** Bone marrow (BMB) (B6-129) or cord blood (CB) (B6H-129) were freshly obtained from National Cheng Kung University Hospital and approved by Institutional Review Board.

### Established humanized mice

**Bone marrow cells transplantation.** Newborn NSG mice were injected with 15mg/kg Busulfan at 24 hr before infusion of human cells.  $1 \times 10^6$  fresh bone marrow cells were transplanted into recipient mice by intratibial injection.

**Cord blood cells transplantation.** 8 week old NSG mice were intraperitoneal injection with 25mg/kg Busulfan. After 24hr busulfan injection,  $1 \times 10^6$  cord blood cells were transplanted into recipient mice by tail vein injection.

**DENV infected humanized mice model.** Peripheral blood mononuclear cells were analyzed by FACS for the expression of human CD35 in the recipient mice at 8 weeks after transplantation. Humanized mice were infected with  $1 \times 10^6$  pfu DENV or saline water treatment by intratibial or tail vein injection. Information of all humanized mice used in this study was shown in Table 1.

Table 1. Information of the humanized mice used in the study.

Transplanted Cell type	mouse group name	Mouse number	Engagement hCD45 (%)
Human Bone marrow cells (BME)	DENV infection	2	17.83
	saline water treatment	4	2.72
	humanized	5	5.95
Human Cord blood cells (CB)	DENV infection	6	43.63
	saline water treatment	8	41.04
	humanized	10	37.18

**Viral load monitoring.** Blood collected from humanized mice at days 6, 10, 14, 21, and every 2 weeks thereafter post DENV infection or saline water treatment. Viral load of blood were detected by standard plaque assay.

**FACS analysis.** Bloods were collected from indicated days of HBM-humanized or HCB-humanized and followed by the treatment of RBC lysis buffer. The organs were harvested from those infected human at time of death. The peripheral mononuclear cells or single cells of tissue were stained with antibodies to the corresponding cell surface markers, CD133, CD34, CD34<sup>+</sup>, CD45, CD45<sup>+</sup> and CD44, then fixed for dengue protein (NS1) by intracellular staining. The stained samples were subjected to FACS analysis. Lineage of cells were classified in Table 2.

Table 2. Lineage of cell classified in this study.

Lineage classification	Marker
human hematopoietic stem cells (HSC)	CD133 <sup>+</sup> or CD117 <sup>+</sup> or CD34 <sup>+</sup> - CD133 <sup>-</sup> CD117 <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup>
Multipotent progenitors	CD133 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD61 <sup>-</sup> CD44 <sup>-</sup>
erythroid/myeloid progenitors (EMP)	CD133 <sup>+</sup> or CD117 <sup>+</sup> or CD34 <sup>+</sup> or CD45 <sup>+</sup> or CD44 <sup>+</sup> or CD34 <sup>+</sup> or CD61 <sup>+</sup> or CD44 <sup>+</sup>
commonmyeloid progenitors (CMP)	CD133 <sup>+</sup> or CD117 <sup>+</sup> or CD34 <sup>+</sup> or CD45 <sup>+</sup> or CD44 <sup>+</sup> or CD61 <sup>+</sup> or CD44 <sup>+</sup>
megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP)	CD133 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> or CD61 <sup>+</sup> or CD44 <sup>+</sup>

## Conclusion

- Persistent DENV viral infection was observed in the infected humanized mice.
- Megakaryocytic lineage cells were potential for DENV infection.
- DENV could be recovered from major organs of persistent DENV viral infected humanized mice.

## Results

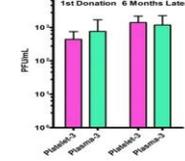


Fig. 1. DENV in plasma and platelets of healthy blood donor. Standard plaque assay was performed to evaluate the amount of DENV in healthy donated bloods. A very similar DENV titers in donated bloods was observed in the same donor, even 6 months apart. The result suggested that persistent DENV infection in healthy or asymptomatic individuals is likely.

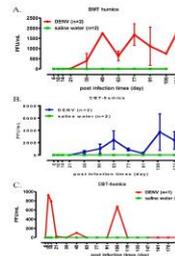


Fig. 2. Persistent and latent DENV infection in humanized mice. Bloods were collected from saline or DENV infected humanized mice in indicated times. Viral load of blood were determined by plaque assay. (A) and (B) Persistent DENV infection. (C) likely to have latent DENV infection.

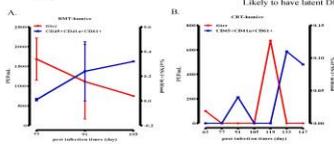


Figure 3. Kinetic profiles of NS1-associated cell populations in line with DENV replication curve. The profile of NS1<sup>+</sup> containing cell lineage was calculated with provided FACS software. The % of NS1<sup>+</sup> cells was graphed with viral titers to correlate the DENV permissive cell population. Potential megakaryocytic lineage cells for DENV infection in HBM-humanized (A) or HCB-humanized (B).

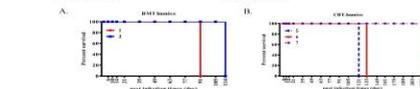


Fig. 4. Survival kinetics of humanized mice after DENV infection. Percent of survival rate in infected humanized mice was recorded at indicated time for the survival rate of DENV infected BMT-humanized or CB-humanized. (A) All BMT-humanized died at 3 month after infection. (B) DENV infected CB-humanized survived more than 4 months after infection. The number indicated the mouse number shown in Table 1.

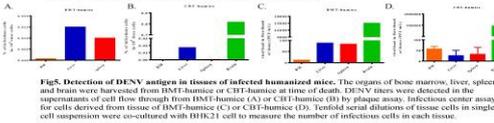


Fig. 5. Detection of DENV antigen in tissues of infected humanized mice. The organs of bone marrow, liver, spleen and brain were harvested from BMT-humanized or CB-humanized at time of death. DENV titers were detected in the supernatants of cell flow through from BMT-humanized (A) or CB-humanized (B) by plaque assay. Infectious center assay for cells derived from tissue of BMT-humanized (C) or CB-humanized (D). Tenfold serial dilutions of tissue cells in single cell suspension were co-cultured with BHK21 cell to measure the number of infectious cells in each tissue.

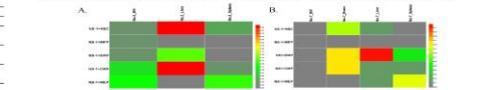


Fig. 6. Profile of human hematopoietic progenitor cells in tissue of infected humanized mice. The organs of bone marrow, liver, spleen and brain were harvested from BMT-humanized or CB-humanized at time of death. Infectious cells of tissue were analyzed with intracellular staining with dengue viral antigen (NS1) by FACS for BMT-humanized (A) or CB-humanized (B).

## Acknowledgements

This research was, in part, supported by the Ministry of Education and Ministry of Health and Welfare Taiwan, R.O.C.

## (子計畫九)台灣地區登革熱病毒之病毒學與分子流行病學分析

### 附錄一：

家訪人員：\_\_\_\_\_ 填表日期：\_\_\_\_\_

問卷編號：\_\_\_\_\_

### 登革熱個案出院追蹤資料表

#### 一、基本資料

姓名：\_\_\_\_\_

性別：(1)男 (2)女

出生日期：\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

種族：(1)閩南人 (2)客家人 (3)外省人 (4)原住民 (5)其他\_\_\_\_\_

教育程度：(1)國小以下 (2)國中 (3)高中/職 (4)大專 (5)研究所以上

職業：\_\_\_\_\_

居住地：\_\_\_\_\_縣(市)\_\_\_\_\_區(鄉鎮)

工作地點：\_\_\_\_\_縣(市)\_\_\_\_\_區(鄉鎮)

身高：\_\_\_\_\_

體重：\_\_\_\_\_

血型：\_\_\_\_\_

旅遊史：\_\_\_\_\_

使用藥物：\_\_\_\_\_

動物接觸史：\_\_\_\_\_

#### 二、登革熱病史：

\_\_\_\_\_(0)N (1)Y 本次之前是否得過登革熱？(若有請回答以下問題)

\_\_\_\_\_(0) 一般登革熱 (1)登革出血熱 (3) 登革休克症候群 先前得到的為哪種登革熱？

\_\_\_\_\_(0)N (1)Y 是否住院？

#### 三、其餘過去病史：

\_\_\_\_\_(0)N (1)Y HBV B型肝炎

\_\_\_\_\_(0)N (1)Y HCV C型肝炎

\_\_\_\_\_(0)N (1)Y Liver cirrhosis 肝硬化

- \_\_\_\_(0)N (1)Y Autoimmune disease 自體免疫疾病\_\_\_\_\_
- (SLE, RA, Sjogren's syndrome, Behçet Disease.....)
- \_\_\_\_(0)N (1)Y Hematologic malignancy\_\_\_\_\_
- (血液腫瘤 ex. Leukemia, lymphoma, multiple myeloma )
- \_\_\_\_(0)N (1)Y Solid tumor : \_\_\_\_\_
- (實質腫瘤 ex. Colon ca, esophageal ca, breast ca, prostate ca, oral ca, lung ca, brain ca, gastric ca, pancreatic ca....)
- \_\_\_\_(0)N (1)Y HTN (Hypertension) 高血壓
- \_\_\_\_(0)N (1)Y DM (Diabetes mellitus) 糖尿病
- \_\_\_\_(0)N (1)Y GU (gastric ulcer) 胃潰瘍
- \_\_\_\_(0)N (1)Y DU (duodenal ulcer) 十二指腸潰瘍
- \_\_\_\_(0)N (1)Y GERD 胃食道逆流
- \_\_\_\_(0)N (1)Y Alcoholism 酗酒
- \_\_\_\_(0)N (1)Y Old pulmonary TB 肺結核病史
- \_\_\_\_(0)N (1)Y COPD (chronic obstructive pulmonary disease) 慢性阻塞性肺病
- \_\_\_\_(0)N (1)Y CHF (congestive heart failure) 鬱血性心衰竭
- \_\_\_\_(0)N (1)Y CVA (cerebrovascular accident) 腦血管疾病，中風
- \_\_\_\_(0)N (1)Y ESRD (end-stage renal disease )
- \_\_\_\_(0)N (1)Y CRF/CRI (chronic renal failure)
- \_\_\_\_(0)N (1)Y ARF (acute renal failure or acute kidney injury)
- \_\_\_\_(0)N (1)Y Immunosuppression: \_\_\_\_\_
- (steroid, ...)
- \_\_\_\_(0)N (1)Y Burn 有無燒傷
- \_\_\_\_(0)N (1)Y Bed-sore 有無壓瘡

四、本次登革熱症狀 (見附件) : \_\_\_\_\_

五、家庭族譜：(每位家庭成員請註明登革熱或其他慢性病病史)



## 附件

### 登革熱症狀表

1. Fever 有無發燒
2. Chills 打寒顫
3. Headache 頭痛
4. retrobulbar pain 後眼窩痛
5. back pain 背痛
6. bone pain 骨頭痛
7. joint pain (Arthralgia) 關節痛
8. Myalgia (muscle pain, soreness) 肌肉痠痛
9. skin rash 皮疹
10. petechia 出血點
11. Diarrhea 拉肚子 腹瀉
12. Abdominal pain/discomfort 肚子痛/不舒服
13. Nausea/vomiting 噁心/嘔吐
14. Sorethroat 喉嚨痛
15. Cough 咳嗽
16. Jaundice 黃疸
17. Sweating 盜汗
18. General weakness/ malaise 全身無力
19. lethargy 嗜睡

(子計畫十一)應用誘卵桶和蚊蟲自動散播百利普芬的技術來滅除隱藏性的  
斑蚊孳生源

附錄一、20160127-20161004 百利普芬野外試驗出差報告

附錄二、駐有效環境用藥許可証

附錄三、審查委員意見回復

(子計畫十五)血液製品之登革病毒偵測調查

第五屆登革熱國際研討會

5th International Dengue Conference

日期: 2016/10/23 -10/24 (Sunday-Monday)

地點: 台灣高雄蓮潭國際會館 B1F 國際一廳

附件一、報告用簡報資料

**Poster Session C (2016/11/16)**

**Presentation Number #LB 5432**

**American Society of Tropical Medicine and  
Hygiene 65th Annual Meeting November 13-17, 2016**

## Screening of dengue fever in the blood donors during the dengue outbreak in 2015 in southern Taiwan

Control/Tracking Number: 16-LB-4137-ASTMH

Activity: Late Breaker Abstract

Current Date/Time: 8/24/2016 11:46:35 PM

Author Block Jih-Jin Tsai<sup>1</sup>, Li-Teh Liu<sup>2</sup>, Guey-Cheun Perng<sup>3</sup>, Yu-Wen Chien<sup>4</sup>, Chun-Yuh Yang<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Center for Dengue Fever Control and Research, Kaoshiung Medical University; Div. of Infectious Diseases, Tropical Medicine Center, Kaohsiung Medical University Hospital, Kaohsiung, Taiwan, <sup>2</sup>Department of Medical Technology, Chung Hwa University of Medical Technology, Tainan, Taiwan, <sup>3</sup>Department of Microbiology & Immunology of National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, <sup>4</sup>Department of Public Health, College of Medicine, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, <sup>5</sup>Center for Dengue Fever Control and Research, Department of Public Health, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan

Dengue virus could cause transmission via blood transfusion. There was a big dengue outbreak in 2015 in southern Taiwan, chiefly in Kaohsiung and Tainan. The total laboratory confirmed dengue cases were approaching 43,784. The predominant dengue serotype was DENV-II. In Kaohsiung, DENV-I co-circulated, but played the minor roles. The phylogenetic tree demonstrated DENV-II from Indonesia. The mortality rate of dengue cases was 5.1 ‰. The median age of the mortality was 72 y/o. The comorbidities played the key roles for the dengue mortality cases. During the peak dengue outbreak from September to November in 2015, we collected the samples from the blood bank under the consent of IRB at Kaohsiung Medical University Hospital. We used both the SD NS1 Combo rapid test and ELISA test to detect antigen and antibody, and used real-time PCR to detect dengue virus. Totally we screened 6050 samples for dengue infection from the blood donors of Kaohsiung and Tainan, and we found one blood donor containing DENV-II. Plaque assay showed 50 pfu/ml. The dengue NS1 antigen rapid test (RDT) of this case was negative and the antibody for dengue was also negative. All the other samples were NS1 RDT negative. There were 8 samples containing both IgM and IgG, and 4 samples containing only IgM. But these antibody positive samples failed to be detected dengue virus from the real-time RT-PCR. The confirmed dengue infection from the blood donors was 0.17 ‰ in 2015. From the previous reports of the other countries, the detection rate from blood donors ranged from 0.7‰ to 3‰. This is the first time we detected dengue virus of blood donors in Taiwan. Whether the blood bank should screen the dengue virus infection during the big dengue outbreak warranted more consideration from this pilot study in Taiwan.

(平台一)行政暨教育資源平台

附錄 1

索羅門群島辦理登革熱國際研討會簽到表

**International Dengue Fever Symposium**

**Date:** 2015/11/26 (W4)

**Location:** Conference Room, National Referral Hospital, Solomon Islands

**Organizer:** Center for Dengue Fever Control and Research, Kaohsiung Medical University Tropical Medicine Center, Kaohsiung Medical University (KMU)/ Kaohsiung Medical University Hospital (KMUH)

**Co-organizer:** Taiwan Health Center, Kaohsiung Medical University Hospital

Name	Organization	contact	Signature
Ray Royer Nanki	WHO	7488450	
Cynthia Joshua	Surveillance	<del>7853723</del> 23650	
Alison Ripuira	Surveillance	7874069	
ANTHONY TASHABE	MEDICAL LAB	8722203	
kelvin SHIH	Taiwan Accreditation Foundation (TAF)	cpshih@taf.org.tw +886-912236910	
CHIU, MAN-TZU	Taiwan Accreditation Foundation	+886-3-5336333-224	邱曼慈
Lin, Shih-Wen	Taiwan Accreditation Foundation	+886 915 270753	林思文
Lia, Ping-Chang	Tropical Medicine Center KMDH	+886 963 03 195	林秉昌
PO-Chih chen	Lab. Medicine KMUH	+886 915 35589	陳其志

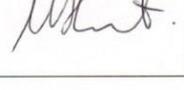
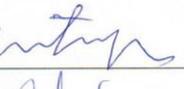
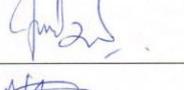
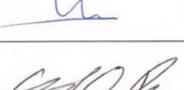
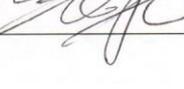
## International Dengue Fever Symposium

**Date:** 2015/11/26 (W4)

**Location:** Conference Room, National Referral Hospital, Solomon Islands

**Organizer:** Center for Dengue Fever Control and Research, Kaohsiung Medical University Tropical Medicine Center, Kaohsiung Medical University (KMU)/ Kaohsiung Medical University Hospital (KMUH)

**Co-organizer:** Taiwan Health Center, Kaohsiung Medical University Hospital

Name	organization	Contact	Signature
ALBINO Bobogare	NVBDCP/MHMS	8788414	
Seyha Ross	WHO	Ross@wpro.who.int	
Matt Shortus	WHO	shortusm@who.int	
Victor Yu	ROC Embassy	dsyu@mot.gov.tw	
Jared Koli	Island Sun Newspaper	7483470 jyedekoli@gmail.com	
Solomon Lofana	Solomon Star News paper	Solofanazz@gmail.com	
STEVE ANUMANU	NRH	Saumann@nrh.gov.sb	
Aaron Oritamao	NRH	aoritamao@gmail.com	
Guoy Chuan Ferry	college of medicine NCKU	gperng@mail.NCKU.edu.tw	

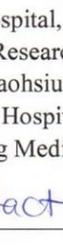
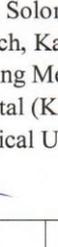
## International Dengue Fever Symposium

**Date:** 2015/11/26 (W4)

**Location:** Conference Room, National Referral Hospital, Solomon Islands

**Organizer:** Center for Dengue Fever Control and Research, Kaohsiung Medical University Tropical Medicine Center, Kaohsiung Medical University (KMU)/ Kaohsiung Medical University Hospital (KMUH)

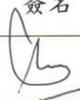
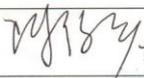
**Co-organizer:** Taiwan Health Center, Kaohsiung Medical University Hospital

Name	Org	contact	Sign
Donald Tahoni	Med Lab NRH	7302921	
Oceiv Wilson	PRFH LAB.	7459409	
Brenda Lavin	Med Lab	7492509	
Guthrie Joshua	Surveillance	7753723	
CHARLES BUTAFA	NVBDOP	7808739	
Angella Manele	Med Lab NRH	7674811	
			
			

附錄 2

第五屆登革熱國際研討會簽到表

2016/10/23 (Sunday)

2016 年 10/23~10/24 第五屆國際登革熱研討會		(10/23)
編號	姓名	簽名
1	馬來西亞 Prof. Sazaly AbuBakar	
2	新加坡 Prof. Yee-Sin Leo	
3	新加坡 Prof. Jang-Hann Chu	
4	夏威夷大學王維恭教授	王維恭
5	疾病管制署楊靖慧組長	楊靖慧
6	高雄市衛生局黃志中局長	黃志中
7	高雄市衛生局張秋文簡技	張秋文
8	國家衛生研究院齊嘉鈺副所長	
9	國家衛生研究院陳俊宏教授	
10	高雄醫學大學陳宜民教授	
11	高雄醫學大學蔡季君主任	蔡季君
12	高雄醫學大學許超群主任	許超群
13	高雄醫學大學李景欽主任	李景欽
14	小港醫院張科主任	張科
15	國立成功大學彭貴春教授	
16	國立台灣大學蔡坤憲教授	蔡坤憲
17	國立中興大學戴淑美教授	戴淑美
18	國立台灣大學蕭信宏教授	蕭信宏
19	中華醫事科技大學劉立德教授	劉立德

共  
209  
+  
17  
=  
226

1776

## 簽 到 表

2016 年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會			(10/23)
序號	姓名	服務單位	簽到
1	陳朝東	高雄市三民區衛生所	陳朝東
2	劉育豐	高雄市政府衛生局疾病管制處蟲媒股	劉育豐
3	李欣媛	高雄市左營衛生所	
4	吳佳玲	國衛院蚊媒中心	吳佳玲
5	楊亞倫	國衛院蚊媒中心	楊亞倫
6	馮郁欽	台南國立成功大學	馮郁欽
7	劉鳳飛	國立中山大學	劉鳳飛
8	吳文綺	高雄醫學大學	吳文綺
9	王榮慧	高雄醫學大學	王榮慧
10	李孟珊	高雄醫學大學	李孟珊
11	李娥	高雄醫學大學	李娥
12	洪慈翊	高雄醫學大學	洪慈翊
13	蔡靜怡	高雄醫學大學	蔡靜怡
14	林明宏	高雄醫學大學	
15	林虹良	高雄醫學大學	
16	廖彥雄	高雄醫學大學	廖彥雄
17	楊淑媚	高雄醫學大學	楊淑媚
18	林芮安	高雄醫學大學	
19	丁毓倫	醫學研究所	丁毓倫
20	許羿華	環境醫學暨生物所	許羿華
21	李玲誼	輔英科技大學	李玲誼
22	俞孟均	輔英科技大學	
23	黃昱璇	輔英科技大學	黃昱璇
24	葉思均	輔英科技大學	
25	葉婷安	輔英科技大學	

1816

## 2016年10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/23)

序號	姓名	服務單位	簽到
26	葉馨楓	輔英科技大學	
27	方茂守	中華醫事科技大學	方茂守
28	林宏隆	高雄醫學大學附設中和記念醫院	林宏隆
29	李文賢	高雄醫學大學附設中和記念醫院	李文賢
30	李啟偉	高雄醫學大學附設中和記念醫院	李啟偉
31	吳秉勳	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
32	陳禾昌	高雄醫學大學附設中和記念醫院	陳禾昌
33	王昱人	高雄醫學大學附設中和記念醫院	王昱人
34	王昱鑫	高雄醫學大學附設中和記念醫院	王昱鑫
35	吳依萍	高雄醫學大學附設中和記念醫院	吳依萍
36	李佩珊	高雄醫學大學附設中和記念醫院	李佩珊
37	李明全	高雄醫學大學附設中和記念醫院	李明全
38	周佳璋	高雄醫學大學附設中和記念醫院	周佳璋
39	林秉昌	高雄醫學大學附設中和記念醫院	林秉昌
40	林淑娟	高雄醫學大學附設中和記念醫院	林淑娟
41	林雅雲	高雄醫學大學附設中和記念醫院	林雅雲
42	邱孟甫	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
43	柯宜婷	高雄醫學大學附設中和記念醫院	柯宜婷
44	洪芙蓉	高雄醫學大學附設中和記念醫院	洪芙蓉
45	高志維	高雄醫學大學附設中和記念醫院	高志維
46	張淑玲	高雄醫學大學附設中和記念醫院	張淑玲
47	張機珍	高雄醫學大學附設中和記念醫院	張機珍
48	莊美蓮	高雄醫學大學附設中和記念醫院	莊美蓮
49	許紋瑄	高雄醫學大學附設中和記念醫院	許紋瑄
50	許鈺桂	高雄醫學大學附設中和記念醫院	許鈺桂

22/10

## 2016年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/23)

序號	姓名	服務單位	簽到
51	陳武政	高雄醫學大學附設中和記念醫院	陳武政
52	陳阿香	高雄醫學大學附設中和記念醫院	陳阿香
53	陳美吟	高雄醫學大學附設中和記念醫院	陳美吟
54	陳素櫻	高雄醫學大學附設中和記念醫院	陳素櫻
55	曾麗憑	高雄醫學大學附設中和記念醫院	曾麗憑
56	葉淑媛	高雄醫學大學附設中和記念醫院	葉淑媛
57	蔡吟芬	高雄醫學大學附設中和記念醫院	蔡吟芬
58	蔡聖健	高雄醫學大學附設中和記念醫院	蔡聖健
59	鄭彬紘	高雄醫學大學附設中和記念醫院	鄭彬紘
60	蕭王魁	高雄醫學大學附設中和記念醫院	蕭王魁
61	賴秀玲	高雄醫學大學附設中和記念醫院	賴秀玲
62	藍永勝	高雄醫學大學附設中和記念醫院	藍永勝
63	王文怡	高雄醫學大學附設中和記念醫院	王文怡
64	王怡芳	高雄醫學大學附設中和記念醫院	王怡芳
65	宋雅雯	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
66	林妙禛	高雄醫學大學附設中和記念醫院	林妙禛
67	林芸	高雄醫學大學附設中和記念醫院	林芸
68	姚乃菁	高雄醫學大學附設中和記念醫院	姚乃菁
69	施惠敏	高雄醫學大學附設中和記念醫院	施惠敏
70	洪翎瑄	高雄醫學大學附設中和記念醫院	洪翎瑄
71	洪霽宸	高雄醫學大學附設中和記念醫院	洪霽宸
72	陳力綺	高雄醫學大學附設中和記念醫院	陳力綺
73	陳妍均	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
74	陳茹芳	高雄醫學大學附設中和記念醫院	陳茹芳
75	陳綺雯	高雄醫學大學附設中和記念醫院	

2-17

## 2016年10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/23)

序號	姓名	服務單位	簽到
76	陳鳳英	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
77	傅秀琴	高雄醫學大學附設中和記念醫院	傅秀琴
78	黃麗嘉	高雄醫學大學附設中和記念醫院	黃麗嘉
79	葉佩芬	高雄醫學大學附設中和記念醫院	葉佩芬
80	董千寧	高雄醫學大學附設中和記念醫院	董千寧
81	蔡欣樺	高雄醫學大學附設中和記念醫院	蔡欣樺
82	蕭梢羨	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
83	謝佳琪	高雄醫學大學附設中和記念醫院	謝佳琪
84	謝雅雯	高雄醫學大學附設中和記念醫院	謝雅雯
85	簡秋雲	高雄醫學大學附設中和記念醫院	簡秋雲
86	羅好安	高雄醫學大學附設中和記念醫院	羅好安
87	嚴幸慈	高雄醫學大學附設中和記念醫院	嚴幸慈
88	蘇姿菱	高雄醫學大學附設中和記念醫院	蘇姿菱
89	王文宏	高雄醫學大學附設中和記念醫院	王文宏
90	簡淑惠	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
91	盧妙禪	高雄市長小港醫院	盧妙禪
92	陳惇杰	高雄市長大同醫院	
93	林桂如	高雄市長大同醫院	林桂如
94	陳彥潔	高雄市長大同醫院	陳彥潔
95	曾亞君	高雄市長大同醫院	曾亞君
96	楊琪伶	高雄市長大同醫院	楊琪伶
97	顏培元	高雄市長大同醫院	
98	趙珮娟	高雄榮民總醫院	趙珮娟
99	張正杰	高雄長庚紀念醫院	張正杰
100	孫羽萱	高雄長庚紀念醫院	

187A

## 2016年10/23-24 第五屆登革熱國際研討會

(10/23)

序號	姓名	服務單位	簽到
101	陳珽萁	高雄長庚紀念醫院	
102	傅姿樺	高雄長庚紀念醫院	
103	彭成輝	高雄長庚紀念醫院	彭成輝
104	黃文顯	高雄長庚紀念醫院	
105	鄭又嘉	國軍高雄總醫院	鄭又嘉
106	陳素琴	國軍高雄總醫院左營分院	陳素琴
107	蔡孟純	國軍高雄總醫院左營分院	蔡孟純
108	彭成標	國軍高雄總醫院左營分院	彭成標
109	趙執雨	國軍高雄總醫院左營分院	趙執雨
110	陳佩琪	國軍高雄總醫院左營分院	
111	劉彥鋌	國軍高雄總醫院左營分院	劉彥鋌
112	謝雅雯	高雄市立醫院	謝雅雯
113	王永利	高雄阮綜合醫院	王永利
114	江德慧	高雄阮綜合醫院	江德慧
115	潘蒂蓁	高雄阮綜合醫院	潘蒂蓁
116	游信良	高雄市立民生醫院	
117	涂玉玲	高雄市立民生醫院	
118	夏慧伶	高雄市立民生醫院	
119	陳荔瑤	高雄市立民生醫院	陳荔瑤
120	曹晴晴	輔英科技大學附設醫院	曹晴晴
121	張淑秋	輔英科技大學附設醫院	張淑秋
122	陳琬儒	義大醫院檢驗科	
123	汪雪卿	義大大昌醫院	
124	陳耿弘	高雄基督教醫院	
125	莊玉芬	高雄基督教醫院	

14份

## 2016年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/23)

序號	姓名	服務單位	簽到
126	尤建偉	財團法人天主教聖功醫院	
127	吳宙芳	財團法人天主教聖功醫院	
128	林秀瑾	財團法人天主教聖功醫院	林秀瑾
129	林泳昕	財團法人天主教聖功醫院	
130	陳佳惠	財團法人天主教聖功醫院	陳佳惠
131	黃舒敏	財團法人天主教聖功醫院	
132	楊惠馨	財團法人天主教聖功醫院	
133	鄭湘怡	財團法人天主教聖功醫院	鄭湘怡
134	游文聖	高雄市立鳳山醫院	游文聖
135	鐘惠虹	二聖醫院	
136	陳俊銘	安泰醫院	陳俊銘
137	詹明錦	台北三軍總醫院	
138	彭柏森	台北三軍總醫院	
139	陳怡伶	新竹馬偕醫院癌症中心	
140	黃茹玉	台中三軍總醫院	黃茹玉
141	王亭茵	財團法人天主教聖馬爾定醫院	
142	顏淑霞	台南郭綜合醫院	顏淑霞
143	劉巧芬	台南奇美醫院	
144	周瑞鈴	新營衛生所	
145	郭政諭	衛生福利部屏東醫院	
146	范高超	屏東縣枋寮醫療社團法人枋寮醫院	
147	許芯婕	屏東寶建醫院	
148	吳詩婷	屏東寶建醫院	
149	吳巧屏	台東馬偕醫院	
150	蕭惠文	國立陽明大學附設醫院	蕭惠文

8份

## 2016年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/23)

序號	姓名	服務單位	簽到
151	楊雅婷	國立陽明大學附設醫院	
152	曾士賓	台灣血液基金會高雄捐血中心	曾士賓
153	吳斯雅	台灣血液基金會高雄捐血中心	
154	蔡易達	台灣血液基金會高雄捐血中心	
155	余錦鳳	台灣血液基金會高雄捐血中心	余錦鳳
156	江糧晏	台灣血液基金會高雄捐血中心	
157	鄒嘉文	台灣血液基金會高雄捐血中心	鄒嘉文
158	李榆涵	台灣血液基金會高雄捐血中心	李榆涵
159	孫興忠	台灣血液基金會高雄捐血中心	
160	吳欣蓉	巨蛋法泊時尚診所	吳欣蓉
161	曾秀花	陳嘉偉皮膚科診所	
162	吳文萍	王文達診所	
163	廖雅玲	萬安診所	
164	周詩涵	邱建皓耳鼻喉科	
165	齊瑞華	華康診所	齊瑞華
166	邱愛婷	誠心診所	邱愛婷
167	蔡寶明	加安診所	蔡寶明
168	詹雅玲	岡山榮譽國民之家	詹雅玲
169	黃惠真	血液透析室	
170	劉勝忠	聯興醫事檢驗所	劉勝忠
171	鍾佩育	中壇醫事檢驗所	鍾佩育
172	吳佳貞	台南血液透析室	
173	林佳勳	奇安診所血液透析室	
174	馬宜君	健檢中心	
175	簡麗君	屏東縣健檢中心	簡麗君

12份

## 2016年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/23)

序號	姓名	服務單位	簽到
176	楊淑媛	屏東縣檢驗科	
177	謝佩倫	桃園門診	
178	林淑菁	急診	林淑菁
179	林慧青	急診室	
180	曹榮順	內科	曹榮順
181	林品蓁	檢驗科	林品蓁
182	陳彥蓉	感染科	陳彥蓉
183	黃詩于	感染科	黃詩于
184	林虹妙	內視鏡	
185	劉怡佳	神經內科	劉怡佳
186	楊惠茹	一般檢驗室	楊惠茹
187	陳建宇	檢驗醫學部	陳建宇
188	鍾舒涵	OPDE	鍾舒涵
189	徐慧珍	門診部 OPDE	徐慧珍
190	蘇鈴惠	門診	蘇鈴惠
191	賴思穎	消化道內視鏡中心	賴思穎
192	歐玲君	OPDE	歐玲君
193	孔淑鈴	國防部軍備局生產製造中心第205廠	孔淑鈴
194	陳逸君	經濟部加工出口區高雄分處衛生保健所	
195	柯佳妍	中鋼診療所	
196	賴曾圭言	台灣中油股份有限公司石化事業部醫務室	賴曾圭言
197	施宛汝	國巨股份有限公司	
198	張秀耘	協勝發鋼鐵股份有限公司	
199	柯承韻	頌邦科技股份有限公司	
200	蘇素貞	長興材料工業股份有限公司	蘇素貞

16/15

## 2016年10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/23)

序號	姓名	服務單位	簽到
201	張芝華	善吉精密工業有限公司	
202	吳冠儀	丞豐一科技股份有限公司	吳冠儀
203	葉芳宙	中鼎工程股份有限公司	葉芳宙
204	葉子慧	中鼎工程股份有限公司	葉子慧
205	林筱涓	儒億科技股份有限公司	
206	黃羽綾	高雄楠梓日月光半導體-員工診所	
207	顏財賜	凌隆資訊	顏財賜
208	吳玫瑩	茂迪	
209	蔡佩如	住華科技	
210	楊淑芬	台中喬山健康科技	
211	陳冠樺	私人機構	
212	賴筱慧	無	賴筱慧
213	蔡佩豫	無	
214	賴雅琴	無	
215	許藝瓊	無	許藝瓊
216	楊天錫	無	楊天錫
217	顏威裕	顏威裕醫院	顏威裕
218	林家吟	顏威裕醫院	林家吟
219	楊雲志	楊雲志診所	楊雲志
220	李浴風	疾病管制署高屏區管中心	李浴風
221	吳青倪	高醫	吳青倪
222	鄭元瑜	尚文診所	鄭元瑜
223	王文才	王文才診所	王文才
224	林伯寧	林伯寧診所	林伯寧
225	陳嘉喜		陳嘉喜

16/5

2016年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/23)

序號	姓名	服務單位	簽到
226	田莉萱	高醫中和醫院檢驗部	田莉萱
227	李榮惠	劉明福內科	李榮惠
228	劉志光	星泰診所	劉志光
229	潘妤穎	高市衛生局疫苗	潘妤穎
230	翁培	台大寄生蟲學科	翁培
231	郭瑋	國軍左營醫院	郭瑋
232	黃文傑	星泰診所	黃文傑
233	鄧子	國衛院	鄧子
234	蔡靜儀	KMUH	蔡靜儀
235	陳素德	KMUH	陳素德
236	許雅婷	KMUH	許雅婷
237	杜亭吟	KMUH	杜亭吟
238	李育如	KMUH	李育如
239	鄧子惠	KMUH	鄧子惠
240	金博君	NTU	金博君
241	莊子昇		莊子昇
242	魏文龍	嘉義慢性病防治所	魏文龍
243	楊翔宇	KMUH	楊翔宇
244	洪敏南	CDC	洪敏南
245	林珈卉	MIRI	林珈卉
246	周芳如	KMTCH OPD	周芳如
247	陳舒惠	KMUH	陳舒惠
248	簡明靜	KMUH	簡明靜
249	蘇鈺樺	診所	蘇鈺樺
250	王昱瑄	CDC	王昱瑄

胡師華

→ 民告醫院

胡師華 26份

2016年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/23)

序號	姓名	服務單位	簽名
251	廖佩茹	中壢軍事檢驗所	廖佩茹
252	張聰賢	高雄榮民總醫院	張聰賢
253	陳玲妤	嘉仁診所	陳玲妤
254	黃琴茹	七賢推推外科醫院	黃琴茹
255	詹佳華	栢仁婦產科醫院	詹佳華
256	黃聖文	KMUH	黃聖文
257	余佳瑋	新基	余佳瑋
258	黃美霖	高雄區黃美霖診所	黃美霖
259	吳柏芳	吳柏芳診所	吳柏芳
260	賴建義	高雄長庚醫院	賴建義
261	紀靜惠	KMUH	紀靜惠
262	霍永志	霍永志診所	霍永志
263	譚之明	高雄中銘跟完	譚之明
264	林吉福	仁武內中內科診所	林吉福
265	夏文儀	廣聖醫院	夏文儀
266	林學夏	新油管製署	林學夏
267	洪祥哲	壽瑞臨診所	洪祥哲
268	李鳳信	傳染病及癌症研究中心	李鳳信
269	何新英	傳染病及癌症研究中心	何新英
270	傅柏志	高醫附設醫院	傅柏志
271	林楚瑩	高雄市長大同醫院	林楚瑩
272	邱再珠	高雄榮民總醫院	邱再珠
273	程重輝	"	程重輝
274	利佳貞	"	利佳貞
275	邱嘉敏	"	邱嘉敏

洪祥哲

英

25份

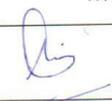
2016年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/23)

序號	姓名	服務單位	簽到
276	蔣士婷	成大	蔣士婷
277	賴羽君	台南市新營衛生所	賴羽君
278	周珮韻	高雄榮總	周珮韻
279	甘慈閔	高醫	甘慈閔
280	許智陽	高醫	許智陽
281	謝雅勻	高醫小港	謝雅勻
282	林光友	台南胸腔醫院	林光友
283	李雅萍	四香公司	李雅萍
284	王佑仁	無	王佑仁
285	張雅淑	成大醫院	張雅淑
286	林欣瑜	高榮	林欣瑜
287	葉淑媛	KMUH	葉淑媛
288			
289			
290			
291			
292			
293			
294			
295			
296			
297			
298			
299			
300			

12/16

2016/10/24 (Monday)

2016 年 10/23~10/24 第五屆國際登革熱研討會 (10/24)		
編號	姓名	簽名
1	馬來西亞 Prof. Sazaly AbuBakar	
2	新加坡 Prof. Yee-Sin Leo	
3	新加坡 Prof. Jang-Hann Chu	
4	夏威夷大學王維恭教授	
5	疾病管制署楊靖慧組長	
6	高雄市衛生局黃志中局長	
7	高雄市衛生局張秋文簡技	張秋文
8	國家衛生研究院齊嘉鈺副所長	齊嘉鈺
9	國家衛生研究院陳俊宏教授	陳俊宏
10	高雄醫學大學陳宜民教授	
11	高雄醫學大學蔡季君主任	蔡季君
12	高雄醫學大學許超群主任	
13	高雄醫學大學李景欽主任	李景欽
14	小港醫院張科主任	張科
15	國立成功大學彭貴春教授	彭貴春
16	國立台灣大學蔡坤憲教授	蔡坤憲
17	國立中興大學戴淑美教授	
18	國立台灣大學蕭信宏教授	蕭信宏
19	中華醫事科技大學劉立德教授	劉立德

共  
113  
+  
14  
= 127

## 簽 到 表

2016 年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會			(10/24)
序號	姓名	服務單位	簽到
1	陳朝東	高雄市三民區衛生所	陳朝東
2	劉育豐	高雄市政府衛生局疾病管制處蟲媒股	劉育豐
3	李欣媛	高雄市左營衛生所	
4	吳佳玲	國衛院蚊媒中心	吳佳玲
5	楊亞倫	國衛院蚊媒中心	楊亞倫
6	馮郁欽	台南國立成功大學	馮郁欽
7	劉鳳飛	國立中山大學	劉鳳飛
8	吳文綺	高雄醫學大學	吳文綺
9	王榮慧	高雄醫學大學	王榮慧
10	李孟珊	高雄醫學大學	李孟珊
11	李娥	高雄醫學大學	李娥
12	洪慈翊	高雄醫學大學	洪慈翊
13	蔡靜怡	高雄醫學大學	蔡靜怡
14	林明宏	高雄醫學大學	
15	林虹良	高雄醫學大學	
16	廖彥雄	高雄醫學大學	
17	楊淑媚	高雄醫學大學	
18	林芮安	高雄醫學大學	
19	丁毓倫	醫學研究所	
20	許羿華	環境醫學暨生物所	
21	李玲誼	輔英科技大學	
22	俞孟均	輔英科技大學	
23	黃昱璇	輔英科技大學	
24	葉思均	輔英科技大學	
25	葉婷安	輔英科技大學	

12/8

## 2016年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/24)

序號	姓名	服務單位	簽到
26	葉馨楓	輔英科技大學	
27	方茂守	中華醫事科技大學	
28	林宏隆	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
29	李文賢	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
30	李啟偉	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
31	吳秉勳	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
32	陳禾昌	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
33	王昱人	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
34	王昱鑫	高雄醫學大學附設中和記念醫院	王昱鑫
35	吳依萍	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
36	李佩珊	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
37	李明全	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
38	周佳瑋	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
39	林秉昌	高雄醫學大學附設中和記念醫院	林秉昌
40	林淑娟	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
41	林雅雲	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
42	邱孟甫	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
43	柯宜婷	高雄醫學大學附設中和記念醫院	柯宜婷
44	洪芙蓉	高雄醫學大學附設中和記念醫院	洪芙蓉
45	高志維	高雄醫學大學附設中和記念醫院	高志維
46	張淑玲	高雄醫學大學附設中和記念醫院	張淑玲
47	張機珍	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
48	莊美蓮	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
49	許紋瑄	高雄醫學大學附設中和記念醫院	許紋瑄
50	許鈺桂	高雄醫學大學附設中和記念醫院	

770

## 2016年10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/24)

序號	姓名	服務單位	簽到
51	陳武政	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
52	陳阿香	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
53	陳美吟	高雄醫學大學附設中和記念醫院	陳美吟
54	陳素櫻	高雄醫學大學附設中和記念醫院	陳素櫻
55	曾麗憑	高雄醫學大學附設中和記念醫院	曾麗憑
56	葉淑媛	高雄醫學大學附設中和記念醫院	葉淑媛
57	蔡吟芬	高雄醫學大學附設中和記念醫院	蔡吟芬
58	蔡聖健	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
59	鄭彬紘	高雄醫學大學附設中和記念醫院	鄭彬紘
60	蕭王魁	高雄醫學大學附設中和記念醫院	蕭王魁
61	賴秀玲	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
62	藍永勝	高雄醫學大學附設中和記念醫院	藍永勝
63	王文怡	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
64	王怡芳	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
65	宋雅雯	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
66	林妙禪	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
67	林芸	高雄醫學大學附設中和記念醫院	林芸
68	姚乃菁	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
69	施惠敏	高雄醫學大學附設中和記念醫院	施惠敏
70	洪翎瑄	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
71	洪霈宸	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
72	陳力綺	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
73	陳妍均	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
74	陳茹芳	高雄醫學大學附設中和記念醫院	陳茹芳
75	陳綺雯	高雄醫學大學附設中和記念醫院	

11/15

## 2016年10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/24)

序號	姓名	服務單位	簽到
76	陳鳳英	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
77	傅秀琴	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
78	黃麗嘉	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
79	葉佩芬	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
80	董千寧	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
81	蔡欣樺	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
82	蕭梢蓁	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
83	謝佳琪	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
84	謝雅雯	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
85	簡秋雲	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
86	羅妤安	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
87	嚴幸慈	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
88	蘇姿菱	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
89	王文宏	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
90	簡淑惠	高雄醫學大學附設中和記念醫院	
91	盧妙禪	高雄市長小港醫院	盧妙禪
92	陳惇杰	高雄市長大同醫院	
93	林桂如	高雄市長大同醫院	
94	陳彥潔	高雄市長大同醫院	陳彥潔
95	曾亞君	高雄市長大同醫院	
96	楊琪伶	高雄市長大同醫院	
97	顏培元	高雄市長大同醫院	顏培元
98	趙珮娟	高雄榮民總醫院	
99	張正杰	高雄長庚紀念醫院	
100	孫羽萱	高雄長庚紀念醫院	

3份

## 2016年10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/24)

序號	姓名	服務單位	簽到
101	陳珽蕙	高雄長庚紀念醫院	
102	傅姿樺	高雄長庚紀念醫院	
103	彭成輝	高雄長庚紀念醫院	
104	黃文顯	高雄長庚紀念醫院	
105	鄭又嘉	國軍高雄總醫院	鄭又嘉
106	陳素琴	國軍高雄總醫院左營分院	
107	蔡孟純	國軍高雄總醫院左營分院	
108	彭成標	國軍高雄總醫院左營分院	彭成標
109	趙執雨	國軍高雄總醫院左營分院	
110	陳佩琪	國軍高雄總醫院左營分院	
111	劉彥鋌	國軍高雄總醫院左營分院	劉彥鋌
112	謝雅雯	高雄市立醫院	
113	王永利	高雄阮綜合醫院	王永利
114	江德慧	高雄阮綜合醫院	江德慧
115	潘蒂蓁	高雄阮綜合醫院	潘蒂蓁
116	游信良	高雄市立民生醫院	
117	涂玉玲	高雄市立民生醫院	
118	夏慧伶	高雄市立民生醫院	夏慧伶
119	陳荔瑤	高雄市立民生醫院	
120	曹晴晴	輔英科技大學附設醫院	
121	張淑秋	輔英科技大學附設醫院	
122	陳琬儒	義大醫院檢驗科	
123	汪雪卿	義大大昌醫院	汪雪卿
124	陳耿弘	高雄基督教醫院	
125	莊玉芬	高雄基督教醫院	

8/4

## 2016年10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/24)

序號	姓名	服務單位	簽到
126	尤建偉	財團法人天主教聖功醫院	
127	吳宙芳	財團法人天主教聖功醫院	
128	林秀瑾	財團法人天主教聖功醫院	
129	林泳昕	財團法人天主教聖功醫院	
130	陳佳惠	財團法人天主教聖功醫院	
131	黃舒敏	財團法人天主教聖功醫院	
132	楊惠馨	財團法人天主教聖功醫院	
133	鄭湘怡	財團法人天主教聖功醫院	
134	游文聖	高雄市立鳳山醫院	
135	鐘惠虹	二聖醫院	鐘惠虹
136	陳俊銘	安泰醫院	陳俊銘
137	詹明錦	台北三軍總醫院	
138	彭柏森	台北三軍總醫院	
139	陳怡伶	新竹馬偕醫院癌症中心	
140	黃茹玉	台中三軍總醫院	黃茹玉
141	王亭茵	財團法人天主教聖馬爾定醫院	
142	顏淑霞	台南郭綜合醫院	顏淑霞
143	劉巧芬	台南奇美醫院	
144	周瑞鈴	新營衛生所	
145	郭政諭	衛生福利部屏東醫院	
146	范高超	屏東縣枋寮醫療社團法人枋寮醫院	范高超
147	許芯婕	屏東寶建醫院	
148	吳詩婷	屏東寶建醫院	
149	吳巧屏	台東馬偕醫院	吳巧屏
150	蕭惠文	國立陽明大學附設醫院	

670

## 2016年10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/24)

序號	姓名	服務單位	簽到
151	楊雅婷	國立陽明大學附設醫院	
152	曾士賓	台灣血液基金會高雄捐血中心	
153	吳斯雅	台灣血液基金會高雄捐血中心	吳斯雅
154	蔡易達	台灣血液基金會高雄捐血中心	蔡易達
155	余錦鳳	台灣血液基金會高雄捐血中心	余錦鳳
156	江糧晏	台灣血液基金會高雄捐血中心	江糧晏
157	鄔嘉文	台灣血液基金會高雄捐血中心	鄔嘉文
158	李榆涵	台灣血液基金會高雄捐血中心	李榆涵
159	孫興忠	台灣血液基金會高雄捐血中心	孫興忠
160	吳欣蓉	巨蛋法泊時尚診所	
161	曾秀花	陳嘉偉皮膚科診所	
162	吳文萍	王文達診所	
163	廖雅玲	萬安診所	
164	周詩涵	邱建皓耳鼻喉科	
165	齊瑞華	華康診所	齊瑞華
166	邱愛婷	誠心診所	邱愛婷
167	蔡寶明	加安診所	
168	詹雅玲	岡山榮譽國民之家	詹雅玲
169	黃惠真	血液透析室	
170	劉勝忠	聯興醫事檢驗所	
171	鍾佩育	中壇醫事檢驗所	鍾佩育
172	吳佳貞	台南血液透析室	
173	林佳勳	奇安診所血液透析室	
174	馬宜君	健檢中心	
175	簡麗君	屏東縣健檢中心	

1175

## 2016年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/24)

序號	姓名	服務單位	簽到
176	楊淑媛	屏東縣檢驗科	
177	謝佩倫	桃園門診	
178	林淑菁	急診	林淑菁
179	林慧青	急診室	林慧青
180	曹榮順	內科	曹榮順
181	林品蓁	檢驗科	林品蓁
182	陳彥蓉	感染科	陳彥蓉
183	黃詩于	感染科	
184	林虹妙	內視鏡	
185	劉怡佳	神經內科	劉怡佳
186	楊惠茹	一般檢驗室	楊惠茹
187	陳建宇	檢驗醫學部	陳建宇
188	鍾舒涵	OPDE	
189	徐慧珍	門診部 OPDE	
190	蘇鈴惠	門診	
191	賴思穎	消化道內視鏡中心	
192	歐玲君	OPDE	
193	孔淑鈴	國防部軍備局生產製造中心第205廠	孔淑鈴
194	陳逸君	經濟部加工出口區高雄分處衛生保健所	
195	柯佳妍	中鋼診療所	
196	賴曾圭言	台灣中油股份有限公司石化事業部醫務室	
197	施宛汝	國巨股份有限公司	
198	張秀妘	協勝發鋼鐵股份有限公司	
199	柯承韻	碩邦科技股份有限公司	
200	蘇素貞	長興材料工業股份有限公司	蘇素貞

10/24

## 2016年10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/24)

序號	姓名	服務單位	簽到
201	張芝華	善吉精密工業有限公司	
202	吳冠儀	丞豐一科技股份有限公司	吳冠儀
203	葉芳宙	中鼎工程股份有限公司	
204	葉子慧	中鼎工程股份有限公司	
205	林筱涓	儒億科技股份有限公司	
206	黃羽婕	高雄楠梓日月光半導體-員工診所	
207	顏財賜	凌隆資訊	顏財賜
208	吳玫瑩	茂迪	
209	蔡佩如	住華科技	
210	楊淑芬	台中喬山健康科技	
211	陳冠樺	私人機構	
212	賴筱慧	無	賴筱慧
213	蔡佩豫	無	蔡佩豫
214	賴雅琴	無	
215	許藝瓊	無	
216	楊天喜	無	
217	顏威裕	顏威裕醫院	顏威裕
218	林家吟	顏威裕醫院	林家吟
219	鄭政盛	北榮台東分院	鄭政盛
220	謝直偉	高雄榮總輸血醫學科	謝直偉
221	林光友	衛生福利部胸腔病院	林光友
222	謝雅年	高雄市立小港醫院檢驗科	謝雅年
223	陳錦芬	左營正生所	陳錦芬
224	林紋年	KMOH	林紋年
225	林紋年	疾病管制署高屏區管制中心	林紋年

13/19

2016年 10/23~24 第五屆登革熱國際研討會

(10/24)

序號	姓名	服務單位	簽到
226	吳青虹		吳青虹
227	陳嘉嘉		陳嘉嘉
228	翁仕哲	銘傳大學 醫學院	翁仕哲
229	李宇儀	疾病管制署 高屏區管制中心	李宇儀
230	羅取晉	南大(H)	羅取晉
231	林伯偉	高師大 數學系	林伯偉
232	詹佳奇	相仁(H)	詹佳奇
233	黃琴淑	七賢醫院 椎外科(H)	黃琴淑
234	盧柏樺	高醫	盧柏樺
235	鄧宇	國研院	鄧宇
236	許嘉瑄		許嘉瑄
237	金博春	台大	金博春
238	黃冠宇	CDC 高屏區	黃冠宇
239	林如丹	NHRI	林如丹
240	鄧澤翔	高雄捐血中心	鄧澤翔
241	張簡宏旭	高雄捐血中心	張簡宏旭
242	卓日方	全民醫院	卓日方
243	凌靜玫	全民醫院	凌靜玫
244	潘怡家	衛生局 在研	潘怡家
245	林桂如	大同醫院	林桂如
246	廖佩茹	中壢醫事檢驗所	廖佩茹
247	莊珮文	高市民生醫院	莊珮文
248	夏文儀	聖功醫院	夏文儀
249	周茂大	中興醫院	周茂大
250	蔡冠廷	中興醫事科大	蔡冠廷

25/16

2016年10/23-24 第五屆登革熱國際研討會

(10/24)

序號	姓名	服務單位	簽名
251	郭琦	國軍總醫院左營分院	郭琦
252	陳相志	高醫附設醫院	陳相志
253	林廷瑩	高雄市立大同醫院	林廷瑩
254	許智陽	高醫	許智陽
255	謝雅玲	高醫小港	謝雅玲
256	林光友	台南胸腔病院	林光友
257	葉淑媛	KMUH	葉淑媛
258			
259			
260			
261			
262			
263			
264			
265			
266			
267			
268			
269			
270			
271			
272			
273			
274			
275			

2份

### 附錄 3

## 第五屆 登革熱國際研討會 滿意度問卷調查

親愛的與會者您好：

非常感謝您參與本次的活動，為了往後的活動有更完美的呈現，希望您能夠在下列的問題中給予我們寶貴與具體的意見。再次感謝您的全程參與！

題號	題目	很好	好	普通	稍做改進會更好	不理想
1	對於本次研討會報名方式，您覺得					
2	對於本次研討會之會場，您覺得					
3	對於本次研討會提供的服務，您覺得					
4	對於本次研討會提供的手冊內容，您覺得					
5	對於本次研討會演講與討論的時間安排，您覺得					
6	對於本次研討會主講人整體表現，您覺得					
7	對於本次研討會主持人整體表現，您覺得					
8	對於本次研討會的演講內容，您覺得					
9	對於參加本次研討會工作人員的服務態度，您覺得					
10	對於參加本次研討會的整體收穫，您覺得					

★性別：\_\_\_\_\_ ★年齡：\_\_\_\_\_歲 ★如何得知本活動之訊息：\_\_\_\_\_

★服務單位：\_\_\_\_\_ ★職稱：\_\_\_\_\_

#### 意見與建議：

1. 對於上述問題您如果勾選「稍做改進會更好」或「不理想」，請具體詳述：

2. 您希望再加入什麼樣的演講主題會更好？請詳述：

3. 其他的意見與建議：

**衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫**  
**104年計畫重要研究成果及具體建議**  
(本資料須另附1份於成果報告中)

計畫名稱：「登革熱防治研究中心」委託科技研究計畫

主持人：楊俊毓 計畫編號：MOHW104-CDC-C-114-114901

**1.計畫之新發現或新發明**

**(子計畫一)**

PR1 可以被預期作為登革熱患者的生物標誌。當確認 PR1 何種 Isoform 會專一性表現在登革熱患者體內後，我們未來也可以了解 PR1 在不顯性感染者的表現，除了診斷外也可以對登革熱傳播有一定的預防功效。

**(子計畫二)**

對於登革病毒的宿主細胞的來源仍是有很多不同的想法，已周邊血幹細胞的角度看待登革病毒感染的情形，是在目前登革熱領域上一個創新的概念。最近的期刊發現因登革熱致死的病患，其骨髓內帶有的登革病毒的濃度比周邊血要高，顯示登革病毒會至骨髓中生存。骨髓細胞已知是周邊血免疫細胞的前驅細胞，所以在一些登革病毒體內都會看到血小板或是嗜鹼性球的表現會降低，可能跟骨髓細胞受到登革病毒感染所影響，造成周邊血球細胞的平衡失衡導致後續在登革熱病患在臨床上觀察到的一些免疫失控的狀況。體外登革病毒的結構已被解析多年，然而對於體內的登革病毒的結構，因受限於很難測量登革熱病患體內的病毒含量，而遲未有更進一步的分析，隨著技術的進步，我們的研究團隊首先了解到登革熱病毒體內的病毒顆粒的狀態有別於體外用來製造疫苗的病毒型態，這要的發展將可以解釋為何疫苗的保護力效果不盡理想。

**(子計畫三)**

計畫執行成果與原計畫規劃具高度一致性，以台灣地區人口學資料所分析出，具胃潰瘍、十二指腸潰瘍、糖尿病、鬱血性心衰竭、末期腎病及慢性腎衰竭等疾病史之群眾，易罹患登革熱重症之危險性比其他不具上述疾病史的人為高，在控制可能的干擾因素後，登革熱患者惡化成登革熱重症的危險因素，曾經罹患十二指腸潰瘍的患者是無相關病史患者的 4.89 倍(95%信賴區間為 1.55-20.55)，而曾經罹患慢性腎衰竭的患者是無相關病史患者的 4.04 倍(95%信賴區間為 1.64-14.61)。這顯示曾罹患十二指腸潰

瘍與慢性腎衰竭疾病的患者，在感染登革熱後具有較高危險性轉變成登革熱重症。

#### (子計畫四)

1. 高雄市每年均有一個登革熱週期性或約每四年會有一個週期性流行在統計學上均呈現有意義。
2. 最低溫的提升對於登革熱的發生率有 2-3 個月的延遲月數效應(正面效應)及雨量提升則有 1-2 個月延遲月數(負面效應)。
3. 2014 年登革熱發生率相較於 2002 年而言，在氣爆後 5 週至 22 週增加了 2.0 至 8.0 倍，氣爆區與鄰近氣爆區登革熱的發生率有顯著相關係數達(rs = 0.956, P < 0.001)。如此訊息告訴我們在氣爆後的 5 週開始登革熱就會上升了，故若有類似事件發生時，這事發後的 5 週是關鍵的時刻，應該善用此段時間盡量減少孳生源，降低登革熱傳播的機會。
4. 比較參考年份(2000 to 2014 年資料，但去掉 2002 及 2014 年，計 13 個年份)相比較，最低溫、雨量及氣爆事件解釋了 2014 年的 75.1% 變異量。
5. 而四月份”每日最低溫的月平均值”為 22°C，此點可推測該年高市有登革熱的大流行機會較高。且因四月份最低溫度上升和孳生源增加與登革熱大流行有關係，因此在登革熱流行期的前幾個月左右，進行登革熱孳生源的清除動作，舉如提早到每年的 3-4 月進行，如此對登革熱防治較能發揮功效，若是等到七月份登革熱流行時再開始做孳生源的清除已較慢。
6. 最低溫及雨量會影響到環境因素而加速登革熱傳遞，意外事件如氣爆事件與氣候及其對人蚊的動態交互作用造成的影響，在登革熱防治上不應忽略。

#### (子計畫五)

1. 本國研究顯示年長者為登革熱死亡之高危險族群，與國外報告死亡個案多是年輕人及小孩有很大的不同。
2. 登革熱重症病人之死亡原因主要是登革熱所導致的休克及出血，且有極高的比率是在三日內快速死亡。臨床上對於登革熱病人出現休克或出血情形時應更積極處理，各加護病房也應將此類病人視為優先轉入個案，未來研究應嘗試建立重症登革熱的 bundle care，以期能增加這群病人的存活率。

3. 器官衰竭之綜合指標 SOFA 為登革熱重症極佳之預後指標，可供家屬和臨床醫師在做重要決策時參考。登革熱重症病人應以 SOFA 評估其器官衰竭情形，特別是心、肺、腦三個系統，與病人之預後有高度的相關。

#### (子計畫六)

本計畫成功建立了四種高通量藥物篩選系統，並且已利用其中兩種高通量篩選系統篩選出兩個有潛力的抗病毒藥物 compound L 及 GS。這兩種藥物對於登革病毒能夠有效的抑制其複製能力，並且在動物模式中進行生物安全、抑制登革病毒活性之相關測試後，有相當大的機率可以快速進入臨床階段的相關測試，並且快速地投入目前沒有有效藥物治療的登革病毒感染相關疾病之臨床治療以及運用，對於登革病毒日趨嚴重的台灣地區也可以提供除了公衛管理以外另一個對付登革病毒之解決方案。此外為了提高此四種藥物的臨床應用價值，本計畫更初步建立了 AG129 登革感染出血小鼠模式，將來可進一步應用於藥物開發上。並且本實驗室也分析 NGS 數據並初步尋找到三個與登革病毒複製相關之 miRNA，期望將來能夠將這些結果應用於登革出血熱早期診斷上，讓出血熱病患能夠早期接受治療提高生存率。

#### (子計畫七)

在本研究中，進行高雄市兩個行政區血清陽性率調查，可用於將來選擇引進疫苗種類的依據。

我們針對計畫中所參與的志願者進行登革疫苗試驗的意願調查，發現於三民區中有 30 人與楠梓區中有 80 人願意參與登革疫苗試驗，年齡 20~70 歲不等，將來如果在高雄市要進行登革疫苗試驗，將可提供相關志願者的資訊。

#### (子計畫八)

1. 尋找到天然可以對抗登革病毒感染的中草藥-牛樟芝，為台灣特有的牛樟芝界定新的研究價值。
2. 雖然此模式是建立在具有免疫不全的小鼠體內，但在植入人體的幹細胞後，可以部份的回復免疫的功能。相較於現行的體外細胞培養方式，單純觀察細胞與病毒之間的感互作用，然而登革熱感染的擬人化小鼠模式，可以提供新的疫苗和藥物研發的臨床前導試驗，並確認安全性才能擴展到人體。

### (子計畫九)

我們發現 2014 年台灣高雄地區流行之第一型登革病毒株可能源自印尼地區，其疫情延續至 2015 年中仍有零星病例；而 2015 年在台灣台南與高雄地區流行的第二型登革病毒株則可能由中國大陸傳入台灣，兩者皆為境外移入株。

再者，我們發現不論患者感染的型別為第一型或第二型登革病毒，或者其是否為次級感染，在感染並康復後的半年至九個月間仍可在血中偵測到一定濃度的抗登革病毒 IgG。此外，我們也發現了次級感染第二型登革病毒的患者在急性期的 IgG 與 IgM 皆顯著高於次級感染第一型登革病毒的患者，此一體液免疫反應在不同登革病毒型別感染者上的差異值得我們進一步探討。

### (子計畫十)

防治登革熱孳生最主要方法是避免積水及清除孳生源，水溝要避免積水的方法，除了注意水溝本身的洩水坡度外，亦需避免水溝內因日久遭外物碰撞所產生之凹洞；若無法改善水溝實體狀態，僅能透過定期清除水溝內淤積物及積水處，方是避免蚊蟲於水溝內大量孳生作法。

### (子計畫十一)

為避免蚊蟲孳生，首要執行孳生源清除，清除肉眼可見、人類可以尋找到的孳生源，並重複操作，而無法清除的區域則應妥善管理。若是區域內已有定期全面性的執行孳生源清除但斑蚊數量還持續偏高，則可挑選適當地點（蚊蟲頻繁活動、喜愛棲息、陰暗潮濕處..等）範圍性的噴灑百利普芬，藉由蚊蟲自動散播以滅除該區域內的 20% 隱藏性孳生源，為期一個月。

硼酸誘殺桶整合誘殺成蚊、撲滅幼蟲及觀測蚊蟲密度等功能，建議可將放置在地下室、半開放區域等較少外力影響地點的傳統誘卵桶更換為硼酸誘卵桶，將可減少觀測誘卵桶所需的人力成本、工作時間且沒有孳生蚊蟲的疑慮。

### (子計畫十二)

1. 登革熱病媒蚊成蚊比較常在住宅外面活動，但是高樓公寓的一樓與地下室也常見埃及斑蚊，第 5, 10, 15, 20 層與頂樓偶而也會捕獲病媒成蚊。
2. 住宅內外所捕獲的登革熱病媒蚊成蚊以埃及斑蚊居多，但此現象會因地域性與季節性變化而有所不同。例如：苓雅區正心里的埃及斑蚊明顯多於白線斑蚊，在調查期

間所捕獲的數量比為96:10；2015年秋季楠梓區翠屏里所捕獲的埃及白線斑蚊的比例為34:2，但是2016年夏季變成1:31。

3. 在高雄市苓雅區正心里進行的病媒蚊空間分布調查與產卵習性調查結果相當一致，即成蚊比較常在住宅外面活動，也偏好產卵於住宅外的積水容器；但是也會進入室內，在客廳、廚房與臥室產卵，尤其在二月到五月調查期間均有埃及斑蚊與白線斑蚊進入客廳、廚房或臥室產卵。臺南市南區新興區、田寮里與文華里的調查結果與高雄市苓雅區正心里大致相同。
4. 高雄市苓雅區正心里的登革熱病媒蚊仍偏好以積水容器為幼蟲孳生地，只有極小的比例(0.3%)以水溝或下水道為棲地。

#### (子計畫十三)

1. 已確認 Wolbachia(wAlbB) 菌株能在實驗室內穩定繼代，同時也確認 Wolbachia(wAlbB) 能在實驗室埃及斑蚊族群內造成 Cytoplasmic incompatibility (細胞質不相容性)，並已建立該埃及斑蚊族群。
2. 已利用多軸無人飛行載具吊掛誘集器，於高雄市楠梓區翠屏里、三民區鼎泰里以及苓雅區正心里調查環境中病媒蚊分布。此外，已成功調整多軸無人飛行載具，可施作幼蟲生長抑制劑之噴灑。同時已建立多軸無人飛行載具施作之標準流程建立，以提供未來衛生局或環保局等相關單位實施之參考。

#### (子計畫十四)

臺灣位處熱帶及亞熱帶區域，登革熱/茲卡非唯一威脅臺灣南部地區民眾健康疾病，爰建議動用國家資源培育多位熱帶疾病全方位講師人才，並專職負責巡迴於南臺灣地區(如臺南、高雄及屏東等)行政區里講授熱帶疾病相關資訊及防治方法，以提升南部地區民眾及政府部門對於熱帶疾病知能。

#### (子計畫十五)

1. 確認我國在登革熱疫情期間的確可能有經攜帶登革病毒的病媒蚊叮咬的無登革熱症狀捐血者至捐血中心捐血，雖然登革病毒在捐血者血液中的盛行率可能因為檢驗樣本數量與使用技術的靈敏度不同而有高低的差異
2. 登革病毒在捐血者血液中的盛行率可能因為檢驗樣本數量與使用技術的靈敏度不同而有高低的差異，但本研究的結果應讓我們面對以往的猜測已經成為事實，接下來應進一步思考是否在登革熱疫情時期對血袋進行登革病毒的篩檢或是提出其他

策略避免潛在的登革病毒無症狀感染者捐血，甚至是對其他與登革病毒具同樣病媒的病毒進行篩檢，例如茲卡病毒。

### (平台一)

針對第五屆登革熱國際研討會進行學員滿意度分析，以很好為 5 分、好為 4 分、普通為 3 分、需改進為 2 分、不理想為 1 分評估結果，參與人員對這場研討會有將近九成以上覺得好。另外，有少數意見針對會場的環境、研討會舉辦的時間、訊息公布、講題多樣化、建議能用中文演講等方面希望再做改進，這些意見能做為將來再次舉辦研討會時，於籌備過程中多加留意並改進的部分。

### (平台二)

建立標準檢驗流程，含病毒之核酸檢測分析(Real-Time RT-PCR)、抗體檢測及快篩試劑檢測標準作業流程，茲卡病毒、屈公病毒標準檢驗流程，2015 年登革熱檢驗收檢量為 3894 例，陽性 1985 例(50.98%)、陰性 1904 例(48.90%)、未確定 5 例(0.13%)、105 年至 10 月份收檢量為 407 例，陽性 36 例(8.85%)、陰性 361 例(88.70%)、未確定 10 例(2.46%)。本計畫並執行 2015-2016 年高雄市登革熱爆發之陽性檢體回溯性病毒型別分析目前進度為 583 例(27.46%)，Real-Time RT PCR 確認結果陰性為 94 例(16.12%)、第一型 43 例(7.38%)、第二型 442 例(75.81%)、第三型 4 例(0.69%)。

## 2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

- 辦理多元化登革熱衛教宣導 20 場次以上，總計約 1,377 人次參與。  
透過臨床醫師診斷教育訓練及社區民眾衛教宣導，將登革熱年平均致死率降至 0.4 % (含) 以下。(本年度致死率為 0%)。
- 本局於 105 年 5 月 1 日動員局內各科室成立登革熱衛教推動小組，於本局辦理各種衛教場合加強宣導登革熱及茲卡相關資訊，截至 105 年 9 月 30 日止，總計辦理 84 場次，衛教 22,955 人；另於 105 年 9 月 5 日再度成立整合式教育訓練(全方位講師)，期望全面提升本市市民登革熱及茲卡知能，並主動清除孳生源，避免登革熱及茲卡疫情發生與蔓延。

### 3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

- 本研究之成果將可為台灣地區醫護人員未來在收治具上述疾病史之登革熱患者時，在提供臨床醫療照護時能夠給予更多的關心與警覺，並在臨床上對於此類重症病患能有進一步的預警及適當的臨床處置。
- 我們應結合南台灣的重症醫師從事本土登革熱重症的研究。我們建議台灣登革熱防疫措施應特別著重於高齡社區及養護之家。
- 我們期望透過本研究可增進人們對於登革病毒在台灣地區的傳播模式、以及患者對於不同型別之登革病毒所產生免疫反應上之差異的了解，以做為未來相關醫療衛生單位針對登革熱疫情防治與控制之政策制訂上的重要參考資訊。
- 中央應動用國家資源成立衛教及研究等相關部門(如國家病媒蚊研究中心)，由專業講師負責衛教、研究人才負責研發及地方政府負責執行，透過各自專業分工及聯合作戰方式，方能打造熱帶地區最先進的防疫城市。
- 由於相對較多的登革熱病媒蚊成蚊在住宅外面被捕獲，尤其是夏季與秋季期間，意味著登革熱流行熱期戶外病媒蚊較多，因此在應減少在戶外被叮咬。
- 登革熱病媒蚊除了在住宅外面活動，也會進入大樓地下室、不同樓層與屋頂樓頂，因此除了清除地面上的積水容器，也應注意各樓層，甚至於樓頂的積水容器或適合病媒蚊產卵孳生的環境。
- 在冬季與春季期間，登革熱病媒蚊於住宅外面與公園樹叢中的數量雖然大幅降低，卻會進入室內吸血或產卵，所以應注意室內防範。
- 登革熱病媒蚊基本上仍以積水容器為幼蟲孳生地，所以積水容器清除仍是撲滅病媒蚊的首要工作之一。