

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣地區第二型登革病毒的分子流行病學與其流行潛力探  
究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-002-165-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學公共衛生學院流行病學研究所

計畫主持人：金傳春

計畫參與人員：周莒光、黃彥彰

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 12 月 30 日

台灣地區第二型登革病毒的分子流行病學  
與其流行潛力探究

**2003 NSC Report**

金傳春

**Chwan-Chuen King**

(台大流行病所教授)

**Summer, 2004**

## 中文摘要

2002 年台灣爆發生近六十年最嚴重的一次登革出血熱流行，重症與死亡病例數創歷年新高，且登革出血熱的致死率高達 8.7%，此波流行病學的重要性值得深入探討。本研究目的是探討致禍的第二型登革病毒在分子層次上的變異，分析台灣第二型登革病毒全長外套膜(envelope)基因 1485 核苷酸序列的歷年趨變。

做法是自 2001 至 2003 年登革病人血中分離出的第二型登革病毒 30 株進行 E 基因序列全長的比對，發現其有高達 99.1%~100% 的同質性，仔細分析知 2001 年的 8 株、2002 年 20 株與 2003 年兩株的相似度各為 99.6%~100%、99.5%~100% 及 99.7%，**相似性相當高**。又以 1981 年的第二型登革病毒株之 E 基因序列為基準，相較於 1987、1997、2001~2003 年所得的此型病毒 E 基因序列之相似度由 95.3% 已降至各為 94.4% 與 92.6%。演化樹比較發現：(1)台灣的**第二型登革病毒有兩群(0%~8.7% 變異)**，分別為都會型基因型別與亞洲第二基因型別；(2)2001 與 2002~2003 年可以清楚區分兩個明顯的分支，在核苷酸位置 137、291、1128 上由 2001 年 8 株的 C、A、T，至 2002-2003 年的 22 株已被取代成 T(其中一株仍維持 C)、T、C，而氨基酸位置 46 是由 2001 年的**酰胺酸(T)**被 2002 年取代為**異白胺酸(I)**，即**隨著流行時間拉長而基因序列上有一致性變化**；(3)有趣的是 2001 年與 2002 年均可看出自屏東縣東港鎮的第二型登革病毒株是和其他高雄縣/市、屏東市所分離的第二型登革病毒株有較遠的親源關係，**顯示環境的不同與流行的密度會影響病毒演化的速率，或是在不同的選擇壓力下易有不同的演化方向**；及(4)此台灣第二型登革病毒也屬於都會型(cosmopolitan)基因型別，與 1998 年自泰國、2002 年自緬甸、2003 年自越南的第二型登革病毒株不同。

綜述此都會基因型的第二型登革病毒依流行時間拉長而產生一致性變化，且在不同地區的相同環境下病毒 E 基因序列相近。由於經費侷限性，未來將比較此病毒分子變異群(quasispecies)的變化差異何在及其與宿主之間的關係。

## English Abstract

The largest epidemic of dengue hemorrhagic fever (DHF) with the highest morbidity, mortality, and case fatality rate (CFR : 8.7%) in recent sixty years exploded in southern Taiwan in 2002, since 1942. The causing agent of this DHF epidemic was primarily due to dengue virus serotype 2 (DENV-2). How could the different isolates of DENV-2 change over years in Taiwan is very important to be understood. We investigated the molecular changes of viral factors in this epidemic in KaoHsiung City/County and Pingtung City/County during 2001-2003 by elucidating the molecular changes in nucleotide and amino acid sequences of complete envelope (E) gene (1485 nucleotides) of DENV-2 through collecting the viral isolates obtained from 2001-2003 compared with those from past epidemics in Taiwan and other countries from GenBank through phylogenetic and qualitative analyses.

To determine the role of viral evolution in emerging a large-scale epidemic of DHF during 2001-2003, we analyzed the complete sequences of E gene of 38 DENV-2 isolates obtained from epidemics in 1981, 1987, 1997, and 2001-2003 in Taiwan. The maximum-likelihood phylogenetic tree analysis revealed that Taiwan's DENV-2 isolates fell into 2 clusters (diversity 0~8.7%). The 2001-2003's DENV-2 isolates, which belonged to the cosmopolitan genotype, showed 99.1%~100% sequence identity and 8, 20 and 2 DENV-2 isolates of 2001, 2002 and 2003 had 99.6-100%, 99.5-100% and 99.7% homology, respectively. The 1981's DENV-2 isolate had 95.3% nt homology with 1987's and such an identity dropped to 94.4% in 1997, and declined to 92.6% in 2001-2003. The nucleotide sequences of E gene at positions of 137, 291, 1128 of 2001's eight DENV-2 isolates had consistent changes from C, A, T to T (only one remained as C), T, C in 2002-2003's twenty-two isolates whereas the amino acid at position 46 was consistently changed from Thr in 2001 to

Ile in 2002 as the epidemic became longer. Tungkang's DENV-2 isolates showed geographic differences from Kaohsiung's DENV-2 isolates in both 2001 and 2002, implying different environmental factors or selective pressures affecting various evolution rate or directions of DENV-2. Unfortunately, there were no molecular signatures of distinct lineage for those isolates from DHF vs. DF or dengue cases with or without specific underlying diseases.

In summary, the Cosmopolitan genotype of DENV-2 came into Taiwan in 2001 and increased its diversity in 2002-2003 plus geographical variation taken together had facilitated to emerge more variants of DENV-2. Therefore, future studies on quasispecies of DENV-2 in host with different conditions and investigate pathogenesis of DHF between virus evolution and alternating hosts through transmission chains.

## 一、前言

台灣從 1870 年始有登革熱病例報告，到 1944 年間隔每幾年會有一次或大或小的流行，1945 年後登革熱消聲匿跡，直到 1981 年菲律賓回台的漁夫帶有第二型登革病毒造成琉球鄉的登革熱大流行，台灣再度受到登革病毒肆虐。至 2002 年第二型登革病毒再次襲捲南台灣，疫情從五月起源於高雄縣市交界處的前鎮、鳳山地區，並逐漸擴散至屏東縣、台南市、澎湖縣等地。為了控制疫情，從中央到地方，投入龐大的經費，動員無數的人力與物力，還是難以快速阻斷登革病毒的繼續擴散。然而在這場近六十年來最大一波的登革出血熱流行中，登革病毒在台灣有怎樣的趨變和演化？

本研究因此挑選不同流行病學意義的病毒株分析第二型登革病毒在台灣罕見的大流行中，對於巨觀的趨勢造成何種方面的影響，試圖逐步探討 2002 年對南台灣民眾這場深刻的浩劫，期許未來在登革防治上有所貢獻。

## 二、 文獻探討

登革熱/登革出血熱為人類疾病中最嚴重的一種「蟲媒」傳染病，全球每年約有估計五千萬到一億人遭受登革病毒感染，其中兩萬五千到五萬人為登革出血熱重症病例，即全球有超過一半的地區是在登革病毒的健康威脅下(Gubler 1998)。近十年的登革疫情已愈演愈烈，主因人口暴增、城市化的加速、主要病媒蚊 - 埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)也藉著交通與旅遊業的發達而擴大了傳播的版圖，在近年的登革疫情中出現與以往不同的是多種血清型別的登革病毒共同在同一個地區流行，並且登革出血熱的重症病例更出現在許多過去不曾發生的地區，自 1958 年起累計六萬名以上兒童死於登革出血熱，是造成兒童疾病率及致死率最重要的原因之一(Halstead 1990)。

### (一)、登革病毒簡介

登革病毒(dengue virus)屬於黃病毒科(*Flaviviridae*)中之黃病毒屬(*Flavivirus*)，是造成登革熱(dengue fever，簡稱為 DF)、登革出血熱(dengue hemorrhagic fever，簡稱為 DHF) 以及登革休克症候群(dengue shock syndrome，簡稱為 DSS)的病原，依照中和抗體的抗原性的不同而可分成四種血清型別，分別為第一型登革病毒(dengue virus serotype 1，DENV-1)、第二型登革病毒(dengue virus serotype 2，DENV-2)、第三型登革病毒(dengue virus serotype 3，DENV-3)、第四型登革病毒(dengue virus serotype 4，DENV-4)。

登革病毒的病毒顆粒(virion) 直徑約 40~60 nm，為有雙分子脂膜(lipid bilayer)包圍直徑約 30 nm 之殼包核酸(nucleocapsid)的球狀體。登革病毒的基因體結構是由一單股正向的核糖核酸組成，基因全長約 10,700 鹼基對(base pairs)，其外包裹蛋白質的外套膜。登革病毒的基因組(genome)可先直接轉譯(translation)為一條長的多蛋白鏈(polyprotein) 其後再經宿主與病毒酵素分別切割為不同的結構

(structure)與非結構(non-structure)蛋白。十組基因中有三個結構基因，可轉譯出三個結構性蛋白，分別是 C (capsid)、prM (precursor membrane)、E (envelope)，其功能與病毒顆粒之形成以及病毒進入宿主細胞有關。七個非結構性基因，分別為 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 與 NS5，功能主要與病毒複製子代病毒有關。在黃質病毒(Flavivirus)中，包括黃熱病毒(yellow fever virus, YFV)、日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)、蜱腦炎病毒(tick-borne encephalitis virus, TBE)及登革病毒(dengue virus, DEN)等，大部分病原性的特異生物標記均在外套膜蛋白上。過去研究指出登革病毒上的基因核苷酸或胺基酸變異可能影響病毒的毒力，如 E、NS2B、NS5 基因上的變異與人體免疫、病毒顆粒構型、與病毒活性有相關性，因此這些基因上的突變可能在人類上導致重症，但是在分子層次上決定病毒毒力的因素尚未明瞭(Twiddy, Woelk et al. 2002)。

## (二)、E 基因與 E 蛋白

E 基因的產物 E 蛋白質是登革病毒表面暴露的外套膜蛋白質(envelope protein)，由 495 個胺基酸所組成，功能與受體結合(receptor binding)、吸附細胞(cell attachment)、膜融合(membrane fusion)、組成病毒顆粒(virus assembly)以及產生宿主中和性抗體(neutralizing antibody)作用的主要蛋白質(Heinz 1986; Gritsun, Holmes et al. 1995; Chen, Maguire et al. 1996)。由於登革病毒為 RNA 病毒而有其微演化(microevolution)的突變性，再加上人群中和抗體的擇，因而此蛋白的變異，不論是在同一各地區經歷不同年代、或同一年代流行至不同地區顯得格外有趣。

E 蛋白質之結構根據蜱腦炎病毒(TBE)的 E 蛋白質可區分為 I、II、III 等三個作用區域(domains) (Rey, Heinz et al. 1995)：

1. 作用區域 I (Domain I)：由 122 個胺基酸殘基(amino acid residues)所組成，



共有三段胺基酸(residues)：1-51、137-189、285-302，其中包含可扭轉的折點(hinge region)，牽涉到不同酸鹼值而產生不同的結構(Roehrig, Bolin et al. 1998)。

2. **作用區域 II (Domain II)**：由 180 個胺基酸殘基組成，包含兩段胺基酸 52-136、190-284，其中 98-113 個胺基酸在所有黃質病毒中具有高度保存性(conservation)，且具相當的疏水性(hydrophobicity)以及較多的甘胺酸(Glycine)，推測其功能為與**膜融合**(Roehrig, Bolin et al. 1998)。
3. **作用區域 III (Domain III)**：由 93 個胺基酸殘基所組成(residues 303-395)，具有類似免疫球蛋白(immunoglobulin)的結構，與**受體結合有關**(Ruoslahti and Pierschbacher 1987)。因為在所有的黃質病毒中十分保存 E 蛋白的半胱胺酸(Cysteine)位置，因此，所有的黃質病毒(包括登革病毒在內)的 E 蛋白質之構造有其相似處。據 Hiramatsu 對於第二型登革病毒所做之抗原性分析(antigenic mapping)，可知此病毒的 **E 蛋白質抗原性區域 A** (domain A)，包含三處胺基酸(residues 1-55、79-142、225-249)相當於前述結構上之**作用區域 II**，而其**抗原區域 B** (domain B：residues 333-388)相當於前述結構上的**作用區域 III**，最後的**抗原區域 C** (residues 333-388)相當於前述結構上的**作用區域 I** (Megret, Hugnot et al. 1992; Lin, Parrish et al. 1994; Hiramatsu, Tadano et al. 1996)。

### (三)、登革病毒的基因差異與登革出血熱重症之關係

過去的研究雖然不斷探討登革出血熱重症是否歸因於特定的基因差異所致，但是在目前被提出來的核苷酸或胺基酸的改變，並沒有明確特定的病毒毒力決定位置能區辨症狀輕微的典型登革熱與較嚴重的登革出血熱，不管是試管實驗(*in vitro*)與動物實驗(*in vivo*)尚無法重覆得到良好的人體感染模式(Pandey and Igarashi 2000)，但歸納已知功能的胺基酸位置中，**E 基因胺基酸 390 的位置在 RNA 的二級結構上會影響病毒吸附宿主細胞**，推測當該位置由天門東胺酸(Asp)

改變為組織胺(His)時會增加病癥的嚴重，若由天門東胺酸(Asp)改變為天門東醯胺(Asn)時也會有較輕微的病癥，因此該位置被視為可能的毒力決定位置(Leitmeyer, Vaughn et al. 1999; Twiddy, Woelk et al. 2002)；其他在第二型登革病毒 E 基因上的已知重要位置有 **E-52 與宿主免疫擇選有關**，當在較酸的環境時會與 B 細胞反應，**85、90、144、170 與宿主免疫 T 細胞反應有關**，98、100、105 與病毒融合細胞有關，131 是酸鹼度影響病毒構型改變敏感區，因此被視為第二型登革病毒可能發生正向選殖的位置(Twiddy, Woelk et al. 2002)。而第二型登革病毒 E 基因的中和抗原決定位置(epitope)上，目前已知當株抗體(monoclonal antibody)4E11 的對應位置為 F306-E314，3H5 的對應位置為 E383-G385 與 Q386-S397，1B7 的對應位置為 A50-R57、G127-N134、與 G349-P356，4G2 的對應位置為 S274-L283，6B2/10F2 的對應位置為 P53、T69、E71、G112、N124、E311、F402，T 細胞反應的對應位置為 M1-R2、C3-N8、S16、G17、A35、N67、E79、T142、Q167、V208、F240、S274、K361、K388、I398、H437、I443、S470(Roehrig, Risi et al. 1994; Hiramatsu, Tadano et al. 1996; Falconar 1999; Lok, Ng et al. 2001; Serafin and Aaskov 2001; Thullier, Demangel et al. 2001)。

#### (四)、第二型登革病毒在東南亞與美洲基因型別的流行差異

針對第二型登革病毒的東南亞株與南美洲株分別來自不同年代、不同嚴重病癥程度(登革熱與登革出血熱病毒)的 E/NS1 基因序列進行比較發現，由演化樹的關係中可以推論南美洲的登革流行在是始於東南亞型別的第二型登革病毒引入，而受到重視的登革出血熱病毒株並沒有自成一格，而是和登革熱病例隨之散佈在原有的同登革熱所分離得的同一基因型別群，也沒有發現登革出血熱特有的生物標記(即登革出血熱病例所分離得的不同第二型登革病毒株之變異並未有其相同變異的基因或蛋白質序列而可有其如同簽印的獨特處)。也許是因早年代的登革病毒受到地裡的限制，會侷限在一個地區流行，但近幾年的登革病毒株卻

可能隨著交通快速便捷而流傳到原本不曾出現的地區(Rico-Hesse, Harrison et al. 1997)。

#### (五)、登革出血熱與登革熱的第二型登革病毒之比較

東南亞在 1950 年代盛行登革出血熱，在如此高盛行的地區與高頻率的傳播有助於登革病毒之變異的累積與演化的加速，又由於南美洲的流行與東南亞傳入的第二型登革病毒有強烈的相關性，因此長期流行登革熱/登革出血熱的泰國第二型登革病毒株受到重視。1998 年 Rico-Hesse 收集橫跨 51 年(1944~1995)在泰國長期追蹤的第二型登革病毒，包含登革熱和登革出血熱病人的第二型登革病毒共 73 株，作 E/NS1 240nt 基因定序，得到以下結論：(1)病毒的不同變異株可以同時在一個地區流行，反映出 RNA 病毒在自然界會有不同變異株群(quasispecies)的情形；(2)在觀察中發現曼谷有兩種基因型別的第二型登革病毒之流行，並且此兩種基因型別均可導致登革出血熱重症的病例，此兩種基因型別可能曾來自於同一祖先分歧後個別演化的結果，彼此分享相同的致病潛力，然而在哪一個時間點分道揚鑣，目前並沒有很清楚的劃分點(Rico-Hesse, Harrison et al. 1998)。若能預知流行的病毒株有多少潛力造成重症，對於疾病控制與未來疫苗發展上會有很大的幫助。

病毒在登革出血熱機制上佔有多重的角色？過去的研究多是部份基因即某一蛋白，全長去外推到全部，結論是不夠充分的，因此自 1999 年發表全長的登革病毒基因序列分析(Leitmeyer, Vaughn et al. 1999)，認為一級結構的病毒基因序列會影響登革出血熱的關鍵在於胺基酸導致的突變，並且經由 RNA 的二級結構的模擬，推測在 E-390 位置上由天門東醯胺到天門東胺酸(Asn→Asp)因為酸鹼性的改變，致使病毒與宿主細胞結合能力有所差，可用以作為登革出血熱的基因指標(genetic marker)；而在 5'端非轉譯的核苷酸(5'-untranslated region)68~80 因為在

結構上為深凹的型態，可能與病毒的複製相關，可惜的是登革熱和登革出血熱的病人得到的病毒基因序列並沒有很明顯的指出其確切恆定的差異之所在。

#### (六)、第二型登革病毒的基因型別

每一個基因型別均可能導致重症，只是比率的不同。以第二型登革病毒的外套膜蛋白(E gene)可歸納為五種基因型別：(1)以叢林循環史為主的「叢林基因型別」(sylvatic genotype)，(2)東南亞為主要流行區的為兩種基因型別的「亞洲基因型一與型二」(Asian genotype 1、Asian genotype 2)，(3)主要流行於南美洲的「美國基因型」(American genotype)，(4)在南美洲與東南亞交互重組的「亞美混合基因型」(American/Asian genotype)，以及(5)目前最受到重視而廣泛流行於世界各地且又造成較嚴重流行的「都會型基因型別」(Cosmopolitan genotype) (Twiddy, Farrar et al. 2002)，有許多場流行病學的證據顯示不同的基因型別主導不同臨床病癥嚴重程度或不同大小規模的流行，根據核苷酸序列演化分析，可以證明登革病毒在都會型基因型別(Cosmopolitan genotype)及亞洲基因型一與型二(Asian genotype 1、Asian genotype 2)具有「正向選擇」(positive selection)的突變現象，暗示此兩基因型的登革病毒在流行中有加速適應環境的演化，也許因此導致病毒在趨性(tropism)、致病力、傳播效率、流行潛力會隨著不同基因型別而有所差異。

綜觀上述分子流行病學研究，想嘗試能夠解釋病毒與其在不同時地之間的關係，但是對於其是否導引為登革出血熱機制，至今在病毒基因序列上尚無法得到結論答案。因此登革病毒分子流行病學之探究在目前應用主要在於探索其在世界各地流行的相關性與病毒來源的追溯等流行病學探察(Guzman, Deubel et al. 1995; Leitmeyer, Vaughn et al. 1999; Hwang, Chu et al. 2003)。

### 三、 材料與方法

#### (一)、研究設計

台灣自 1981 年第二型登革病毒在屏東縣小琉球鄉爆發以來，斷續有第二型登革病毒所造成的本土病例傳出，且多伴隨在境外移入之後，為了從 2002 年第二型登革病毒引發的這場史無前例的登革出血熱浩劫中學習經驗，本研究因此收集 2001~2003 年高雄縣、高雄市、屏東縣/市南台灣重要的三大疫區為主軸所設的警哨醫院，在流行期間所收集到的疑似病例檢體，探討：(一)、此波登革出血熱大流行之描述性分析，及(二)、以病例對照流行病學研究法，著手登革出血熱的危險因子相關性分析。因此本研究收集台灣在 1981、1987、1997、與 2001~2003 年之本土第二型登革病毒株，與分別來自泰國、菲律賓、緬甸、越南的第二型登革病毒株，比較其 E 基因全長序列(1485 個鹼基對)，探究第二型登革病毒在台灣歷年的演化及 2001~2003 年台灣的登革出血熱疫情中，第二型登革病毒在不同的流行時間與地理聚集，採用病人急性期血漿經 C6/36 cell(白線斑蚊中腸細胞株)僅一代增殖後的 PCR 產物序列分析(amplifying sequencing analysis)，以探討台灣地區不同第二型登革病毒株全長 E 基因序列的差異。

#### (二)、研究族群與病例定義

登革病例定義(case definition)是以實驗室診斷(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)為「登革病毒感染陽性者」。

登革出血熱的判定是依照世界衛生組織(WHO)定義，有以下四個要點：(1)具典型登革熱症狀:如肌肉痛、關節痛、腹痛、後眼窩痛，(2)有出血現象。如血壓帶試驗陽性、皮下出血、鼻出血、牙齦出血、血便、血尿，(3)血小板低於十萬，及(4)血漿滲出的現象:如血比容上升超過 20%、腹水或肋膜積水。

### (三)、實驗方法

#### 1、細胞培養(Cell Culture)與病毒分離(Virus Isolation)

##### (1) 細胞培養(Cell Culture)

將 C6/36 細胞於 75 T 的培養瓶中，加入 10 ml 培養基[45% DMEM 培養基(GIBCOL BRL®，Life Technologies®)]、45% M & M 培養基[SIGMA®]各 250 ml，與 50 ml (10%)之 FBS (fetal bovine serum，GIBCOL BRL®，Life Technologies®)、5 ml (1%)廣用抗生素(GIBCOL BRL®，Life Technologies®)]在 28°C 恆溫箱培養，約 3~4 天會長滿可繼代培養或進行病毒感染使用。

##### (2) 病毒分離(Virus Isolation)

由顯微鏡觀察 C6/36 蚊細胞長約七分滿即可進行，倒掉培養基後加入 1 ml 之經 50 倍、100 倍上述蚊細胞培養液加 2% FBS 稀釋的病人急性期血漿，培養兩小時使病毒感染細胞，每隔半小時搖晃一次使更多的登革病毒均質混合後可以進入細胞，吸附時間終了後加入培養基[DMEM 培養基(GIBCOL BRL®，Life Technologies®)]與 M & M 培養基[(SIGMA®)]各 250 ml，10 ml (2%)之 FBS (fetal bovine serum，GIBCOL BRL®，Life Technologies®)及 5 ml (1%)廣用抗生素(GIBCOL BRL®，Life Technologies®)]，約五到七天收回病毒。

#### 2、登革病毒核酸之萃取

##### (1) 自血漿中萃取病毒核糖核酸(RNA)

採用德國廠商所提供的萃取病毒 RNA 組裝試劑 QIAamp® Viral RNA Kit (Qiagen)來萃取病人血漿(plasma)中的登革病毒 RNA。將分裝保存於-80°C 冰箱中之病人血漿用手指搓彈解凍完全，吸取 140 µl

血漿，加入已有 560  $\mu$ l 緩衝液(Buffer) AVL/Carrier RNA 的 1.5 ml 微量離心管中，vortex 15 秒，置於室溫 10 分鐘，離心數秒打開後加入 560  $\mu$ l 100%酒精(ethanol, Merck)，震盪 15 秒左右後，將上述溶液分成兩次加入試劑組中所附之旋轉分離柱(spin column)，以 8000 rpm 離心一分鐘後，丟棄濾出液。在此旋轉分離柱(spin column)中加入 500  $\mu$ l AW1 緩衝液，以 8000 轉速(rpm)離心一分鐘後，丟棄濾出液；在此旋轉分離柱(spin column)中加入 500  $\mu$ l AW2 緩衝液，以 8000 轉速(rpm)分別離心三分鐘與一分鐘之後，丟棄濾出液。將此旋轉分離柱(spin column)置於乾淨的 1.5 ml 微量離心管中，加入 30 $\mu$ l AVE 緩衝液，置於室溫下一分鐘後，以 8000 轉速(rpm)離心一分鐘。經由上述步驟所得之溶液即為病毒 RNA 的萃取物，直接進行反轉錄作用(reverse transcription)，或保存於-80 $^{\circ}$ C 冰箱以供日後實驗需要。

## (2) 、反轉錄作用(Reverse Transcription, RT)

採用 SuperScript<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Cat. No. 18064-014, Life Technologies, USA) 試劑組以隨意引子 (random primers) 的方法做出後續實驗所需之 cDNA 模板。實驗流程如下：

將 2 $\mu$ l RNA 萃取物與 1 $\mu$ l 3 $\mu$ g/ $\mu$ l 隨意六核苷酸引子(random hexamers)、1 $\mu$ l 10mM dNTP (deoxyribonucleotide triphosphate : dATP、dTTP、dCTP、dGTP)、6  $\mu$ l DEPC(diethyl pyrocarbonate)-treated water 於 0.2 $\mu$ l 的微量離心管中混合均勻，置入溫度控制器以 65 $^{\circ}$ C 加熱五分鐘，使作為引子的隨意六核苷酸引子(random hexamers)黏附在 RNA 模板上。作用時間結束立刻取出，插入冰上，再加入 2  $\mu$ l 10 倍反轉錄作用緩衝液(10 $\times$ RT buffer)、4  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>、2  $\mu$ l 0.1 M DTT(dithiothreitol)還原劑及 1  $\mu$ l 抑制 RNA 核酸酵素的抑制劑 (RNase Recombinant Ribonuclease Inhibitor, 40 units/ $\mu$ l)之混合液，

在溫度控制器中以 25°C 作用 2 分鐘，加入 1 µl 反轉錄酵素 (Superscript II RT: 50 units/µl)，置於溫度控制器中以 25°C 10 分鐘、接續 42°C 50 分鐘，使反轉錄酵素進行反應做出互補的去氧核糖核酸(complementary DNA, cDNA)，溫度再升為 72°C 反應 15 分鐘以終止反轉錄酵素之反應進行。至此產物為 DNA-RNA 雜交物 (hybrid)，再加入 1 µl RNA 酵素 H (RNase H, 2 units/µl)，37°C 作用 20 分鐘以移除 RNA 模板。由上述步驟所得之溶液即為 cDNA 模板，將此產物直接進行聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，或儲存於 -20°C 冰箱，以供日後實驗所需。

### (3) 、**酵素鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)**

利用具有第二型登革病毒特異性結合的引子對進行兩次酵素鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)，增殖本研究欲分析的那段登革病毒基因片段。

#### (a)、**引子(primer)的設計**

參考文獻已發表之第二型登革病毒 E gene 引子對 (Leitmeyer, Vaughn et al. 1999; Uzcategui, Camacho et al. 2001)，整理後由廠商 (Mission Biotech) 合成。採用兩次 PCR (nested PCR) 的方法來增加 PCR 產物的特異性與量，因此第一次 PCR 使用的引子對所增殖者包含欲分析基因片段之較大範圍，第二次則為第一次片段中較小的基因片段。

#### (b)、**反應條件**

在 0.2µl 的微量離心管中加入 25µl 之反應物 [1µl cDNA、15.25 nuclease-free water、4µl 10µM primers、2.5µl 10×PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl)、1.25µl DMSO、0.75µl



MgCl<sub>2</sub>、0.25μl dNTP、0.1μl Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase]，最後在溫度控制器下進行 PCR。第一次 PCR 時加入 1μl RT 所得的 cDNA 產物做為 DNA 合成的模板；在第二次 PCR 時，加入第一次 PCR 產物做為 DNA 合成的模板。引子對與反應溫度如下：

**a) 分離登革病毒及確切鑑定登革病毒時所採用的引子(C/PrM)**

**(i) 第一次 PCR 的引子，即採第一、二、三、四型登革病毒 C/PrM**

上共同區域(Uzategui, Camacho et al. 2001)。

D1 5'TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'

D2 5'TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'

**(ii) 第二次 PCR (nested PCR) 的引子，即採用四種登革病毒不**

**同血清型別的引子(Leitmeyer, Vaughn et al. 1999)。**

**TS1** (type-specific DENV-1);

5'CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'

**TS2** (type-specific DEN-2) :

5'CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'

**TS3** (type-specific DEN-3) :

5'TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'

**TS4**(type-specific DEN-4) :

5'CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'

**b) E 基因全長序列的 PCR 溫度條件與反應**

95°C 3 分鐘,

95°C 45 秒、

55°C 45 秒、

72°C 45 秒 (35 循環)

72°C 10 分鐘

4°C 停止

### (c) 純化 PCR 產物

採用商用試劑組 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Cot. No. 27-9602-01) 純化 E 基因全長片段。由洋菜膠電泳法分析上述引子對增殖的基因後因為只觀察到單一特定長度染色帶，所以即直接採用將此 E 基因全長的 PCR 產物混合液以試劑組來純化。

將 50 µl PCR 產物混合液與 500µl 捕捉緩衝液(capture buffer)混合均勻加入套在收集管(collection tube)的 GFX 管柱(column)中，以 14,000 rpm 離心 30 秒，丟棄濾出液，再加入 500µl 沖洗緩衝液(wash buffer)後，以 14,000 rpm 的轉速離心 30 秒，丟棄濾出液及收集管(collection tube)。將 GFX 管柱(column)改套在 1.5 ml 的微量離心管中，加入 30µl ddH<sub>2</sub>O 於室溫靜置 1 分鐘，再以 14,000 rpm 離心 1 分鐘析出溶有 DNA 的水溶液，進行基因定序分析實驗或保存於-20 °C 冰箱，供日後使用。

### 3、去氧核糖核酸定序分析(DNA Sequence Analysis)

採用病人急性期血漿經 C6/36 cell(白線斑蚊中腸細胞株)僅一代增殖後的 PCR 產物序列分析(amplifying sequencing analysis)探討台灣歷年與境外、本土病例的登革病毒全長 E 基因序列差異。

全長序列以下列三段內涵引子(Inner sequence primer)聯合完成之：

D2H1153 : 5'CGTTGCCCAACACAAGGG -3'

D2H1490 : 5'GCTCTCCGAGAACAGGCC -3'

D2E314A : 5'GAAACACAACATGGAAC -3'

將含有 E 基因的 PCR 產物混合液經純化後，取 5  $\mu$ g 並加入 3~5  $\mu$ M 的 sequencing primers，將總體積補水至 5ul 於 2 $\mu$ l 的微量離心管中，直接序列分析送台大醫院第二共同研究室做核酸定序。

#### (四)、第二型登革病毒的 E 基因序列資料分析

- 1、 從各檢體所得之 E 基因全長由套裝軟體 DNA Star 進行排列。
- 2、 比較台灣歷年第二型登革病毒株之演化樹分析，由套裝軟體

PHYMLIP version 3.573 進行，由於登革病毒會受到不同的選殖壓力 (selection pressure) 產生不同的演化方向，因此在這種演化速率不一致的特性下，本研究選擇沒有預設相同演化速率、並且結果可以呈現不同的分支長度(branch length)的 Neighbor-Joining 統計方法，分析研究的第二型登革病毒 E 基因序列的演化距離與序列間的親源性遠近。

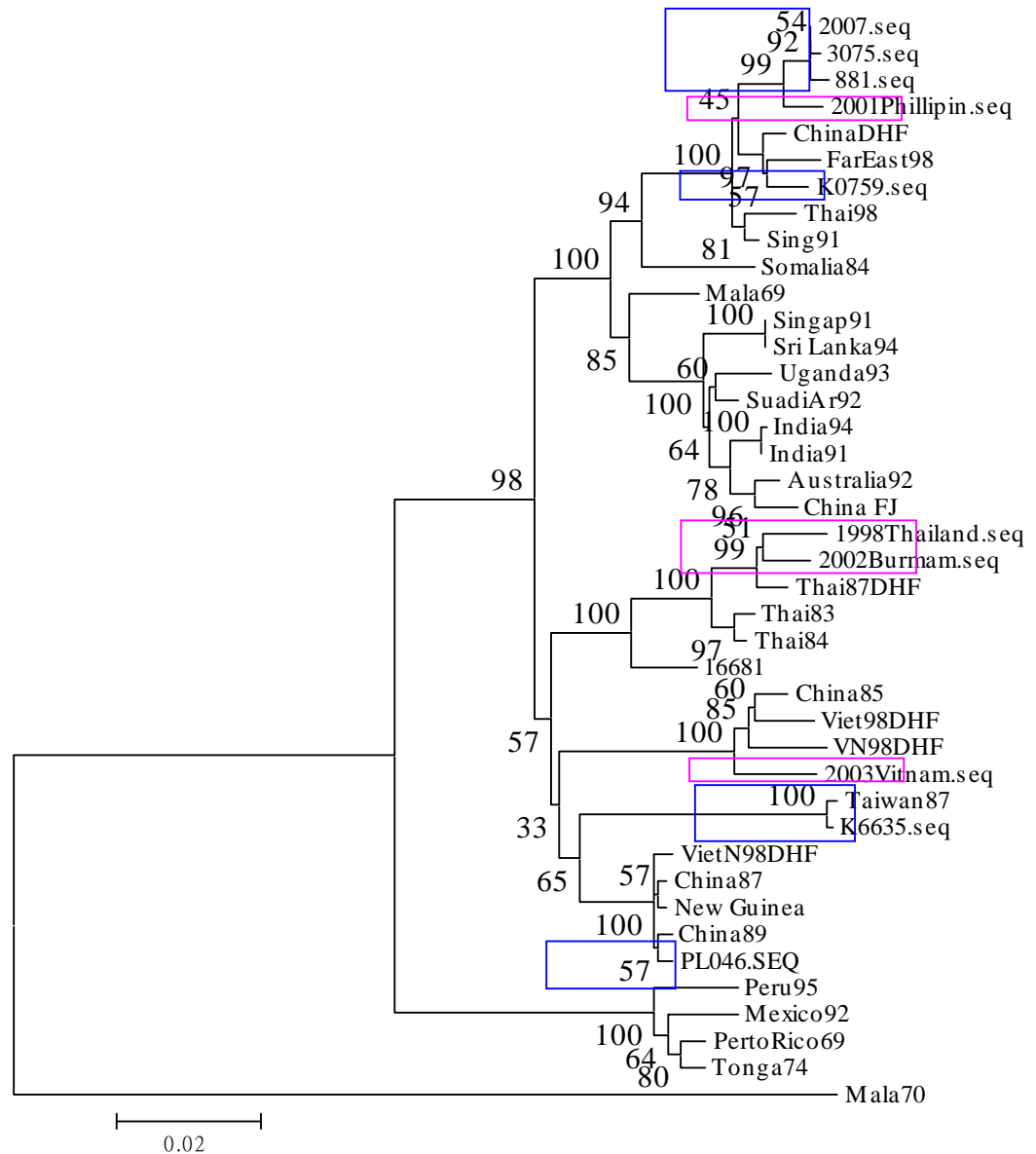
## 四、 結果

在本研究共分離 38 株第二型登革病毒，包括一株 1981、兩株 1987、一株 1997、8 株 2001、20 株 2002、2 株 2003 之本土病例，與四株分別由 1998 年泰國、2001 年菲律賓、2002 年緬甸、2003 年越南之第二型登革病毒，分析其 E 基因共 1485 個核苷酸序列全長，分析：(一)、台灣歷年第二型病毒與世界其他國家分離株之分子演化比較，(二)、台灣本土病例與境外移入之比較，及(三)、台灣歷年基因序列變異之微演化(micro-evolution)與胺基酸對結構影響探討。

### (一)、台灣歷年第二型病毒與世界其他國家分離株之分子演化比較

首先，不同年代的第二型登革病毒在基因型別上是否有所差異？**1981**年在屏東縣東港鎮分離出來的病毒與**1987**年在高雄前鎮、苓雅區的兩株本土病毒株，以及 1998 年由泰國、2002 年由緬甸、2003 年由越南境外移入的分離株在 Holmes 的第二型登革病毒分類中均是屬於**亞洲第二基因型別 (Asian Genotype 2)**；**2001~2003**年由高雄縣/市，屏東市、屏東東港鎮由本土病例所分離出的第二型登革病毒，與 2001 年由菲律賓帶回的境外移入病例分離株，均屬於近年來廣布世界的「**都會型基因型別**」(Cosmopolitan Genotype)，詳見圖一。

圖一、用 Neighbor-Joining 統計法分析第二型登革病毒 E 基因之核苷酸序列之  
分子演化樹



Phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining isolates of DEN-2 from imported cases (1998: Thailand; 2001: Philippine; 2002: Burma; 2003: Vietnam) and indigenous cases (1981 : PL046; 1987 : K6635; 1997 : K0759; 2001 : 881; 2002 : 2007; 2003 : 3075) were classified as 3 different genotypes (defined by Holmes et al., 2001)

## (二)、台灣本土病例與境外移入之比較

過去台灣登革疫情多在秋後爆發，而且是隨著「境外移入」的出現造成地區性大小不等的流行，以 1981 年屏東縣琉球鄉的第二型登革疫情為例，便是屏東漁夫自外海捕魚受困菲律賓回台後發病，造成全島超過 80% 居民感染，近年來更因為交通的便捷、人口出入境的頻繁、疫區旅遊人口眾多、以及外籍勞工的引用，台灣本土病登革疫情與境外移入病例息息相關，因此本研究在 1998 年泰國、2001 年菲律賓、2002 年緬甸、2003 年越南這四株境外移入的第二型登革病毒中，藉分子流行病學證據探討台灣第二型登革病毒之來龍去脈。在這四株境外移入病毒株中，2001 年由菲律賓帶回的病毒與 2001~2003 年流行有高達 98.9% 以上的核苷酸序列相似性(homology)，但因為該病例居住地為彰化，可能不是直接影響 2001 年流行的導火線，但由此資料顯示，**台灣的登革疫情與鄰近的高度流行國家有密切相關**；此外，來自 2002 年緬甸、2003 年越南分別與 2001~2003 年台灣本土流行的第二型登革病毒相似度分別為 92.8%~93.1% 與 92.5%~ 92.7%，顯然對本土疫情尚沒有造成重大影響；而 1998 年泰國的分離株因為沒有該年的本土病例分離株，所以無從得知其與本土疫情的相關性。

以 1981 年的第二型登革病毒株之基因序列為基準，相較於 1987、1997、2001~2003 的基因序列其相似度由 95.3% 下降至 94.4% 與 92.6%，顯示台灣在光復之後的登革疫情並無本土化的情況。回首過去台灣登革疫情多在秋後爆發，而且是尾隨在「境外移入」之後，而 2002 年的疫情卻提前至五月引爆流行，而重症病例數更達歷年新高，有研究指出：一旦登革病毒進入某地區長期流行之後，即有較大可能久留該地區，如同埋下一個定時炸彈，未來會有極高的可能性造成登革出血熱的流行，國外如聖地牙哥、泰國、菲律賓、馬來西亞，有相同的趨勢，

即登革熱病例數突然大量增加，伴隨著許多登革出血熱病人，因此在這樣的流行病學特徵觀察下，證實台灣 2001~2003 的第二型登革病毒已經本土化，在這樣超過 5788 名確定病例、橫跨三年連綿不絕及流行時間和地理(集中在南台灣)密集之下，病毒的演化與變異值得重視。

### (三)、台灣歷年基因序列變異之微演化(micro-evolution)

由 PCR 實驗室診斷出所有 2001~2003 年所收集到的疑似病例檢體中，分離出登革病毒感染陽性者皆為第二型登革病毒；在挑選基因定序分析的檢體方面，則依照時間、地點、輕重症、人口學特徵、是否有系統性疾病或慢性病與其他具有流行病意義等參數，進行分子流行病之探討，其細目茲整理於表八中。量性分析下發現：2001~2003 年的基因序列相似度為 99.1%~100%，2001 年的 8 株中相似度在 99.6%~100%之間，2002 年 20 株中相似度在 99.5%~100%之間，2003 兩株相似度更高達 99.7%。由演化樹的親緣關係(圖二)比較發現：

#### 1、演化樹分析

2001 與 2002~2003 年可以清楚區分兩個明顯的分支，表示即使在近三年來病毒基因序列高度相似性的情形下，在分子層次上仍有隨著流行時間拉長而發生一致性變化的情形，也就是說第二型登革病毒在台灣本土流行的過程，已出現「微演化」的現象，然而這種改變的趨勢在生物性與流行潛力上尚未明確而有待探究。

#### 2、地理差異

2001 年與 2002 年的兩支樹枝中可以看出，來自屏東縣東港鎮

的分離株(ID 921、ID 2644)均和其他分離株有較遠的親源關係，暗示地理的遠近差異與流行波的密度會影響病毒演化的速率，或是在不同的選殖壓力(selection pressure)下有不同的演化方向，然而屏東縣屏東市的病毒株與高雄縣/市沒有明顯區分，可能是因地理上的關係較近，因此差異度較遙遠的屏東縣東港鎮為小(圖二)。

### 3、重症與潛在病因在演化樹的比較

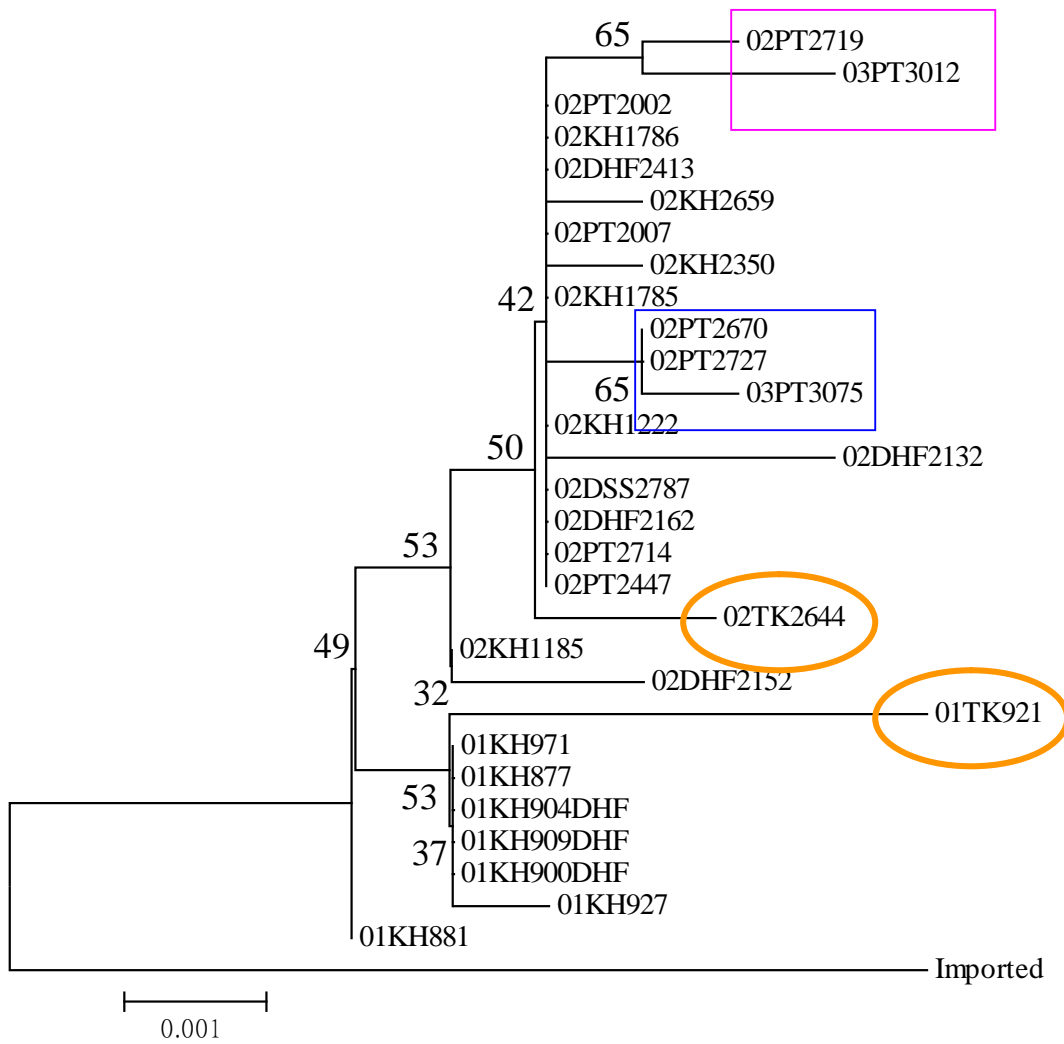
依流行病學特徵在演化樹分析下，發現疾病嚴重程度、身體是否有系統系疾病等潛在病因(underlying diseases)，均不會在演化樹上有不同的表現；與過去研究發現相同，即每一種基因型別都有造成登革出血熱的潛力，是否為登革出血熱尚無法由分子層次得到清楚(clear cut)的結論。

### 4、2001 境外移入與本土第二型登革病毒親源比較

在 30 株 2001~2003 年由本土病例分離出的病毒株與 2001 年菲律賓的境外移入的同血清型登革病毒比較，雖然兩者有極高的相似性(98.9%~99%)，但由演化樹的結果看出本土與境外仍有明顯的區隔，且該境外移入病患居住地為彰化，由流行病學邏輯推理與基因序列之實驗證據研判，該病毒株並未造成本土流行，但由此窺知台灣與鄰近的疫區仍有極度密切的相關，值得在未來防治上作為偵測的依據。

圖二、2001~2003 年第二型登革病毒 E 基因演化樹分析





KH : Kaohsiung City/County

PT : PingTung City

TK : TungKung

Isolates from the three districts showed sequence diversity cluster

## 五、 討論

分子流行病學近幾年在傳染流行病學上日益重要，不但可協助明瞭正在流行的病原微生物、協助傳染病偵測，且對新滋生傳染病流行的病原終端來源 [即在自然界的貯存窩(reservoir)]，相關聯的生態環境、微生物族群的演化變遷均有極大助益(Holm, 1998)。

在自然界中，病毒本身是一個群體，隨著流行的時地與環境而可能有所變遷，我們過去在 1998 年台南的登革出血熱流行時，即發現同一家中後面一位病患較易得登革出血熱 (Chao., et al., EID)，緊接著，由這些家庭中挑選有登革熱與登革出血熱的均為第三型登革病毒，卻又發現同一家庭且潛伏期為 3~10 天之內的登革出血熱的病人中之第三型登革病毒病毒變異群 (quasispecies)，在 E 蛋白基因的變異度 (diversity) 又遠較自同一家庭來的第三型登革病毒登革熱病人為高 (Chao., et al., 2005)。更有趣的是居然自人、蚊中均可看到許多登革病毒基因傳來傳去的跨越不同交替宿主之分子記憶性 (molecular memory)。可惜那波 1998 年流行幅度小，向疾管局正式申請一些第三型登革病人血清也要不到，所幸很感謝他們給了分離到的蚊子第三型登革病毒，但在病例樣本數的侷限，較難施展研究的更高理想以下更確切的結論。

然而第二型登革病毒又是怎樣呢?尤其我們台灣為何在 1981 年小琉球流行時卻沒有那麼多的登革出血熱病例，1987 年第二型登革病毒在屏東出沒也是如此。那麼為何於 2001 年的第二型登革病毒的那一年在高雄已造成 10 位官方報告的登革出血熱病例，到了 2002 年情況更為嚴重呢?它們這些病毒在不同年代的流行嚴重度為何有如此巨大差異，又病毒的流行潛力 (epidemic potential) 的分子層次定義為何?我們在兩年多前即申請國科會的「基因體研究計畫」，在台大內部即遭「滑鐵盧」，而 2004 年中研院何美鄉老師申請的宿主「基因體研究」也是如

此「被拒絕」命運；換言之，我們在某些審委「非常不公平的」資源侷限之下，還是很努力地想探究一些科學上非常有趣而又極富公共衛生意義的課題，及如何由科學角度協助未來防疫工作，是知識份子最重要也義不容辭的「社會責任」。

## (一)、第二型登革病毒的流行國際觀

### 1. 美洲

在 2002 年墨西哥的雲卡坦州 (Yucatan State) 發生流行所分離到的第二型登革病毒是屬於「美亞基因型」(American genotype) (Lorono-pino et al., 2004)。由於過去「美亞基因型」曾造成極為嚴重的流行，所以此型的引入以備受當局公共衛生的重視，更值得注意的是據世界衛生組織的「登革出血熱」病例定義，此波流行在 282 登革確定病例中，已有 31% 病例已是登革出血熱，且 2 人死亡，這些嚴重病例之中，有 77% 為二次感染 (secondary infectious)，顯示第二型登革病毒在 2002 年台灣南部致禍，也曾在美洲興風作浪。

以委內瑞拉的不同年代的第二型登革病毒而言 (Uzategui et al., 2001)，發現此國的病毒也可淵源於亞洲，與 1970 年代至 1980 年早期此病毒廣泛地入侵中亞區 (Caribbean region) 可說是來自「同一祖先」，其後即可見不同的演化系列第二型登革病毒同時流行著 (Co-circulating lineages)，而不像台灣過去常是每年自他國「境外移入」登革病例，更有趣的是他們居然發現 Mara 4 重組病毒 (recombinant virus) 是來自委內瑞拉與亞洲第二型登革病毒的混合種。

美洲除了上述兩國之外，其他國家如巴西的登革出血熱流行也造成巴西總統那年的困擾，他們單單同一基因型 [第三型：牙買加型 (Jamaica genotype)]

即可流行多年 (Miagostovich, 2003)。此外，秘魯的流行也不單純 (古巴國際會議)，顯示第二型登革病毒確實已在各國狂飆是流行，不但美洲、亞洲均是如此，而且快速地擴增流行地區，並增加病例的臨床嚴重度。換言之，美洲的登革出血熱「惡向」流行已步一九五零年代東南亞嚴峻流行之後塵。

## 2. 亞洲

有趣的是泰國的第二型登革病毒卻綿延不斷地流行了二十年，因而造成「高度的地方性流行」(hyper-endemicity)，我們可以看到不同年代的第二型登革病毒是隔幾年因伴隨的他種血清型登革病毒出沒而變異 (Zhang et al., 2004 年泰國曼谷登革疫苗會議)。在越南的情形也類似(Twiddy et al., 2002)，且由都會基因型別佔優勢。換言之，免疫選擇 (selection pressures) 是登革病毒變異極為重要的演化選擇壓力之所在。

亞洲許多國家如印度早在七 0 至八 0 年代並沒有嚴重的登革出血熱流行，近年卻也無可倖免。顯而易見的是若以病毒的 C-PrM 區看第二型登革病毒之演化，可見印度 1967 年代的第五型基因型 (Genotype V) 已被 1996 年的第四基因型所取代 (Singh and Seth, 2001)，此情況與其他南美諸國與斯里南卡 (Sri Lanka) 雷同，即新入侵的基因型別取代舊有的同血清型另一基因型別之登革病毒 (即有競爭「優勢」) 之後，極易引發登革出血熱。

### (二)、 第二型登革病毒的基因型別與流行潛力

台灣 1981 年的第二型登革病毒是屬於亞洲第二基因型別 (Asian Genotype 2)，而 2001~2003 年所分離出的第二型登革病毒則屬於都會型基因型別 (Cosmopolitan Genotype)，基因型別的不同有可能導致在重症表現上差距的原因之一。

過去的登革流行中較常被討論登革病毒的兩個基因型別是亞洲基因型別(Asian Genotype)與美洲基因型別(American Genotype)，第二型登革病毒亞洲基因型別較常出現在亞洲流行，**流行病學的觀察中發現第二型登革病毒亞洲基因型別較容易導致登革出血熱**，第二型登革病毒美洲基因型別牽涉較零星(sporadic)的流行與輕微的典型登革熱，許多研究顯示不同基因型別具不同的流行潛力，然而近年交通頻繁各地往來便易，病毒也隨著這潮流打破固有藩籬散佈到世界各地，因此不同的基因型別在大鎔爐的混合下很快的演化出新的基因型別來，2002 年有學者提出**第二型登革病毒都會型基因型別(cosmopolitan genotype)**跨越國家疆域而出現在世界五大洲的基因型別，流行特徵**多造成重大傷亡與較大波的疫情**，尤其它在**E-390**位置上的氨基酸多為絲胺酸(Serine)。在老鼠實驗上已發現該位置上的差異會影響病毒進入細胞的趨性，使老鼠在感染此特定基因型別的第二型登革病毒後病程有較嚴重的傾向，證明都會型基因型別**具較高的毒力**(Sanchez and Ruiz 1996)，後人將此重要位置繼續研究，發現 E-390 位置為絲胺酸(Serine)的第二型登革病毒與人體宿主的 B 細胞中和抗原決定位置有關，可以預測其病成嚴重度(Bray, Men et al. 1998)。

### **(1) 亞洲第二基因型別(Asian Genotype 2)**

此基因型別於可搜尋到的基因庫中，發現最早在 1944 年新幾內亞(New Guinea)已經分離出，其後在 1980 年代造成亞洲地區的流行，包括最早期的菲律賓與 1981 年台灣小琉球第二型登革病毒流行事件，接著在斯里蘭卡與中國均有該基因型的病毒株被分離出，1987 年台灣的第二型登革病毒也屬於此基因型別，直到近年(1998~2001)仍在越南流行(Twiddy et al., 2002)。

### **(2) 都會型基因型別 (Cosmopolitan Genotype)**

此基因型別在基因庫的蒐集中，發現這個近年的當紅炸子雞其實早在 1969 年的馬來西亞(Malaysia)就出現，1970 年代主要均在印尼(Indonesia)分離出，1980 年代版圖擴充到斯里蘭卡與索馬利亞，1990 年代後便同時出現在中國、太平洋群島、新加坡、澳洲、烏干達、印度、泰國、沙烏地阿拉伯以及台灣，表示它並非新崛起的基因型別，反而是蟄伏許久，在近年來快速散播而在許多國家均有疫情傳出。

不管是亞洲第二基因型別、都會型基因型別，均是過去被歸類為毒力較高的基因型別，但是在台灣流行表現上仍有差異，顯示即使單一病原因素無法決定流行大小，還需要環境與其他因素的配合。

### (三)、1981、1987 年與 2001~2003 年第二型登革病毒所造成的疫情比較

1987 年的登革疫情共 527 登革確定病例，第一型登革病毒占 98.34% (298/303)，第二型登革病毒僅占 1.65% (5/303)，在屏東縣東港鎮主要流行地區的三民區又多為第一型登革病毒，造成次年在高雄爆發第一型登革病毒大流行，超過 4800 人感染。相較於 1981 年與 2001~2003 年同為第二型登革病毒所造成的疫情比較，發現其生態較不一致，尤其以血清型別來說，1987 年與第一型登革病毒共同競爭高雄市，牽涉較複雜，然而該年同時地的較勁下，第一型與第二型登革病毒並沒有同時坐大，反而有強弱勢的消長，此特點與東南亞國家四型循環的情況不同。

### (四)、研究限制

1. 探討各基因型別在世界上的來龍去脈是很有興趣的，但是基因庫中的序列不是每個做完的人都上傳，因此在這方面的資料收集捉襟見肘，是

本研究在基因型別探討上受限的原因。在此特別感受到學術界合作的重要性。

2. 台灣早期的登革流行較缺流行病學資料，較難掌握某登革病毒株的來龍去脈。
3. 本研究受時間、經費與所蒐集的登革病毒株之侷限，許多分析仍在努力中。

## 六、參考文獻

- Bray M, Men R, Tokimatsu I, Lai CJ. (1998) Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. *J Virol.* Feb;72(2):1647-51.
- Chen, Y., T. Maguire, et al. (1996). "Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells." *J Virol* 70(12): 8765-72.
- Dash PK, Parida MM, Saxena P, Kumar M, Rai A, Pasha ST, Jana AM. ( 2004 ) Emergence and continued circulation of dengue-2 (genotype IV) virus strains in northern India. *J Med Virol.* 74(2):314-22.
- Falconar, A. K. (1999). "Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins." *Arch Virol* 144(12): 2313-30.
- Fong MY, Koh CL, Lam SK. ( 1998 ) Molecular epidemiology of Malaysian dengue 2 viruses isolated over twenty-five years (1968-1993). *Res Virol.* 149(6):457-64.
- Gritsun, T. S., E. C. Holmes, et al. (1995). "Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis." *Virus Res* 35(3): 307-21.

- Gubler, D. J. (1998). "The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future." *Ann Acad Med Singapore* 27(2): 227-34.
- Guzman, M. G., V. Deubel, et al. (1995). "Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic." *Am J Trop Med Hyg* 52(3): 241-6.
- Halstead, S. B. (1990). "Global epidemiology of dengue hemorrhagic fever." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 21(4): 636-41.
- Heinz, F. X. (1986). "Epitope mapping of flavivirus glycoproteins." *Adv Virus Res* 31: 103-68.
- Hiramatsu, K., M. Tadano, et al. (1996). "Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence." *Virology* 224(2): 437-45.
- Holmes EC. (1998) Molecular epidemiology and evolution of emerging infectious diseases. *Br Med Bull.* 54(3):533-43.
- Hwang, K. P., P. Y. Chu, et al. (2003). "Molecular epidemiological study of dengue virus type 1 in Taiwan." *J Med Virol* 70(3): 404-9.
- Leitmeyer, K. C., D. W. Vaughn, et al. (1999). "Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis." *J Virol* 73(6): 4738-47.
- Lin, B., C. R. Parrish, et al. (1994). "Localization of a neutralizing epitope on the envelope protein of dengue virus type 2." *Virology* 202(2): 885-90.
- Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA, Zapata-Peraza AL, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Garcia-Rejon JE, Diaz FJ, Blitvich BJ, Andrade-Narvaez M, Jimenez-Rios E, Blair CD, Olson KE, Black W 4th, Beaty BJ. (2004) Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 71(4):485-92.



- Megret, F., J. P. Hugnot, et al. (1992) "Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein." *Virology* 187(2): 480-91.
- Miagostovich MP, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Lanciotti RS. ( 1998 ) Molecular epidemiology of DEN-2 virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 93(5):625-6.
- Pandey, B. D. and A. Igarashi (2000). "Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses." *Microbiol Immunol* 44(3): 179-88.
- Rey, F. A., F. X. Heinz, et al. (1995). "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 A resolution." *Nature* 375(6529): 291-8.
- Rico-Hesse, R., L. M. Harrison, et al. (1997). "Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas." *Virology* 230(2): 244-51.
- Rico-Hesse, R., L. M. Harrison, et al. (1998). "Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand." *Am J Trop Med Hyg* 58(1): 96-101.
- Roehrig, J. T., P. A. Risi, et al. (1994). "T-helper cell epitopes on the E-glycoprotein of dengue 2 Jamaica virus." *Virology* 198(1): 31-8.
- Roehrig, J. T., R. A. Bolin, et al. (1998). "Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica." *Virology* 246(2): 317-28.
- Ruoslahti, E. and M. D. Pierschbacher (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." *Science* 238(4826): 491-7.
- Sanchez IJ, Ruiz BH. (1996) A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol.* 77 ( Pt 10):2541-5.
- Serafin, I. L. and J. G. Aaskov (2001). "Identification of epitopes on the envelope (E) protein of dengue 2 and dengue 3 viruses using monoclonal antibodies." *Arch Virol* 146(12): 2469-79.

Singh UB, Seth P. ( 2001 ) Use of nucleotide sequencing of the genomic cDNA fragments of the capsid/premembrane junction region for molecular epidemiology of dengue type 2 viruses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 32(2):326-35.

Thullier, P., C. Demangel, et al. (2001). "Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism." *J Gen Virol* 82(Pt 8): 1885-92.

Twiddy, S. S., C. H. Woelk, et al. (2002). "Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature." *J Gen Virol* 83(Pt 7): 1679-89.

Uzcategui, N. Y., Camacho D., et al (2001) "Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination." *J Gen Virol.* 82(Pt 12):2945-53.

## 七、致謝

在 2002 年台灣發生首度最大一波登革出血熱流行，我們「手無寸鐵」仍在「赤字」中努力。

本研究首先感謝各地警哨醫師及地方衛生單位的鼎力協助，才可有檢體進行此項研究，雖然我們曾向疾管局申請歷年第二型登革病毒，公文來回費時，也只得到 4 株病毒，沒有像成大一下子得到數百支登革血清，但仍十分真心感謝。本研究群更要謝謝過去多年高醫黃高彬、成大劉清泉兩醫師教導登革出血熱的臨床表徵與判斷及台大微生物所王維恭老師的實驗指導，並在此特別致謝美國疾病管制中心張光正老師的技術指導與中研院林宜玲老師所提供的病毒株。

雖然我們的資源與經費不多，但是仍銘謝遇到不少「好心人」熱心襄助。資料仍陸續分析中，以力求改進。