

フラビウイルス遺伝子の増幅を検討した。その結果蚊によって媒介される日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、デングウイルス、ダニによって媒介されるロシア春夏脳炎ウイルス、さらにコウモリから分離されたフラビウイルスであるヨコセウイルスを検出することが可能なフラビウイルス共通プライマーを作製することに成功した。

そこで我々は本プライマーをフラビウイルス感染症の迅速診断に応用し、北海道における蚊のフラビウイルス保有状況の調査を行った。

B. 研究方法

小樽検疫所管内蚊族成虫調査

小樽検疫所管内の小樽港、石狩港、留萌港、稚内港、紋別港、網走港、花咲港、釧路港、苫小牧港、室蘭港、函館港、千歳空港、旭川空港、函館空港(図1-A)(苫小牧港、室蘭港、千歳空港の調査は千歳空港で実施)において、炭酸ガス・ライトトラップ法(図1-B)により蚊族成虫の捕集を実施した。

ライトトラップは、事前に設定した各定点に、ライトの高さを約1.5mにして、ドライアイス約1kgを入れたボックスをラップの上に吊るし、夕刻に設置し翌朝に回収した。

フラビウイルス検査

① 蚊からの粗抽出液作製：同時に捕集した同種の雌蚊を1.5mLマイクロチューブに入れ、300 μ Lのリン酸緩衝液を加えマイクログラインダーを手動で動かし磨砕した。十分に磨砕した後、10,000回転で10

分間遠心し、上清を200 μ Lを回収した。

② ウイルスRNAの抽出と精製：ウイルスRNAの抽出と精製は、High pure viral RNA kit (Roche) を使用した。i) 200 μ LのPBS粗抽出液を1.5mLマイクロチューブに入れ、Working solution 400 μ Lを加え、ピペッティングでよく混和し、室温で、10分間不活化する。ii) フィルターチューブと回収チューブを連結させ、反応液600 μ Lを注いだ。iii) 10,000回転、15秒間遠心した。iv) ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、500 μ LのInhibitor removal bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。v) ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、450 μ LのWash bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。vi) ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、再度、450 μ LのWash bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。vii) 回収チューブを外し、空のチューブを連結し、12,000回転、10秒遠心した。viii) 回収チューブを捨て、新しい1.5mLチューブにフィルターチューブを連結させ、50 μ LのElution bufferを加え、10,000回転、1分間遠心した。ix) 得られた精製RNAはすぐに使用しない場合は-80 $^{\circ}$ Cで保管した。

③ RT-PCR反応：RT-PCR反応はフラビウイルス共通プライマー i) FVcx.8695s : atg act gac acc aca gcc tt、ii) FVcx.9044c : tct ctc ttg ccc atc atg tt を使用しRT-PCRキット、Access Quick RT-PCR System (Promega) にて行った。RT-PCR終了後、反応生成物5 μ Lを2%アガロースゲル電気泳動(100V、約30分)を行い、エチジウムブロマイド溶液(10mg/mL)に20分染色し、PCRによって増幅されたDNA

の断片を確認した。

C. 研究結果

小樽検疫所管内蚊族成虫調査

平成20年5月13日から10月22日までの間、小樽検疫所管内で実施した調査結果は、小樽港（調査9回・27カ所、捕集12カ所・62匹）、石狩港（調査1回・2カ所、捕集なし）、留萌港（調査1回・1カ所、捕集なし）、稚内港（調査10回・10カ所、捕集3カ所・12匹）、紋別港（調査1回・1カ所、捕集1カ所・1匹）、網走港（調査1回・1カ所、捕集1カ所・38匹）、花咲港（調査7回・7カ所、捕集なし）、釧路港（調査10回・10カ所、捕集なし）、函館港（調査8回・8カ所、捕集なし）、旭川空港（調査13回・19カ所、捕集2カ所・2匹）、函館空港（調査10回・10カ所、捕集なし）であった。捕集した蚊族の種類は、アカイエカ68匹、セスジヤブカ40匹、キンイロヤブカ3匹、ヤマトヤブカ1匹、トウゴウヤブカ1匹、ハマダライエカ1匹の6種で全て雌蚊115匹であった。

フラビウイルス検査

同時に捕集した同種の雌蚊 21 プール 114 匹について検査を行った（表 1）。その結果、全 21 検体においてフラビウイルス陰性であった（図 2）。（5 月小樽港で捕集されたアカイエカ 1 匹は、横浜検疫所輸入食品・検疫検査センターで実施した。）

D. 考 察

日本脳炎は東アジアから東南アジア、南アジア地域に広く分布している。感染者の多くが無症状に終わるがひとたび発症すると死亡率 20-40%で、幼少児や高齢者で

は死亡の危険が大きい。本邦では 1966 年までは毎年 1,000-5,000 人以上の患者が発生していたが、その後患者数は激減し 1992 年以降は 10 人以下の患者発生に留まっている。これはワクチン接種の普及と農業および畜産業の近代化、衛生環境の整備等によると考えられる。しかし日本ではコガタアカイエカとブタの間で日本脳炎ウイルスの感染環が形成されており、現在も北海道を含む全国において免疫力のない若いブタが毎年日本脳炎に暴露されていることが疫学的調査から明らかとなっている。したがってヒトへの感染の危険性は依然として存在すると考えられ、現在も日本脳炎に対する警戒が必要となっている。またウエストナイルウイルスは自然宿主であるトリからイエカ属やヤブカ属の広い宿主域の蚊を媒介してヒトやウマに感染する。ウエストナイルウイルスは世界中の熱帯・温帯地域に分布し近年は米国において 10 年間におよび流行が継続している。またロシア東部においてもその存在が報告されている。したがってウエストナイルウイルスが日本に侵入する可能性は否定できない。

本研究においては夏期において北海道の各地点から 6 種 114 匹の蚊を採取し解析を行った結果、いずれの蚊のプールからもフラビウイルスは検出されなかった。またいずれの地点からも日本脳炎ウイルスの主な媒介蚊であるコガタアカイエカは採取されなかった。しかしながらウエストナイルウイルスを媒介する可能性が考えられる多くのイエカ属、ヤブ蚊属の蚊が採取されたため今後も引き続き調査を行う必要が示唆された。

E. 結 語

フラビウイルス感染症はひとたび発症し重篤化するとその致死率は高く、予後不良である。またその治療法は確立されていないので、その予防対策が重要である。従って今後も蚊のフラビウイルス保有調査を含めたフラビウイルスの動態調査を行うことが予防対策として重要である。

F. 健康危険情報

特記することなし

G. 研究発表

1. 論文発表

特記することなし

2. 学会発表

C. Lim, A. Kotaki, T. Takasaki, I. Kurane. Development of Universal Primers for Rapid Detection of Flavivirus. The Second International Conference on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (Phuket, Thailand) 2008/10/15-17

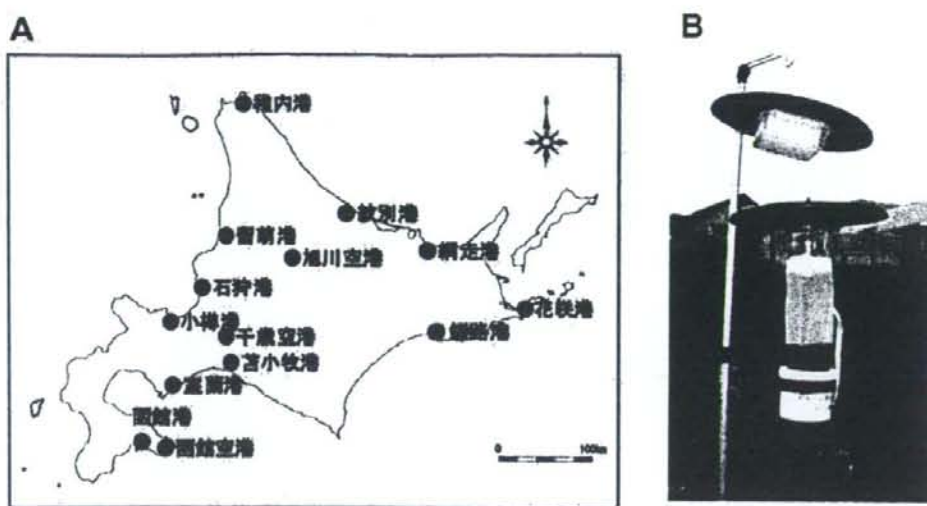


図1. 蚊捕集地域と捕集方法：(A) 平成20年5月13日から10月22日までの間の蚊の捕集地域を示す。調査の結果、小樽港（調査9回・27カ所、捕集12カ所・62匹）、石狩港（調査1回・2カ所、捕集なし）、留萌港（調査1回・1カ所、捕集なし）、稚内港（調査10回・10カ所、捕集3カ所・12匹）、紋別港（調査1回・1カ所、捕集1カ所・1匹）、網走港（調査1回・1カ所、捕集1カ所・38匹）、花咲港（調査7回・7カ所、捕集なし）、釧路港（調査10回・10カ所、捕集なし）、函館港（調査8回・8カ所、捕集なし）、旭川空港（調査13回・19カ所、捕集2カ所・2匹）、函館空港（調査10回・10カ所、捕集なし）広い範囲から検体を得た。(B) 蚊族成虫の捕集を炭酸ガス・ライトトラップ法によりを実施した。ライトトラップは、事前に設定した各定点に、ライトの高さを約1.5mにして、ドライアイス約1kgを入れたボックスをラップの上に吊るし、夕刻に設置し翌朝に回収した。

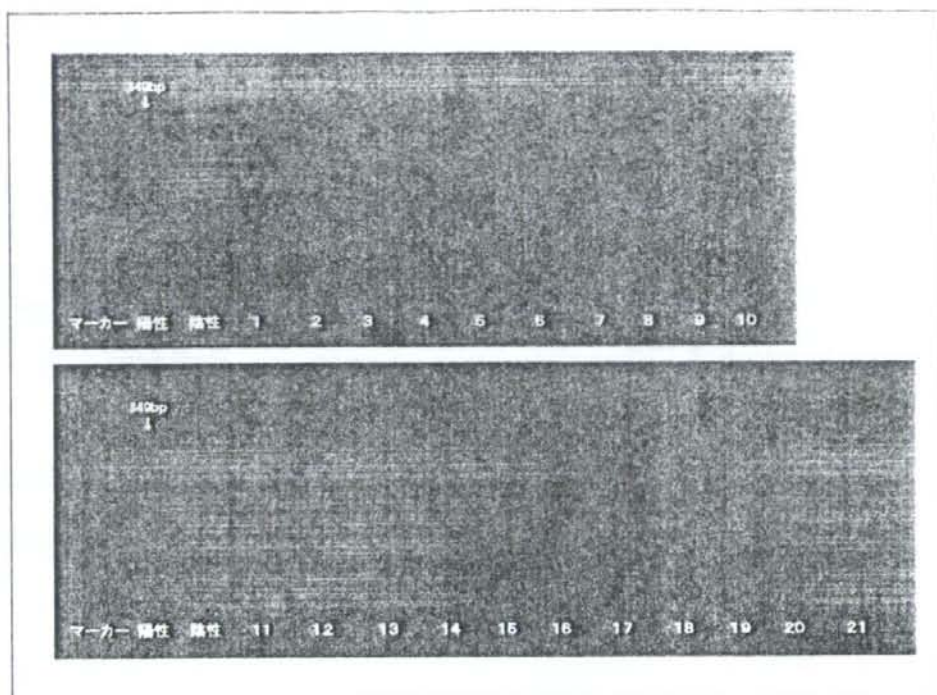


図2. RT-PCRによるフラビウイルス遺伝子の検出：捕集した同種の雌蚊21ブール114匹について検査を行った。電気泳動の結果は全21検体においてフラビウイルス陰性であった。各検体は1. アカイエ蚊♀1頭、2. アカイエ蚊♀1頭、3. ヤマトヤブ蚊♀1頭、4. アカイエ蚊♀8頭、5. アカイエ蚊♀7頭、6. アカイエ蚊♀1頭、7. キンイロヤブ蚊♀3頭、8. アカイエ蚊♀10頭、9. アカイエ蚊♀5頭、10. アカイエ蚊♀3頭、11. トウゴウヤブ蚊♀1頭、12. アカイエ蚊♀5頭、13. セスジヤブ蚊♀32頭、14. ハマダライエ蚊♀1頭、15. アカイエ蚊♀8頭、16. アカイエ蚊♀15頭、17. アカイエ蚊♀1頭、18. セスジヤブ蚊♀8頭、19. アカイエ蚊♀1頭、20. アカイエ蚊♀1頭、21. アカイエ蚊♀1頭である。

表1 小樽検疫所管内におけるフラビウイルス検査結果

	捕集日	捕集場所	3次メッシュ※	捕集種及び数	気温 (°C)		検査結果
					最高	最低	
1	6月17日	小樽港	6441-60-21	アカイエカ♀1	17.6	12.7	陰性
2	6月23日	小樽港	6441-60-40	アカイエカ♀1	23.2	13.5	陰性
3	7月24日	小樽港	6441-60-40	ヤマトヤブカ♀1	23.9	19.8	陰性
4	7月24日	小樽港	6441-60-40	アカイエカ♀8	23.9	19.8	陰性
5	7月24日	小樽港	6441-60-30	アカイエカ♀7	23.9	19.8	陰性
6	7月25日	旭川空港	6542-33-96	アカイエカ♀1	24.7	14.8	陰性
7	7月29日	稚内港	6841-05-85	キンイロヤブカ♀3	22.5	15.7	陰性
8	7月30日	小樽港	6441-60-40	アカイエカ♀10	27.1	17.3	陰性
9	7月30日	小樽港	6441-60-30	アカイエカ♀5	27.1	17.3	陰性
10	7月30日	小樽港	6441-60-21	アカイエカ♀3	27.1	17.3	陰性
11	8月6日	網走港	6624-02-23	トウゴウヤブカ♀1	30.1	18.5	陰性
12	8月6日	網走港	6624-02-23	アカイエカ♀5	30.1	18.5	陰性
13	8月6日	網走港	6624-02-23	セスジヤブカ♀32	30.1	18.5	陰性
14	8月11日	旭川空港	6542-43-06	ハマダライエカ♀1	29.0	13.7	陰性
15	8月14日	小樽港	6441-60-40	アカイエカ♀8	27.6	21.1	陰性
16	8月14日	小樽港	6441-60-30	アカイエカ♀15	27.6	21.1	陰性
17	8月25日	紋別港	6643-42-09	アカイエカ♀1	19.8	13.2	陰性
18	8月27日	稚内港	6841-05-85	セスジヤブカ♀8	18.3	15.8	陰性
19	9月5日	稚内港	6841-05-85	アカイエカ♀1	23.0	15.1	陰性
20	9月11日	小樽港	6441-60-40	アカイエカ♀1	27.7	12.5	陰性
21	9月11日	小樽港	6441-60-30	アカイエカ♀1	27.7	12.5	陰性

※3次メッシュ：総務省統計局の標準地域メッシュ

チクングニヤ熱の疫学に関する研究

分担研究者 高橋 和郎 (大阪府立公衆衛生研究所 副所長兼感染症部長)

研究協力者 青山 幾子、弓指 孝博、加瀬 哲男

(大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課)

研究要旨

チクングニヤ熱は蚊によって媒介されるウイルス性の熱性疾患であり、現在まで国内での流行はみられず、輸入症例も少ない。チクングニヤウイルスに対する抗体検査において、特異的 IgM 抗体の検出は最近罹患した証拠となり診断材料として重要であるが、IgM 抗体の持続期間については明らかになっていない。本研究では、チクングニヤ熱感染後のウイルス特異的 IgM 抗体の持続期間について検討するため、当所に搬入されたチクングニヤ熱症例のウイルス学的検査を行い、経時的に血清を採取して抗体価の推移を調査した。その結果、チクングニヤウイルス特異的 IgM 抗体が感染後少なくとも 3~4 ヶ月まで検出できることが示された。

A. 研究目的

チクングニヤ熱は蚊によって媒介される熱性疾患で、発熱・関節痛・発疹の 3 主徴を呈し、ときに出血傾向が認められる。同じく蚊媒介性感染症であるデング熱やウエストナイル熱などと流行地域が部分的に重なっており、症状も類似しているため、海外から帰国した発熱患者では、これら疾患の鑑別診断を適切に行うことが必要となる。実験室診断として、ウイルス分離・遺伝子検査・抗体検査などが行われるが、急性期を過ぎたサンプルではウイルス分離や遺伝子検査が陰性となる場合があり、抗体検査の結果が重要となる。またウイルス特異的 IgM 抗体の検出は最近の感染を示すため重視されるが、チクングニヤウイルス感染後のウイルス特異的 IgM 抗体が検出される期間について報告したものはほとんどない。そこで、本研究では、当所に搬入されたチクングニヤ熱症例のウイルス学的検査を行い、経時的に血清を採取して抗体価の推移を調査し、IgM 抗体の持続期間につ

いて検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 症例の概要

患者は 37 歳男性、大阪府堺市在住。2008 年 7 月 16 日にインドへ赴任し、同月 26 日から 39.0℃ の発熱、頭痛、全身の関節痛を認め、現地のクリニックを受診した。抗菌薬を処方され服用したが、同日夜間に病状が悪化して他院を受診し入院となった。4 日間抗菌薬を内服し、7 月 29 日に解熱した。その翌日から顔以外にまだら模様の発疹が出現したが、数日で軽快し 8 月 1 日に退院した。入院中、医師は典型的なチクングニヤ熱であると診断しており、急性期採血での抗チクングニヤウイルス抗体は陰性であった。その後 8 月 8 日に帰国し、発熱はみられず食欲もあつたが、全身の関節痛が 8 月中旬より特に強くなったため、9 月 8 日に近医を受診し、精査加療目的にて 9 月 22 日大阪市立総合医療センターを受診した。

受診時の主訴は、右手首・左右近位指節間関

節・右膝・左足関節に違和感(突っ張るような感じがする)であった。理学的所見は異常なく、体温 36.6℃、意識清明、全身の関節には明らかな腫脹・疼痛・変型を認めなかった。血液検査は、(9月8日)WBC 11200/ μ l、Hb 17.8g/dl、Plt 25.0万/ μ l、CRP 0.0mg/dl、AST/ALT 52/89、(9月22日)WBC 9,810/ μ l、Hb 17.0 g/dl、Plt 20.8万/ μ l、AST/ALT 60/106であった。

(2) ウイルス特異的遺伝子の検出

第58病日(9月22日)に採血した血清について、ウイルス学的検査を実施した。渡航歴がインドであることから、鑑別診断のためデング熱についても検査を実施した。

遺伝子検査として、チクングニヤウイルスとフラビウイルスに対するRT-PCRを実施した。チクングニヤウイルス特異的プライマーは、長谷部らの報告した CHIKnsp1-S/nsp2-C、CHIKI1-S/E1-Cと国立感染症研究所のマニュアルに記載されている Chik10294s/10573c を用いた。また、フラビウイルス検出用プライマーとして森田らの報告した YF1/YF3 を用いた。

(3) ウイルス特異的抗体の検出

第58病日の血清について、デングウイルスに対するIgM、IgG抗体検出ELISA(Dengue IgM、IgG-capture ELISA、Panbio 製)、チクングニヤウイルスに対する特異的IgM抗体検出ELISA(国立感染症研究所に依頼)、チクングニヤウイルスに対する中和抗体価測定(50%ブランク減少法)、間接蛍光抗体法を実施した。間接蛍光抗体法は、日本脳炎ウイルス(JaGAr01株)感染Vero細胞、デングウイルス(1、2、3、4型)感染Vero細胞、チクングニヤウイルス感染VeroE6細胞の6種を固定した抗原スライドを用いた。

また上記の検査でチクングニヤ熱による感染症と確定診断された後、主治医より患者の同意を得

て毎月採血を行い、抗体検査を継続した。採血日は2008年11月11日、12月9日、2009年1月6日、2月3日で、それぞれ発症してから108、137、164、192病日であった。

C. 研究結果

第58病日の血清におけるウイルス学的検査について表1に示した。

チクングニヤウイルスとフラビウイルスの遺伝子検査は陰性であった。またELISA法でデングウイルスに対するIgM、IgG抗体は陰性判定となり、デング熱の感染は否定された。間接蛍光抗体法では、チクングニヤウイルスに対するIgM抗体、IgG抗体が共に陽性となった。中和抗体価測定でもチクングニヤウイルスに対して中和抗体を持つことが示され、チクングニヤウイルスに対するIgM ELISAも陽性と判定されたことから、この症例はチクングニヤ熱感染症と確定された。

また、経時的に採取した血清の抗体価について表2に示した。血清中のチクングニヤウイルスに対する特異的IgM抗体は間接蛍光抗体法で第58病日まで、ELISA法で108病日まで陽性となり、約3~4ヶ月間検出可能であることが判明した。また、この間IgG抗体は間接蛍光抗体法で陽性を維持し、同様に中和抗体も11月以降同じ抗体価を維持していた。

D. 考察

本症例の血清学的検査において発症後2か月を経過してもウイルス特異的IgM抗体が検出されたことは特記すべき点であり、初感染と診断する診断的有用性は大きい。また、遺伝子検査が陰性となった理由は、検体が58病日の血清で、チクングニヤ熱のウイルス血症の時期は過ぎており、血中のウイルス量が検出限界以下であったためと考えられる。

また、経時的な抗体測定の結果から、IgM抗

体は発症後約 3～4 ヶ月まで検出可能であることが判明し、持続する期間が長いことが示された。

チクングニヤウイルスは、1953 年にタンザニアで初めて分離され、アフリカやアジアで散発的な流行が認められていたが、2005 年コモロ諸島などで大規模な流行が発生した。その後インド洋諸島国に拡大し、インドやスリランカで流行がみられ、現在シンガポール、マレーシア、インドネシアなど東南アジアでも流行が報告されている。また、2007 年イタリア北部でインドからの輸入感染症患者が原因と考えられるチクングニヤ熱が流行し、約 300 人の患者が発生、死亡例が 1 例報告された。イタリアにおける本疾患の媒介蚊は、日本にも生息するヒトスジシマカであるため、我が国へチクングニヤ熱が侵入した場合、流行する危険性があると示唆されている。

本邦で確認されたチクングニヤ熱輸入症例は、これまで 2006 年 11 月にスリランカで感染したと推定される 2 例、本症例(インド)、2008 年 9 月(インドネシア)、2009 年 1 月(マレーシア)の 5 例が報告されている。これらのうち、チクングニヤウイルスが分離されたのは 2 例で、その他は抗体検査によって実験室診断されている。輸入感染症では、海外で発症し、帰国後提供された検体はしばしば急性期を過ぎており、病原体を同定できない場合がある。このような場合は臨床症状や渡航歴などと抗体検査の結果で判断することになるが、国内に流行がみられない感染症では、特異的 IgM 抗体の検出は最近罹患した証拠となり、診断材料として重要である。そのため、本研究においてチクングニヤ熱感染後 3～4 ヶ月経てもウイルス特異的 IgM が検出されると示されたことは、実験室診断における有益な情報となるだろう。

また、本症例の患者は、関節痛が発症後半年経過した現在も持続している。チクングニヤ熱の後遺症として関節痛が数ヶ月から数年継続する

場合があることが知られているため、国内で感染が拡大した場合は、急性期の症状だけでなく、予後の健康被害も考慮しなくてはならない。また、チクングニヤ熱は母子感染や輸血による感染リスクがあることが報告されているので、それらの対応も必要となるだろう。

現在のところ、チクングニヤ熱は我が国では感染症法や検疫法に定められていない疾患である。同じく蚊媒介性疾患のデング熱やウエストナイル熱と症状や流行地域が類似するため、これら疾患との鑑別診断を適切に行える検査体制を整える必要がある。さらに、輸入症例が認められた場合、迅速な感染防止対策を遂行するためにも、感染症法ならびに検疫法において本疾患の類型化を定めることが必要だと思われる。

E. 結論

今回の症例は、チクングニヤ熱の輸入症例と確定診断された。本研究で、血中のウイルス特異的 IgM 抗体が発症後 3～4 ヶ月まで検出されたことから、今後急性期を過ぎた検体でも、ウイルス特異的 IgM 抗体の検出によって最近の感染であることを示すことができると考えられる。

F. 健康危機情報

感染症媒介ベクターの研究などで、我が国には広くヒトスジシマカが分布していることが知られている。ヒトスジシマカはチクングニヤウイルスを媒介することが知られており、今後チクングニヤ熱の侵入と流行が懸念される。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし(予定あり)
2. 学会発表
なし
3. その他

表1 第58病日血清におけるウイルス学的検査.

検査法	検出ウイルス	検査結果
RT-PCR	フラビウイルス	陰性
	チクングニヤウイルス	陰性
ELISA	デングウイルス	IgM,IgG 陰性
	チクングニヤウイルス	IgM 陽性
IFA test	日本脳炎ウイルス	IgM,IgG 陰性
	デングウイルス	IgM,IgG 陰性
	チクングニヤウイルス	IgM 陽性(1:20) IgG 陽性(1:160)
PRNT	チクングニヤウイルス	陽性(1:160)

RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFA test, indirect fluorescent antibody test; PRNT, 50% plaque-reduction neutralization test;

表2 チクングニヤ熱発症後の抗体価の推移

Date (illness day)	ELISA	IFA		NT
	IgM	IgM	IgG	
58	陽性	1:20	1:160	1:160
108	陽性	陰性	1:160	1:320
137	陰性	陰性	1:160	1:320
164	—	—	1:160	1:320
192	—	—	1:160	1:320

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFA, indirect fluorescent antibody test; NT, neutralizing antibody tested by 50% plaque-reduction neutralization test; —, not tested.

**Virological and serological surveillance of Dengue fever/Dengue hemorrhagic fever in Thailand,
April 2008 – March 2009**

**Surapee Anantapreecha
Chief, Arbovirus Section, National Institute of Health, Thailand**

From April 2008 to March 2009, National Institute of Health, Department of Medical Sciences received blood specimens from 3,564 suspected dengue cases patients. According to the results of IgM and IgG antibody capture ELISA and/or virus isolation and/or RT-PCR, 82.5% of total cases were confirmed to be infected by dengue virus (Table 1). Confirmed dengue cases were found all year round, but the most prevalent between June to July (Table 2). The majority of confirmed dengue cases were in the age group 10-14 years with 43.6% (Table 3). Confirmed dengue cases were found in male 50% (Table 4). Of the total, 91.7% of confirmed dengue cases experienced secondary infection. All four dengue serotypes were identified of which DEN-1 was the predominant with 59.7% (Table 5).

Table 1. IgM and IgG antibody capture ELISA and/or virus isolation and/or RT-PCR results of suspected dengue cases-patients, April 2008 to March 2009

Tested No.	Confirmed dengue cases	%	Uninterpretable	%	Negative	%
3553	2941	82.8	228	6.4	384	10.8

Table 2. Month distribution of tested numbers and confirmed dengue cases, April 2008 to March 2009

Onset	Tested No.	Confirmed dengue cases	%	Uninterpretable	%	Negative	%
2008							
April	244	213	7.2	15	6.6	16	4.2
May	313	256	8.7	19	8.3	38	9.9
June	675	562	19.1	39	17.1	74	19.3
July	680	587	20.0	31	13.6	62	16.1
August	490	417	14.2	26	11.4	47	12.2
September	389	309	10.5	34	14.9	46	12.0
October	290	246	8.4	22	9.6	22	5.7
November	270	202	6.9	29	12.7	39	10.2
December	102	86	2.9	5	2.2	11	2.9
2009							
January	52	41	1.4	3	1.3	8	2.1
February	32	14	0.5	3	1.3	15	3.9
March	16	8	0.3	2	0.9	6	1.6
Total	3553	2941	100.0	228	100.0	384	100.0

Table 3. Age distribution of tested numbers and confirmed dengue cases, April 2008 to March 2009

Age group	Tested	%	Confirmed dengue cases	%
< 1 year	51	1.5	38	1.3
1-4	298	8.5	221	7.6
5-9	893	25.5	716	24.7
10-14	1528	43.6	1371	47.3
15-24	422	12.1	360	12.4
25-34	134	3.8	96	3.3
35-44	88	2.5	56	1.9
45-54	50	1.4	26	0.9
55-64	24	0.7	12	0.4
65up	13	0.4	2	0.1
Total	3501	100	2898	100.0

Remark : Unknown 52 cases

Table 4. Sex distribution of tested numbers and confirmed dengue cases, April 2008 to March 2009

Sex	Tested No.	%	Confirmed dengue cases	%
Female	1,775	50	1,471	50.0
Male	1,778	50	1,470	50.0
Total	3,553	100	2,941	100.0

Table 5. Preportion of each of the four Serotype, April 2008 to March 2009

DENV-1	%	DENV-2	%	DENV-3	%	DENV-4	%	Total
877	59.7	248	16.9	261	17.8	84	5.7	1470

Complete envelope protein sequences of dengue1 viruses was characterized. The dengue 1 virus sequences were compared with previous Thai strain. We used strain that isolated in 1963, 1983 and 1993. Figure 1 was showed phylogenetic tree of dengue 1 virus. We found that a genetic diversity of dengue 1 envelope protein was different about 10 percent when compared with previous strain. Among the present strains the genetic diversity was resemblance about 0-4%.

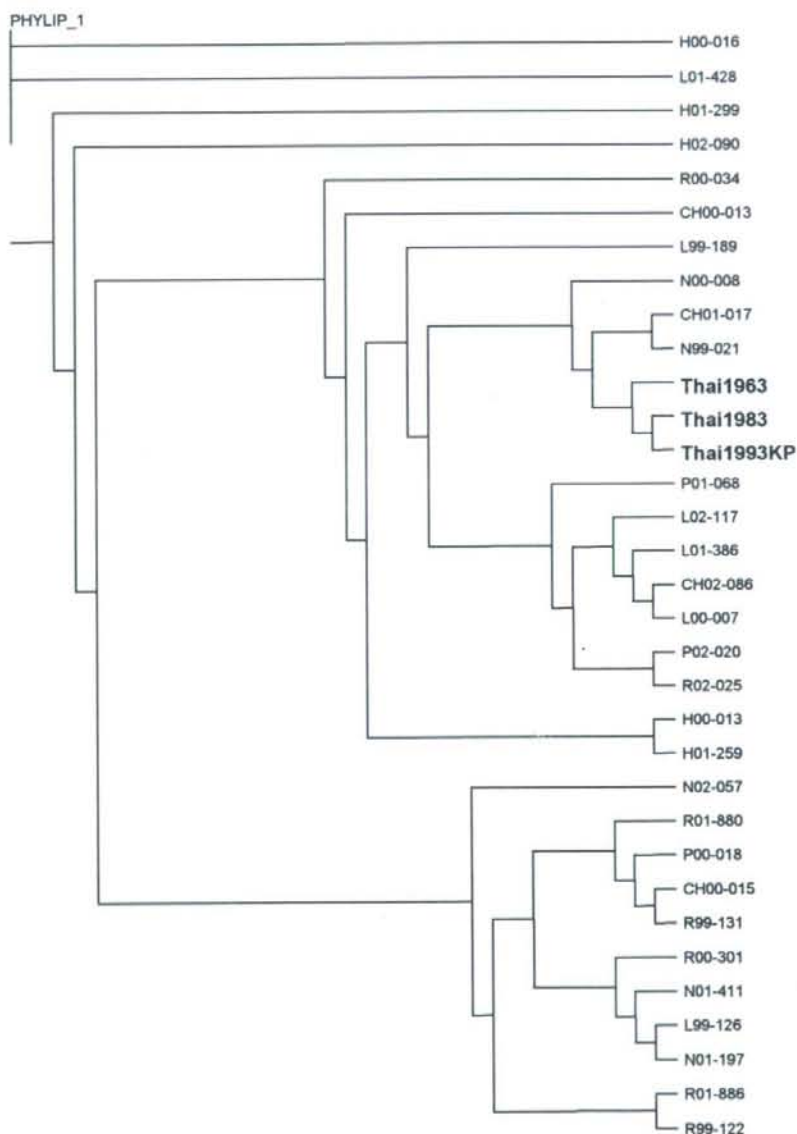


Figure 1 Phylogenetic tree of dengue 1 virus compared with previous strain

Epidemiology analysis of Japanese encephalitis in Thailand, April 2008 to March 2009

From April 2008 to March 2009 a total of 665 cases of clinical diagnosed viral encephalitis were submitted from hospitals all over the country for laboratory examination. According to the results of IgM-Capture ELISA 63 cases were determined to be JE (Table 1). JE cases were reported in all the 4 regions in Thailand (Table 2). Confirmed JE cases occurred most in May with 31.7% (Table 3). The most affected age group were 10-14 years with 32.3% (Table 4). Confirmed JE cases were found in male more than in female with 58.7% and 41.3% (Table 5).

Table 1. IgM antibody capture ELISA results of suspected encephalitis cases, April 2008 to March 2009

Tested No.	Confirmed JEV cases	%	Uninterpretable	%	Negative	%	Confirmed Flavivirus cases	%	Confirmed Dengue cases	%
665	63	9.5	453	68.1	106	15.9	27	4.1	16	2.4

Table 2. Region distribution of confirmed JEV cases, April 2008 to March 2009

Region	Tested No.	Confirmed JEV cases	%
Central	335	29	46.0
North	115	15	23.8
North/East	111	13	20.6
South	103	6	9.5
Unknown	1		0.0
Total	665	63	100.0

Table 3. Month distribution of confirmed JEV cases, April 2008 to March 2009

Onset	Tested No.	Confirmed JEV cases	%
2008			
April	38	4	6.3
May	87	20	31.7
June	91	14	22.2
July	52	5	7.9
August	74	6	9.5
September	44	1	1.6
October	53	3	4.8
November	47	3	4.8
December	43	1	1.6
2009			
January	51	3	4.8
February	36		0.0
March	49	3	4.8
Total	665	63	100.0

Table 4. Age distribution of confirmed JEV cases, April 2008 to March 2009

Age group	Tested No.	Confirmed JEV cases	%
< 1year	41	1	1.6
1-4	83	13	21.0
5-9	111	11	17.7
10-14	151	20	32.3
15-24	68	6	9.7
25-34	69	5	8.1
35-44	48	3	4.8
45-54	35		0.0
55-64	27	3	4.8
65up	23		0.0
Total	656	62	100.0

Remark : Unknown 9 cases

Table 5. Sex distribution of confirmed JEV cases, April 2008 to March 2009

Sex	Tested No.	Confirmed JEV cases	%
Female	297	26	41.3
Male	368	37	58.7
Total	665	63	100.0

Epidemiology analysis of Chikungunya fever in Thailand, April, 2008 to March, 2009

From April 2008 to March 2009, a total of 1,849 cases of clinical diagnosed chikungunya fever were submitted from hospitals all over the country for laboratory examination. According to the results of RT-PCR and/or HI assay, 762 (41.2%) cases were determined to be chikungunya infection (Table 1). Confirmed chikungunya cases were found most in South region (Table 2). Confirmed chikungunya cases occurred most in November (Table 3). The Most affected age group were 35-44 years with 20.5% (Table 4). Confirmed chikungunya cases were found in female more than in male with 58% and 42% (Table 5).

Table 1. RT-PCR and/or HI assay results of suspected Chikungunya cases, April 2008 to March 2009

Tested No.	Confirmed chikungunya cases	%	Uninterpretable	%	Negative	%	HI titer was detected cases	%	Confirmed dengue cases	%
1849	762	41.2	632	34.2	63	3.4	338	18.3	54	2.9

Table 2. Region distribution of confirmed Chikungunya cases, April 2008 to March 2009

Region	Tested No.	Confirmed chikungunya cases	%	Uninterpretable	%	Negative	%	HI titer was detected cases	%	Confirmed dengue cases	%
Central	178	11	1.4	88	13.9	10	15.9	55	16.3	14	25.9
North	123	2	0.3	68	10.8	12	19.0	36	10.7	5	9.3
North/East	14	1	0.1	5	0.8	2	3.2	5	1.5	1	1.9
South	1533	748	98.2	470	74.4	39	61.9	242	71.6	34	63.0
Unknown	1	0	0.0	1	0.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Total	1849	762	100.0	632	100.0	63	100.0	338	100.0	54	100.0

Table 3. Month distribution of confirmed Chikungunya cases, April 2008 to March 2009

Onset	Tested No.	Confirmed chikungunya cases	%	Uninterpretable	%	Negative	%	HI titer was detected cases	%	Confirmed dengue cases	%
2008											
April	1	0	0.0	1	0.2		0.0	0	0.0	0	0.0
May	47	0	0.0	33	5.2		0.0	11	3.3	3	5.6
June	40	0	0.0	33	5.2		0.0	5	1.5	2	3.7
July	2	0	0.0	2	0.3		0.0	0	0.0	0	0.0
August	10	0	0.0	2	0.3		0.0	7	2.1	1	1.9
September	88	31	4.1	20	3.2	4	6.3	32	9.5	1	1.9
October	501	200	26.2	160	25.3	22	34.9	99	29.3	20	37.0
November	487	253	33.2	156	24.7	16	25.4	44	13.0	18	33.3
December	292	162	21.3	77	12.2	4	6.3	45	13.3	4	7.4
2009											
January	185	68	8.9	61	9.7	10	15.9	45	13.3	1	1.9
February	131	34	4.5	53	8.4	5	7.9	37	10.9	2	3.7
March	65	14	1.8	34	5.4	2	3.2	13	3.8	2	3.7
Total	1849	762	100.0	632	100.0	63	100.0	338	100.0	54	100.0

Table 4. Age distribution of confirmed Chikungunya cases, April 2008 to March 2009

Age group	Tested No.	Confirmed chikungunya cases	%	Uninterpretable	%	Negative	%	HI titer was detected cases	%	Confirmed dengue cases	%
< 1year	5	1	0.1	2	0.3	0	0.0	2	0.6	0	0.0
1-4	43	11	1.5	17	2.8	2	3.2	12	3.7	1	1.9
5-9	69	30	4.0	27	4.5	2	3.2	8	2.4	2	3.8
10-14	124	58	7.8	42	7.0	5	7.9	14	4.3	5	9.6
15-24	306	106	14.2	140	23.2	14	22.2	38	11.6	8	15.4
25-34	383	128	17.2	155	25.7	18	28.6	69	21.0	13	25.0
35-44	336	153	20.5	103	17.1	8	12.7	62	18.9	10	19.2
45-54	296	143	19.2	71	11.8	10	15.9	62	18.9	10	19.2
55-64	142	66	8.9	30	5.0	4	6.3	41	12.5	1	1.9
65up	88	49	6.6	17	2.8		0.0	20	6.1	2	3.8
Total	1792	745	100.0	604	100.0	63	100.0	328	100.0	52	100.0

Remark : Unknown 57 cases

Table 5. Sex distribution of confirmed Chikungunya cases, April 2008 to March 2009

Sex	Tested No.	Confirmed chikungunya cases	%	Uninterpretable	%	Negative	%	HI titer was detected cases	%	Confirmed dengue cases	%
Female	1024	442	58.0	329	52.1	26	41.3	193	57.1	34	63.0
Male	825	320	42.0	303	47.9	37	58.7	145	42.9	20	37.0
Total	1849	762	100.0	632	100.0	63	100.0	338	100.0	54	100.0

Characterization of dengue virus prevalence in Taiwan for establishment of the laboratory network for molecular epidemiology of dengue and other mosquito-borne viruses prevalent in Asia

Name of researcher: Wen-Yi Shih, Jyh-Hsiung Huang, Pei-Yun Shu

Affiliation: Centers for Disease Control, Taiwan

Summary:

Recent molecular epidemiological study had demonstrated that dengue is not endemic in Taiwan and constant importations of multiple dengue viruses (DENVs) from the neighboring Southeast Asian countries were responsible for each year's local outbreaks. To reduce the imported DENVs and their local spread, we establish laboratory-based dengue surveillance system for early identification of imported cases. In addition, we conducted molecular epidemiological study to monitor the local transmissions of multiple DENV strains circulated in Taiwan. Among the 226 confirmed imported dengue patients in 2008, 102 (45.1%) were detected through airport fever screening surveillance system. From the acute phase serum samples of all imported dengue cases, 44 DENV-1, 15 DENV-2, 13 DENV-3, and 7 DENV-4 strains were isolated. For local dengue outbreaks in Taiwan, a total of 488 dengue patients were laboratory confirmed with 3 cases of dengue hemorrhagic fever (DHF). Sequence analyses from more than 111 DENV isolates obtained from acute phase serum samples of indigenous cases showed that 8 different DENV strains (5 DENV-1, 2 DENV-2, and 1 DENV-4) were circulated in Kaohsiung City, Kaohsiung County, Taipei County, Taoyuan County, and Taipei City with limited overlap in the transmission areas. Phylogenetic analysis showed that these DENVs were imported from Vietnam, Thailand, Myanmar, Cambodia, and the Philippines.

For other arboviruses, we identified 9 imported chikungunya cases from airports fever screening surveillance in 2008. Among these travelers, 4, 3, 1, and 1 case(s) were returned back from Indonesia, Malaysia, Bangladesh, and India, respectively. Phylogenetic analyses of isolated chikungunya viruses (CHIKVs) showed that all CHIKV strains from Indonesia belong to Asian genotype, whereas other isolates belong to African genotype.

Purpose:

Emergence of pathogenic microorganisms is an increasing concern. Infection by mosquito-borne viruses is a foremost problem in Asia. Understanding the epidemiological situations of the diseases and the phenotypic and genotypic

characteristics of viruses contributes to the development of new strategies for control and prevention. In order to promote communication and exchange of the information of dengue and other mosquito-borne viruses, laboratory network between Asia and Pacific Rim should be developed and strengthened.

Methods:

1. Clinical samples and laboratory diagnosis

Human serum samples from clinically suspected DENV and other arbovirus infections were submitted to the Vector-Borne Viral and Rickettsial Diseases Laboratory, Research and Diagnostic Center, Centers for Disease Control, Taiwan (Taiwan CDC), Department of Health, for laboratory diagnosis. A confirmed dengue or chikungunya case was defined as febrile illness associated with a positive real-time reverse transcription (RT)-PCR test (1-4), isolation of DENV or CHIKV (3-4), or the detection of DENV- or CHIKV-specific IgM and IgG antibodies (5-6). A multiplex one-step real-time RT-PCR was developed to simultaneously detect and differentiate various flaviviruses and alphaviruses in the acute-phase serum samples using group-specific and virus-specific primers. In addition, a flavivirus/alphavirus-specific capture ELISA was developed to detect and differentiate various flavivirus/alphavirus infections.

2. Virus isolation and identification

DENVs and CHIKVs were isolated from the acute phase serum samples of confirmed cases. The virus isolation was performed using mosquito cell line (clone C6/36 of *Aedes albopictus* cells). For each acute phase serum, 4 μ l of serum sample was diluted in 200 μ l cultured medium (RPMI, Gibco/BRL, Life Technologies, containing 1% FCS) and added to a 96-well microtiter plate, 50 μ l/well in quadruplicate. Then, 10⁵ cells/100 μ l/well of C6/36 cell line were added into the microtiter plate and incubated at 37°C for 2-7 days. Cells were harvested and virus isolates were identified by the indirect fluorescent antibody test with virus group-specific and serotype-specific monoclonal antibodies.

3. Primers used for RT-PCR and nucleotide sequencing of DENV

The diagnostic tests for flavivirus infection from febrile patients on the basis of the results of one-step SYBR Green I-based real-time RT-PCR and envelope/membrane-specific capture IgM and IgG ELISA had been described previously (1, 5). To screen viremic fever patients with alphavirus infection, a multiplex one-step SYBR Green I-based real-time RT-PCR was developed (3). A cocktail consisted with three sets of primers were mixed and used for

RT-PCR screening. The alphavirus-specific primer set (AL-2: 5'-AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA AG-3' and AL-3: 5'-GTG GTG TCA AAC CCT ATC CA-3') targeted a consensus region of the nonstructural protein 1 (nsp1) genes to detect all alphaviruses. The CHIKV-specific primer set (F-CHIK: 5'-AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA AG-3' and R-CHIK: 5'-CCA AAT TGT CCY GGT CTT CCT-3') targeted a region of the envelope protein 1 (E1) gene of CHIKVs (7). The Ross River virus-specific primer set (RRV-1: 5'-GGG TAG AGA GAA GTT YGT GGT YAG-3' and RRV-2: 5'-CGG TAT ATC TGG YGG TGT RTG C-3') targeted a region of the envelope protein 2 (E2) gene of Ross River virus. Positive results were then confirmed by gene sequence analysis, virus isolation, and serological test.

4. Preparation of viral RNA, RT-PCR amplification and nucleotide sequencing

Viral RNAs were extracted from either acute phase serum samples or culture supernatant of C6/36 cell line infected with each of the isolated DENV or CHIKV strains using the QIAamp viral RNA mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of partial NS5 gene fragment of DENV were determined directly from acute phase serum samples using RT-PCR product of one-step SYBR Green I quantitative RT-PCR (1). Partial NS5 gene sequencing was routinely performed to detect and differentiate serotype and genotype of the newly identified DENVs. For full-length structure gene sequencing, extracted viral RNA from culture supernatant of C6/36 cell line infected with each of the isolated DENV strains was used as a template for cDNA synthesis, which subsequently was used for PCR amplification. Two overlapping PCR products spanning the full-length structure gene were purified from agarose gels and directly sequenced in both directions using ABI Prism automated DNA sequencing kit and ABI Prism 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Overlapping nucleotide sequences were combined for analysis and edited with the Laser software package (DNASTAR Inc, Madison, WI).

5. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses were conducted using PHYLIP version 3.6 or MEGA version 4.0 software package. Genetic distances were calculated by using Kimura 2-parameter distance algorithm with 1,000 bootstrap replicates. Neighbor-Joining method was used to generate the phylogenetic trees.

Results: