

計畫編號：DOH91-DC-2016

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

黃病毒血清診斷系統建立：鑑別診斷與流行病學應用

研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗組

計畫主持人：黃智雄

研究人員：舒佩芸、周玲、樂怡雲、簡麗蓉、張淑芬、

蘇千玲、陳志恒、潘秀玲、林鼎翔

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目 錄

	頁 碼
封面	
一、中文摘要	(3-5)
英文摘要	(6-7)
二、本文	
(1) 前言	(8-14)
(2) 材料與方法	(15-20)
(3) 結果	(20-23)
(4) 討論	(24-25)
(5) 結論與建議	(25)
(6) 參考文獻	(25-30)
三、圖次	(31-37)
四、表次	(38-42)
五、附錄	(43)
	共 (43)頁

一之一、中文摘要

關鍵詞：黃病毒、登革熱、日本腦炎、ELISA、非結構蛋白質一(NS1)

登革熱、日本腦炎及黃熱病是台灣地區三種重要的法定傳染病，分別屬於黃病毒屬的登革熱、日本腦炎及黃熱病亞群。開發快速的黃病毒鑑別診斷系統，能監測台灣地區已知存在的黃病毒（登革病毒及日本腦炎病毒）及未來可能會侵入的黃病毒（如黃熱病毒及西尼羅腦炎病毒）是十分重要的。本計劃的目的在建立一套完整的黃病毒血清學診斷系統，能快速的診斷已知存在的及再浮現的黃病毒感染，改善現有監測系統的不足。此外，我們將利用這些方法，進行流行病學研究，以深入了解台灣地區登革熱及日本腦炎的流行歷史、現況、及未來發展趨勢，做為制定防治政策的參考。台灣地區由於有日本腦炎與登革熱二種病毒之流行，且多數民眾因接種日本腦炎疫苗已產生抗結構性蛋白質抗體，對於同質(homologous)與異質(heterologous)黃病毒的 IgG 抗體有相當程度的交叉反應(cross-seroreactivity)，所以在血清鑑別診斷上相當困難。我們希望能建立一套完整的血清診斷系統，利用酵素免疫分析法(ELISA)快速及靈敏的檢驗出各種黃病毒感染。這包括以外套膜蛋白質(Envelope protein, E)為基礎的 Capture IgM 及 IgG ELISA，Indirect IgM 及 IgG ELISA，與非結構蛋白質(NS1、NS3、NS5)為基礎的 Indirect IgG ELISA，檢測恢復

期血清中之病毒特異性抗體。在急性期血清中，則利用 sandwich ELISA 方法檢測特異性病毒 NS1 抗原。為積極建立一個國際水準的黃病毒參考實驗室，我們也進行已商品化或研發中之檢驗試劑評估工作，了解現有及新開發檢驗試劑之可靠性。在 ELISA 方面，我們對各步驟進行最適化的分析研究，以增加 ELISA 檢驗試劑的靈敏度與特異性，並進一步完成 ELISA 檢驗試劑乾式化及自動化的檢驗流程，可以快速的、大量的檢驗血清檢體。在 NS1-specific IgG ELISA 方面，我們開發出一套新的、間接酵素免疫分析法，能鑑別診斷日本腦炎、登革及黃熱病毒感染，並能偵測及分辨自然感染與疫苗接種所產生的抗日本腦炎抗體反應，此方法也能分辨初次及二次登革病毒感染，並能取代複雜的 PRNT 中和抗體法，分辨初次感染之登革病毒血清型別，此對於疫情的分析與血清流行病學的研究十分重要。在急性期血清之 ELISA 檢驗方面，我們建立了一套 sandwich ELISA 方法，可以檢測出病毒 NS1 抗原，研究結果顯示 NS1 抗原與病毒核酸表現成正相關性，而與 NS1 特異性抗體成反相關性。由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，建立一套完整的黃病毒診斷系統（病毒學、血清學及分子診斷），能快速的診斷各種黃病毒是十分重要的。我們建議在疾病管制局成立一個黃病毒研究中心，有系統的進行病媒、診斷、流行病學及防治各方面的研究，並逐步完成台灣各主要地區（北、中、南、東）

登革熱及日本腦炎的血清及分子流行病學調查研究，做為制定未來防治政策的參考。

(篇幅不足，請自行複製) 第 頁

一之二、英文摘要

Keyword: flavivirus、 dengue fever、 Japanese encephalitis、 ELISA、

Nonstructural protein1 (NS1)

Dengue fever, Japanese encephalitis (JE), and yellow fever (YF) are the three important reportable diseases belonging to Flavivirus family in Taiwan. It is important to develop a system that is able to differentially diagnose all flavivirus (dengue virus, JE virus, YF virus, and West Nile virus) potentially cause outbreaks in Taiwan. Our ultimate goal is to develop a comprehensive ELISA system based on Capture IgM and IgG ELISA, indirect IgM and IgG ELISA and nonstructural protein (NS1, NS3, and NS5)-specific IgG ELISA to detect virus-specific antibodies in the convalescent-phase serum samples and a sandwich ELISA to detect NS1 antigen in the acute-phase serum samples. In order to setup a flavivirus reference lab with international standard, we have evaluated several commercial kits of dengue virus infection for comparison. The ELISA systems we have developed have demonstrated high sensitivity and specificity through optimization of reagents and various steps in the protocol. The ELISA system is fully automatic and can handle large-scale serum samples rapidly. For acute-phase serum samples, we have setup a sandwich ELISA to detect NS1 antigen that have good correlation with RT-PCR results. The presence of NS1 antigen in the serum samples is in reverse relationship with NS1-specific antibodies. We have recently developed a NS1 isotype- and serotype-specific ELISA for the serodiagnosis and seroepidemiologic studies of flavivirus infection. The results showed that the NS1-specific IgG ELISA can be reliably used to differentiate: (1) JE and dengue infections, (2) JE vaccination

and JE infection, (3) primary vs. secondary dengue virus infection, and (4) serotype of dengue virus infection. Interestingly, we have found that serotype of primary dengue virus infection could be correctly identified when convalescent and postinfection sera were analyzed for NS1 serotype-specific IgG. These findings suggested that NS1 serotype-specific IgG ELISA could be reliably applied for serodiagnosis and seroepidemiologic study of dengue virus infection. We suggest setup a flavivirus research center in CDC to study various aspects of mosquito vector, serological and molecular diagnoses, and epidemiology. Epidemiological investigation on dengue and JE infections should be conducted for a better understanding of serological and molecular epidemiology. This will contribute significantly for the decision-making and development of effective control strategy.

二、本文

(1) 前言

由於全球溫室效應影響,病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加,發生頻率將日益頻繁與嚴重,其中又以蚊蟲(mosquito)及壁蝨(Tick)所媒介的節肢動物病毒(Arbovirus)性傳染病最重要。黃病毒是節肢動物病毒中最大分支,種類繁多(有六、七十種),至少有二十八種會造成人類疾病。在台灣地區,登革熱及日本腦炎是比較重要的黃病毒傳染病,分別屬於登革熱及日本腦炎亞群,二者皆是重要的法定傳染病。由於世界地球村之形成,黃病毒之分布區域正逐漸擴大,開始侵入新領域,使不同黃病毒之分布產生重疊,造成鑑別診斷上的困難。因此,開發快速的黃病毒鑑別診斷系統,能監測台灣地區已知存在之黃病毒(登革病毒及日本腦炎病毒)及未來可能會侵入的黃病毒(如黃熱病毒及西尼羅腦炎病毒)是十分重要的。1998年在馬來西亞發生的Nipah病毒性腦炎及1999年在美國紐約市爆發的West Nile病毒性腦炎就是最好的例子。在Nipah病毒方面,由於對血清學的過度解釋,導致錯誤的疫情判斷及防治措施,因而延誤疫情,造成大規模流行,不但使上百人死亡,更摧毀了當地的養豬業,引發出政治、經濟及社會問題,也造

成國際上不小的震撼。1999 年在美國紐約市爆發之 West Nile 腦炎方面，則造成 61 個人感染及 7 個死亡病例。此流行剛開始時一直被誤認為是 St. Louis 病毒，因為美國的 CDC 只檢驗美國常見的六種腦炎病毒，並未考慮其為國外傳入的非地方性病毒或生化戰武器之可能，直到紐約市 Bronx 動物園之鳥類專家將死去鳥類之腦部檢體，送往美國農業部國家獸醫研究所分離出病毒，再由美國的 CDC 以 PCR 及核酸定序技術分析後才發現錯誤。事實上，West Nile 病毒從未在西半球出現過，這是首次在美國本土出現，顯示出此病毒確能在新的區域散佈及流行。美國政府受此教訓，為防止 West Nile virus 再度在東部各州造成流行，已及早進行防範措施，包括美國 CDC、農業部及各州政府衛生局都在人力、組織、經費及監測系統上積極改善，希望能有效控制此病毒之擴散。這二次流行事件均突顯出監測系統及實驗室正確檢驗的重要性，因此，及早建立全方位之傳染病監測系統，是十分重要的。我們應透過與美、澳等先進國家合作，儘速建立一個具有國際水準的病媒性疾病參考實驗室與完善的監測及通報系統。

登革熱及日本腦炎是台灣地區二種重要的法定傳染病，分別屬於日本腦炎及登革熱亞群，其中日本腦炎是地方性疾病，而登革熱

也有本土化的趨勢。日本腦炎亞群中各病毒在全球不同地區分別引起 Japanese encephalitis (JE), Murray Valley encephalitis (MVE), West Nile encephalitis (WN), Saint Louis encephalitis (SLE), Kunjin (KUN), Usutu (USU), Kokobera (KOK), Stratford (STR), Alfuy (ALF)等疾病，鑑別診斷並不容易。為了正確診斷新興及再浮現傳染病的侵入，我們有必要建立一套完整的節肢動物病毒，特別是黃病毒的監測系統，能快速且正確的分離及鑑定病毒、檢驗微量的病毒核酸、及檢驗病毒之特異性抗原及抗體，以改善現有監測系統與檢驗能力。

黃病毒家族(Flavivirus family)為小的、具外套膜的、正單股(single-positive strand) RNA 病毒。在對人類的致病源中，以黃熱(yellow fever, YF)病毒、登革(dengue)病毒、日本腦炎(Japanese encephalitis, JE)病毒、C 型肝炎病毒(hepatitis C virus)及 tick-borne encephalitis (TBE) 病毒流行最為廣泛(Shope 1980 ; Monath, 1986)。登革病毒的流行區域包括了亞洲、美洲、非洲、大洋洲等熱帶、亞熱帶地區(Gubler, 1997)。隨著病媒蚊的擴散，病毒的種類、病情的嚴重程度、病例的數目和流行地區的分佈都大幅上升，例如 1981-1990 十年間的病例是 1956-1980

二十五年間的兩倍。雖然大部份的登革病毒感染引發的臨床症狀 (Burke et al, 1988) 為不明顯感染 (inapparent infection), 輕微的類似感冒的發燒 (mild flu-like undifferentiated fever), 或典型登革熱 (dengue fever, DF), 仍有少數的登革病毒感染者會導致嚴重致死的登革出血熱 (dengue haemorrhagic fever, DHF) 症狀 (Nimmannitya et al, 1969, 1987; WHO, 1997)。登革出血熱在 1950 年代間只見於東南亞的菲律賓及泰國等地, 但從 1980 到 1990 的十年間, 卻在加勒比海周圍國家蔓延流行。1980 年代末期整個亞洲 - 太平洋地區也都受到波及, 在中國大陸的廣東、海南島及印尼、斯里蘭卡等地紛傳疫情。根據世界衛生組織統計, 全世界有超過二十億的人暴露在登革病毒的威脅之下, 每年有一千萬以上的新病例發生, 登革熱/登革出血熱已成為全世界最重要的蚊媒傳染病。在東南亞許多地方, 包括台灣, 是登革病毒與日本腦炎病毒重疊流行的地區。臺灣地區在日據時代曾有多次登革熱流行的記錄 (Gubler, 1997), 但自民國 31 年的全島性大流行之後, 直到民國 70 年才在屏東縣的小琉球再度爆發由第二型登革病毒造成的流行, 估計全島近 80% 的居民受到感染 (謝維詮等, 1981; 吳盈昌, 1986)。民國 76 年高雄屏東地區再度爆發了以第一型登革病毒為主

的流行(報告病例 1,123 名,確定病例 527 名),次年疫情繼續擴大,官方的統計共有 4,389 名確定病例,但實際感染人數估計可能超過五萬人。民國 78 年至 82 年只有少數的病例或小規模的流行。但近年來,由於台灣社會環境的變遷,流行情況開始有所轉變。民國 84 年登革熱的威脅甚至越過北迴歸線,進入無埃及斑蚊但只有白線斑蚊分佈的區域,台灣本島的北、中、南地區,曾分別發生四型登革病毒之流行,全年共計有 369 名確定病例,其中 329 例為本土病例,而且四型登革病毒皆已出現本土病例(衛生署預研所 84 年登革熱偵測年報,1996)。而去年 10 月起在高雄市開始流行的第二型登革病毒,在成功越冬以後,今年度更逐漸擴大其流行範圍,造成高雄市、高雄縣、與屏東縣為主的南部地區大流行,確定病例數已超過 5000 人,除了打破 76-77 年的高雄屏東地區官方記載確定病例數外,更創下台灣地區自二次大戰以來最大規模之流行。值得注意的是其中有 175 名病例出現登革出血熱的嚴重臨床症狀,並且有 15 人死亡。目前的流行現況,顯示登革熱防治的急迫性,已成為臺灣公共衛生上的重要防疫問題。另一方面,日本腦炎病毒為一本土化之傳染病,雖然大多數三十歲以下人均曾注射過疫苗,但每年仍有數十病例,日本腦炎疫苗之預防注射仍是公共衛生上的重要問

題。

目前，黃質病毒實驗室診斷，主要靠病毒分離、反轉錄酶/聚合酶鏈鎖反應法 (reverse-transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)、及 Capture IgM and IgG ELISA 血清學方法。其中藉由細胞培養方法分離登革病毒，再以病毒特異性 (virus-specific) 之單株抗體做免疫螢光染色，仍是目前的 Gold Standard，但是因為檢體需接種至細胞株培養至少 7 天後才能進行免疫螢光染色判讀，檢驗流程耗費時日，已逐漸被 RT-PCR 方法取代，用以偵測急性期血清中的病毒核酸(RNA)。而最近二年快速發展的 real-time quantitative RT-PCR 方法，由於其靈敏度為傳統 RT-PCR 方法的十倍，檢驗時間可縮短為 1 天，陽性率比病毒分離與傳統 RT-PCR 方法更高，未來勢必取代傳統 RT-PCR 方法成為新的 Gold standard，有效提升診斷時效。

血清學方面，Capture IgM and IgG ELISA 已逐漸取代血球凝集抑制試驗 (Hemagglutination Inhibition test, HI) 成為新的 Gold Standard，用以檢驗恢復期血清中的特異性抗體。病毒之中和試驗 (viral neutralization) 雖可以區分日本腦炎與登革熱之初次感染 (但無法區分連續的 "sequential infection")，然而這種分析太費

事，且缺乏足夠之準確度與靈敏度，故不適合於大量地例行診斷。事實上，黃病毒的血清學診斷相當複雜，主要有下列三個原因：1) 對於同質(homologous)與異質(heterologous) 黃病毒的 IgG 抗體有相當程度的交叉反應(cross-seroreactivity)，所以在血清鑑別診斷上相當困難；2) 在一有二種或多種黃病毒流行的地區，由於原本暨存在抗體 (pre-existing antibodies) 及“原始抗原之罪”現象 (“original antigenic sin” phenomenon)影響，使得連續的黃病毒感染的鑑別診斷相當困難；及 3)由日本腦炎疫苗接種所產生的抗結構性蛋白質抗體，使得分辨日本腦炎/登革病毒感染與疫苗接種之抗體更為複雜。為解決這些問題，我們建立了一套完整的血清診斷系統，利用酵素免疫分析法 (ELISA) 快速及準確的檢驗出各種黃病毒感染。這包括以外套膜蛋白質 (Envelope protein, E) 為基礎的 Capture IgM 及 IgG ELISA，Indirect IgM and IgG ELISA，與非結構蛋白質(NS1、NS3、NS5) 為基礎的 Indirect IgG ELISA，檢測恢復期血清中之病毒特異性抗體。在急性期血清中，則利用 sandwich ELISA 方法檢測特異性病毒 NS1 抗原。此外，我們將利用這些方法，進行流行病學研究，以深入了解台灣地區登革熱及日本腦炎的流行歷史、現況、及未來發展趨勢，做為制定防治政策的參考。

(2) 材料與方法

1. 病毒之生產

病毒之體外細胞培養係利用 C6/36 或 Vero 細胞株生產各種黃病毒。經細胞培養大量生產後分裝保存於 -70 中。各種黃病毒感染 Vero 細胞所培養之上清液也是 NS1 抗原的來源。為建立完整的黃病毒的血清學診斷系統，需要取得各種黃病毒菌株，經與美國 ATCC 申請、洽詢，我們已於 90 年 12 月取得購買 Biosafety level 3 病原菌之資格，並買到西尼羅 (West Nile) 腦炎病毒及聖路易 (St. Louis) 腦炎病毒，並加以培養、保存、使用於病毒分離、Capture IgM and IgG ELISA 及反轉錄酶/聚合酶鏈鎖反應法 (reverse-transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 等之實驗室診斷。

2. 病例定義

黃病毒感染 (包括日本腦炎、登革熱、黃熱病等) 之確診是基於病毒分離、血清抗體陽轉及反轉錄酶/聚合酶鏈鎖反應法等之實驗室診斷。確定病例必須符合以下任一標準：(1) 病毒分離陽性；(2) 反轉錄酶/聚合酶鏈鎖反應法陽性；(3) 在單隻血清檢體，病毒特異性 (登革病毒、日本腦炎病毒、或黃熱病毒) IgM 及 IgG 抗體均為陽性反應時；(4) 在成對血清檢體，病毒特異性 IgM 或 IgG 抗體有四倍上升者。登革出

血熱之定義係依照 WHO 標準 [WHO, 1997]，確定病例必須符合以下四項標準：(1) 登革熱確定病例；(2) 出現出血性症狀；(3) 血小板低於 100,000/cu mm；(4) 伴隨以下任一檢驗證據：血液濃縮 (hemoconcentration, HCT 上升 20% 以上)、胸腔積水 (pleural effusion) 或低蛋白血症 (hypoalbuminemia)。

3. 人血清檢體收集

本計畫將收集各種黃病毒病人與疫苗接種者之抗血清。病人血清包括急性期 (症狀出現後 0-7 天)、早恢復期 (症狀出現後 8-13 天)、晚恢復期 (症狀出現後 14-30 天) 與感染後期 (post infection, 症狀出現後超過 30 天) 血清。病人血清收集後，將進行血清學、病毒學及分子生物學之實驗室診斷，以確認感染源。不同期血清，將用以分析病人對病毒各種抗原之抗體反應，如抗體之效價、種類、特異性及動力學變化，建立免疫保護力及免疫病理機轉之相關性。經實驗室確診為陽性反應血清將加以分裝，儲存於 -70°C 冷凍櫃長久保存。日本腦炎疫苗接種者之免疫血清將有系統的加以收集，以了解抗體之效價及動力學變化。

4. ELISA (酵素免疫分析法)

一、Capture IgM and IgG 抗體檢驗：先以山羊 IgG 抗人 IgM 或

IgG (goat IgG against Human IgM or IgG)在 4 °C 下隔夜覆被 (coating)在 96 孔微量效價盤上。覆被完成後以磷酸氫化鈉緩衝液 (PBS)清洗,之後再用 200 μ l 之 5 % 牛血清白蛋白 (in PBS)於 37 °C 下進行 1 小時覆蓋反應 (blocking) , 然後加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照血清反應 1 小時。接下來加入從細胞培養的病毒抗原 (local strain of DEN-1 (8700828), DEN-2 (454009), DEN-3 (8700829), DEN-4 (8700544), vaccine strain of JE (Beijing) virus、 or other flaviviruses) , 在 37 °C 下反應 1 小時。清洗後, 病毒細胞培養液分別以血清稀釋液兩倍稀釋後加 1/1000(v/v) 之抗黃病毒屬抗原之單株抗体 D56-3。反應 1 小時, 清洗後, 加入 1:1000 稀釋之山羊抗鼠 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體, 於 37 °C 反應 1 小時, 清洗後, 加入酵素受質體 p-nitrophenyl-phosphate (Sigma) 室溫作用 30 分鐘, 再用 Dynatech MR700 微量效價盤判讀儀 (microplate reader) 以波長 405 nm 測吸光度。

二、E/M (envelope/membrane protein)-specific indirect IgM and IgG ELISA: 先以 5 μ g/ml, 100 μ l/well of 單株抗体

D56-3 在 4 °C 下隔夜覆被 (coating) 在 96 孔微量效價盤上。清洗後，將含有病毒抗原的細胞培養上清液以 1: 4 稀釋後加入，在 37 °C 下反應 1 小時。清洗後，加入連續稀釋好的待測血清及對照血清反應 1 小時 (1:100-1:12,800)。再加入 1:1000 稀釋之山羊抗人 IgM 或 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體，於 37 °C 反應 1 小時。最後，加入酵素受質體酵素受質體 p-nitrophenyl-phosphate (Sigma) 室溫作用 30 分鐘，再用 Dynatech MR700 微量效價盤判讀儀 (microplate reader) 以波長 405 nm 測吸光度。

三、NS1-specific indirect IgM and IgG ELISA: 先以 5 µg/ml, 100 µl/well of 單株抗体 D2/8-1 在 4 °C 下隔夜覆被 (coating) 在 96 孔微量效價盤上。清洗後，將含有 NS1 抗原的細胞培養上清液以 1: 3 稀釋後加入，在 37 °C 下反應 1 小時。清洗後，加入 1:50 稀釋好的待測血清及對照血清反應 1 小時。再加入 1:1000 稀釋之山羊抗人 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體，於 37 °C 反應 1 小時。最後，加入酵素受質體酵素受質體 p-nitrophenyl-phosphate (Sigma) 室溫作用 30 分鐘，再用 Dynatech MR700 微量效價盤判讀儀 (microplate

reader) 以波長 405 nm 測吸光度。

5. ELISA 診斷試劑之最適化研究與的乾式試劑之開發

為了將各種 ELISA 診斷試劑製造成 ready-to-use 的型式，供未來各分局及地方衛生局使用，我們計畫將完成最適化的 ELISA 診斷試劑製成 commercial available format，以方便相關單位使用。為提高效率及產品品質，乾式 ELISA 診斷試劑的開發將透過委託生產的方式進行。

6. 現有商品化診斷試劑之評估

為積極建立一個國際水準的黃病毒參考實驗室，我們將進行已商品化檢驗試劑(包括 ELISA kit 及 rapid chromatographer strip 等)之評估工作，了解其靈敏度與特異性，與實驗室現有檢驗試劑之相關性。我們將與有意願的廠商合作，共同測試本實驗室所建立的 control panel，包括登革熱及日本腦炎的急性期及恢復期陽性及陰性血清，所有的陽性血清都是抗體陽轉所確定的。

7. 日本腦炎與登革熱病人 NS1 及 E 抗體血清盛行率流行病學研究

為了解台灣地區登革熱及日本腦炎的流行歷史、現況、及未來發展趨勢，做為制定防治政策的參考，我們計畫進行有系統的登革熱及日本腦炎的血清流行病學調查研究。我們將有系統的收集正常人及疫苗注

射者血清，分別測定非結構蛋白質一(NS1)及外套膜蛋白質(E)的特異性 IgM 與 IgG 抗體效價變化，以建立台灣地區日本腦炎與登革熱血清抗體盛行率資料。本計畫將在台灣各主要地區（北、中、南、東）收集正常人及疫苗注射者血清進行分析研究。

(3) 結果

1. 利用酵素免疫分析法 (ELISA) 建立一套完整的黃病毒血清學鑑別診斷系統：酵素免疫分析法具有快速、靈敏及可檢驗大量血清檢體的優點，且能夠分辨抗原特異性的 IgM, IgA, IgG, 與 IgE 不同 isotype 抗體反應。我們利用三種不同型式的 ELISA 方法，開發出一套完整的常規檢驗系統，並建立判定標準，使檢驗結果更為可靠。這套系統包括以外套膜蛋白質(Envelope protein, E) 為基礎的 Capture IgM 及 IgG ELISA, Indirect IgM and IgG ELISA, 與非結構蛋白質(NS1, NS3, NS5) 為基礎的 Indirect IgG ELISA, 這三種不同型式的 ELISA 方法，可以檢測恢復期血清中之病毒特異性抗體。藉著仔細分析大量確定病例血清檢體的經驗，我們發現若 Capture IgM 及 IgG ELISA 反應均為陽性時，可以很準確的判定大部分登革熱確定病例，即使只有單隻的血清檢體時，圖一為初次登革病毒感染患者血清之 Capture IgM and

IgG ELISA 之結果，而圖二為二次以上登革病毒感染患者血清之 Capture IgM and IgG ELISA 之結果，比較圖一及圖二，可以很容易看出 IgM/IgG 之比率可分辨是初次或二次以上感染。但有少數確定病例之血清檢體僅 Capture IgM 或 IgG ELISA 反應陽性，無法判定其臨床症狀是否為登革病毒感染，因其 IgM 或 IgG 抗體有可能是數個月前感染所留下來的，需要利用 Indirect IgM and IgG ELISA 來確定恢復期血清檢體之 IgM or IgG 抗體是否比急性期血清有四倍上升(圖三)。而非結構蛋白質一(NS1) 為基礎的 Indirect IgG ELISA 則能分辨初次及二次登革病毒感染(圖四)，及取代複雜的 PRNT 中和抗體法，分辨初次感染之登革病毒血清型別，利用於血清流行病學的研究(圖七)。表一是 91 年度部分確定病例 1-14 天血清檢體之 dynamic 分析，結果顯示隨著早恢復期往後，Capture IgM and IgG ELISA 可以判定約 80-90% 的確定病例，但有約 10-20% 的確定病例需要以 Indirect IgM and IgG ELISA 來確定恢復期血清檢體之 IgM or IgG 抗體是否比急性期血清有四倍上升。

2. 利用 sandwich ELISA 方法檢測急性期血清中病毒 NS1 抗原：利用 NS1 抗原特異性之單株抗體做為 primary 及 secondary

antibody，我們建立了一套 sandwich ELISA，可以檢測急性期血清中登革病毒 NS1 抗原。藉著仔細分析大量確定病例急性期與恢復期的血清檢體，我們發現急性期血清中登革病毒 NS1 抗原之表現與 NS1 抗體量成反比，即隨著登革病毒感染次數增加，NS1 抗原也不容易檢驗出。而在第一次或第二次登革病毒感染者，其急性期血清檢體大多可檢驗出 NS1 抗原；研究結果也顯示，NS1 抗原之表現與 RT-PCR 結果有很好的相關性(表二)。因此，雖然 NS1 抗原 ELISA 之靈敏度在急性期血清比 RT-PCR(特別是 real-time quantitative RT-PCR)差，此方法仍然是一有用的輔助診斷方法。

3. 實驗室 ELISA 檢驗試劑之改進與市售的檢驗試劑比較評估工作：在實驗室自備的 ELISA 檢驗試劑改進部分，我們目前完成了乾式 coating plate 之產品開發，這是利用委託製造方法，尋找適當廠商進行乾式 coating plate 生產。此外也完成了自動化的檢驗流程，可以快速的、大量的檢驗血清檢體，這對於防治工作極為重要。由於業務的需要，常有代理商希望我們協助進行其代理檢驗試劑的評估工作，也有廠商希望與我們合作，進行研發產品的比較及評估工作。我們陸續評估過 PanBio dengue and JE capture IgM ELISA kit (data not shown)、PanBio rapid chromatographer kit

(圖五)、dBest rapid one step dengue test kit (表三)、AccuSpot dengue fever IgG/IgM rapid chromatographer kit (表四)、Hope dengue IgM and IgG ELISA kit(表五) 及 Globio denType ELISA kit (圖六)等血清學檢驗試劑，這些 commercial kits 都有其優點，特別是以 strip chromatographer 為基礎的快速診斷試劑(15-20 分鐘即可判讀結果)，但都有偽陽性的問題，因此僅建議做為有典型症狀患者之臨床診斷參考用，以免誤判，造成不必要的困擾。

4. 台南市歷年來確定病例血清流行病學調查研究:利用 NS1 特異性之酵素免疫分析法，可以取代複雜的 PRNT 中和抗體法，分析大量血清檢體，進行 retrospective 或 prospective 血清流行病學的研究 (圖七)，解決目前登革熱血清流行病學研究之最大瓶頸。今年度，我們收集了台南市歷年來確定病例之後恢復期 (post-infection) 血清進行分析研究，比較其急性期、恢復期與後恢復期之 E/M-specific IgM and IgG 抗體及 NS1-specific IgG 抗體反應，結果顯示有 1/3 確定病例是屬於第二次感染，且與年齡層有密切相關性，即大多數二次感染確定病例是 60 歲以上，此結果也證實大多數台南市年青人在最近二十年來並未感染過登革熱 (data not shown)。

(4) 討論

目前，黃質病毒實驗室診斷，主要靠傳統之病毒分離、反轉錄酶/聚合酶鏈鎖反應法(reverse-transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)、及血清學方法。其中急性期血清因抗體尚未產生，主要靠反轉錄酶/聚合酶鏈鎖反應法來檢驗，為此，我們正積極研發更快速、更靈敏 特異性更高的螢光定量 RT-PCR 方法，來改進急性期血清之檢驗。在恢復期血清方面，主要靠檢驗特異性 IgM 與 IgG 抗體，但台灣地區由於有日本腦炎與登革熱二種病毒之流行，且多數民眾因接種日本腦炎疫苗已產生抗結構性蛋白質抗體，對於同質(homologous)與異質(heterologous) 黃病毒的 IgG 抗體有相當程度的交叉反應(cross-seroreactivity)，所以在血清鑑別診斷上相當困難。為解決這些問題，我們建立了一套完整的血清診斷系統，利用酵素免疫分析法(ELISA)快速及準確的檢驗出各種黃病毒感染。這包括以外套膜蛋白質(Envelope protein, E)為基礎的 Capture IgM 及 IgG ELISA，Indirect IgM and IgG ELISA，與非結構蛋白質(NS1、NS3、NS5)為基礎的 Indirect IgG ELISA，檢測恢復期血清中之病毒特異性抗體。在急性期血清中，則利用 sandwich ELISA 方法檢測特異性病毒 NS1 抗原。建立一套完整的血清診斷系統除了有助於快速診斷，對病患的治療

與防治工作有用外，也可以取代複雜的 PRNT 中和抗體法，應用於血清流行病學的研究，這也是目前登革熱血清流行病學研究之最大瓶頸。

(5) 結論與建議

由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，建立一套完整的黃病毒診斷系統（病毒學、血清學及分子診斷），能監測台灣地區已知存在的黃病毒（登革病毒及日本腦炎病毒）及未來可能會侵入的黃病毒（如黃熱病毒及西尼羅腦炎病毒）是十分重要的。本計畫主要目標在建立黃病毒血清診斷系統，希望能在台灣地區建立一個具有國際水準的黃病毒參考實驗室。我們建議在疾病管制局成立一個黃病毒研究中心，進行病媒、診斷、流行病學及防治各方面的研究，並逐步完成台灣各主要地區（北、中、南、東）登革熱及日本腦炎的血清流行病學調查研究，做為制定未來防治政策的參考。

(6) 參考文獻

1. Birch-Machin I, Rowan A, Pick J, Mumford J, Binns M. Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of Anti-NS1 antibody in post infection. *J. Virol. Methods* 1997; 65:255-263.
2. Bougrine SI, Fihri OF, Fehri MM. Western immunoblotting as a method for the detection of African horse sickness virus protein-specific antibodies: differentiation between infected and vaccinated horses. *Arch. Virol. Suppl.* 1998; 14:329-336.
3. Bundo K, Igarashi A. Antibody capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue haemorrhagic fever patients. *J. Virol. Methods* 1985; 11:15-22.

4. Burke DS, Nisalak A, Ussery MA. Antibody capture immunoassay detection of Japanese encephalitis virus immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 17:283-292.
5. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, et al. Antigenic relationships between flavivirus as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antiserum. *J. Gen. Virol.* 1989; 70:37-43.
6. Cane PA, Gould EA. Reduction of yellow fever virus mouse neurovirulence by immunization with a bacterially synthesized nonstructural protein (NS1) fragment. *J. Gen. Virol.* 1988; 69:1241-1246.
7. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 1990; 44:649-688.
8. Chen LK, Liao CL, Lin CG, et al. Persistence of Japanese encephalitis virus is associated with abnormal expression of nonstructural protein NS1 in host cells. *Virology* 1996; 217:220-229.
9. Churdboonchart V, Bhamarapavati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 44:481-493.
10. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1958; 7:561-573.
11. Cuzzubbo AJ, Endy TP, Vaughn DW, et al. Evaluation of a new commercially available immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Japanese encephalitis infections. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:3738-3741.
12. Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, et al. Comparison of PanBio dengue duo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and MRL dengue fever virus immunoglobulin M capture ELISA for diagnosis of dengue virus infections in Southeast Asia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999; 6:705-712.
13. Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J. Virol.* 1990; 64:4356-4363.
14. Falkler WA, Diwan AR, Halstead SB. Human antibody to dengue soluble complement-fixing (SCF) antigens. *J. Immunol.* 1973;

- 111:1804-1809.
15. Gubler DJ. Serological diagnosis of dengue haemorrhagic fever. *Dengue Bull.* 1996; 20:20-23.
 16. Gubler, D. J. 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International, p 1-22.
 17. Halstead, S. B., S. Rojanasuphot, and N. Sangkawibha. 1983. Original antigenic sin in dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**:154-156.
 18. Han XY, Ren QW, Xu ZY, Tsai TF. Serum and cerebrospinal fluid immunoglobulin M, A, and G in Japanese encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26:976-978.
 19. Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger JJ. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J. Gen. Virol.* 1988; 69:2101-2107.
 20. Hsieh, W. C., M. F. Chen, K. T. Lin. et al. 1982. Outbreaks of Dengue fever in 1981 in Liouchyong Shiang, Pingtung County. *Taiwan Yi Hui Za Zhi* **81**:1388-1395.
 21. Huang JH, Wey JJ, Sun YC, Chin C, Chien LJ, Wu YC. Antibody responses to an immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *J. Med. Virol.* 1999; 57:1-8.
 22. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 40:418-427.
 23. Kreil TR, Maier E, Fraiss S, Eibl MM. Neutralizing antibodies protect against flavivirus challenge but allow for the development of active humoral immunity to a nonstructural virus protein. *J. Virol.* 1998; 72:3076-3081.
 24. Ku CC, King CC, Lin CY, et al. Homologous and heterologous neutralization antibody responses after immunization with Japanese encephalitis vaccine among Taiwan children. *J. Med. Virol.* 1994; 44:122-131.
 25. Kuno G, Vorndam AV, Gubler DJ, Gomez I. Study of anti-dengue NS1 antibody by western blot. *J. Med. Virol.* 1990; 32:102-108.

26. Lanciotti, RS, Calisher, CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbio.* 1992; 30:545-551.
27. Lin YL, Chen LK, Liao CL, et al. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J. Virol.* 1998; 72:191-200.
28. Mackay DKJ, Forsyth MA, Davies PR, et al. Differentiation infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, nonstructural proteins in ELISA. *Vaccine* 1998; 16:446-459.
29. Makino Y, Tadano M, Saito M, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. *Microbiol. Immunol.* 1994; 38:951-955.
30. Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology* 1989; 169:354-364.
31. Monath TP, Nystrom RR, Bailey RE, Calisher CH, Muth DJ. Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of St. Louis encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20:784-790.
32. Monath TP. Pathobiology of flaviviruses. In: S.Schlesinger and M. Schlesinger. eds. *The Togaviruses and Flaviviruses*. New York: Plenum Press, 1986: 375-440.
33. Nimmannitya S, Halstead SB, Cohen SN, Margiotta MR. 1969. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with haemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hygiene* 18:954-971.
34. Nimmannitya S. 1987. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 18:392-397.
35. Oya A. Japanese encephalitis vaccine. *Acta. Paediatr. Jpn.* 1988; 30:175.
36. Patarapotikul J, Pothipunya S, Wanotayan R, Hongyantarachai A, Tharavanij S. Western blot analysis of antigens specifically recognized by natural immune responses of patients with Japanese encephalitis infections. *Southeast Asean J. Trop. Med. Public Health* 1993;

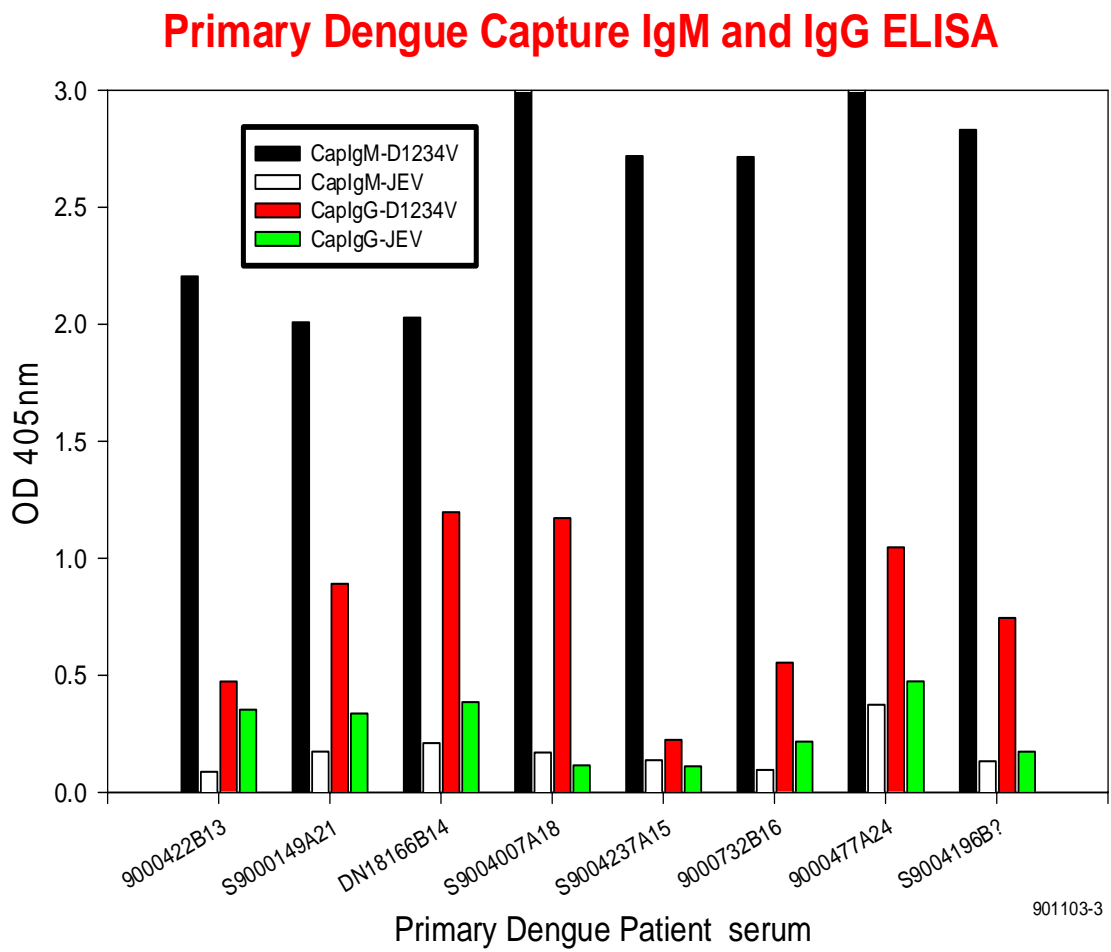
- 24:269-276.
37. Qu X, Chen W, Maguire T, Austin F. Immunoreactivity and protective effects in mice of a recombinant dengue 2 Tonga virus NS1 protein produced in baculovirus expression system. *J. Gen. Virol.* 1993; 74:89-97.
 38. Rosen L. 1977. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hygiene* 26:337-343.
 39. Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J. Immunol.* 1967; 99:285-290.
 40. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. 1984. Risk factors for dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 120:653-669.
 41. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Cropp CB, Monath T. Protection against yellow fever virus in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *J. Virol.* 1986; 60:1153-1155.
 42. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J. Gen. Virol.* 1987; 68:853-857.
 43. Shope R. Medical significance of Togaviruses: An overview of diseases in man and in domestic and wild vertebrate animals. In "The Togaviruses" (R. W. Schlesinger, Ed.), Academic Press, New York/London. 1980: 47-82.
 44. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Dengue NS1-specific Antibody Responses: Isotype Distribution and Serotyping in Patients with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. *J. Med. Virol.* 2000; 62: 224-232.
 45. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Antibody to the Nonstructural Protein NS1 of Japanese Encephalitis Virus: Potential Application of mAb-based Indirect ELISA to Differentiate Infection from Vaccination. *Vaccine.* 2001; 19: 1753-1763.
 46. Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, et al. Rapid serological diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that

- distinguishes primary and secondary infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60:693-698.
47. Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane associated after dimerization. *Virology* 1989; 171:302-305.
 48. Wu, Y. C. 1986. Epidemic dengue 2 on LiouChyou Shiang, Pingtung County in 1981. *Chinese J. Microbiol. Immunol.* 19:203-211.
 49. Wu, Y. C. 1996. Epidemiology and control of Japanese encephalitis and dengue fever in Taiwan. *World Health Organization, Dengue Bull.* 20:51-54.
 50. World Health Organization. 1997. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control.* Geneva: World Health Organization.

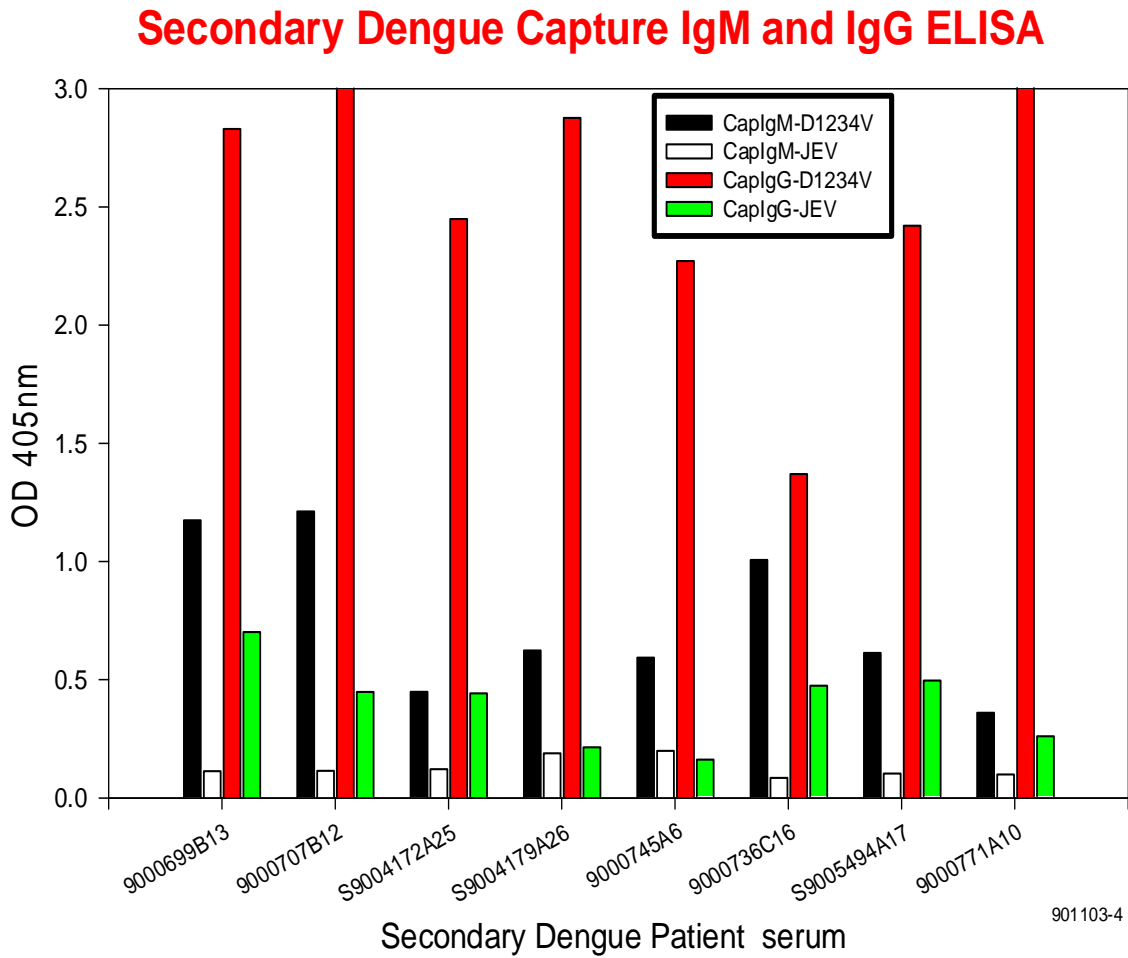
三、圖

圖一、

The representative results of Capture IgM and IgG ELISA from serum samples of primary dengue virus infection.

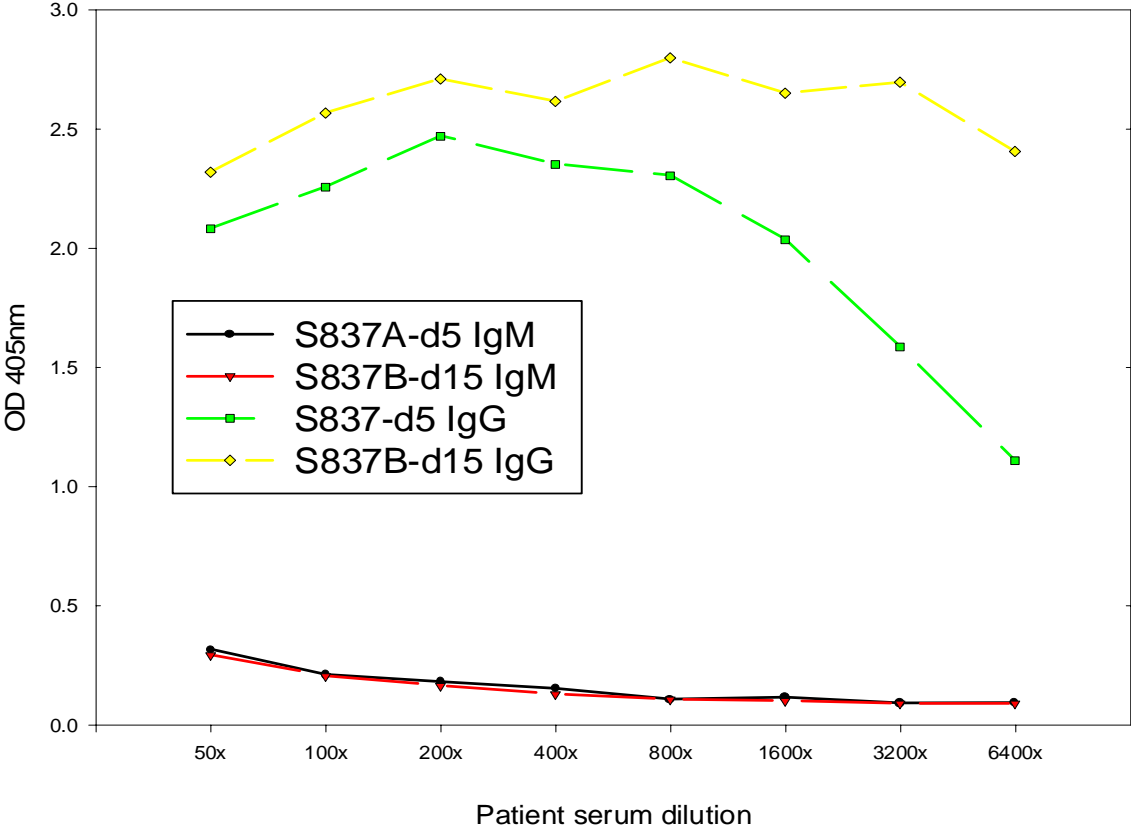


圖二、The representative results of Capture IgM and IgG ELISA from serum samples of secondary dengue virus infection.



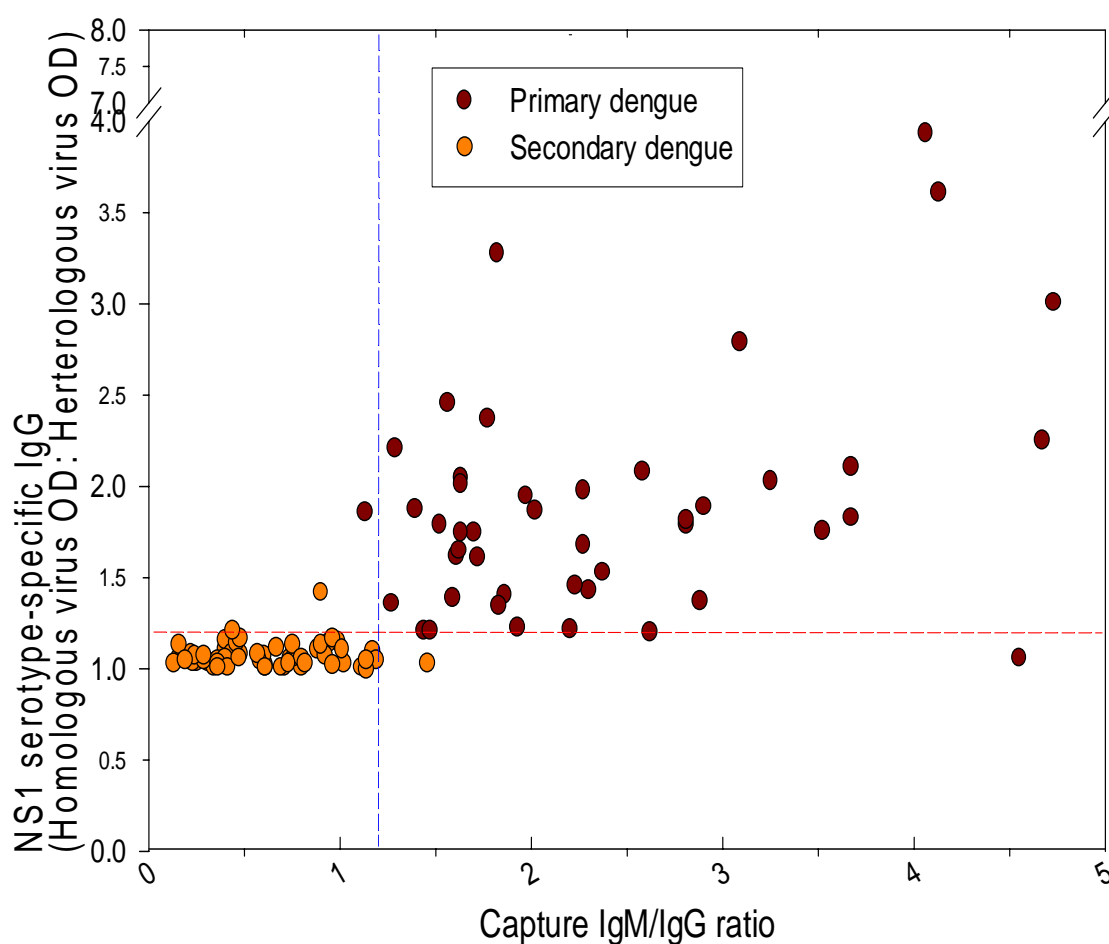
圖三、The representative results of Envelope-specific indirect IgM and IgG ELISA from paired serum samples of dengue virus infection.

Dengue E-specific Indirect IgM and IgG ELISA



圖四、 Correlation plot of capture IgM:IgG ratio and NS1 serotype-specific IgG ELISA. Comparison of individual assay values from serum samples designated as primary or secondary dengue virus infection collected between day 9 and 45 of illness. O.D., optical density.

Correlation of Capture IgM/IgG Ratio with NS1 Serotype-specific IgG ELISA in the Differentiation of Primary vs Secondary Infections



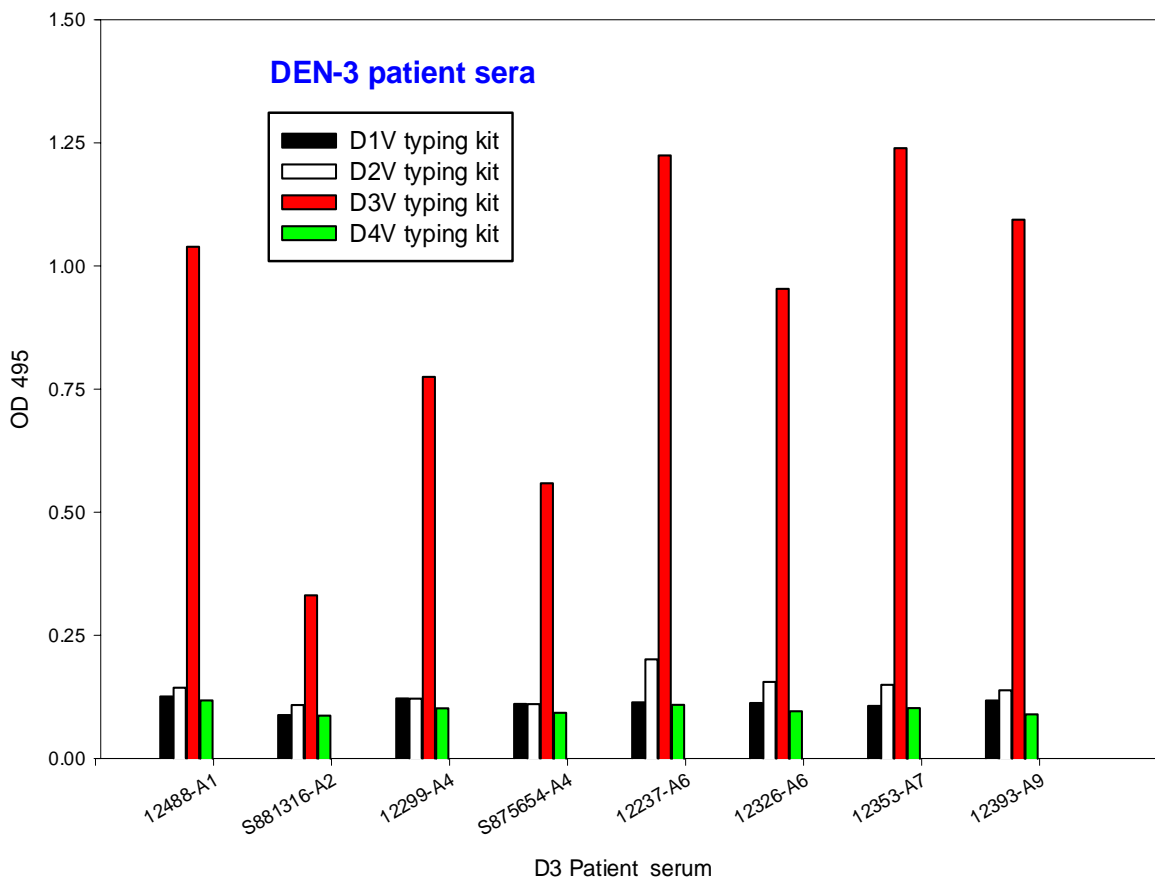
901123-1

圖五、 Evaluation of PanBio dengue rapid chromatographer strip in the detection of dengue virus infection. Serum samples from primary dengue infections (Strips 1 and 2), secondary dengue infection (Strips 3 and 4), normal individual (Strips 5 and 6), and JE patients were analyzed to evaluate the sensitivity and specificity of PanBio rapid strip kit.



圖六、 Evaluation of Globio denType ELISA kit for the detection and serotyping of dengue virus infections. The results shown are dengue virus type 3-specific ELISA.

Antigen-detecting ELISA for Dengue Virus Typing

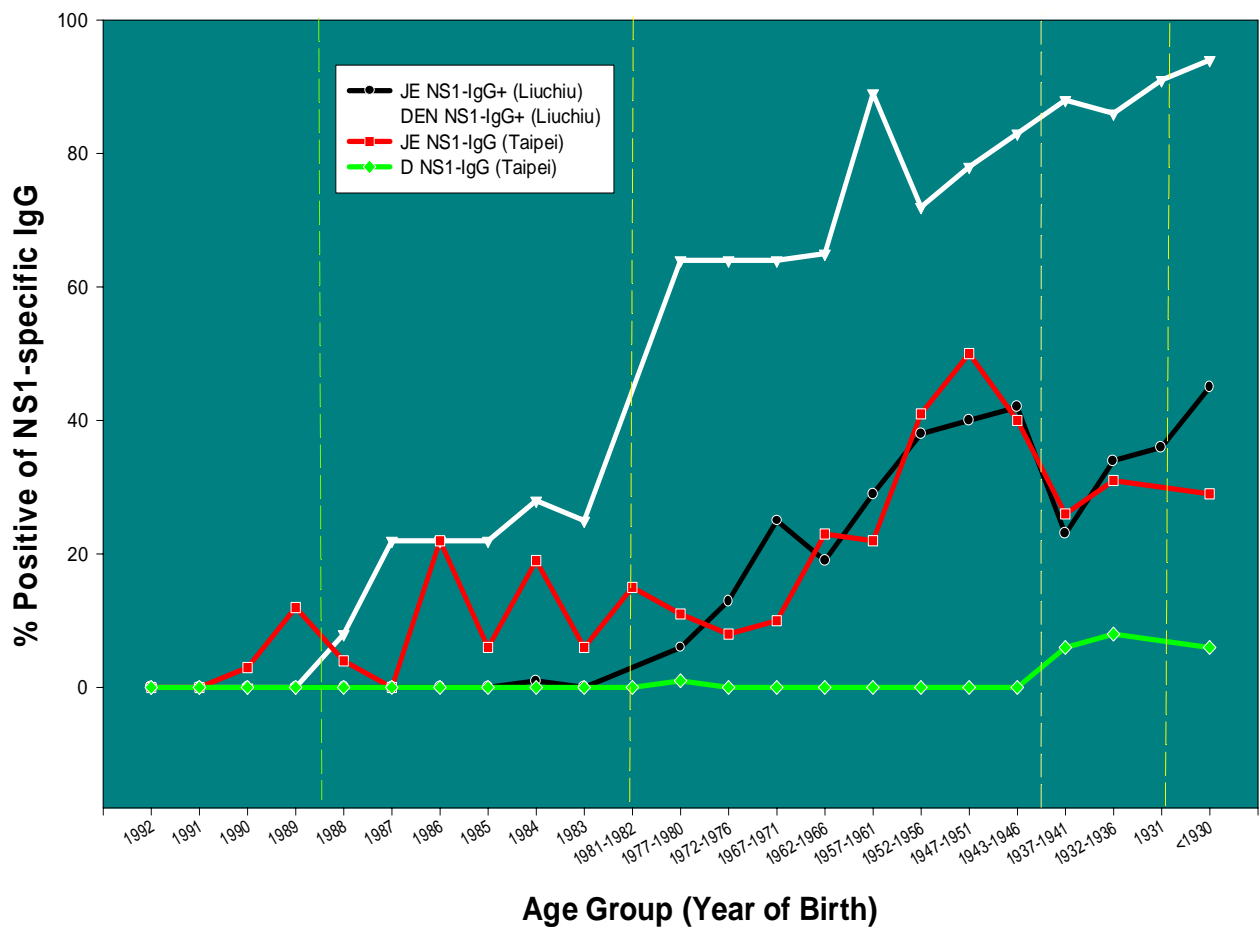


880323-1

圖七、

Seroepidemiological studies of JE and dengue virus infections based on NS1-specific IgG ELISA. Age-dependent seroprevalence of dengue and JE virus infections in Liuchiu Hsiang, Pingtung and Chinshan village, Tai[pei].

Seroprevalence of JE and Dengue Infections based on NS1-specific IgG in Liuchiu Hsiang/Pingtung County and Chinshan Village/Taipei County of Taiwan



四、表

表一、登革熱確定病例 1-14 天血清檢體之 dynamic 分析：Capture IgM and IgG ELISA 之常規檢驗結果，依 IgM 與 IgG 陽性結果判定疑似血清為陽性、陰性與無法判定三類。

91 年登革熱實驗室檢驗結果分析

占確定病例血清檢體之百分比 (%)

檢驗方法	檢驗結果	1天	2天	3天	4天	5天	6天	7天	8天	9天	10天	11-14天
Capture IgM and IgG ELISA	陽性	16.7	29	12.5	24.3	25	68.4	61.5	81	80	90	93.3
Capture IgM and IgG ELISA	無法判定	6.7	3.2	10	5.4	18.8	21.1	30.8	14.3	20	10	6.7
Capture IgM and IgG ELISA	陽性+											
Capture IgM and IgG ELISA	無法判定	23.3	32.3	22.5	29.7	43.7	89.5	92.3	95.2	100	100	100

表二、Detection of soluble NS1 antigen in the acute-phase sera of confirmed dengue patients using sandwich ELISA. Positive correlation and negative correlation were demonstrated for RT-PCR and/or virus isolation methods and NS1-specific IgG ELISA, respectively.

91 年登革熱本土確定病例實驗室檢驗												
Dengue patient	Day	RT-PCR	VI	Cap-IgM	Cap-IgG	NS1-IgG ELISA				NS1 Ag		
		D/F		Den	Den	PK-1	D1	D2	D3	D4	CC	ELISA
9102533A	7			0.559	0.228	0.313	0.268	0.261	0.237	0.232	0.234	0.558
9102533B	24			1.505	0.895	0.309	0.235	0.367	0.276	0.168	0.094	0.169
9100519A	9			0.711	0.153	0.175	0.132	0.127	0.13	0.108	0.112	1.444
9100519B	11			2.97	2	0.605	0.336	0.375	0.278	0.425	0.281	0.253
9101370A	9			3.409	0.257	0.201	0.163	0.156	0.146	0.155	0.149	0.958
9101370B	31			3.367	1.084	0.266	0.227	0.588	0.315	0.183	0.15	0.229
9100379A	3	RD2	D2	0.298	0.145	0.197	0.568	0.166	0.188	0.174	0.136	1.345
9100379B	10			2.275	3.898	0.263	2.795	3.259	3.265	3.166	0.134	0.144
9102594A	3	RD2	D2	0.226	0.241	0.216	0.578	0.251	0.267	0.232	0.25	1.366
9102594B	15			1.536	3.208	0.333	2.516	2.018	1.791	1.365	0.29	0.138
9101238A	2	RD2	D2	0.127	0.103	0.291	0.65	0.314	0.291	0.255	0.257	0.575
9101238C	9			1.383	3.462	0.818	3.165	3.308	2.332	1.644	0.286	0.192
9100525A	3	RD2		0.257	0.664	0.262	0.722	0.347	0.464	0.388	0.252	1.093
9100525C	8			0.786	3.229	0.213	1.163	1.032	1.039	0.639	0.111	0.163
9102560A	3	D2		0.284	0.299	0.279	0.579	0.341	0.478	0.442	0.309	1.356
9102560B	6	26/28/32		2.168	2.981	0.237	2.654	2.638	2.484	2.294	0.247	0.218
9102184A	2	D2	D2	0.267	0.222	0.201	0.528	0.218	0.229	0.187	0.174	1.087
9102184B	18	17/18/20		0.496	3.482	0.206	2.715	2.423	2.549	2.241	0.128	0.288
9101774A	5	RD2		0.143	1.206	0.2	1.077	0.717	0.203	0.171	0.218	1.343
9101774B	20			0.391	3.581	0.172	2.251	2.262	1.098	0.451	0.152	0.17
9100696A	8			0.347	1.103	0.291	1.103	0.81	0.581	0.397	0.289	0.566
9100696B	21			0.698	2.101	0.196	2.112	2.251	1.879	1.488	0.139	0.164
9101773A	3			0.632	3.526	1.062	2.641	2.164	2.174	2.295	0.155	0.23
9101773B	15			2.915	3.273	1.845	3.466	3.805	3.054	3.084	0.261	0.22
9102130A	6			3.646	3.475	0.137	3.185	2.89	2.781	2.368	0.116	0.188
9102130B	10			2.8	3.552	0.187	2.775	2.772	2.49	2.508	0.112	0.2

表三、 Evaluation of dBest rapid one step dengue test kit in the detection of dengue virus infection. Comparison of dBest dengue test kit with CDC-Taiwan Dengue and JE Capture IgM and IgG ELISA

No.	Capture IgM		Capture IgG		Comment	CDC DN ELISA 結果		dBest Cassett (美聯合)	
	DN	JE	DN	JE		IgM	IgG	IgM	IgG
1	0.193	3.328	0.097	0.636	JE	陰性	陰性	陽性	陰性
2	0.146	1.146	0.09	1.056	JE	陰性	陰性	陽性	陰性
3	0.26	2.891	0.259	0.946	JE	陰性	陰性	陽性	陽性?
4	0.194	1.419	0.175	0.513	JE	陰性	陰性	陰性	陰性
5	0.404	0.379	0.158	0.454	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
6	0.494	0.497	0.186	0.194	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
7	0.175	0.175	0.172	0.181	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
8	0.359	0.348	0.154	0.382	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
9	0.29	0.273	0.158	0.147	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
10	0.941	0.158	0.159	0.197	primary	陽性	陰性	陽性	陽性
11	2.22	0.278	0.523	0.725	primary	陽性	陽性	陽性	陽性
12	1.823	0.212	1.271	0.206	primary	陽性	陽性	陽性	陽性
13	0.732	0.167	0.277	0.227	primary	陽性	陰性	陽性	陽性
14	1.974	0.41	2.492	1.954	second	陽性	陽性	陽性	陽性
15	0.716	0.209	2.806	0.42	second	陽性	陽性	陽性	陽性
16	0.864	0.302	1.719	2.084	second	陽性	陽性	陽性	陽性
17	1.949	0.469	3.606	1.699	second	陽性	陽性	陽性	陽性
18	0.484	0.098	3.356	0.768	second	陽性	陽性	陽性	陽性
19	0.84	0.683	0.233	0.298	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
20	0.636	0.604	0.194	0.183	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
21	0.61	0.586	0.18	0.289	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
22	0.697	0.431	0.56	0.238	無法判定	陰性	陽性	陽性	陽性

DN: Dengue

JE: Japanese encephalitis

primary: dengue primary infection

second: dengue secondary infection

表四、Evaluation of AccuDx rapid dengue test kit in the detection of dengue virus infection. Comparison of AccuDx dengue test kit with CDC-Taiwan Dengue and JE Capture IgM and IgG ELISA.

	IgM		IgG		comment	AccuDx	
	DEN	JE	DEN	JE		IgM	IgG
24915	2.381	0.213	1.68	1.913	primary	++	++
24920	3.161	0.175	1.329	0.748	primary	+	+/-
24926	1.721	0.215	0.765	0.157	primary	++	++
24889	2.668	0.405	0.509	0.149	primary	++	++
24898	1.352	0.166	0.325	0.156	primary	+	++
24735	0.537	0.264	0.154	0.306		+/-	-
24934	1.011	0.246	3.606	2.462	second	-	++
24790	1.112	0.261	2.07	0.252	second	+	++
24827	1.68	0.131	3.36	2.424	second	++	+++
24843	1.536	0.175	3.208	0.66	second	+/-	+++
24741	0.945	0.128	3.391	1.42	second	+	++
24777	0.536	0.314	1.399	0.192	second	+/-	++
24854	0.749	0.698	0.119	0.167	NC	+/-	-
24841	0.764	0.535	0.126	0.169	NC	+/-	-
24663	0.727	0.698	0.158	0.149	NC	+/-	-
24742	1.004	1.045	1.829	2.331		+/-	+/-
24905	0.263	0.161	0.161	0.159	NC	+/-	-
24906	0.259	0.131	0.23	0.155	NC	-	-
24908	0.289	0.178	0.152	0.272	NC	+/-	-
24910	0.209	0.197	0.193	0.187	NC	+/-	-
21451	0.243	2.169	0.119	0.207	JE	-	-
21453	0.24	0.914	0.118	0.597	JE	+	+
21523	0.225	2.125	0.141	0.618	JE	+/-	-
21526	0.368	2.013	0.16	0.513	JE	-	-
21551	0.489	2.967	0.143	0.342	JE	-	-

表五、Evaluation of HOPE Dengue Envelope-specific Indirect IgM and IgG ELISA in the detection of dengue virus infection. Comparison of HOPE dengue test kit with CDC-Taiwan Dengue and JE Capture IgM and IgG ELISA

HOPE Indirect IgM and IgG ELISA 檢驗試劑評估

	HOPE		CDC-CapIgM		CDC-CapIgG		Comments
	DEN-IgM	DEN-IgG	DENV	JEV	DENV	JEV	
NC	0.027	0.024					
CO	0.876	1.182					
CO	0.914	1.044					
PC	1.429	2.196					
22132	0.657	0.991	0.249	1.546	0.083	0.08	JE patient
22135	1.134	3.054	0.214	1.379	0.09	0.322	JE patient
21883	2.96	3.211	1.4	0.326	0.763	0.737	Primary DEN
21921	3.723	3.428	2.205	0.18	1.104	0.443	Primary DEN
21960	3.475	3.36	1.508	0.126	0.539	0.465	Primary DEN
22029	3.514	3.206	1.109	0.099	0.516	0.053	Primary DEN
22129	3.766	2.957	2.225	0.148	1.301	0.096	Primary DEN
21884	1.226	3.523	1.583	0.125	2.934	0.5	Secondary DEN
22055	0.829	3.796	0.692	0.479	2.091	0.771	Secondary DEN
22075	0.906	3.902	0.686	0.101	1.741	0.844	Secondary DEN
22137	1.692	3.679	1.268	0.205	2.506	1.034	Secondary DEN
22181	1.665	3.609	2.037	0.269	3.169	1.471	Secondary DEN
21855	2.836	3.457	2.69	0.094	0.04	0.038	Primary DEN
22160	3.709	2.933	3.116	0.322	0.165	0.163	Primary DEN
22046	3.352	2.012	1.147	0.146	0.069	0.06	Primary DEN
22163	2.023	1.058	0.663	0.118	0.083	0.076	Primary DEN?
21916	1.353	0.11	0.816	0.759	0.099	0.09	False positive
21987	2.707	3.499	0.602	0.528	0.192	0.079	False positive
22173	1.668	0.468	0.648	0.502	0.076	0.074	False positive

五、附錄

附件

行政院衛生署疾病管制局 90 年 10 月

台南市登革熱確定病例（83-89年）回顧性調查研究問卷

訪視日期：_____年_____月_____日

訪視者：_____

一、個案背景資料：

姓名：_____ 編號：_____ 性別：_____

出生日期：_____年_____月_____日

住址：_____市_____區_____里_____街（路）

_____段_____巷_____弄_____號_____樓

電話：（_____）_____

工作地：_____市_____區_____里_____街（路）

_____段_____巷_____弄_____號_____樓

二、居住地：您曾住過哪些地方（台南市以外地區）

1. _____年~_____年，_____縣市_____鄉鎮區市區_____里

2. _____年~_____年，_____縣市_____鄉鎮區市區_____里

三、登革熱感染：您曾感染過幾次登革熱（例如民國 4-5 年、16 年、20 年、31-32 年、76 年、83 年、84 年、86 年、87-88 年、89 年等）？

一次 二次 三次 四次 不確定

第一次感染時間：_____年_____月，感染地點：_____縣市（或國外地區）

第二次感染時間：_____年_____月，感染地點：_____縣市（或國外地區）

第三次感染時間：_____年_____月，感染地點：_____縣市（或國外地區）

四：您出現登革熱症狀前後，家人及鄰居、親戚朋友是否也有和您相似症狀？

否 是