

計畫編號：DOH96-DC-2002

行政院衛生署疾病管制局九十六年度科技研究發展計畫

節肢動物媒介病毒之主動監測與實驗室診斷

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、陳昶勳、李翠瓊、楊正芬、蘇千玲、張淑芬、
蔡坤憲、陳宗佑、鄭佳欣

執行期間：96年1月1日至96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)
英文摘要	(4)
二、本文	
(1) 前言	(5-7)
(2) 材料與方法	(8-11)
(3) 結果	(12-15)
(4) 討論	(16)
(5) 結論與建議	(17)
(6) 參考文獻	(18-21)
三、表次	(22-26)
四、圖次	(27-28)
	共 (28)

頁

中文摘要

在全球經濟一體化趨勢下，國際貿易和旅遊愈趨頻繁與便捷，為傳染病的國際傳播與擴散提供了有利條件，各種新興及再浮現傳染病對人類健康所造成的威脅日益嚴重；如何因應此發展趨勢，在傳染病爆發全球大流行威脅下，建立一個更有效率的國際化監測網路及現代化檢驗系統，防止病原菌的全球擴散是公共衛生上極為重要的挑戰。台灣地區自 SARS 後期所建立的機場發燒篩檢系統，利用機場紅外線體溫偵測儀篩檢發燒病患，並配合檢驗實驗室之快速檢驗，監測與發燒有關之傳染病（包括新型流感、瘧疾、腸道疾病、鼠疫、登革熱、黃熱病、屈公病等），已證明是一項有效的監測措施，能及時篩檢出有傳播力的病患，減少病原菌之境外移入與境內擴散。由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加，其中又以蚊蟲（mosquito）及壁蝨（Tick）所媒介的節肢動物媒介病毒（arthropod-borne viruses, Arbovirus）傳染病最重要。本計畫的主要目標在建立一套有效的節肢動物媒介病毒主動監測與實驗室診斷系統：在主動監測方面，配合機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患進行例行性的篩選；在實驗室診斷方面，建立快速的檢驗方法，進行節肢動物媒介病毒的篩選與確認。本年度已建立完成黃病毒屬（Flavivirus）及阿爾發病毒屬（Alphavirus）重要病毒的檢驗方法，並由機場發燒篩檢系統確認出 60 例境外移入登革熱患者及 1 例屈公病患者。在實驗室分子診斷方面，我們建立了多重病毒篩檢方法（multiplex real-time RT-PCR），可以大量的檢驗發燒病患急性期血清，同時偵測各種可能引進的節肢動物媒介病毒；在屈公病檢驗方面，我們建立了高靈敏度及高特異性的 ELISA 檢驗方法。

關鍵詞：節肢動物媒介病毒、主動監測、發燒篩檢、登革熱、屈公病、實驗室診斷、PCR、ELISA、病毒分離

英文摘要

In the global trend of economic integration, international trade and tourism have become increasingly frequent and convenient providing favorable conditions for the international spread of emerging and re-emerging infectious diseases endangering human health. How to respond to this threat of infectious disease outbreaks in the global pandemic by establishing more efficient international monitoring network and modernization inspection system have been extremely important challenges. Since the late SARS outbreak in 2003, Taiwan CDC had implemented a fever screening at airports active surveillance program utilizing infrared thermal detection instrument to monitor potential imported cases with various infections (including new influenza, malaria, intestinal disease, plague, dengue fever, yellow fever, chikungunya fever, etc.). The surveillance system has been proven to be successful in the detection of imported cases supported by the devoted diagnostic laboratory, which allows timely control measures to be implemented to prevent further spread of the imported pathogens. As global warming impact, the geographic distribution and case numbers of vector-borne infectious diseases are rapidly increasing. Among them, the mosquito-borne and tick-borne arboviruses are the most important. The main objective of this project is to establish a laboratory-based surveillance system for the detection of arboviruses. In 2007, we established diagnostic tests for the detection and differentiation of various flaviviruses and alphaviruses. A multiplex real-time RT-PCR has been developed to simultaneously detect various flaviviruses and alphaviruses in the acute-phase serum samples. In addition, a sensitive and specific alphavirus-specific ELISA was developed to detect and differentiate chikungunya virus infection from flavivirus infections. Through fever screening at airport surveillance, we have so far identified 60 imported dengue cases and 1 chikungunya case.

Keyword: fever screening at airport, dengue fever, chikungunya fever, multiplex real-time RT-PCR, ELISA.

前言

目前台灣地區入境民眾每日約 25,000 至 35,000 名旅客，平均一年國人入境人次數約 800-1,200 萬人。為防範境外移入傳染病之發生及散佈，自民國 92 年 3 月 SARS 疫情開始，行政院衛生署疾病管制局針對入境旅客全面測量體溫，並於同年 7 月 14 日起，將機場的發燒篩檢列為傳染病監測系統，利用紅外線體溫偵測儀測量入境旅客的體溫。有發燒症狀者，經醫師診斷後，經由疾病管制局主動採取病人檢體，檢驗相關傳染病（包括新型流感、瘧疾、腸道疾病（主要為桿菌性痢疾及霍亂）、鼠疫、登革熱、黃熱病、屈公病等）。目前經機場發燒篩檢檢疫偵測，每年約有超過 20,000 入境旅客有發燒症狀（比例約為千分之 3 至千分之 10），約有 5,000-6000 人經採取臨床檢體送實驗室檢驗。此傳染病監測措施，成效良好，於民國 92、93 及 94 年分別檢驗出登革熱確定病例 14、57 及 46 人（95 年為 47 人），桿菌性痢疾 32、43 及 10 人，瘧疾 1、3 及 1 人，93 年霍亂 1 人。因為這些確定病例多處於急性期，機場發燒篩檢及高效率的實驗室檢驗，可及時發現境外移入的確定病例，進行防治工作，有效的防止病原菌的散播。利用發燒篩檢所偵測及分離出之登革病毒株及建立之基因資料庫，對分辨現有病毒或新引進病毒的傳播及監測相當重要，並有助於了解東南亞地區登革病毒的演化及流行情形。建立以實驗室為基礎的監測系統，配合相關的各種防治措施，包括流行病學調查、衛教宣導、病媒蚊調查、孳生源清除及噴藥等，對登革熱的防治是極為重要的。目前機場的發燒篩檢已成為台灣地區最重要的監測系統之一，能有效降低傳染病的引進(1)。登革熱機場發燒篩檢的經驗顯示出病原菌的成功檢出與此傳染病的輸出國家之流行幅度、入境旅客之人數與地區、及檢驗實驗室的效能有關，93-95 年間之監測結果顯示，越

南、印尼、泰國及菲律賓是主要的引進國家。

在各種新興及再浮現傳染病中，新型流感（Pandemic Influenza）、登革熱、瘧疾、黃熱病、西尼羅河熱/腦炎、及桿菌性痢疾等是目前主要監測的項目。但其他的傳染病也不能忽視。例如，地處印度洋的法國海外省份留尼旺島（island of Reunion）自 2005 年三月爆發屈公病以來，估計已有 255,000 人受感染(2)。該疫情逐漸擴大，除留尼旺島，同樣位於非洲東岸對出的塞席耳、模里西斯、馬達加斯加、葛摩群島等亦受波及，並傳播至亞洲地區引發流行。2006 年三月底香港衛生防護中心宣佈檢測出一宗境外移入案例(3)；四月初馬來西亞衛生部也證實屈公病在霹靂州迅速傳播，有超過 300 人受感染(4)；在印度已有 29 個村莊在流行，估計有超過 100,000 人受感染，其中有一處同時有登革熱及屈公病的流行(5,6)。在歐洲方面，法國、德州、英國、比利時、捷克、與挪威等國分別監測到 307、17、9、12、1 及 1 人境外移入確定病例。截至目前為止，已有 213 人直接或間接因此病致死，WHO 及歐盟正採取必要措施，協助入侵地區對抗此流行(7)。由於屈公病與登革熱一樣，主要的傳染媒介都是埃及斑蚊和白線斑蚊兩種病媒蚊，臨床症狀也很相似，進行鑑別診斷是十分重要的(7,8)。

由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加，發生頻率日益頻繁與嚴重，其中又以蚊蟲（mosquito）及壁蝨（Tick）所媒介的節肢動物媒介病毒（arthropod-borne viruses, Arbovirus）傳染病最重要(9)。目前歸類為節肢動物媒介的病毒有 500 多種，其中超過 100 種可感染人類，主要分佈在四個病毒屬，包括阿爾發病毒（alphaviruses），黃病毒（flaviviruses），本洋病毒（bunyaviruses），及呼腸孤病毒（reoviruses）。Alphaviruses 的主要疾病為屈公病（Chikungunya）、羅斯河病毒病（Ross River virus disease）、東方馬腦炎（Eastern Equine

encephalitis, EEE)、西方馬腦炎(Western Equine encephalitis, WEE)、及委瑞內拉馬腦炎(Venezuelan equine encephalitis, VEE)等; Flaviviruses 的主要疾病為登革熱 (Dengue)、黃熱病 (yellow fever)、日本腦炎 (Japanese encephalitis)、西尼羅河熱 / 腦炎 (West Nile fever/encephalitis)、聖路易腦炎 (St. Louis encephalitis)、及壁蝨腦炎 (Tick-Borne Encephalitis Virus, TBEV) 等; Bunyaviruses 的主要疾病為加利福尼亞腦炎(California encephalitis, 如 LaCrosse encephalitis)、裂谷熱 (Rift Valley fever)、及克里米亞-剛果出血熱 (Crimean-Congo hemorrhagic fever) 等; Reoviruses 的主要疾病為科羅拉多壁蝨熱 (Colorado tick fever)。

為有效的防止節肢動物媒介病毒的入侵，需要建立一套有效的節肢動物媒介病毒主動監測與實驗室診斷系統。在主動監測方面，配合機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患進行例行性的篩選、檢驗能減少境外移入的病患。實驗室診斷方面，我們將依據近年來研究黃病毒分子診斷的經驗(10,11)，建立了多重病毒篩檢方法 (multiplex real-time RT-PCR)，利用以病毒屬(或群)共通引子 (consensus primers) 為基礎的 SYBR Green I-base 即時螢光定量 RT-PCR (Real-time RT-PCR) 方法，可以大量的檢驗發燒病患急性期血清，同時偵測到各種可能引進的節肢動物媒介病毒。再配合病毒特異性的引子 (virus-specific primers) 及核酸序列方法，即可確認病毒種類(12)。之後再配合傳統細胞培養的病毒分離及血清學方法，則可進一步確認感染與鑑定病毒特性(13,14)。目前，實驗室配合機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患進行急性期血清之例行檢驗，可在收到檢體後 24-48 小時內完成。

材料與方法

本計畫之實施方法主要分為三部分：(一) 利用多重病毒篩檢螢光定量 RT-PCR 技術 (multiplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR)，開發節肢動物媒介病毒傳染病之分子診斷方法；(二) 病毒的分離、鑑定與基因定序；(三) 利用免疫螢光抗體分析法 (IFA) 及酵素免疫分析法 (ELISA)，開發節肢動物媒介病毒傳染病血清學檢驗方法。茲將實驗方法分述如下：

(一) 利用多重病毒篩檢螢光定量 RT-PCR 技術 (multiplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR)，開發節肢動物媒介病毒傳染病之分子診斷方法。本計畫實施策略係配合 Mx4000 定量 PCR 序列偵測儀，有系統地找出最具潛力的核酸引子組(primer pair)合。實驗方法如下：

1. **血清檢體及病毒株來源**：血清檢體來源為通報自疾管局之各種節肢動物媒介病毒感染之血清，及配合機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患進行例行性的篩選。全部檢體 (血清 3c.c.)，以保持低溫之國內快捷郵件寄送或由專人親送方式送達實驗室。而實驗室於收到檢體後立即置於 4°C 冰箱內靜置保存，隨後進行後續之檢驗分析事項。各種病毒株之來源為購自 ATCC 或設法由其他實驗室取得。
2. **抽取病毒核糖核酸 (RNA extraction)**：以 QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) 抽取及純化病毒核酸。詳細的步驟如下：首先將病人血清檢體加入溶解液，分解蛋白質等雜質，同時將核糖核酸酶去活性，再將處理後的血清加到離心圓柱中，使核糖核酸與矽土膜結合，再經過離心及加入清洗液之重覆步驟清洗離心圓柱，最後以純水將核糖核酸洗脫下來。血清(140 µl)中的 RNA 依據本法萃取，最後將 RNA 溶於 70 µl 純水(Water , containing 0.02% sodium azide)。

3. **引子(Primer)的設計與合成**：引子的設計可依不同的需要而定，其功能是在有效地擴增模版 DNA 序列。理論上螢光定量 PCR 的靈敏度可以到達 1~10 copies/Rxn，可藉由核酸引子之設計及純化、檢體核酸的萃取及純化、反應試劑之選擇、反應條件之修正等，改善系統之靈敏度及專一性。目前已開發出一些可用於黃病毒及阿爾發病毒的引子組。
4. **SYBR Green 即時螢光定量反轉錄酶／聚合酶鍊鎖反應 (SYBR Green Real-time RT-PCR Reaction)**：使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μ l 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5 μ l QuantiTect RT Mix，最後加入 10 μ l 檢體 RNA，反應最終體積為 50 μ l。再進行 SYBR Green one-step RT-PCR 反應：50 $^{\circ}$ C RT 作用 30 分鐘，PCR 作用 95 $^{\circ}$ C 15 分鐘，45 次循環之 94 $^{\circ}$ C 15 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 20 秒、77 $^{\circ}$ C 30 秒（讀取螢光值）。
5. **熔點曲線分析(Melting curve analysis)**：RT-PCR 反應完成後，再進行熔點曲線分析：95 $^{\circ}$ C, 1 分鐘、68 $^{\circ}$ C, 30 秒，再進行 45 次循環，每次循環比前次溫度+0.5 $^{\circ}$ C/30 秒/循環。

(二) 病毒的分離、鑑定與基因定序。實驗方法如下：

1. **病毒的分離與鑑定**：血清檢體來源為通報自疾管局之各種節肢動物媒介病毒的分離，係將病人血清、腦組織液(CSF)、或媒蚊均質液經 C6/36、Vero 等常用之細胞株培養至少 7 天後分離出病毒，再以病毒專一性單株抗體【如 Flavivirus-specific mAb (D56.3)、JEV group-specific mAb (E3.3)、dengue group-specific mAb (ATCC HB114)、Alphavirus virus-specific mAb (1A4B6 (Chemicon) 與 sc-58088 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)】等做免疫螢光染色，以鑑定分離之病毒及其血清型。
2. **基因定序與親源性分析**：對於具有代表性的分離病毒株，以病毒培養液為材料，進行 5'端非轉譯區及整個結構基因的定序工作，RT-PCR 產物經瓊膠電泳分離及純化後，以 ABI Prism 3700 DNA

sequencer (Applied Biosystems) 核酸定序儀定序 (315 定序實驗室)。特殊的境外移入病毒株會進行病毒完整基因之全長定序。Chikungunya 病毒的基因定序所用之引子及係依據 schuffenecker 等人文獻。親源性分析係依據 23 株 Chikungunya 病毒部分 E1 基因序列 (255 bp) 的排序比對，並追查 2 株境外移入病毒之來源。

(三) 利用間接免疫螢光抗體分析法 (IFA) 及酵素免疫分析法 (ELISA)，開發節肢動物媒介病毒傳染病血清學檢驗方法，實驗方法如下：

1. 單株抗體之製備、純化與分析：單株抗體之來源將由不同管道取得，包括購買、請求贈與、自行生產或以合作研究方式取得。分別用於不同型式 ELISA 開發，進行鑑別診斷及分型研究。自行生產之單株抗體將以 BALB/c 小白鼠之腹水方式生產，再以 protein A sepharose 4B Fast Flow 親和力管柱(Pharmacia Biotech) 純化。其中 Alphavirus virus-specific mAb (1A4B6 與 sc-58088) 是分別購自 Chemicon 及 Santa Cruz Biotechnology, Inc.公司，可用於 Alphavirus virus 的血清學檢驗。
2. 病毒之生產與純化：病毒之體外細胞培養係利用 C6/36、Vero 等常用之細胞株生產各種節肢動物媒介病毒。經細胞培養大量生產後分裝保存於-70°C 中，供相關實驗使用。各種節肢動物媒介病毒感染 Vero 細胞所培養之上清液也是 NS1 抗原的來源。
3. 屈公病毒 E1 結構基因重組蛋白質之製作與高效價腹水抗體之生產：利用 E. coli 表現屈公病毒 E1 結構基因重組蛋白質，經純化後得到 28 kd 含有 His 6 tag 的 E1 重組蛋白質，用於 ELISA 檢驗。為製作屈公病毒特異性抗體，利用純化之屈公病毒免疫 BALB/c 小白鼠方法，生產高效價抗體之腹水，用於 ELISA 檢驗。
4. 間接免疫螢光抗體分析法 (IFA)：(1)製備抗原玻片:將病毒培養之細胞，滴在 12 孔玻璃片上，室溫中風乾後，置於-20°C 丙酮固定 10 分鐘，室溫下乾燥，此抗原抹片可保存於-20°C 冰箱中或直

接染色; (2) 加入待測之血清檢體 (可做 20、40、80、160 倍連續稀釋), 置於 37°C 培養箱 30 分鐘, 之後將抹片取出並以磷酸鹽緩衝液 (換三次) 洗去多餘之抗體, 再以蒸餾水沖洗, 在室溫中將玻璃片吹乾; (3) 將抹片加上 25 μ l 螢光標記之山羊抗人抗體 (FITC-Goat Anti-Human IgG), 置於 37°C 培養箱 30 分鐘, 之後將抹片清洗後, 滴上甘油緩衝液及蓋玻片以螢光顯微鏡檢查。

5. **Capture IgM/IgG 酵素免疫分析法:** 先以 100 μ l 抗人 IgM 或 IgG 特異性之山羊 IgG (goat IgG against Human IgM or IgG) 在 4°C 下隔夜吸附 (coating) 在 96 孔微量效價盤上。吸附完成後以磷酸緩衝液 (PBS) 清洗, 之後再用 200 μ l 之 1% 牛血清白蛋白緩衝液 (1% Bovine serum albumin in PBS) 於 37°C 下進行 1 小時封鎖作用 (blocking)。清洗後, 加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照組血清 100 μ l 反應 1 小時。清洗後, 加入 100 μ l 細胞培養的病毒抗原, 在 37°C 下反應 1 小時。清洗後, 加入 1/1000(v/v) 稀釋之抗病毒之單株抗体 100 μ l。反應 1 小時後, 加入 1:1000 稀釋之山羊抗鼠 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合物 100 μ l, 於 37°C 反應 1 小時。清洗後, 加入 100 μ l 酵素受質體 PNPP (p-nitrophenyl-phosphate) 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。

結果

1. 利用多重病毒篩檢螢光定量 RT-PCR 技術 (multiplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR), 開發節肢動物媒介病毒傳染病之分子診斷方法: 為有效監測病毒血症發燒患者感染節肢動物媒介病毒, 我們建立了一套三個 wells 的 multiplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR 方法, 每一個 well 內都加入多套混合的核酸引子組, 分別可測定 flavivirus (dengue virus, JE virus, yellow fever virus, 及 West Nile virus 等), dengue virus (4 serotypes), 及 alphavirus (chikungunya virus 及 Ross River virus 等)。表一為各種引子的詳細資料, 包括引子序列, 基因位置及反應物大小等。表二為 Alphavirus 的 multiplex 測試結果, 顯示 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'), chikungunya virus-specific primer set (F-CHIK: 5'-AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA AG-3' (15) 及 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') 的混合核酸引子組可有效用於 alphavirus 之檢驗。
2. 利用機場發燒篩檢境外移入的節肢動物媒介病毒: 為有效配合機場發燒篩檢系統, 對疑似發燒病患之急性期血液檢體進行例行性的篩選, 我們建立了多重病毒篩檢方法 (multiplex real-time RT-PCR), 可同時偵測各種可能引進的節肢動物媒介病毒。今年(96年)度至 10 月底已完成約 4000 件發燒病患之疑似檢體, 已篩選到 60 例境外移入登革熱確定病例及 1 例屈公病確定病例。表三為所有登革熱境外移入確定病例(共 144 名, 包括醫院通

報、機場發燒篩檢及其他主動通報系統)感染地之分布與病毒血清型別，其中越南、印尼、柬埔寨及菲律賓是主要的引進國家，病毒血清型別則以第一型登革病毒最多。

3. **屈公病的境外移入病患：**台灣地區自 95 年初開始進行節肢動物媒介病毒監測至今，我們分別於 95 年 11 月與 96 年 6 月自桃園國際機場入境發燒篩檢系統各檢驗出 1 例屈公病確定病例。表四為二例患者之相關資料，臨床症狀和實驗室檢查結果。其中 95 年 11 月 20 日，一名 13 歲的台灣學生，在新加坡的一個國際教育培訓中心留學返國時，於桃園國際機場經發燒篩檢系統篩檢出 (16)，其 alphavirus-specific primer set 混合核酸引子組進行的 real-time RT-PCR 檢驗為陽性，隨後的病毒分離及序列分析證實為一例屈公病確定病例。利用免疫螢光抗體方法檢測第 2 天及 14 天血清標本，顯示屈公病毒特異性免疫球蛋白抗體效價(IgM+G+A)分別為< 20 和 640。此病患檢體的 Partial E1 基因定序結果與目前仍在流行的印度株最相似 (IND-06-TN1 of East/Central/South African genotype) (圖一)。而 96 年 6 月 21 日於桃園國際機場入境發燒篩檢檢驗出台灣地區第二例境外移入個案，係一名由印尼入境的 5 歲台灣男童，他和他的母親曾去過印度尼西亞的東加里曼丹省，在那裡參觀了一些親戚。其 alphavirus-specific primer set 混合核酸引子組進行的 real-time RT-PCR 檢驗為陽性，隨後的病毒分離及序列分析證實為屈公病感染。利用免疫螢光抗體方法檢測第 3 天及 19 天血清標本，顯示屈公病毒特異性免疫球蛋白抗體效價(IgM+G+A)分別為< 20 和 640。此病患檢體的 Partial E1 基因定序結果屬於亞洲基因型(Chikungunya Asian genotype)，與馬來西亞株, MALh0198 (圖一)或印度尼西亞株, RSU1 最相近 (data not shown, based on

1044 bp partial E1 gene sequences) of Asian genotype。

4. **屈公病毒 E1 結構基因重組蛋白質之生產與高效價腹水抗體之製作：**我們利用 gene cloning 方法在 *E. coli* 生產含有 His 6 tag 的 28 kd 屈公病毒 E1 基因重組蛋白質，經純化後用於 ELISA 檢驗。另外，也利用免疫 BALB/c 小白鼠腹水方法製作屈公病毒特異性抗體用於 ELISA 檢驗。表五為利用 E1 重組蛋白質進行 ELISA 之結果，顯示可測出屈公病毒特異性 IgG 抗體，但是靈敏度與特異性仍有待改進。而小白鼠生產之腹水抗體效價與特異性也仍待改進。
5. **利用 ELISA 方法，進行開發節肢動物媒介病毒傳染病血清學檢驗方法：**雖然利用自行生產屈公病毒 E1 基因重組蛋白質及高效價腹水抗體之結果並不理想，仍需繼續努力改進，但利用商品化可購買的 alphavirus 特異性單株抗體，我們成功地建立了 alphavirus 的 ELISA 檢驗試劑。1A4B6 (Chemicon) 與 sc-58088 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 單株抗體是最近才商品化的 Alphavirus virus-specific mAb，可用於檢測多種 Alphavirus。我們運用以前建立 flavivirus 鑑別性血清學檢驗系統經驗，成功地建立了 Alphavirus 的 ELISA 血清學檢驗系統，可以檢驗各種 Alphavirus 的特異性 IgM、IgG、IgA 抗體，鑑別診斷出不同性 Alphavirus 感染。圖二為 chikungunya virus 與 flavivirus 的 capture IgM and IgG ELISA，圖 2A 顯示 chikungunya virus-specific IgM and IgG ELISA 結果，CK95 及 CK96 為 2 位 95 年及 96 年感染 chikungunya virus 的確定病例恢復期血清，均對 chikungunya virus 有強的 IgM 及 IgG 反應，對 dengue virus 及 Ross River virus 則為陰性反應。圖 2 B 顯示 dengue-specific IgM and IgG ELISA 結果，#42744 為感染 dengue virus 的確定病例恢復期血清，對 dengue virus 有強的 IgM

及 IgG 反應，但對 chikungunya virus 及 Ross River virus 則為陰性反應。

討論

本計畫預期建立一套節肢動物媒介病毒的主動監測與實驗室診斷系統，在主動監測部分，強化機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患進行例行性的篩選，以防止各種新興及再浮現傳染病的入侵。在實驗室診斷部分，建立完成一套節肢動物媒介病毒的分子診斷系統，有效的檢驗重要的節肢動物媒介病毒。以病毒屬(或群)共通引子 (consensus primers) 為基礎的 SYBR Green I-base 即時螢光定量 RT-PCR (Real-time RT-PCR) 方法，具有極高靈敏度及多重特異性，可以同時篩檢大量的發燒病患急性期血清，配合病毒特異性的引子 (virus-specific primers) 及核酸序列方法，可偵測到多種病毒，對傳染病的檢驗十分重要。

目前機場的發燒篩檢已成為台灣地區最重要的監測系統之一，能有效降低傳染病的引進。登革熱機場發燒篩檢的經驗顯示出病原菌的成功檢出與此傳染病的輸出國家之流行幅度、入境旅客之人數與地區、及檢驗實驗室的效能有關(1)。機場發燒篩檢監測系統分別於民國 92、93、94、95 及 96 (至 10 月底)年檢驗出登革熱確定病例 14、57、46、47 及 60 人。由於成效良好，從 95 年初開始擴大進行節肢動物媒介病毒監測，我們分別於 95 年 11 月與 96 年 6 月自桃園國際機場入境發燒篩檢系統各檢驗出 1 例屈公病確定病例。

屈公病是一種由蚊子傳染的再浮現的傳染病，在非洲和東南亞地區是地方病，臨床症狀的特徵是突然發燒，頭痛，倦怠，關節痛，肌肉痛，皮疹，背痛，這些臨床症狀類似登革熱，因此很難區分。2005-2006 年在西南印度洋島嶼，尤其是 Reunion 島，爆發大規模屈公病流行，影響超過二十萬人 (2)。基因親源性分析顯示該屈公病毒為 East/Central/South African genotype (17)。由 2006 年至今，同一基因

型屈公病毒仍在印度和斯里蘭卡大規模流行，約有 130 多萬疑似個案。相較之下，與所有先前(1963 年至 1973 年) 流行之印度株均為亞洲基因型(Asian genotype)明顯不同 (5,6)。事實上，從 1960 年至 2003 年，在東南亞很多國家，包括印度，馬來西亞，印尼，柬埔寨，越南，緬甸，巴基斯坦，菲律賓和泰國屈公病流行都市由 Asian genotype 爆發所造成 (7)。最近，在 2005 年-2007 年在印尼和馬來西亞再次出現的屈公病也是 Asian genotype 屈公病毒 (4)。然而，許多歐洲和非洲國家，香港，加拿大，台灣，美國，澳大利亞，新加坡和日本之境外移入的屈公病例都是 East/Central/South African genotype，而不是 Asian genotype (7)。這裡，我們報導了兩例由境外移入台灣的屈公病例，一位由新加坡引進，另一位由印尼感染，這二株屈公病毒分別屬於 East/Central/South African genotype 及 Asian genotype。

我們的研究顯示機場發燒篩檢是一種有效的監測系統，能及時發現境外移入的確定病例，減少病毒的引進及進行緊急防治工作，防止病原菌的擴散。

結論與建議

在全球經濟一體化趨勢下，各種新興及再浮現傳染病對人類健康所造成的威脅日益嚴重；如何因應此發展趨勢，在傳染病爆發全球大流行威脅下，建立一個更有效率的國際化監測系統及現代化檢驗系統，防止病原菌的全球擴散是公共衛生上極為重要的挑戰。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，建立一套完整的病媒性病毒監測（主動與被動監測）、快速檢驗（病毒學、血清學及分子診斷）與流行病學（血清流行病學及分子流行病學）分析系統，能監測台灣地區已知存在（登革病毒及日本腦炎病毒）及未來可能會侵入的病媒性病毒（如黃熱病毒、西尼羅腦炎病毒及屈公病毒等）是十分重要的。我們正積極在疾病管制局成立一個具有國際水準的病媒性病毒參考實驗室，有系統的進行各種病媒性病毒的監測、檢驗、與流行病學之研究，希望以後能在 APEC 或 WHO 平台下運作，成為 APEC 或 WHO 下的一個病媒性病毒參考實驗室。此外也正積極與國際上相關實驗室合作，進行學術交流與共同研究計劃，包括加入日本國立傳染病研究所所推動的登革病毒基因資料庫的建立，及 WHO 與 PDVI 所推動的登革熱檢驗試劑評估工作。未來，將積極參與一個以電子平台為基礎的病媒性病毒全球監測網，建立更有效率的國際化監測系統及現代化檢驗系統，防止病原菌的全球擴散，有效地進行防治措施。

參考文獻

1. Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, et al. Fever screening at airports and imported dengue. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:460-2.
2. Bessaud M, Peyrefitte CN, Pastorino BA, Tock F, Merle O, Colpart JJ, et al. Chikungunya virus strains, Reunion Island outbreak. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1604–6.
3. Lee N, Wong CK, Lam WY, Wong A, Lim W, Lam CW, Cockram CS, Sung JJ, Chan PK, Tang JW. Chikungunya fever, Hong Kong. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12:1790-1792.
4. AbuBakar S, Sam IC, Wong PF, MatRahim N, Hooi PS, Roslan N. Reemergence of endemic Chikungunya, Malaysia. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:147-149.
5. Manimunda SP, Singh SS, Sugunan AP, Singh O, Roy S, Shriram AN, et al. Chikungunya fever, Andaman and Nicobar Islands, India. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1259-60.
6. Yergolkar PN, Tandale BV, Arankalle VA, Sathe PS, Sudeep AB, Gandhe SS, et al. Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1580-3.

7. Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol.* 2007; 88: 2363-77.
8. Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7:319-27.
9. Gubler DJ, Reiter P, Ebi KL, Yap W, Nasci R, Patz JA. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environ Health Perspect.* 2001 109 Suppl 2:223-33.
10. Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, et al. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2408-16.
11. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1295-304
12. Huang JH, Liao TL, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Kuo YC, et al. Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005: A molecular epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77:903-909.
13. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, et al. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1

serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10:622-30.

14. Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11:642-50
15. Pastorino B, Bessaud M, Grandadam M, Murri S, Tolou HJ, Peyrefitte. Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *J Virol Methods.* 2005;124:65-71.
16. Wu JW, Lee TC, Huang TM, Chen CH. The first case of chikungunya fever in Taiwan. *Taiwan Epidemio Bull.* 2007;23:130-6.
17. Schuffenecker I, Itean I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, et al. Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 2006;3:e263.

Table 1. Primer sets used for real-time RT-PCR screening of arbovirus

Primer name	sequence(5'→3')	Region	Amplicon size
Alphavirus			
AL-2	TAA TGC CAG AGC GTT TTC GCA	NS1	414 b.p.
AL-3	GTG GTG TCA AAC CCT ATC CA		
NS1-96F	GCA GGT CAC DCC DAA TGA CCA TGC	NS1	442 b.p.
NS1-538R	ACA TGA ADG GGG TTG TGT CGA A		
NS4-1125F	TGG AAA CGG ACA TNG CNT CNT TTG A	NS4	281 b.p.
NS4-1406R	ATG TTG TCG TCG CCG ATG AAV GC		
Chikungunya Virus			
CHIKV-F	AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA G	E1	209 b.p.
CHIKV-R	CCA AAT TGT CCY GGT CTT CCT		
Ross River Virus			
RRV1	GGG TAG AGA GAA GTT YGT GGT YAG	E2	120 bp
RRV2	CGG TAT ATC TGG YGG TGT RTG C		
Flavivirus			
FL-F162	GGC ATA TGG TAC ATG TGG CTA GGA GC	NS5	153 b.p.
	GTG ATT CTT GTG TCC CAT CCG GCT GTG TCA		
FL-R3	TC		
FL-R163	GTA ATG CGG GTG TCC CAG CCA GCT GTG TCA TCA TC		
1370F	TGY GTB TAC AAC ATG ATG GG	NS5	250 B.P.
1620R	GTG TCC CAN CCH GCT GTG TCA		
Dengue Virus			
R36	CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA	C	200 b.p.
R169	CCC CAT CTA ACC AAT ATT CCT GCT		
R170	CCC CAT CTG TTC AGT ATC CCT GCT		
Japanese Encephalitis Virus			
R145	GW (A/T)A AGC CCT CAG AAC CGT CTC GGA A	3UTR	215 b.p.
R146	CR (G/A)C GGG GTC TCC TCT AAC CTC TAG TCC		
10F	CTG GGA ATG GGC AAT CGT G	E	315 b.p.
325R	TGT CAA TGC TTC CCT TCC C		
West Nile Virus			
WN9483	CAC CTA CGC CCT AAA CAC TTT CAC C	NS5	311b.p.
WN9794	GGA ACC TGC TGC CAA TCA TAC CAT C		
Yellow Fever Virus			
YF-F	GTC AAT ATG GTA CGA CGA GGA G	C	135b.p.
YF-R	AGT CAA AAT GTT GAA CAA AAA GAA A		

Table 2. Multiplex real-time RT-PCR for Alphaviruses

Strain	Detection (Ct) with primer pair					
					AL2/AL3	96F/538R
	AL2/AL3	96F/538R	CHIKV-F/CHIKV-R	RRV1/RRV2	CHIKV-F/CHIKV-R	CHIKV-F/CHIKV-R
					RRV1/RRV2	RRV1/RRV2
Alphaviruses						
Chikungunya	+(26)	+(23)	+(16)	-(no Ct)	+(16)	+(16)
CHIK950004	+(40)	+(31)	+(24)	-(no Ct)	+(26)	+(26)
Ross River	+(18)	+(21)	-(no Ct)	+(12)	+(15)	+(16)
Sindbis	+(21)	+(20)	-(no Ct)	-(no Ct)	+(20)	+(20)
NSNC	-(no Ct)	-(no Ct)	-(no Ct)	-(no Ct)	-(no Ct)	-(no Ct)
NTC					-(no Ct)	-(no Ct)

Table 3. 2007 年登革熱境外移入確定病例感染地之分布與病毒血清型別 (2007/01/01-2007/11/08)

感染地區	D1	D2	D3	D4	Unknown	總計
中國大陸	5	1			1	7
印尼	7	10	7	1	17	42
印度					1	1
柬埔寨	2	1	1		8	12
泰國	2			2	4	8
馬來西亞	3	1	1		1	6
菲律賓	2	4	8		5	19
越南	15	6	1		18	40
新加坡		3				3
寮國					1	1
緬甸			2		3	5
總計	36	26	20	3	56	144

Table 4. Summary of two imported chikungunya cases in Taiwan.

	Patient 1	Patient 2
Sex	M	M
Age (year)	13	5
Importing country	Singapore	Indonesia
Symptom onset	19 Nov, 2006	18 Jun, 2007
Symptoms	Fever, fatigue, generalized arthragia, rash	Fever, generalized arthragia, rash
Fever at airport and first sampling date	20 Nov, 2006	20 Jun, 2007
Diagnostic test	Day 2 after the onset of illness	Day 3 after the onset of illness
RT-PCR ^a	+	+
Virus isolation	+	+
IFA titer ^a	≤ 20	≤ 20
IFA titer	Day 14 after the onset of illness 640	Day 19 after the onset of illness 640
Chikungunya virus	East/Central/South African genotype	Asian genotype

^a RT-PCR, reverse transcription-PCR; IFA, immunofluorescent antibody assay.

Table 5. Indirect IgM and IgG ELISA to chikungunya E1 recombinant proteins.

Serum samples	His 6 tag recombinant E1 301F-903R-D				His 6 tag recombinant E1 301F-903R-E			
	30mins		60mins		30mins		60mins	
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
CK95	0.134	0.745	0.231	1.436	0.123	1.222	0.210	2.301
CK96	0.102	2.92	0.175	3.019	0.092	2.983	0.149	3.015
S9604319	0.072	0.131	0.107	0.225	0.072	0.133	0.102	0.233
S9604372	0.101	0.224	0.166	0.424	0.096	0.214	0.154	0.407
S9604541	0.105	0.196	0.174	0.361	0.099	0.190	0.159	0.350

- Ni-NTA His Sorb Plate
- E1-D 與 E1-F 是 28 kd 的 His 6 tag recombinant protein of chikungunya virus
- The convalescent-phase serum samples from the two patients with chikungunya virus infections (CK95 and CK96) showed positive IgG responses to His 6 tag recombinant E1 301F-903R-D 與 His 6 tag recombinant E1 301F-903R-E..

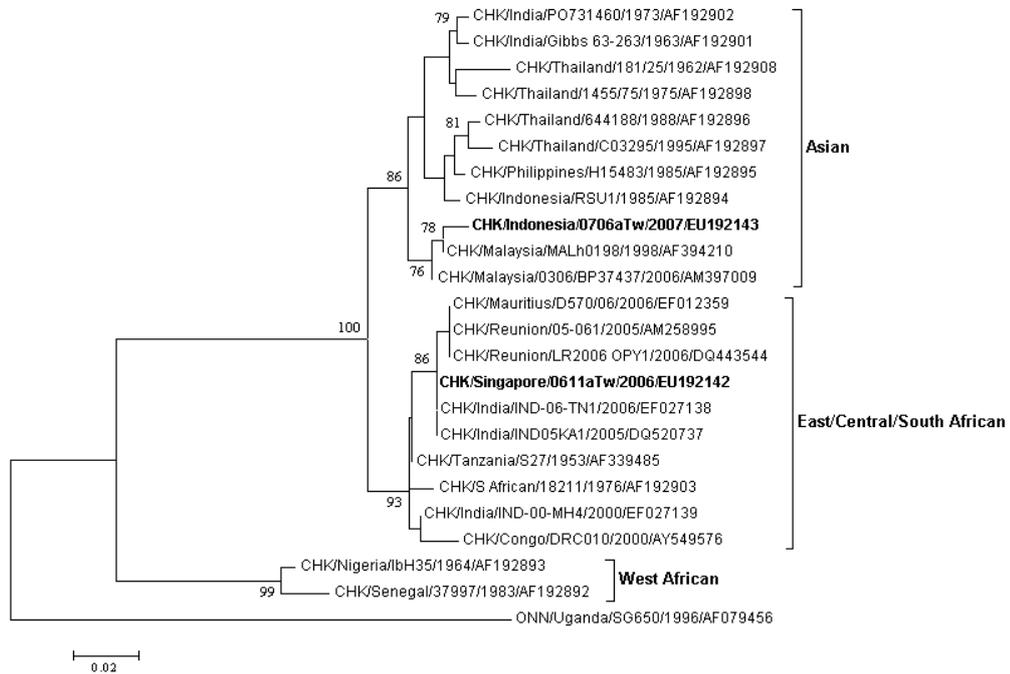
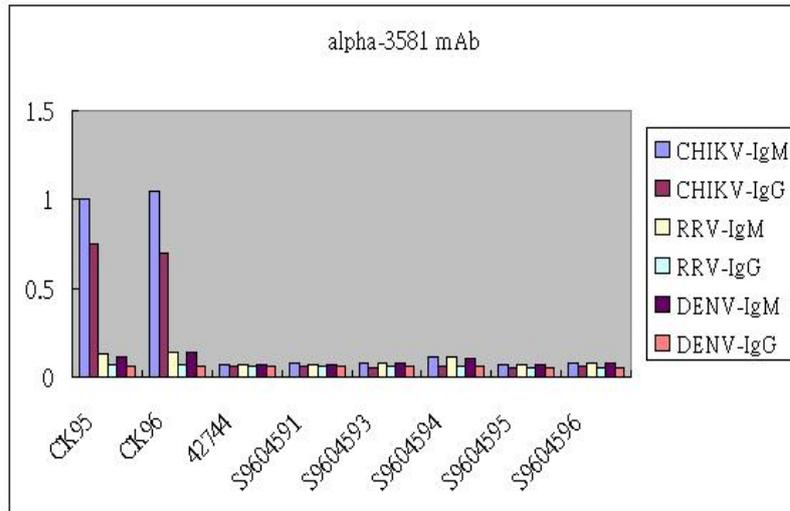


Figure 1. Phylogenetic relationships of chikungunya virus (CHIKV) isolates from the two imported cases in Taiwan. The tree was constructed by the neighbor-joining method using partial nucleotide sequences of envelope protein 1 (E1) gene (255 bp) of 23 CHIKV strains. O’nyong-nyong (ONN) virus sequence was used as the outgroup virus. Bootstrap support values great than 75 are shown. The two imported CHIKV strains in Taiwan are designated by bold type. Viruses were identified using the nomenclature of virus/country/strain/year of isolation/GenBank accession number. The scale bar on the left indicates substitutions per site.

2A



2B

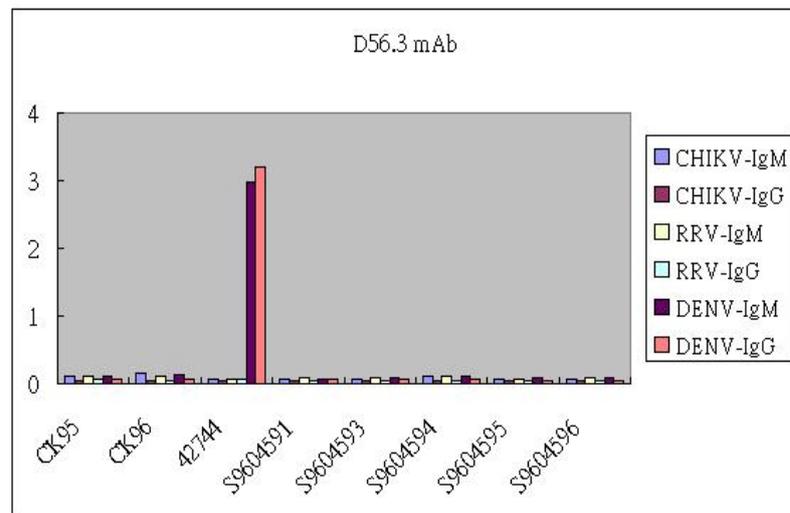


Figure 2. Chikungunya virus- and Flavivirus-specific capture IgM and IgG ELISA.

Figure 2A showed the chikungunya virus-specific IgM and IgG ELISA. The convalescent-phase serum samples from the two patients with chikungunya virus infections (CK95 and CK96) showed positive IgM and IgG responses to chikungunya virus but not to dengue virus and Ross River virus. Figure 2B showed the dengue-specific IgM and IgG ELISA. The convalescent-phase serum sample from the dengue patients (42744) showed positive IgM and IgG responses to dengue virus but not to chikungunya virus and Ross River virus.