

建立黃熱病血清學檢測方法之分析

摘 要

為了建立黃熱病的實驗室檢驗系統，以便迅速診斷，及早發現病例，早期掌控疫情，及預防疾病的蔓延。吾等利用黃熱病疫苗的自願接種者，分別在接種前、接種後 7 天、14 天及 48 天採集其血清樣本，以酵素連結免疫反應法 (ELISA)、血球凝集抑制試驗法 (HI)、溶斑減少中和試驗法 (PRNT) 及病毒分離等四種方法檢測，以期能找出黃熱病的最適檢驗方法。在酵素連結免疫反應法 (ELISA) 方面，結果顯示，接種黃熱病疫苗後第 14 天血清，ELISA-IgM 均呈陽性反應，顯示 ELISA-IgM 系統之靈敏度及特異度均相當的高。在病毒分離 (virus isolation) 方面，接種後第 7 天及 14 天血清，經細胞培養後，均未發現有病毒的存在。在血球凝集抑制試驗法 (HI) 方面，接種前及接種後第 14 天血清檢體經測驗後，結果顯示以此法檢測病毒抗體時，會與其它黃病毒屬 (flavivirus) 產生交叉反應 (cross-reaction)，但仍然可明顯的看出確有四倍上升的情形，因此血球凝集抑制試驗法僅可作為初步篩選的工具。在溶斑減少中和試驗法 (PRNT) 方面，比較接種前及接種後第 14 天配對血清檢體，發現黃熱病毒中和抗體均呈四倍上升，且效價最高，尤其是初次感染 (primary infection) 或是早期 (early phase) 感染，以溶斑減少中和試驗法檢測其中和抗體效價，能有效分辨是何種黃病毒屬所引起的感染，其敏感度及特異度均相當的高，且高於其它血清學檢驗方法。由不同實驗方法所得的結果顯示，ELISA-IgM 與溶斑減少中和試驗法的結果相同，可清楚的分辨是何種 Flaviviridae 所引起的感染，相較於其他檢驗方法，有較高的敏感度及特異度。

關鍵詞：黃熱病，登革熱，日本腦炎，酵素連結免疫分析法，病毒分離，血球凝集抑制試驗法，溶斑減少試驗法

前 言

台灣近年來由於工商業發達，前往東南亞商務往來及旅遊俱增，而使境外移入之傳染病成為防治上的一大隱憂，縱使加強港口檢疫也難以完全隔絕傳染性病原微生物的傳入。黃熱病 (yellow fever) 在台灣地區被列為第一級的法定傳染病，發現疑以病例必須在24小時內通報當地衛生機關。黃熱病與日本腦炎 (Japanese Encephalitis)、登革熱 (Dengue Fever) 同為黃病毒屬 (Flavivirus) 中Flaviviridae的一員。

黃熱病的種類可分成都市 (urban) 黃熱病及叢林 (sylvan) 黃熱病。都市黃熱病主要是藉由埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 傳播⁽¹⁾，主要流行於非洲多雨的叢林地帶。在非洲及美洲的熱帶地區叢林黃熱病呈地方性的流行，藉由脊椎動物及叢林蚊子來傳播⁽²⁾。在1940年代由於黃熱病17D疫苗的發展成功，因此自1942年以後，美洲再也不見藉由埃及斑蚊散播的都市黃熱病。同時西非地區亦接種French neurotropic vaccine 於法屬之西非地區國家，成功的防止黃熱病的發生，但在部分西非地區，並未實施全面性的預防接種政策，因此還是有爆發流行的案例發生。

黃熱病臨床症狀，為一病期短且變化大的急性病毒感染疾病，最輕微時臨床上無法診斷出來，典型的病症似登革熱：猝然發作、冷顫、發燒、頭痛、背痛、全身肌肉痛、虛脫、噁心、嘔吐。病程繼續，脈搏逐漸減慢且無力，肝炎，出現蛋白尿甚至無尿。馬鞍型發熱曲線經常見。病程稍早出現黃疸，以後逐漸加重^(3,4)。地方性流行時該地人口的致死率小於5%，但外來人口感染時，其致死率可能高達50%^(3,4)。潛伏期約三至六天，感染者的血液在發燒前一段不長的時間到發作後三至六天之間對蚊子有感染性，此期間可以分離到病毒，甚至到第17天仍可分離出病毒。

黃熱病雖然主要流行於美洲及非洲之熱帶地區，但在熱帶及亞熱帶地區登革熱呈高度的地方性流行，尤其台灣位於亞熱帶地區，人口密度大，病媒蚊散佈地區廣，黃熱病與登革熱或出血性登革熱 (DHF) 的臨床症狀

非常相似，在亞洲這些登革熱及登革出血熱流行的國家，萬一真有黃熱病出現很容易被誤判為是出血性登革熱，除非在例行的登革熱檢測時亦同時檢測黃熱病，否則黃熱病容易被疏忽掉，亞洲地區雖然沒有黃熱病的發生，但台灣每年仍有零星的報告病例發生，埃及斑蚊廣佈於亞洲地區，同時埃及斑蚊也是散播登革熱病毒的主要病媒蚊之一，況且絕大多數人均易感受性個體，再加上工商業的發達，空中往來頻繁，使得黃熱病的監控受到防疫單位高度的重視，而實驗室的診斷則為防疫的第一道防線，因此快速且準確的檢驗方法的研發就顯得格外重要。

材料及方法

樣本來源

本研究樣本來自八位自願接種黃熱病疫苗者，以接種前及接種後7天、14天、48天的為採血基準點，除了二位自願者接種後7天及48天未抽血外，其餘均完成採血，所有血清均以酵素連結免疫反應法 (ELISA)、血球凝集抑制試驗法(HI)、溶斑減少中和試驗法(PRNT)及病毒分離(virus isolation)等四種方法進行檢測，若檢測結果為陽性，則重覆再測一次，務求慎重。

HI及ELISA抗原製備

以 17D (Yellow fever)、HAWAII (Dengue 1)、及 JaGarol (Japanese encephalitis) 病毒分別接種剛出生 1~3 天的鼠腦內，待鼠發病將死時，抽出鼠腦，以蔗糖及丙酮溶液抽取抗原，並檢測抗原效價，實驗操作者必須十分小心，以防針頭插到自己。

一、IgM 酵素連結免疫檢定法 (enzyme-linked immunosorbent assay:ELISA-IgM) ^(5,6)

1. 於 96 孔微量滴定盤中加入 100 μ l 含 5 μ g/ml 之 Goat Anti-Human IgM 稀釋液，置 4 $^{\circ}$ C 隔夜或室溫放置 2 小時。
2. 以 Washing buffer 清洗 5 次，拍乾。

3. 加入 200ul 的 Blocking buffer，於 37°C 30 分鐘。
4. 檢體用 Blocking buffer 以 1:100 稀釋備用。
5. 將抗原濃度調為 20HA，再與 HB112（單株抗體）以 1:1,000 稀釋，置於室溫中備用。
6. 以 Washing buffer 清洗 5 次，拍乾。
7. 加入 100ul/well 步驟 17 備用的檢體，同時以登革熱及日本腦炎的陽性及陰性血清為對照，置於 37°C 1 小時。
8. 以 Washing buffer 清洗 5 次，拍乾。
9. 加入 100ul/well 步驟 18 備用的病毒液，於 37°C 1 小時。
10. 以 Washing buffer 清洗 5 次，拍乾。
11. 加入 100ul/well 的 AP-Goat Anti-Mouse IgG（1:1000 稀釋），於 37°C 1 小時。
12. 加 100ul/well 的 PNPP，置室溫約 30 分鐘左右，於波長 450nm 測吸光度值，陰性對照的吸光度值約 0.3，陽性對照約為 2.0。

二、病毒分離（Virus Isolation）⁽⁷⁾

以 C6/36 或其他細胞株來分離黃熱病毒，再以間接免疫螢光法（Indirect fluorescent antibody test）檢測是否有病毒存在。在 96 孔組織培養盤中，每個 well 加入 0.005 mL 血清，將檢體以含有 2% 胎牛血清之 RPMI 培養液作 50 到 200 倍稀釋，每 well 加入 0.1 mL C6/36 細胞（ 1×10^6 個/mL）。於 30°C 培養箱培養 7 天，刮下盤中之細胞，於室溫中風乾後，置 -20°C 丙酮固定。加上抗黃熱病毒之單株抗體，置於 37°C 培養箱中染色 30 分鐘，以磷酸鹽緩衝液洗去多餘之抗體，風乾。加上螢光標示抗鼠球蛋白之山羊血清，以螢光顯微鏡來檢查。

三、血球凝集抑制試驗（hemagglutination-inhibition test: HI）^(5,8)

依目前實驗室常規檢驗法檢測，先將抗原效價調整至 16HAU，再將血清以丙酮萃取，以 100% RBC 將血清作吸附處理，取上清液，此時檢體的稀

釋倍數即為1:10，再於於56°C 30分鐘不活化處理。最後以2X稀釋做HI檢測（登革熱、日本腦炎分別以HI<10、80、640為陽性及陰性對照）。

四、溶斑減少試驗法（plaque reduction neutralization test）^(5,8)

分別以 17D（vaccine strain）、HAWAII（DEN1）、Nakayama 檢測黃熱病、登革熱及日本腦炎之中和抗體效價。

1. 取 0.5mL BHK21 細胞（15 萬/cc）置於 24 孔培養盤，於 37°C 含 5%CO₂ 培養箱培養 3 天。
2. 檢體於 56 °C 水浴 30 分鐘做不活化處理，並以血清稀釋液（含 Minimum Essential Medium（MEM）+ 5% FCS 及 0.01MHepes）稀釋。
3. 已定量之病毒以病毒稀釋液[含 Minimum EssentialMedium（MEM）+ 5%Fetal Calf Serum（FCS）+ 0.01M Hepes]稀釋，與等量不活化檢體混合於 4°C 下放置 18-21 小時。
4. 將前項（1）之細胞上清液倒掉，加入 50μl 檢體與病毒混合液於 37°C 含 5%CO₂ 培養箱放置 1 小時，加入約 1mL 的 overlay medium（1% methylcellulose + MEM + 5% FCS）於 37°C 含 5%CO₂ 培養箱培養 3-6 天。
5. 將 overlay medium 倒掉，加 0.5mL 0.9%NaCl 將 overlay medium 洗掉，以 NBB 作細胞染色。
6. 判讀：測試血清溶斑數低於對照病毒（不含血清）溶斑數的 50%則判定為陽性（分別以已知之登革熱及日本腦炎為陽性及陰性對照）。

結果與討論

一、酵素連結免疫反應法（ELISA-IgM）

使用實驗室自行研發的ELISA-IgM試劑，分別檢測接種後7天、14天及48天的血清，第7天黃熱病之IgM抗體均呈陰性，但第14及48天之IgM抗體則100%均呈陽性反應（圖1），亦同時檢測登革熱及日本腦炎之IgM抗體，結果均呈陰性（圖2,3），顯示目前由實驗室自行研發的ELISA-IgM試劑之特

異性及敏感性均相當的好，短時間內即可完成，具時效性、操作簡便，相關的研究也顯示ELISA-IgM的特異性高，為快速的血清學檢驗方法^(9,10)，適用於例行性或大量檢體篩檢用。不管是初次感染（primary infection）或是重複感染黃熱病均會出現IgM抗體，因此以ELISA-IgM診斷黃熱病疑似病例（suspect case）或最近感染是很好的選擇⁽¹¹⁾。

二、病毒分離（Virus Isolation）

通常要分離到病毒並不容易，一般發病時間約8-9天內可分離出病毒，2-4天病毒的複製量達最高峰，過了此時病毒分離的成功率會隨時間的逝去而降低，但由第7天及第14天之血清檢體，並未分離出病毒，但是否真的沒有病毒存在，或是目前使用的檢驗系統敏感度不夠，原因待進一步探討。但是若有黃熱病疑似的報告病例，均應為境外移入，可能已經過了可以分離出病毒的最佳時機，想從血清中分離出病毒就更不容易，是否如此尚需更多的樣本作測試，另一方面病毒分離所需的時間約7天，較為耗時且時效性差。

三、血球凝集抑制試驗法（hemagglutination-inhibition test:HI）

利用HI檢測接種前及接種後第14天血清檢體，除了其中一人以外，所有黃熱病HI抗體明顯的呈四倍上升，至48天HI抗體則略有下降的趨勢。在登革熱方面，除其中有二人接種前及接種後第14天HI抗體沒有四倍上升外，其餘六人登革熱抗體均呈四倍上升，在日本腦炎方面其HI抗體檢測結果與黃熱病相似，但日本腦炎HI抗體效價卻遠高於黃熱病及登革熱（表1）。以HI抗體效價來看所有檢測結果，發現登革熱HI抗體效價最低，日本腦炎抗體最高，之所以會如此的結果應該是與「歸咎原抗原」（original antigenic sin）有關^(11,12)，因為國人大多是接種日本腦炎疫苗或經由自然感染而具有日本腦炎抗體，再接種黃熱病疫苗後，日本腦炎HI抗體效價自然會高於黃熱病，而登革熱除了在1970年以前曾發生過幾次流行外，近來大多為境外移入病例，僅少數人具有抗體，因此效價也較低，雖然以HI的方法檢測黃

熱病抗體，容易產生交叉反應且特異性低，尤其先前若已感染過其他的黃病毒屬，常使得檢驗結果不易判定^(13,14)。本研究結果顯示以HI檢測黃熱病抗體均會與其它黃病毒屬產生某種程度的交叉反應，而無法釐清是何種黃病毒屬感染，但實驗結果仍然可明顯的看出確有四倍上升的情形，因此可作為初步篩選的工具，在血清學的診斷方面若以HI方法檢測，約2-3天可以得到結果，如果是初次感染或是早期（early phase）感染，則特異性高，而以此法檢測需配對（paired）血清檢體，且需間隔14天採血，其配對血清抗體效價有4倍上升或下降者可作為判定的依據。

四、溶斑減少試驗法（plaque reduction neutralization test: PRNT）

以溶斑減少試驗法檢測黃熱病中和抗體，發現接種前及接種後第 14 天血清，均呈四倍上升，中和抗體效價均在 640 以上，而登革熱及日本腦炎中和抗體效價並沒有四倍上升的情形（表 1），國人因大部分人在幼年時均接種過日本腦炎疫苗，或因自然感染而具有日本腦炎中和抗體，但日本腦炎中和抗體效價均相當的低。在登革熱方面，僅有一位中和抗體效價為 10，且檢測登革熱IgM-ELISA抗體亦呈陽性，是否之前曾經感染過登革病毒並不清楚，但其餘 7 人沒有中和抗體，顯示雖然重複感染會有交叉反應的發生，但是大部份的人其黃熱病中和抗體效價仍較其他黃病毒屬來得高，由研究結果顯示，以溶斑減少試驗法檢測黃病毒屬中和抗體，可以很明確的區分是何種黃病毒屬所引起的，相關的研究也証實中和抗體的檢測，可顯著區分是何種黃病毒屬感染^(10,15,16)，其靈敏度及特異性均相當高。尤其是初次感染或是早期感染則靈敏度及特異性特別的高，但相對的所需的時間也較長，雖然重複感染（superinfection）會有交叉反應的發生，但是大部份的人其黃熱病的中和抗體效價仍較其他黃病毒屬來得高，不會影響結果判定，但此方法需配對血清檢體，所須的時間長，且需間隔 14 天採血，其配對血清抗體效價有 4 倍上升或下降者，可作為感染與否判定的依據，另外溶斑減少試驗法亦可用於登革熱型別感染判定，但缺點是不具時效性，實

驗所需的時間較長，約 6 至 9 天，耗用時間長且費力，不適用於大型流病調查研究⁽¹⁷⁾。

結論與討論

本研究結果顯示，以 ELISA-IgM 檢測黃熱病抗體敏感性及特異性均優於血球凝集抑制試驗與病毒分離，且與溶斑減少試驗法的結果一致，顯示目前實驗室自行研發 ELISA-IgM 檢驗系統的特異性及敏感性均佳，但尚需要作更多的檢體測試。ELISA-IgM 是目前實驗室最常用的檢驗方法，較其他檢測方法快速、簡便、且具有高敏感性及特異性，與溶斑減少試驗法的結果相同⁽¹⁷⁾，有助早期診斷，達到快速做防疫的目的，不管是初次感染或是重複感染之檢體均適用於⁽¹⁰⁾。

至於血球凝集抑制法是黃病毒屬傳統的檢驗方法，實驗過程步驟繁瑣，且需採病人急性期及恢復期兩次血清比較，才能作為判定依據，敏感度及特異性皆不高，對黃病毒屬均有交叉反應^(13,14)，以致難以從血球凝集抑制的結果判定是何種黃病毒屬感染，因此非黃熱病診斷的優先選擇方法。

溶斑減少試驗法是黃病毒屬感染的黃金標準 (Golden Standard) 檢驗方法，其特異性及靈敏度遠高於其他檢驗方法，能有效且準確的檢測出感染的病源體，雖然重複感染會有交叉反應的發生，但是大部份的人其黃熱病的中和抗體效價仍較其他黃病毒屬來得高，不會影響結果判定，可作為不同黃病毒屬感染判定的依據^(10,15,16)。溶斑減少試驗法雖是檢測定黃病毒屬感染的重要的技術，但操作者除了細心以外更需要相當的經驗及嫻熟的技巧，否則實驗結果會因穩定性不夠造成嚴重的誤判，且因溶斑減少試驗法實驗步驟繁複，工作負荷大，通常不用於大規模流行病學調查的篩檢⁽¹⁷⁾，甚至不用於例行的檢驗工作，但是以目前每年黃熱病的報告病例均為少數幾個案例，在 PCR 未能建立的情況下，溶斑減少試驗法是最好的黃熱病鑑定方法，尤其今年因登革出血熱的病例出現，更應加強對黃熱病的防範。

未來應積極建立快速的黃熱病鑑定系統，尤其是分子生物檢驗法，可提高檢驗的靈敏度及特異性，能在極短的時間內，正確的鑑定病毒的種類及型別，作準確的診斷，對未來疾病的監視與防治極有助益。

誌 謝

本文得以完成，多承前預防醫學研究所流行病學組組長黃智雄先生及全體同仁鼎立相助，尤其是前組長吳盈昌先生在全程研究設計工作上的協助與指導，使得本研究計劃得以順利完成，謹致謝忱。

撰稿者：許麗卿、徐鳳光、張淑芬、周玲、王聖帆、楊世仰

衛生署疾病管制局實驗室資源服務組

參考文獻

- 1.Lorenz L, Beaty BJ, Aitken HG, Wallis GP, Tabachnick WJ. The effect of colonization upon *Aedes aegypti* susceptibility to oral infection with yellow fever virus. Am J Trop Med Hyg 1984;33:690-694
- 2.Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, LeDuc JW, Esteves K. Yellow fever: A decade of reemergence. JAMA 1996;276 (14) :1157-1162
- 3.法定傳染病防治工作手冊：黃熱病 行政院衛生署疾病管制局 2001
- 4.Abram SB. Control of communicable diseases manual : Yellow fever. 1995;16th:519-524
5. Rose NR, Everly Conway de Macario, Fahey JL, Friedman H, Penn GM, . Manual clinical laboratory immunology.4th, American Society for Microbiology Washington, D.C.1992;611-618
- 6.Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisre P, Hoke CH. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infection where dengue and Japanese

- encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:418-427
7. Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 1978;40:531-544
8. Edwin HL, Nathalie JS Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5th, Washington, DC 20005, American Public Health Association, Inc. 1979;767-814.
9. Barry M, Patterson JE, Tirrell S, Cullen MR, Shope RE. The effect of chloroquine prophylaxis on yellow fever vaccine antibody response: comparison of plaque reduction neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 1991;44 (1) :79-82
10. Holzmann H, Kundi M, Stiasny K, Clement J, McKenna P, Kunz C, Heinz FX. Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *J Med Virol* 1996;48 (1) :102-7
11. Monath TP, Nystrom RR. Detection of yellow fever in serum by enzyme immunoassay *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1984;33:151-157
12. Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N (1983) :Original anti-genic sin in dengue. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32:154-156.
13. Bres P.L.J. A century of progress in combating yellow fever. *Bull WHO* 1986;64 (6) :775-786
14. Casals J. The arthropod-borne group of animal viruses. *Transactions of the New York Academy of Sciences* 19:219-235 in : Holzmann H, Kundi M, Stiasny K, Clement J, McKenna P, Kunz C, Heinz FX. Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *J Med Virol* 1996;48 (1) :102-7

15. Madrid AT, Porterfield JS (1974) : The flaviviruses (group B arboviruses) : A cross-neutralization study. *Journal of General Virology* 23:91-96.
16. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE (1989) : Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *Journal of General Virology* 70:37-43.
17. Deubel V, Mouly V, Salaun JJ, Adam C, Diop MM, Digoutte JP. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with standard tests used to detect yellow fever virus antibodies. 1983;32 (3) :565-568

表一 不同黃病毒屬 HI 抗體效價

number	Unvaccinated	7days	14 days	48 days
	HI-titer	HI-titer	HI-titer	HI-titer
黃熱病				
N1	<10	<10	320	320
N2	ND	<10	5120	2560
N3	<10	<20	20	20
N4	<10	ND	40	80
N5	<10	<10	40	40
N6	<10	<10	320	320
N7	<10	ND	80	ND
N8	<10	ND	80	ND
日本腦炎				
N1	<10	<10	2560	1280
N2	ND	40	≥10240	≥10240
N3	<10	<10	<10	<10
N4	<10	<10	80	40
N5	<10	ND	320	80
N6	<10	<10	640	1280
N7	40	ND	320	ND
N8	<10	ND	80	ND
登革熱				
N1	<20	<20	160	80
N2	ND	<20	1280	640
N3	<20	<20	<20	<20
N4	<20	<20	40	<20
N5	<20	ND	80	<20
N6	<20	<20	80	80
N7	<20	ND	40	ND
N8	<20	ND	20	ND

表二 不同黃病毒屬中和抗體效價

number	Unvaccinated	7days	14 days	48 days
	Nt-titer	Nt-titer	Nt-titer	Nt-titer
黃熱病				
N1	<10	<10	10240	5120
N2	<10	<10	≥20480	5120
N3	<10	<10	2560	2560
N4	<10	<10	2560	1280
N5	<10	ND	2560	1280
N6	<10	<10	10240	5120
N7	<10	ND	640	ND
N8	<10	ND	2560	ND
日本腦炎				
N1	10	10	10	10
N2	20	20	20	20
N3	10	10	10	10
N4	<10	ND	<10	<10
N5	10	10	10	10
N6	10	10	10	10
N7	20	ND	20	ND
N8	20	ND	20	ND
登革熱				
N1	<10	<10	<10	<10
N2	<10	<10	≥10	≥10
N3	<10	<10	<10	<10
N4	<10	ND	<10	<10
N5	<10	<10	<10	<10
N6	<10	<10	<10	<10
N7	<10	ND	<10	ND
N8	<10	ND	<10	ND



