前言：

近年來國際間新興疾病發生頻仍，其原因包括有：全球性旅遊發達、食物集中處理化及全球性供應化、人口增加及環境快速都會區化及擁擠化、由於內戰、飢餓或人為及自然災難所造成人口遷移、由於灌溉、森林砍伐及造林等計劃，而致使病媒蟲(或動物)改變其棲息地 及棲息性、人類行為的變遷。如：靜脈藥物注射及危險性行為等。、廣泛使用抗菌藥物或殺蟲劑，而加速抗藥性的衍生或人類和熱帶雨林或(及)其他荒野地區的接觸或入侵頻率不斷提昇。其原因包括有：人口成長、人口分布都市化、旅遊增加、病媒蚊控制不佳及氣候變化等多重因素。

這些新興疾病的疫情如 1993 年美國爆發漢他肺症候群(Hanta Pulmonary Syndrome, HPS)疫情(Rodriguez-Moran P et al;1998)在科羅拉多州造成數人死亡，接著此類病例一直不斷，這些確定病例在美國累計到 2002 年 4 月已有 331 個病例，1999 年亦爆發西尼羅河病毒(West Nile Virus)疫情，在紐約等三州計有 59 人發病 7 人死亡(Jia XY et al;1999)。1999 年馬來西亞爆發立百病毒 ” (Nipah virus)疫情，至少死亡 95 人（Chua KB et al;1999）。1998 年台灣爆發口蹄疫(Foot and Mouth Disease) (Chen BJ et al;1999)及 1997 年香港爆發家禽流行性感冒(禽流感, Influenza Virus)造成經濟方面之嚴重損失(Shortridge KF et al;1998)。

其他全世界發生出血性疾病疫情的還有：1994 年在象牙海岸(Formenty P et al;1999)、1994-1996 年在加彭(Volchkov V et al;1997、Georges AJ et al;1999)、1995 年在薩伊爆發伊波拉出血熱(Ebola Hemorrhagic Fever , Ebola HF) (Muyembe-Tamfum JJ et al;1999)、1996 年在菲律賓及 1997 年在美國爆發猿猴型之伊波拉病毒感染

(Rollin PE et al;1999)。1999 年在薩伊爆發馬堡出血熱(Marburg HF)疫情(Bertherat E et al;1999)。1994 年在奈及利亞(Fisher-Hoch SP et al;1995)及 1997 年在獅子山共和國爆發拉薩熱(Lassa Fever)疫情(此資料由美國亞特蘭大 CDC 提供)。1994 年在中東牲畜場(Khan AS et al;1997) 、1996 年在南非(Burt FJ et al;1998)及 1998 年在巴基斯坦(Altaf A et al; 1998)爆發克里米亞-剛果出血熱(Crimean-Congo HF)疫情。1994 年在秘魯爆發玻利維亞出血熱(Bolivian HF)疫情(*MMWR Morb Mortal Wkly Rep*；1994)。1990s 年在南美洲一直皆有爆發登革出血熱(Dengue HF)疫情(Aviles G et al;1999)。1993 年在埃及(Arthur RR et al;1993、Abu-Elyazeed R et al; 1996)及 1998 年在肯亞爆發裂谷熱(Rift Valley Fever)疫情(Linthicum KJ et al;1999)。1996 年在塞內加爾爆發黃熱病(Yellow Fever)疫情(Thonnon J et al;1998)。1993 年在美國（Peters, CJ et al;1996、Wells RM et al;1997）、1995-1996 年在巴西（Johnson AM et al;1999、Figueiredo LT et al;1999）、1996 年在德國（Schreiber, M et al;1996）、1997 年在智利及阿根廷爆發漢他病毒肺症候群(HPS)疫情、（Schmaljohn, CS et al;1997、Cantoni G et al;1997、Toro J et al;1998）。

在這些爆發之出血性病毒大部分皆屬於第四級病毒，而在 1999 年 3 月馬來西亞發生疫情的立百病毒也歸於第四級病毒屬。出血熱在非洲，通常不會造成很大之流行；但是在侷限小的人口密集社區或村莊，卻會造成很嚴重之疫病。 這些疾病可造成高死亡率，有些亦會有失能之後遺症；如拉薩熱會造成聽力受損(Cummins Det al; 1990)。

這些致病病毒存在於自然界種類繁多，且易變異性，其不論致病率，致死率、散播性均高，且目前對於病毒的預防和診斷都比較

困難，治療方面也沒有特效藥。防疫人員平時了解這些致病病毒之特性、危害及防護準則，平日做好偵檢防治之基本(物資)器材準備及演練使用方法和支援程序，達到疫情爆發時才能降低人員傷亡比率。在進行出血熱診斷時，應與以發熱為主的疾病相鑑別，如上呼吸道感染、流行性感冒、流行性腦脊髓膜炎、鉤端螺旋體病、發革出血熱、阿根廷出血熱（Argentine Hemorrhagic fever）、天花病毒、傷寒與斑疹傷寒、金黃色葡萄球菌敗血症等；其次應與血液病相鑑別，如急性白血病、血小板減少性紫斑，過敏性紫斑等。

這些新興疾病的病原大都屬於第四級病毒，第四級病毒是屬於高致死率的傳染性病毒，近年來由於國人出國旅遊頻繁，很有可能將第四級病毒之病原體由流行地區傳到本國，成為境外移入病例。尤其中國大陸是許多傳染性疾病感染很嚴重的地區，而我國與其地源接近，港口貿易及人民往來頻繁，易將病原由大陸帶入國內。由於這些病毒致死率甚高，又無有效的疫苗，甚至有些第四級病毒可藉由人與人之接觸而傳染疾病，如此將造成國人之恐慌，這些疾病包括有伊波拉出血熱(Ebola hemorrhagic fever, Ebola HF) 、馬堡熱(Marburg fever)、拉薩熱(Lassa fever)及克里米亞-剛果出血熱(Crimean-Congo hemorrhagic fever)等。在我國具有診斷這些高致死率疾病能力與經驗的醫師極少或幾乎沒有，而我們無法一直寄望、仰賴外人的協助，一定要建立自己的偵檢能力和系統，這是要靠長期努力累積下來的，雖然無法取得大部分的病毒，但仍需找些取代的解決方法，我們期望繼續不斷的發展建立這個偵檢的能力與體系，並發展一套快速、簡易、敏感、且具特異性的檢驗方法，將有助於各類感染疾病之早期診斷，以遏止疫情擴散。

有鑑於這些疾病之嚴重性及潛在未知危險病原體之存在，我們在民國八十四年建造完成了全世界第八座生物安全等級第四級(Biohazard level 4)之實驗室，以因應突發狀況。這些疾病之診斷一樣需要分離病毒，也需要具有專一性之免疫抗體、抗原反應和電子顯微鏡鏡檢等，不過這些診斷步驟皆需要在具有生物安全等級第四級之實驗室操作或前處理，才能確保操作人員之安全。生物安全第四級實驗室目前我國只有預醫所建置使用，因此對於疑似第四級病毒之感染，預醫所可提供衛生署此項設施，並協助加以鑑定，以達物盡其用之目的。

本計畫將利用病毒分離、反轉錄聚合酵素連鎖反應(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)、特異性抗體、免疫轉漬、及電子顯微鏡鏡檢等技術，對可能在本國境內發生高致病率及高致死性疫情的疾病，持續維持診斷的能力，期盼對本土之預防醫學及疫情控制有所貢獻。依近年來國際發生新興病毒疫情之報告，研判對可能在本國境內發生高致病率及高致死性疫情的疾病，持續加強與維持診斷的能力。雖然有些出血性病毒的中間宿主並不存在，沒有造成大量流行之條件，但是這些第四級病毒卻潛在人傳播給人而致病甚至於致死之傳染途徑，若不能早期給予確立診斷則將有擴大疫情之疑慮。

（2）材料與方法：

本計畫所用之血清或尿液檢體均為疑似第四級病毒感染之病患檢體。其檢驗流程作業，所必須應用之方法及實驗步驟簡要如下。

我們實驗室的診斷方式(必需至少一項符合)：

（一）病毒分離、鏡檢：利用細胞來分離病毒，時間約 7-10 天後觀察細胞病變之現象。取此細胞病變之細胞或細胞外液體，經病毒去活化及濃縮體積後，進行電子顯微鏡鏡檢來觀察病毒之形狀外型。

（二）病毒基因偵測：設計出可增殖各病毒之正反引子，利用反轉錄聚合　連鎖反應之技術予以判定。

（三）病毒基因定序分析：將所得到之基因片段給予基因序列分析，將得到之基因序列與病毒基因庫各亞型進行資料比對，確立此致病毒及其病毒亞型。

（四）血清學檢查：利用病毒之基因序列為基礎，以人為基因合成之方式，合成長度約為 0.5 Kb 且經電腦軟體分析具有免疫抗原性之病毒核蛋白或外套蛋白。利用細菌（E.coli）或真核細胞株系統大量製備檢測用抗原。製備之檢測用病毒抗原，進行病人血清 IgM-capture or IgG 特異性抗體之分析，若大於 64 倍即判陽性或取病患之恢復期血清有 4 倍以上之結果判陽性。

（五）病毒抗原檢查：利用大量製備之檢測用抗原，製備出多源抗體及單株抗體，以免疫轉漬 (Immunoblot) 之方法分析感染之細胞溶解液之病毒抗原。以免疫螢光分析 (Immunofluoresence assay, IFA) 偵測感染之細胞中抗原之出現。

（六）免疫組織染色 (Immuno-histochemistry, IHC) 分析：利用免疫組織染色分析疑似病毒感染患者的組織細胞偵測病毒抗原之存在。

病毒抗原製備：國內直至目前為止並無第四級病毒感染之病例報告，更因此類病毒受到國際協會的管制無法獲得這些第四級病毒做為參考病毒。所以這些病毒抗原之製備，則需靠人工合成基因之方式獲得 (目前人工合成基因之技術已趨成熟) 。我們可將此人工合成基因以大腸桿菌或昆蟲表現系統來大量表現病毒蛋白，做為診斷用之病毒抗原。

病毒分離培養：Vero E6 細胞以Eagles‘ mininum essential medium (EMEM，內含10%加熱去活化胎牛血清)在37℃，5%CO_2的條件下培養。該細胞被用來分離多種出血性病毒。細胞接種後，改以2%EMEM做繼代培養。送檢樣本先經過濾除去雜質後，上浮液以EMEM 培養液調整成10%的懸浮液，以100µl 之該懸浮液，於37℃接種至70%細胞滿的25cm^2 的培養瓶，接種2小時候，再加入5ml 2% EMEM培養液，置入37℃，5%CO_2 培養箱之後，每兩週做一次繼代培養，先吸出上層培養液，以0.25% Trypsine-EDTA處理分離細胞，再混入原吸出之培養液，而後將1/3量置入新的 25 cm^{2}培養瓶，並以2%EMEM 補足至5 ml ，另1/3 置於-70℃ 凍存，另1/3量留做免疫轉漬檢測用。

血清檢體病毒或細胞培養病毒液RNA之萃取：使用Quagen 廠牌之QIAamp Viral RNA抽取試劑組，依廠牌步驟指示，略述如下。取140µl血清加入560µl AVL 溶液(註)，室溫靜置10分鐘，再加入560µl絕對酒精，混勻後，10000rpm轉速離心使通過QIAamp Spin Column，續以500µl AW 溶液(註)清洗管柱兩次，最後以80^{0}C之60µl Rnase-free ddH_2O 沖流出病毒RNA（Homczynski, P et al;1987）。反轉錄-聚合酵素連鎖反應(Reverse Transcription-PCR) ：在由細胞培養

液或血清檢體萃取出之RNA溶液中，加入上、下端引子(100μl)後，將此混合物於90℃加熱5分鐘，置於冰上3分鐘，短暫離心收集溶液於管底。取20μl此模版/引子溶液於0.2ml離心管中，並加入5μl10x緩衝液 (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH8.3, 15 mM $MgCl_2$,0.01% (v/v) gelatin)，4μl 2.5 mM dNTPs (BRL), 0.5μl 0.1M DTT (dithiothreitol)，0.5μl 核糖核酸酵素抑制劑(ribonuclease inhibitor, RNAsin, 10U/μl, BRL), 0.5μl SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RNase H^-, 20U/μl, BRL)和0.5μl AmpliTaq DNA polymerase (5U/μl, Perkin Elmer), 以depc無菌水將總體積補至50μl，混合均勻後，於GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) 進行反轉錄-聚合酵素連鎖反應。反應條件如下：於41℃進行反轉錄反應60分鐘，再進行聚合酵素連鎖反應：94℃ 40秒，38℃ 40秒，72℃ 1分鐘，共40個循環。

巢式聚合酵素連鎖反應(Nested-PCR)：巢式聚合酵素連鎖反應則接著在第一對引子增幅得到之病毒核酸中，再設計出第二對引子進行病毒核酸增幅聚合酵素連鎖反應，其目的在增加診斷之專一性及敏感性。取10% (5 μl) RT-PCR反應之溶液為模版於0.2ml 離心管，加入上、下端引子(100 μM) 各1 μl，5μl 10 x PCR緩衝液，4 μl 2.5mM dNTPs, 0.5 μl 0.1M DTT, 0.5 μl AmpliTaq DNA polymerase (5U/ μl, Perkin Elmer), 以無菌水將總體積補至50 μl混合均勻後，於GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) 進行聚合酵素連鎖反應。反應條件如下：94℃ 40秒，41℃ 40秒，72℃ 1分鐘，共35個循環。反應完成後以瓊脂凝膠進行電泳以分析所得片段。

雙股DNA定序法：將聚合酵素連鎖反應得到之DNA片段，做DNA定序反應，其目的在做進一步之確認。 DNA定序是採dye-dideoxyribonucleotide chain termination。

酵素連結免疫吸附試驗(MAC-ELISA)：首先加100μl/well 1:200 goat antihuman IgM抗體於96-well plate，於室溫下靜置4小時，以PBS沖洗各well，再以4%BSA(bovine serum albumin)加入各well，此為blocking step，於37^0C放置5分鐘後，以PBS沖洗各well，於各well中加入50μl 1:10稀釋之血清，於室溫下靜置2小時，吸取稀釋之血清後以PBS沖洗各well，然後於各well中加入50μl定量之病毒濃縮液或純化之病毒抗原，於室溫下靜置2小時，以PBS沖洗各well，於各well中加入25μl horseradish peroxidase-conjugated 單株抗體，於37^0C反應30分鐘後，以PBS沖洗各well後，各加入100μl之ABTS受質，於37^0C反應30分鐘後加入停止溶液，再於室溫下靜置2小時，最後以ELISA reader 於405nm波長下讀取吸光值。評估結果時，每一plate都以至少一個已確立感染者血清做為positive control，並以三個未感染血清做為negative control，此三個negative control所得之mean+3SE做為判定之標準，超過此值判為陽性，反之為陰性。

酵素免疫吸附分析法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA)：將96孔酵素免疫分析盤劃分為上下兩部份，其一加入100μl 1：2000稀釋之病毒抗原混合液，另一半加入100μl 1：2000稀釋之E6細胞之抗原液以作為對照實驗。將加好抗原之96孔酵素免疫分析盤靜置於4℃，隔夜後即可使用。把置備好的酵素免疫分析盤先以washing machine以磷酸緩衝液(Phosphate Buffer Saline; PBS, 8mM Na_2HPO_4, 2mM KH_2PO_4, 140mM NaCl, 10mM KCl)洗淨，將待測血清以10%脫脂乳(skimmed milk)以1：100濃度稀釋，分別加入100μl 稀釋血清於盤中之對照組於實驗組中。於37℃中作用1小時後，以PBS清洗酵素免疫分析盤，在酵素免疫分析盤中之孔內，各加入100μl以1：2000稀釋之第二抗體(Goat anti-Rat IgG-HRP, Cappel)，再置於37

℃反應1小時，清洗酵素免疫分析盤後，每孔加入100μl之呈色劑(TMB-0.035% H_2O_2, in Citrate-Citrate buffer, pH5.5)置於室溫於黑暗中作用15-20分鐘後，每孔加入50μl反應終止溶液(2M H_2SO_4)，以分光光度計OD_{450}測其吸光值，作分析比較，將OD_{450}值高於負對照平均值加3倍標準差者，視為正反應。

免疫螢光染色(IFA)：將適量經Trypsin-EDTA處理分離下來的Vero-E6細胞，滴至12孔玻片上，置於抽氣櫃中抽乾，而後以-20℃ 1:1 之甲醇/丙酮溶劑固定2分鐘，在放入抽氣櫃以揮發甲醇/丙酮固定液。以PBS沖洗各well後，加入初級抗體 (1:100 in PBS)，於37℃反應30分鐘，以PBS重複浸洗3次，每次各5分鐘，再加入FITC標定之次級抗體 (1:100 in PBS)，於37℃反應30分鐘，以PBS 重複浸洗3次，每次各5分鐘，待加入0.5ml之PBS後，以免疫螢光顯微鏡觀察染色結果。

凝膠電泳與轉漬酵素免疫反應：根據 Laemmli(1970)所敘述之SDS-polyacrylamide electrophoresis 方法，採用 10% separating gel。首先將準備好之病毒液或基因表現之病毒蛋白與等量之 2 X sample buffer 混合，經沸水煮 10 分鐘。將此混合液加入 2.5% stacking gel 之樣品槽中，以固定電壓 100 伏特進行電泳，待指示劑向下移動至距膠體底端 2 公分處，停止電源。參考 Towbin et al(1979)之方法，利用 Semi-Dry Blot 的方式，將凝膠電泳上之病毒蛋白轉漬到與膠體一樣大小之 NC-膜。轉漬後將 NC-膜剪成一條條長形之膜，進行酵素免疫反應。先以 10%胎牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)與 NC-膜做非特異性結合，於 37℃反應 60 分鐘，再加入稀釋之病人血清，於 37℃反應 60 分鐘，以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 分鐘，再加入 HRP 結合之次級抗體 Goat-antihuman IgG-HRP (1:100 in

PBS)，於 37℃反應 30 分鐘，以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 分鐘，待加入含有 3-Amino-9-EthylCarbazole(AEC)和 H_2O_2 的溶液後，等待十五分鐘後結果呈現粉紅色至褐色反應，依其蛋白分子大小判定為是否陽性。

表現重組蛋白：將大腸重組基因表現載具之大腸菌培養至 log-phase transformed經過 IPTG 的刺激 3 小時後，離心、去掉培養液、沈澱的大腸菌體浮懸在 TEN buffer （10 mM Tris-HCl pH 8.0 ，1 mM EDTA 和 50 mM NaCl) 及 1 mg/ml lysozyme 中，保持在 4℃40 分鐘，再以超音波打破菌體，加 5 mg/ml DNase I NaCl-Mg 在溶液中 4 ℃ digest DNA 60 min，離心、收沈澱物。沈澱物 用 TEN buffer 含 0.1% NP-40 洗兩次後，將沈澱物溶於 GTG buffer （5M Guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0，and 10% glycerol)，加入 2-mercaptoethanol 至 8 mM 放置於 60℃ 30 min，然後以 GTG buffer 稀釋 8 倍並和 Ni-NTA 樹酯混合，用大量的 GTG buffer 洗掉沒附著上的雜質後，再以 GTG buffer 含 0.25 M imidazole elute 出表現蛋白。若需要進一步 renaturation 成 active form of viral protein，則沖出液稀釋至 $A_{280}<0.200$ 以下，用 0.5 M guanidine HCl-50 mM Tris HCl pH 8.0 - 1 mM EDTA-1 mM dithiothreitol-20% glycerol 透析，在換為 buffer A （25 mM HEPES pH 7.4-50 mM KCl-0.02% 2-mercaptoethanol-1 mM EDTA- 0.01% Triton X-100-20% glycerol) 4℃ 至少 6 小時。

純化各種重組蛋白： 由於各種蛋白的特性都不同，所以純化的方法都不一樣，上述所得的 Ni-NTA eluent 可試著用分子量的大小、帶電量的多寡、親酯性的強弱、或有特別的特性來做分離，然後進一步用 FPLC column 來做分離。

（3）結果：

檢體檢測

今年（91 年）到現在總共收到了 20 件檢體（如表一至表四），大部分的檢體被要求檢測立百、亨得拉、西尼羅河或狂犬病病毒，只有一件要測試波利維亞出血熱病毒和 Kyasanur forest disease（表一、檢體 091-1-31-000063），血清或腦脊髓檢體經 0.45 微米孔徑的率膜過濾後，因為這些病毒都為 RNA 病毒，一部份的檢體首先以 RT-PCR 做檢定再以巢氏 PCR 進一步測試，使用的引子對則依所要求的項目而定，檢測的結果大都為陰性（表一、二、三和四），只有羅氏的檢體（表三）在狂犬病病毒的項目呈現陽性。另一部份的檢體則進行病毒分離，依各個要求檢驗項目決定使用的細胞，大部分的病毒分離都沒顯現細胞病變效果（CPE），除了羅氏的檢體外，有三例（鄭彩雲 550、091-2-36-000169 和 091-1-31-000259）可見到 CPE，接連培養三代可見到 CPE 越來越快越強，若以各種不同之抗體進一步作 IFA，可推斷它們有可能為 CMV 或流行性感冒 B 型，不過仍須作進一步測 CMV 或流行性感冒 B 型之 RT-PCR 和巢氏 PCR 等方法確認。

至於偵檢羅氏之檢體 RT-PCR 和 semi-nested PCR 所用的引子出處及核酸序列都顯示於圖一的 A 格，我們只拿到上呼吸道的抽出液，取抽出液 0.3 cc 經離心後上清液以 0.45 微米孔徑的率膜過濾後，0.15 cc 的檢體以 Trizol 抽取 RNA，抽取步驟按照廠商提供之方法，RT-PCR 採取單步驟用 P61 和 P62 為引子，結果如圖一 B 格，顯示的 DNA band 大約 1.3 kb，和預測的大小 1311bp 相類似，RT-PCR 完的產品取 5 μl，並以 P63 和 P62 為引子，進行 semi-nested PCR，結果顯示於圖一 B 格中，結果可見到大約 1.3 kb 的 DNA band，和所預測大小之 DNA 片段 1302bp 非常接近。在還未得到這 1.3kb 的

核酸序列之前，從病毒基因資訊的分析比較有一些限制酵素對各個病毒株能切在固定相近似的位置，作為確定或分型用，因此我們試著用 NilI、SphI、PvuII 和 EcoRI 等酵素去切這 1.3 kb 的 DNA 片段，結果顯示於圖一 B 格中，PvuII 和 EcoRI 沒有切的位置，而 NilI 和 SphI 各有一個切的位置，分別位於 428 和 426，因此切成兩段 DNA 片段約 880 和 430bp，與預期的相近。接著在此疑似狂犬病的檢討會議後隔天，由 PCR 所得的 1.3 kb DNA 片段經核酸序列分析結果也得到了，更強有力支持檢體含狂犬病毒，這一段 1.3 kb DNA 的核酸序列和其它目前 gene library 的狂犬病病毒基因作比對，結果（圖二）顯示這 PCR 所得的核酸序列與已知狂犬病病毒 NP 基因最接近，由 phylogenic tree 來看和大陸發表的狂犬病病毒株最接近，高達 88.6%為最高，其它的狂犬病毒株的這段基因片段的比對都介於 85 至 88%之間。因此很確定在這檢體中確實含有狂犬病病毒的 RNA，且與大陸發表之狂犬病病毒核酸序列最接近。

上述是由分子生物技術檢驗的結果，另一方面我們進行病毒分離，將不到 0.15cc 的檢體過濾液經過 PBS 稀釋後，放入約 7、8 成 confluence 的 N18 細胞（一種 neuroblastoma cell line）中一起培養，至第三天可看到些微的 CPE，至第四天可見到很明顯細胞分解的 CPE 孔洞（圖三格 C、D 和 E），但沒加檢體的陰性對照組則未呈任何 CPE（圖三格 A 和 B）。若將這些細胞進一步用抗狂犬病病毒的單株抗體作 IFA 檢測，可見到圖四格 B 和 C，添加檢體的這組細胞能被這單株抗體附著呈現很強的螢光。接著我們也將這細胞再作 RT-PCR 和 semi-nested PCR 的測試，結果也是陽性。因此綜合上述結果可推論這檢體含有活性的狂犬病病毒，且強力支持此病人確實感染狂犬病。

研發工作

往年按照伊波拉出血熱、馬堡出血熱、拉薩熱和立百病毒等蛋白之抗原性，選取抗原性高的 domain，利用人工合成出約 500bp 之核酸片段，伊波拉出血熱病毒位於 nt1719-2218、馬堡出血熱病毒為 nt1469-1967、立百病毒為 nt1190-1689、拉薩熱病毒為 nt43-538，然後進入大腸桿菌蛋白表現系統表現重組蛋白，接著純化並試著去利用這些重組蛋白，接著今年生產重組蛋白及其所誘導出的多株抗體仍繼續在進行中，但最主要的問題這些誘導出的抗體是否適用於或真的能專一辨認真正的病毒或運用於臨床檢體，目前礙於沒有標準病毒株，因此這個答案一直無法回答，這問題只好尋求國際間之合作，如美國疾病管制局。

至於漢他病毒 S 基因已經能利用大腸桿菌系統作大量的重組蛋白表現、純化，利用這重組蛋白運用於 coating ELISA plate，或誘導多株抗體，其效果也很好，至於整個 G1 和 G2 基因已被建構完成，然而它們的重組蛋白無法在大腸桿菌系統生產，甚至連接入的克隆都挑不到，即使換了幾種載體，也無法得到能表現的克龍，有可能此基因的重組蛋白對菌有毒害，因此我們已經換到 baculovirus 的蛋白表現系統，目前已經把 G2 基因兩端接上 homologous domain，再經過 recombination 把 G2 基因接入 Bacmid 裡面，挑選接入 G2 基因片段的 Bacmid 克龍，然後試著感染 sf9 細胞並測試含有表現 G2 重組蛋白的重組病毒，大量繁殖含這 G2 基因的重組病毒及 titration 病毒的量，接著尋找最佳表現的條件和如何提高產量仍在進行中，至於 G1 基因仍在積極地嘗試進入 Baculovirus 系統中。

1999 年美國爆發西尼羅河病毒(West Nile Virus)疫情，在紐約等三州計有 59 人發病 7 人死亡(Jia XY et al;1999)。延至今年 2002 年西尼羅河病毒更是在美國大流行，流行地區更是擴大到除了西部幾州未出現病例，其它地區都無法倖免。雖說西尼羅河病毒屬於 P3 的病

毒，台灣從未有疑似或確定病例，但這種病毒可經由鳥或蚊子來攜帶，像美洲從來不曾發生，卻於 1999 年帶入就在美國本土化，來勢洶洶，所以我們也不可輕忽，尤其台灣對這病毒的檢測能力及經驗都沒有，更須儘速建立偵檢的能力，因此我們於 91 年度開始增加西尼羅河病毒為研發的對象。

現在我們已經分析生物資訊依不同的基因片段設計了 11 條引子（圖五），我們仍覺得需要更進一步或更多的工具來鑑定此病毒，因此我們先以 RT-PCR 取得一段 preM-E 基因約 1.5 kb，作核酸序列分析，與美國最近流行的病毒株比較核酸序列的相似性高達 93%，至於氨基酸序列的相似性也是相當高約 94%，其中有一小段 4 個氨基酸不見了，結果顯示於表四。

接著將此西尼羅病毒 preM-E 基因克隆到大腸桿菌，換了好幾個 vectors，但都挑不到克隆，也就是在大腸桿菌的系統無法進一步作蛋白的表現。所以換到一個酵母的系統，將此 preM-E 基因接入 pPICZαB vector 中（圖五格 A），挑到幾個克隆如圖五格 B，lane 1、2、3 和 4 顯示比 pPICZαB vector 多出個約 1.5kb 的 DNA 片段，再 fusion 到酵母菌的染色體，最後測試這些酵母菌是否表現西尼羅河病毒的 E 蛋白，顯示於圖六，若以抗西尼羅病毒的多株抗體可見到約 47kD 的一條 band（格 A），以抗 his-tag 的抗體檢測也可看到類似的 band（格 B）。由以上的結果看來西尼羅河病毒的 E 蛋白可以在酵母菌的系統表現，接下來仍有待去尋找最佳的蛋白表現條件和純化方法，再者因為表現的重組蛋白似乎形成 polymer，這是否為 pseudovirus particle 也是一個很有趣的問題都有待進一步的探討研究的。

(4)討論：

今年（91 年）收到了 20 件檢體，大部分的檢體被要求檢測立百、亨得拉、西尼羅河或狂犬病病毒，只有一件要測試波利維亞出血熱病毒和 Kyasanur forest disease，這些疑似的病毒都為 RNA 病毒，因此首先以 RT-PCR 做檢定再以巢氏 PCR 進一步測試，檢測的結果大都為陰性，只有羅氏的檢體在狂犬病病毒的項目呈現陽性，我們也一直在問為何陽性率這麼低，如果問題是出在取檢體不是最佳的時間點，或檢體採取後輸送時保存不當，這些都不是我們能夠控制的部分，再來檢體經過 RNA 萃取，如果我們手上有陽性對照組的病毒時，都會同時加入對照病毒萃取作為陽性對照組，如狂犬病病毒和西尼羅河病毒，至於沒有陽性對照組病毒則以合成 RNA 片段混於陰性對照檢體再做萃取工作，如立百和亨得拉病毒，結果一定要看到陽性對照組呈現陽性，而陰性對照組呈現陰性時，才能下斷言論及待檢檢體是陽性或陰性，至於波利維亞出血熱病毒和 Kyasanur forest disease；目前我們沒有標準病毒株也沒有合成 RNA 片段，因此在檢測時沒有陽性對照組，寄望有與預計大小類似的 DNA band 出現時，仍有待進一步的核酸序列來證明，至於如何去避免或降低偽陰性的出現可能性，是我們繼續要努力的方向。若不是懷疑的檢測項目時，那又要如何著手去找到真正病癥的原因？一般都依賴病毒分離的成功，才能有機會繼續追尋真正的病源，不過經常按照所要求偵檢的病毒來決定使用的細胞，檢體的量有限也不可能試許多細胞，因此細胞不對時也錯失病毒分離的機會。今年除了羅氏的檢體外，有三例（鄭彩雲 550、091-2-36-000169 和 091-1-31-000259）可見到 CPE，接連培養三代可見到 CPE 越來越快越強，若以各種不同之抗體進一步作 IFA，可推斷它們有可能為 CMV 或流行性感冒 B 型，不過仍須作進一步測 CMV 或流行性感冒 B 型之 RT-

PCR 和巢氏 PCR 等方法確認，我們寄望時間足夠時能繼續追究下去，或疾管局接著繼續探究。

至於偵檢羅氏之檢體 RT-PCR 和 semi-nested PCR 的結果，二者都顯現一條 DNA band 約 1.3kb，和預期的大小分別為 1311bp 和 1302 bp 類似。在還未得到這 1.3kb 的核酸序列之前，從病毒基因資訊的分析比較有一些限制酵素對各個病毒株能切在固定相近似的位置，作為確定或分型用，因此我們試著用 NilI、SphI、PvuII 和 EcoRI 等酵素去切這 1.3 kb 的 DNA 片段，結果顯示 PvuII 和 EcoRI 沒有切的位置，而 NilI 和 SphI 各有一個切的位置，分別位於 428 和 426，因此切成兩段 DNA 片段約分別為 880 和 430bp，與預期的相近，這切的位置顯示更接近大陸的一些狂犬病病毒株。在此疑似狂犬病的檢討會議中，台大李教授曾建議應該用一些較傳統卻快速簡單的組織免疫染色來檢測，不要一直估注於用較現代而時髦複雜的 RFLP 去做檢測，他的建議我也很贊成，但問題出在我們只有上呼吸道的抽出液約 0.4 cc，沒有其它任何檢體或組織切片，抽出液經過濾後只足夠做 RT-PCR 和病毒分離而已，在還未得到這 1.3kb 的核酸序列之前和等待病毒分離的 CPE 出現之前，我們只能試著用 RFLP 去取得更多的證據和支持，雖然我們有抗狂犬病病毒的單株抗體，可是沒有組織切片，實在無法進行快速簡單的組織免疫染色來檢測，倒不是我們執意用時髦複雜的 RFLP 去做檢測。

最後 PCR 所得的 1.3 kb DNA 片段經核酸序列分析結果更強有力支持檢體含狂犬病毒，這一段 1.3 kb DNA 的核酸序列和目前 gene library 的所有基因作比對，結果顯示這 PCR 所得的核酸序列與已知狂犬病病毒 NP 基因最接近，由 phylogenic tree 來看和大陸發表的狂犬病病毒株最接近，高達 88.6%為最高，其它的狂犬病毒株的這段基因片段的比對都介於 85 至 88%之間。因此很確定在這檢體中確

實含有狂犬病病毒的 RNA，且與大陸發表之狂犬病病毒核酸序列最接近，這些結果與這境外移入的病例也很吻合，此病人於湖北被家中飼養的狗咬過的紀錄，未曾做較適當的處置，至發病的時間都還在一般的潛伏期之內。不過另一個議題卻仍在議論中，因為大陸仍為狂犬病的疫區，如何去避免杜絕經由各種管路將此病毒傳入台灣？

以往預測伊波拉出血熱、馬堡出血熱、拉薩熱和立百病毒等蛋白之抗原性，利用人工各合成出約 500bp 之核酸片段，然後進入大腸桿菌蛋白表現系統表現重組蛋白，接著純化並試著去利用這些重組蛋白，但是因為這些蛋白的實際結構仍不清楚，是否這些 domain 暴露在分子的表面，因此目前最主要的問題這些抗原和誘導出的抗體是否適用於或真的能專一辨認真正的病毒、抗體或運用於臨床檢體，目前礙於沒有標準病毒株，因此這個答案一直無法回答，這問題只好尋求國際間之合作，如美國疾病管制局，目前我們也經由謝醫師幫我們詢問中。

目前 G1 和 G2 基因已被建構完成，然而它們的重組蛋白無法在大腸桿菌系統生產，甚至連接入的克隆都挑不到，即使換了幾種載體，也無法得到能表現的克龍，這種情況常常可碰見的，有可能此基因的重組蛋白對菌有毒害，一般用各種不同的載體含有各種不同的 fusion protein，試著去緩和它的毒性，或利用不同的載體和大腸菌抑制 constitutively expression 的 basal level，不過仍無法測到蛋白的表現，因此我們換到 baculovirus 的蛋白表現系統，目前已經挑到能表現 G2 重組蛋白的重組病毒，接下來的工作是尋找最佳表現的條件和如何提高產量，一般而言，baculovirus 的蛋白表現系統產量約為大腸桿菌系統的十分之一，因此如何提高產量是很重要的突破

點，我們計畫接著嘗試用細胞浮懸的方法來提高產量，至於 G1 基因也積極地嘗試進入 Baculovirus 系統中。

為了避免偵檢時發生偽陽性或偽陰性的結果，通常我們都設計準備了好幾套的引子，因此在西尼羅河病毒依不同的基因片段設計了 11 條引子，我們有一株西尼羅河病毒，但不知道它的核酸序列，因此我們也分析它的核酸序列，以後可當作陽性的對照組，先以 RT-PCR 取得一段 preM-E 基因約 1.5 kb，其核酸序列與美國最近流行的病毒株比較核酸序列的相似性高達 93%，至於氨基酸序列的相似性也是相當高約 94%，其中有一小段 4 個氨基酸不見了。

在克龍西尼羅病毒 preM-E 基因到大腸桿菌，也遇到和漢他 G1、G2 相同的問題，換了好幾個 vectors，但都挑不到克隆，這在黃質病毒如登革熱日本腦炎等也有相同的情況發生，且只有 E 基因其蛋白表現量會很低或不表現，因此都需要加上 preM，當作一個 signal peptide 把 E 蛋白帶進 ER 裡面，因此我們克龍 preM 和 E 基因在一起，並試著換到酵母的系統，將此 preM-E 基因接入 pPICZαB vector 中，挑到幾個克隆顯示比 pPICZαB vector 多出個約 1.5kb 的 DNA 片段，並試著用限制酵素都切出如預期的 DNA 片段，這 preM-E 應已接入 vector 裡，最後測試這些酵母菌是否表現西尼羅河病毒的 E 蛋白，若以抗西尼羅病毒的多株抗體可見到約 47kD 的一條 band，以抗 his-tag 的抗體檢測也可看到類似的 band，由以上的結果看來西尼羅河病毒的 E 蛋白可以在酵母菌的系統表現，接下來仍有待去尋找最佳的蛋白表現條件、提高產量和純化方法。最後還有一個有趣的問題，因為表現的重組蛋白似乎形成 polymer，這是否為 pseudovirus particle 都有待進一步的探討研究的。

(5)結論與建議：

今年的檢體中確定羅氏的上呼吸道抽取液含有狂犬病病毒的 RNA 基因和活的病毒，其它的檢體對所疑似的病毒偵檢結果都為陰性。我們也一直在問為何陽性率這麼低，如果問題是出在取檢體不是最佳的時間點，或檢體採取方法、量和保存之方式都會決定性的影響到偵檢之結果，這些都不是我們能夠控制的部分，我們能夠改進的部分只能加強陰性、陽性對照組的嚴格要求，在病毒分離方面盡量多採用各種細胞做培養，再者檢體運送之程序及安全也是需要更多的考慮及討論。

研發方面則接續去年的工作，伊波拉出血熱、馬堡出血熱、拉薩熱和立百病毒等以 capsid protein 為主要的對象，還有漢他病毒的 S 基因（nucleocapsid protein），這五個重組蛋白都以大腸桿菌為表現系統，而漢他病毒的 G1 和 G2 則以 baculovirus 為表現系統，今年增加了西尼羅河病毒，不過是以 preM-E 基因為表現的基因，目前利用酵母菌為表現系統。可是這些抗原抗體是否真的實用，仍然需要有標準的菌株當作陽性對照組，唯一的解決方法就是要建立國際合作管道，測試它們之實用性。

目前台灣可取得的病毒實在太少，當然這很欣慰表示我們的衛生水準相當高，再加上國際間也懼怕生物武器的研發禁止傳染性細菌病毒的釋放或交易，因此要發展建立偵檢第四級病毒或新興病毒有很多限制。我們沒持有這類的病毒，那就更依賴更需要有關這些病毒的生物資訊，來瞭解這些疫情的發生、預防、偵檢及治療，所以這生物資訊要經常更新。

(6)参考文獻：

Abu-Elyazeed R, el-Sharkawy S, Olson J, Botros B, Soliman A, Salib A, Cummings C, Arthur R （1996） Prevalence of anti-Rift-Valley-fever IgM antibody in abattoir workers in the Nile delta during the 1993 outbreak in Egypt. Bull WHO 74:155-158.

Alexeyev, OA; Baranov, BA (1993) Puumala Virus Infection without signs of Renal Involvement. Scand. J Infect Dis 25: 525-527.

Altaf A, Luby S, Ahmed AJ, Zaidi N, Khan AJ, Mirza S, McCormick J, Fisher-Hoch S (1998) Outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Quetta, Pakistan: contact tracing and risk assessment. Trop Med Int Health 3:878-882.

Arthur RR, el-Sharkawy MS, Cope SE, Botros BA, Oun S, Morrill JC, Shope RE, Hibbs RG, Darwish MA, Imam IZ (1993) Recurrence of Rift Valley fever in Egypt. Lancet 342 :1149-1150.

Baron RC, McCormick JB, Zubeir OA (1983) Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. Bull WHO 61:997-1003.

Borisevich IV, Mikhailov VV, Potryvaeva NV, Malinkin IuN, Kirillov AP, Krasnianskii VP, Markov VI, Makhlai AA, Lebedinskaia EV（1996） Development of the immunoenzyme test-system for detection of Ebola virus antigen. Vopr Virusol 41:232-234.

Burney Ml, Ghafoor A, Saleen M, Webb PA, Casals J (1980) Nosocomial outbreak of viral hemorrhagic fever caused by Crimean hemorrhagic fever-Congo virus in Pakistan, January 1976. Am J Trop Med Hyg 29:941-7.

Burt FJ, Leman PA, Smith JF, Swanepoel R (1998) The use of a reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. J Virol Methods 70:129-137.

Burt FJ, Swanepoel R, Shieh WJ, Smith JF, Leman PA, Greer PW, Coffield LM, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Zaki SR（1997） Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. Arch Pathol Lab Med 121:839-846

Butler, JC; Peters, CJ (1994) Hantavirus and Hantavirus pulmonary syndrome. Clinical Infectious Disease 19,387-395.

Cantoni G, Lazaro M, Resa A, Arellano O, Amestoy AM, De Bunder S, Herrero E, Perez A, Larrieu E （1997） Hantavirus pulmonary syndrome in the Province of Rio Negro, Argentina, 1993-1996. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 39:191-196.

Chew MHL, Arguin PM, Shay, DK, Goh KT, Rollin PE, Shieh WJ, Zaki SR, Rota PA, Ling AE, Ksiazek TG, Chew SK, Anderson LJ (2000) Rick factors for nipah virus infection among abattoir worker in Singapore. J Infect Dis 181:1760-1763

Chua KB, Goh KJ, Wong KT, Kamarulzaman A, Tan PS, Ksiazek TG, Zaki SR, Paul G, Lam SK, Tan CT（1999） Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. Lancet 354:1257-1259.

Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamon A, Lam SK, Ksiazek TG,Rollin PE, Zaki SR, Shieh WJ, Goldsmith CS, Gubler DJ, Roehrig JT, Eaton B, Gould AR, Olson J, Field H, Daniels P, Ling AE, Peter CJ, Anderson LJ, Mahy BW (2000) Nipah virus:a recently emergent deadly paramyxovirus. Science 288:1432-1435

Cummins D, McCormick JB, Bennett D, Samba JA, Farrar B, Machin SJ, Fisher-Hoch SP (1990) Acute sensorineural deafness in Lassa fever. JAMA 264:2093-2096.

Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS (1994) Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 32:2898-2903

Duchin, JS; Koster, FT; Peters, CJ (1994) Hantavirus pulmonary syndrome: a clinical descrption of 17 patients with a newly recognized disease. New Engl J Med 330: 945-945.

Elliott, LH; Ksiazek, TG; Rollin, PE; Spiropoulou, CF; Morzunov, S; Monroe, M; Goldsmith, CS; Humphrey, CD; Zaki, SR; Grebs, JW; Maupin, G; Gage, K; Childs, JE; Nichol, ST; Peters, CJ (1994) Isolation of the causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51: 102-108.

Enserink M (2000) Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats. Science 289:518-519

Figueiredo LT, Moreli ML, Almeida VS, Felix PR, Bruno JC, Ferreira IB, Mancano FD （1999） Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) in Guariba, SP, Brazil. Report of 2 cases. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 41:131

Fisher-Hoch SP, Tomori O, Nasidi A, Perez-Oronoz GI, Fakile Y, Hutwagner L, McCormick JB (1995) Review of cases of nosocomial Lassa fever in Nigeria: the high price of poor medical practice. BMJ 311:857-859.

Formenty P, Hatz C, Le Guenno B, Stoll A, Rogenmoser P, Widmer A (1999) Human infection due to Ebola virus, subtype Cote d'Ivoire: clinical and biologic presentation. J Infect Dis 179 Suppl 1:S48-53.

Frame JD, Baldwin JM Jr., Gocke DJ, Troup JM (1970) Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa: I. Clinical description and pathological findings. Am J Trop Med Hyg 19:670-676.

Gear JSS, Cassel GA, Gear AJ (1975) Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. Br Med J 4:489-493.

Georges AJ, Leroy EM, Renaut AA, Benissan CT, Nabias RJ, Ngoc MT, Obiang PI, Lepage JP, Bertherat EJ, Benoni DD, Wickings EJ, Amblard JP, Lansoud-Soukate JM, Milleliri JM, Baize S, Georges-Courbot MC (1999) Ebola hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: epidemiologic and health control issues. J Infect Dis 179 Suppl 1:S65-75.

Harcourt BH, Tamin A, Ksiazek TG, Rollin PE, Anderson LJ, Bellini W and Rota PA (2000) Molecular characterizatin of Nipah virus, a new emergent paramyxovirus. Virology 271, 334-349.

Heymann DL, Weisfeld JS, Webb PA, Johnson KM, Cairns T, Berquist H. Ebola hemorrhagic fever: Tandala, Zaire,1977-1978. J Infect Dis 142:372-376.

Hjelle B, Jenison S, Torrez-Martinez N, Herring B, Quan S, Polito A, Pichuantes S, Yamada T, Morris C, Elgh F, Lee HW, Artsob H, Dinello R （1997） Rapid and specific detection of Sin Nombre virus antibodies in patients with hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. J Clin Microbiol 35:600-608.

Hotta H(1998)Viral hemorrhagic fever-Ebola hemorrhagic fever, Marburg disease and Lassa fever. Rinsho Byori – Japanese Journal of Clinical Pathology 46(7):651-5.

Hubalek Z, Halouzka J （1999） West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. Emerg Infect Dis 5:643-650.

Hummel KB, Martin ML, Auperin DD (1992) Baculovirus expression of the glycoprotein gene of Lassa virus and characterization of the recombinant protein. Virus Res 25:79-90 .

Jahrling PB, Niklasson BS, McCormick JB (1985) Early diagnosis of human Lassa fever by ELISA detection of antigen and antibody. Lancet. 1:250-252.

Jia XY, Briese T, Jordan I, Rambaut A, Chi HC, Mackenzie JS, Hall RA, Scherret J, Lipkin WI (1999) Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. Lancet 354:1971-1972.

Johnson AM, de Souza LT, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ, Nichol ST （1999） Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. J Med Virol 59:527-535

Keenlyside RA, McCormick JB, Webb PA, Smith E, Elliott L, Johnson KM (1983) Case-control study of Mastomys natalensis and humans in Lassa virus-infected households in Sierra Leone. Am J Trop Med Hyg 32:829-837.

Khan AS, Maupin GO, Rollin PE, Noor AM, Shurie HH, Shalabi AG, Wasef S, Haddad YM, Sadek R, Ijaz K, Peters CJ, Ksiazek TG（1997） An outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates, 1994-1995. Am J Trop Med Hyg 57:519-525.

Kim, YS; Ahn, C; Han, JS; Kim, S; Lee, JS; Lee, WP (1995) Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Caused by the Seoul Virus. Nephron 71: 419-427.

Ksiazek TG, Rollin PE, Williams AJ, Bressler DS, Martin ML, Swanepoel R, Burt FJ, Leman PA, Khan AS, Rowe AK, Mukunu R, Sanchez A, Peters CJ （1999） Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. J Infect Dis 179 :Suppl 1:S177-87.

Ksiazek TG, West CP, Rollin PE, Jahrling PB, Peters CJ (1999)ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. J Infect Dis 179 Suppl 1:S192-8.

Lee, HW; Lee, PW; Johnson, KM (1978) Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. J. Infect. Dis. 137: 298-308.

Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ （1999） Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. Science 286:2333-2337.

Leroy EM, Baize S, Lu CY, McCormick JB, Georges AJ, Georges-Courbot M, Lansoud-Soukate J, Fisher-Hoch SP (2000) Diagnosis of Ebola haemorrhagic fever by RT-PCR in an epidemic setting. J Med Virol 60:463-467.

Li, D; Schmaljohn, AL; Anderson, K; Schmaljohn, CS (1995) Complete nucleotide sequence of the M and S segments of two Hantavirus isolated from California: evidence for reassortment in natire among viruses related to Hantavirus pulmonary syndrome. Virology 206: 973-983.
Li, YL; Ruo, SL; Tong, Z (1995) A serotypic study of hemorrhagic fever with renal syndrome in rural China. Am. J. Trop. Med. Hyg. 52: 247-251.
Linthicum KJ, Anyamba A, Tucker CJ, Kelley PW, Myers MF, Peters CJ (1999) Climate and satellite indicators to forecast Rift Valley fever epidemics in Kenya. Science 285:397-400
Lukashevich LS, Clegg JC, Sidibe K（1993）Lassa virus activity in Guinea: distribution of human antiviral antibody defined using enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant antigen. J Med Virol 40:210-217.
Mariott AC, Nuttall PA (1992) Comparison of the S RNA segments and nucleoproteins sequences of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Virology 180: 795-799.
McCormick JB, King IJ, Webb PA (1987) A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. J Infect Dis 155:445-455.
Merzlikin NV, Chepurnov AA, Istomina NN, Ofitserov VI, Vorob'eva MS（1995）Development and application of an immunoenzyme test system for diagnosing Ebola fever. Vopr Virusol 40:31-35.
Miranda ME, Ksiazek TG, Retuya TJ, Khan AS, Sanchez A, Fulhorst CF, Rollin PE, Calaor AB, Manalo DL, Roces MC, Dayrit MM, Peters CJ（1999）Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. J Infect Dis 179 Suppl 1:S115-119.
MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1994 43(50):943-6. Bolivian hemorrhagic fever--El Beni Department, Bolivia,
Muyembe-Tamfum JJ, Kipasa M, Kiyungu C, Colebunders R (1999) Ebola outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: discovery and control measures. J Infect Dis 179 Suppl 1:S259-262.
Nichol, ST; Spiropoulou, CF; Morzunov, S (1993) Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. Science 262: 914-917.
Niklasson BS, Jahrling PB, Peters CJ (1984) Detection of Lassa virus antigens and Lassa virus-specific immunoglobulins G and M by enzyme-linked immunosorbent assay. Jof Clin Microbio 20:239-244.
Nordin MN (1999) O.I.E. Dis. Inf. 12:20
Paton NI, Leo YS, Zaki SR, Auchus AP, Lee KE, Ling AE, Chew SK, Ang B, Rollin PE, Umapathi T, Sng I, Lee CC, Lim E, Ksiazek TG （1999）Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. Lancet 354:1253-1256.
Peters, CJ; Khan, AS; Zaki, SR (1996) Hantaviruses in the United States. Archives of International Medicine 156: 705-707.
Prehaud C, Hellebrand E, Coudrier D, Volchkov VE, Volchkova VA, Feldmann H, Le Guenno B, Bouloy M (1998) Recombinant Ebola virus nucleoprotein and glycoprotein (Gabon 94 strain) provide new tools for the detection of human infections. J Gen Virol 79 (Pt 11):2565-2572.
Rand, MS (1994) Hantavirus: an overview and update. Lab. ani. Sci. 44, 301-304.
Rodriguez LL, De Roo A, Guimard Y, Trappier SG, Sanchez A, Bressler D, Williams AJ, Rowe AK, Bertolli J, Khan AS, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST (1999) Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. J Infect Dis 179 Suppl 1:S170-176.
Rodriguez-Moran P, Kelly C, Williams TM, Hjelle B (1998) Hantavirus infection in the Four Corners region of USA in 1998. Lancet; 352:1353.
Rollin PE, Williams RJ, Bressler DS, Pearson S, Cottingham M, Pucak G, Sanchez A, Trappier SG, Peters RL, Greer PW, Zaki S, Demarcus T, Hendricks K, Kelley M, Simpson D, Geisbert TW, Jahrling PB, Peters CJ, Ksiazek TG (1999) Ebola (subtype Reston) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to the United States. J Infect Dis 179 Suppl 1:S108-114.
Ruo, SL; Li, YL; Tong, Z (1994): Retrospective and prospecitve studies of hemorrhagic fever with renal syndrome in rural China. J. Infect. Dis. 170, 527-534.
Schmaljohn, CS; Hasty, SE; Dalrymple, JM (1985) Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. Sicience 227, 1041-1044.
Schmaljohn, CS; Hjelle, B (1997) Hantavirus: A Global Disease Problem. Emerging Infect. Dis. 3, 95-104.
Schreiber, M.; Laue, T; Wolff, C (1996) Hantavirus pulmonary syndrome in Germany. Lancet 3347: 336-337.
Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA, Shepherd SP（1986）Comparison of methods for isolation and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J Clin Microbiol 24:654-656.

Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, Murti KG, Norwood M, Senne D, Sims L, Takada A, Webster RG (1998) Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. Virology 252:331-342

Smith DH, Johnson BK, Isaacson M (1982) Marburg-virus disease in Kenya. Lancet 1 :816-820.

Song, NW; Baek, LJ; Gavrilovskaya, IN; Mackow, ER; Hjelle, B; Yanagihara, R (1996) Sequence analysis of the complete S genomic segment of a newly identified Hantavirus isolated from the shite-footed mouse (*Peromyscus leucopis*): phylogenetic relationship with other Sigmodontine rodent-borne Hantaviruses. Virus Genes 12: 249-256.

Stephenson EH, Larson EW, Dominik JW (1984) Effect of environment factors on aerosol-induced Lassa virus infection. J Med. Virol 14:295.

Suieiman M, Muscat-Baron JM, Harries JR (1980) Congo/Crimean haemorrhagic fever in Dubai. Lancet 2:939-941.

Swanepoel R, Shepherd AJ, Leman PA (1978) Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa. Am J Trop Med Hyg 36:120-132.

Swanepoel R, Struthers JK, Shepherd AJ, McGillivray GM, Nel MJ, Jupp PG （1983）Crimean-congo hemorrhagic fever in South Africa. Am J Trop Med Hyg 32:1407-1415.

Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ (1989）The clinical pathology of Crimean-congo hemorrhagic fever. Rev Infect Dis 11(Suppl 4): S794-800.

Ter Meulen J, Koulemou K, Wittekindt T, Windisch K, Strigl S, Conde S, Schmitz H（1998）Detection of Lassa virus antinucleoprotein immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies by a simple recombinant immunoblot assay for field use. J Clin Microbiol 36:3143-3148.

Thonnon J, Spiegel A, Diallo M, Sylla R, Fall A, Mondo M, Fontenille D (1998) Yellow fever outbreak in Kaffrine, Senegal 1996: epidemiological and entomological findings. Trop Med Int Health 3:872-877.

Toro J, Vega JD, Khan AS, Mills JN, Padula P, Terry W, Yadon Z, Valderrama R, Ellis BA, Pavletic C, Cerda R, Zaki S, Shieh WJ, Meyer R, Tapia M, Mansilla C, Baro M, Vergara JA, Concha M, Calderon G, Enria D, Peters CJ, Ksiazek TG （1998）An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. Emerg Infect Dis 1998 4:687-694.

Trappier SG, Conaty AL, Farrar BB, Auperin DD, McCormick JB, Fisher-Hoch SP (1993) Evaluation of the polymerase chain reaction for diagnosis of Lassa virus infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49:214-221.

Tsai, TF (1987) Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Mode of Transmission to Human. Lab Animal Sci. 37: 428-430.

Van Eeden PJ, Joubert JR, Van De Wal BW, King JB, De Kock A, Groenewald JH (1985) A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital: Part 1. Clinical features. S Afr Med J 68:711-717.

Vanderzanden L, Bray M, Fuller D, Roberts T, Custer D, Spik K, Jahrling P, Huggins J, Schmaljohn A, Schmaljohn C（1998）DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. Virology 246(1):134-144.

Volchkov V, Volchkova V, Eckel C, Klenk HD, Bouloy M, LeGuenno B, Feldmann H (1997) Emergence of subtype Zaire Ebola virus in Gabon. Virology 232:139-144

Wang LF (1995) J. Immunol. Methods.1678:1

Well, RM; Estana, SS; Yadon, ZE; Enria, D; Padila, P; Pini, N; Mills, JN; Peters, CJ; Segura, EL (1997) An Unusual Hantavirus Outbreak in Southern Argentina: Person-to Person Transmission? Emerging Infect. Dis. 3: 171-174.

Wells RM, Young J, Williams RJ, Armstrong LR, Busico K, Khan AS, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Nichol ST, Peters CJ （1997）Hantavirus transmission in the United States. Emerg Infect Dis 3(3):361-5.

Williamson MM, Hooper PT, Selleck PW, Gleeson LJ, Daniels PW, Westbury HA, Murray PK （1998）Transmission studies of Hendra virus (equine morbillivirus) in fruit bats, horses and cats. Aust Vet J 76:813-818.

Yen YC, Kong LX, Lee L, Zhang YQ, Li F, Cai BJ, Gao SY（1985）Characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Xinjiang strain) in China. Am J Trop Med Hyg 34:1179-1182.

Xiao, SY; LeDuc, JW; Chu, YK; Schmalhjohn, CS (1994) Phylogenetic analysis of virus isloates in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae. Virology 198:205-217.