

計畫編號：DOH92-DC-2005

行政院衛生署疾病管制局九十二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、簡麗蓉、張淑芬、蘇千玲、廖采苓、郭郁中、

游淳如、陳同輝、陳語潔、林鼎翔

執行期間：92年1月1日至92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	(3-4)
英文摘要	(5-6)
二、本文	
(1) 前言	(7-13)
(2) 材料與方法	(13-19)
(3) 結果	(20-23)
(4) 討論	(23-24)
(5) 結論與建議	(24-25)
(6) 參考文獻	(25-33)
三、圖次	(34-40)
四、表次	(41-43)
	共 (43) 頁

一之一、中文摘要

關鍵詞：黃病毒、黃熱病、登革熱、日本腦炎、ELISA、非結構蛋白質一(NS1)

黃熱病、登革熱、及日本腦炎是台灣地區三種重要的法定傳染病，分別屬於黃病毒屬的黃熱病、登革熱、及日本腦炎亞群。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、西尼羅腦炎病毒等）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。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。我們利用酵素免疫分析法(ELISA)建立了一套完整的血清診斷系統，能快速的監測及鑑別診斷各種黃病毒感染。這包括以外套膜蛋白質(Envelope protein (E) and Membrane (M))為基礎的Capture IgM及IgG ELISA，E/M antigen-coated indirect IgM及IgG ELISA，與非結構蛋白質NS1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，則主要利用Real time one-step RT-PCR方法檢測特異性病毒核

酸。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快速檢驗試劑評估工作，了解其臨床應用之可靠性。目前依據 Real time one-step RT-PCR 及 Capture IgM 及 IgG ELISA 為基礎的登革熱檢驗方法，可在檢體送達後 24 小時內完成檢驗，其靈敏度可達 95%。因此，我們建議對於醫院通報病例，在非登革熱流行期，由於陽性檢出率低，可等檢驗結果為陽性或疑似陽性後才進行噴藥工作。此外，我們也建立了一套登革病毒感染血清分型的分析系統，利用 NS1 serotype-specific IgG ELISA，E/M serotype-specific Capture IgM ELISA，與 NS1 serotype-specific Capture IgM ELISA 等三種方法，除了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，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，分辨大部分初次感染者與約 50% 之二次感染者之登革病毒血清型別。我們正積極規劃在疾病管制局成立一個具有國際水準的黃病毒參考實驗室，有系統的進行各種黃病毒的監測、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 下的一個黃病毒參考實驗室。未來，我們將積極與國際上相關實驗室合作，進行學術交流與共同研究，目前正計劃加入 WHO 所建構的登革監測網，以監控全球登革熱疫情，有效地進行防治措施。

（篇幅不足，請自行複製）

第 頁

一之二、英文摘要

Keyword: flavivirus, Yellow fever, dengue fever, Japanese encephalitis, ELISA, Nonstructural protein1 (NS1)

Yellow fever (YF), dengue fever, and Japanese encephalitis (JE) 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 (YF virus, dengue virus, JE virus, and West Nile virus) potentially cause outbreaks in Taiwan. The serological diagnosis of flavivirus virus infection is rather difficult because multiple and sequential flavivirus infections occurred in the regions where two or more flaviviruses are co-circulating and high cross-reactivity of IgG antibodies to homologous and heterologous flavivirus antigens. We have developed a comprehensive serological system using ELISA to rapidly detect and differentiate various flavivirus infections for efficient disease surveillance. These included E/M-specific Capture IgM and IgG ELISA, E/M antigen-coated indirect IgM and IgG ELISA, and NS1-specific indirect IgG ELISA for the analysis of virus-specific antibodies in the convalescent phase sera. For acute phase sera, we have developed Real-time one-step RT-PCR to detect virus-specific nucleotide sequences. In order to setup a flavivirus reference lab with international standard, we have evaluated several commercial rapid test kits of dengue virus infection. Based on the combined analyses of Real-time one-step RT-PCR and E/M-specific Capture IgM and IgG ELISA, 95% of acute phase sera from confirmed cases can be identified as positive or probable cases within 24-48 hours of receiving serum samples. Therefore, we recommend that the insecticide spray will be hold for suspected

cases unless laboratory diagnosis comes out positive or probable in areas with no indigenous dengue cases. 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. In addition, E/M serotype-specific Capture IgM ELISA and NS1 serotype-specific Capture IgM ELISA can be reliably used to correctly identify dengue serotype from most of primary dengue patients and about 50% of secondary dengue patients. We plan to set up a flavivirus reference laboratory in CDC-Taiwan to play functional roles in the disease surveillance, vector control, serological and molecular diagnoses, and epidemiology. This flavivirus reference laboratory can be operated under the APEC and/or WHO platforms in the future. We will establish international cooperation with other flavivirus laboratories for joined research and information exchange. To start with, we plan to join WHO DengueNet surveillance network for global information exchange of dengue outbreaks in the near future.

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。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)。

在台灣地區,黃熱病、日本腦炎、及登革熱是三種重要的法定傳染病,分別屬於黃病毒屬的黃熱病、日本腦炎、及登革熱亞群。其中,黃熱病非本土性疾病,至今也沒有境外移入的確定病例。日本腦炎病毒為一本土性傳染病,主要靠疫苗進行預防,雖然大多數三十歲以下人均曾注射過疫苗,但每年仍有二十至三十病例,仍是公共衛生上的重要問題。而登革熱主要是經由境外移入引進,但也

常因監控及防治之困難導致大流行，近年來，更有出血性登革熱病例增加趨勢，至於是否登革熱已成為或將變成本土性疾病雖仍有爭議，但已成為南部地區公共衛生上之重要議題。

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，如何建立完善地監測系統及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、西尼羅腦炎病毒等）是十分重要的。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。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。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。West Nile virus 之在美國本土流行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、及歐洲等先進國家合作，儘速建立一套完整的黃病毒監測及通報系統，並建立一個具有國際水準的病媒性疾病參考實驗室，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。

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出血性登革熱(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/出血性登革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 2001 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，更於 2002 年擴大其流行範圍，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 242 名病例出現登革出血熱的嚴重臨床症狀，並且有 21 人死亡。

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，由於其靈敏度與傳統的 nested RT-PCR 相似，但檢驗時間縮短為 6 小時，且污染率大幅

降低，未來勢必取代傳統 **nested 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，我們利用酵素免疫分析法(ELISA)建立了一套完整的血清診斷系統，能快速的監測及鑑別診斷各種黃病

毒感染。這包括以外套膜蛋白質(Envelope protein (E) and Membrane (M))為基礎的 Capture IgM 及 IgG ELISA , Antigen-coated indirect IgM 及 IgG ELISA , 與非結構蛋白質 NS1 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 , 則主要利用 Real time one-step RT-PCR 方法檢測特異性病毒核酸。我們也建立了一套登革病毒感染血清分型的分析系統 , 利用 NS1 serotype-specific IgG ELISA , E/M serotype-specific Capture IgM ELISA , 與 NS1 serotype-specific Capture IgM ELISA 等三種方法 , , 除了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 , 也能分辨初次及二次登革病毒感染 , 及分辨大部分初次感染者與約 50%之二次感染者之登革病毒血清型別。

(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。出血性登革熱之定義係依照 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)或低蛋白素血症(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、E/M-specific 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。覆被完成後以磷酸氯化鈉緩衝液 (PBS) 清洗, 之後再用 $200\ \mu\text{l}$ 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混合病毒抗原

(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 antigen-coated indirect IgM and IgG ELISA: 先以 5 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{l/well}$ 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 μ g/ml, 100 μ l/well of 單株抗体 D2/8-1 在 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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-鹼性磷酸酶結合物，於 37 $^{\circ}$ 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。

四、NS1 serotype-specific indirect IgG ELISA: 先以 5 μ g/ml, 100 μ l/well of 單株抗体 D2/8-1 在 4 $^{\circ}$ 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 JEV、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4 病毒培養上清液以 1:3 稀釋後分別加入各小孔，在 37 $^{\circ}$ 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 反應 1 小時。最後，加入酵素受質體 p-nitrophenyl-phosphate (Sigma) 成色後以波長 405 nm 測吸光度。

五、E/M serotype-specific Capture IgM ELISA:先以山羊 IgG 抗人 IgM (goat IgG against Human IgM)在 4 下隔夜覆被 (coating)在 96 孔微量效價盤上。然後加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照血清反應 1 小時。清洗後，將含有 E/M 抗原的 JEV、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4 病毒培養上清液以 1: 3 稀釋後分別加入各小孔，在 37 下反應 1 小時。清洗後，加 1/1000 稀釋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 反應 1 小時。最後，加入酵素受質體 p-nitrophenyl-phosphate (Sigma) 成色後以波長 405 nm 測吸光度。

六、NS1 serotype-specific Capture IgM ELISA:先以山羊 IgG 抗人 IgM (goat IgG against Human IgM)在 4 下隔夜覆

被 (coating) 在 96 孔微量效價盤上。然後加入 1:50 稀釋好的待測血清及對照血清反應 1 小時。清洗後，將含有 NS1 抗原的 JEV、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4 病毒培養上清液以 1:3 稀釋後分別加入各小孔，在 37 °C 下反應 1 小時。清洗後，加 1/1000 稀釋之抗黃病毒屬 NS1 抗原之單株抗体 D2/8-1，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。最後，加入酵素受質體 酵素受質體 p-nitrophenyl-phosphate (Sigma) 成色後以波長 405 nm 測吸光度。

5. 現有商品化快速診斷試劑之評估

為積極建立一個國際水準的黃病毒參考實驗室，我們也進行已商品化快速檢驗試劑(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。

(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：(1) E/M-specific Capture IgM and IgG ELISA，(2) E/M antigen-coated indirect IgM and IgG ELISA，與(3) NS1-specific Indirect IgG ELISA 三種不同型式的 ELISA 方法，可以檢測病人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 E/M-specific Capture IgM 及 IgG 抗體反應均為強陽性時，可以很準確的判定為黃病毒感染。由於 anti-flavivirus 之 IgM 抗體之 cross-reactivity 相當低，因此可用於分辨不同黃病毒之感染，但是 IgG 抗體之 cross-reactivity 則相當高，僅能用於判定是否為黃病毒之感染 (圖一)。但有少數確定病例之血清檢體僅 E/M-specific 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 (data not shown)。NS1 serotype-specific Indirect IgG ELISA 除了可用於分辨不同黃病毒感染外，也能分辨初次及二次登革病毒感染 (data not shown)，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，用於血清流行病學的研究 (圖二)。

2. 登革病毒血清抗體分型系統建立：除了 NS1 serotype-specific Indirect IgG ELISA 可用於分辨初次感染者之登革病毒血清型別外，我們也建立了 E/M serotype-specific Capture IgM ELISA 與 NS1 serotype-specific Capture IgM ELISA 二種方法。圖三與圖四分別為 E/M serotype-specific Capture IgM ELISA 與 NS1 serotype-specific Capture IgM ELISA 之代表性結果，顯示這二種方法確實能分辨大部分初次感染者與約 50%之二次感染者之登革病毒血清型別。
3. 為了分析初次感染者與二次感染者血清抗體之動力學變化，我們進行了 91 年度高雄地區登革熱確定病例之血清學調查，圖五、

圖六、與圖七分別是及急性期及恢復期感染者、後恢復期初次感染者、與後恢復期二次感染者之血清 IgM and IgG 抗體效價分布圖，結果顯示利用 E/M-specific Capture IgM and IgG ELISA 分析，初次感染者之 IgM and IgG 抗體在四個月後已下降很多，但是相當多二次感染者之血清 IgG 抗體效價在十個月後仍維持相當高效價。因此，我們強烈建議，最可靠的血清抗體檢體分析，需要以恢復期血清檢體之 IgM or IgG 抗體是否比急性期血清有四倍上升來確定。

4. 以螢光定量 RT-PCR 及酵素免疫分析法(Capture IgM/IgG ELISA) 分析 91 年度登革熱陽性病人之急性期血清的陽性率。共分析 779 支陽性血清，RT-PCR 的陽性率隨發病日增加而遞減，由發病第一日的 75% 減為發病第七日的 22% 日，而 IgM/IgG ELISA 的陽性率則隨發病日增加而遞增，由發病第一日的 32% 增加為發病第七日的 80%。結果顯示以快速檢驗為基礎的登革熱檢驗方法，可在急性期血清檢體送達後 24-48 小時內完成檢驗，約有 95% 的確定病例之檢驗結果為陽性或無法判定，此對於疾病的診斷及疫情的防治有極大的幫助（表一）。
5. 市售的快速檢驗試劑評估工作：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。我們目前已建立了一套完整的 Serum panel，並陸續評估了不同廠商及代理商以 strip chromatographer 為基礎的快速診斷試劑(15-20分鐘即可判讀結果)，這些診斷試劑都有其優點，但都有偽陽性與偽陰性的問題，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。表二及表三為初步完成 Onsight 品牌的快速診斷試劑評估工作，其 IgM 抗體檢測之靈敏度仍需改進，我們正協助其改善其產品。其他品牌之快速診斷試劑之評估工作也陸續在進行中。

(4) 討論

目前，黃病毒實驗室診斷，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。在急性期血清中，因抗體尚未大量產生，主要靠反轉錄酶/聚合酶鏈鎖反應法來檢驗，為此，我們建立了更快速、特異性更高的螢光定量 Real time one-step RT-PCR 方法，來取代目前大部分實驗室所使用的 Nested RT-PCR 方法，來檢測黃病毒特異性核酸序列。

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鑑別診斷系統，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 E/M-specific Capture IgM and IgG ELISA，E/M antigen-coated indirect IgM and IgG ELISA，與 NS1-specific Indirect IgG ELISA，檢測病人血清中之病毒特異性抗體。

目前依據 Real-time RT-PCR 及 ELISA 為基礎的登革熱檢驗方法，可在檢體送達後 24 小時內完成檢驗，其靈敏度可達 95%。因此，我們建議對於醫院通報病例，在非登革熱流行期，由於陽性檢出率低，可等檢驗結果為陽性或疑似陽性後才進行噴藥工作；在本土登革熱流行期，因陽性檢出率高 (疫情高峰時可達 30%)，只要接獲通報，即可進行噴藥工作。快速鑑別診斷系統之建立，除了對病患的治療與防治工作有幫助外，也可以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。本計畫是三年計畫的最後一年，我們已初步完成計畫之主要目標，建立了一套黃病毒血清鑑別診斷系統，並運用於血清流行病學之研究。我們正積極規劃在疾病管制局成立一個具有國際水準的黃病毒參考實驗室，有系統的進行各種黃病毒的監測、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 下的一個黃病毒參考實驗室。未來，我們將積極與國際上相關實驗室合作，進行學術交流與共同研究，目前正計劃加入 WHO 所建構的登革監測網，以監控全球登革熱疫情，有效地進行防治措施。

(6) 參考文獻

1. **Alcon, S., A. Talarmin, M. Debruyne, A. Falconar, V. Deubel, and M. Flamand.** 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.* **40**:376-381.
2. **Balmaseda, A., M. G. Guzman, S. Hammond, G. Robleto, C. Flores, Y. Tellez, E. Videa, S. Saborio, L. Perez, E. Sandoval, Y. Rodriguez, and E. Harris.** 2003. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**:317-322.

3. **Branch, S. L., and P. N. Levett.** 1999. Evaluation of four methods for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**:555-557.
4. **Bravo, J. R, M. G. Guzman, and G. P. Kouri.** 1987. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? I. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**:816-820.
5. **Bundo, K., and A. Igarashi.** 1985. Antibody-capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. *J. Virol. Methods* **11**:15-22.
6. **Burke, D. S., A. Nisalak, and M. A. Ussery.** 1982. Antibody capture immunoassay detection of Japanese encephalitis virus Immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **15**:1034-1042.
7. **Burke, D. S.** 1983. Rapid methods in the laboratory diagnosis of dengue virus infections. *In: Pang, T. and Pathmanathan, (eds) Proceedings of the International Conference on Dengue/dengue Hemorrhagic Fever.* University of Malaya, Kuala Lumpur, pp. 72-84.
8. **Burke, D. S., A. Nisalak, D. E. Johnson, and R. M. Scott.** 1988. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hygiene* **38**:172-180.
9. **Callahan, J. D., S. J. Wu, A. Dion-Schultz, B. E. Mangold, L. F. Peruski, D. M. Watts, K. R. Porter, G. R. Murpgy, W. Suharyono, C. C. King, C. G. Hayes, and J. J. Temenak.** 2001. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4119-4124.
10. **Cardosa, M. J., T. Phaik, and N. Sham.** 1988. Development of a dot enzyme immunoassay for dengue 3: a sensitive method for the detection of anti-dengue antibodies. *J. Virol. Methods* **22**:81-88.
11. **Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler, and C. M. Rice.** 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 649-688.
12. **Charrel, R. N., and X. de Lamballerie.** 2002. Low specificity of an immunochromatographic serological assay for diagnosis of dengue Fever in travelers returning with malaria. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**:1400.
13. **Chen, R. F., W. T. Yeh, M. Y. Yang, and K. D. Yang.** 2001. A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **30**:1-7.
14. **Chungue, E., G. Marche, R. Plichart, J. P. Boutin, and J. Roux.** 1989. Comparison of immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) and haemagglutination inhibition (HI) test for the detection of dengue antibodies. Prevalence of dengue IgG-ELISA antibodies in Tahiti. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**:708-711.

15. **Churdboonchart, V., N. Bhamarapravati, S. Peampramprecha, and S. Sirinavin.** 1991. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**:481-93.
16. **Clarke, D. H., and J. Casals.** 1958. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **7**:561-573.
17. **Cuzzubbo, A. J., T. P. Endy, A. Nisalak, S. Kalayanarooj, D. W. Vaughn, S. A. Ogata, D. E. Clements, and P. L. Devine.** 2001. Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of Dengue virus infection in an immunochromatographic assay *Clin Diagn Lab Immunol.* **8**:1150-1155.
18. **Deubel, V., R. M. Kinney, and D. W. Trent.** 1988. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. *Virology* **165**:234-244.
19. **Drosten, C., S. Gottig, S. Schilling, M. Asper, M. Panning, H. Schmitz, and S. Gunther.** 2002. Rapid detection and quantitation of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift valley fever virus, dengue virus, and Yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2323-2330.
20. **Endy T. P., S. Chunsuttiwat, A. Nisalak, D. H. Libraty, S. Green, A. L. Rothman, D. W. Vaughn, and F. A. Ennis.** 2002. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am. J. Epidemiol.* **156**:40-51
21. **Falkler, W. A. A. R. Diwan, and S. B. Halstead.** 1973. Human antibody to dengue soluble complement-fixing (SCF) antigens. *J. Immunol.* **111**:1804-1809.
22. **Garcia, G., D. W. Vaughn, and R. M. Del Angel.** 1997. Recognition of synthetic oligopeptides from nonstructural proteins NS1 and NS3 of dengue-4 virus by sera from dengue virus-infected children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56**:466-470.
23. **Gardner, S. N., T. A. Kuczmarski, E. A. Vitalis, and T. R. Slezak.** 2003. Limitations of TaqMan PCR for detecting divergent viral pathogens illustrated by hepatitis A, B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2417-2427.
24. **Gentry, M. K., E. A. Henchal, J. M. McCown, W. E. Brandt, and J. M. Dalrymple.** 1982. Identification of distinct determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**:548-555.
25. **Gibbons, R. V., and D. W. Vaughn.** 2002. Dengue: an escalating problem. *BMJ.* **324**:1563-1566.
26. **Green S, D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, A. Nisalak, R. Lew, B. L. Innis, I. Kurane, A. L. Rothman, and F. A. Ennis.** 1999. Early

immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect. Dis* **179**:755-762.

27. **Groen, J., P. Koraka, J. Velzing, C. Copra, and A. D. M. E. Osterhaus.** 2000. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**:867-871.
28. **Gubler, D. J., and L. Rosen.** 1976. A simple technique for demonstrating transmission of dengue virus by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **25**:146-150.
29. **Gubler, D. J., D. Reed, L. Rosen, and J. C. J. Hitchcock.** 1978. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the kingdom of Tonga. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**:581-589.
30. **Gubler, D. J., and G. E. Sather.** 1988. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever, p. 291-322. *In* A. Homma and J. F. Cunha (ed). Proceedings of the International Symposium on Yellow fever and dengue.
31. **Gubler, D. J.** 1996. Serologic diagnosis of dengue/dengue haemorrhagic fever. *Dengue bulletin.* 20:20-23.
32. **Gubler, D. J.** 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. P. 1-22. *In* D. J. Gubler and G. Kuno (ed), *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* CAB International, New York, N. Y.
33. **Gubler, D. J.** 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:480-496.
34. **Guzman, M.G., G. Kouri, J. Bravo, M. Soler, S. Vazquez, and L. Morier.** 1990. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**:179-184.
35. **Guzman, M.G., and G. Kouri.** 1996. Advances in dengue diagnosis. *Clin. Microbiol. Diagn. Lab. Immunol.* **3**:621-627.
36. **Guzman, M.G., and G. Kouri.** 2003. Dengue: an update. *Lancet Infect. Dis.* **2**:33-42.
37. **Halstead, S. B., H. Shotwell, and J. Casals.** 1973. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys II. Clinical laboratory responses to heterologous infection. *J. Infect. Dis.* **128**:15-22
38. **Halstead, S. B.** 1988. Pathogenesis of dengue: challenge to molecular biology. *Science.* **239**:476-481.
39. **Harris, E., T. G. Roberts, L. Smith, J. Selle, L. D. Kramer, S. Valle, E. Sandoval, and A. Balmaseda.** 1998. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbio.* **36**:2634-2639.

40. **Henchal, E. A., J. M. McCown, M. C. Seguin, M. K. Gentry, and W. E. Brandt.** 1983. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**:164-169.
41. **Henchal, E. A., S. L. Polo, V. Vorndam, C. Yaemsiri, B. L. Innis, and C. H. Hoke.** 1991. Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**:418-428.
42. **Houng, H. H., R. C. M. Chen, D. W. Vaughn, and N. Kanesa-thasan.** 2001. Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3'noncoding sequences. *J. Virol. Methods.* **95**:19-32.
43. **Huang, J. H., J. J. Wey, C. Chin, and Y. C. Wu.** 1999. Antibody Responses to an Immunodominant Nonstructural 1 Synthetic Peptides in Patients with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. *J. Med. Virol.* **57**:1-8.
44. **Huang, J. L., J. H. Huang, R. H. Shyn, C. W. Teng, Y. L. Lin, M. D. Kuo, C. W. Yao, and M. F. Shaio.** 2001. High level expression of immunodominant recombinant dengue viral NS1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *J. Med. Virol.* **65**:553-560.
45. **Hung, N.T., H. Y. Lei, N. T. Lan, Y. S. Lin, K. J. Huang, L. B. Lien, C. F. Lin, T. M. Yeh, D. Q. Ha, V. T. Q. Huong, L. C. Chen, J. H. Huang, L. T. My, C. C. Liu, and S. B. Halstead.** Dengue hemorrhagic fever in infants: a study on clinical and cytokine profiles. *J. Infec. Dis.* (In press).
46. **Innis, B. L., A. Nisalak, S. Nimmannitya, S. Kusalerdchariya, V. Chongswasdi, S. Suntayakorn, P. Puttisri, and C. H. Hoke.** 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**:418-427.
47. **Innis, B. L.** 1997. Antibody responses to dengue virus infection. P. 221-243. *In* D. J. Gubler and G. Kuno (ed), *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* CAB International, New York, N. Y.
48. **Koraka, P., B. Murgue, X. Deparis, T. E. Setiati, C. Suharti, E. C. van Gorp, C. E. Hack, A. D. Osterhaus, and J. Groen.** 2003. Elevated levels of total and dengue virus-specific immunoglobulin E in patients with varying disease severity. *J. Med. Virol.* **70**:91-98.
49. **Koraka, P., C. P. Burghoorn-Maas, A. Falconar, T. E. Setiati, K. Djamiatun, J. Groen, and A. D. M. E. Osterhaus.** 2003. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4154-4159.

50. **Kuberski, T., and L. Rosen.** 1977. A simple technique for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**:533-537.
51. **Kuno, G., A. V. Vorndam, D. J. Gubler, and I. Gomez.** 1990. Study of anti-dengue NS1 antibody by western blot. *J. Med. Virol.* **32**:102-108.
52. **Kuno, G., I. Gomez, and D. J. Gubler.** 1991. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J. Virol. Methods* **33**:101-113.
53. **Kuno, G.** 1998. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J. Virol. Methods.* **72**:27-41.
54. **Kurane, I., A. L. Rothman, P. G. Livingston, S. Green, S. J. Gagnon, J. Janus, B. L. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, and F. A. Ennis.** 1994. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol Suppl* **9**:59-64.
55. **Lam, S. K.** 1986. Isolation of dengue viruses by intracerebral inoculation of mosquito larvae. *J. Virol. Methods.* **14**:133-140.
56. **Lam, S. K., and P. L. Devine.** 1998. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. *Clin. Diagn. Virol.* **10**:75-81.
57. **Lanciotti, R. S., C. H. Calisher, D. J. Gubler, G. J. Chang, and A. V. Vorndam.** 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**:545-551.
58. **Laue, T., P. Emmerich, and H. Schmitz.** 1999. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. *J. Clin. Microbio.* **37**:2543-2547.
59. **Lei, H. Y., T. M. Yeh., H. S. Liu., Y. s. Lin., S. H. Chen, and C. C. Liu.** 2001. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J. Biomed Sci.* **8**: 377-388.
60. **Leyssen, P., E. D. Clercq, and J. Neyts.** 2000. Perspectives for the treatment of infections with *flaviviridae*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:67-82.
61. **Lin, C. F., H. Y. Lei, A. L. Shiau, C. C. Liu, H. S. Liu, T. M. Yeh, S. T. Wang, T. I. Zang, F. C. Sheu, C. F. Kuo, and Y. S. Lin.** 2001. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J. Med. Virol.* **63**:143-149.
62. **Ludolfs, D., S. Schilling, J. Altenschmidt, and H. Schmitz.** 2002. Serological differentiation of infections with dengue virus serotypes 1 to 4 by using recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4317-4320.
63. **Mackay, I. M., K. E. Arden, and A. Nitsche.** 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* **30**:1292-1305.
64. **Makino, Y., M. Tadano, M. Saito, N. Maneekarn, N. Sittisombut, V. Sirisanthana, B. Poneprasert, and T. Fukunaga.** 1994. Studies on serological

- cross-reaction in sequential flavivirus infections. *Microbiol. Immunol.* **38**:951-955.
65. **Martin, D. A., B. J. Biggerstaff, B. Allen, A. J. Johnson, R. S. Lanciotti, and J. T. Roehrig.** 2002. Use of immunoglobulin m cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. *Clin. Diagnos. Lab. Immunol.* **9**:544-549.
 66. **Miagostovich, M. P., R. M. Nogueira, F. B. dos Santos, H. G. Schatzmayr, E. S. Araujo, and V. Vorndam.** 1999. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J. Clin. Virol.* **14**:183-189.
 67. **Morita, K., M. Tanaka, and A. Igarashi.** 1991. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2107-2110.
 68. **Nawa, M., K. I. Yamada, T. Takasaki, T. Akatsuka, and I. Kurane.** 2000. Serotype-cross-reactive immunoglobulin M responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**:774-777.
 69. **Nimmannitya S.** 1987. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **18**:392-397.
 70. **Oliveira, D. P. S., L. D. Malta, M. Clotteau, N. R. R. J. Pires, and F. B. A. Lopes.** 2003. Improved detection of dengue-1 virus from IgM-positive serum samples using C6/36 cell cultures in association with RT-PCR. *Intervirolgy.* **46**:227-231.
 71. **Patarapotikul, J., S. Pothipunya, R. Wanotayan, A. Hongyantarachai, and S. Tharavanij.** 1993. Western blot analysis of antigens specifically recognized by natural immune responses of patients with Japanese encephalitis infections. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public Health.* **24**:269-276.
 72. **Reynes, J. M., S. Ong, C. Mey, C. Ngan, S. Hoyer, and A. A. Sall.** 2003. Improved molecular detection of dengue virus serotype 1 variants. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3864-3867.
 73. **Rice, C. M., E. M. Lenches, S. R. Eddy, S. J. Shin, R. L. Sheets, and J. H. Strauss.** 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus. Implications for flavivirus expression and evolution. *Science* **229**:726-733.
 74. **Rosen, L., and D. Gubler.** 1974. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**:1153-1160.
 75. **Rosen, L.** 1977. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**:337-343.
 76. **Russell, P. K, A. Nisalak, P. Sukhavachana, and S. Vivona.** 1967. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J. Immunol.* **99**:285-290.

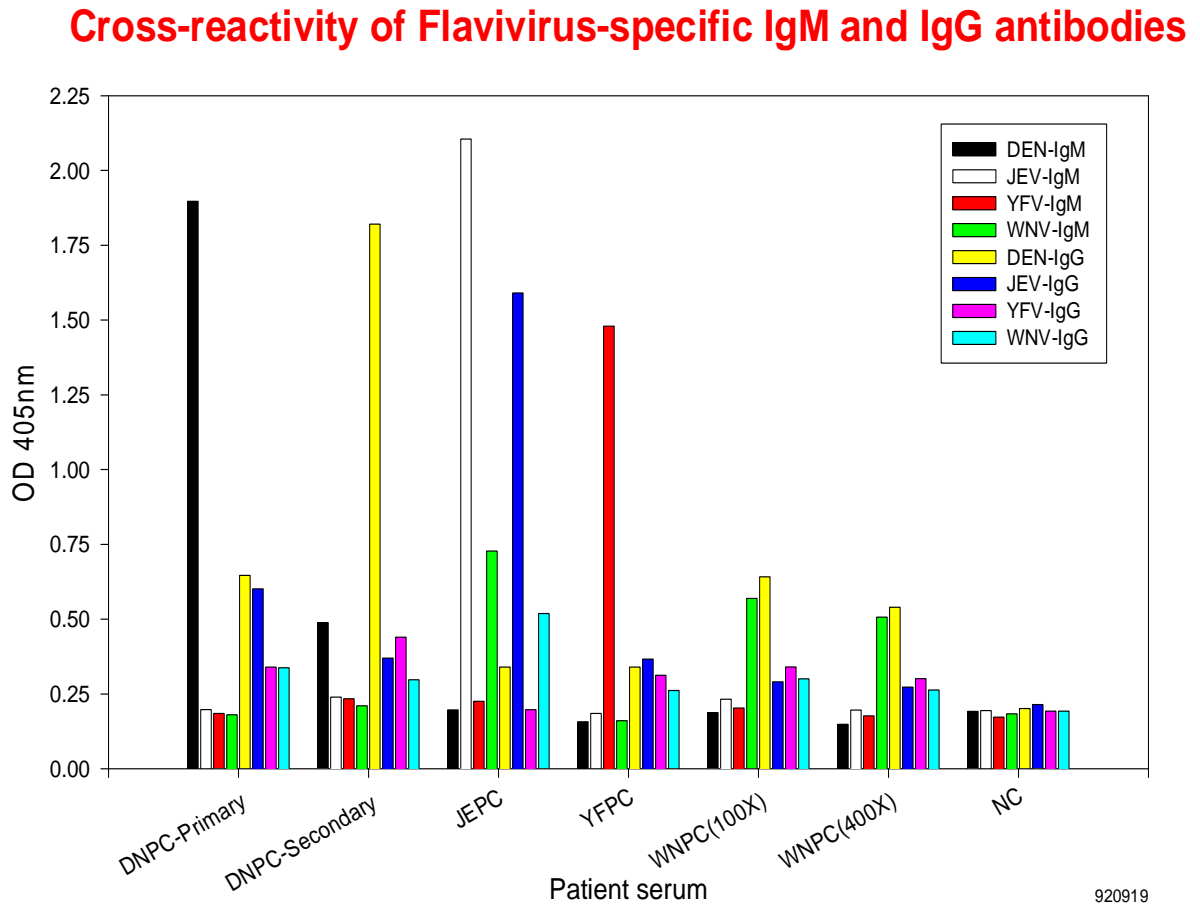
77. **Schmitz, H., and P. Emmerich.** 1984. Detection of specific immunoglobulin M antibody to different flaviviruses by use of enzyme-labeled antigens. *J. Clin. Microbiol.* **19**:664-667.
78. **Se-Thoe, S. Y., M. M. Ng, and A. E. Ling.** 1999. Retrospective study of Western blot profiles in immune sera of natural dengue virus infections. *J. Med. Virol.* **57**:322-330.
79. **Seah, C. L. L., V. T. K. Chow, H. C. Tan, and Y. C. Chan.** 1995. Rapid single-step RT-PCR typing of dengue viruses using NS3 gene primers. *J. Virol. Methods.* **51**:193-200.
80. **Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin, and J. H. Huang.** 2000. Dengue NS1-specific Antibody Responses: Isotype Distribution and Serotyping in Patients with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. *J. Med. Virol.* **62**: 224-232.
81. **Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin, and J. H. Huang.** 2001. Antibody to the nonstructural protein NS1 of Japanese encephalitis virus: potential application of mAb-based indirect ELISA to differentiate infection from vaccination. *Vaccine* **19**: 1753-1763.
82. **Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, H. H. Yang, T. H. Lin, and J. H. Huang.** 2002. Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue virus infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1840-1844.
83. **Shu, P. Y., S. F. Chang, Y. C. Kuo, Y. Y. Yueh, L. J. Chien, C. L. Sue, T. H. Lin, and J. H. Huang.** 2003. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR Green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2408-2416.
84. **Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin and J. H. Huang.** 2003. 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. Diagnos. Lab. Immunol.* **10**:622-630.
85. **Sudiro, T. M., H. Ishiko, S. Green, D. W. Vaughn, A. Nisalak, S. Kalayanarooj, A. L. Rothman, B. Raengsakulrach, J. Janus, I. Kurane, and F. A. Ennis.** 1997. Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'-noncoding region universal primers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56**:424-429.
86. **Talarmin, A., B. Labeau, J. Lelarge, and J. L. Sarthou.** 1998. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1189-1192.

87. **Valdes, K., M. Alvarez, M. Pupo, S. Vazquez, R. Rodriguez, and M. G. Guzman.** 2000. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**:856-857.
88. **Vathanophas, K, W. M. Hammon, R. W. Atchison, and G. E. Sather.** 1973. Attempted type specific diagnosis of dengue virus infection by the indirect fluorescent antibody method directed at differentiating IgM and IgG responses. *Proc Soc Exp Biol Med.* **142**:697-702.
89. **Vaughn, D. W.** 1998. Serological investigation of a febrile outbreak in Delhi, India, using a rapid immunochromatographic test. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2795-2796.
90. **Vaughn, D. W., A. Nisalak, S. Kalayanarooj, T. Solomon, N. M. Dung, A. Cuzzubbo, and P. L. Devine.** 1998. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. *J. Clin. Microbiol.* **36**:234-238.
91. **Vaughn, D. W., S. Green, S. Kalayanarooj, B. L. Innis, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, T. P. Endy, B. Raengsakulrach, A. L. Rothman, F. A. Ennis, and A. Nisalak.** 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect. Dis* **181**:2-9.
92. **Vorndam, V., and G. Kuno.** 1997. Laboratory diagnosis of dengue virus infections, p. 313-334. *In* D. J. Gubler and G. Kuno (ed), *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* CAB International, New York, N. Y.
93. **Wang, W. K., T. L. Sung, Y. C. Tsai, C. L. Kao, S. M. Chang, and C. C. King.** 2002. Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* **40**:4472-4478.
94. **Warrilow D, J. A. Northill, A. Pyke, and G. A. Smith.** 2002. Single rapid TaqMan fluorogenic probe based PCR assay that detects all four dengue serotypes. *J Med Virol.* **66**:524-528.
95. **Win, T.** 1982. Detection of dengue viruses by immunofluorescence of the intracerebral inoculation of mosquitoes. *Lancet* **i**:57-64.
96. **Wong, S. J., R. H. Boyle, V. L. Demarest, A. N. Woodmansee, L. D. Kramer, H. Li, M. Drebot, R. A. Koski, E. Fikrig, D. A. Martin, and P. Y. Shi.** 2003. Immunoassay targeting nonstructural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue and St. Louis encephalitis virus infections and from flavivirus vaccination. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4217-423.
97. **World Health Organization.** 1997. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control* (second edition). Geneva: World Health Organization.

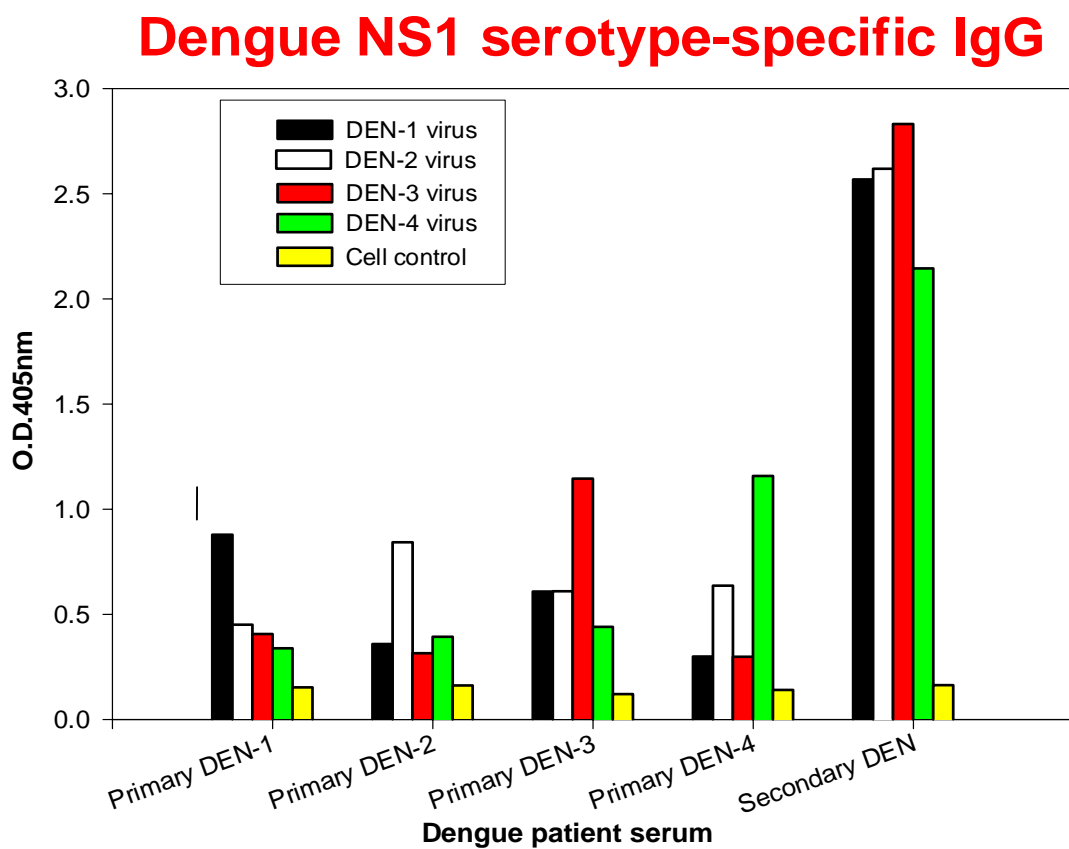
98. **World Health Organization.** 1999. Strengthening implementation of the global strategy for dengue fever and dengue haemorrhagic fever, prevention and control. Report of the informal consultation, 18-20 October. Geneva: World Health Organization.
99. **Wu, S. J., E. M. Lee, R. Putvatana, R. N. Shurtliff, K. R. Porter, W. Suharyono, D. M. Watts, C. C. King, G. S. Murphy, C. G. Hayes, and J. W. Romano.** 2001. Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol.* **39**:2794-2798.
100. **Young, P. R., P. A. Hilditch, C. Bletchly, and W. Halloran.** 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1053-1057.

三、圖

圖一、 Differentiation of various flavivirus infections by E/M-specific Capture IgM and IgG ELISA. The results of flavivirus-specific IgM and IgG antibodies to primary and secondary dengue virus infection, Japanese encephalitis virus infection, yellow fever virus infection, and West Nile virus infection were shown to demonstrate the limited cross-reactivity of IgM antibodies and significant cross-reactivity of IgG antibodies.



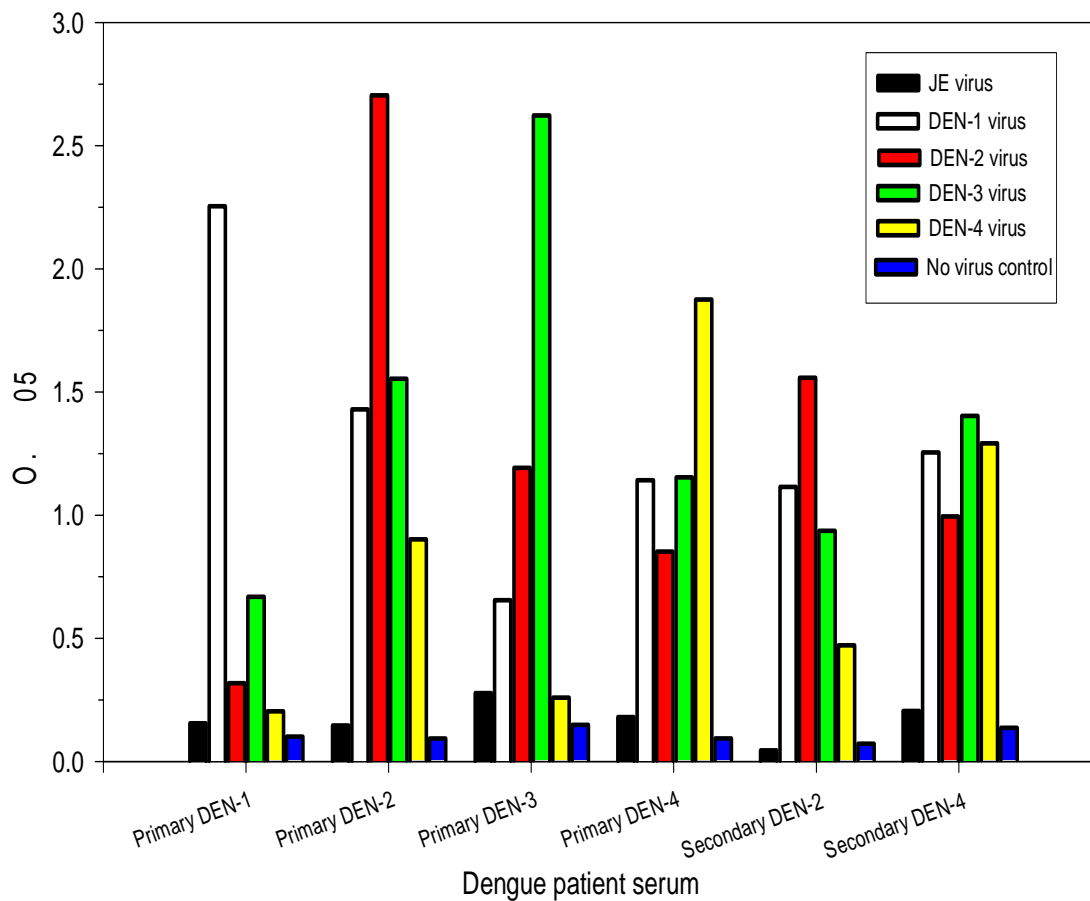
圖二、 Dengue serotyping based on NS1 serotype-specific IgG ELISA. The representative results of NS1 serotype-specific IgG ELISA to primary DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 and secondary dengue virus infection were shown to demonstrate the NS1 serotype-specific IgG response in primary dengue patient, but not secondary patients.



圖三、 Dengue serotyping based on E/M serotype-specific Capture IgM ELISA.

The representative results of E/M serotype-specific Capture IgM ELISA to primary DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 and secondary dengue virus infection were shown to demonstrate the E/M serotype-specific IgM response in most of the primary dengue patients and about 50% secondary dengue patients.

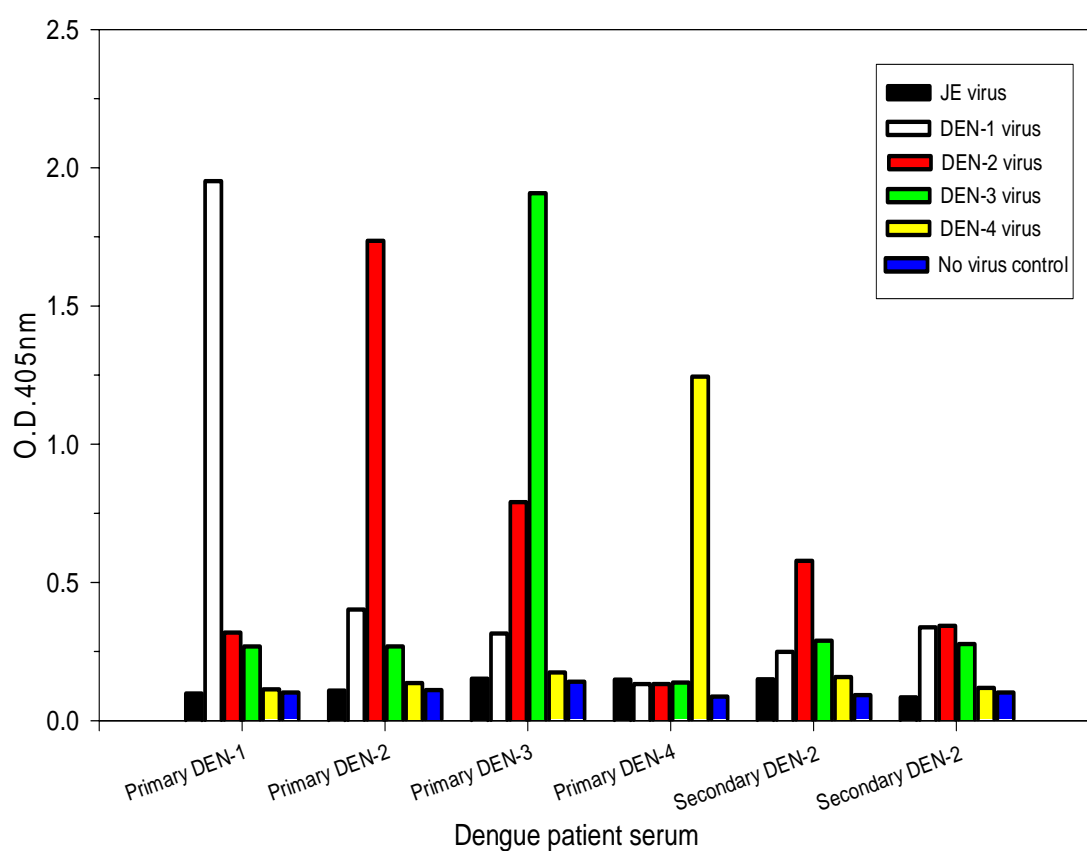
Dengue E/M Serotype-specific Capture IgM ELISA



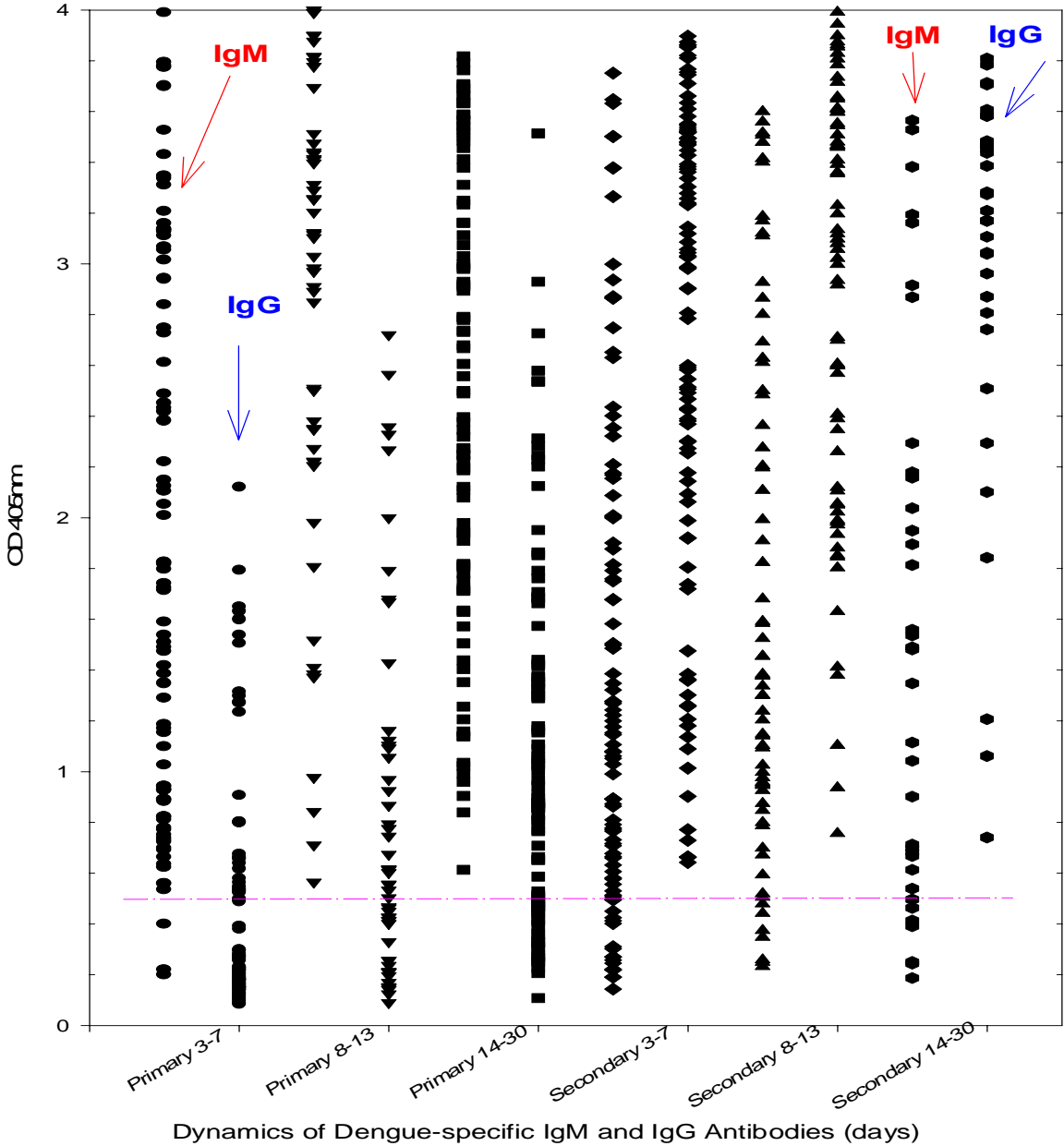
圖四、 Dengue serotyping based on NS1 serotype-specific Capture IgM ELISA.

The representative results of NS1 serotype-specific Capture IgM ELISA to primary DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 and secondary dengue virus infection were shown to demonstrate the NS1 serotype-specific IgM response in most of the primary dengue patients and about 50% secondary dengue patients.

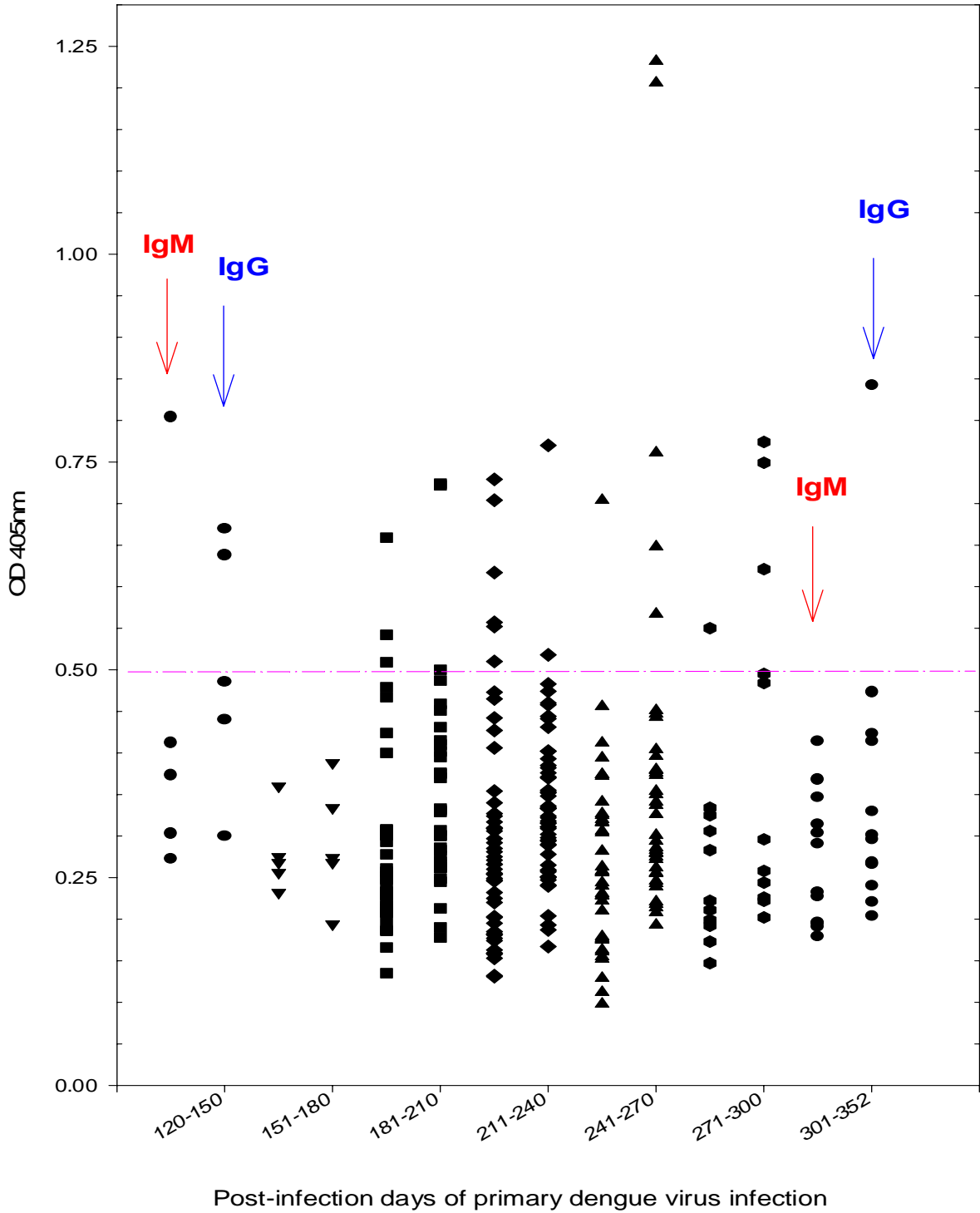
Serotype-specificity of Dengue Virus NS1 Capture IgM ELISA



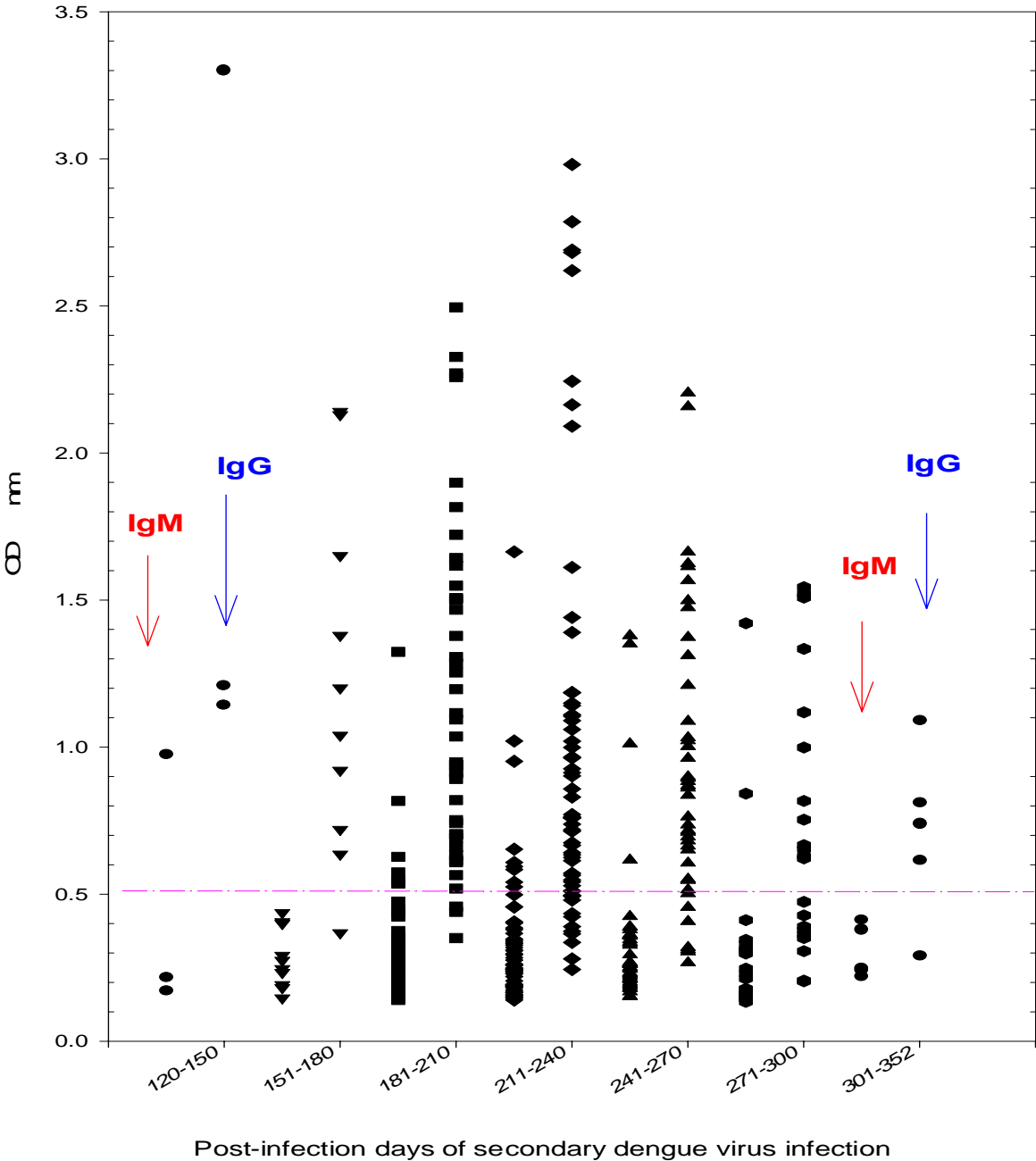
圖五、Dynamics of IgM and IgG antibody levels of acute- and convalescent-phase serum samples from dengue patients with primary or secondary infection. Serum samples collected at acute- (3-7 days after the illness), early convalescent- (8-13 days) and late convalescent-phases (14-30 day) were analyzed by E/M-specific capture IgM and IgG ELISA.



圖六、 Persistence of IgM and IgG antibody levels of post-infection sera from dengue patients with primary infection. Serum samples were collected between 120-352 days post infections and measured by E/M-specific capture IgM and IgG ELISA.



圖七、Persistence of IgM and IgG antibody levels of post-infection sera from dengue patients with secondary infection. Serum samples were collected between 120-352 days post infections and measured by E/M-specific capture IgM and IgG ELISA.



四、表

表一、 Statistical analysis of results of serum samples from confirmed dengue cases reported in 2002. Based on the combined analyses of Real-time one-step RT-PCR and E/M-specific capture IgM and IgG ELISA, 95% of acute phase sera from confirmed cases can be identified as positive or probable cases within 24-48 hours of receiving serum samples.

Day after onset	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Total serum No. tested (n=779)	95	95	130	128	97	80	45	58	27	24
% (RT-PCR+)	75	70	72	77	58	36	22	nd	nd	nd
%(ELISA IgM+ and/or IgG+)	32	33	30	39	53	88	80	93	100	100
%(RT-PCR+ or IgM+ and/or IgG+)	96	95	93	97	90	98	93	93	100	100

表二、 Evaluation of sensitivity of OnSight dengue rapid chromatographer strip in the detection of dengue virus infection. Acute and convalescent serum samples from primary and secondary dengue infection were analyzed to evaluate the sensitivity of OnSight rapid strip kit.

Onsight Dengue Duo IgM and IgG Rapid Strip Test

(Sensitivity Test)

	No. IgM+/ Total No. (%) Day 1-7 sera	No. IgM+/ Total No. (%) Day 8-30 sera	No. IgG+/ Total No. (%) Day 1-7 sera	No. IgG+/ Total No. (%) Day 8-30 sera
Primary dengue	13/19 (68%)	13/15 (87%)	12/19 (63%)	13/15 (87%)
Secondary dengue	14/18 (78%)	14/18 (78%)	18/18 (100%)	18/18 (100%)

表三、 Evaluation of specificity of OnSight dengue rapid chromatographer strip in the detection of dengue virus infection. Serum samples from various fevered patients and JE vaccine children were analyzed to evaluate the specificity of OnSight rapid strip kit.

Onsight Dengue Duo IgM and IgG Rapid Strip Test

(Specificity Test)

	No. IgM Negative/Total	No. IgG Negative/Total	No. IgM or IgG Negative/ Total
UFO	43/43	42/43	43/43
JE patients	9/10	7/10	10/10
JE vaccine children	10/10	10/10	10/10
Scrub Typhus	10/10	10/10	10/10
Typhoid Fever	10/10	10/10	10/10
Q Fever	10/10	10/10	10/10
Total (Specificity)	92/93 (99%)	89/93 (96%)	93/93 (100%)