

計畫編號：DOH92-DC-2006

行政院衛生署九十二年度自行研究計畫

病媒性傳染病分子診斷系統建立

研究報告

執行機構：疾病管制局

研究主持人：舒佩芸

研究人員：黃智雄、張淑芬、廖采苓、郭郁中、簡麗蓉、蘇千玲、
張云憶、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	1
目錄	2
中文摘要	3-4
英文摘要	5-6
前言	7-12
材料與方法	13-16
結果	17-21
討論	22-23
結論與建議	24
參考文獻	25-32
圖	33-39
表	40-51

中文摘要

黃熱病、登革熱、日本腦炎及漢他出血熱是台灣地區重要的法定傳染病，前三者分別屬於黃病毒屬的黃熱病、登革熱及日本腦炎亞群。開發快速的分子診斷系統，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。漢他出血熱雖然在台灣未曾流行，但由於鼠種的類別及分佈，有可能因感染漢他病毒而造成流行，故監測台灣地區的漢他病毒種類及分佈也是非常重要的。本計劃的目的在建立一套完整的病媒性傳染病分子生物學診斷系統，能快速的診斷已知存在及再浮現的病媒性傳染病，改善現有監測系統的不足。利用最近開發的螢光定量聚合酵素鏈反應方法，配合自動化儀器，以快速的診斷病媒性傳染病的侵入。在登革病毒(Dengue virus)方面，我們利用 SYBR Green I 螢光染劑之特性與病毒核心蛋白之核酸序列設計出之引子可偵測病人血清中的四型登革病毒。其中黃病毒及登革病毒共通引子可同時偵測到四型登革熱病毒，可用來篩檢出登革熱病人陽性血清。篩檢出之陽性檢體再以型別專一性引子區分第一~四型登革病毒。由結果顯示，我們的方法所得到的靈敏度在每毫升血清中可偵測到 1~50 病毒溶斑(plaque forming units)。比較不同方法之陽性率結果顯示，螢光定量 PCR 方法較之傳統 PCR 方法及病毒分離方法的靈敏度為高。此外利用黃熱病毒(Yellow fever virus)核心蛋白之核酸序列所設計出之引子

(YF-F, YF-R)，可偵測到黃熱病毒。以西尼羅病毒(West Nile virus)核心蛋白核酸序列所設計出之引子(WN-F, WN-R)，可偵測到西尼羅病毒。在漢他病毒的研究方面，利用 SYBR Green I 為基礎的方法，也已開發出對漢他病毒具專一性的引子，可用於疾管局之例行性檢驗。利用 TaqMan 螢光探針方法，目前也已開發出對登革四型病毒之引子及探針，並與美國疾管局合作共同開發出登革四型病毒、黃熱病毒、西尼羅病毒等引子及探針。利用螢光定量 RT-PCR 方法，可降低傳統 Nested RT-PCR 方法的檢體污染率，而且可以大幅縮短檢驗時程。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 24-48 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。

中文關鍵詞

螢光定量 PCR 方法，黃病毒、登革病毒

ABSTRACT

As a national laboratory responsible for routine diagnosis of reported cases of dengue fever (DF), Japanese encephalitis (JE), Yellow fever (YF), and hantavirus diseases, we have set up a diagnostic laboratory with the capability to perform routine tests including cell culture and virus isolation, molecular diagnosis, serological diagnosis, and molecular epidemiology. For rapid detection and differentiation of dengue and JE viruses, a diagnostic system was developed and applied to daily routine. For acute-phase sera, virus isolation by cell culture and real-time one-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed. For all of the sera reported, serological diagnosis of specific antibodies based on envelope and membrane (E/M)-specific capture IgM and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were tested. In this report, a quantitative one-step SYBR Green I reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) system was developed for the detection and differentiation of four different dengue virus serotypes in acute-phase serum samples. A set of group- and serotype-specific primer pairs was designed against conserved sequences in the core region and evaluated for clinical diagnosis. A linear relationship was obtained between the amount of input RNA and cycle threshold (Ct) value over a range of 10 to 10⁷ plaque forming units (PFU) per milliliter of cell culture-derived dengue viruses. The detection limit of group-specific primer pair was between 4.1-43.5 PFU/ml for four dengue serotypes. The detection limit of each of the serotype-specific primer pairs was calculated to be 10 PFU/ml for DEN-1, 4.6 PFU /ml for DEN-2, 4.1 PFU/ml for DEN-3, and 5 PFU/ml for DEN-4. Comparison between one-step SYBR Green RT-PCR and conventional cell culture method in the clinical diagnosis of dengue virus infection from acute phase serum samples of confirmed dengue patients were performed. The results showed that 83% vs. 67% out of 193 acute phase serum samples tested were positive for one-step SYBR Green RT-PCR and cell culture method,

respectively. Further analysis showed that one-step SYBR Green RT-PCR could detect twice much more acute phase serum samples with positive dengue-specific IgM and/or IgG antibodies than cell culture method. Our results demonstrate the potential clinical application of one-step SYBR Green I RT-PCR for the detection and differentiation of dengue virus RNA. 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.

Key words: dengue, SYBR Green I, Real-Time RT-PCR

前言

由於國際間往來日益頻繁及全球溫室效應的影響，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）所媒介的節肢動物病毒（Arbovirus）傳染病最為重要。為因應未來新興或再浮現傳染病之侵入，我們應儘速建立一套完整的病媒性傳染病防疫體系，包括檢驗設備之硬體設施、病媒監測系統網、快速的檢驗技術與有效的防治策略等，否則將無法應付未來傳染病侵入所造成的危機。目前以實驗室為基礎的快速診斷方法，主要有二種，一種為利用 ELISA 方法的血清學診斷技術，另一種則是利用 PCR 技術為基礎的分子診斷方法。本計畫將建立近年來新開發的螢光定量 PCR 方法，利用自動化儀器，建立一套完整的病媒性傳染病分子診斷系統，以快速的診斷地方性、及新興與再浮現病媒性傳染病的侵入。由於節肢動物病毒，特別是黃病毒，是台灣地區最重要的病媒性傳染病，我們的目標將分短期、中期、與長期三個階段進行；短期目標為建立一個具有國際水準的黃病毒研究中心；中期的目標則延伸至節肢動物病毒，擴大成為節肢動物病毒研究中心；長期的目標則是完成所有可能侵入的病媒性傳染病監測與診斷系統。

登革熱及日本腦炎是台灣地區兩種重要的法定傳染病，分別屬於登革

及日本腦炎病毒亞群，其中日本腦炎是地方性疾病，而登革熱也有本土化的趨勢。日本腦炎亞群中各病毒在全球不同地區分別引起 Japanese encephalitis (JE), Murray Valley encephalitis (MVE), West Nile encephalitis (WN), Saint Louis encephalitis (SLE), Kunjin (KUN), Usutu (USU), Kokobera (KOK), Stratford (STR), Alfuy (ALF)等疾病。黃病毒家族(Flavivirus family)為小的、具外套膜的、單股正向(single stranded, positive-sense) RNA 病毒。在對人類的致病源中，以黃熱(yellow fever, YF)病毒、登革(dengue)病毒、日本腦炎(Japanese encephalitis, JE)病毒、C 型肝炎病毒(hepatitis C virus)及 tick-borne encephalitis (TBE)病毒流行最為廣泛(Shope 1980 ; Monath, 1986)。登革病毒的流行區域包括了亞洲、美洲、非洲、大洋洲等熱帶、亞熱帶地區(Gubler, 1997)。隨著病媒蚊的擴散，病毒的種類、病情的嚴重程度、病例的數目和流行地區的分佈都大幅上升，例如 1981-1990 十年間的病例是 1956-1980 二十五年間的兩倍。雖然大部份的登革病毒感染引發的臨床症狀(Burke et al, 1988)為不明顯感染(inapparent infection)，症狀輕微者類似感冒的發燒(mild flu-like undifferentiated fever)或典型登革熱(dengue fever, DF)，但有少數的登革病毒感染會導致嚴重致死的登革出血熱(dengue haemorrhagic fever, DHF)症狀(Nimmannitya et al, 1969, 1987; WHO, 1997)。登革出血熱在 1950 年代間只見於東南亞的菲律賓及泰國等地，但從 1980 到 1990 的十年間，卻在加勒比海周圍國家蔓延流行。1980 年代末

期整個亞洲—太平洋地區也都受到波及，在中國大陸的廣東、海南島及印尼、斯里蘭卡等地紛傳疫情。根據世界衛生組織統計，全世界有超過二十億的人暴露在登革病毒的威脅之下，每年有一千萬以上的新病例發生，登革熱/登革出血熱已成為全世界最重要的蚊媒傳染病。在東南亞許多地方，包括台灣，是登革病毒與日本腦炎病毒重疊流行的地區。臺灣地區在日據時代曾有多次登革熱流行的記錄(Gubler, 1997)，但自民國 31 年的全島性大流行之後，直到民國 70 年才在屏東縣的小琉球再度爆發由第二型登革病毒造成的流行，估計全島近 80%的居民受到感染(謝維詮等，1981；吳盈昌，1986)。民國 76 年高雄屏東地區再度爆發了以第一型登革病毒為主的流行(報告病例 1,123 名，確定病例 527 名)，次年疫情繼續擴大，官方的統計共有 4,389 名確定病例，但實際感染人數估計可能超過五萬人。民國 78 年至 82 年只有少數的病例或小規模的流行。但近年來，由於台灣社會環境的變遷，流行情況開始有所轉變。民國 84 年登革熱的威脅甚至越過北迴歸線，進入無埃及斑蚊但有白線斑蚊分佈的區域，台灣本島的北、中、南地區，分別發生四型登革病毒之流行，該年共計有 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)。而民國 90 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，去年度更逐漸擴大其流行範圍，造成高雄市、高雄縣、與屏東縣為主的南部地區大流行，確定病例數超過 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。目前的流行現況，顯示登革熱防治的急迫性，已成為臺灣公共衛生上的重要防疫問題。

目前黃病毒實驗室診斷，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，再以病毒特异性 (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)。而最近兩年快速發展的 real-time quantitative RT-PCR 方法，其靈敏度與傳統的 nested RT-PCR 相似，但可降低檢體污染率，檢驗時間可縮短為縮短為 6 小時，未來勢必取代傳統 RT-PCR 方法成為新的 Gold standard，有效提升診斷時效。

此外，漢他出血熱是台灣地區法定的傳染病，雖然從民國 83 年至今的確定病例數不到 10 例，但因臨近各國如中國大陸、韓國、日本等皆是漢他出血熱流行的地區，所以預防漢他出血熱的流行是非常重要的。漢他病毒感染人類主要引起兩種急性症候，一為漢他出血熱及腎症候，主要流行在亞洲及歐洲，由漢灘病毒 (Hantaan virus)、漢城病毒 (Seoul virus)、Dorbrava、Puumala

等病毒感染所引起。另一為漢他肺症候，主要流行在美洲，由 Sin Nombre、New York、Black Creek Canal、Andes virus 等病毒感染所引起。漢他病毒屬於 Bunyaviridae 科的一員，病毒顆粒由外套膜、核心蛋白及三段單股負向的 RNA 基因物質所組成。嚙齒類動物是病毒最主要的宿主，感染的動物通常沒有疾病的症狀，為慢性感染且終生帶有病毒。人類因吸入帶有病毒的老鼠排泄物或分泌物如尿液、糞便、唾液等而被感染，故而監測鼠類的種類、分佈、數目及帶病毒率是防範漢他出血熱流行的重要方法之一。目前台灣鼠類僅發現帶有漢城病毒，一般人感染後所引起的症狀較為輕微，而鄰近的中國大陸則同時有可引起嚴重出血熱的漢灘病毒及漢城病毒的流行，故發展漢他病毒感染的快速的診斷方法，有助於疾病的治療及疫情的防範。

由於 1995 年美國 Perkin Elmer 公司成功研發出具有革命性的螢光定量 PCR 技術，其融合了 PCR 高靈敏度、DNA 雜交的高特異性和光譜技術的高精確定量的優點，直接偵測 PCR 過程中螢光信號的變化以獲得定量的結果。此螢光定量 PCR 方法不需要 PCR 後處理或電泳檢測，成功地克服了常規 PCR 技術的許多難題，為 PCR 全面進入臨床應用打開了成功之門。應用此技術檢測沙門氏菌的診斷試劑已得到美國 FDA 的批准。此外，世界各國(包括中國大陸)都在積極開發相關技術與產品，一般相信，由於螢光定量 PCR 技術具有快速、高靈敏度、高特異性與高精確定量等優點，未來將廣泛應用於傳染病的檢驗，取代現有的常規 PCR 技術。本計畫的主要工

作項目在利用 Stratagene 公司之 Mx 4000 定量 PCR 序列偵測儀及螢光定量 PCR 方法，開發病媒性傳染病臨床診斷的檢驗試劑。若配合傳統病毒學的分離及鑑定病毒、PCR 及核酸定序、血清學 ELISA 方法檢驗病毒之特異性抗原及抗體，則可建立一套完整的病媒性傳染病監測與診斷系統，有效地診斷新興及再浮現傳染病的侵入。

材料與方法

- (1) **黃病毒培養**: 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°C 中。病毒的種類包括有登革病毒之四型參考病毒株(D1 Hawaii, D2 NGC, D3 H87, D4 H241)及衛生署疾病管制局病媒病毒實驗室自登革熱病人血清中分離出之病毒株(D1 157001, D1 8500600, D1 8500796, D2 454009, D2 454021, D2 466177, D3 8700829, D3 466322, D3 333137, D4 8700544, D4 8900508, D4 768346)。西尼羅病毒(West Nile virus, strain B 956, ATCC)及黃熱病毒(Yellow fever virus, strain 17D, ATCC)。
- (2) **病人血清檢體收集**: 病人血清包括急性期(症狀出現後 0-7 天)、恢復期(症狀出現後 8-30 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。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。
- (3) **引子的設計與合成**: 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。螢光探針則可與引子擴增出的 DNA 序列進行雜交作用，釋出螢光。引子與螢光探針的選擇可依據 Primer Express software (PE Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)。螢光探針含有 5'端-reporter dye (6-FAM, Cy5, Texas Red-X, Hex 等)及 3'端-quencher dye (TAMRA 或 BHQ

等)。理論上螢光定量 PCR 的靈敏度可以到達 1~10 copies/Rx，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。偵測黃病毒之引子列於表一及表二。

(4) **漢他病毒質體(plasmid)之構築**：因本局未實施漢他病毒之分離及培養，為取得病毒基因序列以提供發展漢他病毒螢光定量 PCR 特殊引子測試之用，故構築質體 phaS (含 Seoul strain, S segment 43-1332), phaM1 (含 Seoul strain, M segment 47-1858), 及 phaM2 (含 Seoul strain, M segment 1835-3448)。構築質體之病毒基因來自花蓮捕獲之溝鼠 (*Rattus norvegicus*) RT-PCR 陽性肺臟組織檢體，所使用之載體(Vector)為 pIVEX2.3d (購自 Roche Diagnostics)。所使用之引子列於表三，引子組與陽性檢體純化出之 RNA 混合經 RT-PCR 作用後，可獲得漢他病毒 cDNA 片段，再經限制酶的作用及嵌入載體，可得到含有漢他病毒基因序列之質體。此質體可以在大腸桿菌中大量複製，並可作為體外轉錄(in vitro transcription)病毒 RNA 的模版，轉錄作用所得到的病毒 RNA 可提供測試漢他病毒螢光定量 RT-PCR 之用。偵測漢他病毒所使用之引子及探針列於表四。

(5) **抽取病毒核糖核酸 (RNA extraction)**：以 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)，純化血清或細胞培養之病毒 RNA。詳細操作步驟見 Kit 之操作說明書。主要原理為利用裝有矽土-膠膜的離心圓柱，可以選擇性的與核糖

核酸結合，再經過數次清洗步驟，進而達到純化的目的。其步驟如下：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。

- (6) **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 One-step 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°C RT 作用 30 分鐘，PCR 作用 95°C 15 分鐘，45 次循環之 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 20 秒、77°C 30 秒（讀取螢光值）。
- (7) **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°C, 1 分鐘、68°C, 30 秒，再進行 45 次循環，每次循環比前次溫度+0.5°C/30 秒/循環。
- (8) **TaqMan 即時螢光定量聚合酶鍊鎖反應 (Real-time quantitative PCR Reaction)**：使用 QuantiTect Probe RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μ l 的 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix，RNase-free

Water，核酸引子，TaqMan 探針，最後加入 10 μ l 檢體 DNA，反應最終體積為 50 μ l。再進行 TaqMan RT-PCR 反應：50°C RT 作用 30 分鐘，PCR 作用 95°C 15 分鐘，45 次循環之 94°C, 15 秒、60°C, 60 秒（讀取螢光值）。

結果

- (1) 利用 SYBR Green 螢光定量 RT-PCR 方法偵測各種黃病毒：目前本局登革熱例行檢驗所使用之方法為本計畫所開發之 SYBR Green one-step 螢光定量 RT-PCR 方法(Shu et al.)。首先將疑似登革熱病人的急性期血清以黃病毒共通引子(FL-F, FL-R)及登革病毒共通引子(DN-F, DN-R)篩選，所得的陽性檢體再以具有登革病毒型別專一性之引子區分病毒型別。所使用之引子核酸序列如表一所示。引子 DN-F(120 nM)及 DN-R (120 nM)可同時偵測四型登革病毒，除了可偵測四型參考病毒株(D1 Hawaii, D2 NGC, D3 H87, D4 H241)外，由疾病管制局所分離出之其餘 12 種病毒株（包括四型登革熱病毒）均可偵測出。表五中的 Ct 值是加入約 500~5000 pfu 的病毒量所得的結果。引子 DN-F(100 nM)及 D1-R (100 nM)，可偵測到不同 strain 的第一型登革病毒，對其餘三型登革病毒及其他黃病毒 (Yellow fever virus, Japanese encephalitis virus and West Nile virus)則無反應。引子 DN-F(300 nM)及 D2-R (150 nM)可偵測第二型登革病毒，引子 DN-F(100 nM)及 D3-R (100 nM)對第三型登革病毒有專一性，引子 DN-F(150 nM)及 D4-R (150 nM)則僅對第四型登革病毒有專一性，對其他登革病毒或黃病毒則皆無反應。以引子 DN-F 及 DN-R 偵測第一~四型登革病毒，所得之螢光定量 one-step RT-PCR 標準曲線圖如圖一，靈敏度可達 4.1~43.5 pfu/ml。以引子 DN-F 與 D1-R、D2-R、D3-R 或 D4-R，

分別偵測第一~四型登革病毒，所得之螢光定量 one-step RT-PCR 標準曲線圖如圖二所示，靈敏度可達 4.1~10 pfu/ml。圖三為利用登革病毒共通引子及型別專一性引子經 SYBR Green 螢光定量 RT-PCR 反應之產物以瓊膠電泳所得的結果，顯示 PCR 產物的大小，且並無明顯的 primer dimer 產物出現影響 SYBR Green I 方法的判讀結果。利用引子 WN-F (150 nM) 及 WN-R (150 nM) 可偵測到西尼羅病毒，結果如表五，僅對西尼羅病毒具有專一性，與其他病毒皆無反應。引子 YF-F (300 nM) 及 YF-R (300 nM) 則對黃熱病毒具有專一性。靈敏度在 1~10 PFU/ml (圖四)。

- (2) 以 SYBR Green one-step 螢光定量 RT-PCR 方法偵測登革熱病人血清檢體並與傳統 Nested RT-PCR 方法作比較：表六為 2001 年高雄市登革熱(第二型)病人血清檢體，用 Nested RT-PCR 及螢光定量 RT-PCR(DN-F/DN-R 引子)所得之結果。由結果顯示，所有 24 個登革熱病人用螢光定量 RT-PCR 方法所得的結果均為陽性，所偵測的初始病毒濃度範圍在 $1.21 \sim 5.08 \times 10^5$ 之間。其中有兩個檢體(#11 及 #16) 以 Nested RT-PCR 方法無法偵測到病毒核酸 PCR 產物，而用螢光定量 RT-PCR 方法則可測到 Ct 值分別為 34 及 29，由此可見螢光定量 RT-PCR 方法較之傳統 Nested RT-PCR 方法更為靈敏。
- (3) 比較病毒分離與 SYBR Green 螢光定量 RT-PCR 方法之結果：表七分析 87 年至 91 年收集之 193 支登革熱確定病例急性期血清檢體。所有的檢

體均為病毒分離陽性或恢復期血清登革熱抗體陽性。比較病毒分離與螢光定量 RT-PCR 方法之結果，其中 129 個檢體(67%)為病毒分離陽性，160 個檢體(83%)為螢光定量 RT-PCR 陽性。不同型別之病毒分離率分別為 DEN-1，63%；DEN-2，67%；DEN-3，77%；DEN-4，60%。不同型別病毒的螢光定量 RT-PCR 之陽性率分別為 DEN-1，75%；DEN-2，82%；DEN-3，92%；DEN-4，100%。結果顯示螢光定量 RT-PCR 方法所得之陽性率較病毒分離為高。

- (4) 比較登革熱病人急性期血清登革熱抗體、病毒分離與螢光定量 RT-PCR 方法之結果：為進一步測試螢光定量 RT-PCR 方法之靈敏度，表七中之 193 支檢體重新以登革熱抗體之出現與否作為分類，再比較病毒分離與螢光定量 RT-PCR 方法之靈敏度，所得之結果如表八：當急性期血清之 IgM 及/或 IgG 為陽性時，螢光定量 RT-PCR 之陽性率遠比病毒分離之陽性率為高，顯示螢光定量 RT-PCR 方法之靈敏度較病毒分離方法為高。
- (5) 偵測登革熱病人血清中病毒的含量：圖五所示為利用登革病毒共通引子，以 SYBR Green RT-PCR 方法偵測四型登革熱病人血清檢體之病毒含量，結果顯示登革病毒含量在 $10\sim 10^7$ PFU/ml 之間。
- (6) 91 年度登革熱陽性血清實驗室診斷方法之分析：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，結果列於表九。共分析 779 支陽性血清，RT-PCR

陽性率隨發病日增加而遞減，由發病第一日的 76%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%。顯示約有 95%的登革熱病人以實驗室診斷方法，可在急性期血清中鑑別出，對於疾病的診斷及疫情的防治有極大的幫助。利用 SYBR Green 螢光定量 RT-PCR 方法，從今年 7 月 1 日開始進行之機場發燒篩檢，至 12 月 15 日止已有 14 個境外移入病例被篩檢出（表十）。

(7) 以 TaqMan 螢光定量 RT-PCR 方法偵測黃病毒：由於 TaqMan 方法除了利用引子擴增病毒基因序列外，主要利用螢光探針偵測病毒基因序列而釋放出螢光，經由儀器讀取螢光值及計算後，可定出病毒基因的含量。由於多了螢光探針，所以 TaqMan 方法的專一性比 SYBR Green 方法更高。表二列出黃病毒 TaqMan 螢光定量 RT-PCR 方法所使用的引子及探針。表十一利用 20 種病毒測試兩組引子及探針之專一性，其中 MFU1/CFU2/FLRP 可偵測出所有的黃病毒，圖六顯示這組引子及探針對登革四型病毒所得的標準定量曲線，其靈敏度在 0.1~2 pfu/ml 之間。表十二比較 SYBR Green 與 TaqMan 方法對登革病人血清的測試結果，兩種方法的靈敏度相似，均可作為疑似檢體篩檢之用。

(8) 偵測漢他病毒：表四為漢他病毒 SYBR Green 螢光定量 RT-PCR 方法所使用的引子。若所得結果為陽性，再以核酸定序方法分析。圖七顯示以

HTN-S4/HTN-S6 對漢城病毒(Seoul virus)所得的標準定量曲線，其靈敏度
<10 **copies**/reaction。

討論

目前黃病毒實驗室診斷，主要是以傳統之病毒分離、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 RT-PCR 檢驗，因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，用來取代目前大部分實驗室所使用的 Nested RT-PCR 方法以檢測黃病毒特異性核酸序列。本計畫利用螢光定量 RT-PCR 方法，結合特殊的引子以偵測及定量黃病毒屬之病毒。在登革熱病毒方面，引子 DN-F/DN-R 可同時偵測四型登革熱病毒，且靈敏度可達 1 pfu/ml，因此可作為篩檢登革熱病人陽性檢體之用。此外，亦設計出對型別具有專一性之特殊引子，可區分四型登革熱病毒。本研究亦發現此螢光定量 RT-PCR 方法較本研究室日常檢驗所使用之傳統 Nested RT-PCR 的靈敏度為高，推測其靈敏度約高 10 倍以上。

所謂螢光定量 PCR 方法即是能夠在 PCR 的每個循環(Cycle)中，都能同步偵測 (Real-Time Detection)到 PCR 產物的增生，因此可以獲得反應到達飽和前的資料，並利用此功能來定量樣品中 DNA 或 RNA 的原始模版量。如果是用 Mx 4000 儀器進行檢測，反應結束後，可透過電腦分析，直接計算出定量結果。自 PCR 反應開始後，全部的過程不需再打開管蓋，既簡化了操作步驟，又可避免後處理過程的污染導致的偽陽性。本研究利用單步驟 RT-PCR 方法，比之雙步驟先進行反轉錄作用，再進行 PCR 的方法更為省時，而且污染率也更低。在加入檢體 RNA、引子及

RT-PCR 反應試劑後，在 Mx 4000 核酸序列偵測儀中(Stratagene)作用 3~4 小時後即可獲得檢驗結果。較之傳統 Nested RT-PCR 方法則需經 RT-PCR，再進行 Nested PCR 及電泳，不但費時且容易造成污染。

SYBR Green I 是一螢光染劑，可與雙股 DNA 結合發出螢光，較一般用的 DNA 染劑 Ethidium Bromide 的靈敏度為高。SYBR Green I 與雙股 DNA 結合時比與單股 DNA 或單獨存在時所發出之螢光強度高約 1000 倍，所以利用此特性而應用於即時定量 PCR (Real-time quantitative PCR)反應。這種方法的優點是僅需正、反兩股引子即可偵測檢體的病毒核酸含量，但其缺點由於 SYBR Green I 可與任何雙股 DNA 結合，所以 PCR 產物中若含有非標地(Non-target)之雙股 DNA 時（如 primer-dimer），非特異性之螢光產物亦會增加，所以在設計引子時，須盡量避免 primer-dimer 的產生。但即使有非標地之雙股 DNA 產生時，仍可用熔解度曲線分析(Melting curve analysis)區分標地及非標地 PCR 產物。由我們的結果也發現，引子的濃度對反應的靈敏度及專一性有很大的影響，通常增加引子的濃度可增加靈敏度，但引子的專一性會降低，反之亦然。故決定適當的引子濃度是反應成功的條件之一。

本研究設計出四型登革熱、西尼羅、黃熱病毒及漢他病毒引子。以 SYBR Green I 螢光定量 PCR 方法及 TaqMan 方法，不但靈敏度優於傳統 Nested RT-PCR 方法，而且步驟簡單、易操作，是非常適合病媒性病毒的分子診斷方法。

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，建立一套完整的病媒性傳染病診斷系統（病毒學、血清學及分子診斷），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病媒性傳染病是十分重要的。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 24-48 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。病媒性傳染病快速鑑別診斷系統之建立，除了對病患的治療，對防治的工作也極為重要。

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.

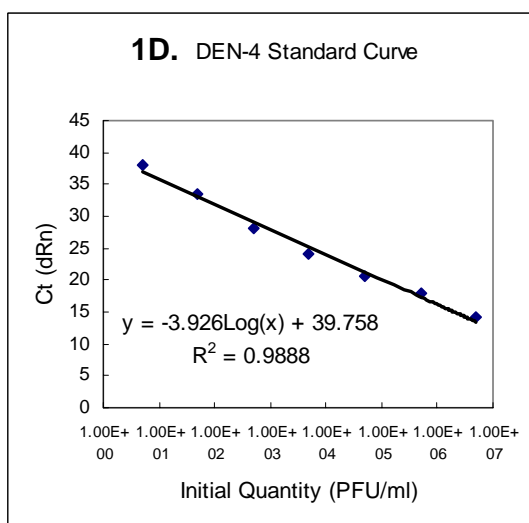
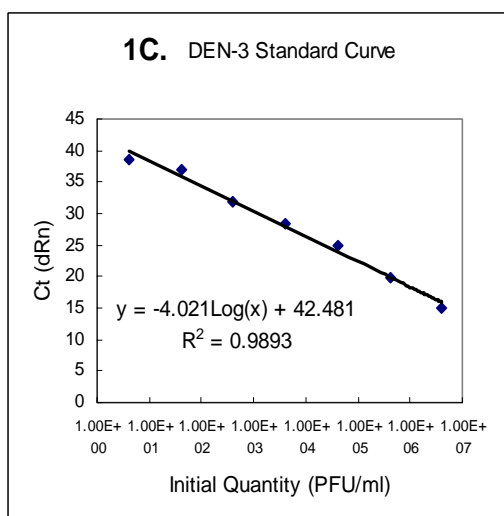
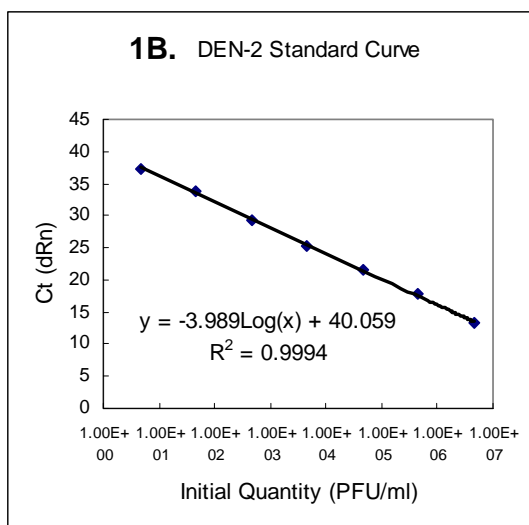
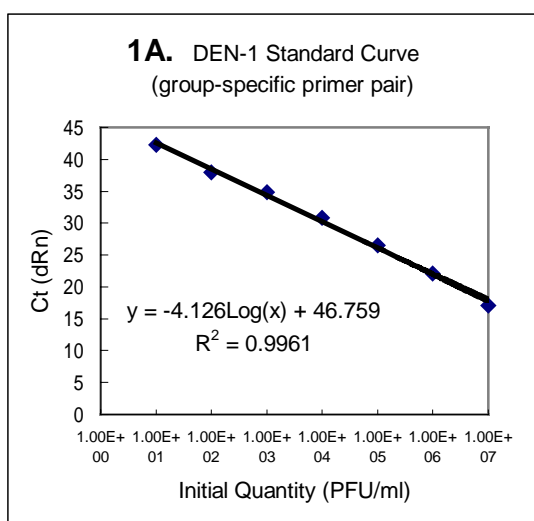
56. **Lam, S. K., and P. L. Devine.** 1998. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. *Clin. Diagn. Virol.* **10**:75-81.
57. **Lanciotti, R. S., C. H. Calisher, D. J. Gubler, G. J. Chang, and A. 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. Microbiol.* **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. Diagn. 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. *Intervirology*. **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.

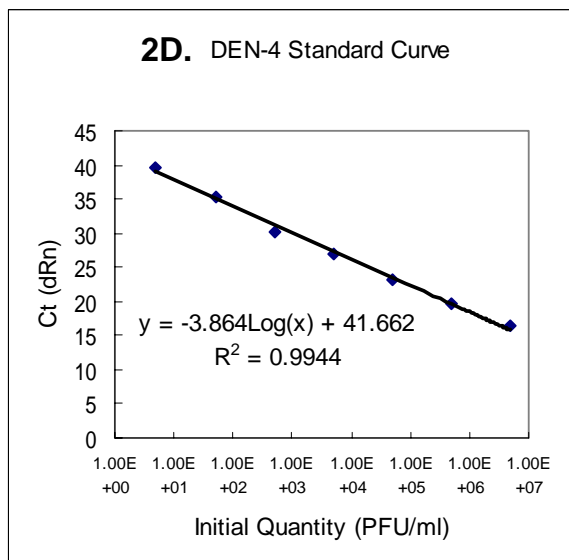
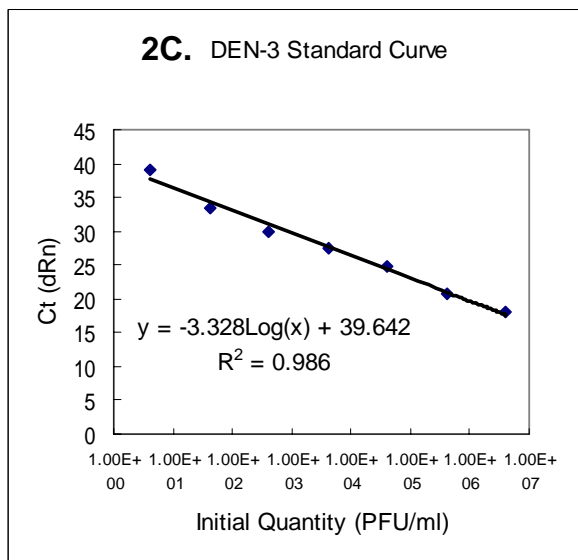
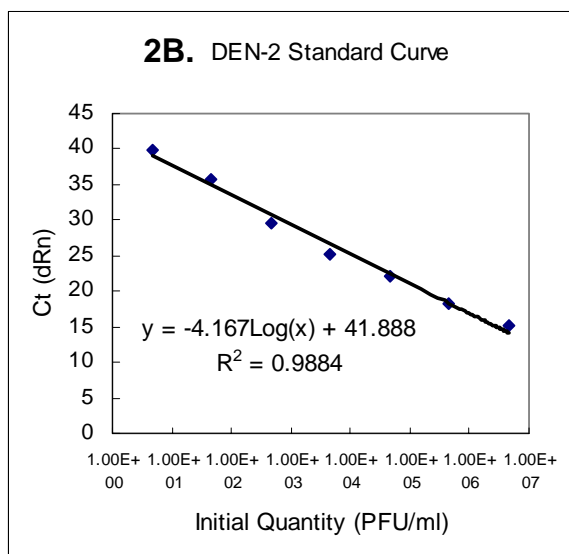
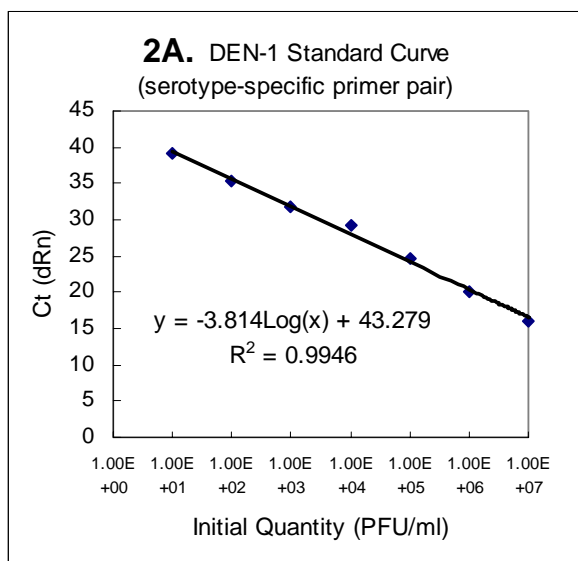
84. **Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin and J. H. Huang.** 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary 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.

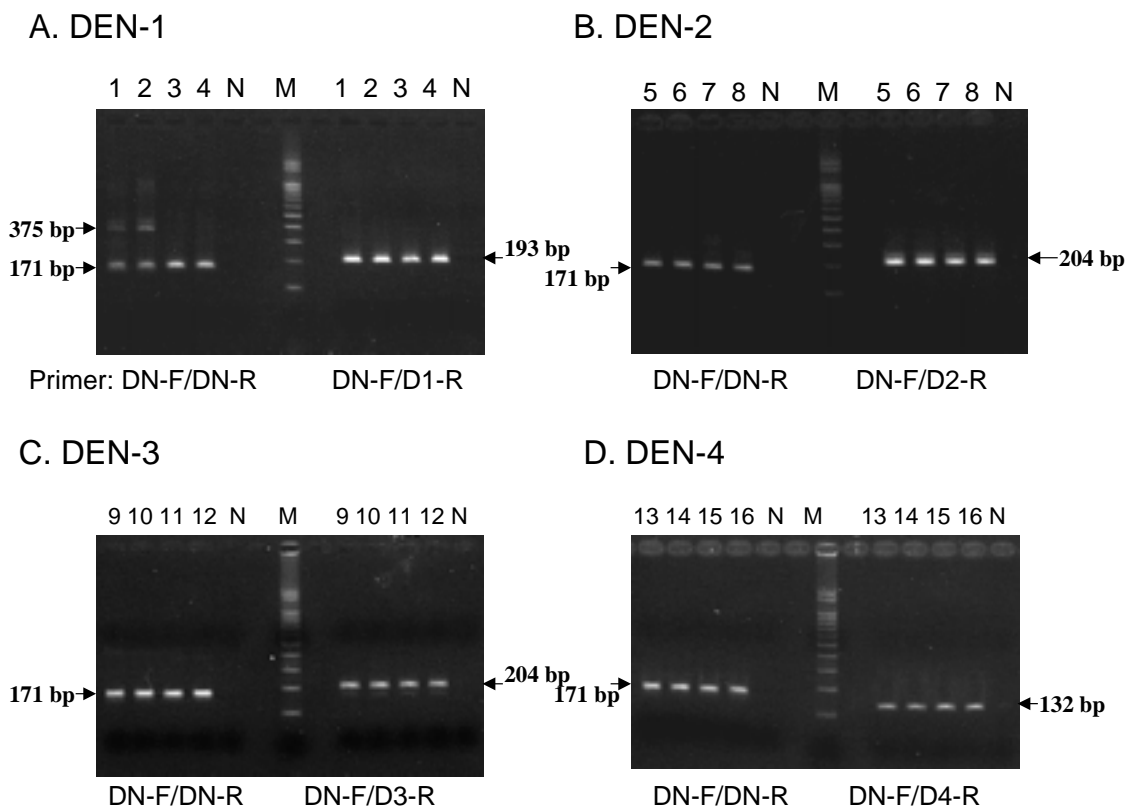
圖一. Standard curves of four dengue virus serotypes tested by one-step SYBR Green quantitative RT-PCR using group-specific primer pair. Standard curves were generated from the amplification plots of each of the four dengue strains representing DEN-1 (Fig. 1A), DEN-2 (Fig. 1B), DEN-3 (Fig.1C), and DEN-4 (Fig. 1D). The starting viral titer (PFU/ml) was plotted against the Ct value of each dilution.



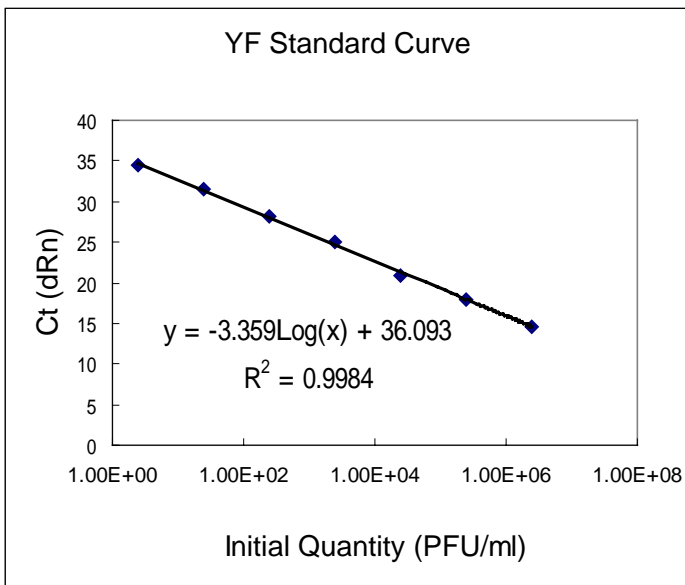
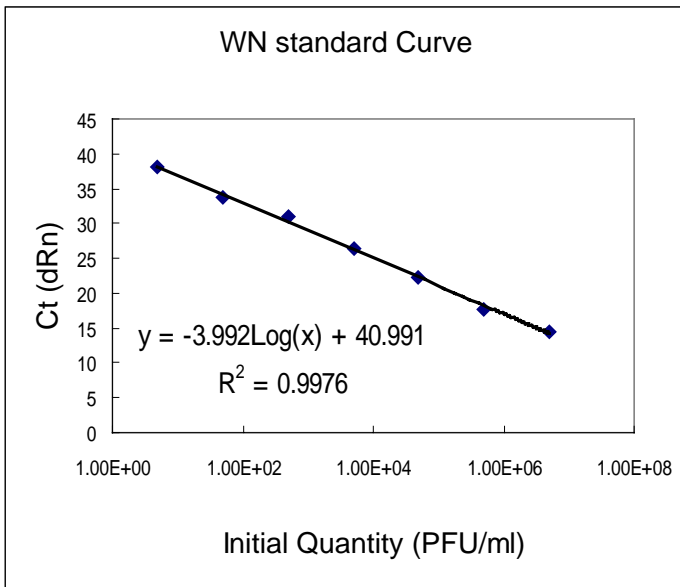
圖二. Standard curves of four dengue virus serotypes tested by one-step SYBR Green quantitative RT-PCR using serotype-specific primer pair. Standard curves were generated from the amplification plots of each of the four dengue strains representing DEN-1 (Fig. 2A), DEN-2 (Fig. 2B), DEN-3 (Fig.2C), and DEN-4 (Fig. 2D). The starting viral titer (PFU/ml) was plotted against the Ct value of each dilution.



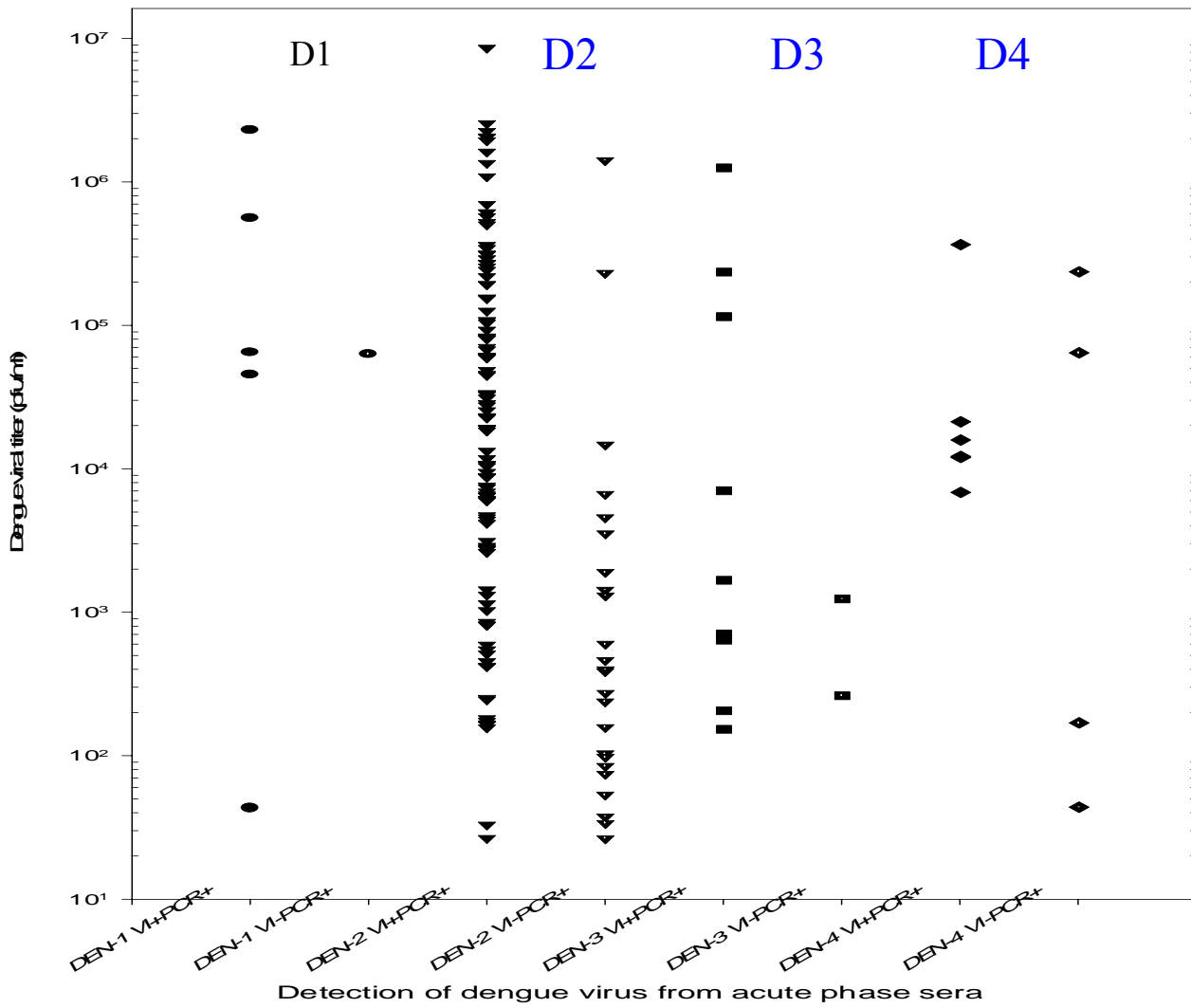
圖三、利用登革病毒共通引子及型別專一性引子經 SYBR Green 螢光定量 RT-PCR 反應之產物以瓊膠電泳所得的結果，顯示 PCR 產物的大小，且並無明顯的 Primer dimer 產物出現。DEN-1 strains, 1-4; DEN-2 strains, 5-8; DEN-3 strains, 9-12; DEN-4 strains, 13-16.



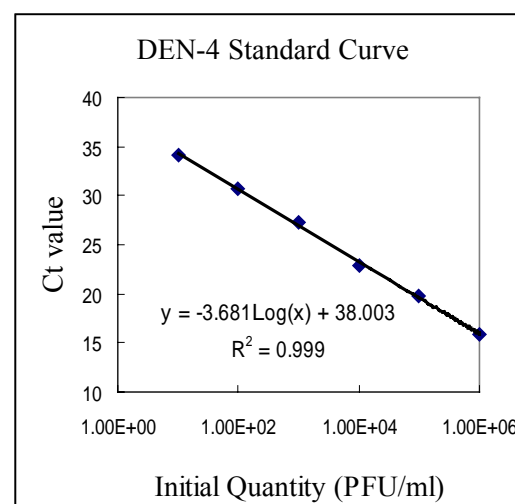
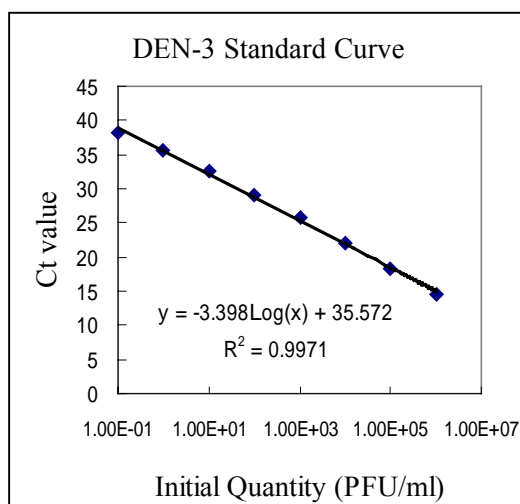
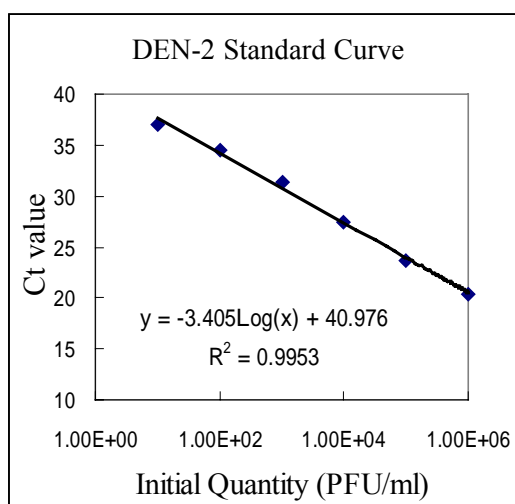
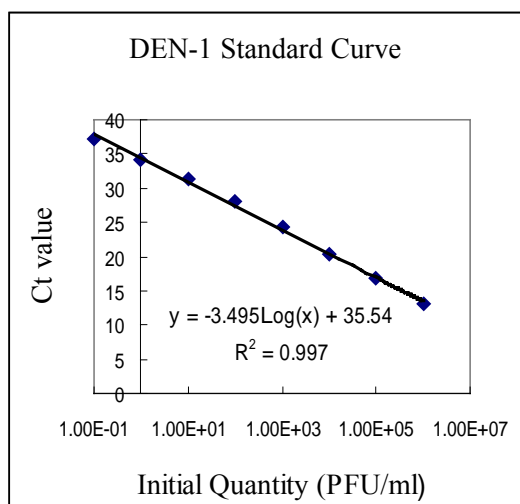
圖四. Standard curves of West Nile virus and yellow fever virus tested by one-step SYBR Green quantitative RT-PCR using WN and YF-specific primer pairs. Standard curves were generated from the amplification plots of West Nile virus (Fig. 3A), and Yellow fever virus (Fig. 3B). The starting viral titer (PFU/ml) was plotted against the Ct value of each dilution.



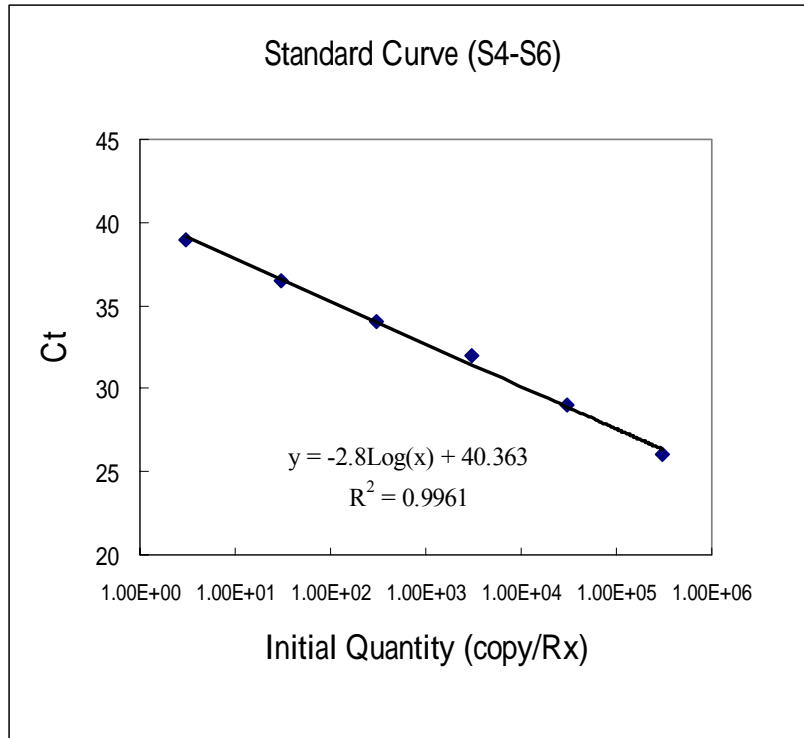
圖五、利用登革病毒共通引子，以 SYBR Green RT-PCR 方法偵測四型登革熱病人血清檢體之病毒含量，結果顯示登革病毒含量在 $10 \sim 10^7$ PFU/ml 之間。



圖六、黃病毒共通引子及探針 MFU1/CFU2/FLRP 對登革四型病毒所得的標準定量曲線，



圖七、利用引子 HTN-S4/HTN-S6 對漢城病毒(Seoul virus)所得的標準定量曲線。



表一、黃病毒 SYBR Green 螢光定量 RT-PCR 所使用之引子

Primer	Sequence	Specificity	Reference
FL-F	GCC ATA TGG TAC ATG TGG	Flavivirus	CDC/Taiwan, J Clin. Microbiol. 41:2408
FL-R	TGT CCC ATC CTG CGG TAT CAT	Flavivirus	CDC/Taiwan, J Clin. Microbiol. 41:2408
DN-F	CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA	Dengue virus	CDC/Taiwan, J Clin. Microbiol. 41:2408
DN-R	CCC CAT CTA TTC AGA ATC CCT GCT	Dengue virus	CDC/Taiwan, J Clin. Microbiol. 41:2408
D1-R	CGC TCC ATA CAT CTT GAA TGA G	DEN-1	CDC/Taiwan, J Clin. Microbiol. 41:2408
D2-R	AAG ACA TTG ATG GCT TTT GA	DEN-2	CDC/Taiwan, J Clin. Microbiol. 41:2408
D3-R	AAG ACG TAA ATA GCC CCC GAC	DEN-3	CDC/Taiwan, J Clin. Microbiol. 41:2408
D4-R	AGG ACT CGC AAA AAC GTG ATG AAT	DEN-4	CDC/Taiwan, J Clin. Microbiol. 41:2408
WN-F	GGG CCG TCA ATA TGC TGA AAC	West nile virus	CDC/Taiwan, Shu
WN-R	TTG CAG TGA ATC TGA AGA AC	West nile virus	CDC/Taiwan, Shu
YF-F	GTC AAT ATG GTA CGA CGA GGA G	Yellow fever virus	CDC/Taiwan, Shu
YF-R	AGT CAA AAT GTT GAA CAA AAA GAA A	Yellow fever virus	CDC/Taiwan, Shu

表二、黃病毒 TaqMan 螢光定量 RT-PCR 所使用之引子及探針

Primer/Probe	Sequence	Specificity	Reference
DN2F	CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA	Dengue virus	CDC/Taiwan, Shu
D1RP	TCC ATT CTT CTT GAA TGA TGA GCC C	DEN-1	CDC/Taiwan, Shu
D1R	GAG ATT TCT TTC TTG AAA CCC CGT A	DEN-1	CDC/Taiwan, Shu
D2RP	TTA GGA AAC GAA GGA ACG CCA C	DEN-2	CDC/Taiwan, Shu
D2R	AAG ACA TTG ATG GCT TTT GA	DEN-2	CDC/Taiwan, Shu
D3RP	TGA GGA AAG CTA TGA ACG CCA TA	DEN-3	CDC/Taiwan, Shu
D3R	CCT TTT AGG ACC TTA ATA GCC C	DEN-3	CDC/Taiwan, Shu
D4RP	CCG GAC TTT TTT CTG GGA AAG GA	DEN-4	CDC/Taiwan, Shu
D4R	AGG ACT CGC AAA AAC GTG ATG AAT	DEN-4	CDC/Taiwan, Shu
MFU1	TAC AAC ATG ATG GGA AAG CGA GAG AAA AA	Flavivirus	CDC/USA, Chang
CFU2	GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC	Flavivirus	CDC/USA, Chang
FLRP	CTC CCA GCC ACA TGT ACC ATA TGG C	Flavivirus	CDC/Taiwan, Shu
DNFP	AGT GGA GTG GAA GGA GAA GGA CTG CAC A	Dengue virus	CDC/Taiwan, Shu

表三、構築漢他病毒質體所使用之引子

Primer	Sequence	Gene	R.E./site/Plasmid
SeoS-F	AAC AGG CCA TGG CAA CTA TGG AAG AAA TCC AG	Nucleoprotein	NcoI/+43/phaS
SeoS-R	CAT ATT CCC GGG TAA TTT CAT AGG TTC CTG GTT	Nucleoprotein	SmaI/-1332/phaS
SeoM-F	GGA ATT CCA TAT GTG GAG TTT GCT ATT ACT GGC C	Envelope glycoprotein	NdeI/+47/phaM1
SeoM-R2	ATT GGA GTC GAC AGT TAC AGT CTT TTT TAA ATC TTC	Envelope glycoprotein	SalI/-1858/phaM1
SeoM-F2	ATT CAT GTC GAC CCG ACA GAA ACT GCA ATT CAG GC	Envelope glycoprotein	SalI/+1835/phaM2
SeoM-R	CAT ATT CCC GGG TGA TTT TTT ATG CTT TCT AA	Envelope glycoprotein	SmaI/-3448/phaM2

表四、漢他病毒 SYBR Green 螢光定量 RT-PCR 方法使用之探針

Primer	Sequence	Specificity	Reference
HTN-S4	GAI IGI TGT CCA CCA ACA TG	Hantavirus	Am. J. Trop. Med. Hyg. 47:210, 1992
HTN-S6	AGC TCT GGG TCC ATA TCA TC	Hantavirus	Am. J. Trop. Med. Hyg. 47:210, 1992
SF-1	CAG AAA GTC AAG GAT GCA GAA AA	HTN-SEO	CDC/Taiwan, Shu
SF-2	CAG TAT GAA AAG GAT CCT GAT GA	HTN-SEO	CDC/Taiwan, Shu
SR-3	GGC TCT ACC CCT GTA GGA TC	HTN-SEO	CDC/Taiwan, Shu
SR-5	GTC TGC CTG CCT CTT GTT GT	HTN-SEO	CDC/Taiwan, Shu
SF-8	CCA TCA TCA ATA TGG GTG TTT GC	HTN-SEO	CDC/Taiwan, Shu
SR-9	CCC ACA GTT TTT GAA GCC AT	HTN-SEO	CDC/Taiwan, Shu

表五: Detection and differentiation of various flaviviruses using dengue group- and serotype-specific primer pairs

Strain	DEN Genotype	DN-F/DN-R	DN-F/D1-R	DN-F/D2-R	DN-F/D3-R	DN-F/D4-R
DEN-1 Hawaii	I	+ (25 ^a)	+ (24)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)
DEN-1 157001	I	+ (24)	+ (22)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)
DEN-1 8500660	I	+ (26)	+ (25)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)
DEN-1 8600098	I	+ (27)	+ (25)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)
DEN-2 NGC	IA	+ (17)	- (no Ct)	+ (20)	- (no Ct)	- (no Ct)
DEN-2 466177	IB	+ (21)	- (no Ct)	+ (24)	- (no Ct)	- (no Ct)
DEN-2 454009	IC	+ (19)	- (no Ct)	+ (23)	- (no Ct)	- (no Ct)
DEN-2 454021	IC	+ (19)	- (no Ct)	+ (24)	- (no Ct)	- (no Ct)
DEN-3 8700829	I	+ (26)	- (no Ct)	- (no Ct)	+ (25)	- (no Ct)
DEN-3 H87	II	+ (22)	- (no Ct)	- (no Ct)	+ (23)	- (no Ct)
DEN-3 466322	II	+ (28)	- (no Ct)	- (no Ct)	+ (27)	- (no Ct)
DEN-3 333137	II	+ (26)	- (no Ct)	- (no Ct)	+ (25)	- (no Ct)
DEN-4 H241	I	+ (19)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)	+ (25)
DEN-4 8900508	II	+ (25)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)	+ (26)
DEN-4 8700544	?	+ (24)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)	+ (27)
JEV (JaGAR)		- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)
West Nile virus		- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)
Yellow fever virus		- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)
NTC ^b		- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)	- (no Ct)

^a Total of 45 cycles of amplification was carried out using one-step SYBR Green RT-PCR for dengue virus detection and differentiation. Ct values were measured by adding dengue virus 500~5000 PFU/ml and the results were shown in parenthesis. Negative results were defined as the Ct values more than 40 cycles of amplification. ^b Non-Template control.

表六、90年高雄市登革熱病人血清利用螢光定量 RT-PCR 偵測病毒含量

Serum sample	Nested RT-PCR	Q-PCR(DN-F/DN-R)	pfu/ml
1	+	+(14)	5.08×10^5
2	+	+(15)	3.7×10^5
3	+	+(26)	8.29×10^2
4	+	+(31)	35
5	+	+(30)	91.7
6	+	+(18)	5.87×10^4
7	+	+(16)	2.53×10^5
8	+	+(25)	1.32×10^3
9	+	+(24)	2.42×10^3
10	+	+(27)	3.02×10^2
11	-	+(34)*	6.21
12	+	+(17)	1.06×10^5
13	+	+(19)	2.94×10^4
14	+	+(16)	2.49×10^5
15	+	+(16)	1.85×10^5
16	-	+(29)*	1.45×10^2
17	+	+(20)	2.23×10^4
18	+	+(24)	1.67×10^3
19	+	+(16)	2.21×10^5
20	+	+(20)	1.64×10^4
21	+	+(20)	1.88×10^4
22	+	+(16)	2.13×10^5
23	+	+(24)	2.42×10^3
24	+	+(20)	2.5×10^4
NC (40)#	-	-(no Ct)	0

*傳統 RT-PCR 陰性，急性期及恢復期血清登革熱抗體陽性。

#非登革熱病人血清檢體 40 支，以傳統 RT-PCR 方法及登革熱抗體檢測均為陰性。

表七、 Comparisons of results between SYBR Green one-step RT-PCT and cell culture method

in the detection of dengue virus from acute phase sera^a.

Serotypes	Confirmed Cases ^b	No. of positive serum samples detected by		
		Virus isolation (%)	Group-specific primer pair (%)	Serotype-specific primer pairs (%)
DEN-1	8	5 (63%)	6 (75%)	6 (75%)
DEN-2	162	108 (67%)	132 (82%)	132 (82%)
DEN-3	13	10 (77%)	12 (92%)	12 (92%)
DEN-4	10	6 (60%)	10 (100%)	10 (100%)
Total	193	129 (67%)	160 (83%)	160 (83%)

^a Sera collected during day 1-7 after onset of symptoms are referred as acute phase samples.

^b All serum samples were selected from confirmed dengue patients with positive dengue virus isolation in the acute phase sera or 4-fold increase of dengue-specific IgM or IgG antibodies in the pair sera.

表八、 Comparisons of results by SYBR Green one-step RT-PCT and cell culture method for the detection of acute phase sera^a with positive or negative dengue-specific IgM and/or IgG antibody.

Acute phase sera positive for dengue-specific IgM or IgG antibodies	Confirmed Cases	No. of positive serum samples detected by		
		Virus isolation (%)	Group-specific primer pair (%)	Serotype-specific primer pair (%)
IgM-IgG-	138	119 (86%)	133 (96%)	133 (96%)
IgM+ IgG-	24	5 (21%)	12 (50%)	12 (50%)
IgM- IgG+	8	3 (38%)	6 (75%)	6 (75%)
IgM+ IgG+	23	2 (9%)	9 (39%)	9 (39%)
Total	193	129 (67%)	160 (83%)	160 (83%)

^a Sera collected during day 1-7 after onset of symptoms are referred as acute phase sample.

表九、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

表十、Imported dengue cases identified at airport (14 out of >400 reported) in 2003

Case number	Onset day	Import Nations	Serotype	Active surveillance at
21	20030709	Cambodia	D2	C.K.S.airport
24	20030805	Vietnam	D2	C.K.S.airport
26	20030812	Thailand	D4	Kaohsiung airport
28	20030820	Vietnam	D4	C.K.S.airport
34	20030917	The Philippines	D1	C.K.S.airport
37	20030930	Indonesia	D1	C.K.S.airport
38	20031013	Thailand	D1	C.K.S.airport
39	20031015	The Philippines	D4	C.K.S.airport
41	20031023	Vietnam	D3	C.K.S.airport
42	20031024	Vietnam	D2	C.K.S.airport
45	20031028	Malaysia	D2	C.K.S.airport
46	20031028	Malaysia	D2	C.K.S.airport
52	20031204	Indonesia	D3	C.K.S.airport
53	20031204	Indonesia	D3	C.K.S.airport

表十一、Detection and differentiation of various flaviviruses using flavivirus-consensus primer pairs

Strain	DEN genotype	MFU1/CFU2/DNFP	MFU1/CFU2/FLRP
DEN-1 Hawaii	I	+ (19)	+ (19)
DEN-1 157001	I	+ (17)	+ (17)
DEN-1 8500660	I	+ (13)	+ (15)
DEN-1 8600098	I	+ (17)	+ (17)
DEN-2 NGC	IA	+ (15)	+ (14)
DEN-2 466177	IB	+ (21)	+ (22)
DEN-2 454009	IC	+ (18)	+ (18)
DEN-2 454021	IC	+ (18)	+ (19)
DEN-3 8700829	I	+ (14)	+ (14)
DEN-3 H87	II	+ (13)	+ (13)
DEN-3 466322	II	+ (21)	+ (21)
DEN-3 333137	II	+ (18)	+ (18)
DEN-4 H241	I	+ (14)	+ (14)
DEN-4 768346	I	+ (15)	+ (16)
DEN-4 8900508	II	+ (17)	+ (17)
DEN-4 8700544	?	+ (15)	+ (16)
JEV (JaGAR)		+ (18)	+ (15)
JEV (PK-1)		- (No Ct)	+ (18)
West Nile virus		+ (17)	+ (15)
Yellow fever virus		- (No Ct)	+ (19)
NTC		- (No Ct)	- (No Ct)

表十二、SYBR Green 與 TaqMan 方法對病人血清測試結果

Patient's serum	SYBR Green* (Ct 值)	TaqMan** (Ct 值)
S9201814	20.14	19.15
S9201818	26.15	27.63
S9201839	15.59	19.66
S9201840	18.52	16.38
S9201842	36.97	No Ct
S9201850	21.37	19.4
S9201852	18.36	16.52
S9201733	22.44	18.36
S9201814	20.14	18.13
KSD8594	24.59	18.83
KSD8598	25.34	23.05
KSD6843	22.62	12.08
KSD6846	39.84	No Ct
KH1719	24.78	17.52
KSD10209	29.59	24.65
KH1667	27.16	27.59
KH1671	17.4	18.19
KSD10358	30.11	24.15
KSD10754	25.21	21.5
KSD10357	24.37	18.63
KSD7844	23.45	22.53
KSD7929	24.66	24.43
H9201821	23.31	16.98
H9201832	27.35	20.54
26568	38.3	32.69
26611	26.13	25.03

*SYBR Green 方法所使用之引子為 DN-F, DN-R

**TaqMan 方法所使用之引子為 MFU1/CFU2/FLRP