

行政院衛生署九十年度

自行研究計畫

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

計畫編號：DOH90-DC2015

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、周玲、樂怡雲、簡麗蓉、張淑芬、

陳志恒、潘秀玲、林鼎翔

執行期間：90年1月1日至90年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目 錄

	頁 碼
封面	
一、中文摘要	(3-6)
英文摘要	(7)
二、本文	
(1) 前言	(8-15)
(2) 材料與方法	(15-21)
(3) 結果	(21-21)
(4) 討論	(21-22)
(5) 結論與建議	(23-24)
(6) 參考文獻	(24-29)
三、圖次	(30-36)
四、表次	(37)
五、附錄	(38)
	共 (38) 頁

一之一、中文摘要

關鍵詞：黃病毒、登革熱、日本腦炎、ELISA、非結構蛋白質一(NS1)

研究目的：登革熱及日本腦炎是台灣地區二種重要的法定傳染病，分別屬於黃病毒屬的登革熱及日本腦炎亞群。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，開發快速的黃病毒鑑別診斷系統，能監測已知之本土性黃病毒（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，能快速的診斷已有的及再浮現的黃病毒感染，改善現有監測系統的不足。此外，我們將利用這些方法，進行流行病學研究，以深入了解台灣地區登革熱及日本腦炎的流行歷史、現況、及未來發展趨勢，做為制定防治政策的參考。

研究方法：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。為解決此問題，我們利用外套膜蛋白質(Envelope protein, E)特異性之單株抗體，改良了現有的外套膜蛋白質的酵素免疫分析法(ELISA)；並利用非結構蛋白質

一(NS1) 特異性之單株抗體，開發了新的 NS1 酵素免疫分析法。在血清流行病學方面，本計畫將收集登革熱及日本腦炎確定病例不同感染後期 (postinfection) 之血清及日本腦炎疫苗注射者之免疫血清，以了解 NS1 特異性之 IgM 及 IgG 抗體之持久性。為建立台灣地區日本腦炎與登革熱血清抗體盛行率資料，本計畫將在台灣各主要地區 (北、中、南、東) 收集正常人及疫苗注射者血清進行分析研究。為建立完整的黃病毒的血清學診斷系統，我們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，加以培養、保存及進行實驗。

研究發現：

- (1) 黃病毒之血清學鑑別診斷：利用病毒感染之細胞培養液及外套膜蛋白質特異性之單株抗體，我們改良了傳統 Envelope 特異性之酵素免疫分析法，增加了檢驗試劑的靈敏度與特異性，並建立血清學 (ELISA) 鑑別診斷方法，以區分不同黃病毒之感染。我們也初步開發了乾式 ELISA 檢驗試劑，並進一步完成自動化的檢驗流程，可以快速的、大量的檢驗血清檢體，這對於防治工作極為重要。
- (2) 利用 NS1 特異性之單株抗體，我們開發出一套新的、間接酵素免疫分

析法，能鑑別診斷日本腦炎及登革熱感染，並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。研究結果顯示，日本腦炎與登革病患之抗 NS1 特異性 IgM、IgA、與 IgG 抗體，彼此並沒有交叉反應，因此檢驗 NS1 特異性 IgG 抗體能分辨一個個體是否感染過日本腦炎或登革熱。

- (3) NS1 特異性之酵素免疫分析法能分辨初次及二次登革病毒感染，此對於了解登革出血熱的致病機轉研究十分重要。
- (4) NS1 特異性之酵素免疫分析法能分辨初次感染之登革病毒血清型別，此對於疫情的分析與血清流行病學的研究十分重要。
- (5) NS1 特異性之酵素免疫分析法，可以取代複雜的 PRNT 中和抗體法，能利用於血清流行病學的研究，解決目前登革熱血清流行病學研究之最大瓶頸。目前已收集台灣部分地區正常人及疫苗注射者血清進行分析研究，並初步完成屏東縣琉球鄉日本腦炎與登革熱血清抗體盛行率調查研究。

結論及建議：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），能快速的診斷已知之本土性黃病毒及可能侵入的新興再浮現黃病毒，是十分

重要的。本計畫主要目標在建立黃病毒血清診斷系統，希望能在台灣地區建立一個具有國際水準的黃病毒參考實驗室。我們建議在疾病管制局成立一個黃病毒研究中心，有系統的進行病媒、診斷、流行病學及防治各方面的研究，並逐步完成台灣各主要地區（北、中、南、東）登革熱及日本腦炎的血清及分子流行病學調查研究，做為制定未來防治政策的參考。

（篇幅不足，請自行複製）

第 頁

一之二、英文摘要

Keyword: flavivirus、dengue fever、Japanese encephalitis、ELISA、
nonstructural protein1 (NS1)

We have recently developed a NS1 isotype- and serotype-specific ELISA for the serodiagnosis and seroepidemiologic studies of flavivirus infection. Our main goals are setup an ELISA that can be reliably used to differentiate: (1) JE and dengue infections, (2) JE vaccination and JE infection, (3) primary vs. secondary dengue virus infection, and (4) serotype of dengue virus infection. Investigation on NS1-specific antibody response to JE virus showed that NS1-specific IgM and IgA antibodies from JE patients did not cross-react to dengue virus NS1 glycoprotein, while IgG antibodies from ~10% of these patients showed significant cross-reactivity. However, careful analysis suggested that cross-reactive IgG antibodies to dengue virus NS1 antigen found in a few JE patients were related to the previous infection with heterologous flavivirus, most likely dengue virus.

NS1 isotype- and serotype-specific ELISA was setup to analyze antibodies to each of these four dengue serotypes. NS1 serotype-specific immunoglobulin G (IgG) ELISA was found to be able to differentiate primary and secondary dengue virus infections since kinetics study showed that NS1-specific IgG antibodies would only be detected 10 days after onset and persist for more than 30 years. Indeed, comparison of NS1 serotype-specific IgG ELISA with envelope (E)- and membrane (M)-specific Capture Immunoglobulin (Ig) M and IgG ELISA in the differentiation of primary and secondary dengue virus infection showed more reliable results. Interestingly, 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. These findings suggested that NS1 serotype-specific IgG ELISA could be reliably applied for serodiagnosis and seroepidemiologic study of dengue virus infection.

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。在台灣地區，登革熱及日本腦炎是比較重要的黃病毒傳染病，分別屬於登革熱及日本腦炎亞群，二者皆是重要的法定傳染病。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，開發快速的黃病毒鑑別診斷系統，能監測已知之本土性黃病毒 (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。我們目前的傳染病防治策略，均止於對已知地方性及流行性病菌的監視與檢驗，尚未建立新興及再浮現傳染病之監測系統，但由於世界地球村之形成，這些新興及再浮現病毒之分布區域正逐漸擴大，開始侵入新領域，使各種不同病菌之分布產生重疊，造成檢驗與防治上的困難。1998 年在馬來西亞發生的 Nipah 病毒性腦炎及 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。在 Nipah 病毒方面，由於對血清學的過度解釋，導致錯誤的疫情判斷及防治措施，因而延誤疫情，造成大規模流行，不但使上百人死亡，更摧毀了當地的養豬業，引發出政治、經濟及社會問題，也造成國際上不小的震撼。1999 年在美國紐約市爆發之 West Nile 腦炎方面，則造成 61 個人感染及 7 個死亡病例。此流行剛開始時一直被誤認為是 St. Louis 病毒，因為美國的 CDC 只檢驗美國常見的六種腦炎病毒，並未考慮其為國外傳入的非地方性病毒或生化戰武器之可能，直到紐約市 Bronx 動物園之鳥類專家將死去鳥類之腦部檢體，送往美國農業部國家獸醫研究所分離出病毒，再由美國的 CDC 以 PCR 及核酸定序技術分析後才發現錯誤。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。這二次流行事件均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。比起先進的已開發國家，我們的防疫

系統仍然相當落後，我們在傳染病研究的投資相當有限，軟硬體也都需要加強，由於時機相當急迫，現在正是積極建立一套完整防疫體系最佳時刻。我們應透過與美、澳等先進國家合作，儘速建立一個具有國際水準的病媒性疾病參考實驗室與完善的監測及通報系統。

登革熱及日本腦炎是台灣地區二種重要的法定傳染病，分別屬於日本腦炎及登革熱亞群，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，鑑別診斷並不容易。為了正確診斷新興及再浮現傳染病的侵入，我們有必要建立一套完整的節肢動物病毒，特別是黃病毒的監測系統，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。

國內外相關研究之文獻探討：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)。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僅引發較輕微的登革熱(dengue fever, DF)臨床症狀(Burke et al, 1988)，仍有少數的登革病毒感染者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)，次年疫情繼續擴大。民國 78 年至 82 年只有少數的病例或小規模的流行。最近幾年來，由於台灣社會環境的變遷，流行情況開始有所轉變。民國 83 年起，高雄市左營區爆發第三型登革病毒的流行，接著在臺南市有第一型登革病毒的感染發生，並出現臺灣第一名因登革出血熱死亡的病例，迄此年年底共有 11 名符合世界衛生組織登革出血熱標準的病例發生(衛生署預研所 83 年登革熱偵測年報，1995)。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)。登革熱流行的擴及全島以及嚴重臨床病例的出現增加，已使其成為臺灣公共衛生界的重要防疫問題。另一方面，日本腦炎

病毒為一本土化之傳染病，雖然大多數三十歲以下人均曾注射過疫苗，但每年仍有數十病例，仍是公共衛生上之一重要問題。

目前，黃質病毒實驗室診斷，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。其中登革病毒的分離與血清型鑑定，乃藉由細胞培養或由媒蚊中分離出病毒，再以病毒特異性(virus-specific)之單株抗體做免疫螢光染色，以確知被感染病毒之血清型，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，是其缺點。PCR 方法可以偵測到急性期的病毒血症，其陽性率與病毒分離相近(Lanciotti et al, 1992)，惟確診時間可縮短為 1~2 天，提升確診時效。

目前常用的血清學分析，包括 IgM 免疫球蛋白之酵素免疫分析法(IgM ELISA)與血球凝集抑制試驗(Hemagglutination Inhibition test, HI)。HI 是檢驗登革病毒感染的傳統方法，但必須取得急性期與恢復期的成對血清，才能經由抗體效價的變化判讀；IgM ELISA 的方法雖然快速且不需成對血清即可直接研判結果，但若採血時間太早則無法測得抗體；據統計，發病五天內所採檢體有 75%為陰性，須待發病十四天後再採血一次始能確診，如此一來又落入檢驗時效不足的問題當

中。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(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。為解決此問題，我們建立了一套新的間接酵素免疫分析法，利用非結構蛋白質一(NS1)特異性之單株抗體，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。此外，特異性抗體分析顯示日本腦炎與登革病患之抗 NS1 特異性 IgM、IgA、與 IgG 抗體，並沒有交叉反應，能用於不同黃病毒的鑑別診斷。我們將在本計畫中，開發完成此 ELISA 系統，解決目前黃病毒血清診斷上的困難。此外，我們將利用這些方法，進行流行病學研究，以深入了解台灣地區登革熱

及日本腦炎的流行歷史、現況、及未來發展趨勢，做為制定防治政策的參考。

(2) 材料與方法

1. 病毒之取得與生產

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。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。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。

2. 病例定義及常規實驗室之診斷

日本腦炎病毒與登革病毒感染之確診是基於病毒分離、Capture IgM and IgG 酵素免疫分析法(Capture IgM and IgG ELISA)[Monath et al, 1984]及反轉錄酶/聚合酶鏈鎖反應法(reverse-transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) [Lanciotti et al, 1992]等之實驗室診斷，確定病例必須符合以下任一標準：(1) 登革或日本腦炎 IgM 及 IgG 抗體陽性反應；(2) 病毒分離陽性；(3) 反轉錄酶/聚合酶

鏈鎖反應法陽性。因此，例行的實驗室診斷將包括上述三種試驗。登革出血熱之定義係依照 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(postinfection, 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. 溶斑減少中和試驗法(Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT)

我們將建立一套 ELISAized PRNT 中和試驗法，以取代目前使用的傳統中和試驗法。傳統中和試驗法係將 BHK-21 細胞以 0.75×10^5 個細胞/孔分注於 24 孔盤，放入 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培養箱內培養 48 小時。血清檢體以血清稀釋液（ $0.01\text{MPBS}+5\%\text{FCS}$ ）作 10 倍稀釋後，於 56°C 水浴 30 分鐘作不活化處理。病毒（如 DEN-1, 2, 3, 4 型，第一型為 Hawaiian strain，第二型為 New Guinea C，第三型為 H-87，第四型為 H-241）以 BHK 細胞培養液調整濃度至 100 PFU/ml。去活化的稀釋血清與等體積病毒混合均勻，放入 4°C 冰箱中 18-21 小時進行中和反應，取出已培養 2~4 天的 BHK-21 細胞，倒掉上清液，加入病毒-細胞混和液，放入 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培養箱內感染 1 小時，之後加入含 1% Methylcellulose 的 BHK-21 細胞培養液，放入 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培養箱培養 3 至 6 天後取出培養盤，用 Amino Black 固定染色 30 分鐘，計算溶斑數。ELISAized PRNT 中和試驗法主要是以 96 孔微盤使用，並於已經培養 2~4 天的 BHK-21 細胞，以單株抗體/ELISA 方法操作，利用 ELISA reader 讀取 OD 值方式，測定血清中和抗體效價。

5. ELISA(酵素免疫分析法)

一、Capture IgM/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 μ l 之 5% 牛血清白蛋白 (in PBS) 於 37°C 下進行 1 小時封鎖作用 (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 OPD (O-phenylene diaamine) 室溫作用 30 分鐘，最後加入 2N 硫酸停止反應，再用 Labsystems multiskan MS 型微量效價盤判讀儀 (microplate reader) 以波長 490 測吸光度。

二、*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°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°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°C 反應 1 小時。最後，加入酵素受質體 OPD 室溫作用 30
分鐘，最後加入 2N 硫酸停止反應，再以波長 490 測吸光度。

三、*ELISA* 最適化研究：為改進 *ELISA* 之 sensitivity (靈敏度)
及 specificity (特異性)，我們將致力於 *ELISA* 最適化研究。
specificity 的改進可以提高鑑別診斷之可靠性，分辨不同腦
炎黃病毒的感染，取代目前較麻煩的 PRNT 方法。Sensitivity
的改進也是重點之一，因為，流行病學的應用，需要極高的靈
敏度，才能得到真正可靠的血清抗體陽性率，這正是目前研究
上的瓶頸。

6. 開發乾式 *ELISA* 診斷試劑

為了將各種 *ELISA* 診斷試劑製造成 ready-to-use 的型式，供未來各分
局及地方衛生局使用，我們計畫將完成最適化的 *ELISA* 診斷試劑製成
commercial available format，以方便相關單位使用。為提高效率及
產品品質，乾式 *ELISA* 診斷試劑的開發將透過委託生產的方式進行。

7. 日本腦炎與登革熱病人血清 NS1 及 E 抗體持久性調查研究

為了解台灣地區登革熱及日本腦炎的流行歷史、現況、及未來發展趨勢，我們計畫進行有系統的登革熱及日本腦炎的血清流行病學調查研究。利用我們新開發的 NS1 及 E 抗體特異性 IgM 及 IgG ELISA，可以取代複雜的 PRNT 中和抗體法，並且分析個體血清是否感染過日本腦炎及/或登革熱。由於 NS1 及 E 抗體特異性 IgM 及 IgG 之持久性會影響到抗體陽性率之判定，了解 IgM 及 IgG 抗體之持久性是極為重要的。本計畫將收集登革熱及日本腦炎確定病例不同感染後期 (postinfection) 之血清及日本腦炎疫苗注射者之免疫血清，分別測定特異性的 IgM 及 IgG 抗體效價變化，做為血清抗體盛行率研究之基礎。

8. 日本腦炎與登革熱病人 NS1 及 E 抗體血清盛行率流行病學研究

為了解台灣地區登革熱及日本腦炎的流行歷史、現況、及未來發展趨勢，做為制定防治政策的參考，我們計畫進行有系統的登革熱及日本腦炎的血清流行病學調查研究。我們將有系統的收集正常人及疫苗注射者血清，分別測定非結構蛋白質一(NS1)及外套膜蛋白質(E)的特異性 IgM 與 IgG 抗體效價變化。此結果將與傳統 PRNT 及快速 ELISAized 中和抗體 (PRNT) 分析法比較，以建立台灣地區日本腦炎與登革熱血清抗體盛行率資料。本計畫將在台灣各主要地區 (北、中、南、東) 收

集正常人及疫苗注射者血清進行分析研究。

(3) 結果

1. 黃病毒之血清學鑑別診斷：利用病毒感染之細胞培養液及外套膜蛋白質特異性之單株抗體，我們改良了傳統 Envelope 特異性之酵素免疫分析法，增加了檢驗試劑的靈敏度與特異性，並建立血清學鑑別診斷方法，以區分不同黃病毒之感染。圖一為病患被日本腦炎、登革、或黃熱病毒感染時 IgM 與 IgG 抗體之交叉反應情形，結果顯示日本腦炎病患之 IgM 與 IgG 抗體確實會對西尼羅病毒有部份的交叉反應，但與登革病毒及黃熱病毒並無明顯的交叉反應。此結果顯示利用 ELISA 方法可以進行黃病毒之鑑別診斷。
2. 我們也初步開發了乾式 ELISA 檢驗試劑，並進一步完成自動化的檢驗流程，可以快速的、大量的檢驗血清檢體，這對於防治工作極為重要。圖二顯示實驗室自備的 Capture IgM 與 IgG ELISA 檢驗試劑與市售的產品比較，具有相同或更好的靈敏度與特異性。
3. 利用 NS1 特異性之單株抗體，我們開發出一套新的、間接

酵素免疫分析法，能鑑別診斷日本腦炎或登革熱感染，並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（圖三）。研究結果顯示，日本腦炎與登革病患之抗 NS1 特異性 IgM、IgA、與 IgG 抗體，彼此並沒有交叉反應，因此能分辨一個個體是否感染過日本腦炎或登革熱（圖四）。

4. NS1 特異性之酵素免疫分析法能分辨初次及二次登革病毒感染（圖五），此對於了解登革出血熱的致病機轉研究十分重要。
5. NS1 特異性之酵素免疫分析法能分辨初次感染之登革病毒血清型別（圖六），此對於疫情的分析與血清流行病學的研究十分重要。
6. NS1 特異性之酵素免疫分析法，可以取代複雜的 PRNT 中和抗體法，能利用於血清流行病學的研究（圖七），解決目前登革熱血清流行病學研究之最大瓶頸。目前已收集台灣部分地區正常人及疫苗注射者血清進行分析研究，並初步完成屏東縣琉球鄉日本腦炎與登革熱血清抗體盛行率調查研究（表一）。

(4) 討論

目前，黃質病毒實驗室診斷，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。其中急性期血清因抗體尚未產生，主要靠反轉錄酶/聚合酶鏈鎖反應法來檢驗，這也是目前檢驗上的一大瓶頸，因為靈敏度仍有待改進，此外，偽陽性也是偶而會發生的問題。為此，我們正積極研發更快速、更靈敏、特異性更高的螢光定量 PCR 方法，來改進急性期血清之檢驗。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。為解決此問題，我們改良了傳統 Envelope 特異性之酵素免疫分析法，增加了檢驗試劑的靈敏度與特異性。此外，我們發展出一套新的間接酵素免疫分析法，利用非結構蛋白質一(NS1)特異性之單株抗體，能鑑別診斷日本腦炎與登革熱的感染。進一步研究更發現非結構蛋白質一的間接酵素免疫分析法能分辨自然感染與疫苗接種所產生的抗日本腦炎抗體反應，且能分辨是初次或二次登革病毒感染，及分辨初次感染之登革病毒血清型別。

本研究最重要的貢獻在於發展出一套新的 NS1 特異性酵素免疫分析法，可以取代複雜的 PRNT 中和抗體法，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），能快速的診斷已知之本土性黃病毒及可能侵入的新興再浮現黃病毒，是十分重要的。本計畫主要目標在建立黃病毒血清診斷系統，希望能在台灣地區建立一個具有國際水準的黃病毒參考實驗室。我們建議在疾病管制局成立一個黃病毒研究中心，進行病媒、診斷、流行病學及防治各方面的研究，並逐步完成台灣各主要地區（北、中、南、東）登革熱及日本腦炎的血清流行病學調查研究，做為制定未來防治政策的參考。

(6) 參考文獻

1. Birch-Machin I, Rowan A, Pick J, Mumford J, Binns M. Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of Anti-NS1 antibody in post infection. *J. Virol. Methods* 1997; 65:255-263.
2. Bougrine SI, Fihri OF, Fehri MM. Western immunoblotting as a method for the detection of African horse sickness virus protein-specific antibodies: differentiation between infected and vaccinated horses. *Arch. Virol. Suppl.* 1998; 14:329-336.
3. Bundo K, Igarashi A. Antibody capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue haemorrhagic fever patients. *J. Virol. Methods* 1985; 11:15-22.

4. Burke DS, Nisalak A, Ussery MA. Antibody capture immunoassay detection of Japanese encephalitis virus immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 17:283-292.
5. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, et al. Antigenic relationships between flavivirus as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antiserum. *J. Gen. Virol.* 1989; 70:37-43.
6. Cane PA, Gould EA. Reduction of yellow fever virus mouse neurovirulence by immunization with a bacterially synthesized nonstructural protein (NS1) fragment. *J. Gen. Virol.* 1988; 69:1241-1246.
7. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 1990; 44:649-688.
8. Chen LK, Liao CL, Lin CG, et al. Persistence of Japanese encephalitis virus is associated with abnormal expression of nonstructural protein NS1 in host cells. *Virology* 1996; 217:220-229.
9. Churdboonchart V, Bhamarapravati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 44:481-493.
10. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1958; 7:561-573.
11. Cuzzubbo AJ, Endy TP, Vaughn DW, et al. Evaluation of a new commercially available immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Japanese encephalitis infections. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:3738-3741.
12. Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, et al. Comparison of PanBio dengue duo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and MRL dengue fever virus immunoglobulin M capture ELISA for diagnosis of dengue virus infections in Southeast Asia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999; 6:705-712.
13. Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J. Virol.* 1990; 64:4356-4363.
14. Falkler WA, Diwan AR, Halstead SB. Human antibody to dengue soluble complement-fixing (SCF) antigens. *J. Immunol.* 1973;

111:1804-1809.

15. Gubler DJ. Serological diagnosis of dengue haemorrhagic fever. *Dengue Bull.* 1996; 20:20-23.
16. Gubler, D. J. 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International, p 1-22.
17. Halstead, S. B., S. Rojanasuphot, and N. Sangkawibha. 1983. Original antigenic sin in dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**:154-156.
18. Han XY, Ren QW, Xu ZY, Tsai TF. Serum and cerebrospinal fluid immunoglobulin M, A, and G in Japanese encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26:976-978.
19. Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger JJ. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J. Gen. Virol.* 1988; 69:2101-2107.
20. Hsieh, W. C., M. F. Chen, K. T. Lin. et al. 1982. Outbreaks of Dengue fever in 1981 in Liouchyong Shiang, Pingtung County. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi* **81**:1388-1395.
21. Huang JH, Wey JJ, Sun YC, Chin C, Chien LJ, Wu YC. Antibody responses to an immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *J. Med. Virol.* 1999; 57:1-8.
22. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 40:418-427.
23. Kreil TR, Maier E, Fraiss S, Eibl MM. Neutralizing antibodies protect against flavivirus challenge but allow for the development of active humoral immunity to a nonstructural virus protein. *J. Virol.* 1998; 72:3076-3081.
24. Ku CC, King CC, Lin CY, et al. Homologous and heterologous neutralization antibody responses after immunization with Japanese encephalitis vaccine among Taiwan children. *J. Med. Virol.* 1994; 44:122-131.
25. Kuno G, Vorndam AV, Gubler DJ, Gomez I. Study of anti-dengue NS1 antibody by western blot. *J. Med. Virol.* 1990; 32:102-108.
26. Lanciotti, RS, Calisher, CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid

- detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbio.* 1992; 30:545-551.
27. Lin YL, Chen LK, Liao CL, et al. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J. Virol.* 1998; 72:191-200.
 28. Mackay DKJ, Forsyth MA, Davies PR, et al. Differentiation infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, nonstructural proteins in ELISA. *Vaccine* 1998; 16:446-459.
 29. Makino Y, Tadano M, Saito M, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. *Microbiol. Immunol.* 1994; 38:951-955.
 30. Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology* 1989; 169:354-364.
 31. Monath TP, Nystrom RR, Bailey RE, Calisher CH, Muth DJ. Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of St. Louis encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20:784-790.
 32. Monath TP. Pathobiology of flaviviruses. In: S.Schlesinger and M. Schlesinger. eds. *The Togaviruses and Flaviviruses*. New York: Plenum Press, 1986: 375-440.
 33. Nimmannitya S, Halstead SB, Cohen SN, Margiotta MR. 1969. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with haemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hygiene* 18:954-971.
 34. Nimmannitya S. 1987. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 18:392-397.
 35. Oya A. Japanese encephalitis vaccine. *Acta. Paediatr. Jpn.* 1988; 30:175.
 36. Patarapotikul J, Pothipunya S, Wanotayan R, Hongyantarachai A, Tharavanij S. Western blot analysis of antigens specifically recognized by natural immune responses of patients with Japanese encephalitis infections. *Southeast Asean J. Trop. Med. Public Health* 1993; 24:269-276.
 37. Qu X, Chen W, Maguire T, Austin F. Immunoreactivity and protective

- effects in mice of a recombinant dengue 2 Tonga virus NS1 protein produced in baculovirus expression system. *J. Gen. Virol.* 1993; 74:89-97.
38. Rosen L. 1977. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hygiene* 26:337-343.
 39. Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J. Immunol.* 1967; 99:285-290.
 40. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. 1984. Risk factors for dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 120:653-669.
 41. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Cropp CB, Monath T. Protection against yellow fever virus in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *J. Virol.* 1986; 60:1153-1155.
 42. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J. Gen. Virol.* 1987; 68:853-857.
 43. Shope R. Medical significance of Togaviruses: An overview of diseases in man and in domestic and wild vertebrate animals. In "The Togaviruses" (R. W. Schlesinger, Ed.), Academic Press, New York/London. 1980: 47-82.
 44. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Dengue NS1-specific Antibody Responses: Isotype Distribution and Serotyping in Patients with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. *J. Med. Virol.* 2000; 62: 224-232.
 45. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Antibody to the Nonstructural Protein NS1 of Japanese Encephalitis Virus: Potential Application of mAb-based Indirect ELISA to Differentiate Infection from Vaccination. *Vaccine.* 2001; 19: 1753-1763.
 46. Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, et al. Rapid serological diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60:693-698.

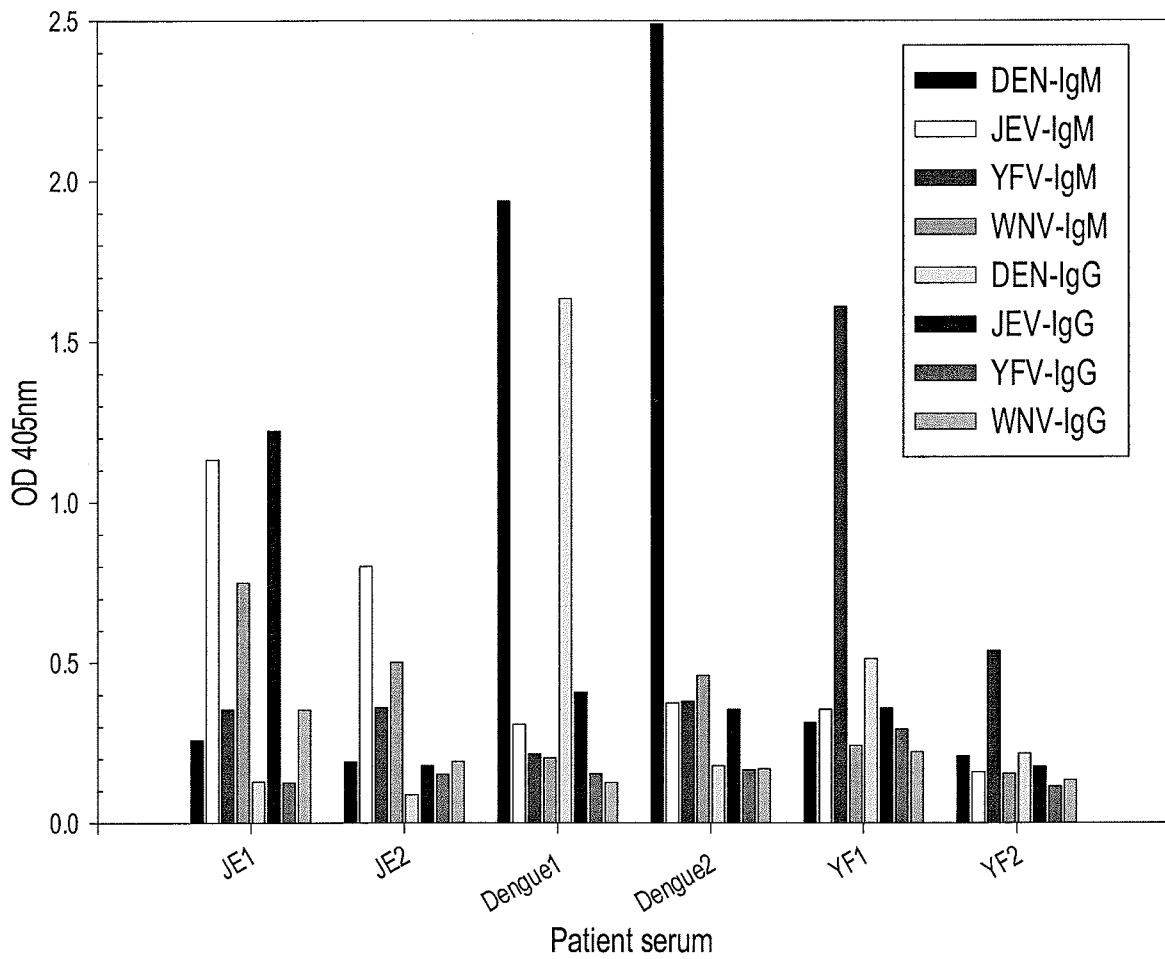
47. Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane associated after dimerization. *Virology* 1989; 171:302-305.
48. Wu, Y. C. 1986. Epidemic dengue 2 on LiouChyou Shiang, Pingtung County in 1981. *Chinese J. Microbiol. Immunol.* 19:203-211.
49. Wu, Y. C. 1996. Epidemiology and control of Japanese encephalitis and dengue fever in Taiwan. *World Health Organization, Dengue Bull.* 20:51-54.
50. World Health Organization. 1997. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control.* Geneva: World Health Organization.

三、圖

圖一、

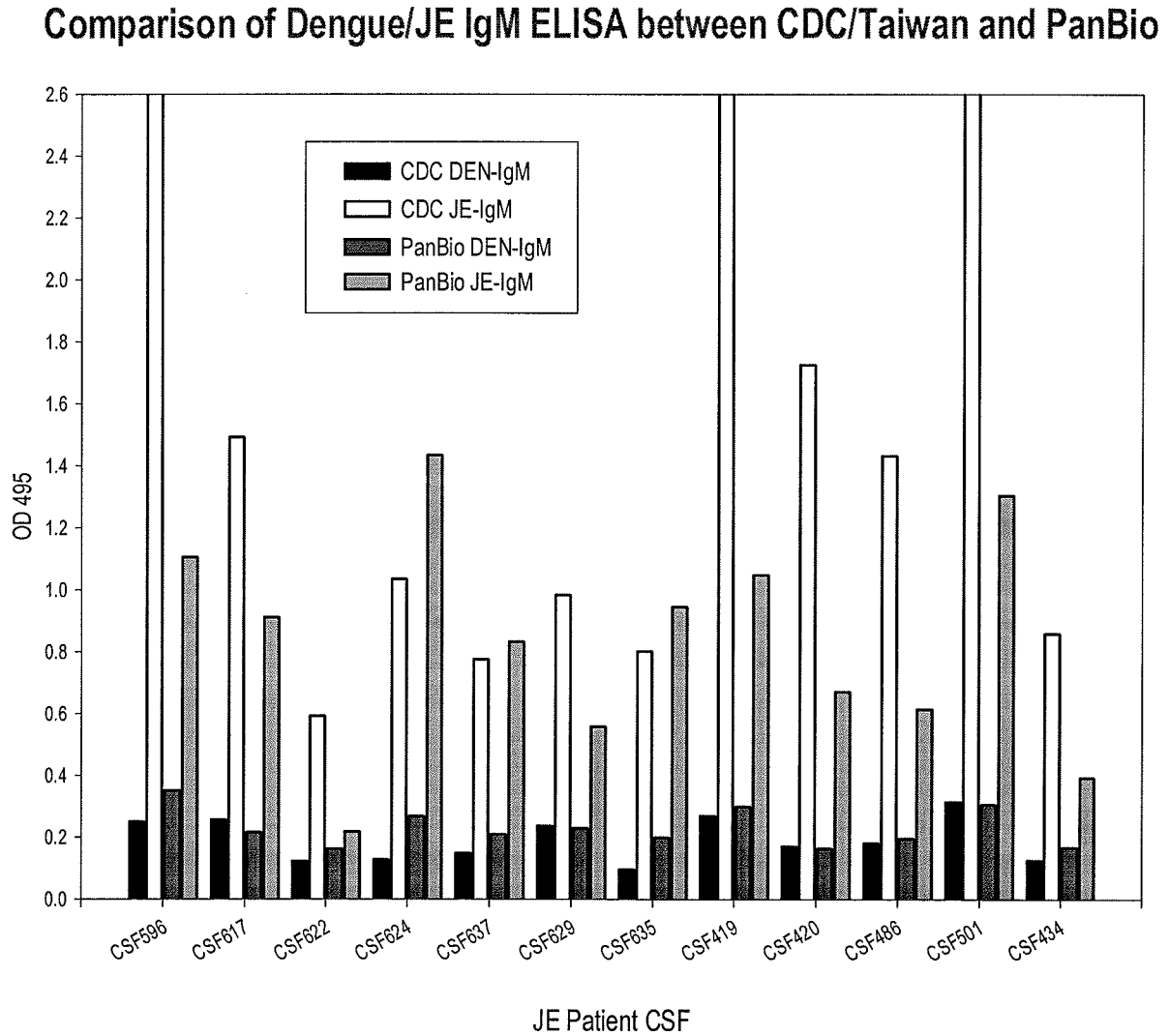
Differential diagnosis of flavivirus infection: Cross-reactivity between IgM and IgG antibodies from patients infected with dengue, JE, or yellow fever viruses.

Cross-reactivity of Flavivirus-specific IgM and IgG antibodies



圖二、

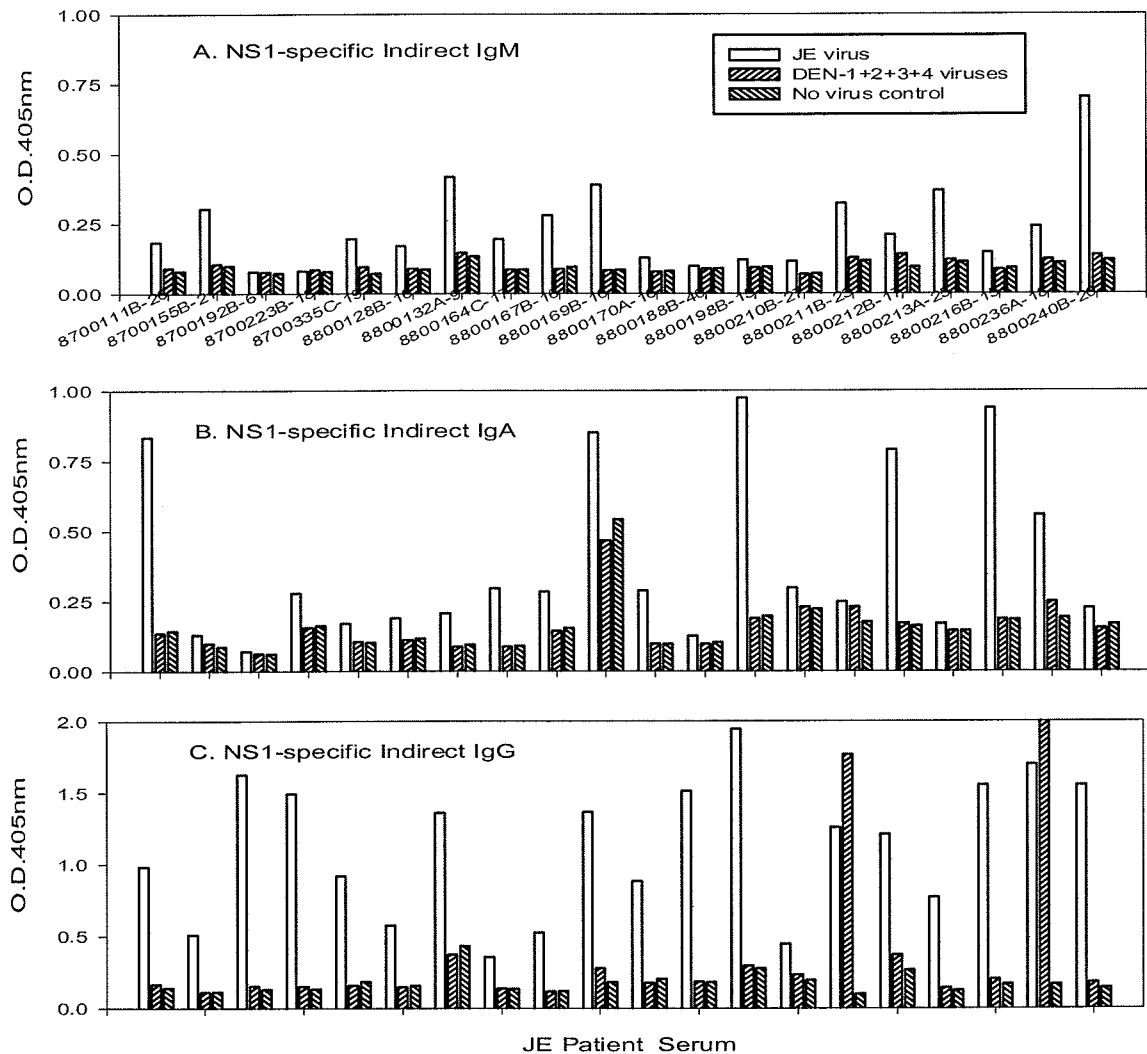
Comparison of Dengue and JE Envelope-specific Capture IgM ELISA between CDC/Taiwan and commercial kit (PanBio).



900613

圖三、

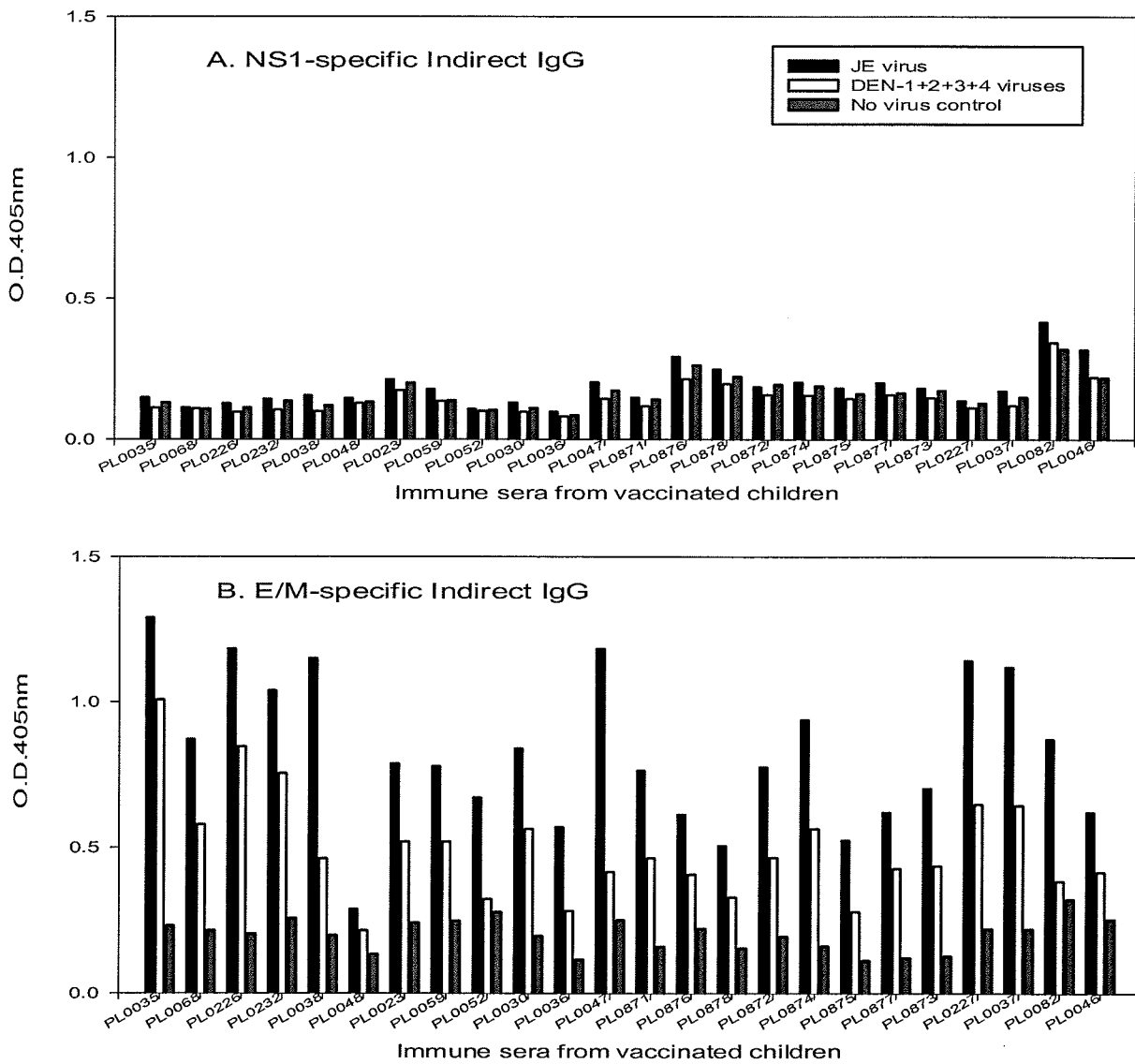
NS1-specific IgM, IgA and IgG antibodies in convalescent sera of JE patients. ELISA was performed with twenty sera of JE patients to measure the NS1-specific IgM (A), IgA (B), and IgG (C) antibodies as described in Materials and Methods. Dengue virus NS1 antigen was a mixture of culture supernatants harvested from DEN-1, DEN-2, DEN-3 or DEN-4 virus-infected Vero cells. The suffix of identification number of JE patients indicated the days after the onset of illness. NS1, nonstructural protein 1., JE, Japanese encephalitis., ELISA, enzyme-linked immunosorbent assays., DEN, dengue virus serotype., O.D., optical density.



圖四、

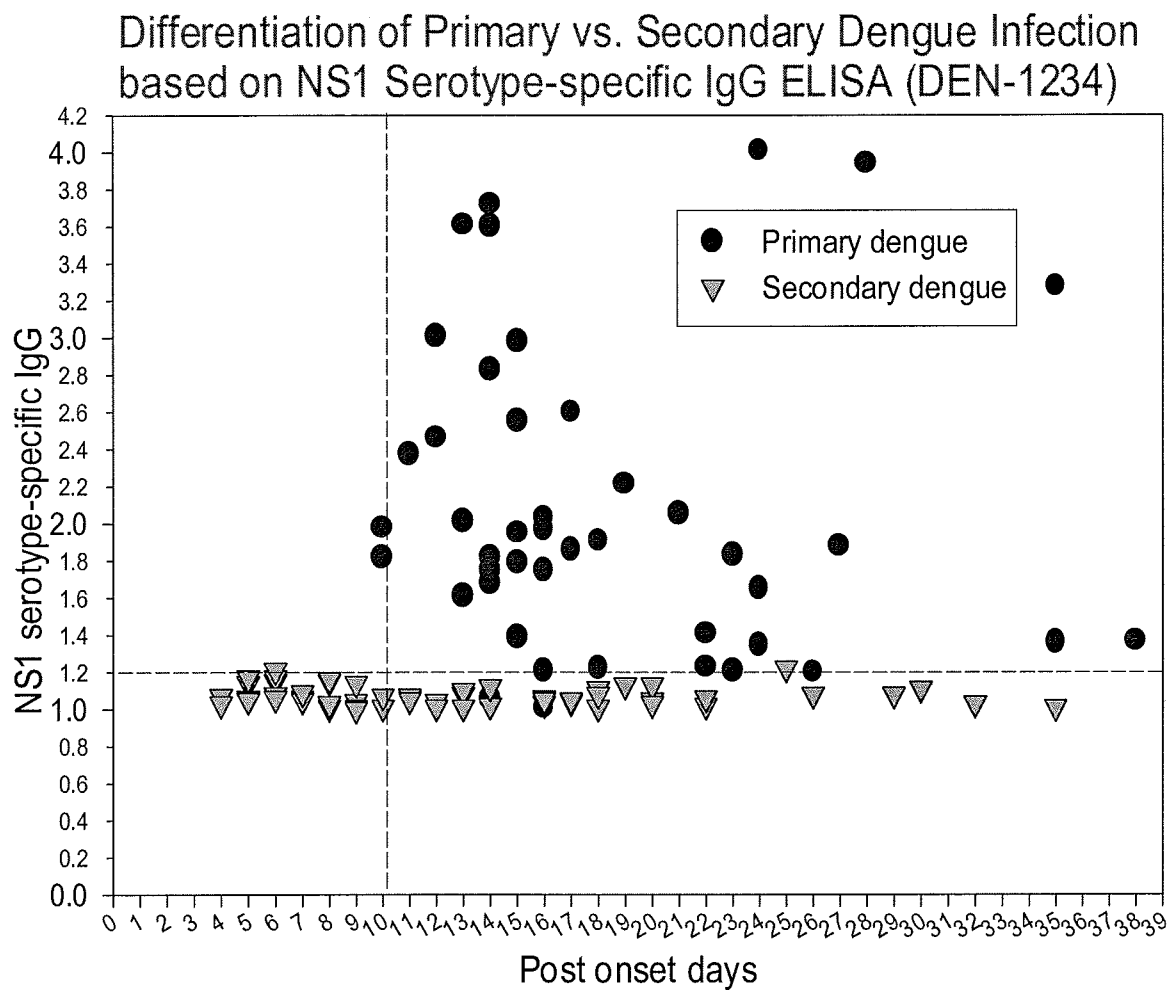
Differentiation of infection from vaccination using NS1-specific IgG ELISA. Immune sera from twenty-four children vaccinated with inactivated JE vaccine were collected three months after the fourth dose and analyzed for JE virus-specific antibodies. (A) Indirect ELISA was used to measure the NS1-specific IgG responses, (B) Indirect ELISA was used to measure the E/M-specific IgG responses. For further details, see Materials and Methods. E, envelope protein., M, membrane protein.

Fig. 3



圖五、

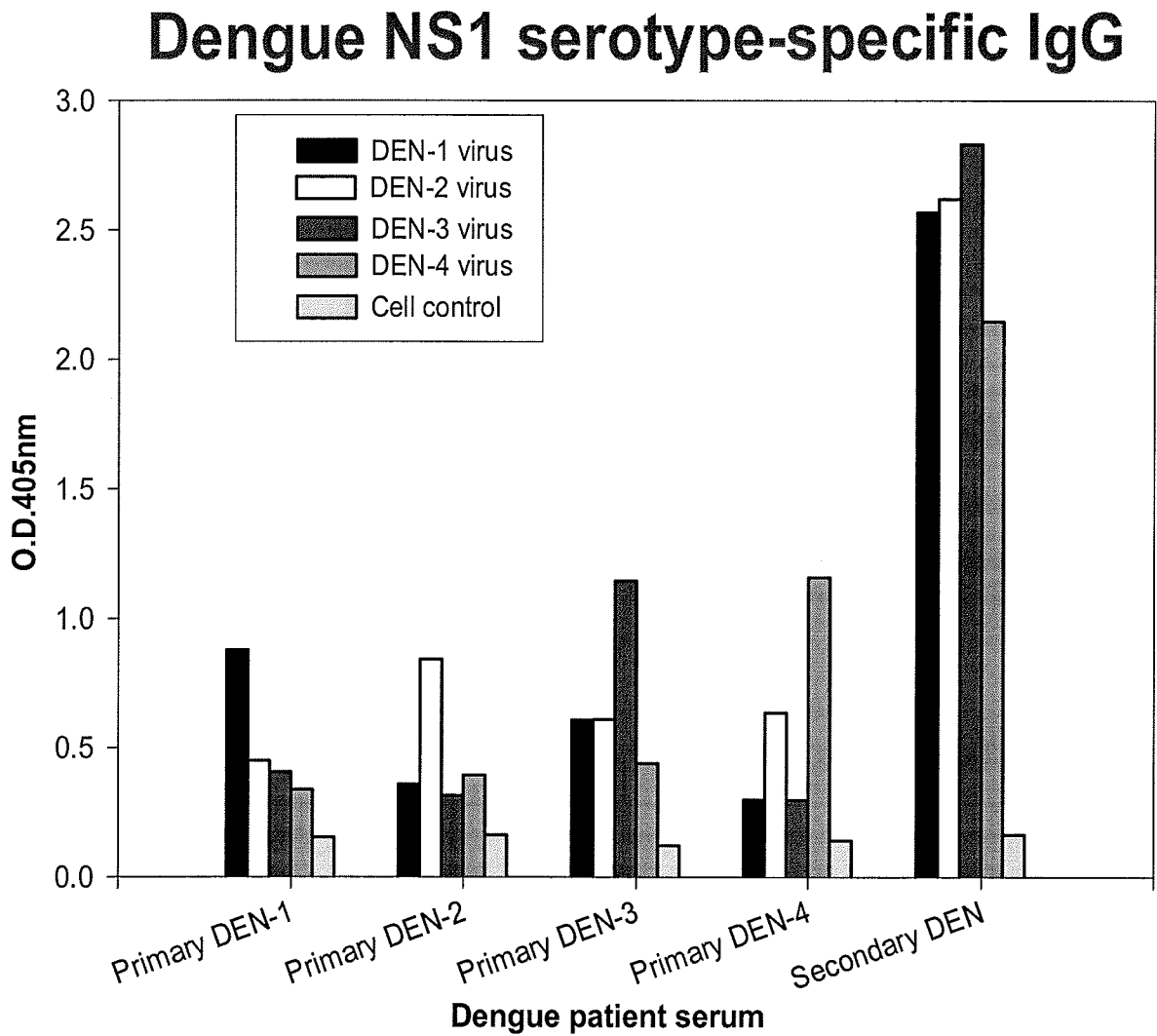
Differentiation of primary and secondary dengue infections using NS1-specific IgG ELISA-Kinetics study.



90112Z

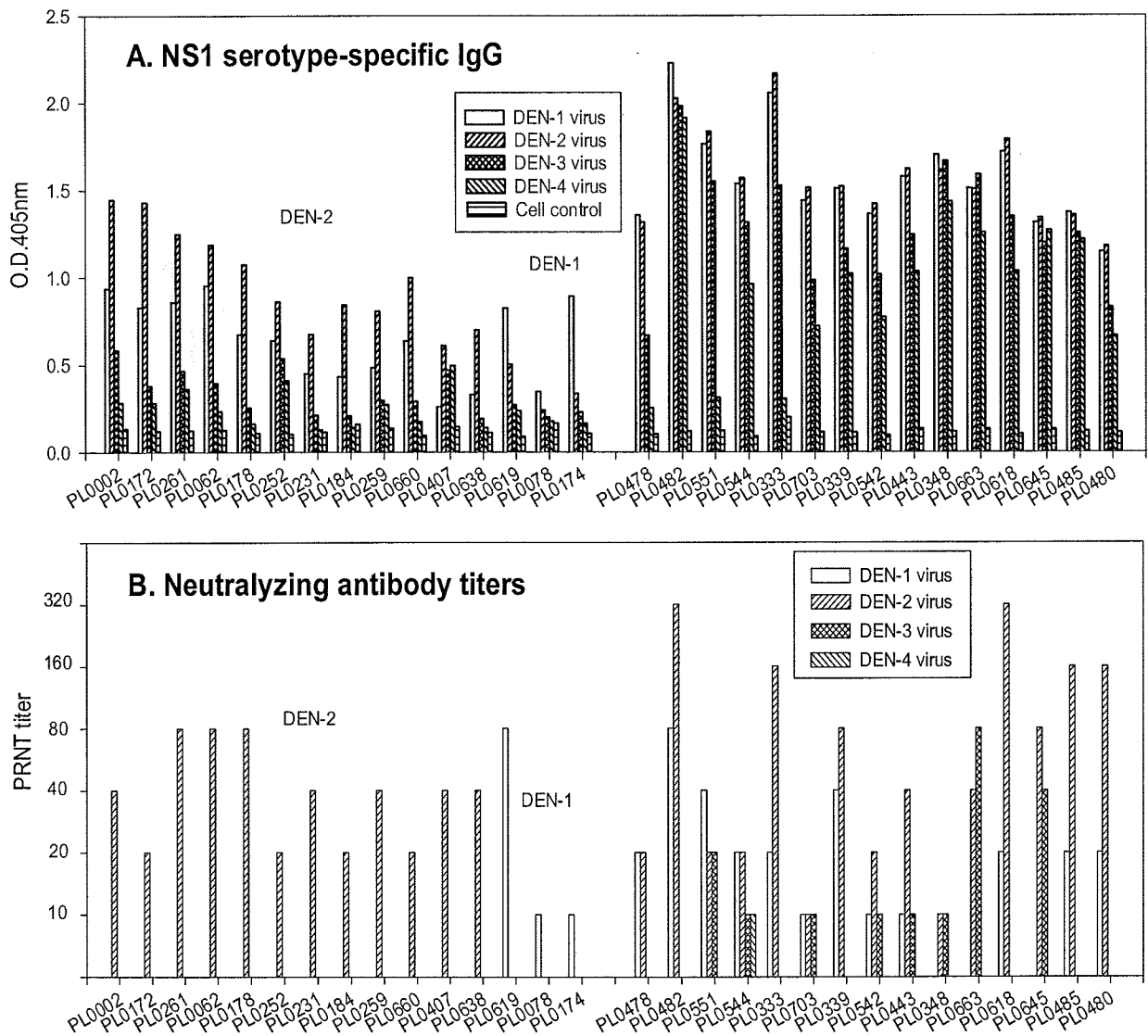
圖六、

Serotype analysis of dengue positive sera based on NS1 serotype-specific IgG ELISA. Serum samples from primary DEN-1, DEN-2, DEN-3, and DEN-4 infected individuals were analyzed and representative data were shown.



圖七、

Serotype analysis of dengue positive sera from residents of Liuchiu Hsiang, Pingtung County born between 1944 and 1980. Serum samples from 50 randomly selected dengue positive individuals were analyzed and representative data demonstrating primary and secondary/multiple infections were shown. (A) NS1 serotype-specific IgG ELISA were used to analyze the NS1-specific IgG antibodies to various dengue serotypes. (B) PRNT was used to measure neutralizing antibody titers to various dengue serotypes.



四、表

表一、

Age-dependent seroprevalence of dengue infection in Liuchiu Hsiang, Pingtung County analyzed by NS1-specific IgG ELISA

Age groups ^a (Year of Birth)	Liuchiu Hsiang, Pingtung County (Southern Taiwan)	
	Case number	Dengue NS1-IgG positive individuals (%)
Before 1931	47	44 (93.6%)
1931	11	10 (90.9%)
1932-1941	96	84 (87.5%)
1942-1943	20	18 (90.0%)
1944-1980	342	250 (73.1%)
1981	18	3 (16.7%)
1982-1986	525	129 (24.6%)
1987-1988	100	14 (14.0%)
1989-1998	158	0 (0.0%)
Total	1,317	552 (41.9%)

Age groups were arbitrarily assigned in order to fit the recorded dengue epidemics.

五、附錄

附件

行政院衛生署疾病管制局 90 年 10 月

台南市登革熱確定病例 (83-89 年) 回顧性調查研究問卷

訪視日期：_____年_____月_____日

訪視者：_____

一、個案背景資料：

姓名：_____ 編號：_____ 性別：_____

出生日期：_____年_____月_____日

住址：_____市_____區_____里_____街(路)

_____段_____巷_____弄_____號_____樓

電話：(_____)_____

工作地：_____市_____區_____里_____街(路)

_____段_____巷_____弄_____號_____樓

二、居住地：您曾住過哪些地方 (台南市以外地區)

1. _____年~_____年，_____縣市_____鄉鎮區市區_____里

2. _____年~_____年，_____縣市_____鄉鎮區市區_____里

三、登革熱感染：您曾感染過幾次登革熱 (例如民國 4-5 年、16 年、20 年、31-32 年、76 年、83 年、84 年、86 年、87-88 年、89 年等)？

一次 二次 三次 四次 不確定

第一次感染時間：_____年_____月，感染地點：_____縣市(或國外地區)

第二次感染時間：_____年_____月，感染地點：_____縣市(或國外地區)

第三次感染時間：_____年_____月，感染地點：_____縣市(或國外地區)

四：您出現登革熱症狀前後，家人及鄰居、親戚朋友是否也有和您相似症狀？

否 是