

計畫編號：DOH98-DC-2009

行政院衛生署疾病管制局九十八年度科技研究發展計畫

病媒性傳染病快速診斷試劑之開發與應用

研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗組

計畫主持人：舒佩芸

研究人員：黃智雄、張淑芬、蘇千玲、余勝凱、楊智翔、徐同慶、林建州

執行期間：98年1月1日至98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)
英文摘要	(4)
二、本文	
(1) 前言	(5-6)
(2) 材料與方法	(7-12)
(3) 結果	(13-14)
(4) 討論	(15-16)
(5) 結論與建議	(17)
(6) 計畫重要研究成果及具體建議	(18)
(7) 參考文獻	(19-21)
三、表次	(22-29)
四、圖次	(30-32)
	共 (32) 頁

中文摘要

由於國際間交通往來日益頻繁及全球氣候暖化的影響，使得病媒性傳染病在全世界流行的範圍逐漸擴大，病例數也快速增加。為因應未來傳染病之侵入及流行，我們應建立一套完整的病媒性傳染病防疫體系，包括完善的傳染病及病媒監測系統、快速靈敏的檢驗技術與有效的防治策略等，以有效的降低傳染病流行，解決公共衛生上的危機。本計畫的主要目標在開發以免疫色層分析法（Immunochromatographic test; 簡稱 ICT）為基礎的病媒性傳染病快速抗原及抗體檢測試劑，以期迅速的偵測新興及再浮現傳染病的侵入及流行。我們的目標分為三個部分進行，第一部分以開發黃病毒（Flaviviruses）之抗原及抗體診斷系統為主，特別是登革熱；第二部分以開發阿爾發病毒（Alphavirus）之抗原及抗體診斷系統為主，特別是屈公病；第三部分以立克次體傳染病為主，如恙蟲病與地方性斑疹傷寒快速抗原及抗體檢測試劑。98年之重點在開發登革病毒 NS1 抗原及屈公病毒抗原快速檢測試劑，已完成登革病毒 NS1 及屈公病毒單株抗體之篩選及製備。目前正利用這些單株抗體組裝登革病毒 NS1 抗原及屈公病毒抗原酵素免疫分析試劑及快速診斷試劑。

關鍵詞：登革熱、屈公病、酵素免疫分析法、免疫色層分析法

英文摘要

As the international close commercial link, modern transportation, and the impact of global warming, vector-borne infectious diseases have gradually invaded to new geographic territories and the number of cases has also increased rapidly. Rapid and accurate diagnosis of arbovirus infection contributes greatly to disease surveillance, patient management in hospitals and control measures in public health. The main objective of the project is to develop immunochromatographic test (referred to as ICT) for detection of vector-borne viral and rickettsial infections. Its objectives and goals are divided into three categories which are: (1) development of a flavivirus rapid diagnostic systems, dengue fever in particular; (2) development of an alphavirus rapid diagnostic systems, chikungunya fever in particular; and (3) development of a rickettsioses rapid diagnostic systems, scrub typhus in particular. In this study, we reported the production of monoclonal antibodies against dengue virus NS1 antigen and chikungunya virus antigen for the development of rapid diagnostic test for detection of dengue virus and chikungunya virus infections.

Keyword: dengue fever, chikungunya fever, ELISA,
immunochromatographic test, ICT

前言

由於國際間交通往來日益頻繁及溫室效應影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加，發生頻率日益頻繁與嚴重，其中又以蚊蟲（mosquito）及壁蝨（Tick）所媒介的節肢動物媒介病毒（arthropod-borne viruses, Arbovirus）傳染病最重要(1-6)。目前歸類為節肢動物媒介的病毒有 500 多種，其中超過 100 種可感染人類，主要為黃病毒（flaviviruses）及阿爾發病毒（alphaviruses）。由黃病毒引起的主要疾病為登革熱（dengue fever）、黃熱病（yellow fever）、日本腦炎（Japanese encephalitis）、西尼羅河熱/腦炎（West Nile fever/encephalitis）、聖路易腦炎（St. Louis encephalitis）、及壁蝨腦炎（Tick-Borne Encephalitis Virus, TBEV）等；由阿爾發病毒引起的主要疾病為屈公病（Chikungunya）、羅斯河病毒病（Ross River virus disease）、東方馬腦炎（Eastern Equine encephalitis, EEE）、西方馬腦炎（Western Equine encephalitis, WEE）及委內瑞拉馬腦炎（Venezuelan equine encephalitis, VEE）等。

由於節肢動物病毒，特別是登革及屈公病毒所引起的登革熱及屈公病，是台灣地區最重要的境外移入病媒性傳染病（7-10）。登革熱每年約有五千萬至一億人受感染，五十萬人因登革出血熱住院，25,000 人因而死亡。主要流行於熱帶及亞熱帶地區，尤其是與台灣經貿、旅遊關係密切的東南亞國家，包括越南、印尼、泰國及菲律賓等，都是登革熱盛行的地區。屈公病為近年來在非洲及亞洲造成許多疫情的再浮現的病媒性傳染病。屈公病自 2004-2005 在非洲及西印度洋島嶼開始爆發疫情後，病毒已由印度傳播至東南亞許多國家並造成流行。登革及屈公病毒主要是由埃及斑蚊所傳播，其次是

白線斑蚊。埃及斑蚊在台灣分佈於北迴歸線以南的各縣市，白線斑蚊則分佈於全台灣。目前在印度及東南亞國家流行的屈公病毒株很有可能已變異為更適合於白線斑蚊體內繁殖並藉由其傳播的病毒株，這些病毒株的出現有可能對台灣造成更嚴重的威脅及更廣泛的流行（11-14）。

登革熱與屈公病並非台灣本土性的流行疾病，而登革熱的流行主要是由境外移入病毒入侵，近而造成本土的疫情（15）。由於近年來境外移入登革熱及屈公病病例都有持續增加的趨勢，因此發展快速又靈敏的傳染病診斷與監測系統，以期早期診斷及防治，是實驗室長期努力的目標之一。本計畫開發以免疫色層分析法為基礎的快速檢測試劑，其最大的優點是不需特殊的儀器，操作簡便，能迅速得到檢測結果。有助於及早檢測出傳染病種類，對病人實施正確的醫療照顧，及早啟動緊急防治措施，對傳染病的防治工作有極大的幫助。98年主要發展的項目包括登革病毒 NS1 抗原及屈公病毒抗原快速檢測試劑。

材料與方法

本計畫之實施方法主要分為六部分：(一) 血液檢體、病毒株之收集；(二) 抗原之純化與分析；(三) 融合瘤之製備；(四) 單株抗體之篩選；(五) 抗體之製備、純化與分析；(六) ICT 快速檢測試劑之製備與分析，茲將實驗方法分述如下：

(一) **血液檢體、病毒株之收集**：血液檢體來源為通報自疾病管制局之各種黃病毒及阿爾發病毒傳染病之確定病例血清。病毒株為疾病管制局歷年來以細胞培養方法分離所得者。病人血清檢體包括急性期(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)之檢體。病人檢體收集後，將進行病原分離、血清學及分子生物學之實驗室診斷，以確認感染源。不同期血清，將用以分析病人血清中抗原的含量或對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。經實驗室確診為陽性反應之檢體將加以分裝，儲存於 -80°C 冷凍櫃長久保存。

(二) **抗原之純化與分析**：

(1) **登革病毒 NS1 抗原之純化與分析**：登革病毒非結構蛋白 1 (nonstructural protein 1; 簡稱 NS1 抗原)是一個分子量為 46-50 kDa 的 glycoprotein。被登革病毒感染的哺乳動物細胞會分泌 NS1 抗原至細胞外，而在受登革病毒感染的病人急性期血清中也可測到 NS1 抗原。NS1 抗原在血清中的濃度可由 1 ng/ml- 20 $\mu\text{g/ml}$ ，是目前所知最好的登革病毒感染之蛋白質標的。將黃病毒屬特異性抗 NS1 蛋白之單株抗體 (D0001)，利用 protein A 親和性層析管柱，純化出單株抗體，再將此單株抗體之糖分子氧化後與 Affi-Gel 連結，製備成 NS1 抗體免疫親和性層析管柱備用。NS1 抗原經前處理：NS1 抗原

- (2) 屈公病毒之純化：使用 PEG virus precipitation kit (BioVision, Mountain View, CA) 純化屈公病毒。
- (3) 基因重組蛋白質之製備與純化：由於大腸桿菌(*Escherichia coli*) 可提供便宜、快速且能大量生產蛋白質的多種優點 (Gold, 1990)，本計畫採用大腸桿菌(*Escherichia coli*) 表現重組蛋白質。首先利用 RT-PCR 或 PCR 得到蛋白質的 DNA 片段。將此 DNA 片段選殖至 pET 表現系統(Novagen)，產生 N 端 (或 C 端) 為 His-tag 的全長重組蛋白質。利用 Anti- His-tag mAb (正對照組)、Anti-NS1 mAb、Anti-CHIKV mAb 等，決定重組蛋白質是否帶特異的抗原決定位置 (Western blot, Immunoprecipitation)。再大量表現、純化，並利用 ELISA 的方法評估其發展 ELISA 及 ICT 檢驗試劑之可能性。DENV NS1 及 CHINKV E1/E2 蛋白質以 PCR 及引子 (表一) 放大 DENV NS1 及 CHINKV E1/E2 蛋白質的全長及部分 DNA 片段，並於 5'端與 3'端加上 Bam HI 及 Sal I 限制酶切位，將此 DNA 片段利

(三) 融合瘤之製備：將五至六週齡之 BALB/c 雌性小鼠經由腹腔內或皮下注射約 50 μg 的登革病毒 NS1 抗原或 10^6 pfu 去活性、純化之屈公病毒，加等體積之 Freund's complete adjuvant (Sigma)。分別間隔三週後，使用相同抗原，再追加免疫注射二次，但改用 Freund's incomplete adjuvant。第四次免疫時，採用靜脈注射，使用不加佐劑

- (四) **單株抗體之篩選**：以 ELISA 方法檢測單株抗體的效價及專一性。ELISA 檢測系統的專一性及靈敏度皆高，且與動物抗體中和效價測定法相比較，兩者結果相符合，故採用 ELISA 方法作為快速篩選抗體之檢測系統。首先將純化出之 NS1 抗原 (affinity column purified 或重組蛋白抗原) 用 pH9.6 carbonate buffer 吸附在 96 microwell immunoassay strips，4°C 隔夜後，以 1% BSA 進行 Block，37°C 反應一小時，清洗 3 次後，加入以 PBST-20 適當稀釋之待測檢體及陽性、陰性控制組，放置於 37°C 保溫箱中震盪半小時。清洗 3 次，再加入山羊抗小鼠 IgG-alkaline phosphatase 二次抗體 (Goat anti-mouse IgG AP) 作用於 37°C 保溫箱中震盪半小時，清洗 3 次。最後，在每孔中加入 100ul pNPP 呈色劑，放置於室溫暗處，呈色反應約一小時，以 ELISA 吸光儀讀取波長 405nm 及 620nm 吸收光。
- (五) **抗體之製備、純化與分析**：單株抗體以 BALB/c 小白鼠之腹水方式生產，再以 protein A sepharose 4B Fast Flow 親和力管柱(Pharmacia Biotech)純化。
- (六) **ICT 快速檢測試劑之製備與分析**：
- (1) 原理：快速免疫色層分析法檢測試劑主要由幾種元件組成，包括樣品墊 (sample pad)、結合墊 (Particle conjugate pad)、薄膜試紙 (Nitrocellulose membrane)、吸收墊 (Absorbent pad) 與底卡。使用噴印設備將測試線 (Test line) 與控制線 (Control line) 塗佈於薄膜試紙上。通常先由樣品墊與結合墊緊密貼合，再與薄膜試紙接合，加上吸收墊，各種元件組裝後，切割至適合尺寸後即完成。其測試原理與一般免疫分析法相

- (2) 樣品墊：依檢體種類選擇樣品墊材料，其目的在控制檢體流速，使檢體均勻分佈。
- (3) 結合墊：可使用 BioDot 出產之 AirJet，將 colloidal gold、monodisperse latex 或 paramagnetic particle conjugates 噴灑於上。可根據檢測方法，將抗原或抗體與上述材料接合，依 conjugates 種類選擇結合墊材料。Conjugate solutions 通常含有高濃度的 sugars and/or polymers 作為安定劑。
- (4) 薄膜試紙：依實驗測試原理，可使用 BioDot 出產之 Front line 或 BioJet 將抗原或抗體塗佈於 Nitrocellulose membrane 之測試線（Test line）與控制線（Control line）位置。
- (5) 樣品墊、結合墊及薄膜試紙通常需要經過前處理及後處理步驟使其親水性增加、使塗佈其上的蛋白質及薄膜的結構穩定性增加，並防止 non-specific binding。可使用 AirJet Quanti 或經浸泡及高效能烘乾步驟達成。

結果

- (一) **登革病毒 NS1 單株抗體之篩選**:表二至表五為以 affinity-column purified 登革病毒 NS1 抗原，免疫 Balb/c 小鼠，所得到的單株抗體融合瘤細胞株。不同的血清型(一至四)NS1 抗原皆分別進行 2-3 次融合瘤實驗，從 20-30 的 96 孔盤之融合瘤細胞中用 ELISA 篩選出陽性細胞株。篩選出之陽性融合瘤細胞再用 limiting dilution 方法稀釋，重新在 96 孔盤中培養(每孔中最多只含有一個細胞)，待其生長成群落後，再篩選出抗體效價較高者。表中所示即為單株抗體融合瘤所分泌之抗體。由表中可見有些融合瘤細胞在單株化過程中失去分泌 NS1 抗體的能力。表二為以 DENV-1 NS1 抗原免疫，所得到的單株抗體融合瘤，除了一株(N22180)可分泌 DENV serotype cross reactive anti-NS1 mAb，其餘大部分細胞已失去分泌 NS1 抗體的活性。表三為以 DENV-2 NS1 抗原免疫，所得到的單株抗體融合瘤，其中三株(8F7、9H5、10H1)可分泌 DENV-2-specific anti-NS1 mAb。其他大部分細胞則可分泌 DENV serotype cross reactive anti-NS1 mAb。表四為以 DENV-3 NS1 抗原免疫，所得到的單株抗體融合瘤，雖然大部分細胞已失去分泌 NS1 抗體的活性。但其中一株(10B1)可分泌 DENV-3-specific anti-NS1 mAb。其他兩株細胞則可分泌 DENV serotype cross reactive anti-NS1 mAb。表五為以 DENV-4 NS1 抗原免疫，所得到的單株抗體融合瘤，其中兩株(9B5、9D8)可分泌 DENV-4-specific anti-NS1 mAb。一株細胞可分泌 DENV serotype cross reactive anti-NS1 mAb。其他細胞則已失去分泌 NS1 抗體的活性。
- (二) **登革病毒 DENV-3 NS1 抗原 ELISA 之建立與專一性之測試**:篩選出之單株抗體融合瘤細胞注射入小鼠腹腔中，以生產高濃度之單株抗體腹水(ascites)。單株抗體腹水以 protein A 親和性層析管柱，純化

(三) 屈公病毒單株抗體之篩選：表七為以 PEG-purified 屈公病毒抗原，免疫 Balb/c 小鼠，所得到的單株抗體融合瘤細胞株。其中一株 (15-7C) 對 chikungunya virus E/C/S African genotype 具有較高的靈敏度，另外三株 (10-8G、5-7B、4D11) 對 chikungunya virus Asian genotype 具有較高的靈敏度。

討論

登革熱與屈公病並非台灣本土性的流行疾病，而登革熱的流行主要是由境外移入病毒入侵，近而造成本土的疫情。由於近年來境外移入登革熱及屈公病病例都有持續增加的趨勢，因此發展快速又靈敏的登革熱及屈公病診斷與監測系統，以期早期診斷及防治，是實驗室努力的目標之一。目前疾管局登革熱檢驗包括四個項目：病毒分離、病毒核酸分子檢測、NS1 抗原檢測及 IgM/IgG 抗體檢測。NS1 抗原檢測於 2008 年六月開始在機場發燒篩檢實施，所使用的試劑是市售最靈敏的 Bio-Rad NS1 Ag rapid test stripe (ICT 型式)。由於機場的發燒篩檢站可以檢測出處於急性期的、發燒的登革熱及屈公病境外移入病例，所以在機場使用 NS1 Ag ICT test 可以減少臨床與實驗室診斷的時間差距，一旦登革熱病例確定後，可即時啟動防治措施，有效的防止境外移入登革病毒造成本土的傳播及流行。未來若開發出屈公病快速檢驗試劑，則可同時在機場檢驗登革熱及屈公病境外移入病例，更能有效的防止 arbovirus 的侵入及流行。

Bio-Rad NS1 rapid test 具有很高的專一性 (>99%)，對四型登革熱初次感染急性期血清之靈敏度分別為 94.9% (75/79)、58.8% (20/34)、75.8% (25/33) 及 84.6% (11/13)。對四型登革熱二次或多次感染急性期血清之靈敏度分別為 58.3% (7/12)、31.6% (6/19)、31.6% (6/19) 及 50.0% (6/12)。因此對 DENV-2 初次感染及四型登革熱繼發感染患者血清之靈敏度較差，均 <60.0%。因此該試劑之靈敏度仍有許多可以改善的空間。表八為分析 170 個登革熱確定病例，RT-PCR、NS1 抗原及 IgM/IgG 檢測的結果，其中 1.9% (3/170) 為 PCR(-)、IgM/IgG (-)、NS1 Ag (+); 18.9% (32/170) 為 PCR(-)、IgM/IgG (+)、NS1 Ag (+); 這些病例可由 NS1 Ag test

的陽性結果，直接判定為確定病例。可見 NS1 Ag test 除了使用方便，能快速獲得檢驗結果外，確實可增加登革熱急性期血清檢驗的靈敏度。

研發自製的 NS1 抗原檢測試劑除了可提升急性期血清檢驗的靈敏度外，還有許多優點，包括可降低檢驗價格、檢驗試劑的來源也不虞匱乏。本研究目前已獲得多株具有高親和性的單株抗體，正進行 ELISA 及 ICT 試劑的組裝和測試。良好的檢驗試劑，需經由不斷的改良與試驗，以增加檢驗的專一性及靈敏度，並同時能檢測出不同血清型別、基因型別、不同地理區域之病毒株，使之更可靠的應用於登革熱例行性檢驗。在屈公病毒檢測部分，本研究也已獲得一些具有潛力的單株抗體，目前仍持續在進行融合瘤實驗，希望篩選出具有更高親和力的單株抗體，以增加試劑的靈敏度，以期未來可與登革病毒 NS1 抗原同時應用於機場發燒篩檢及登革熱及屈公病之實驗室例行性檢驗。

結論與建議

由於製造高靈敏度及高專一性之快速診斷試劑，需要有良好的、高親和力之單株抗體。欲獲得好的單株抗體，則首先需有高純度的抗原用以免疫小鼠、再經融合瘤實驗、融合瘤篩選及單株化、單株抗體之純化、試劑之組裝等。又因單株抗體的優劣決定試劑的靈敏度與專一性，所以好的檢驗試劑應有足夠的材料（包括單株抗體）供試劑的組裝與測試，進行最佳化。在病毒株不斷的演化，新的病毒株不斷的出現下，需不斷提升診斷試劑的靈敏度。由於研發過程長，需時間與有經驗的人才，建議中心要有長期的研發策略，以因應未來的發展。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

開發登革病毒 NS1 抗原及屈公病毒抗原快速檢測試劑，已完成登革病毒 NS1 及屈公病毒單株抗體之篩選及製備。目前正利用這些單株抗體組裝登革病毒 NS1 抗原及屈公病毒抗原酵素免疫分析套組及快速檢測試劑。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

加強衛教宣導、實施病人自主管理、鼓勵醫師通報等防疫措施可及早發現病毒血症期的發燒患者，減少境外移入病毒的引進及本土擴散。對於境外移入的無症狀、無發燒之空窗期患者，因無法得知其感染，無法進行及時篩檢，更需要後續的監測與通報系統配合。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

登革熱和屈公病毒正逐漸在亞洲地區與登革熱共同流行，須加強監測與鑑別診斷，未來應加強機場發燒篩檢監測，並配合實驗室為基礎的檢驗系統，有系統的進行各種病媒性病毒的監測、檢驗、與流行病學研究。未來將使用 ICT 等為基礎的快速檢驗試劑，在機場進行 real time 檢驗，並考慮在醫療院所使用快速檢驗試劑，及早檢驗出確定病例。

References

1. Gubler DJ, 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, 1–22.
2. Gibbons RV, Vaughn DW, 2002. Dengue: an escalating problem. *BMJ* 324: 1563-1566.
3. Gubler DJ, 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480–496.
4. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C, 2009. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology* 25;393:183-97.
5. Powers AM, Logue CH, 2007. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol* 88: 2363-77.
6. Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M, 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* 7:319-27.
7. Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, et al., 2005. Fever screening at airports and imported dengue. *Emerg Infect Dis* 11:460-2.

8. Shu PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC, Chang MC, Hu HC, Huang JH, 2009. Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003-2007: geographic distribution and genotype shift. *Am J Trop Med Hyg* 80:1039-46.
9. Shu PY, Yang CF, Su CL, Chen CY, Chang SF, Tsai KH, Cheng CH, Huang JH, 2008. Two imported chikungunya cases, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 14:1326-7.
10. Huang JH, Yang CF, Su CL, Chang SF, Cheng CH, Yu SK, Lin CC, Shu PY, 2009. Imported chikungunya virus strains, Taiwan, 2006-2009. *Emerg Infect Dis* 15:1854-6.
11. Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, Fallacara F, et al., 2008. Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg Infect Dis* 14:852-4.
12. Pagès F, Peyrefitte CN, Mve MT, Jarjaval F, Brisse S, Iteaman I, et al., 2009. *Aedes albopictus* mosquito: the main vector of the 2007 Chikungunya outbreak in Gabon. *PLoS ONE* 4:e4691.
13. Santhosh SR, Dash PK, Parida MM, Khan M, Tiwari M, Lakshmana Rao PV, 2008. Comparative full genome analysis revealed E1: A226V shift in 2007 Indian Chikungunya virus isolates. *Virus Res* 135:36-41.

14. de Lamballerie X, Leroy E, Charrel RN, Ttsetsarkin K, Higgs S, Gould EA, 2008. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virology* 5:33.
15. Huang JH, Liao TL, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Kuo YC, Yang CF, Lin CC, Shu PY, 2007. Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005: a molecular epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 77(5):903-9.

Table 1. Primers used for PCR amplification and cloning of DENV nonstructural protein 1 gene sequences.

primer name	primer sequence	
Den1 NS1F	CGG <u>GAT CCG</u> GAT TCA GGA TGT GTA ATT AAT TGG	352 a.a
Den1 NS1R	GC <u>GTC GAC</u> CTA TGC AGA GAC CAT TGA CCT	
Den2 NS1F	CGG <u>GAT CCG</u> GAT AGT GGC TGC GTT GTG AGC	352 a.a
Den2 NS1R	GC <u>GTC GAC</u> CTA GGC TGT GAC CAA AGA GTT	
Den3 NS1F	CGG <u>GAT CCG</u> GAC ATG GGG TGT GTC ATA AAC	352 a.a
Den3 NS1R	GC <u>GTC GAC</u> CTA TGC TGA GGC TAG AGA CTT TAC	
Den4 NS1F	CGG <u>GAT CCG</u> GAC ATG GGT TGT GTG GCG TCA	352 a.a
Den4 NS1R	GC <u>GTC GAC</u> CTA GGC CGT CAC CTG TGA TTT GAC	
CHIKV E1_22F	CGG <u>GAT CCG</u> CCG AAC ACG GTG GGA GTA CCG	411 a.a
CHIKV E1_1244R	GC <u>GTC GAC</u> CTA ACC CGT GAT CTT CTG CAC CCA	
CHIKV E2_40F	CGG <u>GAT CCG</u> CCA TAC TTA GCT CAC TGT CCC G	353 a.a
CHIKV E2_1101R	GC <u>GTC GAC</u> CTA AGT CAT AGT AGG GTA CAG CTC A	
CHIKV E1_1F	CGG <u>GAT CCG</u> TAC GAA CAC GTA ACA GTG ATC C	439 a.a
CHIKV E1_1320R	GC <u>GTC GAC</u> TTA GTG CCT GCT GAA CGA CAC GCA	
CHIKV E2_1F	CGG <u>GAT CCG</u> AGC ACC AAG GAC AAC TTC AAT G	423 a.a
CHIKV E2_1269R	GC <u>GTC GAC</u> CTA CGC TTT AGC TGT TCT GAT GCA GC	

Table 2. Monoclonal antibodies obtained after immunization with affinity-column purified DENV-1 NS1 antigen.

mAb ID	Den1	Den2	Den3	Den4
N22180 (IgG1)	2.732	2.984	2.546	3.024
8F12	0.592	0.175	0.163	0.433
2H6	0.187	0.066	0.156	0.302
2H12	0.26	0.075	0.15	0.321
4H5	0.351	0.082	0.152	0.304
PC	2.376	2.917	2.507	2.841

Table 3. Monoclonal antibodies obtained after immunization with affinity-column purified DENV-2 NS1 antigen.

mAb ID	Den1	Den2	Den3	Den4
2D6	0.224	2.65	1.084	0.241
2A10	0.23	2.691	1.747	0.255
5C6	0.621	1.865	0.154	0.278
5C11	2.153	2.816	0.135	0.302
5C12	1.152	2.593	0.138	0.265
3F6	1.826	2.666	0.803	0.295
7D12	0.251	2.582	0.146	0.279
8A10	0.154	0.063	0.155	0.269
8F7	0.173	2.754	0.148	0.271
9A1	0.869	1.877	0.169	0.41
9H5	0.208	2.687	0.173	0.33
10H1	0.227	2.86	0.156	0.263
N22661 (IgG1)	0.197	2.5	1.245	0.642
PC	2.376	2.917	2.507	2.841

Table 4. Monoclonal antibodies obtained after immunization with affinity-column purified DENV-3 NS1 antigen.

mAb ID	Den1	Den2	Den3	Den4
10B1	ND	ND	2.668	ND
18E10	2.249	0.277	2.498	0.107
20D9	0.112	0.17	0.131	0.109
12D5	2.044	0.241	2.332	0.102
20C6	0.107	0.183	0.14	0.116
7E6	0.127	0.179	0.176	0.115
8E6	0.121	0.183	0.141	0.111
7H6	0.114	0.188	0.21	0.094
PC	2.376	2.917	2.507	2.841

Table 5. Monoclonal antibodies obtained after immunization with affinity-column purified DENV-4 NS1 antigen.

mAb ID	Den1	Den2	Den3	Den4
5C11	0.212	0.054	0.404	0.667
7A5	0.2	0.059	0.286	0.463
7A12	0.196	0.063	0.149	0.252
7C11	0.192	0.061	0.155	0.256
7H9	0.166	0.055	0.148	0.255
9B5	0.203	0.068	0.169	1.192
9D8	0.179	0.055	0.173	1.065
20F3	0.197	0.056	0.156	0.298
N10530 (IgG2a)	0.653	0.422	1.131	3.174
PC	2.376	2.917	2.507	2.841

Table 6. DENV-3-specific NS1 antigen ELISA.

Sample	OD
s2736	0.763
s2745	1.281
s2649	1.708
NC	0.118
NC	0.288
D1_PC	0.111
D2_PC	0.125
D3_HPC	1.960
D3_LPC	0.463
D4_PC	0.116
JE_PC	0.116
CHIK_PC	0.118

coating D3 NS1 mAb---Ag---NS1 mAb-Biotin---Strep-Avidin---pNPP

Table 7. Monoclonal antibodies obtained after immunization with PEG-purified Chikungunya virus antigen.

mAb ID	African-1	Asian-1
15-7C (IgG 2a k)	2.276	1.174
10-8G (IgG 2b k)	1.381	2.047
5-7B (IgG1 k)	0.463	1.015
4D11	0.564	1.417
10F6	0.219	0.411
PC (Anti-alpha)	0.742	0.694

Table 8. Identification of positive dengue cases by RT-PCR, NS1 Ag and IgM/IgG,

2008/06-2009/06

Test	Positive case	% positive
PCR(+)NS1(+)IgM/IgG(-)*	106	62.4%
PCR(+)NS1(-)IgM/IgG(-)*	29	17.1%
PCR(-)NS1(+)IgM/IgG(-)*	3	1.9%
PCR(-)NS1(+)IgM/IgG(+)*	20	11.8%
PCR(-)NS1(+)IgM/IgG(+) (8-10days)	12	7.1%
Total	170	

*Serum samples: 1-7 days after onset of fever

Figure 1. A plasmid containing the entire coding sequence for NS1 protein gene of DENV.

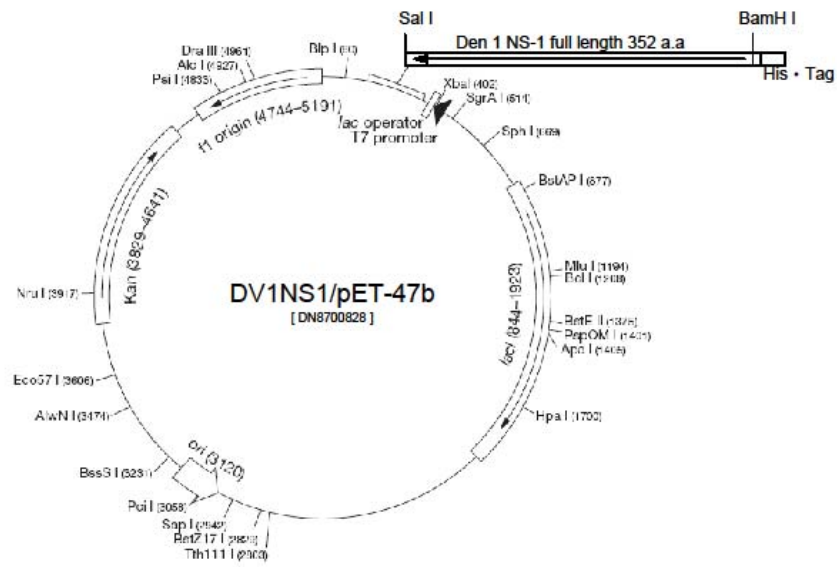


Figure 2. A plasmid containing the entire coding sequence for E2 protein gene of CHIKV.

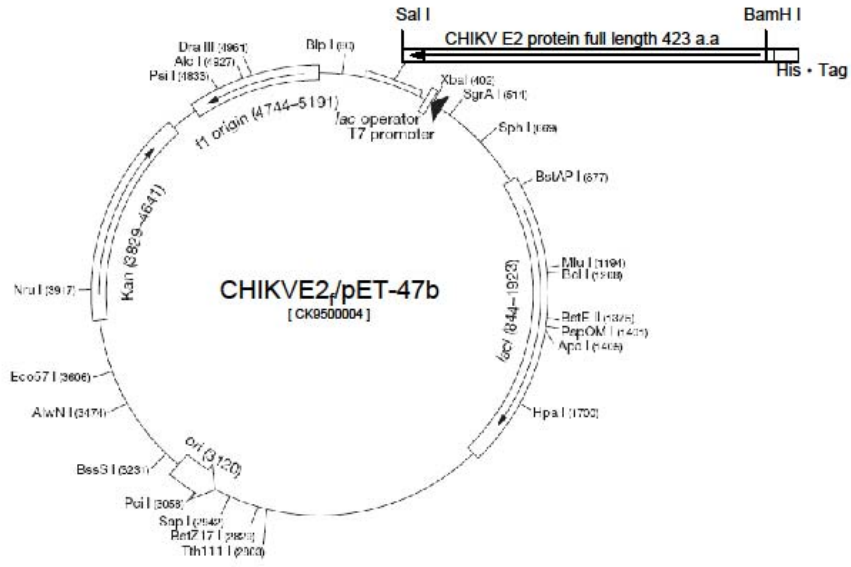


Figure 3. A plasmid containing the entire coding sequence for E1 protein gene of CHIKV.

