計畫編號：DOH94-DC-2034

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

登革熱危險因子之分析

研 究 報 告

執行機構：第五分局

計畫主持人：楊國禧分局長

研究人員：

執行期間：94 年 01 月 01 日至 94 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

摘要	2-3
前言	4-5
材料與方法	6-9
結果	10-13
結論與建議	14-15
參考文獻	16

摘要

登革熱病毒(Dengue virus)在分類上屬於節肢動物媒介病毒(Arthropod-borne viruses) 的黃色病毒科(Flaviviridae)的黃色病毒屬(Flavivirus)。目前登革熱病毒依血清抗原性可分為 1、2、3、4 血清型，均具有感染人類的致病力。登革熱病毒感染後可以造成發燒、肌肉痛、關節痛、頭痛、紅疹和白血球低下症狀。除了造成典型的登革熱(DF, dengue fever)之外，臨床上還可能是登革出血熱(DHF, dengue hemorrhagic fever)或登革休克症候群(DSS, dengue shock syndrome)，這會因為血管通透性增加而造成出血和休克。登革出血熱和登革休克症候群嚴重的病患則可能會致死。

本研究計畫將收集台灣南部登革熱病人檢體、病歷資料、及分析基因型(SNP, single nucleotide polymorphism)，以找出登革熱病人和健康人的特殊危險因子，以提供臨床醫師診斷登革熱疾病的重要參考依據。我們蒐集到 32 個登革熱病人檢體以及 80 個健康人檢體來做分析。結果顯示當人體中含有 TGF-β1 codon10/codon25 的基因型為 TG/CG，當被登革熱病毒感染時，會較容易產生登革熱的症狀，並且登革熱病人和健康組的年紀相比較，有顯著性的差異。

中文關鍵詞(至少三個)：登革熱、single nucleotide polymorphism、TGF-β1

Abstract:

Dengue viruses are an arthropod-borne viruses belonging to the Flaviridae family. So far, there are four serotypes found, such as DEN-1, DEN-2, DEN-3 and DEN-4 and all of them have the ability to infect human. It will cause fever, muscle pain, joint pain, headache, rash and leucopenia. In addition to the typical dengue fever, there are two clinical syndromes, dengue hemorrhage fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Those will result in hemorrhage and shock respectively due to the permeability of vascular increases and DHF and DSS are lethal disease.

We collect patient's samples, case history, and analyze the genotype of single nucleotide polymorphism of patients to look for the risk factors between the patients with dengue fever and healthy persons. These factors can assist clinical doctors to diagnose dengue disease. We collect 32 samples of dengue disease and 80 samples of healthy persons to analyze. The results show that persons infected by dengue virus contain the genotype TG/CG of TGF-β1 codon10/codon25 will have higher risk to become dengue fever and age is also a significant risk factor.

Keyword: dengue、single nucleotide polymorphism、TGF-β1

前言

登革熱病毒是由感染登革熱病毒的蚊子叮咬人類來傳染的，主要是Aedes aegypti 和Aedes albopictus。登革熱病毒感染在熱帶和亞熱帶的大部份區域中，是發病和致死的重要原因：主要是在和亞洲東南區和南區，美國中布和南部和加勒比海。有將近100個國家和區域有報導有地方性的登革熱病毒感染[1]。全世界登革熱詳細病例數則不清楚，一般是認為實際的感染數目比每年報導的數目多。登革熱病例估計每年有一億人。每年有250000-500000的DHF，致死率是1-5%。因此，登革熱是目前人類傳染性疾病中重要的疾病之一[23]。

2002 年登革熱再次席捲南台灣，主要為第 I 及第 II 血清型之登革病毒，疫情從六月起源於高雄縣市交界處的前鎮、鳳山地區，並逐漸擴散至屏東縣、台南市、澎湖縣等地，累計全年確定病例數達五千餘例，其中包括登革出血熱 242 例，並有 21 名患者不幸死亡，同年境外移入為 52 例。2003 年登革熱防治工作持續進行，主要為第 II 血清型之登革病毒，當年全台僅發生 86 例本土確定病例，且其中 51 例為 3 月 8 日以前在高高屏發生的病例，係 2002 年登革熱疫情之延續，同年境外移入則有 59 例。2004 年至今本土確定病例已有 28 例，主要為第 I 型登革病毒，而全臺境外移入則高達 59 例。

2002 年台灣疑似登革熱病患醫院通報數為 15221 件，5388 件為登革熱確定病例，其中高高屏地區就有 5198 件確定病例，可見得南台灣是防治登革熱的重點地區。也由於登革熱的傳播是藉由蚊子為媒介來散佈，再加上旅遊消費觀念的普及，國人出國觀光旅遊及洽公經商，常需要往返各地，在外地一不小心就很容易被病媒蚊叮咬而感染，再到另外一個國家或是返國後，如果又被病媒蚊叮咬，這病媒蚊又去叮咬其他人，就可能將登革熱病毒傳染到其他人身上，因此，登革熱在台灣現在已經成為一個很重要的公共衛生話題。

登革熱病毒感染通常是沒有症狀的。有症狀的的登革熱病毒感染可以引起兩種疾病，DF和DHF。DF是一種發燒疾病。感染後過了孵育期2-7天後，會突然發生發燒，伴隨著後眼窩痛或前額頭痛。發燒後則有肌肉痛和骨痛的症狀。有短暫的紅疹（這紅疹施加壓力後會變白），噁心，嘔吐，淋巴結病變和味覺失常。發燒後1-2天，除了手心和腳掌沒有之外，全身會出現像麻疹的紅疹。病人通常大約十天後會回復正常[4]。

有些感染登革熱病毒的病人的血漿會流到組織間隙，也有出血的表徵，這會有生命危險的症狀稱為DHF。DHF的孵育期和DF類似。開始時是發燒，不舒服，嘔吐，頭痛，厭食和咳嗽。2-5天後臨床上會快速的惡化和衰竭。在第二時期，病人會顯現出四肢發冷，身體軀幹溫暖，FLASHED FACE，心神不定，過敏，中腸胃道痛和可能會變成快速虛弱的脈搏，高血壓和脈搏壓範圍變窄。這種危險的現象會持續24-36小時，而且一旦恢復期開始，病人會很快就恢復正常。血液方面的表徵有Hct增加，血小板缺乏症，bleeding time和prothrombin time都延長。當微小管發生破損時，體溫會回復到正常。世界衛生組織（WHO）將DHF分為四個grade，從較不嚴重（grade 1）到嚴重（grade 4）。grade 3和grade 4時，因為流失的的血漿很多，會發生休克，所以又稱為登

革休克症候群（DSS）[5]。

先前有研究報告指出，出血性登革熱病人含有TGF-beta1的量比登革熱病人及正常人含量高[6]。這種含量不同的差異，根據其他研究報告指出，可能和TGF-beta 1的基因型有關係[78]。或者是和登革熱病毒感染後產生高量的病毒濃度，造成TGF-beta 1分泌增加，這部分需要做更進一步的探討，才能了解細胞激素增加的原因。

台灣南部是登革熱流行的地區，對於發生的疑似登革熱案件，其可能發生的疾病種類，包括症狀不明顯、登革熱、登革出血熱或登革熱休克症候群及其他疾病，尚未有統計分析其各自的專一性生物指標。本計畫將致力於分析上述幾種症狀在南台灣個案中所佔的比例做統計分析，並且進一步分析這幾種症狀的臨床及分析病人基因型(SNP)變異以及病毒含量與症狀嚴重程度的相關性，找出具有專一性的生物指標，以提供臨床醫師診斷的依據和參考。

材料與方法

研究對象:

2004 年至 2005 年南台灣高高屏地區醫療院所和擴大疫調送驗疾病管制局之登革熱病患收集 32 人以及健康人 80 人做分析。

1. 檢體和資料的收集與分類:

參考世界衛生組織所公佈的登革熱判定標準，並收集病人的血清檢體且保存在-80°C的冷凍庫中，依據醫院病歷資料，疾病管制局的疫調相關資料與實驗室血清中登革熱病毒量和血清學 IgM 和 IgG 抗體等數據，將檢體資料區分為症狀不明顯、登革熱、登革出血熱／登革熱休克症候群與其他疾病四大類。

2.問卷調查

依據研究目的設計結構式問卷，內容包括基本人口學資料(包括居住地.性別.年齡.身高.體重)、個人疾病史(包括是否曾感染登革熱與是否有慢性病)、生活型態、臨床症狀、實驗室 CBC/DC、一般生化等變項。針對醫師通報疑似登革熱病人做調查分析。相關資料以 EpiInfo version 6.0 資料處理軟體建檔。

3.以 capture ELISA 的方法來分析收集到的病人血清中的抗登革熱抗體

取 100λ抗人類 IgM(IgG) 到 96 孔盤中，放置於 4°C中過夜，隔天以 PBS 緩衝液沖洗三次，再加入 blocking 溶液，反應半小時，再以 PBS 緩衝液沖洗三次。將病人的血清取 100λ加到已經 coating 抗人類 IgM(IgG) 到 96 孔盤的 well 中反應半小時，再以 PBS 緩衝液沖洗三次，再加入四種型別的登革熱病毒以及有結合上酵素的抗登革熱抗體，反應半小時，再以 PBS 緩衝液沖洗三次，最後加入 chromogen，十分鐘後測量 OD 值。

4.以定量 real time PCR 及 plaque assay 方法來測量病人血清中含有的登革熱病毒量 [9,10]

將 560 λ lysis 緩衝液和病人 140λ血清混合均勻，使登革熱病毒的 RNA 從病毒的外套膜中釋放出來，再通過 column (Qiagene)，吸附住登革熱病毒的 RNA，再以 500λwashing 緩衝液沖洗 column 兩次，最後用 70 λelution 緩衝液將吸附在 column 上的 RNA 沖洗下來，以 eppendorf 管收集。取 10λ收集到的 RNA 和定量 PCR 的標準液一起執行即時定量 PCR，將病人檢體的 Ct 值和標準液的標準曲線比對，即可換算出登革熱病毒在病人血液中的 copy number。

BHK 細胞附著在 75T Flask 使用 BHK medium 加 5% FCS 37°C 培養三天，以 trypsin 處理，再以 medium 配製成 $1.5x10^5$個/cc 的細胞懸浮液。分注於 24 孔盤 0.5cc/well，置於 37°C 5% CO_2培養箱培養 48 小時。將病毒做一系列的稀釋並注入 24 孔盤均勻搖晃 37°C 5% CO_2培養箱培養 1 小時，之後取出 24 孔盤加入 methyl cellulose (1%FCS)0.5cc/well，37°C 5% CO_2培養箱培養 5 天，取出 24 孔盤加入 0.9% Nacl 0.5cc/well 搖晃後倒掉，再加入 0.1% NBB 染劑 0.5cc/wel 靜置一夜後倒掉染劑並於水龍頭下側面沖洗，甩乾後計算 PFU/cc。

5. 以 ELISA 來分析 TGF-beta1 濃度

每個well加50 μl of Standard或sample，Cover wells且incubate two hours。用200 μl的 Wash Buffer清洗5次。每個步驟要徹底去除洗液。加50 μl的Biotinylated TGF-beta 1抗體到每個well and incubate for 60 minutes。用200 μl的 Wash Buffer清洗5次。每個well加50 μl of Streptavidin-Peroxidase Conjugate and incubate for 30 minutes。用200 μl的 Wash Buffer清洗5次。50 μl 的Chromogen Substrate and incubate for 10 minutes或產生顏色。每個well加50 μl of Stop Solution。顏色會由藍色變成黃色。.立刻用450 nm波長來讀吸光值，建立標準曲線，將檢體的吸光值對照標準曲線換算出檢體的TGF-beta1的濃度。

6.以 PCR-RFLP 來分析 SNP

使用 primer5'-CCTCCCCACCACACCAG-3' (forward) and 5'-CCGCAGCTTGGACAGG-3' (reverse)，30 μl of PCR mixture 含有 10 ng of DNA, 1 unit of Hotstar *Taq* DNA polymerase (Qiagen, Valencia, CA), 1x Qiagen PCR buffer containing 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM each dNTP, 6 μl of Qiagen Q-solution,

和 0.5 μM each primer.反應條件為 denatured at 95°C for 15 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 62°C for 30 s, and 72°C for 45 s. a final extension cycle at 72°C for 8 min. 將 PCR product 以限制脢切割, For codon 10 polymorphism, *T* allele 可以產生四個 DNA 片段(103, 67, 40, and 25 bp), 如果是 *C* allele 則產生五個片段(91, 67, 40, 25, and 12 bp). For codon 25 polymorphism, 如果是 *C* allele 會有兩個片段(133 and 102 bp), 如果是 *G* allele 則無法被限制脢切割。和限制脢反應後, 再跑電泳 3% 2:1 agarose:NuSieve gel ,然後用 ethidium bromide 染色觀察結果。

描述性統計

7.以描述性統計呈現四大類病人的各項數據

將四大類病人的基本資料、臨床症狀、流行病學、血清學數據利用 EpiInfo version 6.0(CDC, Atlanta, GA)資料處理軟體建檔,並於資料庫完成後再次進行校正工作,以確保資料的完整性與正確性,校正工作完成後利用 SAS version8.2 進行統計分析,分別以頻率分布(Frequency)、平均值(Mean)、標準差(SD)來呈現四大類病人的各項數據,並以 GraphPad Priam v2.01 軟體來進行資料繪圖。

推論性統計

8.以單因子分析方法比較四大類病人的差異性

a.以單因子分析方法找出四大類病人的差異性

若為連續變數(如年齡、身高、體重)將以變異數分析(Analysis of Variance)或無母數變異數分析(Nonparametric ANOVA)來比較四大類病人的差異性,類別變數(如人口學變項、健康狀況、

居住方式、臨床症狀、生化數據、檢驗數據等)將以 rxc 關聯表分析哪些變數比例在四大類會有顯著差異，若 P value<0.05，表有統計上顯著的差異。

b.以多因子分析來建立可預測四大類病人的重要變數模式

進一步將單因子分析結果中達統計顯著意義($p < 0.05$)之變數，使用多因子邏輯迴歸(Multiple logistic regression)分析，來建立可預測四大類的重要變數模式診斷，(例如在登革熱血清學抗體效價、病毒量、白血球、血小板等單因子分析中顯著之變項，採用複線性回歸分析(Multiple linear regression)，以進行各種因素的多變項分析，藉以綜合各項檢定結果)，並以勝算比(Odds ratio)探討在相關變數影響下，各重要變數對四大類病人的相關性，找出每類病人的特性。

c.驗證所建立四大類病人的重要變數模式

將所建立之四大類病人的重要變數模式設計成結構式問卷, 當臨床醫師通報疑似登革熱病患時填寫，調查分析 200 人，去驗證模式的正確與否，以提供臨床醫師診斷登革熱疾病重要參考依據。

結果

1. 登革熱病人和健康人的基本資料

就像表一的結果，登革熱病人和正常人的男女性別並無顯著性的差異，但是年齡則有顯著性的差異。登革熱病人的平均年齡和正常人相比顯的年紀較低，平均值為 44.2 歲，正常人的平均年齡為 52.8 歲。

表一、登革熱病人和控制組的病歷資料

	DF	Control	P value
Mean age(yr)	44.2±20.2	52.8±16.4	0.019*
Gender	19(54.3%)男 16(45.7%)女	29(36.3%)男 51(63.8%)女	0.071

註記：表格內的數字，年紀列的數值為平均值±2 標準差；性別列的數字則為數量，括弧內為百分比。*符號代表有顯著性差異。

2. 登革熱病人和控制組在 TGF-β1 和 IL-10 上 SNP 種類(百分比)

我們分析了 TGF-β1 在 codon 10 和 codon 25 位置的 SNP，分析的結果顯示，登革熱病人和控制組之間並無顯著性的差異。另外又分析 IL-10 基因上離轉錄起始位置-592、-819 和-1082 位置的 SNP，如表二資料所顯示的，並無發現有顯著性的差異。表三的資料是將 TGF-β1 和 IL-10 上的 genotype 和 haplotype 來做分析，結果顯示出 TGF-β1 在 codon 10 位置上的 SNP 在登革熱病人和正常人來比較則有顯著性的差異。

表二、登革熱病人和控制組在 TGF-β1 和 IL-10 上的 allele 頻率

	DF	Control	P value
TGF-β1 (codon 10)			
C	64(39) (60.9%)	160(96) (60%)	0.897
T	64(25) (39%)	160(64) (40%)	
TGF-β1 (codon 25)			
G	64(64) (100%)	160(160) (100%)	1
IL-10 (-592)			
A	67(44) (65.6%)	160(98) (61.2%)	0.53

C	67(23) (34.3%)	160(62) (38.7%)	
IL-10 (-819)			
T	66(45) (68.1%)	160(97) (60.6%)	0.285
C	66(21) (31.8%)	160(97) (39.3%)	
IL-10 (-1082)			
A	68(67) (98.5%)	160(148) (92.5%)	0.115
G	68(1) (1.5%)	160(12) (7.5%)	

註記：表格內的數字為整體數量，括弧則是具有此基因型的數量，下面的括弧為百分比。

表三、登革熱病人和控制組在 TGF-β1 和 IL-10 上的基因型頻率

	DF	Control	P value
TGF-β1 (codon 25)			
G/G	32(100)	80(100)	1
TGF-β1 (codon 10)			
C/C	32(10) (31.25%)	80(34) (42.5%)	0.271
C/T	32(19) (59.4%)	80(28) (35%)	0.018*
T/T	32(3) (9.4%)	80(18) (22.5%)	0.108
IL-10 (-592, -891, -1082)			
ATA/ATA	17(13) (76.4%)	45(29) (64.4%)	1.0
ACC/ACC	17(3) (17.6%)	45(9) (20%)	0.366
GCC/ACC	17(0)	45(4) (8%)	
ATC/ATA	17(1) (5.8%)	45(0)	
GTA/GTA	17(0)	45(1)	

		(2%)	
ACC/ACA	17(0)	45(1) (2%)	
ATA/GTA	17(0)	45(1) (2%)	
TGF-β1 (codon 10, codon 25)			
CG/CG	32(10) (31.25%)	80(34) (42.5%)	0.271
TG/CG	32(19) (59.4%)	80(28) (35%)	0.018*
TG/TG	32(3) (9.4%)	80(18) (22.5%)	0.108
IL-10 (-592)			
C/C	34(3) 9%	80(13) 16.25%	0.577
C/A	34(17) 50%	80(36) 45%	
A/A	34(14) 41%	80(31) 38.75%	
IL-10 (-891)			
C/C	33(3) 9%	80(14) 17.5%	0.504
T/C	33(15) 45.5%	80(35) 43.8%	
T/T	33(15) 45.5%	80(31) 38.8%	
IL-10 (-1082)			
A/A	35(34) 97.1%	80(69) 86.3%	0.103
A/G	35(1) 2.9%	80(10) 12.5%	0.169
G/G	35(0)	80(1) 1.2%	1

*: compared with non-ATA/ATA

*: compared with non-ACC/ACC

註記：表格內的數字為整體數量，括弧則是具有此基因型的數量，下面的括弧為百分比。

3. 登革熱病人和控制組在 IL-10 上的 haplotype 頻率

如同表四資料顯示，登革熱病人和控制組在 IL-10 上的 haplotype 頻率並無顯著性的差異。

表四、登革熱病人和控制組在 IL-10 上的 hapalotype 頻率

	DF	Control	P value
ATA	27(79.4%)	56(65.5%)	0.302
ACC	6(17.6%)	23(25.5%)	0.213
ATC	1(2.9%)	0	0.298
GCC	0	4(4%)	0.316
GTA	0	4(3%)	0.316
ACA	0	1 (1%)	1.0

整個表 P = 0.215 所以個別的 P 值一定大於 0.05

4. TGF-β1 (codon 10)的基因型在有登革熱和沒有登革熱人上的分配比率

如同表五和表六的資料顯示，登革熱和沒有登革熱在 TGF-β1 (codon 10)的基因型並沒有顯著性的差異。

表五、TGF-β1 (codon 10)的基因型在有登革熱和沒有登革熱人上的分配比率

	DF	Control	P value	OR(95%CI)
TGF-β1 (codon 10)				
T/C,T/T	32(22) 68.8%	80(46) 57.5%		
C/C	32(10) 31.3%	80(34) 42.5%	0.271	OR:1.63 CI:0.68-3.88

表六、TGF-β1 (codon 10)的基因型在有登革熱和沒有登革熱人上的分配比率

	DF	Control	P value	OR(95%CI)
TGF-β1 (codon 10)				
T/T	32(3) 9.4%	80(18) 22.5%		

T/C,C/C	32(29) 90.6%	80(62) 77.5%	0.108	OR:0.36 CI:0.1-1.31

5. TGF-β1 和 IL-10 的基因表型種類和登革熱的相關性

如同表七所顯示，不同基因表型之間也並無顯著性的差異。

表七、TGF-β1 和 IL-10 的基因表型種類和登革熱的相關性

	TGF-β1 (codon 10, codon 25)				IL-10			
	low	intermediate	high	other	low	intermediate	high	other
DF	32(0)	32(9) 28.2%	32(3) 9.4%	32(20) 62.5%	17(16) 94.1%	17(0)	17(0)	17(1) 5.9%
CONTROL	80(0)	80(34) 42.5%	80(18) 22.5%	80(28) 35%	45(38) 84.4%	45(4) 8.9%	45(0)	45(3) 6.7%
P Value	NS				NS			

TGF-β1 (codon 10, codon 25)

Intermediate with non-intermediate: P = 0.258

High with non-high: P = 0.108

other with non-others: P = 0.0007

IL-10:

Low with non-low: P = 0.427

Intermediate with non-intermediate: P = 0.567

other with non-others: P = 1.0

P: by Chi-square test or Fisher's exact test

結論與建議

TGF-β1 是一種具有多功能的細胞激素，在 in vitro 的情況下，它可以調節很多種類細胞的增長和分化。最近的研究顯示，發現 TGF-β1 路徑的錯誤調控會造成許多嚴重的疾病，例如癌症 [11]、纖維化疾病 [12] 和自體免疫疾病 [13]。先前的研究顯示，TGF-β1 在血液中的濃度和環境因子，比如說年紀、體重和服藥並無顯著性的關係。因此，我們分析是否基因上的差異會影響到 TGF-β1 在血液中的濃度。

在此次研究中，我們分析登革熱病人細胞激素的基因種類，來比較是否台灣地區患有登革熱的病人，其基因型和正常人的基因型不同。我們的結果顯示，登革熱病人和正常人來比較 TGF-β1 在 codon 10 位置上的 SNP 為 C/T，則具有顯著性的差異。但在 TGF-β1 在 codon 25 位置上的 SNP 和 IL-10 基因上離轉錄起始位置-592、-819 和-1082 位置的 SNP 則無顯著性的差異。這些結果顯示出，TGF-β1 在 codon 10 位置上的 SNP 可能是決定登革熱感染耐受性的重要因子。

IL-10 主要是由巨噬細胞所產生，為一種免疫抑制激素，它能夠調降 Th1 路徑的細胞激素量[1415]。先前的研究顯示，IL-10 產生的量會受到基因上 SNP 種類的影響，尤其是離 IL-10 轉錄起始位置-592、-819 和-1082 位置的 SNP，這些 SNP 的不同會影響 IL-10 mRNA 的表現量[1617]。因此，我們分析登革熱病人和正常人之間在 IL-10 上-592、-819 和-1082 位置的 SNP 的分佈情形，結果顯示並無顯著性的差異存在。

總之，這次研究顯示，登革熱病人和正常人來比較 TGF-β1 在 codon 10 位置上的 SNP 為 C/T，則具有顯著性的差異。這些資料顯示出，TGF-β1 上 SNP 的種類對於感染登革熱是具有顯著性的意義。

参考文獻

1. **Alejandria, M.** 2004. Dengue fever. Clin. Evid **(12):**1062-1071.

2. **Mairuhu, A. T., J. Wagenaar, D. P. Brandjes, and E. C. Van Gorp.** 2004. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.

3. **Das, P.** 2004. Infectious disease surveillance update. Lancet Infect. Dis. **4:**259.

4. **Chaturvedi, U. C., R. Agarwal, E. A. Elbishbishi, and A. S. Mustafa.** 2000. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **28:**183-188.

5. **Malavige, G. N., S. Fernando, D. J. Fernando, and S. L. Seneviratne.** 2004. Dengue viral infections. Postgrad. Med. J. **80:**588-601.

6. **Agarwal, R., E. A. Elbishbishi, U. C. Chaturvedi, R. Nagar, and A. S. Mustafa.** 1999. Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. Int. J. Exp. Pathol. **80:**143-149.

7. **Shah, R., B. Rahaman, C. K. Hurley, and P. E. Posch.** 2005. Allelic diversity in the TGFB1 regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. Hum. Genet. 1-14.

8. **Howell, W. M., S. J. Turner, J. M. Theaker, and A. C. Bateman.** 2003. Cytokine gene single nucleotide polymorphisms and susceptibility to and prognosis in cutaneous malignant melanoma. Eur. J. Immunogenet. **30:**409-414.

9. **Richardson, J., A. Molina-Cruz, M. I. Salazar, and W. Black 4th.** 2006. Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual aedes aegypti. Am. J. Trop. Med. Hyg. **74:**132-141.

10. **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.

11. **Becker, C., M. C. Fantini, and M. F. Neurath.** 2005. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. Cytokine Growth Factor Rev.

12. **Fichtner-Feigl, S., W. Strober, K. Kawakami, R. K. Puri, and A. Kitani.** 2006. IL-13 signaling through the IL-13alpha(2) receptor is involved in induction of TGF-beta(1) production and fibrosis. Nat. Med. **12:**99-106.

13. **Harrison, J. S., K. E. Corcoran, D. Joshi, C. Sophacleus, and P. Rameshwar.** 2006. Peripheral monocytes and CD4(+) cells are potential Sources for increased circulating levels of TGF-beta and substance P in autoimmune myelofibrosis. Am. J. Hematol. **81:**51-58.

14. **Satoguina, J. S., E. Weyand, J. Larbi, and A. Hoerauf.** 2005. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. J. Immunol. **174:**4718-4726.

15. **Chai, S. K., G. M. Altman, M. Yazdanbakhsh, J. Tsuji, L. Godat, and T. K. Takaro.** 2005. Production of interleukin 10 and transforming growth factor beta in concomitant allergy and autoimmunity. Ann. Allergy Asthma Immunol. **94:**279-285.

16. **Eskdale, J., G. Gallagher, C. L. Verweij, V. Keijsers, R. G. Westendorp, and T. W. Huizinga.** 1998. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95:**9465-9470.

17. **Schaaf, B. M., F. Boehmke, H. Esnaashari, U. Seitzer, H. Kothe, M. Maass, P. Zabel, and K. Dalhoff.** 2003. Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **168:**476-480.