

封面式樣

計畫編號：DOH90-DC-1024

行政院衛生署九十年度科技研究發展計畫

第四級病毒偵檢方法之建立與發展

研究報告

執行機構：國防大學醫學院預防醫學研究所

計畫主持人：蔣先元

研究人員：姚振文、郭明德、詹家琮、黃昭菱

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

中文摘要	I-IV
英文摘要	V-VI
前言	1-19
材料與方法	20-24
結果	25-33
討論	34-37
結論與建議	38-39
參考文獻	40-46
附表	47-56
附圖	57-69

摘要：

近年來國際間新興疾病發生頻仍，加上國與國、人與人之間的接觸日趨繁密，第四級病毒之病原體由流行地區傳到本國成為境外移入病例的可能性也隨著升高。由於第四級病毒是屬於高致死率的傳染性病毒，有些亦會有失能之後遺症，目前又無有效的疫苗或療法，甚至有些病毒可藉由人與人之接觸而傳染疾病，如此將造成國人之恐慌。目前在我國具有診斷這些高致死率傳染性病毒的能力與實際經驗的醫師極少或幾乎沒有，因此發展一套快速、簡易、敏感、且具特異性的檢驗方法。平時要了解這些病毒之特性、危害及防護準則，做好偵檢防治之基本器材準備及演練使用方法和支援程序，將有助於各類感染疾病之早期診斷，以期盡快遏止疫情擴散。

本計畫依近年來國際發生新興病毒疫情及本國歷年之疫情報導，研判對可能在本國境內發生高致病率及高致死性疫情的疾病，平時針對這些病毒建立相關之生物資訊或分析本島的病毒資訊，由這些資訊持續加強與維持診斷的能力，若發生類似第四級病毒的症候病例，則運用本所 P4 設備，協助疾病管制局確定病源。首先本計畫在前幾年內將先針對的致病源病毒如下：伊波拉出血熱、拉薩熱、立百、馬堡出血熱、克里米亞-剛果出血熱、漢他出血熱、西尼羅河、和黃熱病毒等。在上述八項病毒當中，將逐年建立完整之診斷系統。有些

病毒無法取得其標準病毒株者將由文獻中取得足夠之病毒基因序列資料，設計出專一性的正反引子；也將以人工合成這些病毒抗原性高的基因片段，再大量表現出可當偵檢抗原用之病毒重組蛋白質及製備偵檢用之多株及單株抗體。

90 年的研究成果如下：

病毒核酸序列分析及生物資訊和反轉錄聚合酵素鍊鎖反應引子對之收集：

在 90 年由花蓮捕獲感染漢他病毒的溝鼠分離出漢城株病毒，然後分析整段 S 和 M 基因的核酸序列並和其他漢他病毒比較，結果顯示這株病毒確屬於漢城株且它與梧棲的那株漢城株最接近。本計畫已收集八種病毒之基因結構、核酸序列、參考相關資料，設計及合成這些病毒之引子對，以進行反轉錄聚合酵素連鎖反應及巢式聚合酵素連鎖反應之偵檢。當然病毒的分離及電子顯微鏡的確認也必須加入，以增強、支持判斷的根據。

病毒基因片段之選殖或合成：

目前由漢城病毒克隆出 S 和 G1 基因或部分的基因片段，至於伊波拉出血熱、馬堡出血熱、拉薩熱和立百病毒等核蛋白之抗原性，則

選取抗原性高的序列，利用人工基因合成出約 500bp 之核酸，伊波拉出血熱病毒之 nt1719-2218、馬堡出血熱病毒之 nt1469-1967、立百病毒之 nt1190-1689、拉薩熱病毒之 nt43-538，接著分別選殖至表現質體 pQE30 或 pQE31，DNA 定序確定其序列與 pQE 之 His Tag 於相同編列區域(reading frame)，此系列特殊病毒基因片段表現載體除作為表現偵檢蛋白質外，亦可作為 RT-PCR 條件標準化及正對照組之模版。

病毒蛋白重組片段之誘發和表現：

這些病毒重組基因片段經 IPTG 誘導之後，以 SDS-PAGE、染色，觀察有否誘發出重組蛋白質，並利用 Western blot 偵測其是否帶有 His-Tag 之序列。結果伊波拉出血熱病毒之核蛋白質重組片段可大量表現，馬堡出血熱病毒、立百病毒、拉薩熱病毒之核蛋白質重組片段亦均可誘發表現。確定有大量表現出分子量正確（約 30kDa）的融合蛋白後，再進一步利用這些抗原去誘導製備多株抗體。

委託檢體之偵檢：

今年委託分析的檢體都已立即完成偵測之工作，其中花蓮吳氏夫婦檢體顯示免疫組織化學染色為陽性，RT-PCR 和巢式聚合酵素鍊鎖反應亦為陽性，進一步的核酸序列分析也屬於漢城株的漢他病毒，但

是否此病毒造成死亡的主因仍待進一步的釐清。至於其他的檢體對所要求分析的項目都為陰性。

我們無法一直寄望、仰賴外人的協助，一定要建立自己的偵檢能力與系統，這是要靠長期努力累積下來的，雖然無法取得大部分的病毒，但仍需找些取代的解決方法，我們期望繼續不斷的發展建立這個偵檢的能力與體系。

中文關鍵詞(至少三個)：第四級病毒、反轉錄聚合酶連鎖反應、特異性抗體、免疫轉漬

Abstract :

Recently the infectious diseases emerge frequently. Furthermore traveling and the interactions between the nations or people become more and more. Therefore, the possibility of that the infectious diseases befall in Taiwan follow increasingly. The biohazard level 4 viruses; such as Ebola hemorrhagic fever、Marburg fever、Lassa fever、Crimean-Congo hemorrhagic fever and Nephi viruses etc; belong to the high fatal rate of infectious diseases. Even more they may spread through human-to-human and cause the panic. As to now , there is scarcely the capability or experience to diagnoses these biohazard level 4 viruses in Taiwan. Hence, it is urgent to develop and establish a specific, sensitive, simple, speedy and reproducible diagnostic system, which can help the diagnoses during the early stage of epidemic and stop the further spread of the disease.

According the international and domestic epidemic reports, we first focus on eight biohazard level viruses including Ebola hemorrhagic fever, Marburg fever, Lassa fever, Crimean-Congo hemorrhagic fever, Nephi, West Nile and Hanna viruses. We routinely collect the bioinorganic data and analyze the nucleotide sequences of the viruses got in the island. Once the outbreaks occur, we will utilize the P4 leveled equipments to diagnosis the pathogens based on the bioinformatic data. The viruses we don't have will be designed the primers for PCR or RT-PCR and synthesize part of gene fragments , according the bioinformatic data. Furthermore, the recombinant proteins are expressed and used as the antigen to induce the antibody.

During 2001, we caught Rattus norvegicus and isolated the hanta virus from them. The nucleotide sequences of S and M segments of #66 R.norvegicus were analyzed. Comparison among the published data and the data we got from Taichung Wu-Chi harbor #106 R. norvegicus, the results show that the homology of Sand M segments between two Taiwanese strains are the closest. The primers for PCR or RT-PCR to diagnosis eight viruses we focus were designed based on the bioinformatic data.

So far, we cloned the nucleocapsid protein gene from Seoul S segment, and selected the high antigenicity domain to synthesize DNA fragments about 500 bp (including Ebola virus nt1719-2218, Marburg virus nt1469-1967, Napah virus nt 1190-1689, Lassa virus nt 43-538). Then these genes were inserted into vectors

pQE30 or pQE31 for protein expression.

After induction by IPTG, the recombinant Seoul viral nucleocapsid could be expressed in large quantity, and be purified through several chromatographic columns. But the expressed protein is in inclusion bodies. The induced poly- or monoclonal antibodies recognize denature form only. Therefore, the next problem need to be solved is to express in eukaryotic system or to find a renaturation method. As for those synthesized genes, they could also be expressed the recombinant proteins (about 30 kDa) and could be recognized by anti-His Tag antibodies. In the next step, we need to set up the purification procedure, then, induce the antibodies too.

The samples from CDC were diagnosed and all the items, which CDC asked to screen, were negative and the isolation of viruses were negative. The only exception is the Mr. Wus' family. The serodiagnoses of antibody were negative for all his family members, but the RT-PCR shows positive and the nucleotide sequences are highly homologous to Seoul virus.

In order to set up more methods to support every diagnosis, we continually try to get the antigens and specific antibodies and enbroad our bioinformatics.

Keyword: biohazard level 4 viruses, RT-PCR, specific antigen, immunoblot

(1) 前言：

近年來國際間新興疾病發生頻仍，其原因包括有：全球性旅遊發達、食物集中處理化及全球性供應化、人口增加及環境快速都會區化及擁擠化、由於內戰、飢餓或人為及自然災難所造成人口遷移、由於灌溉、森林砍伐及造林等計劃，而致使病媒蟲(或動物)改變其棲息地 及棲息性、人類行為的變遷。如：靜脈藥物注射及危險性行為等。、廣泛使用抗菌藥物或殺蟲劑，而加速抗藥性的衍生或人類和熱帶雨林或(及)其他荒野地區的接觸或入侵頻率不斷提昇。其原因包括有：人口成長、人口分布都市化、旅遊增加、病媒蚊控制不佳及氣候變化等多重因素。

這些新興疾病的疫情如 1993 年美國爆發漢他肺症候群(Hanta Pulmonary Syndrome, HPS)疫情(Rodriguez-Moran P et al;1998)在科羅拉多州造成數人死亡，接著此類病例一直不斷，這些確定病例在美國累計到 2002 年 4 月已有 331 個病例，1999 年亦爆發西尼羅河病毒(West Nile Virus)疫情，在紐約等三州計有 59 人發病 7 人死亡(Jia XY et al;1999)。1999 年馬來西亞爆發立百病毒”(Nipah virus)疫情，至少死亡 95 人 (Chua KB et al;1999)。1998 年台灣爆發口蹄疫(Foot and Mouth Disease) (Chen BJ et al;1999)及 1997 年香港爆發家禽流行性感冒(禽流感, Influenza Virus)造成經濟方面之嚴重損失(Shortridge KF et al;1998)。

其他在 1990s 年間全世界發生出血性疾病疫情的有：1994 年在象牙海岸 (Formenty P et al;1999)、1994-1996 年在加彭(Volchkov V et al;1997、Georges AJ et al;1999)、1995 年在薩伊爆發伊波拉出血熱(Ebola Hemorrhagic Fever , Ebola HF) (Muyembe-Tamfum JJ et al;1999)、1996 年在菲律賓及 1997 年在美國爆發猿猴型之伊波拉病毒感染(Rollin PE et al;1999)。1999 年在薩伊爆發馬堡出血熱(Marburg HF)疫情(Bertherat E et al;1999)。1994 年在奈及利亞(Fisher-Hoch SP et al;1995)及 1997 年在獅子山共和國爆發拉薩熱(Lassa Fever)疫情(此資料由美國亞特蘭大 CDC 提供)。1994 年在中東牲畜場(Khan AS et al;1997) 、1996 年在南非(Burt FJ et al;1998)及 1998 年在巴基斯坦(Altaf A et al; 1998)爆發克里米亞-剛果出血熱(Crimean-Congo HF)疫情。1994 年在秘魯爆發玻利維亞出血熱(Bolivian HF)疫情

(MMWR Morb Mortal Wkly Rep ; 1994)。1990s 年在南美洲一直皆有爆發登革出血熱(Dengue HF)疫情(Aviles G et al;1999)。1993 年在埃及(Arthur RR et al;1993、Abu-Elyazeed R et al; 1996)及 1998 年在肯亞爆發裂谷熱(Rift Valley Fever)疫情(Linthicum KJ et al;1999)。1996 年在塞內加爾爆發黃熱病(Yellow Fever)疫情(Thonnon J et al;1998)。1993 年在美國 (Peters, CJ et al;1996、Wells RM et al;1997)、1995-1996 年在巴西(Johnson AM et al;1999、Figueiredo LT et al;1999)、1996 年在德國 (Schreiber, M et al;1996)、1997 年在智利及阿根廷爆發漢他病毒肺症候群(HPS)疫情、(Schmaljohn, CS et al;1997、Cantoni G et al;1997、Toro J et al;1998)。

在這些爆發之出血性病毒大部分皆屬於第四級病毒，而在 1999 年 3 月馬來西亞發生疫情的立百病毒也歸於第四級病毒屬。出血熱在非洲，通常不會造成很大之流行；但是在侷限小的人口密集社區或村莊，卻會造成很嚴重之疫病。這些疾病可造成高死亡率，有些亦會有失能之後遺症；如拉薩熱會造成聽力受損(Cummins Det al; 1990)。

這些致病病毒存在於自然界種類繁多，且易變異性，其不論致病率，致死率、散播性均高，且目前對於病毒的預防和診斷都比較困難，治療方面也沒有特效藥。防疫人員平時了解這些致病病毒之特性、危害及防護準則，平日做好偵檢防治之基本(物資)器材準備及演練使用方法和支援程序，達到疫情爆發時才能降低人員傷亡比率。在進行出血熱診斷時，應與以發熱為主的疾病相鑑別，如上呼吸道感染、流行性感冒、流行性腦脊髓膜炎、鉤端螺旋體病、發革出血熱、阿根廷出血熱 (Argentine Hemorrhagic fever)、天花病毒、傷寒與斑疹傷寒、金黃色葡萄球菌敗血症等；其次應與血液病相鑑別，如急性白血病、血小板減少性紫斑，過敏性紫斑等。

這些新興疾病的病原大都屬於第四級病毒，第四級病毒是屬於高致死率的傳染性病毒，近年來由於國人出國旅遊頻繁，很有可能將第四級病毒之病原體由流行地區傳到本國，成為境外移入病例。尤其中國大陸是許多傳染性疾病感染很嚴重的地區，而我國與其地源接近，港口貿易及人民往來頻繁，易將病原由大陸帶

入國內。由於這些病毒致死率甚高，又無有效的疫苗，甚至有些第四級病毒可藉由人與人之接觸而傳染疾病，如此將造成國人之恐慌，這些疾病包括有伊波拉出血熱(Ebola hemorrhagic fever, Ebola HF)、馬堡熱(Marburg fever)、拉薩熱(Lassa fever)及克里米亞-剛果出血熱(Crimean-Congo hemorrhagic fever)等。在我國具有診斷這些高致死率疾病能力與經驗的醫師極少或幾乎沒有，因此發展一套快速、簡易、敏感、且具特異性的檢驗方法，將有助於各類感染疾病之早期診斷，以遏止疫情擴散。

有鑑於這些疾病之嚴重性及潛在未知危險病原體之存在，我們在民國八十四年建造完成了全世界第八座生物安全等級第四級(Biohazard level 4)之實驗室，以因應突發狀況。這些疾病之診斷一樣需要分離病毒，也需要具有專一性之免疫抗體、抗原反應和電子顯微鏡鏡檢等，不過這些診斷步驟皆需要在具有生物安全等級第四級之實驗室操作或前處理，才能確保操作人員之安全。生物安全第四級實驗室目前我國只有預醫所建置使用，因此對於疑似第四級病毒之感染，預醫所可提供衛生署此項設施，並協助加以鑑定，以達物盡其用之目的。

本計畫將利用病毒分離、反轉錄聚合酵素連鎖反應(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)、特異性抗體、免疫轉漬、及電子顯微鏡鏡檢等技術，對可能在本國境內發生高致病率及高致死性疫情的疾病，持續維持診斷的能力，期盼對本土之預防醫學及疫情控制有所貢獻。依近年來國際發生新興病毒疫情之報告，研判對可能在本國境內發生高致病率及高致死性疫情的疾病，持續加強與維持診斷的能力。雖然有些出血性病毒的中間宿主並不存在，沒有造成大量流行之條件，但是這些第四級病毒卻潛在人傳播給人而致病甚至於致死之傳染途徑，若不能早期給予確立診斷則將有擴大疫情之疑慮。綜合各項因素本計畫先著重於致病源如下：

1. 伊波拉出血熱病毒
2. 拉薩熱病毒
3. 立百病毒

4. 馬堡出血熱病毒
5. 克里米亞-剛果出血熱病毒
6. 漢他出血熱病毒（包括漢他肺症候群病毒）
7. 西尼羅河病毒
8. 黃熱病毒

在上述八項選擇診斷致病源當中，我們將逐年建立完整之診斷系統。其中，對漢他出血熱病毒(漢城株)及黃熱病毒這兩種病毒我們實驗室已建立了初步之偵檢方式，包括分離病毒，具病毒專一性之正反引子，及製備好之病毒抗體。對於其它六項所列之病毒，由於無法獲得該六項病毒之標準病毒株，使得本實驗室缺乏偵檢材料及實際之診斷經驗。我們計劃由文獻中取得足夠之病毒基因序列資料，設計出此六項所列病毒之專一性正反引子；也將人工合成這些病毒抗原性高的序列，再利用*E coli*或真核表現系統大量表現出可當偵檢抗原用之病毒重組蛋白質及製備之偵檢用之多株及單株抗體。以下為此八項病毒之背景資料及我們預期之建立之診斷方式：

一、伊波拉出血性病毒

本病毒屬於生物安全等級第四級之致病源，屬於絲狀病毒科(*Filoviridae*)。依基因及抗原性質來分至少有四個亞型。原始型為由 1976 年在非洲薩伊分離出來，在 1995 年又重現；另一型在 1976 年於蘇丹分離出來，在 1979 年又重現；"雷思頓" (Reston) 亞型是於 1989 年由菲律賓運到美國的猿猴身上分離出來，在菲律賓運到義大利的猿猴身上亦分離出相同之病毒 (Miranda Me et al; 1999)；最近於 1994 年象牙海岸 (Côte d'Ivoire) 分離出新亞型。伊波拉病毒感染後可造成發熱、劇烈頭痛、咽喉痛、肌痛、噁心、嘔吐、全身出血、發病後 6~9 天死亡。潛伏期為 3~20 天。人與人之間具有高傳染性。感染可藉由呼吸道進入、接觸及醫療行為感染(Baron RC et al;1983)。具有高致死率 53~92 % (蘇丹型 53 %、薩伊型 92 %) (Heymann DL et al;1980)。基因序列分析 1995 年於剛果爆發之伊波

拉出血熱疫情之伊波拉病毒，經比對分析後與二十年前爆發之伊波拉病毒薩伊株非常相近，顯示此病毒具保守性 (Rodriguez LL et al;1999)。而不同時期分離出來之兩株蘇丹株及三株雷思頓株，同亞型間幾乎一樣。然此四個亞型伊波拉出血性病毒之間，則有很大之差異。1994 年在加彭分離出來之病毒株與薩伊株在基因比對上幾乎相同。利用此病毒基因特性設計出人工合成之伊波拉病毒基因，以大腸桿菌為載具大量表現薩伊株之伊波拉病毒核蛋白或利用真核表現系統表現外套蛋白，此兩蛋白皆可用來當做感染伊波拉病毒病人之檢驗試劑(Merzlikin NV et al;1995、Borisevich IV et al;1996、Prehaud C et al;1998、Ksiazek TG et al;1999)。此薩伊株之伊波拉病毒蛋白亦被用來診斷感染象牙海岸株之病患血清(Prehaud C et al;1998)。目前沒有疫苗及治療用藥，但以 DNA 疫苗的方式注射伊波拉病毒核蛋白或外套蛋白可得到很好之保護作用(Vanderzanden et al,1998)。依其各亞型伊波拉出血性病毒間之基因保守性，我們將分別設計做為診斷之具亞型專一性之正反引子(Leroy EM;2000)。分析各亞型伊波拉出血性病毒間之核蛋白具有 97%以上之相同性，我們可人工合成薩伊株之核蛋白基因供病毒偵檢抗原(diagnostic Ag)之產製。

我們實驗室的診斷方式(必需至少一項符合)：

(一) 病毒分離、鏡檢：利用 Vero 細胞來分離病毒，時間約 7-10 天後觀察細胞病變之現象。

取此細胞病變之細胞或細胞外液體，經病毒去活化及濃縮體積後，進行電子顯微鏡鏡檢來觀察病毒之絲狀外型。

(二) 病毒基因偵測：以四個亞型之伊波拉病毒基因序列為基礎，設計出可增殖各亞型之伊波拉病毒之正反引子，利用反轉錄聚合酶連鎖反應之技術予以判定。

(三) 病毒基因定序分析：將所得到之基因片段給予基因序列分析，將得到之基因序列與伊波拉病毒基因庫各亞型進行資料比對(見 89 年計畫)，確立此致病毒及其病毒亞型。

(四) 血清學檢查：利用伊波拉病毒之基因序列為基礎，以人為基因合成之方式，合成長度約為 0.5 Kb 且經電腦軟體分析具有免疫抗原性之伊波拉病毒核蛋白或外套蛋白。利用細菌 (E.coli) 或真核細胞株系統大量製備檢測用抗原。製備之檢測用伊波拉病毒抗原，進行

病人血清 IgM-capture or IgG 特異性抗體之分析，若大於 64 倍即判陽性或取病患之恢復期血清有 4 倍以上之結果判陽性。

(五) 病毒抗原檢查：利用大量製備之檢測用伊波拉抗原，製備出伊波拉多源抗體及單株抗體，以免疫轉漬 (Immunoblot) 之方法分析感染之 Vero 細胞溶解液之伊波拉病毒抗原。以免疫螢光分析 (Immunofluorescence assay, IFA) 偵測感染之 Vero 細胞中伊波拉抗原之出現。

(六) 免疫組織染色 (Immuno-histochemistry, IHC) 分析：利用免疫組織染色分析疑似伊波拉病毒感染患者的皮膚細胞偵測伊波拉病毒抗原之存在。

二、拉薩熱病毒

本病毒屬於生物安全等級第四級之致病源，屬於 Arenavirus。在 1960 年末於奈及利亞發生大流行，有數人死亡。此自然宿主為鼠類，遍佈於整個非洲大陸，但是拉薩熱多發生於西非及中非洲地區之地方，每年約有 20~30 萬人被感染。(Keenlyside RA et al;1983)。此疾病常發生於乾熱之季節。感染後可造成發熱、口內潰瘍、喉頭痛、下痢、咳嗽、腹痛、胸痛、肌痛、發疹、腎炎、肺炎、心肌炎 (Frame JD et al;1970)。潛伏期 5~21 天。人與人之間具有高傳染性，院內感染的死亡率高達 30~50%。(Fisher-Hoch SP et al;1985、McCormick JB et al;1987、Fisher-Hoch SP et al;1995)。經由鼠類之排泄物經由呼吸道感染或是經由病患直接感染 (Stephenson EH et al;1984)。1988 年曾發生一位日本人赴西非旅遊，回國而患拉薩熱病。目前對於拉薩熱的偵檢法在血清學方面可以 ELISA 方法來偵檢拉薩熱病的特異性抗體 (Jahrling PB et al;1985、Niklasson BS et al;1984、Frame JD et al;1970)；以 ELISA 方法來偵測拉薩熱病毒的 IgM 抗體效價，在病毒感染 10 天內可以測到，而在感染 36 天內達到最高效價，經過一年半仍然可以測到對抗病毒的 IgM 抗體 (Niklasson BS et al;1984)。利用大腸桿菌表現之重組核蛋白質 (Lukashevish LS;1993、Ter Meulen J et al;1998) 或 baculovirus 表現之重組糖蛋白質 (Hummel KB;1992) 可代替拉薩熱的病毒抗原來偵測感染拉薩熱病毒病人血清的特異性抗體。以反轉錄聚合酵素連鎖反應方法來偵測疑似病人血清可幫助拉薩熱

之早期診斷。(Demby AH et al;1994、Trappier SG et al;1993)。拉薩熱疫苗目前仍在研發階段(Djavani M;2000)。滅鼠、改善環境衛生及疫情爆發時之隔離為拉薩熱重要之防範之道。我們將設計做為診斷之反轉錄聚合酵素連鎖反應之正反引子及人工合成拉薩熱病毒之核蛋白基因供病毒蛋白產製。

我們實驗室的診斷方式(必需至少一項符合)：

- (一) 病毒分離、鏡檢：利用 Vero 細胞來分離病毒，並觀察細胞病變之現象。取此細胞病變之細胞或細胞外液體，經病毒去活化及濃縮體積後，進行電子顯微鏡鏡檢來觀察病毒之外型。
- (二) 病毒基因偵測：以拉薩熱基因序列為基礎，設計出可增殖拉薩熱病毒之正反引子，利用反轉錄聚合酵素連鎖反應之技術予以鑑定。
- (三) 病毒基因定序分析：將所得到之基因片段給予基因序列分析，將得到之基因序列與拉薩熱病毒基因庫進行資料比對，確立此致病毒及其病毒型。
- (四) 血清學檢查：利用拉薩熱之基因序列為基礎，以人為基因合成之方式，合成長度約為 0.5 Kb 且經電腦軟體分析具有免疫抗原性之拉薩熱病毒核蛋白基因。利用細菌 (E.coli) 或細胞株系統大量製備檢測用抗原 (見 89 年計畫)。利用檢測用拉薩熱抗原，進行病人血清 IgM-capture or IgG 特異性抗體之分析，取病患之恢復期血清有 4 倍以上之結果判陽性。
- (五) 病毒抗原檢查：利用大量製備之檢測用抗原，製備出拉薩熱病毒多源抗體及單株抗體，以免疫轉漬之方法分析感染之 Vero 細胞溶解液之拉薩熱病毒抗原。以免疫螢光分析偵測感染之 Vero 細胞中拉薩熱抗原之出現。
- (六) 核酸原位雜交法(*In situ hybridization*)、免疫組織染色分析：利用核酸原位雜交法偵測拉薩熱病毒感染人的組織細胞中拉薩熱病毒之基因；利用免疫組織染色偵測拉薩熱病毒感染人的組織細胞中拉薩熱病毒抗原。

三、立百病毒

1999 年在馬來西亞及新加坡之養豬戶爆發嚴重腦炎之流行，致病原為一種

新型副黏液病毒(paramyxovirus)，因首次分離出此病毒之檢體係來自馬來西亞 Kampung Sungai Nipah 村莊之死亡檢體，故將此新病毒命名為立百病毒(Nordin MN, 1999)。此次疫情在 1998 年九月即有病例傳出。至 1999 年六月，在馬來西亞有超過 265 個腦炎病例，其中 105 例死亡。在新加坡有 11 例有腦炎或呼吸道疾病，其中有一名死亡病例(Chew MHL;2000)。電子顯微鏡檢，血清學及核酸序列分析比對顯示立百病毒屬於副黏液病毒科，和 1994 年在澳洲發現之亨得拉(Hendra)病毒最接近，同屬於副黏液病毒科中新的一屬。立百病毒和亨得拉病毒不同於副黏液病毒之其他病毒，它們可以在許多種宿主，包括人類，造成致死疾病，為人畜共通之病毒。雖然此病毒無人與人相互傳染的直接證據，美國疾病防治中心還是將此病毒歸為生物安全第四級之病毒。(Chua KB et al;1999 、 McCormack JG et al;1999 、 Paton NI et al;1999)。

1998 年在 Peninsular Malaysia 開始有嚴重發燒伴隨致死腦炎之疾病流行。此疫區同時有豬隻罹患呼吸道疾病。在馬來西亞共超過 265 個腦炎病例，其中 105 例死亡。因此地地方性疾病-日本腦炎，豬隻為其病毒宿主(Sinniah M, 1989)，此疫情開始被誤以為日本腦炎之傳染 (Paton NI et al., 1999;Chua KB et al., 1999)。但次疫病之流行病學特徵絕然不同於日本腦炎，因罹病者大多為養豬之成年男性，極少小孩病例，且蚊子控制及施打日本腦炎均未能控制疫情(Monath TP et al.,1996)。確立診斷是由死亡病人腦脊髓液接種之 Vero 細胞培養出病毒。細胞培養中發現感染細胞聚集在一起，形成一巨大多核融合的細胞。電子顯微鏡檢顯示此被命名為立百之病毒屬副黏液病毒科，其單股未分段之 negative polarity RNA 被核蛋白質包被，此螺旋核蛋白質被包含兩種糖蛋白質(fusion(F) ; attachment(G))之套膜包裹。此病毒顆粒大小 120 到 500nm 不等，電顯下呈現副黏液病毒典型之”herringbone”的核蛋白質，長度約 1.67um。感染細胞之細胞質中出現包涵體，且細胞膜有正在 budding 之病毒顆粒。血清學之檢查顯示立百病毒感染之細胞和亨得拉病毒抗血清有很強之反應，但卻和其它副黏液病毒(如 measles virus, RSV,parainfluenzavirus)沒有交叉反應。立百病毒和亨得拉病毒之交叉中和測試有 8-16 倍之差異，顯示此二病毒雖相近，卻非相同之病毒 (Wang LF,

1995 ; Chua KB et al., 2000)。血清學之檢查(檢測抗 Nipahvirus IgG,IgM)顯示馬來西亞及新加坡之罹病檢體顯示其病原是相關的(Ksiazek TG, 1999)，立百病毒是此波疫情之主兇。此波疫情之兩大特徵是 1. 感染之人、畜(包括貓、狗)均有跟豬直接接觸之病史；2. 常併發致死性腦炎。病理方面之研究為此提供合理的解釋(利用 hendra virus 或 nipah virus hyperimmune serum 偵測立百病毒抗原)(Chua KB et al., 2000)。很明顯的患病豬隻借由其呼吸道(loud cough)將病毒傳給密切接觸之豬農，因其病理切片顯示呼吸道、肺部均被病毒嚴重侵犯，有立百病毒抗原存在肺部巨大多核融合細胞，此上、下呼吸道嚴重感染顯示患病豬隻之呼吸道分泌物為立百病毒重要來源。死亡病人之解剖也透露 multiorgan vasculitis，內皮細胞有多核巨細胞。而在中樞神經的感染最為顯著，cerbral cortex, brain stem,parachymal cell, neuron 等都有立百病毒抗原。立百病毒感染之人類有廣泛之中樞神經病變。分子病毒學之序列分析也很明顯顯示此立百病毒屬副黏液病毒，在 phosphoprotein (P) 區域有副黏液病毒之 conserved 序列，設計引子，RT-PCR 得到 141bp 之產物，由此序列和亨得拉病毒之序列，一一得到 nucleoprotein (N, P and matrix)基因，此結果顯示立百病毒(GenBank accession number AF212302) 和亨得拉 病毒核酸序列有 70-78% 之相似性。此外，由 N, P, M, F, G 這些基因片段之分析均顯示立百病毒和亨得拉病毒同屬於副黏液病毒科中新的一屬(Chua KB et al., 2000; Harcourt BH et al., 2000)。立百病毒有相當廣的宿主，如豬、貓、人、狗這些天然宿主。馬來西亞之研究者追蹤立百病毒疫情之來源也認為立百病毒原本存於自然界之蝙蝠尿液、唾液中(Enserink M ; 2000、Williamson MM ; 1998)，發現立百病毒之來源將有助於衛生單位預防此類人畜共通疾病之爆發流行。台灣與馬來西亞雙方來往頻繁，極有可能將此疾病傳入。我們將使用美國疾病防治中心用來診斷立百病毒之正反引子，做反轉錄聚合酵素連鎖反應之診斷，且人工合成立百病毒之核蛋白基因供病毒蛋白抗原之產製。配合細胞感染造成融合之特徵來鑑定立百病毒之感染。

我們實驗室的診斷方式(必需至少一項符合)：

- (一) 病毒分離、鏡檢：抽取疑似病人腦脊髓或死亡病例腦部組織液，利用 Vero 細胞來分離，並觀察細胞是否有聚集，形成一巨大多核融合之病變現象。取此細胞病變之細胞或細胞外液體，經病毒去活化及濃縮體積後，進行電子顯微鏡鏡檢來觀察副黏液病毒特有之外型。
- (二) 病毒基因偵測：以立百基因已發表之序列為基礎，設計出可增殖立百基因之正反引子或參考美國疾病防治中心用來診斷立百病毒之正反引子，利用反轉錄聚合酵素連鎖反應之技術予以鑑定。
- (三) 病毒基因定序分析：將所得到之基因片段給予基因序列分析，將得到之基因序列與立百、亨得拉病毒基因庫進行資料比對，確立此致病毒及其病毒型。
- (四) 血清學檢查：利用立百病毒之基因序列為基礎，以人為基因合成之方式，合成長度約為 0.5 Kb 且經電腦軟體分析具有免疫抗原性之立百病毒核蛋白或外套蛋白(見 89 年計畫)。利用細菌 (E.coli) 或真核細胞株系統大量製備檢測用抗原。利用立百病毒重組抗原，進行病人血清 IgM-capture or IgG 特異性抗體之分析。
- (五) 病毒抗原檢查：利用大量製備之檢測用抗原，製備出立百多源抗體及單株抗體，以免免疫轉漬之方法分析感染之 Vero 細胞溶解液之立百病毒抗原。以免免疫螢光分析偵測感染之 Vero 細胞中立百病毒抗原之出現。
- (六) 核酸原位雜交法、免疫組織染色分析：利用核酸原位雜交法偵測立百病毒感染病人的組織細胞中立百病毒之基因；利用免疫組織染色偵測立百病毒感染病人的組織細胞中立百病毒抗原之存在。

四、馬堡出血熱病毒

本病毒屬於生物安全等級第四級之致病源，與伊波拉病毒同歸絲狀病毒屬。此出血熱之發生與由東非運往德國之非洲綠猴有關。此疾病主要發生在非洲次沙哈拉地區，但是真正的流行病學資料尚不完全，院內感染也是很重要的問題。感

染後可造成發熱、劇烈頭痛、咽喉痛、肌痛、噁心、嘔吐、全身出血、發病後6~9天死亡。潛伏期3~16天，及高罹病率。人與人之間具有高傳染性(Gear JSS et al;1975)。感染可由呼吸道進入、接觸及醫療行為感染。高致死率>20%(Smith DH et al;1982)。目前沒有疫苗及治療用藥。1975年澳洲白人在南非、1980年法國技師於肯亞患此疾病死亡。

我們實驗室的診斷方式(必需至少一項符合)：

- (一) 病毒分離、鏡檢：利用 Vero 細胞來分離病毒，並觀察細胞病變之現象。取此細胞病變之細胞或細胞外液體，經病毒去活化及濃縮體積後，進行電子顯微鏡鏡檢來觀察病毒絲狀之外型。
- (二) 病毒基因偵測：以馬堡出血熱基因序列为基礎，設計出可增殖馬堡出血熱之正反引子(見表 2)，利用反轉錄聚合酵素連鎖反應之技術予以鑑定。
- (三) 病毒基因定序分析：將所得到之基因片段給予基因序列分析，將得到之基因序列與馬堡出血熱病毒基因庫進行資料比對，確立此致病毒及其病毒型。
- (四) 血清學檢查：利用馬堡出血熱病毒之基因序列为基礎，以人為基因合成之方式，合成長度約為 0.5 Kb 且經電腦軟體分析具有免疫抗原性之馬堡出血熱病毒核蛋白或外套蛋白(見 89 年計畫)。利用細菌或真核細胞株系統大量製備檢測用抗原。製備之檢測用馬堡出血熱病毒抗原，進行病人血清 IgM-capture or IgG 特異性抗體之分析。
- (五) 病毒抗原檢查：利用大量製備之檢測用馬堡出血熱病毒抗原，製備出馬堡出血熱病毒之多源抗體及單株抗體，以免疫轉漬之方法分析感染之 Vero 細胞溶解液之馬堡出血熱病毒抗原。以免疫螢光分析偵測感染之 Vero 細胞中馬堡出血熱抗原之出現。
- (六) 免疫組織染色分析：利用免疫組織染色分析疑似馬堡出血熱病毒感染患者的組織細胞偵測馬堡出血熱病毒抗原之存在。

五、克里米亞-剛果出血熱

本病毒屬於生物安全等級第四級之致病源，屬於 Nairoviruses。在非洲、中東、蘇聯地中海地區、中亞洲、印亞大陸及中國大陸西北地區，有此疾病流行

(Swanepoel R et al;1983 、 Yen YC et al;1985)。人類是因蟲蚤(Hyalomma)叮咬而感染。小哺乳動物及鳥類是蟲蚤幼蟲之寄主，而大哺乳動物是成蟲之寄主。此疾病易發生於春季及秋季。牧場工人、牧羊人、獸醫及接觸患病之動物、照顧病患之醫護人員易發生此疾病 (Swanepoel R et al;1983 、 Yen YC et al;1985)。感染後可造成突然惡寒與發熱 (39°C 以上) 、頭痛、倦怠感、腹痛、嘔吐、口腔炎、血小板降低、脈搏降低 (Suieiman M et al;1980 、 Swanepoel R et al;1978 、 Swanepoel R et al;1989)。潛伏期 2~9 天，及高致病率。人與人之間具有高傳染性 (Burney MI et al;1980 、 Van Eeden PJ et al;1985)，致死率大於 20 % (Khan AS et al;1997 、 Burt FJ et al;1997)。

我們實驗室的診斷方式(必需至少一項符合)：(Shepherd AJ et al;1986)。(Mariott AC et al;1992)

- (一) 病毒分離、鏡檢：利用 Vero 細胞來分離病毒，並觀察細胞病變之現象。取此細胞病變之細胞或細胞外液體，經病毒去活化及濃縮體積後，進行電子顯微鏡鏡檢來觀察病毒之外型。
- (二) 病毒基因偵測：以克里米亞-剛果出血熱病毒基因序列為基礎，設計出可增殖克里米亞-剛果出血熱病毒之正反引子，利用反轉錄聚合酵素連鎖反應之技術予以鑑定。
- (三) 病毒基因定序分析：將所得到之基因片段給予基因序列分析，將得到之基因序列與克里米亞-剛果出血熱病毒基因庫進行資料比對，確立此致病毒及其病毒型。
- (四) 血清學檢查：利用克里米亞-剛果出血熱病毒之基因序列為基礎，以人為基因合成之方式，合成長度約為 0.5 Kb 且經電腦軟體分析具有免疫抗原性之克里米亞-剛果出血熱病毒核蛋白或外套蛋白(見 89 年計畫)。利用細菌或真核細胞株系統大量製備檢測用抗原。製備之檢測用克里米亞-剛果出血熱病毒抗原，進行病人血清 IgM-capture or IgG 特異性抗體之分析。
- (五) 病毒抗原檢查：利用大量製備之檢測用克里米亞-剛果出血熱病毒抗原，製備出克里米亞-剛果出血熱病毒之多源抗體及單株抗體，以免疫轉漬之方法分析感染之 Vero 細胞溶解液之克里米亞-剛果出血熱病毒抗原。以免疫螢光分析偵測感染之 Vero 細胞中克里米亞-

剛果出血熱病毒抗原之出現。

(六) 免疫組織染色分析：利用免疫組織染色分析疑似克里米亞-剛果出血熱病毒感染患者的組織細胞偵測克里米亞-剛果出血熱病毒抗原之存在。

六、漢他出血熱病毒（包括漢他肺症候群病毒）

早在西元 960 年中國醫典上就有記載類似漢他病毒的症狀，病例報告則首見於 1913 年前蘇聯的 Vladivostok。自此，類似的流行疾病如遠東腎因性腎炎及流行出血性腎炎等陸續被發現；中國大陸在 1931 年也開始有類似症狀的報告。第一次世界大戰時，日軍再次於中國東北發現此具有高燒、蛋白尿及出血症狀的嚴重疾病，死亡率高達 15%，日本陸軍醫學中心於 1942 年將之命名為流行性出血熱。在此同時北歐則開始有流行性腎病的流行，估計至少有 10,000 個以上的病例。1951 至 1954 年的韓戰期間，韓國出血熱造成 3,000 以上的美軍感染，使得此一疾病更受重視。直到 1978 年韓國 Lee 等首次由黑帶姬鼠的肺臟分離到漢灘病毒、1981 年漢城病毒的分離成功，以及相關培養技術、鑑定方法相繼發展建立，才使得漢他病毒的研究大為進展；並於 1982 年世界衛生組織的會議中，將漢他病毒所引起的各項與腎病變相關的疾病，統稱為腎出血熱。接著 1993 年 5 月在美國亞利桑那州、新墨西哥州、科羅拉多州和猶他州出現一種不明疾病，病人突然致病演變成急性呼吸窘迫症，致死率高達 50%，最後證實這些不明疾病是由一種新認定的漢他病毒 Sin Nombre virus 所引起的 (Nichol, ST et al;1993)。因為感染的部位主要在肺部，所以另命名為漢他病毒肺症候群(Schmaljohn, CS et al;1997)。

漢他病毒漢他病毒在分類上屬於布尼亞病毒科為一種經由鼠類直傳染給人的病毒，由含有三條單股負股 RNA 的病毒顆粒，其病毒顆粒成圓形直徑約 100nm，這三條單股核糖核酸分別用於合成核糖核酸聚合酵素、外套膜醣蛋白(G1 和 G2) 及核蛋白。目前根據抗原及基因特性的分析，至少可歸納成八個不同的病毒亞型，且各有不同宿主，分列如下，漢灘病毒(Hantaan virus)～赤背條鼠(*Apodemus*

agrarius)、漢城病毒(Seoul virus)~溝鼠(*Rattus norvegicus*)、普馬拉病毒(Puumala virus)~堤田鼠(*Clethrionomys glareolus*)、觀景山病毒(Prospect Hill virus)~草地田鼠(*Microtus Pennsylvanicus*)、泰國病毒(Thailand virus)~鬼鼠(*Bandicota indica*)、杜不拉巴病毒(Dobrava virus)~黃頸姬鼠(*Apodemus flavicollis*)、多答巴拉牙姆病毒(Thottapalayam virus)~錢鼠(*Suncus murinus*)及未名病毒(Sin Nombre virus)~鹿鼠(*Peromyscus maniculatus*) (Alexeyev, OA et al;1993、Peters, CJ et al;1996、Rand, MS 1994, Song, NW et al;1996)。每一病毒具有特定齧齒類動物宿主。病毒在齧齒類動物體內造成終生感染，但無症狀，齧齒類動物之間主要經平行的、呼吸道傳播。人類經由吸入含病毒之乾燥排泄物，如尿液、糞便感染。齧齒類動物咬傷(唾液)亦可罹病。潛伏期為4 - 42天，平均為兩週 (Tsai, TF et al;1987、Kim, YS et al;1995、Peters, CJ et al;1996)。每年全世界約有十五萬漢他病毒感染住院病人，死亡率為1-10 % 不等。目前主要分佈於韓國、俄羅斯等三十一個國家和地區。中國大陸至少有二十九個省市有本病發生。發病數大約每年五、六萬人，居世界各國出血熱之首位。眼眶痛頭痛和腰痛食慾不振、噁心、嘔吐、腹痛、腹瀉，休克為其主要症狀 (Butler, JC et al;1994、Duchin, JS et al;1994、Ruo, SL et al;1994、Li, YL et al;1995、Xiao, SY et al;1994)。

至於實驗診斷方法仍然不例外以血清學檢驗 (Elwell, MR et al;1985、Schmaljohn, CS et al;1985、Hjelle et al;1997)、病毒分離(Lee, HW et al;1978、Elliott, LH et al;1994)、免疫組織化學法和反轉錄酵素鏈反應 (Li, D et al;1995) 為主。其中病毒分離，由人類分離漢他病毒非常不容易，因此無法以病毒分離當作很有效的診斷用工具。用ELISA檢測法檢測特異性的IgM時，血清抗體效價 $>1:20$ 為陽性，病後二、三天即可出現之，第五天可達高峰，利於早期診斷。特異性IgG抗體 $1:40$ 為陽性，兩次血清滴度達4倍以上升高時則更有診斷價值。這些檢驗大都需要抗原、單源或多源抗體及核糖核酸的排列順序，因此在平常沒有緊急病例時，我們會以分子生物技術去生產外套膜醣蛋白(G1和G2)及核蛋白，然後由這些蛋白當作抗原生產單源或多源抗體；我們也會針對台灣的溝鼠及家鼠或其他有可能攜帶漢他病毒的鼠種多做調查，然後由血清陽性的老鼠來分析漢他病毒的核

糖核酸排列順序，以便累積台灣本土型的資料，這可利於反轉錄酵素鏈反應引子的設計，甚至可運用到微陣(microarray)的設計。

我們實驗室的診斷方式(必需至少一項符合)：

- (一) 病毒分離、鏡檢：利用 Vero 細胞來分離病毒，並觀察細胞病變之現象。取此細胞病變之細胞或細胞外液體，經病毒去活化及濃縮體積後，進行電子顯微鏡鏡檢來觀察病毒之外型。
- (二) 病毒基因偵測：以漢他病毒基因序列為基礎，設計出可增殖漢他病毒之正反引子(見 89 年計畫)，利用反轉錄聚合酵素連鎖反應之技術予以鑑定。
- (三) 病毒基因定序分析：將所得到之基因片段給予基因序列分析，將得到之基因序列與漢他病毒基因庫進行資料比對，確立此致病毒及其病毒亞型。
- (四) 血清學檢查：利用漢他病毒之基因序列為基礎，以基因選殖之方式，得到長度約為 1.5 Kb 且經電腦軟體分析具有免疫抗原性之漢他病毒核蛋白或外套蛋白(見 89 年計畫)。利用細菌或真核細胞株系統大量製備檢測用抗原。製備之檢測用漢他病毒抗原，進行病人血清 IgM-capture or IgG 特異性抗體之分析。
- (五) 病毒抗原檢查：利用大量製備之檢測用漢他病毒抗原，製備出漢他病毒之多源抗體及單株抗體，以免疫轉漬之方法分析感染之 Vero 細胞溶解液之漢他病毒抗原。以免疫螢光分析偵測感染之 Vero 細胞中漢他病毒抗原之出現。
- (六) 核酸原位雜交法、免疫組織染色分析：利用核酸原位雜交法偵測漢他病毒感染病人的組織細胞中立百病毒之基因；利用免疫組織染色偵測漢他病毒感染病人的組織細胞中漢他病毒抗原之存在。
- (七) 將利用小老鼠為實驗動物，培養漢他病毒。

七、西尼羅河病毒

去年 10 月份於紐約等三州爆發西尼羅河病毒疫情，計有 59 人發病、7 人死亡。疫情爆發之初，誤診斷為聖路易腦炎病毒，後出現鳥類死亡案例後，多項樣本幾經查證，利用具西尼羅河病毒特異性之引子診斷 (Jia XY et al;1999、Lanciotti RS et al;1999)，最後才確定是西半球未曾出現過的西尼羅河病毒。得到此病毒基因序列顯示和 1977~1980 年間在中東以色列爆發疫情造成 33% 老人死

亡的 Endemic West Nile virus 有 99%以上的相同性。此病毒與日本腦炎病毒屬同一族群。好發於非洲、歐洲、蘇聯、中東及遠東地區 (Hubalek Z et al;1999)。病毒毒性低，人類感染後多半沒有症狀或症狀很輕微，但是以色列曾發生老年人患病而有 33%死亡之病歷報告。由蚊子 (Culex spp.) 及野鳥來傳遞。(蝙蝠為可能寄主) 可造成散發性之馬及狗之腦炎症狀。潛伏期為 1~6 天。人感染後可造成發燒、頭痛、背痛、全身肌肉酸痛及食慾不振之臨床症狀持續 3~6 天。發燒呈現雙峰的型態。

有一半的病患在發燒末期會出現疹子的現象。疹子呈現小的丘疹或大的斑疹形狀，不會發癢，此疹子可持續出現一星期。常見有淋巴腺腫大的現象。有少數的病人會發展成無菌性腦膜炎、腦膜腦炎、脊髓炎、視神經炎或多發性神經根炎 (Ceausu E et al;1997)。

我們實驗室的診斷方式(必需至少一項符合)：

- (一) 病毒分離、鏡檢：利用 Vero 細胞來分離病毒，並觀察細胞病變之現象。取此細胞病變之細胞或細胞外液體，經病毒去活化及濃縮體積後，進行電子顯微鏡鏡檢來觀察病毒之外型。
- (二) 病毒基因偵測：先應用黃質病毒共同之正反引子做反轉錄聚合酶連鎖反應，再以西尼羅河病毒專一之正反引子(見 89 年計畫)做反轉錄聚合酵素連鎖反應予以鑑定。
- (三) 病毒基因定序分析：將所得到之基因片段給予基因序列分析，將得到之基因序列與西尼羅河病毒基因庫進行資料比對，確立此致病毒及其病毒亞型。
- (四) 血清學檢查：利用西尼羅河病毒之基因序列為基礎，以人為基因合成之方式，合成長度約為 0.5 Kb 且經電腦軟體分析具有免疫抗原性之西尼羅河病毒核蛋白或外套蛋白(見 89 年計畫)。利用細菌或真核細胞株系統大量製備檢測用抗原。製備之檢測用西尼羅河病毒抗原，進行病人血清 IgM-capture or IgG 特異性抗體之分析。用 ELISA 檢測法檢測特異性的 IgM 時，血清抗體效價>1：20 為陽性，病後二、三天即可出現之，第五天可達高峰，以利於早期診斷。特異性 IgG 抗體 1：40 為陽性，兩次血清滴度達 4 倍以上升高時則更有診斷價值。
- (五) 病毒抗原檢查：利用大量製備之檢測用西尼羅河病毒抗原，製備出西尼羅河病毒之多源抗體及單株抗體，以免疫轉漬之方法分析感染之 Vero 細胞溶解液之西尼羅河病毒抗原。以免

疫螢光分析偵測感染之 Vero 細胞中西尼羅河病毒抗原之出現。

(六) 核酸原位雜交法、免疫組織染色分析：利用核酸原位雜交法偵測西尼羅河病毒感染病人的組織細胞中西尼羅河病毒之基因；利用免疫組織染色偵測西尼羅河病毒感染病人的組織細胞中西尼羅河病毒抗原之存在。

八、黃熱病毒

本病毒屬於生物安全等級第三級之致病源，屬於黃質病毒科(*Flavivirus*) (Rice CM et al;1985)。此疾病常發生在南美洲及非洲地區（在中國大陸、東南亞及台灣地區皆沒有感染之報告）。至於亞洲只有零星的境外移入病例，未曾大流行過，然而現在各種交流日趨密切，對這種較少發生的病在鑑定判斷的經驗較少，更是要未雨綢繆。其經由埃及斑蚊叮咬感染，感染後可造成突發症狀，發冷發熱、劇烈頭痛、頭暈、頸部、腿部及背部疼痛、惡心、嘔吐、衰弱、嚴重腸胃症狀、黃疸、黏膜充血、胃及牙齦出血、排尿量減少、譫妄。潛伏期 2~6 天，高罹病率。致死率為 5 % (有肝臟病症時會更高)。它在臨牀上常常跟其他會造成黃疸且發燒的感染疾病混淆在一起，如瘧疾、傷寒、登革熱和細螺旋體病等，所以它的偵檢鑑定顯得更重要。

黃熱病病毒是屬於黃質病毒的原型(Calisher, C. H. et al;1989)，它的病毒顆粒呈球形，直徑大約為 43 nm，內含有 nucleocapsid 外則被脂質包圍著。Nucleocapsid 除了蛋白外還帶有一條單股正向的核糖核酸甘，依這核糖核酸甘的順序表現出一條 polyprotein，這 polyprotein 再經過 proteases 的修剪可形成三個結構蛋白和七個非結構性蛋白。其中結構蛋白 E 和 M 具有很強的免疫抗原性，所以是最適當的偵檢對象及作為疫苗用的蛋白。蚊子是這病毒的主要媒介，在森林間這病毒經由白天較活動的蚊子（像 *Haemagogus spp.* 和 *Ae. africanus*）傳播於非人類的靈長動物，而都市鄉村型的黃熱病則由埃及斑蚊等當作人與人之間的傳播媒介。目前 WHO 已有很好之疫苗，但無有效之藥物治療。

黃質病毒分離及感染率的分析可用未斷乳的小老鼠以腹腔注射或顱腔注射，也可用斷乳的小老鼠，但只能以顱腔注射來測試。另外因為這病毒一般對很

多細胞都有細胞病變及形成斑點，像 vero、MA-104、BHK、LLCMK2、MA-111、PS 和 SW13。也有人注射至蚊子或蚊子細胞如 C6/36、C17、Mos61，用免疫螢光的方法來確認，這可以增加檢驗的靈敏度並加速分析的速度，不過這方法還是非常耗時間。在病毒血症的期間，血清中的病毒抗原可被偵檢到的可能性不低，這主要決定於好的抗體和檢體收取的時間點。傳統的血清測試方法都被 ELISA 所取代(Monath TP et al;1984)，尤其是 IgM capture immunoassay，這取決於好的抗原。RT-PCR 可檢測血中病毒 RNA 的快速方法，檢體收取的時間點、檢體的保存方法、病毒 RNA 的萃取方式和測試引子的設計對檢測非常重要。因此在平常時我們需要準備好黃熱病病毒的抗原和抗體。

我們實驗室的診斷方式(必需至少一項符合)：

- (一) 病毒分離、鏡檢：利用 Vero 細胞來分離病毒，並觀察細胞病變之現象。取此細胞病變之細胞或細胞外液體，經病毒去活化及濃縮體積後，進行電子顯微鏡鏡檢來觀察病毒之外型。
- (二) 病毒基因偵測：先應用黃質病毒共同之正反引子做反轉錄聚合酵素連鎖反應，再以黃熱病專一之正反引子(見 89 年計畫)做反轉錄聚合酶連鎖反應予以鑑定。
- (三) 病毒基因定序分析：將所得到之基因片段給予基因序列分析，將得到之基因序列與黃熱病基因庫進行資料比對，確立此致病毒及其病毒亞型。
- (四) 血清學檢查：利用本所病毒庫保存之黃熱病毒病毒，增殖後抽取其基因組，反轉錄聚合酵素連鎖反應放大經電腦軟體分析具有免疫抗原性之核蛋白或外套蛋白區域。利用細菌或真核細胞株系統大量製備檢測用抗原。製備之檢測用黃熱病毒抗原，進行病人血清 IgM-capture or IgG 特異性抗體之分析。用 ELISA 檢測法檢測特異性的 IgM 時，血清抗體效價 $>1:20$ 為陽性，病後二、三天即可出現之，第五天可達高峰，以利於早期診斷。特異性 IgG 抗體 1:40 為陽性，兩次血清滴度達 4 倍以上升高時則更有診斷價值。
- (五) 病毒抗原檢查：利用大量製備之檢測用黃熱病毒抗原，製備出黃熱病毒之多源抗體及單株抗體，以免疫轉漬之方法分析感染之 Vero 細胞溶解液之黃熱病毒抗原。以免疫螢光分析偵測感染之 Vero 細胞中黃熱病毒抗原之出現。
- (六) 核酸原位雜交法、免疫組織染色分析：利用核酸原位雜交法偵測黃熱病毒感染病人的組織

細胞中黃熱病毒之基因；利用免疫組織染色偵測黃熱病毒感染病人的組織細胞中黃熱病毒抗原之存在。

(2) 材料與方法：

本計畫所用之血清或尿液檢體均為疑似第四級病毒感染之病患檢體。,根據上述之檢驗流程作業，所必須應用之方法及實驗步驟簡要如下。

病毒抗原製備：國內直至目前為止並無第四級病毒感染之病例報告，更因此類病毒受到國際協會的管制無法獲得這些第四級病毒做為參考病毒。所以這些病毒抗原之製備，則需靠人工合成基因之方式獲得（目前人工合成基因之技術已趨成熟）。我們可將此人工合成基因以大腸桿菌或昆蟲表現系統來大量表現病毒蛋白，做為診斷用之病毒抗原。

病毒分離培養：Vero E6 細胞以Eagles' minimum essential medium (EMEM，內含10%加熱去活化胎牛血清)在37°C，5%CO₂的條件下培養。該細胞被用來分離多種出血性病毒。細胞接種後，改以 2%EMEM做繼代培養。送檢樣本先經過濾除去雜質後，上浮液以 EMEM 培養液調整成10%的懸浮液，以100μl 之該懸浮液，於37°C接種至70%細胞滿的25cm² 的培養瓶，接種2小時候，再加入5ml 2% EMEM培養液，置入37°C，5%CO₂ 培養箱之後，每兩週做一次繼代培養，先吸出上層培養液，以0.25% Trypsine-EDTA處理分離細胞，再混入原吸出之培養液，而後將1/3量置入新的 25 cm²培養瓶，並以 2%EMEM 補足至5 ml ，另1/3 置於-70°C 凍存，另1/3量留做免疫轉漬檢測用。

血清檢體病毒或細胞培養病毒液RNA之萃取：使用Quagen 廠牌之QIAamp Viral RNA抽取試劑組，依廠牌步驟指示，略述如下。取 140μl血清加入560μl AVL 溶液(註)，室溫靜置10分鐘，再加入560μl絕對酒精，混勻後，10000rpm轉速離心使通過QIAamp Spin Column，續以500μl AW 溶液(註)清洗管柱兩次，最後以80°C 之60μl Rnase-free ddH₂O 沖流出病毒RNA (Homczynski, P et al;1987)。 註：廠商未說明AVL及之AW 溶液內含物。

反轉錄-聚合酵素連鎖反應(Reverse Transcription-PCR)：在由細胞培養液或血清檢體萃取出之RNA溶液中，加入上、下端引子(100μl)後，將此混合物於90°C 加

熱5分鐘，置於冰上3分鐘，短暫離心收集溶液於管底。取20 μ l此模版/引子溶液於0.2ml離心管中，並加入5 μ l10x緩衝液 (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH8.3, 15 mM MgCl₂, 0.01% (v/v) gelatin), 4 μ l 2.5 mM dNTPs (BRL), 0.5 μ l 0.1M DTT (dithiothreitol), 0.5 μ l 核糖核酸酵素抑制劑(ribonuclease inhibitor, RNAsin, 10U/ μ l, BRL), 0.5 μ l SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RNase H⁻, 20U/ μ l, BRL)和0.5 μ l AmpliTaq DNA polymerase (5U/ μ l, Perkin Elmer)，以depc無菌水將總體積補至50 μ l，混合均勻後，於GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) 進行反轉錄-聚合酵素連鎖反應。反應條件如下：於41°C 進行反轉錄反應60分鐘，再進行聚合酵素連鎖反應：94°C 40秒，38°C 40秒，72°C 1分鐘，共40個循環。

巢式聚合酵素連鎖反應(Nested-PCR)：巢式聚合酵素連鎖反應則接著在第一對引子增幅得到之病毒核酸中，再設計出第二對引子進行病毒核酸增幅聚合酵素連鎖反應，其目的在增加診斷之專一性及敏感性。取10% (5 μ l) RT-PCR反應之溶液為模版於0.2ml 離心管，加入上、下端引子(100 μ M) 各1 μ l，5 μ l 10 x PCR緩衝液，4 μ l 2.5mM dNTPs, 0.5 μ l 0.1M DTT, 0.5 μ l AmpliTaq DNA polymerase (5U/ μ l, Perkin Elmer)，以無菌水將總體積補至50 μ l混合均勻後，於GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) 進行聚合酵素連鎖反應。反應條件如下：94°C 40秒，41°C 40秒，72°C 1分鐘，共35個循環。反應完成後以瓊脂凝膠進行電泳以分析所得片段。

雙股DNA定序法：將聚合酵素連鎖反應得到之DNA片段，做DNA定序反應，其目的在做進一步之確認。DNA定序是採dye-dideoxyribonucleotide chain termination。以耐熱之sequenase 進行cycle sequencing。以Qiagen PCR/gel purification kit純化PCR產物以除去dNTPs、primers或其他雜質。取0.2至2 μ g 之

雙股DNA於0.2ml 微量離心管中，加入5 μ l 1 μ M 之適當引子，以無菌水將體積

調至12 μ l，再加入8 μ l sequencing reagent pre-mix (Amersham Thermal Sequenase pre-mix kit, US 79765)，混合均勻後，置入GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) 進行cycle sequencing。反應條件如下：96°C 30秒，38°C 15秒，60°C 4分鐘，共30個循環。反應完後，將溶液轉至1.5 ml 微量離心管，加入7ml 7.5M KOAc和2.5倍體積 (約 68 μ l) 之isopropanol，混合均勻後置於冰上至少15分鐘。12,000離心15分鐘，棄置上清液，以300 μ l 70% 酒精清洗一次，抽氣乾燥後，將核酸溶於4 μ l loading dye (Amersham)。於70°C 加熱2至5分鐘，短暫離心後置於冰上。以4.75%acrylamide gel (acrylamide: bis= 19:1, 8.3 M urea in 1X TBE《每公升含Tris (Tris(hydroxymethyl) aminomethane) 10.8g, boric acid 5.5g, EDTA 0.93g》)，1500伏特，於DNA序列繪跡儀373A (Applied Biosystems.)進行13小時之電泳，以電腦程式Data Collection (v 1.2.1, Applied Biosystems.) 收集資料，Sequence Analysis (v 2.0.1, Perkin Elmer) 進行資料分析。

酵素連結免疫吸附試驗(MAC-ELISA)：首先加100 μ l/well 1:200 goat antihuman IgM抗體於96-well plate，於室溫下靜置4小時，以PBS沖洗各well，再以4%BSA(bovine serum albumin)加入各well，此為blocking step，於37°C放置5分鐘後，以PBS沖洗各well，於各well中加入50 μ l 1:10稀釋之血清，於室溫下靜置2小時，吸取稀釋之血清後以PBS沖洗各well，然後於各well中加入50 μ l定量之病毒濃縮液或純化之病毒抗原，於室溫下靜置2小時，以PBS沖洗各well，於各well中加入25 μ l horseradish peroxidase-conjugated 單株抗體，於37°C反應30分鐘後，以PBS沖洗各well後，各加入100 μ l之ABTS受質，於37°C反應30分鐘後加入停止溶液，再於室溫下靜置2小時，最後以ELISA reader 於405nm波長下讀取吸光值。評估結果時，每一plate都以至少一個已確立感染者血清做為positive control，並以三個未感染血清做為negative control，此三個negative control所得之mean+3SE 做為判定之標準，超過此值判為陽性，反之為陰性。

酵素免疫吸附分析法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA)：將96孔酵素免疫分析盤劃分為上下兩部份，其一加入100 μ l 1：2000稀釋之病毒抗原混合液，另一半加入100 μ l 1：2000稀釋之E6細胞之抗原液以作為對照實驗。將加好抗原

之96孔酵素免疫分析盤靜置於4°C，隔夜後即可使用。把置備好的酵素免疫分析盤先以washing machine以磷酸緩衝液(Phosphate Buffer Saline; PBS, 8mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 140mM NaCl, 10mM KCl)洗淨，將待測血清以10%脫脂乳(skimmed milk)以1：100濃度稀釋，分別加入100μl 稀釋血清於盤中之對照組於實驗組中。於37°C中作用1小時後，以PBS清洗酵素免疫分析盤，在酵素免疫分析盤中之孔內，各加入100μl以1：2000稀釋之第二抗體(Goat anti-Rat IgG-HRP, Cappel)，再置於37°C反應1小時，清洗酵素免疫分析盤後，每孔加入100μl之呈色劑(TMB-0.035% H₂O₂, in Citrate-Citrate buffer, pH5.5)置於室溫於黑暗中作用15-20分鐘後，每孔加入50μl反應終止溶液(2M H₂SO₄)，以分光光度計OD₄₅₀測其吸光值，作分析比較，將OD₄₅₀值高於負對照平均值加3倍標準差者，視為正反應。

免疫螢光染色(IFA)：將適量經Trypsin-EDTA處理分離下來的 Vero-E6細胞，滴至12孔玻片上，置於抽氣櫃中抽乾，而後以-20°C 1:1 之甲醇/丙酮溶劑固定2分鐘，在放入抽氣櫃以揮發甲醇/丙酮固定液。以PBS沖洗各well後，加入初級抗體(1:100 in PBS)，於37°C反應30分鐘，以PBS重複浸洗3次，每次各5分鐘，再加入FITC標定之次級抗體(1:100 in PBS)，於37°C反應30分鐘，以PBS 重複浸洗3次，每次各5分鐘，待加入0.5ml之PBS後，以免疫螢光顯微鏡觀察染色結果。

凝膠電泳與轉漬酵素免疫反應：根據 Laemmli(1970)所敘述之 SDS-polyacrylamide electrophoresis 方法，採用 10% separating gel。首先將準備好之病毒液或基因表現之病毒蛋白與等量之 2 X sample buffer 混合，經沸水煮 10 分鐘。將此混合液加入 2.5% stacking gel 之樣品槽中，以固定電壓 100 伏特進行電泳，待指示劑向下移動至距膠體底端 2 公分處，停止電源。參考 Towbin et al(1979)之方法，利用 Semi-Dry Blot 的方式，將凝膠電泳上之病毒蛋白轉漬到與膠體一樣大小之 NC-膜。轉漬後將 NC-膜剪成一條條長形之膜，進行酵素免疫反應。先以 10% 胎牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)與 NC-膜做非特異性結合，於 37°C 反應 60 分鐘，再加入稀釋之病人血清，於 37°C 反應 60 分鐘，以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 分鐘，再加入 HRP 結合之次級抗體 Goat-antihuman IgG-HRP (1:100 in PBS)，於 37°C 反應 30 分鐘，以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 分鐘，待加入含有 3-Amino-9-EthylCarbazole(AEC)和 H₂O₂ 的溶液後，等待十五分鐘後結果呈現粉紅色至褐色反應，依其蛋白分子大小判定為是否陽性。

表現重組蛋白：將大腸重組基因表現載具之大腸菌培養至 log-phase transformed 經過 IPTG 的刺激 3 小時後，離心、去掉培養液、沈澱的大腸菌體浮懸在 TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA 和 50 mM NaCl) 及 1 mg/ml lysozyme 中，保持在 4°C 40 分鐘，再以超音波打破菌體，加 5 mg/ml DNase I NaCl-Mg 在溶液中 4°C digest DNA 60 min，離心、收沈澱物。沈澱物用 TEN buffer 含0.1% NP-40 洗兩次後，將沈澱物溶於 GTG buffer (5M Guanidine-HCl,

50 mM Tris-HCl pH 8.0, and 10% glycerol), 加入 2-mercaptoethanol 至 8 mM 放置於 60°C 30 min, 然後以 GTG buffer 稀釋 8 倍並和 Ni-NTA 樹酯混合, 用大量的 GTG buffer 洗掉沒附著上的雜質後, 再以 GTG buffer 含 0.25 M imidazole elute 出表現蛋白。若需要進一步 renaturation 成 active form of viral protein, 則沖出液稀釋至 $A_{280} < 0.200$ 以下, 用 0.5 M guanidine HCl-50 mM Tris HCl pH 8.0 - 1 mM EDTA-1 mM dithiothreitol-20% glycerol 透析, 在換為 buffer A (25 mM HEPES pH 7.4-50 mM KCl-0.02% 2-mercaptoethanol-1 mM EDTA-0.01% Triton X-100-20% glycerol) 4°C 至少 6 小時。

純化各種重組蛋白：由於各種蛋白的特性都不同，所以純化的方法都不一樣，上述所得的 Ni-NTA eluent 可試著用分子量的大小、帶電量的多寡、親脂性的強弱、或有特別的特性來做分離，然後進一步用 FPLC column 來做分離。

抗體的製備：抗各種重組蛋白的抗體可已經 Ni-NTA column 純化的蛋白或經一些層析的高純度蛋白當作抗原即可，亦可用經過 renaturation 的 active form of recombinant protein，至於動物以兔子和老鼠為主，而老鼠的動物 model 可進一步試著去生產單株抗體，這些抗體可來做偵檢用。

(3) 結果：

九十年一月中旬花蓮發生吳氏一家三口疑似漢他症狀後，九十年二月一日本所一隊人馬到花蓮去做疫情調查，三天共捕獲小型齧齒動物；錢鼠 35 隻、溝鼠 25 隻、小黃腹鼠 3 隻、鬼鼠 3 隻，共計 66 隻（表一）。我們用合成的漢城病毒 nucleocapsid 重組蛋白覆蓋在 ELISA 碟子上，用此種碟子來作 ELISA 分析老鼠血清，結果有四隻動物第 10、35、36、66 號的血清呈現抗漢他病毒抗體為陽性，這四隻都是溝鼠。進一步取小塊的溝鼠肺臟，經磨碎純化 RNA，以此檢體用 RT-PCR 做檢測，用 S、M 和 L 基因設計的引子，結果在第 10、35、66 號老鼠都為陽性，如圖一顯示 M 基因引子的結果，由 RT-PCR 表示這三隻溝鼠攜帶漢他病毒，第 36 隻老鼠只有血清含有抗體而不帶病毒，可推測此老鼠應曾經感染過這類病毒，但被捕捉之時已不攜帶病毒。且由鼠種和這三組設計的引子、重組蛋白可推測這病毒是漢城株的可能性很高。

因第 66 號老鼠的肺臟較大，材料較充分且它的 RT-PCR 訊息很強，我們挑選花蓮第 66 號老鼠，來繼續分析感染它的病毒的 S、M 和 L 基因 RNA 序列，分別利用 4 對、6 對和 8 對引子以 RT-PCR 來 amplify S、M 和 L 基因片段並分析其序列，這些序列都經過三次不同 RT-PCR 及正反二方向的確定並排除由 PCR 所造成的錯誤，至於 5'

和 3' 端的序列則以 random hexamer 去取得 5' 和 3' 端的 cDNA 片段，然後接入 TA vector 測定序列。目前 S 和 M 基因的全長都已經完全獲得，L 基因約 6.5K 的序列已完成 4K 以上。

現在在 gene bank 登記的漢城病毒 (Seoul type) 全長的 S 基因共有 9 株，再加上我們從台中梧棲港捕獲的老鼠第 106 分離出一株漢城病毒，並且將其全長的核酸序列分析。若將這些漢城病毒全長的 S 基因序列和花蓮 66 老鼠全長的 S 基因 (SeoHL66S) 序列做比對，結果如表二，其 RNA 的相似性除了 SeoAa9S (大陸) 和 SeoGou3S (大陸) 各為 68.3% 和 85.3% 以外，其它的都在 96% 附近，尤其 Swc106S (梧棲老鼠 106 S segment) RNA 相似性高達 97.6%，因此可確定這花蓮 66 老鼠攜帶的病毒確實為漢城病毒。圖二顯示由 S 基因比較推演出的漢城病毒種源關係樹狀圖，而它 S 基因的 RNA 序列似乎較接近於台灣梧棲病毒 (Swc106S)，是否它們早已形成本土化，然後漸漸散佈於台灣，逐漸各自突變演化而成，不過從另一角度看，因各港口的陽性率較高而內地之感染率相當低，所以從台灣各港口互相移出入，來散佈的可能性也不小，或者從大陸的某一定點港口分散至台灣各港口，亦有其可能性，因此仍需要收集分析更多的漢城病毒和基因序列來證明。

這 SeoHL66S 基因 5'、和 3' 端約 15bp 能互補形成 pan handle 的

形狀，這結構可能與病毒複製有關係。從第 43 到 1332 nucleotide 能夠複製一條 429 個氨基酸的蛋白，它的氨基酸序及此蛋白一些推測的特性列表示於圖三，預測其分子量約 48kDa，isoelectric point 為 7.36，其電荷和酸鹼度的關係表示於圖四，此蛋白所含的 cysteine 約 1.17% 較偏低，有可能會形成 disulfide bond 的機會低，因此在大腸菌或原核細胞系統來表現重組蛋白有可能得到具有活性的蛋白，親脂性的氨基酸約佔 32.63% 算是很正常的，但於氨基酸 120 到 145 間為較親脂性，有可能附著於 envelope 或親脂性區域互相结合在一起，其推測的親脂性、親水性、抗原性和二次結構的分佈情況顯示於圖五，酸性和鹼性氨基酸比例一樣為 13.29%，且分佈得很均勻，因此這蛋白的功能為 nucleocapsid，如何能和帶負電的病毒 RNA 結合在一起；形成非常緊實的結合體仍然需要進一步的去探討。若比較這 11 株漢他病毒 S 基因所複製蛋白的相似性；其結果顯示於表三，它們之間的相似性更高，除了 SEOA9S 與其它病毒株都介於 81% 之間，有趣的是 SEOGOU3S 和其它株的 DNA 只有 85~86% 的相似性，然而氨基酸序列的相似性竟然高達 97~98% 以上，因此大部分的基因突變為 nonsense，如此高的保守性也表示它們氨基酸序列結構上在此蛋白功能的必需性，至於梧棲 SEWC106S 和花蓮 SEOHL66S 仍為最接近，還有 SEOA9S 的差異較大是否造成此株病毒的感染性是否有差異也

是很想知道的問題。

至於花蓮第 66 老鼠的 M 基因長為 3652 個 nucleotides，同樣的在 5' 和 3' 端有 15 個 nucleotides 能互補形成 pan handle 的形狀，這也是 Bunyaviridae 的特性，若與其它已知的全長 M 基因來比較核酸序列，結果如表四，給予更多的證據支持花蓮第 66 老鼠分離之病毒為漢城病毒，除了 SEOHU694 和 SEOOU3M 之相似性很低；各為 47.1 和 82.8% 外，因此 SEOHU694 似乎不應該列於這一種病毒中，其它的漢城病毒 M 基因序列之間的相似性都介於 94.8~95.6% 之間，至於在台灣分離的兩株之間高達 96.1%。還有其中 SEOKI83M 和 SEOKI85M 為日本同一地區不同年代的老鼠身上分離出的病毒，兩者 RNA 的相似性高達 99.8%，因此同一株漢城病毒經過演化其相似性仍然很高，當然這差異性也會隨著時間加長而變大。圖六顯示 M 基因比較推演出的漢城病毒種源關係樹狀圖，而花蓮第 66 老鼠感染的病毒的 M 基因 RNA 序列仍然較接近於台灣梧棲病毒 (Swc106MD) 的，而與 SEOL99M 較接近，此株病毒是在大陸分離到的漢城病毒且被用來當疫苗株用。

推測這 SEOHL66M 基因可複製一個長 1133 個氨基酸的蛋白(圖七)，其分子量約 126kDa，isoelectric point 為 7.12，其電荷和酸鹼度的關係表示於圖八，此蛋白所含的 cysteine 約 5.21% 較偏高，有可能

會形成較多的 disulfide bond，因此結構會比較緊實，很有可能在大腸菌或原核細胞系統來表現重組蛋白不會得到具有活性的蛋白。若比較其它漢城病毒的 M 蛋白結果如表五，花蓮 SEOHL66M 蛋白和梧棲 SEWC106M 蛋白只有 97.8% 的相似性，反倒比其它大部分的幾株漢城病毒 M 基因序列相異性較大，但是氨基酸序列之相異性卻來的低，大部分的差異仍然是相同性質的氨基酸置換，只有花蓮 SEOHL66M 蛋白的幾個氨基酸被置換成不同性質之氨基酸 473C→G、478H→N、520E→K、861C→R、和 969K→E，不知這些差異對病毒的影響有大？

一般漢他病毒 M 基因可複製一個蛋白，接著這蛋白經過修飾得到 G1 和 G2 兩個糖蛋白，構成 envelope protein，同樣的這 SEOHL66M 複製的蛋白具有 WAASAA 的氨基酸排列 domain（圖七中氨基酸 562 至 567），而被切成兩個蛋白 G1 和 G2。推測的 G1 約有 647 個氨基酸，分子量約 72kDa，偏弱鹼性。在其 N 端含有一段約 20 個親脂性的氨基酸，應該是 signal peptide，當蛋白被製造出來時，signal peptide 把蛋白帶到內質網內，同時這段 signal peptide 也被切掉，至於 G1 的推測結構與親脂性抗原性等等顯示於圖九。至於 G2 含 487 個氨基酸，分子量約為 54 kDa，在氨基酸 448~479 是較傾向親脂性，有可能讓 G2 能附著於 envelope 上，圖十顯示 G2 推測的二次結構和親脂性、抗原性的分佈情形。

89 年我們曾把梧棲 SWC106S 基因片段經克隆及分子生物的技術，轉殖到 vector pET32a 進入大腸菌系統，大量的表現重組漢他病毒核酸蛋白，然後進一步純化，將這蛋白用來誘導多株抗體的生產，結果能產生高滴定量的抗體，不過也遇到很多困難，仍需要進一步的改良，最主要的問題在於這重組蛋白表現出來在 inclusion body 中，為不可溶，需要用 chaotropic reagent 來溶解如 urea，因此它的活性結構被完全破壞，所純化的蛋白可以誘導抗體的產生，但是這抗體只認線性排列順序的 epitope，對 native form 的蛋白 titer 降低很多，因此我們試著繼續改進這缺點，譬如將這基因移轉到其它真核細胞的系統如 baculovirus system 或者尋找 renaturation 的方法，甚至用花蓮 SEOHL66S 基因來置換，或者將 histidine tag 改到 C 端，這工作將繼續延續到 91 年度，一旦得到 native 蛋白馬上進行誘導抗體的工作。至於 G1 和 G2 蛋白的基因工程也試著去進行，目前已將全長的 G1 和 G2 或者全長的 M 基因片段連結起來，進入 vector pET32a 在大腸桿菌系統表現，不過很不幸正如前所預測；產量低且不穩定很容易被分解掉，這部分的工作也是延續至 91 年度，轉換到真核細胞的系統來表現。

至於其它大部分的第四級病毒無法取得標準病毒株，只能由生物資訊資料庫取得基因序列的資料，從這些資料或發表的文獻設計取得

一些引子對，作為 RT-PCR 或巢式 PCR 偵檢時所需，、表六、七和八分別列出各型伊波拉出血熱病毒、拉薩熱、馬堡病毒和克里米亞-剛果熱等病毒、立百及西尼羅河病毒等各有兩對引子。

按照伊波拉出血熱、馬堡出血熱、拉薩熱和立百病毒等蛋白之抗原性，選取抗原性高的 domain，利用人工合成出約 500bp 之核酸片段，伊波拉出血熱病毒位於 nt1719-2218、馬堡出血熱病毒為 nt1469-1967、立百病毒為 nt1190-1689、拉薩熱病毒為 nt43-538，接著分別選殖至表現質體 pQE30 或 pQE31（圖十一），再次作 DNA 定序確定其序列與 pQE 之 His Tag 銜接於相同編列區域(reading frame)，此系列特殊病毒基因片段表現載體除作為表現偵檢蛋白質外，亦可作為 RT-PCR 條件標準化及正對照組之模版。接著誘發和表現病毒基因片段之重組蛋白，這些病毒重組基因片段經 IPTG 誘導之後，以 SDS-PAGE、染色，觀察有否誘發出重組蛋白質，並利用 Western blot 偵測其是否帶有 His-Tag 之序列（圖十二和十三）。結果除了拉薩熱病毒之核蛋白質重組片段之產量非常低，馬堡出血熱病毒和立百病毒均可誘發表現出很強的一條 band，分子量約 30kDa 的融合蛋白，這分子量與推算的分子量非常接近，只有載體本身沒接上外來基因沒有表現這一個蛋白，至於伊波拉出血熱病毒之核蛋白質重組片段亦可見到這約 30kDa 的蛋白 band，雖然表現量不是最高但是其純度相當

高，用 anti-polyhistidine 抗體去作 Western blot，Ebola 重組蛋白（30kDa band）能被 anti-polyhistidine 抗體辨認，也就是表示此重組蛋白確實含有 polyhistidine，用這蛋白來誘導多株抗體之產生，並能認此重組蛋白。接著今年要再進一步要去尋找馬堡出血熱病毒和立百病毒重組蛋白的純化部驟，最後可利用這些抗原去檢測抗體之存在否，或去誘導製備多株及單株抗體，還有 Lassa 的重組蛋白也需要作其它改進的方法以求達到相同的目標。

委託檢體之偵檢：

90 年委託分析的檢體都已立即完成偵測之工作，其中花蓮吳氏夫婦和女兒的檢體顯示血清抗體之檢測為陰性，但是肺組織的免疫學染色為陽性，其夫婦和最小女兒的檢體作 RT-PCR 和巢式聚合酵素鍊鎖反應亦為陽性（表九），進一步我們也分析 S 和 M 部分基因的核酸序列，559bp 的 M 基因片段與其它的漢他病毒基因作比較，如表十，可確定它也屬於漢城株的漢他病毒，與台灣的漢城病毒株相似性為 97.1 和 95.5%，這相異性又遠高於 PCR 所造成的錯誤，且這兩株漢城病毒是我們唯一所擁有的漢城病毒株，不可能因污染造成的，若是應與這兩株的相似性應該相當高，因此確有這株病毒的存在。但是否此病毒造成死亡的主因仍待進一步的釐清。

至於其他的檢體、所要求分析的項目及其檢驗結果顯示於表十一，其結果都為陰性，用各種細胞作病毒分離，連續用細胞三次培養仍然無法看到任何 CPE。

(4)討論：

花蓮第 36 隻老鼠血清含有抗體而不帶病毒，可推測此老鼠應曾經感染過這類病毒，但被捕捉之時已不攜帶病毒。一般情況若檢體的取得和儲存過程很好時，抗體和病毒都為陽性率的機會幾乎在 95% 以上，甚至為百分之百，這種情況的比例不高，也就是說一旦溝鼠被漢城病毒感染，幾乎病毒跟隨老鼠一生，不知為何所產生出的抗體沒有中和的能力，或者有其它的機制讓病毒能躲過免疫系統的反應，至於抗體單獨存在的溝鼠又是如何排除病毒？母鼠感染病毒是否可以直接傳給後代？或把抗體傳遞至後代？剛出生之小鼠在免疫系統未成熟前感染病毒，是否就成為終生攜帶病毒？至於抗體為陰性而病毒為陽性的例子也有，不過比例更低，為何病毒會躲過免疫系統而不誘導出抗體？是否在人也會有這種例子發生？這一連串的問題都待進一步的探討。

由以往在台灣地區的漢他病毒調查顯示，在台灣港口區域老鼠感染漢他病毒的比例偏高，感染的老鼠以溝鼠、家鼠為主，病毒則以漢城病毒為主，而內地或山區則幾乎為零，這些病毒如何傳到台灣？是否已經在台灣變成本土化？因此我們去分析台灣各個地區溝鼠感染的病毒基因序列，目前完成兩株分別為梧棲港及花蓮地區各一，跟

其它發表的漢城病毒基因比較，它們 S 和 M 基因的 RNA 序列似乎較接近，是否它們早已形成本土化，然後漸漸散佈於台灣，逐漸各自突變演化而成，不過從另一角度看，因各港口的陽性率較高而內地之感染率相當低，所以從台灣各港口互相移出入，來散佈的可能性也不小，或者從大陸的某一定點港口分散至台灣各港口，亦有其可能性，因此仍需要收集分析更多的漢城病毒和基因序列來證明。

這花蓮 SeoHL66 的 S 和 M 基因在 5'、和 3' 端約 15bp 能互補形成 pan handle 的形狀，這結構是 Bunyavirus 所共有的特徵，是否與病毒複製有關係？RNA polymerase 如何辨識附著到病毒 RNA 上，也不是非常清楚？是否這 pan handle 的結構扮演很重要的角色？S 基因所複製的這蛋白其功能為 nucleocapsid，能與病毒 RNA 很緊密的結合在一起，好讓 RNA 能裝入病毒顆粒中，但此蛋白所帶的電荷幾乎為中性，也沒有一些特定區域帶有較多的正電，如何能和帶負電的病毒 RNA 結合在一起；形成非常緊實的結合體仍然需要進一步的去探討。

由於 S 基因在大腸菌系統所表現的蛋白存在於 inclusion body 裡，為了要操作一定要變成溶解狀態，通常用 chaotropic reagent 來溶解如 urea，因此它的活性結構被完全破壞，經過純化後的蛋白也不具活性，將這蛋白用來誘導多株抗體的生產，結果能產生高滴定量的抗

體，不過也遇到很多困難，需要進一步的改良，所純化的蛋白可以誘導抗體的產生，但是這抗體只認線性排列順序的 epitope，對 native form 的蛋白 titer 降低很多，當用這種多株抗體來測組織的螢光化學染色往往認不到活性的結構，雖然可以把組織切片用低量的 SDS 先行處理再以抗體去染色，但是檢體的新鮮度與處理會影響很大，造成 SDS 的處理破壞組織，沒能把握重現性，因此我們試著繼續改進這缺點，譬如將這基因移轉到其它真核細胞的系統如 baculovirus system 或者尋找 renaturation 的方法，甚至用花蓮 SEOHL66S 基因來置換，或者將 histidine tag 改到 C 端，這工作將繼續延續到 91 年度，一旦得到 native 蛋白馬上進行誘導抗體的工作。

至於 G1、G2 蛋白具有較多的親脂性片段、含較多的 cysteine 氨基酸、也含有糖化的氨基酸序列，由這些特性推測它們應較適合以真核細胞系統來表現，若能同時表現這兩個蛋白有可能生產 pseudo virus particle，因此建立這表現系統是很需要的也很有其開發性。對於漢他病毒的工作，我們會嘗試擴充到漢江病毒，甚至擴展其它漢他病毒肺病症。

目前我們最大的困難是很多病毒沒有標準株，因此再進行偵檢時無法取得陽性的對照組，也無法取得全長的基因作進一步的分子生物

技術利用，唯一用合成基因來開始，即使合成較短的片段或表現蛋白，距利用的層面仍有一段相當遠的距離。目前伊波拉病毒的核蛋白可以被表現，也可以被純化及拿來誘導多株抗體，但這抗原或抗體是否具有活性結構，仍須進一步的證明，因此需要與國外合作幫我們鑑定這些抗體抗原之可用性。至於 Lassa 病毒我們將會以原來設計的基因片段向 3 端延伸避免 5 端核酸片段的影響。我們也會繼續設計合成其它的基因片段，以便建立更多的證據去支持一個病毒的偵檢，最後可再進一步利用這些抗原和抗體建立更方便的紙碟和 ELISA plate。

(5) 結論與建議：

目前台灣可取得的病毒實在太少，除了漢他病毒中的漢城病毒在台灣港區的溝鼠感染率相當高，我們可以由野外調查得到有關本土型的生物資訊，並由這些資訊可設計更適合台灣本土型的偵檢方法，亦可用這些病毒以生物技術建立更多有特異性的偵檢辦法。從另一個方向來看，我們很幸運幾乎沒有屬於第四級的疫情發生，因此我們沒持有這類的病毒，那就更依賴更需要有關這些病毒的生物資訊，來瞭解這些疫情的發生、預防、偵檢及治療，所以這生物資訊要經常更新。

由生物資訊的收集比對，再進一步合成能利用的基因片段，這基因片段可運用到 microarray、抗原及抗體的產生，如立百病毒之發現確定是用合成之蛋白誘導出的抗體，我們將會持續一個個病毒建立起它們的基因片段、抗體及抗原，接著用這些材料制訂出最佳化、標準化的偵檢程序。可是這些抗原抗體是否真的實用，仍然需要有標準的菌株當作陽性對照組，唯一的解決方法就是要建立國際合作管道，測試它們之實用性。

因為病毒的穩定性相當低，要有很確定的診斷有賴於偵檢方法外，檢體之採檢時間、方法、檢體之種類、量和保存之方式都會決定性的影響到偵檢之結果，這些不知要如何去討論溝通改進？再者檢體

運送之程序及安全也是需要更多的考慮及討論。

(6)参考文献：

- Abu-Elyazeed R, el-Sharkawy S, Olson J, Botros B, Soliman A, Salib A, Cummings C, Arthur R (1996) Prevalence of anti-Rift-Valley-fever IgM antibody in abattoir workers in the Nile delta during the 1993 outbreak in Egypt. Bull WHO 74:155-158.
- Alexeyev, OA; Baranov, BA (1993) Puumala Virus Infection without signs of Renal Involvement. Scand. J Infect Dis 25: 525-527.
- Altaf A, Luby S, Ahmed AJ, Zaidi N, Khan AJ, Mirza S, McCormick J, Fisher-Hoch S (1998) Outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Quetta, Pakistan: contact tracing and risk assessment. Trop Med Int Health 3:878-882.
- Arthur RR, el-Sharkawy MS, Cope SE, Botros BA, Oun S, Morrill JC, Shope RE, Hibbs RG, Darwish MA, Imam IZ (1993) Recurrence of Rift Valley fever in Egypt. Lancet 342 :1149-1150.
- Aviles G, Rangeon G, Vorndam V, Briones A, Baroni P, Enria D, Sabattini MS (1999) Dengue reemergence in Argentina. Emerg Infect Dis 5:575-578.
- Baron RC, McCormick JB, Zubeir OA (1983) Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. Bull WHO 61:997-1003.
- Bertherat E, Talarmin A, Zeller H (1999) Democratic Republic of the Congo: between civil war and the Marburg virus. International Committee of Technical and Scientific Coordination of the Durba Epidemic. Med Trop (Mars) 59:201-204.
- Borisevich IV, Mikhailov VV, Potryvaeva NV, Malinkin IuN, Kirillov AP, Krasnianskii VP, Markov VI, Makhlai AA, Lebedinskaia EV (1996) Development of the immunoenzyme test-system for detection of Ebola virus antigen. Vopr Virusol 41:232-234.
- Burney MI, Ghafoor A, Saleen M, Webb PA, Casals J (1980) Nosocomial outbreak of viral hemorrhagic fever caused by Crimean hemorrhagic fever-Congo virus in Pakistan, January 1976. Am J Trop Med Hyg 29:941-7.
- Burt FJ, Leman PA, Smith JF, Swanepoel R (1998) The use of a reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. J Virol Methods 70:129-137.
- Burt FJ, Swanepoel R, Shieh WJ, Smith JF, Leman PA, Greer PW, Coffield LM, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Zaki SR (1997) Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. Arch Pathol Lab Med 121:839-846
- Butler, JC; Peters, CJ (1994) Hantavirus and Hantavirus pulmonary syndrome. Clinical Infectious Disease 19,387-395.
- Calisher, C H, Karabatsos, N, Dalrymple, J M, Shope, R E, Poterfield, J S (1989) Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. J Gen Virol 70, 37-43.
- Cantoni G, Lazaro M, Resa A, Arellano O, Amestoy AM, De Bunder S, Herrero E, Perez A, Larrieu E

- (1997) Hantavirus pulmonary syndrome in the Province of Rio Negro, Argentina, 1993-1996. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 39:191-196.
- Ceausu E, Erscoiu S, Calistru P, Ispas D, Dorobat O, Homos M, Barbulescu C, Cojocaru I, Simion CV, Cristea C, Oprea C, Dumitrescu C, Duiculescu D, Marcu I, Mociornita C, Stoicev T, Zolotusca I, Calomfirescu C, Rusu R, Hodrea R, Geamai S, Paun L (1997) Clinical manifestations in the West Nile virus outbreak. Rom J Virol 48:3-11.
- Chen BJ, Sung WH, Shieh HK (1999) Managing an animal health emergency in Taipei China: foot and mouth disease. Rev Sci Tech 18:186-192.
- Chew MHL, Arguin PM, Shay, DK, Goh KT, Rollin PE, Shieh WJ, Zaki SR, Rota PA, Ling AE, Ksiazek TG, Chew SK, Anderson LJ (2000) Risk factors for nipah virus infection among abattoir worker in Singapore. J Infect Dis 181:1760-1763
- Chua KB, Goh KJ, Wong KT, Kamarulzaman A, Tan PS, Ksiazek TG, Zaki SR, Paul G, Lam SK, Tan CT (1999) Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. Lancet 354:1257-1259.
- Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tammon A, Lam SK, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Shieh WJ, Goldsmith CS, Gubler DJ, Roehrig JT, Eaton B, Gould AR, Olson J, Field H, Daniels P, Ling AE, Peter CJ, Anderson LJ, Mahy BW (2000) Nipah virus:a recently emergent deadly paramyxovirus. Science 288:1432-1435
- Cummins D, McCormick JB, Bennett D, Samba JA, Farrar B, Machin SJ, Fisher-Hoch SP (1990) Acute sensorineural deafness in Lassa fever. JAMA 264:2093-2096.
- Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS (1994) Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 32:2898-2903
- Duchin, JS; Koster, FT; Peters, CJ (1994) Hantavirus pulmonary syndrome: a clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. New Engl J Med 330: 945-945.
- Elliott, LH; Ksiazek, TG; Rollin, PE; Spiropoulou, CF; Morzunov, S; Monroe, M; Goldsmith, CS; Humphrey, CD; Zaki, SR; Grebs, JW; Maupin, G; Gage, K; Childs, JE; Nichol, ST; Peters, CJ (1994) Isolation of the causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51: 102-108.
- Elwell, MR; Ward, GS; Tingpalapong, M; LeDuc, JW (1985) Serologic evidence of hantaan -like virus in rodents and man in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 16: 349 -354.
- Enserink M (1999) New virus fingerd in Malaysian epidemic. Science 284:407
- Enserink M (2000) Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats. Science 289:518 -519
- Figueiredo LT, Moreli ML, Almeida VS, Felix PR, Bruno JC, Ferreira IB, Mancano FD (1999) Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) in Guariba, SP, Brazil. Report of 2 cases. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 41:131
- Fisher-Hoch SP, Price ME, Craven RB (1985) Safe intensive care management of a severe case of lassa fever with simple barrier nursing techniques. Lancet 2: 1227.
- Fisher-Hoch SP, Tomori O, Nasidi A, Perez-Oronoz GI, Fakile Y, Hutwagner L, McCormick JB (1995)

- Review of cases of nosocomial Lassa fever in Nigeria: the high price of poor medical practice. BMJ 311:857-859.
- Formenty P, Hatz C, Le Guenno B, Stoll A, Rogenmoser P, Widmer A (1999) Human infection due to Ebola virus, subtype Cote d'Ivoire: clinical and biologic presentation. J Infect Dis 179 Suppl 1:S48-53.
- Frame JD, Baldwin JM Jr., Gocke DJ, Troup JM (1970) Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa: I. Clinical description and pathological findings. Am J Trop Med Hyg 19:670-676.
- Frame JD, Casals J, Dennis EA (1979) Lassa virus antibodies in hospital personnel in western Liberia. Trans R Soc Trop Med Hyg 73:219-224.
- Gear JSS, Cassel GA, Gear AJ (1975) Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. Br Med J 4:489-493.
- Georges AJ, Leroy EM, Renaut AA, Benissan CT, Nabias RJ, Ngoc MT, Obiang PI, Lepage JP, Bertherat EJ, Benoni DD, Wickings EJ, Amblard JP, Lansoud-Soukate JM, Milleliri JM, Baize S, Georges-Courbot MC (1999) Ebola hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: epidemiologic and health control issues. J Infect Dis 179 Suppl 1:S65-75.
- Harcourt BH, Tamin A, Ksiazek TG, Rollin PE, Anderson LJ, Bellini W and Rota PA (2000) Molecular characterizatin of Nipah virus, a new emergent paramyxovirus. Virology 271, 334-349.
- Heymann DL, Weisfeld JS, Webb PA, Johnson KM, Cairns T, Berquist H. Ebola hemorrhagic fever: Tandala, Zaire, 1977-1978. J Infect Dis 142:372-376.
- Hjelle B, Jenison S, Torrez-Martinez N, Herring B, Quan S, Polito A, Pichuantes S, Yamada T, Morris C, Elgh F, Lee HW, Artsob H, Dinello R (1997) Rapid and specific detection of Sin Nombre virus antibodies in patients with hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. J Clin Microbiol 35:600-608.
- Homczynski, P; Sacchi, N (1987) Single step method of RNA isolation by acid quaniginium thiocyanate-phenol-chlorofomr extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159.
- Hooper PT, Russell GM, Selleck PW, Lunt RA, Morrissy CJ, Braun MA, Williamson MM (1999) Immunohistochemistry in the identification of a number of new diseases in Australia. Vet Microbiol 68:89-93.
- Hotta H (1998) Viral hemorrhagic fever-Ebola hemorrhagic fever, Marburg disease and Lassa fever. Rinsho Byori – Japanese Journal of Clinical Pathology 46(7):651-5.
- Hubalek Z, Halouzka J (1999) West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. Emerg Infect Dis 5:643-650.
- Hummel KB, Martin ML, Auperin DD (1992) Baculovirus expression of the glycoprotein gene of Lassa virus and characterization of the recombinant protein. Virus Res 25:79-90 .
- Jahrling PB, Niklasson BS, McCormick JB (1985) Early diagnosis of human Lassa fever by ELISA detection of antigen and antibody. Lancet. 1:250-252.
- Jia XY, Briese T, Jordan I, Rambaut A, Chi HC, Mackenzie JS, Hall RA, Scherret J, Lipkin WI (1999) Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. Lancet 354:1971-1972.

- Johnson AM, de Souza LT, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ, Nichol ST (1999) Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J Med Virol* 59:527-535
- Keenlyside RA, McCormick JB, Webb PA, Smith E, Elliott L, Johnson KM (1983) Case-control study of Mastomys natalensis and humans in Lassa virus-infected households in Sierra Leone. *Am J Trop Med Hyg* 32:829-837.
- Khan AS, Maupin GO, Rollin PE, Noor AM, Shurie HH, Shalabi AG, Wasef S, Haddad YM, Sadek R, Ijaz K, Peters CJ, Ksiazek TG (1997) An outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates, 1994-1995. *Am J Trop Med Hyg* 57:519-525.
- Kim, YS; Ahn, C; Han, JS; Kim, S; Lee, JS; Lee, WP (1995) Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Caused by the Seoul Virus. *Nephron* 71: 419-427.
- Ksiazek TG, Rollin PE, Williams AJ, Bressler DS, Martin ML, Swanepoel R, Burt FJ, Leman PA, Khan AS, Rowe AK, Mukunu R, Sanchez A, Peters CJ (1999) Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* 179 :Suppl 1:S177-87.
- Ksiazek TG, West CP, Rollin PE, Jahrling PB, Peters CJ (1999) ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *J Infect Dis* 179 Suppl 1:S192-8.
- Lee, HW; Lee, PW; Johnson, KM (1978) Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 137: 298-308.
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ (1999) Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286:2333-2337.
- Leroy EM, Baize S, Lu CY, McCormick JB, Georges AJ, Georges-Courbot M, Lansoud-Soukate J, Fisher-Hoch SP (2000) Diagnosis of Ebola haemorrhagic fever by RT-PCR in an epidemic setting. *J Med Virol* 60:463-467.
- Li, D; Schmaljohn, AL; Anderson, K; Schmaljohn, CS (1995) Complete nucleotide sequence of the M and S segments of two Hantavirus isolated from California: evidence for reassortment in nature among viruses related to Hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 206: 973-983.
- Li, YL; Ruo, SL; Tong, Z (1995) A serotypic study of hemorrhagic fever with renal syndrome in rural China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52: 247-251.
- Linthicum KJ, Anyamba A, Tucker CJ, Kelley PW, Myers MF, Peters CJ (1999) Climate and satellite indicators to forecast Rift Valley fever epidemics in Kenya. *Science* 285:397-400
- Lukashevich LS, Clegg JC, Sidibe K (1993) Lassa virus activity in Guinea: distribution of human antiviral antibody defined using enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant antigen. *J Med Virol* 40:210-217.
- Mariott AC, Nuttall PA (1992) Comparison of the S RNA segments and nucleoproteins sequences of

- Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Virology* 180: 795-799.
- McCormick JB, King IJ, Webb PA (1987) A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. *J Infect Dis* 155:445-455.
- McCormack JG, Allworth AM, Selleck LA, Selleck PW (1999) Transmissibility from horses to humans of a novel paramyxovirus, equine morbillivirus (EMV). *J Infect* 38:22-23.
- Merzlikin NV, Chepurnov AA, Istomina NN, Ofitserov VI, Vorob'eva MS (1995) Development and application of an immunoenzyme test system for diagnosing Ebola fever. *Vopr Virusol* 40:31-35.
- Miranda ME, Ksiazek TG, Retuya TJ, Khan AS, Sanchez A, Fulhorst CF, Rollin PE, Calaor AB, Manalo DL, Roces MC, Dayrit MM, Peters CJ (1999) Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *J Infect Dis* 179 Suppl 1:S115-119.
- MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994 43(50):943-6. Bolivian hemorrhagic fever--El Beni Department, Bolivia,
- Monath TP, Ngstrom RR (1984) Detection of yellow fever virus in serum by enzyme immunoassay. *Am J Trop Med Hyg* 33:151.
- Monath TP, Heinz FX (1996) Field Virology, pp961-1034
- Muyembe-Tamfum JJ, Kipasa M, Kiyungu C, Colebunders R (1999) Ebola outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: discovery and control measures. *J Infect Dis* 179 Suppl 1:S259-262.
- Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S (1993) Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914-917.
- Niklasson BS, Jahrling PB, Peters CJ (1984) Detection of Lassa virus antigens and Lassa virus-specific immunoglobulins G and M by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 20:239-244.
- Nordin MN (1999) O.I.E. Dis. Inf. 12:20
- Paton NI, Leo YS, Zaki SR, Auchus AP, Lee KE, Ling AE, Chew SK, Ang B, Rollin PE, Umapathi T, Sng I, Lee CC, Lim E, Ksiazek TG (1999) Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *Lancet* 354:1253-1256.
- Peters CJ, Khan AS, Zaki SR (1996) Hantaviruses in the United States. *Archives of International Medicine* 156: 705-707.
- Prehaud C, Hellebrand E, Coudrier D, Volchkov VE, Volchkova VA, Feldmann H, Le Guenno B, Bouloy M (1998) Recombinant Ebola virus nucleoprotein and glycoprotein (Gabon 94 strain) provide new tools for the detection of human infections. *J Gen Virol* 79 (Pt 11):2565-2572.
- Rand, MS (1994) Hantavirus: an overview and update. *Lab. ani. Sci.* 44, 301-304.
- Rice CM, Lenches EM, Eddy SR (1985) Nucleotide sequence of yellow fever virus: implication for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229: 726.
- Rodriguez LL, De Roo A, Guimard Y, Trappier SG, Sanchez A, Bressler D, Williams AJ, Rowe AK, Bertolli J, Khan AS, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST (1999) Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* 179 Suppl 1:S170-176.

- Rodriguez-Moran P, Kelly C, Williams TM, Hjelle B (1998) Hantavirus infection in the Four Corners region of USA in 1998. Lancet; 352:1353.
- Rollin PE, Williams RJ, Bressler DS, Pearson S, Cottingham M, Pucak G, Sanchez A, Trappier SG, Peters RL, Greer PW, Zaki S, Demarcus T, Hendricks K, Kelley M, Simpson D, Geisbert TW, Jahrling PB, Peters CJ, Ksiazek TG (1999) Ebola (subtype Reston) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to the United States. J Infect Dis 179 Suppl 1:S108-114.
- Ruo, SL; Li, YL; Tong, Z (1994): Retrospective and prospective studies of hemorrhagic fever with renal syndrome in rural China. J. Infect. Dis. 170, 527-534.
- Schmaljohn, CS; Hasty, SE; Dalrymple, JM (1985) Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. Science 227, 1041-1044.
- Schmaljohn, CS; Hjelle, B (1997) Hantavirus: A Global Disease Problem. Emerging Infect. Dis. 3, 95-104.
- Schreiber, M.; Laue, T; Wolff, C (1996) Hantavirus pulmonary syndrome in Germany. Lancet 3347: 336-337.
- Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA, Shepherd SP (1986) Comparison of methods for isolation and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J Clin Microbiol 24:654-656.
- Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, Murti KG, Norwood M, Senne D, Sims L, Takada A, Webster RG (1998) Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. Virology 252:331-342
- Smith DH, Johnson BK, Isaacson M (1982) Marburg-virus disease in Kenya. Lancet 1:816-820.
- Song, NW; Baek, LJ; Gavrilovskaya, IN; Mackow, ER; Hjelle, B; Yanagihara, R (1996) Sequence analysis of the complete S genomic segment of a newly identified Hantavirus isolated from the shite-footed mouse (*Peromyscus leucopus*): phylogenetic relationship with other Sigmodontine rodent-borne Hantaviruses. Virus Genes 12: 249-256.
- Stephenson EH, Larson EW, Dominik JW (1984) Effect of environment factors on aerosol-induced Lassa virus infection. J Med. Virol 14:295.
- Suieiman M, Muscat-Baron JM, Harries JR (1980) Congo/Crimean haemorrhagic fever in Dubai. Lancet 2:939-941.
- Swanepoel R, Shepherd AJ, Leman PA (1978) Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa. Am J Trop Med Hyg 36:120-132.
- Swanepoel R, Struthers JK, Shepherd AJ, McGillivray GM, Nel MJ, Jupp PG (1983) Crimean-congo hemorrhagic fever in South Africa. Am J Trop Med Hyg 32:1407-1415.
- Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ (1989) The clinical pathology of Crimean-congo hemorrhagic fever. Rev Infect Dis 11(Suppl 4): S794-800.
- Ter Meulen J, Koulemou K, Wittekindt T, Windisch K, Strigl S, Conde S, Schmitz H (1998) Detection of Lassa virus antinucleoprotein immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies by a simple recombinant immunoblot assay for field use. J Clin Microbiol 36:3143-3148.

- Thonnon J, Spiegel A, Diallo M, Sylla R, Fall A, Mondo M, Fontenille D (1998) Yellow fever outbreak in Kaffrine, Senegal 1996: epidemiological and entomological findings. *Trop Med Int Health* 3:872-877.
- Toro J, Vega JD, Khan AS, Mills JN, Padula P, Terry W, Yadon Z, Valderrama R, Ellis BA, Pavletic C, Cerdá R, Zaki S, Shieh WJ, Meyer R, Tapia M, Mansilla C, Baro M, Vergara JA, Concha M, Calderon G, Enria D, Peters CJ, Ksiazek TG (1998) An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. *Emerg Infect Dis* 1998 4:687-694.
- Trappier SG, Conaty AL, Farrar BB, Auperin DD, McCormick JB, Fisher-Hoch SP (1993) Evaluation of the polymerase chain reaction for diagnosis of Lassa virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49:214-221.
- Tsai, TF (1987) Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Mode of Transmission to Human. *Lab Animal Sci.* 37: 428-430.
- Van Eeden PJ, Joubert JR, Van De Wal BW, King JB, De Kock A, Groenewald JH (1985) A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital: Part 1. Clinical features. *S Afr Med J* 68:711-717.
- Vanderzanden L, Bray M, Fuller D, Roberts T, Custer D, Spik K, Jahrling P, Huggins J, Schmaljohn A, Schmaljohn C (1998) DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology* 246(1):134-144.
- Volchkov V, Volchkova V, Eckel C, Klenk HD, Bouloy M, LeGuenno B, Feldmann H (1997) Emergence of subtype Zaire Ebola virus in Gabon. *Virology* 232:139-144
- Wang LF (1995) *J. Immunol. Methods*. 1678:1
- Well, RM; Estana, SS; Yadon, ZE; Enria, D; Padila, P; Pini, N; Mills, JN; Peters, CJ; Segura, EL (1997) An Unusual Hantavirus Outbreak in Southern Argentina: Person-to Person Transmission? *Emerging Infect. Dis.* 3: 171-174.
- Wells RM, Young J, Williams RJ, Armstrong LR, Busico K, Khan AS, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Nichol ST, Peters CJ (1997) Hantavirus transmission in the United States. *Emerg Infect Dis* 3(3):361-5.
- Williamson MM, Hooper PT, Selleck PW, Gleeson LJ, Daniels PW, Westbury HA, Murray PK (1998) Transmission studies of Hendra virus (equine morbillivirus) in fruit bats, horses and cats. *Aust Vet J* 76:813-818.
- Yen YC, Kong LX, Lee L, Zhang YQ, Li F, Cai BJ, Gao SY (1985) Characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Xinjiang strain) in China. *Am J Trop Med Hyg* 34:1179-1182.
- Xiao, SY; LeDuc, JW; Chu, YK; Schmaljohn, CS (1994) Phylogenetic analysis of virus isolates in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae. *Virology* 198:205-217.

表一、花蓮捕獲小型齧齒動物（90年2月）

- * 捕獲溝鼠25隻、鬼鼠3隻、錢鼠35隻、小黃腹鼠3隻，共66隻。
- * 第10、35、36、66老鼠顯示血清陽性，這四隻老鼠皆為溝鼠。
- * 反轉錄巢式聚合酵素鍊反應顯示第10、35、66老鼠為漢他病毒陽性。

表二、漢城病毒株全長的S基因比較

	Percent Similarity											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	97.6	63.0	86.8	95.1	96.0	96.0	95.6	95.7	96.0	96.0	96.0	SWC106SD.SEQ
2	2.4	68.3	85.3	96.1	96.2	96.2	96.5	96.5	96.3	96.3	96.3	SEOHL66S.SEQ
3	26.8	25.1	62.1	62.3	63.6	63.4	63.1	62.8	64.0	63.4	63.4	SEOAGS.SEQ
4	11.3	12.3	26.2	86.0	85.9	85.9	86.7	86.3	86.8	85.6	85.6	SEOGOU3S.SEQ
5	4.0	3.8	26.5	11.9	95.1	95.2	94.7	95.3	95.0	95.1	95.1	SEOIR46S.SEQ
6	3.6	3.7	26.9	11.9	4.5	99.7	94.9	95.3	95.5	98.7	98.7	SEOK24ES.SEQ
7	3.6	3.7	27.0	11.8	4.4	0.3	94.9	95.4	95.6	98.8	98.8	SEOK24VS.SEQ
8	3.7	3.5	26.0	11.3	4.2	4.5	4.5	94.6	98.4	95.0	95.0	SEOPF26S.SEQ
9	3.8	3.5	26.6	11.5	4.1	4.3	4.3	4.0	95.2	95.2	95.2	SEOTCHOSS.SEQ
10	3.7	3.6	26.0	11.3	4.3	4.4	4.3	1.3	3.9	95.7	95.7	SEOZY27S.SEQ
11	3.6	3.6	27.0	11.8	4.6	1.2	1.2	4.3	4.4	4.1	4.1	SEOHBB6S.SEQ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	

較長的S氨基酸序列的株毒病城漢三、表

Percent Similarity											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	99.5	81.8	98.8	99.3	98.6	99.5	99.3	99.1	99.5	98.8	1
2	0.5	■ 81.6	98.4	98.8	98.1	99.1	98.8	98.6	99.1	98.4	2
3	18.2	18.4	■ 81.6	81.6	81.6	81.8	81.6	81.4	81.4	81.4	3
4	1.2	1.6	18.4	■ 88.1	97.4	98.4	98.1	97.9	98.4	97.7	4
5	0.7	1.2	18.4	1.9	■ 97.9	99.3	99.1	98.8	98.8	98.6	5
6	1.4	1.9	18.4	2.6	2.1	■ 98.1	97.9	97.7	98.1	97.4	6
7	0.5	0.9	18.2	1.6	0.7	1.9	■ 99.8	99.1	99.5	99.1	7
8	0.7	1.2	18.4	1.9	0.9	2.1	0.2	■ 98.8	99.3	98.8	8
9	0.9	1.4	18.6	2.1	1.2	2.3	0.9	1.2	■ 98.6	98.4	9
10	0.5	0.9	18.6	1.6	1.2	1.9	0.5	0.7	1.4	■ 98.6	10
11	1.2	1.6	18.6	2.3	1.4	2.6	0.9	1.2	1.6	1.4	11
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

表四、漢城病毒株全長的M基因比較

	Percent Similarity														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
1	■ 96.0	83.1	98.1	98.0	97.9	95.7	95.3	90.1	95.3	85.9	95.2	95.9	1	HAN-SAPM. SEQ	
2	4.0	■ 82.9	96.2	96.1	96.1	95.3	94.8	98.7	95.3	89.8	95.2	89.8	2	SE08039M. SEQ	
3	18.1	18.3	■ 83.5	83.4	83.4	82.8	83.3	82.6	82.8	82.8	82.8	82.8	3	SE06GOU3M. SEQ	
4	1.9	3.8	17.7	■ 99.8	99.8	99.8	95.6	89.8	90.4	95.3	86.0	95.1	86.4	4	SE0K183M. SEQ
5	2.0	3.9	17.8	0.2	■ 99.8	95.5	94.9	90.3	95.2	95.7	95.0	95.7	5	SE0K185M. SEQ	
6	2.1	3.9	17.8	0.2	0.2	■ 95.5	94.8	90.2	95.1	95.6	94.9	95.6	6	SE0K188M. SEQ	
7	4.4	4.8	17.2	4.4	4.5	4.5	■ 98.5	95.4	96.0	95.3	95.8	95.3	7	SE0HUL66M. SEQ	
8	4.8	5.4	17.8	5.2	5.3	5.3	3.6	■ 92.2	95.4	94.9	95.3	94.9	8	SWC106MD. SEQ	
9	3.8	3.4	18.3	3.8	3.7	3.8	4.6	5.3	■ 95.3	85.9	95.2	89.9	9	SE0B-IM. SEQ	
10	4.6	4.6	18.0	4.7	4.8	4.8	4.1	4.5	4.6	■ 95.7	99.5	95.7	10	SE0HB55M. SEQ	
11	4.1	4.2	18.2	4.3	4.4	4.5	4.8	5.1	4.1	4.3	■ 95.5	91.2	11	SE0HU694. SEQ	
12	4.8	4.7	18.0	4.8	4.9	5.0	4.2	4.6	4.8	0.5	4.4	■ 95.5	12	SE0L99M. SEQ	
13	4.1	4.2	18.2	4.3	4.4	4.5	4.8	5.1	4.1	4.3	0.0	4.4	13	SE0Z37M. SEQ	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
														Percent Difference	

表五、漢城病毒株全長的M氨基酸序列比
較

	Percent Similarity												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	97.8	98.1	98.1	95.9	98.4	98.7	98.8	98.5	98.3	98.4	98.0	1	SE0HL86M.PRO
2	2.1	98.3	98.4	96.3	98.8	99.0	98.9	98.9	98.7	98.8	98.1	2	SEM/C106M.PRO
3	1.9	1.7	98.5	96.8	99.0	99.1	99.0	98.9	98.8	99.0	98.5	3	SE0L99MP.PRO
4	1.9	1.6	1.5	96.6	98.9	99.2	99.1	99.1	98.9	98.9	98.3	4	SE0B039M.PRO
5	3.8	3.5	3.2	3.2	97.0	97.1	97.0	96.9	96.7	97.0	96.2	5	SE0G0U3M.PRO
6	1.6	1.2	1.0	1.1	2.7	99.6	99.5	99.4	99.2	100.0	98.9	6	SE0HUG89M.PRO
7	1.3	1.0	0.9	0.8	2.7	0.4	99.7	99.6	99.5	99.6	98.9	7	SE0K183M.PRO
8	1.4	1.1	1.0	0.9	2.7	0.5	0.3	99.7	99.4	99.5	98.9	8	SE0K185M.PRO
9	1.5	1.1	0.9	2.8	0.6	0.4	0.3	99.3	99.4	98.8	9	SE0K188M.PRO	
10	1.7	1.3	1.2	1.1	3.0	0.8	0.5	0.6	0.7	99.2	98.8	10	SE0SSR11M.PRO
11	1.6	1.2	1.0	1.1	2.7	0.0	0.4	0.5	0.6	0.8	98.9	11	SE0Z37M.PRO
12	2.0	1.9	1.5	1.7	3.5	1.1	1.1	1.2	1.2	1.1	1.1	12	SE0B-1M.PRO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
													Percent Difference

表六. 本實驗設計可增殖伊波拉病毒各亞型之正反引子之序列

名稱	Sequence
Zaire 171gp	TCGTGATCGATTCAAGAGGACA
Zaire 230gp	CATTTCCATCCCCACTTGGAG
Zaire 382Cgp	AGTTGCCACTCCATTCCCTTCG
Zaire 790Cgp	TGGTAGAATACTAGCCACTAGAC
Zaire 417p	TCCGGTGTCCCACCAAAGGTGGT
Zaire 445p	TATGAAGCTGGTGAATGGGC
Zaire 634m	GTGGAAGCAAGTCGATCATA
Zaire/Reston 1012m	TTTTAGTTCCAGAACGGCCA
Reston 101gp	TGCCGCTTGGTATAGTGACA
Reston 178gp	CAACCAGTCAGCTCAAGTCTGT
Reston 400Cgp	GGAATCCTCGTACACCGTGC
Reston 580Cgp	AATGCTTCTGGCTCTGACAG
Reston 417p	TCAGGGTGTGCCTCCAAAGGTGGT
Reston 445p	TATGAAGGCCGAGATGGGC
Reston 634m	GTTGAGGCCAATCTATCATA
Sudan 101gp	CCATCCTCAGGATCTCGCAAT
Sudan 231gp	GTGACCAACAGCACTTAGA
Sudan 372Cgp	GCTTTGTCGGCAGATGGGATATC
Sudan 772Cgp	AAGTAGGGATGTGGCATAGTAAC

名稱	Sequence
Lassa 51	TTGGAGTG ACCACATTCAAGAC
Lassa 158	ACTATCTGGCTACTGTTCCAAC
Lassa 315c	GACTGCATTGAGATCTCTCAG
Lassa 461c	TTCCCCATATAAACTCCCTGAACTCA
Marburg 51	AGAATATTAACATTGACATT
Marburg 171	TCATGTC CGTAATAAGAAAGTG
Marburg 371c	GTTGAATTATCCTTATCAGAA
Marburg 432c	CTGTAATGAGGTTCATTAGGA
CCHF 217	GATGATGCACAAAAGGATTCCA
CCHF 367	AAAATGCA GG AACCATTA AATC
CCHF 656c	ACCACTCCACATGTTCACGGC
CCHF 1120c	CCACTTCATTGGGGGTGCTCA

表七. 本實驗設計拉薩熱病毒2、馬堡病病毒2及克里米亞-剛果熱等各病毒之正反引子之序列

名稱	Sequence
Hendra 35	TCGAAG AGTGGTGC AACCGGTA
Hendra 141	GTCACGAGGAATGAAGGACACGA
Hendra 331 c	TCTCTAAATCGTAATCATTGAG
Hendra 3451 c	TCTTAGC AACACTCGATCAAATG
Nipah/Hendra 2271 p	AAGAAAAACTTAGGATCCAAAGA
Nipah/Hendra 2427 p	ATTGACTTTATTAGAAAGAACCA
Nipah/Hendra 2714 c	TGGGGCCAGTTGTATGTCATC
Nipah/Hendra 2746 c	CCATGATCATGGTATAACAACGT
WN211	AAAGCTGCRTGCCCGACCAT
WN1174c	GTTGTTCTCTCTGCCYACCACTA
WN345	ATGGGCCAAATTGCTGYTCYAC
WN747c	CCTTYGTGGCGTGTGGTTCYTCAA

表八. 本實驗設計百病毒及西尼羅河病毒

等各病毒之正反引子之序列

表九、吳家病例偵檢結果

Mr. Wu's Tissue	electromicroscopy(+)?.
HHCK(+)	RT-PCR(+).
Sera from CDC	antibodies all negative.
	RT-PCR: S-and-M segments.
	Mr. And. Mrs. Wu, Oldest and youngest daughters (+).
The slide of lung tissue from professor Su	HHCK(+)?.
The lungs of lung tissue from Dr. Chen injected rats.	RT-PCR: the infected rats (+).
	Sequence of the M-and-S segments of RT-PCR products 500 bp of M show about 95% homologous and S share higher homologous.

表十、Comparison among nucleotide sequences of Seoul viral partial M genes and RT-PCR product

		Percent Similarity								
		1	2	3	4	5	6	7		
1	97.1	95.5	94.5	95.2	96.1	95.5	1	HLWUWMP. SEQ		
2	2.8	97.0	95.2	96.1	96.4	96.8	2	-SEHL66M. SEQ		
3	4.5	3.1	94.6	94.8	95.2	95.3	3	-SWC108M. SEQ		
4	5.7	5.1	5.7	93.7	94.6	94.6	4	-SEZ37M. SEQ		
5	4.9	3.9	5.3	6.5	96.6	96.4	5	-SEOK88M. SEQ		
6	4.1	3.5	4.9	5.7	3.5	97.1	6	-SEB039M. SEQ		
7	4.5	3.1	4.6	5.6	3.7	2.8	7	-SEOB-1M. SEQ		
	1	2	3	4	5	6	7			

Cases

表十一、90年度檢體偵檢項目與結果

090-1-31-000078 Ebola hemorrhagic fever RT-PCR(-)

virus isolation (-)

• 090-3-02-000168 Tick borne encephalitis RT-PCR(-)

virus isolation (-)

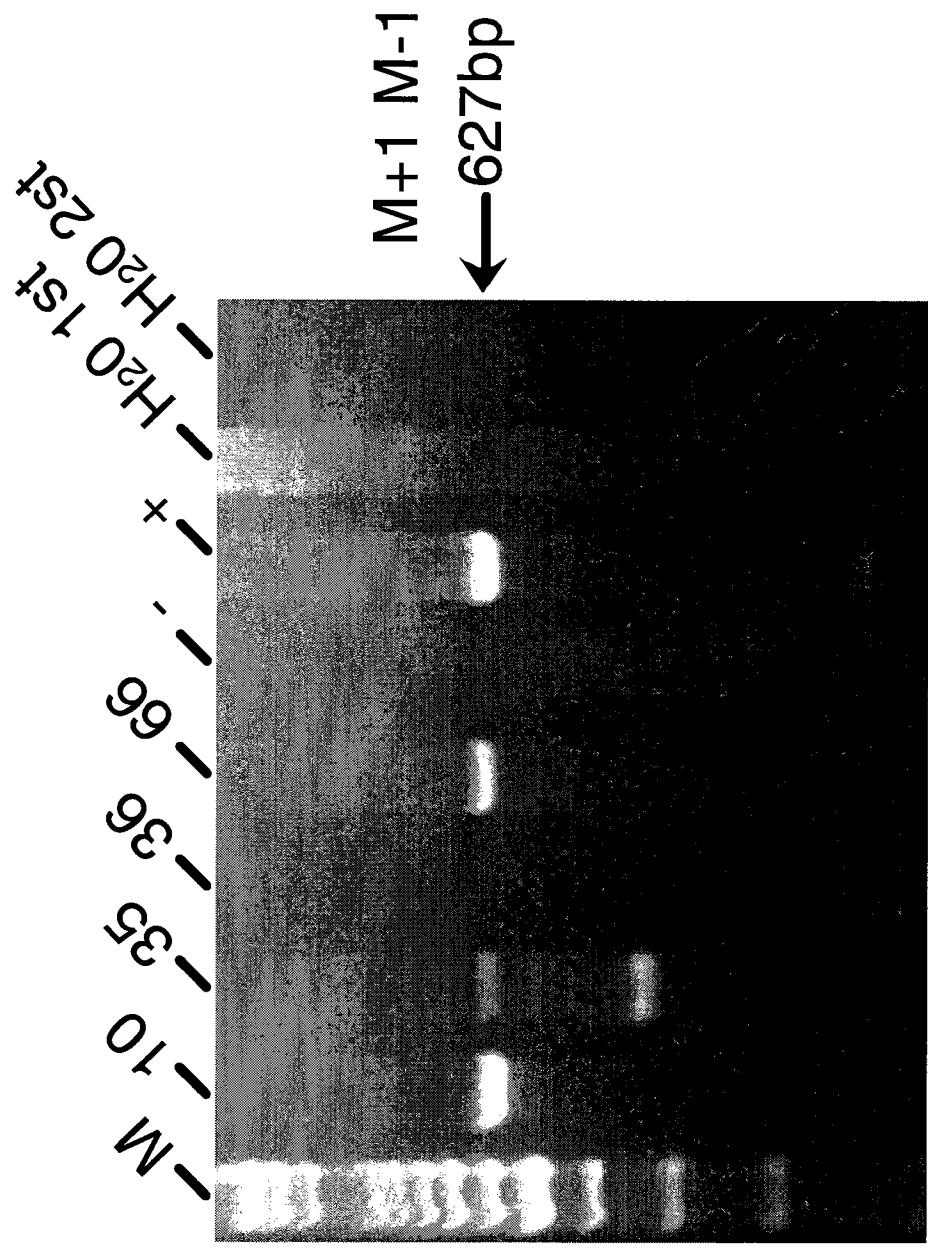
• 090-1-34-000122 Hendra viral disease Nipah viral disease common and specific RT-PCR (-)

virus isolation (-)

• 090-2-37-000221 Nipah viral disease RT-PCR (-)

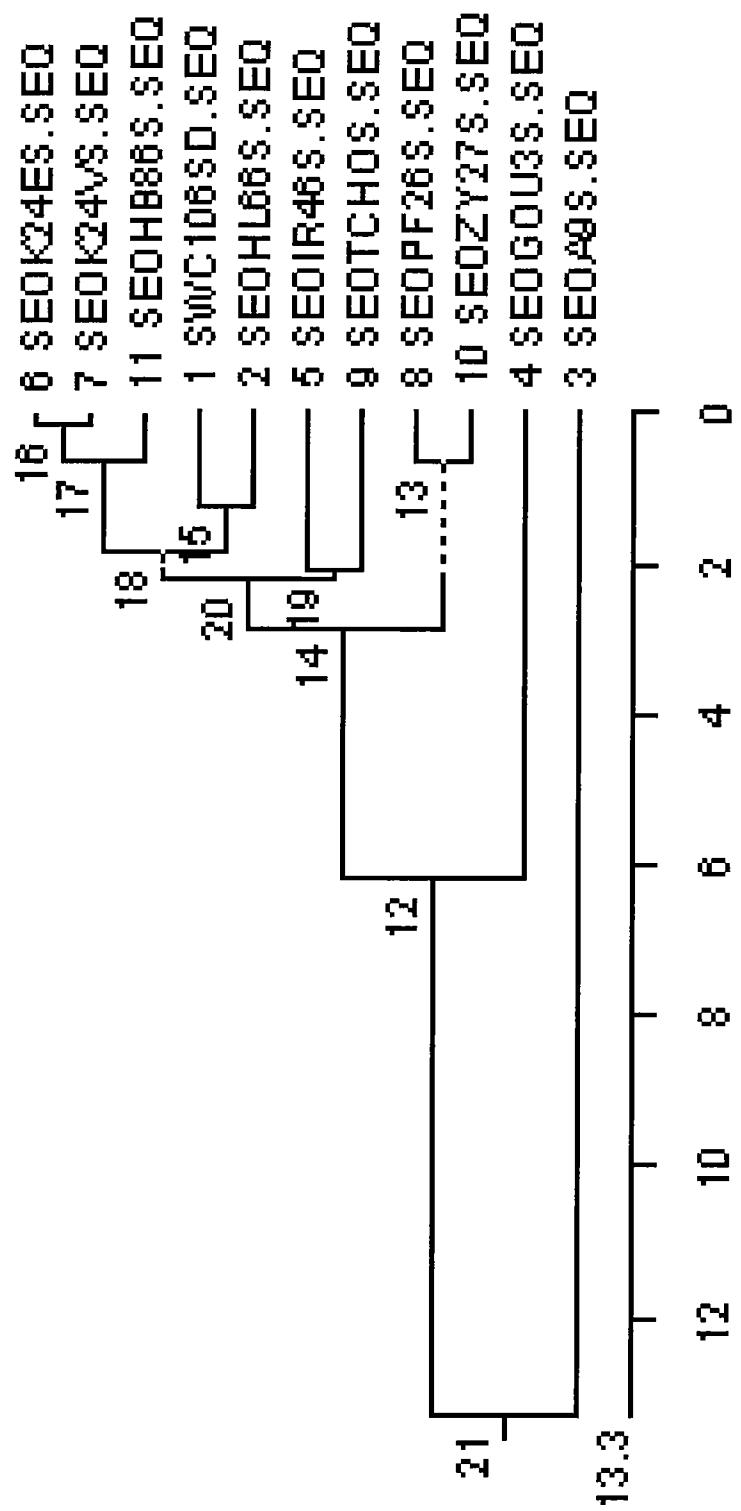
virus isolation (-)

• 邏X喬



圖一、花蓮捕獲老鼠的RT-PCR試驗

圖二、漢城病毒株全長的S基因種源
關係樹狀圖



圖三、漢城病毒 SEOHL66S nucleocapsid 的氨基酸序列

10	20	30	40	50	60	70
MATMEETTREIISAHEGQLVIAQKVKDAEKQYEQKDPOOLNKRALHORESWAASIOSKIDELKRLADRIA						
AGKNIIGQDQDPTGYEPGDHLKERSALSYGNTLDLNSLDIDEPTGQTADWLTLIIWYLTTSFVVPIILKALYH						
LTTTRGRQTSKDNKGMRIRFKDODSSYEDWNGIRKPKHLYWMPNAQSSMKAEEITPGRFRATVCGLYPAQI						
KARNKWSWSPVWSSVYGFLLAKDWTSRIEEWLGAPCKFMAESPIAGSLSGNPNVNRDQYIRQRQGALAGMEPKE						
FQALRQHSKDAAGCTLYEHIESPSSIIWVFAGAPDRCPPTCFLVGGMAELGASFSLQDMRNTIMASKTVGT						

Translate DNA Sequence SEOHL66S. SEQ(38,1326)
With Standard Genetic Code

Molecular Weight 47992.60 Daltons

429 Amino Acids

57 Strongly Basic(+) Amino Acids (K,R)

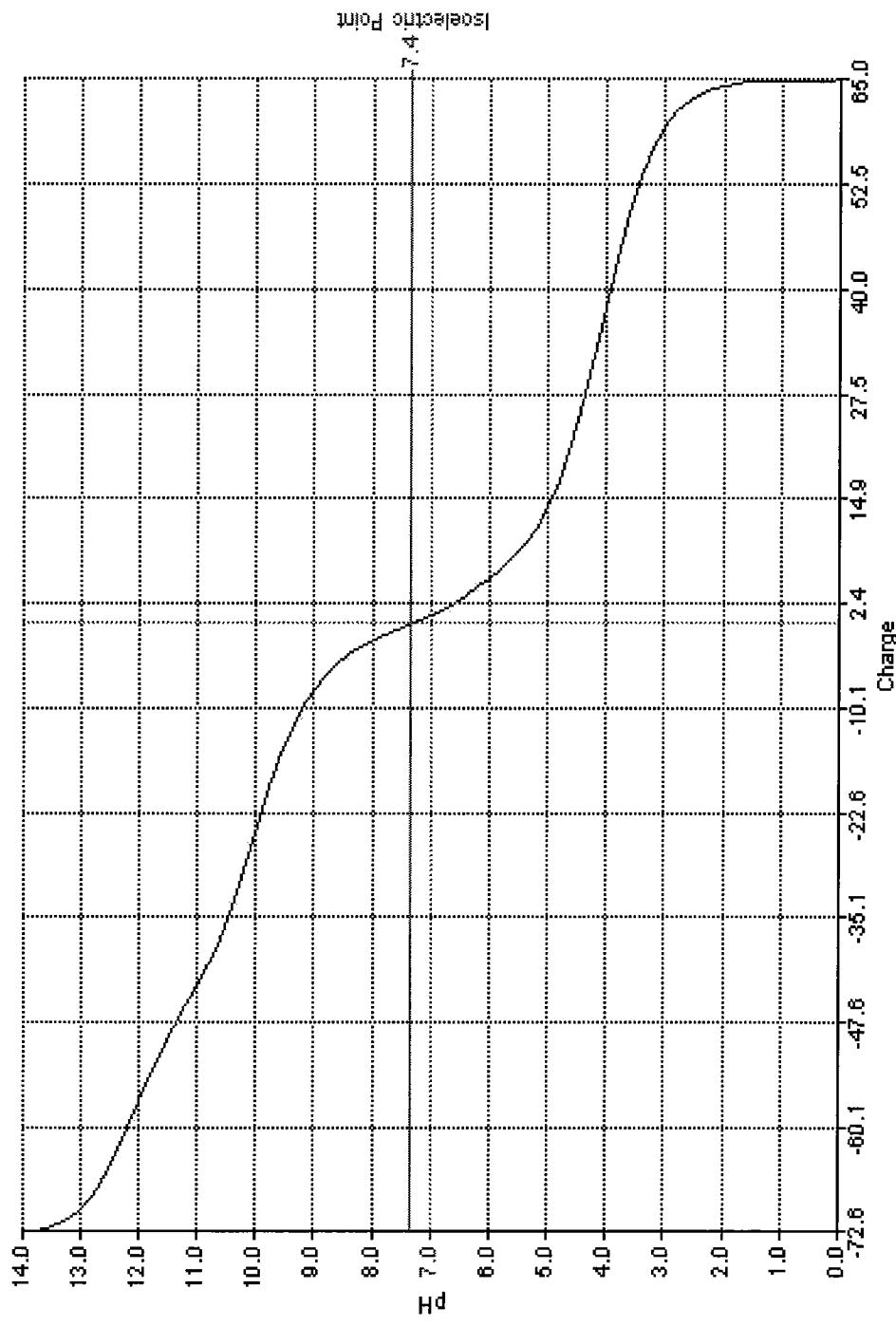
57 Strongly Acidic(-) Amino Acids (D,E)

140 Hydrophobic Amino Acids (A,I,L,F,W,V)

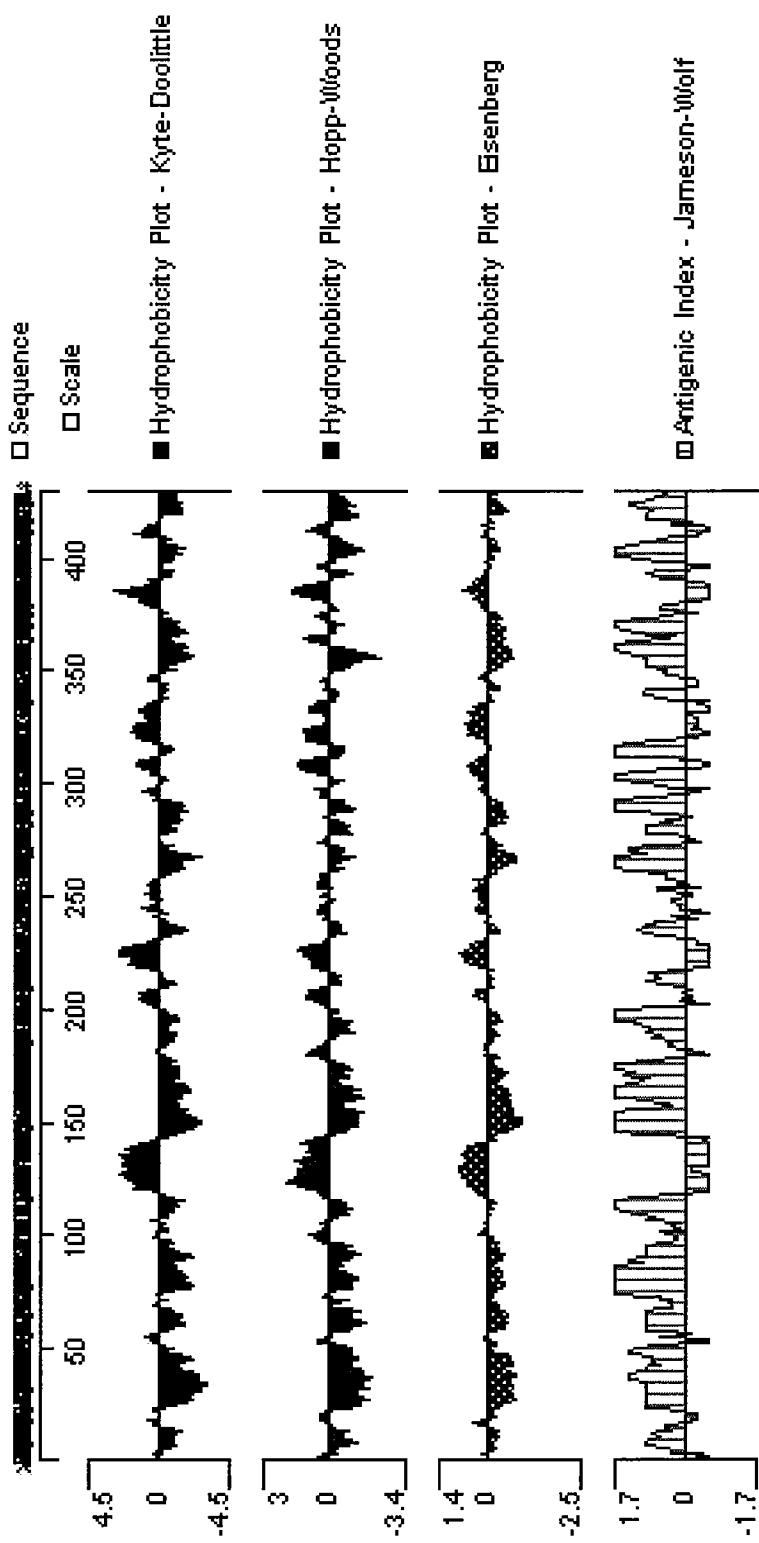
103 Polar Amino Acids (M,C,Q,S,T,Y)

7.356 Isoelectric Point
0.970 Charge at pH 7.0

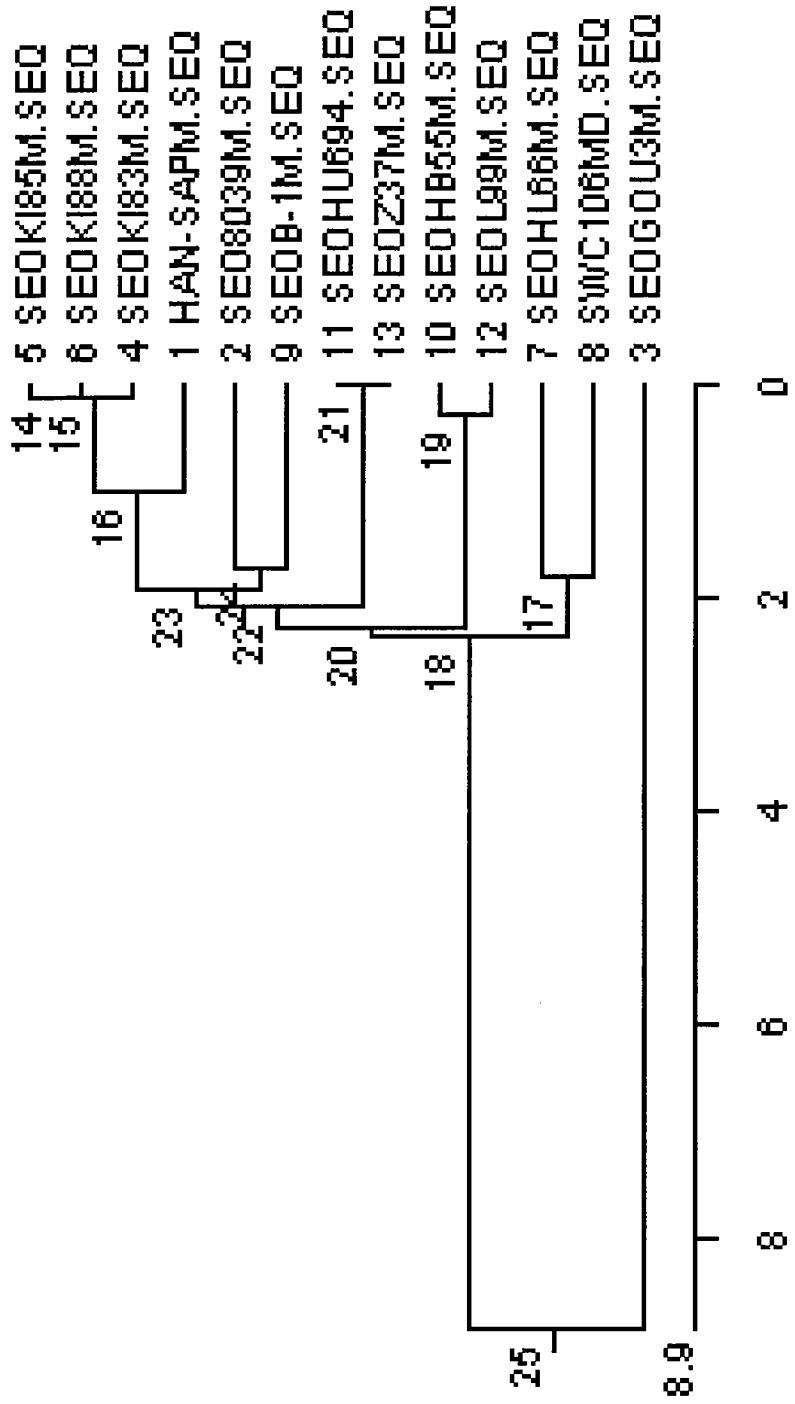
圖四、花蓮漢城病毐S蛋白酸鹼度和電荷之關係



圖五、漢城病毒 SEOHL66S nucleocapsid
推測的親脂性和抗體性



圖六、漢城病毒株全長的M基因種源關係樹狀圖



圖七、漢城病毒 SEOHL66M glycoprotein 的氨基酸序列

	10	20	30	40	50	60	70	80
MWSLLLAALVQQGFALKWYFDMRIQCPHSYINFGETSYGTYELPPLSQEAEQLVPESSCNHMDNHQSLSTINKLTKIVW RKKAQDESANQNSFEVVESEYSFKGLCMLKHMRYEEESYRNRRSYICYDLACNSTFCPKPTVYMIYPIHACNMMSKCLIGL PYRIQVYVERTYCTTGKCFYPOKAVYSAALKRGMYIAIASIETICFFIHQKGNTYKIVTAITSAMGSKCNNNTDKVQ GYVICIGGNSAPWYAPAGEDFTTGTGKCFYDLPGEETATYQISQIEAKIPHTYSSKLNKLTAFAQIPSY SSTSILAASEDGRFIFSPGLFPNLNQSVCNNALPLIWRGLIOTLGYYEAWHPCNYFCYLSGPGASCEAFSEGGIFNITS PMCLYSKQNRFRRAAEQQISFYCQRVYDMDIIYCYNGQKKTILTTLFIGQGIYTITSFLSLLPGVAHSIAIELGVPGFNGW ATAALLITFCFGWWWHIPACTLPILLYLRFLANILHTSNQKRNRFKAIRRKIKEEEFKTKGSWYCEICKYEGETKLKLAHN LSCVQGECPYCFCFTCEPTEAIDAHYKVQOATHRFREDLKKTYTPQWIGPGCYRTLMNFRYKSRCVYLTHWTLLLIESI LWAASAAEIPLYPLWTONAHGCGYPMHTOLEDFSLPSSESKYTYKRHLTNPVNDQQSVSLSLHIEIESQIGADYHHLGHW YDARLNLKTSFHCYGAETKYYQYPWHTAKCHFEKEDYEYENSWACNPPOCGPGVGTGCTACGGLYDQLKPYGTAFKIISVRYS RKYCYQDFGEELYLCKTIDMNDCFYTRHAKICIGTYSKFSQGDTLLLGPMEGGIIIFKHWRSTSCHFGDOPGODYMGPKDQP FICPEFPQDFRKKCNFATTPYCEYDGNIISGYKKVLATIDSFSQSFNTSNIHFTDERIEMRDPOGMLRDHINIIVISKDIDF ENLAENPCEVGLOAANIEGAWGSGYGFTLTCQVSLTECPTFLTIKACOMAIICYGAESVTLSRGQNTYKITGKGHHSGSS FKCCHGKECSSTGLQASAPHLDKYNGISELENEKFYDGAPECGWTCHFKSGGEWVNGIINGNWVYVLIWLCVLLLFSLIL	80 160 240 320 400 480 560 640 720 800 880 960 1040 1120							

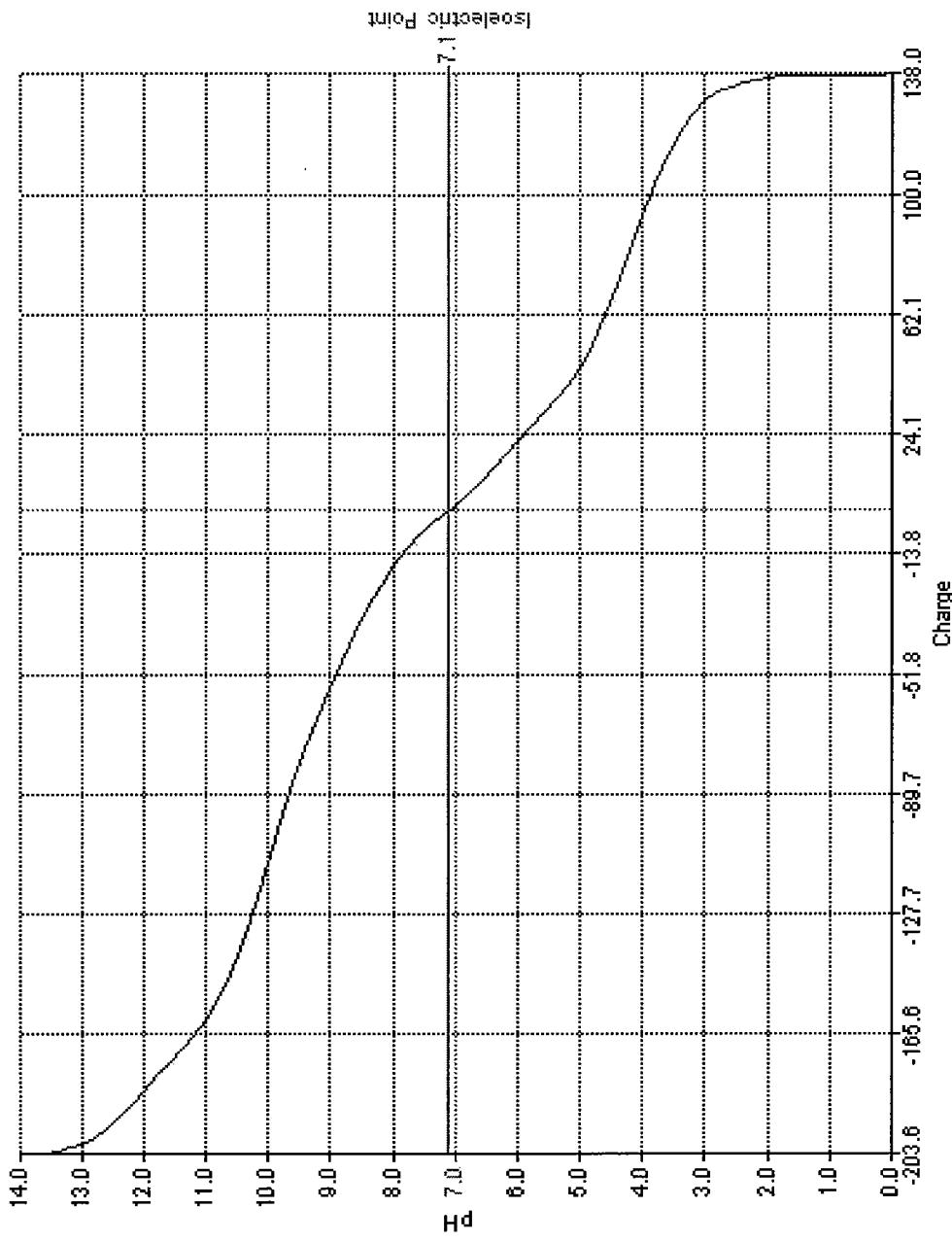
Translate DNA Sequence SEOHL66M. SEQ(47,3448)
With Standard Genetic Code

Molecular Weight 125715.20 Daltons
1133 Amino Acids

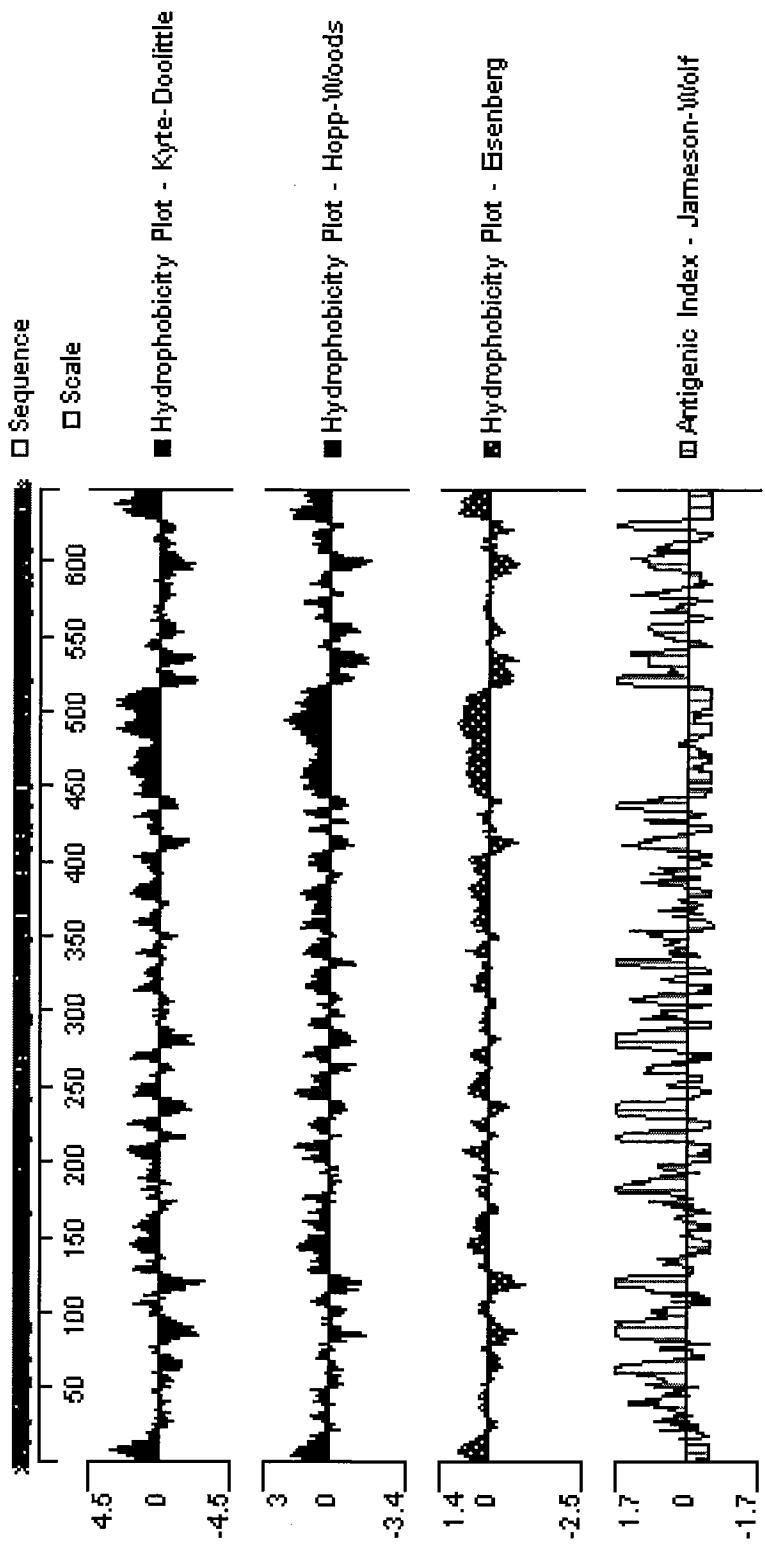
- 103 Strongly Basic (+) Amino Acids (K,R)
- 105 Strongly Acidic (-) Amino Acids (D,E)
- 388 Hydrophobic Amino Acids (A,I,L,F,W,V)
- 345 Polar Amino Acids (N,C,Q,S,T,Y)

7.120 Isoelectric Point
1.843 Charge at pH 7.0

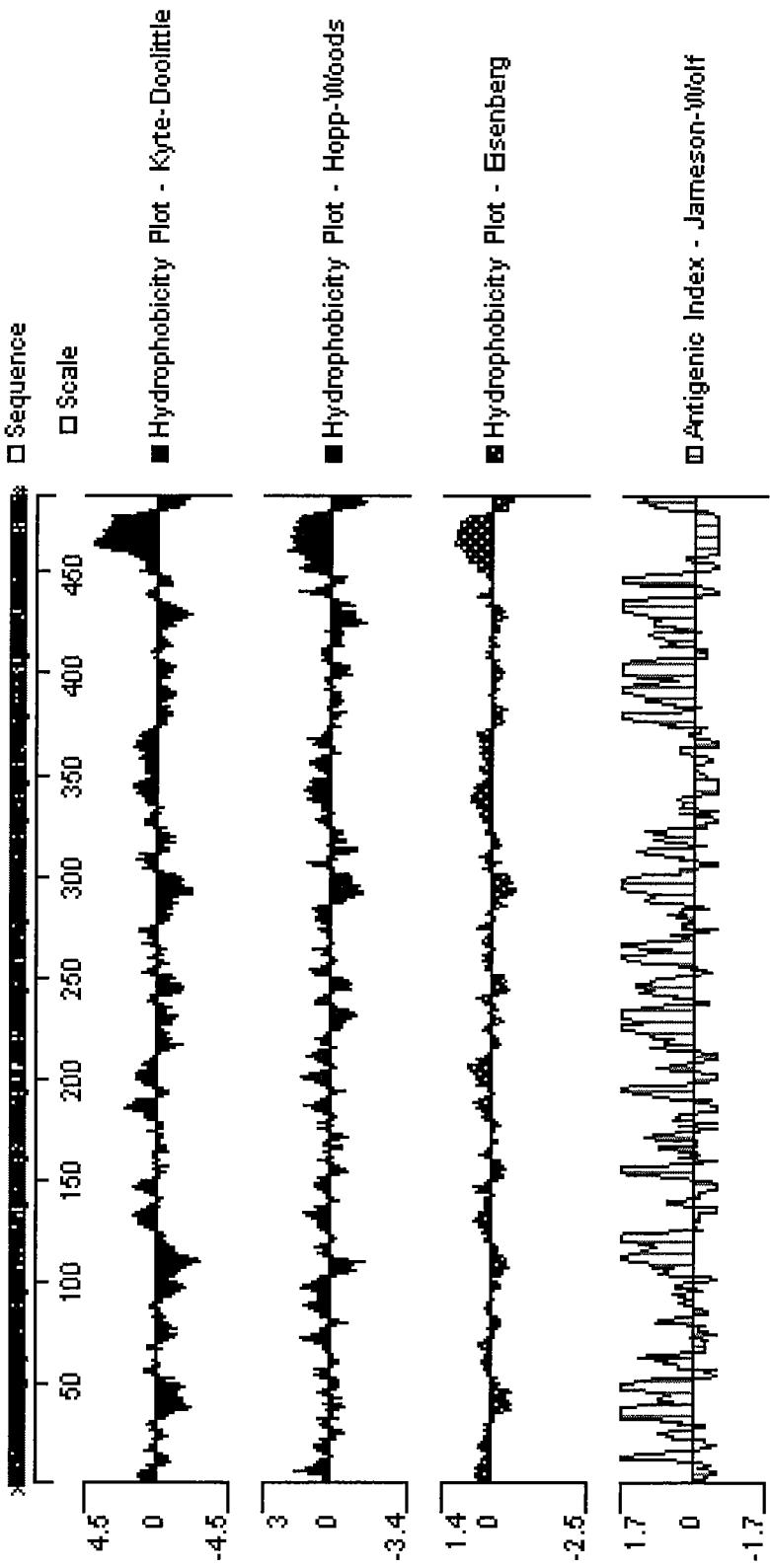
圖八、花蓮漢城病毐M基因蛋白酸鹼度和電荷之關係



圖九、漢城病毒 SEOHL66M glycoprotein 1
推測的親脂性和抗體性



圖十、漢城病毒 SEOHL66M glycoprotein 2
推測的親脂性和抗體性



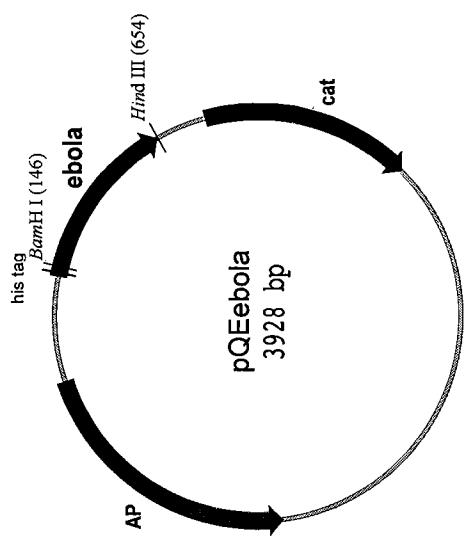


圖 11a 伊波拉病毒核蛋白大腸桿菌表現載具之簡圖

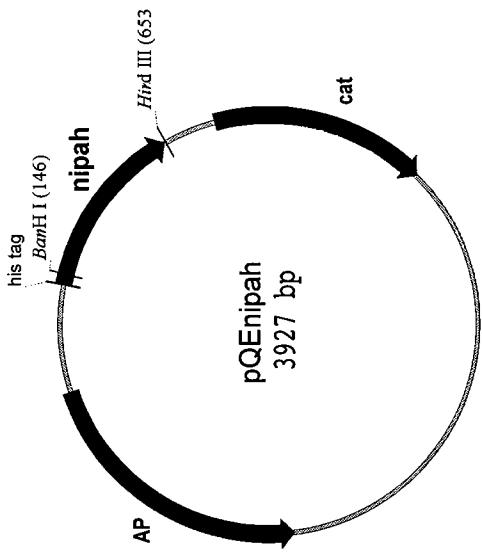


圖 11b 立百病毒蛋白大腸桿菌表現載具之簡圖

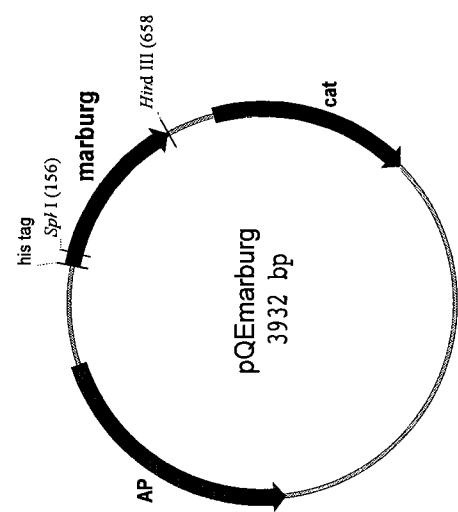


圖 11c 馬堡病毒蛋白大腸桿菌表現載具之簡圖

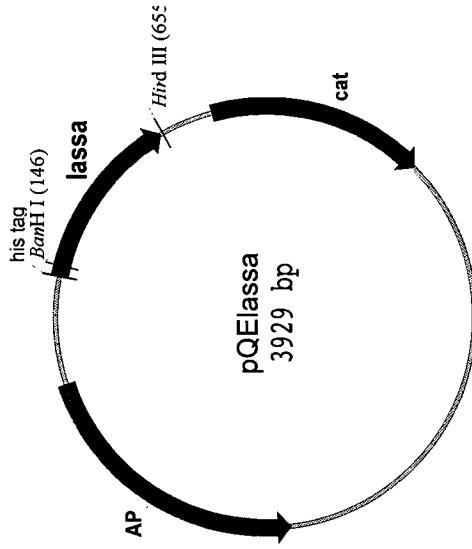
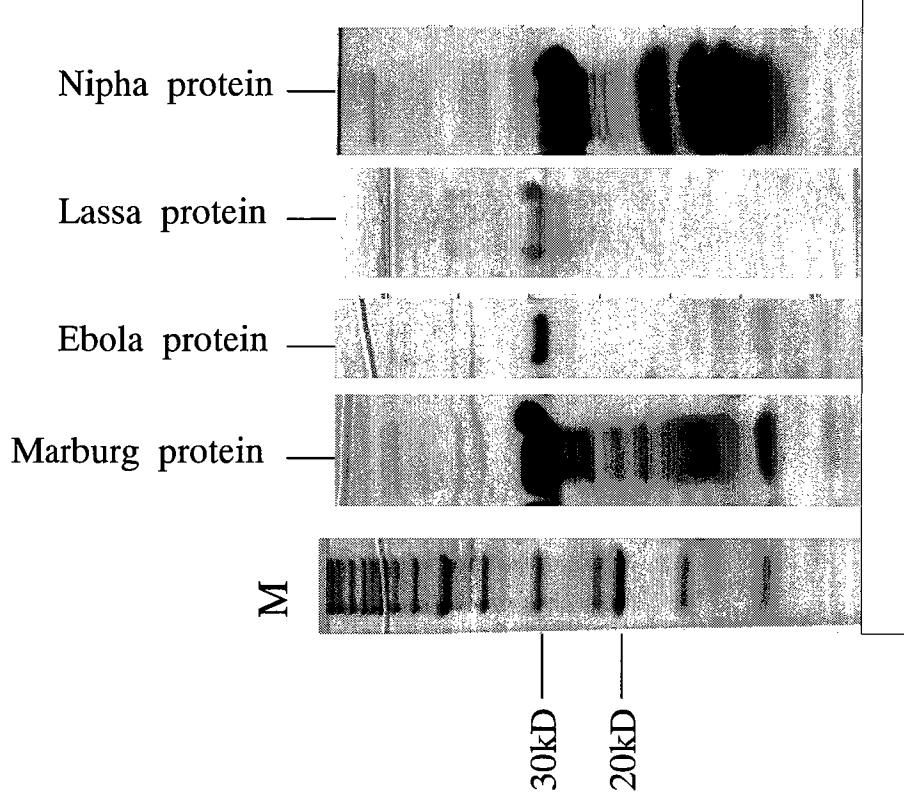


圖 11d 拉薩病毒蛋白大腸桿菌表現載具之簡圖

圖十二 伊波拉，馬堡，拉薩及立百病毒核蛋白在大腸桿菌表現載具pQE30表現之情形



Anti-Polyhistidine Ab

Anti-Ebola Ab

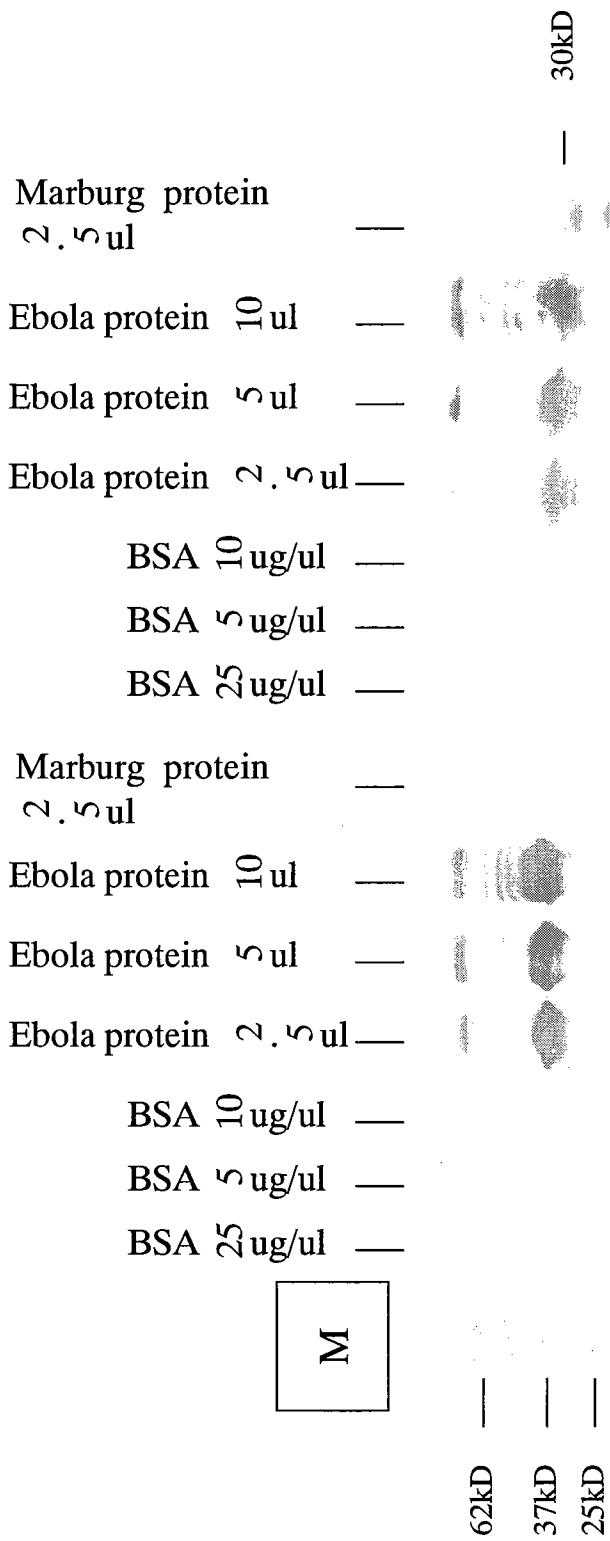


圖 十三 Western blot rabbit anti-伊波拉病毒蛋白
note: antiserum 1: 2000 dilution