

計畫編號：DOH94-DC-2021

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

台灣南部地區登革熱血清流行病學調查研究

研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗組

計畫主持人：黃智雄

研究人員：舒佩芸、郭郁中、蘇千玲、廖采苓、張淑芬、

陳語潔、吳和生、吳炳輝、韓明榮

執行期間：94年1月1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

	頁 碼
封面	
一、中文摘要	(3-4)
英文摘要	(5-6)
二、本文	
(1) 前言	(7-10)
(2) 材料與方法	(11-13)
(3) 結果	(14-15)
(4) 討論	(16-17)
(5) 結論與建議	(18)
(6) 參考文獻	(19-21)
三、附件一：調查研究問卷	(22)
四、圖次	(1-8)
五、表次	(1-4)

共 (34) 頁

## 中文摘要

病媒性病毒及立克次體實驗室是疾病管制局內負責病媒性傳染病（Vector-borne infectious disease）檢驗與研究之權責單位。由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形急速增加，發生頻率日益頻繁與嚴重。在台灣地區，登革熱與日本腦炎是最重要的兩種黃病毒傳染病，分別屬於登革熱與日本腦炎亞群，各亞群中之黃病毒有相當高的血清學交叉反應，正確的鑑別診斷相當困難。而在流行病學調查研究方面，也因無法利用中和抗體分析法檢測大量的血清檢體，使得血清抗體盛行率的研究十分困難。在登革熱血清流行病學調查研究上，更因有四型登革病毒的交叉感染，感染者可分為初次及二次以上感染，其中二次感者染無法利用中和抗體分析法知道登革病毒感染之血清型別。為了解決此問題，我們建立了一套 NS1 血清型特異性間接酵素免疫分析法，可用以分辨第一次及第二次登革病毒感染，及分辨第一次登革病毒感染之血清型別。我們曾利用此方法，針對 1997-1998 年間在屏東縣琉球鄉所採集之民眾血清進行回溯性血清流行病學研究。研究結果顯示非結構性蛋白質一(NS1)血清型特異性免疫球蛋白 G 之酵素免疫分析法與中和抗體試驗法有良好相關性。這些結果顯示非結構性蛋白質一(NS1)血清型特異性免疫球蛋白 G 之酵素免疫分析法能夠取代中和抗體試驗法進行血清流行病學研究，分辨日本腦炎及登革病毒感染，並能分辨第一次登革病毒感染之血清型別。

本計劃之目的在調查分析台灣南部地區民眾之登革熱血清抗體，以了解不同縣市地區，各個年齡層民眾之登革熱感染比率、感染次數、感染之血清型別、及與登革出血熱之相關性。本計劃 94 年度以高雄市為調查對象，分別在高雄市三民區（高流行區調查組）、前鎮區（高流行區調查組）、與前金區（低流行區對照組）三個地區進行，每個地區再依歷年來流行情形（高病例數與低病例數），選出最適合，實施採血，參與之民眾將同時進行問卷調查。目前已完成三民區 A 區域（本武里+本元里）、三民區 B 區域（本揚里）、前

鎮區 C 區域（瑞祥里）、與前鎮區 D 區域（民權里）之 dengue NS1 serotype-specific IgG 血清抗體分析。研究結果顯示，各年齡層登革熱血清抗體大致上與年齡層有正相關，其中小於 19 歲者(1986 年以後出生)大多為抗體陰性(前鎮區 D 區域除外)，各區域 55-70 歲者(1950-1935 年間出生)約有 25-65% 為抗體陽性，又大於 70 歲者(1935 年以前出生)約有 52-86% 為抗體陽性。此結果也符合台灣地區例年來的歷史記載，即 1931 年、1942-1943 年、及 1987-1988 年(第一型登革病毒)有三次較大規模的登革熱流行。利用 dengue NS1 serotype-specific IgG 分辨第一次登革病毒感染之血清型別，顯示第一型登革病毒是最主要的流行血清型別，但高年齡層者也有約 50% 感染過第二型登革病毒，及少數感染過第三及第四型登革病毒者。此結果顯示，藉由有系統的流行病學調查研究，可逐步繪出台灣南部登革熱高危地區歷年來流行情形，做為防治政策之參考。

關鍵詞：登革熱、日本腦炎、ELISA、非結構蛋白質一(NS1)

## 英文摘要

There had been a number of historical dengue epidemics (either regional or island wide) over the last century (1915, 1931, 1942-1943, 1981, 1987-1988, 1991, 1994, 1995, 1998 and 2000) in Taiwan. Among these, 1915, 1931 and 1942-1943 outbreaks were island wide large epidemics. For seroepidemiologic study, plaque reduction neutralization test (PRNT) remains the gold standard for the confirmation and serotyping of past dengue infections in the regions where two or more flaviviruses are co-circulating. This is due to high cross-reactivity of envelope (E)- and membrane (M)-specific IgG antibodies produced from Japanese encephalitis/Yellow fever vaccination and sequential flavivirus infections. The PRNT, however, is time consuming and difficult to perform, and not as amenable to testing large numbers of sera such as ELISA. To solve this problem, an NS1 serotype-specific indirect ELISA was developed to differentiate primary and secondary dengue infections and serotypes of primary dengue infection. We had previously reported retrospective seroepidemiologic studies on serum samples collected from residents of Liuchiu Hsiang, Pingtung County in the southern Taiwan during 1997-1998. The results demonstrated that NS1 serotype-specific IgG ELISA can replace PRNT for seroepidemiologic study to differentiate JE and dengue infections and for the dengue serotyping. The age-dependent increase in NS1-specific IgG positive sera from older individuals provided strong support that the 1942-1943 and 1931 outbreaks were indeed dengue infections.

In this study, we carry out retrospective seroepidemiologic studies on serum samples collected from residents of Kaohsiung city. The dengue seroprevalences were investigated at three administration districts including Samin, Cianjhen, and Cianjin. For each administration district, serum samples collected from the volunteer residents of two communities, one with high epidemic record and another with low epidemic record were analyzed for comparison. For this study, age-related infection rate, number of infection times, and infected dengue virus

serotypes of the volunteer residents will be analyzed. We have so far completed the analysis of NS1 serotype-specific IgG antibodies in those serum samples collected from four areas of Kaohsiung city. The result showed an age-dependent increase in NS1-specific IgG positive sera. Therefore, for these volunteers with their ages lower than 19 years old (born after the 1986 ), most of the serum samples tested were NS1-IgG antibody negative (except D area in Cianjhen district). For those volunteers between 55-70 years old (born between 1950-1935), 25-65% were found to be NS1-IgG antibody positive. For those volunteers higher than 70 years old (born before 1935), 52-86% were found to be NS1-IgG antibody positive. This result accorded with the historical records that Taiwan had large dengue outbreaks in 1931, 1942-1943, and 1987-1988. Further analysis in the differentiation of dengue virus serotypes showed that dengue 1 serotype was the major serotype causing dengue outbreaks in Taiwan. The result also showed that about 50% older individuals had been infected with dengue serotype 2, while few had been infected with DEN-3 or DEN-4. The result is very encouraging and suggests that integrated control measures against *Ae. Aegypti* are very successful during the last 20 years in Kaohsiung city.

Keyword: Dengue fever, Japanese encephalitis, ELISA, Nonstructural protein1 (NS1)

## 前言

傳染病防治法於 93 年 1 月修正後，已將登革熱歸類於第二類法定傳染病，依規定應於發現疑似病例二十四小時內通報。且為掌握不顯性感染及未被診斷為登革熱而漏報的個案，疾病管制局透過各種監測系統，以「寧枉勿縱」的方式加強監視通報登革熱，力求於第一時間掌握疑似個案，以防止登革病毒藉由病媒蚊的傳播而蔓延。而主動監測系統中之機場紅外線發燒篩檢 SARS 及登革熱病患，已證實是極為有效地登革熱病患篩檢方法。本中心黃病毒實驗室近年來積極研發登革熱的檢驗試劑，目前已建立一系列自動化的快速 ELISA 檢驗方法，能大量的分析血清檢體，目前綜合 Real-time RT-PCR 及 ELISA 二種登革熱快速檢驗方法，用於登革熱病人急性期血清之例行檢驗，可在收到檢體後 24-48 小時內完成，其靈敏度可達 95%。因此，我們建議對於醫院通報病例，在非登革熱流行期，由於陽性檢出率低，可等檢驗結果為陽性或疑似陽性後才進行噴藥工作。此快速檢驗方法對於病患的治療、疫情之監測與防治工作十分重要。為了區分第一次或第二次登革熱感染，我們開發出 NS1 特異性 IgG 抗體 ELISA 血清分析方法，能分析大量檢體，應用於血清流行病學研究。

本計畫的主要目標在在調查分析台灣南部地區民眾之登革熱血清抗體，以了解不同縣市地區，各個年齡層民眾之登革熱感染比率、感染次數、感染之血清型別、及與登革出血熱之相關性。其中各個年齡層民眾之登革熱血清抗體盛行率的研究結果，對於了解台灣地區是否有登革病毒潛在傳播（silent transmission）及登革熱已逐漸本土化之假說，提供可靠的數據。在東南亞許多地方,包括台灣，是登革病毒與日本腦炎病毒重合流行的地區。台灣地區在日據時代（1895-1945）曾有多次登革熱流行的記錄(Gubler, 1997)，包括 1915-1916、1931、及 1942-1943 至少三次有記載的大規模、全島性流行。此後，直到 1981 年才在屏東縣的小琉球爆發由第二型登革病毒造成的流行，估計全島近 80%的居民受到感染(謝維詮等，1981；吳盈昌，1986)。1987-1988

年高雄及屏東地區爆發了以第一型登革病毒為主的大流行，確定病例達 4,916 名。1991 年，高雄市三民及苓雅區出現第一型登革病毒的流行。至 1994 年，高雄市小港及前鎮區，出現第一型登革病毒的流行，且在三民及左營等區又爆發第三型登革病毒的流行，同年在臺南市也有第一型登革病毒的感染發生，並且出現臺灣第一名因登革出血熱死亡的病例，迄此年年底共有 11 名符合世界衛生組織登革出血熱標準的病例發生(衛生署預研所 83 年登革熱偵測孳生年報，1995)。近年來，除台北縣中和市(1995 年，179 例)、台中市東海大學(1995 年，8 例)、及台北市信義區(1996 年，10 例)三次地方性流行發生於中北部外，其他流行均發生於高雄縣市、台南市及屏東縣，而且這些地區均已出現三至四型之登革熱的流行，並曾出現登革出血熱病例。登革熱流行幅度的擴大以及嚴重臨床病例的出現增加，已使其成為臺灣公共衛生界的重要防疫問題。

南部地區高雄市、高雄縣及屏東縣於 2001-2002 年發生第二型登革病毒大流行，共有 5278 個登革熱確定病例，其中有 229 個屬於重症的出血性登革熱，這次流行與 1987-1988 年第一型登革病毒流行相似，均為延續前一年疫情之跨年流行。高雄市與高雄縣一直是台灣地區最主要的登革熱流行地區，2001-2002 年第二型登革熱大流行更是一警訊，突顯出現有防治措施之不足。這些確定病例的急性期、恢復期、與後恢復期血清對登革熱的分子生物學與血清學診斷、流行病學及致病機轉研究等相當珍貴，因為它提供了不同年齡層、不同區域、初次或多次登革熱感染等變數。若有系統的分析這些血清，對於建立完整的檢驗方法及了解南部地區登革熱流行現況均極有幫助。

台灣地區登革熱流行病學特徵包括：(1) 流行狀況：非本土性疾病，病患均由東南亞地區感染，並經由境外移入引進新登革病毒；(2) 流行特性：流行均由單一登革病毒引起，流行後無法再偵測到此病毒；(3) 流行地區：民國 32 年以前的流行，常由高雄地區開始，逐漸延伸至北部，造成全省大流行；近年流行，則主要集中在南部高高屏地區，也就是埃及斑蚊分布的地區；(4)



流行季節：通常為九月至十二月，與雨季有關，跨年流行少見；(5) 近年流行有升高趨勢：與都市化，出國旅遊頻繁，病媒蚊產生抗藥性等因素有關；及(6) 出血性登革熱之病患有升高趨勢：由於南部高高屏地區，二次以上感染之比例隨年齡層升高而增加，使登革出血熱之病患也逐漸升高。雖然台灣地區登革熱之流行現況，顯示登革熱並非本土性疾病，即本土性登革熱之流行，均需要由東南亞地區經由境外移入引進新登革病毒，待流行結束後即無法再偵測到此病毒。但對於台灣地區是否會有登革病毒不斷地自境外移入引進，卻未被偵測到，並緩慢地進行潛在傳播 (silent transmission)，以致登革熱已逐漸本土化之假說，目前並沒有可靠的證據加以證實或排除。上述假說，需要有系統的血清流行病學及分子流行病學的研究結果提供可靠的數據。

黃病毒的血清學診斷相當複雜，在台灣地區，由於有日本腦炎與登革熱二種病毒之流行，且多數民眾因接種日本腦炎疫苗已產生抗結構性蛋白質抗體，對於同質(homologous)與異質(heterologous) 黃病毒的 IgG 抗體有相當程度的交叉反應(cross-seroreactivity)，所以在血清鑑別診斷上相當困難。而在流行病學調查研究方面，也因無法利用中和抗體分析法檢測大量的血清檢體，使得血清抗體盛行率的研究十分困難。此外，登革病毒因有四種血清型別，中和抗體並沒有交叉保護，因此登革熱感染者可分為初次及二次以上感染，其中二次感者染無法利用中和抗體分析法知道登革病毒感染之血清型別。某些早期的血清流行病學研究，只分析登革熱外套膜蛋白質(E)特異性之 IgG 抗體，所得到的結果並不可靠，因為會與日本腦炎之 IgG 抗體有交叉反應。為了解決此問題，我們建立了一套 NS1 血清型特異性間接酵素免疫分析法，可用以分辨第一次及第二次登革病毒感染，及分辨第一次登革病毒感染之血清型別。我們針對 1997-1998 年間在屏東縣琉球鄉所採集之民眾血清進行回溯性血清流行病學研究。研究結果顯示非結構性蛋白質一(NS1)血清型特異性免疫球蛋白 G 之酵素免疫分析法與中和抗體試驗法有良好相關性。這些結果顯示非結構性蛋白質一(NS1)血清型特異性免疫球蛋白 G 之酵素免疫分析法能夠取

代中和抗體試驗法進行血清流行病學研究，分辨日本腦炎及登革病毒感染，並能分辨第一次登革病毒感染之血清型別。

我們曾收集了台南市歷年來確定病例之後恢復期(post-infection) 血清進行分析研究，比較其急性期、恢復期與後恢復期之 E/M-specific IgM and IgG 抗體及 NS1-specific IgG 抗體反應，結果顯示有 1/3 確定病例是屬於第二次感染，且與年齡層有密切相關性，即大多數二次感染確定病例是 60 歲以上，此結果也證實大多數台南市年青人在最近二十年來並未感染過登革熱。

本計畫將分析台灣南部地區民眾之登革熱血清抗體，以了解不同縣市地區，各個年齡層民眾之登革熱感染比率、感染次數、感染之血清型別、及與登革出血熱之相關性。藉著分析採血者之抗登革病毒外套膜蛋白質(E)與非結構性蛋白質 NS1 之 IgG 血清抗體 (dengue E and NS1 serotype-specific IgG antibody)，再依據年齡層進行分析，以了解各年齡層登革熱血清抗體盛行率的趨勢。本計畫最終目的，係希望藉由有系統的流行病學調查研究，逐步繪出台灣南部登革熱高危地區歷年來流行情形，做為防治政策之參考。

## 材料與方法

1. **調查研究地區**：本年度分別在高雄市三民區（調查組）、前鎮區（調查組）、與前金區（低流行區對照組）三個地區進行，每個地區再依歷年來流行情形（高病例數與低病例數），選出最適合的二個「里」，實施採血。
2. **採血對象與數量**：民眾依十四個年齡層（組）進行採血，分別為 5-9、10-14、15-19、20-24、25-29、30-34、35-39、40-44、45-49、50-54、55-59、60-64、65-69、及 $\geq 70$  歲。每個「里」的每個年齡層（組）將採血 30 支，合計每個「里」將採血 420 支，即每個地區 840 支，總計採血 2,520 支。故以里為單位，將人數不足四千人與鄰近里合併，再以隨機方式挑出兩個單位作為調查地點。
  - 選定採血目標里：
    - A. 三民區：高病例區：本武里+本元里  
低病例區：本揚里
    - B. 前鎮區：高病例區：瑞祥里  
低病例區：民權里（或忠孝里+復國里）。
    - C. 前金區：高病例區：博孝里+社西里+林投里  
低病例區：北金里+東金里+長城里+三川里。
3. **血清採取、收集**：採血部分，將利用統計方法，進行電腦隨機取樣，選出民眾名單，進行採血。
4. **調查問卷與分析**：(附件一)
5. **調查民眾血清學檢驗**：利用血清學 ELISA 方法，分析 dengue NS1 serotype-specific IgG antibody。
6. **溶斑減少中和試驗法 (Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT)**：傳統中和試驗法係將 BHK-21 細胞以  $0.75 \times 10^5$  個細胞/孔分

注於 24 孔盤，放入 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培養箱內培養 48 小時。血清檢體以血清稀釋液（0.01MPBS+5%FCS）作 10 倍稀釋後，於 56°C 水浴 30 分鐘作不活化處理。病毒(如 DEN-1,2,3,4 型,第一型為 Hawaiian strain，第二型為 New Guinea C，第三型為 H-87，第四型為 H-241)以 BHK 細胞培養液調整濃度至 100 PFU/ml。去活化的稀釋血清與等體積病毒混合均勻，放入 4°C 冰箱中 18-21 小時進行中和反應，取出已培養 2~4 天的 BHK-21 細胞，倒掉上清液，加入病毒-細胞混和液，放入 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培養箱內感染 1 小時，之後加入含 1% Methylcellulose 的 BHK-21 細胞培養液，放入 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培養箱培養 3 至 6 天後取出培養盤，用 Amino Black 固定染色 30 分鐘，計算溶斑數。

## 7. ELISA(酵素免疫分析法)

(1) Capture IgM/IgG 抗體檢驗:先以 100  $\mu$ l 對人 IgM 或 IgG 特異性之山羊 IgG (goat IgG against Human IgM or IgG)在 4°C 下隔夜覆被 (coating)在 96 孔微量效價盤上。覆被完成後以磷酸氫化鈉緩衝液 (PBS)清洗，之後再用 200  $\mu$ l 之 5% 牛血清白蛋白 (in PBS)於 37°C 下進行 1 小時封鎖作用 (blocking)。清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照血清 100  $\mu$ l 反應 1 小時。清洗後，加入 100  $\mu$ l 從細胞培養的病毒抗原(local strain of DEN-1 (8700828), DEN-2 (454009), DEN-3 (8700829), DEN-4 (8700544), JE (JaGAr strain) virus、or other flaviviruses)，在 37°C 下反應 1 小時。清洗後，加入 1/1000(v/v) 稀釋之抗黃病毒屬抗原之單株抗体 D56-3 腹水 100  $\mu$ l。反應 1 小時後，加入 1:1000 稀釋之山羊抗鼠 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體 100  $\mu$ l，於 37°C 反應 1 小時。清洗後，加入 100  $\mu$ l 酵素受質體 pNPP (p-nitrophenyl-phosphate)室溫作用 30 分鐘，再用 Dynatech

MR700 微量效價盤判讀儀 (microplate reader) 以波長 405nm 測吸光度。

- (2) NS1 serotype-specific IgG ELISA: 先以  $5\ \mu\text{g/ml}$ ,  $100\ \mu\text{l/well}$  of 單株抗体 D2/8-1 在  $4^\circ\text{C}$  下隔夜覆被 (coating) 在 96 孔微量效價盤上。清洗後，將不同血清型別之登革病毒細胞培養，含有 NS1 抗原的上清液分別以 1: 3 稀釋後加入不同 96 微孔，在  $37^\circ\text{C}$  下反應 1 小時。清洗後，加入 1:50 稀釋好的待測血清及對照血清反應 1 小時。再加入 1:1000 稀釋之山羊抗人 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體，於  $37^\circ\text{C}$  反應 1 小時。最後，加入酵素受質體 OPD 室溫作用 30 分鐘，最後加入 2N 硫酸停止反應，再以波長 490 測吸光度。

## 結果

1. **建立 NS1 serotype-specific IgG ELISA**：圖一是 NS1 serotype-specific IgG ELISA 的一個代表性結果，根據我們已經發表的研究結果顯示此方法可用以分辨第一次及第二次登革病毒感染，及分辨第一次登革病毒感染之血清型別。
2. **高雄市各行政區之相關地理位置**：本計劃之目的在調查分析台灣南部地區民眾之登革熱血清抗體，以了解不同縣市地區，各個年齡層民眾之登革熱感染比率、感染次數、感染之血清型別、及與登革出血熱之相關性。94 年度以高雄市為調查對象，分別在高雄市三民區（高流行區調查組）、前鎮區（高流行區調查組）、與前金區（低流行區對照組）三個地區進行（圖二），每個地區再依歷年來流行情形（高病例數與低病例數），選出最適合「里」，實施採血。表一是高雄市歷年來登革熱流行情形之摘要。
3. **血清採取**：民眾依十四個年齡層（組）進行採血，分別為 5-9、10-14、15-19、20-24、25-29、30-34、35-39、40-44、45-49、50-54、55-59、60-64、65-69、及  $\geq 70$  歲。每個「里」的每個年齡層（組）預定將採血 30 支，合計每個「里」將採血 420 支，即每個地區 840 支，參與之民眾將同時進行問卷調查(附件一)。表二是各區實際採血的統計表，其中除前金區之高病例數(E 組)採血較預期差外，其他都達到預定目標。
4. **三民區（高流行區調查組）高病例數二個「里」的血清抗體陽性率**：目前已完成三民區 A 區域（本武里+本元里）、三民區 B 區域（本揚里）、前鎮區 C 區域（瑞祥里）、與前鎮區 D 區域（民權里）之 dengue NS1 serotype-specific IgG 血清抗體分析。表三為各年齡層實際採血數及抗體陽性數。圖三為 age-dependent seroprevalence rate，結果顯示各年齡層登革熱血清抗體大致上與年齡層有正相關，其中小於 19 歲者(1986 年以後出生) 大多為抗體陰性(前鎮區 D 區域除外)，55-70 歲者(1950-1935 年間

出生)約有 25-65%為抗體陽性，又大於 70 歲者(1935 年以前出生)約有 52-86%為抗體陽性。圖四為依年齡層分佈之第一次或第二次感染之血清抗體陽性數分析圖。此結果也符合台灣地區例年來的歷史記載，即 1931 年、1942-1943 年、及 1987-1988 年(第一型登革病毒)有三次較大規模的登革熱流行(前鎮區 D 區域除外)。

5. **第一次登革病毒感染之血清型別分析：**利用 dengue NS1 serotype-specific IgG ELISA 可以分辨第一次或第二次登革病毒感染，及第一次感染之登革病血清型別。表四為三民區 A 區域各年齡層第一次及第二次之陽性數及其第一次感染之登革病血清型別。圖五~圖八為各區域依年齡層第一次感染之登革病血清型別分析圖。顯示第一型登革病毒是最主要的流行血清型別，但高年齡層者也有約 50%感染過第二型登革病毒，及少數感染過第三及第四型登革病毒者。

## 討論

以往，黃病毒的血清流行病學調查研究主要是利用中和抗體分析法，來分辨各種黃病毒特異性的中和抗體(主要是 IgG)。但是因為中和抗體分析法十分耗時，且操作困難，無法檢測大量的血清檢體，使得血清抗體盛行率的研究十分困難。又由於登革病毒因有四種血清型別，中和抗體並沒有交叉保護，因此登革熱感染者可分為初次及二次以上感染，其中二次感者染無法利用中和抗體分析法知道登革病毒感染之血清型別。又某些早期的血清流行病學研究，只分析登革熱外套膜蛋白質(E)特異性之 IgG 抗體，因為會與日本腦炎之 IgG 抗體有交叉反應，所得到的結果並不可靠。因此，由於缺乏簡單、可靠的檢驗方法，可以大量的檢測血清檢體，使得血清抗體盛行率的研究十分困難，一直無法突破。為了解決此問題，我們建立了一套 NS1 血清型特異性間接酵素免疫分析法，可用以分辨第一次及第二次登革病毒感染，及分辨第一次登革病毒感染之血清型別。

我們曾利用此方法，針對 1997-1998 年間在屏東縣琉球鄉所採集之民眾血清進行回朔性血清流行病學研究。研究結果顯示非結構性蛋白質一(NS1)血清型特異性免疫球蛋白 G 之酵素免疫分析法與中和抗體試驗法有良好相關性。這些結果顯示非結構性蛋白質一(NS1)血清型特異性免疫球蛋白 G 之酵素免疫分析法能夠取代中和抗體試驗法進行血清流行病學研究，分辨日本腦炎及登革病毒感染，並能分辨第一次登革病毒感染之血清型別。

利用 NS1 血清型特異性間接酵素免疫分析法，我們也曾收集了台南市歷年來確定病例之後恢復期(post-infection) 血清進行分析研究，比較其急性期、恢復期與後恢復期之 E/M-specific IgM and IgG 抗體及 NS1-specific IgG 抗體反應，結果顯示有 1/3 確定病例是屬於第二次感染，且與年齡層有密切相關性，即大多數二次感染確定病例是 60 歲以上，此結果也證實大多數台南市年青人在最近二十年來並未感染過登革熱。此外，利用 dengue NS1 serotype-specific IgG ELISA 分辨第一次登革病毒感染之血清型別，其結果也與歷年來台南市流



行的登革病毒血清型別符合，即 83 年為第一型登革病毒、86 年為第二型登革病毒、87 年為第三型登革病毒、及 89 年為第四型登革病毒。

為調查分析台灣南部地區民眾之登革熱血清抗體，以了解不同縣市地區，各個年齡層民眾之登革熱感染比率、感染次數、感染之血清型別、及與登革出血熱之相關性。目前已完成三民區 A 區域（本武里+本元里）、三民區 B 區域（本揚里）、前鎮區 C 區域（瑞祥里）、與前鎮區 D 區域（民權里）之 dengue NS1 serotype-specific IgG 血清抗體分析。研究結果顯示，各年齡層登革熱血清抗體大致上與年齡層有正相關，其中小於 19 歲者(1986 年以後出生)大多為抗體陰性(前鎮區 D 區域除外)，各區域 55-70 歲者(1950-1935 年間出生)約有 25-65% 為抗體陽性，又大於 70 歲者(1935 年以前出生)約有 52-86% 為抗體陽性。此結果也符合台灣地區例年來的歷史記載，即 1931 年、1942-1943 年、及 1987-1988 年(第一型登革病毒)有三次較大規模的登革熱流行。此結果再次顯示，NS1 血清型特異性間接酵素免疫分析法，可用以進行流行血清病學調查研究，相關結果可逐步繪出台灣南部登革熱高危地區歷年來流行情形，做為防治政策之參考。

## 結論與建議

由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，建立一套完整的黃病毒監測（主動與被動監測）、快速檢驗（病毒學、血清學及分子診斷）與流行病學（血清流行病學及分子流行病學）分析系統，能監測台灣地區已知存在的黃病毒（登革病毒及日本腦炎病毒）及未來可能會侵入的黃病毒（如黃熱病毒及西尼羅腦炎病毒）是十分重要的。我們正積極在疾病管制局成立一個具有國際水準的黃病毒參考實驗室，有系統的進行各種黃病毒的監測、檢驗、與流行病學之研究，希望以後能在 APEC 或 WHO 平台下運作，成為 APEC 或 WHO 下的一個黃病毒參考實驗室。此外也正積極與國際上相關實驗室合作，進行學術交流與共同研究計劃，包括加入日本國立傳染病研究所所推動的登革病毒基因資料庫的建立，及 WHO 與 PDVI 所推動的登革熱檢驗試劑評估工作。未來，將建立一個以電子平台為基礎的登革熱監測網，以監控全球登革熱疫情，有效地進行防治措施。

## 參考文獻

1. Burke, D. S., A. Nisalak, D. E. Johnson, and R. M. Scott. 1988. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hygiene* 38:172-180.
2. Calisher, C. H., N. Karabatsos, J. M. Dalrymple, et al. 1989. Antigenic relationships between flavivirus as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antiserum. *J. Gen. Virol.* 70:37-43.
3. Chen, L. K., C. L. Liao, C. G. Lin, et al. 1996. Persistence of Japanese encephalitis virus is associated with abnormal expression of nonstructural protein NS1 in host cells. *Virology* 217:220-229.
4. Chen WJ, Chen SL, Chien LJ, Chen CC, King CC, Harn MR, Hwang KP, Fang JH. 1996. Silent transmission of the dengue virus in southern Taiwan. *Am J Trop Med Hyg.* 55:12-6.
5. Chen WJ, King CC, Chien LY, Chen SL, Fang AH. 1997. Changing prevalence of antibody to Dengue virus in paired sera in the two years following an epidemic in Taiwan. *Epidemiol Infect.* 119:277-9.
6. Endy T. P., S. Chunsuttiwat, A. Nisalak, D. H. Libraty, S. Green, A. L. Rothman, D. W. Vaughn, and F. A. Ennis. 2002. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am. J. Epidemiol.* 156:40-51
7. Ey, P. L., S. J. Prowse, and C. R. Jenkin. 1978. Isolation of pure IgG1, IgG2a, and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A-sepharose. *Immunochemistry* 15:429-436.
8. Gibbons, R. V., and D. W. Vaughn. 2002. Dengue: an escalating problem. *BMJ.* 324:1563-1566.
9. Gubler, D. J. 1996. Serological diagnosis of dengue haemorrhagic fever. *World Health Organization, Dengue Bull.* 20:20-23.
10. Gubler, D. J. 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* New York: CAB International, p 1-22.
11. Gubler, D. J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:480-496.
12. Halstead, S. B., S. Rojanasuphot, and N. Sangkawibha. 1983. Original antigenic sin in dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:154-156.
13. Harn, M. R., Y. L. Chiang, M. J. Tian, Y. H. Chang, and Y. C. Ko. 1993. The 1991 dengue epidemic in Kaohsiung City. *J. Formos. Med. Assoc. Suppl.* 1:S39-43.
14. Hesketh, L., A. Charlett, P. P. Farrington, et al. 1997. An evaluation of nine commercial EIA kits for the detection of measles-specific IgG. *J. Virol. Methods* 66:51-59.
15. Hsieh, W. C., M. F. Chen, K. T. Lin. et al. 1982. Outbreaks of Dengue fever in 1981 in Liouchyou Shiang, Pingtung County. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi*

81:1388-1395.

16. Innis, B. L., A. Nisalak, S. Nimmannita, et al. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:418-427.
17. Ko, Y. C., M. J. Chen, and S. M. Yeh. 1992. The predisposing and protective factors against dengue virus transmission by mosquito vector. *Am. J. Epidemiol.* 136:214-220.
18. Lin, H. M., C. S. Chen, C. C. Hsu, and C. L. Chung. 1986. Dengue vector density survey in Liuchiu, Pingtung, Taiwan. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi.* 19:218-223.
19. Makino, Y., M. Tadano, M. Saito, et al. 1994. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. *Microbiol. Immunol.* 38:951-955.
20. Russell, P. K., A. Nisalak, P. Sukhavachana, and S. Vivona. 1967. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J. Immunol.* 99:285-290.
21. Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, et al. 2000. Dengue NS1-specific Antibody Responses: Isotype Distribution and Serotyping in Patients with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. *J. Med. Virol.* 62: 224-232.
22. Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, et al. 2001. Antibody to the nonstructural protein NS1 of Japanese encephalitis virus: potential application of mAb-based indirect ELISA to differentiate infection from vaccination. *Vaccine* 19: 1753-1763.
23. Pei-Yun Shu, Li-Kuang Chen, Shu-Fen Chang, Yi-Yun Yueh, Ling Chow, Li-Jung Chien, Chuan Chin, Ting-Hsiang Lin and Jyh-Hsiung Huang. 2002. Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1840-1844.
24. Pei-Yun Shu, Shu-Fen Chang, Yu-Chung Kuo, Yi-Yun Yueh, Ling Chow, Li-Jung Chien, Chien-Lin Sue, Ting-Hsiang Lin and Jyh-Hsiung Huang. 2003. Development of Group- and Serotype-specific one-step SYBR Green I-Based Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Dengue Virus. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2408-2416.
25. Pei-Yun Shu, Li-Kuang Chen, Shu-Fen Chang, Yi-Yun Yueh, Ling Chow, Li-Jung Chien, Chuan Chin, Ting-Hsiang Lin and Jyh-Hsiung Huang. 2003. Comparison of Capture Immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Nonstructural Protein NS1 Serotype-specific IgG ELISA for Differentiation of Primary and Secondary Dengue Virus Infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10: 622-630.
26. Pei-Yun Shu, Li-Kuang Chen, Shu-Fen Chang, Chien-Lin Sue, Li-Jung Chien, Chuan Chin, Ting-Hsiang Lin and Jyh-Hsiung Huang. 2004. Dengue Virus Serotyping Based on Envelope and Membrane and Nonstructural Protein

- NS1 Serotype-Specific Capture Immunoglobulin M Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *J. Clin. Micro.* 42:2489-2494.
27. Pei-Yun Shu and Jyh-Hsiung Huang. 2004. MiniReview: Current advances in dengue diagnosis. *Clin. Diagnos. Lab. Immunol.* 11:642-650.
  28. Singh J, Balakrishnan N, Bhardwaj M, Amuthadevi P, George EG, Subramani K, Soundararajan K, Appavoo NC, Jain DC, Ichhpujani RL, Bhatia R, Sokhey J. 2000. Silent spread of dengue and dengue haemorrhagic fever to Coimbatore and Erode districts in Tamil Nadu, India, 1998: need for effective surveillance to monitor and control the disease. *Epidemiol Infect.* 125:195-200.
  29. Wang, C. H., N. T. Chang, H. H. Wu, and C. M. Ho. 2000. Integrated control of the dengue vector *Aedes aegypti* in Liu-Chiu village, Ping-Tung County, Taiwan. *J. Am. Mosq. Control Asso.* 16:93-99.
  30. Wu, Y. C. 1986. Epidemic dengue 2 on LiouChyou Shiang, Pingtung County in 1981. *Chinese J. Microbiol. Immunol.* 19:203-211.
  31. Wu, Y. C. 1996. Epidemiology and control of Japanese encephalitis and dengue fever in Taiwan. World Health Organization, *Dengue Bull.* 20:51-54.

附件一

行政院衛生署疾病管制局 94 年 月

高雄市/台南市/高雄縣 登革熱血清流行病學調查研究問卷

訪視日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日

訪視者：\_\_\_\_\_

一、個案背景資料：

姓名：\_\_\_\_\_ 編號：\_\_\_\_\_ 性別：\_\_\_\_\_

出生日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日

住址：\_\_\_\_\_市\_\_\_\_\_區\_\_\_\_\_里\_\_\_\_\_街(路)

\_\_\_\_\_段\_\_\_\_\_巷\_\_\_\_\_弄\_\_\_\_\_號\_\_\_\_\_樓

電話：(\_\_\_\_\_)\_\_\_\_\_

職業別：農 工 軍 公 教 商 家管 學生 其他：\_\_\_\_\_

工作地：\_\_\_\_\_市\_\_\_\_\_區\_\_\_\_\_里\_\_\_\_\_街(路)\_\_\_\_\_段\_\_\_\_\_

二、居住地：您曾住過哪些地方(高雄市/台南市/高雄縣以外地區)

1. \_\_\_\_\_年~\_\_\_\_\_年, \_\_\_\_\_縣市\_\_\_\_\_鄉鎮區市區\_\_\_\_\_里

2. \_\_\_\_\_年~\_\_\_\_\_年, \_\_\_\_\_縣市\_\_\_\_\_鄉鎮區市區\_\_\_\_\_里

3. \_\_\_\_\_年~\_\_\_\_\_年, \_\_\_\_\_縣市\_\_\_\_\_鄉鎮區市區\_\_\_\_\_里

三、登革熱感染：您曾感染過幾次登革熱(例如民國 4-5 年、16 年、20 年、31-32 年、70 年、76-77 年、83 年、84 年、86 年、87 年、88 年、89 年、90-91 年等)?

一次 二次 三次 四次 不確定

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

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

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

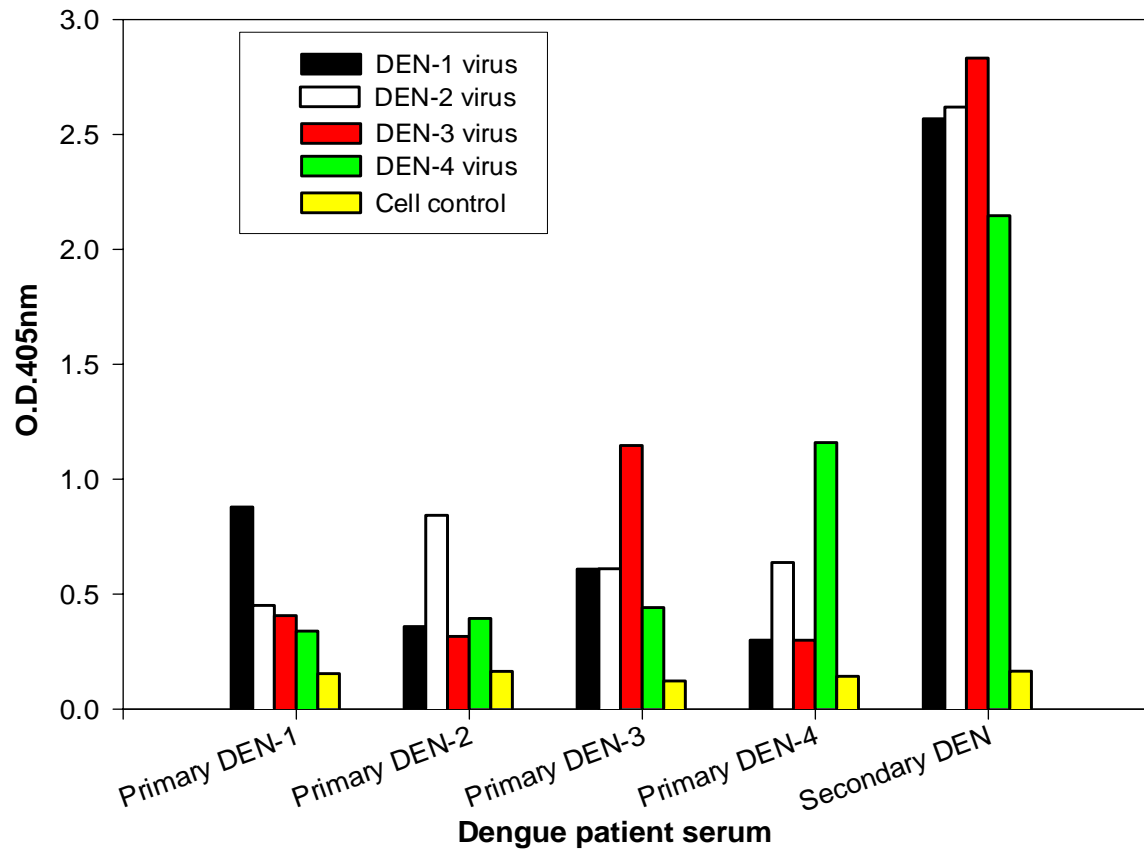
第四次感染時間：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月, 感染地點：\_\_\_\_\_縣市(或國外地區)

四：您出現登革熱症狀前後，家人及鄰居、親戚朋友是否也有和您相似症狀?

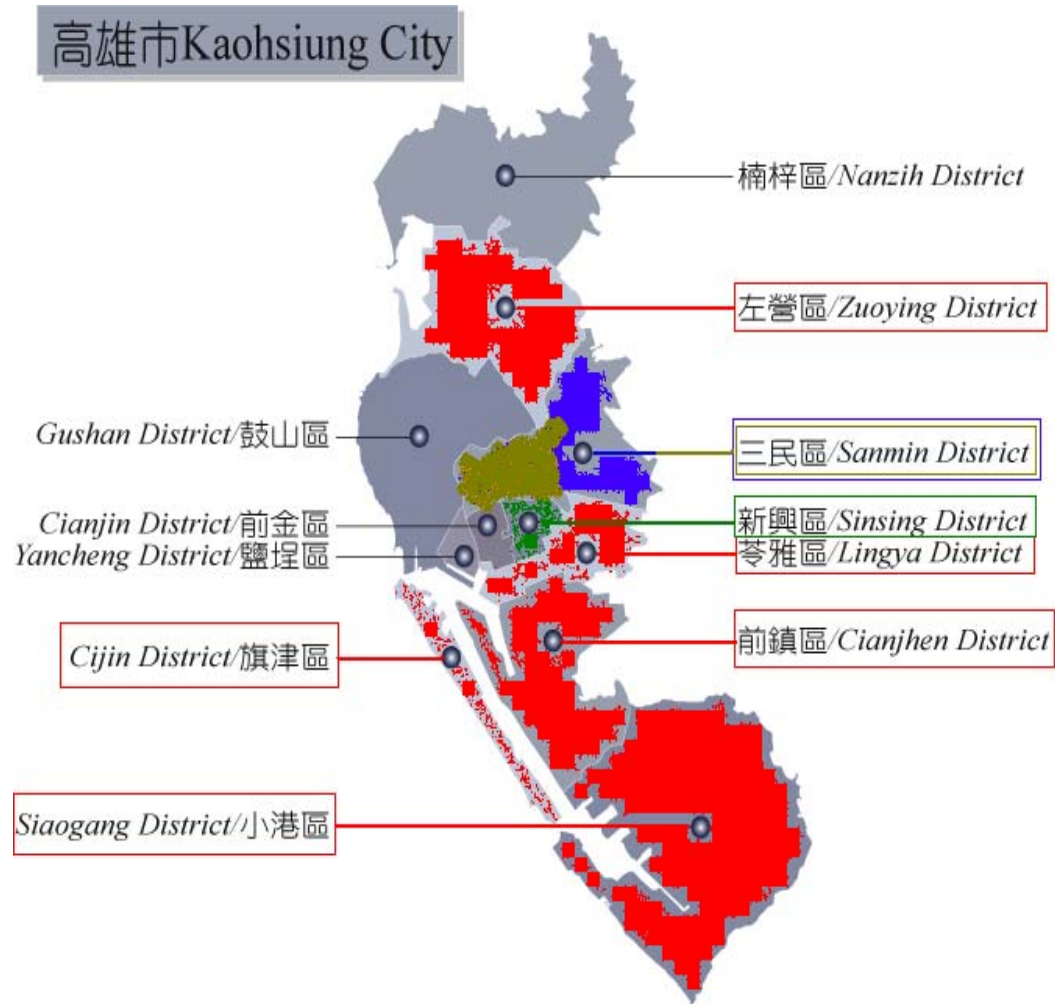
否 是

圖一、Dengue serotyping based on NS1 serotype-specific IgG ELISA. The representative results of NS1 serotype-specific IgG ELISA to primary DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 and secondary dengue virus infection were shown to demonstrate the NS1 serotype-specific IgG response in primary dengue patient, but not secondary patients.

## Dengue NS1 serotype-specific IgG

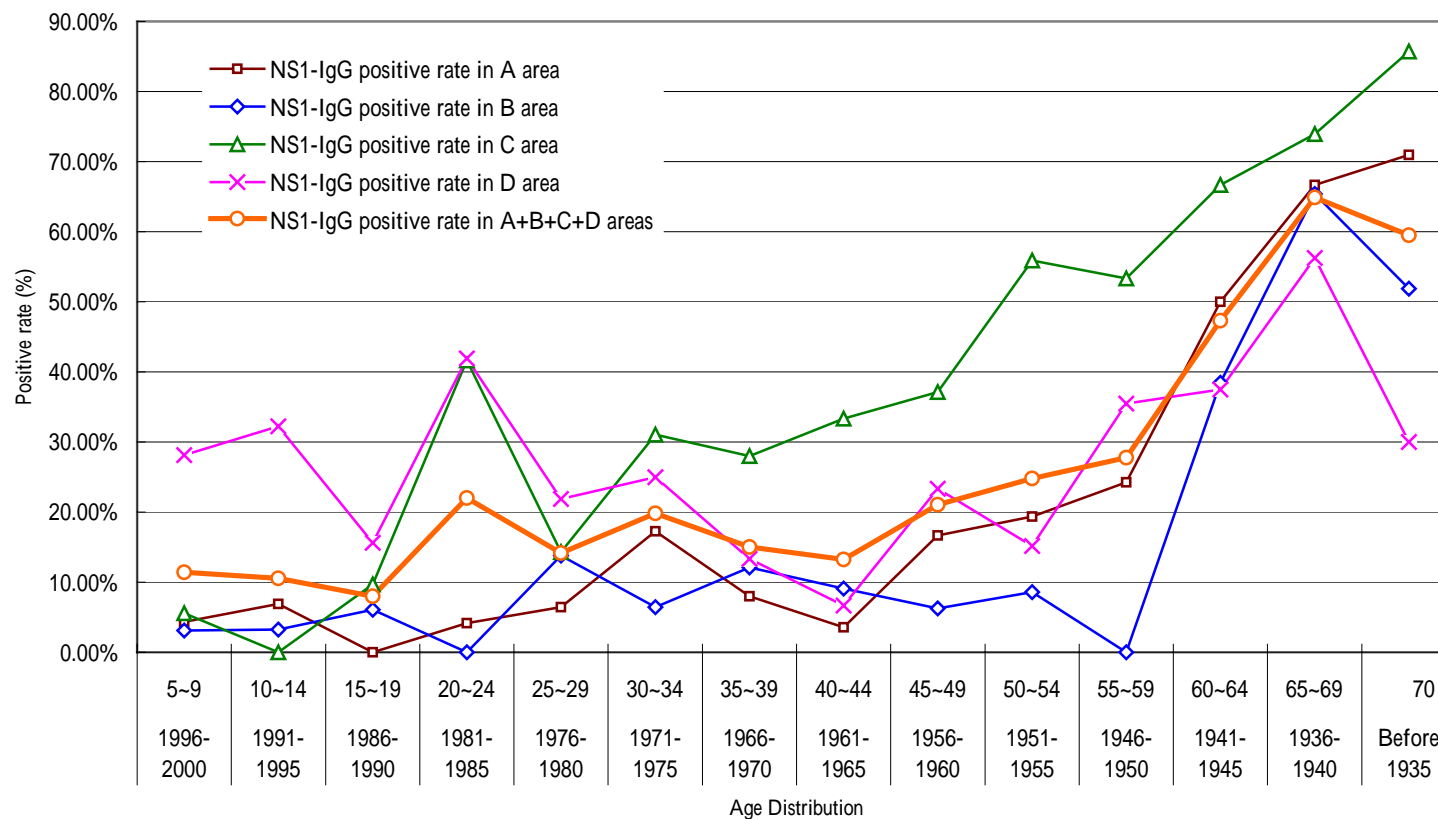


圖二、Map of Kaohsiung city. Three administration districts, Samin,Cianjhen, and Cianjin were chosen to study the seroprevalence of dengue virus infection.

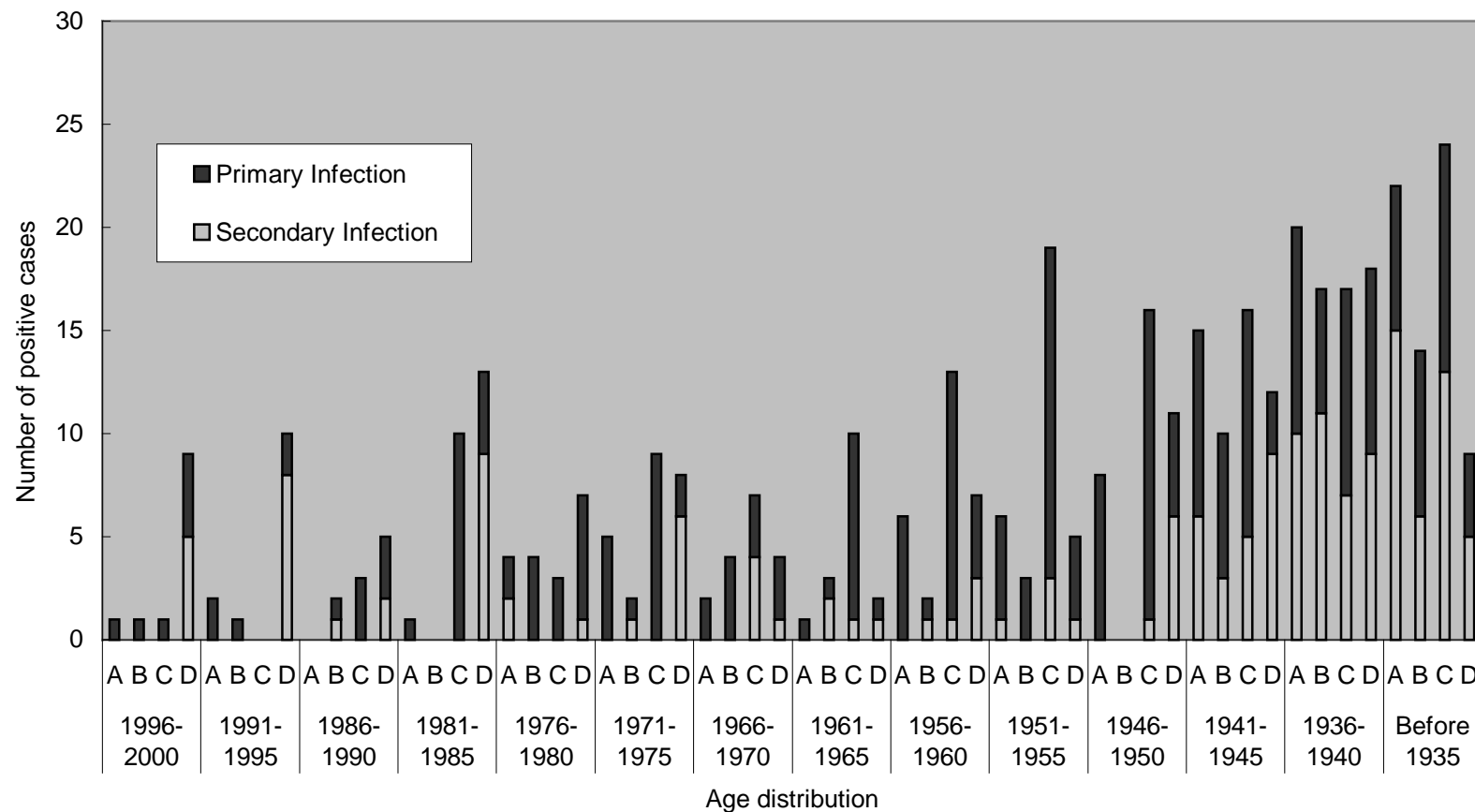




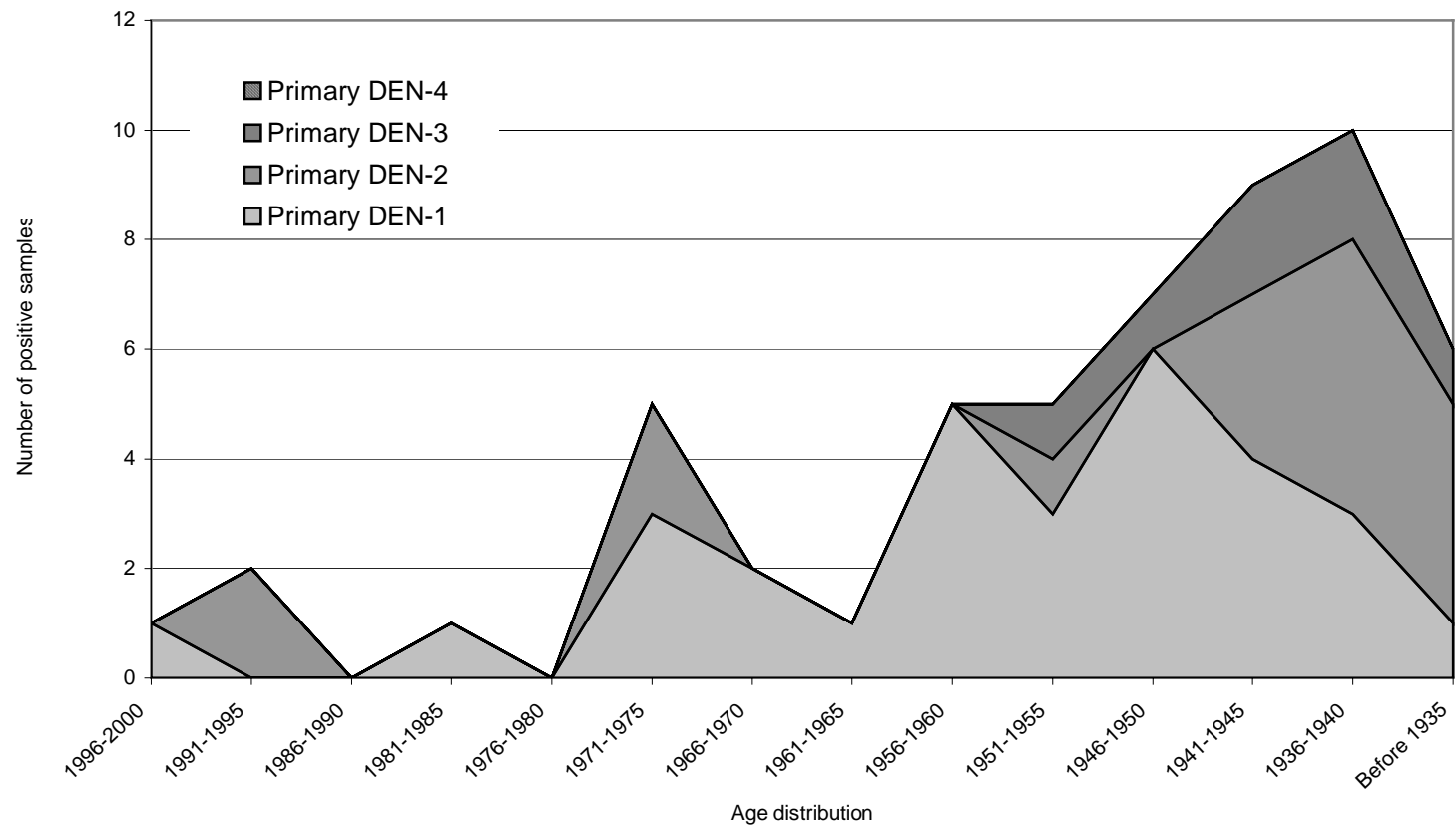
圖三、Age-dependent seroprevalence rate of dengue NS1-specific IgG antibody in four different areas of Kaohsiung city.  
 三民區 A 區域 (本武里+本元里)、三民區 B 區域 (本揚里)、前鎮區 C 區域 (瑞祥里)、與前鎮區 D 區域 (民權里)



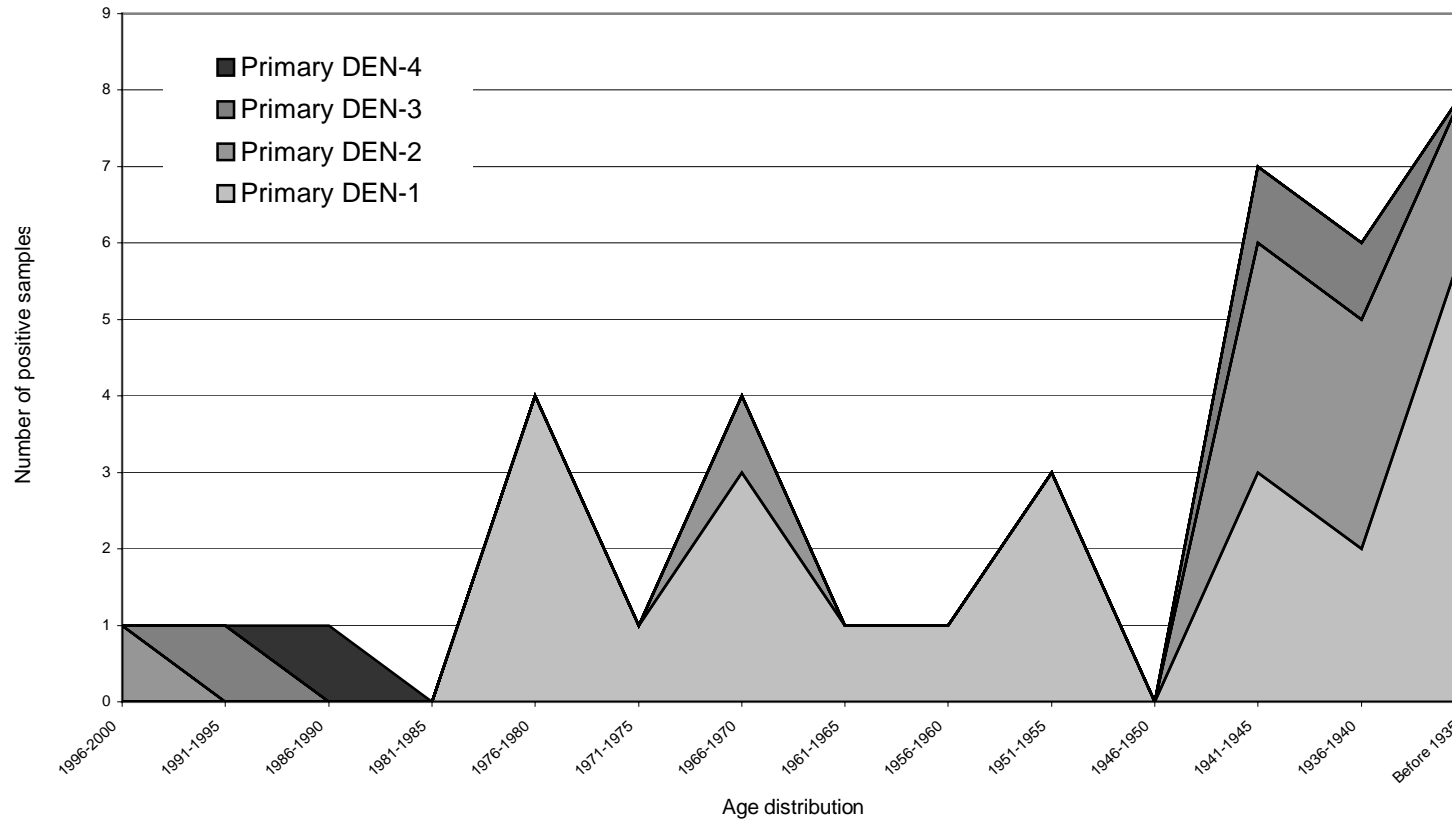
圖四、Age-related positive numbers of volunteers with primary or secondary dengue virus infection in four different areas of Kaohsiung city. 三民區 A 區域 (本武里+本元里)、三民區 B 區域 (本揚里)、前鎮區 C 區域 (瑞祥里)、與前鎮區 D 區域 (民權里)



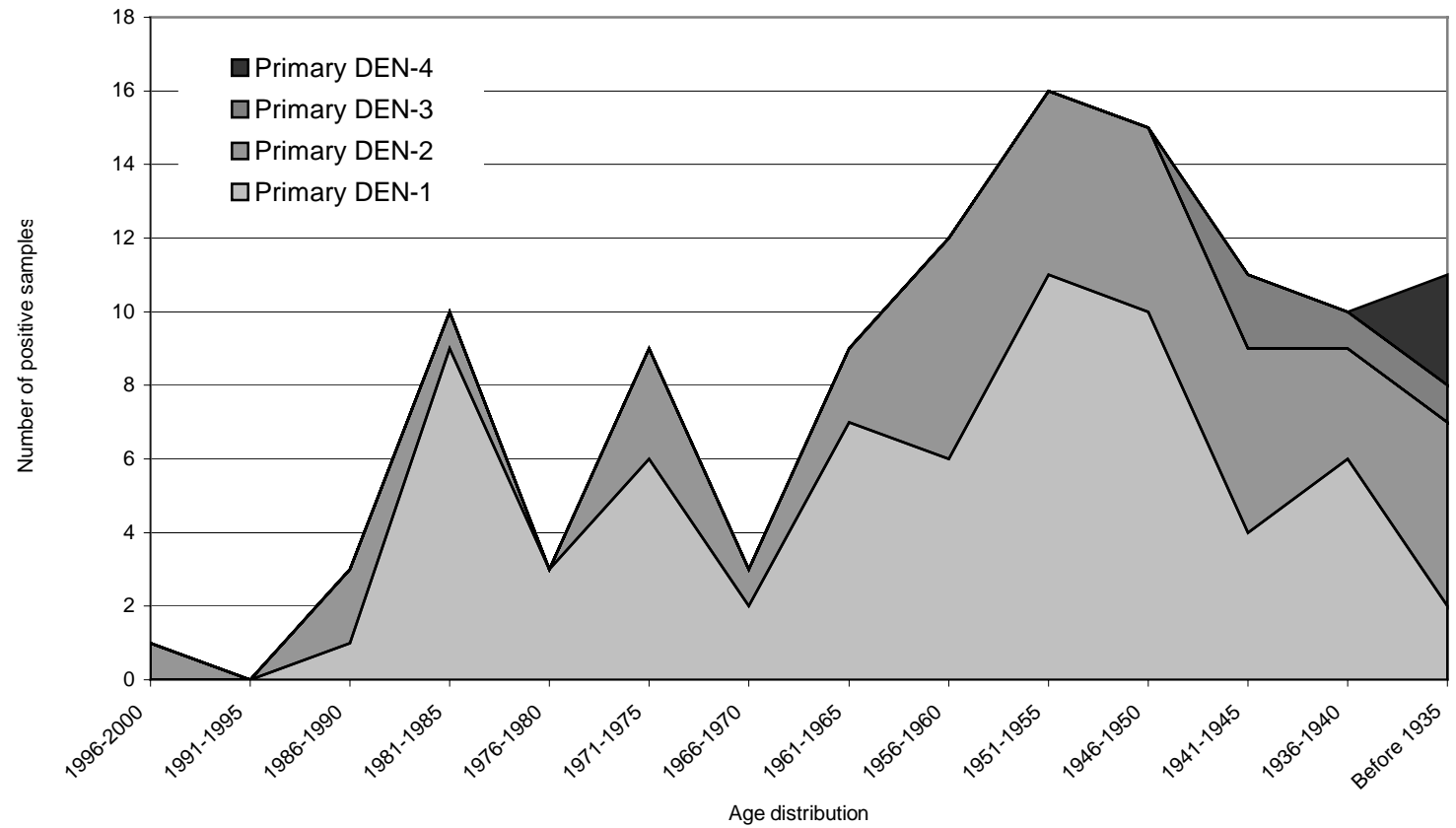
圖五、Age-related dengue virus serotypes responsible for dengue outbreaks in A area (三民區，本武里+本元里) of Kaohsiung city.



圖六、Age-related dengue virus serotypes responsible for dengue outbreaks in B area (三民區，本揚里) of Kaohsiung city.



圖七、Age-related dengue virus serotypes responsible for dengue outbreaks in C area (前鎮區，瑞祥里) of Kaohsiung city.



圖八、Age-related dengue virus serotypes responsible for dengue outbreaks in D area (前鎮區，民權里) of Kaohsiung city.

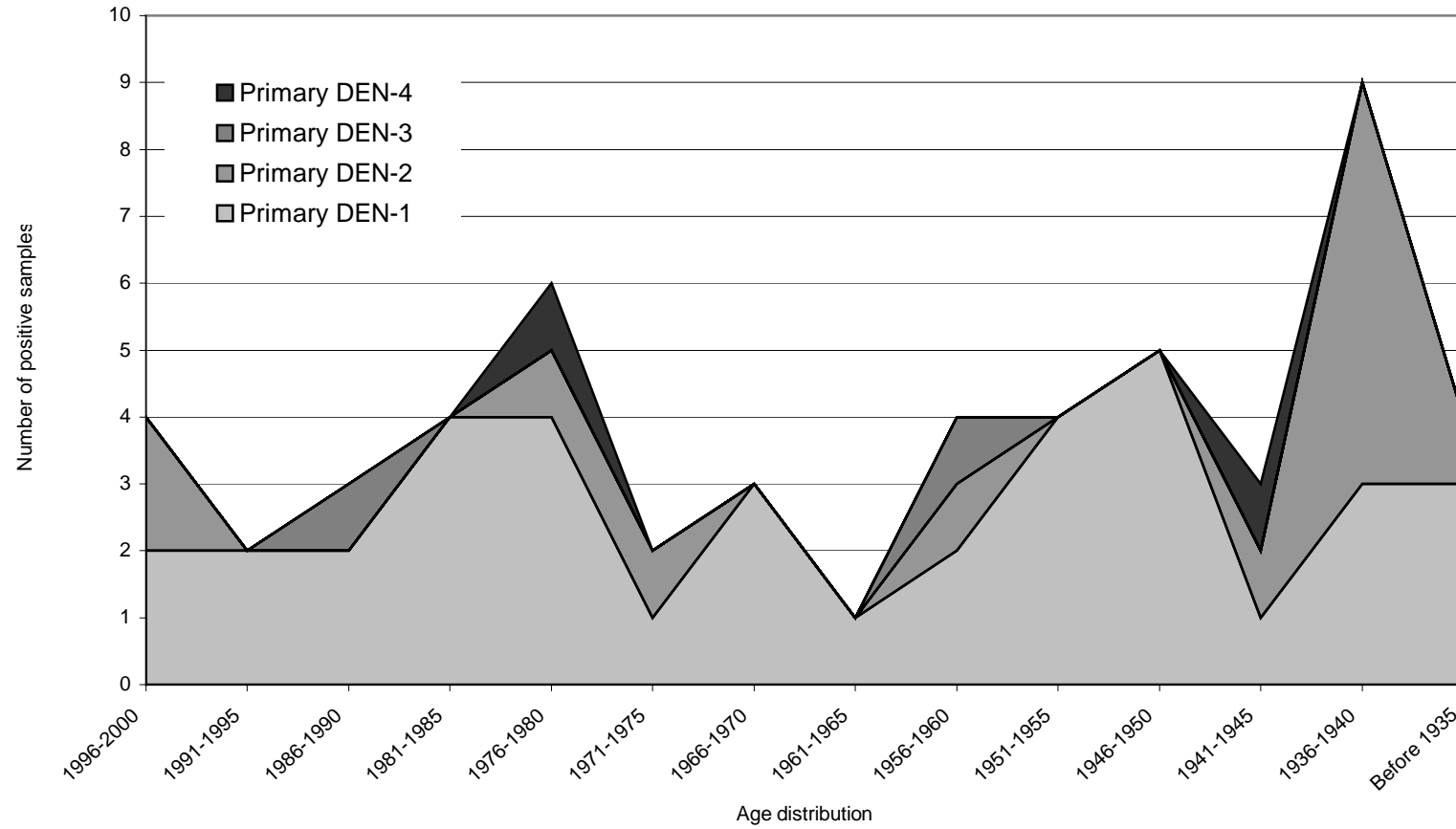


Table 1. Major dengue epidemics in Kaohsiung city of southern Taiwan between 1901 and 2005

Year	Epidemic area	Main administration district of Kaohsiung city	No. of confirmed cases	Serotype
1901-1902	Southern Taiwan	All districts	Large outbreak	DEN?
1915-1916	Island wide	All districts	Large outbreak	DEN?
1927	Southern Taiwan	All districts	Small outbreak	DEN?
1931	Island wide	All districts	Large outbreak	DEN?
1942-1943	Island wide	All districts	Large outbreak	DEN?
1987	Kaohsiung Pingtung	Sanmin Lingya Cianjhen Sinsing	>500	DEN-1, 2, 4 DEN-2 DEN-2 DEN-1
1988	Kaohsiung Pingtung	Sanmin Siaogang Lingya Cianjhen	>4500	DEN-1, 4 DEN-1 DEN-1 DEN-1
1991	Kaohsiung	Sanmin Lingya	>100 12	DEN-1 DEN-1, 3
1994	Kaohsiung	Zuoying Nanzih Sanmin Siaogang Cianjhen	~50	DEN-3 DEN-3 DEN-3 DEN-1 DEN-1
1995	Southern Taiwan	Sanmin Siaogang Zuoying Sinsing	~50	DEN-3 DEN-3 DEN-4 DEN-2
1998	Kaohsiung	Sanmin Zuoying Cianjhen Lingya	~64	DEN-2 DEN-1 DEN-3 DEN-4
2001-2003	Southern Taiwan	Cianjhen, Siaogang, Lingya	>5500	DEN-2
2004	Kaohsiung	Sanmin, Lingya, Sinsing	~40	DEN-4
2005	Kaohsiung	Cijin Sanmin Zuoying Cianjhen	33 26 10 9	DEN-3 DEN-2, 3 DEN-3 DEN-3

Table 2. Number of serum sample collected

Birth year	Age	Sanmin District		Cianjhen District		Chienchin District	
		A	B	C	D	E	F
1996-2000	5-9	23	32	27	32	0	7
1991-1995	10-14	29	34	39	32	5	15
1986-1990	15-19	29	33	33	32	11	42
1981-1985	20-24	24	32	30	32	32	23
1976-1980	25-29	31	30	32	32	30	24
1971-1975	30-34	29	33	23	32	20	17
1966-1970	35-39	25	33	32	32	31	28
1961-1965	40-44	28	33	34	32	33	40
1956-1960	45-49	36	35	36	32	33	51
1951-1955	50-54	31	35	38	33	31	47
1946-1950	55-59	33	32	31	32	28	50
1941-1945	60-64	30	30	33	32	23	30
1936-1940	65-69	30	32	32	32	18	23
Before 1935	70	31	32	19	32	31	60
Total		409	456	439	449	326	457



Table 3. Age-stratified seroprevalence of dengue virus infection in four different areas of Kaohsiung City based on NS1 serotype-specific IgG ELISA. 三民區 A 區域 (本武里+本元里)、三民區 B 區域 (本揚里)、前鎮區 C 區域 (瑞祥里)、與前鎮區 D 區域 (民權里)

Year of birth	Age	Number of serum collected in A area	Positive cases in A area	NS1-IgG positive rate in A area	Number of serum collected in B area	Positive cases in B area	NS1-IgG positive rate in B area	Number of serum collected in C area	Positive cases in C area	NS1-IgG positive rate in C area	Number of serum collected in D area	Positive cases in D area	NS1-IgG positive rate in D area
1996-2000	5~9	23	1	4.35%	32	1	3.13%	18	1	5.56%	32	9	28.13%
1991-1995	10~14	29	2	6.90%	31	1	3.23%	32	0	0.00%	31	10	32.26%
1986-1990	15~19	29	0	0.00%	33	2	6.06%	31	3	9.68%	32	5	15.63%
1981-1985	20~24	24	1	4.17%	30	0	0.00%	24	10	41.67%	31	13	41.94%
1976-1980	25~29	31	2	6.45%	29	4	13.79%	21	3	14.29%	32	7	21.88%
1971-1975	30~34	29	5	17.24%	31	2	6.45%	29	9	31.03%	32	8	25.00%
1966-1970	35~39	25	2	8.00%	33	4	12.12%	25	7	28.00%	30	4	13.33%
1961-1965	40~44	28	1	3.57%	33	3	9.09%	30	10	33.33%	30	2	6.67%
1956-1960	45~49	36	6	16.67%	32	2	6.25%	35	13	37.14%	30	7	23.33%
1951-1955	50~54	31	6	19.35%	35	3	8.57%	34	19	55.88%	33	5	15.15%
1946-1950	55~59	33	8	24.24%	32	0	0.00%	30	16	53.33%	31	11	35.48%
1941-1945	60~64	30	15	50.00%	26	10	38.46%	24	16	66.67%	32	12	37.50%
1936-1940	65~69	30	20	66.67%	26	17	65.38%	23	17	73.91%	32	18	56.25%
Before 1935	70	31	22	70.97%	27	14	51.85%	28	24	85.71%	30	9	30.00%
Total		409	91	22.25%	430	63	14.65%	384	148	38.54%	438	120	27.40%

Table 4. Age-stratified seroprevalence of dengue virus infection in A area, Sanmin District (本武里+本元里) of Kaohsiung City based on NS1 serotype-specific IgG ELISA

Ages	Positive Case	Primary Infection				Secondary Infection	
		Total	DEN-1	DEN-2	DEN-3		DEN-4
5-9	1	1	1	0	0	0	0
10-14	2	2	0	2	0	0	0
15-19	0	0	0	0	0	0	0
20-24	1	1	1	0	0	0	0
25-29	4	2	0	0	0	0	2
30-34	5	5	3	2	0	0	0
35-39	2	2	2	0	0	0	0
40-44	1	1	1	0	0	0	0
45-49	6	6	5	0	0	0	0
50-54	6	5	3	1	1	0	1
55-59	8	8	6	0	1	0	0
60-64	15	9	4	3	2	0	6
65-69	20	10	3	5	2	0	10
70	22	7	1	4	1	0	15