

## 亞太地區登革熱之實驗室分子診斷訓練

服務機關：行政院衛生署疾病管制局

出國人職稱：薦任技士

姓名：簡麗蓉

出國地區：美國科羅拉多州 Fort Collins

出國期間：民國 91 年 8 月 19 日至 9 月 19 日

報告日期：民國 92 年 3 月 7 日

J4/  
/009>00900

系統識別號:C09200966

公務出國報告提要

頁數: 33 含附件: 否

報告名稱:

亞太地區登革熱之實驗室分子診斷訓練

主辦機關:

行政院衛生署疾病管制局

聯絡人/電話:

黃貴玲/23959825x3022

出國人員:

簡麗蓉 行政院衛生署疾病管制局 檢驗研究組 技士

出國類別: 研究

出國地區: 美國

出國期間: 民國 91 年 08 月 19 日 - 民國 91 年 11 月 19 日

報告日期: 民國 92 年 03 月 07 日

分類號/目: J4/公共衛生、檢疫 J4/公共衛生、檢疫

關鍵詞: 登革熱,分子診斷,即時RT-PCR

內容摘要: 登革病毒為黃病毒屬，流行於熱帶與亞熱帶地區，每年估計全球約有一億人次受到登革病毒感染；不論就致病性、致死率或造成的經濟損失來看，登革熱在近年來已成為最重要的病毒性蟲媒傳染病之一。登革病毒的感染可藉由偵測病毒血症或血清學檢驗進行實驗室確診；本次研習主要目的即在發展登革熱的分子診斷系統，推廣於APEC會員國中有登革熱流行的地區，以建立共同的分子診斷標準。期間共完成三套系統，反應位置分別在C/prM、NS5及3' NC區域，利用SYBR Green (C/prM及3' NC) 或TaqMan (NS5) 系統檢測登革病毒及區分感染型別。結果發現，系統偵測敏感度可達 $\leq 2$  pfu；對於選取143株世界各地不同時間點收集到的登革病毒株也都能成功檢測。顯示這三套系統值得進一步應用於登革熱臨床檢驗，進行實地評估。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

行政院及所屬各機關出國報告提要 系統識別號：C09200966

出國報告名稱：亞太地區登革熱之實驗室分子診斷訓練

頁數：33 含附件：是 否

出國計畫主辦機關/行政院衛生署疾病管制局

聯絡人/電話/國際業務組國際合作科 黃貴玲/ 23959825 轉 3022

出國人員姓名/簡麗蓉 行政院衛生署疾病管制局研究檢驗組薦任技士

出國類別：1 考察2 進修3 研究4 實習5 其他

出國期間：美國科羅拉多州 Fort Collins

出國地區：民國 91 年 8 月 19 日至 9 月 19 日

報告日期：民國 92 年 3 月 7 日

分類號/目：J4 公共衛生

關鍵詞：登革熱、分子診斷、即時 RT-PCR

內容摘要：( 二百至三百字 )

登革病毒為黃病毒屬，流行於熱帶與亞熱帶地區，每年估計全球約有一億人次受到登革病毒感染；不論就致病性、致死率或造成的經濟損失來看，登革熱在近年來已成為最重要的病毒性蟲媒傳染病之一。登革病毒的感染可藉由偵測病毒血症或血清學檢驗進行實驗室確診；本

次研習主要目的即在發展登革熱的分子診斷系統，推廣於 APEC 會員國中有登革熱流行的地區，以建立共同的分子診斷標準。期間共完成三套系統，反應位置分別在 C/prM、NS5 及 3'NC 區域，利用 SYBR Green (C/prM 及 3'NC) 或 TaqMan (NS5) 系統檢測登革病毒及區分感染型別。結果發現，系統偵測敏感度可達  $\leq 2$  pfu；對於選取 143 株世界各地不同時間點收集到的登革病毒株也都能成功檢測。顯示這三套系統值得進一步應用於登革熱臨床檢驗，進行實地評估。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

## 摘要

登革病毒為黃病毒屬，流行於熱帶與亞熱帶地區，每年估計全球約有一億人次受到登革病毒感染；不論就致病性、致死率或造成的經濟損失來看，登革熱在近年來已成為最重要的病毒性蟲媒傳染病之一。登革病毒的感染可藉由偵測病毒血症或血清學檢驗進行實驗室確診；本次研習主要目的即在發展登革熱的分子診斷系統，推廣於 APEC 會員國中有登革熱流行的地區，以建立共同的分子診斷標準。期間共完成三套系統，反應位置分別在 C/prM、NS5 及 3'NC 區域，利用 SYBR Green (C/prM 及 3'NC) 或 TaqMan (NS5) 系統檢測登革病毒及區分感染型別。結果發現，系統偵測敏感度可達 $\leq 2$  pfu；對於選取 143 株世界各地不同時間點收集到的登革病毒株也都能成功檢測。顯示這三套系統值得進一步應用於登革熱臨床檢驗，進行實地評估。

## 目次

一、前 言 .....	6
二、目 的 .....	8
三、行 程 .....	9
四、研習內容 .....	10
五、心 得 .....	31
六、建 議 .....	33

## 前言

登革病毒為黃病毒屬 (Flavivirus)，共有四種血清型，流行於熱帶與亞熱帶地區，每年估計全球約有一億人次受到登革病毒感染。臨床表徵可能為不顯性感染，呈現發燒出疹等症狀的登革熱 (DF)，乃至於嚴重甚或致命的登革出血熱/登革休克症候群 (DHF/DSS)。不論就致病性、致死率或造成的經濟損失來看，登革熱在近年來已成為最重要的病毒性蟲媒傳染病之一。

登革病毒的感染可藉由偵測病毒血症或血清學檢驗進行實驗室確診，其中血清學檢驗必須等患者抗體產生，甚至要比較急性期和恢復期檢體測得抗體效價 4 倍上升才能確診，對於患者治療與疾病防治的時效性較緩，相形之下，發展敏感且快速的病毒血症檢驗方法顯得非常重要。病毒分離是病毒血症檢測的標準檢驗方法，但缺點在於必須培養至少 7 天才能得到結果，因此利用分子診斷方法檢測病毒核酸或酵素免疫學方法檢測病毒抗原，成為兩大主要的發展方向。在分子診斷方面，傳統 RT-PCR 方法只能做定性分析，且必須經過瓊膠電泳及紫外線檢測產物，不僅需多種儀器設備，且實驗步驟長而費時，又容易發生污染導致偽陽性，不適用篩檢大量檢體，所以本次研習的方向以發展即時定量 RT-PCR 系統為主。

即時定量 RT-PCR 依探針的有無與設計的差異，可分為 TaqMan,

NASBA 等多種系統。本研究共設計三套不同引子組，反應位置分別位於病毒基因的 C/prM、NS5 及 3'NC 區域，應用 SYBR Green (C/prM、3'NC) 及 TaqMan (NS5) 兩種方式進行偵測。其中 SYBR green 是利用染料與雙股 DNA 鍵結後會釋放出螢光；TaqMan 則是利用 PCR 反應過程水解帶有螢光染料的探針(probe)，使能量釋放出的原理進行偵測。其中，3'NC 區域的引子組未區分感染型別，C/prM 區域是將四型登革病毒特异性引子組分別放在四個試管反應，區分感染型別；NS5 區域四型登革病毒特异性探針分別標示上可釋放不同波長螢光的染料，在單一試管的反應中區分感染型別。應用在檢驗流程上可以 3'NC 區域的引子組做初步篩檢，對於陽性個案再利用 NS5 或 C/prM 區域的引子組和探針進行分型及確認的系統。



## 目的

- 一、 登革病毒分子診斷系統反應條件設立。
- 二、 評估診斷系統應用於檢測世界各地登革病毒株之敏感性及特異性。
- 三、 APEC 研討會議程與教材之準備。

## 行程

8月19日由台北啟程至桃園中正機場搭乘由美國政府所提供之聯合航空至美國舊金山，再轉搭 Frontier Airline 抵達科羅拉多州丹佛市，由 CDC 張光正博士接至美國疾病管制中心病媒傳染病實驗室所在地— Fort Collins。8月20日進實驗室報到，報到手續包括參加實驗室安全課程、印指紋、照相製作通行證，8月21日開始正式至實驗室進行研習至11月17日止。11月18日回程，11月19日返抵國門。

## 研習內容

### 方法與材料

設計三套不同引子組，反應位置分別位於病毒基因的 C/prM、NS5 及 3'NC 區域 (表一)，利用 BioRad 公司製造生產的 iCycler，QIAGEN 的 QuantiTech SYBR RT-PCR Kit 或 QuantiTech Probe RT-PCR Kit 進行登革病毒的即時反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (real-time RT-PCR)。以偵測方式區分，C/prM 及 3'NC 區域的反應是利用 SYBR green 即時偵測 PCR 產物的生成；而 NS5 區域的系統則是利用 TaqMan 的原理進行檢測。若以檢測結果區分，3'NC 區域的引子組目的為檢測是否為登革病毒陽性，並未區分感染型別，適合用於檢體的初步篩檢；C/prM 區域是將四型登革病毒特異性引子組分別放在四個試管反應，區分感染型別；NS5 區域的引子組可以和絕大多數常見的黃病毒 (Flavivirus) 反應，配合四型登革病毒特異性探針分別標示上可釋放不同波長螢光的染料，因此可在單一試管的反應中區分感染型別。病毒 RNA 採用 QIAGEN 的 Viral RNA Kit 進行萃取，取 140  $\mu$ l 病毒液萃取到 70  $\mu$ l elution buffer。在設立系統反應條件的階段，先以登革病毒 DEN-1: 16007 strain, DEN-2: 16681 strain, DEN-3: Thailand strain, DEN-4: 1036 strain 做為材料。用來測試引子組適用性的全球登

革病毒株來自於 Dr. Gubler 歷年來自世界各地的收集，共計 155 個病毒株（表二），根據紀錄計有 DEN-1：33 株、DEN-2：40 株、DEN-3：17 株、DEN-4：25 株、混合感染 36 株以及 4 株型別不明。病毒先經過 C6/36 細胞培養約一週後，冷凍保存於-70°C 冰箱。

我們同時將四種血清型登革病毒 C/prM 及 NS5 的 RT-PCR 反應產物利用 Invitrogen 公司的 pCR-X1-TOPO cloning 系統進行選殖後，再利用 DuraScribe T7 transcription kit 轉錄出對 RNase A 具耐受性的 RNA，以光度計（spectrophotometer）測定 RNA 濃度，做為登革病毒定量檢測的陽性對照。

系統設立過程中的核酸定序反應都是利用 CEQ2000 Dye Terminator Cycle sequencing kit 進行，由 Beckman Coulter 生產製造的 CEQ2000 核酸定序儀讀取及分析序列。

## 結果

### 一、 反應條件設立

#### A. C/prM 區域

反應條件如表三。原始引子組是由 Lanciotti 等人設計發表，應用於傳統的 nested RT-PCR 系統，先利用一組對四型登革病毒都會反應的引子組（dengue consensus primers）夾出一段長度為

511 bp 的 DNA 產物，再於其中設計四型登革病毒特異性引子組 (type specific primers) 進行第二階段的 PCR 反應，達到區分型別的目的。根據後續不同研究室使用的經驗，發現不同型別引子組的敏感性相異，其中以第一型和第四型引子組敏感性較差。因此，張光正博士於此區域內重新設計四型登革病毒特異性引子組，分別比對敏感性，結果如表四。顯示變更設計後的第一型與第四型引子 (mTS1 及 mTS4) 敏感性優於原始設計 (TS1 及 TS4) 10 至 100 倍，第三型引子組 (TS3 vs. mTS3) 的敏感性沒有顯著差異，第二型引子組則以原始設計的敏感性較佳，因此我們選定 mTS1、TS2、TS3 以及 mTS4 做為此系統分型用的引子組，反應產物長度分別為 208bp，119bp，288bp，及 260bp。為了解 consensus primer 是否具相當或較佳的敏感性以用於檢體初步篩檢，我們比較了引子組三種組合方式，結果如表五。發現 consensus primer 的敏感性較特異性引子組的敏感性低了約 10 至 100 倍不等；同時加入兩種引子組的 internal nested RT-PCR 方式也未能提高敏感性，因此 C/prM 區域選取特異性引子組進行檢測。

#### B. 3'NC 區域

為了尋找一組適用於篩檢登革病毒感染的引子組，我們選取了

5'NC (DC1, cDC133)、E (DC1694, cDC2107)、NS1 (DEN2894, cDEN3092) 以及 3'NC (DC10418, cDC10590) 等四個區域的引子組比對敏感性，結果顯示以 3'NC 區域的敏感性最佳，雖然這對引子組對 JEV、WNV 和 SLE 會有交叉反應的現象發生，但仍適合用於初步篩檢是否為登革病毒陽性時使用。

### C. NS5 區域

根據核酸序列比對分析，本系統的引子可與除了 CFA 及 Tamana bat virus 以外，絕大部分目前已知的黃病毒 (Flavivirus) 反應，張光正博士針對此段 RT-PCR 產物區設計出可分辨第一~四型登革病毒、日本腦炎病毒 (JEV)、西尼羅病毒 (WNV)、黃熱病毒 (YFV) 及聖路易腦炎病毒 (SLE) 的特異性探針。在測試反應條件時發現：第二型及第四型革病毒特異性探針在黏合 (annealing) 及加長 (elongation) 的溫度提高至 60°C 時均可反應，但第一型的探針在 annealing 或 elongation 任一溫度高於 48.9°C，而第三型是在高於 52.4°C 時，反應皆無法表現螢光，但電泳分析可見 RT-PCR 陽性的單一片段，且經核酸序列分析證實產物正確無誤。因此我們便將反應條件設為兩階段 RT-PCR (two step RT-PCR)，將 annealing 與 elongation 的溫度定在 48°C。相同反應條件經初步測試，亦適用於 JEV、WNV、YFV 及 SLE

的探針。

## 二、標準曲線

反應條件設立完成，便建立標準曲線測試敏感性。將病毒 RNA 由 1:10 開始連續 10 倍稀釋至 1:10<sup>7</sup>，每個稀釋倍數重複 3 次 (triplicate)，結果如圖一~三。其中 3'NC 和 C/prM 區域引子組對第一型至第四型登革病毒的敏感性皆可測到 1:10<sup>6</sup>。雖然我們不知道病毒的實際效價，但一般來說，登革病毒在細胞能培養到 1×10<sup>8</sup> pfu/ml 就算是相當高的產量。若以此濃度估算，這兩個系統的敏感性可達 10<sup>2</sup> pfu/ml，約為每次反應只需 2 pfu 就可以測到。NS5 系統有經 UV260 nm 吸光值估算濃度 (copies/ml) 的 *in vitro* transcribed RNA 做為陽性對照，因此可以用來推估細胞培養病毒液內的病毒核酸濃度。結果發現 (圖三)，第一型的敏感性最差，只能測到 1:10<sup>3</sup> 稀釋倍數，推算約相當於 2.2×10<sup>5</sup> copies/ml；第二、三、四型的敏感性可以測到 1:10<sup>5</sup> 稀釋倍數，約為 2.8~5.3×10<sup>4</sup> copies/ml。

## 三、病毒株測試

我們根據病毒型別、分離時間、地點、宿主等條件，選取了 155 株具代表性的病毒株做為測試對象，其中 1 株數量不足病毒庫暫無法提供，2 株疑似保存來源有黴菌污染，剩餘 152 株病毒進入分析，

結果如表六。。由 3'NC 篩選結果來看，152 株病毒中有 9 株呈現陰性反應，分別為第一、二型 1 株，第一型 1 株，第二型 1 株，第三型 2 株及型別不明 4 株；這 8 株在後續的型別鑑定中（C/prM、NS5 區域）也都呈現陰性反應。其中 4 株型別不明的病毒來自中國大陸，培養後有明顯細胞病變產生，但以螢光染色與 RT-PCR 皆無法測得陽性反應，對於這 4 株病毒的真實身分有待進一步確認。剩餘 5 株推測因 stock 的病毒量太低或甚至已無存活病毒，以至增殖失敗。依血清型別分析單一型別檢體 3'NC 區域產物的 Tm 值，發現其平均值與 95% 信賴區間分別為：第一型 83.8°C（83.3~84.2），第二型 82.7°C（82.0~83.3），第三型 84.9°C（84.2~85.5），第四型 83.9°C（83.2~84.6）。很有趣的現象是：第二型的 Tm 值顯著低於其他型別，只有第三型的 Tm 值會高於 85°C。藉由此一現象，我們發現有 2 株原來登記為第一型（42、54），1 株登記為第二型（98）的病毒紀錄錯誤。經 C/prM 和 NS5 區域分型及核酸序列分析，分別應該是：第二型、第三型及第一型。

3'NC 區域陽性的單一型別檢體，除了上述 3 株外，其他用 C/prM 或 NS5 區域分型結果都和紀錄相同。但在混合感染的 35 支 3'NC 區域陽性檢體中，C/prM 區域測試了其中 26 支，除了 1 株（2）應為第一、三、四型感染只測得第一、四型陽性之外，其他結果都與



紀錄相符合。但在 NS5 區域，可能因為多型且大量的 RNA 在單一試管內競爭使用反應原料（引子、核苷酸、酵素等），所以除了其中 2 支（15、19）結果與紀錄相符外，其餘僅能測得其中一或二種血清型。

表一、

C/prM		
ID	Primer	Product Size (bp)
MD1	134-TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG	
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-616	511 (MD1-D2)
MTS1-2	CCCGTAACTTTGATCGCT-322	208 (MD1/MTS1-1)
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG-232	119 (MD1-TS2)
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC-400	288 (MD1-TS3)
MTS4-5	TTCTCCCGTTCAGGATGTTC-374	260 (MD1/MTS4-5)
3'NC		
ID	Primer	
DC10418	TTGAGTAAACYRTGCTGCCTGTAGCTC	
CDC10590	GGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCT	
NS5		
ID	Sequence (5'-3')	Reporter-Quencher
MFU1	TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA	
CFD2	GTGTCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	
D1P	TCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGG	FAM-BHQ
D2P	AAGAGACGTGAGCAGGAAGGAAGGGGGAGC	Tex Red-BHQ
D3P	TGAGAGATATTTCCAAGATACCCGGAGGAG	Cy5-BHQ
D4P	TGGAGGAGATAGACAAGAAGGATGGAGACC	HEX-BHQ

表二、

No.	Original ID	Serotype	Country or Origin	Year of Isolation	Source	DF/DHF/DSS
1	2-HA	D1,2,3	VIETNAM	1995		
2	BC31/96	D1,3,4	MEXICO	1996	HUMAN SERUM	DEN/FE
3	BC179/96	D1,3,4	PHILIPPINES	1996	HUMAN SERUM	DEN/FE
4	RKI-746	D1D2	GERMANY	1995	HUMAN SERUM	DF
5	RKI-745	D1D2	GERMANY	1995	HUMAN SERUM	DF
6	BC88/97	D1D2	INDONESIA	1975	MOSQUITO	DEN/FE
7	BC166/96	D1D2	PHILIPPINES	1996	HUMAN SERUM	DF
8	BC169/96	D1D2	PHILIPPINES	1996	HUMAN SERUM	DF
9	1835	D1D2	PUERTO RICO	1987	MOSQUITO	DEN/FE
10	S-M-384/95	D1D2	VIETNAM	1995	HUMAN SERUM	DF
11	BC71/97	D1D3	AUSTRALIA	1993	HUMAN SERUM	DEN/FE
12	BC73/97	D1D3	AUSTRALIA	1993	HUMAN SERUM	DEN/FE
13	BC116/96	D1D3	INDONESIA	1976	HUMAN SERUM	DEN/FE
14	BC90/97	D2D3	INDONESIA	1976	MOSQUITO	DEN/FE
15	BC51/97	D2D4	INDONESIA	1976	MOSQUITO	DEN/FE
16	BC12/97	D2D4	MALAYSIA	1997	HUMAN SERUM	DEN/FE
17	BC117/96	D3D4	INDONESIA	1976	HUMAN SERUM	DEN/FE
18	S-1037	D3D4	INDONESIA	1976	HUMAN SERUM	DF
19	BC113/96	D3D4	INDONESIA	1976	HUMAN SERUM	DEN/FE
20	BC167/96	D3D4	PHILIPPINES	1996	HUMAN SERUM	DF
21	BC177/96	D3D4	PHILIPPINES	1996	HUMAN SERUM	DEN/FE
22	BC165/96	D3D4	PHILIPPINES	1996	HUMAN SERUM	DF
23	BC164/96	D3D4	PHILIPPINES	1996	HUMAN SERUM	DF
24	BC176/96	D3D4	PHILIPPINES	1996	HUMAN SERUM	DEN/FE
25	BC168/96	D3D4	PHILIPPINES	1996	HUMAN SERUM	DF
26	BC181/96	D3D4	PHILIPPINES	1997	HUMAN SERUM	DEN/FE
27	BC180/96	D3D4	PHILIPPINES	1997	HUMAN SERUM	DEN/FE
28	BC183/96	D3D4	PHILIPPINES	1997	HUMAN SERUM	DEN/FE
29	BC170/96	D3D4	PHILIPPINES	1996	HUMAN SERUM	DF
30	BC21/96	D3D4	SRI LANKA	1995	TISSUE CULTURE	DHF
31	BC23/96	D3D4	SRI LANKA	1995	TISSUE CULTURE	DHF
32	1-HA	D3D4	VIETNAM	1995		
33	BC115/96	DEN1,3,4	INDONESIA	1976	HUMAN SERUM	DEN/FE

表二 (續)

No.	Original ID	Serotype	Country or Origin	Year of Isolation	Source	DF/DHF/DSS
34	BC118/96	DEN1,3,4	INDONESIA	1976	HUMAN SERUM	DEN/FE
35	1296	DENGUE-?	GAMBIA	1980	MOSQUITO	
36	33532	DENGUE-1	AUSTRALIA	1990	HUMAN SERUM	DF
37	1465	DENGUE-1	BELIZE	1984	MOSQUITO	DF
38	BC253/95	DENGUE-1	BRAZIL	1995	TISSUE CULTURE	DEN/FE
39	S-40568	DENGUE-1	BURMA	1976		DF
40	CI00374	DENGUE-1	COLUMBIA	1993	CELL CULTURE	DEN/FE
41	BC89/94	DENGUE-1	COSTA RICA	1994	HUMAN SERUM	DEN/FE
42	1715	DENGUE-1	DOMINICAN REPU	1986	MOSQUITO	DEN/FE
43	NAMRU-3	DENGUE-1	EGYPT/SUDAT?	1985		DEN/FE
44	BC63/94	DENGUE-1	EL SALVADOR	1994	HUMAN SERUM	DEN/FE
45	S-32090	DENGUE-1	FIJI	1975	HUMAN SERUM	DF
46	GT00175	DENGUE-1	GUATEMALA	1990	CELL CULTURE	DF
47	200569	DENGUE-1	HAITI	1983	HUMAN SERUM	DF
48	HO00327	DENGUE-1	HONDURAS	1995	CELL CULTURE	DF
49	276RKI	DENGUE-1	INDIA	1997	HUMAN SERUM	DF
50	1266	DENGUE-1	INDONESIA	1978	MOSQUITO	DF
51	228690	DENGUE-1	JAMAICA	1977	HUMAN SERUM	DF
52	MC00895	DENGUE-1	KOSRAE	1990	CELL CULTURE	DF
53	BC167/97	DENGUE-1	MALAYSIA	1997	HUMAN SERUM	DF
54	BC202/97	DENGUE-1	MEXICO	1997	HUMAN SERUM	DEN/FE
55	S-16289	DENGUE-1	NAURU	1974	HUMAN SERUM	DEN/FE
56	BC95/94	DENGUE-1	PANAMA	1994	TISSUE CULTURE	DEN/FE
57	260705	DENGUE-1	PERU	1990	HUMAN SERUM	DF
58	12150	DENGUE-1	PHILIPPINES	1984	HUMAN SERUM	DF
59	BC245/97	DENGUE-1	PUERTO RICO	1994	HUMAN SERUM	DEN/FE
60	BC116/94	DENGUE-1	SAUDI ARABIA	1994	TISSUE CULTURE	DEN/FE
61	1669	DENGUE-1	SRI LANKA	1985	MOSQUITO	DEN/FE
62	S-44939	DENGUE-1	TAHITI	1981	HUMAN	DF
63	BC-5015	DENGUE-1	TAIWAN	1989	HUMAN SERUM	DF
64	BC-5013T	DENGUE-1	TAIWAN	1988	HUMAN SERUM	DF
65	498 RKI	DENGUE-1	THAILAND	1998	HUMAN SERUM	
66	S-31062	DENGUE-1	TONGA	1975	HUMAN SERUM	DF
67	TD00030	DENGUE-1	TRINIDAD	1992	CELL CULTURE	DF
68	10674	DENGUE-2	AFRICA	1970	HUMAN SERUM	DF

表二 (續)

No.	Original ID	Serotype	Country or Origin	Year of Isolation	Source	DF/DHF/DSS
69	22316	DENGUE-2	AUSTRALIA	1993	HUMAN SERUM	DF
70	BC100/98	DENGUE-2	BOLIVIA	1998	CELL CULTURE	DF
71	BC248/95	DENGUE-2	BRAZIL	1995	TISSUE CULTURE	DEN/FE
72	S-40921	DENGUE-2	BURMA	1976	HUMAN SERUM	DF
73	CI00405	DENGUE-2	COLUMBIA	1993	CELL CULTURE	DEN/FE
74	CR00172	DENGUE-2	CURASAO	1993	CELL CULTURE	DEN/FE
75	3956	DENGUE-2	DAKAR	1983		
76	AMB-42	DENGUE-2	DJIBOUTI	1993	HUMAN SERUM	DF
77	EC02133	DENGUE-2	ECUADOR	1993	CELL CULTURE	DF
78	10	DENGUE-2	EGYPT(SOMALIA)	1984	HUMAN SERUM	DF
79	373915	DENGUE-2	GUATEMALA	1979	HUMAN SERUM	DF
80	1474	DENGUE-2	HAITI	1984	HUMAN SERUM	DF
81	S-17850	DENGUE-2	HAWAII	1974	HUMAN SERUM	DF
82	85-428	DENGUE-2	INDONESIA	1985	HUMAN SERUM	DF
83	HA242-82	DENGUE-2	IVORY COAST	1982	HUMAN SERUM	DF
84	MEYERS	DENGUE-2	KENYA	1982	HUMAN SERUM	DF
85	P8-1407MS	DENGUE-2	MALAYSIA	1968	HUMAN SERUM	DF
86	BC145/97	DENGUE-2	MALAYSIA	1997	HUMAN SERUM	DF
87	BC124/97	DENGUE-2	MALAYSIA	1997	MONKEY	DF
88	IMTSSA703	DENGUE-2	MARTINIQUE	1998	HUMAN SERUM	
89	BC17/97	DENGUE-2	MEXICO	1996	HUMAN SERUM	DEN/FE
90	S-9290	DENGUE-2	NEW CALEDONIA	1972		
91	BC62/94	DENGUE-2	NICARAGUA	1994	HUMAN SERUM	DEN/FE
92	239127	DENGUE-2	PALAU	1988		
93	BC171/96	DENGUE-2	PHILIPPINES	1996	HUMAN SERUM	DF
94	BC141/96	DENGUE-2	PUERTO RICO	1994	TISSUE CULTURE	DEN/FE
95	S-5285	DENGUE-2	SAMOA	1972	HUMAN SERUM	DF
96	BC102/94	DENGUE-2	SAUDI ARABIA	1994	TISSUE CULTURE	
97	S630/62	DENGUE-2	SINGAPORE	1962	HUMAN SERUM	DF
98	S-19966	DENGUE-2	TAHITI	1975	HUMAN SERUM	DF
99	BC-5007	DENGUE-2	TAIWAN	1989	HUMAN SERUM	DF
100	MK-244-87	DENGUE-2	THAILAND	1987	HUMAN SERUM	DHF
101	D79-069	DENGUE-2	THAILAND/BURMA	1979	HUMAN SERUM	DF
102	S-14635	DENGUE-2	TONGA	1974	HUMAN SERUM	DF
103	8211085	DENGUE-2	TRINIDAD	1982	HUMAN SERUM	DF

表二 (續)

No.	Original ID	Serotype	Country or Origin	Year of Isolation	Source	DF/DHF/DSS
104	UV0190	DENGUE-2	UPPER VOLTA	1983	HUMAN SERUM	DF
105	BC27/96	DENGUE-2	VIETNAM	1995	TISSUE CULTURE	DEN/FE
106	BC74/97	DENGUE-3	AUSTRALIA	1993	HUMAN SERUM	DEN/FE
107	S-40580	DENGUE-3	BURMA	1976		DF
108	HN	DENGUE-3	CHINA			DF
109	29364	DENGUE-3	FIJI	1992	HUMAN SERUM	DF
110	II00032	DENGUE-3	INDIA	1993	CELL CULTURE	DF
111	1235	DENGUE-3	INDONESIA	1978	MOSQUITO	DF
112	BC14/97	DENGUE-3	MALAYSIA	1997	HUMAN SERUM	DEN/FE
113	BC188/97	DENGUE-3	MEXICO	1997	HUMAN SERUM	DEN/FE
114	1558	DENGUE-3	MOZAMBIQUE	1985	MOSQUITO	DF
115	317685	DENGUE-3	NEUE	1994	HUMAN SERUM	DF
116	BC13/96	DENGUE-3	PANAMA	1994	TISSUE CULTURE	DEN/FE
117	BC182/96	DENGUE-3	PHILIPPINES	1997	HUMAN SERUM	DEN/FE
118	FI00401	DENGUE-3	RAROTONGA	1991	CELL CULTURE	DEN/FE
119	329659	DENGUE-3	SAMOA	1995	HUMAN SERUM	DF
120	271242	DENGUE-3	SRI LANKA	1991	HUMAN SERUM	DF
121	MK-594-87	DENGUE-3	THAILAND	1987	HUMAN SERUM	DEN/FE
122	BC169/95	DENGUE-4	MEXICO	1985	TISSUE CULTURE	DF
123	1385	DENGUE-4	BRAZIL	1982	HUMAN SERUM	DF
124	S-40946	DENGUE-4	BURMA	1976		DF
125	299649	DENGUE-4	COLUMBIA	1993	HUMAN SERUM	DF
126	CS00123	DENGUE-4	COSTA RICA	1994	CELL CULTURE	DEN/FE
127	CR00163	DENGUE-4	CURASAO	1993	CELL CULTURE	DEN/FE
128	5890	DENGUE-4	DAKAR	1983		
129	BC65/94	DENGUE-4	EL SALVADOR	1994	HUMAN SERUM	DEN/FE
130	BC71/94	DENGUE-4	HONDURAS	1994	HUMAN SERUM	DEN/FE
131	HO00323	DENGUE-4	HONDURAS	1995	CELL CULTURE	DF
132	1269	DENGUE-4	INDONESIA	1978	MOSQUITO	DF
133	BC123/97	DENGUE-4	MALAYSIA		MONKEY	DF
134	BC13/97	DENGUE-4	MALAYSIA	1997	HUMAN SERUM	DEN/FE
135	329155	DENGUE-4	MARTINIQUE	1995	HUMAN SERUM	DF
136	BC287/97	DENGUE-4	MEXICO	1997	HUMAN SERUM	DEN/FE
137	BC59/94	DENGUE-4	NICARAGUA	1994	HUMAN SERUM	DEN/FE
138	D2399	DENGUE-4	NIUE ISLAND	1980	HUMAN SERUM	DF

表二 (續)

No.	Original ID	Serotype	Country or Origin	Year of Isolation	Source	DF/DHF/DSS
139	12123	DENGUE-4	PHILIPPINES	1984	HUMAN SERUM	DF
140	BC258/97	DENGUE-4	PUERTO RICO	1994	HUMAN SERUM	DEN/FE
141	5168	DENGUE-4	SENEGAL	1983		
142	BC19/96	DENGUE-4	SRI LANKA	1994	TISSUE CULTURE	DHF
143	057-005-85	DENGUE-4	TAHITI	1985	HUMAN SERUM	
144	BC-5006	DENGUE-4	TAIWAN	1989	HUMAN SERUM	DF
145	D85-019	DENGUE-4	THAILAND	1985	HUMAN SERUM	DHF
146	JQ11-90	DENGUE-4	VENEZUELA	1990	HUMAN SERUM	DF
147	BC72/97	DENMIX	AUSTRALIA	1993	HUMAN SERUM	DEN/FE
148	HN14	DENGUE-?	CHINA			
149	HN23	DENGUE-?	CHINA			
150	HN37	DENGUE-?	CHINA			
151	HN45	DENGUE-?	CHINA			
152	BC15/97	D2D3	MALAYSIA	1997	MOSQUITO	DEN/FE
153	BC25/96	DENGUE-2	SRI LANKA	1996	HUMAN SERUM	DEN/FE
154	EC02189	DENGUE-1	ECUADOR	1993	CELL CULTURE	DF
155	VL-M-422/98	DENGUE-3	VIETNAM	1998		

表三

<b>Cycling condition for 3'NC dengue-all &amp; modified-L protocol</b>				
<b>Cycle 1:</b>	<b>(1X)</b>	Step 1:	50.0°C	for 30:00
<b>Cycle 2:</b>	<b>(1X)</b>	Step 1:	95.0°C	for 15:00
		Step 2:	50.0°C	for 01:00
		Step 3:	72.0°C	for 00:30
<b>Cycle 3:</b>	<b>(1X)</b>	Step 1:	94.0°C	for 00:15
		Step 2:	50.0°C	for 01:00
		Step 3:	72.0°C	for 00:30
<b>Cycle 4:</b>	<b>(33X)</b>	Step 1:	94.0°C	for 00:15
		Step 2:	50.0°C	for 00:15
		Step 3:	72.0°C	for 00:30
		Step 4:	78.5°C	for 00:10
<b>Cycle 5:</b>	<b>(1X)</b>	Step 1:	94.0°C	for 01:00
<b>Cycle 6:</b>	<b>(200X)</b>	Step 1:	78.5°C	for 00:10
Increase setpoint temperature after cycle 2 by 0.1°C				
<b>Cycling condition for the multiplexing TaqMan assay</b>				
<b>Cycle 1:</b>	<b>(1X)</b>	Step 1:	50.0°C	for 30:00
<b>Cycle 2:</b>	<b>(1X)</b>	Step 1:	95.0°C	for 15:00
		Step 2:	50.0°C	for 00:30
		Step 3:	72.0°C	for 01:00
<b>Cycle 3:</b>	<b>(45X)</b>	Step 1:	95.0°C	for 00:15
		Step 2:	48.0°C	for 03:00
				<b><u>Data collection</u></b>

表四

RNA	Ct value							
	D1/TS1	D1/mTS1	D1/TS2	D1/mTS2	D1/TS3	D1/mTS3	D1/TS4	D1/mTS4
1:20	17.5	12.3	16.4	12.7	13.3	12.3	21.5	15.59
1:200	21.6	16.4	19.2	17.3	17	17.1	26.3	19.92
1:2,000	26.2	20.3	23.4	21.3	21	21.2	30.5	24.45
1:20,000	30	23.7	26.9	25.7	24.5	24.5	N/A	26.53
1:200,000	N/A	26.6	29.6	N/A	27.5	29	N/A	30.88
H2O	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PCR efficiency	72.60%	89.20%	96.40%	70.90%	90.10%	76.10%	66.90%	85.80%
correlation coefficient	0.999	0.998	0.998	1	0.999	0.998	0.999	0.994

表五

RNA	DEN-1			DEN-2			DEN-3			DEN-4		
	D1/mTS1	D1/D2	D1/D2+mTS1	D1/TS2	D1/D2	D1/D2+TS2	D1/TS3	D1/D2	D1/D2+TS3	D1/mTS4	D1/D2	D1/D2+mTS4
1:200	16.08	20.44	18.52	19.91	22.05	20.43	16.18	18.38	16.13	15.01	18.68	14.28
1:2,000	20.26	24.78	22.58	23.49	25.83	25.08	20.19	22.55	20.07	19.45	23.71	18.2
1:20,000	23.67	30.14	26.43	27.33	N/A	29.46	23.86	26.73	23.44	23.2	28.57	22.22
1:200,000	26.95	N/A	29.15	30.99	N/A	N/A	27.06	30.47	27.21	27.37	N/A	26.77
H2O	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
correlation coefficient	0.998	0.993	0.996	1.000	0.994	0.997	0.998	0.998	0.997	0.999	1.000	0.999
PCR efficiency	91.60%	60.90%	91.00%	85.90%	83.80%	66.90%	88.40%	77.20%	88.30%	76.50%	59.40%	76.40%

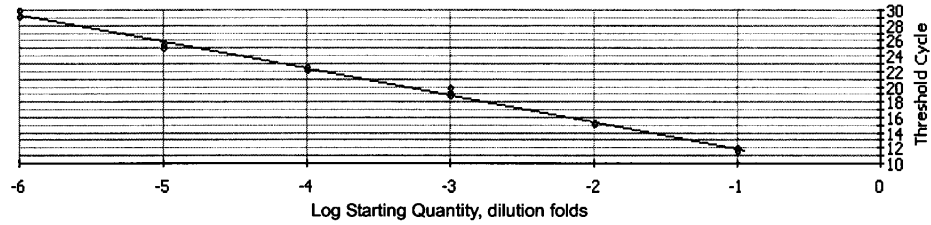


圖一、3'NC 區域標準曲線

**DEN-1**

Correlation Coefficient: 0.998 Slope: -3.490 Intercept: 8.371  $Y = -3.490 X + 8.371$   
PCR Efficiency: 93.4 %

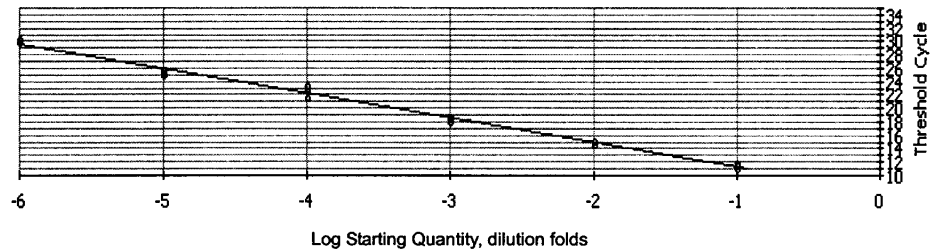
□ Unknowns  
○ Standards



**DEN-2**

Correlation Coefficient: 0.996 Slope: -3.651 Intercept: 7.659  $Y = -3.651 X + 7.659$   
PCR Efficiency: 87.9 %

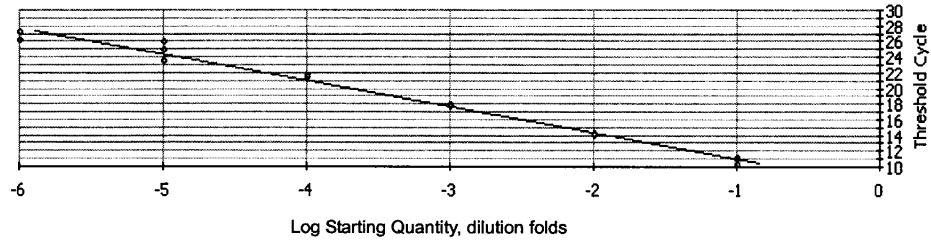
□ Unknowns  
○ Standards



**DEN-3**

Correlation Coefficient: 0.993 Slope: -3.334 Intercept: 7.739  $Y = -3.334 X + 7.739$   
PCR Efficiency: 99.5 %

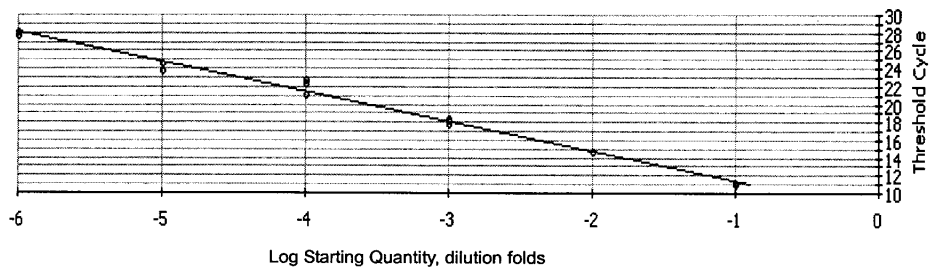
□ Unknowns  
○ Standards



**DEN-4**

Correlation Coefficient: 0.995 Slope: -3.356 Intercept: 8.011  $Y = -3.356 X + 8.011$   
PCR Efficiency: 98.6 %

□ Unknowns  
○ Standards

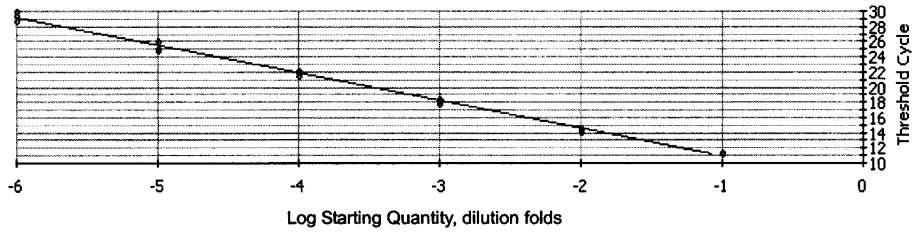


圖二、C/prM 區域標準曲線

**DEN-1**

Correlation Coefficient: 0.998 Slope: -3.612 Intercept: 7.466  $Y = -3.612 X + 7.466$   
PCR Efficiency: 89.2 %

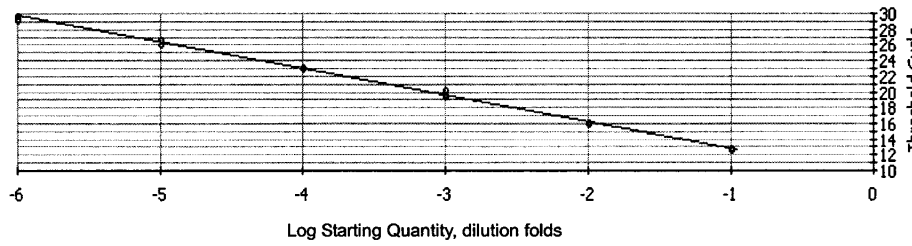
□ Unknowns  
○ Standards



**DEN-2**

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.364 Intercept: 9.506  $Y = -3.364 X + 9.506$   
PCR Efficiency: 98.3 %

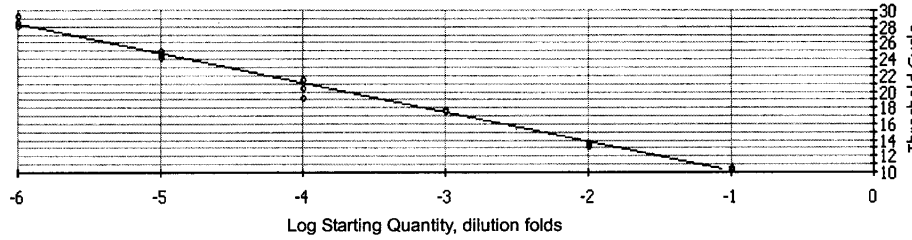
□ Unknowns  
○ Standards



**DEN-3**

Correlation Coefficient: 0.996 Slope: -3.648 Intercept: 6.492  $Y = -3.648 X + 6.492$   
PCR Efficiency: 88.0 %

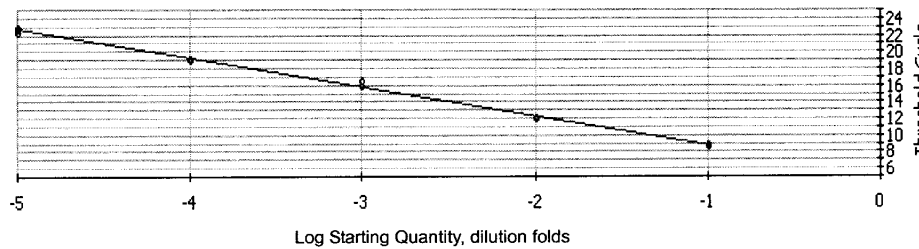
□ Unknowns  
○ Standards



**DEN-4**

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.483 Intercept: 5.331  $Y = -3.483 X + 5.331$   
PCR Efficiency: 93.7 %

□ Unknowns  
○ Standards



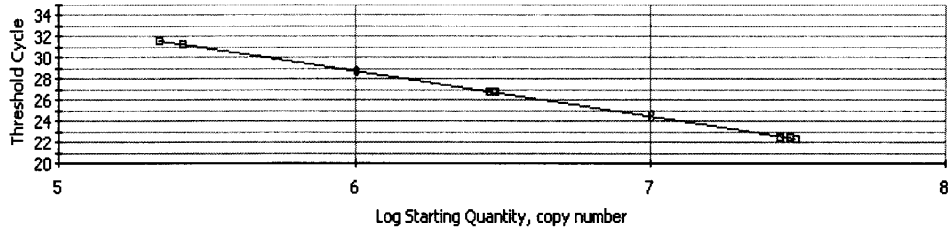
PCR Standard Curve: Nov-8 DEN-3&4\_SYBR.opd

圖三、NS5 區域標準曲線

**DEN-1**

Correlation Coefficient: 0.996 Slope: -4.354 Intercept: 54.930  $Y = -4.354 X + 54.930$   
 PCR Efficiency: 69.7 %

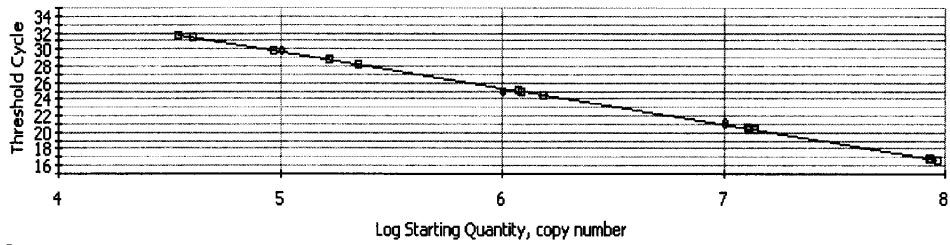
□ Unknowns  
 ○ Standards



**DEN-2**

Correlation Coefficient: 0.997 Slope: -4.392 Intercept: 51.691  $Y = -4.392 X + 51.691$   
 PCR Efficiency: 68.9 %

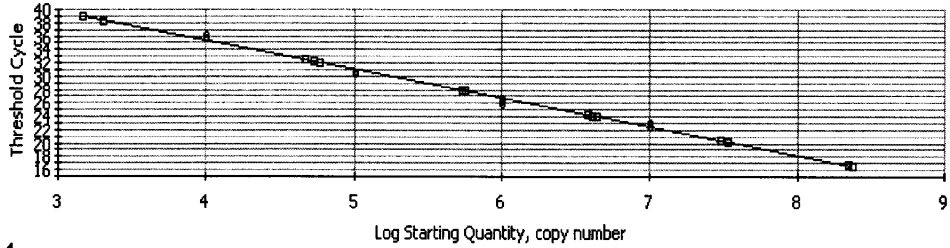
□ Unknowns  
 ○ Standards



**DEN-3**

Correlation Coefficient: 0.991 Slope: -4.290 Intercept: 52.502  $Y = -4.290 X + 52.502$   
 PCR Efficiency: 71.0 %

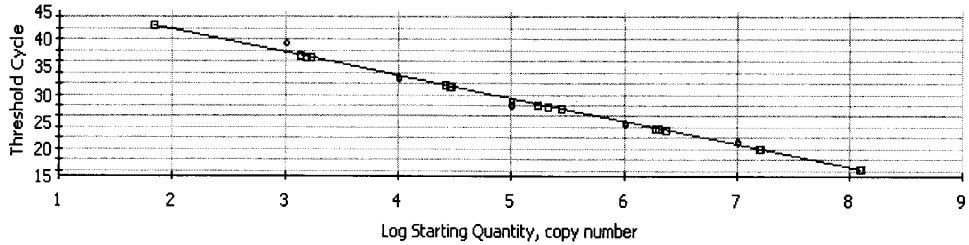
□ Unknowns  
 ○ Standards



**DEN-4**

Correlation Coefficient: 0.991 Slope: -4.199 Intercept: 50.119  $Y = -4.199 X + 50.119$   
 PCR Efficiency: 73.0 %

□ Unknowns  
 ○ Standards



表六

	Identifier	3'NC_Ct	D1P3	D2P3	D3P3	D4P3	D1_mTS1	D1_TS2	D1_TS3	D1_mTS4
DEN-1,2,3	1	11.3	N/A	21.47	27.52	N/A	14.98	12.18	10.79	
DEN-1,3, 4	2	8.6	N/A	N/A	15.83	17.32	16.12		N/A	14.23
	3	10.7	N/A	N/A	19.92	N/A	23.02		10.73	18.81
DEN-1,2	4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
	5	7.7	20.85	N/A	N/A	N/A	10.17	18.27		
	6	10.4	20.39	N/A	N/A	N/A	10.56	24.05		
	7	9.8	18.34	N/A	N/A	N/A	10.01	26.06		
	8	9.5	N/A	21.16	N/A	N/A	16.65	10.55		
	9	8.4	N/A	30.6	N/A	N/A	22.22	16.09		
DEN-1,3	10	9.9	N/A	19.27	N/A	N/A	14.62	11.97		
	11	8.5	N/A	N/A	14.84	N/A	18.23		7.43	
	12	11.8	N/A	N/A	17.03	N/A	19.06		9.19	
	13	11.4	N/A	N/A	22.41	N/A	25.61		14.07	
DEN-2,3	147	9.2	N/A	N/A	14.9	N/A	19.72		7.88	
	14	8.1	N/A	18.47	N/A	N/A		16.59	18.49	
DEN-2,3	152	7.8	N/A	15.4	14.4	N/A				
	DEN-2,4	15	9.4	N/A	15.68	N/A	27.22		14.02	N/A
DEN-3,4	17	8	N/A	N/A	17.86	N/A			13.55	20.07
	18	7.4	N/A	N/A	17.89	N/A			12.55	20.13
	19	11.9	N/A	N/A	21.65	29.52			12.89	14.41
	20	8.1	N/A	N/A	14.65	N/A			7.98	17.18
	21	7.9	N/A	N/A	15.48	N/A				
	22	10.8	N/A	N/A	15.36	N/A			8.76	18
	23	8	N/A	N/A	16.15	N/A				
	24	10.5	N/A	N/A	15.71	N/A			14.25	19.8
	25	11.1	N/A	N/A	13.87	N/A				
	26	9.4	N/A	N/A	17.49	N/A				
	27	10.2	N/A	N/A	16.58	N/A			10.61	16.23
	28	7.9	N/A	N/A	15.4	N/A				
	29	10.7	N/A	N/A	16.39	N/A			16.39	16.86
	30	10.6	N/A	N/A	13.03	N/A				
DEN-1,3,4	31	10.9	N/A	N/A	14.1	N/A			7.47	16.86
	32	7.7	N/A	N/A	14.21	N/A			8.86	16.01
DEN-1,3,4	33	11.2	N/A	N/A	17.89	N/A				
	34	8.3	N/A	N/A	15.92	N/A	19.23		10.75	23.12
DEN-mix	35	23.2	N/A	N/A	<sup>27</sup> N/A	N/A				

表六 (續)

	Identifier	3'NC_Ct	D1P3	D2P3	D3P3	D4P3	D1_mTS1	D1_TS2	D1_TS3	D1_mTS4
DEN-1	36	10.8	13.6				<9			
	37	11.9	17.8				11.72			
	38	8.4	13.1				<9			
	39	11.8	18.4				12.23			
	40	8	11.1				12.54			
	41	11.9	17.7				11.21			
	42	10.8	N/A	13.4			N/A			
	43	8.1	20.4				9.8			
	44	12.1	14.6				<9			
	45	8.7	14.9				10.21			
	46	8.2	11.7				12.4			
	47	8.7	13.5				<9			
	48	8.4	13.9				9.07			
	49	7.9	19.6				<9			
	50	10.8	19.7				11.7			
	51	9.1	12.2				<9			
	52	11.2	14.5				<9			
	53	12.1	25.1				12.39			
	54	10.5	N/A		11.5		N/A			
	55	10.2	11.6				<9			
	56	8.7	10.8				<9			
	57	11.5	15.4				10.18			
	58	7.9	15.3				10.31			
	59	8.2	11.5				<9			
	60	10.4	26.6				11.12			
	61	8.5	17				9.95			
	62	N/A	N/A				N/A			
	63	8	23.7				10.86			
	64	8.5	23.8				10.98			
	65	10.9	20.1				11.41			
66	13.2	24.3				14.85				
67	10.7	17.3				10.56				
154	10.3	16.9								

表六 (續)

	Identifier	3'NC Ct	D1P3	D2P3	D3P3	D4P3	D1 mTS1	D1 TS2	D1 TS3	D1 mTS4
DEN-2	68	10.5		20				22.3		
	69	8.6		14.8				14.24		
	70	11.2		19.6				13.34		
	71	9		17.3				9.48		
	72	8.9		13.9				11.85		
	73	8.8		17.7				14.84		
	74	8.6		16.7				11.17		
	75	11.1		21.8				22.03		
	76	N/A		N/A				N/A		
	77	10.1		17.9				16.44		
	78	9.6		16.3				16.35		
	79	11.2		17.6				16.8		
	80	9		18.8				11.81		
	81	8		15				10.9		
	82	7.9		13.1				12.6		
	83	11.4		12.5				14.63		
	84	7.7		13.3				14.63		
	85	9.4		16.6				14.12		
	86	8.4		15.8				13.31		
	87	8.2		15.1				24.33		
	88	7.9		15.2				10.69		
	89	12.9		13.7				15.51		
	90	13.9		20.1				28.4		
	91	8.3		13.5				16.51		
	92	10.3		10.3				9.21		
	93	10.1		17.4				12.15		
	94	8.2		15.4				13.55		
	95	10		17				16.63		
	96	8.2		15.4				12.75		
	97	8.3		14				11.2		
	98	16.5	31.8	N/A	N/A	N/A		N/A		
	99	11.6		22.4				14.29		
100	11.9		18.4				14.28			
101	7.9		16.4				10.92			
102	10.4		15.2				17.38			
103	8.8		14				15.2			
104	10.6		10.8				13.43			
105	7.9		16				10.59			
153	8.8		17.6							

表六 (續)

	Identifier	3'NC Ct	D1P3	D2P3	D3P3	D4P3	D1 mTS1	D1 TS2	D1 TS3	D1 mTS4
DEN-3	106	12.3			19.3				11.33	
	107	8.3			14.3				7.6	
	109	N/A			N/A				N/A	
	110	10.9			17.8				11.14	
	111	N/A			N/A				N/A	
	112	8.1			14.6				7.39	
	113	7.7			13.2				10.51	
	114	11.8			18.1				10.66	
	115	7.7			13.1				10.18	
	116	8.1			14.4				7.26	
	117	10.8			19.7				18.72	
	118	8.5			16.7				7.54	
	119	9.6			16.6				10.06	
	120	7.6			13.8				7.98	
	121	8.1			14.2				7.25	
155	7.7			11.9						
DEN-4	122	12.6				18.7				11.8
	123	9.3				14.3				8.9
	124	8.8				12.9				14.42
	125	8.9				12.8				10.1
	126	11.7				16.6				9.26
	127	10.5				15.3				9.6
	128	9.7				14.1				10.88
	129	9.9				13				7.92
	130	10.8				14.9				9.19
	131	10.6				16.5				10.36
	133	11.9				15.3				9.79
	134	9				13.7				11.31
	135	11.4				17.1				10.47
	136	7.8				11.6				9.83
	137	11.8				16.6				11.63
	138	9.2				12.1				10.32
	139	12.8				17.1				13.49
	140	9.3				12.7				8.15
141	8.3				12.1				10.59	
142	8.8				12.4				10.6	
143	9.1				12.9				7.94	
144	8.2				12.8				10.65	
145	8.8				12				10.76	
146	8.4				11.8				10.38	
UNKNOWN	148	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A				
	149	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A				
	150	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A				
	151	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A				
	JE	23.1								
	WN	10.8								
	SLE	22.4								
	YF	N/A								

心得

將分子診斷系統應用於臨床檢驗的最大優點在於其敏感與快速的特性，但也正因為其敏感性高，偽陽性是必須特別防範的錯誤。本實驗室持續研究建立登革病毒分子診斷系統，期望至少發展兩套以上檢測不同區域的即時 RT-PCR 系統，彼此互補以提高系統敏感性，兼具雙重確認功效以減少錯誤的發生。此次研習設立的系統也是依循此原則，因而設立以 3'NC 區域的引子組做初步篩檢的工具，對於陽性個案再利用 NS5 或 C/prM 區域的引子組和探針進行分型及確認的系統。在研習結束時，尚未有任何實驗室發表可在單一試管內以 multiplex 的方式完成登革病毒分型的工作，因此 NS5 系統能在未符合一般建議 TaqMan 探針 Tm 值應高於引子組 8~10°C，以及將 annealing 及 elongation 反應溫度降到 48°C 的狀況下建立成功，對我來說，是相當值得高興的成果。這也讓我體認到，在我們熟悉的實驗程序中，一般含著一些”最佳化” (optimal) 的條件在其中，但這不一定是完全不可違背的原則，研究者不應自宥於這些限制當中，必須經過理性的思考與實驗的驗證；有時，真理藉此愈辯愈明，而成果可能就存在意料之外。

美國疾病管制中心內部持續為工作人員舉辦許多主題性的短期訓練課程 (2 天~2 週不等)，並定期安排專題演講，對工作人員的專業提昇有很大的幫助。另外讓我印象深刻的是他們的圖書館資源，不但電子期



刊種類繁多，即使有些文章無法由此下載，仍可透過內部網路系統申請，圖書館會以極佳的效率幫忙取得，依申請者的需求以影印本或掃描影像存檔的方式送達；工作人員想借的書，即使是在國外圖書館，只要對方同意，圖書館也會幫忙借來。能擁有如此充裕的資源，的確令人相當欽羨。

在國外這段期間，如何融入當地生活圈的確是一大挑戰。語言能力是重要的影響因素，而平時與國外相關單位建立良好關係與維持聯繫，也會有相當程度的幫助。這次協辦 APEC 會議，更讓我們與東南亞部分國家建立起連絡管道。希望 2003 年 APEC 能繼續支持辦理登革病毒分子流病研習會，而台灣仍能擔任主要協辦單位，相信對台灣未來在登革熱防治與研究的國際合作事務上，會有相當大的幫助。

## 建議

1. 因台灣並非世界衛生組織會員國，對於國際間許多訊息或活動無法獲知或參加。這次藉由協辦 APEC 會議的機會，得以與其他東南亞國家建立聯絡管道。未來應保持聯繫，嘗試藉此管道與東南亞地區國家交換疫情訊息或病毒株等，以掌握登革熱在全球流行的概況與動向，以達到成為亞太地區登革熱參考實驗室的目的。
2. 因研習時間不足的限制，建立的系統未能來得及測試足夠數量的臨床樣本。後續應加大樣本數，與現行系統比較，持續評估，以建立敏感性高且特異性佳的登革熱分子診斷流程。對於偵測其他黃病毒的探針組也應繼續測試建立，以達成利用相同系統同時檢測多項經由蚊子傳播的重要人類致病性黃病毒的目標。
3. 世界衛生組織籌設的 Dengue Net 網頁，內容將包括登革病毒的分子流行病學資料，預計由美國疾病管制局進行規劃並建立基本資料庫。未來期望能在這部分與張光正博士繼續合作，由台灣擔任主要的協辦單位，提昇國際合作地位。
4. 分子診斷雖然敏感且快速，但檢驗成本太高卻是許多東南亞、中南美洲或非洲地區登革熱流行國家無法解決的問題。可嘗試建立敏感性高的酵素免疫診斷方法（ELISA）偵測病毒血症，以期有助於解決成本問題，並減少偽陽性的產生，同時達到快速檢測登革熱急性期患者的目的。