

發明專利說明書

【發明名稱】 評估個體之登革熱病毒感染嚴重程度的方法、檢測裝置及檢測套組

METHOD, DETECTION DEVICE AND DETECTION KIT
FOR ASSESSING THE SEVERITY OF DENGUE VIRUS
INFECTION IN A SUBJECT

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種評估個體之登革熱病毒感染嚴重程度（severity of dengue virus infection）的方法。本發明亦有關於一種用於評估個體之登革熱病毒感染嚴重程度的檢測裝置（detection device）及檢測套組（detection kit）。

【先前技術】

【0002】 登革熱（dengue fever）是一種經由登革熱病毒（dengue virus，DENV）的感染所引起的蚊媒熱帶病（mosquito-borne tropical disease）。依據世界衛生組織（World Health Organization，WHO）所發佈的登革熱的臨床處理手冊（Handbook for Clinical Management of Dengue），感染登革熱病毒的病患可依嚴重程度（severity）而區分為下列三群：（1）A群（group A）病患，其特徵為不具有警示症狀（warning signs），例如不具有腹部疼痛或壓痛（abdominal pain or tenderness）、持續性嘔吐（persistent vomiting）、臨床體液蓄積（clinical fluid accumulation）或黏膜出血（mucosal bleed）；（2）B群病患（group B）病患，其特徵為具有上述警示症狀；及（3）C群（group C）病患，其特徵為嚴重血漿滲漏（severe plasma leakage）而造成休克（shock）及體液蓄積併呼吸窘迫（respiratory distress）、嚴重出血（severe bleeding）或嚴重器官損傷（severe organ impairment）。

【0003】 登革熱病毒是一種黃病毒科（*Flaviviridae*）、黃病毒屬（*Flavivirus*）的正單股 RNA 病毒（single positive-stranded RNA virus），依據抗原性（antigenicity）的不同主要可區分為四種血清型（serotype），包括

DENV-1、DENV-2、DENV-3 及 DENV-4。受到登革熱病毒感染的個體會出現口鼻出血 (mouth and nose bleeding)、頭痛 (headache)、嘔吐 (vomiting)、紅疹 (rash) 及肌肉與關節疼痛 (muscle and joints pain) 等症狀，嚴重者甚至會產生止血異常 (abnormal hemostasis)、登革出血熱 (dengue hemorrhage fever, DHF) 及登革熱休克症候群 (dengue shock syndrome, DSS)。因此，防治登革熱已成為本領域的研究人員所重視的課題。

【0004】 登革熱病毒的基因體 (genome) 包括大約 11,000 個鹼基 (base) 而可編碼鞘蛋白 C (capsid protein C)、膜蛋白 M (membrane protein M) 及外套膜蛋白 E (envelope protein E) 等三種結構蛋白質 (structural protein) 及非結構蛋白質 1 (NS1)、非結構蛋白質 2A (NS2A)、非結構蛋白質 2B (NS2B)、非結構蛋白質 3 (NS3)、非結構蛋白質 4A (NS4A)、非結構蛋白質 4B (NS4B) 及非結構蛋白質 5 (NS5) 等七種非結構蛋白質 (nonstructural protein, NS)，其中非結構蛋白質僅在受感染的宿主細胞中發現到。已有研究指出，非結構蛋白質 1 (NS1) 在登革熱病毒複製中扮演重要的角色，並且與登革熱所引起的症狀 (例如登革出血熱) 有密切關聯 (Libraty D.H. *et al.* (2002), *J. Infect. Dis.*, 186:1165-1168; Fan J. *et al.* (2014), *Virol. Sin.*, 29:162-169)。

【0005】 NS1 是一種 46 至 50 kDa 的醣蛋白 (glycoprotein)，其在受感染的哺乳動物細胞中表現並且呈分泌型 (secreted form) 及膜聯型 (membrane-associated form)。由於 NS1 與登革熱之間的密切關聯性，已有研究人員以 NS1 作為檢測個體是否受到登革熱病毒感染的重要標記 (marker)。例如，有文獻報導，檢測 NS1 對於登革熱病毒感染的早期診斷是重要的 (Badave G.K. *et al.* (2015), *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 4:779-784)。

【0006】 目前習知用於檢測登革熱病毒感染的方法主要是單獨地利用抗 NS1 專一性抗體 (anti-NS1 specific antibody)，並透過免疫方式進行檢測。然而，習知方法中不論是將病毒自病患體內分離，或是藉由反轉錄聚合酶鏈反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 來判斷感染之病毒類型，都是極為耗時、高成本，且高度仰賴實驗室器材才能

進行的檢測手段，應用範圍相當狹隘。

【0007】 除此之外，習知的檢測方法必須在條件嚴謹的環境下操作，以免稍有不慎造成汙染，影響檢測結果。更重要的是，僅單獨以 NS1 為檢測標記靈敏度（sensitivity）不足，往往造成誤診或延誤治療等後果。

【0008】 此外，已有研究是利用專一性結合包含 NS1 與凝血酶（thrombin）的複合物（complex）或是包含 NS1 與凝血酶原（prothrombin）的複合物之抗體來檢測登革熱病毒感染。例如，TW I428598 B 揭示一種黃病毒科病毒感染之檢測方法，藉由檢測生物樣本是否含有由 NS1 與凝血酶二蛋白質或 NS1 與凝血酶原二蛋白質所形成的複合物，以判斷患者是否感染登革熱病毒。US 2016/0363590 A1 揭示一種利用如嗅質蛋白 4（olfactomedin 4）或 NS1 的蛋白質標記（protein marker）來早期預測嚴重性登革熱或出血性登革熱（hemorrhagic dengue）之方法。

【0009】 在上述的先前技術中是透過檢測活體外生物樣品（*in vitro* biological sample）中是否存在包含 NS1 與凝血酶的複合物或是包含 NS1 與凝血酶原的複合物來判斷個體是否有感染登革熱病毒。然而，登革熱的嚴重程度存在相當大的差異，最嚴重者可能會導致死亡。若患者僅得知自己感染登革熱病毒而無法進一步瞭解感染的嚴重程度，很可能會輕忽病況而延誤治療的時程。因此，若能開發出一種透過檢測活體外生物樣品來評估個體之登革熱病毒感染嚴重程度的方法、檢測裝置及檢測套組，將會對登革熱的治療策略帶來突破。

【發明內容】

【0010】 有鑑於習知方法及技術僅能透過檢測活體外生物樣品中是否存在包含 NS1 與凝血酶的複合物或是包含 NS1 與凝血酶原的複合物來判斷個體是否有感染登革熱病毒，而無法快速鑑定患者之登革熱病毒感染的嚴重程度，導致患者輕忽病況，甚而延誤治療的時程。

【0011】 於本發明中，申請人發現且經由實驗證實：依據本發明的方法可準確地檢測個體的登革熱病毒感染而具有高靈敏度及高準確率，且當活體外生物樣品中同時存在有 NS1 及包含 NS1 及凝血酶的複合物時，表示

該個體的登革熱感染程度較為嚴重。

【0012】 本發明的上述及其它目的、特徵與突出效果，將於以下段落加以說明。

【0013】 本發明提供一種評估一個體之登革熱病毒感染嚴重程度的方法，藉由檢測個體的活體外生物樣品以執行。該方法包含以下步驟：檢測活體外生物樣品中是否存在 NS1，得到第一檢測結果。檢測活體外生物樣品中是否存在一複合物，得到第二檢測結果，所述的複合物包含 NS1 與凝血酶，或是包含 NS1 與凝血酶原。並且，藉由第一檢測結果及第二檢測結果評估個體登革熱病毒的感染嚴重程度。

【0014】 本發明亦提供一種檢測裝置，用於評估一個體之登革熱病毒感染嚴重程度。檢測裝置包含第一檢測單元及第二檢測單元。第一檢測單元用以檢測活體外生物樣品中是否存在 NS1，以得到第一檢測結果。第二檢測單元用以檢測活體外生物樣品中是否存在複合物以得到第二檢測結果，所述的複合物包含 NS1 與凝血酶，或是包含 NS1 與凝血酶原。同時藉由第一檢測結果及第二檢測結果評估個體登革熱病毒的感染嚴重程度。

【0015】 本發明亦提供一種檢測套組，其包含如上所述的檢測裝置。

【0016】 在本說明書中，「登革病毒 (dengue virus)」、「登革熱病毒 (dengue fever virus)」及「DENV」可交換使用。

【0017】 在本說明書中，「嚴重程度 (severity)」意指一令人痛苦的病況 (distressing condition)、症狀 (symptom) 或一群症狀 (group of symptoms) 的程度或強度。

【0018】 在本說明書中，「生物樣品 (biological sample)」意指由生物體所產生的或可從生物體中分離出的所有物質。

【0019】 在一實施例中，生物樣品包括下列之一者：血液 (例如血清、血漿或全血)、尿液、唾液及淋巴液。在一較佳實施例中，生物樣品是血清。

【0020】 在一實施例中，當生物樣品中同時存在有包含 NS1 與凝血酶的複合物及包含 NS1 與凝血酶原的複合物當中之二者及 NS1 時，表示個體是帶有登革熱病毒感染的 B 群病患或是帶有登革熱病毒感染的 C 群病患。

【0021】 上述的「帶有登革熱病毒感染的 B 群病患 (group B patient

with dengue virus infection)」意指具有如腹部疼痛或壓痛 (abdominal pain or tenderness)、持續性嘔吐 (persistent vomiting)、臨床體液蓄積 (clinical fluid accumulation) 及黏膜出血 (mucosal bleed) 等警示症狀 (warning signs) 的登革熱病患。此部分可以參照世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 所發佈的登革熱的臨床處理手冊 (Handbook for Clinical Management of Dengue)。

【0022】 上述的「帶有登革熱病毒感染的 C 群病患 (group C patient with dengue virus infection)」意指具有嚴重血漿滲漏 (severe plasma leakage) 而造成休克 (shock) 及體液蓄積併呼吸窘迫 (respiratory distress)、嚴重出血 (severe bleeding) 或嚴重器官損傷 (severe organ impairment) 等症狀的登革熱病患。此部分可以參照世界衛生組織所發佈的登革熱的臨床處理手冊。

【0023】 在一實施例中，檢測活體外生物樣品中是否存在 NS1 是藉由使用一專一性辨識 NS1 的抗體而進行檢測。

【0024】 在一實施例中，檢測活體外生物樣品中是否存在複合物是藉由使用一專一性辨識複合物的抗體而進行檢測。

【0025】 在一實施例中，抗體是一單株抗體 (monoclonal antibody) 或一多株抗體 (polyclonal antibody)。在一較佳實施例中，專一性辨識 NS1 的抗體是單株抗體。在另一較佳實施例中，專一性辨識複合物的抗體是多株抗體。

【0026】 前述的「抗體 (antibody)」包括「以抗體為基礎的結合部分 (antibody-based binding moiety)」、「免疫球蛋白分子 (immunoglobulin molecules)」及「免疫球蛋白分子的免疫活性決定位 (immunologically active determinants)」，例如含有一個會與 NS1 或前述的複合物專一性地結合 (免疫反應) 的抗原結合位址 (antigen-binding site) 的分子，並且意欲涵蓋具有任一種如 IgG、IgA、IgM 及 IgE 等同型 (isotype) 的所有抗體及包含其亦會與 NS1 或前述的複合物專一性地反應的片段 (fragment)。

【0027】 前述的「抗體」亦包括捕獲抗體 (capture antibody) 及檢測抗體 (detection antibody)。

【0028】 上述的「捕獲抗體」意指一抗體，不論是單株抗體、多株抗體，或是抗體的一免疫反應片段 (immunoreactive fragment)，其能夠結合一感興趣的抗原 (antigen)，並且因而容許藉由一被隨後地施用的抗體來辨識抗原。捕獲抗體可用於一異質性 (固相) 或均質性 (液相) 分析法 (heterogeneous (solid phase) or homogeneous (solution phase) assay) 中。較佳地，捕獲抗體被固定於一固相上，例如以尼龍、聚苯乙烯 (polystyrene)、聚氯乙烯 (polyvinylchloride) 或硝化纖維 (nitrocellulose)、聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 等材料所製成之基材，且基材可具有例如孔盤、管柱或試紙等不同形式。捕獲抗體與生物樣品中之抗原亦可以在一懸浮液 (suspension) 中結合，端視後續與抗原結合之捕獲抗體與未與抗原結合之捕獲抗體的分離方式及使用者操作便利與否作為選擇的依據，本發明在此不限。

【0029】 前述的「檢測抗體」意指一包含可偵測的標記 (detectable label) 的抗體，可偵測的標記對於存在樣品中之一或多個感興趣的待測物 (analytes) 具有專一性。其亦涵蓋對於一或多個感興趣的待測物具有專一性的抗體，其中抗體可與另一個包含可偵測的標記的物種結合。可偵測的標記的實例包括，但不限於：如生物素／鏈黴抗生物素蛋白 (biotin/streptavidin) 及地高辛 (digoxigenin, Dig) 等半抗原標記 (hapten label)、如寡核苷酸 (oligonucleotide) 標記的核酸標記、化學發光標記 (chemiluminescent label)、如 FITC (fluorescein isothiocyanate)、5-羧基螢光素 (5-carboxyfluorescein)、6-羧基螢光素 (6-carboxyfluorescein)、花青素 (anthocyanin)、藻紅素 (phycoerythrin) 及玫瑰紅 (rhodamine) 等螢光標記 (fluorescent label)、如螢光素酶 (luciferase)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase)、過氧化氫酶 (catalase)、辣根過氧化酶 (horseradish peroxidase, HRP)、 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)、尿酸酶 (uricase)、細菌發光酶及乳過氧化酶 (lactoperoxidase) 等酵素標記 (enzymatic label)、如 H^3 、 C^{11} 、 C^{14} 、 P^{32} 、 S^{35} 、 I^{123} 、 I^{124} 、 I^{125} 、 I^{131} 、 Tc^{111} 及 Lu^{177} 等放射性標記 (radioactive label)、如 T7、c-Myc、HA、VSV-G、HSV、FLAG、V5 及 HIS 等抗原決定位標籤 (epitope tag)，及它們的組合。

【0030】 在一實施例中，個體是哺乳動物。在後述的實驗例中，係以人類做為代表。

【0031】 在一實施例中，檢測是藉由使用下列方法學之所組成之群組中任一者而進行：酵素結合免疫吸附分析法（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）、點漬法（dot blotting）、側層流分析法（lateral flow assay，LFA）、多重免疫分析法（multiplex immunoassay）、放射免疫分析法（radioimmunoassay，RIA）、免疫放射量測定分析法（immunoradiometric assay，IRMA）、螢光免疫分析法（fluorescent immunoassay，FIA）、化學發光免疫分析法（chemiluminescent immunoassay）及免疫濁度測定法（immunonephelometry）。

【0032】 在一實施例中，登革熱病毒包括多種不同的血清型，例如 DENV-1、DENV-2、DENV-3 及 DENV-4。

【0033】 在一實施例中，生物樣品之「生物」包括可被登革熱病毒感染之動物宿主，較佳是哺乳動物，例如人類、猴、鼠、牛、羊、狗、貓、及豬。在後述的實驗例中，生物是人類。

【0034】 在一實施例中，生物樣品可以具有任何形式，主要係登革熱病毒在個體內可影響之範圍，包括血液（例如血清、血漿或全血）、尿液、唾液、淋巴液等，或是血液、尿液或淋巴液流經的附近組織或細胞等。生物樣品較佳含有能被登革熱病毒感染之細胞，包括神經細胞、肌肉細胞、肝臟細胞、內皮細胞、血球細胞及淋巴細胞；較佳地，生物樣品含有哺乳動物之內皮細胞或血球細胞。生物樣品可以為新鮮、經組織培養或經冷藏或冷凍之樣品。再者，生物樣品可以為經過純化、離心、萃取或濃縮等方法進一步提升抗原濃度者。

【0035】 綜上所述，本發明所提供之評估個體之登革熱病毒感染嚴重程度的方法、檢測裝置及檢測套組，除能有效檢測出是否受到登革熱病毒感染外，更重要的是，相較於習知技術，本發明之檢測方法、檢測裝置及檢測套組能提供更高之靈敏度及準確率。

【0036】 於本說明書中被引述之所有專利和文獻藉由引用而併為本說明書揭露之一部。

【圖式簡單說明】**【0037】**

圖 1 為本發明之評估一個體之登革熱病毒感染嚴重程度的方法之一流程圖；及

圖 2 為本發明之較佳實施例的一示意圖。

【實施方式】

【0038】 本發明將就下面的實施例及實驗例來做進一步說明，但應瞭解的是，該等實施例及實驗例僅是供例示說明用，而不應限制本發明。

【0039】 實施例

【0040】 以下將參照相關圖式，說明本發明之一實施例，為一種評估一個體之登革熱病毒感染嚴重程度的方法，其具有高靈敏度及高準確率。該方法係藉由檢測個體之活體外生物樣品予以執行。該方法的步驟流程如圖 1 所示，包含檢測活體外生物樣品中是否存在非結構蛋白質 1 (nonstructural protein 1, NS1)，得到第一檢測結果 (步驟 S01)；檢測活體外生物樣品中是否存在一複合物 (complex)，得到第二檢測結果，其中複合物包含 NS1 與凝血酶 (thrombin)，或是包含 NS1 與凝血酶原 (prothrombin) (步驟 S02)。並且，藉由第一檢測結果及第二檢測結果評估個體登革熱病毒的感染嚴重程度 (步驟 S03)。

【0041】 在本實施例的步驟 S01 中，活體外生物樣品是取自於帶有或疑似帶有登革熱病毒感染的個體。在本發明的實驗例中，個體是人類。在本發明的實驗例中，生物樣品是血清 (serum)。

【0042】 在本實施例的步驟 S02 中，NS1 與凝血酶或是 NS1 與凝血酶原相互綴合 (conjugate)。亦即，NS1 與凝血酶或是 NS1 與凝血酶原皆具有能交互作用 (interaction) 或共價鍵結 (covalent bonding) 的部位。在本發明的實施例中，NS1 與凝血酶或是 NS1 與凝血酶原亦可透過其它分子而間接地綴合。在本發明的實施例中，血清同時具有多個複合物，部分複合物包含 NS1 與凝血酶，部分複合物包含 NS1 與凝血酶原。在本發明的實施例中，複合物可以同時包含 NS1 與凝血酶及 NS1 與凝血酶原，且 NS1、凝

血酶或凝血酶原的數目均無限制，彼此綴合的關係亦可以為一個 NS1 與兩個凝血酶或凝血酶原相互綴合，或是兩個以上之 NS1 與一個凝血酶或凝血酶原相互嵌合，本發明在此不限。在本發明的實施例中，NS1 的形式包括，但不限於：分泌至細胞外之分泌蛋白（secreted protein）及結合在宿主細胞表面之膜聯蛋白（membrane-associated protein）。在本發明的另一實施例中，NS1 可為不經轉譯後修飾（post-translational modification）或如醣基化（glycosylation）及磷酸化（phosphorylation）等經轉譯後修飾之形式。在本發明的實施例中，凝血酶或凝血酶原可以自生物體中被分離或純化出，也可以是藉由人工合成（artificial synthesis）的一功能性蛋白質（functional protein），而這些分離、純化及人工合成技術是本發明所屬技術領域中具有通常知識者所能理解的。

【0043】 在本實施例的步驟 S03 中，當第一檢測結果是活體外生物樣品中存在有 NS1，及第二檢測結果是活體外生物樣品中存在有複合物時，亦即當生物樣品中同時存在有包含 NS1 與凝血酶的複合物及包含 NS1 與凝血酶原的複合物當中之二者及 NS1 時，表示個體是一帶有登革熱病毒感染的 B 群病患或一帶有登革熱病毒感染的 C 群病患。在本發明的實驗例中，第一檢測結果是活體外生物樣品中存在有 NS1，及第二檢測結果是活體外生物樣品中存在有包含 NS1 與凝血酶的複合物。

【0044】 本發明亦提供另一實施例，為一種檢測裝置。該檢測裝置係用於評估一個體之登革熱病毒感染嚴重程度。檢測裝置包含第一檢測單元及第二檢測單元。第一檢測單元用以檢測活體外生物樣品中是否存在 NS1，以得到第一檢測結果。第二檢測單元用以檢測活體外生物樣品中是否存在複合物以得到第二檢測結果，所述的複合物包含 NS1 與凝血酶，或是包含 NS1 與凝血酶原。同時藉由第一檢測結果及第二檢測結果評估個體登革熱病毒的感染嚴重程度。

【0045】 在本實施例中，活體外生物樣品的來源是如上面實施例的步驟 S01 中所述者。

【0046】 在本實施例中，NS1 與凝血酶或是 NS1 與凝血酶原之間的關係是如上面實施例的步驟 S02 中所述者。

【0047】 在本實施例中，當第一檢測結果是活體外生物樣品中存在有 NS1，及第二檢測結果是活體外生物樣品中存在有複合物時的代表意義是如上面實施例的步驟 S03 中所述者。

【0048】 本發明亦提供再一實施例，為一檢測套組。該檢測套組包含前述的檢測裝置。此外，檢測裝置之各細部部件之組成、變化態樣與其他部件之連接關係，則同於前面實施例中所述，於此不再贅述。

【0049】 以下，本發明將提供以帶有登革熱病毒感染的病患之血清為代表的實驗例，說明本發明之一種評估一個體之登革熱病毒感染嚴重程度的方法，以補充上述說明內容，同時說明本發明之方法具有高靈敏度及準確率。然需注意的是，以下之說明是用來詳述本發明以使此熟習該項技術者能夠據以實現，但並非用以限定本發明之範圍。

【0050】 實驗例：本發明評估方法評估個體之登革熱病毒感染嚴重程度的靈敏度試驗

【0051】 實驗材料：個體血清樣品的製備

【0052】 參與本研究的實驗個體都有就他們的血清樣品之捐贈而取得經告知的同意 (informed consent)。本研究共計有 26 位人類個體參加，他們皆是由衛生福利部疾病管制署 (Centers for Disease Control, CDC, 台灣) 確診帶有登革熱病毒感染的病患。這些病患藉由使用針頭而從各個病患的血管來收集血液，繼而在常溫下以 2500 rpm 進行離心 25 分鐘，藉此而得到血清樣品。

【0053】 實驗方法

【0054】 本實驗是利用 SD BIOLINE™ Dengue Duo 套組 (Standard diagnostic Inc.) 並參照製造商的操作指南來進行。首先，將用來進行本實驗的快篩試劑 (rapid test) 分成六組，其中包括一個實驗組及比較組 1 至 5 等五個比較組。各組快篩試劑皆包含標記為「C」的控制線 (control line)。比較組 1 及比較組 5 的快篩試劑包含標記為「G」及「M」的試驗線 (test line)，其中標記為「G」的試驗線含有抗人類 IgG 抗體作為捕獲抗體，標記為「M」的試驗線含有抗人類 IgM 抗體作為捕獲抗體；其膠金墊含有登革熱病毒膜蛋白-膠體金 (membrane protein of dengue virus-colloidal gold)。比較組 2、3、

4 與 5 及實驗組的快篩試劑包含標記為「T」的試驗線，其含有 1 μ L 的小鼠抗 NS1 單株抗體 (Cat. 12100/12110, Leadgene Biomedical Inc., Taiwan) 作為捕獲抗體，膠金墊則有小鼠抗 NS1 單株抗體-膠體金。另外，比較組 3、5 及實驗組的膠金墊除了膠體金標記的小鼠抗 NS1 單株抗體外，還含有 1 μ L 的綿羊抗凝血酶多株抗體 (sheep anti-thrombin polyclonal antibody) 作為偵測抗體。接著，將 80 μ L 的血清樣品添加至設置於各組快篩試劑的樣品槽 (sample pad) 中並進行反應。在反應的第 15 分鐘時，以肉眼進行結果判讀。

【0055】 實驗結果

【0056】 圖 2 為各組快篩試劑的示意圖，其中各快篩試劑的符號所代表之意義已於本實驗例的「實驗方法」段落中進行說明，於此不重複敘述。表 1 為依據上面「實驗方法」進行實驗及圖 2 的示意圖進行結果判讀之後所作成的數據統計表 (參見下方)。

表 1

組別	所測得的抗原或抗體	靈敏度
比較組 1	抗登革熱 IgG 抗體及／或抗登革熱 IgM 抗體	9/26 (34.61%)
比較組 2	NS1	19/26 (73.07%)
比較組 3	包含 NS1 及凝血酶的複合物	22/26 (84.61%)
比較組 4	NS1 及抗登革熱 IgG 抗體及／或抗登革熱 IgM 抗體	23/26 (88.46%)
比較組 5	包含 NS1 及凝血酶的複合物及抗登革熱 IgG 抗體及／或抗登革熱 IgM 抗體	23/26 (88.46%)
實驗組	NS1 及包含 NS1 及凝血酶的複合物	25/26 (96.15%)

【0057】 由圖 2 及表 1 可見，就比較組 1 而言，26 位帶有登革熱病

毒感染的病患中有 9 位病患的血清樣品測得抗登革熱 IgG 抗體 (anti-dengue IgG antibody) 及／或抗登革熱 IgM 抗體 (anti-dengue IgM antibody)，靈敏度為 34.61%。就比較組 2 而言，26 位帶有登革熱病毒感染的病患中有 19 位病患的血清樣品測得 NS1，靈敏度為 73.07%。就比較組 3 而言，26 位帶有登革熱病毒感染的病患中有 22 位病患的血清樣品測得包含 NS1 及凝血酶的複合物 (complex)，靈敏度為 84.61%。就比較組 4 而言，26 位帶有登革熱病毒感染的病患中有 23 位病患的血清樣品測得 NS1 及抗登革熱 IgG 抗體及／或抗登革熱 IgM 抗體，靈敏度為 88.46%。就比較組 5 而言，26 位帶有登革熱病毒感染的病患中有 23 位病患的血清樣品測得包含 NS1 及凝血酶的複合物及抗登革熱 IgG 抗體及／或抗登革熱 IgM 抗體，靈敏度為 88.46%。就實驗組而言，26 位帶有登革熱病毒感染的病患中有 25 位病患的血清樣品測得 NS1 及包含 NS1 及凝血酶的複合物，靈敏度為 96.15%。本實驗例的結果顯示：依據本發明的方法可準確地檢測個體的登革熱病毒感染，因而具有高靈敏度及高準確率。特別地，申請人發現到，當帶有登革熱病毒感染的病患之血清樣品中同時存在有 NS1 及包含 NS1 及凝血酶的複合物時，表示該病患是一帶有登革熱病毒感染的 B 群病患或一帶有登革熱病毒感染的 C 群病患 (數據未顯示)。因此，申請人認為，依據本發明的方法可用來評估個體之登革熱病毒感染嚴重程度，且具有高靈敏度及高準確率。

【0058】 以上所述僅為舉例性，而非為限制性者。任何未脫離本發明之精神與範疇，而對其進行之等效修改或變更，均應包含於後附之申請專利範圍中。

【符號說明】

【0059】

S01~S03：步驟

201901152

發明摘要

※ 申請案號：106115848

※ 申請日：106/05/12

※IPC 分類：G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

【發明名稱】評估個體之登革熱病毒感染嚴重程度的方法、檢測裝置及檢測套組

METHOD, DETECTION DEVICE AND DETECTION KIT
FOR ASSESSING THE SEVERITY OF DENGUE VIRUS
INFECTION IN A SUBJECT

【中文】

本發明提供一種評估一個體之登革熱病毒感染嚴重程度的方法，藉由檢測個體之一活體外生物樣品以執行。該方法包含檢測活體外生物樣品中是否存在非結構蛋白質 1，得到第一檢測結果；檢測活體外生物樣品中是否存在一複合物，得到第二檢測結果，其中複合物包含非結構蛋白質 1 與凝血酶，或是包含非結構蛋白質 1 與凝血酶原；及藉由第一檢測結果及第二檢測結果評估個體登革熱病毒的感染嚴重程度。本發明亦提供一種用於評估一個體之登革熱病毒感染嚴重程度的檢測裝置及檢測套組。

【英文】

The present invention provides a method for assessing the severity of dengue virus infection in a subject by detecting an *in vitro* biological sample of the subject. The method comprises detecting the presence of nonstructural protein 1 in the *in vitro* biological sample to obtain a first detection result; detecting the presence of a complex in the *in vitro* biological sample to obtain a second detection result, wherein the complex comprises nonstructural protein 1 and thrombin or it comprises nonstructural protein 1 and prothrombin; and assessing the severity of dengue virus infection in the subject by the first detection result and the second detection result. The present invention also provides a detection device and a detection kit for assessing the severity of dengue virus infection in a subject.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖1。

【本代表圖之符號簡單說明】：

S01~S03：步驟

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

- 1、一種評估一個體之登革熱病毒感染嚴重程度的方法，藉由檢測該個體之一活體外生物樣品以執行，該方法包含：
 檢測該活體外生物樣品中是否存在非結構蛋白質 1，得到一第一檢測結果；
 檢測該活體外生物樣品中是否存在一複合物，得到一第二檢測結果，其中該複合物包含一非結構蛋白質 1 與一凝血酶或是包含一非結構蛋白質 1 與一凝血酶原；及
 藉由該第一檢測結果及該第二檢測結果評估該個體登革熱病毒的感染嚴重程度。
- 2、如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中當該生物樣品中同時存在有該包含非結構蛋白質 1 與凝血酶的複合物及該包含非結構蛋白質 1 與凝血酶原的複合物當其中之一者及非結構蛋白質 1 時，表示該個體是一帶有登革熱病毒感染的 B 群病患或一帶有登革熱病毒感染的 C 群病患。
- 3、如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中檢測該活體外生物樣品中是否存在非結構蛋白質 1 是藉由使用一專一性辨識非結構蛋白質 1 的抗體而進行檢測。
- 4、如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中檢測該活體外生物樣品中是否存該複合物是藉由使用一專一性辨識該複合物的抗體而進行檢測。
- 5、如申請專利範圍第 3 或 4 項所述的方法，其中該抗體是一單株抗體或多株抗體。
- 6、如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中該生物樣品包括下列之一者：血液、尿液、唾液及淋巴液。
- 7、如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中該個體是一哺乳動物。
- 8、如申請專利範圍第 7 項所述的方法，其中該哺乳動物是一人類。
- 9、如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中該非結構蛋白質 1 是一分泌蛋白或一膜聯蛋白。
- 10、如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中該檢測是藉由使用下列方法

學之所組成之群組中任一者而進行：酵素結合免疫吸附分析法、點漬法、側層流分析法、多重免疫分析法、放射免疫分析法、免疫放射量測定分析法、螢光免疫分析法、化學發光免疫分析法及免疫濁度測定法。

- 11、一種檢測裝置，用於評估一個體之登革熱病毒感染嚴重程度，該檢測裝置包含：
一第一檢測單元，用以檢測一活體外生物樣品中是否存在非結構蛋白質 1，以得到一第一檢測結果；及
一第二檢測單元，用以檢測該活體外生物樣品中是否存在一複合物，其中該複合物包含一非結構蛋白質 1 與一凝血酶或是包含一非結構蛋白質 1 與一凝血酶原，以得到一第二檢測結果，
藉由該第一檢測結果及該第二檢測結果評估該個體登革熱病毒的感染嚴重程度。
- 12、如申請專利範圍第 11 項所述的檢測裝置，其中該生物樣品包括下列之一者：血液、尿液、唾液及淋巴液。
- 13、如申請專利範圍第 11 項所述的檢測裝置，其中該個體是一哺乳動物。
- 14、如申請專利範圍第 13 項所述的檢測裝置，其中該哺乳動物是一人類。
- 15、如申請專利範圍第 11 項所述的檢測裝置，其中當該生物樣品中同時存在有該包含非結構蛋白質 1 與凝血酶的複合物及該包含非結構蛋白質 1 與凝血酶原的複合物當中之二者及非結構蛋白質 1 時，表示該個體是一帶有登革熱病毒感染的 B 群病患或一帶有登革熱病毒感染的 C 群病患。
- 16、如申請專利範圍第 11 項所述的檢測裝置，其中該非結構蛋白質 1 是一分泌蛋白或一膜聯蛋白。
- 17、一種檢測套組，其包含一如申請專利範圍第 11 至 16 項中任一項所述的檢測裝置。

圖式

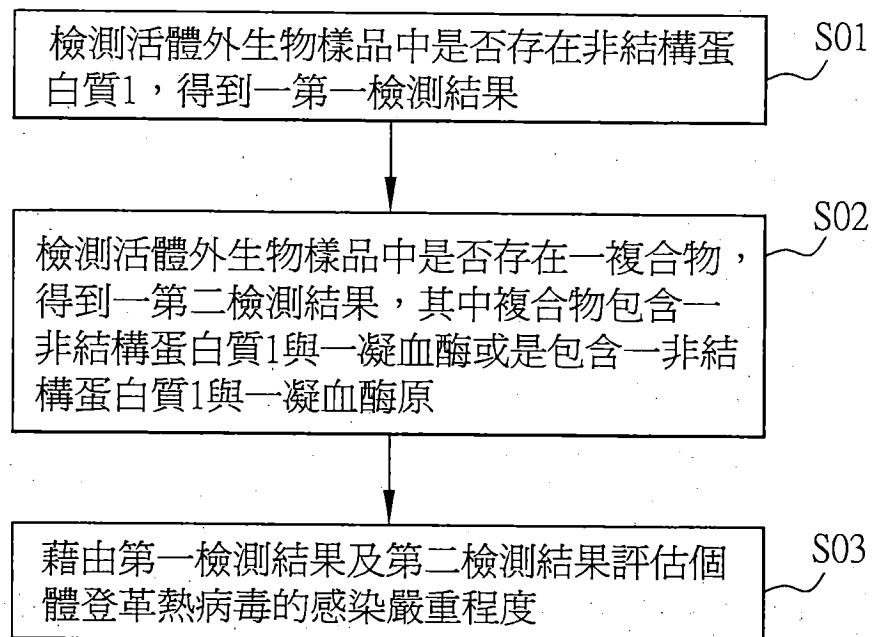


圖 1

