J. Biomed. Lab. Sci. 8 (2002) 269–273

# A Study on Serologic Diagnosis for Dengue Virus Infection

**Sang-Wook Park[1], Je-Hoon Yang[1], Hyung-Joon Bae[2], Hi-Joo Moon[2] and Young-Dae Woo[1†]**

*[1]Asan Institute for Life Science, Seoul, 138-736, Korea, [2]Department of Medical Technology, Seoul Health College, Seongnam, 461-713, Korea*

Dengue fever (DF) is an acute febrile illness caused by dengue viruses in the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. DF has so far posed any problem in Korea, however it has been recently believed to be associated with oversea's traveler infected with dengue virus. Antibody titers of sera from DF patients against dengue virus were measured by indirect immunofluorescence assay (IFA) and plaque reduction neutralization test (PRNT), including the haematologic test. Three of patients with DF showed highly fluorescent and neutralizing antibody titers by IFA and PRNT assay. Two of them showed higher, remarkably. Meanwhile, one of them was tested and resulted in severe thrombocytopenia, elevated serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) activities as well as mild leucopenia, increased monocytes and basophils and depressed lymphocytes in haematological differential count.

**Key Words:** Dengue virus, DF, IFA, PRNT, *Aedes*

## 서 론

말라리아 이후 뎅기열은 가장 중요한 급성 열성 질환으로 전 세계적으로 매년 100만 건 정도 뎅기열 감염이 보고되고 있으며 그 중 평균 5%의 치사율을 나타내고 있다[6,24].

뎅기출혈열과 뎅기쇽증후군을 보이는 뎅기열의 원인체는 플라비비리대과의 플라비바이러스속에 속하는 뎅기 (Dengue, DEN) 바이러스이며 열대 숲모기 (*Aedes aegypti*)와 흰줄 숲모기 (*Aedes albopictus*) 등 몇 종류의 숲모기 (Aedes)가 매개체인 급성 열성 질환이다[3,15].

뎅기 바이러스는 11 kb로 3개의 구조 단백질 (capsid, matrix and envelope)과 7개의 비구조 단백질 (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b and NS5)을 가진 RNA 바이러스이다[4,19].

뎅기열은 최근 동남아시아 (인디아, 스리랑카, 몰디브, 파키스탄과 중국 등), 호주 북부, 서아프리카, 카리브해, 중미, 태평양 군도 (타이티, 뉴 칼레도니아, 팔라우, 쿡 아일랜드 등) 등 아시아와 열대지역에 걸쳐 분포하고 있다[5].

뎅기 바이러스 감염을 진단하기 위한 혈청학적 방법들은 hemagglutination-inhibition (HI), complement fixation (CF), neutralization (NT), immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA), indirect immunoglobulin G ELISA 등이 있다[8,9,27]. 또한 Conjugate를 이용한 직접면역형광항체법 (direct immunofluorescence assay, DFA)과 간접면역형광항체법 (IFA)으로 감염된 세포에서 검출할 수 있는 뎅기 항원은 주로 모기 세포를 사용하고 있으며[7], 모기 세포배양은 뎅기 바이러스를 분리하기 위한 방법으로 *A. albopictus*의 C6/36 clone과 *A. peudoscutellaris* 세포를 최근에 가장 많이 사용하고 있다[13].

뎅기열 환자에서 나타내는 여러 가지 비정상적인 혈액상은 발병기전을 진단하는데 도움이 된다[25]. Haematocrit (Hct)와 혈색소 (haemoglobin, Hb)는 감염 후 1~3일 동안은 정상이거나 약간 감소하지만 이후에 보통 40%와 20% 각각 감소하고[20,26], 백혈구감소증은 감염 1~3일에 백혈구가 50% 감소를 보이며[28], AST (=serum glutamate-oxaloacetate transaminase, SGOT)와 ALT (=serum glutamate-pyruvate transaminase, SGPT)는 중증인 경우에 약간 상승한다[21]. 한편 혈소판감소증 (thrombocytopenia)은 뎅기열을 임상 진단하는데 세계보건기구 (WHO)에 의해 권장하는 임상 기준 중의 하나이다[30].

항공교통망의 발달로 세계가 일상생활권으로 들어가고 있고, 가족들을 동반한 해외여행의 급증으로 새로운 외부 감염의 위험에 직면하게 되었으며 또한 해외여행 자유화와 더불어 선진국 뿐만 아니라 의료 부문에서 낙후된 후진국에 사업과 배낭여행 등 여러 목적으로 해외를 다녀온 후에 각종 전염성 질병에 노출되고 있다.

본 연구에서는 국내에서의 발병 보고는 거의 없지만 해외의 아열대 지방을 다녀온 후 발병된 뎅기열을 혈청학적으로

*논 문 접 수: 2002년 11월 18일
수 정 재 접 수: 2002년 12월 11일
†별책 요청 저자: 우영대, (우) 138-736 서울특별시 송파구 풍납동 388-1, 아산생명과학연구소
Tel: 02-3010-4420, Fax: 02-3010-4500
e-mail: ydwoo@hanmail.net

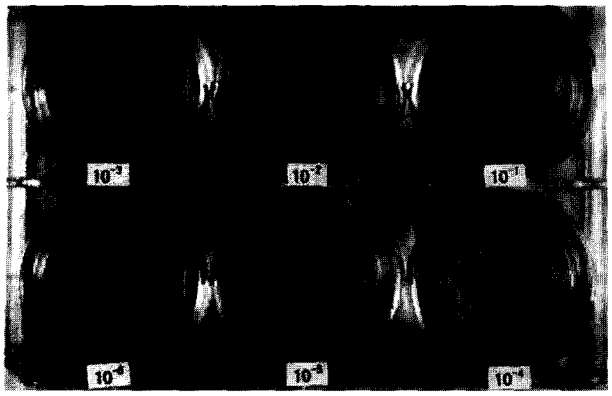

**Fig. 1.** Titration of dengue 2 virus in vero E6 by plaque test. Dengue 2 virus titer: $1\times10^6$ PFU/ml.

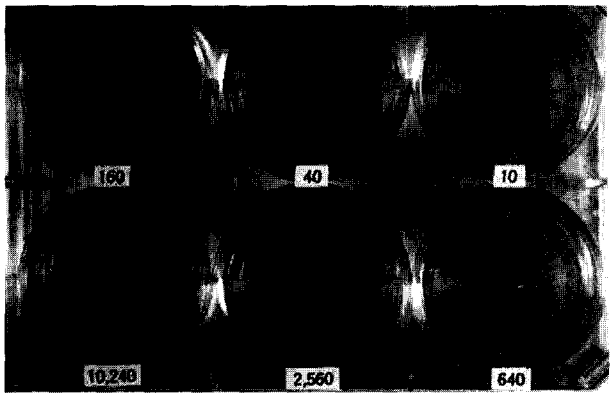


**Fig. 2.** Pictures of PRNT against dengue 2 virus of DF patients sera diluted 4-fold serial dilution. Lee (M/41), PRN titer 2,560.

진단하여 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상 혈청

필리핀, 미얀마를 사업과 여행으로 각각 다녀온 후 두통과 오한 그리고 고열 등을 주요한 소인으로 하는 환자 3명의 혈액을 채혈하여 혈청을 원심분리 (400 xg, 10 min)하여 비동화 (56℃, 30 min)한 후 검사를 실시하였다.

### 2. 항원 제작

*A. albopictus*의 C6/36 (larval stage) 세포를 tissue culture flask에 3~4일간 33℃, 5% $CO_2$ 배양기에서 배양하고 단층배양이 형성된 것을 확인한 후 dengue virus 2 (ATCC VR-222) 균주를 접종하고 1시간 동안 흡착시킨 다음 eagle's minimum essential medium (MEM 93%, fetal bovine serum 5%, HEPES 1%, penicillin/streptomycin 1%)를 가한 후 33℃, 5% $CO_2$ 배양기에서 7일간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 감염된 세포를 0.25% trypsine으로 처리한 다음 일정량의 세포용액을 10 well spot slide (CEL-LINE, USA)에 분주하여 12시간 배양하고, PBS로 3회 천천히 세척한 후 건조시킨 다음 100% 냉각 아세톤으로 10분간 고정하여 건조한 후 항체검사용 항원으로 -80℃에 보관하면서 사용하였다.

### 3. 간접면역형광항체법 (IFA)

IFA는 Lee 등[28]의 방법으로 실시하였다. 뎅기 바이러스 감염 세포를 냉각 아세톤으로 10분간 고정한 다음 1차 반응은 각 well에 인산완충식염수 (PBS; 0.01 M, pH 7.2)로 계단 희석된 혈청을 20 μl 씩 가한 후 moist chamber에 넣어 36.5℃에서 30분간 반응시켰다. 냉각된 PBS로 3회 천천히 세척하고, 증류수로 1회 씻은 다음 실온에서 건조시켰다. 2차 반응은 FITC goat anti-human IgG (H+L) (KPL, USA)를 8~16 unit로 적정하여 20 μl 씩 가한 후 1차 반응과 동일한 방법으로 반응시킨 다음 세척과 건조하여 mounting media를 가하고 유리덮개를 덮어 형광현미경 (Zeiss, Germany)으로 특이 형광 반응을 관찰 (×400)하였다.

### 4. 플라크 감소 중화 시험 (PRNT)

중화항체의 존재와 그 역가를 측정하기 위하여 뎅기열 환자 혈청을 1 : 10에서 4배 계단 희석한 후 뎅기 바이러스를 플라크 검사로 역가를 측정하여 (Fig. 1) 200 plaque forming unit (PFU) 뎅기 바이러스를 동량씩 혼합한 후 4℃ 냉장에서 12시간 중화시킨 다음, 미리 준비한 6-well plate (Costar, USA)에서 단층배양한 Vero E6 (ATCC CRL1586) 세포에 준비된 시료를 100 μl 씩 접종하여 36.5℃, 5% $CO_2$ 배양기에서 60분간 흡착시켰다.

바이러스-혈청 혼합액을 흡착 후 1차 한천 중첩배지 (2× EMEM 50%, FBS 10%, NEAA 1%, penicillin/streptomycin 1%, *L*-glutamine 4%, agarose 34%)를 첨가하여 36.5℃, 5% $CO_2$ 배양기에서 배양하고, 7일 후에 염색액으로 5% neutral red를 함유한 2차 한천 중첩배지 (2×EMEM 50%, FBS 5%, NEAA 1%, penicillin/streptomycin 1%, *L*-glutamine 4%, 5% neutral red, agarose 34%)를 가한 후 2~3일 후에 나타나는 바이러스의 플라크를 계산하고, 플라크 감소 중화항체가는 바이러스 플라크를 50% 이상 감소시키는 혈청 희석배수의 역수로서 표시하였다.

## 결 과

### 1. 뎅기열 환자에서 형광과 중화항체가의 비교

뎅기열로 의심되는 3명의 환자 혈청의 뎅기 바이러스 2형 (DEN-2)에 대한 형광항체와 중화항체의 역가는 Table 1과 같다. IFA에 의한 형광항체 역가는 뎅기열 의심 환자 중 사업차 필리핀에 다녀온 40대 남자는 paired serum에서 모두 높게

**Table 1.** Comparison of serological diagnostic tests against dengue virus in DF patients by IFA and PRNT

| No. | Source of patients | | | Antibody titers against dengue virus by | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Gender/Age | Visit nation | Purpose | IFA | PRNT |
| 1 | Lee (M/41) | Philippines | Business | 4,096 | 2,560 |
| | Follow up (d-6) | | | 2,048 | 2,560 |
| 2 | Gil I (M/41) | Myanmar | Travel | 512 | 160 |
| 3 | Gil II (M/26) | Myanmar | Travel | 16,382 | 5,120 |
| 4 | KHF* | No | | <32 | <10 |

*Korean haemorrhagic fever: Negative control

**Table 2.** Changes of the haematologic findings in DF patients (Lee, M/41)

| No. | Follow-up | Hb | Hct. | RBC | PLT | WBC | E-Neutro | E-Lymph | E-Mono | E-Eosino | E-Baso | AST (SGOT) | ALT (SGPT) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (day) | (g/dl) | (%) | ($\times10^6$/mm$^3$) | ($\times10^3$/mm$^3$) | | (%) | | | | | (IU/L) | |
| 1 | 0 | 16.2 | 45.6 | 5.45 | 82 | 3.5 | 63.5 | 15.9 | 14.1 | 2.2 | 4.3 | 86 | 80 |
| 2 | 6 | 16.2 | 45.3 | 5.44 | 292 | 6.9 | 54.9 | 35.2 | 8.4 | 1.2 | 0.3 | 152 | 245 |
| 3 | 13 | 16.1 | 45.4 | 5.37 | 383 | 7.9 | 55.5 | 35.3 | 7.1 | 1.8 | 0.3 | 35 | 86 |
| Normal value | | 12~16 | 36~48 | 4~5.4 | 150~350 | 4~10 | 42.2~75.2 | 20.5~51.5 | 1.7~9.3 | 1~10 | 0~2 | <40 | <40 |

나타났고, PRNT에 의한 중화항체도 역시 높게 나타났다 (Fig. 2). 미얀마를 여행하고 귀국한 40대 남자 길 I은 형광항체와 중화항체의 역가는 비교적 낮았지만 양성으로 나타났고, 함께 여행하고 귀국한 20대 중반 남자 길 II는 형광항체와 중화항체의 역가가 모두 현저히 높게 나타났다. 음성 대조로 국내에서 발생한 신증후출혈열 환자 혈청을 사용한 결과 DEN-2에 대한 IFA와 PRNT 항체는 음성으로 나타났다.

2. 뎅기열 환자에서 혈액학적 소견

필리핀에서 사업상 체류하다 귀국한 40대 남자의 3차례 혈액학적 소견은 Table 2와 같다. 1차 혈액검사에서 82로 현저한 혈소판감소증을 보였으며, 6일 후 2차 검사에서는 292로 정상으로 되었고, 3차 검사에서는 383으로 정상치를 벗어나 상승하였다. 간장 기능검사에서 AST와 ALT는 1차와 2차 혈액검사에서 각각 86, 80과 152, 245로 현저히 상승하였으며, 3차에서 AST는 정상이었으나 ALT는 86으로 여전히 높게 나타났다. Hb는 세 번의 검사에서 정상보다 약간 상승되어 나타났고, 적혈구는 1차와 2차에서 정상보다 약간 상승되어 나타났다. 백혈구는 1차에서만 3.5로 감소한 상태였으며, 2차와 3차에서는 모두 정상으로 되었고, 백혈구 구성 중에서 중성구와 산성구는 모두 정상이었으나 림프구는 1차 검사에서 감소하였고, 단핵구와 염기성구는 1차 검사에서 상승한 것으로 나타났다.

## 고 찰

뎅기 바이러스는 지금까지 4가지의 혈청형이 밝혀졌고[2] 뎅기 1형 (Dengue type 1, DEN-1)은 하와이주 (Hawaiian strain)이며, 사람에 감염되면 발열, 두통, 발진, 근육통, 림프절증등의 증상을 나타내고 분포는 동남아 지방, 태평양 제도, 호주 북부, 뉴우기니, 그리이스 등이다. 뎅기 2형 (DEN-2)은 뉴우기니 C주 (New Guinea C strain)이며 증상은 뎅기 1형과 같은 발열형이고 열대 지방에 분포한다. 뎅기 3형 (DEN-3)은 필리핀에서 분리된 H-87주이며, 발열, 두통, 근육통, 허탈, 출혈 증세를 나타내며 분포는 필리핀, 인도, 동남아시아 지방이다. 뎅기 4형 (DEN-4)은 H-241주이며, 감염 증상은 뎅기 3형과 비슷한 출혈열형이고 분포는 필리핀, 인도 등이며 다른 혈청형에 의하여 재감염된다[29].

우리나라 국립보건원의 뎅기열에 대한 법정전염병 실험실 진단지침에서는 첫째 세포배양법으로 C6/36 세포를 이용한 검체에서 바이러스 분리, 둘째 혈청학적 검사로 CF, PRNT, IFA, MAC-ELISA, IgG capture ELISA 등의 방법을 이용하여 검체에서 IgM 항체 검출 혹은 급성기와 회복기 혈청에서 IgG 항체가 4배 이상 상승, 셋째 분자생물학적 방법으로 혈액, 뇌척수액 등에서 RT-PCR에 의한 뎅기 바이러스 유전자 검출을 제시하고 있다.

뎅기 바이러스 감염을 진단하기 위한 혈청학적 방법들에서 *HI* 검사법은 조작이 용이하고 민감도가 우수하여 가장 보편적으로 사용하지만 HI 항체는 오랜 기간 (48년까지나 그 이상) 존재하기 때문에 혈청역학적 조사에 유용하고[10], CF 검사법은 조작이 어려워 숙련된 검사자를 요구되므로 뎅기 진단 검사에 광범위하게 이용되지는 않지만 일반적으로 CF 항체는 HI 항체보다 늦게 생성되고 짧은 기간 동안 존재하므로 1차 감염에서 더 특이성 있어 유용한 검사법이다[8]. 한편 NT 검사법은 뎅기열의 혈청학적 검사에 있어 높은 특이도와 민감도를 갖는 방법으로 혈청을 희석하여 플라크 감소를 검사하는 PRNT가 가장 일반적인 방법이다[23]. 그러나 NT는 고비용과 긴 검사시간 그리고 기술적으로 어렵다는 단점과 2차와 3차 감염에 대해서는 적합하지 않다[14]. MAC-ELISA는 많은 장비가 필요하지 않으면서 간단하고 신속하여 가장 광범위하게 사용되고 있지만 혈청형을 구별할 수 없다는 단점도 있다[17]. 최근 뎅기 바이러스 감염을 진단하기 위한 분자생물학적 방법은 단일 시험관 내 다중 역전사 중합효소 연쇄반응으로 뎅기 바이러스를 급성기 혈청 하나만을 가지고 저비용으로 신속하게 검사할 수 있으며, 또한 우수한 민감도와 특이도를 나타낸다[11,12].

현재 한국에서 뎅기열은 법정전염병 제4군으로 분류되어 관리되고 있으며, 국내 감염은 없으나 해외에서 감염되어 귀국 후 발병되는 해외 유입 질병으로 분류되고 있으며, 1995년과 2000년에 아프리카 케냐와 아시아 스리랑카에서 발병하여 유입된 예를 각각 1건씩 보고하고 있으나 진단은 싱가포르와 일본에서 ELISA, *HI*와 IFA 등으로 진단되어 보고되었다[16,18].

본 연구에서는 사업과 여행을 목적으로 동남아 아열대 지방을 다녀온 후 발병된 뎅기열을 Den-2에 대한 IFA와 PRNT 등으로 진단하였다.

뎅기열로 의심되는 환자 중 사업차 필리핀에 다녀온 40대 남자는 6일 간격의 1차와 2차 혈청에서 IFA에 의한 형광항체가 각각 4,096과 2,048로 나타나 회복기 환자임을 시사하고 있었고, 한편 PRNT에 의한 중화항체는 모두 2,560으로 높게 나타났다. 미얀마를 여행하고 귀국한 40대 남자 길 I은 형광항체와 중화항체의 역가는 각각 512와 160으로 양성으로 나타났으나 함께 여행하고 귀국한 20대 중반 남자 길 II는 형광항체와 중화항체의 역가가 각각 16,382와 5,120으로 현저히 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 태국에서 실시한 형광항체 결과와 유사하거나 높게 나타났으며[1], Russell 등[22]의 결과와 비교해 보면 Den-2에 대한 중화항체 역가가 현저히 높으므로 Den-2일 가능성을 강력히 시사한다.

필리핀에서 체류하다 귀국한 40대 남자의 혈액상은 1차 혈액검사에서는 혈소판이 80% 감소하는 발열기에 해당하는 82로 현저한 혈소판감소증을 보였으며 6일 후 2차 검사에서는 292로 정상치 (150~350 $\times 10^6/mm^3$)로 되었으며 3차 검사에서는 약간 증가하여 383으로 나타나 회복기를 시사하고 있다. 간 기능검사에서 바이러스에 의해 간세포 손상을 나타내는 AST와 ALT는 1차와 2차 혈액검사에서 각각 86, 80과 152, 245로 현저히 상승하였으며, 3차에서 AST는 정상치 (<40 IU/L)였으나, ALT는 86으로 여전히 높게 나타났다. Hb는 세 번의 검사에서 정상치 (12~16 g/dl) 보다 약간 상승되어 나타났고, 적혈구는 1차와 2차에서 정상치 (4~5.4 $\times 10^6/mm^3$) 보다 약간 상승되어 나타났고, 백혈구는 1차에서만 3.5로 감소한 약간 백혈구감소증 상태였으며, 2차와 3차에서는 모두 정상치 (4~10 $\times 10^3/mm^3$)에 들었고, 백혈구 구성 중에서 중성구와 산성구는 모두 정상이었으나 림프구는 변형된 림프구 때문에 1차 검사에서 정상치 (20.5~51.5%) 보다 감소하였고, 바이러스에 대하여 방어하는데 중요한 작용을 하는 단핵구는 1차 검사에서 14.1로 정상치 (1.7~9.3%) 보다 현저히 상승하였고, IgE와 높은 상관관계가 있는 염기성구는 1차 검사에서 4.3으로 정상치 (0~2%) 보다 상승한 것으로 나타났다.

더불어 이들 환자에서 의심할 수 있는 국내에서 유행하는 급성 출혈성 질환인 신증후출혈열 (한탄바이러스), 리켓치아증 (쯔쯔가무시증과 발진열)과 렙토스피라증은 모두 음성으로 나타났고, 면역부전과 간장 기능과 관련된 *HIV*와 *HCV*도 음성으로 나타났다.

따라서 해외 유입 질병인 뎅기열의 신속한 진단을 위하여 혈청학적 및 분자생물학적 특징을 고려하여 진단시스템을 구축하고 또한 해외여행시 해외 토착전염병에 대해 홍보와 매개체 퇴치법을 주지시켜야 하겠다. 이밖에도 해외에서 주의를 기울여야 할 바이러스들은 열대 아프리카와 중남미에서 열대 숲모기가 매개체인 황열, 서아프리카에서 쥐 (*Mastomys* species)가 매개체인 라싸열 (lassa fever), 그리고 마버그열과 에볼라열 등은 아프리카 열대 우림지역에서 녹색 원숭이 등이 주요 감염원이므로 해외여행이나 체류시 주의를 요하고, 또한 현지 전염병 발생 상황을 주시하여야 한다.

## 참 고 문 헌


1) Boonpucknavig S, Vuttivirojana O, Siripont J, Futrakul P and Nimmannitya S (1974): Indirect fluorescent antibody technic for demonstration of serum antibody in dengue haemorrhagic fever cases. *Am J Clini Patho*, **64:** 365-371.

2) Chambers TJ, Hahn CS, Galler R and Rice CM (1990): Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol*, **44:** 649-688.

3) Chungue E, Deubel V, Cassar O, Laille M and Martin PMV (1993): Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and

genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. *J Gen Virol*, **74:** 2765-2770.

4) Deubel V, Kinney RM and Trent DW (1986): Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural protein of dengue type 2 virus, Jamaica genotype. *Virology*, **155:** 365-377.
5) Gubler DJ (1998): Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Clin Micro Reviews*, **11:** 480-496.
6) Gubler DJ and Clark GG (1995): Dengue/dengue haemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis*, **1:** 55-57.
7) Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M and Oliver A (1984): Use of mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies for routine surveillance of dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*, **33:** 158-165.
8) Gubler DJ and Sather GE (1988): Laboratory diagnosis of dengue and dengue haemorrhagic fever, In A. Homma and J. F. Cunha (ed.), Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue. pp. 291-322.
9) Guzman MG and Kouri G (1996): Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, **3:** 621-627.
10) Halstead SB (1974): Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg*, **23:** 974-982.
11) Harris E, Lopez M, Arevalo J, Bellatin J, Belli A, Morgan J and Orrego O (1993): Shorts courses on DNA detection and amplication in Central and South America: the democratization of molecular biology. *Biochem Educ*, **21:** 16-22.
12) Haris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E and Balmaseda A (1998): Typing of dengue viruses clinical specimens and mosquitoes by one-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clini Micro*, **36:** 2634-2639.
13) Igarashi A (1978): Isolation of Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J Gen Virol*, **40:** 530-544.
14) Kuno G, Gubler DJ and Oliver A (1993): Use of original antigenic sin theory to determine the serotypes of previous dengue infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **87:** 103-105.
15) Kurane I, Rothman AL, Livingston PG, Green S, Gagnon SJ, Janus J, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A and Ennis FA (1994): Immunopathologic mechanism of dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol*, **9:** 54-64.
16) Kwon SR, Cho BK, Yoon SJ, Cho YB, Kim IK and Park BJ (2000): A case of dengue hemorrhagic fever imported from Africa. *Kor J Infec Dis*, Vol 32 No **6:** 467-469.
17) Lam SK, Devi S and Pang T (1987): Detection of specific IgM in dengue infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **18:** 532-538.
18) Lee CJ, Kim HR and Kim MJ (1995): A case imported dengue hemorrhagic fever. *Kor J Infec Dis*, Vol 28 No **4:** 403-406.
19) Mackow E, Makino Y, Zhao B, Zhang YM, Markoff L, Buckler-white A, Guiller M, Chanock R and Lai CJ (1987): The nucleotide sequence of dengue type 4 virus; analysis of gene coding for non-structural proteins. *Virology*, **159:** 217-228.
20) Nelson ER (1960): Haemorrhagic fever in children: report of 69 cases. *J Pediat*, **56:** 101-108.
21) Pongphanich B and Kumponpant S (1973): Studies of dengue haemorrhgic fever. V. haemodynamic studies of clinical shock associated with dengue haemorrhagic fever. *J Pediat*, **83:** 1073-1077.
22) Russell PK and Nisalak A (1967): Dengue virus Identification by the plaque reduction neutralization test. *J Immunol*, **99:** 291-296.
23) Russell PK, Nisalak A, Sukhavchana P and Vivina S (1967): A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol*, **99:** 285-290.
24) Sabin AB (1952): Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*, **1:** 30.
25) Suvatte V (1978): Dengue haemorrhagic fever. haematological abnormality and pathogenesis. *J Med Assoc Thai*, **61**(Suppl)**:** 53-58.
26) Tuchinda P (1973): Haemorrhagic fever in Thailand: physiologic derangement. *J Med Assoc Thai*, **56:** 1-5.
27) Vorndam V and Kuno G (1997): Laboratory diagnosis of dengue virus infections, In Gubler DJ and Kuno G (ed.), Dengue and dengue haemorrhagic fever-1997. DAB International, London, United Kingdom. pp. 313-334.
28) Wells RA (1980): Kinetics of peripheral blood leucocyte alterations in Thai children with dengue haemorrhagic fever. *Inf Immunol*, **28:** 428-433.
29) Westaway EG and Blok J (1997): Taxonomy and evolutionary relationships of flavivirus, In Gubler DJ and Kuno G (ed.), Dengue and dengue haemorrhagic fever. CAB International, United Kingdom. pp. 147-173.
30) World Health Organization (1980): Technical guides for diagnosis, treatment, surveillance, prevention, and control of dengue haemorrhagic fever. World Health Organization, Geneva.