2013年世界卫生组织西太平洋区域登革热诊断第一轮外部质量评估

Kwoon Yong Pok[a*]，Raynal C Squires[b*]，Li Kiang Tan[a]，Tomohiko Takasaki[c]，Sazaly Abubakar[d]，Futoshi Hasebe,[e] Jeffrey Partridge[b]，Chin Kei Lee[b]，Janice Lo[f]，John Aaskov[g]，Lee Ching Ng[a]和Frank Konings[b]

通讯作者：Frank Konings（邮箱：koningsf@wpro.who.int）。

目的：准确的实验室检测是开展登革热疾病监测和控制的关键因素。本项目的目的是评估世界卫生组织（WHO）西太平洋区域的国家级公共卫生实验室登革热诊断能力。

方法：19个国家级公共卫生实验室完成了能力测试平板的常规登革热诊断试验，测试平板包括2项内容：第一项内容为含有培养的登革热病毒的商业血清样品，用来检测核酸和非结构蛋白1（NS1）（项目A），第二项内容包含人血清样品，用于检测抗登革热病毒抗体（项目B）。另外，还对后勤安排进行了检查审核。

结果：所有16个进行项目A测试的实验室均使用逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）完成了RNA和血清型的检测。其中，15个实验室的RNA检测结果正确，16个实验室病毒血清分型全部正确。所有进行NS1抗原检测的9个实验室都获得正确结果。在项目B测试中，有18个实验室使用了IgM检测方法，其中16个实验室获得正确结果，13个使用IgG试验方法的实验室全部获得正确结果。在参加评估的19个实验室中，有15个实验室可以使用分子学（RT-PCR）和血清学（IgM）两种方法对持续的/近期的登革热病毒感染进行检测。

讨论：在WHO西太平洋区域成功地完成了对国家级公共卫生实验室的第一轮登革热诊断能力的外部质量评估，本次评估显示了这些实验室在分子和血清学检测方面的良好能力。在以后的评估中，将会对登革热病毒和本地区其它重要病原体进行更复杂的诊断能力测试。

登革热是一种蚊媒病毒性感染，具有较高的发病率和死亡率，可由4种紧密相关的病毒血清型（DENV-1，-2，-3，和-4）中任何一种导致感染，这4种血清型在世界卫生组织（WHO）西太平洋区域都有流行[1,2]。登革热临床表现多样，并不特异，这可能会影响临床诊断。感染登革热后大多数人（～75%）为隐性感染者，但是有症状的患者中会有一小部分人发生严重的登革热，其特点是快速发展为休克、严重出血和/或多器官损伤，如果未引起注意或处置不当可导致死亡[2,3]。

在西太平洋区域，由于受到病毒、媒介和宿主生物学、气候和社会经济因素、以及国际旅游和贸易等众多因素相互作用的影响[1,4–7]，很多国家每年都会发生登革热暴发。在西太平洋区域内，登革热监测使用不同的病例定义，有些国家（例如新加坡，澳大利亚）只包括实验室确诊病例，而其他国家则包括所有的临床诊断病例，其中只有一部分（例如儿科患者）病例进行实验室确诊。2013年，暴发导致老挝人民民主共和国发生44 098例登革热病例，马来西亚发生39 222例病例，新加勒多尼亚发生10 548例病例，新加坡发生22 170例病例[8,9]。对新加坡、马来西亚以及后来斐济（至2014年4月22日已经超过20 000例）发生的暴发进行分析，结果显示登革热病毒的血清型与前一年的类型有所不同[10,11]。研究显示第二次感染不同的血清型预示将出现更多的登革热病例和重症登革热病例[12]，这就是我们关注在人群中开展流行血清型监测的原因。

准确的实验室检测是开展登革热监测和控制的关键因素。在急性感染阶段，检测主要是针对登革热病毒（DENV）RNA和/或病毒非结构蛋白1（NS1），而在恢复期阶段，诊断则主要针对抗DENV IgM抗体和/或高滴度的IgG抗体。目前有一些登革热商业诊断试剂盒供使用，这些试剂盒使用逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）检测DENV RNA或确定血清型，或者检测NS1，或登革热病毒IgG和IgM。实验室为了保持诊断的准确性和质量，通常采用外部质量评估（EQA）或能力

[a] 新加坡国家环境署环境健康学院，世界卫生组织虫媒病毒和相关媒介研究和参比合作中心。
[b] 菲律宾马尼拉世界卫生组织西太平洋区域办公室，卫生安全和应急处，新发疾病监测和应对组。
[c] 日本东京国家传染病研究院。
[d] 马来西亚吉隆坡马来西亚大学医学院，医学微生物部，热带传染病研究与教育中心，世界卫生组织虫媒病毒研究和参比合作中心（登革热/重症登革热）。
[e] 日本长崎市长崎大学，世界卫生组织热带和新发病毒病研究和参比合作中心。
[f] 中国香港特别行政区卫生署，卫生防护中心，公共卫生实验室服务部。
[g] 澳大利亚布里斯班昆士兰科技大学，健康和生物创新学院，世界卫生组织虫媒病毒研究和参比合作中心。
[*] 两位作者对撰写本文有同等贡献。

投稿日期：2015年2月23日；发表日期：2015年6月30日
doi: 10.5365/wpsar.2015.6.1.017

测试的方式，即由外部机构向实验室发放盲样进行检测，然后对实验室进行验证并报告结果。通过EQA可以比较实验室的水平，发现与诊断试剂或操作程序有关的潜在问题，找出实验室需要改进的方面，并识别出培训需求[13]。

在2010亚洲太平洋新发传染病策略（APSED）框架下，WHO西太平洋区域办公室在2013年启动了一项针对登革热诊断检测的EQA[14]。本次EQA主要根据WHO流感EQA[15]制定，通过能力测试来评估国家级公共卫生实验室使用分子和血清学方法检测DENV核酸、NS1抗原和抗-DENV抗体的水平。据提议该EQA将每年开展一次、对实验室是免费或低成本的、并将逐渐包括其他病原体。此外，为确保登革热诊断的准确性，EQA项目也将参加的实验室和国际参比实验室联系起来，国际参比实验室能够根据需求给予更专业的诊断或分析。

本文的目的是总结2013年WHO西太平洋区域开展的登革热诊断第一轮外部质量评估情况。

方法

参加的实验室

本次EQA共邀请了19个国家级公共卫生实验室，他们来自WHO西太平洋区域的18个国家和地区（其中越南有2个），这些国家和地区均为登革热流行区或发现有输入性病例，所有的19个实验室都同意参加（图**1**）。2013年5月—7月期间，向这些实验室分发了一份EQA测试样本平板。

EQA样本平板的准备

WHO虫媒病毒及相关媒介研究和参比合作中心位于新加坡国家环境署环境健康所内，被选作EQA的提供者，因为其具有必备的专业技术能力，拥有样本和所需的资源。

2013年登革热诊断EQA的样本平板有2项内容（A和B），包含了灭活的DENV血清（项目A）和来自登革热病例的血清样本（项目B）（表**1**）。所有的样本已经过热灭活，检测不到HIV，乙肝表面抗原或丙肝病毒抗体。

在项目A中，样本A2013-V01和A2013-V03每毫升中包含至少106个试管内培养的不同血清型登革热病毒的RNA拷贝——基因型III的DENV-1和进化分支里的第二集群的DENV-2，它们在基因库（Genbank）中的标识码分别为KP685233和KP685236。它们被稀释在无病原体的人血清中（美国马萨诸塞州米尔福德SaraCare生命科学公司）。使用商业登革热NS1试剂盒确认样本中含有NS1抗原，通过接种细胞盲传三代后证明热灭活之后的病毒无感染性。通过实时RT-PCR[16]和商用登革热NS1试剂盒确认样本A2013-V02（只有血清）为DENV阴性，并使用商业酶联免疫吸收试验（ELISA）和空斑减少中和试验（PRNT）[17]确认该样本为抗登革热抗体阴性。

在项目B中，样本B2013-S01和B2013-S02是来自同一名登革热恢复期患者分离的血清样品，目的是评估参评实验室检测的可重复性。使用PRNT方法确认这些样本含有DENV 1–4型的中和抗体（>1:1000），以及确认样本中DENV为阴性。使用一些商业登革热抗体检测试剂盒（美国马萨诸塞州沃尔瑟姆Alere公司；大韩民国京畿道龙仁市标准诊断公司；美国加利福尼亚州赛普拉斯焦点诊断公司；美国加利福尼亚州赫拉克勒斯伯乐实验室公司）对标本进行了额外的验证试验。使用SeraCare公司的人血清样本作为阴性样本B2013-S03。

所有的EQA样本在被分发到参加的实验室之前，由一家独立的国际标准化组织（ISO）15189认证的实验室进行了外部确认。

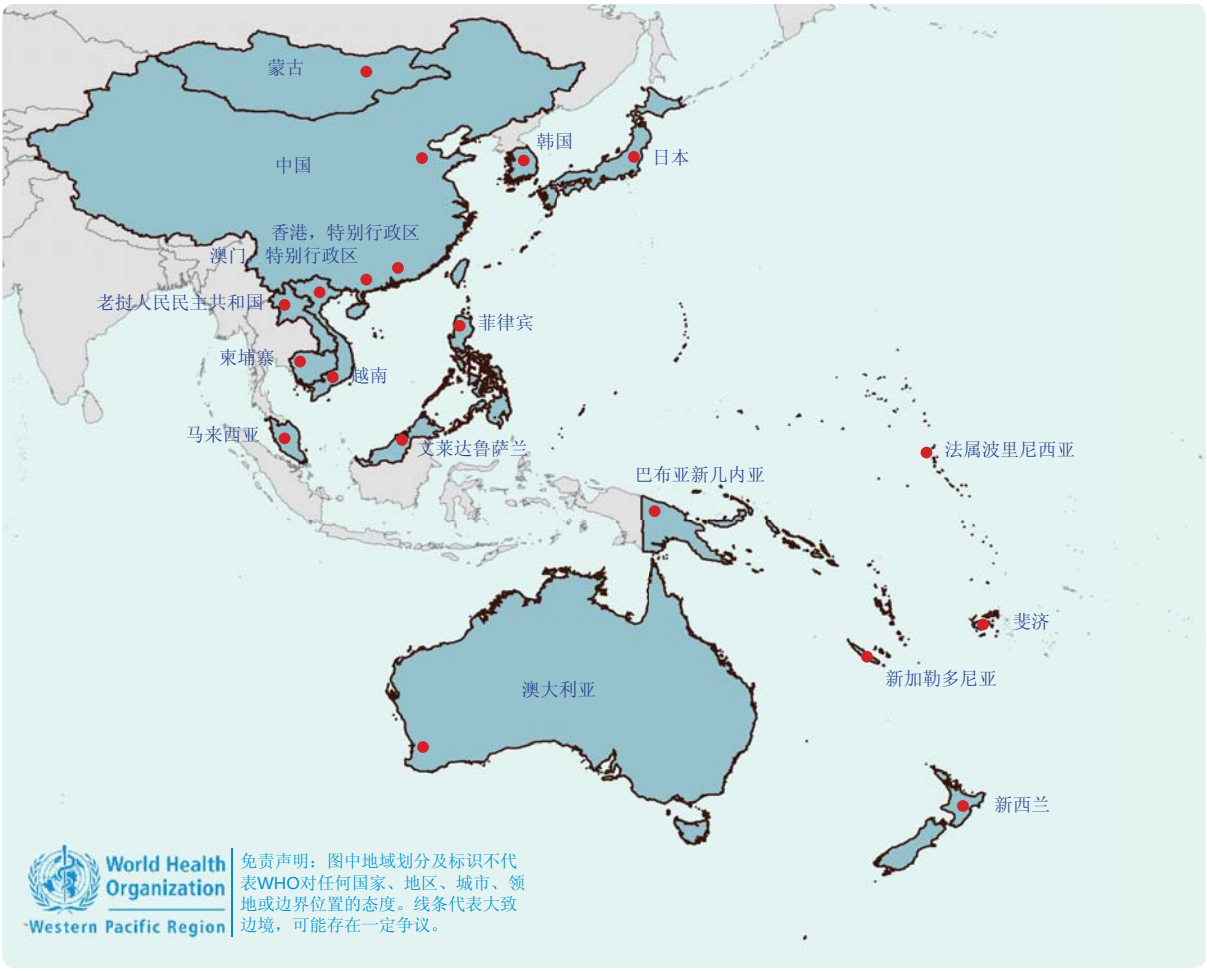
参加评估的实验室可以要求EQA提供者通过快递发送干冰保存的一个或两个测试样本平板。同时也要求实验室在收到测试平板时告知EQA提供者，并报告样本到达时是否仍处于冷冻状态。为参加评估的每个实验室提供了唯一的识别码、指导说明和结果提交表格、良好实验室操作调查和运输质量以及反馈表。要求参加者使用本实验室常规的检测方法采用一式三份独立运行的形式（以评估可重复性）检测样本，并提交使用的方法、设备和试剂等背景技术信息。要求在30天之内提交检测结果。

结果分析

在项目A中，使用RT-PCR或者NS-1方法正确检测到DENV或者准确进行DENV血清分型者均得2分。在项目B中，正确检测到抗—DENV IgG和IgM抗体每项均得2分。使用有效期内的试剂额外得3分。仅根据每个样本的检测完成情况进行评分。最终的评分是实际得分占可能最大总得分的比例。每项试验（例如血清分型）的准确性被定义为该项试验得分为100%的实验室所占的比例。

使用提交的定量数据（RT-PCR循环阈值数值和ELISA值）作为参照，并评估实验室结果的可重复性。对于ELISA试验，使用三个重复试验的值计算变异百

图1. 2013年西太平洋区域参加登革热诊断EQA的国家级公共卫生实验室



SAR，特别行政区。

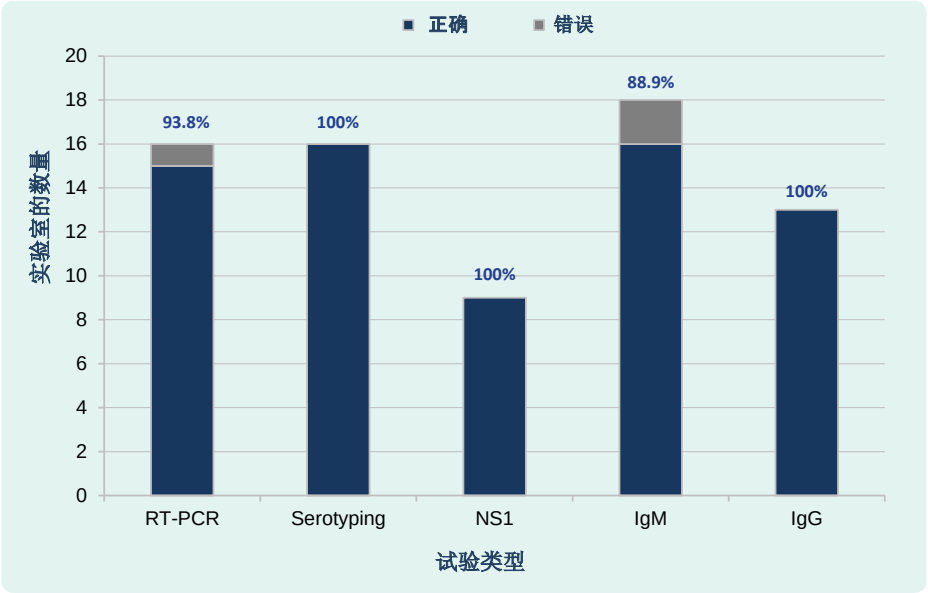
表1. 2013年WHO西太平洋区域登革热诊断EQA使用的样本平板内容特征

项目	样本编号	内容物	血清型	抗体
病毒RNA/NS1抗原（项目A）	A2013-V01	血清中灭活的登革热病毒	DENV-2	–
	A2013-V02	只有血清	不适用	–
	A2013-V03	血清中灭活的登革热病毒	DENV-1	–
抗体（项目B）	B2013-S01*	恢复期血清	–	IgM, IgG
	B2013-S02*	恢复期血清	–	IgM, IgG
		阴性的人类血清	–	阴性对照

* B2013-S01和B2013-S02样本是从一名近期康复的登革热患者体内采集的相同样本，用来评估实验室结果的可重复性。

ID，编号；NS1，非结构蛋白1。

图2. 2013年WHO西太平洋区域登革热诊断EQA中，按照检测方法和结果分类的实验室比例



NS1，非结构蛋白1；RT-PCR，逆转录聚合酶链反应；serotyping，血清分型。

分比系数（CV），用于评价结果的可重复性。使用≤15%CV为限值[18]，该限值反映了生产厂商关于商业ELISA试剂盒伴随产品插件的内部/外部样本变异的指南。在发给每家实验室的评估报告中，对较大的变异进行了标注以引起注意。

结果

实验室的登革热诊断能力

实验室最常使用的方法是抗-DENV IgM ELISA检测；18个开展该试验的实验室中，有16个实验室在所有的样本中都检测到IgM（2个实验室仅在1份血清分离的样品中检测到IgM），这项试验的总体准确度达到88.9%（图**2**）。

16个实验室使用RT-PCR进行核酸检测。由于一个实验室对项目A的阴性样本检测结果报告为可疑，因此RT-PCR的总体准确性为93.8%。16个实验室也进行了病毒血清分型，准确性为100%（图**2**）。有1个实验室只进行了RT-PCR，而另一个实验室使用过期的试剂进行RNA检测，尽管这对准确性没有影响。15个能开展RT-PCR和抗-DENV IgM ELISA检测的实验室显示出具有发现持续或最近发生登革热感染的能力。

检测抗-DENV IgG和NS1抗原是第二常见的试验方法，有13个实验室检测抗-DENV IgG，有9个实验室检测NS1抗原，两种试验方法的准确性均为100%（图**2**）。能开展所有5项试验（PT-PCR，血清分型，NS1，IgM和IgG检测）的实验室共有7个，每项试验的准确度均为100%。

项目A：病毒RNA和NS1抗原

在项目A测试中使用RT-PCR的实验室中，大多数（11/16）使用QIAmp病毒RNA迷你试剂盒（美国加利福尼亚洲巴伦西亚凯杰试剂盒）来提取和纯化DENV RNA，使用商业试剂盒进行RT-PCR检测。超过一半（56.3%）的实验室使用实时RT-PCR方法，其他的实验室则使用传统的RT-PCR方法（表**2**）。对项目A的阴性样本检测结果报告为可疑的实验室使用的是实时检测方法。大多数实验室（87.5%）使用内部阳性对照进行病毒检测和血清分型。用于病毒检测和血清分型的DENV基因区域不同，最常使用的是非结构蛋白5和衣壳区域。为了检测NS1抗原，9个实验室中的7个使用Platelia登革热NS1抗原试剂盒（Bio-Rad实验室有限公司。），一个实验室使用SD登革热NS1抗原ELISA（标准诊断有限公司），另一个实验室使用内部酶联免疫吸附法。

在使用商业ELISA试剂盒进行一式三份检测NS1的7个实验室中，3个实验室显示了不同检测间的可重复性较低（CV达到30%）。尽管对最后的结果解释没有影响，但是较大的CV变异提示需要更严格地遵守操作程序。

项目B：血清学

所有要求检验项目B的18个实验室都选择ELISA方法检测抗-DENV IgM（表**2**）。一半实验室使用Panbio登革热IgM捕获ELISA（Alere公司），其中2个实验室也使用了快速诊断实验（Panbio登革热双重试剂盒，Alere公司）。有2家仅在1份标本中检测到抗-DENV IgM的

表2. 2013年WHO西太平洋区域登革热EQA中，使用不同试验类型的实验室数量和比例

试验类型	数量/合计	%
病毒核酸检测（RT-PCR）	16/19	84.2
实时RT-PCR方法	9/16	56.3
传统RT-PCR方法	7/16	43.8
商业RT-PCR试剂盒	11/16	68.8
内部RT-PCR对照	14/16	87.5
病毒抗原检测（NS1）	9/19	47.4
商业NS1 ELISA试剂盒	8/9	88.9
抗体检测	18/19	94.7
IgM抗体检测	18/18	100.0
ELISA方法	18/18	100.0
商业IgM ELISA试剂盒	15/18	83.3
IgG抗体检测	13/18	72.2
ELISA方法	11/13	84.6
商业IgG ELISA试剂盒	11/11	100.0

ELISA，酶联免疫吸附试验；NS1，非结构蛋白1； RT-PCR，逆转录聚合酶链反应。

实验室分别使用了内部IgM MAC-ELISA方法和商业登革热IgM ELISA试剂盒（德国吕贝克欧蒙公司），其他实验室都没有使用这两种方法。ELISA也是作为检测抗-DENV IgG的方法，13个实验室中有11个（84.6%）使用商业间接ELISA和/或高滴度IgG捕获ELISA试剂盒，另外2个实验室使用了内部DENV红细胞凝集抑制试验。

参加的实验室在项目B测试中展示了可重复的IgG试验结果（平均CV≤15%）；然而，三分之一的实验室在进行IgM检测时，标本间的CV超过30%。其中包括对血清样本检测结果错误的2家实验室。

后勤

多数（17/19）实验室在指定的一个月内反馈了结果；接到样本到完成结果的平均时间为27.8天。有一个实验室的结果报告延迟了5天，另一个实验室由于等待试剂运送，因此要求延长了13天。在运送样本平板到各个实验室的过程中没有大的后勤问题；所有的样本都是在冷链完好情况下准时到达。航班时间都提前进行告知，标本递送也很准确，以确保有实验室人员接收标本，并避免在国家节假日或周末期间递送和接收标本。

在寄送样本平板之前的准备工作中，获取各国政府或相关部门的标本准入许可花费了大量时间。有11个实验室要求必须有许可。获得这些许可的中位时间为1.5个月（范围为1周至2.5个月）。只有一个实验室有长期有效的进口许可。由于一些参加评估的实验室必须通过政府卫生部/卫生部门等渠道招募，而不能直接与他们联系，所以EQA的时间进度也被延长，最长的招募过程达1.5个月。

讨论

本研究报告了西太平洋区域国家级公共卫生实验室登革热诊断能力的EQA项目。该报告展示了这些参评实验室对登革热样本的诊断能力，也显示了这些实验室所使用的诊断登革热的方法。本研究也促进了国家级实验室和WHO虫媒病毒及相关媒介研究与参比合作中心之间的交流，这对将来的公共卫生突发事件应对是非常有帮助的。

为保证最有效的诊断能力，必须在合适的时间使用恰当的的登革热诊断工具[19]。因此，国家/参比实验室配备检测DENV RNA/NS1抗原和抗-登革热抗体的设备是非常重要的。在19家实验室中，有15家同时使用DENV RNA检测和抗-DENV IgM检测两种方法作为持续/最近登革热感染的常规诊断流程，这是令人鼓舞的。另外4家实验室中，有1家能进行RT-PCR但不能进行抗体检测，有3家实验室能进行抗体检测但不能进行RT-PCR。这些实验室的诊断能力可以通过使用商业ELISA试剂盒检测NS1抗原或抗-DENV抗体而得到快速提高。

所有18家进行项目B测试的实验室都开展了抗-DENV IgM检测。他们最常使用的方法是商业ELISA试剂盒检测抗-DENV IgM，大多数实验室对几乎所有样本都提交了准确和可重复的结果。抗-DENV IgM检测结果报告的不一致性可能是由于操作问题所致（例如对ELISA不熟悉，没有严格遵守操作程序，试剂处理技术和移液技巧不熟练等）。有3家实验室使用了内部ELISA试验，其中1家实验室报告了错误结果。尽管内部ELISA试验可能比较经济，但必须要优先考虑试验的有效性、试剂的质量以及正确的培训工作人员。如预期所示，国家级实验室中很少使用登革热快速诊断实验。

18家参与项目B测试的实验室中，13家也开展了抗-DENV IgG检测，他们使用了2种商业抗-DENV IgG ELISA方法；有4家实验室使用了适用于检测持续/近期感染的高滴度IgG ELISA，6家实验室使用了低滴度IgG ELISA检测既往的登革热感染（例如在血清流行状况研

究中），有1家实验室两种方法都使用。在登革热地方性流行区，使用高滴度IgG ELISA方法检测急性期血清标本可以区分原发性和继发性登革热感染；然而，低滴度ELISA则没有诊断价值，除非它与IgM ELISA联合使用。IgM单独存在高度提示持续/近期感染，但是登革热感染后检测到低滴度的IgG的情况则可不定期地发生。由于国家实验室更有可能检测来自持续/近期感染的样本，这可能就是国家级实验室更多地使用IgM试剂盒的原因。一些不检测抗-DENV IgG的实验室报告说这样做是因为他们没有IgG试剂盒或不常规检测IgG。

可重复性也是EQA的一项重要内容。在一些参加项目B测试的实验室中，看到了检测结果之间的较高变异（≥15%CV），尤其是有2家实验室错误地诊断了项目B中的血清样本。这一点强调了为了保证试验结果的准确性和可重复性，使用经过验证试验、遵守标准操作程序以及对实验室技术人员持续开展培训的重要性。由于使用的样本数量较小（2份样本一式三份检测，每个实验室只能得到6个数据点），限制了对计算结果的解释；但是，该结果已经显示出检测结果的变异以及潜在的操作问题，这也是本次研究开展的目的。参与诸如EQA这类的评估审核，对于实验室明确自己需要改进的领域是非常有用的。

参加的实验室使用血清学和分子检测方法诊断登革热均具有较高的准确性，这一点与欧洲“输入性”病毒病诊断网络（ENIVD）最初的4个样本测试平板进行血清学检测的结果类似，但是与欧洲的20个样本的EQA样本平板检测结果却不一致，欧洲EQA中有79%的参评实验室在正确检测抗-DENV抗体方面需要改进[20]。同样，近期开展的针对DENV分子检测的ENIVD EQA结果发现，有80.4%的实验室需要在识别登革热和非登革热样本以及血清型方面进行改进[21]。与我们本次EQA相比，他们那次参评实验室来自的国家没有登革热本地流行，样本包括了不同浓度的DENV或者患者血清，而且对照是其他虫媒病毒或其抗血清。在西太平洋区域即将要进行的下一轮EQA中，样本平板将包括更多的登革热血清型和不同的滴度范围，也将包括本区域其它重要的虫媒病毒。

尽管未遇到大的后勤问题，EQA也按照预期正常进行，但是我们仍然学到了重要的管理经验。获得进口许可以及通过政府渠道招募实验室所导致的时间延误是未预料到的问题。因此，在将来的EQA中可能会在这些环节上安排更多的时间。

本次第一轮登革热诊断的EQA也存在一些局限性。每个检测项目包括3份样本，这就限制了用于评价试验可重复性的盲样样品的多样性。测试平板的尺寸大小也限制了不能包括其他虫媒病毒或针对它们的抗血清，以及不能包括多个滴度的病毒用来确定试验的灵敏度。然而，本次第一次EQA的目的是获得本区域登革热诊断检测能力的初步概况。本文展示的这些发现需要在将来的EQA中使用更复杂的样本平板进一步证实。

本次第一轮西太平洋区域EQA显示了使用现有的流感EQA项目可促进对另一种重要病原体开展EQA。尽管检测样本的数量较少，但是这次的评价结果显示了西太平洋区域实验室诊断登革热的能力较好，为后续的安排提供了经验。这种针对登革热的持续开展的EQA项目随着其测试范围进一步扩大到其他重要病原体，必将增强该地区公共卫生实验室系统检测新发传染病的能力，这一点与APSED（2010）是一致的。

利益冲突

无。

资金

本项目大部分资金由美国国际新发大流行威胁发展项目的IDENTIFY计划提供支持。

致谢

我们感谢参与外部质量评估（EQA）的国家级公共卫生实验室，感谢帮助获得登革热抗体阳性血清样本的新加坡陈笃生（Tan Tock Seng）医院的Leo Yee Sin教授。我们也向对本文进行批判式阅读的Sandy Walker表示感谢。

参加实验室的清单

QEII医学中心，PathWest医学实验室（澳大利亚）；卫生部实验室服务局（文莱达鲁萨兰）；柬埔寨巴斯德研究所（柬埔寨）；中国疾病预防控制中心，国家病毒病预防控制所（中国）；斐济传染病控制中心（斐济）；Louis Malardé研究所（法属波里尼西亚）；公共卫生实验室中心，病毒学部门（中国香港特别行政区）；国家传染病研究所，病毒学1部（日本）；韩国国家卫生研究所，虫媒病毒部门（大韩民国）；国家实验室和流行病学中心（老挝人民民主共和国）；卫生局公共卫生实验室（中国澳门特别行政区）；马来亚大学医学微生物学研究所（马来西亚），卫生部国家人兽共患病中心（蒙古）；新加勒多尼亚巴斯德生物医学研究实验室（新加勒多尼亚）；环境科学和研究所，临床病毒学部门（新西兰）；巴布亚新几内亚医学研究所，环境和新发疾病部门（巴布亚新几内亚）；热带医学研究所，病毒学部门（菲律宾）；国

家卫生和流行病学研究所，病毒学部门，以及胡志明市巴斯德研究所，虫媒病毒实验室（越南）。

引用本文地址：

Pok et al. First round of external quality assessment of dengue diagnostics in the WHO Western Pacific Region, 2013. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2015, 6(2):73–81. doi:10.5365/wpsar.2015.6.1.017

参考文献

1. Arima Y et al. Epidemiologic update on the dengue situation in the Western Pacific Region, 2012. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2015, 6(2). doi:10.5365/wpsar.2014.5.4.002
2. *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva, World Health Organization, 2009 (http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf, accessed 17 June 2015).
3. Bhatt S et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 2013, 496:504–507. doi:10.1038/nature12060 pmid:23563266
4. Lee KS et al. Dengue virus surveillance in Singapore reveals high viral diversity through multiple introductions and in situ evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012, 12:77–85. doi:10.1016/j.meegid.2011.10.012 pmid:22036707
5. Ritchie SA. Dengue vector bionomics: why *Aedes aegypti* is such a good vector. In: Gubler DJ, Ooi EE, Vasudevan S and Farrar J, eds. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Oxfordshire, CABI. 2014, 455–480. doi: 10.1079/9781845939649.0455
6. Banu S et al. Dengue transmission in the Asia-Pacific region: impact of climate change and socio-environmental factors. *Tropical Medicine & International Health*, 2011, 16:598–607. doi:10.1111/j.1365-3156.2011.02734.x pmid:21320241
7. Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *The Medical Clinics of North America*, 2008, 92:1377–1390, x. doi:10.1016/j.mcna.2008.07.002 pmid:19061757
8. *Dengue Situation Update – 25 December 2013.* Manila, World Health Organization Regional Office for the Western Pacific, 2013 (http://www.wpro.who.int/entity/emerging_diseases/Dengue.Biweekly.24Dec2013.pdf, accessed 17 June 2015).
9. *Communicable Disease Surveillance in Singapore 2013*. Singapore, Ministry of Health, 2014 (https://www.moh.gov.sg/content/moh_web/home/Publications/Reports/2014/communicable-diseases-surveillance-in-singapore-2013.html, accessed 25 June 2015).
10. Governments of Malaysia and Singapore. *Joint Media release: UNITEDengue cross-border data sharing provides countries with timely risk alerts*. Singapore, National Environment Agency, 2014 (http://www.moh.gov.my/index.php/database_stores/attach_download/337/573, accessed 17 June 2015).
11. *Dengue Situation Update - 22 April 2014*. Manila, World Health Organization Regional Office for the Western Pacific, 2014 (http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/Dengue.Biweekly.22Apr2014.pdf, 17 June 2015).
12. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of Virology*, 2013, 158:1445–1459. doi:10.1007/s00705-013-1645-3 pmid:23471635
13. *Laboratory quality management system*. Geneva, World Health Organization, 2011 (http://www.who.int/ihr/training/laboratory_quality/10_b_eqa_contents.pdf, accessed 17 June 2015).
14. *Asia Pacific Strategy for Emerging Diseases (2010).* Manila, World Health Organization Regional Office for the Western Pacific, 2011 (http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/documents/ASPED_2010/en/, accessed 17 June 2015).
15. *WHO External Quality Assessment Project for the detection of influenza virus type A by PCR.* Manila, World Health Organization Regional Office for the Western Pacific, 2012 (http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/external_quality_assessment_project/en/, accessed 17 June, 2015).
16. Lai YL et al. Cost-effective real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for Dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45:935–941. doi:10.1128/JCM.01258-06 pmid:17215345
17. Morens DM et al. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *Journal of Clinical Microbiology*, 1985, 22:250254. pmid:4031038
18. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: bioanalytical method validation*. Maryland, United States Department of Health and Human Services, 2001 (http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf, accessed 17 June 2015).
19. Peeling RW et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8 Suppl;S30–38. doi:10.1038/nrmicro2459 pmid:21548185
20. Donoso Mantke O et al. Quality control assessment for the serological diagnosis of dengue virus infections. *Journal of Clinical Virology*, 2004, 29:105–112. doi:10.1016/S1386-6532(03)00110-0 pmid:14747029
21. Domingo C et al. 2nd International external quality control assessment for the molecular diagnosis of dengue infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2010, 4:e833. doi:10.1371/journal.pntd.0000833 pmid:20957194