

201225068A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

水疱性口内炎ウイルスを用いたアレナウイルス感染中和抗体開発に関する  
基盤研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 谷 英樹

平成25(2013)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

水疱性口内炎ウイルスを用いたアレナウイルス感染中和抗体開発に関する  
基盤研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 谷 英樹

平成25（2013）年 3月

## 目次

I.	総括研究報告 水疱性口内炎ウイルスを用いたアレナウイルス感染中和抗体開発に関する基盤研究 谷 英樹 -----	1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	11
III.	研究成果の刊行物・別刷 -----	13

# I. 総括研究報告

総括研究報告書

水疱性口内炎ウイルスを用いたアレナウイルス感染中和抗体開発に関する  
基盤研究

研究代表者 谷 英樹 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

ヒトが罹患する出血熱ウイルス感染症は、重篤な疾患を引き起こし、致死率も高いため、ワクチン及び有効な治療法の開発が急務である。しかしながら、出血熱ウイルスの多くは生物学的封じ込めレベル4(BSL4)病原体に指定されているために、本国はもとより世界的にも研究への取り組みが難しい状況にあり、有効な治療薬の開発は進んでいない。本研究では、細胞侵入阻害薬の開発に向けての基礎研究として、ラッサ熱の原因ウイルスであるラッサウイルス、および各種南米アレナウイルスの感染を中和できるように、免疫抗原として水疱性口内炎ウイルス(VSV)を基盤としたアレナウイルスGPシュードタイプVSVを用いて、エンベロープ蛋白質(GP)に対するモノクローナル抗体の作製を試みる。本年度、ラッサウイルスのGPを外套したシュードタイプVSVを大量調整し、マウスへ免疫し、その血清に対してラッサウイルスGPシュードタイプVSVの感染阻害活性を調べた。その結果、コントロールとしてVSVGを外套したシュードタイプVSVを免疫したマウスの血清において、VSVGのシュードタイプウイルスにおける感染性は中和されたのに対し、ラッサウイルスGPシュードタイプウイルスの場合、中和活性は認められなかった。ウイルス粒子中のGPの取り込み量を比較するとVSVGに比べラッサウイルスGPは極端に少なく免疫する抗原量が問題であることが示唆された。

A. 研究目的

アレナウイルスを起因とするウイルス性出血熱は、発熱、出血、多臓器不全などを誘発し、致死率の高い重篤な

疾患として知られている。しかしながら現在まで、これらのウイルス感染症に対して治療薬をはじめ有効なワクチンや抗ウイルス剤の開発は進んで

いない。ウイルス感染症に対する効果的な治療薬としては、複製阻害剤の他、ウイルスの細胞侵入を阻害できる侵入阻害剤がある。その中でもウイルスのエンベロープ蛋白質に対する中和抗体薬は、特に出血熱ウイルス感染症のような急性期に劇症化する疾患の場合、ウイルスの生体内への感染そのものを阻止することができ、非常に効果的である。ラッサウイルスをはじめ各種南米アレナウイルスにおいては、未だ効率良くウイルスの感染を中和できるような抗体は得られておらず、治療薬としての開発が必要とされている。

本研究では、ラッサウイルスや各種南米アレナウイルスの感染を阻害できるような中和抗体の作製を試みる。この作製にあたり、本来のウイルスを抗原として用いることは本邦ではバイオセーフティー上、不可能なため、代替モデルとしてアレナウイルスエンベロープ蛋白質を外殻したシュードタイプVSVを用いる。このウイルスを抗原として用いることで、精製蛋白質よりも天然型のウイルスに近い構造を保持したエンベロープ蛋白質に対する抗体を作出することができると考えられる。これまでに、シュードタイプVSVを抗原として抗体を作製した報告例はなく、また抗体産生細胞の選別にシュードタイプVSVの感染実

験系を用いることで、直接的に中和活性のある抗体を得る可能性が高い（研究成果概要図参照）。

本研究において、各種アレナウイルスの感染を阻害できるような中和抗体が作製できれば、予防ワクチンのみならず、感染後に治療薬としても利用することができ、抗体医薬品として臨床現場においても有用性は高い。感染患者等への応用にはまだ取り組むべき課題は多いが、将来的なワクチン開発及び抗体療法確立に向けての第一歩になるものと考えられる。特に、西アフリカ等の感染流行地域においては、こうした治療法や治療薬の整備も遅れていると予想されるため、本邦から治療薬として供給することができれば、国際的な貢献度は高い。また、流行地以外での輸入感染例も世界中で見られることから、本邦においても決して対岸の火事ではなく、厚生労働行政として対策を講じておく必要性が高いと思われる。

現在、こうしたアレナウイルス種のエンベロープ蛋白質に対する抗体作製の取り組みは、世界的にもほとんど報告されておらず、感染を阻害できるような中和抗体が得られなくとも、エンベロープ蛋白質を検出できる抗体が作製できれば、アレナウイルス感染症対策に関する基礎研究の有用なツールとして活用できるだけでなく、抗

原検出のための迅速診断法への開発にも応用することが期待できる。

## B. 研究方法

### 1. 細胞

シュードタイプウイルスの作製および感染価の測定用として、ヒト腎由来293T細胞、サル腎由来COS7細胞、ヒト肝癌由来Huh7細胞を用いた。

### 2. 発現プラスミド

ラッサウイルス、フニンウイルス、チャパレウイルスおよびルジョウイルスのエンベロップ遺伝子であるGPを、発現プラスミドであるpKS336およびflagタグを付加してあるpCAG-FOSにクローニングした。DNA免疫用に大腸菌で大量培養しカラムを用いてDNA精製を行い5 mg 調整した。

### 3. シュードタイプウイルスの作製

80%コンフルエントの293T細胞にGP発現プラスミドをトランスフェクション試薬を用いてトランスフェクションし、24時間培養後、トランスフェクション効率をGFPを発現するコントロールプラスミドで確認し、親ウイルスである \*G-ΔG-GFP もしくは \*G-ΔG-Luciをmoi 3で接種する。2時間吸着後に感染しなかった親ウイルスを培地で洗浄し、24時間後に培養上清を回収する。ウイルス感染価をHuh7細胞を用いて評価した。シュードタイプウイルスの精製には、ベックマン分

離用超遠心機を用いて、20%スクロースのクッションのもと行った。濃縮・精製ウイルスは感染価を確認後、-80°Cの超低温フリーザーにて実験に用いるまで小分け保存した。

### 4. マウスへの免疫

6週齢のメスのBALB/cマウスを免疫動物として用いた。6匹1群として、それぞれラッサウイルスGP発現プラスミド免疫群、ラッサウイルスGP外套シュードタイプウイルス免疫群、プラスミドとシュードタイプウイルスを併用させる群に分け、5回免疫を行った（併用群は3回ウイルス免疫後、2回DNA免疫）。各免疫時に、尾静脈より適量採血し、感染中和活性をシュードタイプウイルスを用いて評価した。

### 5. ウイルス感染中和実験

Huh7細胞を96wellプレートに播種し、24時間前培養する。免疫マウス抗血清とシュードタイプウイルスを1時間反応させた後、細胞へ添加する。2時間反応させた後、ウイルスと抗血清を取り除き24時間培養する。その後、ウイルスの感染性をルシフェラーゼ活性を指標に評価した。

（倫理面への配慮）

アレナウイルスエンベロップ遺伝子を挿入したプラスミドの作製及び使用に関しては、第二種使用等拡散防止措置確認実験として既に文部科学

大臣へ申請・承認済みであり（平成20年6月3日付20国文科振第14号）、規定の要項を遵守して、外部への漏出には十分に留意する。また、VSVはP2レベルの取り扱い病原体であり、VSVGを欠損させたアレナウイルスシュードタイプウイルスの供与核酸もウイルスの伝達性・病原性に影響しないことを勘案し、P2レベルの拡散防止措置を執る。上記を用いた組換えDNA実験は、国立感染症研究所遺伝子組換え実験等安全管理委員会の承認を得る。また特定病原体等の取扱いは感染症法に従う。動物取り扱いに関しては、国立感染症研究所実験動物委員会の審査と承認を得て、動物愛護の精神に則り遂行する。

### C. 研究結果

本年度はラッサウイルスおよび各種南米アレナウイルスエンベロップ蛋白質（GP）を外套したシュードタイプウイルスを大量作製し、分離用超遠心機を用いてウイルスの濃縮・精製を行った。このシュードタイプウイルスへのGPの取り込み量および作製細胞内のGPの発現を確認するために、ウェスタンブロット法を行った。その結果、南米アレナウイルスGPおよびコントロールとして作製したVSVGを一過性に外套したVSVGシュードタイプウイルスはGPを効率良く大量に

取り込んでいるのに対し、ラッサウイルスGPを外套したシュードタイプウイルスにおけるGPの取り込み量は少ないことがわかった。ラッサウイルスのGPは細胞内での発現量も少なく安定性が低いことが予想された（図1）。

エンベロップ蛋白質の取り込み量が少ないながらも、この精製したラッサウイルスGP外套シュードタイプウイルスをBALB/cマウス三群に、それぞれ精製ウイルス、プラスミドDNA、精製ウイルスとプラスミドDNAを併用したパターンで五回免疫し、二週間おきに採血し、それぞれの血清中におけるシュードタイプウイルスの感染中和活性を、ウイルスの感染性を指標に測定した（図2）。その結果、コントロールとしてVSVGを外套したシュードタイプウイルスを免疫したマウスの血清において、VSVGのシュードタイプウイルスにおける感染性は99.99%以上中和されたのに対し、ラッサウイルスGP外套シュードタイプウイルスの場合、どのパターンでの免疫でも血清における中和活性は認められなかった（図3、4）。

マウスへの免疫と平行してウサギへプラスミドDNAを免疫し、ポリクローナル抗体の作製も試みた。この実験ではラッサウイルスGPの他、南米アレナウイルスの一つであるルジョウイルスGPを発現するプラスミド



DNA を複数回導入し、それぞれ対応する GP を外套したシュードタイプウイルスに対する感染中和活性を調べた。その結果、ルジヨウイルス GP に対して感染中和活性を持つ抗血清は得られたものの、マウスへの免疫と同様ラッサウイルス GP に対して感染中和活性を持つ抗血清は得られなかった (図 5、データ示さず)。

#### D. 考察

本研究では、各種アレナウイルス GP をタグを付加した発現プラスミドにクローニングすることによって、これまで細胞での発現量やシュードタイプウイルスへの取り込み量をウイルスごとに比較することが可能となった。比較した結果、他の南米アレナウイルス種に比べてラッサウイルスは GP の細胞内での発現量自体が少ないことが明らかとなった。これは、GP の安定性が低いために分解等の影響を受けて発現量が少なくなるのか、そもそも性状的に少ないのかは現時点では不明である。ただ、免疫原として用いるにあたりやはり発現量、取り込み量が高いほうが好ましく今後、改善する必要があると考えられる。また、今回平行して行った DNA 免疫でもラッサウイルス GP に対しては、期待された感染中和活性が認められず、これはマウスだけでなくウサギにおいても

同様の結果であった。一方、ウサギへの免疫では他のアレナウイルス種のルジヨウイルスに対しては、感染中和活性を持つ抗血清が得られていることから、動物種や材料、手技的な影響ではなくラッサウイルス GP の性質によるものと思われた。同じく、シュードタイプウイルスの免疫においても、コントロールとして用いた VSVG を外套したウイルスを免疫した群では非常に高い感染中和活性が認められたことから、こちらも材料や手技的な影響ではないものと考えられる。今回の結果をふまえて、来年度以降ラッサウイルス GP に関しては、発現量を高く維持させるために産生細胞を検討する。また、プロテアーゼ阻害剤などを添加して再度 GP の取り込み量の高いシュードタイプウイルスの作製を試みる。また、ラッサウイルス GP を外套したシュードタイプウイルス以外に南米アレナウイルスの代表的なウイルスであるフニンウイルスとルジヨウイルスの GP を外套したシュードタイプウイルスをマウスへ免疫し、血清中の感染中和活性の有無をそれぞれのシュードタイプウイルスを用いて評価する。活性が認められたら、脾臓細胞よりハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体の選出を行う。

#### E. 結論

本研究では、ラッサウイルスGPが他のアレナウイルス種に比べて細胞への発現およびシュードタイプウイルスへの取り込み量が少ないことが明らかとなった。これまでもラッサウイルスGPに対する抗体の作製に関しては成功例が少なく、GPそのものの性状が起因の一つであると考えられた。今後、これらのことをふまえつつ、他のアレナウイルス種のGPに対する感染中和抗体の作製も併せて取り組む予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses*. (2012). 4: 2097-2114.
2. 谷 英樹、福士秀悦、吉河智城、西條政幸、森川茂：アレナウイルス感染症 ウイルス(2013). 62: 229-238.

### 2. 学会発表

1. Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and

Shigeru Morikawa : Characterization of pseudotype VSV possessing New and Old World arenavirus envelope proteins. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Japan, 2012.

2. Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.
3. Kie Yamamoto, Koichiro Iha, Christine Bruce, Stuart D. Dowall, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Yoshiyuki Ishii, Shigeru Kyuwa, Roger Hewson, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.
4. 谷 英樹、伊波興一朗、谷口 怜、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、

森川 茂：シールドタイプ VSV を  
用いたルジョウイルスの細胞侵入  
機構の解析 第60回日本ウイルス  
学会学術集会、大阪、2012 年 11  
月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

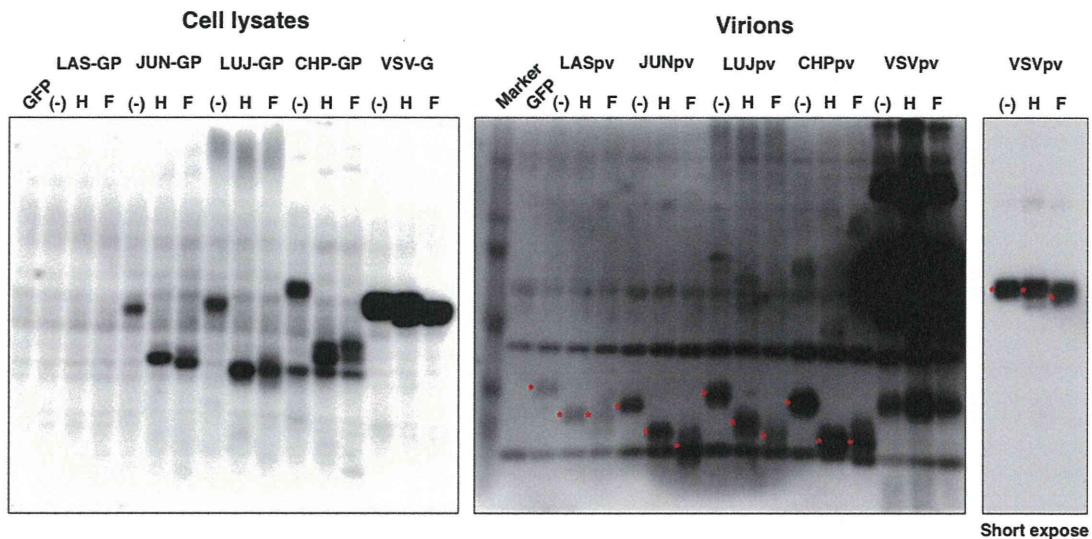
### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

図1 アレナウイルスGPの発現および粒子への取り込み量の比較



1<sup>st</sup> antibody 1:600 Anti-Flag mouse mAb, 2<sup>nd</sup> antibody 1:2000 10% SDS-PAGE

図2 免疫スケジュール

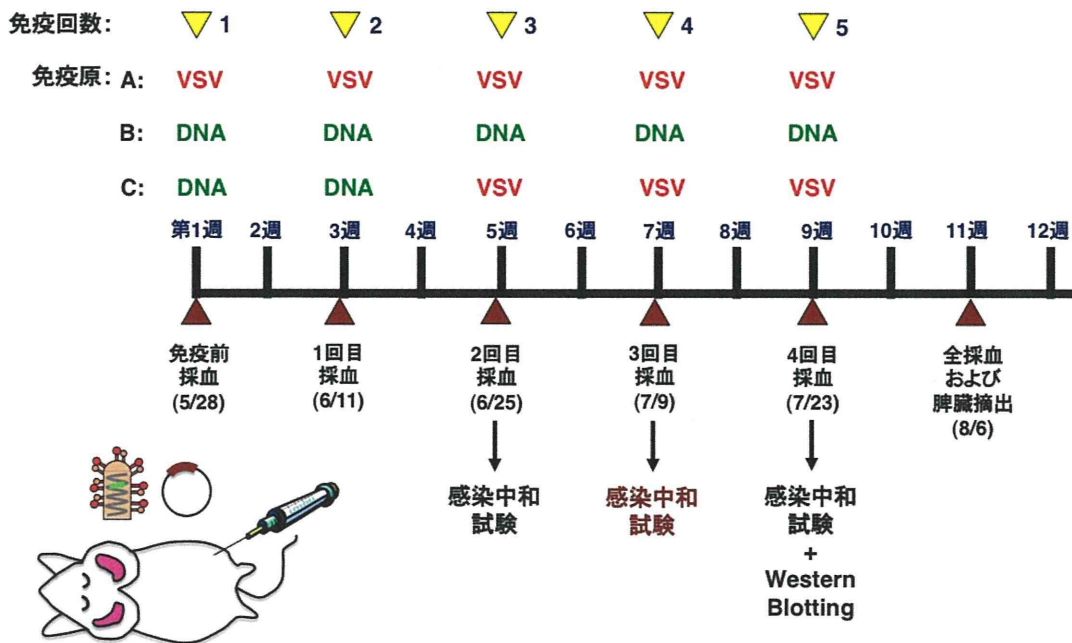


図3 免疫3回後のマウス血清によるLASpv感染の中和効果

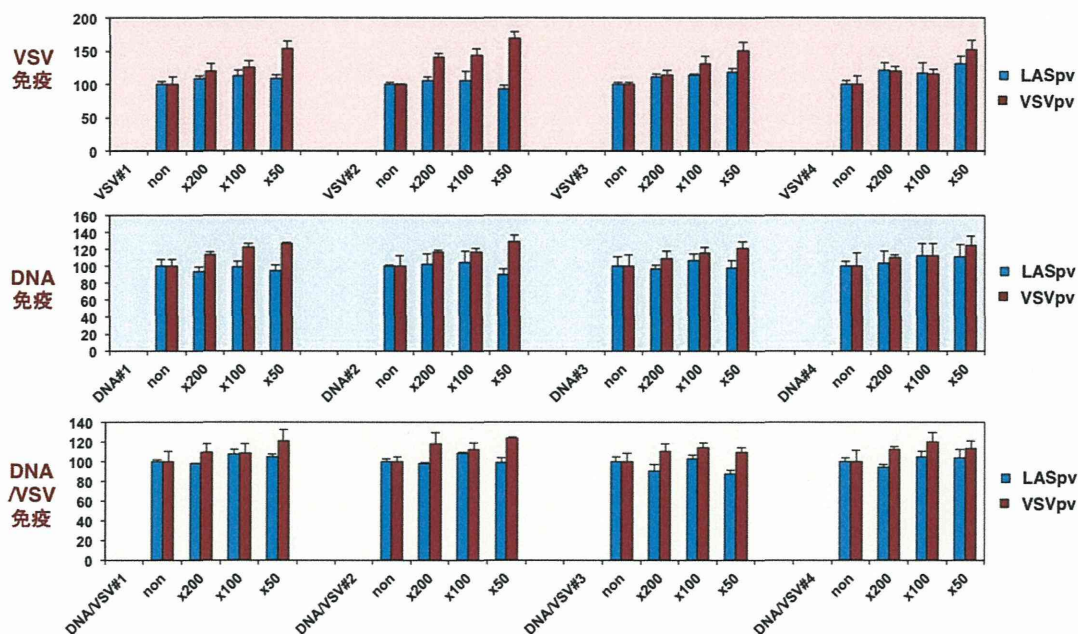


図4 VSVpv免疫後のマウス血清におけるVSVpv感染中和効果

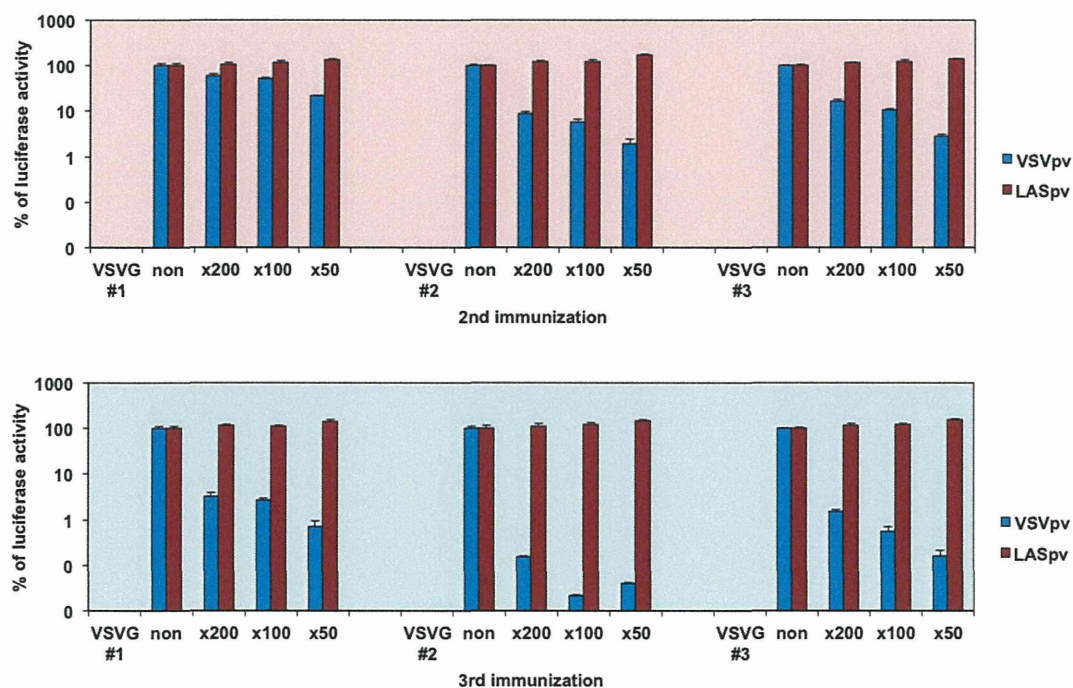
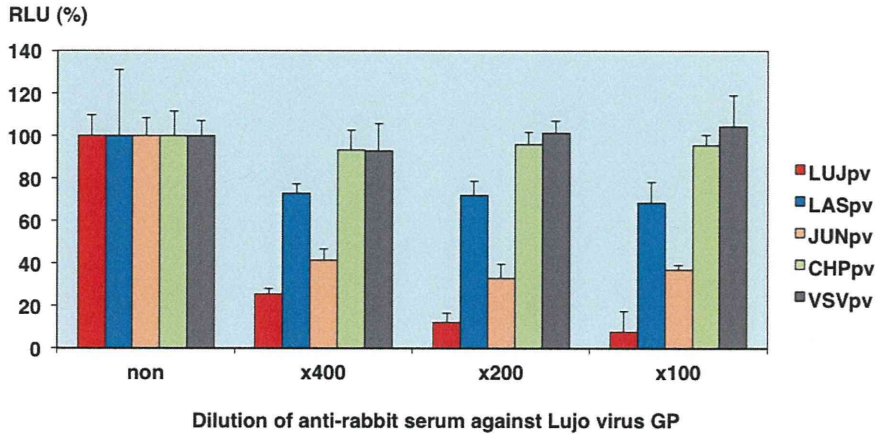
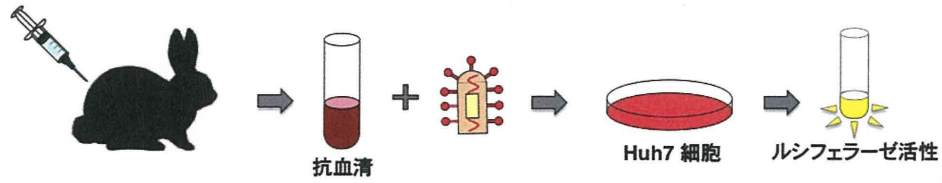
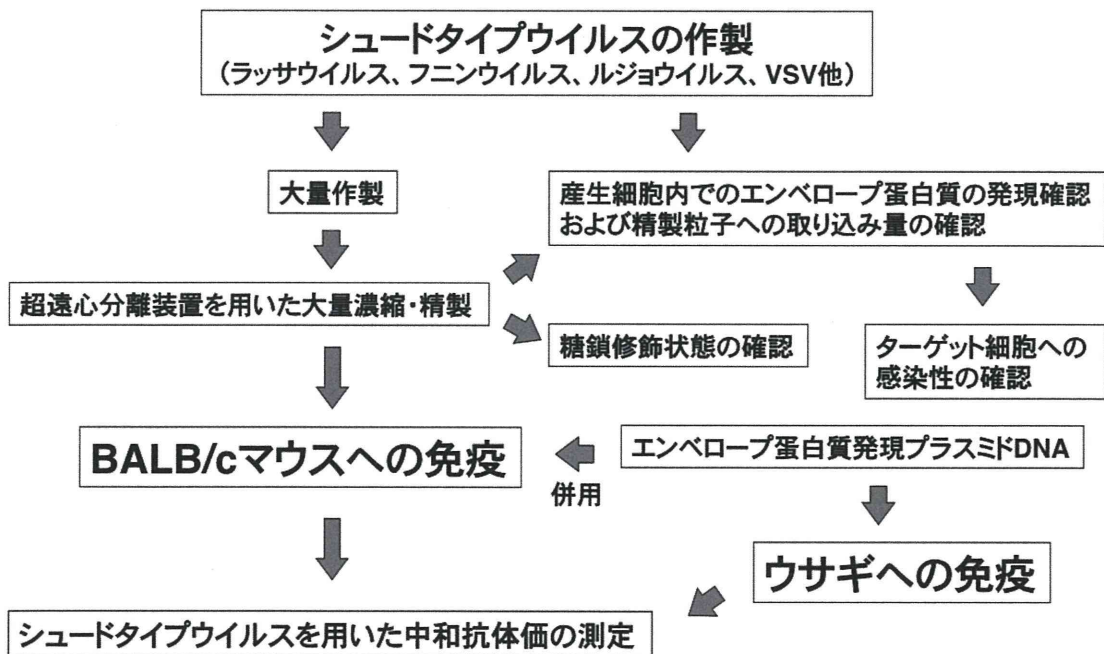


図5 ルジヨウイルスGPウサギ抗血清における感染中和

Lujo virus GP plasmid DNA



研究成果概要図



## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Fukushi, H. Tani, T. Yoshikawa, M. Saijo, S. Morikawa	Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers.	Viruses	4	2097-2114	2012
谷 英樹 福士秀悦 吉河智城 西條政幸 森川 茂	アレナウイルス感染症	ウイルス	62	229-238	2013



### III. 研究成果の刊行物・別刷

Review

## Serological Assays Based on Recombinant Viral Proteins for the Diagnosis of Arenavirus Hemorrhagic Fevers

Shuetsu Fukushi \*, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo and Shigeru Morikawa

Department of Virology, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan; E-Mails: htani@nih.go.jp (H.T.); ytomoki@nih.go.jp (T.Y.); msaijo@nih.go.jp (M.S.); morikawa@nih.go.jp (S.M.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: fukushi@nih.go.jp;  
Tel.: +81-42-561-0771; Fax: +81-42-561-2039.

Received: 1 August 2012; in revised form: 19 September 2012 / Accepted: 25 September 2012 /  
Published: 12 October 2012

---

**Abstract:** The family *Arenaviridae*, genus *Arenavirus*, consists of two phylogenetically independent groups: Old World (OW) and New World (NW) complexes. The Lassa and Lujo viruses in the OW complex and the Guanarito, Junin, Machupo, Sabia, and Chapare viruses in the NW complex cause viral hemorrhagic fever (VHF) in humans, leading to serious public health concerns. These viruses are also considered potential bioterrorism agents. Therefore, it is of great importance to detect these pathogens rapidly and specifically in order to minimize the risk and scale of arenavirus outbreaks. However, these arenaviruses are classified as BSL-4 pathogens, thus making it difficult to develop diagnostic techniques for these virus infections in institutes without BSL-4 facilities. To overcome these difficulties, antibody detection systems in the form of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and an indirect immunofluorescence assay were developed using recombinant nucleoproteins (rNPs) derived from these viruses. Furthermore, several antigen-detection assays were developed. For example, novel monoclonal antibodies (mAbs) to the rNPs of Lassa and Junin viruses were generated. Sandwich antigen-capture (Ag-capture) ELISAs using these mAbs as capture antibodies were developed and confirmed to be sensitive and specific for detecting the respective arenavirus NPs. These rNP-based assays were proposed to be useful not only for an etiological diagnosis of VHFs, but also for seroepidemiological studies on VHFs. We recently developed arenavirus neutralization assays using vesicular stomatitis virus (VSV)-based pseudotypes bearing arenavirus recombinant glycoproteins. The goal of this article is to review the recent advances in developing laboratory diagnostic assays based on recombinant viral

proteins for the diagnosis of VHFs and epidemiological studies on the VHFs caused by arenaviruses.

**Keywords:** arenavirus; viral hemorrhagic fever; diagnosis; recombinant protein

---

## 1. Introduction

The virus family *Arenaviridae* consists of only one genus, but most viruses within this genus can be divided into two different groups: the Old World arenaviruses and the New World arenaviruses (also known as the Tacaribe complex) [1,2]. The differences between the two groups have been established through the use of serological assays. Most of the arenaviruses cause persistent infection in rodents without any symptoms, and humans acquire a variety of diseases when zoonotically infected. Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) is the only arenavirus to exhibit a worldwide distribution, and causes illnesses such as meningitis [3,4]. Congenital LCMV infections have also been reported [4,5]. Most importantly, viral hemorrhagic fever (VHF) can be caused by several arenaviruses. Lassa fever, caused by the Lassa virus (LASV), an Old World arenavirus, is one of the most devastating VHFs in humans [6]. Hemorrhaging and organ failure occur in a subset of patients infected with this virus, and it is associated with high mortality. Many cases of Lassa fever occur in Western Africa in countries such as Guinea, Sierra Leone, and Nigeria [7–13]. Tacaribe complex lineage B of the New World arenaviruses consists of the Junin virus (JUNV), Guanarito virus (GUNV), Sabia virus (SABV) and Machupo virus (MACV), the etiological agents of Argentine, Venezuelan, Brazilian, and Bolivian hemorrhagic fevers, respectively [14,15]. Although genetically distinct from one another, they appear to produce similar symptoms, accompanied by hemorrhaging in humans [14,15]. These pathogenic New World arenavirus species are closely associated with a specific rodent species [6].

Humans are usually infected with pathogenic arenaviruses through direct contact with tissue or blood, or after inhaling aerosolized particles from urine, feces, and saliva of infected rodents. After an incubation period of 1–3 weeks, infected individuals abruptly develop fever, retrosternal pain, sore throat, back pain, cough, abdominal pain, vomiting, diarrhea, conjunctivitis, facial swelling, proteinuria, and mucosal bleeding. Neurological problems have also been described, including hearing loss, tremors, and encephalitis. Because the symptoms of pathogenic arenavirus-related illness are varied and nonspecific, the clinical diagnosis is often difficult [14,16]. Human-to-human transmission may occur via mucosal or cutaneous contact, or through nosocomial contamination [14,16]. These viruses are also considered to be potential bioterrorism agents [2].

A number of arenavirus species have been recently discovered as a result of both rodent surveys and disease outbreaks [17–26]. A novel pathogenic New World arenavirus, Chapare virus (CHPV), has been isolated from a fatal case of VHF in Bolivia [20]. In addition, five cases of VHF have been reported in South Africa, and a novel arenavirus, named Lujo virus, was isolated from a patient [17]. The Lujo virus is most distantly related to the other Old World arenaviruses [17]. To date, there is no information concerning the vertebrate host for the Chapare and Lujo viruses.

There is some evidence of endemicity of the Lassa virus in neighboring countries [27,28]. However, as the magnitude of international trade and travel is continuously increasing, and the perturbation of the environment (due either to human activity or natural ecological changes) may result in behavioral changes of reservoir rodents, highly pathogenic arenaviruses could be introduced to virus-free countries from endemic areas. In fact, more than twenty cases of Lassa fever have been reported outside of the endemic region in areas such as the USA, Canada, Europe, and Japan [29–33]. It is of great importance to detect these pathogens rapidly and specifically in order to minimize the risk and scale of outbreaks of VHFs caused by arenaviruses. However, these arenaviruses are classified as biosafety level (BSL)-4 pathogens, making it difficult to develop diagnostic techniques for these virus infections in laboratories without BSL-4 facilities. To overcome these difficulties, we have established recombinant viral nucleoproteins (rNPs)-based serological assays, such as IgG-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence assay (IFA), and antigen (Ag)-capture ELISA for the diagnosis of VHFs caused by highly pathogenic arenaviruses. Furthermore, virus neutralization assays using pseudotype virus-bearing arenavirus GPs have been developed. In this review, we describe the usefulness of such recombinant protein-based diagnostic assays for diagnosing VHFs caused by arenaviruses.

## 2. Currently Used Diagnostic Techniques for VHFs

In outbreaks of VHFs, infections are confirmed by various laboratory diagnostic methods. Virus detection is performed by virus isolation, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and antigen-capture ELISA. It has been shown that monoclonal antibody panels against pathogenic arenaviruses are useful for detecting viral antigens on the virus-infected cells as well as for investigating of antigenic relationships of arenaviruses [34–36]. Detection of the virus genome is suitable for a rapid and sensitive diagnosis of VHF patients in the early stage of illness, and extensive reviews of such RT-PCR assays have been described [37,38]. More recently, progress in the RT-PCR method covering genetic variations of the hemorrhagic fever viruses (HFVs) [39,40] and a multiplexed oligonucleotide microarray for the differential diagnosis of VHFs have also been reported [41]. On the other hand, antibodies against these viruses can be detected by the indirect immunofluorescence assay (IFA), or IgG- and IgM-ELISA. An IFA detects the antibody in the serum, which is able to bind to the fixed monolayer of the virus-infected cells. Although the interpretation of immunofluorescence results requires experience, the assay has advantages over other methods, since each virus generates a characteristic fluorescence pattern that adds specificity to the assay compared to a simple ELISA readout. A serological diagnosis by the detection of specific IgM and IgG antibodies to the HFVs must be sensitive, specific and reliable, because a misdiagnosis can lead to panic in the general population. An IgM-specific ELISA is suitable for detecting recent infection, but the relevance of IgM testing for acute VHF depends on the virus and the duration of illness; specific IgM is not often present in the very early stage of illness, and patients who die of VHF often fail to seroconvert at all. An IgG-specific ELISA is efficacious, not only in the diagnosis of a large number of VHF cases, especially during convalescence, but also for epidemiological studies in the endemic regions. The detailed methods used for the IFA and IgG- and IgM-ELISAs for the diagnosis of VHF using authentic virus-antigens have been described in detail [42–45].