

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-133412

衛生福利部疾病管制署 109 年署內科技研究計畫

蟲媒病毒傳染病創新安全快速檢驗試劑之開發與應用

年度研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：舒佩芸

協同主持人：張淑芬

研究人員：胡懷菁、蘇千玲、楊凱蓉、楊正芬

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

目錄

	頁碼
封面	
中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
本文	
(1) 前言	(5-6)
(2) 材料與方法	(7-10)
(3) 結果	(11-19)
(4) 討論	(20)
(5) 結論與建議	(21)
(6) 計畫重要研究成果及具體建議	(22)
(7) 參考文獻	(23)
表次	
圖次	

共 (26) 頁

中文摘要

由於氣候變遷，居住環境變化及全球交通便捷等因素，病媒性傳染病在全世界散佈情形急速增加，發生頻率也愈趨頻繁與嚴重。為因應蟲媒傳染病之侵入及流行，本實驗室持續開發靈敏且快速的檢驗技術，以期能快速偵測出傳染病，有效的降低疾病的流行，解決公共衛生的危機。本計畫的主要目標在製備與生產抗蟲媒病毒之融合瘤細胞株，並篩選及純化單株抗體。將利用委託製造具生物安全性的表現蟲媒病毒表面抗原之重組桿狀病毒，組裝成靈敏度高且安全快速的蟲媒病毒抗體檢驗試劑，以取代傳統使用有生物安全疑慮地病毒培養液作為檢驗材料。重組桿狀病毒具生物安全性，可應用於製造安全簡易的血清抗體檢測試劑。本年度主要在開發黃病毒抗體檢驗試劑，已製作可表現日本腦炎病毒外套蛋白的重組桿狀病毒，應用於 capture IgM ELISA 病毒抗體檢測方法。

關鍵詞：蟲媒傳染病、融合瘤細胞株、單株抗體、重組桿狀病毒、ELISA

英文摘要

Because of the impact of climate change, living environmental urbanization and convenient global transport services, the spread of vector-borne infectious diseases in the world has increased rapidly in recent decades. In order to prevent the infestation and epidemic of infectious diseases, our laboratory is continuing to develop sensitive and rapid diagnostic techniques to detect infectious diseases and to reduce the risk of epidemic of vector-borne diseases. Primary goals of this project are (1) to generate and produce monoclonal antibodies against arboviruses (such as dengue virus, Zika virus and chikungunya virus) for the detection of arboviral infections. (2) These monoclonal antibodies will be combined with the recombinant baculovirus that expressed arboviral antigens, and assembled into a highly sensitive, safe and rapid diagnostic test kit for the detection of arbovirus diseases. In this study, we have developed capture IgM ELISA using recombinant-Japanese encephalitis virus baculovirus as antigen to detect Japanese encephalitis virus disease.

Keyword: Vector-borne infectious diseases, hybridoma, monoclonal antibody, recombinant baculovirus, Japanese encephalitis virus

前言

由於國際間交通往來日益頻繁及氣候變遷的影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加，發生頻率日益頻繁與嚴重，其中又以蚊蟲（mosquito）媒介的傳染病最為重要(1-9)。許多對人類具有致病性的蚊蟲媒介病毒屬於黃病毒科(Flaviviridae) 黃病毒屬(Flavivirus) 病毒，包括登革病毒(dengue virus)、茲卡病毒(Zika virus)、黃熱病毒(yellow fever virus)、日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus)、西尼羅病毒(West Nile virus)等。此外，Togaviridae 科的阿爾發病毒(Alphavirus)屬亦包括許多致病性的蟲媒病毒，如屈公病毒(Chikungunya virus)、羅斯河病毒(Ross River virus)等。

登革病毒可引起登革熱及登革熱重症，是台灣最重要的病媒病毒傳染病(10-14)。全球每年約有三至四億人感染，將近五十萬人因登革熱重症住院，25,000人因而死亡。登革熱主要流行於熱帶及亞熱帶地區，尤其是與台灣經貿、旅遊關係密切的東南亞國家，包括印尼、越南、泰國及菲律賓等，都是登革熱盛行的地區。

茲卡病毒感染症(Zika virus infection)是由茲卡病毒(Zika virus)感染所引起的急性傳染病，最早在1947年於烏干達的茲卡森林中的獼猴體內分離出來。過去只有在非洲及亞洲有少數人類病例的報導，直到2007年在密克羅尼西亞聯邦(Micronesia)的雅浦島(Yap Island)首次爆發群聚疫情。其後在2013年玻里尼西亞(French Polynesia)等南太平洋島嶼地區，2015年在巴西東北部爆發流行，2016年1月，疫情更擴增至中、南美洲數十個國家/屬地，包括巴西、哥倫比亞、薩爾瓦多、瓜地馬拉、墨西哥、巴拉圭等皆出現本土疫情。茲卡病毒感染症在2015-16年疫情快速蔓延，流行區域跨越美洲、大洋洲、東南亞地區及非洲，影響全球逾70國(15-17)。臺灣於2016年1月出現首例境外移入病例(18)。

屈公病為近年來在非洲及亞洲造成許多疫情的再浮現蚊媒病毒傳染病。屈公病在2004-2005年非洲及西印度洋島嶼開始爆發疫情後，病毒已由印度傳播至東南亞及美洲造成全球大流行(6-9)。登革、茲卡及屈公病毒主要是由埃及斑蚊所傳播，其次是白線斑蚊。埃及斑蚊在台灣分佈於北迴歸線以南的各縣市，白線斑蚊則分佈於全台灣。這些病毒均有可能對台灣造成嚴重的威脅及爆發流行。

日本腦炎的流行區包含了大部份的亞洲地區、西太平洋島嶼及澳洲北部，也是亞洲地區最重要的病毒性腦炎傳染病。每年約有35,000至50,000日本腦炎病例，造成約10,000-15,000人死亡。由於日本腦炎是經由病媒蚊的傳播，所以疫情的流行與氣候及季

節兩大因素有關。在熱帶地區，日本腦炎為散發性流行，全年皆有；在溫帶及亞熱帶地區，日本腦炎的流行則有明顯的季節性，主要發生在夏季，尤其是雨季，發生的型態是爆發性。由於預防注射的有效實施，日本、南韓、臺灣及中國大陸的病例已減少很多，但鄰近的許多國家，包括菲律賓、印尼、馬來西亞、印度、尼泊爾等國都有許多日本腦炎患者，也常有流行的發生。

目前實驗室診斷登革熱、茲卡、屈公病及日本腦炎的檢驗方法包含細胞培養分離病毒、real-time RT-PCR、酵素免疫分析法。其中 real-time RT-PCR 係檢測急性期病毒核酸（1-7 天），由於 real-time RT-PCR 具有高靈敏度及快速等優點，已取代病毒分離培養法成為急性期的標準檢驗方法，但也有價格昂貴且操作複雜等缺點，須特定實驗室方可進行。IgM/IgG ELISA 係檢測急性期及恢復期 IgM 及 IgG 抗體，具有高靈敏度，可以做定性及定量分析，但通常需利用 ELISA washer 及 reader 儀器進行檢驗步驟，優點是可以進行全自動化檢驗，且可同時檢測大量檢體，非常適合用於檢體數量大的實驗室。利用免疫色層分析法為原理製作的快速檢驗試劑，具有簡單、快速和無需儀器的優點，可於 15-30 分鐘得到檢驗結果，適合用於臨床上 Point of care 之現場(on-site)篩檢，具有很高的實用價值。

本計畫主要目標為開發 ELISA 及免疫色層分析法為基礎的黃病毒感染及屈公病抗體快速檢測試劑。由於使用重組桿狀病毒表現蟲媒病毒表面抗原，具有生物安全性及高靈敏度的優點，適合開發成為市售檢驗試劑。我們最終目標是希望未來蟲媒病毒傳染病檢驗試劑可直接應用於機場發燒篩檢、診所、醫院及公衛調查等，並進行多種病媒病毒之同步檢驗。

材料與方法

- (一) 血液檢體、病毒株之收集：血液檢體的來源為通報自疾病管制署之各種黃病毒及阿爾發病毒傳染病的確定病例血清。病毒株為疾病管制署歷年來以細胞培養方法分離所得者。病人血清檢體包括急性期(症狀出現後 0-7 天)、早恢復期(症狀出現後 8-13 天)、晚恢復期(症狀出現後 14-30 天)之檢體。病人檢體收集後，將進行病原分離、血清學及分子生物學之實驗室診斷，以確認感染源。不同時期血清，將用以分析病人血清中抗體反應。經實驗室確診為陽性反應之檢體將加以分裝，儲存於 -80°C 冷凍櫃長久保存。
- (二) 蟲媒病毒表面抗原之製備：(1) Sf21 昆蟲細胞 (Spodoptera frugiperda 21 cell line) 秋行軍蟲卵巢細胞所分化出來的細胞株，也稱為 IPLB-Sf21AE。此細胞的外觀呈圓形飽滿，以半懸浮的方式生長，不完全貼壁，約 18-24 小時進行增生，培養基為 TNMFH (Gibco) 加 10% 胎牛血清 (fetal calf serum; FCS)，培養環境為 27°C 恆溫，不需額外注入 CO_2 ，此細胞和同為秋行軍蟲卵巢細胞分化出來的 Sf9 cell line 皆常被用於桿狀病毒表現系統中。(2) 以 Bac-to-Bac 雙效桿狀病毒表現系統 (Bac-to-Bac bi-cistronic baculovirus expression system) 製備呈現蟲媒病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 Bac-to-Bac baculovirus expression system (購自 ThermoFisher Scientific)，此系統特點為可快速且高效率的生產重組桿狀病毒，改良了傳統以共轉染的方式在昆蟲細胞內製作重組病毒的繁雜與耗時過程 (Polaves et al., 1996)。此產品為 Monsanto 公司所販售，在專用的傳送載體 (transfer plasmid) 上具有轉位子 (transposable elements) Tn7，再配合專用的勝任細胞中的輔助質體 (helper plasmid)，其可於勝任細胞中生產轉位酶 (transposase)，並協助將傳送載體上的目標基因以專一性位置跳躍重組 (site-specific recombination) 的方式嵌入勝任細胞中的桿狀病毒 DNA (Bacmid) 上，由於嵌入的位置是在 LacZ α 基因上，所以後續可以透過菌落進行藍白篩選 (Blue-white selection) 挑出白色菌落 (含有目標基因的重組桿狀病毒 DNA)，之後將重組桿狀病毒 DNA 純化出來並轉染至昆蟲細胞中後就能生產出所需的重組桿狀病毒。而本實驗室以 Bac-to-Bac® 桿狀病毒表現系統中所使用的傳送載體 pFastBac™1 為框架，並加入了紅螢光基因 DsRed2 以及我們實驗室所製作的 Liu IRES 所形成的 pFastBac-MCS-Lir-DsRed2 雙效桿狀病毒表現載體作為我們的傳送載體。本實驗室已證實 Liu IRES 其在昆蟲細胞以及哺乳類細胞皆具有高轉譯活性 (Liu et al., 2015)。(3) 免疫螢光分析 (Immunofluorescence assay; IFA): 將 Sf21 昆蟲細胞分至 24 well plate 中 (2×10^5 cells/well)，以 M.O.I=2 (Dengue virus 1 and 2) 或 M.O.I=0.5 (Dengue virus 3 and 4) 的病毒量來感染 Sf21 昆蟲細胞，在病毒感染

後第 3 天時以螢光顯微鏡觀察感染情形，確認完每顆細胞都被病毒感染後將病毒液移除，並以 500 μ l 的 PBS 潤洗一次，潤洗完後加入 350 μ l 的 4% formaldehyde 進行固定 (固定條件為室溫下 15 分鐘)，待 15 分鐘後，移除 4% formaldehyde，並以 500 μ l 的 PBS 潤洗 3 次，潤洗完後移除 PBS 並加入 350 μ l，濃度為 5 % 的 BSA 進行 blocking (blocking 的條件為在室溫中一小時)，一小時後將 blocking Buffer 移除並加入 350 μ l 以 1:500 稀釋比例所調配的一抗 (1° Ab)，接著置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱過夜 (overnight)，隔日移除一抗並以 500 μ l 的 PBS 潤洗 3 次，潤洗完後移除 PBS 並加入 350 μ l 以 1:250 稀釋比例所調配的二抗 (2° Ab)，接著置於室溫並避光作用一小時，一小時後移除二抗並以 500 μ l 的 PBS 潤洗 3 次，潤洗完後移除 PBS 並加入 mounting Buffer 以利於後續在螢光顯微鏡下觀察與保存。

(4) 西方墨點法 (western blotting) 取 25 μ g 的蛋白質樣品與 sample buffer 在 100 $^{\circ}$ C 乾裕槽中煮 6 分鐘，將樣品置入 SDS-PAGE 的 well 中，於蛋白質電泳裝置 (Bio-Rad) 先以 70 V 進行電泳約半小時後再以 110 V 進行電泳 1.5 小時，在電泳結束後於 transfer buffer 中將 SDS-PAGE 所分離的蛋白質以 0.34 安培約 2 小時轉漬到 PVDF 轉漬膜上。轉漬完成後的 PVDF 膜以含有 7% 脫脂奶粉的 Tris-buffered saline buffer (TBS: 100 mM Tris, pH = 7.4、100 mM NaCl 與 0.1 % Tween-20) 在室溫中進行 blocking 作用一小時。一小時後將 blocking buffer 移除並加入以 TTBS 稀釋，稀釋比例為 1:5000 的一抗 (1° Ab) 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱過夜 (overnight)。隔天以 TTBS buffer 輕輕搖晃潤洗 PVDF 膜 3 次 (每次 10 分鐘)。然後移除 TTBS 並加入稀釋比例為 1:5000 的二抗 (2° Ab; anti-rabbit HRP antibody) 於室溫下輕輕搖晃作用一小時。接著再以 TTBS buffer 輕輕搖晃潤洗 PVDF 膜 3 次 (每次 10 分鐘)。最後進行 PVDF 膜化學冷光呈色後再上機 (Fusion-SOLO 冷光系統暗箱設備)。

(三) 黃病毒及屈公病毒之純化與分析：病毒來源為於受病毒感染的 Vero 細胞培養液。將病毒去活化後，此病毒細胞培養液先經 PEG 將病毒沉澱，經離心取得沉澱物，將沉澱物回溶於 TNE buffer (Tris-NaCl-EDTA, PH7.4)，此為經過部分純化之病毒抗原。再將此抗原以 discontinued sucrose density gradient centrifugation (sucrose gradient 10%-50%; 離心 39K rpm, 4 $^{\circ}$ C, 2 hr) 純化出病毒顆粒。

(四) 融合瘤之製備：將五至六週齡之 BALB/c 雌性小鼠經由腹腔內或皮下注射約 20-50 μ g recombinant proteins 或 10^6 PFU 去活性、純化之病毒，加入等體積之 Freund' s complete adjuvant。分別間隔三週後，使用相同抗原，再追加免疫注射二次，但改用 Freund' s incomplete adjuvant。第四次免疫時，採用靜脈注射，使用不加佐劑之抗原。免疫四次後之

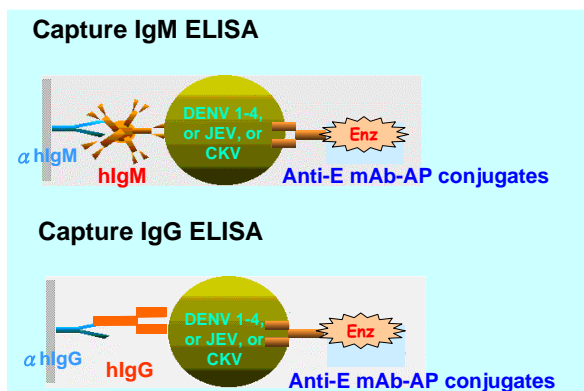
小鼠抽取其尾巴血，以免疫酵素法 (ELISA) 測定血清中抗病毒抗體之效價。將高效價小鼠之脾臟細胞以無菌技術取出後和 FO 骨髓瘤細胞在含有 PEG 之溶液中進行融合，再經含有 HAT (H - hypoxanthine; A - aminopterin; T - thymidine) 之培養液培養 7-14 天後，以 ELISA 方法篩選出會分泌抗病毒抗體的融合瘤細胞。再以限制稀釋法 (limiting dilution) 進行單一細胞培養成單株細胞，再重覆進行 ELISA 篩選出分泌抗病毒單株抗體的融合瘤細胞株。詳細步驟如下：FO 細胞應於細胞融合前 4~7 天增殖培養，使 FO 細胞在細胞融合當天的生長處於對數生長期 (log phase)，且細胞數目需大於 3×10^7 。取出小鼠的脾臟細胞直接以 RPMI 培養液清洗 3 次後，將它和 FO 骨髓瘤細胞混合，在 50 ml 離心管中小心把細胞離心下來，倒掉上清液後以殘留的 RPMI 將細胞打散，放在 37°C 內保溫準備加入 PEG 1500 (polyethylene glycol) 進行細胞融合。在 1.5 分鐘內慢慢加入 1.5 ml PEG，同時一邊輕輕搖動讓 PEG 均勻的與細胞混合。靜置 1.5 分鐘後，在 5 分鐘內緩緩加入 5 ml RPMI，邊加邊混勻；再於 2 分鐘內加入 20 ml RPMI。再以離心去除上清液後，緩緩加入 45 ml HT medium，把細胞均分到 6 個 96 孔培養盤中，每孔加約 2~3 滴 (約 75 μ l) 細胞懸浮液。培養一天後，加入等量的 H2AT medium。培養第三天後置換 75 μ l HAT medium，每 3-4 天置換一次，當控制組的 FO 細胞死亡後，置換成 75 μ l HT medium，每 3-4 天置換一次。最後每孔只剩下 1 或 2 個穩定細胞群落，再以 ELISA 篩選抗體效價較高者，將該細胞株以限制稀釋法稀釋，每孔中只含有一個細胞，待其生長成群落後再用 ELISA 篩選抗體效價較高者，即為單株抗體融合瘤，經大量培養後，保存至液態氮中。

(五) 單株抗體之篩選：由於 ELISA 檢測系統的專一性及靈敏度皆高，故採用此方法作為快速篩選抗體之檢測系統。首先將純化出之重組蛋白抗原或病毒顆粒用 pH9.6 carbonate buffer 吸附在 96 microwell immunoassay strips，4°C 隔夜吸附後，以 1% BSA 進行 Block，37°C 反應一小時，清洗 3 次後，以 PBST (PBS-0.5% Tween20-1% BSA-2.5% NRS) 稀釋待測檢體及陽性、陰性控制組檢體，置於 37°C 保溫箱中震盪半小時。清洗 3 次，加入山羊抗小鼠 IgG-alkaline phosphatase 二次抗體 (Goat anti-mouse IgG AP) 作用於 37°C 保溫箱中震盪半小時，清洗 3 次。每孔中加入 100ul pNPP 呈色劑，置於室溫及暗處呈色反應約 30-60 分鐘，最後以 ELISA 吸光儀讀取波長 405nm 及 620nm 吸收光。

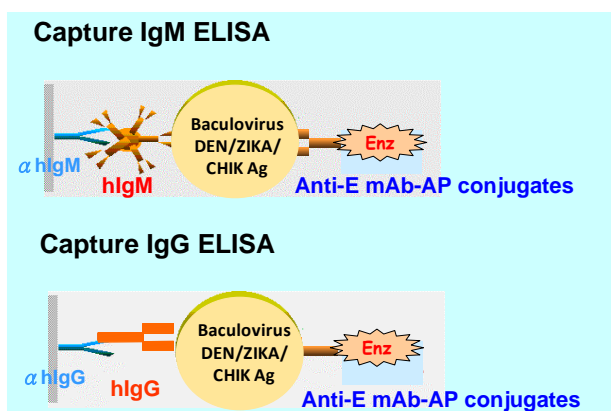
(六) 抗體之製備、純化與分析：單株抗體以 BALB/c 小白鼠或 SCID (severe combined immunodeficiency) 小鼠之腹水方式生產，再以 protein A sepharose 4B Fast Flow 親和力管柱 (Pharmacia Biotech) 純化。

(七) ELISA 試劑之製備： Capture IgM/IgG ELISA 方法最適用於病毒傳染病之病人抗體檢驗。首先將抗人類 IgM 或 IgG 抗體用 pH9.6 carbonate buffer 吸附在 96 microwell immunoassay strips, 4°C 隔夜吸附後，以 PBS-1% BSA 進行 Block, 37°C 反應一小時，清洗 4 次後，以 Casein buffer(Casein blocking buffer-2.5% normal rabbit serum-4% normal goat serum-0.05% Tween20)稀釋待測病人血清檢體及陽性、陰性控制組檢體，置於 37°C 保溫箱中震盪半小時。清洗 4 次，加入預先混合之 **Recombinant baculovirus expressing arbovirus envelope protein**(委託計畫提供)或去活性之蟲媒病毒及抗病毒單株抗體-Alkaline Phosphatase conjugate，於 37°C 保溫箱中震盪半小時，清洗 4 次。每孔中加入 100ul pNPP 呈色劑，置於室溫及暗處呈色反應約 30-60 分鐘，最後以 ELISA 吸光儀讀取波長 405nm 及 620nm 吸收光。

(八) 目前例行性血清學檢驗使用的方法。以去活性病毒作抗原來源，若做成市售檢驗試劑時，有生物安全方面的疑慮。



使用重組桿狀病毒(委託計畫提供)取代病媒病毒作抗原來源，具生物安全性，容易組裝成檢驗試劑。



結果

(一) **病媒病毒重組蛋白之表現:** 表一所列為疾管署實驗室、中原大學吳教授及國防郭老師所生產之病媒病毒重組蛋白。目前疾管署實驗室已製作完成登革病毒重組蛋白抗原，已初步完成 ELISA 及 ICT 測試。屈公病毒重組蛋白則 3 個實驗室均已成功生產，已初步完成 ELISA 測試。茲卡病毒重組蛋白在 3 個實驗室均已生產，且疾管署實驗室已初步完成 ELISA 及 ICT 測試。日本腦炎病毒重組蛋白在 3 個實驗室均已成功生產，且已初步完成 ELISA 測試。疾管署實驗室生產之 baculovirus-based 及 E. coli-based recombinant proteins 均具有 His tag，可用 nickel column 純化，適用於 ELISA 及 ICT 製作。Recombinant baculovirus 可不需純化，直接用於 ELISA system，且可液態 4 度 C 保存數月仍維持高抗原性，有穩定性高的優點。

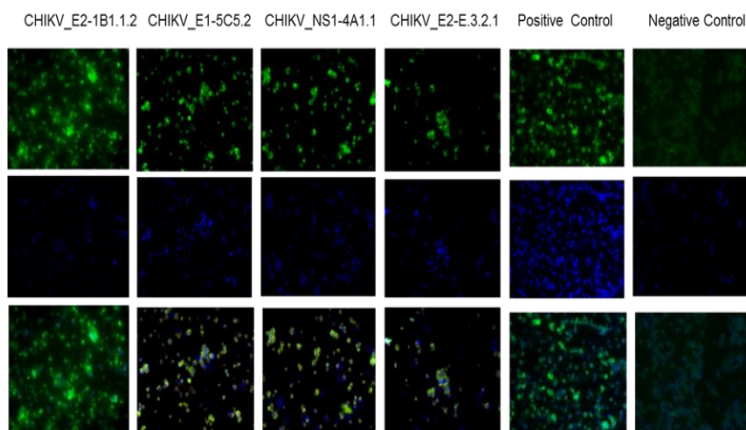
Arbovirus	Recombinant proteins (TCDC 張淑芬)		Recombinant baculovirus (中原 Prof. Wu)
	Baculovirus/Bac-to-Bac	E. Coli/ pET-47b/28a	Recombinant baculovirus
DENV	rE(D1,D2,D3,D4), rEDIII(D1-2-3-4), rNS1(D1-4)	rE(D1,D2,D3,D4), rEDIII(D1-2-3-4), rEDIII(D2)	rBac-DENV1-4(C-prM-E)
CHIKV	rE2	rE1,rE2	rBac-CHIKV(26S)
ZIKV	rNS1	rE, rEDIII	rBac-ZIKV(C-prM-E)
JEV	rE	rE	rBac-JEV(C-PrM-E)
COVID-19	S1/S2	NP	rBac-COVID-19(S)

* Complete, *Incomplete

(二)Anti-CHIKV 單株抗體之特性分析: 下表為 Anti-CHIKV 單株抗體之 subclass 及親和性分析。應用生物膜干涉技術(Biolayer interferometry, BLI)及計算軟體得到 KD 值, 顯示 4A1.1 與 1B1.1.2 單株抗體具有高親和性。IFA 使用 Vero cells infected with CHIKV 做為抗原(玻片), 1B1.1、5C5.2、4A1.1 與 E3.2.1 4 株抗體皆可與 CHIKV 結合。由於 AMC probe 先與抗體鍵結, 再對抗原進行結合與解離來計算其親和性, 但因此探針僅對 IgG1 的鍵結效果良好, 而 1B1.2.1.2.與 4A1.1 的 subclass 為 IgG2a, 會影響到親和性檢測結果, 故再以 NTA rprobe 進行抗體-抗原間的親和性檢測, 所以 1B1.2.1 的 KD 應為 5.68E-12;而 4A1.1 的 KD 應該大於 1E-12。

Characterization of monoclonal antibodies against CHIKV

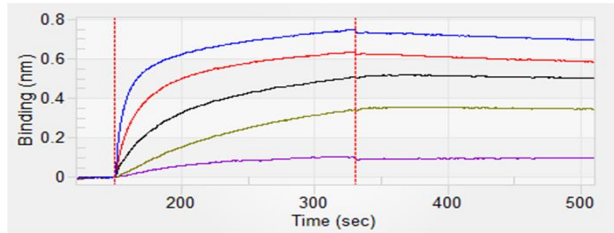
Antibody	mAb ID	Subclass	KD	ELISA	IFA
Anti-Flavivirus Env Ag	D56	IgG1	ND	2.555	+++
Anti-Flavivirus NS1 Ag	D2/8-1	IgG1	6.095E-12	3.027	+++
Anti-CHIKV Env Ag	5C5.2 (E1)	IgG1	ND	2.709	+++
	E3.2.1 (E1)	IgG1	ND	2.707	+
	4A1.1 (E2)	IgG2a	1E-12	2.51	+++
	1B1.2.1 (E2)	IgG2a	5.68E-9~12	2.505	++
	4F4.3 (E2)	IgG1	2.8E-9	2.387	+++



20201013b AMC 4F4.3 CK-E2-341

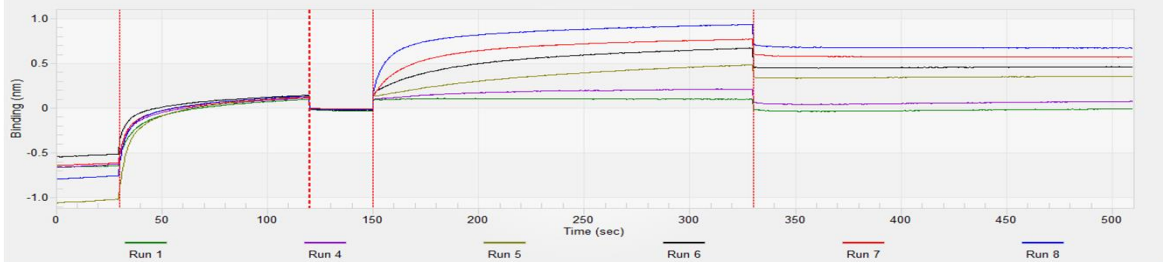
Run Settings

Step	Step Type	Duration (s)	Position
1	Initial Baseline	30	Tube
2	Loading	90	Drop
3	Baseline	30	Tube
4	Association	180	Drop
5	Dissociation	180	Tube

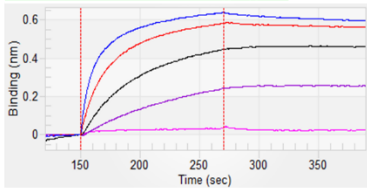


Index	Sample ID	Conc. (nM)	Information	KD (M)	ka (1/Ms)	ka Error	kd (1/s)	kd Error	Rmax	Rmax Error	R equilibrium	X^2	R^2
1	CK-E2-341	0											
2	CK-E2-341	500		2.844E-9	9.99E3	9.243E1	2.841E-5	1.443E-5	0.1998	0.002913	0.1986	0.6789	0.9942
3	CK-E2-341	1000		2.844E-9	9.99E3	9.243E1	2.841E-5	1.443E-5	0.5007	0.00847	0.4993	0.6789	0.9942
4	CK-E2-341	2000		2.844E-9	9.99E3	9.243E1	2.841E-5	1.443E-5	0.554	0.003418	0.5532	0.6789	0.9942
5	CK-E2-341	4000		2.844E-9	9.99E3	9.243E1	2.841E-5	1.443E-5	0.6127	0.001347	0.6122	0.6789	0.9942
6	CK-E2-341	8000		2.844E-9	9.99E3	9.243E1	2.841E-5	1.443E-5	0.7062	0.001111	0.7059	0.6789	0.9942

Run Data

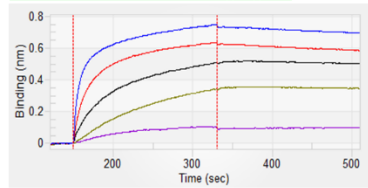


20201015a AMC 1B1.1 CK-E2-341



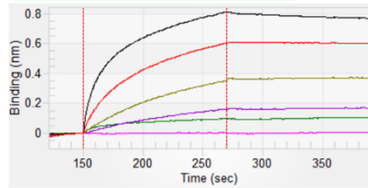
$K_D=5.68\text{nM}$
 $K_a=7.44 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
 $K_d=4.22 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

20201013b AMC 4F4.3 CK-E2-341



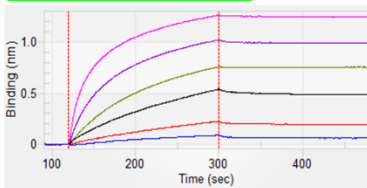
$K_D=2.84\text{nM}$
 $K_a=9.99 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
 $K_d=2.84 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

20201014c AMC 4A1.1 CK-E2-341



$K_D=<\text{pM}$
 $K_a=5.66 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
 $K_d=<10^{-7} \text{ s}^{-1}$

20201029e NTA CK-E2 1B1.1



$K_D=<\text{pM}$
 $K_a=5.31 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
 $K_d=<10^{-7} \text{ s}^{-1}$

NTA CK-E2-341 4F4.3

NTA CK-E2-341 4A1.1

利用委託中原大學吳教授所生產之具生物安全性的表現蟲媒病毒表面抗原之重組桿狀病毒(recombinant CHIKV baculovirus)配合單株抗體 1B1.2.1/5C5.2 等組裝成靈敏度高且安全快速的蟲媒病毒抗體 ELISA 檢驗試劑(Recombinant baculovirus-CHIKV (rBac-CHIKV-26S) capture IgM ELISA), rBac-CHIKV-26S 可以取代傳統使用有生物安全疑慮地病毒培養液作為 capture IgM ELISA 抗原。結果證明具有專一性，可應用於臨床檢體檢測，具有專一性，但 ELISA 試劑內容仍需調整以降低 background。

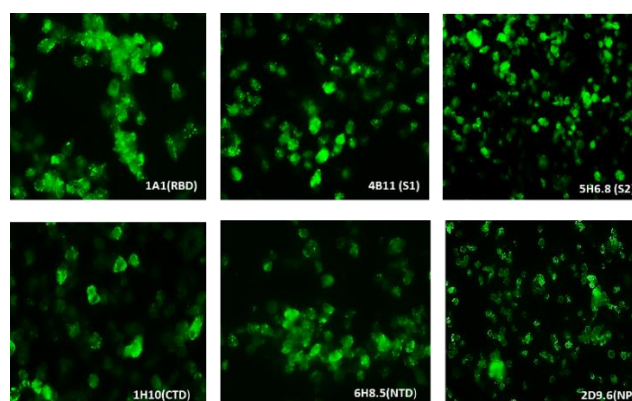
Bac-CHIKV Capture IgM ELISA

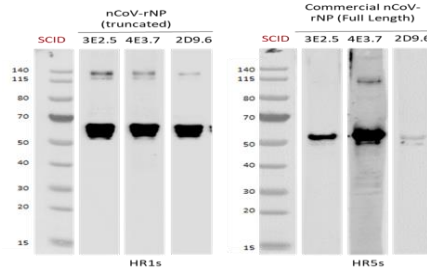
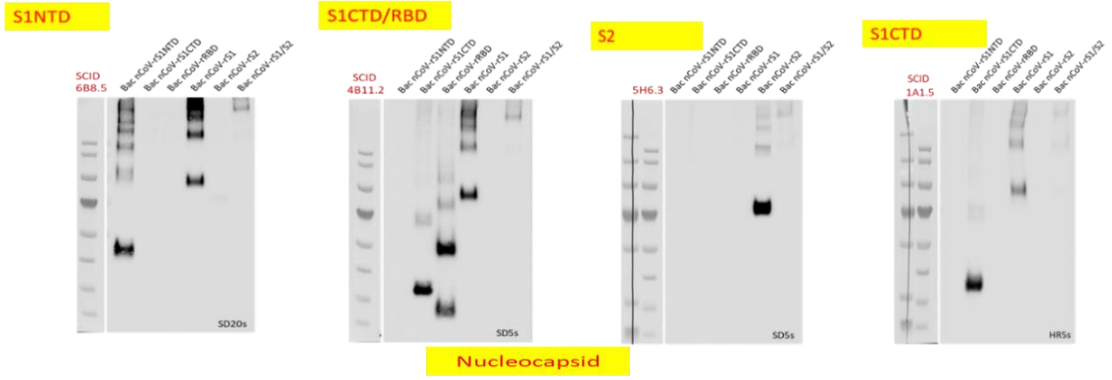


(三) **Anti-SARS CoV-2 單株抗體之特性分析**: 下表為 Anti-SARS CoV-2 單株抗體之 subclass 及親和性分析。應用生物膜干涉技術(Biolayer interferometry, BLI) 及計算軟體得到 KD 值，顯示 spike 蛋白部分，4B11 與 6B8 單株抗體具有高親和性；nucleocapsid 部分，以 4E3.7 較高，但由於其為 IgG2b subclass，AMC probe 鍵結效果不好，故親和性可能被低估，需再以 NTA rprobe 進行抗體-抗原間的親和性檢測。IFA 使用 Vero E6 cells infected with **SARS CoV-2** 做為抗原(玻片)，下圖所示之 8 株抗體皆可與新型冠狀病毒結合。並以連續 **recombinant SARS CoV-2 baculovirus** (中原吳老師)與老鼠多株抗體血清反應可成功檢測 **SARS CoV-2** 陽性檢體；及使用 anti-spike monoclonal antibodies 與國防預醫所提供之 SARS-CoV-2 viral-like particle，建立 anti-SARS-CoV-2 capture IgM ELISA 方法。Capture ELISA 可測出 SARS-CoV-2 病人血清中之 IgM 抗體。正在發展快速抗原 ICT 檢測試劑，支援 SARS-CoV-2 血清學診斷。初步結果顯示可與處理後 **SARS CoV-2** 病原體 (Vircell, RUO, handling by heat)反應，並可與其他冠狀病毒(from TFDA)在 10^5 copies/ml 做出識別。

Characterization of monoclonal antibodies against SARS-CoV-2

Antibody	mAb ID	Fragment	Subclass	KD	ELISA	IFA	WB
Anti-SARS-CoV-2 Spike1/S2 Ag	1A1.5	CTD	IgG1	1.8E-8	+	+	+
	4B11.2	CTD/RBD	IgG2a	1.8E-12	+	+	+
	5H6.3	S2	IgG1		+	+	+
	6B8.5	NTD	IgG1	1.4E-9	+	+	+
	1H10	CTD	IgG1	1E-8	+	+	+
Anti-SARS-CoV-2 Nucleocapsid Ag	2D9	NP	IgG1		+	+	+
	1C3.7	NP	IgG1	2.9E-7	+	+	+
	4E3.7	NP	IgG2b	1.4E-8	+	+	+

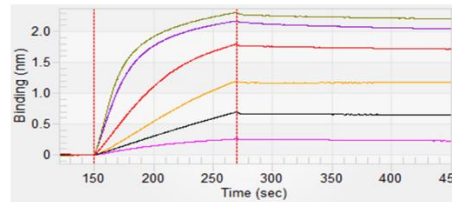




20201022a NTA nCoV-NP 6C8

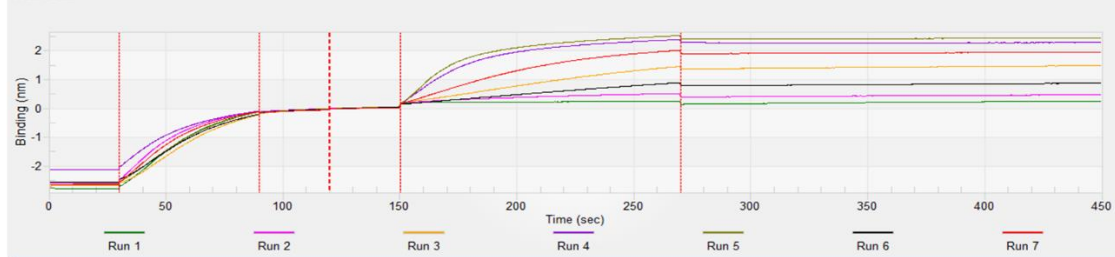
Run Settings

Step Type	Duration (s)	Position
1 Initial Baseline	30	Tube
2 Loading	60	Drop
3 Baseline	30	Tube
4 Baseline	30	Tube
5 Association	120	Drop
6 Dissociation	180	Tube

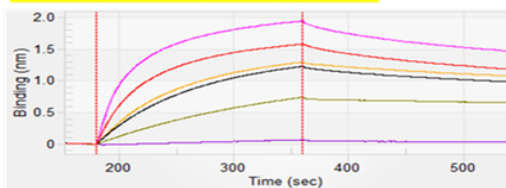


Index	Sample ID	Conc. (nM)	Information	KD (M)	ka (1/Ms)	ka Error	kd (1/s)	kd Error	Rmax	Rmax Error	R equilibrium	X^2	R^2
1	6C8	0											
2	6C8	20		1.422E-9	1.383E5	1.454E3	1.966E-4	1.622E-5	0.912	0.01857	0.8515	7.254	0.9945
6	6C8	40		1.422E-9	1.383E5	1.454E3	1.966E-4	1.622E-5	1.391	0.02567	1.343	7.254	0.9945
3	6C8	80		1.422E-9	1.383E5	1.454E3	1.966E-4	1.622E-5	1.602	0.01988	1.574	7.254	0.9945
7	6C8	120		1.422E-9	1.383E5	1.454E3	1.966E-4	1.622E-5	2.061	0.01954	2.037	7.254	0.9945
4	6C8	160		1.422E-9	1.383E5	1.454E3	1.966E-4	1.622E-5	2.356	0.01582	2.335	7.254	0.9945
5	6C8	320		1.422E-9	1.383E5	1.454E3	1.966E-4	1.622E-5	2.27	0.005503	2.26	7.254	0.9945

Run Data

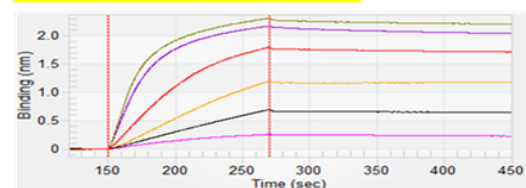


20201022b NTA nCoV-NP 4E3.7



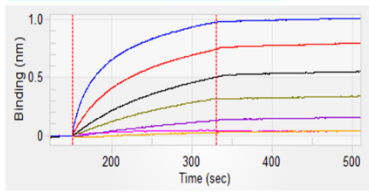
$K_D=14.25\text{nM}$
 $K_a=1.07 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
 $K_d=1.53 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

20201022a NTA nCoV-NP 6C8



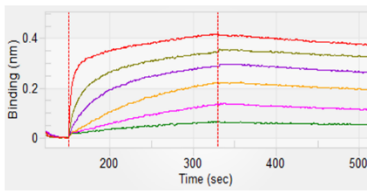
$K_D=1.42\text{nM}$
 $K_a=1.38 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
 $K_d=1.97 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

20201021a AMC 4B11 nCoV-CTD



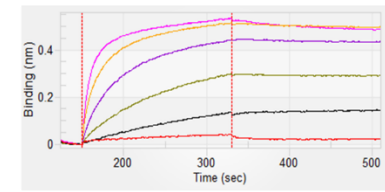
$K_D = < \text{pM}$
 $K_a = 1.75 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
 $K_d = < 10^{-7} \text{ s}^{-1}$

20201021b AMC 1H10 nCoV-CTD



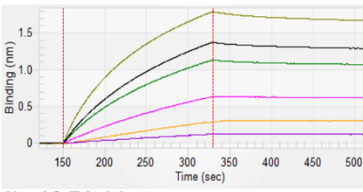
$K_D = 16.13 \text{ nM}$
 $K_a = 1.17 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
 $K_d = 1.89 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

20201020b AMC 1A1 nCoV-CTD



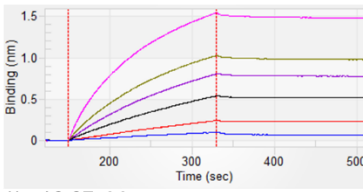
$K_D = 13.92 \text{ nM}$
 $K_a = 6.66 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
 $K_d = 9.28 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

20201029b NTA nCoV-CTD 4B11



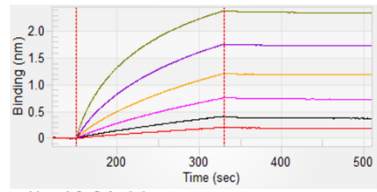
$K_D = 18.74 \text{ nM}$
 $K_a = 1.72 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
 $K_d = 3.22 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

20201029c NTA nCoV-CTD 1H10

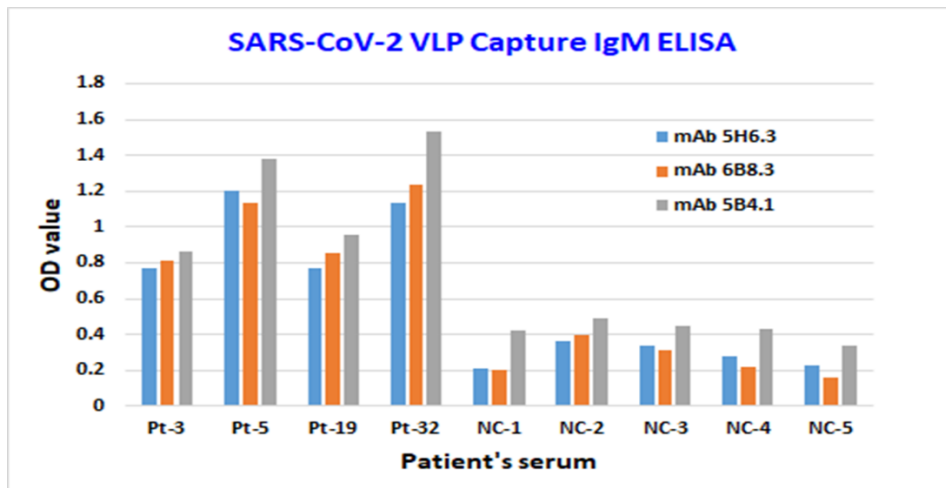
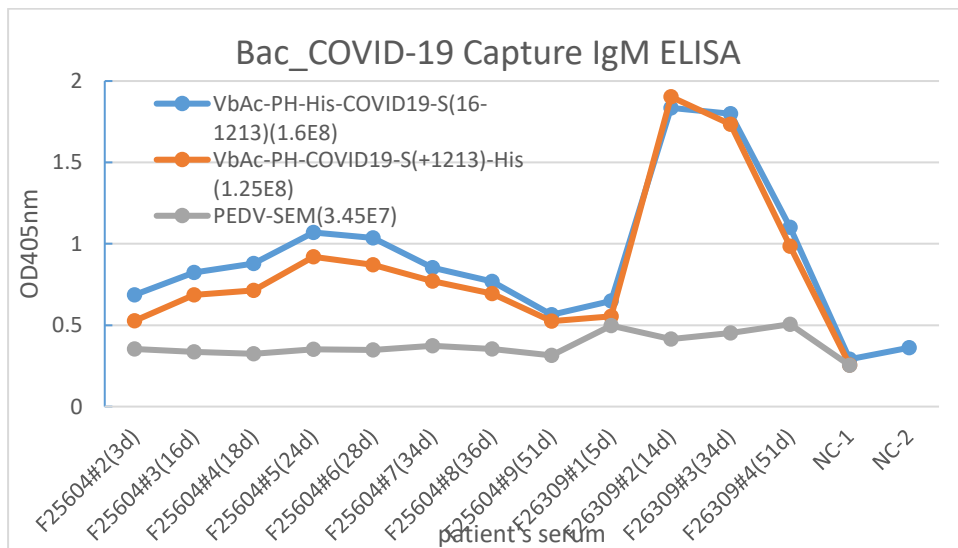


$K_D = 10.07 \text{ nM}$
 $K_a = 1.83 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
 $K_d = 1.84 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

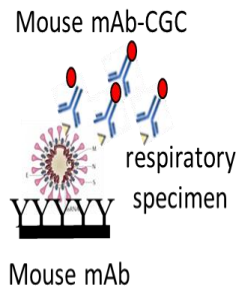
20201029d NTA nCoV-CTD 1A1



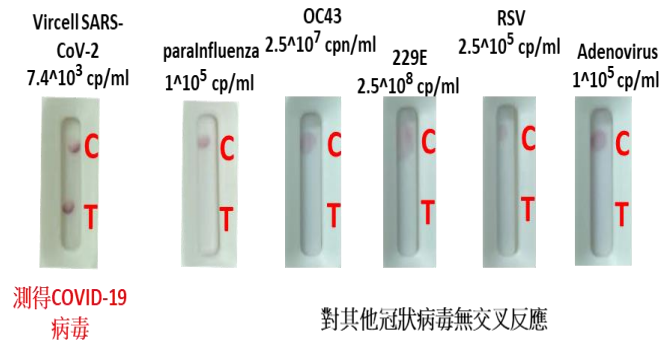
$K_D = 18.84 \text{ nM}$
 $K_a = 2.98 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
 $K_d = 5.61 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$



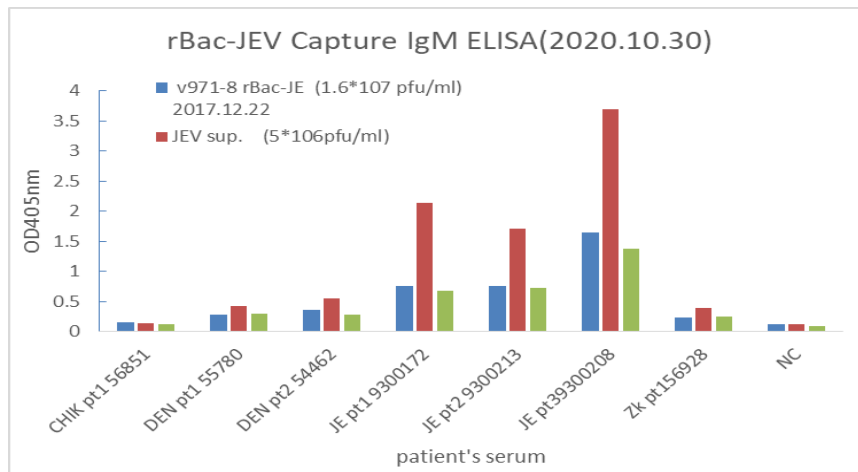
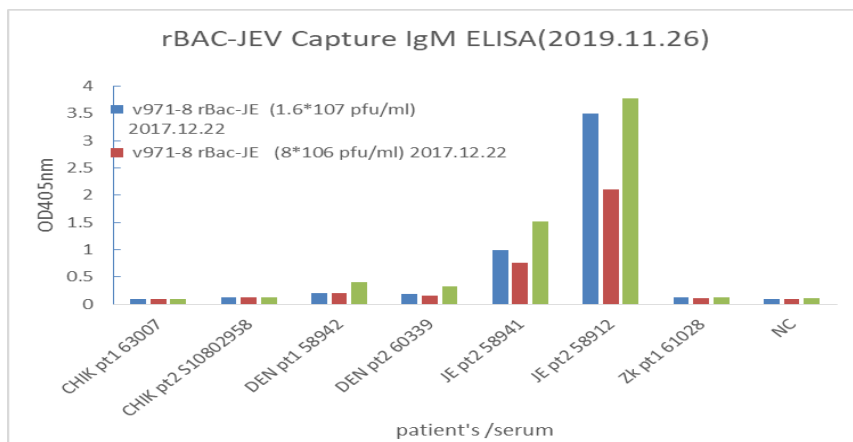
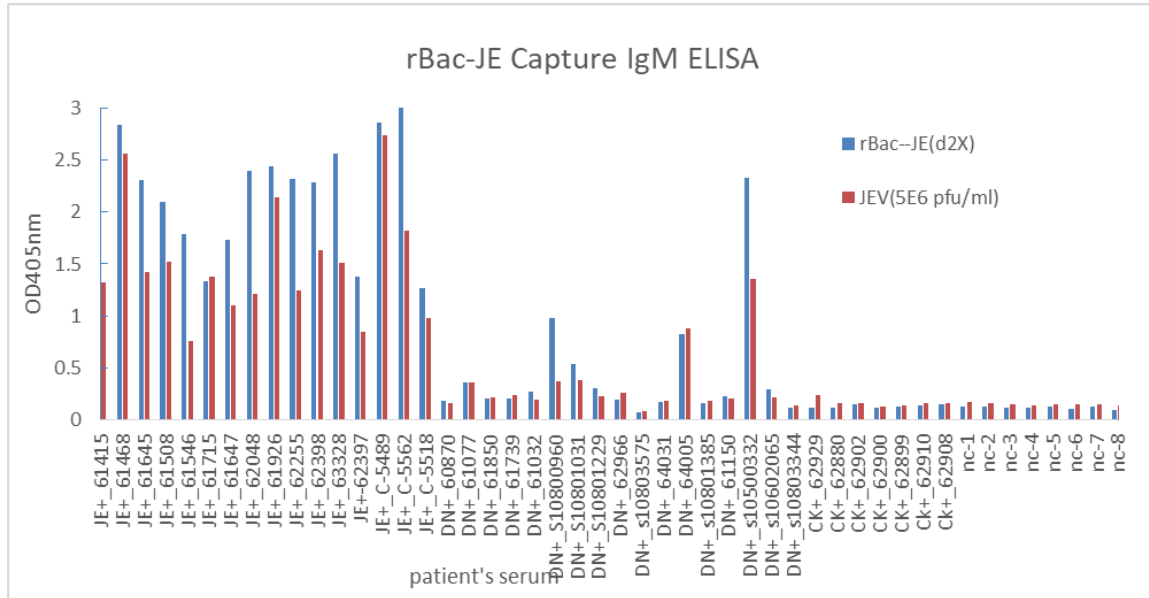
Anti -COVID-19
mAb-colloidal
gold
↑
COVID-19 Ag
(sample)
100ul~150ul
↓
Anti-COVID-19
mAb
(Test Line)



COVID-19 spike antigen Test



(四) 中原大學吳教授所生產之 recombinant JEV baculovirus 可用於 Capture IgM ELISA，具有專一性。其應用於臨床檢體，可成功檢測出日本腦炎陽性個案，並與登革熱、屈公及茲卡陽性檢體做出區分，不會有嚴重交叉反應。rBac-JEV 可作為 capture IgM ELISA 抗原，效果與使用 cell culture-derived JEV 相似。而生產的 recombinant JEV baculovirus 的 shelf life 可長達 1 年半仍具抗原性。



討論

本計畫主要目標為開發具有生物安全性之 ELISA 及免疫色層分析法的蟲媒病毒傳染病抗體快速檢測試劑。由於使用具有生物安全性之重組桿狀病毒表現蟲媒病毒表面抗原，因而具有生物安全性及高靈敏度的優點。今年度已完成日本腦炎抗體快速檢測試劑。同時也測試不同來源的抗原及抗體，未來有希望組成具有生物安全性之診斷試劑。我們最終目標是希望未來蟲媒病毒傳染病檢驗試劑可直接應用於機場發燒篩檢、診所、醫院及公衛調查等，進行黃病毒及屈公病之同步檢驗，可及早實施防疫工作，對病人實施正確的醫療照顧，對傳染病的防治工作有極大的幫助。

結論與建議

由於氣候變遷使得生態環境受到衝擊與改變、人口向都市集中化及國際間交通便捷等因素，許多病原體及其傳播宿主(如登革病毒、茲卡病毒、屈公病毒、日本腦炎病毒及病媒蚊等)的分布範圍日益擴大並快速散播至全球。目前各種新興及再浮現病媒傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，對人類健康所造成的威脅日益嚴重，因此實施完整的傳染病監測及防治是十分重要的。

台灣登革熱流行主要的原因是由於每年由鄰近東南亞國家引進大量的病毒，加以台灣的病媒蚊密度除了在冬季溫度降至 15°C 以下時較低之外，其他季節皆適合病媒蚊孳生，故登革熱易在人口密集及病媒蚊密度高的地區造成流行。茲卡病毒與屈公病毒的傳播與登革熱相同，主要由埃及斑蚊與白線斑蚊所傳播，且鄰近國家皆為疫區，故主動監測及醫師的早期通報，及早發現病例並進行防治工作，對病媒病毒傳染病疫情的控制有很大的幫助。疾管署實驗室可提供快速的監測及檢驗報告，並開發病媒病毒傳染病快速檢驗試劑，縮短檢驗時間，有助於及早發現病例，降低傳染病的流行。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

本計畫主要目標為開發具有生物安全性之 ELISA 及免疫色層分析法的蟲媒病毒傳染病抗體快速檢測試劑。由於使用具有生物安全性之重組桿狀病毒表現蟲媒病毒表面抗原，因而具有生物安全性及高靈敏度的優點。今年度已完成屈公病及日本腦炎抗體快速檢測試劑。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

相關單位在舉辦研討會及教育訓練時，應將登革熱、茲卡病毒感染症、屈公病與日本腦炎之臨床特徵及檢驗方法納入宣導及教育內容。境外移入病媒病毒傳染病之病例數逐年上升，其中很多是無症狀、無發燒之空窗期患者，需要其他監測系統配合，應加強衛教宣導、鼓勵病人自我通報及加強醫師通報等。日本腦炎方面，應強調現有的日本腦炎疫苗能提供具有保護力的中和抗體，鼓勵幼兒按計畫施打疫苗。對高年齡的民眾，若有需要，可考慮再施打疫苗，降低感染的風險。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

因應交通便捷及氣候變遷，台灣地區未來很可能發生病媒病毒傳染病的共同流行(如登革熱、茲卡病毒感染症及屈公病等)。應加強監測，配合實驗室為基礎的檢驗系統，有系統的進行各種病媒病毒傳染病的監測、檢驗與流行病學研究

參考文獻

1. Gubler DJ, 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International, 1–22.
2. Gibbons RV, Vaughn DW, 2002. Dengue: an escalating problem. *BMJ* 324: 1563-1566.
3. Gubler DJ, 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480–496.
4. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, et al. (2016) Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. *Antivir Res* 130:69e80.
5. Musso D, Gubler DJ (2016) Zika virus. *Clin Microbiol Rev* 29:487e524.
6. Powers AM, Logue CH, 2007. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol* 88: 2363-77.
7. Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M, 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis* 7:319-27.
8. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C, 2009. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology* 25;393:183-97.
9. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet*. 2012;379:662-71.
10. Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, et al., 2005. Fever screening at airports and imported dengue. *Emerg Infect Dis* 11:460-2.
11. Shu PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC, Chang MC, Hu HC, Huang JH, 2009. Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003-2007: geographic distribution and genotype shift. *Am J Trop Med Hyg* 80:1039-46.
12. Huang JH, Liao TL, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Kuo YC, Yang CF, Lin CC, Shu PY, 2007. Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005: a molecular epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 77(5):903-9.
13. Chang SF, Yang CF, Hsu TC, Su CL, Lin CC, Shu PY. Laboratory-based surveillance and molecular characterization of dengue viruses in Taiwan, 2014. *Am J Trop Med Hyg*. 2016; 94:804-811.
14. Yang CF, Chang SF, Hsu TC, Su CL, Wang TC, Lin SH, Yang SL, Lin CC, Shu PY. Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2011-2016. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Sep 20;12(9):e0006773.
15. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, et al. (2009) Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360:2536-43.
16. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, et al. (2014) Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 20:1085-6.
17. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI (2015) Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 21:1885-6.
18. Huang AS, Shu PY, Yang CH (2016). A new reportable disease is born: Taiwan Centers for Disease Control's response to emerging Zika virus infection. *J Formos Med Assoc* 115:223-5.

109 年度科技研究計畫期末審查意見回復表

計畫名稱：蟲媒病毒傳染病創新安全快速檢驗試劑之開發與應用

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-133412

計畫主持人：舒佩芸研究員

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
1	無特殊建議。	謝謝委員意見。	無
2	Kd 值有無陽性對照組？	謝謝委員意見。有拿市售抗體(有建議之 KD 值)作陽性對照組。	無
3	也有進行 Rapid antigen tests，但宜進入下一個階段，由專業廠商接手。	謝謝委員建議，正進行臨床檢體評估，並與廠商洽談技轉事宜。	無

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 109 年 12 月 23 日前至 GRB 系統完成資料抽換。