

計畫編號：MOHW105-CDC-C-315-112113

衛生福利部疾病管制署 105 年委託科技研究計畫

漢他病毒抗體快速檢驗試劑之開發

## 年度研究報告

執行機構：疾病管制署 研究檢驗中心

計畫主持人：張淑芬

研究人員：舒佩芸、蘇千玲、楊凱蓉

執行期間：105 年 1 月 1 日至 105 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意\*

# 目 錄

	頁 碼
封面	
一、中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
二、本文	
(1) 前言	(5-9)
(2) 材料與方法	(10-13)
(3) 結果	(14-16)
(4) 討論	(17-21)
(5) 結論與建議	(22)
(6) 計畫重要研究成果及具體建議	(23)
(7) 參考文獻	(24)
三、表次	(25)
四、圖次	(26-32)
	共 (32) 頁

## 中文摘要

由於國際間交通往來日益頻繁，全球氣候也因溫室效應影響，使得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。為因應未來傳染病之侵入及流行，我們應建立一套完整的病媒性傳染病防疫體系，包括檢驗設備之硬體設施、病媒監測系統網、快速的檢驗技術與有效的防治策略等，以有效的降低傳染病流行，解決公共衛生上的危機。本計畫的主要目標在應用以酵素免疫分析法及免疫色層分析法（Immunochromatographic test; ICT）為基礎，開發漢他病毒抗體快速檢測試劑，以期能迅速偵測漢他出血熱腎症候群、漢他肺症候群的引進及流行。快速檢測試劑的優點是操作簡便，能迅速得到檢測結果。有助於快速檢測出傳染病種類、監測鼠類的漢他陽性率來預防疾病的移入，及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。

關鍵詞：—漢他出血熱、漢他肺症候群、酵素免疫分析法、免疫色層分析法

## 英文摘要

As the international close commercial link, modern transportation, and the impact of global warming, vector-borne infectious diseases have gradually invaded to new geographic territories and the number of cases has also increased rapidly. Rapid and accurate diagnosis of hantavirus infection contributes greatly to monitor virus-carrier rate of hantavirus infected rodents caught in harbor, patient management in hospitals and control measures in public health. The main objective of this project is to develop ELISA- and immunochromatographic test (ICT)-based hanta antibody detection kits. ICT-based detection kits can offer faster, cheaper and more efficient than traditional laboratory. Rapid point-of-care testing for specific detection hantavirus pulmonary syndrome 、haemorrhagic fever with renal syndrome infection during late-acute and convalescence phase in order to implement clinical treatment and control measure in public health.

Keyword: hantavirus, ELISA, immunochromatographic test,

## 前言

### 1. 政策或法令依據：

漢他病毒症候群為一種急性人畜共通病毒性疾病，歸類為第二類法定傳染病，依規定應於發現疑似病例二十四小時內通報。

### 2. 問題狀況或發展需求：

由於國際間交通往來日益頻繁，全球氣候也因溫室效應影響，使得各種新興及再浮現傳染病，尤其是病媒性傳染病，在全世界散佈情形正急速增加，發生頻率也愈趨頻繁與嚴重。漢他病毒症候群為一種急性人畜共通病毒性疾病，由感染漢他病毒(Hantavirus)造成，該病毒係屬布尼亞病毒科(Bunyaviridae)之漢他病毒屬，依其抗原性的不同，目前至少有二十種以上血清型別的種漢他病毒，分布在不同地理區域，各有其特有的齧齒類宿主。

這些病毒引起的臨床症狀及疾病嚴重程度有很大的差異，其引起的臨床症狀主要可分成二類，一類主要造成漢他病毒出血熱，又稱為腎症候性出血熱(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)，主要在亞洲和歐洲等地區出現，常見的血清型有漢灘型(Hantaan)、首爾型(Seoul)、普瑪拉型(Puumala)等等，其中以漢灘型對人類最具致病性，死亡率較高，台閩地區鼠類感染漢他病毒之種類均屬首爾型〔1〕，引起的病徵較輕；另一類則引起漢他病毒肺症候群(Hantavirus pulmonary syndrome, HPS)，大多數出現在美洲地區，例如無名病毒(Sin Nombre virus)等。

漢他病毒症候群主要途徑係經由呼吸道吸入鼠類分泌物之飛沫。病毒出現在被感染而無症狀的齧齒類動物之尿液、糞便及唾液中，由肺部中可發現高濃度的病毒。人類一旦吸入或接觸遭病毒污染的空氣或物體或被帶病毒之齧齒動物咬到即會受到感染。每年有大約 20 萬人以上的臨床病例，其中更有多達 100,000 的病例發生在中國大陸。台灣從民國 84 年台灣發生首次大陸境外移入漢他出血熱的病例後，90 年到目前也陸續發生了好幾個確定病例。近年來兩岸經貿往來頻繁，尤其是小三通後，將勢必可能對台灣的漢他疫情造成衝擊。為避免漢他病毒藉由鼠類自國外傳入我國，署內於民國 93 年底開始於港阜地區及臨近區域，監測鼠類的漢他病毒抗體陽性率，以在適當時間採防治措施，降低鼠類數量。

漢他病毒的感染必須經由實驗室診斷的確認，目前主要的檢驗方式包括病毒抗原、病毒核酸及抗體的檢測。但以免疫螢光抗體測定法(IFA)及酵素免疫分析法 (ELISA) 為主要檢驗特異性抗體的方法，大部份病人於住院期間即有 IgM 抗體產生。IFA 與 IgM/IgG ELISA 係檢測恢復期 (感染後 5-30 天) IgM 及 IgG 抗體，是一個有效且快速又具有高靈敏度的系統，可彌補耗時耗力的中和試驗。同時亦適用於有多型漢他病毒流行地區。但目前市售抗體有價格昂貴；另一方面可發展與 ELISA 原理相同，以色層免疫分析法為原理製作的快速檢驗試劑，可於 15-30 分鐘內檢測出急性期血清病毒抗原及恢復期血清 IgM 及 IgG 抗體。

本計畫的目標在建立簡單、快速又檢驗多種血清型的漢他症候群快速診

斷系統，研發自製的快速檢測試劑可提升後急性期及恢復期的血清檢驗的靈敏度、降低檢驗價格、檢驗試劑的來源也不虞匱乏，使防治工作更具成效。

### 3. 國內外相關研究之文獻探討：

P. Heyman 等人發表「比利時漢他感染的盛行率」。在比利時，人感染漢他病毒野生株首例發生於 1978 年，病例發生的主要高峰期在 6-9 月的夏季，次高峰發生於 1-3 月的冬季，而與老鼠的密度高峰相吻合。由 1977-2000 年的數據，他們發現 3 年為一週期循環，流行年為 1987、1990、1993、1996 及 1999，流行年病例數的增加是因醫療診所對該疾病的認知提高以及實驗室診斷能力提昇所致。在非流行年其發生率為 0.2-0.5/100000 人（平均 36 例），流行年發生率為 2.0/100000 人（平均 157 例）(8)。

M. Bouloy 等人發表「Alphavirus replicon 表現的 PUU 核蛋白是 HFRS 診斷的可能抗原」。目前血清學診斷以及 RT-PCR 是診斷最常用的方法，然而 RT-PCR 僅適用於病毒血症期，且常常因病毒在細胞培養長得很慢，而無法分離出來。在感染早期，核蛋白是誘導抗體反應的主要抗原。在不同實驗室，此核蛋白可經由大腸菌、昆蟲、哺乳動物細胞等不同媒介者變成重組抗原。他們經由哺乳動物細胞的 Semliki Forest replicon 重組核鞘蛋白變成重組抗原，並將此抗原與原抗原比較抗原性質。結果顯示原抗在 IgG ELISA 診斷方法中較敏感，而 IgM ELISA 及 IFA 則效率及敏感度相同。

應用免疫色層分析法技術發展出的快速檢測試劑最早出現於 1988 年的驗孕試劑。至今已有許多不同的檢測試劑發展出來，如藥物、農藥、醫學、

傳染病等檢測。

快速免疫色層分析法常用於傳染病病原體蛋白質抗原或抗體的檢測，其原理如下：檢測試劑主要由幾種元件組成，包括樣品墊 (sample pad)、結合墊 (Particle conjugate pad)、薄膜試紙 (Nitrocellulose membrane)、吸收墊 (Absorbent pad) 與底卡。使用噴印設備將測試線 (Test line) 與控制線 (Control line) 塗佈於薄膜試紙上，各種元件組裝切割後即完成。

其測試原理與一般免疫分析法相同，但檢測方法非常簡單，只需將檢體滴入檢測試劑上，幾分鐘內即可獲得結果。目前市面已售之傳染病快速檢測試劑包括 Influenza virus、AIV、SARS、Dengue virus、Adenovirus、Epstein-Barr virus、HBV、HIV、M. tuberculosis 等。因為 ELISA 方法與快速免疫色層分析法之基本原理相似，所以可以利用 ELISA 方法來篩選免疫色層分析法所需的試劑，並評估其靈敏度及專一性。由於高靈敏度及專一性的快速診斷試劑，一直是大家所努力與希望達成的目標與趨勢，故有必要儘速發展傳染病之快速診斷試劑。

#### 4. 本計畫與防疫工作之相關性：

漢他病毒在全世界廣泛分布，所引起的臨床症狀可分為漢他出血熱腎症候群及漢他肺症候群，分別有 1%~15% 及 50% 的致死率。日本、韓國、中國、馬來西亞、俄羅斯、獨立國協、東歐、南歐皆有漢他病毒症候群 (Hantavirus Syndrome) 病例，每年造成約 20 萬以上的臨床病例，其中鄰近的中國大陸每年發生病毒數高達 100,000 的例，近年來兩岸經貿往來頻繁，尤其是小三通



後，將可能對台灣的漢他疫情造成衝擊。為避免漢他病毒藉由鼠類自國外傳入我國，署內於民國 93 年底開始於港阜地區及臨近區域，透過監測鼠類的漢他病毒抗體陽性率，以在適當時間採防治措施，降低鼠類數量。可有效防止病毒藉由鼠隻大量繁殖病毒而傳播疾病，有利於疫情的及時監測與緊急防治措施。

漢他病毒在新世界的分布比原來預計的範圍更廣，血清型別更多，目前全世界有更多的地方開始瞭解並正視此疾病，積極建立該疾病偵測系統，例如墨西哥、泰國、印尼等國家。

在舊世界的漢他病毒的分類仍然適用，但在新世界的漢他病毒臨床症狀的變化多端，特別是南美洲，則需要更多的研究加入。應用免疫色層分析法為基礎的快速檢測試劑，其最大的優點是不需特殊的儀器，操作簡便，能迅速得到檢測結果。有助於快速檢測出傳染病種類，及早偵測病例，以達到早期治療，降低死亡率。並可提早實施防疫工作，對傳染病的防治工作有極大的幫助，未來可應用於流行病學的研究。

## 材料與方法

本計畫之實施方法主要分為六部分：(一) 血液檢體、組織之收集；(二) 基因重組蛋白之置備與純化；(三) 重組基因蛋白標誌 AP/HRP 酵素；(四) ELISA 快速檢測試劑之製備與分析

### (一) 人、老鼠血液檢體、鼠類組織之收集：

人的來源為通報自疾病管制署之各種漢他病毒傳染病的驗餘血清及老鼠血液、組織檢體來源則為港阜檢疫檢體。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。病人與老鼠檢體收集後，將進行血清學及分子生物學之實驗室診斷，以確認感染源。不同期血清，將用以分析病人血清中抗原的含量或對各種抗原之抗體反應。經實驗室確診為陽性反應之檢體將加以分裝，儲存於  $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍櫃長久保存。

### (二) 基因重組蛋白之製備與純化：

- (1) 漢他病毒抗原之純化與分析：由於大腸桿菌(*Escherichia coli*) 可提供便宜、快速且能大量生產蛋白質的多種優點，故本計畫採用 *E. coli* 表現重組蛋白質。首先利用 RT-PCR 或 PCR 得到蛋白質的 DNA 片段。將多種血清型的 HTNV 的 NP 蛋白利用 RT-PCR 或 PCR 得到蛋白質的 DNA 片段，並於 5'端與 3'端加上 Bam HI 及 sal I 限制酶切位，將此 DNA 片段選殖至 pET 表現系統(Novagen)，產

生 N 端(或 C 端)為 His-tag 的全長重組蛋白質。利用 Anti- His-tag mAb (正對照組)、Anti-NS1 mAb 等，以 immunoprecipitation 及 Western blot 方法檢測重組蛋白質是否帶特異的抗原決定位置。再大量表現、純化，並利用 ELISA 的方法評估其發展 ELISA 及 ICT 檢驗試劑之可能性。將 HTN S、M、L 及 NP Ag 以 PCR 及引子放大基因的全長或部分 DNA 片段，並於 5'端與 3'端加上不同的限制酶切位，將此 DNA 片段利用限制酶選殖至 pET-47b 表現載體上，產生 N 端為 His-tag 的基因重組蛋白質，利用最終濃度 80 μM 的 IPTG (Merck)誘導 *E.coli* 大量表現此重組蛋白質。

- (2) 將大量表現之重組蛋白以 14,000 rpm、10 分鐘離心收集 *E.coli*，再以 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 8M urea, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM imidazole, pH 8.0)溶解 *E.coli*，置於 4°C 冰箱一小時後，以 14,000 rpm、10 分鐘離心收取上清液。再將上清液用 Ni-NTA His•Bind® Resin (Merck)進行純化，上清液先通過含有 Resin 的 column 兩次，再以 10 mL 含有 10 mM imidazole 的 wash buffer (10 mM Tris-HCl, 8M urea, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0)沖洗 column 兩次，接著分別以 8 mL、6 mL 含有 20 mM、40 mM imidazole 的 wash buffer 沖洗 column 一次，最後以 10 mL 含有 500 mM imidazole 的 elution buffer (10 mM Tris-HCl, 8M urea, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0)沖出 N 端帶有 His-tag 的重組蛋白質。將上述純化後之重組蛋白質，以 refolding

buffer (50 mM Tris, pH8.0, 400mM L-arginine, 1.0mM GSH, 0.1 mM GSSG)進行透析，置於 4°C 冰箱，透析三天，至少更換兩次 buffer，最後以 PBS pH7.4 進行最後透析，於八個小時後收取蛋白質。經過透析之後的蛋白質以 1 mL 的體積分裝於 1.5 mL eppendorf，冰存於-20°C，取其中一支進行 bradford 蛋白質定量，以 O.D 595nm 測定蛋白質濃度。

### (三) 標誌基因重組蛋白：

將生產的重組蛋白先以 Ni-NTA His•Bind® Resin (Novagen)進行純化，再以 AP/HRP 酵素標誌。Lightning-Link (Innova Biosciences, UK)是以共價鍵結，辨視蛋白質/抗體/胜肽的 amino groups (lysine/a-amino)來進行標誌反應，以 100ug 的單株抗體與 100ug 的 Lightning-Link-AP 或以 2~400ug 的單株抗體與 100ug 的 Light-Link-HRPmodifier 在室溫下反應至少 3 小時後，再以 Quencher reagent 化學反應徹底中止殘餘反應及停止非專一性結合，之後加入 40-50%抗凍劑(glycerol)冷凍保存。

### (四) ELISA 快速檢測試劑之製備與分析：

**Indirect IgM and IgG ELISA:**先以 1µg/ml, 100 µl/well of 重組蛋白在 4°C 下隔夜吸附(coating)在 96 孔微量效價盤上。再用 200µl 之 1% 牛血清白蛋白緩衝液( 1% Bovine serum albumin in PBS )於 37°C 下進行 1 小時 blocking 作用。以 PBS 清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對

照血清反應 1 小時。再加入 1:2000 稀釋之山羊抗人 IgM 或 1:15000 稀釋之山羊抗人 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體，於 37°C 反應 30 分鐘。最後加入酵素受質體 PNPP，於室溫作用 30 分鐘，再以波長 405 nm 測吸光度。

## 結果

### (一)建置漢他病毒不同血清型 Nucleocapsid(NP)重組蛋白

表一為利用 gene cloning 方法在 E.coli 表現系統上，建置含有五種不同血清型 Seoul, Hantaan, Puumala, Dobrava, Sin Nombre (SEO、HTN、PUU、DOV、SNV)的漢他病毒(NP)基因重組蛋白質的質體基因庫，如表一。經生產與純化後可用做酵素免疫分析法(ELISA)及免疫色層分析法(ICT)為基礎的快速檢驗試劑檢驗。

### (二)漢他病毒 Nucleocapsid 重組蛋白質之製備與純化：

我們利用 RT-PCR 或基因合成方式產生五種不同漢他血清型(SEO、HTN、PUU、DOV、SNV)核鞘蛋白(Nucleocapsid, NP)的 S 片段 DNA，約 429 ~433 a.a，如圖一。再利用 gene cloning 方法建置於 sumo vector 上大量生產漢他病毒 NP 重組蛋白，如圖二。從胺基酸序列比對後，可以得知這五種血清型的漢他抗原蛋白有相當程度的相似度，因此血清抗體容易對不同血清型的抗原有交叉反(cross-reactivity)，其中 SEO、HTN 與 DOV 的胺基酸序列更有高達 50%以上的相似度，如圖一。

以國內所收集到的陽、陰性病人血清(Seoul)檢體及市售試劑(IGL、PROGEN)所提供的不同型別(Hantaan、Puumala)的漢他陽性控制血清、單株抗體(Anti\_His Ab; 34757 -Anti\_Seoul, Puumala, Sin Nombre Ab; 1D11-Anti\_Puumala Ab; 1E9/G2-Anti\_Dobrava Ab) 及港埠所收集到的

鼠類血清進行 western blot 所得到的結果，如圖三。圖三左為以抗漢他抗體對蛋白所做的專一性實驗，結果顯示 Anti-His 單株抗體成功確認漢他病毒症候群 SEO、HTN、PUU、DOV、SNV 共五種血清型別 NP 重組蛋白質皆有表現外；利用其他單株抗體來確認表現蛋白的專一性，如單株 34757 確可辨識到 SEO & PUU & SNV 重組蛋白抗原，1D11 及 1E9 單株則確認分別只對單一的 PUU 或 DOV 抗原有反應。在臨床血清檢體方面，PUU IgG 陽性控制血清雖對 Puumala、Sin Nombre 抗原蛋白皆有反應，但對 Puumala 型別有較強的陽性反應；HTN IgG 陽性控制血清與人的陽性血清則分別辨識到 Hantaan, Dobrava and Seoul 三種血型別的漢他抗原蛋白；鼠類陽性血清也辨識到 Hantaan, Dobrava and Seoul 三種型別的漢他抗原蛋白，其中又以 Seoul 型別表現量最強（如圖三右）。

### (三)建立漢他重組蛋白酵素免疫吸附分析法：

我們利用建置完成的五種不同血清型的漢他 NP 重組蛋白質，測試不同比例混合後與市售試劑 Focus, USA 的 ELISA 試劑對人的血清檢體做檢測結果比對，並將陽、陰性血檢體同步以 PROGEN, Germany 的 IFA 試劑進行結果確認(如表二)與型別判定（結果未顯示），結果顯示自製試劑偵測漢他病毒特異性 IgM/IgG 抗體結果與其他市售抗體檢測試劑測得的陽性率幾近完全相同(如圖四與表二)，蛋白質抗原

的專一性及特異性經 anti-his 單株抗體,專一性抗體及病人血清確認其抗原性。已建置 ELISA 系統,漢他病毒症候群的 IgM 的 ELISA sensitive 為 100 %, specificity 為 100%, PPV 為 100%, NPC 為 100%。IgG ELISA 的 sensitive 為 100 %, specificity 為 100%, PPV 為 100%, NPC 為 100%(如表三)。進一步以國內收集到人及鼠類的血清作 IFA 型別分析,檢體經序列稀釋後與感染各種型別漢他病毒的細胞作反應,得到檢體的血清型別皆為 Seoul 血清型,但在 ELISA 檢測結果上,對 Hantaan, Dobrava and Seoul 會有一樣強的交叉反應,這結果也與 western blot 顯示的 Data 一致(圖三)。然而從 IBL 與 PROGEN Hantaan 及 Puumala 試劑中所提供的強、弱陽性控制血清(PC)得到的 ELISA 結果則清楚辨識到 Puumala IgM/IgG 特異性抗原;Hantaan 血清的 IgM 反應較弱,對 SEO,HTN,DOV 皆為陽性反應,但在 IgG 結果上卻對 Hantaan 重組蛋白有專一性反應(如圖 6)。而在鼠類血清方面,相較於人的檢體,IgG 結果除了一樣可完全成功辨識出陽、陰性檢體外,也可成功區分出目前從台灣港阜收集來的陽性鼠類血清,主要型別是漢城型(Seoul),這似乎與國外論文提及抗原在 IgG ELISA 診斷方法中較敏感的結論相同。

所以初步推論開發的漢他病毒血清學檢驗試劑是可以成功應用在檢驗與分型上,圖 7 為目前市面上所有試劑類型與品牌,可作為評估與製作試劑的參考的對象。



## 討論

漢他出血熱及肺症候群，分別有 1%~15%及 50%的致死率。日本、韓國、中國、馬來西亞、俄羅斯、獨立國協、東歐、南歐皆有漢他病毒症候群(Hantavirus Syndrome)病例，每年造成約 20 萬以上的臨床病例，其中鄰近的中國大陸每年發生病毒數高達 100,000 的例，近年來兩岸經貿往來頻繁，尤其是小三通後，對台灣的漢他疫情造成衝擊不容有所輕忽。漢他病毒廣泛分布在全世界，目前已知鼠類為漢他病毒的主要宿主，有多種的齧齒動物伺機將漢他病毒傳播給人。台灣從民國 84 年台灣發生首次大陸境外移入漢他出血熱的病例後，90 年到目前，每隔一年都會有陽性確定病例。尤其今年更在高雄地區傳統市場更發生了類似群聚的漢他病毒感染事件。在地球環境逐漸暖化的現在，病媒性傳染病更較以往猖獗。以往因缺乏足夠的檢體來源，以致一直無從建立更完善的漢他病毒檢驗技術。但自署內於民國 93 年底開始於港阜地區及臨近區域，透過監測鼠類的漢他病毒抗體陽性率，以在適當時間採取防治措施，降低鼠類數量後。除有效防止了病毒藉由鼠隻大量繁殖病毒而傳播疾病，有利於疫情的及時監測與緊急防治措施外。另一方面可藉由收集到的血清幫助建立更適用於臺灣漢他病毒診斷的的漢他病毒實驗室血清學檢驗系統，期望能對疫情監測及醫學臨床診斷端能有所貢獻。

目前世界上主要造成人類疾病的漢他病毒，主要有引起漢他病毒出血熱 (1) 漢灘病毒(Hantaan virus), ; (2) 漢城病毒：(Seoul virus); (3)

普馬拉病毒(Puumala virus)；(4) 多伯伐病毒(Dobrava virus)及(5) 引起「漢他病毒肺症候群」的 Sin Nombre 病毒。並參考市面上所有的快速檢驗試劑，如圖 7。從論文中評選受到肯定的 Focus, USA 的漢他 ELISA 試劑作為發展自製快速檢驗試劑的先期目標，並選擇相同的五種型別的漢他重組蛋白作為開始，其中涵蓋的 Seoul, Hantaan 是流行在亞洲區域最重要的血清型別。從圖三可以清楚得知自製試劑測試結果能與 Focus, USA 的漢他 ELISA 試劑檢測結果一致。而收集的台灣地區人與老鼠的陽性血清檢體，經 IFA 確認後皆屬於 Seoul 血清型(表二)。繼之以血清學做進一步的型別分析，冀望能以 ELISA 快速檢測法成功取代 IFA 的分型結果。從 IBL 與 Progen 試劑中所提供的強、弱陽性 Hantaan 及 Puumala 控制血清(PC)在 In house serotype- hantavirus ELISA 中的確能成功區分出血清型別。在老鼠的血清方面，圖五(3) 顯示分型結果中，seoul 雖會與 Hantaan、Dobrava 有交叉反應，但卻可以清楚從 sigama plot 的圖形中明顯看出所有檢體對 Seoul 血清型的 O.D.值都在 mean 之上，代表所有血清型別為 Seoul。但國內所收集到人的血清檢體不管在 In house hantavirus recombinant protein 的 western blot(圖三) 或 serotype-hantavirus ELISA(圖五)的結果都顯示會與 seoul、Hantaan 與 Dobrava 三種血清型皆有效價相當的陽性反應，無法明顯區分。這部份建議以 truncated hantavirus nucleocapsid proteins 來區分 Hantaan、Seoul(SOE)及 Dobrava(DOB) 漢他病毒感染型別，利用缺乏 N terminal

50 a.a. 的 hantavirus nucleocapsid proteins 當做 ELISA 方法中血清分型的抗原，希望達到快速且有效的分型 ELISA 系統。這類的血清型別是屬於造成 Haemorrhagic fever with renal syndrome(HFRS)的舊世界的漢他病毒(e.g. **Hantaan, Dobrava and Seoul**)；舊世界的漢他病毒中的另一類是造成 Nephropathia epidemica (NE)的(e.g. **Puumala**)及新世界漢他病毒造成 cardiopulmonary syndrome (HPS)的 **Sin Nombre**。進一步了解多伯伐型引發的疾病症狀最嚴重，死亡率約在 5-10% ，其次是漢城型，死亡率約為 1-2% ，感染此型病毒的患者多有肝炎症狀，這是和其他三種型別的臨床症狀最大不同之處；而且因為傳播宿主的活動習性，漢城型病毒的感染比較常發生在都市地區。普馬拉型引起的症狀最輕微，致死率只有 0-0.2% 。而引起「漢他病毒肺症候群」的 Sin Nombre 病毒僅出現在美洲地區，是新世界主要的漢他病毒血清型。利用這些特點，可更進一步細分可能感染的型別。

根據港阜研究調查結果顯示，台灣地區目前至少有啮齒目的溝鼠 (*Rattus norvegicus*)、家鼠(*R. rattus*)、鬼鼠(*Bandicota indica*)、黃胸鼠(*R. flavipectus*)、月鼠(*Mus musculus*)、小黃腹鼠(*R. losea*)、赤背條鼠 (*Apodemus agrarius*) 及食蟲目的錢鼠(*Suncus murinus*)等八種漢他病毒宿主存在。從收集到的鼠隻陽性血清所做分析結果都為漢城型(*Seoul*)，圖 5(3)，結果與 IFA 的結果一致。其中溝鼠的抗體陽性率占最高，是主要的漢他病毒傳播者(結果未顯示)。

由鼠媒所引起的漢他出血熱及漢他肺症候群，是台灣地區的病媒性傳染病之一，近年來鼠患頻傳，病例更有持續增加的趨勢(圖八)。目前疾管局漢他出血熱/肺症候群檢驗包括二種項目：病毒核酸分子檢測、IgM/IgG 抗體檢測，必要時搭配 IFA 確認型別。但由於市售檢測試劑昂貴，完全仰賴國外購入。且如需細分型別，則須購買多種型別的試劑，更是所費不貲，也常有供貨品質不穩定或因購買量不足，不生產某種型別的檢測試劑。而自行研發的檢測試劑，分批次生產五種抗原，其每次的生產量可達約 100~200ug，約可生產約 10 plate(96-well)的檢測量，每年僅需生產三個批次就可提供 1 年 ELISA assay 使用，但如果生產 ICT，就需要較高的產量。所以研發自製的病媒病毒快速檢測試劑除了可維持血清檢驗的靈敏度外，還有許多優點，包括可降低檢驗價格、檢驗試劑的來源也不虞匱乏。

本計畫在應用酵素免疫分析法技術 (ELISA)，建立簡單、快速又檢驗多種血清型的漢他症候群快速診斷系統，希望藉由發展快速、便宜、方便的檢測試劑穩定提供傳染病的防疫檢驗，而結果顯示不但可成功開發出偵測到漢他特異性 IgM/IgG 抗體，也在血清型別分析上有了初步結果。可用來幫助機場港阜的鼠類漢他檢體的監測及醫療院所(Point of Care Testing)診斷工作。將來更可進一步開發出偵測 IgM/IgG 抗體的 ICT 快速檢驗試劑。應用於機場港阜的鼠類漢他監測及醫療院所(Point of Care Testing)診斷工作。將有助於防止境外移入與本土擴散，並幫

助病人的及時診斷與治療。

## 結論與建議

良好的檢驗試劑，需經由不斷的改良與試驗，以增加檢驗的專一性及靈敏度，並同時能檢測出不同血清型別、不同地理區域之病毒株，使之更可靠的應用於漢他出血熱的例行性檢驗。在病毒株不斷的演化，新的病毒株不斷的出現下，需持續提升診斷試劑的靈敏度。由於研發過程長，需時間與有經驗的人才，及有長期的研發策略，以因應未來的發展。

## 計畫重要研究成果及具體建議

由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加。由鼠媒所引起的漢他出血熱及漢他肺症候群，是台灣地區的病媒性傳染病之一，近年來鼠患頻傳，病例更有持續增加的趨勢。本計畫在應用酵素免疫分析法技術 (ELISA)，開發漢他檢驗試劑，並希望藉由血清學分型上的快速分型幫助應用於機場港阜的鼠類漢他監測及醫療院所(Point of Care Testing)診斷工作。將有助於防止境外移入與本土擴散，並幫助病人的及時診斷與治療。

### 2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

加強衛教宣導、加強環境清掃，避免接觸鼠類，居家周圍環境鼠類的數目越多，感染的機率越高，因此應減少周圍環境鼠類數目。應加強對餐廳、飯店、食品工作、市場、機場及港阜鄰近地區進行監測，減少境外移入病毒的引進及本土擴散。

### 3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

漢他血熱及肺症候群在鼠患日益增加的環境下，須加強監控與鑑別診斷，未來應加強機場發燒篩檢監測，並配合實驗室為基礎的檢驗系統，有系統的進行各種病媒性病毒的監測、檢驗、與流行病學研究。未來可考慮製作 ICT 為基礎的快速檢驗試劑，在機場、港阜當地進行定期抽採鼠樣的檢測監控，及在醫療院所使用快速檢驗試劑，及早檢驗出確定病例。

## References

1. Chen HY, Wang SF, Huang WT, et al. Hantavirus Syndrome. In: A Clinical Guide to Zoonoses. Taipei: Centers for Disease Control, Department of Health, 2006; 26-36.
2. Walter M, Udo B, Martin Z, et al. Hantavirus infection. Journal of the American Society of Nephrology 2005; 16: 3669-79.
3. Chow L, Shu PY, Huang JH, et al. Epidemiologic Investigation of Hantavirus in Taiwan Area. Department of Health, Taiwan, 2002. (In Chinese).
4. Chow L, Shu PY, Huang JH, et al. A retrospective study of hantavirus infection in Kinmen, Taiwan. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 2005; 38: 343-9
5. 衛生福利部疾病管制署，傳染病防治手冊漢他病毒症候群，  
<http://www.cdc.gov.tw>
6. <http://www.who.int/ith/diseases/hantavirus>
7. Johansson P, Yap G, Low WT, Siew CC, Kek R, Ng LC, Bucht G. Molecular characterization of two hantavirus strains from different rattus species in Singapore. Virol J. 2010;7:15 (doi:10.1186/1743-422X-7-15)
8. Heyman P(1), Vervoort T, Escutenaire S, Degrave E, Konings J, Vandenvelde C Incidence of hantavirus infections in Belgium. Virus Res. 2001 Sep;77(1):71-80.
9. Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. (1996). Hantaviruses: Genome structure, expression and evolution. J General Virology 77: 2677-2687.



**Table1. Hantavirus Plasmid DNA library :**

1.No.	2. Plasmid name	3. insert	4.Size	5.residues (a.a.)	6.MW (kDa)	7. PCR check	8.western check
1	SEO/ sumo	Hanta NP(S)	1287 bp	429	48.1	v	v
2	HTN/ sumo	Hanta NP(S)	1287 bp	429	48.1	v	v
3	PUU/ sumo	Hanta NP(S)	1299 bp	433	49.5	v	v
4	DOV/ sumo	Hanta NP(S)	1287 bp	429	48.1	v	v
5	SNV/ sumo	Hanta NP(S)	1284 bp	428	48.2	v	v

**Table 2 Diagnostics performance of the In house Hantavirus serotype-specific IgM/IgG ELISA**

Human serum panel	n	commercial Hantavirus ELISA		In house Hantavirus ELISA		commercial Hantavirus IFA	
		IgM pos	IgG pos	IgM pos	IgG pos	IgM pos	IgG pos
SEO	16	16(100%)	16(100%)	16(100%)	16(100%)	16(100%)	16(100%)
HTN	4	4(100%)	3(75%)	4(100%)	3(75%)	2(50%)	3(75%)
DOV	0	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
PUU	4	3(75%)	1(25%)	3(75%)	2(50%)	1(25%)	2(50%)
SNV	0	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Control-	13	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)

**Table3 measurements of In house Hantavirus IgM/IgG ELISA**

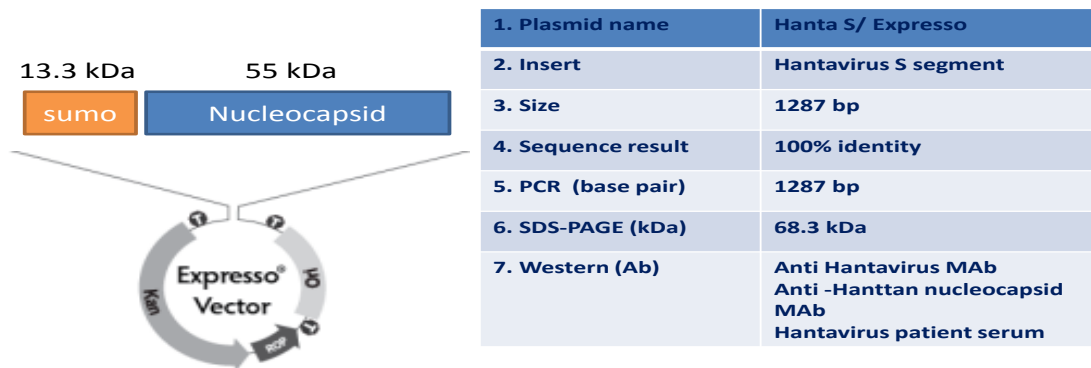
Hanta IgM		Commercial Kits		Hanta IgG		Commercial Kits(ELISA/IFA)	
		positive	negative			positive	negative
In house	positive	23	0	In house	positive	21	0
	negative	0	12		negative	0	12
Diagnostics sensitivity:100% (23/23)				Diagnostics sensitivity:100% (21/21)			
Diagnostics specificity:100% (12/12)				Diagnostics specificity:100% (12/12)			
Agreement:100% (35/35)				Agreement:100% (33/33)			
PPV:100% /NPV:100%				PPV:100% /NPV:100%			

**Fig1 HantavirusSEO/HTN/PUU/DOV/SNV plasmid insert sequence**

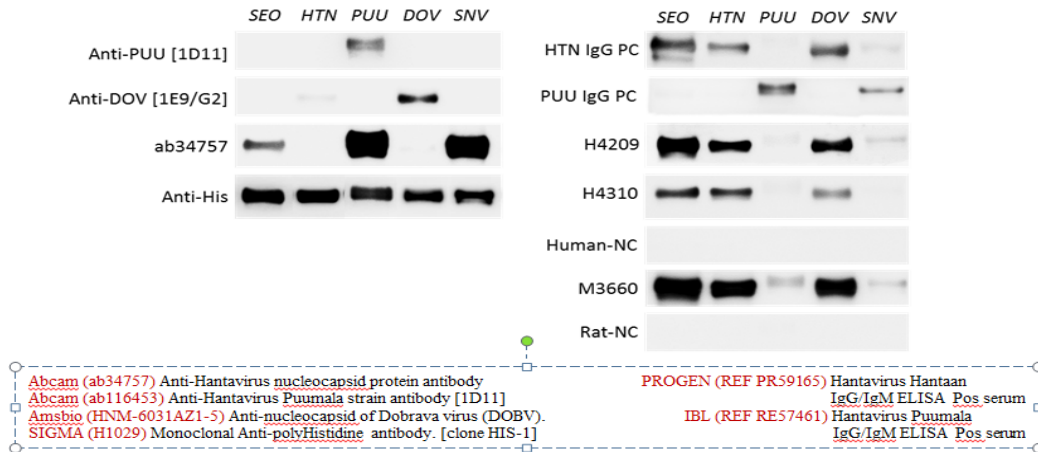
SEO 1	MATMEEIQREISAHEGQLVIARQEVKDAEKQYEKDPDDLNRKRALHDRRESVAASTQSKIDELKRQLADRIAAGKNIQQDRD	80
HTN 1	MATMEELQREINAHEGQLVIARQEVKDAEKQYEKDPDELNRKRLTDREGVAVSIQAKIDELKRQLADRIATGKNLQKEQD	80
PUU 1	MSDLTDIQEDITRHEQQLIVARQKLDKDAERAVEVDPDDVKNVILQARQQTVSALEDKLADYKRMADAVSRKMDTKPTD	80
DOV 1	MATLEELQKEINNHEGQLVIARQEVKDAEKQYEKDPDDLNRKRALSDRESVAASTQSKIDELKRQLADRIAAGKNIQKERD	80
SNV 1	MSTLKEVQDNITLHEQQLVTARQKLDKDAERAVELDPDDVKNKSTLQSRRAAVSALETKLGELKRELADLIAAQKLASKPVD	80
SEO 81	PTGVPEGDHLKERSALSYGNVLDLNSLDIDEPTGQTADWLTIIIVYLTSFVVPPIILKALYMLTRGRQTSKDNKGMIRIFK	160
HTN 81	PTGVPEGDHLKERSMLSYGNVLDLNSLDIDEPTGQTADWLSIIIVYLTSFVVPILLKALYMLTRGRQTTKDNKGTIRIFK	160
PUU 81	PTGIEPDDHLKERSRLRYGNVLDVNAIDIEEPSGQTADWYTIIGVYVIGFTLPIILKALYMLSTRGRQTVKENGTIRIFK	160
DOV 81	PTGLDPGDHLKEKSMLSYGNVIDLNSLDIDEPTGQTADWLSIIIVYLTSFVVPILLKALYMLTRGRQTTKDNKGMIRIFK	160
SNV 81	PTGIEPDDHLKEKSSRLRYGNVLDVNSIDLEEPSGQTADWKSIGLYILSFALPIILKALYMLSTRGRQTIKENGTIRIFK	160
SEO 161	DDSSYEDVNGIRKPKHLYVSMPTAQSTMKAEEITPGRFRTAVCGLYPAQIKARNMSPVMSVVGFLALAKDWTSRIEEWL	240
HTN 161	DDSSYEDVNGIRKPKHLYVSMPTAQSTMKAEEITPGRFRTAVCGLYPAQIKARNMSPVMSVIGFLALAKDWSDRIEQWL	240
PUU 161	DDTSFEDINGIRKPKHLYVSMPTAQSTMKAEEITPGRFRTIVCGLFPTQIQVRNIMSPVMGVIGSFFVKDWSERIREFM	240
DOV 161	DDSSYEDVNGIRKPKHLYVSMPTAQSTMKAEEITPGRFRTAVCGLYPAQIKARNMSPVMSVIGFLALAKNWTERVEEWL	240
SNV 161	DDSSYEVNGIRKPKHLYVSMPTAQSTMKAEEITPGRFRTIACGLFPAQIKARNMSPVMSVIGSFFVKDWMERIDDFL	240
SEO 241	GAPCKFMAESPIAGSLSGN---PVNRDYLRQQRGALAGMEPEKFQALRQHAADAGCTLVEHIESPSSIWVWVAGAPDRCP	316
HTN 241	IEPCKLLPDTAAVSLGGP---ATNRDYLNRQQRVALGNMETKESKAIHQHAEAGCSMIEDIESPSSIWVWVAGAPDRCP	316
PUU 241	EKECPFIKPEVKPGTPAQEiemlKRNKIYFMQRQDVLKDNHVADIDKLIDYAAAGDPTSPDNIDSPNAPWVWVACAPDRCP	320
DOV 241	DLPCKLLSEPSPTSLTKGP---STNRDYLNRQQRGALAKMETKEAQAQRKHAIDAGCNLIDHIDSPSSIWVWVAGAPDRCP	316
SNV 241	AARCPFLPEQKDPDRAA----LATNRAYFITRQLQVDESKVSDIEDLIADARAESATIFADIATPHSVWVWVACAPDRCP	315
SEO 317	PTCLFVGGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTADEKLRRKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVFMVWAWGKEAVDNF	396
HTN 317	PTCLFIAGIAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTSEEKLRRKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVLFMVWAWGKEAVDNF	396
PUU 321	PTCIYVAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTAEELKRRKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIILLFMLEWGWKEMVDHF	400
DOV 317	PTCLFIAGMAELGAFFAVLQDMRNTIMASKTIGTSEEKLRRKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVLFMVWAWGKEAVDSF	396
SNV 316	PTALYVAGMPELGAFFAIIQDMRNTIMASKSVGTSEEKLRRKSAFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIILYMSHWGREAVNHF	395
SEO 397	HLGDDMDPELRSLAQILIDQKVKEISNQPEMKL	429
HTN 397	HLGDDMDPELRTLAQSLIDVKVKEISNQPEPLKL	429
PUU 401	HLGDDMDPELRGLAQUALIDQKVKEISNQPEPLKI	433
DOV 397	HLGDDMDPELRGLAQUALIDQKVKEISNQPEPLKL	429
SNV 396	HLGDDMDPELRELAQTLVDIKVREISNQPEPLKL	428

**Figure 2**

*Hantavirus Hantaan S segment/ Expresso Vector*

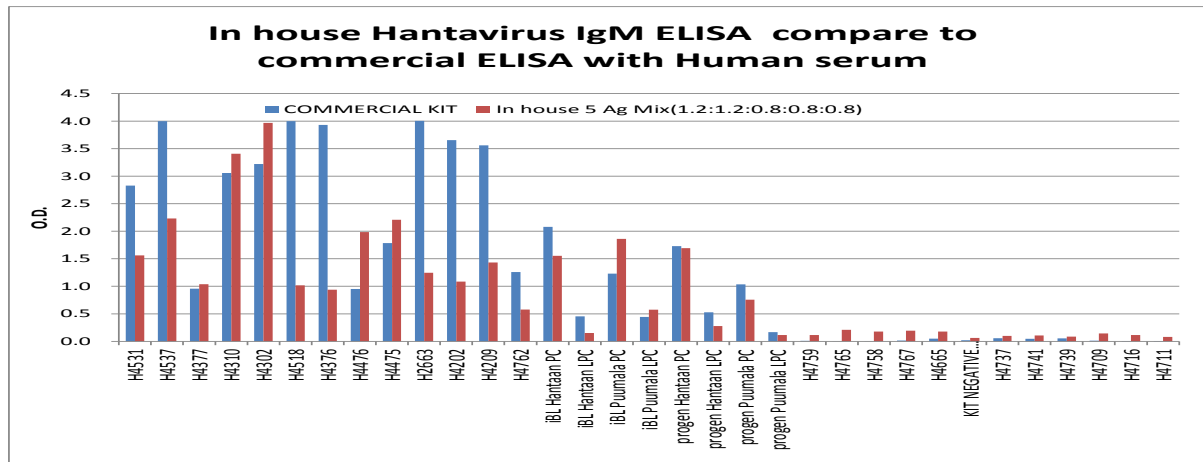


**Fig3 Expression of recombinant Hantavirus nucleocapsid protein**  
**Anti-Hantavirus nucleocapsid protein**  
**Western blot**

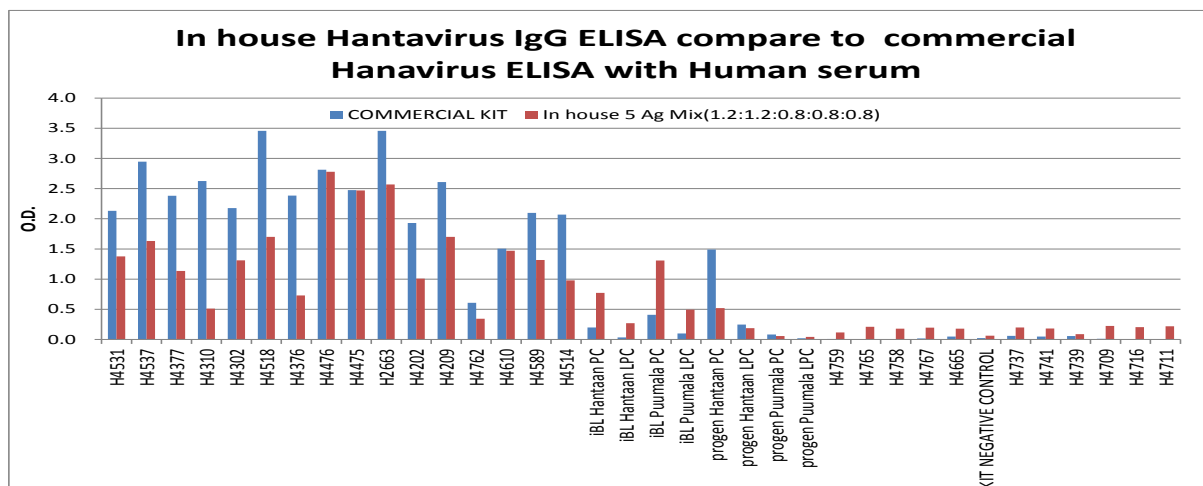


**FIGURE4 In house Hantavirus IgM/IgG ELISA compare to commercial ELISA with Human/Rat serum**

(1)



(2)



(3)

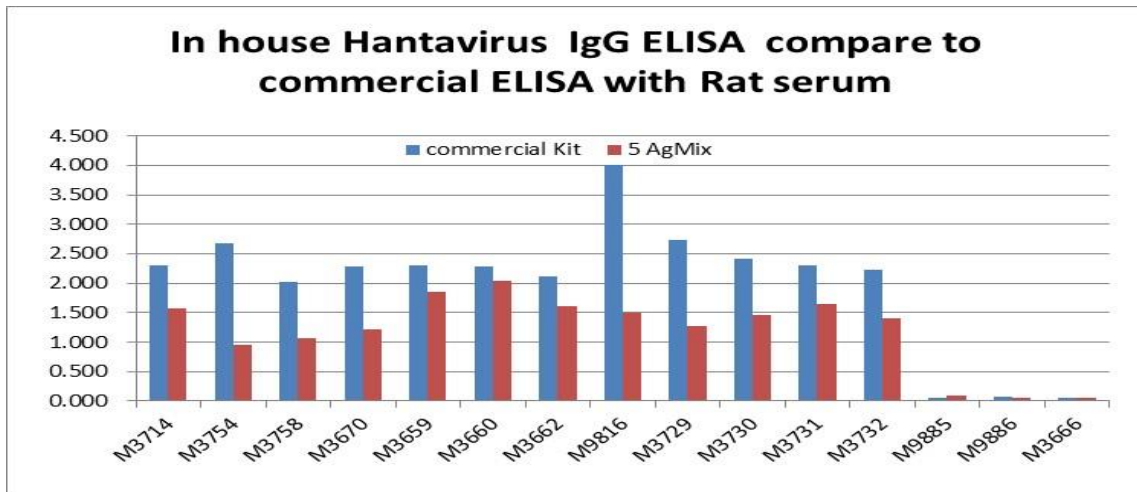
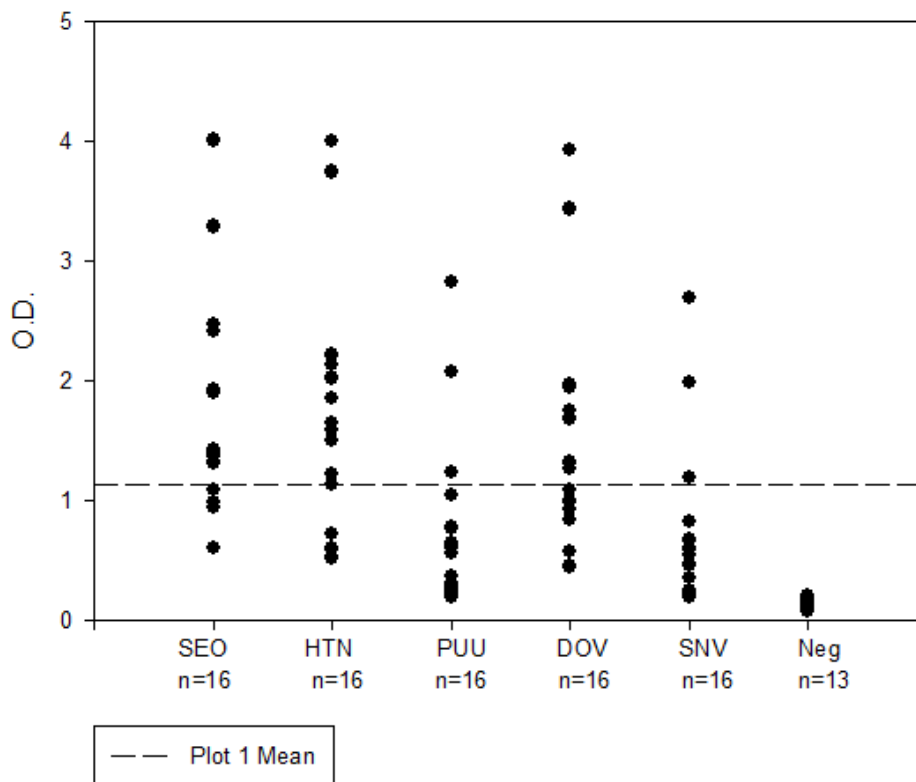
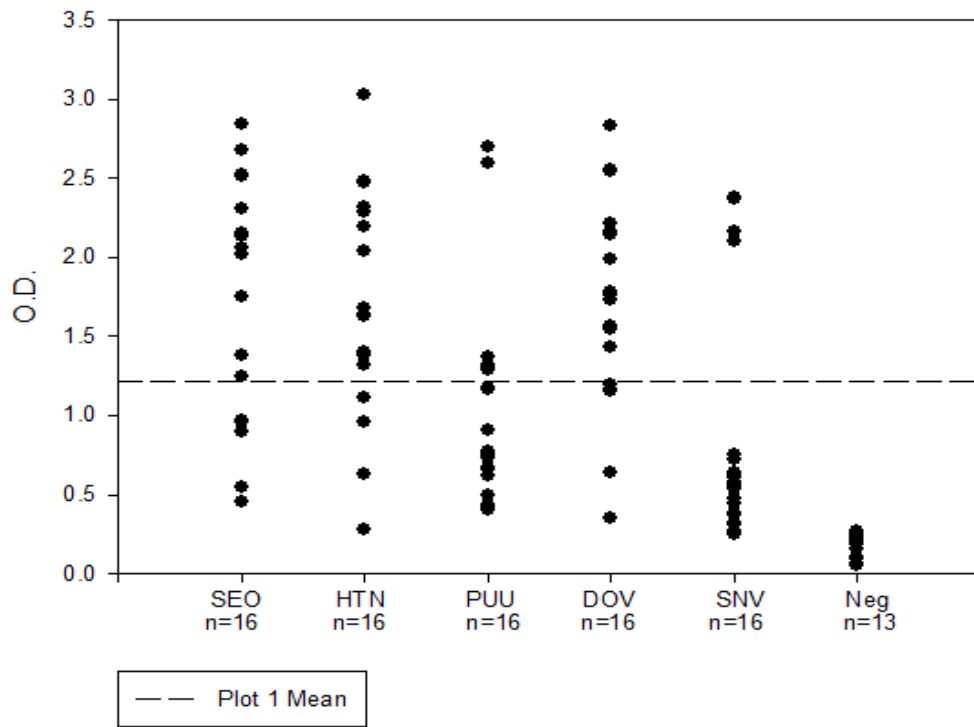


FIGURE 5 In house Hantavirus serotype-specific gM/IgG ELISA

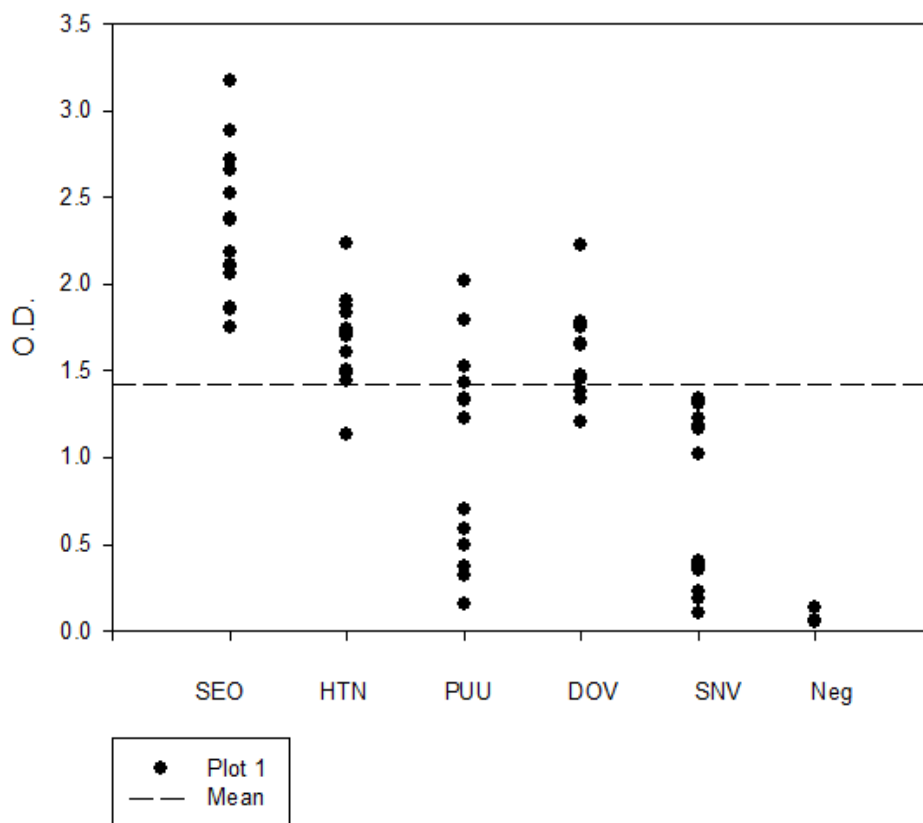
In house serotype-Hantavirus IgM ELISA with Human serum



### In house serotype-hantavirus IgG ELISA with Human serum



### In house Hantavirus IgG ELISA with Rat serum



**FIGURE6 In house Hantavirus IgM/IgG ELISA with HTN&PUU POS Serum**

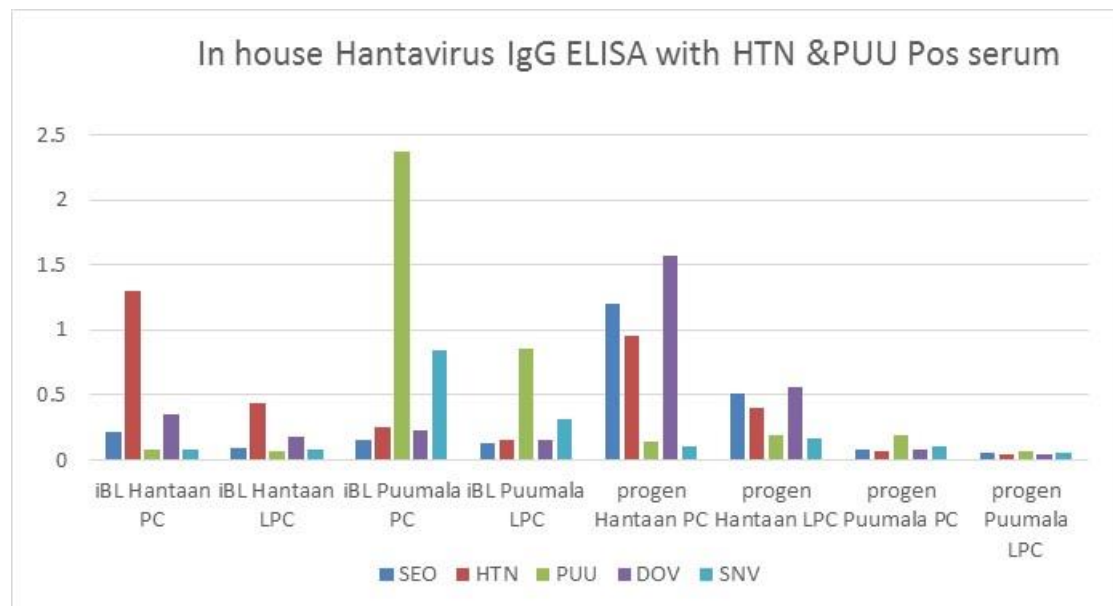
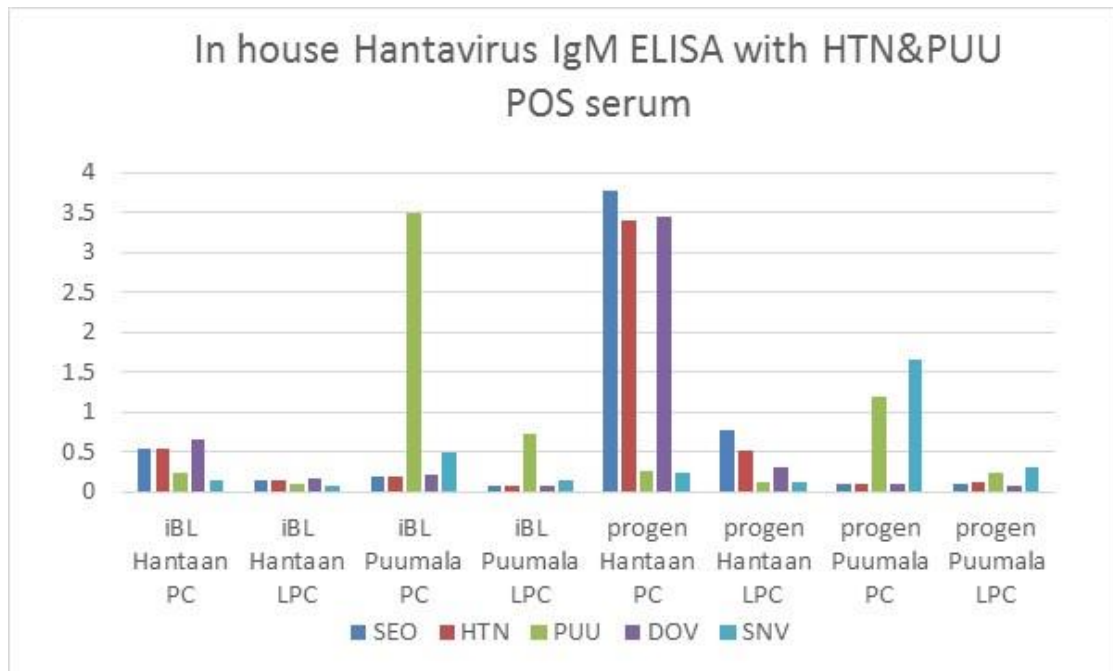


Figure7



## 偵測漢他抗體快速檢驗試劑

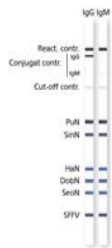
**Table 2. Immuno-enzymatic assays and antigens for the diagnosis of hantavirus infection.**

Tests	Antigen type	Sensitivity	Specificity	Commercial name	Ref.
ELISA	Sin Nombre Seoul Hantaan Dobrava Puumala	95.1%	94.1%	Hantavirus IgG and IgM DxSelect™ ELISA Kits Focus Diagnostics	[53]
ELISA	Hantaan, Dobrava, Seoul Puumala	96.7%	98.7%	Hantavirus IgG/IgM Combo Test® (Colloidal gold immunochromatographic assay, Xiamen Biotech, China)	[31]
ELISA	Araraquara (ARAVIN)	97.2%	100%	In-house ELISA	[27]
IFA	Puumala/Hantaan	98%	91%	Progen® IFA	[20]
Immunoblot assay	Puumala, Hantaan, Dobrava-Belgrade, Seoul	96%	100%	kit Mikrogen®, Neuried, Germany	[32]

IFA: Immunofluorescence assay.



Hantavirus IgM DxSelect  
Hantavirus IgG DxSelect



recomLine HantaPlus IgG  
recomLine HantaPlus IgM

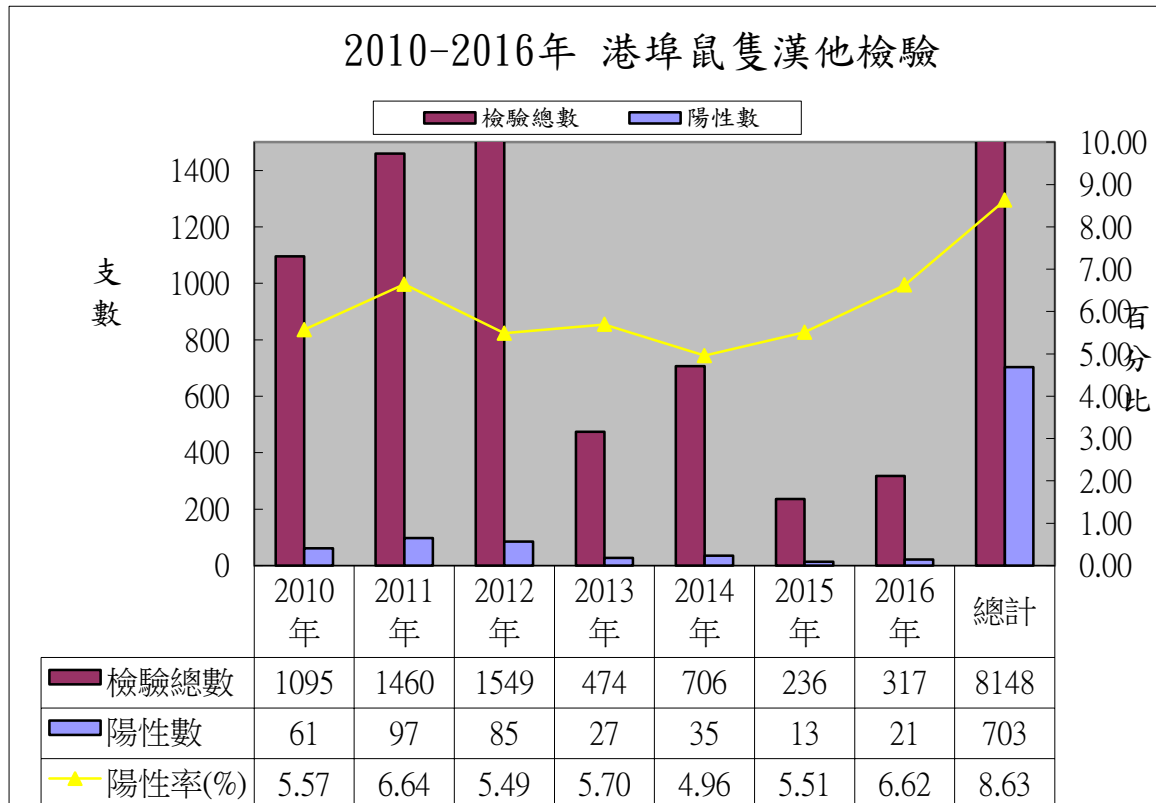


SD BIOLINE Hantaan Virus



Hantavirus Immunofluorescence Tests

Figure8



2014-2016年醫院通報漢他檢驗

