

計畫編號：DOH98-DC-2015

行政院衛生署疾病管制局九十八年度科技研究發展計畫

計畫名稱：

腸病毒 71 型快速檢驗試劑與即時定量系統(Real-time RT-PCR)之研發

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：楊志元 研究員

研究人員：洪志昌、謝若郁、郭亦亦

執行期間： 98 年 01 月 01 日至 98 年 12 月 31 日

目 錄

頁 碼

封面

目錄

壹、綜合資料

貳、計畫摘要

中文摘要-----1

英文摘要-----2

參、計畫內容

一、研究簡介-----4

二、材料方法-----7

三、結果-----13

四、討論-----15

五、表圖-----19

六、參考文獻-----29

貳、計畫摘要

中文摘要

關鍵字：腸病毒 71 型、病毒結構蛋白、免疫層析檢測技術

腸病毒 71 型每年流行期間仍常引起幼童感染造成重症或死亡，而目前檢驗需要設備完善的實驗室與專業人員操作與判讀。本研究以腸病毒 71 型之病毒顆粒免疫實驗動物製備單株或多株抗體，並以病毒結構蛋白（VP1、VP2、VP3、VP4）利用基因選殖大量表現重組蛋白，利用免疫層析檢測技術(immunochromatographic test, ICT)製成偵測臨床檢體之抗原及血清 IgM 之快速檢驗試劑，提供醫師及早診斷腸病毒 71 型的感染，以符合防疫及醫療照護之需要。

研究結果發現，腸病毒 71 型抗原快速檢驗試劑測定範圍約 10^{-3} ~ 10^{-4} CCID₅₀/100ul(臨床檢體病毒量約為 10^{-2} CCID₅₀/100ul 以下)，基於實際臨床檢體病毒量，故檢測抗原 ICT 仍有待發展；而利用間接捕捉病人血清中 IgM 並以 Protein G 加強反應之腸病毒 71 型血清 IgM 快速檢驗試劑，初步測試可有效區分陽性或陰性病人檢體；經 100 支病人血清檢體測試，與腸病毒 71 型 IgM capture ELISA 實驗相比，其敏感性為 81.13%，特異性為 65.95%，將再評估細微調整，提高特異性與敏感性。

Abstract

Key word : *Enterovirus 71* 、 Virus structure protein 、

Immunochromatographic test

Enterovirus infection is one of the most causative agents for small children hospitalization. Among them *Enterovirus 71*(EV71) has the potential to cause more severe disease or even death. Therefore the diagnosis of EV71 infection has its merit in alerting medical care and for deploying preventative measures if necessary to avoid further spreading. However almost all laboratory assays for EV71 need well-equipped and specialists to operate and interpret the result. In addition, it is very time consuming to perform EV detection, for example virus culture and it takes time to deliver the clinical samples back to equipped laboratory. Therefore, the aim of this research was to develop a rapid test to specifically detect EV71 infection.

After evaluation of *enterovirus 71* virus structure protein (VP1, VP2, VP3, and VP4) by using gene cloning method to massive expression recombination protein, VP1 was chosen for making up the immunochromatographic test (ICT) to detect anti-EV71 IgM immune response. Therefore expressed EV71-VP1 was spotted onto the membrane and in conjunction with anti-human IgM monoclonal antibody and protein G both labeled with colloidal gold on conjugated pad to formulate the ICT to detect human anti-EV71 IgM in serum.

Our initial test was able to differentiate between EV71 infection positive and negative serum specimens. 100 serum samples were chosen for further assessment and the result was compared to our previous EV71

IgM capture assay by ELISA. The result showed that the sensitivity and specificity of this *enterovirus 71* IgM-capture ICT was 81.13% and 65.95%, respectively. We will try to modify and enhance the specificity and sensitivity of the *enterovirus 71* IgM-capture ICT for clinical use on sites.

參、計畫內容

一、研究簡介

腸病毒71型(*Enterovirus 71, EV71*)近幾年來在夏天引起一定規模的流行，依據公共衛生學上三段五級的預防方法中，第二段預防：早期診斷、早期治療，為使腸病毒71型達到早期診斷的目標，需要發展腸病毒71型快速檢驗試劑。

腸病毒71 型首度被發現是在1969年美國加州由一腦炎嬰兒之糞便檢體中分離出來，之後便在美國本土、保加利亞、日本、香港、馬來西亞、台灣及澳洲等地區陸續被分離出[1]，且引起不同程度規模的流行。台灣在1998年時，爆發了腸病毒71 型流行，導致78 例兒童死亡，其後在2000年與2001年的流行亦造成二十至三十名的死亡病例，而在2002至2005年間也有流行，但有病毒學確認的死亡病例則較1998年減少許多[2]，於2008年全年通報重症病例共計有522例，確定病例有370例，其中有14例兒童死亡[3]。腸病毒重症確定及死亡個案主要發生於五歲以下兒童，早期病患常表現有嗜睡、肌躍型抽搐合併心脈加速，會造成手足口症(*Hand-foot-mouth disease, HFMD*)或疱疹性咽峽炎(*herpangina*)，臨床症狀與部分克沙奇病毒(*Coxsackie virus*)相同；而腸病毒71型則會感染併發重症造成急性神經性疾病(*acute neurologic disease*)，包括：類脊髓灰白質炎

(poliomyelitis-like paralysis)、腦炎(encephalitis)與無菌性腦膜炎(aseptic meningitis)等嚴重併發症[4, 25]。因此能在第一線針對手足口症或皰疹性咽峽炎的症狀確認是否受到腸病毒71型的感染，對治療與後續防疫方向會有極大的幫助。

腸病毒71型為小RNA病毒科(*Picornaviridae*)、腸病毒屬(*Enterovirus*)，近年來依據基因序列分析結果重新歸類，分為人類腸病毒A、B、C、D(*Human enterovirus A、B、C、D*)型，其中腸病毒71型被歸類於人類腸病毒A型[5] (Pallansch MA and Roos)。腸病毒直徑大小約20~30nm，不具外套膜(non-envelope)呈現立體對稱正二十面體之結構，基因組為大小約7.5Kb之單股正向RNA[6] (Pallansch MA and Roos)。腸病毒顆粒是由外殼蛋白(capsid)包覆其單股RNA，外殼蛋白是由VP1、VP2、VP3與VP4四種蛋白質共同組成，VP4與病毒RNA的穩定性有關，而VP1、VP2以及VP3則是與細胞接受器及抗體結合有關，其中VP1不僅是發展疫苗與中和抗體主要作用區域，亦是基因序列中變化較大之區域，並可與其他不同腸病毒之血清型進行區分[7, 19-24]。

目前國內對於腸病毒的實驗室診斷，仍依賴傳統標準方法病毒分離，鑑定時間依採檢的病毒量多寡，由3天至14天不等；針對腸病毒71型，有EV71 RT-PCR分子生物學核酸快速檢測方法可在收件24

小時內確認是否感染腸病毒71型[8, 9]；另外本局亦發展了腸病毒71型IgM 酵素免疫分析(EV71 IgM capture ELISA)快速檢驗法[10]，經偵測病人血清是否有腸病毒71 型IgM，來確認感染腸病毒71 型之急性期，可於數小時內得知結果。惟上述檢驗方法皆需於專業的實驗室及相當熟練的技術人員方可進行。

為因應未來腸病毒71型防疫及醫療照護之需要與臨床疑似腸病毒71型感染病患之確認，快速檢驗之結果為最重要的部分，故研發腸病毒71型快速檢驗試劑，於極短時間內(5-10分鐘)即可得知結果，不需特殊儀器、操作簡單、使用方便，不需專業人員判讀結果，可提供一般醫院及第一線現場直接檢測，對作為即時提供患者治療及後續防疫決策之參考會有極大的幫助。

二、材料與方法

病毒株及血清檢體來源

本研究使用之病毒株來自於2008年流行於台灣地區並經由本局研究檢驗中心分離鑑定確認之腸病毒71型B5基因亞型病毒株。快速檢驗試劑測試用之100支血清檢體來自2009年經各單位通報為腸病毒重症並送驗之血清檢體，年齡層及人數分別為0-5歲有77人，6-10歲15人、11-20歲7人、20歲以上11人；採樣時間於1-15天有72人，15天以上有28人，經中心實驗室以血清例行性檢驗EV71 IgM capture ELISA鑑定是否為腸病毒71型所引發之重症病人。

病毒RNA的萃取

以商業化套組 QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Cat. No. 52906, QIAGEN) 進行病毒 RNA 萃取[11]。吸取 EV71 病毒液檢體 140ul 與 560ul 含 RNA carrier 之緩衝液 AVL 均勻混合，於室溫靜置作用 10 分鐘，再加入 560ul 純度 100%的絕對酒精，劇烈震盪混合 15 秒。將上述混合液體加至 QIAmp spin column 高速離心後，丟棄濾出液，並以 Buffer AW 清洗 column，再以 50µl 緩衝液 AVE 溶出 column 中之病毒 RNA，保存於-20°C 或-80°C，可用於反轉錄及聚合酶鏈鎖反應(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)。

反轉錄及聚合酶醱素鏈鎖反應

(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR)

(1) 反轉錄反應(Reverse Transcription)

萃取自 EV71 之 RNA 須經由反轉錄酶作用製成 cDNA，才可進一步以引子操作聚合酶鏈鎖反應放大後續實驗需要之 DNA 片段。取 5ul 病毒 RNA 加入 RT 反應混合液中，分別含有 5X buffer mix(75mM KCl、50mM Tris-HCl、3mM MgCl₂、10mM DTT、0.5mM dNTP mixture)、RNasin 40U/ul 與 antisense primer 50 pmole 以及 100 units reverse transcriptase，反應時間溫度分別為 42°C：50 分鐘，95°C：10 分鐘，之後置於 4°C 或-20°C 保存使用。

(2) 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

以反轉錄反應中所獲得之 cDNA 當作模版進行 PCR 反應。取 1ul cDNA 加入含有 2X buffer Mix(50mM KCl、10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、dNTP mixture 1mM)、5 units *Taq* polymerase 及 sense 與 antisense primer(表一)各 50pmole 的反應混合液中，於 94°C 變性(denature)10 分鐘後，以 94°C：30 秒、60°C：30 秒、72°C：1 分鐘，進行 30 次反應，最後在 72°C 作用 10 分鐘。經 PCR 分別增幅放大之 VP1、VP2、VP3 及 VP4 產物片段，須以 DNA 電泳確認產物大小分別為 891bp、762bp、726bp、207bp。

病毒結構蛋白重組表現及純化

將RT-PCR增幅放大的VP1、VP2、VP3、VP4之DNA序列片段，經由引子特定限制酵素切割位設計，選殖於pET-22b(+)質體上，並以熱休克(heat-shock)方式Transformation進入*E. coli* TOP10 (Invitrogen)中，培養於LB/Amp(最終濃度為 100 μ g/ml)之固態培養基上，以Colony PCR之方式確認篩選出含有VP1、VP2、VP3、VP4之載體。將確認轉殖成功之載體分別再Transformation至*E. coli* BL21B菌株中，以IPTG(最終濃度為 1mM)誘導蛋白質表現，於低溫離心收集菌體，再加入Lysis buffer(100mM NaH₂PO₄、10mM Tris、8M Urea，pH 8.0)再懸浮並破壞菌體，離心取其上清液，並將之注入含四價螯合NI-NTA的純化樹脂(Qiagen, hikden, Germany)中，先以Lysis buffer沖洗管柱，再利用Elution buffer(100mM NaH₂PO₄、10mM Tris、300mM Imidazole、8M Urea，pH 8.0)沖洗出含His-tag之蛋白質，以聚丙稀醯胺凝膠電泳(Sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE))及西方墨點法(Western blot)進行蛋白質產物確認，並使用EV71相關之單株與多株抗體及病人血清反應測試之[12, 13]。

抗體之製備(委由民間生技公司進行)

多株抗體(Polyclonal antibody)

將適量之腸病毒71型病毒抗原或病毒重組蛋白，進行老鼠免疫(immunization)(至少需注射3次以上)。經由抗原分子上許多的抗原決定基(antigenic determinant)，免疫反應使不同的epitopes分別誘導出不同的抗體，於施打免疫期程間，採集血清進行測試，以決定免疫小鼠是否已有產生足以辨識EV71之抗體，此部份收集之抗體即為多株抗體。

單株抗體(Monoclonal antibody)

將前述步驟之有產抗體之小鼠，由sacrifice mice 取得脾臟細胞，將此含有B cell之脾臟細胞與骨髓瘤細胞(immortalized cells)進行細胞融合，並以HAT(Hypoxanthine, Aminopterin, and Thymidine)培養篩選融合瘤細胞，並將細胞株稀釋，以酵素免疫分析法(ELISA)挑選出單株融合瘤細胞產生之專一性抗體，施打入小鼠腹部或經由特殊培養，收集所分泌之腹水或上清液即得專一性單株抗體。

免疫層析檢測技術(immunochromatographic test, ICT)

此實驗是仿效三明治免疫分析法 (sandwich immunosorbent assay)，其原理是藉由抗體抗原間之專一性與免疫親和力，以毛細引

力(capillary attraction)，使待測物質於Nitrocellulose薄膜(NC膜)中移動，經標定物-膠體金的顯色作用做檢測[14-18]。

膠體金(Colloids Gold, CGC)之製備

膠體金主要為標誌抗體所用，其粒子大小與立體結構均影響顯色結果，製作步驟參考 2009 年 Zhou 等人發表之文獻[18]。於 1000ml 煮沸騰之二次水中持續攪拌加熱混合均勻 0.01% Gold chloride solution 與 1% Sodium citrate solution (量愈多，粒子愈小)，之後置於常溫水中降溫，鋁箔避光，置於 4°C 保存待使用。

抗體與膠體金之結合

主要目的是使抗體結合上膠體金(Ab-CGC)，並放置於結合墊片(Conjugate pad)上，做為檢測時能於檢測線(Test line)與控制線(Control line)上顯色。於每 100mL 膠體金中加入適量濃度之抗體(Mouse anti-human IgM Monoclonal antibody 與 Protein G)，於室溫中攪拌混合均勻，之後以低溫高速離心去除上清液，並加入 sucrose 及 trehalose 穩定膠體金溶液，延長使用效期。

噴膜

利用噴膜機器(XYZ 3000 dispenser with BioJets and AirJets)將病毒重組蛋白及抗體固定噴於檢測線、控制線位置與結合墊片上。將製備好之病毒重組蛋白、單株抗體以及 Ab-CGC 依照實驗設計之快

檢試劑，分別將之檢測線、控制線噴於黏貼於支撐底卡上之 NC 膜以及結合墊片(須先經過親水性處理)上，置於室溫乾燥。乾燥後浸泡 NC blocking buffer 中 30 分鐘，填補 NC membrane 表面之孔隙、降低偽陽性發生及減緩 protein 活性降低。

快速檢驗試劑元件之組裝

將已貼上 NC 膜並經 buffer 處理乾燥後之支撐底卡分別再依序黏貼上，吸水墊片(Absorption pad)(位置 3)、膠體金墊片(Conjugate pad)(位置 2)以及檢體墊片(Sample pad)(位置 1)，黏貼順序如圖一，每張墊片之間都須有重疊 $2\pm 1\text{mm}$ ，確實壓合及黏貼牢固。將上述組裝好的試紙卡(圖二)，以試紙裁切機(CM 4000 Guillotine Cutter)進行裁切，並組裝試紙條至試劑卡組待使用。

三、結果

表現及確認EV71之病毒結構蛋白

以Western blot實驗利用病人血清檢體、市售EV71單株抗體與EV71全病毒蛋白反應結果顯示，兩者皆於約30KDa處有反應線產生(圖三)，依EV71結構蛋白大小推測，應為VP1結構蛋白。為證實此反應點為VP1蛋白，實驗室以EV71基因亞型B5病毒RNA，利用RT-PCR方法增幅放大分別獲得891bp、762bp、726bp、207bp之VP1、VP2、VP3及VP4產物，並建構重組表現蛋白，分子量約為39KDa、33KDa、32KDa及14KDa(實驗結果未呈現)。經由Western blot實驗，以VP1、VP2、VP3及VP4重組蛋白分別與實驗室自行研發之Rabbit anti-EV71多株抗體及病人血清檢體反應測試，實驗結果顯示只有VP1重組蛋白與之有分子量大小正確的反應產生(>38KDa)(圖四)，推論腸病毒71型結構蛋白VP1應為主要的抗體結合位，VP2、VP3及VP4則否。而利用VP1重組蛋白以Western blot與Direct ELISA實驗與病人血清反應，其敏感性及專一性最低有77~80%(表二、表三)，故後續ICT之研究發展仍將以VP1重組蛋白為主。

EV71抗原快速檢驗試劑

EV71抗原快速檢驗試劑(圖五)，實驗室委由廠商利用自行研發之多株抗體或市售單株抗體，共同配對製做成偵測EV71抗原之

ICT。實驗證明，不論是以自行研發之多株抗體或單株抗體，利用已知不同濃度之EV71病毒液測試，其結果靈敏度約在 10^{-4} ~ 10^{-6} CCID₅₀/100ul(表四)，與臨床上呼吸道檢體中可檢測之病毒濃度可能仍相差100倍，故仍需委託廠商研發專一性及靈敏度成效更佳之EV71單株抗體。

EV71血清IgM抗體快速檢驗試劑

EV71血清IgM抗體快速檢驗試劑，設計原理是以間接捕捉人體血清中IgM (Indirect Human IgM Capture)，以Mouse anti-human IgM單株抗體結合於膠體金捕捉血清中IgM，並以Protein G加強於檢測線上與VP1重組蛋白反應，初步可有效區分陽性及陰性血清檢體(圖六)。經由100支病人血清檢體初步測試ICT之效能，以EV71 IgM capture ELISA實驗為對照組，其敏感性為81.13%(31/47)，特異性為65.95%(43/53)，準確度為74%(74/100)；以病毒分離及Real-time PCR為對照組，敏感性為81.39%(35/43)，特異性57.89% (33/57)，準確度88%(88/100)。而本實驗所使用之檢體，以ELISA與病毒分離及Real-time PCR相對照，敏感性為97.67%(42/43)，特異性為80.70%(46/57)，準確度為88%(88/100)(表五)。

四、討論

抗原快速篩檢診斷試劑

有關抗原之快速篩檢診斷試劑，市售較為成熟的當屬流感快篩試劑，市面上也有許多試劑取得FDA或CE核可之試劑，而真正運用於流感之篩選時，發現其靈敏度往往只有分生檢測之5-6成。除了採集部位、病人情況、病毒量等，皆有可能影響到其檢測結果。而流感病毒是屬於上呼吸道感染，因此在這些部位之病毒量理論上是較濃的，才有利於病毒的散播。而腸病毒的檢測，如果純粹以抗原檢測為考量，可能會無法達到預期之效果，主要原因是腸病毒是糞便經口傳染，腸病毒初步先在口腔內建立灘頭堡，再至由腸胃道大量繁殖，隨排泄物排放至體外，因此以口腔部位之檢體來檢測腸病毒是否存在，其困難度較高。目前ICT檢測方法測得低濃度的病毒抗原，這也可能是小兒麻痺病毒並無任何市售的抗原快篩檢驗試劑之原因。為解決此一病毒量偏低之問題，未來有幾個研究方向也許值得努力開發：

- 一、 檢體之採集由口腔部位改成糞便檢體，但因欠缺糞便檢體中所存在之腸病毒病毒量之資料，所以應該先有相關研究調查，才可得知是否可行。
- 二、 大量產生針對抗原決定位之單株抗體，以取得具有高親和力之

抗體，以提升檢驗之靈敏度。

三、 利用化學方法處理檢體，使得病毒顆粒破壞，釋出裂解段化之

抗原部位，以增加被偵測抗原之濃度

四、 利用訊號放大之原理來加強增加偵測目標物之訊號已提升靈敏

度。

五、 改採其他標的物，如抗體反應而非以抗原偵測為目標。

本研究結果在病原檢測之部分，目前之程度不足以測試臨床檢體，抗原敏感性低於一般臨床檢體抗原濃度，故需在加強技術發展及更具專一性與敏感性之單株抗體，以增加試劑之可用性。

抗體快速篩檢診斷試劑

因本計劃之執行有期限限制與急迫性，故先以第五點為執行方向進行研發。現階段是以診斷病患anti-EV71 IgM之免疫反應為主。根據先前研究指出急性期病患在發病後3天有超過9成以上可測得專一性之IgM免疫反應[10]；而目前2天亦有2-5成之比例可測得IgM反應。而本實驗室亦有自行研發之anti-EV71 IgM capture assay (ELISA)，運用於腸病毒重症病患之實驗室診斷，所以利用相同策略，先將ELISA之檢驗型式想辦法改成ICT的形式以利進行發展EV71之快速篩檢試劑工作。

實驗中以*E. coli*之表達系統來表現VP1 protein，有可能因為原核

生物不比真核生物，其表現出protein欠缺post modification，而使得protein folding之構造與原先感染人之EV71之抗原有所差異。如此一來，可能會影響到試劑與宿主免疫反應中之抗EV71專一性抗體之結合，所以在相類似有關EV71表達protein與抗體間之作用，會有實驗室以yeast或其他真核細胞來表達EV71之抗原。我們嘗試*E. coli*之蛋白質表現系統，主要原因是入手容易、好操作，而且經過西方墨點法之測試也發現這些*E. coli*所表現出之VP1 protein仍可與EV71病患的血清作用，所以繼續以此VP1 protein研發EV71快速篩檢診斷試劑。

開發快速診斷試劑尤其是以抗體、抗原之檢驗，與實驗室以往純粹著重於診斷病毒病原體之感染有絕大的不同。以往實驗室是屬於試劑的使用者，而今因任務需要，故需積極轉型以開發檢驗試劑，無可廢言，我們可能需要時間充實自己有關這方面之智能。理因任務需求，實驗室及長官也大都寄予厚望並給予多方指導與資源之揖注。目前此一EV71 IgM抗體ICT有初步的prototypes，與實驗室使用之EV71 IgM ELISA test相比，其靈敏度至少有超過八成，雖專一性只有約六成五，有偽陽性及偽陰性之情形發生，但仍比目前市售的流感快篩試劑之靈敏度高，故可再經由細微調整，極力於排除偽陽性及偽陰性、提高專一性及靈敏度，未來應可完成腸病毒71型

抗體快速檢驗試劑之開發，並預計增加試劑產量，分送至各合約實驗室進行相關檢測試驗。本研究係發展檢驗腸病毒71型之抗原及IgM抗體之快速檢驗試劑，在防疫上對於加速腸病毒之診斷有實際之幫助，且可普遍應用於醫療體系之實務面。而因此一抗體快速篩檢試劑之檢測係採用血清檢體，基於多數診所未備有離心機設備，可能會影響計畫之推廣效益，故未來可朝測試whole blood之快速篩檢試劑進行開發研究，以提高推廣之效益。

五、表圖

表一、引子名稱及序列

Primer Name	Sequence (5' to 3')
VP1-F-B	AGTCGGATCCGGGAGATAGGGTGGCAGATGT
VP1-R-S	AGTCGTCGACAAGGGTAGTAATGGCGGTAC
VP2-F-N	ATGCGTCGACATGTCTCCATCCGCTGAAGCT
VP2-R-N	AGTCCTCGAGAAGGGTAGTAATGGCGGTACG
VP3-F-B	AGTCGGATGCGGGCTTTCCCACTGAGCCAAA
VP3-R-S	AGTCGTCGACCTGAATAGAGGCTGTCTGTAA
VP4-F-N	TGCGTCGACATGGGCTCACAGGTG
VP4-R-N	AGTCCTCGAGCTTTAGAGGGGCAGCCATTTC

表二、Direct ELISA 偵測 VP1 重組蛋白與病人血清反應

		Test-1		Test-2	
1		0.313	-	0.475	-
2		0.253	-	0.331	-
3		0.644	+	0.786	+
4		0.639	+	0.780	+
5	EV71 (+)	1.092	+	1.235	+
6		1.465	+	1.801	+
7		2.802	+	3.291	+
8		0.742	+	0.717	+
9		0.865	+	0.856	+
10		2.400	+	2.474	+
11	EV71 (-)	0.150	-	0.276	-
12		0.267	-	0.246	-
13	Normal	0.212	-	0.268	-
14	Blank	0.112	-	0.205	-

表三、西方墨點法偵測 VP1 重組蛋白與病人血清反應

		Western Blot IgM
1		EV71 (3d) +
2		EV71 (15d) +
3		EV71 (4d) +
4		EV71 (4d) +
5		EV71 (5d) -
6		EV71 (1d) -
7	EV71 (+)	EV71 (5d) +
8		EV71 (17d) +
9		EV71 (20d) +
10		EV71 (1d) -
11		EV71 (19d) +
12		EV71 (4d) +
13		EV71 (22d) +
14		CB4 (3d) -
15		CB4 (19d) +
16		CA2 -
17	Non-EV71 (-)	CA2 (5d) -
18		CA2 (19d) -
19		CB3 (1d) +
20		CB3 (32d) -
21	Negative	-
22	Negative (3d)	-
23	Negative (28d)	-

表四、腸病毒71型抗原快速檢驗試劑效能初步測試結果。

EV71 Ab	Ab #	抗體結合		相對應原型抗原測定範圍 (CCID ₅₀ /100ul) *代表約略可見	Note
		Colloid-gold	T-line		
Poly	1	A	A	10 ⁴ ~10 ⁵ 或以上	False positive line.
Poly	2	A	B	10 ⁴ ~10 ⁵ 或以上	Less False positive line , but Response to medium.
		B	A	10 ⁵ ~10 ⁶ 或以上	
Mono / Poly	各1	Mono	Poly-A	10³~10⁴或以上	Medium test show no band.

表五、腸病毒71型IgM抗體快速檢驗試劑-間接捕捉血清IgM抗體，

效能初步測試結果。

		ICT				
		+	-	Total		
IgM ELISA	+	43	10	53	specificity	65.95
	-	16	31	47	sensitivity	81.13
Total		59	41	100	Accuracy	74.00

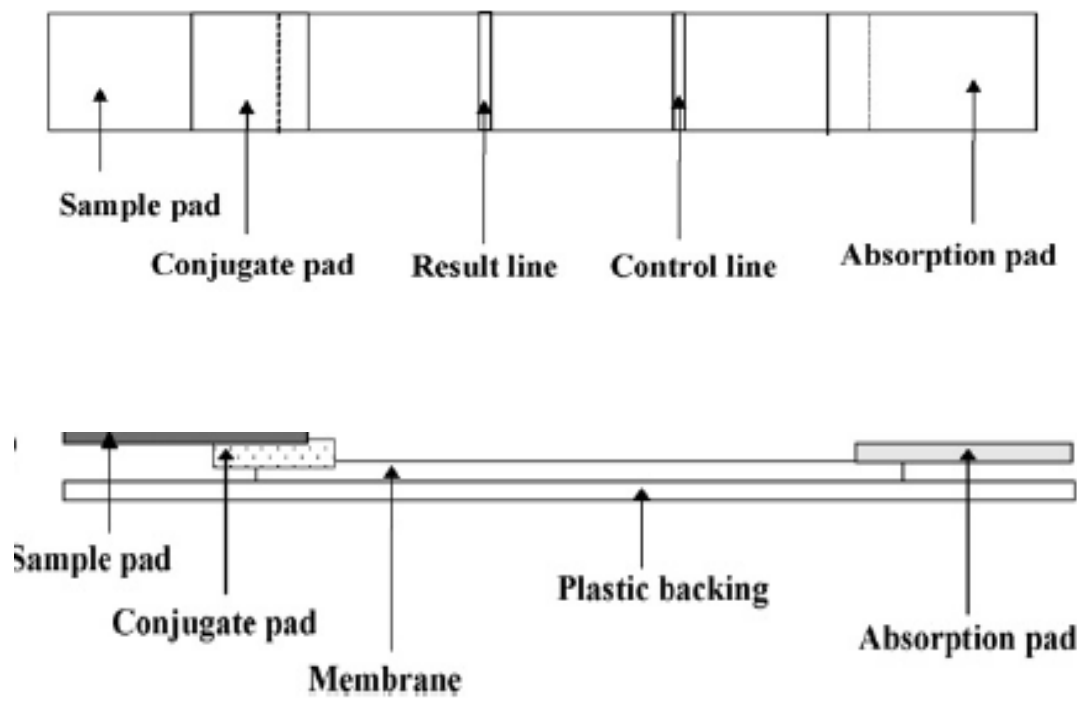
		ICT				
		+	-	Total		
EV71 isolated	+	35	8	43	specificity	57.89
RT-PCR	-	24	33	57	sensitivity	81.39
Total		59	41	100	Accuracy	88.00

		IgM ELISA				
		+	-	Total		
EV71 isolated	+	35	8	43	specificity	80.70
RT-PCR	-	24	33	57	sensitivity	97.67
Total		59	41	100	Accuracy	88.00

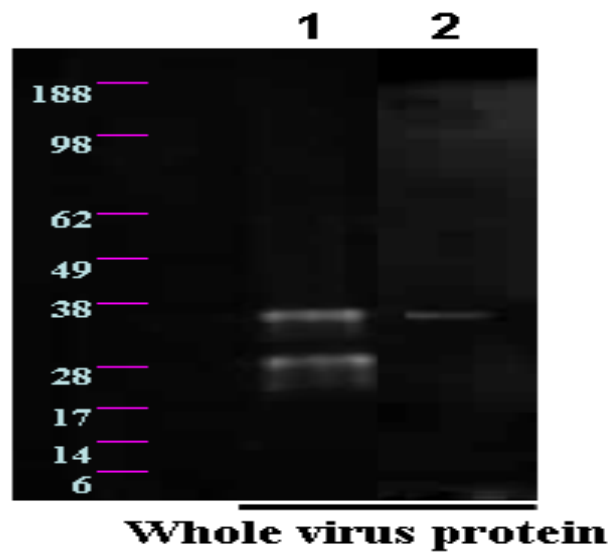
圖一、快速檢驗試劑元件組裝順序示意圖

吸水墊片(Absorption pad)黏貼處-2
NC 膜(Nitrocellulose membrane)黏貼處-1
膠體金墊片(Conjugate pad)黏貼處-3
檢體墊片(Sample pad)黏貼處-4

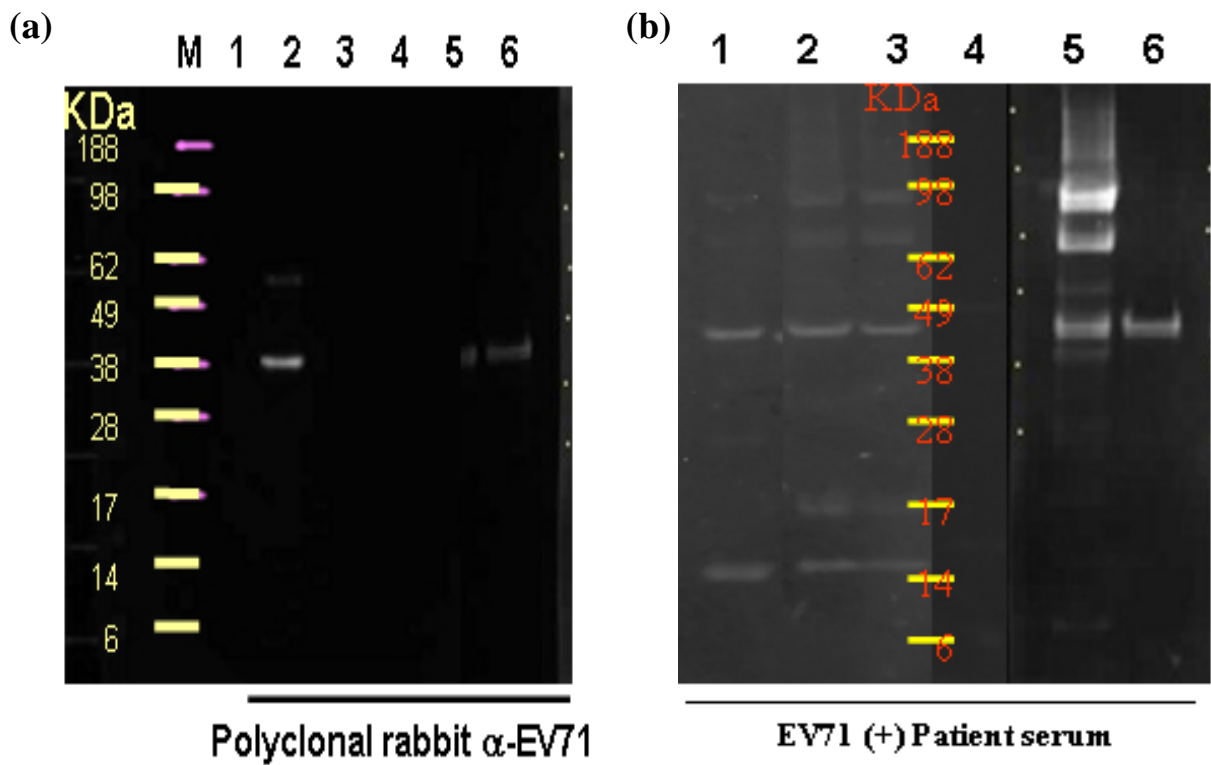
圖二、快速檢驗試劑元件組裝完成圖



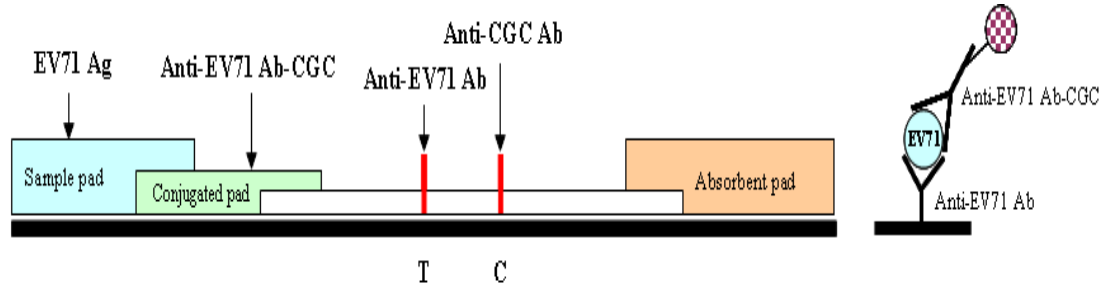
圖三、西方墨點法偵測EV71全病毒蛋白與市售EV71單株抗體(1)病人血清檢體(2)之反應。



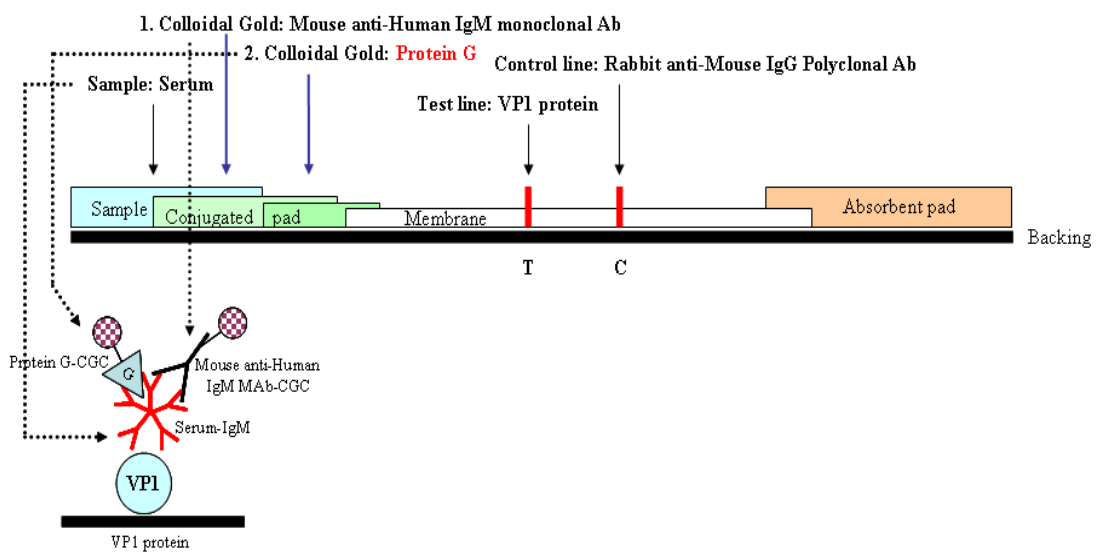
圖四、(a)西方墨點法偵測自行研發多株抗體與EV71全病毒蛋白(2)、VP1(6)、VP2(3)、VP3(4)及VP4(5)重組蛋白反應，以pET-22b+(1)為陰性對照組。(b)西方墨點法偵測病人血清與未純化及純化VP1(5、6)、VP2(2)、VP3(3)及VP4(4)重組蛋白反應，以pET-22b+(1)為陰性對照組。



圖五、腸病毒71型抗原快速檢驗試劑模型圖。



圖六、腸病毒71型IgM抗體快速檢驗試劑模型圖-間接補捉血清IgM抗體。



六、參考文獻

1. Chumakov M., Voroshilova M., Shindarov L., Lavrova I., Gracheva L., Koroleva G., Vasilenko S., Brodvarova I., Nikolova M., Gyurova S., Gacheva M., Mitov G., Ninov N., Tsyka E., Robinson I., Frolova M., Bashkirtsev V., Martiyanova L., Rodin V. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. Arch Virol. 1979; 60(3-4):329-340.
2. Chen K. T., Chang H. L., Wang S. T., Cheng Y. T., Yang J. Y. Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998-2005. Pediatrics. 2007; 120(2):244-252.
3. Taiwan Centers for Disease Control. Guidelines for the control and prevention of enterovirus infections.
4. Cardoso M. J., Perera D., Brown B. A., Cheon D., Chan H. M., Chan K. P., Cho H., McMinn P. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. Emerg Infect Dis. 2003; 9(4):461-468.
5. King AM, Brown F, Christian P, et al. Picornaviridae 2000, In Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 657-78. San Diego: Academic Press.
6. Pallansch MA, Roos, RP. Enteroviruses : *Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds), Fields Virology, third ed. Lippicott-Raven, Philadelphia, 1996 pp. 723-775.

7. Herrero L. J., Lee C. S., Hurrelbrink R. J., Chua B. H., Chua K. B., McMinn P. C. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Arch Virol.* 2003; 148(7):1369-1385.
8. 林翠莉, 王聖凡, 林奇勇, 李祥吉, 徐秋菊, 羅淑真, 陳豪勇, 楊志元。腸病毒即時定量系統(Real-time RT-PCR)對臨床檢體之檢驗與分析。疫情報導94年; 第21卷(第6期):436~450。
9. 林翠莉, 黃教威, 林敏琮, 賴明和, 徐秋菊, 李宜學, 楊志元, 吳和生。腸病毒71型(Enterovirus 71)群聚感染之實驗室鑑定與分析。疫情報導95年;252~266。
10. Wang S. Y., Lin T. L., Chen H. Y., Lin T. S.. Early and rapid detection of enterovirus 71 infection by an IgM-capture ELISA. *J Virol Methods.* 2004;119(1):37-43.
11. Huang Y. P., Lin T. L., Kuo C. Y., Lin M. W., Yao C. Y., Liao H. W., Hsu L. C., Yang C. F., Yang J. Y., Chen P. J., Wu H. S. The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007. *Virus Res.* 2008; 137(2):206-212.
12. Huemer H. P., Wechselberger C., Bennett A. M., Falke D., Harrington L. Cloning and expression of the complement receptor glycoprotein C from Herpesvirus simiae (herpes B virus): protection from complement-mediated cell lysis. *J Gen Virol.* 2003; 84(5):1091-1100.
13. Huemer H. P., Strobl B., Shida H., Czerny C. P. Induction of recombinant gene expression in stably transfected cell lines using attenuated vaccinia virus MVA expressing T7 RNA polymerase with a

- nuclear localisation signal. *J Virol Methods*. 2000 ; 85(1-2):1-10.
14. Oh J. S., Ha G. W., Cho Y. S., Kim M. J., An D. J., Hwang K. K., Lim Y. K., Park B. K., Kang B., Song D. S. One-step immunochromatography assay kit for detecting antibodies to canine parvovirus. *Clin Vaccine Immunol*. 2006; 13(4):520-524.
 15. Shiota S., Mannen K., Matsumoto T., Yamada K., Yasui T., Takayama K., Kobayashi Y., Khawplod P., Gotoh K., Ahmed K., Iha H., Nishizono A. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies. *J Virol Methods*. 2009;161(1):58-62.
 16. Rajerison M., Dartevelle S., Ralafiarisoa L. A., Bitam I., Tuyet D. T., Andrianaivoarimanana V., Nato F., Rahalison L. Development and Evaluation of Two Simple, Rapid Immunochromatographic Tests for the Detection of *Yersinia pestis* Antibodies in Humans and Reservoirs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(4):421.
 17. Mikawa A. Y., Santos S. A., Kenfe F. R., da Silva F. H., da Costa P. I. Development of a rapid one-step immunochromatographic assay for HCV core antigen detection. *J Virol Methods*. 2009; 158(1-2):160-164.
 18. Zhou Y., Pan F. G., Li Y. S., Zhang Y. Y., Zhang J. H., Lu S. Y., Ren H. L., Liu Z. S. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples. *Biosens Bioelectron*. 2009; 24(8):2744-2747.
 19. Mizuta K., Aoki Y., Suto A., Ootani K., Katsushima N., Itagaki T., Ohmi A., Okamoto M., Nishimura H., Matsuzaki Y., Hongo S., Sugawara K., Shimizu H., Ahiko T. Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan,

between 1990 and 2007. *Vaccine*. 2009;27(24):3153-3158.

20. Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Pallansch M. A. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*. 1999; 73(3):1941-1948.
21. Chen H. F., Chang M. H., Chiang B. L., Jeng S. T. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. *Vaccine*. 2006; 24(15):2944-2951.
22. Foo D. G., Alonso S., Phoon M. C., Ramachandran N. P., Chow V. T., Poh C. L. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides. *Virus Res*. 2007; 125(1):61-68.
23. Foo D. G., Alonso S., Chow V. T., Poh C. L. Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide. *Microbes Infect*. 2007; 9(11):1299-1306.
24. Wu C. N., Lin Y. C., Fann C., Liao N. S., Shih S. R., Ho M. S. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus. *Vaccine*. 2001; 20(5-6):895-904.
25. Iwai M., Masaki A., Hasegawa S., Obara M., Horimoto E., Nakamura K., Tanaka Y., Endo K., Tanaka K., Ueda J., Shiraki K., Kurata T., Takizawa T. Genetic changes of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 isolated from hand, foot, and mouth disease patients in Toyama, Japan between 1981 and 2007. *Jpn J Infect Dis*. 2009; 62(4):254-259.