

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-114301

衛生福利部疾病管制署 109 年署內科技研究計畫

計畫名稱：建立優質新興病原防疫檢驗應變模式

年度研究報告

執行單位：疾病管制署

計畫主持人：劉銘燦

協同主持人：楊季融

研究人員：郭權益

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

二、目錄：包括目次、圖次、表次、附錄。

頁數

封面

第 1 頁

目錄

第 2 頁

摘要

第 3 頁

本文

前言

第 5 頁

材料與方法

第 7 頁

結果

第 10 頁

討論

第 16 頁

計畫重要研究成果及具體建議

第 18 頁

參考文獻

第 19 頁

圖、表

第 20 頁

附錄 一 新型冠狀病毒(SARS-CoV-2)核酸檢測(Real time RT-PCR)

第 25 頁

### 三、摘要

關鍵詞：新興病原體;分子檢測;實驗室發展檢測;檢驗方法評估與確效

由於全球氣候變遷、環境過度開發、國際間交通日漸頻繁之際，使得各種新興傳染病病原體出現及傳播速度更勝以往。新興病原體出現之初，若只依賴臨床醫師的警覺性，依病患臨床症狀去推測可能病原及感染途徑，缺乏實驗室明確的檢驗證據，恐因病原體的未知而使引起社會大眾恐慌，無法即時且有效地遏阻傳染病蔓延，而付出相當大的社會成本。當新興傳染病出現，如何於疫情初期即時而正確地偵測病原體，釐清其傳播路徑及感染原，並且開發出快速準確的檢驗方法，對後續感染人員的隔離與避免疫情的擴散，將是未來新興傳染病防治成效的關鍵。新興病原體突然出現，第一時間無市售檢驗試劑可使用，須即時發展實驗室內(in house)的檢驗方法。為了確保機構內或實驗室內發展的檢驗方法(Laboratory Developed Test, LDT)的檢驗品質，須進行檢驗方法評估與確效。本計畫完成新型冠狀病毒(SARS-CoV-2)檢驗應變模式，從設計分子檢驗方法、確效與評估分子檢驗並將流程文件化，建立嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構檢驗網，提升檢驗量能與實驗室檢驗品質監測。

## **Abstract**

keywords : Emerging pathogens; molecular testing; laboratory development testing; assessment and validation of testing

Due to climate change, over-exploitation of the environment and increasing global transportation, various emerging infectious pathogens have emerged and spread faster than ever. If the first appearance of these pathogens in human was found with only dependence on the alertness of clinicians, who deduce pathogens according to clinical symptoms of patients and presumably pathogen infection route, without clear laboratory test evidence, it will cause public panic because of unknown pathogens and be unable to effectively curb the spread of disease. It will take considerable social cost. When emerging infectious diseases occur, how to detect pathogens immediately and correctly in the early stage of the epidemic, to clarify their transmission routes and etiologic pathogens, and to develop rapid and accurate testing methods, are important for control of emerging infectious diseases. Emerging pathogens suddenly appear, and no commercially available test reagents can be used at the first time, and in-house methods must be developed immediately. In order to ensure the quality of the laboratory developed tests (LDT), the testing methods should be evaluated and confirmed. This project has completed a response mode for SARS-CoV-2 testing, from designing molecular detection methods, evaluating molecular tests and documenting processes, and establishing a testing network of designated institutions for COVID-19, which strengthen the quality of emerging pathogen molecular testing laboratory and overall testing capacity for emerging diseases.

#### 四、本文

##### (1)前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等

由於全球氣候變遷、環境過度開發、國際間交通日漸頻繁之際，使得各種新興傳染病病原體出現及傳播速度更勝以往，新興病原體出現之初，若只依賴臨床醫師的警覺性，依病患臨床症狀去推測可能病原及感染途徑，缺乏實驗室明確的檢驗證據，恐因病原體的未知而使引起社會大眾恐慌，無法即時且有效地遏阻傳染病蔓延，而付出相當大的社會成本。如何於疫情初期即時而正確地偵測病原體，釐清其傳播路徑及感染原，並且開發出快速準確的檢驗方法，對後續感染人員的隔離與避免疫情的擴散，將是未來新興傳染病防治成效的關鍵。

近年來，以聚合酶連鎖反應（Polymerase chain reaction, PCR）為基礎的分子檢驗方法已逐漸成為市售套組且對無法或難以培養的病原體有很高的檢出率並且可即時提供臨床端相關的資訊。一般PCR方法的靈敏度比傳統檢測方法高，對於新發現的病原體也能快速的因應發展出檢驗方法。近年來各種高通量檢測平台已改變現代檢驗實驗室的運作方式，從微生物培養與抗原檢測等方法逐漸轉移至以使用PCR為基礎的標準檢驗方法。有些PCR檢驗方法兼具定性與定量，且PCR放大的產物，可用來基因定序，分析病原體的遺傳資料[1-4]。新興病原體突然出現，第一時間無市售檢驗試劑可使用，須即時發展實驗室內(in house)使用的檢驗方法應急。如1997年H5N1，2003年SARS, , 2009 H1N1pdm09, 2012 MERS-CoV, 2013 H7N9新型流感，世界衛生組織或新興病原體的發現者皆會即時公布分子檢測方法的引子與探針序列[5-9]，可針對該病原體進行實驗室確認。2009年爆發H1N1pdm09大流行，台灣疾病管制署也即時發展實驗室內(in house)使用的檢驗方法[10]。為了確保機構內或實驗室內發展的檢驗方法(Laboratory Developed

Test, LDT) 的檢驗品質，各國各有不同的管制方式。台灣食品藥物管理署 (FDA) 107年12月17日公告「精準醫療分子檢測實驗室檢測與服務指引」與民國 108 年 05 月 31 日公告「精準醫療分子檢測實驗室列冊登錄管理要點」，針對LDT實驗室進行管理，在品質管理系統方面參考ISO 15189 國際標準制定，以作為管理分子檢測實驗室 LDT 項目之參考依據。在開發、申請與服務之完整流程遵循此指引進行實驗室管理，以維持實驗室自行研發之 LDT 項目之品質。檢測項目分析確效評估報告應依檢測項目特性，評估須執行之檢測項目確效內容：(1)分析反應性 (Analytical Reactivity) (2)偵測極限(Limit of Detection, LoD) (3)分析特異性-交叉反應 (Analytical Specificity- Cross-Reactivity) (4).分析特異性-干擾 (Analytical Specificity- Interference) (5).閾值(Cut-off) (6).精密度/再現性 (Precision/ Reproducibility) (7).殘留汙染及交叉汙染(8).方法比較(Method Comparison) (9) 安定性 (Stability)(10) 檢測過程之流程圖及其描述(11) 檢測結果(Result)。在經過這品質管理過程，確保檢驗品質。

新型冠狀病毒感染(SARS-CoV, MERS-CoV)與新型流感病毒感染因對人類造成嚴重疾病，在我國被列為第一與第五類法定傳染病。依傳染病防治法第 46 條規定，第一類及第五類傳染病之相關檢體，應送中央主管機關或其指定具實驗室能力試驗證明之地方主管機關、醫事機構、學術或研究機構等進行檢驗；傳染病檢驗及檢驗機構管理辦法第 6 條亦進一步規範這些可進行檢驗的實驗室需符合：(1)具備符合感染性生物材料管理辦法所定第三級或第四級實驗室、(2)置有經生物安全訓練合格之實驗室人員、(3)備有與操作檢體相當等級之生物安全管理措施及文件。本計畫擬建立優質新興病原體防疫檢驗應變模式，從發現新的病原體後，利用已知的基因序列，開發分子檢驗方法包含 real-time PCR 檢測與可攜式檢驗套組，進行 real-time

PCR 檢測與可攜式檢驗套組檢驗方法確效評估與將確效評估流程文件化，建立跨區域實驗室檢驗網絡與實驗室檢驗品質監測。在建立跨區域實驗室檢驗網絡選定全國北中南東各地具有 BSL-2 以上，且具病毒檢驗能力的實驗室作為指定機構室，將其常規納入我國新興防疫檢驗網絡，除可精進整備我國針對此類法定傳染病的檢驗量能，以在地化檢驗的策略縮短檢體運送時間，爭取防疫時效；亦藉由提升各實驗室的檢驗能力與品質，儲備國內針對新興傳染病檢驗的實驗室專業人才，俾使相關防疫工作可永續推動。經此計畫可建立新興病原檢驗應變模式，提升新興病原分子檢測實驗室效能與整體檢驗量能。

## (2)材料與方法

### 1.設計新興病原體分子檢驗: SARS-CoV-2

建立引子與探針對資料庫：參考科學文獻或 WHO 網站，以及 GISAID (<https://www.gisaid.org/>)下載相關病原體基因序列，經比對後，根據病毒序列的保守情形 (conservation)，評估各檢測目標區域的適用性。將選擇相對保守的區域作為基因檢測標的，設計研發或改良可精準檢測 SARS-CoV-2 專一性檢測用引子與探針。SARS-CoV-2 於 2019 年 12 月大陸武漢發現人類感染個案後，2020 年 1 月 10 日病毒序列公布(accession No: MN908947.1 Wuhan-Hu-1)，1 月 13 日台灣疾病管制署根據病毒序列設計 real-time RT-PCR 診斷用引子與探針，WHO 也於 1 月 14 日公布數組 real-time RT-PCR 引子與探針[11]，建立新型冠狀病毒 real-time RT-PCR 檢測平台。搭配 Roche LightCycler 480 系統，以原廠 Multiplex RNA Virus Master 試劑，先測試資料庫內各 PCR 反應的個別檢測條件，並加以優化，試劑配置與 PCR 反應環境條件分別如下所述：

#### 試劑配置

Component	Volume/reaction
RT-Enzyme Solution, 200 X	0.1 $\mu$ l
RT-qPCR Reaction Mix, 5 X	4 $\mu$ l
Forward primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Reverse primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Probe (5 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
RNase-Free Water	8.4 $\mu$ l
Template RNA	5 $\mu$ l
Total volume	20 $\mu$ l

### 反應環境設定

Reverse Transcription:	50 °C	30 min
Initial denaturation	95 °C	30 sec
3-step cycling Amplification:	95 °C	5 sec
Annealing:	53 °C	30 sec
Extension:	72°C	30 sec
Number of cycles:	45	
Cooling:	40 °C	30 ec

陽性對照檢體來源：根據病毒序列合成短片段 DNA，取得合成 DNA 後，首先以 real-time RT-PCR 之引子放大產物片段，並植入載體 DNA，構築各檢測反應的陽性對照質體 DNA。

2.分子檢驗方法確效與驗證並建立流程與文件化，檢測項目分析確效評估報告，依檢測項目特性，執行之檢測項目確效內容如下：



- (1)分析反應性 (Analytical Reactivity)
- (2)偵測極限(Limit of Detection, LoD)
- (3)分析特異性-交叉反應 (Analytical Specificity- Cross-Reactivity)
- (4).分析特異性-干擾 (Analytical Specificity- Interference)
- (5).閾值(Cut-off)
- (6).精密度/再現性 (Precision/ Reproducibility)
- (7).殘留汙染及交叉汙染
- (8).方法比較(Method Comparison)
- (9) 安定性(Stability)
- (10) 檢測過程之流程圖及其描述
- (11) 檢測結果(Result)

### 3.建立跨區域檢驗實驗室網絡

於我國北、中、南、東四個地理區，初步各選擇 1 家位於教學醫院或醫學中心，且檢驗品質與能力符合標準的病毒檢驗室參與。執行方式為：進行國內各符合資格檢驗機構的意願調查。針對有意參與之檢驗機構，由疾病管制署進行能力試驗，能力試驗，合格標準為 80 分，並針對檢驗結果不符，進行矯正預防措施。對於每個檢體的 Ct 值，亦須與預期 Ct 值接近(與國家實驗室檢測結果差異在正負 1.5 個 Ct 值區間內)。檢驗機構須以疾病管制署所提供的標準檢驗方法，包含實驗 protocol，以及實驗所需已合成好之引子、探針與陽性對照樣本，執行檢驗。

### 4.實驗室檢驗品質監測

定期或不定期針對各指定檢驗機構進行品質監督管理，確保各實驗室檢驗結果的正確性。疾病管制署持續監視病毒基因序列變化，評估現有標準檢

驗方法的適用性，若現有病毒已產生變異，將進行引子或探針等序列調整，並經重新評估其適用性後，再次提供新的檢驗方法供各指定實驗室使用，包含實驗 protocol，以及實驗所需已合成好之引子、探針與陽性對照樣本。

### (3)結果

#### 一、SARS-CoV-2 分子檢驗 real-time RT-PCR 之 primers, probes 設計

2019年12月中國大陸發生新型冠狀病毒人類感染，病原體為SARS-CoV-2，後續更造成全球大流行，2020年1月11日病毒全基因體序列公布(MN908947.1 Wuhan-Hu-1)，根據此序列進行real-time RT-PCR 之 primers, probes 設計，並製備陽性對照 plasmids。WHO公布數組real-time RT-PCR引子與探針[11]，包括美國CDC、香港、中國大陸等國家，以續列稀釋之陽性對照組DNA，初步比較4個real-time RT-PCR 檢測效能如圖一~四。當稀釋至100 copies/reaction 台灣CDC 3個 real-time RT-PCR 有陽性訊號，德國TIB 3基因中有2個基因有陽性訊號，美國CDC3個基因與中國大陸 2個基因有陽性訊號，香港在100 copies/reaction 呈現陰性(圖五)，當稀釋至10 copies/reaction 台灣CDC 有1 個 N1 基因呈陽性訊號，初估檢測極限不同基因約10~100 copies/reaction。後續為了可與國際比較且德國TIB有市售primers, probes 可購買，嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構檢驗網使用的方法為德國TIB primers, probes (圖六)。詳細操作步驟如附錄 一。

#### 二、SARS-CoV-2 核酸檢測試劑評估測試

項目	進行方式	是否完成
1. 分析反應性 (Analytical Reactivity)	應至少可偵測包括具有時間和區域特徵的10株不同的新型冠狀病毒株，其來源可為陽性臨床檢體或臨床分離株。	完成

<p>2. 偵測極限 (Limit of Detection, LoD)</p>	<p>選擇不同來源的3個陽性臨床檢體或臨床分離病毒株或標準品進行系列稀釋，每個病毒稀釋液重複3份，將具有95%陽性結果的濃度作為偵測極限。並以製備20個偵測極限濃度的稀釋液進行檢驗，證實於此偵測極限濃度時，會有95%以上的陽性結果。</p>	<p>完成</p>
<p>3. 分析特異性-交叉反應 (Analytical Specificity-Cross-Reactivity)</p>	<p>應針對核酸序列具同源性、易引起相似臨床症狀的病原體評估可能的交叉反應，例如：HCoV-HKU1，HCoV-OC43，HCoV-NL63，HCoV-229E，SARS-CoV，MERS-CoV，Influenza A/B，Adenovirus type 1、7，Cytomegalovirus，Enterovirus，Epstein Barr Virus，Human parainfluenza type 1、2、3，Measles，Human metapneumovirus，Mumps Virus，Respiratory syncytial virus type B，Rhinovirus，<i>Bordetella pertussis</i>，<i>Chlamydia pneumoniae</i>，<i>Corynebacterium sp.</i>，<i>Escherichia coli</i>，<i>Hemophilus influenzae</i>，<i>Lactobacillus sp.</i>，<i>Legionella spp</i>，<i>Moraxella catarrhalis</i>，<i>Mycobacterium tuberculosis (avirulent)</i>，<i>Mycoplasma pneumoniae</i>，<i>Neisseria meningitidis</i>，<i>Neisseria sp.</i>，<i>Pseudomonas aeruginosa</i>，<i>Staphylococcus aureus (Protein A producer)</i>，<i>Staphylococcus epidermidis</i>，<i>Streptococcus pneumoniae</i>，<i>Streptococcus pyogenes</i>，<i>Streptococcus salivarius</i>。</p> <p>對於交叉反應濃度，以具有醫學意義的病毒濃度（通常為<math>10^5</math> pfu/mL或更高）、細菌濃度（<math>10^6</math> pfu/mL或更高）進行測試。</p>	<p>部分完成</p>
<p>4. 分析特異性-干擾 (Analytical Specificity-Interference)</p>	<p>應針對潛在干擾物質研究。可能造成干擾的物質包括、但不限於：純化粘蛋白，人類血液，鼻腔噴霧劑或滴劑，鼻腔糖皮質激素，鼻用凝膠，緩解過敏性症狀藥物，潤喉片、口服麻醉劑和鎮痛劑，抗病毒藥物，抗生素、鼻用軟膏，全身抗菌藥等。</p> <p>應使用至少2株病毒株，使用濃度近臨床判別點的檢體來進行干擾評估，並評估各干擾</p>	<p>未完成</p>

	物質於其不受明顯干擾可能的最高濃度。	
5. 閾值 (Cut-off)	應說明決定閾值的方法。可以臨床檢體先導研究 (pilot study) 的Receiver Operating Curve (ROC) 分析所得到之相關靈敏度及相關特異性判斷，並以預期受檢族群加以確認。若分析法含不確定區段 (Equivocal Zone) 應說明如何決定此區段之上下限值。	完成
6. 精密度/再現性 (Precision/ Reproducibility)	<p><b>(1) 實驗室間精密度 (Site-to-Site Reproducibility)</b></p> <p>應在代表預期使用者的3處地點 (如：2個外部測試地點，及1個內部測試地點) 進行測試，包括至少5天 (無需為連續)，每天至少進行2次操作，每次操作每件檢體3次重複檢驗，及至少由2名操作者進行重複檢驗。</p> <p>應至少包括使用下列3種濃度進行測試，並包含檢體前處理步驟：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 「高陰性 (high negative)」檢體：檢體的分析物濃度低於閾值，且該檢體重複檢驗的結果約有95%的機率為陰性，5%的機率為陽性。</li> <li>● 「低陽性 (low positive)」檢體：檢體的分析物濃度略高於閾值，且該檢體重複檢驗的結果約有95%的機率為陽性，5%的機率為陰性。</li> <li>● 「中等陽性 (moderate positive)」檢體：檢體的分析物濃度高於閾值，且該檢體重複檢驗的結果幾乎100%的機率均為陽性。例如，大約為閾值濃度的2至3倍。</li> </ul> <p><b>(2) 實驗室內部精密度/再現性 (Within-Laboratory Precision)</b></p> <p>使用與(1)實驗室間精密度試驗之相同檢體組，進行分析內 (intra-assay)、分析間</p>	完成

	<p>(inter-assay) 及批次間 (inter-lot) 的精密度研究。</p> <p>應針對變異的來源進行測試，例如：不同操作者、不同天及不同次操作 (runs) 進行測試。測試至少12天 (不需為連續)，每天以2名操作者進行2次操作，每次操作每件檢體重複檢驗2次。應使用至少3批試劑進行批次間評估。</p>	
<p>7. 殘留汙染及交叉汙染 (Carry-Over and Cross-Contamination)</p>	<p>交互使用高陽性與高陰性檢體進行至少5次測試，以高陰性檢體檢測結果為陰性的比率是否高於95%評估是否有交叉汙染的情況。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 「高陰性 (high negative)」檢體：檢體的分析物濃度低於閾值，且該檢體重複檢驗的結果約有95%的機率為陰性，5%的機率為陽性。</li> </ul> <p>「高陽性 (high positive)」體：檢體的分析物濃度超過預期使用族群之患者檢體檢測結果的95%或以上。</p>	完成
<p>8. 方法比較 (Method Comparison)</p>	<p>應使用至少50例陽性檢體及100例陰性檢體進行此項研究，如陽性臨床檢體難以取得，應至少包含25例臨床檢體，其餘檢體得以模擬檢體進行測試。模擬檢體可以去活化SARS-CoV-2病毒加入陰性檢體製備，至少50%的模擬檢體濃度為1至2倍偵測極限值，其餘模擬檢體濃度應涵蓋整個分析範圍，且不超過5倍偵測極限值。</p> <p>1至2倍偵測極限值檢體之陽性一致率應達95%，其餘檢體測試結果一致率應達100%。</p>	完成
<p>9. 安定性 (Stability)</p>	<p>應提供器材於宣稱之儲存條件下的開封前、後的安定性評估資料。</p>	進行中

進行分子檢驗方法確效與驗證並建立流程與文件化，執行之檢測項目包含如下：

- (1)分析反應性 (Analytical Reactivity)：已使用26株臨床分離株進行檢驗。
- (2)偵測極限(Limit of Detection, LoD)：以衛生福利部食品藥物管理署分讓之「核酸擴增技術用SARS-CoV-2病毒核酸國家標準品」(Lot COV 109-06)，屬去活化病毒液，仿單所標示之病毒核酸濃度為 $3 \times 10^6$  copies/mL，另食藥署亦同步提供個別基因之濃度分別為：E基因： $5.7 \times 10^6$  copies/mL、RdRp基因： $2.1 \times 10^6$  copies/mL、N基因： $1 \times 10^6$  copies/mL。進行實驗，將SARS-CoV-2國家標準品樣本以經確認陰性之臨床檢體稀釋，混合後形成帶有特定濃度去活化病毒之待測樣本，再進行E、RdRp及N基因檢測，依據結果初步估計各基因偵測極限(LoD)範圍 (圖七)。偵測極限濃度進行20次重複試驗(圖八)，E、RdRp及N基因檢測偵測極限值分別為1.71, 1.26, 15 copies/reaction.
- (3)分析特異性-交叉反應 (Analytical Specificity- Cross-Reactivity)：以測試Influenza A/H1N1pdm09, A/H3N2, influenza B, Adenovirus, metapneumovirus, RSV, Rhinovirus, Coronavirus HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-229E 無交叉反應(圖九)。
- (4).分析特異性-干擾 (Analytical Specificity- Interference)：進行中
- (5).閾值(Cut-off)：生物參考區間/臨床決策值，各基因檢測反應之Ct值分析，係以即時定量偵測儀「Abs Quant/2nd Derivative」模式進行，螢光閾值係採用機器預設值，無法以手動方式調整。檢驗結果的可報告區間：依各基因檢測方法之偵測極限，估計為E基因檢測法： $1.71$  copies/reaction、RdRp基因檢測法： $1.26$  copies/reaction、N基因檢測法： $15$  copies/reaction。
- (6).精密度/再現性 (Precision/ Reproducibility)：精密度/再現性，不同時間同一實驗室內操作，共檢測49支臨床樣本(含9月9日10支及9月24日39支)，再現性為100%。精密度/重複性，相同時間同一實驗，20次反應 E, RdRp, N

三基因Ct值平均值±標準差分別為 35.3 ±0.39, 36.8 ±0.43, 34.8±0.38。

(7).殘留汙染及交叉汙染:利用培養病毒(Ct 15-20)與陰性檢體測試。

(8).方法比較(Method Comparison):分析自109年7月6日至9月19日間，LDT real-time RT-PCR及市售EUA Xpert® Xpress SARS-CoV-2同步進行檢驗之58支檢體，比較不同方法所得檢驗結果。其中13支檢體於兩種方法之檢驗結果皆為陽性；45支檢體於兩種方法之檢驗結果皆為陰性，專一性 100% (45/45)，敏感性100%(13/13)，正確性100% (58/58)。

(9) 安定性(Stability):進行中

(10) 檢測過程之流程圖及其描述:如附件一。

(11) 檢測結果(Result): 新型冠狀病毒real-time PCR陽性，新型冠狀病毒real-time PCR陰性。

### 三、建立嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構檢驗網

2019年12月中國首度爆發武漢肺炎疫情之後，我國當時雖有疾管署昆陽、中區以及南區等三家實驗室於第一時間進行全國疑似個案檢驗，惟為迅速拓展全國實驗室檢驗量能，疾管署仍立即針對8家指定檢驗機構(病毒合約實驗室)進行能力試驗，並提供新型冠狀病毒檢驗所需試劑及引子探針對，於109年1月22日完成首批8家實驗室的依法指定工作，使嚴重特殊傳染性肺炎之通報個案，可藉由檢驗網絡之運作進行地在檢驗，縮短檢體運送所需耗費時間，提升檢驗效能。隨著國際疫情持續延燒，國內針對疑似個案的檢驗需求大增，疾管署除持續輔導其他尚未加入且具有三級實驗室之醫療院所擔任指定檢驗機構外，亦透過修訂傳染病檢驗及檢驗機構管理辦法，將符合指定檢驗機構之法定資格由原先需具有三級實驗室放寬至具有二級負壓實驗室，使國內許多醫學中心及區域或地區級之醫療或醫事機構，均可在完成能力試驗後，加入指定檢驗網的行

列。申請成為COVID-19 指定檢驗機構，須符合下列資格者：

一、實驗室設備：具備符合感染性生物材料管理辦法所定第三級、第四級實驗室或經機構生物安全會通過之第二級負壓實驗室及疫情指揮中心成立期間，第二級實驗室。二、置有經生物安全訓練合格之實驗室人員。三、備有與操作檢體相當等級之生物安全管理措施及文件。四、生物安全會生物安全等級合格證明書、生物安全檢查表及生物安全櫃檢測報告。五、能力試驗合格。截至109年10月26日，在疾管署的持續輔導下，嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗網絡已有79家醫療或醫事機構，每日可負荷之最大檢驗量能9049件(圖十)。目前79家嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構，具品質系統認證者70 家，ISO15189 TAF或 CAP 實驗室有69家、ISO17025 TAF 1家、ISO9000 1家；ISO15189 TAF 暫時終止1家，未具品質系統認證8家為國防醫學院預防醫學研究所、中國醫藥大學新竹附設醫院(新成立認證中)、以及6家離島醫院與衛生所。

#### (4)討論

Real-time RT-PCR方法已廣泛應用於病原體檢驗。在發生公共衛生緊急情況時，熟練的檢驗實驗室可以利用real-time RT-PCR技術在常規的服務範圍內迅速建立新的檢驗項目。在建立檢驗方法時，除了相關試劑酵素，primers, probes 和陽性對照外，還需品質監測計劃，實驗室還需要進行技術鑑定的文件以及臨床評估試驗的數據收集，以確保檢驗的品質。新興病原體突然出現，第一時間無市售檢驗試劑可使用，須即時發展實驗室內(in house)使用的檢驗方法應急。如1997年H5N1，2003年SARS, , 2009 H1N1pdm09, 2012 MERS-CoV , 2013 H7N9新型流感，世界衛生組織或新興病原體的發現者皆會即時公布分子檢測方法的引子與探針序列[5-9]，可針



對該病原體進行實驗室確認。2019年12月中國大陸武漢地區發現 SARS-CoV-2人類感染個案後，2020年1月10日病毒序列公布(accession No: MN908947.1 Wuhan-Hu-1)，1月13日台灣疾病管制署根據病毒序列設計 real-time RT-PCR診斷用引子與探針，WHO也於1月14日公布數組real-time RT-PCR引子與探針[11]，其中德國TIB發展的檢測方法，檢測極限小於10 copies/reaction，且進行臨床專一性、敏感性評估，與其它呼吸道病原體也無交叉反應[12]，故後續台灣嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構檢驗網常規使用的方法。

為了確保實驗室內發展的檢驗方法的檢驗品質，各國各有不同的管制方式。台灣食品藥物管理署(FDA) 107年12月17日公告「精準醫療分子檢測實驗室檢測與服務指引」與民國 108 年 05 月 31 日公告「精準醫療分子檢測實驗室列冊登錄管理要點」，針對LDT實驗室進行管理，在品質管理系統方面參考ISO 15189 國際標準制定，以作為管理分子檢測實驗室 LDT 項目之參考依據。在開發、申請與服務之完整流程遵循此指引進行實驗室管理，以維持實驗室自行研發之 LDT 項目之品質。本次開發的 SARS-CoV-2 檢測方法，根據相關指引，進行檢測方法進行檢驗品質確效包括：(1)分析反應性 (Analytical Reactivity) (2)偵測極限(Limit of Detection, LoD) (3)分析特異性-交叉反應 (Analytical Specificity- Cross-Reactivity) (4).分析特異性-干擾 (Analytical Specificity- Interference) (5).閾值(Cut-off) (6).精密度/再現性 (Precision/ Reproducibility) (7).殘留汙染及交叉汙染(8).方法比較 (Method Comparison) (9) 安定性(Stability)(10) 檢測過程之流程圖及其描述 (11) 檢測結果(Result)。在經過這品質管理過程，確保檢驗品質。本檢測方法經食藥署書面資料審查、實地查核、專家會議審議等程序，9月29日核可為新型冠狀病毒(SARS-CoV-2)核酸檢測，符合精準醫療分子檢測實驗室檢

測與服務指引之品質管理要求，並自發文日起至「嚴重特殊傳染性肺炎中央流行疫情指揮中心」解除開設日止 用於檢測檢體中是否有新型冠狀病毒之核酸。

分子檢測雖具設計容易、靈敏、快速等好處，但病原體基因經常改變，分子檢測的 primers 與 probes 需定期審視與更新，否則易造成偽陰性[13]，為了避免此情形，同一病原體可選擇不同區域當檢測區域，例如有兩個反應檢測 A 型流感病毒 M 基因，當病原體突變時，其中一檢測方法檢測陰性，可進行更新引子與探針序列，維持高靈敏性。

## **(5)結論與建議**

本計畫已建立新興病原體防疫檢驗應變模式，從設計分子檢驗方法、確效與評估分子檢驗並將流程文件化，建立嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構檢驗網，有效提升檢驗量能與檢驗品質，為了持續監測實驗室品質，目前陽性個案仍逐案討論檢測結果，後續進行實地訪查，進行每年一次能力試驗，並鼓勵參加國際性之能力試驗（如 CAP）。

## **(6)計畫重要研究成果及具體建議**

本計畫已建立新型冠狀病毒(SARS-CoV-2)核酸檢測方法，並將確效與評估分子檢驗過程文件化檢，本檢測方法經食藥署書面資料審查、實地查核、專家會議審議等程序，符合精準醫療分子檢測實驗室檢測與服務指引之品質管理要求，並自發文日(9/29)起至「嚴重特殊傳染性肺炎中央流行疫情指揮中心」解除開設日止 用於檢測檢體中是否有新型冠狀病毒之核酸。已建立嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構檢驗網，擴大檢驗量能至每日 9049 件。

**衛生福利部疾病管制署委託/署內科技研究計畫**  
**109 年度計畫重要研究成果及具體建議**  
(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：建立優質新興病原防疫檢驗應變模式

主持人：劉銘燦

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-114301

1.計畫之新發現或新發明

建立 SARS-CoV2 分子檢驗方法、進行分子檢驗確效並將流程文件化，此檢測方法經食藥署書面資料審查、實地查核、專家會議審議等程序，符合精準醫療分子檢測實驗室檢測與服務指引之品質管理要求，用於檢測檢體中是否有新型冠狀病毒之核酸。

此 SARS-CoV2 分子檢驗方法已導入嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構檢驗網。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

即時建立 SARS-CoV2 分子檢驗方法，縮短檢驗時效與確保檢驗品質，正確地偵測 SARS-CoV2，釐清其傳播路徑及感染原，避免病毒擴散，維護大眾健康。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

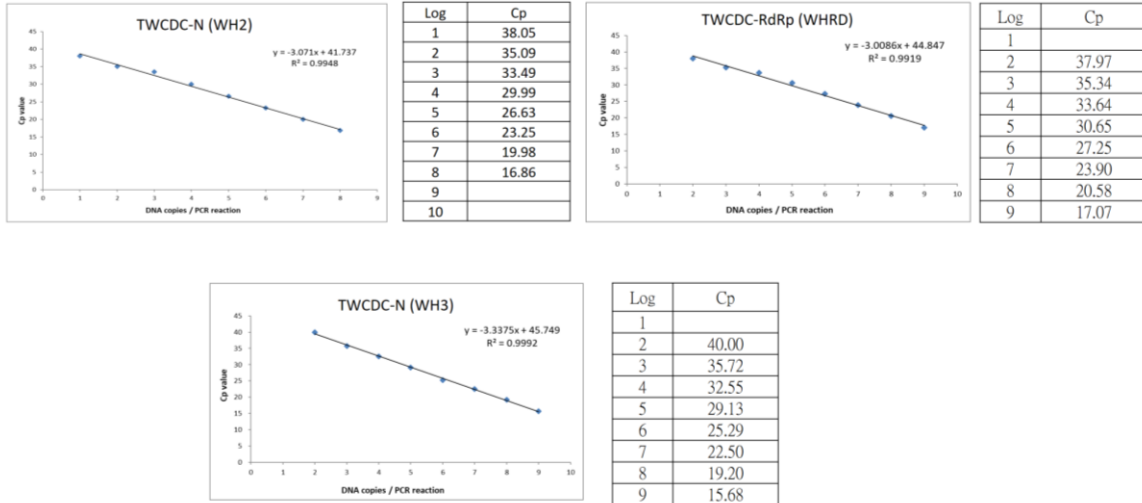
目前 SARS-CoV2 分子檢驗方法具高靈敏度與專一性，請醫師提高警覺，若 COVID-19 疑似個案，應加強通報。

(7)參考文獻：請依台灣醫誌編排方式

1. Anderson TP, Werno AM, Barratt K, Mahagamasekera P, Murdoch DR, Jennings LC. Comparison of four multiplex PCR assays for the detection of viral pathogens in respiratory specimens. *Journal of virological methods*. 2013;191(2):118-121.
2. Drancourt M, Gaydos CA, Summersgill JT, Raoult D. Point-of-care testing for community-acquired pneumonia. *The Lancet Infectious diseases*. 2013;13(8):647-649.
3. Pillet S, Lardeux M, Dina J, Grattard F, Verhoeven P, Le Goff J, et al. Comparative evaluation of six commercialized multiplex PCR kits for the diagnosis of respiratory infections. *PloS one*. 2013;8(8):e72174.
4. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nature reviews Microbiology*. 2013;11(8):574-585.
5. Corman VM, Muller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B, et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2012;17(49).
6. WHO. WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans. Available from [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO\\_Diagnostic\\_RecommendationsH1N1\\_20090521.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf) 2009.
7. WHO. Real-time RT-PCR protocol for the detection of avian influenza A(H7N9) virus. Available from [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/cnic\\_realtime\\_rt\\_pcr\\_protocol\\_a\\_h7n9.pdf](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/cnic_realtime_rt_pcr_protocol_a_h7n9.pdf). 2013.
8. WHO. Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases. Available from <http://www.who.int/influenza/resources/documents/RecAllabtestsAug07.pdf>. 2007.
9. Poon LL, Chan KH, Wong OK, Yam WC, Yuen KY, Guan Y, et al. Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2003;28(3):233-238.
10. Yang JR, Lo J, Liu JL, Lin CH, Ho YL, Chen CJ, et al. Rapid SYBR green I and modified probe real-time reverse transcription-PCR assays identify influenza H1N1 viruses and distinguish between pandemic and seasonal strains. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3714-3716.
11. WHO. Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols> accessed on 25 July, 2020. 2020.
12. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020;25(3).
13. Yang JR, Kuo CY, Huang HY, Wu FT, Huang YL, Cheng CY, et al. Newly emerging mutations in the matrix genes of the human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses reduce the detection sensitivity of the real-time RT-PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:76-82.

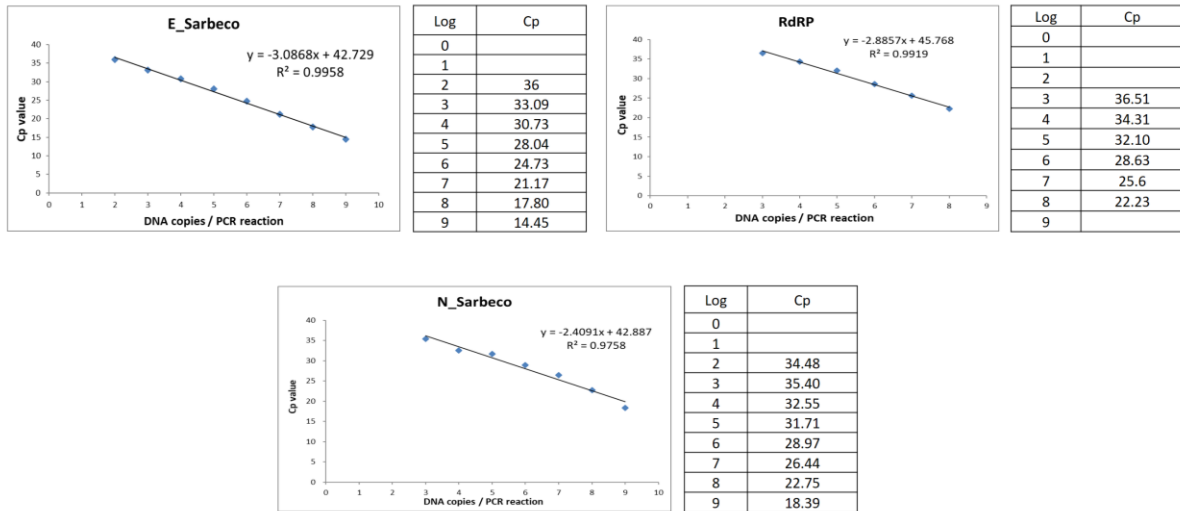
(8)圖、表

### SARS-CoV2分子檢測方法評估



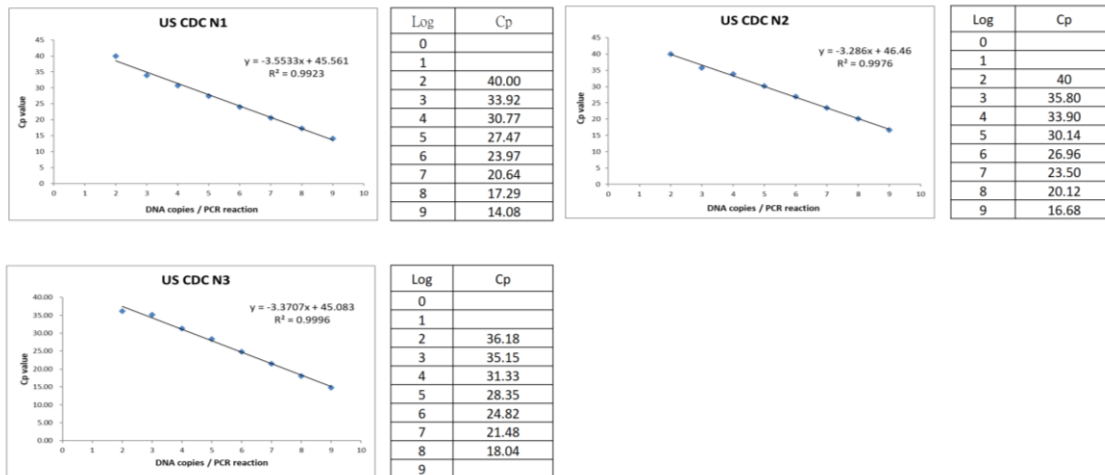
圖一、台灣疾病管制署 SARS-CoV-2 real-timeRT-PCR 檢測極限值。

### SARS-CoV2分子檢測方法評估



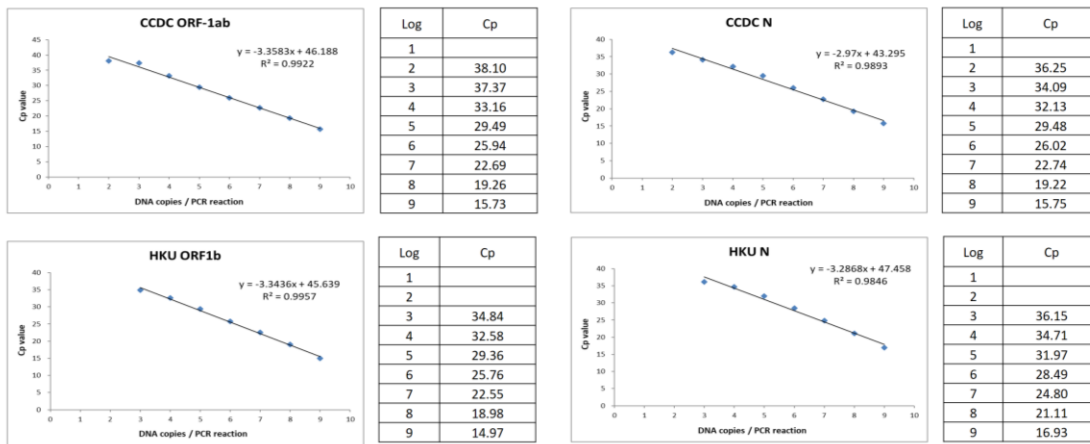
圖二、德國 TIB SARS-CoV-2 real-timeRT-PCR 檢測極限值。

## SARS-CoV2分子檢測方法評估



圖三、美國 CDC SARS-CoV-2 real-timeRT-PCR 檢測極限值。

## SARS-CoV2分子檢測方法評估



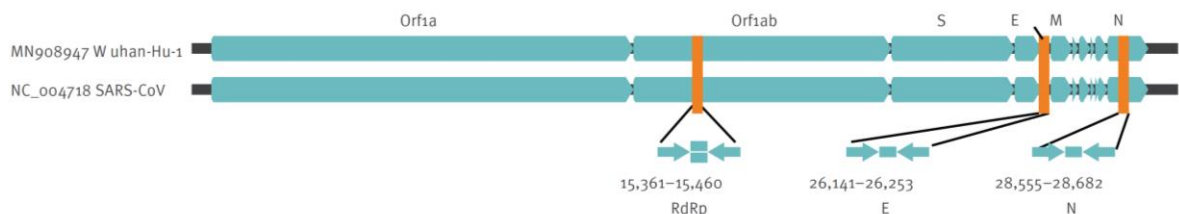
圖四、中國大陸與香港 SARS-CoV-2 real-timeRT-PCR 檢測極限值。

Log 10	TCDC			TIB			US-CDC			CCDC		HKU	
	RdRp	N1	N2	RDRP	E	N	N1	N2	N3	Orf	N	Orf	N
1		38.05											
2	37.97	35.09	40		36	34.48	40	40	36.18	38.1	36.25		
3	35.34	33.49	35.72	36.51	33.09	35.4	33.92	35.8	35.15	37.37	34.09	34.84	36.15
4	33.64	29.99	32.55	34.31	30.73	32.55	30.77	33.9	31.33	33.16	32.13	32.58	34.71
5	30.65	26.63	29.13	32.1	28.04	31.71	27.47	30.14	28.35	29.49	29.48	29.36	31.97
6	27.25	23.25	25.29	28.63	24.73	28.97	23.97	26.96	24.82	25.94	26.02	25.76	28.49
7	23.9	19.98	22.5	25.6	21.17	26.44	20.64	23.5	21.48	22.69	22.74	22.55	24.8
8	20.58	16.86	19.2	22.23	17.8	22.75	17.29	20.12	18.04	19.26	19.22	18.98	21.11

圖五、不同 SARS-CoV-2 real-timeRT-PCR 之檢測極限值比較。

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence <sup>a</sup>	Concentration <sup>b</sup>
RdRP gene	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV.
	RdRp_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Use 100 nM per reaction and mix with P1 Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs.
	RdRp_SARSr-R	CARATGTAAASACACTATTAGCATA	Use 100 nM per reaction and mix with P2
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 800 nM per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 400 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 200 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACC CGCAATC	Use 400 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACCTTCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 200 nm per reaction
			Use 800 nm per reaction

Relative positions of amplicon targets on the SARS coronavirus and the 2019 novel coronavirus genome



E: envelope protein gene; M: membrane protein gene; N: nucleocapsid protein gene; ORF: open reading frame; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase gene; S: spike protein gene.

Numbers below amplicons are genome positions according to SARS-CoV, GenBank NC\_004718.

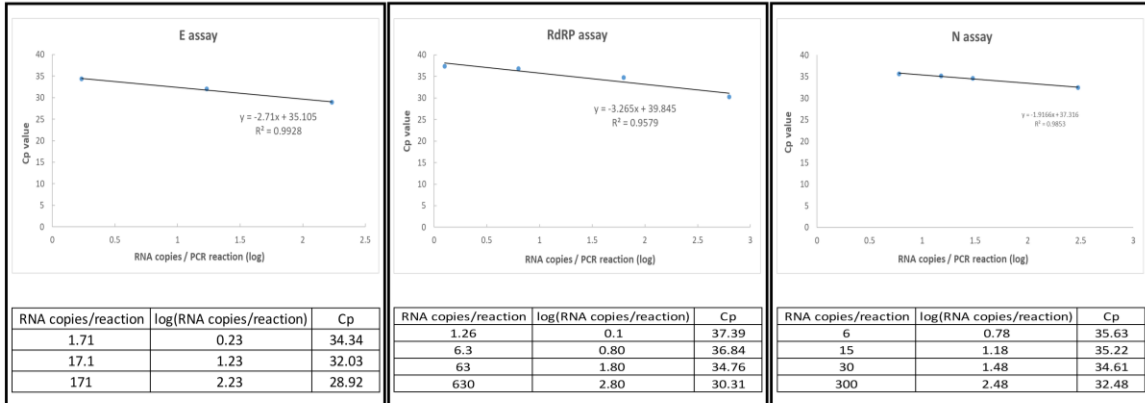
圖六、德國 TIB SARS-CoV-2 real-timeRT-PCR primers 與 probes 序列與檢測基因位置。

## 檢驗方法分析性能確效-偵測極限

E基因

RdRp基因

N基因



- 1) 將SARS-CoV-2國家標準品樣本以確認陰性之臨床檢體稀釋，混合後形成帶有特定濃度去活化病毒之待測樣本，再分別取300 ul進行核酸萃取，萃取後每支核酸體積為50 ul。
- 2) 將萃取後各病毒濃度核酸依本署SOP，進行E、RdRp及N基因檢測，依據結果初步估計各基因偵測極限(LoD)範圍。

圖七、以標準品進行 SARS-CoV-2 real-timeRT-PCR 檢測極限值測定。

## 檢驗方法分析性能確效-偵測極限

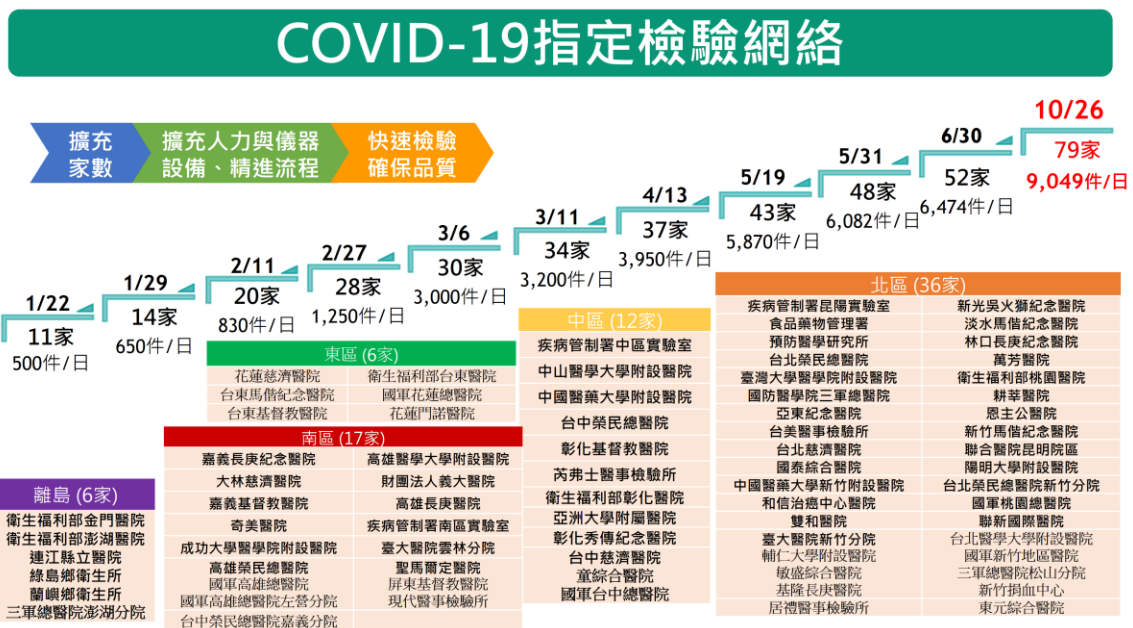
Target gene: E			Target gene: RdRp			Target gene: N		
Replicate	Amount of virus (copies/reaction)		Replicate	Amount of virus (copies/reaction)		Replicate	Amount of virus (copies/reaction)	
	1.71	0.86		1.26	0.63		15	6
1	35.02	35.95	1	36.82	35.00	1	34.19	35.34
2	35.44	35.32	2	36.85	-	2	34.68	35.14
3	35.19	36.08	3	36.23	-	3	35.97	34.84
4	35.31	35.63	4	36.25	-	4	34.95	34.94
5	35.72	-	5	36.22	35.29	5	34.84	34.9
6	34.99	36.27	6	36.66	-	6	34.67	35.25
7	35.03	36.71	7	37.39	-	7	34.9	34.87
8	35.65	36.73	8	36.74	35.09	8	34.24	34.94
9	35.27	35.93	9	37.16	34.96	9	34.71	-
10	34.68	36.2	10	37.02	35.25	10	34.73	35.83
11	35.44	-	11	36.27	35.52	11	34.57	35.18
12	35.25	-	12	37.04	35.47	12	34.69	-
13	34.52	36.26	13	36.96	34.49	13	34.87	-
14	35.57	35.78	14	36.78	35.1	14	34.8	35.63
15	36.16	36.27	15	37.31	35.2	15	34.22	-
16	35.79	35.95	16	36.75	35.18	16	34.68	-
17	34.99	35.71	17	37.98	-	17	34.81	-
18	35.46	35.6	18	36.91	35.63	18	34.73	35.28
19	35.15	35.42	19	36.8	-	19	34.89	-
20	35.59	36.6	20	36.97	-	20	35.22	35.21

圖八、偵測極限濃度進行 20 次重複試驗。



No	E	RdRP	N	hCoV-229E	hCoV-NL63	hCoV-OC43	A/H3N2	A/H1N1pdm09	Flu B	Adenovirus	RSV	Metapneumovirus	Rhinovirus
1	-	-	-	-	-	-	-	18.18	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	18.22	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	17.63	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	15.67	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	17.5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	18.18	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	17.88	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	25.24	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	25.83	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	19.14	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	18.98	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	20.66	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	25.8	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	22.86	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	23.65	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	15.94	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	16.23	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	14.2	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	16.99	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	17.65	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	17.26	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	13.99	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	17.65	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	15.65	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	14.95	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27.2	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26.65	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.23	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26.29	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.14	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20.06	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.21	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	22.34	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	35.67	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	29.66	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	34.12	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24.53
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28.83
39	-	-	-	32.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	29.37	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	30.74	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	18.53	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	21.43	-	-	-	-	-	-	-

圖九、分析特異性-交叉反應 (Analytical Specificity- Cross-Reactivity)



圖十、嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗網絡已有 79 家醫療或醫事機構，每日可負荷之最大檢驗量能 9049 件。

## 109 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱：建立優質新興病原防疫檢驗應變模式

計畫主持人：劉銘燦

填報日期：109.12.22

\*修正處請在報告中以紅字標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
1	全台檢測量能的提升與快速核酸檢測，以及對於 COVID-19 的應用，成效良好。	謝謝委員意見。	
2	未來與訂製的自動化儀器，如何結合使用？	當檢驗需求量暴增時，可使用自動化儀器，擴增檢驗量。	
3	建議採用食藥署已核准的試劑。	目前 COVID-19 檢驗網，使用試劑為食藥署已核准的試劑或本署建議的方法，此檢測方法經食藥署書面資料審查、實地查核、專家會議審議等程序，符合精準醫療分子檢測實驗室檢測與服務指引之品質管理要求核可	
4	有妥適用於 SARS-CoV2 檢測量能之應變。	謝謝委員意見。	
5	協助快速因應新冠肺炎病毒檢驗工作。	謝謝委員意見。	

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。