

計畫編號：MOHW111-CDC-C-315-134202

衛生福利部疾病管制署 111 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

111 年 度 研 究 報 告

執行單位：疾病管制署

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：111 年 1 月 1 日至 111 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 342 萬元整

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

壹、摘要	
一、中文摘要	第 3 頁
二、英文摘要	第 4 頁
貳、本文	
一、前言（包括研究問題之背景與現況、文獻探討等）	第 5 頁
二、計畫目標	第 7 頁
三、重要工作項目及實施辦法（含材料與方法）	第 8 頁
四、結果與討論	第 11 頁
五、結論與建議	第 18 頁
六、 參考文獻	第 20 頁
七、 圖表	第 22 頁
八、附錄：包括空白研究調查問卷、法規及其他重要資料。	
參、經費支用情形	第 27 頁

壹、摘要

一、中文摘要

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，從設計可攜式分子檢驗方法、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。評估 real-time RT-PCR 池化檢驗方式的可行性與病原體演變之新變異株對檢驗試劑效能之影響。

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

二、英文摘要

Abstract

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 portable 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. We evaluated the feasibility of using pooled testing strategy in real-time RT-PCR method for SARS-CoV-2 detection and impacts of new variants on detecting reagents.

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

貳、本文

一、前言（包括研究問題之背景與現況、文獻探討等）

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, 2019 SARS-CoV-2，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。

二、計畫目標

1. 完成 1 組可攜式新型冠狀病毒檢驗套組確效與評估並將流程文件化。
2. 建立與維護「嚴重特殊傳染性肺炎」跨區域實驗室檢驗網絡實驗室。
3. 進行「嚴重特殊傳染性肺炎」指定檢驗機構實驗室檢驗品質監測。
4. 市售 SARS-CoV-2 檢驗試劑評估，確保實驗室檢驗效能。

三、重要工作項目及實施辦法（含材料與方法）

重要工作項目

1. 完成 1 組可攜式新型冠狀病毒檢驗套組確效與評估並將流程文件化。執行確效檢測項目：此 SARS-CoV2 real-time RT-PCR 檢驗方法，後續已有廠商技轉，搭配廠商可攜式檢驗平台，產品已獲我國食藥署核可專案製造新冠病毒檢驗試劑(防疫專案核准製造第 1096819804 號, Dagne G SARS-CoV-2 Test Assay)。
2. 建立跨區域檢驗實驗室網絡：至 2022 年 11 月 12 日，嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗網絡已有 266 家指定檢驗實驗室，每日可負荷之最大檢驗量能 23,6873 件。

3.進行「嚴重特殊傳染性肺炎」指定檢驗機構實驗室檢驗品質監測:執行實驗室能力試驗與提升能力試驗執行機構的信賴度與公信力，申請並已獲 TAF 認證為流感病毒核酸檢測之能力試驗執行機構。

4. 市售 SARS-CoV-2 檢驗試劑評估，確保實驗室檢驗效能:評估 3 種常用的檢驗平台，包括 1 種傳統以及 2 種快速 Point-of-care real-time RT-PCR 於池化檢驗的效能，每個檢測組的樣本數為 5。池化檢驗的吻合度介於 100%~93.75%之間

實施辦法（含材料與方法）

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 µl

RT-qPCR Reaction Mix, 5 X	4 μ l
Forward primer (10 μ M)	1 μ l
Reverse primer (10 μ M)	1 μ l
Probe (5 μ M)	0.5 μ l
RNase-Free Water	8.4 μ l
Template RNA	5 μ l
Total volume	20 μ 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

隨著 COVID-19 全球大流行，檢驗需求急速增加，早期檢驗量能需求每日 1 萬件增至 10 萬件，非單一實驗室能負荷，故疫情爆發初期即於我國北、中、南、東四個地理區各教學醫院或醫學中心，建立檢驗實驗室網絡，參與的實驗室需符合生物安全規範與能力試驗合格，以確保檢驗品質。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)。初期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。當經評估有市售 EUA/IVD 檢測試劑與原檢驗方法檢驗敏感度與專一性相當或更佳，則可改使用 EUA/IVD 檢測試劑。

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。

四、結果與討論

結果

1. 完成1組可攜式新型冠狀病毒檢驗套組確效與評估並將流程文件化

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-CoV2，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)，後續在 GISAID database (<https://www.gisaid.org/>)資料上傳超過1388萬筆(2022/11/1止)，從這些病毒序列，挑選保守度高區域進行real-time RT-PCR 之primers, probes 設計，並製備陽性對照 plasmids。進行初步分析反應性(Analytical Reactivity)測試，並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(1)準確性(Accuracy)(2) 閾值確認(Cut-off Value) (3) 靈敏度(Sensitivity) (4) 特異性(Specificity)。偵測極限(Limit of Detection, LoD) :使用臨床分離病毒株進行系列稀釋，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，LoD約在10-100 copies/reaction。(3) 靈敏度(Sensitivity)特異性(Specificity)測試: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，包括 Influenza A/H1N1pdm09, A/H3N2, influenza B, Adenovirus, metapneumovirus, RSV, Rhinovirus, Coronavirus HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-229E。測試完成之SARS-CoV2 real-time RT-PCR 檢驗方法，後續已有廠商技轉，搭配廠商可攜式檢驗平台，產品已獲我國食藥署核可專案製造新冠病毒檢驗試劑(防

疫專案核准製造第1096819804號, Dagene G SARS-CoV-2 Test Assay)。

2. 建立嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構檢驗網

此檢驗網是建立在我國既有新型A型流感指定檢驗網之基礎。該新型A型流感檢驗網絡係由疾病管制署檢驗及疫苗研製中心為強化國內第五類傳染病在地檢驗效能。2019年12月中國大陸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國家級實驗室於第一時間負擔起全國疑似個案檢驗，惟為迅速拓展全國實驗室檢驗量能，疾管署仍立即針對前述8家指定檢驗機構進行能力試驗，並提供新型冠狀病毒檢驗所需試劑及引子探針對，於2020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。截至2022年11月12日，嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗網絡已有266家指定檢驗實驗室，每日可負荷之最大檢驗量能236,873件(如圖一)。

3. 實驗室檢驗品質監測

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。為了持續監測實驗室品質，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)。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。若國內外已出現全新的新型病毒，國家實驗室則須立即建立標準檢驗方法，提供各指定檢驗機構使用，亦將包含實驗protocol，以及實驗所需已合成好之引子、探針與陽性對照樣本。進行能力試驗(Proficiency Testing)為評估實驗室檢驗能力，驗證實驗室檢驗品質最直接且有效的一種方式，透過檢測相同的樣品，實驗室間相互比對檢驗結果差異，評估實驗室內部量測水準，可發現是否有檢驗程序不當、人員訓練不足、技術操作不佳或儀器設備校正等問題，實驗室認證也要求參加能力試驗，而COVID-19 指定檢驗機構須通過疾病管制署之能力試驗。新興傳染病爆發初期，尚無可提供該新興病原體之能力試驗執行機構，初期以實驗室比對或由疾病管制署提供比對樣本，來評估實驗室檢驗能力。因應需定期監測流感病毒檢驗之品質，疾病管制署每年須提供樣品給檢驗機構進行能力試驗，為了提升能力試驗執行機構的信賴度與公信力，疾病管制署申請並已獲TAF認證為流感病毒核酸檢測之能力試驗執行機構，且符合ISO/IEC 17043:2010 規範、能力試驗執行者提供測試樣本之要求與測試結果之分析(圖二、圖三)。

4. 市售SARS-CoV-2 檢驗試劑評估，確保實驗室檢驗效能。

當檢驗陽性率低，池化檢驗模式是提高單位時間的檢測通量的重要策略。然而，由於世界各國 COVID-19 疾病盛行率以及檢測需求不同，各類 real-time RT-PCR 應用於池化檢驗時，每個檢測組的最適樣本數尚無定論。我們評估我國 3 種常用的檢驗平台，包括 1 種常規與 2 種快速 Point-of-care(POC) real-time RT-PCR 於池化檢驗的效能，每個檢測組的樣本數為 5。結果顯示，3 種平台皆可在池化檢驗模式下，正確檢出病毒含量介

於 348000 與 342 RNA 拷貝數之間的鼻咽或咽喉拭子樣本，與個別檢體單獨檢驗的結果相比，陽性檢體於池化檢驗的吻合度介於 93.75%~100% 之間(圖四)。3 種檢驗平台在單獨檢驗與 5 個樣本池化檢測時，常規 real-time RT-PCR Ct 值平均增加 1.7 (E gene), 2.0 (N2)；Xpert Ct 值平均增加 2.8 (E gene), 2.5 (N2)；Liat Ct 值平均增加 1.8 (圖五)，理論上 5 個樣本池化檢測時，病毒濃度會稀釋 5 倍，理論值增加 Ct 值 2.32 ($\log_2 5 = 2.32$)。這些結果顯示，2 種 POC 平台應用於檢體個別檢驗時的靈敏度與常規 real-time RT-PCR 相當，常規與 2 種快速 Point-of-care real-time RT-PCR 於 5 個樣本池化檢驗時，仍能保有可接受的效能。此結果可作為國內各檢驗機構將 real-time RT-PCR 應用於 SARS-CoV-2 池化檢驗的參考，使全國的實驗室每日最大檢驗量能可在適當的情境下有效提升。此部分結果也已發表於(J Clin Lab Anal. 2022 Jun;36(6):e24491)。

新型冠狀病毒 SARS-CoV-2 引起全球大流行，造成社會、經濟和醫療保健系統之全球性災難，變異株不斷出現，導致各國疫情一波又一波，難以平息，尤其 2021 年 12 月後的 Omicron 變異株，接續出現 BA.1, BA.2, BA.4, BA.5，對其傳播速度、疾病嚴重程度、疫苗、治療藥物、診斷工具或其他公共衛生和社會防治措施的有效性，須進一步評估。加上我國 2022 年 5 月 26 日開始修訂「嚴重特殊傳染性肺炎」病例定義，民眾使用家用抗原快篩試劑檢測結果陽性，不分年齡及族群，經醫事人員確認，或由醫事人員執行抗原快篩結果陽性者，即可研判為確定病例，抗原快篩是否可檢出 Omicron BA.4, BA.5 成重要問題。我們評估常用 6 種抗原快篩，相較於 PCR 方法，檢測極限值約 Ct 26-28 (圖六)，與原始株相似，目前流行 BA.5 使用抗原快篩仍可檢出。

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 新型流感與2019 SARS-CoV-2，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(TFDA) 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。本計畫2020年已開發的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，2020年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。本計畫2021年經相同流程，開發可攜式SARS-CoV2 real-time RT-PCR 檢驗方法，進行檢驗品質確效，此檢驗方法，後續已技轉廠商，搭配廠商可攜式檢驗平台，產品已獲我國食藥署核可專案製造新冠病毒檢驗試劑(防疫專案核准製造第1096819804號, Dagne G SARS-CoV-2 Test Assay)。

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 SARS-CoV2 不同區域，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。

新興傳染病爆發，優質可靠的實驗室檢驗，關係疫情防治成敗，疫情爆發即時而正確地檢驗病原體，釐清其傳播路徑及感染原，精準快速地檢

驗，即時隔離感染個案避免病原體擴散，將是新興傳染病防治成效的關鍵。本計畫著重在疫情初期，尚無有靠之檢驗試劑可用，需及時開發靈敏度與專一性高之檢驗方法，另一方面需建立指定檢驗機構，擴大檢驗量能，並導入高通量檢驗儀器，快速提升每日檢驗量。且針對越來越多樣式的檢驗試劑，掌握指定檢驗機構使用之檢驗試劑之良劣，避免因檢驗試劑問題，導致疫情失控。就疫情初期、中期與疫情結束三個階段分析描述新興病原防疫檢驗應變，就開發實驗內檢驗方法、有無 EUA/IVD 檢驗試劑、建立檢驗網、評估市售檢驗試劑與進行能力試驗等方面進行分析如下表。

建立優質新興病原防疫檢驗應變模式

疫情階段	開發實驗內檢驗方法	EUA/IVD 檢驗試劑	檢驗網	市售檢驗試劑評估	能力試驗
初期	迫切需求	無	迫切需求	無市售檢驗試劑	實驗室比對
中期	依需求精進	試劑品質不明	穩定成長	迫切需求	能力試驗執行機構
結束緊急狀態 回歸檢驗常態	退場/技轉/ 形成商品	試劑品質穩定	持續由指定檢驗機構轉換成認可檢驗機構	新技術評估	能力試驗執行機構

2019 年新型冠狀病毒 SARS-CoV-2 引起之 COVID-19 疾病在全球迅速蔓延，造成社會、經濟和醫療保健系統之全球性災難，世界各國皆採取各種防治措施以控制疫情擴散。病毒快速突變影響其傳播速度、疾病嚴重程度、疫苗、治療藥物、診斷工具或其他公共衛生和社會防治措施的有效性，爰此，為持續維持檢驗品質，變異株對檢驗試劑的影響，須即時監測與評估，以確實掌握疫情起伏，適時調整防治策略。

五、結論與建議

本計畫已建立新興病原體防疫檢驗應變模式，從開發分子檢驗方法、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，並持續增加指定檢驗機構家數、擴充人力與儀器設備，有效提升檢驗量能，並精進能力試驗執行機構之信賴度與公信力，持續提升監測實驗室檢驗品質。評估池化檢驗方式的可行性與病原體演變之新變異株對檢驗試劑效能之影響。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 本計畫 2020 年建立新型冠狀病毒(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。此方法於疫情初期，及時導入嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構檢驗網。
2. 2021 年開發可攜式 SARS-CoV2 檢驗方法，後續已有廠商技轉，搭配廠商可攜式檢驗平台，產品已獲我國食藥署核可專案製造新冠病毒檢驗試劑(防疫專案核准製造第 1096819804 號, Dagene G SARS-CoV-2 Test Assay)。
3. 建立嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構檢驗網，持續增加指定檢驗機構家數、擴充人力與儀器設備，2021 年 11 月，已有 247 家醫療或醫事機構，每日可負荷之最大檢驗量能 153,702 件。
4. 疾病管制署申請並已獲 TAF 認證為流感病毒核酸檢測之能力試驗執行機構，且符合 ISO/IEC 17043:2010 規範、能力試驗執行者提供測試樣本之要求與測試結果之分析，精進能力試驗執行機構之信賴度與公信力，持續提

升監測實驗室檢驗品質。

5. 評估池化檢驗方式的可行性，當 5 個樣本池化檢驗時，檢驗仍具敏感度
本研究成果可作為國內各檢驗機構將 real-time RT-PCR 應用於 SARS-CoV-2
池化檢驗的參考，使全國的實驗室每日最大檢驗量能可在適當的情境下再
次提升。

6. 為持續維持檢驗品質，變異株對檢驗試劑的影響，須即時監測與評估，以
確實掌握疫情，適時調整防治策略。

六、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. *J Virol Methods* 2013;191:118-21.
2. Drancourt M, Gaydos CA, Summersgill JT, Raoult D: Point-of-care testing for community-acquired pneumonia. *Lancet Infect Dis* 2013;13:647-9.
3. Pillet S, Lardeux M, Dina J, Grattard F, Verhoeven P, Le Goff J, Vabret A, Pozzetto B: Comparative evaluation of six commercialized multiplex PCR kits for the diagnosis of respiratory infections. *PLoS One* 2013;8:e72174.
4. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D: Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:574-85.
5. Corman VM, Muller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B, Kreher P, Lattwein E, Eschbach-Bludau M, Nitsche A, Bleicker T, Landt O, Schweiger B, Drexler JF, Osterhaus AD, Haagmans BL, Dittmer U, Bonin F, Wolff T, Drosten C: Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill* 2012;17.
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 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. 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, Lo YM, Peiris JS: Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR. *J Clin Virol* 2003;28:233-8.
10. Yang JR, Lo J, Liu JL, Lin CH, Ho YL, Chen CJ, Wu HS, Liu MT: 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;47:3714-6.
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, Bleicker T, Brunink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DG, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MP, Drosten C: Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020;25.
13. Yang JR, Kuo CY, Huang HY, Wu FT, Huang YL, Cheng CY, Su YT, Chang FY, Wu HS, Liu MT: 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.

七、圖、表

持續擴充檢驗量能 — COVID-19指定檢驗網絡

266家指定檢驗機構

每日最大量能 236,873件

擴充
家數

擴充人力與儀器
設備、精進流程

快速檢驗
確保品質

111/9/30

110/4/20

126家
27,602件/日

266家
236,873件/日

110/3/15

114家
24,144件/日

110/1/25

99家
12,613件/日

9/25

73家
8,944件/日

4/13

37家
3,950件/日

3/11

34家
3,200件/日

2/27

28家
1,250件/日

1/22

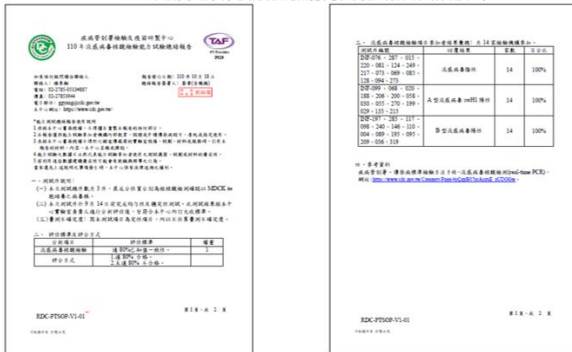
11家
500件/日

地區	檢驗機構
基隆 (1家)	高美長興紀念醫院
台北 (11家)	花籃慈濟醫院、衛生福利部台東醫院、台北馬儀紀念醫院、維多利亞醫院、衛生福利部仁愛醫院、衛生福利部松山醫院、衛生福利部新莊醫院、衛生福利部板橋醫院、衛生福利部中和醫院、衛生福利部新埔醫院、衛生福利部林口醫院
桃園 (8家)	高美長興紀念醫院、大林慈濟醫院、高美長興醫院、奇美醫院、成大附設醫院附設醫院、高美長興醫院、高美長興醫院、高美長興醫院、高美長興醫院
新竹 (1家)	高美長興醫院
苗栗 (1家)	高美長興醫院
台中 (1家)	高美長興醫院
南投 (1家)	高美長興醫院
雲林 (1家)	高美長興醫院
嘉義 (1家)	高美長興醫院
台南 (1家)	高美長興醫院
高雄 (1家)	高美長興醫院
屏東 (1家)	高美長興醫院
澎湖 (1家)	高美長興醫院
金門 (1家)	高美長興醫院
馬祖 (1家)	高美長興醫院
總計	266家

圖一、嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗網絡已有 266 家醫療或醫事機構，每日可負荷之最大檢驗量能 236,873 件。

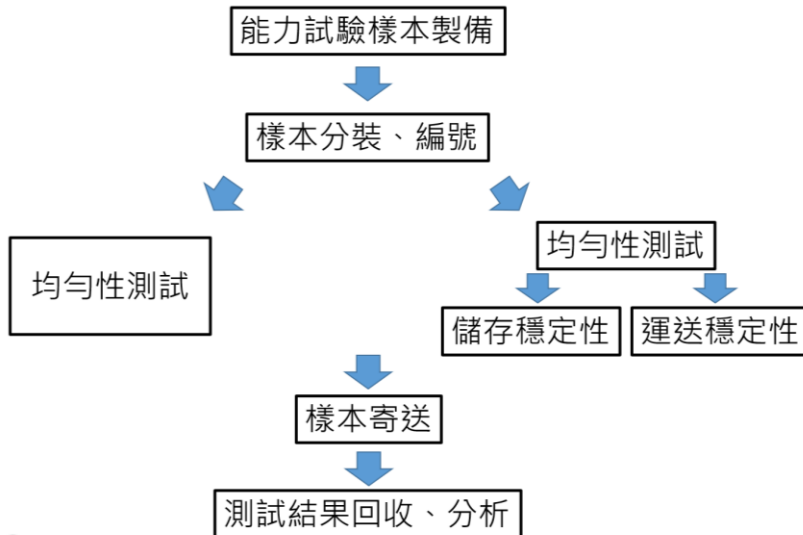


110年流感病毒核酸檢驗能力試驗-報告回饋模式

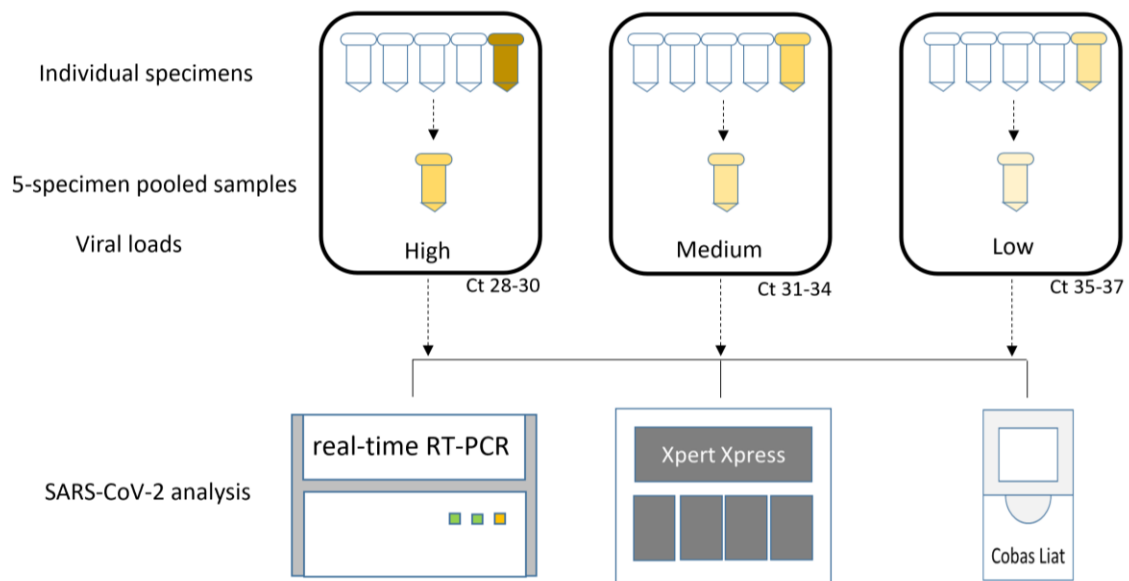


圖二、疾病管制署申請並已獲 TAF 認證為流感病毒核酸檢測之能力試驗執行機構與能力試驗結果回饋表。

傳染病檢驗能力試驗模式建立(TAF認證)



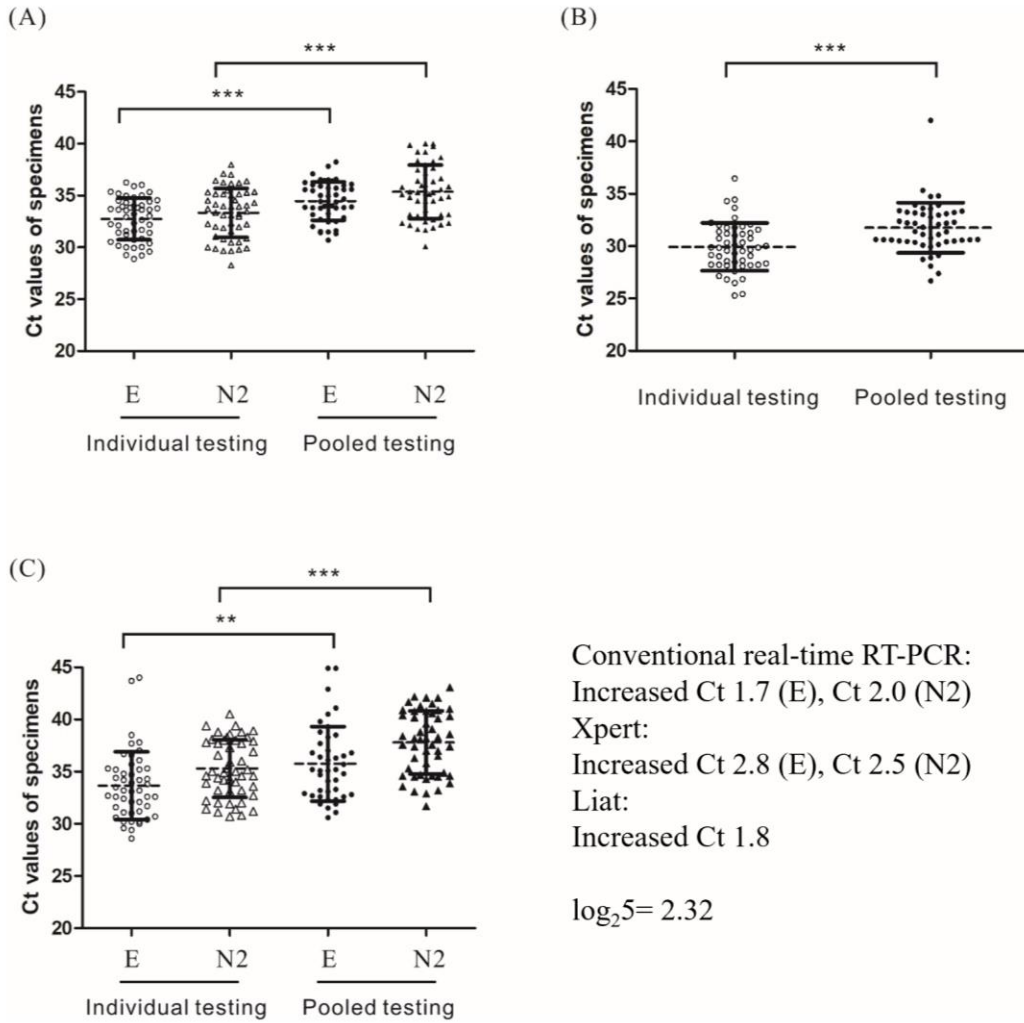
圖三、根據 ISO/IEC 17043:2010 規範、能力試驗執行者提供測試樣本之要求。



PPA (High/Medium/Low)

Individual testing	Standard method	(100%/100%/100%)	(100%/100%/100%)
5-pooled testing	(100%/100%/93.75%)	(100%/100%/100%)	(100%/100%/93.75%)

圖四、評估 1 項常規 real-time RT-PCR 與 2 項可診間用 real-time RT-PCR 平台(Xpert 與 Liat), 5 個樣本池化檢測方式之檢驗效能策。



圖五、不同 real-time RT-PCR 檢驗平台，常規 real-time RT-PCR (A), Liat (B), Xpert (C)，在單獨檢驗與 5 個樣本池化檢測時，Ct 值之改變，5 個樣本池化檢測，理論值會增加 Ct 值 2.32。

廠牌*	變異株	偵測極限 (Ct)
進口A	Omicron BA.4	28
	Omicron BA.5	28
進口B	Omicron BA.4	28
	Omicron BA.5	28
國產A	Omicron BA.4	28
	Omicron BA.5	28
國產B	Omicron BA.4	27
	Omicron BA.5	27
國產C	Omicron BA.4	26
	Omicron BA.5	26
國產D	Omicron BA.4	26
	Omicron BA.5	26

*備註：測試廠牌皆為取得我國食品藥物管理署緊急使用授權(EUA)

圖六、6種台灣常用 SARS-CoV-2 抗原快篩對 Omicron BA.4, BA.5 變異株檢測極限評估

參、經費支用情形

項 目	本年度核定金額	支 用 狀 況
總計	3,400,000	3,301,560(97.1%)
人事費	695,000	695,000(100%)
業務費	2,705,000	2,606,560(96.3%) 111 年度核酸定序-明欣\$300,000 論文修改及發表費\$100,000 法定傳染病能力檢測試驗組\$70,500 「111 年羅氏核酸萃取儀及即時螢光分析系統專用 原廠試劑耗材一批」開口式合約採購案\$50,815 111 年檢體採購案\$138,632 「111 年磁珠式核酸萃取試劑一批」採購案\$23,000 111 年度實驗室共通使用之耗材及試劑一批 \$273,350 「111 年度腸道腹瀉及呼吸道病毒檢驗試劑耗材一 批」開口式合約採購案\$55,600 111 年呼吸道病毒與細菌類抗體檢測試劑\$296,550 111 年度核酸純化及蛋白質自動萃取平台相關試劑 耗材採購\$80,010 111 年度基因篩選表現分生試劑與耗材\$35,000 「111 年度全自動電子化學冷光免疫分析儀專用試 劑及耗材乙批」開口式合約採購案\$54,660 「111 年體外診斷實驗用耗材乙批」開口式合約採 購案\$149,200 111 年度冷凍冷藏櫃維修乙批\$124,500 「111 年度實驗試劑分裝暨滅菌耗材乙批」開口式 合約\$94,680 111 年度蛋白質、基因分析偵測系統試劑耗材一批 \$64,048 「111 年度限制酶、聚合酵素及核酸分析試劑乙批」 開口式合約\$210,540 輸入「The 2021-2022 WHO INFLUENZA REAGENT KIT」套組\$8,245 111 年微生物生化分生實驗相關試劑耗材乙批 \$18,520 「111 年實驗室聚合酶鏈鎖反應管、酵素反應盤及 核苷酸混合液等試劑耗材乙批」採購案\$168,212 HP 5550dn 彩色雷射印表機耗材\$108,598 檢測新冠病毒變異株用的 PCR 試劑\$81,900

(篇幅不足，請自行複製)

第 頁

衛生福利部疾病管制署委託研究計畫
111 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：MOHW110-CDC-C-315-134202

1. 計畫之新發現或新發明

開發可攜式 SARS-CoV2 檢驗方法，後續已有廠商技轉，搭配廠商可攜式檢驗平台，產品已獲我國食藥署核可專案製造新冠病毒檢驗試劑(防疫專案核准製造第 1096819804 號, Dagne G SARS-CoV-2 Test Assay)。

建立嚴重特殊傳染性肺炎指定檢驗機構檢驗網，持續增加指定檢驗機構家數、擴充人力與儀器設備，2022 年 11 月，已有 266 家醫療或醫事機構，每日可負荷之最大檢驗量能 236,873 件。

評估池化檢驗方式的可行性，當 5 個樣本池化檢驗時，檢驗仍具敏感度本研究成果可作為國內各檢驗機構將 real-time RT-PCR 應用於 SARS-CoV-2 池化檢驗的參考，使全國的實驗室每日最大檢驗量能可在適當的情境下再次提升。

持續維持檢驗品質，變異株對檢驗試劑的影響，須即時監測與評估，以確實掌握疫情，適時調整防治策略。

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。

111 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：111 年 12 月 19 日

*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	研究主題及目標能配合業務需要。	謝謝委員意見。	無
2	已完成階段性任務，但應與病毒合約實驗室檢驗網絡合併，可更有成效。	謝謝委員意見。退場機制會保留病毒合約實驗室檢驗網絡為核心種子實驗室，下次疫情爆發時，可靈活快速啟動檢驗量能。	無
3	指定檢驗機構達 266 家，宜計畫退場機制。	謝謝委員意見。因確診檢驗調整，PCR 檢驗需求大幅降低，退場機制應考量儲存檢驗網人力與經驗，下次疫情爆發時，可靈活快速啟動檢驗量能。	無
4	已開發新冠肺炎可攜式檢驗套組並技轉予廠商。	謝謝委員意見。	無
5	已建立 COVID-19 檢驗網，達到不錯的檢驗量能。	謝謝委員意見。	無
6	池化檢驗評估於應付疫情有幫助。	謝謝委員意見。	無
7	本計畫內容有助提升新興病原分子檢測實驗室效能與整體應變檢驗量能，對於即時監測新興傳染病具重要性。	謝謝委員意見。	無

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 111 年 12 月 21 日前至 GRB 系統完成資料抽換。