

計畫編號： MOHW109-CDC-C-315-144410

衛生福利部疾病管制署 109 年署內科技研究計畫

計畫名稱：創新標定檢驗法之研究發展

109 年 度 研 究 報 告

執行機構：疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：楊志元

協同主持人：舒佩芸、張淑芬

研究人員：黃偉倫、范文斌

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 349 萬 1 仟元整

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

	頁	碼
壹、 中文摘要		3
貳、 英文摘要		4
參、 本文		
1. 前言		5
2. 材料與方法		9
3. 結果		16
4. 討論		22
5. 結論與建議		25
6. 重要研究成果及具體建議		25
7. 參考文獻		27
8. 圖、表		30

壹、 中文摘要

關鍵詞：創新標定法、側向流分析、鎔(III)奈米微粒螢光標定

本計畫已成功利用快速篩檢試紙，以鎔(III)奈米微粒螢光標定登革熱病毒 NS1 單株抗體，利用側向流原理，透過讀取儀內部特定波長之光源進行激發，並設定接收產生之較長波長之螢光，儀器將影像轉換為數值，進行結果判定。經微調緩衝液以去除偽陽性訊號後，以 50 支陽性及 200 支陰性檢體進行實際測試。計算相關數據為靈敏度(Sensitivity) 98.0%、特異性(Specificity) 92.0%、準確度(Accuracy) 93.2%、陽性預測率(Positive predictive value, PPV) 75.4%、陰性預測率(Negative predictive value, NPV) 99.5%、Kappa 值: 0.809。

本試劑原型已經符合快速檢驗試劑性能需求的一般規範。此項鎔(III)奈米微粒技術如果將來要應用在其他的傳染病上，建議使用在抗原檢測，才能最大的發揮其優勢(微量抗原需較高的靈敏度)，而在特異性抗體檢測部分，因為大多數檢體中抗體含量高，鎔(III)奈米微粒效益可能就不明顯，但優勢在於鎔(III)奈米微粒螢光訊號需借助機器判讀，在檢測灰色區域值可降低人為肉眼誤判的機率。

貳、 英文摘要

keywords : Innovative conjugation method, lateral flow assay, europium III chelate fluorescent

This project has successfully used the rapid screening test paper to determine the dengue virus NS1 monoclonal antibody with Europium (III) nanoparticle fluorescent markers. Using the principle of lateral flow, it is excited by a light source of a specific wavelength inside the reader and set to receive. For the longer-wavelength fluorescent light produced, the instrument converts the image into a numerical value and judges the result. After fine-tuning the buffer to remove false positive signals, 50 positive and 200 negative samples were used for actual testing. Calculate the relevant data as sensitivity is 98.0%, specificity is 92.0%, accuracy is 93.2%, positive predictive value is 75.4%, negative predictive value is 99.5 %, and Kappa value is 0.809.

This reagent prototype has met the general specifications for rapid test reagent performance requirements. If this Europium(III) nanoparticle technology is to be applied to other infectious diseases in the future, it is recommended to use it in antigen detection to maximize its advantages (minor antigens in specimen require higher sensitivity), and in the specific antibody detection part because of the high content of antibodies in most specimen, the benefits of Europium(III) nanoparticles may not be obvious, but the advantage is that the fluorescence signal of Europium(III) nanoparticles needs to be interpreted by a machine, which can reduce artificial misjudgment by the naked eye.

參、 本文

1. 前言

Point of care test (POCT)也稱作 Point of patient care test，指在照顧病患的當下，即可使用的醫療診斷測試方法，這種測試在任何地方都可執行¹。例如常見的血糖測試、懷孕檢測，這種類型的測試速度快，能讓臨床人員在照顧病患可以得到更多資訊去判斷疾病，進而及早決定對患者的治療。

隨著現代化醫療的發展，診斷檢測通常需要集中於醫療院所之檢驗實驗室進行，由專業的設備與訓練良好的人員執行，搭配自動化儀器之試劑與耗材，雖然具備良好的品管機制，提供高度準確之檢驗報告，但試劑由儀器設備廠商壟斷提高檢驗成本，常為患者抱怨。相對於專業實驗室，POCT 則能讓第一線醫護人員立即得到檢測結果，提供醫療人員及早介入處置之參考²。

POCT 最常見為快速檢測試紙，從技術面而言，快速檢測試紙原理為側向流動試驗法 (lateral flow assay)³，是利用抗原與抗體結合後，以類似酵素免疫分析法之原理⁴，最終利用顆粒聚集呈色方式顯示結果⁵。抗體在檢測試紙製作時已先固化在裝置的內部，而抗原是來自病患在檢測時所提供的體液或血液，或依不同檢測標的進行調整⁶。快速檢測試紙能提供快速、單一步驟、低成本、簡易設備、低干擾、高專一性與可輕易攜帶等等的優勢³。快速檢測試紙組成為：檢體片(sample pad)、標誌片(conjugate pad)、硝酸纖維素膜(Nitrocellulose membrane)與吸收片(Absorbent pad)，判讀有測試線(Test line)與對照線(Control line)。

由於多數快速檢測試紙結果呈現設計為可見光，早期免疫層析快速檢測使用有色乳膠作為可見光的訊號，乳膠主要用於凝集反應，但卻容易導致偽陽性結果，近年來奈米膠體金(colloidal gold nanoparticles)被引入作為標定方法，膠體金為球形結構，正確連接時能將辨識標的物之專一抗體穩定接於膠體金上，標定好之抗體置於標誌片上，另一組抗體則置於反應線上，當檢體加於檢體片上，透過虹吸反應經過標誌片，標的物所含之抗原分子即被標誌片中抗體辨識，一同朝硝酸纖維素膜上移動，藉由觀察反應線上膠體金呈色有無，判定有無標的物，方便肉眼直接判讀⁷，如此一來雖然簡便，卻容易受到人為因素干擾，當判讀人員忽略弱陽性之反應線，造成偽陰性之結果，反之，誤判無反應線為有反應，則造成偽陽性。另一方面，由於呈色反應是以肉眼觀察後直接判讀，因此需要偵測標的物濃度達到一定程度以上，才足以被偵測與判讀到，增加了產生偽陰性的機率⁸。因此標定呈色方法及相對配方比例能影響整體分析之靈敏度。不同於以往之奈米膠體金標定方法，研究指出其他標定方法，如螢光粒子⁹、冷光¹⁰、免疫複合體化學發光法¹¹等，亦能增加快篩試紙靈敏度。

目前市面上可見之螢光快速篩檢試紙讀取儀，為偵測流感病毒與呼吸道融合病毒(RSV)等作為標的物，快速篩檢試紙以螢光標定呈色，透過讀取儀內部特定波長之光源進行激發，並設定接收產生之較長波長之螢光，儀器轉換光能為數值，進行結果判定。本計畫目的即在方法學上多方比較及回顧多篇文獻，我們選擇了鎘(III)奈米微粒做為主要螢光材料，以鎘奈米螢光粒子標示

登革熱抗體，改善快速檢測試紙呈色反應之敏感性，並搭配可攜式讀取儀，透過儀器內 LED 光源照射反應線與對照線，以光電二極體接收反射光之強度轉換為電訊號，儀器中軟體則能將電訊號轉為數位顯示結果，以提升快速檢測平台穩定性與靈敏度。

109 年度計畫目標

1. 調整新型快速篩檢平台

配合讀取儀器讀值結果，衡量試劑成本及組裝材料之便利性，將新型快速篩檢平台作調整，測試各組成部分作改良。

試劑性能調整完畢後，並且進行配方及標準書定版，確認產品原型(prototype)，會以半定量標準，針對登革熱四個型別進行設計，進行第一次的產品性能設計驗證。驗證內容包括螢光快篩試劑的需求：偵測範圍(detection range)、重複性(repeatability)，中間精密度(intermediate precision，between run, within run)、偵測極限(limit of detection, LOD)、最低偵測濃度(Lower detection limit)、干擾物(interference)、安定性(stability)。

測試結果確認符合臨床需求後，再進行臨床設計驗證，以較小量的檢體(陽性陰性總和 100 例、其中登革熱陽性檢體各型別 10~40 例)，測試產品的第一次臨床設計驗證，分析包括：靈敏度(sensitivity)、專一性(specificity)、各型別之陽性檢出率(positive detection rate)、陰性檢出率(negative detection rate)、準確性(accuracy)、p 值(p value)、Kappa 值(Kappa value)。此外在檢體取得之許可狀況下，因偵測標的為登革熱病毒來源的 NS1(non structural protein 1)，將針對可能發生交叉反應的幾種病毒性感染

檢體(若檢體取得許可將納入包含屈公熱、瘧疾、茲卡；急性發熱：A 型流感, B 型流感等病患)，進行交叉反應測試。

另外，針對判讀儀也會以 TRF 微粒標示產品原型，進行儀器的靈敏度、偵測範圍、線性、重複性，中間精密度、偵測極限、定量極限驗證測試。

全部完成後可以將資料彙整，提供未來下一個產品應用於此平台的基礎驗證依據。

2. 尋求具有經驗與設備之廠商進行育成合作計畫

為了使平台產品化，將尋求具有相關經驗與完整設備之廠商，作相關育成合作計畫。

3. 市場化及技術移轉評估作業(由於本年度新冠疫情影響，整體作業隨計畫進度延後約 3-4 個月，此作業預計於 110 年推動)

推動新型快速篩檢平台之技術移轉，協助評估相關資料，以通過食藥署體外診斷醫療器材查驗登記。

技術轉移考量因素眾多，由於此產品相關技術較為繁複，將請有意願廠商依據產品原型進行量產規劃，並依照相關規範，規劃內容將以三批以上量產產品進行較大規模再驗證以及臨床檢體試驗。確認可以進行良好性能的產品生產，以期通過 GMP 查驗登記。

2. 材料與方法

2.1.調整新型快速篩檢平台：原材料基礎資訊

使用高靈敏度的鎔螯合物微球(fluorescent microspheres) 螢光粒子，在微球表面修飾具羧基(carboxyl group)可與抗體上的胺基(amine)作用，透過共價鍵而形成穩定的複合物，此偶聯作用(Covalent Coupling)步驟包含 (1)微球的活化、(2)微球與抗體的偶聯、(3)微球表面的封閉(blocking)、(4)偶聯後微球清洗與保存。其中羧基的活化需要 EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodi-imide)作用，而偶聯後的微球表面則是需要乙醇胺(Ethanolamine)及牛血清白蛋白(BSA)將羧基及非專一性結合封閉。

螢光訊號系統則以側向流動試驗法為基礎加上螢光讀取儀，依據登革熱單株抗體(NS1-3、4、8、9)與不同型別登革熱病毒之 NS1 結合特性，首先將選定之登革熱抗體分別固定於硝化纖維膜(Nitrocellulose membrane)作為檢驗線(T line)及品管線(C line)，再將檢體片、標誌片、吸收片黏著於背卡，而另一組抗體與螢光微球進行偶聯，螢光複合物再以手動方式加注於標誌片上，將試條與卡匣組合後進行樣本測試，測試樣本包含緩衝液、正常人類血清(Normal human serum)、dengue virus NS1 recombinant protein (type 1、2、3、4, vector :E. coli BL21, vector: pET32)、dengue virus-spiked serum (type 1、2、3、4)及向本署申請之陽性登革熱患者血清，加於樣本孔，等待 15 分鐘，隨後將卡匣放置於螢光讀取儀進行訊號讀取。

2.2.調整新型快速篩檢平台：試劑設計驗證方法

蒐集相關新型快速篩檢平台研究資料，改良不同組合，提升其靈敏度並提高抗體結合效率，並以小批量試產的產品驗證各項性能。進行試劑性能驗證，試劑驗證具體進行方法如下：

2.2.1. 檢體移行速度

按產品設計完成的使用規範進行操作，從樣本液浸入試紙 A 區開始用碼錶計時，直至液體達到圖 1 所示的 C 區和 D 區之間的交界線時停止計時，所用的時間記為 t ，用遊標卡尺測量 A+B+C 區的長度，記為 L ，則 L/t 為移行速度，結果應不低於 10 mm/min。以本試劑的規格(圖一)來計算，移行距離為 37mm，所以總秒數必須小於 220 秒。

- 本試劑進行測試如下：
 - 取三批次小量試做試劑產品，每個批次測試 20 個產品，統計數值必須小於 10mm/min，計算平均移行速度及誤差值。

2.2.2. 臨界值 (critical value)計算與性能表現計算

在定性試驗中有許多種方法進行臨界值的確定，如以陰性對照均值加上兩倍或三倍標準差作為臨界值(多稱為 LOD，實際上應為 LOB)、以百分位數法單側 95% 或 99% 來確定臨界值、使用 ROC 曲線 (receiver operating characteristic) 設定臨界值等。本試劑使用 ROC 曲線 (receiver operating characteristic) 來設定閾值。

臨界值的驗證可以通過製備在臨界值上下 20% 左右濃度的樣本進行。一般來說，臨界值上下 20%左右為 95% 區間。可以進行重複檢測，看檢測結果是否滿足 95% 的陰性和 95% 的陽性，從而判斷臨界值的確定是否合適。

- 本試劑偵測極限((limit of detection, LOD) 計算:
 - 以陰性檢體進行大量實測，統計陰性檢體的訊號/控制組之訊號百分比 (T/C % value)，最後以實際平均值加上兩倍實測標準差(mean+2*SD)計算出 LOD。
- 本試劑 Cut off value 計算:
 - 以臨床檢體進行 ROC 曲線(receiver operating characteristic) 計算，此值必須大於 LOB(limit of Blank)
- 本試劑 Cut off value 驗證測試：
 - a. 對臨界值增加一定濃度的樣本檢測次數 ≥ 20 ，結果的陽性率應 $\geq 95\%$ 。
 - b. 對臨界值減少一定濃度的樣本檢測次數 ≥ 20 ，結果的陰性率應 $\geq 95\%$ 。

注 1：使用的陽性樣本是申請本署之陽性登革熱患者血清，已驗證抗體及 PCR 之陽性結果。陰性樣本為本實驗室收集的正常人血清(Normal human serum)。

2.2.3. 干擾性測試 (interference test)

干擾物質可能是內源性(endogenous)或外源性(exogenous)的，可以從多方面影響分析過程，如化學效應、物理效應、基質效應、非特异性、交叉反應性等，使得在分析時產生干擾。

免疫類產品應包括脂血、溶血、黃疸、類風濕因數等常見干擾物。應明確潛在干擾物質不引起干擾的最高濃度，檢測含有鄰近濃度的干擾物質的陽性/陰性樣本 3 次，結果應滿足即干擾標準。干擾標準表示干擾物質引起的最大容許的影響，通常是基於可能影響醫師對患者的診斷、治療或處治的真實值的偏差。

- 本試劑測定免疫法樣本常見的 3 種內源性、3 種外源性干擾物，皆為在未來檢測的檢體中可能存在的濃度：
 - 內源性干擾物：採用正常人血清(Normal human serum, NHS) 加入 Dengue Type3 recombinant NS1，再以 1:1 方式外加以下干擾物，調整到下列各表濃度或比例進行測試。

■ 模擬溶血：

NHS+血紅素(hemoglobin, catalogue no. H7379, Sigma Aldrich)

測試組	1	2	3	4	5	6
干擾物終濃度 (mg / dL)	0	25	50	100	200	300
干擾物終濃度 (g/L)	0	0.25	0.5	1	2	3

* EP7-A2 建議測試 hemoglobin 濃度至少至 2 g/L。病人可達>2g/L。一般人 1-2g/L。

■ 模擬黃疸：

膽紅素(unconjugated bilirubin catalogue no. 24519, Merck)

測試組	1	2	3	4	5	6
干擾物終濃度 (mg / dL)	0	8	16	24	32	40
干擾物終濃度 (umol/L)	0	136.8	273.5	410.2	547.0	683.8

*EP7-A2 建議測試 bilirubin 濃度至 372 umol/L，病人可達 684 umol/L。一般人 5-21 umol/L。

■ 模擬脂血:

甘油混合物 (glycerol, catalogue no. G5516, mixed with Soybean oil)

測試組	1	2	3	4	5	6
干擾物終濃度(%)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
干擾物終濃度 (mmol/L)	0	21.7	43.5	65.2	87.0	108.6

*EP7-A2 建議測試 Triglycerides 濃度至少 >37 mmol/L。一般人 $0.34 - 3.7$ mmol/L。

■ 外源性干擾物：測試標準採血管中的抗凝劑濃度

■ 血漿採血管:

抗凝劑 EDTA K2 (3.2%)、抗凝劑 heparin(0.7 IU/ mL)、
抗凝劑 Sodium citrate (3.2%)

2.2.4. 重複性 (reproducibility) [含中間精密度(intermediate precision , between run, within run)計算值]

重複性代表試劑本身的性能穩定性，取陰性(正常人類血清 (Normal human serum))及模擬的強陽性的樣本進行反覆測定，確定試劑本身的性能。

● 主要測試如下：

- 陽性及陰性樣本各測定 ≥ 20 次，其「T/C ratio」重複性計算 CV 值應滿足 $\leq 15\%$ 。(within run)
- 在 5 個不同時間點重複上述測試，計算不同次試驗之間，「T/C ratio」重複性 CV 值應滿足 $\leq 20\%$ 。(between run)

2.2.5. S/CO 值重複性 (“signal /cut off value” ratio reproducibility)

S/CO 值用於表示檢測樣本 (sample) 與臨界值 (cut off) 的偵測值比率，通常 $S/CO \geq 1$ 判為陽性， <1 為陰性。

- 主要測試如下：
 - 檢測臨界值附近水準樣本 20 次，其「S/CO 值」重複性 CV 值應滿足 $\leq 15\%$ 。

2.2.6. 偵測範圍及鉤狀效應 (detection range, Hook effect)

抗原抗體反應時，抗原抗體須在一定比例範圍內才能出現最大凝集，抗原過量或抗體過量都會導致兩者交聯度降低，從而導致凝集程度與實際濃度不符的現象，在凝集曲線上表現為類似拋物線的形狀。所以強陽性樣本可能會出現假陰性結果。HOOK 效應適用於如雙抗體夾心法等已明確可能出現此效應的方法學產品。

- 本試劑進行相關測試如下：
 - Hook effect 各型別抗原確認，以及 Hook 圖形
 - 檢測臨床可見最高濃度的強陽樣本 3 次，結果不出現陰性。
 - 根據 Cut off value 以及最高偵測極限，進行偵測範圍的確認 (? ng/ml~ ? ug/ml)

2.2.7. 批間差評估 (lot to lot variation)

進行不同時間的三批次小量試劑製作，抽取三個批次的試劑，每個批次至少 40 份，按【臨界值: cut off value 測試】的檢驗方法檢測，各濃度反應結果應一致。

- 本試驗中使用的三個不同批次試劑編號 TWCDC-FLDENAG-020、TWCDC-FLDENAG-021、TWCDC-FLDENAG-022

- 本試劑 Cut off value 驗證測試：
 - a. 對臨界值增加一定濃度的樣本檢測次數 ≥ 20 ，結果的陽性率應 $\geq 95\%$ 。(上次報告)
 - b. 對臨界值減少一定濃度的樣本檢測次數 ≥ 20 ，結果的陰性率應 $\geq 95\%$ 。(上次報告)

2.2.8. 穩定性 (stability)

目前穩定性試驗有做效期穩定性驗證的，也有做加速試驗的。考慮到加速試驗並無明確可靠方案直接推導產品有效期，故現在法規規範中一直採用效期穩定性驗證作為實際產品證照核發時的有效期限。但因本計畫中未能實際展延到有效期，所以採用加速性測試結果作為初步結論。

- 本試劑提供測試結果為
 - 試劑(完整封裝於鋁箔袋中)，在 37°C 貯存條件下保存至一個月、兩個月完成後進行檢測，產品的性能應至少符合臨界值、S/CO 值重複性的規範要求。

3. 結果

本次的計畫年度總結果，主要在於試劑設計驗證，以及臨床測試數據的分析整理，以下結果分成幾個部分。

1. 試劑設計驗證結果

以下是經過設計固定配方、製作 SOP、經過三批次小量試做 (TWCDC-FLDENAG-020、TWCDC-FLDENAG-021、TWCDC-FLDENAG-022 三批)，進行檢體移行速度測試。結果如表一顯示，三批次平均移行速度為 16.1、16.0、16.1 mm/min，SD 分別為 0.31、0.36、0.4。

1.1. 臨界值 (critical value) 計算與性能表現計算

本試劑的所有臨界值，分別計算如下 1.2.1~1.2.8:

1.1.1. 本試劑偵測極限((limit of detection, LOD) 計算

本試劑 LOD 計算方式，以陰性檢體進行大量實測，統計陰性檢體的訊號/控制組 訊號百分比 (T/C ratio %)，最後以 實際平均值+兩倍實測標準差(mean+2*SD)計算出 LOD。若以 LOB(limit of blank) 概念依照 EP7-2A 計算，則是以 mean+ 1.645*SD。

計算出結果如下(表二):

LOD: T/C ratio= 11.08%

LOB: T/C ratio= 10.04%

1.1.2. 本試劑 Cut off value 計算

以臨床檢體進行 ROC 曲線 (receiver operating characteristic) 計算，此值必須大於 LOB(limit of Blank)。依照陽性陰性檢體實際測試的結果，繪製出 ROC curve 圖(圖二)。

AUC 最大時，Cut off value: T/C ratio=10.0%，此時 Sensitivity=98.0%，Specificity=92.1% (LOD=11.0%, LOB=10.0%)

1.1.3. 本試劑 Cut off value 驗證測試

本試劑 Cut off value 驗證測試，採用台灣最常見的登革熱型別，並且是試劑表現偵測值 T/C ratio 最低的型別 Type 3 進行以下測試：

a. 對臨界值增加 30%濃度的樣本檢測 20 次，結果的陽性率:100%

b. 對臨界值減少一定濃度的樣本檢測 20 次，結果的陰性率:100%

(表三)。即便 Cut off 值移動到 10.5% (陽性率 100%，陰性率

100%)或 9.5%(陽性率 100%，陰性率 95%)，可顯示現有 Cut off

值定義經過驗證是可信的。

1.2. 干擾性測試 (interference test)

1.2.1. 內源性干擾物

干擾物測試整體詳細結果如表四。

模擬溶血:

在溶血程度到達 1g/L 時，干擾<10%，可正確判讀。(此部分比一般商業販售的快篩試劑良好，因為輕微溶血便會干擾膠體金塊檢試劑的判讀)。

但是>2g/L，會有嚴重干擾，故未來說明書上必須說明，嚴重溶血超過 2g/L 的檢體無法使用。

模擬黃疸:

調整膽紅素干擾物最終濃度 0-683.8 umol/L 均可正確判讀。

模擬脂血:

調整甘油混合干擾物最終濃度 0-108.6 mmol/L 均可正確判讀。

1.2.2. 外源性干擾物

血漿採血管

本試劑若使用者使用血漿檢體做為樣本，極可能有許多抗凝劑會出現在檢體樣本中。本試劑在既有常見的三種固定濃度抗凝劑採血管(抗凝劑 EDTA K2 (3.2%)、抗凝劑 heparin(0.7 IU/mL)、抗凝劑 Sodium citrate (3.2%))，在其標準濃度下，尚無明確干擾，可正確判讀。

所以本試劑在未來說明書上，針對使用者可以宣稱血清檢體或血漿檢體都可通用。

1.3. 重複性 (reproducibility)

重複性驗證採用模擬的強陽性(NHS A+Dengue type3 recombinant NS1)以及陰性(NHS A)檢體，進行每天重複 20 次的測試，結果詳見表五。

測試結果說明試劑本身的重複性:

- Within run 陽性樣本 CV= 7.51%~12.15%
陰性樣本 CV= 9.87~14.73%
- Between run 陽性樣本 CV= 10.46%
陰性樣本 CV= 12.80%

結果顯現試劑本身的重複性符合一般快檢試劑規範，並未因為靈敏度的提升，而降低了重複性的表現值。

1.4. S/CO 值重複性

重複性驗證採用真實的弱陽性檢體(#564)，進行 20 次的測試，結果詳見表六。結果顯示，以真實弱陽性檢體進行檢測時，其 S/CO 值的重複性，與利用模擬的陽性樣本結果類似，其 CV 值為 12.86%，符合一般快速檢驗試劑的規範 (S/CO<15%)。

1.5. 偵測範圍及鉤狀效應

本試劑現有的配方及製作 SOP 下，在高濃度的 NS1 蛋白出現時還是會有明顯的 Hook effect 出現。各型別 NS1 抗原添加濃度為 500ng/ml~50mg/ml，圖形如圖三。基本上各型別 NS1 抗原出現偵測最高值反轉的濃度，Type1 及 Type2 為 50ug/ml，Type3 及 Type4 為 20ug/ml。

以目前可收集到的臨床最高濃度的強陽樣本，測試結果 T/C value 平均為 83.5%，未出現陰性。

根據 Cut off value 以及最高偵測極限，本試劑的偵測範圍約(detection range)如下：可信之最低偵測濃度為 500ng/ml (由 Cut off 驗證資料 Dengue type3 NS1 濃度判斷)；可信之最高偵測濃度為 20ug/ml (由 Hook effect 資料 Dengue type3, type4 濃度判斷)。

1.6. 批間差評估

本試劑小量試做 (TWCDC-FLDENAG-020、TWCDC-FLDENAG-021、TWCDC-FLDENAG-022) 三批，第一批經過 Cut off value 驗證後，另外兩批次也進行相同測試，測試結果如表七所示。

另外，表七中紅色標示結果為貼近 Cut off value 10% 的邊緣值，如果設定為 10.5%，9.5%，會使符合率降低。現在每組資料中即便移動 cut off value，符合率也在 95%，符合一般快檢試劑規範。

1.7. 穩定性

本測試結果為第二批試劑(TWCDC-FLDENAG-021)完整封裝於鋁箔袋中，在 37°C 貯存條件下保存至一個月、兩個月的性能結果。應至少符合臨界值重複性的規範要求。

測試結果詳見表八，結果涵蓋第 0 個月(試劑完成時的檢測資料)、第一個月抽檢資料、第二個月抽檢資料。結果發現第一個月試劑性能表現完全符合 100% 陰性陽性符合率。但是在第二個月明顯看到部分的 C line 值、T line 值有明顯的下降趨勢，另外在此狀況下測試的 T/C % value 在陽性組已經有兩組偏移(尚在 10% 以上)，陰性組的符合率已經降到 95%。所以在本試劑的儲存穩定性上，應該還有改善空間，針對配方濃度或者蛋白質保護劑等需要細部加強。

2. 臨床數據計算

根據本次的性能驗證中，執行的陽性檢體 50 例，陰性檢體 200 例，驗證確認 Cutoff value 以後，可以根據結果計算出相關的臨床數據：

靈敏度(Sensitivity) : $49/50=98.0\%$

特異性(Specificity) : $184/200=92.0\%$

準確度(Accuracy) : $(49+184)/200=93.2\%$

陽性預測率(Positive predictive value,PPV) : $49/(49+16)=75.4\%$

陰性預測率(Negative predictive value,NPV) : $184/(184+1)=99.5\%$

Kappa 值: 0.809

4. 討論

POCT 中最重要的側向流原理快速檢驗試劑，在近 20 年來非常受到現場人員的青睞。受到重視的主因，主要是因為簡單方便，讓現場人員可以不用有過多的技術能力要求，就能完成檢驗的實施。但是與其他免疫檢驗方法來進行比較，已經有很多檢驗方法可以偵測到檢體中 pg/ml 濃度的標的物。相較之下，快檢試劑中最常見的幾種像是驗孕試劑、糞便潛血檢驗試劑等，其方法學上先天的弱勢導致偵測極限都遠遜於其他免疫類或分生試劑。

然則近年來針對很多傳染病，基於疾病檢測管控的需求，快速檢驗試劑又再度成為熱門話題。站在檢驗科學的研究者角度來說，不是每一種傳染病都適合使用快速檢測試劑來進行檢驗。必須根據傳染病本身的特性及病程，選擇合理的檢測標的，並且確認在合適的環境下，可以收集到有代表性的受檢者檢體，才能設計生產出有實際效能的快速檢驗試劑。站在傳染病第一線的感染管控上來說，靈敏且穩定的直接檢測到病原體特定標的，一定比間接證據來得有效，所以病原體的特定蛋白質，或者是特定序列 DNA/RNA，其證據效力一定是遠超於人體的免疫反應產物如抗體、干擾素來得直接。基於上述的基本概念，病原的抗原蛋白質快速檢測，需求一直存在，並且趨勢就是不斷的追求試劑的分析靈敏度(analytical sensitivity)，同時卻又要求不能降低特異性和試劑本身的穩定性。

本計畫開始之初，就是針對近年來在流感病毒快篩試劑、呼吸道融合病毒試劑的發展趨勢，已經有愈來愈多廠商開始轉向螢光原理進行快篩試劑的設計，目的都是因為冷光或螢光，本身比可見光

的方法原理就靈敏百倍以上。只要能搭配上合適的判讀儀(便宜、可攜)，就有可能在 POCT 應用上充分發揮其優勢。

快篩試劑的材料使用上，其實由於螢光的不同，使用微粒粒徑大小的不同，會有完全不同的設計概念，從緩衝液配方到硝化纖維膜到樣本墊片全部都需要更動。計畫起始點，經過方法學上的比較及多篇論文的回顧，我們選擇了鎔(III)奈米微粒做為主要螢光材料¹²⁻¹⁷，而捨棄了其他螢光分子微粒以及量子點。最終的成果也確定我們的選擇，在與其他商業用的可見光試劑進行比對，確認了最低偵測濃度(lower detection limit concentration，不同型別的 NS 濃度略有不同)比現有可見光法的市售產品來得好，展現了方法學上的優越性。

另外，過程中也有諸多發現，例如在干擾性試驗，我們原本期待與可見光相比，螢光可能不會遭受過大的干擾。性能驗證試驗的結果發現，在溶血 1mg/ml 時不受嚴重干擾(此部分比一般商業販售的快篩試劑良好，因為輕微溶血便會干擾膠體金塊檢試劑的判讀)，但是再超過時就一樣會有可能測試結果不正確。這結果給未來做一個提醒，如果本試劑將來要設計成全血檢體的快速篩檢試劑(因應 POCT 的需求，甚至於使用到指尖血)，樣本墊前的紅血球濾膜就必須特別注意，並且在緩衝液的設計上就必須考量避免溶血狀況的發生。在可偵測範圍部分的驗證結果，發現鎔(III)奈米與可見光方法的快速檢驗試劑相較，雖然略優但並未明顯大範圍優於可見光法，在一定範圍內仍會出現 Hook effect，所以應該就是受限於免疫檢驗法以及快速檢驗試劑平台，無可避免的方法學原理障礙。

其他試劑性能驗證之結果，經過不斷的調整配方與製作方法後所進行的小量三批製成，已經得到令人滿意的驗證數據。搭配現有的合作廠商生產的判讀儀，驗證出來不論是基礎臨界值的結果，或者是試劑最重要的性能--重複性，閾值附近重複性，都可以確認現有的試劑配方及 SOP 都是穩定可再現的，並且具有良好性能的登革熱 NS1 抗原快速檢驗試劑。

5. 結論與建議

本計畫我們使用了鎔(III)奈米微粒，完成快速檢驗試劑檢驗標定的創新開發。此種螢光快速檢驗試劑方法具有潛力，可應用於傳染病的第一線抗原快速檢驗試劑。

此項鎔(III)奈米微粒技術如果將來要應用在其他的傳染病上，建議使用在抗原檢測，才能最大的發揮其優勢(微量抗原需較高的靈敏度)，而在特異性抗體檢測部分，因為大多數檢體中抗體含量高，鎔(III)奈米微粒效益可能就不明顯，但優勢在於鎔(III)奈米微粒螢光訊號需借助機器判讀，在檢測灰色區域值可降低人為肉眼誤判的機率。

6. 重要研究成果及具體建議

本此計畫我們使用了鎔(III)奈米微粒，完成快速檢驗試劑檢驗標定的創新開發，並且證明了其性能可以超越原有的可見光類產品。

試劑的基礎表現，針對登革熱 NS1 抗原，檢測的性能結果彙整如下：

- 閾值設定: $T/C=10\%$ 大於此值為陽性
- $LOB=10.0\%$, $LOD=11.0\%$
- 內源性干擾物: Hemoglobin $>1\text{mg/ml}$ 有干擾，其他無干擾
- 外源性干擾物: 三種常用採血管的抗凝血劑無干擾
- 重複性: 中間精密度: (以 T/C ratio 計算)
 - Within run 陽性 $CV=7.51\% \sim 12.15\%$, 陰性 $CV=9.87 \sim 14.73\%$
 - Between run 陽性 $CV=10.46\%$, 陰性樣本 $CV=12.80\%$
- S/CO 重複性: $CV=12.86\%$

- 可偵測範圍: 500ng/ml~20ug/ml ，各型別 Dengue NS1 超過皆有 Hook effect
- 批間差: 三批次符合率 100%
- 穩定性: 37°C 加速性試驗 一個月符合率=100%，兩個月後陽性符合率 100%，陰性符合率 95%

以上述基礎性能驗證的產品，進行臨床樣本 陽性 50 例，陰性 200 例的檢測臨床性能初步評估，結果彙整如下:

- 靈敏度(Sensitivity) : $49/50=98.0\%$
- 特異性(Specificity) : $184/200=92.0\%$
- 準確度(Accuracy) : $(49+184)/200=93.2\%$
- 陽性預測率(Positive predictive value,PPV) : $49/(49+16)=75.4\%$
- 陰性預測率(Negative predictive value,NPV) :
 $184/(184+1)=99.5\%$
- Kappa 值: 0.809

本試劑原型已經符合快速檢驗試劑性能需求的一般規範。此項鎘(III)奈米微粒技術如果將來要應用在其他的傳染病上，建議使用在抗原檢測，才能最大的發揮其優勢(微量抗原需較高的靈敏度)，而在特異性抗體檢測部分，因為大多數檢體中抗體含量高，鎘(III)奈米微粒效益可能就不明顯，但優勢在於鎘(III)奈米微粒螢光訊號需借助機器判讀，在檢測灰色區域值可降低人為肉眼誤判的機率。如果有廠商願意投入此類型的快速檢驗試劑開發，為第一線傳染管控增添新的可靠工具，將是我們所樂見的。

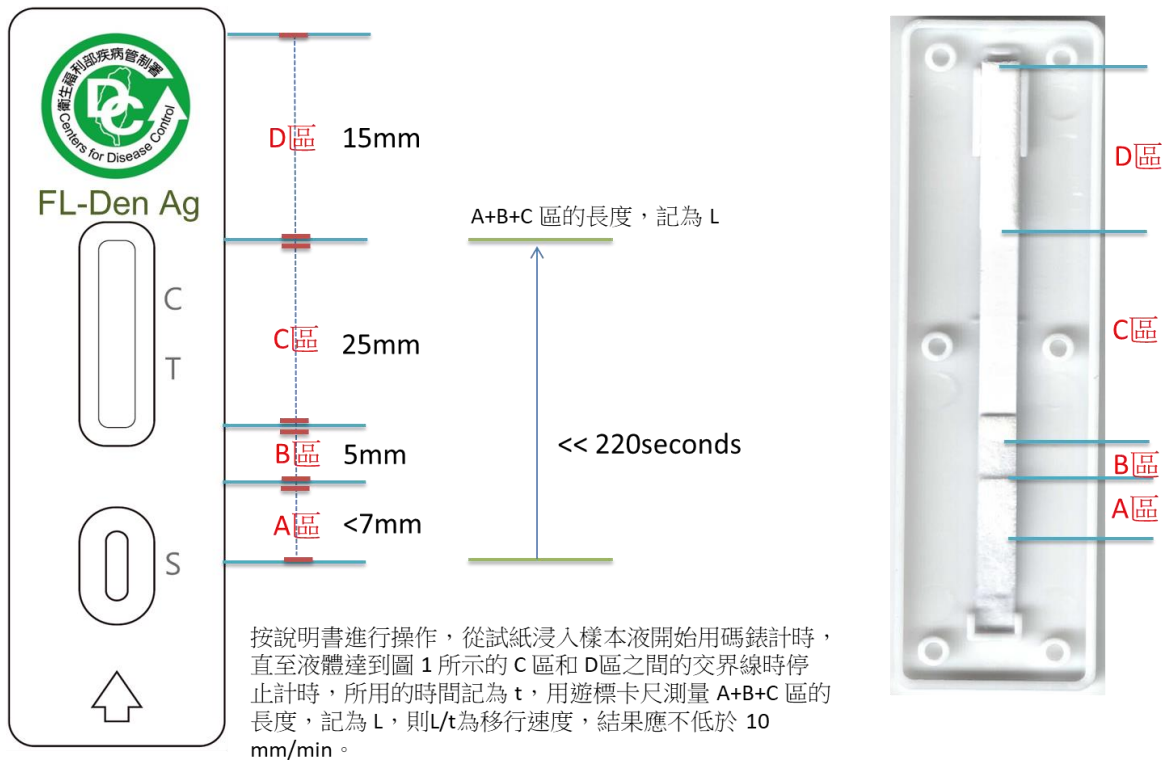
7. 參考文獻

1. V. Gubala, L.F. Harris, A.J. Ricco, M.X. Tan, D.E. Williams, Point of care diagnostics: status and future, *Anal. Chem.* 2012; 84:487–515.
2. Navarro-Marí JM. Rapid diagnostic methods for acute viral respiratory infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016; 34: 329-30.
3. M. Sajid, A.N. Kawde, M. Daud, Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review, *Jour. Saudi Chem. Soci.* 2015; 19: 689-705
4. A. Kawde, X. Mao, H. Xu, Q. Zeng, Y. He, G. Liu, Moving enzyme-linked immunosorbent assay to the point of care dry-reagent strip biosensors, *Am. J. Biomed. Sci.* 2010; 2: 23–32.
5. I.Y. Goryacheva, P. Lenain, S. De Saeger Nanosized labels for rapid immunotests TrAC, *Trends Anal. Chem.* 2013; 46: 30–43.
6. K.Y. Huang, S. Yang, K.C. Tsao, C.J. Chen, Y.C. Hsieh, C.H. Chiu, J.Y. Hsieh, J.Y. Yang, Y.C. Huang. Bedside immunochromatographic test for enterovirus 71 infection in children. *J Clin Virol.* 2013; 58: 548-52.
7. Liu X, Xiang JJ, Tang Y, Zhang XL, Fu QQ, Zou JH, Lin Y. Colloidal gold nanoparticle probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of chromium ions in water and serum samples. *Anal Chim Acta.* 2012; 745: 99-105.
8. Krajaejun T, Imkhieo S, Intaramat A, Ratanabanangkoon K. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16: 506-9.

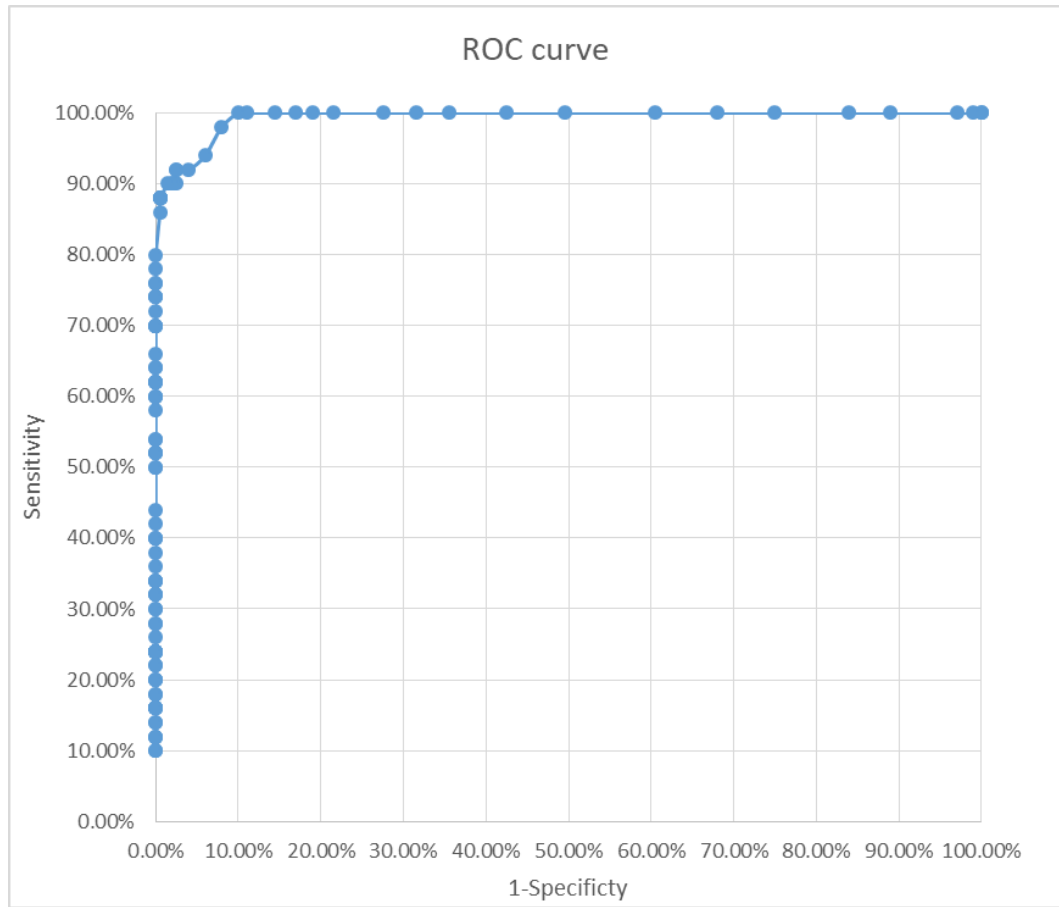
9. Q.-Y. Xie, Y.-H. Wu, Q.-R. Xiong, H.-Y. Xu, Y.-H. Xiong, K. Liu, et al, Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays, *Biosens. Bioelectron.* 2014; 54: 262-5.
10. W.C. Chan, D.J. Maxwell, X. Gao, R.E. Bailey, M. Han, S. Nie, Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002; 13: 40-6.
11. Takeda K, Maruki M, Yamagaito T, Muramatsu M, Sakai Y, Tobimatsu H, Kobayashi H, Mizuno Y, Hamaguchi Y. Highly sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen by use of a semiautomated immune complex transfer chemiluminescence enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 2238-44.
12. Rundström G, Jonsson A, Mårtensson O, Mendel-Hartvig I, Venge P. Lateral flow immunoassay using Europium (III) chelate microparticles and time-resolved fluorescence for eosinophils and neutrophils in whole blood. *Clin Chem.* 2007; 53:342-8.
13. Liang RL, Xu XP, Liu TC, Zhou JW, Wang XG, Ren ZQ, Hao F, Wu YS. Rapid and sensitive lateral flow immunoassay method for determining alpha fetoprotein in serum using europium (III) chelate microparticles-based lateral flow test strips. *Anal Chim Acta.* 2015; 891:277-83.
14. Montana MP, Pappano NB, Debattista NB. New analytical reagents for europium(III). *Talanta.* 1998 ;47 :729-33.
15. Liang RL, Deng QT, Chen ZH, Xu XP, Zhou JW, Liang JY, Dong ZN, Liu TC, Wu YS. Europium (III) chelate microparticle-based lateral flow immunoassay strips for rapid and quantitative detection of antibody to hepatitis B core antigen. *Sci Rep.* 2017 ;7 :14093.

16. Nikkari S, Halonen P, Kharitonov I, Kivivirta M, Khristova M, Waris M, Kendall A. One-incubation time-resolved fluoroimmunoassay based on monoclonal antibodies in detection of influenza A and B viruses directly in clinical specimens. *J Virol Methods*. 1989 ;23 :29-40.
17. Liu J, Du B, Zhang P, Haleyurisetty M, Zhao J, Ragupathy V, Lee S, DeVoe DL, Hewlett IK. Development of a microchip Europium nanoparticle immunoassay for sensitive point-of-care HIV detection. *Biosens Bioelectron*. 2014; 61:177-83.

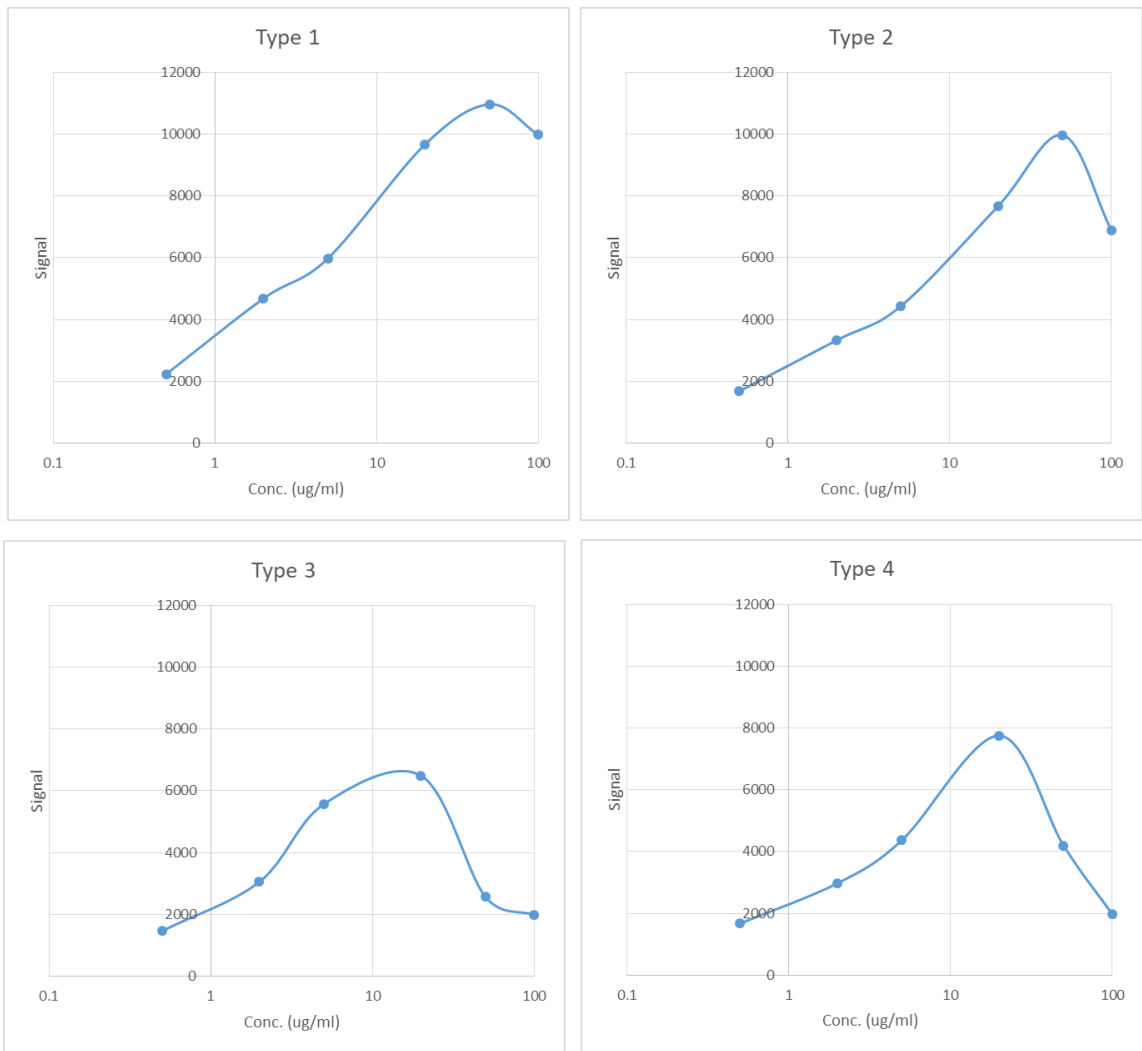
8. 圖、表



圖一、試劑卡匣規格表。 樣本加入 S 樣本區之後，樣本液體的移行速度，必須不低於 10mm/min ，換算約為小於 220 秒。



圖二、根據陰性檢體 200 例、陽性檢體 50 例，測得數據繪製成的 ROC curve。



圖三、Hook effect 檢測，在不同型別上出現的濃度不同

表一、移行速度測試數據

Test	batch (mm/Min)		
	FLDENAG-020	FLDENAG-021	FLDENAG-022
1	15.9	15.4	16.6
2	16.3	16.8	15.6
3	16.6	16.0	16.2
4	15.7	16.2	16.4
5	16.1	16.1	16.3
6	16.7	15.4	16.2
7	15.6	15.6	15.6
8	15.7	15.9	15.5
9	16.4	15.9	16.7
10	16.0	16.0	16.8
11	16.3	16.2	15.6
12	16.2	16.3	15.9
13	16.0	16.6	16.0
14	16.0	15.7	16.1
15	16.6	16.2	16.2
16	15.7	16.2	15.7
17	15.9	15.6	16.2
18	16.0	15.9	15.5
19	16.2	15.6	15.9
20	16.2	16.0	16.4
mean	16.1	16.0	16.1
SD	0.31	0.36	0.40
CV%	1.92%	2.26%	2.46%

表三 Cut off value 驗證結果

驗證中採用 NHS A 作為基質，加入固定濃度的抗原，驗證 cut off 值。

其中陰性組結果最高值為 T/C ratio=9.81%，較貼近 cut off

Cut off 驗證							
Type	Dengue Type 3 NS1 recombinant Ag						
Spike Conc.	陽性驗證濃度	650 ng/ml	(500+30%)				
	陰性驗證濃度	350 ng/ml	(500-30%)				
Spike Matrix	NHS A						
Cut off value	10%						
陽性驗證				陰性驗證			
Posi #	T	C	T/C Ratio%	Posi #	T	C	T/C Ratio%
1	1281	9817	13.05%	1	866	10267	8.43%
2	1225	10609	11.55%	2	715	9663	7.40%
3	1321	9410	14.04%	3	820	9047	9.06%
4	1166	9566	12.19%	4	705	9335	7.55%
5	1325	9379	14.13%	5	769	8738	8.80%
6	1358	10201	13.31%	6	884	10772	8.21%
7	1430	11499	12.44%	7	908	11678	7.78%
8	1379	10866	12.69%	8	1023	10426	9.81%
9	1343	9777	13.74%	9	1010	11096	9.10%
10	1293	10058	12.86%	10	1051	12221	8.60%
11	1363	11975	11.38%	11	919	10147	9.06%
12	1393	11897	11.71%	12	999	11862	8.42%
13	1220	11271	10.82%	13	1042	12189	8.55%
14	1416	10304	13.74%	14	905	12394	7.30%
15	1189	9805	12.13%	15	929	11052	8.41%
16	1212	11019	11.00%	16	860	10954	7.85%
17	1404	12064	11.64%	17	886	12528	7.07%
18	1461	10278	14.21%	18	893	10741	8.31%
19	1328	9564	13.89%	19	801	10666	7.51%
20	1417	10962	12.93%	20	888	12094	7.34%
			陽性符合率				陰性符合率
			100%				100%

表四、干擾性測試結果

Internal interference Tests				
Hemoglobin	Spike	hemoglobin H7379, Sigma Aldrich		
	Spkie matrix	NHS A+5ug/ml Dengue Type3 recombinant NS1		
	Conc. (g/l)	T	C	T/C ratio
	0.00	7283	9469	76.9%
	0.25	7091	9231	76.8%
	0.50	6283	9268	67.8%
	1.00	4999	7221	69.2%
	2.00	2633	4671	56.4%
	3.00	976	3746	26.1%
Bilirubin	Spike	unconjugated bilirubin 24519, Merck		
	Spkie matrix	NHS A+5ug/ml Dengue Type3 recombinant NS1		
	Conc. (umol/L)	T	C	T/C ratio
	0.00	7266	9751	76.7%
	136.80	7481	9764	75.0%
	273.50	7324	9296	78.8%
	410.20	7314	9421	77.6%
	547.00	7561	9634	78.5%
	683.80	7530	9782	77.0%
Glycerol	Spike	glycerol, mixed with oil G5516, Merck		
	Spkie matrix	NHS A+5ug/ml Dengue Type3 recombinant NS1		
	Conc. (mmol/L)	T	C	T/C ratio
	0.0	7583	9811	77.3%
	21.7	7541	9601	78.5%
	43.5	7320	9696	75.5%
	65.2	7453	9710	76.8%
	87.0	7492	9640	77.7%
	108.6	7335	9551	76.8%
External Interference tests				
Spike	hemoglobin H7379, Sigma Aldrich			
Spkie matrix	NHS A+5ug/ml Dengue Type3 recombinant NS1			
Interference (conc.)	T	C	T/C ratio	
EDTA K2 (3.2%)	7426	9450	78.6%	
Heparin (0.7 IU/ mL)	7313	9788	74.7%	
Sodium citrate (3.2%)	7180	9801	73.3%	

表五、重複性驗證

Type	Dengue Type1 NS1 recombinant Ag							
Spike Con	強陽性驗證濃度		1000 ng/ml					
	陰性驗證濃度		0 ng/ml					
Spike Mat	NHS A							
Cut off val	10%							
Day1	陽性驗證				陰性驗證			
	Posi #	T	C	T/C Ratio%	Posi #	T	C	T/C Ratio%
	1	3710	8888	41.74%	1	257	9135	2.81%
	2	3973	11025	36.04%	2	257	9380	2.74%
	3	3584	8718	41.11%	3	205	8909	2.30%
	4	4260	9415	45.25%	4	219	8795	2.49%
	5	4174	10427	40.03%	5	255	9967	2.56%
	6	3881	10660	36.41%	6	218	9916	2.20%
	7	3566	11345	31.43%	7	368	11246	3.27%
	8	4047	10458	38.70%	8	338	11526	2.93%
	9	3521	9655	36.47%	9	284	10988	2.58%
	10	3927	11548	34.01%	10	371	12448	2.98%
	11	3561	11648	30.57%	11	336	11903	2.82%
	12	4002	9858	40.60%	12	306	11250	2.72%
	13	3816	9597	39.76%	13	381	12033	3.17%
	14	4038	11178	36.12%	14	338	10943	3.09%
	15	4065	10581	38.42%	15	268	10991	2.44%
	16	3932	11048	35.59%	16	388	10618	3.65%
	17	3550	10514	33.76%	17	282	11683	2.41%
	18	3626	10527	34.44%	18	299	10247	2.92%
	19	4072	10229	39.81%	19	298	11820	2.52%
	20	4295	10188	42.16%	20	270	10577	2.55%
Day1	Mean	37.62%			Mean	2.76%		
	STDEV	3.78%			STDEV	0.36%		
	CV%	10.05%			CV%	12.99%		
Day2	陽性驗證				陰性驗證			
	Posi #	T	C	T/C Ratio%	Posi #	T	C	T/C Ratio%
	1	4052	8969	45.18%	1	213	8930	2.39%
	2	4124	10513	39.23%	2	267	10871	2.46%
	3	3627	9107	39.83%	3	260	9042	2.88%
	4	3540	8624	41.05%	4	257	9744	2.64%
	5	4039	9358	43.16%	5	232	9188	2.53%
	6	4061	9915	40.96%	6	237	9751	2.43%
	7	4186	12087	34.63%	7	297	10616	2.80%
	8	3700	10610	34.87%	8	344	9979	3.45%
	9	4377	9726	45.00%	9	257	10786	2.38%
	10	4064	9974	40.75%	10	357	10274	3.47%
	11	4481	12083	37.09%	11	358	10758	3.33%
	12	4409	11988	36.78%	12	382	10894	3.51%
	13	4116	10623	38.75%	13	306	11607	2.64%
	14	3780	10344	36.54%	14	328	10067	3.26%
	15	3932	12646	31.09%	15	407	12000	3.39%
	16	4011	11466	34.98%	16	326	10879	3.00%
	17	4022	11131	36.13%	17	347	11425	3.04%
	18	3983	10595	37.59%	18	339	11489	2.95%
	19	3700	11589	31.93%	19	422	11127	3.79%
	20	3588	10372	34.59%	20	341	12475	2.73%
Day2	Mean	38.01%			Mean	2.95%		
	STDEV	3.93%			STDEV	0.43%		
	CV%	10.33%			CV%	14.73%		

表五、重複性驗證 (續 1)

Day 3				Day 3			
陽性驗證				陰性驗證			
Posi #	T	C	T/C Ratio%	Posi #	T	C	T/C Ratio%
1	4171	9643	43.25%	1	252	9801	2.57%
2	4135	9550	43.30%	2	269	10092	2.67%
3	3657	10265	35.63%	3	238	9544	2.49%
4	4190	8830	47.45%	4	270	8849	3.05%
5	4232	9750	43.41%	5	243	10723	2.27%
6	4432	9858	44.96%	6	267	9707	2.75%
7	4326	10730	40.32%	7	387	11651	3.32%
8	3699	11507	32.15%	8	417	10770	3.87%
9	3678	11070	33.22%	9	295	9326	3.16%
10	3973	11142	35.66%	10	357	11231	3.18%
11	3999	10690	37.41%	11	349	11205	3.11%
12	4360	12605	34.59%	12	298	9818	3.04%
13	4501	12474	36.08%	13	317	10456	3.03%
14	4470	10242	43.64%	14	313	11452	2.73%
15	4318	9635	44.82%	15	312	10777	2.90%
16	4056	10442	38.84%	16	334	11774	2.84%
17	3993	9937	40.18%	17	385	11849	3.25%
18	4075	10985	37.10%	18	320	11445	2.80%
19	3768	10620	35.48%	19	324	11300	2.87%
20	4306	12572	34.25%	20	342	11525	2.97%
Day 3	Mean	39.09%		Mean	2.94%		
	STDEV	4.55%		STDEV	0.34%		
	CV%	11.64%		CV%	11.72%		
Day 4				Day 4			
陽性驗證				陰性驗證			
Posi #	T	C	T/C Ratio%	Posi #	T	C	T/C Ratio%
1	4074	9743	41.81%	1	256	9309	2.75%
2	4048	10022	40.39%	2	266	8884	2.99%
3	3860	9422	40.97%	3	267	10142	2.63%
4	4039	9414	42.90%	4	270	8827	3.06%
5	4093	10318	39.67%	5	248	10824	2.29%
6	3730	9798	38.07%	6	232	10439	2.22%
7	4373	10705	40.85%	7	257	9318	2.76%
8	3717	10168	36.56%	8	357	11919	3.00%
9	4545	10550	43.08%	9	330	10103	3.27%
10	4229	10385	40.72%	10	342	11182	3.06%
11	4018	10712	37.51%	11	314	9923	3.16%
12	4165	10880	38.28%	12	362	12021	3.01%
13	3954	11125	35.54%	13	371	12620	2.94%
14	3724	11051	33.70%	14	318	11542	2.76%
15	4166	11852	35.15%	15	315	10378	3.04%
16	4175	11969	34.88%	16	319	10782	2.96%
17	3844	11161	34.44%	17	298	9797	3.04%
18	3956	10471	37.78%	18	286	10976	2.61%
19	4105	11438	35.89%	19	303	12120	2.50%
20	4274	11269	37.93%	20	334	11121	3.00%
Day 4	Mean	38.31%		Mean	2.85%		
	STDEV	2.88%		STDEV	0.28%		
	CV%	7.51%		CV%	9.87%		

表五、重複性驗證 (續 2)

Day 5					Day 5				
陽性驗證					陰性驗證				
Posi #	T	C	T/C Ratio%	Posi #	T	C	T/C Ratio%		
1	3808	10794	35.28%	1	255	8967	2.84%		
2	3843	9339	41.15%	2	236	10657	2.21%		
3	4094	8723	46.93%	3	241	9733	2.48%		
4	4422	9401	47.04%	4	262	8925	2.94%		
5	3905	9767	39.98%	5	269	8757	3.07%		
6	4145	8717	47.55%	6	231	9895	2.33%		
7	3787	10714	35.35%	7	329	9944	3.31%		
8	3929	10112	38.85%	8	330	10909	3.03%		
9	4170	10423	40.01%	9	332	10700	3.10%		
10	3850	12224	31.50%	10	371	11550	3.21%		
11	4281	11365	37.67%	11	303	9513	3.19%		
12	4480	9929	45.12%	12	360	11898	3.03%		
13	3805	9141	41.63%	13	385	11425	3.37%		
14	3910	11206	34.89%	14	350	11195	3.13%		
15	3700	11815	31.32%	15	385	10164	3.79%		
16	4108	9670	42.48%	16	325	9731	3.34%		
17	4188	11950	35.05%	17	362	9990	3.62%		
18	4378	10852	40.34%	18	311	9237	3.37%		
19	4170	10083	41.36%	19	353	11802	2.99%		
20	4396	11305	38.89%	20	292	10566	2.76%		
Day 5	Mean	39.62%		Mean	3.06%				
	STDEV	4.81%		STDEV	0.39%				
	CV%	12.15%		CV%	12.92%				

重複性驗證資料彙整				
	陽性驗證		陰性驗證	
Day1	CV%	10.05%	CV%	12.99%
Day2	CV%	10.33%	CV%	14.73%
Day3	CV%	11.64%	CV%	11.72%
Day4	CV%	7.51%	CV%	9.87%
Day5	CV%	12.15%	CV%	12.92%
Between	mean	38.53%	mean	2.91%
run	STDEV	4.03%	STDEV	0.37%
	CV%	10.46%	CV%	12.80%

表六、 S/CO 重複性測試

S/CO 重複性測試驗證				
Type	Dengue Type1 NS1 recombinant Ag			
測試樣本	弱陽性樣本	#564		
Cut off value	10%			
Posi #	T	C	T/C Ratio%	S/CO
1	1483	9686	15.31%	1.53
2	1675	9682	17.30%	1.73
3	1540	10047	15.33%	1.53
4	1388	9517	14.58%	1.46
5	1355	10719	12.64%	1.26
6	1470	10127	14.52%	1.45
7	1226	9967	12.30%	1.23
8	1333	11474	11.62%	1.16
9	1400	11344	12.34%	1.23
10	1636	11777	13.89%	1.39
11	1892	11482	16.48%	1.65
12	1605	11215	14.31%	1.43
13	1801	10204	17.65%	1.76
14	1635	10570	15.47%	1.55
15	1810	11398	15.88%	1.59
16	1304	12287	10.61%	1.06
17	1748	12250	14.27%	1.43
18	1730	10629	16.28%	1.63
19	1656	11476	14.43%	1.44
20	1459	10161	14.36%	1.44
Mean	14.48%			144.78%
STDEV	1.86%			18.62%
CV%	12.86%			12.86%

表七、批間差驗證

Batch 1 資料同 Cut off 驗證結果，為第一批試驗結果

批間差驗證							
Type	Dengue Type 3 NS1 recombinant Ag						
Spike Conc.	陽性驗證濃度	650 ng/ml	(500+30%)				
	陰性驗證濃度	350 ng/ml	(500-30%)				
Spike Matrix	NHS A						
Cut off value	10%						
Batch 1							
陽性驗證				陰性驗證			
Posi #	T	C	T/C Ratio%	Posi #	T	C	T/C Ratio%
1	1281	9817	13.05%	1	866	10267	8.43%
2	1225	10609	11.55%	2	715	9663	7.40%
3	1321	9410	14.04%	3	820	9047	9.06%
4	1166	9566	12.19%	4	705	9335	7.55%
5	1325	9379	14.13%	5	769	8738	8.80%
6	1358	10201	13.31%	6	884	10772	8.21%
7	1430	11499	12.44%	7	908	11678	7.78%
8	1379	10866	12.69%	8	1023	10426	9.81%
9	1343	9777	13.74%	9	1010	11096	9.10%
10	1293	10058	12.86%	10	1051	12221	8.60%
11	1363	11975	11.38%	11	919	10147	9.06%
12	1393	11897	11.71%	12	999	11862	8.42%
13	1220	11271	10.82%	13	1042	12189	8.55%
14	1416	10304	13.74%	14	905	12394	7.30%
15	1189	9805	12.13%	15	929	11052	8.41%
16	1212	11019	11.00%	16	860	10954	7.85%
17	1404	12064	11.64%	17	886	12528	7.07%
18	1461	10278	14.21%	18	893	10741	8.31%
19	1328	9564	13.89%	19	801	10666	7.51%
20	1417	10962	12.93%	20	888	12094	7.34%
		陽性符合率	100%			陰性符合率	100%
Batch 2							
陽性驗證				陰性驗證			
Posi #	T	C	T/C Ratio%	Posi #	T	C	T/C Ratio%
1	1355	8866	15.28%	1	814	10364	7.85%
2	1500	9200	16.30%	2	803	10505	7.64%
3	1271	10079	12.61%	3	816	9647	8.46%
4	1360	8893	15.29%	4	794	10350	7.67%
5	1308	8861	14.76%	5	729	8943	8.15%
6	1392	9412	14.79%	6	734	10410	7.05%
7	1287	11898	10.82%	7	887	10904	8.13%
8	1451	10781	13.46%	8	887	10402	8.53%
9	1202	11552	10.41%	9	810	11170	7.25%
10	1410	10498	13.43%	10	784	10319	7.60%
11	1250	9998	12.50%	11	945	10085	9.37%
12	1360	10521	12.93%	12	836	11796	7.09%
13	1275	11546	11.04%	13	783	11197	6.99%
14	1363	10865	12.54%	14	803	10802	7.43%
15	1391	9904	14.04%	15	747	9975	7.49%
16	1408	11954	11.78%	16	759	11646	6.52%
17	1418	9776	14.50%	17	949	12687	7.48%
18	1254	10974	11.43%	18	899	11721	7.67%
19	1318	11224	11.74%	19	878	11683	7.52%
20	1366	11692	11.68%	20	895	11413	7.84%
		陽性符合率	100%			陰性符合率	100%

表七、批間差驗證 (續)

Batch 3							
陽性驗證				陰性驗證			
Posi #	T	C	T/C Ratio%	Posi #	T	C	T/C Ratio%
1	1361	10719	12.70%	1	758	9180	8.26%
2	1365	10417	13.10%	2	675	8896	7.59%
3	1450	9179	15.80%	3	675	8936	7.55%
4	1282	8862	14.47%	4	859	10842	7.92%
5	1277	10393	12.29%	5	710	9312	7.62%
6	1288	10793	11.93%	6	775	8867	8.74%
7	1434	11066	12.96%	7	940	12269	7.66%
8	1516	11819	12.83%	8	743	11308	6.57%
9	1201	11550	10.40%	9	889	10748	8.27%
10	1307	10365	12.61%	10	843	9784	8.62%
11	1378	10190	13.52%	11	808	11513	7.02%
12	1285	9737	13.20%	12	874	9695	9.01%
13	1312	10590	12.39%	13	754	10089	7.47%
14	1450	11772	12.32%	14	867	9928	8.73%
15	1340	10911	12.28%	15	846	11895	7.11%
16	1400	10614	13.19%	16	861	10612	8.11%
17	1273	10871	11.71%	17	974	11398	8.55%
18	1455	11732	12.40%	18	922	10461	8.81%
19	1424	10930	13.03%	19	780	10133	7.70%
20	1297	11950	10.85%	20	977	12034	8.12%
陽性符合率			100%	陰性符合率			100%

批間差資料彙整		
	陽性符合率	陰性符合率
Batch 1	100%	100%
Batch 2	100%	100%
Batch 3	100%	100%

*表七中紅色標示結果為 貼近 Cut off value 10% 的邊緣值，如果設定為 10.5%, 9.5%，即會使符合率降低。現在每組資料中即便移動 cut off value，符合率也在 95%，符合一般快檢試劑規範。

表八、穩定性測試

批間差驗證									
Type	Dengue Type 3 NS1 recombinant Ag								
Spike Conc.	陽性驗證濃度	650 ng/ml	(500+30%)						
	陰性驗證濃度	350 ng/ml	(500-30%)						
Spike Matrix	NHS A								
Cut off value	10%								
Month 1	陽性驗證				陰性驗證				
	Posi #	T	C	C Ratio%	Posi #	T	C	C Ratio%	
	1	1255	9826	12.77%	1	813	10299	7.89%	
	2	1253	10511	11.92%	2	776	10891	7.13%	
	3	1435	9455	15.18%	3	755	9708	7.78%	
	4	1214	8732	13.90%	4	727	9052	8.03%	
	5	1447	10403	13.91%	5	779	9910	7.86%	
	6	1149	10723	10.72%	6	817	9833	8.31%	
	7	1184	10639	11.13%	7	821	11378	7.22%	
	8	1343	10465	12.83%	8	977	12419	7.87%	
	9	1291	10641	12.13%	9	910	12342	7.37%	
	10	1334	10823	12.33%	10	956	12806	7.47%	
	11	1446	12037	12.01%	11	1009	12639	7.98%	
	12	1292	11324	11.41%	12	929	11473	8.10%	
	13	1286	9403	13.68%	13	942	11443	8.23%	
	14	1391	11248	12.37%	14	933	10990	8.49%	
	15	1262	11385	11.08%	15	857	10752	7.97%	
	16	1288	11345	11.35%	16	840	11444	7.34%	
	17	1248	10798	11.56%	17	966	11766	8.21%	
	18	1286	10064	12.78%	18	941	10064	9.35%	
	19	1199	10049	11.93%	19	979	10470	9.35%	
	20	1325	11784	11.24%	20	1005	12371	8.12%	
			陽性符合率	100%			陰性符合率	100%	
Month2	陽性驗證				陰性驗證				
	Posi #	T	C	C Ratio%	Posi #	T	C	C Ratio%	
	1	1281	10087	12.70%	1	752	8516	8.83%	
	2	1214	8488	14.30%	2	755	8150	9.26%	
	3	1214	9427	12.88%	3	849	9983	8.50%	
	4	1210	10204	11.86%	4	850	8509	9.99%	
	5	1262	8836	14.28%	5	681	9721	7.01%	
	6	1293	8349	15.49%	6	772	9714	7.95%	
	7	1153	10762	10.71%	7	937	9647	9.71%	
	8	1240	10724	11.56%	8	895	10044	8.91%	
	9	1215	11640	10.44%	9	893	11094	8.05%	
	10	1273	11047	11.52%	10	794	10278	7.73%	
	11	1400	11083	12.63%	11	903	9922	9.10%	
	12	1248	10544	11.84%	12	808	9627	8.39%	
	13	1122	10197	11.00%	13	925	9132	10.13%	
	14	1113	9690	11.49%	14	736	10709	6.87%	
	15	1184	10913	10.85%	15	890	11088	8.03%	
	16	1202	11962	10.05%	16	1015	11763	8.63%	
	17	1117	10685	10.45%	17	857	10808	7.93%	
	18	1275	11294	11.29%	18	769	9796	7.85%	
	19	1376	10690	12.87%	19	923	10692	8.63%	
	20	1237	9491	13.03%	20	817	11269	7.25%	
			陽性符合率	100%			陰性符合率	95%	