

計畫編號： MOHW108-CDC-C-315-134519

衛生福利部疾病管制署 108 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

年度/全程研究報告

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：108 年 1 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 381 萬 4 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		6
2. 材料與方法		9
3. 結果		11
4. 討論		15
5. 結論與建議		20
6. 重要研究成果及具體建議		20
7. 參考文獻		21
8. 圖、表		24

壹、 中文摘要

關鍵詞：快速篩檢平台、創新標定法

快速篩檢平台能在臨床端應用，提供醫療人員作初步檢測，快速而方便，然而目前市面上所設計的快速篩檢平台主要以膠體金之標定方法，成本便宜且標定狀態穩定，判讀結果快速。但由於是肉眼判讀，容易產生人為誤差而影響結果，導致偽陰性(有微弱反應線卻忽略)或者偽陽性(無反應線錯誤判讀)的發生。

本計畫執行在於研究出可行之創新標定檢驗方法，與委託有相關經驗之產業界，共同研發可攜式讀取儀，藉由現有快速篩檢平台，以鎳螯合物標定方法，作為偵測傳染病之標的物(抗原或抗體)，除了提高檢測抗體與新標定法之結合效率，並能搭配可攜式儀器進行半定量方法，提升整體快速篩檢平台之靈敏度與再現性，減少人為誤差，從敏感性測試與專一性測試，測量改良成效。再搭配小型讀取儀，能提高現行檢測之靈敏度，製備出更加符合市場需求之快速篩檢平台。本計畫已成功利用快速篩檢試紙，以鎳(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，各 10 支陽性及陰性檢體經實際測試，原型快篩試劑結果令人滿意。

貳、 英文摘要

keywords : Innovative conjugation method, lateral flow assay

Lateral flow assay tests are nowadays becoming powerful, low-cost diagnostic tools. The application of colloidal gold lateral flow assay is widespread with popularity in the fields of medical diagnosis. However, colloidal gold labeling is accompanied by limitations especially when high sensitivity is required. Labeling methodology is crucial in lateral flow assay and will inevitably affect the final result of the assay. The development of innovative conjugation methods in lateral flow assay has surged with the advances in detection methodology and instrumentation. Therefore, highly sensitive assays using europium III chelate fluorescent is being adopted for diagnostic purpose.

This project will combine improved lateral flow immunoassays with automatic digital scan device and interpretation of the test strip, hence, minimizing potential operator errors due to manual reading. To provide good quantitative and reproducible results, detection system should be sensitive to different intensities of colors. Optical standards can be used to calibrate an optical reader device for featured quantitative analysis.

An appropriate and suitable lateral flow assay biosensor shall be recognized by the following characters, such as affordability in cost; high specificity; high sensitivity; portability and rapidity of analysis. Other features include, reproducibility/precision of results; wide working range of analysis; accuracy of analysis; high throughput; compactness and simplicity of operation. Flexibility in configuration;

possibility of miniaturization; potential of mass production and on-site detection must ultimately be considered. The final goal of this project is to launch a novel detection platform into the current market. The project has successfully used Europium (III) chelate labelled dengue virus NS1 monoclonal antibody microparticle-based lateral flow immunoassay strips, and uses directional flow of immunochromatography flow to excite the light source of a specific wavelength inside the reader and set receiver. Longer-wavelength fluorescence is generated, and the instrument converts the image into a numerical value to determine the result. After adjusting the buffer conditions to remove the false positive signal, each of the 10 true positive and negative samples was actually tested and the results of prototype rapid test were satisfactory.

參、 本文

1. 前言

Point of care (POC)也稱作 Point of patient care，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，但卻相當耗時，且試劑由儀器設備廠商壟斷提高檢驗成本，常為醫療患者抱怨。相對於專業實驗室，POC 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。

POC 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，最終利用奈米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，標的物即被標誌片中抗體辨識，一同於硝酸纖維素膜上移動，藉由觀察反應線上膠體金呈色，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，因而增加了產生偽陰性的機率⁸。因此標定呈色方法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。標定呈色方法會影響整體分析靈敏度，本計畫目的即在研究發展創新標定檢驗方法，以銷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。

2. 材料與方法

1. 提升新型快速篩檢平台靈敏度

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，以降低材料成本之方法。

2. 測試標定方法

評估可行之創新標定方法，如改良之乳膠粒子(期中進度以黑色乳膠及膠體金標示)、螢光粒子(期末進度以鎔螯合物(europium III chelate, Eu[III] chelate)奈米微粒標示)等，作為新型標定方法，並測試抗體與新標定法之結合效率。

高靈敏度的鎔螯合物微球(fluorescent microspheres) 螢光粒子¹²⁻¹⁴，係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)-carbodiimide)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單株抗體NS1-8及anti-mouse IgG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，而單株抗體NS1-3、NS1-4、NS1-9

則分別與螢光微球進行偶聯，單株抗體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-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。

3. 由委託單位研發之可攜式讀取儀器

目前市面上已開發出流感快篩偵測儀，藉由螢光標定偵測抗體，大幅提升流感快篩試劑之敏感度。本計畫委託曾開發出相同功能產品之業者，運用機械與電機專業，設計出符合本署需求之可攜式讀取儀，激發光源及截取波長採 UV 365nm LED 激發光源搭配 610nm 的濾光片，再以 CMOS 彩色影像模組擷取影像，分析試條上檢驗線、品管線相對於背景的螢光強度值，並可透過內部軟體分析計算，設定陽性、陰性的臨界值，同時可透過連線之電腦讀取、紀錄螢光強度並將資料做後續處理。

3. 結果

(1) 原型快篩試劑操作方法:

設定操作流程為圖一，具程序簡單，降低操作錯誤之機率之優點。

• 操作步驟注意事項:

*1: 韓國 SD Bioline NS1 Antigen colometric test 需要使用之血清量為: 100uL。本實驗僅須使用僅只有 SD 的 50%。

*2: Running buffer(0.5% tween 20): 補足 strip 所需之液體量以及利用高濃度 detergent 使疑似病患血清內可能含有的登革熱病毒去活化，降低操作者感染風險。

*3: 室溫反應，無須避光。

(2) 小規模健康人血清(NHS)測試 (N=60)

小規模健康人血清測試目的為”使用已經確認的原型快篩試劑，以正常人血清反應過，確認不會有嚴重的非特異性反應出現”。健康人血清為實驗室同仁自願提供血清，經分裝成多管 50uL 小樣本，以盲樣及亂數取出 60 支進行測試。測試方法如下：

2.1 實驗方式取健康人血清 50uL 滴入卡匣再加入 50ul Normal saline 補齊試劑所需要之 100uL 的液體量。(此測試先不考慮 pH 值的影響，但是考慮離子總強度所以使用 Normal saline)

2.2 以期中報告之原型試劑所定下來的 T line >400(試劑原型之 LOD)及 C/T>10 作為初期試驗的閾值，第一次篩選找出可能有

non-specific binding (false positive)的血清。

實驗結果於健康人血清中，找到 10 個（記錄為 10/60）測試血清呈現 false positive 結果(圖二)。

(3)針對偽陽性結果微調 Buffer 系統

一般側向流原理的快篩試劑，為了達到抗體抗原的反應正確性以及速度，會選用貼近體液 pH 值的緩衝液系統保持反應的穩定性，並且微調離子強度(通常是改變 NaCl 的濃度來調整)，使反應最適化。

本試驗中利用上個實驗中找到的 10 支 positive signal 檢體，作為 Buffer 微調之樣本。微調配方目的為將這 10 支有 non-specific binding 調整至 Negative signal。

選用的 3 個不同 Buffer system 如圖三：

(A) Tris-Saline: 此系統是本實驗 Bead conjugation 所選之 buffer 系統

(B) PBS: 為多數市面上快速檢驗試劑所使用之 buffer

(C) Phosphate buffer 為本實驗 bead conjugate 完成所選用之保存液

上述三個 A/B/C buffer 全部內含有額外添加的 0.5% Tween20, 0.1% Proclin 300, 1% immunoassay stabilizer(Sigma BioStab).

(3.1) (A) Tris-Saline 系統結果: 於 15 分鐘內背景值偏亮、Test line 與 control line 不均勻。此 buffer 系統不適合本實驗，導致 beads 附著在大範圍 NC membrane 上。偽陽性比例仍維持在 50% (圖四)。

(3.2) (B) PBS 系統結果: 15 分鐘內此 buffer 系統嚴重導致

Conjugate pad 與 NC membrane 交接處 bead 附著狀況。偽陽性比例仍維持在 40% (圖五)。

(3.3) (C) Phosphate buffer 系統結果: 15 分鐘內背景值沒有過多殘留 beads 導致特亮之背景。Test line 亮度均勻。Beads 附著在 Conjugate pad 與 NC membrane 交接處不明顯。偽陽性比例維持在 30% (圖六)。

(4) 後續改善去除 non-specific binding signal (false positive)

由於 phosphate buffer 使用後，仍然有 3 支檢體有 non-specific binding signal。這三支檢體分別編號為 A/B/C。本實驗設計去除 non-specific binding 進行兩個測試：(1) detergent test: 使用不同濃度(1%、2%、3%)的 tween 20 detergent 添加測試；(2) blocking reagent test: 以快篩試劑常會使用的兩種不同的 blocking reagent: Bovine Serum Albumin (BSA) 不同濃度(1%、3%、5%) 與 Casein 不同濃度(1%、3%、5%)進行測試(圖七)。結果顯示 **Phosphate buffer(pH7.4) + 3% Tween 20 + 3% casein** Test line signal 較接近 >400(試劑原型之 LOD)。

(5) 陽性與陰性樣本測試

(5.1) 陰性樣本測試

以(2)盲樣健康人檢體 10 支，測試經調整過之緩衝液系統，此批樣本同時以 SD Bioline Dengue NS1 Ag rapid test 測試，2 者測試結果均為陰性(圖八)。

(5.2) 陽性樣本測試

利用 10 支向本署申請之陽性登革熱患者血清，上述陽性樣本均以 real time PCR 確認，測試結果均為陽性(圖九)。

4. 討論

108年10月23日下午假本署昆陽辦公室辦理之「108年防疫研發成果產業交流會議」，本項計畫研究成果為當日吸引最多廠商進行媒合討論的場次。共吸引包括益生生技開發股份有限公司、普生股份有限公司、台塑生醫技術股份有限公司、瑞凌庚生物醫學股份有限公司、全譜科技股份有限公司、長興材料工業股份有限公司等6家公司進行一對一媒合討論，上述廠商均認為此項鎔奈米螢光標定技術應用於傳染病病原體檢測極具可行性。

側向流(lateral flow)原理的快速測試試劑在臨床診斷環境中發揮了重要作用。此項原理所發展的試劑為經濟實惠且便於使用，對於具有時間限制需求、有限資源或遠端/分散實驗室的檢測，提供快速的篩檢結果尤為重要。雖然目前許多重要的試劑已使用常規微粒(microsphere, 如膠體金、乳膠顆粒)為原料進行產品設計開發，但是使用鎔螯合物(europium III chelate, Eu[III] chelate)奈米微粒進行快速免疫分析試劑的開發，則具有更大的靈敏度且可搭配便於操作的螢光讀取儀進行定量偵測。因為鎔螯合物具有比傳統螢光更長的螢光衰減週期，可以從奈秒(nanoseconds, ns)延長到微秒(microseconds, μ s)，同時可在入射光的背景螢光的衰減週期之外收集信號，這種特性可以確保檢測儀器的快門或收光控制，可與入射光的關閉時間完全錯開，亦即在關閉入射光時再進行激發光信號截取。此外，較長的入射光到激發光的光譜位移(Stoke shift)可確保激發源的入射光($\lambda \sim 330-340\text{nm}$)不易干擾檢測儀器收集的螢光($\lambda \sim 610-620\text{nm}$)。臨床檢驗或免疫染色上常出現由於入射光波造成的螢光背景值之干擾，在這種特定鎔螯合物材質下可以完全避開，因此可以大幅的提

高訊噪比(signal noise ratio, S/N ratio)。這種螢光材質的特性，其發展出來的應用材料微粒，稱之為時間分辨螢光(time-resolved fluorescence, TRF)微粒。其訊號值可以比一般可見光光學訊號大得多。將 TRF 微粒應用在臨床檢測時，再加上高訊噪比的特性，就可以提高分析靈敏度(analytical sensitivity)，並且同時降低非專一性訊號的干擾。更而甚之的，如果將來量產時的品質控制得當，此種螢光微粒理論上可以做到半定量或是定量的快速檢驗，這是膠體金或乳膠微粒難以做到的。近年來，用於 B 型肝炎病毒檢測¹⁵、流感病毒¹⁶、HIV¹⁷，或者是臨床訊號較低的特別標的物檢測，需要較高的分析靈敏度，已開始選用銻螯合物 (europium III chelate, Eu[III] chelate)螢光奈米微粒作為材料進行開發研究。

除了提高檢測抗體與新標定法之結合效率，搭配可攜式儀器進行半定量方法，提升整體快速篩檢平台之靈敏度與再現性，減少人為誤差，由於 LED 產業的發展以及偵測設備的工業快速發展，其所需的入射光光源以及激發光偵測，皆為現有產業容易提供的儀器規格，儀器設備廠商可以輕易地設計並量產微小化的偵測設備。以上特點，加上小體積可攜式時間分辨螢光儀器的可用性，在快速診斷試劑的進化中提供了新的機會。目前可攜式讀取儀除了以 LED 光源照射反應線與對照線，利用光電二極體轉換成為電訊號，再經軟體計算吸收光值，設定陽性臨界值，但開發過程亦有限制:如須搭配原廠設計，反應線位置不能容許誤差，需要大量之測試抗體，與較繁複之測試品管過程。本計畫目前已與台灣全譜光學公司接洽，針對 TRF 微粒螢光訊號讀取儀進行軟體參數設定細節。

以健康人血清進行分析，針對可能產生偽陽性訊號結果，發現

以產品原型的配方之下，雖然檢測的靈敏度高，但是在正常人血清約有 $1/6=16.67\%$ 可能產生偽陽性，因此進行產品微調。微調步驟為：

(1)改變 running buffer 配方，選擇更適合的反應緩衝液系統。測試結果顯示 Phosphate buffer 可有效改善大部分健康人血清的偽陽性反應。作為去除 non-specific binding 之基底 buffer.

(2)利用 detergent 或者是 Blocking reagent 來去除非專一性的 test line 反應：結果顯示 **Phosphate buffer(pH7.4) + 3% Tween 20 + 3% casein** 能改善偽陽性反應之發生。

(3) 小量陰性檢體(正常人血清檢體)，與陽性檢體對試劑性能的再確認。選用的是經過 SD Bioline Dengue NS1 快檢試劑確認過的陰性檢體，以及經過 PCR 確認過的陽性患者檢體。各 10 支陽性及陰性檢體，檢測結果均符合預期。此項結果已經使本計畫高靈敏度的創新標定檢驗法，更接近市售產品可接受的規格。產品配方規格，均以小量臨床樣本驗證，只要再進行量產化的驗證，驗證快篩試劑所需的各種產品技術規範，即可對廠商進行技術轉移。

本研究目前仍有待改進之處，

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)、線性(linearity)、重複性(repeatability)、中間精密度(intermediate precision, between run, within run)、偵測極限(limit of detection, LOD)、定量極限(limit of quantification, LOQ)、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。

合作育成計畫中，將考量本平台所需設備及場地需求，進行環境驗證，確認未來可以符合量產條件，以輔導廠商進行技

術轉移。

3. 市場化及技術移轉評估作業

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。

5. 結論與建議

本計畫利用快速篩檢試紙，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，並設定接收產生較長波長之螢光，儀器將影像轉換為數值，進行結果判定。建議螢光偵測系統需進行更多臨床樣本的實測，以優化系統的演算設定及修正，排除偽陰性結果等因素及強化弱陽性結果之檢測效率。

6. 重要研究成果及具體建議

鎔(III)奈米微粒螢光標定登革熱病毒 NS1 單株抗體，現階段已建立偵測登革熱病毒原型平台，並成功將螢光影像訊號轉化成數值，對於結果之判定可減少人為誤差。此外，此一技術未來可應用於其他病原體偵測，快速檢測結果可加速防疫之反應時效。

具體建議為進行大規模檢體之評估，以調整讀取儀之各項參數設定。達到最適合之檢測閾值。

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. News 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, Kendal 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

操作步驟

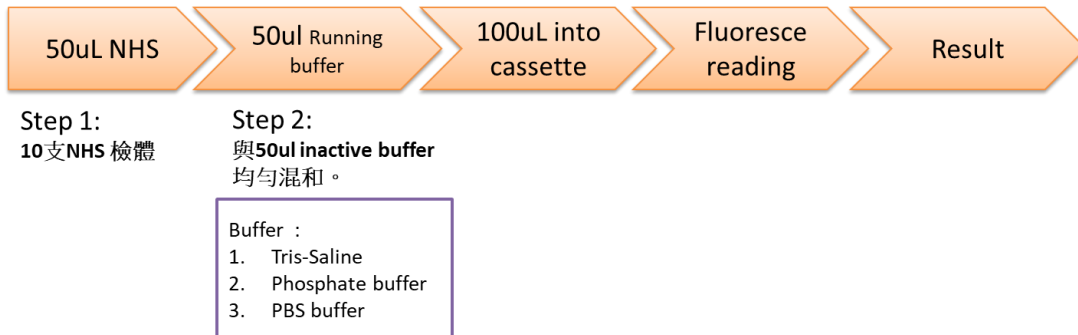


圖一：登革熱原型快篩試劑操作步驟

NHS	T/C	RATIO%	NHS	T/C	RATIO%	NHS	T/C	RATIO%	NHS	T/C	RATIO%
1	312/5975	5	16	171/5107	3	31	177/5030	4	46	6321/487	8
2	359/5887	6	17	356/5948	6	32	238/5483	4	47	928/4750	20
3	267/6541	4	18	643/8087	8	33	200/4966	4	48	230/5056	5
4	2148/4658	47	19	215/4900	4	34	310/5524	6	49	517/5759	9
5	1304/5161	25	20	393/6005	7	35	273/5730	5	50	169/4623	4
6	1438/5334	27	21	975/7752	13	36	387/6565	6	51	425/7381	6
7	825/5683	15	22	260/5806	4	37	813/6680	12	52	490/5467	9
8	392/5343	7	23	938/5445	17	38	216/4732	5	53	353/6413	5
9	389/6653	6	24	311/6442	5	39	373/6456	6	54	1301/7168	18
10	194/5041	4	25	273/4707	6	40	279/6986	4	55	114/5504	2
11	328/5134	6	26	373/4664	8	41	325/6090	5	56	281/5517	5
12	319/6017	5	27	1810/7291	25	42	327/5421	6	57	585/7416	8
13	202/5468	4	28	368/6962	5	43	311/7246	4	58	345/5025	7
14	295/6003	5	29	377/5168	8	44	343/4878	7	59	183/4875	4
15	321/6851	6	30	316/6269	5	45	229/5939	4	60	351/4579	8

圖二：盲樣測試 60 支正常人血清快篩結果。

操作步驟



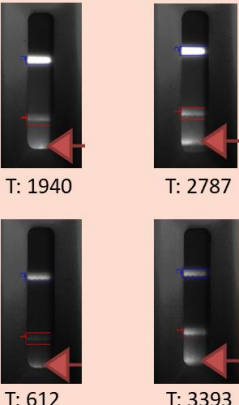
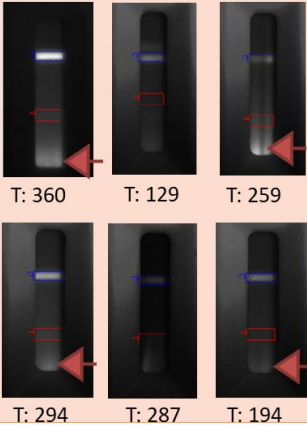
圖三: 微調 Buffer 系統快篩試劑操作步驟

Tris-Saline system

Buffer	Specimen	Positive result (*Testline Value)	Negative result (*Testline Value)
Tris-Saline	NHS	 T: 2113 T: 685 T: 2300	 T: 386 T: 387 T: 359
		 T: 715 T: 773	 T: 256 T: 327

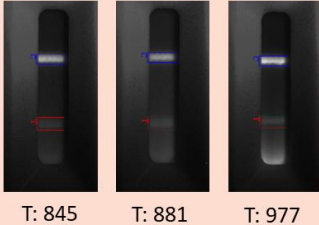
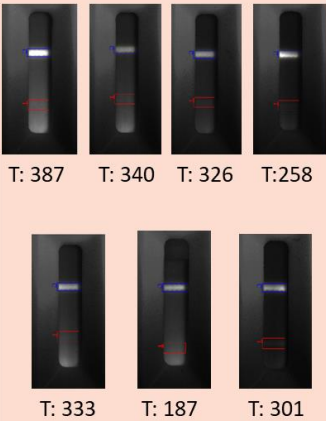
圖四: Tris-Saline 微調 Buffer 之偵測結果

PBS buffer System

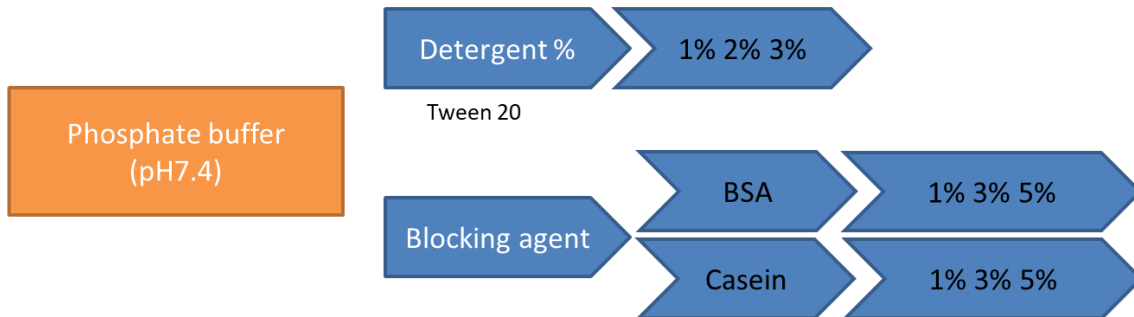
Buffer	Specimen	Positive result (*Testline Value)	Negative result (*Testline Value)
PBS buffer	NHS	 T: 1940 T: 2787 T: 612 T: 3393	 T: 360 T: 129 T: 259 T: 294 T: 287 T: 194

圖五: PBS 微調 Buffer 之偵測結果

Phosphate buffer (pH7.4) system

Buffer	Specimen	Positive result (*Testline Value)	Negative result (*Testline Value)
Phosphate buffer (pH7.4)	NHS	 T: 845 T: 881 T: 977	 T: 387 T: 340 T: 326 T: 258 T: 333 T: 187 T: 301

圖六: Phosphate buffer 微調 Buffer 之偵測結果



圖七：使用 Phosphate buffer 添加不同微調 Buffer 之偵測結果

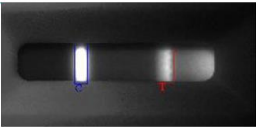
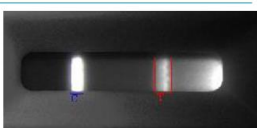
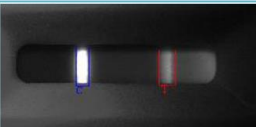
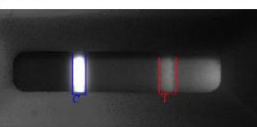
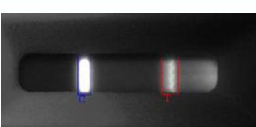
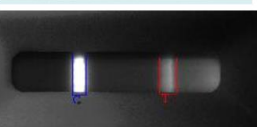
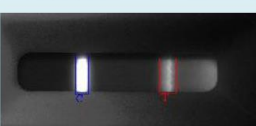
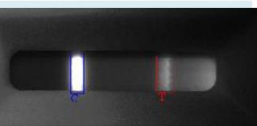
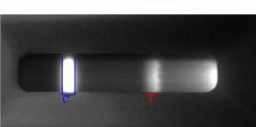
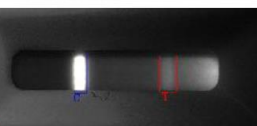
Final Test: NHS

SD Bioline Dengue rapid tests confirmed

C:10214 T:342 NEGATIVE	C/T Ratio 3%		C:10311 T:436 NEGATIVE	C/T Ratio 4%	
C:9799 T:430 NEGATIVE	4%		C:10214 T:342 NEGATIVE	3%	
C:10021 T:378 NEGATIVE	4%		C:10122 T:501 NEGATIVE	4%	
C:10214 T:488 NEGATIVE	5%		C:11949 T:420 NEGATIVE	3%	
C:9981 T:620 NEGATIVE	6%		C:12328 T:534 NEGATIVE	4%	

圖八：使用微調 Buffer 後快篩試劑檢測健康人血清之結果

Final Test: POSTIVE specimen serum confirmed by RT-PCR

C:18123 T:6005 POSITIVE	C/T Ratio 33%		C:16104 T:3807 POSITIVE	C/T Ratio 24%	
C:13842 T:3404 POSITIVE	25%		C:16806 T:2616 POSITIVE	16%	
C:16362 T:5656 POSITIVE	35%		C:15260 T:3653 POSITIVE	70%	
C:15374 T:3226 POSITIVE	21%		C:17250 T:5424 POSITIVE	31%	
C:15600 T:4595 POSITIVE	29%		C:20283 T:5133 POSITIVE	25%	

圖九:使用微調 Buffer 後快篩試劑檢測陽性個案血清之結果

**衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫
期末審查意見回復**

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-134519

計畫名稱：創新標定檢驗法之研究發展

計畫主持人：楊志元

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正 處 頁 碼
1	本計畫已經完成技術開發，證實方法可行，且規劃進行技轉，值得肯定；惟未來相關產品優化事項，建議考慮交由技轉廠商進行。	<p>謝謝委員意見。</p> <p>因技術轉移時本署所獲之權利金多寡，需取決於技術發展之成熟度及邁入市場化門檻之難易度，本年度媒合會談時，多數廠商均<u>建議本署完成測試產品的第一次臨床設計驗證後再辦理技轉</u>，臨床設計驗證分析項目包括：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)。<u>此項設計驗證將儘速於明年計畫執行完成後進行技轉說明。</u></p>	
2	此技術完成研發後，除應用本技術國外已完成流感病毒與呼吸道融合病毒(RSV)等商品化疾病檢測試劑外，亦可以延伸應用於各種原膠體金檢測技術之取代，具商業應用價值，可技術轉移相關業者。	<p>謝謝委員意見。</p>	

3	<p>本計畫已完成利用鎔(III)奈米微粒螢光標定登革熱病毒 NS1 單株抗體於快速篩檢試紙，並利用讀取儀內部特定波長之光源進行激發特定波長之螢光後，讀取檢測值，以判定結果。研究成果符合計畫目標。且具市場價值，可為提高台灣生技產業貢獻度。</p>	<p>謝謝委員意見。</p>	
4	<p>已有初步成果，未來希望技轉 此技術與產業界合作。(登革熱 NS1)。</p>	<p>謝謝委員意見，本年度此計畫已和國內具商品開發及量產之生技業進行此項技術合作，非由本署研究團隊單獨進行。</p>	
5	<p>建議尋找有意願投入此項技術開發的廠商。</p>	<p>謝謝委員意見，本年度此計畫已和國內具商品開發及量產之生技業進行此項技術合作。</p>	
6	<p>如何進行臨床試驗？(與「開發檢測 arbovirus 的整合型快速檢測試劑」的 ICT 區分)</p>	<p>1. 臨床試驗目前規劃有四項需執行: (1) 利用剩餘檢體進行與經由 RT-PCR 確認之檢體的平行比對。建議檢體數量大於>200 例，其中 100 例為陰性檢體。 (2) 陽性檢體(至少 100 例)區分兩類(2.1)Primary infection 初次感染判斷為 DENV -IgG 陰性(>70)，各血清型>10 例。(2.2)secondary infection 再次感染判斷為 DENV -IgG 陽性</p>	

		<p>(>30),各血清型>5 例。</p> <p>(3) Cross reaction: 需與以下疾病逕行 cross-reactivity test Japanese Encephalitis、Yellow Fever、Malaria <i>P.falciparum</i>、Malaria <i>P.vivax</i>、</p> <p>2.謝謝委員意見，本計畫經洽「開發檢測 arbovirus 的整合型快速檢測試劑」討論後，確認 2 項計畫發展屬性不同，上述計畫係以快篩方式 <u>檢測抗體</u>，然本計畫係以舒博士團隊開發完成之成熟單株抗體，應用新一代鎔螯合物標示抗體，結合螢光讀取儀訊號截取，成為新一代之 <u>抗原檢測</u>快篩試劑。</p>	
--	--	--	--

備註:請將此表單附在期末報告後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，並務必至 GRB 系統完成資料抽換。

衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫
108 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： 創新標定檢驗法之研究發展

主持人： 楊志元

計畫編號： MOHW108-CDC-C-315-134519

1.計畫之新發現或新發明

銷(III)奈米微粒螢光標定登革熱病毒 NS1 單株抗體，現階段已建立偵測登革熱一至四型病毒原型平台，並成功將螢光影像訊號轉化成數值。經微調緩衝液以去除偽陽性訊號後，各 10 支陽性及陰性檢體經實際測試，原型快篩試劑結果令人滿意。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

此一技術未來可應用於其他病原體偵測，快速檢測結果可加速防疫之反應時效。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

此平台可成功將螢光影像訊號轉化成數值，對於結果之判定可減少人為誤差，對防疫工作可藉以提升效能。