

計畫編號： MOHW107-CDC-C-315-124510

衛生福利部疾病管制署 107 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：謝若郁、范文斌

執行期間：107 年 1 月 1 日至 107 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 375 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		8
3. 結果		10
4. 討論		12
5. 結論與建議		15
6. 重要研究成果及具體建議		15
7. 參考文獻		16
8. 圖、表		19

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，改良膠體金或鎘螯合物標定方法，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。在搭配小型讀取儀，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，以鎘(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，與肉眼判定之商用試劑訊號值相較，可以發現有較佳的靈敏度。

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 very widespread and popular in the fields of medical diagnosis. However, colloidal gold labeling shows some limitations especially when high sensitivity is needed. Labeling method is important for lateral flow assay and will affect the final result of the assay. The development of innovative conjugation methods for lateral flow assay has surged with the advances in detection methodology and instrumentation. Therefore highly sensitive assays using europium III chelate fluorescent or immune complex transfer chemiluminescence labeling have been adopted for diagnostic purpose.

This project is going to combine an improved lateral flow immunoassays with automatic digital scan device and interpretation of the test strip, which minimizes 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 feature quantitative analysis.

An appropriate lateral flow assay biosensor shall be recognized by some characters, including low cost, high specificity, high sensitivity, portability, rapidity of analysis, reproducibility/precision of results, wide working range of analysis, accuracy of analysis, high throughput,

compactness, simplicity of operation, flexibility in configuration, possibility of miniaturization, potential of mass production and on-site detection. The final goal of this project is to launch a novel detection platform onto the market. The project has successfully used Europium (III) chelate labelled dengue virus NS1 monoclonal antibody microparticle-based lateral flow immunoassay strips, and uses the direction of the direction finding flow to excite the light source of a specific wavelength inside the reader and set the receiver. The longer-wavelength fluorescence is generated, and the instrument converts the image into a numerical value to determine the result. Compared with the commercial reagent signal value determined by the naked eye, better sensitivity can be found.

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，或者依需求作不同位置進行調整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。然而標定呈色方法能影響整體分析靈敏度，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。

本計畫目的即在研究發展創新標定檢驗方法，改善現有快速檢測試紙之敏感性，並搭配可攜式判讀儀器判讀結果。目前市面上針對傳染病快篩檢測儀，其設計方向為置於檢驗實驗室，將檢驗結果傳輸至實驗室資訊系統，雖然檢測結果準確，但卻價格相當昂貴。而在排卵或驗孕快篩試紙的領域，已有廠商開發出單/多次使用之掌上型讀取儀，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，將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)，將各式樣本 100ul 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，可直接顯示陰性或陽性結果於讀取儀螢幕上，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

以本署病媒病毒及立克次體實驗室所研發針對登革熱 NS1 蛋白之單株抗體，作為快速檢驗試紙測試對象。計畫初期初步測試以黑色乳膠粒子進行標定，可偵測四型登革熱模擬血清(以病毒培養上清液作為 NS1 偵測標的，稀釋於正常血清中)，但以無添加病毒上清液之正常血清進行測試，發現測試線出現非專一性反應(圖一)，而且經過測試不同條件降低非專一性反應，發現即使模擬不同血清濃度，降低陽性值反應線，仍無法避免正常血清之非專一性反應出現(圖二)，推測初步得到之反應線可能為非專一性反應。詳細觀察反應結果，由於黑色乳膠粒子顆粒較大(400 nm)，於快速檢驗試紙上移動結果，下方會出現粒子沉澱，影響反應線判讀，因此實驗方向放棄以黑色乳膠粒子做為標定方法，改以顆粒較小之膠體金(40 nm)，作為後續改良方向。

為降低非專一性反應，重新調整抗體排列組合，改以不同抗體作標定，並測試不同酸鹼度下，膠體金與抗體結合效果較好之 pH 值，測試結果以 pH6.5 與 pH7.0 情況下，膠體金與其中一株抗體結合效果最佳(圖三)，且添加表面活性劑後能去除正常血清之非專一性反應(圖四)。期中結果顯示，抗體組合初步僅能測得第一型與第二型登革熱之 NS1 抗原，仍需進一步改良條件，以偵測四型登革熱為目標。

計畫第二階段採用鎔螯合物 (europium III chelate, Eu[III] chelate) 奈米微球進行登革熱單株抗體螢光標示(圖五)，並將螢光呈色整併至側向流方式，訊號讀取系統包含螢光標定試條卡匣與讀取儀，透過安裝於電腦的程式對連線之讀取儀進行控制讀取。讀取儀可以選定不同的光源(白光、UV 光)，以達到記錄不同標定試條的需求(圖六)。

以正常未感染登革熱病毒之人類血清進行 2X 稀釋及 400X 稀釋病毒培養上清液加入正常血清進行模擬測試，2X 正常血清於 CDC 及 label S 測試/品管訊號比值分別為 2.8 及 2.3，2 者訊號比值結果類似(表一)。於登革熱一型病毒測試結果，CDC 與 label S 訊號比值分別為 20% 及 12.9%，登革熱二型病毒為 25.6% 及 5.3%，登革熱三型為 18.4% 及 14%，登革熱四型病毒為 16.7% 及 6%。實際影像結果於 2X 稀釋正常人血清及 400x 稀釋不同型別登革熱病毒如圖七。登革熱一型、二型、三型及四型病毒以 125x、200x、400x 稀釋倍率測試 CDC 與 label S 結果於圖八、九、十及十一。

當減少檢體稀釋倍數進行測試，即調高檢體濃度，CDC 及 label S 測試/品管訊號比值提高，登革熱一型病毒 CDC 由 20% 提高至 50%，label S 由 12.9% 提高至 38.5%，登革熱二型病毒 CDC 由 25.6% 提高至 37.6%，label S 由 5.3% 提高至 31.7%，登革熱三型病毒 CDC 由 18.4% 提高至 47.9%，label S 由 14% 提高至 29.2%，登革熱四型病毒 CDC 由 16.7% 提高至 31%，label S 由 6% 提高至 12.7%。但於登革熱二型 三型及四型 200X 稀釋出現較低之訊號比值(表一)。

4. 討論

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，已開始選用鎔螯合物 (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 excitation 以及 emission，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，以顯示陰性或陽性結果於讀取儀螢幕上，可多次使用之拋棄式可攜式讀取儀器，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。本計畫已開始諮詢國內生技廠商，使用快速檢驗試紙之讀取儀器，先以照相掃描系統開發原理，發展之快速檢驗試紙讀取儀，目前已有小型機台，搭配一般電腦軟體控制與分析結果，讀取儀器彈性調整空間較大，可接受不同規格之卡匣，另可依讀取數據結果作標準曲線之定量反應，並能輸出結果報告，保留快速檢驗試紙之完整結果，以符合臨床檢驗端品管之需求，且可攜式讀取儀已內建可見光偵測與紫外光偵測系統，對將來進一步提升靈敏度，轉變為螢光呈色，可以相同儀器進行偵測。由於本計畫研究團隊並非專業的儀器研發團隊，目前已與台灣全譜光學公司接洽，進行 TRF 微粒螢光訊號讀取儀之開發。

本研究以稀釋不同倍率之登革熱病毒檢體進行螢光檢測評估，主要

目的在於了解螢光標定的可行性及偵測靈敏度；相對於膠體金在肉眼無法直接辨識結果的濃度下，是否可藉由螢光判讀儀進行微量陽性結果的判讀，研究結果指出，在最高稀釋倍率(400X)稀釋樣本測試條件下，不同型別登革熱病毒之測試/品管(T/C)訊號比值結果，除登革三型病毒 CDC 及 label S 兩者訊號比相當外，其餘另 3 種登革病毒檢測結果，CDC 之訊號比值均較 label S 為高，2 者 T/C 倍率在登革熱一型、二型、四型分別為 1.6、4.8 及 2.8。顯見 CDC 具較高之檢測敏感度。此外，於高稀釋 400X 檢體下，使用 label S 試劑組檢測登革熱二及四型病毒檢體，已無法用肉眼清楚判別陽性反應結果，然 CDC 之開發試劑組仍可利用螢光訊號清楚判定陽性結果。初步測量結果顯示，針對相同檢體，同時比較市售商品化試劑(label S)，於不同稀釋倍率下分析檢驗線(test line)與品管線(control line)訊號比(表一)，螢光標定可順利執行檢測。受委託單位開發之儀器結合螢光訊號系統經實作測試，已可達到預期的初步結果，可將快篩試劑偵測結果由肉眼定性觀察進一步量化。

本研究目前仍有待改進之處，如目前測試檢體為登革熱病毒之培養上清液，尚未進行 NS1 蛋白定量之規範，此部分將是下一階段的目標；其次針對鎊(III)奈米微粒螢光標定登革熱病毒 NS1 單株抗體，以定量體積標示於側向流試紙上，目前做法是以手動方式以分注器標示，無法準確的進行品管控制，未來大量測試時，可透過機器噴頭設定標示定量體積及一定厚度之薄膜，進行批次品管監測。再者針對此項技術之專一性及敏感性，仍需進一步以大量實測血清進行分析評估。

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，與肉眼判定之商用試劑訊號值相較，可以發現有較佳的靈敏度。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，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

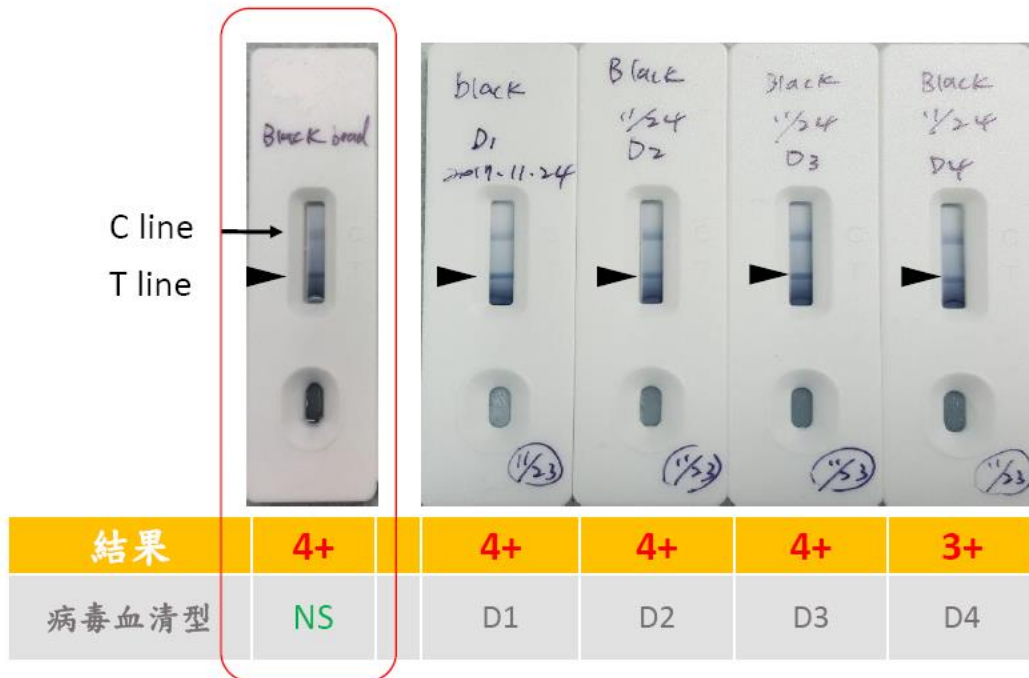
1. V. Gubala, L.F. Harris, A.J. Ricco, M.X. Tan, D.E. Williams, Point of care diagnostics: status and future, *Anal. Chem.* 2012; 84:487–515.
2. Navarro-Marí JM. Rapid diagnostic methods for acute viral respiratory infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016; 34: 329-30.
3. M. Sajid, A.N. Kawde, 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. 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.

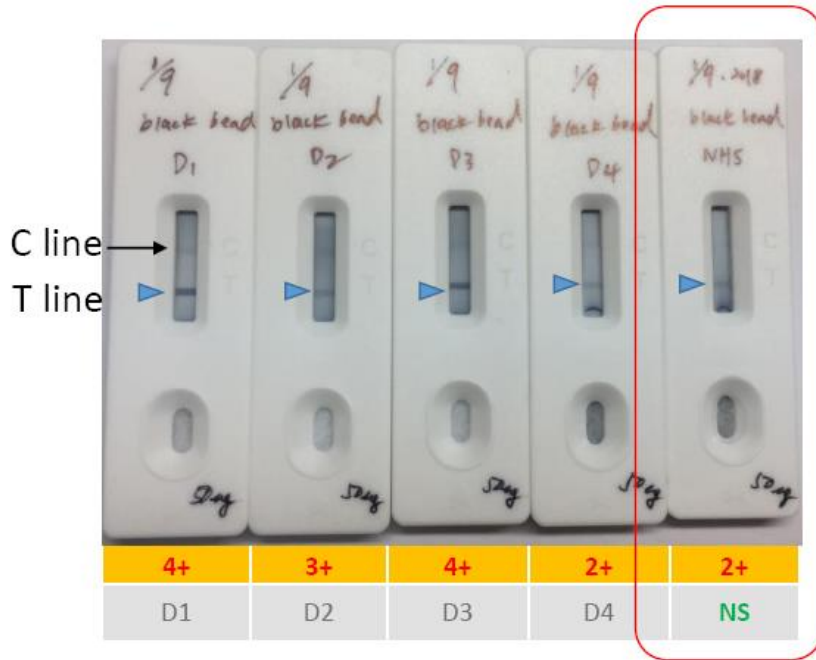
17. Liu J, Du B, Zhang P, Haleyurgirisetty M, Zhao J, Ragupathy V, Lee S, DeVoe DL, Hewlett IK. Development of a microchip Europium nanoparticle immunoassay for sensitive point-of-care HIV detection. *Biosens Bioelectron*. 2014; 61:177-83.

8. 圖、表

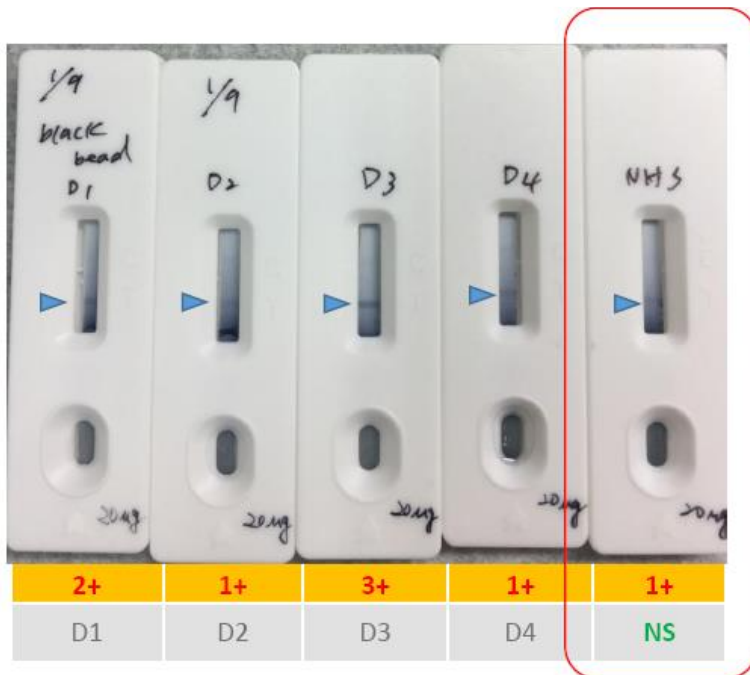


圖一：黑色乳膠粒子標示登革熱抗體側向流偵測結果

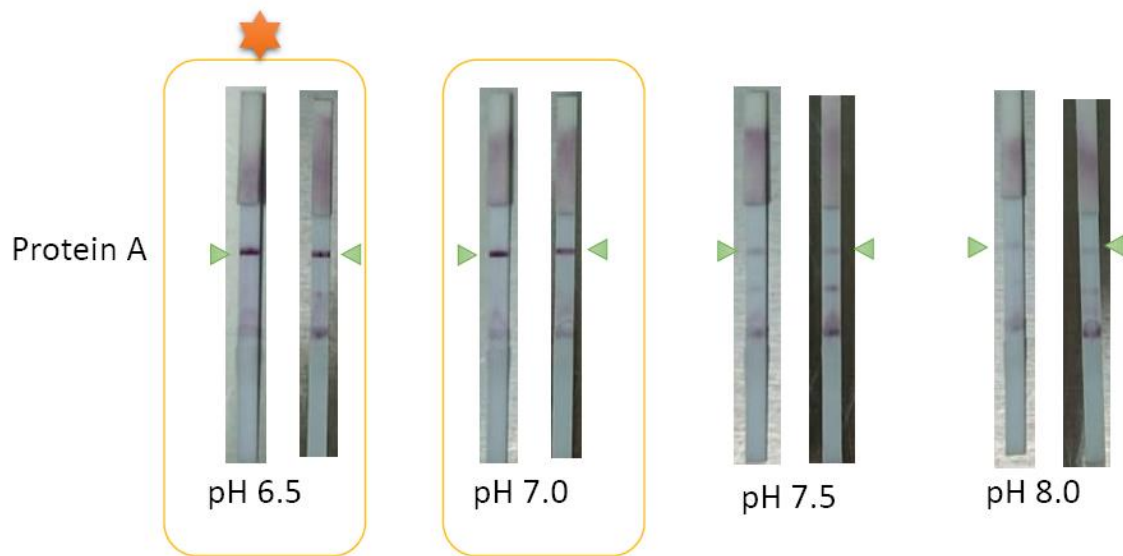
(A)



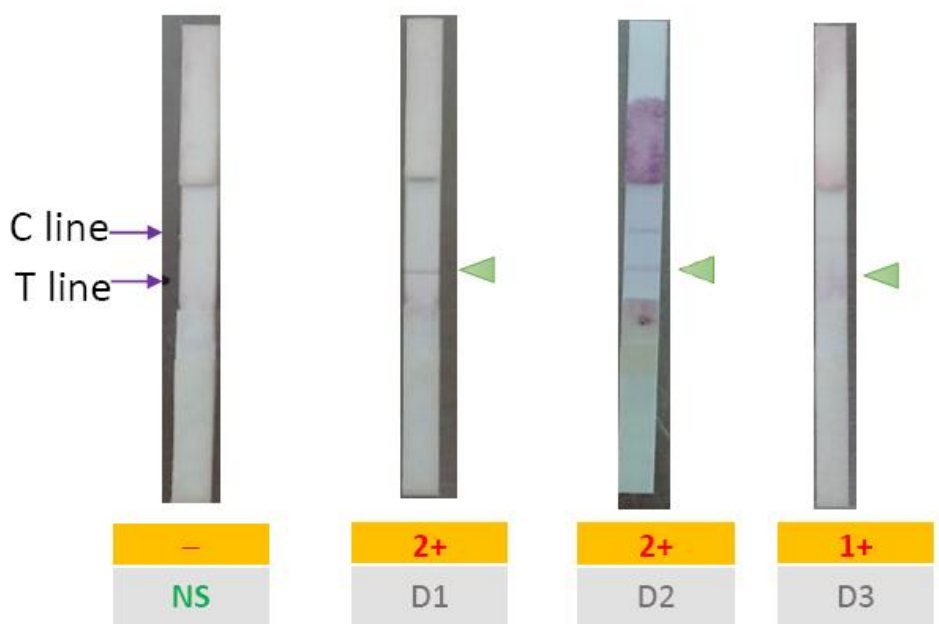
(B)



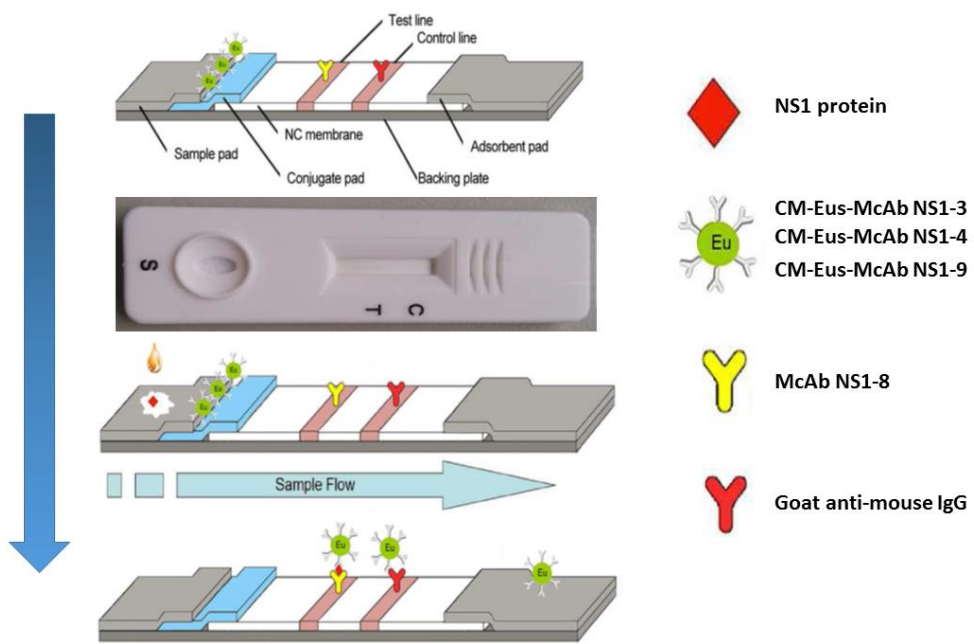
圖二: 黑色乳膠粒子標示(A)高濃度(B)低濃度登革熱抗體側向流偵測結果



圖三：膠體金粒子標示登革熱抗體於不同 pH 值條件偵測結果



圖四：評估膠體金粒子標示登革熱抗體添加界面活性劑之偵測結果

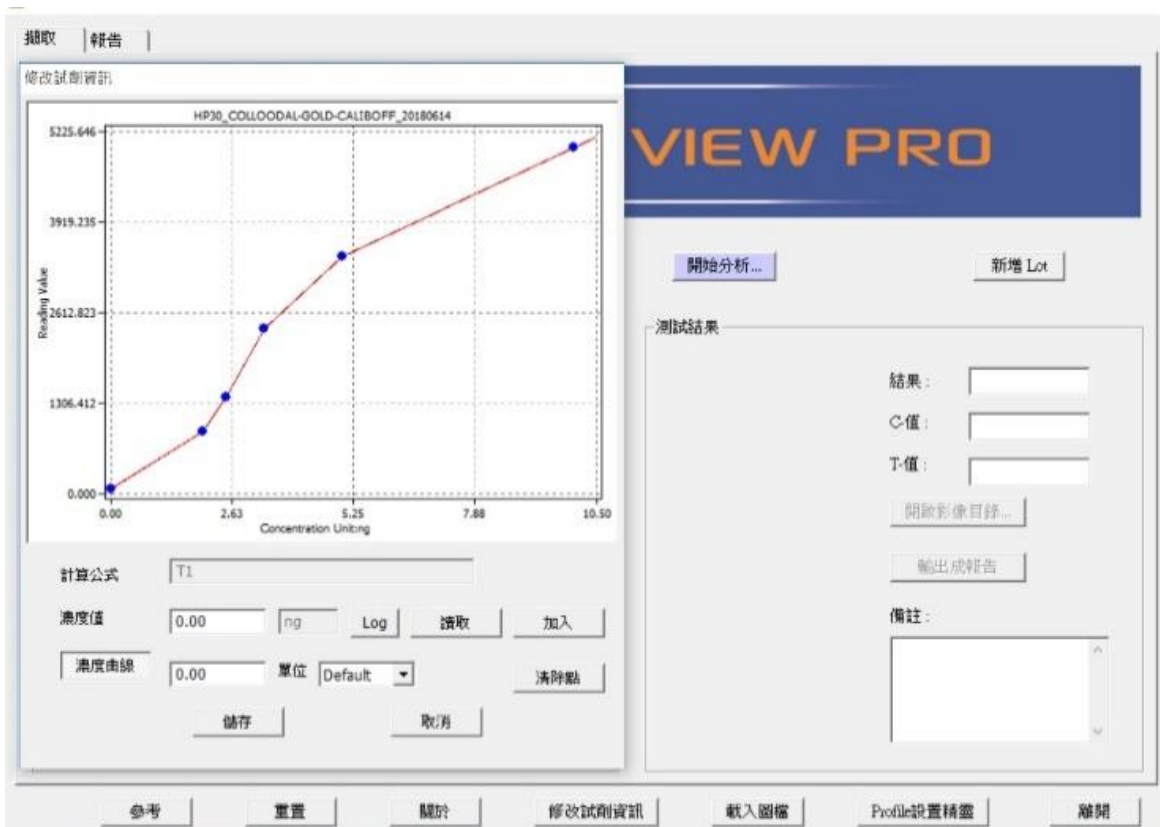


圖五 鎊螯合物奈米微粒側向流設計原理



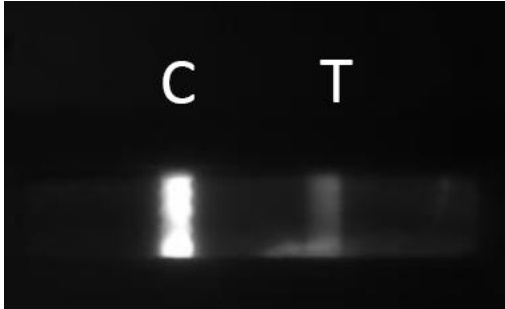

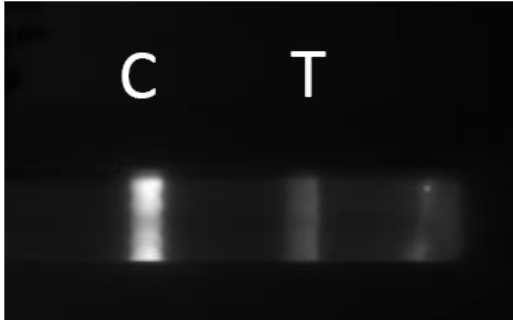

(A)



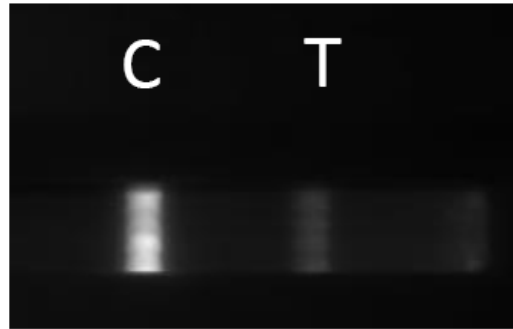
(B)



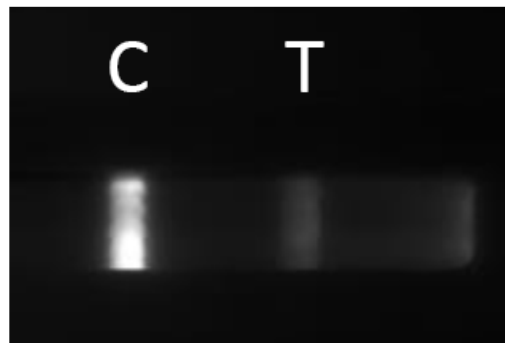
圖六 銻螯合物奈米微粒側向流(A)讀取儀(B)訊號讀取示意圖

Type	CDC	Label S
Normal serum (2X)		
D1 (400X)		
D2 (400X)		

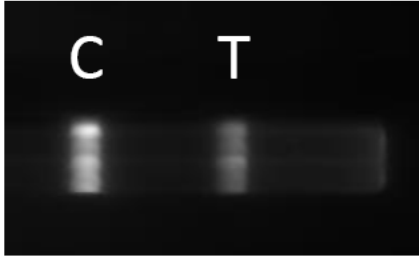

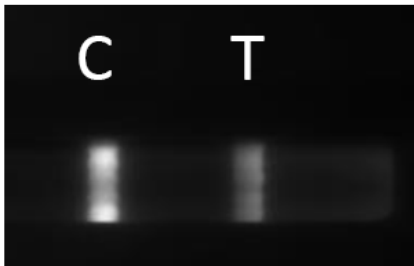
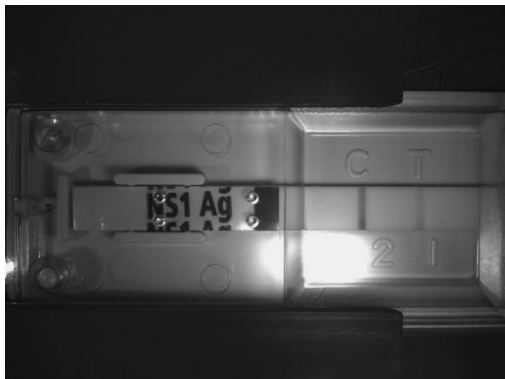
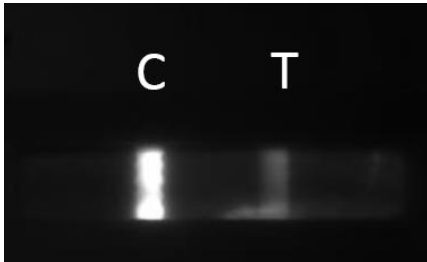

D3 (400X)



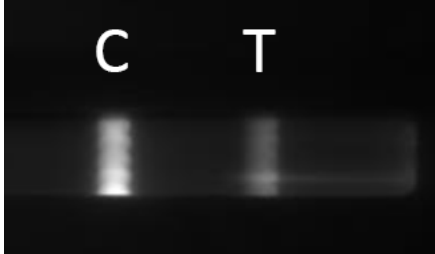
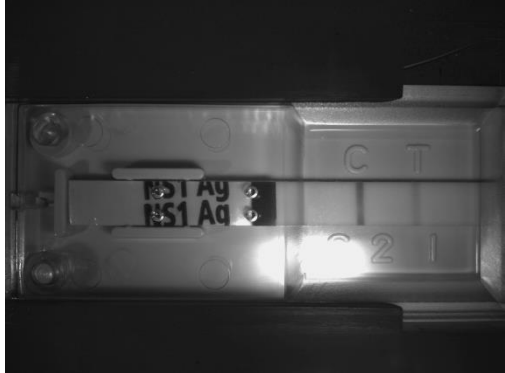
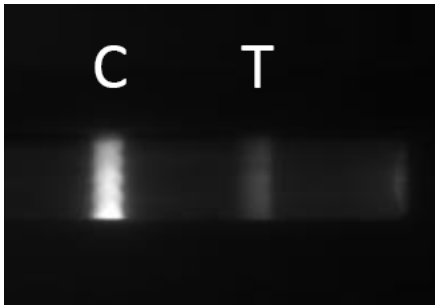
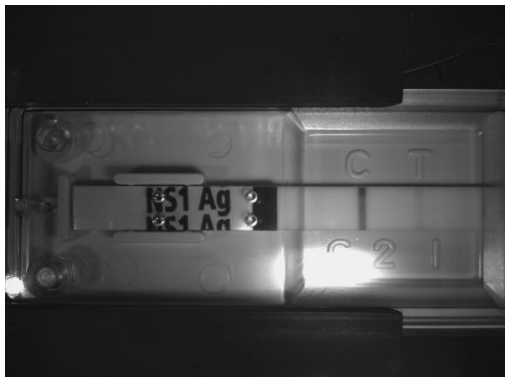
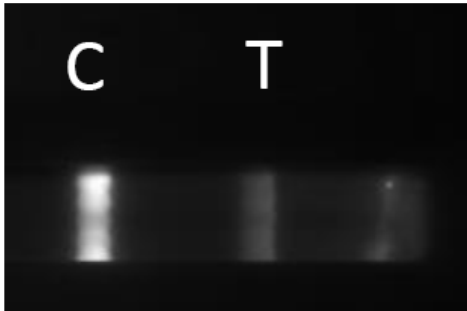

D4 (400X)



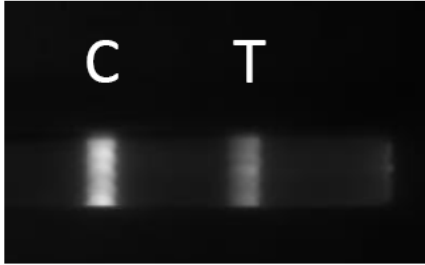

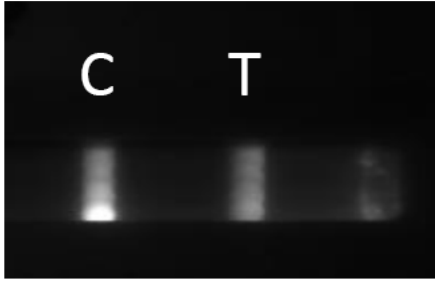

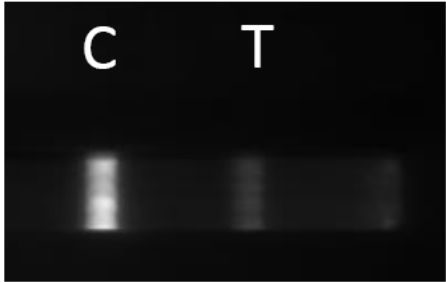

圖七 鎔螯合物奈米微粒與市售商用試劑之登革熱抗原測試結果(2X Normal serum 及 400X 稀釋測試檢體)

Type	CDC	Label S
D1 (125X)		
D1 (200X)		
D1 (400X)		

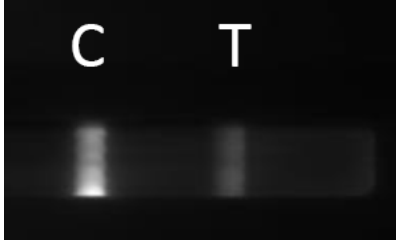

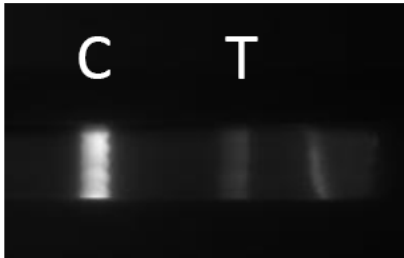
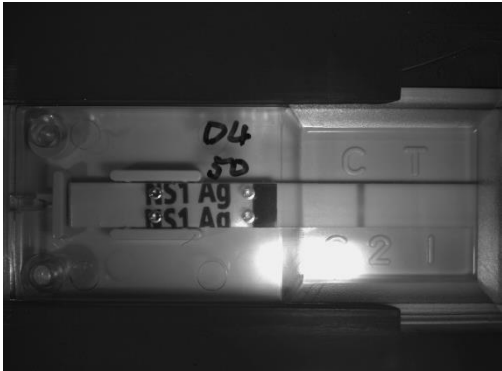
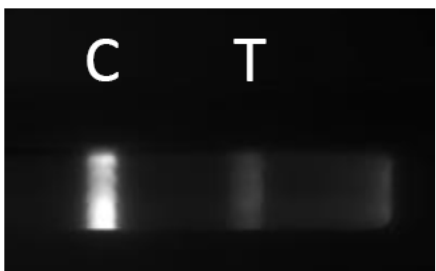

圖八 鎔螯合物奈米微粒與市售商用試劑評估登革熱一型病毒測試結果

Type	CDC	Label S
D2 (125X)		
D2 (200X)		
D2 (400X)		

圖九 鎔螯合物奈米微粒與市售商用試劑評估登革熱二型病毒測試結果

Type	CDC	Label S
D3 (125X)		
D3 (200X)		
D3 (400X)		

圖十 鎔螯合物奈米微粒與市售商用試劑評估登革熱三型病毒測試結果

Type	CDC	Label S
D4 (125X)		
D4 (200X)		
D4 (400X)		

圖十一 鎔螯合物奈米微粒與市售商用試劑評估登革熱四型病毒測試結果

表一：鎔螯合物奈米微粒與市售商用試劑螢光與可見光之測試訊號比

	Type	CDC (T/C) %	Label S (T/C) %
Normal serum	2x	2.8	2.3
D1	400x	20	12.9
	200x	47.7	25.6
	125x	50	38.5
D2	400x	25.6	5.3
	200x	18.1	16.3
	125x	37.6	31.7
D3	400x	18.4	14
	200x	59.5	18.5
	125x	47.9	29.2
D4	400x	16.7	6
	200x	14.1	5.6
	125x	31	12.7

衛生福利部疾病管制署 107 年科技研究計畫 期末審查意見回復

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-000304

計畫名稱：肝炎病毒分生親緣性分析方法之建立與評估

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	螢光 reader(現有 Sofia、Taidoc、Pacific Image 系統) 可以變成為 POCT 嗎?	謝謝委員意見,POCT 主要是要考量 reader 的價格成本,因此也會跟 reader 的檢測定位有關係因此只要成本符合考量,應該還是有機會成為 POCT。	
2	結果沒有線性關係,是否可行?	謝謝委員意見,目前的線性關係在不同濃度時確實是沒達到,在製程上有改進的空間,可以進一步把線性在濃度上的標準提升。	
3	TRF 與傳統螢光不同,TRF 是不用 filter 直接收光的。	謝謝委員意見,TRF 還是可以使用 filter 來取樣的,透過時間差也可以提高效果。	
4	請使用 excitation 和 emission,不要使用入射波及吸收波請修正	謝謝委員意見,已修正。	p13
5	Reader 是用於篩檢或判定,需考慮相關實際需求。	謝謝委員意見,Reader 確實是可以依篩檢或判定的需求來建置,可以符合實際需求。	
6	Eu ³⁺ 的 TRF 有其優勢,不過要注意其使用限制與歐盟環保法規。	謝謝委員意見,不同的微粒分子的特性確實有需要考慮除了檢測功能效用的部分,因此會進一步了解環保課題。	

備註:請將此表單附在計畫書後方,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。