

A型流行性感冒病毒快速診斷試劑效能評估調查研究

林佳蓓 高明輝 方怡雅 王德原 羅吉方

研究檢驗組

摘要

2009年一種新型流感病毒於美洲爆發，並散播至世界各國造成大流行。為了有效監控病情與防疫，醫療單位利用流行性感冒病毒快速診斷試劑以進行篩檢與監控。國內現行之流行感冒快速檢測試劑列為第一級醫療器材，上市販售前只需文件審查。

本研究以先前執行「B型肝炎表面抗原」、「C型肝炎抗體」等血液病毒篩選用之第三等級體外診斷試劑效能評估之模式運用於流行性感冒病毒快速診斷試劑之效能評估；因A型流行感冒病毒之變異較快，症狀亦較為嚴重，故本研究著重於「A型流行性感冒病毒快速診斷試劑效能評估調查研究」之品質調查。

99年度抽驗22品項，共45件市售流感快速診斷檢測試劑。本研究將流感病毒與血凝素(HA)標準品稀釋至各特定濃度，並依據各產品仿單進行操作，以檢示產品對不同濃度標準品之靈敏度反應。實驗結果顯示，其中有44件產品之靈敏度檢驗結果與其仿單標示不相符。上述結果顯示，利用快速診斷試劑進行篩檢雖可立即獲得檢驗結果，但可能因檢驗產品本身效能的不足而造成檢驗結果的不精確，進而導致流感防疫之漏洞。

關鍵詞：流感病毒、快速診斷試劑、後市場調查

前言

流行性感冒，簡稱流感，是由流行性感冒病毒(簡稱流感病毒)所引起的急性呼吸道疾病，病毒體呈球形，直徑在80至120 nm間。流感病毒屬於正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)，病毒結構自內而外可分為核心、基質蛋白及包膜三部分⁽¹⁾。流感病毒通常是透過空氣中的飛沫傳播而進行感染，其潛伏期約1至4天。此疾病好發於各年齡層，對大部份健康成年人而言，通常可在3-7天內會康復⁽²⁾。流感為具有明顯季節性特徵之流行疾病，而在台灣雖然全年皆有病例發生，但仍以秋冬季節較容易發生流行⁽³⁾。流感除了爆發快速、散播範圍廣泛外，還會產生嚴重併發症及死亡，尤其是老年人、幼童、免疫功能不全者，以及患有

心、肺、腎臟及代謝性疾病者，應及早防治，以避免感染後合併嚴重併發症或死亡之風險^(2,4)。

流感病毒根據其核蛋白的抗原性可以分為A型流感病毒(Influenza A virus)、B型流感病毒(Influenza B virus)與C型流感病毒(Influenza C virus)。其中以A型流感病毒因容易產生變異，故A型流感病毒具有許多亞型並容易引起區域性流行或全球性流行，也是最常見的流感病毒。B型流感病毒雖然也會引起區域性流行，但規模與症狀常不及A型流感病毒來的嚴重；至於C型流感病毒所造成之症狀則較為輕微，甚至無症狀，至今並無造成大流行之記錄^(1,3)。不同亞型之A型流感病毒具有不同之血凝素(Hemagglutinin or HA)和神經氨酸酶(Neuraminidase or NA)，故常作為區分病毒株亞型的依據。目前僅確定A型流感病毒共有

16種血凝素(HA，以H1、H2...H16區別)及9種神經氨酸酶(NA，以N1、N2...N9區別)，故命名上便以H1N1、H2N2依此類推來命名。過去流行病學上僅確定H1N1、H2N2、H3N2等3種亞型會於人類間感染，且均曾造成大流行。另外H5N1禽流感雖然暫時未有人類之間互相傳染的證據，但世界各地衛生部門正密切關注其引起世界大流行的可能性⁽¹⁻⁴⁾。

2009年3月底，一種含有人類流感病毒基因、豬流感與禽流感病毒基因的的新型H1N1流感(以下簡稱H1N1新流感)由北美開始爆發，導致多人染病與死亡，後來更有不斷蔓延的趨勢，並且引發全球性流行。同年6月11日，世界衛生組織(WHO)因應H1N1新流感疫情，將流感大流行警戒提升為第六級⁽⁵⁻⁷⁾。

爲了因應H1N1新流感的大流行，衛生署與疾管局確立流感快速診斷試劑作爲第一線臨床診斷的手段。隨著越來越多的疑似病例被發現，各廠商亦大量進口各國生產製造之流感快速診斷試劑，以因應防疫所需⁽⁸⁾。

相較於其他檢驗流感病毒之技術，流感快速診斷試劑爲可普遍於基層醫療院所進行快速篩檢之技術。然而國內現行之流行感冒快速檢測試劑僅列爲第一級醫療器材，上市販售前只需文件審查。故該產品不論於上市前與上市後，國內皆缺乏相關機制有效監控品質。研究報告與臨床檢驗上並陸續提出各項資料與數據質疑該類診斷試劑的靈敏度與正確性，因此流感快速診斷試劑之品質良莠，與是否能有效控制流感具有密切關係^(9,10)。

本計畫涵蓋目前國產3種及輸入19種之具有有效許可證產品共22品項，每種產品至少抽購1-3個不同生產批次以進行試驗分析。計畫目的爲監測該類試劑品質與效能，並作爲後續訂定該類產品靈敏度國家標準規格之參考。

材料與方法

一、材料

(一)流行性感胃快速診斷試劑：

本計畫涵蓋國產及輸入之產品共22品項，3項爲國產產品(試劑A-C)，而輸入產品共19項(試劑D-V)，其中包含陸輸產品3項(試劑D-F)。每項產品抽購1至3個不同的生產批次，總抽樣件數爲45件，以進行試驗分析(表一)。本研究利用由NIBSC所購買的HA(血凝素)標準品進行序列稀釋，另外由長庚大學所分讓之流感病毒進行定量與序列稀釋，並依各廠牌仿單建議選用HA標準品或流感病毒稀釋液進行效能評估與靈敏度檢測。

(二)HA標準品

1. Influenza Antigen A/California/7/2009 (H1N1) (NYMC-X179A) (Egg Derived) (NIBSC code: 09/146)
2. Influenza Antigen A/Victoria/210/2009 (H3N2) (NYMCX-187) (NIBSC code: 10/102)

(三)流感病毒標準品(由長庚大學新興病毒感染研究中心分讓)

1. A/Taiwan/9042/2008 (H3N2) virus : $10^{8.23}$ CCID₅₀/mL
2. A/Taiwan/439/2009 (H1N1) virus : $10^{6.3}$ CCID₅₀/mL

二、方法

流行性感胃快速診斷試劑效能評估

1. HA標準品稀釋：

取得Influenza Antigen A/California/7/2009 (H1N1) HA及Influenza Antigen A/Victoria/210/2009 (H3N2) HA，並利用待檢測產品所搭配之稀釋液(Diluted buffer)進行序列稀釋，分別得到9-11個濃度的稀釋階，對照組爲各待檢產品之原廠稀釋緩衝液(表二)。

2. 流感病毒標準品稀釋：

由長庚大學新興病毒感染研究中心分讓A/Taiwan/9042/2008 (H1N1) virus (以下簡稱H1N1 A型流感病毒)與A/Taiwan/439/2009 (H3N2) virus (以下簡稱H3N2 A型流感病

表一、流行性感冒快速診斷試劑檢體

產品代號	批號	效期	產品代號	批號	效期
A	MS19A21	2011.03.31	K	11321910	2011.11.03
	MS19A71	2011.03.31		11321911	2011.11.15
	MS19A81	2011.03.31		11321912	2011.11.24
B	990510-06	2011.11.30	L	FLU9090087	2011.09.30
	990629-01	2011.12.31	M	911067A	2011.11.30
	990928-07	2012.03.31		912150A	2011.12.31
C	10072609	2012.07.30		1008201	2012.08.31
D	9341551	2010.11.24	N	Z-031	2011.09
				Z-036	2012.01
E	AB091102	2011.10.31			Z-037
	AB100501	2012.04.30	O	43842	2011.10.05
	AB100502	2012.04.30	P	Z031	2011.09
F	FLU00880002	2011.10.30	Q	INF101109	2011.11.08
	21825	2011.03	R	69043	2011.04.16
21888	2011.03	69041		2011.11.04	
81929	2011.03	69042		2011.11.11	
H	W7100401	2012.04.30	S	1031/069039-U	2011.11.30
	W7100402	2010.04.30	T	169111	2011.02.28
	W7100403	2010.04.30	U	706058	2011.12.07
I	091511A	2011.01		705960	2011.08.07
			706067	2011.09.07	
J	731230.075	2011.04.26	V	RM91006	2010.12
	751230.082	2011.04.26		RM91108	2011.01
				RM91210	2011.02

毒)，經定量後以MEM或原廠稀釋液進行序列稀釋，分別得到6-8個濃度的稀釋階，並以MEM或原廠稀釋液作為對照組(表三)。

本實驗操作步驟依據各產品之仿單來進行，每批次試驗中，標準品之各個稀釋濃度及陰性對照組各進行1至3個重覆。最後依據原廠仿單建議判讀時間與方法，同時由兩位同仁進行判讀，以減少人為誤差。

結 果

99年度抽驗22品項，共45件流感快速診斷試劑組；依照各廠牌仿單的說明，選用HA標準品稀釋液或流感病毒標準品稀釋液進行產品的效能評估(表四)。

一、利用定量之流感病毒稀釋液(H1N1與H3N2)對流感病毒快速診斷試劑進行效能評估研究

結果指出，國產試劑A、B、C對於H1N1 A型流感病毒溶液的檢測靈敏度分別是 $10^{5.3}$ CCID₅₀/mL、 $10^{6.3}$ CCID₅₀/mL與 $10^{6.3}$ CCID₅₀/mL，而對於H3N2 A型流感病毒溶液的檢測靈敏度均為 $10^{6.23}$ CCID₅₀/mL。本研究抽購之A、B、C試劑各批次對本研究所使用之流感病毒檢體並無發生批次內或批次間的反應不一致，顯示各產品的品管之一致性。各試劑抽購批次雖然可偵測高濃度之流感病毒檢體，但無法偵測低濃度之流感病毒檢體，且亦無達到仿單所宣稱之檢測靈敏度。

利用流感病毒稀釋液檢測由中國輸入(陸輸)

表二、HA標準品稀釋階

Influenza Antigen A/ California/7/2009 (H1N1)		Influenza AntigenA/ Victoria/210/2009 (H3N2)	
A (H1N1)	STD	A (H3N2)	STD
原始濃度	(ng/mL)	原始濃度	(ng/mL)
	50000		13000
	5000		6500
	1000		3250
	500		2000
	100		1000
50000	100	26000	500
ng/mL	50	ng/mL	100
	5		50
	0.5		5
	0.25		0.5
			0.25
陰性對照組	該廠緩衝液	陰性對照組	該廠緩衝液

之流感快速診斷試劑則發現，試劑D對於H1N1 A型流感病毒稀釋液與H3N2 A型流感病毒稀釋液的濃度檢測極限分別約 $10^{5.3}$ CCID₅₀/mL與 $10^{6.23}$ CCID₅₀/mL。試劑E對於H3N2 A型流感病毒稀釋液的檢測靈敏度約於 $10^{6.23}$ CCID₅₀/mL，但對於H1N1 A型流感病毒稀釋液的靈敏度測試卻有批次間不一致之現象，其檢測結果顯示抽驗批次1之靈敏度約為 $10^{6.3}$ CCID₅₀/mL，而批次2與3則均為 $10^{5.3}$ CCID₅₀/mL。各產品之抽購批次雖可偵測高濃度之流感病毒檢體，但無法偵測低濃度之流感病毒檢體，且無達到仿單所分別宣稱的檢測靈敏度。

輸入試劑G、H、J、K之所有抽驗批次對H1N1 A型流感病毒之檢測靈敏度均為 $10^{5.3}$ CCID₅₀/mL，對H3N2 A型流感病毒之檢測靈敏度均為 $10^{6.23}$ CCID₅₀/mL；而輸入試劑I對H1N1 A型流感病毒之檢測靈敏度均為 $10^{6.3}$ CCID₅₀/mL，對H3N2 A型流感病毒之檢測靈敏度為 $10^{7.23}$ CCID₅₀/mL；輸入試劑J的兩個批次對H1N1 A型流感病毒之檢測靈敏度均為 $10^{5.3}$ CCID₅₀/mL，批次1對H3N2 A型流感病毒之檢測靈敏度為 $10^{7.23}$ CCID₅₀/mL，批次2對H3N2 A型流感病毒之檢測靈敏度為 $10^{6.23}$ CCID₅₀/mL，即批次間出現結果不一致現象。上述各試劑之檢驗結果與其仿單所

表三、流感病毒溶液稀釋液

A/Taiwan/439/ 2009 (H3N2) virus		A/Taiwan/9042/ 2008 (H1N1) virus	
A (H3N2)	STD	A (H1N1)	STD
原始濃度	(CCID ₅₀ /mL)	原始濃度	(CCID ₅₀ /mL)
	$10^{7.23}$		$10^{5.3}$
	$10^{6.23}$		$10^{4.3}$
	$10^{5.23}$	$10^{6.3}$	$10^{3.3}$
$10^{8.23}$	$10^{4.23}$	TCID ₅₀ /mL	$10^{3.3}$
CCID ₅₀ /mL	$10^{3.23}$		$10^{2.3}$
	$10^{2.23}$		$10^{1.3}$
	$10^{1.23}$		
陰性對照組	MEM	陰性對照組	MEM

宣稱之靈敏度不相符。

輸入試劑T、U與V的抽購批次產品對H1N1 A型流感病毒之檢測靈敏度均為 $10^{5.3}$ CCID₅₀/mL；而上述試劑對H3N2 A型流感病毒之檢測靈敏度約均為 $10^{6.23}$ CCID₅₀/mL，亦無發生批次間與批次內不一致之現象。

二、利用NIBSC國際標準品對流感病毒快速診斷試劑進行效能評估研究

以不同稀釋濃度之Influenza Antigen A/California/7/2009 (H1N1) HA標準品(以下簡稱H1N1 HA標準品)對試劑M、N及O進行試驗。試劑M、N所抽驗的批次產品對於500 ng/mL以上之標準品均一致判讀為有反應，然而當HA濃度稀釋至100 ng/mL以下，則一致呈現陰性反應。故推測試劑M與N對H1N1 A型流感病毒之HA抗原之靈敏度皆約為500 ng/mL，而試劑O經檢驗測得之靈敏度約為1000 ng/mL。雖然上述產品均可偵測流感病毒抗原，但卻無達到仿單所標示之檢測靈敏度。

利用Influenza Antigen A/Victoria/210/2009 (H3N2) HA標準品(以下簡稱H3N2 HA標準品)對試劑M、N及O進行試驗。試劑N與O所抽驗的所有批次產品對於1000 ng/mL以上之標準品均一致判讀為有反應，然而當HA濃度稀釋至500 ng/mL

表四、各產品之偵測靈敏度

來源	品項	批次數	靈敏度		備註
			H1N1	H3N2	
國產	A	3	10 ^{5.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} CCID ₅₀ /mL	-
	B	3	10 ^{6.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} CCID ₅₀ /mL	批次內不一致
	C	1	10 ^{6.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} CCID ₅₀ /mL	-
陸輸	D	1	10 ^{5.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} CCID ₅₀ /mL	-
	E	3	10 ^{5.3} -10 ^{6.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} CCID ₅₀ /mL	批次間不一致
	F	1	500 ng/mL	500 ng/mL	-
其他 國家 輸入	G	3	10 ^{5.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} CCID ₅₀ /mL	-
	H	3	10 ^{5.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} CCID ₅₀ /mL	-
	I	1	10 ^{6.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{7.23} CCID ₅₀ /mL	-
	J	2	10 ^{5.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} -10 ^{7.23} CCID ₅₀ /mL	批次間不一致
	K	3	10 ^{5.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} CCID ₅₀ /mL	-
	L	1	10 ^{6.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{7.23} CCID ₅₀ /mL	-
	M	3	500 ng/mL	1000 ng/mL	批次內不一致
	N	3	500 ng/mL	1000 ng/mL	-
	O	1	1000 ng/mL	1000 ng/mL	-
	P	1	1000 ng/mL	6500 ng/mL	-
	Q	1	500 ng/mL	3250 ng/mL	-
R	3	500 ng/mL	500 ng/mL	-	
S	1	500 ng/mL	500 ng/mL	-	
T	1	10 ^{5.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} CCID ₅₀ /mL	-	
U	3	10 ^{5.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} CCID ₅₀ /mL	-	
V	3	10 ^{5.3} CCID ₅₀ /mL	10 ^{6.23} CCID ₅₀ /mL	-	

以下，則一致呈現陰性反應。故推測試劑N與O對H3N2 A型流感病毒之HA抗原之靈敏度皆約為500 ng/mL，而試劑M的抽驗批次產品於HA標準品濃度3250 ng/mL以上均可判定為有反應，然而當HA濃度為降為1000 ng/mL時，則會出現批次間與批次內不一致結果，而利用HA標準品濃度為500 ng/mL時，所有抽購批次均一致判讀為陰性，故推測試劑M對A型流感病毒抗原之靈敏度約為1000 ng/mL。雖然上述產品均可偵測流感病毒抗原，但卻無達到仿單所標示之檢測靈敏度。

針對未標明靈敏度之產品，本研究利用流感

病毒HA標準品進行檢測。其中試劑F、Q、R、S之抽購批次對H1N1 HA標準品之靈敏度為500 ng/mL，而試劑P之抽購批次對H1N1 HA標準品之偵測極限則為1000 ng/mL。試劑F、R、S的抽購批次對H3N2 HA標準品之靈敏度均為500 ng/mL，而試劑P與Q之抽購批次對H3N2 HA標準品之靈敏度則分別為6500 ng/mL與3250 ng/mL。

討論

一、在利用流感病毒抗原HA進行效能評估試驗中發現，所有抽驗試劑均未達到其仿單所宣稱

靈敏度。結果已交醫粧組，以進行後續行政作業及研議產品管理相關措施。

二、目前市面販售之流感快速診斷試劑於其仿單上所標示之靈敏度與產品本身之效能不相符。在利用流感病毒稀釋液進行效能評估試驗中顯示，產品實測之靈敏度約為 10^5 - 10^7 CCID₅₀/mL，而產品仿單標示之靈敏度則落在 10^2 - 10^4 CCID₅₀/mL，故產品實測之靈敏度與仿單標示不相符。在利用流感病毒抗原HA進行效能評估試驗中發現，產品實測之靈敏度約為500-6500 ng/mL，而產品仿單標示之靈敏度則落在0.15-100 ng/mL，故顯示產品之靈敏度遠不及其仿單所標示。仿單標示之效能會影響醫療院所對流感快速診斷試劑之選擇，並進一步影響將來對病人的治療策略，因此對於流感快速診斷試劑是否需要更嚴格的控管與其是否適合列為第一級醫療器材尚待考量。

三、由於第一級醫療器材在查驗登記過程中並不需要附上產品的靈敏度，因此本次抽購之部分產品(試劑套組F、P、Q、R及S)並無標示靈敏度。產品未標示靈敏度會造成管理政策上的困難，藥政主管機關對於產品品質的管控也無依循的標準，因此將來是否變更登記，請廠商附上產品靈敏度有待研議。

四、試劑套組E及J於本次效能評估中出現批次間不一致的現象，顯示其產品之原料品質控管有再檢討之必要。

參考文獻

1. 行政院衛生署疾病管制局。季節性流感防治工作指引。2008。行政院衛生署疾病管制局，台北。
2. 行政院衛生署疾病管制局。季節性流感及流感併發重症教材。2008。行政院衛生署疾病管制局，台北。
3. 行政院衛生署疾病管制局。H1N1新型流感臨床治療指引。2009。行政院衛生署疾病管制

局，台北。

4. WHO. The Weekly Epidemiological Record 2005. 80 (49/50): 428-431.
5. Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G. and Kawaoka, Y. 1999. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 9345-9350.
6. Hurt, A. C., Baas, C., Deng, Y. M., Roberts, S., Kelso, M. and Baar, I. G. 2009. Performance of influenza rapid point-of-care tests in the detection of swine lineage A (H1N1) influenza viruses. Influenza Other Respi. Viruses 3: 171-176.
7. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood, F. S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M. W., Lindstrom, S., Garten, R. J., Gubareva, L. V., Xu, X., Bridges, C. B., and Uyeki, T. M. 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N. Engl. J. Med. 360: 2605-2616.
8. Cunningham, J. 2010. Use of influenza rapid diagnostic tests. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599283_eng.pdf].
9. Balish, A., Warnes, C. M., Wu, K. et al. 2009. Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) virus-United States. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 58: 826-829.
10. Faix, D. J., Sherman, S. S. and Waterman, S. H. 2009. Rapid-test sensitivity for novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N. Engl. J. Med. 361: 728-729.
11. World Health Organization. 2009. CDC protocol of realtime RT PCR for swine influenza A (H1N1). [<http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html>].

Post-Market Surveillance for the Performance of Influenza A Rapid Test In Vitro Diagnostic Devices

CHIA-PEI LIN, MING-HUI KAO, YI-YA FANG, DER-YUAN WANG AND
CHI-FANG LO

Division of Research and Analysis

ABSTRACT

Influenza, commonly referred to as the flu, is an infectious disease that affects birds and mammals. Influenza spreads around the world in seasonal epidemics, resulting in thousands of deaths of people every year, up to millions in some pandemic years. In April 2009, an A (H1N1) influenza virus of swine lineage was detected in humans in the USA, and in just over a month has infected over 10,000 people in more than 40 countries. The type A viruses are the most virulent among all influenza types and cause severe disease. There are primarily two influenza A virus subtypes (H3N2 and H1N1) infecting humans worldwide during the past several decades.

For the patient's well being and for the prevention of virus spread throughout the community, an early influenza diagnosis is required. Influenza A rapid test in-vitro diagnostic devices are the fastest diagnostic tools for the detection of influenza viruses currently. However, the Influenza rapid test in-vitro diagnostic devices were categorized into class 1 (low risk) medical devices in Taiwan. The registration and approval procedures for class 1 medical device imports in Taiwan are not as strict as that for other classes.

We have evaluated the performance of several widely available influenza rapid test in-vitro diagnostic devices in Taiwan. Swine lineage A (H1N1) and the human seasonal influenza strain (H3N2) were cultured, and the cultured viruses and influenza hemagglutinin (HA) were diluted to specific infectivity titres. Viral and HA dilutions were assayed using the rapid test in-vitro diagnostic devices. The study indicated that most of the products detected virus or HA only when they were presented at high concentrations. Early diagnosis of infection can assist in the rapid management. However, the tests are not as sensitive as PCR assays and as such, negative results should be verified by a laboratory test.

Key words: influenza virus, rapid test in vitro diagnostics, post-market surveillance