



台灣藥物法規  
資訊網法規公告



台灣藥品  
臨床試驗資訊



TFDA 藥物  
食品安全週報



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

## 新型冠狀病毒核酸檢測方法之現行國際標準與各國指引規範

楊孟庭<sup>1</sup>

### 前言

嚴重特殊傳染性肺炎(Coronavirus Disease 2019, COVID-19)的快速肆虐，成為目前國際公共衛生的棘手問題，為了能降低新型冠狀病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2)的傳播，國際組織和各國莫不藉由各種疫情監控工具以利有效地管控疫情。而在臨床上，體外診斷試劑的使用為監控 SARS-CoV-2 感染傳播的重要工具，其中核酸檢測方法在 SARS-CoV-2 檢驗扮演重要的角色，針對核酸檢測方法的規範與品質要求將至為重要。因此，本文參考現行國際標準化組織(International Organization for Standardization, ISO)、世界衛生組織(The World Health Organization, WHO)、歐盟、英國、韓國及我國衛生主管機關對於 SARS-CoV-2 核酸檢測方法的文件，聚焦於核酸檢測方法之相關指引、規範與建議內容並加以整理討論。

### ISO/TS 5798:2022 標準對 SARS-CoV-2 核酸檢測方法之規範與建議

#### 一、標準適用範圍與核酸檢測方法介紹

##### (一)標準適用範圍

ISO 於 2022 年 4 月發表「體外診斷試驗系統- 藉由核酸擴增檢測方法偵測 SARS-CoV-2 之規範與建議(第一版)(In vitro diagnostic test systems — Requirements and recommendations for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by nucleic acid amplification methods (First edition))」<sup>[1]</sup>，針對使用核酸擴增方式偵測人類樣本中 SARS-CoV-2 之分析方法，提供製造業者、自行開發

1 財團法人醫藥品查驗中心醫療器材組



試劑之實驗室、檢測之實驗室等單位應注意之建議與規範，其適用於醫學實驗室、體外診斷試劑開發與製造業者、研究 SARS-CoV-2 之機構和組織的人類樣本，但不適用於環境樣本。

首先，該標準先就不同核酸擴增方法進行介紹，接著建議製造業者、自行開發試劑之實驗室或檢測實驗室，須在試驗前、試驗中及試驗後進行品質屬性評估，包含設計、開發、驗證、確效及執行，最後，亦提供製造業者或自行開發試劑之實驗室於設計試驗時，可以優化試劑和方法的考量事項，以及執行檢測之實驗室在產出報告結果時，應注意呈現的方式。

## (二)核酸檢測方法介紹

核酸擴增試驗(Nucleic acid amplification test, NAAT)可以用以偵測樣本所含的 SARS-CoV-2，而不同 NAAT 方法各有其優點與使用限制，進而影響試驗品質，故進行試驗前須依據預期用途決定合適的測試方法，不同方法之描述請詳見表一。

表一、核酸擴增技術<sup>[1]</sup>

NAAT 方法名稱	名稱縮寫	方法描述
聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction)	(RT)PCR	RT-PCR 技術為使用反轉錄酶自 RNA 合成互補 DNA (cDNA)，再使用兩個寡核苷酸引子辨認特定序列與啟動聚合酶，透過重複循環的溫度變化達到變性、黏合及延長反應，最終可生成足夠的 SARS-CoV-2 RNA 目標序列之雙股 DNA 複製物。
即時定量聚合酶連鎖反應 (Real time quantitative polymerase)	(RT)qPCR	RT-qPCR 技術為使用同時可進行溫度循環與偵測擴增子生成反應之儀器，過程中運用螢光 DNA 黏合染劑或特殊標記寡核苷酸探針，經反轉錄與 PCR 以測量每個反應的目標 RNA，可降低操作時間並將實驗自動化。



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

chain reaction)		RT-qPCR 是目前用於 SARS-CoV-2 RNA 偵測的主要方法。
數位聚合酶連鎖反應 (Digital polymerase chain reaction)	(RT)dPCR	RT-dPCR 技術使用限數稀釋法(limiting dilution)將模板稀釋，製造出上萬個次奈升級的反應(sub-nanoliter reactions)，由於稀釋倍數很大，所以部分反應可能不含待測模板。接續利用 qPCR 的偵測策略區分陽性及陰性的反應。
恆溫環型擴增法 (Loop-mediated isothermal amplification)	(RT)LAMP	RT-LAMP 技術為使用 4 到 6 個引子啟動 DNA 聚合酶，內引子被設計用於結合與啟動 DNA 合成，且其 5' 端與引子下游序列互補。單股分子因上游引子髮夾結構形成而被生成，環狀引子會與髮夾結構結合並加速反應。RT-LAMP 方法結合兩種步驟於一個單一反應中，但與 PCR 不同處為 LAMP 是在單一溫度條件下進行反應。
重組酶聚合酶擴增 (Recombinase polymerase amplification)	(RT)RPA	RT-RPA 與 PCR 應用相似的啟動策略，但是在單一溫度條件下進行，使用多種蛋白質(包含重組酶、DNA 聚合酶、單股結合蛋白)以促使引子結合、延長與 DNA 股分離。
轉錄媒介之擴增反應 (Transcription mediated amplification)	TMA	TMA 技術是運用具有 RNA 聚合酶黏合位之引子來辨認 RNA，結合反轉錄酶與 RNA 聚合酶，產生目標序列之 RNA 擴增子。
轉錄-反轉錄協同反應 (Transcription-RT concerted reaction)	TRC	TRC 運用與 TMA 相似的技術，但使用剪狀引子來篩選最終目標區域。



台灣藥物法規  
資訊網法規公告



台灣藥品  
臨床試驗資訊



TFDA 藥物  
食品安全週報



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

<p>切口酶擴增反應 (Nicking enzyme amplification reaction)</p>	<p>(RT)NEAR</p>	<p>NEAR 技術是結合兩個引子、切口酶與 DNA 聚合酶，以不斷產生 DNA。</p>
<p>(RT): 表示該方法偵測對象為 DNA，故須先經反轉錄酶步驟，將待測 SARS-CoV-2 RNA 轉為 cDNA</p>		

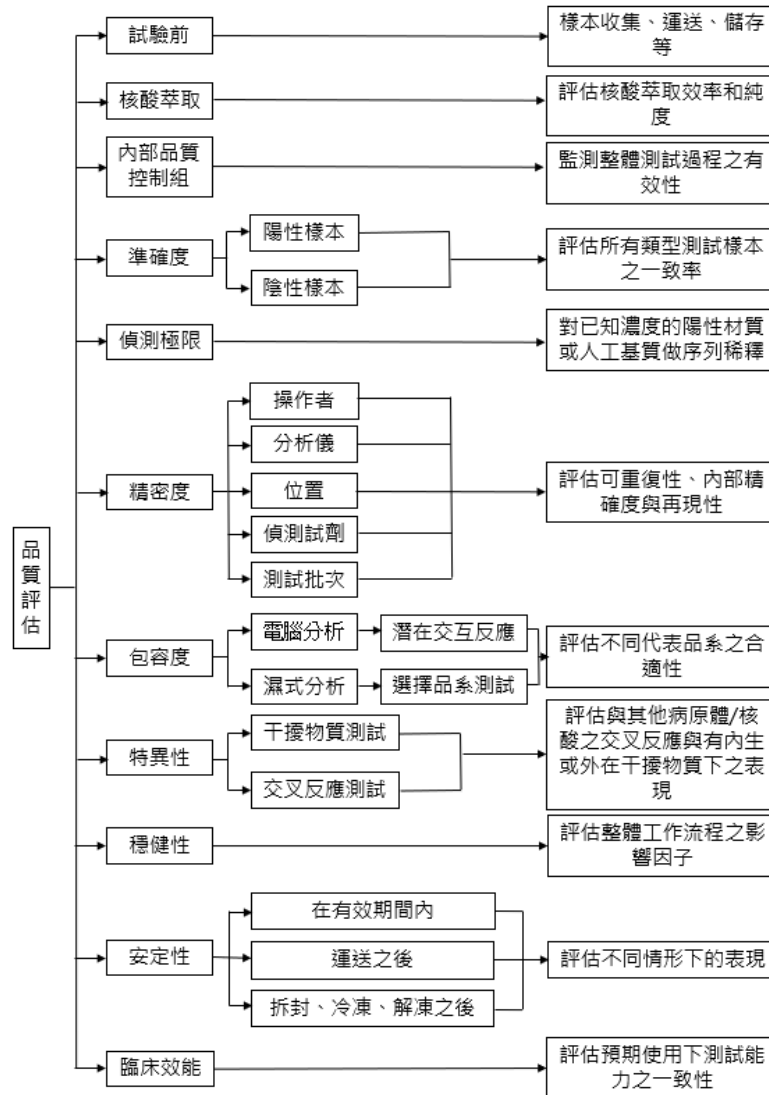
## 二、品質評估工作流程

於選擇合適的 NAAT 方法後，此標準建議製造業者、自行開發試劑之實驗室或檢測實驗室須在試驗前、試驗中及試驗後，評估各品質屬性(quality attributes)項目是否達到要求，就 NAAT 而言，評估內容包含(但不限於)：適用萃取流程的效能、試驗試劑是否有達到最小允收規格、試驗方法的分析特異性及偵測極限、試劑安定性等。品質屬性評估之技術流程如圖一所示，其含括整體過程評估與重點分析表現評估。

經整體流程評估後，須開始規劃試驗之設計及開發。在設計與開發過程中，首先需根據客戶、病患與利益相關者之需求進行定義與紀錄，並依據需求選擇 SARS-CoV-2 之分析方法。於臨床策略上，需評估國際上常用之方法(例如：單一樣本或樣本混和測試)、依試驗執行與一致性評估與討論最佳實行方式及指引開發、提供參考材料、認證材料、控制組或研究等級材料，與常見方法進行器材比較，鼓勵分享試驗表現結果資訊，以增加產業與國家的交流，確認試驗器材具有合適的標籤以確保其可接受性，並協調供應方與需求方。上述建議，能提升試驗能力與確保符合當地及國際之試驗品質要求。接著，開始進行後續其他品質評估，包含試驗前、核酸萃取、內部材料、環境及品質控制、臨床前測試、安定性、臨床效能。



致力法規科學  
守護生命健康  
Regulatory Science, Service for Life



圖一、以 NAAT 為 SARS-CoV-2 偵測方法之品質評估工作流程<sup>[1]</sup>

(一) 試驗前

在進行 SARS-CoV-2 呼吸道樣本試驗之前，須注意樣本採集、樣本種類、運輸過程及樣本接收與儲存(表二)。



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

表二、樣本試驗之前須注意步驟<sup>[修改自 1]</sup>

項目	內容
1 樣本採集	<ul style="list-style-type: none"> <li>由受過良好訓練人員採集正確的呼吸道樣本，以利提升核酸測試時的敏感度。</li> <li>依據採樣技術與標準化流程，鼻咽樣本具有最佳臨床敏感度(90%~95%)與特异性，而口咽(咽喉)樣本則敏感度較低(80%~90%)；若無法採集鼻咽樣本，可提供混和中鼻甲、咽喉或呼吸之樣本，或是透過漱口採集唾液樣本。</li> <li>採集之樣本應提供詳細資訊，以利追蹤陽性患者，強烈建議需有病患人口統計資料、在病患體內或體外之資訊、採集日與時間；而應被考量在內之資訊為樣本類型、所需量、適當的容器、樣本可接受之允收標準、運輸、儲存條件與效期、降低核酸降解或污染之因子。</li> </ul>
2 樣本種類	<ul style="list-style-type: none"> <li>種類：鼻咽拭子、口咽(咽喉)拭子、鼻拭子、上呼吸道沖洗液與唾液、呼吸道抽取液、深咳痰、支氣管肺泡灌洗液、合併所有呼吸道樣本、其他樣本(血液、血漿、尿液、糞便)。</li> <li>注意採集樣本時所適合的 COVID-19 感染階段： <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ 無症狀或感染早期：鼻咽拭子、口咽(咽喉)拭子、前中鼻甲拭子、上呼吸道沖洗液。</li> <li>➢ 疑似臨床感染現象：呼吸道抽取液、深咳之痰、支氣管肺泡灌洗液。</li> <li>➢ 顯著急性感染階段：血液、血漿。</li> <li>➢ 眼睛感染症狀：結膜拭子。</li> </ul> </li> </ul>
3 運輸過程	<ul style="list-style-type: none"> <li>呼吸樣本應於採樣後 2 至 4 小時內送達實驗室；若運輸時間可能超過 4 小時，須將樣本保存於病毒運輸培養液或等同穩定的溶液，並使用保冷袋或保持於 2°C 至 8°C 溫度運輸；若運輸時間延遲超過 3 至 4 天，須將樣本保存於 -70°C 中運輸，若無法，則保存於 -20°C 運輸。</li> <li>盡可能避免樣本重複冷凍與解凍，預防病毒核酸降解。</li> </ul>



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

		<ul style="list-style-type: none"> <li>運輸過程若有經過國家交界，須注意國際法規，建議參考 WHO 指引文件規範<sup>[2] [3]</sup>。</li> </ul>
4	樣本接收與儲存	<ul style="list-style-type: none"> <li>當收到樣本後，運輸盒與第二層塑膠袋應被消毒，且第二層塑膠袋應於生物安全櫃內開啟，並移出樣本。</li> <li>樣本名稱、性別、年齡、數量、測試項目、狀態、異常與否應被確認，並記錄於實驗室資訊系統。</li> <li>樣本應存放於適當之容器內且標示清楚，並儲存於適當條件、-70°C或建議之條件；萃取的核酸樣本應存放於被確認過的適當條件、-70°C或更低溫。</li> </ul>

## (二) 核酸萃取

樣本處理步驟應進行評估，例如：處理樣本過程中，萃取效率、試劑、PCR 表現等，須要與現行用於萃取相似病毒 RNA 樣本的方法做比較，確保後續 PCR 偵測順利。此外，也能藉此確認其分析敏感性。核酸萃取評估，建議可參考 ISO 20184 系列與 ISO 20186 系列的規範。

## (三) 內部材料、環境及品質控制

為了能監測整體測試過程之有效性，材料與環境的管控及品質控制組的建立，是為重要關鍵(表三)。



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

表三、內部材料、環境及品質控制之注意事項<sup>[修改自 1]</sup>

項目	內容
1 材料與環境的控制	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 宣稱體外診斷試劑之儲存與運輸條件，需有安定性試驗證實。</li> <li>• 樣本與 RNA 標準品應根據製造業者所提供之操作手冊儲存，若操作手冊未提供儲存說明，則依據儲存時間小於一週或六個月，分別將之儲存於-18°C或-70°C。</li> <li>• 所有試劑應不存在去氧核糖核酸酶(DNase)或核糖核酸酶(RNase)，否則應另說明。</li> <li>• 所有試劑應根據實驗室標準與要求處理、儲存、運輸或清除；試劑購入與開封時間應被記錄。</li> <li>• 所有實驗室自製試劑之名稱、濃度、配製日期、儲存條件，應被標註於試劑上。</li> <li>• 若有需要，試劑應使用高壓滅菌鍋進行滅菌；若試劑無法滅菌，建議可使用過濾方式進行滅菌。</li> <li>• 試劑應避免反覆解凍與冷凍。</li> <li>• 萃取的 RNA 與相關標準品有容易降解之特性，故應盡快進行 NAAT 試驗。</li> <li>• 應使用適當的水進行試驗，試驗用水不可含有干擾物質，並應具備低離子含量且無核酸酶(nuclease)。</li> </ul>
2 控制組的建立	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 陰性控制組，用於監測整個試驗過程是否有汙染。</li> <li>• 陽性控制組，用於監測偵測效能表現。</li> <li>• 內部抑制組，用於監測樣本收集、處理、RNA 萃取、RT-qPCR 過程。</li> <li>• 若無法在每次試驗使用控制組，則在使用不同批次試劑時須進行測試，或重新定義時間間隔(例如：每天或每週)。</li> </ul>

#### (四) 臨床前測試

一般而言，進行確效時應評估臨床前測試表現，包含準確度、偵測極限、精密度、





致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

包容度、特異性、穩健性等指標(表四)，而試驗樣本可以使用臨床樣品(specimens，被挑選出具代表性並用於科研的樣品)或人工樣本(samples，泛指一般樣本)。

表四、確效評估指標<sup>[修改自 1]</sup>

項目	內容
1 準確度	<ul style="list-style-type: none"> <li>理想上，須使用已知測試結果之臨床樣品(specimens)或樣本作為測試方法的準確度評估。</li> <li>若偵測方法涵蓋多種不同類型樣本，所有樣本須同時被涵蓋於內；若無法取得樣本，則可以選擇使用非目標臨床或人工樣本作為稀釋基質，並將已知濃度之假病毒目標序列混和其中以進行測試。</li> <li>須考量測試樣本大小、樣品(specimens)數量，建議測試數量不小於 20 個，一般而言 40 至 50 或更多個樣品(specimens)。</li> <li>使用臨床樣本進行方法之準確度評估者，須注意國內或國際之人類研究倫理規範要求。</li> </ul>
2 偵測極限	<ul style="list-style-type: none"> <li>為了確保統計有效性，建議將個別陰性樣品(specimens)混和，產生足夠大量樣品(specimens)體積作為基質，另外，也可用等同病患臨床基質之人工基質替換。建議可以參考 ISO 20395<sup>[4]</sup>對 NAAT 試驗之統計分析的規範。</li> <li>每一種宣稱之樣品(specimens)類型，需定義其偵測極限。</li> <li>偵測極限應以 copies/ml 或 IU/ml 為單位刊載於報告。</li> </ul>
3 精密度	<ul style="list-style-type: none"> <li>須評估影響試驗之精密度因子，包含偵測試劑(含核酸萃取組件)、分析儀、操作者、位置、測試批次等。</li> <li>應評估可重複性、內部精密度及再現性。</li> <li>測試樣本可包含標準品、品質控制材料、樣本或病患樣本熟練度測試。</li> <li>應基於統計分析方法，以標準差(SD)表示其非精密度。</li> </ul>
4 包容度	<ul style="list-style-type: none"> <li>電腦分析：對每一物種，應包含多種來自於 GenBank 或 GISAID 序列資料庫具代表性之品系；若發現有潛在交叉反應，強烈建議</li> </ul>



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

		<p>進行仔細地序列比對，因額外的交叉反應或干擾物會影響特異性。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>濕式分析：應使用不同來源之 SARS-CoV-2 樣本，且所選品系應在靠近偵測極限進行測試，以確保不同來源之品系可以準確地被偵測到。</li> </ul>
5	特異性	<ul style="list-style-type: none"> <li>進行特異性試驗時，應將干擾物質、常見呼吸道致病菌之交叉干擾因素、樣本本身狀態等納入評估。</li> </ul>
6	穩健性	<ul style="list-style-type: none"> <li>應評估會影響試驗表現與穩定度之因子，例如：樣品(specimens)類型、運輸培養液品牌、試劑體積、汙染物、儀器、操作溫度。</li> </ul>

#### (五) 安定性

試劑之安定性須進行評估，應注意事項請詳見表五。

表五、試劑之安定性評估指標<sup>[修改自 1]</sup>

項目	內容
1 安定性	<ul style="list-style-type: none"> <li>安定性試驗應反映出試劑之架儲期。</li> <li>架儲期試驗應使用真實或極端環境條件(例如：溫度、濕度、振動、壓力)來進行。</li> <li>若因緊急情況而無法在有限時間內完成所有試驗，可以將產品先進行上市，後續再完成所有試驗。</li> <li>實務上，應使用已知濃度之參考物質進行安定性試驗。</li> <li>試劑之架儲期應依據 ISO 23640 進行規範。</li> <li>試劑之冷凍與解凍安定性可用來評估使用時冷凍與解凍次數。</li> </ul>



## (六) 臨床效能

在評估臨床效能時，應注意臨床證據與臨床樣本或樣品之特性(表六)。

表六、臨床效能之評估<sup>[修改自 1]</sup>

項目	內容
1 臨床證據	<ul style="list-style-type: none"> <li>製造業者應使用臨床證據支持其臨床效能宣稱。</li> <li>一般而言，臨床效能應根據每個宣稱的臨床樣品(specimens)種類做評估，且樣品(specimens)應進行盲測。</li> <li>臨床評估時，應挑選自然臨床樣品(specimens)，且盡量避免自同一個體重複取樣。理想上，應使用已被預期的樣品(specimens)類型進行研究。若無法進行前瞻性研究，則可以回溯性研究代替之。</li> <li>臨床樣品(specimens)數量應達到統計分析基本要求；產品臨床效能應透過與參考方法之比較進行計算評估。</li> </ul>
2 臨床樣品(specimens)或樣本之特性	<ul style="list-style-type: none"> <li>須使用已知試驗結果之臨床樣品(specimens)或樣本評估試驗方法產出結果之能力。</li> <li>應定期評估因時間與地理上造成 SARS-CoV-2 基因變異的不同對 NAAT 方法表現的影響。</li> <li>應確認臨床樣本數大小是否有符合統計分析基本要求、臨床效能是否與預先定義之允收標準一致，且應描述臨床試驗之分析與受試者數量。</li> </ul>

## 三、試驗設計與結果說明考量

另外，此標準提供製造業者或自行開發試劑之實驗室，須注意的試驗設計事項。進行試劑與方法優化時，須考量 SARS-CoV-2 目標序列之選擇、高關注變異株(Variant of



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

Concern, VOC)對偵測 SARS-CoV-2 之 NAAT 方法品質之潛在影響、擴增方法選擇、設計與選擇引子、反應系統優化、閾值決定、試驗設計之確效與驗證(表七)。

此外，也建議進行檢測之實驗室，就試驗結果說明部分，試驗後之報告產出與解釋，應刊載方法偵測範圍與單位，定性結果應以“偵測到”和“未偵測到”呈現，且偵測極限、閾值、影像紀錄也應被考慮進去，而定量結果則須提供閾值、有效線性範圍、偵測極限、定量限制以解釋報告結果，所有報告結果須經設計能將上述資訊呈現，且若偵測到 SARS-CoV-2 陽性，也應通報樣本採集處給公共衛生管理機關。

表七、優化試劑與方法之考量<sup>[修改自 1]</sup>

項目	內容
1 SARS-CoV-2 目標序列之選擇	<ul style="list-style-type: none"> <li>建議選擇 WHO 或具有適當品質管控的基因序列資料來源庫(例如：GISAID)所發表之 SARS-CoV-2 目標序列，作為測試方法之偵測區域與引子開發。</li> <li>對於實驗室獨立選擇之目標區域，須經常與資料庫的序列做比對，以確認是否須進行修飾或改變，其特異性須進行確效，例如與同源物種進行比較分析。</li> </ul>
2 高關注變異株 (Variant of Concern, VOC)對偵測 SARS-CoV-2 之 NAAT 方法品質之潛在影響	<ul style="list-style-type: none"> <li>基因變異會影響診斷效能與造成偽陰性，設計能辨認多基因區域之測試方法，可以降低偽陰性結果產生。</li> <li>若 SARS-CoV-2 分子診斷方法可與診斷其他潛在致病菌(例如：流感病毒、呼吸道融合病毒)的方法一起使用，則能辨認同病毒之多基因區域的測試方法將會受限。</li> <li>開發方法者應在試驗方法所應用之序列，隨時偵測所設計引子與探針之互補性，是否有涵蓋於循環變異中。</li> </ul>
3 擴增方法選擇	<ul style="list-style-type: none"> <li>應依據實驗室環境，選擇合適的條件、設備、擴增方法，包含(但不限於)螢光 PCR、dPCR、等溫擴增與其他擴增方法。</li> </ul>
4 設計與選	<ul style="list-style-type: none"> <li>建議使用 WHO 所發表的引子序列作為試驗用。</li> </ul>

台灣藥物法規  
資訊網法規公告台灣藥品  
臨床試驗資訊TFDA 藥物  
食品安全週報致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

	擇引子	<ul style="list-style-type: none"><li>若實驗室要設計試驗方法的 SARS-CoV-2 辨認區域，需考慮引子長度、GC 量、融解曲線及避免引子二聚體(primer dimer)形成。</li></ul>
5	反應系統優化	<ul style="list-style-type: none"><li>反應系統之開發中，須檢測 PCR 所需組件的適用性，包含(但不限於)擴增酵素、試劑、引子。</li><li>擴增流程擬定時，需考慮擴增效能與穩定度。</li></ul>
6	閾值決定	<ul style="list-style-type: none"><li>閾值應依據預期用途來決定，並作為辨識樣本是否含有特殊疾病的限制。</li><li>使用於閾值決定之樣本應選擇臨床樣本，且樣本要能夠有不同濃度(陰性、臨界陽性及強陽性)，並須使用不同批次樣本確效。</li><li>使用者需注意國內與國際上對人體試驗研究倫理之要求與規範，尤其在使用臨床樣本評估測試方法之準確度時。</li></ul>
7	試驗設計之確效與驗證	<ul style="list-style-type: none"><li>須評估試驗之準確度、精密度、可重複性、再現性、特異性及試劑之安定性。</li></ul>

## WHO 對 SARS-CoV-2 核酸檢測方法之規範

為了能提供政府機構/官員具系統性且公正的 SARS-CoV-2 醫材選擇資訊，以利健康照護系統與區域性的規範建立，WHO 於 2021 年 6 月 14 日發表「SARS-CoV-2 重要的體外診斷試劑選擇之技術規範 (TECHNICAL SPECIFICATIONS FOR SELECTION OF ESSENTIAL IN VITRO DIAGNOSTICS FOR SARS-COV-2)」<sup>[5]</sup>，針對 SARS-CoV-2 之抗原及核酸測試之體外診斷試劑(In vitro diagnostics, IVD)提供技術規範之資訊。以下將針對核酸測試 IVD 之技術規範進行說明(表八)。



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

表八、核酸測試 IVD 之技術規範<sup>[修改自 5]</sup>

項目		規範內容及範例
1	預期用途	<p>應刊載以下內容</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>偵測標的：至少兩個獨立之 SARS-CoV-2 基因體標的；若在傳播盛行區域，可以使用一個單獨標的。</li> <li>試驗目的</li> <li>適應症</li> <li>試驗型式：如定性 NAAT、手動和/或自動 RT-PCR。</li> <li>樣本種類：如上呼吸道和下呼吸道樣本。</li> <li>試驗族群：應訂定是否涵蓋具急性、亞急性呼吸道症狀、發燒、其他疑似 COVID-19 症狀患者，與確診者有接觸或居住於群聚感染區域且與有/無症狀的人有近距離接觸者。</li> <li>預期使用者：如受過適當訓練之實驗室專業人士。</li> <li>適用健康照護系統層級：如臨床實驗室使用。</li> </ul>
2	功能特性	<ul style="list-style-type: none"> <li>臨床敏感度：&gt;95%</li> <li>臨床特異性：&gt;99%</li> <li>分析特異性：應確認試驗方法只偵測 SARS-CoV-2 病毒品系，不受其他物質干擾。</li> <li>偵測極限：可接受值為任何呼吸道樣本種類於每毫升含有 <math>10^3</math> 基因拷貝數，理想值為上呼吸道和下呼吸道樣本與糞便之每毫升含有 <math>10^2</math> 基因拷貝數。</li> <li>無效/錯誤/不可回復的比率：&lt;5%</li> <li>精密度：方法內之 CV&lt;3%，方法間之 CV&lt;5%。</li> </ul>
3	技術與操作特性	<ul style="list-style-type: none"> <li>方法原理：使用 NAAT 方法偵測 SARS-CoV-2 RNA 之特定序列</li> <li>樣品(specimen(s))安定性：理想上樣品(specimens)在採集後應立即進行測試；若無法，樣品(specimen)應採集後 8 小時內儲存於 15°C 至 25°C，12 天內儲存於 2°C 至 8°C，超過 12 天儲存於 -70°C；避免重複冷凍與解凍。</li> </ul>



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 樣品(specimen(s))體積：依據單一拭子與樣品(specimen)運輸材質而定。</li> <li>• 結果類型：定性</li> <li>• 檢測結果完成之時間：可接受每個試驗 4 至 5 小時，理想上每個試驗 &lt; 3.5 小時。</li> <li>• 樣品(specimens)檢測數量：可接受 8 小時內處理至少達 188 個樣品(specimens)，理想上 8 小時內處理大於 188 個樣品(specimens)。</li> <li>• 測試限制：限受過良好 RT-PCR 操作訓練之實驗室專業人員使用，須遵守製造業者使用說明。</li> <li>• 內部品質控制組：試劑組須提供陽性與陰性控制組，或另以其他包裝販售形式提供。</li> <li>• 對外部品質控制組材質之相容性</li> <li>• 試劑之安定性：需能耐受 -25°C 至 25°C 且 70% 濕度環境之運輸與儲存條件，以及 10°C 至 35°C 且極低相對濕度之操作條件。</li> <li>• 樣本收集培養液之安定性：需能耐受 2°C 至 25°C 之運輸與儲存環境，以及維持 2°C 至 25°C 達 48 小時之操作環境，若操作時間超過 48 小時，則須能耐受 -70°C 之冷凍環境。</li> <li>• 控制組/校正品之安定性：須能耐受 -25°C 至 25°C 之運輸與儲存環境，以及 10°C 至 35°C 且極低相對濕度之操作條件。</li> <li>• 製造業者試劑之保存期限：12 個月或更長。</li> <li>• 運輸試劑之剩餘保存期限：當產品運送至使用處，至少剩 6 個月保存期限。</li> </ul>
4	基本設備需求	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 水品質要求：分子試驗等級</li> <li>• 試劑儲存之冷凍/冷藏設備：須備有</li> <li>• 試劑與控制組之冷凍/冷藏設備：須備有</li> </ul>
5	配件、消耗品、備用與其他組件	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 試劑組之組件：須含重要之試驗試劑、控制組、消耗品、所有必要之 PCR 試劑，若有樣本收集套組更佳。</li> <li>• 試劑組大小：應含足夠於 10 至 96 次反應之試劑。</li> </ul>

台灣藥物法規  
資訊網法規公告台灣藥品  
臨床試驗資訊TFDA 藥物  
食品安全週報致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

		<ul style="list-style-type: none"><li>非試劑組提供之消耗品：樣本收集套組、樣本運輸保存劑、輔助試劑、拋棄式塑膠容器。</li><li>非提供之其他輔助實驗的儀器：均質器、離心機、震盪器、加熱板、水浴槽、移液器、PCR 儀器等。</li></ul>
6	文件	<ul style="list-style-type: none"><li>儀器操作手冊：須備有</li><li>使用說明書：須使用當地語言與註冊過之規範版本。</li><li>產品品質證明：由合法且具品質保證之製造部門提供。</li><li>物質安全資料表：須提供產品之完整資訊，包含暴露於該產品對健康之影響、在操作、儲存或使用產品時之危險評估、評估如何保護暴露於風險中之工作者、緊急處理流程。</li></ul>
7	環境安全要求	<ul style="list-style-type: none"><li>危險等級：可依據全球調合系統(Globally Harmonized System)進行等級分類，評估潛在危害來源。</li><li>應制定拋棄規範。</li></ul>
8	訓練、安裝、使用	<ul style="list-style-type: none"><li>使用者訓練：1 至 3 天(包含試驗流程、解釋結果、品質控管、問題排除)。</li></ul>

## 歐盟對 SARS-CoV-2 核酸檢測方法之規範

為了改善 SARS-CoV-2 檢驗試劑之效能，歐盟醫療器材協調小組(Medical Device Coordination Group, MDCG)於 2022 年 2 月公告「新型冠狀病毒體外診斷醫療器材之性能評估指引(Guidance on performance evaluation of SARS-CoV-2 in vitro diagnostic medical devices)」<sup>[6]</sup>，其中涵蓋病毒核酸定性或定量檢測之一般性考量(General considerations)，與核酸擴增檢測(NAAT)之特定考量(Specific considerations)，詳細內容可參考本刊第 143 期之「美國與歐盟對新型冠狀病毒體外診斷試劑之現行法規要求與考量」<sup>[7]</sup>。

## 英國對 SARS-CoV-2 核酸檢測方法之規範

有鑑於 COVID-19 之核酸檢測技術的開發需求，英國衛生安全局(UK Health Security Agency, UKHSA)於 2022 年 7 月 11 日更新公告「SARS-CoV-2 核酸偵測之技術確效程序指引(Guidance-Technical validation protocol for SARS-CoV-2 nucleic





acid detection) 」<sup>[8]</sup>，針對 SARS-CoV-2 核酸檢測之方法描述、預期用途、樣本類型、儀器與試劑、表現特性、精密度、穩健性、特異性、敏感度進行規範，相關內容摘錄於表九。

表九、英國對 SARS-CoV-2 核酸檢測之規範<sup>[修改自 8]</sup>

項目	內容
1 方法描述與預期用途	<ul style="list-style-type: none"> <li>須闡明試驗方法與原理。</li> <li>器材使用之預期用途。</li> <li>器材為單獨使用或需與其他儀器一起使用。</li> <li>是否有生物安全防護之需求。</li> </ul>
2 用於確效之樣本類型	<ul style="list-style-type: none"> <li>樣本類型：例如未萃取之全病毒、萃取 RNA、合成 RNA、帶有目標區域之 DNA 質體。</li> <li>樣本基質：例如唾液、血漿、鼻咽/口鼻拭子。</li> <li>若材質須進行萃取，要規範所須取得、萃取、洗滌之體積及洗滌緩衝液。</li> <li>應規範干擾物質、架儲期、冷凍與解凍次數、使用拭子之地點、樣本收集須具有回溯性等。</li> </ul>
3 儀器與試劑	<ul style="list-style-type: none"> <li>應列出所有檢測所須之儀器。</li> <li>應列出所有檢測所須之試劑，含陽性與陰性控制組材料。</li> </ul>
4 功能特性	<p>SARS-CoV-2 標的之分析敏感度與線性：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>序列稀釋：應使用已被驗證過的標準品做序列稀釋；若無法獲得標準品，可以使用經序列稀釋後的 5 個臨床陽性樣本，以及 5 個陰性樣本和抑制(內部)控制組來進行測試。</li> <li>線性與效能：理想上線性之規範，應使用標準化的參考品，確保一般基準之有效性與稀釋之準確性。</li> <li>最低偵測極限(Lowest limits of detection, LLOD)：驗證過的標準稀釋序列應被用於計算 LLOD，可以使用線性與效能所得之數據。</li> </ul>
5 精密度與穩	<ul style="list-style-type: none"> <li>方法內之精密度：使用序列稀釋的 5 重複數值和抑制控制組</li> </ul>



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

	健性	<p>以計算標準差與變異係數，結果應小於 10%。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>方法間之精密度：使用序列稀釋的 5 重複數值計算標準差與變異係數，結果應小於 15%。</li> <li>可重複性：混和 30 個來自不同個體之陰性樣本和已知濃度陽性物質(建議為 3 倍 LLOD)進行試驗，結果應全陽性。</li> </ul>
6	分析特異性 (干擾與交叉反應)	<ul style="list-style-type: none"> <li>非目標標的樣本/物種之交叉反應：使用臨床樣本或混和其他疾病的已知陽性樣本進行測試，且這些疾病樣本有著相似的病毒與感染症狀，且常見之疾病(例如 HIV、HBV、HCV、VZV、EBV、CMV)也應該被檢測。</li> </ul>
7	診斷之敏感度與特異性 (臨床確效)	<ul style="list-style-type: none"> <li>試驗樣本選擇時，應將含低、中與高病毒量之樣本均勻分布，以避免造成診斷之敏感度與特異性之增減。</li> <li>診斷之敏感度：須使用已被確認來自於陽性病患之臨床樣本，樣本數量應達 150 個，且須與藥品和醫療產品監管署 (Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, MHRA) 之目標產品概況 (Target Product Profile, TPP) 進行比對，臨床敏感度(95% CI)與陽性預測值(Positive Predictive Value, PPV)之計算，應與歐盟合格認證(CE)之文獻方法做比對，CT 值或等同值應被評估於確效報告。</li> <li>診斷之特異性：需使用已被確認來自於陰性病患之臨床樣本，樣本數量應達 250 個，且須與藥品和醫療產品監管署 (MHRA) 之目標產品概況(TPP)進行比對，臨床特異性(95% CI)與陰性預測值(Negative Predictive Value, NPV)之計算，應與歐盟合格認證(CE)之文獻方法做比對，CT 值或等同值應被評估於確效報告。</li> </ul>

## 韓國對 SARS-CoV-2 核酸檢測方法之規範

為了能提升產業界申請與製造 COVID-19 體外診斷試劑的效率，韓國食品藥物安全全部 (Ministry of Food and Drug Safety, MFDS)於 2020 年 11 月公告「COVID-19 體外診斷試劑之審查與核准指引(產業適用)」(Guideline on the Review and Approval

台灣藥物法規  
資訊網法規公告台灣藥品  
臨床試驗資訊TFDA 藥物  
食品安全週報致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

of In Vitro Diagnostic Devices for COVID-19 (For Industry))<sup>[9]</sup>，針對欲生產 SARS-CoV-2 體外診斷試劑之廠商提供產品分類分級、形狀與結構、原始材料、製造方法、預期用途、效能、試驗過程、注意事項、保存與安定性、試驗標準等相關規範，以下將聚焦於核酸檢測方法之內容進行摘要說明(表十)。

表十、韓國對欲申請與製造 SARS-CoV-2 核酸檢測試劑之廠商的規範<sup>[修改自 9]</sup>

項目	內容
1 分類分級	<ul style="list-style-type: none"> <li>應提供產品分類與分級資訊。</li> <li>範例：高風險致病菌基因檢測試劑(High-Risk Pathogen Genetic Test Reagent [ N05030.01, Class 3 ])</li> </ul>
2 形狀與結構	<ul style="list-style-type: none"> <li>操作原理：應提供產品之操作原理、科學證明、組成，例如：臨床之重要性、診斷原理、與產品一起使用之儀器或軟體。</li> <li>外表：應詳盡描述體外診斷醫材之原始狀態，包含重量、材質、顏色、特性、流動性。</li> </ul>
3 原始材質	<ul style="list-style-type: none"> <li>應提供序號、產品名稱、混和目的、材質/組成名稱、量、標準品、每一種體外診斷試劑之量。</li> </ul>
4 製造方法	<ul style="list-style-type: none"> <li>應提供製造業者之製造方法，例如：滅菌方法、包裝等。若產品使用動物衍生組成物，應提供動物名稱、來源國別、動物年齡、使用部位、操作流程，且物質名稱需根據所使用之標準品來提供。</li> </ul>
5 預期用途	<ul style="list-style-type: none"> <li>應提供細節，包含受試者族群、樣本類型、分析品項(基因)、診斷之疾病、執行原理、結果(定性或定量)、方法。</li> <li>範例：用於疑似呼吸感染疾病之病患樣本(樣本來自痰、口咽、鼻咽)SARS-CoV-2 基因之體外診斷試劑，與 RT-PCR 方法一起使用並診斷(確認)SARS-CoV-2 感染。</li> </ul>
6 效能	<ul style="list-style-type: none"> <li>應依據所提供之組件的組成(技術文件)按順序列出效能資訊，且所提供數據須可以被驗證；不應提供摘要與不清楚之描述。</li> <li>範例：分析敏感度(最低偵測極限)、分析特異性(干擾物)、分析特異性(交叉反應)、精準度(可重複性、再現性)、臨床效能(臨床</li> </ul>



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

		<p>敏感度與特異性、試驗結果)</p>
7	試驗過程	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 應提供樣本準備與保存方法、試驗前準備、試驗過程、結果決定、品質控制、使用儀器(製造業者、型號、核准號碼等)。</li> <li>• 範例：             <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 樣本準備與保存：目標樣本與方法、樣本種類所需量、樣本儲存條件與時間、樣本之結凍、解凍適用性和限制、樣本之預先處理過程。</li> <li>2. 試驗前準備：使用試劑組之條件(溫度、濕度等)、試劑準備方法與條件、已準備好試劑之儲存條件與使用期限、儀器、可能影響效能之儀器、校正材料與方法描述。</li> <li>3. 試驗過程：每個試驗方法之細節描述、樣本使用量、預處理過程、反應時間、溫度與條件、結果判讀時間、須注意事項。</li> <li>4. 結果決定：結果決定過程、預期試驗結果、處理無效的發現。</li> <li>5. 品質控制：品質控制計畫、試驗過程滿足所提出之允收標準、當品質控制結果無效時之替代技術。</li> </ol> </li> </ul>
8	注意事項	<p>應於產品說明書刊載以下內容：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 應敘明本器材僅限體外診斷使用，且應被專業人士使用。</li> <li>• 一般實驗室安全資訊、生物危害之安全注意事項。</li> <li>• 應依產品之處理、儲存、使用、結果、清除說明警告和注意事項。</li> <li>• 若器材與其他體外診斷器材一起使用，應敘明其資訊。</li> <li>• 若器材為可拋棄式，應敘明器材重複使用之注意事項。</li> <li>• 若產品在韓國或國外有新的安全資訊要求，應加註於注意事項。</li> </ul>
9	保存與安定性	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 應依據醫療器材安定性試驗標準(Medical Device Stability Test Standard，MFDS 公開宣布)，設定保存方法與使用期限/架儲期時間。</li> <li>• 範例：每一種試劑之儲存溫度條件、試劑開封後之保存方法與</li> </ul>

台灣藥物法規  
資訊網法規公告台灣藥品  
臨床試驗資訊TFDA 藥物  
食品安全週報致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

		使用期限/架儲期時間、重組試劑之保存方法與使用期限/架儲期時間。
10	試驗標準	<ul style="list-style-type: none"> <li>應提供試驗項目、允收標準、方法。</li> <li>範例：試驗項目(完成產品之最終品質控制、分析效能試驗)、允收標準(參考值之耐受範圍)、方法(須以條列式呈現方法細節)。</li> </ul>

## 台灣對 SARS-CoV-2 核酸檢測方法之規範

為因應防疫需求，國內於 2021 年 5 月 1 日公告「體外診斷醫療器材查驗登記須知(110.5.1)」<sup>[10]</sup>，針對國內欲研發體外診斷醫療器材之製造業者，提供核酸檢驗試劑之相關常規規範(表十一)，詳細內容可參考本刊第 119 期之「新型冠狀病毒檢驗試劑之國內外法規管理現況及上市要求」<sup>[11]</sup>。

表十一、我國體外診斷醫療器申請查驗登記參考文件<sup>[修改自 10,11,12]</sup>

項目	內容
1 醫療器材 結構、規格 性能用途、 圖樣	<ul style="list-style-type: none"> <li>預期用途</li> <li>測試原理及方法、平台、手工操作或需搭配儀器使用、待測標的及序列特徵。</li> <li>檢體採集部位、類型與其運送、處理及保存的材料、方法與保存時間。</li> <li>器材所有組成及完整成分濃度或含量百分比。</li> <li>搭配使用之檢驗系統儀器、型號及其特徵。</li> <li>所使用軟體之敘述。</li> <li>器材的組件，各種組合或包裝的完整清單。</li> <li>配件及其他配合使用之相關產品。</li> <li>檢驗結果判讀之說明及其注意事項。</li> <li>檢驗方法的侷限性，防止可能造成偽陽性或陰性結果的檢驗條件、程序、品質管制措施及干擾物質。</li> </ul>



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

2	製造品質資料	<ul style="list-style-type: none"> <li>原料、製程中及成品品質管制之檢驗規格、檢驗測試程序書及其相關紀錄。</li> <li>產品製造包裝出貨程序書(含製程流程圖)及其相關紀錄。另廠內倘有下列文件，亦請一併提供：全廠配置圖及製造作業區域圖、主要生產製造及檢驗設備、廠內品質文件一覽表。</li> </ul>
3	性能評估報告	<ul style="list-style-type: none"> <li>核酸萃取/純化、品管物質、分析反應性、偵測極限、分析特異性-交叉反應、分析特異性-干擾、閾值、精密度/再現性、殘留汙染及交叉汙染、檢體保存及運送、方法比較、安定性、軟體驗證文件、原廠品質管制之檢驗規格、方法及成績書、標示 (詳細內容可參考<sup>[11,12,13]</sup>)</li> </ul>
4	風險利益評估報告	

## 結語

比較歐盟、英國、韓國及我國針對 SARS-CoV-2 核酸檢測方法之現行建議與規範，雖然各國對產品之上市前審查要求略有不同，但整體管理考量皆相近，就技術文件而言，皆有要求開發單位和/或廠商須對產品之預期用途做說明，且也應另敘明測試原理及方法、是否與其他儀器搭配使用等資訊。此外，就效能要求部分，則針對偵測極限、交叉反應、特異性、精密度/再現性等，進行建議與規範。由此可見，各國對 SARS-CoV-2 核酸檢測方法要求是趨於一致的，以便提升各國業者產品製造與申請的效率。

而 ISO/TS 5798:2022 標準與 WHO，除了產品技術文件及效能要求以外，更進一步對製造業者、自行開發試劑或檢測之實驗室，提出執行檢測的各項環節之品質管控建議與規範，涵蓋之內容為建議製造業者與實驗室，應依其目的選擇合適的核酸檢測方法；在試驗前，須注意樣本採集、種類、運輸過程、接收與儲存；應評估核酸萃取流程；應考量品質控制，例如材料與環境的控制、控制組的建立；臨床評估部分，須注意臨床證據與臨床樣本之特性；試驗設計時，須注意與優化 SARS-CoV-2 目標序列之選擇、高關注變異株之考量、引子之設計與選擇、反應系統、閾值決定等。



比起各國要求，ISO/TS 5798:2022 標準及 WHO 提供製造業者及實驗室更全面性之 SARS-CoV-2 核酸檢測方法的品質管控規範，故建議執行相關檢測之實驗室，應參考 ISO/TS 5798:2022 標準及 WHO 之相關品管考量，有助提升檢測品質；另外，亦建議製造業者或自行開發檢測試劑之實驗室，應將相關品管措施納入產品設計與優化考量，使產品能更符合臨床使用時之品管需求，提升臨床檢測結果的準確性與穩定性，改善申請上市審查與製造的品質。

### 參考文獻

1. ISO/TS 5798: 2022 In vitro diagnostic test systems — Requirements and recommendations for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by nucleic acid amplification methods.
2. WHO. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019 – 2020: applicable from 1 January 2019.
3. WHO. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19). Interim guidance, 2020.
4. ISO 20395:2019 Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR.
5. WHO. TECHNICAL SPECIFICATIONS FOR SELECTION OF ESSENTIAL IN VITRO DIAGNOSTICS FOR SARS-COV-2. 14 June 2021.
6. Medical Device Coordination Group, Guidance on performance evaluation of SARS-CoV-2 in vitro diagnostic medical devices (Rev.1), Feb. 15, 2022.
7. 顧國暉，美國與歐盟對新型冠狀病毒體外診斷試劑之現行法規要求與考量，當代醫學法規月刊(Vol.143)，頁 1-15，2022
8. UKHSA. Guidance-Technical validation protocol for SARS-CoV-2 nucleic acid detection (Updated), 11 July 2022.
9. MFDS. Guideline on the Review and Approval of In Vitro Diagnostic Devices for COVID-19 (For Industry), November 2020.
10. 衛生福利部食品藥物管理署，體外診斷醫療器材查驗登記須知(110. 5. 1 更新)



11. 李曜珊，新型冠狀病毒檢驗試劑之國內外法規管理現況及上市要求，當代醫學法規月刊(Vol.119)，頁 1-17，2020
12. 衛生福利部食品藥物管理署，因應新型冠狀病毒 ( COVID-19 ) 疫情緊急使用核酸檢驗試劑申請專案製造參考文件(110. 11. 16 更新)