

行政院及所屬各機關出國報告  
(出國類別：開會)

赴希臘雅典參加「第九屆 EPFA/NIBSC 檢測血液病毒核酸擴增技術研討會」及  
「WHO 基因擴增技術標準化會議」

服務機關：行政院衛生署藥物食品檢驗局  
出國人 職 稱：薦任技士  
姓 名：陳瑜絢

出國地區：希臘  
出國期間：中華民國九十一年五月二十六日至六月一日  
報告日期：中華民國九十一年八月二十八日

## 摘 要

EPFA/NIBSC「檢測血液病毒核酸擴增技術研討會」(Workshop on Nucleic Acid Amplification Testing for the Detection)係由歐洲血漿分劃協會(European Plasma Fractionation Association, EPFA)及英國國家生物標準品暨管制研究所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)共同主辦,自一九九四年開始每年舉辦一次,邀請各國政府單位、研究機構、血液中心、血液製劑製造廠商、檢驗試劑製造廠商等相關領域的專家學者,共同討論有關血液病毒核酸擴增技術之最新進展及相關規範。第九屆 EPFA/NIBSC 研討會於二〇〇二年五月二十八日至五月二十九日在希臘雅典舉辦,研討會內容包括血漿檢測對血液收集之影響、Parvovirus B19、HBV 綜論及 HBV 變異株、NAT 與抗原檢測及血清學檢驗之評估、NAT 標準品之製備及品質管制、NAT 與輸血服務、NAT 之其他應用(用於檢測細菌、HPV、HHV-8 等)及巴斯德滅菌法對 Parvovirus B19 之去活化研究等議題。

五月三十日於相同地點舉行之 WHO 基因擴增技術標準化(Standardisation of Genomic Amplification Technologies, SoGAT)第十五次會議,內容也是討論血液及血液製劑之病毒安全性與 NAT 相關議題,包括 Parvovirus B19 感染之檢測、NAT 相關研究、及定量 NAT 分析等。

藉此次參與國際性研討會的機會,不僅得與各國專家學者互相交流,汲取經驗,並可得知歐美等世界先進國家對於捐血者血液及原料血漿病毒檢測之趨勢與規範,以及 NAT 標準化之規定與要求。這些新知可作為我國推動國血國用政策,制定對於捐血者血液進行 NAT 篩檢,及訂定相關規範之參考。

# 目 次

一、前言及目的	4
二、行程與工作紀要	5
三、會議內容	
(一) EPFA/NIBSC 檢測血液病毒核酸擴增技術 研討會	6
(二) WHO 基因擴增技術標準化會議	12
四、心得	15
五、建議	17

## 一、前言及目的

血液製劑於醫療上之使用頻繁，然隨著經由血液傳染之疾病諸如 B 型肝炎、C 型肝炎、愛滋病等之發現及蔓延，確保血液製劑之安全性也更顯其重要性。如何於血漿原料及混合血漿中篩檢出污染之病毒，進而降低污染病毒量，乃是目前世界各國努力之方向。由於傳統上用於篩檢血液是以血清學方法檢測病毒抗原或抗體，其空窗期( Window period)較長，而利用核酸擴增技術( NAT ) 檢測可以縮短空窗期。歐美日等先進國家均已開始利用 NAT 進行血液之篩檢，歐盟並規定自 1999 年 7 月起製造血液製劑之混合血漿均應以 NAT 檢測 HCV RNA，我國於 90 年 11 月公告之「人用血漿製劑查驗登記審查準則」亦已規範製造血液製劑之混合血漿均應以 NAT 檢測 HCV 之病毒核酸。

以 NAT 檢測血液病毒已是世界潮流趨勢，且為因應我國「國血國用」國產血液製劑之檢驗管理，建立 NAT 之標準檢驗體系及製備 NAT 檢驗用之病毒核酸國家對照標準品，實為刻不容緩之課題。參加 EPFA/NIBSC 檢測血液病毒核酸擴增技術研討會及 WHO 基因擴增技術標準化會議，可與國際接軌，吸收檢測血液病毒核酸擴增技術及標準化之最新相關資訊，作為我國推動國血國用政策，制定對於血液製劑病毒安全性之檢驗管理及相關規範之參考，以確保血液製劑之病毒安全性，保障國人健康，並可提昇國產製品之品質，增加國際競爭力。

## 二、行程與工作紀要

<u>日期</u>	<u>工作紀要</u>
5月26日	啟程
5月27日	抵達希臘雅典
5月28日	參加 EPFA/NIBSC 研討會
5月29日	參加 EPFA/NIBSC 研討會
5月30日	參加 SoGAT 會議
5月31日	回程
6月 1日	返台

### 三、會議內容

#### (一) 第九屆 EPFA/NIBSC 檢測血液病毒核酸擴增技術研討會 ( Workshop on Nucleic Acid Amplification Testing for the Detection )

EPFA/NIBSC 研討會係由歐洲血漿分劃協會 ( European Plasma Fractionation Association, EPFA ) 及英國國家生物標準品暨管制研究所 ( National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC ) 共同主辦，自一九九四年開始每年舉辦一次，邀請各國政府單位、研究機構、血液中心、血液製劑製造廠商、檢驗試劑製造廠商等相關領域的專家學者，共同討論有關血液病毒核酸擴增技術之最新進展及相關規範。今年為第九次會議，於二〇〇二年五月二十八日至五月二十九日在希臘雅典 National Hellenic Research Foundation ( NHRF ) 舉行，與會人士有來自美國、加拿大、英國、法國、德國、比利時、荷蘭、義大利、瑞士、西班牙、葡萄牙、丹麥、芬蘭、希臘、澳洲、日本、及台灣等地，共約一百五十人。

該研討會之內容包括：( 1 ) 血漿檢測對血液收集之影響、( 2 ) Parvovirus B19、( 3 ) HBV 綜論及 HBV 變異株、( 4 ) NAT 與抗原檢測及血清學檢驗之評估、( 5 ) NAT 標準品之製備及品質管制、( 6 ) NAT 與輸血服務、( 7 ) NAT 之其他應用 ( 用於檢測細菌、HPV、HHV-8 等 )、( 8 ) 巴斯德滅菌法對 Parvovirus B19 之去活化研究等議題，研討會之內容重點如下：

### (1) 血漿檢測對血液收集之影響

美國紅十字會 Dr. R.Y. Dodd 說明不論對混合血漿或是單一供血者血品而言，病毒安全性均非常重要，要確保血液及其製品之安全性，應對供血者進行選擇及面談，血液檢體經實驗室檢驗，製品製程中應經病毒去活化/去除之過程，同時應符合 cGMP 之規範以確保其品質。

### (2) Parvovirus B19

德國 PEI 官員 Dr. R. Seitz 說明 Parvovirus B19 屬無套膜病毒，世界各地感染率極高，於已開發國家中，5 歲以下的人約有 2-10% 曾遭感染，20 歲以上的人約有 40-60% 體內有 B19 抗體，70 歲以上的人更高達 85% 以上有抗體。一般人感染 B19 後，只是類似感冒症狀，且體內免疫反應會產生具有保護性之抗體，但對於免疫功能缺乏或免疫功能遭抑制之患者及懷孕婦女，則會造成較大的傷害。美國曾對於經溶劑/清潔劑 (S/D) 處理的混合血漿進行自願者輸液研究，發現輸用含 B19  $> 10^7$  geq/ml 混合血漿的人會受 B19 感染，而輸用含 B19  $< 10^4$  geq/ml 混合血漿的人則不受感染，故 FDA 要求血漿混合液之 B19 含量應  $< 10^4$  geq/ml 才可用於製造血液製劑。歐洲藥典也正在討論要將血漿混合液之 Parvovirus B19 限量定為  $< 10^4$  IU/ml，並將納入 Human Anti-D immunoglobulin 及 Human plasma (pooled and treated for virus inactivation) [SD-plasma] 兩個章節中，預估今年內即會公佈施行。

### (3) HBV 綜論及 HBV 變異株

來自德國的 Prof. W. Gerlich 介紹 HBV 感染之血清學及相關檢驗，對於 HBV 之檢測使用靈敏度較高的 HBsAg 試劑應較檢測 anti-HBc 或以 PCR 方法檢測病毒核酸為佳。該 HBsAg 試劑之靈敏度應  $< 100$  pg/ml，可檢測出所有的 genotypes，且具特異性。有關於 HBsAg 之標準品，除 NIBSC/WHO 國際標準品外，德國 PEI、Abbott 公司、及法國均有 HBsAg 對照標準品。

英國劍橋大學的 Prof. J.P. Allain 說明經由自然基因轉變、被動/自動免疫、或藥物影響均可能使 HBV 產生變異株。目前 HBsAg 試劑並不能檢測出所有的 HBV 變異株，造成血液篩檢可能有所疏漏，是亟須重視的問題。

#### (4) NAT 與抗原檢測及血清學檢驗之評估

德國 PEI 官員 Dr. M. Nubling、美國太平洋血液中心 Dr. M. Busch、及美國紅十字會 Dr. S. Stramer 分別說明有關 HCV、HBV、及 HIV 之抗原及 NAT 檢測之評估。於 HCV 部分還是以 NAT 檢測可有效縮短空窗期且靈敏度最高；HBV 之研究顯示主要的帶原者血液中 HBsAg 含量較 HBV DNA 高，且有少部分 HBsAg(+) anti-HBc(+) 的帶原者為 HBV DNA(-)，是否可以 HBV NAT 取代 HBsAg 試驗仍待進一步評估。對於 HIV 之研究顯示 HIV-1 NAT 之檢測靈敏度較 p24Ag 之篩選試驗來得佳，故建議以 Anti-HIV 1/2 及 HIV-1 NAT 取代 Anti-HIV 1/2 及 p24Ag 之檢驗。

法國 LFB 的 Dr. B. Flan 說明在法國對於血漿以 NAT 及血清學檢驗之評估，對於單一供血者之血清學檢驗包括：Anti-HCV、Anti-HIV 1/2、HBsAg、Anti-HBc、Anti-



HTLV、及 ALT，另對於 small pools（ < 24 donations）進行 HCV 及 HIV NAT 檢測。對於製造血漿製劑之迷你混合血漿（ < 100 donations）則進行 Anti-HCV、Anti-HIV 1/2、及 HBsAg 等血清學檢驗，並依 CPMP/BWP/269/95 之規範進行 HCV NAT 檢測，有些血液中心亦進行 HIV 及 HBV 之 NAT 檢測。對於血漿原料之 NAT 檢測及製程中病毒去活化/去除步驟並行，可提升血漿製劑之病毒安全性。

#### （5） NAT 標準品之製備及品質管制

英國 NIBSC 的 Dr. H. Holmes 介紹 HIV NAT 標準品之製備及共同標定，WHO 第一個 HIV-1 RNA 國際標準品之製備是由美國 CBER、英國 NIBSC、及荷蘭 CLB 共同合作完成的，每瓶標準品含 100,000 IU。WHO 亦提供一組 HIV genotype panel，包含 group M( subtypes A, B, C, D, E (A), F, G, H ) group N、及 group O。HIV 標準品之製備未來將往 HIV-2 genotype panel 及合成的 HIV RNA 標準品等方面發展。

荷蘭 CLB 的 Dr. N. Lelie 介紹有關 NAT 檢驗之研究結果，NAT 國際標準品之國際單位 IU 會因使用之檢驗方法不同而相當於不同的 copies 或 genome equivalents 等單位，例如 HCV RNA 1 IU 可相當於 2.4-5.1 copies 或 1.7-3.8 genome equivalents，其他 NAT 標準品也有相同情形，所以應對於不同檢驗方法之檢驗結果進行校正與評估。

美國 Chiron 公司的 Dr. B. Phelps 說明體外診斷試劑用病毒核酸標準品之開發，必須考慮到合成標的核酸（target nucleic acid）之特性、來源、長度、基因型變異

株、基因序列、定量方法、單位含量、貯存溫度、製造過程、包裝瓶間一致性、批次間變異性、及安定性等。目前診斷試劑廠商聯合委員會（Industrial Liaison Committee, ILC）的成員正計畫評估以 HCV RNA transcripts 及 HBV recombinant DNA 作為標準品之適用性。

#### （6） NAT 與輸血服務

法國 EFS 的 Dr. J. Coste 介紹法國血液中心 NAT 篩檢之執行狀況，法國衛生部自 1999 年 2 月建議將 HCV NAT 納入血液篩檢項目，並於 2001 年 7 月開始將 HIV-1 及 HCV NAT 篩檢與血清學檢驗併列為供血者常規性檢驗項目。法國血液中心所使用之 NAT 篩檢方法主要有 bioMerieux/Roche Cobas Ampliscreen（pool size 24）及 Gen-Probe/Chiron Procleix TMA（pool size 8 或 individual testing）兩種系統，二者之特異性及再現性均相近。

Dr. K. Roth 說明德國 Red Cross Blood Transfusion Service Hessen 對血液 NAT 篩檢之發展情形，該中心自 1997 年 1 月開始實施 HIV-1、HBV、HCV 之 PCR 檢驗，2000 年 4 月起增加 HAV 及 Parvovirus B19 之 PCR 檢驗，但對於紅血球及血小板二種血品並不進行 HAV 及 Parvovirus B19 之 PCR 檢驗。PCR 檢驗之 pool size 最多為 96 donations，自檢體處理至檢驗完成時間約需 7 小時，所採用檢驗方法為 in house TaqMan PCR。有關該 PCR 方法之靈敏度分析，HCV 為 10.5-14 copies、HBV 為 20-26.7 copies、HIV 為 66.6-88.8 copies。對於 Parvovirus B19 之 95% 檢測限度（detection limit）為  $10^7$  molecules/ml，HAV

為  $10^3$  molecules/ml。

有關以 NAT 篩檢未來發展方向之議題，由 Chiron、Roche、及 Gen-Probe 等廠商分別介紹各自公司所發展出篩檢血液病毒之 NAT 分析方法及檢驗套組，包括 Chiron 與 Gen-Probe 共同研發檢測 Parvovirus B19 及 HAV 的方法，Roche 的 COBAS Ampliscreen System 與 AMPLINAT MPX System，及 Gen-Probe 的 Procleix System。

#### (7) NAT 之其他應用

德國 PEI 的 Dr. T. Montag 說明血品亦可能遭 Enterobacteria、Staphylococci、Corynebacteria 等細菌之污染，經由輸血而感染細菌之機率約 1/10,000。傳統檢測血品中細菌污染之方法，是採抽樣血品進行無菌試驗，新發展出快速檢測方法則有 FACS 流式細胞儀分析法及 NAT 檢測法。FACS 分析法之檢測限度為  $10^4$ - $10^5$ /ml，可用來篩檢遭高度污染之血品；NAT 法是檢測細菌 16S rRNA 基因，其靈敏度對於 Gram(-)細菌可達 1-8 cfu，對於 Gram(+)細菌可達 8-15 cfu，但在定量分析上最大的問題就是反應酵素純度不足，可能殘存其生產宿主（如：*E. coli*）的 RNA，造成定量分析時之背景值過高，無法精確定量，要解決此一問題則寄望於能有純度更高的反應酵素。荷蘭 Delft Diagnostic Lab 的 Dr. W. Quint 及美國 University of Nebraska 的 Dr. C. Wood 則分別介紹 NAT 在 human papilloma virus (HPV) 及 human herpes virus-8 (HHV-8) 臨床檢驗上之應用。

#### (8) 巴斯德滅菌法對 Parvovirus B19 之去活化研究

德國 PEI 的 Dr. J. Blumel 說明對於人血清白蛋白以巴斯德滅菌法之 Parvovirus B19 去活化研究，在 5% Albumin 中加入 B19 及通常用於病毒去活化/去除確效研究之標準病毒 ( Model virus ) Porcine parvovirus ( PPV )，結果發現於 60 作用 10 分鐘內，B19 之感染力即由約  $10^6$  TCID<sub>50</sub> 降至檢測限度  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub> 以下；而 PPV 於 60 作用 60 分鐘僅由  $10^8$  TCID<sub>50</sub> 降至  $10^7$  TCID<sub>50</sub>。分析巴斯德滅菌法對於不同濃度 ( 5%、20%、25% ) 白蛋白產品中 B19 去活化效果，顯示白蛋白濃度愈高，去活化所需時間愈長，但均能在 60 作用 10 分鐘內由  $10^6$  或  $10^7$  TCID<sub>50</sub> 降至檢測限度以下，所以人血清白蛋白以巴斯德滅菌法應可有效將 Parvovirus B19 去活化。但此結論並不適用於經加熱處理之凝血因子，由於凝血因子產品可能含高病毒量，且曾發生使用經乾熱處理之第八凝血因子而感染 B19 之案例，故降低製造血漿製劑之血漿混合液中病毒負荷量 ( viral load ) 是極重要的品質管制步驟。

## (二) WHO 基因擴增技術標準化會議 ( Standardisation of Genomic Amplification Technologies, SoGAT )

五月三十日繼續參加於相同地點舉行之 WHO 基因擴增技術標準化第十五次會議，內容也是討論血液及血液製劑之病毒安全性與 NAT 相關議題，包括 Parvovirus B19 感染之檢測、NAT 相關研究、及定量 NAT 分析等。

比利時紅十字會的 Dr. R. Laub、日本感染症研究所的 Dr. Y. Okada、及英國 NIBSC 的 Dr. J. Saldanha 分別說明

Parvovirus B19 感染之檢測方法，一般是以 KU812 細胞株來檢測 Parvovirus B19 的感染性，結果顯示含 5 IU 感染劑量之 B19 即具有感染細胞之能力。

對於 NAT 相關研究之議題，德國 PEI 的 Dr. M. Chudy 介紹評估不同實驗室對供血者 HCV RNA 及 HIV-1 RNA 之 NAT 檢測方法的研究，結果顯示各實驗室在 HCV NAT 方法的靈敏度及特異性差異不大，但在 HIV-1 NAT 方面則有較大的差異，應再進一步加強及確效。英國 NIBSC 的 Dr. J. Saldanha 說明 HAV 國際標準品之製備及共同標定，有 16 個實驗室參與共同標定，目前已完成第一個 HAV RNA NAT 國際標準品，含量定為  $10^5$  IU/ml。澳洲 NRL 的 Dr. K. McGavin 介紹澳洲血庫的品保作業，為確保血液篩檢 NAT 之品質，NRL 提供品管檢體及品質評估血清組給各 NAT 實驗室，於每次檢驗時均需包含該品管檢體，並且每週回報檢驗結果給 NRL。各實驗室之檢驗結果經分析顯示使用 TMA HIV-1/HCV multiplex 方法在各次檢驗間並無顯著差異，且無交叉污染之情形。英國 NIBSC 的 Dr. C. Davis 報告有關 HIV-1 基因型血清組的研究結果，該血清組包括 HIV-1 subtype A-H、group N 及 group O，有 24 個實驗室參與此研究，結果顯示各實驗室均可檢測出 subtype A-E，但對於 subtype F、G、H、及 group N 之檢測能力則有差異，且大部分的實驗室無法檢測出 group O，故應加強對於 HIV-1 group O subtype 之檢測能力。

有關定量 NAT 分析之議題，分別由德國 University of Giessen 的 Prof. W. Gerlich 介紹 LightCycler 定量分析法；University of Cologne 的 Dr. R. Kaiser 介紹 bDNA 分析法；

英國 Q-one Biotech 的 Dr. J. Black 介紹同步定量 PCR 分析之確效研究；美國 NGI 的 Dr. A. Conrad 介紹該公司定量分析產品 SuperQuant 及 QuantaSure；美國 Gen-Probe 的 Dr. C. Giachetti 介紹 HIV-1、HCV、及 HBV 之定量 TMA 檢測法；荷蘭 CLB 的 Dr. M. Koppelman 介紹對於 B19 DNA 及 HAV RNA 之檢測法。在 NAT 檢體純化之新興發展方面，由德國 Qiagen 的 Dr. F. Krieg-Schneider 介紹該公司全自動純化病毒核酸的儀器 BioRobot *MDx*。

大會最後討論 SoGAT 未來應努力的方向，所有會員均同議 SoGAT 會議應持續舉辦。WHO 認同 SoGAT 對於達成基因擴增技術標準化有極大的貢獻，更期望能朝向 WHO 所關注的標準化、公共衛生、及世界性責任等方面發展。

下一次的 SoGAT 會議預定於二〇〇三年六月在德國 Paul Ehrlich Institute 舉行。

## 四、心得

1. 為提高血液製劑之病毒安全性，有四個重要關鍵，分別為：供血者之選擇、血液檢體之檢驗、產品製程中使用之病毒去除/去活化步驟、以及製造廠執行之 cGMP 規範。
2. 歐美日各國血液中心為提高血品之病毒安全性，目前幾乎已全面對供血者血漿實施 HIV-1 及 HCV 之核酸擴增檢測 (NAT) 試驗，可直接偵測血漿中病毒，縮短病毒檢驗之空窗期，保障民眾輸血之安全性。
3. 歐盟規定自 1999 年 7 月起所有供製造血液製劑之血漿混合液( plasma pool )須進行 HCV RNA 之 NAT 檢測，結果為陰性者方可放行使用。目前美國已訂定相關草案，要求血液製劑廠於 2002 年 6 月前提出血漿原料進行 HCV 及 HIV NAT 檢測之資料。
4. 由於溶劑/清潔劑處理之病毒去活化方法對於 HAV 及 Parvovirus B19 等非套膜病毒之效果不佳，尤其 B19 以加熱處理之去活化方法效果亦有限，目前各國將開始規範製造血液製劑之混合血漿中 Parvovirus B19 的含量，美國 FDA 要求混合血漿中 B19 含量應  $< 10^4$  geq/ml，歐洲藥典也預定要將限量定為  $< 10^4$  IU/ml。
5. 為使 NAT 能達標準化，WHO 生物製劑標準品實驗室與各合作國的實驗室，共同製備標定病毒核酸標準品及標準套組。目前 WHO 已完成的病毒核酸國際標準品有 HCV、HIV-1、HBV、Parvovirus B19、及最近完

成標定的 HAV。美國、澳洲、日本等國均有製備 NAT 檢驗用之病毒核酸國家標準品或對照品。為因應我國「國血國用」國產血液製劑之檢驗管理，建立 NAT 標準檢驗體系及製備 NAT 檢驗用之病毒核酸國家標準品，實為刻不容緩之課題。本局已於民國 89 年製備完成國內首批用於血清學檢驗之 B 型肝炎表面抗原（HBsAg）國家標準品，目前正積極建立血液病毒 NAT 標準檢驗體系及籌畫製備 NAT 檢驗用之病毒核酸標準品。



## 五、建議

1. 此次能參加 EPFA/NIBSC 研討會及 WHO SoGAT 會議，係因之前本局主管參加國際性研討會時認識主辦 SoGAT 會議的 NIBSC 官員，經由其同意並提供相關資訊，才使我國有機會參與 WHO 技術性會議。建議能多提供同仁參加國際性研討會的機會，不僅可直接快速獲得新知，亦可增加與其他國家交流及與國際接軌的機會。
2. 將血液病毒 NAT 檢測列入供血者之血液檢驗項目為世界趨勢，我國捐血中心也應朝此方向規劃，惟進行捐血者全面性 NAT 篩檢須耗費龐大經費及人力、物力，又要考慮到血品有效期限之問題。目前中華血液基金會已在進行相關研究評估，希望能儘速將血液病毒 NAT 檢測列入血液篩檢項目，增進血品之安全性。
3. 日本已規定自 2001 年 3 月起所有國內製造及由國外輸入之血液製劑，其原料血漿均須經 HBV、HCV 及 HIV 之 NAT 檢測。美國亦已訂定相關草案，要求血液製劑廠於 2002 年 6 月前提出血漿原料進行 HCV 及 HIV NAT 檢測之資料。我國於 90 年 11 月公告之「人用血漿製劑查驗登記審查準則」已規範製造血液製劑之混合血漿均應以 NAT 檢測 HCV 之病毒核酸，應儘速再將 HIV NAT 納入檢測項目，以提高血液製劑之病毒安全性。