

行政院及所屬各機關出國報告
(出國類別：研究實習)

赴英國國家生物標準品暨管制研究所 (NIBSC)
研習血漿原料中病毒之 NAT 檢測技術
與核酸標準品之製備

服務機關：衛生署藥物食品檢驗局
出國人職稱：薦任技士
姓名：楊依珍
出國地區：英國
出國期間：91.09.01-91.09.15
報告日期：91.11.07

J0/c09104241

公務出國報告提要

頁數: 46 含附件: 否

報告名稱:

血漿原料中病毒之 NAT 檢測技術與核酸標準品之製備

主辦機關:

行政院衛生署藥物食品檢驗局

聯絡人/電話:

陳婉麗/02-26531300

出國人員:

楊依珍 行政院衛生署藥物食品檢驗局 第二組 技士

出國類別: 研究 實習

出國地區: 英國

出國期間: 民國 91 年 09 月 01 日 - 民國 91 年 09 月 15 日

報告日期: 民國 91 年 11 月 11 日

分類號/目: J0/綜合(醫藥類) J0/綜合(醫藥類)

關鍵詞: 血漿原料, NAT 檢測技術, 核酸標準品

內容摘要: 因應「國血國用」國產血液製劑之檢驗管理, 對於 NAT 標準檢驗體系之建立及供 NAT 檢驗使用之核酸檢驗國家對照標準品之製備, 乃為刻不容緩之課題。我國衛生署於 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, 今年 8 月公告新增由人血漿製得血漿製劑之管理規定(草案)亦已將 HBV 與 HIV 檢測項目納入。為期十五天之研習期間遠赴英國之 WHO 實驗室 NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, 國家生物標準品暨管制研究所) 研習檢測血漿原料中病毒之 NAT 標準檢驗體系與核酸標準品之製備技術及共同標定之作業程序。此外, 並藉此寶貴機會了解 NIBSC 對於 Plasma pool 之 Batch release 作業情形、HCV 與 HIV 病毒實驗室之設施及相關操作規範、並參觀標準品製備部門作業情形及新建築設施。研習所學將實際提供於本局建立檢測血漿原料中 HCV、HIV 等病毒之 NAT 檢測技術, 並建立對疑遭受病毒污染之血液製劑進行 NAT 檢測之技術; 進而建立本署檢測血漿原料與疑遭污染血液製劑中病毒之 NAT 技術標準檢驗體系, 加強我國對血液製劑病毒安全性之檢驗管理, 以保障國人使用血液製劑之安全。另研習核酸標準品製備技術所學亦將實際應用於製備我國 HIV、HCV 等核酸國家標準品, 除供本局將來對國產血液製劑各批次 Plasma pool 進行 NAT 檢測病毒時所使用; 亦可提供我國捐血中心與血液製劑製造廠、診斷試劑製造廠作為 NAT 篩檢血液、血漿原料或製造病毒核酸診斷試劑之對照標準品, 以提升其製造與檢驗水準, 有助我國生物技術產業之推動, 邁向亞太生技中心之目標。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

摘要

因應「國血國用」國產血液製劑之檢驗管理，對於 NAT 標準檢驗體系之建立及供 NAT 檢驗使用之核酸檢驗國家對照標準品之製備，乃為刻不容緩之課題。我國衛生署於 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，今年 8 月公告新增由人血漿製得血漿製劑之管理規定（草案）亦已將 HBV 與 HIV 檢測項目納入。

為期十五天之研習期間遠赴英國之 WHO 實驗室 NIBSC（National Institute for Biological Standards and Control，國家生物標準品暨管制研究所）研習檢測血漿原料中病毒之 NAT 標準檢驗體系與核酸標準品之製備技術及共同標定之作業程序。此外，並藉此寶貴機會了解 NIBSC 對於 Plasma pool 之 Batch release 作業情形、HCV 與 HIV 病毒實驗室之設施及相關操作規範、並參觀標準品製備部門作業情形及新建築設施。

研習所學將實際提供於本局建立檢測血漿原料中 HCV、HIV 等病毒之 NAT 檢測技術，並建立對疑遭受病毒污染之血液製劑進行 NAT 檢測之技術；進而建立本署檢測血漿原料與疑遭污染血液製劑中病毒之 NAT 技術標準檢驗體系，加強我國對血液製劑病毒安全性之檢驗管理，以保障國人使用血液製劑之安全。另研習核酸標準品製備技術所學亦將實際應用於製備我國 HIV、HCV 等核酸國家標準品，除供本局將來對國產血液製劑各批次 Plasma pool 進行 NAT 檢測病毒時所使用；亦可提供我國捐血中心與血液製劑製造廠、診斷試劑製造廠作為 NAT 篩檢血液、血漿原料或製造病毒核酸診斷試劑之對照標準品，以提升其製造與檢驗水準，有助我國生物技術產業之推動，邁向亞太生技中心之目標。

目 次

摘 要	-----	2
目 次	-----	3
前 言 與 目 的	-----	4
內 容	-----	7
心 得	-----	28
建 議	-----	30
附 錄	-----	32

前言與目的

血液製劑目前於醫療上之使用仍相當廣泛而頻繁，然由於經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，因此確保所使用之血液製劑的安全性也更突顯其重要性。對於血液製劑病毒之安全性，除了於血液製劑之製程中須加入經確效之病毒去除/不活化步驟外，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，乃是目前世界各國正著重努力之方向。由於目前病毒檢測仍有其技術上的極限，也就是所謂的空窗期 (Window period)，而利用核酸擴增技術 (Nucleic Acid Amplification Technology, NAT) 可以縮短空窗期；歐盟已規定自 1999 年 7 月起對於製造成血液製劑之混合血漿均應以 NAT 檢測 HCV RNA，檢驗結果為陰性之混合血漿製成之血液製劑方可被放行。美國 FDA 已要求血液製劑製造廠於 2002 年 6 月前進行以 NAT 檢測血漿原料中 HCV 與 HIV 病毒核酸，近期亦已核發第一張 NAT 許可證。日本赤十字社自 1999 年 7 月起針對所有血品進行以 NAT 檢測 HBV、HCV 與 HIV-1，日本厚生省已規範自 2000 年 3 月起全面實施。世界衛生組織亦已製備各種核酸國際標準品與 Working reagent 供 NAT 試驗之研發與檢驗體系標準化所用。目前衛生署於 90 年 11 月 6 日衛署藥字第 0900071621 號公告之「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；今年 8 月 30 日衛署藥字第 0910054156 號公告新增由人血漿製得血漿製劑之管理規定(草案)亦已將 HBV 與 HIV 檢測項目納入。

另外由於愛滋病與 CJD 等疾病於西方國家盛行率較高，同時由於本國血漿可能具備區域性疾病如腸病毒、B 型肝炎病毒等抗體，世界衛生組織亦曾呼籲各國使用自製血漿及其衍生之製

劑以降低各項危險因子。行政院科技顧問組評估我國發展血漿製劑產業，具有帶動我國相關生物產業技術與提供國人較安全血液製劑兩項優勢，故於民國 85 年 12 月 5 日行政院第十七次科技顧問會議通過推動我國血漿製劑方案，開始推動國產血漿製劑自給自足計畫。此外，目前因國際政局不穩定造成之恐怖攻擊事件影響各國血液製劑供應，造成仰賴進口之國家常處於因缺貨而危及生命安全之恐懼中，亦顯示「國血國用」政策之勢在必行。

行政院已於 90 年 5 月 8 日台九十衛字第○二六八一五號函核准備查「國血國用」衛生政策，於 90 年 7 月 16 日行政院台九十經字第○四二六四六-一號函核准經濟部核定之「推動血液製劑工業措施」。為因應「國血國用」及政府鼓勵發展生物科技產業之政策，目前中華民國血液基金會已公開徵求廠商委託製造國血製劑，預計近年內將成立國內第一座血液製劑製造廠，建廠階段則將血漿原料運至國外血液製劑製造廠委託製造成血液製劑供醫療使用，落實「國血國用」的目標。

因應「國血國用」國產血液製劑之檢驗管理，對於 NAT 標準檢驗體系之建立及供 NAT 檢驗使用之核酸檢驗國家對照標準品之製備，乃為刻不容緩之課題。同時亦應儘速建立對疑遭受病毒污染之血液製劑進行 NAT 檢測之標準檢驗體系，以確保血液製劑之病毒安全性，俾便保障國人健康。並提昇國產製品之品質水準，增加國際競爭力。

由於英國國家生物標準品暨管制研究所（National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC）長期以來持續為 WHO 建立國際標準品，自 1997 年起至今已建立 HCV RNA、HIV RNA、HBV DNA 與 Parvovirus B19 國際標準品，故遠赴 NIBSC 研習檢測血漿原料中病毒之 NAT 標準檢驗體系與核酸標準品之製備技術，學習前人經驗以縮短嘗試時間，儘速建立本

局檢測血漿原料及疑遭受病毒污染之血液製劑中 HCV、HIV 等病毒之 NAT 檢測技術；進而建立本署檢測血漿原料與疑遭污染血液製劑中病毒之 NAT 技術標準檢驗體系，加強我國對血液製劑病毒安全性之檢驗管理，提昇國產製品之品質水準，以保障國人使用血液製劑之安全。另研習核酸標準品製備技術所學亦將實際應用於製備我國 HCV、HIV 等核酸國家標準品，除供本局將來對國產血液製劑各批次血漿混合液（Plasma pool）進行 NAT 檢測病毒時所使用；亦可提供我國捐血中心與血液製劑製造廠及診斷試劑製造廠作為 NAT 篩檢血液、血漿原料或製造病毒核酸診斷試劑之對照標準品，以提升其檢驗與製造水準，有助我國生物技術產業之推動，邁向亞太生技中心之目標。此外，希望能藉此機會建立與 NIBSC 相關業務單位之聯繫管道，增加互動機會，進而爭取我國參與國際標準品共同標定之機會，同時亦將邀請 NIBSC 參與我國國家核酸標準品之共同標定，以增進我國國家核酸標準品之公信力。

內 容

(一) 研習檢測血漿原料中 HCV 病毒之 NAT 技術與標準檢驗體系

首先於 NIBSC 之病毒學部門 (Division of Virology) Dr. John Saldanha 實驗室研習檢測血漿原料中 HCV 病毒之 NAT 技術，並實際操作 HCV NAT 檢測方法。Dr. Saldanha 負責建立與製備 HCV 核酸國際標準品與 Working reagent，他所建立之 HCV NAT 檢測方法乃為其進行共同標定研究 (collaborate study) 或作其他相關研究或器官移植篩檢之用。有關於血液製劑原料 Plasma pool 之逐批放行作業 (Batch release) 則由 Dr. Morag Ferguson 實驗室負責。

Dr. Saldanha 實驗室建立之 HCV NAT 檢測方法採用 QIAGEN DNA Mini Extraction Kit (外加 RNA Carrier)，所需檢體量為 200 μL ，之後採用 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit 進行反轉錄與核酸擴增步驟，其配製條件如下：

5x Buffer	5 μL
5x Q solution	5 μL
dNTP	1 μL
Primer F(0.6mM)	0.1 μL
Primer R(0.6mM)	0.1 μL
RNase free water	2.8 μL
Enzyme mix	1 μL
Template	10 μL

Primer F CAC TCC CCT GTG AGG AAC T

Primer R GTG CAC GGT CTA CGA GAC CTC

進行核酸擴增之儀器為 Stratagene Robocycler

Gradient 96，條件如下：

50°C	30 min.	
95°C	15 min.	
95°C	45 sec.	} 43 cycles
57°C	40 sec.	
72°C	40 sec.	
72°C	10 min.	

分析核酸擴增產物之方法為傳統電泳法，其分析條件為 2 % Agarose Gel (GIBCO BRL Ultrapure Agarose)。

每次檢測均應包含核酸萃取控制組與 PCR 控制組，以確認該次 NAT 檢測技術與設備均無誤，驗證該次檢測為有效之試驗。核酸萃取控制組應包含陽性控制組與陰性控制組，陽性控制組為三種濃度之 WHO Working reagent (710 IU/mL, 71 IU/mL, 7.1 IU/mL)，陰性控制組為經過血清學檢驗與核酸擴增技術篩檢為陰性之血漿；PCR 控制組亦應包含陽性控制組與陰性控制組，陽性控制組為之前已確認 PCR 產物無誤之 Template，另以 RNase free water 為陰性控制組。

(二) 研習檢測血漿原料中 HIV 病毒之 NAT 技術與標準檢驗體系

其次於 NIBSC 之反轉錄病毒學部門 (Division of Retrovirology) Dr. Harvey Holmes 實驗室研習檢測血漿原料中 HIV 病毒之 NAT 技術與標準檢驗體系。Dr. Holmes 負責建立與製備 HIV 核酸國際標準品與 Working reagent，目前他所建立之 HIV NAT 檢測方法乃為其進行共同標定研究 (collaborate study) 或作其他相關研究之用。目前歐盟尚未規範血液製劑原料 Plasma pool 需以 NAT 技術逐批檢測 HIV 病毒，但可以預見不久之將來，歐盟將會比照 HCV 病毒之管理方式，納入以 NAT 技術逐批檢測 Plasma pool 中 HIV 病毒之規範；因此 NIBSC 亦已建立方法並定期進行外部能力試驗 (UK National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) in HIV / AIDS) 以長期監控試驗品質，作好因應之準備。

Dr. Holmes 實驗室建立之 HIV NAT 檢測方法採用 COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Kit, version 1.5 (Roche)，一般標準之檢體萃取方式 (Standard Specimen Preparation) 所需檢體量為 200 μ L，其檢測極限 (Detection Limit) 可達 400 copies / mL，超靈敏之檢體萃取方式 (Ultra Sensitive Specimen Preparation) 所需檢體量為 500 μ L，其檢測極限可達 50 copies / mL；兩種檢體萃取方式最大之區別除檢體量不同外，超靈敏之檢體萃取方式增加了一道 23,600 \times g 離心一小時之步驟。依診斷試劑套組操作說明書進行操作，之後以 PE Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9600 thermal cycler 進行反轉錄與核酸擴增步驟，再依操作說明書之 Detection 部分進行操作後以 Micro-well Plate Reader (450 nm) 測量 O.D. 值，最後依操作說明書進行計算判讀。

(三) 研習核酸標準品之製備流程與作業

利用核酸擴增技術 (NAT) 來定性或定量檢體中之病毒核酸量，會執行該項試驗之單位諸如血液製劑製造廠、捐血中心、診斷試劑製造廠、國家醫藥品品質管制單位等；由於每次試驗均需包含標準品以確保該次試驗正確無誤並了解其靈敏度，但其病毒核酸量之表示單位及靈敏度常因不同實驗室或使用不同分析方法而不同，常造成試驗結果無法互相比對之困擾。WHO 為使不同實驗室間之結果能互相比對，使 NAT 試驗標準化，故委託 NIBSC 建立核酸國際標準品，藉由全球廣泛實驗室之共同標定，獲得國際性標準品，訂定單位為 IU/mL。建立之核酸國際標準品供各國國家標準品、各廠對照標準品等 NAT 試驗時使用之標準品校準 (Calibration) 用，進而使使用不同標準品之實驗室能互相比對其結果，達成 NAT 試驗標準化之目的。

NIBSC 已完成 HCV, HIV, HBV, Parvovirus B19 等四項核酸國際標準品之建立工作，HAV 核酸標準品亦已完成共同標定研究，並於今年五月三十日之 WHO 基因擴增技術標準化會議中報告其製備及共同標定研究結果，目前尚待 WHO Expert Committee on Biological Standardization (ECBS) 訂定為國際標準品。其中除 HIV 核酸國際標準品為 Dr. Harvey Holmes 所建立外，其餘四項核酸國際標準品均由 Dr. Saldanha 所建立。

Dr. Saldanha 於 1997 年建立 HCV RNA 國際標準品，屬於 Genotype 1a，含量為 5×10^4 IU/vial；隨後於 1999 年建立 HBV DNA 國際標準品，屬於 Genotype A，含量為 5×10^5 IU/vial；之後於 2000 年建立 Parvovirus B19 DNA 國

際標準品，含量為 5×10^5 IU/vial；HAV RNA 標準品目前含量為 5×10^4 IU/vial。Dr. Holmes 於 1999 年建立 HIV RNA 國際標準品，屬於 Genotype B，含量為 1×10^5 IU/vial。

由於 NIBSC 目前已初步完成五項病毒核酸標準品之建立工作，此次研習期間並未適逢任何核酸國際標準品之實際建立過程，但經過與製備核酸國際標準品之負責人 Dr. Saldanha 與 Dr. Holmes 詳細討論，仍對核酸國際標準品之建立流程與作業有了整體概括之了解，討論過程並且進一步就我國製備國家標準品所需注意事項向兩位專家請益。茲摘要相關內容如下：

核酸國際標準品必須具備下述條件：

- (1) 以凍晶乾燥型式貯存
- (2) 維持長期安定性
- (3) 供給量足夠
- (4) 共同標定單位廣泛周全且具全球性

核酸國際標準品之建立綱要大致如下：

- (1) 製備候選標準品
- (2) 組織共同標定研究
- (3) 分析共同標定結果並訂定濃度
- (4) 評估安定性
- (5) 由 WHO ECBS 訂定為國際標準品

HCV 核酸國際標準品之詳細建立流程大致如下：

- (1) 製備候選標準品

共準備 AA, BB 及 CC 三個候選標準品，其中 AA 與 BB 為同一來源，由經篩檢之 High - titer HCV - positive donation (約為 5×10^6 IU/mL) 而得，經 Murex genotyping kit 鑑定為 Genotype

1;以 2,040 毫升經血清學檢驗篩檢 HCV 與 HIV 抗體陰性，及經 PCR 篩檢 HCV, HAV 與 Parvovirus B19 病毒核酸陰性之冷凍沉澱血漿上清液 (Cryosupernatant) 將 140 毫升之 High-titer HCV - positive donation 作稀釋，分為 AA 與 BB 兩部分，分別進行分裝充填作業，充填量為 0.5 mL/vial，此分裝充填作業完全於安全防護三級實驗室中之生物安全操作櫃內進行，之後並進行冷凍乾燥程序，該冷凍乾燥設備亦須獨立於安全防護實驗室中，與一般冷凍乾燥作業作區隔，因此並未使用 NIBSC 本身製備生物性標準品時使用之冷凍乾燥設備，必須送至符合要求之公司進行之。

(2) 組織共同標定研究

邀請全球 26 個實驗室單位，包含血液製劑製造廠、捐血中心、診斷試劑製造廠、國家醫藥品品質管制單位等，共計 24 個單位同意參加，寄送三候選標準品至參加單位，每一標準品包含四瓶，要求參加單位進行四次獨立之試驗。

(3) 分析共同標定結果並訂定濃度

由 NIBSC 資訊部門之 Dr. Alan Heath 以套裝軟體 GLIM (或 SAS) 進行統計分析共同標定研究之結果，與負責核酸標準品專家 Dr. Saldanha 依據各候選標準品分析結果平均值及其他因素初步決定 AA 為國際標準品，訂定其濃度為 1×10^5 IU/mL。

(4) 評估安定性

分別對 AA 進行實際時間安定性試驗 (Real-time stability study) 及加速性安定性試驗 (Accelerated degradation study) 以評估其安定性；加速性安定性試驗為分別將 AA 貯存於 4°C 及 20°C 200 天、37°C 56 天、45°C 7 天及 21 天，與貯存於 -20°C 之 AA 進行比較，試驗結果顯示 AA 於 0°C 或更低之溫度貯存其效期可達兩年以上。

(5) 由 WHO ECBS 訂定為國際標準品

將建立核酸標準品相關資料及共同標定研究結果提交 WHO ECBS，由該委員會開會討論後訂定為 WHO 國際標準品。

HIV 核酸國際標準品之詳細建立流程大致如下：

(1) 製備候選標準品

共準備 XX, YY 及 ZZ 三個候選標準品，其中 XX 為分離自死於愛滋病之病患，以經血清學檢驗篩檢 HBsAg 抗原、HCV 與 HIV 抗體陰性之冷凍沉澱血漿上清液 (Cryosupernatant) 作稀釋，之後進行分裝充填作業，充填量為 1.0 mL/vial，此分裝充填作業完全於安全防護三級實驗室中之生物安全操作櫃內進行，之後並進行冷凍乾燥程序。YY 為經 PCR 及血清學檢驗篩檢之 HIV-1 RNA (+) /antibody (-) plasmapheresis donation，以 BBI 公司生產之 Base matrix (經血清學檢驗篩檢 HBsAg 抗原、HCV 與 HIV 抗體陰性之 defibrinated plasma) 作稀釋，之後進行分裝充填作業，充填量為 1.0

mL/vial，此分裝充填作業完全於安全防護三級實驗室中之生物安全操作櫃內進行，之後並進行冷凍乾燥程序，據 Dr. Holmes 表示，該冷凍乾燥設備須獨立於安全防護實驗室中，與一般冷凍乾燥作業作區隔，因此並未使用 NIBSC 本身製備生物性標準品時使用之冷凍乾燥設備，必須送至符合要求之公司進行之，由於成本相當昂貴，故只有 XX, YY 製備成凍晶乾燥型式。ZZ 為增殖培養於 MT2 細胞之病毒株，以經血清學檢驗篩檢 HBsAg 抗原、HTLVI/II 抗體陰性，及經 PCR 篩檢 HBV, HCV 與 HIV 病毒核酸陰性之 Pooled clarified plasma 作稀釋，之後進行分裝充填作業，充填量為 0.5 mL/vial，此分裝充填作業完全於安全防護三級實驗室中之生物安全操作櫃內進行。

(2) 組織共同標定研究

全球共計 26 個實驗室單位參與此共同標定研究，包含血液製劑製造廠、捐血中心、診斷試劑製造廠、國家醫藥品品質管制單位等，寄送三候選標準品至參加單位，每一標準品包含五瓶，要求參加單位進行四次獨立之試驗。

(3) 分析共同標定結果並訂定濃度

由 NIBSC 資訊部門之 Dr. Alan Heath 以套裝軟體 GLIM (或 SAS) 進行統計分析共同標定研究之結果，與負責核酸標準品專家 Dr. Holmes 依據各候選標準品分析結果平均值及其他因素初步決定 YY 為國際標準品，訂定其濃度為 1×10^5 IU/mL。

(4) 評估安定性

分別對 *XX* 與 *YY* 進行實際時間安定性試驗 (Real-time stability study) 及加速性安定性試驗 (Accelerated degradation study) 以評估其安定性; 加速性安定性試驗為分別將 *XX* 與 *YY* 貯存於 4°C 及 20°C 26 週、37°C 及 45°C 3 週, 分別與貯存於 -20°C 之 *XX* 與 *YY* 進行比較, 試驗結果顯示貯存於 -20°C 其效價流失率低於 0.2% /年。

(5) 由 WHO ECBS 訂定為國際標準品

將建立核酸標準品相關資料及共同標定研究結果提交 WHO ECBS, 由該委員會於 1999 年 10 月開會討論後訂定為 WHO 國際標準品。

另外由於 Dr. Holmes 剛於 2002 年 5 月完成 WHO HIV-1 RNA Genotype Reference Panel 之共同標定研究, 他認為研究結果相當令人震驚, 因此雖然尚未發表, 他也相當熱切地敘述之, 茲摘要如下:

由於許多早期之 HIV NAT 試驗主要針對 Subtype B, 因此 WHO 要求 NIBSC 建立 HIV-1 RNA Genotype Reference Panel, 涵蓋 Subtype A, B, C, D, E, F, G, H (Group M)、Group N 及 Group O。

共計 24 個實驗室參與共同標定研究, 其中 8 個單位使用定性分析方法, 16 個單位使用定量分析方法。8 個使用定性分析方法單位中: 4 單位使用 in-house 方法, 3 單位使用 COBAS AmpliScreen (Roche), 1 單位使用 TMA (Transcription-Mediated Amplification, Gen-Probe &

Chiron)；16 個使用定量分析方法之單位中：10 單位使用 COBAS AmpliCor HIV-1 Monitor version 1.5 (Roche)，3 單位使用 NucliSens (Organon)，2 單位使用 bDNA version 3 (branched DNA amplification, Bayer Diagnostics & Chiron)，1 單位使用 LCx (Abbott)。結果顯示：

- (1) 定性分析法之結果低於定量分析法。
- (2) 使用 COBAS AmpliCor HIV-1 Monitor version 1.5 之實驗室，其結果一致性良好。
- (3) NucliSens 對不同 Genotype 之分析結果一致性較其他分析試劑差。
- (4) 24 個實驗室中只有 3 個單位使用之分析法有能立檢測出 Group O，對於 Group O 之檢測能力如下：

定量分析法	Monitor	0/10
	NucliSens	0/3
	bDNA	0/2
	Abbott LCx	1/1
	(使用較大檢體量重複試驗始檢測出)	
定性分析法	AmpliScreen	0/3
	TMA	1/1
	In-House	1/4

(四) NIBSC 對於原料血漿混合液之逐批放行作業情形

歐盟已規定用於製造血液製劑之原料血漿混合液 (Plasma Pool) 必須送至國家檢驗機關以核酸擴增技術 (NAT) 逐批檢驗 HCV RNA，檢驗結果為陰性始得進一步製造成血液製劑。NIBSC 有關此部份之逐批放行作業 (Batch release) 則由 Dr. Morag Ferguson 實驗室負責。

NIBSC 要求血液製劑製造廠檢送之原料血漿混合液檢體，每批次須含六份 (每份 1 mL)，一份於病毒學部門以血清學方法進行 HBsAg 抗原與 HCV 抗體之檢驗；一份於反轉錄病毒學部門以血清學方法進行 HIV 抗體之檢驗；四份於病毒學部門以 NAT 方法進行 HCV RNA 病毒核酸之檢驗，每次檢驗使用一份，其餘三份為須進行後續檢驗之備份檢體。

以 NAT 方法進行 HCV RNA 病毒核酸之檢測方法原先採用 COBAS AmpliCor HCV Kit, version 2.0 (Roche)，於八月中旬更新為 COBAS Ampliscreen HCV Kit, version 2.0 (Roche)，此更新使用新系統業經完成確效報告並審核通過後方依指示實施，其確效方法乃依 EDQM CD89/381/EEC 進行，用以評估 NAT 檢測方法之特異性及靈敏度，其確效報告顯示該實驗室使用該系統之檢測極限可達 8.8 IU/mL。使用儀器為 COBAS AMPLICOR Analyzer，可自動執行反轉錄、核酸擴增及偵測步驟，故本系統除檢體萃取為操作者依診斷試劑套組操作說明書進行手動操作外，其餘步驟則依說明書由 COBAS AMPLICOR Analyzer 執行。

(五) HCV 與 HIV 病毒實驗室之設施及相關操作規範

除 NIBSC 本身規範安全資訊（見附錄）外，各實驗室均有專門之操作規範，詳細記載監督管理、進出及通道管制、人員醫療監督、進出實驗室程序、儲存、個人衛生（實驗衣、手套、傷口等）、儀器設備、生物危害廢棄物處理、設備及環境之消毒及緊急狀況之處理等程序。對於所有將進入 NIBSC 及各實驗室工作之人員，涵蓋研習生、臨時僱員等均須於進入實驗室前先研讀各項相關之安全資訊與操作規範，並由 NIBSC 職業健康部門審核個人健康狀況及免疫記錄，必要時須完成特定之訓練。

NIBSC 之病毒學部門與反轉錄病毒部門均分別具備生物安全防護三級實驗室，各項安全資訊、操作規範與實驗室規劃堪稱完善，其目的除為確保試驗品質，主要仍為保障全體同仁之健康與安全，其相關要求整理如下：

(A) 行政管制

(1) 監督管理

實驗室之安全操作規範詳細載明負責人與正副監督管理者及其扮演之角色與工作。資深且受過訓練者可獨立工作，但必須自行負責；未遵循實驗室之安全操作規範將導致無權使用該實驗室。

(2) 人員管制

實驗室門口貼有明顯之生物危險警告標示牌及生物安全防護級數與管制人員進出之告示，大門以密碼鎖控制人員進出，只有經授權人員具有密碼得以進入。

(3) 員工使用規範

各生物安全防護實驗室只有經授權人員依規範完成相關核准作業（見附錄）方可使用。經授權人員清冊應為實驗室監督管理者所持有並張貼於入口處。由於實驗室規劃完善，各實驗室幾乎均為特定種類或目的所使用，同時操作規範亦規定同一使用時間只能有一種生物性物質或從事一類工作，均能避免交叉污染之發生。

(4) 醫療監督

NIBSC 具備職業健康部門負責所有員工之醫療監督。員工甚至研習生於被授權使用生物安全防護實驗室前及執行工作前，必須經由 Medical officer 審核個人健康狀況及免疫記錄，以評估適當與否或安排相關之免疫接種保護措施。對於操作某些第二級與第三級危險性之生物性物質之操作者必須於進行前先建立個人血清基準線，並於進行後定期收集血清檢體監控其健康狀況。

(5) 實驗室相關操作程序

生物安全防護實驗室之使用紀錄應包含使用人員、時間及操作之生物性物質種類與操作內容/形式。於進入實驗室前必須檢查壓力計確定室內壓力符合規範之負壓範圍，並紀錄於紀錄簿中。

進入生物安全防護實驗室內，於穿戴完成保護裝置（見附錄）前不得碰觸任何物品。於實驗室內必須隨時穿戴保護裝置如實驗衣與

乳膠手套，傷口必須以防水材質包紮，長髮必須紮緊或帶頭套；於工作完成後離開實驗室前必須以 70% IMS 或 3% Tegodor 等消毒劑消毒離心機等使用設備及工作檯表面等環境，確保使用區域已乾淨安全是使用者之責任。離開實驗室前必須脫除保護裝置，並以具消毒作用之洗手乳徹底清洗雙手，不得穿著實驗室內之實驗衣離開，非拋棄式實驗衣送洗前必須先行滅菌。

所有第三級危險性之生物性物質必須貯存於生物安全防護三級實驗室，除非經由申請並核准之特殊情況。

安全操作規範內詳載生物安全防護實驗室內之所有儀器設備，未經授權或確認其已消毒安全，不得移出實驗室或進行保養工作。離心機必須採用具有封蓋者，且最好能放置於生物安全操作櫃中，生物安全操作櫃須定期薰蒸消毒與維修保養。

實驗之原始紀錄必須紀錄於乾淨之紀錄紙後裝入塑膠袋，並以 70% IMS 或 3% Tegodor 等消毒劑擦拭後方可攜出。

(5) 廢棄物處理

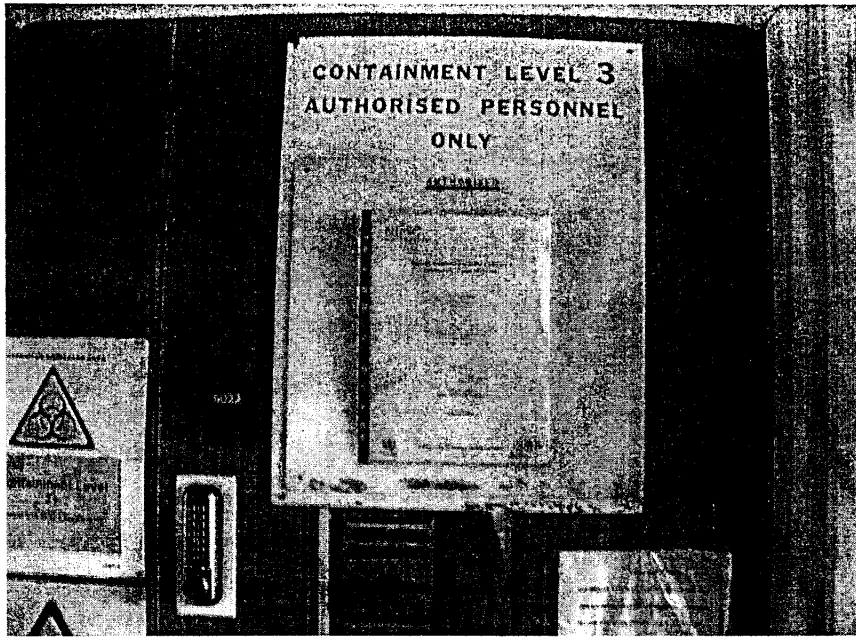
所有廢棄物必須置入滅菌袋後放入滅菌箱中，並於滅菌指示帶上載明實驗室編號及工作者，滅菌箱於攜出前必須以 70% IMS 或 3% Tegodor 等消毒劑擦拭外部。

任何疑似遭污染液體於傾倒前均應以 Tegodor (最終濃度為 3%) 或 Chlorox (最終濃度為 10%) 處理至少 12 小時。

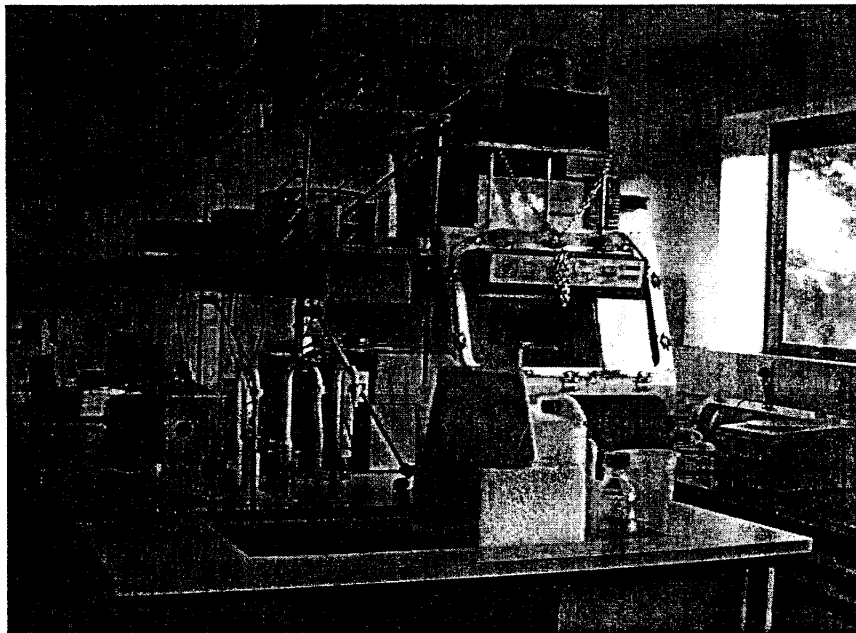
(B) 工程設計之管制

- (1) 雙重入口，使走廊與實驗室入口隔離。
- (2) 負壓實驗室以防止污染物質外洩。
- (3) 生物安全操作櫃是透過薄層氣流及高效率顆粒氣體過濾系統 (High Efficiency Particulate Air, HEPA) 來防止操作感染性物質時產生之空氣污染，可提供操作人員及四周環境有效之初級屏障。

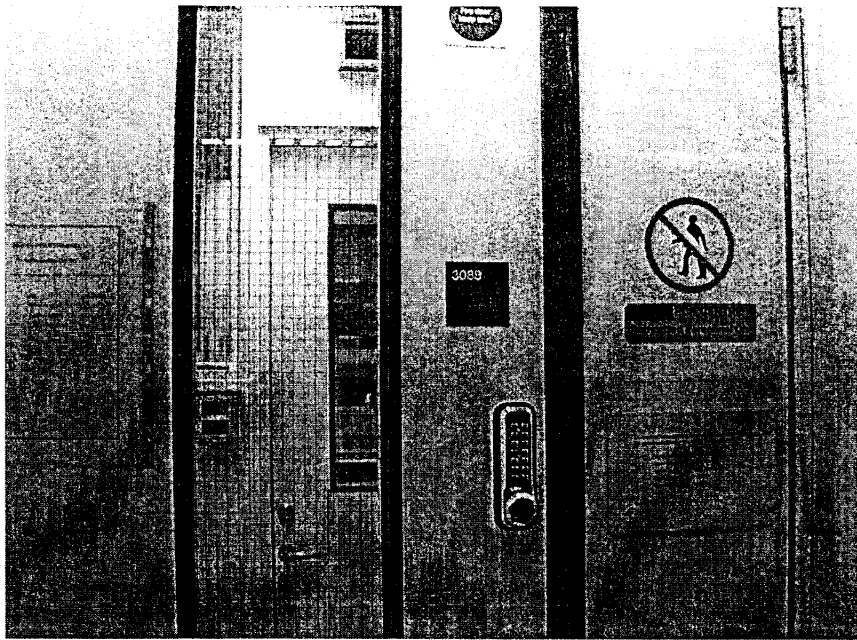
此外，除病毒核酸萃取於生物安全防護三級實驗室內之生物安全操作櫃內進行外，病毒學部門與反轉錄病毒部門之 PCR 實驗室亦均區分為 PCR master mix 製備室 (清淨度最高)、添加 PCR template 室、核酸擴增與檢測 (跑電泳) 室，以防交叉污染造成偽陽性結果。尤其反轉錄病毒部門之 PCR 實驗室之規劃與設施堪稱完善，其規劃設計涵蓋：(1) 雙重入口，使走廊與實驗室入口隔離。(2) 正壓實驗室以維持清淨度，防止導入污染物質。(3) PCR master mix 製備室、添加 PCR template 室、核酸擴增與檢測室以正壓之高低依序區分其清淨度，並以顏色作區分，依序為綠、黃、紅，使各室之實驗衣、試管架等安全防護設備不致混淆而誤用，每室門口均有數字面板隨時監控溫度及壓力。(4) 以密碼鎖進行人員管制，經授權人員方可進入。



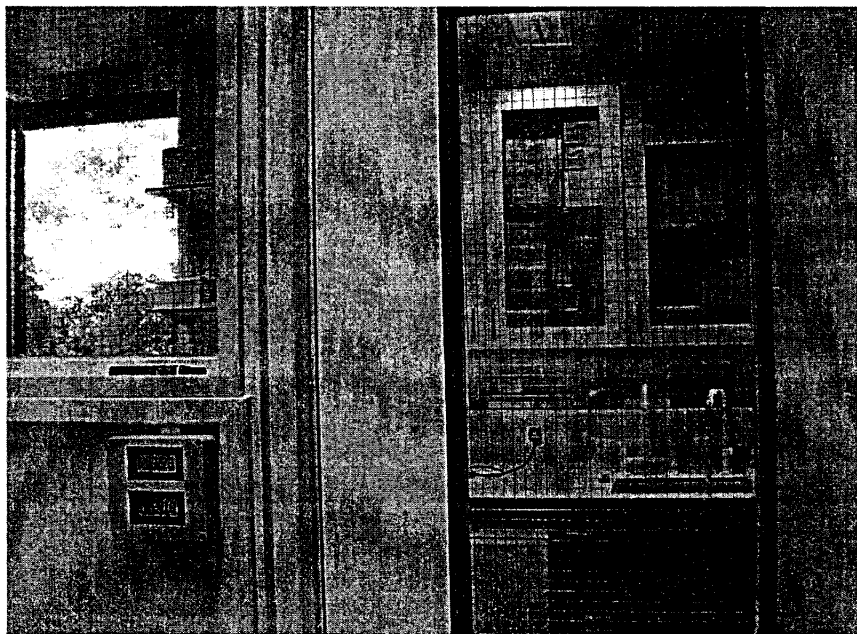
明顯之生物危險警告標示牌，並以密碼鎖管制人員進入



HCV 病毒核酸萃取於生物安全防護實驗室內之生物安全操作櫃進行



反轉錄病毒部門之 PCR 實驗室具雙重入口，使走廊與實驗室入口隔離，並以密碼鎖管制人員進入



實驗室為正壓以維持清淨度，防止導入污染物質，門口均有數字面板隨時監控溫度及壓力

(六) 參觀標準品製備部門之作業情形

實際參訪歷史悠久之標準品製備部門之一般生物性標準品充填、冷凍乾燥與充填環境監測等作業情形，以及 WHO 國際標準品之貯存設備與包裝配送作業。

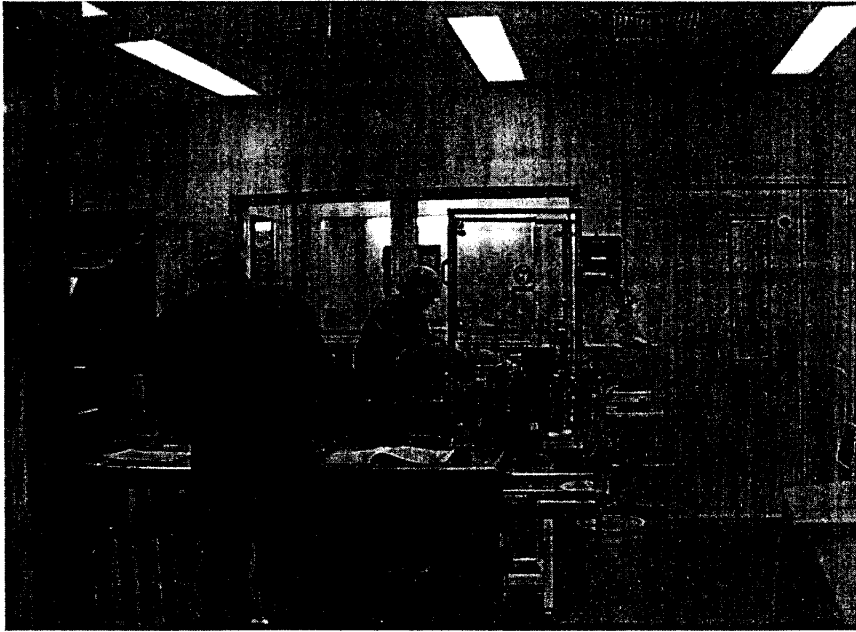
一般生物性標準品之製備均先由 NIBSC 各部門實驗室之專家製備好原液後送交標準品製備部門，進行隨後之充填與冷凍乾燥作業，完成後分類貯存於冷凍或冷藏庫。

為確保充填環境之清淨度，該部門有專人定期採樣進行培養以了解充填環境清淨度，並公佈監測結果於走道牆壁；若發現環境遭污染，將進一步鑑定菌種並找出污染源，該部門走道牆壁上亦張貼有樓層分布圖標明歷年來遭污染之位置與污染菌種類。

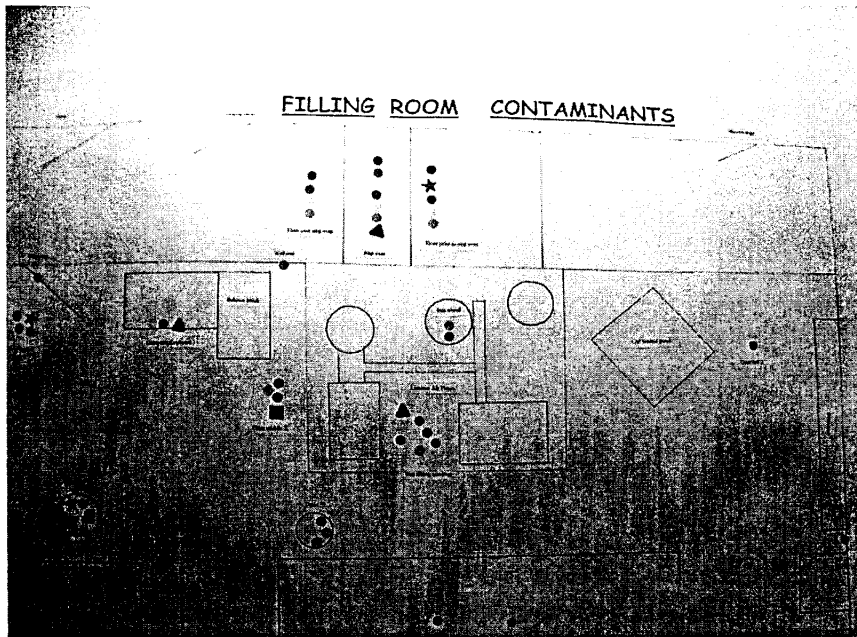
本次研習重點之一『核酸國際標準品之製備』並非如同一般生物性標準品提供原液供標準品製備部門進行後續充填與冷凍乾燥程序即可，由於經血液傳染之病毒核酸屬於危險生物性物質，必須於生物安全防護三級實驗室甚至於生物安全操作櫃內進行稀釋、充填等程序，其冷凍乾燥設備亦須獨立於安全防護實驗室中，完成作業後尚須進行消毒程序，因此病毒核酸標準品之製備不得使用一般生物性標準品之製備相關設施，同時核酸國際標準品標準品製備部門，乃獨立貯存於獨立空間中上鎖之冷凍櫃中。

此外有幸獲此機會參觀標準品製備部門之新建築設施，但該建築目前僅完成硬體建設，儀器設備如冷凍乾燥設備等均尚未進駐，預計須耗時一年完成搬遷及確效作業始能啟用。新標準品製備部門之規劃涵蓋了生物安全防護三級之充填室及冷凍乾燥設備，以及各型 walk-in 冷藏冷

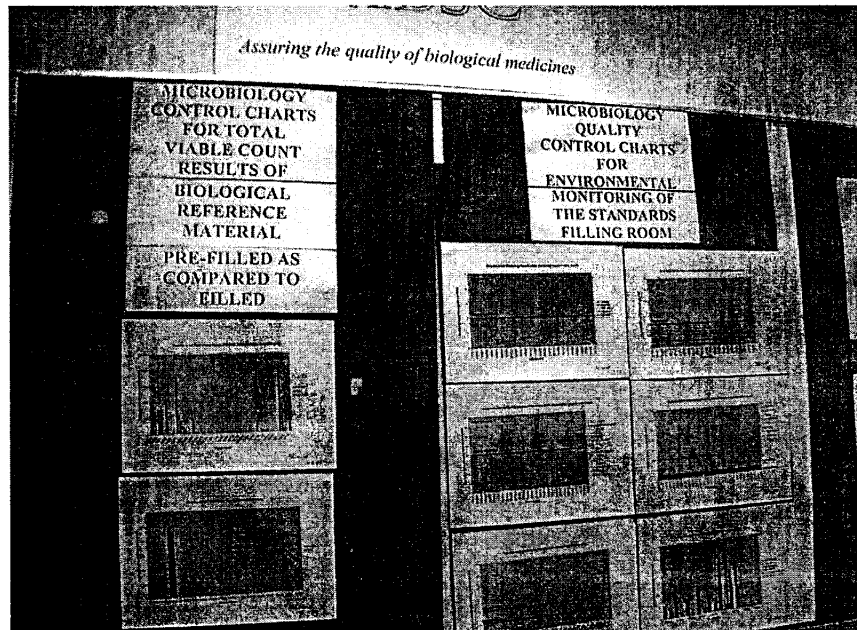
凍庫。由硬體之規劃、動線之設計及相關細節設計均顯示 NIBSC 期許該標準品製備部門具備 cGMP 製造廠充填貯存設施之規格。



一般生物性標準品充填之作業情形



走道牆壁上張貼有樓層分布圖標明歷年來遭污染之位置與污染菌種類



專人定期進行環境微生物監測，並公佈結果於走道牆壁

(七) 參觀血液製劑製造廠 Bio Product Laboratory (BPL)

由於 Dr. Saldanha 之熱心安排，有幸藉此機會實地參觀血液製劑製造廠之相關設施及製造流程。雖然參觀時間僅有 2 小時，在 Dr. Brian Kennedy (Unit Manager of Ethanol Fractionation) 迅速疾走及詳細解說下，亦能對製造流程與相關設備稍具了解。

Bio Product Laboratory (BPL) 並非營利性組織，屬於英國政府 (National Health Service)，生產第八因子、高純度第八因子、高純度第九因子等凝血因子，4.5% 及 20% 白蛋白製劑，免疫球蛋白靜脈注射液 (凍晶乾燥或液劑)、免疫球蛋白肌肉注射液及各類特殊免疫球蛋白製劑如 Anti-D 免疫球蛋白製劑。除製造部門外尚有研究部門進行製程與品質改進之研究工作或新產品之研發工作。

由於國內目前尚無血液製劑製造廠，此次能藉機目睹血液製劑製造廠相關設備規劃、製造過程及製程管制作業情形，對於平日審核之血液製劑案件能有更深刻之體會與助益；實際之經歷希望對於日後國內血液製造廠之設立與品質要求之把關亦有所幫助。

心得

- (1) 血漿原料中病毒之 NAT 檢測技術可配合市售試劑之採用，其優點為方法確效與品質保證之維持容易；但缺點為花費極為昂貴。亦可採用自行建立之方法 (In-house method)，其優點為花費相對較低；但缺點為確效與品質保證之維持不易，必須經常參加外部能力試驗以長期監控檢測技術輔之。此外，NAT 檢測方法必須能偵測出待測血漿原料所屬族群之所有亞型。
- (2) 製備核酸國家標準品前必須先了解待測血漿原料所屬族群之主要亞型，預訂所建立標準品之濃度 (Dr. Saldanha 建議訂定為 1,000 IU/mL)；搜尋 High titer 之陽性血漿，除大約定量外，尚須篩檢其他病毒，並鑑定其亞型；稀釋用之血漿亦須篩檢相關病毒。充填作業須於生物安全操作櫃內進行。此外，與 Dr. Saldanha 討論有關獨立於生物安全防護實驗室之冷凍乾燥設備，我國國家標準品毋須比照國際標準品維持五至十年；一般而言，液態貯存於-70°C 達 2-3 年即可，故不需經過冷凍乾燥程序，節省極大之開銷。
- (3) 參與核酸國家標準品之共同標定至少須 5-8 所實驗室，以確保具備統計意義，並與 WHO 核酸國際標準品進行 Calibration，訂定其國際單位 (IU/mL)，便於國際上實驗室間之互相比對。
- (4) 實驗室規劃設計完善有助於工作效率之提昇及避免污染之發生，然而實驗室安全之維護是屬於全體成員之責任。此外，NIBSC 門禁森嚴，入口警衛嚴格把關並辦理

登記換證（磁卡）事宜，即使員工未攜帶磁卡亦需登記換取磁卡，因為進入建築物大門需刷卡，訪客進出需再登記進出時間並告知總機小姐欲拜訪者，由總機小姐連絡。進入各部門亦需刷卡，而訪客使用之磁卡無法進入各部門實驗室，各生物安全防護實驗室均以密碼鎖管制人員進入，完善之防護措施避免未熟黯實驗室安全操作規範之訪客不慎遭受感染物質危害或造成感染物質之外洩，進而保障全體成員及工作環境之衛生安全。

建議

- (1) 儘速評估 NAT 檢測體系之方向，以建立檢測血漿原料中病毒之 NAT 檢測體系，並建立對疑遭病毒污染之血液製劑進行 NAT 檢測之技術，加強我國對血液製劑病毒安全性之檢驗管理，以保障國人用藥安全。
- (2) 將血液病毒 NAT 檢測納入捐血者血液篩檢項目已是世界趨勢，目前我國中華血液基金會正進行相關評估，期能儘速將血液病毒 NAT 檢測納入捐血者血液篩檢項目，除能增加血漿原料之病毒安全性進而增進血液製劑之安全品質，更能增進未經任何病毒去除/不活化步驟之醫療用品之安全性。
- (3) 美國、澳洲及日本等國均有製備 NAT 檢驗用之病毒核酸國家標準品或對照標準品，我國亦應儘速建立我國核酸國家標準品，除供本局對國產血液製劑各批次 Plasma pool 進行 NAT 檢測病毒時所使用；亦可提供我國捐血中心、血液製劑與診斷試劑製造廠作為 NAT 篩檢試驗或製造病毒核酸診斷試劑之對照標準品。
- (4) 本局實應儘速建立涵蓋生物安全防護三級實驗室及 PCR 實驗室之『血液製劑病毒核酸檢驗核心實驗室』，加速建立檢測血漿原料或血液製劑中病毒之 NAT 檢測體系與製備病毒核酸國家標準品，以加強我國對血液製劑病毒安全性之檢驗管理。
- (5) 本局目前正積極建立血漿原料與血液製劑中病毒 NAT 標準檢驗體系及籌畫製備病毒核酸標準品，英國 NIBSC 已製備各種病毒核酸標準品與病毒核酸標準套組，可供我

國建立 NAT 檢測體系及核酸國家標準品使用，以加速建立速度。此外，期能建立與 NIBSC 相關業務單位之聯繫管道，增加互動機會，進而爭取我國參與國際標準品共同標定之機會，同時亦將邀請 NIBSC 參與我國國家核酸標準品之共同標定，以增進我國國家核酸標準品之公信力。

- (6) 此次能有機會赴英國 NIBSC 研習血漿原料中病毒之 NAT 檢測技術與核酸標準品之製備流程，係因去年本局主管參加國際性研討會時認識英國 NIBSC 負責製備核酸國際標準品之專家，經由其同意並聯繫 NIBSC 承辦訓練單位，才使我國有機會赴 WHO 實驗室 NIBSC 研習，可惜仍因我國並非 WHO 之會員國，僅能以十五天取代原本預計研習四十天之計畫。建議在我國尚未加入 WHO 前，能多提供同仁參加國際性會議之機會，不僅能及時汲取新知，亦可增加與國際專家之交流，獲取非正式之研習機會。