

行政院及所屬各機關出國報告  
(出國類別：開會)

赴法國參加「WHO 基因擴增技術標準化會議」暨  
「EPFA/PEI 血液病原監測與篩檢研討會」

出國人 服務機關：行政院衛生署  
職 稱：簡任技正  
姓 名：陳惠芳

服務機關：行政院衛生署藥物食品檢驗局  
職 稱：薦任技正  
姓 名：陳瑜綸

出國地區：法國  
出國期間：中華民國九十三年五月二十三日至五月三十日  
報告日期：中華民國九十三年八月二十日

50/  
c09301970

系統識別號:C09301970

公務出國報告提要

頁數: 25 含附件: 否

報告名稱:

赴法國參加[基因擴增技術標準化會議]暨[血液病原監測與篩檢研討會]

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:

陳瑜綸 行政院衛生署藥物食品檢驗局 第二組 薦任技正

出國類別: 其他

出國地區: 法國

出國期間: 民國 93 年 05 月 23 日 - 民國 93 年 05 月 30 日

報告日期: 民國 93 年 08 月 20 日

分類號/目: J0/綜合(醫藥類) J0/綜合(醫藥類)

關鍵詞: SoGAT, 基因擴增技術, 血液病原

內容摘要: 以核酸擴增技術(Nucleic acid amplification technology, NAT)檢測血液病毒已是世界潮流趨勢,相較於傳統以血清免疫學方法檢測血液中之病毒抗原或抗體,以核酸擴增技術可直接偵測病毒核酸,縮短檢測空窗期,提高血液之安全性。為因應我國「加強生物技術產業推動方案」中有關國血國用血液製劑之推動實施,參加有關血液病毒核酸檢測之國際性研討會,汲取國外科技最新發展相關資訊及知識,可作為我國對血液製劑原料血漿檢測與管理制度之參考,以因應國血製劑原料血漿查核與審核管理,確保血液製劑之品質與安全性。本次出國係赴法國參加「WHO基因擴增技術標準化(Standardization of Genome Amplification Techniques, SoGAT)會議」暨「EPFA/PEI血液病原監測與篩檢之核酸擴增技術研討會」(NAT Workshop on Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens),並應邀於SoGAT會議中發表我國相關研究結果。開會地點位於巴黎Maison de la Chimie,會議時間由2004年6月25日至27日,與會人員有來自美國、加拿大、英國、法國、德國、比利時、荷蘭、義大利、瑞士、奧地利、西班牙、葡萄牙、匈牙利、丹麥、芬蘭、希臘、澳洲、日本、及台灣等地,共約一百五十人。我國此次於WHO SoGAT會議中發表「Preparation of HBV DNA reference standards and the experience of HBV NAT in Taiwan」,報告有關我國B型肝炎病毒核酸國家標準品之製備及對捐血人B型肝炎病毒NAT檢測評估之研究成果,獲得與會人員之肯定與讚賞。藉由此國際間技術經驗之交流,除可提昇我國對血液製劑檢驗及品質管理之水準,亦對於建立與其他國家之溝通管道及合作關係有莫大助益。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

## 摘 要

以核酸擴增技術 (Nucleic acid amplification technology, NAT) 檢測血液病毒已是世界潮流趨勢，相較於傳統以血清免疫學方法檢測血液中之病毒抗原或抗體，以核酸擴增技術可直接偵測病毒核酸，縮短檢測空窗期，提高血液之安全性。為因應我國「加強生物技術產業推動方案」中有關國血國用血液製劑之推動實施，參加有關血液病毒核酸檢測之國際性研討會，汲取國外科技最新發展相關資訊及知識，可作為我國對血液製劑原料血漿檢測與管理制度之參考，以因應國血製劑原料血漿查核與審核管理，確保血液製劑之品質與安全性。

本次出國係赴法國參加「WHO 基因擴增技術標準化 (Standardization of Genome Amplification Techniques, SoGAT) 會議」暨「EPFA/PEI 血液病原監測與篩檢之核酸擴增技術研討會」(NAT Workshop on Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens)，並應邀於 SoGAT 會議中發表我國相關研究結果。開會地點位於巴黎 Maison de la Chimie，會議時間由 2004 年 6 月 25 日至 27 日，與會人員有來自美國、加拿大、英國、法國、德國、比利時、荷蘭、義大利、瑞士、奧地利、西班牙、葡萄牙、匈牙利、丹麥、芬蘭、希臘、澳洲、日本、及台灣等地，共約一百五十人。

我國此次於 WHO SoGAT 會議中發表「Preparation of HBV DNA reference standards and the experience of HBV NAT in Taiwan」，報告有關我國 B 型肝炎病毒核酸國家標準品之製備及對捐血人 B 型肝炎病毒 NAT 檢測評估之研究成果，獲得與會人員之肯定與讚賞。藉由此國際間技術經驗之交流，除可提昇我國對血液製劑檢驗及品質管理之水準，亦對於建立與其他國家之溝通管道及合作關係有莫大助益。

## 目 次

一、前言及目的 -----	4
二、會議內容	
(一) EPFA/PEI 血液病原監測與篩檢研討會-----	6
(二) WHO 基因擴增技術標準化會議 -----	15
三、心得 -----	23
四、建議 -----	25

## 一、前言及目的

隨著經由血液感染之各種病毒漸次被發現，輸血及使用血液製劑的病毒安全性也倍受重視。傳統篩檢血液病毒是使用血清免疫學方法檢測血液中之抗原或抗體，但由於其空窗期較長，在感染初期可能無法檢出；若是以核酸擴增技術（Nucleic acid amplification technology, NAT）直接偵測病毒核酸，則可縮短病毒檢測之空窗期，提高血液安全性。目前歐、美等國已將 HCV 及 HIV NAT 檢測列為血液篩檢及血漿原料檢驗項目；日本方面則將 HIV、HBV 及 HCV 三種病毒之 NAT 檢測列為血液篩檢及血漿原料檢驗項目；我國衛生署亦於 91 年 12 月 19 日公告新增由人血漿製得血漿藥品之管理規定，其中規範：「混合血漿應以 NAT 檢測 HIV、HBV 及 HCV 等為陰性後，使得供作進一步製造人用血漿藥品之原料血漿」，故以 NAT 檢測血液病毒已是世界潮流趨勢。

由於某些可能因輸血而感染的疾病於各地區之盛行率不同，例如愛滋病與西尼羅病毒等疾病於西方國家感染率較高，而我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。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」。目前中華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家血液製劑製造廠，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國內醫療使用。

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 WHO 基因擴增技術標準化會議及 EPFA/PEI 血液病原之監測與篩檢之核酸擴增技術研討會，可獲取有關核酸擴增技術之新知，並了解各國對血液病毒之檢測與管理現況，作為我國制定血液製劑原料血漿規範之參考，以因應國血國用血液製劑之原料血漿查核與檢測污染病毒之審核管理，提昇血液製劑之品質與安全性。

此外，此次應邀於 SoGAT 會議中發表「Preparation of HBV DNA reference standards and the experience of HBV NAT in Taiwan」，報告有關我國 B 型肝炎病毒核酸國家標準品之製備及對捐血人 B 型肝炎病毒 NAT 檢測評估之研究成果，獲得與會人員之肯定與讚賞。藉由此國際間技術經驗之交流，除可提昇我國對血液製劑檢驗及品質管理之水準，亦對於建立與其他國家之溝通管道及合作關係有莫大助益。

## 二、會議內容

### (一) 第十一屆 EPFA/PEI 血液病原監測與篩檢之核酸擴增技術研討會 (11<sup>th</sup> NAT Workshop on Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens)

此次 EPFA/PEI 核酸擴增技術研討會係由歐洲血漿分劃協會 (European Plasma Fractionation Association, EPFA) 及德國生物製劑國家檢定機構 Paul Ehrlich Institute (PEI) 共同主辦，今年為第十一屆會議，開會地點位於法國巴黎 Maison de la Chimie，會議時間為 2004 年 6 月 25 日整天及 6 月 27 日上午，與會人員為各國政府單位、研究機構、血液中心、血液製劑製造廠、檢驗試劑製造廠等相關領域的專家學者，分別來自美國、加拿大、英國、法國、德國、比利時、荷蘭、義大利、瑞士、奧地利、西班牙、葡萄牙、匈牙利、丹麥、芬蘭、希臘、澳洲、日本、及台灣等地，共約一百五十人，於會中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。

研討會之內容包括：(1) 血液安全及 IVD 之規範、(2) NAT 應用之當前議題、(3) 其他血液病原之篩檢、(4) 血液篩檢之現況及未來發展、(5) 血液安全性之評估、(6) 新興病原之監控等議題，會議內容重點如下：

#### (1) 血液安全及 IVD 之規範

首先由德國 PEI 的 Prof. R. Seitz 介紹歐盟對血液安全之規範，歐盟血液指令 (EU Blood Directive) 2002/98/EC 為血液管理體系之基本規範，有關技術需求方面之指令為

2004/33/EC 及附錄，與血漿管制標準書（Plasma Master File, PMF）相關指令為 2003/63/EC 及 CPMP（Committee for Proprietary Medicinal Products）guideline。血液指令適用範圍包括血液及成分血之收集、檢驗、製備、儲存及配送。

接著由美國 FDA 的 Dr. I. Hewlett 介紹 FDA 對體外診斷試劑（IVDs）及新技術產品之規範，她先說明影響血液安全性有五個層面：供血者篩檢、供血者檢驗及再進入（re-entry）、血品檢疫、過失/意外報告及病原不活化。主管機構應針對血液及血漿檢驗用 IVDs 的分析確效、供血者檢驗與處置及產品管理等制定相關規範。有關 NAT 檢測部分，用於血漿原料篩檢之 HIV-1 及 HCV NAT 於 2001 年取得美國 FDA 許可，用於全血篩檢之 HIV-1 及 HCV NAT 於 2002 年取得美國 FDA 許可。HIV-1 NAT 對混合血漿檢測靈敏度應達 100 IU/mL，對單一供血者之檢測靈敏度應達 10,000 IU/mL；HCV NAT 對混合血漿檢測靈敏度應達 100 IU/mL，對單一供血者之檢測靈敏度應達 5,000 IU/mL。新技術產品方面包括微陣列（Microarray）及奈米技術產品，要應用於血液檢測仍有待進行研究評估及建立標準。

## （2）NAT 應用之當前議題

首先由日本廣島大學的 Prof. H. Yoshisawa 說明 HBV-NAT 在流行地區之檢驗結果分析。日本之 HBV 盛行率較歐美國家高，而日本自 1999 年開始即全面施行捐血者 NAT 篩檢，同時檢測 HIV-1、HBV、HCV 三種病毒，在 1999 年 7 月至 2000 年 1 月間檢驗 pool size 為 500，共篩檢 2,140,207 件血清學檢驗為陰性之檢體，NAT 檢測結果



為陽性者計有 HBV 19 件 (0.0088 %)、HCV 8 件 (0.0037 %)、HIV 0 件；在 2000 年 2 月至 2004 年 4 月間檢驗 pool size 為 50，共篩檢 23,094,404 件檢體，NAT 檢測結果為陽性者計有 HBV 448 件 (0.0194 %)、HCV 70 件 (0.0030 %)、HIV 8 件 (0.0003 %)，所以降低 pool size 可有效提高 HBV 檢出率。

其次由法國 EFS 的 Dr. A. Assal 說明 HBV-NAT 在非流行地區之實施現況。法國為 B 型肝炎低盛行率地區，HBV 慢性帶原者約佔 0.2-0.5 %，每年有 2,000 至 3,000 個新病例，其中 5-10 % 感染者會變為慢性帶原者，約有一半的慢性帶原者會引發肝硬化或肝癌。有關供血者之篩檢，法國自 1971 年開始實施 HBsAg 篩檢，1988 年開始實施 Anti-HBc 篩檢，目前 HBV-NAT 尚未納入常規篩檢項目。有關 HBV minipool-NAT (MP-NAT) 與 individual-NAT (ID-NAT) 之檢驗研究顯示，與 HBsAg 檢驗空窗期相較，MP-NAT 約可縮短 5 天，ID-NAT 約可縮短 15-20 天。由於法國已對供血者施行 HBsAg 及 Anti-HBc 篩檢，現今認為 MP-NAT 對 HBV 篩檢之助益有限，若要應用於血液篩檢則宜採用 ID-NAT 進行 HBV 檢測。

接著由美國 ARC 的 Dr. S. Stramer 介紹 West Nile Virus (WNV) 在美國流行情形及檢驗研究，WNV 可經由蚊子叮咬而傳播，北美洲於 2002 年爆發 WNV 大流行，美國有 4,156 個感染病例，其中 284 人死亡；加拿大有 73 個病例，其中 2 人死亡。WNV 亦可經由輸血感染，於 2003 年即有 23 件因輸血感染 WNV 之報告病例。為避免輸血感染 WNV，美國 FDA 於 2003 年核可 WNV NAT 檢驗試劑之 IND，於血液中心進行 WNV 篩檢。美國紅十字會 2003 年

研究結果顯示，供血者 WNV ID-NAT 陽性率為 1.14 % (349/30,501)，其中 51 % (181/349)為確定案例。

本議程最後由德國 PEI 的 Dr. J. Blumel 說明 Parvovirus B19 之變異種對血液篩檢及血漿製劑之影響。典型 B19 病毒 DNA 序列具高度保存性（變異性小於 1 %），而目前已發現二種 B19 病毒變異種：Erythrovirus V9 及 Erythrovirus A6，其 DNA 序列與典型 B19 病毒有所差異，有些針對典型 B19 病毒檢驗之 NAT primers 可能無法偵測到 B19 病毒變異種，造成偽陰性結果。有關病毒不活化研究結果顯示，將 B19 病毒加入 5 % Albumin 中，於 56°C 放置約 30 分鐘或於 pH 4.3, 37°C 放置約 2 小時，對於典型 B19 病毒與 A6-like 變異種均可有效不活化。由於 B19 病毒變異種亦具致病性，所以檢測血漿原料中 B19 之 NAT 方法應可偵測到典型 B19 病毒及 B19 變異種，始可確認其安全性。為評估各製造廠及實驗室對 B19 NAT 之檢驗能力，歐盟 EDQM 於今年 4-5 月間舉辦 B19 NAT 能力試驗，共有七家製造廠及包括我國衛生署藥物食品檢驗局等十所官方實驗室參與，該能力試驗檢體組中亦包括 A6-like 變異種，現已收到各實驗室之檢驗報告，正進行結果分析。

### (3) 其他血液病原之篩檢

首先由美國 NIH 的 Prof. P. Brown 說明 vCJD 篩檢技術及可行性，有關疑似經由輸血感染 vCJD 有一報告案例，受血者於 1996 年輸注一袋紅血球濃厚液，供血者於 1999 年被診斷為 vCJD 患者，而該受血者於 2003 年亦被診斷為 vCJD 患者。對於 vCJD 的檢驗及診斷主要還是檢測腦部 PrP，檢驗方法包括 CE、SIFT、Aggregate ligand、CDI、Nucleic acid ligands、Specific Ab 及 Immuno-PCR 等。

其次由英國 NBS 的 Dr. A. Kitchen 介紹對於瘧原蟲及錐蟲之篩檢，瘧疾與錐蟲病（Chagas disease）是血液寄生蟲病，可藉由蚊子傳播，也可能經由輸血感染。在血漿或全血中，於 4°C 環境下錐蟲至少可存活 18 天，瘧原蟲至少可存活 25 天，於冷凍狀態時錐蟲與瘧原蟲均至少可存活 72 小時，血漿製劑製品因須經分離純化製程，故並不會受污染。供血者到高流行地區旅行時遭感染，返國後供血時若尚未發病或為無症狀感染，可能造成受血者亦遭傳染，所以有暫緩捐血之規範，但由於往來國際間旅行的人逐年增加，造成血源不足。若合併血液篩檢方式，可對暫緩捐血之期限加以調整，則有助於增加供血量。在檢驗方法方面，錐蟲病可用抗體檢驗法（包括 HA、EIA、IFAT），瘧原蟲可用寄生蟲鏡檢法、抗體檢驗法（EIA 或 IFAT）及核酸檢驗等方法。

接著由愛爾蘭輸血服務中心的 Dr. W. Murphy 說明有關輸血之細菌感染及篩檢方法。依英國 Serious Hazards of Transfusion (SHOT) 1996 年至 2002 年的研究顯示，輸血細菌感染致死率約為 1/320,000，致病率約為 1/73,000。各國血液中心檢驗細菌污染一般是進行細菌培養，較常使用的系統包括 bioMérieux 公司生產的 BacT/ALERT 及 PALL 公司生產的 PALL BDS，此外還有 Hemosystems 公司生產的 Scansystem 是以螢光偵測，其中以 BacT/ALERT 檢測靈敏度最高。

#### （4）血液篩檢之現況及未來發展

首先由美國 Abbott 公司的 Dr. C. Brennan 介紹該公司發展的 HIV Ag/Ab Combination Assays 檢驗試劑，包括 AxSYM HIV Ag/Ab Combo、PRISM HIV Ag/Ab Combo、

ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo。這些試劑對 HIV Ag 之檢測靈敏度可達 20-30 pg/mL，且可檢測出 HIV-1 group M 及 group O，對 HIV Ab 則可檢測 HIV-1 group M、group O 及 HIV-2。

其次由美國 Chiron 公司的 Dr. B. Phelps 介紹該公司研發生產 WNV 重組抗原及發展 WNV 的血清學檢驗試劑，使用 CHO 細胞株產製 WNV 套膜蛋白 Pre-M 及 E，應用於製造 WNV 血清學檢驗試劑 RIBA SIA 及 ELISA。目前該試劑尚在研究階段，初步結果顯示 WNV RIBA SIA 可檢測人類抗 WNV 抗體，WNV ELISA 亦具有良好的特異性與靈敏度。

接著由美國 Roche 公司的 Dr. J. Nunes 介紹該公司 NAT 血液篩檢平台之發展。Roche 公司第一代血液篩檢平台為 COBAS Ampliscreen 系統及可執行 multiplex 同時篩檢 HIV-1、HCV、HBV 的 AMPLINAT MPX 系統，還有因應 WNV 大流行而緊急開發的 TaqScreen WNV 系統。TaqScreen WNV 平台的儀器設備包括進行自動化核酸萃取的 COBAS AmpliPrep 及進行定量 PCR 檢測的 COBAS TaqMan 96。開發中的下一代 NAT 操作平台有 cobas s200 及 cobas s400，可用於 HIV-1/HCV/HBV multiplex 及 WNV 檢測，提供更快速準確的檢驗結果。

有關血液篩檢未來技術發展議題，是由美國 Roche 公司的 Dr. S. Herman 介紹 DNA 晶片。將各種病原基因之相關 DNA 片段作為探針 (Probes) 置於晶片上，檢體經核酸萃取與擴增反應後，與晶片上的探針進行雜交反應，可檢測多種病原。若能將 DNA 晶片技術應用於血液篩檢，可同步檢測各種血液病毒，提高血液篩檢之效率，但由於

DNA 晶片檢驗技術相當繁複，且有關 multiplex PCR 對各種病毒檢測結果之影響，以及 DNA 晶片檢驗之靈敏度與特異性仍待進一步評估，故 DNA 晶片用於血液篩檢之技術目前尚在研發階段。

#### (5) 血液安全性之評估

首先由荷蘭 Sanquin Diagnostic Services 的 Dr. P. Strenger 說明血液安全概論。有關輸血安全之基本原則包括選擇適當供血者、血液篩檢、減除白血球、病毒不活化、適當供應及適當使用。為探討血液供應與人類開發指數 (Human Development Index, HDI) 之關係，經統計有採集血液的 178 個國家，其中已開發國家 (高 HDI) 55 個，開發中國家包括中 HDI 國家 88 個及低 HDI 國家 36 個。計算各國人口每千人之平均供血率，高 HDI 國家為 46.7、中 HDI 國家為 7.3、低 HDI 國家為 3.6，因此開發度越高的國家供血率越高。對於供血者病毒檢驗結果進行分析，結果顯示 HIV 及 HBV 之感染率為低 HDI 國家高於中 HDI 及高 HDI 國家，而 HCV 感染率則為中 HDI 及高 HDI 國家高於低 HDI 國家。依 WHO 2001-2002 年報告資料，已開發國家供血數為四千九百萬人次，其中超過 99 % 血液均經檢驗；開發中國家供血數為三千二百萬人次，其中 81 % 血液經檢驗，但有 19 % 未經檢驗，所以仍有必要提昇開發中國家對血液篩檢之普及率，以促進血液安全性。

其次由非洲血液安全基金會的 Mr. J. Busch 介紹非洲推動血液安全之現況。為預防經由血液傳染的 HIV 及其他疾病之傳播，非洲已成立血液安全基金會，總部位於南非約翰尼斯堡，工作任務包括協助北非各國建立或促進國家輸血服務品質、加強捐血宣導、工作人員訓練、提昇實驗

室檢驗系統及提供諮詢服務等，該基金會的成立對於非洲地區輸血安全有極大助益。

接著由澳洲 NRL 的 Prof. E. Dax 說明澳洲及亞太地區之血液篩檢實驗室品質評估研究。NRL 執行外部品質評估計畫 (external quality assessment schemes, EQAS)，每年提供 3 組 NAT panels (2 組為 NRL 製備、1 組來自荷蘭 VQC 實驗室) 給血液篩檢實驗室進行檢測，以評估各實驗室對 HIV-1 及 HCV NAT 檢驗之品質與一致性。2003 年評估結果顯示，對於 HCV 高含量檢體 (500 copies/mL) 檢出率為 94.7 % (54/57)，HCV 低含量檢體 (38 copies/mL) 檢出率為 87.7 (64/73)，對於 HIV-1 group O 之檢出率為 71.9 % (41/57)。與前幾年之結果相較，各實驗室之檢驗品質確實有逐年提昇。

#### (6) 新興病原之監控

首先由英國 University of Edinburgh 的 Prof. P. Simmonds 介紹新興血液病原。血液病原除 HIV、HBV、HCV、HAV 等傳統血液病毒外，近年來又發現新病毒如：HGV/GBV-C、TTV、HHV-8，與尚未確認但已納入血液安全考量之感染原如：vCJD，以及新興病毒如：West Nile Virus。由於可能仍有許多血液病原尚未被發現，為確保輸血安全，對於血品進行病毒不活化處理有其必要性。

其次由美國加州大學的 Prof. E. Delwart 說明發現新病原之方法，可藉由臨床症狀評估、表現差異分析、電腦分析、病毒 DNA 序列比較等方法進行病原鑑識。

接著由荷蘭 Erasmus MC 的 Dr. A. Osterhaus 介紹可能危及血液安全之新興病毒的相關研究。由於生態及社會環

境之變遷，人類與動物接觸頻繁，可能產生新興人畜共通傳染病，或是病毒基因自行重組突變，也可能演變成新病毒。例如在 1918 年、1957 年、1968 年均曾因流行性感  
冒病毒突變，造成世界性大流行，有上百萬人因而死亡。近年來亞洲地區發生禽流感，北美地區發生 West Nile Virus 流行，以及 2002-2003 年間爆發 SARS 大流行，均屬新興病毒。為因應新興病毒對人類健康之衝擊，首先必須能快速發展相關診斷技術及健全疾病監控網，再進一步發展抗病毒藥物及疫苗。

## (二) WHO 基因擴增技術標準化會議(Standardization of Genome Amplification Techniques, SoGAT)

WHO 基因擴增技術標準化會議是由 WHO 生物製劑國際標準品實驗室--英國國家生物製劑標準品暨管制研究所 (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)主辦,此次為第十七次會議,於 EPFA/PEI NAT 研討會結束後,緊接著於 6 月 26 日下午及 6 月 27 日舉行。此次會議討論內容包括 (1) NAT 標準化、(2) NAT 檢測面臨之挑戰、(3) Parvovirus B19、(4) NAT 與能力試驗、(5) 各國相關經驗與現況等議題。

### (1) NAT 標準化

美國 FDA 的 Dr. I. Hewlett 說明 NAT 標準化之概論, NAT 可用來檢測多種血液病毒,經由 NAT 篩檢可偵測出感染初期之供血者,減少輸血感染的機率,也可降低用於製造血液製劑之原料血漿中的病毒含量。因為 NAT 檢測結果直接影響血液安全,所以檢驗體系標準化極為重要。建立 NAT 標準化檢驗體系必須考量所應用之 NAT 方法 (PCR、TMA、bDNA); 是否可檢測出病毒不同的 subtypes; 檢測所用 pool sizes 的大小; NAT 方法之靈敏度、特異性及再現性。NAT 的品保 (Quality Assurance) 包括分析確效、檢驗試劑與儀器之品管試驗、檢驗規格標準、優良製造與優良實驗室規範。建立 NAT 標準化首先必須要有標準品,目前美國 FDA 已建立 HIV、HCV、HBV、B19 及 HAV 之 NAT 標準品, WNV 標準品尚在製備中。標準品可用於 NAT 之品管及品保、申請許可時之檢驗及上市後之監控管理等。



英國 NIBSC 的 Dr. H. Holmes 介紹 SoGAT 及 WHO NAT 標準品之發展。1994 年於赫爾辛基舉行第一屆 EPFA/NIBSC NAT 研討會，促成了 SoGAT 工作小組的成立，並於 1995 年 4 月在 NIBSC 舉行第一次 SoGAT 會議。SoGAT 會議的任務包括檢驗方法標準化、新技術之開發、標準品之建立與供應。到目前為止已建立 HCV(1997 年)、HIV-1 (1999 年)、HBV (1999 年)、Parvovirus B19 (2000 年)、HAV (2002 年) 五種 NAT 檢驗用 WHO 國際標準品，且於 2002 年建立一組 HIV-1 genotypes 檢驗標準套組。

英國 NIBSC 的 Dr. A. Bristow 及美國 Chiron Diagnostics 公司的 Dr. B. Phelps 介紹合成標準品(Synthetic Standards)。目前 WHO NAT 標準品均是由人類血漿所製備的，診斷製劑業者希望也能發展合成標準品，並與 WHO 合作進行相關研究。初期評估結果顯示合成 HCV RNA 作為標準品應具可行性，後續將與現行標準品比較及進行分析確效。

德國 PEI 的 Dr. M. Nubling 說明 PEI 對 CE marking 的觀點，依據歐盟體外診斷試劑指令 (IVD Directive 98/79/EC)，體外診斷試劑要在歐洲上市使用必須取得 CE marking，但有關檢驗用之參考物質、in-house NAT 檢測、核酸萃取試劑等是否須取得 CE marking 則未有明確之規定。依 PEI 的看法，參考物質方面，如屬國際標準品或供作為外部品質評估計畫 (EQAS) 使用之標準品，可不受規範；但實驗室或製造廠內建立及使用之對照品或控制組，則應受該指令之規範。有關 in-house NAT 檢測及核酸萃取試劑是否須取得 CE marking，可能視情況不同而有不同做法，目前尚未有定論。

英國 NIBSC 的 Dr. M. Ferguson 說明 NIBSC 工作標準品申請 CE marking 之情形。NIBSC 認為其製備及提供給英國血液中心之工作標準品屬體外診斷試劑，依歐盟體外診斷試劑指令應申請 CE marking。目前已取得 CE marking 的 NIBSC 工作標準品有 HBsAg working standard and monitor sample、Anti-HCV working standard、Anti-HIV 1 working standard、Anti-HIV 2 working standard；正在申請 CE marking 的 NIBSC NAT 工作標準品有 HCV RNA 及 HIV RNA。

## (2) NAT 檢測面臨之挑戰

WHO 的 Dr. W. Wood 說明器官與組織移植之安全性考量，依 WHO 統計全世界每年器官移植數，肺臟約 1,000 例、心臟約 6,000 例、肝臟約 13,000 例、腎臟約 50,000 例；組織移植方面每年更多達 300 萬至 500 萬例。有關移植之安全性除手術及排斥之風險外，也可能感染疾病，例如經由硬模或角膜移植感染 CJD，經由器官或組織移植感染 HIV 或肝炎。要降低移植感染之危險性，應對捐贈者進行篩檢，對組織細胞產品進行檢驗及安全性測試，並對受贈者持續追蹤檢查。

加拿大血液服務中心的 Dr. J. Saldanha 說明對於遺體捐贈者組織之血液病毒 NAT 檢驗，一般用於臨床檢驗之檢驗試劑並不適用於遺體捐贈者檢體之檢驗，因為以抗體檢測結果呈偽陽性比例高，以 NAT 檢測則會有偽陰性情形，此外有關檢體之品質（是否產生溶血或自溶現象）也會影響檢驗結果。Dr. Saldanha 由醫院取得 36 件遺體組織或血液檢體，依照一般核酸萃取及 RT-PCR 方法進行 HCV RNA 檢測，結果有 20 件為陽性，16 件為陰性，但 16 件陰性檢

體中有 6 件是由於抑制作用造成偽陰性。後來在進行 RT-PCR 前，先以 Qiagen AX matrix (InhibitEX) 處理檢體，則可去除抑制作用，得到正確的結果。

### (3) Parvovirus B19

德國法蘭克福血液銀行的 Dr. K. Roth 介紹該血液銀行對於 B19 之檢驗，是採用同步定量 TaqMan PCR 系統，篩檢之 pool sizes 為 96，針對所有血品均進行檢測，該檢驗方法 95 % 檢測限度為  $10^3$  IU/mL，容許限值為  $<10^5$  IU/mL。若檢測結果為  $\geq 10^5$  IU/mL，則必須確認個別陽性血袋並將其銷毀；若結果為  $<10^5$  IU/mL 而  $>10^3$  IU/mL，則不須確認陽性血袋，所有血袋均可放行不作任何標記，可用於一般病患之輸血；若結果為  $<10^3$  IU/mL，則在血袋上標記 "Parvovirus B19 not detectable"，可用於如免疫抑制、再生不良貧血或孕婦等高危險群之輸血。

英國 NIBSC 的 Dr. C. E. Hana 說明有關 B19 去除/不活化之研究，將  $10^{11}$  IU/mL B19 加入 Factor VIII 產品，凍結乾燥後於  $80^\circ\text{C}$  處理 24 及 72 小時，然後進行 B19 感染試驗，結果處理 24 小時之產品可降低 2.5 log 感染單位，處理 72 小時之產品則不具感染力。

日本紅十字會血漿分劃中心的 Mr. K. Furuya 說明 B19 於 Factor VIII 產品中可呈現 intact virus virion、disrupted virion、DNA fragment 三種型態，使用 20 nm nanofiltration 可除去 virus virion 及 disrupted virion，DNA fragment 則可以用 Q-Sepharose 將其分離。

英國 NIBSC 的 Dr. S. Baylis 說明 B19 變異種之檢驗，B19 目前已發現有三種 genotypes，genotype 1 為典型的

B19 病毒，genotype 2 為 A6-like 變異種，genotype 3 為 V9-like 變異種。評估市面上 Roche 及 Artus 的 B19 定量檢驗試劑套組，結果 Roche 的試劑無法檢測出 genotype 2 及 genotype 3，Artus 的試劑則可檢測出三種 genotypes，其主要的差異在於 primers 與 probes 設計之位置。NIBSC 檢測 58 件 plasma pools，並未發現有 B19 變異種，但 B19 NAT 檢驗方法之建立仍須考量對各種 genotypes 之檢測能力，以避免造成偽陰性之檢驗結果。

美國 FDA 的余翁美瑛博士說明 FDA 對 B19 NAT 檢測之規範，建議製造血液製劑之血漿 manufacturing pools 之 B19 DNA 含量應  $< 10^4$  geq/mL，全血應盡量確認 B19 高含量之血袋，避免 B19 高含量 ( $\geq 10^6$  geq/mL) 之血品被用於輸血。目前大部分血液製劑製造廠已將 B19 NAT 篩檢列為製程管制之檢驗項目。

奧地利 Baxter 公司的 Dr. M. Gessner 說明對於 B19 檢測設定含量限度及實際檢測結果比較，由於檢驗有其差異性，若希望所有血漿混合液之 B19 含量均  $\leq 10^4$  IU/mL，則 B19 含量限度應設定為  $10^3$  IU/mL，以避免有少部分血漿混合液雖檢驗結果合格，但實際上 B19 含量已超出設定限度值。

#### (4) NAT 與能力試驗

此議題首先由 Bayer 公司的 Dr. C. Hill 說明以 NIBSC HIV-1 subtype A 及 subtype B 標準品，對 Bayer HIV-1 定量 bDNA 試劑 (Versant HIV Version 3.0 bDNA) 進行品保評估計畫。英國 NIBSC 的 Dr. C. Davis 說明第二批 HIV-1 NAT 國際標準品的製備，目前正進行共同標定計

畫，待完成結果分析，預定今年八月於 WHO ECBS 會議中討論定案後開始供應。

接著由英國 Health Protection Agency 的 Dr. V. James、義大利 Istituto Superiore di Sanita 的 Dr. G. Pisani、德國 PEI 的 Dr. M. Chudy、荷蘭 Sanquin Diagnostic Services 的 Dr. H. Drimmelen 及德國 Charite, Campus Benjamin Franklin 的 Dr. H. Grunert 分別報告對各實驗室執行 HIV、HCV、HBV 等血液病毒 NAT 檢測之能力試驗評估結果。整體而言，各實驗室之檢測能力及品質有逐年改善提昇之趨勢。

#### (5) 各國相關經驗與現況

德國 Qiagen 公司的 Dr. F. Krieg-Schneider 說明該公司生產有關 NAT 檢體製備之試劑及標準化體系，包括手動核酸萃取試劑 QIAamp DSP Virus Kit 及自動化核酸萃取儀器 BioRobot M48，對於 DNA 及 RNA 之萃取均可得到良好的實驗結果。QIAamp DSP Virus Kit 及 BioRobot M48 已分別於 2004 年 4 月及 5 月取得 CE certification。

我國衛生署陳惠芳簡任技正報告有關製備 B 型肝炎病毒核酸國家標準品之過程及對台灣地區捐血人進行 HBV NAT 篩檢之結果。我國衛生署藥物食品檢驗局製備首批 HBV 核酸國家標準品，所使用陽性血漿原液之 HBV 含量約  $10^9$  IU/mL，其 genotype 為 B，serotype 為 adw。以陰性血漿（HIV-1、HBV、HCV、HAV、B19 NAT 檢測均為陰性）對 HBV 陽性血漿原液進行系列稀釋，製備成 HBV 含量約  $10^6$  IU/mL 之國家標準品（0.5 mL/vial），以及含量約  $10^3$  IU/mL 之工作標準品（1 mL/vial），然後將製備分裝完成之標準品分送各參與實驗室進行共同標定。共有 11

個國內外實驗室參與此共同標定計畫，國外檢測單位包括美國 CBER/FDA、日本國立感染症研究所、英國 NIBSC、加拿大血液服務中心、澳洲 Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory (VDRL)；國內檢測單位包括台大肝炎研究中心、疾病管制局及藥物食品檢驗局；另有三家診斷試劑製造廠（Roche Diagnostics、Artus GmbH、Digene Diagnostic Technology）參與。共同標定結果經彙整及統計分析，最後決定標示含量「B 型肝炎病毒核酸國家標準品」為  $10^6$  IU/mL，「B 型肝炎病毒核酸工作標準品」為  $10^3$  IU/mL。為對台灣地區 HBsAg 陰性而 HBV DNA 陽性捐血者所佔比例作初步評估，藥物食品檢驗局於 2003 年中由捐血中心取得血段進行檢測，對於 1296 件檢體以每 12 件 pool 的方式檢測 HBV DNA，結果並未檢出 HBsAg 陰性而 HBV DNA 陽性之檢體，HBsAg 及 HBV DNA 均為陽性之檢體有 5 件（佔 0.4%）；後續不採 pool 方式，而以單一檢體個別進行 HBV DNA 檢測，共檢測 516 件檢體，結果檢出 HBsAg 陰性而 HBV DNA 陽性之檢體有 6 件（佔 1.2%），HBsAg 及 HBV DNA 均為陽性之檢體有 2 件（佔 0.4%），因此對 HBV DNA 以 pool 方式檢測，其檢驗之靈敏度似嫌不足，若要將 HBV NAT 應用於血液篩檢，宜先評估降低 pool size 或採用單一檢體進行檢測。

接著由美國 BBI 公司的 Dr. M. Manak 介紹該公司所製造用於 Human Papilloma Virus (HPV) DNA 檢驗之品管套組；德國紅十字輸血服務中心的 Dr. L. Pichl 介紹以磁珠技術進行血漿混合液中病毒 DNA 或 RNA 之萃取方法；最後由瑞士輸血服務中心的 Dr. C. Niederhauser 說明瑞士施行 HCV NAT 篩檢之經驗及成果。

大會最後再次強調 SoGAT 之發展方向與任務，應致力於與血液、組織及器官之病毒安全性相關之定性與定量核酸檢驗之標準化，內容包括：

1. 血液病原(含病毒、細菌及寄生蟲)核酸檢驗之國際標準品與參考試劑之開發、評估與供應。
2. 執行實驗室間對於候選標準品之共同標定計畫、方法確效及再現性評估。
3. 建立主管機關、研究實驗室、血液製劑製造廠、檢驗試劑製造廠、診斷實驗室、血液銀行間之溝通管道。
4. 新一代試劑與標準品之研究與開發（例如：合成核酸、非感染性生物物質）。
5. 新興病原及基因變異病原所需檢驗標準品之開發。
6. 新興技術(如多引子核酸檢測方法、微陣列檢測方法)所需標準品之開發。
7. 核酸濃度及抗原濃度與感染力相關性之評估方法的建立。
8. 病原滅除方法之評估與檢測感染力所需標準品之開發。

### 三、心得

1. 我國此次應邀於 WHO SoGAT 會議中發表「Preparation of HBV DNA reference standards and the experience of HBV NAT in Taiwan」，報告有關我國 B 型肝炎病毒核酸國家標準品之製備及對捐血人 B 型肝炎病毒 NAT 檢測評估之研究成果，獲得與會人員之肯定與讚賞。藉由此國際間技術經驗之交流，除可提昇我國對血液製劑檢驗及品質管理之水準，亦對於建立與其他國家之溝通管道及合作關係有極大助益。
2. 為使血液病毒核酸檢驗能達標準化，歐美等先進國家均已建立 HIV、HCV、HBV 等病毒核酸檢驗標準品及標準套組。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 檢驗用病毒核酸國家標準品，乃為刻不容緩之課題。到目前為止，我國已建立 HBV、HCV、Parvovirus B19 NAT 之標準檢驗體系，並製備完成首批 B 型肝炎病毒核酸國家標準品，後續將陸續製備 HCV 及 Parvovirus B19 之病毒核酸國家標準品。所製備之標準品除可用於對國產血液製劑血漿原料進行病毒 NAT 檢測，亦可用於病毒核酸檢驗相關試劑產品查驗登記及品質審查，也可供我國捐血中心、血液製劑與診斷試劑製劑製造廠作為 NAT 檢測之對照標準品。
3. 於研討會中有專家提出有關以 NAT 檢測 Parvovirus B19 變異種之議題，研究結果顯示有些檢測方法及檢驗試劑無法偵測出某些變異種，可能造成偽陰性而誤判，影響



血液安全性。所以建立 NAT 檢驗方法之標準化及確效評估極為重要，我國於建立標準化檢驗方法時亦應進行相關評估研究，以確保檢驗結果之準確性。

4. 藉由參與此次國際研討會，獲取有關核酸擴增技術之新知，並了解各國對血液病原之檢測與管理現況，可作為我國制定血液製劑原料血漿規範之參考，以因應國血國用血液製劑之原料血漿查核與檢測污染病毒之審核管理，提昇血液製劑之品質與安全性。

#### 四、建議

1. 歐美各國血液中心已將 HCV 及 HIV-1 之核酸增幅檢驗 (NAT) 列入捐血者常規檢驗項目，日本自 1999 年開始即全面性以 NAT 方法對捐血者檢測 HBV、HCV 及 HIV-1 三種病毒。NAT 可直接偵測血漿中病毒，縮短病毒檢測空窗期，有效降低輸血感染率。我國捐血中心至今尚未施行以 NAT 檢測相關病毒，實應儘速規劃並執行之，以提高血液製品之安全性。
2. 對於血液中心施行 NAT 篩檢之結果分析顯示，將血漿檢體以 pool 方式進行 HIV 及 HCV NAT 檢測可有效縮短檢測空窗期。但有些 HBV 帶原者其 HBsAg 血清學檢驗為陰性，且血中 HBV DNA 含量低，以 pool 方式進行 HBV NAT 檢測之靈敏度可能不足，所以建議針對 HBV NAT 檢測應考慮降低 pool size 或採用單一檢體進行檢測。目前我國中華血液基金會正在規劃將 NAT 列入血液篩檢項目，宜先對國內捐血者 HBV DNA 感染情形進行評估，作為規劃執行相關作業之參考，以符合實際需求。
3. 於國際性會議中發表論文，報告我國研究成果，不僅可使各國人員認識我國，更能增進與其他國家交流之機會。建議能多鼓勵同仁參加國際性研討會，以汲取國外科技最新發展相關資訊及知識，更應積極爭取於會中發表論文或發言的機會，有助於提昇我國於相關領域之地位及國際知名度。