

出國報告（出國類別：開會）

赴美國參加「第 18 屆血液病原基因擴  
增技術標準化會議」暨「第 12 屆  
IPFA/PEI 血液病原監測與篩檢研討會」

服務機關：行政院衛生署藥物食品檢驗局

姓名職稱：楊依珍 薦任技正

派赴國家：美國

出國期間：94.05.22-94.05.29

報告日期：94.08.26

## 摘 要

本次出國係赴美國國家衛生研究院園區（NIH Campus）參加「基因擴增技術標準化會議（Standardization of Genome Amplification Techniques, SoGAT）」及「IPFA/PEI 血液病原監測與篩檢研討會（IPFA/PEI NAT Workshop on Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens）」，獲取血液病毒核酸擴增技術檢測之新知與各國之管理現況，應用於本局建立血液中病毒核酸檢測體系及相關標準品之製備，並藉機建立與他國相關領域專家之溝通管道，以便日後能隨時掌握最新技術發展及建立共同合作關係。基因擴增技術標準化（SoGAT）會議主辦單位英國國家生物標準品暨管制研究所（National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC）為 WHO 生物性標準品國際實驗室，「IPFA/PEI 血液病原監測與篩檢研討會」由國際血漿分劃協會（International Plasma Fractionation Association, IPFA）與德國生物藥品主管機關（Paul-Ehrlich-Institute, PEI）主辦。SoGAT 會議討論重點為血液病毒核酸檢測標準化及 WHO 國際標準品製備等議題，IPFA/PEI NAT 研討會主要探討血液中病原監測與篩檢之核酸擴增技術最新進展與相關規範。

# 目 次

摘要	2
目次	3
一、前言與目的	4
二、會議內容	7
(一) 基因擴增技術標準化會議	7
(二) IPFA/PEI 血液病原監測與篩檢研討會	26
三、心得	42
四、建議事項	44

# 一、前言與目的

近年來血液製劑在台灣地區醫療上之使用頻率增加，使確保血液製劑之病毒安全性更顯重要，亦是目前世界各國衛生主管機關持續努力之任務之一。對於血液製劑病毒之安全性，除了於血液製劑製程中須加入經確效之病毒去除/不活化步驟外，致力於篩檢出血漿原料及混合血漿中之污染病毒，進而降低污染病毒量，持續為世界各國著重努力之方向。由於目前病毒檢測仍有技術上之極限，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，近期亦已核發多張 NAT 分子診斷試劑許可證；日本赤十字社已自 1999 年 7 月起針對所有血品進行以 NAT 檢測 HBV、HCV 與 HIV-1，且厚生省已規範自 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工作試劑（Working Reagent）供 NAT 診斷試劑之研發與檢測體系標準化所用。我國衛生署於 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；91 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，並要求以溶劑及清潔劑處理之人用血漿藥品，應加入另一道病毒去除/不活化步驟，其確效資料應顯示可有效去除/不活化 HAV 至少  $10^4$  IU/mL 以上，否則應以 NAT 檢測 HAV 為陰性後使得供作血漿原料；此外並建議於混合血漿或迷你混合血漿施行 Parvovirus B19 之 NAT 檢驗，結果低於  $10^4$  IU/mL 方可供作進一步製造血漿藥品之原料。

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。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，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 90 衛字第 026815 號函核準備查「國血國用」衛生政策，於 90 年 7 月 16 日行政院台 90 經字第 042646-1 號函核准經濟部核定之「推動血液製劑工業措施」。總統並於 94 年 1 月 19 日頒布「血液製劑條例」，以達到血液製劑自製自給自足之最終目的，顯示「國血國用」政策勢在必行。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國內醫療使用，落實「國血國用」的目標。

本局身為國家血液製劑與診斷試劑品質管理機關，應建立血漿原料與疑遭污染血液製劑之病毒核酸擴增標準檢測體系與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，保障國人使用血液製劑之安全。另核酸國家標準品除供本局將來對國產血液製劑之血漿原料進行 NAT 檢測用，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、血漿原料或分子診斷試劑製造品管之對照標準品，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。故藉由持續參與國際相關研討會議，獲取血液病毒安全相關新知，除作為我國對血液製劑與血品品質管理之參考，並藉機建立溝通管道，以便日後能隨時掌握最新技術法規發展及建立共同合作關係，同時亦將邀請各國相關單位參與我國核酸國家標準品之共同標定，以增進我國國家核酸標準品之公信力，進而爭取我國參與國際標準品共同標定之機會。

## 二、會議內容

### **(一) 第 18 屆基因擴增技術標準化會議 (International Scientific Working Group on the Standardization of Genome Amplification Techniques for The Safety Testing of Blood, Tissues and Organs for Blood Borne Pathogens, SoGAT XVIII)**

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，為 WHO 生物性標準品實驗室；為提升各國血液病原篩檢相關領域之 NAT 檢測水準，自 1995 年起召開基因擴增技術標準化會議 (Standardization of Genome Amplification Techniques, SoGAT)，該會議主要目的為提供主管機關、血液製劑製造廠、診斷試劑製造廠、捐血機構與檢驗實驗室相關專家就核酸擴增技術 (Nucleic Acid Amplification Techniques, NAT) 及其應用等議題交換觀點，以提升各國相關領域之 NAT 檢測水準。該會議之優先工作即為建立血液相關病毒之 NAT 檢測體系，NIBSC 並已藉該會議發表討論所完成之多項 NAT 檢測用國際標準品

(International Standard) 與工作試劑 (Working Reagent) 之製備工作與國際共同標定研究。

本次為第 18 屆會議，於 2005 年 5 月 24 至 25 日在美國國家衛生研究院園區 (NIH Campus) 內召開，參與者包含各國主管機關、血液製劑製造廠、診斷試劑製造廠、捐血機構、檢驗實驗室、公私立研究機構與學校等代表參與，計有約 126 位來自歐洲各國、美國、加拿大、日本、台灣與新加坡等國代表參與該會。會議內容包含：(1) NAT 標準化之發展方向、(2) NAT 檢測用標準品、(3) NAT 檢測之實施與品質管制、(4) Parvovirus B19 相關議題、(5) HBV 相關議題、(6) 組織、器官篩檢與新興議題等六部份，其內容重點如後述。

## 1. NAT 標準化之發展方向

首先由加拿大衛生部 (Health Canada) 之 Dr. Elwyn Griffiths 說明 WHO 標準品的相關指引及他對於 WHO 生物性標準品的看法。WHO 曾於 1986 年制訂生物性標準品製備指引，並於 1990 年修訂之；另外，WHO 生物性標準品建立程序主要是基於團隊合作，團隊成員涵蓋與該標準品相關之官方檢驗單位與製造廠等單位。一般而言，生物性標準品的問題是變異性大、對其物化特性缺乏充分了解，同時由於歐洲執行委員會 (European Commission, EC) 在體外診斷試劑指令 (IVD Directive 98/79/EC) 採認 ISO 標準，而 ISO 對於 reference materials 的規範是：primary standard



的建立必須為 SI units，因此將來更新的 WHO 生物性標準品製備指引可能將參考 ISO 17511，且將會新增含量測不確定度（uncertainty）及品質保證（quality assurance）之建議。

其次由位於法國之國際度量衡局(Bureau International des Poids et Mesures, BIPM) 之 Dr. Robert Wielgosz 簡介 Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (簡稱 JCTLM)。JCTLM 是由 International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (簡稱 IFCC)、International Laboratory Accreditation Cooperation (簡稱 ILAC) 及 BIPM 為滿足醫學實驗室對於國際認可之高等參考物質、檢測程序及參考實驗室之需求，於 2002 年 6 月 12 日共同合作宣告成立之體制。JCTLM 目前有兩個工作小組，第一工作小組負責參考物質與參考方法部分，第二工作小組負責參考實驗室部分，本次內容主要是敘述參考物質與參考方法部分。由於歐盟體外診斷試劑指令 Annex 1 (3) 對於 Calibrators 與 Control materials 可追溯性之要求，因此診斷試劑製造廠紛紛尋求國際認可之參考物質與檢測程序，以符合該指令對於可追溯性之要求。第一工作小組即負責建立程序來確認與審核診斷試劑製造廠需求之高等參考物質與參考方法是否符合 criteria，並公布符合之高等參考物質與參考方法清單。

接著由美國 AcroMetrix 公司 Dr. Paul Neuwald 報告 NAT 核酸萃取方法之標準化。他首先指出 NAT 檢測方法的 variation 來自檢體類型、操作平台/步驟、操作者/實驗室、calibrators/標準品、檢測試劑及核酸萃取

方法；並舉 CMV DNA Assay Comparison Study 實例證明：同一組系列稀釋濃度之 Panel 以不同核酸萃取方法、相同檢測條件所得線性結果之斜率有所不同，因此他建議有必要以相同檢體、操作平台、標準品及試劑來針對不同核酸萃取方法進行比較研究。

隨後由美國 Ambion 公司 Dr. Cindy Walker Peach 介紹 Armored RNA。Armored RNA 是以 Protein coat 將 RNA 包裹，以防止 RNA 被 nuclease 破壞，可應用於製備病毒檢測用之 RNA 標準品，目前 Armored RNA 同時具有 Nuclease Resistant 與 User Defined 的特性。

接著由荷蘭 Sanquin Diagnostic Services 之 Dr. Theo Cuypers 提出他們的研究成果推論 geq 對於 IU 之 conversion factor 是 assay specific 的。研究中採用之參考物質有 WHO 國際標準品-HCV genotype 1 (NIBSC 96/790)，HIV genotype B (NIBSC 97/656) 及 HBV genotype A (NIBSC 97/746)，以國際共同標定研究結果為標示含量，單位為 IU；以及 VQC 之 PeliCheck reference panel-HCV genotype 1 (S2088)，HIV genotype B (S2092) 及 HBV genotype A (S2184)，以 Bayer bDNA 試劑定量，單位為 geq。研究中涵蓋之診斷試劑套組有 (1) NucliSens Extraction + Cobas Amplicor HCV、(2) Procleix Ultrio HIV-1, HCV, HBV、(3) MultiPrep + Cobas AmpliScreen HBV、(4) AmpliPrep TNAI + Cobas AmpliScreen HIV v1.5、(5) AmpliPrep TNAI + Cobas AmpliScreen HCV v2.0、(6) AmpliPrep TNAI + Cobas AmpliScreen HBV；綜合結果如下表。

### Conversion factors IU to VQC-geq

	AmpliScreen			
	Ultrio	AmpliPrep	MultiPrep	Amplacor
HIV-1	1.7 (1.2-4.3)	1.6 (0.9-2.7)	-	-
HCV	17.0 (5.8-84)	9.4 (3.3-43)	-	5.1 (3.1-9.1)
HBV	20.7 (9.1-60)	12.5 (5.4-40)	11.0 (4.9-33)	-

之後分別由美國 Bayer 公司 *Dr. Susan Bromley* 與 Chiron 公司 *Dr. Bruce Phelps* 介紹合成標準品 (synthetic standards) 之發展與其特性。由於 synthetic standards 是設計合成的，因此具有確認之特性。*Dr. Bromley* 並介紹 synthetic standard 之製程與驗證；*Dr. Phelps* 則說明他們的評估研究與證明 synthetic standards 適用性之 criteria。

本單元最後由美國 Roche Molecular Systems 公司 *Dr. John Saldanha* (前 NIBSC 官員，完成 WHO HCV, HBV, B19, HAV NAT 國際標準品製備，亦為本會議創始籌辦人之一) 提出他對於以 synthetic standards 作為 Primary standards 可行性之看法。他首先比較 biological standards 與 synthetic standards 之優缺點，biological standards 為實際的待測物質，物質性質與檢體性質相似，最能完整反映檢體的所有狀態，且 biological standards 含有完整序列，可以被不同檢測方法的 probe 辨識，因此不同檢測方法所得結果相似，安定性也較佳；synthetic standards 則為特性清楚之同質性物質，較少有先天之變異存在，批次間一致性較佳，

且來源豐富不虞匱乏。他認為 synthetic standards 建立時之評估研究必須涵蓋所有實驗室以了解其是否會造成結果偏差或定量結果不一致，同時主管機關應有更嚴格的要求。Dr. Saldanha 並拋出一些議題供大家深思，如以 synthetic standards 作為 Calibrators 之可行性、將檢測結果之 variation 訂為 Log 0.5-0.6、選擇熟練的實驗室參與標準品共同標定研究，以及建立涵蓋參考物質、參考方法與參考實驗室的 SI 標準品等議題。

## 2. 供 NAT 檢測用標準品

首先由英國 NIBSC 之 Dr. Harvey Holmes 報告第二個 HIV-1 RNA 國際標準品之製備工作。他先介紹 NIBSC 與本會議共同合作建立之 WHO 國際標準品與 Working Reagents，國際標準品部分有 1997 年建立之 HCV RNA (NIBSC 96/790)、1999 年建立之 HIV-1 RNA (NIBSC 97/656)、1999 年建立之 HBV DNA (NIBSC 97/746)、2000 年建立之 B19 DNA (NIBSC 99/800)、2002 年建立之 HAV RNA (NIBSC 00/560)、2003 年建立之第二個 HCV RNA (NIBSC 96/798) 及 2003 年建立之 HIV-1 genotype reference panel (genotypes A-H, NIBSC 01/466); Working Reagents 部分有 HIV-1 RNA PWS 1~3, HCV RNA, HBV DNA, HAV RNA, B19 DNA, Multiplex (HCV, HBV, HIV, B19, HAV) 及 HCV Genotype Panel (genotypes 1-6)。接著說明第一個 HIV-1 RNA 國際標準品 (NIBSC 97/656) 是由 HIV-1 PCR(+), anti-HIV-1(-) 之分離術血漿以 defibrinated plasma 稀釋製備而成，濃度為  $10^5$  IU/mL，共計製備 2,300 瓶，凍晶乾燥後儲存於 -20°C；由於第一個 HIV-1 RNA 國際標準品庫存量漸低以及含有

HBV DNA (可能影響 multiplex assays) 等因素, 於 2003 年本會議中決定建立第二個 HIV-1 RNA 國際標準品, 並建議重新評估第一次共同標定研究中之另一候選標準品 XX 是否適合成為第二個 HIV-1 RNA 國際標準品。該候選標準品亦為 HIV-1 subtype B, 自病人檢體分離後以 human PBMCs 培養增殖, 製備時以 cryosupernatant 稀釋而成, 共計製備 2,200 瓶, 凍晶乾燥後儲存於 -20°C。之後報告第二個 HIV-1 RNA 國際標準品之國際共同標定研究, 總計邀請 10 個單位參加, 請其就候選標準品與第一個 HIV-1 RNA 國際標準品兩檢品執行 3 次獨立試驗, NIBSC 最後收到 8 個單位的數據, 5 個採用定量分析, 3 個採用定量分析, 與第一次共同標定研究結果比較後顯示該候選標準品前後兩次共標結果並無顯著差異 (前次為 5.6 Log IU/mL, 此次為 5.44 Log IU/mL), 顯示其安定性不成問題。他提出一些方案來決定該候選標準品的濃度, 如採用第一次共同標定研究結果 (5.6 Log IU/mL)、第二次共同標定研究結果 (5.44 Log IU/mL) 或結合兩次共同標定研究結果 (5.56 Log IU/mL) 等, 而 NIBSC 統計專家傾向以結合兩次共同標定研究結果來決定該候選標準品的濃度; 此份報告仍將送交 WHO ECBS (Expert Committee on Biological Standardization) 來決定是否成為 WHO 國際標準品。此外 Dr. Holmes 並提及目前 HIV-1 genotype reference panel 有 11 支, 涵蓋 Group M (Subtype A-G 及 AG-GH recombinant)、Group N、Group O, 由於 HIV 多樣性 (diversity) 大, 不尋常之 Subtype 發現頻率漸增, 因此他提議第二組 HIV-1 genotype reference panel 應包含更多不同的 Subtype、Group N、Group O、circulating recombinant forms (CRFs) 以及 HIV-2。

其次由英國 NIBSC 之 Dr. Sally Baylis 報告惡性瘧原蟲 (*Plasmodium falciparum*) NAT 標準品之製備工作。她首先說明有 4 種同屬不同種之瘧原蟲 (*Plasmodia species*) 會導致瘧疾，藉由蚊子傳播，但也會經由輸血感染，爲了進行瘧原蟲 NAT 篩檢，必須建立 *Plasmodium falciparum* NAT 標準品，目前已完成候選標準品製備工作，正在尋求相關實驗室進行共同標定研究。另外她指出前兩個 HCV NAT 國際標準品均爲 HCV 抗體陽性，且以 Cryosupernatant 稀釋製備而成，因此提出擬以 HCV 抗體檢測陰性、NAT 檢測陽性之血漿爲原料，以一般血漿爲稀釋液來製備第 3 個 HCV NAT 國際標準品。

接著由美國 CBER 之 Dr. Marie Rios 報告 West Nile Virus NAT 標準品之建立工作。美國近年來多次爆發 West Nile Virus 大流行，由於 West Nile Virus 曾經輸血與移植等途徑傳染，短而無症狀之急性感染期需以 NAT 篩檢方能檢測到，故美國已規範輸血用血品必須進行 NAT 篩檢，因此 FDA 必須儘速建立 West Nile Virus NAT 標準品以評估 NAT 檢測試劑之分析靈敏度是否符合法規要求。目前 FDA West Nile Virus NAT Panels 有 14 支，由 2 個來源 (NY99 與 FDA-Hu2002) 的 7 個稀釋濃度組成，分別爲 1,000, 500, 100, 50, 10, 5, 0 viral copies/mL，其最終濃度仍會經由共同標定研究來決定；製備初期 NY99 與 FDA-Hu2002 stocks 均經基因特性分析、viral titer 評估與 RNA copy number 定量，結果整理如下表：

Sample	Copies/mL	PFU/mL
FDA-Hu2002	$10^{10}$	$10^{7.5}$
FDA-Hu2002 (60°C 2hr)	$10^7$	0

NY99	$10^{10}$	$10^{7.5}$
NY99 (60°C 2hr)	$10^{6.5}$	0

結果顯示 NY99 與 FDA-Hu2002 stocks 均約為  $10^{10}$  Copies/mL, viral PFU titer 約較 RNA copy number 低 2.5 Log, 60°C 2 小時加熱處理將使其喪失感染力, 定量分析結果亦降低 3.5 Log。首次邀請 7 個實驗室參與共同標定研究結果顯示低濃度之變異性相當大, 未來可能需要進行第二次共同標定研究, 目前正持續進行統計分析。FDA 現行對 West Nile Virus NAT 的規範為個別血者不得超過 100 copies/mL, 在更多有關 viremia 與感染力相關資訊成為已知前可能會更新為規範分析靈敏度。

本單元最後由德國 Qiagen 之 Dr. Dirk Heckel 介紹供病毒診斷用自動核酸萃取的標準化。自動核酸萃取有確保結果完整性、Sample ID 可追溯、減少人為失誤、增加萃取過程管制、萃取過程書面化與可大量處理檢體等優點; Dr. Dirk Heckel 列舉該公司通過 CE 認證之核酸萃取系統, 並舉例說明體外診斷系統必須經過效能評估 (performance evaluation) 方能取得 CE 認證, 評估項目包含檢測極限、是否具線性、線性範圍、準確度、精密度、再現性、耐變性、系統失敗率、交叉污染與臨床特異性等。

### 3. NAT 檢測之實施與品質管制

首先由德國 Charite University Medicine Berlin 之 Dr. Hans Peter Grunert 報告血液病毒與牛腦 BSE prions 之外部品質評估計畫 (External

Quality Assessment Scheme, EQAS)。EQAS 在病毒學方面是由 INSTAND 統籌，經由 WHO 與國際血液安全聯盟 (International Consortium for Blood Safety, ICBS) 授權，自 1997 年起已經執行 12 個病毒基因檢測 EQAS 計畫，會中報告多項數據提供 EQAS 在 HIV, HCV, HBV NAT 的評估經驗，以中位數加減 0.5 Log 為評估標準區間；並介紹德國之國家 BSE 檢測體系外部品質評估計畫 (National BSE EQASs)，自 2002 年 5 月起執行，總計有 57 個單位參與，歷年結果顯示檢測正確率已逐年改善。NAT 檢測體系之品質確保必須結合外部與內部之品質管制，外部品質管制如參與 EQAS 每年 3 次之評估 (2006 年起改為每年 4 次)，內部品質管制則每次試驗均必須以參考物質當作 "Run Control"，此外並介紹 INSTAND (Institute for Standardization and Documentation in Medicine Laboratories) 參考物質。

接著由德國 Paul-Ehrlich Institute (PEI) 之 Dr. Micha Nübling 報告 PEI 對於德國血液篩檢用之 in-house HCV, HIV NAT 所進行之評估研究結果。由於德國捐血機構除 HIV NAT 檢測項目外，於 2004 年 5 月起已正式納入 HIV NAT 檢測項目，其檢測極限要求為 10,000IU/mL single donation，對於採用 in-house NAT 檢測體系之捐血機構，PEI 除審核其檢測體系之設計與確效評估報告 (必須包含分析靈敏度、genotype/subtype、特異性等項目)，亦要求其必須每年參與共同研究計畫以評估其檢測能力。該共同研究計畫包含 12 支 panels，依受測單位之 pool size 調配不同濃度以評估其是否符合 single donation 檢測靈敏度之要求。結果顯示有 2



個捐血機構 (pool size = 96) 無法檢測到 3,160 IU/mL HIV subtype B，有 1 個捐血機構 (pool size = 20) 無法檢測到 10,000 IU/mL HIV subtype B，將要求其改善或改採有 CE 認證之體外診斷試劑；對於 HCV 則大致上均有較佳之檢測能力，檢測靈敏度均可符合法規要求；此外，目前已有 80% 捐血機構納入 HBV NAT 檢測項目，雖然目前尚未規範 HBV 檢測靈敏度之要求，將來共同研究計畫亦可評估納入 HBV 項目之可行性；另外，是否必須使用有 CE 認證之體外診斷試劑以符合 IVD 指令則尚未有最終定論。

隨後由美國 BBI Biotech 公司之 Dr. Mark Manak 報告 HIV、HBV 與 HCV 之 Linearity Panels。Linearity Panels 的設計主要是模仿臨床檢體，其組成爲完整病毒體與 defibrinated plasma，用途爲供檢測體系效能評估、人員訓練與實驗室品質保證計畫用。他舉該公司 HCV Linearity Panels (亦爲 genotype 1) 爲例，報告目前市售診斷試劑之檢測研究結果，如 Cobas Amplicor 爲 2.2 copies/IU，Versant HCV RNA bDNA 3.0 爲 5.2 copies/IU，LCx 爲 4.3 copies/IU，Roche Taqman 爲 0.6 copies/IU。

接著由奧地利 Baxter AG 之 Dr. Matthias Gessner 報告該公司病毒核酸 NAT 檢測結果，提醒大家注意到 Mutants 的存在，並時常參與能力試驗以確保 NAT 檢測體系之檢測能力涵蓋各種 Mutants。

之後由美國 Blood Systems Research Institute 之 Dr. Michael Busch 報告以 seroconversion Panels 比較市售診斷試劑 HIV-1 與 HCV 之 ID (individual) NAT 及 MP (mini pool) NAT。他們以 44 組 HIV seroconversion Panels (計有 145 支檢體) 與 55 組 HCV seroconversion Panels (計有 629

支檢體) 進行 Roche AmpliScreen 與 Gen-Probe/Chiron Procleix HIV-1 與 HCV 之 ID (individual) NAT 及 MP (mini pool) NAT 比較, 其中 Gen-Probe/Chiron Procleix 之 pool size 為 16, Roche AmpliScreen 之 pool size 為 24, 研究結果顯示(1)對於 HIV 之檢測, 1:16 MP 之 Procleix 檢測空窗期比 1:24 MP 之 AmpliScreen 少 0.5 天(每千萬人可多檢測出 0.3 人), 兩者之 ID NAT 檢測空窗期沒有差異; Procleix 之 ID NAT 檢測空窗期比 1:16 MP 少 3.4 天(每千萬人可多檢測出 2 人), AmpliScreen 之 ID NAT 檢測空窗期比 1:24 MP 少 3.9 天(每千萬人可多檢測出 2.3 人)。(2) 對於 HCV 之檢測, 1:16 MP 之 Procleix 檢測空窗期比 1:24 MP 之 AmpliScreen 少 0.6 天(每千萬人可多檢測出 0.5 人), Procleix ID NAT 檢測空窗期比 AmpliScreen ID NAT 少 0.4 天(每千萬人可多檢測出 0.3 人); Procleix 之 ID NAT 檢測空窗期比 1:16 MP 少 1.8 天(每千萬人可多檢測出 1.4 人), AmpliScreen 之 ID NAT 檢測空窗期比 1:24 MP 少 2.1 天(每千萬人可多檢測出 1.6 人); 結論是以個別檢體進行 NAT 篩檢將會比 16-24 個檢體之 pool NAT 篩檢多檢測出 1-2 人/千萬人。

澳洲 NRL 之 Dr. Derren Jardine 報告澳洲與亞洲地區之 NAT 檢測系統品質保證情形。澳洲 NRL 之品質保證方法主要是經由監測診斷試劑效能來評估診斷試劑, 透過外部品質評估計畫 (External Quality Assessment Scheme, EQAS) 與提供品管檢體與品質評估套組之品質管制計畫等方法、逐批監測與搭配教育計畫等品質管理策略, 經由數據報告與計畫間之互動來確保實驗室品質。目前有 25 個血液 NAT 篩檢實驗室參加 NRL 之品質保證

計畫，涵蓋澳洲、紐西蘭、亞洲與歐洲國家；有 14 個實驗室採用 Chiron TMA 試劑，10 個實驗室採用 Roche AmpliScreen 試劑，1 個實驗室採用 in-house 方法；NRL 為使品質監測具及時性，建立了 EDCNet，為網際網路介面之品質監測系統，實驗室輸入品管檢體數據到資料庫可即時顯示品質監測圖表，具即時性與機密性，同時亦可監測實驗室本身與實驗室間之 variation、儀器試劑之效能與操作員之技能。EDCNet 不僅可提供國際間實驗室對於 QC 檢體結果之比較，亦完整提供 QC 檢體、軟體與品質保證相關建議，更可持續監控檢測系統之效能。

本單元最後由波蘭 Institute of Haematology and Blood Transfusion 之 Dr. Ewa Brojer 報告波蘭之 HCV、HIV 與 HBV NAT 檢測現況。波蘭現行對於輸血用血品之血清學檢測有 Anti-HCV、AntiHIV 與 HBsAg，自 2000 年起執行 HCV NAT 檢測，自 2005 年起執行 HIV 與 HBV NAT 檢測。檢測至今發現 HBV 陽性比預期高，多是經由以個別檢體進行 NAT 檢測時發現，同時發現 low level viremia 常會導致 Ultrio triplex 與之後的 Discriminatory test 結果不一致，對於不一致的結果可以 2 mL 檢體進行 Cobas AmpliScreen HBV 來確認是否為 HBV 陽性。

#### 4. Parvovirus B19 相關議題

首先由荷蘭 Sanquin Diagnostic Services 之 Dr. Theo Cuypers 報告他們對於血液製劑製造用血漿中 Erythrovirus genotype 2 與 genotype 3

之調查結果。Erythrovirus genotype 1 以 parvovirus B19 為代表，genotype 2 以 A6 為代表，genotype 3 以 V9 為代表。由於歐洲藥典已經規定自 2004 年 1 月起製造抗 D 免疫球蛋白之血漿混合液必須以 NAT 檢測 Parvovirus B19，未超過  $10^4$  IU/mL 者方能進一步製造抗 D 免疫球蛋白製劑，因此官方檢驗實驗室與製造廠均需建立 B19 NAT 檢測體系；2003 年 6 月歐洲醫藥品品質管理局公布之 Parvovirus B19 NAT 確效指引提及所建立之試驗應能檢測到 Erythrovirus genotype 2 與 genotype 3，2004 年 4 月由歐洲醫藥品品質管理局舉辦之 B19 NAT 能力試驗結果顯示大部分實驗室對於 parvovirus B19 檢測能力佳，但普遍缺乏檢測 Erythrovirus genotype 2 與 genotype 3 之能力，同時發現 Roche B19 DNA 定量分析套組亦無法檢測到 Erythrovirus genotype 2 與 genotype 3，而 Artus B19 DNA 定量分析套組雖可檢測到 genotype 2，卻會低估 genotype 3 結果，因此建議各實驗室應改善其 NAT 檢測體系以涵蓋 Erythrovirus genotype 2 與 genotype 3 之檢測能力。搜尋文獻結果顯示大約 10 萬支丹麥人檢體中未發現 genotype 3，約 14 萬支芬蘭人檢體中未發現 genotype 2 與 genotype 3，約 9 萬支荷蘭人檢體中未發現 genotype 2 與 genotype 3，NIBSC 曾報告來自 9 個製造廠的 52 支血漿混合液檢體未發現 genotype 2 與 genotype 3，Sanquin 重新以針對 genotype 2 與 genotype 3 之檢測方法重新檢測 2003 年 9 月到 2004 年 10 月間的 321 個血漿混合液，結果亦未發現 genotype 2 與 genotype 3；德國 Haemophilia Centre Bonn 曾調查 2000-2003 年間 13 種市面上之凝血因子（計 181 批次）中 genotype 1 與 genotype 2 之存在情形，結果顯示有 42.5% 存在 genotype 1，有 1.1% 存在 genotype 2。結

論為目前數據無法明確顯示是否應能涵蓋所有 variants，需有更多研究數據顯示 Erythrovirus genotype 2 與 genotype 3 之盛行率與病毒量，然而進一步的研究需有這些 variants 的參考物質方能執行。

其次亦是由荷蘭 Sanquin Blood Bank Southwest 之 Dr. Harry Bos 報告以 Ant-B19 篩檢來提供更安全的血品給具 Parvovirus B19 感染風險之接受者。由於成人之 seroprevalence 為 50-80%，每年之 seroconversion rate 為 0.8%；一般健康成人遭受 Parvovirus B19 感染將會產生抗體，或是持續感染一段時間，因此 B19 安全血品是指含有 Anti-B19 IgG 者。Ant-B19 之篩檢是採用 Biotrin Anti-B19 試劑，該試劑是 FDA clear 的體外診斷試劑，其設計是針對 Anti-VP2 之 IgG。愛爾蘭 Biotrin 公司之 Dr. Gordon Elliott 亦報告以 Ant-B19 進行捐血者篩檢來降低或去除 Parvovirus B19 輸血感染之風險。他首先介紹 Biotrin Anti-B19 試劑之檢測原理，並提及目前正在評估該試劑是否亦可檢測 B19 variants A6, V9 之抗體。

本單元最後由日本感染症研究所 (National Institute of Infectious Diseases) 之 Dr. Yoshiaki Okada 報告以 epithelial cell line 評估加熱處理對於 parvovirus B19 之病毒不活化作用。epithelial cell line 是採用 HTB-41 cell，為自人類 salivary gland carcinoma 分離之細胞株；評估巴斯德滅菌法 (60°C 10 小時) 對於 5% 與 25% 白蛋白製劑之 parvovirus B19 不活化效果，以及乾熱法 (60°C 48 小時, 60°C 96 小時) 對於 5% 蛋白製劑之 parvovirus B19 不活化效果；結果顯示巴斯德滅菌法

對於 5% 白蛋白製劑之 parvovirus B19 不活化效果顯著，減少約 4 Log，對於 25% 白蛋白製劑則僅減少約 1 Log；乾熱法對於 5% 蛋白製劑不活化效果不佳。

## 5. HBV 相關議題

首先由日本 Hiroshima University 之 Prof. Hiroshi Yoshizawa 報告他們對於血液篩檢 HBV 之研究。他首先說明 HBV NAT 檢測之重要性，敘述 HBV 持續感染之慢性帶原典型狀態、與急性感染產生抗體之自然時程、急性感染之特性、HBV DNA 含量與 anti-HBc titer 之關係等；值得一題的是，他們曾以較靈敏之 HBsAg 檢測法 (PRISM) 檢測出 268 例 HBV 早期感染之捐血者，其 HBsAg 檢測法 (R-PHA 方法) 與 Anti-HBc 檢測結果均為陰性；此外他們以黑猩猩來探討 HBV 感染，結果顯示 10 copies HBV DNA 可以使黑猩猩感染 HBV，並探討感染之黑猩猩週邊血液中 HBV 之 doubling time。他的結論是：對於 HBV 感染後期，高流行區與低流行區應有不同策略；對於 HBV 感染早期，要以 HBV NAT 檢測達到百分之百血液安全，不管對於高流行區與低流行區而言均是不可能的，必須考慮搭配社會教育等策略。

其次由德國 Paul-Ehrlich Institute 之 Dr. Michael Chudy 報告 HBsAg 與 HBV DNA 之相關性。目前大多數較靈敏的 HBsAg 診斷試劑已可達到 0.01 ng/mL (10 pg/mL)，研究結果顯示以 WHO HBV DNA 標準品檢測時，HBsAg cut-off 約相當於 114 IU/mL，以 seroconversion panels 檢測時約相當於

461 copies/mL;此外,研究顯示 HBV 慢性帶原者其 HBsAg, Anti-HBc, Anti-HBe 之間並無相關性, 研究中曾發現有 17 例 HBsAg 陽性而 HBV DNA 陰性, 之後證實為 HBV 慢性帶原者。

之後由日本紅十字會 (Japanese Red Cross) 之 Dr. Masahiro Satake 報告他們經由全國回溯調查研究來確認實施 NAT 後之 HBV 輸血感染風險。全國回溯調查研究顯示以 pool size 50 進行 NAT 檢測, 每年仍有 6-10 例經輸血導致 HBV 感染; 他們的研究發現 HBV 慢性帶原者通常其 Anti-HBc 為陽性, 至於如何確認 Anti-HBc 陰性是感染早期或晚期則尚待研究。

本單元最後由英國劍橋大學 Prof. Jean-Pierre Allain 報告潛伏性 HBV 感染 (occult HBV) 捐血者特性分析。Occult HBV 可能有不同的診斷結果 (Anti-HBc, Anti-HBe, Anti-HBs), 研究發現某些慢性帶原者其 HBV DNA 檢測結果非常低 (如 17 IU/mL), 顯示捐血者 HBV NAT 篩檢可能必須以 single donation 取代 mini-pool。

## 6. 組織、器官篩檢與新興議題

首先由法國 INSERM 之 Dr. Dominique Challine 報告器官、組織與細胞移植之 HBV 篩檢情形。他先介紹供器官篩檢用之 HBV NAT 檢測試劑, 目前尚缺乏較靈敏的器官用 HBsAg 篩檢試劑, 此外需注意遺體 (cadaveric) 移植之檢體可能會有的偽陰性與偽陽性結果。

其次由荷蘭 Sanquin Diagnostic Services 之 Dr. Marco Koppelman 報告針對遺體移植檢體之 HCV NAT 檢測之確效評估研究。目前針對移植組織之血液傳染病原檢測如(1) 骨頭與小骨(ossicle) 檢測 Anti-HIV 1/2, HIV p24 Ag, HIV-1 DNA, Anti-HTLV 1/2, HBsAg, Anti-HBc, Anti-HCV, HCV RNA, Anti-CMV 與梅毒血清檢驗(TPPA);(2) 眼角膜、皮膚與心臟瓣膜等組織檢測 Anti-HIV 1/2, HIV p24 Ag, Anti-HTLV 1/2, HBsAg, Anti-HBc, Anti-HCV (結果為陽性才進行 HCV RNA) 與梅毒血清檢驗(TPPA)。他們以 4 支檢體為 pool, 每支檢體量為 50uL 血漿, 採用 BioMerieux 之 NucliSens extractor, 搭配 Roche AmpliScreen HCV v2.0; 確效評估研究結果顯示其 95% 檢測極限為 165 IU/mL (840 qeg/mL), 並以 320 支未挑選檢體混合成 80 個 pools 評估其 invalid 百分比 <5%, 額外添加 300 qeg/mL HCV RNA 亦可被正確檢測出, 確效評估研究結果證明以 4 支檢體為 pool 進行 HCV NAT 檢測之可行性。

本單元最後由西班牙 Instituto Grifols 之 Dr. Marta José 報告儲存之血漿檢體中 HCV, HIV-1 與 HBV 核酸之安定性。該議題之所以重要主要是可避免造成偽陰性結果, 尤其是 low-titer 檢體, 以及減少長期儲存與運送時之問題; 他們之前的研究顯示不同 HCV RNA 濃度在 -70°C 與 -20°C 儲存時其核酸降解並無差異,  $10^4$  IU/mL 左右之 HCV 檢體儲存於 5°C 與 25°C 之半衰期分別為 3 個月與 14 天。本次研究目的是為更了解低濃度之 HCV RNA 檢體之安定性, 並評估 HIV-1 與 HBV 核酸在不同溫度下之安定性。結果顯示 100 IU/mL HCV RNA 檢體在 -20°C 儲存 5 年後仍有 285/324 檢測得到, 在 -70°C 儲



存 5 年後仍有 288/323 檢測得到，顯示低濃度之 HCV RNA 檢體 5 年儲存之安定性佳，且 -20°C 或 -70°C 儲存並無區別；1,000 IU/mL HIV-1 RNA 檢體在 -20°C 儲存 3 年後仍有 40/54 檢測得到，在 -70°C 儲存 3 年後仍有 44/54 檢測得到，顯示 HIV-1 RNA 檢體 3 年儲存之安定性佳，且 -20°C 或 -70°C 儲存並無區別，此外  $10^4$  IU/mL 左右之 HIV-1 檢體儲存於 25°C 之半衰期為 7 天； $10^4$  IU/mL 獲  $10^3$  IU/mL 之 HBV 檢體儲存於 5°C 與 25°C 28 天後並無核酸降解情形；大致而言，這些病毒核酸在不同儲存條件下之安定性尚可。

大會最後再次強調 SoGAT 之發展方向與任務仍為致力於血液、組織與器官之 NAT 檢測標準化，依目前研究發展來看，HBV 與 B19 仍為重要議題，對於 HBsAg 與 HBV 之相關性與取代性仍待繼續研究評估，由於 B19 genotype 2 與 genotype 3 之發現，使 B19 NAT 檢測能力是否能涵蓋所有 genotypes 備受關注，對於 B19 infectivity assay 之建立亦極為重要；此外 synthetic standards 之研發仍為未來探討議題之一。

**(二) 第 12 屆 IPFA/PEI 血液病原監測與篩檢之核酸擴增技術研討會**  
**( IPFA/PEI 12<sup>th</sup> NAT Workshop on Surveillance and Screening**  
**of Blood Borne Pathogens )**

此次血液病原監測與篩檢之核酸擴增技術研討會係由國際血漿分劃協會 (International Plasma Fractionation Association, IPFA) 與德國生物藥品國家檢定機構 Paul-Ehrlich Institute (PEI) 共同舉辦，該會議自 1994 年起每年舉辦一次，主要目的為提供主管機關、血液製劑製造廠、診斷試劑製造廠、捐血機構與檢驗實驗室相關專家討論血液病原核酸擴增技術之最新進展與相關規範，以提升各國血液病原篩檢相關領域之知識技術與 NAT 檢測水準。

本次為第 12 屆研討會，於 2005 年 5 月 26 至 27 日在同一地點舉辦，參與者包含各國主管機關、血液製劑製造廠、診斷試劑製造廠、捐血機構、檢驗實驗室、公私立研究機構與學校等代表參與，計有 126 位來自歐洲各國、美國、加拿大、日本、台灣與新加坡等國代表參與該會。會議內容包含：(1) NAT 現行之應用、(2) HBV DNA 檢測之實施、(3) Parvovirus B19 NAT 檢測之應用、(4) NAT 之其他應用、(5) 其他病原篩檢、(6) 新興技術、(7) 全球議題等七部份，其內容重點如後述。

## 1. NAT 現行之應用

首先由法國 Blood bank(Établissement Français du Sang, EFS) 之 *Dr. J. Coste* 報告全球以 NAT 檢測執行捐血篩檢之現況(更新至 2003 年)。調查方式是以問卷方式詢問全球 NAT 專家有關 HCV, HIV-1 與 HBV NAT 實施日期、採用市售體外診斷試劑或 in-house 方法、各套檢測系統之分析效能評估、預測與實際之殘餘風險(residual risk)、及血清學陰性/NAT 陽性之比率等資訊；全球共計 26 個國家收到問卷，如美國、加拿大、英國、法國、德國奧地利、比利時、荷蘭、澳洲、香港等國，回收 18 國問卷結果；調查結果顯示除瑞典尚未實施 HCV NAT，芬蘭、希臘與香港為 ”建議實施” 外，其他 13 個國家均已分別於 1997-2003 年間規定實施 HCV NAT；比例時、法國、德國(2004 年起)、荷蘭、英國(部份)、美國、加拿大、澳洲、香港、希臘及瑞士等國均已規定或建議實施 HIV-1 NAT；奧地利、德國(Red Cross)、希臘(計畫 2004 年起)、西班牙(計畫 2005 年起)、加拿大與香港(計畫中)均已/將實施 HBV NAT，美國與法國則尚在爭議是否實施 HBV NAT。

其次由美國 Blood Systems Research Institute 之 *Dr. Michael Busch* 報告 West Nile Virus 篩檢狀況。他首先說明近年來 West Nile Virus 曾在美國造成多次流行，同時由於文獻報導有多起是經由輸血傳染，因此美國已規定捐血篩檢必須納入 West Nile Virus NAT 檢測項目；並報告 2003 年 7 月至 10 月間以 NAT 篩檢 458.6 萬捐血者之篩檢結果，ID NAT 與 MP NAT 之檢測極限分別為 10 geq/mL 與 100 geq/mL；進而分別探討 ID NAT 與 MP

NAT 搭配 IgG 與 IgM 檢測之檢測空窗期；最後他並提醒至少有 35 種經由蚊子傳染之黃病毒屬 (flaviviruses) 會導致人類疾病，若移入美國所造成之衝擊尚無從評估，部分節肢動物媒介病毒 (arboviruses) 可能證實曾經輸血傳染，如 St. Louis Encephalitis 與 dengue 之研究正在進行中。

本單元最後由法國 National Institute of Blood Transfusion (l'Institut National de la Transfusion Sanguine, INTS) 之 *Dr. S. Laperche* 報告 NAT 檢測對於血清學篩檢之衝擊。法國之捐血篩檢項目：自 1971 年起實施 HBsAg EIA, 1985 年起實施 Anti-HIV-1 EIA, 1988 年起實施 Anti-HBc + ALT, 1989 年起實施 Anti-HIV-1/2 EIA, 1990 年起實施 Anti-HCV EIA, 1991 年起實施 Anti-HTLV EIA, 2001 年起實施 HCV 與 HIV-1 NAT, 2001-2003 年數據顯示未進行/進行 NAT 時 HIV 感染之殘餘風險分別為 1/1,700,000 與 1/3,150,000, HCV 感染之殘餘風險分別為 1/1,560,000 與 1/10,000,000；進而探討是否需因實施 NAT 而修改捐血篩檢項目，經過多項研究數據顯示，即使採用 ID NAT 亦不能刪除 Anti-HIV-1/2 檢測項目，何況現行 NAT 檢測尚未包含 HIV-2；HCV 部分亦同，即使採用 ID NAT 亦不能刪除 Anti-HCV 檢測項目。由於 HBsAg 靈敏度高，因此目前尚未實施 HBV NAT, 現正進行 ID NAT 評估，同時亦將評估實施 HBV NAT 後刪除 HBsAg 與 Anti- HBc 檢測項目之可能性，然而由於 NAT 可檢測到 HBsAg 無法檢測到的 mutants、MP NAT 檢測空窗期與 HBsAg 並無顯著差異及黑猩猩實驗證明 HBsAg 陽性之低病毒濃度 (NAT 陰性) 檢體仍具感染力等數據，目前尚未有定論，未來可能會以極靈敏之 ID NAT 搭配 Anti-HBc 來進行。

## 2. HBV DNA 檢測之實施

首先由美國 Baylor College of Medicine 之 *Dr. B. Hollinger* 概述 HBV 感染之血清學及相關檢驗。HBV DNA 通常於感染後 2-5 週可檢測到，平均較 HBsAg 早 6-15 天；HBsAg 一般則於 ALT 結果異常前 1-35 週或出現症狀或黃疸前 3-5 週出現，於急性感染時達高峰，4-6 個月內降低到無法檢測；Anti-HBc IgM 顯示病毒正持續複製，在一些慢性感染者體內存在但無法檢測；Anti-HBc 顯示過去或現在受到 HBV 感染，注射 B 型肝炎疫苗並不會檢測到；Anti-HBs 則為復原或打疫苗後產生之中和抗體，約有 20% 人口於數年後可能會檢測不到；根據 HBV DNA, HBsAg, Anti-HBc, Anti-HBs 四個診斷結果可以判定 HBV 感染各種時期與狀況，如只有 HBV DNA 陽性時代代表 Preseroconversion 空窗期、只有 Anti-HBc 陽性時代代表 low-level 帶原者或偽陽性等、只有 Anti-HBs 陽性時代代表疫苗注射反應；值得一提的是：HBsAg 消失並產生 Anti-HBs，且 ALT 值回復正常可能仍不能代表 HBV 急性感染已復原，一些報告指出復原後數個月內仍持續檢測到 HBV DNA，顯示 HBsAg 陰性時仍會造成 HBV 感染，此外可能半數慢性帶原者其 HBV DNA 含量極低 ( $<10^2$  geq/mL)。

其次由德國 DRK Blutspendedienst (Red Cross blood transfusion Service) 之 *Dr. K. Roth* 報告 HBV 篩檢方案與降低之風險。經探討德國捐血機構實施 HBV NAT 數據後，結論為 mini-pool NAT (MP-NAT) 靈敏度仍不足，可能需要增加檢體萃取量或實施 individual donation NAT (ID-NAT)，

同時必須考慮 genotype 的多樣性；並報告 1 例潛伏性 HBV (occult HBV) 感染之慢性帶原者，其為 HBsAg 陰性、Anti-HBc 陽性、HBV DNA 只有 50 IU/mL、屬於 genotype D；對於 14 例潛伏性 HBV (occult HBV) 感染之慢性帶原者之研究顯示其 Anti-HBc 均為陽性、MP-NAT 均未檢測出、ID-NAT 只檢測出 1 例，經由 9.6mL 檢體之 Enhanced PCR 方全部檢出，顯示 Anti-HBc 檢測對於潛伏性 HBV (occult HBV) 感染慢性帶原者之靈敏度較 NAT 佳；但若規定 Anti-HBc 陽性者緩捐可能會流失不少捐血者，未來可能會評估納入 Anti-HBc 項目後以 HBV NAT 取代 HBsAg 檢測之可行性；根據文獻探討之結論顯示 HBsAg 與 HBV DNA 之間並無相關性，HBsAg 與 Anti-HBc 陽性者其 HBV DNA 濃度可能會極低，因此可能有 3-6% HBsAg 陽性以目前 MP NAT 無法檢測出。

本單元最後由德國 Paul-Ehrlich Institute 之 Dr. Michael Chudy 報告 HBV NAT 之分析靈敏度與診斷靈敏度。他們研究比較 Procleix Ultrio Assay (Gene-Probe) 與 Cobas AmpliScreen HBV test (Roche) 之分析靈敏度與診斷靈敏度；前者檢體量為 0.5mL，前者檢體量為 0.25mL，分析靈敏度是以 PEI HBV-DNA 參考物質進行評估，再以 Probit 統計分析其 95% 檢測靈敏度，PEI HBV-DNA 參考物質為 genotype D, subtype ayw，HBV DNA 濃度為 50,000 IU/mL，Procleix Ultrio Assay 與 Cobas AmpliScreen HBV test 之 95% 檢測靈敏度分別為 8.49 IU/mL 與 6.08 IU/mL，兩者差異不大；診斷靈敏度是以 5 組 HBV seroconversion panels (ZeptoMetrix) 進行評估，結果顯示 Cobas AmpliScreen HBV test 診斷靈敏度較佳，建議 NAT 檢測系

統應同時納入 seroconversion panels 來進行效能評估；現正持續進行 NAT 檢測體系對於 HBV 慢性帶原者之評估研究。

### 3. Parvovirus B19 NAT 檢測

首先由英國劍橋大學 Dr. Jean-Pierre Allain 報告對於人類 Parvovirus B19 感染相關議題之探討。Candotti 於 2004 年建議將人類 erythrovirus 根據其 NS1/VP1u 序列區分為 3 型 genotype，genotype 1 為一般 Parvovirus B19，genotype 2 為 A6 like variants，genotype 3 為 V9 like variants，一些區域調查結果顯示英國主要為 genotype 1，非洲迦納(Ghana)存在許多 genotype 3；此外一些研究報告指出感染 Parvovirus B19 復原後幾年內仍能檢測到病毒核酸，推論可能與免疫缺乏有關，而捐血者之中和性抗體可加速清除病毒，初步數據顯示同時含有病毒核酸與中和抗體之血液可能不會感染免疫健全之受血者。

其次由美國 FDA CBER 之 Dr. Mei-ying W. Yu 報告她們對於血液製劑 Parvovirus B19 感染力之評估。她首先對 Parvovirus B19 作一完整介紹，由於 Parvovirus B19 非常小（直徑 18-26nm），又屬於無套膜 DNA 病毒，因此一般血液製劑之病毒去除/不活化步驟對其效果有限；該病毒盛行率為 0.003-0.6%，急性感染期血中病毒含量可達  $10^{13}$  geq/mL，而 low level viremia 可能持續多年，由於一般人感染症狀輕微或無症狀，所以捐血時無法透過面談體檢來排除；雖然 Parvovirus B19 一般是經由呼吸道傳染，但已有不少

案例報告其透過血液與血液製劑來傳染，如凝血因子，但究竟多少病毒量會導致感染則尚未明確；CBER 以案例研究與細胞培養方式同時評估最低感染劑量，結果顯示在沒有抗體存在下，Parvovirus B19 最低感染總劑量約為  $10^4$  IU，在抗體存在下則約為  $10^8$  IU，因此 FDA 現行想法為建議將 B19 NAT 列為製程管制項目，單一血袋 B19 濃度高於  $10^6$  IU/mL 者不應作為進一步製造血液製劑原料，而製造血漿混合液（manufacturing pool）B19 濃度不應超過  $10^4$  IU/mL。

本單元最後是由奧地利 Baxter BioScience 之 Dr. T Kreil 報告以 NAT 進行病毒去除/不活化之確效研究。病毒去除/不活化效果通常以細胞感染力研究來評估病毒減少量，對於尚無法以細胞培養繁殖之病毒如 HCV 則採用特性相當之 model virus 來評估，某些細胞感染力研究會因檢體本身含有抗體之干擾而無法作實際正確之評估，如 Parvovirus B19 與 HAV，而隨著定量 PCR 技術之普及與精進，以 NAT 來評估病毒去除效果成為更快速、更靈敏之方法。

#### 4. NAT 之其他應用

首先由 FDA CBER 之 Dr. M. Greenwald 說明美國對於細胞與組織之法規架構。FDA 對於組織的管理早於 1993 年即公佈暫行法規，1997 年公佈正式法規（Final rule），法源依據為公共健康服務法（Public Health Service Act, PHS）Section 361，其目的主要是為預防傳染性疾病之傳播；並陸續



提出相關法規草案，如組織機構登記與產品造冊規定、捐贈者合適性與現行優良細胞組織操作規範，並已相繼公告正式法規，於今年 5 月 25 日生效，此外 CBER 並已公佈多項相關指引供大家參考。歐盟於 2004 年公佈 2004/23/EC 指令，設定細胞組織最低標準，將於 2006 年 4 月 7 日生效，其適用範圍為週邊造血細胞、臍帶血、骨髓幹細胞、生殖細胞、胎兒組織細胞其成人與胚胎幹細胞，並不適用自體移植、血液、血液製劑與器官。美國 FDA 捐贈者合適性法規規範相關傳染性疾病與物質(Relevant Communicable disease agents and diseases, RCDADs)，機構必須對 RCDADs 進行篩檢或檢測，所有的人體細胞組織及其相關產品 (Human cells, tissues, or cellular or tissue-based products, HCT/Ps) 均需篩檢 HIV-1/2, HBV, HCV, TSE 與梅毒螺旋體，富含白血球之活細胞或藥品需額外篩檢 HTLV-1/2，生殖細胞或藥品需額外篩檢砂眼披衣菌與淋病雙球菌，此外法規並提及將會因應新興傳染病新增 RCDADs 項目，如 West Nile Virus 與 SARS；進行捐贈者篩檢之檢體必須於收集細胞或組織同時或前後 7 日內收集，捐贈者篩檢應採用有 FDA 許可證之 Anti-HIV-1/2, HBsAg, Anti-HBc, Anti-HCV 診斷試劑，FDA 也建議採用有 FDA 許可證之 HCV 與 HIV NAT 血液篩檢試劑與遺體檢體篩檢試劑；對於遺體檢體篩檢試劑之上市規定是必須進行靈敏度、特異性與再現性評估，至少以 3 批次進行各項評估，靈敏度、特異性至少需有 50 支檢體，再現性至少需有 20 支檢體，並須提供檢體收集時間、收集方法、儲存條件與前處理方法等相關訊息。

接著由 Puget Sound Blood center/ Northwest tissue center 之 Dr. D. M. Strong 報告遺體檢體之 NAT 篩檢狀況。組織移植曾有 HCV 血清學陰性導致感染，其後調查發現為 HCV NAT 陽性，為縮短檢測空窗期，降低傳染風險，因此相關單位相繼進行 NAT 研究，美國曾有盛行率調查發現組織捐贈之病毒傳染殘餘風險較捐血者高；他們對遺體檢體 NAT 檢測系統之評估包含靈敏度、特異性、再現性、干擾物與檢體安定性等，結果發現心臟未收縮 9-13 小時後及因溶血造成血紅素超過 5.6 g/dL 時對 NAT 有抑制作用，將檢體稀釋 5 倍方無抑制，以此條件評估 Cobas AmpliScreen test 之 95% 檢測極限分別為 HIV-1 v1.5- 400 IU/mL, HCV v2.0- 50 IU/mL, HBV- 20 IU/mL，同時以 spiked study 評估往生前後檢體之檢測能力顯示並無顯著差異；另安定性評估顯示遺體檢體於冷藏 72 小時及室溫 48 小時內均尚稱安定。

本單元最後由荷蘭 Erasmus MC 之 Dr. H. G. Niesters 報告臨床病毒檢測用之分子診斷試劑之標準化與品質管制議題。他首先指出以分子診斷試劑執行臨床病毒檢測之瓶頸，如其檢測範圍是否符合臨床需要、檢測單位之標準化 (IU/mL 或 copies/mL)、不同臨床檢體之核酸萃取方式、萃取後核酸之安定性等，此外實驗室認證、品質管制及參加外部能力試驗仍是需要的；醫學實驗室可以國際標準 ISO 15189 為遵循標準，實驗室對於使用之試劑或市售診斷試劑必須建立本身之分析與效能評估程序，內部品質管制系統必須定期審視更新；此外目前檢測單位以 IU/mL 表示者僅限於捐血機構與血液製劑製造廠篩檢血液傳染病毒，臨床檢測單位仍多以 copies/mL 表示，同時目前只有經血傳染病毒具備病毒核酸國際標準品，且多數國際標準品僅限於單

型 genotype，其餘臨床檢測病毒如 EBV, Enterovirus 等尚無公分子診斷用之國際標準品；同時他有多項建議：需有通用之品質管制方法如 Ct 值來評估不同類型臨床檢體，納入新的核酸萃取系統或檢測系統均應進行確效評估等，最後他建議相關機構須就臨床病毒檢測用之分子診斷試劑之標準化與品質管制相關議題有更深入之討論，方能共同提升人民健康照護。

## 5. 其他病原篩檢

首先由美國 Univ. of North Carolina 之 Prof. M. Brecher 介紹有關捐血機構進行細菌篩檢之各項方法。美國血小板遭細菌污染之比例為 1:1000-2000，因此避免輸血後因細菌感染引發敗血症死亡亦是當前輸血安全之重要議題之一，美國血庫協會（AABB）已要求協會所屬機構對血小板進行細菌污染之篩檢，除了直接進行細菌培養方法外，Dr. Brecher 介紹曾被文獻報導或目前使用之血液細菌篩檢法，如廣為使用之 BacT/Alert Microbial Detection System、Cytometry 搭配 Polymyxin CY-5、Acridine Orange 染色、Pall eBDS (Enhanced Bacteria Detection System)、Scansystem 及以 Multistix 生化試紙檢測葡萄糖濃度與 pH 值等。

其次由荷蘭 Sanquin Blood Bank 之 Dr. H. Reesink 報告以 NAT 進行血液細菌篩檢之研究。他首先比較現有之三大血液細菌篩檢系統，BacT/Alert、Pall BDS 及 Scansystem，其檢測原理分別利用 CO<sub>2</sub>、O<sub>2</sub> 與螢光染色，靈敏度分別為 0.1 CFU/mL、1-100 CFU/mL 與 1000 CFU/mL，檢測時間分

別為 12-36 小時、>24 小時與 1.5 小時；他們研究建立之 NAT 篩檢系統是以 MagNa Pure 進行核酸萃取，引子與探針是設計在存在於所有細菌之 16S ribosomal RNA，以 ABI PRISM 7000 進行 Real-time PCR，系統中並含陽性、陰對照等控制組確認核酸萃取與擴增無誤，且無操作污染；將 NAT 篩檢系統與 BacT/Alert 自動系統進行比較，檢測約 2,000 支檢體(約 10,000 donations) 之檢出率均為 0.8%，顯示靈敏度相當，而 NAT 檢測時間僅需 4 小時，未來將會探討區分活菌與死菌之方法與檢測真菌與孢子之方法。

接著由 Emory Univ. School of Medicine 之 Dr. J. Roback 報告以 NAT 檢測捐血者細胞相關病毒之研究。以往對於高危險群是給予巨細胞病毒 (CMV) 血清學檢驗陰性之產品，亦有臨床試驗在評估經過濾之白血球血品降低輸血傳染 CMV 之效果，然而目前仍持續有輸血傳染 CMV 之案例發生；因此又有許多研究欲評估以 NAT 篩檢 CMV 之效果，然而研究顯示在使用血清學檢驗陰性及過濾程序兩道策略後，NAT 篩檢 CMV 並未對預防感染更有助益；此外經輸血傳染 human herpes virus-8 (HHV-8) 之案例有增加之趨勢，但目前一些研究報告無論是血清學檢驗陽性或陰性之捐血者均無法以 NAT 檢測出 HHV-8 DNA，因此尚不清楚 NAT 對於 HHV-8 檢測能力是否優於血清學檢驗。

本單元最後由美國 FDA CBER 之 Dr. D. Asher 報告 vCJD 之篩檢研究。他首先說明 FDA 針對 TSE 之血液安全策略，FDA 於 1983 年要求撤回受 CJD 牽連之血品，1987 年建議曾施打人類生長荷爾蒙、接受過硬腦膜移植及有 CJD 家族史者暫緩捐血，1996 年新的 vCJD 發現於英國與法國，1999 年 FDA

建議 1980-1996 年間於英國居住半年以上者暫緩捐血，2002 年建議擴大暫緩捐血地理限制（即現行指引），2003 年英國報告一例疑似遭輸血傳染 vCJD 案例，2004 年英國報告第二例疑似遭輸血傳染 vCJD 案例，2004 年 7 月英國報告第二例疑似遭輸血傳染 vCJD 案例，2004 年 7 月英國報告第二例疑似遭輸血傳染 vCJD 案例，2004 年 9 月英國通知某些血液製劑接受者其 vCJD 感染風險可能增加；對於進行血液製劑風險評估後認為有兩大主要因素會影響其 vCJD 風險，一為血漿混合液中 vCJD 捐血者數目，另一為製程對於降低 vCJD 含量之效果，前者可透過暫緩捐血來減少 vCJD 捐血者血漿混入，後者則最好有 2 道有效步驟可不活化/去除 vCJD 物質，必要時需增加步驟並進行確效研究。以目前暫緩捐血方式實無法準確排除 vCJD 捐血者，許多旅居英國暫緩捐血者可能均未受感染，而一些 vCJD 確認案例並未旅居英國或未停留一個月以上，但目前尚無 FDA 核准之 vCJD 血液篩檢與檢測試劑，亦無 FDA 核准之去除 TSE 感染之有效步驟，仍待繼續研究開發；目前檢測血中 PrP<sup>sc</sup> 之問題為檢測靈敏度不足，以及不同實驗室與方法間變異大，一些改善檢測靈敏度之方式正在進行研究，如以沉澱或 Anti-PrP 等 Capture reagents 來增加蛋白質總量、以 Amplifying reagents 或更佳之 Anti-PrP 等方式提升檢測靈敏度，同時需要建立 TSE 參考物質或國際標準品供評估檢測方法或試劑用。

## 6. 新興技術

首先由 Roche Molecular System 公司之 Dr. S. Herman 介紹該公司整套血液篩檢系統-cobas s 201，宣稱為整套具彈性工作流程管理之篩檢系統，是整套全自動 TaqMan-based 之血液篩檢系統；涵蓋 Pooling manager Workstation 電腦（檢體編號資料登入）、Hamilton Microlab STAR Pipettor（pool 檢體）、Cobas AmpliPrep（核酸萃取）、Cobas TaqMan Analyzer（核酸擴增與檢測）、Amplilink Workstation 電腦（連結兩儀器資料送 PDM 伺服器）、PDM 伺服器（三台 Workstation 電腦之連結）、Data Manager Workstation 電腦（檢驗結果報告）。

其次由 Microsens Biotechnologies 之 Dr. S. Wilson 介紹生前（ante-mortem）血液篩檢 vCJD 之 Seprion 系統之研發、評估與執行。由於 Prion 是一種會自我複製之蛋白質，並非病毒，所以並無核酸可擴增檢測，目前亦無免疫反應之報告，檢測問題在於 Prion Protein（PrPc）之靈敏度與特異性；目前已有文獻證明 polyionic polymers 可以與 prion 結合，Seprion 即利用此原理研發，而正常 PrPc 將不會與其結合，檢測程序大致為：採用 225uL 血漿與 Seprion bead 震盪混合 30 分鐘，經過清洗程序後 elute 出 prion，進一步進行 ELISA 分析，檢測時間合計約 3.5-4.5 小時；全血檢測則先進行 cell lysis 與 DNase 處理，與 Seprion bead 震盪混合時間為 60 分鐘，其餘程序相同；以 spiked vCJD 腦組織評估其檢測極限可達 0.03mg vCJD brain，與西方墨點法比較評估其靈敏度與特異性結果分別為 100%與 96%，該檢測系統已証實可診斷出醫源性感染 CJD 病人，目前仍持續

進行檢體量與生前血液篩檢之評估研究，此外他並提及結合 NAT 與酵素免疫分析技術將可得到更靈敏之檢測結果。

本單元最後由 Chiron Blood Testing 公司之 Dr. B. Phelps 介紹該公司之 Ultrio 篩檢試劑搭配 Tigris 儀器之整套血液篩檢系統，是整套全自動之 HCV, HIV-1 與 HBV 血液篩檢系統；以 WHO HCV, HIV-1 與 HBV 國際標準品進行分析方法靈敏度評估，其 95% 檢測極限分別為 4.6 IU/mL, 26 IU/mL 與 11 IU/mL，並以 HBV seroconversion panels 評估該系統縮短檢測空窗期之時間，結果顯示 ID NAT 較 Ortho HbsAg ELISA 提前 18 天，MP NAT (pool size 16) 提前 8 天。

## 7. 全球議題

首先由德國 Paul-Ehrlich Institute 之 Dr.H. Scheiblaue 報告他們對於低開發國家使用之 Anti-HCV 診斷試劑之評估研究。PEI 為國際血液安全聯盟 (International Consortium for Blood Safety) 之一員，其主要任務為藉由提供訓練及技術轉移，以其可負擔且確保品質之血液篩檢試劑達成提升開發中國家之血液安全，而 PEI 為 ICBS 國際診斷試劑評估中心；他們以 200 支收集自各國之陽性檢體 (涵蓋 6 型主要之 genotypes) 及 200 支陰性檢體評估 34 種 ELISA kits 與 9 種 rapid assays，並以 seroconversion panels 評估其縮短檢測空窗期之時間，結果顯示只有 11 種 ELISA kits 符合歐盟 CTS (Common Technical Specifications) 之規範 (靈敏度 100%，

特异性 $\geq 99.5\%$ )，seroconversion panels 評估其檢測到之時間較歐盟核准之診斷試劑約晚 16 天。

其次由英國劍橋大學之 Dr. H. Lee 報告非洲地區血液篩檢之現況。非洲有 50%病人如未立即輸血將慧死亡，因此足夠之供血列為優先需求，目前只有約 40%捐血經過 HCV, HIV 與 HBV 篩檢，而篩檢用診斷試劑之設計均是針對開發國家，用於某些 subtype 不同之區域可能靈敏度不同，此外，提升非洲血液安全之挑戰有高盛行率、人力與金錢之限制、水與電之缺乏、儀器維修問題、生物危害廢棄物之管理、無標準實驗室儀器設備（如生物安全操作櫃與精準之定量吸管等），因此 Rapid tests 快速簡單之操作步驟、毋須多方面訓練、無特殊儀器及維修問題、適用於熱帶地區、相對較不昂貴等等特性至少可以提供一些解決方案；以 Rapid tests 進行捐血前篩檢策略適用於高盛行率地區，可節省捐血相關耗材之使用，且捐血中心冰箱只存放安全的血液，但是必須考慮病人隱私、捐血中心變相成為檢驗中心等議題；經評估現有 Rapid tests 進行血液篩檢結果顯示 HBsAg rapid tests 需要提高其靈敏度，此外 Dr. Lee 認為在盛行率如此高之地區以 Rapid tests 進行捐血前篩檢可以扮演重要角色，以 Rapid tests 進行捐血前篩檢搭配以 NAT 進行捐血篩檢目前正在非洲迦納等地進行評估研究。

本單元最後由 WHO 汎美健康組織(Pan American Health Organization, PAHO).之 Dr. J.R. Cruz 報告拉丁美洲與加勒比海之輸血安全議題。拉丁美洲與加勒比海至今並未全面檢測 HIV、HBsAg 與 HCV，有許多人因輸血而遭病毒感染，在汎美健康組織協助下，目前尚未篩檢之比率已逐年降低，由



2000 年之 0.34, 0.35 與 1.21 降至 2003 年之 0.07, 0.14 與 0.48，因此其經輸血傳染 HIV、HBV 與 HCV 之風險分別由 2000 年之每 10 萬人之 0.47, 21.18 與 3.29 降至 2003 年之 0.08, 0.3 與 2.0；實際由於缺乏篩檢造成輸血感染 HIV、HBV 與 HCV 之案例由 2000 年之 30 人、1,357 人與 211 人降至 2003 年之 6 人、22 人與 147 人，成效極為顯著。

### 三、心得

- (1) 獲取有關血液病毒核酸擴增技術相關新知與各國對於血液病毒之檢測與管理現況，作為我國對血液製劑與血品品質管理之參考，以提升我國血液製劑與血品之品質與病毒安全性。
- (2) 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檢驗方法是否可以檢測出病毒所有的 subtype 與 genotype、檢測之 pool size、方法之靈敏度、特異性與再現性，NAT 之品質保證系統包含分析方法確效、檢驗試劑與儀器之品質管理與優良實驗室操作規範、並以標準品進行檢驗體系之品管與品保。
- (3) 極低 HBV 病毒含量 (10 copies HBV DNA) 即會使黑猩猩遭受感染，一些報告亦指出復原後數個月內仍持續檢測到 HBV DNA，顯示 HBsAg 陰性時仍會造成 HBV 感染，此外可能半數慢性帶原者其 HBV DNA 含量極低 ( $<10^2$  geq/mL)，以 mini-pool NAT 篩檢仍常會造成偽陰性。
- (4) 對於細胞、組織與器官移植捐贈者之篩檢技術持續研發，一般輸血篩檢試劑仍需經由確效評估方能使用於遺體捐贈者檢體篩檢，此外檢體品質 (是否溶血)、收集時間、保存時間均會影響篩檢結果。

(5) 藉參與會議機會當面邀請 PEI Molecular Pathogen 部門主管 Dr. Micha Nübling 來台擔任專家講者，參與本局於今年 10 月主辦之「體外診斷試劑研討會」與協辦之「2005 Symposium of Regulatory and Recent Advance in Biochip and Pharmacogenomics」已獲允諾。並藉機邀請美國 CBER、英國 NIBSC、德國 PEI、日本 NIID、加拿大 CBS 與奧地利 Baxter 公司參與本局今年年底之 Parvovirus B19 核酸國家標準品之共同標定研究。

## 四、建議事項

- (1) 為提升血品之病毒安全性，歐美日各國血液中心目前幾乎均已利用核酸擴增技術對捐血進行 HCV 與 HIV-1 篩檢，以縮短病毒檢測空窗期，我國捐血中心則尚在規劃中，為確保國人用血安全，實應儘速納入常規檢驗項目中，對於 HBV NAT 應採用更靈敏之 single unit NAT 以檢測出極低病毒含量之慢性帶原者。
- (2) 因應國血國用政策之推行，參加該項國際性會議不僅可獲取血液病原檢驗之相關現況與新知，除提升本局血液製劑品質管理能力與相關病毒檢測及核酸標準品製備技術，並藉此與各國相關領域專家建立溝通管道，有助於我國病毒核酸標準品之國際共同標定研究，提升我國標準品之公信力，對促進國際合作與交流有極大助益；更有助於穩固雙方實質關係並進而建立新管道，增加與國內外管理機關之經驗交流，與國際接軌。
- (3) WHO 目前正委託德國 PEI 製備 WHO HBV genotype panel，計畫涵蓋全球各地之 HBV 檢體，我國亦應爭取提供檢體之機會，以促進國際交流與提升國際能見度。
- (4) 宜儘速完成我國血漿原料病毒 NAT 檢測體系之建立及核酸國家標準品之製備，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，亦可供我國捐血中心、血液製劑與診斷試劑製造廠作為 NAT 檢測之對照標準品。