

出國報告（出國類別：研習）

赴波蘭參加第 20 屆「血液病原基因擴
增技術標準化研討會」暨第 14 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：波蘭

出國期間：96.06.10-95.06.17

報告日期：96.09.13

摘 要

本次奉派出國係赴波蘭華沙參加第 20 屆「血液病原基因擴增技術標準化研討會 (Standardization of Genome Amplification Techniques, SoGAT)」及第 14 屆「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)」，本次並於血液病原基因擴增技術標準化研討會 (SoGAT) 上口頭報告我國 B19 病毒核酸國家標準品之製備與共同標定結果，獲得不少迴響，有助於本局能見度之提升。另本局藉會議機會受邀參與 WHO 第三支 HCV NAT 國際標準品之共同標定研究，由英國 NIBSC *Dr. Sally Baylis* 報告內容與交談獲知本局標定結果均落於主要分布族群，相當良好。SoGAT 發展方向與任務仍為致力於血液相關病原之 NAT 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。目前歐盟打算修訂共同技術規範(CTS)中 HBsAg 診斷試劑之分析靈敏度要求為 0.13 IU/mL，值得我們密切注意後續發展，供未來我國規範更新之參考；此外，目前已有診斷試劑製造廠研發出以微陣列平台為基礎之定量 PCR 檢測系統雛型與登革熱檢測試劑雛型，相關評估研究與輸血傳染率等議題亦值得我們密切注意。藉由參與國際研討會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。

目 次

摘要	2
目次	3
一、前言與目的	4
二、行程紀要	8
三、內容	9
(一) 血液病原基因擴增技術標準化研討會	9
(二) IPFA/PEI 血液病原監測與篩檢研討會	35
四、心得與建議	49

一、前言與目的

近年來由於性汙濫與毒癮患者共用針頭行為遽增，使得經由體液傳染之疾病如 B 型肝炎、C 型肝炎、愛滋病等之蔓延日益嚴重，因此確保所使用之血液製劑的安全性也更突顯其重要性。對於血液製劑之病毒安全性，在現行法規要求下，經由捐血者之選擇、血液檢體進行 HBsAg、Anti-HCV、Anti-HIV 等篩檢項目、以 mini-pool 方式篩檢 HCV, HIV 及 HBV 病毒核酸、於製程中加入經確效之病毒去除/不活化之步驟，以及製造廠遵循現行藥品優良製造規範進行製造，已能相當程度地確保血液製劑之病毒安全性。由於血液製劑在國際間醫療使用上仍佔有一定之比例，近年來又由於細胞治療等人體細胞組織物臨床研究與應用之相關發展，使得確保血液相關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，為世界各國持續努力之方向。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 亦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，至今亦已核發多張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；世界衛生組織亦持續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。另外，由於研究顯示無套膜病毒如 Parvovirus B19 較不易為病毒去除/不活化步驟所清除，已有文獻指出曾於血液製劑中檢測出 B19 病毒核酸，因此如何避免血液製劑遭受無套膜病毒（如 B19 病毒）污染，亦是目前世界各國正著重努力之方向。歐洲藥典已規範自 2004 年起製造抗 D 免疫球蛋白之血漿混合液及以溶劑清潔劑處理之血漿混合液，必須以 NAT 檢測 Parvovirus B19，未超過 10^4 IU/mL 者方能進一步製造血液製劑，FDA 亦以建議製造廠將 B19 NAT 與 HAV NAT 列為製程管制項目。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 12 月 19 日衛署藥字第 0910079060 號公告新增由人血漿製得血漿製劑之管理規定中亦已將 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 10^5 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，目前台灣血液基金會已公開徵求廠商委託製造國血製劑，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，且因應「國血國用」國產血液製劑之檢驗管理，業已積極著手進行相關病毒核酸檢測技術之建立與病毒核酸國家標準品之製備，以加強我國對血液製劑病毒安全性之風險管理，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因應血液製劑風險管理之 NAT 檢測體系用，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，同時亦將持續邀請各國相關單位參與我國核酸國家標準品之共同標定，以提升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、行程紀要

<u>日期</u>	<u>工作紀要</u>
6月10日	啓程
6月11日	抵達波蘭華沙
6月12日	參加第20屆血液病原基因擴增技術標準化研討會
6月13日	參加第20屆血液病原基因擴增技術標準化研討會
6月14日	參加第14屆IPFA/PEI血液病原監測與篩檢之核酸擴增技術研討會
6月15日	參加第14屆IPFA/PEI血液病原監測與篩檢之核酸擴增技術研討會
6月16日	返程
6月17日	抵台

三、內容

(一) 第 20 屆血液病原基因擴增技術標準化研討會 (International Scientific Working Group on the Standardization of Genomic Amplification Techniques for The Safety Testing of Blood, Tissues and Organs for Blood Borne Pathogens, SoGAT XX)

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研討會 (Scientific Working Group on the Standardization of Genomic Amplification Techniques for The Safety Testing of Blood, Tissues and Organs for Blood Borne Pathogens, SoGAT)，該研討會主要目的為報告 WHO NAT 國際標準品製備情形，並提供主管機關、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。該研討會之優先工作即為建立血液相關病毒之 NAT 檢測體系，NIBSC 並於會上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情形。

本次為第 20 屆研討會，於 2007 年 6 月 12 至 13 日在波蘭華沙 Sheraton 飯店附設之會議中心舉辦，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、公私立研究機構與大學院校等代表參與，計有約 120 位來自歐洲各國、美國、澳洲、加拿大、日本與台灣等國代表參與該會。研討會內容包含：(1) 標準化科學 Part 1、(2) 標準化科學 Part 2、(3) 外部品質評估計畫與能力試驗評估研究、(4) Parvovirus B19 相關議題、(5) 病毒變異性與 HBV 相關議題、(6) CMV 之檢測與標準化、(7) NAT 新技術與現行技術之效能評估等 7 部份相關議題，其內容重點如後所述。

1. 標準化科學 Part 1

英國 NIBSC 之 *Dr. Sally Baylis* 報告她們在建立接替之第三支 HCV 國際標準品之工作進度。由於第二支 HCV NAT 國際標準品 (NIBSC code 96/798) 庫存量已很低，因此他們在 WHO 要求下於 2005 年起著手建立第三支國際標準品。她們取得 HCV 抗體陰性之空窗期陽性血漿，以 LiPA 基因分型試劑與 DNA 定序確認為 genotype 1a，並經篩檢為其他病毒陰性，進一步製備成候選標準品；她們準備 4 支檢體進行共同標定來決定國際標準品，Sample 1 為第二支 HCV NAT 國際標準品 (NIBSC code 96/798)，Sample

2 為新製備之凍晶乾燥候選標準品 (NIBSC code 06/100)，Sample 3 亦為新製備之不同批次凍晶乾燥候選標準品 (NIBSC code 06/102)，Sample 4 為製備候選標準品之 bulk material (NIBSC code 06/118)，共同標定研究於 2006 年 11 月開始進行，總計包含 14 國 33 個實驗室參與共同標定，本局亦受邀參與標定。結果總計收到 40 組數據，其中 25 組數據是採用定量分析方法，15 組是採用定性分析方法，NIBSC 收集結果後進行統計分析，結果顯示 Sample 2 平均值為 5.19 Log IU/mL，Sample 3 平均值為 5.41 Log IU/mL，Sample 4 平均值為 5.70 Log IU/mL；安定性研究評估結果顯示凍晶乾燥之 Sample 2 相當穩定，適合長期使用，因此擬建立 Sample 2 (NIBSC code 06/100) 為第三支 HCV RNA 國際標準品，建議訂定濃度為 5.19 Log IU/mL，每瓶含量為 4.89 Log IU，報告將於 7 月前提交 WHO 生物學標準化專家委員會 (Expert Committee on Biological Standardization, ECBS) 來決定是否成為 WHO 國際標準品。另外她並報告 HAV RNA 國際標準品之安定性評估研究結果，HAV RNA 國際標準品 (NIBSC code 00/560) 於 2001 年製備，經由 16 個實驗室共同標定後於 2003 年建立，共標結果為 5.29 Log equivalents/mL，由於 WHO 生物學標準化專家委員會注意到與該候選標準品 (NIBSC code 00/560, 共標結果為 5.07 Log equivalents/mL) 同時製備與標定之另一候選標準品 (NIBSC code 00/562) 可能可望接替成為第二支 HAV RNA 國際標準品，因此由 NIBSC 進行安定性評估研究，然而加速試驗結果顯示，與存放 -20°C 之國際標準品 (NIBSC code 00/560) 比較，4 °C 存放 6 年之國際標準品 (NIBSC code 00/560) 減少 0.1 Log，而另一候

選標準品 (NIBSC code 00/562) 減少 1.0 Log，結論認為 HAV RNA 國際標準品 (NIBSC code 00/560) 非常穩定，適合長期使用。

英國 NIBSC 之 *Dr. Harvey Holmes* 報告他們擬建立 HIV-2 RNA 國際標準品及建立接替之第二組 HIV-1 RNA genotypes 國際對照參考套組 (International reference panel) 之計畫。他首先介紹目前 NIBSC 所供應之 HIV 相關參考物質，如第二支 HIV-1 RNA 國際標準品 (NIBSC code 97/650, 5.56 Log IU/mL)，及 2003 年所建立之第一組 HIV-1 RNA genotypes 國際對照參考套組 (NIBSC code 01/466) 等，接著說明擬建立 HIV-2 RNA 國際標準品之緣由，由於全球之 HIV 流行主要為 HIV-1，因此大部分 NAT 診斷試劑之設計主要是針對 HIV-1 之檢測與定量，HIV-2 主要是發現於西非與歐洲鄰近國家，如葡萄牙、法國與比利時，由於近來已有可同時偵測 HIV-1/HIV-2 之 NAT 診斷試劑 (如 Roche Cobas Taqscreen MPX) 上市或研發，顯示未來將有建立 HIV-2 RNA 國際標準品之必要性。候選標準品計畫將以培養之 HIV-2 經由陰性血漿稀釋來製備，由於目前可偵測或定量 HIV-2 之 NAT 診斷試劑相當稀少，因此他們將以自行建立之 In house real time PCR assay 來定量 HIV-2，該方法之引子探針設計是位於 LTR 序列。在 HIV-1 RNA genotypes 國際對照參考套組方面，2003 年所建立之第一組對照參考套組約有 500 組，目前僅剩 120 組，該套組涵蓋 Subtype A, B, C, D, AE, F, G, AGH, 及 Group N 與 O；由於 HIV 變異性大，目前已新增許多重組變異株 (Circulating recombinant form, CRF) CRF01-CRF32，因此擬擴展套組內容涵蓋：Subtype G, H, J, K, Group N 與 O，及所有 CRFs

，將提供予診斷試劑製造廠或其他機構檢視其偵測稀少或具挑戰性 HIV strains 之檢測能力。

美國 FDA CBER 之 *Dr. Indira Hewlett* 報告 CBER 在標準化方面之進展。美國規定用於捐血者篩檢之 NAT assays 需有許可證，目前已有針對 HIV-1, HBV, HCV 及 WNV 等病毒篩檢之許可證，FDA 在 2004 年公告之指引中建議對於血液及血漿實施 NAT 篩檢 HIV-1 及 HCV，此外，針對供血液製劑製造用之血漿則另建議以 NAT 檢測 Parvovirus B19 與 HAV，作為製程中之品質管制項目。而 CBER 目前已建立之 NAT 標準品有 HIV-1, HBV, HCV 及 WNV 等 NAT 套組，供 NAT 診斷試劑逐批放行用；HIV-1 subtype NAT panel 及 HIV-2 NAT panel 則正建立中；供 NAT 診斷試劑逐批放行用之 HIV-1 RNA panel 是以病患分離出之病毒培養液來製備，屬於 subtype B，經加熱不活化處理後以陰性血漿稀釋，稀釋液濃度經 15 個實驗室共同標定來決定，組成 8 支陽性（10, 50, 100, 500, 2.5×10^3 , 5×10^3 , 2.5×10^4 , 2.5×10^5 copies/mL）與 2 支陰性之套組。HIV-1 subtype NAT panel 涵蓋 Subtype A, B, C, D, E, F, G, 及 Group N 與 O 等 9 支，未來也將擴展納入主要之新興變異株（如 CRF_02_AG 與 CRF_01_AE）。HCV RNA Panel 是以 Anti-HCV 陰性血漿稀釋空窗期陽性血漿來製備，屬於 subtype 1b，組成 8 支陽性（5, 10, 50, 100, 500, 10^3 , 10^4 , 10^5 copies/mL）與 2 支陰性之套組。HBV DNA Panel 是取自空窗期陽性血漿，屬於 genotype A/serotype adw2，組成 2 支陽性（10, 100 copies/mL）與 1 支陰性之套組。WNV NAT Panel 是取自病患分離出之病毒株（NY99-FDA 與 FDA-Hu2002），組成 12 支陽性（每株分別含

5, 10, 50, 100, 500, 10^3 copies/mL 等濃度) 與 2 支陰性之套組。此外，CBER B19 DNA 標準品是取自空窗期陽性血漿，以經篩檢其他病毒均陰性之血漿稀釋為約 10^6 IU/mL，並與 NIBSC 之 WHO B19 DNA 國際標準品同時進行共同標定，訂定濃度為 10^6 IU/mL。HAV RNA 標準品是取自空窗期陽性血漿，以經篩檢其他病毒均陰性之血漿稀釋為約 10^4 copies/mL，並與 NIBSC 之 WHO HAV RNA 國際標準品同時進行共同標定，結果亦證明濃度相同。另外，值得一提的是，由於登革熱目前在熱帶與亞熱帶地區盛行，造成全球每年約有 5 千萬至 1 億人之感染案例發生，美國 CDC 於 2005 年調查 199 例疑似登革熱案例，有 78 例經實驗室診斷證明感染登革熱，其中 70 例 (70/78, 約 90%) 具有 Anti-dengue IgM 抗體，另外 8 例 (8/78, 約 10%) 可以 PCR 檢測出病毒核酸或分離出病毒，199 例疑似登革熱案例中有 18 例未曾旅遊過危險地區但卻具有 Anti-dengue IgM 抗體，顯示可能有本土傳染 (autochthonous transmission) 的情形。因此 CBER 開始著手建立 Dengue fever virus panel，她們計畫取得 4 種血清型病毒檢體，分離出病毒株並進行特性分析，以共同標定研究決定病毒量並決定 panel 組成內容，並進行安定性試驗評估其穩定性。

德國 Paul-Ehrlich Institute 之 *Dr. Micha Nübling* 報告與本領域相關之 WHO 研究計畫近況。在 WHO HBV-genotype panels 方面，由於目前 WHO HBsAg 國際標準品與 HBV DNA 標準品均為 genotype A，僅能代表全球 1% HBV 感染人口，因此 WHO 於 2004 年在日內瓦召開之會議中一致同意應進一步調查 HBsAg 診斷試劑對於其他 HBV genotypes 的靈敏度，因此擬製備

HBV-genotype panels，將由同一袋陽性血漿製備 HBsAg panel 與 HBV-DNA panel，以反映所有主要之基因型與基因亞型，全球 HBV-genotype 分布如下表，計畫收集日本、巴西、蘇俄、南非、埃及、台灣、中國等涵蓋全球基因型之血漿，目前已取得蘇俄、德國、日本與巴西等國涵蓋 genotype A, B, C, D 之血漿，將持續收集其他基因型血漿並進一步分析其特性。在 WHO Anti-HBc 國際標準品方面，Anti-HBc 是代表過去曾受 HBV 感染之血清學標記，由於曾發現一些極低 HBV DNA 陽性者為 Anti-HBc 陽性之案例，也曾有一些報告受血者遭 Anti-HBc 陽性捐血者傳染之案例，因此 Anti-HBc 在某些國家亦屬於捐血者篩檢項目。由於目前對於 Anti-HBc 並沒有確認用分析法 (Confirmation assay)，對於 Anti-HBc 陽性也並無共通法則，計畫製備之 WHO Anti-HBc 國際標準品可供診斷試劑批次間之品質管制及評估診斷靈敏度用，目前初步製備之候選標準品血漿是取自輸血傳染案例，為 Anti-HBc 弱陽性/HBV DNA 陽性，計有約 2,000 支，每支 0.5 mL，將供診斷靈敏度評估用；另外 NIBSC 所製備之候選標準品 (95/522) 為 Anti-HBc 強陽性/Anti-HBs 陽性，計有約 2,700 支，每支 1 mL，將供分析靈敏度評估用。

HBV-genosubtypes: worldwide distribution

Genotype	Genosubtype	HBsAg subtype	Frequency	Main Geographical Distribution
A	A1	<i>adw2, ayw1</i>	high	Africa Europe, North America, Australia Cameroon, Democratic Republic of Congo, Gabon
	A2	<i>adw2</i>	high	
	A3			
B	B1	<i>adw2</i>	high	Far East (Japan, China, Taiwan) Far East (China, Japan, Vietnam/Thailand) Far East (Indonesia, Sumatra, Sulawesi) Vietnam
	B2	<i>adw2/adw3</i>	high/low	
	B3	<i>adw2</i>	high	
	B4	<i>ayw1</i>	high	
C	C1	<i>adr/ayr/adw2</i>	high/high/low	Far East (Japan, China) Thailand, China/Vietnam Pacific (New Zealand to Polynesia), Micronesia/Far East Northeast Australia
	C2	<i>adr/ayr; ad</i>	high/high	
	C3	<i>adrq-/adw2</i>	high/low	
	C4	<i>ayw3</i>	low	
D	D1	<i>ayw2</i>	high	Mediterranean, Middle East, India worldwide/USA South Africa, Alaska/Europe, Costa Rica Oceania, Somalia, Eastern Europe Spain
	D2	<i>ayw3/ayw4</i>	high/low	
	D3	<i>ayw2/ayw3</i>	high/high	
	D4	<i>ayw2,</i> <i>adw3</i>	high low	
	not identified			
E	-	<i>ayw4</i>	high	Africa
F	F1	<i>adw4q-/ayw4</i>	high/low	Central America, Argentina, Spain, Alaska/Nicaragua South America, Polynesia, France/Venezuela
	F2	<i>adw4q-/ayw4</i>	high/low	
G	-	<i>adw2</i>	low	USA, Mexico, Europe
H	-	<i>adw4</i>	low	Central America (Nicaragua, Mexico), California
Recombinant Strains				
A/D		<i>adw2</i>		India
C/D		<i>ayw2</i>		Tibet
C/?		<i>adw2</i>		Vietnam

美國 Roch Molecular Diagnostics 之 *Dr. Roberta Madej* 代表工業

聯繫委員會 (Industry Liaison Committee, ILC) 報告他們對於合成之對

照標準品與生物性對照標準品之評估研究進展。因應 2002 年 WHO 在日內瓦召開的諮詢會議（該會議是針對供病毒核酸體外檢測用之國際標準品相關討論會議）討論內容，進行以合成物質（Synthetic materials）作為 calibrators 或對照標準品之可行性研究，ILC 業於 2003 年進行 Phase I 評估研究並於 SoGAT 會議中報告，2005/2006 年重新設計並執行 Phase II 評估研究；在 Phase I 評估研究中，由 AcroMetrix 將 HCV 病患檢體製備成 4 個稀釋階的 panel，之後 ILC 以 4 種不同的 NAT 方法定量分析，並以 synthetic calibrator 重新計算定量數值之後進行比較分析，結果發現 4 種 NAT 方法定量各稀釋階樣品的數值差異均在 0.6 Log 內，證明 synthetic calibrator 的可行性。本次報告 Phase II 之評估研究進展，他們以 Siemens 的 Synthetic RNA、Asuragen 的 armoured HCV RNA, PEI reference (80,000 IU/mL), HCV positive serum sample, HCV positive EDTA plasma sample, WHO 2nd HCV 國際標準品(96/798, 100,000 IU/mL)，使用 Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 Assay (bDNA)/ HCV RNA TMA QN Assay, Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HCV, Abbott RealTime HCV 等 3 種市售 HCV NAT 定量套組進行平行測試，每支檢體均以 6 個稀釋濃度進行 3 次獨立試驗。結果顯示合成對照標準品與生物性對照標準品有相同之特性，均能以 3 種市售 HCV NAT 定量套組檢測之，亦均有相似之變異性，同時亦發現每支檢體之相關定量結果在不同分析方法之間不一定一致。未來仍將評估比較合成對照標準品與生物性對照標準品之安定性、可製造性與可取代性；同時，目前合成對照標準品僅合成部份基因體，隨著科技之進展，亦將考慮合成完整基因體之可行性。

2. 標準化科學 Part 2

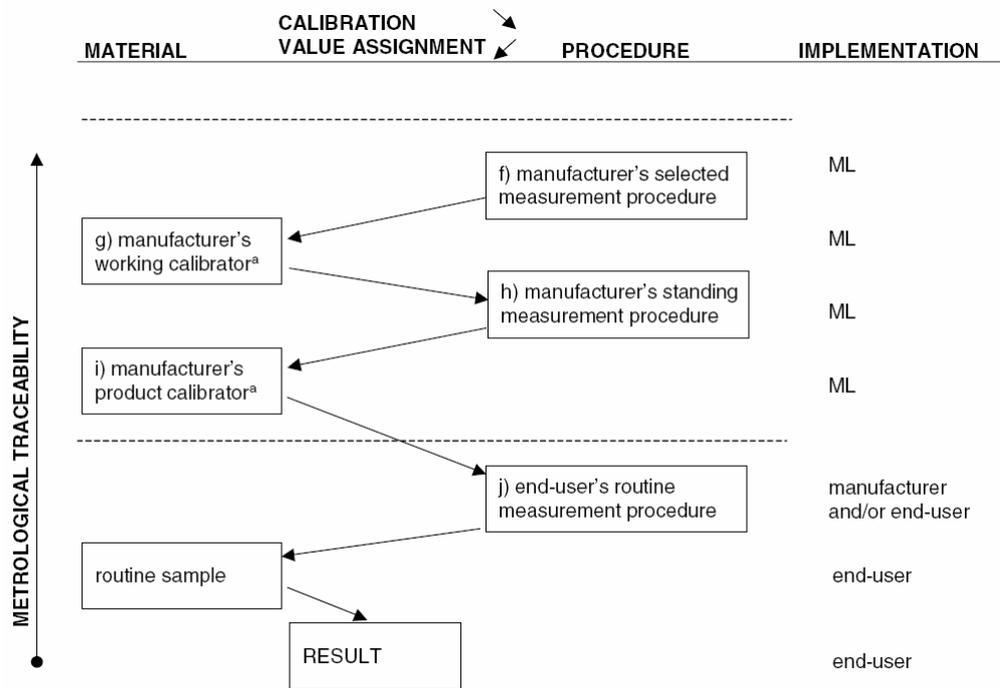
借調到 WHO 工作之 *Dr. Michael Chudy* (原服務於德國 Paul-Ehrlich Institute) 報告 WHO 在發展血液安全相關體外診斷試劑用之生物性對照參考物質的策略計畫。WHO 之生物性參考物質包含國際標準品 (International standard, 單位係以 IU 表示)、國際對照參考套組 (International reference panel) 與對照參考試劑 (Reference reagent), 其製備程序是參照 Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004, Annex 2, WHO TRS, 932, 2005), 製備完成後需提交報告給 WHO 生物學標準化專家委員會 (Expert Committee on Biological Standardization, ECBS), 供其決定是否成爲 WHO 之生物性對照參考物質。WHO 爲訂定發展血液安全相關體外診斷試劑用之生物性對照參考物質的 5 年策略計畫, 於 2007 年 1 月邀集 WHO 生物性標準品共同合作中心 (NIBSC, CBER, PEI) 開會討論, 內容包含現況與新計畫之審視、全球流行病學資料之角色、新檢測平台與新興技術、決定優先專案、以及共同合作之方式。討論重點涵蓋所有可能對血液安全造成衝擊之高風險微生物, 目前 WHO 已分別建立 HIV, HAV, HBV 與 B19V 之 NAT 與血清學檢測用對照參考物質、HCV NAT 檢測用對照參考物質、HEV 血清學檢測用對照參考物質、梅毒血清學檢測用對照參考物質、瘧疾 NAT 檢測用對照參考物質、登革熱病毒血清學檢測用對照參考物質及 TSE 對照參考物質,

建立中或計畫建立的有 HCV 血清學檢測用對照參考物質、Anti-HBc 國際標準品、HBV genotype panels、HCV 血清學檢測用對照參考物質、B19V genotype panel、HTLV-1/2 血清學檢測用對照參考套組、WNV NAT 檢測用對照參考物質或建立黃熱病毒科 family group (含西尼羅病毒與登革熱病毒) multiplex NAT 檢測用對照參考物質，此外 CBER 打算建立 WHO HHV-8 (人類疱疹病毒第八型) NAT 與血清學檢測用對照參考物質，因在烏干達的捐血者與受血者關聯性調查研究發現 HHV-8 曾經輸血傳染。會中並討論到血液病原流行病學資料的改變可能會影響捐血者篩檢系統之效能，診斷試劑檢測捐血者族群中新亞型或基因型的能力均須被評估，因此新興/再流行感染原之存在與其對血液安全之影響等資料，對於建立適當之 WHO 對照參考物質供研發診斷試劑標準化用是相當重要的。另外會中亦討論到因應新檢測平台與新興技術之發展所需考量之對照參考物質製備議題，如 HIV Ag/Ab combo 之 HIV-1 p24 Ag、HCV Ag/Ab combo 之 HCV core Ag、以及目前研發焦點之基因晶片與未來可能結合奈米技術發展低成本之快速分子診斷試劑等。

美國 AcorMetrix 公司之 *Dr. Ralf Schonbrunner* 報告一個全球性之品管對照物質 (Control) 製造廠標準化之實務面。AcorMetrix 的品質系統經 ISO 13485:2003 認證，亦遵循 FDA 21CFR Part 820 品質系統法規及 cGMP 規範，其校正液與品管液數值之訂定均遵循 ISO 17511:2003 (In vitro diagnostic medical devices. Measurement of quantities in biological samples. Metrological traceability of values assigned to

calibrators and control materials)，他舉腸病毒為例說明該公司製備流程，由於腸病毒檢測單位目前無法追溯到 SI unit，亦無國際統一之參考方法與對照校正物質可使用，因此屬於 ISO 17511:2003 所定義之 Metrological level 5，其校準層次 (Calibration hierarchy) 如下圖。他們以 Human Enterovirus Species B/ Coxsackie A9 (CVA9) 製備 In-house working calibrator，在單位訂定上，由於目前並無 WHO 國際標準品可供標定，同時考量到避免與他人對 copies 定義產生混淆，且該校正液經加熱不活化處理，並不適用 TCID₅₀，因此依據 ISO 17511:2003 4.1.1d，產生獨立之 In-house unit – Enterovirus Unit (EVU)。目前該公司製備之 In-house calibrator 為 50,000 EVU/mL，名為 EV APS (AcorMetrix primary standard)，屬於該公司之一級標準品，Product calibrator 為 100 EVU/mL，名為 EV LPC AQS (AcorMetrix QC standard)，由 2 個獨立實驗室檢測結果顯示其再現性佳；最後他並期許相關單位能針對尚無國際標準的病原儘速建立 WHO 國際標準品。

Calibration Hierarchy without International Standard



美國 SeraCare Life Sciences/ BBI Diagnostics 公司之 *Dr. Mark Manak* 介紹該公司所供應之 HIV, HCV 與 HBV NAT 檢測用之品管對照組。該公司的品質系統經 ISO 13485:2003 認證，製造亦遵循 cGMP 規範，所供應之 HIV, HCV 與 HBV ACCURUN controls 是取陽性血漿（HIV 為培養之病毒株 8E5）經去纖維蛋白之陰性血漿（Basematrix）稀釋，不同系列有不同之濃度範圍；此種獨立之外部品管對照組用途為評估實驗室檢測精密度、偵測檢驗程序之失誤及作為整個檢驗流程之品質管制組。該些品管對照組評估研究結果顯示於不同批次間、不同次試驗間、與不同實驗室間之檢測結果一致性均極佳，即時安定性試驗結果亦顯示至今仍維持穩定。

日本國立感染症研究所(National Institute of Infectious Diseases, NIID) 之 *Dr. Saeko Mizusawa* 介紹該單位所建立供血液相關病毒 NAT 檢測及 NAT 能力試驗評估計畫用之國家標準品。她概要說明其 NAT 國家標準品之製備流程，由日本赤十字社製備候選標準品，再由國立感染症研究所、赤十字社及血液製劑製造廠以 WHO 國際標準品共同標定其濃度，分析方法是採用 End-point assay，第 1 次分析是以 10 倍稀釋方式決定 Endpoint，第 2-5 次分析是以 Endpoint 濃度附近之 7 個 half-log 稀釋階來決定。日本已分別於 1999 年與 2002 年完成 HCV 與 HBV、HIV NAT 國家標準品，所建立之 HCV NAT 國家標準品為 10^5 IU/mL，屬於 genotype 1b；HBV NAT 國家標準品為 4.4×10^5 IU/mL，屬於 genotype C；HIV NAT 國家標準品為 1.8×10^5 IU/mL，屬於 genotype B。

美國 Asuragen 公司之 *Dr. Cindy Walker-Peach* 介紹該公司所研發供固體組織與器官進行 NAT 檢測用之 RNARetain Pre-analytical Solution。該試劑是一種無毒性之非有機溶液，藉由將核酸水解酶不活化以避免 DNA 與 RNA 被破壞來保存核酸，其特性是可於室溫保存核酸，因此檢體運送時無需乾冰或液態氮，同時該試劑亦可適用於所有後續之 RNA 萃取方法，目前該試劑已取得美國專利，其製造均遵循品質系統法規 21CFR Part 820 以確保製造批次間之一致性。實驗室評估比較結果顯示保存於 RNARetain 之檢體與新鮮冷凍檢體所萃取之細胞內 RNA 品質並無差異，RNARetain 亦不會影響 RNA 萃取與分析之再現性，後續將針對組織檢體之收集與運送進行臨床適用性評估。

3. 外部品質評估計畫 (EQAS) 與能力試驗評估研究

德國 Institut fuer Virologie/ Campus Benjamin Franklin 之 *Dr. Heinz Zeichhardt* 代表 Institute for Standardization and Documentation in Medical Laboratories (INSTAND) 等單位報告他們以外部品質評估計畫作為了解和解決市售套組與 In-house 分析方法問題之工具。血液相關病毒學方面之 EQAS 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，他們自 1997 年起開始對定性之 HCV NAT 分析法進行外部品質評估計畫，結果顯示沒有經驗之新參與單位常有偽陰性結果發生，藉由利用 EQAS 剩餘檢體進行每日品管與訓練而改善之，至 2002 年正確率已可達 99-100%；自 1999 年起開始對定量之 HCV NAT 與 HIV NAT 分析法進行外部品質評估計畫，訂定中位數加減 0.5 Log 為可信賴之區間，在 HCV NAT 方面，1999 至 2007 年間落於區間內之比率為 75%，另一評估計畫 2000 至 2007 年間落於區間內之比率為 92%，在 HIV NAT 方面，1999 至 2007 年間落於區間內之比率為 93%，另一評估計畫 2002 至 2007 年間落於區間內之比率為 82%，並發現以重複之檢體組成於同一套組中進行評估可了解實驗室之檢測能力是否足夠佳；自 1999 年起開始對定量之 HBV NAT 分析法進行外部品質評估計畫，訂定中位數加減 0.5 Log 為可信賴之區間，1999 至 2007 年間落於區間內之比率為 77%，另一評估計畫 2001 至 2007 年間

落於區間內之比率為 81%，並發現以相同之 EQAS 檢體進行 2 年訓練可改善實驗室之檢測能力。

澳洲 NRL 之 *Dr. Wayne Dimech* 報告他們應用 EDCNet 與 Digital PT 取得數據持續監控血液病原 NAT 檢測效能之作業。NRL 提供外部品質評估計畫已有 15 年以上的歷史，他們提供品管檢體與評估套組 (panels) 來監控確保分析方法與實驗室之效能，透過外部品質評估計畫除了達到監控實驗室效能，預先找出潛在問題，持續改進或維持檢測品質之目的外，NRL 為使品質監測具及時性與全球性，並利用電腦處理複雜數據與統計分析能力之特性，建立了網際網路介面之品質監測系統 EDCNet，各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，同時亦可監測該試驗之檢測靈敏度、是否受抑制或交叉污染、儀器試劑之效能與操作員之技能、及實驗室本身與實驗室間之 variation。他並舉 Chiron TMA assays 為例，說明電腦系統分析 15 個月期間使用該系列 (Duplex, Ultrio, Tigris) 進行 2 批次品管檢體之檢驗結果，資料庫包含 21 個實驗室 31 部儀器，總計超過 16,000 筆數據，分析結果顯示 Ultrio 與 Tigris 整體 CV% 均較 Duplex 小，具體說明以電腦軟體分析監控資料庫中龐大之相關數據並呈現評估比較結果之顯著優勢。

4. Parvovirus B19 相關議題

美國 FDA CBER 之 *Dr. Mei-ying W. Yu* 報告 CBER 與 NIH 等單位合作進行 B19 病毒輸血感染之先期性研究，輸血相關感染先期性研究 (Transfusion Related Infections Prospectively Study, TRIPS) 是以 NAT 與血清學檢驗方法檢測參與捐血者與受血者連結研究 (進行 Cohort study) 之受血者來調查研究 HIV, HBV, HCV, CMV, HHV-8, EBV 與 B19 病毒之輸血傳染風險。他們收集 2001 年 11 月至 2006 年 11 月間曾接受輸血之 742 位病患血液檢體，檢測其 B19 DNA (輸血後 4 週與 8 週) 與 Anti-B19 IgG (輸血後 12 週與 24 週)，如 B19 DNA 為陽性，則檢測捐血者與受血者捐輸血前後檢體之 B19 DNA, Anti-B19 IgM 與 Anti-B19 IgG，並進行 DNA 定序與分子演化分析 (Phylogenetic Analysis) 確認因果關係。結果顯示 742 位中有 14 位為 B19 DNA 為陽性，其中 11 位於輸血前已遭 B19 病毒感染，其 B19 DNA 均呈陽性，Anti-B19 IgM 與 Anti-B19 IgG 亦多呈陽性，其餘 3 位中已確定一位為輸血前所有檢測結果均呈陰性而輸血後所有檢測結果均呈陽性，進一步分析其輸血相關捐血者，找出 B19 DNA 為陽性者 (5×10^9 IU/mL)，並進行 DNA 定序與分子演化分析確認其因果關係，兩者皆為 B19 genotype 1，由該研究結果計算經輸血感染 B19 病毒之比率約為 0.1% (1/742)。

本人亦代表台灣藥物食品檢驗局 (BFDA) 報告我國 B19 病毒核酸國家標準品之製備與共同標定結果。首先說明我國於 2002 年新增 NAT 管理規定中建議以 NAT 檢測 plasma pool 或 mini-pool，其 B19 DNA 必須低於 10^5 IU/mL

方能供進一步製造血液製劑用，有鑒於 WHO B19 DNA 國際標準品供應數量有限，歐盟亦已製備完成相關標準品供其會員國進行 B19 DNA NAT 檢測用，為利於我國日後相關規定之實施，亦有必要儘速建立 B19 病毒核酸國家標準品與工作標準品供 NAT 檢測體系用。並概要介紹目前本局已製備完成之 NAT 國家標準品—HBV DNA 國家標準品與工作標準品、HCV RNA 國家標準品與工作標準品，並說明我國 HBV 與 HCV 主要盛行基因型與西方國家不同，因此我國 HBV DNA 標準品屬於 genotype B，HCV RNA 標準品屬於 genotype 1b，與 WHO 國際標準品（HBV/ genotype A, HCV/ genotype 1a）不同，本局製備之 B19 DNA 國家標準品與 WHO 國際標準品均屬於 genotype 1，因其為目前全球主要基因型；製備流程遵循 WHO 國際標準品，首先以病毒篩檢、定量分析 B19 DNA 含量與 DNA 定序分析選定陽性血漿後，以陰性血漿作適當稀釋並進行定量分析，隨即進行分裝充填作業，製備完成之候選標準品並進行國際共同標定研究，參與標定研究單位含美國 CBER, 英國 NIBSC, 德國 PEI, 日本 NIID 等國內外 7 國 10 機構，涵蓋官方（授權）檢驗機構、NAT 檢驗機構、血液製劑製造廠及診斷試劑製造廠，標定數據經統計分析結果顯示一致性極佳，因此訂定國家標準品含量為 1.9×10^6 IU/mL，工作標準品含量為 2×10^4 IU/mL；同時並進行標準品之安定性評估研究，目前結果顯示於 25°C 及 4°C 貯存時其穩定性分別可達 4 週與 8 週以上，-20°C 及 -80°C 貯存時可達 12 個月以上，長期安定性評估仍持續進行中，報告結果於會上及會後均獲得不少迴響。

英國 NIBSC 之 *Dr. Jacqueline Fryer* 報告她們研究新發現的 Parvovirus 4 (PARV4) 與 variant PARV5 在人類血漿與血液製劑中檢出的情形。由於 PARV4 在 2005 年才被發表於文獻，最近發現於 Manufacturing plasma pools 中檢出比率高於以往，因此她們想了解 PARV4 與 PARV5 是否存在於由這些 Manufacturing plasma pools 所製造之血液製劑中。NIBSC 共計檢測 175 批次來自 10 家製造廠送驗之 12 種第八凝血因子製劑（效期為 1974-2005 年間），檢體核酸萃取是採用 Roche 自動核酸萃取設備 MagNa Pure，檢體萃取量為 1mL，隨後以傳統 PCR 檢測，以即時定量 PCR 進行定量分析，引子設計均針對 PARV4/5 ORF2，結果顯示 PARV4/PARV5 自 1975 年即存在於第八凝血因子製劑，效期在 1990 年以前之產品檢出率 23% 高於 1990 年以後之產品 2%，推測可能是 1980 年左右因 HIV 流行而開始篩檢排除高危險群捐血者以增加血液安全所造成之結果，目前尚未了解 PARV4 與 PARV5 在人類疾病中所扮演的角色。

美國 Talecris Biotherapeutics 之 *Dr. Lori Rinckel* 報告她們所找到的一些 Parvovirus B19 variants。包含 variant E3, D11 與 P1，經 DNA 定序分析確認 E3 與 D11 屬於 genotype 1 variant，P1 則屬於 genotype 3 variant；因 genotype 3 相當稀少，故 P1 備受矚目，於會上及會後均獲熱烈討論，極可能成爲 NIBSC 製備 B19 genotype panel 之原料。

5. 病毒變異性與 HBV 相關議題

日本國立感染症研究所(National Institute of Infectious Diseases, NIID)之 *Dr. Yoshiaki Okada* 報告他們製備含有 HBV genotype A 至 H 之 full genome 質體套組。由於 genotype B 與 C 是日本主要盛行之基因型，但最近發現東京之 genotype A 檢出率逐漸上升，因此有必要製備 HBV genotype panel 以確保血液安全，然而除 genotype A, B 與 C 外，其餘基因型在日本均不易取得，因此製備含有 HBV genotype A 至 H full genome 之質體套組，來評估 NAT 檢驗方法與 HBsAg 診斷試劑對於 HBV 各基因型之檢測能力。

波蘭 Institute of Haematology and Blood Transfusion 之 *Dr. Ewa Brojer* 報告她們研究探討 Ultrio non-repeatable reactive 捐血者之 Anti-HBc 檢測結果。波蘭現行對於輸血用品之血清學檢測有 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，同時發現有一些 Ultrio triplex 陽性但之後的 Discriminatory test 結果陰性的不一致情形，定義為 Ultrio non-repeatable reactive；調查研究 2005 年檢測結果發現以 Ultrio 篩檢 250,191 支檢體中，有 9 支為為 triplex 與 Discriminatory test 陽性，其 Ultrio S/co 均大於 10，其中 5 支（約 56%）為 Anti-HBc 陽性，另有 129 支（約佔篩檢檢體之 0.05%）為 Ultrio non-repeatable reactive，進一步以另一種 NAT 檢測試劑確認，發現有 12 支（約 10%）為 HBV DNA 陽性，其 Ultrio S/co 亦均大於 10，12 支中有 10 支（約 83.3%）

為 Anti-HBc 陽性。因此 2006 年更進一步調查研究分析 Ultrio non-repeatable reactive 檢體之 S/co 分佈值與 Anti-HBc 陽性率，以 Ultrio 篩檢 247,263 支檢體中，有 1 支為為 triplex 與 Discriminatory test 陽性，另有 366 支(約佔篩檢檢體之 0.14%)為 Ultrio non-repeatable reactive，進一步以另一種 NAT 檢測試劑確認，發現有 3 支(約 0.8%)為 HBV DNA 陽性，其 Ultrio S/co 亦均大於 10，其餘 363 支為 HBV DNA 陰性，其中 Ultrio S/co 大於 10 者有 49 支(約 14%)，該組之 Anti-HBc 陽性率約為 29%，而 Ultrio S/co 小於 10 之 2 群組的 Anti-HBc 陽性率均低於 10%；後續將持續探討該些 Anti-HBc 陽性之 Ultrio non-repeatable reactive 捐血者是否屬於病毒量低於檢測靈敏度之 Occult HBV 感染，並評估 Anti-HBc 檢測項目是否能用於確認程序。

日本 Hiroshima University 之 *Prof. Hiroshi Yoshizawa* 報告他們建立移植人類肝細胞老鼠模式及探討 HBV 之最低感染劑量，並與之前黑猩猩模式所得之實驗結果比較。他們首先以小鼠肝臟組織與切片證明多被人類肝細胞置換，接著以 HBV 不同感染期(包含急性前期與感染晚期)之黑猩猩血清來決定 50%老鼠感染劑量(50% Mouse Infectious Dose, MID₅₀)，急性前期之黑猩猩血清為 Anti-HBc 陰性/ HBV DNA 2.6×10^6 copies/mL，屬於 genotype A，分析 2 批老鼠實驗結果求得其 MID₅₀ 為 1.2-4.6 copies HBV DNA；感染晚期之黑猩猩血清為 Anti-HBc 強陽性/ HBV DNA 2.8×10^6 copies/mL，屬於 genotype A，分析 2 批老鼠實驗結果求得其 MID₅₀ 為 200-380 copies HBV DNA，與急性前期血清比較，其感染劑量約高 100 倍，所建立

之人類肝細胞老鼠模式將可供作評估 HBV 不同感染期檢體感染力之生物分析系統。

6. CMV 之檢測與標準化

加拿大 Provlab 之 *Dr. Jutta Preiksaitis* 報告他們建立 CMV 定量檢測用之標準品以評估定性與定量檢測方法之情形。CMV 定量檢測分析目前用於疾病之診斷、治療之監測、組織與幹細胞移植之篩檢、免疫抑制劑臨床試驗之安全監測等方面，現行 CMV 定量檢測之問題在於分析方法多為自家建立的，並無標準化或互相對照參考，病毒自然發展史研究稀少，以致許多關鍵點尚無法明確定義；因此本研究之目的即為建立標準品以檢視定性與定量檢測 CMV 分析實驗室間之變異性。他們以 12 支檢體組成一組 panel，包含 2 支陰性血漿、7 支純化病毒稀釋液及 3 支臨床檢體，總計有 33 個實驗室參與此評估研究，包含美國 19 家、加拿大 12 家與歐盟 2 家，評估結果顯示的確有顯著之變異性存在，尤其是臨床檢體與低濃度之病毒稀釋液，在定量檢測分析方面，如設定 ± 0.5 Log 為可接受之變異範圍，則評估結果只有 62.5% 落入該範圍，此外，整體而言，市售診斷試劑之變異性較 In-house assays 低，實驗室間之變異性則顯著高於實驗室本身，顯示建立國際標準品供各分析方法比對校正之需求性。

美國 National Institute of Standards and Technology (NIST) 之 *Dr. Marcia Holden* 報告他們 NIST 標準對照參考物質專案計畫之一：CMV

純化 DNA 標準品。該計畫之緣由是因 NIST 發出問卷詢問臨床醫師與研究學者所提之需求，分子病理協會舉辦之研討會中亦討論到 CMV 標準品之需求，遂達成共識決定 NIST 應製備 CMV 純化 DNA 標準品，NIST 強調他們並非要建立供應實驗室品管使用之對照標準品，而是要建立可追溯到 SI unit 與計算 genome copy number 的純化 DNA 標準品，供檢測病毒量之即時定量 PCR 方法標準化用。該計畫目前尚在規劃階段，目前尚未決定該標準對照參考物質之形式，但定量分析 DNA 的程序已經過確效評估，她最後強調 NIST 在 DNA 標準品方面有所經驗，但他們均非病毒學家，因此有臨床醫師與 CMV 研究學者組成之諮詢委員會，並希望自 SoGAT 學習相關經驗。

英國 HPA 之 *Dr. Vivienne James* 報告她們最近針對 HCV 與 CMV 進行之外部品質評估結果。該項 HCV 定性檢測法之外部品質評估計畫於 2000 年進行試行作業，並自 2001 年 7 月開始，至今年已有 179 個機構登記參與，過去 2 年（約每半年進行評估）結果顯示實驗室檢測正確率已達 86.3% (2.5 Log IU/mL) 至 100% (5.1 Log IU/mL) 不等；CMV 定量檢測法之外部品質評估計畫於 2004 年進行試行作業，並自 2006 年 6 月開始，目前已有 80 個機構登記參與，訂定中位數加減 0.5 Log 為可接受之範圍，過去 1 年（約每半年進行評估）結果顯示落於範圍內之實驗室佔 32.5% (3.6 Log copies/mL) 至 94% (5.8 Log copies/mL) 不等。

7. NAT 新技術與現行技術之效能評估

德國 DRK Blutspendedienst (Red Cross Blood Transfusion Service) West 捐血中心之 *Dr. Lutz Pichl* 報告他們對於 Roche cobas s201 system 搭配 cobas TaqScreen MPX test 整個自動化 NAT 系統執行 HCV, HBV, HIV-1, HIV-1 O 與 HIV-2 檢測之評估經驗。由於該中心自 2005 年 7 月起之例行檢測已開始使用 COBAS AmpliPrep 與 COBAS TaqMan, 因此本次評估重點在於 cobas TaqScreen MPX test。以 16 支包含 HIV-1, HBV, HCV 高濃度之陽性檢體與 16 支陰性檢體交互放置, 進行交叉汙染評估研究, 結果顯示除了 1 支 HCV 偽陽性外, 其餘並無交叉汙染之情形; 以 2 位操作員及 2 批號試劑進行 4 天之檢測以評估再現性, 檢測內容包含 HBV (30 IU/mL), HCV (50 IU/mL), HIV-1 (160 IU/mL) 等 3 項 Run Controls, 每項每天進行 8 重複, 結果顯示 4 天 8 重複之檢測結果均呈陽性; 添加 HBV (30 IU/mL), HCV (50 IU/mL), HIV-1 (160 IU/mL) 於溶血、脂血等檢體以評估潛在干擾物質之影響, 結果顯示該些物質並未干擾其檢測能力; 以 100 IU/mL 之 NIBSC HCV RNA genotype panel (02/202)、1,000 copies/mL 之 Acrometrix VQC PeliCheck HBV DNA genotype panel 及 NIBSC international Ref. Panel for HIV RNA (01/466), 評估該檢測系統對於病毒基因型之檢測能力, 結果顯示除了 HIV group 0 外, 其餘各病毒基因型均能正確地檢測出, 目前正在進一步調查中。

美國 Chiron 之 *Dr. Yiu-Lian Fong* 介紹該公司定量及定性 HBV NAT assays 之檢測效能及確認陽性之案例。她首先介紹以 WHO HBV 國際標準品

評估分析靈敏度與檢測極限之結果，結果顯示研發建立中之 Chiron QPCR 之 95% 檢測極限為 3.26 IU/mL，Ultrio 為 8.0 IU/mL，Ultrio dHBV 為 6.8 IU/mL；以 DDL HBV genotype panel 評估 Chiron QPCR 之分析靈敏度，結果顯示該方法對於不同 genotype 之檢出靈敏度不同，genotype A, G 於 30 Cp/mL 時均能 100% 檢測出，genotype C, D, E 於 100 Cp/mL 時方能 100% 檢測出；方法確效評估結果顯示其於 $10-10^6$ IU/mL 間呈線性關係， R^2 為 0.995-0.999，CV 為 0.4-1.3%；以多組 Seroconversion panel 進行臨床評估，結果顯示 Chiron QPCR 比 ABBOTT PRISM HBsAg 提早 15-33 天檢測出；此外，5 例 HBsAg 案例亦經 Chiron QPCR 與 Ultrio 一致性地確認為陽性案例。

英國 NIBSC 之 *Dr. Sally Baylis* 報告她們打算建立臨床病毒學方面之標準品的計畫。NIBSC 目前正與英國臨床病毒學聯網 (Clinical Virology Network, CVN) 及健康保護部 (Health Protection Agency, HPA) 合作建立標準化計畫，以提供試驗對照組 (Run controls) 給診斷實驗室。初步已將一些病毒套組寄送到參與實驗室，以選擇適當之試驗對照組組成，包含 Influenza A (H1N1, H3N2)，Influenza B, HSV-1, HSV-2, CMV 及 Norovirus GII，參與實驗室被要求以例行之檢測方法與作業進行評估，並將結果寄回 NIBSC 以利統計分析。CMV 初步檢測結果顯示有一實驗室無法檢測出 CMV，進一步調查分析發現該檢測方法之 Primer 與 Probe 均與 CMV 檢體 (Towne strain) 核酸序列有 mismatch 的情形。未來除臨床套組外，亦計畫建立 CMV 與 EBV 之國際標準品。

最後由英國 NIBSC Director *Dr. Stephen Inglis* 說明 SoGAT 研討會未來的發展方向。他認為 SoGAT 在過去 12 年來在血液安全方面已經完成許多顯著的任務，如：建立 WHO HCV RNA 國際標準品 (1st & 2nd & 3rd)、WHO HIV RNA 國際標準品 (1st & 2nd)、WHO HBV DNA 國際標準品、WHO B19 DNA 國際標準品、WHO HAV RNA 國際標準品等；目前該是思考未來發展方向的時機，以確定 SoGAT 可在 NAT 檢驗技術之其他領域繼續提供協助，NIBSC 希望 SoGAT 不僅止於貢獻在血液安全領域，而且能更符合公共衛生之需求，因此 SoGAT 將分為 2 部分，本研討會 SoGAT-BT (blood/ tissues safety) 仍針對血液安全方面持續辦理，仍將與 IPFA/PEI 血液病原監測與篩檢之核酸擴增技術研討會接連舉辦，SoGAT-BT 研討會之後將改為每 2 年舉辦一次（而 IPFA/PEI 血液病原監測與篩檢研討會則仍維持每年舉辦），目前已決定下次將於 2009 年在布魯塞爾舉辦；另外由於臨床病毒檢測領域明確提出 NAT 檢驗技術標準化之需求，有鑒於 SoGAT 與會者有部分與此領域並不相關，因此將成立 SoGAT-CV (Clinical virology)，首次將於 2008 年在英國舉辦。

(二) 第 14 屆 IPFA/PEI 血液病原監測與篩檢之核酸擴增技術研討會
(IPFA/PEI 14th NAT Workshop on Surveillance and Screening of
Blood Borne Pathogens)

本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 14 屆研討會，於 2007 年 6 月 14 至 15 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 149 位來自歐洲各國、美國、巴西、奈及利亞、日本、台灣、澳洲與中國大陸等國代表參與該會。會議內容包含：(1) HIV 相關議題、(2) HCV 相關議題、(3) HBV 相關議題、(4) 血液篩檢相關診斷試劑介紹、(5) 血液篩檢之遠景與限制、(6) 篩檢策略 I、(7) 篩檢策略 II 等七部份，其內容重點如後述。

1. HIV 相關議題

首先由英國 University College London(UCL)之 *Dr. Robin A. Weiss* 介紹 HIV 之起源與傳播，並介紹其他可能感染人類的反轉錄病毒。人類免疫缺乏病毒(human immunodeficiency virus, HIV)是一種反轉錄病毒，其他有名的反轉錄病毒尚有人類嗜 T 淋巴球病毒 (human T-cell Lymphotropic virus type 1/2, HTLV-1/2)，均會經由體液傳染，其中 HIV 會經血漿及細胞傳染，HTLV-1 幾乎完全經由細胞傳染，因此減除白血球有助於該病毒之去除。目前科學家研究證實 HIV-1 group M 與 N 是從黑猩猩 (Chimpanzee, *Pan troglodytes*) 的猴免疫缺陷病毒 (Simian Immunodeficiency Virus, SIV) 跨種感染進化而來，HIV-1 group O 可能是來自非洲大猩猩 (*Gorilla gorilla*)；HIV-2 則是從幾內亞比索的烏黑白眉猴 (Sooty Mangabey, *Cercocebus atys*) 的另一種猴免疫缺陷病毒跨種感染而來。HIV 最初之傳播主要是由於共用注射針與針頭傳染 (1950 年左右)，第二波傳播則是由於性接觸傳染 (1970 年左右)，至 2007 年已有 4 千萬人以上被感染。另外，最近自豬身上發現之一些病毒，如 Porcine endogenous retroviruses A/ B/ C, Porcine Parvovirus 也提醒我們注意異種移植及其他動物來源生物製劑可能潛藏之新感染風險。

英國 University of Edinburgh 之 *Dr. Peter Simmonds* 則以科學觀點對現行血液安全提出一些問題與議題，供大家深思，如我們是否已使用最有效的方法來預防 HIV 傳染？我們是否足夠了解 HIV 感染之流行病學、基因變異性與自然發展史等資訊？近來與 HIV 相關之議題如建立結合血清學

與 NAT 篩檢方法之架構以互補相互之不足，並可了解基因變異對於病毒或抗體檢測之影響等情形；其他議題如建立有效之血品病毒不活化方法，本議題可能比靈敏之篩檢方法更需要，因其對未知或新興病毒可能也有效。在 HIV 基因變異性方面，HIV-2 之篩檢目前仍只能依靠血清學檢驗，Group N 與 O 則可藉由 PCR 檢測出，但血清學檢驗法與 Group M 相較之下則靈敏度相當差，由於非 Group M 之感染族群相當稀少，因此其檢測方法並非優先研發之項目，也造成檢測方法評估的問題。

2. HCV 相關議題

德國海德堡大學（University of Heidelberg）之 *Dr. Ralf Bartenschlager* 介紹有關 HCV 之研究發展：HCV 複製與持續感染之新視野。HCV 的研究進展較緩慢之部份原因即是因 HCV 無法在一般細胞培養系統中感染與增殖。直到 1999 年他們研究團隊發展出 HCV 次基因體複製系統，使 HCV 的研究有快速之進展。他們以特定的 HCV 病毒株(JFH1 clone)可於一般的細胞(如 Huh7)中進行感染及複製之特性，發展出適合 HCV 病毒感染及複製的細胞培養系統，有助於研究 HCV 如何進入細胞，如何在受感染細胞內進行複製，病毒顆粒如何在細胞內組裝及釋放至細胞外。另外，該系統也有助於肝炎治療藥物之篩選，可快速尋找可抑制病毒 RNA 複製或干擾病毒顆粒組裝與釋出細胞等過程之具潛力化合物。

英國 University of Edinburgh 之 *Dr. Peter Simmonds* 則以科學觀點對現行血液安全提出一些議題，如建立結合血清學與 NAT 篩檢方法之架構以互補相互之不足，並可了解基因變異對於病毒或抗體檢測之影響等情形；其他議題如建立有效之血品病毒不活化方法，本議題可能比靈敏之篩檢方法更需要，因其對未知或新興病毒可能也有效。在 HCV 基因變異性方面，由於 5' UTR 之高保留區，使得 6 種基因型檢測靈敏度均大約相等；人類 HCV 之起源仍屬未知，而至今並無證據顯示有更分歧之 HCV variants，目前 HCV 基因型之分布概要分爲：genotype 1 主要於中非，genotype 2 主要於西非，genotype 3 主要於南亞/東南亞，genotype 4 主要亦於中非，genotype 5 主要亦於南非，genotype 6 主要於東南亞。目前 HCV 血清學檢驗之問題在於其對初次感染之檢測效能不佳，因 pre-seroconversion 空窗期長，IgM 檢測法又無法區分急性或慢性感染，同時確認陽性檢體又有其困難性，核准之確認試驗診斷試劑有限且長年未更新，目前 NAT 診斷試劑之研發可能也會影響血清學診斷試劑之發展進步。

3. HBV 相關議題

義大利 University of Heidelberg 之 *Dr. Giovanni Raimondo* 報告 Occult HBV 感染與其病理生物學 (Pathobiology)。他首先提及過去 25 年來文獻提及之 Occult HBV 感染逐漸增加 (自 1980-1989 年間之 10%左右，1990-1999 年間之 30%左右，到 2000-2004 年間之 70%左右)，接著說明 Occult HBV 是指血液或組織中長期持續存在 HBV DNA (通常低於 1,000 copies/mL)，

且其 HBsAg 為陰性，其他如 Anti-HBc, Anti-HBe, Anti-HBs 等標記則可能有不同的診斷結果，經整理文獻結果發現，如只有 Anti-HBc 為陽性時，其 HBV 病毒量較高。他舉出一些文獻與數據說明 Occult HBV 感染對於臨床之衝擊，如曾經輸血或器官移植而傳染 HBV，會使肝纖維化進展至肝硬化，容易發展成肝癌，另外，一些情況下會使 HBV 恢復活動，如 HIV 感染、血液惡性腫瘤、接受骨髓/肝/腎移植與化療等。去年德國 National Consulting Laboratory for HBV and HDV 之 Dr. Wolfram H. Gerlich 亦曾報告 Occult HBV 感染，他舉出一些文獻報告有關遭 HBsAg 陰性輸血感染的案例，經回溯分析發現部分原因為捐血時尚未進行 HBV DNA 篩檢，而部分原因則為 HBV DNA 篩檢之靈敏度不足，如 2004 年一例感染案經回溯分析發現其 HBV DNA 含量低於 12.5 IU/mL(以 single donation 檢測)，而捐血篩檢時採用之 mini-pool 檢測極限為 50 IU/mL。

德國 Paul-Ehrlich Institute (PEI) 之 *Dr. Sigrid Nick* 報告她們評估比較全球使用之 HBV 檢測試劑的研究結果。她首先說明歐盟體外診斷試劑指令 (IVDD) / 共同技術規範 (CTS) 對於 HBsAg 檢驗試劑要求製造廠必須以 400 支陽性檢體 (需考慮涵蓋各亞型)、20 組 Seroconversion panels 評估其診斷靈敏度，以英國或法國標準品 (直到 WHO 國際標準品建立) 評估其分析靈敏度必須達 0.5ng/mL，以 5,000 支未篩選捐血者檢體 (需涵蓋首次捐血者)、200 支醫院病患檢體及 100 支可能有潛在干擾物質之檢體 (如孕婦及其他病毒感染者)。而她們此次評估範圍包含 PRISM HBsAg, IMx HBsAg, Murex HBsAg 3.0, Elecsys HBsAg 等 25 種涵蓋 Abbott, Murex, Roche 等

製造廠之 HBsAg 診斷試劑，以 BBI 及 Zeptometrix 等公司之多組 panels 進行測試，結果發現以臨床檢體檢測之結果，各種診斷試劑之靈敏度差異極大，有些診斷試劑甚至比較靈敏的診斷試劑晚 13 天方能檢測出陽性，而有些 CE-marked HBsAg kit 無法檢測出重要的 HBsAg mutants。另外，值得注意的是，WHO 第二支 HBsAg 國際標準品 (00/588) 已經建立並供應使用，因此之前規範所提之分析靈敏度必須達 0.5ng/mL，大約相當於 0.263 IU/mL，她們以該支標準品評估目前市面上診斷試劑之分析靈敏度，結果顯示均能符合，因此 IVD 技術小組打算修訂共同技術規範 (CTS) 所載之分析靈敏度要求為 0.26 IU/mL，而 2006 年 2 月 IVD 技術小組會議中決議修訂為 0.13 IU/mL。

4. 血液篩檢相關診斷試劑介紹

美國 Roche Molecular Systems 之 *Dr. Karen Young* 介紹該公司 PCR 血液檢測試劑之新世代產品。內容包含現行供應之檢測平台 (cobas s201 System) 與研發中之檢測平台 (cobas s401 Instrument)、現行供應之檢測試劑 (cobas TaqScreen MPX Test) 與研發中之檢測試劑 (Parvovirus B19/HAV Test)、以及未來之技術。cobas s201 System 是血液 NAT 篩檢之自動化系統，可提供多種 pool sizes (1, 6, 24, 48, 96) 或 single donation 之檢體檢測方式，而 cobas TaqScreen MPX Test 搭配 Cobas s 201 儀器之整套血液篩檢系統，是目前供應之整套自動化之 HCV, HIV 及 HBV 血液篩檢系統，對於 HIV 檢測包含 HIV-1 Group M/O 與 HIV-2，該系統包含 Internal

control 來確認反應過程未受抑制或干擾，各地區以 WHO 國際標準品評估其分析靈敏度結果如下表：

	HBV (IU/mL)		HCV (IU/mL)		HIV-1 (IU/mL)	
	95% LOD	Lower - Upper	95% LOD	Lower - Upper	95% LOD	Lower - Upper
Valencia	1.7	1.2 - 4.1	10.0	5.7 - 27.7	45.0	23.2 - 137.0
Madrid	3.6	2.3 - 7.7	5.7	3.5 - 12.7	37.0	22.1 - 90.0
Rome	3.1	1.6 - 5.6	14.4	8.5 - 34.6	53.2	30.1 - 132.1
Edinburgh	1.9	1.2 - 4.4	9.7	5.7 - 23.4	47.3	26.4 - 118.5
Verona	3.9	2.4-8.7	13.2	7.5 - 33.0	72.7	39.0 - 196.0
Porto	4.6	2.6 - 11.3	12.1	6.9 - 29.9	80.2	42.0 - 226.0
RMS	3.7	3.3 - 4.4	10.7	7.0 - 21.7	49.0	42.3 - 58.1

該系統在歐洲之臨床評估研究總計有 23,716 筆可用結果，發現有 14 個初測陽性 pools，其中 2 個為 HBV NAT (+) / HBsAg (-) / Anti-core (+)，2 個為 HBV NAT (+) / HBsAg (+)，1 個為 HCV NAT (+) / Anti-HCV (+)，1 個為 HIV NAT (+) / Anti-HIV (+)。目前研發中之第二代 cobas TaqScreen MPX Test 採 Multi-channel system，將 Target 與 IC 之 probe 以不同 reporter dye 標示，可同時檢測並確定 target 種類，由於更多序列資訊可獲得，他們亦重新檢視設計引子與探針，提升檢測包容性；目前第二代試劑分析靈敏度評估結果，HIV 95%檢出率約 20 IU/mL，HCV 95%檢出率約 4 IU/mL，HBV 95%檢出率約 4 IU/mL。對於 Parvovirus B19/ HAV Test 之研發，其試劑組成將與 cobas TaqScreen MPX Test 相同，目前合適性評估結果：B19V 靈敏度約為 8 IU/mL，定量之線性範圍為 50-10⁸IU/mL，HAV 靈敏度約為 6 IU/mL，兩者之專一性均為 100%。另外該公司目前正研發以 Array

為基礎之定量 PCR 檢測系統，所需檢體量少，可同時檢測多種目標物，且操作簡便迅速，自檢體處理到取得結果僅需 2 小時，預料未來亦有應用於血庫供 HLA 與血型鑑定等檢驗之潛力。

法國 Chiron 公司 *Dr. Nico Lelie* 報告他們評估研究進行 Individual NAT 對於血液安全之影響。他們以 7 組 Seroconversion Panels 評估 2 代 Ultrio NAT 檢驗試劑 (ID-NAT) 與 PRISM HBsAg 檢驗試劑之靈敏度結果如下表，整體而言，以 Ultrio 進行 ID-NAT 較 PRISM 縮短 16 天檢測空窗期，以第二代 Ultrio 進行 ID-NAT 則可縮短 21 天檢測空窗期。

panel	Window period in days		
	Ultrio (n)	Ultrio 2 nd gen (n)	PRISM
1	19,0 (3)	14,8 (2)	36,0
2	14,7 (12)	16,4 (2)	30,4
3	27,6 (18)	25,8 (4)	41,7
4	13,8 (8)	10,9 (4)	26,9
5	22,4 (11)	15,3 (2)	44,7
6	16,1 (18)	13,9 (2)	35,4
7	22,5 (10)	9,9 (2)	39,2
geomean	18,9	14,6	35,9

美國 Chiron 公司 *Dr. Jeff Linnen* 報告他們研發中之 TMA 診斷試劑。該公司目前新研發之血液篩檢試劑有第二代 Ultrio Assay, Parvovirus B19/HAV Assay, Influenza A Assay, Dengue Virus Assay 等；其中第二代 Ultrio Assay 改善了臨床特異性及對某些 HBV genotypes 之靈敏度，

Parvovirus B19/HAV Assay 是搭配 TIGRIS 之半自動化系統，Influenza A Assay 之研發雛型可檢測到 Influenza A 所有 strains，包含 H5N1，且其檢測靈敏度可達 0.02 TCID₅₀（或低於 50 copies/mL），未來將會評估用於篩檢捐血者之適用性。本次報告重點在 Dengue Virus Assay，此部份是與美國 Blood Systems Research Institute (BSRI) 之 *Dr. Michael Busch* 及美國 American Red Cross (ARC) 之 *Dr. Susan L. Stramer* 共同合作。WHO 估計全球於 2004 年約有 5 千萬到 1 億個登革熱感染案例，其中有 50 萬例發展成出血性休克症候群，有 2 萬例死亡，由於目前全球有 2.5 億人口生活在有登革熱感染風險之區域，且流行率顯示有擴展之情形，可能是由於全球暖化及交通發達等因素使病媒蚊擴展版圖，登革熱已成為人類相當重要的節肢動物攜帶性病毒疾病 (Arboviral disease)。因此該公司擬研發相關檢測試劑，並先藉由研發雛型了解高度流行地區（如宏都拉斯、巴西、波多黎各）及定期爆發流行區（如澳洲）之捐血者檢體檢出登革熱病毒之盛行率。實驗室評估研發雛型之分析靈敏度，其 95% 檢測極限為 14.9 copies/mL，並與傳統病毒培養檢驗法比較，確認可檢出 4 種血清型病毒；2003-2005 年間總計篩檢宏都拉斯 2,994 支捐血者檢體，巴西 4,858 支捐血者檢體，波多黎各 16,521 支捐血者檢體，檢測陽性檢體並由 BSRI 或 CDC 進行確認，結果顯示宏都拉斯檢體中有 12 支初測陽性，9 支複測陽性，與 BSRI 結果一致，該區盛行率約為 0.37%，巴西檢體中有 8 支初測陽性，3 支複測陽性，BSRI 結果為 2 支陽性，該區盛行率約為 0.06%，波多黎各檢體中有 15 支初測陽性，12 支複測陽性，CDC 結果為 4 支 PCR 陽性，9 支 IgG 陽性，該區盛行率約為 0.07%，臨床評估結果證實該研發雛型可檢測出無症狀之登革熱感染捐血者，且 4

種血清型病毒均可檢出，盛行率調查結果亦引發輸血傳染率之問題，他們進一步將針對此部分進行研究。

5. 血液篩檢之遠景與限制

法國 Euro HIV, Institut de Veille Sanitaire 之 *Dr. Giedrius Likatavicius* 報告他們調查 1990-2004 年間歐洲捐血者之 HIV 流行病學結果。由各國負責單位每年定期提供 HIV 調查結果給該單位，包含新診斷出之 HIV 與 AIDS 案例報告，HIV 於 8 大特定族群（捐血者為族群之一）之盛行率，結果顯示西歐國家之 HIV 感染通報增加主要是因異性戀與男同性戀感染案例增加，而最近幾年西歐之捐血者 HIV 盛行率低且穩定（<10/10 萬人），可能可以歸因於西歐許多國家良好之捐血者選擇作業，以及有些國家一般族群之 HIV 盛行率原本就低；東歐國家之 HIV 感染通報增加主要是因靜脈注射與異性戀感染案例增加，而最近幾年東歐 13 個國家通報之捐血者 HIV 盛行率高者（>10/10 萬人）即有 6 個國家，其比率在許多國家（如烏克蘭）迅速成長。最後他對於東歐問題提出一些建議來確保血液安全，如藉由增加自願性輔導與檢驗中心、改善調查方式以確保可分別收集到首次與重複捐血人資訊、增加常規捐血人、提升捐血者選擇作業、與採用更靈敏之篩檢試劑。

中國北京紅十字捐血中心之 *Dr. Yan Qiu* 報告中國大陸有關診斷試劑評估與血液篩檢狀況。診斷試劑在中國申請上市前許可必須檢送文獻報告（如

疾病盛行率、該類產品研發現況、有效性與安全性之預期結果、風險效益評估)、研究數據(如抗原抗體或其他物質、製程之選擇、靈敏度特異性之評估方式)、生產規格與品質管制規格、3 批次製造紀錄、安定性試驗及臨床評估結果;由中國藥品生物製品檢定所(National Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products, NICPBP)負責審核規格等技術資料,進行上市前檢驗,以及製備對照血清套組(Reference panels),此外尚有上市後產品抽樣評估及製造廠查核等上市後監測機制,針對捐血篩檢試劑則採逐批放行措施。中國大陸之捐血者篩檢策略包含捐血前評估與捐血檢體檢驗 2 部分,捐血者捐血前評估包含面談詢問、醫療史與危險因子評估、以快速檢驗試劑進行捐血前試驗(Hb 是必要項目,其他如感染性疾病 HBsAg, ALT 與梅毒則視情況決定),捐血檢體檢驗規定須進行 ALT, HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV 1/2 與梅毒等項目, Anti-HBc 與 NAT 則視情況決定。此外,北京與上海捐血中心曾進行 NAT 試驗評估,以 Chiron Procleix 檢測 HCV/HIV RNA,結果北京捐血中心 89,000 支檢體發現 3 支 Anti-HCV(-)/HCV RNA(+),上海捐血中心 103,539 支檢體並無發現 EIA(-)/NAT(+) 檢體。

6. 篩檢策略 I

法國 *Institut National de la Transfusion Sanguine* 之 *Dr. Syria Laperche* 報告他們捐血者篩檢採用之血清學與 NAT 檢驗等相關概況。法國自 1971 年起執行 HBsAg EIA 檢驗,1985 年執行 Anti-HIV-1 EIA 檢驗,1988 年執行 Anti-HBc EIA 及 ALT 檢驗,1989 年執行 Anti-HIV-1/2 EIA 檢驗,

1990 年執行 Anti-HCV EIA 檢驗，1991 年執行 Anti-HTLV-1 EIA 檢驗，2001 年執行 HIV-1/HCV NAT 檢驗 (HBV NAT 僅 1.6%地區執行)；自從導入 NAT 檢驗後，最大優點即為補足血清學檢驗之不足所造成之檢測空窗期，尤其是針對 Silent infections 或 viral variants，顯著降低殘餘風險 (Residual risk, RR)，依 2003-2005 年數據顯示血清學搭配 NAT 檢驗使 HIV-1 之殘餘風險(1/2,600,000)較血清學檢驗之殘餘風險(1/1,430,000)降低 45%，HCV 之殘餘風險 (1/6,500,000) 較血清學檢驗之殘餘風險 (1/1,160,000) 降低 83%，但是 NAT 檢驗也有一些限制，如文獻曾報告過 NAT (-) /EIA (+) 之案例，因此必須有進一步或後續之評估研究才可能廢止目前捐血者篩檢之血清學檢驗。他最後歸納：捐血者篩檢策略之決定必需考量生物學方法之特性、當地流行病學資料、及當地組織；而提升血液安全必須藉由更靈敏之篩檢方法與採取病原不活化程序。

英國 NIBSC 之 *Dr. Philip Minor* 以管理者的觀點來看血清學檢驗與 NAT 檢驗。他指出 NIBSC 自 2001 年至 2006 年間每年所檢測之 Plasma pools (每年約 1,200-2,300 個 pools)，僅 2004 年有 2 個 pools 檢出 B19 病毒超出限量，其他均為陰性，但是自從歐洲藥典不再要求 Plasma pools 篩檢 Anti-HCV (規定檢測 HCV RNA) 後，未來 Plasma pools 檢出結果或許會改變。英國 1999 年至 2007 年捐血者之 HCV 檢測結果如下表，其中抗體陽性者中有 1/3 無法檢測到 HCV RNA，此外有部分檢體(約為抗體陽性者之 2%) 為 HCV RNA NAT (+) / Anti-HCV (-)，可能具有感染性。

Country	Number tested	Total Ab positive	NAT (+) Ab (+)	NAT (-) Ab (+)	NAT (+) Ab (-)
England	17,999,098	906	666	191	19
Wales	900,622	84	64	20	2
Northern Ireland	558,948	15	11	2	1
Republic of Ireland	1,215,743	39	23	10	0
Scotland	2,084,590	172	144	27	1

(NBS/HPA Donation testing surveillance report Jan 2007)

7. 篩檢策略 II

德國 Paul-Ehrlich Institute (PEI) 之 *Dr. Johannes Blümel* 概要介紹血品病原不活化之方式，並探討病原篩檢與不活化之優缺點。病原不活化處理主要是針對 3 種目標—envelope (脂質)、capsid (蛋白質) 與 DNA/RNA (核酸)，一些不活化處理方法如放射線照射對於 3 種目標均有作用；核酸修飾物質 (Nucleic acid modifying substances) 必須考慮穿透病毒外殼或細胞壁之能力，因此該方式對於套膜病毒 (Envelope virus) 的不活化效果較無套膜病毒 (Non-envelope virus) 差，同時必須考量毒性物質之移除問題；甲基藍/UV 照射方式已使用於輸血用血漿多年，對於套膜病毒 (HIV, BVDV, WNV, HTLV 等) 不活化效果良好，對於部分無套膜病毒 (Parvovirus B19, Adenoviruses) 不活化效果亦可，但對於 Polio virus, HAV 等無套膜病毒則無效果；另外尚有用於血小板濃厚液之 Amotosalen+UVA 照射與 Riboflavin/UV，均對於套膜病毒不活化效果良好，對於部分無套膜病毒效果亦可，對於細菌與原蟲均有不活化效果。他

並概略探討病原篩檢與不活化之優點與限制，前者之優點為靈敏且具特异性，其限制為檢測極限及無法針對未知病原進行檢測；而不活化處理之優點為能有效不活化許多未知或無法預期之病原、及許多細菌與原蟲，但其限制為必需考量其適用性以免影響血品、及對於高病毒血品之不活化能力與具抵抗能力之病原。

英國 Liverpool School of Tropical Medicine 之 *Dr. Imelde Bates* 說明在資源有限地區之血液篩檢選擇方式。他首先說明 WHO 針對非洲 46 國於 2001-2012 年目標為 (1) 建立並實施國家輸血政策者需達 75%，(2) 100%血袋均需篩檢 HIV 與其他輸血相關病原，(3) 自願無償捐血需達 80% 以上。但目前非洲有 70%孕婦貧血，造成一歲以下嬰兒 Hb <8g/dl 者超過 20%，且血品短缺加上捐血者篩選逐漸嚴格，造成供血嚴重不足，曾有報告指出由於缺乏血品可供輸血，肯亞每 10 分鐘有 1 人因此而死亡。目前非洲許多國家之輸血系統主要是以醫院為主，病患即為捐血者；另一方面，國家輸血系統成本約較醫院系統高 3.75 倍，但醫院系統品質如何則未知，因此一些國家針對醫院系統採變通方式來增加供血來源與安全性，如坦尚尼亞降低捐血者 Hb 標準、迦納以快速檢測試劑進行捐血前篩檢、馬拉威訂定篩檢項目之優先順序等。

四、心得與建議

- (1) 依據法國 2003-2005 年數據顯示：血清學搭配 NAT 檢驗使 HIV-1 之殘餘風險 (Residual risk, RR) 較單獨血清學檢驗降低 45%，HCV 之殘餘風險則降低 83%，顯示導入 NAT 檢驗可補足血清學檢驗之不足所造成的檢測空窗期，尤其是針對 Silent infections 或 viral variants，顯著降低殘餘風險。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，為確保國人用血安全，實應儘速納入常規篩檢項目中，必須參考當地流行病學資料，建立適合我國之篩檢系統，對於 HBV NAT 應採用更靈敏之 Individual Donor NAT 以檢測出極低病毒含量之慢性帶原者。
- (2) 我國因 Anti-HBc 陽性者過多而無法逕予排除捐血，也因此無法避免 Occult HBV 感染之潛在風險，同時研究數據亦顯示輸血後感染 HBV 之發生率明顯高於西方已開發且 HBV 盛行率低的國家。為增加輸血安全，採用新的篩檢策略（增加 HBV NAT 檢測項目）以排除 Occult HBV 捐血者實有迫切之必要。同時需注意的是，可能半數慢性帶原者其 HBV DNA 含量極低 ($<10^2$ geq/mL)，以 mini-pool NAT 篩檢仍可能會有偽陰性的情形。
- (3) 歐盟共同技術規範 (CTS) 原對於 HBsAg 檢驗試劑規範其分析靈敏度必須達 0.5ng/mL，因 WHO 第二支 HBsAg 國際標準品 (00/588) 已經建立並供

應使用，之前規範所提之分析靈敏度（0.5ng/mL）大約相當於 0.263 IU/mL，PEI 以該支標準品評估目前市面上診斷試劑之分析靈敏度，結果顯示均能符合，因此目前歐盟 IVD 技術小組打算修訂共同技術規範(CTS) 所載之分析靈敏度要求為 0.13 IU/mL；目前我國相關規範亦為 0.5ng/mL，值得我們密切注意後續發展，供未來我國規範更新之參考。

(4) 目前已有診斷試劑製造廠研發出以微陣列平台為基礎之定量 PCR 檢測系統雛型，因其所需檢體量少，可同時檢測多種目標物，且操作簡便迅速，預料未來快速分子診斷試劑潛力無限，目前由於檢測靈敏度等相關議題，微陣列平台尚不可能取代現行血液篩檢技術，奈米技術在血液篩診方面之應用雖於目前尚未成熟，但其一般運用性進展神速，預期仍將會帶動這方面領域應用之加速發展。因應新檢測平台與新興技術之發展所需考量之對照參考物質製備與相關技術規範等議題，仍需密切注意相關發展，及早規劃。

(5) 由於目前全球有 2.5 億人口生活在有登革熱感染風險之區域，且流行率顯示有擴展之情形，可能是由於全球暖化及交通發達等因素使病媒蚊擴展版圖，登革熱已成為人類相當重要的節肢動物攜帶性病毒疾病 (Arboviral disease)，已有診斷試劑製造廠研發相關檢測試劑，並先藉由研發雛型了解高度流行地區之捐血者檢體之登革熱病毒盛行率，臨床評估結果證實該研發雛型可檢測出無症狀之登革熱感染捐血者，盛行率調查結果亦引發輸血傳染率之議題，位於亞熱帶的我國亦屬於登革熱高風險區，應密切注意該部分之研究。

- (6) 血液病原流行病學資料的改變可能會影響捐血者篩檢系統之效能，診斷試劑檢測捐血者族群中新亞型或基因型的能力均須被評估，因此新興/再流行感染原之存在與其對血液安全之影響等資料，對於對照參考物質之建立與檢測體系之標準化用均相當重要。
- (7) 血液病原篩檢之優點為靈敏且具特異性，但其限制為仍有檢測極限及無法針對未知病原進行檢測，而不活化處理之優點為能有效不活化許多未知或無法預期之病原、及許多細菌與原蟲。血液製劑製程中尚有經確效之病毒去除/不活化步驟可降低傳染風險，而目前國內血品均尚未導入血品之病毒不活化步驟，建議相關單位應及早著手進行研究評估，以降低未知感染原傳染風險，評估內容需考量其適用性以免影響血品、及對於高病毒血品之不活化能力。
- (8) 藉參與會議機會受邀參與英國 NIBSC 製備第三支 WHO HCV NAT 國際標準品之共同標定研究，由 *Dr. Sally Baylis* 報告內容與交談獲知本局標定結果均落於主要分布族群，相當良好。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。

- (9) 於會議上報告我國 Parvovirus B19 NAT 核酸國家標準品之製備與共同標定研究結果，於會上及會後均獲得不少迴響，如美國 FDA/CBER *Dr. Mei-Ying Yu*, *Dr. Indira Hewlett*、英國 NIBSC *Dr. Sally Baylis* 及德國 PEI *Dr. Micha Nubling* 等人均表示各實驗室間之標定結果差異極小，共標結果一致性相當佳，其他尚有對照參考物質及診斷試劑製造廠等機構主動攀談，表示極感興趣，有助本局能見度之提升。
- (10) SoGAT 在過去 12 年來在血液安全方面已完成許多顯著任務，NIBSC 希望 SoGAT 能更符合公共衛生之需求，而不僅止於貢獻在血液安全領域，故本研討會將更名爲 SoGAT-BT (blood/ tissues safety)，並改爲每 2 年舉辦一次，下次將於 2009 年在布魯塞爾舉辦；另外將會成立 SoGAT CV (Clinical virology)，首次將於 2008 年在英國舉辦。