

出國報告（出國類別：研習）

參加第 24 屆血液病毒基因擴增技術標準化研討會報告

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：楊依珍 薦任技正

派赴國家：斯洛維尼亞

出國期間：102.05.06-102.05.11

報告日期：102.07.29

摘 要

本次奉派出國係赴斯洛維尼亞參加第 24 屆血液病毒基因擴增技術標準化研討會 (SoGAT)，並藉機邀請與會相關機構參與本署 HCV genotype 2 核酸標準品之共同標定研究。本次會議並與臨床診斷領域之基因擴增技術標準化研討會共同舉辦，參與會議獲知 WHO 目前於血液安全領域及臨床診斷領域之標準品建立情形，其他如標準品的互通性、次世代定序技術等新興技術之應用等議題、以及歐洲藥典血漿混合液品目新增 HEV NAT 規範之進度亦值得我們密切關注，為提升血液及血漿原料病毒安全，納入更靈敏之 HBV、HCV 及 HIV NAT 已是國際趨勢。藉由參與國際研討會獲取血液病毒核酸擴增技術檢測新知與各國管理現況，應用於本署血液相關病毒核酸檢測體系及相關標準品之建立，並藉機建立並維持與他國相關領域專家之溝通管道，以利日後能隨時掌握最新技術發展與持續建立共同合作關係，亦有利於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，以提升我國生物性標準品之公信力。另本單位之前受邀參與 WHO 第 3 支 B19V 國際標準品之共同標定研究，由報告內容獲知標定結果均落於主要分布族群，成果相當良好。

目 次

摘要	-----	2
目次	-----	3
一、目的	-----	4
二、行程紀要	-----	6
三、內容	-----	7
四、心得及建議	-----	30

一、目的

血液製劑係由人血漿製備而成，仍有潛藏經血傳染感染原之風險，而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，為目前世界各國衛生主管機關持續努力之任務之一。

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，持續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，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。

血液病原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) 係 WHO 委託英國國家生物標準品暨管制研究所 (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) 辦理之國際性科學技術

研討會議，NIBSC 為 WHO 之 Collaborating Center，長期以來負責為 WHO 製備與供應生物性國際標準品，而其召開 SoGAT 會議之主要目的為報告相關國際標準品製備情形，並提供各國主管機關及相關領域專家就血液病原核酸擴增技術 (Nucleic Acid Amplification Techniques, NAT) 標準化等議題交換觀點，以提升各國血液病原之 NAT 檢測水準。衛生福利部自前藥物食品檢驗局及食品藥物管理局時期，基於血液製劑與第三等級體外診斷試劑之品質檢驗管理，亦曾多次派員參與該研討會議，除獲取血液病原檢測之相關現況與新知，了解 WHO 國際標準品製備現況，與國際接軌，同時藉此會議保持與各國相關領域專家建立溝通管道，以便隨時掌握最新技術法規發展及建立共同合作關係，不僅因而順利邀請到各國官方實驗室(包括英、美、德、日、澳等國) 參與本署建立國家病毒核酸標準品過程之國際共同標定研究，提升我國標準品之公信力，進而爭取參與 WHO 國際標準品共同標定研究之機會，增加國家能見度。

本次參加會議並藉機邀請與會相關機構參與本署 HCV genotype 2 核酸標準品之共同標定研究，待完成標準品之共同標定研究，所建立之核酸國家標準品除供本署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、臨床檢驗單位與診斷試劑製造廠作為 NAT 檢測方法與分子診斷試劑研發品管評估用，以提升其製造與檢驗水準，除保障國人用血安全，亦有助於我國生物技術產業之推動，達成與國際接軌之目標。

二、行程紀要

<u>日期</u>	<u>工作紀要</u>
5月6日	啟程
5月7日	抵達斯洛維尼亞盧比茲納
5月8日	參加第24屆「血液病毒領域」暨第4屆「臨床診斷領域」 基因擴增技術標準化研討會
5月9日	參加第24屆「血液病毒領域」暨第4屆「臨床診斷領域」 基因擴增技術標準化研討會
5月10日	返程
5月11日	抵台

三、內容

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 年起召開血液病原基因擴增技術標準化會議，該會主要目的為報告 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。SoGAT 於過去 10 餘年來在血液安全方面已經完成許多顯著的任務，例如：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（1st & 2nd）、WHO B19 DNA 國際標準品（1st & 2nd）、WHO HAV RNA 國際標準品等；近年來由於血液相關病毒之 NAT 檢測用國際標準品（International Standard）與工作試劑已陸續建立，同時鑒於分子檢測在臨床診斷上日益普遍，卻缺乏相關之國際標準品與工作試劑可供使用，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，以確保 SoGAT 在 NAT 檢驗技術之其他領域繼續提供協助，因此將 SoGAT 分為 2 部分，本研討會 SoGAT-BT（Blood/Tissues Safety），又名 SoGAT-BV（Blood Virology），仍針對血液安全方面持續辦理，惟改為每 2 年舉辦一次；另外由於臨床病毒診斷領域明確提出 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

此成立臨床診斷領域之基因擴增技術標準化研討會，簡稱 SoGAT-CD (Clinical Diagnostics)。

本次為第 24 屆 SoGAT-BT 暨第 4 屆 SoGAT-CD 研討會，於 2013 年 5 月 8 至 9 日在斯洛維尼亞盧比茲納舉辦，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 110 位來自歐洲各國、美國、澳洲、加拿大、巴西、土耳其、日本與台灣等國代表參與該會。研討會內容包含：(1) 國際標準品之發展情形、(2) 標準品建立之相關議題、(3) 標準品之「互通性」、(4) 外部能力試驗及相關檢體、(5) 第二級參考物質、(6) 新興技術、(7) 法規等 7 部份相關議題，其內容重點如後所述。

1. WHO 國際標準品之發展情形

此部份分別由英國 NIBSC、美國 CBER 及德國 Paul-Ehrlich Institute (PEI) 相關研究人員報告他們目前進行中的國際標準品建立計畫的執行情形，包含了英國 NIBSC 建立的 WHO 第 2 支 A 型肝炎病毒 (Hepatitis A Virus, HAV) 國際標準品、WHO 第 3 支微小病毒 (Parvovirus B19, B19V) 國際標準品、以及 WHO 第 1 組愛滋病毒第一型之流行重組型國際對照套組 (International Reference Panel for HIV-1 CRFs)，英國 NIBSC 與美國 CBER 共同建立的 WHO 第 1 支西尼羅病毒 (West Nile Virus) 國際標準品，以及德國 PEI 建立的 WHO 第 1 支 D 型肝炎病毒 (Hepatitis D Virus, HDV) 國際標準品與 WHO 第 1 組黴漿菌 (Mycoplasma) 國際標準套組，以下擇重點摘述之。

英國 NIBSC 之 Dr. Jacqueline Fryer 報告她們建立 WHO 第 2 支 A 型肝炎病毒國際標準品之執行情形。她首先說明擬建立第 2 支 WHO HAV RNA 國際標準品之緣由，由於目前第 1 支 HAV 國際標準品 (00/560) 庫存量持續

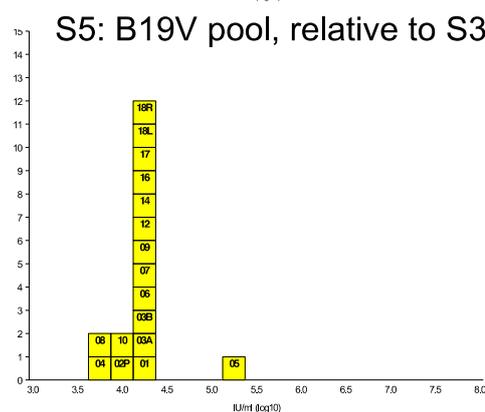
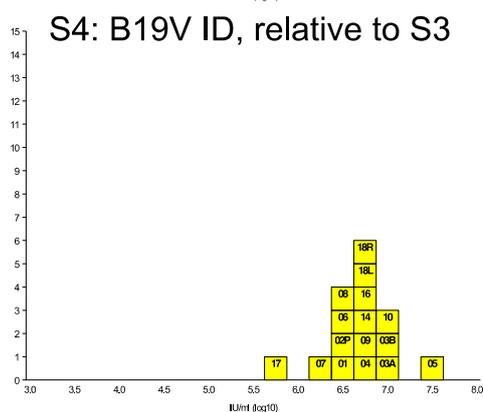
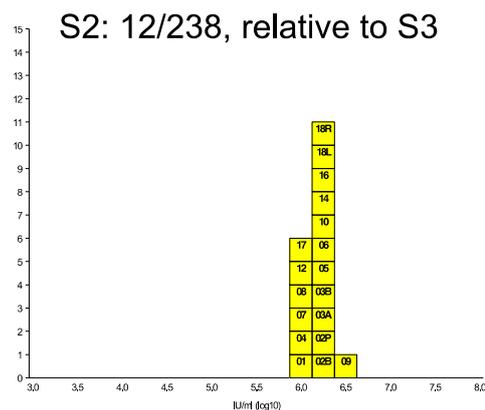
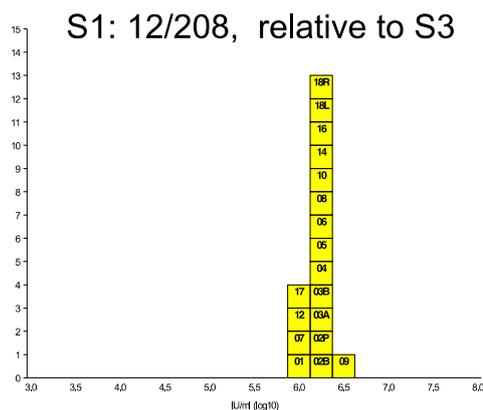
降低，因此必須持續建立第 2 支 WHO HAV RNA 國際標準品，供官方實驗室、血液製劑製造廠、診斷試劑製造廠及臨床實驗室校正其第二級參考物質用。她們準備了 2 支候選標準品，分別編號為 12/234 與 00/562，其中 12/234 為取自 A 肝患者之 HAV 陽性血漿，其病毒基因型為 genotype 1a，以人類陰性血漿稀釋成為 10^5 IU/mL，分裝成 0.5 mL 後冷凍乾燥保存之；00/562 與第 1 支 HAV RNA 國際標準品(00/560)來自相同原液，亦為 HCV genotype 1a 陽性血漿，與第 1 支 HAV RNA 國際標準品同時於 2001 年分裝與冷凍乾燥。接著藉由共同標定研究來評估挑選適當之國際標準品，由於這 2 支候選標準品都是凍晶乾燥型式，因此本次共同標定研究同時並加入 2 支冷凍之 HAV 陽性血漿，供作評估凍晶乾燥標準品互通性 (commutability) 用。共同標定研究總計涵蓋全球 12 個國家的 15 個實驗室，參與機構包含官方實驗室、診斷試劑製造廠、血液製劑製造廠及臨床檢驗實驗室，我國食品藥物管理局（現為食品藥物管理署）亦受邀參加。由於參與單位寄回結果的期限為 102 年 4 月 30 日，因此她們於報告時只能先簡要說明一些基本資訊，如總計收到 18 組數據，其中 7 組採用定量分析方法，11 組採用定性分析方法，採用實驗室自行建立方法者有 7 組，其餘 11 組採用市售試劑套組，後續尚須進行數據的統計分析以訂定候選標準品的濃度，而候選標準品的安定性評估研究也正進行中，屆時方能據以評估建議出最適當之國際標準品，她們將於完成後提交報告給 WHO 生物學標準化專家委員會 (ECBS)，供其決定是否建立成為 WHO 國際標準品。

英國 NIBSC 之 Dr. Jacqueline Fryer 接著報告她們建立 WHO 第 3 支微小病毒國際標準品之執行情形。她首先說明擬建立第 3 支 WHO B19V DNA 國際標準品之緣由，由於目前第 2 支 B19V 國際標準品 (99/802) 庫存量持續降低，因此必須持續建立第 3 支 WHO B19V DNA 國際標準品，供官方實驗室、血液製劑製造廠、診斷試劑製造廠及臨床實驗室校正其第二級參考物質用。她們準備了 2 支候選標準品，分別編號為 12/208 與 12/238，都是取自人類 B19V 陽性血漿，其病毒基因型為 genotype 1，以人類陰性血漿

稀釋成為 10^6 IU/mL，分裝成 0.5 mL 後冷凍乾燥保存之。接著藉由共同標定研究來評估挑選適當之國際標準品，由於這 2 支候選標準品都是凍晶乾燥型式，因此本次共同標定研究同時並加入 2 支冷凍之 B19V 陽性血漿，供作評估凍晶乾燥標準品互通性 (commutability) 用。共同標定研究總計涵蓋全球 13 個國家的 18 個實驗室，參與機構包含官方實驗室、診斷試劑製造廠、血液製劑製造廠及臨床檢驗實驗室，我國食品藥物管理局（現為食品藥物管理署）亦受邀參加。NIBSC 總計收到 20 組數據，其中 18 組採用定量分析方法，2 組採用定性分析方法，採用實驗室自行建立方法者有 6 組，其餘 14 組採用市售試劑套組，NIBSC 收集結果後進行統計分析，定量分析結果如下圖，其中 S3 為現行 WHO 國際標準品 (99/802)，12/208 (S1) 與 12/238 (S2) 候選標準品經與現行國際標準品比對後，標定濃度分別為 6.16 Log IU/mL 及 6.14 Log IU/mL，候選標準品的安定性評估研究現正進行中，屆時方能據以評估建議出最適當之國際標準品，根據之前的研究顯示現行 WHO 國際標準品 (99/802) 維持約 13 年仍相當穩定。完成後她們會提交報告給 WHO 生物學標準化專家委員會 (ECBS)，供其決定是否建立成為 WHO 國際標準品。

Sample	n	Mean	Range	SD
S1: 12/208	17	6.16	5.88 – 6.41	0.14
S2: 12/238	17	6.14	5.88 – 6.42	0.14
S4: B19 plasma, ID	15	6.63	5.71 – 6.95	0.32
S5: B19 plasma, pool	16	4.15	3.79 – 4.29	0.16

(摘自 Dr. Jacqueline Fryer 簡報)



(摘自 Dr. Jacqueline Fryer 簡報)

S3: 99/802

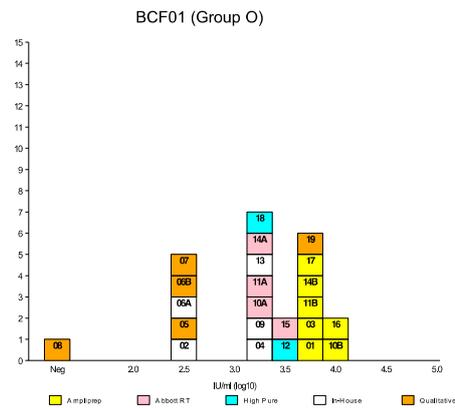
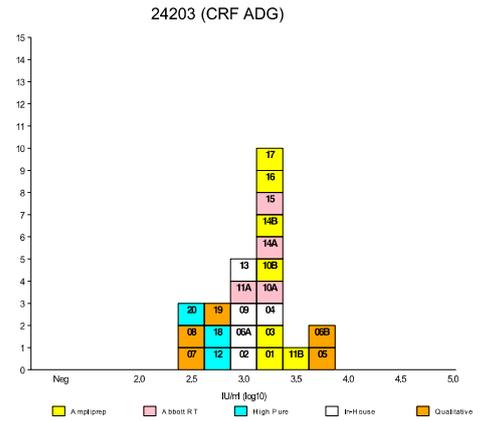
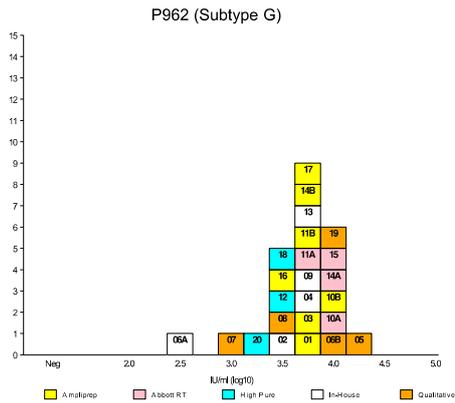
英國 NIBSC 之 Dr. Clare Morris 報告她們建立 WHO 第 1 組愛滋病毒第一型之流行重組型國際對照套組 (International Reference Panel for HIV-1 CRFs) 之情形。她首先說明擬建立愛滋病毒第一型之流行重組型國際對照套組之緣由，NIBSC 曾於 2003 年建立供核酸擴增分析用之 HIV-1 亞型套組 (subtype panel)，近年來由於各亞型經過基因重組後所產生的流行重組型 (circulating recombinant forms, CRFs) 逐漸普遍，例如 A 亞型和 E 亞型重組之 CRF 01_AE，B 亞型和 C 亞型重組之 CRF 07_BC，這兩種流行重組型在台灣已逐漸普遍，尤其是靜脈藥癮者感染之病毒多屬 CRF 07_BC。有鑒於現行市售或實驗室自行研發建立之 HIV-1 診斷方法通常是針對病毒基因序列的一個區域或兩個不同區域，流行重組型可能會導致引子錯誤配對 (primer mismatch) 而影響診斷結果，因此 NIBSC 擬建立 1 組涵

蓋全球常見之流行重組型對照套組，供診斷試劑製造廠、臨床實驗室、血庫及研究單位評估及改善其檢驗方法對於流行重組型之偵測能力。她們所建立之候選套組涵蓋 10 支檢體，檢體成員如下表：

Code	Virus	Study Code	Residual moisture
11/100	SE9173 (Subtype GU J)	Sample 7	0.230
11/102	CM244 (CRF01 AE)	Sample 4	0.286
11/138	P962 (Subtype G)	Sample 9	0.787
11/140	P1261 (CRF 02 AG)	Sample 3	0.520
11/144	BCF01 (Group O)	Sample 1	0.768
11/146	24203 (CRF ADG)	Sample 10	0.733
11/148	MP1307 (CRF 11 GJ)	Sample 2	0.722
12/142	X1936 (Subtype C)	Sample 8	0.756
12/144	X2456 (CRF BG 24)	Sample 6	1.01
12/146	96CM1849 (Subtype J)	Sample 5	1.02

(摘自 Dr. Clare Morris 簡報)

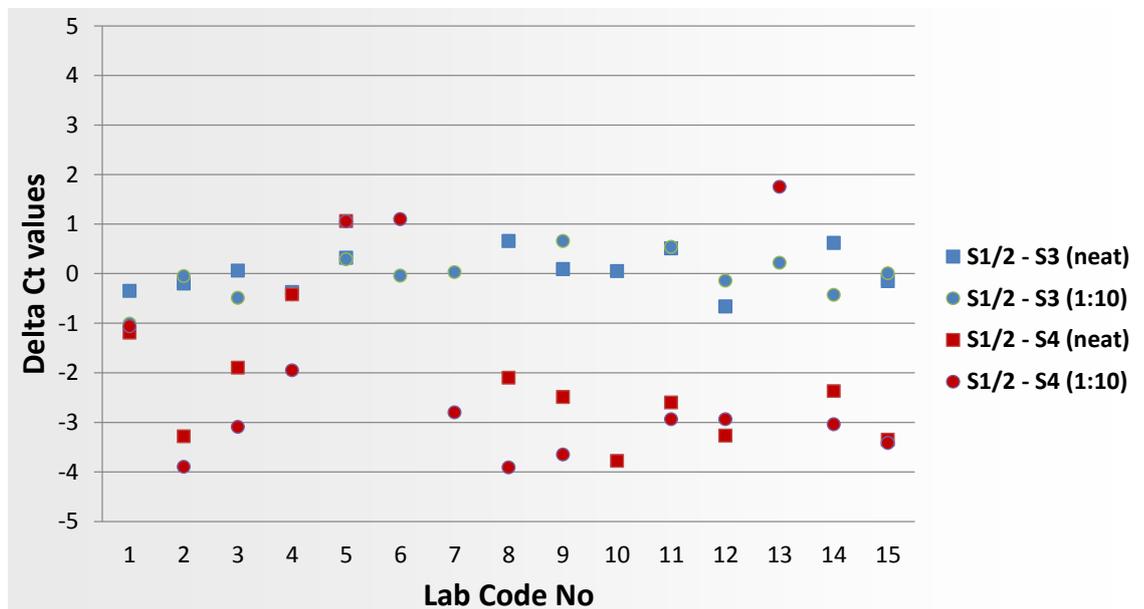
共同標定研究總計有 11 個國家的實驗室參與標定，收到 19 組標定數據，NIBSC 收集結果後進行統計分析，與目前 WHO 國際標準品比對標定結果初步呈現如下圖，她們將於完成後提交報告給 WHO 生物學標準化專家委員會 (ECBS)，供其決定是否建立成為 WHO 國際標準品。



(摘自 Dr. Clare Morris 簡報)

德國 Paul-Ehrlich Institute (PEI) 之 Dr. Michael Chudy 報告他們建立 D 型肝炎病毒國際標準品之情形。D 型肝炎病毒屬於 *Deltavirus* Genus，直徑大小約 36 nm，目前有 8 種病毒基因型，D 型肝炎病毒是一種 RNA 缺陷病毒，必須在 HBV 或其他嗜肝 DNA 病毒的輔助下才能複製增殖，因此 D 型肝炎病毒感染者通常也伴隨著 B 型肝炎病毒感染，許多臨床研究發現，D 型肝炎病毒感染常會導致 B 型肝炎病毒感染者的症狀加重與病情惡化。D 型肝炎病毒傳染途徑與 B 型肝炎病毒相同，主要是透過體液接觸及輸血等方式傳染，高危險群包括靜脈注射藥癮者及多次受血者。由於血清學檢驗方法靈敏度不佳，因此以核酸擴增技術方法檢測 D 型肝炎病毒就顯得極為重要，目前主要的核酸擴增技術檢測方法多屬實驗室自行研發建立，尚未全面標準化，因此建立 D 型肝炎病毒標準品是有必要的，遂於 2009 年 WHO 生物學標準化專家委員會 (ECBS) 會議中提議建立第 1 支 D 型肝炎病毒國際標準品。他們與土耳其 Ankara 大學合作，總計取得 7 袋 HDV 陽性

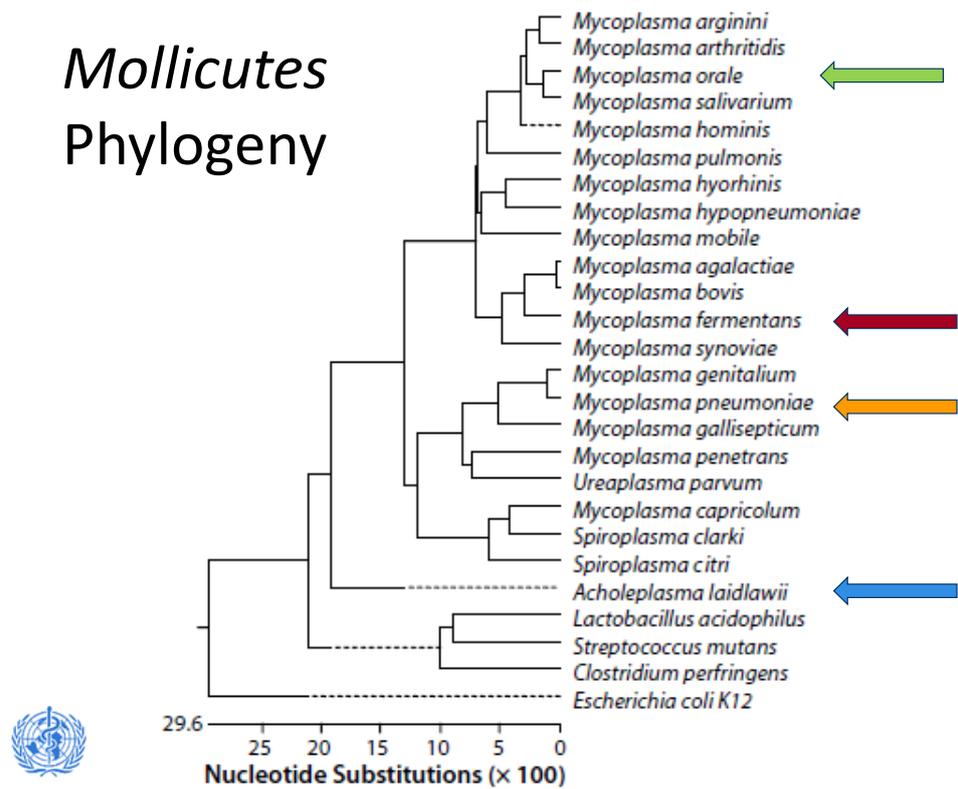
血漿，均為 genotype 1，病毒量約在 10^5 - 10^7 cps/mL 之間，進一步進行其他分析評估後，選定編號 N6357 作為候選標準品原料，再以陰性血漿進行 50 倍稀釋後進行分裝與冷凍乾燥程序，總計分裝 4,010 瓶，每瓶 0.5 mL，完成之候選標準品編號為 PEI code 7657/12，後續尚須進行共同標定研究及安定性評估研究。共同標定研究總計邀請 10 國 20 個有 HDV 檢測經驗之實驗室，其中 9 國 15 個實驗室寄回數據，初步彙整數據如下圖，預計 5 月中完成統計分析，完成後提交報告給 WHO 生物學標準化專家委員會 (ECBS)，供其決定是否建立成為 WHO 國際標準品。



(摘自 Dr. Michael Chudy 簡報)

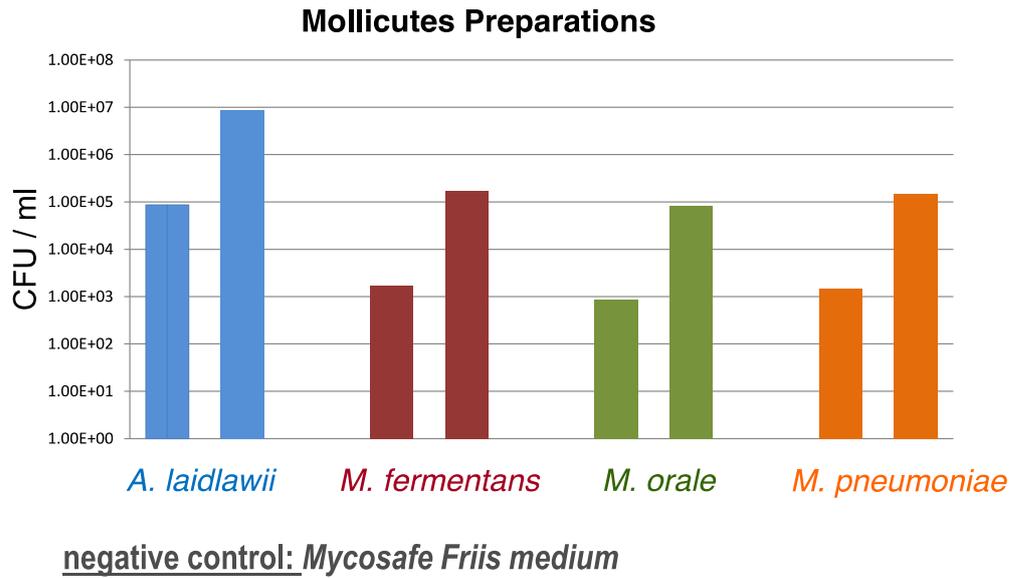
德國 Paul-Ehrlich Institute (PEI) 之 Dr. Micha Nuebling 報告他們建立 WHO 第 1 組黴漿菌 (Mycoplasma) 國際標準套組之情形。黴漿菌原本是柔膜菌綱 (*Mollicutes*) 的俗稱，該綱細菌有一重要的特徵，就是沒有細胞壁，現在 *Mycoplasma* 則指柔膜菌綱下之黴漿菌屬 (*Mycoplasma* Genus)，目前已發現的黴漿菌超過一百多種。黴漿菌經常是造成生物製劑製程污染的污染源，例如細胞培養過程污染黴漿菌，將會導致細胞代謝與表型改變。因此如歐洲藥典等各國規範都會要求生物製劑製程中必須進行

黴漿菌檢測。目前黴漿菌檢測方法包括直接培養法及指示細胞培養法，由於培養法檢驗時間需要 28 天，以及培養條件複雜等因素，各國藥典亦陸續接受以經確效及比對研究驗證過之核酸擴增技術法取代培養法，目前已知針對 16S rRNA 為偵測目標的 PCR 方法已陸續被美國 FDA、歐盟 EMA 及日本等主管機關接受，因此建立黴漿菌標準品是有必要的，遂於 WHO 生物學標準化專家委員會（ECBS）會議中提議建立第 1 組黴漿菌（Mycoplasma）國際標準套組，該組套組包含 *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pneumoniae* 等 4 菌種及陰性對照（Mycosafe Friis medium），挑選菌種的代表性如下圖：



（摘自 Dr. Micha Nuebling 簡報）

該組套組包含 9 支檢體，檢體成員分別為前述 4 菌種各 2 支及陰性對照 1 支，各支檢體濃度初步測定如下圖：



(摘自 Dr. Micha Nuebling 簡報)

每支檢體分裝成 0.5 mL 後進行冷凍乾燥程序，後續尚須進行共同標定研究及安定性評估研究。共同標定研究總計收集到 16 組標定數據，其中 10 組為半定量分析方法，6 組為定性分析方法，初步結果顯示，所有半定量分析方法均能檢測到黴漿菌陽性檢體，大部分定性分析方法能檢測到黴漿菌陽性檢體，有 1 項定性分析方法無法檢測到 *Acholeplasma laidlawii* 及 *Mycoplasma pneumoniae*，有 2 項定性分析方法無法檢測到 *Mycoplasma orale*，他們以 *Mycoplasma fermentans* (10^5 Candidate IU/mL) 當作共同的 Calibrator，初步分析結果如下圖，將待完成統計分析後訂定標準品濃度，候選標準品的安定性評估研究現正進行中，完成後將提交報告給 WHO 生物學標準化專家委員會(ECBS)，供其決定是否建立成為 WHO 國際標準品。

2. 標準品建立之相關議題

英國 NIBSC 之 Dr. Jacqueline Fryer 報告她們擬建立 WHO 第 5 支 C 型肝炎病毒國際標準品之計劃。C 型肝炎病毒國際標準品係供官方實驗室、血液製劑製造廠、診斷試劑製造廠及臨床實驗室校正其第二級參考物質及確效其 HCV NAT 分析方法用。WHO 第 4 支 C 型肝炎病毒國際標準品 (06/102) 於 2011 年 10 月建立 (WHO/BS/2011.2173)，供應量應該足夠 3-4 年，因該支標準品 (06/102) 與 WHO 第 3 支 HCV RNA 國際標準品 (06/100) 同時都在 2006 年分裝充填，來自相同原液，因此這 2 支 HCV 候選標準品同時於 2007 年藉由共同標定研究進行標定，當時共同標定研究總計涵蓋全球 33 個實驗室參與（我國前藥物食品檢驗局亦獲邀參與），以 WHO 第 2 支國際標準品標定結果分別為 5.19 Log IU/mL (06/100) 與 5.41 Log IU/mL (06/102)，前者於 2007 年建立成為 WHO 第 3 支 HCV 國際標準品，而後者於 2011 年再藉由較小型之共同標定研究來評估建立成為 WHO 第 4 支 HCV 國際標準品之可行性。該次共同標定研究包含診斷試劑製造廠、捐血中心及國家檢驗機構等 8 個實驗室，其中有 2 個實驗室分別提供 2 至 3 種方法的結果，因此總計有 10 個標定結果，NIBSC 收集結果後進行統計分析，訂定該標準品濃度為 5.2 Log IU/mL，較 2007 年標定結果降低約 0.2 Log IU/mL，由於該次共標檢體是以室溫運送，因此懷疑運送溫度會影響標準品效價，她們進一步將該支標準品分別置於 4°C 及 20°C 存放 7 天後，與存放於 -20°C 之標準品進行評估比較，結果顯示（如下表）標準品於 20°C 存放 7 天後的確降低 0.24 Log IU/mL。

- Compared HCV concentration of 06/102 when stored at +4°C and +20°C for 7 days with those stored at -20°C.

Temperature (°C)	Mean log ₁₀ IU/mL	Difference in log ₁₀ IU/mL from -20°C baseline sample
	06/102	06/102
-20	5.50	-
+4	5.46	-0.04
+20	5.26	-0.24

（摘自 Dr. Jacqueline Fryer 簡報）

她們更進一步邀集數個實驗室進行共同研究以確認標準品運送溫度之影響，將 WHO 第 2 支 (96/798)、第 3 支 (06/100) 及第 4 支 (06/102) HCV 國際標準品分別置於 20°C 存放 7 天後，與持續存放於 -20°C 之標準品進行評估比較，該次共同研究總計有 5 個實驗室參與，寄回 7 組數據，結果顯示 (如下表) 第 3 支 (06/100) 及第 4 支 (06/102) HCV 國際標準品於 20°C 存放 7 天後確降低約 0.2 Log IU/mL，而第 2 支 HCV 國際標準品 (96/798) 並無影響。同時，共同研究結果顯示第 4 支 HCV 國際標準品 (06/102) 如維持於 -20°C 以下將相當穩定，因此以 2007 年共同標定研究結果訂定其濃度為 5.41 Log IU/mL，並建議日後應以乾冰運送以維持於 -20°C。

		Mean log ₁₀ IU/mL		
		06/102	06/100	96/798
2007 CS Mean		5.41	5.19	5.00
Transport study	-20°C	5.44	5.17	5.02
	+20°C	5.09	4.93	4.94
Difference in log ₁₀ IU/mL from -20°C sample		0.34	0.25	0.08

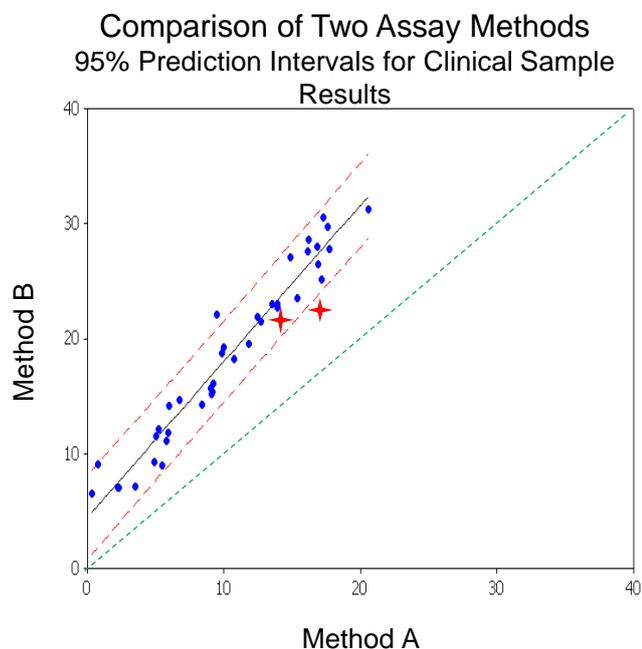
(摘自 Dr. Jacqueline Fryer 簡報)

基於前述理由，她們於 2012 年 SoGAT-BV 會議上建議規劃建立 WHO 第 5 支 HCV 國際標準品，以取代現行有高溫安定性疑慮之國際標準品。為建立 WHO 第 5 支 HCV 國際標準品，她們規劃先進行先導研究，總計將進行 6 種不同 HCV 製備液的分裝及冷凍乾燥程序，後續並將進行 HCV RNA 濃度測定 (含 20°C 存放 7 天與維持於 -20°C 之比較)、含溼度及含氧量，再視前述評估結果選定 WHO 第 5 支 HCV 國際標準品之製備液原料，後續再進行分裝與冷凍乾燥程序，預計分裝約 6,000 瓶，標準品之共同標定研究將邀請全球 20 個實驗室進行評估，評估時將同時納入第 1 支 HCV 國際標準品 (96/790) 或第 2 支 HCV 國際標準品 (96/798)，預計於 2014 年或 2015 年提交報告給 WHO 生物學標準化專家委員會 (ECBS)。

3. 標準品之「互通性」(commutability)

英國 NIBSC 之 Dr. Philip Minor 報告 WHO 於 2013 年 4 月 18-19 日會議中提及之互通性 (commutability) 議題。他首先藉由該次會議中提及之互通性議題來討論現行 WHO 國際標準品之互通性，由於生物性對照標準品相當複雜，其檢測方法也相當複雜，「互通性」之目的就是要使實驗室的檢測結果能達成全球協同化，一個參考物質能夠像臨床檢體一樣適用於所有檢驗方法，即稱之為「有互通性 (commutable)」。亦即，應用不同的檢驗方法同時對某參考物質和臨床檢體進行檢測，所得到的結果具有相同的比率時，該參考物質即被認為具有互通性。確定參考物質互通性的需求首先源自於臨床化學，在臨床檢驗中常使用各式各樣之檢驗方法來檢測患者檢體中的某項特殊目標偵測物，這些檢驗方法是以不同的物理化學或生物化學原理來檢測複雜生物分子中的一些分子組成，這些檢驗方法對於參考物質和臨床檢體基質之間的差異可能會引起不同程度的干擾，或參考物質製備過程中待測物的改變（如變性、聚集、與金屬結合等）與基質的改變所引起的差異可能會產生相當大的影響，因此不能將此種情形造成之偏差歸咎於是檢驗方法的問題，或者歸咎於是參考物質在不同檢驗方法間的反應差異所引起的偏差，因此，參考物質建立前即應考量到「互通性」的問題。一般而言，評估參考物質的互通性最簡單的方法是建立與兩種檢驗方法有關的互換性，同時用兩種檢驗方法檢測臨床檢體，再以回歸分析確認這兩種檢驗結果之間的數學關係，通常以 95% 預測區間來呈現臨床檢體檢測結果比率的分佈。如果參考物質以同樣兩種方法檢測所得結果的比率落在臨床檢體信賴區間內，則該參考物質即被認為具有互通性（如下圖）。

Commutable / not commutable
- but similar performance for both



(摘自 Dr. Philip Minor 簡報)

Dr. Philip Minor 接著討論到 WHO 國際標準品之互通性議題，由於臨床病毒學領域之巨細胞病毒國際標準品 (WHO IS CMV-DNA) 被報告在血漿、血液及細胞培養液中有不同的檢測值，因而引發此議題之討論。過去 WHO NAT 國際標準品未曾被報告過有互通性議題，推測可能的原因是這些標準品都具有互通性，或此問題被隱藏於核酸擴增技術檢測結果之高變異係數中。未來臨床病毒學領域之國際標準品可能須考量潛在之互通性議題，包括：標準品應儘可能地類似臨床檢體、注意操作步驟的影響、事先進行先導研究評估等。

4. 外部能力試驗及相關檢體

澳洲 NRL 之 Dr. Vincini Joe 報告 NRL 最近執行的一些專題研究計畫與外部能力試驗。他首先報告他們 2012 年執行之 HCV genotyping 專題研究計畫，該計畫總計包含 15 支檢體，涵蓋 HCV 所有基因型 (Gt 1 / 2 支、Gt 2 / 3 支、Gt 3 / 4 支、Gt 4 / 1 支、Gt 5 / 2 支、Gt 6 / 2 支、陰性對照 / 1 支)，結果顯示位於 5' UTR 區域的引子無法區分第 1 型與第 6 型，如納入位於 HCV core 區域的引子將可改善這兩型的區分能力，現行 WHO HCV 國際標準品是屬於第 1 型，第 6 型則流行於東南亞；此外，第 4 型流行於埃及，2012 年參與該計畫的 25 個實驗室中只有 1 個實驗室無法正確鑑別出第 4 型，該實驗室的結果是“無法判定”；此外，針對病毒量為 3.95 Log IU/mL 之 HCV 第 5 型檢體，2012 年參與該計畫的 47 個實驗室中只有 1 個實驗室無法正確鑑別出第 5 型，該實驗室的結果是“混合基因型”，該實驗室是採用自行研發建立之檢驗方法，而該方法在過去參加該計畫時是能正確鑑定出第 5 型的。

Dr. Vincini Joe 接著報告他們 2012 年執行之 HIV-1, HBV 及 HCV 病毒量專題研究計畫，該計畫包含序列稀釋，並進一步評估檢測方法之線性 (linearity)、重複性 (repeatability) 與再現性 (reproducibility)。首先在 HCV 方面，有 35 個參與實驗室使用 Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test，有 11 個參與實驗室使用 Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test v2.0，有 5 個參與實驗室使用 Abbott RealTime HCV RNA test，各檢測方法之再現性分析結果如下表；在 HIV-1 方面，有 29 個參與實驗室使用 Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test v2.0，有 14 個參與實驗室使用 Abbott RealTime HIV-1 RNA test，有 5 個參與實驗室使用 Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test v1.0，各檢測方法之再現性分析結果如下表；在 HBV 方面，有 26 個參與實驗室使用 Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test v2.0，有 8 個參與實驗室使用 Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test，有 5 個參與實驗室使用

Roche High Pure Viral Nucleic Acid Extraction kit/Roche COBAS TaqMan
 HBV Test，各檢測方法之再現性分析結果如下表：

Assay Type	No. of Participants	No. of Participants Submitted Results	No. Outside 0.5 log ₁₀
Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test	35	34	3
Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test v2.0	11	3	0
Abbott RealTime HCV RNA PCR	5	5	1
Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit/Roche COBAS TaqMan HCV Test v2.0	2	1	1
aj ROBOSCREEN INSTANT Virus RNA Kit/aj ROBOSCREEN RoboGene Hepatitis C Virus (HCV) Quantification Kit	1	1	0
aj ROBOSCREEN INSTANT Virus RNA Kit/ZJ Bio-Tech HCV Real Time RT-PCR Kit (Quantitative)	1	1	1
GeneDia GD611 Real Quant C HCV RNA viral load Real Time PCR Assay	1	1	1
In-house (HED) RNA Extraction Kit/ZJ Bio-Tech HCV Real Time RT-PCR Kit (Quantitative)	1	1	0
Promega Maxwell 16 Viral Total Nucleic Acid Purification System/ZJ Bio-Tech HCV Real Time RT-PCR Kit (Quantitative)	1	1	0
Qiagen QIAamp MinElute Virus Spin Kit/aj ROBOSCREEN RoboGene Hepatitis C Virus (HCV) Quantification Kit	1	0	NE
Qiagen QIAamp Virus BioRobot 9604 Kit/Abbott RealTime HCV RNA PCR	1	1	0
Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit/Roche COBAS TaqMan HCV Test	1	1	0
Siemens Versant HCV RNA 3.0 (bDNA)	1	1	1
Siemens VERSANT Sample Preparation 1.0 Reagents/Siemens Versant HCV RNA 1.0 Assay (kPCR)	1	1	0

NE = Not evaluated

Assay Type	No. of Participants	No. of Participants Submitted Results	No. Outside 0.5 log ₁₀
Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test V2.0	29	26	3
Abbott RealTime HIV-1 RNA PCR	14	13	0
Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test V1.0	5	2	0
Siemens Versant HIV-1 RNA 3.0 (bDNA)	4	2	0
bioMerieux NucliSens Magnetic Extraction/bioMerieux BV NucliSens EASYQ HIV-1 V2.0	2	2	1
Cavidi ExaVir Load Version 3	2	0	NE
Roche COBAS Amplicor HIV-1 Monitor v.1.5	2	1	0
Roche High Pure Viral Nucleic Acid Extraction Kit/Roche COBAS TaqMan HIV-1 Test	2	2	1
bioMerieux NucliSens Isolation Reagents/Lysis Buffer/bioMerieux BV NucliSens EASYQ HIV-1 V2.0	1	1	0
Qiagen QIAamp Virus BioRobot 9604 Kit/Abbott RealTime HIV-1 RNA PCR	1	1	0
Qiagen RNA Mini Kit/Biocentric Generic HIV Charge Virale	1	0	NE
Roche Amplicor HIV-1 Monitor v.1.5 (MWP)	1	1	0
Roche High Pure Viral Nucleic Acid Extraction Kit/In house Amp (n=1)	1	1	0
Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit/Roche COBAS TaqMan HIV-1 Test V 2.0	1	1	0
Siemens Versant HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR)	1	0	NE
Siemens VERSANT Sample Preparation 1.0 Reagents/Siemens Versant HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR)	1	1	0

NE = Not evaluated

Assay Type	No. of Participants	No. of Participants Submitted Results	No. Outside 0.5 log10
Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test version 2.0	26	25	1
Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test	8	8	1
Roche High Pure Viral Nucleic Acid Extraction Kit/Roche COBAS TaqMan HBV Test	5	5	1
Abbott RealTime HBV DNA PCR	3	3	0
affigene DNA extraction kit	1	1	0
aj ROBOSCREEN INSTANT Virus DNA Kit/aj ROBOSCREEN RoboGene Hepatitis B Virus (HBV) Quantification Kit	1	1	0
GeneDia GD631 Real Quant B HBV DNA viral load Determination by Real Time PCR	1	1	1
In-house (DJB) HBV DNA Extraction/In-house (DJB) HBV DNA Viral Load PCR/In-house (DJB) Southern Blot	1	1	1
Promega Maxwell 16 Viral Total Nucleic Acid Purification System/affigene HBV trender	1	1	0
Qiagen QIAamp Virus BioRobot 9604 Kit/Abbott RealTime HBV DNA PCR	1	1	0
Roche COBAS Amplicor HBV Monitor v.2.0	1	0	NE
Roche COBAS AmpliPrep TNA Isolation Kit/Roche COBAS TaqMan HBV Test	1	1	0
Siemens Versant HBV DNA 3.0 (bDNA)	1	1	0

NE = Not evaluated

(摘自 Dr. Vincini Joe 簡報)

5. 第二級參考物質

英國 NIBSC 之 Dr. Clare Morris 報告她們建立愛滋病毒第二型工作試劑 (working reagent) 套組之情形。她首先說明擬建立該試劑套組之緣由，WHO 於 2009 年建立核酸擴增分析用之 HIV-2 國際標準品 (08/150)，由於該標準品標定濃度只有 1000 IU/mL，因此引發一些討論，如製備更高濃度之工作試劑供定量分析用，或重新製備國際標準品等意見，她們因此計劃建立 HIV-2 工作試劑套組，該套組包含 4 支檢體，目前正規劃共同標定研究，參與標定之實驗室將收到 3 組試劑套組及 HIV-2 國際標準品，將請參與實驗室進行 3 次獨立的試驗。

6. 新興技術

美國 Blood Systems Research Institute 之 Dr. Eric Delwart 報告次世代定序技術 (Next Generation Sequencing, NGS) 在病毒領域之應用。

次世代定序技術之定序速度遠快於傳統 Sanger 定序技術，近年來隨著相關儀器的迅速發展，次世代定序技術已被廣泛地應用於生命科學相關領域之研究，在此僅針對 NGS 在病毒領域之應用。NGS 除了用於發現新病毒外，亦曾被用於以總體基因體學 (metagenomics) 的方式研究活病毒疫苗，因而發現口服輪狀病毒疫苗中汙染豬的環狀病毒 (Porcine Circovirus)，引發各國衛生主管機關要求停止使用與調查等事，此外，以 NGS 檢測供製造血漿製劑之人類血漿混合液，亦發現 B19V 等病毒序列，惟僅能證明病毒序列之存在，無法得知其病毒活性，而血漿製劑製造過程均會以經確效之病毒去除/不活化方法去除或不活化篩檢空窗期未發現之病毒。此外，NGS 在病毒診斷方面之應用尚包含 HIV/HCV/HBV 抗藥性突變株病毒之檢測、抗藥性細菌之檢測、傳染網絡 (transmission networks) 之確認等，在生物製劑品質管制方面之應用尚包含細胞培養上清液、血清及單株抗體之微生物汙染檢測等。Dr. Eric Delwart 並提出一些需注意之相關議題，如實驗進行前要先清楚定序目標，需要包含所有宿主與病毒之核酸嗎？還是要先 enrich 病毒核酸或已知病原？在實驗品管方面須注意降低核酸的汙染、利用病毒標準品了解靈敏度、檢體類型 (血液、呼吸道分泌物、糞便或活組織切片) 可能造成之影響、選擇不會造成偏差之最佳擴增方法等議題，在生物資訊 (bioinformatics) 方面須注意比對速度、是否採用 de novo assembly、是否有輔助的病毒資料庫、是否只報告已知病毒 (序列相似程度之標準如何) 等議題。

7. 法規

歐盟 EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare) 之 Dr. Marie-Laure Hecquet 報告歐盟規劃將 HEV NAT 納入歐洲藥典中 1646 Human plasma (pooled and treated for virus inactivation) 品目之進度。E 型肝炎病毒屬於 Hepeviridae family，為

無套膜 RNA 病毒，目前有 5 種病毒基因型，genotype 1&2 只會感染人類，genotype 3&4 會感染豬、鹿等動物，同時也會傳染給人類，文獻指出養豬戶有較高之血清抗 HEV 抗體盛行率，且肉類產品中曾檢測出 E 型肝炎病毒。E 型肝炎病毒主要是經糞口傳染，屬於水媒介傳染病，飲用遭污染的水源、食物、或接觸其他感染 E 型肝炎病毒的動物如牛豬羊等均可能被感染，E 型肝炎病毒通常爆發或流行於衛生環境較差之開發中國家，如非洲、東南亞、中東與中美洲，多數人感染後並無症狀，但嚴重時常會導致急性肝炎，致死率約為 0.2%-4%，兩歲以下嬰幼兒感染致死率較高，孕婦感染致死率更高達 10%-25%。曾有案例報告感染 HEV 之移植患者與愛滋病患者會有持續感染現象，雖然 E 型肝炎病毒一般是經糞口傳染，近年來陸續有文獻報導證實 E 型肝炎病毒會經移植或輸血而傳染，沙烏地阿拉伯、日本、英國及法國等地均有因輸注血小板或紅血球而傳染 E 型肝炎病毒之案例報導，且由於多數人感染 HEV 後並無症狀，因而引發經輸血傳染 HEV 之隱憂。德國 PEI 之 Dr. Sally Baylis 研究團隊曾以 PCR 檢測全球不同血液製劑製造廠之血漿混合液之 HEV RNA，結果發現總計 75 個血漿混合液中有 8 個為 HEV RNA 陽性，顯示血漿混合液為 HEV RNA 陽性者佔 10%，且她們分析發現 12 個 HEV RNA 陽性之單一捐血者中，只有 3 個為 ALT 陽性，因此在完成 WHO HEV 國際標準品後，即建議 EDQM 修訂歐洲藥典中之 1646 Human plasma (pooled and treated for virus inactivation) 品目，增加以經確效之核酸擴增技術（詳如歐洲藥典 2.6.21）檢測 HEV RNA 之規定，同時規範該檢測方法必須涵蓋陽性對照組（2.5 Log IU/mL），以證明該檢測方法之檢測靈敏度至少能達到 2.5 Log IU/mL，亦須涵蓋內部對照組（加入檢體中），以證明檢體未含有可能導致偽陰性結果之抑制物質，檢測結果如顯示陽性對照組為陰性或證明有抑制物質存在，則該次試驗無效；檢測結果如證明該次試驗有效，而血漿檢體仍為陰性，則可據以判定該血漿符合本品目對於 HEV RNA 之規範。她們請各國主管機關於 102 年 3 月到 5 月間針對該修訂版提供意見，預計於 102 年 10 月於 Group 6B 討論各界意見，於 102 年 11 月提

交到歐洲藥典編修委員會，如經該委員會同意，預計於 103 年 7 月 1 日公告，於 104 年 1 月 1 日實施。

日本 NIID 的 Dr. Yoshiaki Okada 報告日本目前在血液病毒安全相關規範的更新情形。他首先介紹他們目前已建立之血液相關病毒國家標準品，包含 HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA 及 HEV RNA 等國家標準品，詳細資料如下表：

National standard (established year)	Potency (IU/mL)	genotype
HBV-DNA (2002)	4.3X10 ⁵ IU	C
HCV-RNA (1999)	1.0X10 ⁵ IU	1b
HIV-RNA (2002)	1.8X10 ⁵ IU	Subtype B
HEV-RNA (2012)	2.5X10 ⁵ IU	3b

(摘自 Dr. Yoshiaki Okada 簡報)

日本目前規定捐輸血用品及血漿製劑均應以血清學試驗及核酸擴增技術篩檢 HBV, HCV 及 HIV，以核酸擴增技術檢測捐輸血用單一血袋之靈敏度要求分別為 2,000 IU/mL (HBV & HCV) 及 4,000 IU/mL (HIV)，檢測血漿製劑混合血漿之靈敏度要求均為 100 IU/mL。此外，北海道血液中心為了輸血安全，主動在北海道地區進行 HEV NAT 篩檢，因為日本北海道血液中心的研究發現 ALT 大於 500 IU/L 的血液檢體中，約有 20%可檢測出 HEV RNA，擴大調查範圍到日本全國，發現 ALT 大於 200 IU/L 的血液檢體中，約有 1.1%可檢測出 HEV RNA (均為 genotype 3 與 genotype 4)，1.0%可檢

測出 Anti-HEV IgM，3.2%可檢測出 Anti-HEV IgG。此外，調查發現該處之 HEV RNA 陽性率為 1/8600，且 genotype 4 佔 10%。

四、心得及建議

- (1) 英國 NIBSC 與德國 PEI 此次報告之 WHO 生物性國際標準品有：第 2 支 A 型肝炎病毒國際標準品、WHO 第 3 支微小病毒國際標準品、以及 WHO 第 1 組愛滋病毒第一型之流行重組型國際對照套組，英國 NIBSC 與美國 CBER 共同建立的 WHO 第 1 支西尼羅病毒國際標準品，以及德國 PEI 建立的 WHO 第 1 支 D 型肝炎病毒國際標準品與 WHO 第 1 組黴漿菌國際標準套組等，我國仍需持續注意相關發展，持續了解 WHO 生物性標準品製備重點，供本署規劃參考。
- (2) 由於臨床病毒學領域之巨細胞病毒國際標準品 (WHO IS CMV-DNA) 被報告在血漿、血液及細胞培養液中有不同的檢測值，因而引發此議題之討論。過去 WHO NAT 國際標準品未曾被報告過有互通性議題，推測可能的原因是這些標準品都具有互通性，或此問題被隱藏於核酸擴增技術檢測結果之高變異係數中，未來臨床病毒學領域之國際標準品可能須考量潛在之互通性議題。
- (3) 近年來隨著次世代定序技術 (NGS) 相關儀器的迅速發展，NGS 已被廣泛地應用於生命科學相關領域之研究，除了用於發現新病毒外，在病毒診斷方面之應用尚包含 HIV/HCV/HBV 抗藥性突變株病毒之檢測、抗藥性細菌之檢測、傳染網絡之確認等，在生物製劑品質管制方面之應用尚包含細胞培養上清液、血清及單株抗體之微生物污染檢測等。此部分之實務應用上尚需注意相關議題，我國亦需持續注意相關發展。
- (4) 歐盟 EDQM 正規劃將 HEV NAT 納入歐洲藥典中 1646 Human plasma (pooled and treated for virus inactivation) 品目，我國仍需持續注意相關發展，並作為更新國內相關規範之參考。

- (5) 由英國 NIBSC 報告 WHO 第 3 支 B19V 國際標準品之共同標定研究初步結果及交談內容，獲知本署參與標定結果均落於主要分布族群，相當良好。參與該項國際性會議除獲取血液病毒安全相關新知及相關 WHO 國際標準品建立情形，並藉此了解所參與之 WHO 國際標準品的標定情形，增加經驗交流，更有助於穩固雙方實質關係。
- (6) 本次參加會議並藉機邀請與會相關機構參與本署 HCV genotype 2 核酸標準品之共同標定研究，以提升我國標準品之公信力與能見度，總計邀請到英國 NIBSC、德國 PEI、美國 CBER、日本 NIID 等官方實驗室、美國 Roche 及 Abbott 等診斷試劑製造廠、及參與國血製劑血漿原料篩檢之 CSL 血液製劑製造廠。待完成標準品之共同標定研究，所建立之核酸國家標準品除供本署因應分子診斷試劑上市前後品質管理及血液製劑風險管理檢測體系用，亦可供業界作為分子診斷試劑研發控管用，有助於我國生物技術產業之推動，達成與國際接軌之目標。
- (7) 參與該項國際性研討會議不僅可獲取血液病原檢驗之相關現況與新知，並藉此與各國相關領域專家建立溝通管道，不僅能順利邀請到各國官方實驗室參與本署病毒核酸標準品之國際共同標定研究，進而爭取我國參與 WHO 國際標準品共同標定之機會，對促進國際合作與交流有極大助益。