

出國報告（出國類別：其他－國際會議）

2016年血液病原基因擴增技術標準化 研討會

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：黃玉卉 薦任技士

派赴國家：英國

出國期間：105年6月5日至6月10日

摘要

本次奉派出國係赴英國參與 2016 年血液病毒基因擴增技術標準化研討會 (SoGAT)，該會議係由世界衛生組織 (WHO) 委託英國國家生物標準品暨管制研究所(NIBSC)所主辦，此研討會對於提供我國最新之國際資訊及教育具有良好之成效，而今年更首次擴大舉辦將會議天數延長至三天，並同時針對核酸擴增技術 (NAT) 及血清學部分各別進行討論，讓更多主題及新知可供各界專家學者參考及討論。本次會議主要包含四項主題：近期標準品的發展現況及計畫、製備二級參考物質校正時需注意之事項及新知、新的血液病原診斷技術對標準化之衝擊，以及評估現行血清學診斷技術是否需要更高的標準化。在 NAT 部份，本次探討之主題為針對歐洲目前已使用於臨床檢驗上但尚未建立標準之新分析技術 (Point of Impact Testing/Point of Care) 之注意事項，包含應使用符合內部品管物質、二級標準品之校正及追溯國際標準品等。血清學部分則著重於抗 B 型肝炎病毒表面抗原之抗體 (anti-HBs) 及抗德國麻疹病毒之免疫球蛋白 G (RV-IgG) 兩者抗體於臨床上之檢測及定義進行討論。本次研討會亦同時發表本署製備的國家標準品及工作標準品之共同標定結果，提升我國在製備標準品技術上之能見度並與國際同步接軌。參與該會議，除了獲取血液病原檢測之國際現況與新知外，也幫助我國衛生主管單位瞭解 NIBSC 國際標準品製備之最新情形及最新之血液病原安全等訊息，使我國能即時掌握國際最新技術與相關法規之演進，以作為我國日後訂定血液製劑及體外診斷試劑等相關產品管理法規之參考依據。

目次

壹、目的.....	4
貳、過程.....	6
參、會議內容重點摘要	7
肆、心得及建議.....	24

壹、目的

由於愛滋病、B型肝炎、C型肝炎以及德國麻疹等相關透過血液傳染之疾病至今仍無法透過有效之方式杜絕其傳染，僅部分疾病已發展出保護性疫苗可作為防疫之用，因此有效檢測國人是否受該類病原感染及接種疫苗後是否產生足夠保護力價之抗體為預防醫學上之重要環節之一。另外，由於多數血液製劑之原料來源為人體血漿，如未能於製造前檢測出原料中潛藏之病毒，將造成國人用血健康之風險。因此，為確保國人健康及用血安全，有效檢測國人體內抗體保護力價是否具足夠保護性，及篩檢患者及捐血者之血漿中是否含污染病毒等安全性監測為各國衛生主管機關重要之把關環節。我國現行醫藥衛生法規要求捐血者之評估、血液來源檢驗體均需進行HBsAg、Anti-HCV、Anti-HIV等項目檢測，以及利用分子生物技術篩檢檢驗體是否存在HBV, HCV及HIV之病毒核酸等，但目前廣泛作為病毒檢測篩檢之血清學技術有其檢測限制存在，當病原量低於其偵測極限時將無法被有效鑑定出來(即空窗期)，而近幾年發展的核酸擴增技術 (Nucleic Acid Amplification Technology, NAT) 可縮短空窗期進而降低污染風險，因此各國紛紛將核酸擴增技術檢測病毒核酸納入血液篩檢及血漿原料檢驗項目中。但因檢測各種病原之技術及方法標準不同，造成各方法間檢測之標準、靈敏度及特異性等亦不相同，因此世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 為縮小各檢驗方法間之差異，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) 製備各種生物性國際標準品，供血清學及核酸診斷試劑之研發與檢測標準化所用。

而血液病原基因擴增技術標準化研討會 (Standardization of Genomic Amplification Techniques, SoGAT) 係由WHO委託NIBSC辦理之國際研討會，近年恢復為每年舉行，該研討會之目的為報告目前NIBSC製備國際標準品之現況、目前各國有關血液病原檢測之新技術研究及遭遇之問題、探討未來應優先製備何種高風險病原標準品及目前各相關單位使用標準品時是否遭遇到技術上問題等議題，藉此會議與各國衛生主管機關及相關領域專家進行討論，以提升國際間血液病原之檢測水準及統一標準。我國亦多次派員參加該會議，除獲取血液病原檢測之國際現況與新知外，並了解NIBSC國際標準品製備之最新情形，同時藉此會議獲得最新之血液病原安全等資訊，有助於我國能即時掌握國際最新技術與相關法規發展，作為我國制定血液製劑及體外診斷試劑管理法規之參考依據。另外藉此會議進行國際間技術經驗之交流，除了可提昇我國對血液製劑及體外診斷試劑之檢驗及品質管理之水準

外，亦對我國於建立國家標準品的經驗上有莫大助益。

貳、過程

日期	過程
6月5日	啟程與抵達英國 (臺北-泰國曼谷轉機-英國倫敦)
6月6日	報到/參加 2016 年血液病毒基因擴增技術標準化研討會
6月7日	參加 2016 年血液病毒基因擴增技術標準化研討會
6月8日	參加 2016 年血液病毒基因擴增技術標準化研討會
6月9日	返程 (英國倫敦-泰國曼谷轉機)
6月10日	抵曼谷轉機返臺

參、會議內容重點摘要

一、WHO 國際標準品目前的製備計畫及發展現況

本次會議得知 HBV 第四代 DNA 及 anti-Ebola virus 第一代國際標準品預計於 2016 年通過 WHO ECBS (Expert Committee on Biological Standardization) 審核，未來 2017 年預計送審的標準品包含 Ebola RNA 第一代標準品、HHV-6 DNA 第一代標準品、HIV-1 RNA 第四代標準品、HAV RNA 第三代標準品、human adenovirus DNA 第一代標準品及 HIV-1 p24 抗原對照標準品(Reference panel)。預計於 2018 年送審 WNV DNA 第一代標準品、HSV-1/2 DNA 第一代標準品、VZV DNA 第一代標準品、*P.vivax* 第一代標準品及 *T. Cruzi* 第一代標準品。另外，本次會議發表了三項目前完成及仍在進行之調查研究，包含 HBV 核酸標準品共同標定研究、人類腺病毒核酸標準品製備前之調查研究及製備第三代 B19 DNA 標準品目前所面臨的問題。

SoGAT 目前正著手進行 HBV 第三代核酸國際標準品原液及第四代候選國際標準品之共同標定計畫，此標準品為 2011 年由 Eurohep 製備之 R1 參考物質（來源為基因型 A 型，HBsAg adw2 亞型），以人血清稀釋至濃度為 10^6 IU/mL，稀釋方式比照第一代及第二代 HBV 標準品。計畫研究使用之檢體包含第三代標準品(NIBCS code:10/264，凍晶乾燥)、第四代候選標準品(NIBSC code:10/266，凍晶乾燥)、NIBSC 二級標準品(NIBSC code:15/254，液體，基因型 A 型)、我國製備之國家標準品及工作標準品(working reagent，液體，基因型 C 型)及三種 HBV 血漿(分別為基因型 D 型、E 型及 A 型，液體)，總計八種檢體。參與本次共同標定之實驗室共 13 個實驗室(來自 7 個國家)，使用之檢測方法有 15 種(14 種定量檢測及 1 種定性檢測)。共標結果顯示，在定量檢測方法中，第三代標準品之核酸含量平均值為 $10^{5.94}$ IU/mL，第四代候選標準品之平均值為 $10^{5.97}$ IU/mL，與 2011 年的共標結果(第三代標準品： $10^{5.93}$ 、第四代候選標準品 $10^{5.98}$)相似，惟第四代候選標準品之值有些許下降。SoGAT 還有對第四代候選標準品持續進行加速性試驗，其結果顯示該標準品對溫度壓力具為穩定性。NIBSC 二級標準品(NIBSC code:15/254)之效價平均值為 $10^{5.69}$ IU/mL，SoGAT 認為其可作為校正三級標準品之參考標準品。而我國國家標準品及工作標準品之效價平均值分別為 $10^{6.03}$ IU/mL 及 $10^{3.01}$ IU/mL。

Sample	No. of datasets	Mean	Min	Max	SD	%GCV
S1: 10/264 (gt.A)	14	5.94(5.93)	5.75	6.23	0.13	35
S2: 10/266 (gt.A)	14	5.97(5.98)	5.78	6.26	0.13	35
S3: SRR (gt.A)	14	5.68	5.48	5.91	0.11	29
S4: NS (gt.C)	14	6.03	5.45	6.30	0.22	65
S5: WR (gt.C)	12	3.05	2.33	3.25	0.24	75
S6: HBVpl (gt.D)	14	3.32	1.98	3.70	0.42	160
S7: HBVpl (gt.E)	14	3.28	2.50	3.54	0.29	95
S8: HBVpl (gt.A)	14	3.53	2.39	3.94	0.39	145

括弧內為 2011 年之共標結果



第三代、第四代國際標準品

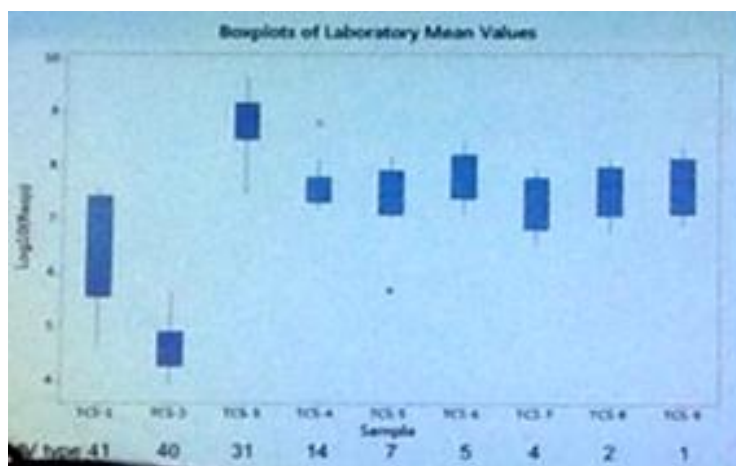
我國國家標準品

我國工作標準品

針對新製備出的人類腺病毒（Human Adenovirus）一級標準品進行試驗性研究（pilot study）。為何需製備腺病毒標準品？主因是因為人類腺病毒為全球常見的感染病原，感染人類後會造成呼吸道及腸胃道的疾病或出現膀胱炎及結膜炎等病徵，並容易導致免疫力低下患者高發病率及死亡率。而過去管理高風險病人之建議方式為使用定量 PCR 來檢測患者之周邊血液及糞便中之病毒核酸，進一步定量病毒含量。而檢測腺病毒之核酸方式眾多，包含實驗室自行開發之方法（Laboratory-developed Tests, LDT）或是以市售腺病毒檢測套組進行檢測。腺病毒本身有 68 型，可歸類為 7 個種類（A—G），因此，為了能確認腺病毒之型別及統一所有檢測腺病毒核酸方法之測量標準，製備腺病毒候選標準品勢在必行。該試驗性研究所採用的檢體為臨床檢體，包含來自患者的全血、血漿、血清、尿液、糞便、眼周抹片、鼻腔灌洗液及痰，以測試選定適合製備標準品之種類。收集之檢體內包含之腺病毒型別有 Type 1、2、4、5、7、14、31、40、41，使用之稀釋基質則視該檢體之基質而定，非統一使用單一基質作為稀釋液。另外從病人檢體培養出病毒後，使用統一之稀釋液作為基質定量病毒製備成候選標準品（TCS），培養病毒之方式為使用 Hep2C cell，將檢體和細胞共同培養並繼代五次後，以離心方式去除細胞得到病毒，再使用 10 mM Tris HCl(pH7.4)含 0.5%HAS 作為稀釋液進行稀釋完成檢體製備。臨床檢體共 14 件（檢體編號依病毒型分類，同型別之檢體再

區分檢體種類)，培養之病毒檢體共 9 件（依病毒型別編號由大到小排列），參與共標的實驗室共 12 間，各別來自 6 個歐洲國家，共使用 16 種定量分析方法，分析結果之單位為 copies/mL。在 9 件 TCS 之結果，講者分析了各檢體之平均值、各實驗室間結果之標準差 (SD) 及各實驗室組內結果的標準差，結果及分布如下表及圖所示：

Cultured virus samples	HAdV Type	HAdV concentration (Log10 copies/mL)		
		Mean	Inter-lab SD	Intra-lab SD
TCS-1	41	6.56	1.03	0.22
TCS-2	40	4.66	0.41	0.17
TCS-3	31	8.76	0.58	0.21
TCS-4	14	7.68	0.40	0.19
TCS-5	7	7.36	0.74	0.18
TCS-6	5	7.88	0.44	0.17
TCS-7	4	7.30	0.49	0.14
TCS-8	2	7.55	0.48	0.11
TCS-9	1	7.67	0.52	0.16



另外測量 14 件臨床檢體之病毒含量，並同時以 TCS 作為該型之對照標準品進行檢測，觀察如使用該 TCS 作為標準品時是否可降低實驗室間差異。檢測之結果如下表：

Clinical sample	HA/V Type	Intra-Lab (SD)	Inter-Lab (SD)		n (relative)
			Absolute	Relative	
Stool C	41	0.06	0.32	0.42	8 (7)
Stool B	40	0.05	0.57	0.42	7
Plasma C	31	0.07	0.51	0.37	14
Whole Blood A	14	0.07	0.44	0.32	15
Urine A	7	0.06	1.09	0.23	7
Nasal Lavage A	7	0.16	0.54	0.26	8
Saliva A	5	0.12	0.72	0.33	6
Eye Swab A	4	0.05	0.39	0.17	7
Eye Swab B	4	0.11	0.50	0.24	7
Sputum A	4	0.18	0.38	0.31	7
Plasma B	2	0.12	0.39	0.18	14
Urine B	2	0.13	1.04	0.32	7
Plasma A	1	0.11	0.38	0.17	14
Serum A	1	0.13	0.41	0.20	6 (5)

(absolute 為使用各家標準品檢測之病毒量之標準差，relative 為以 TCS 作為對照標準品經計算後得到之標準差)。

9 件 TCS 之實驗室間變異介於由 $10^{0.40}$ 到 $10^{1.03}$ copies/mL 之間，其中 type 7、31 和 41 之變異較大。14 件臨床檢體之實驗室間變異介於由 $10^{0.33}$ 到 $10^{1.09}$ copies/mL 之間。實驗室間變異在兩大類檢體中皆比實驗室組內變異還大。而 12 件臨床檢體在使用了 TCS 作為對照標準品後計算其實驗室間之標準差皆有下降的趨勢，僅兩檢體（痰及糞便 C 型）有上升情形。

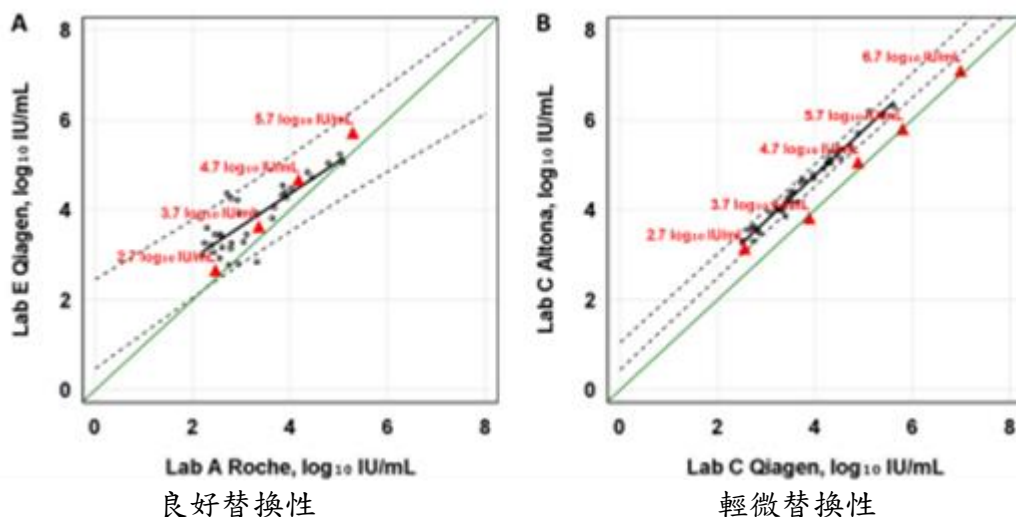
第三代 B19 標準品 (NIBSC code:12/208) 建立時間點為 2013 年 10 月，但在 2015 年秋天曾有議題被報導出：使用羅氏 COBAS TaqScreen DPX (CTS) 系統檢測第三代 B19 標準品（該產品為追溯第一代國際標準品 code:99/800）發現檢測之結果含量偏低。另一家 Hologic assay 也有檢測量偏低的結果（但此為二手資料，尚無詳細內容）。因此 NIBSC 分析了第三代 B19 標準品的資料並重新評估當時共標的結果後指出：一、第三代標準品使用之來源與第一、二代來源不同。二、在納入及排除羅氏 cobas 系統的定量結果，無論是第三代標準品、另一候選標準品 (code:12/238) 及病人血清共同標定之效價平均值差異達 2 倍以上。目前 NIBSC 正對第三代 B19 標準品及病人檢體進行定序，並將定序結果提供給該設備的使用者，未來將公告於 ECBS 報告中。至於為何會造成如此大的差異目前仍還在釐清當中，以及還需探討是否會對使用單位造成衝擊（例如需進行血液篩檢的血漿製造廠等）。

二、檢測參考物質替換性之新方法

替換性(Commutability)是指參考物質 (reference material) 之測量結果的可移植性 (portability)，也就是說當使用不同測量方式來測量參考物質與具代表性之特定種類的檢體在計算關係上會具有相同的結果。換句話說，就是要探

討論測量這些參考物質與測量病人檢體是否會得到相同的測量結果？（參考物質的表現是否和臨床檢體一樣？），而這些參考物質（像是校正液）是否在不同分析方法上具有相同或相似的測量數值？（參考物質的表現是否在每個不同分析方法都相同？）

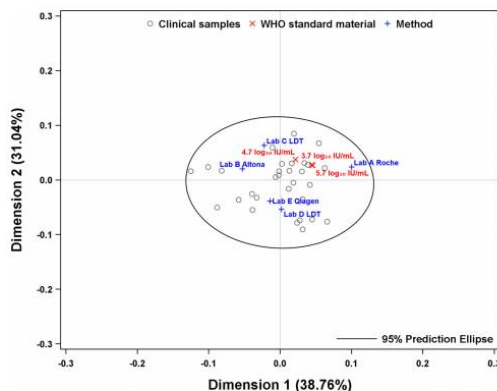
為了探討參考物質是否具有良好的替換性，特別是 WHO 國際標準品，會於製備完參考物質後連同大量病人檢體進行替換性評估。替換性評估的方法包含配對的比較以及整體的分析。目前探討替換性的方法包含預定區間（prediction intervals）及對應分析（correspondence analysis）。預測區間法是利用線性迴歸（Linear regression）的方式將多個分析方法進行配對比較，計算方法如下：針對以兩分析方法檢測所有病人檢體之測量值，列入 XY 散佈圖後進行迴歸分析，即可計算出該分佈之迴歸方程式，同時可計算出該線性之 95% 信賴區間（confidence interval）。得到此線性之 95% 信賴區間後再標上兩分析方法測量多點稀釋參考物質之測量值，探討不同濃度之參考物質是否落入該 95% 信賴區間（預定區間）中。如該參考物質各濃度之檢測值皆落入該線性之 95% 信賴區間，則代表此參考物質具有可替換性；反之，若皆不落入預定區間則表示不具可替換性；若僅有一個稀釋濃度落入預定區間外，則該參考物質則為輕微可替換性。此種方法一次只能比較兩個分析方法，因此如使用多種檢驗方法進行分析，則需多次配對各檢驗方法並列出矩陣圖表，以顯示該參考物質之替換性結果。



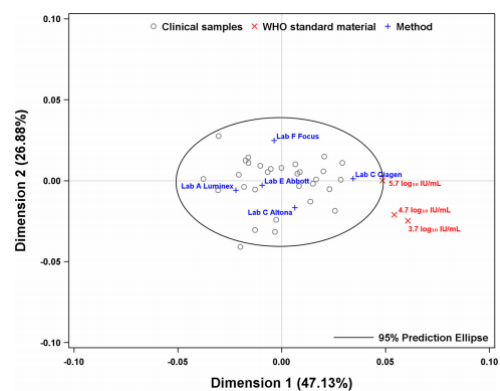
	Lab A Luminex	Lab A Roche	Lab B Altona	Lab C Altona	Lab C LDT	Lab C Qiagen	Lab D LDT	Lab E Abbott	Lab E Qiagen
Lab A Roche	3/4								
Lab B Altona	4/4	4/4							
Lab C Altona	4/4	3/5	4/4						
Lab C LDT	2/4	5/5	4/4	3/5					
Lab C Qiagen	0/4	4/5	4/4	1/5	4/5				
Lab D LDT	3/3	4/4	3/3	4/4	4/4	2/4			
Lab E Abbott	0/3	4/4	3/3	2/4	3/4	3/4	4/4		
Lab E Qiagen	2/3	4/4	3/3	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	
Lab F Focus	4/4	3/4	4/4	4/4	2/4	0/4	3/3	0/3	0/3

■ Commutable ■ Marginally commutable ■ Not commutable

對應分析為利用二維圖形方式表現檢體和參考物質兩者之關聯性強度之統計方法，優點為可同時納入所有分析方法之結果一起進行比對。首先，將病人檢體之測量結果對應各分析方法列成矩陣表，再以卡方檢定 (chi-square test) 等統計方法對此數據進行對應分析轉換，可得病人檢體與分析方法兩變相之二維圖，從圖中可看到各檢體及各檢驗方法之關聯性 (距離越近表示相關性越大)，得到之二維圖可同時計算所有點分佈之 95% 信賴區域 (confidence region，呈一橢圓形範圍)。最後再納入多點稀釋參考物質 (作為變相) 於上述之二維圖中，觀察各濃度點是否皆落入 95% 信賴區域範圍內，則可知該參考物質是否具替換性。



良好替換性

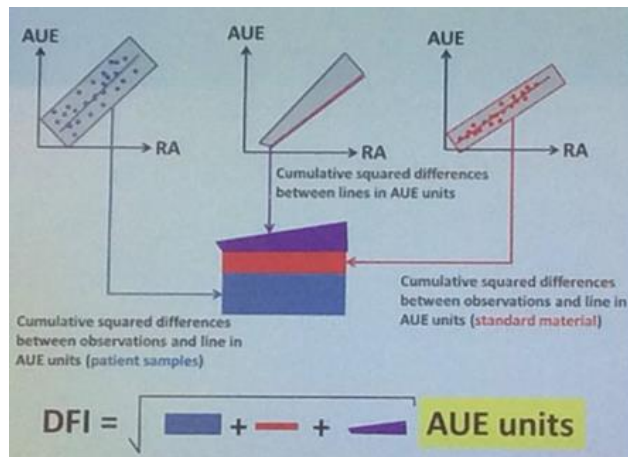


無替換性

然而，從上述的兩種方法評估出的替換性結果可能仍會有些許爭議，兩方法並非具絕對性，因為其結果容易受不同分析方法及病人檢體的變異性而改變其替換性，目前兩種檢測替換性方式皆未將變異性納入考量，容易因變異

性大而使替換性評估之結果是不好的。兩方法也無法僅使用一種方法來分析參考物質之替換性。此外，兩方法只能對替換性下“是”或“否”的結論，無法了解各方法間之檢體檢測值差異與替換性是否具關聯性。另一方面，兩分析方法皆未能反應出檢測結果的準確性，造成無法直接比較各方法間的替換性結果。

聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 是一個容易受外來因素影響其結果的檢驗方法，影響因素包含標準品的純度、病人檢體的萃取、安定性、放大效應等，所以標準參考物質真的能精準的表現病人檢體嗎？為了能更有效的評估參考物質之替換性，講者開發了一個新的分析方法稱為「與理論值之差異性」(deviation-from-ideal, DFI)。此方法是將一個可絕對分析方法當作標準方法 (reference assay, RA)，其餘檢測方法作為待評估方法 (assay under evaluation, AUE)。計算方法如下：標準方法及待評估方法分別對病人檢體和參考物質之檢測值做迴歸分析可得到兩線性（一為病人檢體，另一為參考物質），兩線性可分別計算出各別及兩線性間之累積平方差 (cumulative squared differences)，其表示單位為待評估方法之單位。將三項累積平方差相加後開根號即為 DFI 值。



講者利用原兩種分析方法以及新分析方法應用在評估 Epstein-Bar virus (EBV)WHO 國際標準品之替換性，使用之 PCR 檢測方法：數位 PCR(digital PCR)作為標準方法，LDT、Focus、Luminex 及 Elitech 四種定量方法作為待評估方法。病人檢體數為 194 個，使用之 EBV 國際標準品作為參考物質，其濃度稀釋範圍從 1.7、2.7 到 6.7 \log_{10} IU/mL。以預定區間分析方法檢測 EBV 國際標準品之替換性之結果，在 6 個比較圖中顯示只要有與 LDT 比較之預定區間結果，標準品皆為輕微替代性。使用對應分析之結果中，將所有分析

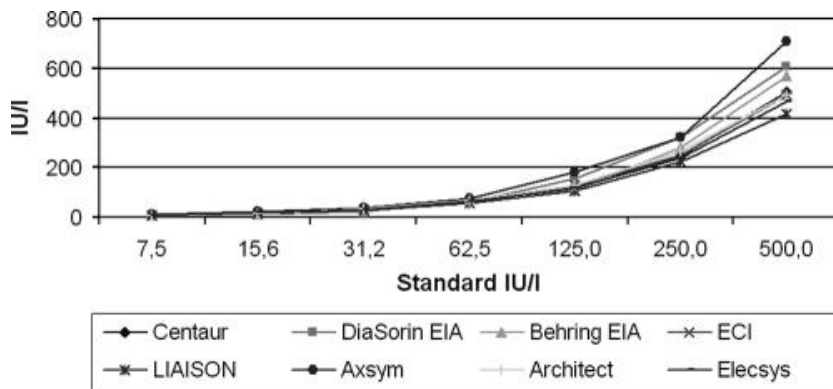
方法納入計算之標準品僅一個稀釋濃度未落入 95%信賴區域中，但如果排除 LDT 檢驗法後所有邊準品稀釋濃度皆落入 95%信賴區域中。只用 DFI 分析法之結果顯示：四種分析方法之病人檢體及標準品之變異性皆相似，與標準方法之線性差異卻不相同，其中 LDT 之差異最小，此現象可解釋為：當以 digital PCR 作為標準方法來檢測標準品及病人檢體之表現，待評估方法中 LDT 標準品及病人檢體之表現最為接近，但講者有提到可能原因為 LDT 和 digital PCR 使用相同的 primer 和 probes 的緣故。在此分析結果中，以傳統的預定區間法或對應分析法分析替換性會誤導大家因 LDT 而有較差的替換性結果，只因為 LDT 和其他三個分析方法之差異較大，而使用了 DFI 法才釐清了 LDT 再與 digital PCR 作為對照方法中是替換性最好的，這也解釋為何 LDT 會和其他三個檢驗方法有如此大的差異。

DFI 提供了可測量替換性的方法，且具有單位指標 (copies/mL 或 IU/mL 等)，此新分析方法納入了病人檢體和參考物質之變異性，以及待評估方法與標準方法之差異性。它還可用來比較各檢驗方法，而且可解釋的內容更為豐富。最後講者提及未來將繼續完成以 DFI 來評估替換性的方法，包含發展如何計算 DFI 之信賴區間、正式以統計方式比較 DFI 及設計統計架構、探討 DFI 與準確性、協同性 (agreement)、變異量及縱向追蹤 (longitudinal tracking) 等關係、擬定 DFI“可接受”之標準值及其他實驗設計。

三、比較 9 種市售可定量測定抗 B 型肝炎表面抗原之抗體(anti-HBs)的檢測系統

抗 B 型肝炎表面抗原之抗體(anti-HBs)定量測量用於評估醫藥衛生人員之 B 型肝炎疫苗接種的反應，作為人員日後於醫療院所之暴露管理參考。但即使透過不同的疫苗接種程序，anti-HBs 抗體量的定量檢測結果於不同的檢測方法中應有相同的水平及可比較性。本次報告中，講者從 2008 年以來自病人及醫藥衛生人員中收集了約 200 個血清樣本給可供檢測 anti-HBs 之實驗室進行定量檢測。這些實驗室使用的測定方法為亞培的 AxSYM、biomerieux Vidas 和羅氏的系統，共有 9 種檢驗方法。而這 9 種檢驗方法中包含 3 種 EIA 方法及 6 種自動檢測系統。使用的樣本為收集來的檢體進行 pool 以後，濃度約為 100 IU/L，作為樣本進行實驗室間比對 (inter-assay variability)。另使用 anti-HBs 一級國際標準品稀釋成 500 IU/L 至 7.5 IU/L 共 7 個濃度，作為實驗對照組。講者首先進行 9 種檢測系統之背景分析，將分析系統分為兩類，EIA 方法及自動檢測系統。自動檢測系統包含亞培 AxSYM 和 architect、羅氏 cobas、西門

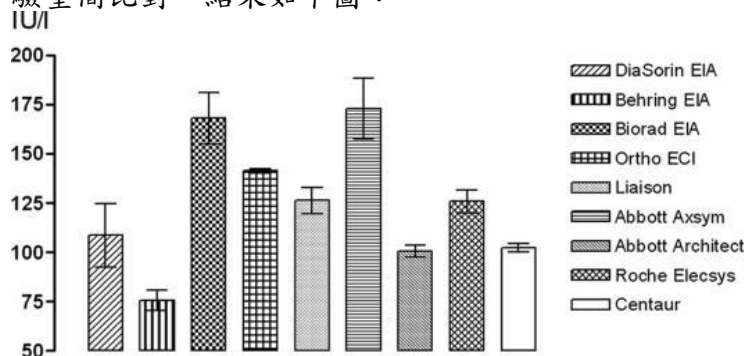
子 Centaur、ortho vitros ECI 和 Diasorin LIASON，並列出其使用之基質 (substrate)、線性範圍 (linearity) 與是否具自動稀釋功能。EIA 方法包含西門子恩奈格斯特、Bio-Rad Monalisa anti-HBs 和 DiaSorin ETI-AB-AUK-3，並列出校正液、品管液總支數及線性範圍。在上述方法的測定結果中，Bio-Rad 檢測 5 個不同濃度之國際標準品結果與預期值差異相觀，因而將該廠之標準品以其他分析系統進行濃度比對，發現檢測結果與理論值相差甚大：從最低理論濃度 10 IU/L 結果測量值為 37 IU/L，最高理論濃度 150 IU/L 結果測量值為 518 IU/L，該組試劑之內建標準品與國際標準品相比明顯值皆偏高許多，因此講者直接捨棄該組試劑之內建標準品，直接以國際標準品作為校正液使用，並在測量國際標準品之檢測項目中直接排除該組試劑。各廠牌檢測國際標準品之結果如下：



由圖中可看出 9 種檢測系統於高濃度之標準品與理論值差異越大，其中西門子的 centaur 普遍測出之值皆為最高，Diasorin LIAISON 則最低。

將收集來的 200 個檢體進行 pool 後定量為濃度約為 100 IU/L 的樣本進行實

驗室間比對，結果如下圖：



由圖中可看出 9 個系統檢驗出之結果數值約介於 75 IU/L 到 175 IU/L 之間，除了羅氏檢驗系統低於 100 IU/L 外，其餘系統皆高於 100 IU/L，其中又以亞培的 architect 和西門子的 Centaur 最接近實際樣本的 100 IU/L。另以這 9

種檢驗方法對 200 個收集來的血清樣本進行 anti-HBs 含量測試。結果顯示，單一檢體於這 9 種檢驗方法的結果數值之平均組內變異係數(CV%)約為 47.1% (範圍從 15-201%)，組內數值最大值除以最小值之比值 (factor of multiplication) 範圍介於 2.8-105 之間，說明每個檢體於這 9 種檢驗方法所測得的數值也存在很大的差異。因此講者進一步去探討每個病人檢體個別在 9 個系統測量之 anti-HBs 濃度範圍、病人血清是否含有 anti-HBc 及血清來源是否為健康或有病者，以此三項變因去探討是否為造成 CV% 偏高之主因，但結果顯示皆未達統計上意義，說明這些因子皆不是造成 CV% 偏高之主因。因此講者持續探討其他因素，如溶血和高血脂的檢體是否為造成高 CV% 之原因，但結果發現這兩類檢體之 CV% 值仍在正常範圍內。另外，講者還發現有 43% 的檢體會被各檢測系統歸類成不同群組 (包含 negative、<100 IU/L、>100 IU/L 及 >1000 IU/L)，顯示這 9 個檢測系統於結果判定上有彼此間的差異存在。另外，講者還探討特異性 (Specificity) 之問題，國際上已經公認 anti-HBs 之 cut-off 值為 10 IU/L。但在這次調查中，31 個確認為陰性的檢體中有 1 個檢體被 4 個檢驗系統判定為弱陽性 (結果值介於 10.3-14.7 IU/L)。另一個檢體被西門子的 Centaur 判定為陽性 (結果值為 175 IU/L)，但卻被其他 8 種檢測方法測定為陰性檢體，而且該樣本的病人並無施打 B 型肝炎疫苗的紀錄或被 HBV 感染之病史，而該檢體在稀釋及未稀釋的狀態下 Centaur 系統所檢測出的數值都很高，表示並非基質干擾。

於 9 種檢驗方法之靈敏度 (Sensitivity) 測試中，講者將所有檢測方法之 cut-off 值皆訂為 10 IU/L，並將 200 個檢體中大於 6 個以上系統判定為陽性的檢體共 139 個作為確定為陽性的檢體，用於檢測其臨床靈敏度。結果顯示在 9 個檢驗方法中亞培 AxSYM、architect、羅氏 cobas、西門子 Centaur 及 Diasorin LIASON 共 5 種檢測系統之靈敏度達 100%，而 DiaSorin ETI-AB-AUK-3 (EIA) 之靈敏度最低 (93.5%，有 9 個檢體為偽陰性)。追查被判定為偽陰性之檢體其病人資訊不是曾經有接種過疫苗，就是有 anti-HBc 陽性 (表示曾感染 HBV)，僅一個病人未記載是否接種過疫苗。

講者另一個探討的主題為 anti-HBs 的 cut-off 值訂在 10 IU/L 是否合適，因此進行了一個有趣的實驗，他將 3 個接種過 B 型肝炎疫苗的患者檢體以亞培的 architect 進行檢測，確認 anti-HBs 皆小於 10 IU/L，之後將這 3 個檢體分別加入 2500 IU/mL 的 HBsAg 進行中和後再進行 HBsAg 含量檢測，結果發現這

3 個檢體所測得的 HBsAg 值皆為 0 IU/mL。另一個對照組為以西門子 Centaur 檢測出某位病人的 anti-HBs 濃度約為 3.21 IU/L，但此人過去並沒有疫苗接種史，將此檢體一樣加入 2500 IU/mL 的 HBsAg 進行中和後再檢測其 HBsAg 含量為 2350 IU/mL。從上述兩個試驗結果，講者認為有接種過疫苗之檢體其 anti-HBs 檢測濃度如介於 2-10 IU/L 之間，仍然具有抑制 HBsAg 反應的功能，因此講者認為將 cut-off 值訂在 10 IU/L 可能過高，低於濃度 10 IU/L 的 anti-HBs 仍具有保護力，因此需要再去定義更精確的 cut-off 值為多少。

另外講者也提到檢體於檢驗系統中被判定為偽陽性是否真的為偽陽性？他分析了所有檢體來源患者的病例史，發現在 11 個檢體來源患者中有 8 名患者曾施打過 B 型肝炎疫苗、3 個檢體之 anti-HBc 為陽性，該檢體都有被 1-2 個系統檢測為陽性但 anti-HBs 含量皆不高（約 10-15 IU/L 左右），較重要的其中有一個檢體為 anti-HBc 陽性，被西門子的 Centaur 測出之值為 170 IU/L，但於其他系統檢測皆低於 5 IU/L。

本次報告最後，講者分為兩個部份進行探討：第一部份是探討標準品定量之問題，講者認為即使已經有標準化可定量的國際標準品，卻還是造成 9 個系統檢驗之結果數值仍有如此大的差異，主要原因有下列幾點：

1. 抗原連接到固相（solid phase）會造成抗原本身的構型改變，因此不同的固相就會造成不同的抗原構型。
2. 使用的緩衝液（buffer）成份不同，會造成低親和力的抗體依然可以連接到抗原，而且不同緩衝液幫助 binding 的效能也會有非常大的差異。
3. 每個個體的抗體濃度不同，且辨認的抗原辨認位（epitope）和抗體本身的親和力（avidity）也不同。
4. 太多標準品定量的變異，包含系統本身在製備自己廠內標準品時也可能有批次間的變異。

講者舉出 3 個檢體的例子，該檢體使用相同西門子 Centaur 系統，於 2013-2014 年檢測之 anti-HBs 抗體含量分別為 43、90、132 IU/L，但相同檢體在 2016 年檢驗之結果皆大於 1000 IU/mL，結果說明相同系統於不同批次間檢測結果亦有差異。第二部份講者探討臨界值訂在 10 IU/L 是否恰當，講者認為訂在 10 IU/L 會造成較短的線性範圍及較差的特異性。另外也指出現行使用的冷光技術的檢測範圍較廣，且可偵測更低濃度特異性抗體含量。

最後，講者認為分析系統的製造廠應將重點擺在真實的精確度因子上（靈敏度、特異性和陽性/陰性預測值），且被確認為陰性之檢體應該被收集保存及提供給系統製造廠，以作為樣本讓他們發展更精確的分析方法。並強調陰性檢體的定義不應該只被製造廠外另一個商品化的分析系統判定為陰性即認定其為陰性檢體。應該要有該檢體來源者之臨床資訊（病例、病史及疫苗接種史等），以及也需要被其他多種分析方法或系統同時判定為陰性時，才可真正認定其為陰性檢體。

四、 調查 8 種市售以免疫學法檢測抗德國麻疹病毒免疫球蛋白 G (RV-IgG) 之檢測系統

德國麻疹病毒的免疫測定一般是透過測定患者體內的抗德國麻疹病毒特異性免疫球蛋白 G (RV-IgG) 的抗體量而定。然而，即便使用國際標準品進行校準，其測定結果仍會因市面上檢驗試劑的廠牌不同，而有不同的 RV-IgG 抗體量之結果。目前國際上法規訂定德國麻疹具保護力之抗體力價為 10 IU/mL，小於 10 IU/mL 視為具感受性（陰性）。

講者在本次研究中利用免疫墨點法(immunoblot, IB)、抗體抗原中和試驗(neutralization, Nt)以及 8 種歐洲市售免疫學方式 (commercial immunoassay, CIA) 檢測抗德國麻疹特異性免疫球蛋白 G (RV-IgG) 之檢驗試劑，針對 322 組檢測結果 RV-IgG 為陰性或可疑的孕婦常規篩檢樣本之血清進行檢測，探討所有檢測 RV-IgG 之檢測系統結果是否皆相同或提供相同的結果說明。其中 IB 及 Nt 被視為對照檢驗方法 (Reference assay)。在免疫墨點法(IB)與抗體抗原中和試驗(Nt)的結果如下表：

	Neutralization negative	Neutralization positive	Total
Immunoblot negative	85 (26.4) ^{§*}	46 (14.3)	131 (40.7)
Immunoblot positive	9 (2.8)	182 (56.5) ^{**}	191 (59.3)
Total	94 (29.2)	228 (70.8)	322 (100)

§ No. of samples (percent)

* Concordant negative samples were defined as best negative samples

** Concordant positive samples were defined as best positive samples

由結果發現 82.9%(267/322)在兩對照方法之結果呈一致的情形，其中 85 個樣

本(26.4%)的結果為陰性（視為真實陰性檢體），182 個樣本(56.5%)為陽性結果（視為真實陽性檢體）。

以 8 種市售免疫學檢測系統(CIA)中檢驗上述 85 個真實陰性檢體，結果全部判定為陰性結果。但在 182 個陽性樣本的檢測結果有 25.3%-61.5%被歸類為可疑，僅 6%-64.8%被歸類為陽性結果，甚至有 9.9%-40.1%被歸類為陰性，結果如下表：

Results of reference assays No. of sera	Architect Abbott Diagnostics	Cobas 6000 Roche Diagnostics	Vidas bioMérieux	Dxl Beckmann Coulter	Centaur Siemens HealthCare	Enzygnost Siemens HealthCare	LXL DiaSorin	Serion
IB/Nt negative (best negative) N=85	0 0 85 (100) [0.1-0.9]	0 0 85 (100) [0-0]	0 0 85 (100) [0-5]	0 0 85 (100) [0.1-0.9]	0 0 85 (100) [<0.2-4.2]	0 0 85 (100) [0-3]	0 0 85 (100) [<3.0*-3.5]	0 0 85 (100) [0.3-7.0]
IB/Nt positive (best positive) N=182	11 (6.0) [10.2-14.8] 106 (58.2) [5.0-9.9] 65 (35.8) [0.4-4.9]	109 (59.9) [10.3->500] - 73 (40.1) [0-9.5]	65 (35.7) [15-27] 56 (30.8) [10-15] 61 (33.5) [2-9]	15 (8.2) [15.0-22.8] 112 (61.6) [10.2-14.9] 55 (30.2) [1.3-9.9]	115 (63.2) [10-66.8] 48 (26.4) [5.0-9.9] 19 (10.4) [0.2-4.9]	118 (64.8) [7-27] 46 (25.3) [4-6] 18 (9.9) [2-3]	32 (17.6) [10.3-23.2] 83 (45.6) [5.1-9.9] 67 (36.8) [<3*-4.9]	22 (12.1) [20.0-36.9] 88 (48.3) [10.2-19.6] 72 (39.6) [2.3-9.9]

No. of samples tested positive (%) [IU/mL value range]
No. of samples tested equivocal (%) [IU/mL value range]
No. of samples tested negative (%) [IU/mL value range]

講者更細部探討此 184 組真實陽性檢體其中有高達 58.2%檢體被 8 組 CIA 歸類為陽性及陰性，55.5%檢體有三個檢驗結果（陽性、陰性及不確定）。而該 8 項 CIA 檢測系統之單位皆使用 IU/mL，表示所有檢測系統皆追溯至國際標準品，而此調查結果顯示即使有國際標準品作為參考標準品下，各檢驗系統間於檢測抗體效價時依然有高度變異性的存在。

另外講者比較將此 55%檢體被判定為不確定之結果歸類為陽性或陰性，結果如下表：

Interpretation of CIA equivocal results	Overall No. of concordant sera (%) by indicated CIA							
	Architect (Abbott Diagnostics)	Cobas 6000 (Roche Diagnostics)	Vidas (bioMérieux)	DxI (Beckmann Coulter)	Centaur (Siemens HealthCare)	Enzygnost (Siemens HealthCare)	LXL (DiaSorin)	Serion
Equivocal results are considered negative	96 (36)	194 (72.7)*	150 (56.2)	100 (37.5)	200 (74.9)	203 (76.0)	117 (43.8)	107 (40.1)
Equivocal results are considered positive	202 (75.7)	194 (72.7)*	206 (77.2)	212 (79.4)	248 (92.9)	249 (93.3)	200 (74.9)	195 (73.0)

結果顯示將此類檢體不確定結果歸類為陽性的狀況下可提升靈敏度且不會降低特異性。

講者依此結果認為：一、所有市售檢測 RV-IgG 檢測系統之變異性大，此將影響醫生診斷結果之判定及血清保護力價之研究。二、目前市售檢驗套組之靈敏度需提高，以避免偽陰性判定。三、可能需重新考慮臨床免疫測定的 RV 定量的 cut-off 值標準 10 IU / mL (是否過高)，讓市售 RV IgG 抗體測定套組有一個更好的標準化。

五、 有關 Point of care 品質確效試驗之議題

定點照護檢驗裝置 (Point of care, POC) 為在照顧病患當下所執行的醫學診斷檢驗之技術，此技術之主要訴求特點為可以在任何地方 (包含救護車、居家、辦公室、門診等) 都可執行，且操作方式較為簡易。為何要發展 POC 這類診斷檢驗技術呢？講者提供了幾項觀點：它改變了現行健康照護 (health care) 的運輸模式 (患者不一定要到大醫院才可進行檢驗診斷)、增加初級衛生保健醫師的重要性 (不一定要找專科醫生，家庭醫師即可) 以及簡易操作及產出報告的時間短 (快速提供資訊，避免因延誤提供報告而對病人之病情造成嚴重影響)。POC 基本訴求包含需有高度精確性 (accurate)、容易操作和具可運輸性之設備，並且可即時提供結果報告。它可以增加檢測的覆蓋率，改變病人的健康型態並幫助了解疾病的趨勢，使疾病在早期即有警示以避免後期大爆發後增加健康照護系統的負擔。一般市面上使用的 POC 裝置特性為小巧方便攜帶、低耗電性、可自動即時連線以及耐用度高，且目前現行 POC 系統網絡的穩健性 (robustness) 和整合能力已有大幅度的提昇，所以使得 POC 是目前病人照護流行的趨勢，並比傳統常規的健康照護機構系

統需求更為廣泛。

有關製造廠在研發 POC 裝置時所需考慮之確效 (Validation) 及驗證 (verification) 研究問題，需考量到該產品的安全性及是否提供給特定對象進行使用，並可提供適當的品質管理系統，可供上市後確認。POC 裝置之初步研究還需包含：

1. 定義和分析使用者範圍：是否適用於特定對象、環境及預期使用之場所。
2. 發展初始產品之概念及樣板 (prototype)。
3. 預測可能使用上之危險性，包含生物危害性、風險性以及 POC 對臨床結果的影響。

有關上述的研究可分兩種形式：分析研究 (analytical studies) 和臨床研究 (clinical studies)。分析研究需包含下列項目：

1. 樣品種類：包含適用性、保存及運輸。
2. 精密度 (precision)：包含可重複性 (repeatability) 及再現性 (reproducibility)。
3. 靈敏度 (sensitivity)：包含最低偵測極限 (LOD，建議比照國際標準品) 及基因型 (genotype，需使用 panel 分析)。
4. 特異性 (specificity)：包含是否有交叉反應 (cross-reaction) 及干擾作用。
5. 校正液及品管液對國際標準品之追溯性。
6. 檢測範圍，需注意是否有虎克效應 (Hook effect)。
7. 臨界值 (cut-off) 之確效試驗。
8. 試驗步驟之確效，需注意判讀時間。
9. 安定性試驗：包含產品宣稱的保存期限 (shelf-life)、已經開封使用中的產品安定性、運輸安定性及包裝安定性 (可否通過掉落測試)。
10. 穩健性。其中穩健性在 POC 上是一個很重要的關鍵，有許多因子會影響到報告產出之結果，影響因子包含：
 - (1) 人為因素：使用錯誤的檢體種類、操作檢體錯誤 (檢體放置錯誤或體積不正確)、添加試劑操作不正確 (添加位置、體積、順序、混用其他批次試劑等)、操作實驗錯誤、判讀時間不正確、因有色盲而造成判定錯誤等。

- (2) 檢體正確性及處理：錯誤的檢體收集方式、使用不適當的抗凝血劑、有 clotted 產生、檢體處理有誤、檢體保存或運輸方式不當、檢體含有干擾物質、有氣泡產生等。
- (3) 試劑的正確性：試劑保存不當、使用逾有效日期之試劑、試劑混合不正確、使用污染的試劑等。
- (4) 軟體、硬體及電力的正確性（設備）：包含電源不足、電流不穩、電壓不正確、反覆插接裝置、軟體、硬體、電池損毀或外力造成設備受損等。
- (5) 校正液和品管液的安定性：包含可能影響品管液安定性及可能干擾品管液之因素。
- (6) 環境因素：環境中可能會影響試劑、檢體和結果之因子（包含溫度、濕度、大氣壓力、經緯度、光照、表面張力或設備被移動等）及其他變項的改變，例如 pH 值和溫度。臨床研究則為臨床患者實際使用的狀態。它必須要設定特定的使用環境，例如使用的地方是醫院、診所、加護病房、復健科、長期照護中心、居家環境、社交場所（公司、學校、戶外等）或可移動的環境（車、飛機、火車、公車、救護車、直昇機等），以及需設定合適的操作者，是否為一般民眾或是需高度訓練的專家或操作員、操作者之知識、經驗等級、年齡、工作能力、心智情緒管控等設定。

為了有效的將產品資訊與操作者溝通，並且確保可安全的使用 POC 裝置，使用說明書必須包含：檢測目的、操作者規定、如何操作、可使用何種類型之檢體進行檢測、如何執行試驗、如何解釋試驗結果、試驗的限制性（limitation）、警語及可證明支持試驗效能的要求。此外，依據 CLSI POCT-09A 文件提到診斷試驗的責任，在未考慮到試驗的複雜性下，應該要確保下列條件：實驗步驟和過程可有效的執行、試驗結果是可接受的、試驗/試驗系統的提供符合品質要求、錯誤的試驗結果風險已達最小化。另外在 ISO 15189 第 5.5 節提到品質管理系統之責任：

1. 實驗室僅可使用經確效的步驟來確認在特定使用目的上該檢測步驟是適當的。
2. 確效試驗需儘可能地擴大至可達到設定的應用或領域上。
3. 實驗室應紀錄經確效之實驗步驟產出之實驗結果。

4. 被應用於藥品檢測之方法和步驟的選用需經過評估及統計分析。
5. 步驟需經由實驗室主持人或指派者進行審視，了解其初始目的及定義，並且再次審視需要定期執行之所有文件紀錄。

初始評估 POC 的技術，應考量下列幾點：容易操作使用、品管液和校正液是否需要、可偵測錯誤的能力、宣稱效能、產品效期、對環境的可容許變異。其中評估效能宣稱需盡可能的模擬最真實的狀況。內容需包含：陽性/陰性一致性（該方法與現有方法之比較）、靈敏度/特異性（效能試驗，與對照標準品比對）、精密度（可重複性和再現性）、準確性（使用校正液、品管液或 EQA 原料）、測量區間（依據 CLSI EP06 protocol）、參考區間（認證試驗的群體與製造廠或公告之參考群體具一致性）、品質管制（確認所有試驗系統的架構是最佳化）。

最後，講者強調 POC 試驗可以加強醫療保健及使醫療保健行為不僅局限於醫院內，所以應共同加入維持 POC 確效之責任以確保其效力是對病人有益的。

心得及建議

一、體外診斷試劑之品監調查：

(一) 因體外診斷試劑常須在實驗室內執行，且大部分檢測系統為自動化機台需搭配特定操作之儀器進行檢測，又國內使用體外診斷試劑之實驗室大部分皆為醫院、檢驗所或其他有關研究單位，試劑之使用量龐大，建議未來如需進行類似之體外診斷試劑相關調查，可另以下列方式作為替代方案：相關主管機關可以採取統一提供檢體或標準品的方式，招募有使用該項檢驗試劑進行檢驗項目之實驗室共同參與調查計畫，待增加樣本數目提高其統計分析之結果代表性後，方可看出各產品間之檢測結果趨勢或問題，並同時納入各實驗室之差異進行比較，以反應該類產品於使用端的真實使用情形，以達進行後市場品質監測之目的。

(二) 由於體外診斷試劑一般應用於臨床檢體的檢測，建議未來實行品監計畫時，檢測之檢體除了使用可追溯國際標準品之參考物質外，亦可收集足量患者及健康者之檢體一起納入進行檢測，觀察受測檢驗系統之臨床靈敏度、特異性、偽陽性及偽陰性等結果。經此監測調查，可有效控管及瞭解各診斷試劑實際應用於設備使用者之真實品質。

二、標準品之製備：

(一) 與會中提及製備參考物質（標準品）除招募大量實驗室及多樣檢測系統共同參與標定該標準品外，應同時瞭解該標準品之適用性及替換性（是否能真實代表臨床患者檢體），因此未來進行標準品共標並完成確定其效能後，建議可進一步對其進行替換性評估，提供足量收集之患者檢體及不同濃度的標準品，與多種檢驗系統間進行比對，除了以現今的線性回歸及對應分析方式做評估外，亦可嘗試以新方法（DFI）進行替換性評估，補足現今評估方法之不足處。署內亦可開發計算標準品替換性之統計方法，期未來可應用於標準品之替換性評估。

(二) 會上得知曾施打過 B 型肝炎疫苗的臨床檢體其抗體效價測量值低於 10 IU/mL 亦具有保護力價，建議可參考講者考量之觀點，於收集病人檢體時在相關人體試驗法規允許的範圍下建議可收集臨床檢體捐贈者之疫苗接種史，

以及同時使用多種檢測系統對特定之臨床檢體進行檢測，如結果判定為真實陽性或真實陰性之臨床檢體可作為參考標準品，作為產品上市前品質控管之參考依據。

(三) NIBSC 製備之標準品如非直接來自臨床檢體（即使用培養或基因工程方式製備），會同時以臨床檢體（包含病原基因型、亞型及檢體種類）進行評估，探討製備之標準品是否可有效減少各方法及實驗室間之變異性，因此建議未來在製備該類標準品前應同時利用臨床檢體與標準品進行比對，以確認製備之標準品作為參考物質時之代表性。

三、 臨界值規範：

目前國際對於 anti-HBs 之有效保護力價訂為 10 IU/mL，因此各廠牌之靈敏度皆訂為 10 IU/mL，我國之查驗登記準則亦跟進國際標準，但在本次研討會上得知曾施打過 B 型肝炎疫苗的臨床檢體其抗體效價測量值低於 10 IU/mL 亦具有保護力價，而 B 型肝炎疫苗為我國的疫苗常規接種項目之一，嬰兒出生 24 小時之內會立即施打第一劑 B 型肝炎疫苗，但卻常有成人之 anti-HBs 檢驗結果未達 10 IU/mL 而擔心保護力不足再補打疫苗，建議持續關注該議題之國際發展，了解國際間相關靈敏度規格修訂之進度。

四、 Point of care 裝置：

未來可隨處帶著走的體外診斷試劑將會是一股趨勢，但目前對於該類醫療器材尚未有明確的規範，尤其是穩定性的部分更是 point of care 裝置與傳統檢驗系統差異最甚之部分，而本署之任務為替人民之醫藥衛生安全把關，建議未來此類項目可依據 WHO 建議之穩定度以及注意事項擬定相關品管之法律規範。同時也可輔導台灣欲發展 point of care 檢測儀器之廠商通過認證，使台灣生技產業可迅速蓬勃發展，以促進台灣生技起飛及走在醫療科技前端，提升台灣之國際能見度。

五、 未來將持續參與 SoGAT 舉辦之國際研討會議：

SoGAT 近年皆於每年舉辦國際研討會議探討各種血液病原之相關檢測新知及目前國際上所面臨的標準品製備議題，同時參與的委員及各大廠商皆為在血液病原檢測項目上占有重要關鍵性之人物，建議未來每年應持續派員參

加，吸收獲取該領域上重要的相關訊息，即時了解國際趨勢及面臨之問題，以提升本署血液病原檢測相關技術及標準品製備能力。