

出國報告（出國類別：研習）

赴英國參加「2019年血液病原基因 擴增技術標準化研習」

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：廖婉婷技士

派赴國家：英國

出國期間：中華民國 108 年 6 月 1 日至 6 月 6 日

報告日期：中華民國 108 年 9 月 3 日

摘要

本次奉派出國係赴英國倫敦參與 2019 年血液病毒基因擴增技術標準化研習 (Standardization of Genomic Amplification Techniques, SoGAT)，並藉機邀請與會官方實驗室(英國、德國、日本)參與本署第 2 代 HBV 核酸標準品之共同標定研究。該研習由英國國家生物標準品暨管制研究所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)主辦，於英國藥物與保健產品法規管理局(Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, MHRA)內部會議室中舉行為期 2 天之會議。研習內容包含血液病原新興診斷分析方法簡介及比較，以及從參考標準品之互通性、萃取方法效率之影響、基因之變異性及次世代定序(Next generation sequencing, NGS)應用等各個層面去剖析診斷分析標準化在未來所面臨之挑戰，並且包含了定點照護檢驗之特點、目前的發展與應用及未來之挑戰。藉由參與本次研習獲取國際間血液病毒核酸擴增技術檢測新知及相關標準品製備情形，使我國即時掌握國際間最新技術與相關規範之演進。另於研習中獲 NIBSC 通知本單位之前受邀參與世界衛生組織(WHO)第 6 代 C 型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)國際標準品之共同標定研究，由報告草稿內容獲知標定結果均落於主要分布族群，成果相當良好。

目錄

壹、 前言與目的	4
貳、 行程及工作紀要	6
參、 研討會內容	7
一、 標準品現況發展	7
二、 新興診斷分析方法之簡介	8
三、 診斷分析標準化之挑戰	13
四、 定點照護檢驗	20
肆、 心得與建議	24
伍、 附件	26

壹、 前言與目的

血液製劑之原料係由人體血漿製備而來，如未能於製造前檢測出血漿中潛藏之傳染病原，將造成國人用藥健康之風險。為確保血液製劑等相關生物藥品品質安全，在現行醫療衛生法規要求下，捐血者之血液檢體均需要進行 HBsAg、Anti-HCV 及 Anti-HIV 等項目篩檢，利用 mini-pool 方式來篩檢血漿中是否含有 HBV、HCV 及 HIV 病毒核酸之風險，並在產品製程中進行病毒去除及不活化方法確效等步驟，而製造廠必須符合現行藥品優良製造規範，來確保血液製劑相關產品之安全性。然而，傳統血液病原偵測之血清學技術受病原量而影響，當病原量低於最低檢測極限時，將無法被檢測出。

利用核酸擴增技術(NAT)先將病原量進行擴增後再行檢測，提升血液病原污染偵測之靈敏度，確保血液製劑相關產品不含傳染病病原，以降低使用者感染之風險。因此各國紛紛運用核酸擴增技術於血液篩檢或血漿原料檢驗項目中。但因為檢測各種病原的技術標準不同，造成檢測標準、方法靈敏性及特異性皆不相同，為縮小各國檢驗方法之差異性，世界衛生組織(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)製備各種生物性標準品及工作試劑(working reagents)，以提供各國血清學、核酸診斷試劑研究或檢測體系之標準化使用。

血液病原基因擴增技術標準化研習(Standardisation of Genome Amplification Techniques, SoGAT)係世界衛生組織委託英國國家生物標準品暨管制研究所辦理之國際性科學技術研討會議，其主要目的為報告目前國際標準品製備現況及未來規劃、血液病原檢測技術面臨的挑戰及新技術開發與應用，以及國際間體外診斷試劑最新規範及邁向趨勢，藉由研習中來自各國衛生主管機關及相關領域專家聚集討論，以提升國際間血液病原之檢測水準及統一各國檢測方法之標準，降低檢測方法差異性。本署執掌血液製劑及第三等級體外診斷試劑之品質檢驗管理，多年來派員參與該研習，以獲取國際間血液病原檢測技術之現況

及新知，並瞭解國際間標準品製備情形，有助於我國即時掌握國際間最新技術及相關規範，以作為我國血液製劑或體外診斷試劑等相關產品品質檢驗之參考依據，提升相關產品品質管制水準，保障國人用藥安全。同時亦藉由研習與各國相關領域專家建立溝通管道，促進國際交流，以便日後合作關係之建立。

本次藉機邀請各國官方實驗室(包括英、德、美、日等國家)參與本署 HBV 第 2 代國家病毒核酸標準品共同標定研究，該標準品可用於核酸擴增技術之檢驗。藉此提升我國國際標準品之公信力，所建立之核酸國家標準品除可提供本署作為血液製劑相關產品品質安全評估之用，亦可提供國內捐血中心、臨床檢驗單位與體外診斷試劑製造廠研發及檢測之標準化使用，有助於我國相關生技產業之發展，並與國際接軌。

貳、 行程及工作紀要

日期	工作紀要
6月1日	啟程(台北-法蘭克福機場轉機-英國倫敦)
6月2日	抵達英國
6月3日	<p>報到/參加 2019 年血液病原基因擴增技術標準化研習</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 開場介紹 (講者：NIBSC 之 Neil Almond) ● WHO 分子診斷標準品計畫之現況與更新 (講者：François Xavier-Lery；主持人：Clare Morris) ● 診斷分析標準化之挑戰 - part I <ul style="list-style-type: none"> ✓ 參考標準品之互通性 (講者：Megan Cleveland 等 3 位；主持人：Sheila Govind 及 Peter Vallone) ✓ 萃取方法效率之影響 (講者：Simon Carne 等 3 位；主持人：Michael Chudy 及 Rob Anderson)
6月4日	<p>參加 2019 年血液病原基因擴增技術標準化研習</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 診斷分析標準化之挑戰 - part II <ul style="list-style-type: none"> ✓ 基因之多樣性 (講者：Dianne Wilkinson 等 3 位；主持人：Jacqueline Fryer 及 Simon Carne) ✓ dPCR 與 NGS 在診斷上之應用 (講者：Peter Vallone 等 4 位；主持人：Bert Niesters 及 Neil Berry) ● 定點照護檢驗之標準化 (講者：Ute Stroher 等 3 位；主持人：Beatrice Vetter 及 Clare Morris)
6月5日	返程 (英國倫敦-台北)
6月6日	抵達台北

參、 研討會內容

會議第一天由 NIBSC 之 Dr. Neil Almond 開場介紹本(2019)年度 SoGAT 是 24 年來第 28 次會議，以 SoGAT 會議主要目的及生物性標準品之發展作為承先啟後之介紹，簡要說明 2018 年 SoGAT 之主軸及 2019 年 SoGAT 之計畫內容，並且介紹會議主軸及每一主題演講後將進行討論及討論進行之方式。為期 2 天之會議內容摘要如下(由於本會議結束後主辦單位未提供簡報電子檔，而簡報拍照清晰度有限，故內文圖表皆取自講者所提供之文獻)：

一、 標準品現況發展

- (一) 腸病毒(Enterovirus)所引起的常見症狀主要為腦膜炎，部分型別會導致急性無力脊髓炎(Acute Flaccid Myelitis, AFM)與急性無力肢體麻痺(Acute Flaccid Paralysis, AFP)，目前主要常見之型別為 EV-A71(Enterovirus A71)及 EV-D68。EV-A71 會引起手足口症(hand-foot-mouth disease, HFMD)，而 EV-D68 則會引起呼吸道症狀與急性無力脊髓炎，臨床上有許多診斷方式，主要是利用核酸擴增技術偵測腸病毒核酸之高度保守區域之 5' -UTR，惟該診斷方式由於靈敏度差異很大，故需要發展適合之腸病毒核酸標準品，NIBSC 的 Dr.Morris 表示現階段須尋找適合的病毒株及臨床分離株，以作為參考物質。
- (二) 登革熱參考物質套組即將用罄，許多登革熱疫苗在發展中，且抗體相關試驗需要標準品進行校正及協和化，因此需要再建立登革熱抗體標準品，NIBSC 的 Dr.Mark 表示目前正在材料蒐集階段，並且預計有大量含登革熱抗體血清即將運送至 NIBSC，主要來自新加坡、美國及哥倫比亞，後續將利用中和試驗(Neutralisation assay)確認送來之血清/血漿之專一性血清型別，以建立登革熱抗

體標準品。

- (三) 流感病毒 A 型及 B 型之核酸標準品亦正處於材料蒐集階段，而 HIV-1 CRF 標準品套組亦同，FDA 之 Dr.Indira 表示第一代 WHO HIV CRF 標準品套組已於 2013 年建立，現需要更新該標準品之套組內的型別，以符合實際需求，目前預計增加 8 個流行之 CRF 型別株，而 FDA 之 CBER 將可以提供從病人周邊血所分離培養出來之去活化病毒株，用來建立標準品之套組。
- (四) 會議中 NIBSC 之 Dr.Jacqueline 亦說明了第 6 代 HCV 核酸國際標準品，現正處執行共標研究之時程，該共標研究除了要驗證候選標準品 1 及 2 是否適合作為第 6 代 HCV 核酸國際標準品，並且探討日本 NIID 的 Dr.Wakita 提供之細胞培養 HCV(cell cultured HCV, HCVcc)是否可以作為未來標準品之替代來源。此 HCVcc 是利用 UV 進行病毒去活化，再利用糖密度梯度純化之，而結果顯示 HCVcc 並不會使得整體標準品之協和化降低，可做為候選標準品之一。後續會進行候選標準品安定性試驗以及其他標準品製備之相關程序。

二、新興診斷分析方法之簡介

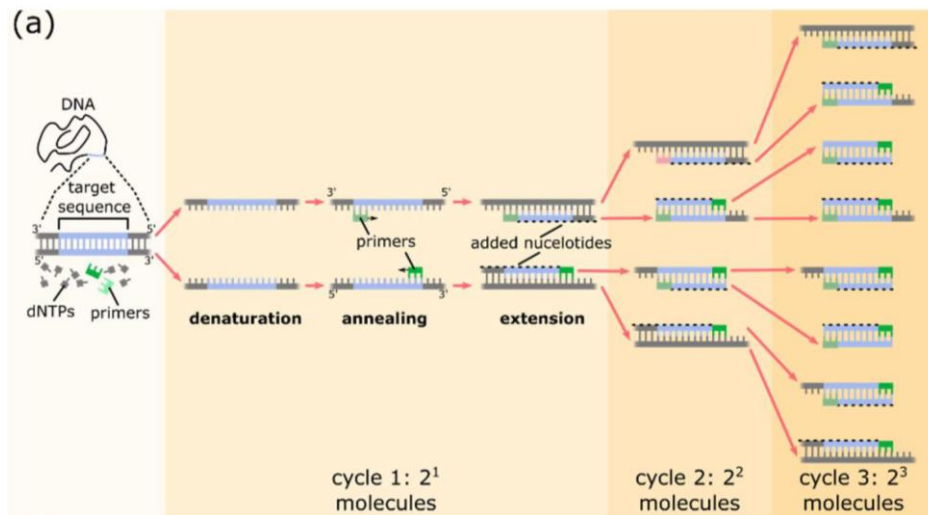
(一) 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

「聚合酶鏈鎖反應(PCR)」是一種體外診斷分析方法之一，可針對特定 DNA 片段進行核苷酸擴增。其原理為利用引子(Primer)與特定 DNA 片段序列互補結合，針對該特定 DNA 片段進行核苷酸擴增進而分析，此為定性或半定量之方法(圖一)。「即時聚合酶鏈鎖反應(Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)」原理為利用引子探針(Primer probe)在 PCR 過程中產生螢光，再利用螢光偵測系統偵測

每個循環(cycle)所釋放出之螢光量，進而推算出每個循環所產生之 PCR 產物量，達到即時定量目的，惟此定量方式非絕對定量，而是相對定量(圖二)。

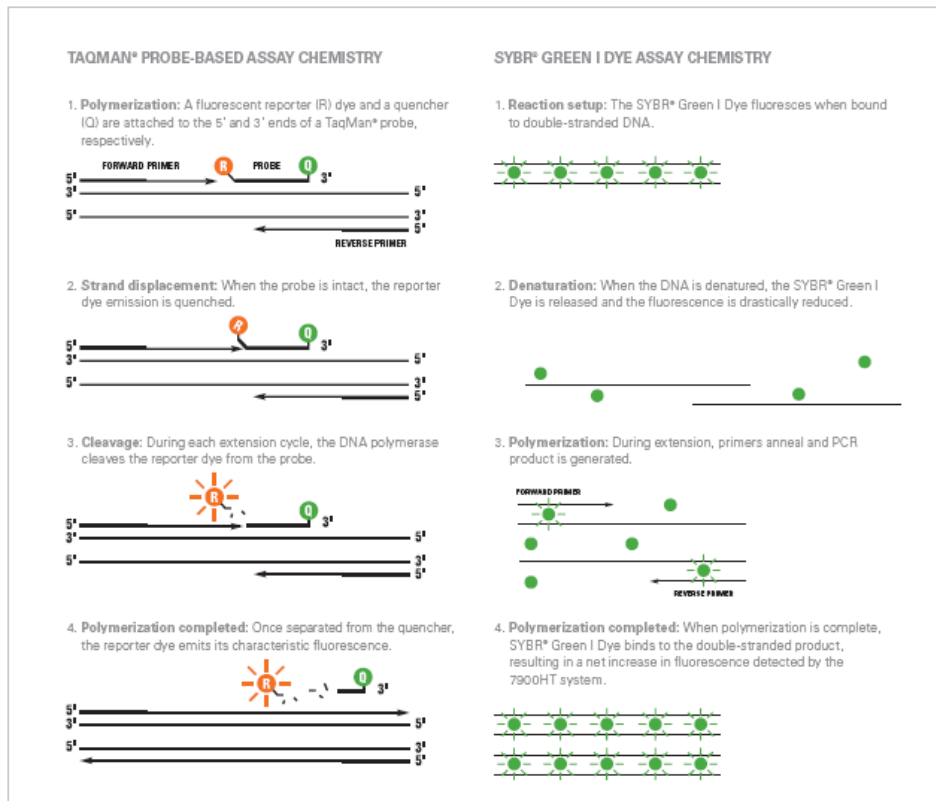
「數字聚合酶鏈鎖反應(Digital PCR, dPCR)」則是將一個 DNA 樣本稀釋且區分成幾十到百萬份之不同且獨立之反應單元中，每一獨立反應單元中最多包含一個標的 DNA 分子，而 PCR 則發生於每一獨立反應單元中，再以螢光訊號進行統計分析，故可偵測樣本中絕對 DNA 分子個數，而非相對定量(圖三)。其中「微滴數字聚合酶鏈鎖反應(Droplet Digital PCR, ddPCR)」即是以乳化微滴將樣品區隔，使樣品 DNA 在每一微滴中(獨立反應單元)進行 PCR。

由於 dPCR 不需要標準曲線或參考物質即可絕對定量樣品中之 DNA 分子濃度，不止可精準定量亦具高度重複性，因此可適用於參考標準品濃度之訂定、參考標準品相關特性之分析。



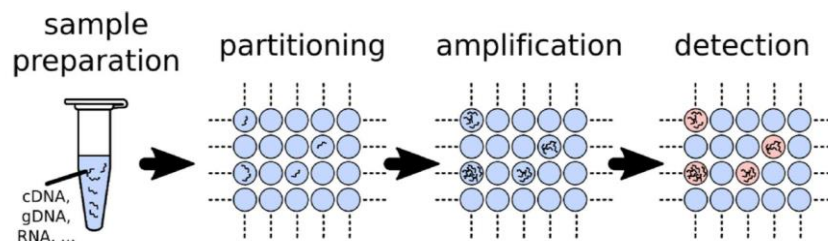
圖一、PCR 之原理示意圖

(資料來源：Quan, P., Sauzade, M. & Brouzes, E., *Sensors*, 2017)



圖二、Real-time PCR 之原理示意圖

(資料來源：bioSYNTHESIS 官網)



圖三、dPCR 之原理示意圖

(資料來源：Quan, P., Sauzade, M. & Brouzes, E., *Sensors*, 2017)

(二) 次世代定序技術

1953 年 James Watson 和 Francis Crick 發現去氧核醣核酸構造，以及 1977 年 Frederick Sanger 所發展的定序技術(鏈終止法，chain termination method)，奠定了人類在分子生物學領域的基礎，

並且在 2003 年透過了定序技術完成了人體基因組計畫。而後續所改良出來的次世代定序(Next generation sequencing, NGS)更是開啟了分子生物學領域的新篇章，傳統的第一代定序技術不管是在通量、成本及速度等方面都不及次世代定序技術，次世代定序可在同一時間對大量的短序列片段進行快速定序，且樣品不需經質體複製就能進行定序，減少複製過程可能出現的錯誤率。與傳統定序方法相較，次世代定序法檢測較為靈敏，且更能快速及更精確地定序。

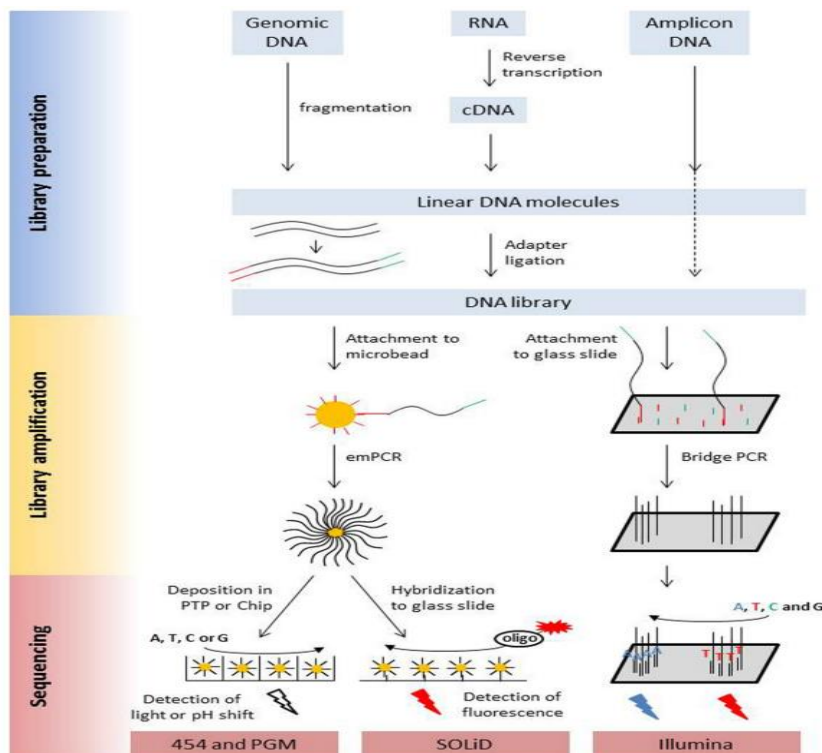
次世代定序操作流程主要分為樣本庫製備(library preparation)、樣本庫擴增(library amplification)、定序反應(sequencing reaction)及後續之數據分析(data analysis)(圖四)。

1. 樣本庫製備：檢體進行核酸萃取後得到基因，將基因序列片段化(fragmentation)成大小不等的短片段後，再將短片段基因序列末端接上轉接子(adapter)，如此即製成樣本庫。
2. 樣本庫擴增：接上轉接子之基因片段被置入微磁珠或晶片固相介質中，該固相介質帶有與轉接子有互補之序列，再以乳化聚合酶鏈鎖反應(emulsion PCR)或橋式聚合酶鏈鎖反應(bridge PCR)等方式擴增待測基因片段。
3. 定序反應：依據不同的定序原理可以有不同方式進行定序，包含焦磷酸定序(pyro-sequencing)、合成式定序(sequencing by synthesis)及接合性定序(sequencing by ligation)。合成式定序法與傳統定序方法(Sanger 定序法)之原理相同，加入不同鹼基(dNTP)及合成反應試劑進行反應，該鹼基已標定不同螢光分子且可被移除，當鹼基接上正在合成之 DNA 片段，螢光分子將會釋出而被偵測到，置換試劑後再反覆進行一系列之螢光標記移除、試劑置換與螢光影像之偵測，即可快速且獲得大量之

定序結果。

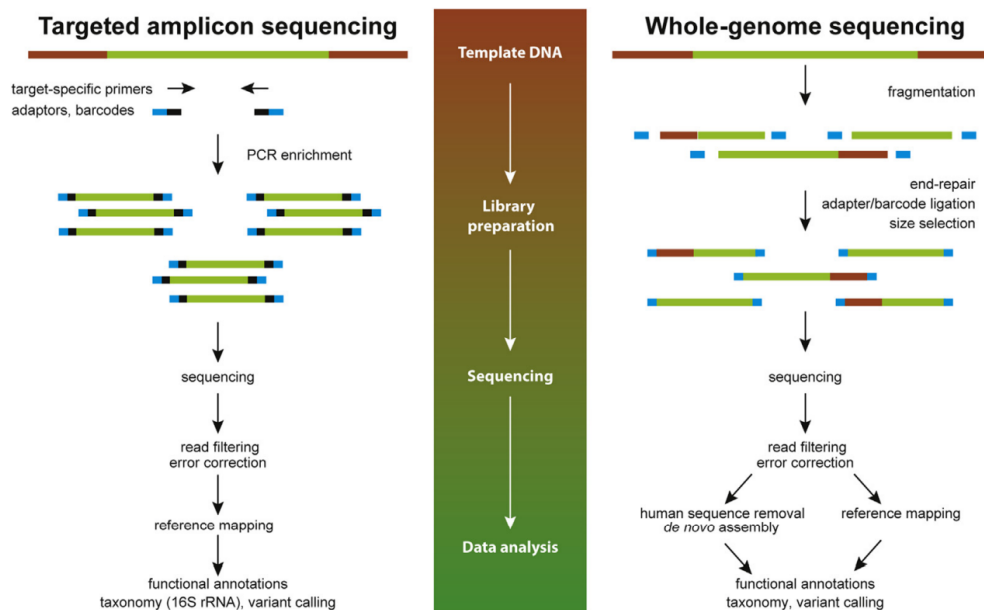
4. 數據分析：所獲得之大量定序數據後，透過生物資訊軟體之分析，將所有小片段序列重組及排列，盡可能地還原成原始待測基因片段序列。

次世代定序應用於感染病原菌診斷及監控之主要方式有二，分別為特定擴增子定序法(Target amplicon sequencing)以及全基因體定序法(Whole genome sequencing)(圖五)。特定擴增子定序法是利用已知序列片段當作擴增子，以 PCR 方式對特定區域進行放大，並進一步定序及分析，此種方法適用於分析已知序列區域，常應用於找尋病原體是否含抗藥基因;而全基因體定序法則是利用已建立好之基因庫來進行搜尋比對，找尋未知核酸片段是來自於哪個病原菌，此方法可直接進行定序，不須將檢體培養等繁雜步驟，定序結果再與資料庫進行搜尋比對，找出致病之病原體。



圖四、次世代序原理

(資料來源：Claudia Knief, *Front Plant Sci.*, 2014)



圖五、次世代定序應用於感染病原菌之診斷及監控


(資料來源：Lefterova MI et al. *J Mol Diagn*, 2015)

三、診斷分析標準化之挑戰

(一) 參考標準品之互通性(commutability)

世界衛生組織(World Health Organization, WHO)及美國國家標準暨技術研究(National Institute of Standards and Technology, NIST)所製造之病毒標準品，兩者間之特性有所差異，如 WHO 標準品組成分是病毒顆粒，NIST 標準品是從病毒萃取出來之 DNA；WHO 標準品使用時須先進行萃取步驟再執行核酸擴增技術進行定量，而NIST使用時不需萃取步驟即可進行定量；WHO 標準品之單位為 IU(International Units)，NIST 標準品濃度單位為 genome copies/ μ L 及標準品濃度之訂定等(圖六)。不同來源之標準品在使用流程及濃度單位等皆有所不同，可能導致分子診斷技術結果產生差異，因此，不同來源之標準品之間的互通性極為重要。

WHO Standards / NIST Standards		
	WHO Viral Standards	NIST Viral Standards
Contains	Viral particles	Extracted DNA
Intended Use	Extraction & Quantitation	Quantitation only
Concentration	International Units	Genome Copies per μ L
How Concentration is Determined	Large, international multicenter effort	At NIST, multiple ddPCR assays



圖六、WHO 及 NIST 標準品之特性比較表

(資料來源：研習資料)

NIST 之 Dr.Megan 提及利用 ddPCR 進行 BKV 之標準品特性分析，分別針對 5 個不同來源之標準品進行分析比對，分析方式係使用針對 BKV 基因體之 VP1(virus partical 1)及 T(tumor antigen)區域具有專一性之引子進行 ddPCR，理論上同時分析 VP1 及 T 區域與只有分析 VP1 區域所獲得數據之比值應該接近 2 倍。分析結果顯示 4 個不同來源標準品之比值介於 1.7-1.9 之間，與比值 2 相去不遠；然 WHO 標準品之比值僅有 1.19(圖七)。此數據假設 T 區域中與專一性引子互補結合之序列發生突變，惟其他相關數據並沒有顯示有相關突變發生。

以 NGS 進一步分析 NIST 及 WHO 標準品基因體序列之覆蓋率，此定序結果顯示 WHO 標準品基因體序列發生重組而產生出病毒亞群(subpopulation)，此重組導致約有 70%病毒亞群之 T 區域發生缺失(deletion)，位於 bp 3338 和 4981；NIST 標準品基因體序列則沒有發生大片段的缺失，僅在調控區(regulatory region)(bp 297-401)發生小片段之重組(圖八)。

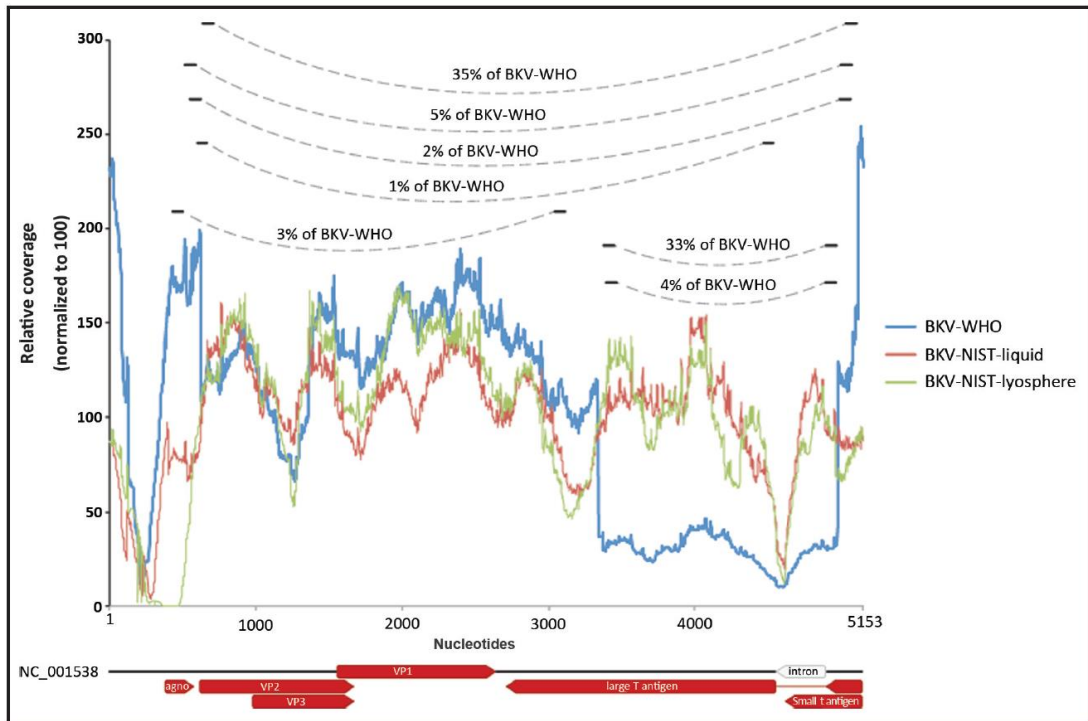
診斷分析方法應用於標準品互通性分析上，ddPCR 與 NGS 皆是極具重要之技術，跟 Real-time PCR 相比，ddPCR 不僅能絕對定量標準

品內含濃度，更能準確且清楚分析不同來源標準品之特性及差異。

Table 1. Ratio of the concentration when VP1 and T are targeted simultaneously over the concentration when only VP1 is targeted.	
Manufacturer	VP1 and T targeted simultaneously/only VP1 targeted, mean (SD)
Exact	1.9 (0.14)
Acrometrix	1.7 (0.16)
Zeptomatrix	1.7 (0.17)
NIST	1.9 (0.18)
WHO	1.19 (0.08)

圖七、不同來源標準品之分析比對

(資料來源：Bateman AC, et al. *Clin Chem.*, 2017)



圖八、NGS 分析 NIST 及 WHO 標準品基因體序列之覆蓋率

(資料來源：Bateman AC, et al. *Clin Chem.*, 2017)

(二) 萃取方法效率之影響

NGS 是未來體外診斷方法之新興趨勢之一，可針對病原菌進行全基因體定序，而影響定序結果之重要因素之一為，如何有效率萃取病毒 RNA，且有效率的萃取流程是可被重複的，此有效率之萃取平台需能萃取出產率高且品質好之 DNA，而萃取過程可移除任何會影響後續定序結果之抑制物質。由於 real-time PCR 是針對短片段區域之序列放大，故 DNA 萃取過程中若發生斷裂對於 real-time PCR 之影響較小；但 NGS 需要讀取較長之序列，故 DNA 萃取過程應該要盡可能地降低 DNA 斷裂發生之機率。

針對病原體核苷酸萃取方法之效率，英國公共衛生部(Public Health England, PHE)之 Dr.Simon 統整了 1 個手動萃取法(QIAamp Viral RNA Mini Kit extraction, Qiagen)及 4 個自動化萃取法(包含 EZ1 Advanced XL, Qiagen、MagNA Pure 96, Roche、NucliSENS easyMag, BioMérieux 及 QIASymphony , Qiagen)，說明並分析比較這些萃取平台。

添加 hazara virus 於人類血漿模擬臨床檢體，再進行核酸萃取並執行後續之 real-time PCR 與 NGS 分析，由於 hazara virus 是一個分段基因組(segmented genome)病毒，作為萃取平台效率分析是一個很好的挑戰，故而選擇之。核酸萃取完後所進行之後續分析若為 real-time PCR，則 NucliSENS easyMag 之萃取平台表現最好，而 MagNA Pure 96 萃取平台表現最差；若後續分析為 NGS，EZ1 Advanced XL 及 NucliSENS easyMag 之定序結果則有較高的覆蓋率，而 MagNA Pure 96 萃取後的 NGS 定序結果之覆蓋率較差。雖然 hazara virus 是一個良好之目標病原體替代物，可用來模擬含有病原菌之臨床檢體，但若換成其他目標病原體仍需要另做一系列之驗證及探討。

在此，Dr.Simon 以 hazara virus 為例說明，不同之萃取方法會有不同之萃取效率，而萃取效率之差異將會影響分子診斷技術之結果，此外，為了獲得品質良好且高產量之核苷酸或有效去除抑制物避免後續 real-time PCR 與 NGS 分析受到干擾等，仍需要更進一步研究與探討才可以了解不同萃取平台之間的差異，進而優化萃取平台以應用於後續基因體之分析。

(三) 基因之變異性

美國 FDA 之 Dr.Indira 以人類免疫缺乏病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV) 為例說明病原體基因多樣性及發生重組時，對於診斷分析標準化之挑戰。依據基因型別分型，HIV 分為 HIV-1 及 HIV-2 兩型，HIV-1 是目前導致後天免疫缺乏症候群 (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) 主要傳染流行之基因型別；而 HIV-2 是毒力較弱之基因型，主要盛行於西非。HIV 是慢病毒屬(Lentivirus)反轉錄病毒科(Retroviridae)之 RNA 病毒，感染 T 細胞、單核球及巨噬細胞，並潛伏在細胞裡。

由於 HIV 反轉錄酶複製的過程中缺乏錯誤檢測及校正 (proofreading) 之功能，因此 HIV 基因複製的過程中容易發生變異，這樣不斷的基因變異使得 HIV 突變機率極高。HIV-1 主要分群為主群 M (Major group)、局外群 O (outlier)、N 群及 P 群，主群 M 根據 env 基因(外套膜糖蛋白)的差異又分為 9 個亞型(subtype) A-D、F-H、J 及 K；而 HIV-2 則區分成 A-H 亞型。除了發生突變，HIV 在病人體內亦會與高度不相同或相近的病毒發生基因重組產生獨特重組型 (unique recombinant forms, URF)，若 URF 在一個群體中散播開來則稱之為流行重組型 (circulating recombinant forms; CRF)，也就是一個新

的重組型病毒株在 3 個以上流行病學不相關的個體中被分離且鑑定出來，即可定義為一個新的流行重組型(CRF)，目前已有 98 個 CRF 已被定義。HIV 亞型在全世界流行比例約佔 3 分之 2，剩下 3 分之 1 係 98 個 CRF 所造成之感染，盛行率較高的主要為 CRF02_AG、CRF01_AE 及 CRF06_cpx 等。

由於 HIV 基因變異以相當快之速度在演化及盛行於全球，因此 Dr.Indira 表示可準確且靈敏偵測主要流行之 CRF，對於疾病診斷及捐輸血篩檢安全是一件極度重要之事，常見之核酸擴增技術(Nucleic acid amplification technology, NAT)是基於引子與病毒基因互補而有專一性結合進而進行核酸擴增之分析，若病毒基因發生突變，則核酸擴增技術之偵測將受到限制，且新的重組病毒株亦會影響偵測之靈敏度。為了偵測新的主要流行 CRF，不僅需持續監控全球病毒之基因變異及各地盛行之病毒株，且亦需製備診斷試驗所需之參考試劑或參考標準品，利用共標研究來驗證主要流行之 CRF，如此可將全球盛行率高之主要 CRF 納入，用以擴大目前 WHO 的 HIV-1 CRF 標準品套組，因此，透過 HIV 例子，可以得知倘若病原體之基因具有高度變異性，對於診斷分析標準化而言，是一個不容忽視之挑戰！

(四) NGS 在診斷上之應用

據統計每年至少有 35 萬人死於 C 型肝炎相關肝病，至少有 100 萬人死於病毒性肝炎感染。然而，至今仍未開發出有效預防之疫苗，因此，C 型肝炎對於健康危害是各國家衛生單位關注之議題。C 型肝炎病毒為單股 RNA 病毒並具有脂質外套膜，因為中性演化(neutral evolution)、適應性突變(adaptive mutations)、病毒複製缺失及病毒重組等因素造成其基因多變性，目前已知 C 型肝炎病毒有 7 種基因

型及 67 種基因亞型，不同基因型具有高地域性差異，對於抗病毒藥物的感受性也不盡相同，而 C 型肝炎病毒在感染人體後，其病毒裡核酸分子 RNA 很容易發生轉錄錯誤而產生突變，使 C 型肝炎病毒有高達 80% 的比例發展成慢性感染。因此，了解 HCV 基因型在 C 型肝炎的診斷、治療上是相當重要的。

臨床上會先分析病人所帶有 C 型肝炎病毒之基因型以及抗病毒藥物耐受性試驗，再決定其治療方式，英國公共衛生部的 Dr. Tamyo 表示次世代定序技術應用於臨床分析 C 型肝炎病毒之基因型，是一個準確性較佳之方法。因此，能正確的診斷出病人患有哪一型的 C 型肝炎病毒，才能給予適當的治療方式。在臨床微生物實驗室中，次世代定序技術已逐漸取代傳統定序技術(Sanger 定序法)，且執行病毒株定序結果準確度(accurate)及精確度(precise)皆較高。

然而，在次世代定序技術的流程中，從檢體採集、基因萃取、樣本庫製備、樣本庫擴增、定序反應到最後的數據分析，中間有可能因為污染、樣本偏差、DNA 降解、定序發生錯誤等原因而使得結果產生錯誤，因此非常需要參考物質，用來作為每次上機或確效所需要之對照物質，Dr. Tamyo 表示該參考物質可以是病毒顆粒或 RNA，目前所需要之參考物質為：

- (1) 單一型別之參考對照物。
- (2) 以不同比例混合基因型或亞型之參考對照物。
- (3) 參物質含有不同之變異頻率(variant frequencies)之抗病毒基因標記。
- (4) 重組病毒之參考物質。
- (5) 已添加汙染物質(如：人類或病原菌來源)之參考物質。

NGS 應用於病毒診斷是具有較高的準確度及精確度，惟缺乏良好

NGS 專用之參考物質以滿足每次上機及確效試驗之需求，若可以發展出有效之參考標準品將有助於改善病毒 NGS 檢驗之風險管理及品質控制，如此亦可使得病毒診斷定序技術更加符合現實需求。

四、定點照護檢驗

(一) 定點照護檢驗(Point-of-care testing, POCT)之特點

定點照護檢驗是體外診斷檢驗之一，係指在採樣後於病患旁或採樣現場利用可攜式分析儀器或套組快速得到檢驗結果的方法。有別於傳統方式須於採樣後送至檢驗室進行檢驗，並且等待數時或數日後方能獲得檢驗結果，而定點照護檢驗不受時間及地點之侷限，醫護人員可快速獲得檢驗結果並且盡速執行適當醫療處置，提升了病患之醫療服務品質。依照不同之檢驗原理及方法區分為臨床檢驗、生物化學檢驗、免疫學檢驗、微生物檢驗、核酸與分子檢驗等。

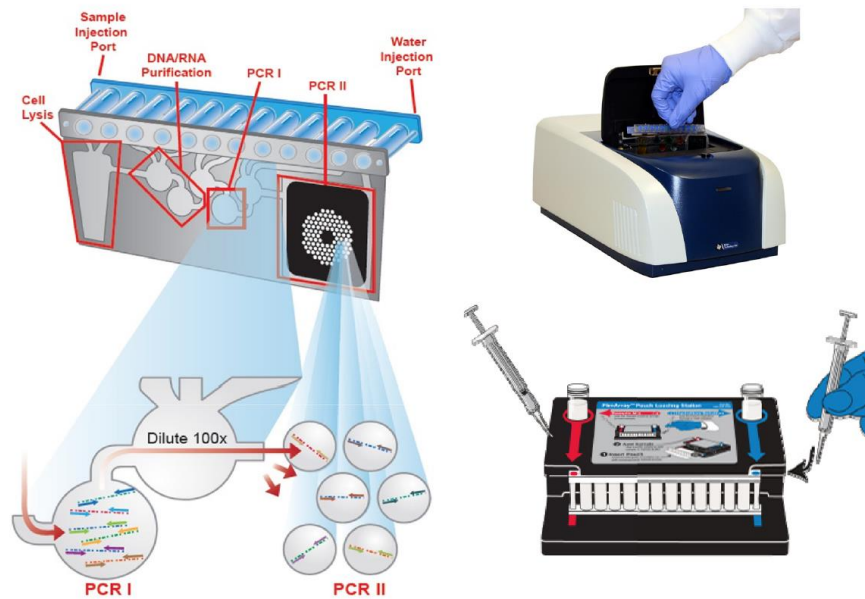
(二) 定點照護檢驗應用於呼吸道病原菌之偵測

呼吸道感染常常導致發病及死亡，急性的呼吸道疾病中常偵測到病毒感染，而流感病毒所造成的季節性流行亦導致大規模住院治療，嚴重者甚至使免疫力較弱之年長者死亡，每 10 萬人約有 5-20 個成人因流感住院治療；而老人則是每 10 萬人高達 1,200 人因流感住院治療。雖然每年世界衛生組織會預測流行之病毒株，各疫苗廠依此製造出當年度之流感病毒疫苗，但由於流感病毒易突變且型別種類多，往往疫苗並無法完全阻斷流感病毒之侵襲。因此，呼吸道感染病患之預後往往取決於臨床上醫療處置，而僅僅以類流感症狀(influenza-like illness syndrome, ILI)作為判斷依據是不夠的，需仰賴實驗室檢驗結果協助判斷。目前呼吸道病毒檢測之黃金標準(gold

standard)係核酸擴增技術(PCR)，雖然具備高靈敏度(sensitivity)及特異性(specificity)，但檢驗報告時間(turnaround time, TAT)需至少 24 小時，且需要專業人員及相關之實驗室設備方能進行。由於傳統實驗室檢驗往往耗時費日，醫護人員獲得檢驗結果時早已錯過了黃金治療期，故快速檢驗試劑應運而生。

抗原之快速檢驗方法可透過病原菌之抗原進而偵測流感病毒及其他呼吸道病原菌，然其成人檢測之靈敏度僅約 50%，而近年發展核酸之快速檢驗，如 FilmArray Respiratory Panel 則僅需操作 2 分鐘，便可於 1 小時左右獲得檢驗結果(圖九)，此快速檢驗方法利用 nested real-time PCR 方式偵測 20 種病原菌，病毒包含 A 型流感病毒(Influenza A: untyped, A/H1, A/H1-2009, A/H3)、B 型流感病毒(Influenza B)、腺病毒(Adenovirus)、冠狀病毒(Coronaviruses:HKU1, NL63, 229E, OC43)、人類間質肺炎病毒(Human Metapneumovirus)、人鼻病毒(Human Rhinovirus)、人腸道病毒(Human Enterovirus)、副流行性感冒病毒(Parainfluenza:types 1, 2,3, 4)及呼吸道融合病毒(Respiratory Syncytial Virus)；細菌包含百日咳桿菌(*Bordetella pertussis*)，肺炎披衣菌(*Chlamydophila pneumoniae*)及肺炎黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*)。

The FilmArray Pouch



圖九、FilmArray Respiratory Panel 之示意圖

(資料來源：Rand KH, et al. *J Clin Microbiol.*, 2011)

英國南安普敦大學(University of Southampton)的 Dr. Tristan Clark 提及許多文獻指出，核酸擴增之快速檢驗(rapid nucleic acid amplification tests, NAATs)有許多優勢，不僅增加了流感病毒偵測率，亦改善了抗病毒藥物之使用，並且降低不必要之抗生素使用等。Dr. Tristan Clark 在 2014-2016 年間的兩個冬季執行了一個開放式隨機對照臨床試驗，受試者隨機分配到 POCT 組(360 人)，收集其鼻腔及咽喉檢體，以 FilmArray Respiratory Panel 執行定點照護檢驗；另有受試者隨機分配到控制組(354 人)，以臨床常規醫療流程給予抗生素及抗病毒藥物，檢驗方式則是以傳統實驗室進行 PCR。此臨床試驗結果顯示，核酸偵測之快速檢驗應用於臨床呼吸道病毒感染，並沒有降低病患使用抗生素的比例，但 POCT 組別之病患使用抗生素的劑量較單一且使用時間較短，此外，POCT 組別病患不僅住院天數減少，且在檢驗報告時間、流感病毒之偵測及抗病毒藥物之使用皆有所改善。

(三) 定點照護檢驗之挑戰

診斷之檢驗數據可用於疾病之預防、治療及監控等，因此診斷之檢驗數據必須是慎重的、可比較的且不因執行檢驗實驗室之不同、檢驗系統之不同(如 POCT 與傳統診斷方法)及操作人員不同而有所差異。定點照護檢驗固然擁有許多優勢，可改善醫療照護品質，然而仍有許多重要觀點值得大家探討，除了定點照護檢驗之操作人員之訓練、專業能力以及在高壓臨床環境之操作風險等，檢驗品質管制之監控及確效之執行亦不容忽視

肆、心得與建議

- 一、 本次研習可得知現階段各個國際標準品發展狀況，預計建立之國際標準品包含腸病毒核酸標準品、登革熱抗體血清標準品、流感病毒 A 型及 B 型之核酸標準品及第 6 代 HCV 核酸國際標準品等，並且也可知悉各個標準品之製備現況，了解國際標準品之發展趨勢以及生物性標準品製備之重點，供本署體外診斷試劑產品品質檢驗相關業務參考。
- 二、 今年度本署參與由英國 NIBSC 主辦之第 6 代 HCV 核酸國際標準品共同標定研究，研習中講者向大家說明共同標定研究初步結果，而本署參與標定結果均落於主要分布族群，其結果相當良好。除了獲知標定結果分析外，講者亦說明未來 6 代 HCV 核酸國際標準品之製備流程，以及預定執行之時程，因此參加國際標準品共同標定研究不僅可以增加國際間之經驗交流，提升本署國際能見度，有助於穩健雙方實質合作關係，更能提升我國分子診斷技術之實戰經驗。
- 三、 由於本署持續派員參與 SoGAT，因此可觀察到國際生物性標準品整個發展脈絡，為因應新興分子診斷技術之發展，國際專家學者以不同層面去剖析診斷分析標準化在未來所面臨之挑戰，如：參考標準品之互通性、新興檢驗技術之萃取方法效率對於結果分析之影響、病原菌基因變異性對於分析標準化之挑戰，以及 NGS 之診斷分析方法未來之實際需求。生物科技發展日新月異，隨著分子診斷技術不斷推陳出新，生物性標準品之發展亦與時俱進，我國需持續注意相關發展，掌握相關標準品建立之資訊，以應用於我國診斷技術之需求，促進診斷技術平台之優化。
- 四、 dPCR 跟 NGS 是目前極具發展潛力之新興分子診斷技術之一，雖然與傳統方法相比，這些新興分子診斷技術具有絕對定量、高準確度、高精確等優勢，

然而技術操作過程中的偏差及錯誤仍需要具有公信力之國際標準品來確保良好之品質管制，以期優化分子診斷技術，因此診斷分析標準化是眾所期盼之需求，而我國亦須密切注意其未來之發展。

五、 **SoGAT** 研習不僅是生物性標準品極具代表性之國際會議，且與會人員皆是各國官方實驗室及相關領域專家，參與該國際研討論不僅可建立溝通管道，亦藉此邀請各國官方實驗室(包括英國、美國、德國及日本等國)參與本署病毒核酸標準品之共同標定研究，而各國官方實驗室之參與可提升我國標準品之公信力及能見度。待本署所建立之標準品完成共同標定研究，該核酸國家標準品不僅可供作本署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之用，亦可供業界分子診斷試劑研發控管用，因此，本署國家標準品之建立將有利於我國生物技術產業之發展，並且達到與國際接軌之目的。

伍、 附件



與英國 NIBSC Dr. Jacqueline Fryer(左圖)及 Dr. Kevin Markey(右圖)合影



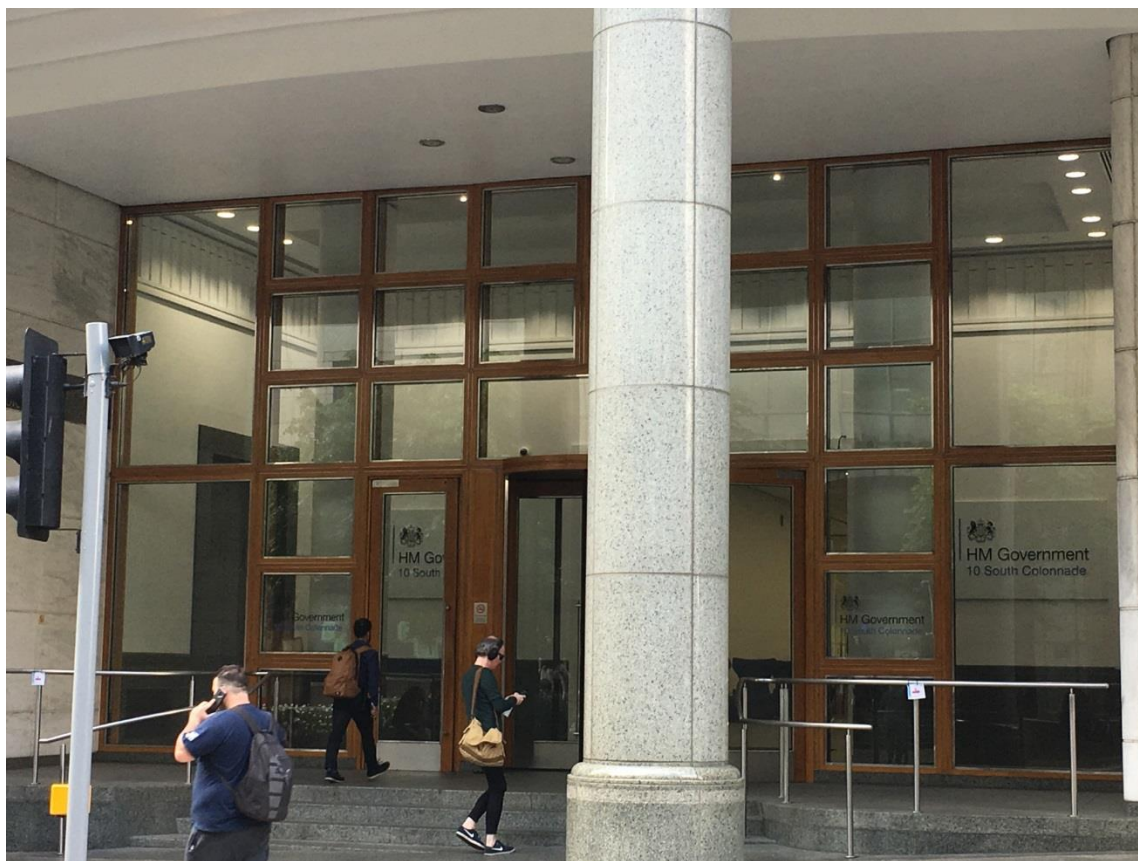
與英國 NIBSC 退休顧問 Dr. John Saldanha(左圖)及
德國 PEI Dr. Micha Nübling(右圖)合影



與美國 FDA Dr. Indira K. Hewlett(左圖)及
英國 PHE Dr. Tamyo Mbisa(右圖)合影



與英國 PHE Dr. Li Jin (左 2)及日本 NIID 百瀨暖佳博士(右 1)
於 MHRA 研習地點附近之 cabot square 廣場合影



研習地點 MHRA 大樓一樓景況