

出國報告（出國類別：開會）

參與第四屆次世代定序偵測人類與
動物用生物製劑之外來病毒應用會議
**(4th Conference on Next Generation
Sequencing for Adventitious Virus Detection
in Biologics for Humans and Animal)**

服務機關：疾病管制署

姓名職稱：林欣毅助理研究員

派赴國家/地區：德國法蘭克福

出國期間：113 年 12 月 1 日至 12 月 7 日

報告日期：114 年 2 月 11 日

摘要

生物製劑標準化國際聯盟(International Alliance for Biological Standardization, IABS)主辦第四屆次世代定序偵測人類與動物用生物製劑之外來病毒應用會議，113 年 12 月於德國法蘭克福舉辦，為期 3 日探討次世代定序技術用於病毒偵測目前發展狀況及法規面實務探討。首日主要為次世代定序工作坊，介紹次世代定序的各項步驟；第 2~3 日為正式研討會，先從國際組織及現行規範強調次世代定序的趨勢，再進一步由來自於政府部門或是生技公司的研究單位，分享最新的研究及發展結果，並提出可能碰到的問題，於現場和與會人員討論。

透過此次會議，得知國際間對於生物製劑病毒監測以次世代定序取代傳統細胞或動物試驗之趨勢，對於本署之抗蛇毒血漿檢驗項目與規格及委託產製抗蛇毒血清之品管檢驗方式有極大的參考價值，有助於規劃次世代定序技術應用於偵測血漿中病毒汙染，以期能提升產製之品質。

目次

壹、目的	4
貳、過程	5
一、行程	5
二、會議內容	5
(一) IABS	5
(二) 會議發展沿革	6
(三) 生物製劑的病毒污染管控	8
(四) 次世代定序介紹	9
(五) 次世代定序偵測外來病毒程序	10
(六) 次世代定序偵測外來病毒最新觀點	17
(七) 次世代定序確效及參考材料	19
(八) 次世代定序應用	20
(九) 世代定序偵測病毒最佳化策略	21
參、心得與建議	24

壹、 目的

偵測生物製劑之外來病毒為近年來生物製劑品質管理的趨勢，本署負責生產抗蛇毒血漿及委託國家衛生研究院產製抗蛇毒血清凍晶注射劑，血漿原物料病毒檢測有待建立，而抗蛇血清產製過程中病毒清除能力有評估報告，惟隨著製程及檢測技術的發展，可於適當時機，再次評估產製過程清除病毒能力。國際人用藥品技術要求協調委員會生物製劑病毒安全性法規指南文件 ICH Q5A(R2)，於 2023 年 11 月正式將次世代定序(NGS)納入病毒檢測的方法。

本次參與之第四屆次世代定序偵測人類與動物用生物製劑之外來病毒應用會議，除了因應 ICH Q5A(R2)文件改版進行討論外，同時也探討關於 NGS 用於生物製劑裡外來病毒偵測的現況，並對現今存在的挑戰提出可能的解決方向；正式會議的前一天也舉辦 NGS 工作坊，讓參與人員了解 NGS 的原理及執行方式，並且初步了解到如何用 NGS 偵測生物製劑裡的外來病毒之策略。

藉由此次會議，解了 NGS 的運作方法及用於病毒偵測的實務參考，並用以評估以新興生物技術執行針對血漿原物料之病毒檢測、測試抗蛇毒血清生物製劑製程中病毒清除能力及 NGS 偵測外來病毒之可行性，以利產製品質之提升。

貳、 過程

一、 行程

12月1~2日	啟程
12月3日	參加次世代定序偵測人類與動物用生物製劑之外來病毒工作坊
12月4日	參加第四屆次世代定序偵測人類與動物用生物製劑之外來病毒應用會議 <ul style="list-style-type: none">● 使用次世代定序執行外來病毒測試之最新觀點● 次世代定序之確效及參考材料
12月5日	參加第四屆次世代定序偵測人類與動物用生物製劑之外來病毒應用會議 <ul style="list-style-type: none">● 次世代定序應用● 次世代定序偵測病毒最佳化策略及後續訊號判讀
12月6~7日	返程

二、 會議內容

(一) IABS

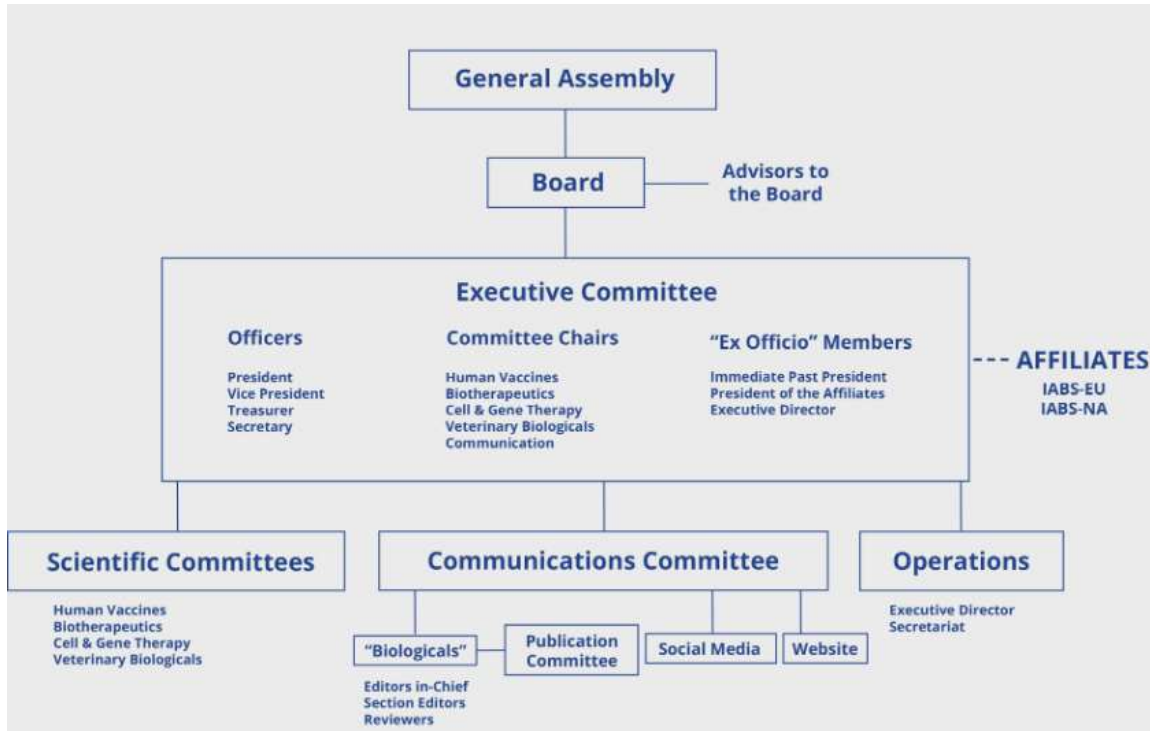
IABS 全名 International Alliance for Biological Standardization，生物製劑標準化國際聯盟，是一個總部位於瑞士日內瓦的獨立且非營利性的學術性聯盟，目前為止已超過 50 個會員國。該組織 1955 年於法國里昂成立，其中心主旨為提供可以讓科學家們討論如何提升生物製劑品質與調整的論壇。

IABS 目前的主要任務包括：

- 舉辦與發現、發展、產製及調整用於人類及動物健康的生物製劑相關之研討會及工作坊，並促進溝通及發展共識。
- 促進以實證為基礎的科學方法為標準，以促進及確保生物製劑產品的品質及安全性。
- 透過 IABS 出版之期刊「Biologicals」，分享科學進展及創新的調整方法。

IABS 舉辦之研討會包括以下領域：人用疫苗、細胞與基因治療、生物治療(即蛋白質為基礎導向的治療方式)及用於動物的生物製劑。

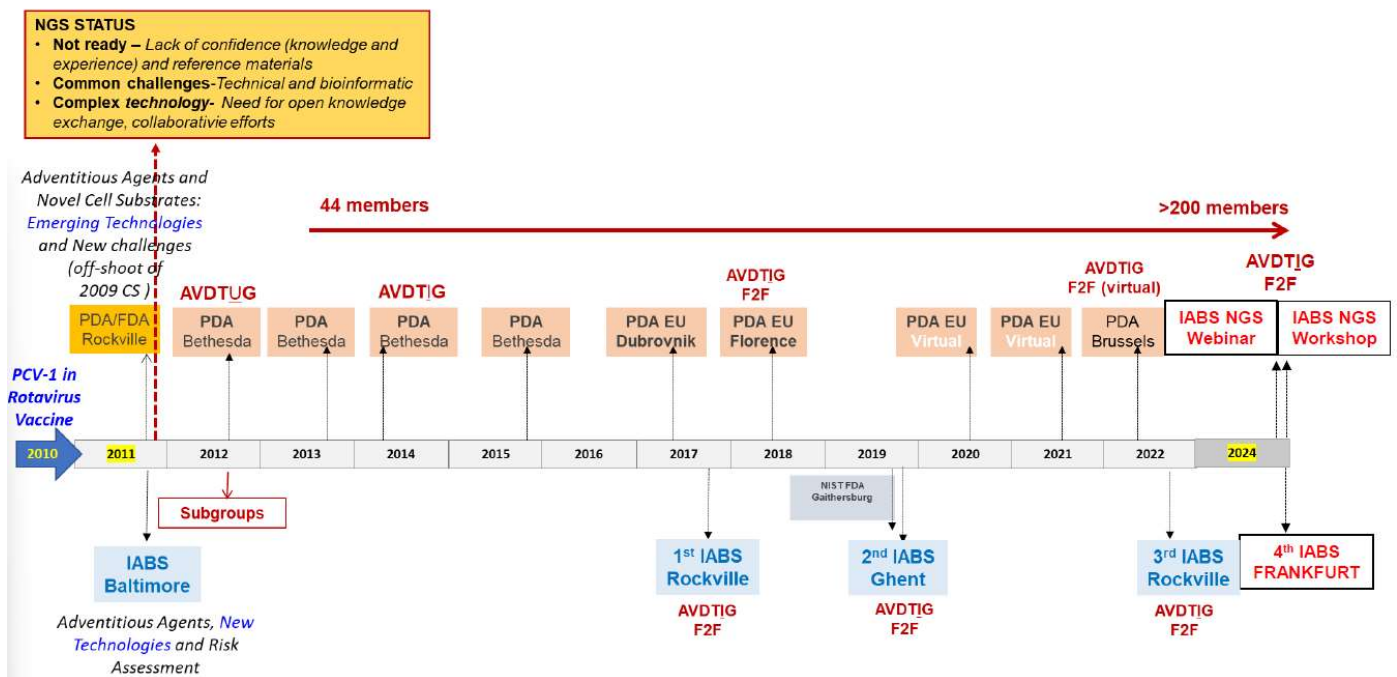
該組織之架構圖如下：



資料來源：IABS 官方網站(www.iabs.org)

(二) 會議發展沿革

次世代定序偵測人類與動物用生物製劑之外來病毒應用會議(Conference on Next Generation Sequencing for Adventitious Virus Detection in Biologics for Humans and Animal)的發展沿革參考下圖：



資料來源：IABS 會議資料

自 2010 年發現輪狀病毒疫苗(Rotavirus Vaccine) Rotarix 受到豬圓環病毒第一型(Porcine circovirus, PCV-1)污染後，對於生物製劑裡的外來病毒監測便開始成為其中一項迫切需要發展的技術，早在 2011 年 IABS 於美國馬里蘭州的巴爾的摩便舉辦關於生物製劑中外來污染的新偵測技術與風險評估會議(Adventitious Agents, New Technologies and Risk Assessment)，雖然當時有提出以次世代定序(Next Generation Sequencing, NGS)，但囿於缺乏實證，也缺少參考材料，以及關於技術和生物資訊學的發展限制，再加上當時 NGS 技術需要更多的知識交流及合作，並無法直接運用。

2012 年，美國無菌製劑總會成立相關的研究小組，並持續在 NGS 用於偵測生物製劑中外來病毒污染之技術研究。

直到 2017 年，IABS 於美國馬里蘭州洛科威爾舉辦第一屆次世代定序偵測人類與動物用生物製劑之外來病毒應用會議，當時便有 126 人次來自 14 個不同國家參與。當時 NGS 用於動物用生物製劑之外來病原偵測已有一定之經驗，故該次會議主軸，主要探討 NGS 用於人用疫苗上之可行性，與會者提出有些條件仍須精進或是有些必要需求，包括標準參考試劑、完整註解的資料庫、大數據儲存及移轉容量、精簡可遵循的 NGS 策略及技巧、專業人員(尤其是生物資訊領域的專家)及協調化的生物製劑檢測及生產所用試劑之國際法規。

2019 年，於比利時根特大學舉辦第二屆會議，來自 16 國共 124 人與會，並預計每隔兩年輪流於美國及歐洲舉辦會議。會議主要目的為匯集產業界、學術界、技術商及國際監管機構，以不同角度討論以 NGS 偵測外來病毒之現行情況。生物製劑廠引入 NGS 偵測外來病毒時，最大的問題會是驗證程序，故此屆也將 NGS 技術之驗證納入討論內容，並且對於標準化及生物資訊在生物製劑之應用的安全性及特徵做評估討論，同時也就檢測之「可讀性(Readiness)」(即偵測訊號之判斷)取得共識。該次提出了許多議題，包括「取代 PCR」、「取代 *in vivo* 動物實驗」、「取代 *in vitro* 細胞試驗」、「真陽性與偽陽性之辨識」、「NGS 的監測與適用指導原則」、「以 NGS 監測病毒的風險評估」，並且因為 NGS 技術進展快速，鼓勵更多的國際交流及公開討論，甚至可以分享參考材料。但由於缺乏標準及資料庫，以當年度來說，將 NGS 納入強制性監管要求還為時過早，但最後仍鼓勵未來以 NGS 納入國際準則為目標繼續精進與發展技術和管理系統。

受到疫情影響，第三屆會議延至 2022 年舉辦，參與人員及國家皆有增加，來自 18 國共計 157 人次參與，舉辦地點與第一屆一樣，為洛科威爾。這屆的主軸為發展使用 NGS 的共識，由於當時有多家公司及監管機構在執行 NGS 技術方面，已有亮眼的發展，已經可以提供驗證方法與結果，甚至有發表出版物，且轉錄體學資料的存在支持 NGS 可能能夠取代 *in vivo* 試驗，但不同的 NGS 方法有些利害上的考量，且標準病毒的建立也是當時的當務之急，這使的不同地區對 NGS 是否正式列入檢驗方法尚未達成共識。對於 NGS 可能應用於檢測，該年度會議最後提出雖然有機會驗出過去沒驗出的訊號，甚至需要後續調查，但這項工具是能讓製造商對其產品的病毒安全負責，不應該透過未來制定法規才開始實施這項技術用於病毒監測之檢驗。

本屆為第四屆，首次於德國法蘭克福舉辦會議，人數增加至 170 人，來自 26 個國家。

本次會議的主軸，除了 12/3 舉辦的 NGS 工作坊，提供此項技術的初學者相關知識及背景，12/4~12/5 的正式會議包括以下面向之討論：

- NGS 用於偵測生物製劑中外來病毒之最新科學數據以評估產品之安全性。
- NGS 納入國際指引中的最新版本。
- 討論 NGS 用於業界及監測管理的現況。
- NGS 監測生物製劑中病毒的驗證之展望。

因為國際人用藥品技術要求協調委員會(ICH)生物製劑病毒安全性法規指南 Q5A(R2) 於 2023 年 11 月發布最新版本，其中有下列事項：

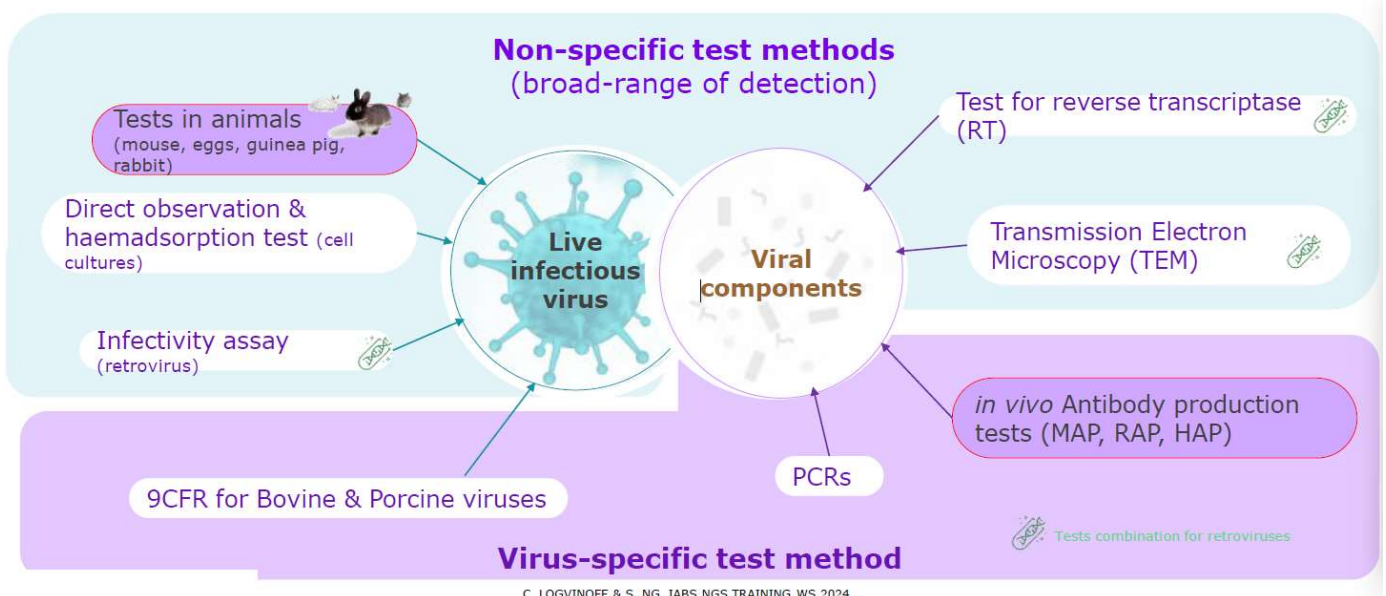
- 易於清除病毒的新形態產品類型(包括基因工程病毒載體及其衍生產品)。
- 最新的測試分析方法(特別舉出 NGS)。
- 生產方式(成熟的產業模式及連續生產)。
- 不同的病毒清楚驗證策略。

NGS 已被列入 ICH Q5A(R2)中，顯示對於生物製劑品管監控而言，該項技術的需求日益提高，且同時具有廣泛性及特異性的偵測優勢，在這次會議其中一項議題便是針對法規提出的內容作討論。

(三) 生物製劑的病毒汙染管控

生物製劑病毒汙染可能造成許多負面影響，包括：產品被汙染導致的疾病或傷害、藥品或疫苗短缺、生產廠房關閉，更甚至造成消費者的不信任等，所以在品管階段監測病毒汙染被規範於 ICH Q5A(R2)當中。

在 2010 年以前，「傳統」(相較於 NGS)的病毒檢測法包括非特異性及特異性病毒檢測，詳如下圖。



資料來源：IABS 會議資料

非特異性(及廣泛偵測)方法包括動物實驗、血球吸附試驗(細胞培養)及直接觀察、針對反轉錄病毒的感染性試驗等偵測具活性已感染細胞的病毒；或是透過偵測病毒成

分，包括反轉錄法、穿透式電子顯微鏡等方式觀察。特異性病毒檢測包括 9CFR 建議之偵測牛或豬的病毒方法、PCR 法及 *in vivo* 抗體生成測試(動物實驗)。

然而傳統的病毒偵測方式有其限制性，以非特異性檢測而言，無法直接提供何種病毒污染的資訊，且動物實驗牽涉到實驗動物本身的狀況，會有檢測上面的不確定性；特異性檢測方法僅能針對特定病毒作檢測，PCR 也需要得知病毒序列，但如果有些病毒有分株及型別，又更需要仰賴序列的設計。尤其近代針對動物實驗強調 3R 原則，取代動物實驗的方法更是近期在各項學術會議中廣泛討論的議題。

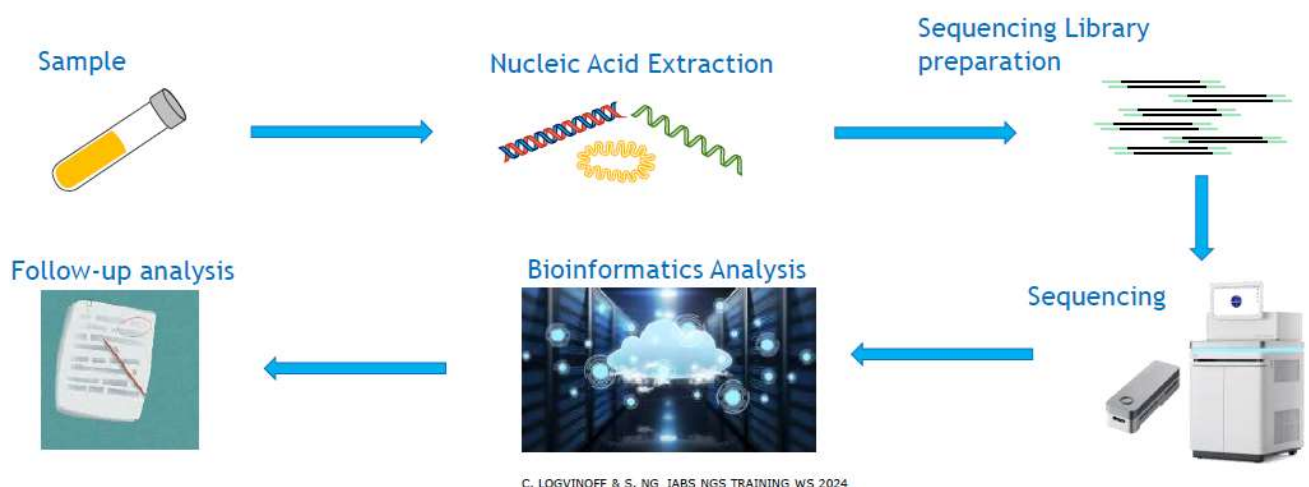
又因為 2010 年發生的輪狀病毒疫苗(Rotavirus Vaccine) Rotarix 受到豬圓環病毒第一型(Porcine circovirus, PCV-1)污染事件，對於生物製劑(尤其是人用疫苗)的病毒監測方式，有迫切更新的必要性，於是 NGS 便成為了一個具有潛力的偵測方式。

NGS 的可能優勢是：不需要事先知道是哪種病毒污染，可直接透過對樣本進行核酸定序，以辨識已知及未知的外來病毒；相較於其他方法，NGS 提供更高的病毒偵測靈敏度；相較於 *in vivo* 試驗，NGS 可以更短時間內執行且獲得結果。

(四) 次世代定序介紹

DNA 定序技術最早從 1970 年代，康乃爾大學吳瑞博士的團隊發展開始，利用互補的序列引子(primer)及以放射性同位素標記的核苷酸(nucleotide)執行，接著便開始逐漸發展，直到英國分子生物學家 Fred Sanger 發展出運用螢光標記及終止互補序列合成過程的核苷酸的定序法(Sanger 法)，以達到快速且全自動化的定序作業，也因為 Sanger 法的進展，美國衛生研究院於 1990 年正式啟動人類基因體定序計畫，但人類基因體序列資訊龐大，前後花費共 13 年才終於將序列確認，使的 Sanger 法的實用性備受考驗，而且除了耗材以外，也花費極大的成本，於是次世代定序(NGS)便開始發展。NGS 是一種 DNA 定序技術，較 Sanger 定序法，速度更快且成本能大幅降低。NGS 現為基因體學的主流工具，並持續再精進，可用於各領域，以此次的會議，便是探討運用 NGS 偵測生物製劑中，是否有受到外來病毒之污染。

NGS 是一種能夠對生物檢體的核酸萃取物進行定序並偵測可能病毒污染的技術，大致上流程如下圖：



C. LOGVINOFF & S. NG IABS NGS TRAINING WS 2024

資料來源：IABS 會議資料

執行 NGS，首先要取得樣品，並將樣品中的核酸萃取出來，接著進行定序樣本庫的製備後，送入定序儀進行定序，定序完成的結果經過生物資訊學的分析後，再將分析的結果作後續判定。

(五) 次世代定序偵測外來病毒

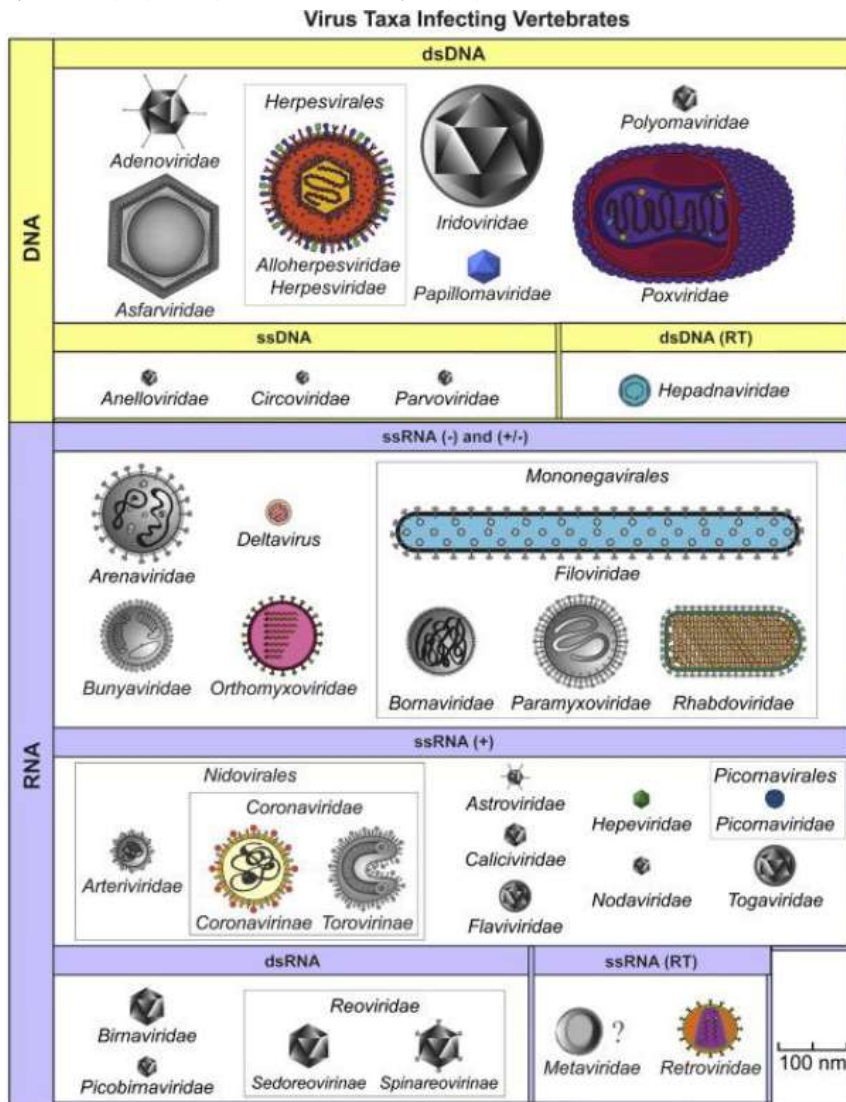
1. 定序樣品庫製備前處理

(1) 準備樣品

病毒會因其生理及基因體組成方式而有不同特性，如下表：

分類	特性
基因體核酸	ssDNA, dsDNA, ssRNA, dsRNA
基因體結構	線形、環形、分段
基因體大小	約 3kb~超過 300kb
病毒衣殼	20 面體或螺旋形
病毒套膜	有套膜或無套膜

依不同特性將病毒分類，可參考下圖：



資料來源：IABS 會議資料

因病毒有許多種變異，在樣品製備上，如果能最完整回收所有形式的核酸，將會使誤差大幅度降低，另外愈高品質的 dsDNA 或 RNA 將會使定序樣品庫品質提升，也會讓後續定序數據更為一致及可信。而不同的 NGS 方法則須考量不同的收集標的，如病毒體學需考量病毒顆粒裡的核酸、基因體學需要考量所有的核酸都要收集到、轉錄體學則主要針對病毒轉錄體的偵測。另外因應下游分析流程，在樣品準備時也有其他需要注意的地方，例如是否將 DNA 及 RNA 分開或是合在一起、不同的儀器可以定序的核酸長度不同、因應生物資訊分析考量而準備樣品等等。

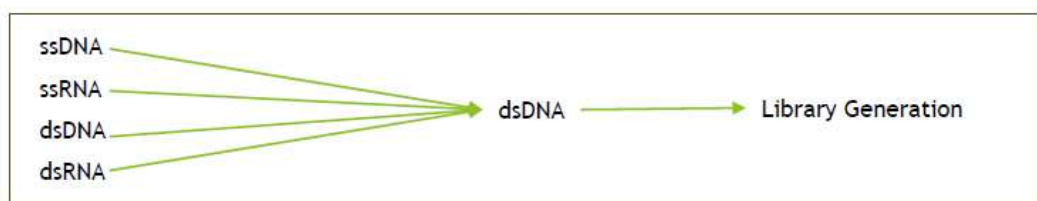
(2) 核酸萃取

- a. 矽膠膜法(Silica Membrane)：例如 QIAamp MinElute Virus Spin Procedure。可以回收到非常高純度的核酸，適用於 DNA、RNA 及總核酸。
- b. 磁珠萃取法(Bead-based Extraction)：例如 Maxwell RSC Instruments 發展之總核酸萃取法及 Monarch Mag Viral DNA/RNA Extraction Kit。
- c. 沉澱法(Precipitation-based Extraction)：包括 Phenol-Chloroform extraction 及 Ethanol Precipitation for DNA 兩步驟。

(3) 放大病毒訊號：放大病毒訊號對於 NGS 是相當重要的步驟，否則有可能被宿主細胞的序列影響判讀。放大的技術包括：

- a. 核酸酶處理(Nuclease Treatment)：移除宿主細胞的游離核酸，可用 DNase(如 DNase I)及 RNase(如 RNase A)等核酸酶。
- b. 核糖體消耗(Ribosomal Depletion)：移除宿主細胞的核糖體(例如 NEBNext rRNA Depletion Kit)。
- c. 離心(Centrifugation)：先利用低轉數(<700g)去除細胞碎片，超高轉數離心則可以濃縮病毒顆粒。離心轉數及時間可以區分不同的病毒顆粒及回收率。
- d. 過濾(Filtration)：利用膜或 Tangential Flow Filtration 皆能去除細胞碎片及回收不同類型的病毒。

(4) 轉變成 dsDNA 及放大完整基因體：任何形式的病毒基因體需要轉變成 dsDNA 以建立樣品庫，如下圖：



資料來源：IABS 會議資料

基因體轉變成 dsDNA 後，會比較穩定且不容易降解，轉變完畢再進行放大，以建立樣本庫，但不建議使用 Oligo dT 將 mRNA 反轉錄成 DNA(牽涉到病毒基因體的序列型式)。dsDNA 放大方式包括：

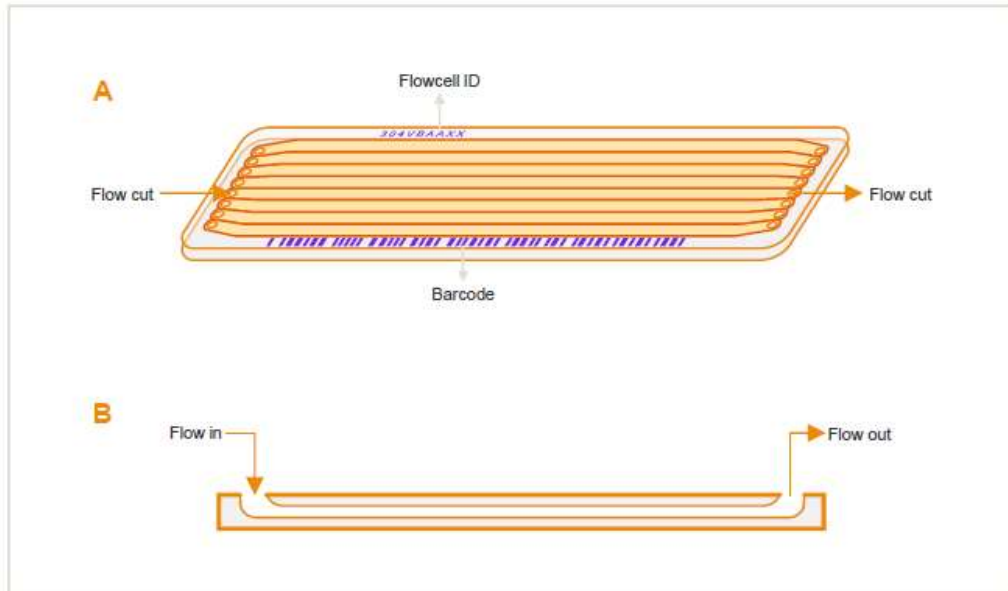
- a. 運用 PCR 放大：如 Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR。
- b. 等溫放大法：如 Multiple Displacement Amplification、Rolling Circle

Amplification。

c. 其他。

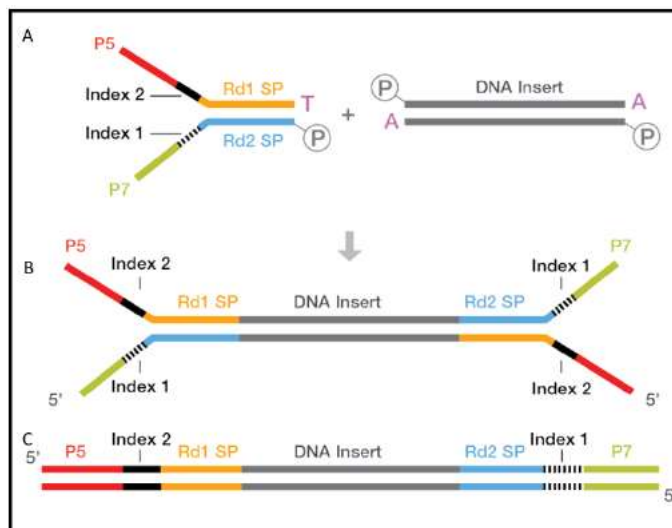
2. 樣品庫建立及定序：當樣品基因體準備完成後，因應不同的定序技術，建立樣品庫的方式會有不同。

(1) Illumina：僅需 ng~ μ g 的 DNA 樣品即可操作。樣品製備方式為「Flow Cell」技術，核酸可被 Illumina Sequencer 偵測。Flow Cell 製備方式簡圖如下：



資料來源：Illumina 提供給予 IABS 會議資料

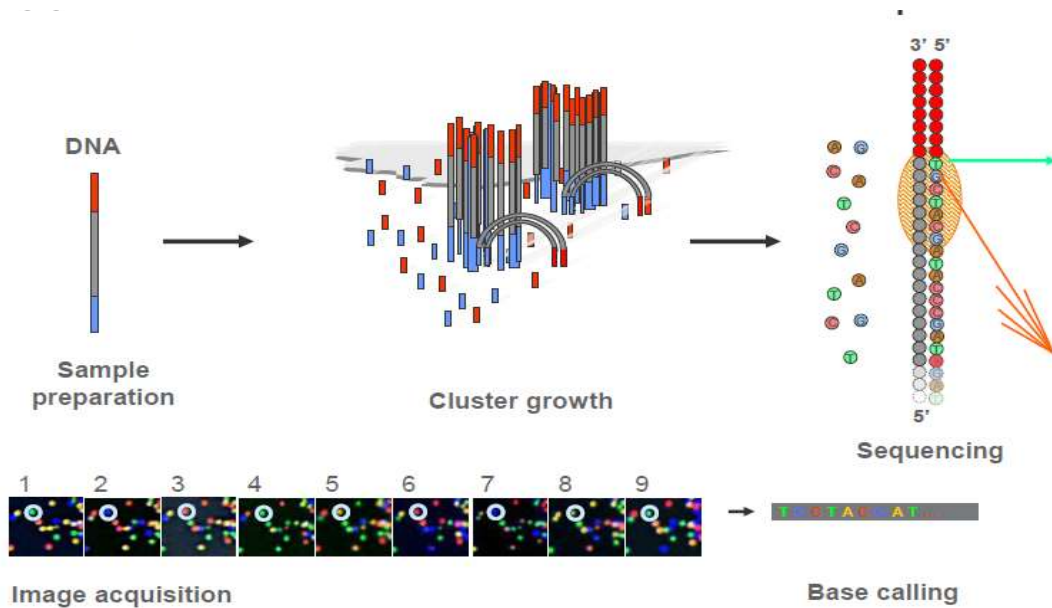
接著放大核酸並建立樣品庫，主要技術是在定序先標上特定 barcode，並在 dsDNA 頭尾都接上 adapters，以利辨識樣品，放大方式如下圖。



資料來源：Illumina 網站

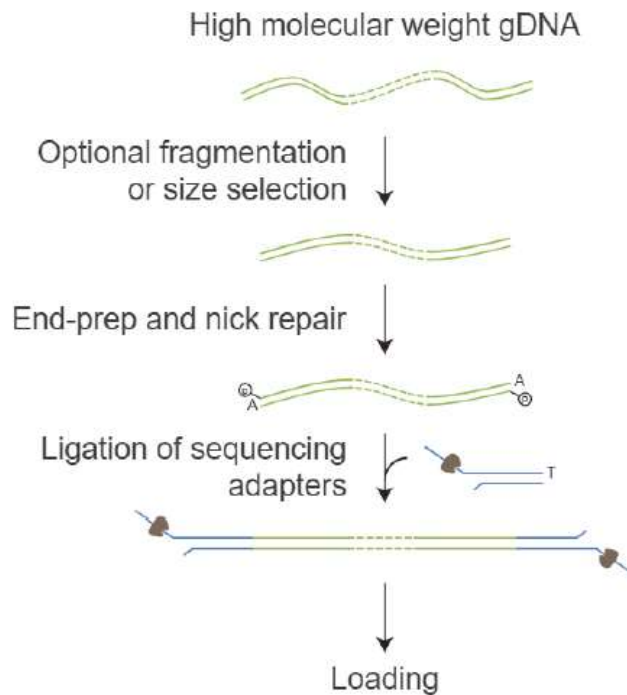
https://knowledge.illumina.com/library-preparation/general/library-preparation-general-reference_material-list/000003874

定序方式主要是將不同的核酸標示不一樣的顏色，偵測這些色彩訊號後，使用 DRAGEN 系統分析。



資料來源：Illumina 提供給予 IABS 會議資料

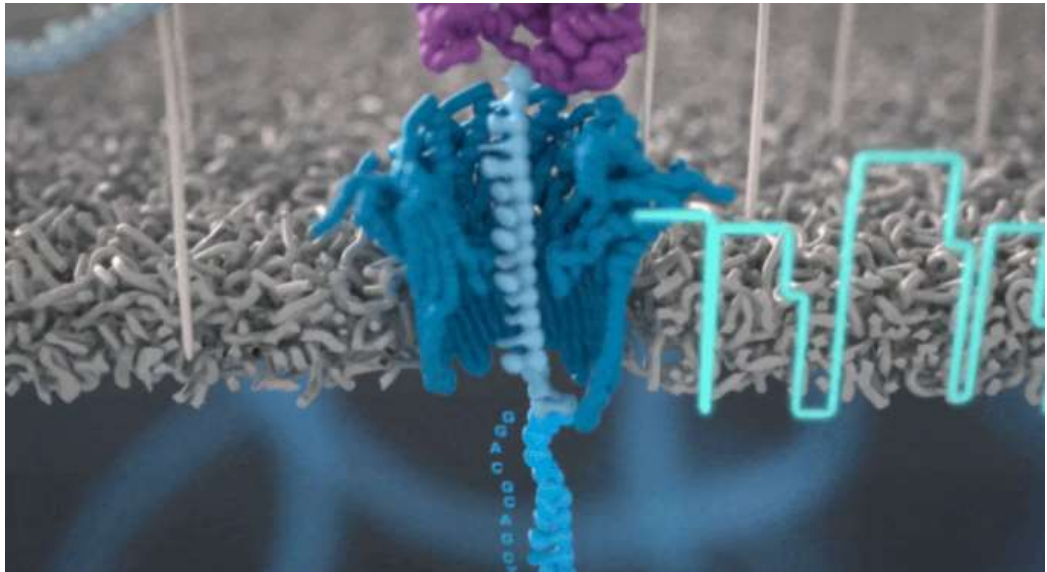
(2) Nanopore：由 Oxford 發展，所需的 DNA 含量僅需 100ng。將 DNA 切成片段後，讓 DNA 經過膜孔而產生的電訊號，不同的核酸的電訊號也不同，將這些訊號分析後，即可獲得定序結果，其定序的速率較高。詳如下圖：



資料來源：Nanopore 網站

(<https://nanoporetech.com/document/chemistry-technical-document>)

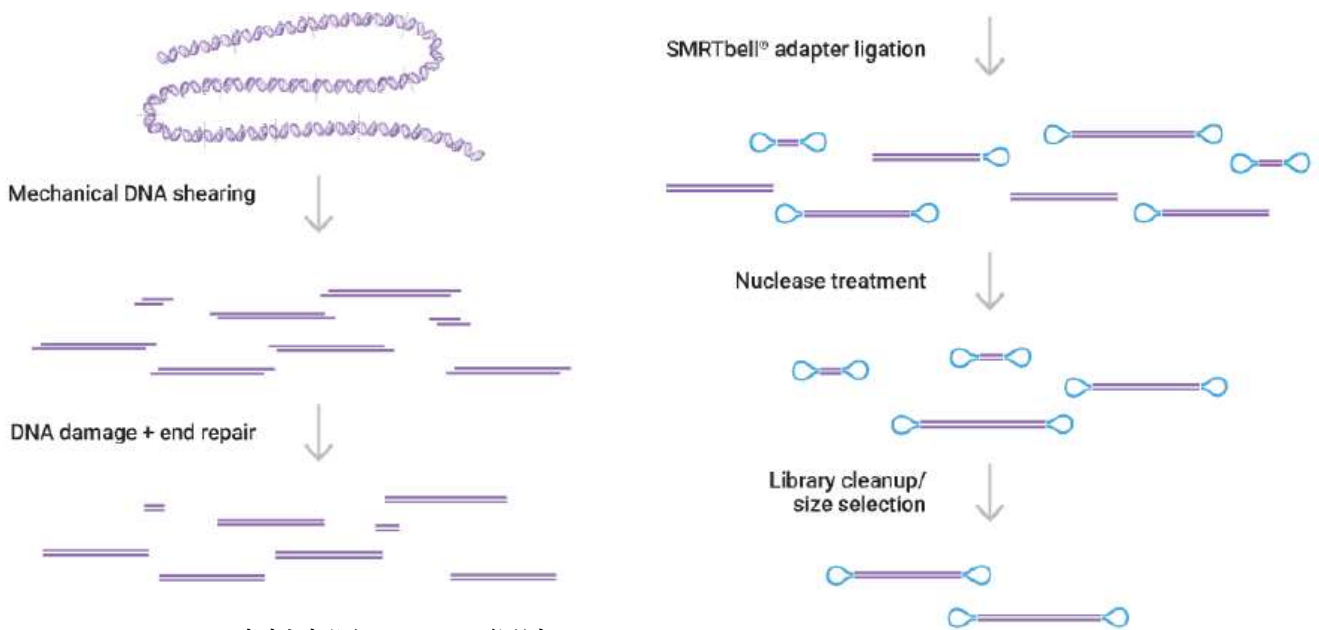
下圖為官網提供之核酸序列經過膜孔產生電訊號的示意圖：



資料來源：Nanopore 網站

(<https://nanoporetech.com/platform/technology/basecalling>)

- (3) PacBio：需要 1~2 μ g 的 DNA 樣品，但可以定序較長片段(甚至在步驟中，小片段需要先移除)。主要技術為 SMRT(Single Molecule, Real-Time sequencing)，在樣品製備到樣品庫階段，會以形成 SMRTbell 結構(將 dsDNA 片段頭尾接上上特殊片段，最終在定序時能成為環型構造的模板)，以利後續進行 CCS(circular consensus sequencing)，SMRTbell 合成方式詳如下圖：

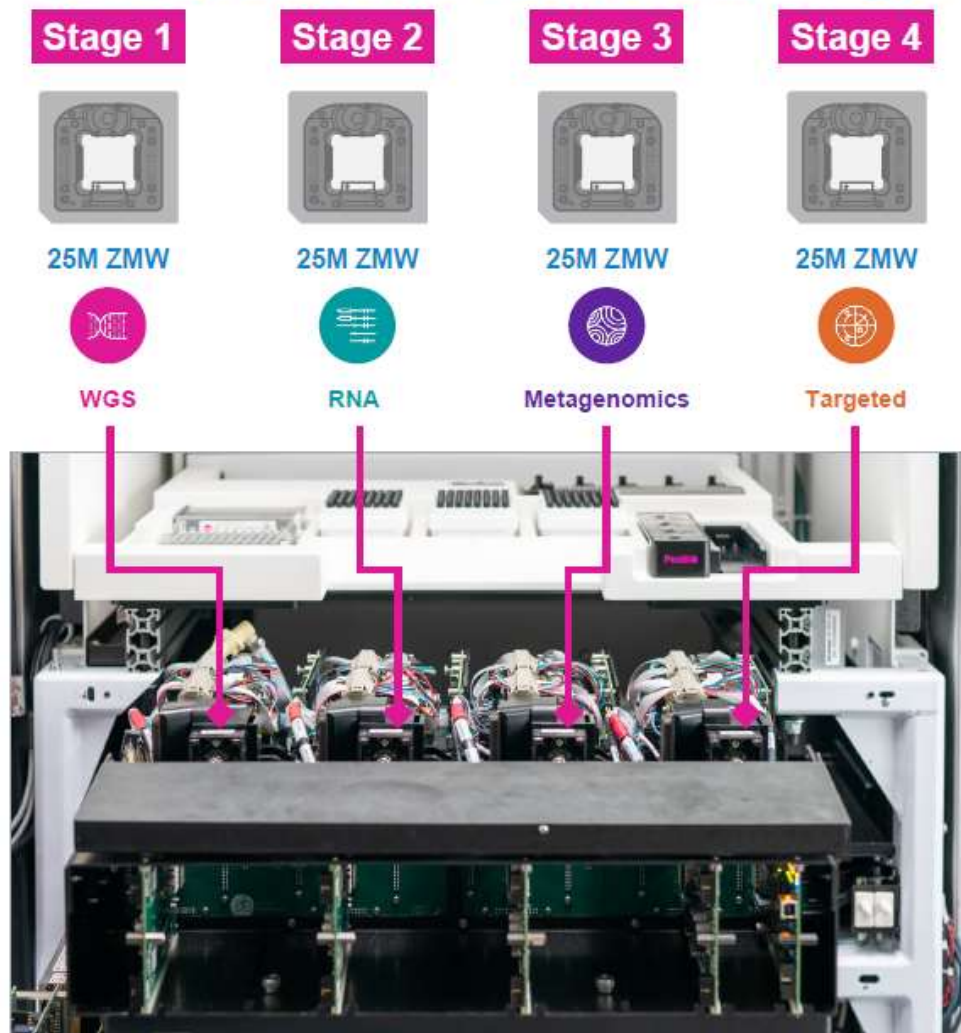


資料來源：PacBio 網站

(<https://www.pacb.com/products-and-services/applications/whole-genome-sequencing/>)

PacBio 搭配 Revio System 甚至能平行處理 4 個不同的定序階段，不斷能加快分析效率，也可以負荷更龐大的序列資訊量，如下圖所示：

Revio system uses 4 independent stages

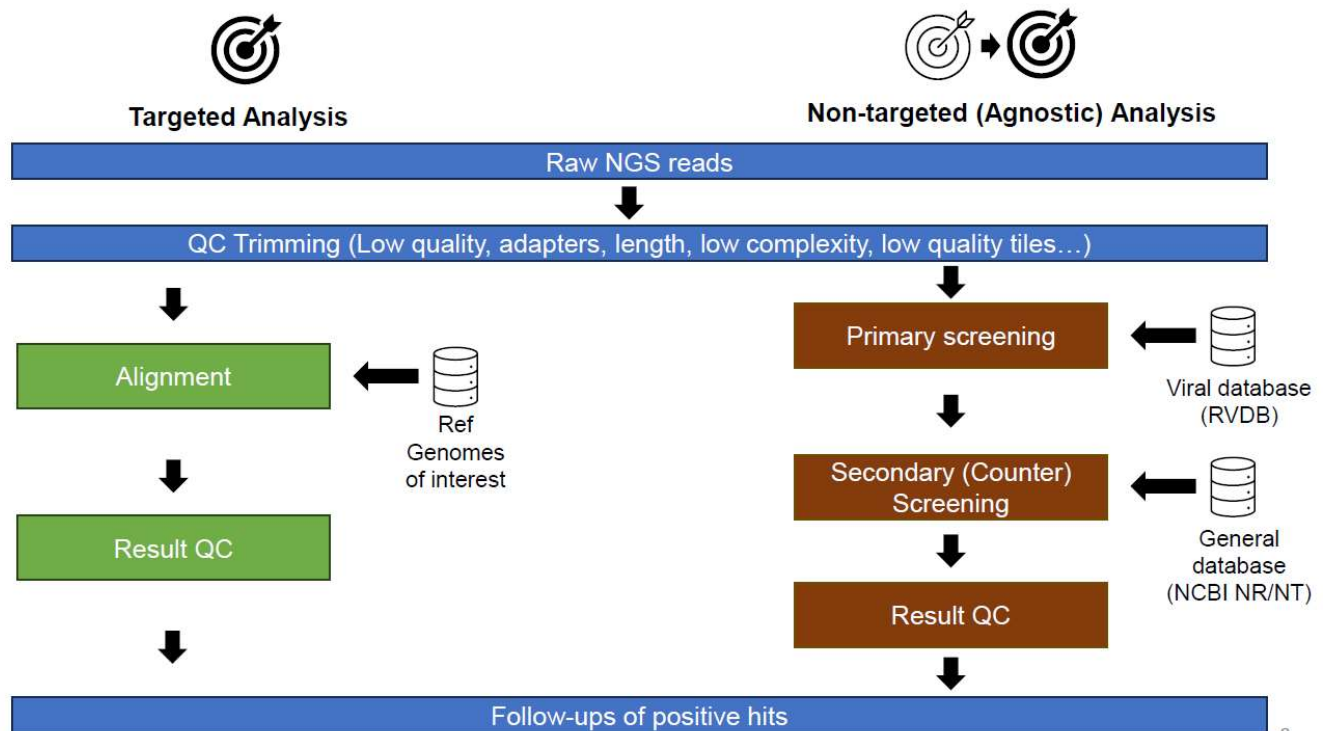


資料來源：PacBio 提供給予 IABS 會議資料

3. 生物資訊分析：通常是最缺乏專業人員的步驟，但定序的結果卻是極度仰賴生物資訊才能獲得的。定序分析有兩種策略：
 - (1) 目標導向分析：通常用於已知要找尋的目標，於監測病毒而言，最適合用於分析是否生物製劑裡含有「已知病毒」，進而可以取代傳統的病毒特異性 PCR 分析。優點是比起傳統以及非目標導向分析，監測到已知病毒的效率非常高，而分析所需要耗費的時間及資源也比較少；缺點是限制性較高，僅能依靠已知的參考基因體去比對。
 - (2) 非目標導向分析(即「未知分析」)：如果不確定要尋找的目標是什麼，非目標導向分析會是主要的策略，進而可以取代傳統以 *in vivo* 的方式監測是否有未知病原體在生物製劑中。優點是可以廣泛性地將所有病毒都分析出來，但同

時需要極度大量的電腦運算就變成其缺點，同時也是當缺乏專業人員時，可能無法達成非目標導向分析方式。

不同分析策略的比較詳如下圖，目標導向與非目標導向最大的不同點，在於目標導向在分析過程中，僅需要有特定的參考基因體序列，然而非目標導向除了兩次掃描以外，第一次的參考基因體虛列是透過 RVDB 的資料庫以搜索所有可能的病毒序列，第二次則是更廣泛的去比對所有資料庫，尤其是利用 NCBI 的資訊：



資料來源：IABS 會議資料

講者提供以下網路資源，提供與會者可以用於執行分析作業：

線上分析平台：

- Galaxy <https://usegalaxy.org/>
- Chan Zuckerberg ID <https://czid.org/>

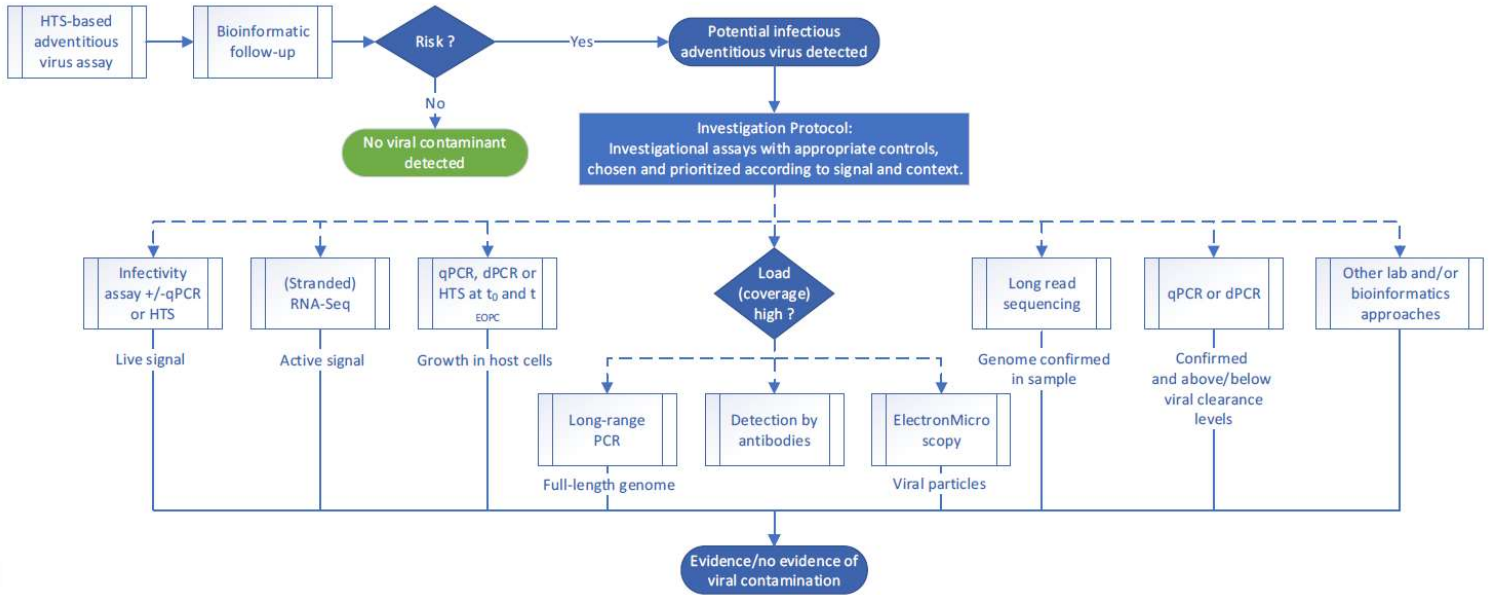
工具：

- Qiagen CLC Genomics Workbench <https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-clc-genomics-workbench/>
- Geneious <https://www.geneious.com/>
- DNANexus <https://www.dnanexus.com/use-cases/genomic-anal>
- GATK <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>
- UGENE <https://ugene.net/>

資料庫：

- NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Reference Virus Database (RVDB) <https://rvdb.dbi.udel.edu/home>

4. 後續分析：以高通量外源性病毒偵測為例，在生物資訊定序分析完畢後，後續的分析策略依照不同狀況而有不同策略。首先是風險，當定序分析完成後，沒有偵測病毒污染，代表樣品無風險，但當有可能的病毒訊號時，代表具有風險產生，有要進一步的後續分析，以確認訊號的真實性，最後才能確認是否有病毒污染。後續分析的實驗室流程如下圖：



資料來源：IABS 會議資料

整體而言，NGS 偵測外來病毒的技術及策略，需要依照特定的樣本型式而選擇最適合的做法。

(六) 次世代定序偵測外來病毒最新觀點

1. ICH Q5A(R2)：ICH Q5A(R2)於 2024 年 6 月 14 日公告實施最新版本，其中有 4 項重點：
 - (1) 執行病毒清除適用於新型態的生物製劑(包括基因工程的病毒載體及其衍生物)。
 - (2) 納入最新且有效的分析方法，其中最重要的例子就是 NGS。
 - (3) 製程：包括已經成熟的工業製程以及新興的連續製程。
 - (4) 選擇性的病毒清除驗證策略，包括已知的資訊。

其中 NGS 用於生技產品是明確寫進文件中的技術，對於生技產業而言，品管試驗面臨巨大革新，但在 GMP 的範疇下，確效驗證仍然是不可或缺的步驟，與傳統病毒偵測試驗之比較於近期開始會有許多不同的討論。當動物試驗減量的概念為主流時，NGS 極具取代 *in vivo* 測試之潛力，並輔助或取代 *in vitro* 測試，也是這場會議的主軸。而 ICH Q5A(R2)甚至明確指出 *in vivo* 測試的限制性高，靈敏度

也不具有優勢，特別鼓勵以 NGS 取代傳統 *in vivo* 試驗。

2. EDQM：歐洲藥品品質與衛生保健局(The European Directorate For The Quality Of Medicines & Healthcare；EDQM)為歐盟理事會下的單位，也負責歐洲藥典的編撰。歐洲藥典提及 NGS 的章節包括 5.2.3 細胞物質測試(包括外來物質試驗)、2.6.16 病毒接種的外來物質測試及 5.2.14 取代 *in vivo* 試驗的概念，這些章節都提到使用高通量定序為廣泛性分子偵測方法，去偵測病毒等的外源性物質，但這些章節並沒有特別提到確效方法。關於 NGS 將編撰於章節 2.6.41 高通量定序以偵測病毒類外來物質，預計 2025 年更新完成，該章節下分 4 大段：
 - (1) 引言。
 - (2) 方法介紹：即介紹 NGS 的操作流程以及後續分析等內容。
 - (3) 驗證：此章節特別提到如何執行 NGS 的方法驗證，並提供 SpikingMaterial 的選擇策略，也提到產品特異性的驗證原則。
 - (4) 目標導向型高通量定序之介紹。
3. 美國食品藥物管理局(FDA)：成立 PDA-Advanced Virus Detection Technologies Interest Group(AVDTIG)致力於 NGS 標準化建立及用於生物製劑的病毒偵測；組織 Advanced Virus Detection Technologies Working Group(AVDTWG)，以發展及革新 NGS 技術及整合現有資訊和科研人才。AVDTWG subgroup C 其中一項工作是維持 RVDB 資料庫，該資料庫目前提供 Herpesvirus、Retrovirus、Paramyxovirus、Reovirus 及 Circovirus 序列做為比對參考。以目前在驗證執行上的觀點，關於 NGS 與傳統病毒檢測方式直接正面比較是沒有必要的。
4. 世界衛生組織(WHO)：WHO 在 2024 年 3 月於 79th ECBS 會議首次提及高通量定序用於生物製劑的病毒監測，並且進一步發表可提供 7 種病毒完整基因體序列做為參考比較，包括 hCoV、PCV1、REO、FeLV、EBV、RSV 及 MVM，並預期將於 TRS 978 Annex 3 及 TRS 993 Annex 2 等文件將高通量定序監測病毒的原則列入。另外依據 WHO 對其中 16 個會員國的調查，1/4 的成員國不願意將高通量定序作為取代傳統方法的方式去監測生物製劑中的病毒，不過同意的會員國中，也有些國家僅接受取代 *in vivo* 試驗或僅接受取代 *in vitro* 試驗，不接受的主要理由仍然是以缺乏實證及驗證方法不足為主，且可以用高通量定序監測的生物製劑，各國接受的品項也不一致，有些甚至只願意用於疫苗而已，所以未來 WHO 的努力方向，仍然需為 NGS 取代傳統監測方法之目標，規劃更完善的法規及各項指引。
5. CAACB：生物製劑的病毒污染在學界的研究，不一定能讓業界應用或者是得知相關資訊，為了補足這段落差，麻省理工學院於 2011 年成立 Consortium on Adventitious Agent Contamination in Biomanufacturing(CAACB)。該組織提到現行的病毒檢測有其限制性，有一定偽陰性的比例，這會造成生物製劑的安全風險，而 NGS 及 PCR 則是相對新的技術，有較高的靈敏度檢測出病毒污染，尤其 CAACB 的成員也從實證推估 NGS 將會是病毒監測最有利的工具，並提出必須要有新的方式去取代 *in vivo* 試驗監測病毒。
6. EFPIA：歐洲製藥工業協會聯合會(The European Federation of Pharmaceutical Industries

and Associations ; EFPIA)於 2019~2022 期間與 CAACB 及 AVDTIG 開會，對於 NGS 用於生物製劑病毒監測也提出立場書。EFPIA 支持 ICH Q5A 及歐洲藥典 2.6.41 章節，但對於 ICH Q2(R2)NGS 附則有些疑慮。EFPIA 對於 NGS 在偵測病毒的確效方式認為有其限制性及偵測極限，並對於取代傳統病毒偵測方法持保留看法。

(七) 次世代定序確效及參考材料

在這個部分，有六組廠商或學術代表發表相關確效內容及其技術介紹，並展示初步試驗的結果。

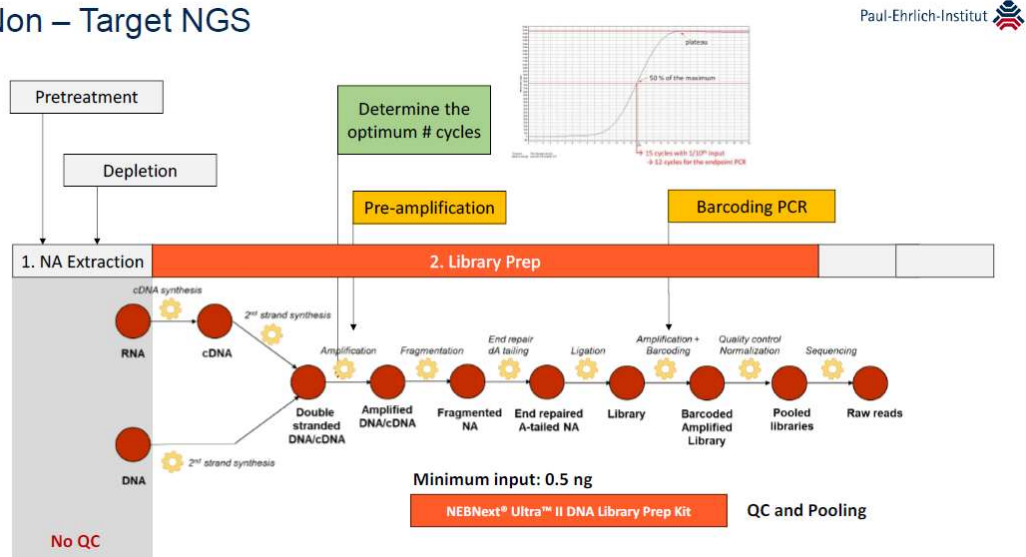
1. 細胞轉錄體學 NGS 取代傳統病毒檢測技術之確效作業：由 PathoQuest 發展，選取的試驗病毒包括牛與豬的病毒、鼠類的病毒及人類病毒數種，鼠類會用 CHO-K1 細胞、豬或牛則用 BT 細胞、人類則使用 HEK-293 作為載體細胞進行測試。最後展示偵測極限(0.1 RNA copy/cell)，而選取的病毒 100%都有被偵測到，並預期可用於細胞庫(Cell Bank)、細胞治療及重組蛋白測試等領域。
2. Matrix specific LOD determinations: 由 Millipore/Sigma 執行該項偵測極限驗證研究。選取的細胞庫包括 CHO、人類細胞、Vero 及 SF9，也選取非細胞庫的細胞，如昆蟲細胞，並引入 Benzonase endonuclease 測試對偵測極限的影響。
3. 對於低複雜度背景下長片段定序偵測病毒的評估：由 Merck 執行該項研究，該研究團隊隸屬於 AVDTWG Spiking study 4。長片段定序的方式為 Nanopore，並與 AVDTWG Spiking study 2B 執行之以 Illumina 做短片段定序比較。當前成果為測試出讀取總長度 8K 至 14M(依實驗室不同而有差異)，平均讀取長度在 581~3,345 bp 之間。除了可以分析線形的病毒基因體外，環形基因體也可分析。
4. 完整比較 NGS、*in vivo* 試驗及 *in vitro* 試驗之病毒偵測能力：由跨公司及政府部門團隊執行(PC3.1- 305 project team)。研究用的病毒為 RSV 及 REO，樣品為 CHO cell，但已知 NGS 可以偵測到非預期於 *in vivo* 試驗或 *in vitro* 試驗可偵測到的病毒(如 PCV-1、EBV、FeLV)。比較的技術包括 28 天的細胞培養試(*in vitro*)、乳鼠、成鼠及雞胚蛋之 *in vivo* 試驗、NGS(短片段定序)及 ddPCR。目前結果為：NGS 依據不同實驗室靈敏度不同，但兩種病毒都能驗，且與 ddPCR 有接近的靈敏度；*in vitro* 試驗使用不同的細胞株皆能偵測到 REO，但對於 RSV 反應則有不同，但整體而言相較於 NGS，*in vitro* 試驗偵測的靈敏度較高；*in vivo* 試驗目前尚無結論。
5. 完善 RVDB 資料庫：RVDB 作為病毒基因體參考來源，目前仍有急需擴大的功能需要完善。目前該項作業主要由美國 FDA 主導。目前較完整的基因體資料庫中，NCBI 雖然主要病毒的完整基因體，但大部分未完全定序的病毒仍然只有片段序列登載，且還有物種限制，故開始啟動 RVDB 的建置。建置 RVDB 仍然主要依靠 NGS 及相關技術，去排除大部分非病毒物質，而可以偵測真正的病毒訊號。RVDB 發展至今已有 U-RVDB fasta file、C-RVDB fasta file、SQLite DB Script 及 Proteic RVDB 等工具，並於 2024 年 7 月釋出 RVDB Version 29.0，網站為 <https://rvdb.dbi.udel.edu> 及 <https://rvdb-prot.pasteur.fr>。
6. 用於流感疫苗 Flumist / Fluenz 之 NGS 確效：由 AstraZeneca 執行該項研究。目前該團隊的驗證方式為 Generic Validation + Spiking Study，並期許可以取代 *in vivo* 動

物試驗。在 Spiking Study 初步適用性試驗結果為可以偵測到指定之病毒。

(八) 次世代定序應用

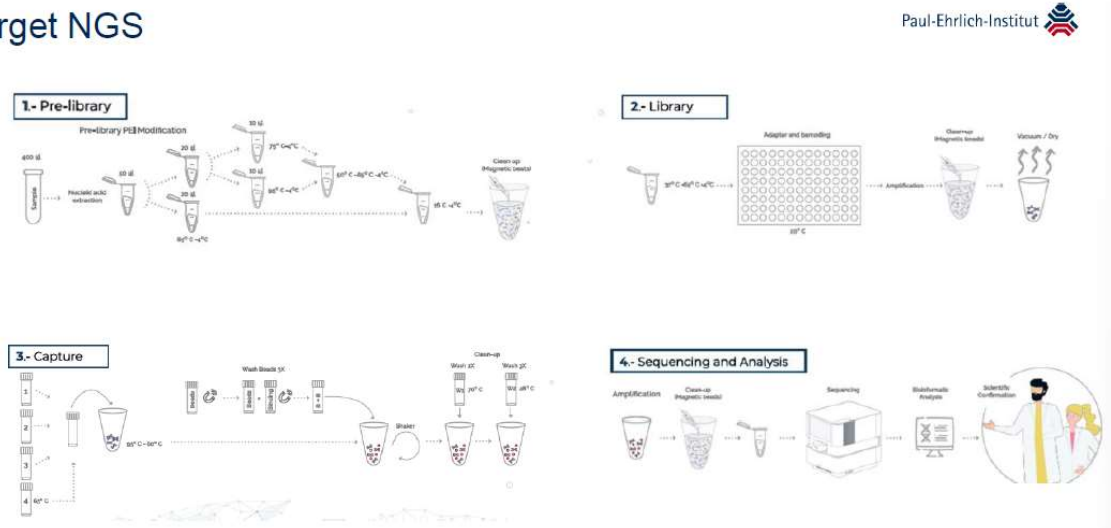
1. 比較非目標導向及廣泛性導向之 NGS 偵測病毒：由 Paul-Ehrlich-Institut 研究人員報告該項工作目前近況。由於不可能有無偏差的定序方式，該團隊試圖比較兩種策略分析導向之 NGS 對於偵測病毒之能力，使用的樣品為血液，預期是較適合用於抗蛇毒血漿製程品管的技術。下兩圖為兩種策略的流程比較：

Non – Target NGS



非目標導向 NGS 流程。資料來源：IABS 會議資料

Target NGS

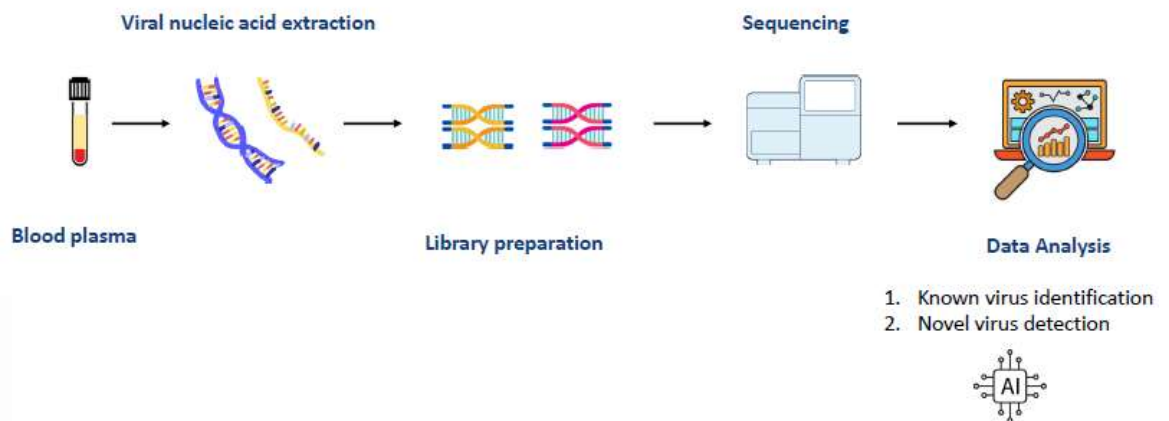


目標導向 NGS 流程。資料來源：IABS 會議資料

兩種導向皆以 Illumina Nextseq 2000 執行定序，差異在非目標導向樣品庫以 NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina 製備，反轉錄過程較快且只需調整一次反應溫度，而目標導向以 Library Preparation EF 2.0 with Enzymatic

Fragmentation and Twist Universal Adapter System 製備，反轉錄過程較久且步驟較繁雜，目前初步尚無明確之結論。另外該團隊有同步進行的是蒐集中南美洲臨床血液樣本來執行測試，有部分定序結果已經完成。

2. 賽諾菲發展之高通量定序用於疫苗品管：賽諾菲公司也於此次會議提供關於 NGS 用於疫苗內病毒汙染偵測之初步結果。該公司現行使用細胞庫及病毒接種執行病毒偵測，目前正在研究以高通量定序取代傳統檢測方式。目前賽諾菲發表之文獻提出能夠支持高通量定序取代 *in vivo* 試驗檢測到病毒的證明，使用的系統也為 Illumina。目前仍然在進行確效作業。
3. BLOODVIR：由 Paul-Ehrlich-Institut 正在發展的系統，主要以 NGS 及 AI 監測未知病毒，該系統流程圖如下：

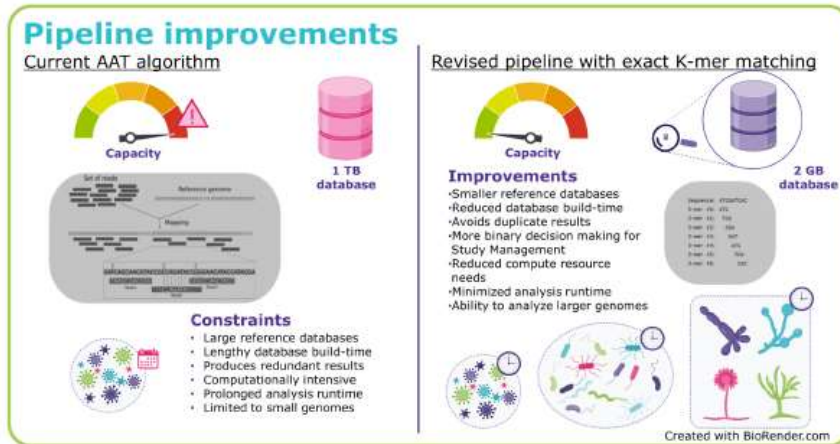


資料來源：Paul-Ehrlich-Institut 提供 IABS 會議資料

該系統特主要由 Snakemake 為生物資訊分析系統執行後續分析，並且可以訓練 AI 執行分析並解讀出非預期性的病毒訊號，相較於 RVDB 可能忽略掉的資訊，BLOODVIR 更能偵測到未知病毒訊號。目前仍然在試驗階段。

(九) 次世代定序偵測病毒最佳化策略

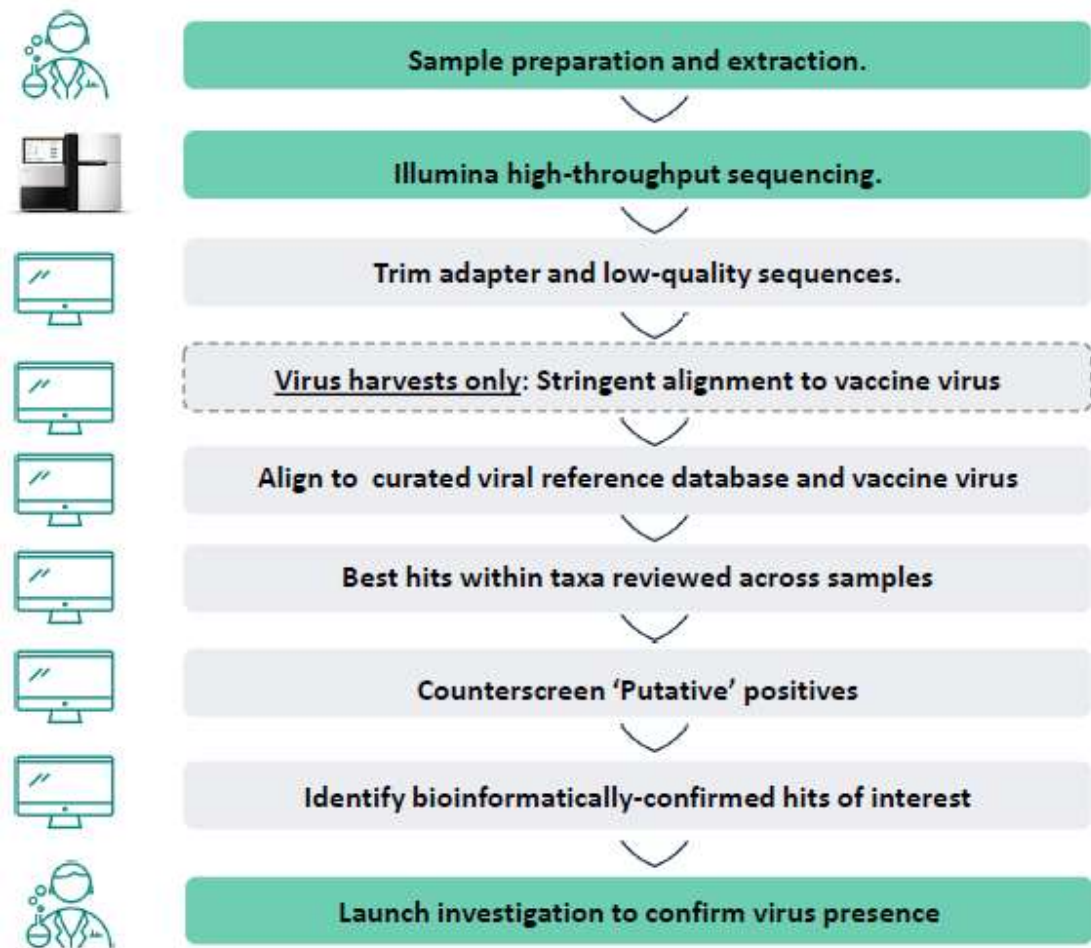
1. Metagenomics Next Generation Sequencing(mNGS)：由 Merck/Millipore 研究人員報告發展工作目前近況。Merck/Millipore 預計於 2025 年開始啟動以 mNGS 執行定序，系統為 Illumia NextSeq2000，相較於上一代 Illumia MiSeq，平均每次讀取的效率，從 25M 提升至 400M，運用特殊的 K-mer 執行作業，使檔案大小大幅降低。優化前後比較如下圖：



資料來源：Merck/Millipore 提供 IABS 會議資料

除了定序效率提高以外，更可以以更短的序列就區分出不同科的病毒，靈敏度也更為提升。目前也繼續累積更多數據以證明其優化的效果。

2. Viral metagenomic analysis(VMA)：由 MSD 公司開發，測試活病毒疫苗裡的外來病毒污染，使用系統為 Illumina short reads，並搭配 HIVE 及 ViruScreen 執行生物資訊分析，並可以開發用以符合 GMP 規範。主要流程如下圖：



資料來源：MSD 提供 IABS 會議資料

3. 優化生物資訊分析：由賽諾菲研究人員報告此項議題。以賽諾菲開發而言，目前優化的系統為 PhyloID，直到現在已經發展到 v2.1 版本。優化策略為使用 position-aware k-mer 尋找病毒或細菌訊號，更具專一性、靈敏度以及快速；擁有更完整的病毒資料庫且更能搜尋到不明顯的病毒訊號；更自動化且介面單純化等等。目前發展情形甚至可以偵測細菌及反轉錄病毒。但仍然有背景雜訊及假訊號等尚待解決的問題。

參、 心得及建議

將 NGS 運用於生物製劑品管檢驗為現今之趨勢，除了在病毒檢測上兼具廣泛性及專一性外，對於近期國際推廣動物實驗的減量而言，NGS 具有相當的潛力取代動物實驗。雖然 NGS 以現今的發展，仍有一些限制與挑戰，包括參考資料庫的缺乏、真假訊號的辨識、成本、生物資訊人才的缺乏等等問題，但 ICH Q5A(R2)已將 NGS 納入生物製劑病毒檢測的方法之一，顯示此方法已經具備成熟的條件，能夠提高生物製劑的品質及安全性。

生產生物製劑產品必須依循 GMP 規範，其中引進新的檢驗方法必須經過確效驗證，而 NGS 用於不同生物製劑產品檢驗之確效方式也是此次會議的其中一項議題，然而 NGS 與傳統的病毒檢測有著本質上的差異，兩者之間的比較仍然具有相當大的討論空間。

本次赴德國法蘭克福參與第四屆次世代定序偵測人類與動物用生物製劑之外來病毒應用會議，除了學習到最基礎的 NGS 檢測病毒方法外，也獲得許多國際大廠在此項技術中的經驗，以及未來如果要發展可能會遇到的問題。

鑒於本中心產製之抗蛇毒血漿預期以朝向原料藥的品質發展，同時從上游馬血漿採集、血漿原物料品質之把關，乃至於委託國衛院生產抗蛇毒血清凍晶注射劑之製程中病毒清除管控，建立 NGS 檢測病毒之技術是極具潛力發展的方向，在有充足之經費及充裕人力的前提下，建議先測試 NGS 用於抗蛇毒血漿病毒檢驗之可行性評估，同時也可以規劃使用 NGS 執行產製血漿之馬匹健康監測的技術建立。