

血液類病原標準品安定性試驗

林伯霖 彭怡瑄 鄧子華 許家銓 林美智 曾素香

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

高風險第三等級體外診斷醫療器材，除須於上市前進行查驗登記檢驗外，並須藉由不定期監測調查上市後產品，以確保品質效能。因應前述檢驗需求，衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)已建立病毒類核酸標準品共計27項，並自93年起對外供應HBV、HCV、B19以及SARS-CoV-2等體外診斷醫療器材品質管理用之抗血清或核酸標準品，協助促進國內生技產業之發展。

食藥署遵循WHO政策，以不設定標準品效期為原則，若標準品評估後不適用將下架，故為維持標準品之公信力，本年度優先挑選血液類病原之B19、HBV、HCV以及HIV-1等4類病毒核酸國家與工作標準品(10項已對外供應之國家/工作標準品、4項未對外供應之國家/工作標準品共14項)進行安定性評估，透過與國際標準品比對確認國家/標準品目前病毒核酸含量，並以t-test與原始病毒核酸含量進行統計分析。目前14項標準品已全數評估完畢，t-test之 p -value皆在0.05以上，無顯著差異，保存狀況良好可繼續使用。後續將持續監測國家/工作標準品病毒核酸含量，並針對濃度降低較快之標準品種類導入冷凍乾燥技術，強化我國生物性國家標準品之可信度，協助促進國內生技產業之發展，守護國人健康。

關鍵詞：國家標準品、安定性

前言

血液製劑係指將多袋人血漿混合、分餾精製或經收集免疫後之動物血清或血漿精製濃縮而得之治療性產品。其包括全血及血漿製劑、紅血球製劑、血小板製劑、凝血因子製劑、免疫球蛋白製劑等。由於血液製劑來源較為複雜，可能受到病毒的污染，其中包括人類免疫缺陷病毒(HIV)、B型肝炎病毒(HBV) C型肝炎病毒(HCV)，以及微小病毒B19型(Parvovirus B19)等。為此，在製造過程中採取了多種管控措施。首先，進行材料來源的篩檢，以確保捐

血者沒有攜帶可能的潛在病毒。其次，進行製程中的病毒篩檢，確保製程中沒有混入外來病毒。同時，製程中亦必須使用病毒去除或不活化的方法，例如加熱、過濾、使用化學藥劑等，進一步降低風險。透過上述綜合的風險管理，儘可能確保血液製劑的安全性。由於核酸擴增技術(Nucleic acid amplification technology, NAT)等分子診斷技術自1990年代逐漸普及，其具有高靈敏度、專一性且可直接偵測血液中病毒核酸等優點，能有效縮短檢測空窗期，大幅降低輸血感染機率，進而提高血液及血液製劑之安全性⁽²⁾。因此，WHO自1996年起於血液



篩檢中，將NAT法逐項納入病毒核酸篩檢。此外，歐盟亦規定自1997年7月起，對於血液製劑之混合血漿原料應以NAT檢測C型肝炎病毒之核酸，需為陰性方可放行。中華藥典亦規範血液製劑之人用血漿須以NAT檢測HIV、HBV以及HCV病毒核酸為陰性，且HAV與B19須在特定濃度以下才可做為原料血漿⁽³⁾。

實驗室在進行病毒NAT篩檢時，可能受到病毒的型別、基質的干擾以及檢測試劑的不同，其檢驗數據在實驗室間或方法間，可能會產生較大差異難以比較檢驗結果。因此一個具有公信力且通用之標準品至關重要，其可做為檢驗方法之標定、確效及量測系統的標準，進而彌平方法間的差異，增加試驗結果的可比性。為了因應NAT類診斷試劑的普及，WHO在1997年著手建立第一項用於NAT之血液類病毒國際標準品並陸續擴展血液類病毒標準品項目，且因病毒基因型之地理區域分布差異特性，WHO於2006年建議各區域與國家衛生主管機關以該國血源製備其國家標準品或血清組⁽¹⁾。衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)為血液製劑之品質管理機關，並有第三等級體外診斷試劑查驗登記檢驗之需求，且為配合「國血國用」政策，自2003年起陸續建立病毒核酸檢測技術與製備相關對照標準品，目前已建立之包含HBV、HCV、HIV-1以及SARS-CoV-2等病毒類核酸標準品，製備方式可分為傳統人類血漿製程以及細胞製程病毒類核酸標準品⁽⁴⁻⁸⁾。所有標準品皆經一系列的篩選確認基因型與核酸含量後進行分裝。接著參照國際標準品製備流程，並參考WHO國際共同標定(International collaborative studies)之方法，邀請美國、英國、德國、澳洲、日本、加拿大、奧地利及國內等專業領域頂尖之10多間官方實驗室進行共同標定，提升標準品之公信力，並賦予其國際單位。此外亦參考國際標準品安定性評估，依藥品安定性試驗基準等相關規範，及考量標準品依儲存條件不同的耐受性，模擬

標準品在運送及使用時可能的溫度環境，將標準品存放於-80°C、-20°C、4°C及24°C等四種不同溫度，在特定時間點評估其濃度變化，至少追蹤2年評估病毒類核酸標準品的安定性⁽⁹⁻¹⁰⁾。

食藥署遵循WHO標準品政策之精神，原則上不標示病毒類核酸標準品效期，所有病毒類核酸標準品自製備完成後每半年分析一次安定性，並且至少追蹤其安定性長達2年，此外病毒類核酸標準品皆存放於經驗證且隨時監控之-80°C超低溫冷凍設施。然而病毒類核酸標準品目標使用時間可能長達15年以上，且難以透過熱加速試驗以Arrhenius模型預測其降解速度⁽¹⁰⁻¹⁴⁾。為了確保其公信力，定期監控其核酸濃度變化顯得十分重要。本年度透過real-time PCR或real-time RT-PCR全面評估B19、HBV、HCV以及HIV-1等共14項標準品(10項已對外供應之國家/工作標準品、4項未對外供應之國家/工作標準品)之核酸含量，並以最新一代之國際標準品標定標準品目前核酸含量，將所得結果與該標準品共標數據進行統計分析評估標準品是否與標示含量具顯著差異。

材料與方法

一、材料與設備

(一)材料

1. 1st HCV genotype 1 RNA national standard for NAT assays (TFDA Lot: 93-09, 4.72 Log IU/mL, Taiwan)
2. 1st HCV genotype 1 RNA working reagent for NAT assays (TFDA Lot: 93-09W, 2.95 Log IU/mL, Taiwan)
3. HCV genotype 2 RNA national standard for NAT assays (TFDA Lot: 101-08, 5.15 Log IU/mL, Taiwan)
4. 2nd HCV genotype 1 RNA national standard for NAT assays (TFDA Lot: 105-



- 10, 5.15 Log IU/mL, Taiwan)
 5. 2nd HCV genotype 1 RNA working reagent for NAT assays (TFDA Lot: 105-10W, 3.23 Log IU/mL, Taiwan)
 6. Parvovirus B19 genotype 1 DNA national standard for NAT assays (TFDA Lot: 94-08, 6.28 Log IU/mL, Taiwan)
 7. Parvovirus B19 genotype 1 DNA working reagent for NAT assays (TFDA Lot: 94-08W, 4.30 Log IU/mL, Taiwan)
 8. 1st HBV genotype B DNA national standard for NAT assays (TFDA Lot: 92-08, 6.00 Log IU/mL, Taiwan)
 9. 1st HBV genotype B DNA working reagent for NAT assays (TFDA Lot: 92-08W, 3.00 Log IU/mL, Taiwan)
 10. 1st HBV genotype C DNA national standard for NAT assays (TFDA Lot: 103-08, 6.05 Log IU/mL, Taiwan)
 11. 1st HBV genotype C DNA working reagent for NAT assays (TFDA Lot: 103-08W, 3.10 Log IU/mL, Taiwan)
 12. 2nd HBV genotype B DNA national standard for NAT assays (TFDA Lot: 107-07, 6.09 Log IU/mL, Taiwan)
 13. 2nd HBV genotype B DNA working reagent for NAT assays (TFDA Lot: 107-07W, 3.16 Log IU/mL, Taiwan)
 14. HIV-1 RNA national standard for NAT assays (TFDA Lot: 98-11, 4.04 Log IU/mL, Taiwan)
 15. 6th WHO international standard for hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (NIBSC code 18/184, 5.41 Log IU/mL, UK)
 16. 3rd WHO international standard for parvovirus B19 for nucleic acid amplification techniques (NIBSC code 12/208, 6.15 Log IU/mL, UK)
 17. 4th WHO international standard for HBV DNA for nucleic acid amplification techniques (NIBSC code 10/266, 5.98 Log IU/mL, UK)
 18. 4th WHO international standard for HIV-1 RNA for nucleic acid amplification techniques (NIBSC code 16/194, 5.10 Log IU/mL, UK)
 19. EZ1 Virus mini kit v2.0 (Qiagen, Germany)
 20. RealStar HCV RT-PCR kit 2.0 (Altona, Germany)
 21. RealStar parvovirus B19 PCR kit 1.0 (Altona, Germany)
 22. Cobas HBV quantitative nucleic acid test for use on the 4800 system (Roche, Switzerland)
 23. Cobas HIV-1 nucleic acid test for use on the 4800 system (Roche, Switzerland)
 24. Cobas HBV/HCV/HIV-1 control kit for use on the 4800 system (Roche, Switzerland)
 25. DNase/RNase-free 1.5 mL微量離心管 (Axygen, USA)
 26. DNase/RNase-free filter tips (Axygen, USA)
- (二)設備
1. SAFZONE生物安全操作櫃(Class-II-A2, Yakos65, Taiwan)。
 2. 核糖核酸分析系統Qiagen EZ1 advanced XL (Qiagen, Germany)。
 3. 多功能基因核酸分析儀(Lightcycler 480 II, Roche, Switzerland)。
 4. Cobas 4800 System (Roche, Switzerland)。
 5. 操作台(造鑫, 台灣)。
 6. 微量吸管。

月旦知識庫

二、方法

本研究透過real-time PCR/real-time RT-PCR技術以自行開發方法或市售NAT套組全面評估B19、HBV、HCV以及HIV-1等共14項血液病毒標準品之核酸含量，詳細項目及使用之檢測試劑見表一。完整標定包含3次獨立試驗並以最新一代之國際標準品標定標準品目前濃度。試驗系統適用性與待測標準品皆須符合標準，則可評估標準品的濃度，將所得結果與該標準品原始標定數據進行統計分析評估標準品是否與標示含量具顯著差異。

(一)HCV與Parvovirus B19核酸標準品之安定性評估研究

1. 病毒核酸萃取方法

取EZ1 virus mini kit v2.0中之卡夾插入核糖核酸分析系統(Qiagen EZ1 advanced XL)之卡槽，開啟儀器匯入病毒核酸萃取程式。取適量之裂解反應試劑條置於

儀器內之加熱槽，並於後方圓孔處放入2 mL微量離心空管。另取適量1.5 mL微量離心空管置於工作板最前排，以收集萃取之病毒核酸；取適量之吸管套(Tip holder)與過濾式微量吸管尖(Filter tip)置於相應之工作板第二排；取適量之carrier RNA混合液60 µL (含3.6 µL carrier RNA與56.4 µL buffer AVE)放於1.5 mL微量離心管，並置於工作板第三排；再取400 µL疫苗檢品放入2 mL微量離心管後，置於工作板第四排。關閉操作門，依儀器面板指示檢查步驟後即開始進行自動萃取。待萃取完畢後，收集工作板最前排之病毒核酸萃取液接續進行RT-qPCR/qPCR步驟。

2. RT-qPCR/qPCR

依各原廠方法配製RT-qPCR/qPCR mix，並依建議體積於96孔盤加入上述

表一、安定性評估之病毒類標準品及使用之檢測方法

No.	項目	Lot	萃取套組	定量套組	定量標準
1	1 st HCV gt1 RNA National Standard	93-09	EZ1 virus mini kit v2.0	RealStar HCV RT-PCR Kit 2.0	6th WHO IS Hepatitis C virus RNA for NAT (18/184)
2	1 st HCV gt1 RNA Working Reagent	93-09W			
3	HCV gt2 RNA National Standard	101-08			
4	2 nd HCV gt1 RNA National Standard	105-10			
5	2 nd HCV gt1 RNA Working Reagent	105-10W	EZ1 virus mini kit v2.0	RealStar Parvovirus B19 PCR Kit	3rd WHO International Standard for Parvovirus B19 for NAT (12/208)
6	Parvovirus B19 DNA National Standard	94-08			
7	Parvovirus B19 DNA Working Reagent	94-08W	Cobas HBV test for the 4800		4th WHO IS Hepatitis B virus DNA for NAT (10/266)
8	1 st HBV gtB DNA National Standard	92-08			
9	1 st HBV gtB DNA Working Reagent	92-08W			
10	1 st HBV gtC DNA National Standard	103-08			
11	1 st HBV gtC DNA Working Reagent	103-08W			
12	2 nd HBV gtB DNA National Standard	107-07			
13	2 nd HBV gtB DNA Working Reagent	107-07W	Cobas HIV-1 test for the 4800		4th WHO International Standard for HIV-1 RNA for NAT (16/194)
14	HIV-1 RNA National Standard	98-11			

gt : genotype



mix及病毒RNA或DNA。取Sealing foils封膜96孔盤後進行反應。HCV反應條件依序為：55°C作用20分鐘，95°C作用2分鐘，95°C作用15秒，55°C作用45秒，72°C作用15秒，上述三個溫階重複循環45次。B19反應條件依序為：95°C作用10分鐘，95°C作用15秒，58°C作用1分鐘，上述二個溫階重複循環45次。不同病毒均分別進行3次獨立試驗，每次試驗均為二重複。

3. 統計分析

將不同標準品之定量結果進行統計分析評估，以儲存前後之定量結果是否具統計上之顯著差異($p < 0.05$)以確認標準品之安定性。試驗系統適用性的部分須符合以下條件，在國際標準品之標準曲線中 R^2 值需大於0.98、斜率需介於-3.1~-3.6之間確認該曲線之適用性，在待測標準品中，其獨立試驗之精密度(Intra-assay precision)需小於5%，試驗間中間精密度(Inter-assay precision)需小於10%。上述條件皆符合後則可評估標準品的濃度，將所得結果與該標準品原始標定數據以單尾t-test進行檢定，若 p 值小於0.05則代表該標準品濃度變化有顯著差異，將評估產品下架之可行性，當 p 值大於0.05以上則代表該標準品濃度無顯著變化，仍適合繼續作為標準品使用。

(二)HBV與HIV-1核酸標準品之安定性評估研究

1. 病毒核酸萃取與定量

使用Cobas 4800 system進行評估，依試劑套組操作說明書之步驟進行，首先放置所需耗材如Extraction plate、AD-plate及480 high volume tips with filters，再依儀器指示放置試劑及檢體，進行Cobas X 480全自動核酸萃取。隨後將萃取完

成之核酸置入Cobas Z 480儀器中進行即時定量PCR。

2. 統計分析

將不同標準品之定量結果進行統計分析評估，詳細評估條件見材料與方法第二章之(一)之3.所述，若 p 值小於0.05則代表該標準品濃度變化有顯著差異，將評估產品下架之可行性，當 p 值大於0.05以上則代表該標準品濃度無顯著變化，仍適合繼續作為標準品使用。

結 果

一、HCV國家標準品/工作標準品安定性分析

本研究透過第6代WHO HCV RNA 國際標準品(18/184)比對食藥署建立之HCV病毒標準品，包含第一代HCV genotype 1 國家標準品/工作標準品(93-09/93-09W)、第一代HCV genotype 2國家標準品(101-08)以及第二代HCV genotype 1 國家標準品/工作標準品(105-10/105-10W)共計5品項。在國際標準品之標準曲線的3次獨立試驗中 R^2 介於0.992~0.996之間，斜率介於-3.12~-3.26之間，標準曲線皆符合規範，所有待測標準品獨立試驗之精密度(Intra-assay precision)與試驗間中間精密度(Inter-assay precision)皆小於5%亦符合規範(表二)。接著分析待測標準品，將本次標定結果與共標數據以單尾t-test進行檢定，其 p 值介於0.061-0.393之間無顯著差異，所有待測標準品皆符合內控標準(表三)。

二、B19國家標準品/工作標準品安定性分析

本研究透過第3代B19 DNA 國際標準品(12/208)比對食藥署建立之B19病毒標準品，包含第一代B19 genotype 1 國家標準品與工作標準品(94-08/94-08W)共計2品項。在國際標準

表二、HCV國家標準品/工作標準品定量結果

Assay No.	R ² * Slope*	1 st HCV gt1 RNA NS (Lot. 93-09)			1 st HCV gt1 RNA WR (Lot. 93-09W)			HCV gt2 RNA NS (Lot. 101-08)			2 nd HCV gt1 RNA NS (Lot. 105-10)			2 nd HCV gt1 RNA WR (Lot. 105-10W)		
		Average (Log IU/mL)	SD	CV (%)	Average (Log IU/mL)	SD	CV (%)	Average (Log IU/mL)	SD	CV (%)	Average (Log IU/mL)	SD	CV (%)	Average (Log IU/mL)	SD	CV (%)
Assay 1	0.996 -3.26	4.59	0.02	0.41	2.89	0.12	4.02	5.11	0.04	0.70	5.12	0.05	0.97	3.14	0.09	2.89
Assay 2	0.993 -3.12	4.67	0.05	1.17	2.80	0.02	0.65	5.14	0.01	0.16	5.10	0.03	0.64	3.12	0.10	3.07
Assay 3	0.992 -3.17	4.55	0.04	0.98	2.72	0.05	1.69	5.01	0.02	0.32	5.12	0.05	1.04	3.16	0.02	0.52
Total		4.60	0.06	1.41	2.82	0.10	3.66	5.09	0.06	1.26	5.11	0.04	0.81	3.14	0.04	1.31

Calibrated against 6th WHO IS Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (18/184)

*Criteria: R²≥0.98, -3.6≥Slope ≥-3.1

表三、HCV國家標準品/工作標準品安定性分析

1 st HCV gt1 RNA NS (Lot. 93-09)				1 st HCV gt1 RNA WR (Lot. 93-09W)				HCV gt2 RNA NS (Lot. 101-08)				2 nd HCV gt1 RNA NS (Lot. 105-10)				2 nd HCV gt1 RNA WR (Lot. 105-10W)			
Label Con. (Log IU/mL)		4.72		2.95		5.15		3.23				5.15				3.14			
Average experimental Con. (Log IU/mL)		4.60		2.82		5.09		3.14				5.11				3.16			
p-value		0.092		0.061		0.393		0.080				0.239				0.080			

Calibrated against 6th WHO IS Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (18/184)



表四、B19國家標準品/工作標準品定量結果

Assay No.	R ²	Slope	Parvovirus B19 DNA NS (Lot. 94-08)			Parvovirus B19 DNA WR (Lot. 94-08W)		
			Average (Log IU/mL)	SD	CV (%)	Average (Log IU/mL)	SD	CV (%)
Assay 1	0.986	-3.25	6.19	0.02	0.38	4.33	0.03	0.76
Assay 2	0.995	-3.32	6.23	0.12	1.96	4.30	0.07	1.56
Assay 3	0.996	-3.29	6.15	0.13	2.06	4.05	0.09	2.20
Total			6.19	0.04	0.64	4.23	0.10	2.26

Calibrated against 3rd WHO International Standard for Parvovirus B19 for nucleic acid amplification techniques (12/208)

表五、B19國家標準品/工作標準品安定性分析

	Parvovirus B19 DNA NS (Lot. 94-08)	Parvovirus B19 DNA WR (Lot. 94-08W)
Label Con. (Log IU/mL)	6.28	4.30
Average experimental Con. (Log IU/mL)	6.19	4.23
p-value	0.183	0.239

Calibrated against 3rd WHO International Standard for Parvovirus B19 for nucleic acid amplification techniques (12/208)

品之標準曲線的3次獨立試驗中R²介於0.986~0.996之間，斜率介於-3.25~-3.32之間，標準曲線皆符合規範，所有待測標準品獨立試驗之精密度(Intra-assay precision)與試驗間中間精密度(Inter-assay precision)皆小於3%亦符合規範(表四)。接著分析待測標準品，將本次標定結果與共標數據以單尾t-test進行檢定，其p值分別為0.183與0.239，無顯著差異，所有待測標準品皆符合內控標準(表五)。

三、HBV國家標準品/工作標準品安定性分析

本研究透過第4代WHO HBV DNA國際標準品(10/266)比對食藥署建立之HBV病毒標準品，包含第一代HBV genotype B國家標準品/工作標準品(92-08/92-08W)、第一代HBV genotype C國家標準品/工作標準品(103-08/103-

08W)以及第二代HBV genotype B國家標準品/工作標準品(107-07/107-07W)共計6品項。在國際標準品之標準曲線的3次獨立試驗中R²介於0.998~0.999之間，斜率介於-3.15~-3.29之間，標準曲線皆符合規範，所有待測標準品獨立試驗之精密度(Intra-assay precision)與試驗間中間精密度(Inter-assay precision)皆小於4%亦符合規範(表六)。接著分析待測標準品，將本次標定結果與共標數據以單尾t-test進行檢定，其p值介於0.106-0.491之間無顯著差異，所有待測標準品皆符合內控標準(表七)。

四、HIV-1國家標準品安定性分析

本研究透過第4代HIV-1 RNA國際標準品(16/194)比對食藥署建立之第一代HIV-1國家標準品(98-11)。在國際標準品之標準曲線的3次獨立試驗中R²介於0.995~0.998之間，斜率介於-3.24~-3.32之間，標準曲線皆符合規範，所有待測標準品獨立試驗之精密度(Intra-assay precision)與試驗間中間精密度(Inter-assay precision)度皆小於2%亦符合規範(表八)。接著分析待測標準品，將本次標定結果與共標數據以單尾t-test進行檢定，其p值為0.220，無顯著差異符合內控標準(表九)。

討 論

本研究共分析14項病毒核酸國家與工作標準品，其中包含項DNA病毒HBV、B19以及

表六、HBV國家標準品/工作標準品定量結果

Assay No.	1 st HBV gB DNA NS (Lot. 92-08)				1 st HBV gB DNA WR (Lot. 92-08W)				1 st HBV gC DNA NS (Lot. 103-08)				1 st HBV gC DNA WR (Lot. 103-08W)				2 nd HBV gB DNA NS (Lot. 107-07)				2 nd HBV gB DNA WR (Lot. 107-07W)			
	Average (Log IU/mL)		CV (%)	Slope	Average (Log IU/mL)		CV (%)		Average (Log IU/mL)		CV (%)		Average (Log IU/mL)		CV (%)		Average (Log IU/mL)		CV (%)		Average (Log IU/mL)		CV (%)	
Assay 1	0.999	-3.27	6.02	0.06	1.04	3.02	0.09	3.02	0.01	0.07	6.08	0.01	0.07	3.02	0.03	1.15	6.08	0.07	1.04	3.13	0.01	0.14		
Assay 2	0.999	-3.15	6.04	0.03	0.45	3.00	0.02	0.53	6.16	0.02	0.22	3.03	0.01	0.07	6.11	0.02	0.45	3.07	0.03	1.03				
Assay 3	0.998	-3.29	5.96	0.01	0.11	3.08	0.03	0.91	6.10	0.01	0.11	3.19	0.01	0.14	6.08	0.01	0.11	3.24	0.01	0.40				
Total			6.01	0.05	1.41	3.03	0.06	1.99	6.11	0.04	1.41	3.08	0.06	1.99	6.09	0.04	0.61	3.16	0.08	2.53				

Calibrated against 4th WHO IS Hepatitis B virus DNA for nucleic acid amplification techniques (10/266)

表七、HBV國家標準品/工作標準品安定性分析

	1 st HBV gtB DNA NS (Lot. 92-08)	1 st HBV gtB DNA WR (Lot. 92-08W)	1 st HBV gtC DNA NS (Lot. 103-08W)	1 st HBV gtC DNA WR (Lot. 103-08W)	2 nd HBV gtB DNA NS (Lot. 107-07)	2 nd HBV gtB DNA WR (Lot. 107-07W)
Label Con. (Log IU/mL)	6.00	3.00	6.05	3.10	6.09	3.16
Average experimental Con. (Log IU/mL)	6.01	3.03	6.11	3.08	6.09	3.15
p-value	0.489	0.324	0.106	0.375	0.491	0.323

Calibrated against 4th WHO IS Hepatitis B virus DNA for nucleic acid amplification techniques (10/266)

表八、HIV-1國家標準品/工作標準品定量結果

Assay No.	R ²	Slope	HIV-1 RNA NS (Lot 98-11)		
			Average (Log IU/mL)	SD	CV (%)
Assay 1	0.997	-3.24	4.01	0.05	1.25
Assay 2	0.995	-3.29	3.93	0.02	0.39
Assay 3	0.998	-3.32	4.01	0.06	1.53
Total			3.98	0.06	1.43

Calibrated against 4th WHO International Standard for HIV-1 RNA for nucleic acid amplification techniques (16/194)

表九、HIV-1國家標準品/工作標準品安定性分析

HIV-1 RNA NS (Lot. 98-11)	
Label Con. (Log IU/mL)	4.04
Average experimental Con. (Log IU/mL)	3.98
p-value	0.220

Calibrated against 4th WHO International Standard for HIV-1 RNA for nucleic acid amplification techniques (16/194)

RNA病毒HCV、HIV-1，透過t-test分析皆無顯著差異。但進一步分析發現 5項HCV標準品中有3項 p 值小於0.1，雖未達統計差異，但稍低於其他標準品。參考國際標準品製備之文獻，HCV國際標準品於熱加速試驗中可觀察到顯著下降⁽¹²⁾，但於其他標準品於熱加速試驗則無此現象⁽¹¹⁻¹⁴⁾，本研究結果與國際標準品相似，而在HCV標準品建立時所進行之熱加速試驗中亦有相似結果。探討其原因，可能因RNA病毒之核酸結構較不穩定，產生降解所致。此外HCV國際標準品透過使用熱加速試驗之Arrhenius模型分析數據，該模型預測在-20℃下儲存的樣品每年下降9%，以及4℃下每年下降30%，然而由Arrhenius模型計算之結果在統計上顯著低於實際結果，特別在較高溫度下之間的結果差異與Arrhenius模型不一致，在較高溫度下之濃度下降可能無法反映在-20℃下儲存的樣品的安定性。故病毒類核酸標準品可能無法透過熱加速試驗評估其保存期限，因此定期監控

核酸變化確保標準品品質是必須且無法替代的環節。

結 論

本研究共分析14項病毒核酸國家與工作標準品，透過t-test分析皆無顯著差異(表十)，評估適合繼續作為標準品使用。未來將持續進行國家標準品安定性分析，確認核酸含量變化趨勢，確保其公信力。

參考文獻

1. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004). WHO technical report series 2006, vol. 932, WHO, Geneva, Switzerland (2006), pp. 73-131.
2. Pripuzova, N., Wang, R., Tsai, S. and *et al.* 2012. Development of real-time PCR array for simultaneous detection of eight human blood-borne viral pathogens. PLoS One. 7: e43246.
3. 衛生福利部。2021。中華藥典第九版。110年10月15日衛生福利部部授食字第1101902494號。
4. 楊依珍、鍾嘉瑩、胡卉欣、陳仕軒等。2013。建立血液製劑病毒安全檢測體系-HCV genotype 2病毒核酸國家標準品之建立。衛生福利部食品藥物管理署102年度自行研究計畫報告。
5. 楊依珍、謝郁琦、陳伊婷、林子軒等。2015。HBV genotype C病毒核酸國家標準品之建立。衛生福利部食品藥物管理署104年度自行研究計畫報告。
6. 楊依珍、宋古鈞、廖婉婷、趙珮伶等。2017。第二代HCV genotype 1病毒核酸候選標準品之建立。衛生福利部食品藥物管



表十、國家標準品/工作標準品安定性分析彙整表

	Label Conc. (Log IU/mL)	Average experimental Conc. (Log IU/mL)	p-value
1 st HCV gt1 RNA National Standard (Lot. 93-09)	4.72	4.60	0.092
1 st HCV gt1 RNA Working Reagent (Lot. 93-09W)	2.95	2.82	0.061
HCV gt2 RNA National Standard (Lot. 101-08)	5.15	5.09	0.393
2 nd HCV gt1 RNA National Standard (Lot. 105-10)	5.15	5.11	0.239
2 nd HCV gt1 RNA Working Reagent (Lot. 105-10W)	3.23	3.14	0.080
Parvovirus B19 DNA National Standard (Lot. 94-08)	6.28	6.19	0.183
Parvovirus B19 DNA Working Reagent (Lot. 94-08W)	4.30	4.23	0.239
1 st HBV gtB DNA National Standard (Lot. 92-08)	6.00	6.01	0.489
1 st HBV gtB DNA Working Reagent (Lot. 92-08W)	3.00	3.03	0.324
1 st HBV gtC DNA National Standard (Lot. 103-08)	6.05	6.11	0.106
1 st HBV gtC DNA Working Reagent (Lot. 103-08W)	3.10	3.08	0.375
2 nd HBV gtB DNA National Standard (Lot. 107-07)	6.09	6.09	0.491
2 nd HBV gtB DNA Working Reagent (Lot. 107-07W)	3.16	3.15	0.323
HIV-1 RNA National Standard (Lot. 98-11)	4.04	3.98	0.220

理署106年度自行研究計畫報告。

7. 第二代HBV genotype B病毒核酸候選標準品之建立。2019。許家銓、巫博智、林伯霖、陳昕梅等。衛生福利部食品藥物管理署108年度自行研究計畫報告。
8. 許家銓、巫博智、林伯霖、陳昕梅等。2021。建立病毒國家標準品-人類巨細胞病毒(HCMV)。衛生福利部食品藥物管理署110年度自行研究計畫報告。
9. World Health Organization Technical Workshop on Stability of reference materials for biological medicines and in vitro diagnostics. 2005. World Health Organization, Switzerland.
10. 衛生福利部。2016。藥品安定性試驗基準，105年3月11日衛生福利部授食字第1041408733號。
11. Saldanha, J., Heath, A., Aberham, C., Albrecht, J. and *et al.* 2005. World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C

virus RNA nucleic acid amplification technology assays. *Vox Sanguinis*, 88: 202-204.

12. Fryer, J., Heath, A., Wilkinson, D., Minor, P. and *et al.* 2017. A collaborative study to establish the 3rd WHO International Standard for hepatitis B virus for nucleic acid amplification techniques. *Biologicals*. 46: 57-63.
13. Fryer, J., Heath, A., Wilkinson, D., Minor, P. and *et al.* 2016. Collaborative Study Group. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for Epstein-Barr virus for nucleic acid amplification techniques. *Biologicals*. 44: 423-33.
14. Fryer, J., Heath, A., Minor, P. and Collaborative Study Group. 2016. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification technology. *Biologicals*. 44: 242-51.



Stability Analysis of National Standards for Blood-Derived Pathogen

PO-LIN LIN, YI-HSUAN PENG, TZU-HUA TENG, JIA-CHUAN HSU,
MEI-CHIH LIN AND SU-HSIANG TSENG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

Registration inspection before market entry and periodic monitoring after release are required for Class III high-risk *in vitro* diagnostic medical devices to ensure quality and performance. In response to these inspection requirements, Taiwan Food and Drug Administration (TFDA) has established 27 nucleic acid virus standards. Since 1993, antiserum and nucleic acid standards for quality management of *in vitro* diagnostic medical devices, such as HBV, HCV, B19, and SARS-CoV-2, have been provided to the public, supporting the development of the domestic biotechnology industry. Basically, TFDA follows WHO's policy, which is not setting an expiration date of the standard. If the standard is no longer applicable, it will be withdrawn or replaced. In order to maintain the credibility of the standards, we re-evaluate the concentrations of four types of national/working standards, including B19, HBV, HCV and HIV-1. We analyze the current concentrations of these standards by calibrating them against international standards and evaluate the differences between current and original concentrations using a t-test. All 14 standards from these four types have been assessed. The *p*-values of t-test are all above 0.05, meeting the internal criteria. In the future, we will continue monitoring the concentrations of standards and introduce freeze-drying technology for those whose concentrations drop rapidly. This will strengthen the credibility and calibration accuracy of biological national standards, promote the development of biotechnology industry, and protect public health in Taiwan.

Keywords: national standard, stability