

建立人類巨細胞病毒(HCMV)核酸國家標準品

巫博智 林伯霖 陳昕梅 彭怡瑄 許家銓 林美智 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

本研究參考世界衛生組織(WHO)之HCMV國際標準品製備流程,以細胞培養方式製備病毒原液,經加熱去活化,以Tris-HSA作為稀釋液,將病毒原液稀釋至適當濃度後透過體外診斷(IVD)檢測套組與In-house digital PCR兩套系統進行定量,完成候選國家與工作標準品各1,188管與1,207管。為使標準品具客觀性與公信力,邀集國內外5家實驗室參與共同標定研究,經統計分析顯示HCMV國家與工作標準品定量之濃度分別為 7.7×10^6 IU/mL (6.89 log IU/mL)與 8.7×10^3 IU/mL (3.94 log IU/mL)。並進行24°C、4°C、-20°C以及-80°C等4個溫度點至12個月之安定性評估,結果顯示於-20°C與-80°C儲存溫度下之濃度並無顯著變化。該標準品除供衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)作為細胞治療產品之查驗登記與品質監測及相關病毒核酸標準檢測體系用,亦可供業界與捐血中心作為分子診斷試劑與細胞治療產品研發及/或檢驗之品質管控,增加國內取得標準品之管道,協助我國再生醫療產業發展。

關鍵詞：病毒核酸標準品、巨細胞病毒、共同標定研究、再生醫療

前 言

因應國際再生醫療領域發展趨勢,衛生福利部(下稱衛福部)於107年9月6日發布「特定醫療技術檢查檢驗醫療儀器施行或使用管理辦法」,開放6項風險較低且國內外已有文獻證明相當安全及療效之自體細胞治療技術,並推動「再生醫療製劑管理條例草案」協助細胞治療製劑發展。鑑於細胞治療製劑之原料取自人體細胞或組織,捐贈者應依照「人類細胞治療產品捐贈者合適性判定基準」執行傳染性病原篩檢或檢測,若原料來源為病患自體,雖對自身無傳染疾病之疑慮,惟為保護接觸者的安全和製造環境之風險管控,仍須執行捐贈者篩選或測試,其中該基準亦特別提及應針對富

含白血球之細胞或組織進行人類巨細胞病毒(HCMV)篩檢。

HCMV為常見於感染人體的疱疹病毒科中的β疱疹病毒亞科(*Betaherpesviruses*),其會在免疫力未成熟(如新生兒和嬰兒)及免疫力低下的個體(尤其是器官移植者與AIDS患者)中引起疾病⁽¹⁾。人類疱疹病毒根據複製和潛伏期進一步分成三個亞科,分別為α、β及γ。α疱疹病毒亞科主要感染神經細胞並潛伏在神經節中,具相對較短的複製週期與較廣泛的宿主物種。β疱疹病毒亞科常潛伏感染造血細胞,宿主範圍相當有限且複製週期較長。γ疱疹病毒亞科則易潛伏感染淋巴細胞⁽²⁾。

HCMV屬於巴爾的摩病毒分類系統第一類的雙股DNA病毒。病毒顆粒為150-200 nm的球

形顆粒，其具有230 kbp單體雙股線性DNA基因組包含約173個基因⁽³⁾。HCMV基因組中包含多種醣蛋白基因，其中以glycoprotein B (gB)以及glycoprotein N (gN)表現量最多，且其變異直接影響治療藥物的選擇^(4,5)，因此在临床上多以gB與gN作為HCMV基因型別鑑定之標的⁽⁶⁾。在台灣，gB僅觀察到gB1與gB3，其中以gB1為主流型別(約佔70%)，gB3為27%，其餘3%則為gB1與gB3同時感染⁽⁷⁾。而gN以gN4最多(35%)，其次為gN1 (29%)、gN2 (22%)以及gN3 (14%)，基因型分布較為平均⁽⁸⁾。

除了編碼結構蛋白(encoding structural proteins)外，HCMV基因組亦包含許多非結構蛋白(nonstructural proteins)與非編碼RNA(non-coding RNAs)，其調節複雜的病毒複製週期並與宿主免疫系統交互作用進而逃離免疫系統的監視與攻擊⁽³⁾。HCMV能廣泛存在於被感染者的體液中，包含唾液、血液以及母乳都能發現具感染力的病毒顆粒。HCMV在具有正常免疫力宿主中的臨床症狀通常不明顯，初次感染可能會有短暫的類流感症狀及單核球增多症⁽⁹⁾。然而在免疫力未成熟或受損的個體中，如：新生兒、AIDS患者以及接受長期免疫抑制治療的個體(器官移植者)於HCMV感染後通常在临床上會有明顯的症狀^(10,11)。

至今仍無HCMV疫苗，感染HCMV僅能透過dGTP之競爭抑制劑類的抗病毒藥物進行治療⁽¹²⁾，因此藉由HCMV病原篩檢技術，可提前掌握新生兒、器官移植者或HIV帶原者可能暴露之風險，有助及早診斷並給予必要處置。隨著分子生物技術進步，目前正極力發展以核酸檢驗為基礎的核酸擴增技術(nucleic acid amplification technology, NAT)，具有靈敏度佳、專一性高且可直接偵測血液中病毒核酸等優點。文獻指出，NAT檢測相較於傳統的HCMV試管培養法可提早21日測得病毒感染⁽¹³⁾，相較於血清免疫學方法可提早12日⁽¹⁴⁾，且NAT檢測僅需1-2小時即可完成病毒篩檢，大

幅縮短檢測時間。其中設計較為精細的PCR方法能夠直接區分基因型別⁽¹⁵⁾，為其預後及用藥提供必要資訊，有助於臨床上準確快速地評估、診斷、治療及監測⁽¹⁶⁾。

為因應食藥署對於細胞治療產品之查驗登記與品質監測及相關病毒核酸標準檢測體系用，並滿足產業界與捐血中心作為分子診斷試劑與細胞治療產品研發及/或檢驗之品質管控等大量需求，亟需建立我國HCMV核酸國家標準品。本研究參考WHO第一代NAT用HCMV國際標準品之製備方式及食藥署過往製備核酸標準品之經驗⁽¹⁷⁻²²⁾，選定與國際標準品相同之HCMV Merlin strain⁽¹⁷⁾，經NGS全基因定序其醣蛋白gB與gN之基因型為台灣最盛行之gB1/gN4^(7, 8)且不含其他外來病毒核酸。透過邀集澳洲國家血清諮詢實驗室(National Serology Reference Laboratory, NRL)、日本國立感染症研究所(National Institute of Infectious Diseases, NIID)、韓國國家食品藥物安全評估中心(National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, NIFDS)及我國長庚醫療財團法人長庚紀念醫院等國內外相關機構參與國際共同標定研究，並同時進行安定性評估。

材料與方法

一、材料與設備

(一)材料

1. Human herpesvirus 5 (ATCC, Cat. No. VR-1590™, USA)
2. MRC-5 (ATCC, Cat. No. CCL-171™, USA)
3. Eagle's minimum essential medium (EMEM) (ATCC, Cat. No. 30-2003™, USA)
4. Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Cat. No.10100-147, Australia)
5. Dulbecco's phosphate buffered saline

- (DPBS) (Sigma, Cat. No. D8537, Germany)
6. 1st WHO international standard for HCMV for NAT assays (NIBSC code 09/162, 5×10^6 IU/mL, UK)
 7. Nuclease free water (Promega, USA)
 8. EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (QIAGEN, Cat. No. 955134, Germany)
 9. Illumina DNA Prep (24 samples) (Illumina, Cat. No. 20018704, U.S.A)
 10. IDT[®] for Illumina[®] DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) (Illumina, Cat. No. 20027213, U.S.A)
 11. MiSeq[®] Reagent Micro Kit, v2 (300 cycles) (Illumina, Cat. No. MS-103-1002, U.S.A)
 12. Qubit[®] dsDNA HS assay kits (Invitrogen, U.S.A)
 13. Qsep1[™] Standard Cartridge (S2) (BiOptic, Cat. No. C105201, Taiwan)
 14. AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA)
 15. Primers and probes (Purigo, Taiwan)
 16. QuantStudio[™] 3D Digital PCR Master Mix v2 (ThermoFisher, Cat. No. A26358, USA)
 17. QuantStudio[™] 3D Digital Chip Kit v2 (ThermoFisher, Cat. No. A26316, USA)
 18. COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] CMV Test (Roche, Cat. No. 04902025190, Switzerland)
 19. COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] Wash Reagent (Roche, Cat. No. 03587797190, Switzerland)
 20. 乙醇(分生級, Sigma, Germany)
 21. Tris-HCl (Sigma, Germany)
 22. Human serum albumin (Baxter, Austria)

(二)設備

1. 離心機(KUBOTA 1720, Japan)
2. SAFZONE生物安全操作櫃(Class-II-A2, Yakos65, Taiwan)
3. 核糖核酸分析系統(EZ1 Advanced XL, QIAGEN, Germany)
4. 螢光核酸定量系統Fluorometer (Qubit 2.0, Invitrogen, USA)
5. 核酸增殖器(Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA)
6. 高通量次世代核酸定序系統(MiSeq, Illumina, USA)
7. QuantStudio[™] 3D Digital PCR Instrument (4489084, Thermo Fisher Scientific, USA)
8. QuantStudio[™] 3D Digital PCR Chip Loader (4482592, Thermo Fisher Scientific, USA)
9. ProFlex[™] 2 × Flat PCR System (4484078, Thermo Fisher Scientific, USA)
10. QuantStudio[™] 3D AnalysisSuite[™] Software (Ver. 3.1.6, Thermo Fisher Scientific, USA)
11. COBAS[®] AmpliPrep Instrument (Roche, Switzerland)
12. COBAS[®] TaqMan[®] 48 Analyzer (Roche, Switzerland)
13. AMPLILINK Software (Roche, Switzerland)

二、方法

參照WHO第一代HCMV國際標準品製備方法與食藥署以往病毒核酸標準品製備經驗⁽¹⁷⁻²²⁾，進行我國HCMV核酸候選國家與工作標準品之建構。濃度規劃分別為7 log IU/mL及4 log IU/mL，預計各製備約1,000管。參考WHO的製備方法以MRC-5細胞株培養台灣最常見之gB1/gN4型別。在病毒培養過程中，觀察細胞病變作用(cytopathic effect, CPE)確認病毒感

染情形。待產生明顯CPE現象時收集病毒液，並做初步病毒核酸濃度分析，再置於65°C水浴槽中加熱30分鐘進行病毒去活化。接著將去活化病毒液取1 mL接種到MRC-5細胞，5天後取培養液接種到一批新的細胞中，連續培養3代，除觀察每代細胞是否會產生CPE，並取每代之培養液以real-time PCR進行核酸監測，確認此批病毒液已成功去活化。此時，再次進行定量分析確認病毒原液之核酸含量不受去活化步驟所影響。

(一)HCMV核酸含量定量

以HCMV國際標準品(NIBSC code 09/162)為一級標準品，採用市售套組與本實驗室自行開發之Digital PCR系統分別進行定量評估。二種分析方法均分別進行2次獨立試驗，每次試驗均為二重複。分析方法分別為COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV Test (以下簡稱Roche kit)與ThermoFisher QuantStudio™ 3D *In-house* digital PCR (以下簡稱QS-3D)，其使用之引子與探針詳表一。

(二)HCMV全基因定序

依EZ1 Virus Mini Kit v2.0試劑套組操作說明書之步驟，使用核糖核酸分析系統進行病毒核酸自動萃取。所得之病毒核酸萃取液接續依Illumina DNA Prep操作說明書，使用DNA Prep kits與DNA/RNA UD indexes製備成DNA樣本庫。再使用Qubit® dsDNA HS assay kit以Qubit 2.0 fluorometer進行濃度定量，並使用生物片段分析儀Qsep1依Standard cartridge kit操作說明書

進行片段大小分析。根據所得之濃度與片段大小數值，調整DNA樣本庫至適當上機濃度並加至MiSeq® reagent micro kit, v2 (300 cycles)反應槽中，再放入MiSeq進行基因定序。定序後產生之.fastq讀序檔案以自行開發之病毒序列完整性與變異分析系統(Virus integrity and variant analyzer, VIVA)分析。該系統以Python語言撰寫，開發環境為Ubuntu 20.04.1，開發規格整合讀序品質處理(Reads QC)、讀序定位(Reads aligner mapping)、讀序組裝(Read *De Novo* assembler)、變異序列與變異頻率偵測(Variant caller)、基因組序列草稿重建(Draft genome construction)等功能。VIVA系統取bitscore最高的blast hit作為參考序列。若檢品核酸序列並非單純的病毒序列，可直接以組裝後序列長度最長的contig作為參考序列。為偵測未正確定位之讀序中是否含有外來病毒序列，使用SPAdes對讀序進行*de novo*組裝，組裝模式為meta模式，以blastn將contigs進行比對尋找，使用的資料庫為RVDB。另以LoFreq與VarScan兩種工具同時偵測變異位點(Variant calling)，亦分別對bowtie 2與bwa的定位結果BAM檔分析檢品與參考序列之間的變異程度。

(三)HCMV核酸標準品之製備

將去活化之病毒原液以Tris-HSA作適當稀釋，製備完成之標準液隨即進行定量分析與充填分裝作業，國家標準品每管分裝0.5 mL以上、工作標準品每管分裝1.0

表一、*In-house* digital PCR使用之HCMV引子與探針

目標基因	引子/探針	核苷酸序列 (5'-3')	片段長度
DNA polymerase UL54 gene (AY422361.1)	Forward primer	GGC CGT TAC TGT CTG CAG GA	72 bp
	Reverse primer	GGC CTC GTA GTG AAA ATT AAT GGT	
	Probe	FAM-CCG TAT TGG TGC GCG ATC TGT TCA A-BHQ	

mL以上，製備成之核酸候選標準品置於-80°C冰箱保存。另舉辦國際共同標定研究訂定標準品最終濃度，同時進行標準品之安定性評估研究。

(四)HCMV核酸標準品之共同標定

邀集國內外相關機構參與國際共同標定研究(表二)，提供各實驗室HCMV候選國家與工作標準品各3管及國際標準品(NIBSC code 09/162) 1管，使用其例行HCMV核酸定量分析方法進行3次獨立試驗，並以國際標準品標定候選標準品濃度。將各單位回傳之數據取對數後平均，排除超出平均值 ± 2 SD之數值後計算平均，所得結果即為共同標定值。

(五)HCMV核酸標準品之安定性評估

參照衛福部公布之藥品安定性試驗基準、國際醫藥法規協和會(The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)安定性試驗相關指引及WHO國際標準品安定性評估模式^(23,24)，並考量標準品儲存條件之耐受性、運送及使用狀況規劃設計安定性評估研究，將標準品存放於-80°C、-20°C、4°C及24°C四種不同溫度之儲存環境，其時程設計如圖四，在特定時間取出測試，評估病毒核酸濃度是否穩定。各時間點皆進行3次獨立試驗，每次試驗均以Roche kit及QS-3D兩種定量方法分別進行二重複試驗，並以國

際標準品(NIBSC code 09/162)校正濃度。將存放於不同溫度之標準品各時間點之定量結果進行統計分析評估，以存放前後之定量結果是否具統計上顯著差異($p < 0.05$)確認標準品之安定性。

結 果

一、HCMV病毒原液DNA定量分析

以HCMV感染MRC-5細胞後，細胞於第3日出現CPE，至第5日CPE超過80%，即選定收取第5日之培養液為病毒原液，共收取100 mL。將取得之病毒原液進行核酸定量分析，採用二種定量分析方法(Roche kit及QS-3D)，並以HCMV國際標準品(NIBSC code 09/162)進行校正，以評估病毒原液之HCMV核酸含量，定量結果如表三，平均濃度為7.82 log IU/mL，大於所需之7 log IU/mL，確認製備之病毒原液可作為HCMV核酸候選標準品之原液。

二、HCMV全基因定序分析

將培養所得之HCMV病毒液以Illumina MiSeq進行全基因定序，分析HCMV Genome之完整性與病毒型別，並分析其他可能會干擾的未知外來病毒。定序後之數據以實驗室自行開發之VIVA分析工具進行分析，*de novo*組裝後，blastn比對結果與HCMV Merlin strain的Reference sequence (NC_006273.2)最為相似。於其中發現G40231C變異，變異頻率60.3%，

表二、參與共同標定之成員與研究機構

參與機構	國家
澳洲國家血清諮詢實驗室National Serology Reference Laboratory (NRL)	澳洲
國立感染症研究所National Institute of Infectious Diseases (NIID)	日本
國家食品藥物安全評估中心National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS)	南韓
長庚醫療財團法人長庚紀念醫院	臺灣
臺灣食品藥物管理署研究檢驗組生物藥品科	臺灣
臺灣食品藥物管理署研究檢驗組食品生物科	臺灣

表三、HCMV去活化前後及HCMV NS/WR稀釋後之病毒原液核酸濃度

	HCMV核酸濃度(log IU/mL)		
	以國際標準品(NIBSC code 09/162)進行校正		
	Roche kit (n=2)	QS-3D (n=2)	平均值
HCMV 病毒原液	8.01±0.19	7.71±0.15	7.82±0.21
HCMV 去活化病毒原液	7.98±0.18	7.78±0.10	7.88±0.19
HCMV NS (Lot. 109-10)	7.12±0.07	7.04±0.07	7.09±0.08
HCMV WR (Lot. 109-10W)	4.35±0.12	4.28±0.07	4.32±0.10

位置落在UL32基因上，不影響glycoprotein B與N之型別，且非為常見之核酸定量目標基因。此外，亦無分析到其他外來病毒之核酸。故評估此HCMV病毒原液可做為標準品之原料。

三、HCMV病毒原液去活化及其結果驗證

取HCMV病毒原液進行病毒去活化，接著將去活化病毒液接種到MRC-5細胞，連續培養3代，觀察每一代細胞是否產生CPE，並以real-time PCR進行核酸監測每一代之培養液(第0天與第5天)。活病毒組每一代細胞在第5天皆產生非常明顯的CPE，而去活化組的三代觀測皆未見CPE產生，且細胞型態與MOCK組相同(圖一A)。核酸監測的部分以Roche kit進行real-time PCR。MOCK組完全沒有偵測到病毒核酸，活病毒組在每一次繼代培養中第5天相較於第0天有明顯上升，顯示病毒具有複製能力。而去活化組則在每次繼代培養中第5天相較於第0天有極顯著的下降，且第三代已降至0.76 log IU/mL以下，顯示病毒無複製能力(圖一B)，病毒原液成功去活化。為確認去活化對

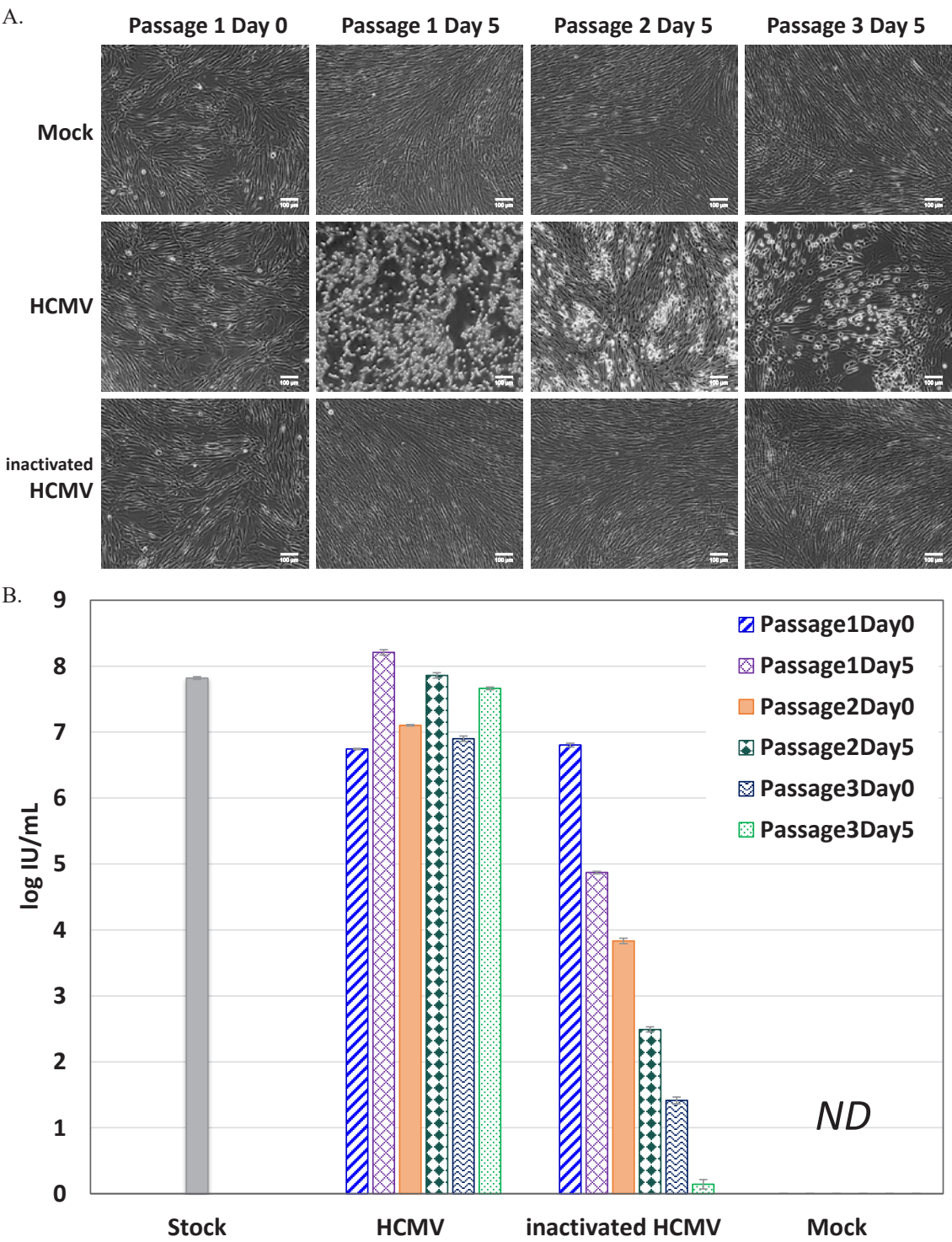
於病毒核酸之影響，以前述兩種定量分析方法進行HCMV含量測定，結果顯示去活化後之核酸含量仍大於所需之7 log IU/mL (表三)，確認製備之去活化病毒原液可作為HCMV核酸候選標準品之原液。

四、基質評估

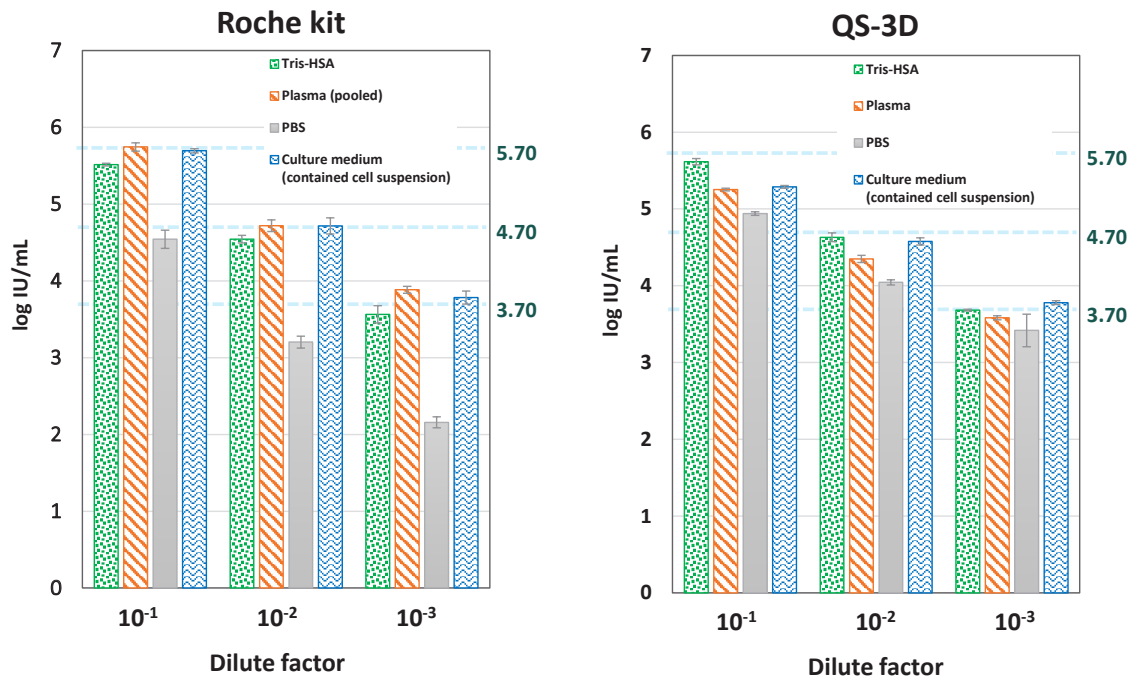
考量HCMV檢體種類除了血液外可能來自唾液、尿液及細胞培養產物，因此進一步分析適合的稀釋基質。將國際標準品以4種常見的基質作為稀釋液分別進行 10^{-1} ， 10^{-2} ， 10^{-3} 稀釋，4種基質分別為Tris-HAS (10 mM tris-HCl, 0.5% human serum albumin, pH 7.4，國際標準品使用)、人類血漿、PBS及細胞培養液(含MRC-5細胞約 10^4 cells/mL)，評估是否影響核酸定量。Roche kit的結果顯示以Tris-HSA、人類血漿及細胞培養液在各稀釋階之定量結果與預期濃度相近，差異皆在0.5 log IU/mL內，PBS組別差異較大，皆低於預期濃度超過1 log IU/mL(圖二)。QS-3D中Tris-HSA、人類血漿以及細胞培養液在各個稀釋階之定量結果與Roche kit相似，差異在0.5 log IU/mL內，PBS與預期濃度差異則落在0.5-1 log IU/mL之間(圖二)。綜合兩定量方法結果，並考量HCMV檢體種類眾多及國際標準品所採用之基質，評估以通用之Tris-HSA更為合適。

五、HCMV核酸候選標準品製備

本計畫製備HCMV核酸候選國家及工作標準品，濃度分別規劃為7 log IU/mL及4 log IU/mL。綜觀前述結果，取去活化病毒原液以Tris-HSA進行稀釋，再以前述兩種定量分析方法(Roche kit及QS-3D)進行HCMV核酸測定，結果顯示兩種方法定量結果與規劃濃度相近(表三)，接著進行分裝充填作業，最終總計製備完成HCMV核酸候選國家標準品(Lot 109-10)共1,188管(0.5 mL/管)，及候選工作標準品(Lot 109-10W)共1,207管(1.0 mL/管)。分裝完成



圖一、病毒去活化驗證之CPE觀測結果(A)與核酸表現偵測結果(B)



圖二、標準品基質評估結果

之候選標準品均存放於 -80°C 保存，並依分裝順序各取分裝前、中與後段檢體，以前述兩種定量分析方法評估 HCMV 核酸含量，確認分裝全程之濃度一致性，並以前、中、後三段之濃度之平均值作為初步定量之濃度。結果顯示候選國家及工作標準品分裝前、中與後段樣品之平均濃度均相近(表四)，兩者平均濃度分別為 $7.06 \log \text{ IU/mL}$ 與 $4.26 \log \text{ IU/mL}$ ，符合本計畫之規劃。

六、HCMV 核酸候選標準品之共同標定研究

為使食藥署所製備之 HCMV 核酸標準品具客觀性及公信力，邀請國內外相關機構參與國際共同標定研究計畫，參與標定研究單位總計 4 個國家共 5 個單位(表二)。其中萃取試劑部分包含 3 個廠牌，定量試驗則包含 real-time PCR 與 digital PCR 等 2 種方法，其中包含 2 種廠牌之 IVD 檢測試劑(Cobas、BioMerieux)以及 3 個實

驗室自行開發之方法，分別針對 UL54 與 UL83 兩個目標基因(表五)，共計 7 筆試驗結果。參與單位以各實驗室例行使用之 HCMV 核酸定量分析方法，針對 HCMV 國家標準品進行 3 次獨立試驗，最後將標定結果及相關資料回傳。分析各組數據定量用之 IS 標準曲線稀釋階之線性與 PCR 效率，其允收標準須符合線性之決定係數(R^2)大於等於 97% 並且其斜率介於 $-3.1 \sim -3.6$ 之間(即 PCR 效率 90-110%)。線性部份其決定係數(R^2)除了第五組數據分布於 89-92% 外其餘數據皆大於 99%(圖三)。接著分析 IS 標準曲線之 PCR 效率，除了第五組數據大於 -3.1 外其餘數據分布於 $-3.1 \sim -3.6$ 之間(圖三)，經上述兩項參數評估第五組數據之試驗結果不適合列入定量計算。因此，在排除第五組數據後計算標定數據(表六)後，各實驗室標定之國家標準品及工作標準品數據皆在整體平均值 $\pm 2\text{SD}$ 範圍內，整體標定結果國家與工作標準品分別為 $6.89 \pm 0.08 \log \text{ IU/mL}$ 、 $3.94 \pm 0.13 \log \text{ IU/}$

表四、HCMV候選核酸國家標準品(NS)與工作標準品(WR)分裝後定量結果

HCMV NS (Lot. 109-10)	HCMV核酸濃度(log IU/mL)			
	以國際標準品(NIBSC code 09/162)進行校正			
	Roche kit (n=3)	QS-3D (n=3)	平均值	變異係數(%)
分裝前段	7.06±0.18	7.04±0.11	7.05±0.14	2.03
分裝中段	7.06±0.19	7.06±0.10	7.06±0.14	1.99
分裝後段	7.10±0.17	7.02±0.10	7.06±0.17	2.48
總平均值	7.07±0.19	7.04±0.10	7.06±0.15	2.11

HCMV WR (Lot. 109-10W)	HCMV核酸濃度(log IU/mL)			
	以國際標準品(NIBSC code 09/162)進行校正			
	Roche kit (n=3)	QS-3D (n=3)	平均值	變異係數(%)
分裝前段	4.23±0.12	4.20±0.08	4.22±0.10	2.30
分裝中段	4.34±0.19	4.20±0.16	4.27±0.18	4.25
分裝後段	4.32±0.14	4.24±0.05	4.28±0.10	2.42
總平均值	4.30±0.15	4.21±0.10	4.26±0.13	3.10

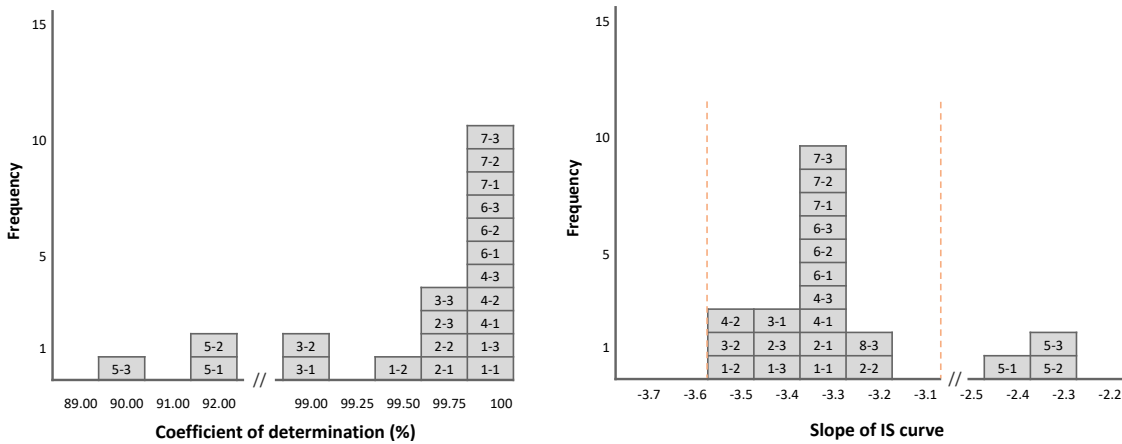
表五、國際共同標定研究之標定方法詳細資料

方法代碼	萃取方法	NAT方法	分析方法類型	目標基因	國際認證	報告讀值表示方式
1	Roche cobas® AmpliPrep	cobas® TaqMan® CMV Test	Quantitative	UL54	CE;IVD	IU/mL
2	Roche cobas® 4800 System	cobas® CMV for cobas® 4800 System	Quantitative	UL54	CE;IVD	IU/mL
3	Maxwell® RSC 48 System	BioMerieux CMV R-gene Real time Detection and Quantification kit	Quantitative	UL83	CE;IVD	Ct
4	Roche MagNaPure 96	BioMerieux CMV R-gene Real time Detection and Quantification kit	Quantitative	UL83	CE;IVD	Cp
5	Roche High Pure Viral Nucleic Acid kit	Real time PCR	Quantitative	UL83	In-house	Ct or copies/mL
6	Qiagen EZ1 Virus Mini Kit v2.0	Bio-Rad QX ONE Droplet Digital PCR	Quantitative	UL54	In-house	copies/mL
7	Qiagen EZ1 Virus Mini Kit v2.0	Qiagen QIAcuity Digital PCR System	Quantitative	UL54	In-house	copies/mL

mL(表六)，換算回病毒核酸濃度分別為 7.7×10^6 IU/mL及 8.7×10^3 IU/mL。

七、HCMV核酸候選標準品之安定性評估

HCMV核酸標準品建議儲存的條件為-80℃，為了評估標準品的安定性，參照衛福部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



圖三、HCMV共同標定標準曲線之決定係數(R^2 , %)與斜率分佈

表六、HCMV核酸國家標準品與工作標準品共同標定之定量試驗結果

方法代碼	NAT方法	HCMV NS (Lot. 109-10)			HCMV WR (Lot. 109-10W)		
		平均值 (log IU/mL)	標準差	變異 係數(%)	平均值 (log IU/mL)	標準差	變異 係數(%)
1	Cobas® TaqMan® CMV Test	6.98	0.07	1.00	3.79	0.09	2.25
2	Cobas® CMV for cobas® 4800 System	6.90	0.03	0.45	3.91	0.08	1.94
3	BioMerieux CMV R-gene Real time Detection and Quantification kit	6.99	0.07	1.02	3.98	0.17	4.36
4	BioMerieux CMV R-gene Real time Detection and Quantification kit	6.82	0.09	1.28	3.99	0.07	1.77
5	Real time PCR	7.92 ^a	0.01	0.10	4.52 ^a	0.10	2.35
6	Bio-Rad QX ONE Droplet Digital PCR	6.81	0.02	0.32	4.10	0.12	2.97
7	Qiagen QIAcuity Digital PCR System	6.84	0.01	0.15	3.85	0.05	1.30
計算值		6.89	0.09	1.32	3.94	0.14	3.47

^a 標準曲線不符合規範，故排除該組數據。

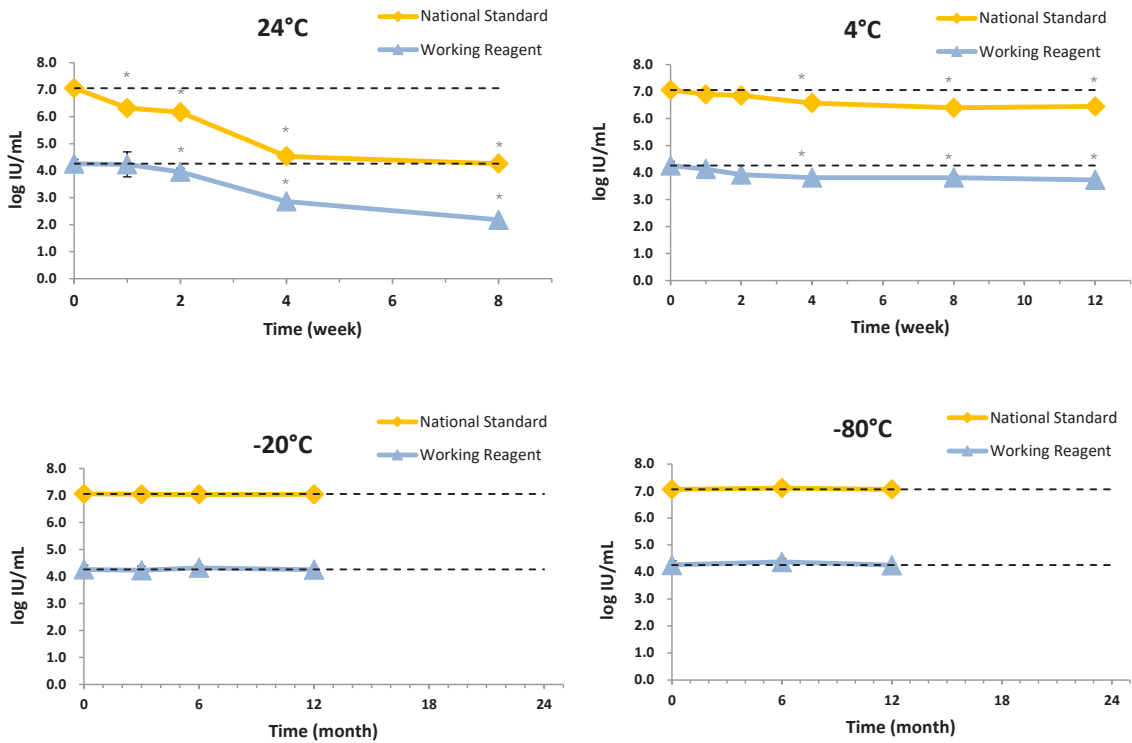
運送及使用時可能的溫度環境設計規劃HCMV核酸標準品的安定性評估研究(圖四)。將標準品存放於 -80℃、-20℃、4℃及24℃等四種不同溫度，在特定時間點將相同溫度下不同時間點之定量結果以統計分析確認標準品之安定性。

由實驗結果可見，核酸國家及工作標準品於24℃儲存時，病毒核酸含量在儲存1週後已顯著下降(圖四)，顯示兩者皆不適合儲存於

24℃環境；於4℃儲存時，病毒核酸含量在儲存2週後並無顯著差異，在4週後已顯著下降(圖四)，顯示HCMV核酸標準品於4℃環境下至多可儲存2週。在長期安定性試驗中(國家及工作標準品於 -20℃與 -80℃儲存至12個月)，病毒核酸含量與起始濃度均無顯著差異。顯示HCMV核酸國家及工作標準品，可於 -20℃及 -80℃穩定儲存至少12個月，後續仍持續進行長期安定性評估研究。

加速試驗			長期試驗		
儲存時間	儲存條件		儲存時間	儲存條件	
	4°C	24°C		-20°C	-80°C
1 週	✓	✓	3 個月	✓	—
2 週	✓	✓	6 個月	✓	✓
4 週	✓	✓	12 個月	✓	✓
8 週	✓	✓	18 個月	✓	✓
12 週	✓	—	24 個月	✓	✓

✓：執行安定性試驗；—：不設計執行安定性試驗。



圖四、HCMV核酸國家標準品安定性試驗評估結果

討 論

一、Digital PCR

Digital PCR為近年各國官方實驗室積極建

立之技術，其為基於Taqman PCR之核酸絕對定量方法，特點是不須透過標準曲線即可對目標物進行定量分析。本實驗室目前建置之方法為晶片式digital PCR，透過將Taqman PCR反

應混合液均勻塗到約20,000個小孔之晶片上，在適當濃度下核酸隨機分布於晶片小孔中，接著在晶片上進行PCR反應，存在目標序列的小孔就會有螢光訊號，後續透過儀器判讀，並以軟體分析晶片上有訊號小孔的比例，即可得到反應混合液核酸中含有多少個目標序列。然而就本實驗室內部定量HCMV病毒液的結果而言，發現digital PCR定量值稍低於Roche kit定量值，且國際標準品定量值亦低於標示值，但若兩方法皆以國際標準品進行校正則可得到相近之結果，推測為不同萃取試劑的萃取效率不同導致定量結果之差異，並顯示標準品在不同方法間之重要性。故即使digital PCR可絕對定量，但在需要萃取的情況下，仍應使用具公信力之標準品進行校正，以獲得更精確之數據。

二、國家標準品之可交換性 (commutability)

臨床樣品中病毒測量的準確性取決於參考物質或對照標準品能表現出與臨床樣品相同之被檢測效力，即表現出可交換性。可交換性會受到一系列因素的影響，包括分析物之基質與分子變體(此處為HCMV DNA)。本研究中未特別評估以陽性臨床檢品製備之候選標準品的可交換性。HCMV因臨床檢體種類眾多且足量之陽性檢體取得不易，難以如同其他血液病毒國家標準品透過臨床檢體以血漿進行製備，因此將候選標準品以通用基質溶液(Tris-HSA)配製，使其適合在多數臨床基質中進行稀釋以符合不同之測定需求。此外，HCMV候選國家標準品來自細胞培養物，其中包含完整的病毒顆粒與裸露的HCMV DNA形式⁽¹⁷⁾。而來自臨床周邊血液之檢品亦可能包含多種HCMV形態，包含完整病毒顆粒、病毒碎片以及片段化的基因組DNA，其中不同型態的HCMV在不同的血液檢品中比例各有不同，例如來自腎臟移植者的血漿和血清檢品含有高度片段化的HCMV DNA⁽²⁵⁾。以實驗室現有之方法進行基

質評估候選標準品之可交換性。就結果來看Tris-HSA、人類血漿以及細胞培養液定量濃度接近，表現出與可能的檢品種類相似之被檢測效力，3種基質間具有可交換性，然而PBS與其他基質定量結果差異巨大，未來在相關試驗應避免使用PBS。所得之結果除了提供標準品製備與檢品稀釋時基質選擇評估；亦可作為未來在監測細胞治療產品時對於檢品基質與方法選擇間之參考，例如：若獲得之檢品以PBS為基質時，應避免使用Roche kit作為分析方法，並注意可能低估檢品中HCMV之濃度。

三、國家標準品之理想儲存溫度及時限

HCMV國家及工作標準品皆以液體凍存形式保存，因此建議儲存條件為-80°C，為評估標準品的安定性，參照衛福部藥品安定性試驗基準⁽²³⁾、ICH安定性試驗相關指引以及WHO國際標準品安定性評估模式⁽²⁴⁾，並考量標準品儲存條件之耐受性、運送及使用狀況規劃設計安定性評估研究。經由試驗結果證實HCMV國家及工作標準品於液態形式保存效果不佳，但可進行短時間存放，其能維持相應濃度約1-2週，可作為未來使用時之參考。而在冷凍形式保存中則相對穩定，然考量國家標準品需保存數年甚至數十年，因此仍建議儲存條件為-80°C，並應定期檢測其濃度變化。

結 論

本研究已完成HCMV核酸國家與工作標準品各1,188與1,207管之製備，經NGS分析病毒株為與國際標準品相同之Merlin strain，其基因型為國內最盛行之gB1/gN4，且不含其他病毒。考量HCMV因臨床檢體種類眾多，經評估將候選標準品以通用基質(Tris-HSA)配製，使其適合在多數臨床基質中進行稀釋以符合不同之測定需求。並根據共同標定研究結果，定量HCMV核酸國家與工作標準品濃度分別為7.7

$\times 10^6$ IU/mL (6.89 log IU/mL)與 8.7×10^3 IU/mL (3.94 log IU/mL)。其安定性已評估至12個月，於 -20°C 與 -80°C 下保存狀況良好。建立完成之標準品除供食藥署作為細胞治療產品之查驗登記與品質管理及相關病毒核酸標準檢測體系用，亦可供業界與捐血中心作為分子診斷試劑與細胞治療產品研發及/或檢驗之品質管控，將有助於提昇我國生技產業製造水準。

致 謝

感謝澳洲國家血清諮詢實驗室(National Serology Reference Laboratory, NRL)、日本國立感染症研究所(National Institute of Infectious Diseases, NIID)、韓國國家食品藥物安全評估中心(National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, NIFDS)及我國長庚醫療財團法人長庚紀念醫院參與共同標定。

參考文獻

1. Ryan K.J., Ray C.G. 2004. Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp. 556, 566-9. ISBN 978-0-8385-8529-0.
2. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2021. Virus Taxonomy: EC53.
3. Taylor G.H. 2003. Cytomegalovirus. *Am Fam Physician*. 67: 519-524.
4. Vilas Boas L.S., de Souza V.A., Penalva de Oliveira A.C., Rodriguez Viso, A.T., et al. 2003. Cytomegalovirus glycoprotein B genotypes and central nervous system disease in AIDS patients. *J Med Virol*. 71:404-407.
5. Jiang X.J., Zhang J., Xiong Y., Jahn G., et al. 2017. Human cytomegalovirus glycoprotein polymorphisms and increasing viral load in AIDS patients. *PLoS One*. 12:e0176160.
6. Dar L. 2007. Identifying human cytomegalovirus genotypes and defining their clinical significance. *Indian J Med Res*. 126:99-100.
7. Wu K.G., Hung M.C., Chang Y.T., Chen C.J., et al. 2011. Occurrence of human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompetent and immunosuppressed Taiwanese patients. *Intervirology*. 54:196-201.
8. Chen H.P., Lin J.C., Yang S.P., Lan Y.C., et al. 2008. The type-2 variant of human cytomegalovirus glycoprotein N (gN-2) is not the rarest in the Chinese population of Taiwan: Influence of primer design. *J Virol Methods*. 15: 161-164.
9. Larson L. 2009. Sexually Transmitted Diseases Sourcebook. Health Reference Series Detroit: Omnigraphics, Inc; Online.
10. Iwasenko J.M., Howard J., Arbuckle S., Graf N., et al. 2011. Human cytomegalovirus infection is detected frequently in stillbirths and is associated with fetal thrombotic vasculopathy. *J Infect Dis*. 203: 1526-1533.
11. Rosenthal L.S., Fowler K.B., Boppana S.B., Britt W.J., et al. 2009. Cytomegalovirus shedding and delayed sensorineural hearing loss: results from longitudinal follow-up of children with congenital infection. *Pediatr Infect Dis J*. 28: 515-520.
12. European Medicines Agency. 2017. Prevymis: EPAR-summary for the public. EMA/754186/2017.
13. Razonable R.R., Paya C.V., Smith T.F. 2002. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 40:746-752.
14. Hadaya K., Wunderli W., Deffernez C., Martin P.Y., et al. 2003. Monitoring of

- cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients by an ultrasensitive plasma PCR assay. *J. Clin Microbiol* 41:3757–3764.
15. Deckers M., Hofmann J., Kreuzer K.A., Reinhard H., et al. 2009. High genotypic diversity and a novel variant of human cytomegalovirus revealed by combined UL33/UL55 genotyping with broad-range PCR. *Virology* 6:210.
 16. Razonable R.R., Hayden R.T. 2013. Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clin Microbiol Rev.* 26:703-727.
 17. Fryer J.F., Heath A.B., Minor P.D. 2016. Collaborative Study G. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification technology. *Biologicals*. 44: 242-251.
 18. 楊依珍、鄭家弘、陳建彰、葉祐瑄等。2011。建立血液製劑病毒安全檢測體系-多種病毒同步多重檢測體系之評估研究。行政院衛生署100年度自行研究計畫研究報告。
 19. 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。
 20. 楊依珍、陳伊婷、林子軒、謝郁琦等。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。
 21. 楊依珍、宋古鈞、趙珮伶、巫博智等。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理署106年度自行研究計畫報告。
 22. 許家銓、巫博智、林伯霖、陳昕梅等。第二代HBV genotype B病毒核酸候選標準品之建立。衛生福利部食品藥物管理署108年度自行研究計畫報告。
 23. 衛生福利部。2016。藥品安定性試驗基準，105年03月11日衛生福利部授食字第1041408733號。
 24. World Health Organization. 2005. World Health Organization. Technical Workshop on Stability of reference materials for biological medicines and in vitro diagnostics. World Health Organization, Switzerland.
 25. Boom R., Sol C.J., Schuurman T., Breda A.V., et al. 2002. Human cytomegalovirus DNA in plasma and serum specimens of renal transplant recipients is highly fragmented. *J Clin Microbiol*. 40:4105-4113.

Establish the National Standard of Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAAT)

PO-CHIH WU, PO-LIN LIN, HSIN-MEI CHEN, YI-HSUAN PENG,
JIA-CHUAN HSU, MEI-CHIN LIN, SU-HSIANG TSENG AND
DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

The preparation of the 1st national standard for human cytomegalovirus (HCMV) DNA followed the WHO international standard for HCMV and related literature. HCMV virus stock was prepared by cell culture. After heat inactivation, the inactivated virus stock was diluted with tris-HSA to appropriate concentrations and filled into 1,188 vials of candidate national standard and 1,207 vials of working reagent. Quantification was carried out by a commercial IVD kit and an *in-house* digital PCR assay. In order to ensure the objectivity and credibility of the 1st HCMV DNA National Standard, we invited five clinical and official control laboratories to participate in an international collaborative study. The laboratories were requested to test the candidate standards and the WHO HCMV International Standard (NIBSC code 09/162) using their routine method in three independent experiments. All data sets were calculated in International Units/mL (IU/mL). The mean contents of the candidate national standard and working reagent, calibrated against the 1st WHO HCMV International Standard were 7.7×10^6 and 8.7×10^3 IU/mL, respectively. We have also conducted the stability study for 12 months at 4 different temperatures (24°C, 4°C, -20°C and -80°C). The results indicated that the concentration of standards had no significant degradation storing at -20°C and -80°C for 12 months. Further studies on long-term stability are ongoing. The established viral national standards are not only used for registration and quality management for cellular therapy products and related viral nucleic acid standard testing systems, but also used by the industry and blood centers for the development of molecular diagnostic reagents and cellular therapy products and/or quality control of testing. We hope to enhance domestic access to standard products and assist the development of regenerative medical industry in Taiwan.

Key words: national standard, human cytomegalovirus (HCMV), collaborative study, regenerative medicine