

IVD法規彙整-製造綱要

目的：提供動物用離體診斷試劑套組製造綱要撰寫指南

簡要說明

1. 診斷劑簡要說明

2. 動物性來原原料、試劑聲明

套組組成

3. 抗體的製備

4. 抗原的製備

5. 核酸擴增技術

6. 標準試劑的製備

產品說明與 驗證

7. 產品的製備

8. 驗證試驗

參考法規

1. 防檢局 動物診斷試劑草案-製造綱要
2. 中華民國 體外診斷醫療器材查驗登記須知(人用)
3. USDA- VETERINARY SERVICES MEMORANDUM NO. 800.206

製造綱要簡要說明與聲明

診斷劑套組簡要說明

- 診斷劑原理 (酵素結合免疫吸附法、乳膠凝集試驗...等)
- 檢測的標的 (抗原、抗體或核酸)
- 診斷劑為定性、半定量、定量
- 適用之檢體種類 (血清、全血或淚液...等)
- 診斷劑套組所有組成和儀器、軟體清單
- 檢測結果之解讀及其限制、包含後續試驗的說明

動物性原料、試劑聲明

- 診斷劑套組生產過程中，有動物來源之成分須提出證明，其不含外來物質，如牛海綿狀腦病變 (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) 物質。
- 如果該國存在高致病性禽流感 (Highly pathogenic avian influenza, HPAI) 和新城病，不得自該國採購任何禽類動物成分。
- 如果該國存在口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 、非洲豬瘟 (African swine fever, ASF) 、典型豬瘟 (Classical swine fever, CSF) ，不得自該國採購任何哺乳類動物成分。

抗體的製備

外購者

外部購買單株抗體、多株抗體、融合瘤需說明

- 供應商、產品型號、生產國
- 接收後進行的所有測試，確認是否符合規範
- 單株抗體需提供完整特性、反應表位或細胞名稱。

多株抗體

免疫前

- 說明動物的種別、年齡、體重、條件，及健康狀況。
- 說明免疫前的檢查、準備、照護、檢疫程序及給予的處置。

動物免疫

- 說明抗原特性和劑量，使用佐劑者，應提供其製備的細節。使用商品化產品者，說明其標籤上的品名、供應商、批號及有效期間。
- 說明免疫方法、免疫計畫和採集方法、次數、間隔、體積
- 說明採樣產物的允收試驗與標準

抗體的製備

單株抗體

融合瘤

- 自行製備者，應確認使用的抗原、佐劑、說明動物種別、免疫方法
- 確認組織的來源及採集、分離和鑑定免疫細胞的程序
- 說明母代骨髓瘤細胞株的來源、鑑定及其分泌的產物（輕鏈或重鏈）
- 說明轉殖與再轉殖的程序，包含其特性和增殖過程
- 說明細胞庫的建立和維持程序等，須有完整的批次編號，並標示於細胞保存容器。
 - 監測每批次細胞的特性，例如外觀、生長速率、產酸或其他可觀察特徵。
 - 說明其他在融合瘤細胞株執行的相關檢驗或程序

抗體生產

- 說明生產方法，若以細胞株生產，說明完整的細胞培養和繼代程序。
- 若以動物生產說明使用的動物種類、動物來源、飼養管理、繼代程序。
- 提供單株抗體的允收標準，含純度試驗
- 說明所生產抗體批次間一致性的所有試驗，或其他維持一致性的方法
- 說明所有特性確認的程序，包含所有對照單株抗體的預期反應性。

抗原的製備

外購者

- 供應商、生產國、產品批號與型號，說明允收標準，包含所有生產者和接收者所進行的檢驗。

自行生產

- 鑑別使用的微生物、細胞，包含各生產階段所使用之種株與工作株。
- 如果使用已核准的病毒種株、細菌或其衍生的抗原，提供其相關的檢驗和核准日期等資料。
- 說明繼代步驟，包含細胞培養的鑑別、培養基成分、培養條件和採集方法。
- 若以雞蛋生產抗原，說明蛋的來源、日齡、接種途徑。
- 若使用合成抗原或寡核苷酸 (oligonucleotides)，說明抗原名稱、分子式、化學結構、序列、純化步驟、純度、安定性、特異性，其他對於原料、成或用途之特別說明。
- 說明萃取、確認抗原的程序、抗原標準化的程序

核酸擴增技術

- 藉由標的序列的放大分析方法，每個測試檢體宜有內部對照組（internal control），以反應其分析狀態。
- 基因型檢測須提供適當設計之引子（primer）或探針（probe）設計確認資料，並由已知基因型檢體進行確效（validation）。
- 為了研究檢體間之交互污染，於再現性試驗時須交互操作強陽性與陰性檢體至少五次以上。強陽性檢體須為自然感染且具高效價之病毒。
- 應測試弱陽性檢體以評估造成偽陰性結果之整體系統失效率。弱陽性檢體應相當於偵測極限三倍之病毒濃度。
- 必要時，需證實能偵測突變株或各種基因多型性。

標準試劑的製備

標準試劑須符合下表限制：

成分	同批次套組， 需使用同批次試劑	製造大綱中標示來源或成分	成分效期不可超過 套組效期
抗物種之抗體或鍵結物	需要	需要	需要
抗原或抗體	需要	需要	需要
PCR 預混合液 (PCR Master Mix)	需要	需要	需要
樣本稀釋液	不需要	需要	需要
對照組	需要	需要	需要
終止試劑	不需要	需要	不需要
固相塗層	需要	需要	需要

自行生產

說明試劑避免細菌汙染的方法，包含製造到保存的最長時間。

說明生產流程和標準化流程，包含

- 陽性和陰性對照
- 鍵結物，包含抗物種抗體、免疫球蛋白結合蛋白（例如：A、G、L、膠體金、生物素）或任何標定之酵素。
- 緩衝液、稀釋液、其他試劑

外購者

- 供應商、生產國、產品批號與型號，說明允收標準，包含所有生產者和接收者所進行的檢驗。

產品的製備

產品製程的完整說明

完整說明從生產外購到最終產品過程中，用於標準化抗原、參考標準品陽性與陰性對照組血清，及標準試劑的方法，包含

- 充填、植盤、或接合抗原及抗體之固定相方法。同一批診斷劑套組需使用單一批次製備的固定相基質。
- 診斷劑套組中所有試劑的可接受之最大最小充填體積，確保有足夠的試劑執行測試。
- 列出所有防腐劑的化學名稱或產品名稱與其含量。如外購者說明供應商、產品型號、允收標準。

試驗

效價（potency）試驗

- 說明確認診斷劑套組相對反應性的試驗細節，包含可接受的最低標準。
- 使用於此目的的對照標準品與對照血清應以代碼或批號加以確認，並說明每個對照標準品與對照血清的檢測的有效標準、保存條件。效價檢測的樣本須包含
 - 陰性/未感染動物的樣本
 - 強陽性動物的樣本
 - 弱陽性動物的樣本
- 詳細內容參考VS Memorandum No. 800.73確效驗證

製備後的步驟

- 說明診斷劑套組中所有試劑/成分的最終容器形式和大小。
- 說明代表性檢體的收集保存和送樣
- 說明試劑盒儲存、運輸條件
- 確認有效期限，診斷劑套組的每個成分應標示各別的有效期限。有效期限的計算應自第一次效力檢測開始日期計算。
- 提供建議使用方法的細節，包含測試樣品的品質條件、試劑的限制、合格條件和結果的解讀。所有具傳染性的材料都須有適當標示；所有化學品皆須有化學安全標示與處置說明。

種株、細胞庫

背景與定義

- 動物用產品生產過程中，用於生產的微生物與細胞株，須由批准的種株與細胞庫衍生而來。
- **種株(Master seed)**：由生產者選定特定的生物代數永久保存，其他子代的傳代均需源自於此，並在特定的代數中衍生。
- **細胞庫(Master cell stock, MCS)**：供應特定的細胞代數，作為生產的生物製劑的細胞起源

診斷劑套組應用

- 單株抗體的生產-融合瘤
- 抗原的生產-以微生物生產或以細胞生產

細胞庫(MCS)

細胞基本資訊

- 細胞名稱
- 細胞來源、種類、培養基、細胞特性
- 細胞繼代方式，指明細胞庫建立的繼代代數
- 細胞庫需有完整批次編號(或其他特定標示)，細胞保存容器的批次編號需與紀錄一致
- 說明可容許的最大繼代代數，並規範於製造綱要中
 - ▣ 於初代細胞(MCS)與最大繼代代數(MCS+n)檢測50個細胞的減數分裂，MCS+n中染色體總數需介於MCS的染色體數 $\pm 15\%$ 。
 - ▣ 於初代細胞(MCS)與最大繼代代數(MCS+n)的細胞中須檢測到相同的染色體標記

細胞庫

細胞庫物種鑑定

經過以下方法驗證細胞庫細胞與上述細胞，物種來源一致

➤ 細胞庫細胞染色鑑定

- ❑ 以總面積6 cm²培養容器培養至少4個單層細胞，每個單層細胞需有80%覆蓋率
- ❑ 將單層細胞取出進行染色
 1. 其中兩個單層細胞使用與來源物種無關的抗物種螢光抗體進行染色
 2. 另外兩個單層細胞使用與來源物種相關的抗物種螢光抗體進行染色
 3. 檢測細胞使否有螢光訊號

染色抗體	結果
來源物種無關	如有非特異性螢光，或模糊結果，應重複程序，直至沒有其他物種螢光抗體。
來源物種相關	如未發現螢光訊號，則該細胞庫不得用於生產

細胞庫

細胞庫外來物質鑑定

- 細胞庫、所有用於產品生產之細胞、產品容器須證明不得含有黴漿菌、真菌、細菌
- 將MCS單層細胞75 cm²培養21天，培養期間須證明不含本段規定的外來物質
 1. 細胞病變劑(cytopathogenic agent)
 2. 附血性因子(hemadsorbing agents)-吸附於紅血球表面的物質
 3. 外來病毒-Bovine virus diarrhea virus、Reovirus、Rabies virus
 4. 如使用特定物種細胞，須針對特定病毒進行檢測

細胞物種	檢測特定病毒
牛細胞、山羊細胞、綿羊細胞	藍舌病病毒、牛腺病毒、博卡病毒、牛呼吸道融合性病毒
犬類細胞	犬冠狀病毒、犬瘟熱病毒、犬小病毒
馬細胞	馬皰疹病毒、馬動脈炎病毒
貓類細胞	貓傳染性腹膜炎病毒、貓泛白血球減少症病毒
豬細胞	豬腺病毒、豬細小病毒、豬傳染性胃腸炎病毒、豬凝血性腦脊髓炎病毒

參考資料：USDA- VETERINARY SERVICES MEMORANDUM NO. 800.109
 9 CFR § 113.52 - Requirements for cell lines used for production of biologics
 9 CFR § 113.46 - Detection of cytopathogenic and/or hemadsorbing agents.
 9 CFR § 113.47 - Detection of extraneous viruses by the fluorescent antibody technique.

細胞庫

細胞庫外來物質鑑定

- MCS培養21天後細胞須經過3次冷凍解凍破碎細胞，取離心後的細胞上清液培養於Vero cell與 Embryonic cells、neonatal cells或其他與MCS同物種的細胞系，須培養14天並繼代至少1次。培養14天期間須證明不含以下外來物質存在
 1. 細胞病變劑(cytopathogenic agent)
 2. 附血性因子(hemadsorbing agents)
 3. 外來病毒-Bovine virus、diarrhea virus、Reovirus、Rabies virus

細胞庫

細胞來源：對於所使用材料為細胞來源如單株抗體或重組DNA技術時，須依實際需要載明：

- 細胞來源、種類
- 細胞之基因型與表現型
- 母細胞株之特性
- 單株選殖步驟
- 不朽化之步驟
- 監控與測試步驟
- 基因構築之特性
- 載體之特性
- 細胞庫之建立、特性、維持與安定性
- 細胞培養步驟
- 收集步驟
- 純化與去活化步驟
- 下游製程步驟
- 其他對於原料、製程或用途之特別敘述

種株

種株起源、繼代歷史

- 生物名稱
- 說明微生物取得的方法、繼代紀錄，包含如何分離、培養基、繼代方法、過程中是否有用到動物或細胞。

種株鑑定

- 說明種株的分類階層，須為規範於9CFR或APHIS認可的分類。
- 如果種株有特定的菌株或類型，則必須執行額外的測試以確認菌株類型。
- 如果種株表現的特定抗原對有重要的免疫原性(或作為標誌物)且此抗原並非所有分離株都具有的特定抗原(例如，大腸桿菌上的 K99 菌毛)，請提供測試結果以確認該抗原的表達。

種株

種株純度鑑定

- 檢驗種株是否有其他細菌、真菌汙染
- 如種株為病毒或胞內寄生生物需檢測是否有外來黴漿菌汙染

種株外來物鑑定

- 禽類來源病毒須檢驗是否有沙門氏菌(*Salmonella*)、淋巴樣白血病病毒(lymphoid leucosis virus)和凝血病毒(hemagglutinating viruses)汙染。
- 病毒與其他胞內寄生生物，需進行外來病毒的檢測
 1. 將種株培養於vero cell、胚胎細胞或新生兒細胞、或其他推薦之細胞
 2. 如種株造成細胞病變或引起血球吸附，則應使用APHIS提供獲批准的特異性抗血清中和病毒，或APHIS批准的方法中和。
 3. 如種株無法引起細胞病變或血球吸附，則將接種細胞連續培養14天，持續觀察細胞，如有細胞病病，則種株不符合規範。
 4. 培養14天後，以特定螢光抗體檢測細胞是否有外來病毒、細胞病變劑、血球吸附物。

9 CFR § 113.47 - Detection of extraneous viruses by the fluorescent antibody technique.

9 CFR § 113.55 -Detection of extraneous agents in Master Seed Virus.

種株

摘要訊息

- 經重組技術生產的種株、應用於活生物產品的種株需提交額外的安全報告、與身分鑑定報告。
- 用於表現外源抗原的重組生物，須測試種株的表現能力。

附錄

- 用於活生物產品的改良種株需要重新測試免疫源性、或其他項目的測試，原始種株的測試報告須以附錄形式提交，內容須包含測試種株的產品代碼、研究日期。

種株、細胞庫

	細胞庫	種株
基本資訊	培養基、培養條件、繼代條件、來源及歷史	培養基、培養條件、繼代條件、來源及歷史
身分鑑定	物種鑑定	物種分類 菌株鑑定
汙染物鑑定	不得有黴漿菌、真菌、細菌汙染	不得有外來細菌、黴菌汙染
外來物鑑定	不得有細胞病變劑、附血性因子、外來病毒	病毒或胞內寄生生物不得有其他病毒、黴漿菌汙染
其他	須建立細胞最大繼代代數	抗原生產能力測定 活生物產品種株包含安全報告

主序列Master sequence

- Master sequence(MSQ)-以目標序列生產的生物製劑，應用於生物製品。
- 每批合成試劑須符合製造綱要中建立的標準，標準須包含
 - ❑ 效力
 - ❑ 特性
 - ❑ 純度
 - ❑ 身分鑑定
 - ❑ 預期用途的特性