

防疫學苑系列 008-1

傳染病  
標準檢驗方法手冊（上）  
Manual of Standard Operation  
Procedure of Communicable Diseases ( I )

衛生福利部疾病管制署 編

衛生福利部疾病管制署出版

2014 年 5 月

衛生福利部疾病管制署  
傳染病標準檢驗方法手冊

保管人：\_\_\_\_\_

分發冊號：\_\_\_\_\_

領取日期：\_\_年\_\_月\_\_日

一、第一類法定傳染病	1
1. 天花	1
● 天花病毒分離與鑑定	1
● 天花病毒核酸檢測 (Real-time PCR)	5
2. 鼠疫	11
● 鼠疫桿菌分離與鑑定	11
● 鼠疫桿菌F1 抗體檢測 (酵素免疫分析法)	17
3. 嚴重急性呼吸道症候群 (SARS)	21
● SARS病毒病原體分離、鑑定	21
● SARS病毒核酸檢測 (real-time PCR)	24
4. 狂犬病	31
● 狂犬病病毒分離與鑑定	31
● 狂犬病病毒核酸檢測 (RT-PCR)	34
● 狂犬病病毒抗體檢測 (ELISA)	40
5. H5N1 流感	44
● H5N1流感病毒分離、鑑定	44
● H5N1流感病毒螢光定量聚合酶連鎖反應(real-time PCR)	46
二、第二類法定傳染病檢體	50
1. 炭疽病	50
● 炭疽桿菌分離與鑑定	50
● 炭疽桿菌分子生物學核酸檢測 (即時定量聚合酶連鎖反應)	56
● 炭疽桿菌血清學抗體檢測	61
2. 白喉	66
● 白喉桿菌分離與鑑定	66
● 白喉桿菌核酸檢測 (PCR)	74
● 白喉桿菌毒素測定(Elek's plate virulence test)	78
3. 傷寒、副傷寒	83
● 傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌分離與鑑定	83
4. 登革熱	91
● 登革病毒分離與鑑定	91
● 登革病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	97
● 登革病毒NS1抗原檢測 (Dengue virus NS1 antigen rapid test)	101
● 登革病毒、日本腦炎病毒IgM及IgG抗體檢測 (ELISA)	103
5. 流行性腦脊髓膜炎	108
● 奈色氏腦膜炎雙球菌分離與鑑定	108
6. 桿菌性痢疾	116
● 痢疾桿菌分離與鑑定	116
7. 阿米巴性痢疾	124
● 痢疾阿米巴檢測 (鏡檢法)	124

●	痢疾阿米巴糞便核酸檢測(兩階段巢式PCR).....	129
●	痢疾阿米巴糞便抗原(酵素免疫篩檢法).....	136
●	痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗(即時Real time PCR法).....	140
8.	小兒麻痺.....	147
●	小兒麻痺病毒分離與鑑定.....	147
9.	瘧疾.....	166
●	瘧原蟲檢測(鏡檢法)1.....	166
●	瘧原蟲分子生物學核酸檢測(兩階段巢式PCR法).....	171
10.	麻疹.....	181
●	麻疹病毒分離與鑑定.....	181
●	麻疹病毒核酸檢測.....	191
●	麻疹病毒IgM抗體檢測(Indirect ELISA).....	198
●	麻疹病毒IgG抗體檢測(Indirect ELISA).....	207
11.	急性病毒性A型肝炎.....	217
●	A型肝炎病毒IgM抗體檢測(化學冷光微粒免疫分析法).....	217
12.	漢他病毒症候群.....	224
●	漢他病毒核酸檢測(Real-time RT-PCR).....	224
●	漢他病毒抗體檢測(ELISA).....	228
13.	腸道出血性大腸桿菌感染症.....	232
●	出血性大腸桿菌分離與鑑定.....	232
●	出血性大腸桿菌毒素檢測(RPLA).....	240
●	出血性大腸桿菌毒素基因鑑定(PCR).....	245
14.	德國麻疹.....	250
●	德國麻疹病毒分離與鑑定.....	250
●	德國麻疹病毒核酸檢測.....	265
●	德國麻疹病毒IgM抗體檢測(Indirect ELISA).....	266
●	德國麻疹病毒IgG抗體檢測(Indirect ELISA).....	275
15.	屈公病.....	284
●	屈公病毒分離與鑑定.....	284
●	屈公病毒核酸檢測(Real-time RT-PCR).....	288
●	屈公病毒IgM及IgG抗體檢測(ELISA).....	292
16.	霍亂.....	297
●	霍亂弧菌分離與鑑定.....	297
●	霍亂弧菌毒素基因鑑定(PCR).....	305
●	霍亂弧菌毒素檢測(RPLA).....	310
17.	多重抗藥性結核病.....	315
●	結核菌群培養.....	315
●	結核菌群鑑定(生化).....	321
●	結核菌群藥物感受性試驗(多重抗藥性結核桿菌抗藥基因檢測).....	327
●	結核菌群間接藥物感受性試驗(瓊脂平板法).....	334
18.	西尼羅熱.....	338

●	西尼羅病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	338
●	西尼羅病毒IgM 及IgG 抗體檢測 (ELISA)	342
19.	流行性斑疹傷寒	347
●	恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒病原體核酸檢測	347
●	流行性斑疹傷寒抗體檢測	353
三、	第三類法定傳染病檢體	359
1.	百日咳	359
●	百日咳菌分離與鑑定	359
●	百日咳菌核酸檢測 (PCR)	366
●	百日咳核酸檢測 (PCR LAMP 法)	373
●	百日咳菌核酸菌株抗原分析	380
2.	日本腦炎	384
●	日本腦炎病毒分離與鑑定	384
●	日本腦炎病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	388
●	登革病毒、日本腦炎病毒IgM 及IgG 抗體檢測 (ELISA)	392
3.	結核病 (除多重抗藥性結核病外)	397
●	結核菌群培養	397
●	分枝桿菌屬鑑定 (抗酸性抹片鏡檢法)	403
●	結核菌群鑑定 (生化)	408
●	結核菌群間接藥物感受性試驗 (瓊脂平板法)	414
●	結核菌群核酸檢測 (間隔寡核酸分子分型法)	418
●	分枝桿菌屬核酸檢測 (限制酶片段長度多型性分子鑑定法)	423
●	結核菌群核酸檢測 (IS6110結核菌限制酶片段長度多型性分型法)	429
●	結核菌群核酸檢測 (散置重複單元-可變重複序列分子分型法)	441
●	結核菌群分子檢測 (IS6110 real-time PCR for Mycobacterium tuberculosis complex)	446
●	結核菌群快速核酸檢測 (GenoType® MTBC)	451
●	不常見非結核分枝桿菌快速核酸檢測 (GenoType Mycobacterium AS)	457
●	常見非結核分枝桿菌快速核酸檢測 (GenoType Mycobacterium CM)	462
4.	先天性德國麻疹症候群	
●	同德國麻疹	
5.	急性病毒性肝炎 (除A型外)	467
●	B型肝炎病毒核心IgM抗體檢測 (化學冷光微粒免疫分析法)	467
●	C型肝炎病毒抗體檢測 (化學冷光微粒免疫分析法)	474
●	C型肝炎病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	481
●	D型肝炎病毒IgM抗體檢測 (ELISA)	487
●	E型肝炎病毒抗體檢測 (IgM/IgG)	491
●	E型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測 (IgM/IgG)	501
6.	流行性腮腺炎 (群聚感染)	512
●	腮腺炎病毒分離與鑑定	512
●	腮腺炎病毒核酸檢測	522

●	腮腺炎病毒IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	528
●	腮腺炎病毒IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	537
7.	退伍軍人病	546
●	退伍軍人病病原菌分離與鑑定	546
●	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (EIA)	555
●	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (RIMA)	562
●	嗜肺退伍軍人菌抗體檢測 (IFA)	566
●	退伍軍人菌抗原檢測 (LATEX)	573
●	退伍軍人菌抗體檢測 (DFA)	577
●	水中退伍軍人菌分離與鑑定	581
8.	侵襲性b型嗜血桿菌感染症	590
●	侵襲性b型嗜血桿菌分離與鑑定	590
9.	梅毒	597
●	RPR (Rapid Plasma Reagin) 快速血漿反應素試驗標準檢驗方法	597
●	VDRL (Venereal Disease Research laboratory) 標準檢驗方法	602
●	TPPA (Treponema Pallidum Particle Agglutination) 標準檢驗方法	608
●	TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination Agglutination) 標準檢驗方法	616
10.	淋病	625
●	奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定	625
●	奈色氏淋病雙球菌染色鏡檢 (革蘭氏染色法)	630
●	奈色氏淋病雙球菌及砂眼披衣菌分子生物學檢測 (Real-Time-PCR)	634
11.	腸病毒感染併發重症	641
●	腸病毒分離與鑑定	641
●	腸病毒七十一型IgM抗體檢測	651
●	腸病毒七十一型核酸檢測 (反轉錄酶-聚合酶鏈鎖反應法)	654
●	腸病毒-巢式聚合酶鏈鎖反應法(CODEHOP)	660
12.	人類免疫缺乏病毒感染與後天免疫缺乏症候群 (AIDS)	667
●	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (粒子凝集法)	667
●	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (WB)	674
●	人類免疫缺乏病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	682
四、第四類法定傳染病檢體 744		
1.	疱疹B病毒感染症	690
●	疱疹B病毒分離與鑑定	690
●	疱疹B病毒核酸檢測 (Real-time PCR)	694
●	疱疹B病毒抗體檢測	702
2.	鈎端螺旋體病	704
●	鈎端螺旋體分離與鑑定	704
●	鈎端螺旋體抗體檢測 (顯微凝集法)	709
●	鈎端螺旋體抗體檢測 (ELISA)	716
3.	類鼻疽	720

●	類鼻疽伯克氏菌分離與鑑定	720
4.	肉毒桿菌中毒	725
●	肉毒桿菌分離與鑑定	725
●	肉毒桿菌中和試驗	729
●	肉毒桿菌毒素檢測	733
5.	侵襲性肺炎鏈球菌感染症	737
●	侵襲性肺炎鏈球菌分離與血清型別鑑定	737
6.	Q熱	744
●	貝氏考克斯菌核酸檢測 (STN-RT PCR)	744
●	Q熱病原體血清學抗體檢測 (IgM 與IgG, IFA)	750
7.	恙蟲病、地方性斑疹傷寒	756
●	恙蟲病及斑疹傷寒病原體分離與鑑定	756
●	恙蟲病及斑疹傷寒病原體核酸檢測 (Real-time PCR)	761
●	恙蟲病抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	768
●	地方性斑疹傷寒抗體檢測	774
8.	萊姆病	780
●	萊姆病病原菌分離與鑑定	780
●	萊姆病病原菌抗體檢測 (ELISA)	784
●	萊姆病病原菌抗體檢測 (WB)	788
9.	兔熱病	794
●	兔熱病病原菌抗體檢測 (微量平板法)	794
●	兔熱病病原菌抗體檢測 (IHA)	797
10.	水痘併發症	802
●	水痘病毒分離與鑑定	802
●	水痘病毒核酸檢測	811
●	水痘病毒IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	817
●	水痘病毒IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	826
11.	弓形蟲感染症	835
●	弓形蟲分子生物學核酸檢測 (PCR)	835
●	弓形蟲IgM及IgG抗體檢測 (EIA及ELFA)	840
●	弓形蟲IgG親和力試驗 (IgG avidity test)	846
12.	流感併發症	851
●	流感病毒分離與鑑定 (流感併發症)	851
●	流感病毒核酸檢測 (real-time PCR)	861
13.	庫賈氏症	867
●	庫賈氏病標示蛋白檢測 (WB)	867
●	庫賈氏病PRNP基因型別分析	875
14.	布氏桿菌病	879
●	布氏桿菌分離與鑑定	879
●	布氏桿菌抗體檢測 (RBT及CFT)	884
五、	第五類法定傳染病檢體	887

1. 裂谷熱	887
● 裂谷熱病毒分離與鑑定	887
● 裂谷熱病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	891
● 裂谷熱病毒抗體檢測 (ELISA)	896
2. 馬堡病毒出血熱	900
● 馬堡病毒分離與鑑定	900
● 馬堡病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	904
● 馬堡病毒抗體檢測 (ELISA)	910
3. 黃熱病	914
● 黃熱病毒分離與鑑定	814
● 黃熱病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	918
● 黃熱病毒IgM 及IgG 抗體檢測 (ELISA)	922
4. 伊波拉病毒出血熱	927
● 伊波拉病毒分離與鑑定	927
● 伊波拉病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	931
● 伊波拉病毒抗體檢測 (ELISA)	937
5. 拉薩熱	941
● 拉薩病毒分離與鑑定	941
● 拉薩病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	945
● 拉薩病毒抗體檢測 (ELISA)	951
6. 中東呼吸症候群冠狀病毒感染症	955
● 中東呼吸症候群冠狀病毒病原體分離、鑑定	955
● 中東呼吸症候群冠狀病毒核酸檢測 (real time RT-PCR)	958
7. H7N9流感	963
● H7N9流感病毒核酸檢測 (real time RT-PCR)	963
六、非法定傳染病檢體	967
1. 金黃色葡萄球菌食品中毒	967
● 金黃色葡萄球菌分離與鑑定	967
● 金黃色葡萄球菌腸毒素檢測 (RPLA)	973
● 金黃色葡萄球菌毒素測定(聚合酶連鎖反應法)	979
2. 腸炎弧菌食品中毒	984
● 腸炎弧菌分離與鑑定	984
3. 食物中毒及腹瀉群聚	991
● 諾羅病毒抗原檢測 (ELISA)	991
● 諾羅病毒分子生物學檢測	998
● 輪狀病毒抗原檢測 (ELISA)	1002
● 輪狀病毒分子生物學檢測	1009
4. CRE抗藥性檢測	1013
● CRE抗藥性檢測	1013
5. VISA/VRSA抗藥性檢測	1018
● VISA/VRSA菌種鑑定及抗藥性基因檢測	1018



6. A群鏈球菌侵襲性感染或毒性休克症候群	1025
● A群鏈球菌菌種分離、鑑定	1025
7. 肺炎披衣菌	1031
● 肺炎披衣菌核酸檢測 (PCR)	1031
● 肺炎披衣菌IgM 及IgG 抗體檢測 (MIF)	1039
8. 鸚鵡熱	1048
● 鸚鵡熱披衣菌IgM及IgG抗體試驗	1048
9. 隱球菌症	1057
● 新型隱球菌抗原檢測(latex agglutination test)	1057
10. 仙人掌菌	1062
● 仙人掌桿菌分離與鑑定	1062
中文索引	1067
英文索引	1072



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 1 頁/共 1078 頁

天花病毒分離與鑑定

核准日期：年 月 日

修訂日期：年 月 日

## 1 目的

檢測疑似病患的血液或組織中是否含有天花病毒。

## 2 適用檢體種類

適用於病患發病期內皮膚水泡、血液、咽喉擦拭檢體或結痂檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用 Vero 細胞株於組織培養盤中接種病患上述檢體，於 5 % CO<sub>2</sub>，37 °C 培養箱中培養 3 日，利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 原理，將培養細胞內經純化之病毒核酸進行特異複製放大，以洋菜膠電泳分析法進行聚合酶鏈鎖反應產物分析，由 DNA 片段大小判定結果。

## 5 試劑耗材

5.1 EMEM 細胞培養液 (Eagles' minimum essential medium)，含 10 % 胎牛血清【FBS】及 1 % 三合一抗生素【PSA】

EMEM Gibco, USA, Cat. no. 51200-046

FBS, fetal bovine serum, certified, heat-inactivated, Cat. no. 10082-147

PSA, pen-strep-ampho sol., Gibco, USA, Cat. no. 15070-063

trypsin, 0.25 % with EDTA 4Na, liquid, Gibco, USA, Cat No. 25200-056。

5.1 非洲綠猴腎臟上皮細胞株 Vero E6 (ATCC No. CCL-81)。

5.2 特異引子：

VAR1-S1：CTGGTGTAGAGATAGCCGA

VAR1-A1：ATGGCTTCCGATTGGATTAC

5.3 病毒核酸純化套組 (QIAamp DNA blood mini kit, Quagen, USA)。

5.4 0.2 mL PCR 反應管。

5.5 聚合酶鏈鎖反應試劑 (phusion high-fidelity DNA polymerase)。

5.6 洋菜膠 (MetaPhor® agarose)。

5.7 Protech MI-100T Bio 100 bp DNA ladder。

5.8 無菌微量吸管尖 (tip)：10 μL、20 μL、200 μL。

5.9 無菌蒸餾水。

5.10 可拋棄式無菌塑膠手套。

## 6 儀器設備

6.1 37 °C CO<sub>2</sub> 培養箱 (Napco, USA, Model 5430)。

6.2 第 III 級生物安全櫃 (La Calhene, France)。

6.3 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC, SterilGARD III Advance, USA, Baker Company)。

6.4 MJ research PTC 200 thermocycler。

6.5 5 - 40 μL、40 - 200 μL 及 200 - 1,000 μL Pipette。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 2 頁/共 1078 頁

天花病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

6.6 -20 °C 及 -80 °C 冷凍櫃 (Thermo Scientific, USA)。

## 7 環境設施安全

7.1 於生物安全第四等級實驗室內檢體分裝、去活化。檢驗操作在生物安全等級 BSL-2 plus 實驗室進行。

7.2 水質：25 °C 蒸餾水或 RO 逆滲透可達 18 MΩ-CM 以上超純水。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowt reeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowt reeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

10.1 在 Vero 細胞株於含有 EMEM (含 10 % FCS 及 1 % PSA) 培養液之 12 孔組織培養盤中培養。

10.2 將患者 100 μL 之檢體加入。

10.3 於 37 °C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中培養約 3 - 4 天。

10.4 培養細胞內病毒核酸純化，依 QIAamp DNA blood mini kit 操作手冊

10.5 病毒核酸特異複製放大 (PCR)：

10.5.1 反應溶液：

10X PCR buffer 5 μL, 10 mM dNTP 1 μL, 10 pmol/μL VAR1-S1 primer 1 μL, 10 pmol/μL VAR1-A1 primer 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 40 μL, Taq 1 μL, 檢體核酸或質體核酸陽性對照組 2 μL。

10.5.2 反應步驟：

98 °C 1 min, 再進行 40 次循環 98 °C 10 sec, 55 °C 30 sec, 72 °C 10 sec, 最終以 72 °C 10 min 結束。

10.5.3 進行洋菜膠電泳分析。

## 11 結果判定


### 11.1 判讀標準

11.1.1 洋菜膠電泳分析判定：PCR 反應產物取 10 μL，在 3 % MetaPhor® Agarose 進行電泳後，檢視結果。天花病毒核酸 PCR 產物為 151 bp，其他痘病毒科 PCR 產物均大於 160 bp。

11.2 報告核發：病原體分離(陰性)，病原體分離(陽性)

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送報告簽署人審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	天花病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 3 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 12 品質管制

- 12.1 嚴防病原散佈或污染，工作時帶手套。
- 12.2 實驗過程遵循 S.O.P 的作業規範與流程，檢體處理需在 BSL-4 實驗室內操作，以避免污染。
- 12.3 生物安全櫃及培養箱定期做校正及維護。
- 12.4 置於 37 °C CO<sub>2</sub> 恆溫箱染色時應注意保持溼度。
- 12.5 必須要有未感染病毒之細胞及感染病毒（其他痘科病毒）之細胞分別做為陰性與陽性對照組。
- 12.6 聚合酶鏈鎖反應須含有陰性與陽性對照組。

## 13 廢棄物處理

- 13.1 檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序辦理。

## 14 參考資料

- 14.1 Henderson DA, Inglesby TV, Bartlett JG.. 1999. Smallpox as a biological weapon, medical and public health management. JAMA 281: 2127-37.
- 14.2 Ropp S, Jin Q, Knight J. 1995. PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses. J Clin Microbiol 33: 2069-2076.

## 15 附錄

- 15.1 天花病毒分離與鑑定流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

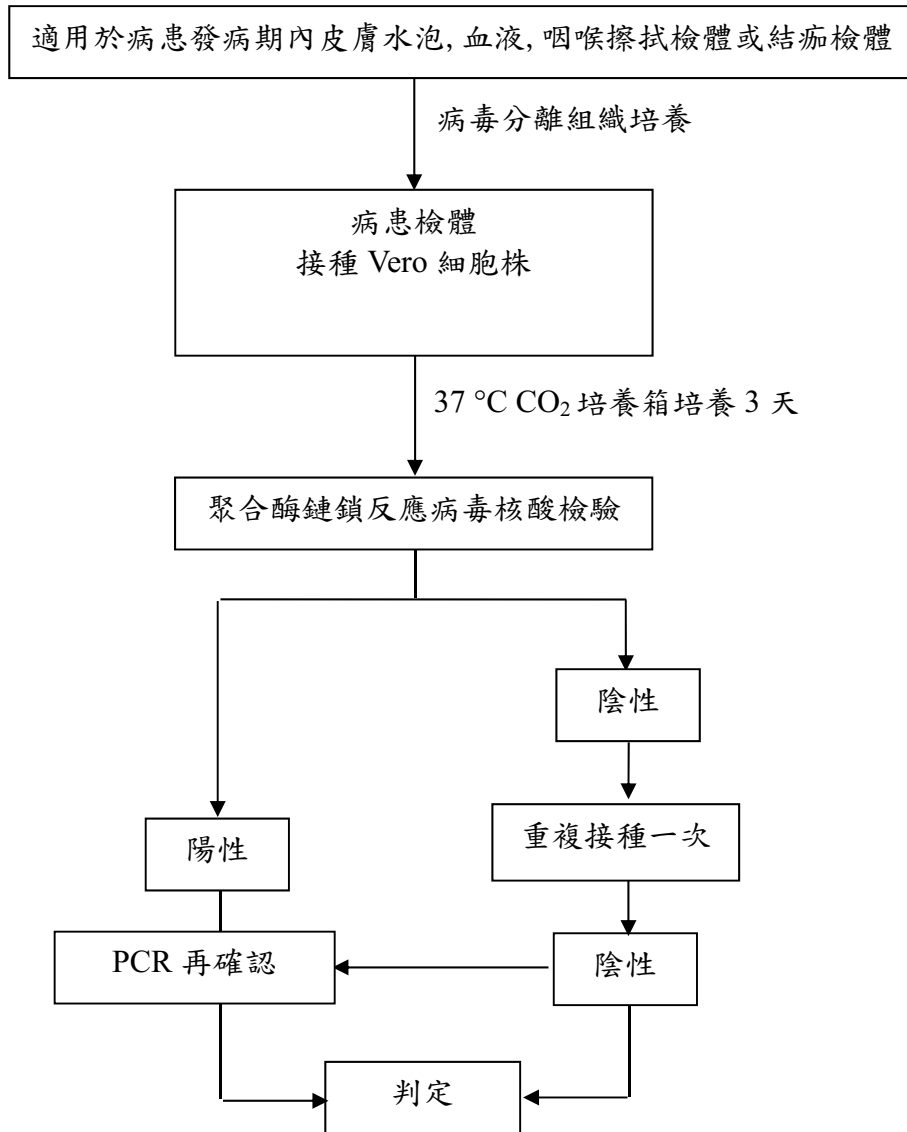
頁次：第 4 頁/共 1078 頁

天花病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 天花病毒分離與鑑定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 5 頁/共 1078 頁

天花病毒核酸檢測  
(Real-time PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

檢測天花病毒基因。

## 2 適用檢體種類

適用於符合天花病毒感染病徵之病患血清檢體。

## 3 名詞解釋

Smallpox virus：天花病毒。

## 4 原理概述

其技術原理是將待測的病毒 DNA，利用 PCR 技術將基因片段以幾何級數倍增的方式增加到數十萬倍，若以 Real Time PCR 儀器進行時，則是 PCR 反應一面進行時，機器就利用 Taqman 螢光偵測技術與電腦分析並記錄 PCR 的反應結果，因此能以螢光曲線即時呈現檢驗結果。

## 5 試劑耗材

5.1 檢體稀釋液 (PBS pH 7.2, 0.05 % Tween 20, 0.5 % BSA)。

5.2 QIAamp viral DNA 抽取試劑組。

5.3 Real-time PCR 儀器 LightCycler 所需之檢體毛細管。

5.4 LightCycler Fast-Start DNA master HybProbe (Cat no. 03 515 575 001)。

5.5 Nuclease-free (RNase/DNase-free) 無菌微量吸管尖 (tip)：5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、200  $\mu$ L。

5.6 Nuclease-free (RNase/DNase-free) 無菌蒸餾水。

5.7 可拋棄式無菌 Nuclease-free (RNase/DNase-free) 塑膠手套。


5.8 病毒基因製備：

國內直至目前為止並無第四級病毒感染之病例報告，更因此類病毒受到國際協會的管制無法獲得這些第四級病毒做為參考病毒。所以這些病毒抗原之製備，則需靠人工合成基因之方式獲得，本實驗方法之陽性對照組由天花病毒之合成基因取代完整病毒。

5.9 引子與探針的合成：

天花病毒的引子與探針合成，分別選定偵側的正痘病毒(二段基因序列，HA 及 DNA polymerase)及天花病毒(三段基因序列，HA, B9R 及 B10R)後，參照文獻及利用 Roche 公司所出的 Probe design software 2.0 進行引子與探針序列之設計，之後再送交廠商合成。


## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	天花病毒核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 6 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

<b>Pan-Orthopox virus</b>		
HA (J7R)		
Forward	5'-gatgatgcaactctatcatgta-3'	130bp
Reverse	5'-gtataattatcaaaatacaagacgtc-3'	
Taqman-MGB	5'-6'FAM-agtgcttggtataaggag-MGBNFQ-3'	
<b>Pan-Orthopox virus</b>		
DNA polymerase (E9L)		
Forward	5'-gaacattttggcagagagagcc-3'	177bp
Reverse	5'-caactcttagccgaagcgtag-3'	
Taqman-MGB	5'-6'FAM-caggctaccagtcaa-MGBNFQ-3'	
<b>Variola virus</b>		
HA (J7R)		
Forward	5'-tcactggagaatccacaaca-3'	139bp
Reverse	5'-catcattggcggtgattta-3'	
Taqman-MGB	5'-6'FAM-aagacgctcgggaccaat-MGBNFQ-3'	
<b>Variola virus</b>		
B9R		
Forward	5'-cagatagcgggtgcagaatacca-3'	87bp
Reverse	5'-atacgttccaaatcagatcctg-3'	
Taqman-MGB	5'-6'FAM-caatggaacaattaggtattac-MGBNFQ-3'	
<b>Variola virus</b>		
B10R		
Forward	5'-caaatgcagggtacaacaaca-3'	88bp
Reverse	5'-caatgaatccttagtattgccaacg-3'	
Taqman-MGB	5'-6'FAM-taatgacggaagtaaacg-MGBNFQ-3'	



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	天花病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 7 頁/共 1078 頁	(Real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 The LightCycler instrument system。
- 6.2 微量吸管 (pipetmen)：5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、200  $\mu$ L。
- 6.3 計時器。
- 6.4 37  $^{\circ}$ C 水浴箱。

## 7 環境設施安全

送檢樣本在 BSL-4 實驗室的隔離箱分裝後，必需經去活性處理才可將檢體送出一般實驗室進行血清學測試，如經 Guanidine Thiocyanate 處理才可進入生 (BSL-2) 實驗室進行病毒核酸抽取及 PCR 等實驗，而只有操作活病毒的實驗如病毒培養、動物實驗等才需進入 BSL-4 實驗室操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢驗前檢體處理

- 10.1.1 檢體以 2,000 rpm 離心 30 min，分離出上清液備用。
- 10.1.2 在接獲疑似第四級病毒檢體時，先將裝運檢體之容器以 UV 燈照射 20 min，P4 實驗室工作人員在實驗室操作將容器打開拿出檢體，在隔離箱內將送檢樣本 (血液或尿液) 經過濾處理後分裝：
  - 10.1.2.1 感染細胞株進行病毒培養。
  - 10.1.2.2 加入 Guanidine Thiocyanate 溶液中進行病毒核酸抽取及 PCR 之實驗。
- 10.1.3 在細胞株觀察到有細胞病變時，將細胞外溶液或細胞加入 Guanidine Thiocyanate 溶液中，進行病毒核酸抽取及 PCR 或 real-time PCR 之實驗，一部分將細胞加入最終濃度為 10 % 福馬林中，進行免疫抗原之診斷、以刮杓將細胞刮下後加入最終濃度為 10 % 福馬林中，進行細胞內免疫抗原之診斷或加入 Glutaldehyde 中進行電子顯微鏡觀察等各種相關之診斷實驗。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 8 頁/共 1078 頁

天花病毒核酸檢測  
(Real-time PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 10.2 檢體 DNA 萃取：

採用商品化套組 QIAamp DNA minikit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) 進行 DNA 萃取，參照其手冊操作之。

10.2.1 取 100  $\mu$ L 乳劑於 1.5 mL 微量離心管，依序加入 100  $\mu$ L Buffer ATL、20  $\mu$ L Proteinase K 混合均勻後。

10.2.2 56  $^{\circ}$ C 離心 (spin down)，後加入 200  $\mu$ L buffer AL 並混合均勻。

10.2.3 70  $^{\circ}$ C 加熱，10 min 後短暫離心。

10.2.4 再加入 200  $\mu$ L 酒精 (96 - 100%) 混合均勻。

10.2.5 並將液體移置 Spin column。以 8,000 rpm 離心 1 min 後丟棄濾液收集管。

10.2.6 更換新的收集管後加入 500  $\mu$ L Buffer AW1，於 8,000 rpm 離心 1 min 後丟棄濾液收集管。

10.2.7 更換新的收集管加入 500  $\mu$ L Buffer AW2，以 14,000 rpm 離心 3 min 後丟棄濾液收集管。

10.2.8 更換新的 1.5 mL 微量離心管加入 200  $\mu$ L Buffer AE，置於室溫 1 min，以 8,000 rpm 離心 1 min 後收集濾液 (DNA)。

10.2.9 該濾液檢體即可進行即時定量聚合酶連鎖反應或存於 -20  $^{\circ}$ C 備用。

## 10.3 Real-time PCR amplification

### 10.3.1 製備試劑：

#### 10.3.1.1 製備 Primer

以 H<sub>2</sub>O 將 Primer 溶解，使其濃度為 100  $\mu$ M，再以 H<sub>2</sub>O 將 Primer 稀釋到 0.5  $\mu$ M。

#### 10.3.1.2 製備 Probe：

以 H<sub>2</sub>O 將 Probe 溶解，使其濃度為 100  $\mu$ M，再以 H<sub>2</sub>O 將 Primer 稀釋到 0.05  $\mu$ M。

### 10.3.2 製備 Real time PCR Mix：

DNA template (500 ng genomic DNA or 10<sup>1</sup> - 10<sup>10</sup> copies plasmid DNA / 5  $\mu$ L)

0.5  $\mu$ M Forward primer 2  $\mu$ L x Z

0.5  $\mu$ M Reverse primer 2  $\mu$ L x Z

0.05 (~0.1)  $\mu$ M Probe 2  $\mu$ L x Z

Master mix, 5X conc. 4  $\mu$ L x Z

H<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L x Z

Total 15  $\mu$ L

(Z= 總反應數 + 1)

以微量吸管混合均勻，勿 Vortex。

10.3.3 取 15  $\mu$ L PCR mix 至 LightCycler capillary。

10.3.4 加入 DNA template 各 5  $\mu$ L。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 9 頁/共 1078 頁

天花病毒核酸檢測  
(Real-time PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.3.5 將各毛細管封上專用蓋子。  
10.3.6 離心  $700 \times g$ ，5 sec。（或 spin down）  
10.3.7 將毛細管放入檢體轉盤。  
10.3.8 Run real-time PCR：  
程式設定：

Cycle step	Temperature	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95 °C	10 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing and Extension	60 °C	40 sec	
Final extension	72 °C	5-10 min	1
	4 °C	hold	

- 10.3.9 軟體分析結果。  
利用儀器軟體分析 PCR 產物，亦可進一步利用洋菜膠電泳技術分析 PCR 產物。

## 11 結果判定：

- 11.1 判讀標準：45 個 PCR 循環加上螢光曲線的鑑定過程在 30 min 內，經螢光放射分析即可得到結果。並將陽性對照組之模板 DNA 用量為 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg 等核酸濃度，測定核酸與循環數之標準曲線，可應用於檢體之定量分析。  
11.2 報告核發：有螢光曲線產生（ $C_t$  值小於 40 cycles），則可判定為陽性。  
11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送報告簽署人審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

## 12 品質管制 略。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料 略。

## 15 附錄

- 15.1 天花病毒基因檢測分析法流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

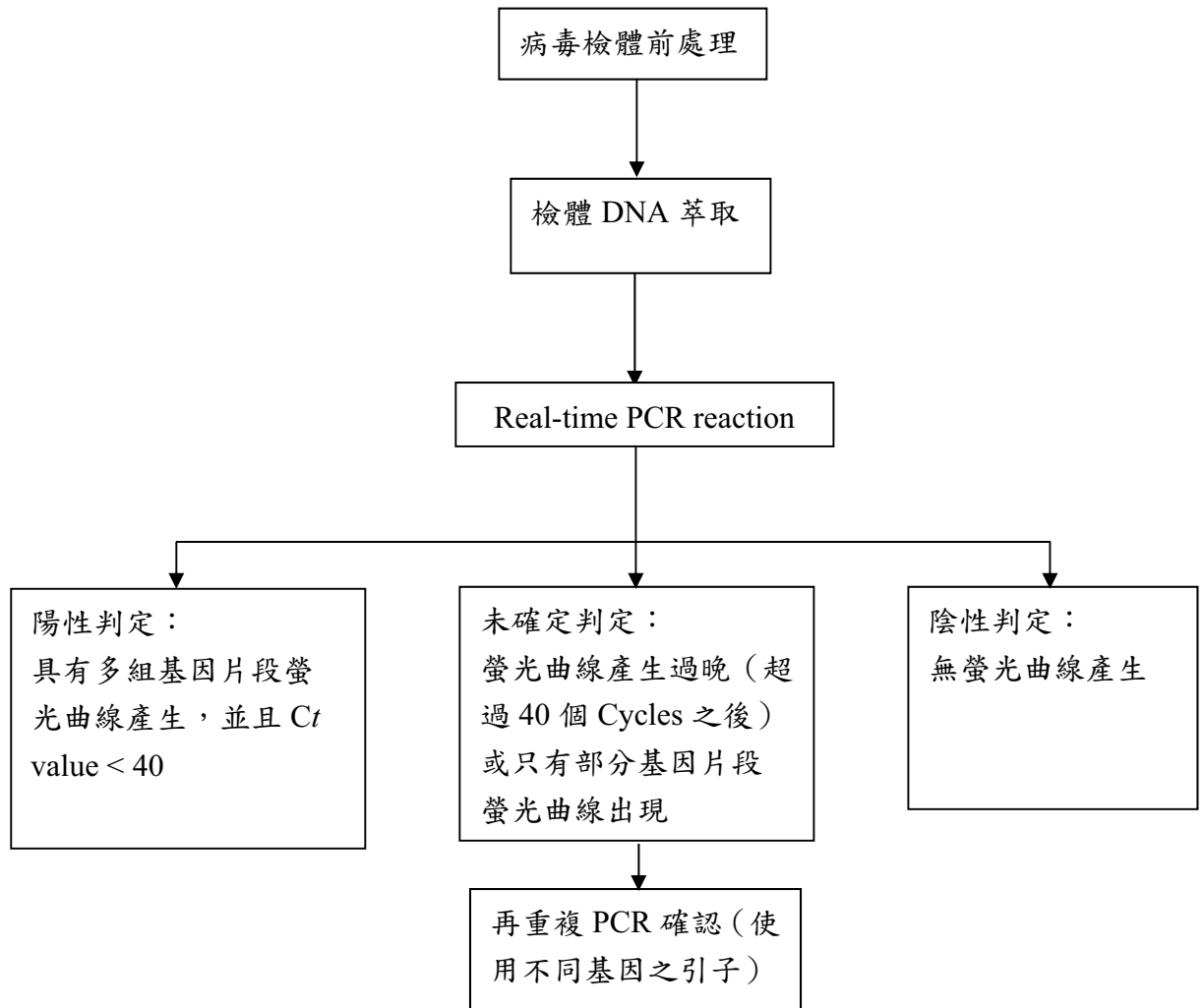


編號：  
頁次：第 10 頁/共 1078 頁


天花病毒核酸檢測  
(Real-time PCR)

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 天花病毒基因檢測 (real-time PCR) 流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	鼠疫桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 11 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
鼠疫檢體或送驗培養基上可疑鼠疫桿菌的分離與鑑定。
- 2 適用檢體種類  
對懷疑鼠疫患者之膿、痰、咽喉拭子、血液、淋巴腺腫抽取液，及身體組織如肝臟、脾臟、心臟及骨髓解剖之材料等。動物組織或蚤之標本。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述
  - 4.1 以特定培養基分離鼠疫桿菌，利用菌落型態、染色特徵、生化代謝、血清學特性及噬菌體感受性鑑定。
  - 4.2 PCR 則利用鼠疫桿菌攜帶之三種致病質體（96.2、70.3 及 9.6 kb）及其染色體基因 *cafI*、*yopM*、*pla*、*inv*，設計多重核酸引子 (multiplex primer)，再藉由 PCR 將疑似鼠疫檢體或菌株之去氧核糖核酸進行複製，以鑑定是否為鼠疫桿菌。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 Gram's staining 染劑。
  - 5.2 Wayson stain 染色液的配製
    - 5.2.1 取 0.2 g Fuchsin 溶於 10 mL 無水酒精。
    - 5.2.2 取 0.75 g Methylene blue 溶於 10 mL 無水酒精。
    - 5.2.3 將 5.2.1 及 5.2.2 混合後再加入 200 mL 5 % Phenol，以濾紙過濾後即成。
  - 5.3 Methanol。
  - 5.4 磷酸緩衝液。
  - 5.5 陽性對照 (*Yersinia pestis* Yreka, PMBP-0019 疫苗株)。
  - 5.6 陰性對照 (*E coli* ATCC 25922)。
  - 5.7 培養基：
    - 5.7.1 BAP。
    - 5.7.2 MacConkey agar。
    - 5.7.3 TSI。
    - 5.7.4 SIM (semisolid)。
    - 5.7.5 Lysine。
    - 5.7.6 Citrate。
    - 5.7.7 Urease。
    - 5.7.8 VP (semisolid)。
    - 5.7.9 Ornithine。
    - 5.7.10 Arginine。
    - 5.7.11 *Yersinia* Selective agar (含 *Yersinia* antimicrobial supplement CN)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 12 頁/共 1078 頁

鼠疫桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 5.7.12 TSB。
- 5.7.13 Tryptic soy agar (TSA)
- 5.8 Oxidase: 可選用商品化試劑, 如榮研、Difco、BBL、Rosco 等均有 Oxidase 試劑, 型態有 Strips、Disks、Tablets 等。
- 5.9 3% Catalase。
- 5.10 快速生化鑑定試劑套組: API 20 E: bioMerrius, France。
- 5.11 無菌微量吸管尖 (tip): 1,000 uL、200 uL。
- 5.12 無菌滴管 (dropper): 3mL。
- 5.13 接種針 (環)。
- 5.14 載玻片。
- 5.15 水質: 25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透可達 18 MΩ-CM 以上超純水。
- 5.16 PCR 專用八連排反應管。
- 5.17 GoTaq green master mix (Promega Corp., Cat no. M7122)。
- 5.18 引子序列
  - yopM (S): ATA ACT CAT CGG GGG CAA AAT
  - (A): GCG TTA TTT ATC CGA ATT TAG C
  - pla (S): ATC TTA CTT TCC GTG AGA AG
  - (A): CTT GGA TGT TGA GCT TCC TA
  - inv (S): TAA GGG TAC TAT CGC GGC GGA
  - (A): CGT GAA ATT AAC CGT GGC GGA
  - cafI (S): CAG GAA CCA CTA GCA CAT C
  - (A): CCC CCA CAA GGT TCT CAC
- 5.19 電泳偵測試劑:
  - 5.19.1 1.5% agar 膠片。
  - 5.19.2 Tracking dye。
  - 5.19.3 0.5xTBE 緩衝液 pH 8.2 - 8.3。
  - 5.19.4 核酸標記 (100 bp DNA ladder)。
- 6 儀器設備
  - 6.1 37°C 培養箱 (incubator)。
  - 6.2 微量電子天平。
  - 6.3 第二級生物安全櫃 (class II A2 BSC)。
  - 6.4 4°C 冰箱。
  - 6.5 -20°C 冷凍櫃。
  - 6.6 顯微鏡。
  - 6.7 半自動化偵測血液培養裝置。
  - 6.8 核酸增幅儀。
  - 6.9 DNA 電泳膠體觀察照相設備。
  - 6.10 馬克法藍氏濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 13 頁/共 1078 頁

鼠疫桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內，但個人防護及操作均依生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室規定實施。

## 8 檢體採集

8.1 對懷疑鼠疫患者之膿、痰、咽喉拭子、血液、淋巴腺腫抽取液，及身體組織如肝臟、脾臟、心臟及骨髓解剖之材料等。動物組織或蚤之標本。

8.2 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

9.1 檢體以 4 °C 低溫快速運送，拭子可置入 Cary-Blair transport medium 低溫運送，淋巴液及血液培養瓶以室溫運送。

9.2 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

10.1 檢驗前處理：若高度污染標本或取自嚙齒動物蚤類，可先作動物接種，蚤約 25 隻以 2 mL 生理食鹽水研磨，再以 0.5 mL 上清液皮下接種於實驗五週齡 BAL/C 老鼠，觀察 21 天後，取其脾臟分離培養，或接種於 *Yersinia* Selective medium。

10.2 接種和抹片製作：檢體接種於 BAP、MacConKey agar、*Yersinia* selective agar。

10.2.1 患者之膿、痰、咽喉拭子及全血可直接作抹片和培養。

10.2.2 臟器採樣或培養基上可疑菌落（以磷酸緩衝液稀釋），塗抹在乾淨之玻片上每一檢體塗抹數片，注意勿太厚。

10.2.3 懷疑腺鼠疫患者早期腫，少有壞疽，可利用 18 - 22 號針頭注射 1 - 2 mL 食鹽水入淋巴腺區再抽取，作抹片和培養。

10.2.4 血液檢體量應 6 - 10 mL，將血液檢體以體積 1 : 6 - 10 接種於血液培養瓶中（血液培養瓶瓶蓋先以 70 % 酒精及 2 % 碘酊消毒），於 37 °C 有氧狀況下，培養 14 - 16 hr 後觀察，然後每天觀察，培養基中若呈混濁，即將培養液混合均勻並取出作革蘭氏染色及次培養於 MacConkey、*Yersinia* selective agar 及 BAP 培養基中。

10.3 抹片染色：將玻片置於空氣中自然風乾，作 Gram's 染色法及 Wayson 染色法。

Wayson 染色法：將玻片置於甲醇 (methanol) 中 5 - 10 min 即完成固定之抹片，於其上滴加 Wayson 染色液，靜置 25 sec 後充分水洗，置於濾紙上自然風乾後，即可鏡檢培養：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 14 頁/共 1078 頁

鼠疫桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

10.4 在 25 °C 及 37 °C 培養。

10.5 觀察：24 - 48 hr 後進行觀察與鑑定。

10.6 鑑定：

10.6.1 菌落觀察：在 BAP 培養 24 hr 後，菌落甚小如針尖大小，在 48 - 72 hr 後能見非溶血平滑較典型菌落，老的菌落成煎蛋型中央突起，邊緣不規則，在 MacConkey agar 菌落亦甚小，呈無色（乳糖非發酵性），而在 *Yersinia* selective agar 能見紫紅色平滑菌落可和其他雜菌區別。鼠疫桿菌在 25 °C 比 37 °C 培養生長好。

10.6.2 革蘭氏染色及 Wayson 染色：顯微鏡下鏡檢形態呈革蘭氏陰性桿菌或球桿菌，Wayson 染色抹片可見到雙極性（bipolarity）特徵。

10.6.3 生化試驗：TSI、Citrate、Urease、SIM、VP(semisolid)、Ornithine、Arginine、Lysine medium，並操作 Oxidase 試驗，然後將接種之培養基在 37 °C 一般培養箱過夜培養。SIM 細菌運動性 25 °C 或 37 °C 均為陰性。培養在 TSB 48 hr 後，輕微混淆可見棉絮狀菌體凝集現象。API 20 E 需比對其電腦碼並符合，其他生化特性如 Catalase 陽性，Oxidase 陰性，亦可輔助確認菌株。

10.6.3.1 PCR

10.6.3.2 培養於 Tryptic soy agar (TSA) 培養基之疑似鼠疫菌株。

10.6.3.3 檢驗步驟

10.6.3.3.1 模版準備：於 1.5 mL 微量離心管內加入 100 uL 滅菌蒸餾水，取平板上之分離菌製成微濁菌液，約 McFarland no.1 濃度。100 °C 水浴 10 min 取出直接置於冰塊內冷卻，4 °C 離心，取上清液當作模版，置於 -20 °C 冰箱保存。

10.6.3.3.2 PCR 反應物：25 uL 2X GoTaq green master mix，0.1 uM cafI 引子組，0.1 uM yopM 引子組，0.1 uM pla 引子組，0.05 uM inv 引子組，模版 2 uL，以二次蒸餾水加到 50 uL。

10.6.3.3.3 PCR 反應條件：Pre-denature 95 °C 5 min，Denature 94 °C 30 sec，Annealing 54 °C 1.5 min，Extension 72 °C 1 min，以上 30 Cycles，Post extension 72 °C 10 min，4 °C 保存。

10.6.3.3.4 PCR 產物之確認：將 10 uL 的 PCR 增殖產物加 2 uL Tracking dye 混合，以 1.5% 洋菜膠，50 Voltage，約 1.5 hr，0.5 X TBE，



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 15 頁/共 1078 頁

鼠疫桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

進行 Minigel 電泳分析。再以 0.5 uL/mL Ethidium bromide 染色 15 min，水洗 10 min 後觀察。可見 565 bp (yopM)、480 bp (pla)、295 bp (inv) 及 171 bp (cafI) 四個片段。

## 11 結果判定

11.1 陽性結果標準：Wayson stain 鼠疫桿菌經染色後，於顯微鏡下可見淺藍色卵圓形短桿菌，且菌體兩端濃染，中央淡染之雙極性菌體，狀如安全別針。MacConkey agar 菌落呈無色（乳糖非發酵性），而在 *Yersinia* selective agar 能見紫紅色平滑菌落。API 20 E 電腦碼為 *Yersinia pestis* 95% 以上。符合前項檢驗結果即判定為鼠疫桿菌陽性。

### 11.2 結果判定

野生鼠疫桿菌可見 565 bp (yopM)、480 bp (pla)、295 bp (inv) 及 171 bp (cafI) 四個片段。

11.3 報告核發：鼠疫桿菌陽性，鼠疫桿菌陰性。

11.4 鼠疫桿菌分離與鑑定流程圖，如附錄 15.1。

## 12 品質管制

12.1 一般培養基及試劑依品質管制規定辦理。

12.2 參照菌株為 *Yersinia pestis* Yreka, PMBP-0019 疫苗株及 *Y. pseudotuberculosis* ATCC 6902。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 蔡文城。2000。實用臨床微生物診斷學，第九版。九洲圖書文物有限公司，臺灣。

14.2 Bibel DJ, Chen TH. 1976. Diagnosis of plague: an analysis of the Yersin-Kitasato controversy. *Bacteriol Rev* 40: 633 - 51.

14.3 Murray PR, Jo Baron E, Pfaller AR. 1999. *Manual of clinical microbiology*, 7<sup>th</sup> edition, American Society for Microbiology, Washington, DC.

14.4 Wilmoth B.A. 1996. Identification of *Yersinia pestis* by BBL crystal enteric/nonfermenter identification system. *Clin Microbiol* 34: 2829 - 2830.

14.5 Dennis DT, Cage KL, Gratz N, Poland JD, Tikhomirov E. 1999. *Plague manual, epidemiology, distribution surveillance and control*. WHO, Geneva. WHO/CDS/CSR/EDC/99/2/EN.

14.6 Tsukano H, Itoh KI, Suzuki S, Watanable H, 1996. Detection and identification of *Yersinia pestis* by polymerase chain reaction (PCR) using Multiplex primers. *Microbiol Immunol* 40: 773 - 775.

## 15 附錄

15.1 鼠疫桿菌分離與鑑定流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

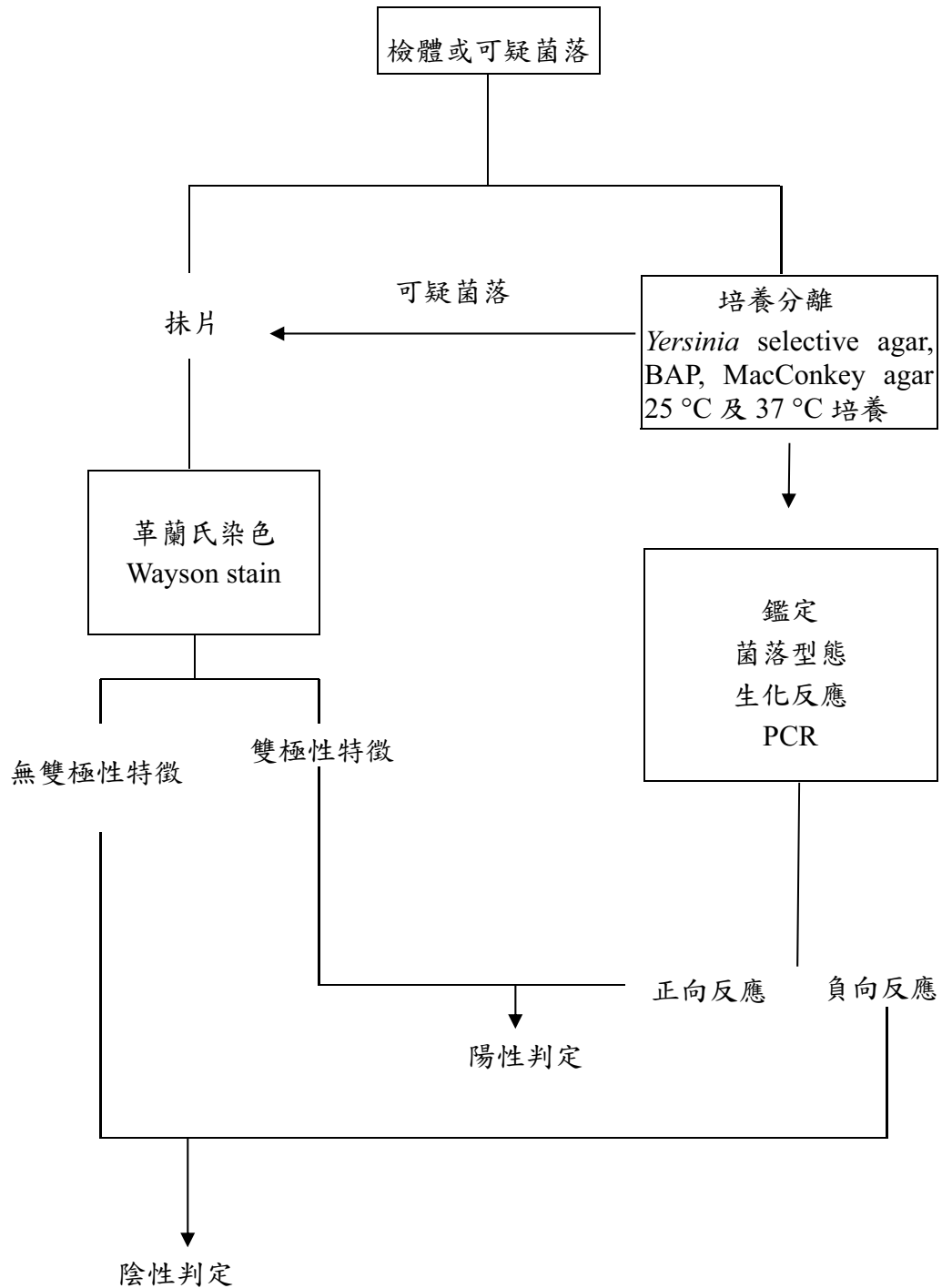
頁次：第 16 頁/共 1078 頁

鼠疫桿菌分離與鑑定


核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 鼠疫桿菌分離與鑑定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	鼠疫桿菌 F1 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 17 頁/共 1078 頁	(酵素免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以血清學檢測法檢測人體或鼠類血清中 F1 抗體之效價，以診斷是否曾遭受鼠疫桿菌感染。

## 2 適用檢體種類

適用於人體血清檢體及動物血清檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用 F1 為抗原，與血清中之 F1 特異性抗體結合，以酵素標幟抗體間接地將此反應轉成顏色訊號，由全自動酵素免疫分析儀讀取結果判定。

## 5 試劑耗材

5.1 0.1 M Carbonate Buffer, pH 9.2, 1 L：含 Sodium carbonate ( $\text{NaCO}_3$ ) 1.36 g, Sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) 7.35 g。

5.2 10 X PBS Stock Solution, pH 7.3, 1 L：含 NaCl 80 g, KCl 2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  11.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g。

5.3 96 孔 ELISA plate。

5.4 Blocking buffer：4 % BSA + 0.1 % Sodium azide 之 pH 7.2 PBS。

5.5 Washing buffer (PBS-T)：0.05 % Tween-20 之 pH 7.2 PBS。

5.6 F1 抗原 (自備)：本實驗室保存之鼠疫桿菌 *Yersinia pestis* Yreka 疫苗株以 caseine amino acid 或 BHI (brain heart infusion) agar 於 37 °C 培養 48-72 小時，加 PBS 沖洗培養基表面，再刮下菌落，以 -20~-60 °C 冰冷丙酮 (acetone) 混和殺菌固定，放置室溫隔夜，以 10,000 rpm 在 0 °C 離心 30 分鐘，丟棄上清液，再以 Toluene 飽和之 2.5% NaCl 萃取，利用 30% 硫酸銨 (ammonium sulfate) 沉澱萃取液，透析沉澱的 F1 抗原再通過 Superdex-200 Hiload preparative gel filtration column 純化，冷凍乾燥保存。試驗前先以 pH7.0 生理食鹽水配製為 200 ug/mL，於 4 °C 隔夜溶解。

5.7 老鼠抗鼠疫 F1 多價免疫球蛋白或單株抗體 (自備)。

5.8 HRP stabilizer：Nalgene KPL ELISA kit, USA。

5.9 HRP conjugate：Nalgene KPL ELISA kit, USA。

5.10 TMB substrate：Nalgene KPL ELISA kit, USA。

5.11 TMB stop solution：Nalgene KPL ELISA kit, USA。

5.12 無菌 tip：需 1,000  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$  與 10  $\mu\text{L}$  等三種規格。


5.13 陽性對照血清：免疫老鼠 42 天後血清稀釋 100 倍。

5.14 陰性對照血清：正常血清。

## 6 儀器設備


6.1 ELISA reader

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	鼠疫桿菌 F1 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 18 頁/共 1078 頁	(酵素免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 6.2 37 °C 恆溫培養箱。
  - 6.3 插電式可調溫水浴箱。
  - 6.4 離心機。
  - 6.5 Pipetman：需 1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、10  $\mu$ L 與八爪 300 $\mu$ L 等四種規格。
  - 6.6 Mixer。
  - 6.7 4 °C 冰箱。
  - 6.8 -20 °C 冷凍櫃。
  - 6.9 pH meter。
  - 6.10 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 7 環境設施安全  
於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內，檢體前處理於生物安全櫃操作。
- 8 檢體採集
- 8.1 檢體的採集，除不添加任何抗凝劑外，血清量不得少於 200  $\mu$ L。
  - 8.2 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存
- 9.1 血清檢體以低溫保存運送。
  - 9.2 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
- 10.1 檢驗前處理
    - 10.1.1 以 0.1 M Carbonate Buffer 將 F1 抗原稀釋成 0.1  $\mu$ g F1 抗原/100  $\mu$ L，加至 96 孔 ELISA 盤進行 Coating，4 °C Overnight，但不超過 16 hr。吸去 Carbonate Buffer，加 200  $\mu$ L/孔 Blocking buffer，4 °C Overnight。若不馬上使用，可不用倒掉 Blocking buffer，封膜避光 4 °C 保存，可安定保存 6 - 12 個月。
    - 10.1.2 血採集後，先以 2,000 rpm 離心 6 min，所得血清分裝儲存於 -20 °C 冷凍櫃。血清標本品質不佳，如有溶血現象，不宜使用。
  - 10.2 檢驗步驟
    - 10.2.1 每一檢體血清稀釋 500 倍，陽性對照與陰性對照同法做稀釋。
    - 10.2.2 加 100  $\mu$ L/孔待測檢體，置於 37 °C 30 min。
    - 10.2.3 PBS-T wash 5 次。
    - 10.2.4 用 HRP Stabilizer 稀釋 HRP Conjugate 成 1：5,000，加 100  $\mu$ L/孔，置於 37 °C 30 min。
    - 10.2.5 PBS-T wash 5 次。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	鼠疫桿菌 F1 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 19 頁/共 1078 頁	(酵素免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 10.2.6 加 100 uL /孔 TMB substrate，放室溫 15 min，避光。
- 10.2.7 加 100 uL /孔 TMB stop solution，混和均勻並小心去除氣泡。
- 10.2.8 放 ELISA reader，用 450 nm 讀取 OD 值。

## 11 結果判定

- 11.1 抽樣正常港區老鼠血清 40 支，以平均值加 3 個 SD 定 ELISA cut point 值 (cutpoint value average=0.176239)。超過此值判定為陽性。
- 11.2 報告核發：鼠疫桿菌抗體陽性，鼠疫桿菌抗體陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於實驗室資訊系統，經 PI 核准報告後發佈。

## 12 品質管制

- 12.1 本實驗法檢測人體或鼠類需使用不同二次抗體。
- 12.2 若陽性標準液之吸光值未達上述之標準或陰性標準液超過上述標準時，必須重做檢驗。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 Chen TH, Meyer KF. 1966. An evaluation of *Pasteurella pestis* fraction-1-specific antibody of plague infections. Bull WHO 34: 911-918.
- 14.2 Chen TH, Meyer KF. 1954. Studies on immunization against plague. Bull WHO 74: 282-298.
- 14.3 Cavanaugh DC, Thorpe BD, Bushman JB, Nicholes PS, Rust JH, Jr. 1965. Detection of an enzootic plague focus by serological method. Bull WHO 32: 197-203.
- 14.4 Dennis DT, Cage KL, Gratz N, Poland JD, Tikhomirov E. 1999. Plague manual, epidemiology, distribution surveillance and control. WHO, Geneva. WHO/CDS/CSR/EDC/99/2/EN.
- 14.5 Nalgene KPL ELISA kit 廠品說明。

## 15 附錄

- 15.1 鼠疫桿菌 F1 抗體酵素免疫分析法 (ELISA) 測定流程圖

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

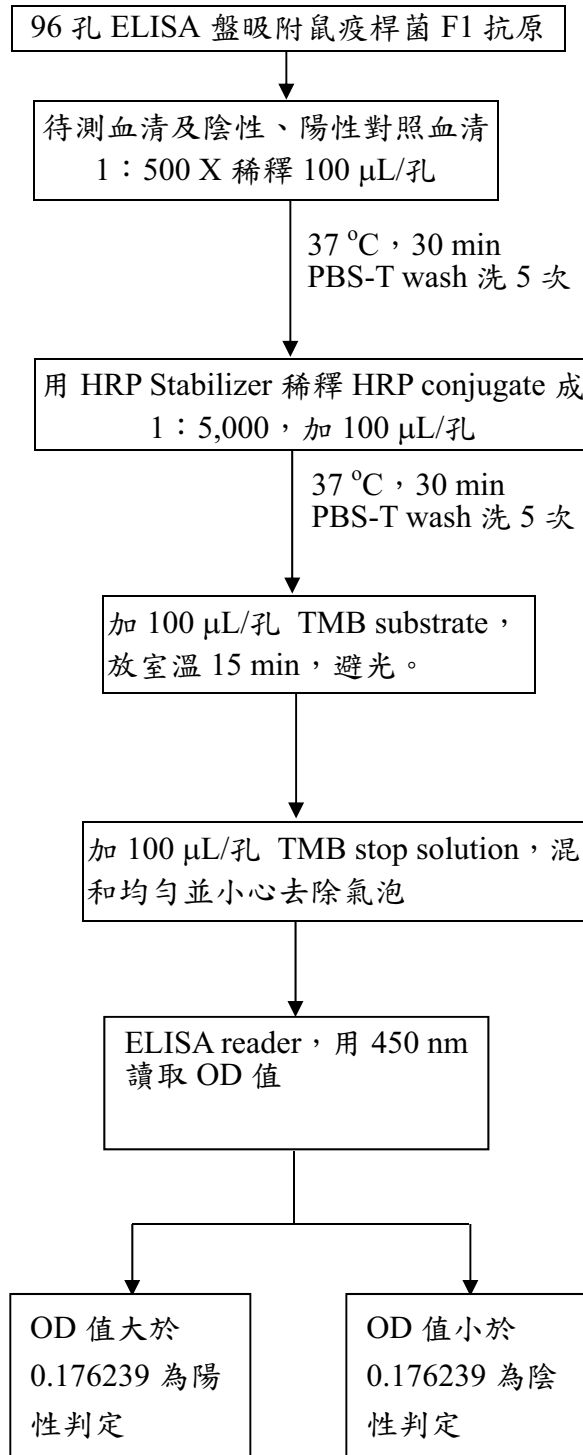
頁次：第 20 頁/共 1078 頁

鼠疫桿菌 F1 抗體檢測  
(酵素免疫分析法)


核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.1 鼠疫桿菌 F1 抗體酵素免疫分析法 (ELISA) 測定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒病原體分離、鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 21 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

在疑似受感染個案之採集檢體中，分離與鑑定是否存在 SARS 病毒。

## 2 適用檢體種類

痰、糞便、咽喉拭子。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

選擇適當的細胞株 (Vero E6) 培養 SARS 病毒，觀察細胞病變 (CPE) 的出現，最後再以 SARS 病毒核酸檢測方法確認。

## 5 試劑耗材

### 5.1 試劑

5.1.1 Growth medium (由含 10 % FBS 與 1 X pen-strep solution 之 DMEM 組成)。

5.1.1.1 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)。

5.1.1.1.1 With 4,500 mg/L D-glucose (high glucose)。

5.1.1.1.2 With L-glutamine。

5.1.1.1.3 Without sodium pyruvate。

5.1.1.2 Fetal bovine serum (FBS)：以 56 °C Heat inactivate 後開封，以 15 mL 離心管分裝，-20 °C 儲存。

5.1.1.3 Pen-strep solution (100 X)。

5.1.1.3.4 With 10,000 units/mL penicillin G。

5.1.1.3.5 With 10,000 µg/mL streptomycin sulfate in 0.85 % saline，開封後以 15 mL 離心管分裝，-20 °C 儲存。

5.1.2 Sample pretreat medium (由含 2 X pen-strep solution 之 DMEM 組成)。

5.1.3 Maintain Medium (由含 2 % FBS 與 1 X pen-strep solution 之 DMEM 組成)。

5.1.4 Trypsin-EDTA。

5.1.4.1 With 0.05 % trypsin。

5.1.4.2 With 0.53 mM EDTA in Hanks'balanced salt solution (HBSS) without Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup>，開封後以 15 mL 離心管分裝，-20 °C 儲存。

5.1.5 Vero E6 細胞株。

### 5.2 耗材：

5.2.1 25-cm<sup>2</sup> Culture vessels (T-25)。

5.2.2 24 well Plate。

5.2.3 Pipette：1 mL、5 mL、10 mL、25 mL。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 22 頁/共 1078 頁

SARS 病毒病原體分離、鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 5.2.4 200  $\mu$ L Tip。
- 5.2.5 3 mL 無菌塑膠吸管。
- 5.2.6 1.5 mL Eppendorf tube。
- 5.2.7 無菌螺旋試管：2 mL、4 mL。
- 5.2.8 無菌離心管：15 mL、50 mL。
- 5.2.9 5 mL 針筒。
- 5.2.10 0.45  $\mu$ M 針頭過濾器。
- 5.2.11 抗凍標籤紙。
- 5.2.12 油性細字筆。

## 6 儀器設備

- 6.1 生物安全櫃 (BSC 2B)。
- 6.2 37 °C 二氧化碳培養箱。
- 6.3 倒立相差顯微鏡。
- 6.4 水浴槽。
- 6.5 電動輔助吸管。
- 6.6 4 °C 冰箱。
- 6.7 -20 °C、-80 °C 冷凍櫃。
- 6.8 乾浴器。

## 7 環境設施安全

於生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

10.1 檢體編號：收件檢體依通報疾病及種類編號。

### 10.2 檢驗前處理

- 10.2.1 開啓生物安全櫃之紫外光照射操作枱面 20 min。
- 10.2.2 將 5.1.1-5.1.4 試劑先置於 37 °C 回溫或解凍。
- 10.2.3 檢體前處理

10.2.3.1 咽喉拭子：加 1.5 mL Sample pretreat medium 至採檢管充分攪拌，將溶液吸出至 4 mL 滅菌塑膠檢體瓶中，以 5 mL 針筒吸取溶液後，拔去針頭，接上 0.45  $\mu$ m



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 23 頁/共 1078 頁

SARS 病毒病原體分離、鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

過濾器過濾後置於 2 mL 無菌試管保存，接種細胞或暫時置於-80°C 保存。

## 10.3 檢驗步驟：

10.3.1 接種：取長滿單層之 Vero E6 細胞，吸出 Growth medium，接種檢體 100  $\mu$ L，輕輕搖動使檢體佈滿細胞層，置於 37 °C 含 5 % CO<sub>2</sub> 的培養箱培養，其間約間隔 15 min，即輕輕搖動 plate，使檢體能均勻散佈於細胞層並防止細胞層乾燥。1 hr 後加入 1 mL Maintain medium，置於 37 °C 含 5 % CO<sub>2</sub> 的培養箱培養。

10.3.2 每天觀察細胞是否產生細胞病變(CPE)，可培養 7 天，若發現細胞病變，收集細胞培養液，進行病毒核酸檢測方法鑑定確認。

## 11 結果判定

11.1 判讀標準：產生細胞病變(CPE)且經病毒核酸檢測方法測定為陽性者，判定為陽性。

11.2 報告核發：SARS-CoV 病毒分離陽性，SARS-CoV 病毒分離陰性。

11.3 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果欄”，並上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。

## 12 品質管制


12.1 全程作業都要在生物安全櫃內進行。

12.2 二氧化碳培養箱內壁每月要定期以抗黴菌劑擦拭及水盤添加抑菌劑的無菌水以保持培養箱內溼度。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 24 頁/共 1078 頁	(real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以分子生物學的技术利用反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 與即時定量 RT-PCR 來檢測檢體中是否有 SARS 病毒。

## 2 適用檢體種類

適用之檢體種類包括痰 (sputum)、糞便 (stool)、咽喉拭子 (throat swab)、血清 (serum)、血漿 (plasma) 等。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

### 4.1 RT-PCR：

利用分子生物學技術 RT-PCR 與 Real-time RT-PCR 高敏感度的方法來檢測檢體中的 SARS 病毒 RNA。RT-PCR 之原理為設計專一性之引子 (primers)，把檢體中的病毒 RNA 反轉錄成 cDNA，並將擴增放大。

### 4.2 即時定量 RT-PCR：

此系統的定量原理是利用一標記兩種螢光的 DNA 探針來偵測聚合酶鏈反應的產物。此 DNA 探針的 5'端標記一報告染劑 (reporter dye)，3'端則標記一遮蔽染劑 (quencher dye)，完整的 DNA 探針其報告染劑所散發出的螢光會被遮蔽染劑所掩蓋。當聚合酶進行延伸反應 (extension phase) 時，具有從 5'端 DNA 切割活性的 DNA 聚合酶將探針切割，使得 5'端報告染劑與 3'端遮蔽染劑分開，遮蔽效應被破壞，此時即可偵測到螢光反應。

## 5 試劑耗材

5.1 QIAmp viral RNA kit。

5.2 One-step RT-PCR kit。

5.3 TBE buffer (tris-borate/EDTA electrophoresis buffer)。

5.4 陽性對照組 (positive control)：採用已知 SARS 陽性的檢體作對照；陰性對照組 (negative control)：採用 SARS 陰性的檢體作對照或以水作陰性對照。

5.5 試劑 TaqMan one-step RT-PCR master mix reagents (SN：4309169) 4 °C 保存與 TaqMan exogenous internal positive control (VIC) (SN：4308323) -20 °C 保存。

5.6 Optical 96 well reaction plate (Part Number N801-0560)。

5.7 Optical plate adhesive covers (Part Number 4311971)。

5.8 Agarose。

5.9 DEPC 水。


5.10 無菌 PCR 反應管。

5.11 無菌 2 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1,000 μL Tips。

5.12 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.13 手套。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 25 頁/共 1078 頁	(real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 PCR thermal cycler。
- 6.2 即時定量偵測儀 (如 ABI system, Bio-rad system, LightCycler system 等)。
- 6.3 電泳槽。
- 6.4 DNA 電泳膠體觀察設備。
- 6.5 2  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L Pipetman。

## 7 環境設施安全

採用獨立的操作空間，將 RNA 或 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

10.1.1 檢體編號：核對檢驗單之個案與檢體是否相符，給予疾病編號。

10.1.2 血清或添加抗凝劑如 Sodium citrate 或 EDTA 的血漿皆可使用。

10.1.2.1 檢體的採集量並無嚴格限制。

10.1.2.2 檢體的運送：4  $^{\circ}$ C。

10.1.2.3 採集後之檢體，以 2,000 rpm 離心 10 min，以分離出的血清備用。

10.1.3 咽喉拭子檢體

10.1.3.1 棉棒充分攪拌後，於塑膠管壁旋轉擠乾取出。

10.1.3.2 於 4  $^{\circ}$ C，2100  $\times$ g 離心 15 min。

10.1.3.3 收集上清液分裝於 2 - 3 支 Cryotube，標示號碼及日期，取 140  $\mu$ L，其餘保存於-70  $^{\circ}$ C。


10.1.4 糞便檢體

10.1.4.1 取糞便 1 g，放入 15 mL 離心管中，加入玻璃圓球及 10 mL PBS<sup>(+)</sup> 液調成 10% 懸浮液。

10.1.4.2 於 4  $^{\circ}$ C，2100  $\times$ g 離心 15 min。

10.1.4.3 收集上清液分裝於 2 - 3 支 Cryotube，標示號碼及日期，取 140  $\mu$ L，其餘保存於-70  $^{\circ}$ C。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 26 頁/共 1078 頁	(real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 10.1.5 痰檢體:

10.1.5.1 取 PBS 緩衝液與痰檢體約 1:1 的比例混合。

10.1.5.2 攪拌使其均質化並於 4 °C，2100 ×g 離心 15 min。

10.1.5.3 收集上清液，取 140 μL，其餘保存於-70 °C。

## 10.2 萃取病毒 RNA

10.2.1 取 140 μL 的檢體，加入 560 μL Lysis buffer (AVL)，震盪混合，室溫靜置反應 10 min。

10.2.2 加入純酒精 560 μL 終止反應。

10.2.3 將上述混合液分兩次加入通管柱 (column)，並以離心 (8,000 rpm, 1 min) 方式加速混合液通過濾膜，檢體中如有 RNA 存在，會吸附在管柱底部的濾膜上。

10.2.4 以清洗液 (AW1) 500 μL，離心 8,000 rpm，1 min，作第一次沖洗，清洗膜上所吸附的雜質。

10.2.5 以清洗液 (AW2) 500 μL，離心 14,000 rpm，3 min，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。

10.2.6 離心 14,000 rpm，1 min，以徹底去除膜上殘留酒精。

10.2.7 加入 50 μL DEPC 水，室溫靜置 1 min，在 4 °C 離心 8,000 rpm，1 min，取得 RNA。

## 10.3 反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) (以 Qiagen one-step RT-PCR kit 為例)

### 10.3.1 試劑添加量如下：

<b>5X buffer</b>	<b>10</b>	<b>μL</b>
<b>Cor-p-F2 forward primer (10 μM)</b>	<b>3</b>	<b>μL</b>
<b>Cor-p-R1 reverse primer (10 μM)</b>	<b>3</b>	<b>μL</b>
<b>RNA enzyme mix</b>	<b>2</b>	<b>μL</b>
<b>dNTP</b>	<b>2</b>	<b>μL</b>
<b>Q solution</b>	<b>10</b>	<b>μL</b>
<b>DEPC treatment H<sub>2</sub>O</b>	<b>15</b>	<b>μL</b>
<b>RNA sample</b>	<b>5</b>	<b>μL</b>
	<b>50</b>	<b>μL</b>

10.3.2 取 5 μL RNA 做模板，加入引子組 (primers 參考引子組序列表) 與 RT-PCR 試劑試劑添加量如 10.3.1

### 10.3.3 使用 PCR thermal cycler。

10.3.3.1 R.T.作用，50 °C 30 min。

10.3.3.2 Taq 活化作用，95 °C 15 min。

10.3.3.3 Denaturation，95 °C 35 sec。


10.3.3.4 Annealing，51 °C 40 sec。

10.3.3.5 Extension，72 °C 60 sec。

10.3.3.6 重複 10.3.3.3 至 10.3.3.5 步驟 40 cycle。

10.3.3.7 Final extension, 72 °C 10 min。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 27 頁/共 1078 頁	(real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 10.3.4 膠片電泳分析

- 10.3.4.1 製備 1.5% 洋菜膠：6 g Agarose 溶於 400 mL (1X) TBE buffer。
- 10.3.4.2 選擇 100 bp DNA size marker：5  $\mu$ L (2 ng/ $\mu$ L)。
- 10.3.4.3 取二次產物 10  $\mu$ L，各加入 2  $\mu$ L 6X Loading dye。
- 10.3.4.4 進行電泳分離：100 V，35 min。
- 10.3.4.5 膠片染色：1  $\mu$ L/mL Ethidium bromide 染色 10 min，H<sub>2</sub>O 褪染。
- 10.3.4.6 使用 UV light 觀察，並照相紀錄。

## 10.4 即時反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (real time RT-PCR) (以 AB one-step RT-PCR 為例)

### 10.4.1 試劑添加量

2X Master mix buffer	12.5	$\mu$ L
SARS2 forward primer (10 $\mu$ M)	1	$\mu$ L
SARS2 reverse primer (10 $\mu$ M)	1	$\mu$ L
CDC-probe (5 $\mu$ M)	0.5	$\mu$ L
RNA enzyme mix	0.67	$\mu$ L
Exo IPC mix	1.25	$\mu$ L
IPC DNA	0.25	$\mu$ L
DEPC treatment H <sub>2</sub> O	2.9	$\mu$ L
RNA sample	5	$\mu$ L
	25	$\mu$ L

- 10.4.2 取適量的 RNA 加到 one-step RT-PCR 混合反應液 (reaction mix) 中，加入適當濃度的引子與探針。反轉錄作用為 48 °C 30 min，接著為活化 AmpliTaq DNA 聚合酶 95 °C 10 min，再進行 PCR 反應 40 個循環：denature 為 95 °C 15 sec, Annealing-extension 為 60 °C 1 min，螢光訊號的收集 Annealing-extension 的步驟，並以 ABI Prism SDS 軟體進行分析。

### 10.4.3 Real-time RT-PCR 反應條件

- 10.4.3.1 RT reaction：48 °C，30 min。
- 10.4.3.2 Taq activation：95 °C，10 min (1 replication cycle)。
- 10.4.3.3 PCR reaction：95 °C，15 sec；60 °C，1 min (45 replication cycles)。

## 10.5 檢驗後處理

檢驗完成後之檢體與廢液，於高溫高壓滅菌器滅菌後，依感染性醫療廢棄物處理。檢驗後之剩餘檢體依序裝入檢體架內保存。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 28 頁/共 1078 頁

SARS 病毒核酸檢測  
(real-time PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

11.1.1 RT-PCR：RT-PCR 產物各取 5  $\mu$ L，在 1.5 % 洋菜膠進行分析，檢視分析結果。增幅產物片段約 368 bp。若出現上述 RT-PCR 產物，檢驗結果為陽性。

### 11.1.2 Real-time RT-PCR：

11.1.2.1 標準曲線 (standard curve) 分析：根據 NTC (none template control) 的背景螢光值將 Base line 定在 0.20，按下機器分析鈕，依據所輸入的標準品的濃度計算出 Standard curve ( $C_t$  值與標準品濃度)。

11.1.2.2 檢體螢光值分析：檢體中的病原體於 RT-PCR 的反應過程中由螢光標記的探針於片段增幅時所釋放出的螢光值，根據標準曲線定出檢體中 SARS 病毒濃度。

11.1.2.3 注意事項：建議標準曲線的  $R^2$  值趨近於 1。

11.2 報告核發：SARS 病毒 real-time PCR 陽性，SARS 病毒 real-time PCR 陰性。

11.3 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果欄”，並上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。

## 12 品質管制

12.1 陽性對照組：陽性對照組呈現陽性螢光訊號產生。

12.2 陰性對照組：陰性對照組(二次水)需無任何螢光訊號產生。

12.3 若檢驗結果不符合上述任一品質管制要點，該結果不可作為檢驗結果判讀依據，檢體需重新檢驗。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121  $^{\circ}$ C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。


## 14 參考資料

14.1 WHO. PCR primers for SARS developed by WHO Network Laboratories. <http://www.who.int/csr/sars/primers/en/index.html>.

14.2 WHO biosafety guidelines for handling of SARS specimens. [http://www.who.int/csr/sars/biosafety2003\\_04\\_25/en/](http://www.who.int/csr/sars/biosafety2003_04_25/en/)

14.3 Keightley MC, Sillekens P, Schippers W, et al. 2005. Real-time NASBA detection of SARS-associated coronavirus and comparison with real-time reverse transcription-PCR. J Med Virol 77: 602-606.

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測 (real-time PCR)	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 29 頁/共 1078 頁		修訂日期：	年	月	日

## 15 附錄

15.1 SARS 病毒鑑定流程圖。

15.2 SARS 病毒診斷用引子組序列表。


### 15.3 注意事項

15.3.1 以 Heparin 為抗凝劑的血漿或溶血檢體可能會干擾 Taq polymerase 的作用，降低檢驗敏感性。

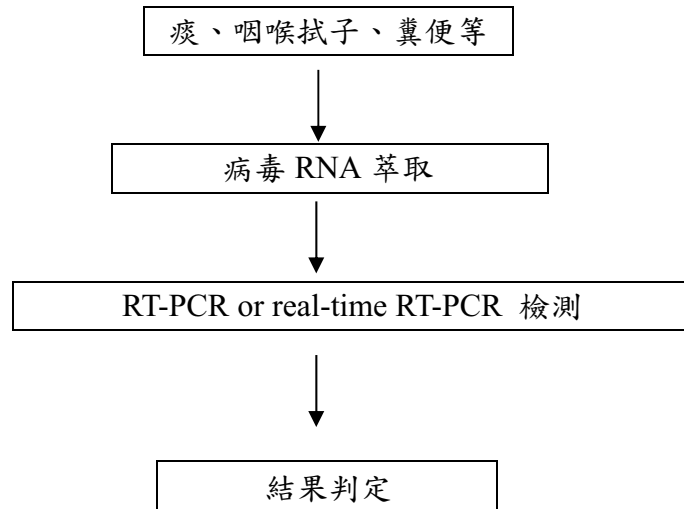
15.3.2 病毒 RNA 的萃取，除了最後一步 RNA 的洗脫 (elution) 是在 4 °C 下離心之外，其餘步驟皆可在室溫下進行。

15.3.3 序列分析：將經 RT-PCR 增幅的 DNA 片段作定序分析，並將定序的結果利用 NCBI 的基因庫作序列分析。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測 (real-time PCR)	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 30 頁/共 1078 頁		修訂日期：	年	月	日

## 附錄 12.1 SARS 病毒鑑定流程圖



## 附錄 12.2 SARS 病毒診斷用引子組序列表

Cor-p-F2 :5'-CTAACATGCTTAGGATAATGG-3'  
Cor-p-R1 :5'-CAGGTAAGCGTAAACTCATC-3'  
SARS2 Forward: 5'-GGAGCCTTGAATACACCCAAAG-3'  
SARS2 Reverse: 5'-GCACGGTGGCAGCATTG-3'  
CDC-Probe: 5'-CCACATTGGCACCCGCAATCC-3'

---



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 31 頁/共 1078 頁

狂犬病病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
以株化細胞（老鼠神經胚胎細胞株）分離狂犬病毒。
- 2 適用檢體種類  
適用於人體體內組織檢體。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
利用株化細胞（老鼠神經胚胎細胞株）分離狂犬病毒。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 老鼠神經胚胎細胞培養培養盒 25 cm<sup>2</sup> 或 75 cm<sup>2</sup>。
  - 5.2 Eagle's minimal essential 細胞培養液（見附錄）。
  - 5.3 0.01 M 磷酸鹽緩衝食鹽溶液，pH 7.2 - 7.4，無鈣、無鎂離子。
  - 5.4 試劑級丙酮（Sigma）。
  - 5.5 Buffered glycerol mounting medium, pH 8.5。
  - 5.6 70 % Isopropanol rubbing alcohol 桌面消毒水。
  - 5.7 Trypsin/EDTA。
  - 5.8 0.04 % Trypan blue in PBS。
  - 5.9 四級胺（Zepharin）金屬器械消毒水。
- 6 儀器設備
  - 6.1 剪刀、鑷子。
  - 6.2 壓舌板。
  - 6.3 八孔細胞培養玻片盤（Chamber slide；Labteck）。
  - 6.4 四孔經鐵氟龍處理的玻片（corning）。
  - 6.5 細胞培養培養盒 25 T 和 75 T。
  - 6.6 固定槽和染色盤。
  - 6.7 CO<sub>2</sub> 恆溫箱，37 °C，0.5 % CO<sub>2</sub>。
  - 6.8 離心機。
  - 6.9 1 mL 細胞保存瓶。
  - 6.10 15 mL 離心管。
  - 6.11 13 × 100 mm 試管。
  - 6.12 冰箱。
  - 6.13 螢光顯微鏡。
  - 6.14 倒立顯微鏡。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 32 頁/共 1078 頁

狂犬病病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

7 環境設施安全  
略。

8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treid=4C19A0252BBEF869&nowtreid=6C7C52E7A7D5621A>。

9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treid=4C19A0252BBEF869&nowtreid=6C7C52E7A7D5621A>。

10 檢驗步驟

10.1 以目視及鏡檢選取生長良好，培養於 75 cm<sup>2</sup> 培養盒之無污染之 MNA 細胞。

10.2 於無菌操作台內操作抽棄培養液。

10.3 以 PBS[Ca(-), Mg(-)] 5 mL 清洗細胞二次，加注 2 毫升 Trypsin/EDTA，置 37°C 處理約 5 min，加入 8 mL 細胞培養液並用滴管將細胞沖散。

10.4 取 5 支 75 cm<sup>2</sup> 培養盒，每瓶先加入 8 mL 的細胞培養液，再加入 2 mL 上述 10.3 細胞懸浮液。

10.5 培養 3 - 4 天後，細胞可做為分離病毒之用或持續繼代之用。

10.6 取一小片擦手紙封住腦組織樣品瓶口，輕輕打開瓶蓋以避免病毒霧氣溢出。

10.7 以無菌棉棒竹籤端取出約 0.2 克重，約米粒大的檢體組織，以竹籤端搗碎製成 20% 乳劑，於 1600 rpm 離心 10 min。

10.8 取 0.5 mL 乳劑上清液於試管，加入 2 mL (4 × 10<sup>6</sup> 個細胞/mL) 之細胞懸浮液，以手套包裹住試管後震盪混合數秒。

10.9 置於 37°C 濕式恆溫箱內培養 30 min，每 15 min 搖動混合一次。

10.10 不鏽鋼淺盤上，鋪上浸濕的擦手紙並壓平以便放置玻片。96 孔盤的上蓋經 70% isopropanol 噴灑消毒 10 min 後以紙巾擦乾，做為蓋子蓋住玻片。

10.11 檢體與細胞混合後，分裝 1 個 25 cm<sup>2</sup> 培養盒和製作 12 片四孔經鐵氟龍處理的玻片，每孔加入 0.2 mL。

10.12 培養 24 hr 後，取一玻片經直接螢光抗體染色 (dFA)，於 200 倍視野觀察是否有細胞質內螢光。

11 結果判定

11.1 判讀標準：若出現細胞質內螢光則判定為陽性，可收集 25 cm<sup>2</sup> 培養盒之病毒液。若 4 - 5 天 dFA 仍舊呈陰性，則於第 5 天盲目繼代。25 cm<sup>2</sup> 培養盒棄上清液後，以 Tyysin-EDTA 處理細胞懸浮液，繼續培養和以

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 33 頁/共 1078 頁

狂犬病病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

dFA 判定是染含有狂犬病病毒，盲目繼代至少三次以上，以確認是否可分離出狂犬病病毒。

11.2 報告核發：病原體分離(陰性)，病原體分離(陽性)

11.3 結果登錄：相關檢驗紀錄及檢體送驗單陳核實驗室主管審核，由本署內部之網站應用系統進入傳染病通報系統輸入檢驗結果。

## 12 品質管制

12.1 嚴防病原散佈或污染，工作時帶手套。

12.2 實驗過程遵循 S.O.P 的作業規範與流程，檢體處理需在 BSL-2 實驗室內操作，以避免污染。

12.3 生物安全櫃及培養箱定期做校正及維護。

12.4 置於 37°C CO<sub>2</sub> 恆溫箱培養時應注意保持溼度。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序辦理。

## 14 參考資料

無。

## 15 附錄

### 15.1 MEM 培養基 (100 mL)

MEM with Earles Salts (BRL)	90	mL
Fetal Bovine Serum	10	mL
Glutamine, 3% (BRL)	2	mL
MEM vitamin (BRL)	2	mL
Gentamicin, 40 mg/mL	0.24	mL
Streptomycin, 250 mg/mL	0.5	mL
Penicillin, 5x10 <sup>5</sup> U/mL	0.5	mL

### 15.2 Lysis buffer

**10 mM Tris HCl, pH 7.5**

**150 mM NaCl**

**1.5 mM MgCl**

**0.65% NP-40**

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	狂犬病病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 34 頁/共 1078 頁	(RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以分子生物學技術，利用反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 來檢測檢體中是否含有狂犬病毒核酸。

## 2 適用檢體種類

適用於人體體內組織。

## 3 原理概述

利用具特殊專一性之引子 (primers)，把檢體中的狂犬病毒 RNA 經由 RT-PCR 的過程，增幅出 DNA 片段，以篩選檢體是否有狂犬病病毒。所用之引子是根據犬病毒的 nucleoprotein 區域所設計的。

## 4 名詞解釋

無。

## 5 試劑耗材

5.1 QIAmp viral RNA kit。

5.2 RT-PCR reagent

5.3 TBE buffer (tris-borate/EDTA electrophoresis buffer)。

5.4 positive control RNA (Rabipur 狂犬病病毒疫苗株)。

5.5 Agarose。

5.6 水質：25 °C 蒸餾水或 RO 逆滲透可達 18 MΩ-CM 以上超純水。

5.7 無菌 PCR 反應管。

5.8 無菌 2 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL Tips。

5.9 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.10 手套。

## 6 儀器設備

6.1 PCR thermal cycler。

6.2 Agarose 電泳槽。

6.3 DNA 電泳膠體觀察設備。

6.4 2 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL Pipetman。

## 7 環境設施安全

應有獨立的操作空間，盡量與操作 RNA 或 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

狂犬病病毒核酸檢測  
(RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

頁次：第 35 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

10.1.1 檢體的採集量至少 0.5 cc

10.1.2 檢體的運送：4 °C。

### 10.2 萃取病毒 RNA

10.2.1 吸取 140 µL 的血清檢體，加入 560 µL Lysis buffer (AVL)，震盪混合，室溫靜置反應 10 min。

10.2.2 加入純酒精 560 µL 終止反應。

10.2.3 將上述混合液分兩次，以離心方式 (8,000 rpm, 1 min) 通管柱 (column)，檢體中如有 RNA 存在，會吸附在管柱底部的膜上。

10.2.4 以清洗液 (AW1) 500 µL，離心 8,000 rpm, 1 min，作第一次沖洗，清洗膜上所吸附的雜質。

10.2.5 以清洗液 (AW2) 500 µL，離心 12,000 rpm, 1 min，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。

10.2.6 離心 12,000 rpm, 3 min，以徹底去除膜上殘留酒精。

10.2.7 加入萃取液 (AVE)，室溫靜置 9 min，在 4 °C 離心 8,000 rpm, 2 min，取得 RNA。

### 10.3 反轉錄酶—聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)

10.3.1 取 10 µL RNA 做模板，加入引子組各 10 pmole，70 °C 作用 10 min 後，並使其降溫至 4 °C。

10.3.2 加入反應溶液 (成份如下表)，調整反應總體積至 100 µL。

試劑	加入	體積
2X RT-PCR buffer	25	µL
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	2	µL
RNaseOUT	1	µL

10.3.3 反轉錄酶—聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)：使用 PCR thermal cycler。

10.3.3.1 R.T.作用：50 °C, 30 min。

10.3.3.2 Taq 活化作用：95 °C, 10 min。

10.3.3.3 Denaturation：95 °C, 30 sec。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

狂犬病病毒核酸檢測  
(RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

頁次：第 36 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

- 10.3.3.4 Annealing：56 °C，40 sec。
- 10.3.3.5 Extension：72 °C，60 sec。
- 10.3.3.6 重複 10.3.3.3 至 10.3.3.5 步驟 40 cycle。
- 10.3.3.7 Final extension：72 °C，10 min。

## 10.4 膠片電泳分析

- 10.4.1 製備 1.5 % 洋菜膠：6 g agarose 溶於 400 mL (1X) TBE buffer。
- 10.4.2 選擇 100 bp DNA size Marker：5 μL (25 ng/μL)。
- 10.4.3 取二次產物 10 μL，各加入 2 μL 6X loading dye。
- 10.4.4 進行電泳分離 100 V，35 min。
- 10.4.5 膠片染色：1 μL/mL ethidium bromide 染色 10 min，H<sub>2</sub>O 褪染。
- 10.4.6 使用 UV light 觀察，並照相紀錄。

## 10.5 檢驗後處理

- 10.5.1 檢驗完成後之檢體與廢液，於高溫高壓滅菌器滅菌後，依感染性醫療廢棄物處理。
- 10.5.2 檢驗後之剩餘檢體依序裝入檢體架內保存。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 RT-PCR 產物各取 5 μL，在 1.5 % 洋菜膠進行反應，檢視反應結果。
- 11.1.2 產物長度如下  
RT-PCR 產物：增幅出的片段約 1,468 bp。

### 11.2 報告核發：RT-PCR(陽性)、RT-PCR(陰性)。

### 11.3 結果登錄：相關檢驗紀錄及檢體送驗單陳核實驗室主管審核，由本署內部之網站應用系統進入傳染病通報系統輸入檢驗結果。

## 12 品質管制

- 12.1 嚴防病原散佈或污染，工作時帶手套。
- 12.2 實驗過程遵循 S.O.P 的作業規範與流程，檢體處理需在生物安全櫃內操作，以避免污染。
- 12.3 生物安全櫃定期做校正及維護。
- 12.4 聚合酶鏈鎖反應須含有陰性與陽性對照組。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序辦理。

## 14 參考資料

- 14.1 Poch O, Tordo N, Keith G. 1988. Sequence of the 3386 3' nucleotides of the genome of the AVO1 strain rabies virus: structural similarities in the protein regions involved in transcription. *Biochimie* 70: 1019 - 1029.

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 37 頁/共 1078 頁

狂犬病病毒核酸檢測  
(RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 14.2 Sasaki DM, et al. 1992. Rabid bat diagnosed in Hawaii. Hawaii Med J 51: 992.
- 14.3 Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1998. Quarantine & rabies. UK MAFF Publications, London.
- 14.4 CDC. 1999. Human rabies prevention—United States. MMWR 48: RR-1.
- 14.5 狂犬病檢查マニュアル，日本国立感染症研究所獣医科学部，第 14 - 19 頁，2012。
- 14.6 Qiagen, QIAamp viral RNA mini 專一性之 primers kit handbook pp.18 - 19.

## 15 附錄

- 15.1 狂犬病病毒鑑定（反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應法）流程圖。
- 15.2 狂犬病病毒診斷用引子組序列表。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

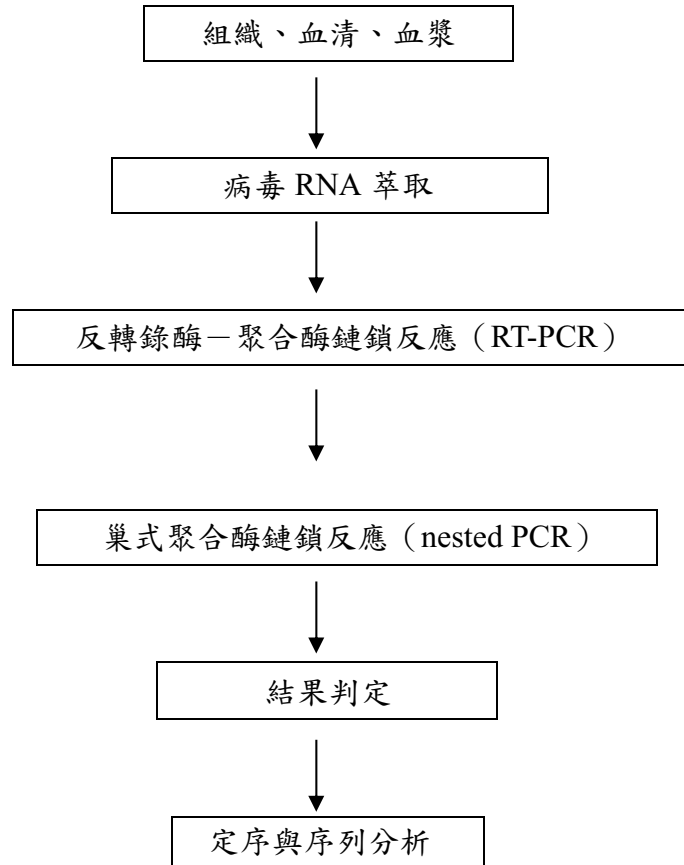
頁次：第 38 頁/共 1078 頁

狂犬病病毒核酸檢測  
(RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 狂犬病病毒鑑定（反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應法）流程圖





# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	狂犬病病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 39 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 狂犬病病毒診斷用引子組序列表

---

N7 : 5' - ATG TAA CAC C(T/C)C TAC AAT GG - 3'

JW6(DPL) : [5' - CAA TTC GCA CAC ATT TTG TG - 3'

JW6(E) : 5' - CAG TTG GCA CAC ATC TTG TG - 3'

JW6(M) : 5' - CAG TTA GCG CAC ATC TTA TG - 3'

---

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	狂犬病病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 40 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

檢測狂犬病病毒抗體。

## 2 適用檢體種類

適用於人體體內組織。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用狂犬病病毒醣蛋白作為抗原，與待測血清進行抗原抗體反應，以酵素標幟抗體間接地將此反應轉成顏色訊號，由全自動酵素免疫分析儀讀取結果。

## 5 試劑耗材

5.1 試劑組：PLATELIA™ RABIES II KIT (Ref.: 3551180)，BIO-RAD，France。

5.1.1 已吸附狂犬病病毒醣蛋白之 96 孔微量滴定盤：試劑組(R1)保存 4°C 冰箱。

5.1.2 清洗液 Wash solution (10X)：試劑組(R2)保存 4°C 冰箱。

5.1.3 陰性對照組 Negative control：試劑組(R3) 保存 4°C 冰箱。

5.1.4 陽性對照組 0.5 EU/ml Positive control (human)：試劑組(R4a) 保存 4°C 冰箱。

5.1.5 陽性對照組 4 EU/ml Positive control (human)：試劑組(R4b) 保存 4°C 冰箱。

5.1.6 檢體稀釋液(TRIS-EDTA buffer)：試劑組(R6)保存 4°C 冰箱。

5.1.7 酵素 conjugate (Protein A labeled with Peroxidase)：試劑組(R7) 保存 4°C 冰箱。

5.1.8 基質緩衝液(citric acid and sodium acetate with 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 4% DMSO)：試劑組(R8)保存 4°C 冰箱

5.1.9 呈色劑(TMB 受質)：試劑組(R9)保存 4°C 冰箱

5.1.10 終止液(1 N sulphuric acid solution)：試劑組(R10)保存 4°C 冰箱

### 5.2 耗材

5.2.1 96 孔微量滴定盤封膜。

5.2.2 無菌微量吸管尖 (tip)：10μL、200μL、1,000μL。

5.2.3 可拋棄式無菌塑膠手套。

5.2.4 無菌離心試管：15mL

5.2.5 無菌蒸餾水。

5.2.6 黑膠蓋

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	狂犬病病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 41 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 第二級生物安全櫃 (Class II BSC)。
- 6.2 全自動酵素免疫分析儀 (ELISA reader: Thermo scientific Multiskan FC, USA)。
- 6.3 全自動盤式清洗器。(Microplate washer: Thermo scientific Wellwash, USA)
- 6.4 微量吸管 (pipetmen): 20 $\mu$ L、100 $\mu$ L、1,000 $\mu$ L。
- 6.5 8 爪微量吸管。
- 6.6 計時器。
- 6.7 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱。

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢驗前血清處理

10.1.1 檢體以 1,500 rpm 離心 10 min，分離出血清備用。

### 10.2 檢驗步驟

10.2.1 使用 R6 試劑 100 倍稀釋 R3、R4a、R4b 控制組和待測血清。

10.2.2 取 100 $\mu$ l 稀釋過的檢體加入 microplate (R1) 中，並封上薄膜放入 37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 的培養箱中 1 小時 $\pm$ 5 分鐘。

10.2.3 準備 Wash Buffer 和稀釋 conjugate solution，將 500 $\mu$ l R7 以 4.5ml R2 wash buffer 10 倍稀釋。

10.2.4 移除薄膜後，用 wash buffer 清洗三次。

10.2.5 在 wells 中加入 conjugate solution (R7) 100 $\mu$ l，蓋上新的膜後放入培養箱中 37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 的培養箱中 1 小時 $\pm$ 5 分鐘。

10.2.6 準備 Enzymatic development solution (R8 : R9 = 11 : 1)

10.2.7 移除薄膜後，利用 wash buffer 清洗五次。

10.2.8 在 wells 中加入 enzymatic development solution (R8+R9) 100 $\mu$ l，並蓋上黑膠蓋避光，放在室溫( 18 - 30 $^{\circ}$ C )30 $\pm$ 5 分鐘。

10.2.9 在 wells 中加入 100 $\mu$ l 的 stop solution (R10)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	狂犬病病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 42 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

10.2.10 利用 450-620 nm 波長讀取吸光值。

## 10.3 檢驗後處理

10.3.1 完成檢驗，試劑組儲存於 4°C 冰箱保存。

10.3.2 檢驗後之檢體應依序歸回檢體盒，放置 -20°C 冰箱保存。

10.3.3 整理清除實驗工作桌面上之抗污紙墊及使用後拋棄之微量吸管尖和手套，包裝於廢棄物滅菌塑膠袋。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準：

11.1.1 每個 R3 之 OD 讀值需小於 0.05，且每個 R4a 之 OD 讀值應大於 0.300 小於 1.200，每個 R4b 之 OD 讀值應大於 1.500 小於 3.500。若有任一對照組數值不符合上述條件，即應重複該次實驗。

11.1.2 若檢體之 OD 讀值大於 R4a 平均值，表示血清抗體陽性

11.1.3 若檢體之 OD 讀值小於 R4a 平均值，表示血清抗體陰性。

11.2 報告核發：IgG anti-Rabies virus(陽性)、IgG anti-Rabies virus(陰性)。

11.3 結果登錄：將檢驗結果填寫於檢體送驗單之”檢驗結果”欄，並於送驗單背面蓋職章，相關檢驗紀錄及檢體送驗單陳核實驗室主管審核，由本署內部之網站應用系統進入傳染病通報系統輸入檢驗結果。

11.3.1 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。

## 12 品質管制

12.1 陰性對照組(R3)OD 讀值需 < 0.05

12.2 陽性對照組(R4a)OD 讀值需介於 0.300~1.200 間

12.3 陽性對照組(R4b)OD 讀值需介於 1.500~3.500 間

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Feysaguet, M., Dacheux, L., Audry, L., Compoin, A., Morize, J. L., Blanchard, I. & Bourhy, H.(2007).Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIA RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vaccinated people. *Vaccine* 25, 2244–2251.

14.2 PLATELIA™ RABIES II KIT 原廠試劑說明書

## 15 附錄

15.1 狂犬病病毒抗體試驗-酵素免疫分析法流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

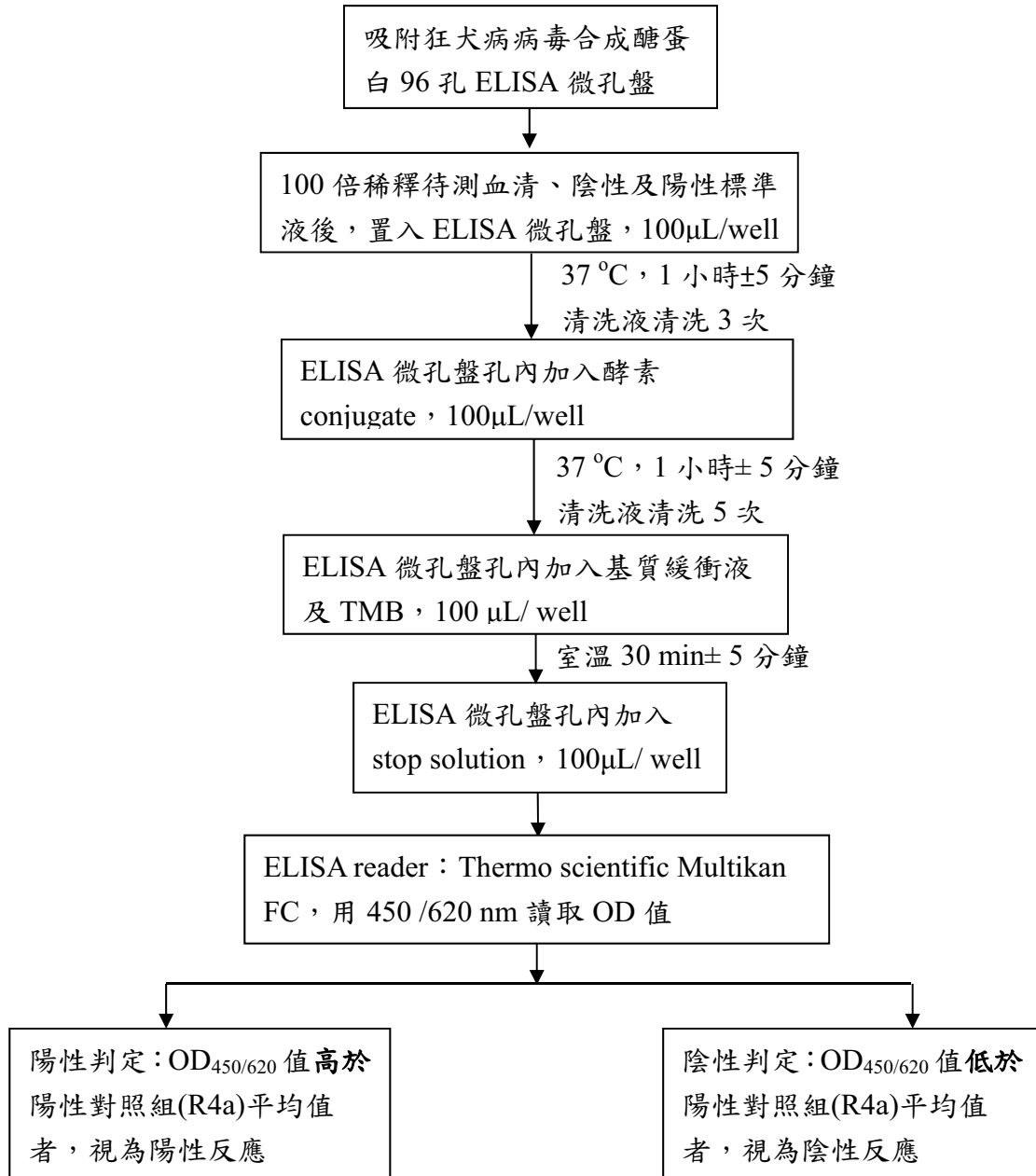
狂犬病病毒抗體檢測  
(ELISA)

核准日期： 年 月 日


頁次：第 43 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 狂犬病病毒抗體試驗（酵素免疫分析法）流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	H5N1 流感病毒分離、鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 44 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
檢測 H5N1 流感病毒病原體。
- 2 適用檢體種類  
適用之檢體種類包括咽喉拭子、鼻咽拭子、鼻咽抽出液、支氣管肺泡灌洗液等。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
利用 H5N1 流感病毒可感染 MDCK 細胞株之特性，進行病毒病原體之培養，觀察細胞病變 (CPE) 的出現，最後再以 H5N1 流感病毒核酸檢測方法確認。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 試劑
    - 5.1.1 緩衝液：PBS，GibcoBRL，美國。
    - 5.1.2 DMEM 培養基：GibcoBRL，美國。
      - 5.1.2.1 生長培養基：添加 10 % 胎牛血清，100 U/mL 抗生素。
      - 5.1.2.2 維持培養基：添加 100 U/mL 抗生素，2.0 µg/mL 之 tpck-trypsin，不添加胎牛血清。
    - 5.1.3 胰蛋白酶：Tpck treated trypsin，Sigma。
  - 5.2 耗材
    - 5.2.1 25T 細胞培養盒。
    - 5.2.2 75T 細胞培養盒。
    - 5.2.3 5 mL 針筒。
    - 5.2.4 0.45 µM 針筒用過濾膜。
    - 5.2.5 刻度吸管：10 mL、5 mL、1 mL。
    - 5.2.6 21 孔螢光檢測玻片。
    - 5.2.7 96 孔 U 型底孔盤。
    - 5.2.8 96 孔盤封盤膠膜。
    - 5.2.9 八爪分注器。
    - 5.2.10 手套、口罩等個人安全防護用品。
- 6 儀器設備
  - 6.1 第二級生物安全櫃。
  - 6.2 35 °C 二氧化碳恆溫培養箱。
  - 6.3 高速離心機。
  - 6.4 倒立顯微鏡。
- 7 環境設施安全
  - 7.1 季節性流感於生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室內操作。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 45 頁/共 1078 頁

H5N1 流感病毒分離、鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 接種

10.1.1 取已接種於 culture tube 並長滿平面之 MDCK 細胞，吸除舊有生長培養基，以不含 Mg 離子的 PBS 溶液清洗兩次後，加入同量含有 2.0 µg/mL Tpkc-trypsin 維持培養基。

10.1.2 每一檢體接種 2 支 Culture tube，每支 Tube 接種 100 µL 檢體，培養於 35 °C，CO<sub>2</sub> 培養箱 7 - 10 日。

### 10.2 觀察

10.2.1 自接種後翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態。

10.2.2 接種細胞產生 50 % 以上細胞病變者 (CPE 達二至三價)，收集細胞及培養液，立即進行鑑定。

### 10.3 檢驗後處理

病毒液置於抗低溫之保存管，存於 4 °C 或 -80 °C，螢光玻片存於 -20 °C，其餘廢液及檢驗器具均以高溫滅菌銷毀。

## 11 結果判定

11.1 判讀標準：培養液經 H5N1 病毒核酸檢測方法測定為陽性者，判定為陽性。

11.2 報告核發：H5N1 流感病毒分離陽性，H5N1 流感病毒分離陰性。

11.3 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之「檢驗結果欄」，並上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。

## 12 品質管制

實驗室每年進行內部檢驗能力評估，每季進行人員檢驗流程熟悉度檢視。


## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

WHO. 2011. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	H5N1 流感病毒螢光定量聚合酶	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 46 頁/共 1078 頁	連鎖反應(real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
以分子生物學的技术利用反轉錄酶－聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 檢測檢體中是否有 H5N1 流感病毒。
- 2 適用檢體種類  
適用之檢體種類包括血清、咽喉拭子、鼻咽拭子、鼻咽抽出液、支氣管肺泡灌洗液等。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
即時定量 RT-PCR：  
此系統的定量原理是利用一標記兩種螢光的 DNA 探針來偵測聚合酶連鎖反應的產物。此 DNA 探針的 5' 端標記一報告染劑 (reporter dye)，3' 端則標記一遮蔽染劑 (quencher dye)，完整的 DNA 探針其報告染劑所散發出的螢光會被遮蔽染劑所掩蓋。當聚合酶進行延伸反應 (extension phase) 時，具有從 5' 端 DNA 切割活性的 DNA 聚合酶將探針切割，使得 5' 端報告染劑與 3' 端遮蔽染劑分開，遮蔽效應被破壞，此時即可偵測到螢光反應。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 試劑
    - 5.1.1 QIAmp viral RNA kit。
    - 5.1.2 One-step RT-PCR kit。
    - 5.1.3 TBE buffer (tris-borate/EDTA electrophoresis buffer)。
    - 5.1.4 陽性對照組 (positive control)：以建立之 H5 陽性標準 Plasmid DNA 的檢體作對照；陰性對照組 (negative control)：採用 H5N1 陰性的檢體作對照或以水作陰性對照。
    - 5.1.5 Agarose。
    - 5.1.6 DEPC 水。
  - 5.2 耗材
    - 5.2.1 無菌 PCR 反應管。
    - 5.2.2 無菌 2  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L Tips。
    - 5.2.3 無菌 1.5 mL 微量離心管。
    - 5.2.4 手套。
- 6 儀器設備
  - 6.1 PCR thermal cyclers。
  - 6.2 電泳槽。
  - 6.3 DNA 電泳膠體觀察設備。
  - 6.4 2  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L Pipetman。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	H5N1 流感病毒螢光定量聚合酶	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 47 頁/共 1078 頁	連鎖反應(real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 7 環境設施安全

採用獨立的操作空間，將 RNA 或 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

10.1.1 檢體編號：核對檢驗單之個案與檢體是否相符，給予疾病編號。

10.1.2 血清或添加抗凝劑如 sodium citrate 或 EDTA 的血漿皆可使用

10.1.2.1 檢體的採集量並無嚴格限制。

10.1.2.2 檢體的運送：4 °C。

10.1.2.3 採集後之檢體，以 2,000 rpm 離心 10 min，以分離出的血清備用。

10.1.3 咽喉拭子檢體

10.1.3.1 棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。

10.1.3.2 於 4 °C，2,100 ×g 離心 15 min。

10.1.3.3 收集上清液分裝於 2 - 3 支 Cryotube，標示號碼及日期，取 140 μL，其餘保存於-70 °C。

10.1.4 痰檢體

10.1.4.1 取 PBS 緩衝液與痰檢體約 1：1 的比例混合

10.1.4.2 攪拌使其均質化並於 4 °C，2,100 ×g 離心 15 min。

10.1.5 收集上清液，取 140 μL，其餘保存於-70 °C。

### 10.2 萃取病毒 RNA

10.2.1 吸取 140 μL 的檢體，加入 560 μL Lysis buffer (AVL)，震盪混合，室溫靜置反應 10 min。


10.2.2 加入純酒精 560 μL 終止反應。

10.2.3 將上述混合液分兩次加入通管柱 (column)，並以離心 (8,000 rpm, 1 min) 方式加速混合液通過濾膜，檢體中如有 RNA 存在，會吸附在管柱底部的濾膜上。

10.2.4 以清洗液 (AW1) 500 μL，離心 8,000 rpm，1 min，作第一次沖洗，清洗膜上所吸附的雜質。

10.2.5 以清洗液 (AW2) 500 μL，離心 14,000 rpm，3 min，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	H5N1 流感病毒螢光定量聚合酶	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 48 頁/共 1078 頁	連鎖反應(real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

10.2.6 離心 14,000 rpm，1 min，以徹底去除膜上殘留酒精。

10.2.7 加入 DEPC 水，室溫靜置 9 min，在 4 °C 離心 8,000 rpm，1 min，取得 RNA。

10.3 轉錄酶－聚合酶連鎖反應（RT-PCR）（以 Qiagen one-step RT-PCR kit 為例）

10.3.1 試劑添加量

5X buffer	10 μL
Forward primer (10 μM)	3 μL
Reverse primer (10 μM)	3 μL
RNA enzyme mix	2 μL
dNTP	2 μL
DEPC treatment H <sub>2</sub> O	25 μL
RNA sample	5 μL
<hr/>	
	50 μL

10.3.2 使用 PCR thermal cycler

10.3.2.1 R.T.作用，63 °C 3 min。

10.3.2.2 Taq 活化作用，95 °C 30 sec。

10.3.2.3 Denaturation，95 °C 10 sec。

10.3.2.4 Annealing，58 °C 30 sec。

10.3.2.5 Extension，72 °C 3 sec。

10.3.2.6 重複 10.3.2.3 至 10.3.2.5 步驟 45 cycle。

10.4 檢驗後處理

檢驗完成後之檢體與廢液，於高溫高壓滅菌器滅菌後，依感染性醫療廢棄物處理。檢驗後之剩餘檢體依序裝入檢體架內保存。

11 結果判定

11.1 判讀標準

Real-time RT-PCR：若有螢光訊號產生，即可判定為 H5N1 流感病毒 real-time RT-PCR 陽性。

11.2 報告核發：H5N1 流感病毒 real-time PCR 陽性，H5N1 流感病毒 real-time PCR 陰性。

11.3 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果欄”，並將檢驗結果上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。


12 品質管制

12.1 陽性對照組：陽性對照組 RNA 之 Ct 值應介於 25~26 之間。

12.2 陰性對照組：陰性對照組(二次水)需無任何螢光訊號產生。

12.3 若檢驗結果不符合上述任一品質管制要點，該結果不可作為檢驗結果判讀依據，檢體需重新檢驗。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	H5N1 流感病毒螢光定量聚合酶	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 49 頁/共 1078 頁	連鎖反應(real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 WHO. Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A (H5N1) virus in specimens from suspected human cases.

Available at

[http://www.who.int/csr/avian\\_influenza/guidelines/labtests/en/index.html](http://www.who.int/csr/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html).

14.2 WHO. Guidelines for investigation of human cases of avian influenza A(H5N1). Available at

[http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_EPR\\_GIP\\_2006\\_4/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_EPR_GIP_2006_4/en/index.html).

## 15 附錄

### 15.1 H5N1 病毒診斷用引子組序列表

H5-266F: 5'- TGCCGGAATGGTCTTACATAGTG -3'

H5-290P: 5'-(FAM)-AGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTGTTA-(TAMRA)-3'

H5-347R: 5'- TCTTCATAGTCATTGAAATCCCCTG -3'


### 15.2 注意事項

15.2.1 以 Heparin 為抗凝劑的血漿或溶血檢體可能會干擾 Taq polymerase 的作用，降低檢驗敏感性。

15.2.2 病毒 RNA 的萃取，除了最後一步 RNA 的洗脫 (elution) 是在 4 °C 下離心之外，其餘步驟皆可在室溫下進行。

15.2.3 序列分析：將經 RT-PCR 增幅的 DNA 片段作定序分析，並將定序的結果利用 NCBI 的基因庫作序列分析。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	炭疽桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 50 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
分離與鑑定炭疽桿菌，以確定病例與感染源。
- 2 適用檢體種類
  - 2.1 人體血液、腦脊髓液、皮膚水泡液、痂皮檢體。
  - 2.2 非人體檢體之郵件、白粉。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
以培養基分離培養細菌後，依據菌落形態、細菌生理特徵、芽孢形狀、生化反應特性、PCR 分子檢測等方法原理鑑定之。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 BAP (blood agar plate)。
  - 5.2 SIM (sulfide indole motility) agar。
  - 5.3 革蘭氏染色液 (Gram stain solution)。
  - 5.4 API 50 CHB 生化鑑定套組。
  - 5.5 AB TaqMan *Bacillus Anthracis* Detection kit。
  - 5.6 real-time PCR 毛細管。
  - 5.7 載玻片。
  - 5.8 接種環 (針)。
  - 5.9 1 mL 無菌塑膠吸管。
  - 5.10 無菌 (含濾棉) 微量吸管尖 (tip)：200  $\mu$ L、20  $\mu$ L、10  $\mu$ L。
  - 5.11 無菌棉棒。
- 6 儀器設備
  - 6.1 37 °C 培養箱。
  - 6.2 立體解剖顯微鏡：有變焦功能，至少可放大 4.5X。
  - 6.3 顯微鏡：能放大至 1,000 倍之一般光學顯微鏡。
  - 6.4 微量吸管 (Pipetman)。
  - 6.5 即時定量聚合酶鏈鎖反應器。
- 7 環境設施安全  
於生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室之設施內操作。
- 8 檢體採集  
參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 51 頁/共 1078 頁

炭疽桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treid=4C19A0252BBEF869&nowtreid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

實驗室於收到檢體及送驗單後，先行核對檢體種類、姓名、數量等資料正確與否，並依序登錄於紀錄簿。

### 10.2 分離培養

10.2.1 人體血液、腦脊髓液、皮膚水泡液、痂皮檢體等：以無菌棉花棒沾取少許或以無菌滴管吸取少許接種於 BAP 培養基上。

10.2.2 非人體檢體之郵件、白粉檢體：先將無菌棉花棒以無菌水浸濕，再以此棉棒沾取上述檢體，並將之浸泡於無菌水數 min 後（視檢體多寡酌量使用無菌水），取適量接種於 BAP 培養基上。

10.2.3 培養：37 °C CO<sub>2</sub> 培養箱培養。

10.2.4 觀察：18 - 24 hr 後，開始觀察有無可疑菌落，如有即進行鑑定。

### 10.3 鑑定

#### 10.3.1 菌落型態及染色

10.3.1.1 直接抹片染色觀察：直接取少量新鮮血液、腦脊髓液、水泡液檢體置玻片上做成抹片，進行革蘭氏染色，觀察有無革蘭氏陽性、菌體中央具卵圓形芽孢的竹節狀排列長桿菌。

10.3.1.2 菌落型態：炭疽桿菌在 BAP 培養基上，呈現不溶血或微溶血之大型乳白色菌落，直徑約 2 - 5 mm，外觀呈磨砂玻璃、粗糙、扁平、圓形具水母頭狀（蛇髮女妖頭髮狀 medusa-head）。

10.3.1.3 菌落染色觀察：挑選獨立可疑之菌落型態作革蘭氏染色，符合革蘭氏陽性、菌體中央具卵圓形芽孢之竹節狀排列長桿菌，進行後續鑑定。

#### 10.3.2 莢膜染色鑑定

莢膜染色鑑定：挑選可疑菌落，作 Polychrome methylene blue stain，觀察菌體型態是否符合藍黑色、方邊角、桿狀，外鞘膜則呈現無色透明。

#### 10.3.3 運動性試驗（motility）

以無菌接種針挑取可疑菌落插入運動性試驗培養基（SIM）中，置 37 °C 培養箱隔夜培養，觀察有無運動性。

#### 10.3.4 API 50 CHB 生化鑑定

10.3.4.1 取數個菌落置入 API 50B 安瓿培養液中，混合均勻將濃度調整為 2 McFarland。

10.3.4.2 將調好之菌液以滴管分別慢慢注入 50 個試驗孔中，置 37 °C 培養 24 - 48 hr。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 52 頁/共 1078 頁

炭疽桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

10.3.4.3 觀察試驗孔溶液轉黃色為陽性，紅色為陰性。編號 25 的孔洞 (Esculin test) 變成黑色為陽性反應。分別於 24 及 48 hr 各登記判讀結果一次，並由 API 細菌鑑定檢索電腦軟體查詢菌種名稱。

10.3.5 AB TaqMan *Bacillus Anthracis* Detection kit -real time PCR 鑑定  
取數個可疑新鮮菌落，放入含 100  $\mu$ L 無菌水的 1.5 mL 微量離心管中，100  $^{\circ}$ C 煮沸 10 min 後，10,000 rpm 離心 5 min，取上清液作為 PCR 反應模板 DNA。

## 11 結果判定

11.1 判讀標準：符合下列結果判定為炭疽桿菌陽性；如有其中一項不符合，判定為炭疽桿菌陰性。

11.1.1 菌落型態：BAP 培養基上呈不溶血或微溶血大型乳白色菌落，直徑約 2 - 5 mm，外觀呈磨砂玻璃、粗糙、扁平、圓形具水母頭狀 (蛇髮女妖頭髮狀 medusa-head)。

11.1.2 革蘭氏染色：革蘭氏陽性、菌體中央具卵圓形芽孢的竹節狀排列長桿菌。

11.1.3 莢膜染色：藍黑色方邊角桿狀，外鞘膜則呈現無色透明。

11.1.4 運動性試驗：無運動性。

11.1.5 API 50 CHB 生化鑑定：經鑑定菌種為炭疽桿菌。

11.1.6 Real-time PCR 鑑定：pXO1、pXO2 二質體之標的基因擴增曲線 (FAM 螢光) 皆呈陽性，IPC (internal positive control, VIC 螢光) 擴增曲線可為出現或無出現；陰性對照組之 IPC 反應應出現。

11.2 報告核發：炭疽桿菌陽性、炭疽桿菌陰性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於炭疽桿菌分離與鑑定紀錄表及檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送報告簽署人審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

## 12 品質管制

### 12.1 培養基

測試時間：每一批號由廠商提供品質管制文件，實驗室每季進行一次品管測試。

測試菌株：no.1，no.2，BA-Japan。

測試方法：使用新鮮的測試菌，取適量接種於培養基，37 $^{\circ}$ C 隔夜培養。  
觀察結果：菌落型態或測試反應符合炭疽桿菌反應特性。

### 12.2 試劑套組

測試時間：每一批號由廠商提供品質管制文件，每批號進行一次品管測試。

測試菌株：no.1，no.2，BA-Japan。

測試方法：使用新鮮的測試菌，依操作手冊說明進行試驗。

觀察結果：試驗結果需符合陽性判定結果。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 53 頁/共 1078 頁

炭疽桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 蔡文城。2010。實用臨床微生物診斷學：嗜氧性革蘭氏陽性桿菌的鑑定(芽孢桿菌屬及相關菌屬)，第十版，九州圖書文物有限公司，臺灣。

14.2 Komeman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5<sup>th</sup> edition. Chapter 13. The Aerobic Gram-Positive Bacilli. pp. 651 - 708.

14.3 API 50 CHB 操作手冊。


14.4 AB TaqMan *Bacillus Anthracis* Detection kit 操作手冊。

## 15 附錄

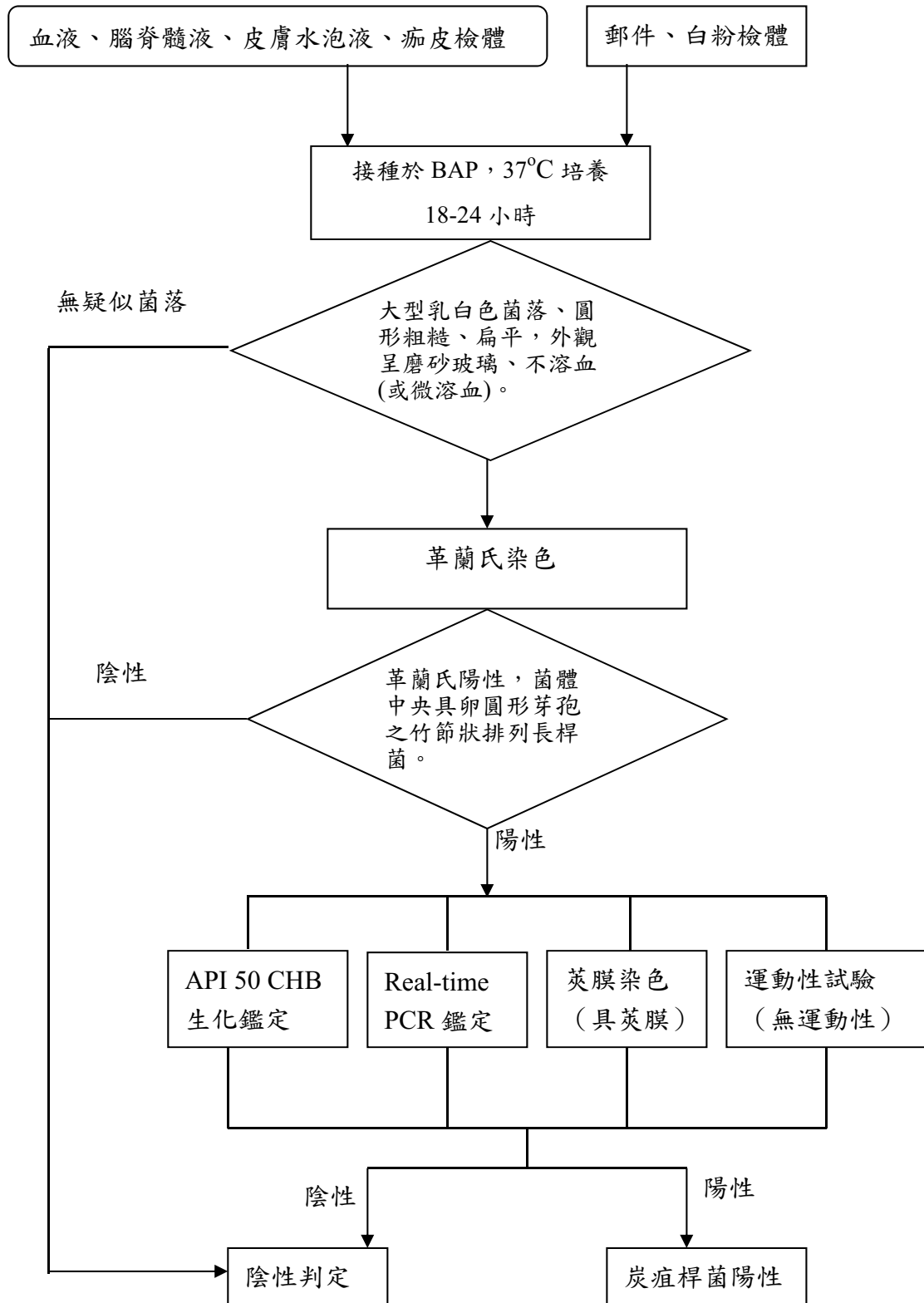
15.1 炭疽桿菌分離與鑑定流程圖

15.2 炭疽桿菌分離與鑑定紀錄表

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法


	編號：	炭疽桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 54 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 炭疽桿菌分離與鑑定流程圖





# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	炭疽桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 55 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 炭疽桿菌分離與鑑定紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 頁 數：第 頁/共 頁  
炭疽桿菌分離與鑑定紀錄表 填表日期： 年 月 日

檢體編號或姓名								
項目								
檢體種類 (採檢日期)								
檢體採檢運送狀況適當	是	否	是	否	是	否	是	否
BAP 培養基上大型乳白色菌落、圓形粗糙、扁平、呈磨砂玻璃外觀	是	否	是	否	是	否	是	否
溶血	是	否	是	否	是	否	是	否
運動性試驗	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
革蘭氏染色	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
	桿菌	非桿菌	桿菌	非桿菌	桿菌	非桿菌	桿菌	非桿菌
莢膜染色	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
Real-time PCR 結果	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
API 50 CHB 鑑定結果								
綜合結果	炭疽桿菌	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
		陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
備註								

檢驗者：

實驗室負責人：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

炭疽桿菌分子生物學核酸檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 56 頁/共 1078 頁

(即時定量聚合酶鏈鎖反應法)

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

針對疑似檢體或菌落進行即時定量聚合酶鏈鎖反應法檢測炭疽桿菌的核酸，以確定病例與感染源。

## 2 適用檢體種類

- 2.1 人體血液、腦脊髓液、皮膚水泡液、痂皮或組織檢體。
- 2.2 非人體檢體之郵件、白粉。
- 2.3 次培養之菌落。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

以即時定量聚合酶鏈鎖反應增幅炭疽桿菌分別位於其 pXO1 與 pXO2 質體上的兩個標的基因。

## 5 試劑耗材

- 5.1 Real-time PCR 毛細管。
- 5.2 AB TaqMan *Bacillus Anthracis* Detection kit。
- 5.3 QIAamp DNA mini kit。
- 5.4 Proteinase K (20 µg/mL，保存在 4 °C)。
- 5.5 接種環 (針)。
- 5.6 1 mL 無菌塑膠吸管。
- 5.7 1.5 mL 離心管。
- 5.8 無菌 (含濾棉) 微量吸管尖 (tip)：1 mL、200 µL、20 µL、10 µL。
- 5.9 無菌棉棒。
- 5.10 無菌研磨棒。
- 5.11 解剖剪刀。
- 5.12 無菌 TE buffer。

## 6 儀器設備

- 6.1 水浴槽。
- 6.2 微量分注器 (Pipetman)。
- 6.3 即時定量聚合酶鏈鎖反應器。
- 6.4 桌上型離心機。

## 7 環境設施安全

於生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

炭疽桿菌分子生物學核酸檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 57 頁/共 1078 頁

(即時定量聚合酶鏈鎖反應法)

修訂日期： 年 月 日

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

10.1.1 實驗室於收到檢體及送驗單後，先行核對檢體種類、姓名、數量等資料正確與否，並依序登錄於紀錄簿。

10.1.2 人體痂皮或組織檢體以消毒之解剖剪刀剪碎，取適量於 1.5 mL 離心管並加入無菌 TE buffer 以研磨棒磨碎。

10.1.3 人體血液、腦脊髓液、皮膚水泡液與 TE buffer 等比例混合，同上述磨碎之組織液，每 200  $\mu$ L 加入 20  $\mu$ L proteinase K 於 56 °C 反應 2 - 3 hr。

10.1.4 非人體檢體之郵件、白粉與次培養之菌落，以無菌棉棒或接種環收集待測樣本後，浸泡並使其溶於 TE buffer 中，同樣每 200  $\mu$ L 加入 20  $\mu$ L proteinase K 於 56 °C 反應 2 - 3 hr。

### 10.2 核酸萃取

10.2.1 於 56 °C 反應完成後，取出震盪混合 10 - 15 sec，加入 200  $\mu$ L Buffer AL，震盪混合 10 - 15 sec 後，置入 70 °C 水浴槽，反應作用 10 min。

10.2.2 取出離心管，加入 200  $\mu$ L 96 - 100 % Ethanol，震盪混合 10 - 15 sec。

10.2.3 以微量分注器將上述離心管中的液體移至 QIAamp spin column 中，並以 8,000 rpm 離心 1 min。

10.2.4 倒掉濾液，換新的 Collection tube，在 Column 中加入 500  $\mu$ L Buffer AW1，以 8,000 rpm 離心 1 min。

10.2.5 倒掉濾液，換新的 Collection tube，在 Column 中加入 500  $\mu$ L Buffer AW2，以 14,000 rpm 離心 3 min。

10.2.6 倒掉濾液，再以 14,000 rpm 離心 1 min。

10.2.7 丟棄 Collection tube，將 QIAamp spin column 套上新的 1.5 mL 離心管，加入 150  $\mu$ L Buffer AE 或無菌水，室溫下靜置 5 min。

10.2.8 以 8,000 rpm 離心 1 min，所得於離心管中的 DNA 產物，於實驗後放置 -20 °C 保存。


### 10.3 即時定量聚合酶鏈鎖反應

10.3.1 以 AB TaqMan *Bacillus Anthracis* Detection kit 進行炭疽桿菌核酸之檢測。

10.3.2 每個檢體包括陽性與陰性對照組都要進行兩種反應即 pXO1 與 pXO2 標的基因的偵測。

10.3.3 每個反應加入 2X master mix 15  $\mu$ L，10X pXO1 或 pXO2 target mix 3  $\mu$ L，PCR 等級無菌水 7  $\mu$ L，與待測 DNA 檢體 5  $\mu$ L，總反應體積為 30  $\mu$ L。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	炭疽桿菌分子生物學核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 58 頁/共 1078 頁	(即時定量聚合酶鏈鎖反應法)	修訂日期： 年 月 日

10.3.4 上機反應條件如下：95 °C 20 sec；45 個循環之 95 °C 3 sec、60 °C 30 sec。

10.3.5 反應結束後，分析反應擴增曲線。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

符合下列結果判定為炭疽桿菌核酸檢測陽性；如有其中一項不符合，判定為陰性：

兩個標的基因(FAM 螢光)皆有擴增曲線反應，IPC (internal positive control, VIC 螢光)擴增曲線可為出現或無出現；陰性對照組之 IPC 反應出現。

11.2 報告核發：炭疽桿菌核酸檢測陽性、炭疽桿菌核酸檢測陰性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於炭疽桿菌分離與鑑定紀錄表及檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送報告簽署人審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

## 12 品質管制

12.1 試劑套組： AB TaqMan *Bacillus Anthracis* Detection kit。

測試時間：每一批號由廠商提供品質管制文件，每批號進行一次品質測試。

測試菌株：BA-no.1，BA-no.2，BA-Japan。

測試方法：以測試菌株為待測檢體，進行上述標準流程之實驗。

觀察結果：實驗結果需符合陽性判定結果。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 蔡文城。2010。實用臨床微生物診斷學：嗜氧性革蘭氏陽性桿菌的鑑定(芽孢桿菌屬及相關菌屬)，第十版。九州圖書文物有限公司，臺灣。

14.2 Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC. 2005.

14.3 Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6<sup>th</sup> edition. Chapter 14. The Aerobic Gram-Positive Bacilli. pp. 765 - 857.

14.4 AB TaqMan *Bacillus Anthracis* Detection kit 操作手冊。

## 15 附錄

15.1 炭疽桿菌核酸檢測流程圖。

15.2 炭疽桿菌核酸檢測紀錄表。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 59 頁/共 1078 頁

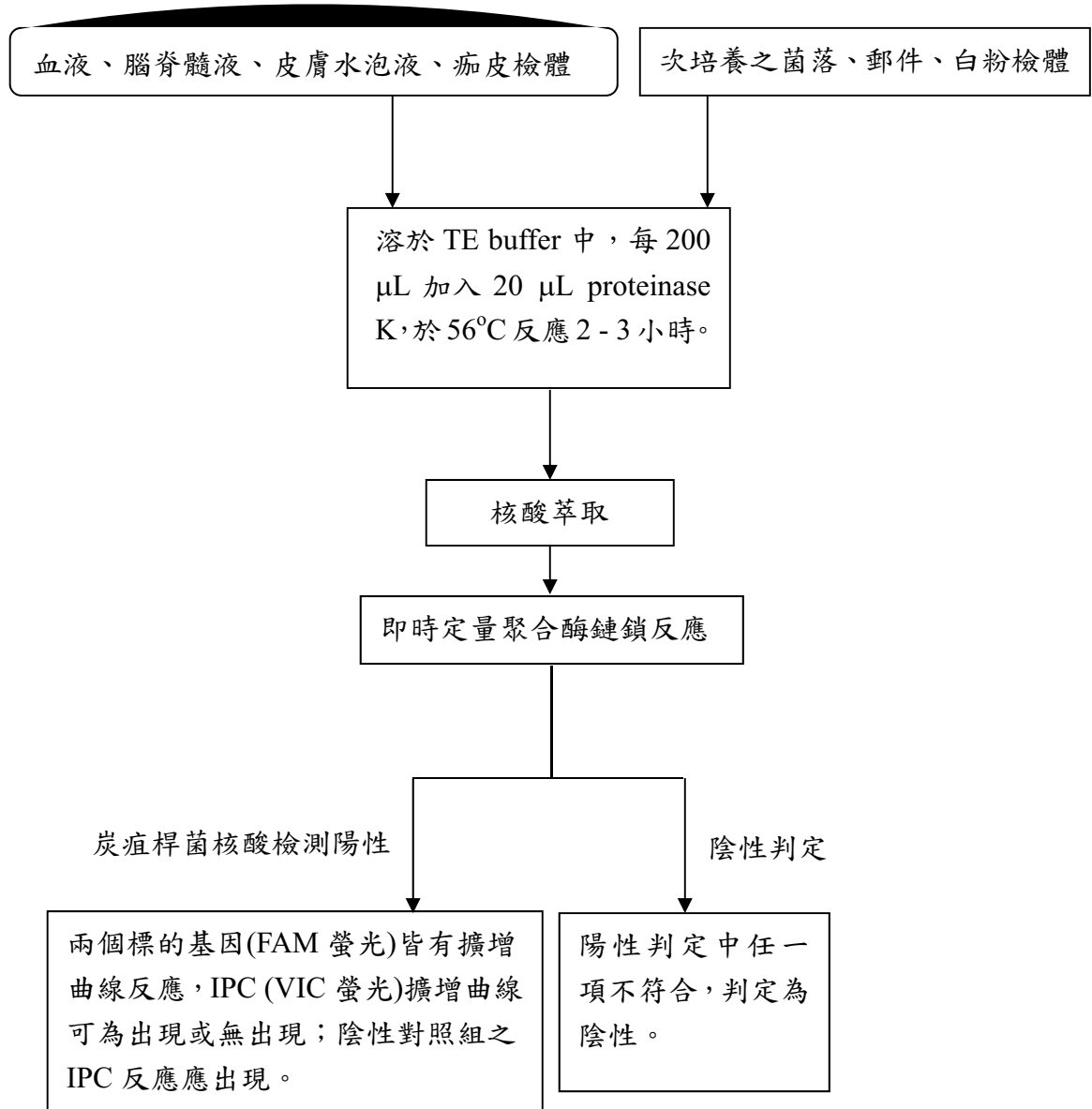
炭疽桿菌分子生物學核酸檢測

(即時定量聚合酶鏈鎖反應法)


核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 炭疽桿菌核酸檢測流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	炭疽桿菌分子生物學核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 60 頁/共 1078 頁	(即時定量聚合酶鏈鎖反應法)	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 炭疽桿菌核酸檢測紀錄表

### 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 炭疽桿菌核酸檢測紀錄表

頁 數：第 頁/共 頁  
填表日期： 年 月 日

項目	檢體編號或姓名		陽性對照組		陰性對照組		檢體編號		檢體編號	
檢體種類 (採檢日期)										
檢體採檢運送狀況適當	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
核酸萃取適當	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
加入 master mix 2 μL, <i>capB</i> 或 <i>pagA</i> detection mix 2 μL, 無菌水 11 μL	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
加入待測 DNA 檢體 5 μL	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
Real-time PCR 結果 pXO1 target	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
Real-time PCR 結果 pXO2 target	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
NTC IPC- pXO1										
NTC IPC- pXO2										
綜合結果	炭疽桿菌核酸檢測	陰性		陰性		陰性		陰性		
		陽性		陽性		陽性		陽性		
	備註									

檢驗者：

實驗室負責人：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 61 頁/共 1078 頁

炭疽桿菌血清學抗體檢測

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
檢測炭疽桿菌抗體。
- 2 適用檢體種類  
適用於符合炭疽桿菌病徵之病患血清檢體。
- 3 名詞解釋  
Bacillus Anthracis：炭疽桿菌。
- 4 原理概述  
將已純化之炭疽桿菌 Protective antigen (PA) 抗原接合至指定編號之微球組，送至 Bio-Plex 儀器內以螢光激發微球作為偵測依據，並以已知濃度之 PA 單株抗體作為標準物，所得到的反應曲線，可作為抗體相對定量之標準曲線。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 Gel-loading micropipette tip。
  - 5.2 Antigen (PA 1 mg/mL in PBS)。
  - 5.3 Bio-Plex beads (#43)。
  - 5.4 Bio-Plex Amine Coupling Kit(含 bead wash buffer、bead activation buffer、PBS, pH 7.4、blocking buffer、storage buffer、staining buffer、coupling reaction tubes)。
  - 5.5 PBST: 0.1 % Tween-20 in PBS。
  - 5.6 Mouse anti-human IgM-PE。
  - 5.7 Mouse anti-human IgG (Fc-PE)。
  - 5.8 PE labeled goat anti-mouse Ig。
  - 5.9 Purified PA-2C6 Monoclonal Ab。
  - 5.10 Filter plate。
- 6 儀器設備
  - 6.1 第二級生物安全櫃 (Class II BSC)。
  - 6.2 Bio-Plex 200。
  - 6.3 Vacuum manifold。
  - 6.4 全自動清洗器。
  - 6.5 微量吸管 (pipettes)：1,000  $\mu$ L、100  $\mu$ L、30 $\mu$ L。
  - 6.6 8 爪微量吸管。
  - 6.7 計時器。
- 7 環境設施安全  
於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 62 頁/共 1078 頁

炭疽桿菌血清學抗體檢測

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

檢體無添加抗凝劑，血清無溶血且量不少於 200  $\mu\text{L}$ 。

### 10.2 Bead Activation

10.2.1 選出 Bio-Plex #43，vortex 震盪 30 sec，再以超音波震盪 30 sec。

（務必使 COOH beads 呈現單一懸浮顆粒，若仍出現聚集物，再以超音波震盪 30 sec，直到看不到聚集之顆粒為止）

10.2.2 取出 100  $\mu\text{L}$  ( $1.25 \times 10^6$  beads) 到 1 管 Coupling reaction tube 中，離心  $14,000 \times g$ ，4 min，小心吸除上清液。

10.2.3 加入 100  $\mu\text{L}$  的 Bead wash buffer，震盪 10 sec，超音波震盪 10 sec，離心  $10,000 \times g$ ，2 min，小心吸除上清液。

10.2.4 將 beads 懸浮在 80  $\mu\text{L}$  的 Bead activation buffer 中，震盪 30 sec，超音波震盪 30 sec。

10.2.5 製備 EDC (50 mg/mL) 及 S-NHS (50 mg/mL) in bead activation buffer (務必新鮮配製)。

10.2.6 加入 10  $\mu\text{L}$  的 50 mg/mL EDC 後立刻加入 10  $\mu\text{L}$  的 50 mg/mL S-NHS 至 beads 中，高速震盪 5 sec，待全部管子都加過 EDC 和 S-NHS 後，高速震盪 30 sec，以錫箔紙將管子包住，在旋轉器上室溫旋轉 20 min，12 rpm。（反應過程中，微球一定要維持懸浮狀態）

10.2.7 加入 150  $\mu\text{L}$  的 PBS, pH 7.4，高速震盪 10 sec，離心  $10,000 \times g$ ，2 min，小心吸除上清液。

10.2.8 重複步驟 10.1.7。

10.2.9 將微球懸浮於 100  $\mu\text{L}$  的 PBS, pH 7.4 中，中速震盪 30 sec，超音波震盪 15 sec。

### 10.3 Protein Coupling


10.3.1 加入 PA 抗原溶液（抗原量為 5 - 12 mg），以 PBS 將最終體積調整至 500  $\mu\text{L}$ 。以錫箔紙將管子包住，在旋轉器上室溫旋轉 2 hr，15 rpm。（反應過程中，微球一定要維持懸浮狀態）

10.3.2 離心  $10,000 \times g$ ，2 min，小心吸除上清液。

10.3.3 用 500  $\mu\text{L}$  PBS, pH 7.4 清洗微球，離心  $10,000 \times g$ ，2 min，小心吸除上清液（不可用超音波震盪）。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	炭疽桿菌血清學抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 63 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.3.4 將微球懸浮在 250  $\mu$ L 的 Blocking buffer 中，中速震盪 15 sec，以錫箔紙將管子包住，在旋轉器上室溫旋轉 30 min。
- 10.3.5 離心 10,000  $\times$  g，2 min，小心吸除上清液。
- 10.3.6 用 500  $\mu$ L Storage buffer 清洗微球，離心 10,000  $\times$  g，2 min，小心吸除上清液。
- 10.3.7 將微球懸浮在 150  $\mu$ L 的 Storage buffer 中，避光 4  $^{\circ}$ C 保存。
- 10.3.8 利用血球計數盤計算出微球濃度。
- 10.4 Immunoassay
- 10.4.1 檢體製備：
- 10.4.1.1 Negative control：1 % normal human serum in PBS, pH 7.4。
- 10.4.1.2 Diluent：1 % normal human serum in PBS, pH 7.4 (稀釋檢體之稀釋液)。
- 10.4.1.3 Sample：以 Diluent 進行 1:100 倍稀釋。
- 10.4.1.4 Standard：purified PA-2C6 MoAb，以 Standard diluent (1 % normal mouse serum in PBS, pH 7.4) 進行兩倍序列稀釋至 1,000 ng/mL - 0.12 ng/mL。
- 10.4.2 微球配製：將 BioPlex #43-PA beads 震盪 30 sec，取適量之微球於 PBST 中 (各反應需 2,500 beads in 50 $\mu$ L PBST)。
- 10.4.3 取一個 96 Well filter plate，以 150  $\mu$ L PBST/孔 預潤 2 次，利用 Vacuum manifold 將液體吸掉。將稀釋後的微球懸浮液依指定位置加入各孔中，50  $\mu$ L/孔。
- 10.4.4 依序取 50  $\mu$ L 的陰性對照組、檢體、標準品至指定位置中。
- 10.4.5 室溫靜置 30 min，避光 Vortex。
- 10.4.6 利用 Vacuum manifold 將上清液吸掉，以 150  $\mu$ L 的 PBST 清洗 3 次。
- 10.4.7 依序加入稀釋後之二次抗體。
- 10.4.7.1 Mouse anti-human IgM-PE。
- 10.4.7.2 Mouse anti-human IgG (Fc-PE)。
- 10.4.7.3 PE labeled goat anti-mouse Ig (加至標準品之反應槽中) 50  $\mu$ L/孔。
- 10.4.8 室溫靜置 30 min，避光 vortex。
- 10.4.9 利用 Vacuum manifold 將上清液吸掉，以 150  $\mu$ L 的 PBST 清洗 3 次。
- 10.4.10 各加入 100  $\mu$ L 的 PBST。
- 10.4.11 利用 BioPlex 分析。
- 11 結果判定
- 11.1 判讀標準：建立 anti-PA 之參考值(cut-off value)，以人類健康者血清與各微球反應產生之螢光值，求出 mean + 3SD 作為 cut-off value。將螢光值高於陰性對照組之平均值加 3 倍標準差者，視為陽性反應。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 64 頁/共 1078 頁

炭疽桿菌血清學抗體檢測

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 11.2 報告核發：炭疽桿菌血清學抗體檢測陽性，炭疽桿菌血清學抗體檢測陰性。
  - 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送報告簽署人審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。
- 12 品質管制  
每次執行陽性及陰性對照血清。
  - 13 廢棄物處理  
檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。
  - 14 參考資料
    - 14.1 Bioplex technology: Novel synthetic gene delivery system based on peptides anchored to nucleic acids. Methods in Enzymology 2002. 346:106 - 124.
    - 14.2 Evaluation of the BioPlex™ 2200 ANA Screen: Analysis of 510 Healthy Subjects: Incidence of Natural/Predictive Autoantibodies. Annals of the New York Academy of Sciences 2005. 1500:380 – 388.
  - 15 附錄
    - 15.1 炭疽桿菌抗體試驗-螢光免疫分析法流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

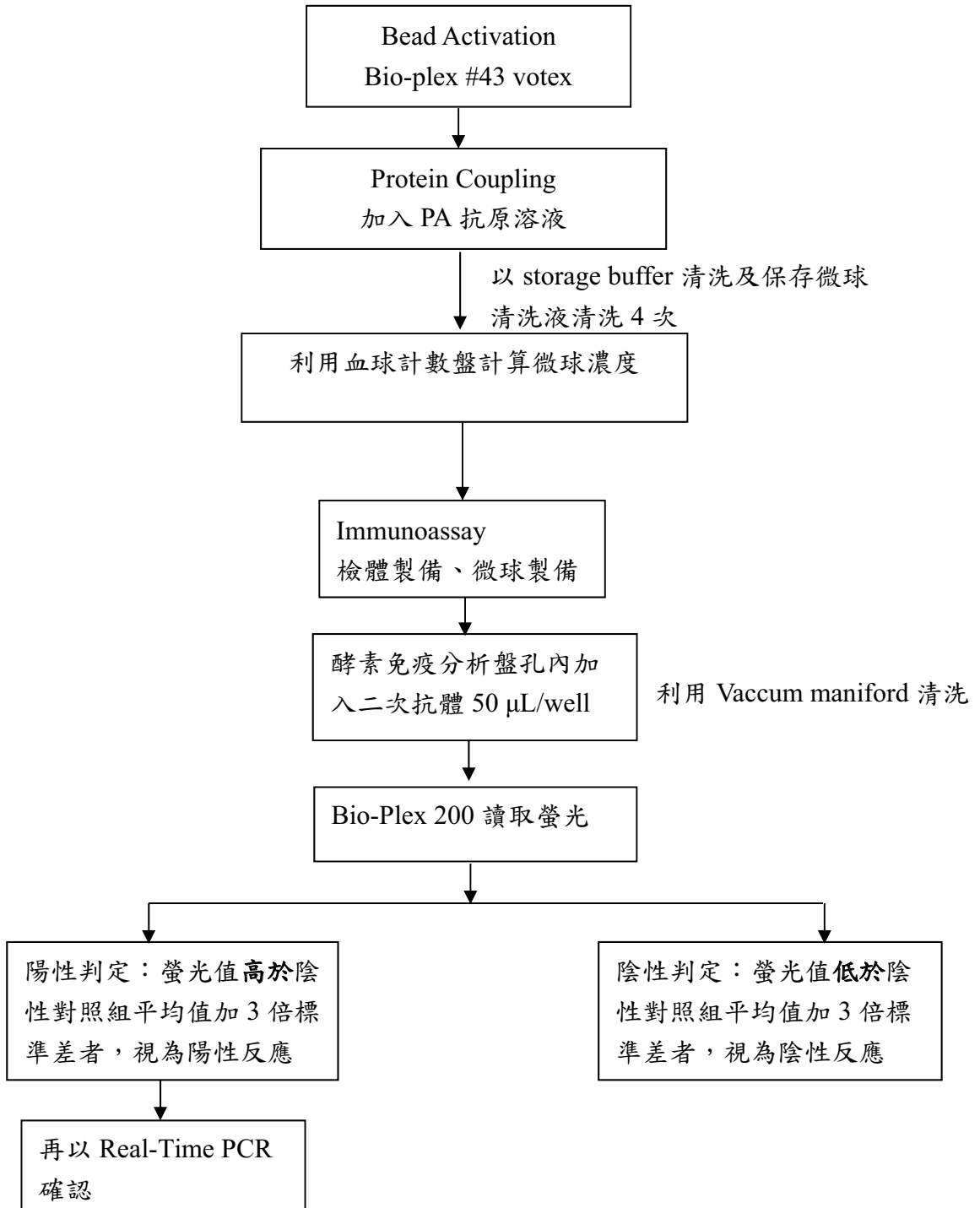
頁次：第 65 頁/共 1078 頁

炭疽桿菌血清學抗體檢測


核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 炭疽桿菌抗體試驗流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 66 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用微生物分離培養鑑定檢查檢體是否有白喉棒狀桿菌。

## 2 適用檢體種類

適用於病患病灶偽膜，咽喉、鼻腔黏膜擦抹棉棒。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

微生物培養分離，依據生化特性鑑定。

## 5 試劑耗材

5.1 馬克法藍氏濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)：商品化產品 (Remel)。

### 5.2 培養基

5.2.1 亞碲酸鉀培養基 (tellurite medium)：取 BHI base 3.7 gm 及 Bacto agar 1.5-3.0 gm 及蒸餾水 100 mL。以蒸氣高壓滅菌 121 °C，15 min，冷卻至 50 °C 再加入無菌的脫纖維血液 (sterile defibrinate blood) 5 - 10 mL 及 1 % 亞碲酸鉀 (1 % potassium tellurite) 3 - 4 mL，無菌傾注在平板，凝固後置 4 °C 保存待用。

5.2.2 DSS 鑑別培養基 CMP，臺灣。

5.2.3 Loeffler blood serum。

商品化產品 CMP，臺灣

5.2.4 Neisser's 染色變法染色液

第一液 (Neisser 液)

酒精 (95 % alcohol)	2 mL	}	使用前： 將第一液 以 2 體積
美藍 (methylene blue)	0.1 g		
蒸餾水 (distilled water)	95 mL		
冰醋酸 (acetic acid)	5 mL		

第二液

結晶紫 (crystal violet)	0.1 g	}	混合 第二液 1 體積
酒精 (95 % alcohol)	1 mL		
蒸餾水 (distilled water)	30 mL		

5.2.5 沙黃溶液

Safranin O	2.5 g
酒精 (95 % alcohol)	100 mL


2.5 % Safranin 酒精溶液 (使用時稀釋 10 倍)。

5.2.6 無菌生理食鹽水

5.2.7 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution)：Difco


5.3 吸管：無菌，10 mL 吸管應該有 0.1 mL 刻度。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 67 頁/共 1078 頁		修訂日期：	年	月	日

- 5.4 微量吸管尖 tip：無菌，需 1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L 與 20  $\mu$ L 三種。
  - 5.5 接種針（環）：鎳鉻合金、鉑鈦或鉻線，或可拋棄式。
  - 5.6 載玻片及蓋玻片。
  - 5.7 可拋棄式塑膠手套。
  - 5.8 試管：10  $\times$  100 mm，13  $\times$  100 mm 試管或其他合適者。
  - 5.9 無菌濾膜：孔徑 0.45  $\mu$ m 之親水性醋酸纖維膜。
  - 5.10 品質管制菌種：*Corynebacterium diphtheriae* ATCC14779。
- 6 儀器設備
- 6.1 高壓滅菌釜。
  - 6.2 生物安全操作台。
  - 6.3 冰箱：4  $^{\circ}$ C 與 -20  $^{\circ}$ C 及 -80  $^{\circ}$ C 冰箱。
  - 6.4 35 – 37  $^{\circ}$ C 培養箱。
  - 6.5 顯微鏡：能放大至 1,000 倍之一般光學顯微鏡。
  - 6.6 電動 pipetaid。
  - 6.7 微量吸管 Pipetman：需 1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、30  $\mu$ L 等三種規格。
  - 6.8 滅菌用容器：10 公升不鏽鋼容器。
- 7 環境設施安全
- 於生物安全第二等級（BSL-2）實驗室之設施內操作。
- 8 檢體採集
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
- 10.1 檢視檢體採檢運送是否恰當，檢體依序編號登錄。
  - 10.2 將進行分離培養所需之培養基 Potassium tellurite blood agar plate，BAP 及試劑由 4  $^{\circ}$ C 冰箱拿出置室溫回溫 30 min 待用。
  - 10.3 分離培養  
將 Cary-Blair 輸送培養基中之棉棒取出直接塗佈於白喉桿菌分離用培養基 Potassium tellurite blood agar plate 及 BAP（觀察溶血 *Corynebacterium diphtheriae* 不溶血），置 37  $^{\circ}$ C 培養 48 hr。並且咽喉拭子直接塗抹於乾淨玻片上，作染色鏡檢，以 Neisser's 液染小體染色法，顯微鏡觀察是否有典型異染小體桿菌存在。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 68 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 10.4 鑑定

10.4.1 觀察分離培養基上之菌落，挑取黑色可疑菌落接種於 DSS、ID. NF-18 kit 或 API coryne 生化鑑別套組，置於 37 °C 培養 18 - 24 hr 後，觀察其生化反應，如葡萄糖分解、蔗糖不分解時，即為可疑。將菌接種於 Loeffler 血清培養基上於 37 °C 培養 20 - 24 hr 後，再作塗抹標本染色觀察有否典型異染小體出現，以供參考鑑定。如生化反應符合，染色抹片標本出現典型異染小體時，則以白喉桿菌毒素測定法 (Elek's plate virulence test) 作毒素產生試驗。

10.4.2 Gram's stain。

10.4.3 DSS 鑑定試驗：挑取 Potassium tellurite blood agar plate 上之黑色可疑菌落，以穿刺及畫斜面方式接種於 DSS 培養基，37 °C 培養 18 - 24 hr 後，觀察糖類發酵之生化反應。

10.4.4 Neisser's 液染色

10.4.4.1 挑菌生長於 Loeffler 血清培養基上塗抹在玻片上，自然乾燥，固定。

10.4.4.2 染色液 (混合液) 染約 10 - 15 sec，水洗。

10.4.4.3 沙黃溶液，染數秒 - 1 min。

10.4.4.4 水洗、乾燥、鏡檢。

10.4.4.5 異染體呈黑棕色 (藍紫色) 位桿菌體兩端，菌體呈淡紅色。

10.4.5 生化試驗：商品試劑 ID. NF-18 kit、API coryne system 等商品，依據套組說明製備菌液、接種菌液於鑑定盤各反應格、培養、判讀結果。

## 11 結果判定


### 11.1 DSS 生化判定

菌 名	DSS 培養基	(Sucrose)	(Dextrose)	(Starch)
		斜面部	高層部	凝固水 Lugol 液加入
白喉菌 <i>C. diphtheriae</i>	Gravis	鹼性	酸性	呈色反應陰性 (無變化)
	Intermedium	鹼性	酸性	呈色反應陽性 (褐色)
	Mitis	鹼性	酸性	呈色反應陽性 (褐色)
<i>C. hoffmannii</i>		鹼性	鹼性	呈色反應陽性 (褐色)
<i>C. xerosis</i>		酸性	酸性	呈色反應陽性 (褐色)

酸性：糖發酵，顏色變 (指示藥：water blue) 青色 (指示藥：phenol red 黃色)。

鹼性：無發酵，顏色無變化。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 69 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 11.2 生化表現

菌 名	生化試驗	Nitrate reduction	Urease	Esculin hydrolysis	Acid production from :				
					Glucose	Maltose	Sucrose	Mannitol	Xylose
<i>C. diphtheriae</i> Gravis		+	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. diphtheriae intermedius</i>		+	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. diphtheriae</i> Mitis		+	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. pseudodiphtheriae</i>		+	+	-	-	-	-	-	-

11.3 將檢體之檢驗結果登錄於白喉桿菌生化試驗紀錄表、白喉桿菌分離與鑑定紀錄表及檢體送驗單並加蓋檢驗者，送報告簽署人審核及蓋章。

## 12 品質管制

12.1 培養基生長試驗：每一批號取 1/10 量，接種品管菌株，37 °C 培養 18 - 24 hr 後，生長觀察生長狀況。

12.2 培養基無菌試驗：每一批號取 1/10 量，37 °C 培養 18 - 24 hr 後，觀察。

12.3 品管菌株：*Corynebacterium diphtheriae* ATCC14779。

## 13 廢棄物處理

13.1 送驗之病灶偽膜，咽喉、鼻腔黏膜擦抹棉棒塗抹培養基後，置冰箱保存 1 個月後，滅菌丟棄。

13.2 過程使用過之物品皆需經 121 °C，30 min 高壓滅菌後，再依廢棄物處理要求丟棄。

13.3 菌種保存：經鑑定之新鮮菌株，以有冷凍保存溶液之保存試管保存 (protect)。取一整個接種環菌量之菌落置於保存液中，搖晃均勻後，靜置 30 sec，將冷凍保存液吸出，隨後旋緊試管蓋子，放入 -80 °C 保存，並做詳細的菌種保存紀錄。


## 14 參考資料

14.1 蔡文城。2000。實用臨床微生物診斷學，第九版。九州圖書文物有限公司，臺灣。

14.2 Murray PR, Jo Baron E, Pfaller AR. 1999. Manual of clinical microbiology, 7<sup>th</sup> edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 319-341.

14.3 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC 1997. Color atlas textbook of diagnostic microbiology, 5<sup>th</sup> edition. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, PA.

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 70 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 15 附錄

- 15.1 白喉桿菌分離與鑑定流程圖。
- 15.2 白喉桿菌分離與鑑定紀錄表。
- 15.3 白喉桿菌生化試驗紀錄表。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

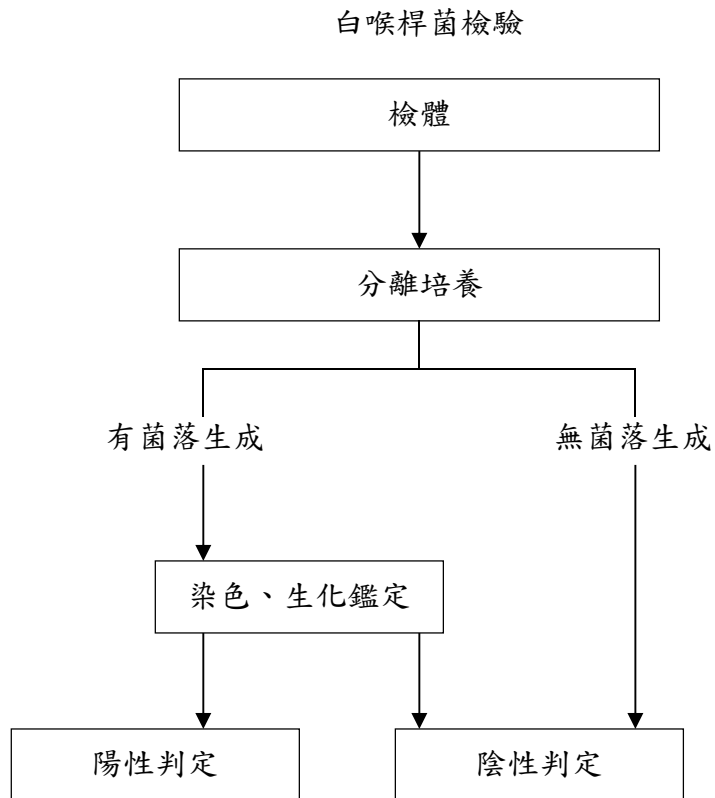
頁次：第 71 頁/共 1078 頁

白喉桿菌分離與鑑定


核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 白喉桿菌分離與鑑定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 72 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 白喉桿菌分離與鑑定紀錄表


衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 頁數：第 頁/共 頁  
 白喉桿菌分離與鑑定紀錄表 填表日期： 年 月 日

實驗室編號 項目												
	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
檢體採檢運送狀況適當	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Potassium tellurite blood agar plate 上之菌落是黑色。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gram's stain 鏡檢區分革蘭氏陽性菌或陰性菌，區分球菌或桿菌	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
	球菌	桿菌	球菌	桿菌	球菌	桿菌	球菌	桿菌	球菌	桿菌	球菌	桿菌
DSS 培養基生化特性鑑定 (sucrose) 斜面部 陽性變色，陰性不變色	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DSS 培養基生化特性鑑定 (dextrose) 高層部 陽性變色，陰性不變色	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DSS 培養基生化特性鑑定 (starch) 凝固水 Lugol 液加入 陽性褐色，陰性不變色	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Neisser's 液染色 異染顆粒	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
綜合結果												

實驗室主管：

檢驗者：

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 73 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

### 附錄 15.3 白喉桿菌生化試驗紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 頁數：第 頁/共 頁  
 白喉桿菌生化試驗紀錄表 填表日期： 年 月 日

生化試驗  實驗室編號	Nitrate reduction		Urease		Esculin hydrolysis		Acid production from										
							Glucose		Maltose		Sucrose		Mannitol		Xylose		
							陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性

實驗室主管：

檢驗者：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 74 頁/共 1078 頁

白喉桿菌核酸檢測 (PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

白喉毒素以聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 快速診斷鑑定。

## 2 適用檢體種類

培養於 Tryptic soy agar (TSA) 培養基之疑似白喉菌株。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理及概述

利用白喉毒素基因 tox 之 A 和 B subunit 製作二組 Primers，再藉由 PCR 將疑似白喉菌株之去氧核糖核酸進行複製，以鑑定是否有白喉毒素基因。

## 5 試劑耗材

### 5.1 滅菌蒸餾水。

### 5.2 PCR 試驗。

#### 5.2.1 10 倍 PCR 緩衝液。

#### 5.2.2 所需核酸引子如下：

Tox1： ATC CAC TTT TAG TGC GAG AAC CTT CGT CA

Tox2： GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AA

Dipht6F： ATA CTT CCT GGT ATC GGT AGC

Dipht6R： CGA ATC TTC AAC AGT GTT CCA

#### 5.2.3 去氧核糖 (dNTP)。

#### 5.2.4 去氧核糖核酸聚合酶 (taq polymerase)。

#### 5.2.5 氯化鎂 $MgCl_2$ 。

#### 5.2.6 純水。

#### 5.2.7 微量吸管 Pipetman。

### 5.3 電泳偵測試劑

#### 5.3.1 1.2 % agar 膠片。

#### 5.3.2 Tracking dye。

#### 5.3.3 TBE 緩衝液 pH 8.2 - 8.3。

#### 5.3.4 核酸標記 (100 bp DNA ladder)。

#### 5.3.5 Ethidium bromide 溶液 (50 $\mu M$ )。

## 6 儀器設備

### 6.1 桌上型離心機。

### 6.2 生物安全操作箱。

### 6.3 4°C, -20°C 冰箱。

### 6.4 核酸增幅儀：Biometra。

### 6.5 水浴槽

### 6.6 電泳槽

### 6.7 DNA 電泳膠體觀察照相設備

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 75 頁/共 1078 頁

白喉桿菌核酸檢測 (PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 7 環境設施安全

- 7.1 菌株需於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 菌株處理、PCR 反應混和物配製、PCR 反應進行、電泳皆需於獨立區域操作。

## 8 檢體採集

無。

## 9 檢體運送及保存

無。

## 10 檢驗步驟

- 10.1 於 1.5 mL 微量離心管內加入 100  $\mu$ L 滅菌蒸餾水，取平板上之分離菌製成微濁菌液，約 McFarland no.1 濃度。100  $^{\circ}$ C 水浴 10 min 取出直接置於冰塊內冷卻，4  $^{\circ}$ C 離心，取上清液當作模版置於-20  $^{\circ}$ C 冰箱保存。
- 10.2 PCR 反應物：25  $\mu$ L 2 $\times$  PCR Master Mix (0.05 units/ $\mu$ L Taq DNA Polymerase in reaction buffer、4 mM  $MgCl_2$ 、0.4 mM dNTPs of each, Fermentas)，12.5  $\mu$ M 每一引子各 1  $\mu$ L，模版 10  $\mu$ L，以二次蒸餾水加到 50  $\mu$ L。
- 10.3 PCR 反應條件：Predenature 95  $^{\circ}$ C 2 min，Denature 95  $^{\circ}$ C 30 sec，Annealing 55  $^{\circ}$ C 30 sec，Extension 72  $^{\circ}$ C 1 min，以上 35 Cycle，Post extension 72  $^{\circ}$ C 10 min，4  $^{\circ}$ C 保存。
- 10.4 PCR 產物之確認：將 8  $\mu$ L 的 PCR 增殖產物加 2  $\mu$ L Tracking dye 混合，以 1.2 % 洋菜膠，50 Voltage，約 1.5 hr，1 $\times$  TBE，進行 Minigel 電泳分析。
- 10.5 膠片染色：以 0.5  $\mu$ L/mL Ethidium bromide 染色 15 分，水洗 10 min 後觀察。
- 10.6 陽性菌株 ATCC13812，陰性菌株 ATCC11913 做對照組檢驗比較。

## 11 結果判定

- 11.1 陽性白喉毒素基因可見 248 bp (A subunit)、297 bp (B subunit) 二個片段。
- 11.2 判定白喉感染應配合臨床症狀，培養菌落性狀，菌落生化反應。


## 12 品質管制

所使用試劑皆應於有效期內用完。

## 13 廢棄物處理

- 13.1 檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121  $^{\circ}$ C，30 min 高壓後，依本署廢棄物處理作業程序。
- 13.2 Ethidium bromide 為 carcinogen 倒掉前加入分解劑後再作處理。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌核酸檢測 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 76 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 14 參考資料

Nakao H, Popovic T. 1997. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. J Clin Micro 35: 1651 - 1655.

## 15 附錄

15.1 白喉毒素聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 快速診斷鑑定流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

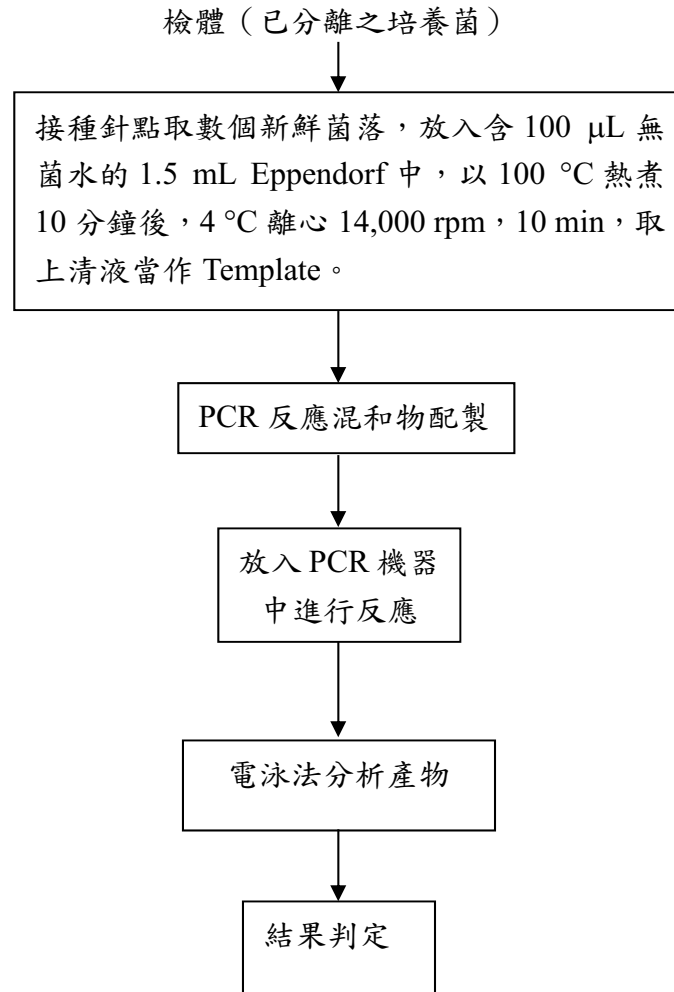
頁次：第 77 頁/共 1078 頁

白喉桿菌核酸檢測 (PCR)


核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 白喉毒素聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 快速診斷鑑定流程圖。




# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌毒素測定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 78 頁/共 1078 頁	(Elek's plate virulence test)	修訂日期： 年 月 日

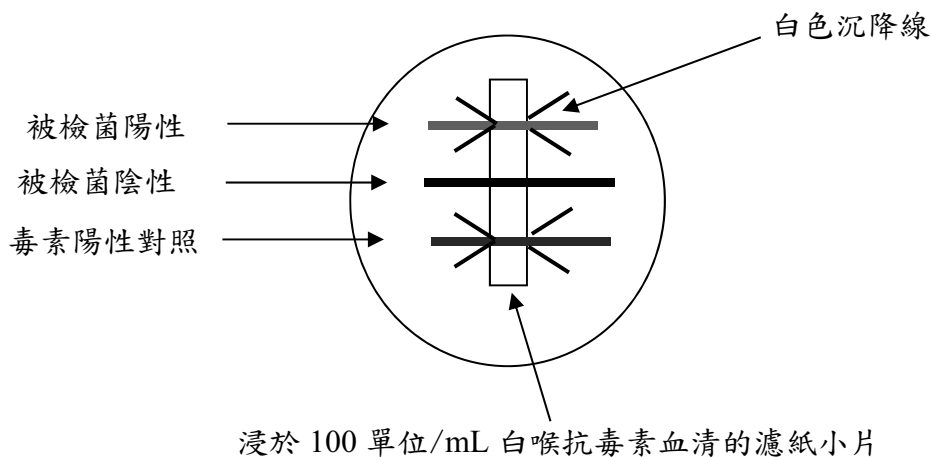
- 1 目的  
利用免疫沉降法檢驗白喉棒狀桿菌是否含有毒素。
- 2 適用檢體種類  
適用於從病患已分離出之純培養菌株之毒素鑑定。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
利用免疫沉澱法測試當抗原抗體結合時會有沉降線出現，免疫沉降線的出現可得知有無毒素抗原。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 正常兔血清（或小牛血清，抗毒素血清（疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心）。
  - 5.2 培養基  
基礎培養基  
蛋白胨（proteose peptone） 20 g  
食鹽（sodium chloride） 2.5 g  
瓊脂（agar） 15 g  
蒸餾水（distilled water） 1,000 mL  
pH 7.8  
高壓滅菌 121 °C，15 min。
  - 5.3 無菌培養皿。
  - 5.4 無菌生理食鹽水。
  - 5.5 吸管：無菌，10 mL 吸管應該有 0.1 mL 刻度。
  - 5.6 微量吸管尖 tip：無菌，需 1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L 與 10  $\mu$ L 三種。
  - 5.7 接種針（環）：鎳鉻合金、鉑鈹或鉻線，或可拋棄式。
  - 5.8 可拋棄式塑膠手套。
  - 5.9 試管：10  $\times$  100 mm，13  $\times$  100 mm 試管或其他合適者。
  - 5.10 無菌濾膜：孔徑 0.45  $\mu$ m 之親水性醋酸纖維膜。
  - 5.11 7  $\times$  1.5 cm 小片之濾紙。
  - 5.12 品質管制菌種：*Corynebacterium diphtheriae* ATCC13812。
- 6 儀器設備
  - 6.1 高壓滅菌釜。
  - 6.2 生物安全操作台。
  - 6.3 冰箱：4 °C 與 -20 °C 冰箱。
  - 6.4 電子式微量天平，可秤至 0.001 g。
  - 6.5 pH 值測定儀。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌毒素測定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 79 頁/共 1078 頁	(Elek's plate virulence test)	修訂日期： 年 月 日

- 6.6 攪拌器。
  - 6.7 35 °C 培養箱。
  - 6.8 電動 Pipetaid。
  - 6.9 微量吸管 Pipetman：需 1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、2  $\mu$ L 等三種規格。
  - 6.10 滅菌用容器：10 公升不鏽鋼容器。
  - 6.11 已滅菌剪刀及鑷子。
- 7 環境設施安全  
於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 8 檢體採集  
無。
- 9 檢驗步驟
- 9.1 平板配製：濾紙小片浸於 100 單位/mL 白喉抗毒素血清。約 2 mL 的兔血清 (或小牛血清) (最後血清濃度 10-20%) 加入 20 mL 冷至 50 °C 的基礎培養基。傾倒在平板皿。上述培養基未凝固前，放置有浸於 100 單位/mL 白喉抗毒素血清的濾紙小片 (1.5  $\times$  7 cm) 在平板皿中央部。培養基凝固後表面應乾燥。
  - 9.2 Elek's plate virulence test
    - 9.2.1 接種：塗抹培養被檢菌，使與濾紙小片直角交叉於一直線方向。培養 33 - 37°C 觀察 2 - 7 天。應做毒素陽性菌株及陰性菌株之對照。
    - 9.2.2 判定：陽性菌株在濾紙小片數 mm 之處，略 45 度角度，呈現白色沉降線 (斑線)。陰性菌株不呈現沉降線 (斑線)。沉降線出現通常 48 - 72 hr，毒素愈大出現愈快，但需繼續觀察約一星期。
- 10 結果判定
- 10.1 Elek's plate virulence test 毒性試驗



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 80 頁/共 1078 頁

白喉桿菌毒素測定  
(Elek's plate virulence test)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

10.1 將檢體之檢驗結果登錄於白喉桿菌毒素測定檢驗紀錄表及檢體送驗單並加蓋檢驗者，送報告簽署人審核及蓋章。

## 11 品質管制

毒素陽性菌株 *Corynebacterium diphtheriae* ATCC13812，沉降線出現通常 48 - 72 hr。

## 12 廢棄物處理

過程使用過之物品皆需經 121 °C，30 min 高壓滅菌後，再依廢棄物處理要求丟棄。

## 13 參考資料

13.1 蔡文城。2000。實用臨床微生物診斷學，第九版。九州圖書文物有限公司，臺灣。

13.2 Murray PR, Jo Baron E, Pfaller AR. 1999. Manual of clinical microbiology, 7<sup>th</sup> edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 319-341.


13.3 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC 1997. Color atlas textbook of diagnostic microbiology, 5<sup>th</sup> edition. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, P.A.

## 14 附錄

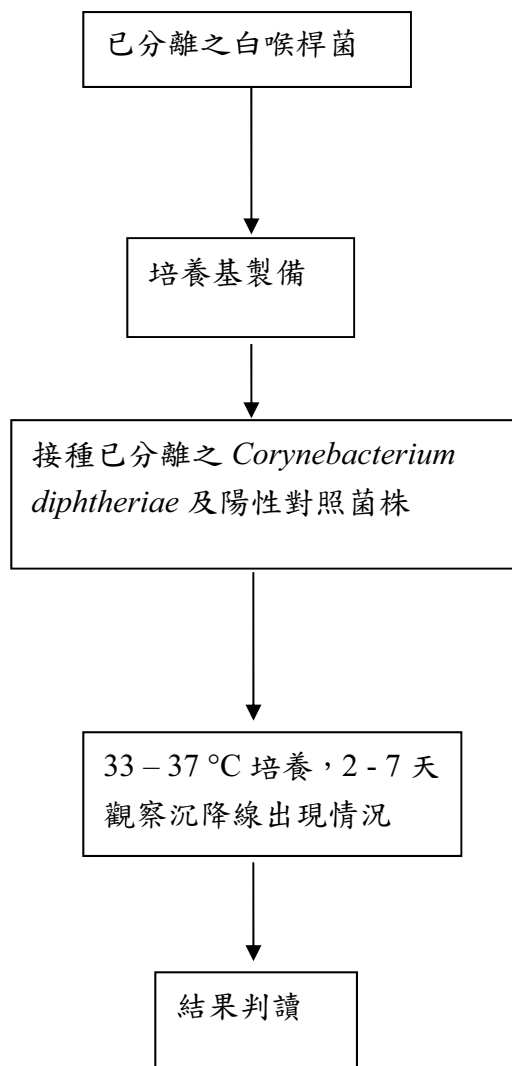
14.1 白喉桿菌毒素測定流程圖。

14.2 白喉桿菌毒素測定紀錄表。


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌毒素測定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 81 頁/共 1078 頁	(Elek's plate virulence test)	修訂日期： 年 月 日

附錄 14.1 白喉桿菌毒素測定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌毒素測定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 82 頁/共 1078 頁	(Elek's plate virulence test)	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 14.2 白喉桿菌毒素測定紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 頁 數：第 頁/共 頁  
 白喉桿菌毒素測定紀錄表 填表日期： 年 月 日

項 目	實驗室編號		
Elek 氏法			
第 2 天沉降線出現			
第 3 天沉降線出現			
第 4 天沉降線出現			
第 5 天沉降線出現			
第 6 天沉降線出現			
第 7 天沉降線出現			

實驗室主管：

檢驗者：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌

核准日期： 年 月 日

頁次：第 83 頁/共 1078 頁

分離與鑑定

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

分離與鑑定傷寒、副傷寒桿菌及一般沙門氏桿菌，以確定病例與感染源。

## 2 適用檢體種類

患者血液；患者、帶菌者、接觸者之糞便、直腸拭子、尿液；疑似污染的水質。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用選擇性培養基由待驗檢體中分離培養出特定細菌之特性，並根據其上所生長的菌落形態特徵進行初步的鑑別；之後挑選疑似菌落進行生化反應試驗，以個別菌種所能進行的特定生化反應來鑑定之；同時利用菌株表面所表現的特有抗原性質，進行抗血清凝集反應來確認該菌株並決定其血清型別；最後綜合以上反應試驗判定結果。

## 5 試劑耗材

### 5.1 培養基

5.1.1 SS (Salmonella-Shigella) agar。

5.1.2 HE (Hektoen Enteric) agar。

5.1.3 TSIA (triple sugar iron agar)。

5.1.4 LIA (lysine iron agar)。

5.1.5 SIM (sulfide indole motility) agar。

5.1.6 TSB (tryptic soy broth)。

5.1.7 BAP (blood agar plate)。

5.2 API 20E 生化鑑定套組：BioMérieux，法國。

5.3 VITEK 2 革蘭氏陰性菌鑑定卡 (VITEK 2 GN)：BioMerieux，法國。

5.4 氧化酶試紙(oxidase strips)：Mast，英國或氧化酶試劑(oxidase reagent) BioMérieux，法國。

5.5 O 群及 Vi 沙門氏菌抗血清：Seiken，日本。詳見附錄說明

5.6 H 抗血清：生研，日本。

5.7 無菌生理食鹽水：0.85 % NaCl。

5.8 載玻片。

5.9 無菌吸管：3 mL。

5.10 接種針 (環)。

5.11 馬克法藍氏濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)。

5.12 無菌塑膠試管。


5.13 1 mL 無菌針筒及針頭。

5.14 手術小刀及鑷子。

5.15 嗜氧性血液培養瓶：Bactec BD，USA。

5.16 0.2 μm 無菌過濾杯組裝置。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 84 頁/共 1078 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 培養箱。
- 6.2 水浴槽。
- 6.3 高壓滅菌鍋。
- 6.4 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 6.5 幫浦機。

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

- 10.1.1 實驗室於收到檢體及送驗單後，先行核對檢體種類、姓名、數量等資料正確與否，並依序登錄於紀錄簿。
- 10.1.2 血液檢體以針筒吸取管內血液並以無菌操作方式注入血液培養瓶中，將血液培養瓶置於 37 °C 培養箱培養。
- 10.1.3 水質檢體以無菌過濾杯組裝置接幫浦機過濾處理後，以消毒過之手術小刀沿濾孔邊緣切割下濾膜，並用消毒過之鑷子取出。

### 10.2 分離培養

- 10.2.1 糞便、直腸拭子或尿液檢體塗抹接種於 SS、HE 培養盤，微量檢體或檢驗反應異常等情況下另加做 BAP 等培養盤，並以接種環依三區劃法劃開，37 °C 培養 18 - 24 hr。
- 10.2.2 血液培養瓶於隔日即進行分離培養，以 1 mL 針筒吸取培養瓶內檢體約 0.5 mL，滴入接種於 SS、HE 培養盤，以接種環依三區劃法劃開，置於 37 °C 培養箱培養 18 - 24 hr；血液培養瓶需每天觀察有否細菌生長，需觀察 7 - 10 天，若有混濁、氣泡等生長情形，應即時進行上述分離培養程序，發送檢驗報告前若無生長跡象，亦需再進行一次分離培養的程序，確認有否細菌的生長。
- 10.2.3 過濾水質檢體的濾膜以鑷子取出後，覆蓋於 SS、HE 培養盤上接種，並以接種環均勻劃開後，置於 37 °C 培養箱培養 18 - 24 hr。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 85 頁/共 1078 頁

傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌

分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 10.3 生化反應鑑定

在上述分離培養的 SS 培養盤上挑選無色半透明或具有黑色中心可疑菌落，於 HE 培養盤上挑選綠色、藍綠色或具有黑色中心可疑菌落，使用接種針以穿刺劃線法接種於 TSIA、LIA，以穿刺法接種於 SIM，37 °C 培養 18 - 24 hr，觀察其生化反應特性（生化反應判定參照附錄 15.2）。

## 10.4 抗血清凝集反應鑑定與分型

### 10.4.1 O 群及 Vi 抗血清凝集反應

疑似菌株先以 Poly O 群抗血清進行凝集試驗，如果反應陽性再以個別的 O 群抗血清分別試驗其屬於哪一個 O 群。傷寒疑似菌株（O9 陽性）另需進行 Vi 抗血清的測試。所有的 O 群及 Vi 抗血清反應皆採用玻片凝集法，於載玻片上滴取一滴的抗血清（O 群或 Vi 抗血清），以接種針取適量待測菌與之混合均勻，於 30 sec - 1 min 內觀察凝集反應；陰性對照組試驗為，取一滴的無菌生理食鹽水與抗血清試劑混合均勻。

### 10.4.2 H 抗原分析

傷寒、副傷寒菌的鑑定還需進行 H 抗原分析，在疑似傷寒菌株 O9、疑似副傷寒菌株 O2 抗血清凝集反應陽性時，須進行其 H 抗原的分析。採用試管凝集法，菌株接種於 TSB broth 37 °C 培養 4 - 6 hr 後，加入等量含 1% 福馬林之無菌生理食鹽水（0.85 % NaCl）作為抗原液，取 0.5 mL 抗原液於無菌試管中，並加入 H 抗血清（鑑定傷寒菌時加入 d 抗血清，副傷寒菌時加入 a 抗血清）二滴或 50 µL，放置於 50 - 52 °C 水浴槽反應，0.5 - 1 hr 內觀察有否出現雲絮狀凝集。

10.4.3 細菌之外套膜（capsular, Vi）可能會阻斷凝集反應，因此會導致某些具有外套膜的疑似菌其 O 群凝集反應可能會出現偽陰性或不典型反應，因此如果發生判讀結果不明確的情形，可將調製的高濃度菌液以 100 °C 乾浴加熱 30 - 60 min，破壞細菌之外套膜後，再以此菌液重測其抗原反應。

10.5 其他確認試驗，在結果判讀不明確（不典型生化或血清凝集反應）或任何有確認必要的狀況下進行。

10.5.1 API 20E 生化鑑定套組：依照原廠 API 20 E（腸內菌鑑定組）操作步驟執行。


10.5.2 VITEK 2 革蘭氏陰性菌鑑定卡（VITEK 2 GN）：依照原廠全自動微生物分析儀 VITEK 2 標準操作流程執行。

10.5.3 氧化酶試驗（Oxidase test）：挑選 TSA 培養基上菌落進行試驗。

## 11 結果判定

11.1 傷寒疑似菌符合下表傷寒所有反應結果，即判定為傷寒陽性；約 90 % 傷寒菌 Vi 陽性反應，因此若 Vi 陰性，但其他所有結果符合，仍判定為陽性。副傷寒 A 疑似菌符合下表副傷寒 A 所有反應結果，即判定為副傷寒陽性，H 抗原分析至 a 陽性即可判定為陽性。沙門氏菌疑似菌符合

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 86 頁/共 1078 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

下表沙門氏菌所有反應結果，即可判定為沙門氏菌陽性。不符合下表反應結果的判定為陰性。

		<i>S. typhi</i>	<i>S. paratyphi A</i>	<i>Salmonella</i>
SS 培養基上典型菌落特徵		無色半透明或具有黑色中心	無色半透明	無色半透明或具有黑色中心
HE 培養基上典型菌落特徵		綠色、藍綠色或具有黑色中心	綠色、藍綠色	綠色、藍綠色或具有黑色中心
TSIA	AS/AB <sup>a</sup>	K/A	K/A	K/A
	Gas	-	+	+
	H <sub>2</sub> S	+	-	+
LIA		K/K	K/A	K/A
SIM-IND		-	-	-
SIM-MOT		+	+	+
SIM-IPA		-	-	-
O 群抗原型別 <sup>b</sup>		O9, [Vi]	O2	Poly O 陽性, 型別依抗血清反應決定
H 抗原型別		d	a:[1, 5]	

<sup>a</sup> 斜面/底部之反應變化，K:不變色或呈紅色，A:酸化，呈黃色。

<sup>b</sup> [ ]該抗原非所有菌株都會出現。

- 11.2 *S. paratyphi B* 及 *S. paratyphi C* 已被列入一般沙門氏菌，因此其檢驗與結果判定標準依沙門氏菌標準檢驗操作並判定之，若須進一步鑑定，可將其送至參考實驗室檢驗確認。
- 11.3 API 20E 生化試驗套組的檢驗結果，依其說明書指示之方法判定。
- 11.4 完成檢驗後，將檢驗結果登錄於附錄 15.3 傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌分離與鑑定紀錄表，檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果”欄，並將紀錄表背面蓋職章，相關檢驗紀錄及檢體送驗單，陳核實驗室主管審核，並上網登錄於傳染病通報系統。


## 12 品質管制

### 12.1 血清凝集鑑定之品質管制

- 12.1.1 應於有效期內使用，同一批號試劑，第一次使用時取一組進行試驗，之後每隔 6 個月再取一組進行試驗。
- 12.1.2 使用 *S. typhi* #52344 T6 (署內保存並經過測試之菌株) 作為 O9、Vi 及 Hd 血清之陽性反應標準菌株；*S. paratyphi A* ATCC 9150 作為 O2 及 Ha 血清之陽性反應標準菌株；*S. choleraesuis* ATCC 10708 作為 O6,7 血清之陽性反應標準菌株；*E. coli* ATCC 25922 為陰性反應標準菌株，進行試驗。
- 12.1.3 試驗結果必須符合陽性反應及陰性反應，始可使用。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 87 頁/共 1078 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 蔡文城。2000。實用臨床微生物診斷學，第九版。九州圖書文物有限公司，臺灣。第 639-716 頁。
- 14.2 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Sckreckenberger PC, Winn WC. 1997. Enterobacteriaceae : color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5<sup>th</sup> edition, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia PA, pp. 171-252.
- 14.3 Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. 2003. General principles of specimen collection and handling, specimen collection transport and processing, enterobacteriaceae: introduction and identification, *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella* : Manual of clinical microbiology vol.1 , 8<sup>th</sup> edition. , American Society for Microbiology, Washington DC. pp. 55-66, 286-330, 636-671.

## 15 附錄

- 15.1 傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌分離與鑑定流程圖。
- 15.2 生化反應判定表。
- 15.3 傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌分離與鑑定紀錄表。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

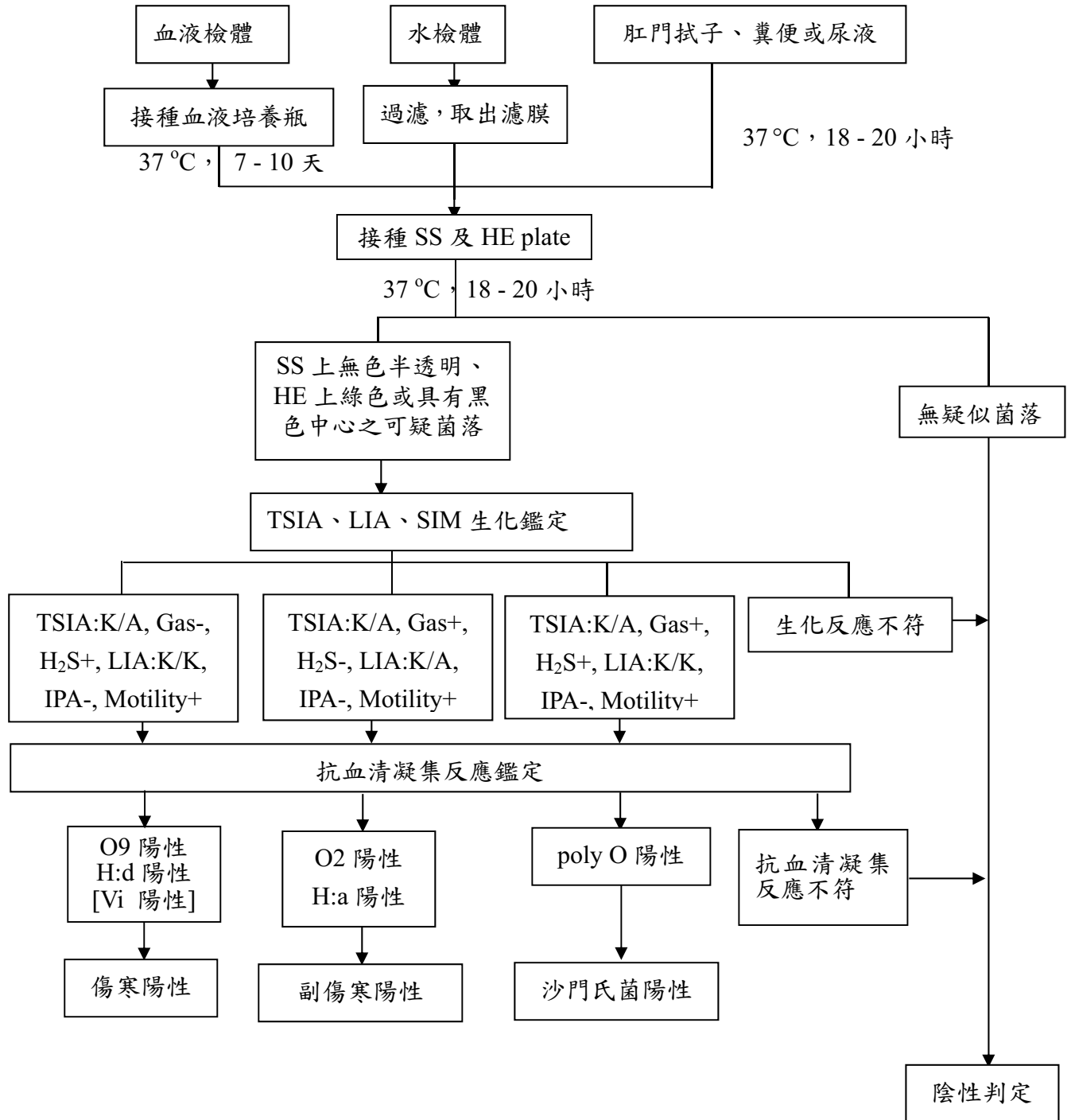


編號：  
頁次：第 88 頁/共 1078 頁


傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌  
分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌分離與鑑定流程圖




## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 89 頁/共 1078 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

### 附錄 15.2 生化反應判定表

試驗		正反應	負反應
TSIA	AS	黃色(斜面酸化)。指利用 Lactose 及 Sucrose 之能力。	紅色或不變色。指不利用 Lactose。
	AB	黃色(基底酸化)或黑色(由於產硫化氫將黃色掩蓋)。指利用 Glucose 之能力。	紅色或不變色。指不利用 Glucose。
	Gas	任何氣泡產生,指產生 CO <sub>2</sub> 及 H <sub>2</sub> 之能力。	無任何氣泡產生。
	H <sub>2</sub> S	產生黑色沉澱。	無黑色沉澱。
LIA		全管為紫色	Slant: 紫; But: 黃
SIM	IND	加入 Kovacs indole 試劑 5 滴後,培養基上層呈紅色。	不呈紅色(呈銅色)
	MOT	細菌生長遠離接種線,培養基呈混濁。	只生長於接種線上。
	IPA	培養基出現棕褐色環。	不出現棕褐色環。
Oxidase test		紫色	無色(不變色)

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 90 頁/共 1078 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌分離與鑑定紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心  
傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌分離與鑑定紀錄表


頁數：第 頁/共 頁

檢體編號											
收件日期											
檢驗日期											
檢體採檢運送狀況適當		是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
SS 上無色半透明、 HE 上綠色或具有黑 色中心之可疑菌落	培養/觀察	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
	第二天										
	第三天										
生化鑑定 ( <i>S. typhi</i> ): K/A, Gas-, H <sub>2</sub> S+, Lys+, IND-, IPA-, Motility+		符合	不符	符合	不符	符合	不符	符合	不符	符合	不符
生化鑑定 ( <i>S. paratyphi A</i> ): K/A, Gas+, H <sub>2</sub> S-, Lys-, IND-, IPA-, Motility+		符合	不符	符合	不符	符合	不符	符合	不符	符合	不符
生化鑑定 ( <i>Salmonella</i> ): K/A, Gas+, H <sub>2</sub> S+, Lys+, IND-, IPA-, Motility+		符合	不符	符合	不符	符合	不符	符合	不符	符合	不符
抗血清凝集試驗： O 群陽性凝集型別		凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無
抗血清凝集試驗： H 抗原陽性凝集型別		凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無
附註											
綜合結果											
報告日期											

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 91 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

檢測疑似病患的血液或組織中是否含有登革病毒。

## 2 適用檢體種類

適用於急性期發病病患七病日內血液檢體或組織檢體。

## 3 名詞解釋

無

## 4 原理概述

利用白線斑蚊細胞株於細胞培養盤中接種病患血清或組織研磨液，於 28 °C 培養箱中培養 7 日，取其細胞於 24 孔玻璃片上，加入抗登革病毒單株抗體及螢光標記的山羊抗鼠抗體，於螢光顯微鏡下檢查，測定是否有登革病毒。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

5.1.1 RPMI 細胞培養液 (RPMI 1640, 含 1%胎牛血清【FCS】及 1%三合一抗生素【PSA】)

5.1.2 白線斑蚊細胞株 (C6/36, 前美國海軍醫院第二研究所)。

5.1.3 FITC-goat anti-mouse IgG。

5.1.4 登革病毒 (台灣本土株當控制組)：各型登革病毒以 C6/36 細胞培養 7 天，取上清液，當登革病毒來源。

5.1.4.1 登革病毒第一型 (8700828)。

5.1.4.2 登革病毒第二型 (454009)。

5.1.4.3 登革病毒第三型 (8700829)。

5.1.4.4 登革病毒第四型 (9201818)。

### 5.1.5 單株抗體

5.1.5.1 抗黃病毒單株抗體 (ATCC HB-112)。

5.1.5.2 抗登革病毒單株抗體 (ATCC HB-114)。

5.1.5.3 抗登革病毒第一型單株抗體 (ATCC HB-47)。

5.1.5.4 抗登革病毒第二型單株抗體 (ATCC HB-46)。

5.1.5.5 抗登革病毒第三型單株抗體 (ATCC HB-49)。

5.1.5.6 抗登革病毒第四型單株抗體 (ATCC HB-48)。

5.1.6 丙酮。

5.1.7 磷酸鹽緩衝液。

5.1.8 甘油緩衝液。

### 5.2 耗材

5.2.1 96 孔培養盤。

5.2.2 50 mL 的離心管。

5.2.3 24 孔玻璃片

5.2.4 蓋玻片

5.2.5 無菌 250  $\mu$ L、1,250  $\mu$ L 之吸管尖

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 92 頁/共 1078 頁

登革病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 28°C CO<sub>2</sub> 培養箱。
- 6.2 37°C CO<sub>2</sub> 培養箱。
- 6.3 第 II 級生物安全櫃。
- 6.4 螢光顯微鏡。
- 6.5 吹風機。
- 6.6 5 – 40 ul Pipette 及 40 - 200 ul Pipette。
- 6.7 -20°C 及 -80°C 冷凍櫃。

## 7 環境設施安全

- 7.1 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。
- 7.2 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透去離子可達 18 MΩ-CM 以上超純水。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtrecid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtrecid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

- 10.1.1 於 4°C，2,100 × g 離心 15 分鐘，上清液盛於塑膠小瓶(1.8mL)，標示號碼及日期，保存於 -80°C。

### 10.2 步驟

- 10.2.1 在 96 孔細胞培養盤中將患者血清 5ul 以細胞培養液做 20、40、80、160 倍連續稀釋，每孔加入 50ul 之 2 倍連續稀釋血清。每孔中再加入 100ul C6/36 細胞懸浮液【培養 C6/36 cell 於 flask 75T，加 15 ml 培養液 (RPMI 1640，含 5% FCS 及 1% PSA) 培養約 3-4 天，以細胞括杓括下細胞→以血球計術器計算細胞量。配製成 1×10<sup>6</sup>/ml 細胞懸浮液】。
- 10.2.2 置 28°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱培養 7 天。
- 10.2.3 將每一孔中培養液移至另一無菌盤中，置於 -80°C 保存。
- 10.2.4 取 20 μL PBS 刮下培養盤中之細胞，在 24 孔玻璃片上做抹片。
- 10.2.5 於室溫中風乾後，置於 -20°C 丙酮固定 10 min。
- 10.2.6 取出 24 孔玻璃片陰乾。
- 10.2.7 此檢體抹片可保存於 -20°C 冰箱中或直接染色。
- 10.2.8 在抹片上加上 25 μL 抗黃病毒單株抗體。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 93 頁/共 1078 頁

登革病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.2.9 將抹片放置在潮濕的培養皿中，置於 37°C 溫箱 30 min。
- 10.2.10 將抹片取出並以磷酸鹽緩衝液（換三次）洗去多餘之抗體。
- 10.2.11 以蒸餾水沖洗。
- 10.2.12 在室溫中將玻璃片以冷風吹乾或陰乾。
- 10.2.13 將抹片加上 25  $\mu$ L 螢光標記之山羊抗鼠抗體（FITC-goat anti-mouseIgG）。
- 10.2.14 重複 10.2.9 至 10.2.12。
- 10.2.15 滴上甘油緩衝液，然後以蓋玻片覆蓋。
- 10.2.16 以螢光顯微鏡檢查。
- 10.2.17 若鏡檢結果為陽性則將此陽性患者培養盤中之細胞取出，在 24 孔玻璃片上做抹片（點 5 孔）。
- 10.2.18 重複 10.2.5 至 10.2.16，其中 10.2.8 步驟之抗體為抗登革病毒單株抗體及抗登革病毒第一、二、三、四型單株抗體。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 在螢光顯微鏡下將檢測檢體與 Positive control 及 Negative control 比對判讀。
- 11.1.2 當檢體呈現陽性時在螢光顯微鏡下可見黃綠色之細胞；當檢體呈現陰性時在螢光顯微鏡下無綠色細胞僅可見到細胞陰影。

11.2 報告核發：無，內部登錄處理。

11.3 結果登錄：無，內部登錄處理。

## 12 品質管制

- 12.1 嚴防病原散佈或污染，工作時帶手套。
- 12.2 實驗過程遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在 BSL-2 實驗室內操作，以避免污染。
- 12.3 生物安全櫃及培養箱定期做校正及維護。
- 12.4 置於 37°C 溫箱染色時應注意保持溼度。
- 12.5 C6/36 培養溫度不可超過 32°C。
- 12.6 必須要有未感染病毒之細胞及感染病毒之細胞分別做為陽性與陰性對照組。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121°C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 Igarashi A. 1978. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. J Gen Virol 40: 531-534.
- 14.2 Wu YC. 1986. Epidemic dengue 2 on Liouchyou Shiang, Pingtung County in 1981. Chin J Microbiol Immunol 19: 27-35.
- 14.3 Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. 1984. Mosquito cell

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 94 頁/共 1078 頁

登革病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop Med Hyg 33: 158-165.


## 15 附錄

15.1 登革熱檢驗流程表。

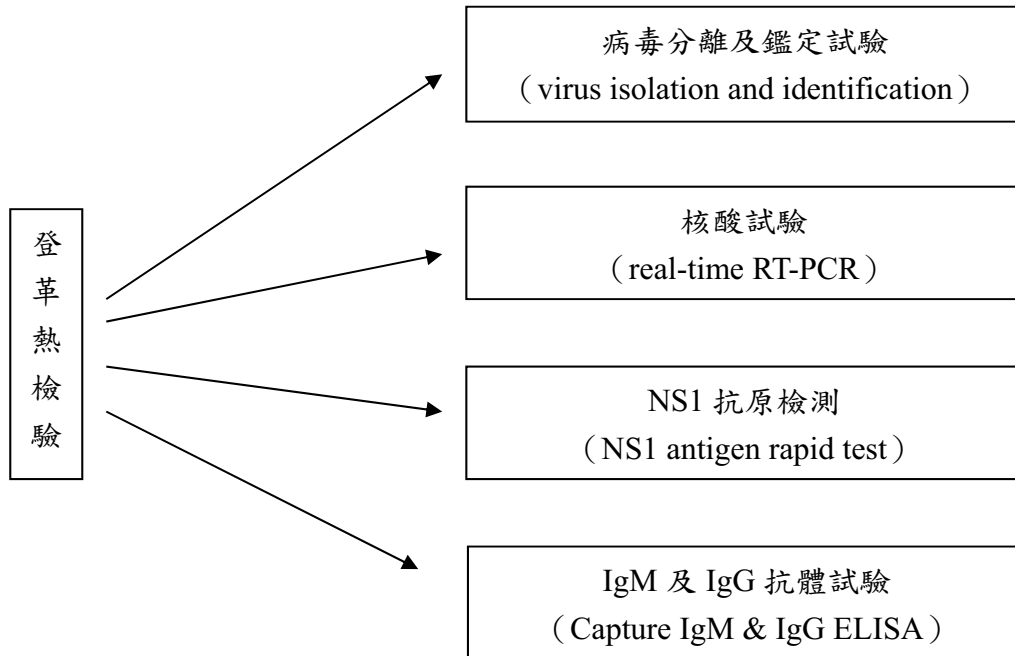
15.2 登革病毒分離與鑑定流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 95 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 登革熱檢驗流程表



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

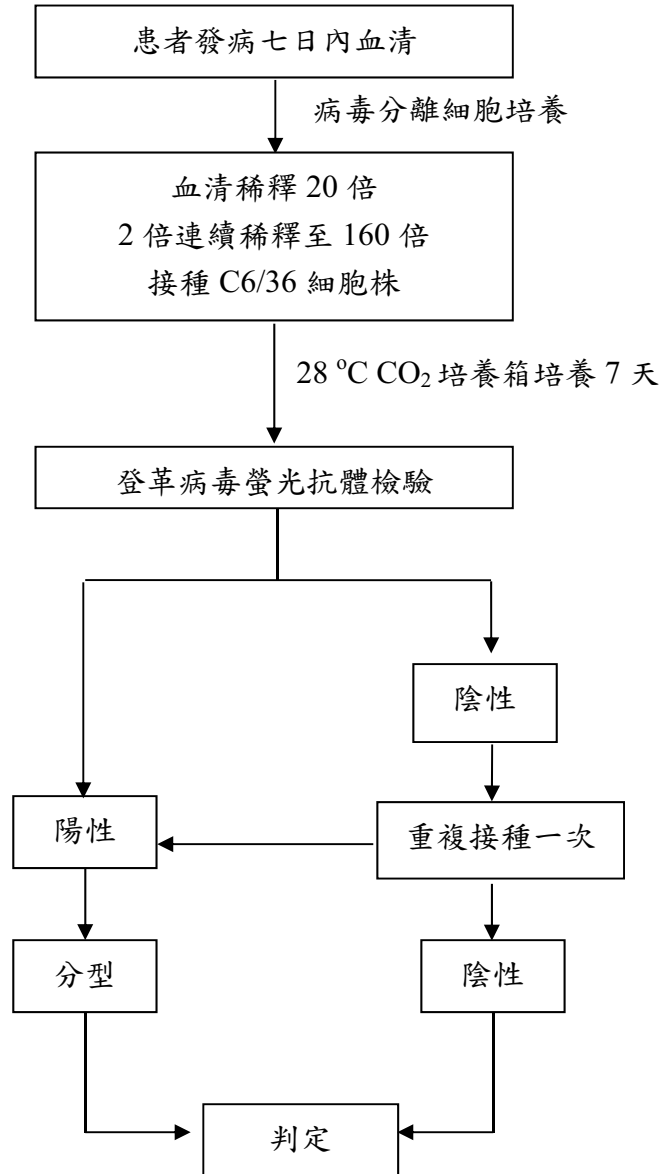
頁次：第 96 頁/共 1078 頁

登革病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 登革病毒分離與鑑定流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 97 頁/共 1078 頁

登革病毒核酸檢測  
(Real-time RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 分子診斷方法檢測疑似病患的血清檢體是否含有登革病毒核酸。

## 2 適用檢體種類

血清。

## 3 名詞解釋

Threshold cycle (Ct)：係指 PCR 產物複製的量，累積到足以被偵測到的第一個循環點稱之。換句話說，Ct 的值越小，表示檢體中初始 DNA/RNA 的含量越多。

## 4 原理概述

利用對黃病毒及登革病毒具有專一性之引子 (primers) 與檢體中之病毒核酸分子結合配對，並利用 RT-PCR 的複製過程及特殊的螢光定量化學方法偵測 RT-PCR 產物，以決定檢體中是否含有登革病毒核酸序列。檢體先以黃病毒及登革病毒共通引子篩檢，當檢體呈陽性時，再以不同登革病毒血清型專一性引子做病毒型別的鑑定。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

5.1.1 病毒 RNA 萃取試劑套組。

5.1.2 SYBR green 定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應單步驟試劑套組。

### 5.2 耗材

5.2.1 檢體瓶。

5.2.2 無菌吸管。

5.2.3 定量 PCR 專用八連排反應管及蓋。

5.2.4 無菌過濾型 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L 吸管尖。

5.2.5 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.2.6 無粉手套。

## 6 儀器設備

6.1 第 II 級生物安全櫃。

6.2 即時多重定量 PCR 偵測系統。

6.3 10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、40  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L 微量滴管分注器。

6.4 高速離心機。

6.5 真空抽氣機。

6.6 冰箱：4  $^{\circ}$ C。

6.7 冷凍櫃：-20  $^{\circ}$ C。

6.8 高壓滅菌鍋。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 98 頁/共 1078 頁

登革病毒核酸檢測

(Real-time RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 7 環境設施安全

- 7.1 病人血清檢體應在第 II 級生物安全櫃 (BSL-2) 內處理。
- 7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。
- 7.3 應有獨立的操作空間，盡量與操作 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

- 10.1.1 裝有靜脈血的無菌真空試管以 2,000 轉離心 10 分鐘，以無菌吸管將血清吸入檢體瓶內旋緊瓶蓋。
- 10.1.2 檢體瓶上標註檢體標號。
- 10.1.3 檢體處理好後置 2-8°C 冰箱冷藏。

### 10.2 步驟

- 10.2.1 萃取病毒 RNA，依據所使用試劑製造業者的操作手冊進行。
- 10.2.2 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應，取 5 µL RNA 做模板，加入黃病毒引子或登革病毒共通引子或登革病毒分型引子組(參考附錄 15.1)，並依據所使用試劑製造業者的操作手冊，加入其他所需試劑，調整反應總體積至 25 µL。
- 10.2.3 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應程式設定：
  - 10.2.3.1 RT 作用：50°C，30 min。
  - 10.2.3.2 Taq polymerase activation：95°C，15 min。
  - 10.2.3.3 Denaturation：95°C，15 sec。
  - 10.2.3.4 Annealing：55°C，30 sec。
  - 10.2.3.5 Extension：72°C，20 sec。
  - 10.2.3.6 77°C，30 sec，收集螢光值。
  - 10.2.3.7 重複 10.2.3.3 至 10.2.3.6 步驟 45 Cycle。
- 10.2.4 Melting curve analysis：
  - 10.2.4.1 95°C，1 min。
  - 10.2.4.2 以 0.2°C/秒速率降溫至 68°C，收集螢光值。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 陽性對照組的 Ct 值需小於或等於 30，Tm 值需大於或等於 79°C。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 99 頁/共 1078 頁

登革病毒核酸檢測

(Real-time RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 11.1.2 陰性對照組的  $C_t$  值需大於或等於 40， $T_m$  值需小於  $79^{\circ}\text{C}$ ， $C_t$  值或  $T_m$  值有一項符合上述要求即可。
- 11.1.3 陽性對照組或陰性對照組其中之一不符合設定值時，則重新實驗。
- 11.1.4 在陽性對照與陰性對照組符合設定值下，凡樣品經黃病毒引子組、登革病毒共通引子及登革病毒分型引子組之  $C_t$  值均小於 35、 $T_m$  值均大於或等於  $79^{\circ}\text{C}$  者，判為登革病毒陽性，反之則判為登革病毒陰性。

## 11.2 報告核發

- 11.2.1 登革熱病原體檢驗方法：螢光定量聚合酶-連鎖反應 (real-time PCR)
- 11.2.2 結果：陽性，大類：登革熱，型別：第一型、第二型、第三型或第四型。
- 11.2.3 結果：陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統 (LIMS) 之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。

## 12 品質管制

- 12.1 每次進行實驗時皆有對照組，陽性對照組與陰性對照組的  $C_t$  值需符合設定值。
- 12.2 實驗過程遵循標準檢驗方法的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。
- 12.3 即時多重定量 PCR 偵測系統定時作檢測與校正。
- 12.4 微量滴管分注器定期校正。
- 12.5 注意試劑套組的使用期限與適當的儲放溫度。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以  $121^{\circ}\text{C}$ ，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。


## 14 參考資料

- 14.1 Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, Lin TH, Huang JH. 2003. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol* 41: 2408-2416.
- 14.2 Houngh HH, Hritz D, Kanesa-thasan N. 2000. Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence. *J Virol Methods* 86: 1-11.

## 15 附錄

- 15.1 登革病毒診斷用引子組序列表。


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 100 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.1 登革病毒診斷用引子組序列表

<u>Dengue- specific primers</u>	<u>參與反應的濃度</u>
R36      5'-CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA-3'	120 nM
R169     5'-CCC CAT CTA ACC AAT ATT CCT GCT-3'	120 nM
R170     5'-CCC CAT CTG TTC AGT ATC CCT GCT-3'	120 nM
<u>Flavivirus- specific primers</u>	
FLF1     5'-GCC ATA TGG TAC ATG TGG CTG GGA GC-3'	60 nM
FLR3     5'-GTK ATT CTT GTG TCC CAW CCG GCT GTG TCA TC-3'	60 nM
FLR4     5'-GTG ATG CGR GTG TCC CAG CCR GCK GTG TCA TC-3'	60 nM
<u>Dengue-serotype specific primers</u>	
<u>Dengue serotype 1:</u>	
R36      5'-CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA-3'	200 nM
R53      5'-CGC TCC ATA CAT CTT GAA TGA G-3'	200 nM
<u>Dengue serotype 2:</u>	
R36      5'-CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA-3'	800 nM
R54      5'- AAG ACA TTG ATG GCT TTT GA-3'	400 nM
<u>Dengue serotype 3:</u>	
R36      5'-CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA-3'	200 nM
R65      5'- AAG ACG TAA ATA GCC CCC GAC-3'	200 nM
<u>Dengue serotype 4:</u>	
R36      5'-CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA-3'	300 nM
R56      5- AGG ACT CGC AAA AAC GTG ATG AAT-3'	300 nM

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒 NS1 抗原檢測 (Dengue	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 101 頁/共 1078 頁	virus NS1 antigen rapid test)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
登革病毒 NS1 抗原檢測。
- 2 適用檢體種類  
適用於人體血清或血漿之檢體。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
當血清或血漿檢體中含有登革病毒 NS1 抗原時，會與結合紙條 (conjugate pad) 上的膠體金粒子 (colloidal gold particles) - 抗登革病毒 NS1 抗體結合體形成複合物，在測試條上利用色層分析原理往上移動時會被測試線 (test line) 上所吸附之抗 NS1 抗體抓住，出現紫紅色線條。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 NS1 抗原測試組 (Bio-Rad Cat no. 70700；每組含測試條 25 條及液體移動輔助液乙瓶)。
  - 5.2 12 × 75 mm 圓底試管。
  - 5.3 丟棄式 200 μL 吸管尖。
  - 5.4 手套。
- 6 儀器設備
  - 6.1 100 μL 或 200 μL 之微量滴管分注器 (pipettors)。
- 7 環境設施安全
  - 7.1 病人檢體應在第 II 級生物安全櫃 (class II BSC) 內處理。
  - 7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。
- 8 檢體採集  
參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存  
參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
  - 10.1 檢體編號登錄。
  - 10.2 以微量滴管分注器取 50 μL 之血清，置入 12 × 75 mm 圓底試管底部。
  - 10.3 於 12 × 75 mm 圓底試管上方，垂直滴入一滴 (約 50 μL) 液體移動輔

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：	登革病毒 NS1 抗原檢測(Dengue	核准日期： 年 月 日
頁次：第 102 頁/共 1078 頁	virus NS1 antigen rapid test)	修訂日期： 年 月 日

助液，輕輕搖晃試管以混合血清及液體移動輔助液。

10.4 取一測試條，依指示方向，置入 12 × 75 mm 圓底試管內。

10.5 將試管直立，靜置於常溫下 15 min。

10.6 進行結果判讀。

10.7 若測試線反應很弱，可將測試條放回試管內，靜置 15 min 後，再進行結果判讀。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

11.1.1 結果判定應於反應後 15 - 30 min 內進行。

11.1.2 測試條上方出現之橫條訊號，為陰性對照組訊號。所有血清檢體，於測試後，均應出現此一訊號。若該訊號未出現，則應考慮測試組是否已過期或失效。

11.1.3 測試條中間出現之橫條訊號，代表測試結果為陽性。

11.1.4 典型之陽性測試結果，應出現上方及中間之兩條橫條訊號。

11.1.5 本項測試屬定性測試，對急性期之登革熱病患之陽性正確率依檢體來源不同而有所差異；惟陰性結果並不保證被測人未被登革病毒感染。

11.1.6 本項測試對孕婦、關節炎病患之血清，或血清內含抗細胞核抗體者，偶會有偽陽性之可能；又血清內含大量溶血物質，亦會造成偽陽性之結果。

### 11.2 報告核發：

11.2.1 檢驗方法：登革病毒 NS1 抗原檢測

11.2.2 結果：陽性。

11.2.3 結果：陰性。

11.3 結果登錄：將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統 (LIMS) 之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。

## 12 品質管制

12.1 測試組應於有效期內使用。

12.2 微量滴管分注器應定期做校正。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料


Dengue NS1 Ag Strip (Bio-Rad Cat no. 70700) Instruction Manual.

## 15 附錄

無。




# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒、日本腦炎病毒IgM及IgG	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 103 頁/共 1078 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
登革病毒及日本腦炎病毒 IgM 和 IgG 抗體檢測。
- 2 適用檢體種類  
適用於人體血清或腦脊髓液之檢體。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
利用 Capture IgM 與 IgG 酵素免疫分析法,測定病人血清或腦脊髓液中之登革熱或日本腦炎特異性抗體。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 Dilution buffer: Casein blocking buffer (Sigma, Product no. C7594, USA) + 2.5 % Normal rabbit serum+ 4% Normal goat serum + 0.05 % Tween-20, pH 7.2。
  - 5.2 Washing buffer (1.5X PBS+0.05 % Tween-20, pH 7.2)。
  - 5.3 Human positive and negative control sera
    - 5.3.1 Dengue primary positive control(以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
    - 5.3.2 Dengue secondary positive control (以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
    - 5.3.3 JE positive control (以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
    - 5.3.4 Negative control (以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
  - 5.4 去活化病毒細胞培養液(病毒經 C6/36 細胞培養 5-7 天,收集上清液,經 UV 照射 1 hr,分裝後保存於-80 °C 冷凍櫃)
    - 5.4.1 DENV-1, strain 8700828。
    - 5.4.2 DENV-2, strain 454009。
    - 5.4.3 DENV-3, strain 8700829。
    - 5.4.4 DENV-4, strain 8700544。
    - 5.4.5 JEV, strain JaGAR。
  - 5.5 含抗黃病毒屬外套抗原(envelope)單株抗體之小鼠腹水(Glyconex, Cat. no. FL0232, Taiwan)。
    - 5.5.1 以 Protein A/G 管柱,經親合性純化後之抗黃病毒屬外套抗原(envelope)單株抗體(抗體名稱為 D56.3);該 D56.3 抗體可逕與 Innova Biosciences 公司生產之 Lightning-Link Alkaline Phosphatase kit 反應,以製備抗黃病毒屬外套抗原單株抗體-鹼性磷酸酶結合體(簡稱 D56.3-AP)。
  - 5.6 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體。(goat anti-mouse IgG-AP conjugate, Jackson, Code no. 115-006-071, USA)
  - 5.7 Substrate reagent, p-Nitrophenyl-phosphate(p-NPP)(Chemicon, USA, Cat. no. ES009-500mL)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法


	編號：	登革病毒、日本腦炎病毒IgM及IgG	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 104 頁/共 1078 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 5.8 96 孔微量滴定盤
  - 5.8.1 Anti-human IgM 真空乾燥盤 (ELISA plate coated with goat anti-human IgM)。
  - 5.8.2 Anti-human IgG 真空乾燥盤 (ELISA plate coated with goat anti-human IgG)。
- 5.9 八連排稀釋管。
- 5.10 丟棄式 250  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L 吸管尖。
- 5.11 手套。
  
- 6 儀器設備
  - 6.1 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC)。
  - 6.2 全自動酵素免疫分析儀 (Tecan, Genesis workstation 150, Germany)。
  - 6.3 微量滴管分注器 2  $\mu$ L、20  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L (pipettors)。
  - 6.4 震盪器。
  - 6.5 冰箱：4  $^{\circ}$ C。
  - 6.6 冷凍櫃：-20  $^{\circ}$ C。
  - 6.7 高壓滅菌鍋。
  
- 7 環境設施安全
  - 7.1 病人血清檢體應在第 II 級生物安全櫃內處理。
  - 7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。
  
- 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
  
- 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
  
- 10 檢驗步驟
  - 10.1 檢體編號登錄。
  - 10.2 檢體量須大於 0.5 mL。
  - 10.3 四型登革病毒細胞培養液 (DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4) 分別以 Dilution buffer 四倍稀釋，各取等量混合後，以 1：1,000 之稀釋比例，加入含抗黃病毒屬外套抗原 (envelope) 單株抗體之小鼠腹水 FL0232 (登革熱病毒加偵測腹水混合液)。另日本腦炎病毒細胞培養液以 Dilution buffer 四倍稀釋後，以 1：1,000 之稀釋比例，加入含抗黃病毒屬外套抗原 (envelope) 單株抗體之小鼠腹水 FL0232 (日本腦炎病毒加偵測腹水混合液)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒、日本腦炎病毒IgM及IgG	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 105 頁/共 1078 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 10.3.1 D56.3-AP (5.5.1) 與病毒稀釋液以 1:2,000 比例混合，即可配製登革熱病毒加偵測抗體混合液及日本腦炎病毒加偵測抗體混合液，以此混合液進行測定，則可省略步驟 10.4、10.10 及 10.11。
- 10.4 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體以 Dilution buffer 1：4000 稀釋。
- 10.5 取待測血清 7  $\mu$ L 加入 Dilution buffer 0.7 mL 稀釋 100 倍。若是腦脊髓液檢體，則取 70  $\mu$ L 加入 Dilution buffer 0.7 mL 稀釋 11 倍。
- 10.6 取 0.1 mL 待測血清(步驟 10.5)及陰性、陽性對照血清(試劑耗材 5.3)，加入 anti-human IgM 及 anti-human IgG 之 96 孔真空乾燥盤。
- 10.7 置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.8 取 0.1 mL 登革熱病毒加偵測腹水混合液及日本腦炎病毒加偵測腹水混合液(步驟 10.3) 分別加入 96 孔真空乾燥盤。
- 10.9 置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.10 取 0.1 mL 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體稀釋液(步驟 10.4) 加入 96 孔真空乾燥盤。
- 10.11 置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.12 取 0.1 mL/孔 呈色劑 (p-NPP) 加入 96 孔微量滴定盤中呈色。
- 10.13 置於 37°C 溫箱，搖盪 40 min。
- 10.14 置微量滴定盤於酵素免疫分析儀裡，以雙波長 405、630 nm 測定吸光度 ( $OD_{405-630}$ )。

## 11 結果判定


### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 若血清檢體之登革病毒特異性 IgM 抗體之 OD 值大於 0.5，且登革病毒 IgM OD 值/日本腦炎病毒 IgM OD 值大於或等於 2，判為登革熱 IgM 陽性。
- 11.1.2 若血清檢體之登革病毒特異性 IgG 抗體之 OD 值大於 0.5，判為登革熱 IgG 陽性。
- 11.1.3 Dengue primary positive control 應符合 IgM OD 值 > 1.5，IgG OD 值 > 0.5。
- 11.1.4 Dengue secondary positive control 應符合 IgM OD 值 > 0.5，IgG OD 值 > 1.5。
- 11.1.5 JE positive control 應符合 IgM OD 值 > 1.5，IgG OD 值 > 1.5。
- 11.1.6 JE negative control 應符合 IgM OD 值 < 0.2，IgG OD 值 < 0.2。

### 11.2 報告核發：

- 11.2.1 檢驗方法：登革病毒及日本腦炎病毒 IgM 和 IgG 抗體檢測。
- 11.2.2 結果：陽性。
- 11.2.3 結果：陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統 (LIMS) 之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒、日本腦炎病毒IgM及IgG	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 106 頁/共 1078 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 12 品質管制

- 12.1 應於有效期內使用，同一批號試劑，第一次使用時取一組進行試驗，之後每隔 3 - 6 個月再取一組進行試驗。
- 12.2 每次檢驗應加入陽性及陰性控制組血清。
- 12.3 遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。
- 12.4 微量滴管分注器定時做校正。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. Clin. Diagnos Lab Immunol 10: 622-630.
- 14.2 Monath TP, Nystrom RR, Bailey RE, Calisher CH, Muth DJ. 1984. Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of St. Louis encephalitis. J Clin Microbiol 20: 784-790.
- 14.3 Innis BL, Nissalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, puttisri P, Hoke CH. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. Am J Trop Med Hyg 40: 418-427.

## 15 附錄

登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG 抗體試驗 (酵素免疫分析法) 流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG

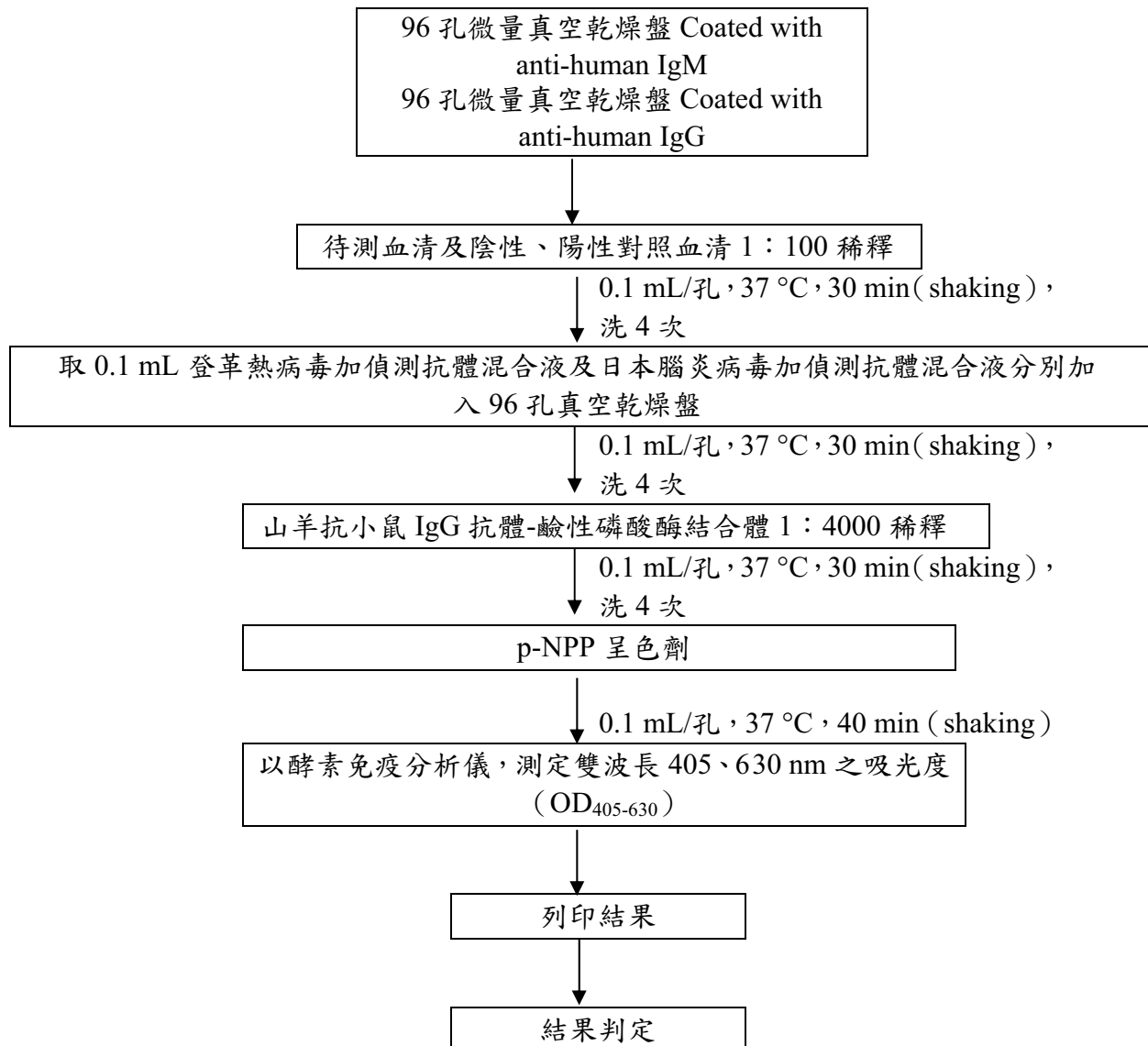
核准日期： 年 月 日

頁次：第 107 頁/共 1078 頁


抗體檢測 (ELISA)

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG 抗體試驗 (酵素免疫分析法) 流程圖。




# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏腦膜炎雙球菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 108 頁/共 1078 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
流行性腦脊髓膜炎通報病例之人體檢體中奈色氏腦膜炎雙球菌的分離鑑定與血清分型。
- 2 適用檢體種類  
適用於病患血液、腦脊髓液與醫院分離菌株。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
以特定培養基分離奈色氏腦膜炎雙球菌，並利用細菌生長菌落特性，菌體型態，生化代謝與血清學特性鑑定與分型。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 巧克力平板 (chocolate agar plate)。
  - 5.2 MTM (modified Thayer-Martin agar)。
  - 5.3 BHI (brain heart infusion) broth。
  - 5.4 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution)：Difco，美國，武藤化學，日本或其它具相同鑑別力之試劑。
  - 5.5 API NH 生化鑑定套組：BioMérieux，法國，或其它具相同鑑別力之生化系統。
  - 5.6 抗血清：*Neisseria meningitidis* agglutinating sera A、B、C、Y、W135, Muréx Biotech，法國或其它具相同鑑別力之試劑。
  - 5.7 氧化酶試劑 (oxidase strips)：MAST，英國，BioMérieux，法國或其它具相同鑑別力之試劑。
  - 5.8 無菌滴管 (dropper)：1 mL。
  - 5.9 接種針 (環)。
  - 5.10 載玻片。
  - 5.11 無菌生理食鹽水：0.85% NaCl。
  - 5.12 無菌塑膠手套。
  - 5.13 標準菌株：*N. meningitidis* BCRC10714=ATCC13090。
  - 5.14 標準菌株：*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228。
  - 5.15 標準菌株：血清型 A，*N. meningitidis* ATCC13077。
  - 5.16 標準菌株：血清型 B，*N. meningitidis* ATCC13090。
  - 5.17 標準菌株：血清型 C，*N. meningitidis* ATCC13102。
  - 5.18 標準菌株：血清型 Y，*N. meningitidis* ATCC35561。
  - 5.19 標準菌株：血清型 W135，*N. meningitidis* ATCC35559。
- 6 儀器設備
  - 6.1 二氧化碳培養箱。
  - 6.2 高壓滅菌鍋。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法


	編號：	奈色氏腦膜炎雙球菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 109 頁/共 1078 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

- 6.3 光學顯微鏡：能放大至 1,000X 油鏡。
- 6.4 第 2 級生物安全櫃 (class II BSC)。
  
- 7 環境設施安全
  - 7.1 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
  - 7.2 處理檢體、接種時於生物安全櫃內操作。
  
- 8 檢體採集

請參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
  
- 9 檢體運送及保存

請參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
  
- 10 檢驗步驟
  - 10.1 分離培養
    - 10.1.1 檢體接種：
      - 10.1.1.1 血液：依據血液培養瓶的需要量而定。要求送驗單位取出血液之後立刻接種於血瓶，血液檢體以 1:5 - 1:10 的比例接種於血液培養瓶。
      - 10.1.1.2 腦脊髓液：取 1 - 2 滴液體接種於巧克力平板及 BHI broth (增菌備用)，其他未接種液體置於 35 °C，3 - 7 % CO<sub>2</sub> 二氧化碳培養箱保留到檢驗結果登錄後。
      - 10.1.1.3 菌株：挑取菌落，接種巧克力平板。
    - 10.1.2 培養：35 °C，3 - 7 % CO<sub>2</sub> 二氧化碳培養箱培養。
    - 10.1.3 觀察：
      - 10.1.3.1 血液：培養 16 - 18 hr 後觀察，若培養液有混濁或紅血球溶解情形，立即將培養液混合均勻，取 0.5 mL 培養液次培養於巧克力平板，培養 16 - 18 hr 後，開始觀察有無可疑菌落，如有則進行鑑定，如無則繼續培養及隔日觀察，至少需培養 72 hr；陰性之血瓶於第 5 天時，再次培養於巧克力平板培養觀察。
      - 10.1.3.2 腦脊髓液：平板培養 16 - 18 hr 後，開始觀察有無可疑菌落，如有則進行鑑定，如無則繼續培養及隔日觀察，至少需培養 72 hr，液態培養基每天觀察連續 7 天，其間液態培養基若有呈現混濁時，則次培養於巧克力平板，培養 16 - 18 hr 後，開始觀察有無可疑菌落，如有則進行鑑定，如無則繼續培養及隔日觀察，至少需培養 72 hr。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏腦膜炎雙球菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 110 頁/共 1078 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

10.1.3.3 菌株：培養 16 - 18 hr 後，進行鑑定。  
 註：將進行分離培養所需之培養基巧克力平板、MTM 或試劑由 4 °C 冰箱拿出，置室溫回溫 30 min 待用。

## 10.2 鑑定

10.2.1 菌落型態及染色：挑取巧克力平板上直徑約 1 毫米，為凸起、光滑有光澤、圓形、無色或乳白略帶灰色，作 Gram's stain，符合革蘭氏陰性雙球菌，咖啡豆狀，成雙排列。

### 10.2.2 生化鑑定

10.2.2.1 Oxidase test：以接種環挑取單一菌落直接塗於 strip 上，觀察顏色變化，10 sec 內變為藍色，為陽性反應。

10.2.2.2 API-NH 生化鑑定套組或其它具相同鑑別力之生化系統，依據套組說明製備菌液、接種菌液於鑑定盤各反應格、培養、判讀結果，得到一組數字查尋判定是否為 *Neisseria meningitidis*，可信度需達 95 % 以上。

### 10.2.3 血清分型：

血清型之測試利用玻片凝集法：

10.2.3.1 將載玻片用蠟筆分格，測試位置如圖說明：

第一片	第二片						
<table border="1" style="border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 30px; height: 30px;">A</td> <td style="width: 30px; height: 30px;">B</td> <td style="width: 30px; height: 30px;">C</td> </tr> </table>	A	B	C	<table border="1" style="border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 30px; height: 30px;">Y</td> <td style="width: 30px; height: 30px;">W135</td> <td style="width: 30px; height: 30px;">N</td> </tr> </table>	Y	W135	N
A	B	C					
Y	W135	N					

A：血清型 A 測試，B：血清型 B 測試，C：血清型 C 測試  
 Y：血清型 Y 測試，W135：血清型 W135 測試，  
 N：陰性對照（無菌食鹽水）。

10.2.3.2 在每一格分別滴入 1 滴（約 40 μL）無菌 0.85% 食鹽水，用 1 μL 接種環挑取 1/4 loop 量的新鮮菌落於各分格中與食鹽水混合均勻，個別加入相對應之抗血清（不要稀釋使用）或無菌食鹽水，均勻搖晃玻片約 1 min，觀察並紀錄凝集情形。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準：

#### 11.1.1 腦膜炎雙球菌陽性判定標準：

試驗或基質	<i>Neisseria meningitidis</i>
1. 巧克力平板上典型菌落外觀特徵	凸起、光滑有光澤、圓形無色或乳白略帶灰色之菌落
2. 革蘭氏染色試驗	革蘭氏陰性，咖啡豆狀成雙排列，直徑約在 0.6 至 0.8 μm 左右
3. Oxidase 試驗	藍色或藍紫色
4. 快速生化鑑定系統 API-NH，或其他具相同鑑別力之生化系統。	得到一組數字，依照說明書查尋號碼簿，判定菌株是否為 <i>N. meningitidis</i>



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 111 頁/共 1078 頁

奈色氏腦膜炎雙球菌  
分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

腦膜炎雙球菌陽性需符合以上條件，若其中有一不符合者，即判定為腦膜炎雙球菌陰性。

## 11.1.2 血清分型判定標準：

11.1.2.1 血清型 A：*N. meningitidis* agglutinating sera A 產生凝集，其他抗血清無凝集。

11.1.2.2 血清型 B：*N. meningitidis* agglutinating sera B 產生凝集，其他抗血清無凝集。

11.1.2.3 血清型 C：*N. meningitidis* agglutinating sera C 產生凝集，其他抗血清無凝集。

11.1.2.4 血清型 Y：*N. meningitidis* agglutinating sera Y 產生凝集，其他抗血清無凝集。

11.1.2.5 血清型 W135：*N. meningitidis* agglutinating sera W135 產生凝集，其他抗血清無凝集。

11.1.2.6 其他：凝集狀況與以上條件不符合。

11.2 報告核發：腦膜炎雙球菌陽性，血清型 A 或 B 或 C 或 Y 或 W135 或其他。腦膜炎雙球菌陰性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於奈色氏腦膜炎雙球菌紀錄表及檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送實驗室主管審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

### 11.3.1 結果的可報告區間

陽性：*N. meningitidis* 血清型 A 或 B 或 C 或 Y 或 W135 或其他。

陰性：non-*N. meningitidis*，No growth。

### 11.3.2 緊急通報

無。

### 11.3.3 干擾因素

病人因素：病程發展階段、抗生素使用。

採樣運送時：採檢部位、運送時間和溫度。

### 11.3.4 潛在變異的來源

接種劃線技術。

菌落型態辨識。

### 11.3.5 檢驗性能之規格

## 12 品質管制


### 12.1 MTM plate 之品質管制：

12.1.1 測試時間：每一批號由廠商提供品質管制文件，實驗室每年進行一次品管測試。

12.1.2 測試菌株：*N. meningitidis* BCRC10714 = ATCC13090，*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228。

12.1.3 測試方法：使用新鮮的測試菌，生長在固體營養培養基一天的菌，挑菌懸浮於 2 mL 無菌水中，調菌液濁度 0.5 McFarland，以 1  $\mu$ L 的 Loop 取菌液接種於測試培養基上，35  $^{\circ}$ C，3 - 7% CO<sub>2</sub> 二氧化碳培養箱培養。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏腦膜炎雙球菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 112 頁/共 1078 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

12.1.4 觀察結果紀錄：預期結果 *N. meningitidis* BCRC10714 = ATCC13090，24 hr 後可見 1 - 2 mm 菌落。*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228，24 hr 後沒有菌落生長或生長菌落稀少。

## 12.2 抗血清：

12.2.1 測試時間：於第一次使用時。

12.2.2 測試菌株：血清型 A，*N. meningitidis* ATCC13077；血清型 B，*N. meningitidis* ATCC13090；血清型 C，*N. meningitidis* ATCC13102；血清型 Y，*N. meningitidis* ATCC35561；血清型 W135，*N. meningitidis* ATCC35559。

12.2.3 測試方法：（依 10.2.3 節）。

12.2.4 觀察結果紀錄：試驗結果必須符合判定標準（依 11.1.2 節），始可使用。

## 12.3 能力試驗

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液、及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 蔡文城。2000。實用臨床微生物診斷學，第九版。九州圖書文物有限公司，臺灣。第 534-539 頁。

14.2 Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 2007. Manual of clinical and microbiology, 9<sup>th</sup> edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 601 -620.

## 15 附錄

15.1 奈色氏腦膜炎雙球菌分離與鑑定流程圖。

15.2 奈色氏腦膜炎雙球菌分離與鑑定紀錄表。

15.3 \_\_\_\_\_Plate 品質管制紀錄表。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

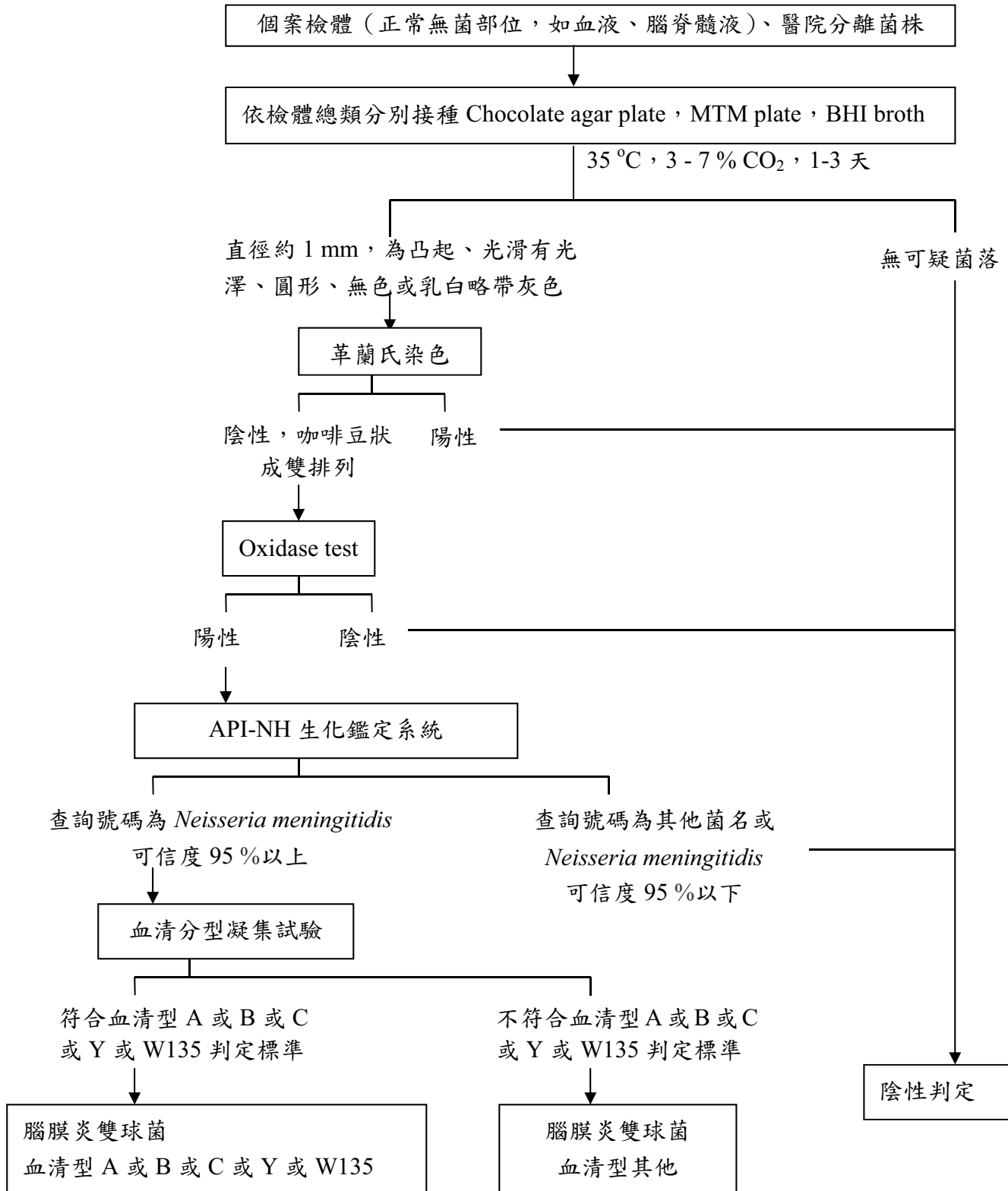


編號：  
頁次：第 113 頁/共 1078 頁


奈色氏腦膜炎雙球菌  
分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 奈色氏腦膜炎雙球菌分離與鑑定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏腦膜炎雙球菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 114 頁/共 1078 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 奈色氏腦膜炎雙球菌分離與鑑定紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

### 奈色氏腦膜炎雙球菌分離與鑑定紀錄表


頁數：第 頁/共 頁

檢體編號											
收件日期											
檢驗日期											
檢體總類											
檢體採檢運送狀況適當		是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
Chocolate agar plate 上菌落外觀特徵，凸起、光滑有光澤、圓形、無色或乳白略帶灰色之菌落。 血液：7天。 腦脊髓液，液態增菌：7天。	培養/觀察	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
	第 2 天										
	第 3 天										
	第 4 天										
	第 5 天										
	第 6 天										
	第 7 天										
	第 8 天										
革蘭氏染色：陽性或陰性，雙球菌或桿菌		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
		雙球菌	桿菌	雙球菌	桿菌	雙球菌	桿菌	雙球菌	桿菌	雙球菌	桿菌
Oxidase test：陽性藍色或藍紫色，陰性不變色		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
生化試驗 API-NH (紀錄檢索碼)											
血清分型凝集試驗 <i>Neisseria meningitidis</i> Antisera A、B、C、X、Y、W135、其他，(有反應之項目用圈選紀錄)		A C Y	B X W135 其他	A C Y	B X W135 其他	A C Y	B X W135 其他	A C Y	B X W135 其他	A C Y	B X W135 其他
附註											
綜合結果											
報告日期											

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏腦膜炎雙球菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 115 頁/共 1078 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.3 \_\_\_\_\_ Plate 品質管制紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心  
\_\_\_\_\_ Plate 品質管制紀錄表

培養基名稱： \_\_\_\_\_  
 廠牌： \_\_\_\_\_ Cat no.： \_\_\_\_\_  
 批號： \_\_\_\_\_ 有效期限： \_\_\_\_\_

交貨日期： 年 月 日 交貨數量： \_\_\_\_\_

試驗日期： 年 月 日


### 品管（查驗）紀錄

項 目	結 果	判 定	備 註
無菌性試驗	<input type="checkbox"/> No growth <input type="checkbox"/> Contamination	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
有效性試驗	1. 試驗菌： 生長描述：	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
	2. 試驗菌： 生長描述：	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
	3. 試驗菌： 生長描述：	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
包裝	<input type="checkbox"/> 完整 <input type="checkbox"/> 破損 <input type="checkbox"/> 其它：	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
水分	<input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 太乾 <input type="checkbox"/> 其它：	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
其它		<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	

實驗室 PI：


品管技術人員：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 116 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
痢疾桿菌的分離鑑定與血清型判定。
- 2 適用檢體種類  
適用於人體糞便、直腸拭子、環境擦拭拭子與水檢體。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
以特定培養基分離菌株，並利用生化代謝與血清學特性鑑定與分型。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 培養基
    - 5.1.1 SS 培養基 (Salmonella Shigella)。
    - 5.1.2 CHROM shigella 培養基。
      - 1.1.1 TSIA (Triple Sugar Iron agar)。
      - 1.1.2 LIA (Lysine Iron agar)。
      - 1.1.3 SIM (Sulfide Indole Motility agar)。
      - 1.1.4 TSA (Tryptic soy agar)。
  - 5.2 鑑定血清 A、B、C、D 亞群抗血清：生研，日本。
    - 5.2.1 A 亞群
      - 5.2.1.1 多價血清：A 多價，A1 多價。
      - 5.2.1.2 因子血清：型血清 1 型—12 型。
    - 5.2.2 B 亞群
      - 5.2.2.1 多價血清：B 多價。
      - 5.2.2.2 因子血清：型血清 I 型—VI 型。
      - 5.2.2.3 因子血清：群血清 (3) 4 群，6 群，7 (8) 群。
    - 5.2.3 C 亞群
      - 5.2.3.1 多價血清：C 多價。
      - 5.2.3.2 因子血清：型血清 1 型—18 型。
    - 5.2.4 D 亞群多價血清
      - 5.2.4.1 多價血清：D 多價。
      - 5.2.4.2 因子血清：相血清 I 相—II 相。
  - 5.3 API 20 E 生化鑑定套組：BioMérieux，法國。
  - 5.4 氧化酶試紙 (Oxidase strips)：MAST，UK 或氧化酶試劑 (Oxidase reagent)：BioMérieux，France。
  - 5.5 無菌生理食鹽水：0.85 % NaCl。
  - 5.6 載玻片。
  - 5.7 無菌吸管：3 mL。
  - 5.8 接種針 (環)。
  - 5.9 馬克法藍氏濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 117 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 37 °C 培養箱。
- 6.2 具有變焦功能的立體解剖顯微鏡（至少可放大 4.5 倍）。
- 6.3 第二級生物安全櫃（Class II BSC）。

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級（BSL-2）實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

人體糞便、直腸拭子，參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

低溫運送及保存，參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 分離培養

#### 10.1.1 接種：

- 10.1.1.1 糞便：以棉棒拭子沾取微量，直接塗抹於 SS 或 HE 培養基上。
- 10.1.1.2 直腸拭子：拭子直接塗抹於 SS 或 HE 培養基上。
- 10.1.1.3 環境擦拭拭子：擦拭拭子直接塗抹於 SS 或 HE 培養基上。
- 10.1.1.4 水檢體：水檢體 1,000 mL 以 0.45 μm 過濾膜過濾，將過濾膜置放於 250 mL TSB 中，於 37 °C 增菌培養 15 - 18 小時後，次培養於 SS 或 HE 培養基上。

#### 10.1.2 培養：置於 37 °C 培養。

10.1.3 觀察：18 - 20 小時後，挑選可疑菌落（SS 培養基上呈無色或粉紅色稍混濁菌落，在 CHROM shigella 培養基底部背景為紅色，呈現白色或灰白色菌落），次接種於 TSIA、LIA、SIM 和 TSA 培養基上，37 °C 培養 18 - 20 小時。

### 10.2 鑑定

10.2.1 菌落型態：痢疾桿菌在 SS 培養基上呈無色或粉紅色稍混濁菌落，在 CHROM shigella 培養基白色或灰白色菌落。

#### 10.2.2 生化鑑定：

- 10.2.2.1 三管生化反應：TSIA：k/A、Gas（-）、H<sub>2</sub>S（-），LIA：K/A，SIM：Motility（-）、Indole（-）、H<sub>2</sub>S（-）、IPA（-）則為疑似痢疾桿菌。（生化反應判定請參照附錄 15.4）。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 118 頁/共 1078 頁

痢疾桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

10.2.2.2 Oxidase test (氧化酶試驗)：挑選 TSA 培養基上菌落進行試驗，痢疾桿菌反應為陰性。

10.2.2.3 API 20 E 生化鑑定套組試驗。  
依照本署「API 20 E (腸道菌屬及革蘭氏陰性桿菌)細菌鑑定法」檢驗標準方法(編號：B-52-2006-1.0)。

10.2.3 血清凝集反應：

10.2.3.1 以痢疾桿菌 A-D 混合型多價血清作玻片凝集反應。

10.2.3.2 若多價血清為陽性，且無菌生理食鹽水為陰性反應，再以相對應之次因子血清作玻片凝集反應以決定其型別。

## 11 結果判定

11.1 結果判定標準：

菌落型態、Oxidase 反應陰性、生化反應、血清凝集反應皆符合，即生化反應與血清型別結果一致，判定為痢疾桿菌陽性。若有一不符合者，即判定為陰性。

11.2 報告核發：痢疾桿菌陽性，痢疾桿菌陰性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於實驗室資訊系統，經 PI 核准報告後發佈。

## 12 品質管制

12.1 血清凝集鑑定之品質管制

12.1.1 應於有效期內使用，同一批號試劑，第一次使用時取一組進行試驗，之後每隔 6 個月再取一組進行試驗。

12.1.2 使用陽性反應標準菌株 *Shigella sonnei* ATCC 3564 (D 型)；陰性反應標準菌株 *E.coli* ATCC 25922，進行試驗。

12.1.3 試驗結果必須符合陽性反應及陰性反應，始可使用。  
全部的培養基及試劑應保存於 4 -6°C，並於有效期限內使用。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 善養寺浩等：腸管系病原菌之檢查法，醫學書院，第四版，1985。

14.2 坂崎利一編集：食水系感染症及細菌性食物中毒，中央法規出版社，2000，139 頁至 152 頁。


14.3 Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, J. B. Lippincott Company, 5<sup>th</sup> edition, 1997.

14.4 日本大阪府立公眾衛生研究所感染症檢查手冊，第 II 集，2001。

14.5 蔡文城 (2000 年)：實用臨床微生物診斷學，第 9 版，台北市，九州圖書文物有限公司，第 717 頁至第 720 頁。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 119 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 15 附錄

15.1 痢疾桿菌分離與鑑定流程圖

15.2 痢疾桿菌分離與鑑定紀錄表

15.3 痢疾桿菌（A-D 血清型）簡單抗原構造表

15.4 生化反應判定表

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

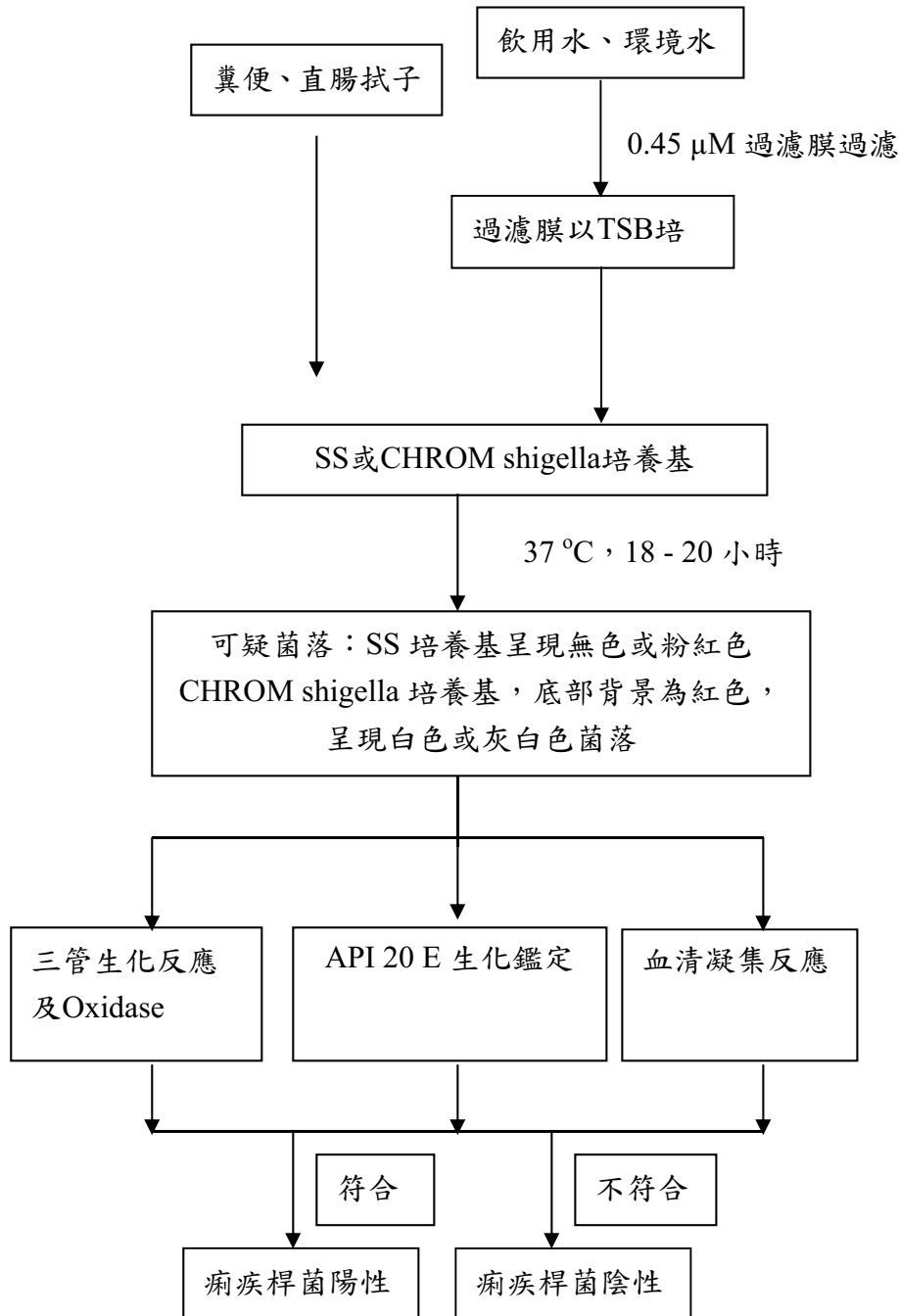
頁次：第 120 頁/共 1078 頁

痢疾桿菌分離與鑑定


核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 痢疾桿菌分離與鑑定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 121 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 痢疾桿菌分離與鑑定紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

### 痢疾桿菌分離與鑑定紀錄表


頁數：第 頁/共 頁

檢體編號											
收件日期											
檢驗日期											
檢體採檢運送狀況適當		是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
SS 培養基生長型態：無色或粉紅色稍混濁菌落 CHROM shigella 培養基生長型態：白色或灰白色菌落	培養/觀察	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
	18-20 小時										
Oxidase test：陽性藍色或藍紫色，陰性不變色		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
生化三管（名稱及反應）：		符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合
TSIA (K/A, GAS-,H2S-)											
LIA (K/A)											
SIM (H2S-, Indole-, Motility-, IPA-)											
血清凝集試驗：		凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無
A 亞群抗血清，多價											
因子血清：型血清 ( ) 型											
B 亞群抗血清，多價											
因子血清：型血清 ( ) 型											
因子血清：群血清 ( ) 群，											
C 亞群抗血清，多價											
因子血清型血清 ( ) 型											
D 亞群抗血清，多價											
因子血清：相血清 ( ) 相											
API 20 E											
附註											
綜合結果											
報告日期											

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 122 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日


## 附錄 15.3 痢疾桿菌 (A、C 與 D 血清型) 簡單抗原構造表

血清型	型
A (多價)	1-7
A1 (多價)	8-12
C (多價)	1-7
C1 (多價)	8-11
C2 (多價)	12-15
C3 (多價)	16-18
D (多價)	I-II 項

## 痢疾桿菌 (B 血清型) 簡單抗原構造表

血清型	亞型	型抗原	群抗原
1	1a	I	4
	1b	I	6
2	2a	II	3, 4
	2b	II	7, 8
3	3a	III	6, 7, 8
	3b	III	3, 4, 6
4	4a	IV	3, 4
	4b	IV	6
5	5a	V	3, 4
	5b	V	7, 8
6	—	VI	—
X	—	—	7, 8
Y	—	—	3, 4

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 123 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.4 生化反應判定表

試驗		正反應	負反應
TSIA	AS	黃色(斜面酸化)。指利用 Lactose 及 Sucrose 之能力。	紅色或不變色。指不利用 Lactose。
	AB	黃色(基底酸化)或黑色(由於產硫化氫將黃色掩蓋)。指利用 Glucose 之能力。	紅色或不變色。指不利用 Glucose。
	Gas	任何氣泡產生,指產生 CO <sub>2</sub> 及 H <sub>2</sub> 之能力。	無任何氣泡產生。
	H <sub>2</sub> S	產生黑色沉澱。	無黑色沉澱。
LIA		全管為紫色	Slant: 紫; But: 黃
SIM	IND	加入 Kovacs indole 試劑 5 滴後,培養基上層呈紅色。	不呈紅色(呈銅色)
	MOT	細菌生長遠離接種線,培養基呈混濁。	只生長於接種線上。
	IPA	培養基出現棕褐色環。	不出現棕褐色環。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 124 頁/共 1078 頁

痢疾阿米巴檢測(鏡檢法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

建立以汞-碘-甲醛液染色，離心沉澱處理之糞便檢體，於顯微鏡下鑑別形態。應用於疑似阿米巴性痢疾患者及個案接觸者之初步篩檢，最後確認需以分子生物學檢驗法判定。

## 2 適用檢體種類

腸內寄生蟲之檢驗適用。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

本法具固定、染色、濃縮之功能，除了檢查痢疾阿米巴（囊體及活動體）外，亦可同時檢查其他腸道原蟲（囊體及活動體）及蠕蟲（卵和幼蟲）。MIF 溶液中之甲醛、丙酮及酒精可固定原蟲之形態，碘及伊紅可將原蟲之核、類染色體等構造染色，Merthiolate 具防腐作用、可抑制細菌生長，伊紅可將背景染成紅色以利觀察。

## 5 試劑耗材

5.1 MIF 染劑已商品化，可直接購買使用。

含魯氏碘液（Lugol's iodine solution）470ml x2 及 MF 儲存液 60 mlx2

5.2 每一批 MIF 染劑在購買後，均應測試最佳染色時間，並做成紀錄存查。

5.3 帶蓋塑膠標本盒

5.4 竹棒

5.5 紗布、不銹鋼濾網或鐵絲網

5.6 漏斗

5.7 10 mL 尖底離心管

5.8 醋酸乙酯（或乙醚）

5.9 塑膠滴管

5.10 載玻片

5.11 蓋玻片

## 6 儀器設備

6.1 低速離心機。

6.2 光學顯微鏡：10X 目鏡（加裝接目測微尺）搭配 10X、40X 與 100X 物鏡。

6.3 目鏡測微尺

## 7 環境設施安全

7.1 操作處理醋酸乙酯（或乙醚）之步驟需在抽風櫃中進行。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 125 頁/共 1078 頁

痢疾阿米巴檢測(鏡檢法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

10.1.1 以沾濕雙層紗布（或不銹鋼濾網、鐵絲網）之漏斗過濾 MIF 糞液。濾液以 10 mL 離心管承接，以 MIF 溶液補足至 7 mL。

10.1.2 離心管上需至少標示實驗室檢體編號及疾管署條碼 (Barcode)。

### 10.2 檢驗步驟

10.2.1 加入 0.5 -1 mL 醋酸乙酯，加蓋塞住管口，上下振盪 30 sec。

10.2.2 以 2000 rpm 離心 2 min，以竹棒沿管壁旋轉一圈鬆動糞層，倒掉上液，保留沉澱物約 0.5-1 mL，立即以大棉花棒擦拭管壁周圍。

10.2.3 以塑膠滴管吸取沉澱物一滴於標示實驗室檢體編號及疾管署條碼之載玻片上，蓋上蓋玻片，先在低倍物鏡（10X）下觀察整張玻片，如發現原蟲囊體或活動體時，再轉換高倍物鏡（40X）及油鏡檢查並以目鏡測微尺測量蟲體大小，記錄鏡檢結果。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

11.1.1 記錄所觀察的原蟲、蟲卵與蟲體之種別，原蟲需註明是囊體或活動體。（如附錄 15.2 *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* 之型態）

11.1.2 依據 1997 年 WHO 專家會議中決議：顯微鏡檢查如發現痢疾阿米巴之囊體及活動體，其檢驗結果應載明為「*E. histolytica*/*E. dispar*」或「疑似痢疾阿米巴」。

11.1.3 鏡檢結果為「疑似痢疾阿米巴」者，必須於 24 hr 內通報轄區衛生單位並於七日內重新採取三次（每天一次）之新鮮糞便檢體（至少拇指大小之量；勿加入任何固定液；4°C 保存）。每次採檢之檢體應在 24 hr 內冷藏送達疾病管制署進行 Real-time PCR 確認診斷。

11.1.4 經目鏡測微尺判定鏡檢結果，若為「疑似痢疾阿米巴」陽性，則原始檢體(MIF 糞便沉渣)須伴同送驗單移送疾病管制署複驗。

11.1.5 MIF 陽性檢體應依標示置於試管架上(或保存盒中)，放置於 4°C 冰箱至少保存 6 個月；陰性檢體則保存 1 個月。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 126 頁/共 1078 頁

痢疾阿米巴檢測(鏡檢法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 11.2 報告核發

於傳染病通報系統內輸入檢驗結果：在病原體檢驗方法項目中選擇糞便離心集卵法，在檢驗結果項目中輸入陰性或其他病原體或疑似痢疾阿米巴，最後於病原體大類中選擇蟲體之種別。若蟲體為原蟲則需於細類中選擇囊體、活動體或為混合感染。

## 11.3 結果登錄

將檢體之檢驗結果登錄於檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送報告簽署人審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

## 12 品質管制

### 12.1 MIF (自配品管檢體)

12.1.1 取尿沉渣約 0.6 c.c 當品管檢體

12.1.2 將 MIF 6ml 加入 0.6ml 尿沉渣細胞內(10:1)染色 3 分鐘

12.1.3 顯微鏡鏡檢，若細胞染上紅色即為染液品管通過。

12.2 操作前檢視魯氏碘液是否過期。

12.3 每季得至少一次針對檢體製作與檢驗加作陽性(糞便)及陰性(糞便)對照組盲測，以進行內部品管。

12.4 顯微鏡之接目鏡測微尺每年需校正一次。

12.5 每年校正離心機一次。

12.6 每次操作時應加以紀錄，並定期由寄生蟲實驗室負責人審閱。

12.7 每年進行三次 CAP 外部品管。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Brown HW, Neva FA. 1983. Basic clinical parasitology, 5<sup>th</sup> edition. Prentice-Hall International, London.

14.2 Sapero JJ, LawLess DK. 1953. The MIF stain-preservation technique for the identification of intestinal protozoa. Am J Trop Med Hyg 2: 613-619.

14.3 B Lagg W, Schloegel EL, Mansour NS, KhaLaf GI. 1955. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. Am J Trop Med Hyg 4: 23-28.

14.4 WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. 1997. Epidemiol. Bull. PAHO 18: 13-14.

## 15 附錄

15.1 痢疾阿米巴檢驗流程圖。

15.2 *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* 之型態



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

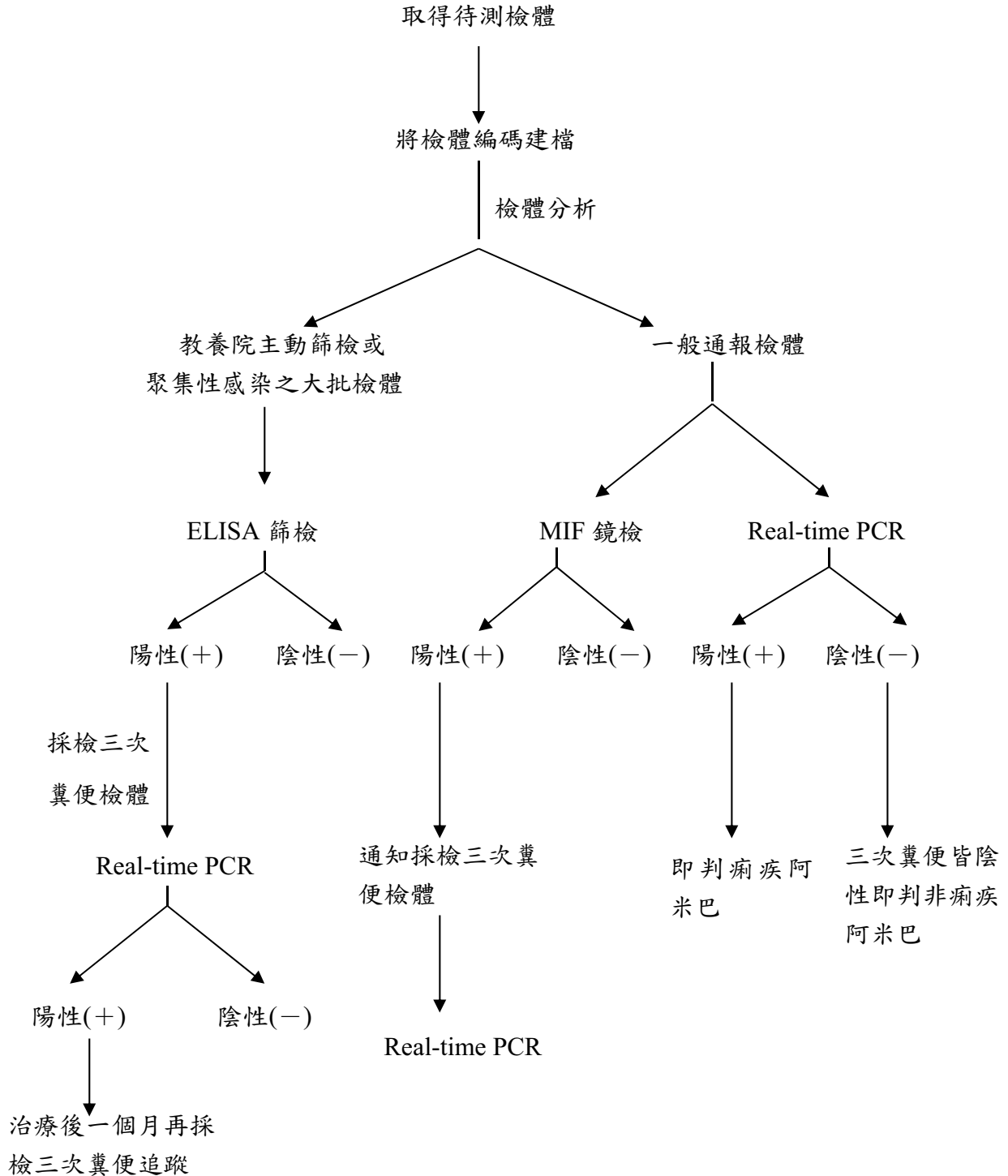


編號：  
頁次：第 127 頁/共 1078 頁

痢疾阿米巴檢測(鏡檢法)

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.1 痢疾阿米巴檢驗流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：  
頁次：第 128 頁/共 1078 頁

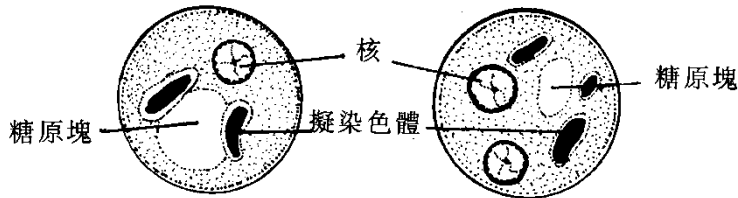
痢疾阿米巴檢測(鏡檢法)

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* 之型態

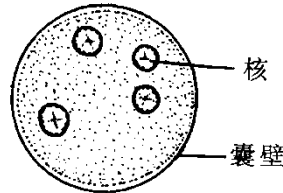
### 囊體(cyst)

1~4 個核，未成熟囊體 1~2 個核，通常 12-15  $\mu\text{m}$ 。核周染色值(PC)顆粒細緻，通常大小一致且分布均勻，核仁(KC)小，密實或分散的，通常居中，偶而偏心。類染色體呈長棒形，邊緣圓鈍。

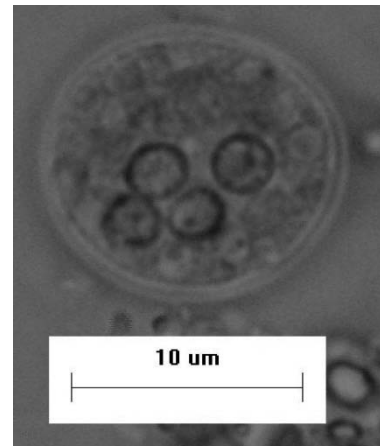


單核囊體

雙核囊體

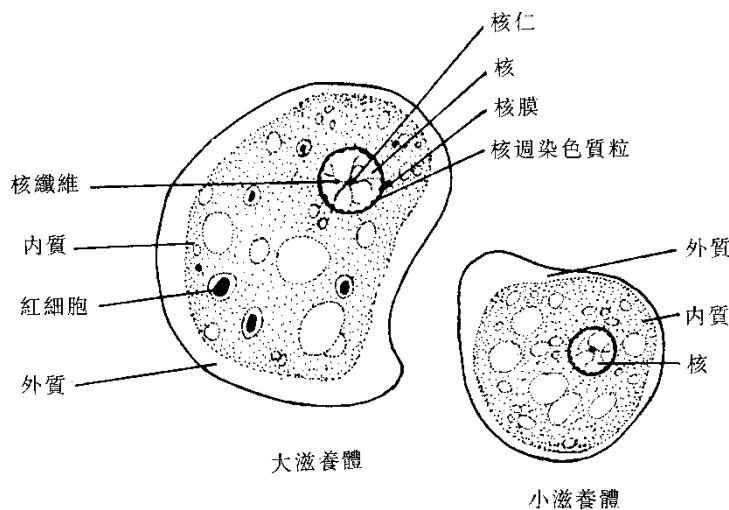


成熟囊體(4核)



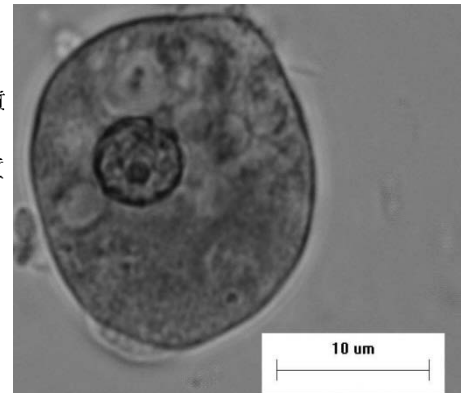
### 活動體(trophozoite)

1 個核，通常 20-30  $\mu\text{m}$ 。染色值(PC)顆粒細緻，通常大小一致且分布均勻，核仁(KC)小，密實或分散的，通常居中，偶而偏心。細胞質外觀呈細緻顆粒，內含細菌或 RBC。




大滋養體

小滋養體



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 129 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以痢疾阿米巴 Small subunit ribosomal RNA gene (SSU-rDNA) 為偵測標的，建立分子生物學確認檢驗方法，以利第二類法定傳染病阿米巴性痢疾個案確認及防疫工作之進行。

## 2 適用檢體種類

新鮮糞便、潰瘍組織刮除物及膿瘍抽出物。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

根據 GenBank 資料庫之 *E. histolytica* 和 *E. dispar* 的 SSU-rDNA 序列，其基因庫之索引號碼及其 DNA 序列長度分別是 *E. histolytica*：gi 9283/emb X56991 (長度 1947-bp)；*E. dispar*：gi 1212896/emb Z49256 (長度 1949-bp)，以 GCG 系統 (genetic computer group package) 進行比對而設計 PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶鏈鎖反應) 引子，設計為巢式 (nested) 暨兩階段式 (two step) 以增加敏感度，並利用引子 3' 端對兩者序列之選擇性粘合為原則，可同時對兩個種別進行鑑別，引子的特異性經由 BLAST 程式對 GenBank 資料庫進行搜尋比對及 PCR 產物直接定序而確認。

## 5 試劑耗材

5.1 檢體保存液：5.3M GIT (guanidine isothiocyanate)

5.2 1.5 mL 離心管

5.3 核酸萃取試劑組：MagNa pure LC DNA isolation Kkit III (Bacteria, Fungi)

5.3.1 清洗緩衝液 I (wash buffer I)

5.3.2 清洗緩衝液 II (wash Buffer II)

5.3.3 清洗緩衝液 III (wash buffer III)

5.3.4 溶解/吸附緩衝液 (lysis/binding buffer)

5.3.5 磁性玻璃微粒懸浮液 (magnetic glass particles (MGPs) suspension)

5.3.6 萃取緩衝液 (elution buffer)

5.4 核酸萃取器 (MagNa pure LC) 耗材

5.4.1 小試劑槽 (reagent tubs small)

5.4.2 中試劑槽 (reagent tubs medium M20)

5.4.3 大試劑槽 (reagent tubs large)

5.4.4 檢體槽 (sample cartridge)

5.4.5 反應槽 (processing cartridge)

5.4.6 吸管保存槽 (tip stand)

5.4.7 大微量吸管 (reaction tips large)

5.4.8 小微量吸管 (reaction tips small)

5.5 PCR 試劑

5.5.1 5 $\mu$ M Outer 1 primer (5'-GAA ATT CAG ATG TAC AAA GA-3')。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 130 頁/共 1078 頁

痢疾阿米巴糞便核酸檢測


(兩階段巢式 PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 5.5.2 5  $\mu$ M Outer 1R primer (5'- CAG AAT CCT AGA ATT TCA C-3')。
  - 5.5.3 10  $\mu$ M Eh 1 primer (5'- AAG CAT TGT TTC TAG ATC TG-3')。
  - 5.5.4 10  $\mu$ M Eh 2 primer (5'- CAC GTT AAA AGA GGT CTA AC-3')。
  - 5.5.5 10  $\mu$ M Ed1 primer(5'- AAA CAT TGT TTC TAA ATC CA-3')。
  - 5.5.6 10  $\mu$ M Ed2 primer (5'- ACC ACT TAC TAT CCC TAC C-3')。
  - 5.5.7 10X PCR buffer。
  - 5.5.8 2 mM dNTP (dGTP, dCTP, dTTP, dATP 2 mM each)。
  - 5.5.9 10X Dye (20 %[w/v] Sucrose, 1mM Cresol Red)。
  - 5.5.10 25 mM MgCl<sub>2</sub>。
  - 5.5.11 AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 units/ $\mu$ L)。
  - 5.5.12 5 mg/mL BSA。
  - 5.5.13 純水 (pure water)。
  - 5.6 電泳分析試劑
    - 5.6.1 洋菜膠 (Agarose)。
    - 5.6.2 1X TBE 電泳緩衝液：1X TBE (tris-borate-EDTA) buffer。
    - 5.6.3 DNA 分子量指標：100 bp Ladder marker。
    - 5.6.4 染色液：0.5  $\mu$ g/mL Ethidium bromide。
- 6 儀器設備
    - 6.1 控溫震盪加熱器。
    - 6.2 高速離心機。
    - 6.3 核酸萃取器：MagNA Pure LC。
    - 6.4 聚合酶鏈鎖反應器：96 孔 GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, CA, USA)。
    - 6.5 電泳槽 (Mupid II)。
    - 6.6 紫外線照相系統。
  - 7 環境設施安全  
無。
  - 8 檢體採集  
參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
  - 9 檢體運送及保存  
參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 131 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體 DNA 萃取：

- 10.1.1 將已處理之檢體，置於控溫震盪加熱器 95 °C 加熱 30 min。
- 10.1.2 冷卻至室溫，置於高速離心機以 14,000 rpm 離心 5 min。
- 10.1.3 移取 250  $\mu$ L 上清液至檢體槽 (sample cartridge)。
- 10.1.4 將檢體槽置入核酸萃取器 (MagNA pure LC) 進行 DNA 萃取。
- 10.1.5 檢體 DNA 最後溶於 100  $\mu$ L 萃取緩衝液 (elution buffer)。
- 10.1.6 移取檢體 DNA 至 1.5 mL 離心管，置於 4 °C 冰箱冷藏保存。

### 10.2 第一階段 PCR：

10.2.1 配置 PCR 反應混合液，每一檢體其反應包括以下成分：

PCR 試劑	體積( $\mu$ L)	濃度(總體積 25 $\mu$ L)
5 $\mu$ M Outer 1 primer	2.5	0.5 $\mu$ M
5 $\mu$ M Outer 1R primer	2.5	0.5 $\mu$ M
10X PCR buffer	2.5	1X
2 mM dNTP	2.5	200 $\mu$ M
10X Dye	2.5	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5 mM
AmpliTaq Gold(5 U/ $\mu$ L)	0.2	0.04 U/ $\mu$ L
5 mg/mL BSA	0.5	0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L
Pure water	7.8	
總體積	22.5	

- 10.2.2 分裝 22.5  $\mu$ L PCR 反應混合液至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管。
- 10.2.3 每一 PCR 反應管加入 2.5  $\mu$ L 檢體 DNA。
- 10.2.4 將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應器進行反應 (總體積 25  $\mu$ L)：


PCR 反應期	溫度(°C)	時間(分：秒)	循環數
酵素活化	95	10:00	1
DNA 解離	95	00:15	35
Primer 粘合	47	00:15	
聚合反應	72	01:00	
後聚合反應	72	06:00	1
停止反應	8	$\infty$	1

### 10.3 第二階段 PCR：

10.3.1 配置 PCR 反應混合液，每一檢體進行 A、B 兩次反應分別包括以下成分：

	A	B	
PCR 試劑	體積( $\mu$ L)	體積( $\mu$ L)	濃度(總體積 25 $\mu$ L)
10 $\mu$ M Eh1 primer	1.25	-	0.5 $\mu$ M
10 $\mu$ M Eh2 primer	1.25	-	0.5 $\mu$ M
10 $\mu$ M Ed1 primer	-	1.25	0.5 $\mu$ M
10 $\mu$ M Ed2 primer	-	1.25	0.5 $\mu$ M
10X PCR buffer	2.5	2.5	1X

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 132 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR)	修訂日期： 年 月 日

2 mM dNTP	2.5	2.5	200 μM
10X Dye	2.5	2.5	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5	1.5 mM
AmpliTaq Gold(5 U/μL)	0.2	0.2	0.04 U/μL
5 mg/mL BSA	0.5	0.5	0.1 μg/μL
Pure water	10.8	10.8	
總體積	23.0	23.0	

- 10.3.2 分裝 PCR 反應混合液 23.0 μL 至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管
- 10.3.3 每一 PCR 反應管加入 2.0 μL 第一階段 PCR 產物
- 10.3.4 將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應器進行反應（總體積 25 μL）：

PCR 反應期	溫度(°C)	時間(分：秒)	循環數
酵素活化	95	10:00	1
DNA 解離	95	00:15	45
Primer 粘合	52	00:15	
聚合反應	72	01:00	
後聚合反應	72	06:00	1
停止反應	8	∞	1

- 10.4 PCR 產物電泳分析：
- 10.4.1 配製 2% 洋菜膠片（含 1X TBE 電泳緩衝液）。
- 10.4.2 電泳分析：將第二階段 PCR 反應 A 及 B 管等量混合，取 10 μL 置於膠片孔洞，與 2.5 μL 100 bp ladder marker 一併於 100 伏特電壓下（1X TBE 電泳緩衝液），電泳 30 min。
- 10.4.3 膠片染色：將洋菜膠片置於 0.5 μg/mL ethidium bromide 染色 10 min，繼以蒸餾水脫色 10 min。
- 10.4.4 將膠片置於紫外線照相系統，擷取圖片，記錄結果。

## 11 結果判定


### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 以第二階段 PCR 反應 (A + B) 產物長度與 DNA 分子量指標比較判讀後，鑑別阿米巴種別。
- 11.1.2 *E. histolytica* 陽性：447 bp。
- 11.1.3 *E. dispar* 陽性：603 bp。
- 11.1.4 *E. histolytica* 及 *E. dispar* 陽性：447 bp 及 603 bp。（附錄 15.2）
- 11.2 報告核發：於傳染病通報系統內輸入檢驗結果：在病原體檢驗方法項目中選擇，聚合酶鏈鎖反應，在檢驗結果項目中輸入陽性 (*E. histolytica*) 或其他病原體 (*E. dispar*) 或陰性（未分離到病原體）。
- 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送報告簽署人審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

## 12 品質管制

- 12.1 每次操作應包含陽性及陰性對照檢體。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 133 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR)	修訂日期： 年 月 日

12.2 陽性對照檢體：新鮮正常人糞便與 *E. histolytica* ATCC 蟲株 (HM-1: IMSS) 100 - 1,000 個細胞混合製成。

12.3 陰性對照：純水。

12.4 每次操作時加以記錄，並定期由寄生蟲實驗室主管審閱。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Anonymous. 1997a. *Entamoeba* taxonomy. Bull WHO 75: 291-292.

14.2 Anonymous. 1997b. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Epidemiological Bull PAHO 18: 13-14.

14.3 Deng HY, Hsiao WH. 2005. Epidemiological study of amebiasis and strain analysis of pathogenic amoeba in an education and nursing institute for the mentally-handicapped in Taiwan. Epidemiol Bull 21: 1-22.


14.4 Hung CC, Deng HY, Hsiao WH, Hsieh SM, Hsiao CF, Chen MY, Chang SC, Su KE. 2005. Invasive amebiasis as an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. Arch Intern Med 165: 409-415.

## 15 附錄

15.1 痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗所用引子之序列。

15.2 *E. histolytica* 與 *E. dispar* 在巢式聚合酶鏈鎖反應之結果。

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法


	編號：	痢疾阿米巴糞便核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 134 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR)	修訂日期： 年 月 日

### 附錄 15.1 痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗所用引子之序列

Category	Primer pairs(forward+reverse)	PCR product size
<i>Primers for Entamoeba histolytica/dispar</i> SSU-rDNA		
1 <sup>st</sup> step PCR	Outer1: 5'- GAA ATT CAG ATG TAC AAA GA -3' Outer1R : 5'- CAG AAT CCT AGA ATT TCA C -3'	823 bp
<i>Primers for Entamoeba histolytica/dispar</i> differentiation		
2 <sup>nd</sup> step PCR	EH1 : 5'- AAG CAT TGT TTC TAG ATC TG -3' EH2 : 5'- CAC GTT AAA AGA GGT CTA AC -3' ED1 : 5'- AAA CAT TGT TTC TAA ATC CA -3' ED2 : 5'- ACC ACT TAC TAT CCC TAC C -3'	447 bp  603 bp

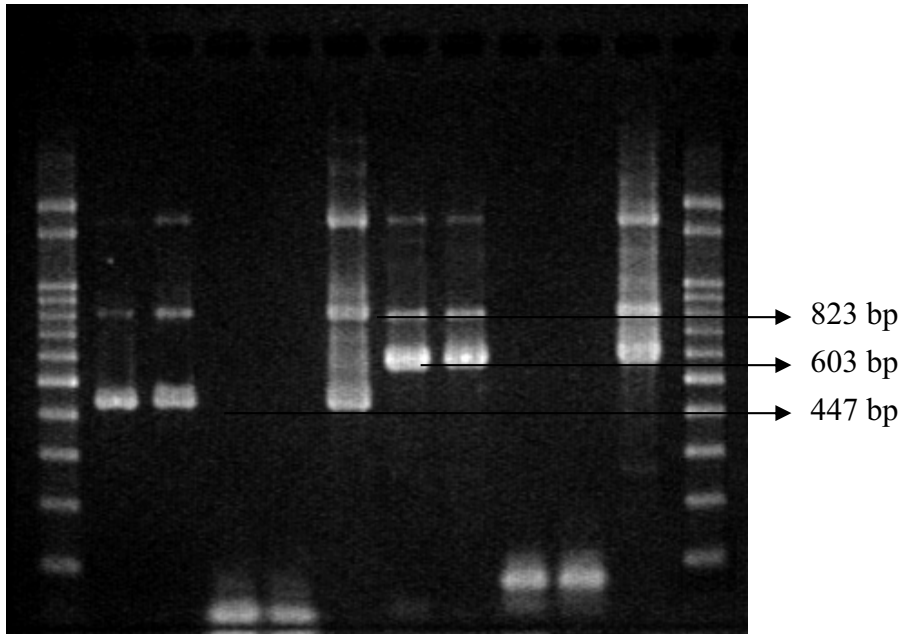


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 135 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR)	修訂日期： 年 月 日


附錄 15.2 *E. histolytica* 與 *E. dispar* 在巢式聚合酶鏈鎖反應之結果

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



Lane M：100 bp Marker；Lane 1-5 使用 Eh1/Eh2 primer，Lane 1 與 2 是檢體中 *E. histolytica* SSU-rDNA 之 447 bp 的增幅基因片段；Lane 6-10 使用 Ed1/Ed2 primer，Lane 6 與 7 是檢體中 *E. dispar* SSU-rDNA 之 603 bp 的增幅基因片段；Lane 3、8 是 GuSCN 陰性對照（進行檢體 DNA 抽取時，另取 250  $\mu$ L 5.35 M GuSCN 進行同步 DNA 及 PCR 反應）；Lane 4、9 是無菌水陰性對照（以 2.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 取代 DNA template 進行兩階段之 PCR 反應）；Lane 5、10 是陽性糞便對照（將 *E. histolytica* cells 與 *E. dispar* cells 加入 0.5 g 糞便後進行同步 DNA 抽取及 PCR 反應）。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便抗原	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 136 頁/共 1078 頁	(酵素免疫篩檢法)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

建立痢疾阿米巴高危險群之大量篩檢方法，協助痢疾阿米巴防治工作。  
本方法不建議作為最後確認診斷之用途。

## 2 適用檢體種類

直腸拭子，新鮮、冷藏或冷凍糞便。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

以固相酵素免疫分析法，偵測糞便中痢疾阿米巴特異抗原 (EHSA) 之存在。稀釋後之糞便檢體，加入已吸附 anti-EHSA 抗體之微量分析孔盤。若糞便中有 EHSA 抗原存在，則會被孔盤上之 Anti-EHSA 抗體捕捉。隨後加入標幟有 Horseradish peroxidase 酵素的 Anti-EHSA 抗體，最後加入受質，受質經酵素催化會呈現黃色。

## 5 試劑耗材

- 5.1 96 孔 Microplate (微量分析盤)：每孔附著 Anti-EHSA 抗體。
- 5.2 Enzyme conjugate (偶合酵素、綠瓶)：1 瓶 (25 mL)。
- 5.3 Positive control (陽性對照)：1 瓶 (4 mL)。
- 5.4 Negative control (陰性對照)：1 瓶 (25 mL)。
- 5.5 Specimen dilution Buffer (檢體稀釋液)：1 瓶 (110 mL)，含 Thimerosal。
- 5.6 Wash buffer (10X 清洗液)：1 瓶 (110 mL)，含 Thimerosal。
- 5.7 Color substrate (呈色受質)：1 瓶 (25 mL)。
- 5.8 Stop solution 反應終止液 (corrosive)：1 瓶 (6 mL)。
- 5.9 採檢棒 (無菌棉棒)。
- 5.10 採檢管 (17 × 100 mm)。
- 5.11 塑膠滴管 (1 mL)。
- 5.12 紙巾。
- 5.13 Cary Blair 運送培養基。
- 5.14 無菌生理食鹽水。

## 6 儀器設備

- 6.1 震盪器。
- 6.2 八爪微量分注吸管。

## 7 環境設施安全

- 7.1 部分試劑溶液含 Thimerosal，對皮膚、眼睛及黏膜具刺激性，不慎接觸時應以大量清水沖洗。
- 7.2 反應終止液具腐蝕性，特別小心。
- 7.3 呈色受質對光敏感。若已變色，應丟棄勿用。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

痢疾阿米巴糞便抗原

核准日期： 年 月 日

頁次：第 137 頁/共 1078 頁

(酵素免疫篩檢法)

修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體處理

10.1.1 直腸拭子或新鮮糞便檢體(成型便或軟便:將採檢棒完全覆蓋;水樣便:用三支採檢棒或取 300  $\mu$ L)置於採檢管。

10.1.2 每一採檢管加 0.5 - 1 mL Specimen dilution buffer, 稀釋倍數為 1:10。

10.1.3 震盪混合均勻。

10.1.4 稀釋後之檢體若暫不處理,可置室溫 8 hr 或冷藏達 48 hr。

10.2 試劑與檢體回溫至室溫。

10.3 以蒸餾水稀釋 Wash buffer (10X) 為 1X。

10.4 自鋁箔包中取出需要量之 Strip 或 Well, 置入 Strip well holder 中。未用之 Strip 或 Well 應重新密封好, 存放於冰箱。

10.5 分別取 4 滴 (200  $\mu$ L) Negative control、Positive control 各加入對應之孔中;取 6 滴 (200  $\mu$ L) 已稀釋之待測檢體, 加於孔中

10.6 室溫下靜置 60 min。(最後一個檢體加完後開始計時)

10.7 甩掉內容物, 以 1X Wash buffer (375 - 400  $\mu$ L/孔) 清洗孔 3 次, 可以將孔盤扣住紙巾以吸掉過多的 Wash buffer 但避免孔完全乾掉。

10.8 加 4 滴 (200  $\mu$ L) Enzyme conjugate (綠瓶)。

10.9 室溫下靜置 30 min。

10.10 甩掉內容物, 以 1X Wash buffer 清洗 孔 5 次。

10.11 加 4 滴 (200  $\mu$ L) 呈色受質。

10.12 室溫下靜置 10 min。

10.13 加 1 滴 (50  $\mu$ L) 反應終止液。輕輕敲擊 Strip well holder 邊緣混合至黃色均勻呈現。

10.14 於 10 min 內觀察呈色, 對照呈色判讀卡之顏色判讀結果。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準


11.1.1 目測: 以肉眼比較孔盤內及呈色判讀卡之顏色判讀。

11.1.2 陽性: 黃色 (> 1+)。

11.1.3 陰性: 無色。

11.1.4 篩檢結果為「陽性」者, 必須於 24 hr 內通報轄區衛生單位,

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便抗原	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 138 頁/共 1078 頁	(酵素免疫篩檢法)	修訂日期： 年 月 日

於七日內重新採取三次（每天一次）之新鮮糞便檢體（至少拇指大小之量、勿加任何固定液、4℃保存），併同送驗單，於每次採檢後 24 hr 內冷藏送至疾病管制署進行鑑別診斷。

11.2 報告核發：不適用。

11.3 結果登錄：不適用。

## 12 品質管制

12.1 操作前確認試劑在有效期限內。

12.2 每次操作應包含陽性及陰性對照檢體。

12.3 陽性對照：黃色（至少呈 2+）。

12.4 陰性對照：無色。

12.5 施測時若對照組呈色結果不符時，應檢視試劑、對照組及清洗步驟，並進行整組重測。

12.6 每次操作時應加以記錄，定期由寄生蟲實驗室主管審閱。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121℃，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 ProSpect® *Entamoeba histolytica* Microplate Assay 試劑組說明書。

14.2 Ong SJ, Cheng MY, Liu KH, Horng CB. 1996. Use of the ProSpect® microplate enzyme immunoassay for the detection of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* in faecal specimens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 248-249.

## 15 附錄

15.1 ProSpect® *Entamoeba histolytica* microplate assay procedure Card(簡易操作流程及呈色判讀卡)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：  
頁次：第 139 頁/共 1078 頁

痢疾阿米巴糞便抗原  
(酵素免疫篩檢法)

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日


## 附錄 15.1 簡易操作流程及呈色判讀卡

### ProSpec<sup>®</sup> *E. histolytica* Microplate Assay Procedure Card


Refer to Package Insert for complete explanation of procedure.

---

#### Specimen Preparation


**1.** 

Remove 100 µl stool (300 µl if dilute) from specimen container using swab or pipette.


**2.** 

Suspend stool in Specimen Dilution Buffer.

#### Test Procedure


**3.** 

Add 4 drops (200 µl) Negative Control, Positive Control, or diluted patient specimen into microplate wells.


**4.** 

Wash wells 3 times with Wash Buffer.

---


**5.** 

Add 4 drops (200 µl) Enzyme Conjugate.


**6.** 

Wash wells 5 times with Wash Buffer.

---

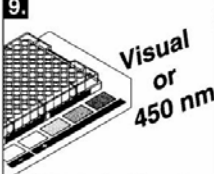
**7.** 

Add 4 drops (200 µl) Color Substrate to each well.

**8.** 

Add 1 drop (50 µl) Stop Solution to each well. Mix.

---

**9.** 

Read reactions visually, or on a spectrophotometer at 450 nm within 10 minutes.

4207-2

14000 Unity St. NW  
Ramsey, MN 55303

For customer and technical assistance,  
call (612) 323-7800 or in the U.S. call (800) 366-0096

---

### ProSpec<sup>®</sup> *E. histolytica* Microplate Assay Interpretation of Results

Refer to Package Insert for complete details.

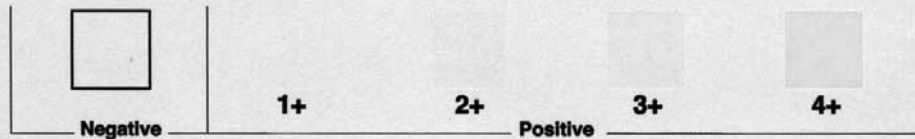
---

#### Visual

- Compare the color in each well with the color panels below.
- Read control results first. The intensity of color in the Positive Control should be  $\geq$  the 2+ color shown. The Negative Control should be colorless.
- Positive** tests develop color within the range shown below.  
**Negative** tests are colorless.

#### Spectrophotometer

- Read the Negative Control at 450 nm. The O.D. of the Negative Control should be  $\leq 0.100$ .
- Blank the reader on the Negative Control.
- Read the Positive Control. The O.D. of the Positive Control should be  $\geq 0.300$ .
- Read the test results:  
**Positive** tests have O.D. values  $\geq 0.050$ .  
**Negative** tests have O.D. values  $< 0.050$ .




4207-E

14000 Unity St. NW  
Ramsey, MN 55303

For customer and technical assistance,  
call (913) 888-0939 or in the U.S. call (800) 255-6730

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 140 頁/共 1078 頁	(即時 Real time PCR 法)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以分子生物學檢驗方法確認痢疾阿米巴原蟲(*Entamoeba histolytica*)感染並與迪斯帕阿米巴原蟲(*E. dispar*)區分,彌補兩者型態學無法以染色鏡檢區分的問題,以利第二類法定傳染病阿米巴性痢疾個案確認及防疫工作之進行。

## 2 適用檢體種類

新鮮糞便、潰瘍組織刮除物及膿瘍抽出物。

## 3 名詞解釋

Threshold cycle (Ct): 係指PCR產物複製的量,累積到足以被偵測到的第一個循環點稱之。換句話說,Ct的值越小,表示檢體中初始DNA的含量越多。

## 4 原理概述

根據GenBank 資料庫之*E. histolytica* 和*E. dispar* 的SSU-rDNA 序列,其基因庫之索引號碼及其DNA序列長度分別是*E. histolytica*: 110 bp (Genbank accession no: *E. histolytica*: X64142, X56991); *E. dispar*: 111 bp, (Genbank accession no: *E. dispar*: Z49256), 利用不同顏色的*E. histolytica*與*E. dispar*探針達成陽性檢體的區分。標記兩種螢光的DNA探針來偵測聚合酶鏈反應的產物。此DNA探針的5'端標記一報告染劑 (reporter dye), 3'端則標記一遮蔽染劑 (quencher dye), 完整的DNA探針其報告染劑所散發出的螢光會被遮蔽染劑所掩蓋。當聚合酶進行延伸反應 (extension phase) 時, 具有從5'端DNA切割活性的DNA聚合酶將探針切割, 使得5'端報告染劑與3'端遮蔽染劑分開, 遮蔽效應被破壞, 此時即可偵測到螢光反應。

## 5 試劑耗材

5.1 檢體保存液: 6M GIT(Guanidine isothiocyanate)

5.2 1.5mL 離心管

5.3 核酸萃取試劑組: MagNa Pure LC DNA Isolation Kit III(Bacteria, Fungi)

5.3.1 清洗緩衝液 I(Wash Buffer I)

5.3.2 清洗緩衝液 II(Wash Buffer II)

5.3.3 清洗緩衝液 III(Wash Buffer III)

5.3.4 溶解/吸附緩衝液(Lysis/Binding Buffer)

5.3.5 磁性玻璃微粒懸浮液 (Magnetic Glass Particles(MGPs) Suspension)

5.3.6 萃取緩衝液(Elution Buffer)

5.4 核酸萃取器 (MagNa Pure LC)耗材


5.4.1 小試劑槽 (Reagent Tubs small)

5.4.2 中試劑槽 (Reagent Tubs medium M20)

5.4.3 大試劑槽 (Reagent Tubs large)

5.4.4 檢體槽 (Sample Cartridge)


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 141 頁/共 1078 頁	(即時 Real time PCR 法)	修訂日期： 年 月 日

- 5.4.5 反應槽(Processing Cartridge)
- 5.4.6 吸管保存槽(Tip Stand)
- 5.4.7 大微量吸管(Reaction Tips large)
- 5.4.8 小微量吸管(Reaction Tips small)
- 5.5 Real-time PCR 試劑
  - 5.5.1 10 $\mu$ M EntaTaq-L (5'- GGACACATTTCAATTGTCCTA -3' )
  - 5.5.2 10 $\mu$ M EntaTaq-R (5'- CATCACAGACCTGTTATTGCTG -3')
  - 5.5.3 5 $\mu$ M EntaTaq1463H(5'-YAK-TGTAGTTATCTAATTTTCGGTTA GACC -3')
  - 5.5.4 5 $\mu$ M EntaTaq1465D(5'-FAM-TGTTAGTTATCTAATTTTCGATT AGAACTC-3')
  - 5.5.5 純水(Pure Water)
  - 5.5.6 Reaction Mix (LightCycler TaqMan Master kit)
- 5.6 Real-time PCR 儀器 LightCycler 所需之檢體毛細管
- 5.7 無菌 1.5 mL 微量離心管
- 5.8 無粉手套
- 6 儀器設備
  - 6.1 控溫震盪加熱器
  - 6.2 高速離心機
  - 6.3 全自動核酸萃取儀 ( MagNA pure 2.0 auto Nuclear acid extraction system )
  - 6.4 即時聚合酶鏈鎖反應器：LightCycler 2.0
  - 6.5 微量吸管 ( pipetmen )：10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L
  - 6.6 第 II 級生物安全櫃 ( class II BSC )
  - 6.7 冰箱：4  $^{\circ}$ C
  - 6.8 冷凍櫃：-20  $^{\circ}$ C
  - 6.9 高壓滅菌鍋
  - 6.10 即時核酸定量分析儀離心機(LightCycler centrifuge System)
- 7 環境設施安全
  - 7.1 病人檢體應在第 II 級生物安全櫃內處理。
  - 7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 ( BSL-2 ) 實驗室進行。
  - 7.3 應有獨立的操作空間，盡量與操作 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。
- 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 142 頁/共 1078 頁	(即時 Real time PCR 法)	修訂日期： 年 月 日

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtrecid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

- 10.1.1 實驗室於收到檢體及送驗單後，先行核對檢體種類、姓名、數量等資料正確與否，並依序登錄於紀錄簿。
- 10.1.2 將送來之糞便檢體刮取約一粒花生米大小的量，置入含有 2 mL 之 6M guanidine thiocyanate (GIT)小管中，稍微攪拌均勻。

### 10.2 步驟：

- 10.2.1 將已處理之檢體，置於控溫震盪加熱器 95°C 加熱 30 分鐘。
- 10.2.2 冷卻至室溫，置於高速離心機以 13,000 rpm 離心 3 分鐘。
- 10.2.3 移取 250µL 上清液至檢體槽(Sample Cartridge)。
- 10.2.4 將檢體槽置入核酸萃取器(MagNA Pure LC)進行 DNA 萃取。
- 10.2.5 檢體 DNA 最後溶於 100µL 萃取緩衝液(Elution Buffer)。
- 10.2.6 移取檢體 DNA 至 1.5mL 離心管，置於 4°C 冰箱冷藏保存。
- 10.2.7 Real-time PCR 製備試劑:
  - 10.2.7.1 製備 Primer
 

以 H<sub>2</sub>O 將 Primer 溶解，使其濃度為 100 µM，再以 H<sub>2</sub>O 將 Primer 稀釋到 10 µM。
  - 10.2.7.2 製備 Probe：
 

以 H<sub>2</sub>O 將 Probe 溶解，使其濃度為 20 µM，再以 H<sub>2</sub>O 將 Primer 稀釋到 5 µM。

### 10.2.8 PCR 反應混合液，每一檢體其反應包括以下成分：

PCR 試劑	體積(µL)	濃度(總體積 20µL)
10µM EntaTaq-L	2	1µM
10µM EntaTaq-R	2	1µM
5µM EntaTaq1463H	1	0.25µM
5µM EntaTaq1465D	1	0.25µM
Pure Water	5	
Reaction Mix	4	1X
總體積	15	

- 10.2.9 取 15 µL PCR mix 至 LightCycler capillary。
- 10.2.10 加入 DNA template 各 5 µL。
- 10.2.11 將各毛細管封上專用蓋子。
- 10.2.12 離心 700 × g，5 sec。
- 10.2.13 將毛細管放入檢體轉盤。
- 10.2.14 將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應器進行反應(總體積 20µL)：



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗

核准日期： 年 月 日

頁次：第 143 頁/共 1078 頁

(即時 Real time PCR 法)

修訂日期： 年 月 日

PCR 反應期	溫度(°C)	時間(分：秒)	循環數
酵素活化	95	7:00	1
DNA 解離	95	00:10	50
Primer 粘合	53	00:25	
聚合反應	72	00:02	
冷卻	40	00:30	1

10.2.15 用 Roche LightCycler 2.0，530nm 560nm 波長預設判讀，並擷取圖片，記錄結果。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

11.1.1 以 Roche LightCycler 2.0 放大曲線作比較判讀後，鑑別阿米巴種別。

11.1.2 *E. histolytica* 陽性：560 nm 有螢光曲線產生( $C_t$  值小於 39 cycles)，則可判定為陽性。

11.1.3 *E. dispar* 陽性：530 nm 有螢光曲線產生( $C_t$  值小於 39cycles)，則可判定為陽性。

11.1.4 *E. histolytica* 及 *E. dispar* 陽性：560 nm 及 530 nm 有螢光曲線產生( $C_t$  值小於 39 cycles)，則可判定為陽性。

11.2 報告核發：於傳染病通報系統內輸入檢驗結果：在病原體檢驗登入之檢驗方法項目中選擇螢光定量聚合酶連鎖反應(real-time PCR)，在檢驗結果項目中輸入陽性或陰性或其他病原體。最後在檢驗報告之綜合檢驗結果項目輸入陽性或陰性或已結案。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送報告簽署人審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

## 12 品質管制

12.1 每次進行實驗時皆有對照組，陽性對照組與陰性對照組的  $C_t$  值需符合設定值。

12.2 陽性對照檢體：新鮮正常人糞便與 *E. histolytica* ATCC 蟲株(HM-1: IMSS)100~1000 個細胞混合製成。

12.3 陰性對照：純水。

12.4 每次操作時加以紀錄並定期由寄生蟲實驗室室主管審閱。

12.5 實驗過程遵循 SOP 的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。


12.6 Pipettman 做定期的校正。

12.7 注意檢測套組的使用期限與適當的儲放溫度。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 144 頁/共 1078 頁	(即時 Real time PCR 法)	修訂日期： 年 月 日


## 14 參考資料

- 14.1 1997a. *Entamoeba* taxonomy. Bull. W.H.O. 75: 291-292.
- 14.2 2010. Evaluation of a new single-tube multiplex real-time PCR for the diagnosis of *E. histolytic* and *E. dispar*. Journal of Parasitology,
- 14.3 羅氏 LightCycler TaqMan Master kit 使用說明書 (Version 8)

## 15 附錄

- 15.1 痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗所用引子之序列
- 15.2 阿米巴病原體檢測 (real-time PCR) 流程圖

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 145 頁/共 1078 頁	(即時 Real time PCR 法)	修訂日期： 年 月 日

### 15.1 痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗所用引子之序列

Category	Primer pairs (forward+reverse)	PCR product size
Primers for <i>Entamoeba histolytica/dispar</i> SSU-rDNA		
Real-time PCR	EntaTaq-L : 5'- GGACACATTTCAATTGTCCTA -3' EntaTaq-R : 5'- CATCACAGACCTGTTATTGCTG -3'	110/1110 bp
Probes for <i>Entamoeba histolytica/dispar</i> differentiation		
2 <sup>nd</sup> step PCR	EntaTaq1463H : 5'- YAK-TGTAGTTATCTAATTTTCGGTTAGACC -3' EntaTaq1465D : 5'- FAM-TGTTAGTTATCTAATTTTCGATTAGAACTC -3'	

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

痢疾阿米巴分子生物學確認檢驗

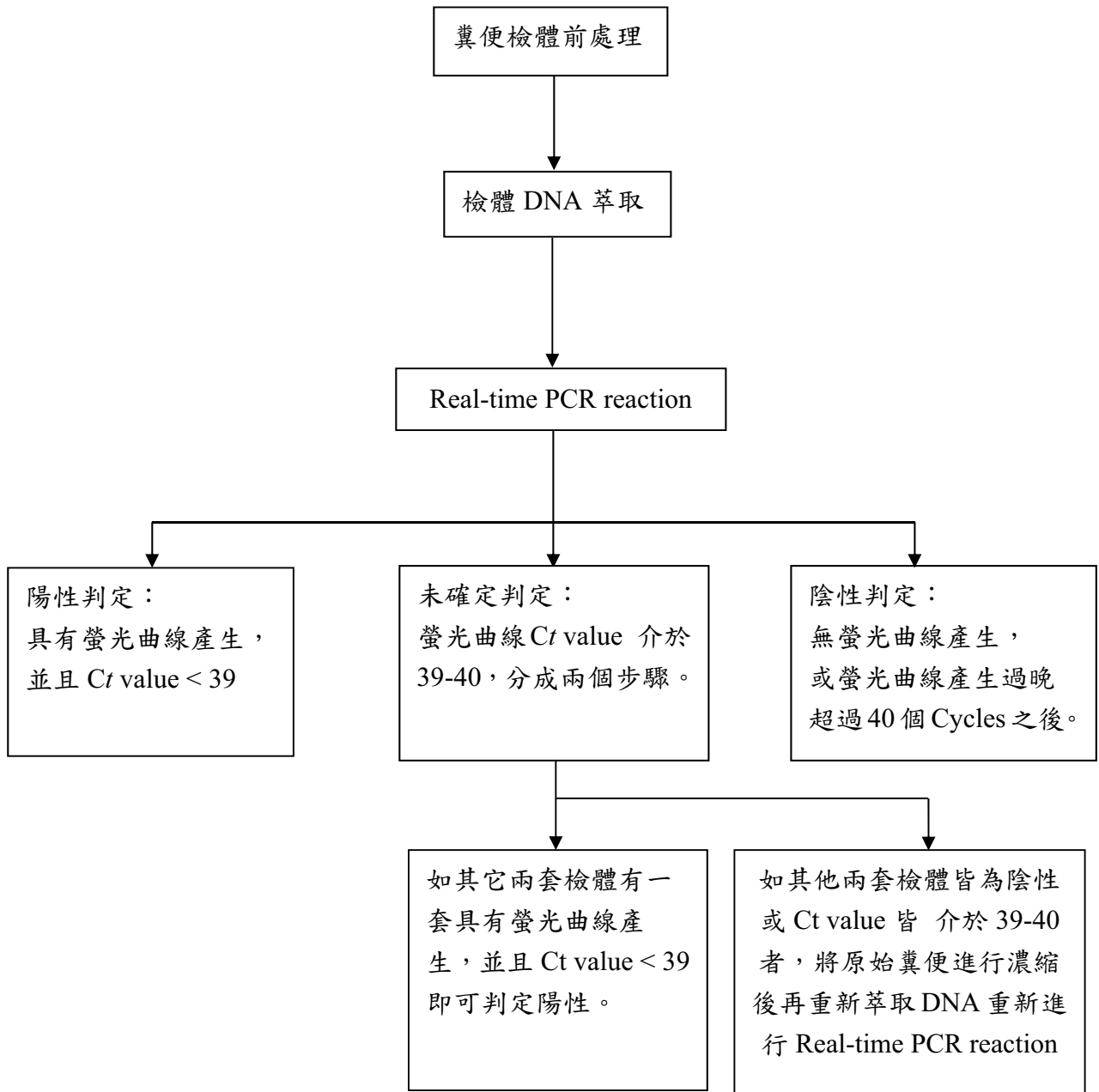
核准日期： 年 月 日

頁次：第 146 頁/共 1078 頁

(即時 Real time PCR 法)

修訂日期： 年 月 日

## 15.2 阿米巴病原體檢測 (real-time PCR) 流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 147 頁/共 1078 頁

小兒麻痺病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

腸病毒分離後，以微量中和試驗方法確認是否為小兒麻痺病毒。

## 2 適用檢體種類

適用於咽喉擦拭檢體、肛門擦拭檢體及人體糞便檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

許多病毒在組織培養的宿主細胞生長時會產生細胞病變，若於病毒培養時加入抗血清，而導致細胞病變現象消失，則表示血清中的專一性抗病毒抗體可中和病毒，藉此可鑑定出病毒種類。常用的三種病毒中和試驗包括：腸病毒中和試驗、疱疹病毒中和試驗及麻疹病毒中和試驗。

## 5 試劑耗材

- 5.1 I、II 混合型 Poliovirus antiserum (each 20 U/ 50  $\mu$ L)。
- 5.2 I、III 混合型 Poliovirus antiserum (each 20 U/ 50  $\mu$ L)。
- 5.3 II、III 混合型 Poliovirus antiserum (each 20 U/ 50  $\mu$ L)。
- 5.4 I、II、III 混合型 Poliovirus antiserum (each 20 U/ 50  $\mu$ L)。
- 5.5 DMEM。
- 5.6 平底 96 孔無菌 plate。
- 5.7 2 mL 的滅菌抗凍小瓶。
- 5.8 4 mL 的滅菌小瓶。
- 5.9 小兒麻痺病毒多價單株抗體 (Chemicon 3336) Polio Blend。
- 5.10 小兒麻痺病毒 I 型單株抗體 (Chemicon 3331) Polio I。
- 5.11 小兒麻痺病毒 II 型單株抗體 (Chemicon 3332) Polio II。
- 5.12 小兒麻痺病毒 III 型單株抗體 (Chemicon 3335) Polio III。
- 5.13 二級螢光抗體 (Chemicon 5008) goat anti-mouse IgG (FITC)。
- 5.14 MEM (high glucose)。
- 5.15 PBS。
- 5.16 胎牛血清 (FCS)。
- 5.17 Tween 20。
- 5.18 丙酮。
- 5.19 螢光玻片。
- 5.20 微量吸管尖 Tip：無菌，200  $\mu$ L。
- 5.21 細胞株：RD Cells (Rhabdomyosarcoma)、L20B Cells (mouse L-cells expressing the poliovirus receptor) 及 HEp-2C。
- 5.22 滅菌蒸餾水。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 148 頁/共 1078 頁

小兒麻痺病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 倒立顯微鏡。
- 6.2 螢光顯微鏡。
- 6.3 離心機。
- 6.4 36 °C CO<sub>2</sub> 培養箱。
- 6.5 分注器。
- 6.6 Vortex。
- 6.7 200 µL Pipetteman。
- 6.8 4 °C 冰箱
- 6.9 -20 °C 及 -80 °C 冷凍櫃。

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及儲存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢驗前處理

#### 10.1.1 檢體處理

10.1.1.1 糞便檢體以 PBS<sup>(+)</sup> 液調成 10 % 懸浮液，咽喉或肛門擦拭檢體，棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。於 4 °C，2,100 × g 離心 15 分鐘。

10.1.1.2 上清液移至耐氣仿的離心管，加 1/10 量冰冷氣仿，振盪混合 15 分鐘。

10.1.1.3 於 4 °C，2,100 × g 離心 15 分鐘，上清液盛於 2 支塑膠小瓶 (2 mL)，標示號碼及日期，保存於 -80 °C。

#### 10.1.2 細胞繼代：以 75 cm<sup>2</sup> 的培養瓶為例。

10.1.2.1 在生物安全櫃中，使用無菌器具，一次操作一種細胞株。

10.1.2.2 在顯微鏡下先觀察確認細胞形態正常，且沒有污染。

10.1.2.3 移除生長培養基。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 149 頁/共 1078 頁

小兒麻痺病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.1.2.4 加入 5 mL 的 PBS 清洗殘餘之生長培養基，清洗兩次。
- 10.1.2.5 加入 5 mL 的 0.25 % trypsin-EDTA (已事先在 37 °C 加溫) 作用 1 分鐘。
- 10.1.2.6 抽掉 trypsin-EDTA 並靜置 30 秒至 1 分鐘。
- 10.1.2.7 以 10 mL 生長培養基由下往上將細胞沖下。
- 10.1.2.8 計算細胞數。
- 10.1.2.9 稀釋細胞至適當濃度作接種與繼代。
- 10.1.2.10 每支培養管種 1 mL，每支 25T 培養瓶種 5 mL，每 75T 培養瓶種 10 mL，每 150T 培養瓶種 20 mL，瓶上標示細胞種類、代數及日期。
- 10.1.2.11 放入 36 °C、5 % CO<sub>2</sub> 保溫箱中培養。
- 10.1.2.12 填寫細胞繼代培養紀錄，備查。

## 10.2 檢驗步驟

### 10.2.1 接種

- 10.2.1.1 發育完成之 RD、HEp-2C 及 L20B 細胞更換成維持培養基。
- 10.2.1.2 每一檢體接種 6 支之培養細胞，RD、HEp-2C 及 L20B 各二支每支接種 0.2 mL。另取 2 支培養細胞各接種培養基 0.2 mL 做為對照。
- 10.2.1.3 置於 36 °C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱繼續培養。

### 10.2.2 觀察

- 10.2.2.1 由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態。
- 10.2.2.2 接種細胞呈顯著病變 (CPE 達三價) 時，進行間接螢光免疫法鑑定。
- 10.2.2.3 接種於細胞若觀察至第 7 天仍如無病變，則經凍結、解凍處理二次，收集細胞及培養液，於 4 °C，2,100 × g 離心 15 分鐘。取上清液再接種一次，觀察至第 7 天，若仍無細胞病變則判定為病毒分離陰性。

### 10.2.3 間接螢光免疫法鑑定 (以 Chemicon 例)

- 10.2.3.1 將 culture tube 以 4 °C，1,000 × g 離心 15 分鐘，上清液存於 2 mL 的塑膠小瓶。
- 10.2.3.2 經離心沉澱之細胞加入 0.5 mL 之 PBS，混合。
- 10.2.3.3 分別將各管細胞取 10 μL 加入玻片，待細胞風乾後置入 4 °C 丙酮之玻片槽中，固定 10 分鐘。
- 10.2.3.4 取出風乾後以 polio blend 一級抗體滴於每個孔 (每滴約 10 μL 左右)，將玻片置於 moisture chamber，置於 37 °C 恆溫培養箱 30 分鐘。
- 10.2.3.5 以 PBS-0.5 % Tween 20 溶液清洗玻片後風乾。
- 10.2.3.6 每個孔加二級螢光標幟抗體 (FITC、Goat anti-mouse IgG)。每滴約 10 μL 左右，將玻片置於 Moisture

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 150 頁/共 1078 頁

小兒麻痺病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

chamber，置於 36 °C 恆溫培養箱 30 min。

10.2.3.7 以 PBS-0.5 % Tween 20 溶液清洗玻片後風乾。

10.2.3.8 以 Mounting fluid 封片後，以螢光顯微鏡鏡檢。

10.2.3.9 小兒麻痺病毒經螢光抗體鑑定為陽性之檢體，則重複 10.2.3.3 步驟，各孔分別滴上 polio 1、polio 2、polio 3 之一級抗體，將玻片置於 Moisture chamber，置於 36 °C 恆溫培養箱 30 min。

10.2.3.10 重複 10.2.3.5 至 10.2.3.10 步驟，以鑑定分離株為 I、II、III 小兒麻痺病毒。

10.2.3.11 小兒麻痺病毒可與 Echo-4 交叉反應，經中和試驗可區分。

## 10.2.4 病毒血清中和試驗

10.2.4.1 陽性之病毒株 10 倍系列稀釋，由  $10^{-1}$  至  $10^{-9}$ ，攻擊病毒 CV1、CV2、CV3 分別為  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  當作 100 TCID<sub>50</sub>，接著為 back titration 的  $10^{-1}$  (10 TCID<sub>50</sub>)、 $10^{-2}$  (1 TCID<sub>50</sub>)、 $10^{-3}$  (0.1 TCID<sub>50</sub>)。

10.2.4.2 畫格線 96 孔盤的 1 - 12 行縱向分四等分，II、III 型 Poliovirus antiserum 3 個孔，其餘 I、III 型 Poliovirus antiserum，I、II 型 Poliovirus antiserum，I、II、III 型 Poliovirus antiserum 相同也是 3 個孔。A-H 8 列橫向每 3 列為一區，分別為 CV1、CV2、CV3 攻擊病毒。

10.2.4.3 對照組 Back titration 盤子規化，CV1、CV2、CV3、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  分別縱向作 8 個孔，如附錄 15.5。

10.2.4.4 96 孔平底盤，A 列橫向 1 - 3 孔各加 II、III 型，4 - 6 孔各加 I、III 型，7 - 9 孔各加 I、II 型，10 - 12 孔各加 I、II、III 混合型小兒麻痺病毒的抗血清 50 μL (各型 20 單位) ---縱向操作，如附錄 15.6。

10.2.4.5 A 列 (1 - 12 孔) 加入 CV1 攻擊病毒 50 μL，B 列 (1 - 12 孔) 加入 CV2 攻擊病毒 50 μL，C 列 (1 - 12 孔) 加入 CV3 攻擊病毒 50 μL，細胞對照組為 100 μL 的 DMEM - 2% FCS (維持培養基) 8 - 10 Well back titration：每個孔加入 50 μL 的 DMEM - 2% FCS，再縱向分別加入 CV1、CV2、CV3、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  濃度病毒，如附錄 15.6。


10.2.4.6 使其混合均勻，蓋上蓋子置 36 °C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱 1 hr。

10.2.4.7 每孔加入 100 μL RD 細胞懸浮液，置 36 °C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱。

10.2.4.8 於 3 - 4 天每天以倒立顯微鏡觀察 CPE，以判定型別。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 151 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

11.1.1 在對照細胞形態無異，而攻擊病毒量在 32–1,000 TCID<sub>50</sub> 下判讀結果。病毒型別之判定如下表。

判定(小兒麻痺病毒型別)	II、III 型 poliovirus antiserum	I、III 型 poliovirus antiserum	I、II 型 poliovirus antiserum	I、II、III 型 poliovirus antiserum
I 型	++++	—	—	—
II 型	—	++++	—	—
III 型	—	—	++++	—
I、II 型	++++	++++	—	—
I、III 型	++++	—	++++	—
II、III 型	—	++++	++++	—
I、II、III 型	++++	++++	++++	—
不是小兒麻痺病毒	++++	++++	++++	++++

11.1.2 若初次無法鑑定時再重複一次，一般檢體中含有 2–3 種 type 的 poliovirus 時，經過 2 次以上中和才能徹底分開。

11.2 報告核發：病原體分離、鑑定/陰性；病原體分離、鑑定/急性無力肢體麻痺/病毒型別/陽性。

11.3 結果登錄：結果登錄於急性無力肢體麻痺病例 (AFP) 檢體送驗單及實驗室資訊系統。

## 12 品質管制

12.1 細胞生長培養基依其所用細胞而異，RD 用 DMEM 加 10 % FCS，維持培養基 DMEM 加 2 % FCS，HEp-2C 用 EMEM 加 10 % FCS，維持培養基血清減為 2 %，L20B 用 EMEM 加 10 % FCS，維持培養基血清減為 2 %。

12.2 培養基用的胎牛血清 (FCS) 應事先測試，證明對小兒麻痺病毒沒有任何抑制作用。

12.3 操作者必須先測定自己的血清中和抗體，無抗體者應接種小兒麻痺疫苗，以防感染。

12.4 嚴防病原散佈或污染，工作時帶手套。

12.5 除離心及細胞冷凍，溶解步驟外，全程作業都要在第二級生物安全櫃 (class II BSC) 內進行。

12.6 操作中病毒務必保持於低溫。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 152 頁/共 1078 頁

小兒麻痺病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理：

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。


## 14 參考資料

- 14.1 Domok I, Magrath DI. 1979. Guide to poliovirus isolation and serological techniques for Poliomyelitis surveillance. WHO Offset Publication no. 46, pp. 26.
- 14.2 WHO, 1990. Manual for the virological investigation of poliomyelitis, World Health Organization, Geneva mimeographed document WHO/EPI-CDS/POLIO/90.1, pp.29-47.
- 14.3 Hsiung GD, Fong CKY, Landry ML. 1994. Hsiung's diagnostic virology: as illustrated by light and electron microscopy, 4<sup>th</sup> edition, Yale University Press, New Haven, NY, pp. 46-55.
- 14.4 WHO. 2004. Polio laboratory manual, 4<sup>th</sup> edition. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, World Health Organization, Geneva, pp.39-98.

## 15 附錄

- 15.1 Preparation of antiserum for poliovirus typing (stock)。
- 15.2 Poliovirus antiserum 單一型別稀釋法。
- 15.3 Poliovirus antiserum 混合型別稀釋法。
- 15.4 小兒麻痺病毒分離與鑑定流程圖。
- 15.5 Back titration 盤子圖。
- 15.6 小兒麻痺病毒中和試驗盤子圖。
- 15.7 細胞繼代紀錄表。
- 15.8 小兒麻痺病毒分離紀錄表。
- 15.9 小兒麻痺病毒感染價測定紀錄表。
- 15.10 小兒麻痺病毒感染價結果紀錄表。
- 15.11 小兒麻痺病毒鑑定對照組 (back titration) 紀錄表。
- 15.12 小兒麻痺病毒鑑定中和試驗 (neutralization) 紀錄表。
- 15.13 小兒麻痺病毒鑑定結果紀錄表。


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 153 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.1 Preparation of antiserum for poliovirus typing (stock) Aug. 9.1996

型別	批號	titer	bleeding
Type I	#R-7	4,000 U/ 0.05 mL	4/28/1967
Type II	#R-11	7,600 U/ 0.05 mL	4/25/1967
Type III	#R-20	14,000 U/ 0.05 mL	5/3/1967


## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 154 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

### 附錄 15.2 Poliovirus antiserum 單一型別稀釋法

型別	單位 /50 $\mu$ L	稀釋比	Antiserum	DMEM-2 % FCS
Tpye I #R7	40 U	1/99 (4,000/40)	0.1 mL	9.9 mL
	60 U	1/65.5 (4,000/60)	0.2 mL	13.12 mL
Tpye II #R-11	40 U	1/189	0.1 mL	18.9 mL
	60 U	1/125.6	0.1 mL	12.56 mL
Tpye III #R-20	40 U	1/349	0.05 mL	17.4 mL
	60 U	1/232	0.05 mL	11.6 mL

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 155 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

### 附錄 15.3 Poliovirus antiserum 混合型別稀釋法

混合型	配置 抗血清	用量	總量
Type II ,III	II ( 40 U ) , III ( 40 U )	各 5 mL	10 mL
Type I, III	I ( 40 U ) , III ( 40 U )	各 5 mL	10 mL
Type I, II	I ( 40 U ) , II ( 40 U )	各 5 mL	10 mL
Type I, II, III	I ( 60 U ) , II ( 60 U ) , III ( 60 U )	各 3.5 mL	10.5 mL

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

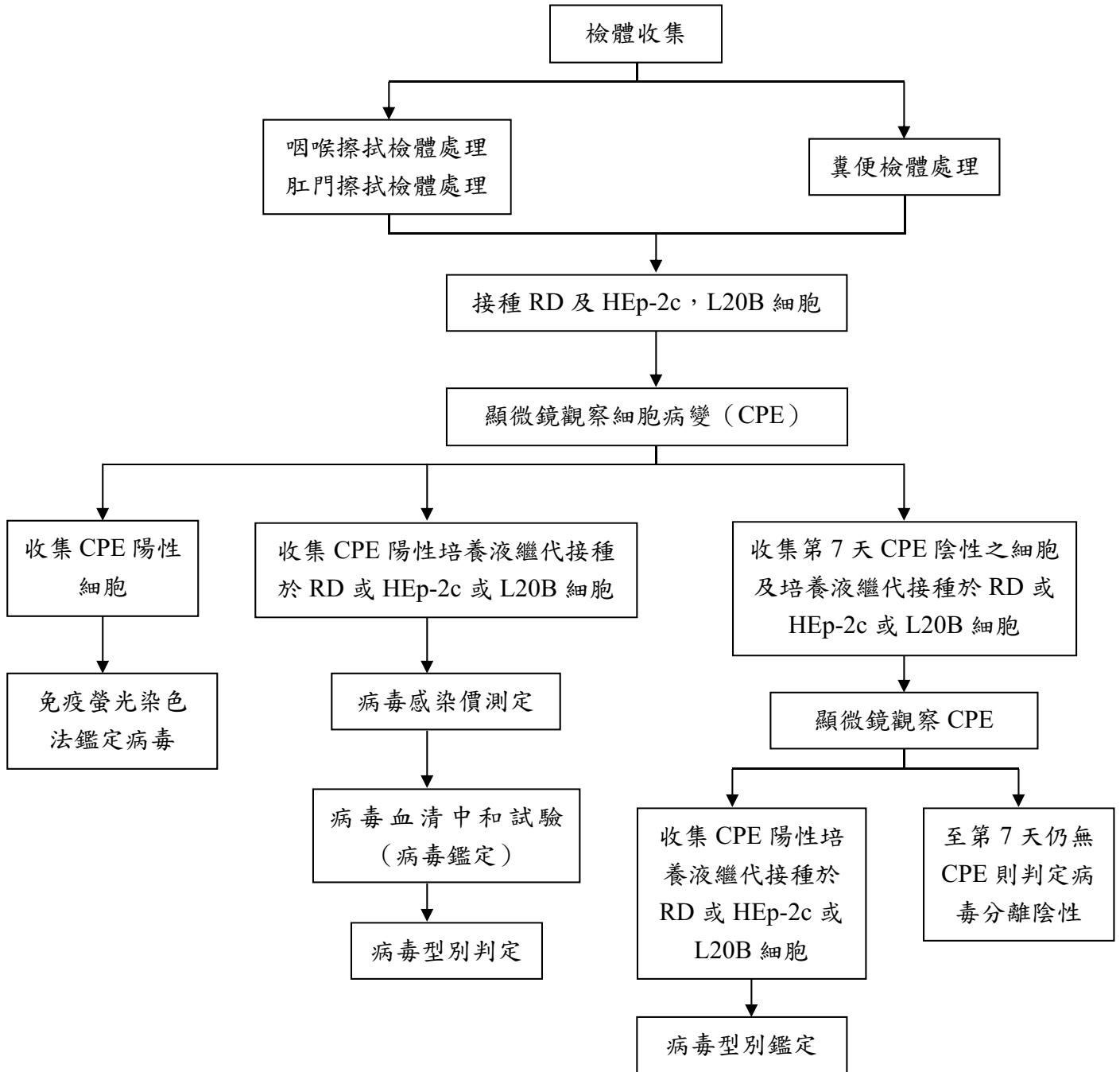


編號：  
頁次：第 156 頁/共 1078 頁


小兒麻痺病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

附錄15.4 小兒麻痺病毒分離與鑑定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 157 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.5 Back titration 盤子圖

(直列 8 個孔，50  $\mu$ L medium + 病毒 50  $\mu$ L + RD cell 100  $\mu$ L)

Back titration												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CV1	CV2	CV3	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$						
B	CV1	CV2	CV3	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$						
C	CV1	CV2	CV3	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$						
D	CV1	CV2	CV3	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$						
E	CV1	CV2	CV3	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$						
F	CV1	CV2	CV3	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$						
G	CV1	CV2	CV3	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$						
H	CV1	CV2	CV3	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$						





# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：  
頁次：第 159 頁/共 1078 頁

小兒麻痺病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.7 細胞繼代紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

頁數：第 頁/共 頁

### 細胞繼代紀錄表

Cell: _____	Transfer (CDC): _____		
Date: _____	Person in charge: _____		
Cell: Seeded on _____	Container: _____		
Medium: _____			
Appearance: _____			
PBS (-) : _____	Trypsin-EDTA Lot No: _____		
Medium at this transfer: _____			
Procedures:			
Discard old Growth Medium			
_____ Add the Tryp-EDTA mixture to monolayer			
_____ Trypsinization at RT Temperature for <u>   </u> min			
Remove the Tryp-EDTA, add _____ mL of fresh GM.			
Disperse cells by gentle pipetting			
Final cell numbers _____ /mL			
Above suspension of cells was seeded as follows:			
Flask no.	Container	Flask no.	Container
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____ Incubated at 36 °C CO <sub>2</sub> incubator			
Remarks:			

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：  
頁次：第 160 頁/共 1078 頁

小兒麻痺病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.8 小兒麻痺病毒分離紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

頁數：第 頁/共 頁

### 小兒麻痺病毒分離紀錄表

Date : Exp. :	Date : Exp. :														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">1</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">2</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">3</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">4</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">5</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">6</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">7</td> </tr> </table>	1	2	3	4	5	6	7	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">1</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">2</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">3</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">4</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">5</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">6</td> <td style="width: 12.5%; text-align: center;">7</td> </tr> </table>	1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7									
1	2	3	4	5	6	7									
Cell: GM: M.M:	Generation:														

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：  
頁次：第 161 頁/共 1078 頁

小兒麻痺病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

## 附錄15.9 小兒麻痺病毒感染價測定紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

頁數：第 頁/共 頁


### 小兒麻痺病毒感染價測定紀錄表

Date : Exp. :								Date : Exp. :																																							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">6</td> <td style="text-align: center;">7</td> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> </table>																1	2	3	4	5	6	7	8	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">6</td> <td style="text-align: center;">7</td> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> </table>																1	2	3	4	5	6	7	8
1	2	3	4	5	6	7	8																																								
1	2	3	4	5	6	7	8																																								
10	1							10	1																																						
	2								2																																						
	3								3																																						
	4								4																																						
	5								5																																						
	6								6																																						
	7								7																																						
	8								8																																						
	9								9																																						
	10								10																																						
10	1							10	1																																						
	2								2																																						
	3								3																																						
	4								4																																						
	5								5																																						
	6								6																																						
	7								7																																						
	8								8																																						
	9								9																																						
	10								10																																						
10	1							CC	1																																						
	2								2																																						
	3								3																																						
	4								4																																						
	5								5																																						
	6								6																																						
	7								7																																						
	8								8																																						
	9								9																																						
	10								10																																						
Cell:	Generation:																																														
G.M:																																															
M.M:																																															

檢驗者：

實驗室主管：

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 162 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.10 小兒麻痺病毒感染價結果紀錄表

### 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 小兒麻痺病毒感染價結果紀錄表

頁數：第    頁/共    頁

Strain code no.	Test no.	Dilution	Results of titration	Remarks

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：  
頁次：第 163 頁/共 1078 頁

小兒麻痺病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

附錄 15.11 小兒麻痺病毒鑑定對照組 (back titration) 紀錄表

## 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 小兒麻痺病毒鑑定對照組紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

Date : / /										Date :											
Exp. : back titration of										Exp. :											
/ / / / / / / /										/ / / / / / / /											
1 2 3 4 5 6 7										1 2 3 4 5 6 7											
Back titration of	CV 1	1									10 <sup>-2</sup>	1									
		2										2									
		3										3									
		4										4									
		5										5									
		6										6									
		7										7									
		8										8									
	CV 2	1									10 <sup>-3</sup>	1									
		2										2									
		3										3									
		4										4									
		5										5									
		6										6									
		7										7									
		8										8									
	CV 3	1									CC	1									
		2										2									
		3										3									
		4										4									
		5										5									
		6										6									
		7										7									
		8										8									
	10 <sup>-1</sup>	1																			
		2																			
		3																			
		4																			
		5																			
		6																			
		7																			
		8																			


Cell : RD      Generation : N+      Culture : day0  
G. M. :  
D. M. :  
Inoculum : 50ul/well      Absorption :

Cell :      Generation :      Culture :  
G. M. :  
D. M. :  
Inoculum :      Absorption :

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 164 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.12 小兒麻痺病毒鑑定中和試驗 (neutralization) 紀錄表

## 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 小兒麻痺病毒鑑定中和試驗紀錄表


頁數：第 頁/共 頁

Date : Exp. : neutralization with trivalent poliovirus antiserum									Date : Exp. :																																												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">3</td><td style="text-align: center;">4</td><td style="text-align: center;">5</td><td style="text-align: center;">6</td><td style="text-align: center;">7</td><td style="text-align: center;">8</td><td style="text-align: center;">9</td> </tr> </table>																		1	2	3	4	5	6	7	8	9	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">3</td><td style="text-align: center;">4</td><td style="text-align: center;">5</td><td style="text-align: center;">6</td><td style="text-align: center;">7</td><td style="text-align: center;">8</td><td style="text-align: center;">9</td> </tr> </table>																		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2	3	4	5	6	7	8	9																																													
1	2	3	4	5	6	7	8	9																																													
CV1	II, III	1																																																			
		2																																																			
		3																																																			
	I III	1																																																			
		2																																																			
		3																																																			
	I II	1																																																			
		2																																																			
		3																																																			
CV2	II, III	1																																																			
		2																																																			
		3																																																			
	I III	1																																																			
		2																																																			
		3																																																			
	I II	1																																																			
		2																																																			
		3																																																			
CV3	II, III	1																																																			
		2																																																			
		3																																																			
	I III	1																																																			
		2																																																			
		3																																																			
	I II	1																																																			
		2																																																			
		3																																																			
Cell:RD      Generation:N+      Culture:day 0									Cell:RD      Generation:N+      Culture:day 0																																												
GM:									GM:																																												
M.M:									M.M:																																												
Inoculum : 50ul/well									Absorption : 1 hr																																												

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 165 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄15.13 小兒麻痺病毒鑑定結果紀錄表

## 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 小兒麻痺病毒鑑定結果紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

Strain code no.	Test no.	TCID of challenge virus	Results of identification	Remarks

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 166 頁/共 1078 頁

瘧原蟲檢測（鏡檢法）

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

藉由血片之製作、染色及顯微鏡檢查進行瘧原蟲檢測，進一步鑑別四種感染人類之瘧原蟲種類及型別，協助確認瘧疾病例，以利防治工作之進行。

## 2 適用檢體種類

新鮮或添加抗凝血劑的血液。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

以 Giemsa 染色法將血球及瘧原蟲染色，在顯微鏡下觀察其形態，並加以辨識。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

#### 5.1.1 Giemsa 原液：

5.1.1.1 Giemsa 粉末（azure B type）3.0 g。

5.1.1.2 以甘油（glycerol）250 mL 加溫溶解（約 60 °C）。

5.1.1.3 再添加甲醇 250 mL（60 °C）。

5.1.1.4 放置 24 hr 後以濾紙濾去雜質，即製成原液，存放於棕色瓶內。

5.1.1.5 Giemsa 原液已商品化，可直接購買使用。

5.1.1.6 每一批 Giemsa 原液在配製完成後，均應測試最佳染色時間，並做成紀錄存查。

### 5.2 耗材

5.2.1 載玻片：先以酒精除去油污。

5.2.2 油鏡油：使用 100 倍物鏡觀察時，可避免光線因折射而減弱。

5.2.3 鏡頭清潔劑：檢驗完畢後，用以溶解掉物鏡與載玻片上之油鏡油。使用乙醚（ether）與 95 % 酒精以 7：3 的比例配製而成。

5.2.4 拭鏡紙：檢驗完畢後，用於擦拭物鏡。

5.2.5 採血針：須消毒完善，每支限用一人。

5.2.6 脫脂棉花。

5.2.7 70 % 酒精：用於採血前皮膚消毒。

5.2.8 血片保存盒。

## 6 儀器設備


6.1 顯微鏡：雙眼光學顯微鏡具 10 X 之目鏡及 100 X 之物鏡。

## 7 環境設施安全

無。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	瘧原蟲檢測（鏡檢法）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 167 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

10.1.1 將檢體分裝於冷凍保存管，以冷凍標籤依序標示

### 10.2 步驟

#### 10.2.1 Giesma 染色法

10.2.1.1 配製染色液：5 %之 Giemsa 染色液，即以 19 mL 磷酸緩衝液加入 1 mL Giemsa 原液，新鮮配製。

10.2.1.2 染色：以 5 %之 Giemsa 染色液覆滿於載玻片，染色約 40 - 50 min。

10.2.1.3 水洗：將玻片保持平衡，自來水由一端慢慢注入，使染色液漂出玻片外，水洗後將玻片斜立使其自然乾燥。

10.2.1.4 磷酸緩衝液之 pH 以 7.0 - 7.2 最適宜。

10.2.1.5 磷酸緩衝液 (phosphate buffer, 6.7 mM, pH 7.1): 0.41g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

10.2.1.6 0.65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

10.2.1.7 Bring to 1 L and pH 7.1

10.2.1.8 顯微鏡檢驗：使用光學顯微鏡 1,000 倍油鏡鏡檢，薄片檢視至少 300 個視野，每個血片約檢視 5 - 10 min，厚片則全範圍檢視。

10.2.1.9 記錄鏡檢結果。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

11.1.1 血片於顯微鏡下檢視出瘧原蟲者，為陽性確認病例，依其形態需加區分為熱帶瘧、間日瘧、三日瘧及卵形瘧之感染（如附錄 15.3 瘧原蟲鏡檢圖片），偶有不同瘧原蟲混合感染病例發生。

11.1.2 陽性確認血片應以蓋玻片封膠後，置於乾燥之環境，妥善保存備查。

11.2 報告核發：於傳染病通報系統內輸入檢驗結果：在病原體檢驗方法項目中選擇厚層血片或薄層血片，在檢驗結果項目中輸入陰性或陽性；

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 168 頁/共 1078 頁

瘧原蟲檢測（鏡檢法）

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

如果陽性，於病原體大類中選擇蟲體之屬別。並於細類中選擇種別、形態。最後厚層血片需於備註欄加註蟲體密度。

- 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送報告簽署人審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

## 12 品質管制

- 12.1 以採取正常人之血液檢體製作抹片標本，染色後觀察白血球、紅血球及血小板之形態是否可以辨識。
- 12.2 每一批 Giemsa 原液在泡製完成後，均應測試最佳染色時間，並做成記錄存查。
- 12.3 每一次血液檢體製作抹片標本，應加作陽性對照組之品管。
- 12.4 每次操作時應加以記錄，並定期由寄生蟲實驗室主管審閱。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 Ljungstrom I, Perlmann H, Schlichtherle M, Scherf A, Wahlgren M. 2004. Methods malaria research, 4<sup>th</sup> edition. MR4/ATCC Manassas, Virginia.
- 14.2 行政院衛生署疾病管制局。2001。防疫檢驗標準作業程序手冊，瘧疾檢驗，第 3 之 1 - 5 頁。

## 15 附錄

- 15.1 瘧疾血片製作方法。
- 15.2 瘧原蟲鏡檢流程圖。
- 15.3 瘧原蟲鏡檢圖片。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

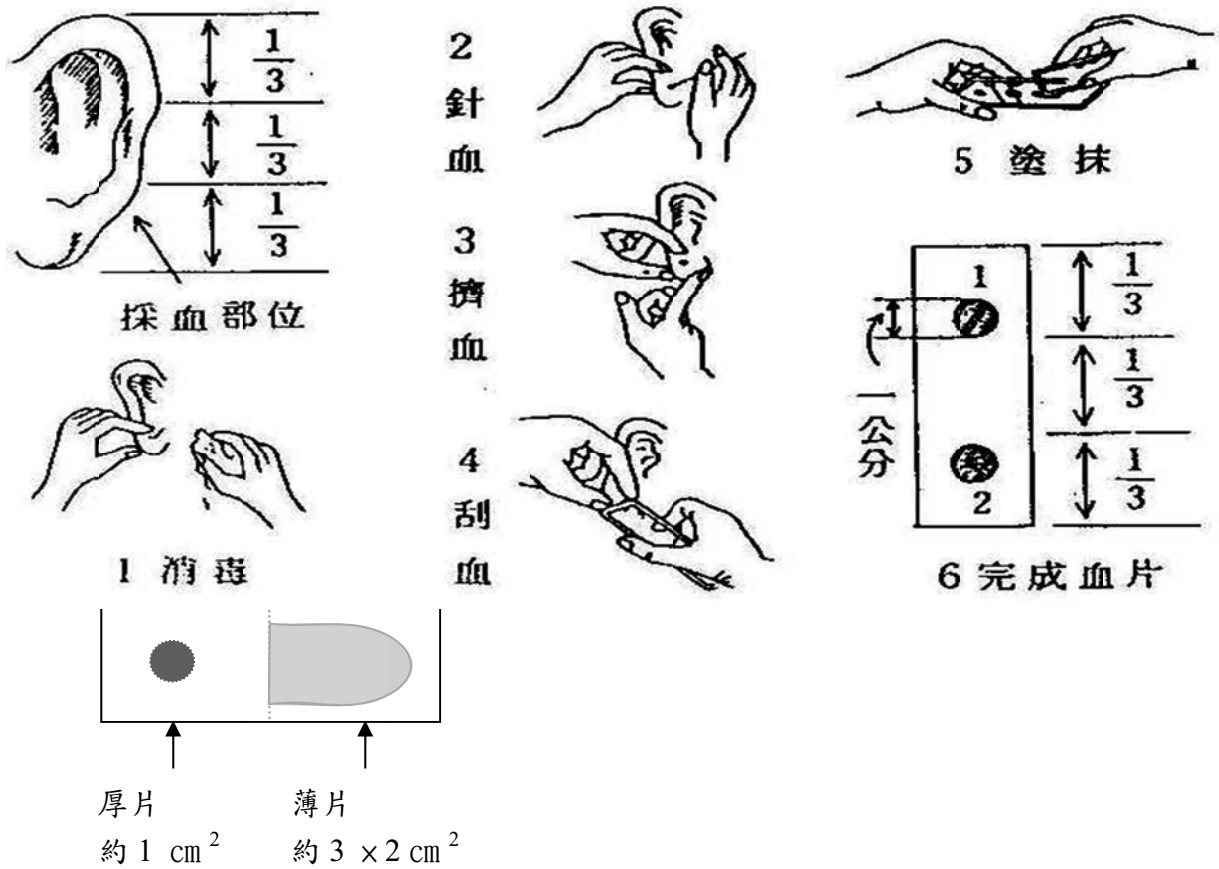


編號：  
頁次：第 169 頁/共 1078 頁


瘧原蟲檢測（鏡檢法）

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

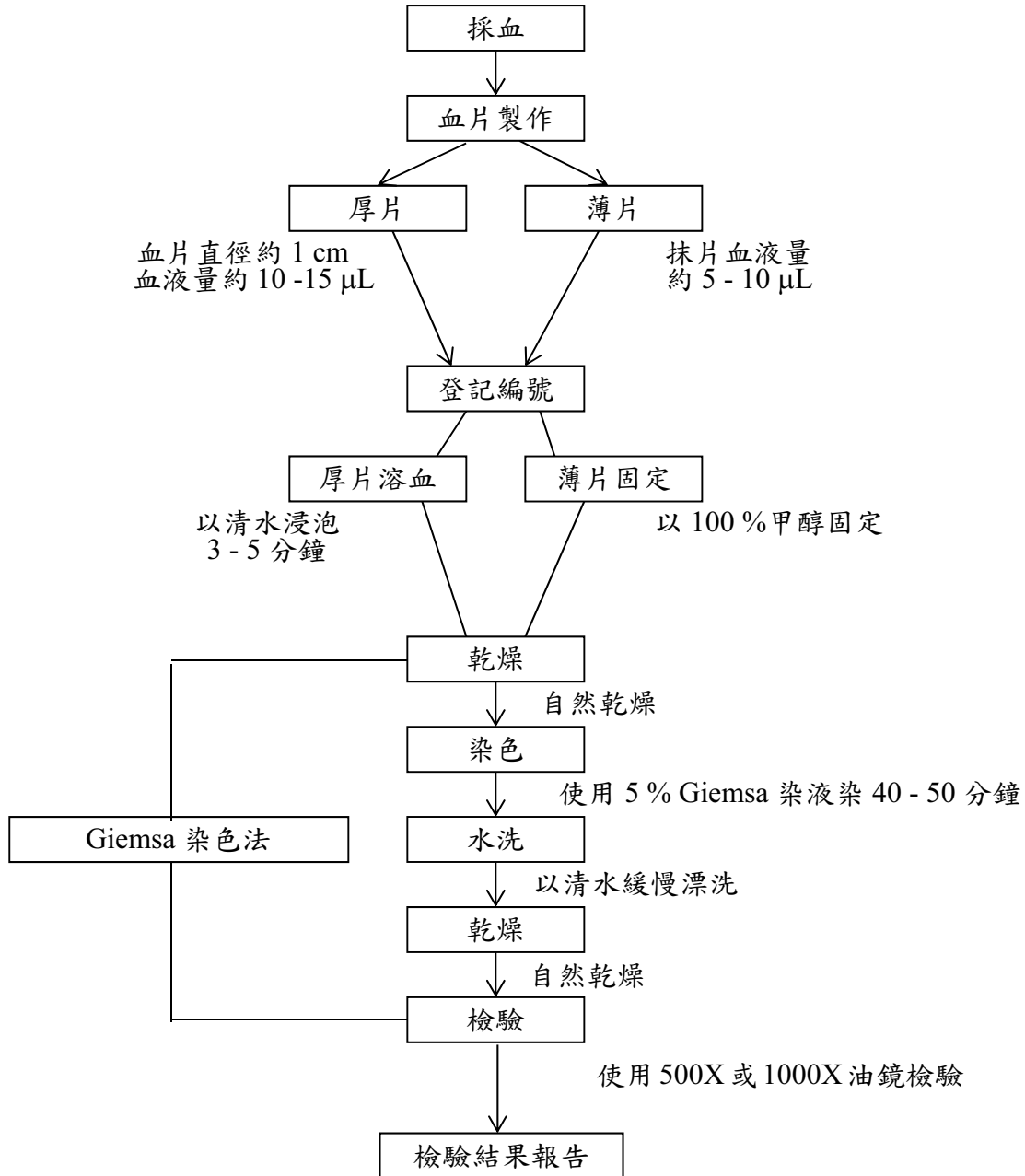
附錄 15.1 採血步驟及血片製作



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法


 編號： 頁次：第 170 頁/共 1078 頁	瘧原蟲檢測（鏡檢法）	核准日期： 年 月 日
		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 瘧原蟲鏡檢流程圖



附錄 15.3 瘧原蟲鏡檢圖片(略)

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 171 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR 法)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以分子生物學方法鑑定四種人類瘧原蟲。

## 2 適用檢體種類

血液。

## 3 名詞解釋

無

## 4 原理概述


以四種人類瘧原蟲 Small ribosomal subunit RNA 之特異性序列為標的，進行聚合酶連鎖反應檢測。自受檢者血液抽取 Total DNA，經增幅反應後，分析 Small ribosomal subunit RNA 特異性序列產物之有無、大小，繼而判定瘧原蟲之存在與否及種別。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

- 5.1.1 檢體保存劑：5.4 mg K<sub>2</sub>EDTA/tube
- 5.1.2 核酸萃取試劑組：QIAamp DNA blood mini kit (Cat. no.51106)
  - 5.1.2.1 蛋白質水解酵素 (protease)
  - 5.1.2.2 溶解緩衝液 AL (buffer AL)
  - 5.1.2.3 96 - 100 %乙醇 (ethanol)
  - 5.1.2.4 緩衝液 AW1 (buffer AW1)
  - 5.1.2.5 緩衝液 AW2 (buffer AW2)
  - 5.1.2.6 萃取緩衝液 (buffer AE)
- 5.1.3 核酸萃取 (QIAamp DNA blood mini kit) 耗材
  - 5.1.3.1 萃取濾管 (QIAamp spin column)
  - 5.1.3.2 2 mL 收集管 (2 mL collection tube)
- 5.1.4 PCR 試劑
  - 5.1.4.1 5 μM rPLU1 primer (5'-tcaaagattaagcca tgcaagtga -3') (附錄 14)
  - 5.1.4.2 5 μM PL1 primer (5'-ttaaattgttcagttaaaacg -3') (附錄 14)
  - 5.1.4.3 5 μM PL2 primer (5'-cctgttggccttaaacttc -3') (附錄 14)
  - 5.1.4.4 5 μM PL3 primer (5'-ttttataaggataactacggaaaagctgt -3') (附錄 14)
  - 5.1.4.5 5 μM PL4 primer (5'-taccgcatagccatgtaggccaatacc -3') (附錄 14)
  - 5.1.4.6 5 μM Pf1 primer (5'-ttaaactggttgggaaaaccaaataatt -3') (附錄 14)
  - 5.1.4.7 5 μM Pf2 primer (5'-acacaatgaactcaatcatgactaccgctc -3')

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 172 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR 法)	修訂日期： 年 月 日

(附錄 14)

5.1.4.8 5  $\mu$ M Pv1 primer(5'-cgcttctagcttaatccacataactgatac -3')  
(附錄 14)

5.1.4.9 5  $\mu$ M Pv2 primer(5'acttccaagccgaagcaagaaagtcctta-3')  
(附錄 14)

5.1.4.10 5  $\mu$ M Pm1 primer(5'-ataacatagttgtacgtaagaataaccgc -3')  
(附錄 14)

5.1.4.11 5  $\mu$ M Pm2 primer(5'-aaaattcccatgcataaaaaattatacaaa -3')  
(附錄 14)

5.1.4.12 5  $\mu$ M Po1 primer(5'-atctcttttgctatttttagtattggaga -3') (附錄 14)

5.1.4.13 5  $\mu$ M Po2 primer(5'-ggaaaaggacacattaattgtatcctagtg -3')  
(附錄 14)

5.1.4.14 10 X PCR buffer

5.1.4.15 2 mM dNTP (dGTP, dCTP, dTTP, dATP 2 mM each)

5.1.4.16 10X Dye (20 % [w/v] sucrose, 1mM Cresol Red)

5.1.4.17 25 mM MgCl<sub>2</sub>

5.1.4.18 AmpliTaq gold DNA polymerase (5 units/ $\mu$ L)

5.1.4.19 5 mg/mL BSA

5.1.4.20 純水 (pure water)

## 5.1.5 電泳分析試劑

5.1.5.1 洋菜膠 (agarose)。

5.1.5.2 1 X TBE 電泳緩衝液：1 X TBE (tris-borate-EDTA) buffer

5.1.5.3 DNA 分子量指標：100 bp Ladder marker

5.1.5.4 染色液：0.5  $\mu$ g/mL Ethidium bromide

## 5.2 耗材

5.2.1 3-5 mL 採血管

## 6 儀器設備

6.1 控溫震盪加熱器

6.2 高速離心機

6.3 聚合酶鏈鎖反應器：96 孔 GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, CA, USA)

6.4 電泳槽 (Mupid II)

6.5 紫外線照相系統

## 7 環境設施安全

無。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

瘧原蟲分子生物學核酸檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 173 頁/共 1078 頁

(兩階段巢式 PCR 法)

修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 步驟

#### 10.1.1 檢體 DNA 萃取：

10.1.1.1 取 200  $\mu\text{L}$  檢體，置於 1.5 mL 離心管，並加入 20  $\mu\text{L}$  Protease。

10.1.1.2 加 200  $\mu\text{L}$  Buffer AL，震盪 15 sec，置於 56  $^{\circ}\text{C}$ ，10 min。

10.1.1.3 加 200  $\mu\text{L}$  酒精，震盪 15 sec，吸取全部置入萃取濾管中。

10.1.1.4 以 8,000 rpm 離心 1 min。

10.1.1.5 加 500  $\mu\text{L}$  Buffer AW1，以 8,000 rpm 離心 1 min，換新收集管。

10.1.1.6 加 500  $\mu\text{L}$  Buffer AW2，以 14,000 rpm 離心 3 min，換新收集管。

10.1.1.7 以 14,000 rpm 離心 1 min，將收集管換為 1.5 mL 離心管。

10.1.1.8 加 200  $\mu\text{L}$  Buffer AE，靜置 1 min。

10.1.1.9 以 8,000 rpm 離心 1 min。


10.1.1.10 置於 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷藏保存。

#### 10.1.2 Genus 鑑定第一階段 PCR：

10.1.2.1 配置 PCR 反應混合液，每一檢體其反應包括以下成分：

PCR 試劑	體積( $\mu\text{L}$ )	濃度(總體積 20 $\mu\text{L}$ )
5 $\mu\text{M}$ rPLU1 primer	1	0.25 $\mu\text{M}$
5 $\mu\text{M}$ PL1 primer	1	0.25 $\mu\text{M}$
10 X PCR buffer	2	1 X
2 mM dNTP	1.25	125 $\mu\text{M}$
25 mM $\text{MgCl}_2$	1.6	2 mM
AmpliTaq gold(5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.1	0.025 U/ $\mu\text{L}$
Pure Water	11.05	
總體積	18	

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 174 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR 法)	修訂日期： 年 月 日

10.1.2.2 分裝 18  $\mu\text{L}$  PCR 反應混合液至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管。

10.1.2.3 每一 PCR 反應管加入 2  $\mu\text{L}$  檢體 DNA。

10.1.2.4 將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應器進行反應 (總體積 20  $\mu\text{L}$ )：

PCR 反應期	溫度( $^{\circ}\text{C}$ )	時間(分:秒)	循環數
酵素活化	95	5:00	1
DNA 解離	94	00:30	40
Primer 粘合	58	01:00	
聚合反應	72	01:00	
後聚合反應	72	05:00	1
停止反應	4	$\infty$	1

10.1.3 Genus 鑑定第二階段 PCR：

10.1.3.1 配置 PCR 反應混合液，每一檢體其反應包括以下成分：

PCR 試劑	體積 ( $\mu\text{L}$ )	濃度(總體積 20 $\mu\text{L}$ )
5 $\mu\text{M}$ PL3 primer	1	0.25 $\mu\text{M}$
5 $\mu\text{M}$ PL4 primer	1	0.25 $\mu\text{M}$
10 X PCR buffer	2	1 X
2 mM dNTP	1.25	125 $\mu\text{M}$
25 mM $\text{MgCl}_2$	1.6	2 mM
AmpliTaq Gold (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.1	0.025 U/ $\mu\text{L}$
Pure water	12.05	
總體積	19	

10.1.3.2 分裝 PCR 反應混合液 19.0  $\mu\text{L}$  至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管


10.1.3.3 每一 PCR 反應管加入 1.0  $\mu\text{L}$  第一階段 PCR 產物

10.1.4 將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應器進行反應 (總體積 20  $\mu\text{L}$ )：

PCR 反應期	溫度( $^{\circ}\text{C}$ )	時間(分:秒)	循環數
酵素活化	95	5:00	1
DNA 解離	94	00:30	29
Primer 粘合	62	01:00	
聚合反應	72	01:00	
後聚合反應	72	06:00	1
停止反應	4	$\infty$	1



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢式 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 175 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 10.1.5 Species 鑑定第一階段 PCR：

10.1.5.1 配置 PCR 反應混合液，每一檢體其反應包括以下成分：

PCR 試劑	體積(μL)	濃度(總體積 20 μL)
5 μM PL1 primer	1	0.25 μM
5 μM PL2 primer	1	0.25 μM
10 X PCR buffer	2	1 X
2 mM dNTP	1.25	125 μM
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.6	2 mM
AmpliTaq Gold(5 U/μL)	0.1	0.025 U/μL
Pure Water	11.05	
總體積	18	

10.1.5.2 分裝 18 μL PCR 反應混合液至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管。

10.1.5.3 每一 PCR 反應管加入 2 μL 檢體 DNA。

10.1.5.4 將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應器進行反應（總體積 20 μL）：

PCR 反應期	溫度(°C)	時間(分： sec)	循環數
酵素活化	95	5:00	1
DNA 解離	94	00:30	32
Primer 粘合	62	01:00	
聚合反應	72	01:00	
後聚合反應	72	05:00	1
停止反應	4	∞	1

## 10.1.6 Species 鑑定第二階段 PCR：

10.1.6.1 配置 PCR 反應混合液，每一檢體其反應包括以下成分：

PCR 試劑	體積( μL)	濃度(總體積 20 μL)
5 μM Species primer 1	1	0.25 μM
5 μM Species primer 2	1	0.25 μM
10X PCR buffer	2	1X
2 mM dNTP	1.25	125 μM
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.6	2 mM
AmpliTaq Gold(5 U/μL)	0.1	0.025 U/μL
Pure water	12.05	
總體積	19	

10.1.6.2 *Plasmodium falciparum* species primer 為 Pf1、Pf2

10.1.6.3 *Plasmodium vivax* species primer 為 Pv1、Pv2

10.1.6.4 *Plasmodium malariae* species primer 為 Pm1、Pm2

10.1.6.5 *Plasmodium ovale* species primer 為 Po1、Po2

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

瘧原蟲分子生物學核酸檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 176 頁/共 1078 頁

(兩階段巢式 PCR 法)

修訂日期： 年 月 日

- 10.1.7 分裝 PCR 反應混合液 19.0  $\mu$ L 至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管  
10.1.8 每一 PCR 反應管加入 1.0  $\mu$ L 第一階段 PCR 產物  
10.1.9 將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應器進行反應 (總體積 20  $\mu$ L)：

PCR 反應期	溫度(°C)	時間(分：秒)	循環數
酵素活化	95	5:00	1
DNA 解離	94	00:30	32
Primer 粘合	62	01:00	
聚合反應	72	01:00	
後聚合反應	72	06:00	1
停止反應	4	$\infty$	1

## 10.1.10 PCR 產物電泳分析：

- 10.1.10.1 配製 2% 洋菜膠片 (含 1X TBE 電泳緩衝液)。  
10.1.10.2 電泳分析：將第二階段 PCR 反應 A 及 B 管等量混合，取 10  $\mu$ L 置於膠片孔洞，與 2.5  $\mu$ L 100 bp Ladder marker 一併於 100 伏特電壓下 (1X TBE 電泳緩衝液)，電泳 30 min。  
10.1.10.3 膠片染色：將洋菜膠片置於 0.5  $\mu$ g/mL Ethidium bromide 染色 10 min，繼以蒸餾水脫色 10 min。  
10.1.10.4 將膠片置於紫外線照相系統，擷取圖片，記錄結果。

## 11 結果判定


### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 以 Genus 鑑定第二階段 PCR 反應產物長度與 DNA 分子量指標比較判讀後，鑑別有無瘧原蟲。  
11.1.2 以 Species 鑑定第二階段 PCR 反應產物長度與 DNA 分子量指標比較判讀後，鑑別瘧原蟲種別。  
11.1.3 瘧原蟲陽性：238 bp。(附錄 14.2)  
11.1.4 *P. falciparum* 陽性：205 bp。(附錄 14.3)  
11.1.5 *P. vivax* 陽性：120 bp。(附錄 14.3)  
11.1.6 *P. malariae* 陽性：144 bp。(附錄 14.3)  
11.1.7 *P. ovale* 陽性：800 bp。(附錄 14.3)  
11.2 報告核發：於傳染病通報系統內輸入檢驗結果：在病原體檢驗方法項目中選擇聚合酶鏈鎖反應，在檢驗結果項目中輸入陽性或陰性；如果陽性，於病原體大類中選擇蟲體之屬別。並於細類中選擇種別。  
11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送報告簽署人審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

## 12 品質管制

- 12.1 每次操作應包含陽性及陰性對照檢體。  
12.2 陽性對照檢體：已確定為瘧原蟲陽性 DNA。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 177 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR 法)	修訂日期： 年 月 日

12.3 陰性對照：純水。

12.4 每次操作時加以記錄，定期由寄生蟲實驗室主管審閱。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Singh B, Bobogare A, Cox-singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. 1999. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 60: 687-692.

14.2 Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 61: 315-320.


## 15 附錄

15.1 瘧疾分子生物學確認檢驗所用引子之序列。

15.2 *Plasmodium* genus 在巢式聚合酶鏈鎖反應之結果。

15.3 *Plasmodium* species 在巢式聚合酶鏈鎖反應之結果。


## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 178 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR 法)	修訂日期： 年 月 日

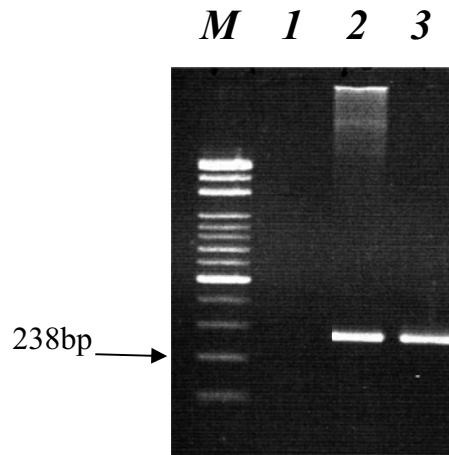
### 附錄 15.1 瘧疾分子生物學確認檢驗所用引子之序列

Category	Primer pairs(forward+reverse)	PCR product size
<b>Primers for Genus</b>		
1 <sup>st</sup> step PCR	Outer1: 5'-tcaaagattaagcca tgcaagtga -3' Outer1R : 5'-ttaaattggtgcagttaaacg -3'	
2 <sup>nd</sup> step PCR	Inner F:5'-ttttataaaggataactacggaaaagctgt -3' Inner R:5'-taccgctatagccatgttaggccaatacc -3'	238 bp
<b>Primers for Species</b>		
1 <sup>st</sup> step PCR	PL1:5'-ttaaattggtgcagttaaacg -3' PL2: 5'-cctgttggtgccttaaacttc -3'	
2 <sup>nd</sup> step PCR	Pf1: 5'-ttaaactgggttggaaccaaataatatt -3' Pf2: 5'-acacaatgaactcaatcatgactaccgctc -3'	205 bp
	Pv1: 5'-cgcttagcttaatccacataactgatac -3' Pv2: 5'actccaagccgaagcaaagaagtcctta-3'	120 bp
	Pm1: 5'-ataacatagttgtacgttaagaataaccgc -3' Pm2: 5'-aaaattcccatgcataaaaaattatacaaa -3'	144 bp
	Po1: 5'-atctcttttgctatttttagtattggaga -3' Po2: 5'-ggaaaaggacacattaattgtatcctagtg -3'	800 bp

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 179 頁/共 1078 頁	(兩階段巢式 PCR 法)	修訂日期： 年 月 日

### 15.2 *Plasmodium* genus 在巢式聚合酶鏈鎖反應之結果



Lane M: 100 bp Marker; Lane 1 是對照組 ddH<sub>2</sub>O(以 ddH<sub>2</sub>O 取代 DNA template 進行兩階段之 PCR 反應); Lane 2 為檢驗檢體; Lane 3 為陽性檢體

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

瘧原蟲分子生物學核酸檢測

核准日期： 年 月 日

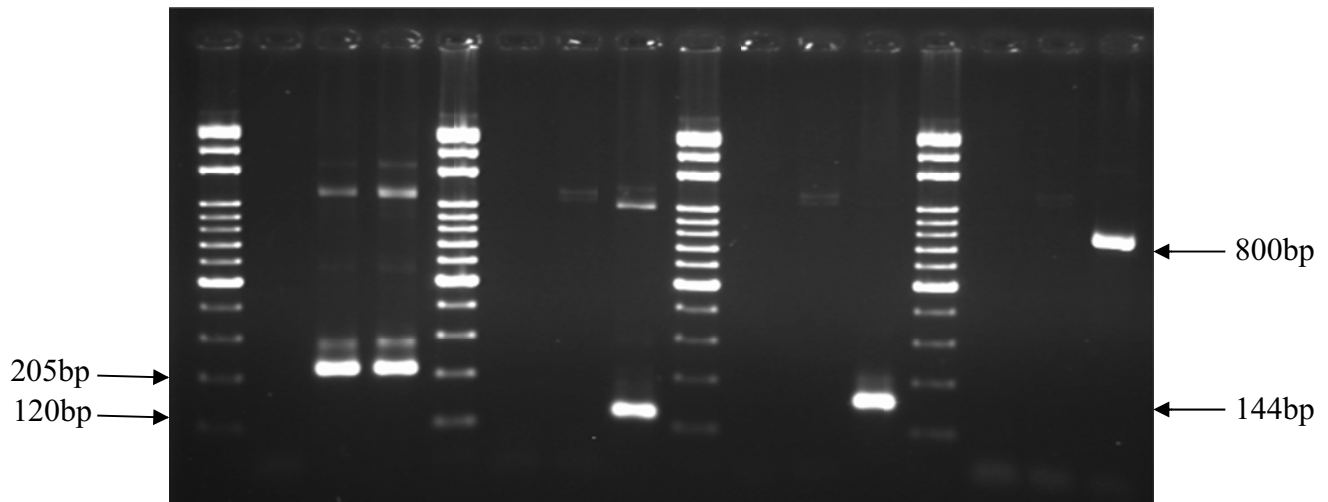
頁次：第 180 頁/共 1078 頁

(兩階段巢式 PCR 法)

修訂日期： 年 月 日


### 15.3 *Plasmodium* species 在巢式聚合酶鏈鎖反應之結果

M 1 2 3 M 4 5 6 M 7 8 9 M 10 11 12



Lane M : 100 bp Marker ; Lane 1、4、7 與 10 是對照組 ddH<sub>2</sub>O (以 ddH<sub>2</sub>O 取代 DNA template 進行兩階段之 PCR 反應) ; Lane 2、5、8 與 11 為檢驗檢體 ; Lane 3、6、9 與 12 為陽性檢體 ; Lane 1、2、3 為 *P.falciparum* species primer ; Lane 4、5、6 為 *P.vivax* species primer ; Lane 7、8、9 為 *P.malariae* species primer ; Lane 10、11、12 為 *P.ovale* species primer 。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 181 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

在疑似受感染個案之採集檢體中，分離與鑑定是否存在麻疹病毒。

## 2 適用檢體種類

咽喉拭子、含抗凝劑之全血、尿液。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

選擇適當的細胞株 (B95a) 培養麻疹病毒，觀察細胞病變 (CPE) 的出現，最後再以抗麻疹病毒單株抗體螢光染色的方法確認。

## 5 試劑耗材

### 5.1 試劑

5.1.1 Growth medium (由含 10 % FBS 與 1X pen-strep solution 之 DMEM 組成)。

5.1.1.1 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)。

5.1.1.1.1 With 4,500 mg/L D-glucose (high glucose)。

5.1.1.1.2 With L-glutamine。

5.1.1.1.3 Without sodium pyruvate。

5.1.1.2 Fetal bovine serum (FBS)：以 56 °C heat inactivate 後開封，以 15 mL 離心管分裝，-20 °C 儲存。

5.1.1.3 Pen-strep solution (100 X)。

5.1.1.3.4 With 10,000 units/mL penicillin G。

5.1.1.3.5 With 10,000 µg/mL streptomycin sulfate in 0.85 % Saline，開封後以 15 mL 離心管分裝，-20 °C 儲存。

5.1.2 Sample pretreat medium (由含 2 X pen-strep solution 之 DMEM 組成)。

5.1.3 Trypsin-EDTA。

5.1.3.1 With 0.05 % trypsin。

5.1.3.2 With 0.53 mM EDTA in Hanks' balanced salt solution (HBSS) without Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup>，開封後以 15 mL 離心管分裝，-20 °C 儲存。


5.1.4 Hank's balanced salt solution (HBSS)。

5.1.5 Ficoll-paque<sup>TM</sup> PLUS：Amersham Biosciences，17-1440-02，Sweden。

5.1.6 Light diagnostics measles IFA Kit：Chemicon，3187，USA，store at 2-8°C。

5.1.6.1 Measles IFA Ab，5030。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 182 頁/共 1078 頁		修訂日期：	年	月	日

- 5.1.6.2 Gt X Ms IgG FITC，5008。
- 5.1.6.3 Measles control slide，5031。
- 5.1.6.4 Mounting fluid，5013。
- 5.1.6.5 Tween 20/sodium azide,100X，5037。
- 5.1.6.6 PBS packet，5087。
- 5.1.7 IFA wash solution：將 5.1.6.6 試劑溶於 1 L distilled H<sub>2</sub>O 再加入 5.1.6.5 試劑以乾淨密封容器室溫儲放。
- 5.1.8 B95a 細胞株：由新竹食科所購入之細胞株 B95-8：CCRC 60199 培養而來，將培養基成份由原來的 RPMI 轉換成 DMEM。
- 5.2 耗材
  - 5.2.1 25-cm<sup>2</sup> Culture vessels (T-25)。
  - 5.2.2 Pipette：1 mL、5 mL、10 mL、25 mL。
  - 5.2.3 200 μL tip。
  - 5.2.4 3 mL 無菌塑膠吸管。
  - 5.2.5 載玻片、蓋玻片。
  - 5.2.6 無菌螺旋試管：2 mL、4 mL。
  - 5.2.7 無菌離心管：15 mL、50 mL。
  - 5.2.8 5 mL 針筒。
  - 5.2.9 0.45 μM 針頭過濾器。
  - 5.2.10 抗凍標籤紙。
  - 5.2.11 油性細字筆。
  - 5.2.12 可拋棄式無菌塑膠手套、口罩。
- 6 儀器設備
  - 6.1 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
  - 6.2 37 °C 二氧化碳培養箱。
  - 6.3 倒立相差顯微鏡。
  - 6.4 螢光顯微鏡 (Zeiss Axioskop 2 plus)。
  - 6.5 水浴槽。
  - 6.6 電動輔助吸管。
  - 6.7 4 °C 冰箱。
  - 6.8 -20 °C、-80 °C 冷凍櫃。
  - 6.9 乾浴器。
- 7 環境設施安全
  - 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 8 檢體採集
  - 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。
  - <http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 183 頁/共 1078 頁

麻疹病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

10.1 檢體編號：收件檢體依通報疾病及種類編號。

### 10.2 檢驗前處理

10.2.1 開啓第二級生物安全櫃之紫外光照射操作枱面 20 min。

10.2.2 將 5.1.1-5.1.5 試劑先置於 37 °C 回溫或解凍。

#### 10.2.3 檢體前處理

##### 10.2.3.1 全血

10.2.3.1.1 以針筒吸取 3 mL 的 Ficoll-paque 置於 15 mL 離心管下層。

10.2.3.1.2 取 2 mL 血液與 2 mL 的 HBSS 混合後，輕輕的置放於 Ficoll-paque 上層。

10.2.3.1.3 400 × g，室溫下離心 40 min。

10.2.3.1.4 以乾淨吸管小心吸去上層液。

10.2.3.1.5 再取另一乾淨吸管吸取 Ficoll-paque 上的淋巴細胞層至另一 15 mL 離心管。

10.2.3.1.6 加入取出淋巴層細胞三倍體積的 HBSS，輕輕以吸管混合均勻。

10.2.3.1.7 100 × g，室溫下離心 10 min 後移除上清液。

10.2.3.1.8 加入 5 mL HBSS，以吸管輕輕上下混合原沉澱細胞，重複 10.2.3.1.6。

10.2.3.1.9 加入 2 mL Sample pretreat medium 後，接種細胞或暫時置於-80 °C 保存。

10.2.3.2 咽喉拭子：加 1.5 mL Sample pretreat medium 至採檢管充分攪拌，將溶液吸出至 4 mL 滅菌塑膠檢體瓶中，以 5 mL 針筒吸取溶液後，拔去針頭，接上 0.45 μm 過濾器過濾後置於 2 mL 無菌試管保存，接種細胞或暫時置於-80 °C 保存。

10.2.3.3 尿液：以 400 × g 於 4 °C 離心 10 min 後，棄上清液，另加 2 mL Sample pretreat medium 與沉澱物混合均勻後，接種細胞或暫時置於-80 °C 保存。

### 10.3 檢驗步驟

10.3.1 接種：取長到平面八至九成滿之 B95-a 細胞以 Growth medium passage 於新的 25T 培養瓶（細胞數約原來的 1/3 至 1/4 量），接種檢體 200 μL，混合均勻，置於 37 °C 含 5 % CO<sub>2</sub> 的培養箱培養。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 184 頁/共 1078 頁

麻疹病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.3.2 觀察：自翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態，連續觀察 3 天，若細胞培養基酸化（呈現黃色）則需更換培養基。
- 10.3.3 若有 CPE 出現，但範圍小於 20%，或沒有觀察到 CPE 則繼續培養至 3 天後，當細胞長滿單層時 passage cell。將 Medium 吸出丟棄，加入 3 mL Trypsin-EDTA 作用 1 min，吸出 Trypsin-EDTA（留少量勿吸到全乾）輕拍後於燈光下觀察細胞脫落狀況，若細胞尚未脫落，可置放於 37 °C 恆溫培養箱數 min，以無菌吸管吸 5 mL Growth medium 將細胞沖下，上下輕輕吸放數次混合均勻，吸取半量細胞至新的 25T 培養瓶，加入 Growth medium 使達 5 mL 體積，如此即為 Passage 2。
- 10.3.4 重複步驟 10.3.2-10.3.3，繼續觀察 CPE 至 Passage 3，若細胞仍未產生病變者，則為陰性。
- 10.3.5 當出現 CPE 但範圍未達 50 – 75% 以前，則繼續培養細胞，必要時需 passage 細胞 1 - 2 次，使 CPE 能在細胞長滿前即達 50 - 75%。此時可刮下細胞，取約 1 mL 進行 10.3.6，其餘則混合均勻後分裝凍於 -80 °C 儲存。
- 10.3.6 間接螢光免疫法鑑定
- 10.3.6.1 取 1 mL 受感染細胞的懸浮液於小離心管中，以 3,000 rpm 離心 15 min。
- 10.3.6.2 取出上清液另存於乾淨試管，沉澱之細胞加入 0.5-1 mL PBS，以 Pipette 上下混合均勻。
- 10.3.6.3 取 10 μL 點入 21 孔玻片（需含未感染細胞以為陰性對照），待細胞風乾後置入含有 4 °C 丙酮之玻片槽，固定 10 min。
- 10.3.6.4 取出風乾後滴一滴 5.1.6.1 Measles IFA Ab，將玻片置於 moisture chamber，置於 37 °C 恆溫箱 30 min。
- 10.3.6.5 以 5.1.7 IFA wash solution 清洗玻片後置於乾浴器烘乾。
- 10.3.6.6 每個孔加一滴 5.1.6.2 Gt X Ms IgG FITC。將玻片置於 Moisture chamber，置於 37 °C 恆溫箱 30 min。
- 10.3.6.7 重覆 10.3.6.5。
- 10.3.6.8 以 5.1.6.4 Mounting fluid 封片後，以螢光顯微鏡鏡檢。細胞呈現紅色為陰性反應，呈現蘋果綠為陽性。
- 10.4 檢驗後處理：生物安全櫃操作檯面以 75% 酒精擦拭，並以紫外光照射 20 min。

## 11 結果判定

- 11.1 判讀標準：細胞出現融合（syncytial）CPE 且經 Measles IFA kit 測定有綠色螢光反應者，判定為陽性。
- 11.2 報告核發：麻疹病毒分離陽性，麻疹病毒分離陰性。
- 11.3 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果登錄於附錄 15.3 病毒培養觀察紀錄表、附錄 15.4 螢光鑑定紀錄表，檢驗結果填寫於檢體送驗單之”檢驗

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 185 頁/共 1078 頁

麻疹病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

結果欄”，並將檢驗結果上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。

## 12 品質管制

- 12.1 除離心及螢光鑑定試驗步驟外全程作業都要在第二級生物安全櫃內進行。
- 12.2 二氧化碳培養箱內壁每月要定期以抗黴菌劑擦拭及水盤添加抑菌劑的無菌水以保持培養箱內溼度。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 Measles lab manual, available at [www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/measles/mam.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/measles/mam.htm)。
- 14.2 Chemicon measles IFA kit 所附操作說明。

## 15 附錄

- 15.1 麻疹病毒分離與鑑定流程圖。
- 15.2 細胞繼代培養紀錄表。
- 15.3 病毒培養觀察紀錄表。
- 15.4 螢光鑑定紀錄表。
- 15.5 麻疹病毒檢驗判定總流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

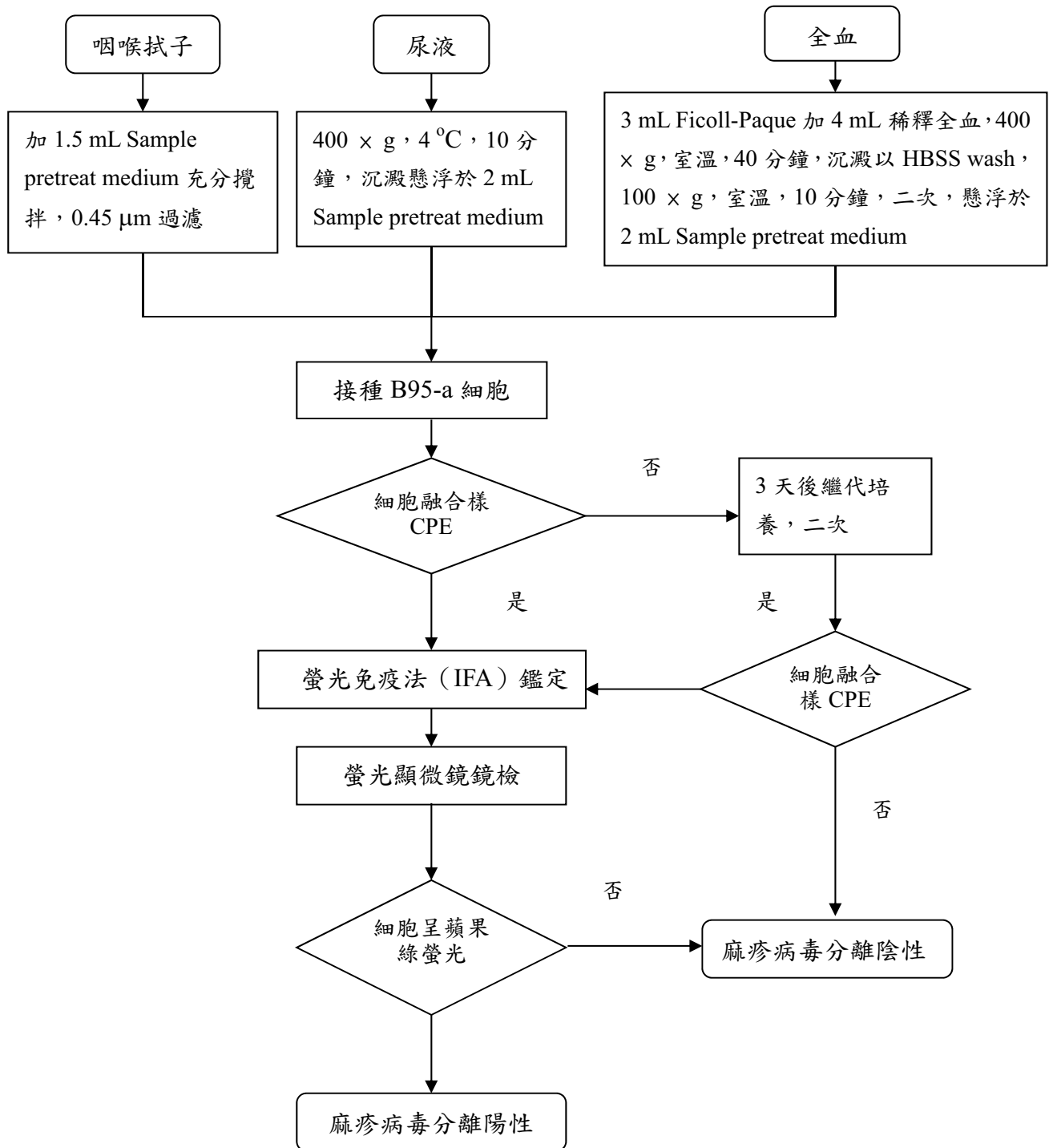


編號：  
頁次：第 186 頁/共 1078 頁


麻疹病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 麻疹病毒分離與鑑定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 187 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 細胞繼代培養紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

### 細胞繼代培養紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

Cell		
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no.	Container	Medium
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no.	Container	Medium
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no.	Container	Medium
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no.	Container	Medium
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no.	Container	Medium
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no.	Container	Medium

檢驗者：

實驗室主管：



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：  
頁次：第 189 頁/共 1078 頁

麻疹病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.4 螢光鑑定紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

螢光鑑定紀錄表

Date :

頁數：第 頁/共 頁

	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Date :

	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

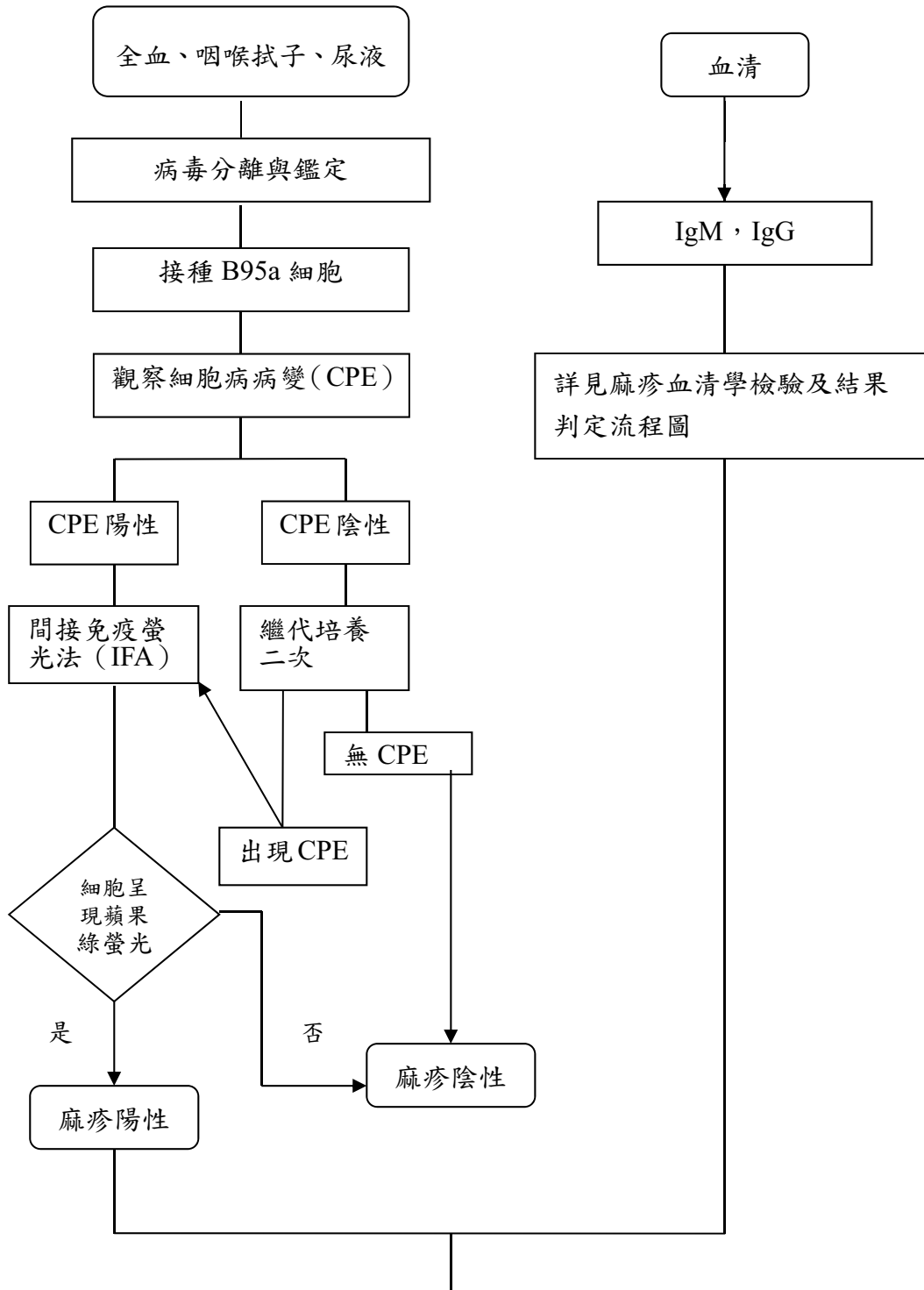


編號：  
頁次：第 190 頁/共 1078 頁

麻疹病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日


附錄 15.5 麻疹病毒檢驗判定總流程圖



血清學檢驗結果與細胞分離結果，有任何一者為陽性，則判為陽性



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 191 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以分子生物學的技术利用反轉錄酶－巢式聚合酶鏈反應 (RT-nested PCR) 與即時定量 RT-PCR 來直接檢測檢體中是否有麻疹病毒。

## 2 適用檢體種類

適用之檢體種類包括咽喉拭子、尿液。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

4.1 RT-PCR：利用分子生物學技術 RT-PCR 高敏感度的方法來檢測檢體中的麻疹病毒 RNA。RT-PCR 之原理為設計專一性之引子 (primers)，把檢體中的病毒 RNA 反轉錄成 DNA，並將其擴增放大。

4.2 即時定量 RT-PCR：此系統的定量原理是利用一標記兩種螢光的 DNA 探針來偵測聚合酶鏈反應的產物。此 DNA 探針的 5'端標記一報告染劑 (reporter dye)，3'端則標記一遮蔽染劑 (quencher dye)，完整的 DNA 探針其報告染劑所散發出的螢光會被遮蔽染劑所掩蓋。當聚合酶進行延伸反應 (extension phase) 時，具有從 5'端 DNA 切割活性的 DNA 聚合酶將探針切割，使得 5'端報告染劑與 3'端遮蔽染劑分開，遮蔽效應被破壞，此時即可偵測到螢光反應。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

5.1.1 Viral RNA Extraction Kit。

5.1.2 One-step RT-PCR Kit。

5.1.3 PCR Kit。

5.1.4 One-step qRT-PCR Kit。

5.1.5 TBE buffer (Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer)。

5.1.6 陽性對照組(positive control):採用已知麻疹陽性個案檢體作對照；陰性對照組(Negative control):以水作陰性對照。

5.1.7 Agarose。

### 5.2 耗材

5.2.1 DEPC 水。

5.2.2 無菌 PCR 反應管。

5.2.3 無菌內濾式 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl 微量滴管。

5.2.4 無菌 1.5 ml 微量離心管。


5.2.5 手套。

## 6 儀器設備

6.1 PCR thermal cycler。


6.2 即時定量偵測儀 (如 ABI system, Bio-rad system, LightCycler system 等)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 192 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 6.3 電泳槽。
- 6.4 DNA 電泳膠體觀察設備。
- 6.5 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l 微量滴管分注器。
- 7 環境設施安全  
採用獨立的操作空間，將 RNA 或 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。
- 8 檢體採集  
參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存  
參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
  - 10.1 檢體前處理
    - 10.1.1 檢體編號：核對檢驗單之個案與檢體是否相符，給予疾病編號。
    - 10.1.2 咽喉拭子檢體：棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。
    - 10.1.3 尿液檢體：以 1,500 rpm 離心 10 分鐘，將沉澱物與 1-2 ml 含 2x 抗生素的 DMEM 混合均勻。
  - 10.2 步驟
    - 10.2.1 萃取病毒 RNA (以 QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit 為例)
      - 10.2.1.1 吸取 140  $\mu$ l 的檢體，加入 560  $\mu$ l Lysis buffer (AVL)，震盪混合，室溫靜置反應 10 分鐘。
      - 10.2.1.2 加入純酒精 560  $\mu$ l 終止反應。
      - 10.2.1.3 將上述混合液分兩次加入通管柱 (column)，並以離心 (8,000 rpm，1 分鐘) 方式加速混合液通過濾膜，檢體中如有 RNA 存在，會吸附在管柱底部的濾膜上。
      - 10.2.1.4 以清洗液 (AW1) 500  $\mu$ l，離心 8,000 rpm，1 分鐘，作第一次沖洗，清洗膜上所吸附的雜質。
      - 10.2.1.5 以清洗液 (AW2) 500  $\mu$ l，離心 14,000 rpm，3 分鐘，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。
      - 10.2.1.6 離心 14,000 rpm，1 分鐘，以徹底去除膜上殘留酒精。
      - 10.2.1.7 加入萃取液(AVE) 50 $\mu$ l，室溫靜置 1 分鐘，在 4 $^{\circ}$ C 離心 8,000 rpm，1 分鐘，取得 RNA。
    - 10.2.2 反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) (以 Qiagen one-step RT-PCR kit 為例)

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 193 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

10.2.2.1 取 5 $\mu$ l RNA 為模版，加入引子組 (primers 參考附錄 15-2) 與 RT-PCR 試劑，反應總體積 25  $\mu$ l，反應溶液成分如下：

RNase-free H <sub>2</sub> O	10.85 $\mu$ l
5 X RT-PCR buffer	5.0 $\mu$ l
Forward primer MV59 (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
Reverse primer MV64 (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
RT-PCR enzyme mix	1.0 $\mu$ l
dNTP Mix (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
RNase inhibitor 40 U/ $\mu$ l	0.15 $\mu$ l
RNA sample	5.0 $\mu$ l
25.0 $\mu$ l	

10.2.2.2 使用 PCR thermal cycle，設定反應條件如下

- 10.2.2.2.1 R.T.作用, 50 $^{\circ}$ C 30 分鐘。
- 10.2.2.2.2 Taq 活化作用, 95 $^{\circ}$ C 15 分鐘。
- 10.2.2.2.3 Denaturation, 94 $^{\circ}$ C 30 秒。
- 10.2.2.2.4 Annealing, 51 $^{\circ}$ C 30 秒。
- 10.2.2.2.5 Extension, 72 $^{\circ}$ C 60 秒。
- 10.2.2.2.6 重複 10.2.2.2.3 至 10.2.2.2.5 步驟 30 cycle。
- 10.2.2.2.7 Final extension, 72 $^{\circ}$ C 5 分鐘。

10.2.3 巢式聚合酶鏈鎖反應(nested PCR) (以 Qiagen HotStarTaq PCR Kit 為例)

10.2.3.1 取 3  $\mu$ l 10.2.2 步驟所得的 RT-PCR 反應產物做模板，加入引子組 (primers 參考引子組序列表) 與 PCR 試劑，反應總體積 50  $\mu$ l，反應溶液成分如下：

RNase-free H <sub>2</sub> O	20.0 $\mu$ l
2 X Master Mix	25.0 $\mu$ l
Forward primer MV216 (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
Reverse primer MV214 (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
DNA sample	3.0 $\mu$ l
50.0 $\mu$ l	


10.2.3.2 使用 PCR thermal cycle，設定反應條件如下：

- 10.2.3.2.1 Taq 活化作用, 95 $^{\circ}$ C 15 分鐘。
- 10.2.3.2.2 Denaturation, 94 $^{\circ}$ C 30 秒。
- 10.2.3.2.3 Annealing, 60 $^{\circ}$ C 30 秒。
- 10.2.3.2.4 Extension, 72 $^{\circ}$ C 60 秒。
- 10.2.3.2.5 重複 10.2.3.2.3 至 10.2.3.2.4 步驟 30 cycle。
- 10.2.3.2.6 Final extension, 72 $^{\circ}$ C 5 分鐘。

10.2.4 膠片電泳分析

10.2.4.1 置備 1.5% 洋菜膠：1.5 g agarose 溶於 100 ml (1 X) TBE buffer。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 194 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.2.4.2 選擇 100 bp DNA size Marker：5 $\mu$ l (2 ng/ $\mu$ l)。
- 10.2.4.3 取二次產物 5  $\mu$ l 及 100 bp Marker，混合 1  $\mu$ l Safe-Green Nucleic Acid Stain (eg :abm -Cat.No.G108-G)。
- 10.2.4.4 進行電泳分離：100V，30 min。
- 10.2.4.5 使用 UV light 觀察，並照相紀錄。
- 10.2.5 即時反轉錄酶-聚合酶鏈鎖反應(real-time RT-PCR)(以 Invitrogen,#11732-020,SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit 為例)
  - 10.2.5.1 取 2.5 $\mu$ l RNA 為模版，加入引子組與探針 (primers 及 probe 參考附錄 15-2) 與 qRT-PCR 試劑，反應總體積 25  $\mu$ l，反應溶液成分如下：

Component	Volumn	Final Conc.
RNase-free H <sub>2</sub> O	7.2 $\mu$ l	
2 X Reaction Mix	12.5 $\mu$ l	1X
Primer/Probe Mix	2.0 $\mu$ l	300nM/250nM
ROX reference	0.05 $\mu$ l	0.25 U/ $\mu$ l
RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l	0.4 U/ $\mu$ l
SSIII/Taq Mix	0.5 $\mu$ l	
RNA sample	2.5 $\mu$ l	
<b>Total</b>	<b>25.0 <math>\mu</math>l</b>	


- 10.2.5.2 使用即時定量偵測儀(eg:Roche LC480)，設定反應條件
  - 10.2.5.2.1 RT reaction：48 $^{\circ}$ C，30 分鐘。
  - 10.2.5.2.2 Taq Activation：95 $^{\circ}$ C，5 分鐘。
  - 10.2.5.2.3 PCR reaction：95 $^{\circ}$ C，15 秒；60 $^{\circ}$ C，1 分鐘 (40 cycles)。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 RT-PCR:取 RT-PCR 產物各 5 $\mu$ L，在 1.5% 洋菜膠進行分析，檢視分析結果。麻疹增幅產物片段約 630 bp，若出現上述 RT-PCR 產物，檢驗結果為陽性。
- 11.1.2 Real-time RT-PCR:按下機器分析鈕，選擇絕對定量二次微分最大值分析(Abs Quant/2 nd Derivate Max)，會帶出自動判讀結果，並將陽性檢體以紅色標示，並計算出相對應的 CP 值，在 High Confidence 及 High Sensitivity 分析模式下皆為陽性且 CP 值小於 40 者，判為麻疹病毒陽性。
- 11.2 報告核發：麻疹病毒 PCR 陽性，麻疹病毒 PCR 陰性。
- 11.3 結果登錄:完成檢驗後，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之”檢驗結果欄”，並上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 195 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 12 品質管制

- 12.1 每次進行實驗時皆有陽性及陰性對照組。
- 12.2 實驗過程遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。
- 12.3 微量吸管分注器做定期的校正。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection , Second edition , WHO/IVB/07.01.
- 14.2 Measles Real-time RT-PCR Kit distributed by Measles, Mumps, Rubella, and Herpesviruses Laboratory Branch, CDC, USA.
- 14.3 Measles Genotyping Kit distributed by Measles, Mumps, Rubella, and Herpesviruses Laboratory Branch, CDC, USA.
- 14.4 Cheng WY, Lee L, Rota PA, Yang DC: Molecular evolution of measles viruses circulated in Taiwan 1992-2008. *Virology* 2009, 6:219.

## 15 附錄

- 15.1 麻疹病毒鑑定流程圖。
- 15.2 麻疹病毒診斷用引子及探針組序列表

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

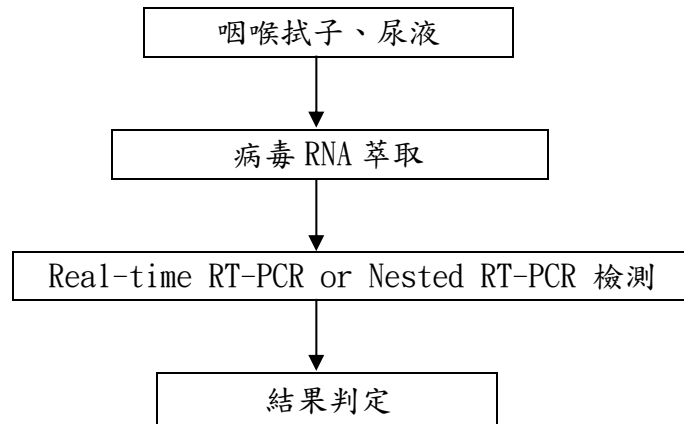
頁次：第 196 頁/共 1078 頁

麻疹病毒核酸檢測


核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15-1 麻疹病毒鑑定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 197 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15-2 麻疹病毒診斷用引子及探針組序列表

一、Nested RT-PCR First round RT-PCR primer

MV59 :5'-GATATGTGACATTGATACATATAT-3'

MV64 :5'-TATAACAATGATGGAGGGTAG-3'

二、Nested RT-PCR Second round nested-PCR primer

MV216: 5'-TGGAGCTATGCCATGGGAGT-3'

MV214: 5'-TAACAATGATGGAGGGTAGG-3'


三、Real-Time RT-PCR

Forward Primer(MVN1139F): 5'-TGGCATCTGAACTCGGTATCAC-3'

Reverse Primer(MVN1213R): 5'-TGTCCTCAGTAGTATGCATTGCAA-3'

Probe(MVN1163P): 5'FAM-CCGAGGATGCAAGGCTTGTTTCAGA-BHQ 3'

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 198 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用間接免疫酵素分析法 (indirect ELISA, indirect enzyme-linked immunosorbent assay) 檢測人體是否有麻疹專一性 IgM 抗體。

## 2 適用檢體種類

血清 (serum) 或血漿 (plasma)。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用間接酵素免疫分析法。檢體先以 RF Absorbent 吸附，以除去類風濕因子及 IgG，降低對所測試 IgM 反應的干擾。再利用吸附有麻疹病毒抗原的微量盤與待測血清中具有麻疹專一性 IgM 抗體作用一段時間，清洗掉未結合的物質然後加上 Anti-human IgM/POD Conjugate，再反應一段時間後清洗掉未結合的物質，最後加上無色受質 TMB 作用 30 min，受質經 conjugate 上的酵素催化後，轉換為藍色，最後再加上終止液終止反應，此時有反應的微量盤會變成黃色。以吸光光度計測定 450 nm 波長的吸光值，以 650 nm 為參考波長。

## 5 試劑耗材

### 5.1 試劑

5.1.1 「Enzygnost anti-measles-virus/IgM : Dade Behring, OWLI 15, Germany, 4 °C 儲存」。

5.1.1.1 Anti-measles virus/IgM test plate : 2 × 6 Strips。

5.1.1.2 Anti-measles virus reference P/P : 0.65 mL。

5.1.1.3 Anti-measles virus reference P/N : 0.45 mL。

5.1.1.4 Sample buffer POD : 2 × 50 mL。

5.1.1.5 Anti-human IgM/POD conjugate (μ-chain specific) : 1 mL。

5.1.1.6 Conjugate buffer microbiol : 4 × 12.5 mL。

5.1.1.7 RF absorbent : 4 × for 5 mL。

5.1.1.8 Polyethylene bag for storing unused test strip。

5.1.1.9 Barcode table of value。

5.1.2 「Supplementary reagents for enzygnost/TMB : Dade Behring, OUV 17, Germany, 4 °C 儲存」。

5.1.2.1 Washing solution POD : 3 × 100 mL。

5.1.2.2 Colour solution blue for enzygnost : 1 × 12.5 mL。

5.1.2.3 Buffer/substrate TMB : 4 × 30 mL。


5.1.2.4 Chromogen TMB : 4 × 3 mL。

5.1.2.5 Stopping solution POD : 2 × 100 mL。

5.1.2.6 Adhesive foils for microtiter plates : 24 pcs。




# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 199 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.1.2.7 Empty bottle for the working Chromogen solution : 1 pcs. °
- 5.1.2.8 Instruction for use : 1 pcs. °
- 5.2 耗材
  - 5.2.1 tips : 200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L °
  - 5.2.2 1.5 mL Eppendorf tube °
  - 5.2.3 4 mL Tube °
  - 5.2.4 2 mL 螺旋試管 °
  - 5.2.5 抗凍標籤紙 °
  - 5.2.6 油性簽字筆 °
- 6 儀器設備
  - 6.1 單爪 Pipetman : 20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L °
  - 6.2 八爪 Pipetman : 200  $\mu$ L °
  - 6.3 電動分注器 : 50  $\mu$ L-1,000  $\mu$ L °
  - 6.4 Microplate washer °
  - 6.5 Microplate reader °
  - 6.6 小型離心機 °
  - 6.7 37 °C 溫箱 °
  - 6.8 振盪混合器 °
- 7 環境設施安全
  - 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作 °
- 8 檢體採集
  - 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版 °
  - <http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A> °
- 9 檢體運送及保存
  - 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版 °
  - <http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A> °
- 10 檢驗步驟
  - 10.1 檢體編號：核對檢驗單之個案與檢體是否相符，給予疾病編號 °
  - 10.2 檢驗前處理
    - 10.2.1 將血液分裝於 1.5 mL Eppendorf tube，以小型離心機離心 3 - 5 min，收集血清或血漿於 2 mL 螺旋試管 °
    - 10.2.2 記錄檢體於檢驗盤上之相對應位置，如附錄 15.1 °
    - 10.2.3 配置 Working RF absorbent: 一瓶 RF absorbent 以 5 mL 蒸餾水溶解 °

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 200 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

- 10.2.4 配置 Working wash solution: 用蒸餾水以 1:20 的比例稀釋 5.1.2.1 Washing solution POD。
- 10.2.5 配置 Working conjugate solution: 1 份 5.1.1.5 Anti-human IgM/POD conjugate + 50 份 5.1.1.6 Conjugate buffer microbiol。
- 10.2.6 配置 Working Chromogen solution: 1 份 5.1.2.4 Chromogen TMB + 10 份 5.1.2.3 buffer/substrate TMB。
- 10.2.7 Microplate washer 先以配置好的 Working wash solution 進行 Prime 指令，使管路充滿 Working wash solution。

## 10.3 檢驗步驟

- 10.3.1 血清稀釋至加到微量盤的步驟詳如附錄 15.2。
- 10.3.2 封上 5.1.2.6 Adhesive foils，置放 37 °C 溫箱培養 60 min。
- 10.3.3 啟動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.4 每個細胞格加入 100 μL Working conjugate solution。
- 10.3.5 置放 37 °C 溫箱培養 60 min。
- 10.3.6 啟動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.7 每個孔加入 100 μL Working Chromogen solution。
- 10.3.8 室溫，避光，培養 30 min。
- 10.3.9 每個孔加入 100 μL Stopping solution。
- 10.3.10 用 Microplate reader 測定 450 nm 吸光度，以 650 nm 做為參考波長。

## 10.4 檢驗後處理

- 10.4.1 Microplate washer 以蒸餾水進行二次 Prime，以去除殘存之 Wash solution，防止管路結晶阻塞。
- 10.4.2 使用後的 Tips、Eppendorf、Microplate strip，滅菌後丟棄。
- 10.4.3 Microplate washer、Microplate reader 關機。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準


計算	判定	判定標準
$\Delta A = A_{\text{antigen}} - A_{\text{control antigen}}$	陽性 (positive)	$\Delta A > 0.2$
	陰性 (negative)	$\Delta A < 0.1$
	未確定 (equivocal)	$0.1 \leq \Delta A \leq 0.2$

- 11.1 報告核發：麻疹 IgM 陽性，麻疹 IgM 陰性，麻疹 IgM 未確定。
- 11.2 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果登錄於附錄 15.4 麻疹 ELISA 實驗紀錄表，檢驗結果填寫於檢體送驗單之”檢驗結果欄”，並上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。

## 12 品質管制

- 12.1 Qualitative evaluation:  $\Delta A_{\text{Reference P/P}} \geq 0.2$ 。
- 12.2 Quantitative evaluation:

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 201 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

12.2.1 Lower margin  $\leq \Delta A_{\text{Reference P/P}} \leq$  upper margin。

12.2.2 任一  $\Delta A_{\text{Reference P/P}}$  介於 Reference P/P 平均值  $\pm 20\%$ 。

12.3 Measurement correction：利用 Reference P/P 來校正實驗值，改善結果的再現性。

### 計算範例

<b>Reference P/P, at start of series</b>	<b><math>\Delta A</math></b>	<b>0.474</b>
<b>With margins ?</b>		<b>yes</b>
<b>Reference P/P, at end of series</b>	<b><math>\Delta A</math></b>	<b>0.388</b>
<b>With margins ?</b>		<b>yes</b>
<b>Mean value</b>	<b><math>\Delta A</math></b>	<b>0.431</b>
<b>Reference P/P, nominal value</b>	<b><math>\Delta A</math></b>	<b>0.518</b>
<b>Correction factor 0.518:0.431</b>	<b>=</b>	<b>1.2</b>
<b>Corrected <math>\Delta A</math> 待測血清</b>	<b>=1.2 x <math>\Delta A</math> 待測血清</b>	

註：upper、lower margin、nominal value 詳見 5.1.1(9)，為 lot-specific。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Dade Behring 公司操作說明書。

14.2 Heath JL, Rota PA, Williams IS, et al. 1997. Measles IgG and IgM enzyme immunoassays. Ver 3, USA Center for Disease Control and Prevention, Viral and Rickettsial Disease Respiratory and Enteric Virus Branch, Measles Virus Section, pp. 4-17.

14.3 WHO. 2000. Manual for the laboratory diagnosis of measles virus infection. WHO/V&B/00.16. pp. 33-38.

## 15 附錄

15.1 檢體排列位置圖。


15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖。

15.3 麻疹病毒 IgM 抗體試驗（間接酵素免疫分析法）流程圖。

15.4 麻疹 ELISA 實驗紀錄表。

15.5 麻疹 ELISA 血清學檢驗及結果判定流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 202 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 檢體排列位置圖

		1		2		3		4		5		6	
Reference P/P	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
In-house positive	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		Antigen	Control antigen										

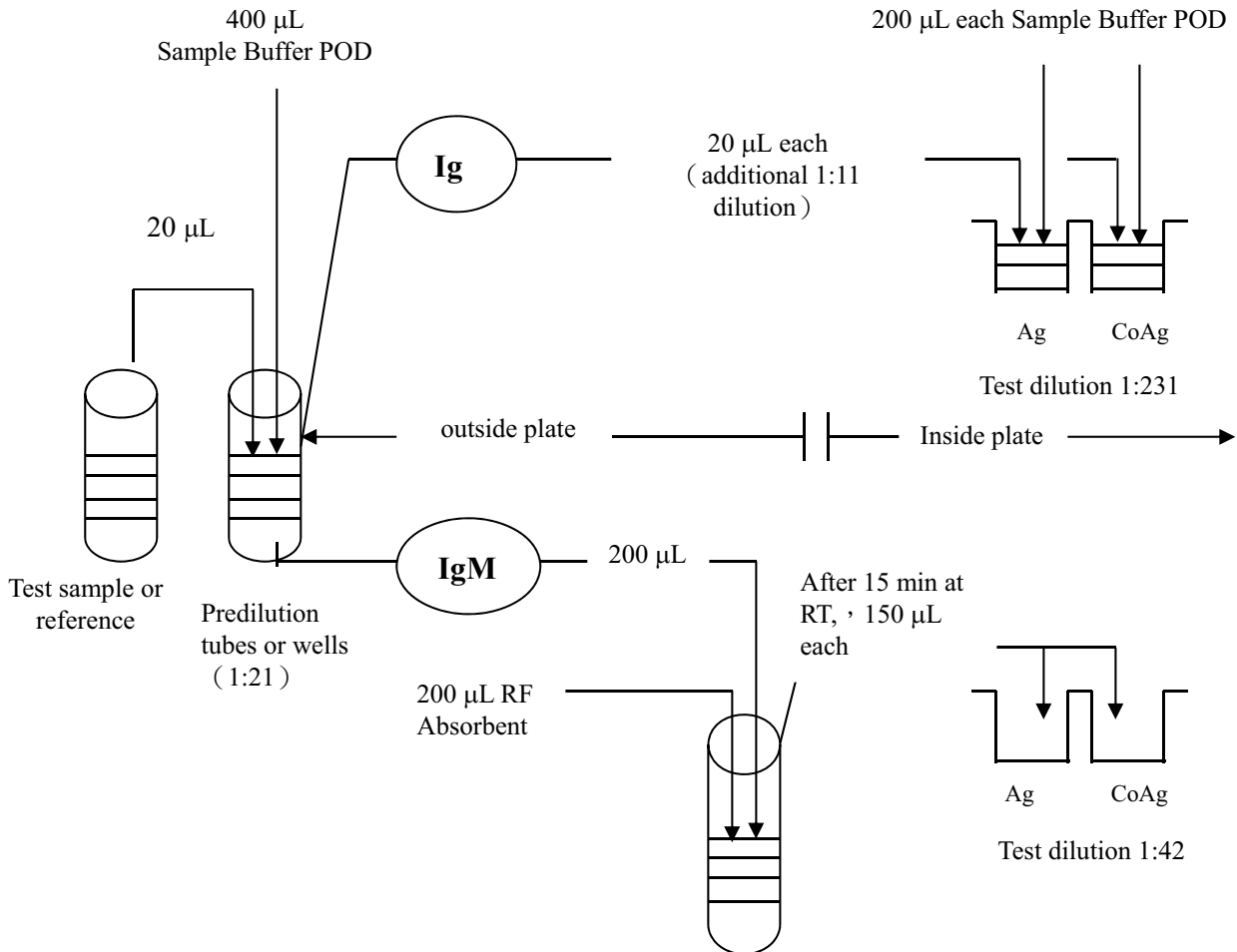
Reference P/P

1. 從 C1 開始置放待測檢體
2. Reference P/P 除 A1 位置固定外，另一 Reference P/P 位置視檢體量而定，在最後一個試劑條 H 對應位置

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 203 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

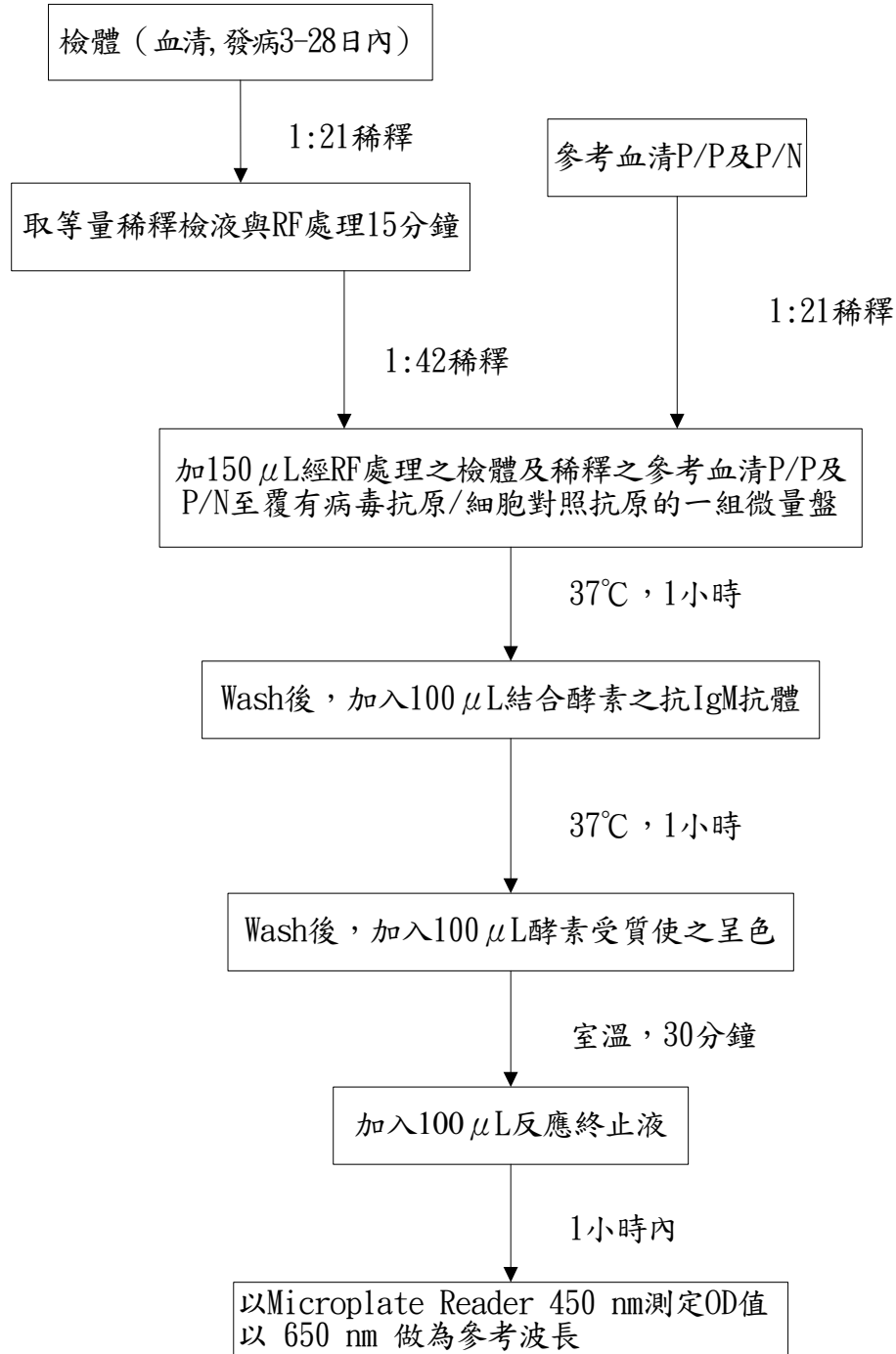
麻疹病毒 IgM 抗體檢測  
(Indirect ELISA)

核准日期： 年 月 日


頁次：第 204 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 麻疹病毒 IgM 抗體試驗 (間接酵素免疫分析法) 流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 205 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.4 麻疹 ELISA 實驗紀錄表

### 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 麻疹ELISA實驗紀錄表

Date :

Name	Measles IgM					Measles IgG				
	Well	Sample No.	$\Delta A$	Corrected $\Delta A$	Result	Well	Sample No.	$\Delta A$	Corrected $\Delta A$	Result
	1A	P/P				1A	P/N			
	B	in-house P				B	in-house P			
	C					C				
	D					D				
	E					E				
	F					F				
	G					G				
	H					H				
	2A					2A				
	B					B				
	C					C				
	D					D				
	E					E				
	F					F				
	G					G				
	H					H				

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px; text-align: center;">Validation Check</div> <p>1.P/P <math>\geq 0.2</math>                  2.P/P within lower and upper margin                  3.Individual P/P within <math>\pm 20\%</math> mean P/P</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">                     Kit Batch :                      Expiry :                      Lower margin :                      Upper margin :                      Nominal Value :                      Mean P/P :                      Correction Factor :                 </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px; text-align: center;">Validation Check</div> <p>1.P/N <math>\geq 0.5</math>                  2.P/N within lower and upper margin                  3.Individual P/N within <math>\pm 20\%</math> mean P/N</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">                     Kit Batch :                      Expiry :                      Lower margin :                      Upper margin :                      Nominal Value :                      Mean P/N :                      Correction Factor :                 </div>
---	---

**Result Interpretation**  
 (-)Negative < 0.10    (+)POSITIVE > 0.20    (+/-)EQUIVOCAL : 0.10-0.20

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

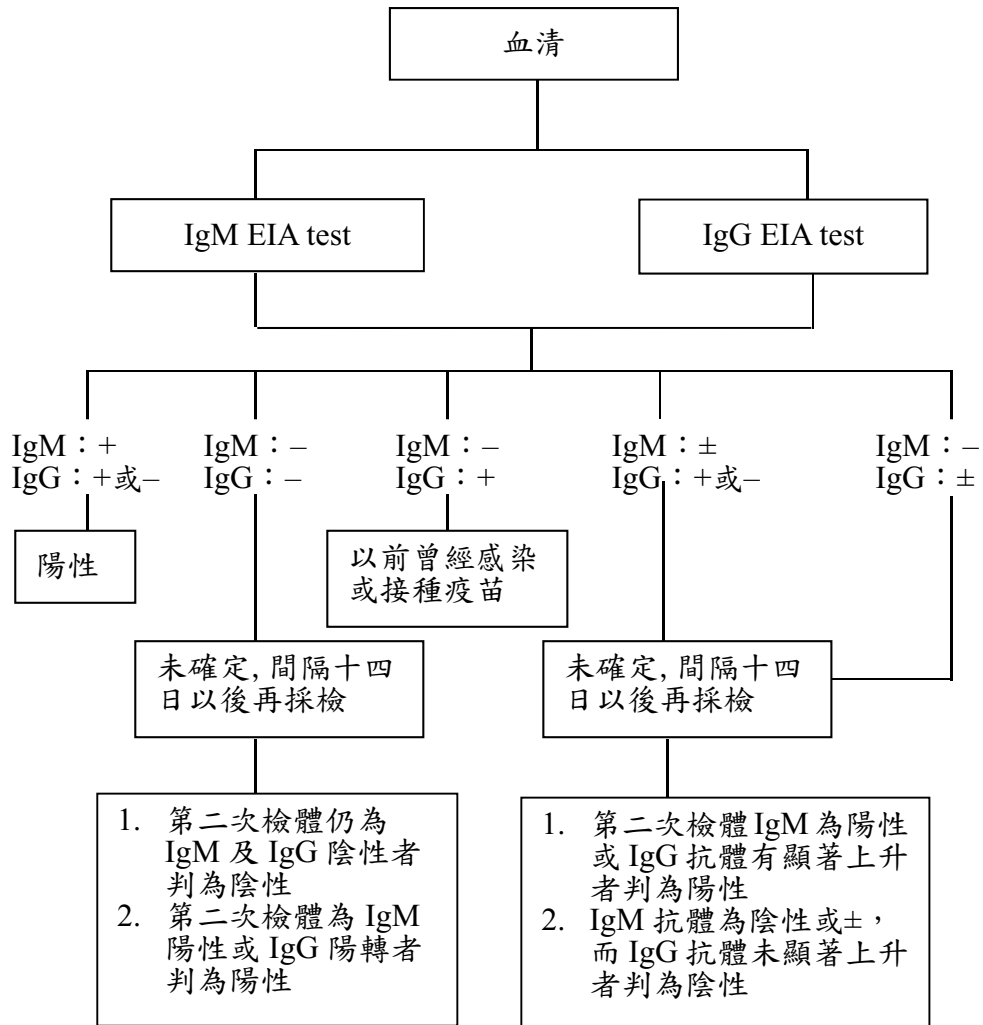


編號：  
頁次：第 206 頁/共 1078 頁

麻疹病毒 IgM 抗體檢測  
(Indirect ELISA)

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 麻疹 ELISA 血清學檢驗及結果判定流程圖





# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 207 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用間接免疫酵素分析法 (indirect ELISA, indirect enzyme-linked immunosorbent Assay) 檢測人體是否有麻疹專一性 IgG 抗體。

## 2 適用檢體種類

血清 (serum) 或血漿 (plasma)。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用間接酵素免疫分析法。利用 96 孔微量盤底覆有麻疹病毒抗原的測試盤與待測血清中具有麻疹專一性 IgG 抗體作用 1 hr，清洗掉未結合的物質，後加上 Anti-human IgG/POD Conjugate，再反應 1 hr，清洗掉未結合的物質，最後加上無色受質 TMB 作用 30 min，經 conjugate 上的酵素催化，轉換為藍色，最後再加上終止液終止反應，此時有反應的位置會變成黃色，以吸光度計測定 450 nm 波長的吸光值，以 650 nm 為參考波長。

## 5 試劑耗材

### 5.1 試劑

5.1.1 「Enzygnost anti-measles-virus/IgG : Dade Behring, OWLN 15, Germany, 4 °C 儲存」。

5.1.1.1 Anti-measles virus/IgG test plate : 2 × 6 strips。

5.1.1.2 Anti-measles virus Reference P/N : 0.4 mL。

5.1.1.3 Sample buffer POD : 2 × 50 mL。

5.1.1.4 Anti-human IgG/POD conjugate : 1 mL。

5.1.1.5 Conjugate buffer microbiol : 4 × 12.5 mL。

5.1.1.6 Polyethylene bag for storing unused test strip。

5.1.1.7 Barcode table of value。

5.1.2 「Supplementary reagents for enzygnost/TMB : Dade Behring, OUV 17, Germany, 4 °C 儲存」。

5.1.2.1 Washing solution POD : 3 × 100 mL。

5.1.2.2 Colour solution blue for enzygnost : 1 × 12.5 mL。

5.1.2.3 Buffer/substrate TMB : 4 × 30 mL。

5.1.2.4 Chromogen TMB : 4 × 3 mL。

5.1.2.5 Stopping solution POD : 2 × 100 mL。

5.1.2.6 Adhesive foils for microtiter plates : 24 pcs。

5.1.2.7 Empty bottle for the working Chromogen solution : 1 pcs。

5.1.2.8 Instruction for use : 1 pcs。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 208 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 5.2 耗材

- 5.2.1 tips：200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L。
- 5.2.2 1.5 mL Eppendorf tube。
- 5.2.3 4 mL Tube。
- 5.2.4 2 mL 螺旋試管。
- 5.2.5 抗凍標籤紙。
- 5.2.6 油性簽字筆。

## 6 儀器設備

- 6.1 單爪 Pipetman：20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L。
- 6.2 八爪 Pipetman：200  $\mu$ L。
- 6.3 電動分注器：50  $\mu$ L-1,000  $\mu$ L。
- 6.4 Microplate washer。
- 6.5 Microplate reader。
- 6.6 小型離心機。
- 6.7 37°C 溫箱。
- 6.8 振盪混合器。

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

10.1 檢體編號：核對檢驗單之個案與檢體是否相符，給予疾病編號。

### 10.2 檢驗前處理

- 10.2.1 將血液分裝於 1.5 mL Eppendorf，以小型離心機離心 3 -5 min，收集血清或血漿於 2 mL 螺旋試管。
- 10.2.2 記錄檢體於檢驗盤上之相對應位置，如附錄 15.1。
- 10.2.3 配置 Working wash solution：用蒸餾水以 1：20 的比例稀釋 5.1.2.1 Washing solution POD。
- 10.2.4 配置 Working conjugate solution：1 份 5.1.1.5 Anti-human IgG/POD conjugate + 50 份 5.1.1.6 Conjugate buffer microbiol。
- 10.2.5 配置 Working Chromogen solution：1 份 5.1.2.4 Chromogen TMB + 10 份 5.1.2.3 Buffer/substrate TMB。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 209 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

10.2.6 Microplate washer 先以配置好的 Working wash solution 進行 Prime 指令，使管路充滿 Working wash solution。

## 10.3 檢驗步驟

- 10.3.1 血清稀釋至加到微量盤的步驟詳如附錄 15.2。
- 10.3.2 封上 5.1.2.6 Adhesive foils，置放 37 °C 溫箱培養 60 min。
- 10.3.3 啟動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.4 每個細胞格加入 100 μL Working conjugate solution。
- 10.3.5 置放 37 °C 溫箱培養 60 min。
- 10.3.6 啟動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.7 每個孔加入 100 μL Working Chromogen solution。
- 10.3.8 室溫，避光，培養 30 min。
- 10.3.9 每個孔加入 100 μL Stopping solution。
- 10.3.10 用 Microplate reader 測定 450 nm 吸光度，以 650 nm 做為參考波長。

## 10.4 檢驗後處理

- 10.4.1 Microplate washer 以蒸餾水進行二次 Prime，以去除殘存之 Wash solution，防止管路結晶阻塞。
- 10.4.2 使用後的 Tips、Eppendorf、Microplate strip，滅菌後丟棄。
- 10.4.3 Microplate washer、Microplate reader 關機。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

計算	判定	判定標準
$\Delta A = A_{\text{antigen}} - A_{\text{control antigen}}$	陽性 (positive)	$\Delta A > 0.2$
	陰性 (negative)	$\Delta A < 0.1$
	未確定 (equivocal)	$0.1 \leq \Delta A \leq 0.2$

11.2 報告核發：麻疹 IgG 陽性，麻疹 IgG 陰性，麻疹 IgG 未確定。

11.3 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果登錄於附錄 15.4 麻疹 ELISA 實驗紀錄表，檢驗結果填寫於檢體送驗單之”檢驗結果欄”，並上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。

## 12 品質管制

12.1 Quantitative evaluation :  $\Delta A_{\text{Reference P/N}} \geq 0.5$ 。

12.2 Quantitative evaluation。

12.3 Lower margin  $\leq \Delta A_{\text{Reference P/N}} \leq$  upper margin

12.4 任一  $\Delta A_{\text{Reference P/N}}$  介於 Reference P/N 平均值  $\pm 20\%$ 。

12.5 Measurement correction：利用 Reference P/N 來校正實驗值，改善結果的再現性。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 210 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

## 計算範例

<b>Reference P/N , at start of series</b>	<b>ΔA</b>	<b>1.374</b>
<b>With margins ?</b>		<b>yes</b>
<b>Reference P/N , at end of series</b>	<b>ΔA</b>	<b>1.188</b>
<b>With margins ?</b>		<b>yes</b>
<b>Mean value</b>	<b>ΔA</b>	<b>1.281</b>
<b>Reference P/P,nominal value</b>	<b>ΔA</b>	<b>1.024</b>
<b>Correction factor 1.024:1.281</b>	<b>=</b>	<b>0.8</b>
<b>Corrected ΔA</b> 待測血清	<b>=0.8 x ΔA</b> 待測血清	

註：upper 、lower margin、nominal value 詳見 5.1.1(7)，為 lot-specific。

### 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

### 14 參考資料

- 14.1 Dade Behring 公司操作說明書。
- 14.2 Heath JL, Rota PA, Williams IS et al. 1997. Measles IgG and IgM enzyme immunoassays, Ver 3. U.S.A，Center for Disease Control and Prevention, Viral and Rickettsial Disease Respiratory and Enteric Virus Branch, Measles Virus Section. pp. 4-17.
- 14.3 WHO. 2000. Manual for the laboratory diagnosis of measles virus infection, WHO/V&B/00.16. pp.33-38.

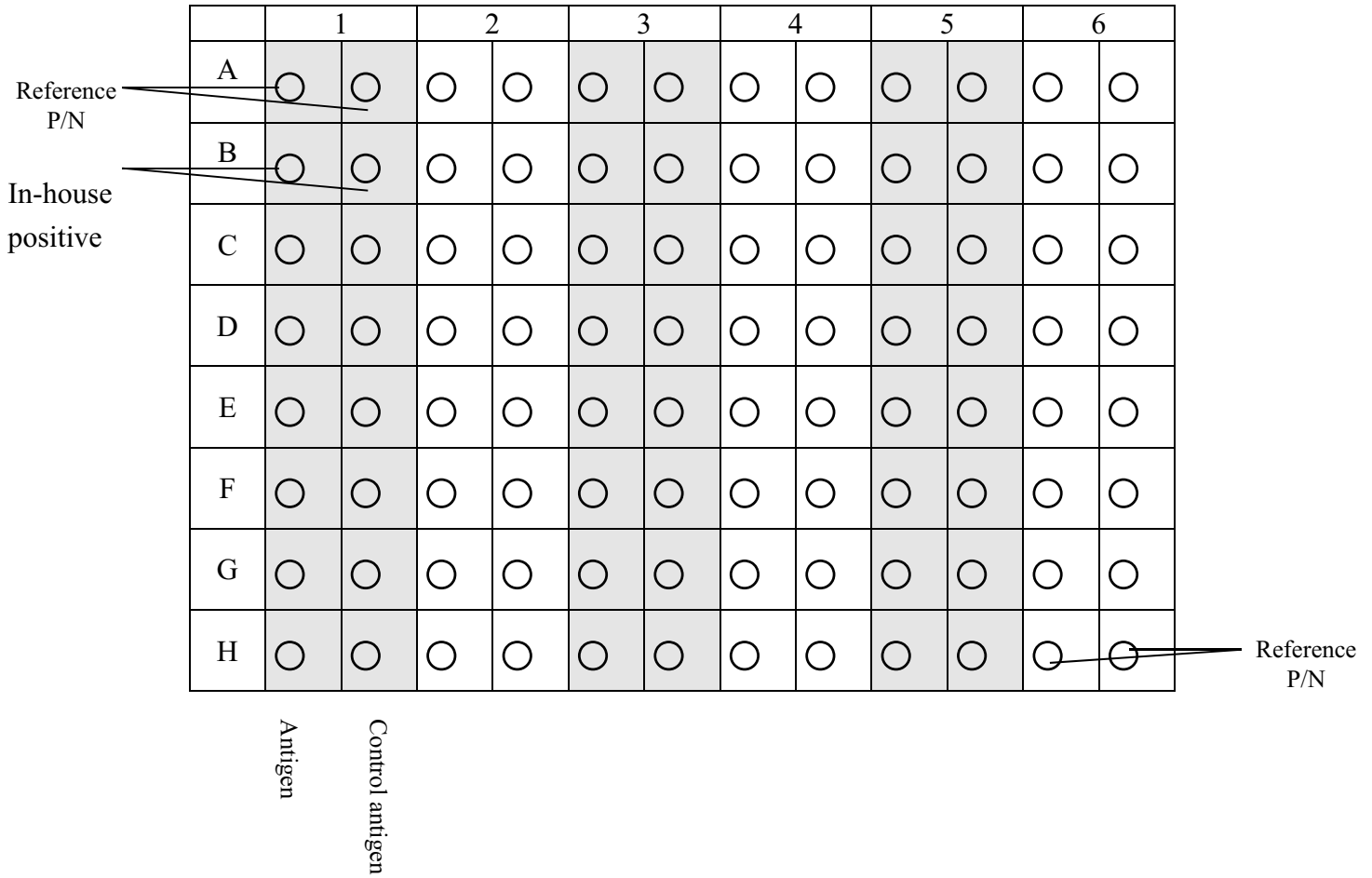
### 15 附錄

- 15.1 檢體排列位置圖。
- 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖。
- 15.3 麻疹病毒 IgG 抗體試驗（間接酵素免疫分析法）流程圖。
- 15.4 麻疹 ELISA 實驗紀錄表。
- 15.5 麻疹 ELISA 血清學檢驗及結果判定流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 211 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 檢體排列位置圖

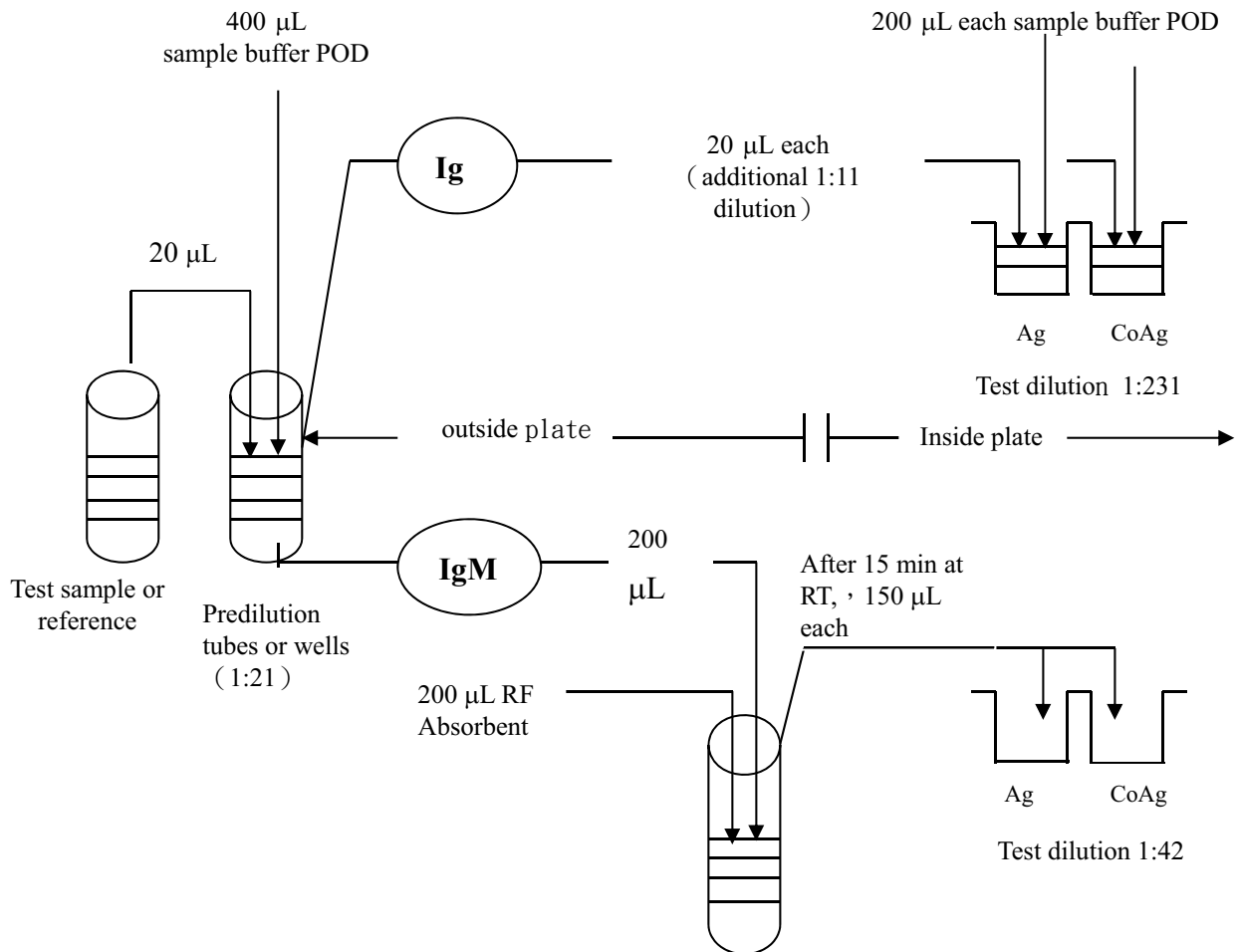


1. 從 C1 開始置放待測檢體。
2. Reference P/N 除 A1 位置固定外，另一 Reference P/N 位置視檢體量而定，在最後一個試劑條 H 對應位置。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 212 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

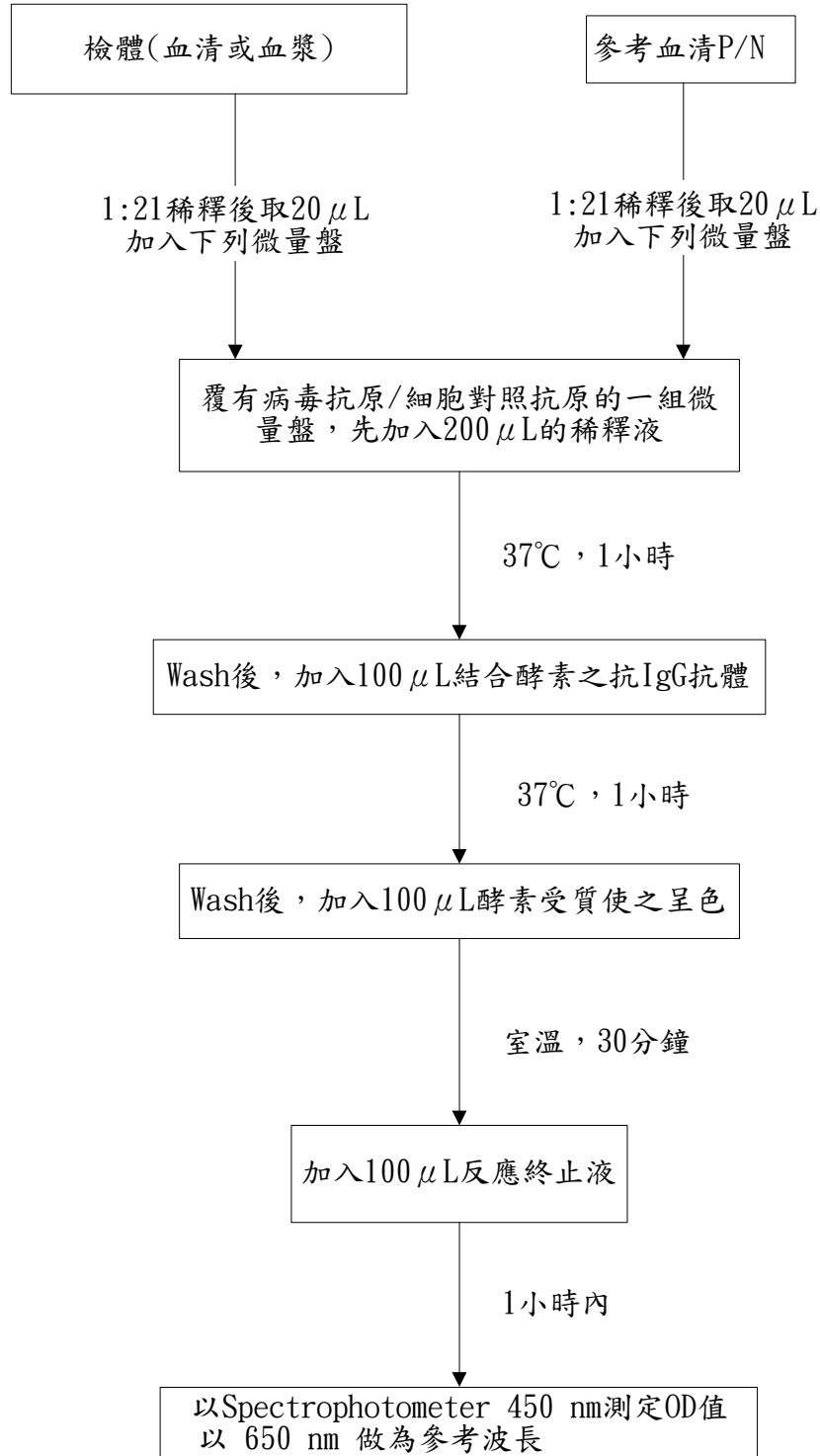
麻疹病毒 IgG 抗體檢測  
(Indirect ELISA)

核准日期： 年 月 日

頁次：第 213 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 麻疹病毒 IgG 抗體試驗 (間接酵素免疫分析法) 流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

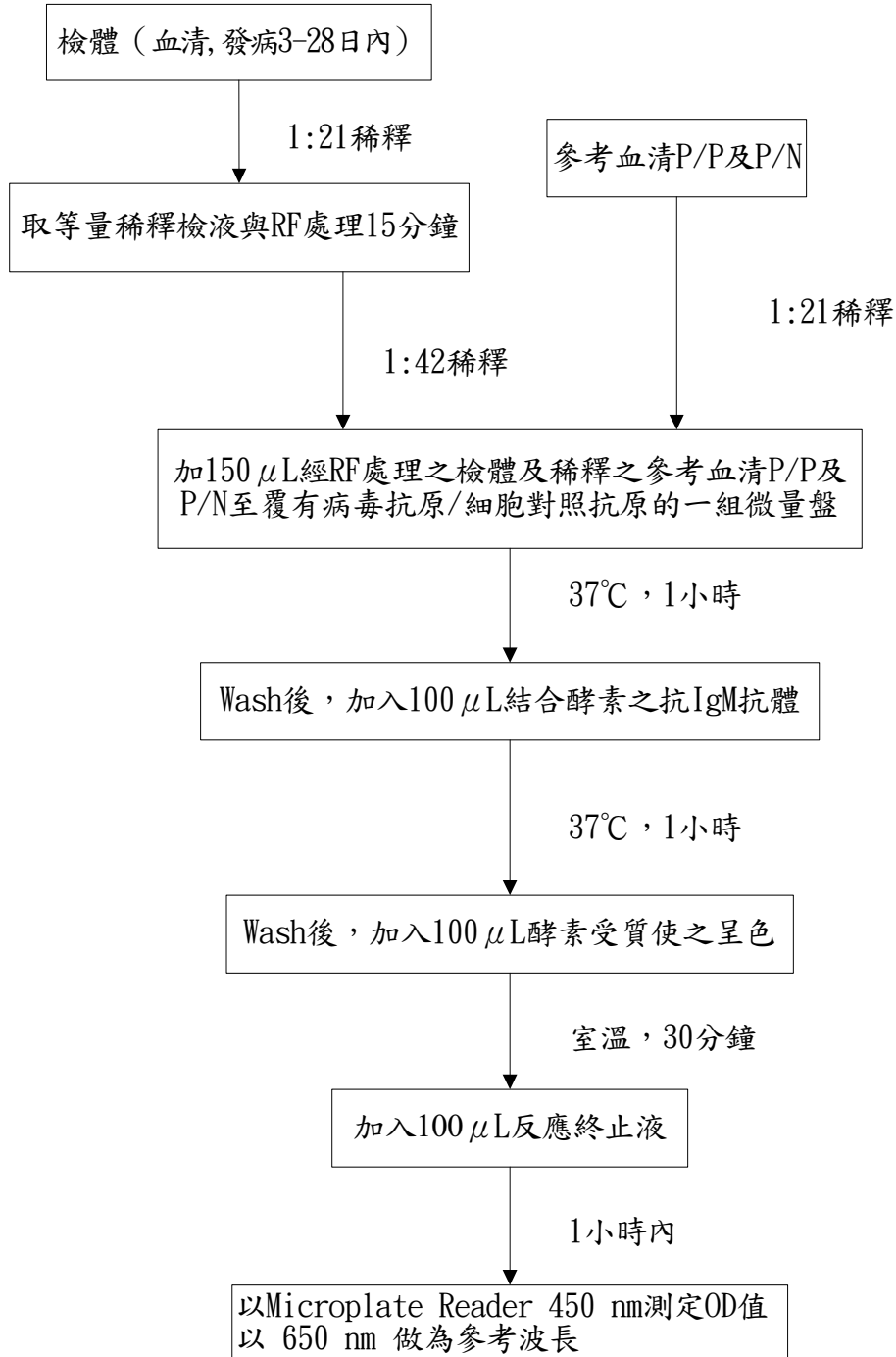


編號：  
頁次：第 214 頁/共 1078 頁

麻疹病毒 IgG 抗體檢測  
(Indirect ELISA)

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 麻疹病毒 IgG 抗體試驗(間接酵素免疫分析法)流程圖(續)





# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 215 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.4 麻疹 ELISA 實驗紀錄表

### 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 麻疹ELISA實驗紀錄表

Date :

Name	Measles IgM					Measles IgG				
	Well	Sample No.	$\Delta A$	Corrected $\Delta A$	Result	Well	Sample No.	$\Delta A$	Corrected $\Delta A$	Result
	1A	P/P				1A	P/N			
	B	in-house P				B	in-house P			
	C					C				
	D					D				
	E					E				
	F					F				
	G					G				
	H					H				
	2A					2A				
	B					B				
	C					C				
	D					D				
	E					E				
	F					F				
	G					G				
	H					H				

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px; text-align: center;">Validation Check</div> <p>1.P/P <math>\geq 0.2</math>                  2.P/P within lower and upper margin                  3.Individual P/P within <math>\pm 20\%</math> mean P/P</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">                     Kit Batch :                      Expiry :                      Lower margin :                      Upper margin :                      Nominal Value :                      Mean P/P :                      Correction Factor :                 </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px; text-align: center;">Validation Check</div> <p>1.P/N <math>\geq 0.5</math>                  2.P/N within lower and upper margin                  3.Individual P/N within <math>\pm 20\%</math> mean P/N</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">                     Kit Batch :                      Expiry :                      Lower margin :                      Upper margin :                      Nominal Value :                      Mean P/N :                      Correction Factor :                 </div>
---	---

**Result Interpretation**  
 (-)Negative < 0.10    (+)POSITIVE > 0.20    (+/-)EQUIVOCAL : 0.10-0.20

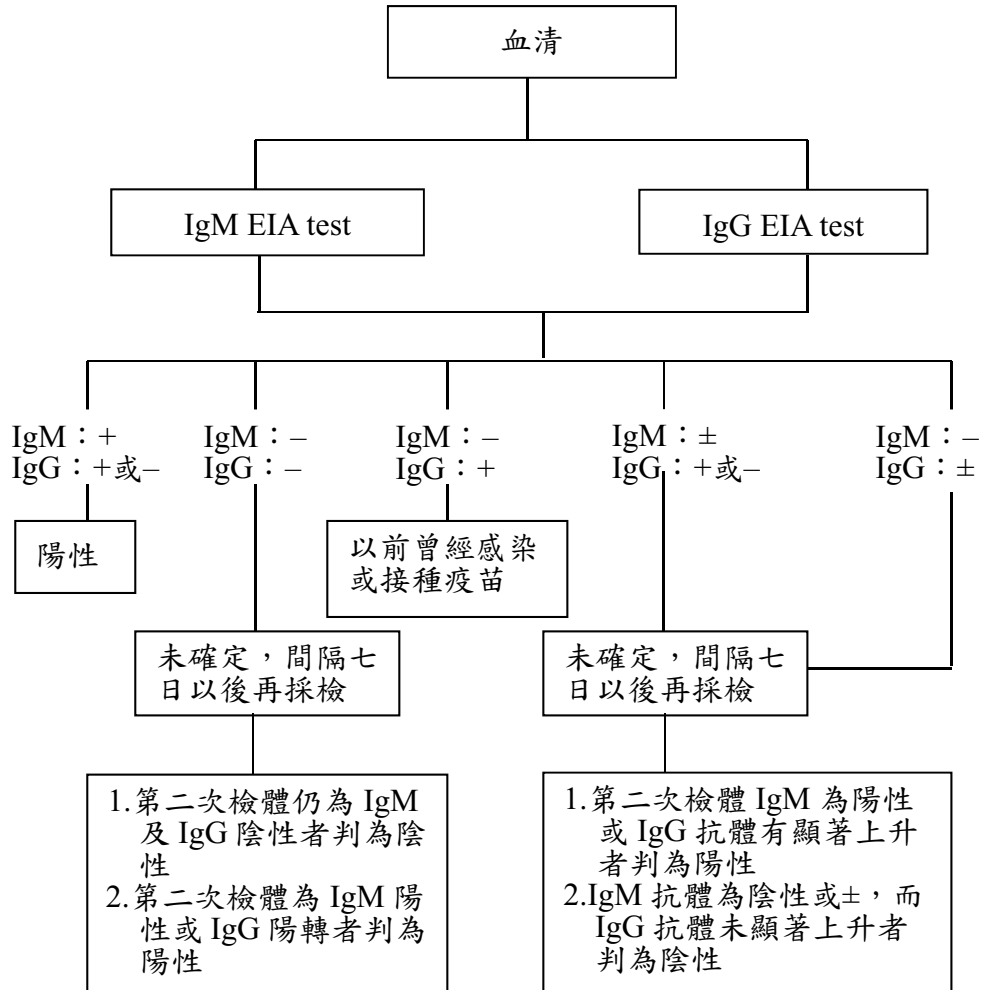
檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 216 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 麻疹血清學檢驗及結果判定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

A 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 217 頁/共 1078 頁

(化學冷光微粒免疫分析法)

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

定性測試人體血清及血漿中之抗 A 型肝炎病毒 IgM 抗體 (IgM anti-HAV)。ARCHITECT HAVAb-IgM 分析可用於輔助診斷急性或近期感染之 A 型肝炎。

## 2 適用檢體種類

適用於血清或血漿檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

ARCHITECT IgM anti-HAV 分析為二步驟免疫分析法，利用化學冷光微粒免疫分析技術，配合彈性式分析過程(亦即 Chemiflex®)，定性測試人體血清及血漿中之 IgM anti-HAV。

在第一步驟中，預先稀釋過之樣本、分析稀釋液和覆被 A 型肝炎病毒(人類)的磁性微粒混合，存於樣本中的 IgM anti-HAV 會與覆被 A 型肝炎病毒(人類)之微粒結合。經清洗後，IgM anti-HAV 會與在第二步驟加入的標示 acridinium 之抗人類 IgM 偶合物結合。經另一次清洗循環後，加入啟動前溶液及啟動溶液至反應混合物中。以相對光線單位 (RLUs) 測量最終的化學冷光反應，樣本中的 IgM anti-HAV 含量與 ARCHITECT i-1000 光學系統所測得之 RLUs 有直接相關性。樣本中的 IgM anti-HAV 存在與否，經由比較反應之化學冷光訊號及由 ARCHITECT HAVAb-IgM 校正液測得之臨界值來判定。

## 5 試劑耗材

### 5.1 試劑：

5.1.1 ARCHITECT HAVAb-IgM 試劑組 (No.6C30)：1 或 4 瓶 (6.6 mL) 覆被 A 型肝炎病毒 (人類) 之微粒於 TRIS 緩衝液中。最小濃度：0.08% 固體。防腐劑：ProClin® 300 及其他抗菌劑。

5.1.2 1 或 4 瓶 (5.9 mL) 標示 acridinium 之抗人類 IgM (小鼠，單株抗體) 偶合物於含蛋白質穩定劑 (牛) 之 MES 緩衝液中。最小濃度：0.01 µg/mL，防腐劑：ProClin 300 及其他抗菌劑。

5.1.3 1 或 4 瓶 (10.0 mL) HAVAb-IgM 分析稀釋液含蛋白質穩定劑 (牛) 於 TRIS 緩衝液中。防腐劑：ProClin 300 及其他抗菌劑。

5.1.4 ARCHITECT i 啟動前溶液 (Pre-Trigger Solution)：含 1.32 % (w/v) 過氧化氫。

5.1.5 ARCHITECT i 啟動溶液 (Trigger Solution)：含 0.35 M 氫氧化鈉。

5.1.6 ARCHITECT i 清洗緩衝液 (Wash Buffer)：含磷酸緩衝食鹽水溶液，防腐劑：抗菌劑。

5.1.7 ARCHITECT i HAVAb-IgM calibrator 校正液 (No. 6C30-01)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

A 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測  
(化學冷光微粒免疫分析法)

核准日期： 年 月 日

頁次：第 218 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

5.1.8 ARCHITECT i HAVAb-IgM control 對照劑 (No. 6C30-10)。

5.1.9 ARCHITECT i probe conditioning solution 探針清洗液。

5.1.10 漂白水。

## 5.2 耗材：

5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L。

5.2.2 反應容器 (Reaction vessels)。

5.2.3 樣本杯 (Sample cups)。

5.2.4 試劑軟蓋 (Septums)。

5.2.5 可拋棄式無菌塑膠手套。

## 6 儀器設備

6.1 Architect i-1000 分析儀。

6.2 第二級生物安全操作櫃 (Class II BSC)。

6.3 微量吸管 (pipettes)：1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L。

6.4 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。

6.5 4  $^{\circ}$ C 冰箱。

6.6 -20  $^{\circ}$ C 冷凍櫃。

6.7 高壓滅菌鍋。

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>

## 10 檢驗步驟

10.1 待測病患檢體依照檢體 Bar code 編號 (由小至大) 排序。

10.2 檢體前處理：

10.2.1 待測檢體 (血清、血漿) 需先震盪混合均勻並以 10,000  $\times$  g 離心 10 分鐘去除雜質，取其上清液。

10.2.2 第一次測試最小樣本杯檢體體積為 150  $\mu$ L，每多一次測試增加檢體 20  $\mu$ L，將樣本杯依序放置於檢體架上。

1.1 Sample Order：

10.2.3 由 Main Menu 中按 Orders 進入選項 calibration order、control order 依序輸入位置後，各選擇 HAVAB-M 項目，按 Add order。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

A 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測  
(化學冷光微粒免疫分析法)

核准日期： 年 月 日

頁次：第 219 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

- 10.2.4 將已放上校正液和對照劑之檢體架放進 i-1000 分析儀中，進行品管分析。
- 10.2.5 點選 Orders 後再點選 Patient order。
- 10.2.6 輸入 Carrier 號碼。
- 10.2.7 輸入 C/P (檢體放置於檢體架上之位置) 及 SID (檢體編號)，亦可輸入 PID (病歷號)。(整批檢體輸入請依 Batch Order 方式)
- 10.2.8 點取測試項目 HAVAB-M。
- 10.2.9 點取 F3 Add order。
- 10.2.10 將放有檢體之 Carrier 放置於 load queue 上，即可開始分析測試。

## 10.3 Batch Order：

- 10.3.1 檢體不含 barcode  
Patient orders 畫面中點選 Batch 即進入 Batch order 畫面，只要於 Starting C:及 P:輸入第一支檢體 carrier 號碼及位置然後於 Number of samples 輸入檢體數目接著點選欲上機之 Assay 項目再點選 F3-Add order 即可。
- 10.3.2 檢體含 barcode  
於 Patient orders 畫面中點選 Batch 並於 Starting SID 輸入第一支檢體之 SID 於 Ending SID 輸入最後一支檢體 SID 接著點選 Assays 後按 F3-Add order 即可。檢驗後處理
- 10.4.1 完成檢驗，HAV 試劑組貯存於 4 °C 冰箱保存。
- 10.4.2 執行關機前做好保養工作，按 F1 Exit 鍵讓螢幕回到 Main Menu，按 F2 Shutdown 鍵，選擇 OK，等待螢幕告知 Shutdown 完全後，才可關掉電源和印表機。
- 10.4.3 檢驗後之檢體應依序歸回檢體盒，放置 -20 °C 冰箱保存。
- 10.4.4 整理清除實驗工作桌面上之抗污紙墊及使用後拋棄之微量吸管尖、手套包裝於廢棄物滅菌塑膠袋。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 ARCHITECT i-1000 系統由校正液 1 三次測試結果之平均 RLU 值計算出臨界值 RLU(CO)並儲存結果。  
臨界值 RLU = 校正液 1 平均 RLU 值 × 0.375  
儲存每一批號試劑校正之臨界值 RLU
- 11.1.2 ARCHITECT i-1000 系統根據樣本 RLU 與臨界值 RLU 之比率 (S/CO)計算每一個檢體及對照劑之分析結果。  
S/CO = 樣本 RLU / 臨界值 RLU  
例如：若樣本 RLU = 2161 且臨界值 RLU = 512.25  
則 S/CO = 2161 / 512.25 = 4.22

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

A 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 220 頁/共 1078 頁

(化學冷光微粒免疫分析法)

修訂日期： 年 月 日

## 11.1.3 生物參考區間：

測試結果 (S/CO)	視為 IgM anti-HAV
< 0.80	無反應性 (陰性)
0.80~1.20	灰色區域有反應性 (GZ)
> 1.2	有反應性 (陽性)

檢體之訊號與臨界值比率(S/CO)大於 1.20，視為 IgM anti-HAV 有反應性；檢體之 S/CO 值介於 0.8 至 1.20 之間，視為灰色區域有反應性；檢體之 S/CO 值小於 0.8，則視為無反應性。

11.1.4 檢驗結果由檢驗儀器傳回電腦再列印出檢驗數據結果，並於列印紙上蓋章。

11.2 報告核發：IgM-anti-HAV (陽性)、IgM-anti-HAV (陰性)。

11.3 結果登錄：將檢驗結果填寫於檢體送驗單之”檢驗結果”欄，並於送驗單背面蓋職章，相關檢驗紀錄及檢體送驗單陳核實驗室主管審核，由本署內部之網站應用系統進入傳染病通報系統輸入檢驗結果並以電子傳真輸送。

11.3.1 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。

11.3.2 臨床意義：

IgM anti-HAV 分析可測定人體血清或血漿中是否有抗 A 型肝炎病毒 IgM 抗體(IgM anti-HAV)的存在。A 型肝炎為一自限性疾病，且通常為次臨床性，尤其是在孩童身上。因為有症狀之 A 型肝炎病毒(HAV)感染在臨床上無法與 B 型或 C 型肝炎病毒感染區別，為達到適當診斷，血清學測試是一重要工具。在 HAV 感染的急性期，IgM anti-HAV 會出現在患者血清中，且大多在症狀開始即可偵測到。在大多數案例中，IgM anti-HAV 反應通常在發病後的第一個月達到尖峰，並可持續長達 6 個月。

## 12 品質管制

12.1 應於有效期限內使用，不同批號試劑組，其試劑不可混合使用。

12.2 每個月或更換試劑批號時都需做校正，此外亦需根據每日對照劑的測試結果，決定是否重新校正。校正液與對照劑使用前要上下均勻混合，動作溫和避免氣泡。為得到建議所需之 ARCHITECT HAVAb-IgM 校正液及對照劑量，垂直握住瓶子，滴 4 滴校正液與陰性、陽性對照劑各 4 滴於各自樣本杯中。

12.3 每次進行檢測試驗皆須加入陰性、陽性對照劑進行測定：

陰性對照劑 (SCO)  $\leq 0.65$

陽性對照劑 (SCO) 1.22 - 2.53

當其測定值落在可接受區間內，就可以繼續進行檢體的測定。若對照劑的測定值超出可接受區間，必須進一步檢視問題，並一一予以確認和排除，然後再重新以對照劑完成品管檢測作業，最後才進行檢體的測定。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

A 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測  
(化學冷光微粒免疫分析法)

核准日期： 年 月 日

頁次：第 221 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料


ARCHITECT HAVAB-IgM 原廠試劑說明書。

## 15 附錄

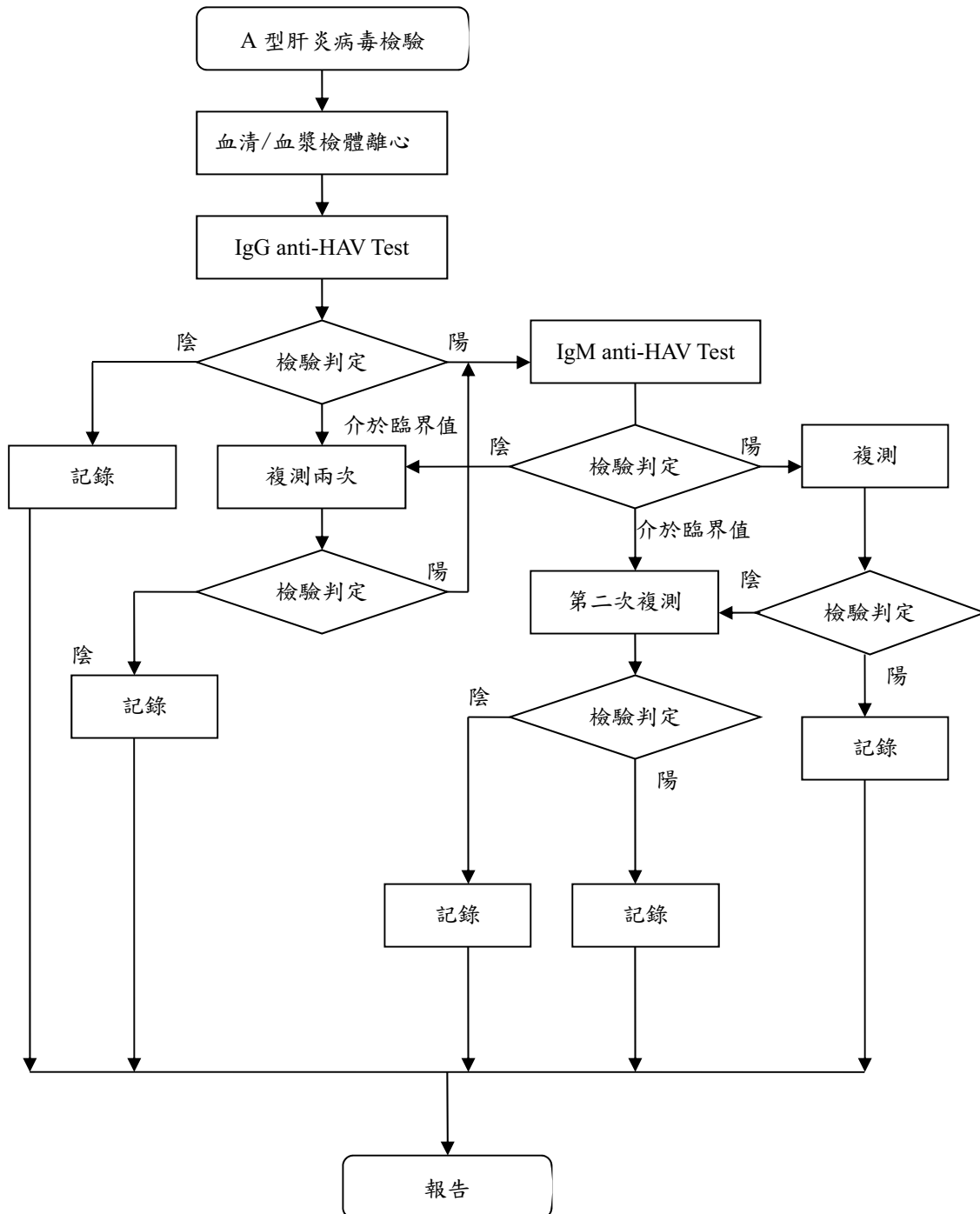
15.1 急性 A 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖。

15.2 A 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗（化學冷光微粒免疫分析法）流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	A 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測 (化學冷光微粒免疫分析法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 222 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 急性 A 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖





# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

A 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測

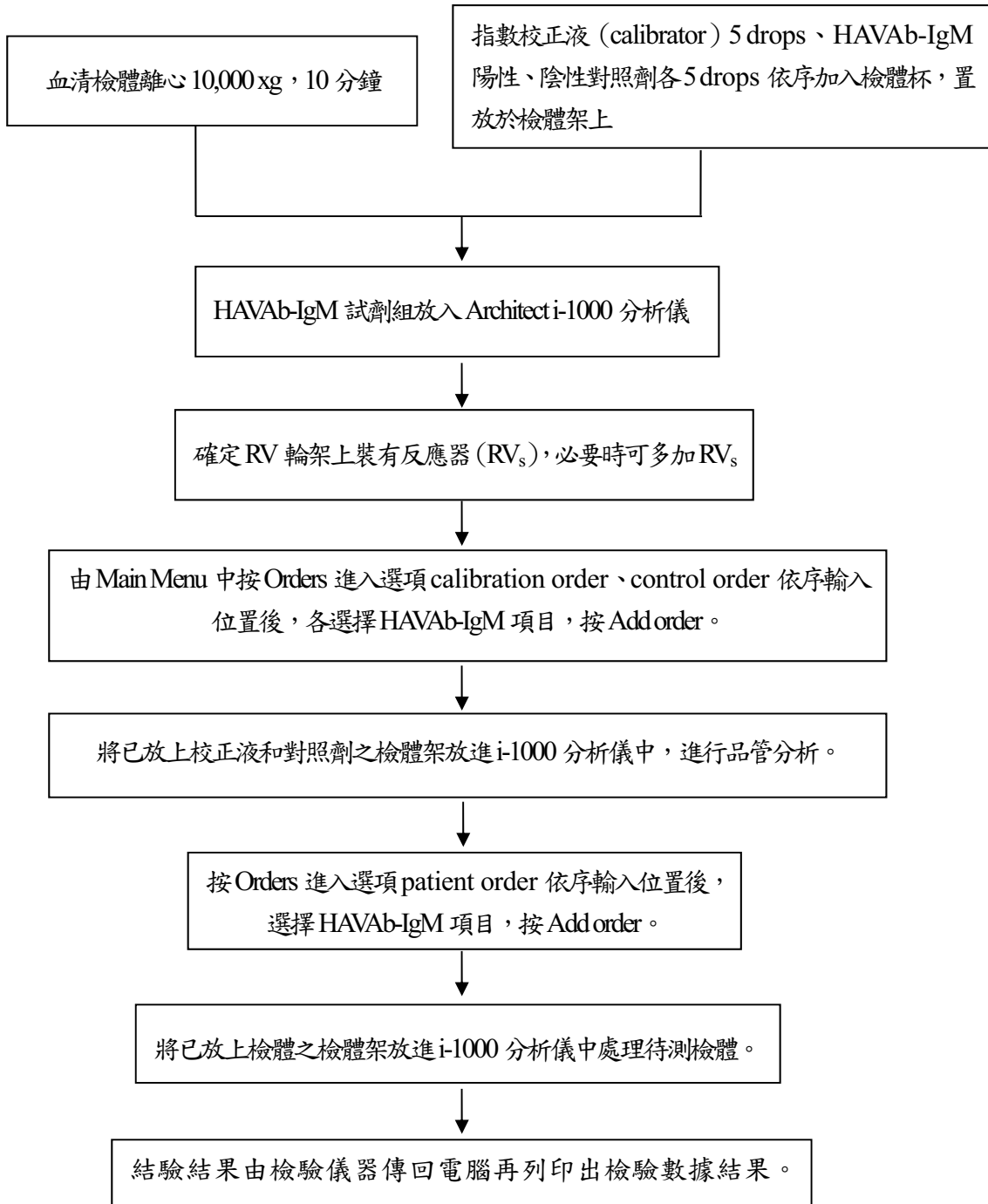
核准日期： 年 月 日

頁次：第 223 頁/共 1078 頁

(化學冷光微粒免疫分析法)

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 A 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗 (化學冷光微粒免疫分析法) 流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

漢他病毒核酸檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 224 頁/共 1078 頁

(Real-time RT-PCR)

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 分子診斷方法檢測疑似病患的血液、體液或組織檢體是否含有漢他病毒核酸。

## 2 適用檢體種類

適用於病人血液、體液或組織檢體。

## 3 名詞解釋

Threshold cycle (Ct)：係指 PCR 產物複製的量，累積到足以被偵測到的第一個循環點稱之。換句話說，Ct 的值越小，表示檢體中初始 DNA/RNA 的含量越多。

## 4 原理概述

利用對漢他病毒 (hantavirus) 具有專一性之引子 (primers) 與檢體中之病毒核酸分子結合配對，並利用 RT-PCR 的複製過程及特殊的螢光定量化學方法偵測 RT-PCR 產物，以決定檢體中是否含有漢他病毒核酸序列，所用之引子選自於漢他病毒之保守性序列 (conserved sequences)。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

5.1.1 病毒 RNA 萃取試劑套組。

5.1.2 SYBR green 定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應單步驟試劑套組。

### 5.2 耗材

5.2.1 檢體瓶。

5.2.2 無菌吸管。

5.2.3 定量 PCR 專用八連排反應管及蓋。

5.2.4 無菌過濾型 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L 吸管尖。

5.2.5 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.2.6 無粉手套。

## 6 儀器設備

6.1 第 II 級生物安全櫃。

6.2 即時多重定量 PCR 偵測系統。

6.3 10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、40  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L 微量滴管分注器。

6.4 高速離心機。

6.5 真空抽氣機。

6.6 冰箱：4  $^{\circ}$ C。


6.7 冷凍櫃：-20  $^{\circ}$ C。

6.8 高壓滅菌鍋。

## 7 環境設施安全

7.1 病人血清檢體應在第 II 級生物安全櫃內處理。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 225 頁/共 1078 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。
- 7.3 應有獨立的操作空間，盡量與操作 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

- 10.1.1 裝有靜脈血的無菌真空試管以 2,000 轉離心 10 分鐘，以無菌吸管將血清吸入檢體瓶內旋緊瓶蓋。
- 10.1.2 檢體瓶上標註檢體標號。
- 10.1.3 檢體處理好後置 2-8°C 冰箱冷藏。

### 10.2 步驟

- 10.2.1 萃取病毒 RNA，依據所使用試劑製造業者的操作手冊進行。
- 10.2.2 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應，取 5 µL RNA 做模板，加入漢他病毒專一性引子組（參考附錄 15.1），並依據所使用試劑製造業者的操作手冊，加入其他所需試劑，調整反應總體積至 25 µL。
- 10.2.3 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應程式設定：
- 10.2.4 RT 作用：50 °C，30 min。
- 10.2.4.1 Taq polymerase activation：95 °C，15 min。
- 10.2.4.2 Denaturation：95°C，15 sec。
- 10.2.4.3 Annealing：55 °C，30 sec。
- 10.2.4.4 Extension：72 °C，20 sec。
- 10.2.4.5 77 °C，30 sec，收集螢光值。
- 10.2.4.6 重複 10.2.4.3 至 10.2.4.6 步驟 45 Cycle。
- Melting curve analysis：
- 10.2.4.7 95 °C，1 min。
- 10.2.4.8 以 0.2°C/秒速率降溫至 68°C，收集螢光值。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 陽性對照組的 Ct 值需小於或等於 30，Tm 值需大於或等於 79°C。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 226 頁/共 1078 頁


漢他病毒核酸檢測  
(Real-time RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 11.1.2 陰性對照組的  $C_t$  值需大於或等於 40， $T_m$  值需小於  $79^{\circ}\text{C}$ ， $C_t$  值或  $T_m$  值有一項符合上述要求即可。
- 11.1.3 陽性對照組或陰性對照組其中之一不符合設定值時，則重新實驗。
- 11.1.4 在陽性對照與陰性對照組符合設定值下， $C_t$  值小於 35、 $T_m$  值大於或等於  $79^{\circ}\text{C}$  者，判為漢他病毒陽性，反之則判為漢他病毒陰性。
- 11.2 報告核發：
  - 11.2.1 漢他病毒核酸檢測方法：螢光定量聚合酶-連鎖反應 (real-time PCR)。
  - 11.2.2 結果：陽性。
  - 11.2.3 結果：陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統 (LIMS) 之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。
- 12 品質管制
  - 12.1 每次進行實驗時皆有對照組，陽性對照組與陰性對照組的  $C_t$  值需符合設定值。
  - 12.2 實驗過程遵循標準檢驗方法的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。
  - 12.3 即時多重定量 PCR 偵測系統定時作檢測與校正。
  - 12.4 微量滴管分注器定期校正。
  - 12.5 注意試劑套組的使用期限與適當的儲放溫度。
- 13 廢棄物處理  
檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以  $121^{\circ}\text{C}$ ，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。
- 14 參考資料
  - 14.1 Arthur RR, Lofts RS, Gomez J, Glass GE, LeDuc JW, Childs JE. Grouping of hantaviruses by small (S) genome segment polymerase chain reaction and amplification of viral RNA from wild-caught rats. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47:210-224.
  - 14.2 Nicol ST, Christina FS, Sergrey M, Rollin PE, Ksiazek TG, Fedmann H, Sabchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ. 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914-917.
- 15 附錄
  - 15.1 漢他病毒診斷用引子組序列表。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 227 頁/共 1078 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.1 漢他病毒診斷用引子組序列表

---

<b><u>Hantavirus specific primer</u></b>		<u>參與反應的濃度</u>
HTN-S4	GAI IGI TGT CCA CCA ACA TG	300nM
HTN-S6	AGC TCI GGA TCC ATI TCA TC	300nM
<b><u>Hantavirus specific primer</u></b>		
RH-20	CAG AAG GTC AAG GAT GCA GAA AA	300nM
RH-21	GTC TGT CCT GTA GGT TCA TCA AT	300nM

---

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 228 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

檢測漢他病毒(Hantavirus) IgM 及 IgG 抗體，可用於漢他病毒出血熱的血清學診斷。

## 2 適用檢體種類

適用於人體血清檢體。

## 3 名詞解釋

間接酵素結合免疫吸附法 (indirect ELISA)，以標有酵素的抗免疫球蛋白之抗體間接抗特定的抗原，主要目的在偵測待測物中抗體反應的量或強度。

## 4 原理概述

酵素結合免疫吸附法是以酵素作標識，結合吸附抗體—抗原複合體，再以呈色劑顯色而來定量的一種方法。此為利用免疫血清中，抗原與抗體之交互作用來探測檢體中是否存在目標病毒抗體。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑：

#### 5.1.1 漢他病毒出血熱酵素免疫吸附分析法檢測套組

5.1.1.1 陽性對照組 (positive control)

5.1.1.2 陰性對照組 (negative control)

5.1.1.3 Cut-Off calibrator

5.1.1.4 檢體稀釋液 (sample diluent)

5.1.1.5 清洗液 (10 X washing buffer)

5.1.1.6 96 孔微量滴定盤 (coating recombinant antigen of hantavirus)

#### 5.1.2 GαH IgG/IgM-AP(山羊抗人 IgG/IgM 抗體-鹼性磷酸酶結合體)

### 5.2 耗材

5.2.1 p-nitrophenyl-phosphate (pNPP)。

5.2.2 丟棄式 250 μL、1,000 μL 吸管尖。

5.2.3 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.2.4 手套。

5.2.5 水質：25 °C，RO 逆滲透去離子可達 18M Ω-CM 以上

5.2.6 之無菌水 (去離子水)。

5.2.7 八連排稀釋管。

## 6 儀器設備

6.1 免疫酵素分析自動清洗機 (automated EIA plate washing device) (操作方法參見文件編號：CDC-LAB-ISOP-000)。

6.2 恆溫培養箱。

6.3 免疫酵素分析儀 (ELISA plate spectrophotometer) (操作方法參見文件編號：CDC-LAB-ISOP-000)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 229 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 6.4 2  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1,000  $\mu\text{L}$  微量滴管分注器 (pipettors)。  
(finnpipette)
  - 6.5 震盪器。
  - 6.6 冰箱：4  $^{\circ}\text{C}$ 。
  - 6.7 冷凍櫃：-20  $^{\circ}\text{C}$ 。
  - 6.8 高壓滅菌鍋。
  - 6.9 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 7 環境設施安全
- 7.1 病人血清檢體應在第 II 級生物安全櫃內處理。
  - 7.2 血清處理之後，先放入 56  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min，以降低病毒活性。
  - 7.3 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。
- 8 檢體採集
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treid=4C19A0252BBEF869&nowtrecid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treid=4C19A0252BBEF869&nowtrecid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
- 10.1 檢驗前處理
    - 10.1.1 檢體以 2000 rpm 離心 10 分鐘，分離出血清備用
  - 10.2 步驟
    - 10.2.1 檢體編號登錄。
    - 10.2.2 取 250  $\mu\text{L}$ /孔 1X PBS 浸潤 96 孔真空乾燥微量滴定盤 5 min。
    - 10.2.3 取待測血清 2  $\mu\text{L}$  加入檢體稀釋液 (sample diluent) 200  $\mu\text{L}$  稀釋 100 倍。
    - 10.2.4 取 100  $\mu\text{L}$ /孔待測血清及陰性、陽性對照血清，分別加入 Coating recombinant protein 抗原的 96 孔微量滴定盤中。
    - 10.2.5 放置於溫度設定為 37  $^{\circ}\text{C}$  的恆溫培養箱中 1 hr，之後清洗 4 次，拍乾。
    - 10.2.6 取 100  $\mu\text{L}$ /孔山羊抗人 IgG/IgM 抗體-鹼性磷酸酶結合體稀釋液加入 96 孔微量滴定盤。
    - 10.2.7 置於溫度設定為 37  $^{\circ}\text{C}$  的恆溫培養箱中 30 min，之後清洗 4 次，拍乾。
    - 10.2.8 取 100  $\mu\text{L}$ /孔 呈色劑 (pNPP) 加入 96 孔微量滴定盤中呈色。
    - 10.2.9 室溫下搖盪 30 min。
    - 10.2.10 置微量滴定盤於波長設定為 405/620 nm 的分光儀中讀取吸光度(OD)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 230 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

11.1.1 陽性對照組(positive control) $>0.9$ ;陰性對照組(negative control) $<0.2$ 。O.D.值 $>$ Cut-Off calibrator 值，判為陽性。

### 11.2 報告核發

11.2.1 漢他 IgM 抗體陽性，漢他 IgG 抗體陽性，陰性，無法判定。

### 11.3 結果登錄

11.3.1 將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統(LIMS)之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。

## 12 品質管制

12.1 應於有效期內使用，同一批號試劑，第一次使用時取一組進行試驗，之後每隔 3 - 6 個月再取一組進行試驗。

12.2 每次檢驗應加入陽性及陰性控制組血清。

12.3 遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。

12.4 微量滴管分注器定期做校正。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Clement J, McKenna P, et al. 1995. Epidemiology and laboratory diagnosis of hantavirus(HTV) infection. Acta Clinica Belgica 50: 9-19.

14.2 Lundkvist A, Hukic M, Horling J, Gilljam M, Nichol S, Niklasson B. 1997. Puumala and Dobrava viruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: Evidence of highly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera. J Med Virol 53: 51.

## 15 附錄

15.1 漢他病毒 IgM 及 IgG 抗體試驗(酵素免疫分析法)流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

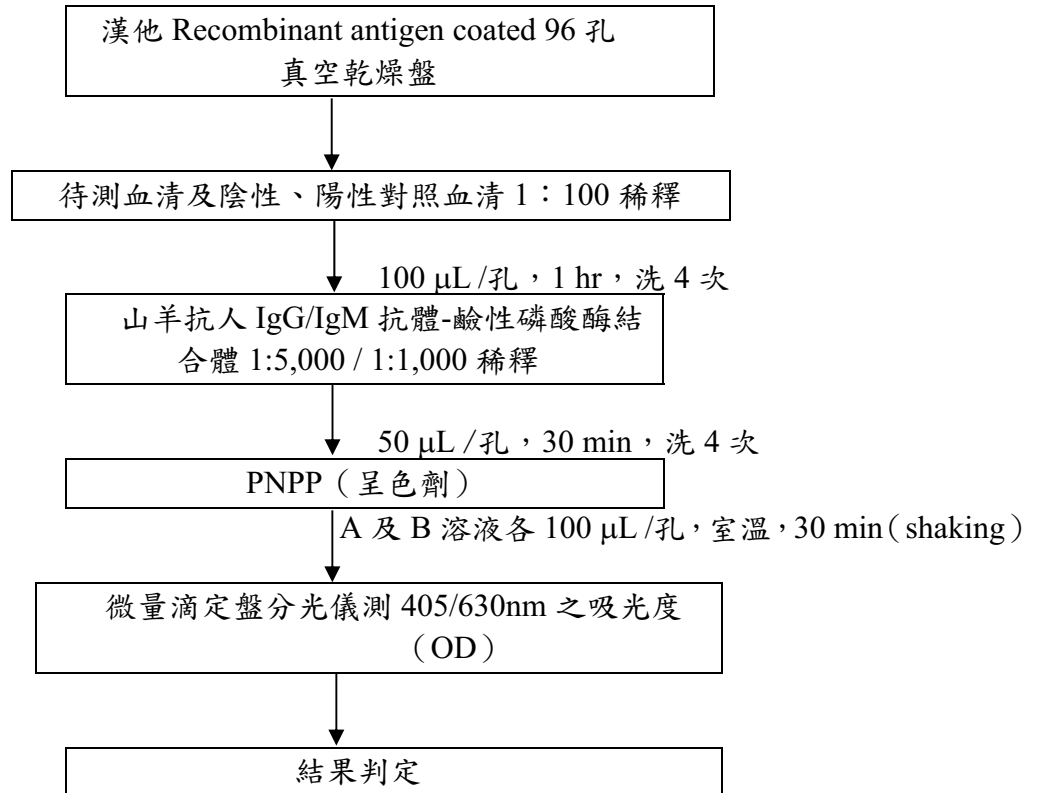
漢他病毒抗體檢測  
(ELISA)

核准日期： 年 月 日

頁次：第 231 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

附件 15.1 漢他病毒 IgM 及 IgG 抗體試驗流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 232 頁/共 1078 頁

出血性大腸桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
出血性大腸桿菌之分離與鑑定。
- 2 適用檢體種類  
適用於人體糞便、直腸拭子、菌株、組織拭子。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
以特定培養基分離可疑菌株，並利用生化代謝特性及血清學方法鑑定菌株。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 培養基
    - 5.1.1 SMAC (sorbitol MacConkey agar)。
    - 5.1.2 CHROM-STEC。
    - 5.1.3 TSIA (triple sugar iron agar)。
    - 5.1.4 LIA (lysine iron agar)。
    - 5.1.5 SIM (sulfide-indole-mobility medium)。
    - 5.1.6 mEC (modified *Escherichia coli*) broth。
    - 5.1.7 H-semi agar。
    - 5.1.8 BHI broth (brain heart infusion broth)。
    - 5.1.9 TSA (trypticase soy agar)。
  - 5.2 氧化酶試紙(oxidase strips): MAST, UK 或氧化酶試劑(oxidase reagent): BioMérieux, 法國。
  - 5.3 API 20 E 生化鑑定套組: BioMerieux, 法國。
  - 5.4 VITEK 2 革蘭氏陰性菌鑑定卡 (VITEK 2 GN): BioMerieux, 法國。
  - 5.5 鑑定血清 O 多價、O157、H7 血清: 生研, 日本。
  - 5.6 無菌生理食鹽水: 0.85 % NaCl。
  - 5.7 載玻片。
  - 5.8 馬克法藍氏濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)。
  - 5.9 微量吸管尖 (tip): 1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L。
  - 5.10 無菌吸管: 3 mL。
  - 5.11 接種針 (環)。
- 6 儀器設備
  - 6.1 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
  - 6.2 Pipetman。
  - 6.3 37 °C 培養箱 (incubator)。
  - 6.4 水浴槽。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 233 頁/共 1078 頁

出血性大腸桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

人體糞便、直腸拭子檢體、菌株，參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」，第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtrecid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

低溫運送及保存，參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtrecid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 分離培養

#### 10.1.1 檢體接種：

10.1.1.1 糞便檢體：以棉棒沾取少許糞便塗抹於 SMAC 或 CHROM-STE<sub>C</sub> 培養基。

10.1.1.2 直腸拭子：直接塗抹於 SMAC 或 CHROM-STE<sub>C</sub> 培養基。

10.1.1.3 醫院送驗之菌株：次培養於 SMAC 或 CHROM-STE<sub>C</sub> 培養基。

10.1.2 培養：37 °C 培養。

10.1.3 觀察：18 - 20 hr 後，挑選可疑菌落次接種於 TSIA、LIA、SIM 和 TSA 培養基上，37 °C 培養 18 - 20 hr。

### 10.2 鑑定

#### 10.2.1 生化鑑定：

10.2.1.1 三管生化反應：TSIA，A/A、Gas( + 或 - )、H<sub>2</sub>S( - )；LIA，K/K；SIM，Indole( + )，Motility( + 或 - )，IPA( - ) 則為疑似大腸桿菌。

10.2.1.2 Oxidase test (氧化酶試驗)：挑選 TSA 培養基上菌落進行試驗。

10.2.1.3 API 20 E 生化鑑定套組試驗：依照原廠 API 20 E (腸內菌鑑定組) 操作步驟執行。

10.2.1.4 VITEK 2 革蘭氏陰性菌鑑定卡 (VITEK 2 GN)：依照原廠全自動微生物分析儀 VITEK 2 標準操作流程執行。

#### 10.2.2 血清凝集反應：

10.2.2.1 O 抗原血清型別鑑定：取菌落於 1.5 mL Eppendorf tube 中，加入生理食鹽水製成高濃度之懸浮液，在 100 °C 乾浴加熱 1 hr 後，經過 900 g 20 min 離心後，移去上

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 234 頁/共 1078 頁

出血性大腸桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

清液，再加入 0.5 mL 的生理食鹽水製成菌液，作玻片凝集步驟，若有凝集者則為陽性。

10.2.2.2 H 抗原血清型別鑑定：於 SIM 試驗中，運動性陽性之菌落，次培養於 H-semi agar 中之內管，於 37 °C 培養約 18 hr（視該菌運動快慢而定），待該菌游至外管之表面，挑選外管表面之菌液次培養於 BHI Broth 中，於 37 °C 下，培養 4 - 6 hr 後（採用試管凝集法），加入等量含 1% 福馬林之無菌生理食鹽水（0.85 % NaCl）作為抗原液，取 0.5 mL 抗原液於無菌試管中，並加入 H7 抗血清二滴或 50  $\mu$ L，放置於 50 - 52 °C 水浴槽反應，0.5 - 1 hr 內觀察有否出現雲絮狀凝集；若無明顯或弱凝集反應，再次培養於另一支 H-semi agar 中之內管中於 37 °C 培養，約 18 hr 後重覆 H 抗原血清型別鑑定。

10.2.3 出血性大腸桿菌之毒素檢驗：

10.2.3.1 出血性大腸桿菌毒素檢測：

依照本署「出血性大腸桿菌毒素檢測（乳膠凝集反應法）」檢驗標準方法。

10.2.3.2 出血性大腸桿菌基因鑑定

依照本署「出血性大腸桿菌毒素基因鑑定（聚合酶鏈鎖反應法）」檢驗標準方法。

## 11 結果判定

11.1 陽性判定標準（附錄 15.3）：

Oxidase 反應、生化反應、PCR 毒性基因鑑定、毒素試驗皆符合者，即判定為出血性大腸桿菌陽性，並進行 O 抗原血清型別分型：O157 凝集者則為 O157 型陽性（若有運動性則加作 H7 血清型別）；非 O157 凝集者則為非 O157 型陽性；若現有血清型均無法凝集，則為無法分型陽性。除以上敘述外，不符合者，皆判定為陰性。

11.2 報告核發（附錄 15.4）：出血性大腸桿菌 O157：H7 陽性、出血性大腸桿菌 O157：NM 陽性、出血性大腸桿菌非 O157 陽性、無法分型出血性大腸桿菌陽性及出血性大腸桿菌陰性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於實驗室資訊系統，經 PI 核准報告後發佈。

## 12 品質管制

用 *E.coli* O157:H7 ATCC 35150 作為 O157 及 H7 血清之陽性反應標準菌株；用 *E.coli* ATCC 25922 為陰性反應標準菌株，進行試驗。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 235 頁/共 1078 頁

出血性大腸桿菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Kaper BK, O'Brien A. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology, Washington, DC.

14.2 蔡文城。2000。實用臨床微生物診斷學，第九版。九州圖書文物有限公司，臺灣。第 695-699 頁。

14.3 日本大阪府立公眾衛生研究所感染症檢查手冊，第 II 集。2001。

## 15 附錄


15.1 出血性大腸桿菌分離與鑑定流程圖。

15.2 出血性大腸桿菌分離與鑑定紀錄表。

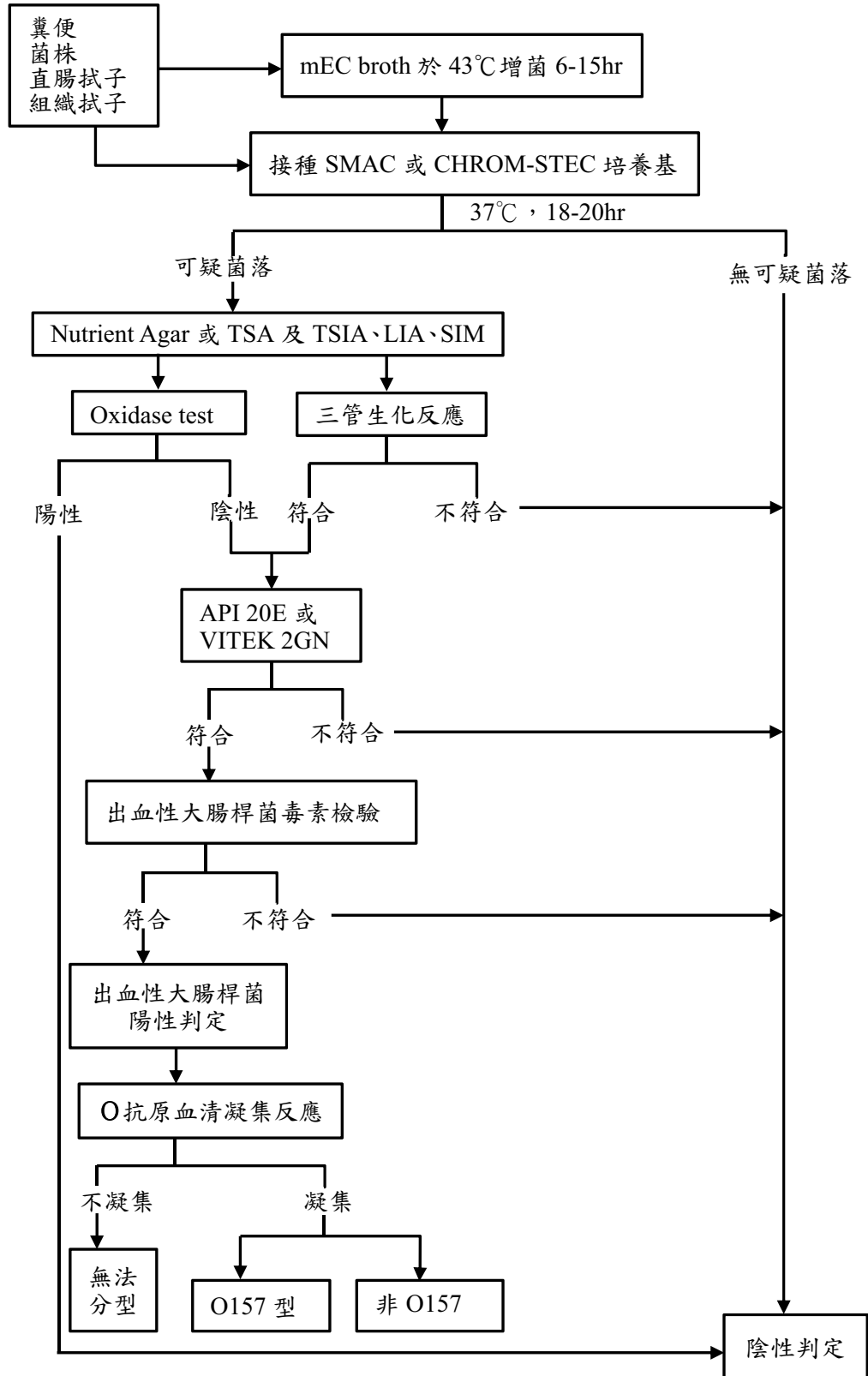
15.3 出血性大腸桿菌結果判定表。

15.4 出血性大腸桿菌報告核發之判定標準及結果登錄表。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法


	編號：	出血性大腸桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 236 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 出血性大腸桿菌分離與鑑定流程圖



出血性大腸桿菌分離與鑑定流程圖

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	出血性大腸桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 237 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 出血性大腸桿菌分離與鑑定紀錄表  
衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心  
出血性大腸桿菌分離與鑑定紀錄表


頁數：第 頁/共 頁

檢體編號											
收件日期											
檢驗日期											
檢體採檢運送狀況適當		是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
SMAC 或 CHROM 培養基生長型態	培養/觀察	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
	24 hr										
Oxidase test：陽性藍色或藍紫色，陰性不變色		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
生化三管（名稱及反應）：		符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合
TSIA (A/A、GAS +或-、H <sub>2</sub> S-)											
LIA (K/K)											
SIM (Motility+或-、H <sub>2</sub> S-、Indole+、IPA-)											
API 20 E 或 VITEK 2 GN											
PCR 毒素基因											
RPLA 毒素試驗											
血清凝集試驗：		凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無
O 多價抗血清：											
O 抗血清：											
H 抗血清：											
附註											
綜合結果											
報告日期											

檢驗者：

實驗室主管：

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法


	編號：	出血性大腸桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 238 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 出血性大腸桿菌結果判定表

試驗		正反應	負反應	腸道出血性大腸桿菌反應
TSIA	AS	黃色（斜面酸化）。指利用 Lactose 及 Sucrose 之能力。	紅色或不變色。指不利用 Lactose。	正反應
	AB	黃色（基底酸化）或黑色（由於產硫化氫將黃色掩蓋）。指利用 Glucose 之能力。	紅色或不變色。指不利用 Glucose。	黃色基底層
	Gas	任何氣泡產生，指產生 CO <sub>2</sub> 及 H <sub>2</sub> 之能力。	無任何氣泡產生。	多數屬正反應
	H <sub>2</sub> S	產生黑色沉澱。	無黑色沉澱。	負反應
SIM	IND	加入 Kovacs indole 試劑 5 滴後，培養基上層呈紅色。	不呈紅色（呈銅色）	正反應
	MOT	細菌生長遠離接種線，培養基呈混濁。	只生長於接種線上。	多數屬正反應
	IPA	培養基出現棕褐色環。	不出現棕褐色環。	負反應
LIA		全管為紫色	Slant：紫；But：黃	正反應
Oxidase test		紫色	無色（不變色）	負反應
O 抗原及 H 抗原血清凝集反應		與抗血清反應呈棉絮狀凝集，而生理食鹽水不凝集現象。	與抗血清反應後呈均勻微細粉末狀	正反應
API 20E 生化測驗或 VITEK 2 GN		依據廠商提供判讀表判讀，比對電腦碼資料庫		
毒素試驗		利用 RPLA 凝集方式測試 VT I 及 VT II，於 V 型盤底呈均勻薄膜。	僅凝聚成集中一點	正反應



## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	出血性大腸桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 239 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 出血性大腸桿菌報告核發之判定標準及結果登錄表。

出血性大腸桿菌報告核發						
判定標準	菌落型態	任一項 不符合	符合	符合	符合	符合
	生化反應					
	氧化酶試驗					
	Vitek2GN 或 API20E					
	毒素基因 (PCR)					
	毒素試驗 (RPLA)					
	O 抗原血清 凝集反應		O157 凝集	O157 凝集	非 O157 凝集	不凝集
	運動性		無	有	無/有	無/有
	H 抗原血清 凝集反應		/	H7 凝集	/	/
結果登錄	病原體分 離、鑑定	出血性 大腸桿菌 陰性	出血性 大腸桿菌 陽性	出血性 大腸桿菌 陽性	出血性 大腸桿菌 陽性	出血性 大腸桿菌 陽性
	次分型		O157:NM	O157:H7	非 O157	無法分型
	綜合研判	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	出血性大腸桿菌毒素檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 240 頁/共 1078 頁	(RPLA)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
利用反轉被動乳膠凝集試驗 (RPLA) 檢測出血性大腸桿菌是否會產生 verotoxin。
- 2 適用檢體種類  
適用於出血性大腸桿菌菌株。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
利用已結合 verotoxin type 1 (VT1) 及 verotoxin type 2 (VT2) 抗體之乳膠顆粒與 VT1、VT2 反應，產生肉眼可見之凝集。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 培養基 配製 效期 保存
    - 5.1.1 BHI agar。
    - 5.1.2 TSA (Trypticase soy agar)。
  - 5.2 VTEC-RPLA Latex agglutination test kit：生研，日本。
  - 5.3 96 孔 V 型塑膠微量滴盤：必須使用無污染、無傷痕製品。
  - 5.4 無菌微量吸管尖 tip：1000  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$  二種。
  - 5.5 無菌吸管：3 mL。
  - 5.6 接種針 (環)。
  - 5.7 1.5 mL eppendorf 無菌管。
- 6 儀器設備
  - 6.1 37  $^{\circ}\text{C}$  溫箱。
  - 6.2 離心機：3,000 rpm 以上。
  - 6.3 搖盪器 (shaker)。
  - 6.4 微量吸管 (pipetman)：需 1000  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$  等規格。
- 7 環境設施安全  
於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 8 檢體採集  
無。
- 9 檢體運送及保存  
無。
- 10 檢驗步驟
  - 10.1 將於 TSA 培養基之新鮮菌株接種於 BHI 培養基，於 37  $^{\circ}\text{C}$  下培養 16~20

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

出血性大腸桿菌毒素檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 241 頁/共 1078 頁

(RPLA)

修訂日期： 年 月 日

小時，自 BHI 培養基取 3 個 loop 體積的菌落放入 1 ml 含 5000U polymyxin B 之生理食鹽水中混合均勻，置於 37 °C 下培養 30 分鐘，每隔 10 分鐘取出輕搖一下。

- 10.2 再以 900 g 離心 15 min，取上清液作為毒素測定用標本。
- 10.3 取 96 孔 V 型塑膠微量滴盤，每個檢體 3 排 8 孔，各孔各放 25  $\mu$ L 稀釋液。
- 10.4 陽性對照組 (Control VT1 及 VT2) 取 2 排 8 孔，各孔各放 25  $\mu$ L 稀釋液。
- 10.5 檢體第一孔放 25  $\mu$ L 檢體，由第一孔取 25  $\mu$ L 檢體至第二孔，使充份混合，移 25  $\mu$ L 至第三孔混合，以此進行兩倍稀釋至第 7 孔，留下最後一孔當作 diluent control。
- 10.6 以相同方式處理陽性對照組。
- 10.7 檢體第一排各孔加入 25  $\mu$ L 敏感化乳膠 VT1 (sensitized latex VT1)，第二排各孔加入 25  $\mu$ L 敏感化乳膠 VT2 (sensitized latex VT2)，第三排各孔加入 25  $\mu$ L 未敏感化乳膠 (control latex)。
- 10.8 同樣的，在陽性對照組的第一排各孔加入 25  $\mu$ L 敏感化乳膠 VT1，第二排各孔加入 25  $\mu$ L 敏感化乳膠 VT2。
- 10.9 利用微量盤振盪器振盪，使孔內之液體混合均勻，放入潮濕盒中，室溫靜置 18-20 hr 後觀察。

## 11 結果判定

- 11.1 陽性判定標準：將 96 孔 V 型塑膠微量滴盤放在光亮平坦之黑紙上，從上面以肉眼觀察各孔中 Latex 沉降來判定其是否有凝集現象，如有擴散粗糙即為陽性，只要 VT1 或 VT2 任一種毒素為陽性，即判定為出血性大腸桿菌產毒性陽性，若 VT1 或 VT2 兩種毒素皆為集中呈圓形沉底即為出血性大腸桿菌產毒性陰性。
- 11.2 報告核發：出血性大腸桿菌產毒性陽性，出血性大腸桿菌產毒性陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於實驗室資訊系統，經 PI 核准報告後發佈。

## 12 品質管制

每次操作使用套組所附腸毒素做陽性對照及陰性對照。


## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 FDA, 2004 MAY, Diarrheagenic *Escherichia coli*, Chapter 4a, Bacteriological Analytical Manual online, U.S.  
<http://www.foodinfonet.com/publication/fdaBAM.htm>
- 14.2 Karmali, M.A. : Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	出血性大腸桿菌毒素檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 242 頁/共 1078 頁	(RPLA)	修訂日期： 年 月 日

with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherchia coli* in stool.  
Lancet, 1, 619 (1983).

14.3 Karmali, M.A. : Infection by Verotoxin- producing *Escherchia coli*,  
Clin.Microbiol. Rev.,2,15(1989).

14.4 Denka Seiken Co. LTD. Bacteriology product information. 1990.

### 15 附錄

15.1 出血性大腸桿菌毒素測定流程圖。

15.2 出血性大腸桿菌毒素測定工作紀錄簿。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

出血性大腸桿菌毒素檢測  
(RPLA)

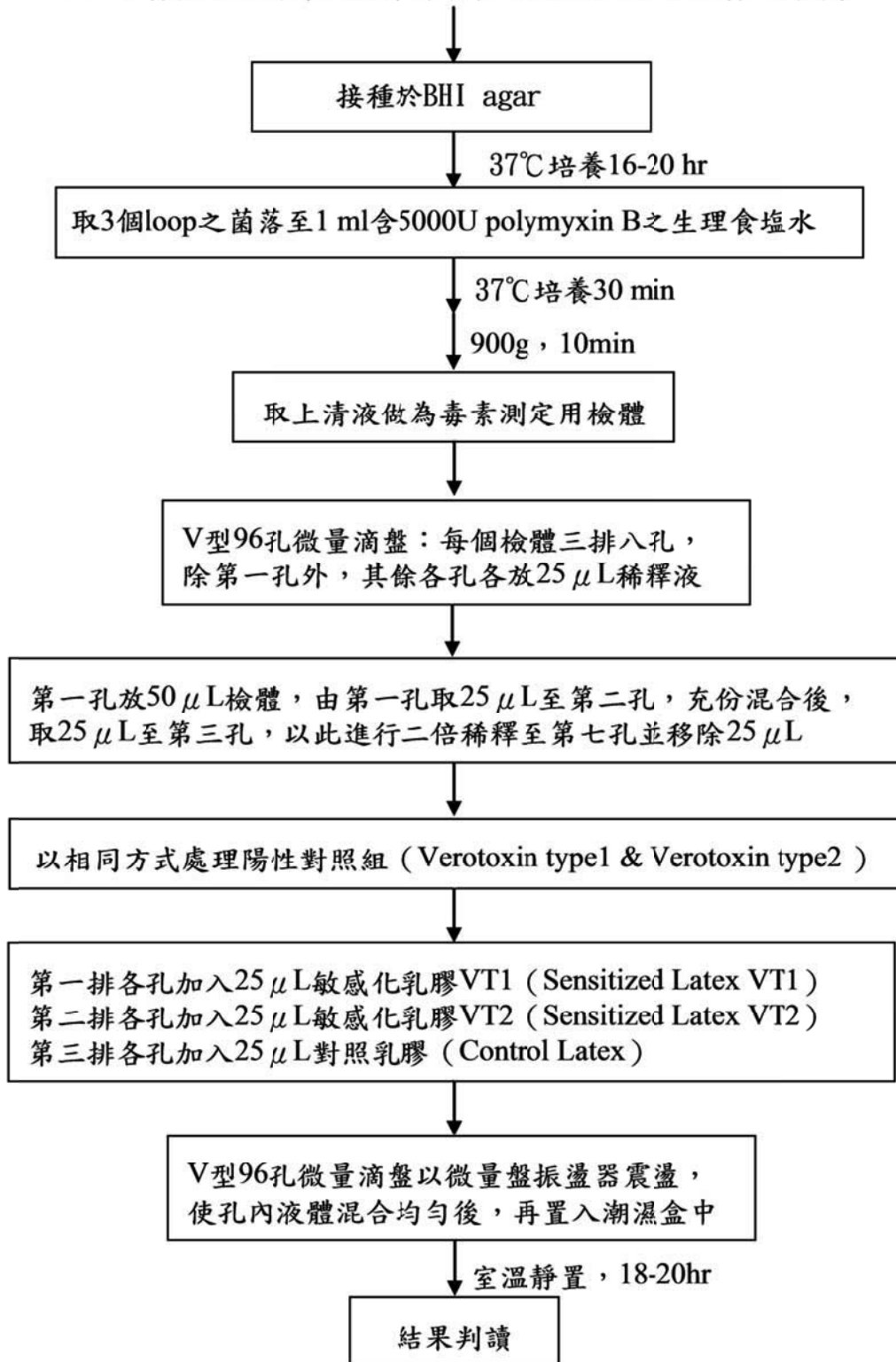
核准日期： 年 月 日

頁次：第 243 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.1 出血性大腸桿菌毒素測定流程圖

TSA培養基上之新鮮大腸桿菌 (從人體檢體分離培養之菌株)



出血性大腸桿菌毒素測定 (乳膠凝集試驗RPLA) 流程圖

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	出血性大腸桿菌毒素檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 244 頁/共 1078 頁	(RPLA)	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 出血性大腸桿菌毒素測定工作紀錄簿

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

### 出血性大腸桿菌毒素測定工作紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

檢體編號										
收件日期										
檢驗日期										
檢體採檢運送狀況適當	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
VTEC-RPLA 毒素測定：	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
VT1										
VT2										
附註										
綜合結果										
報告日期										

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	出血性大腸桿菌毒素基因鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 245 頁/共 1078 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
利用聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 對已分離之疑似出血性大腸桿菌 (EHEC) 進行毒素基因檢測。
- 2 適用檢體種類  
適用於已分離培養之 EHEC 疑似菌株。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
針對出血性大腸桿菌之兩種 verotoxin 毒素基因 (stx1、stx2) 設計 2 對引子，利用聚合酶鏈鎖反應合成放大兩基因之特定片段。其中 verotoxin 1 利用 Stx1F/Stx1R 增殖出 180 bp 之片段，verotoxin 2 利用 Stx2F/Stx2R 增殖出 255 bp 片段。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 無菌水：滅菌 121 °C，15 min。
  - 5.2 PCR 反應試劑：Roche 德國。成分含 Taq DNA polymerase (5 U/μL)、10 X Buffer、10 mM dNTP。
  - 5.3 無菌微量吸管尖 (tip)：需有 Filter，1,000 μL、200 μL、40 μL 與 10 μL 四種。
  - 5.4 接種針 (環)。
  - 5.5 可拋棄式塑膠手套。
  - 5.6 0.2 mL、1.5 mL Eppendorf 無菌管。
  - 5.7 10 X TBE 緩衝液。
  - 5.8 Ethidium bromide。
  - 5.9 陽性對照菌株 *Escherichia coli* ATCC 15376。
  - 5.10 PCR 引子 (primer) -毒素基因。  
Stx1F 5'-ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC-3'  
Stx1R 5'-AGAACGCCCACTGAGATCATC-3'  
Stx2F 5'-GGCACTGTCTGAAACTGCTCC-3'  
Stx2R 5'-TCGCCAGTTATCTGACATTCTG-3'
  - 5.11 PCR 引子 (primer) -Internal control。  
ECP79F 5'-GAAGCTTGCTTCTTTGCT-3'  
ECR620R 5'-GAGCCCGGGGATTCACAT-3'
- 6 儀器設備
  - 6.1 生物安全櫃。
  - 6.2 桌上型離心機。
  - 6.3 4 °C 冰箱。
  - 6.4 -20 °C 冷凍櫃。
  - 6.5 水浴槽。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	出血性大腸桿菌毒素基因鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 246 頁/共 1078 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 6.6 電泳槽。
- 6.7 微量吸管 Pipetman：1,000  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$  三種規格。
- 6.8 核酸增幅儀。

## 7 環境設施安全

- 7.1 菌株處理須於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 菌株處理、PCR 反應混和物配製、PCR 反應進行、電泳皆需於獨立區域操作。

## 8 檢體採集

無。

## 9 檢體運送及保存

無。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體處理

已分離的菌株：接種針點取 3 個新鮮菌落，放入含 150  $\mu\text{L}$  無菌水的 1.5 mL Eppendroff 中，以 100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 15 min，放入離心機 10,000 rpm 離心 5 min，取上清液當作 DNA template。

### 10.2 PCR (*Stx1*、*Stx2*) 反應混和物配製如下：

Component	Volume
DNA template	3 $\mu\text{L}$
10 X buffer	5 $\mu\text{L}$
10 mM dNTP	1 $\mu\text{L}$
Each primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
Taq polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.4 $\mu\text{L}$
無菌水	39.6 $\mu\text{L}$
Total volume	50 $\mu\text{L}$

### 10.3 Internal control 反應混和物配製如下：

Component	Volume
DNA template	3 $\mu\text{L}$
10 X buffer	5 $\mu\text{L}$
10 mM dNTP	1 $\mu\text{L}$
Each primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
Taq polymerase (5U/ $\mu\text{L}$ )	0.4 $\mu\text{L}$



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 247 頁/共 1078 頁

出血性大腸桿菌毒素基因鑑定  
(PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

無菌水 39.6  $\mu$ L

Total volume 50  $\mu$ L

## 10.4 PCR 反應條件設定

10.4.1 95 °C 5 min, 1 cycle。

10.4.2 95°C 30 sec, 50 °C 30 sec, 72 °C 50 sec, 30 cycles。

10.4.3 72 °C 7 min, 1 cycle。

## 10.5 電泳法分析產物

10.5.1 膠片配製：1.5 % Agarose in 1X TBE。

10.5.2 取 5 PCR mixture 跑電泳，電泳條件：100 Voltage, 30 min。

10.5.3 膠片染色：0.5  $\mu$ g/mL Ethidium bromide 染色 20 min。

## 10.6 陽性與陰性對照

10.6.1 試驗陽性對照：以具 *stx1*、*stx2* 之 *E. coli* O157 ATCC 15376 菌株的 DNA template 作為 PCR 反應之陽性對照。反應條件與分析方法參照 10.2 至 10.5。

10.6.2 試驗陰性對照：Template 以無菌水取代。參照 10.2 至 10.5。

## 11 結果判定

### 11.1 依據產物片段結果分析

11.1.1 *stx1*：180 bp，若出現此大小片段則可判定大腸桿菌 *stx1* 陽性。

11.1.2 *stx2*：255 bp，若出現此大小片段則可判定大腸桿菌 *stx2* 陽性。

11.1.3 若無上述預期片段，且陽性對照與 Internal control (541 bp) 仍有產物，則可判定大腸桿菌 *stx* 陰性。

### 11.2 報告核發

將檢體之檢驗結果登錄於實驗室資訊系統，經 PI 核准報告後發佈。

## 12 品質管制

所使用試劑及生化套組皆應於有效期內用完。

## 13 廢棄物處理

13.1 檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C, 30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

13.2 Ethidium bromide 為 Carcinogen 倒掉前，請加入分解藥劑後再作處理。

## 14 參考資料

14.1 Paton AW, Paton JC. 1998. Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. J Clin Microbiol 36: 598-602.

14.2 Teng LJ, Hsueh PR, Liaw SJ, Ho SW, Tsai JC. 2004. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. J Microbiol Immunol Infect 37: 327-334.

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 248 頁/共 1078 頁

出血性大腸桿菌毒素基因鑑定  
(PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

14.3 Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. 2004. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. J Clin Microbiol 42: 5849-5853.

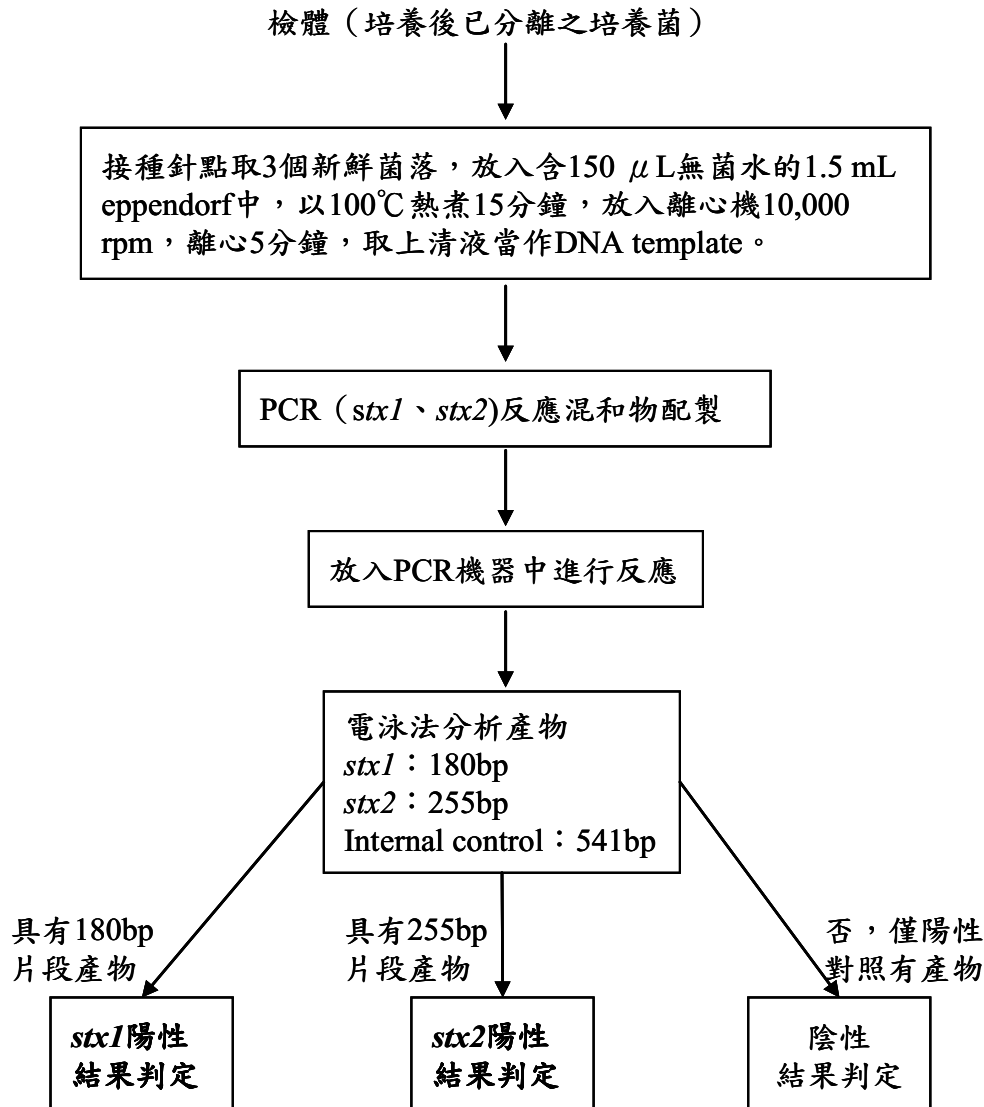
## 15 附錄

15.1 出血性大腸桿菌毒素基因檢測（聚合酶鏈鎖反應法）流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法


	編號：	出血性大腸桿菌毒素基因鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 249 頁/共 1078 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 出血性大腸桿菌毒素基因檢測（聚合酶鏈鎖反應法）流程圖



出血性大腸桿菌毒素基因檢測（聚合酶鏈鎖反應法）流程圖

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 250 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
在疑似受感染個案之採集檢體中，分離與鑑定是否存在德國麻疹病毒。
- 2 適用檢體種類  
咽喉拭子、含抗凝劑之全血、尿液（針對先天性德國麻疹個案）。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
選擇適當的細胞株（Vero）培養德國麻疹病毒，經三次繼代培養後，最後再以德國麻疹病毒專一性抗體螢光染色的方法確認。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 試劑
    - 5.1.1 Growth medium（由含 10 % FBS 與 1 X pen-strep solution 之 DMEM 組成）。
      - 5.1.1.1 Dulbecco's modified eagle medium（DMEM）。
        - 5.1.1.1.1 With 4,500 mg/L D-glucose（high glucose）。
        - 5.1.1.1.2 With L-glutamine。
        - 5.1.1.1.3 Without sodium pyruvate。
      - 5.1.1.2 Fetal bovine serum（FBS）：以 56 °C Heat inactivate 後開封，以 15 mL 離心管分裝，-20 °C 儲存。
      - 5.1.1.3 Pen-strep solution（100 X）。
        - 5.1.1.3.4 With 10,000 units/mL penicillin G。
        - 5.1.1.3.5 With 10,000 µg/mL streptomycin sulfate in 0.85 % saline，開封後以 15 mL 離心管分裝，-20 °C 儲存。
    - 5.1.2 Sample pretreat medium（由含 2 X pen-strep solution 之 DMEM 組成）。
    - 5.1.3 Maintain Medium（由含 2 % FBS 與 1 X pen-strep solution 之 DMEM 組成）。
    - 5.1.4 Trypsin-EDTA。
      - 5.1.4.1 With 0.05 % trypsin。
      - 5.1.4.2 With 0.53 mM EDTA in Hanks'balanced salt solution（HBSS）without Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup>，開封後以 15 mL 離心管分裝，-20 °C 儲存。
    - 5.1.5 Hank's balanced salt solution（HBSS）。
    - 5.1.6 Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS：Amersham Biosciences，17-1440-02，Sweden。
    - 5.1.7 Rubella, E1, clone EI-20：Chemicon，MAB925，USA，store at 2-8°C。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 251 頁/共 1078 頁

德國麻疹病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 5.1.8 Gt X Ms IgG FITC：Chemicon，5008，USA，store at 2 - 8 °C。
- 5.1.9 Mounting fluid：Chemicon，5013，USA，store at 2 - 8 °C。
- 5.1.10 Tween 20/sodium azide,100 X：Chemicon，5037，USA，store at 2 - 8 °C。
- 5.1.11 PBS packet：Chemicon，5087，USA，store at 2 - 8 °C。
- 5.1.12 IFA wash solution：將 5.1.11 試劑溶於 1 L distilled H<sub>2</sub>O 再加入 5.1.10 試劑以乾淨密封容器室溫儲放。
- 5.1.13 Vero 細胞株：由 ATCC 所購入之細胞株 Vero：CCL-81。
- 5.2 耗材：
  - 5.2.1 25-cm<sup>2</sup> Culture vessels (T-25)。
  - 5.2.2 24 well Plate。
  - 5.2.3 Pipette：1 mL、5 mL、10 mL、25 mL。
  - 5.2.4 200 μL Tip。
  - 5.2.5 3 mL 無菌塑膠吸管。
  - 5.2.6 1.5 mL Eppendorf tube。
  - 5.2.7 載玻片、蓋玻片。
  - 5.2.8 無菌螺旋試管：2 mL、4 mL。
  - 5.2.9 無菌離心管：15 mL、50 mL。
  - 5.2.10 5 mL 針筒。
  - 5.2.11 0.45 μM 針頭過濾器。
  - 5.2.12 抗凍標籤紙。
  - 5.2.13 油性細字筆。

## 6 儀器設備

- 6.1 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 6.2 37 °C 二氧化碳培養箱。
- 6.3 倒立相差顯微鏡。
- 6.4 螢光顯微鏡 (Zeiss Axioskop 2 plus)。
- 6.5 水浴槽。
- 6.6 電動輔助吸管。
- 6.7 4 °C 冰箱。
- 6.8 -20 °C、-80 °C 冷凍櫃。
- 6.9 乾浴器。

## 7 環境設施安全


於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 252 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

10.1 檢體編號：收件檢體依通報疾病及種類編號。

### 10.2 檢驗前處理

10.2.1 開啓第二級生物安全櫃之紫外光照射操作枱面 20 min。

10.2.2 將 5.1.1-5.1.5 試劑先置於 37 °C 回溫或解凍。

#### 10.2.3 檢體前處理

##### 10.2.3.1 全血

10.2.3.1.1 以針筒吸取 3 mL 的 Ficoll-paque 置於 15 mL 離心管下層。

10.2.3.1.2 取 2 mL 血液與 2 mL 的 HBSS 混合後，輕輕的置放於 Ficoll-paque 上層。

10.2.3.1.3 400 xg，室溫下離心 40 min。

10.2.3.1.4 以乾淨吸管小心吸去上層液。

10.2.3.1.5 再取另一乾淨吸管吸取 Ficoll-paque 上的淋巴細胞層至另一 15 mL 離心管。

10.2.3.1.6 加入取出淋巴層細胞三倍體積的 HBSS，輕輕以吸管混合均勻。

10.2.3.1.7 100 × g，室溫下離心 10 min 後移除上清液。

10.2.3.1.8 加入 5 mL HBSS，以吸管輕輕上下混合原沉澱細胞，重複 10.2.3.1.6。

10.2.3.1.9 加入 2 mL Sample pretreat medium 後，接種細胞或暫時置於-80 °C 保存。

10.2.3.2 咽喉拭子：加 1.5 mL Sample pretreat medium 至採檢管充分攪拌，將溶液吸出至 4 mL 滅菌塑膠檢體瓶中，以 5 mL 針筒吸取溶液後，拔去針頭，接上 0.45 μm 過濾器過濾後置於 2 mL 無菌試管保存，接種細胞或暫時置於-80 °C 保存。

10.2.3.3 尿液：以 400 × g 於 4 °C 離心 10 min 後，棄上清液，另加 2 mL Sample pretreat medium 與沉澱物混合均勻後，接種細胞或暫時置於-80 °C 保存。

### 10.3 檢驗步驟：

10.3.1 接種：取 24 well plate 長滿單層之 Vero 細胞，吸出 Growth medium，接種檢體 100 μL，輕輕搖動使檢體佈滿細胞層，置於 37 °C 含 5 % CO<sub>2</sub> 的培養箱培養，其間約間隔 15 min，即輕輕搖動 plate，使檢體能均勻散佈於細胞層並防止細胞層乾燥。1 hr 後加入 1 mL Maintain medium，置於 37 °C 含 5 % CO<sub>2</sub> 的培養

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 253 頁/共 1078 頁

德國麻疹病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

箱培養。

10.3.2 培養至 7 天後，收集檢體液繼代培養。步驟如下：以 3 mL 無菌吸管刮取細胞層後同培養液一起收集於 1.5 mL Eppendorf，置於-80°C 冰箱 10-15 min，取出溶解後，以 3,000 rpm 離心 15 min，再將上清液取 100 µL 接種於新的 24 well plate 的單層 Vero Cell，此即為 Passage 1。

10.3.3 重複步驟 10.3.2，此即為 Passage 2。

10.3.4 再繼續培養 7 天後進行 IFA 鑑定。

10.3.5 間接螢光免疫法鑑定

10.3.5.1 取 1 mL 受感染細胞的懸浮液於小離心管中，以 3,000 rpm 離心 15 min。

10.3.5.2 取出上清液另存於乾淨試管，沉澱之細胞加入 0.5 - 1 mL PBS，以 Pipette 上下混合均勻。

10.3.5.3 取 10 µL 點入 21 孔玻片（需含未感染細胞以為陰性對照），待細胞風乾後置入含有 4 °C 丙酮之玻片槽，固定 10 min。

10.3.5.4 用無菌水以 1:100 稀釋 5.1.7 Rubella, EI, clone EI-20。

10.3.5.5 取出風乾後滴一滴 10.3.5.4 Rubella Ab，將玻片置於 moisture chamber，置於 37 °C 恆溫箱 30 min。

10.3.5.6 以 5.1.12 IFA wash solution 清洗玻片後置於乾浴器烘乾。

10.3.5.7 每個孔加一滴 5.1.8 Gt X Ms IgG FITC。將玻片置於 Moisture chamber，置於 37 °C 恆溫箱 30 min。

10.3.5.8 重覆 10.3.5.6。

10.3.5.9 以 5.1.9 Mounting fluid 封片後，以螢光顯微鏡鏡檢。細胞呈現紅色為陰性反應，呈現蘋果綠為陽性。

10.4 檢驗後處理：生物安全櫃操作檯面以 75 %酒精擦拭，並以紫外光照射 20 min。

## 11 結果判定

11.1 判讀標準：經 Rubella IFA 測定有綠色螢光反應細胞者，判定為陽性。

11.2 報告核發：德國麻疹病毒分離陽性，德國麻疹病毒分離陰性。


11.3 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果登錄於附錄 15.3 病毒培養觀察紀錄表、附錄 15.4 螢光鑑定紀錄表，檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果欄”，並在背面蓋職章，相關檢驗記錄及檢體送實驗室主管審核，俟實驗室主管核章後，再上網登錄於傳染病通報系統。

## 12 品質管制

12.1 除離心及螢光鑑定試驗步驟外全程作業都要在生物安全櫃（class II BSC）內進行。

12.2 二氧化碳培養箱內壁每月要定期以抗黴菌劑擦拭及水盤添加抑菌劑的無菌水以保持培養箱內溼度。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 254 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

Rubella laboratory network, available at  
[http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/measles/rubella\\_index.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/measles/rubella_index.htm).

## 15 附錄

- 15.1 德國麻疹病毒分離與鑑定流程圖。
- 15.2 細胞繼代培養紀錄表。
- 15.3 病毒培養觀察紀錄表。
- 15.4 螢光鑑定紀錄表。
- 15.5 德國麻疹病毒檢驗判定總流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

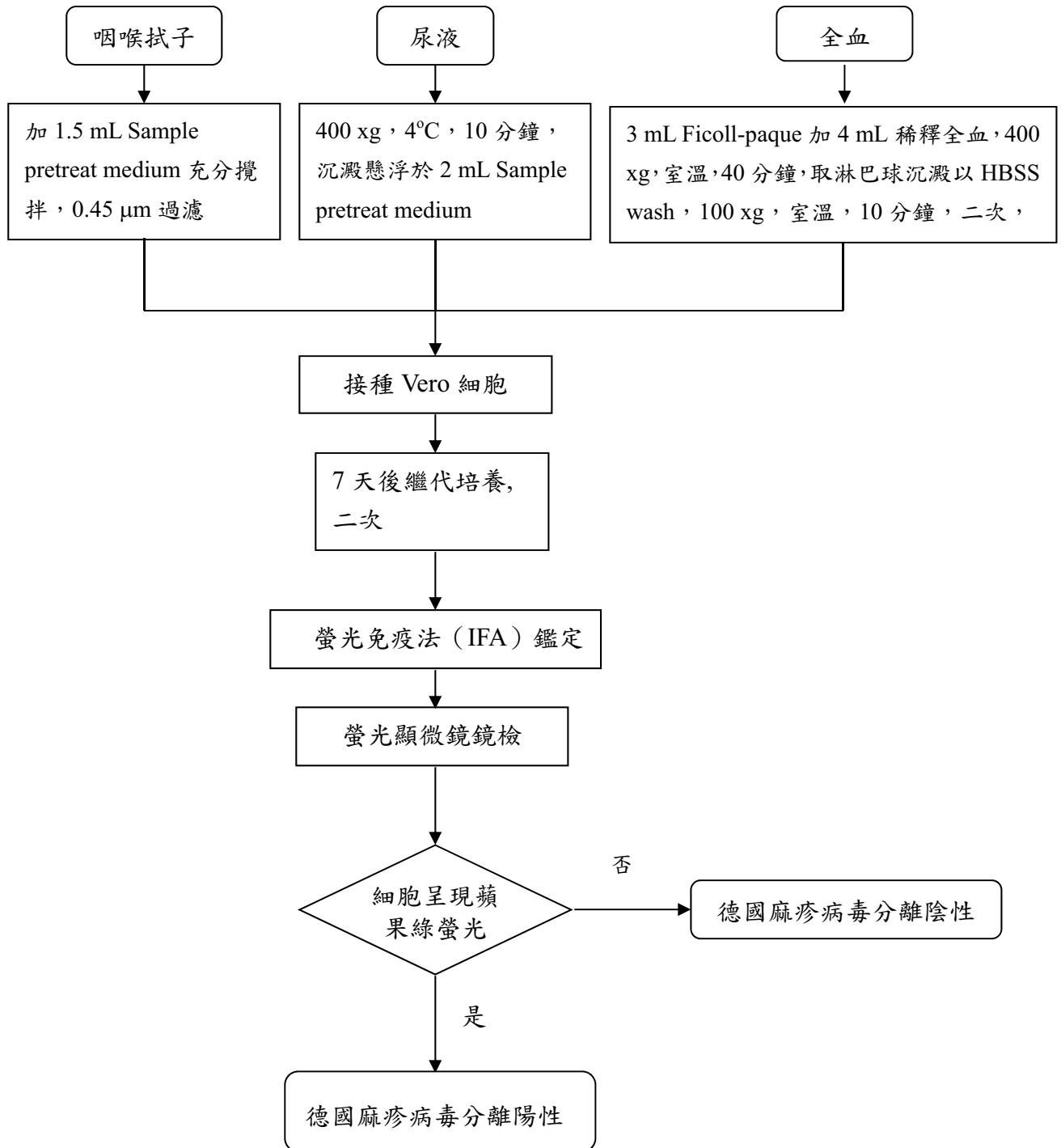
頁次：第 255 頁/共 1078 頁

德國麻疹病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 德國麻疹病毒分離與鑑定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：  
頁次：第 256 頁/共 1078 頁

德國麻疹病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 細胞繼代培養紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

### 細胞繼代培養紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

Cell		
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no	Container	Medium
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no	Container	Medium
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no	Container	Medium
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no	Container	Medium
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no	Container	Medium
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no	Container	Medium

檢驗者：

實驗室主管：



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：  
頁次：第 258 頁/共 1078 頁

德國麻疹病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.4 螢光鑑定紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心  
螢光鑑定紀錄表

Date :

頁數：第 頁/共 頁

	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>


Date :

	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

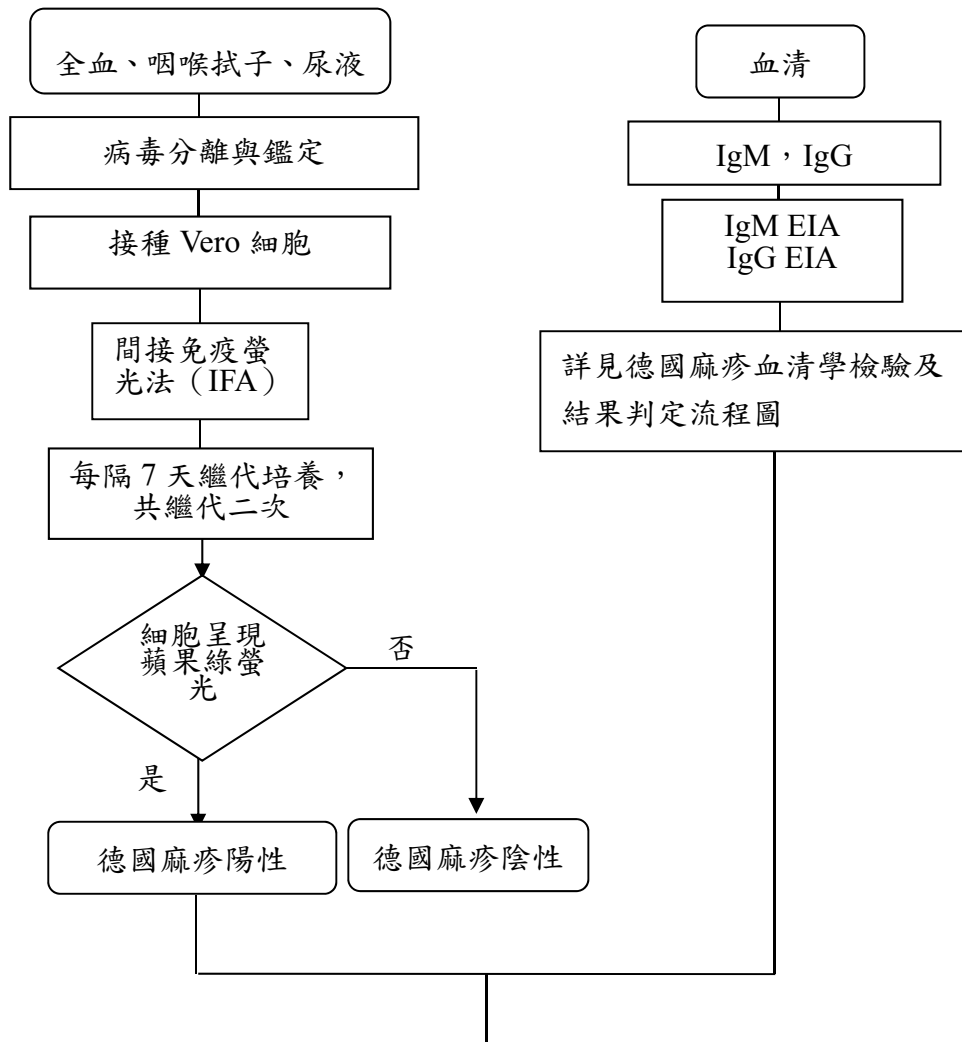
檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 259 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 德國麻疹病毒檢驗判定總流程圖



血清學檢驗結果與細胞分離結果，有任何一者為陽性，則判為陽性

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 260 頁/共 1078 頁

德國麻疹病毒核酸檢測

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以分子生物學的技术利用反轉錄酶—巢式聚合酶鏈反應 (RT-nested PCR) 與即時定量 RT-PCR 來直接檢測檢體中是否有德國麻疹病毒。

## 2 適用檢體種類

適用之檢體種類包括咽喉拭子、尿液。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

RT-PCR：利用分子生物學技術 RT-PCR 高敏感度的方法來檢測檢體中的麻疹病毒 RNA。RT-PCR 之原理為設計專一性之引子 (primers)，把檢體中的病毒 RNA 反轉錄成 DNA，並將其擴增放大。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

5.1.1 Viral RNA Extraction Kit。

5.1.2 One-step RT-PCR Kit。

5.1.3 PCR Kit。

5.1.4 TBE buffer (Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer)。

5.1.5 陽性對照組 (positive control)：採用德國麻疹培養之病毒株作對照；陰性對照組 (negative control)：以水作陰性對照。Agarose。

### 5.2 耗材

5.2.1 DEPC 水。

5.2.2 無菌 PCR 反應管。

5.2.3 無菌內濾式 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l 微量滴管。

5.2.4 無菌 1.5 ml 微量離心管。

5.2.5 手套。

## 6 儀器設備

6.1 PCR thermal cyclers。

6.2 電泳槽。

6.3 DNA 電泳膠體觀察設備。

6.4 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l 微量滴管分注器。

## 7 環境設施安全

採用獨立的操作空間，將 RNA 或 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 261 頁/共 1078 頁

德國麻疹病毒核酸檢測

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

10.1.1 檢體編號：核對檢驗單之個案與檢體是否相符，給予疾病編號。

10.1.2 咽喉拭子檢體：棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。

10.1.3 尿液檢體：以 1,500 rpm 離心 10 分鐘，將沉澱物與 1-2 ml 含 2x 抗生素的 DMEM 混合均勻。

### 10.2 10.2 步驟

10.2.1 萃取病毒 RNA (以 QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit 為例)

10.2.1.1 吸取 140 µl 的檢體，加入 560 µl Lysis buffer (AVL)，震盪混合，室溫靜置反應 10 分鐘。

10.2.1.2 加入純酒精 560 µl 終止反應。

10.2.1.3 將上述混合液分兩次加入通管柱 (column)，並以離心 (8,000 rpm，1 分鐘) 方式加速混合液通過濾膜，檢體中如有 RNA 存在，會吸附在管柱底部的濾膜上。

10.2.1.4 以清洗液 (AW1) 500 µl，離心 8,000 rpm，1 分鐘，作第一次沖洗，清洗膜上所吸附的雜質。

10.2.1.5 以清洗液 (AW2) 500 µl，離心 14,000 rpm，3 分鐘，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。

10.2.1.6 離心 14,000 rpm，1 分鐘，以徹底去除膜上殘留酒精。


10.2.1.7 加入萃取液 (AVE) 50 µl，室溫靜置 1 分鐘，在 4°C 離心 8,000 rpm，1 分鐘，取得 RNA。

10.2.2 反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) (以 Promega access quick RT-PCR system 為例)

10.2.2.1 取 5 µl RNA 為模版，加入引子組 (primers 參考附錄 15-2) 與 RT-PCR 試劑，反應總體積 50 µl，反應溶液成分如下：

RNase-free H <sub>2</sub> O	7.0 µl
2 X Master Mix	25.0 µl
Forward primer 1100F (10 µM)	1.0 µl

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 262 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

Reverse primer 1100R (10 μM)	1.0 μl
5X Betain	10.0 μl
<b>AMV RT (5U/ul)</b>	1.0 μl
RNA sample	5.0 μl
50.0 μl	

10.2.2.2 使用 PCR thermal cycle，設定反應條件如下

- 10.2.2.2.1 R.T.作用, 45°C 45 分鐘。
- 10.2.2.2.2 Taq 活化作用, 94°C 2 分鐘。
- 10.2.2.2.3 Denaturation, 94°C 30 秒。
- 10.2.2.2.4 Annealing, 60°C 30 秒。
- 10.2.2.2.5 Extension, 68°C 60 秒。
- 10.2.2.2.6 重複 10.2.2.2.3 至 10.2.2.2.5 步驟 40 cycle。
- 10.2.2.2.7 Final extension, 68°C 5 分鐘。

10.2.3 巢式聚合酶鏈鎖反應(nested PCR) (以 Fermentas DreamTaq 2X Master Mix 為例)

10.2.3.1 取 3 μl 10.2.2 步驟所得的 RT-PCR 反應產物做模板，加入引子組 (primers 參考引子組序列表) 與 PCR 試劑，反應總體積 50 μl，反應溶液成分如下：

RNase-free H <sub>2</sub> O	12.0 μl
2 X Master Mix	25.0 μl
5X Betain	10.0 μl
Forward primer 875F (10 μM)	1.0 μl
Reverse primer 875R (10 μM)	1.0 μl
DNA sample	1.0 μl
50.0 μl	

10.2.3.2 使用 PCR thermal cycle，設定反應條件如下：

- 10.2.3.2.1 Taq 活化作用, 94°C 2 分鐘。
- 10.2.3.2.2 Denaturation, 94°C 30 秒。
- 10.2.3.2.3 Annealing, 60°C 30 秒。
- 10.2.3.2.4 Extension, 68°C 60 秒。
- 10.2.3.2.5 重複 10.2.3.2.3 至 10.2.3.2.5 步驟 40 cycle。
- 10.2.3.2.6 Final extension, 72°C 5 分鐘。

10.2.4 膠片電泳分析

- 10.2.4.1 製備 1.5% 洋菜膠：1.5 g agarose 溶於 100 ml (1 X) TBE buffer。
- 10.2.4.2 選擇 100 bp DNA size Marker：5μl (2 ng/μl)。
- 10.2.4.3 取二次產物 5 μl 及 100 bp Marker，混合 1 μl Safe-Green Nucleic Acid Stain(eg:abm-Cat.No.G108-G)。
- 10.2.4.4 進行電泳分離：100V，30 min。
- 10.2.4.5 使用 UV light 觀察，並照相紀錄。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 263 頁/共 1078 頁

德國麻疹病毒核酸檢測

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

RT-PCR:取 RT-PCR 產物各 5 $\mu$ L，在 1.5% 洋菜膠進行分析，檢視分析結果。德國麻疹增幅產物片段約 875 bp，若出現上述 RT-PCR 產物，檢驗結果為陽性。

11.2 報告核發：德國麻疹病毒 PCR 陽性，德國麻疹病毒 PCR 陰性。

11.3 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果欄”，並上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。

## 12 品質管制

12.1 每次進行實驗時皆有陽性及陰性對照組。

12.2 實驗過程遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。

12.3 微量吸管分注器做定期的校對。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121  $^{\circ}$ C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, Second edition, WHO/IVB/07.01.

14.2 Abernathy E, Cabezas C, Sun H, Zheng Q, Chen MH, Castillo-Solorzano C, Ortiz AC, Osoro F, Oliveira L, Whittembury A, et al. 2009. Confirmation of rubella within 4 days of rash onset: comparison of rubella virus RNA detection in oral fluid with immunoglobulin M detection in serum or oral fluid. J Clin Microbiol 47: 182-188.

## 15 附錄

15.1 德國麻疹病毒鑑定流程圖。

15.2 德國麻疹病毒診斷用引子及探針組序列表

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

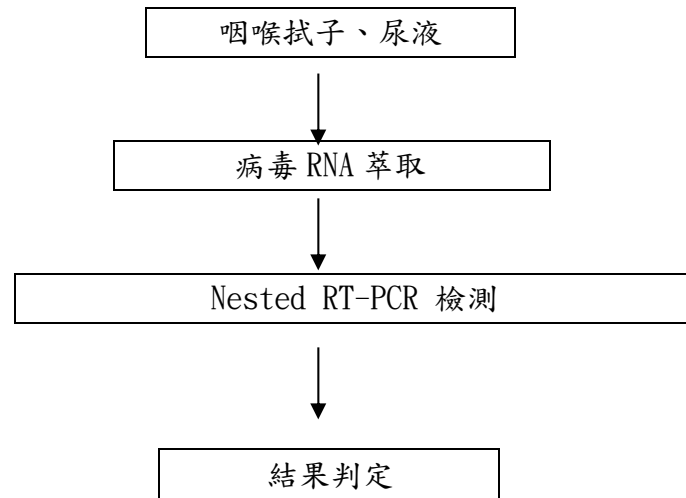
頁次：第 264 頁/共 1078 頁

德國麻疹病毒核酸檢測


核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15-1 德國麻疹病毒鑑定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 265 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15-2 德國麻疹病毒診斷用引子及探針組序列表

### 一、First round RT-PCR primer

**1100F :5'-CCCCACCGACACCGTGATGAG-3'**


**1100R :5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTATACAGCAACAGGTGC-3'**

### 二、Second round nested-PCR primer

**875F: 5'-GTGATGAGCGTGTTTCGCCCTT-3'**

**875R: 5'-TGGTGTGTGTGCCATAC-3'**

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 266 頁/共 1078 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用間接免疫酵素分析法 (indirect ELISA, indirect enzyme-linked immunosorbent assay) 檢測人體是否有德國麻疹專一性 IgM 抗體。

## 2 適用檢體種類

血清 (serum) 或血漿 (plasma)。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用間接酵素免疫分析法。檢體先以 RF absorbent 吸附，以除去類風濕因子及 IgG，降低對所測試 IgM 反應的干擾。再利用吸附有德國麻疹病毒抗原的微量盤與待測血清中具有德國麻疹專一性 IgM 抗體作用一段時間，清洗掉未結合的物質然後加上 Anti-human IgM/POD conjugate，再反應一段時間後清洗掉未結合的物質，最後加上無色受質 TMB 作用 30 min，受質經 Conjugate 上的酵素催化後，轉換為藍色，最後再加上終止液終止反應，此時有反應的微量盤會變成黃色。以吸光光度計測定 450 nm 波長的吸光值，以 650 nm 為參考波長。

## 5 試劑耗材

### 5.1 試劑

5.1.1 「Enzygnost anti-Rubella-virus/IgM : Dade Behring, OWBO 15, Germany, 4 °C 儲存」。

5.1.1.1 Anti-Rubella virus/IgM test plate : 2 × 6 strips。

5.1.1.2 Anti-Rubella virus reference P/P : 0.65 mL。

5.1.1.3 Anti-Rubella virus reference P/N : 0.45 mL。

5.1.1.4 Sample buffer POD : 2 × 50 mL。

5.1.1.5 Anti-human IgM/POD conjugate (μ-chain specific) : 1 mL。

5.1.1.6 Conjugate buffer microbiol : 4 × 12.5 mL。

5.1.1.7 RF absorbent : 4 × for 5 mL。

5.1.1.8 Polyethylene bag for storing unused test strip。

5.1.1.9 Barcode table of value。

5.1.2 「Supplementary reagents for enzygnost/TMB : Dade Behring, OUV 17, Germany, 4 °C 儲存」。

5.1.2.1 Washing solution POD : 3 × 100 mL。

5.1.2.2 Colour solution blue for enzygnost : 1 × 12.5 mL。

5.1.2.3 Buffer/substrate TMB : 4 × 30 mL。

5.1.2.4 Chromogen TMB : 4 × 3 mL。

5.1.2.5 Stopping solution POD : 2 × 100 mL。

5.1.2.6 Adhesive foils for microtiter plates : 24 pcs.。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測  
(Indirect ELISA)

核准日期： 年 月 日

頁次：第 267 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

5.1.2.7 Empty bottle for the working Chromogen solution : 1 pcs. °

5.1.2.8 Instruction for use : 1 pcs. °

## 5.2 耗材

5.2.1 Tips : 200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L °

5.2.2 1.5 mL Eppendorf °

5.2.3 4 mL Tube °

5.2.4 2 mL 螺旋試管 °

5.2.5 抗凍標籤紙 °

5.2.6 油性簽字筆 °

## 6 儀器設備

6.1 單爪 Pipetman : 20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L °

6.2 八爪 Pipetman : 200  $\mu$ L °

6.3 電動分注器 : 50 - 1,000  $\mu$ L °

6.4 Microplate washer °

6.5 Microplate reader °

6.6 小型離心機 °

6.7 37 °C 溫箱 °

6.8 振盪混合器 °

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A> °

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A> °

## 10 檢驗步驟

10.1 檢體編號：核對檢驗單之個案與檢體是否相符，給予疾病編號。

### 10.2 檢驗前處理

10.2.1 將血液分裝於 1.5 mL Eppendorf，以小型離心機離心 3 - 5 min，收集血清或血漿於 2 mL 螺旋試管。

10.2.2 記錄檢體於檢驗盤上之相對應位置，如附錄 15.1。

10.2.3 配置 Working RF Absorbent：一瓶 RF Absorbent 以 5 mL 蒸餾水溶解。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 268 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

- 10.2.4 配置 Working wash solution: 用蒸餾水以 1:20 的比例稀釋 5.1.2.1 Washing solution POD。
- 10.2.5 配置 Working conjugate solution：1 份 5.1.1.5 Anti-human IgM/POD conjugate + 50 份 5.1.1.6 Conjugate buffer microbiol。
- 10.2.6 配置 Working Chromogen solution：1 份 5.1.2.4 Chromogen TMB + 10 份 5.1.2.3 Buffer/substrate TMB。
- 10.2.7 Microplate washer 先以配置好的 Working wash solution 進行 Prime 指令，使管路充滿 Working wash solution。

## 10.3 檢驗步驟

- 10.3.1 血清稀釋至加到微量盤的步驟詳如附錄 15.2。
- 10.3.2 封上 5.1.2.6 Adhesive foils, 置放 37 °C 溫箱培養 60 min。
- 10.3.3 啟動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.4 每個孔加入 100 μL Working conjugate solution。
- 10.3.5 置放 37 °C 溫箱培養 60 min。
- 10.3.6 啟動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.7 每個孔加入 100 μL Working Chromogen solution。
- 10.3.8 室溫，避光，培養 30 min。
- 10.3.9 每個孔加入 100 μL Stopping solution。
- 10.3.10 用 Microplate reader 測定 450 nm 吸光度，以 650 nm 做為參考波長。

## 10.4 檢驗後處理

- 10.4.1 Microplate washer 以蒸餾水進行二次 Prime，以去除殘存之 Wash solution，防止管路結晶阻塞。
- 10.4.2 使用後的 Tips、Eppendorf、Microplate strip，滅菌後丟棄。
- 10.4.3 Microplate washer、Microplate reader 關機。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

計算	判定	判定標準
$\Delta A = A_{\text{antigen}} - A_{\text{control antigen}}$	陽性 (positive)	$\Delta A > 0.2$
	陰性 (negative)	$\Delta A < 0.1$
	未確定 (equivocal)	$0.1 \leq \Delta A \leq 0.2$

11.2 報告核發：德國麻疹 IgM 陽性，德國麻疹 IgM 陰性，德國麻疹 IgM 未確定。

11.3 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果登錄於附錄 15.4 德國麻疹 ELISA 實驗紀錄表，檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果欄”，並上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。

## 12 品質管制

12.1 Qualitative evaluation： $\Delta A_{\text{Reference P/P}} \geq 0.2$ 。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 269 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

## 12.2 Quantitative evaluation。

12.2.1 Lower margin  $\leq \Delta A_{\text{Reference P/P}} \leq$  upper margin。

12.2.2 任一  $\Delta A_{\text{Reference P/P}}$  介於 Reference P/P 平均值  $\pm 20\%$ 。

12.3 Measurement correction：利用 Reference P/P 來校正實驗值，改善結果的再現性。

### 計算範例

<b>Reference P/P， at start of series</b>	<b><math>\Delta A</math></b>	<b>0.474</b>
<b>With margins ?</b>		<b>yes</b>
<b>Reference P/P， at end of series</b>	<b><math>\Delta A</math></b>	<b>0.388</b>
<b>With margins ?</b>		<b>yes</b>
<b>Mean value</b>	<b><math>\Delta A</math></b>	<b>0.431</b>
<b>Reference P/P, nominal value</b>	<b><math>\Delta A</math></b>	<b>0.518</b>
<b>Correction factor 0.518:0.431</b>	<b>=</b>	<b>1.2</b>
<b>Corrected <math>\Delta A</math> 待測血清</b>	<b>= 1.2 x <math>\Delta A</math> 待測血清</b>	

註：upper、lower margin、nominal value 詳見 5.1.1.9，為 lot-specific。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Dade Behring 公司操作說明書。

14.2 Chernesky MA, Wyman L, Mahony JB, Castriciano S, Unger JT, Safford JW, Metzler PS. 1984. Clinical evaluation of the sensitivity and specificity of a commercially available enzyme immunoassay for detection of rubella virus-specific immunoglobulin. J Clin Microbiol 20: 400-404.

14.3 Ender G, Knotek F. 1986. Detection of IgM antibodies against rubella virus: comparison of two indirect ELISAs and anti-IgM capture immunoassay. J Med Virol 19: 377-386.

## 15 附錄

15.1 檢體排列位置圖。


15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖。

15.3 德國麻疹病毒 IgM 抗體試驗 (間接酵素免疫分析法) 流程圖。

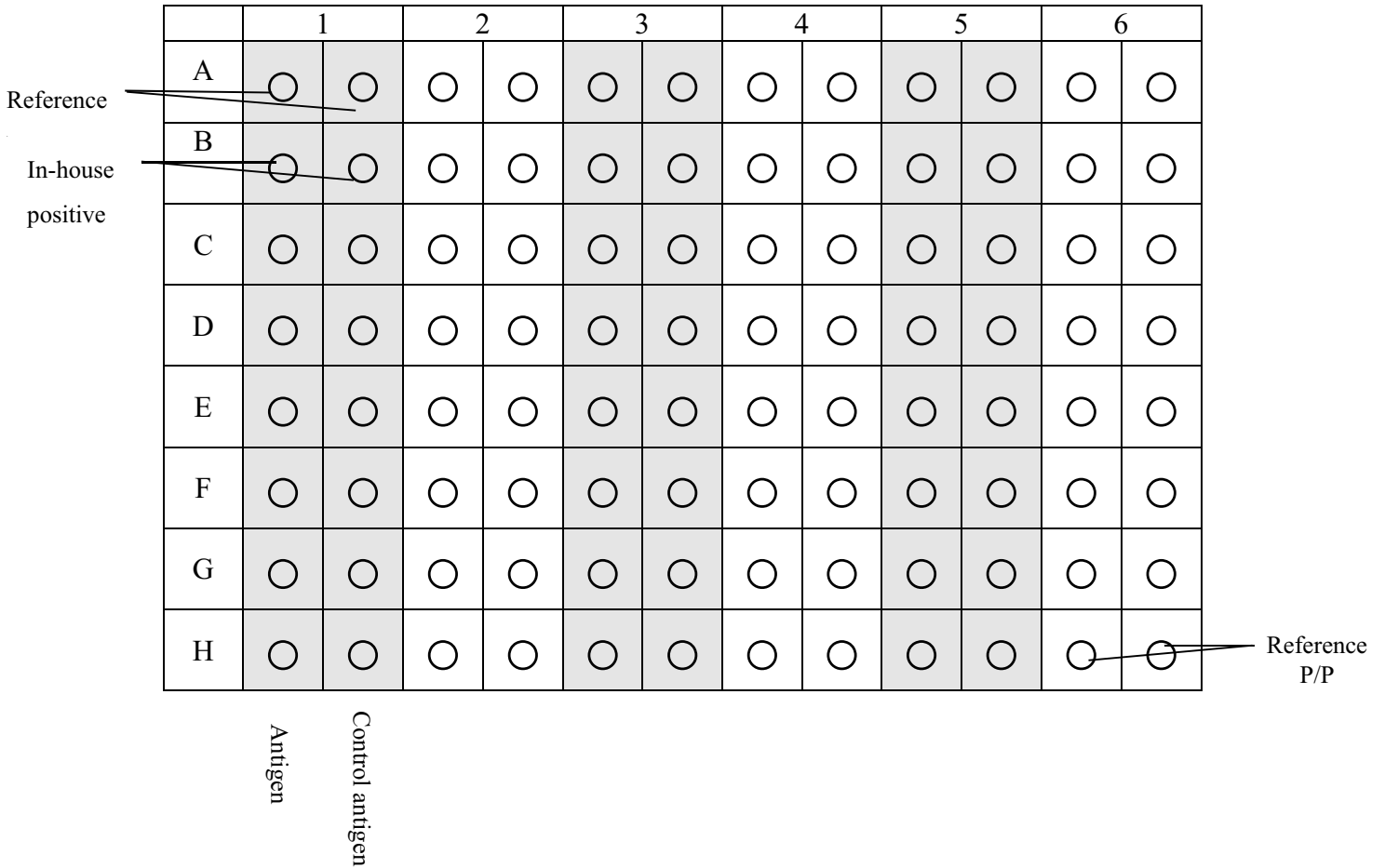
15.4 德國麻疹 ELISA 紀錄表。

15.5 德國麻疹病毒血清學檢驗及結果判定流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測 ( Indirect ELISA )	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 270 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 檢體排列位置圖



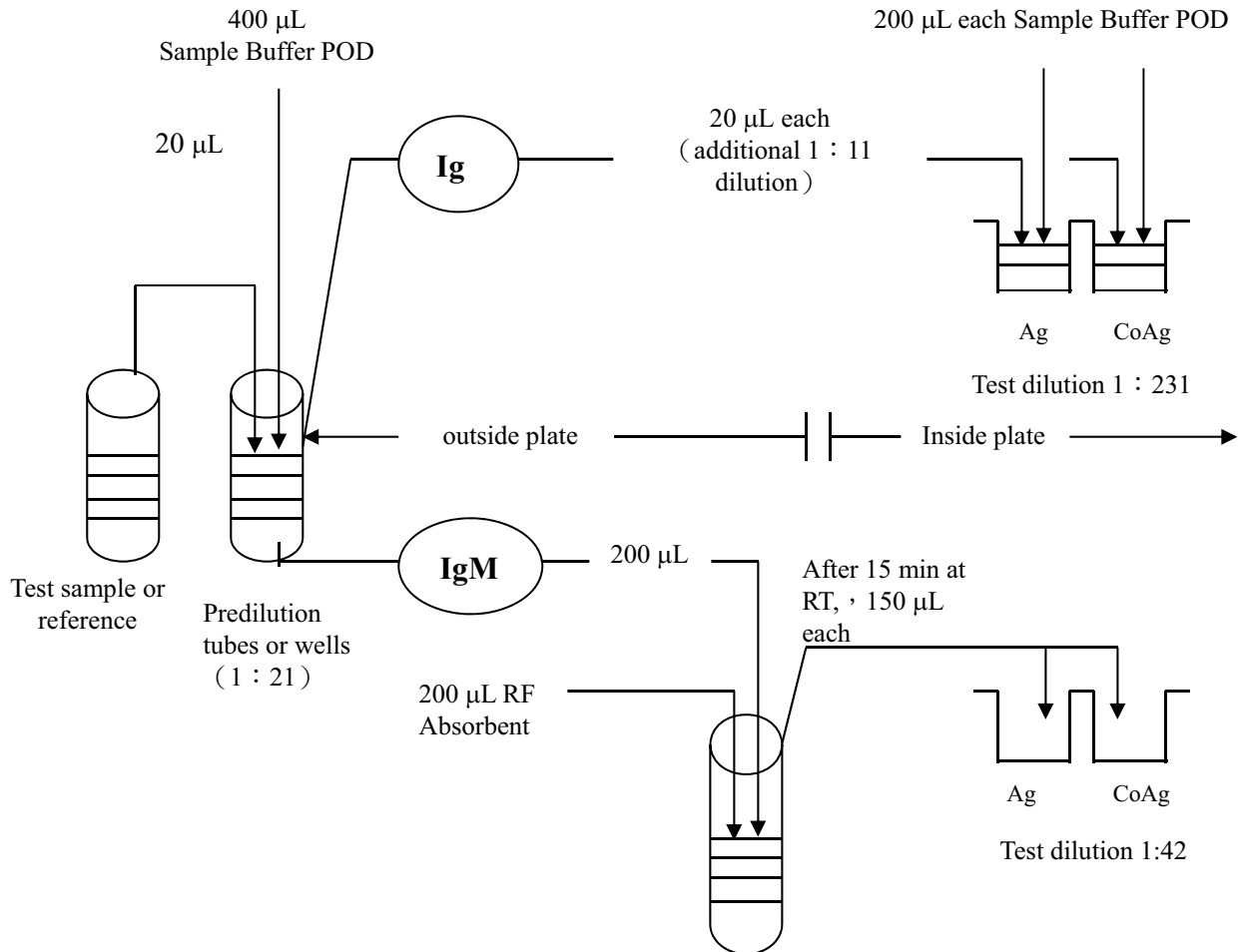
1. 從 C1 開始置放待測檢體
2. Reference P/P 除 A1 位置固定外，另一 Reference P/P 位置視檢體量而定，在最後一個試劑條 H 對應位置



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 271 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

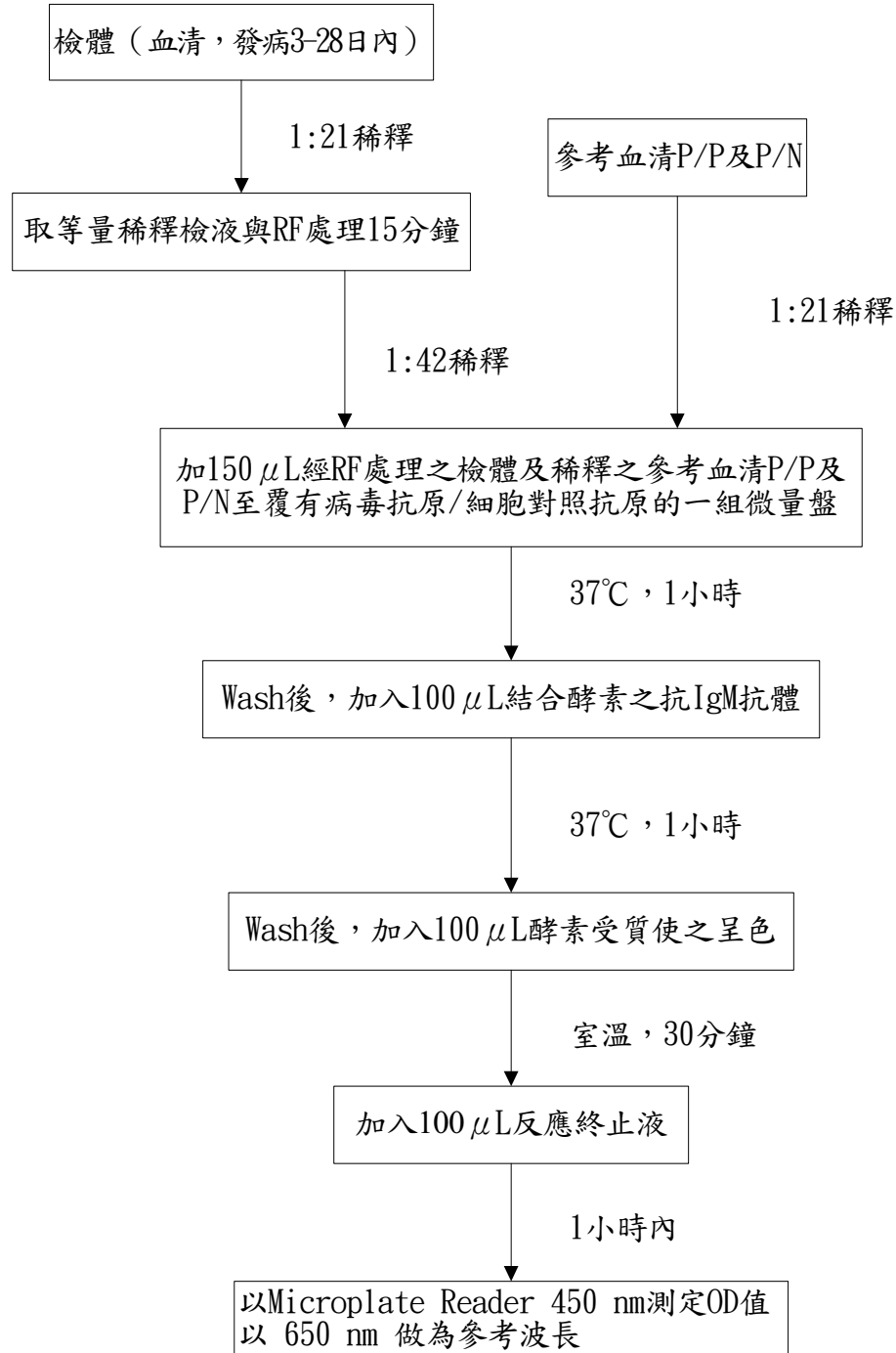


編號：  
頁次：第 272 頁/共 1078 頁

德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測  
(Indirect ELISA)

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 德國麻疹病毒 IgM 抗體試驗 (間接酵素免疫分析法) 流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 273 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.4 德國麻疹 ELISA 紀錄表

### 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 德國麻疹ELISA實驗紀錄表

Date :

Name	Rubella IgM					Rubella IgG																		
	Well	Sample No.	$\Delta A$	Corrected $\Delta A$	Result	Well	Sample No.	$\Delta A$	Corrected $\Delta A$	Result														
	1A	P/P				1A	P/N																	
	B	in-house P				B	in-house P																	
	C					C																		
	D					D																		
	E					E																		
	F					F																		
	G					G																		
	H					H																		
	2A					2A																		
	B					B																		
	C					C																		
	D					D																		
	E					E																		
	F					F																		
	G					G																		
	H					H																		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><th colspan="2" style="text-align: center;">Validation Check</th></tr> <tr><td>1.P/P <math>\geq 0.2</math></td></tr> <tr><td>2.P/P within lower and upper margin</td></tr> <tr><td>3.Individual P/P within <math>\pm 20\%</math> mean P/P</td></tr> </table>						Validation Check		1.P/P $\geq 0.2$	2.P/P within lower and upper margin	3.Individual P/P within $\pm 20\%$ mean P/P	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><th colspan="2" style="text-align: center;">Validation Check</th></tr> <tr><td>1.P/N <math>\geq 0.5</math></td></tr> <tr><td>2.P/N within lower and upper margin</td></tr> <tr><td>3.Individual P/N within <math>\pm 20\%</math> mean P/N</td></tr> </table>					Validation Check		1.P/N $\geq 0.5$	2.P/N within lower and upper margin	3.Individual P/N within $\pm 20\%$ mean P/N				
Validation Check																								
1.P/P $\geq 0.2$																								
2.P/P within lower and upper margin																								
3.Individual P/P within $\pm 20\%$ mean P/P																								
Validation Check																								
1.P/N $\geq 0.5$																								
2.P/N within lower and upper margin																								
3.Individual P/N within $\pm 20\%$ mean P/N																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Kit Batch :</td></tr> <tr><td>Expiry :</td></tr> <tr><td>Lower margin :</td></tr> <tr><td>Upper margin :</td></tr> <tr><td>Nominal Value :</td></tr> <tr><td>Mean P/P :</td></tr> <tr><td>Correction Factor :</td></tr> </table>						Kit Batch :	Expiry :	Lower margin :	Upper margin :	Nominal Value :	Mean P/P :	Correction Factor :	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Kit Batch :</td></tr> <tr><td>Expiry :</td></tr> <tr><td>Lower margin :</td></tr> <tr><td>Upper margin :</td></tr> <tr><td>Nominal Value :</td></tr> <tr><td>Mean P/N :</td></tr> <tr><td>Correction Factor :</td></tr> </table>					Kit Batch :	Expiry :	Lower margin :	Upper margin :	Nominal Value :	Mean P/N :	Correction Factor :
Kit Batch :																								
Expiry :																								
Lower margin :																								
Upper margin :																								
Nominal Value :																								
Mean P/P :																								
Correction Factor :																								
Kit Batch :																								
Expiry :																								
Lower margin :																								
Upper margin :																								
Nominal Value :																								
Mean P/N :																								
Correction Factor :																								
<p><b>Result Interpretation</b></p> <p>(-)Negative &lt; 0.10    (+)POSITIVE &gt; 0.20    (+/-)EQUIVOCAL : 0.10-0.20</p>																								

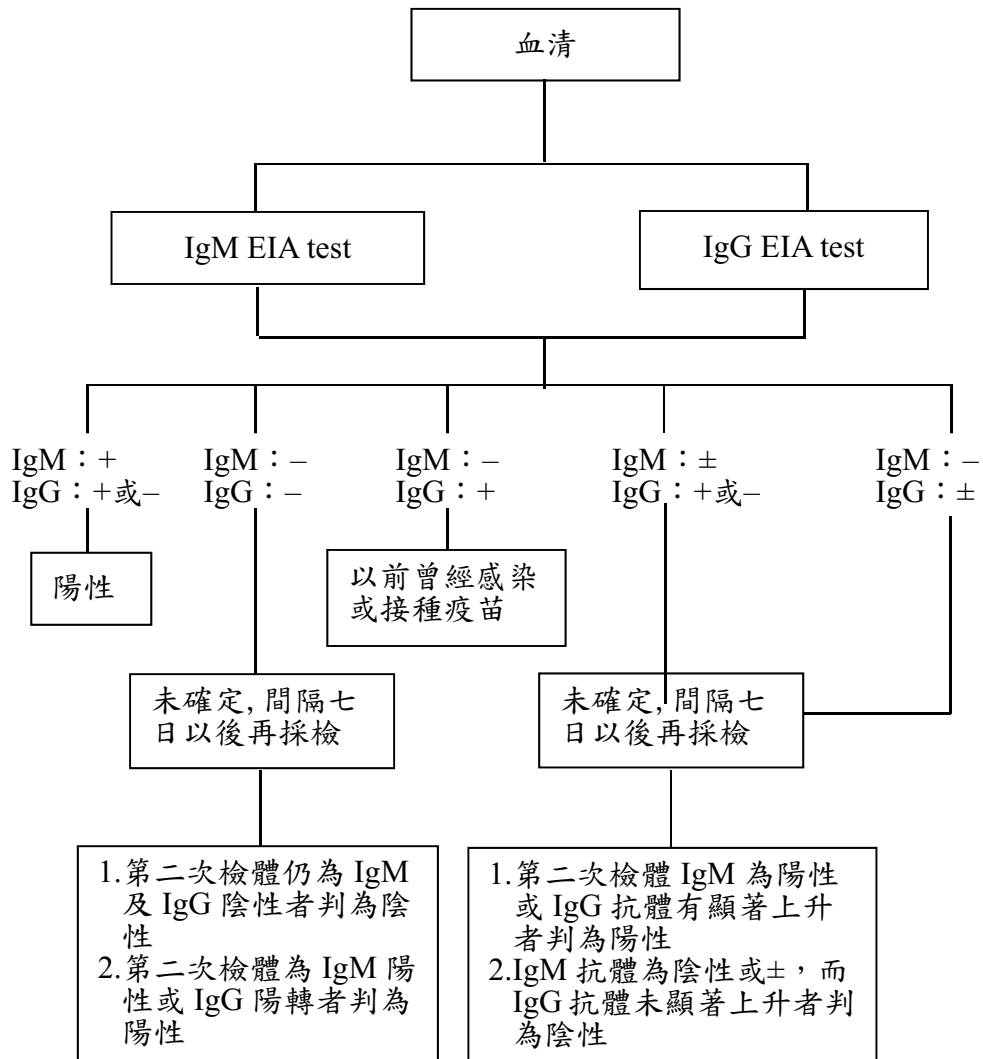
檢驗者：

實驗室主管：


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 274 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 德國麻疹血清學檢驗及結果判定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 275 頁/共 1078 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用間接免疫酵素分析法 (indirect ELISA, indirect enzyme-linked immunosorbent assay) 檢測人體是否有德國麻疹專一性 IgG 抗體。

## 2 適用檢體種類

血清 (serum) 或血漿 (plasma)。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用間接酵素免疫分析法。利用 96 孔微量盤底覆有德國麻疹病毒抗原的測試盤與待測血清中具有德國麻疹專一性 IgG 抗體作用 1 hr，清洗掉未結合的物質然後加上 Anti-human IgG/POD Conjugate，再反應 1 hr，清洗掉未結合的物質，最後加上無色受質 TMB 作用 30 min，經 conjugate 上的酵素催化，轉換為藍色，最後再加上終止液終止反應，此時有反應的位置會變成黃色。以吸光光度計測定 450 nm 波長的吸光值，以 650 nm 為參考波長。

## 5 試劑耗材

### 5.1 試劑

5.1.1 「Enzygnost anti-Rubella-virus/IgG : Dade Behring, OWBF 15, Germany, 4 °C 儲存」

5.1.1.1 Anti-Rubella virus/IgG test plate : 2 × 6 strips。

5.1.1.2 Anti-Rubella virus reference P/N : 0.4 mL。

5.1.1.3 Sample buffer POD : 2 × 50 mL。

5.1.1.4 Anti-human IgG/POD conjugate : 1 mL。

5.1.1.5 Conjugate buffer microbiol : 4 × 12.5 mL。

5.1.1.6 Polyethylene bag for storing unused test strip。

5.1.1.7 Barcode table of value。

5.1.2 「Supplementary reagents for enzygnost/TMB : Dade Behring, OUVF 17, Germany, 4 °C 儲存」。

5.1.2.1 Washing solution POD : 3 × 100 mL。

5.1.2.2 Colour solution blue for enzygnost : 1 × 12.5 mL。

5.1.2.3 Buffer/substrate TMB : 4 × 30 mL。

5.1.2.4 Chromogen TMB : 4 × 3 mL。

5.1.2.5 Stopping solution POD : 2 × 100 mL。

5.1.2.6 Adhesive foils for microtiter plates : 24 pcs.。

5.1.2.7 Empty bottle for the working Chromogen solution : 1 pcs.。

5.1.2.8 Instruction for use : 1 pcs.。

### 5.2 耗材

5.2.1 Tips : 200 μL、1,000 μL。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 276 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

- 5.2.2 1.5 mL Eppendorf。
- 5.2.3 4 mL Tube。
- 5.2.4 2 mL 螺旋試管。
- 5.2.5 抗凍標籤紙。
- 5.2.6 油性簽字筆。

## 6 儀器設備

- 6.1 單爪 Pipetman：20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L。
- 6.2 八爪 Pipetman：200  $\mu$ L。
- 6.3 電動分注器：50  $\mu$ L - 1,000  $\mu$ L。
- 6.4 Microplate washer。
- 6.5 Microplate reader。
- 6.6 小型離心機。
- 6.7 37 °C 溫箱。
- 6.8 振盪混合器。

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

10.1 檢體編號：核對檢驗單之個案與檢體是否相符，給予疾病編號。

### 10.2 檢驗前處理

- 10.2.1 將血液分裝於 1.5 mL Eppendorf，以小型離心機離心 3 - 5 min，收集血清或血漿於 2 mL 螺旋試管。
- 10.2.2 記錄檢體於檢驗盤上之相對應位置，如附錄 15.1。
- 10.2.3 配置 Working wash solution：用蒸餾水以 1：20 的比例稀釋 5.1.2.1 Washing solution POD。
- 10.2.4 配置 Working conjugate solution：1 份 5.1.1.5 Anti-human IgG/POD conjugate + 50 份 5.1.1.6 Conjugate buffer microbiol。
- 10.2.5 配置 Working Chromogen solution：1 份 5.1.2.4 Chromogen TMB + 10 份 5.1.2.3 Buffer/substrate TMB。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 277 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

10.2.6 Microplate washer 先以配置好的 Working wash solution 進行 Prime 指令，使管路充滿 Working wash solution。

## 10.3 檢驗步驟

- 10.3.1 血清稀釋至加到微量盤的步驟詳如附錄 15.2。
- 10.3.2 封上 5.1.2.6 Adhesive foils, 置放 37°C 溫箱培養 60 min。
- 10.3.3 啟動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.4 每個孔加入 100  $\mu$ L Working conjugate solution。
- 10.3.5 置放 37 °C 溫箱培養 60 min。
- 10.3.6 啟動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.7 每個孔加入 100  $\mu$ L Working Chromogen solution。
- 10.3.8 室溫，避光，培養 30 min。
- 10.3.9 每個孔加入 100  $\mu$ L Stopping solution。
- 10.3.10 用 Microplate reader 測定 450 nm 吸光度，以 650 nm 做為參考波長。

## 10.4 檢驗後處理

- 10.4.1 Microplate washer 以蒸餾水進行二次 Prime，以去除殘存之 Wash solution，防止管路結晶阻塞。
- 10.4.2 使用後的 Tips、Eppendorf、Microplate strip，滅菌後丟棄。
- 10.4.3 Microplate washer、Microplate reader 關機。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

計算	判定	判定標準
$\Delta A = A_{\text{antigen}} - A_{\text{control antigen}}$	陽性 (positive)	$\Delta A > 0.2$
	陰性 (negative)	$\Delta A < 0.1$
	未確定 (equivocal)	$0.1 \leq \Delta A \leq 0.2$


11.2 報告核發：德國麻疹 IgG 陽性，德國麻疹 IgG 陰性，德國麻疹 IgG 未確定。

11.3 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果登錄於附錄 15.4 德國麻疹 ELISA 實驗紀錄表，檢驗結果填寫於檢體送驗單之”檢驗結果欄”，並上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。

## 12 品質管制

- 12.1 Qualitative evaluation： $\Delta A_{\text{Reference P/N}} \geq 0.5$ 。
- 12.2 Quantitative evaluation
- 12.3 Lower margin  $\leq \Delta A_{\text{Reference P/N}} \leq$  upper margin。
- 12.4 任一  $\Delta A_{\text{Reference P/N}}$  介於 Reference P/N 平均值  $\pm 20\%$ 。
- 12.5 Measurement correction：利用 Reference P/N 來校正實驗值，改善結果的再現性。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 278 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

## 計算範例

Reference P/N , at start of series	$\Delta A$	1.374
With margins ?		yes
Reference P/N , at end of series	$\Delta A$	1.188
With margins ?		yes
Mean value	$\Delta A$	1.281
Reference P/P, nominal value	$\Delta A$	1.024
Correction factor 1.024:1.281	=	0.8
Corrected $\Delta A$ 待測血清	=0.8 x $\Delta A$ 待測血清	

註：upper 、lower margin、nominal value 詳見 5.1.1(7)，為 lot-specific。

### 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

### 14 參考資料

Dade Behring 公司操作說明書。

### 15 附錄

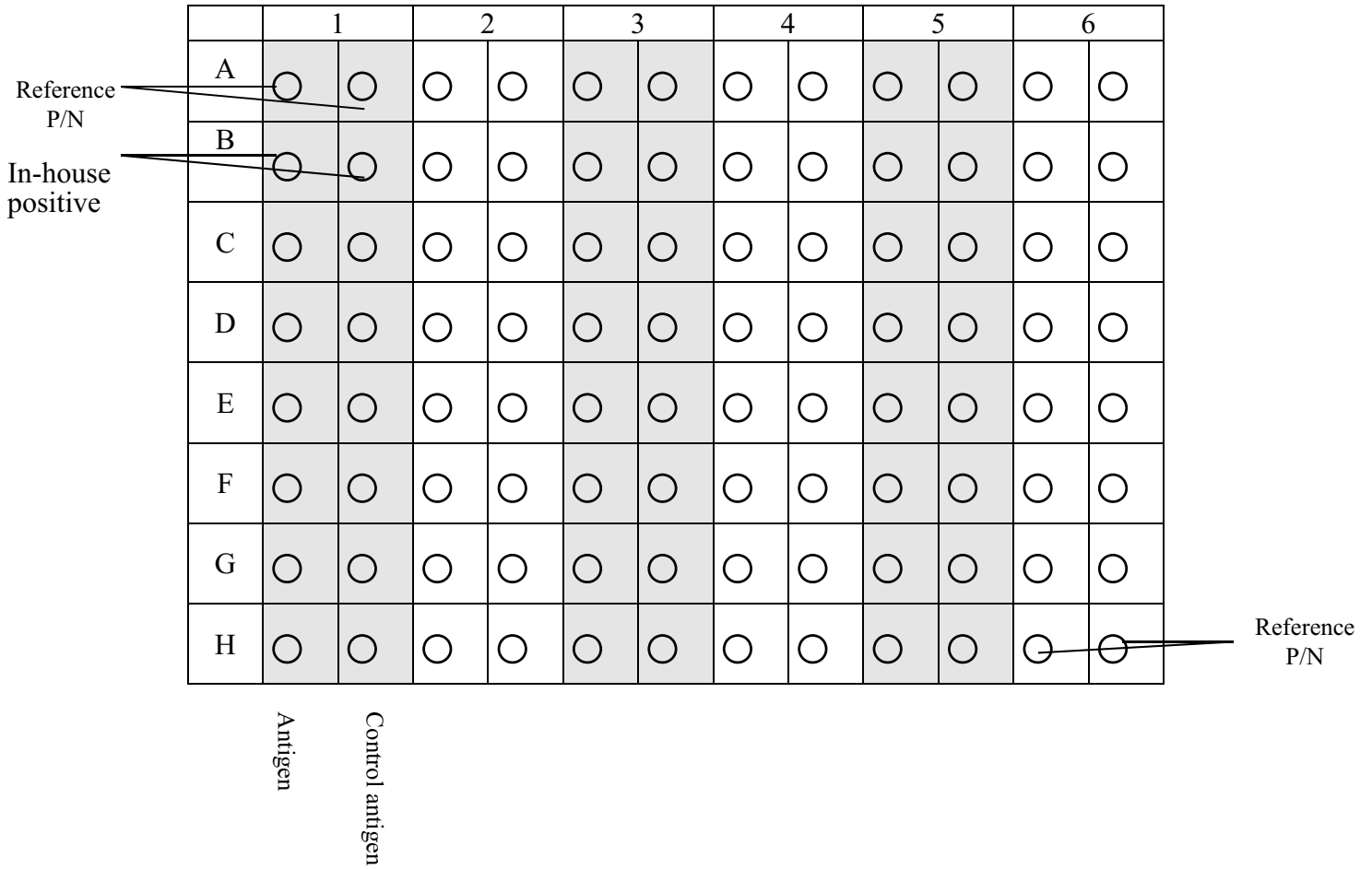
- 15.1 檢體排列位置圖。
- 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖。
- 15.3 德國麻疹病毒 IgG 抗體試驗（間接酵素免疫分析法）流程圖。
- 15.4 德國麻疹 ELISA 實驗紀錄表。
- 15.5 德國麻疹 ELISA 血清學檢驗及結果判定流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 279 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 檢體排列位置圖

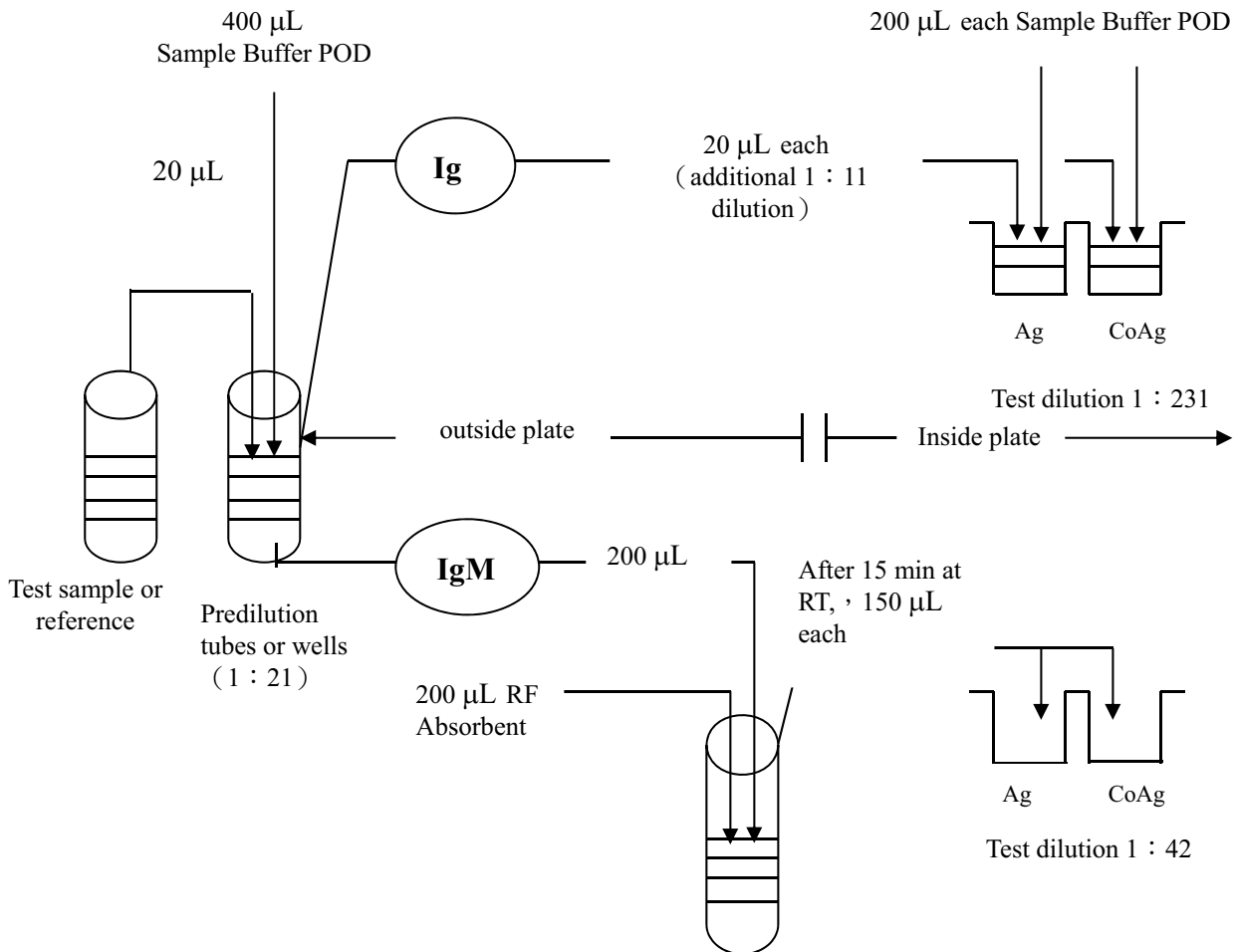


1. 從 C1 開始置放待測檢體。
2. Reference P/N 除 A1 位置固定外，另一 Reference P/N 位置視檢體量而定，在最後一個試劑條 H 對應位置。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 280 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測

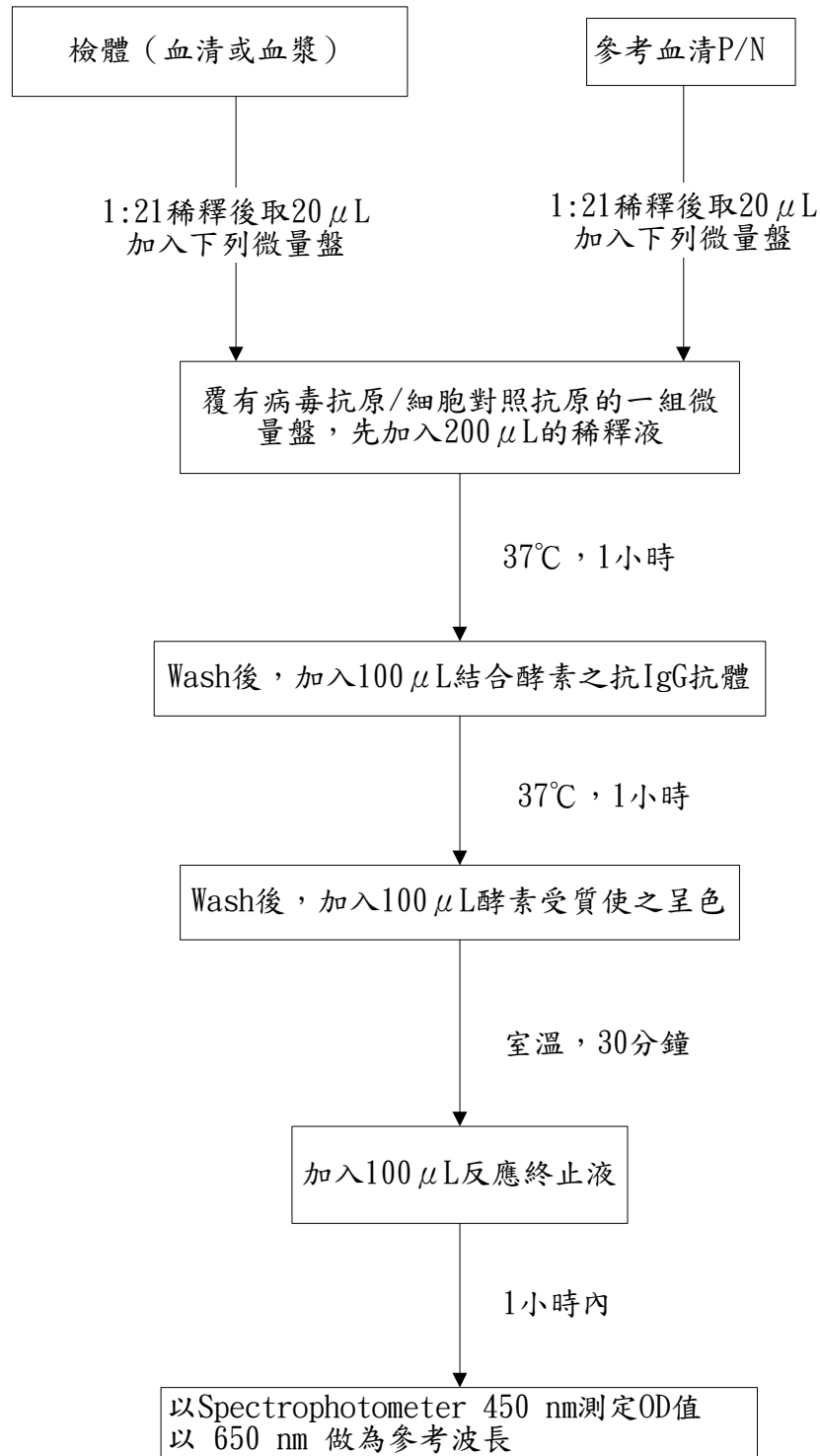
核准日期： 年 月 日

頁次：第 281 頁/共 1078 頁

(Indirect ELISA)

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 德國麻疹病毒 IgG 抗體試驗（間接酵素免疫分析法）流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 282 頁/共 1078 頁	( Indirect ELISA )	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.4 德國麻疹 ELISA 實驗紀錄表

### 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 德國麻疹ELISA實驗紀錄表


Date :

Name	Rubella IgM					Rubella IgG																		
	Well	Sample No.	Δ A	Corrected Δ A	Result	Well	Sample No.	Δ A	Corrected Δ A	Result														
	1A	P/P				1A	P/N																	
	B	in-house P				B	in-house P																	
	C					C																		
	D					D																		
	E					E																		
	F					F																		
	G					G																		
	H					H																		
	2A					2A																		
	B					B																		
	C					C																		
	D					D																		
	E					E																		
	F					F																		
	G					G																		
	H					H																		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><th colspan="2" style="text-align: center;">Validation Check</th></tr> <tr><td>1.P/P ≥ 0.2</td></tr> <tr><td>2.P/P within lower and upper margin</td></tr> <tr><td>3.Individual P/P within ± 20 % mean P/P</td></tr> </table>						Validation Check		1.P/P ≥ 0.2	2.P/P within lower and upper margin	3.Individual P/P within ± 20 % mean P/P	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><th colspan="2" style="text-align: center;">Validation Check</th></tr> <tr><td>1.P/N ≥ 0.5</td></tr> <tr><td>2.P/N within lower and upper margin</td></tr> <tr><td>3.Individual P/N within ±20 % mean P/N</td></tr> </table>					Validation Check		1.P/N ≥ 0.5	2.P/N within lower and upper margin	3.Individual P/N within ±20 % mean P/N				
Validation Check																								
1.P/P ≥ 0.2																								
2.P/P within lower and upper margin																								
3.Individual P/P within ± 20 % mean P/P																								
Validation Check																								
1.P/N ≥ 0.5																								
2.P/N within lower and upper margin																								
3.Individual P/N within ±20 % mean P/N																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Kit Batch :</td></tr> <tr><td>Expiry :</td></tr> <tr><td>Lower margin :</td></tr> <tr><td>Upper margin :</td></tr> <tr><td>Nominal Value :</td></tr> <tr><td>Mean P/P :</td></tr> <tr><td>Correction Factor :</td></tr> </table>						Kit Batch :	Expiry :	Lower margin :	Upper margin :	Nominal Value :	Mean P/P :	Correction Factor :	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Kit Batch :</td></tr> <tr><td>Expiry :</td></tr> <tr><td>Lower margin :</td></tr> <tr><td>Upper margin :</td></tr> <tr><td>Nominal Value :</td></tr> <tr><td>Mean P/N :</td></tr> <tr><td>Correction Factor :</td></tr> </table>					Kit Batch :	Expiry :	Lower margin :	Upper margin :	Nominal Value :	Mean P/N :	Correction Factor :
Kit Batch :																								
Expiry :																								
Lower margin :																								
Upper margin :																								
Nominal Value :																								
Mean P/P :																								
Correction Factor :																								
Kit Batch :																								
Expiry :																								
Lower margin :																								
Upper margin :																								
Nominal Value :																								
Mean P/N :																								
Correction Factor :																								
<p><b>Result Interpretation</b></p> <p>(-)Negative &lt; 0.10    (+)POSITIVE &gt; 0.20    (+/-)EQUIVOCAL : 0.10-0.20</p>																								

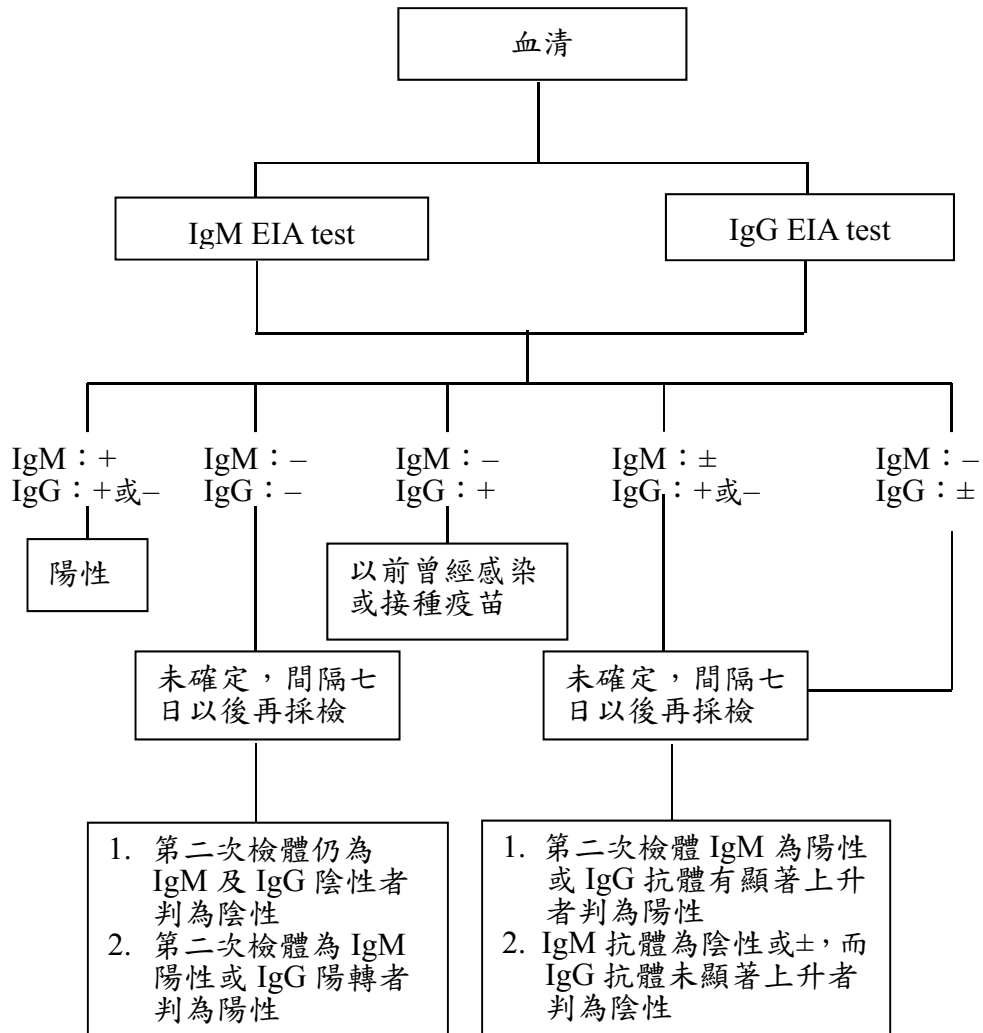
檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 283 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 德國麻疹血清學檢驗及結果判定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 284 頁/共 1078 頁

屈公病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

檢測疑似病患的血液或組織中是否含有屈公病毒。

## 2 適用檢體種類

適用於急性期發病病患七病日內血液檢體或組織檢體。

## 3 名詞解釋

無

## 4 原理概述

利用白線斑蚊細胞株於細胞培養盤中接種病患血清或組織研磨液，於 28°C 培養箱中培養 3~4 日，取其細胞於 24 孔玻璃片上，加入抗屈公病毒抗體及螢光標記的山羊抗鼠抗體，於螢光顯微鏡下檢查，測定是否有屈公病毒。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

5.1.1 RPMI 細胞培養液 (RPMI 1640, 含 1%胎牛血清【FCS】及 1%三合一抗生素【PSA】)。

5.1.2 白線斑蚊細胞株 (C6/36, 前美國海軍醫院第二研究所)。

5.1.3 屈公病毒 (台灣境外株當控制組)：屈公病毒以 Vero 細胞培養 2~3 天，取上清液，當屈公病毒來源。(CK9500004)

5.1.4 抗屈公病毒抗體【Chikungunya (ATCC VR64) Mouse Hyperimmune Ascitic Fluid】

5.1.5 FITC-goat anti-mouse IgG。

5.1.6 丙酮。

5.1.7 磷酸鹽緩衝液。

5.1.8 甘油緩衝液。

### 5.2 耗材

5.2.1 96 孔培養盤。

5.2.2 50 mL 的離心管。

5.2.3 24 孔玻璃片。

5.2.4 蓋玻片。

5.2.5 無菌 250  $\mu$ L、1,250  $\mu$ L 之吸管尖。

## 6 儀器設備

6.1 28°C CO<sub>2</sub> 培養箱。

6.2 37°C CO<sub>2</sub> 培養箱。

6.3 第 II 級生物安全櫃。

6.4 螢光顯微鏡。

6.5 吹風機。

6.6 5~40  $\mu$ L Pipette 及 40-200  $\mu$ L Pipette。

6.7 -20°C 及 -80°C 冷凍櫃。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 285 頁/共 1078 頁

屈公病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 7 環境設施安全

- 7.1 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 以上之負壓實驗室進行。
- 7.2 水質：25 °C 蒸餾水或 RO 逆滲透去離子可達 18 MΩ-CM 以上超純水。

## 8 檢體採集

- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

- 10.1.1 於 4 °C, 2,100 × g 離心 15 分鐘，上清液盛於塑膠小瓶(1.8mL)，標示號碼及日期，保存於 -80 °C。

### 10.2 步驟

- 10.2.1 在 96 孔細胞培養盤中將患者血清 5ul 以細胞培養液做 20、40、80、160 倍連續稀釋，每孔加入 50ul 之 2 倍連續稀釋血清。每孔中再加入 100ul C6/36 細胞懸浮液【培養 C6/36 cell 於 flask 75T，加 15 ml 培養液 (RPMI 1640，含 5% FCS 及 1% PSA) 培養約 3-4 天，以細胞括杓括下細胞→以血球計數器計算細胞量。配製成 1×10<sup>6</sup>/ml 細胞懸浮液】。
- 10.2.2 置 28 °C 5 % CO<sub>2</sub> 培養箱培養 3-4 天。
- 10.2.3 將每一孔中培養液移至另一無菌盤中，置於 -80 °C 保存。
- 10.2.4 取 20 μL PBS 刮下培養盤中之細胞，在 24 孔玻璃片上做抹片。
- 10.2.5 於室溫中風乾後，置於 -20 °C 丙酮固定 10 min。
- 10.2.6 取出 24 孔玻璃片陰乾。
- 10.2.7 此檢體抹片可保存於 -20 °C 冰箱中或直接染色。
- 10.2.8 在抹片上加上 25 μL 抗屈公病毒單株抗體。
- 10.2.9 將抹片放置在潮濕的培養皿中，置於 37 °C 溫箱 30 min。
- 10.2.10 將抹片取出並以磷酸鹽緩衝液 (換三次) 洗去多餘之抗體。
- 10.2.11 以蒸餾水沖洗。
- 10.2.12 在室溫中將玻璃片以冷風吹乾或陰乾。
- 10.2.13 將抹片加上 25 μL 螢光標記之山羊抗鼠抗體 (FITC-goat anti-mouse IgG)。
- 10.2.14 重複 10.2.9 至 10.2.12。
- 10.2.15 滴上甘油緩衝液，然後以蓋玻片覆蓋。
- 10.2.16 以螢光顯微鏡檢查。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 286 頁/共 1078 頁

屈公病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

11.1.1 在螢光顯微鏡下將檢測檢體與 Positive control 及 Negative control 比對判讀。

11.1.2 當檢體呈現陽性時在螢光顯微鏡下可見黃綠色之細胞；當檢體呈現陰性時在螢光顯微鏡下無綠色細胞僅可見到細胞陰影。

11.2 報告核發:無，內部登錄處理。

11.3 結果登錄:無，內部登錄處理。

## 12 品質管制

12.1 嚴防病原散佈或污染，工作時帶手套。

12.2 實驗過程遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在生物安全第二等級以上之負壓實驗室內操作，以避免污染。

12.3 生物安全櫃及培養箱定期做校正及維護。

12.4 置於 37°C 溫箱染色時應注意保持溼度。

12.5 C6/36 培養溫度不可超過 32°C。

12.6 必須要有未感染病毒之細胞及感染病毒之細胞分別做為陽性與陰性對照組。

## 13 廢棄物處理

13.1 檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121°C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Igarashi A. 1978. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. J Gen Virol 40: 531-534.

14.2 Wu YC. 1986. Epidemic dengue 2 on Liouchyong Shiang, Pingtung County in 1981. Chin J Microbiol Immunol 19: 27-35.

14.3 Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop Med Hyg 33: 158-165.

## 15 附錄

15.1 屈公病毒分離與鑑定流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

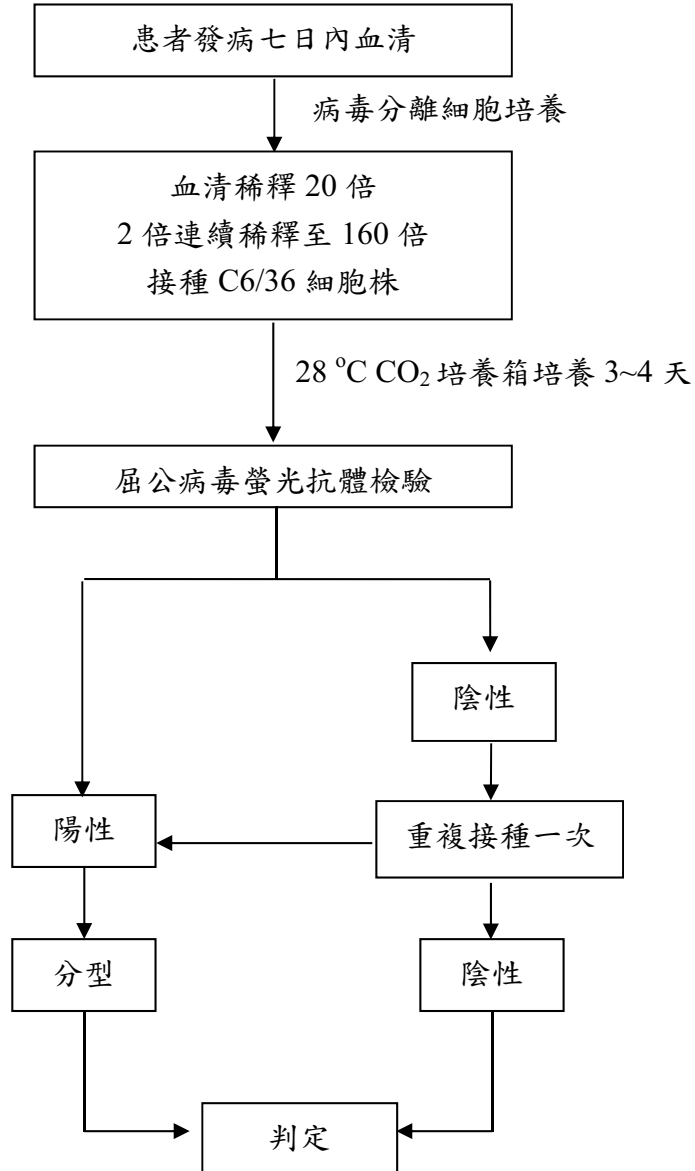
頁次：第 287 頁/共 1078 頁

屈公病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 屈公病毒分離與鑑定流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 288 頁/共 1078 頁

屈公病毒核酸檢測  
(Real-time RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 分子診斷方法檢測疑似病患的血清檢體是否含有屈公病毒核酸。

## 2 適用檢體種類

血清。

## 3 名詞解釋

Threshold cycle (Ct)：係指 PCR 產物複製的量，累積到足以被偵測到的第一個循環點稱之。換句話說，Ct 的值越小，表示檢體中初始 DNA/RNA 的含量越多。

## 4 原理概述

利用對屈公病毒 (chikungunya virus) 具有專一性之引子 (primers) 與檢體中之病毒核酸分子結合配對，並利用 RT-PCR 的複製過程及特殊的螢光定量化學方法偵測 RT-PCR 產物，以決定檢體中是否含有屈公病毒核酸序列，所用之引子選自於屈公病毒之保守性序列 (conserved sequences)。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

5.1.1 病毒 RNA 萃取試劑套組。

5.1.2 SYBR green 定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應單步驟試劑套組。

### 5.2 耗材

5.2.1 檢體瓶。

5.2.2 無菌吸管。

5.2.3 定量 PCR 專用八連排反應管及蓋。

5.2.4 無菌過濾型 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L 吸管尖。

5.2.5 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.2.6 無粉手套。

## 6 儀器設備

6.1 第 II 級生物安全櫃。

6.2 即時多重定量 PCR 偵測系統。

6.3 10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、40  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L 微量滴管分注器。

6.4 高速離心機。

6.5 真空抽氣機。

6.6 冰箱：4  $^{\circ}$ C。


6.7 冷凍櫃：-20  $^{\circ}$ C。

6.8 高壓滅菌鍋。

## 7 環境設施安全

7.1 病人血清檢體應在第 II 級生物安全櫃 (BSL-2) 內處理。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 289 頁/共 1078 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。
- 7.3 應有獨立的操作空間，盡量與操作 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

- 10.1.1 裝有靜脈血的無菌真空試管以 2,000 轉離心 10 分鐘，以無菌吸管將血清吸入檢體瓶內旋緊瓶蓋。
- 10.1.2 檢體瓶上標註檢體標號。
- 10.1.3 檢體處理好後置 2-8°C 冰箱冷藏。

### 10.2 步驟

- 10.2.1 萃取病毒 RNA，依據所使用試劑製造業者的操作手冊進行。
- 10.2.2 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應，取 5 µL RNA 做模板，加入漢他病毒專一性引子組（參考附錄 15.1），並依據所使用試劑製造業者的操作手冊，加入其他所需試劑，調整反應總體積至 25 µL。
- 10.2.3 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應程式設定：
- 10.2.3.1 RT 作用：50°C，30 min。
- 10.2.3.2 Taq polymerase activation：95°C，15 min。
- 10.2.3.3 Denaturation：95°C，15 sec。
- 10.2.3.4 Annealing：55°C，30 sec。
- 10.2.3.5 Extension：72°C，20 sec。
- 10.2.3.6 77°C，30 sec，收集螢光值。
- 10.2.3.7 重複 10.2.3.3 至 10.2.3.6 步驟 45 Cycle。
- 10.2.4 Melting curve analysis：
- 10.2.4.1 95°C，1 min。
- 10.2.4.2 以 0.2°C /秒速率降溫至 68°C，收集螢光值。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 陽性對照組的 Ct 值需小於或等於 30，Tm 值需大於或等於 79°C。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 290 頁/共 1078 頁


屈公病毒核酸檢測  
(Real-time RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 11.1.2 陰性對照組的  $C_t$  值需大於或等於 40， $T_m$  值需小於  $79^{\circ}\text{C}$ ， $C_t$  值或  $T_m$  值有一項符合上述要求即可。
- 11.1.3 陽性對照組或陰性對照組其中之一不符合設定值時，則重新實驗。
- 11.1.4 在陽性對照與陰性對照組符合設定值下， $C_t$  值小於 35、 $T_m$  值大於或等於  $79^{\circ}\text{C}$  者，判為屈公病毒陽性，反之則判為屈公病毒陰性。
- 11.2 報告核發
  - 11.2.1 屈公病原體檢驗方法：螢光定量聚合酶-連鎖反應 (real-time PCR)
  - 11.2.2 結果：陽性。
  - 11.2.3 結果：陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統 (LIMS) 之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。
- 12 品質管制
  - 12.1 每次進行實驗時皆有對照組，陽性對照組與陰性對照組的  $C_t$  值需符合設定值。
  - 12.2 實驗過程遵循標準檢驗方法的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。
  - 12.3 即時多重定量 PCR 偵測系統定時作檢測與校正。
  - 12.4 微量滴管分注器定期校正。
  - 12.5 注意試劑套組的使用期限與適當的儲放溫度。
- 13 廢棄物處理  
檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以  $121^{\circ}\text{C}$ ，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。
- 14 參考資料
  - 14.1 Pastorino B, Bessaud M, Grandadam M, Murri S, Tolou HJ, Peyrefitte CN. 2005. Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. J Virol Methods 124: 65-71.
  - 14.2 Shu PY, Yang CF, Su CL, Chen CY, Chang SF, Tsai KH, Cheng CH, Huang JH. Two imported chikungunya cases, Taiwan. Emerg Infect Dis. 2008;14:1326-7.
- 15 附錄
  - 15.1 屈公病毒診斷用引子組序列表。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 291 頁/共 1078 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.1 屈公病毒診斷用引子組序列表

---

<u>Chikungunya virus specific primer</u>	<u>參與反應的濃度</u>
ChikV-F AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA G	200nM
ChikV-R CCA AAT TGT CCY GGT CTT CTT	200nM

---

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 292 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
屈公病毒(chikungunya virus)IgM 和 IgG 抗體檢測。
- 2 適用檢體種類  
適用於人體血清檢體。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
利用 Capture IgM 與 IgG 酵素免疫分析法,測定病人血清中之屈公病毒特異性抗體。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 Dilution buffer : Casein blocking buffer (Sigma, Product no. C7594, USA) + 2.5 % Normal rabbit serum+ 4% Normal goat serum + 0.05 % Tween-20, pH 7.2。
  - 5.2 Washing buffer (1.5X PBS+0.05 % Tween-20, pH 7.2)。
  - 5.3 Human positive and negative control sera
    - 5.3.1 屈公病(Chikungunya, CHIK) Positive control(以 dilution buffer 1 : 100 稀釋)。
    - 5.3.2 羅斯河病(Ross River, RR) Positive control (以 dilution buffer 1 : 100 稀釋)。
    - 5.3.3 Negative control (以 dilution buffer 1 : 100 稀釋)。
  - 5.4 去活化病毒細胞培養液(病毒經 C6/36 細胞培養 5 - 7 天,收集上清液,經 UV 照射 1 hr,分裝後保存於-80 °C 冷凍櫃)
    - 5.4.1 屈公病毒: CHIKV, strain 950004 Taiwan。
    - 5.4.2 羅斯河病毒: RRV, strain T-48。
  - 5.5 抗 Alpha 病毒屬(Alphavirus)單株抗體( $\alpha$ -3581, Santa Cruz, Cat. no. sc-58088)。
    - 5.5.1 以 Protein A/G 管柱,經親合性純化後之抗 Alpha 病毒屬抗原單株抗體(抗體名稱為 CK1B.01);該 CK1B.01 抗體可逕與 Innova Biosciences 公司生產之 Lightning-Link Alkaline Phosphatase kit 反應,以製備抗黃病毒屬外套抗原單株抗體-鹼性磷酸酶結合體(簡稱 CK1B.01-AP)。
  - 5.6 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體。(goat anti-mouse IgG-AP conjugate, Jackson, Code no. 115-006-071, USA)
  - 5.7 Substrate reagent, p-Nitrophenyl-phosphate(p-NPP)(Chemicon, USA, Cat. no. ES009-500mL)。
  - 5.8 96 孔微量滴定盤
    - 5.8.1 Anti-human IgM 真空乾燥盤(ELISA plate coated with goat anti-human IgM)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 293 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

5.8.2 Anti-human IgG 真空乾燥盤 (ELISA plate coated with goat anti-human IgG)。

5.9 八連排稀釋管。

5.10 丟棄式 250  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L 吸管尖。

5.11 手套。

## 6 儀器設備

6.1 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC)。

6.2 全自動酵素免疫分析儀 (Tecan, Genesis workstation 150, Germany)。

6.3 微量滴管分注器 2  $\mu$ L、20  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L (pipettors)。

6.4 震盪器。

6.5 冰箱：4  $^{\circ}$ C。

6.6 冷凍櫃：-20  $^{\circ}$ C。

6.7 高壓滅菌鍋。

## 7 環境設施安全

7.1 病人血清檢體應在第 II 級生物安全櫃內處理。

7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

10.1 檢體編號登錄。

10.2 檢體量須大於 0.5 mL。

10.3 屈公病毒細胞培養液以 Dilution buffer 二點五倍稀釋後，加入 1：100 之抗 Alpha 屬單株抗體  $\alpha$ -3581。(屈公病毒加偵測抗體混合液)。另羅斯河病毒 (Ross River virus) 細胞培養液以 Dilution buffer 四倍稀釋後，加入 1：100 之抗 Alpha 屬單株抗體單株抗體  $\alpha$ -3581 (羅斯河病毒加偵測抗體混合液)。

10.3.1 CK1B.01-AP (5.5.1) 與病毒稀釋液以 1:2,000 比例混合，即可配製屈公病毒加直接偵測抗體混合液及羅斯河病毒加直接偵測抗體混合液，以此混合液進行測定，則可省略步驟 10.4、10.10 及 10.11。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 294 頁/共 1078 頁

屈公病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測  
(ELISA)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.4 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體以 Dilution buffer 1：2,000 稀釋。
- 10.5 取待測血清 7  $\mu$ L 加入 Dilution buffer 0.7 mL 稀釋 100 倍。若是腦脊髓液檢體，則取 70  $\mu$ L 加入 Dilution buffer 0.7 mL 稀釋 11 倍。
- 10.6 取 0.1 mL 待測血清(步驟 10.5)及陰性、陽性對照血清(試劑耗材 5.3)，加入 anti-human IgM 及 anti-human IgG 之 96 孔真空乾燥盤。
- 10.7 置於 37  $^{\circ}$ C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.8 取 0.1 mL 屈公病毒加偵測抗體混合液及羅斯河病毒加偵測抗體混合液(步驟 10.3) 分別加入 96 孔真空乾燥盤。
- 10.9 置於 37  $^{\circ}$ C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.10 取 0.1 mL 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體稀釋液(步驟 10.4) 加入 96 孔真空乾燥盤。
- 10.11 置於 37  $^{\circ}$ C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.12 取 0.1 mL/孔 呈色劑 (p-NPP) 加入 96 孔微量滴定盤中呈色。
- 10.13 置於 37  $^{\circ}$ C 溫箱，搖盪 40 min。
- 10.14 置微量滴定盤於酵素免疫分析儀裡，以雙波長 405、630 nm 測定吸光度 ( $OD_{405-630}$ )。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 若血清檢體之屈公病毒特異性 IgM 抗體之 OD 值大於 0.5，且屈公病毒 IgM OD 值/羅斯河病毒 IgM OD 值大於或等於 2，判為屈公病 IgM 陽性。
- 11.1.2 若血清檢體之屈公病毒特異性 IgG 抗體之 OD 值大於 0.5，判為屈公病 IgG 陽性。
- 11.1.3 屈公病 Positive control serum 應符合 IgM OD 值  $>1.0$ ，IgG OD 值  $>0.5$ 。
- 11.1.4 羅斯河病 Positive control serum 應符合 IgM OD 值  $>1.0$ ，IgG OD 值  $>0.5$ 。
- 11.1.5 Negative control serum 應符合 IgM OD 值  $<0.2$ ，IgG OD 值  $<0.2$ 。

### 11.2 報告核發：

- 11.2.1 檢驗方法：屈公病毒 IgM 和 IgG 抗體檢測
- 11.2.2 結果：陽性。
- 11.2.3 結果：陰性。

- 11.3 結果登錄：結果登錄：將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統 (LIMS) 之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 295 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 12 品質管制

- 12.1 應於有效期內使用，同一批號試劑，第一次使用時取一組進行試驗，之後每隔 3 - 6 個月再取一組進行試驗。
- 12.2 每次檢驗應加入陽性及陰性控制組血清。
- 12.3 遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。
- 12.4 微量滴管分注器定時做校正。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. Clin. Diagnos Lab Immunol 10: 622-630.
- 14.2 Monath TP, Nystrom RR, Bailey RE, Calisher CH, Muth DJ. 1984. Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of St. Louis encephalitis. J Clin Microbiol 20: 784-790。
- 14.3 Innis BL, Nissalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, puttisri P, Hoke CH. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. Am J Trop Med Hyg 40: 418-427。

## 15 附錄

屈公病毒 IgM 及 IgG 抗體試驗（酵素免疫分析法）流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

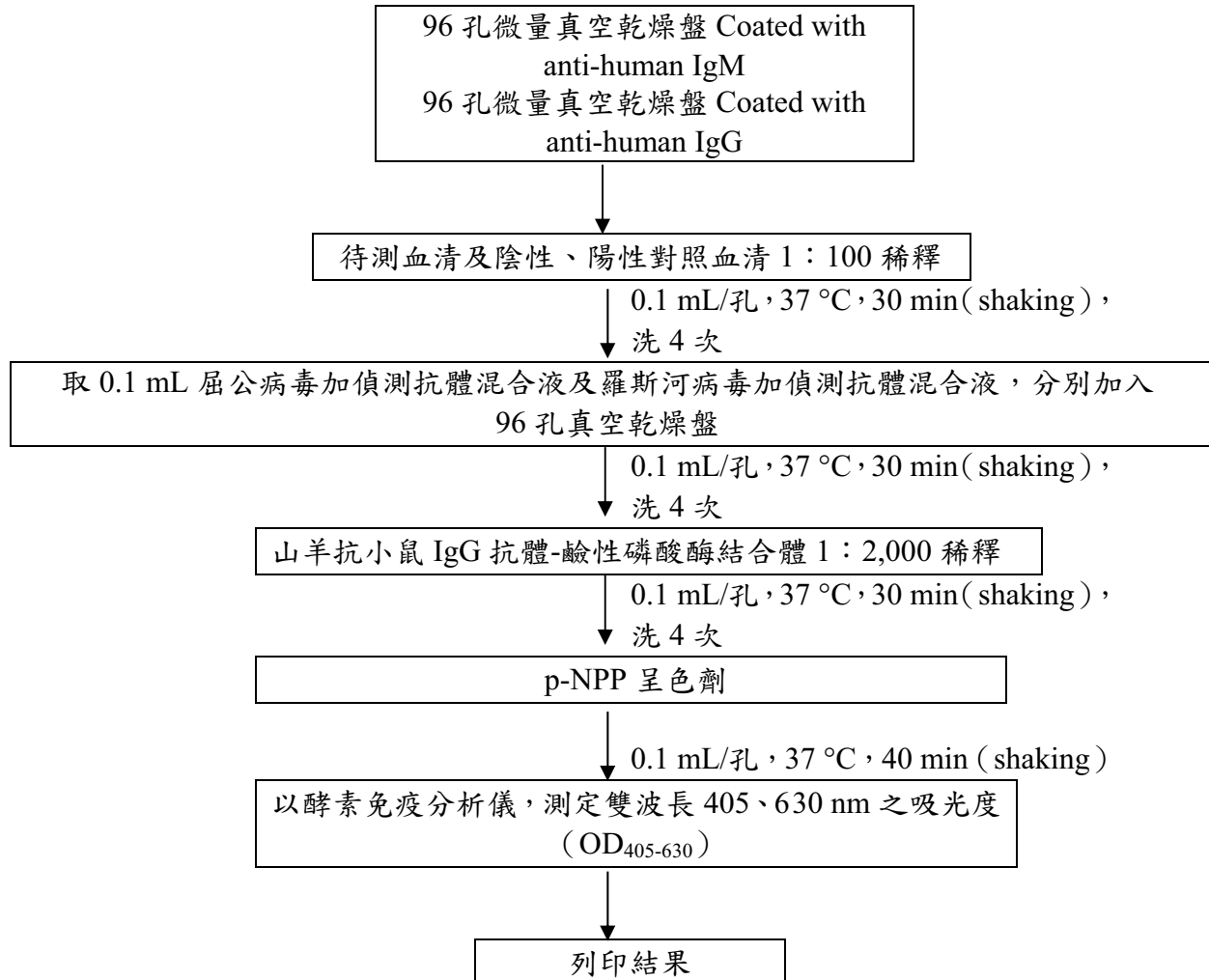
屈公病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測  
(ELISA)

核准日期： 年 月 日


頁次：第 296 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 屈公病毒 IgM 及 IgG 抗體試驗 (酵素免疫分析法) 流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 297 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
霍亂弧菌的分離鑑定與血清分型。
- 2 適用檢體種類  
適用於人體糞便、直腸拭子、環境檢體（水）。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
以特定培養基分離霍亂弧菌，並利用生化代謝特性及血清學方法鑑定霍亂弧菌與血清型別。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 培養基試劑配製
    - 5.1.1 含 1 % NaCl 之 Alkaline Peptone Water pH 8.6。
    - 5.1.2 含 1 % NaCl 之 10 倍濃度 Alkaline peptone water pH 9.2。
    - 5.1.3 TCBS (thiosulfate citrate bile salt sucrose) 培養基。
    - 5.1.4 PMT 培養基。
    - 5.1.5 Nutrient agar plate。
    - 5.1.6 TSA (tryptic soy agar) plate。
    - 5.1.7 TSIA (triple sugar iron agar)。
    - 5.1.8 LIA (lysine iron agar)。
    - 5.1.9 SIM (sulfide indole motility agar)。
  - 5.2 API 20E 生化鑑定套組：BioMérieux，法國。
  - 5.3 VITEK 2 革蘭氏陰性菌鑑定卡 (VITEK 2 GN)：BioMerieux，法國。
  - 5.4 氧化酶試紙 (oxidase strips)：MAST，英國或氧化酶試劑 (oxidase reagent) BioMérieux，法國。
  - 5.5 無菌生理食鹽水：0.85 % NaCl。
  - 5.6 O1 型霍亂多價抗血清，Inaba 抗血清，Ogawa 抗血清，O139 抗血清：SEIKEN，日本。
  - 5.7 載玻片。
  - 5.8 無菌吸管：3 mL。
  - 5.9 接種針 (環)。
  - 5.10 馬克法藍氏濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)。
- 6 儀器設備
  - 6.1 37 °C 培養箱。
  - 6.2 立體解剖顯微鏡：有變焦功能，至少可放大 4.5X。
- 7 環境設施安全  
於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 298 頁/共 1078 頁

霍亂弧菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

8.1 人體糞便、直腸拭子，參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

8.2 環境檢體，則依下述 10.1.1 方法，將檢體置於適當培養液 (alkaline peptone water)，常溫下，於 6 - 18 hr 內送至實驗室處理。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 分離培養

#### 10.1.1 檢體接種：

10.1.1.1 糞便、直腸拭子：直接塗抹於 TCBS、PMT 培養基上。

10.1.1.2 糞便、直腸拭子：除了直接分離培養外，應將糞便、直腸拭子放入 Alkaline peptone water pH 8.6 內，於 37 °C 經 6 - 15 hr 之增菌培養後，再塗抹在 TCBS、PMT 培養基上。

10.1.1.3 環境檢體 (水) 180 mL 加上 20 mL 之 10 倍濃度 Alkaline peptone water (pH 9.2) 稀釋成 1 倍液體，充分搖盪混合成檢液，將檢液置於 37 °C 經 6 - 15 hr 之增菌培養後，塗抹在 TCBS、PMT 培養基上。

10.1.2 培養：37 °C 培養箱培養。

10.1.3 觀察：18 - 24 hr 後，觀察有無可疑菌落，如有則進行鑑定。

### 10.2 鑑定

10.2.1 菌落型態：於 TCBS 培養基上呈黃色扁平透明菌落，於 PMT 培養基上呈鵝黃色菌落如荷包蛋周圍透明，挑取可疑菌落接種於 Nutrient agar 或 TSA agar 及鑑別培養基 TSIA、SIM、LIA 上，37 °C 培養箱培養 18 - 24 hr 後執行生化鑑定。

10.2.2 生化鑑定 (生化反應判定參照附錄 15.2)

10.2.2.1 三管生化反應常見的結果為 TSIA 呈現 A/A 反應，Gas (-)，H<sub>2</sub>S (-)，LIA K/K，IND (+)，IPA (-)，運動性 (+) 時則可能為霍亂弧菌。

10.2.2.2 氧化酶試驗 (Oxidase test)：挑選 TSA 培養基上菌落進行試驗，霍亂弧菌反應為陽性。

10.2.2.3 API 20 E 生化鑑定套組試驗：依照原廠 API 20 E (腸內菌鑑定組) 操作步驟執行。

10.2.2.4 VITEK 2 革蘭氏陰性菌鑑定卡 (VITEK 2 GN)：依照

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 299 頁/共 1078 頁

霍亂弧菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

原廠全自動微生物分析儀 VITEK 2 標準操作流程執行。

## 10.2.3 血清凝集反應

10.2.3.1 以霍亂弧菌 O1 型多價血清作玻片凝集反應，若 O1 型多價為陽性，次以 Ogawa 或 Inaba 因子血清作玻片凝集反應以決定其菌型。

10.2.3.2 若 O1 型多價血清陰性時，再以 O139 型血清做凝集反應。

## 10.2.4 霍亂弧菌毒素試驗

### 10.2.4.1 霍亂弧菌毒素檢測

依照本署「霍亂弧菌毒素檢測（乳膠凝集反應法）」檢驗標準方法。

### 10.2.4.2 霍亂弧菌毒素基因鑑定

依照本署「霍亂弧菌毒素基因鑑定（聚合酶鏈鎖反應法）」檢驗標準方法。

## 11 結果判定

### 11.1 判定標準（附錄 15.3）：

#### 11.1.1 生化鑑定符合霍亂弧菌：

##### 11.1.1.1 血清型別符合 O1 或 O139 且毒素陽性

病原檢驗登入：檢驗結果陽性。  
綜合檢驗結果：陽性。

##### 11.1.1.2 血清型別符合 O1 或 O139，毒素陰性

病原檢驗登入：檢驗結果陽性  
綜合檢驗結果：陽性，非法定傳染病

##### 11.1.1.3 血清型別不符合 O1 或 O139

病原檢驗登入：檢驗結果陽性。  
綜合檢驗結果：陽性，非法定傳染病

#### 11.1.2 生化鑑定不符合霍亂弧菌：

病原檢驗登入：檢驗結果陰性  
綜合檢驗結果：陰性。

11.2 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄實驗室資訊系統，經 PI 核准報告後發佈。

## 12 品質管制

### 12.1 血清凝集鑑定之品質管制

12.1.1 應於有效期內使用，同一批號試劑，第一次使用時取一組進行試驗，之後每隔 6 個月再取一組進行試驗。

12.1.2 使用陽性反應標準菌株 *V.cholerae* El Tor ATCC 14033（O1-Inaba、nontoxigenic）；陰性反應標準菌株 *E.coli* ATCC 25922，進行試驗。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 300 頁/共 1078 頁

霍亂弧菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

12.1.3 試驗結果必須符合陽性反應及陰性反應，始可使用。

12.2 全部的培養基及試劑應保存於 4 - 6 °C，並於有效期限內使用。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 FDA, 2004. *Vibrio*, Chapter 9. Bacteriological analytical manual, U.S.  
<http://www.foodinfonet.com/publication/fdaBAM.htm>.

14.2 蔡文城。2000。實用臨床微生物診斷學，第九版。九州圖書文物有限公司，臺灣。第 737-751 頁。

## 15 附錄

15.1 霍亂弧菌分離與鑑定流程圖。

15.2 生化反應判定表。

15.3 霍亂弧菌分離與鑑定紀錄表。

15.4 霍亂弧菌報告核發之判定標準及結果登錄表。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

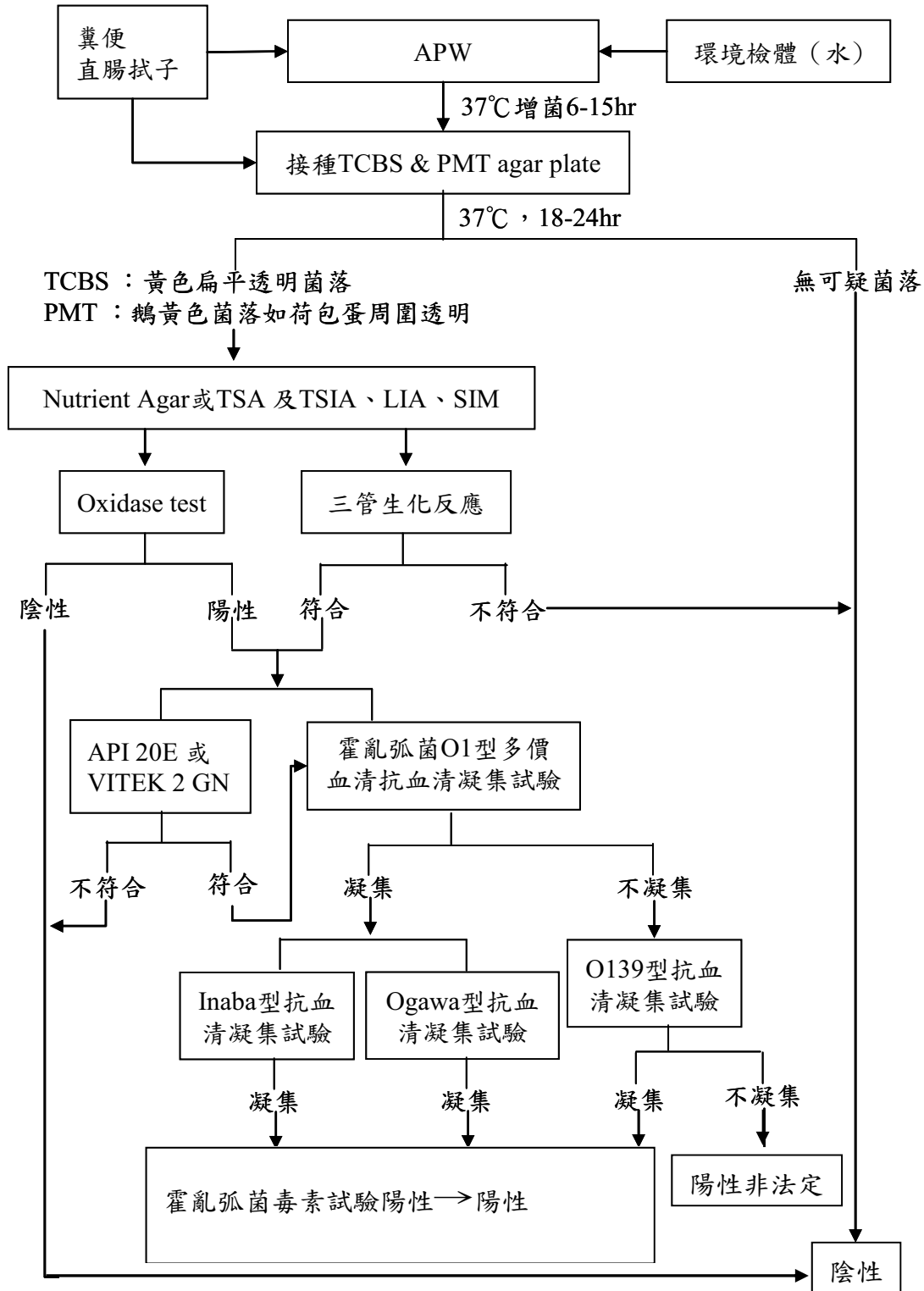


編號：  
頁次：第 301 頁/共 1078 頁

霍亂弧菌分離與鑑定


核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 霍亂弧菌分離與鑑定流程圖



霍亂弧菌分離與鑑定流程圖

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法


	編號：	霍亂弧菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 302 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 生化反應判定表

試驗		正反應	負反應
TSIA	AS	黃色(斜面酸化)。指利用 Lactose 及 Sucrose 之能力。	紅色或不變色。指不利用 Lactose。
	AB	黃色(基底酸化)或黑色(由於產硫化氫將黃色掩蓋)。指利用 Glucose 之能力。	紅色或不變色。指不利用 Glucose。
	Gas	任何氣泡產生,指產生 CO <sub>2</sub> 及 H <sub>2</sub> 之能力。	無任何氣泡產生。
	H <sub>2</sub> S	產生黑色沉澱。	無黑色沉澱。
LIA		全管為紫色	Slant: 紫; But: 黃
SIM	IND	加入 Kovacs indole 試劑 5 滴後,培養基上層呈紅色。	不呈紅色(呈銅色)
	MOT	細菌生長遠離接種線,培養基呈混濁。	只生長於接種線上。
	IPA	培養基出現棕褐色環。	不出現棕褐色環。
Oxidase test		紫色	無色(不變色)



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 303 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.3 霍亂弧菌分離與鑑定紀錄表

### 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 霍亂弧菌分離與鑑定紀錄表


頁數：第 頁/共 頁

檢體編號											
收件日期											
檢驗日期											
檢體採檢運送狀況適當		是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
TCBS agar plate 生長型態：黃色扁平透明菌落 PMT agar plate 生長型態：鵝黃色菌落如荷包蛋周圍透明	培養/觀察	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
	第 2 天										
Oxidase test：陽性藍色或藍紫色，陰性不變色		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
生化三管（名稱及反應）：		符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合
TSIA（A/A, GAS -,H2S -）											
LIA（+）											
SIM（Motility +）											
SIM（IND+）											
血清凝集試驗：		凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無
Vibrio cholerae O1 poly antiserum											
Inaba type antiserum											
Ogawa type antiserum											
Vibrio cholerae O139 antiserum											
API 20E 或 VITEK 2 GN											
PCR											
毒素試驗											
附註											
綜合結果											
報告日期											

檢驗者：

實驗室主管：

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 304 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 霍亂弧菌報告核發之判定標準及結果登錄表

霍亂弧菌報告核發					
判定標準	菌落型態	任一項 不符合	符合	符合	符合
	生化反應				
	氧化酶試驗				
	血清凝集反應	不符合			
	毒素試驗			不符合	
結果登錄	病原體分離、 鑑定	霍亂弧菌 陰性	霍亂弧菌 陽性	霍亂弧菌 陽性	霍亂弧菌 陽性
	次分型		Non-O1 & Non-O139	O1-Ogawa 或 O1-Inaba 或 O139	O1-Ogawa 或 O1-Inaba 或 O139
	綜合研判	陰性	陽性 非法定 傳染病	陽性 非法定 傳染病	陽性

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素基因鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 305 頁/共 1078 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 對已分離之法定傳染病霍亂弧菌做霍亂毒素基因檢測。

## 2 適用檢體種類

適用於霍亂弧菌 O1 型及非 O1 型之菌株。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

針對霍亂弧菌之兩種霍亂毒素基因 (ctxA、ctxB) 設計 2 對引子，利用聚合酶鏈鎖反應合成放大兩基因之特定片段。其中 Cholera toxin A 利用 CtxA-1/ctxA-2 增殖出 380 bp 之片段，Cholera toxin B 利用 ctxB-1/ctxB-2 增殖出 548 bp 片段。

## 5 試劑耗材

5.1 無菌水：滅菌 121 °C，15 min。

5.2 PCR 反應試劑：Roche，德國。成分含 Taq DNA polymerase (5 U/μL)、10 X Buffer、10 mM dNTP。

5.3 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000 μL、200 μL、40 μL 與 10 μL 四種。

5.4 接種針 (環)。

5.5 可拋棄式塑膠手套。

5.6 0.2 mL、1.5 mL Eppendorf 無菌管。

5.7 10 X TBE 緩衝液。

5.8 Ethidium bromide。

5.9 PCR 引子 (primer) - 毒素基因。

### Cholera toxin A

ctxA-1 5'-TCAAACCTATATTGTCTGGTC-3'

ctxA-2 5'-CGCAAGTATTACTCATCGA-3' (Product size 380 bp)

### Cholera toxin B

ctxB-1 5'-CCCAAAGTCTAGGTGTAATAAT-3'

ctxB-2 5'-AAAACGGTTGCTTCTCAT-3' (Product size 548 bp)

## 6 儀器設備

6.1 生物安全櫃。

6.2 桌上型離心機。

6.3 4 °C 冰箱。

6.4 -20 °C 冷凍櫃。

6.5 水浴槽。

6.6 電泳槽。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素基因鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 306 頁/共 1078 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 6.7 微量吸管 Pipetman：1,000  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$  三種規格。
- 6.8 GeneAmp PCR system 9600/9700：Perkin Elmer，USA。
- 7 環境設施安全
- 7.1 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 菌株處理、PCR 反應混和物配製、PCR 反應進行、電泳皆需於獨立區域操作。
- 8 檢體採集
- 請參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存
- 請參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
- 10.1 檢體處理
- 已分離的菌株：接種針點取 3 個新鮮菌落，放入含 150  $\mu\text{L}$  無菌水的 1.5 mL Eppendorf tube 中，以 100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 15 min，放入離心機 10,000 rpm，離心 5 min，取上清液 (含 DNA template) 至另一新 Eppendorf tube，上清液保存至 -20  $^{\circ}\text{C}$  直到測試。
- 10.2 PCR (*ctxA*、*ctxB*) 反應混和物配製如下：
- | Component                            | Volume              |
|--------------------------------------|---------------------|
| DNA template                         | 1 $\mu\text{L}$     |
| 10X buffer (15 mM $\text{MgCl}_2$ )  | 5 $\mu\text{L}$     |
| 10 mM dNTP                           | 1 $\mu\text{L}$     |
| Primer-1 (100 $\mu\text{M}$ )        | 0.5 $\mu\text{L}$   |
| Primer-2 (100 $\mu\text{M}$ )        | 0.5 $\mu\text{L}$   |
| Taq polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) | 0.25 $\mu\text{L}$  |
| 無菌水                                  | 41.75 $\mu\text{L}$ |
| Total volume                         | 50 $\mu\text{L}$    |
- 10.3 PCR 反應條件設定
- 10.3.1 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min，1 cycle。
- 10.3.2 94  $^{\circ}\text{C}$  30 sec，53  $^{\circ}\text{C}$  30 sec，72  $^{\circ}\text{C}$  50 sec，30 cycles。
- 10.3.3 72  $^{\circ}\text{C}$  7 min，1 cycle。
- 10.3.4 4  $^{\circ}\text{C}$ ， $\infty$ 。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素基因鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 307 頁/共 1078 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 10.4 電泳法分析產物

10.4.1 膠片配製：1.5 % agarose in 1X TBE。

10.4.2 取 10  $\mu$ L PCR mixture 跑電泳，電泳條件：於 0.5 X TBE，100 voltage，40 min。

10.4.3 膠片染色：0.5  $\mu$ g/mL ethidium bromide 染色 15 min，水洗 10 min 後觀察。

## 10.5 陽性與陰性對照

10.5.1 試驗陽性對照：以具 *ctxA*、*ctxB* 之霍亂弧菌分離菌株的 DNA template 作為 PCR 反應之陽性對照。反應條件與分析方法參照 10.3 至 10.4。

10.5.2 試驗陰性對照：Template 以無菌水取代。參照 10.3 至 10.4。

## 11 結果判定

### 11.1 依據產物片段結果分析

11.1.1 *ctxA*：380 bp，若出現此大小片段則可判定霍亂弧菌 *ctxA* 陽性。

11.1.2 *ctxB*：548 bp，若出現此大小片段則可判定霍亂弧菌 *ctxB* 陽性。

11.1.3 若無上述預期片段，且陽性對照仍有產物，則可判定霍亂弧菌 *ctx* 陰性。

11.1.4 菌源應為隔夜培養新鮮 colony，且注意 template 量是否足夠，因根據以往實驗經驗其敏感度約為  $5 \times 10^5$  至  $10^6$  CFU/mL，template 量不足會造成偽陰性，故此時 template 量可調高至 10.0  $\mu$ L 重測一次。

11.2 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於實驗室資訊系統，經 PI 核准報告後發佈。

## 12 品質管制

所使用試劑應於有效期內用完。

## 13 廢棄物處理

13.1 檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121  $^{\circ}$ C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

13.2 ethidium bromide 為 carcinogen 倒掉前請加入分解藥劑後再作處理。

## 14 參考資料

14.1 Shangkuan YH, Show YS, and Wang TM. 1995. Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* and to biotype *Vibrio cholerae* O1. J Appl Bacteriol 79: 264-273.

14.2 Kobayashi K, Seto K, Akasaki S, Makino M. 1990. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* using polymerase chain reaction for amplifying the cholera enterotoxin gene. J Jap Assoc Infect Dis 64: 1323-1329.

14.3 Lee HF, Yeh HL, Hsiao HL, Wang TK, Liu CH. 1993. Detection and identification of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains by a simplified

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

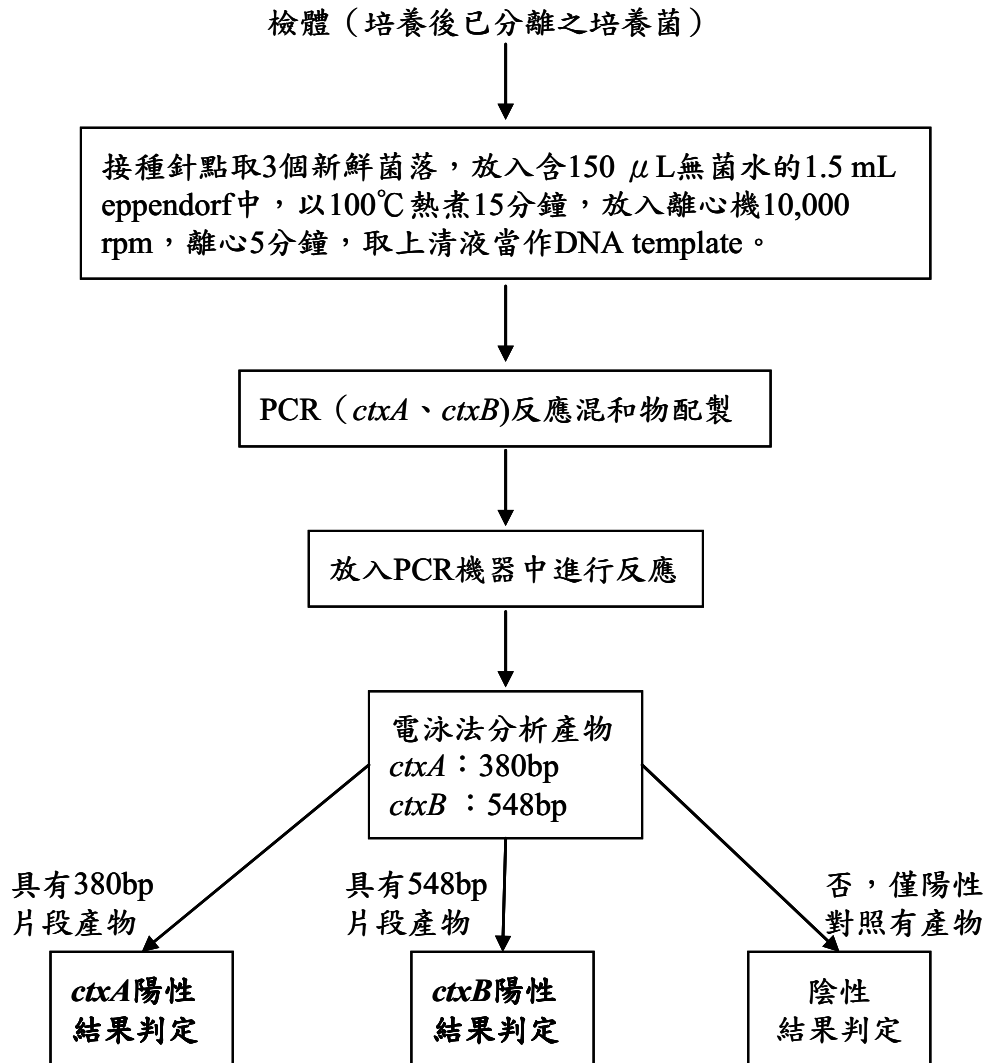
	編號：	霍亂弧菌毒素基因鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 308 頁/共 1078 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

- polymerase chain reaction method. Chin J Microbiol Immunol 26: 6-14.
- 14.4 Fields PI, Popovic T, Wachsmuth K, et al. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. J Clin Microbiol 30: 2118-2121.
- 14.5 Faruque SM, Ahmed KM, Siddique AK, Zaman K, Alim AR, Albert MJ. 1997. Molecular analysis of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 Bengal strains isolated in Bangladesh between 1993 and 1996: Evidence for emergence of a new clone of the Bengal vibrios. J Clin Microbiol 35: 2299-2306.
- 14.6 Mekalanos JJ, Swartz DJ, Pearson GDN. 1984. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. Nature (London) 306: 551-556.
- 14.7 Shirai H, Nishibuchi M, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Pal SC, Takeda Y. 1991. Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. J Clin Microbiol 29: 2517-2521.
- 14.8 Fields PI, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strain from the Latin American cholera epidemic. J Clin Microbiol 30: 2118-2121.
- 15 附錄
- 15.1 霍亂弧菌毒素基因檢測（聚合酶鏈鎖反應法）流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素基因鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 309 頁/共 1078 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 霍亂弧菌毒素基因檢測（聚合酶鏈鎖反應法）流程圖



霍亂弧菌毒素基因檢測（聚合酶鏈鎖反應法）流程圖

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 310 頁/共 1078 頁	(RPLA)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
利用反轉被動乳膠凝集試驗 (RPLA) 檢測霍亂弧菌是否會產生霍亂毒素。
- 2 適用檢體種類  
適用於霍亂弧菌 O1 型及 O139 型菌株。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
利用已結合霍亂毒素抗體之乳膠顆粒與霍亂毒素反應，產生肉眼可見之凝集。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 培養基
    - 5.1.1 CAYE medium：CMP，台灣。
    - 5.1.2 TSA (Trypticase soy agar)：CMP，臺灣。
  - 5.2 VET-RPLA Latex agglutination test kit：生研，日本。
  - 5.3 96 孔 V 型塑膠微量滴盤：必須使用無污染、無傷痕製品。
  - 5.4 無菌微量吸管尖 tip：1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L 二種。
  - 5.5 無菌吸管：3 mL。
  - 5.6 接種針 (環)。
  - 5.7 1.5 mL eppendorf 無菌管。
- 6 儀器設備
  - 6.1 37  $^{\circ}$ C 溫箱。
  - 6.2 30  $^{\circ}$ C 溫箱。
  - 6.3 離心機：3,000 rpm 以上。
  - 6.4 搖盪器 (shaker)。
  - 6.5 微量吸管 (Pipetman)：需 1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、50  $\mu$ L 等規格。
- 7 環境設施安全  
於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 8 檢體採集  
請參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存  
請參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 311 頁/共 1078 頁	(RPLA)	修訂日期： 年 月 日

## 10 檢驗步驟

- 10.1 將於 TSA 培養基之新鮮菌株接種於 10 mL CAYE broth 培養基，置 30 °C 下振盪培養（120 - 150 轉/分）16 - 20 hr。
- 10.2 隔天取 1 接種環（10  $\mu$ L）培養於無菌培養皿內含 10 mL CAYE-L broth 培養基，置 30 °C 培養 18 - 20 hr 後。
- 10.3 加 Polymyxin B 20,000 unit/mL，於 37 °C 放置 2 hr。
- 10.4 取 1 mL 培養液至 1.5 mL eppendorf 無菌管，再以 3000 rpm 離心機離心 20 min，取上清液作為毒素測定用標本。
- 10.5 取 96 孔 V 型塑膠微量滴盤，每個檢體兩排 8 孔，除第一孔外，其餘各孔各放 25  $\mu$ L 稀釋液。
- 10.6 第一孔放 50  $\mu$ L 檢體，由第一孔取 25  $\mu$ L 檢體至第二孔，充份混合後，移 25  $\mu$ L 至第三孔混合，以此進行兩倍稀釋，最後由最後一孔移除 25  $\mu$ L。
- 10.7 第一排各孔加入 25  $\mu$ L 敏感化乳膠 Sensitized latex (latex 表面附有抗霍亂毒素之兔子 IgG)，第二排各孔加入 25  $\mu$ L 未敏感化乳膠 Control latex (latex 表面附著的是未免疫之兔子 IgG)。
- 10.8 取 25  $\mu$ L 溶解之腸毒素與 25  $\mu$ L 敏感化乳膠 Sensitized latex 混合作陽性對照組。
- 10.9 取 25  $\mu$ L 溶解之腸毒素與 25  $\mu$ L 未敏感化乳膠 Control latex 混合作陰性對照。
- 10.10 96 孔 V 型塑膠微量滴盤 (microplate) 以微量盤振盪器振盪，使孔內之液體混合均勻，放入潮濕盒中，室溫靜置 16 - 20 hr 後觀察。

## 11 結果判定

- 11.1 陽性判定標準：將 96 孔 V 型塑膠微量滴盤放在光亮平坦之黑紙上，從上面以肉眼觀察各孔中 Latex 沉降來判定其是否有凝集現象，如有擴散粗糙即為霍亂毒素陽性。若是集中呈圓形沉底即為霍亂毒素陰性。
- 11.2 報告核發：霍亂毒素陽性，霍亂毒素陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於霍亂毒素紀錄表及檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送實驗室主管審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

## 12 品質管制

使用套組所附腸毒素做陽性對照及陰性對照。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 FDA (USA). 2004. *Vibrio*, Chapter 9, Bacteriological analytical manual. Available at <http://www.foodinonet.com/publication/fdaBAM.htm>
- 14.2 Clements JD, Finkelstein RA. 1978. Demonstration of Shared and Unique

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 312 頁/共 1078 頁	(RPLA)	修訂日期： 年 月 日

Immunological Determinants in Enterotoxins from *Vibrio cholerae* and *Escherchia coli*. Infect Immun 22: 709.

- 14.3 Kudoh Y, et al. 1979. Detection of heat-labile enterotoxin of *Escherchia coli* by reversed passive hemagglutination test with specific immunoglobulin against Cholera toxin, Proceedings of the 14<sup>th</sup> Joint Conf., U.S.-Japan Coop. Med. Sci. Program, Cholera. Panel, Toho Univ., Tokyo, 266.

## 15 附錄

- 15.1 霍亂弧菌毒素測定流程圖。  
15.2 霍亂弧菌檢驗工作紀錄簿。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

霍亂弧菌毒素檢測

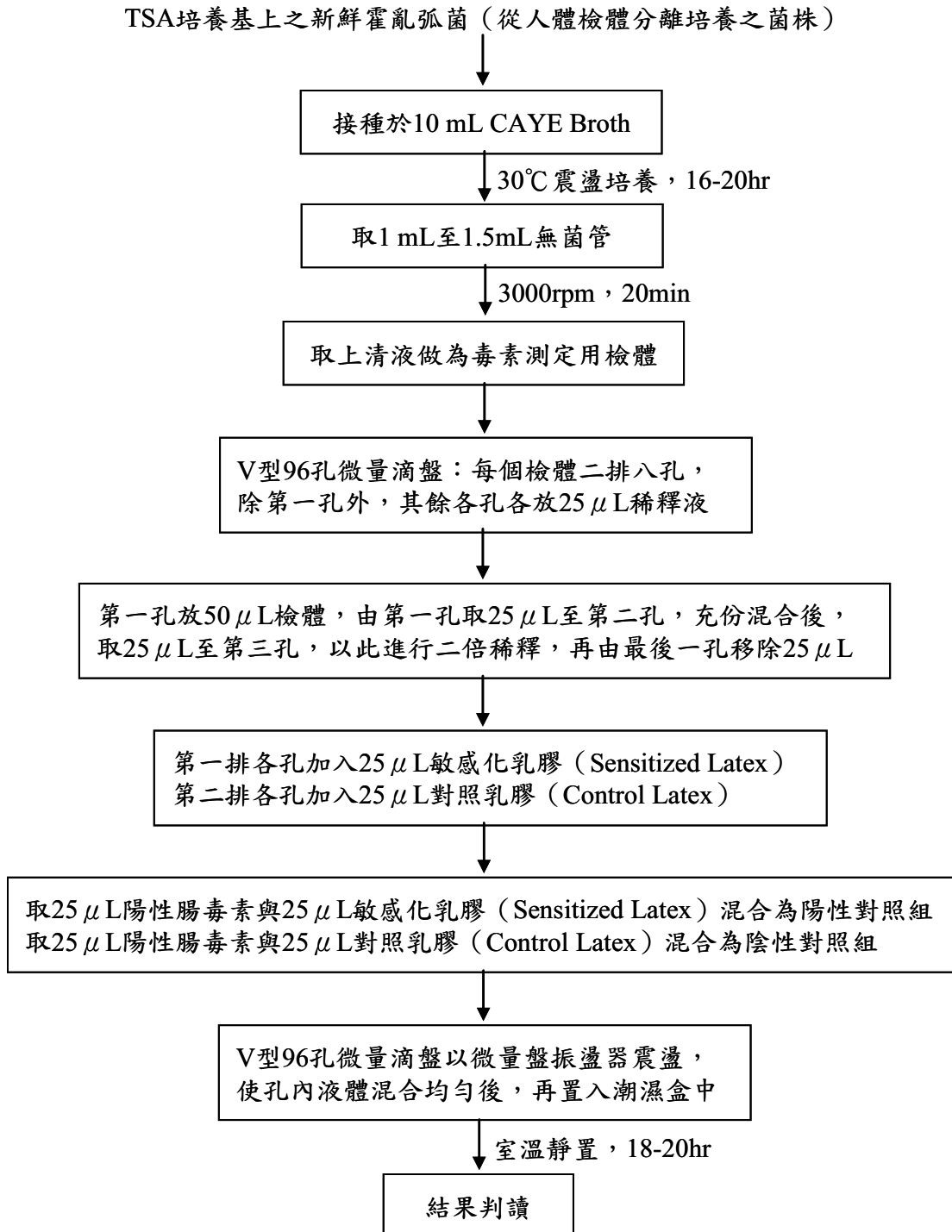
核准日期： 年 月 日

頁次：第 313 頁/共 1078 頁

(RPLA)

修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.1 霍亂弧菌毒素測定流程圖



霍亂弧菌毒素測定（乳膠凝集試驗RPLA）流程圖

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 314 頁/共 1078 頁	(RPLA)	修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 霍亂弧菌毒素檢驗工作紀錄簿

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

### 霍亂弧菌毒素紀錄表


頁數：第 頁/共 頁

檢體編號										
收件日期										
檢驗日期										
檢體採檢運送狀況適當	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
VET-RPLA 霍亂毒素測定：	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
附註										
綜合結果										
報告日期										

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群培養	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 315 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

檢測檢體中是否含有分枝桿菌屬。

## 2 適用檢體種類

適用於人體之痰液、尿液、體液（含腦脊髓液、胸水、腹膜液）、血液、腦脊髓液、胃抽出液、組織及糞便等。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用分枝桿菌屬細胞壁具有抗酸、鹼的性質，使用 NaOH 鹼性溶液作用於非經無菌技術採集之檢體（痰液、糞便等）前處理，然後接種於內含孔雀綠（malachite green）及各種抗生素之蛋基及瓊脂培養基，以抑制檢體中非分枝桿菌屬的生長，另外加入 N-acetyl-L-cystein（NALC）作為消化劑，促使檢體液化，而成功分離出檢體中之分枝桿菌屬。

## 5 試劑耗材

### 5.1 試劑

#### 5.1.1 NaOH—sodium citrate。

5.1.1.1 取 NaOH 4 g 加入 100 mL 蒸餾水配製備用。

5.1.1.2 取 2.6 g sodium citrate anhydrate 加入 100 mL 蒸餾水配製備用。

5.1.1.3 將 5.1.1.1 及 5.1.1.2 混合後高溫高壓蒸氣滅菌，保存於 2 - 8 °C，效期 6 個月。

5.1.1.4 NALC—NaOH：取 0.25 g NALC（如有需要時呈比例增加），加 50 mL 5.1.1.3。此試劑效期 24 小時。

#### 5.1.2 phosphate buffer。

5.1.2.1 取 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 94.7 g 加入 1,000 mL 蒸餾水配製備用。

5.1.2.2 取 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 90.7 g 加入 1,000 mL 蒸餾水配製備用。

5.1.2.3 將 5.1.2.1 及 5.1.2.2 混合後以蒸餾水稀釋 10 倍為 pH 6.8，高溫高壓蒸氣滅菌，保存於 2 - 8 °C，效期 1 年。

5.1.3 BACTEC™MGIT™960 試劑：PANTA，OADC 各一瓶混合備用（拆封混合後保存於 4 °C 冰箱效期 5 天，瓶口邊緣避免污染）。

#### 5.1.4 培養基。

5.1.4.1 Middlebrook 7H11 培養基。

5.1.4.2 selective Middlebrook 7H11（Mitchison's）選擇性培養基。

5.1.4.3 Lowenstein—Jensen（LJ）斜面培養基。

5.1.4.4 BACTEC™MGIT™960 培養管。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 316 頁/共 1078 頁

結核菌群培養

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 5.2 耗材
  - 5.2.1 50 mL 無菌離心管。
  - 5.2.2 無菌吸管。
  - 5.2.3 廢液瓶。
  - 5.2.4 標籤。
  - 5.2.5 10% 滴露液配製使用效期為一週。
  - 5.2.6 70% 酒精。
  - 5.2.7 紗布。
  - 5.2.8 抗污染紙墊。
  - 5.2.9 鉛筆。
  - 5.2.10 玻片。
  - 5.2.11 染色液。
  - 5.2.12 消毒袋 (Biohazard bag)。
- 6 儀器設備
  - 6.1 震盪器。
  - 6.2 35 °C - 37 °C, 5% - 10% CO<sub>2</sub> 溫箱。
  - 6.3 低溫離心機, 離心力 (RCF) 至少可達到 3,000 × g, 附有轉子保護蓋。
  - 6.4 第二級生物安全櫃。
  - 6.5 微量電子天秤。
  - 6.6 BACTEC™MGIT™960 系統 (Becton, Dickinson and Company; 美國)。
- 7 環境設施安全
  - 7.1 實驗應於生物安全第二等級以上之負壓實驗室中進行。
  - 7.2 檢體前處理與接種必須於生物安全櫃中進行。
  - 7.3 實驗人員需穿戴 N95 口罩、實驗防護衣及雙層手套、遮蔽頭髮之髮帽及鞋套。
  - 7.4 實驗完畢須在生物安全櫃中噴灑消毒劑, 於 10 分鐘之後擦拭並打開紫外線燈以維護生物安全櫃之潔淨。
- 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 317 頁/共 1078 頁

結核菌群培養

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體處理

#### 10.1.1 痰液

- 10.1.1.1 以無菌滴管吸取 3 - 5 mL 痰液至 50 mL 離心管。
- 10.1.1.2 加等量的無菌 NALC—NaOH(5.1.1)液化痰液。
- 10.1.1.3 振盪器振盪約 15 - 20 秒。
- 10.1.1.4 室溫靜置 15 分鐘。
- 10.1.1.5 加無菌 phosphate buffer 至 40 mL 刻度處，鎖緊蓋子。
- 10.1.1.6 以 3,000 × g 離心 15 分鐘，將上清液倒入廢液桶。
- 10.1.1.7 添加 2 mL phosphate buffer 以中和酸鹼值，準備接種。

#### 10.1.2 胃抽出液

- 10.1.2.1 經採得的胃抽出液應於 4 小時內處理完畢。
- 10.1.2.2 若檢體呈水樣，直接依步驟 10.1.2.4 處理。
- 10.1.2.3 若檢體呈黏液狀，每 50 mL 檢體加入約 50 -100 mg NALC 粉末後，混合均勻。
- 10.1.2.4 3,000 × g 離心，15 分鐘。
- 10.1.2.5 離心完成後，倒掉上清液，加入 2 - 5 mL 無菌蒸餾水做成懸浮液。
- 10.1.2.6 再加入等量 NALC—NaOH 溶液，如痰液檢體的處理方式。

#### 10.1.3 組織檢體的處理

- 10.1.3.1 將組織檢體移入無菌組織研磨器，加入適量無菌含 0.2 % 牛蛋白血清 (bovine albumin) 的生理食鹽水，均勻研磨使組織均質化，若組織檢體含黏液質，可加入一匙 NALC 均勻研磨使組織均質化。
- 10.1.3.2 若組織檢體為經無菌技術採得，可將經均質化的檢體直接接種入液體培養基及固體培養基 (如 10.2)。

#### 10.1.4 胸水

- 10.1.4.1 胸水以 3,000 × g 離心 15 分鐘，倒掉上清液。
- 10.1.4.2 取沈澱物進行接種。
- 10.1.4.3 若懷疑有雜菌污染，則依痰液檢體的處理方式。

#### 10.1.5 尿液

- 10.1.5.1 緩慢加入 10 % CaCl<sub>2</sub> 至沉澱物形成。
- 10.1.5.2 以 3,000 × g 離心 30 分鐘，倒掉上清液，再依痰液檢體的處理方式。

#### 10.1.6 腦脊髓液

- 以 3,000 × g 離心 15 分鐘，倒掉上清液，取沈澱物進行接種及塗片檢查。如果檢體量少，則可直接至 10.2 接種。

#### 10.1.7 氣管鏡的檢體

- 沖洗液前處理法與痰液檢體的處理方式相同。

#### 10.1.8 血液

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 318 頁/共 1078 頁

結核菌群培養

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.1.8.1 抽取病人血液 8 - 10 mL，置於 50 mL 含 Tween80 的液體培養基（如：Middlebrook 7H9 broth）。
- 10.1.8.2 35 °C-37 °C 培養箱。於暗處培養（可以將試管以鋁箔紙包覆），每日須搖動一次使其混合。
- 10.1.8.3 每週以無菌技術吸取液體培養基，做成抹片進行抗酸菌染色鏡檢。
- 10.1.8.4 若為抗酸菌則再將培養液至 10.2 步驟接種。
- 10.1.9 糞便  
取適量檢體加 7H9 both 做成懸浮液，再依痰液檢體處理。
- 10.1.10 拭子  
浸泡於 7H9 broth 的拭子先用振盪器振盪，吸取液體至 50 mL 離心管，再依痰液檢體處理。
- 10.2 接種
  - 10.2.1 取 1 支 MGIT™960 培養管添加 5.1.3 之 PANTA 與 OADC 混合液 0.8 mL，以無菌吸管取處理好的檢體 0.5 mL 接種，培養於 BACTEC™MGIT™960 系統。
  - 10.2.2 以無菌吸管吸取處理好的檢體 3 滴接種於 LJ 斜面培養基及 1 滴到 7H11 培養基，非經由無菌技術採集或因採集過程有污染到人體常在菌的檢體(如痰液、糞便等)，需再加種 7H11 選擇性培養基，均勻塗開檢體，置入溫箱培養。
- 10.3 培養
  - 10.3.1 LJ 斜面培養基、7H11 培養基及 7H11 選擇性培養基置於 35 °C - 37 °C，5 % - 10 % CO<sub>2</sub> 溫箱，LJ 斜面培養基須鬆蓋傾斜置放，24 小時後再將蓋子鎖緊，垂直放置。
  - 10.3.2 MGIT™960 培養管培養於 BACTEC™MGIT™960 系統，機器設定 35-37 °C，42 天。
- 10.4 觀察
  - 10.4.1 培養判讀：第一週需每天判讀，第二至第八週則每週判讀一次。
  - 10.4.2 第一週每天判讀如發現 7H11 培養基及 LJ 斜面培養基上有菌落出現，須挑取菌落做成抹片，進行抗酸菌染色鏡檢。
  - 10.4.3 BACTEC™MGIT™960 系統機器自動判讀至 42 天。
- 11 結果判定
  - 1.1 判讀方式
    - 11.1.1 分枝桿菌屬培養陽性：培養陽性菌落染色結果為抗酸菌則可先發初步培養陽性之報告。將陽性培養基留下，做後續鑑定與抗藥用。
    - 11.1.2 分枝桿菌屬培養陰性：培養第八週仍無菌落，則發培養陰性報告。
    - 11.1.3 BACTEC™MGIT™960 系統機器顯示陽性時，取出培養管，吸取培養液做抹片及抗酸性染色鏡檢，如 11.1.1 及 11.1.4 判定方式。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 319 頁/共 1078 頁

結核菌群培養

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

11.1.4 污染：若染色結果為非分枝桿菌屬，而是其它細菌或黴菌則登記污染並將培養基丟棄。

## 11.2 報告核發

11.2.1 分枝桿菌屬培養陽性。

11.2.2 分枝桿菌屬培養陰性。

11.2.3 污染。

11.3 結果登錄：登錄於本署實驗室資訊管理系統，TB 功能>TB 檢驗報告查詢，進行檢驗結果登入及在綜合研判頁面點選核發報告。

## 12 品質管制

12.1 商品化的培養基每一批號均附有廠商出廠時的品管文件，培養基應在效期內使用。

12.2 品管執行：每一批號均要執行。

12.2.1 接種：製備 0.5 McFarland 品管菌株之菌液，吸取 10 µL 接種，置入 35 °C - 37 °C，5 % - 10 % CO<sub>2</sub> 溫箱培養 21 天。

12.2.2 品管菌株及結果判讀

陽性品管

*tuberculosis* ATCC 25177

*kansasii* ATCC 12478

*scrofulaceum* ATCC 19981

*intracellulare* ATCC 35763

*fortuitum* ATCC 6841

陰性品管（使用於選擇性培養基）

*coli* ATCC 25922

品管結果

生長菌落

生長菌落

生長菌落

生長菌落

生長菌落

品管結果

量或無生長菌落

12.3 所有品管結果及矯正措施應詳實記錄，並交給實驗室主管定期審核。

12.4 自行配製的培養基每批號要加做無菌試驗，取 1 - 3 % 已配置完成的培養基，置入溫箱培養 48 小時，結果應無任何菌落生長。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 行政院衛生署疾管局，結核菌檢驗手冊，第二版，2004。

14.2 Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333, Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A guide for the level II Laboratory, 1981.

14.3 A minimum 5.0 mL of sputum improves the sensitive of acid-fast smear for *Mycobacterium tuberculosis*, John R. W. et., Am J Respir Crit Care Med., Vol 161 pp 1559-1562, 2000.

14.4 Clinical Microbiology Procedures Handbook, Henry D. Isenberg, Vol2, section 7.3.1, 2004.

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 320 頁/共 1078 頁

結核菌群培養

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

14.5 Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 18<sup>th</sup> edition, pp 1074-1092, 1991.

14.6 行政院衛生署疾管局，防疫檢體採檢手冊，第二版，2005。

## 15 附錄

15.1 檢體應於未開始治療前即予採檢。因為即使僅是數日的藥物治療仍可能殺死或抑制足夠量的抗酸菌，使細菌無法培養出來，而影響診斷的正確性。

15.2 應將檢體收集於清潔、滅菌的容器或單次用的無菌塑膠容器。

15.3 分枝桿菌屬培養污染率在 LJ 培養基應控制在 3% - 5%，檢體過度處理時容易殺死過多待分離的分枝桿菌屬，污染率會下降；若檢體前處理不足，則無法有效抑制非分枝桿菌屬的生長，污染率上昇。當污染率明顯變化時，應對整個處理流程進行檢討，若需修正時，應先改變 NaOH 的濃度而不應改變消化去污染的時間。

15.4 實驗室安全其他注意事項。

15.4.1 檢體處理過程都必須小心，避免產生氣霧及濺出及打翻任何檢體容器。

15.4.2 若有打翻及濺出情形發生，須馬上用 10% 滴露液 (Dettol) 沾濕紗布覆蓋後，以紫外線照射 1 小時才可繼續操作。平板培養皿應以透明塑膠套袋包裝，熱封口機封口固定，以免打翻菌株造成實驗室環境污染。

15.4.3 廢液桶內也要加 10% 滴露液，再經高壓消毒後丟棄。

15.4.4 檢驗人員進出生物安全第二等級負壓實驗室需登記姓名、進出時間及記錄每室負壓值、溫度、溼度等。

15.4.5 操作前後需用 5% 來舒液擦拭生物安全櫃。

15.4.6 於生物安全第二等級負壓實驗室使用過的試管架、空試藥瓶需經過高壓消毒後再清洗。

15.4.7 生物安全櫃需登記使用時間、使用人姓名與紫外線使用時數。

15.4.8 日光燈及紫外線燈管，需每週擦拭表面灰塵。

15.4.9 離開生物安全第二等級負壓實驗室時需在前室將防護衣、N95 口罩、雙層手套、鞋套等脫掉經高壓消毒處理、再以消毒液將手清洗乾淨再離開實驗室。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 321 頁/共 1078 頁

結核菌群鑑定（生化）

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用生物化學反應，鑑定陽性培養菌株是否為結核桿菌群（*Mycobacterium tuberculosis complex*）。

## 2 適用檢體種類

生長於固態培養基之分枝桿菌屬陽性培養菌株。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

niacin (nicotinic acid) 為所有分枝桿菌屬合成代謝過程中，氧化還原反應的必要成份，可作為輔酶生合成的前驅物質。雖然所有分枝桿菌屬均會製造 nicotinic acid，但是由於代謝過程的阻斷現象，使結核桿菌群產生最大量的 niacin。以此可利於結核桿菌群的鑑定，但是不能只用本試驗來鑑定結核桿菌群。因為，有些菌種仍會有陽性反應（*Mycobacterium simiae*、*Mycobacterium chelonae* chemovar niacinogenes 及 *Mycobacterium bovis* BCG）。所以，可加上硝酸鹽（nitrate）還原試驗及 68 °C catalase 試驗，以鑑別結核桿菌群。

分枝桿菌屬能還原硝酸鹽，其還原能力與培養的時間、溫度、酵素抑制劑、氫離子濃度等因子有關。用於本試驗的菌種應經繼代培養之生長茂盛的新鮮菌落，再進行試驗。若為快速生長菌群而於兩週即生長完全者亦可進行試驗。能還原硝酸鹽的分枝桿菌屬有：*Mycobacterium tuberculosis*、*Mycobacterium kansasii*、*Mycobacterium szulgai*、*Mycobacterium flavescens*、*Mycobacterium terrae complex*，以及除了 *Mycobacterium chelonae* 外的快速生長菌群。

## 5 試劑耗材

### 5.1 niacin 試驗

5.1.1 4% aniline：取無色 aniline 4 mL 加入 96 mL 95% 乙醇，冷藏儲存於棕色小瓶，若變成黃色表示變性，不能使用。

5.1.2 10% cyanogen bromide：取 5 g cyanogen bromide 溶解於 50 mL 蒸餾水，冷藏儲存於緊蓋之棕色血清瓶，使用時若有沉澱產生可於室溫中回溫溶解。由於 cyanogen bromide 具揮發性且儲存時易失去活性，所以製備時應少量配製。

5.1.3 0.85% 生理食鹽水：取 0.85 g NaCl 溶解於 100 mL 蒸餾水，高溫高壓蒸氣滅菌。

### 5.2 硝酸鹽還原試驗

5.2.1 基質液：取 0.085 g NaNO<sub>3</sub>，0.117 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，0.485 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 按照順序溶解於 100 mL 蒸餾水，調製成 pH 7，經高溫高壓蒸氣滅菌。

5.2.2 試劑 1：取 50 mL 濃鹽酸加入 50 mL 蒸餾水。

5.2.3 試劑 2：取 0.2 g sulfanilamide 溶解於 100 mL 蒸餾水。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 322 頁/共 1078 頁

結核菌群鑑定（生化）

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

5.2.4 試劑 3：取 0.1 g N-naphthylethylenediamine dihydrochloride 溶解於 100 mL 蒸餾水。所有試劑應儲存於 2 - 8°C 暗處，有效期 3 個月，若有變色或沉澱時應重新配製。

## 6 儀器設備

6.1 35°C - 37°C 溫箱。

6.2 第二級生物安全櫃。

## 7 環境設施安全

7.1 實驗應於生物安全第二等級以上之負壓實驗室進行。

7.2 菌種挑取必須於生物安全櫃中進行。

7.3 實驗人員需穿戴 N95 口罩、實驗防護衣及雙層手套，遮蔽頭髮之髮帽及鞋套。

7.4 實驗完畢須在生物安全櫃中噴灑消毒劑，於 10 分鐘之後擦拭並打開紫外線燈以維護生物安全櫃之潔淨。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 niacin 試驗

10.1.1 取 1 mL 無菌蒸餾水或無菌生理食鹽水，加入長有至少 50 個菌落的 LJ 培養基，若菌落生長太茂盛，可先刮除菌落，再加入試劑，增加試劑與培養基接觸面積。

10.1.2 將培養基傾斜放置，使無菌蒸餾水或無菌生理食鹽水覆蓋整個培養基表面進行萃取。

10.1.3 靜置 15 分鐘，取 10.1.2 之萃取液 0.5 mL，置入 16 × 125 mm 附蓋試管。

10.1.4 加入 0.5 mL 4 % aniline 及 0.5 mL 10 % cyanogen bromide。

10.1.5 立即觀察是否變為黃色。

10.1.6 判讀完成，10.1.4 試管加入等量 NaOH 溶液去除 cyanogen bromide 的毒性，再依照感染性廢棄物處理方式處理。

### 10.2 硝酸鹽還原試驗

10.2.1 取 0.2 mL 無菌蒸餾水，裝於 16 × 125 mm 附蓋試管。

10.2.2 取 LJ 培養基上生長茂盛且新鮮大量菌落的菌量，加入試管內做成懸浮液。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 323 頁/共 1078 頁

結核菌群鑑定（生化）

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.2.3 加入 5.2.1 基質液 2 mL。
- 10.2.4 置於 37 °C 恆溫溫箱 2 小時。
- 10.2.5 自溫箱中取出。
- 10.2.6 加入 1 滴 5.2.2 試劑 1。
- 10.2.7 加入 2 滴 5.2.3 試劑 2。
- 10.2.8 加入 2 滴 5.2.4 試劑 3。
- 10.2.9 立即檢查是否產生粉紅至紅色顏色變化。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀方式

#### 11.1.1 niacin 試驗

11.1.1.1 陽性反應：黃色。

11.1.1.2 陰性反應：不變色。

#### 11.1.2 硝酸鹽還原試驗

11.1.2.1 陽性反應：產生粉紅至紅色顏色變化。若以標準液比色，3 價至 5 價為陽性。

11.1.2.2 陰性反應：不變色。若加入鋅粉產生紅色顏色變化，則確認為陰性反應，若仍未產生紅色顏色變化則可能為陽性，應重檢。

11.2 報告核發：菌株如果是慢速生長非產色菌，同時綜合判斷菌落型態（結核桿菌群通常是表面粗糙且乾燥的菌落型態），且 niacin 試驗及硝酸鹽還原試驗，兩種試驗皆呈陽性反應，就可發結核桿菌群鑑定報告，報告格式為「*M. tuberculosis complex positive*」。

11.3 結果登錄：登錄於本署實驗室資訊管理系統，TB 功能>TB 檢驗報告查詢，進行檢驗結果登入及在綜合研判頁面點選核發報告。

## 12 品質管制

12.1 每次進行生化試驗均要同時與檢體以相同方法進行陽性及陰性品管試驗。

### 12.2 品管菌株及結果判讀

#### 1.1.1 niacin 試驗

12.2.1.1 陽性品管：H37Rv-fully susceptible (ATCC 27294)。

12.2.1.2 陰性品管：*M. avium* (ATCC 49164) 及未接種的培養基。

#### 12.2.2 硝酸鹽還原試驗：

12.2.2.1 陽性品管：H37Rv-fully susceptible (ATCC 27294)。

12.2.2.2 陰性品管：*M. bovis* (ATCC 27291) 及不加菌株，只含試劑。

12.3 所有品管結果及矯正措施應詳實記錄，並交給實驗室主管定期審核。

12.4 自行配製的試劑每批要記錄配製日期。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 324 頁/共 1078 頁

結核菌群鑑定（生化）

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 衛生署疾病管制局結核菌檢驗手冊再版，93 年。

14.2 Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333 Public Health Mycobacteriology, A Guide For the Level II Laboratory, 1981。

14.3 Clinical Microbiology Procedures Handbook, Henry D. Isenberg, Vol2, section 7.6.1.1, 2004.

## 15 附錄


### 15.1 niacin 試驗注意事項

本試驗若是測試由LJ培養基培養出之菌落，則可得到理想的試驗結果；但如果是使用Middlebrook 7H10或7H11培養基培養出之菌落時，則應加入0.1 % potassium aspartate或於37 °C下萃取2小時，才能得到理想的結果。cyanogen bromide為強催淚劑，吸入時具毒性，應於排煙櫃中配製。

15.2 結核桿菌群生化試驗紀錄表。

15.3 結核桿菌群生化鑑定流程。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群鑑定（生化）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 325 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄15.2 結核桿菌群生化試驗紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

### 結核桿菌群生化試驗紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

日期	實驗室編號	姓名	growth rate	pigmen-tation	niacin	nitrate	ID結果	備註

註：

growth rate：S- slow grower； R- rapid grower

pigmentation：n- nonchromogen； photo- photochromogen； scoto- scotochromogen

+：positive

-：negative

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

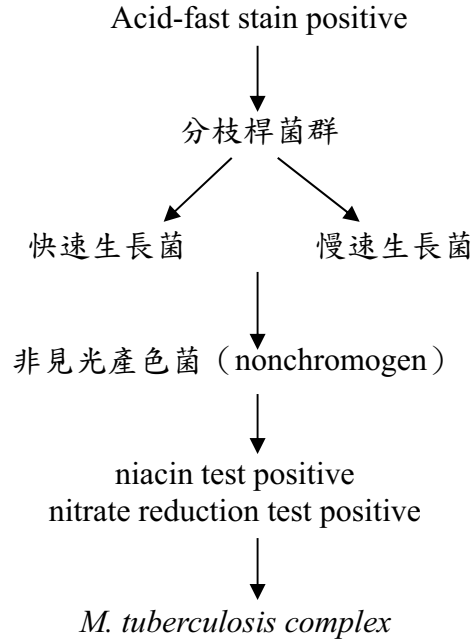
頁次：第 326 頁/共 1078 頁

結核菌群鑑定（生化）

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 附錄15.3 結核桿菌群生化鑑定流程





# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

結核菌群藥物感受性試驗（多重  
抗藥性結核菌抗藥基因檢測）

核准日期： 年 月 日

頁次：第 327 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用 GenoType MTBDR*plus* 試劑組，進行多重抗藥性結核菌基因檢測。

## 2 適用檢體種類

適用於改良式蛋基培養基（Löwenstein-Jensen）培養出之分枝桿菌或為液態培養基培養之菌株。

2.1 不活化菌液上清液：取一接種環菌置於 300  $\mu$ L 無菌水中，劇烈震盪後於 95 $^{\circ}$ C 乾熱槽加熱 20 分鐘，以 13500 rpm 離心 5 分鐘後，取上清液備用。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用核酸線性探針反向雜交測定技術，針對結核菌於立複黴（Rifampin）及異菸鹼醯（Isoniazid）作用藥物之抗藥性基因位點之偵測。

## 5 試劑耗材

5.1 PNM（Primer-Nucleotide-Mix）（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）。

5.2 DNA 聚合酶（5 U/ $\mu$ L）（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）。

5.3 25 mM 氯化鎂溶液。

5.4 不含氯化鎂之 10 X 緩衝液（10 X buffer w/o MgCl<sub>2</sub>）。

5.5 無菌水（Sterilized deionized H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O）。

5.6 DEN（Denaturation Solution）（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）

5.7 GenoType MTBDR*plus* 核酸線性探針反向雜交紙片（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）

5.8 HYB（Hybridization Buffer）（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）

5.9 STR Stringent WMTBCh Solution（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）

5.10 RIN（Rinse Solution）（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）

5.11 CON-C（Conjugate concentrate）（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）

5.12 CON-D（Conjugate Buffer）（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）

5.13 CON 溶液（1：100 之 CON-C 加 CON-D 配製）（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）

5.14 SUB-C（Substrate Concentrate）（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）

5.15 SUB-D（Substrate Buffer）（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）

5.16 SUB 溶液（1：100 之 SUB-C 加 SUB-D 配製）（GenoType MTBDR*plus* 試劑組）

5.17 10  $\mu$ L 具過濾塞之微量吸管尖。


5.18 100  $\mu$ L 具過濾塞之微量吸管尖。

5.19 200  $\mu$ L 具過濾塞之微量吸管尖。

5.20 1000  $\mu$ L 具過濾塞之微量吸管尖。

5.21 2 mL 微量離心管。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群藥物感受性試驗（多重	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 328 頁/共 1078 頁	抗藥性結核菌抗藥基因檢測）	修訂日期： 年 月 日

5.22 核酸聚合酶微量反應管。

## 6 儀器設備

- 6.1 核酸聚合酶機器。
- 6.2 微量離心機。
- 6.3 核酸雜交反應槽 (TwinCubator<sup>®</sup>)
- 6.4 1-10  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器。
- 6.5 10-100  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器。
- 6.6 10-200  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器。
- 6.7 10-1000  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器。

## 7 環境設施安全

- 7.1 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 依行政院國科會「基因重組實驗守則」。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟


10.1 配製核酸聚合酶液，單一檢體之核酸聚合酶液含以下配方：

試劑	體積 ( $\mu\text{L}$ )
PNM (GenoType MTBDR <sub>plus</sub> 試劑組)	35.0
不含氯化鎂之 10 X 緩衝液	5.0
25 mM 氯化鎂溶液	5.0
DNA 聚合酶	0.3
檢體	5.0
總體積為 50 $\mu\text{L}$	

10.2 置於冰上之 2 mL 微量離心管內依序加入 PNM、不含氯化鎂之 10X 緩衝液、25 mM 氯化鎂溶液，最後加 DNA 聚合酶，混合均勻後分別於核酸聚合酶微量反應管內加入 45  $\mu\text{L}$  試劑混合液，操作時均在冰上操作，以維持 DNA 聚合酶活性。

10.3 最後加入檢體 5  $\mu\text{L}$  (2.1 不活化處理離心後之上清菌液)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群藥物感受性試驗（多重	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 329 頁/共 1078 頁	抗藥性結核菌抗藥基因檢測）	修訂日期： 年 月 日

## 10.4 執行 PCR

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	95 °C	5 分鐘
2. Denature	95 °C	30 秒
3. Annealing	58 °C	2 分鐘
步驟 2.至步驟 3.循環重複 10 次		
4. Extension	95 °C	25 秒
	53 °C	40 秒
	70 °C	40 秒
步驟 4.循環重複 20 次		
5. Final extension	70 °C	8 分鐘
6. Store for o/n	16 °C	∞

## 10.5 雜交

- 10.5.1 預熱核酸雜交反應槽至 45 °C。
- 10.5.2 將 HYB 和 STR 預熱至 37 - 45 °C。
- 10.5.3 在室溫下，將 20  $\mu$ L 之 DEN 加入反應盤中之專用溝槽。
- 10.5.4 加入 20  $\mu$ L 之核酸聚合酶產物與 DEN 混和均勻，反應 5 分鐘。
- 10.5.5 將 1 mL 之 HYB Buffer 加入含有混合物之溝槽中，加入時要避免濺入其他之溝槽中。
- 10.5.6 依序放入標示編號之 GenoType MTBDR*plus* 核酸線性探針反向雜交紙片，並將反應盤置入核酸雜交反應槽反應 45 °C，30 分鐘。
- 10.5.7 將 HYB Buffer 完全吸出（例如使用 pipette），加入 1 mL STR Buffer 至含有核酸線性探針反向雜交紙片之溝槽中，置入核酸雜交反應槽反應 45 °C，15 分鐘，此步驟之後續步驟皆在室溫下進行。
- 10.5.8 將 STR Buffer 完全吸出，加入 1 mL RIN Buffer 至含有核酸線性探針反向雜交紙片之溝槽中，擺動清洗 1 分鐘。
- 10.5.9 倒掉 RIN Buffer，加入 1 mL CON 溶液（10  $\mu$ L CON-C 加 1 mL CON-D），擺動反應 45 分鐘。
- 10.5.10 移除 CON 溶液並使用 1 mL 之 RIN Buffer 擺動清洗 1 分鐘 2 次，再加入無菌水 1 mL 擺動清洗 1 分鐘。
- 10.5.11 倒掉無菌水，加入 SUB 溶液（10  $\mu$ L SUB-C 加 1 mL SUB-D），避光靜置 3-20 分鐘，直到核酸線性探針反向雜交紙片呈色完成。
- 10.5.12 加入無菌水 1 mL 擺動清洗 1 分鐘 2 次停止顯色。

## 11 結果判定（註）

### 11.1 判讀方式

- 11.1.1 將核酸線性探針反向雜交紙片對齊貼在 GenoType MTBDR*plus* 評估表（附錄 15.1），依核酸線性探針反向雜交紙片之顯色位

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

結核菌群藥物感受性試驗（多重  
抗藥性結核菌抗藥基因檢測）

核准日期： 年 月 日

頁次：第 330 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

點與比對表（附錄 15.2）對照，得到檢體之抗藥性結果。

- 11.1.2 雜交紙片需同時出現 Conjugate control (CC)、Amplification control (AC)、*M.tuberculosis* complex (TUB) 三種陽性反應時，抗藥結果判定始為可信。
- 11.1.3 若僅有 Rifampin 檢測結果為抗藥，而 Isoniazid 檢測結果為敏感時，判定為 Rifampin 抗藥；反之若僅 Isoniazid 檢測結果為抗藥，則判定為 Isoniazid 抗藥；若 Rifampin 及 Isoniazid 檢測結果均為抗藥時，則判定為 MDR。
- 11.1.4 此項判定結果是依據抗藥基因分析，即仍有菌株抗藥基因未在此分析區域內，仍需依藥物試驗結果做最終判定。

註：

- [ 1. 當 *rpoB* gene WT1-WT8 全部顯色且無任何抗藥位點顯色，即判為對 Rifampin 藥物敏感。 ]
- [ 2. 當 *rpoB* gene WT1-WT8 有基因突變時，即特定 WT 位點不顯色，同時在雜交紙片上相對應基因突變處，觀察到突變位點顯色，則判定為對 Rifampin 藥物具有抗藥。 ]
- [ 3. 當 *rpoB* gene WT1-WT8 有基因突變時，即特定 WT 位點不顯色，此時可能因為雜交紙片上抗藥基因探針之設計考量，只設計常出現突變之核酸序列，因此突變位點並未顯色，此結果同樣可判定對 Rifampin 藥物具有抗藥。 ]
- [ 4. 當 *katG* 及 *inhA* gene 之 WT 同時顯色且無任何抗藥位點顯色，此時判定為對 Isoniazid 藥物敏感。 ]
- [ 5. 當 *katG* 或 *inhA* gene 兩者之中或同時發生基因突變時，即特定 WT 位點不顯色，同時在雜交紙片上相對應基因突變處，觀察到突變位點顯色，則判定為對 Isoniazid 藥物具有抗藥。 ]
- [ 6. 當 *katG* 或 *inhA* gene 兩者之中或兩者同時發生基因突變時，即特定 WT 位點不顯色，此時可能因為雜交紙片上抗藥基因探針之設計考量，只設計常出現突變之核酸序列，因此突變位點並未顯色，此結果同樣可判定對 Isoniazid 藥物具有抗藥。 ]
- 11.2 報告核發：分子複驗為 MDR、分子複驗為非 MDR
- 11.3 結果登錄：實驗人員將檢體之檢驗結果記錄於 GenoType MTBDRplus 紀錄表及並加蓋檢驗者印章及於 LIMS 系統登錄，送報告簽署人審核及蓋章，並於 LIMS 系統覆核後轉實驗室負責人做最終發佈。

## 12 品質管制

- 12.1 須注意每次實驗試劑的使用批號、保存期限、儲存溫度是否符合，以確保實驗成功。
- 12.2 每次實驗前確保所有儀器功能正常。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

結核菌群藥物感受性試驗（多重  
抗藥性結核菌抗藥基因檢測）

核准日期： 年 月 日

頁次：第 331 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料


GenoType MTBDR*plus* 操作手冊(HAIN)

## 15 附錄

15.1 GenoType MTBDR*plus* 評估表。

15.2 核酸線性探針反向雜交紙片之顯色位點與比對表。


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群藥物感受性試驗（多重	核准日期：	年 月 日
	頁次：第 332 頁/共 1078 頁	抗藥性結核菌抗藥基因檢測）	修訂日期：	年 月 日

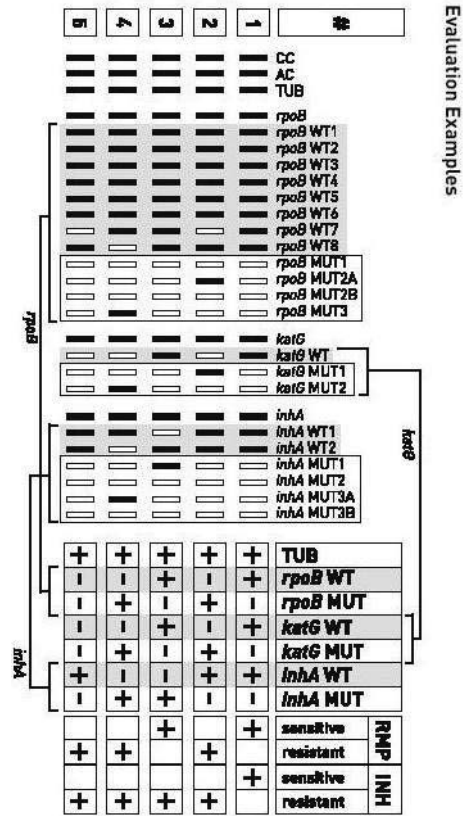
## 附錄 15.1 GenoType MTBDR<sub>plus</sub> 評估表

	Conjugate Control (CC)
	Amplification Control (AC)
	<i>M. tuberculosis</i> complex (TUB)
	<i>rpoB</i> Locus Control ( <i>rpoB</i> )
	<i>rpoB</i> wild type probe 1 ( <i>rpoB</i> WT1)
	<i>rpoB</i> wild type probe 2 ( <i>rpoB</i> WT2)
	<i>rpoB</i> wild type probe 3 ( <i>rpoB</i> WT3)
	<i>rpoB</i> wild type probe 4 ( <i>rpoB</i> WT4)
	<i>rpoB</i> wild type probe 5 ( <i>rpoB</i> WT5)
	<i>rpoB</i> wild type probe 6 ( <i>rpoB</i> WT6)
	<i>rpoB</i> wild type probe 7 ( <i>rpoB</i> WT7)
	<i>rpoB</i> wild type probe 8 ( <i>rpoB</i> WT8)
	<i>rpoB</i> mutation probe 1 ( <i>rpoB</i> MUT1)
	<i>rpoB</i> mutation probe 2A ( <i>rpoB</i> MUT2A)
	<i>rpoB</i> mutation probe 2B ( <i>rpoB</i> MUT2B)
	<i>rpoB</i> mutation probe 3 ( <i>rpoB</i> MUT3)
	<i>katG</i> Locus Control ( <i>katG</i> )
	<i>katG</i> wild type probe ( <i>katG</i> WT)
	<i>katG</i> mutation probe 1 ( <i>katG</i> MUT1)
	<i>katG</i> mutation probe 2 ( <i>katG</i> MUT2)
	<i>inhA</i> Locus Control ( <i>inhA</i> )
	<i>inhA</i> wild type probe 1 ( <i>inhA</i> WT1)
	<i>inhA</i> wild type probe 2 ( <i>inhA</i> WT2)
	<i>inhA</i> mutation probe 1 ( <i>inhA</i> MUT1)
	<i>inhA</i> mutation probe 2 ( <i>inhA</i> MUT2)
	<i>inhA</i> mutation probe 3A ( <i>inhA</i> MUT3A)
	<i>inhA</i> mutation probe 3B ( <i>inhA</i> MUT3B)
	colored marker


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群藥物感受性試驗（多重	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 333 頁/共 1078 頁	抗藥性結核菌抗藥基因檢測）	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 核酸線性探針反向雜交紙片之顯色位點與比對表



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群間接藥物感受性試驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 334 頁/共 1078 頁	(瓊脂平板法)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

結核桿菌群的藥物感受性試驗，主要有三個目的：(1) 決定最初的用藥選擇。(2) 確定抗藥性的發生，而選擇進一步的用藥。(3) 協助流行病學之調查。

## 2 適用檢體種類

由病人檢體初次分離或繼代培養的菌株。

## 3 名詞解釋

比例法 (proportion method)：含藥物培養基和不含藥物培養基所生長之菌落數目加以比較，若含藥物培養基上菌株生長數目大於 1%，判定該菌株對該藥物有抗藥性 (resistance)。

## 4 原理概述

比例法的抗藥性定義為大於 1% 的細菌出現在抗結核桿菌群的藥物臨界濃度下。當用來測試的臨床分離菌株暴露在藥物臨界濃度下，菌株生長超過 1%，則該藥物即不適合繼續當做抗結核治療藥物。

## 5 試劑耗材

5.1 一線藥瓊脂平板法 (一組)：使用兩片四分格盤之 7H10 培養基。

5.1.1 一片含：不含藥培養基 (control)。

0.2  $\mu\text{g/mL}$  Isoniazid (INH)。

1.0  $\mu\text{g/mL}$  Isoniazid (INH)。

1.0  $\mu\text{g/mL}$  Rifampin (RMP)。

5.1.2 一片含：2.0  $\text{g/mL}$  Streptomycin (SM)。

10.0  $\mu\text{g/mL}$  Streptomycin (SM)。

5.0  $\mu\text{g/mL}$  Ethambutol (EMB)。

10.0  $\mu\text{g/mL}$  Ethambutol (EMB)。

5.2 二線藥瓊脂平板法 (一組)：使用 3 片四分格盤之 7H11 培養基及 1 片四分格盤之 7H10 培養基。

5.2.1 一片含：不含藥培養基 (control)。  
7H11 培養基


10.0  $\mu\text{g/mL}$  Ethionamide (ETA)。

0.5  $\mu\text{g/mL}$  Rifabutin (RBU)。

8.0  $\mu\text{g/mL}$  Para-aminosalicylic acid (PAS)。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群間接藥物感受性試驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 335 頁/共 1078 頁	(瓊脂平板法)	修訂日期： 年 月 日

5.2.2 一片含：不含藥培養基 (control)。7H11 培養基

6.0  $\mu\text{g/mL}$  Kanamycin (KM)。

6.0  $\mu\text{g/mL}$  Amikacin (AM)。

10.0  $\mu\text{g/mL}$  Capreomycin(CAP)。

5.2.3 一片含：不含藥培養基 (control)。7H11 培養基

2.0  $\mu\text{g/mL}$  Ofloxacin (OFX)。

0.5  $\mu\text{g/mL}$  Moxifloxacin (MOXI)。

60.0  $\mu\text{g/mL}$  Cycloserine (CS)。

5.2.4 一片含：不含藥培養基 (control)。7H10 培養基

2.0  $\mu\text{g/mL}$  Ciprofloxacin (CIP)。

1.0  $\mu\text{g/mL}$  Gatifloxacin (GATI)。

1.0  $\mu\text{g/mL}$  Levofloxacin (LEVO)。

5.3 含約 20 顆直徑 3 mm 玻璃珠及 2 mL 7H9 broth 之無菌平底玻璃小瓶。

5.4 含 4.5 mL 生理食鹽水之無菌平底玻璃小瓶。

5.5 塑膠滴管。

5.6 1,000  $\mu\text{L}$  filter tip。

## 6 儀器設備

6.1 第二級生物安全櫃。

6.2 比濁儀及 McFarland 1.0 標準液。

6.3 1,000  $\mu\text{L}$  pipette。

6.4 振盪器。

6.5 35°C - 37°C, 5% - 10% CO<sub>2</sub> 溫箱。

## 7 環境設施安全

7.1 實驗應於生物安全第二等級以上之負壓實驗室中進行。

7.2 調整菌液濃度與菌液接種必須於生物安全櫃中進行。


7.3 必須將菌落小心刮入含二次水之平底玻璃小瓶中，鎖緊瓶蓋後方可進行振動。

7.4 稀釋菌液時，鎖緊瓶蓋後方可進行振動混合菌液。

7.5 實驗人員需穿戴 N95 口罩、實驗防護衣及雙層手套，穿戴遮蔽頭髮之髮帽及鞋套。

7.6 實驗完畢須在生物安全櫃中噴灑消毒劑，於 10 分鐘之後擦拭並打開紫外線燈以維護生物安全櫃之潔淨。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群間接藥物感受性試驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 336 頁/共 1078 頁	(瓊脂平板法)	修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 接種菌液濃度調整至 McFarland 1.0。

10.1.1 在含 7H9 broth 及玻璃珠平底玻璃小瓶上，標示品管菌株及測試菌株之編號，一菌株使用一玻璃瓶。

10.1.2 刮取數個接種環之新鮮且生長茂盛之菌落於玻璃小瓶中。

10.1.3 將菌落以振盪器強力振盪 1 - 2 分鐘。

10.1.4 靜置至少 30 分鐘，使大團塊之菌塊沉澱。

10.1.5 取上方液體並以 7H9 broth 將菌液調整成 McFarland 1.0。

### 10.2 稀釋菌液至 $10^{-2}$ 及 $10^{-4}$ 。

10.2.1 取含 4.5 mL 生理食鹽水之玻璃小瓶，加入 0.5 mL 之 McFarland 1.0 之菌液，旋緊蓋子後進行振動，調整成  $10^{-1}$  稀釋菌液。

10.2.2 重複上述步驟，取  $10^{-1}$  稀釋菌液調整成  $10^{-2}$  稀釋菌液。

10.2.3 以同樣步驟，依次 10 倍稀釋調整成  $10^{-4}$  稀釋菌液。

### 10.3 菌液接種

10.3.1 以塑膠吸管吸取  $10^{-2}$  稀釋菌液，於四分盤上每小格滴 3 滴，包含不含藥培養基及 7 種含藥培養基。

10.3.2 同上述方法將  $10^{-4}$  稀釋菌液接種到培養基上。

### 10.4 培養觀察

將接種完畢之培養基置入含 5% - 10%  $\text{CO}_2$  之  $35^\circ\text{C}$  -  $37^\circ\text{C}$  溫箱培養，於接種 3 天後觀察培養基是否遭受其他細菌污染。然後每 7 天觀察一次，於接種 21 天後，發完整抗藥性報告。


## 11 結果判定

### 11.1 判讀方式

11.1.1 比較含藥培養基和不含藥對照組所生長的菌落數，將含藥培養基上之菌落數除以不含藥培養基上之菌落數，若抗藥性菌落數目大於 1%，判定為抗藥性 (resistant, R)；若不含藥培養基生長 3 價 (200 - 500 colonies) 至 4 價 ( $> 500$ , confluent growth)，含藥培養基未生長，則判定為感受性 (susceptible, S)。

11.2 報告核發：敘明「agar proportion method」、各項藥物名稱、濃度及試驗結果。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群間接藥物感受性試驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 337 頁/共 1078 頁	(瓊脂平板法)	修訂日期： 年 月 日

11.3 結果登錄：登錄於本署實驗室資訊管理系統，TB 功能>TB 檢驗報告查詢，進行檢驗結果登入及在綜合研判頁面點選核發報告。

## 12 品質管制

### 12.1 品管菌株及結果

H37Rv – fully susceptible (ATCC 27294)。

### 12.2 品管執行

參考菌株應在每次進行試驗時與測試菌株以相同方法一起進行試驗，至少要同時執行參考菌株 H37Rv – fully susceptible (ATCC 27294)。

### 12.3 品管判定

12.3.1 觀察參考菌株結果，如果試驗結果符合，則表示培養基品質符合要求，方可進行測試菌株之藥物感受性試驗之結果判讀。

12.3.2 不含藥培養基  $10^{-2}$  稀釋倍數生長需 200 - 400 菌落數； $10^{-4}$  稀釋倍數生長需 20 - 40 菌落數。結果判定時，如果  $10^{-2}$  不含藥培養基生長菌落數低於 100，顯示生長菌量過低，無法確定抗藥比例，應重作藥敏試驗。

12.4 商品化的培養基每一批號均附有廠商出廠時的品管文件，培養基應在效期內使用。

12.5 所有品管結果及矯正措施應詳實記錄，並交給實驗室主管定期審核。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 衛生福利部疾病管制署，結核菌檢驗手冊，第二版，2004。

14.2 Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333, Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A guide for the level II laboratory, 1981.

14.3 The National Committee for Clinical Laboratory Standards, Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; tentative standard – second edition, 2000.

14.4 Clinical Microbiology Procedures Handbook, Henry D. Isenberg, Vol2, section 7.7.1, 2004.

## 15 附錄

無。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

西尼羅病毒核酸檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 338 頁/共 1078 頁

(Real-time RT-PCR)

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 分子診斷方法檢測疑似病患的腦脊髓液或血清檢體是否含有西尼羅病毒核酸。

## 2 適用檢體種類

腦脊髓液或血清。

## 3 名詞解釋

Threshold cycle (Ct)：係指 PCR 產物複製的量，累積到足以被偵測到的第一個循環點稱之。換句話說，Ct 的值越小，表示檢體中初始 DNA/RNA 的含量越多。

## 4 原理概述

利用對西尼羅病毒具有專一性之引子 (primers) 與檢體中之病毒核酸分子結合配對，並利用 RT-PCR 的複製過程及特殊的螢光定量化學方法偵測 RT-PCR 產物，以決定檢體中是否含有西尼羅病毒核酸序列，所用之引子選自於西尼羅病毒之保守性序列 (conserved sequences)。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

5.1.1 病毒 RNA 萃取試劑套組。

5.1.2 SYBR green 定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應單步驟試劑套組。

### 5.2 耗材

5.2.1 檢體瓶。

5.2.2 無菌吸管。

5.2.3 定量 PCR 專用八連排反應管及蓋。

5.2.4 無菌過濾型 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L 吸管尖。

5.2.5 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.2.6 無粉手套。

## 6 儀器設備

6.1 第 II 級生物安全櫃。

6.2 即時多重定量 PCR 偵測系統。

6.3 10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、40  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L 微量滴管分注器。

6.4 高速離心機。

6.5 真空抽氣機。

6.6 冰箱：4  $^{\circ}$ C。


6.7 冷凍櫃：-20  $^{\circ}$ C。

6.8 高壓滅菌鍋。

## 7 環境設施安全

7.1 病人血清檢體應在第 II 級生物安全櫃 (BSL-2) 內處理。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 339 頁/共 1078 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。
- 7.3 應有獨立的操作空間，盡量與操作 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

- 10.1.1 裝有靜脈血的無菌真空試管以 2,000 轉離心 10 分鐘，以無菌吸管將血清吸入檢體瓶內旋緊瓶蓋。
- 10.1.2 檢體瓶上標註檢體標號。
- 10.1.3 檢體處理好後置 2-8°C 冰箱冷藏。

### 10.2 步驟

- 10.2.1 萃取病毒 RNA，依據所使用試劑製造業者的操作手冊進行。
- 10.2.2 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應，取 5 µL RNA 做模板，加入漢他病毒專一性引子組（參考附錄 15.1），並依據所使用試劑製造業者的操作手冊，加入其他所需試劑，調整反應總體積至 25 µL。
- 10.2.3 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應程式設定：
- 10.2.3.1 RT 作用：50°C，30 min。
- 10.2.3.2 Taq polymerase activation：95°C，15 min。
- 10.2.3.3 Denaturation：95°C，15 sec。
- 10.2.3.4 Annealing：55°C，30 sec。
- 10.2.3.5 Extension：72°C，20 sec。
- 10.2.3.6 77°C，30 sec，收集螢光值。
- 10.2.3.7 重複 10.2.3.3 至 10.2.3.6 步驟 45 Cycle。
- 10.2.4 Melting curve analysis：
- 10.2.4.1 95°C，1 min。
- 10.2.4.2 以 0.2°C/秒速率降溫至 68°C，收集螢光值。

## 11 結果判定

### 1.1 判讀標準

- 11.1.1 陽性對照組的 Ct 值需小於或等於 30，Tm 值需大於或等於 79°C。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

西尼羅病毒核酸檢測

核准日期： 年 月 日


頁次：第 340 頁/共 1078 頁

(Real-time RT-PCR)

修訂日期： 年 月 日

- 11.1.2 陰性對照組的  $C_t$  值需大於或等於 40， $T_m$  值需小於  $79^{\circ}\text{C}$ ， $C_t$  值或  $T_m$  值有一項符合上述要求即可。
- 11.1.3 陽性對照組或陰性對照組其中之一不符合設定值時，則重新實驗。
- 11.1.4 在陽性對照與陰性對照組符合設定值下， $C_t$  值小於 35、 $T_m$  值大於或等於  $79^{\circ}\text{C}$  者，判為西尼羅病毒陽性，反之則判為西尼羅病毒陰性。
- 11.2 報告核發
  - 11.2.1 西尼羅病原體檢驗方法：螢光定量聚合酶-連鎖反應 (real-time PCR)
  - 11.2.2 結果：陽性。
  - 11.2.3 結果：陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統 (LIMS) 之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。由本署內部網站進入實驗室資訊管理系統輸入檢驗結果。
- 12 品質管制
  - 12.1 每次進行實驗時皆有對照組，陽性對照組與陰性對照組的  $C_t$  值需符合設定值。
  - 12.2 實驗過程遵循標準檢驗方法的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。
  - 12.3 即時多重定量 PCR 偵測系統定時作檢測與校正。
  - 12.4 微量滴管分注器定期校正。
  - 12.5 注意試劑套組的使用期限與適當的儲放溫度。
- 13 廢棄物處理  
檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以  $121^{\circ}\text{C}$ ，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。
- 14 參考資料
  - 14.1 Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, Komar N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, Roehrig JT. 2000. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 38: 66-71。
- 15 附錄
  - 15.1 西尼羅病毒診斷用引子組序列表。


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 341 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.1 西尼羅病毒診斷用引子組序列表

<b><u>West Nile virus specific primer</u></b>		<u>參與反應的濃度</u>
WN212	TTG TGT TGG CTC TCT TGG CGT TCT T	300nM
WN619	CAG CCG ACA GCA CTG GAC ATT CAT A	300nM
WN3111	GGC AGT TCT GGG TGA AGT CAA	300nM
WN3239	CTC CGA TTG TGA TTG CTT CGT	300nM

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 342 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
西尼羅病毒 IgM 和 IgG 抗體檢測。
- 2 適用檢體種類  
適用於人體血清或腦脊髓液之檢體。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
利用 Capture IgM 與 IgG 酵素免疫分析法，測定病人血清或腦脊髓液中之西尼羅病毒特異性抗體。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 Dilution buffer : Casein blocking buffer (Sigma, Product no. C7594, USA)  
-5 % Normal rabbit serum (Equitech-Bio, Inc, Cat. no. SR-0500, USA)  
-0.05 % Tween-20 (Amresco, Cat. no. 0777, USA), pH 7.2。
  - 5.2 Washing buffer : PBS - 0.05 % Tween-20, pH 7.2。
  - 5.3 Human positive and negative control sera
    - 5.3.1 西尼羅 (West Nile, WN) Positive control (以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
    - 5.3.2 登革病毒 1-4 血清型 (dengue virus, DENV) Positive control (以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
    - 5.3.3 日本腦炎 (Japanese encephalitis, JE) Positive control (以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
    - 5.3.4 黃熱病 (Yellow fever, YF) Positive control (以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
    - 5.3.5 Negative control (以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
  - 5.4 去活化病毒細胞培養液 (病毒經 Vero 細胞培養 5-7 天，收集上清液，經 UV 照射 1 hr，分裝後保存於 -80°C 冷凍櫃)
    - 5.4.1 DENV-1, strain 8700828 Taiwan。
    - 5.4.2 DENV-2, strain 454009 Taiwan。
    - 5.4.3 DENV-3, strain 8700829 Taiwan。
    - 5.4.4 DENV-4, strain s9201818 Taiwan。
    - 5.4.5 JEV, strain JaGAR。
    - 5.4.6 WNV, strain 1510。
    - 5.4.7 YFV, strain 17D。
    - 5.4.8 Vero cell culture medium。
  - 5.5 抗黃病毒屬外套抗原 (envelope) 單株抗體腹水 (Glyconex, Cat. no. FL0232, Taiwan)。
  - 5.6 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體。(goat anti-mouse IgG-AP conjugate, Jackson, Code no. 115-006-071, USA)



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 343 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 5.7 Substrate reagent, p-Nitrophenyl-phosphate( p-NPP)( Chemicon, USA, Cat. no. ES009-500 mL)。
- 5.8 96 孔微量滴定盤
  - 5.8.1 Anti-human IgM 真空乾燥盤( coated with goat anti-human IgM , 台灣尖端公司)。
  - 5.8.2 Anti-human IgG 真空乾燥盤 ( coated with goat anti-human IgG , 台灣尖端公司)。
- 5.9 八連排稀釋管。
- 5.10 丟棄式 250  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L 吸管尖。
- 5.11 手套。
- 6 儀器設備
  - 6.1 第 II 級生物安全櫃 ( class II BSC)。
  - 6.2 全自動酵素免疫分析儀 ( Tecan, Genesis workstation 150, Germany)。
  - 6.3 微量滴管分注器 2  $\mu$ L、20  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L ( pipettors)。
  - 6.4 震盪器。
  - 6.5 冰箱：4  $^{\circ}$ C。
  - 6.6 冷凍櫃：-20  $^{\circ}$ C。
  - 6.7 高壓滅菌鍋。
- 7 環境設施安全
  - 7.1 病人血清檢體應在第 II 級生物安全櫃內處理。
  - 7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 ( BSL-2) 實驗室進行。
- 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
  - 10.1 檢體編號登錄。
  - 10.2 西尼羅、登革病毒 1-4 型、日本腦炎與黃熱病病毒的細胞培養液分別以 Dilution buffer 不同倍稀釋後，各取等量混合加入 1：1,000 之抗黃病毒屬抗原單株抗體腹水 FL0232。
  - 10.3 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體以 Dilution buffer 1：2000 稀釋。
  - 10.4 取待測血清 7  $\mu$ L 加入 Dilution buffer 0.7 mL 稀釋 100 倍。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 344 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 10.5 取 0.1 mL 待測血清(步驟 10.4)及陰性、陽性對照血清(試劑耗材 5.3)，加入 Coated goat anti-human IgM 及 Coating goat anti-human IgG 之 96 孔真空乾燥盤。
- 10.6 置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.7 取 0.1 mL 含抗黃病毒屬抗原單株抗體腹水 FL0232 之西尼羅病毒細胞培養稀釋液及日本腦炎、黃熱病、登革病毒細胞培養稀釋液(步驟 10.2)分別加入 96 孔真空乾燥盤。
- 10.8 置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.9 取 0.1 mL 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體稀釋液(步驟 10.3)加入 96 孔真空乾燥盤。
- 10.10 置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.11 取 0.1 mL/孔 呈色劑 (p-NPP) 加入 96 孔微量滴定盤中呈色。
- 10.12 置於 37°C 溫箱，搖盪 40 min。
- 10.13 置微量滴定盤於酵素免疫分析儀裡，以雙波長 405、630 nm 測定吸光度 ( $OD_{405-630}$ )。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 若血清檢體之西尼羅病毒特異性 IgM 抗體之 OD 值大於 0.5，且西尼羅病毒 IgM OD 值/日本腦炎病毒 IgM OD 值大於或等於 2，判為西尼羅 IgM 陽性。
- 11.1.2 若血清檢體之西尼羅病毒特異性 IgG 抗體之 OD 值大於 0.5，判為西尼羅 IgG 陽性。
- 11.1.3 WN positive control serum 應符合 IgM OD 值 > 1.0，IgG OD 值 > 0.5。
- 11.1.4 JE positive control serum 應符合 IgM OD 值 > 1.0，IgG OD 值 > 0.5。
- 11.1.5 Negative control serum 應符合 IgM OD 值 < 0.2，IgG OD 值 < 0.2。

### 11.2 報告核發：

- 11.2.1 西尼羅病毒 IgM 和 IgG 抗體檢測
- 11.2.2 結果：陽性。
- 11.2.3 結果：陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統 (LIMS) 之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。

## 12 品質管制

- 12.1 應於有效期內使用，同一批號試劑，第一次使用時取一組進行試驗，之後每隔 3 - 6 個月再取一組進行試驗。
- 12.2 每次檢驗應加入陽性及陰性控制組血清。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 345 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

12.3 遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。

12.4 微量滴管分注器定期做校正。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagnos Lab Immunol* 10: 622-630.

14.2 Monath TP, Nystrom RR, Bailey RE, Calisher CH, Muth DJ. 1984. Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of St. Louis encephalitis. *J Clin Microbiol* 20: 784-790.

14.3 Innis BL, Nissalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, Hoke CH. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J trop Med Hyg* 40: 418-427.

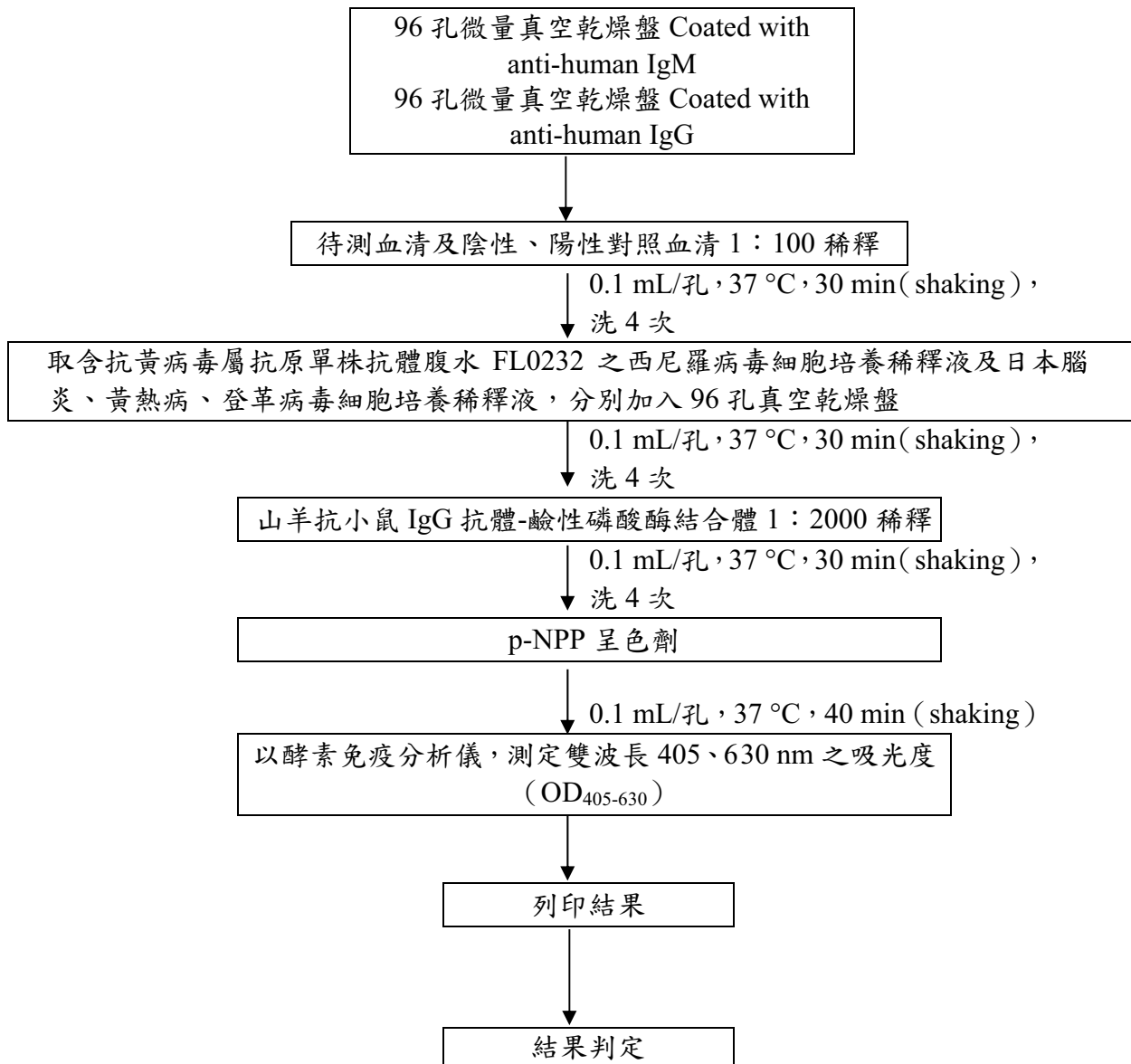
## 15 附錄

15.1 西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體試驗（酵素免疫分析法）流程圖


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 346 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

附錄15.1 西尼羅病毒IgM及IgG抗體試驗（酵素免疫分析法）流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 347 頁/共 1078 頁	病原體核酸檢測	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR) 分子診斷方法檢測疑似病患的血液、體液或組織檢體中是否含有恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒立克次體核酸。

## 2 適用檢體種類

適用於病人血液、體液或組織檢體。

## 3 名詞解釋

Threshold cycle ( $C_t$ ): 係指 PCR 產物複製的量, 累積到足以被偵測到的第一個循環點稱之。換句話說,  $C_t$  的值越小, 表示檢體中初始核酸的含量越多。

## 4 原理概述

利用恙蟲病及斑疹傷寒立克次體專一性之引子 (primers), 與檢體中之立克次體核酸分子結合配對, 並利用 PCR 的複製過程及特殊的螢光定量化學方法偵測 PCR 產物, 以決定檢體中是否含有立克次體核酸序列。檢體先以立克次體 16S rRNA 基因、恙蟲病立克次體 56 kDa 外膜蛋白基因以及斑疹傷寒立克次體 17 kDa 基因之引子混合進行篩檢, 當檢體呈陽性時, 再以不同立克次體基因專一性引子做立克次體種類的鑑定。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

5.1.1 病毒 DNA 萃取試劑套組。

5.1.2 SYBR green 定量反轉錄-聚合酶鏈鎖反應單步驟試劑套組。

5.2 陽性對照組 (positive control DNA): 各種立克次體以 L929 細胞培養 14 天, 收取細胞並抽取其 DNA, 做為 PCR 陽性對照來源。

5.2.1 *Rickettsia typhi* (970432)。

5.2.2 *R. sibirica*。

5.2.3 *R. japonica*。

5.2.4 *R. kato*。

5.2.5 *R. karp*。

5.3 陰性對照組 (negative control RNA):

5.3.1 DNase, RNase-free H<sub>2</sub>O。

5.4 水質: 25 °C 蒸餾水或 RO 逆滲透去離子可達 18 MΩ-CM 以上超純水。

5.5 定量 PCR 專用八連排反應管 (QPCR 8-strip tubes) (Stratagene, USA Cat. no.410022)。


5.6 定量 PCR 專用八連排反應蓋 (QPCR 8-strip caps) (Stratagene, USA Cat. no.410024)。

5.7 無菌 2 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL Tips。

5.8 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.9 無粉手套。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 348 頁/共 1078 頁	病原體核酸檢測	修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 第二級生物安全櫃。
- 6.2 即時多重定量 PCR 偵測系統。
- 6.3 微量滴管分注器 2  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1,000  $\mu\text{L}$ 。
- 6.4 高速離心機。
- 6.5 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。
- 6.6 -20  $^{\circ}\text{C}$  冷凍櫃。
- 6.7 高壓滅菌鍋。

## 7 環境設施安全

- 7.1 病人血清檢體應在第二級生物安全櫃內處理。
- 7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。
- 7.3 應有獨立的操作空間，儘量與操作核酸相關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。


<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 萃取立克次體 DNA

- 10.1.1 先吸取 20  $\mu\text{L}$  Protease (or proteinase K) 與 200  $\mu\text{L}$  Lysis buffer (AL) 放入 1.5 mL Microtube，再加入 200  $\mu\text{L}$  的抗凝固全血檢體，震盪混合，56  $^{\circ}\text{C}$  下靜置反應 10 min。
  - 10.1.2 加入 200  $\mu\text{L}$  酒精(96–100%)後，震盪混合以抽氣方式(1 min)通過管柱 (column)，檢體中的 DNA 會吸附在管柱底部的膜上。
  - 10.1.3 加清洗液 750  $\mu\text{L}$ ，抽氣 1 min，清洗膜上所吸附的雜質。重覆本動作三次，將膜上雜質徹底清洗乾淨。
  - 10.1.4 以清洗液 750  $\mu\text{L}$ ，抽氣 1 min，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。抽氣後再抽氣 1 min，兩次，以徹底去除膜上殘留酒精。
  - 10.1.5 加入萃取液 75  $\mu\text{L}$ ，室溫靜置 5 min，抽氣 1 min，取得 DNA。
- ### 10.2 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR)。
- 10.2.1 取 5  $\mu\text{L}$  DNA 做模板，加入 (A)立克次體 16S rRNA 基因、(B)恙蟲病立克次體 56 kDa 外膜蛋白基因、(C)斑點熱立克次體 17

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 349 頁/共 1078 頁	病原體核酸檢測	修訂日期： 年 月 日

kDa 基因引子組及(D)斑疹傷寒立克次體 17 kDa 基因引子組(參考附錄 15.2)，置於冰上。

- 10.2.2 檢體先進行 PCR 篩選，篩選時用兩個反應管，一反應管加入引子 (A+B)，另一反應管加入引子 (C+D)。若其中有任何反應管為陽性時，則再重新萃取立克次體 DNA 進行 Real-time PCR 確認其陽性反應。若篩選結果疑似為恙蟲病立克次體 (僅 (A+B) 反應陽性)，則確認時用兩個反應管，一反應管加入引子 (A)，另一反應管加入 (B)，兩個反應管皆為陽性時，即確認為恙蟲病立克次體 PCR 陽性。若篩選結果疑似為斑疹傷寒或斑點熱立克次體(篩選時 (A+B)，(C+D) 皆為陽性反應)，則確認時用兩個反應管，一反應管加入引子 (C)，另一反應管加入 (D)，以區分其為斑點熱或斑疹傷寒立克次體之感染。

- 10.2.3 加入反應溶液 (成分如下表)，調整反應總體積至 50  $\mu$ L。

初始濃度	加入體積	最終濃度
2X QuantiTect SYBR green PCR master mix PCR buffer	25 $\mu$ L	1X
Primer	Variable	參考附錄 15.2
RNase-free H <sub>2</sub> O	Variable	

- 10.2.4 即時定量聚合酶鏈鎖反應：

10.2.4.1 Taq polymerase activation：95  $^{\circ}$ C，15 min。

10.2.4.2 Denaturation：94  $^{\circ}$ C，15 sec。

10.2.4.3 Annealing：55  $^{\circ}$ C，30 sec。

10.2.4.4 Extension：72  $^{\circ}$ C，20 sec。

10.2.4.5 77  $^{\circ}$ C，30 sec。收集螢光值。

10.2.4.6 重複 10.2.4.3 至 10.2.4.6 步驟 45 cycle。

- 10.2.5 Melting curve analysis：

10.2.5.1 95  $^{\circ}$ C，1 min。

10.2.5.2 68  $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 90  $^{\circ}$ C +1  $^{\circ}$ C/30 sec/cycle。

10.2.5.3 重複 10.2.5.2 步驟 45 cycles。

## 11 結果判定


### 11.1 判讀標準

11.1.1 以 MxPro 軟體分析結果，可以從 Amplification plots 與 T<sub>m</sub> 值作判斷，結果是陽性或陰性。

11.1.2 在陽性對照與陰性對照組的 C<sub>t</sub> 值符合設定值下，凡樣品經恙蟲病或斑疹傷寒立克次體專一性引子之 C<sub>t</sub> 值小於 40 者，判為恙蟲病或斑疹傷寒陽性。

11.1.3 觀看 Melting curve 時，一般來說，須 T<sub>m</sub> 值 >80  $^{\circ}$ C 的 PCR 產物，才為較具專一性之產物，而 <75  $^{\circ}$ C 之 PCR 產物，通常為非專一性的產物。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 350 頁/共 1078 頁	病原體核酸檢測	修訂日期： 年 月 日

## 11.2 報告核發：

11.2.1 檢驗方法：螢光定量聚合酶-連鎖反應（real-time PCR）

11.2.2 結果：陽性。

11.2.3 結果：陰性。

11.3 結果登錄：將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統（LIMS）之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。

## 12 品質管制

12.1 每次進行實驗時皆有對照組，陽性對照組與陰性對照組的 Ct 值需符合設定值。

12.2 實驗過程遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。

12.3 Mx3000P 機器定時作檢測與校正。

12.4 Pipetman 做定期的校正。

12.5 注意檢測套組的使用期限與適當的儲放溫度。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Shu PY, S Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, Lin TH, Huang JH. 2003. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. J. Clin. Microbiol. 41: 2408-2416.

14.2 Tsai KH, Lu HY, Tsai JJ, Yu SK, Huang JH, Shu PY. 2008. Human case of *Rickettsia felis* infection, Taiwan. Emerg. Infect. Dis. 14: 1970-1972.

## 15 附錄

15.1 立克次體鑑定（即時定量聚合酶連鎖反應）流程圖。

15.2 立克次體診斷用引子組序列表。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒

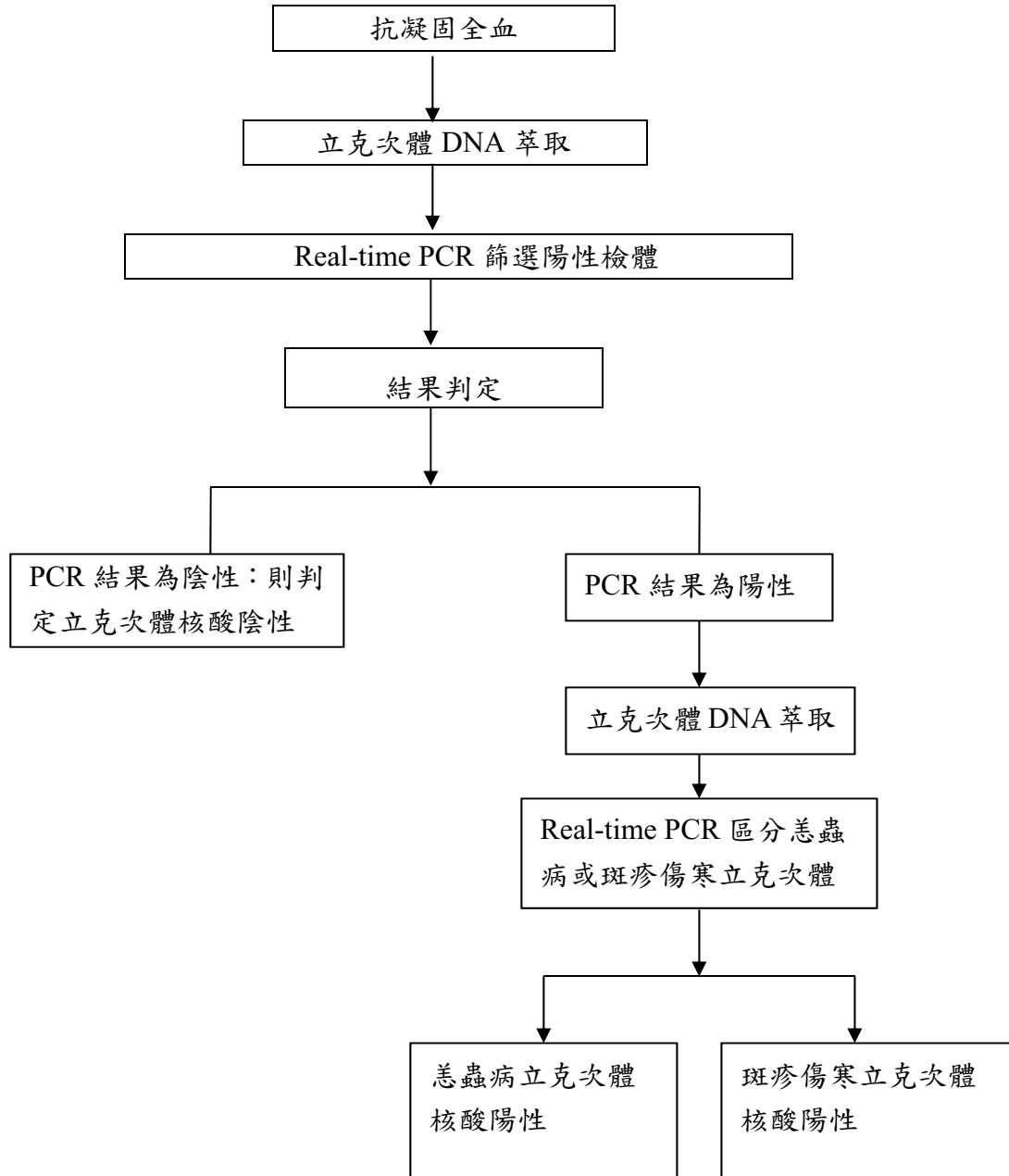
核准日期： 年 月 日

頁次：第 351 頁/共 1078 頁

病原體核酸檢測

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 立克次體鑑定（即時定量聚合酶鏈鎖反應）流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒

核准日期： 年 月 日

頁次：第 352 頁/共 1078 頁

病原體核酸檢測

修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 立克次體診斷用引子組序列表

### A. 立克次體 16S rRNA gene consensus primers

參與反應的濃度

16sRNAOTF7 5'- CCA GYG GGT RAT GCC GGG AAC TAT -3' 300 nM

16sRNAOTR6 5'- GGC AGT GTG TAC AAG GCC CGA GAA -3' 300 nM

### B. 恙蟲病(ST) 立克次體 56 kDa 外膜蛋白 gene specific primers

參與反應的濃度

RST-14F 5'- CCA TTT GGT GGT ACA TTA GCT GCA GGT -3' 300 nM

RST-6R 5'- TCA CGA TCA GCT ATA CTT ATA GGC A -3' 300 nM

### C. 斑點熱(SFG) 立克次體 17 kDa gene specific primers

參與反應的濃度

17kDa 142F 5'- GGT ATG AAT AAA CAA GGT ACA GGA AC -3' 300 nM

17kDa 447R 5'- ATA TTG ACC AGT GCT ATT TCT ATA AG -3' 300 nM

### D. 斑疹傷寒(TG) 立克次體 17 kDa gene specific primers

參與反應的濃度

17kDa 139F 5'- GGG TGG TAT GAA CAA ACA AGG GAC TG -3' 300 nM

17kDa 133F 5'- TGG TCA GAG TGG TAT GAA CAA ACA AG -3' 300 nM

17kDa 378R 5'- CGC CAT TCT ATG TTA CTA CCG CTA GG -3' 300 nM

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 353 頁/共 1078 頁

流行性斑疹傷寒抗體檢測

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以間接免疫螢光法檢測流行性斑疹傷寒立克次體(*Rickettsia prowazekii*)抗體以確定病人感染流行性斑疹傷寒。

## 2 適用檢體種類

適用於人體血清檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用抗原與抗體之專一性結合的免疫反應，加上二級螢光標幟抗體將此反應轉成螢光訊號，而可以透過螢光顯微鏡觀察結果。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

5.1.1 PBS (10 X stock solution) 0.1 M pH 7.4。

5.1.2 螢光標幟抗體 FITC-goat anti-human IgG +A + M (H+L chain)。

5.1.3 螢光標幟抗體 FITC-goat anti-human IgM。

5.1.4 螢光標幟抗體 FITC-goat anti-human IgG。

5.1.5 流行性斑疹傷寒螢光抗原玻片 (*R. prowazekii* IFA slide)。

5.1.6 IgG 去除劑。

5.1.7 *R. prowazekii* positive control serum：2 - 8 °C 保存、直接使用不需稀釋。

5.1.8 *Rickettsiae* Universal Negative Control：2 - 8 °C 保存、直接使用不需稀釋。

5.1.9 水質：25 °C 蒸餾水或 RO 逆滲去離子透可達 18 MΩ-CM 以上超純水。

### 5.2 耗材

5.2.1 96-well U 型盤。

5.2.2 50 mL 儲液槽。

## 6 儀器設備

6.1 螢光顯微鏡。

6.2 37 °C 溫箱。

## 7 環境設施安全

7.1 避免接觸傳染，所以病人的血清檢體，應在第二級生物安全櫃 (class II BSC) 內處理。

7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 354 頁/共 1078 頁

流行性斑疹傷寒抗體檢測

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtrecid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtrecid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

10.1.1 將抗原玻片取出並風乾。

10.1.2 試藥回溫。

10.1.3 做 IgM 力價測定時，血清須事先使用 IgG 去除劑處理，以避免 IgG 干擾螢光免疫結果：取 10  $\mu$ L 待測 IgM 力價之檢體，加入 70  $\mu$ L IgG 去除劑，以 1:8 稀釋比例混和後，靜置 5 min 備用。

### 10.2 步驟

初步篩選 (screening)：以 IFA- anti-human IgG + A + M 篩選 1:40 倍之稀釋血清。

10.2.1 將患者血清以 pH 7.4 之 0.01 M PBS 做 1:40 倍稀釋。

10.2.2 將稀釋血清及陽性、陰性對照組血清各取 50  $\mu$ L 點入 12 孔抗原玻片上。

10.2.3 將玻片置於保濕盒 (moisture chamber)，並於 37°C 恆溫箱作用 30 min。

10.2.4 以 PBS 溶液沖洗玻片後，將玻片浸於 PBS 中，5 min 後再換一次 PBS，並浸泡 5 min。

10.2.5 以蒸餾水沖洗玻片，風乾。

10.2.6 每個孔加二級螢光標幟抗體 (FITC-goat anti-human IgG + A + M)，每滴約 50  $\mu$ L。

10.2.7 將玻片置於保濕盒，並於 37°C 恆溫箱作用 30 min。

10.2.8 以 PBS 溶液沖洗玻片後，將玻片浸於 PBS 中，5 min 後再換一次 PBS，並浸泡 5 min。

10.2.9 以蒸餾水沖洗玻片，風乾。

10.2.10 加封存劑 (配方為 PBS: 甘油 = 1:1) 封片後，以螢光顯微鏡 400 倍鏡檢。

10.2.11 結果判定：有螢光反應者為疑似陽性病例，需再做進一步測定力價確認 (即進行 IgM & IgG 抗體力價測定)。

IgM & IgG 抗體力價測定：

#### 10.2.12 血清稀釋

##### 10.2.12.1 IgM 測定：

將已去除 IgG 之血清檢體以 pH 7.4, 0.01 M PBS 自 1:40 起做 2 倍稀釋至 1:160 或以上。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 355 頁/共 1078 頁

流行性斑疹傷寒抗體檢測

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 10.2.12.2 IgG 測定：

將血清檢體以 pH 7.4，0.01 M PBS 自 1：40 起做 2 倍稀釋至 1：640 或以上。

- 10.2.13 將稀釋血清及陽性、陰性對照組血清各取 50  $\mu$ L 點入 12 孔抗原玻片上。
- 10.2.14 將玻片置於保濕盒，並於 37°C 恆溫箱作用 30 min。
- 10.2.15 以 PBS 溶液沖洗玻片後，將玻片浸於 PBS 中，5 min 後再換一次 PBS，並浸泡 5 min。
- 10.2.16 以蒸餾水沖洗玻片，風乾。
- 10.2.17 每孔內加二級螢光標幟抗體(FITC-goat anti-human IgM 或 IgG)，每滴約 50  $\mu$ L。
- 10.2.18 將玻片置於保濕盒，並於 37°C 恆溫箱作用 30 min。
- 10.2.19 以 PBS 溶液沖洗玻片後，將玻片浸於 PBS 中，5 min 後再換一次 PBS，並浸泡 5 min。
- 10.2.20 以蒸餾水沖洗玻片，風乾。
- 10.2.21 加封存劑封片後，以螢光顯微鏡 400 倍鏡檢。
- 10.2.22 判定抗體力價。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 陽性的判定：若單支血清 IgM 有 1：80 以上，且 IgG 有 1:320 以上，可判為陽性。或配對血清 IgG 力價有 4 倍以上上升者，可判為陽性。
- 11.1.2 陰性的判定：配對血清 IgM 以及 IgG 力價皆低於 1：40 者，可判為陰性。
- 11.1.3 未確定需再採檢：若單支血清 1：40 倍稀釋之 IFA- anti-human IgG+A+M 初步篩選 (screening) 結果為陰性，或結果為陽性但血清 IgM 力價低於 1：80，則判為未確定，需再採檢。
- 11.1.4 不明(無法確定)：配對血清 IgG 力價無 4 倍以上上升者，判為不明(無法確定)。

### 11.2 報告核發

- 11.2.1 普氏立克次體抗體：陰性。
- 11.2.2 普氏立克次體抗體：未確定需再採檢。
- 11.2.3 普氏立克次體抗體：不明(無法確定)。
- 11.2.4 普氏立克次體抗體：陽性。

### 11.3 結果登錄

將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統 (LIMS) 之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 356 頁/共 1078 頁

流行性斑疹傷寒抗體檢測

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 12 品質管制

- 12.1 嚴防病原散佈或污染，工作時帶手套。
- 12.2 除螢光鑑定試驗步驟外全程作業都要在第二級生物安全操作箱內進行。
- 12.3 使用過之器材必須加以消毒處理。
- 12.4 每次檢驗應加入陽性、陰性控制組血清。
- 12.5 遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。
- 12.6 微量滴管分注器定期做校正。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。


## 14 參考資料

- 14.1 財團法人日本公眾衛生協會。1987。Virus、Chlamydia、Rickettsia 檢查，第三版第三分冊。
- 14.2 Tamura A, Takahashi K, Tsuruhara T, Urakami H, Miyamura S, Sekikawa H, Kenmotsu M, Shibata M, Abe S, Nezu H. 1984. Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp and Gilliam strains from patients. *Microbiol Immunol* 28: 873-882.
- 14.3 Department of Health and Human Services Public Health Service. 1987. Indirect fluorescent antibody technique for the detection of *Coxiella burnetii* antibodies.

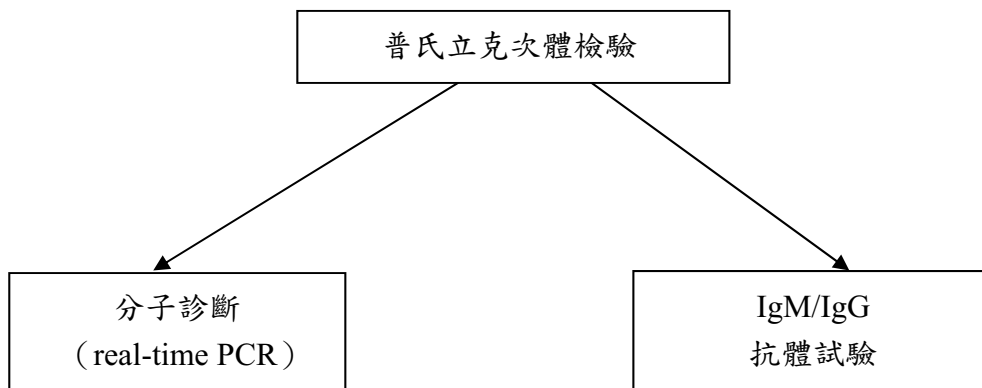
## 15 附錄

- 15.1 普氏立克次體檢驗流程圖。
- 15.2 普氏立克次體抗體試驗（免疫螢光抗體法）流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	流行性斑疹傷寒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 357 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 普氏立克次體檢驗流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

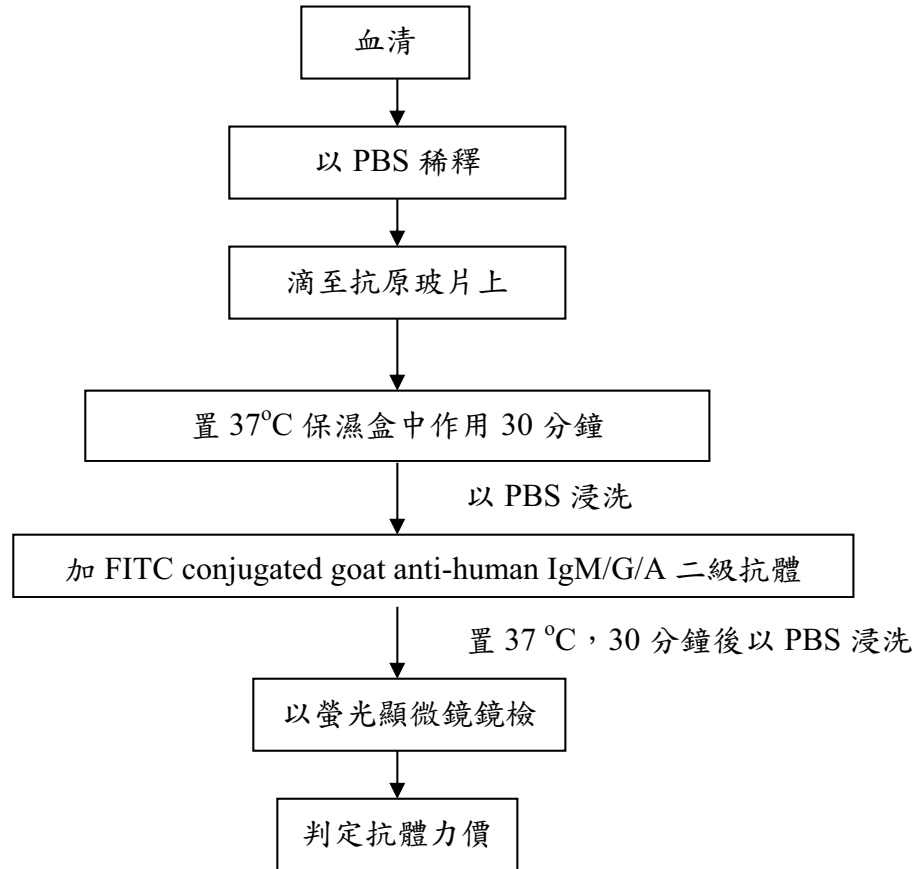
頁次：第 358 頁/共 1078 頁

流行性斑疹傷寒抗體檢測

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 普氏立克次體抗體試驗（免疫螢光抗體法）流程圖。





# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 359 頁/共 1078 頁

百日咳菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

百日咳通報病例所採檢的鼻咽檢體中百日咳菌與副百日咳菌的分離與鑑定。

## 2 適用檢體種類

適用於人體鼻咽分泌物檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

以特定培養基分離百日咳菌與副百日咳菌，並利用生化代謝，血清學特性鑑定。

## 5 試劑耗材

5.1 B-G 培養基 (Bordet-Gengou agar plate)。

5.2 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution)：Difco，美國，武藤化學，日本或其它具相同鑑別力之試劑。

5.3 氧化酶試劑 (oxidase strips)：MAST，英國，BioMérieux，法國或其它具相同鑑別力之試劑。

5.4 無菌滴管 (dropper)：1 mL。

5.5 接種針 (環)。

5.6 載玻片。

5.7 無菌塑膠手套。

5.8 抗血清：Bacto-*Bordetella pertussis* Antiserum, Difco，美國或其它具相同鑑別力之試劑。

5.9 抗血清：Bacto-*Bordetella parapertussis* Antiserum, Difco，美國或其它具相同鑑別力之試劑。

5.10 標準菌株：*Neisseria meningitidis* BCRC10714=ATCC13090。

5.11 標準菌株：*Escherichia coli* BCRC11509=ATCC25922。

5.12 標準菌株：*Bordetella pertussis* Tohama。

5.13 標準菌株：*Bordetella parapertussis* ATCC15311。

## 6 儀器設備

6.1 35 °C 培養箱。

6.2 高壓滅菌鍋。

6.3 光學顯微鏡：能放大至 1,000 X 油鏡。

6.4 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。

## 7 環境設施安全

7.1 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

7.2 處理檢體、接種時於生物安全櫃內操作。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 360 頁/共 1078 頁

百日咳菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

請參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treid=4C19A0252BBEF869&nowtreid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

請參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treid=4C19A0252BBEF869&nowtreid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 分離培養

10.1.1 檢體接種：將百日咳輸送培養基中之鼻咽拭子取出旋轉接種在 B-G 培養基上。

10.1.2 培養：培養基放入塑膠袋中，再置入已添加無菌水保溼的鐵盒中保持溼度，35 °C 培養箱培養。

10.1.3 觀察：16 - 18 hr 後，開始觀察，有可疑菌落則進行鑑定，一般百日咳菌在培養基上培養大約 3 - 4 天後，肉眼可見其菌落，如無，則繼續培養及隔日觀察，至少需培養 7 天。

### 10.2 鑑定

10.2.1 菌落型態及染色：小、突起、平滑、灰白色有珍珠光澤、似水銀滴，若僅有少數幾個菌落時，溶血性不易觀察，但若有一大群菌落，則可看到溶血現象。挑選可疑菌落作 Gram's stain，符合 Gram-negative coccobacilli (short slender)。

10.2.2 生化鑑定 Oxidase test：以接種環挑取單一菌落直接塗於 strip 上，觀察顏色變化，10 sec 內變為藍色，為陽性反應。*B. pertussis* and *B. bronchiseptica* 陽性呈現藍色或藍紫色，*B. parapertussis* 陰性不變色。

10.2.3 血清凝集試驗（玻片凝集法）：

10.2.3.1 將載玻片用蠟筆分格，測試位置如圖說明：

P	Pa	N
---	----	---

P：*Bordetella pertussis* 測試。

Pa：*Bordetella parapertussis* 測試。

N：陰性對照（無菌食鹽水）。

10.2.3.2 在每一格分別滴入 1 滴（約 40  $\mu$ L）無菌 0.85 % 食鹽水，以 1  $\mu$ L 接種環，挑 1/2 Loop 量的新鮮菌落於各分格中與無菌生理食鹽水混合均勻，個別加入相對應之抗血清（1：10 稀釋使用，稀釋後血清只能使用 1 天）或無菌 0.85 % 食鹽水，均勻搖晃玻片約 1 min，觀察並記錄凝集情形。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 361 頁/共 1078 頁

百日咳菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 10.2.3.3 凝集結果紀錄

4 價：100 % 凝集，背景完全清透。

3 價：75 % 凝集，背景輕微混濁。

2 價：50 % 凝集，背景中度混濁。

1 價：25 % 凝集，背景混濁。

—：沒有凝集。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

11.1.1 百日咳菌陽性判定標準：符合百日咳菌於 B-G 培養基的菌落型態、菌落小、突起、平滑、灰白色有珍珠光澤、似水銀滴，Gram's stain 革蘭氏陰性菌，球桿（細短桿）菌，Oxidase test 陽性呈現藍色或藍紫色，*Bordetella pertussis* antiserum 血清凝集試驗、凝集 3 價以上即可判為百日咳菌陽性。凝集未達 3 價需加做 PCR，PCR 為百日咳菌陽性結果，判定為百日咳菌陽性；若 PCR 陰性則百日咳菌判定標準為陰性。

11.1.2 副百日咳菌陽性判定標準：菌落型態、Gram's stain 結果與前面描述相同，Oxidase test 不變色，*Bordetella parapertussis* antiserum 血清凝集試驗、凝集 3 價以上即可判為副百日咳菌陽性。凝集未達 3 價需加做 PCR，PCR 為副百日咳菌陽性結果，判定為副百日咳菌陽性；若 PCR 陰性則副百日咳菌判定標準為陰性。

11.2 報告核發：百日咳菌陽性或百日咳菌陰性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於百日咳菌分離與鑑定紀錄表及檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送實驗室主管審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

#### 11.3.1 結果的可報告區間

陽性：*Bordetella pertussis*

陰性：*Bordetella parapertussis*，non-*Bordetella pertussis*，non-*Bordetella parapertussis*，No growth。

#### 11.3.2 緊急通報

無

#### 11.3.3 干擾因素

11.3.3.1 病人因素：病程發展階段、抗生素使用。

11.3.3.2 採樣運送時：採檢部位、採檢使用之輸送器材、運送時間和溫度。

11.3.3.3 培養溼度、溫度。

#### 11.3.4 潛在變異的來源

11.3.4.1 接種劃線技術。

11.3.4.2 菌落型態辨識。

#### 11.3.5 檢驗性能之規格

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 362 頁/共 1078 頁

百日咳菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 12 品質管制

### 12.1 Oxidase 試驗：

12.1.1 測試時間：同一批號試劑，於第一次使用時進行試驗。

12.1.2 測試菌株：陽性品管菌株，*Neisseria meningitides*  
BCRC10714=ATCC13090，陰性品管菌株，*Escherichia coli*  
BCRC11509=ATCC25922。

12.1.3 測試方法：（依 10.2.2 節）。

12.1.4 觀察結果紀錄：結果要符合預期結果，陽性品管菌株試驗結果需陽性，陰性品管菌株試驗結果需陰性。

### 12.2 B-G 培養基的品質管制：

12.2.1 測試時間：每一批號由廠商提供品質管制文件，實驗室每年進行一次品管測試。

12.2.2 測試菌株：*Bordetella pertussis* Tohama。

12.2.3 測試方法：使用新鮮的測試菌，生長在固體營養培養基一天的菌，挑菌懸浮於 2 mL 無菌水中，調菌液濁度 0.5 McFarland，以 1  $\mu$ L 的 loop 取菌液依四區畫線接種於測試培養基上，35  $^{\circ}$ C 培養箱培養。

12.2.4 觀察結果紀錄：預期結果 3-4 天後，可見 0.5 - 1 mm 菌落，菌落至少生長至第三區。

### 12.3 抗血清：

12.3.1 測試時間：於第一次使用時。

12.3.2 測試菌株：*Bordetella pertussis* Tohama, *Bordetella parapertussis* ATCC15311。

12.3.3 測試方法（依 10.2.3 節）。

12.3.4 觀察結果紀錄：抗血清與相對應抗原凝集應該具有 3 價或 3 價以上，方可使用。

### 12.4 能力試驗

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121  $^{\circ}$ C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 蔡文城。2002。實用臨床微生物診斷學，第九版。九州圖書文物有限公司，臺灣。第 864-868 頁。

14.2 Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 2007. Manual of clinical microbiology, 9th edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 803 -814.

## 15 附錄

15.1 百日咳菌分離與鑑定流程。

15.2 百日咳菌分離與鑑定紀錄表。

15.3 \_\_\_\_\_ Plate 品質管制紀錄表。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

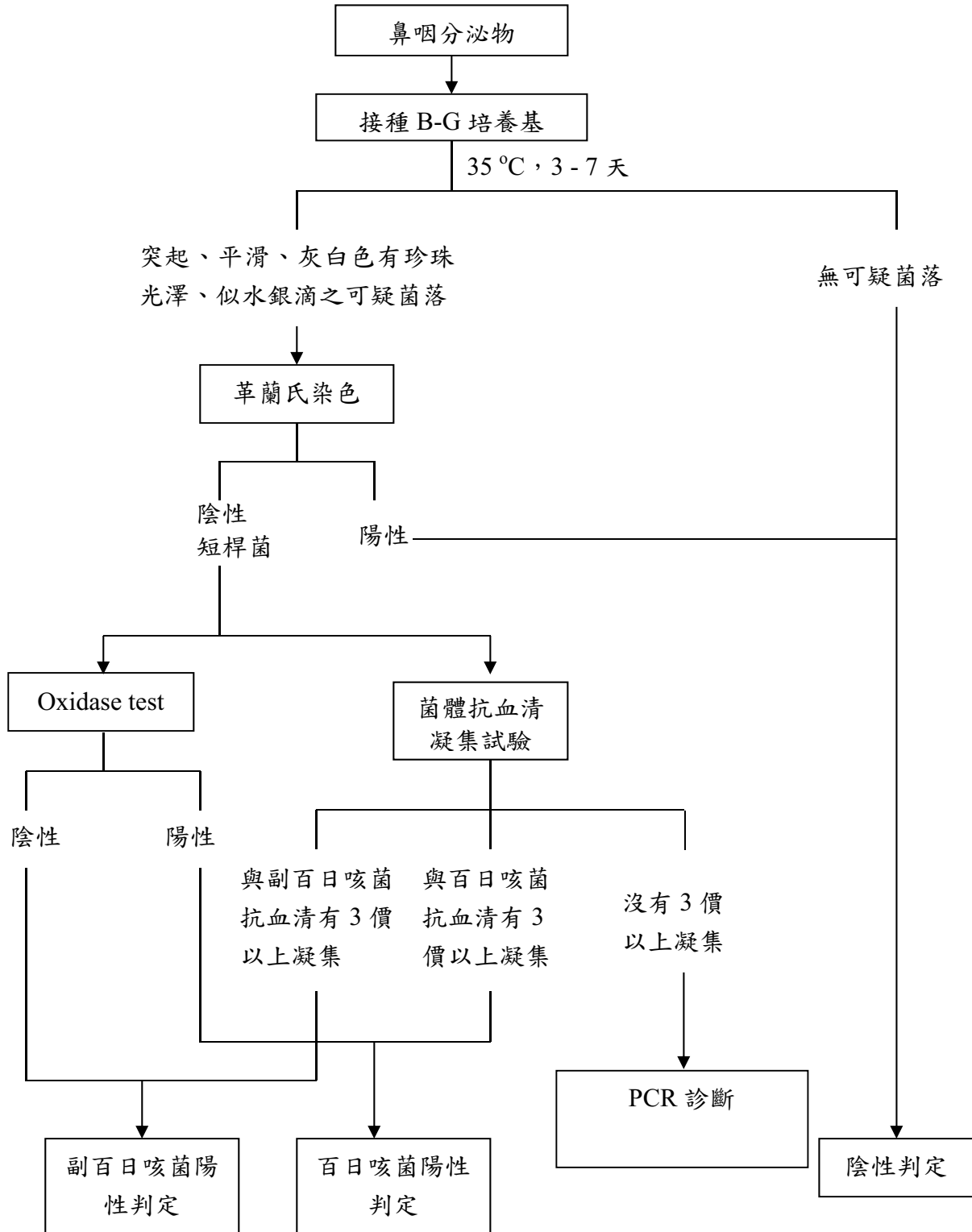


編號：  
頁次：第 363 頁/共 1078 頁


百日咳菌分離與鑑定

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 百日咳菌分離與鑑定流程圖



## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 364 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

### 附件 15.2 百日咳菌分離與鑑定紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

#### 百日咳菌分離與鑑定紀錄表


頁數：第 頁/共 頁

檢體編號											
收件日期											
檢驗日期											
檢體採檢運送狀況適當		是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
B-G agar plate 生長 型態：灰白色有珍珠 光澤、似水銀滴	培養/觀察	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
	第 2 天										
	第 3 天										
	第 4 天										
	第 5 天										
	第 6 天										
	第 7 天										
革蘭氏染色：陽性或陰性，球菌 或球桿菌		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
		球菌	球桿 菌	球菌	球桿 菌	球菌	球桿 菌	球菌	球桿 菌	球菌	球桿 菌
Oxidase test：陽性藍色或藍紫 色，陰性不變色		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
菌體抗血清凝集試驗： <i>B. pertussis</i> antiserum		3 價 凝集	未及 3 價 凝集	3 價 凝集	未及 3 價 凝集	3 價 凝集	未及 3 價 凝集	3 價 凝集	未及 3 價 凝集	3 價 凝集	未及 3 價 凝集
菌體抗血清凝集試驗： <i>B. parapertussis</i> antiserum		3 價 凝集	未及 3 價 凝集	3 價 凝集	未及 3 價 凝集	3 價 凝集	未及 3 價 凝集	3 價 凝集	未及 3 價 凝集	3 價 凝集	未及 3 價 凝集
附註：未及 3 價凝集需加做 PCR 確認											
綜合結果											
報告日期											

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 365 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 \_\_\_\_\_ Plate 品質管制紀錄表  
 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

\_\_\_\_\_ Plate 品質管制紀錄表

培養基名稱： \_\_\_\_\_  
 廠牌： \_\_\_\_\_ Cat no.： \_\_\_\_\_  
 批號： \_\_\_\_\_ 有效期限： \_\_\_\_\_

交貨日期： 年 月 日 交貨數量： \_\_\_\_\_

試驗日期： 年 月 日

**品管（查驗）紀錄**

項 目	結 果	判 定	備 註
無菌性試驗	<input type="checkbox"/> No growth <input type="checkbox"/> Contamination	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
有效性試驗	1. 試驗菌： 生長描述：	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
	2. 試驗菌： 生長描述：	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
	3. 試驗菌： 生長描述：	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
包裝	<input type="checkbox"/> 完整 <input type="checkbox"/> 破損 <input type="checkbox"/> 其它：	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
水分	<input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 太乾 <input type="checkbox"/> 其它：	<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	
其它		<input type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格	

實驗室 PI：

品管技術人員：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 366 頁/共 1078 頁

百日咳菌核酸檢測 (PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 對分離出之培養菌進行百日咳菌及副百日咳菌鑑定。

## 2 適用檢體種類

適用於從病患已分離之培養菌。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

針對百日咳菌及副百日咳菌的 Porin gene 設計 3 條 primer，利用 PCR 放大 2 種特定大小的片段，*Bordetella pertussis* 由 P1/P2 夾出 159 bp 片段，*Bordetella parapertussis* 由 P1/P3 夾出 121 bp 片段。利用 16S rRNA gene 當 Internal control 由 8AU/519B 夾出 512 bp 片段。

## 5 試劑耗材

5.1 無菌水：用電阻可達 18 MΩ-CM 超純水，滅菌 121 °C，15 min。

5.2 PCR 反應管：LTK，台灣。成分 Taq DNA polymerase 2 U，dNTP 1 mM，Buffer salt，Stabilizer，或功能相同之分生混合試劑。

5.3 微量吸管尖 tip：無菌、需有 filter，需 1,000 μL、200 μL、40 μL 與 10 μL 四種。

5.4 接種針 (環)。

5.5 可拋棄式塑膠手套。

5.6 1.5 mL Eppendorf 無菌管。

5.7 TBE 緩衝液。

5.8 Ethidium bromide。

5.9 Primer

P1 5' -TGCAACATCCTGTCCCCTTAATCC -3' 。

P2 5' -ATGCTTATGGGTGTTTCATCCGGCC -3' 。

P3 5' -CGTCCACCAGGGGTGGTAGGAGAT -3' 。

8AU 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 。

519B 5' -ATTACCGCGGCTGCTCG-3' 。

## 6 儀器設備

6.1 生物安全櫃。

6.2 桌上型離心機。

6.3 4°C 冰箱。

6.4 -20°C 冷凍櫃。


6.5 水浴槽。

6.6 電泳槽。

6.7 微量吸管 Pipetman：需 1,000 μL、200 μL、2 μL 等三種規格。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳菌核酸檢測 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 367 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 6.8 核酸增幅儀：Biometra。
- 6.9 DNA 電泳膠體觀察照相設備。
- 7 環境設施安全
- 7.1 菌株處理於於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 PCR 反應混和物配製、PCR 反應進行、電泳皆需於獨立區域操作。
- 8 檢體採集
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
- 10.1 檢體處理
- 10.1.1 分離的菌體：以 1  $\mu\text{L}$  接種環挑取 1/2 Loop 的新鮮菌落，放入含 100  $\mu\text{L}$  無菌水的 1.5 mL eppendorf 無菌管中，以 100°C 熱煮 10 min，放入離心機 5,000  $\times$  g (12,000 rpm) 離心 5 min，取上清液當作 Template。
- 10.2 PCR
- 10.2.1 PCR (P1/P2/P3) 反應混和物配製如下：
- | Component   | Final conc. or volume |
|---|-----------------------|
| Template (陽性 DNA、水、檢體)  | 1 $\mu\text{L}$       |
| Each primer (5 $\mu\text{M}$ )                                | 1 $\mu\text{L}$       |
| PCR 反應管商品內含 (Taq DNA polymerase、dNTP、Buffer salts、Stabilizer) |                       |
| Total volume (加無菌水)   | 20 $\mu\text{L}$      |
- 10.2.2 放入儀器中進行反應，反應條件設定：  
94 °C /5 min，1 cycle。  
94 °C /30s，65 °C /30s，72 °C /30s，30 cycles。  
72 °C /10 min，1 cycle。
- 10.3 Internal control：如果檢體沒有 PCR 產物時需加做
- 10.3.1 Internal control PCR (8AU/519B) 反應混和物配製如下：
- | Component   | Final conc. or volume |
|---|-----------------------|
| Template (水、檢體)   | 1 $\mu\text{L}$       |
| Each primer (5 $\mu\text{M}$ )                                | 1 $\mu\text{L}$       |
| PCR 反應管商品內含 (Taq DNA polymerase、dNTP、Buffer salts、Stabilizer) |                       |
| Total volume (加無菌水)   | 20 $\mu\text{L}$      |

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 368 頁/共 1078 頁

百日咳菌核酸檢測 (PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.3.2 放入儀器中進行反應，反應條件設定：
  - 94 °C /5 min，1 cycle。
  - 94 °C /20s，57 °C /30s，72 °C /40s，30 cycles。
  - 72 °C /10 min，1 cycle。

## 10.4 PCR 電泳分析。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準：

- 11.1.1 *Bordetella pertussis*：159 bp，百日咳菌陽性。
- 11.1.2 *Bordetella parapertussis*：121 bp，副百日咳菌陽性。
- 11.1.3 陰性結果需加作 Internal control：確有 512 bp 產物，則可做陰性判定。

### 11.2 報告核發：百日咳菌陽性或百日咳菌陰性。

### 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於百日咳菌分子生物學鑑定 (PCR) 紀錄表及檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送實驗室主管審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。

#### 11.3.1 結果的可報告區間

- 陽性：*Bordetella pertussis*：159 bp。
- 陰性：*Bordetella parapertussis*：121 bp，non- *Bordetella pertussis*，non- *Bordetella parapertussis*：512 bp。

#### 11.3.2 緊急通報

無。

#### 11.3.3 干擾因素

培養基上物質。

#### 11.3.4 潛在變異的來源

環境中核酸污染。

#### 11.3.5 檢驗性能之規格

11.3.5.1 Sensitivity：*Bordetella pertussis* limited DNA concentration 39 pg，*Bordetella parapertussis* limited DNA concentration 156 pg。

11.3.5.2 Specificity 100 %。

## 12 品質管制

### PCR 反應管：

- 12.1 品管測試時間：每一批號開封使用時。
- 12.2 陽性對照菌株：*Bordetella pertussis* Tohama，*Bordetella parapertussis* ATCC15311。
- 12.3 陽性對照：Template 加入陽性菌株 *Bordetella pertussis* Tohama，*Bordetella parapertussis* ATCC15311 的 DNA。陰性對照：Template 體積以無菌水取代，與預期結果相符。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 369 頁/共 1078 頁

百日咳菌核酸檢測 (PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Li Z, Jansen DL, Finn TM, Halperin SA, Kasina A, O'Connor SP, Aoyama T, Manclark CR, Brennan MJ. 1994. Identification of *Bordetella pertussis* infection by shared-primer PCR. J Clin Microbiol 32: 783-789.

14.2 Qin X, Galanakis E, Martin ET, Englund JA. 2007. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications. J Clin Microbiol 45: 506-511.

## 15 附錄

15.1 百日咳菌分子生物學鑑定 (PCR) 流程圖。

15.2 百日咳菌分子生物學鑑定 (PCR) 紀錄表-1。

15.3 百日咳菌分子生物學鑑定 (PCR) 紀錄表-2。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

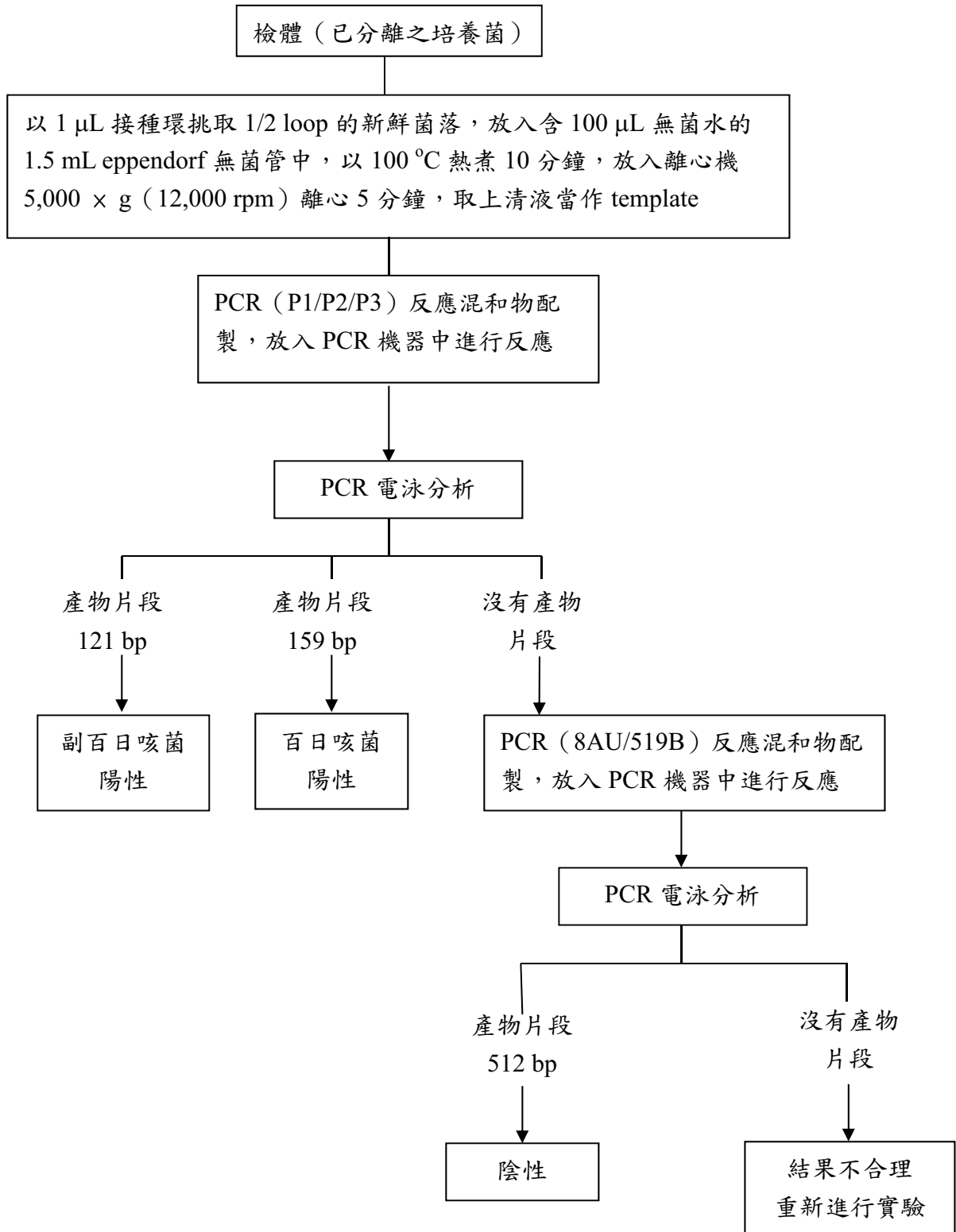
頁次：第 370 頁/共 1078 頁

百日咳菌核酸檢測 (PCR)


核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 百日咳菌分子生物學鑑定 (PCR) 流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳菌核酸檢測 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 371 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 百日咳菌分子生物學鑑定 (PCR) 紀錄表-1

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

百日咳桿菌聚合酶鏈鎖反應法紀錄表-1

頁數：第 頁/共 頁


聚合酶鏈鎖反應	是	否
PCR 反應管管面標記		
DNA template (1μL)		
Each primer (5 μM) 1 μL		
Total volume (加無菌水) 20 μL		
PCR 反應：94°C / 5 min, 1 cycle; 94°C / 30s, 65°C / 30s, 72°C / 30s, 30 cycles; 72°C / 10 min, 1 cycle。		

檢體編號	陽性對照百日咳菌	陽性對照副百日咳菌	陰性對照(無菌水)					
收件日期								
檢驗日期								
PCR 產物： <i>B. pertussis</i> 159 bp <i>B. parapertussis</i> 121 bp	159 bp 121 bp 無	159 bp 121 bp 無	159 bp 121 bp 無	159 bp 121 bp 無	159 bp 121 bp 無	159 bp 121 bp 無	159 bp 121 bp 無	159 bp 121 bp 無
綜合結果								
附註： 無 PCR 產物時，需繼續進行 Internal control 實驗。								
報告日期								

檢驗者：

實驗室主管：

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳菌核酸檢測 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 372 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

### 附錄 15.3 百日咳菌分子生物學鑑定 (PCR) 紀錄表-2

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

#### 百日咳桿菌聚合酶鏈鎖反應法紀錄表-2

頁數：第 頁/共 頁

聚合酶鏈鎖反應	是	否
PCR 反應管管面標記		
DNA template (1 μL)		
Each primer (5 μM) 1 μL		
Total volume (加無菌水) 20 μL		
PCR 反應：94°C/5 min, 1 cycle; 94°C / 30s, 57°C / 30s, 72°C / 30s, 30 cycles; 72°C / 10 min, 1 cycle。		

檢體編號	陽性對照百日咳菌	陽性對照副百日咳菌	陰性對照(無菌水)						
收件日期									
檢驗日期									
Internal control 512 bp	512 bp 無	512 bp 無	512 bp 無	512 bp 無	512 bp 無	512 bp 無	512 bp 無	512 bp 無	512 bp 無
綜合結果									
附註：									
報告日期									

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 373 頁/共 1078 頁	(PCR LAMP 法)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用新型恆溫式圈環形核酸增幅法 (LAMP) 對有症狀之百日咳通報個案檢體，進行百日咳菌核酸鑑定。

## 2 適用檢體種類

適用於病患鼻咽拭子檢體。

## 3 名詞解釋

LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification Method 為恆溫、具 loop 形式的 DNA 增幅法。

## 4 原理概述

針對百日咳菌的 PT promoter 部位設計 6 條 primer，利用 LAMP 法於恆溫下進行快速反應。最大的特點在於：(1) 使用作用溫度 60–65 °C 和具高 DNA strand 置換能力的 DNA 聚合酶 (DNA polymerase)；(2) 使用 Inner primers (FIP, BIP) 和 Outer primers (F3, B3) 再加上 Loop primers (LF, LB)。Inner primers 與 Outer primers 為反應所必須，在增幅的過程中分別扮演了起始引發與後續「self-priming」的角色，而 loop primers 則是互補於 DNA 序列 F1、F2 中間的片段，這個位置在 LAMP 的 DNA product 上，為 Stem-loop 結構的 Loop 位置，有助於提升整個反應的效率；這三對引子在設計之時，Tm 值要控制在 60 - 65 °C，以利 DNA 聚合時可達最佳效能，也因此提升了在溫度調控上的便利性及專一性。

## 5 試劑耗材

### 5.1 PCR 反應管

5.2 微量吸管尖 tip：無菌、需有 filter，1,000 µL、200 µL、10 µL 與 2 µL 四種。

5.3 可拋棄式鼻咽拭子及採集管 Eswab。

5.4 拋棄式塑膠手套。

5.5 1.5 mL Eppendorf 無菌管。

5.6 QIAamp DNA micro kit (50 rxn Qiagen Cat no.56304)。

5.7 Eiken DNA amplification kit。

5.8 Eiken fluorescent detection reagent

5.9 Primer set (5 µL) 含

BP-F3 5'-CCGCATACGTGTTGGCA-3' (5pmole)。

BP-B3 5'-TGCGTTTTGATGGTGCCT-3' (5pmole)。

BP-FIP (40pmole)

5'-TTGGATTGCAGTAGCGGGATGTGCATGCGTGCAGATTCGTC-3'。

BP-BIP (40pmole)

5'-CGCAAAGTCGCGCGATGGTAACGGATCACACCATGGCA-3'。

BP-LF 5'-ACGGAAGAATCGAGGGTTTTGTAC-3' (20pmole)。

BP-LB 5'-GTCACCGTCCGGACCGTG-3' (20pmole)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 374 頁/共 1078 頁	(PCR LAMP 法)	修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 生物安全櫃。
- 6.2 桌上型離心機。
- 6.3 4 °C 冰箱
- 6.4 -20 °C 冷凍櫃。
- 6.5 水浴槽。
- 6.6 溫度調控混合器 (thermomixer)。
- 6.7 微量吸管 Pipetman：需 1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、2  $\mu$ L 等三種規格。
- 6.8 核酸增幅儀：Biometra 或 LA-320C (Eiken)。
- 6.9 波長 254 nm 紫外光燈。
- 6.10 震盪器 (vortex)

## 7 環境設施安全

- 7.1 檢體處理於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 PCR 反應混和物配製、PCR 反應進行皆於獨立區域操作。

## 8 檢體採集

請參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

請參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體處理

10.1.1 在生物安全櫃內將 Eswab 拭子內 Liquid Amies Medium 取 0.5 mL 至 1.5 mL 離心管，剩下的溶液置-20 °C 冷凍櫃，留樣備用。

### 10.2 DNA 萃取

10.2.1 離心 (15,000 rpm 10 min 或 12,000 rpm 15 min) 後，去上清液，沉澱物作 DNA 抽取 (使用 QIAamp DNA micro kit)。

10.2.2 室溫 (15 - 25 °C) 下加入 180  $\mu$ L ATL buffer。

10.2.3 加 20  $\mu$ L Protease K，震盪 (vortex) 混勻 15 sec，放置於 56 °C 的 Thermomixer 上，轉速 400 rpm，震盪至隔日。

10.2.4 次日加入 200  $\mu$ L AL buffer 及 1  $\mu$ L Carrier RNA (1  $\mu$ g / $\mu$ L)，震盪 (vortex) 混勻 15 sec。

10.2.5 加 200  $\mu$ L 酒精 (96 - 100 %)，震盪 (vortex) 混勻 15 sec，室溫放置 5 min。

10.2.6 上清液移入 QIAamp MinElute column，離心 1 min (8,000 rpm) 並將 Column 換至新的 Collection tube。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 375 頁/共 1078 頁

百日咳核酸檢測  
(PCR LAMP 法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.2.7 加入 500  $\mu$ L AW1 buffer，離心 1 min (8,000 rpm)，更換新的 Collection tube。
- 10.2.8 加入 500  $\mu$ L AW2 buffer，離心 1 min (8,000 rpm)，更換新的 Collection tube。
- 10.2.9 全速離心 3 min (14,000 rpm)。
- 10.2.10 將 QIAamp MinElute Column 移至新的 1.5 mL 離心管後，加入 25  $\mu$ L Buffer AE，直接滴在中央過濾膜上，於室溫(15–25  $^{\circ}$ C) 靜置 1 min。
- 10.2.11 全速離心 1 min (14,000 rpm)，完成 DNA 萃取。
- 10.3 LAMP 反應
- 10.3.1 煮沸前述步驟之萃取 DNA 5 min 後，立刻置於冰上 (pre-denature)。
- 10.3.2 配製 LAMP 反應組成物如下：Total 25  $\mu$ L
- |  |                               |
|--|-------------------------------|
| <b>2 X Reaction Mixture</b>              | <b>12.5 <math>\mu</math>L</b> |
| <b>Primer set</b>                        | <b>5 <math>\mu</math>L</b>    |
| <b>Bst DNA polymerase</b>                | <b>1 <math>\mu</math>L</b>    |
| <b>FD (fluorecent detection reagent)</b> | <b>1 <math>\mu</math>L ※</b>  |
| <b>滅菌水</b>                               | <b>4.5 <math>\mu</math>L</b>  |
| <b>萃取之 DNA</b>                           | <b>1 <math>\mu</math>L</b>    |
- ※使用 LA-320C 偵測的場合，不添加 FD，滅菌水加入量改為 5.5  $\mu$ L
- 10.3.3 配製完成後放入核酸增幅儀，溫度條件如下：
- 10.3.4 65  $^{\circ}$ C 40 min  $\rightarrow$  80  $^{\circ}$ C 3 min。
- 10.3.5 於波長 254 nm 紫外光燈下觀察螢光反應或 LA-320C 偵測濁度。
- 11 結果判定
- 11.1 判讀標準：
- 於波長 254 nm 紫外光燈下呈現螢光反應或 LA-320C 有偵測到濁度變化為百日咳菌 PCR 陽性。
- 11.2 報告核發：百日咳菌 PCR 陽性，百日咳菌 PCR 陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於百日咳菌 PCR 鑑定 (LAMP 法) 紀錄表及檢體送驗單並加蓋檢驗者印章，送實驗室主管審核及蓋章，並登錄於網路報告系統。
- 11.3.1 結果的可報告區間
- 於波長 254 nm 紫外光燈下呈現螢光反應或 LA-320C 有偵測到濁度變化為百日咳菌 PCR 陽性。
- 於波長 254 nm 紫外光燈下反應管不呈現螢光反應或 LA-320C 沒有偵測到濁度變化為百日咳菌 PCR 陰性。
- 11.3.2 緊急通報
- 無。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 376 頁/共 1078 頁	(PCR LAMP 法)	修訂日期： 年 月 日

- 11.3.3 干擾因素  
拭子檢體內物質。
- 11.3.4 潛在變異的來源  
環境中核酸污染。
- 11.3.5 檢驗性能之規格
  - 11.3.5.1 Sensitivity：*Bordetella pertussis* 10 copies。
  - 11.3.5.2 Specificity 100 %。

## 12 品質管制

### LAMP 反應試劑：

- 12.1 品管測試時間：每一批號開封使用時。
- 12.2 陽性對照菌株：*Bordetella pertussis* Tohama。
- 12.3 陽性對照：Template 加入 *Bordetella pertussis* Tohama 的 DNA，DNA 濃度 100 pg。
- 12.4 陰性對照：Template 體積以無菌水，抽 DNA 過程的陰性對照組及 *B.parapertussis* ATCC15311 的 DNA，DNA 濃度 100 pg 取代，與預期結果相符。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 Kazunari K, Hiromi TA, Kohei T, Sann CS, Svay S, Ya N, Yoshinobu H, Kazunobu K, Motohide T, Yoshichika A. 2006. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J Clin Microbiol 44: 1899-1902.
- 14.2 林于勤，李淑英，陳豪勇，林鼎翔。2004。新型恆溫式圈環形核酸增幅法簡介與應用。疫情報導 20：323-332。

## 15 附錄

- 15.1 百日咳菌分子生物學鑑定 (LAMP) 流程圖。
- 15.2 百日咳菌分子生物學鑑定 (LAMP) 紀錄表-1。
- 15.3 百日咳菌分子生物學鑑定 (LAMP) 紀錄表-2。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

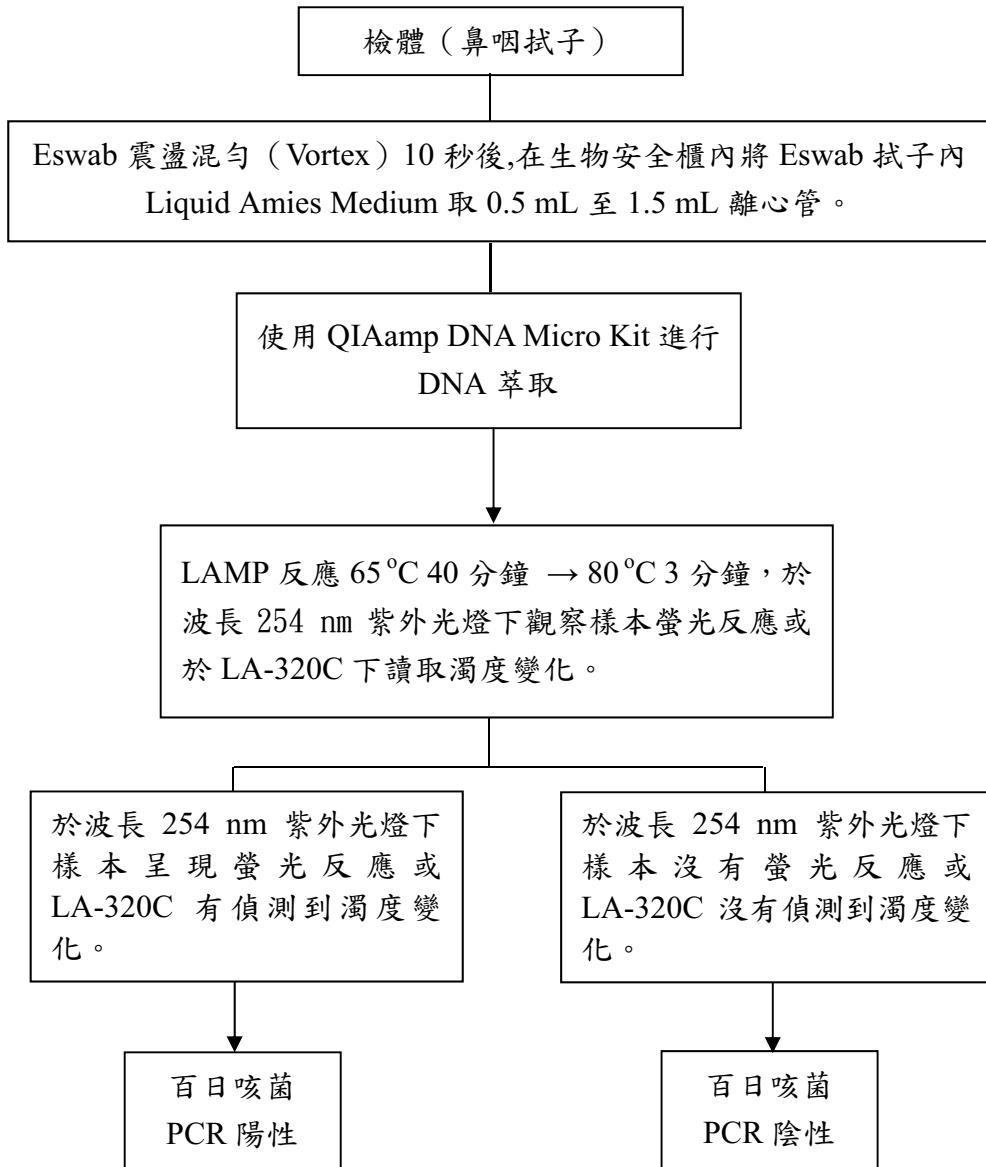
頁次：第 377 頁/共 1078 頁

百日咳核酸檢測  
(PCR LAMP 法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 百日咳菌分子生物學鑑定 (LAMP) 流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳核酸檢測 (PCR LAMP 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 378 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 百日咳菌分子生物學鑑定 (LAMP) 紀錄表-1

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

百日咳桿菌恆溫式圈環形核酸增幅法紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

LAMP 反應	是	否
PCR 反應管管面標記		
2X RM 12.5 $\mu$ L		
DW 4.5 $\mu$ L (使用 LA-320C 偵測の場合 5.5 $\mu$ L)		
Bst 1 $\mu$ L		
FD 1 $\mu$ L (使用 LA-320C 偵測の場合 0 $\mu$ L)		
Primer set 5 $\mu$ L		
DNA template 1 $\mu$ L		
Total volume (加無菌水) 25 $\mu$ L		
LAMP 反應 65°C 40 min $\rightarrow$ 80°C 3 min		

檢體編號	陽性對照百日咳菌 DNA 濃度 100pg	陰性對照副百日咳菌 DNA 濃度 100pg	陰性對照(無菌水)	抽 DNA 過程的陰性對照組				
收件日期								
檢驗日期								
LAMP 產物： 紫外燈波長 254 nm 下觀察螢光反應	有 無	有 無	有 無	有 無	有 無	有 無	有 無	有 無
綜合結果 百日咳 PCR	陽性 陰性	陽性 陰性	陽性 陰性	陽性 陰性	陽性 陰性	陽性 陰性	陽性 陰性	陽性 陰性
附註：								
報告日期								

檢驗者：

實驗室主管：

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 379 頁/共 1078 頁	(PCR LAMP 法)	修訂日期： 年 月 日

### 附錄 15.3 百日咳菌分子生物學鑑定 (LAMP) 紀錄表-2

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

頁數：第 頁/共 頁


#### 百日咳桿菌核酸萃取程序紀錄表

順序	步驟描述	是	否
1	在生物安全櫃內將 Eswab 拭子內 Liquid Amies medium 取 0.5 mL 至 1.5 mL 離心管		
2	離心 (15,000 rpm 10 min 或 12,000 rpm 15 min) 後去上清液，沉澱物作 DNA 抽取		
3	室溫 (15-25°C) 下加入 180 µL ATL Buffer		
4	加 20 µL Protease K，震盪 (vortex) 混勻 15 sec，放置於 56°C 的 thermomixer 上，轉速 400 rpm，震盪至隔日。		
5	加入 200 µL AL buffer 及 1 µL Carrier RNA (1 µg /µL)，震盪 (vortex) 混勻 15 sec。		
6	加 200 µL 酒精 (96-100%)，震盪 (vortex) 混勻 15 sec，室溫放置 5 min		
7	上清液移入 QIAamp MinElute column，離心 1 min (8,000 rpm) 並將 Column 換至新的 Collection tube		
8	加入 500 µL AW1 buffer，離心 1 min (8,000 rpm)，更換新的 Collection tube		
9	加入 500 µL AW2 buffer，離心 1 min (8,000 rpm)，更換新的 Collection tube		
10	全速離心 3 min (14,000rpm)		
11	將 QIAamp MinElute column 移至新的 1.5 mL 離心管後，加入 25 µL Buffer AE，於室溫 (15-25°C) 靜置 1 min		
12	全速離心 1 min (14000 rpm)		
13	萃取 DNA 煮沸 5 min 後，立刻置冰上 (pre-denature)，預備 LAMP 反應		
附註 事項			
報告日期			

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳菌核酸菌株抗原分析	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 380 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用特定基因放大技術經核酸定序，對百日咳 PCR 陽性之核酸和分離出之百日咳菌進行基因抗原分析。

## 2 適用檢體種類

適用於從病患已分離之培養菌和百日咳 PCR 陽性之核酸檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

百日咳菌具多形性的重要抗原基因型(*ptxA*、*prn*、*fim3*)分析，依基因具多形性的特定片段，選取適當引子進行 PCR 放大特定片段，產物經定序取得核酸序列資料，進行序列比對分型。

## 5 試劑耗材

5.1 分生用水。

5.2 HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN)或功能相同之分生混合試劑。

5.3 微量吸管尖 tip：無菌、需有 filter，需 1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、40  $\mu$ L 與 10  $\mu$ L 四種。

5.4 接種針（環）。

5.5 可拋棄式塑膠手套。

5.6 1.5 mL Eppendorf 無菌管。

5.7 TBE 緩衝液。

5.8 Ethidium bromide。

5.9 Primer

*ptxA* 基因引子序列 Sequence (5'-3')

S1F- TAGGCACCATCAAAACGCAG

S1R- TCAATTACCGGAGTTGGGCG

*prn* 基因引子序列 Sequence (5'-3')，AF/AR 放大 *prn* region1，BF/BR 放大 *prn* region2

AF-GCCAATGTCACGGTCCAA

AR-GCAAGGTGATCGACAGGG

BF-AGCTGGGCGGTTCAAGGT

BR-CCGGATTCAGGCGCAACTC

*fim3* 基因引子序列 Sequence (5'-3')

fim3F- CCCCCGGACCTGATATTCTGATG

fim3R- GCTGAGCGTGCTGAAGGACAAGAT

百日咳菌 *ptx* 啟動子(*ptxP*)基因型分析

*ptx* 啟動子基因(*ptxP*)引子序列 Sequence (5'-3')，

forward primer: AATCGTCCTGCTCAACCGCC

reverse primer: GGTATACGGTGGCGGGAGG

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 381 頁/共 1078 頁

百日咳菌核酸菌株抗原分析

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 生物安全櫃。
- 6.2 桌上型離心機。
- 6.3 4°C 冰箱。
- 6.4 -20°C 冷凍櫃。
- 6.5 電泳槽。
- 6.6 微量吸管 Pipetman：需 1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、2  $\mu$ L 等三種規格。
- 6.7 核酸增幅儀：Biometra。
- 6.8 DNA 電泳膠體觀察照相設備。

## 7 環境設施安全

- 7.1 菌株處理於於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 PCR 反應混和物配製、PCR 反應進行、電泳皆需於獨立區域操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體處理

分離的菌體：以 1  $\mu$ L 接種環挑取 1/2 Loop 的新鮮菌落，放入含 100  $\mu$ L 無菌水的 1.5 mL eppendorf 無菌管中，以 100°C 熱煮 10 min，放入離心機 5,000  $\times$  g (12,000 rpm) 離心 5 min，取上清液當作 Template。

百日咳 PCR 陽性之核酸：不需處理可直接當作 Template。

### 10.2 PCR

10.2.1 PCR 反應混和物配製如下：

Component	Final conc. or volume
Template	2 $\mu$ L
Each primer (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
HotStarTaq Master Mix	12.5 $\mu$ L
Total volume (加分生用水)	25 $\mu$ L

10.2.2 放入儀器中進行反應，反應條件設定：

*ptxA* (877bp)

95 °C/15 min, 1 cycle。

95 °C/30s, 61 °C/45s, 72 °C/60s, 27 cycles。

72 °C/10 min, 1 cycle。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 382 頁/共 1078 頁

百日咳菌核酸菌株抗原分析

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

*Prn* (585bp)

95 °C/15 min, 1 cycle。

95 °C/30s, 51 °C/60s, 72 °C/60s, 30 cycles。

72 °C/10 min, 1 cycle。

*fim3* (800bp)

95 °C/15 min, 1 cycle。

95 °C/30s, 62 °C/30s, 72 °C/60s, 30 cycles。

72 °C/10 min, 1 cycle。

*ptxP* (574bp)

95 °C/15 min, 1 cycle。

95 °C/30s, 60 °C/45s, 72 °C/60s, 30 cycles。

72 °C/10 min, 1 cycle。

10.3 PCR 電泳分析產物純度後送定序。

10.4 定序資料與標準序列比對。

## 11 結果判定

11.1 判讀標準：型別判定：完全符合標準序列，*ptxA1-5*, *prn1-11*, *fim3-1-3-5*, *ptxP1-11* 型。

11.2 報告核發：不需核發報告，僅提供防疫政策參考使用。

11.3 結果登錄：無。

11.3.1 結果的可報告區間：核酸序列完全符合。

11.3.2 緊急通報

無。

11.3.3 干擾因素

11.3.4 培養基上物質。

11.3.5 潛在變異的來源

11.3.6 環境中核酸污染。

11.3.7 檢驗性能之規格

## 12 品質管制


無

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液、及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C, 30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	百日咳菌核酸菌株抗原分析	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 383 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 14 參考資料

- 14.1 Mooi, F.R., et al., Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis*, 2009. 15(8): p. 1206-13
- 14.2 Mooi, F.R., et al., Epidemiological typing of Bordetella pertussis isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000. 19(3): p. 174-81.
- 14.3 Tsang, R.S., et al., Polymorphisms of the fimbria fim3 gene of Bordetella pertussis strains isolated in Canada. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(11): p. 5364-7.

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 384 頁/共 1078 頁

日本腦炎病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

檢測疑似病患的血液、腦脊髓液或組織中是否含有日本腦炎病毒。

## 2 適用檢體種類

適用於急性期發病病患七日內血液檢體、腦脊髓液或組織檢體。

## 3 名詞解釋

無

## 4 原理概述

利用白線斑蚊細胞株於細胞培養盤中接種病患血清、腦脊髓液或組織研磨液，於 28 °C 培養箱中培養 3 日，取其細胞於 24 孔玻璃片上，加入抗日本腦炎病毒抗體及螢光標記的山羊抗鼠抗體，於螢光顯微鏡下檢查，測定是否有日本腦炎病毒。

## 5 試劑耗材

- 5.1 RPMI 細胞培養液 (RPMI 1640, 含 1 %胎牛血清【FCS】及 1 %三合一抗生素【PSA】)(RPMI 1640 Biosource, USA, Cat. no. P102G-000) (FCS, fetal calf serum, Biologicals Industries, Israel, Cat. no. 04-001-1A) (Psa, pen-strep-Ampho Sol., Biological Industries, Israel, Cat. no. 03-003-1B)。
- 5.2 白線斑蚊細胞株 (C6/36, 前美國海軍醫院第二研究所)。
- 5.3 日本腦炎病毒 (北京疫苗株當控制組): 日本腦炎病毒以 C6/36 細胞培養 3 天, 取上清液, 當日本腦炎病毒來源。(PK-1)。
- 5.4 抗日本腦炎病毒單株抗體 (monoclonal antibody THI/JE/989, JCU Trorical Biotechnology Pty Ltd, Australia, Cat. no. 01-057-02)。
- 5.5 FITC-goat anti-mouse IgG (Zymed, USA, Cat. no. 62-6511)。
- 5.6 丙酮 (acetone, Merck, Germany, Cat. no. 1.00020)。
- 5.7 磷酸鹽緩衝液 (PBS, Biological Industries, Israel, Cat. no. 02-023-5A) 及水 (H<sub>2</sub>O)。
- 5.8 甘油緩衝液 (Merck, Germany, Cat. no. 1.04093)。
- 5.9 96 孔培養盤。
- 5.10 50 mL 的離心管。
- 5.11 24 孔玻璃片 (Cel-Line/Erie Scientific Co., USA, Cat. no. 10-342)。
- 5.12 蓋玻片。
- 5.13 無菌 250 μL、1250 μL 之吸管尖。

## 6 儀器設備

- 6.1 28 °C CO<sub>2</sub> 培養箱 (Astec, Japan, SCI-165DC)。
- 6.2 37 °C CO<sub>2</sub> 培養箱 (Sanyo, Japan, MCO-20AIC)。
- 6.3 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 6.4 螢光顯微鏡 (Zeiss, Germany, Axio Imager.A1)。
- 6.5 吹風機。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 385 頁/共 1078 頁

日本腦炎病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日


修訂日期： 年 月 日

- 6.6 5-40  $\mu\text{L}$  Pipette 及 40-200  $\mu\text{L}$  Pipette。
- 6.7  $-20^{\circ}\text{C}$  及  $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍櫃。
- 7 環境設施安全
  - 7.1 檢驗操作在生物安全第二等級負壓 (BSL-2 plus) 實驗室進行。
  - 7.2 水質： $25^{\circ}\text{C}$  蒸餾水或 RO 逆滲透離子可達  $18\text{ M}\Omega\text{-CM}$  以上超純水。
- 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
  - 10.1 在 96 孔細胞培養盤中將患者血清  $5\ \mu\text{L}$  以細胞培養液做 20、40、80、160 倍連續稀釋，每孔加入  $50\ \mu\text{L}$  之 2 倍細胞培養液連續稀釋血清。(在 96 孔組織培養盤中將患者腦脊髓液  $50\ \mu\text{L}$  以細胞培養液做 2、4、8、16 倍連續稀釋，每孔加入  $50\ \mu\text{L}$  之 2 倍細胞培養液連續稀釋腦脊髓液。) 每孔中再加入  $100\ \mu\text{L}$  C6/36 細胞懸浮液【培養 C6/36 cell 於 75T flask，加  $15\ \text{mL}$  培養液 (RPMI 1640，含 5% FCS 及 1% PSA) 培養約 3-4 天，以細胞刮杓刮下細胞→以血球計數器計算細胞數。配製成  $1 \times 10^6/\text{mL}$  細胞懸浮液】。
  - 10.2 置  $28^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培養箱培養 3 天。
  - 10.3 將每一孔中培養液移至另一無菌盤中，置於  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。
  - 10.4 取  $20\ \mu\text{L}$  PBS 刮下培養盤中之細胞，在 24 孔玻璃片上做抹片。
  - 10.5 於室溫中風乾後，置於  $-20^{\circ}\text{C}$  丙酮固定 10 min。
  - 10.6 取出 24 孔玻璃片陰乾。
  - 10.7 此檢體抹片可保存於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中或直接染色。
  - 10.8 在抹片上加上  $25\ \mu\text{L}$  抗日本腦炎病毒單株抗體。
  - 10.9 將抹片放置在潮濕的培養皿中，置於  $37^{\circ}\text{C}$  溫箱 30 min。
  - 10.10 將抹片取出並以磷酸鹽緩衝液 (換三次) 洗去多餘之抗體。
  - 10.11 以蒸餾水沖洗。
  - 10.12 在室溫中將玻璃片以冷風吹乾或陰乾。
  - 10.13 將抹片加上  $25\ \mu\text{L}$  螢光標記之山羊抗鼠抗體 (FITC-goat anti-mouse IgG)。
  - 10.14 重複 10.9 至 10.12。
  - 10.15 滴上甘油緩衝液，然後以蓋玻片覆蓋。
  - 10.16 以螢光顯微鏡檢查。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	日本腦炎病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 386 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

11.1.1 在螢光顯微鏡下將檢測檢體與 Positive control 及 Negative control 比對判讀。

11.1.2 當檢體呈現陽性時在螢光顯微鏡下可見黃綠色之細胞；當檢體呈現陰性時在螢光顯微鏡下無綠色細胞僅可見到細胞陰影。

11.2 報告核發：無，內部登錄處理。

11.3 結果登錄：無，內部登錄處理。

## 12 品質管制

12.1 嚴防病原散佈或污染，工作時帶手套。

12.2 實驗過程遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在 BSL-2 plus 實驗室內操作，以避免污染。

12.3 生物安全櫃及培養箱須定期進行校正及維護。

12.4 置於 37 °C 溫箱染色時應注意保持溼度。

12.5 C6/36 細胞培養溫度不可超過 32 °C。

12.6 必須要有未感染病毒之細胞及感染病毒之細胞分別做為陽性與陰性對照組。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序辦理。

## 14 參考資料

14.1 Igarashi A. 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. J Gen Virol 40: 531-534.

14.2 Wu YC. 1986. Epidemic dengue 2 on Liouchyou Shiang, Pingtung County in 1981. Chin J Microbiol Immunol 19: 27-35.

14.3 Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop Med Hyg 33: 158-165.

## 15 附錄

15.1 日本腦炎病毒分離與鑑定流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

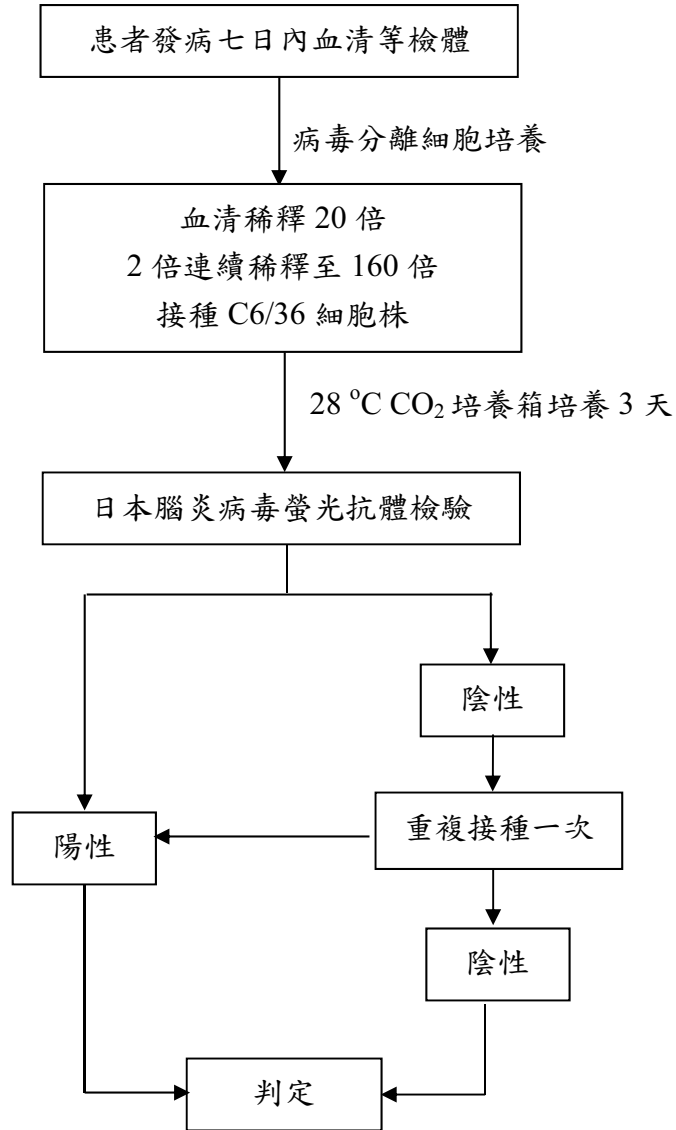
頁次：第 387 頁/共 1078 頁

日本腦炎病毒分離與鑑定

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 日本腦炎病毒分離與鑑定流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

日本腦炎病毒核酸檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 388 頁/共 1078 頁

(Real-time RT-PCR)

修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 分子診斷方法檢測疑似病患的腦脊髓液或血清檢體是否含有日本腦炎病毒核酸。

## 2 適用檢體種類

腦脊髓液或血清。

## 3 名詞解釋

Threshold cycle (Ct)：係指 PCR 產物複製的量，累積到足以被偵測到的第一個循環點稱之。換句話說，Ct 的值越小，表示檢體中初始 DNA/RNA 的含量越多。

## 4 原理概述

利用對日本腦炎病毒具有專一性之引子 (primers) 與檢體中之病毒核酸分子結合配對，並利用 RT-PCR 的複製過程及特殊的螢光定量化學方法偵測 RT-PCR 產物，以決定檢體中是否含有日本腦炎病毒核酸序列，所用之引子選自於日本腦炎病毒之保守性序列 (conserved sequences)。

## 5 試劑耗材

### 5.1 檢測試劑

5.1.1 病毒 RNA 萃取試劑套組。

5.1.2 SYBR green 定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應單步驟試劑套組。

### 5.2 耗材

5.2.1 檢體瓶。

5.2.2 無菌吸管。

5.2.3 定量 PCR 專用八連排反應管及蓋。

5.2.4 無菌過濾型 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L 吸管尖。

5.2.5 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.2.6 無粉手套。

## 6 儀器設備

6.1 第 II 級生物安全櫃。

6.2 即時多重定量 PCR 偵測系統。

6.3 10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、40  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L 微量滴管分注器。

6.4 高速離心機。

6.5 真空抽氣機。

6.6 冰箱：4  $^{\circ}$ C。


6.7 冷凍櫃：-20  $^{\circ}$ C。

6.8 高壓滅菌鍋。

## 7 環境設施安全

7.1 病人血清檢體應在第 II 級生物安全櫃 (BSL-2) 內處理。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	日本腦炎病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 389 頁/共 1078 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。
- 7.3 應有獨立的操作空間，盡量與操作 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

- 10.1.1 裝有靜脈血的無菌真空試管以 2,000 轉離心 10 分鐘，以無菌吸管將血清吸入檢體瓶內旋緊瓶蓋。
- 10.1.2 檢體瓶上標註檢體標號。
- 10.1.3 檢體處理好後置 2-8°C 冰箱冷藏。

### 10.2 步驟


- 10.2.1 萃取病毒 RNA，依據所使用試劑製造業者的操作手冊進行。
- 10.2.2 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應，取 5 µL RNA 做模板，加入漢他病毒專一性引子組（參考附錄 15.1），並依據所使用試劑製造業者的操作手冊，加入其他所需試劑，調整反應總體積至 25 µL。
- 10.2.3 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應程式設定：
- 10.2.3.1 RT 作用：50 °C，30 min。
- 10.2.3.2 Taq polymerase activation：95 °C，15 min。
- 10.2.3.3 Denaturation：95°C，15 sec。
- 10.2.3.4 Annealing：55 °C，30 sec。
- 10.2.3.5 Extension：72 °C，20 sec。
- 10.2.3.6 77 °C，30 sec，收集螢光值。
- 10.2.3.7 重複 10.2.3.3 至 10.2.3.6 步驟 45 Cycle。
- 10.2.4 Melting curve analysis：
- 10.2.4.1 95 °C，1 min。
- 10.2.4.2 以 0.2°C/秒速率降溫至 68°C，收集螢光值。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 陽性對照組的 Ct 值需小於或等於 30，Tm 值需大於或等於 79°C。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	日本腦炎病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 390 頁/共 1078 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 11.1.2 陰性對照組的  $C_t$  值需大於或等於 40， $T_m$  值需小於  $79^{\circ}\text{C}$ ， $C_t$  值或  $T_m$  值有一項符合上述要求即可。
- 11.1.3 陽性對照組或陰性對照組其中之一不符合設定值時，則重新實驗。
- 11.1.4 在陽性對照與陰性對照組符合設定值下， $C_t$  值小於 35、 $T_m$  值大於或等於  $79^{\circ}\text{C}$  者，判為日本腦炎病毒陽性，反之則判為日本腦炎病毒陰性。
- 11.2 報告核發
  - 11.2.1 日本腦炎病原體檢驗方法：螢光定量聚合酶-連鎖反應(real-time PCR)
  - 11.2.2 結果：陽性。
  - 11.2.3 結果：陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統(LIMS)之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。
- 12 品質管制
  - 12.1 每次進行實驗時皆有對照組，陽性對照組與陰性對照組的  $C_t$  值需符合設定值。
  - 12.2 實驗過程遵循標準檢驗方法的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。
  - 12.3 即時多重定量 PCR 偵測系統定時作檢測與校正。
  - 12.4 微量滴管分注器定期校正。
  - 12.5 注意試劑套組的使用期限與適當的儲放溫度。
- 13 廢棄物處理  
檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以  $121^{\circ}\text{C}$ ，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。
- 14 參考資料
  - 14.1 Jeong HS, Shin JH, Park YN, Choi JY, Kim YL, Kim BG, Ryu SR, Baek SY, Lee SH, Park SN. 2003. Development of real-time RT-PCR for evaluation of JEV clearance during purification of HPV type 16 L1 virus-like particles. *Biologicals* 31: 223-229。
- 15 附錄
  - 15.1 日本腦炎病毒診斷用引子組序列表。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 391 頁/共 1078 頁

日本腦炎病毒核酸檢測  
(Real-time RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日


## 附錄 15.1 日本腦炎病毒診斷用引子組序列表

---

<u>Japanese encephalitis virus specific primer</u>	<u>參與反應的濃度</u>
JE3F1 CCC TCA GAA CCG TCT CGG AA	200nM
JE3R1 CTA TTC CCA GGT GTC AAT ATG CTG T	200nM


---

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 392 頁/共 1078 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
登革病毒及日本腦炎病毒 IgM 和 IgG 抗體檢測。
- 2 適用檢體種類  
適用於人體血清或腦脊髓液之檢體。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
利用 Capture IgM 與 IgG 酵素免疫分析法,測定病人血清或腦脊髓液中之登革熱或日本腦炎特異性抗體。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 Dilution buffer: Casein blocking buffer (Sigma, Product no. C7594, USA) + 2.5 % Normal rabbit serum+ 4% Normal goat serum + 0.05 % Tween-20, pH 7.2。
  - 5.2 Washing buffer (1.5X PBS+0.05 % Tween-20, pH 7.2)。
  - 5.3 Human positive and negative control sera
    - 5.3.1 Dengue primary positive control(以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
    - 5.3.2 Dengue secondary positive control (以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
    - 5.3.3 JE positive control (以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
    - 5.3.4 Negative control (以 dilution buffer 1:100 稀釋)。
  - 5.4 去活化病毒細胞培養液(病毒經 C6/36 細胞培養 5-7 天,收集上清液,經 UV 照射 1 hr,分裝後保存於-80 °C 冷凍櫃)
    - 5.4.1 DENV-1, strain 8700828。
    - 5.4.2 DENV-2, strain 454009。
    - 5.4.3 DENV-3, strain 8700829。
    - 5.4.4 DENV-4, strain 8700544。
    - 5.4.5 JEV, strain JaGAR。
  - 5.5 含抗黃病毒屬外套抗原(envelope)單株抗體之小鼠腹水(Glyconex, Cat. no. FL0232, Taiwan)。
    - 5.5.1 以 Protein A/G 管柱,經親合性純化後之抗黃病毒屬外套抗原(envelope)單株抗體(抗體名稱為 D56.3);該 D56.3 抗體可逕與 Innova Biosciences 公司生產之 Lightning-Link Alkaline Phosphatase kit 反應,以製備抗黃病毒屬外套抗原單株抗體-鹼性磷酸酶結合體(簡稱 D56.3-AP)。
  - 5.6 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體。(goat anti-mouse IgG-AP conjugate, Jackson, Code no. 115-006-071, USA)
  - 5.7 Substrate reagent, p-Nitrophenyl-phosphate(p-NPP)(Chemicon, USA, Cat. no. ES009-500mL)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒、日本腦炎病毒IgM及IgG	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 393 頁/共 1078 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 5.8 96 孔微量滴定盤
  - 5.8.1 Anti-human IgM 真空乾燥盤 (ELISA plate coated with goat anti-human IgM)。
  - 5.8.2 Anti-human IgG 真空乾燥盤 (ELISA plate coated with goat anti-human IgG)。
- 5.9 八連排稀釋管。
- 5.10 丟棄式 250  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L 吸管尖。
- 5.11 手套。
  
- 6 儀器設備
  - 6.1 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC)。
  - 6.2 全自動酵素免疫分析儀 (Tecan, Genesis workstation 150, Germany)。
  - 6.3 微量滴管分注器 2  $\mu$ L、20  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L (pipettors)。
  - 6.4 震盪器。
  - 6.5 冰箱：4  $^{\circ}$ C。
  - 6.6 冷凍櫃：-20  $^{\circ}$ C。
  - 6.7 高壓滅菌鍋。
  
- 7 環境設施安全
  - 7.1 病人血清檢體應在第 II 級生物安全櫃內處理。
  - 7.2 檢驗操作在生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行。
  
- 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
  
- 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
  
- 10 檢驗步驟
  - 10.1 檢體編號登錄。
  - 10.2 檢體量須大於 0.5 mL。
  - 10.3 四型登革病毒細胞培養液 (DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4) 分別以 Dilution buffer 四倍稀釋，各取等量混合後，以 1：1,000 之稀釋比例，加入含抗黃病毒屬外套抗原 (envelope) 單株抗體之小鼠腹水 FL0232 (登革熱病毒加偵測腹水混合液)。另日本腦炎病毒細胞培養液以 Dilution buffer 四倍稀釋後，以 1：1,000 之稀釋比例，加入含抗黃病毒屬外套抗原 (envelope) 單株抗體之小鼠腹水 FL0232 (日本腦炎病毒加偵測腹水混合液)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

登革病毒、日本腦炎病毒IgM及IgG

核准日期： 年 月 日

頁次：第 394 頁/共 1078 頁

抗體檢測 (ELISA)

修訂日期： 年 月 日

- 10.3.1 D56.3-AP (5.5.1) 與病毒稀釋液以 1:2,000 比例混合，即可配製登革熱病毒加偵測抗體混合液及日本腦炎病毒加偵測抗體混合液，以此混合液進行測定，則可省略步驟 10.4、10.10 及 10.11。
- 10.4 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體以 Dilution buffer 1：4000 稀釋。
- 10.5 取待測血清 7  $\mu$ L 加入 Dilution buffer 0.7 mL 稀釋 100 倍。若是腦脊髓液檢體，則取 70  $\mu$ L 加入 Dilution buffer 0.7 mL 稀釋 11 倍。
- 10.6 取 0.1 mL 待測血清(步驟 10.5)及陰性、陽性對照血清(試劑耗材 5.3)，加入 anti-human IgM 及 anti-human IgG 之 96 孔真空乾燥盤。
- 10.7 置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.8 取 0.1 mL 登革熱病毒加偵測腹水混合液及日本腦炎病毒加偵測腹水混合液(步驟 10.3) 分別加入 96 孔真空乾燥盤。
- 10.9 置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.10 取 0.1 mL 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體稀釋液(步驟 10.4) 加入 96 孔真空乾燥盤。
- 10.11 置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。
- 10.12 取 0.1 mL/孔 呈色劑 (p-NPP) 加入 96 孔微量滴定盤中呈色。
- 10.13 置於 37°C 溫箱，搖盪 40 min。
- 10.14 置微量滴定盤於酵素免疫分析儀裡，以雙波長 405、630 nm 測定吸光度 (OD<sub>405-630</sub>)。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準


- 11.1.1 若血清檢體之登革病毒特異性 IgM 抗體之 OD 值大於 0.5，且登革病毒 IgM OD 值/日本腦炎病毒 IgM OD 值大於或等於 2，判為登革熱 IgM 陽性。
- 11.1.2 若血清檢體之登革病毒特異性 IgG 抗體之 OD 值大於 0.5，判為登革熱 IgG 陽性。
- 11.1.3 Dengue primary positive control 應符合 IgM OD 值 > 1.5，IgG OD 值 > 0.5。
- 11.1.4 Dengue secondary positive control 應符合 IgM OD 值 > 0.5，IgG OD 值 > 1.5。
- 11.1.5 JE positive control 應符合 IgM OD 值 > 1.5，IgG OD 值 > 1.5。
- 11.1.6 JE negative control 應符合 IgM OD 值 < 0.2，IgG OD 值 < 0.2。

### 11.2 報告核發：

- 11.2.1 檢驗方法：IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)
- 11.2.2 結果：陽性。
- 11.2.3 結果：陰性。

- 11.3 結果登錄：將檢體檢驗數據結果登錄於檢驗紀錄表，送請實驗室主管檢討確認，再依實驗室資訊管理系統 (LIMS) 之操作步驟，將檢驗結果登錄於系統，陳送指定之實驗室主管審核複校，發出正式檢測報告。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 395 頁/共 1078 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 12 品質管制

- 12.1 應於有效期內使用，同一批號試劑，第一次使用時取一組進行試驗，之後每隔 3 - 6 個月再取一組進行試驗。
- 12.2 每次檢驗應加入陽性及陰性控制組血清。
- 12.3 遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在個別獨立的操作空間內操作，以避免污染。
- 12.4 微量滴管分注器定時做校正。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. Clin. Diagnos Lab Immunol 10: 622-630.
- 14.2 Monath TP, Nystrom RR, Bailey RE, Calisher CH, Muth DJ. 1984. Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of St. Louis encephalitis. J Clin Microbiol 20: 784-790。
- 14.3 Innis BL, Nissalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, puttisri P, Hoke CH. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. Am J Trop Med Hyg 40: 418-427。

## 15 附錄

登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG 抗體試驗 (酵素免疫分析法) 流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG

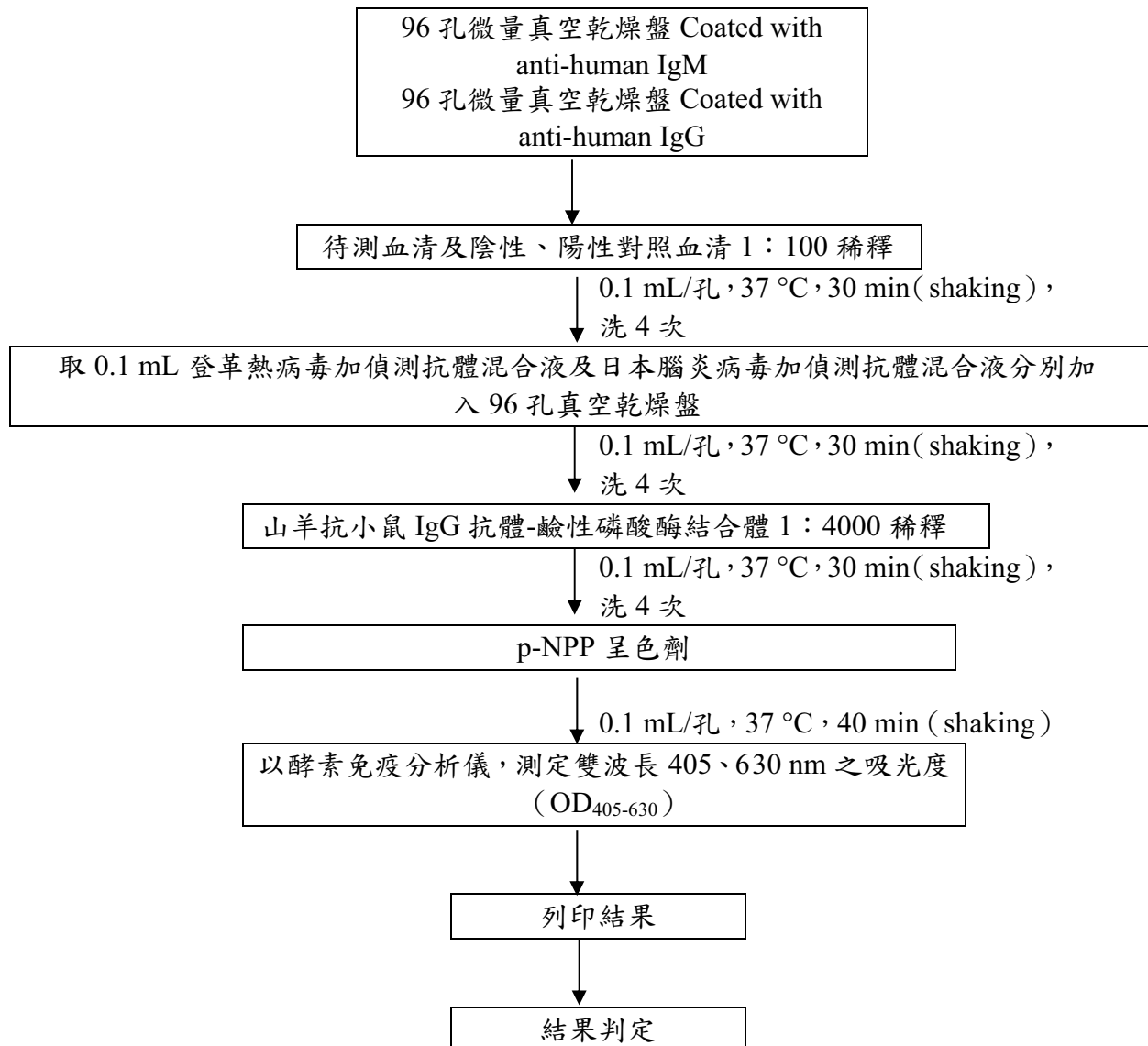
核准日期： 年 月 日

頁次：第 396 頁/共 1078 頁


抗體檢測 (ELISA)

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG 抗體試驗 (酵素免疫分析法) 流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群培養	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 397 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

檢測檢體中是否含有分枝桿菌屬。

## 2 適用檢體種類

適用於人體之痰液、尿液、體液（含腦脊髓液、胸水、腹膜液）、血液、腦脊髓液、胃抽出液、組織及糞便等。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用分枝桿菌屬細胞壁具有抗酸、鹼的性質，使用 NaOH 鹼性溶液作用於非經無菌技術採集之檢體（痰液、糞便等）前處理，然後接種於內含孔雀綠（malachite green）及各種抗生素之蛋基及瓊脂培養基，以抑制檢體中非分枝桿菌屬的生長，另外加入 N-acetyl-L-cystein（NALC）作為消化劑，促使檢體液化，而成功分離出檢體中之分枝桿菌屬。

## 5 試劑耗材

### 5.1 試劑

#### 5.1.1 NaOH—sodium citrate。

5.1.1.1 取 NaOH 4 g 加入 100 mL 蒸餾水配製備用。

5.1.1.2 取 2.6 g sodium citrate anhydrate 加入 100 mL 蒸餾水配製備用。

5.1.1.3 將 5.1.1.1 及 5.1.1.2 混合後高溫高壓蒸氣滅菌，保存於 2 - 8 °C，效期 6 個月。

5.1.1.4 NALC—NaOH：取 0.25 g NALC（如有需要時呈比例增加），加 50 mL 5.1.1.3。此試劑效期 24 小時。

#### 5.1.2 phosphate buffer。

5.1.2.1 取 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 94.7 g 加入 1,000 mL 蒸餾水配製備用。

5.1.2.2 取 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 90.7 g 加入 1,000 mL 蒸餾水配製備用。

5.1.2.3 將 5.1.2.1 及 5.1.2.2 混合後以蒸餾水稀釋 10 倍為 pH 6.8，高溫高壓蒸氣滅菌，保存於 2 - 8 °C，效期 1 年。

5.1.3 BACTEC<sup>TM</sup>MGIT<sup>TM</sup>960 試劑：PANTA，OADC 各一瓶混合備用（拆封混合後保存於 4 °C 冰箱效期 5 天，瓶口邊緣避免污染）。

#### 5.1.4 培養基。

5.1.4.1 Middlebrook 7H11 培養基。

5.1.4.2 selective Middlebrook 7H11（Mitchison's）選擇性培養基。

5.1.4.3 Lowenstein—Jensen（LJ）斜面培養基。

5.1.4.4 BACTEC<sup>TM</sup>MGIT<sup>TM</sup>960 培養管。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 398 頁/共 1078 頁

結核菌群培養

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 5.2 耗材
  - 5.2.1 50 mL 無菌離心管。
  - 5.2.2 無菌吸管。
  - 5.2.3 廢液瓶。
  - 5.2.4 標籤。
  - 5.2.5 10% 滴露液配製使用效期為一週。
  - 5.2.6 70% 酒精。
  - 5.2.7 紗布。
  - 5.2.8 抗污染紙墊。
  - 5.2.9 鉛筆。
  - 5.2.10 玻片。
  - 5.2.11 染色液。
  - 5.2.12 消毒袋 (Biohazard bag)。
- 6 儀器設備
  - 6.1 震盪器。
  - 6.2 35 °C - 37 °C，5 % - 10 % CO<sub>2</sub> 溫箱。
  - 6.3 低溫離心機，離心力 (RCF) 至少可達到 3,000 × g，附有轉子保護蓋。
  - 6.4 第二級生物安全櫃。
  - 6.5 微量電子天秤。
  - 6.6 BACTEC<sup>TM</sup>MGIT<sup>TM</sup>960 系統 (Becton, Dickinson and Company; 美國)。
- 7 環境設施安全
  - 7.1 實驗應於生物安全第二等級以上之負壓實驗室中進行。
  - 7.2 檢體前處理與接種必須於生物安全櫃中進行。
  - 7.3 實驗人員需穿戴 N95 口罩、實驗防護衣及雙層手套、遮蔽頭髮之髮帽及鞋套。
  - 7.4 實驗完畢須在生物安全櫃中噴灑消毒劑，於 10 分鐘之後擦拭並打開紫外線燈以維護生物安全櫃之潔淨。
- 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 399 頁/共 1078 頁

結核菌群培養

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體處理

#### 10.1.1 痰液

- 10.1.1.1 以無菌滴管吸取 3 - 5 mL 痰液至 50 mL 離心管。
- 10.1.1.2 加等量的無菌 NALC—NaOH(5.1.1)液化痰液。
- 10.1.1.3 振盪器振盪約 15 - 20 秒。
- 10.1.1.4 室溫靜置 15 分鐘。
- 10.1.1.5 加無菌 phosphate buffer 至 40 mL 刻度處，鎖緊蓋子。
- 10.1.1.6 以 3,000 × g 離心 15 分鐘，將上清液倒入廢液桶。
- 10.1.1.7 添加 2 mL phosphate buffer 以中和酸鹼值，準備接種。

#### 10.1.2 胃抽出液

- 10.1.2.1 經採得的胃抽出液應於 4 小時內處理完畢。
- 10.1.2.2 若檢體呈水樣，直接依步驟 10.1.2.4 處理。
- 10.1.2.3 若檢體呈黏液狀，每 50 mL 檢體加入約 50 -100 mg NALC 粉末後，混合均勻。
- 10.1.2.4 3,000 × g 離心，15 分鐘。
- 10.1.2.5 離心完成後，倒掉上清液，加入 2 - 5 mL 無菌蒸餾水做成懸浮液。
- 10.1.2.6 再加入等量 NALC—NaOH 溶液，如痰液檢體的處理方式。

#### 10.1.3 組織檢體的處理

- 10.1.3.1 將組織檢體移入無菌組織研磨器，加入適量無菌含 0.2 % 牛蛋白血清 (bovine albumin) 的生理食鹽水，均勻研磨使組織均質化，若組織檢體含黏液質，可加入一匙 NALC 均勻研磨使組織均質化。
- 10.1.3.2 若組織檢體為經無菌技術採得，可將經均質化的檢體直接接種入液體培養基及固體培養基 (如 10.2)。

#### 10.1.4 胸水

- 10.1.4.1 胸水以 3,000 × g 離心 15 分鐘，倒掉上清液。
- 10.1.4.2 取沈澱物進行接種。
- 10.1.4.3 若懷疑有雜菌污染，則依痰液檢體的處理方式。

#### 10.1.5 尿液

- 10.1.5.1 緩慢加入 10 % CaCl<sub>2</sub> 至沉澱物形成。
- 10.1.5.2 以 3,000 × g 離心 30 分鐘，倒掉上清液，再依痰液檢體的處理方式。

#### 10.1.6 腦脊髓液

- 以 3,000 × g 離心 15 分鐘，倒掉上清液，取沈澱物進行接種及塗片檢查。如果檢體量少，則可直接至 10.2 接種。

#### 10.1.7 氣管鏡的檢體

- 沖洗液前處理法與痰液檢體的處理方式相同。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 400 頁/共 1078 頁

結核菌群培養

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 10.1.8 血液

10.1.8.1 抽取病人血液 8 - 10 mL，置於 50 mL 含 Tween80 的液體培養基（如：Middlebrook 7H9 broth）。

10.1.8.2 35 °C-37 °C 培養箱。於暗處培養（可以將試管以鋁箔紙包覆），每日須搖動一次使其混合。

10.1.8.3 每週以無菌技術吸取液體培養基，做成抹片進行抗酸菌染色鏡檢。

10.1.8.4 若為抗酸菌則再將培養液至 10.2 步驟接種。

## 10.1.9 糞便

取適量檢體加 7H9 both 做成懸浮液，再依痰液檢體處理。

## 10.1.10 拭子

浸泡於 7H9 broth 的拭子先用振盪器振盪，吸取液體至 50 mL 離心管，再依痰液檢體處理。

## 10.2 接種

10.2.1 取 1 支 MGIT™960 培養管添加 5.1.3 之 PANTA 與 OADC 混合液 0.8 mL，以無菌吸管取處理好的檢體 0.5 mL 接種，培養於 BACTEC™MGIT™960 系統。

10.2.2 以無菌吸管吸取處理好的檢體 3 滴接種於 LJ 斜面培養基及 1 滴到 7H11 培養基，非經由無菌技術採集或因採集過程有污染到人體常在菌的檢體(如痰液、糞便等)，需再加種 7H11 選擇性培養基，均勻塗開檢體，置入溫箱培養。

## 10.3 培養

10.3.1 LJ 斜面培養基、7H11 培養基及 7H11 選擇性培養基置於 35 °C - 37 °C，5 % - 10 % CO<sub>2</sub> 溫箱，LJ 斜面培養基須鬆蓋傾斜置放，24 小時後再將蓋子鎖緊，垂直放置。

10.3.2 MGIT™960 培養管培養於 BACTEC™MGIT™960 系統，機器設定 35-37 °C，42 天。

## 10.4 觀察

10.4.1 培養判讀：第一週需每天判讀，第二至第八週則每週判讀一次。

10.4.2 第一週每天判讀如發現 7H11 培養基及 LJ 斜面培養基上有菌落出現，須挑取菌落做成抹片，進行抗酸菌染色鏡檢。

10.4.3 BACTEC™MGIT™960 系統機器自動判讀至 42 天。

## 11 結果判定

### 1.1 判讀方式

11.1.1 分枝桿菌屬培養陽性：培養陽性菌落染色結果為抗酸菌則可先發初步培養陽性之報告。將陽性培養基留下，做後續鑑定與抗藥用。

11.1.2 分枝桿菌屬培養陰性：培養第八週仍無菌落，則發培養陰性報告。

11.1.3 BACTEC™MGIT™960 系統機器顯示陽性時，取出培養管，吸取培養液做抹片及抗酸性染色鏡檢，如 11.1.1 及 11.1.4 判定方式。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 401 頁/共 1078 頁

結核菌群培養

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

11.1.4 污染：若染色結果為非分枝桿菌屬，而是其它細菌或黴菌則登記污染並將培養基丟棄。

## 11.2 報告核發

11.2.1 分枝桿菌屬培養陽性。

11.2.2 分枝桿菌屬培養陰性。

11.2.3 污染。

11.3 結果登錄：登錄於本署實驗室資訊管理系統，TB 功能>TB 檢驗報告查詢，進行檢驗結果登入及在綜合研判頁面點選核發報告。

## 12 品質管制

12.1 商品化的培養基每一批號均附有廠商出廠時的品管文件，培養基應在效期內使用。

12.2 品管執行：每一批號均要執行。

12.2.1 接種：製備 0.5 McFarland 品管菌株之菌液，吸取 10  $\mu$ L 接種，置入 35  $^{\circ}$ C - 37  $^{\circ}$ C，5% - 10% CO<sub>2</sub> 溫箱培養 21 天。

12.2.2 品管菌株及結果判讀

### 陽性品管

### 品管結果

*M. tuberculosis* ATCC 25177

有生長菌落

*M. kansasii* ATCC 12478

有生長菌落

*M. scrofulaceum* ATCC 19981

有生長菌落

*M. intracellulare* ATCC 35763

有生長菌落

*M. fortuitum* ATCC 6841

有生長菌落

### 陰性品管（使用於選擇性培養基）

### 品管結果

*E. coli* ATCC 25922

少量或無生長菌落

12.3 所有品管結果及矯正措施應詳實記錄，並交給實驗室主管定期審核。

12.4 自行配製的培養基每批號要加做無菌試驗，取 1 - 3% 已配置完成的培養基，置入溫箱培養 48 小時，結果應無任何菌落生長。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121  $^{\circ}$ C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 行政院衛生署疾管局，結核菌檢驗手冊，第二版，2004。

14.2 Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333, Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A guide for the level II Laboratory, 1981.

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 402 頁/共 1078 頁

結核菌群培養

核准日期： 年 月 日


修訂日期： 年 月 日

- 14.3 A minimum 5.0 mL of sputum improves the sensitive of acid-fast smear for *Mycobacterium tuberculosis*, John R. W. et., Am J Respir Crit Care Med., Vol 161 pp 1559-1562, 2000.
- 14.4 Clinical Microbiology Procedures Handbook, Henry D. Isenberg, Vol2, section 7.3.1, 2004.
- 14.5 Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 18<sup>th</sup> edition, pp 1074-1092, 1991.
- 14.6 行政院衛生署疾管局，防疫檢體採檢手冊，第二版，2005。

## 15 附錄


- 15.1 檢體應於未開始治療前即予採檢。因為即使僅是數日的藥物治療仍可能殺死或抑制足夠量的抗酸菌，使細菌無法培養出來，而影響診斷的正確性。
- 15.2 應將檢體收集於清潔、滅菌的容器或單次用的無菌塑膠容器。
- 15.3 分枝桿菌屬培養污染率在 LJ 培養基應控制在 3% - 5%，檢體過度處理時容易殺死過多待分離的分枝桿菌屬，污染率會下降；若檢體前處理不足，則無法有效抑制非分枝桿菌屬的生長，污染率上昇。當污染率明顯變化時，應對整個處理流程進行檢討，若需修正時，應先改變 NaOH 的濃度而不應改變消化去污染的時間。
- 15.4 實驗室安全其他注意事項。
  - 15.4.1 檢體處理過程都必須小心，避免產生氣霧及濺出及打翻任何檢體容器。
  - 15.4.2 若有打翻及濺出情形發生，須馬上用 10% 滴露液 (Dettol) 沾濕紗布覆蓋後，以紫外線照射 1 小時才可繼續操作。平板培養皿應以透明塑膠套袋包裝，熱封口機封口固定，以免打翻菌株造成實驗室環境污染。
  - 15.4.3 廢液桶內也要加 10% 滴露液，再經高壓消毒後丟棄。
  - 15.4.4 檢驗人員進出生物安全第二等級負壓實驗室需登記姓名、進出時間及記錄每室負壓值、溫度、溼度等。
  - 15.4.5 操作前後需用 5% 來舒液擦拭生物安全櫃。
  - 15.4.6 於生物安全第二等級負壓實驗室使用過的試管架、空試藥瓶需經過高壓消毒後再清洗。
  - 15.4.7 生物安全櫃需登記使用時間、使用人姓名與紫外線使用時數。
  - 15.4.8 日光燈及紫外線燈管，需每週擦拭表面灰塵。
  - 15.4.9 離開生物安全第二等級負壓實驗室時需在前室將防護衣、N95 口罩、雙層手套、鞋套等脫掉經高壓消毒處理、再以消毒液將手清洗乾淨再離開實驗室。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

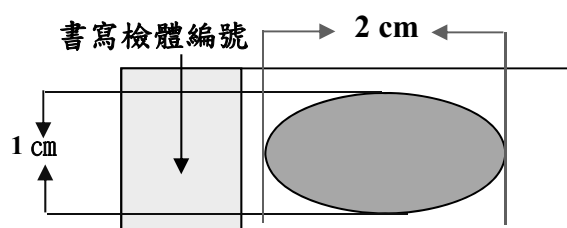
	編號：	分枝桿菌屬鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 403 頁/共 1078 頁	(抗酸性抹片鏡檢法)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
利用此項檢查偵測檢體中是否含有分枝桿菌屬。
- 2 適用檢體種類  
適用於人體之痰液、尿液、體液（含腦脊髓液、胸水、腹膜液）、腦脊髓液、胃抽出液、組織等。
- 3 名詞解釋：  
無。
- 4 原理概述  
利用分枝桿菌細胞壁含 mycolic acid 具有抗酸（acid-fast）的性質，一旦染上 aniline dye 或 basic fuchsin，則很難被酸酒精脫色。
- 5 試劑耗材：
  - 5.1 顯微鏡、拭鏡紙、油鏡油、70 %酒精棉。
  - 5.2 玻片、竹籤或白金耳、標籤，紙和筆。
  - 5.3 蒸餾水、酒精燈及酒精、打火機。
  - 5.4 10% 滴露液（Dettol），配製使用效期為一週、70 %酒精、紗布、無菌吸管、濾紙及抗污染紙墊。
  - 5.5 垃圾袋。
  - 5.6 Ziehl-Neelsen（ZN）染色液：
    - 5.6.1 carbol fuchsin：取 0.3 g basic fuchsin 溶於 10 mL 95 % ethanol，再加入 5 mL phenol 和 95 mL H<sub>2</sub>O，使用前，染色劑必須過濾，試劑保存於褐色瓶，室溫，避免日光直接照射，效期 1 年。
    - 5.6.2 酸性酒精：取 3 mL HCl 加入 97 mL 95 % ethanol，試劑保存於褐色瓶，室溫，避免日光直接照射，效期 1 年。
    - 5.6.3 甲基藍染色液：取 0.3 g methylene blue 加 100 mL 蒸餾水，試劑保存於褐色瓶，室溫，避免日光直接照射，效期 1 年。
  - 5.7 auramine O-rhodamine B-phenol 螢光染色液：
    - 5.7.1 取 1.5 g auramine O, 0.75 g rhodamine B 溶解於 75 mL glycerol。
    - 5.7.2 取 10 mL phenol 溶液加入 50 mL 蒸餾水的溶液。
    - 5.7.3 混合 5.7.1 及 5.7.2，用磁棒混合 24 小時，經玻璃絨（glass wool）過濾，試劑保存於褐色瓶置於避光處（例如瓦楞紙箱內），室溫，效期 3 個月。
    - 5.7.4 酸性酒精：取 0.5 mL HCl 加入 100 mL 70 %乙醇中，試劑保存於褐色瓶，室溫，避免日光直接照射，效期 1 年。
    - 5.7.5 高錳酸鉀溶液：取 0.5 g KMnO<sub>4</sub> 溶解於 100 mL 蒸餾水，試劑保存於褐色瓶，室溫，避免日光直接照射，效期 1 年。
- 6 儀器設備
  - 6.1 電子加熱板。


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	分枝桿菌屬鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 404 頁/共 1078 頁	(抗酸性抹片鏡檢法)	修訂日期： 年 月 日

- 6.2 第二級生物安全櫃。
  - 6.3 明視野顯微鏡及螢光顯微鏡。
  - 6.4 低溫離心機，離心力 (RCF) 至少可達到  $3,000 \times g$ ，附有轉子保護蓋。
- 7 環境設施安全
- 7.1 實驗應於生物安全第二等級以上之負壓實驗室中進行。
  - 7.2 實驗人員需穿戴實驗防護衣及手套。
  - 7.3 實驗完畢須在生物安全櫃中噴灑消毒劑，於 10 分鐘之後擦拭並打開紫外線燈以維護生物安全櫃之安全。
- 8 檢體採集
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
- 10.1 痰檢體
    - 10.1.1 濃縮法：
      - 10.1.1.1 以無菌滴管吸取 3 - 5 mL 痰液至 50 mL 離心管。
      - 10.1.1.2 加等量的無菌 NALC - NaOH 液化痰液。
      - 10.1.1.3 振盪器振盪約 15 - 20 秒。
      - 10.1.1.4 室溫靜置 15 分鐘。
      - 10.1.1.5 加無菌 phosphate buffer 至 40 mL 刻度處，蓋緊蓋子。
      - 10.1.1.6 以  $3,000 \times g$  離心 15 分鐘，將上清液倒入廢液桶。
      - 10.1.1.7 以無菌吸管取 1 滴 10.1.1.6 的檢體作成抹片 (1 X 2 cm)，風乾，使用酒精燈或電子加熱板熱固定後，再用螢光染色。陽性再染 ZN 確認，或熱固定後直接做 ZN 染色。
    - 10.1.2 直接法：用竹籤或白金耳取具有黏稠性，或膿性之痰液放於玻片中央輕輕的往外旋轉使成均勻薄面，不可太厚，然後把塗有痰的玻面朝上迅速通過藍色燄心四至五次，每次約 5 秒，固定做成標本。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	分枝桿菌屬鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 405 頁/共 1078 頁	(抗酸性抹片鏡檢法)	修訂日期： 年 月 日

## 10.2 其他檢體：

### 10.2.1 胸水

10.2.1.1 胸水以 3,000 × g 離心 15 分鐘，倒掉上清液。

10.2.1.2 取沈澱物進行塗片檢查。

10.2.1.3 需培養的檢體若懷疑有雜菌污染，則依痰檢體的離心法處理後再進行塗片檢查。

### 10.2.2 腦脊髓液：

以 3,000 × g 離心 15 分鐘，倒掉上清液，取沈澱物進行塗片檢查。

10.2.3 氣管鏡的檢體：將沖洗液移至 50 mL 離心管，需培養的檢體依痰檢體做前處理後再取沈澱物進行塗片檢查。

## 10.3 Zieh-Neelsen (ZN) 染色法 (加熱法)

10.3.1 將抹片放在染色架上，再將 carbolfuchsin 經濾紙過濾滴到抹片上至完全覆蓋，用酒精燈加熱至冒蒸氣的程度。

10.3.2 放置 5 分鐘後，捨棄染色液，以水沖洗。

10.3.3 注入 3 % 酸性酒精，進行脫色 3 分鐘，如有脫色不完全，則再以 3 % 酸性酒精脫色至肉眼判定為無色止，再以水沖洗。

10.3.4 以 0.3 % Methylene blue 液染色 10 - 20 秒。

10.3.5 水洗後，自然乾燥或以全新的濾紙吸取水氣，於顯微鏡下用 1,000 倍油鏡鏡檢。分枝桿菌屬為紅色，背景為藍色。觀察塗片採用的順序橫掃三次或直掃九次，通常橫掃一次可看約 100 個視野，至少要觀察 300 個視野才能發陰性報告

## 10.4 螢光染色法：

10.4.1 加入螢光染劑，覆蓋整個抹片，靜置 15 分鐘。(不必加濾紙片，不必加熱)。

10.4.2 以蒸餾水或去離子水沖洗。

10.4.3 加入 0.5 % 酸性酒精覆蓋整個抹片脫色約 2 分鐘。

10.4.4 以水沖洗抹片。

10.4.5 加入高錳酸鉀溶液，覆蓋整個抹片背景染色約 2 分鐘。時間不能過長。

10.4.6 以水沖洗抹片，置於空氣中乾燥。

10.4.7 儘速以螢光顯微鏡鏡檢。auramine O-rhodamine B-phenol 染色，分枝桿菌為橘紅色，高錳酸鉀溶液複染背景為黑色。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀方式

判讀依據美國胸腔學會標準 (Am. Rev. Resp. Dis., 123:343,1981)

ZN 染色 X1,000	Auramine-rhodamine 染色		報告方式
	X250	X450	
0	0	0	No AFB seen
1-2/300 fields	1-2/30 fields	2-4/150 fields	Scanty, 建議重檢

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 406 頁/共 1078 頁

分枝桿菌屬鑑定  
(抗酸性抹片鏡檢法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

1-9/100 fields	1-9/10 fields	2-18/50 fields	1+
1-9/10 fields	1-9/field	4-36/10 fields	2+
1-9/field	10-90/field	4-36/field	3+
>9/field	>90/field	>36/field	4+

11.2 報告核發：依照 11.1 報告方式，核發 No AFB seen；Scanty；1+；2+；3+；4+。

11.3 結果登錄：登錄於本署實驗室資訊管理系統，TB 功能>TB 檢驗報告查詢，進行檢驗結果登入及在綜合研判頁面點選核發報告。

## 12 品質管制

12.1 每次進行染色時均需一組陽性及陰性對照組。

12.2 品管菌株及結果判讀：

陽性品管：H37Rv-fully susceptible (ATCC 27294)。

陰性品管：*E. coli* (ATCC 25922)

抗酸菌型態在 ZN 染色鏡檢為紅色，背景為藍色；螢光染色鏡檢為橘紅色，背景為黑色。陰性品管則均只能看到背景染色的顏色。

12.3 染色劑應在效期內使用。

12.4 所有品管結果及矯正措施應詳實記錄，並交給實驗室負責人定期審核。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 疾管局結核菌檢驗手冊再版，93 年。

14.2 Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333, Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis* : A guide for the level II Laboratory, 1981.

14.3 A minimum 5.0 mL of sputum improves the sensitive of acid-fast smear for *Mycobacterium tuberculosis*, John R. W. et., Am J Respir Crit Care Med., Vol 161 pp 1559-1562, 2000.

14.4 Clinical Microbiology Procedures Handbook, Henry D. Isenberg, Vol2, section 7.2, 2004.

14.5 Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 18<sup>th</sup> edition, pp 1074-1092, 1991.

## 15 附錄


注意事項：

15.1 玻片放於染色架上、染色時玻片與玻片要有間距，退染須退乾淨以免觀察困難判斷錯誤。

15.2 Saprophytic mycobacteria 在自然界裡到處都有，自來水裡也有分布，其染色性質也不易被酸脫去。所以為了避免偽陽性，必須使用新的容器，




## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	分枝桿菌屬鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 407 頁/共 1078 頁	(抗酸性抹片鏡檢法)	修訂日期： 年 月 日

而試劑的製備必須使用新鮮蒸餾水。

- 15.3 抹片不可太厚及太薄，一張玻片只能用於一個檢體。
- 15.4 如進行濃縮法抹片，為確保所使用的試劑無污染之虞，建議增加試劑無菌對照組，即從試劑加入離心管開始至抹片及培養之所有流程，結果應為陰性。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 408 頁/共 1078 頁	(生化)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用生物化學反應，鑑定陽性培養菌株是否為結核桿菌群 (*Mycobacterium tuberculosis complex*)。

## 2 適用檢體種類

生長於固態培養基之分枝桿菌屬陽性培養菌株。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

niacin (nicotinic acid) 為所有分枝桿菌屬合成代謝過程中，氧化還原反應的必要成份，可作為輔酶生合成的前驅物質。雖然所有分枝桿菌屬均會製造 nicotinic acid，但是由於代謝過程的阻斷現象，使結核桿菌群產生最大量的 niacin。以此可利於結核桿菌群的鑑定，但是不能只用本試驗來鑑定結核桿菌群。因為，有些菌種仍會有陽性反應 (*Mycobacterium simiae*、*Mycobacterium chelonae* chemovar niacinogenes 及 *Mycobacterium bovis* BCG)。所以，可加上硝酸鹽 (nitrate) 還原試驗及 68°C catalase 試驗，以鑑別結核桿菌群。

分枝桿菌屬能還原硝酸鹽，其還原能力與培養的時間、溫度、酵素抑制劑、氫離子濃度等因子有關。用於本試驗的菌種應經繼代培養之生長茂盛的新鮮菌落，再進行試驗。若為快速生長菌群而於兩週即生長完全者亦可進行試驗。能還原硝酸鹽的分枝桿菌屬有：*Mycobacterium tuberculosis*、*Mycobacterium kansasii*、*Mycobacterium szulgai*、*Mycobacterium flavescens*、*Mycobacterium terrae complex*，以及除了 *Mycobacterium chelonae* 外的快速生長菌群。

## 5 試劑耗材

### 5.1 niacin 試驗

5.1.1 4% aniline：取無色 aniline 4 mL 加入 96 mL 95% 乙醇，冷藏儲存於棕色小瓶，若變成黃色表示變性，不能使用。

5.1.2 10% cyanogen bromide：取 5 g cyanogen bromide 溶解於 50 mL 蒸餾水，冷藏儲存於緊蓋之棕色血清瓶，使用時若有沉澱產生可於室溫中回溫溶解。由於 cyanogen bromide 具揮發性且儲存時易失去活性，所以製備時應少量配製。

5.1.3 0.85% 生理食鹽水：取 0.85 g NaCl 溶解於 100 mL 蒸餾水，高溫高壓蒸氣滅菌。

### 5.2 硝酸鹽還原試驗

5.2.1 基質液：取 0.085 g NaNO<sub>3</sub>，0.117 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，0.485 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 按照順序溶解於 100 mL 蒸餾水，調製成 pH 7，經高溫高壓蒸氣滅菌。

5.2.2 試劑 1：取 50 mL 濃鹽酸加入 50 mL 蒸餾水。

5.2.3 試劑 2：取 0.2 g sulfanilamide 溶解於 100 mL 蒸餾水。

5.2.4 試劑 3：取 0.1 g N-naphthylethylenediamine dihydrochloride 溶解

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 409 頁/共 1078 頁

結核菌群鑑定

(生化)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

於 100 mL 蒸餾水。所有試劑應儲存於 2 - 8°C 暗處，有效期 3 個月，若有變色或沉澱時應重新配製。

## 6 儀器設備

- 6.1 35°C-37°C 溫箱。
- 6.2 第二級生物安全櫃。

## 7 環境設施安全

- 7.1 實驗應於生物安全第二等級以上之負壓實驗室進行。
- 7.2 菌種挑取必須於生物安全櫃中進行。
- 7.3 實驗人員需穿戴 N95 口罩、實驗防護衣及雙層手套，遮蔽頭髮之髮帽及鞋套。
- 7.4 實驗完畢須在生物安全櫃中噴灑消毒劑，於 10 分鐘之後擦拭並打開紫外線燈以維護生物安全櫃之潔淨。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 niacin 試驗

- 10.1.1 取 1 mL 無菌蒸餾水或無菌生理食鹽水，加入長有至少 50 個菌落的 LJ 培養基，若菌落生長太茂盛，可先刮除菌落，再加入試劑，增加試劑與培養基接觸面積。
- 10.1.2 將培養基傾斜放置，使無菌蒸餾水或無菌生理食鹽水覆蓋整個培養基表面進行萃取。
- 10.1.3 靜置 15 分鐘，取 10.1.2 之萃取液 0.5 mL，置入 16 × 125 mm 附蓋試管。
- 10.1.4 加入 0.5 mL 4 % aniline 及 0.5 mL 10 % cyanogen bromide。
- 10.1.5 立即觀察是否變為黃色。
- 10.1.6 判讀完成，10.1.4 試管加入等量 NaOH 溶液去除 cyanogen bromide 的毒性，再依照感染性廢棄物處理方式處理。

### 10.2 硝酸鹽還原試驗

- 10.2.1 取 0.2 mL 無菌蒸餾水，裝於 16 x 125 mm 附蓋試管。
- 10.2.2 取 LJ 培養基上生長茂盛且新鮮大量菌落的菌量，加入試管內做成懸浮液。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 410 頁/共 1078 頁

結核菌群鑑定

(生化)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.2.3 加入 5.2.1 基質液 2 mL。
- 10.2.4 置於 37 °C 恆溫溫箱 2 小時。
- 10.2.5 自溫箱中取出。
- 10.2.6 加入 1 滴 5.2.2 試劑 1。
- 10.2.7 加入 2 滴 5.2.3 試劑 2。
- 10.2.8 加入 2 滴 5.2.4 試劑 3。
- 10.2.9 立即檢查是否產生粉紅至紅色顏色變化。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀方式

#### 11.1.1 niacin 試驗

11.1.1.1 陽性反應：黃色。

11.1.1.2 陰性反應：不變色。

#### 11.1.2 硝酸鹽還原試驗

11.1.2.1 陽性反應：產生粉紅至紅色顏色變化。若以標準液比色，3 價至 5 價為陽性。

11.1.2.2 陰性反應：不變色。若加入鋅粉產生紅色顏色變化，則確認為陰性反應，若仍未產生紅色顏色變化則可能為陽性，應重檢。

11.2 報告核發：菌株如果是慢速生長非產色菌，同時綜合判斷菌落型態（結核桿菌群通常是表面粗糙且乾燥的菌落型態），且 niacin 試驗及硝酸鹽還原試驗，兩種試驗皆呈陽性反應，就可發結核桿菌群鑑定報告，報告格式為「*M. tuberculosis complex positive*」。

11.3 結果登錄：登錄於本署實驗室資訊管理系統，TB 功能>TB 檢驗報告查詢，進行檢驗結果登入及在綜合研判頁面點選核發報告。

## 12 品質管制

12.1 每次進行生化試驗均要同時與檢體以相同方法進行陽性及陰性品管試驗。

### 12.2 品管菌株及結果判讀

#### 12.2.1 niacin 試驗

12.2.1.1 陽性品管：H37Rv-fully susceptible (ATCC 27294)。

12.2.1.2 陰性品管：*M. avium* (ATCC 49164) 及未接種的培養基。

#### 12.2.2 硝酸鹽還原試驗：


12.2.2.1 陽性品管：H37Rv-fully susceptible (ATCC 27294)。

12.2.2.2 陰性品管：*M. bovis* (ATCC 27291) 及不加菌株，只含試劑。

12.3 所有品管結果及矯正措施應詳實記錄，並交給實驗室主管定期審核。

12.4 自行配製的試劑每批要記錄配製日期。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 411 頁/共 1078 頁	(生化)	修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 衛生署疾病管制局結核菌檢驗手冊再版，93 年。

14.2 Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333 Public Health Mycobacteriology, A Guide For the Level II Laboratory, 1981。

14.3 Clinical Microbiology Procedures Handbook, Henry D. Isenberg, Vol2, section 7.6.1.1, 2004.

## 15 附錄


### 15.1 niacin 試驗注意事項

本試驗若是測試由LJ培養基培養出之菌落，則可得到理想的試驗結果；但如果是使用Middlebrook 7H10或7H11培養基培養出之菌落時，則應加入0.1 % potassium asparate或於37 °C 下萃取2小時才能得到理想的結果。cyanogen bromide為強催淚劑，吸入時具毒性，應於排煙櫃中配製。

15.2 結核桿菌群生化試驗紀錄表。

15.3 結核桿菌群生化鑑定流程。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 412 頁/共 1078 頁	(生化)	修訂日期： 年 月 日

## 附錄15.2 結核桿菌群生化試驗紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

### 結核桿菌群生化試驗紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

日期	實驗室編號	姓名	growth rate	pigmen-tation	niacin	nitrate	ID結果	備註

註：

growth rate：S- slow grower； R- rapid grower

pigmentation：n- nonchromogen； photo- photochromogen； scoto- scotochromogen

+：positive

-：negative

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 413 頁/共 1078 頁

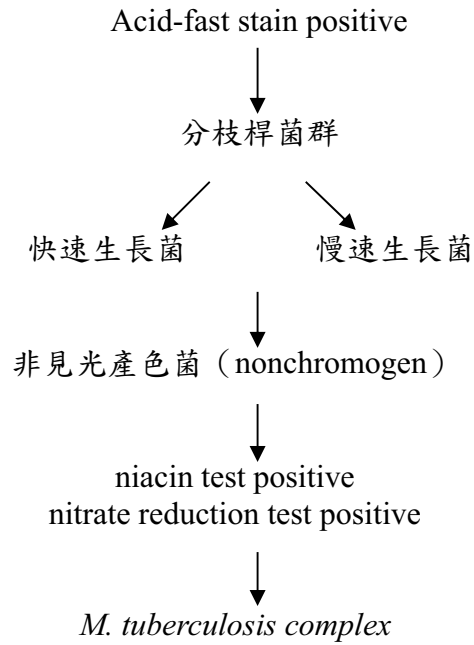
結核菌群鑑定

(生化)


核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 附錄15.3 結核桿菌群生化鑑定流程



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群間接藥物感受性試驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 414 頁/共 1078 頁	(瓊脂平板法)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

結核桿菌群的藥物感受性試驗，主要有三個目的：(1) 決定最初的用藥選擇。(2) 確定抗藥性的發生，而選擇進一步的用藥。(3) 協助流行病學之調查。

## 2 適用檢體種類

由病人檢體初次分離或繼代培養的菌株。

## 3 名詞解釋

比例法 (proportion method)：含藥物培養基和不含藥物培養基所生長之菌落數目加以比較，若含藥物培養基上菌株生長數目大於 1%，判定該菌株對該藥物有抗藥性 (resistance)。

## 4 原理概述

比例法的抗藥性定義為大於 1% 的細菌出現在抗結核桿菌群的藥物臨界濃度下。當用來測試的臨床分離菌株暴露在藥物臨界濃度下，菌株生長超過 1%，則該藥物即不適合繼續當做抗結核治療藥物。

## 5 試劑耗材

5.1 一線藥瓊脂平板法 (一組)：使用兩片四分格盤之 7H10 培養基。

5.1.1 一片含：不含藥培養基 (control)。

0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Isoniazid (INH)。

1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Isoniazid (INH)。

1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Rifampin (RMP)。

5.1.2 一片含：2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycin (SM)。

10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycin (SM)。

5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ethambutol (EMB)。

10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ethambutol (EMB)。

5.2 二線藥瓊脂平板法 (一組)：使用 3 片四分格盤之 7H11 培養基及 1 片四分格盤之 7H10 培養基。

5.2.1 一片含：不含藥培養基 (control)。 $\circ$  7H11 培養基

10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ethionamide (ETA)。

0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Rifabutin (RBU)。

8.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Para-aminosalicylic acid (PAS)。

5.2.2 一片含：不含藥培養基 (control)。 $\circ$  7H11 培養基

6.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin (KM)。

6.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amikacin (AM)。

10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Capreomycin (CAP)。

5.2.3 一片含：不含藥培養基 (control)。 $\circ$  7H11 培養基


2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ofloxacin (OFX)。

0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Moxifloxacin (MOXI)。

60.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cycloserine (CS)。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群間接藥物感受性試驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 415 頁/共 1078 頁	(瓊脂平板法)	修訂日期： 年 月 日

- 5.2.4 一片含：不含藥培養基 (control)。7H10 培養基  
2.0 µg/mL Ciprofloxacin (CIP)。  
1.0 µg/mL Gatifloxacin (GATI)。  
1.0 µg/mL Levofloxacin (LEVO)。
- 5.3 含約 20 顆直徑 3 mm 玻璃珠及 2 mL 7H9 broth 之無菌平底玻璃小瓶。
- 5.4 含 4.5 mL 生理食鹽水之無菌平底玻璃小瓶。
- 5.5 塑膠滴管。
- 5.6 1,000 µL filter tip。
- 6 儀器設備
- 6.1 第二級生物安全櫃。
- 6.2 比濁儀及 McFarland 1.0 標準液。
- 6.3 1,000 µL pipette。
- 6.4 振盪器。
- 6.5 35°C - 37°C，5% - 10% CO<sub>2</sub> 溫箱。
- 7 環境設施安全
- 7.1 實驗應於生物安全第二等級以上之負壓實驗室中進行。
- 7.2 調整菌液濃度與菌液接種必須於生物安全櫃中進行。
- 7.3 必須將菌落小心刮入含二次水之平底玻璃小瓶中，鎖緊瓶蓋後方可進行振動。
- 7.4 稀釋菌液時，鎖緊瓶蓋後方可進行振動混合菌液。
- 7.5 實驗人員需穿戴 N95 口罩、實驗防護衣及雙層手套，穿戴遮蔽頭髮之髮帽及鞋套。
- 7.6 實驗完畢須在生物安全櫃中噴灑消毒劑，於 10 分鐘之後擦拭並打開紫外線燈以維護生物安全櫃之潔淨。
- 8 檢體採集
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
- 10.1 接種菌液濃度調整至 McFarland 1.0。
- 10.1.1 在含 7H9 broth 及玻璃珠平底玻璃小瓶上，標示品管菌株及測試菌株之編號，一菌株使用一玻璃瓶。
- 10.1.2 刮取數個接種環之新鮮且生長茂盛之菌落於玻璃小瓶中。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 416 頁/共 1078 頁


結核菌群間接藥物感受性試驗  
(瓊脂平板法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.1.3 將菌落以振盪器強力振盪 1 - 2 分鐘。
  - 10.1.4 靜置至少 30 分鐘，使大團塊之菌塊沉澱。
  - 10.1.5 取上方液體並以 7H9 broth 將菌液調整成 McFarland 1.0。
  - 10.2 稀釋菌液至  $10^{-2}$  及  $10^{-4}$ 。
    - 10.2.1 取含 4.5 mL 生理食鹽水之玻璃小瓶，加入 0.5 mL 之 McFarland 1.0 之菌液，旋緊蓋子後進行振動，調整成  $10^{-1}$  稀釋菌液。
    - 10.2.2 重複上述步驟，取  $10^{-1}$  稀釋菌液調整成  $10^{-2}$  稀釋菌液。
    - 10.2.3 以同樣步驟，依次 10 倍稀釋調整成  $10^{-4}$  稀釋菌液。
  - 10.3 菌液接種
    - 10.3.1 以塑膠吸管吸取  $10^{-2}$  稀釋菌液，於四分盤上每小格滴 3 滴，包含不含藥培養基及 7 種含藥培養基。
    - 10.3.2 同上述方法將  $10^{-4}$  稀釋菌液接種到培養基上。
  - 10.4 培養觀察  
將接種完畢之培養基置入含 5% - 10%  $\text{CO}_2$  之  $35^\circ\text{C}$  -  $37^\circ\text{C}$  溫箱培養，於接種 3 天後觀察培養基是否遭受其他細菌污染。然後每 7 天觀察一次，於接種 21 天後，發完整抗藥性報告。
- 11 結果判定
- 11.1 判讀方式
    - 11.1.1 比較含藥培養基和不含藥對照組所生長的菌落數，將含藥培養基上之菌落數除以不含藥培養基上之菌落數，若抗藥性菌落數目大於 1%，判定為抗藥性 (resistant, R)；若不含藥培養基生長 3 價 (200 - 500 colonies) 至 4 價 ( $>500$ , confluent growth)，含藥培養基未生長，則判定為感受性 (susceptible, S)。
  - 11.2 報告核發：敘明「agar proportion method」、各項藥物名稱、濃度及試驗結果。
  - 11.3 結果登錄：登錄於本署實驗室資訊管理系統，TB 功能  $>$  TB 檢驗報告查詢，進行檢驗結果登入及在綜合研判頁面點選核發報告。
- 12 品質管制
- 12.1 品管菌株及結果  
H37Rv—fully susceptible (ATCC 27294)。
  - 12.2 品管執行  
參考菌株應在每次進行試驗時與測試菌株以相同方法一起進行試驗，至少要同時執行參考菌株 H37Rv—fully susceptible (ATCC 27294)。
  - 12.3 品管判定
    - 12.3.1 觀察參考菌株結果，如果試驗結果符合，則表示培養基品質符合要求，方可進行測試菌株之藥物感受性試驗之結果判讀。
    - 12.3.2 不含藥培養基  $10^{-2}$  稀釋倍數生長需 200 - 400 菌落數； $10^{-4}$  稀釋倍數生長需 20 - 40 菌落數。結果判定時，如果  $10^{-2}$  不含藥培養基生長菌落數低於 100，顯示生長菌量過低，無法確定抗藥比例，應重作藥敏試驗。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群間接藥物感受性試驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 417 頁/共 1078 頁	(瓊脂平板法)	修訂日期： 年 月 日

12.4 商品化的培養基每一批號均附有廠商出廠時的品管文件，培養基應在效期內使用。

12.5 所有品管結果及矯正措施應詳實記錄，並交給實驗室主管定期審核。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 衛生福利部疾病管制局，結核菌檢驗手冊，第二版，2004。

14.2 Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333, Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A guide for the level II laboratory, 1981.


14.3 The National Committee for Clinical Laboratory Standards, Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; tentative standard – second edition, 2000.

14.4 Clinical Microbiology Procedures Handbook, Henry D. Isenberg, Vol2, section 7.7.1, 2004.

## 15 附錄

無。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 418 頁/共 1078 頁	(間隔寡核酸分子分型法)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用間隔寡核酸分子分型法 (spacer oligonucleotide typing, spoligotyping) 進行結核桿菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex) 分子流行病學研究。

## 2 適用檢體種類

2.1 適用於 Löwenstein-Jensen 蛋基培養基培養出之結核桿菌群。

2.2 適用於經萃取之結核桿菌群全基因組 DNA (genomic DNA)。

## 3 名詞解釋

結核桿菌群：包括結核桿菌 (*M. tuberculosis*)、*M. bovis*、*M. africanum*、*M. microti* 及 *M. canetti*。

## 4 原理概述

利用結核桿菌群 DR region 重複之 Direct repeat 片段在不同菌株之間寡核苷酸不同，設計 43 種不同探針 (probe)，針對不同菌株間此寡核苷酸之不同而進行分型。以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 方式，將寡核苷酸放大再以雜交膜上之探針相互雜交，最後以生物素 (biotin) 與白蛋白 (avidin) 方式，經由 ECL 反應激發產光，於底片曝光後偵測而完成分子分型。

## 5 試劑耗材

5.1 Spoligotyping kit (Ocimum Biosolutions)，置於 2 - 8 °C 儲存，於有效期限內使用。該試劑組包含：

5.1.1 引子 (primer)：DRa、DRb。

5.1.2 陽性對照組：*M. tuberculosis* H37Rv strain、*M. BCG* DNA。

5.1.3 雜交膜 (hybridization membrane)。

5.2 puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE)。

5.3 無菌水 (sterilized deionized H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O)。

5.4 10 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)：100 g SDS (Sigma) 溶於 1,000 mL 二次水中，不要高溫滅菌，儲存於室溫勿超過三個月。

5.5 1 % SDS：50 mL 10 % SDS 加二次水至 500 mL。新鮮配製。

5.6 2 X SSPE / 0.1 % SDS：25 mL 20 X SSPE (Amresco) 及 2.5 mL 10 % SDS 加二次水至 250 mL。新鮮配製。

5.7 2 X SSPE / 0.5 % SDS：100 mL 20X SSPE (Amresco) 及 50 mL 10 % SDS 加二次水至 1,000 mL。新鮮配製。

5.8 Streptavidin-HRP (Invitrogen)。

5.9 2 X SSPE：50 mL 20 X SSPE (Amresco) 加二次水至 500 mL。新鮮配製。

5.10 ECL detection kit (Millipore)：包含試劑 A、B。

5.11 20 mM EDTA (pH 8.0)：10 mL 0.5 M EDTA (Merck) 加二次水至 250 mL。新鮮配製。

5.12 10 µL 具過濾塞之微量吸管尖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 419 頁/共 1078 頁

結核菌群核酸檢測  
(間隔寡核酸分子分型法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 5.13 100  $\mu\text{L}$  具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.14 200  $\mu\text{L}$  具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.15 1,000  $\mu\text{L}$  具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.16 玻璃皿。
  - 5.17 雜交滾動瓶 (roller bottle) (Thermo Hybaid)。
  - 5.18 底片 BioMax Film (Kodak)。
  - 5.19 緩衝墊片 (Immunetics)。
- 6 儀器設備
- 6.1 PCR 機器 (Applied Biosystems 9700 thermocycler)。
  - 6.2 雜交烘箱 (hybridization oven) (ThermoHybaid Shaken'n'Stack and Maxi 14)。
  - 6.3 水浴槽。
  - 6.4 Miniblottor MN45 (Immunetics)。
  - 6.5 抽氣裝置。
  - 6.6 沖片機 (elk Ecomat 21)。
  - 6.7 1-10  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器 (eppendorf)。
  - 6.8 10-100  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器 (eppendorf)。
  - 6.9 10-200  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器 (eppendorf)。
  - 6.10 10-1,000  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 7 環境設施安全
- 7.1 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
  - 7.2 依行政院國科會「基因重組實驗守則」。
- 8 檢體採集
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
- 10.1 檢體前處理
- 10.1.1 在生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室之生物安全櫃中，以接種環 (0.5  $\mu\text{L}$ ) 挑出 1 環的菌，放入裝有 400  $\mu\text{L}$  1X TE 的 2 mL 微量離心管中，於乾熱器以 95  $^{\circ}\text{C}$  不活化處理 5 分鐘，離心後取上清菌液進行實驗。
  - 10.1.2 萃取之結核桿菌群全基因組 DNA：參照本署「IS6110 結核桿

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 420 頁/共 1078 頁

結核菌群核酸檢測  
(間隔寡核酸分子分型法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

菌限制酶片段長度多型性分型法」檢驗標準方法（編號：B-05-2006-1.0），配製成 10 ng/ $\mu$ L 進行實驗。

## 10.2 PCR 反應

- 10.2.1 先標示 PCR Beads 管數與檢體數相同，再多加陽性對照組及陰性對照組。
- 10.2.2 先打開陰性對照組管蓋，添加 20  $\mu$ L 無菌水，各 2.5  $\mu$ L DRa、DRb，25  $\mu$ L 礦物油後蓋上管蓋。
- 10.2.3 其餘管內添加 17  $\mu$ L 無菌水後，依序加入各 2.5  $\mu$ L DRa、DRb，最後加入檢體 3  $\mu$ L。
- 10.2.4 陽性對照組為 *M. tuberculosis* H37Rv strain 或 *M. BCG* DNA，打開陽性對照組管蓋，添加 19  $\mu$ L 無菌水後，依序加入各 2.5  $\mu$ L DRa、DRb，最後加入陽性對照組 1  $\mu$ L。
- 10.2.5 執行 PCR：

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	95°C	5分鐘
2. Denature	95°C	1分鐘
3. Annealing	55°C	1分鐘
4. Extension	72°C	30秒
步驟2.至步驟4.循環重複25次		
5. Final extension	72°C	5分鐘
6. Store for o/n	4°C	$\infty$

## 10.3 核酸雜交反應

- 10.3.1 PCR 機器開機。
- 10.3.2 水浴槽開機並設定 60 °C，同時將 2 X SSPE / 0.1 % SDS 血清瓶置入預熱平衡溫度。
- 10.3.3 設定雜交烘箱 60 °C。
- 10.3.4 取一盒冰。
- 10.3.5 準備與 PCR 產物相同數量之八連排微量試管，每管以微量吸管分注器注入 150  $\mu$ L 2X SSPE / 0.1 % SDS。
- 10.3.6 分別注入 20  $\mu$ L PCR 產物於上述含有 150  $\mu$ L 2X SSPE/0.1% SDS 之微量試管後，置於聚合酶連鎖反應機器，並執行程式 99 °C 10 分鐘。加熱完成後，取出微量試管立即置於冰上。
- 10.3.7 以鑷子將雜交膜自 4 °C 冰箱取出置於玻璃皿中，以 60 °C 250 mL 2 X SSPE / 0.1 % SDS，於 60 °C 雜交烘箱內搖動清洗雜交膜，共清洗 2 次，每次 10 分鐘。
- 10.3.8 將雜交膜取出置於 Miniblotter，底部置入一片緩衝墊片，將 Miniblotter 周圍六個旋鈕對稱鎖緊。
- 10.3.9 以抽氣裝置將 Miniblotter 每條溝內殘留溶液抽出。
- 10.3.10 將 150  $\mu$ L 10.3.6 產物分別注入每條溝中，注意不可將氣泡殘留於溝內。
- 10.3.11 完畢後以 parafilm 封住兩端，置於 60 °C 雜交烘箱內靜置 1 hr。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 421 頁/共 1078 頁

結核菌群核酸檢測  
(間隔寡核酸分子分型法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 10.4 呈色及沖片

- 10.4.1 將 500 mL 2 X SSPE / 0.5% SDS 血清瓶置入 60°C 水浴槽預熱。
- 10.4.2 雜交反應完成後，以抽氣裝置將 Miniblotter 每條溝內溶液抽出，再旋開周圍旋鈕以鑷子將雜交膜取出置於玻璃皿中。
- 10.4.3 以 60 °C 250 mL 2 X SSPE / 0.5 % SDS，於 60 °C 雜交烘箱內搖動清洗雜交膜，共清洗 2 次，每次 10 分鐘。
- 10.4.4 雜交膜自烘箱取出後先靜置至室溫後，以鑷子小心沿雜交膜邊緣捲成一圓筒狀，置於雜交滾動瓶內。
- 10.4.5 將 2.5  $\mu$ L Streptavidin-HRP 加入 10 mL 2 X SSPE / 0.5 % SDS 混合均勻後，加入含雜交膜之雜交滾動瓶中，並使雜交膜均勻貼覆在雜交滾動瓶內側。
- 10.4.6 將雜交烘箱設定 42 °C 待溫度穩定後置入雜交滾動瓶，滾動反應 45 分鐘。
- 10.4.7 將 500 mL 2X SSPE / 0.5% SDS 血清瓶置入 42 °C 水浴槽預熱。
- 10.4.8 反應完畢棄置反應溶液，以鑷子夾出雜交膜置於玻璃皿中，以 42 °C 250 mL 2 X SSPE / 0.5 % SDS 清洗雜交膜，於 42 °C 雜交烘箱內搖動清洗雜交膜，共清洗 2 次，每次 10 分鐘。
- 10.4.9 之後於室溫下以 250 mL 2 X SSPE 溶液清洗雜交膜，共清洗 2 次，每次 5 分鐘。
- 10.4.10 倒乾清洗液後加入 ECL 反應試劑 10 mL (試劑 A、B 各 5 mL 混合均勻)，以手持方式搖動 1 分鐘後棄置反應試劑。以保鮮膜包覆雜交膜後，置於壓片卡匣內。
- 10.4.11 於暗房壓片，將底片放入沖片機進行沖片。

## 10.5 雜交膜的保存


- 10.5.1 水浴槽及雜交烘箱設定溫度 80 °C。
- 10.5.2 將 500 mL 1 % SDS 血清瓶置入 80 °C 水浴槽預熱。
- 10.5.3 沖片完畢將雜交膜置於玻璃皿中，以 80 °C 250 mL 1 % SDS，於 80 °C 雜交烘箱內搖動清洗雜交膜，共清洗 2 次，每次 30 分鐘。
- 10.5.4 雜交膜移出烘箱，於室溫下以 250 mL 20 mM EDTA (pH 8.0) 清洗 15 min 後，將雜交膜置入塑膠袋內，並添加少許 20 mM EDTA (pH 8.0) 後封口，於 4 °C 冰箱保存。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀方式

- 11.1.1 將底片之結果以掃描器掃描後電腦存檔。
- 11.1.2 判讀各菌株圖譜，依其 43 個寡核酸結果，僅出現末 9 點寡核酸之圖譜判為北京株 (Beijing strain, B)；若其末 9 點寡核酸有缺少則判為類北京株 (Beijing-like strain, BL)；若有出現末 9 點之外之寡核酸則稱之非北京株 (Non-Beijing strain, NB)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 422 頁/共 1078 頁	(間隔寡核酸分子分型法)	修訂日期： 年 月 日



北京株 (Beijing strain, B)



類北京株 (Beijing-like strain, BL)



非北京株 (Non-Beijing strain, NB)

11.2 報告核發：B、BL、NB、Negative、bovis、BCG、pattern 無法判別未入 BN。

11.3 結果登錄：實驗人員將檢體之檢驗結果記錄於 Spoligotyping 紀錄表並加蓋檢驗者印章及於 LIMS 系統登錄，送報告簽署人審核及蓋章，並於 LIMS 系統覆核。

## 12 品質管制

12.1 須注意每次實驗試劑的使用批號、保存期限、儲存溫度是否符合，以確保實驗成功。

12.2 每次實驗前確保所有儀器功能正常。

12.3 每次進行聚合酶連鎖反應實驗時，必須陽性對照組呈陽性及陰性對照組呈陰性方為有效實驗。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Kremer K, Bunschoten A, Schouls L, van Soolingen D, van Embden J. 2002. "SPOLIGOTYPING" a PCR-base method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.

14.2 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35: 907-914.

14.3 van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing HZ, Enkhsaikan D, Nymadawa P, van Embden J. 1995. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol* 33: 3234-3238.

## 15 附錄

無。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：	分枝桿菌屬核酸檢測（限制酶片段長度多型性分子鑑定法）	核准日期： 年 月 日
頁次：第 423 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以分子生物技術方式，鑑定並區分結核菌群（*Mycobacterium tuberculosis* complex）與非結核菌群（non-tuberculous mycobacteria, NTM）。

## 2 適用檢體種類

適用於 Löwenstein-Jensen 蛋基培養基培養出之分枝桿菌。

## 3 名詞解釋

3.1 結核菌群：包括結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium africanum*、*Mycobacterium microti* 及 *Mycobacterium canetti*。

3.2 非結核菌群：不屬於結核菌群之其他分枝桿菌菌種。

3.3 分枝桿菌：包括結核菌群與非結核菌群。

3.4 限制酶（restriction endonuclease）：由微生物產生的酵素（enzyme），能識別 DNA 中短的迴文鹼基序列（short palindromic base sequences），並在此序列的特定位點上切割雙股螺旋 DNA，每一特定限制酶能識別一特定的 DNA 序列，目前被廣泛應用於遺傳工程。

## 4 原理概述

利用分枝桿菌屬通有的 65 kD heat shock protein（*hsp65*），以聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）方式增幅檢體中 *hsp65* 核酸片段（439 bp），再將此核酸片段以限制酶切割，不同菌種可切割成不同核酸片段，於電泳分析上判定特殊長度核酸片段以比對並鑑定出特定分枝桿菌菌種。

## 5 試劑耗材

5.1 引子（primer）。

<b>Tb11：5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'</b>
--

<b>Tb12：5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3'</b>
--

<b>加無菌水調整濃度為 100pmole/<math>\mu</math>L，儲存於-20°C 冰箱為保存濃度。</b>
---

5.2 25 mM Deoxyribonucleotide tri-phosphate（dNTP）（Amersham Biosciences）。

5.3 DNA 聚合酶（AmpliTaq Gold Polymerase, 5 U/ $\mu$ L）（Applied Biosystems）。

5.4 25 mM MgCl<sub>2</sub>（Applied Biosystems）。

5.5 不含 MgCl<sub>2</sub> 之 10 X 緩衝液（10 X buffer w/o MgCl<sub>2</sub>）（Applied Biosystems）。

5.6 無菌水（Sterilized deionized H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O）。

5.7 洋菜（Seakem LE agarose）（BMA）。

5.8 1X TBE 緩衝液（AMRESCO）。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

分枝桿菌屬核酸檢測（限制酶片

核准日期： 年 月 日

頁次：第 424 頁/共 1078 頁

段長度多型性分子鑑定法）


修訂日期： 年 月 日

- 5.9 10 X gel-loading 緩衝液：0.42 % (w/v) bromophenol blue, 0.42 % (w/v) xylene cyanol FF, 66.7 % (w/v) sucrose in H<sub>2</sub>O。
  - 5.10 100 bp 核酸標準品 (Biolabs)。
  - 5.11 溴化乙錠染劑：Ethidium bromide 溶於 1 X TBE，最終濃度為 0.5 µg/mL。
  - 5.12 *Bst*EII (10 U/µL)、*Hae*III (10 U/µL) 限制酶 (Biolabs)。
  - 5.13 10 X 限制酶緩衝液 (Biolabs)。
  - 5.14 高解析洋菜 (NuSieve 3 : 1 agarose) (Cambrex)。
  - 5.15 25 bp 核酸標準品 (100 ng/µL) (Invitrogen)。
  - 5.16 10 L 具過濾塞之微量吸管尖 (Neptune)。
  - 5.17 100 L 具過濾塞之微量吸管尖 (Axygen)。
  - 5.18 200 L 具過濾塞之微量吸管尖 (Axygen)。
  - 5.19 1000 L 具過濾塞之微量吸管尖 (Neptune)。
  - 5.20 2 mL 微量離心管。
  - 5.21 PCR 微量反應管。
- 6 儀器設備
    - 6.1 PCR 機器 (Applied Biosystems 9700 thermocycler)。
    - 6.2 水平式電泳槽 (Mupid II)。
    - 6.3 微量離心機。
    - 6.4 1-10 µL 微量吸管分注器 (Eppendorf)。
    - 6.5 10-100 µL 微量吸管分注器 (Eppendorf)。
    - 6.6 10-200 µL 微量吸管分注器 (Eppendorf)。
    - 6.7 10-1000 µL 微量吸管分注器 (Eppendorf)。
    - 6.8 影像分析儀 (VILBER LOURMAT)。
- 7 環境設施安全
    - 7.1 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
    - 7.2 依行政院國科會「基因重組實驗守則」。
- 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
    - 10.1 在生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室生物安全櫃中，以接種環 (0.5 µL) 挑出 1 環的菌，放入裝有 400 µL 1 X TE 的 2 mL 微量離心管中，於乾熱器以 95 °C 不活化處理 5 分鐘，離心後取上清菌液進行實驗。

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	分枝桿菌屬核酸檢測（限制酶片段長度多型性分子鑑定法）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 425 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

10.2 配製 PCR 液，單一檢體之 PCR 液含以下配方：

試劑	體積 (μL)
無菌水	4.7
Tb11 引子 (1.6 pmole/μL)	5.0
Tb12 引子 (1.6 pmole/μL)	5.0
25 mM dNTP	0.2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5
不含 MgCl <sub>2</sub> 之 10X 緩衝液	2.5
DNA 聚合酶	0.1
檢體	5.0
總體積為 25 μL	

- 10.3 計算各試劑實驗所需總體積，總體積為 3 倍檢體管數加 5 管（含 3 管陽性對照組、1 管陰性對照組及 1 管預留量）。
- 10.4 取濃度為 100 pmole/μL Tb11、Tb12 引子各 2μL，加入各含 123μL 無菌水中，即為實際實驗引子濃度（1.6 pmole/μL）。視所需總體積調整引子配製量。
- 10.5 置於冰上之 2 mL 微量離心管內依序加入無菌水、引子、dNTP、MgCl<sub>2</sub>、不含 MgCl<sub>2</sub> 之 10X 緩衝液，最後加 DNA 聚合酶，混合均勻後分別於 PCR 微量反應管內加入 20μL 試劑混合液，操作時均在冰上操作，以維持 DNA 聚合酶活性。
- 10.6 最後加入檢體（不活化處理離心後之上清菌液）5 μL。
- 10.7 陽性對照組為 *M. tuberculosis* H37Rv strain DNA，濃度 100 ng/L，取 1 μL 加 4 μL 無菌水；陰性對照組取 5 μL 無菌水。
- 10.8 執行 PCR

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	96°C	10分鐘
2. Denature	96°C	1分鐘
3. Annealing	58°C	1分鐘
4. Extension	72°C	2分鐘
步驟2.至步驟4.循環重複30次		
5. Final extension	72°C	6分鐘
6. Store for o/n	16°C	∞

10.9 配製 2%核酸電泳洋菜膠：

- 10.9.1 溶解 3 g 洋菜(w/v)於 150 mL 1 X TBE 緩衝液中。
- 10.9.2 以微波爐加熱至完全溶解，將已溶解且降溫（約 50 °C 以下）的洋菜膠倒入洋菜膠製作盤中。
- 10.9.3 小心地將排梳插進洋菜膠中，與底部的距離約為 2 mm，靜置讓洋菜膠凝固後，將洋菜膠置於 1 X TBE 緩衝液盒內保存。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

分枝桿菌屬核酸檢測（限制酶片

核准日期： 年 月 日

頁次：第 426 頁/共 1078 頁

段長度多型性分子鑑定法）

修訂日期： 年 月 日

- 10.10 取 PCR 產物 2 L，加入 10 X gel-loading 緩衝液 1  $\mu$ L 及 7  $\mu$ L 無菌水，混合均勻後注入每一膠孔內；以 100 bp 核酸標準品為分子量標的組，取 1  $\mu$ L 100 bp 核酸標準品，加入 10 X gel-loading 緩衝液 1  $\mu$ L 及 8  $\mu$ L 無菌水，混合均勻後注入膠孔內。
- 10.11 以 100 伏特電壓，進行電泳 40 分鐘後，取出洋菜膠浸泡於溴化乙錠染劑內 5 分鐘。
- 10.12 取出洋菜膠以清水退染。
- 10.13 將洋菜膠置於影像分析儀內以紫外燈拍照，以確定 PCR 反應結果成功及片段大小（439 bp）正確。
- 10.14 取 PCR 產物進行 *Bst*EII、*Hae*III 2 種限制酶切割。配製限制酶反應液，單一檢體之限制酶反應液含以下配方：

試劑	體積 ( $\mu$ L)
無菌水	5
10X 限制酶緩衝液	3
限制酶 <i>Bst</i> EII (10 U/ $\mu$ L) 或 <i>Hae</i> III (10 U/ $\mu$ L)	2
PCR 產物	20
總體積為 30 $\mu$ L	


- 10.15 含 *Bst*EII 之反應管置於 PCR 機器，並執行程式 60  $^{\circ}$ C 1.5 小時；含 *Hae*III 之反應管置於 PCR 機器，並執行程式 37  $^{\circ}$ C 1.5 小時。
- 10.16 配製 4 %核酸電泳洋菜膠，步驟同 10.9，僅洋菜換為 Nuseieve 3：1 高解析洋菜，依濃度調整高解析洋菜重量。
- 10.17 取每一限制酶反應後產物 18  $\mu$ L，加入 10 X gel-loading 緩衝液 2  $\mu$ L，混合均勻後注入每一膠孔內；以 100 bp 及 25 bp 核酸標準品為分子量標的組。
- 10.18 以 100 伏特電壓，進行電泳 80 分鐘後，取出洋菜膠浸泡於溴化乙錠染劑內 10 分鐘。
- 10.19 取出洋菜膠以清水退染。
- 10.20 將洋菜膠置於影像分析儀內以紫外燈拍照。

## 11 結果判定

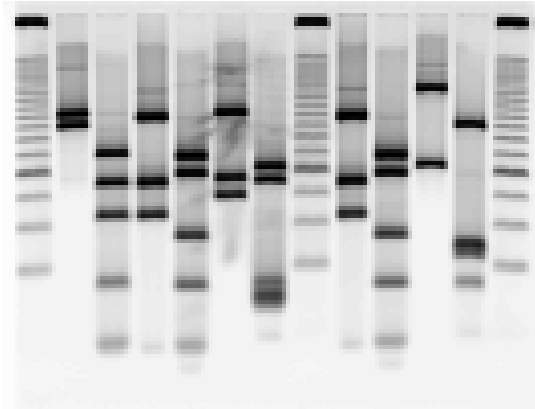
### 11.1 判讀方式

- 11.1.1 分別就 *Bst*EII 及 *Hae*III 限制酶切割之核酸片段與標準核酸片段比較，可上網至 <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> 進行菌種檢索，確認切割之核酸片段大小及判定分枝桿菌名稱。  
例如：1、2 分別為結核菌群經 *Bst*EII、*Hae*III 限制酶切割之核酸片段。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	分枝桿菌屬核酸檢測（限制酶片段長度多型性分子鑑定法）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 427 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 2



11.1.2 當限制酶切割之核酸片段無法對應標準核酸片段導致無法判定時，則結果標示為無法鑑定型別（unknown pattern）。

11.2 報告核發：菌種鑑定結果為 MTBC、菌種鑑定結果為 NTM (說明菌種名)

11.3 結果登錄：實驗人員將檢體之檢驗結果記錄於 PCR-RFLP 紀錄表及並加蓋檢驗者印章及於 LIMS 系統登錄，送報告簽署人審核及蓋章，並於 LIMS 系統覆核後轉實驗室負責人做最終發佈。

## 12 品質管制

12.1 須注意每次實驗試劑的使用批號、保存期限、儲存溫度是否符合，以確保實驗成功。

12.2 每次實驗前確保所有儀器功能正常。

12.3 每次進行 PCR 實驗時，必須陽性對照組呈陽性及陰性對照組呈陰性為有效實驗。

12.4 必須正確配製 4% Nuseieve 3：1 高解析洋菜膠且完全溶解該洋菜所製作出高解析度洋菜膠，才能正確判讀限制酶切割之核酸片段大小。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121°C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Devallois A, Goh KS, and Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbiol 1997;35:2969-73.

14.2 Sambrook J, and Rusell DW. Molecular cloning : A laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

14.3 Taylor TB, Patterson C, Hale Y, and Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. J Clin Microbiol 1997;35:79-85.

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

分枝桿菌屬核酸檢測（限制酶片

核准日期： 年 月 日

頁次：第 428 頁/共 1078 頁


段長度多型性分子鑑定法）

修訂日期： 年 月 日

14.4 Telenti A, Marchesi F, Balz M, et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993;31:175-8.

15 附錄  
無。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 結核菌限制酶 片段長度多型性分型法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 429 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

IS6110 限制酶片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分型法是國際間通用之結核桿菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex) 標準分型法，可以和各地區流行之結核桿菌之菌株做比較，並且有助於釐清結核病病患之感染來源和途徑。

## 2 適用檢體種類

適用於 Löwenstein-Jensen 蛋基培養基培養出之結核桿菌群。

## 3 名詞解釋

- 3.1 結核桿菌群：包括結核桿菌 (*M. tuberculosis*)、*M. bovis*、*M. africanum*、*M. microti* 及 *M. canetti*。
- 3.2 限制酶 (restriction endonuclease)：為一大類由微生物產生的酵素 (enzyme)，能識別 DNA 中短的迴文鹼基序列 (short palindromic base sequences)，並在此序列的特定位置上切割雙股螺旋 DNA，每一特定限制酶能識別一特定的 DNA 序列，目前被廣泛應用於遺傳工程。
- 3.3 探針 DNA (probe DNA)：一種已明確的 DNA 片段，用來作選擇性分子雜交試驗以探測、鑑定核酸的相對應序列。


## 4 原理概述

利用限制酶切割全基因組 DNA (genomic DNA) 內多變重覆序列的切位，由於重覆序列數目和所在位置不同，所產生的 DNA 片段長度就不同，經 DNA 電泳分離可在不同位置上產生不同大小的 DNA 片段，再利用標記之特定探針 DNA 進行雜交作用，可藉由所產生的限制酶片段長度多型性異同來判斷不同來源之 DNA 的差異程度。

## 5 試劑耗材

- 5.1 50 mg/mL Lysozyme：1 g Lysozyme (Roche) 溶於 20 mL 二次水中，分裝後儲存於 -20 °C 勿超過一年。
- 5.2 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)：500 mL 20% SDS (AMRESCO) 加 500 mL 二次水，混合均勻，不要高溫滅菌，儲存於室溫勿超過三個月。
- 5.3 Proteinase K (Qiagen)。
- 5.4 5 M NaCl：29.2 g NaCl (Merck) 溶於 100 mL 二次水中，高溫滅菌後儲存於室溫。勿超過一年。
- 5.5 CTAB/NaCl：4.1 g NaCl (Merck) 及 10 g N-cetyl-N,N,N,-trimethyl ammonium bromide (CTAB) (Merck) 溶於 100 mL 無菌二次水中，加熱攪拌使其溶解，儲存於室溫勿超過一年。
- 5.6 Chloroform/isoamyl alcohol (24：1) (Amresco)。
- 5.7 Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25：24：1) (Amresco)。
- 5.8 Chloroform (Fisher Scientific)。
- 5.9 Isopropanol (Merck)。


## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 結核菌限制酶 片段長度多型性分型法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 430 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.10 100 % Ethanol (Merck)。
- 5.11 *PvuII* 限制酶 (NEB)。
- 5.12 10X 限制酶緩衝液 (NEB)。
- 5.13 洋菜 (Seakem LE agarose) (BMA)。
- 5.14 1 X TBE 緩衝液 (Amresco)。
- 5.15 10 X gel-loading 緩衝液：0.42 % (w/v) Bromophenol blue, 0.42 % (w/v) Xylene cyanol FF, 66.7 % (w/v) Sucrose in H<sub>2</sub>O。
- 5.16 1 kb 核酸標準品 (NEB)。
- 5.17 100 bp 核酸標準品 (Invitrogen)。
- 5.18 溴化乙錠染劑：Ethidium bromide 溶於 1X TBE，最終濃度為 0.5 g/mL。
- 5.19 Supercoiled DNA ladder (SDL) (Invitrogen)。
- 5.20 *PhiX174-HaeIII* (NEB)。
- 5.21  $\lambda$ -*HindIII* (NEB)。
- 5.22 0.25 M HCl：先倒入 300 mL 二次水，再加 100 mL 1M HCl (MERCK) (酸加到水)。
- 5.23 4 M NaOH：400 mL 10 M NaOH [200 g NaOH (MERCK) 加二次水至 500 mL] 加二次水至 1,000 mL，儲存於室溫勿超過三個月。
- 5.24 0.4 M NaOH：120 mL 4 M NaOH 加二次水至 1,200 mL。新鮮配製。
- 5.25 雜交膜 (hybond N<sup>+</sup>) (GE)
- 5.26 10X SSPE：500 mL 20X SSPE (Amresco) 加二次水至 1,000 mL，儲存於室溫勿超過一年。
- 5.27 5 X SSC：100 mL 20 X SSC (Amresco) 加二次水至 400 mL，儲存於室溫勿超過一年。
- 5.28 引子 (primer)。  
 INS-1：5'-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3'  
 INS-2：5'-GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3'  
 加無菌水調整濃度為 500 ng/ $\mu$ L，儲存於 -20 °C 冰箱為保存濃度。勿超過一年。
- 5.29 25 mM Deoxyribonucleotide tri-phosphate (dNTP) (Invitrogen)。
- 5.30 DNA 聚合酶 (AmpliTaq Gold Polymerase, 5  $\mu$ U/ $\mu$ L) (Applied Biosystems)。
- 5.31 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems)。
- 5.32 不含 MgCl<sub>2</sub> 之 10 X 緩衝液 (10 X buffer w/o MgCl<sub>2</sub>) (Applied Biosystems)。
- 5.33 無菌水 (sterilized deionized H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O)。
- 5.34 QIAquick 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) Purification dit (Qiagen)。
- 5.35 ECL direct nucleic acid labelling systems kit (GE)：包含標記溶液 (labeling reagent)、戊二醛 (glutaraldehyde)、雜交緩衝液。
- 5.36 ECL detection kit (Millipore)：包含試劑 A、B。




# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 431 頁/共 1078 頁	(IS6110 結核菌限制酶 片段長度多型性分型法)	修訂日期： 年 月 日

- 5.37 初級清洗液 (primary wash buffer, 0.5 X SSC / 0.4 % SDS) : 25 mL 20X SSC (AMRESCO) 加二次水至 960 mL, 再加 40 mL 10% SDS。
  - 5.38 二級清洗液 (secondary wash buffer, 2 X SSC) : 100 mL 20X SSC (AMRESCO) 加二次水至 1000 mL。
  - 5.39 清除液 (Strip buffer, 0.1 X SSC / 0.1 % SDS) : 5 mL 20X SSC (AMRESCO) 加二次水至 990 mL, 再加 10 mL 10% SDS。
  - 5.40 雜交滾動瓶 (roller bottle) (Thermo Hybaid)。
  - 5.41 底片 BioMax Film (GE)。
  - 5.42 10  $\mu$ L 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.43 100  $\mu$ L 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.44 200  $\mu$ L 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.45 1,000  $\mu$ L 具過濾塞之微量吸管尖。
- 6 儀器設備
- 6.1 化學物質操作排煙櫃 (chemical hood)。
  - 6.2 振動器 (Scientific Industries vortex Genie-2)。
  - 6.3 乾熱器 (thermolyne)。
  - 6.4 桌上型離心機 (Heraeus Biofuge Fresco)。
  - 6.5 分光光度計 (NonaVue) (GE)。
  - 6.6 微波爐。
  - 6.7 小水平式電泳槽 (Mupid II)。
  - 6.8 大水平式電泳槽 (Hoefer SuperSub)。
  - 6.9 影像分析儀 (Vilber Lourmat)。
  - 6.10 真空轉漬裝置及馬達 (vacuum blot apparatus and vacuum pump) (Pharmacia Biotech VacuGene XL and pump)。
  - 6.11 Crosslinker (Hoefer UVC500)。
  - 6.12 PCR 機器 (Applied Biosystems 9700 thermocycler)。
  - 6.13 水浴槽。
  - 6.14 雜交烘箱 (hybridization oven) (ThermoHybaid Shaken'n'Stack and Maxi 14)。
  - 6.15 平板搖動儀 (shaking platform) (lab rotator)。
  - 6.16 沖片機 (elk Ecomat 21)。
  - 6.17 1-10  $\mu$ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。
  - 6.18 10-100  $\mu$ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。
  - 6.19 10-200  $\mu$ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。
  - 6.20 10-1,000  $\mu$ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 7 環境設施安全
- 7.1 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
  - 7.2 依行政院國科會「基因重組實驗守則」。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 結核菌限制酶 片段長度多型性分型法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 432 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 萃取結核桿菌群之全基因組 DNA

10.1.1 在生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室生物安全櫃中，以接種環 (0.5  $\mu$ L) 挑出至少 2 環的菌 (不超過 3 環)，放入裝有 400  $\mu$ L 1X TE 的 2 mL 微量離心管中。80  $^{\circ}$ C 乾熱器加熱 30 min 令菌體失去活性，在室溫中冷卻，即可移出 BSL-3 實驗室。【注意：此步驟需確定菌體全部失去活性，無活菌殘留後，方可移出 BSL-3 實驗室】

10.1.2 用振動器 (vortex) 使菌體分散，並使用研磨棒充分研磨菌體。

10.1.3 加入 40  $\mu$ L 50 mg/mL lysozyme，均勻混合，於 37  $^{\circ}$ C 乾熱器中作用 2 hr。

10.1.4 加入 100  $\mu$ L 10% SDS 和 45  $\mu$ L proteinase K，均勻混合，於 56  $^{\circ}$ C 乾熱器中作用至隔日。【注意：此步驟後的混合皆不宜使用振動，以免 DNA 在萃取過程中斷裂，手持離心管上下搖晃即可。】

10.1.5 加入 100  $\mu$ L 的 5 M NaCl 與 100  $\mu$ L 的 CTAB/NaCl (已 65  $^{\circ}$ C 預熱)，輕微搖晃至溶液成乳白色後，於 65  $^{\circ}$ C 乾熱器中作用 10 min。

10.1.6 加入 500  $\mu$ L chloroform/isoamyl alcohol (24:1)，均勻混合。以 12,000 rpm 離心 15 min (4  $^{\circ}$ C)，將上清液吸出至另一乾淨微量離心管中。

10.1.7 加入 600  $\mu$ L phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)，均勻混合。以 12,000 rpm 離心 15 min (4  $^{\circ}$ C)，將上清液吸出至另一乾淨微量離心管中。


10.1.8 加入 600  $\mu$ L chloroform，均勻混合。以 12,000 rpm 離心 15 min (4  $^{\circ}$ C)，將上清液吸出至另一乾淨微量離心管中。

10.1.9 加入 520  $\mu$ L isopropanol，輕晃，加速 DNA 沉澱下來。置於 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中至隔日 (至少 2 hr)。

10.1.10 以 12,000 rpm 離心 25 min (4  $^{\circ}$ C)，倒掉上清液。

10.1.11 加入 900  $\mu$ L 的 70% Ethanol (-20  $^{\circ}$ C)。以 12,000 rpm 離心 5 min (4  $^{\circ}$ C)，取出上清液。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 結核菌限制酶 片段長度多型性分型法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 433 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

10.1.12 加入 900  $\mu\text{L}$  的 100 % Ethanol ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。以 12,000 rpm 離心 5 min ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )，取出 800  $\mu\text{L}$  上清液，再以 12,000 rpm 離心 5 min ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。

10.1.13 以微量吸管尖小心吸去管壁剩餘液體後，讓沉積於離心管底部的 DNA 於室溫中陰乾；檢查酒精是否完全蒸發，若尚未完全蒸發，則延長陰乾時間。

10.1.14 加入 1 X TE 將 DNA pellet 溶解，加入的量視 pellet 大小而定(約 30 - 200  $\mu\text{L}$ )。

## 10.2 DNA 定量

10.2.1 使用分光光度計將溶解的 DNA 定量。

10.2.2 以 1 X TE 作 100 倍稀釋，測定 260 nm 和 280 nm 的吸光值。

10.2.3 DNA 濃度的計算公式為：260 nm 的吸光值  $\times$  50 (1 O.D.<sub>260</sub> = 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )  $\times$  100 (稀釋倍數) = 【DNA 濃度】  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。並計算 260/280 吸光值比值，此值最好大於 1.7，過多蛋白質容易干擾 RFLP 實驗。

## 10.3 *Pvu*II 限制酶切割全基因組 DNA

10.3.1 每一次實驗必須多加一管為 *M. tuberculosis* Mt14323 的 DNA 當作 External marker。

10.3.2 每一個微量離心管中加入以下溶液：

無菌水	17-X $\mu\text{L}$
10X 限制酶緩衝液	2 $\mu\text{L}$
限制酶 <i>Pvu</i> II (10 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
DNA (4.5 $\mu\text{g}$ )	X $\mu\text{L}$
總體積	20 $\mu\text{L}$

10.3.3 輕輕混合均勻後，spin down。

10.3.4 於  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  中作用至少 6 hr (可以使用 PCR 機器)。作用完畢放置  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。

## 10.4 估計限制酶 *Pvu*II 切割後 DNA (片段 DNA) 量

10.4.1 配製 0.8 % 核酸電泳洋菜膠。


10.4.1.1 溶解 0.8 g 洋菜(w/v) 於 100 mL 1 X TBE 緩衝液中，依所需體積配製。

10.4.1.2 以微波爐加熱至完全溶解，將已溶解且降溫(約  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下)的洋菜膠倒入洋菜膠製作盤中。

10.4.1.3 小心地將排梳插進洋菜膠中，與底部的距離約為 2 mm，靜置讓洋菜膠凝固後，將洋菜膠置於 1 X TBE 緩衝液盒內保存。

10.4.2 取 2  $\mu\text{L}$  片段 DNA，加入 10 X gel-loading 緩衝液 1  $\mu\text{L}$  及 7  $\mu\text{L}$  無菌水，混合均勻後注入每一膠孔內；以 1 kb 核酸標準品為分子量標的組，取 1  $\mu\text{L}$  1 kb 核酸標準品，加入 10 X gel-loading 緩衝液 1  $\mu\text{L}$  及 5  $\mu\text{L}$  無菌水，混合均勻後注入膠孔內。

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 結核菌限制酶 片段長度多型性分型法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 434 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.4.3 以 100 伏特電壓，進行電泳 25-30 分鐘後，取出洋菜膠浸泡於溴化乙錠染劑內 5 分鐘。
- 10.4.4 取出洋菜膠以清水退染。
- 10.4.5 將洋菜膠置於影像分析儀內以紫外燈拍照。
- 10.4.6 根據片段 DNA 亮度來估算 DNA 的濃度，在之後進行電泳時讓每一個檢體都能取得近乎等量的 DNA。

### 10.5 以電泳法分離片段 DNA

10.5.1 製備 internal marker SDL/phi 存放至 4 °C 或 -20 °C 備用。

10.5.1.1 使用酒精沉澱法純化 Supercoiled DNA ladder (SDL)

10.5.1.1.1 於微量離心管中加入以下溶液，混合均勻，置於 -20°C 至少 2 hr。

SDL (250 ng/μL)	40 μL
1X TE	160 μL
100 % ethanol	500 μL
5 M NaCl	25 μL
總體積	725 μL

10.5.1.1.2 12,000 rpm 離心 15 分鐘，除去上清液，等沉澱物乾後，溶於 58 μL 0.1X TE。

10.5.1.2 以限制酶 *PvuII* 切割 10.5.1.1 經純化之 SDL，使成為 SDL-*PvuII*。

10.5.1.2.1 於 10.5.1.1.2 已含 58 μL 純化之 SDL 微量離心管加入 7 μL 10X 限制酶緩衝液，混合均勻後，先取出 10 μL 做為陰性對照組，再於原管加入 5 μL 限制酶 *PvuII*，混合均勻後，分裝 20 μL 共 3 管，置於 37 °C 至少 6 小時。


10.5.1.2.2 進行電泳 (0.8 % 核酸電泳洋菜膠) 確認 SDL-*PvuII* 切割完全。

10.5.1.2.3 使用分光光度計測量 SDL-*PvuII* 濃度，以 0.1 X TE 為 blank。

10.5.1.3 以 3 : 4 混合 SDL-*PvuII* 與 PhiX174-*HaeIII* 使成為 SDL/phi (即 internal marker)，置於 4 °C 備用。於微量離心管中加入以下溶液(以 SDL-*PvuII* 濃度 100 ng/μL 為例)：

SDL- <i>PvuII</i> (100 ng/μL)	30 μL
PhiX174- <i>HaeIII</i> (1,000 ng/μL)	4 μL
1X TE	866 μL
10 X gel-loading 緩衝液	100 μL
總體積	1,000 μL

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法


	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 結核菌限制酶 片段長度多型性分型法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 435 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

10.5.2 製備 electrophoresis marker  $\lambda$ /phi 存放至 4 °C 或 -20 °C 備用。  
於微量離心管中加入以下溶液：

$\lambda$ -HindIII (500 ng/ $\mu$ L)	16 $\mu$ L
PhiX174-HaeIII (1,000 ng/ $\mu$ L)	10 $\mu$ L
1X TE	154 $\mu$ L
10 X gel-loading 緩衝液	20 $\mu$ L
總體積	200 $\mu$ L

- 10.5.3 配製 300 mL 0.8% 核酸電泳洋菜膠，於平板搖動儀上持續混合降溫約 25 分鐘後，加入 600  $\mu$ L 5  $\mu$ g/mL 溴化乙錠染劑，繼續混合 5 分鐘後再小心倒入大水平式電泳槽的洋菜膠製作盤中。
- 10.5.4 取適量的片段 DNA (10.4) 與 5  $\mu$ L internal marker SDL/phi 混合後依序注入膠孔。
- 10.5.5 洋菜膠孔兩端膠孔注入 5  $\mu$ L electrophoresis marker  $\lambda$ /phi。
- 10.5.6 每個膠孔注入適量的片段 DNA。將剩下的片段 DNA 置回 4°C 冰箱中。
- 10.5.7 電泳開始時，電壓先設為 3.2 V/cm (100 V)，10 min，讓片段 DNA 完全進入洋菜膠中。接著再降低電壓至 30 V。電泳時間需約 20-22 hr。
- 10.5.8 將洋菜膠置於影像分析儀內以紫外燈觀察片段 DNA 在洋菜膠中的移動情形。當 Electrophoresis marker 的第六個條帶(2027 bp)到達 8.2 cm 時即可停止電泳。
- 10.5.9 將洋菜膠置於影像分析儀內以紫外燈拍照，將此照片貼於實驗紀錄本中。
- 10.6 以南方墨點法 (southern blotting) 將 DNA 轉漬 (transfer) 至雜交膜上。
- 10.6.1 洋菜膠的前處理
- 10.6.1.1 將電泳完畢的洋菜膠置於影像分析儀內照紫外光，直到洋菜膠上的 Ethidium bromide 完全退色 (30 min)。
- 10.6.1.2 將洋菜膠用二次水清洗。
- 10.6.1.3 將此洋菜膠浸泡於 0.25 M HCl 10 分鐘。
- 10.6.1.4 將洋菜膠用二次水清洗。
- 10.6.1.5 將此洋菜膠浸泡於 0.4 M NaOH 20 分鐘。
- 10.6.1.6 重複步驟 10.6.1.4 和步驟 10.6.1.5。
- 10.6.1.7 將洋菜膠用二次水清洗。
- 10.6.2 DNA 轉漬，使用真空轉漬法 (vacuum blotting)
- 10.6.2.1 製備足夠的 0.8 % 洋菜膠溶液，於平板搖動儀上持續混合降溫，避免凝固。
- 10.6.2.2 將真空轉漬裝置的 Porous divider 浸泡於自來水中，整個浸溼透後，放在 Rib assembly 上。
- 10.6.2.3 將濾紙裁剪為適當的大小，用二次水浸潤溼透後，放在 Porous divider 的中央。


# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 結核菌限制酶 片段長度多型性分型法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 436 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.6.2.4 將雜交膜 (Hybond N+) 裁剪成適當大小 (17.5 cm × 19 cm)，用原子筆寫上編號並做邊框記號。使用毛筆將 Marking mix (3:1 的剩餘不用之片段 DNA 溶液及 internal marker 混合液) 塗抹在原子筆寫過的地方，以便做偵測時可以顯示出來。
- 10.6.2.5 用二次水將雜交膜浸溼後，放在濾紙上。
- 10.6.2.6 在雜交膜的四邊壓上橡膠墊，壓的距離約 0.5 cm。
- 10.6.2.7 將真空轉漬裝置的蓋子蓋上，確定可以真空抽取。
- 10.6.2.8 將洋菜膠放在雜交膜上。
- 10.6.2.9 用 0.8 % 洋菜膠溶液將洋菜膠四邊填滿，等洋菜膠溶液凝固。
- 10.6.2.10 在洋菜膠上倒入 10 X SSPE，讓洋菜膠完全覆蓋。
- 10.6.2.11 接上抽氣馬達，將開關打開。調整吸力至 50 mbar，檢查是否有漏氣的地方。轉漬時間依 150 mL 10 X SSPE 完全吸入洋菜膠為主，約 90 分鐘。
- 10.6.3 轉漬後 DNA 雜交膜的處理
  - 10.6.3.1 將 DNA 雜交膜含有 DNA 的面朝上，浸泡於 0.4 M NaOH，5 min。(若有 crosslinker，先以 3,600 焦耳處理雜交膜，效果較好。)
  - 10.6.3.2 將 DNA 雜交膜浸潤於 5 X SSC。
  - 10.6.3.3 此 DNA 雜交膜可直接進行雜交和偵測，亦可封存於密閉良好的塑膠袋中並保持潮溼，儲存於 4 °C 冰箱中 (超過一週存於 -20 °C)。
- 10.7 探針 (probe) DNA 雜交和偵測
  - 10.7.1 以 PCR 方法製備 IS6110 探針
    - 10.7.1.1 INS-1 引子  
INS-2 引子
    - 10.7.1.2 Template DNA 為 *M. bovis* BCG。
    - 10.7.1.3 配製 PCR 液：

	1x	10x
Template DNA (約 1000 ng/μL)	0.1 μL	1 μL
INS-1 引子 (8 μM)	5 μL	50 μL
INS-2 引子 (8 μM)	5 μL	50 μL
25 mM dNTP	1 μL	10 μL
不含 MgCl <sub>2</sub> 之 10X 緩衝液	5 μL	50 μL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5 μL	50 μL
DNA 聚合酶	0.2 μL	2 μL
無菌水	28.7 μL	287 μL
總體積	50 μL	500 μL

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 結核菌限制酶 片段長度多型性分型法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 437 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

先自未加 DNA 的 PCR 液取出 24  $\mu\text{L}$  做為陰性對照組，再加入 DNA 後，分裝每管為 25  $\mu\text{L}$ 。

## 10.7.1.4 執行 PCR

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	96°C	10分鐘
2. Denature	96°C	1分鐘
3. Annealing	67°C	1分鐘
4. Extension	72°C	2分鐘
步驟2.至步驟4.循環重複20次		
5. Final extension	72°C	6分鐘
6. Store for o/n	4°C	$\infty$

10.7.1.5 將 PCR 反應管合併成 4 管，各取 5  $\mu\text{L}$  進行電泳（2% 核酸電泳洋菜膠）以確定 PCR 產物為單一 245 bp DNA 片段 $\mu\text{L}$ 。

10.7.1.6 使用 PCR 產物 Purification Kit 純化 PCR 產物。

10.7.1.7 使用分光光度計定量純化後的產物（方法同 10.2）。

10.7.1.8 以無菌水將純化後的產物（探針 DNA）稀釋至濃度為 10 ng/ $\mu\text{L}$ ，每 10  $\mu\text{L}$  分裝成一管，存放至 -20 °C 備用（一次製造大量備用），使用期限依 PCR 產物質量而定，一般為 6 個月。

## 10.7.2 製備 internal marker 探針

10.7.2.1 以 1 : 1 混合 SDL-*Pvu*II 與 PhiX174-*Hae*III 成 internal marker 探針（10 ng/ $\mu\text{L}$ ）。於微量離心管中加入以下溶液（以 SDL-*Pvu*II 濃度 100 ng/ $\mu\text{L}$  為例）：

SDL- <i>Pvu</i> II (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	20 $\mu\text{L}$
PhiX174- <i>Hae</i> III (1,000 ng/ $\mu\text{L}$ )	2 $\mu\text{L}$
1X TE	378 $\mu\text{L}$
總體積	400 $\mu\text{L}$

10.7.2.2 混合均勻後，每 10  $\mu\text{L}$  分裝成一管，存放至 4 °C 或 -20 °C 備用（一次製造大量備用），使用期限一般為三個月。

## 10.7.3 探針標記


10.7.3.1 取出製備好的探針(100 ng/10  $\mu\text{L}$ )，99.9 °C 加熱 6 min 後，馬上插入冰浴 5 min。

10.7.3.2 Spin down。加入等體積（10  $\mu\text{L}$ ）的標記溶液（labeling reagent）。以微量吸管尖抽吸數次以均勻混合。

10.7.3.3 加入與標記溶液相同體積（10  $\mu\text{L}$ ）的戊二醛（glutaraldehyde）。以微量吸管抽吸數次以均勻混合。放入微量離心機中，spin down。

10.7.3.4 37 °C 作用至少 30 分鐘（可用 PCR 機器）。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 結核菌限制酶 片段長度多型性分型法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 438 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 10.7.4 雜交

10.7.4.1 DNA 雜交膜前處理 (prehybridization)：將雜交膜放入已裝有 10 mL 雜交緩衝液的雜交滾動瓶中，於雜交烘箱中作用至少 10 min (1 hr 較佳)。(原本裝雜交緩衝液的離心管直立置於雜交烘箱中，令殘餘液流至管底，備用)。

10.7.4.2 將已標記完成的探針加入上述殘餘緩衝液的離心管中，使其均勻混合後，滴入雜交滾動瓶中，要滴入管底緩衝液處，不可以直接接觸雜交膜。

10.7.4.3 在雜交烘箱中進行雜交反應，以 42 °C 作用隔夜，轉速為 6 rpm。

## 10.7.5 雜交後 DNA 雜交膜的清洗

10.7.5.1 預熱初級清洗液至 55 °C。

10.7.5.2 取一乾淨塑膠盒倒入 500 mL 預熱好的初級清洗液。從管中取出 DNA 雜交膜置入初級清洗液內，以 55 °C 搖動 20 min。

10.7.5.3 倒出塑膠盒內清洗液，倒入 500 mL 初級清洗液，再以 55 °C 搖晃 20 min。

10.7.5.4 倒出塑膠盒內清洗液，倒入 500 mL 二級清洗液，於室溫搖動 5 min。

10.7.5.5 重複步驟 10.7.5.4。

## 10.7.6 偵測

10.7.6.1 使用 ECL detection kit，試劑與雜交膜作用時間為 2 分鐘。

10.7.6.2 用保鮮膜將雜交膜包覆，含 DNA 的面朝上放入壓片卡匣中。

10.7.6.3 底片放在 DNA 薄膜上壓緊卡匣，進行壓片。

10.7.6.4 將底片沖洗。若有必要，可再另外做兩次延長及縮短曝光時間以利比較。

10.7.6.5 雜交膜可以重複使用，需以 5X SSC 保持潮濕儲存在 4 °C 冰箱 (超過一週存於 -20 °C)。

## 10.7.7 DNA 雜交膜上 DNA 的清除

10.7.7.1 預熱清除液至 65 °C。

10.7.7.2 取一乾淨塑膠盒倒入 500 mL 預熱好的清除液，將 DNA 雜交膜放入，以 65 °C 搖動 1.5 小時。

10.7.7.3 儲存於 5 X SSC。

10.7.7.4 取出後即可再用不同探針偵測。


## 11 結果判定

### 11.1 判讀方式

結果底片用掃描器掃描後電腦存檔，利用 UPGMA 軟體分析，依 Internal



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 結核菌限制酶 片段長度多型性分型法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 439 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

marker SDL/phi 的結果做調整 (normalization)，並確定每一次實驗中 External marker-*M. tuberculosis* Mt14323 的 IS6110 banding pattern 正確，最後畫出親緣關係樹狀圖 (phylogenetic tree)。IS6110 片段數目少於 5 的菌株，需依其他分子分型方法 (例如 spoligotyping) 進行分析。

11.2 報告核發：可分析、不可分析未入 BN

11.3 結果登錄：實驗人員將檢體之檢驗結果記錄於 RFLP 紀錄表並加蓋檢驗者印章及於 LIMS 系統登錄，送報告簽署人審核及蓋章，並於 LIMS 系統覆核。

## 12 品質管制

12.1 須注意每次實驗試劑的使用批號、保存期限、儲存溫度是否符合，以確保實驗成功。

12.2 每次實驗前確保所有儀器功能正常。

12.3 每一次 IS6110 RFLP 分型實驗操作的檢體中必須包含 External marker-*M. tuberculosis* Mt14323 標準菌株的 DNA，因其 IS6110 banding pattern 為固定形式，可以確認每一次實驗結果值得信賴。

12.4 IS6110 探針和 Internal marker 探針製備完成後，需先以一片已知結果的 DNA 雜交膜進行測試，測試完成後才可以用於未知檢體的 DNA 雜交膜。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 31: 406-409.

14.2 Van Soolingen D, de Haas PEW, Kremer K. 1998. Restriction fragment length polymorphism typing of mycobacteria, p. 165-203. In T. Parish and N. G. Stoker(ed.), *Mycobacterium Tuberculosis* Protocols. Human Press, Totowa, NJ.


14.3 加州大學。RFLP Analysis of *Mycobacterium tuberculosis*。國際抗癆聯盟江振源醫師提供。

## 15 附錄

15.1 流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測（散置重複單元-可變重複序列分子分型法）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 441 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用結核桿菌散置重複單元-可變重複序列分子分型法（mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeat, MIRU-VNTR）進行結核桿菌群（*Mycobacterium tuberculosis* complex）的基因分型。

## 2 適用檢體種類

- 2.1 適用於 Löwenstein-Jensen 蛋基培養基培養出之結核桿菌群。
- 2.2 適用於經萃取之結核桿菌群全基因組 DNA（genomic DNA）。

## 3 名詞解釋

結核桿菌群：包括結核桿菌（*M. tuberculosis*）、*M. bovis*、*M. africanum*、*M. microti* 及 *M. canetti* 等。

## 4 原理概述


利用結核桿菌群染色體上 MIRU 及 VNTR 之位點（locus）在不同菌株可能具有不同序列重複數（repeat number）的多形性，以多重聚合酶連鎖反應法（multiplex polymerase chain reaction, multiplex PCR），將不同單元重複序列位點放大，依照估計出來之重複數，分別給予各位點一數字代碼。本方法選用 15 個位點分別為 MIRU-2、MIRU-4（ETR-D）、MIRU-10、MIRU-16、MIRU-20、MIRU-23、MIRU-24、MIRU-26、MIRU-27、MIRU-31（ETR-E）、MIRU-39、MIRU-40、ETR-A、ETR-B 與 ETR-C。15 個位點的單元重複數組成一串數字代碼即為每個菌株的 MIRU-VNTR 基因型。

## 5 試劑耗材

- 5.1 螢光標定引子：加無菌水調整濃度為 100 pmole/μL，儲存於 -20 °C 冰箱。勿超過一年。稀釋配製成 2 pmole/μL 為 PCR 反應使用。序列如下：

組號	位點	單元長度 (bp)	引子序列
Panel-A	MIRU-4 (ETR-D)	77	5'-(FAM)GCGCGAGAGCCCGAACTGC-3' 5'-GCGCAGCAGAAACGCCAGC-3'
	MIRU-26	51	5'-TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC-3' 5'-(HEX)CATAGGCGACCAGGCGAATAG-3'
	MIRU-40	54	5'-(TAMRA)GGGTTGCTGGATGACAACGTGT-3' 5'-GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA-3'
Panel-B	MIRU-10	53	5'-GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC-3' 5'-(FAM)GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT-3'
	MIRU-16	53	5'-TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA-3' 5'-(HEX)CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC-3'
	MIRU-31 (ETR-E)	53	5'-ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA-3' 5'-(TAMRA)GTGCCGACGTGGTCTTGAT-3'
Panel-C	MIRU-2	53	5'-TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT-3' 5'-(FAM)TACTCGGACGCCGGCTCAAAT-3'
	MIRU-23	53	5'-(HEX)CTGTGATGGCCGCAACAAAACG-3' 5'-AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTGTGTC-3'

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測（散置重複單元-可變重複序列分子分型法）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 442 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日


	MIRU-39	53	5'-CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC-3' 5'-(TAMRA)CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT-3'
Panel-D	MIRU-20	77	5'-(FAM)TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG-3' 5'-GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA-3'
	MIRU-24	54	5'-CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT-3' 5'-(HEX)GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA-3'
	MIRU-27	53	5'-TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA-3' 5'-(TAMRA)GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA-3'
Panel-E	ETR-A	75	5'-(FAM)AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT-3' 5'-CGAAGCCTGGGGTGCCCCGCGATTT-3'
	ETR-B	57	5'-(HEX)GCGAACACCAGGACAGCATCATG-3' 5'-GGCATGCCGGTGATCGAGTGG-3'
	ETR-C	58	5'-GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG-3' 5'-(TAMRA)GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG-3'

- 
- 5.2 25 Mm Deoxyribonucleotide tri-phosphate (dNTP) (invitrogen)。
  - 5.3 DNA 聚合酶 (AmpliTaq gold polymerase, 5 μU/μL) (Applied Biosystems)。
  - 5.4 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems)。
  - 5.5 不含 MgCl<sub>2</sub> 之 10X 緩衝液 (super therm gold buffer, 10X buffer w/o MgCl<sub>2</sub>) (JMR Holding Inc.)。
  - 5.6 無菌水 (sterilized deionized H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O)。
  - 5.7 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma)。
  - 5.8 十二爪手動微量分注器專用 10 μL 具過濾塞之微量吸管尖 (Sorenson)。
  - 5.9 10 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.10 20 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.11 100 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.12 200 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.13 1,000 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.14 1 - 10 μL 分注吸管 (eppendorf)。
  - 5.15 半襯邊 96 孔 PCR 微量反應盤。
  - 5.16 全襯邊 96 孔 PCR 微量反應盤 (Sorenson)。

## 6 儀器設備

- 6.1 PCR 機器 (Applied Biosystems 9700 thermocycler)。
- 6.2 毛細管電泳儀 (Amersham Bioscience MegaBACE 1000)。
- 6.3 0.1 - 2.5 μL 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.4 2 - 20 μL 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.5 1 - 10 μL 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.6 10 - 100 μL 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.7 10 - 200 μL 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.8 10 - 1,000 μL 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.9 十二爪手動微量分注器 (thermo labsystems)。
- 6.10 1 - 10 μL 液晶多功能分注器 (eppendorf)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測（散置重複單元-可變重複序列分子分型法）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 443 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 7 環境設施安全

- 7.1 於生物安全第二等級（BSL-2）實驗室之設施內操作。  
7.2 依行政院國科會「基因重組實驗守則」。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 Mutiplex PCR 反應，每管反應含：

試劑	體積 (μL)
無菌水	3.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.2
不含 MgCl <sub>2</sub> 之 10X 緩衝液	1.0
25 mM dNTP	0.2
DNA 聚合酶 (5U/μL)	0.2
DMSO	0.5
引子 (2 pmole/μL)	
FAM 螢光標定引子對	0.2
HEX 螢光標定引子對	0.2
TAMRA 螢光標定引子對	1.0
Genomic DNA (50 ng/μL)	2.0
總反應體積為 10 μL	


### 10.2 PCR 反應條件

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	95 °C	10分鐘
2. Denature	95 °C	1分鐘
3. Annealing	59 °C	1分鐘
4. Extension	72 °C	1分鐘30秒
步驟2至步驟4重複35次		
5. Final extension	72 °C	8分鐘
6. Store for o/n	4 °C	∞

10.3 PCR 反應結束後的產物加入 40 μL 的無菌水進行 5 倍稀釋，暫時保存於 4 °C 等待毛細管電泳儀上機。

10.4 依毛細管電泳儀操作方法處理。注樣參數為 3 仟伏，45 sec，電泳參數為 9 仟伏，100 min。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測（散置重複單元-可變重複序列分子分型法）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 444 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 11 結果判定

### 11.1 判讀方式

毛細管電泳儀實驗結果利用 Fragment Profiler 軟體進行個別位點重複片段長度 (bp) 的分析。

#### 11.1.1 結果判讀：依下表判讀每個位點之重複數

重複數	MIR U 02	MIR U 04	MIR U 10	MIR U 16	MIR U 20	MIR U 23	MIR U 24	MIR U 26	MIR U 27	MIR U 31	MIR U 39	MIR U 40	ETR -A	ETR -B	ETR -C
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354	195	121	44
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408	270	178	102
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462	345	235	160
3	561	406 (352)	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516	420	292	218
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570	495	349	276
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624	570	406	334
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678	645	463	392
7	773	714	855	936	976	518	771	642	869	863	911	732	720	520	450
8	826	791	908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786	795	577	508
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840	870	634	566
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894	945	691	624
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948			
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002			
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056			
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110			
15	1197	1330	1279	1360	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164			

11.2 報告核發：各位點依 11.1.1 計算重複數。

11.3 結果登錄：實驗人員將檢體之檢驗結果記錄於 MIRU 紀錄表並加蓋檢驗者印章，送報告簽署人審核及蓋章。

## 12 品質管制

12.1 PCR 需放置陰性對照組。


12.2 操作時宜戴手套及口罩，保持環境清潔以避免交叉污染。

12.3 試劑於操作時須放置在 2 - 8 °C 或冰上。

12.4 注意各檢驗試劑之有效效期，避免使用過期試劑。

12.5 檢體污染檯面時宜以核酸清潔劑清潔。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測（散置重複單元-可變重複序列分子分型法）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 445 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。


## 14 參考資料

- 14.1 Barlow RE, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH, Dickens A, Qamer S, Hawkey PM. 2001. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol 39: 2453-2457.
- 14.2 Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiol 144: 1189-1196.
- 14.3 Lee AS, Tang LL, Lim IH, Bellamy R, Wong SY. 2002. Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high-resolution minisatellite-based typing. J Clin Microbiol 40: 657-659.
- 14.4 Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol 39: 3563-3571.

## 15 附錄

無。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群分子檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 446 頁/共 1078 頁	IS6110 real-time PCR for Mycobacterium tuberculosis complex)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用分子生物方法，直接從病人檢體或培養陽性菌株中偵測是否含有結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis complex*) 的核酸，以提高檢驗的敏感性與時效性。

## 2 適用檢體種類

- 2.1 適用於改良式蛋基培養基 (Löwenstein-Jensen) 或 BACTEC™MGIT™960 液態培養管培養出之陽性菌株。
- 2.2 適用於痰檢體，並經消化去污染處理後之沉澱物。
- 2.3 適用於石蠟包埋組織切片經萃取之核酸 (DNA) 檢體。

## 3 名詞解釋

結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis complex*, MTBC)：包括結核菌 (*M. tuberculosis*)、*M. bovis*、*M. africanum*、*M. microti* 及 *M. canetti*。

## 4 原理概述


IS6110 是專一性存在於結核菌群的插入序列 (insertion sequence, IS)，具有 0–25 個拷貝數目，此法以 IS6110 作為檢測方法的標的基因，利用即時定量聚合酶連鎖反應 (real time PCR) 為技術平台，設計具有對結核菌群 IS6110 專一性的引子，並針對 IS6110 產物設計具有專一性的 Taqman® 核酸探針，進行聚合酶連鎖反應與螢光標記核酸探針的雜交反應。

## 5 試劑耗材

- 5.1 核酸萃取套組。
- 5.2 引子 (primer)  
IS6 引子 5'-GGC TGT GGG TAG CAG ACC-3'  
IS7 引子 5'-CGG GTC CAG ATG GCT TGC-3'  
加無菌水調整濃度為 100 μM，儲存於 -20°C 冰箱為保存濃度。
- 5.3 核酸探針 (probe)  
(FAM) 5'-TGT CGA CCT GGG CAG GGT TCG-3'(MGBNFQ)  
原廠合成濃度為 100 μM，取 2 μL 原廠合成探針加入 158 μL 無菌水，  
即為 1.25 μM 實驗濃度。
- 5.4 2X real time PCR 試劑。
- 5.5 10 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.6 100 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.7 200 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.8 1000 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.9 2 mL 微量離心管。
- 5.10 real time PCR 單反應管。
- 5.11 real time PCR 8 連排反應管。
- 5.12 real time PCR 96 孔反應盤。
- 5.13 real time PCR 96 孔盤封膜。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群分子檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 447 頁/共 1078 頁	IS6110 real-time PCR for Mycobacterium tuberculosis complex)	修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 即時定量 PCR 機器。
- 6.2 振盪器。
- 6.3 微量離心機。
- 6.4 0.1-2.5  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器。
- 6.5 0.5-10  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器。
- 6.6 2-20  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器。
- 6.7 10-100  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器。
- 6.8 20-200  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器。
- 6.9 100-1000  $\mu\text{L}$  微量吸管分注器。

## 7 環境設施安全

- 7.1 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 依行政院國科會「基因重組實驗守則」。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體前處理

10.1.1 分枝桿菌菌株：在生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室生物安全櫃中，以接種環 (0.5  $\mu\text{L}$ ) 挑出 1 環的菌，放入裝有 400  $\mu\text{L}$  1X TE 的 2 mL 微量離心管中，於乾熱器以 95 $^{\circ}\text{C}$  不活化處理 5 分鐘，離心後取上清菌液進行實驗。


10.1.2 痰檢體：參照本署結核菌群培養方法 (文件編號：RDC-SOP-B3-E01) 以 NALC (N-acetyl-L-cysteine-sodium) -NaOH 進行消化去污染處理後，取沉澱物進行檢測。

10.1.3 石蠟包埋組織切片：以 Qiagen DNA 萃取套組萃取 DNA (文件編號：RDC-SOP-B3-EXX)。

10.2 挑選進行 real time PCR 之檢體，依序排列，並填寫實驗紀錄表 (版本:20090227v1.0, 文件編號：RDC-QR-B3-E13-QRMY027)。操作前，以 70% 酒精擦拭桌面，準備所需之實驗用品。先將 PCR 室之壓克力操作櫃開啟 UV 照射 15 分鐘。

10.3 進入 Pre-PCR 室前，於緩衝區更換實驗衣再進入 Pre-PCR 室，按下無菌操作台前馬達鈕及電燈開關，並將拉門拉起 10-15 cm，以 70% 酒精

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群分子檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 448 頁/共 1078 頁	IS6110 real-time PCR for Mycobacterium tuberculosis complex)	修訂日期： 年 月 日

擦拭檯面，並待操作台馬達運轉至少 7-15 分鐘，確保操作台內空氣層流穩定，才可進行 11.5 試劑配製。

- 10.4 離開 Pre-PCR 室並更換 PCR 實驗衣。
- 10.5 依照即時定量 PCR 機器之操作手冊 SOP (文件編號:RDC-MY-ISOP-028) 依序開啟電腦、機器、軟體，設定 real time PCR 程式。
  - 10.5.1 螢幕桌面點選 7500 System Software 軟體，開啟新文件 (New Document)。
  - 10.5.2 分析方法 (Assay) 選擇絕對定量標準曲線 (Absolute Quantification Standard Curve)，按下一步 (Next)。
  - 10.5.3 偵測方式 (Detector Name) 選擇 IS6110 Reporter FAM/Quencher none 後，按下一步 (Next)。
  - 10.5.4 編輯檢體、陽性和陰性對照組擺放位置，按下完成 (Finish)。
  - 10.5.5 輸入檢體編號，陽性、陰性對照組名稱。
  - 10.5.6 編輯執行程式 (Instrument)：


Stage	溫度	時間
Stage1	50°C	2分鐘
Stage2	95°C	10分鐘
Stage3 (45 cycles for 2.2及 2.3檢體；40 cycles for 2.1 檢體)	95°C 60°C	15秒 1分鐘

- 10.5.7 編輯實際反應體積，應為 25  $\mu$ L。
- 10.5.8 儲存檔案於資料夾 C://SDS 1.2/ Documents/ KYM/檢驗年份。
- 10.6 進入 Pre-PCR 室於緩衝區更換 Pre-PCR 專用實驗衣，進入 Pre-PCR 室配製 real time PCR 反應液，單一管反應液含以下配方：

試劑	體積 ( $\mu$ L)
無菌水	1.5
IS6 引子 (10 $\mu$ M)	2.0
IS7 引子 (10 $\mu$ M)	2.0
IS6110 probe 核酸探針 (1.25 $\mu$ M)	2.0
2X real time PCR 試劑	12.5
檢體	5.0
總體積為 25 $\mu$ L	

- 10.7 計算各試劑實驗所需總體積，總體積為檢體數乘以 2 (每個檢體包括 1 管檢驗，1 管添加內在對照組) 加 3 管 (1 管陽性對照組、1 管陰性對照組及 1 管預留量)。
- 10.8 取濃度為 100  $\mu$ M IS6、IS7 引子各 1  $\mu$ L，加入 9  $\mu$ L 無菌水中，即為實際實驗引子濃度 (10  $\mu$ M)。視所需總體積調整引子配製量。
- 10.9 置於冰寶上之 2 mL 微量離心管內依序加入無菌水、引子、核酸探針、2X real time PCR 試劑，振盪混合均勻後分別於 real time PCR 反應管內

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群分子檢測 IS6110 real-time PCR for Mycobacterium tuberculosis complex)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 449 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

加入 20  $\mu$ L 試劑混合液 (視檢體數量可選擇單反應管、8 連排反應管或是 96 孔反應盤)，操作時均在冰寶上操作，以維持核酸聚合酶活性。

- 10.10 於陽性對照組反應管先加 4  $\mu$ L 無菌水。
- 10.11 離開 Pre-PCR 室前，確實以 70%酒精擦拭檯面，並將檯面實驗用品歸定位及拿出配置反應試劑及塑膠耗材垃圾袋後，關閉無菌操作台前馬達鈕及電燈開關，開啟 UV 電燈開關，並將拉門拉下。
- 10.12 離開 Pre-PCR 室於緩衝區更換 PCR 專用實驗衣。
- 10.13 將反應管移至 PCR 室，各反應管最後加入 5  $\mu$ L 檢體。
- 10.14 各檢體之內在對照組除依 real time PCR 反應液配方加 5  $\mu$ L 檢體外，需再加入 1  $\mu$ L 陽性對照組 DNA，濃度 1 ng/ $\mu$ L。
- 10.15 陽性對照組為 *M. tuberculosis* H37Rv strain DNA，濃度 1 ng/ $\mu$ L，取 1  $\mu$ L；陰性對照組取 5  $\mu$ L 無菌水。
- 10.16 反應管置於微量離心機旋轉離心 (spin down)。
- 10.17 將反應管置於即時定量 PCR 機器反應座上，並以拭淨紙擦拭反應蓋以避免凝結水氣影響機器偵測反應訊號，執行 real time PCR 程式。
- 10.18 以 70%酒精擦拭壓克力操作櫃桌面，並開啟 UV 照射 30 分鐘消毒。

## 11 結果判定


### 11.1 判讀方式

- 11.1.1 程式執行結束後，在 Amplification Plot 的分析設定中勾選 Auto Ct，按下分析按鈕。
- 11.1.2 在 Report 中可檢視分析結果，須先檢視陽性對照組為陽性 (Ct < 20) 且陰性對照組為陰性 (Undet.) 方為有效實驗，否則必須重新試驗，有效實驗之檢體檢驗結果再依下列標準判讀。

2.1 檢體 反應 Ct 值	內在對照組反應	陽性對照組	陰性對照組	結果判讀
Ct < 35	陽性	陽性	陰性	陽性
Undet. 或 Ct $\geq$ 35	陽性	陽性	陰性	陰性
Undet.	陰性	陽性	陰性	有抑制物，重新處理檢體，重複實驗

2.2 及 2.3 檢體 反應 Ct 值	內在對照組反應	陽性對照組	陰性對照組	結果判讀
Ct < 38	陽性	陽性	陰性	陽性

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群分子檢測 IS6110 real-time PCR for Mycobacterium tuberculosis complex)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 450 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

$38 \leq Ct \leq 40$	陽性	陽性	陰性	備註 1
Undet.或 $Ct > 40$	陽性	陽性	陰性	陰性
Undet.	陰性	陽性	陰性	有抑制物，重新處理檢體，重複實驗

備註 1.  $38 \leq Ct \leq 40$  表示該檢體呈現弱陽性反應，需再重複試驗，若第 2 次檢驗結果為陽性 ( $Ct < 38$ )，即可判為陽性；若第 2 次檢驗結果仍為弱陽性反應 ( $38 \leq Ct \leq 40$ ) 則須進行定序試驗以進一步確認，若定序結果為結核菌群，則可判定為陽性；若第 2 次檢驗結果為陰性，則判定為陰性。

11.2 報告核發：MTBC 核酸檢測陽性、MTBC 核酸檢測陰性。

11.3 結果登錄：實驗人員將檢體之檢驗結果記錄於 IS6110 real-time PCR 紀錄表及並加蓋檢驗者印章及於 LIMS 系統登錄，送報告簽署人審核及蓋章，並於 LIMS 系統覆核後轉實驗室負責人做最終發佈。

## 12 品質管制

12.1 須注意每次實驗試劑的使用批號、保存期限、儲存溫度是否符合，以確保實驗成功。

12.2 每次實驗前確保所有儀器功能正常。

12.3 每次進行 real time PCR 實驗時，必須陽性對照組為陽性且陰性對照組為陰性方為有效實驗。

12.4 若 real time PCR 反應為無效實驗或實驗過程中試劑污染，應檢討後重新進行實驗。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以  $121^{\circ}\text{C}$ ，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。


## 14 參考資料

無。

## 15 附錄

無。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群快速核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 451 頁/共 1078 頁	(GenoType® MTBC)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
利用 GenoType® MTBC 試劑組，進行結核菌群菌株快速核酸檢測以區分菌種。
- 2 適用檢體種類  
適用於改良式蛋基培養基 (Löwenstein-Jensen) 或為液態培養基培養出之結核菌群菌株。
- 3 名詞解釋  
無。
- 4 原理概述  
利用核酸線性探針反向雜交測定技術,鑑別下列菌株: *M. africanum* , *M. bovis* BCG, *M. bovis ssp. bovis* , *M. bovis ssp. caprae* , *M. microti*, 及 *M. tuberculosis*/"*M. canettii*"。
- 5 試劑耗材
  - 5.1 PNM (Primer-Nucleotide-Mix) (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.2 DNA 聚合酶 (5 U/μL)。
  - 5.3 25 mM 氯化鎂溶液。
  - 5.4 不含氯化鎂之 10X 緩衝液 (10X buffer w/o MgCl<sub>2</sub>)。
  - 5.5 無菌水 (Sterilized deionized H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O)。
  - 5.6 DEN (Denaturation solution) (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.7 GenoType MTBC 核酸線性探針反向雜交紙片 (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.8 HYB (Hybridization Buffer) (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.9 STR Stringent WMTBCh Solution (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.10 RIN (Rinse Solution) (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.11 CON-C (Conjugate Concentrate) (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.12 CON-D (Conjugate Buffer) (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.13 CON 溶液(1:100 之 CON-C 加 CON-D 配製) (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.14 SUB-C (Substrate Concentrate) (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.15 SUB-D (Substrate Buffer) (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.16 SUB 溶液(1:100 之 SUB-C 加 SUB-D 配製) (GenoType® MTBC 試劑組)。
  - 5.17 10 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.18 100 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.19 200 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.20 1000 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.21 2 mL 微量離心管。
  - 5.22 核酸聚合酶微量反應管。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 452 頁/共 1078 頁

結核菌群快速核酸檢測

(GenoType® MTBC)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

## 6 儀器設備

- 6.1 核酸聚合酶機器。
- 6.2 微量離心機。
- 6.3 核酸雜交反應槽(TwinCubator®)
- 6.4 1–10 µL 微量吸管分注器。
- 6.5 10–100 µL 微量吸管分注器。
- 6.6 10–200 µL 微量吸管分注器。
- 6.7 10–1000 µL 微量吸管分注器。

## 7 環境設施安全

- 7.1 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 依行政院國科會「基因重組實驗守則」。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟


10.1 配製核酸聚合酶液，單一檢體之核酸聚合酶液含以下配方：

試劑	體積 (µl)
PNM (GenoType® MTBC 試劑組)	35.0
不含氯化鎂之 10X 緩衝液	5.0
25 mM 氯化鎂溶液	5.0
DNA 聚合酶	0.18
檢體	5.0
總體積為 50 µL	

10.2 置於冰上之 2 mL 微量離心管內依序加入 PNM、不含氯化鎂之 10X 緩衝液、25 mM 氯化鎂溶液，最後加 DNA 聚合酶，混合均勻後分別於核酸聚合酶微量反應管內加入 46 µL 試劑混合液，操作時均在冰上操作，以維持 DNA 聚合酶活性。

10.3 最後加入檢體（不活化處理離心後之上清菌液）5 µL。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群快速核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 453 頁/共 1078 頁	(GenoType® MTBC)	修訂日期： 年 月 日

## 10.4 執行 PCR

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	95 °C	5 分鐘
2. Denature	95 °C	30 秒
3. Annealing	58 °C	2 分鐘
步驟 2. 至步驟 3. 循環重複 10 次		
4. Extension	95 °C	25 秒
	53 °C	40 秒
	70 °C	40 秒
步驟 4. 循環重複 20 次		
5. Final extension	70 °C	8 分鐘
6. Store for o/n	16 °C	∞

## 10.5 雜交


- 10.5.1 預熱核酸雜交反應槽至 45°C
- 10.5.2 將 HYB 和 STR 預熱至 37-45°C。
- 10.5.3 在室溫下，將 20 µL 之 DEN 加入反應盤中之專用溝槽。
- 10.5.4 加入 20 µL 之核酸聚合酶產物與 DEN 混和均勻，反應 5 分鐘。
- 10.5.5 將 1 mL 之 HYB Buffer 加入含有混合物之溝槽中，加入時要避免濺入其他之溝槽中。
- 10.5.6 依序放入標示編號之 GenoType® MTBC 核酸線性探針反向雜交紙片，並將反應盤置入核酸雜交反應槽反應 45°C 30 分鐘。
- 10.5.7 將 HYB Buffer 完全吸出(例如使用 pipette)，加入 1 mL STR Buffer 至含有核酸線性探針反向雜交紙片之溝槽中，置入核酸雜交反應槽反應 45°C 15 分鐘，此步驟之後續步驟皆在室溫下進行。
- 10.5.8 將 STR Buffer 完全吸出，加入 1 mL RIN Buffer 至含有核酸線性探針反向雜交紙片之溝槽中，擺動清洗 1 分鐘。
- 10.5.9 倒掉 RIN Buffer，加入 1 mL CON 溶液(10 µL CON-C 加 1 mL CON-D)，擺動反應 45 分鐘。
- 10.5.10 移除 CON 溶液並使用 1 mL 之 RIN Buffer 擺動清洗 1 分鐘 2 次，再加入無菌水 1 mL 擺動清洗 1 分鐘。
- 10.5.11 倒掉無菌水，加入 SUB 溶液(10 µL SUB-C 加 1 mL SUB-D)，避光靜置 3 至 20 分鐘，直到核酸線性探針反向雜交紙片呈色完成。
- 10.5.12 加入無菌水 1 mL 擺動清洗 1 分鐘 2 次停止顯色。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀方式

將核酸線性探針反向雜交紙片對齊貼在 GenoType® MTBC 評估表(附

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群快速核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 454 頁/共 1078 頁	(GenoType® MTBC)	修訂日期： 年 月 日

錄一)，依核酸線性探針反向雜交紙片之顯色位點來與比對表(附錄二)對照，得到檢體之菌株鑑定結果。

- 11.2 報告核發：菌種鑑定為 *M. africanum*, *M. bovis* BCG, *M. bovis ssp. bovis*, *M. bovis ssp. caprae*, *M. microti*,及 *M. tuberculosis*/" *M. canettii*" 。
- 11.3 結果登錄：實驗人員將檢體之檢驗結果記錄於 GenoType MTBC 紀錄表及並加蓋檢驗者印章及於 LIMS 系統登錄，送報告簽署人審核及蓋章，並於 LIMS 系統覆核後轉實驗室負責人做最終發佈。

## 12 品質管制

- 12.1 須注意每次實驗試劑的使用批號、保存期限、儲存溫度是否符合，以確保實驗成功。
- 12.2 每次實驗前確保所有儀器功能正常。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121℃，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

GenoType MTBC 操作手冊(HAIN)

## 15 附錄

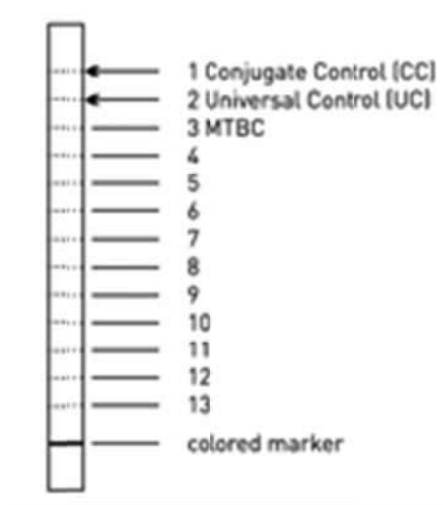
- 15.1 附錄一
- 15.2 附錄二



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群快速核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 455 頁/共 1078 頁	(GenoType® MTBC)	修訂日期： 年 月 日

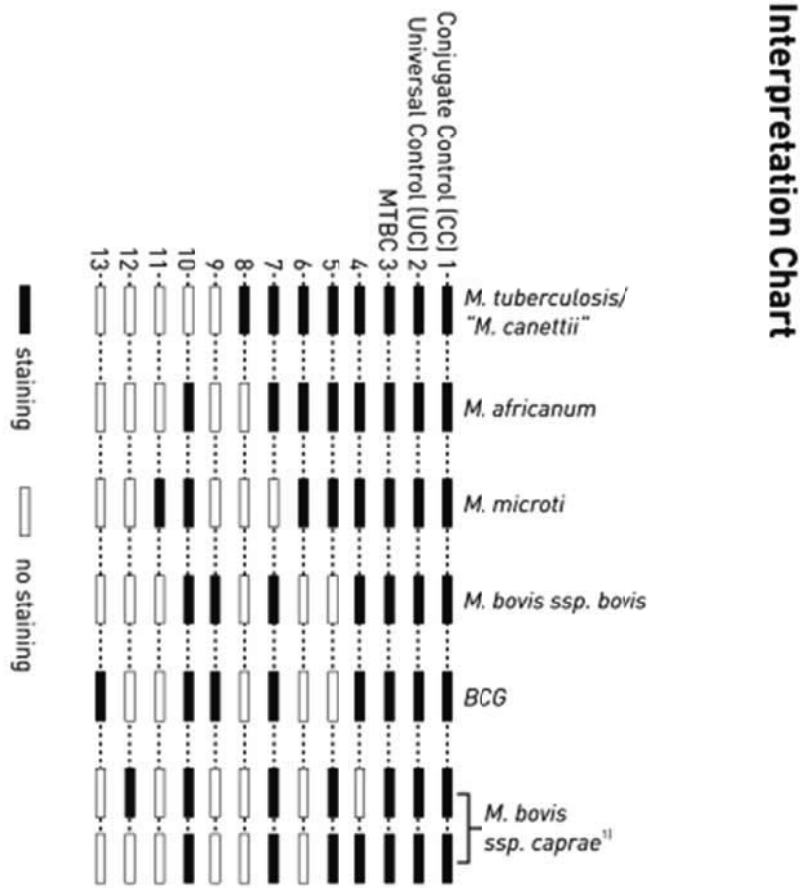
## 15.1 附錄一



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群快速核酸檢測 (GenoType® MTBC)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 456 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 15.2 附錄二



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	不常見非結核分枝桿菌快速核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 457 頁/共 1078 頁	(GenoType Mycobacterium AS)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

利用 GenoType® Mycobacterium AS 試劑組，進行分枝桿菌菌株鑑別。

## 2 適用檢體種類

適用於改良式蛋基培養基 (Löwenstein-Jensen) 或為液態培養基培養出之分枝桿菌菌株。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用核酸線性探針反向雜交測定技術，鑑別下列菌株：*M. simiae*，*M. mucogenicum*，*M. goodii*，*M. celatum*，*M. smegmatis*，*M. genavense*，*M. lentiflavum*，*M. heckeshorensis*，*M. szulgai/M. intermedium*，*M. phlei*，*M. haemophilum*，*M. kansaii*，*M. ulcerans*，*M. gastri*，*M. asiaticum*，及 *M. shimoidei*。

## 5 試劑耗材

- 5.1 PNM (Primer-Nucleotide-Mix) (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.2 DNA 聚合酶 (5 U/μL)。
- 5.3 25 mM 氯化鎂溶液。
- 5.4 不含氯化鎂之 10X 緩衝液 (10X buffer w/o MgCl<sub>2</sub>)。
- 5.5 無菌水 (Sterilized deionized H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O)。
- 5.6 DEN (Denaturation solution) (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.7 GenoType® Mycobacterium AS 核酸線性探針反向雜交紙片 (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.8 HYB (Hybridization Buffer) (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.9 STR Stringent Wash Solution (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.10 RIN (Rinse Solution) (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.11 CON-C (Conjugate Concentrate) (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.12 CON-D (Conjugate Buffer) (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.13 CON 溶液(1:100 之 CON-C 加 CON-D 配製) (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.14 SUB-C (Substrate Concentrate) (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.15 SUB-D (Substrate Buffer) (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.16 SUB 溶液(1:100 之 SUB-C 加 SUB-D 配製) (GenoType® Mycobacterium AS 試劑組)。
- 5.17 10μL 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.18 100μL 具過濾塞之微量吸管尖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

不常見非結核分枝桿菌快速核酸檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 458 頁/共 1078 頁

(GenoType Mycobacterium AS)

修訂日期： 年 月 日

- 5.19 200 $\mu$ L 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.20 1000 $\mu$ L 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.21 2 mL 微量離心管。
- 5.22 核酸聚合酶微量反應管。

## 6 儀器設備

- 6.1 核酸聚合酶機器。
- 6.2 微量離心機。
- 6.3 核酸雜交反應槽(TwinCubator<sup>®</sup>)。
- 6.4 1–10 $\mu$ L 微量吸管分注器。
- 6.5 10–100 $\mu$ L 微量吸管分注器。
- 6.6 10–200 $\mu$ L 微量吸管分注器。
- 6.7 10–1000 $\mu$ L 微量吸管分注器。

## 7 環境設施安全

- 7.1 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 依行政院國科會「基因重組實驗守則」。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

10.1 配製核酸聚合酶液，單一檢體之核酸聚合酶液含以下配方：

試劑	體積 ( $\mu$ l)
PNM (GenoType <sup>®</sup> Mycobacterium AS 試劑組)	35.0
不含氯化鎂之 10X 緩衝液	5.0
25 mM 氯化鎂溶液	5.0
DNA 聚合酶	0.18
檢體	5.0
總體積為 50 $\mu$ L	

10.2 置於冰上之 2 mL 微量離心管內依序加入 PNM、不含氯化鎂之 10X 緩衝液、25 mM 氯化鎂溶液，最後加 DNA 聚合酶，混合均勻後分別於核酸聚合酶微量反應管內加入 46 $\mu$ L 試劑混合液，操作時均在冰上操作，以維持 DNA 聚合酶活性。

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	不常見非結核分枝桿菌快速核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 459 頁/共 1078 頁	(GenoType Mycobacterium AS)	修訂日期： 年 月 日

10.3 最後加入檢體（不活化處理離心後之上清菌液）4  $\mu$ L。

### 10.4 執行 PCR

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	95 °C	5 分鐘
2. Denature	95 °C	30 秒
3. Annealing	58 °C	2 分鐘
步驟 2. 至步驟 3. 循環重複 10 次		
4. Extension	95 °C	25 秒
	53 °C	40 秒
	70 °C	40 秒
步驟 4. 循環重複 20 次		
5. Final extension	70 °C	8 分鐘
6. Store	16 °C	$\infty$

### 10.5 雜交

- 10.5.1 預熱核酸雜交反應槽至 45°C
- 10.5.2 將 HYB 和 STR 預熱至 37-45°C。
- 10.5.3 在室溫下，將 20  $\mu$ L 之 DEN 加入反應盤中之專用溝槽。
- 10.5.4 加入 20  $\mu$ L 之核酸聚合酶產物與 DEN 混和均勻，反應 5 分鐘。
- 10.5.5 將 1 mL 之 HYB Buffer 加入含有混合物之溝槽中，加入時要避免濺入其他之溝槽中。
- 10.5.6 依序放入標示編號之 GenoType® AS 核酸線性探針反向雜交紙片，並將反應盤置入核酸雜交反應槽反應 45°C 30 分鐘。
- 10.5.7 將 HYB Buffer 完全吸出(例如使用 pipette)，加入 1 mL STR Buffer 至含有核酸線性探針反向雜交紙片之溝槽中，置入核酸雜交反應槽反應 45°C 15 分鐘，此步驟之後續步驟皆在室溫下進行。
- 10.5.8 將 STR Buffer 完全吸出，加入 1 mL RIN Buffer 至含有核酸線性探針反向雜交紙片之溝槽中，擺動清洗 1 分鐘。
- 10.5.9 倒掉 RIN Buffer，加入 1 mL CON 溶液(10  $\mu$ L CON-C 加 1 mL CON-D)，擺動反應 45 分鐘
- 10.5.10 移除 CON 溶液並使用 1 mL 之 RIN Buffer 擺動清洗 1 分鐘 2 次，再加入無菌水 1 mL 擺動清洗 1 分鐘。
- 10.5.11 倒掉無菌水，加入 SUB 溶液(10  $\mu$ L SUB-C 加 1 mL SUB-D)，避光靜置 3 至 20 分鐘，直到核酸線性探針反向雜交紙片呈色完成。
- 10.5.12 加入無菌水 1 mL 擺動清洗 1 分鐘 2 次停止顯色。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	不常見非結核分枝桿菌快速核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 460 頁/共 1078 頁	(GenoType Mycobacterium AS)	修訂日期： 年 月 日

## 11 結果判定

### 11.1 判讀方式

將核酸線性探針反向雜交紙片對齊貼在 GenoType® Mycobacterium AS 評估表(附錄一)，依核酸線性探針反向雜交紙片之顯色位點來與比對表(附錄二)對照，得到檢體之菌株鑑定結果。

11.2 報告核發：菌種鑑定為 *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshorensis*, *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansaii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, 及 *M. shimoidei*

11.3 結果登錄：實驗人員將檢體之檢驗結果記錄於 GenoType AS 紀錄表及並加蓋檢驗者印章及於 LIMS 系統登錄，送報告簽署人審核及蓋章，並於 LIMS 系統覆核後轉實驗室負責人做最終發佈。

## 12 品質管制

12.1 須注意每次實驗試劑的使用批號、保存期限、儲存溫度是否符合，以確保實驗成功。

12.2 每次實驗前確保所有儀器功能正常。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液、及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121°C, 30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

GenoType AS 操作手冊(HAIN)

## 15 附錄

15.1 附錄一

15.2 附錄二

### 15.1 附錄一





# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	常見非結核分枝桿菌快速核酸檢測 (GenoType Mycobacterium CM)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 462 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的  
利用 GenoType® Mycobacterium CM 試劑組，進行分枝桿菌菌株鑑別。
- 2 適用檢體種類  
適用於改良式蛋基培養基 (Löwenstein-Jensen) 或為液態培養基培養出之分枝桿菌菌株。
- 3 名詞解釋  
無
- 4 原理概述  
利用核酸線性探針反向雜交測定技術, 鑑別下列菌株: *M. avium* ssp, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. goodnae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum* / *M. ulcerans*, *M. tuberculosis* complex 及 *M. xenopi*
- 5 試劑耗材
  - 5.1 PNM (Primer-Nucleotide-Mix) (GenoType® Mycobacterium CM 試劑組)。
  - 5.2 DNA 聚合酶 (5 U/μL)。
  - 5.3 25 mM 氯化鎂溶液。
  - 5.4 不含氯化鎂之 10X 緩衝液 (10X buffer w/o MgCl<sub>2</sub>)
  - 5.5 無菌水 (Sterilized deionized H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O)。
  - 5.6 DEN (Denaturation Solution) (GenoType® Mycobacterium CM 試劑組)
  - 5.7 GenoType® Mycobacterium CM 試劑組核酸線性探針反向雜交紙片 (GenoType® CM 試劑組)
  - 5.8 HYB (Hybridization Buffer) (GenoType® Mycobacterium CM 試劑組)
  - 5.9 STR Stringent Wash Solution (GenoType® Mycobacterium CM 試劑組)
  - 5.10 RIN (Rinse Solution) (GenoType® Mycobacterium CM 試劑組)
  - 5.11 CON-C (Conjugate Concentrate) (GenoType® Mycobacterium CM 試劑組)
  - 5.12 CON-D (Conjugate Buffer) (GenoType® Mycobacterium CM 試劑組)
  - 5.13 CON 溶液(1:100 之 CON-C 加 CON-D 配製) (GenoType® Mycobacterium CM 試劑組)
  - 5.14 SUB-C (Substrate Concentrate) (GenoType® Mycobacterium CM 試劑組)
  - 5.15 SUB-D (Substrate Buffer) (GenoType® Mycobacterium CM 試劑組)
  - 5.16 SUB 溶液(1:100 之 SUB-C 加 SUB-D 配製) (GenoType® Mycobacterium CM 試劑組)
  - 5.17 10 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.18 100 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.19 200 μL 具過濾塞之微量吸管尖。
  - 5.20 1000 μL 具過濾塞之微量吸管尖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 463 頁/共 1078 頁


常見非結核分枝桿菌快速核酸檢測  
(GenoType Mycobacterium CM)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 5.21 2 mL 微量離心管。
- 5.22 核酸聚合酶微量反應管。
- 6 儀器設備
- 6.1 核酸聚合酶機器。
- 6.2 微量離心機。
- 6.3 核酸雜交反應槽(TwinCubator<sup>®</sup>)
- 6.4 1–10 µL 微量吸管分注器。
- 6.5 10–100 µL 微量吸管分注器。
- 6.6 10–200 µL 微量吸管分注器。
- 6.7 10–1000 µL 微量吸管分注器。
- 7 環境設施安全
- 7.1 於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 依行政院國科會「基因重組實驗守則」。
- 8 檢體採集
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存
- 參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
- 10.1 配製核酸聚合酶液，單一檢體之核酸聚合酶液含以下配方：
- | 試劑   | 體積 (µl) |
|--|---------|
| PNM (GenoType <sup>®</sup> Mycobacterium CM 試劑組) | 35.0    |
| 不含氯化鎂之 10X 緩衝液                                   | 5.0     |
| 25 mM 氯化鎂溶液                                      | 5.0     |
| DNA 聚合酶  | 0.18    |
| 檢體   | 5.0     |
| 總體積為 50 µL                                       |         |
- 10.2 置於冰上之 2 mL 微量離心管內依序加入 PNM、不含氯化鎂之 10X 緩衝液、25 mM 氯化鎂溶液，最後加 DNA 聚合酶，混合均勻後分別於核酸聚合酶微量反應管內加入 46 µL 試劑混合液，操作時均在冰上操作，以維持 DNA 聚合酶活性。
- 10.3 最後加入檢體（不活化處理離心後之上清菌液）4 µL。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	常見非結核分枝桿菌快速核酸檢測 (GenoType Mycobacterium CM)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 464 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 10.4 執行 PCR

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	95 °C	5 分鐘
2. Denature	95 °C	30 秒
3. Annealing	58 °C	2 分鐘
步驟 2. 至步驟 3. 循環重複 10 次		
4. Extension	95 °C	25 秒
	53 °C	40 秒
	70 °C	40 秒
步驟 4. 循環重複 20 次		
5. Final extension	70 °C	8 分鐘
6. Store	16 °C	∞

## 10.5 雜交

- 10.5.1 預熱核酸雜交反應槽至 45°C
- 10.5.2 將 HYB 和 STR 預熱至 37-45°C。
- 10.5.3 在室溫下，將 20 µL 之 DEN 加入反應盤中之專用溝槽。
- 10.5.4 加入 20 µL 之核酸聚合酶產物與 DEN 混和均勻，反應 5 分鐘。
- 10.5.5 將 1 mL 之 HYB Buffer 加入含有混合物之溝槽中，加入時要避免濺入其他之溝槽中。
- 10.5.6 依序放入標示編號之 GenoType® CM 核酸線性探針反向雜交紙片，並將反應盤置入核酸雜交反應槽反應 45°C 30 分鐘。
- 10.5.7 將 HYB Buffer 完全吸出(例如使用 pipette)，加入 1 mL STR Buffer 至含有核酸線性探針反向雜交紙片之溝槽中，置入核酸雜交反應槽反應 45°C 15 分鐘，此步驟之後續步驟皆在室溫下進行。
- 10.5.8 將 STR Buffer 完全吸出，加入 1 mL RIN Buffer 至含有核酸線性探針反向雜交紙片之溝槽中，擺動清洗 1 分鐘。
- 10.5.9 倒掉 RIN Buffer，加入 1 mL CON 溶液(10µl CON-C 加 1ml CON-D)，擺動反應 45 分鐘。
- 10.5.10 移除 CON 溶液並使用 1 mL 之 RIN Buffer 擺動清洗 1 分鐘 2 次，再加入無菌水 1mL 擺動清洗 1 分鐘。
- 10.5.11 倒掉無菌水，加入 SUB 溶液(10µL SUB-C 加 1mL SUB-D)，避光靜置 3 至 20 分鐘，直到核酸線性探針反向雜交紙片呈色完成。
- 10.5.12 加入無菌水 1 mL 擺動清洗 1 分鐘 2 次停止顯色。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀方式

將核酸線性探針反向雜交紙片對齊貼在 GenoType® Mycobacterium CM

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	常見非結核分枝桿菌快速核酸檢測 (GenoType Mycobacterium CM)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 465 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

評估表(附錄一)，依 strips 之顯色位點來與比對表(附錄二)對照，得到檢體之菌株鑑定結果。

11.2 報告核發：菌種鑑定為 *M. avium ssp*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum* / *M. ulcerans*, *M. tuberculosis complex* 及 *M. xenopi*

11.3 結果登錄：實驗人員將檢體之檢驗結果記錄於 GenoType CM 紀錄表及並加蓋檢驗者印章及於 LIMS 系統登錄，送報告簽署人審核及蓋章，並於 LIMS 系統覆核後轉實驗室負責人做最終發佈。

## 12 品質管制

12.1 須注意每次實驗試劑的使用批號、保存期限、儲存溫度是否符合，以確保實驗成功。

12.2 每次實驗前確保所有儀器功能正常。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121°C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

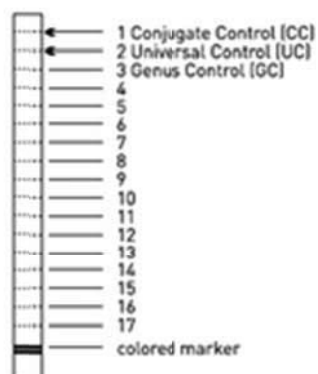
GenoType CM 操作手冊(HAIN)

## 15 附錄

15.1 附錄一

15.2 附錄二

### 15.1 附錄一



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

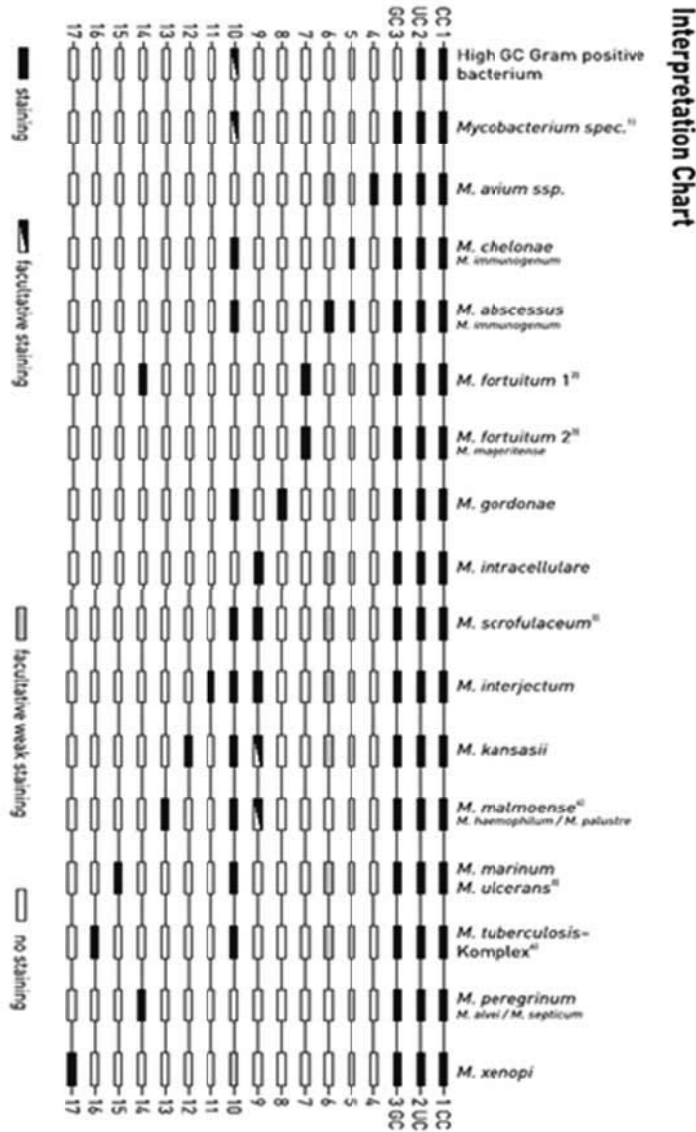


編號：  
頁次：第 466 頁/共 1078 頁


常見非結核分枝桿菌快速核酸檢測  
(GenoType Mycobacterium CM)

核准日期： 年 月 日  
修訂日期： 年 月 日

## 15.2 附錄二



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	B 型肝炎病毒核心 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 467 頁/共 1078 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

定性測試人體血清或血漿中的 B 型肝炎核心抗原之 IgM 抗體(anti-HBc IgM)。ARCHITECT Anti-HBc IgM 分析可用於輔助診斷急性或近期感染之 B 型肝炎。

## 2 適用檢體種類

適用於血清或血漿檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

ARCHITECT Anti-HBc IgM 分析為二步驟免疫分析法，利用化學冷光微粒免疫分析技術，配合彈性式分析過程(亦即 Chemiflex®)，定性測試人類血清及血漿中之 anti-HBc IgM。在第一步驟中，預先稀釋過之樣本和覆被抗人類 IgM (小鼠，單株抗體)的磁性微粒混合，存於樣本中的人類 IgM 會與覆被抗人類 IgM 之微粒結合。經清洗後，具 anti-HBc 特異性的 IgM 會與在第二步驟加入的標幟 acridinium 之重組 B 型肝炎病毒核心抗原 (rHBcAg) 偶合物結合。經另一次清洗循環後，加入啟動前溶液及啟動溶液至反應瓶中。以相對光線單位 (RLUs) 測量最終化學冷光反應，樣本中的 anti-HBc IgM 含量與 ARCHITECT i-1000 光學系統所測得之 RLUs 有直接相關性。

檢體中的 anti-HBc IgM 存在與否，經由比較反應之化學冷光訊號及由 ARCHITECT Anti-HBc IgM 校正劑測得之臨界值來判定。若反應之化學冷光訊號值大於或等於臨界值，則檢體視為以 ARCHITECT Anti-HBc IgM 所測定之 anti-HBc IgM 有反應性。

## 5 試劑耗材

### 5.1 試劑

5.1.1 ARCHITECT Anti-HBc IgM 試劑組 (List No. 6C33)。1 或 4 瓶 (5.6 mL) 覆被抗人類 IgM (小鼠、單株抗體) 之微粒於含蛋白質穩定劑 (牛、山羊) 之 TRIS 緩衝液中。最小濃度：0.12 % 固體。防腐劑：抗菌劑。

5.1.2 1 或 4 瓶 (5.9 mL) 標幟 Acridinium 之 B 型肝炎病毒核心抗原 (大腸桿菌、重組) 偶合物於含蛋白質穩定劑 (牛) 之 succinate 緩衝液中。最小濃度：0.4 µg/mL，防腐劑：抗菌劑。

5.1.3 ARCHITECT i 前激發溶液 (Pre-Trigger Solution)：含 1.32 % (w/v) 過氧化氫。

5.1.4 ARCHITECT i 激發溶液 (Trigger Solution)：含 0.35 N 氫氧化鈉。

5.1.5 ARCHITECT i 清洗液 (Washing Buffer)：含磷酸緩衝食鹽水，防腐劑：抗菌劑。

5.1.6 ARCHITECT i Anti-HBc IgM calibrator 校正液 (No. 6C33-01)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

B 型肝炎病毒核心 IgM 抗體檢測  
(化學冷光微粒免疫分析法)

核准日期： 年 月 日

頁次：第 468 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

- 5.1.7 ARCHITECT i Anti-HBc IgM control 對照劑 (No. 6C33-10)。
- 5.1.8 ARCHITECT i probe conditioning solution 探針清洗液。
- 5.1.9 漂白水。
- 5.2 耗材
  - 5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L。
  - 5.2.2 反應容器 (Reaction vessels)。
  - 5.2.3 樣本杯 (Sample cups)。
  - 5.2.4 試劑軟蓋 (Septums)。
  - 5.2.5 可拋棄式無菌塑膠手套。
- 6 儀器設備
  - 6.1 儀器：Architect i-1000 分析儀。
  - 6.2 第二級生物安全操作櫃 (Class II BSC)。
  - 6.3 微量吸管 (pipettes)：1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L。
  - 6.4 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。
  - 6.5 4  $^{\circ}$ C 冰箱。
  - 6.6 -20  $^{\circ}$ C 冷凍櫃。
  - 6.7 高壓滅菌鍋。
- 7 環境設施安全  
於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 8 檢體採集  
參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存  
參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
  - 10.1 待測病患檢體依照檢體 Bar code 編號 (由小至大) 排序。
  - 10.2 檢體前處理：
    - 10.2.1 待測檢體 (血清、血漿) 需先震盪混合均勻並以 10,000  $\times$  g 離心 10 分鐘去除雜質，取其上清液。
    - 10.2.2 第一次測試最小樣本杯檢體體積為 150  $\mu$ L，每多一次測試增加檢體 14  $\mu$ L，將樣本杯依序放置於檢體架上。
  - 10.3 檢驗步驟：
    - 10.3.1 由 Main Menu 中按 Orders 進入選項 calibration order、control order 依序輸入位置後，各選擇 IgM anti-HBc 項目，按 Add order。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 469 頁/共 1078 頁

B 型肝炎病毒核心 IgM 抗體檢測  
(化學冷光微粒免疫分析法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 10.3.2 將已放入校正液和對照劑之檢體架放進 i-1000 分析儀中，進行品管分析。
  - 10.3.3 點選 Orders 後再點選 Patient order。
  - 10.3.4 輸入 Carrier 號碼。
  - 10.3.5 輸入 C/P (檢體放置於檢體架上之位置) 及 SID (檢體編號)，亦可輸入 PID (病歷號)。(整批檢體輸入請依 Batch Order 方式)。
  - 10.3.6 點取測試項目 IgM anti-HBc。
  - 10.3.7 點取 F3 Add order。
  - 10.3.8 將放有檢體之 Carrier 放置於 load queue 上，即可開始分析測試。
- 10.4 Batch Order:
- 10.4.1 檢體不含 barcode  
於 Patient orders 畫面中點選 Batch 即進入 Batch order 畫面,只要於 Starting C:及 P:輸入第一支檢體 carrier 號碼及位置然後於 Number of samples 輸入檢體數目接著點選欲上機之 Assay 項目再點選 F3-Add order 即可。
  - 10.4.2 檢體含 barcode  
於 Patient orders 畫面中點選 Batch 並於 Starting SID 輸入第一支檢體之 SID 於 Ending SID 輸入最後一支檢體 SID 接著點選 Assays 後按 F3-Add order 即可。檢驗後處理
  - 10.5.1 完成檢驗，IgM anti-HBc 試劑組貯存於 4 °C 冰箱保存。
  - 10.5.2 執行關機前做好保養工作，按 F1 Exit 鍵讓螢幕回到 Main Menu，按 F2 Shutdown 鍵，選擇 OK，等待螢幕告知 Shutdown 完全後，才可關掉電源和印表機。
  - 10.5.3 檢驗後之檢體應依序歸回檢體盒，放置-20 °C 冰箱保存。
  - 10.5.4 整理清除實驗工作桌面上之抗污紙墊及使用後拋棄之微量吸管尖、手套包裝於廢棄物滅菌塑膠袋。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

#### 11.1.1 計算結果原理

ARCHITECT i-1000 系統由 ARCHITECT IgM anti-HBc 校正劑 1 及校正劑 2 三次測試結果之平均化學冷光訊號計算出臨界值比率 (CO) 並儲存結果。

臨界值 RLU = [(校正劑 2 平均 RLU 值-校正劑 1 平均 RLU 值) × 0.75] + 校正劑 1 平均 RLU 值。儲存每一批號試劑校正之臨界值 RLU。

ARCHITECT i-1000 系統根據樣本 RLU 對臨界值 RLU 之比率 (S/CO) 計算每一個樣本及對照劑之分析結果。

$S/CO = \text{樣本 RLU} / \text{臨界值 RLU}$

以 ARCHITECT IgM anti-HBc 分析檢體 S/CO 值 < 1.00，視為無

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 470 頁/共 1078 頁

B 型肝炎病毒核心 IgM 抗體檢測  
(化學冷光微粒免疫分析法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

反應性 (陰性)。以 ARCHITECT IgM anti-HBc 分析檢體 S/CO 值 $\geq 1.00$ ，視為有反應性 (陽性)。

11.1.2 第一次檢測有陽性反應之檢體應再複測試一次，檢驗結果有反應性，檢體可確認為陽性反應。

11.1.3 檢驗結果由檢驗儀器傳回電腦再列印出檢驗數據結果，並於列印紙上蓋章。

11.2 報告核發：IgM anti-HBc (陽性)、IgM anti-HBc (陰性)。

11.3 結果登錄：將檢驗結果填寫於檢體送驗單之”檢驗結果”欄，並於送驗單背面蓋職章，相關檢驗紀錄及檢體送驗單陳核實驗室主管審核，由本署內部之網站應用系統進入傳染病通報系統輸入檢驗結果並以電子傳真輸送。

11.3.1 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。

11.3.2 臨床意義：

ARCHITECT IgM anti-HBc 分析利用標示 acridinium 之重組 B 型肝炎病毒核心抗原 (rHBcAg) 偶合物來測定 IgM anti-HBc。大部分的急性病毒感染都可偵測到具有病毒特異性的 IgM 抗體，因此其為急性病症的一項可靠標記。病患在急性感染時，IgM anti-HBc 的濃度會迅速上升；急性 B 型肝炎患者中可偵測到高量的 IgM anti-HBc。雖然 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 通常也被當作是急性感染的一個血清學標記，但有些病例的 HBsAg 卻無法測得。IgM anti-HBc 在恢復期時會一直存在到 HBsAg 消失後，然後便慢慢減少。鑑於大家對其他 B 型肝炎病毒 (HBV) 的標記所知不多，若一個人具有可測量到的 IgM anti-HBc 時，應將其視為正受到 HBV 感染或感染已痊癒。IgM anti-HBc 也會存在於慢性 B 型肝炎患者中，但其濃度通常低於急性感染的人，且會隨著疾病的惡化而上升或下降。單靠病毒的標記 (像是 HBsAg、anti-HBs、HBeAg、anti-HBe 及 anti-HBc) 很難判別是急性或慢性 B 型肝炎病毒的感染，因為這些標記大部分會同時出現在急性及慢性疾病中。高濃度的 IgM anti-HBc 與急性 B 型肝炎有高度的相關性，因此 IgM anti-HBc 之檢測可用來輔助區分 HBV 所引起的急性肝炎或是 A 型肝炎、C 型肝炎或 delta 病毒等其他可能的致病因所引起的附加感染 (superimposed infection)。

## 12 品質管制

12.1 應於有效期限內使用，不同批號試劑組，其試劑不可混合使用。

12.2 每個月或更換試劑批號時都需做校正，此外亦需根據每日對照劑的測試結果，決定是否重新校正。校正液與對照劑使用前要上下均勻混合，動作溫和避免氣泡。為得到建議所需之 ARCHITECT IgM anti-HBc 校正液及對照劑量，垂直握住瓶子，滴 5 滴校正液 1 及校正液 2 與陰性、陽性對照劑各 5 滴於各自樣本杯中。

12.3 每次進行檢測試驗皆須加入陰性、陽性對照劑進行測定



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 471 頁/共 1078 頁

B 型肝炎病毒核心 IgM 抗體檢測  
(化學冷光微粒免疫分析法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

陰性對照劑： $\leq 0.25$  (IU/mL)

陽性對照劑：1.608 ~ 4.825 (IU/mL)

當其測定值落在可接受區間內，就可以繼續進行檢體的測定。若對照劑的測定值超出可接受區間，必須進一步檢視問題，並一一予以確認和排除，然後再重新以對照劑完成品管檢測作業，最後才進行檢體的測定。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 分鐘高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料


ARCHITECT i-1000 IgM anti-HBc 原廠試劑說明書。

## 15 附錄

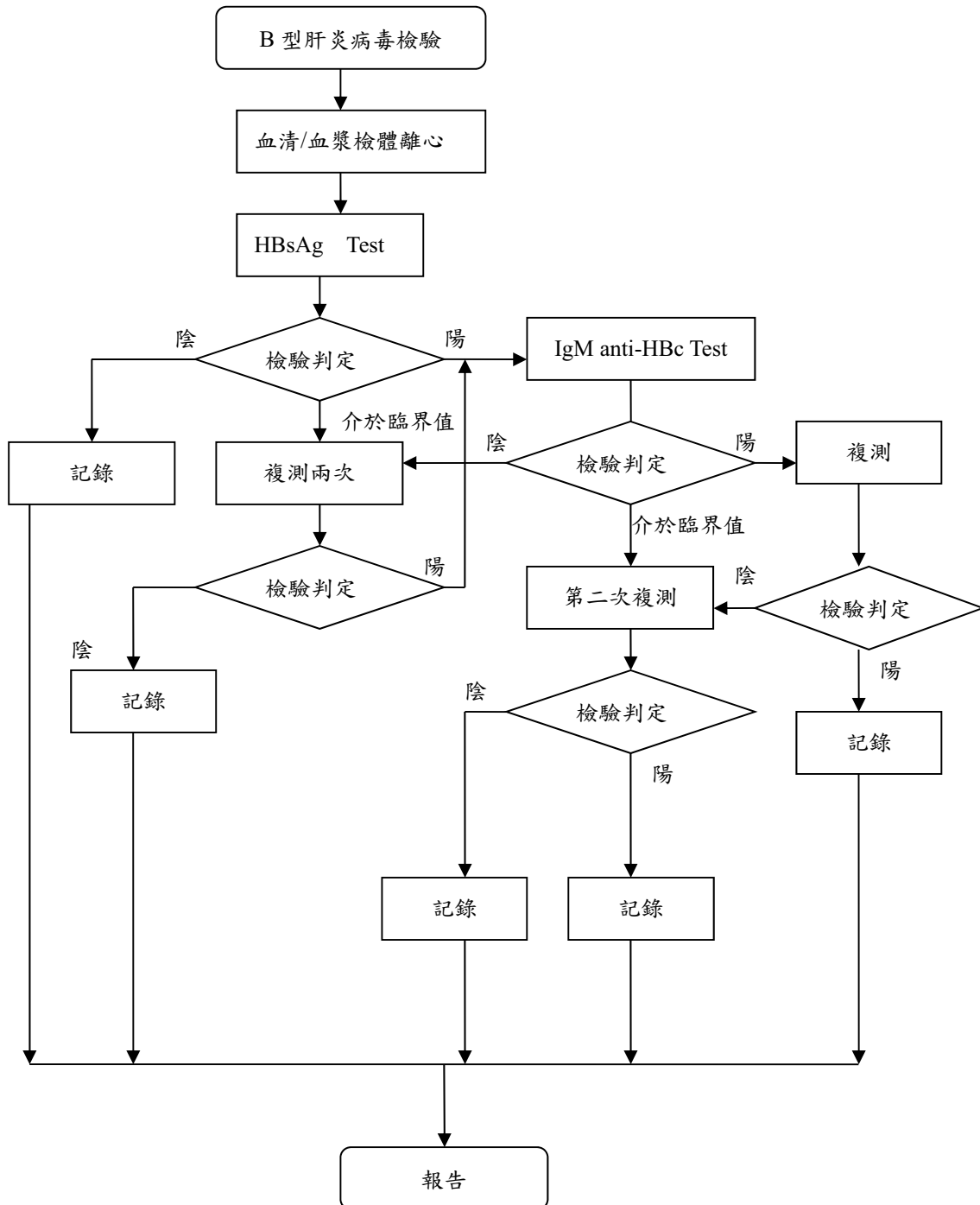
15.1 急性 B 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖。

15.2 B 型肝炎病毒核心抗體 IgM 試驗(化學冷光微粒免疫分析法)流程圖。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	B 型肝炎病毒核心 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 472 頁/共 1078 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 急性 B 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

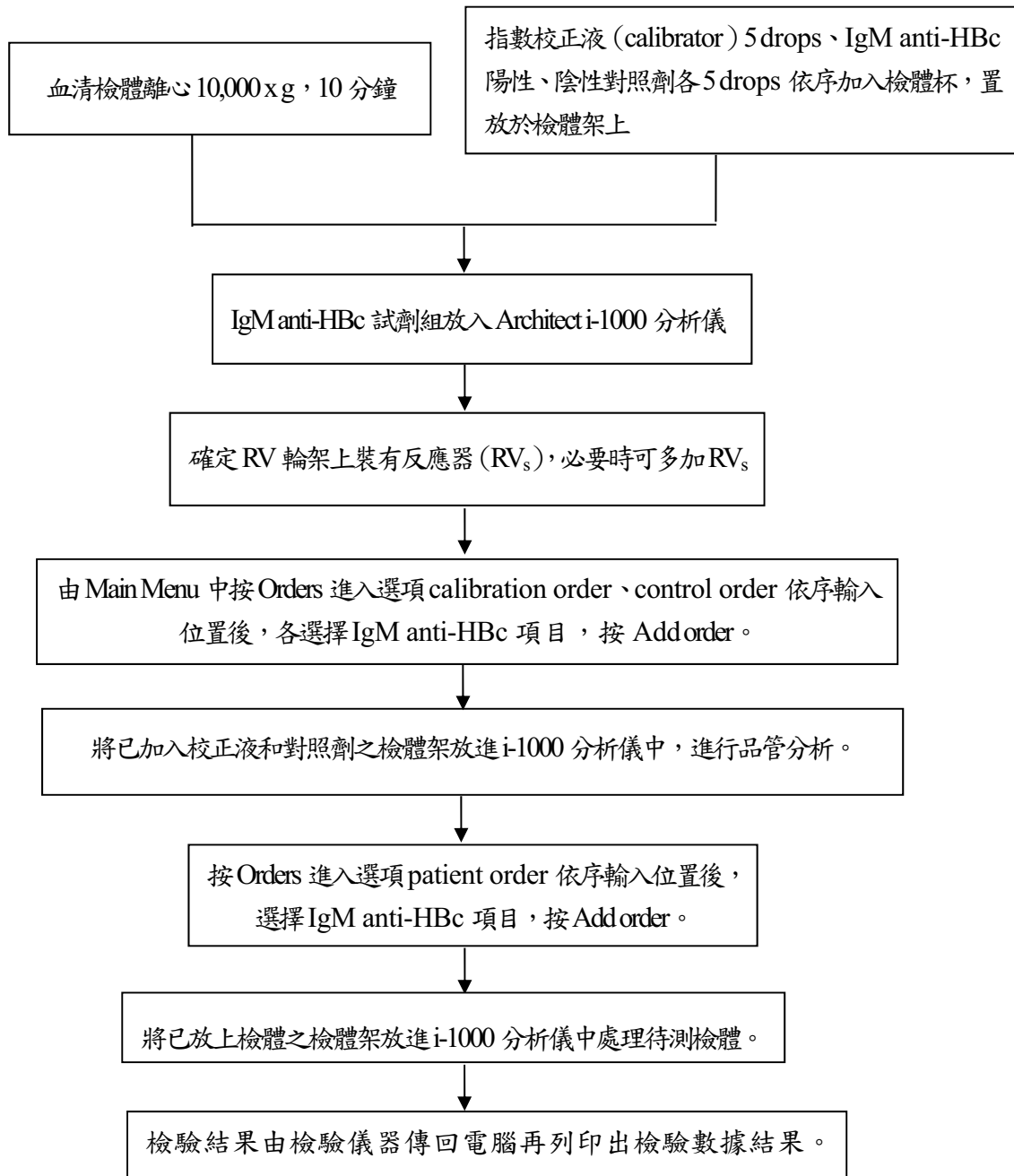
B 型肝炎病毒核心 IgM 抗體檢測  
(化學冷光微粒免疫分析法)

核准日期： 年 月 日


頁次：第 473 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 B 型肝炎病毒核心抗體 IgM 試驗 (化學冷光微粒免疫分析法) 流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	C 型肝炎病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 474 頁/共 1078 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

定性測試人類血清及血漿中之 C 型肝炎病毒抗體。

## 2 適用檢體種類

適用於血清或血漿檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述


ARCHITECT anti-HCV 分析為二步驟免疫分析法，利用化學冷光微粒免疫分析技術，定性測試人類血清及血漿中之 anti-HCV。在第一步驟，樣本、覆被重組 HCV 抗原的磁性微粒和分析稀釋液混合，存於樣本中的 anti-HCV 會與覆被 HCV 抗原之微粒結合，經清洗後，標示 Y 啶(Acridinium)的抗人類抗體偶合物於第二步驟加入，經另一次清洗循環後，加入啟動前溶液及啟動溶液於反應混合物中，以相對光線單位 (RLUs) 測量最終化學冷光反應，樣本中 anti-HCV 含量與 ARCHITECT i -1000 光學系統所測得 RLUs 有直接相關性。檢體中 anti-HCV 存在與否，經由比較反應化學冷光訊號及由 ARCHITECT anti-HCV 校正劑測得之臨界值來判定。若檢體之化學冷光訊號值大於或等於臨界值，則檢體為 anti-HCV 有反應性。

## 5 試劑耗材

### 5.1 試劑


- 5.1.1 ARCHITECT anti-HCV 試劑組 (No.6C37)。1 或 4 瓶 (每 100 次測試瓶裝 6.6 mL 或每 500 次測試瓶裝 27.0 mL) 覆被 HCV 抗原 (大腸桿菌，酵母菌，重組蛋白) 微粒於 MES 緩衝液。最小濃度：0.14 % 固體。  
保存劑：抗菌劑。
- 5.1.2 1 或 4 瓶(每 100 次測試瓶裝 5.9mL 或每 500 次測試瓶裝 26.3 mL) 偶合物：標示 Y 啶 (Acridinium) 之鼠 anti-IgG/anti-IgM 偶合物於 MES 緩衝液。最小濃度：(IgG) 8 ng/mL/(IgM) 0.8 ng/mL。  
保存劑：抗菌劑。
- 5.1.3 1 或 4 瓶(每 100 次測試瓶裝 10.0 mL 或每 500 次測試瓶裝 50.9 mL) anti-HCV 分析稀釋液，含蛋白質穩定劑之 TRIS 緩衝液。  
保存劑：抗菌劑。
- 5.1.4 ARCHITECT i 前激發溶液 (Pre-Trigger Solution)：含 1.32 % (w/v) 過氧化氫。
- 5.1.5 ARCHITECT i 激發溶液 (Trigger Solution)：含 0.35 N 氫氧化鈉。
- 5.1.6 ARCHITECT i 清洗液 (Washing Buffer)：含磷酸緩衝食鹽水，防腐劑：抗菌劑。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	C 型肝炎病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 475 頁/共 1078 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 5.1.7 ARCHITECT i HAVAb-IgM calibrator 校正液 (No.6C37-01)。
- 5.1.8 ARCHITECT i HAVAb-IgM control 對照劑 (No.6C37-10)。
- 5.1.9 ARCHITECT i probe conditioning solution 探針清洗液。
- 5.1.10 漂白水。
- 5.2 耗材
  - 5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L。
  - 5.2.2 反應容器 (Reaction vessels)。
  - 5.2.3 樣本杯 (Sample cups)。
  - 5.2.4 試劑軟蓋 (Septums)。
  - 5.2.5 可拋棄式無菌塑膠手套。
- 6 儀器設備
  - 6.1 儀器：Architect i-1000 分析儀。
  - 6.2 第二級生物安全操作櫃 (Class II BSC)。
  - 6.3 微量吸管 (pipettemen)：1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L。
  - 6.4 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。
  - 6.5 4 $^{\circ}$ C 冰箱。
  - 6.6 -20 $^{\circ}$ C 冷凍櫃。
  - 6.7 高壓滅菌鍋。
- 7 環境與施安全  
於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 8 檢體採集  
參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢體運送及保存  
參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 10 檢驗步驟
  - 10.1 待測病患檢體依照檢體 Bar code 編號 (由小至大) 排序。
  - 10.2 檢體前處理：
    - 10.2.1 待測檢體 (血清、血漿) 需先震盪混合均勻並以 10,000  $\times$  g 離心 10 分鐘去除雜質，取其上清液。
    - 10.2.2 第一次測試最小樣本杯檢體體積為 150  $\mu$ L，每多一次測試增加檢體 20  $\mu$ L，將樣本杯依序放置於檢體架上。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	C 型肝炎病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 476 頁/共 1078 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

## 10.3 Sample Order：

- 10.3.1 由 Main Menu 中按 Orders 進入選項 calibration order、control order 依序輸入位置後，各選擇 HCV 項目，按 Add order。
- 10.3.2 將已放入校正液和對照劑之檢體架放進 i-1000 分析儀中，進行品管分析。
- 10.3.3 點選 Orders 後再點選 Patient order。
- 10.3.4 輸入 Carrier 號碼。
- 10.3.5 輸入 C/P (檢體放置於檢體架上之位置) 及 SID (檢體編號)，亦可輸入 PID (病歷號)。(整批檢體輸入請依 Batch Order 方式)
- 10.3.6 點取測試項目 HCV。
- 10.3.7 點取 F3 Add order。
- 10.3.8 將放有檢體之 Carrier 放置於 load queue 上，即可開始分析測試。

## 10.4 Batch Order：

- 10.4.1 檢體不含 barcode  
於 Patient orders 畫面中點選 Batch 即進入 Batch order 畫面,只要於 Starting C:及 P:輸入第一支檢體 carrier 號碼及位置然後於 Number of samples 輸入檢體數目接著點選欲上機之 Assay 項目再點選 F3-Add order 即可。
- 10.4.2 檢體含 barcode  
於 Patient orders 畫面中點選 Batch 並於 Starting SID 輸入第一支檢體之 SID 於 Ending SID 輸入最後一支檢體 SID 接著點選 Assays 後按 F3-Add order 即可。檢驗後處理
- 10.5.1 完成檢驗，HCV 試劑組貯存於 4 °C 冰箱保存。
- 10.5.2 執行關機前做好保養工作，按 F1 Exit 鍵讓螢幕回到 Main Menu，按 F2 Shutdown 鍵，選擇 OK，等待螢幕告知 Shutdown 完全後，才可關掉電源和印表機。
- 10.5.3 檢驗後之檢體應依序歸回檢體盒，放置-20 °C 冰箱保存。
- 10.5.4 整理清除實驗工作桌面上之抗污紙墊及使用後拋棄之微量吸管尖、手套包裝於廢棄物滅菌塑膠袋。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

#### 11.1.1 計算結果原理

ARCHITECT i-1000 系統自 3 次校正液 1 測試結果計算 anti-HCV 校正液 1 平均化學冷光訊號並儲存結果。

ARCHITECT anti-HCV 分析依 S/CO 計算結果。

臨界值計算：校正液 1 平均 RLU 值 x 0.074 = 臨界值 RLU ；

S/CO = 樣本 RLU/臨界值 RLU。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 477 頁/共 1078 頁

C 型肝炎病毒抗體檢測

(化學冷光微粒免疫分析法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- 11.1.2 檢體之 S/CO 小於 1.00 者可視為呈陰性反應，若檢體之 S/CO 大於或等於 1.00 者為陽性反應。
- 11.1.3 第一次檢測有陽性反應之檢體應再複測試一次，檢驗結果有反應性，檢體可確認為陽性反應。
- 11.1.4 初驗於灰區 (Gray zone) 範圍內 (S/CO 0.80 - 0.99) 之檢體，應以 10,000 x g 離心 15 分鐘，取其上清液，再重測二次 (duplicate)。
- 11.1.5 檢驗結果由檢驗儀器傳回電腦再列印出檢驗數據結果，並於列印紙上蓋章。
- 11.2 報告核發：anti-HCV (陽性)、anti-HCV (陰性)。
- 11.3 結果登錄：將檢驗結果填寫於檢體送驗單之”檢驗結果”欄，並於送驗單背面蓋職章，相關檢驗紀錄及檢體送驗單陳核實驗室主管審核，由本署內部之網站應用系統進入傳染病通報系統輸入檢驗結果並以電子傳真輸送。
- 11.3.1 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。
- 11.3.2 臨床意義：  
HCV 為血液傳染性病毒，利用酵素免疫分析偵測抗 HCV 重組抗原之抗體的血清學研究証實，HCV 為大部份血液傳染及社區感染性非 A 非 B 型肝炎之主因。anti-HCV 之存在表示個體可能已感染 HCV，可能帶有感染性 HCV，並可能傳染給他人。雖然大部份受感染者可能無症狀表現，HCV 感染可能發展成慢性肝炎、肝硬化及增加肝細胞癌之危險性。以酵素免疫分析法進行捐血者 anti-HCV 篩檢，已大幅降低輸血傳染性肝炎之危險。

## 12 品質管制

- 12.1 應於有效期限內使用，不同批號試劑組，其試劑不可混合使用。
- 12.2 每個月或更換試劑批號時都需做校正，此外亦需根據每日對照劑的測試結果，決定是否重新校正。校正液與對照劑使用前要上下均勻混合，動作溫和避免氣泡。為得到建議所需之 ARCHITECT anti-HCV 校正液及對照劑量，垂直握住瓶子，各滴 5 滴校正液與陰性、陽性對照劑各 6 滴於各自樣本杯中。
- 12.3 每次進行檢測試驗皆須加入陰性、陽性對照劑進行測定：  
陰性對照劑 (SCO)  $\leq 0.6$   
陽性對照劑 (SCO) 1.71 - 5.13  
當其測定值落在可接受區間內，就可以繼續進行檢體的測定。若對照劑的測定值超出可接受區間，必須進一步檢視問題，並一一予以確認和排除，然後再重新以對照劑完成品管檢測作業，最後才進行檢體的測定。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

C 型肝炎病毒抗體檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 478 頁/共 1078 頁

(化學冷光微粒免疫分析法)

修訂日期： 年 月 日

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

ARCHITECT anti-HCV 原廠試劑說明書。


## 15 附錄

15.1 急性 C 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖。

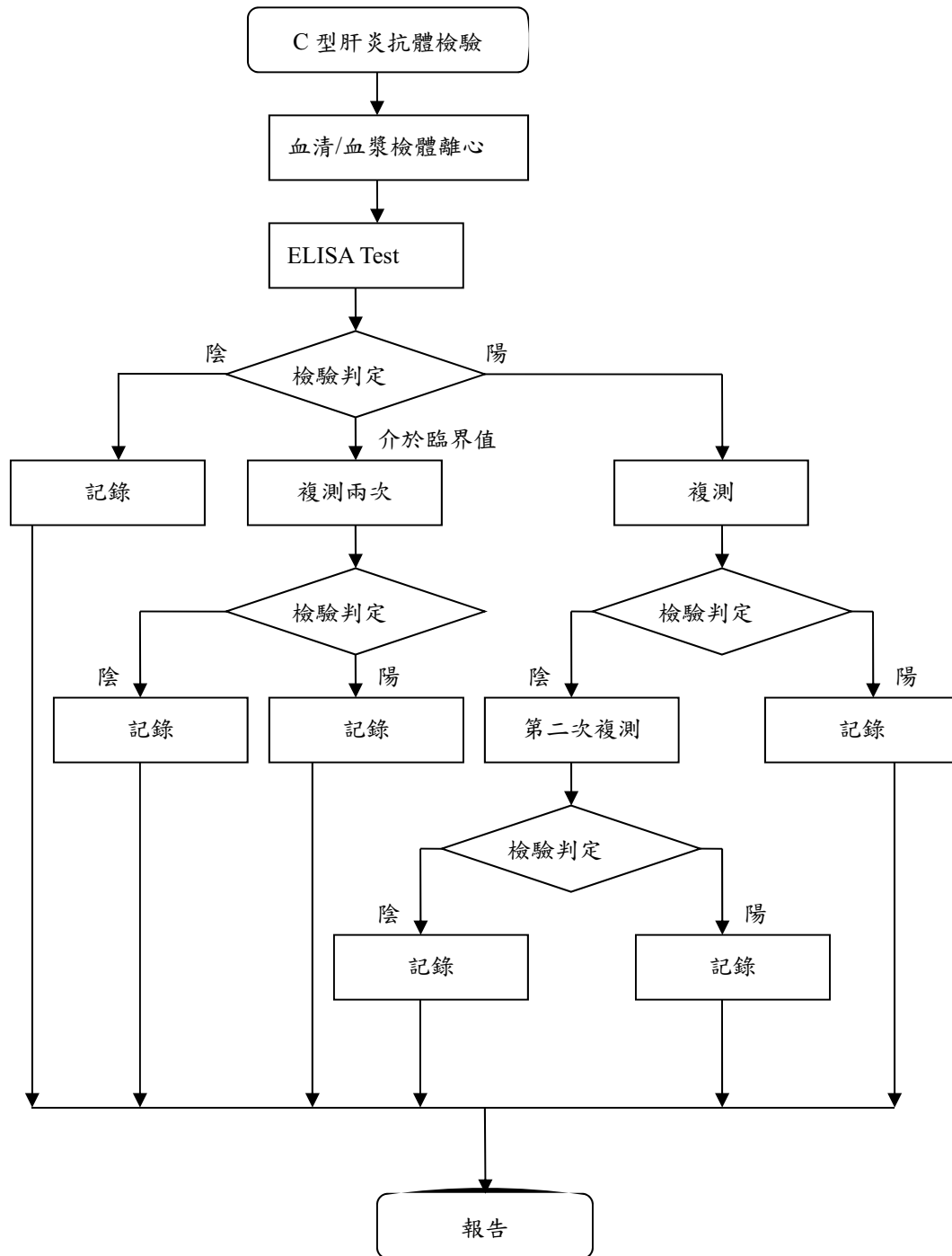
15.2 C 型肝炎病毒抗體試驗（化學冷光微粒免疫分析法）流程圖。



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	C 型肝炎病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 479 頁/共 1078 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 急性 C 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

C 型肝炎病毒抗體檢測

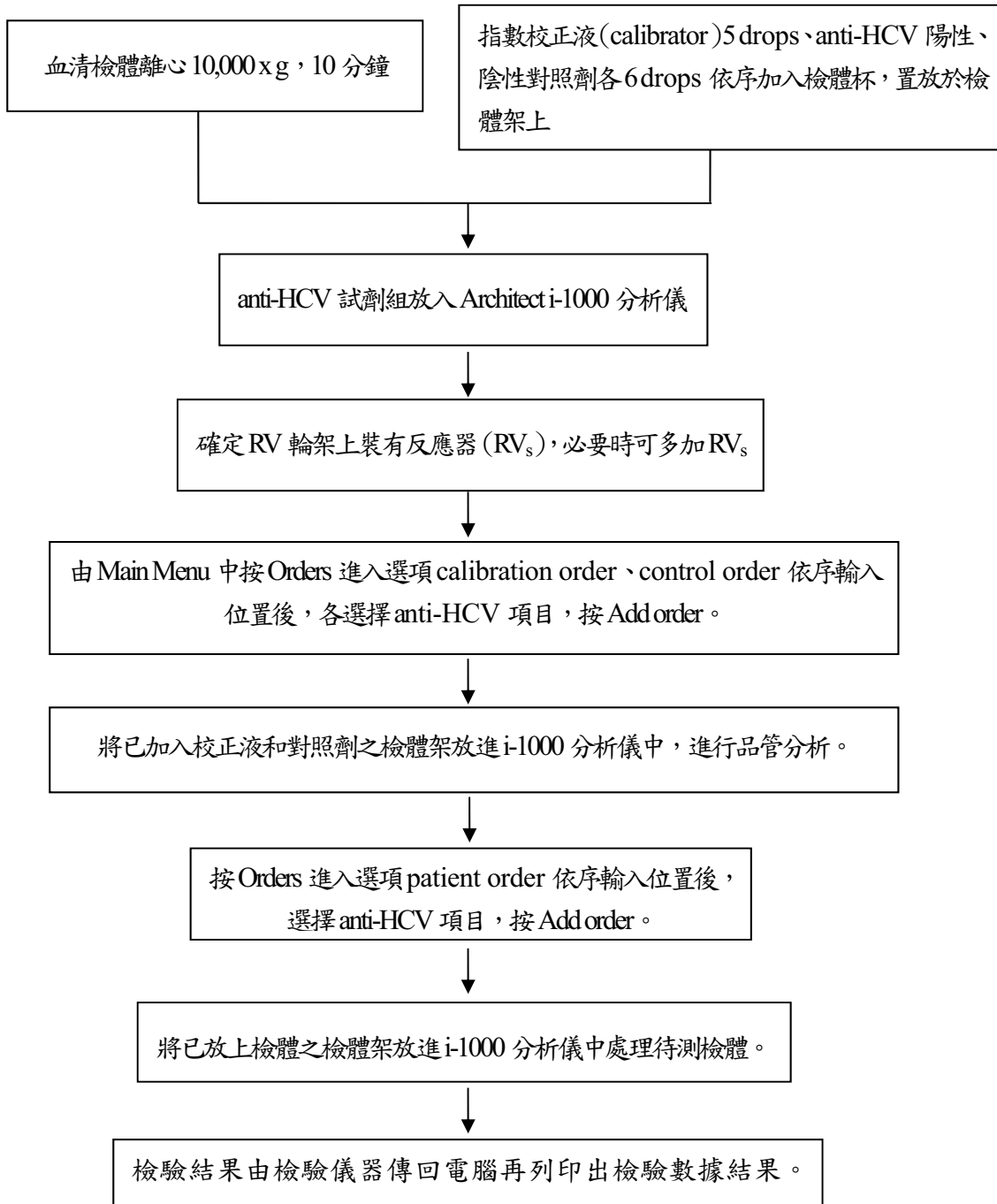
核准日期： 年 月 日

頁次：第 480 頁/共 1078 頁


(化學冷光微粒免疫分析法)

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 C 型肝炎病毒抗體試驗 (化學冷光微粒免疫分析法) 流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	C 型肝炎病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 481 頁/共 1078 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以分子生物學之技術利用即時反轉錄酶-聚合酶鏈鎖反應 (Real time-RT-PCR) 來檢測檢體中 C 型肝炎病毒 RNA。

## 2 適用檢體種類

適用於人體之血清及血漿檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用 ABBOTT RealTime HCV 檢驗試劑搭配 ABBOTT m2000 system，先將檢體血液中的 C 型肝炎病毒顆粒打破，讓 HCV 核酸裸露，讓 RNA 與磁珠結合，經由多次沖洗將其他雜質去除，最後將病毒 RNA 洗出。接著使用 RT - PCR 的方法產生 HCV 臨床檢體 RNA 基因體的擴增產物。在開始樣本準備時即在每一檢體中加入一段與 HCV 目標序列無關的 RNA 序列。此無相關性的 RNA 序列在 RT - PCR 過程中同步被擴增，作為內部對照 (internal control, IC)，用以驗證每一個樣本的測試程序正確。每一次 PCR 循環中 HCV 目標序列的產量都在 m2000 系統中以測定螢光標示的寡核酸探針來定量。探針唯有專一性鍵結在擴增產物上才會產生螢光訊號。每一個樣本中 m2000 偵測到螢光訊號的 PCR 擴增循環數會對應到原始樣本中 RNA 濃度的對數值，再帶到由校準液所建立的標準曲線運算得到樣本濃度。

## 5 試劑耗材

### 5.1 mSample Preparation System：Abbott, Germany。

- 5.1.1 Abbott mLysis。
- 5.1.2 Abbott mWash 1。
- 5.1.3 Abbott mWash 2。
- 5.1.4 Abbott mElution Buffer。
- 5.1.5 Abbott mMicroparticles。

### 5.2 Abbott RealTime HCV Assay：Abbott, Germany。

- 5.2.1 Abbott RealTime HCV Amplification Reagent：含 internal control、rTth polymerase Enzyme、HCV Oligonucleotide reagent、activation reagent。
- 5.2.2 Abbott RealTime HCV Control Kit：含 high positive control、low positive control、negative control。
- 5.2.3 Abbott RealTime HCV Calibrator Kit：含 Calibrator A、Calibrator B。


### 5.3 Deep well plate。

### 5.4 DiTis (1 mL tips)、DiTis (200 $\mu$ L tips)。

### 5.5 Reagent vessels。

### 5.6 Reaction vessels。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法


	編號：	C 型肝炎病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 482 頁/共 1078 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 5.7 master mix tube。
- 5.8 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L、20  $\mu$ L、10  $\mu$ L。
- 5.9 96-well Optical Reaction Plate。
- 5.10 光學增強膜。
- 6 儀器設備
  - 6.1 第 II 級生物安全櫃 (Class II BSC)。
  - 6.2 m2000sp<sup>TM</sup> 全自動核酸萃取系統。
  - 6.3 m2000rt 即時定量聚合酶鏈鎖反應系統。
  - 6.4 微量吸管 (pipettement)：1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L、20  $\mu$ L、10  $\mu$ L。
  - 6.5 振盪器 (vortexer)。
  - 6.6 採血管離心機。
  - 6.7 冰箱：4  $^{\circ}$ C。
  - 6.8 冷凍櫃：-20  $^{\circ}$ C、-80  $^{\circ}$ C。
  - 6.9 高壓滅菌鍋。
  - 6.10 Applicator。
- 7 檢體採集

參考本署之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 8 檢體運送及保存

參考本署之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。
- 9 檢驗步驟
  - 9.1 檢體編號登錄。
  - 9.2 檢驗前處理
    - 9.2.1 血清或添加 EDTA 抗凝劑的血漿皆可使用。
    - 9.2.2 採集後之檢體，以 3,000 x g 離心 10 分鐘，將分離出的血清備用。
    - 9.2.3 檢體分裝：將處理好之血清檢體分成兩管：一管放置-20  $^{\circ}$ C 供 PCR 檢驗用；另一管放置-80  $^{\circ}$ C 儲存。
    - 9.2.4 吸取檢體 800  $\mu$ L 加入 reaction vessel(檢體如果出現顆粒沉澱或是混濁，測試前應用 2000g 離心 5 分鐘後取上清液測試)，將 reaction vessel 和 control (包括 high positive control、low positive control 和 negative control 各一管)、calibrator (Calibrator A 和 Calibrator B 各三管)置於檢體架上，並檢體架放置於工作台上，確定放置穩定並卡入後方之卡榫。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	C 型肝炎病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 483 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

- 9.2.5 放入空的 DiTi tray 及 Deep Well 在 DiTi reuse rack 上，另外再放置一個 deep well plate 到 output deck (A1 朝左上方，有缺角的朝左下方)。
- 9.2.6 放入新的 1,000 μL DiTis 到 carrier，並將 carrier 放置於工作台上 (一支待測檢體需要約 10 支 1,000 μL 的 DiTis tips)。
- 9.2.7 將 reaction vessel 放進 subsystem carrier，蓋上 cover，放至 heater zone 1。
- 9.2.8 Internal Control 充分的 vortex，取 500 μL 加到 Lysis Buffer；準備劑槽 (Reagent Vessel)：先將試劑貼紙靠試劑槽右邊的邊線貼好 (Barcode 朝右)，再依照 reagent carrier 上的標示放入，依標籤上的試劑號碼倒入。(Lysis Buffer 及 Wash Buffer 儘量避免有氣泡產生)。
- 9.2.9 試劑都加好後，依照指定位置放到工作台上，確定有將 Reagent vessel Carriers 推到底部。
- 9.2.10 檢查 System Liquid container (液壓系統用水儲存桶)、Solid waste container (固態廢棄物垃圾桶) 及 Liquid waste container (液體廢棄物垃圾桶)，如果超過下列標準，則系統無法開始進行萃取

Container	Liquid/Solid Level
Solid Waste	<½ Full
Liquid Waste	<¾ Full (以 RO 水補充)
System Liquid	>¼ Full

## 9.3 萃取病毒 RNA

- 9.3.1 打開 m2000sp™ 機器和電腦的電源，電腦開機完成後會自動進入 m2000sp™ 的系統輸入帳號密碼後進入主畫面登入之後，此時點選畫面左方的 Start 進行初始，初始化完成後系統呈現 Ready 狀態。
- 9.3.2 由 Instrument Status 點選 **Orders**，再點選 **Sample Extraction**。
- 9.3.3 在 Application Specification list 下，再選取 **m2000 HCV 0.5 ml**。選好 protocol 後，由畫面左邊的項目中點選 **Set Up Run**。
- 9.3.4 依序輸入以下項目的資料：
  - <Run Name> 可自己設定名稱
  - <Comment> 輸入要補充的資料
  - <Control Information> <Calibrator Information> 包括 lot number、Expiration date 及濃度；若是同一批號，可直接選擇上次保存的批號資料。
 註：Calibration 只要作一次系統就會記憶，不需要每次都重作，只有在以下情形再重作即可：
  - \* Amplification Reagent Kit 或 Sample Preparation System 換批號時

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

頁次：第 484 頁/共 1078 頁


C 型肝炎病毒核酸檢測  
(Real-time RT-PCR)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

- \* 選擇不同的 sample volume 的 protocol 時(Ex：即使同樣為抽取 HCV RNA 的 protocol，但選擇不同的 sample volume，原本為 0.5 ml，但要改成 0.2 ml 時就要重新作 Calibration)
- \* 距離前一次做 Calibration 半年後(m2000rt 作光學保養後)
- 9.3.5 點選 **Next** 後會出現 Sample Extraction: Sample Scan 畫面，選擇 **Scan**，完成後若有條碼會直接顯示在螢幕上，無條碼需輸入檢體編號。
- 9.3.6 點選 **Next** 進到 Sample Extraction：Control and Calibrator Warning 畫面，如果沒有任何 Warning 出現，則點選 **Next**。
- 9.3.7 點選 **Next** 後出現 Sample Extraction: Reagent Setup 的畫面，輸入以下資料：  
輸入<Deep Well Plate ID>  
輸入<Reagent Lot Number>  
輸入<Expiration Date>，月/年
- 9.3.8 點選 **Next**，Sample Extraction：Reagent Scan，點選 **Scan** 進行 scan。如果沒有錯誤，會出現 **Next** (如果 Reagent Vessel Carriers 有放錯位置，則會以紅字標出放錯的位置，更正之後再點選 **Rescan** 重新掃描)，點選後出現 Sample Extraction：Run Start 畫面。
- 9.3.9 確認後選擇 **Start** 開始進行萃取。
- 9.3.10 當萃取結束後會出現一個結束的對話框，選擇 **Close**，由畫面左方選 **Close Process**，系統回復到 READY 狀態。
- 9.4 real-time PCR Master Mix 之配製
  - 9.4.1 放入所需的 master mix tube 和 96-Well Optical Reaction Plate 於工作台上。
  - 9.4.2 放入 1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L 的 DiTi Tips。
  - 9.4.3 將已退冰好的 reagent pack 的蓋子打開 (操作前半小時從 -20  $^{\circ}$ C 拿出來退冰，完全回溶後若還沒要操作則先置於 4  $^{\circ}$ C)，置於架上。
  - 9.4.4 由主畫面選擇 Orders，再點選 **Master Mix Addition** 進入 Run Master Mix Addition 的畫面。
  - 9.4.5 點選剛完成的 protocol，選擇畫面左側的 **Set Up Run**，接著會出現 Master Mix Addition：Plate Details 的畫面，選擇 **Next**。
  - 9.4.6 輸入 PCR plate 的名稱，選擇 **Next**。
  - 9.4.7 出現 Master Mix Addition: Assay Specific Reagent Scan 的畫面，點選 **Scan**，掃描成功後出現 assay reagent IDs, lot 及 expiration date。
  - 9.4.8 選擇 **Next**，出現 Master Mix Addition：Run Start 畫面：依照指示完成再次確認的動作，點選 **Start** 開始進行 Master Mix 配製。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	C 型肝炎病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 485 頁/共 1078 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

## 9.5 封膜

- 9.5.1 撕下光學增強膜白色的部分 (protective backing)，手儘量壓住邊緣 (end tab)，避免直接接觸到會覆蓋在 96 孔盤的範圍 (seal)。
- 9.5.2 將光學增強膜覆蓋在 96 孔盤上，以 Applicator 刮平光學增強膜，再以 Applicator 壓住膜的邊緣，按虛線撕下，最後再以 Applicator 刮 96 孔盤的邊緣區來增加膜跟 96 孔盤的密合度。
- 9.5.3 將封好膜的 96 孔盤移到 m2000rt 進行 real-time PCR。


## 9.6 real-time PCR 之上機

- 9.6.1 在 m2000sp™ 電腦的螢幕上方的工具列 Result，點選 **View by PCR plate**，選擇剛剛完成的 protocol，在畫面左邊點選 **Export**，將 CD-ROM 放入電腦中，選 **Start**。
- 9.6.2 打開 m2000rt™ 機器和電腦的電源，電腦開機完成後會自動進入 m2000rt™ 的系統輸入帳號密碼後進入主畫面登入之後，此時點選畫面左方的 Start 進行初始化 (約 15 分鐘)，初始化完成後系統呈現 Ready 狀態。
- 9.6.3 選擇 m2000rt™ 電腦的螢幕上方的工具列 Orders，點選 **Test Orders**，螢幕會顯示 Pending Test Orders，點選螢幕左方 Create Tasks 中的 **Import Order**，將存有 m2000sp 資料的 CD-ROM 放入電腦中，將 Test Order 加到 Pending Test Order，選 **Finish**。
- 9.6.4 選擇 Orders 中的 **Test Orders**，螢幕會出現 Pending Test Orders，從 Run Tasks 中點選 **Set Up Run**，再從右側的 Test Orders 選擇要進行反應的 plate order。
- 9.6.5 螢幕會顯示 Run Test Order: Order Details，確定顯示的 PCR Plate Id 是否為要進行的 plate order (螢幕下方的 Sample List 中的 Sample ID 是否正確)，再點選 **Next**。
- 9.6.6 進入 Run Test Order: Run Start，打開機器的 tray drawer，將 PCR plate 放在 tray drawer 上，在推入 tray drawer；選擇有下方的 **Start**，開始進行反應。

## 10 結果判定

- 10.1 反應進行完成後，點選主畫面上方的 Result，選擇 **View by Plate**，螢幕會出現本次實驗偵測的結果，在 Result 欄中會顯示樣本的病毒量。
- 10.2 陽性對照組與陰性對照組的結果必須符合設定值範圍之內，同時 internal control 也要在認可範圍內，有偵測出病毒量者，判為 C 型肝炎病毒核酸檢測陽性；未偵測出病毒量者，判為 C 型肝炎病毒核酸檢測陰性。
- 10.3 在螢幕左方的 Result tasks 中選擇 **View Plate Details**、**View All Results Details** 或是 **View Selected Results**。
  - 10.3.1 選擇 **View Plate Details**，可以顯示單一個樣品或是所有樣品的 Target 及 IC 在進行 PCR 的反應曲線，可用以判定每一個樣品 PCR 的反應效率及結果。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	C 型肝炎病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 486 頁/共 1078 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 10.3.2 選擇 [View All Results Details](#)，呈現每一單個樣品的結果，從螢幕右上方的 Test Information 可知樣品的病毒量、即時定量反應的 Target Cycle Number 及 IC Cycle Number，亦可從 Error Code/Description 得知反應失敗的原因。
- 10.3.3 選擇 [View Selected Results](#)，可以看單一個樣品的結果。
- 10.4 檢視反應的校正曲線 (Calibration Curve)：選擇螢幕上方的工具列 Results 選單中的 [View Assay Calibrations](#)，會出現不同次的校正品結果，點選要看的結果進入 Assay Calibration Details，會有 CALA、CALB 各三點校正品的 Cycle Number 及其中間值，另有校正曲線圖。
- 11 品質管制
- 11.1 每次操作均需帶入 high positive control、low positive control、negative control 各一支。
- 11.2 一般試劑之品質管制：參照本署傳染病檢驗標準方法：病毒實驗室品質管制程序辦理。
- 11.3 m2000sp 和 m2000rt 機器定時作維修與保養。
- 12 廢棄物處理
- 檢體、廢液、及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，以 121 °C，30 分高壓滅菌後，參照本署傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序辦理。
- 13 參考資料
- ABBOTT *m2000sp* Operations Manual、ABBOTT *m2000rt* Operations Manual



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 487 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

在疑似受感染個案之採集檢體中，檢測是否存在 D 型肝炎病毒 IgM 抗體。

## 2 適用檢體種類

適用於血清或血漿檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

Microplate 內 coated 上 monoclonal anti-human IgM antibody，此抗體具很好的專一性，於第一次的孵育時會將檢體中的 HDV IgM 抓下來。

接著進行清洗，將檢體內其他的成分洗掉，再加入人工合成的 HDV 抗原產生的免疫複合物以進行第二次孵育，免疫複合物具有 anti-HDV IgM 的專一性抗體，該抗體上標記有過氧化氫酶 (HRP)。

第二次孵育後再進行清洗，清洗後注入呈色劑/基質溶液，連結於盤內的酵素 (HRP) 會與呈色劑/基質溶液反應產生光訊號 (呈色反應)，光訊號的強度與檢體內的 HDV IgM 的濃度成正比。

## 5 試劑耗材

5.1 試劑組：HDV IgM，DIA.PRO Diagnostics，義大利。

5.1.1 96 試孔盤：purified anti human IgM specific mouse monoclonal antibody：試劑組 (1) 保存 4 °C 冰箱。

5.1.2 陰性對照組 Negative Control：非抗 HDV 抗原的人類抗體：試劑組 (2) 保存 4 °C 冰箱。

5.1.3 陽性對照組 Reactive Control：抗 HDV 抗原的人類抗體：試劑組 (3) 保存 4 °C 冰箱。

5.1.4 校正組 Calibrator：抗 HDV 抗原的人類抗體和胎牛血清：試劑組 (4) 保存 4 °C 冰箱。

5.1.5 清洗液 Wash buffer Concentrate (20 X)：試劑組 (5) 保存 4 °C 冰箱。

5.1.6 酵素 Conjugate (20 X)：標幟 peroxidase 的抗 HDV 多株抗體：試劑組 (6) 保存 4 °C 冰箱。

5.1.7 HDV 抗原 HDV Antigen：非感染性重組 HDV 抗原：試劑組 (7) 保存 4 °C 冰箱。

5.1.8 HDV 抗原稀釋液 HDV Antigen Diluent：試劑組 (8) 保存 4 °C 冰箱。

5.1.9 檢體稀釋液 Specimen Diluent：試劑組 (9) 保存 4 °C 冰箱。

5.1.10 基質緩衝液 Chromogen/Substrate：試劑組 (10) 保存 4 °C 冰箱。

5.1.11 硫酸 Sulphuric Acid (0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)：試劑組 (11) 保存 4 °C 冰箱。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 488 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 5.2 耗材：

- 5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L、20  $\mu$ L。
- 5.2.2 無菌微量離心試管：1.5 mL。
- 5.2.3 可拋棄式無菌塑膠手套。
- 5.2.4 口罩。
- 5.2.5 擦手紙。
- 5.2.6 粘膠片。
- 5.2.7 黑膠蓋。

## 6 儀器設備

- 6.1 第二級生物安全操作櫃 (Class II BSC)。
- 6.2 乾式加熱槽 Dynamic incubator (COMMANDER)，ABBOTT，美國。
- 6.3 微量吸管 (pipettes)：1000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L、20  $\mu$ L。
- 6.4 振盪器 (vortexer)。
- 6.5 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。
- 6.6 4  $^{\circ}$ C 冰箱。
- 6.7 盤式自動洗滌機 (ELx 405)，BIO-TEK，美國。
- 6.8 盤式全光譜分析儀 (u Quant)，BIO-TEK，美國。
- 6.9 -20  $^{\circ}$ C 冷凍櫃。
- 6.10 高壓滅菌鍋。

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體編號

### 10.2 檢體前處理：

- 10.2.1 取出 D 型肝炎 IgM 試劑和待測檢體使回復室溫 (20 - 30  $^{\circ}$ C)，使用前先搖勻試劑及待測檢體，先將乾式加熱槽溫度設定 37  $^{\circ}$ C。
- 10.2.2 待測檢體 (血清、血漿) 需先混合均勻並以 3,000  $\times$  g 離心 10 分鐘。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 489 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

## 10.3 檢驗步驟

- 10.3.1 取出 D 型肝炎 IgM 96 試孔盤，預留 1 個試孔 (A1) 作空白試孔，不可加入檢體在此試孔。
- 10.3.2 Diluted sample (1:200)：預先將 5  $\mu$ L 檢體加入 1 mL 檢體稀釋液於新的管子中並均勻混合。
- 10.3.3 吸取 100  $\mu$ L 陰性對照組 (B1, C1, D1) 及 100  $\mu$ L 校正組 (E1, F1) 與 100  $\mu$ L 陽性對照組 (G1) 依序於試孔內。
- 10.3.4 加入 100  $\mu$ L Diluted sample (1:200) 於每個試孔內，由 H1 開始。
- 10.3.5 將黏膠片密貼於試盤上，以免試孔內液體蒸發，輕輕拍打試盤，使試孔內液體混合均勻。
- 10.3.6 置於 37 °C 乾式加熱槽培育 60 分鐘。
- 10.3.7 配製 Immunocomplex: 1.9 mL HDV 抗原稀釋液加入 HDV 抗原，待完全溶解後，再加入 100  $\mu$ L 酵素 Conjugate (20 X)，均勻混合。
- 10.3.8 配製 (20 X) 清洗緩衝液：取 1 份濃縮清洗液加 19 份蒸餾水。依所需檢體清洗容量配製，清洗緩衝液可於冰箱 (2 - 8 °C) 保存一週。
- 10.3.9 撕去黏膠片，清洗試盤每孔至少每次以 350  $\mu$ L 清洗緩衝液清洗 5 次並浸泡 20 秒，清洗完成後，將試盤倒置於乾淨試紙上輕輕拍打，以完全除去試孔內殘餘水份。
- 10.3.10 加入 100  $\mu$ L Immunocomplex 於每個試孔內，不包含 1 個空白 (A1) 試孔。將黏膠片密貼於試盤上，以免試孔內液體蒸發，輕輕拍打試盤，使試孔內試液均勻充滿。
- 10.3.11 置於 37 °C 乾式加熱槽培育 60 分鐘。
- 10.3.12 撕去黏膠片，清洗試盤每孔至少每次以 350  $\mu$ L 清洗緩衝液清洗 5 次並浸泡 20 秒，清洗完成後，將試盤倒置於乾淨試紙上輕輕拍打，以完全除去試孔內殘餘水份。
- 10.3.13 加入 100  $\mu$ L Chromogen/Substrate 於每個試孔內，包含 1 個空白試孔。蓋上黑膠蓋避光放置於室溫 (25 °C) 反應作用 20 分鐘。
- 10.3.14 加入 100  $\mu$ L Sulphuric Acid (0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 於每個試孔內，包含 1 個空白試孔。
- 10.3.15 以 ELISA Reader 分析儀器測定每個試孔的吸光度，波長設定 450 nm/620nm，需於加入 Sulphuric Acid (0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 20 分鐘內判讀結果。

## 10.4 檢驗後處理

- 10.4.1 完成檢驗，HDV 試劑組貯存於 4 °C 冰箱保存。
- 10.4.2 檢驗後之檢體應依序歸回檢體盒，放置 -20 °C 冰箱保存。
- 10.4.3 整理清除實驗工作桌面上之抗污紙墊及使用後拋棄之微量吸管尖、手套、口罩包裝於廢棄物滅菌塑膠袋。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

D 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測  
(ELISA)

核准日期： 年 月 日

頁次：第 490 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 陰性對照值 ( $NRC_X$ )：3 個陰性對照孔吸光度平均值。
- 11.1.2 陽性對照值 ( $RC_X$ )：1 個陽性對照孔吸光值。
- 11.1.3 臨界值 (Cut off Value) =  $0.250 + NRC_X$  (陰性對照平均值)。
- 11.1.4 空白試孔 OD 值  $< 0.100$  OD<sub>450nm</sub> value，校正值與臨界值吸光度之比值 (S/Co) 需  $> 2.5$ 。
- 11.1.5 計算待測檢體與臨界值吸光度之比值 (S/Co)，如果檢體之比值小於 0.9，即為陰性反應 (Negative)。
- 11.1.6 若檢體比值介於 0.9 - 1.1，則表示為不確定反應 (Equivocal)。
- 11.1.7 若檢體之比值大於 1.1，則表示為陽性反應 (Positive)。
- 11.1.8 如果檢體之比值介於不確定反應範圍 (Equivocal) 內，該檢體需重新複檢二次 (Duplicate)，以求正確結果。
- 11.1.9 第一次檢測有陽性反應之檢體應再複測試一次，檢驗結果有反應性，檢體可確認為陽性反應。
- 11.1.10 檢驗結果由檢驗儀器傳回電腦再列印出檢驗數據結果，並於列印紙上蓋章。

11.2 報告核發：IgM anti-HDV (陽性)、IgM anti-HDV (陰性)。

11.3 結果登錄：將檢驗結果填寫於檢體送驗單之"檢驗結果"欄，並於送驗單背面蓋職章，相關檢驗紀錄及檢體送驗單陳核實驗室主管審核，由本署內部之網站應用系統進入傳染病通報系統輸入檢驗結果並以電子傳真輸送。

11.3.1 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。

## 12 品質管制

- 12.1 空白試孔測定吸光值必須  $< 0.10$ 。
- 12.2 陰性對照值 ( $NRC_X$ ) 吸光值扣除空白試孔測定吸光值必須  $< 0.2$ 。
- 12.3 陽性對照值 ( $RC_X$ ) 吸光值必須  $> 0.9$ 。
- 12.4 校正值與臨界值吸光度之比值 (S/Co) 必須  $> 2.5$ 。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121 °C，30 min 高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 DIA.PRO DIAGNOSTICS Bioprobes Srl. 試藥說明書。
- 14.2 Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochemistry 8:871-874, 1971.
- 14.3 Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971.
- 14.4 Chaggar K. Et al.. Journal of Virological Methods. 32: 193-199, 1991.
- 14.5 Lazinski D.W. et al.. Journal of Virol.. 67: 2672-2680, 1993.
- 14.6 Govindarajan S. et al.. Microbiol. And Immunol.. 95: 140- 141, 1990.
- 14.7 Shattock A.G. et al.. J.Clin.Microbiol.. 29: 1873-1876, 1991.

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 491 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 14.8 Forbes B.A. et al.. Clin.Microbiol.News.. 13: 52-54, 1991.
- 14.9 Bergmann, K. et al. J.Immunol. 143:3714-3721, 1989.
- 14.10 Bergmann, K. et al. J.Infect.Dis. 154:702-706, 1986.
- 14.11 Buti, M. et al. Hepatology 8:1125-1129, 1988.
- 14.12 Rizzetto, M. Hepatology 3729-737, 1983.
- 14.13 Rizzetto, M. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:6124-6128. 1980.
- 14.14 Dubois, F. et al. J.Clin.Microbiol. 26:1339-1342, 1988.
- 14.15 Wang, K. et al. Nature 323:508-514, 1986.
- 14.16 Grebenchtchikiov N. et al.. J.Immunol. Methods, 15(2) :219-231, 2002.
- 14.17 Schrijver RS and Kramps JA, Rev.Sci.Tech. 17(2):550- 561, 1998.

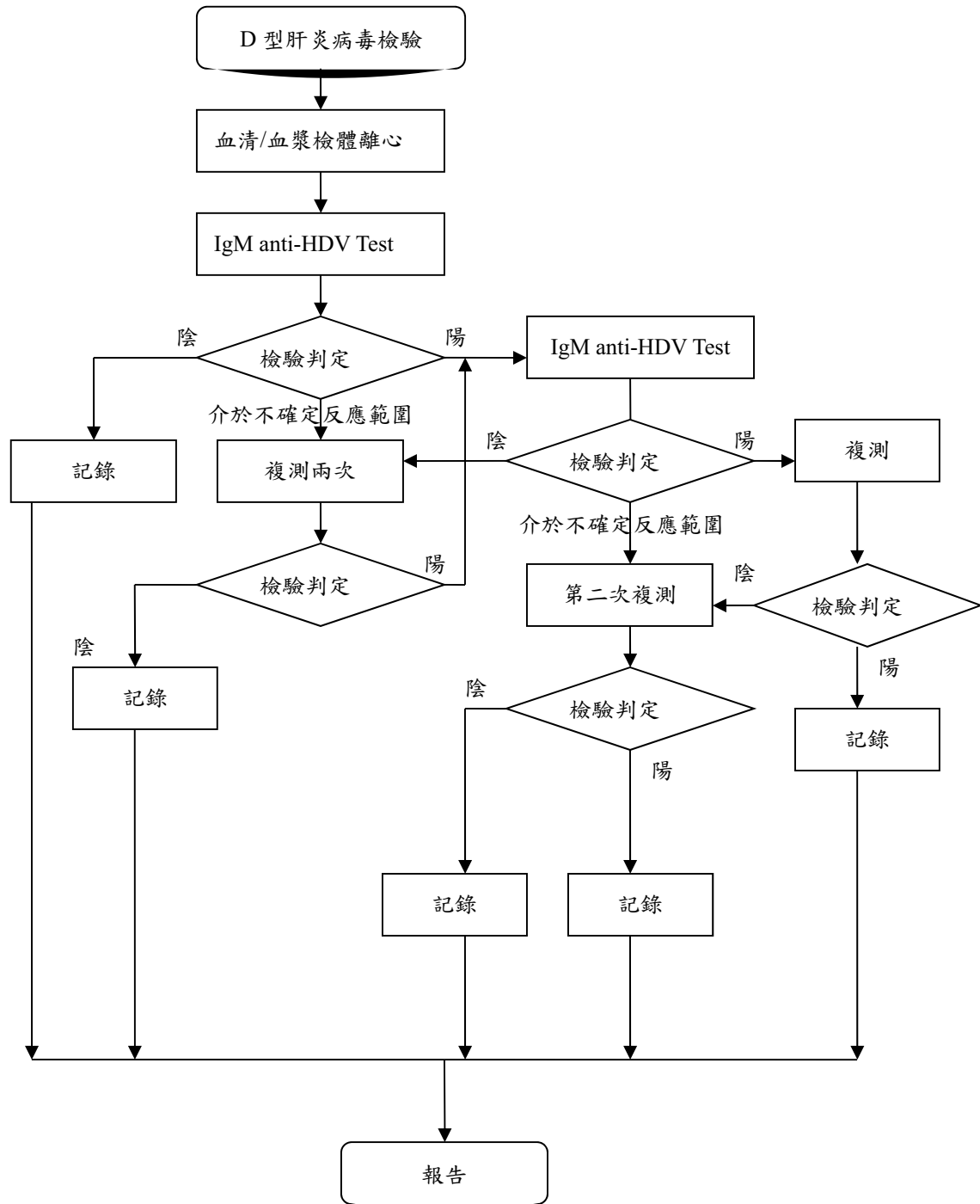
## 15 附錄

- 15.1 D 型肝炎病毒抗體試驗總流程圖。
- 15.2 D 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗（酵素免疫分析法）流程圖。
- 15.3 D 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗檢體位置紀錄表。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 492 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 D 型肝炎病毒抗體試驗總流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

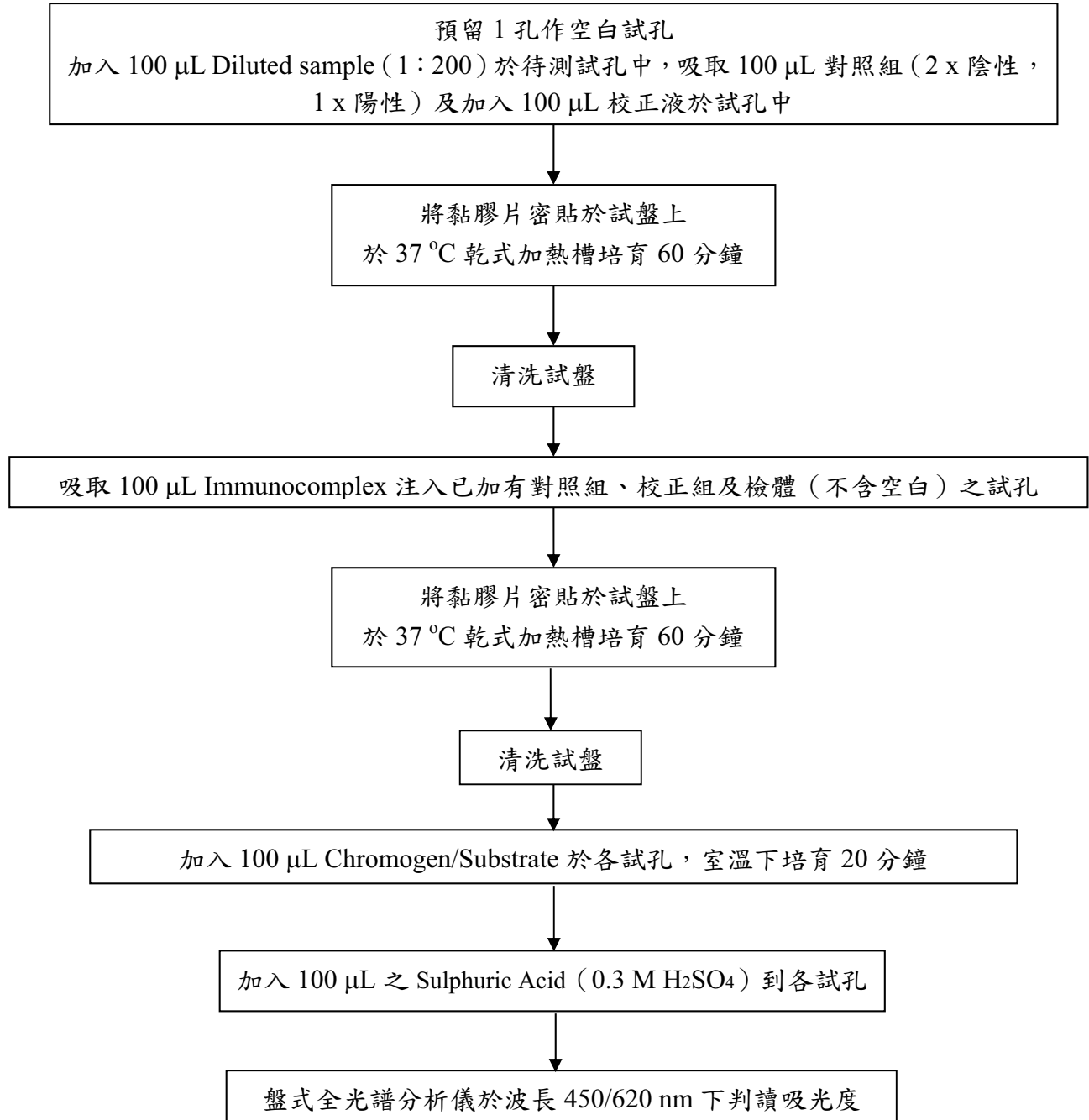
D 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測  
(ELISA)

核准日期： 年 月 日


頁次：第 493 頁/共 1078 頁

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 D 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗 (酵素免疫分析法) 流程圖



## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 494 頁/共 1078 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

### 附錄 15.3 D 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗劑檢體紀錄表

#### 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 D 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗暨檢體紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

Date :

Test :

Kit :


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34	Sample 42	Sample 50	Sample 58	Sample 66	Sample 74	Sample 82
B	NC	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35	Sample 43	Sample 51	Sample 59	Sample 67	Sample 75	Sample 83
C	NC	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36	Sample 44	Sample 52	Sample 60	Sample 68	Sample 76	Sample 84
D	NC	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37	Sample 45	Sample 53	Sample 61	Sample 69	Sample 77	Sample 85
E	CAL	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38	Sample 46	Sample 54	Sample 62	Sample 70	Sample 78	Sample 86
F	CAL	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39	Sample 47	Sample 55	Sample 63	Sample 71	Sample 79	Sample 87
G	PC	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40	Sample 48	Sample 56	Sample 64	Sample 72	Sample 80	Sample 88
H	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33	Sample 41	Sample 49	Sample 57	Sample 65	Sample 73	Sample 81	Sample 89

檢驗者：

實驗室主管：



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 495 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

在疑似受感染個案之採集檢體中，檢測是否存在 E 型肝炎病毒 IgM/IgG 抗體。

## 2 適用檢體種類

適用於血清或血漿檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

Microplate 內覆被上具 HEV 專一性的人工合成的抗原，經轉譯後保留最大的免疫反應決定位置。首先將檢體稀釋後加入盤內，檢體內若有 HEV IgM/IgG 則會被 HEV 抗原抓下來。接著進行清洗，將檢體內其他的成分洗掉，再加入 anti-Human immunoglobulin antibodies(IgM/IgG)進行第二次孵育，anti-human immunoglobulin antibodies(IgM/IgG)上標記有過氧化氫酶 (HRP)，可用來偵測 HEV IgM/IgG 的量。第二次孵育後再進行清洗，清洗後注入呈色劑/基質溶液，連結於盤內的酵素 (HRP) 會與呈色劑/基質溶液反應產生光訊號 (呈色反應)，光訊號的強度與檢體內的 HEV IgM/IgG 的濃度成正比。將光訊號的強度轉換成 cut-off 值即可判讀檢體是 HEV IgM/IgG 陽性或陰性結果。

## 5 試劑耗材

5.1 試劑組：HEV IgM/IgG，MIKROGEN Diagnostics，德國。

5.1.1 96 試孔盤：HEV specific syhthetic antigens derived from ORF2 regions：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.2 陽性對照組 Postive Control：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.3 Cutoff 對照組：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.4 陰性對照組 Negative Control：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.5 清洗液 Wash buffer Concentrate (10 X)：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.6 抗體 Enzyme Conjugate (anti-human IgM/IgG labelled with horseradish Peroxidase)：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.7 基質緩衝液 Chromogen/Substrate：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.8 磷酸 Phosphoric Acid (H<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>)：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.9 檢體稀釋液 Dilution buffer：試劑組保存 4 °C 冰箱。

### 5.2 耗材：

5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000μL、200μL、100μL、20μL。


5.2.2 無菌微量離心試管：1.5 mL。

5.2.3 可拋棄式無菌塑膠手套。

5.2.4 口罩。

5.2.5 擦手紙。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 496 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

- 5.2.6 粘膠片。
- 5.2.7 黑膠蓋。

## 6 儀器設備

- 6.1 第二級生物安全操作櫃 (Class II BSC)。
- 6.2 乾式加熱槽 Dynamic incubator (COMMANDER)，ABBOTT，美國。
- 6.3 微量吸管 (pipetmen)：1,000 $\mu$ L、200 $\mu$ L、100 $\mu$ L、20 $\mu$ L。
- 6.4 振盪器 (vortexer)。
- 6.5 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。
- 6.6 4 $^{\circ}$ C 冰箱。
- 6.7 盤式自動洗滌機 (ELx 405)，BIO-TEK，美國。
- 6.8 盤式全光譜分析儀 (u Quant)，BIO-TEK，美國。
- 6.9 -20 $^{\circ}$ C 冷凍櫃。
- 6.10 高壓滅菌鍋。

## 7 環境設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參考本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體編號

### 10.2 檢體前處理：

- 10.2.1 取出 E 型肝炎 IgM/IgG 試劑和待測檢體使回復室溫(18-25 $^{\circ}$ C)，使用前先搖勻試劑及待測檢體，先將乾式加熱槽溫度設定 37 $^{\circ}$ C。
- 10.2.2 待測檢體 (血清、血漿) 需先混合均勻並以 3,000g 離心 10 分鐘。

### 10.3 檢驗步驟

- 10.3.1 取出 E 型肝炎 IgM/IgG 96 試孔盤。
- 10.3.2 Diluted sample / control (1:101)：預先將 10  $\mu$ L 檢體 / control 加入 1 mL 檢體稀釋液於新的試管中並均勻混合。
- 10.3.3 吸取 100  $\mu$ L diluted cutoff 對照組 (A1 及最後一孔)、100  $\mu$ L diluted 陰性對照組 (B1, C1) 及 100  $\mu$ L diluted 陽性對照組 (D1, E1) 依序於試孔內。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

E 型肝炎病毒抗體檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 497 頁/共 1078 頁

(IgM/IgG)

修訂日期： 年 月 日


- 10.3.4 加入 100  $\mu$ L Diluted sample (1:101) 於每個試孔內，由 F1 開始。
  - 10.3.5 將黏膠片密貼於試盤上，以免試孔內液體蒸發，輕輕拍打試盤，使試孔內液體混合均勻。
  - 10.3.6 置於 37 $^{\circ}$ C 乾式加熱槽培育 60 分鐘。
  - 10.3.7 配製 (10 X) 清洗緩衝液：取 1 份濃縮清洗液加 9 份蒸餾水。依所需檢體清洗容量配製。
  - 10.3.8 撕去黏膠片，清洗試盤每孔至少每次以 300  $\mu$ L 清洗緩衝液清洗 4 次，清洗完成後，將試盤倒置於乾淨試紙上輕輕拍打，以完全除去試孔內殘餘水份。
  - 10.3.9 Diluted Enzyme Conjugate (1:101)：預先將 10  $\mu$ L Enzyme Conjugate 加入 1 mL 檢體稀釋液於新的試管中並均勻混合。加入 100  $\mu$ L Diluted Enzyme Conjugate 於每個試孔內，將黏膠片密貼於試盤上，以免試孔內液體蒸發，輕輕拍打試盤，使試孔內試液均勻充滿。
  - 10.3.10 置於 37 $^{\circ}$ C 乾式加熱槽培育 30 分鐘。
  - 10.3.11 撕去黏膠片，清洗試盤每孔至少每次以 300  $\mu$ L 清洗緩衝液清洗 4 次，清洗完成後，將試盤倒置於乾淨試紙上輕輕拍打，以完全除去試孔內殘餘水份。
  - 10.3.12 加入 100  $\mu$ L Chromogen/Substrate 於每個試孔內，蓋上黑膠蓋避光放置於室溫反應作用 30 分鐘。
  - 10.3.13 加入 100  $\mu$ L 磷酸 ( $H_3PO_4$ ) 於每個試孔內。
  - 10.3.14 以 ELISA Reader 分析儀器測定每個試孔的吸光度，波長設定 450 nm/620-650nm，需於加入磷酸 ( $H_3PO_4$ ) 60 分鐘內判讀結果。
- 10.4 檢驗後處理
- 1.1.1 完成檢驗，HEV 試劑組貯存於 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。
  - 1.1.2 檢驗後之檢體應依序歸回檢體盒，放置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。
  - 1.1.3 整理清除實驗工作桌面上之抗污紙墊及使用後拋棄之微量吸管尖、手套、口罩包裝於廢棄物滅菌塑膠袋。

## 11 結果判定

### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 Cutoff (limit) = 2 個 Cutoff 對照孔吸光度平均值 (at the beginning and at the end of the series)。
- 11.1.2 陰性對照值：2 個陰性對照孔吸光值平均值。
- 11.1.3 陽性對照值：2 個陽性對照孔吸光值平均值。
- 11.1.4 Grey zone: Low limit = Cutoff
- 11.1.5 Upper limit = cutoff + 20%(cutoff x 1.2)
- 11.1.6 若檢體吸光值小於 grey zone，即為陰性反應 (Negative)。
- 11.1.7 若檢體吸光值介於 grey zone 中，則表示為不確定反應 (Borderline)。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 498 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

- 11.1.8 若檢體吸光值大於 grey zone，則表示為陽性反應 (Positive)。
- 11.1.9 檢驗結果由檢驗儀器傳回電腦再列印出檢驗數據結果，並於列印紙上蓋章。
- 11.1.10 檢測結果為陽性者及不確定反應者應加作西方墨點法，執行進一步檢測。

11.2 報告核發：若結果為陰性則報告核發為 IgM/IgG anti-HEV (陰性)，檢測結果為陽性及不確定反應者應加作西方墨點法，執行進一步檢測後再進行核發報告。

11.3 結果登錄：將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果”欄，並於送驗單背面蓋職章，相關檢驗紀錄及檢體送驗單呈核實驗室主管審核，由本署內部之網站應用系統進入傳染病通報系統輸入檢驗結果並以電子傳真輸送。

11.3.1 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。

## 12 品質管制

12.1 2 個 Cutoff control 吸光值之差異不可大於 20% mean cutoff。

12.2 Extinction value – negative control  $\leq$  0.150。

12.3 Cutoff control extinction value - Negative control extinction value  $\geq$  0.050。

12.4 Positive control extinction value - Cutoff control extinction value  $\geq$  0.300。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121°C，30 分鐘高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

14.1 recomWell HEV IgM/IgG 試藥說明書。

## 15 附錄

15.1 E 型肝炎病毒抗體試驗 (IgM/IgG) 流程圖。

15.2 E 型肝炎病毒抗體試驗 (IgM/IgG) 檢體位置紀錄表。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

E 型肝炎病毒抗體檢測

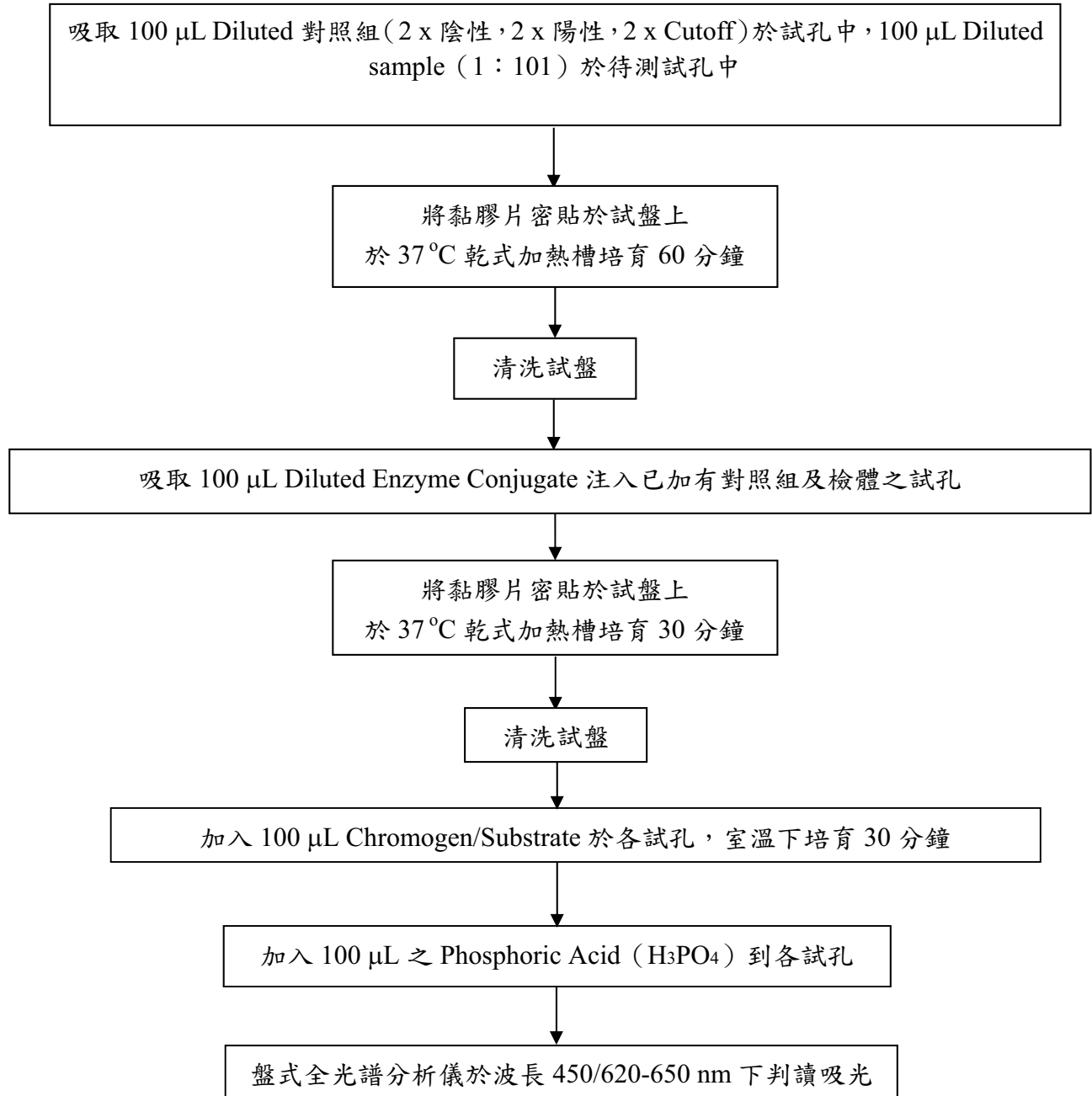
核准日期： 年 月 日

頁次：第 499 頁/共 1078 頁


(IgM/IgG)

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 E 型肝炎病毒 IgM/IgG 抗體試驗 (酵素免疫分析法) 流程圖



# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體檢測 (IgM/IgG)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 500 頁/共 1078 頁		修訂日期： 年 月 日

## 附錄 15.2 E 型肝炎病毒抗體試驗 (IgM/IgG) 檢體位置紀錄表

### 衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心 E 型肝炎病毒抗體試驗 (IgM/IgG) 檢體位置紀錄表


頁數：第 頁/共 頁

anti-HEV IgM / IgG												
Date												
Kit Lot number												
Exp												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Cutoff	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36	Sample 44	Sample 52	Sample 60	Sample 68	Sample 76	Sample 84
<b>B</b>	NC	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37	Sample 45	Sample 53	Sample 61	Sample 69	Sample 77	Sample 85
<b>C</b>	NC	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38	Sample 46	Sample 54	Sample 62	Sample 70	Sample 78	Sample 86
<b>D</b>	PC	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39	Sample 47	Sample 55	Sample 63	Sample 71	Sample 79	Sample 87
<b>E</b>	PC	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40	Sample 48	Sample 56	Sample 64	Sample 72	Sample 80	Sample 88
<b>F</b>	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33	Sample 41	Sample 49	Sample 57	Sample 65	Sample 73	Sample 81	Sample 89
<b>G</b>	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34	Sample 42	Sample 50	Sample 58	Sample 66	Sample 74	Sample 82	Sample 90
<b>H</b>	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35	Sample 43	Sample 51	Sample 59	Sample 67	Sample 75	Sample 83	Cutoff

檢驗者：

實驗室主管：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 501 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

## 1 目的

以西方墨點法檢測人體中是否存在 E 型肝炎病毒 IgM/IgG 抗體。

## 2 適用檢體種類

適用於血清或血漿檢體。

## 3 名詞解釋

無。

## 4 原理概述

利用電泳原理，將 E 型肝炎病毒之蛋白質依不同分子量大小分離，在運用轉印技術將電泳膠內之蛋白質轉至硝化纖維膜試紙表面作保存，以偵測人體血清或血漿中之相對應 E 型肝炎病毒 IgM/IgG 抗體。

## 5 試劑耗材

5.1 試劑組：recomLine HEV IgM/IgG，MIKROGEN Diagnostics，德國。

5.1.1 共計二十條硝化纖維膜試紙條。

5.1.2 清洗液 Wash buffer A Concentrate (10 X)：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.3 檢體稀釋液 Dilution buffer：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.4 陽性對照組 Postive Control：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.5 陰性對照組 Negative Control：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.6 抗體 Enzyme Conjugate (anti-human IgM/IgG labelled with horseradish Peroxidase)：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.7 基質緩衝呈色液 Chromogen Substrate Tetramethylbenzidin：試劑組保存 4 °C 冰箱。

5.1.8 脫脂奶粉 skim milk powder。

### 5.2 耗材：

5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000 $\mu$ L、200 $\mu$ L、100 $\mu$ L。

5.2.2 無菌微量離心試管：1.5 mL。

5.2.3 無菌離心試管：15mL、50mL。

5.2.4 可拋棄式無菌塑膠手套。

5.2.5 口罩。

5.2.6 擦手紙。

5.2.7 玻璃或塑膠無菌吸管。

5.2.8 塑膠鑷子。

5.2.9 量筒。


5.2.10 10%漂白水。

## 6 儀器設備

6.1 第二級生物安全操作櫃 (Class II BSC)。

6.2 ProfiBlot 西方墨點處理分析儀。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 502 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

- 1.2 微量吸管 (pipetemen)：1,000 $\mu$ L、200 $\mu$ L、100 $\mu$ L、20 $\mu$ L。
- 1.3 振盪器 (vortexer)。
- 1.4 4 °C 冰箱。
- 1.5 -20 °C 冷凍櫃。
- 1.6 高壓滅菌鍋。

## 7 環境與設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

## 8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=6C7C52E7A7D5621A>。

## 10 檢驗步驟

### 10.1 檢體編號

### 10.2 檢體前處理：

- 10.2.1 取出 E 型肝炎 IgM/IgG 試劑和待測檢體使回復室溫(18-25 °C)，使用前先搖勻試劑及待測檢體。
- 10.2.2 待測檢體 (血清、血漿) 需先混合均勻。
- 10.2.3 以塑膠鑷子取出 E 型肝炎 IgM/IgG 硝化纖維膜試紙條之末端，調整正面置於反應槽中，號碼應朝上，每批次實驗所需試紙條之數量。
- 10.2.4 於反應槽上方以油性筆註明檢體編號、陰性、陽性對照組。
- 10.2.5 配製 ready-to-use wash buffer A (每 5 條測試紙條需要的總量為 100mL，其中包含 0.5g 的脫脂奶粉、10mL 的清洗液 Wash buffer A Concentrate (10 X) 及 90mL 的水 Distilled water)。
- 10.2.6 配製 HEV IgG/IgM 結合液 Conjugate solutions (每五條測試紙條需要的總量為 10mL，其中包含 100  $\mu$ L 的結合濃縮液 HEV IgG/IgM Conjugate concentrate 及 10mL 的 ready-to-use wash buffer A)。

### 10.3 儀器操作步驟：


#### 10.3.1 進行實驗操作程序：

- 10.3.1.1 開啟儀器電源，螢幕出現如下畫面：





# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 503 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

10.3.1.2 按←螢幕出現如下畫面：

**Run Program**  
 < > **Main Yes**

10.3.1.3 請確認廢液瓶中之廢液以清空，放足量的水(Distilled water) 在 Channel 2、稀釋配置好的(ready-to-use wash buffer A) 在 Channel 3、Dilution buffer 在 Channel 4、HEV IgG/IgM 結合液在 Channel 5、基質緩衝呈色液 Chromogen Substrate Tetramethylbenzidin 在 Channel 6。

10.3.1.4 按>螢幕出現如下畫面：

**Liquid Prep.**  
 < > **Yes**

10.3.1.5 按 Yes 螢幕出現如下畫面：

**Clean**  
 < > **exit Yes**

10.3.1.6 按 Yes 後，利用 - / + 來選擇欲填充之管路編號，螢幕出現如下畫面：

**Channel : X**  
 - + **exit Yes**

10.3.1.7 按 Yes 後，利用 - / + 來選擇欲填充之試劑體積 3ml，螢幕出現如下畫面：

**Volume : 3 ml**  
 - + **exit Yes**

10.3.1.8 按 Yes 螢幕出現如下畫面：


**Volume : 3 ml**  
 - + **exit Yes**

**Channel : X**  
 - + **exit Yes**

10.3.1.9 待所有管路都填滿試劑後，連按 2 次 exit 回到 Run 的畫面，螢幕依序出現如下畫面：

**Channel : X**  
 - + **exit Yes**

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 504 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

**Liquid Prep.**

< > Yes

**Run Program**

< > Main Yes

10.3.1.10 按 Yes 螢幕出現如下畫面：

**WASTE BOTTLE OK?**

Exit Yes

10.3.1.11 確認廢液瓶已裝妥，以-/+按鍵選擇要執行的程式，按 Yes 螢幕出現如下畫面：

**Run : HEV**

- + exit Yes

10.3.1.12 按 Yes 進入 HEV 程式，螢幕出現如下畫面：

**INSERT TRAY!**

Press any key!

10.3.1.13 貼上標有檢體編號的貼紙貼上 TRAY 後，裝 TRAY 放入儀器平台上，並確認將測試條放入反應槽中，按←螢幕出現如下畫面：

**StPos Strip: XX**

- + exit Yes

10.3.1.14 以-/+按鍵輸入反應槽開始位置(注意以三的倍數加一，如 1,4,7...)，按 Yes 出現如下畫面：

**No. of Strip: XX**

- + exit Yes


10.3.1.15 1 以-/+按鍵輸入測試檢體數量，按 Yes 螢幕出現如下畫面：

**Last Aspiration**

No Yes

10.3.1.16 決定實驗最後是否要吸乾反應槽液體，按 Yes 螢幕出現如下畫面：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 505 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

**Proc. : 01 Disp.**  
- + exit Yes

10.3.1.17 按 Yes 開始實驗步驟，螢幕出現如下畫面：

**Proc. : 01 Disp.**  
XX:XX

10.3.1.18 此時儀器已開始執行程式，儀器加完檢體稀釋液後儀器會暫停並顯示如下畫面，請依步驟 4 所記錄之檢體編碼位置依序加入 20 微升檢體。

**Paues**  
Cont. Prime

10.3.1.19 加完檢體後，按 Cont. 按鈕，儀器繼續完成全部自動化流程。實驗完成後，儀器會發出警告聲，出現如下畫面：

**Test done !**  
Please wait

**You should clean**  
Press any key

10.3.1.20 取出相關試劑收藏保存。按 Yes 確認停止步驟，螢幕回到主畫面，如下畫面：

**Run Program**  
< > Main Yes

10.3.1.21 儀器完成實驗步驟。

10.3.2 執行關機前儀器清洗程序：

10.3.2.1 在主畫面中以左右(< >)按鍵選擇次目錄 Liquid Preparation，如下畫面：


**Liquid Prep.**  
< > exit Yes

10.3.2.2 按 Yes 螢幕出現如下畫面：

**Clean**  
< > exit Yes

10.3.2.3 按>螢幕出現如下畫面：

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 506 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

**Pump back**  
< > exit Yes

10.3.2.4 按 Yes 將所有管路內的試劑回收，螢幕出現如下畫面：

**All Pump back?**  
Yes

**Pump back**  
< > exit Yes

10.3.2.5 待回收完畢，按 exit 螢幕出現如下畫面：

**Liquid Prep.**  
< > exit Yes

10.3.2.6 按 Yes 後螢幕出現如下畫面：

**Clean**  
< > exit Yes

10.3.2.7 按 Yes 後螢幕出現如下畫面：

**Channel : X**  
- + exit Yes


10.3.2.8 利用 - / + 來選擇欲清洗之管路編號，依序以 ddH<sub>2</sub>O 清洗管路並排空，按 Yes 後，利用 - / + 來選擇欲填充之試劑體積 10ml，螢幕出現如下畫面：

**Volume : 10 ml**  
- + exit Yes

**Channel : X**  
- + exit Yes

10.3.2.9 待所有管路清洗完畢並排空後，連按 3 次 exit 回到主畫面，螢幕依序出現如下畫面：

## 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 507 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

**Channel : X**  
-    +    exit    Yes

**Liquid Prep.**  
<    >            Yes

**Run Program**  
<    >    Main    Yes

**Main**  
  
FW—Run

10.3.2.10 將反應槽自儀器上取出，風乾反應後之試紙條。

### 10.3.3 檢驗後處理：

10.3.3.1 檢驗完成後之檢體依序放入冰箱之檢體保存盒中-20℃ 冷凍儲存。

10.3.3.2 將試藥放回試劑組內，置入 4-8℃ 冰箱保存。

10.3.3.3 反應後之試紙條則風乾後，比對呈色反應並判讀。

10.3.3.4 判讀完畢後，將反應槽放回 ProfiBlot48 儀器中，利用其照相功能將反應後的試紙照相存檔。

#### 10.3.3.5 掃描/照相處理：

10.3.3.5.1 確認 ProfiBlot48 呈開機狀態，開啟電腦桌面上 BlotSeverShell 軟體。

10.3.3.5.2 視窗開啟後點選 Connect，待出現選擇欲連線儀器之視窗後，點選 ProfiBlot48，按下 OK，連結完成會回到原視窗。

10.3.3.5.3 原視窗下方 SCAN 的項目中選擇反應槽上欲掃描/照相的 First Well 及 Last Well 號碼(皆為 1~48)。

10.3.3.5.4 號碼選好後，點選 Start Scan and save bitmaps 或 Scan all wells and save bitmaps 的按鈕，開始進行掃描/照相功能。


10.3.3.5.5 掃描/照相完畢，圖檔會自動存於 Scanned Pictures 的檔案夾內。點選 Disconnect，關閉儀器電源。

#### 10.3.3.6 圖片優化與存檔：

10.3.3.6.1 開啟電腦桌面”圖檔優化”軟體。

10.3.3.6.2 點選最上方”檔案(F)” ，出現下拉選項，指至”自動(U)” ，再選取” 批次處理(B)” 。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 508 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

- 10.3.3.6.3 出現批次處理視窗，於”動作(A)”的選項按下右方的▼。
- 10.3.3.6.4 點選”Blot 優化”，按下確定，開始進行圖檔優化。已優化之圖檔會自動存於電腦桌面的”優化圖像”資料夾內。
- 10.3.3.6.5 待全數圖檔優化完畢，開啟電腦桌面的”優化圖像”資料夾，將圖檔依相對應之反應槽位置上所標示的檢體名稱重新命名，陽性及陰性對照組則以日期編入命名。
- 10.3.3.6.6 將已命名完之圖檔全數移至”已命名”資料夾內，關閉資料夾。
- 10.3.3.7 將已存檔完畢之已反應試紙條依序貼在附錄 15.2 E 型肝炎病毒抗體西方墨點試驗 (IgM/IgG) 檢體硝化纖維膜試紙條位置紀錄表上。

## 11 結果判定


### 11.1 判讀標準

- 11.1.1 將已反應試紙條依序貼在附錄 15.2 E 型肝炎病毒抗體西方墨點試驗 (IgM/IgG) 檢體硝化纖維膜試紙條位置紀錄表上，比對檢體之不同蛋白位置及呈色帶之特性，將出現之反應線記錄在西方墨點法紀錄表上，並依其 Cutoff-Kontrolle 的強弱判定其他不同蛋白位置之呈色帶的價數。
- 11.1.2 若其他不同蛋白位置之呈色帶與 Cutoff-Kontrolle 相同或較強則可判為+、++、+++。
- 11.1.3 若其他不同蛋白位置之呈色帶有出現但與 Cutoff-Kontrolle 較弱則可判為+/-。
- 11.1.4 若其他不同蛋白位置之呈色帶無反應則可判為 -。
- 11.1.5 依上述 11.1.2~11.1.3 步驟判讀結果記錄抗原呈色帶總分數。
- 11.1.5.1 下表為不同抗原呈色帶之分數

抗原 Antigen	IgG/IgM 分數
O2N (Gt1、Gt3)	2
O2C (Ct1、Gt3)	4
O2M	2
O3 (Ct1、Gt3)	3

- 11.1.5.2 若其他不同蛋白位置之呈色帶被判為+、++、+++，則可依 11.1.5.1 表中之分數得分。
- 11.1.5.3 若其他不同蛋白位置之呈色帶被判為 -、+/-，則無法得分。
- 11.1.5.4 計算總得分數。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 509 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

- 11.1.6 若檢體抗原呈色帶總分數 $\leq 2$ ，即為陰性反應 (Negative)。
- 11.1.7 若檢體抗原呈色帶總分數 $= 3$ ，則表示為不確定反應 (Borderline)。
- 11.1.8 若檢體抗原呈色帶總分數 $\geq 4$ ，則表示為陽性反應 (Positive)。
- 11.1.9 如果檢體抗原呈色帶總分數 $= 3$  (Borderline) 內，該檢體需重新複檢二次 (Duplicate)，以求正確結果。
- 11.2 報告核發：IgM/IgG anti-HEV (陽性)、IgM/IgG anti-HEV (陰性)。
- 11.3 結果登錄：將檢驗結果填寫於檢體送驗單之”檢驗結果”欄，並於送驗單背面蓋職章，相關檢驗紀錄及檢體送驗單陳核實驗室主管審核，由本署內部之網站應用系統進入傳染病通報系統輸入檢驗結果並以電子傳真輸送。
  - 11.3.1 檢體送驗單及 E 型肝炎病毒抗體西方墨點試驗 (IgM/IgG) 檢體硝化纖維膜試紙條位置紀錄表自行歸檔。

## 12 品質管制

- 12.1 檢體硝化纖維膜試紙條上之 cutoff-control (Cutoff-Kontrolle) 呈色帶需出現。
- 12.2 若為檢驗 HEV IgG 檢體硝化纖維膜試紙條上之 IgG AK-Klassen Kontrolle 呈色帶需出現。
- 12.3 若為檢驗 HEV IgM 檢體硝化纖維膜試紙條上之 IgM AK-Klassen Kontrolle 呈色帶需出現。
- 12.4 檢體硝化纖維膜試紙條上之 Reaktions-Ktr. 呈色帶需出現。

## 13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封，再以 121°C，30 分鐘高壓滅菌後，依本署廢棄物處理作業程序處理。

## 14 參考資料

- 14.1 recomLine HEV IgM/IgG 試藥說明書。

## 15 附錄

- 15.1 E 型肝炎病毒 IgM/IgG 抗體試驗 (西方墨點法) 流程圖。
- 15.2 E 型肝炎病毒抗體西方墨點試驗 (IgM/IgG) 檢體硝化纖維膜試紙條位置紀錄表
- 15.3 注意事項
  - 15.3.1 如果檢體抗原呈色帶總分數 $= 3$  (Borderline) 內，該檢體需在二週內重新複檢二次 (Duplicate)，以求正確結果。
  - 15.3.2 如果檢體個案有 EBV 感染，則可能造成偽陽性的結果。
  - 15.3.3 如果硝化纖維膜試紙條呈現 Dark test strips，即試紙條呈現髒汗情形且呈色帶呈現反白情形，應視為陰性結果。

# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法



編號：

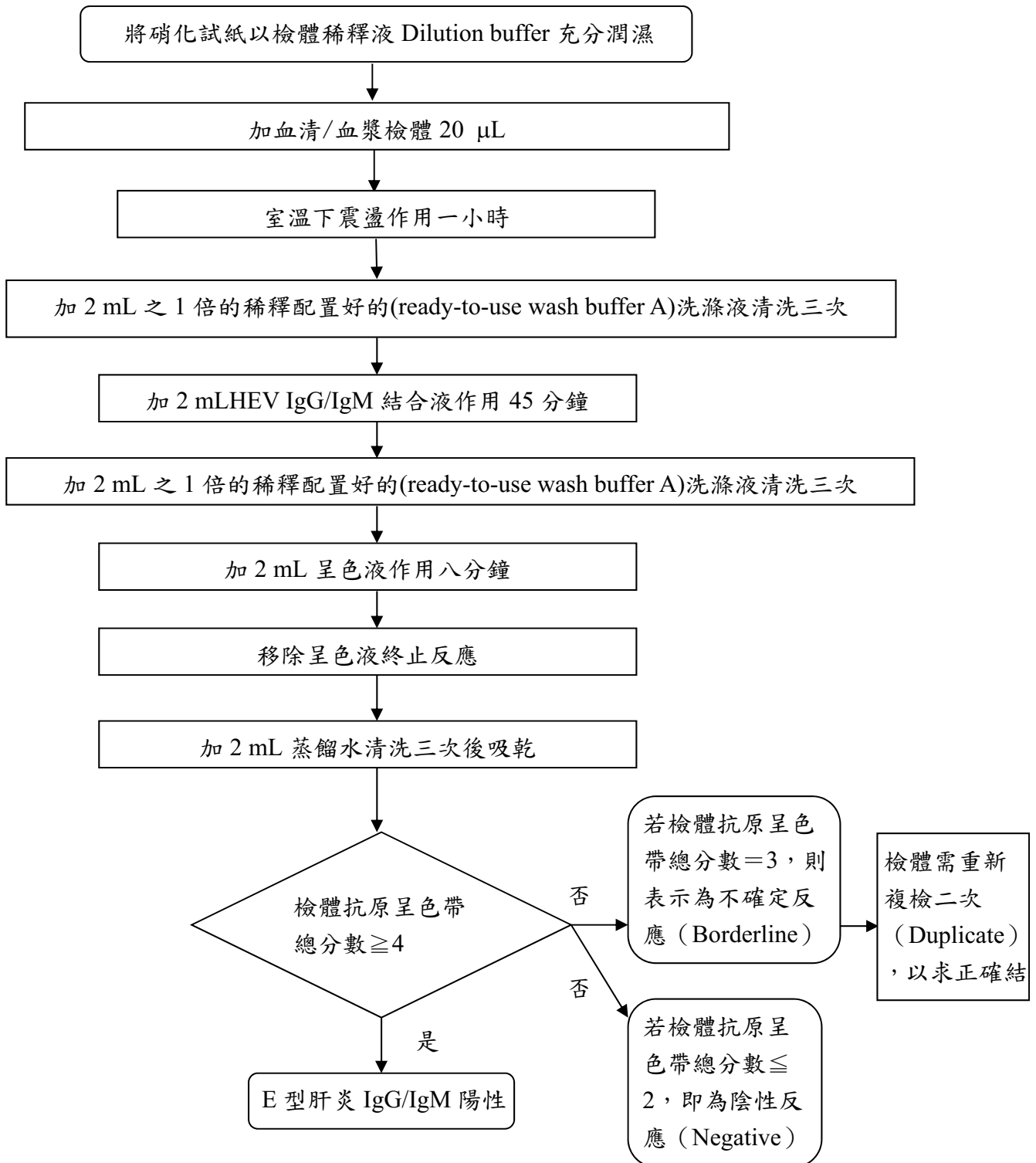
E 型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測  
(IgM/IgG)

核准日期： 年 月 日

頁次：第 510 頁/共 1078 頁


修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 E 型肝炎病毒 IgM/IgG 抗體試驗 (西方墨點法) 流程圖





# 衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒抗體西方墨點法檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 511 頁/共 1078 頁	(IgM/IgG)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 E 型肝炎病毒抗體西方墨點試驗 (IgM/IgG) 檢體硝化纖維膜試紙條位置紀錄表

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

E 型肝炎病毒抗體西方墨點試驗 (IgM/IgG) 檢體硝化纖維膜試紙條位置紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

**MIKROGEN**  
DIAGNOSTIK

Filter-antitoxin 2.4  
D-9206 - Neutralised  
Lot. #49 09 54301 G  
Fax +49 89 54891-100

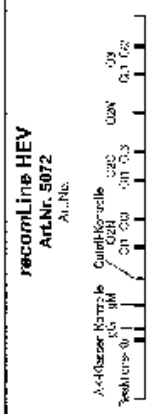
Erkennnte Banden  
Antigen: 2810-2

O2N	O2M	O3
4	2	3

Nr. No.	Erkennnte Banden Antigen: 2810-2				Beurteilung interpretation
	O2N	O2M	O3	O3	
1	2	2	3	2	negatively reag. positive negative reag. positive
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

Auswertebogen  
Evaluation form

Bestell-Nr.:  
Lot-Nr.:  
Führer-Nr.:  
Antikörper-Klasse:  
Antibody class



檢驗者：

實驗室主管



## 國家圖書館出版品預行編目資料

傳染病標準檢驗方法手冊 / 衛生福利部疾病管制署編. --第三版. -- 臺北市：疾管署, 2014.05  
冊；公分  
ISBN 978-986-04-1280-2(全套：平裝)

1. 檢驗醫學 2. 傳染性疾病 3. 手冊

415.12026

103009236

防疫學苑系列 008-1

傳染病標準檢驗方法手冊（上冊）

Manual of Standard Operation Procedure of Communicable Diseases (I)

編者：衛生福利部疾病管制署

編輯群：衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

出版機關：衛生福利部疾病管制署

地址：臺北市林森南路6號

電話：02-23959825

網址：www.cdc.gov.tw

印刷：秀威資訊科技股份有限公司

地址：臺北市內湖區瑞光路76巷65號1樓

電話：02-27963638

出版年月：2014年5月

版次：第三版

定價：1,500元(全套上下兩冊不分售)

### 展售處：

基隆 五南文化海洋書坊	地址：(202) 基隆市北寧路2號	電話：(02)2463-6590
台北 國家書店松江門市	地址：(104) 台北市松江路209號1樓	電話：(02)2518-0207
五南文化台大店	地址：(100) 台北市羅斯福路4段160號	電話：(02)2368-3380
誠品信義旗艦店	地址：(110) 台北市信義區松高路11號	電話：(02)8789-3388
台中 五南文化台中總店	地址：(400) 台中市區中山路6號	電話：(04)2226-0330
逢甲店	地址：(407) 台中市河南路二段240號	電話：(04)2705-5800
嶺東書坊	地址：(408) 台中市南屯區嶺東路1號	電話：(04)2385-3672
雲林 五南文化環球書坊	地址：(640) 雲林縣斗六市鎮南路1221號	電話：(05)534-8939
高雄 五南文化高雄店	地址：(800) 高雄市中山一路290號	電話：(07)235-1960
屏東 五南文化屏東店	地址：(900) 屏東市中山路46-2號	電話：(08)732-4020

### 網路書店：

國家網路書店 網址：<http://www.govbooks.com.tw>

五南網路書店 網址：<http://www.wunanbooks.com.tw>

誠品網路書店 網址：<http://www.eslitebooks.com/>

博客來網路書店 網址：<http://www.books.com.tw>

GPN：1010300977

ISBN：978-986-04-1280-2 (全套：平裝)

請尊重智慧財產權，欲利用內容者，須徵求本署同意或書面授權

