


衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	猴痘病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第1頁/共6頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

以即時定量 real-time PCR 分子診斷方法檢測猴痘病毒核酸。

2 檢體種類與採檢容器

適用於疑似猴痘病毒感染病徵之病患檢體（包含水疱擦拭液、咽喉擦拭液、瘡痂等檢體）。

3 原理概述

3.1 利用一標記兩種螢光的 DNA 探針來偵測聚合酶鏈鎖反應的產物。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)，未進行反應之 DNA 探針其報告染劑的螢光會被遮蔽染劑掩蓋。專一性核酸探針會與檢體核酸序列黏附並進行擴增反應，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。

3.2 猴痘病毒基因製作三組引子探針，第一組探針設計可偵測所有型別的猴痘病毒，第二組探針設計偵測猴痘病毒西非演化分支，第三組探針設計偵測猴痘病毒中非演化分支。

4 檢驗性能特徵：N/A

5 病人準備：N/A

6 試劑耗材

6.1 檢體保存液 (VTM buffer)。

6.2 QIAamp MinElute Virus Kits：QIAGEN, Germany。

6.2.1 QIAamp spin column 離心管柱。

6.2.2 QIAGEN Protease

6.2.3 2 ml 無蓋收集管。

6.2.4 Lysis buffer (AL + carrier RNA-AVE)


6.2.5 清洗液 (AW1+Ethanol)。

6.2.6 清洗液 (AW2+Ethanol)。

6.2.7 萃取液 (AVE)。

6.3 real-time PCR 試驗

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

	編號：	猴痘病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第2頁/共6頁		修訂日期： 年 月 日

6.3.1 iTaq™ Universal Probes Supermix : BIORAD, US。

6.3.2 猴痘病毒核酸引子 (參考資料 14.1)：

MPXV generic detection 猴痘病毒廣泛性核酸引子及探針		
G2R_G assay		
Forward	5'- GGAAAATGTAAAGACAACGAATACAG	90bp
Reverse	5'-GCTATCACATAATCTGGAAGCGTA	
G2R_G probe	5'FAM-AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTCC-3'BHQ1	
Western African clade MPXV 猴痘病毒西非演化分支特異性核酸引子及探針		
G2_WA assay		
Forward	5'-CACACCGTCTCTTCCACAGA	85bp
Reverse	5'-GATACAGGTTAATTTCCACATCG	
G2R_WA probe	5'FAM-AACCCGTCGTAACCAGCAATACATTT-3'BHQ1	
Congo Basin clade MPXV 猴痘病毒中非演化分支特異性核酸引子及探針		
C3L assay		
Forward	5'-TGTCTACCTGGATACAGAAAGCAA	100bp
Reverse	5'-GGCATCTCCGTTTAATACATTGAT	
C3L probe	5'FAM-CCCATATATGCTAAATGTACCGGTACCGGA-3'BHQ1	

6.3.3 positive control DNA : 猴痘病毒重組核酸質體。

6.3.4 negative control DNA: DNase、RNase-free H2O。

6.4 無菌微量吸尖形吸管 (tip) : 1000 µl、200 µl、100 µl、20 µl、10µl。

6.5 無菌微量離心管 : 1.5 mL。

6.6 可拋棄式塑膠手套。

6.7 無菌 PCR 反應管。

7 儀器設備

7.1 第二級生物安全櫃 (Class II BSC)。


7.2 PCR thermal cycler。

7.3 微量吸管 (pipetman) : 1000 µl、200 µl、100 µl、20 µl、10 µl。

7.4 振盪器 (Vortex Mixer)。

7.5 乾式恆溫加熱器

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

	編號：	猴痘病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第3頁/共6頁		修訂日期： 年 月 日

7.6 無菌微量離心管離心機。

7.7 冰箱：4°C。

7.8 冷凍櫃：-20°C。

7.9 即時定量偵測儀。

7.10 高壓滅菌鍋。

7.10.1 使用前確認具年度合格標籤，不合格者停用。

8 環境與設施安全

8.1 病人檢體應在第二級生物安全櫃內處理，並符合 RG3 檢體處理之規範。

8.2 檢體採集參照本署出版之「傳染病檢體採集手冊」。

8.3 檢體運送及保存參照本署出版之「傳染病檢體採集手冊」。

8.4 檢驗操作在生物安全第二等級（BSL-2）實驗室進行。

9 校正程序：

即時聚合酶連鎖反應儀每 2 年進行光學校正。

10 品質管制

10.1 品管執行時機：

10.1.1 新到貨的試劑材料。

10.1.2 試劑儲存溫度超出 2~30°C 範圍。

10.1.3 試驗區域溫度超出 18~30°C 範圍。

10.2 執行方式：與一般檢體相同。

10.3 品管結果的判讀

10.3.1 陰性品管：試驗組皆沒有偵測到螢光反應。

10.3.2 陽性品管：試驗組偵測到專一性探針螢光訊號與內控制組螢光訊號。

11 檢驗步驟


11.1 檢驗人員個人防護裝備

建議穿戴手套、防水隔離衣、高效過濾口罩(N95 或相當等級(含)以上口罩)、配戴護目裝備(全面罩)及髮帽。

11.2 檢體前處理-病毒 DNA 萃取(需在第二級生物安全櫃中操作，此步驟以 QIAamp MinElute Virus Kits 為例)

11.2.1 先吸取 25 µl Protease 放入 1.5 ml 微量離心管，加入 200µl 的檢體，再加入 200µl Lysis buffer (AL buffer 加 carrier RNA-AVE，參考資料 14.2)，震盪混合，56°C 靜置反應 15 分鐘。

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心


	編號：	猴痘病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第4頁/共6頁		修訂日期： 年 月 日

- 11.2.2 加入 250 μ l 絕對酒精，震盪混合 15 秒，室溫靜置反應 5 分鐘。
- 11.2.3 將上述混合液先取至離心管柱 (column)，離心 8,000 rpm，1 分鐘。
- 11.2.4 丟棄管柱內的廢液。加入清洗液 (AW1) 500 μ l，離心 8,000 rpm，1 分鐘。
- 11.2.5 丟棄管柱內的廢液。加入清洗液 (AW2) 500 μ l，離心 8,000 rpm，1 分鐘。
- 11.2.6 丟棄管柱內的廢液。加入絕對酒精 500 μ l，離心 8,000 rpm，1 分鐘。
- 11.2.7 丟棄管柱內的廢液。離心 14,000 rpm，3 分鐘
- 11.2.8 56°C 靜置 3 分鐘以徹底去除離心管柱膜上殘留酒精。
- 11.2.9 將離心管柱 (column) 移入新 1.5 ml 微量離心管，加入 20-150 μ l Elution buffer (buffer AVE) 於離心管柱底部的膜浸潤後，離心 14,000 rpm，1 分鐘。
- 11.3 即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR) 條件，適用 G2R_G assay、G2_WA assay、C3L assay
 - 11.3.1 取 5 μ l 樣本 DNA 做模板，分別加入聚合酶鏈鎖反應試劑及其他反應溶液 (成分如下表)，調整反應總體積至 20 μ l。

反應試劑	加入體積	PCR 反應最終濃度
iTaq™ Universal Probes Supermix	10 μ l	1x
Forward Primer (10 μ M)	0.8 μ l	0.4 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	0.8 μ l	0.4 μ M
Probe (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
RNase/DNase-free water	3 μ l	-

- 11.3.2 依需求自行配置內在對照組反應 (internal control group / human housekeeping gene)
- 11.3.3 即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR)：以使用 Applied Biosystems QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System 為例。
 - 11.3.3.1 HotStart：95 °C，5 分鐘，
 - 11.3.3.2 95 °C，15 秒。
 - 11.3.3.3 60°C，30 秒。
 - 11.3.3.4 重複上述 2~3 步驟 45 cycles。

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

	編號：	猴痘病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第5頁/共6頁		修訂日期： 年 月 日

13 結果判定

13.1 判讀標準 (依使用儀器相關軟體判定，建議 Graph type 同時檢視 Linear 及 Log 方式結果)

13.1.1 G2R_G assay：檢體產生陽性螢光訊號 (FAM)，判定為猴痘病毒陽性。

13.1.2 G2_WA assay：檢體產生陽性螢光訊號 (FAM)，判定為猴痘病毒西非演化分支陽性。

13.1.3 C3L assay：檢體產生陽性螢光訊號 (FAM)，判定為猴痘病毒中非演化分支陽性。

13.2 報告核發

猴痘病毒核酸陽性、陰性

13.3 結果登錄

14 生物參考區間/臨床決策值：陰性。

15 檢驗結果的可報告區間：N/A

16 結果超出量測區間之操作說明：N/A

17 危急值/異常值：N/A

18 臨床意義：陽性結果應視為確認猴痘病毒感染。

19 變異的潛在來源：N/A

20 參考資料

20.1 WHO. Laboratory Guidelines for the Detection and Diagnosis of Monkeypox Virus Infection. <https://www.paho.org/en/documents/laboratory-guidelines-detection-and-diagnosis-monkeypox-virus-infection>

20.2 QIAGEN. QIAamp® MinElute® Virus Spin Handbook

20.3 Bio-Rad. iTaq™ Universal Probes Supermix Product Insert, Ver A

20.4 衛生福利部疾病管制署 (民 111 年 6 月 22 日)。猴痘病例定義暨防疫檢體採檢送驗事項。


<https://www.cdc.gov.tw/File/Get/YI5TohDIT0UfNgaDnTFKRA>

20.5 RDC-QP-1601 安全衛生作業程序

21 附錄

21.1 猴痘病毒—即時聚合酶鏈鎖反應法流程圖

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

	編號：	猴痘病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第6頁/共6頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 21.1 猴痘病毒—即時聚合酶鏈鎖反應法流程圖

