

防疫學苑系列 035-1

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

行政院衛生署疾病管制局 編

行政院衛生署疾病管制局 出版

2011 年 9 月

行政院衛生署疾病管制局
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

目錄

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)	18
3. 嚴重急性呼吸道症候群 (SARS)	22
● SARS 病毒核酸檢測 (RT-PCR)	22
4. 狂犬病	30
● 狂犬病病毒分離與鑑定	30
● 狂犬病病毒核酸檢測 (RT-PCR)	33
● 狂犬病病毒抗原檢測 (直接螢光抗體染色法)	40
5. 炭疽病	42
● 炭疽桿菌分離與鑑定	42
● 炭疽桿菌分子生物學核酸檢測 (及時定量聚合酶鏈鎖反應)	48
● 炭疽桿菌血清學抗體檢測	54
6. H5N1 流感	59
● H5N1 流感病毒核酸檢測 (RT-PCR)	59
二、第二類法定傳染病檢體	63
1. 白喉	63
● 白喉桿菌分離與鑑定	63
● 白喉桿菌核酸檢測 (PCR)	70
● 白喉桿菌毒素檢測 (Elek's plate virulence test)	74
2. 傷寒、副傷寒	79
● 傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌分離與鑑定	79
3. 登革熱	87
● 登革病毒分離與鑑定	87
● 登革病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	93
● 登革病毒 NS1 抗原檢測 (Dengue virus NS1 antigen rapid test)	100
● 登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	102

4.	流行性腦脊髓膜炎	107
	● 奈色氏腦膜炎雙球菌分離與鑑定	107
5.	桿菌性痢疾	115
	● 痢疾桿菌分離與鑑定	115
6.	阿米巴性痢疾	123
	● 痢疾阿米巴檢測 (鏡檢法)	123
	● 痢疾阿米巴核酸檢測 (兩階段巢氏 PCR)	127
	● 痢疾阿米巴抗原檢測 (酵素免疫篩檢法)	134
	● 痢疾阿米巴血清學抗體檢測	138
7.	小兒麻痺	140
	● 小兒麻痺病毒分離與鑑定	140
8.	瘧疾	159
	● 瘧原蟲檢測 (鏡檢法)	159
	● 瘧原蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢式 PCR 法)	164
	● 瘧原蟲血清學抗原檢測 (瘧疾快速檢驗試驗法)	173
9.	麻疹	178
	● 麻疹病毒分離與鑑定	178
	● 麻疹病毒分子生物學核酸檢測 (RT-nested PCR)	188
	● 麻疹病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	194
	● 麻疹定毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	203
10.	急性病毒性 A 型肝炎	213
	● A 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測 (化學冷光微粒免疫分析法)	213
	● A 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測 (化學冷光微粒免疫分析法)	220
11.	漢他病毒症候群	226
	● 漢他病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	226
	● 漢他病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	233
12.	腸道出血性大腸桿菌感染症	237
	● 出血性大腸桿菌分離與鑑定	237
	● 出血性大腸桿菌毒素檢測 (RPLA)	245
	● 出血性大腸桿菌毒素基因鑑定 (PCR)	250
13.	德國麻疹	255
	● 德國麻疹病毒分離與鑑定	255
	● 德國麻疹病毒分子生物學核酸檢測 (RT-nested PCR)	265

● 德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	271
● 德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	280
14. 屈公病	289
● 屈公病毒分離與鑑定	289
● 屈公病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	293
● 屈公病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	300
15. 霍亂	305
● 霍亂弧菌分離與鑑定	305
● 霍亂弧菌毒素基因鑑定 (PCR)	313
● 霍亂弧菌毒素檢測 (RPLA)	318
16. 多重抗藥性結核病	323
● 結核菌群培養	323
● 結核菌群鑑定 (生化)	330
● 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)	336
● 結核菌群間接藥物感受性試驗 (瓊脂平板法)	342
17. 西尼羅熱	346
● 西尼羅病毒分離與鑑定	346
● 西尼羅病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	350
● 西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	357
18. 流行性斑疹傷寒	362
● 普氏立克次體分離與鑑定	362
● 恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒病原體核酸檢測	367
● 普氏立克次體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG, IFA)	373
第三類法定傳染病檢體	379
1. 百日咳	379
● 百日咳菌分離與鑑定	379
● 百日咳菌核酸檢測 (PCR)	386
● 百日咳菌核酸檢測 (PCR LAMP 法)	393
2. 日本腦炎	400
● 日本腦炎病毒分離與鑑定	400
● 日本腦炎病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	404
● 登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA) ...	411

3.	結核病（除多重抗藥性結核病外）	416
	● 結核菌群培養	416
	● 分枝桿菌屬鑑定（抗酸性抹片鏡檢法）	423
	● 結核菌群鑑定（生化）	428
	● 結核菌群核酸檢測（rRNA 直接檢測法）	434
	● 結核菌群核酸檢測（間隔寡核酸分子分型法）	439
	● 結核菌群核酸檢測（IS6110 巢式聚合酶連鎖反應法）	444
	● 分枝桿菌屬核酸檢測（限制酶片段長度多型性分子鑑定法）	450
	● 結核菌群核酸檢測（IS6110 結核桿菌限制酶片段長度多型性分型法）	455
	● 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）	467
	● 結核菌群間接藥物感受性試驗（瓊脂平板法）	472
4.	先天性德國麻疹症候群	476
	● 德國麻疹病毒分離與鑑定	476
	● 德國麻疹病毒分子生物學核酸檢測（RT-nested PCR）	486
	● 德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測（Indirect ELISA）	492
	● 德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測（Indirect ELISA）	501
5.	急性病毒肝炎（除 A 型外）	510
	● A 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測（化學冷光微粒免疫分析法）	510
	● B 型肝炎病毒表面抗原檢測（化學冷光微粒免疫分析法）	517
	● B 型肝炎病毒核心 IgM 抗體檢測（化學冷光微粒免疫分析法）	523
	● C 型肝炎病毒抗體檢測（化學冷光微粒免疫分析法）	530
	● D 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測（ELISA）	536
	● D 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測（ELISA）	544
	● E 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測（ELISA）	551
	● E 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測（ELISA）	559
6.	流行性腮腺炎（群聚感染）	567
	● 腮腺炎病毒分離與鑑定	567
	● 腮腺炎病毒分子生物學核酸檢測（RT-nested PCR）	577
	● 腮腺炎病毒 IgM 抗體檢測（Indirect ELISA）	583
	● 腮腺炎病毒 IgG 抗體檢測（Indirect ELISA）	592
7.	退伍軍人病	601
	● 退伍軍人病病原菌分離與鑑定	601


● 嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (EIA)	610
● 嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (RIMA)	616
● 嗜肺退伍軍人菌抗體檢測 (IFA)	620
● 退伍軍人菌抗原檢測 (LATEX)	626
● 退伍軍人菌抗體檢測 (DFA)	629
● 水中退伍軍人菌分離與鑑定	633
8. 侵襲性 b 型嗜血桿菌感染症	642
● 侵襲性 b 型嗜血桿菌分離與鑑定	642
9. 梅毒	649
● 梅毒螺旋體抗體檢測 (RPR)	649
● 梅毒螺旋體抗體檢測 (VDRL)	655
● 梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	663
● 梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	674
10. 淋病	685
● 奈色氏淋病雙球菌染色鏡檢 (革蘭氏染色法)	685
● 奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定	689
● 奈色氏淋病雙球菌分子生物學檢測 (real-time-PCR)	695
11. 腸病毒感染併發重症	702
● 腸病毒分離與鑑定	702
● 腸病毒中和抗體檢測	712
12. 人類免疫缺乏病毒感染與後天免疫缺乏症候群 (AIDS)	721
● 人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (粒子凝集法)	721
● 人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (WB)	728
● 人類免疫缺乏病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	736
第四類法定傳染病檢體	744
1. 疱疹 B 病毒感染症	744
● 疱疹 B 病毒分離與鑑定	744
● 疱疹 B 病毒核酸檢測 (Real-time PCR)	748
● 疱疹 B 病毒抗體檢測	754
2. 鈎端螺旋體病	758
● 鈎端螺旋體分離與鑑定	758
● 鈎端螺旋體抗體檢測 (顯微凝集法)	764
● 鈎端螺旋體抗體檢測 (ELISA)	768

3.	類鼻疽	772
	● 類鼻疽伯克氏菌分離與鑑定	772
4.	肉毒桿菌中毒	777
	● 肉毒桿菌分離與鑑定	777
	● 肉毒桿菌中和試驗	781
	● 肉毒桿菌毒素檢測	785
5.	侵襲性肺炎鏈球菌感染症	789
	● 侵襲性肺炎鏈球菌分離與血清型別鑑定	789
6.	Q熱	796
	● 貝氏考克斯菌核酸檢測 (STN-RT PCR)	796
	● Q熱病原體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG, IFA)	802
7.	恙蟲病、地方性斑疹傷寒	808
	● 恙蟲病及斑疹傷寒病原體分離與鑑定	808
	● 恙蟲病及斑疹傷寒病原體核酸檢測 (Real-time PCR)	812
	● 恙蟲病抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	818
	● 斑疹傷寒抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	824
8.	萊姆病	830
	● 萊姆病病原菌分離與鑑定	830
	● 萊姆病病原菌抗體檢測 (ELISA)	834
	● 萊姆病病原菌抗體檢測 (WB)	838
9.	兔熱病	844
	● 兔熱病病原菌抗體檢測 (微量平板法)	844
	● 兔熱病病原菌抗體檢測 (IHA)	848
10.	水痘	852
	● 水痘病毒分離與鑑定	852
	● 水痘病毒分子生物學核酸檢測 (Nested PCR)	861
	● 水痘病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	867
	● 水痘病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	876
11.	貓爪病	885
	● 貓爪病病原體分離與鑑定	885
	● 貓爪病病原體抗體檢測 (IFA)	889
12.	弓形蟲感染症	894
	● 弓形蟲分離與鑑定	894

● 弓形蟲分子生物學核酸檢測（兩階段巢式 PCR 法）	895
● 弓形蟲 IgM 及 IgG 抗體檢測（EIA 及 ELFA）	899
13. 流感併發症	905
● 流感病毒分離與鑑定	905
● 流感病毒核酸檢測（RT-PCR）	915
14. 庫賈氏症	921
● 庫賈氏病標示蛋白檢測（WB）	921
第五類法定傳染病檢體	929
1. 裂谷熱	929
● 裂谷熱病毒分離與鑑定	929
● 裂谷熱病毒核酸檢測（Real-time RT-PCR）	933
● 裂谷熱病毒抗體檢測（ELISA）	938
2. 馬堡病毒出血熱	942
● 馬堡病毒分離與鑑定	942
● 馬堡病毒核酸檢測（Real-time RT-PCR）	946
● 馬堡病毒抗體檢測（ELISA）	952
3. 黃熱病	956
● 黃熱病毒分離與鑑定	956
● 黃熱病毒分子生物學核酸檢測（RT-PCR）	960
● 黃熱病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測（ELISA）	967
4. 伊波拉病毒出血熱	971
● 伊波拉病毒分離與鑑定	971
● 伊波拉病毒核酸檢測（Real-time RT-PCR）	975
● 伊波拉病毒抗體檢測（ELISA）	981
5. 拉薩熱	985
● 拉薩病毒分離與鑑定	985
● 拉薩病毒核酸檢測（Real-time RT-PCR）	989
● 拉薩病毒抗體檢測（ELISA）	995
六、非法定傳染病檢體	999
1. 金黃色葡萄球菌食品中毒	999
● 金黃色葡萄球菌分離與鑑定	999
● 金黃色葡萄球菌腸毒素檢測（RPLA）	1005
2. 腸炎弧菌食品中毒	1010

● 腸炎弧菌分離與鑑定·····	1010
3. 布氏桿菌病·····	1017
● 布氏桿菌抗體檢測 (RBT 及 CFT) ·····	1017
4. 肺炎披衣菌·····	1021
● 肺炎披衣菌核酸檢測 (PCR) ·····	1021
● 肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF) ·····	1029
5. 病毒性腸胃炎·····	1039
● 諾羅病毒抗體檢測 (ELISA) ·····	1039
● 輪狀病毒抗體檢測 (ELISA) ·····	1046
6. 猩紅熱·····	1053
● 猩紅熱病原菌 (A 群鏈球菌) 分離與鑑定·····	1053
7. 仙人掌菌·····	1059
● 仙人掌桿菌分離與鑑定·····	1059
8. 腺病毒·····	1064
● 腺病毒分離與鑑定·····	1064
9. 菌種鑑定·····	1074
● 16S rDNA 細菌鑑定法·····	1074
中文索引·····	1082
英文索引·····	1087

行政院衛生署疾病管制局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 1 頁/共 1091 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天花病毒。

2 適用範圍

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% CO₂，37°C 培養箱中培養 3 日，利用聚合酶鏈反應 (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。

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

5.3 特異引子：

VAR1-S1：CTGGTGTAGAGATAGCCGA

VAR1-A1：ATGGCTTCCGATTGGATTAC

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

5.5 0.2 ml PCR 反應管。

5.6 聚合酶連鎖反應試劑 (phusion high-fidelity DNA polymerase)。

5.7 洋菜膠 (MetaPhor® agarose)。

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

5.9 無菌微量吸管尖 (tip)：10 μL、20 μL、200 μL。

5.10 無菌蒸餾水。

5.11 可拋棄式無菌塑膠手套。

6 儀器設備

6.1 37°C CO₂ 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。

行政院衛生署疾病管制局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 2 頁/共 1091 頁		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 18Ω-CM 以上超純水。

8 檢驗採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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% CO₂ 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, 10mM dNTP 1 μL, 10pmol/μL VAR1-S1 primer 1 μL, 10pmol/μL VAR1-A1 primer 1 μL, ddH₂O 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 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。

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 CO₂ 恆溫箱染色時應注意保持溼度。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 聚合酶連鎖反應須含有陰性與陽性對照組。

13 廢棄物處理

- 13.1 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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序辦理。
- 13.2 未使用完檢體放回-80°C 冰箱保存。


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.

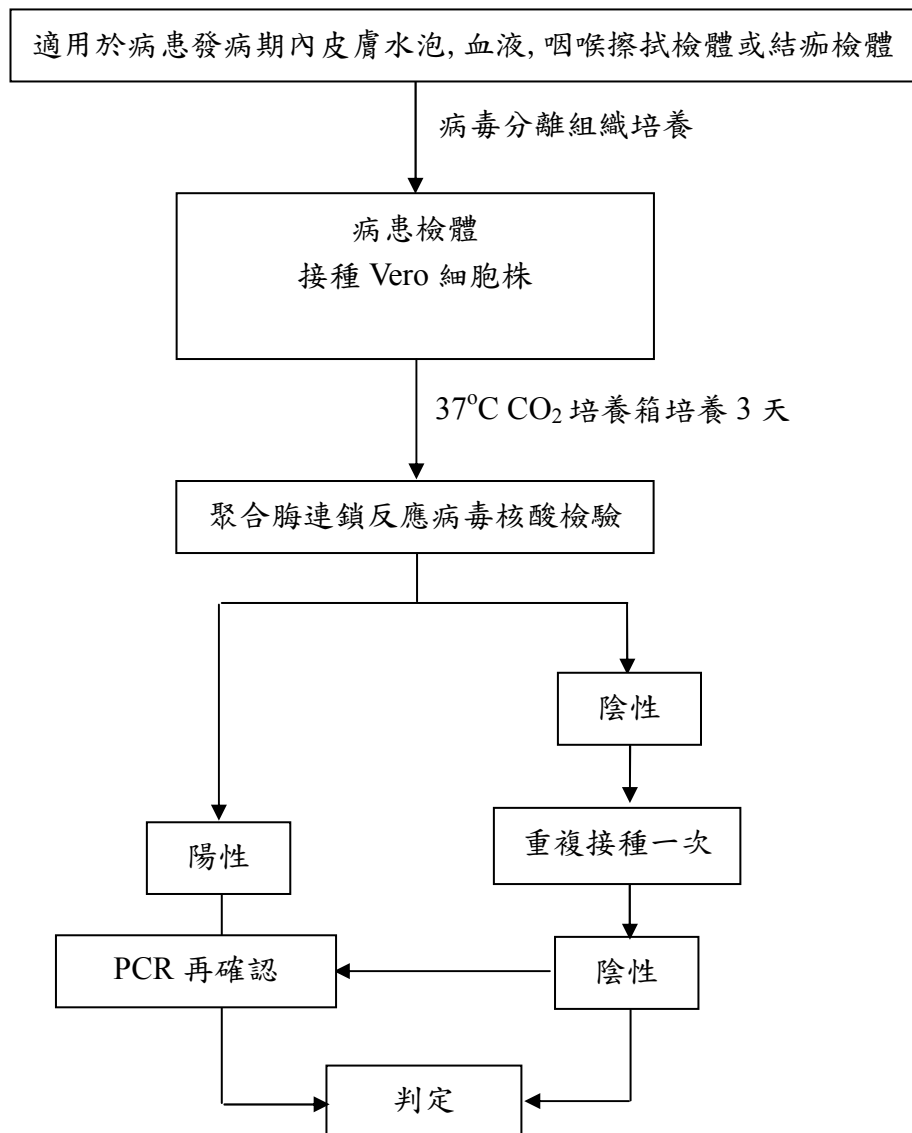
15 附錄

- 15.1 天花病毒分離與鑑定流程圖。

行政院衛生署疾病管制局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 4 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 天花病毒分離與鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 5 頁/共 1091 頁	(Real-time PCR)	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 μ L、10 μ L、200 μ 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，分別選定偵測的正痘病毒 (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。

Pan-Orthopox virus		
HA (J7R)		
Forward	5'-gatgatgcaactctatcatgta-3'	130bp
Reverse	5'-gtataattatcaaaatacaagacgtc-3'	
Taqman-MGB	5'-6'FAM-agtgcttggtataaggag-MGBNFQ-3'	

行政院衛生署疾病管制局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 6 頁/共 1091 頁	(Real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

Pan-Orthopox virus		
DNA polymerase (E9L)		
Forward	5'-gaacattttggcagagagagcc-3'	177bp
Reverse	5'-caactcttagccgaagcgtatgag-3'	
Taqman-MGB	5'-6'FAM-caggctaccagttaa-MGBNFQ-3'	
Variola virus		
HA (J7R)		
Forward	5'-tcattctggagaatccacaaca-3'	139bp
Reverse	5'-catcattggcgggtgattta-3'	
Taqman-MGB	5'-6'FAM-aagacgtcgggaccaat-MGBNFQ-3'	
Variola virus		
B9R		
Forward	5'-cagatagcgggtgtcagaatacca-3'	87bp
Reverse	5'-atagccttccaaatcagatcctg-3'	
Taqman-MGB	5'-6'FAM-caatggaacaattaggtattac-MGBNFQ-3'	
Variola virus		
B10R		
Forward	5'-caaatgcagggtacaacaaca-3'	88bp
Reverse	5'-caatgaatccttagtattgccaacg-3'	
Taqman-MGB	5'-6'FAM-taatgacggaagtaaacg-MGBNFQ-3'	

6 儀器設備

- 6.1 The LightCycler instrument system。
- 6.2 微量吸管 (pipetmen)：5 μL、10 μL、200 μL。
- 6.3 計時器。
- 6.4 37°C 水浴箱。

7 環境與設施安全

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 處理才可進入分生 (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。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	(Real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

8 檢體採集

8.1 檢體無添加抗凝劑，血清無溶血且量不少於 200 μ L。

8.2 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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：

(1) 感染細胞株進行病毒培養。

(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，一部份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。

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

10.2.2 56°C 離心 (spin down)，後加入 200 μ L buffer AL 並混合均勻。

10.2.3 70°C 加熱，10 min 後短暫離心。

10.2.4 再加入 200 μ 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 μ 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 μ L Buffer AW2，以 14,000rpm 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 μ L Buffer AE，置於室溫 1 min，以 8,000 rpm 離心 1 min 後收集濾液 (DNA)。

行政院衛生署疾病管制局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 8 頁/共 1091 頁	(Real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

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°C 備用。

10.3 Real-time PCR amplification

10.3.1 製備試劑：

(1) 製備 Primer

以 H₂O 將 Primer 溶解，使其濃度為 100 μM，再以 H₂O 將 Primer 稀釋到 0.5 μM。

(2) 製備 Probe：

以 H₂O 將 Probe 溶解，使其濃度為 100 μM，再以 H₂O 將 Primer 稀釋到 0.05 μM。

10.3.2 製備 Real time PCR Mix：

DNA template (500 ng genomic DNA or 10¹-10¹⁰ copies plasmid DNA/5 μL)

0.5 μM Forward primer	2 μL	x Z
0.5 μM Reverse primer	2 μL	x Z
0.05 (~0.1) μM Probe	2 μL	x Z
Master mix, 5X conc.	4 μL	x Z
H ₂ O	5 μL	x Z

Total 20 μL

(Z= 總反應數 + 1)

以微量吸管混合均勻，勿 Vortex。

10.3.3 取 15 μL PCR mix 至 LightCycler capillary。

10.3.4 加入 DNA template 各 5 μL。

10.3.5 將各毛細管封上專用蓋子。

10.3.6 離心 700 x 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

行政院衛生署疾病管制局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 9 頁/共 1091 頁	(Real-time PCR)	修訂日期： 年 月 日

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，依本局廢棄物處理作業程序處理。


14 參考資料

略。

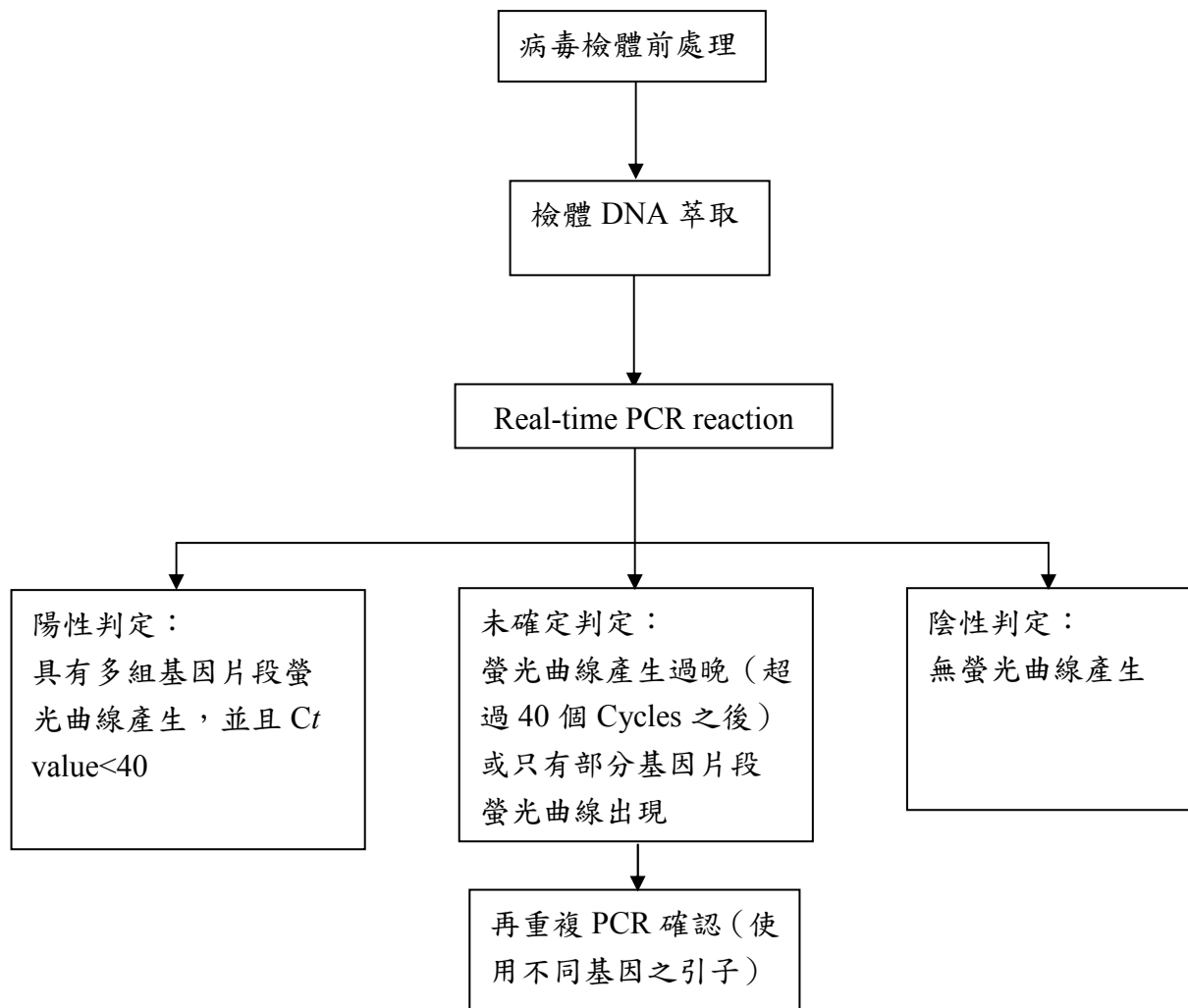
15 附錄

15.1 天花病毒基因檢測分析法流程圖。


行政院衛生署疾病管制局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 10 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局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 1091 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，及生體組織如肝臟、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：Difco，USA。
- 5.2 Wayson stain 染色液的配製
 - 5.2.1 取 0.2 g Fuchsin 溶於無水酒精。
 - 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 老鼠抗鼠疫 F1 多價免疫球蛋白或單株抗體 (自備)。
- 5.4 Methanol。
- 5.5 Acetone。
- 5.6 Phenol。
- 5.7 磷酸緩衝液。
- 5.8 陽性對照 (*Yersinia pestis* Yreka, PMBP-0019 疫苗株)。
- 5.9 陰性對照 (*E coli* ATCC 25922)。
- 5.10 培養基：
 - 5.10.1 BAP。
 - 5.10.2 MacConkey agar。
 - 5.10.3 TSI。
 - 5.10.4 SIM (semisolid)。
 - 5.10.5 Lysine。
 - 5.10.6 *Yersinia* Selective agar (含 *Yersinia* antimicrobial supplement CN)：Difco，USA。
 - 5.10.7 TSB。
- 5.11 Cary-Blair transport medium。

行政院衛生署疾病管制局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 12 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.12 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。
- 5.13 3% Catalase。
- 5.14 快速生化鑑定試劑套組：API 20 E：bioMerrius，France。
- 5.15 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L。
- 5.16 無菌滴管 (dropper)：1 mL。
- 5.17 接種針 (環)。
- 5.18 載玻片。
- 5.19 無菌塑膠手套。
- 5.20 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透可達 18 Ω -CM 以上超純水。
- 5.21 PCR 專用八連排反應管。
- 5.22 PCR 專用八連排反應蓋。
- 5.23 GoTaq green master mix (Promega Corp., Cat no. M7122)。
- 5.24 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
- 5.25 電泳偵測試劑：
 - 5.25.1 1.5% agar 膠片。
 - 5.25.2 Tracking dye。
 - 5.25.3 TBE 緩衝液 pH 8.2-8.3。
 - 5.25.4 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 (Nikon)。
- 6.7 半自動化偵測血液培養裝置 (Bactec 9050, Becton Dickinson)。
- 6.8 核酸增幅儀：Biometra。
- 6.9 DNA 電泳膠體觀察照相設備

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，但個人防護及操作均依生

行政院衛生署疾病管制局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 13 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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，及生體組織如肝臟、脾臟、心臟及骨髓解剖之材料等。動物組織或蚤之標本。

8.2 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 低溫運送血液培養瓶以室溫運送。

9.2 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 檢驗前處理：若高度污染標本或取自齧齒動物蚤類，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* Sselective 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 在腦膜炎發作的患者，腦脊髓液也可離心沈澱作抹片及培養。

10.2.4 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。

10.2.5 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：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。


10.4 培養：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

行政院衛生署疾病管制局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 14 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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，輕微混濁可見棉絮狀菌體凝集現象。API 20 E 其電腦碼為 1004100、1004500、1004503、1004101、1004501 或 1004102，其他生化特性如 Catalase 陽性，Oxidase 陰性亦可輔助確認菌株。最終鑑定最好是以免疫螢光法來染色確認。

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 μL 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 μL 2X GoTaq green master mix, 0.1 μM caf1 引子組, 0.1 μM yopM 引子組, 0.1 μM pla 引子組, 0.05 μM inv 引子組，模版 2 μL，以二次蒸餾水加到 50 μL。

10.6.3.3.3 PCR 反應條件：Predenature 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 8 μL 的 PCR 增殖產物加 2 μL Tracking dye 混合，以 1.5 % 洋菜膠，50 Voltage，約 1.5 hr，1X TBE，進行 Minigel 電泳分析。再以 0.5 μL/mL Ethidium bromide 染色 15 min，

行政院衛生署疾病管制局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 15 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

水洗 10 min 後觀察。可見 565 bp (yopM)、480 bp (pla)、295 bp (inv) 及 171 bp (caf1) 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。以老鼠抗鼠疫 F1 多價免疫球蛋白或單株抗體做凝集反應有凝集現象，鼠疫桿菌菌體莢膜 (F1) 在 37°C 產生，25°C 不產生 F1 抗原。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 (caf1) 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 15.2。

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。

12.3 老鼠抗鼠疫 F1 多價免疫球蛋白或單株抗體保存期限內;每批號需作檢測。

12.4 噬菌體無菌過濾保存在 4°C，調噬菌體濃度在 10^7 - 10^8 PFU/mL。

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，依本局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*, 7th 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

行政院衛生署疾病管制局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 16 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


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.

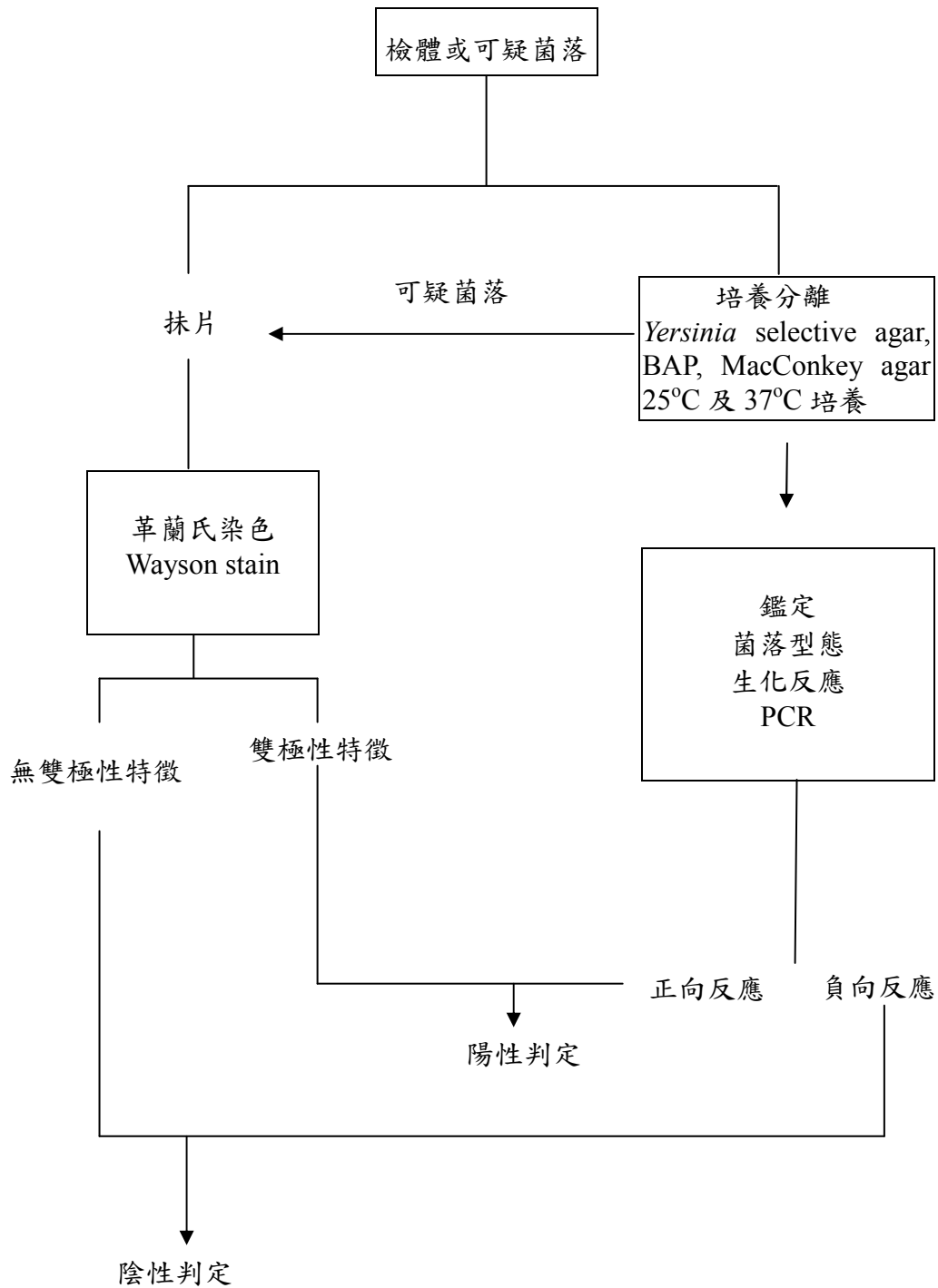
15 附錄

- 15.1 鼠疫桿菌分離與鑑定流程圖。


行政院衛生署疾病管制局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 17 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 鼠疫桿菌分離與鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 1091 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 (NaCO_3) 1.36 g, Sodium bicarbonate (NaHCO_3) 7.35 g。
- 5.2 10X 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, KH_2PO_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)：詳見鼠疫桿菌鑑定 (被動血球凝集及被動血球凝集抑制法)。
- 5.7 HRP stabilizer：Nalgene KPL ELISA kit，USA。
- 5.8 HRP conjugate：Nalgene KPL ELISA kit，USA。
- 5.9 TMB substrate：Nalgene KPL ELISA kit，USA。
- 5.10 TMB stop solution：Nalgene KPL ELISA kit，USA。
- 5.11 2 mL、5 mL 可丟棄式塑膠吸管。
- 5.12 10-200 μL 尖形吸量管。
- 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：MRC TC II, DYNEX。
- 6.2 37°C 恆溫培養箱 (incubator)。
- 6.3 插電式可調溫水浴箱。
- 6.4 離心機。
- 6.5 尖形吸量管輔助器。
- 6.6 Mixer。
- 6.7 4°C 冰箱。
- 6.8 -20°C 冷凍櫃。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	(酵素免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 6.9 pH meter。
- 6.10 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。

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，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 μ L。
- 8.2 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

- 9.1 血清檢體以低溫保存運送。
- 9.2 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 檢驗前處理

- 10.1.1 以 0.1 M Carbonate Buffer 稀釋成 0.1 μ g F1 抗原/100 μ L Coating 在 96 孔 ELISA 盤，4°C Overnight，但不超過 16 hr。200 μ 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 μ L/孔待測檢體，放 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 μ L/孔，放 37°C 30 min。
- 10.2.5 PBS-T wash 5 次。
- 10.2.6 加 100 μ L/孔 TMB substrate，放室溫 15 min，避光。
- 10.2.7 加 100 μ L/孔 TMB stop solution，混和均勻並小心去除氣泡。
- 10.2.8 放 ELISA reader (MRC TC II, Dynex)，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。

行政院衛生署疾病管制局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 20 頁/共 1091 頁	(酵素免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於鼠疫桿菌抗體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

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，依本局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。

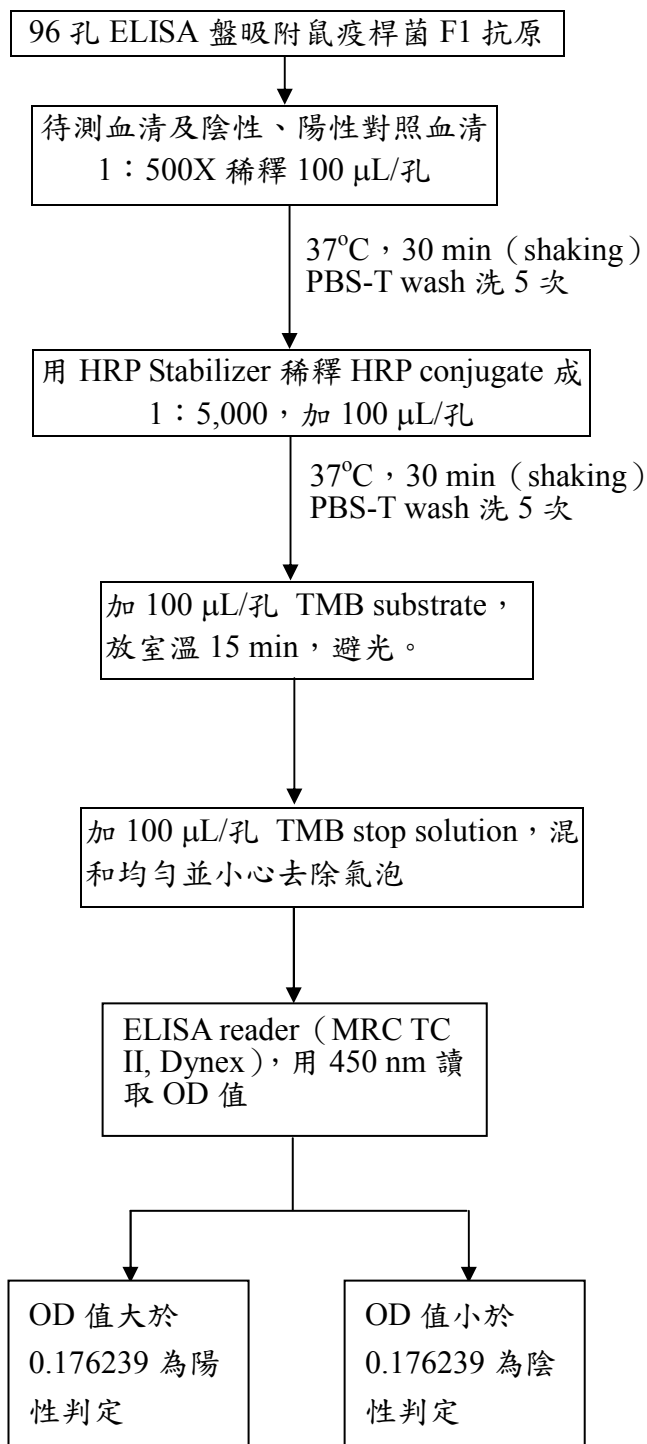
15 附錄

15.1 鼠疫桿菌 F1 抗體酵素免疫法 (ELISA) 測定流程圖

行政院衛生署疾病管制局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 21 頁/共 1091 頁	(酵素免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 鼠疫桿菌 F1 抗體酵素免疫法 (ELISA) 測定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 22 頁/共 1091 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－聚合酶鏈反應 (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)：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。

5.1.5 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 23 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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

5.1.7 Optical plate adhesive covers (Part Number 4311971)。

5.1.8 Agarose。

5.1.9 DEPC 水。

5.1.10 無菌 PCR 反應管。

5.1.11 無菌 2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L Tips。

5.1.12 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.1.13 手套。

5.2 儀器設備

5.2.1 PCR thermal cycler。

5.2.2 即時定量偵測儀 (如 ABI system, Bio-rad system, LightCycler system 等)。

5.2.3 電泳槽。

5.2.4 DNA 電泳膠體觀察設備。

5.2.5 2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L Pipetman。

6 環境與設施安全

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。

7 檢體採集與檢體前處理

7.1 檢體採集參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

7.2 檢體前處理

7.2.1 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。

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

(1) 檢體的採集量並無嚴格限制。

(2) 檢體的運送：4°C。

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

7.2.3 咽喉拭子檢體

(1) 棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。

(2) 於 4°C，2100 \times g 離心 15 min。

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

7.2.4 糞便檢體

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 24 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- (1) 取糞便 1 g，放入 15 mL 離心管中，加入玻璃圓球及 10 mL PBS⁽⁺⁾ 液調成 10% 懸浮液。
- (2) 於 4°C，2100 ×g 離心 15 min。
- (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。

7.2.5 痰檢體:

- (1) 取 PBS 緩衝液與痰檢體約 1:1 的比例混合。
- (2) 攪拌使其均質化並於 4°C，2100 ×g 離心 15 min。
- (3) 收集上清液，取 140 μL，其餘保存於 -70°C。

8 檢體運送及保存

檢體運送以低溫快速為原則，需使用檢體專用運送箱，運送箱內需維持低溫 (4°C)，檢體若無法即刻送檢則可暫時儲存於 4°C 冰箱中。

9 檢驗步驟

9.1 萃取病毒 RNA


- (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。
- (2) 加入純酒精 560 μL 終止反應。
- (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。
- (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。
- (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。
- (6) 離心 14,000 rpm，1 min，以徹底去除膜上殘留酒精。
- (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。

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

- (1) 試劑添加量如下：

5X buffer	10	μL
Cor-p-F2 forward primer (10 μM)	3	μL
Cor-p-R1 reverse primer (10 μM)	3	μL
RNA enzyme mix	2	μL

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	(RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

dNTP	2	μL
Q solution	10	μL
DEPC treatment H₂O	15	μL
RNA sample	5	μL
		50 μL

- (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 (1)
- (3) 使用 PCR thermal cycler。
 - (a) R.T.作用，50°C 30 min。
 - (b) Taq 活化作用，95°C 15 min。
 - (c) Denaturation，95°C 35 sec。
 - (d) Annealing，51°C 40 sec。
 - (e) Extension，72°C 60 sec。
 - (f) 重複 (c) 至 (e) 步驟 40 cycle。
 - (g) Final extension, 72°C 10 min。
- (4) 膠片電泳分析
 - (a) 置備 1.5% 洋菜膠：6 g Agarose 溶於 400 mL (1X) TBE buffer。
 - (b) 選擇 100 bp DNA size marker：5 μL (2 ng/μL)。
 - (c) 取二次產物 10 μL，各加入 2 μL 6X Loading dye。
 - (d) 進行電泳分離：100V，35 min。
 - (e) 膠片染色：1 μL/mL Ethidium bromide 染色 10 min，H₂O 褪染。
 - (f) 使用 UV light 觀察，並照相紀錄。

9.3 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)

(1) 試劑添加量

2X Master mix buffer	12.5	μL
SARS2 forward primer (10 μM)	1	μL
SARS2 reverse primer (10 μM)	1	μL
CDC-probe (5 μM)	0.5	μL
RNA enzyme mix	0.67	μL
Exo IPC mix	1.25	μL
IPC DNA	0.25	μL
DEPC treatment H ₂ O	2.9	μL

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 26 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

RNA sample	5	μL
	25	μL

(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。

(3) Real-time RT-PCR 反應條件

(a) RT reaction：48°C，30 min。

(b) Taq activation：95°C，10 min (1 replication cycle)。

(c) PCR reaction：95°C，15 s；60°C，1 min (45 replication cycles)。

9.4 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。

9.5 結果判定

(1) RT-PCR：RT-PCR 產物各取 5 μL，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，檢驗結果為陽性為。

(2) Real-time RT-PCR：

(a) 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 (Ct 值與標準品濃度)。

(b) 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。

(c) 注意事項：建議標準曲線的 R2 值趨近於 1。

10 注意事項

10.1 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。

10.2 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。

10.3 序列分析：將經 RT-PCR 增幅的 DNA 片段作定序分析，並將定序的

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 27 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

結果利用 NCBI 的基因庫作序列分析。

11 參考文獻

- 11.1 WHO. PCR primers for SARS developed by WHO Network Laboratories. <http://www.who.int/csr/sars/primers/en/index.html>.
- 11.2 WHO biosafety guidelines for handling of SARS specimens. http://www.who.int/csr/sars/biosafety2003_04_25/en/
- 11.3 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.

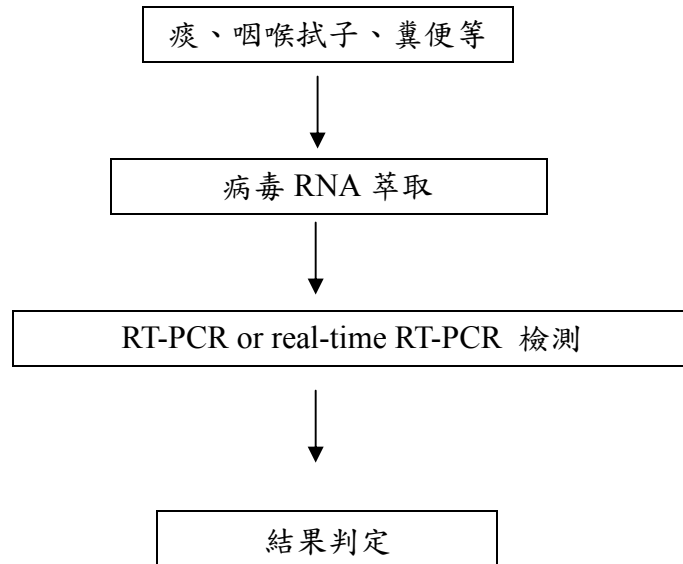
12 附錄

- 12.1 SARS 病毒鑑定流程圖。
- 12.2 SARS 病毒診斷用引子組序列表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 28 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 12.1 SARS 病毒鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	SARS 病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 29 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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'

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	狂犬病病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 30 頁/共 1091 頁		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 檢體

適用於人體體內組織檢體。

3 方法

利用株化細胞（老鼠神經胚胎細胞株）分離狂犬病毒。

4 名詞解釋

無。


5 試劑耗材

- 5.1 老鼠神經胚胎細胞培養培養盒 25 cm² 或 75 cm²。
- 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 25T 和 75T。
- 6.6 固定槽和染色盤。
- 6.7 CO₂ 恆溫箱，37°C，0.5% CO₂。
- 6.8 離心機。
- 6.9 1 mL 細胞保存瓶。
- 6.10 15 mL 離心管。
- 6.11 13 X 100 mm 試管。
- 6.12 冰箱。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	狂犬病病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 31 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

6.13 螢光顯微鏡。

6.14 倒立顯微鏡。

7 環境與設施安全
略。

8 檢體採集
參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存
參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 以目視及鏡檢選取生長良好，培養於 75 cm² 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 cm² 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 (4x10⁶ 個細胞/mL) 之細胞懸浮液，以手套包裹住試管後震盪混合數 sec。


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 cm² 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	狂犬病病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 32 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.13 若出現細胞質內螢光則判定為陽性，可收集 25 cm² 培養盒之病毒液。

10.14 若 4-5 天 dFA 仍舊呈陰性，則於第 5 天盲目繼代。25 cm² 培養盒棄上清液後，以 Typsin-EDTA 處理細胞懸浮液，繼續培養和以 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 附錄

11.1 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 ⁵ U/mL	0.5	mL

11.2 Lysis buffer


10 mM Tris HCl, pH 7.5

150 mM NaCl

1.5 mM MgCl

0.65% NP-40

行政院衛生署疾病管制局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 33 頁/共 1091 頁		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 檢體

適用於人體體內組織、血清或血漿檢體。

3 方法

利用分子生物學技術 RT-PCR 與巢式聚合酶鏈鎖反應 (nested-PCR) 的高敏感度的方法來檢測檢體中的狂犬病毒 RNA。

4 名詞解釋

無。

5 內容

5.1 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，增幅出約 433 bp 的 DNA 片段，以篩選檢體是否感染狂犬病病毒。所用之引子是根據犬病毒的 nucleoprotein 區域所設計的，利用 nested-PCR 以提高偵測的敏感度。

5.2 試劑耗材

5.2.1 QIAmp viral RNA kit。

5.2.2 RT reagent

(1) 0.1 M DTT (Roche)。

(2) 40 U/μL RNase inhibitor (Gibco BRL)。

(3) 200 U/μL RT (Gibco BRL)。

(4) dNTP (dGTP、dCTP、dTTP、dATP, 10 mM each / Roch)。

5.2.3 PCR reagents

(1) 5 U/μL Taq polymerase (Gibco BRL)。

(2) dNTP (dGTP、dCTP、dTTP、dATP, 1.25 mM each)。

(3) 10X PCR buffer (with 1.5 mM MgCl₂)。

(4) 25 mM MgCl₂。


(5) DNase, RNase-free H₂O。

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

5.2.5 positive control RNA (CVS strain 的狂犬病病毒)。

5.2.6 Agarose。


行政院衛生署疾病管制局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 34 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.2.7 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透可達 18Ω-CM 以上超純水。
- 5.2.8 無菌 PCR 反應管。
- 5.2.9 無菌 2 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL Tips。
- 5.2.10 無菌 1.5 mL 微量離心管。
- 5.2.11 手套。
- 5.3 儀器設備
 - 5.3.1 PCR thermal cycler。
 - 5.3.2 Agarose 電泳槽。
 - 5.3.3 DNA 電泳膠體觀察設備。
 - 5.3.4 2 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL Pipetman。
- 5.4 檢體前處理
 - 5.4.1 血清或添加抗凝劑如 Sodium citrate 或 EDTA 的血漿皆可使用。
 - 5.4.2 檢體的採集量並無嚴格限制。
 - 5.4.3 檢體的運送：4°C。
 - 5.4.4 採集後之檢體，以 2000 rpm 離心 10 min，以分離出的血清備用。
 - 5.4.5 檢體分裝：將處理好之血清檢體，依其姓名作檢體編號，並將血清分成兩管：一管放置 4°C 供應 PCR 檢驗用；另一管放置 -20°C 儲存。
- 5.5 環境條件

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。
- 5.6 檢驗步驟
 - 5.6.1 萃取病毒 RNA
 - (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。
 - (2) 加入純酒精 560 μL 終止反應。
 - (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。
 - (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。
 - (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。
 - (6) 離心 12,000 rpm，3 min，以徹底去除膜上殘留酒精。
 - (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。

行政院衛生署疾病管制局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 35 頁/共 1091 頁	(RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

5.6.2 反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)

(1) 取 10 μ L RNA 做模板，加入第一對引子組 (1-Rabies-F 及 1-Rabies-R primers 參考附錄 7.2) 各 10 pmole，70°C 作用 10 min 後，並使其逐漸降溫至 4°C。

(2) 加入反應溶液 (成分如下表)，調整反應總體積至 100 μ L。

初始濃度	加入體積	最終濃度
10X PCR buffer	10 μ L	50 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.01% gelatin
2.5 mM dNTP each	5 μ L	250 μ M dNTP each
0.1M DTT	0.5 μ L	1 mM DTT
40 U/ μ L Rnasin (Gibco BRL)	2 μ L	20 Units RNasin
200 U/ μ L RT (Gibco BRL)	2 μ L	50 Units RT
5 U/ μ L Taq polymerase	2 μ L	1.25 Units Taq polymerase

(3) 反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)：使用 PCR thermal cyclers。

- (a) R.T.作用：42°C，50 min。
- (b) Taq 活化作用：94°C，5 min。
- (c) Denaturation：94°C，30 sec。
- (d) Annealing：50°C，40 sec。
- (e) Extension：72°C，60 sec。
- (f) 重複 (c) 至 (e) 步驟 40 cycle。
- (g) Final extension：72°C，10 min。

5.6.3 巢式聚合酶鏈鎖反應 (nested PCR)

(1) 取 5 μ L RT-PCR 反應產物，與病毒分型用引子組 (2-Rabies-F 及 2-Rabies-R，參考附錄 7.2) 各 10p mole，加入反應溶液 (成份如下表)，調整反應總體積至 100 μ L。

初始濃度	加入體積	最終濃度
10X PCR buffer	10 μ L	50 mM KCl, 1.5mM MgCl ₂ , 10mM Tris-HCl pH 8.5, 0.01% gelatin
2.5 mM dNTP each	5 μ L	250 μ M dNTP each
5 U/ μ L Taq polymerase	2 μ L	1.25 Units Taq polymerase
25 mM MgCl ₂	2 μ L	
dH ₂ O	補水至	
	100 μ L	

(2) 巢式聚合酶鏈鎖反應 (nested PCR)：使用 PCR thermal

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

cycler。

- (a) Taq 活化作用：94°C，5 min。
- (b) Denaturation：94°C，30 sec。
- (c) Annealing：50°C，40 sec。
- (d) Extension：72°C，60 sec。
- (e) 重複 (b) 至 (d) 步驟 20 cycle。
- (f) Final extension：72°C，10 min。

(3) 膠片電泳分析

- (a) 置備 1.5% 洋菜膠：6 g agarose 溶於 400 mL (1X) TBE buffer。
- (b) 選擇 100 bp DNA size Marker：5 μ L (25 ng/ μ L)。
- (c) 取二次產物 10 μ L，各加入 2 μ L 6X loading dye。
- (d) 進行電泳分離 100 V，35 min。
- (e) 膠片染色：1 μ L/mL ethidium bromide 染色 10 min，H₂O 褪染。
- (f) 使用 UV light 觀察，並照相紀錄。

5.7 檢驗後處理

- 5.7.1 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。
- 5.7.2 檢驗後之剩餘檢體依序裝入檢體架內保存。

5.8 結果判定

- 5.8.1 RT-PCR 與 nested PCR 反應產物各取 5 μ L，在 1.5% 洋菜膠進行反應，檢視反應結果。
- 5.8.2 產物長度如下
 - (1) RT-PCR 產物：增幅出的片段約 1,468 bp。
 - (2) Nested PCR 產物：增幅出的片段約 433 bp。


5.9 注意事項

- 5.9.1 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。
- 5.9.2 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。
- 5.9.3 序列分析：將經 RT-PCR 與 nest 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。

6 參考資料

- 6.1 Poch O, Tordo N, Keith G. 1988. Sequence of the 3386 3' nucleotides of the

行政院衛生署疾病管制局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 37 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


genome of the AVO1 strain rabies virus: structural similarities in the protein regions involved in transcription. *Biochimie* 70: 1019-1029.

- 6.2 Sasaki DM, et al. 1992. Rabid bat diagnosed in Hawaii. *Hawaii Med J* 51: 992.
- 6.3 Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1998. Quarantine & rabies. UK MAFF Publications, London.
- 6.4 CDC. 1999. Human rabies prevention—United States. *MMWR* 48: RR-1.
- 6.5 狂犬病源之獸醫傳染病學，近代出版社，第 240-242 頁，1999。
- 6.6 Qiagen, QIAamp viral RNA mini 專一性之 primers kit handbook pp.18-19.

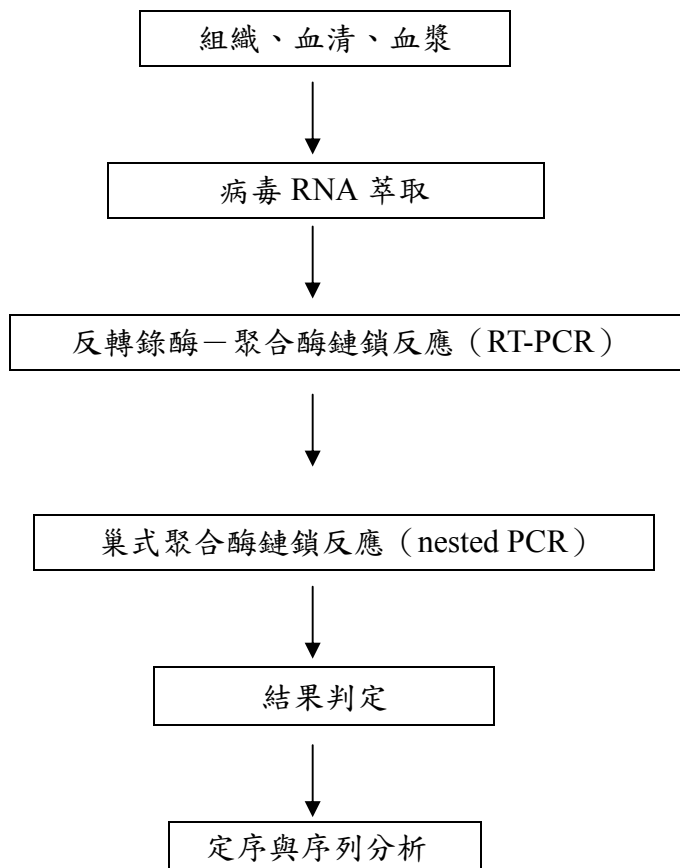
7 附錄

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

行政院衛生署疾病管制局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 38 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 7.1 狂犬病毒鑑定（反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應法）流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 7.2 狂犬病毒診斷用引子組序列表


1-Rabies-F : 5'-CTACAATGGATGCCGAC-3'

1-Rabies-R' : 5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3'

2-Rabies-F' : 5'-TTTGAGACTGCTCCTTTT-3'

2-Rabies-R' : 5'-CCCATATAGCATCCTAC-3'

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	狂犬病病毒抗原檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 40 頁/共 1091 頁	(直接螢光抗體染色法)	修訂日期： 年 月 日

1 目的

以直接螢光標幟抗體檢查狂犬病毒抗原。

2 檢體

適用於人體體內組織檢體。

3 方法

當狂犬病毒抗體以螢光色素標示後，可應用於感染的腦組織切片或抹片診斷試材。螢光色素標幟後之抗體與狂犬病毒抗原結合後形成之結合體，在螢光顯微鏡下可呈現綠色螢光；但如果檢體沒有狂犬病毒抗原則不會呈現螢光。

4 名詞解釋

無。

5 內容

5.1 試劑：

5.1.1 疑似感染之檢體。

5.1.2 陽性和陰性對照組織壓片。

5.1.3 試劑級丙酮 (Sigma)。

5.1.4 Goat anti-mouse monoclonal FITC antibody 抗狂犬病螢光標幟抗體。

5.1.5 0.01 M 磷酸鹽緩衝食鹽溶液，pH 7.6。

5.1.6 Buffered glycerol mounting medium, pH 8.5。

5.1.7 70% Isopropanol rubbing alcohol 桌面消毒水。

5.1.8 四級胺 (zepharin) 金屬器械消毒水。

5.2 器材：

5.2.1 剪刀、鑷子。

5.2.2 壓舌板。

5.2.3 四孔經鐵氟龍處理的玻片 (cel-line)。

5.2.4 固定槽和染色盤。

5.2.5 37°C 恆溫箱 (不鏽鋼淺盤上，鋪上浸濕的擦手紙並壓平以便放置玻片，以 96 孔盤的上蓋，做為蓋子蓋住玻片)。


5.2.6 離心機。

5.2.7 15 mL 離心管。

5.2.8 12X 75 mm test tubes。

5.2.9 冰箱。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	狂犬病病毒抗原檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 41 頁/共 1091 頁	(直接螢光抗體染色法)	修訂日期： 年 月 日

5.2.10 可棄式防污墊。

5.2.11 螢光顯微鏡。

5.2.12 倒立顯微鏡。

5.3 方法

5.3.1 固定試驗

5.3.1.1 取陽性和陰性對照組織壓片以及乾燥的待測組織壓片。

5.3.1.2 分別置入不同的固定槽，槽內加滿-20°C 冷凍的丙酮 (Sigma)，以丙酮固定這些組織大約一至四 hr 後，放置一旁令其自然風乾，若不馬上染色，可收集於-70°C 保存，以維持其抗原性。

5.3.2 染色試驗

5.3.2.1 不鏽鋼淺盤上，鋪上浸濕的擦手紙並壓平以便放置玻片，以 96 孔盤的上蓋，做為蓋子蓋住玻片。

5.3.2.2 狂犬病螢光抗體 (goat anti-mouse monoclonal FITC antibody) 先以 PBS 或 MEM 稀釋 80 倍 (每瓶狂犬病螢光標幟抗體，必須先評估測試其最適當的反應濃度，並避免反覆冷凍解凍，導致蛋白質變性凝集)。

5.3.2.3 每孔滴入 15-25 μ L 稀釋的狂犬病螢光抗體於玻片上，置於 37°C 濕式恆溫箱內培養 30 min。玻片以磷酸緩衝鹽溶液 (PBS) 洗滌數次後，置 PBS 溶液槽中 10 min，再以二次水沖洗一次，洗去殘留物質，玻片面朝下以衛生紙吸除水份後待觀察。

5.4 觀察


5.4.1 玻片滴上 Buffered glycerol mounting medium，蓋上 20x50 mm 蓋玻片，以螢光顯微鏡 40X-63X 接物鏡鏡頭觀察。

5.4.2 陽性對照腦組織壓片，顯微鏡下可見細胞的形態而抗原呈綠色顆粒狀。

5.4.3 陰性對照腦組織壓片，顯微鏡下無明亮綠色。


5.4.4 待測腦組織壓片，若顯微鏡下可見細胞的形態而呈明亮綠色，則判定為陽性；若顯微鏡下可見細胞的形態而無明亮綠色，則判定為陰性。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	炭疽桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 42 頁/共 1091 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、芽胞形狀、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)：CMP，台灣。
 - 5.2 SIM (sulfide indole motility) agar：榮研，日本。
 - 5.3 革蘭氏染色液 (Gram stain solution)：Difco，USA。
 - 5.4 API 50 CHB 生化鑑定套組：BioMérieux，France。
 - 5.5 LightCycler *Bacillus anthracis* Detection Kit：Roche，Germany。
 - 5.6 real-time PCR 毛細管：Roche，Germany。
 - 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 μ L、20 μ L、10 μ 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 羅氏公司即時定量聚合酶鏈反應器 (Roche real-time PCR machine)。
- 7 環境與設施安全
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
參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	炭疽桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 43 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

9 檢體的運送及保存

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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

10.3.1 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。

10.3.2 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。

10.3.3 培養：37°C CO₂ 培養箱培養。

10.3.4 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胞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胞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 安瓶培養液中，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

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	炭疽桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 44 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

中，置 37°C 培養 24-48 hr。

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 LightCycler *Bacillus anthracis* detection - real time PCR 鑑定
取數個可疑新鮮菌落，放入含 100 µL 無菌水的 1.5 mL 微量離心管中，100°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 陽性判定標準：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胞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：*capB*、*pagA* 二基因擴增曲線皆呈陽性。

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°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。

13 廢棄物處理

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	炭疽桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 45 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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，依本局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. 5th edition. Chapter 13. The Aerobic Gram-Positive Bacilli. pp. 651-708.
- 14.3 API 50 CHB 操作手冊。
- 14.4 LightCycler *Bacillus anthracis* Detection Kit 操作手冊。

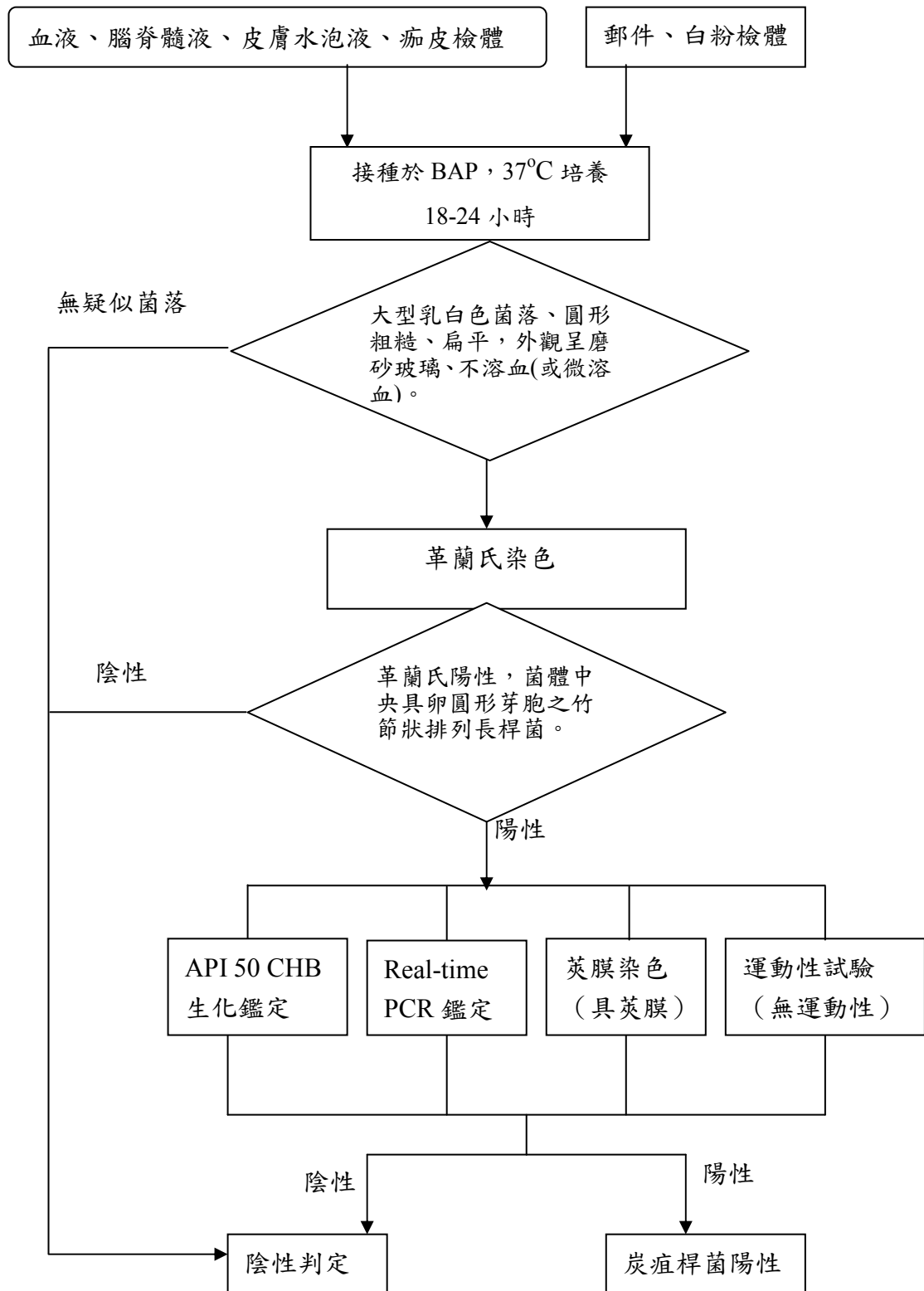
15 附錄

- 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


行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	炭疽桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 46 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 炭疽桿菌分離與鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	炭疽桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 47 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 炭疽桿菌分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
炭疽桿菌分離與鑑定紀錄表


頁數：第 頁/共 頁
填表日期： 年 月 日

項目	檢體編號或姓名							
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								

實驗室主管：

檢驗者：

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	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 48 頁/共 1091 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位於其質體上的 *capB*、*pagA* 兩基因。

5 試劑耗材

5.1 Real-time PCR 毛細管：Roche，Germany。

5.2 LightCycler *Bacillus anthracis* detection kit：Roche，Germany。

5.3 QIAamp DNA mini kit：Qiagen，Germany。

5.4 Qiagen 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：Amresco，USA。

6 儀器設備

6.1 水浴槽。


6.2 微量分注器 (Pipetman)。

6.3 羅氏公司即時定量聚合酶鏈反應器 (Roche real-time PCR machine)。

6.4 桌上型離心機。

7 環境與設施安全

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	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 49 頁/共 1091 頁	(即時定量聚合酶鏈鎖反應法)	修訂日期： 年 月 日

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

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體的運送及保存

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 μ L 加入 20 μ 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 μ L 加入 20 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	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 50 頁/共 1091 頁	(即時定量聚合酶鏈鎖反應法)	修訂日期： 年 月 日

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 LightCycler *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 *capB* 與 *pagA* 基因的偵測。

10.3.3 每個反應加入 master mix 2 μ L, *capB* 或 *pagA* detection mix 2 μ L, PCR 等級無菌水 11 μ L, 與待測 DNA 檢體 5 μ L, 即總反應體積為 20 μ L。

10.3.4 上機 Roche LightCycler 反應條件如下：95°C 10 min；45 個循環之 95°C 10 sec、55°C 15 sec、72°C 12 sec；後進行 melting curve analysis, 一個循環之 95°C 0 sec、50°C 30 sec、85°C slope=0.2°C/sec；最後一個循環之 40°C 60 sec。

10.3.5 反應結束後，將螢光分析模式調整到 F2 (640) 或 F2 (640)/F1 (530) 以進行分析。

11 結果判定

11.1 陽性判定標準

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：

兩個基因 *capB* 和 *pagA* 皆有擴增曲線反應，並且在 melting curve analysis 裡 *capB* 的擴增產物 T_m 值即 melting peak 在 $67 \pm 2.5^\circ\text{C}$, *pagA* 在 $61.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 。

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: LightCycler *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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	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 51 頁/共 1091 頁	(即時定量聚合酶鏈鎖反應法)	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，依本局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, 6th edition. Chapter 14. The Aerobic Gram-Positive Bacilli. pp. 765-857.
- 14.4 LightCycler *Bacillus anthracis* detection kit 操作手冊。

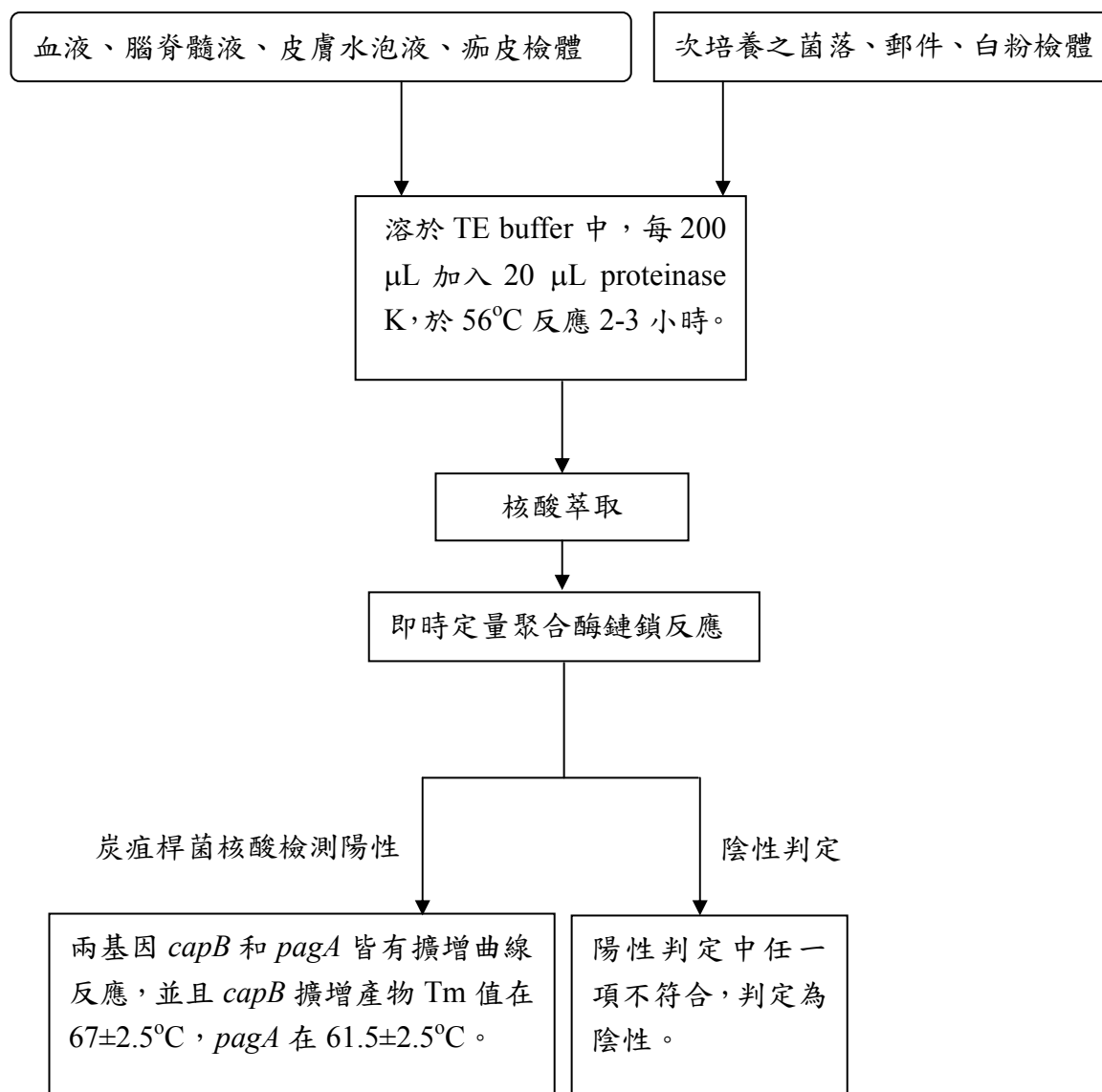
15 附錄

- 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。


行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	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 52 頁/共 1091 頁	(即時定量聚合酶鏈鎖反應法)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 炭疽桿菌核酸檢測流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	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
	頁次：第 53 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 炭疽桿菌核酸檢測紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心 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- <i>capB</i>	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- <i>pagA</i>	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
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									

實驗室主管：

檢驗者：

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	炭疽桿菌血清學抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 54 頁/共 1091 頁		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-Rad 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 : SterilGARD III Advance, Baker Company, USA)。
- 6.2 Bio-Plex 200 (Bio-Rad, USA)。
- 6.3 Vacuum manifold。
- 6.4 全自動清洗器。
- 6.5 微量吸管 (pipetmen) : 1,000 μ L、100 μ L、30 μ L。
- 6.6 8 爪微量吸管。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	炭疽桿菌血清學抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 55 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

6.7 計時器。

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 檢體採集與檢體前處理

8.1 檢體無添加抗凝劑，血清無溶血且量不少於 200 μ L。

8.2 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

低溫運送及保存，參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 Bead Activation

10.1.1 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)

10.1.2 取出 100 μ L (1.25×10^6 beads) 到 1 管 Coupling reaction tube 中, 離心 14,000 x g, 4 min, 小心吸除上清液。

10.1.3 加入 100 μ L 的 Bead wash buffer, 震盪 10 sec, 超音波震盪 10 sec, 離心 10,000 x g, 2 min, 小心吸除上清液。

10.1.4 將 beads 懸浮在 80 μ L 的 Bead activation buffer 中, 震盪 30 sec, 超音波震盪 30 sec。

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


10.1.6 加入 10 μ L 的 50 mg/mL EDC 後立刻加入 10 μ 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)

10.1.7 加入 150 μ L 的 PBS, pH 7.4, 高速震盪 10 sec, 離心 10,000 x g, 2 min, 小心吸除上清液。

10.1.8 重複步驟 10.1.7。

10.1.9 將微球懸浮於 100 μ L 的 PBS, pH 7.4 中, 中速震盪 30 sec, 超

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	炭疽桿菌血清學抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 56 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

音波震盪 15 sec。


10.2 Protein Coupling

- 10.2.1 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 μ 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)
- 10.2.2 離心 10,000 x g，2 min，小心吸除上清液。
- 10.2.3 用 500 μ L PBS, pH7.4 清洗微球，離心 10,000 x g，2 min，小心吸除上清液 (不可用超音波震盪)。
- 10.2.4 將微球懸浮在 250 μ 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。
- 10.2.5 離心 10,000 x g，2 min，小心吸除上清液。
- 10.2.6 用 500 μ L Storage buffer 清洗微球，離心 10,000 x g，2 min，小心吸除上清液。
- 10.2.7 將微球懸浮在 150 μ L 的 Storage buffer 中，避光 4°C 保存。
- 10.2.8 利用血球計數盤計算出微球濃度。

10.3 Immunoassay

- 10.3.1 檢體製備：
 - 10.3.1.1 Negative control：1% normal human serum in PBS, pH 7.4。
 - 10.3.1.2 Diluent：1% normal human serum in PBS, pH 7.4 (稀釋檢體之稀釋液)。
 - 10.3.1.3 Sample：以 Diluent 進行 1:100 倍稀釋。
 - 10.3.1.4 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。
- 10.3.2 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 μ L PBST)。
- 10.3.3 取一個 96 Well filter plate，以 150 μ 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 μ L/孔。
- 10.3.4 依序取 50 μ L 的陰性對照組、檢體、標準品至指定位置中。
- 10.3.5 室溫靜置 30 min，避光 Vortex。
- 10.3.6 利用 Vacuum manifold 將上清液吸掉，以 150 μ L 的 PBST 清洗 3 次。
- 10.3.7 依序加入稀釋後之二次抗體。
 - 10.3.7.1 Mouse anti-human IgM-PE。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	炭疽桿菌血清學抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 57 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.3.7.2 Mouse anti-human IgG (Fc-PE)。

10.3.7.3 PE labeled goat anti-mouse Ig (加至標準品之反應槽中) 50 μ L/孔

10.3.8 室溫靜置 30 min，避光 vortex。

10.3.9 利用 Vacuum manifold 將上清液吸掉，以 150 μ L 的 PBST 清洗 3 次。

10.3.10 各加入 100 μ L 的 PBST。

10.3.11 利用 BioPlex 分析。

11 結果判定

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。

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 分鐘高壓滅菌後，依本局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.

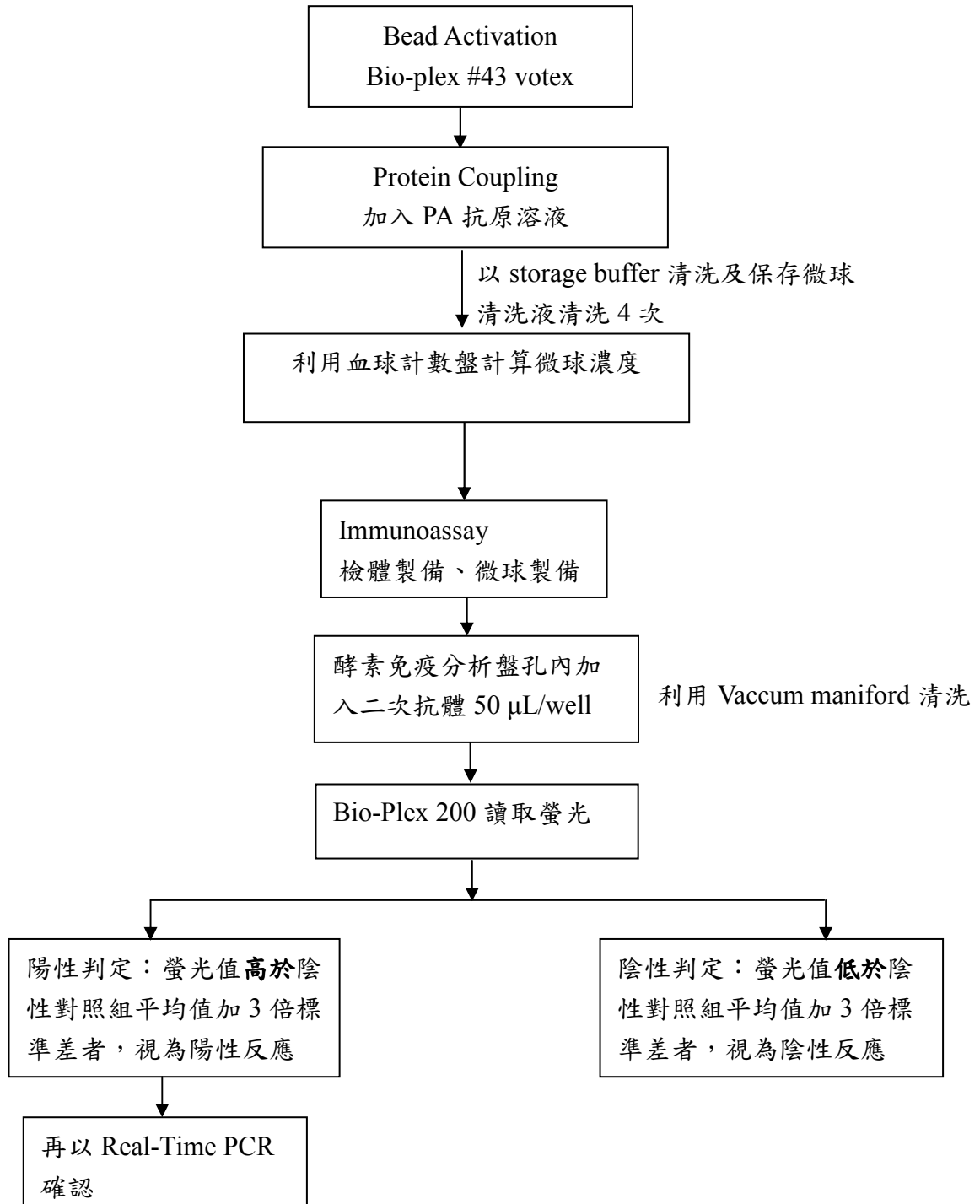
15 附錄

15.1 炭疽桿菌抗體試驗-螢光免疫分析法流程圖。


行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	炭疽桿菌血清學抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 58 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 炭疽桿菌抗體試驗流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	H5N1 流感病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 59 頁/共 1091 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—聚合酶鏈反應 (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

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 H5N1 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，並將擴增放大。

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 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ 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 cycler。

6.2 電泳槽。


6.3 DNA 電泳膠體觀察設備。

6.4 2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L Pipetman。

7 環境與設施安全

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	H5N1 流感病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 60 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

8 體採集與檢體前處理

8.1 檢體採集參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

8.2 檢體前處理

8.2.1 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。

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

(1) 檢體的採集量並無嚴格限制。

(2) 檢體的運送：4°C。

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

8.2.3 咽喉拭子檢體

(1) 棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。

(2) 於 4°C，2,100 ×g 離心 15 min。

(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。

8.2.4 痰檢體

(1) 取 PBS 緩衝液與痰檢體約 1：1 的比例混合

(2) 攪拌使其均質化並於 4°C，2,100 ×g 離心 15 min。

(3) 收集上清液，取 140 μL，其餘保存於 -70°C。

9 檢體運送及保存

檢體運送以低溫快速為原則，需使用檢體專用運送箱，運送箱內需維持低溫（4°C），檢體若無法即刻送檢則可暫時儲存於 4°C 冰箱中。

10 檢驗步驟

10.1 萃取病毒 RNA

(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。

(2) 加入純酒精 560 μL 終止反應。

(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。


(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。

(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。

(6) 離心 14,000 rpm，1 min，以徹底去除膜上殘留酒精。

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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	H5N1 流感病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 61 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.2 轉錄酶—聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) (以 Qiagen one-step RT-PCR kit 為例)

(1) 試劑添加量

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

(2) 取 5 μ L 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 (1)。

(3) 使用 PCR thermal cycler

- (a) R.T.作用，50°C 30 min。
- (b) Taq 活化作用，95°C 15 min。
- (c) Denaturation，95°C 30 sec。
- (d) Annealing，50°C 30 sec。
- (e) Extension，72°C 60 sec。
- (f) 重複 (c) 至 (e) 步驟 40 cycle。
- (g) Final extension，72°C 10 min。

(4) 膠片電泳分析

- (a) 置備 1.5% 洋菜膠：6 g Agarose 溶於 400 mL (1X) TBE buffer。
- (b) 選擇 100 bp DNA size Marker：5 μ L (2 ng/ μ L)。
- (c) 取二次產物 10 μ L，各加入 2 μ L 6X loading dye。
- (d) 進行電泳分離：100V，35 min。
- (e) 膠片染色：1 μ L/mL ethidium bromide 染色 10 min，H₂O 褪染。
- (f) 使用 UV light 觀察，並照相紀錄。

11 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。


12 結果判定

RT-PCR 產物各取 5 μ L，在 1.5% 洋菜膠進行分析，檢視分析結果。H5 增幅產物片段約 424 bp、N1 增幅產物片段約 343 bp，若出現上述 RT-PCR 產物，檢驗結果為陽性為。

13 注意事項

13.1 以 Heparin 為抗凝劑的血漿或溶血檢體可能會干擾 Taq polymerase 的作

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	H5N1 流感病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 62 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

用，降低檢驗敏感性。

13.2 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。

13.3 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。

14 參考文獻

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.

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.

15 H5N1 病毒診斷用引子組序列表


H5-248-270F :5'-GTGACGAATTCATCAATGTRCCG-3'

H5-891-647R :5'-CTCTGGTTTAGTGTTGATGTYCCAA-3'

N1-580-607F: 5'-TGAAGTACAATGGCATAATAACWGACAC-3'

N1-891-918R: 5'-CCACTGCATATATATCCTATTTGATACTCC-3'。

行政院衛生署疾病管制局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 63 頁/共 1091 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

(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。

(2) DSS 鑑別培養基 CMP，臺灣。

(3) Loeffler blood serum。

商品化產品 CMP，臺灣

(4) Neisser's 染色變法染色液

第一液 (Neisser 液)

酒精 (95% alcohol) 2 mL

美藍 (methylene blue) 0.1 g

蒸餾水 (distilled water) 95 mL

冰醋酸 (acetic acid) 5 mL

使用前：
將第一液
以 2 體積

第二液

結晶紫 (crystal violet) 0.1 g

酒精 (95% alcohol) 1 mL

蒸餾水 (distilled water) 30 mL

混合
第二液
1 體積

(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)。

(6) 無菌生理食鹽水

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

行政院衛生署疾病管制局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 64 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.3 吸管：無菌，10 mL 吸管應該有 0.1 mL 刻度。
- 5.4 微量吸管尖 tip：無菌，需 1,000 μ L、200 μ L 與 20 μ L 三種。
- 5.5 接種針（環）：鎳鉻合金、鉑銨或鉻線，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：10×100 mm，13×100 mm 試管或其他合適者。
- 5.9 無菌濾膜：孔徑 0.45 μ 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°C 與 -20°C 及 -80°C 冰箱。
- 6.4 35-37°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 μ L、200 μ L、30 μ L 等三種規格。
- 6.8 滅菌用容器：10 公升不鏽鋼容器。

7 環境及設施安全

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

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。


9 檢體運送及保存

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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°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°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。
- 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。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

<i>C. diphtheriae</i> Gravis	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. diphtheriae intermedius</i>	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. diphtheriae Mitis</i>	+	-	-	+	+	-	-	-
<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記錄。

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, 7th 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, 5th edition. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, PA.


15 附錄

15.1 白喉桿菌分離與鑑定流程圖。

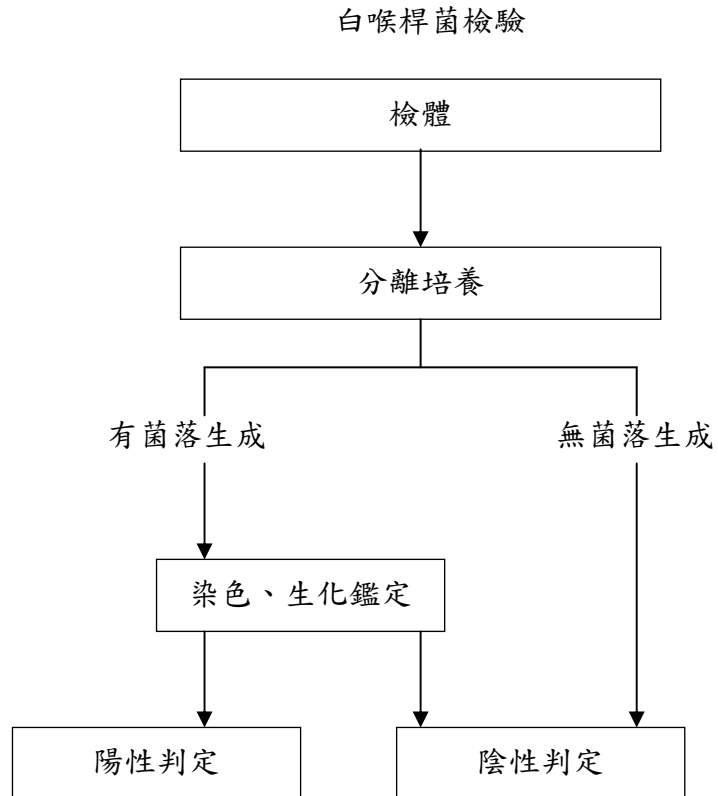
15.2 白喉桿菌分離與鑑定紀錄表。

15.3 白喉桿菌生化試驗紀錄表。


行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 白喉桿菌分離與鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 白喉桿菌分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
白喉桿菌分離與鑑定紀錄表


頁 數：第 頁/共 頁
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												
Potassium tellurite blood agar plate 上之菌落是黑色。												
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												
DSS 培養基生化特性鑑定 (dextrose) 高層部 陽性變色，陰性不變色												
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												
Neisser's 液染色 異染顆粒												
綜合結果												

實驗室主管：

檢驗員：

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 白喉桿菌生化試驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
白喉桿菌生化試驗紀錄表

頁數：第 頁/共 頁
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	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性

實驗室主管：


檢驗員：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 70 頁/共 1091 頁	(PCR)	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 μM)。
- 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	白喉桿菌核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 71 頁/共 1091 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

7 環境與設施安全

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 μ 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°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。

10.2 PCR 反應物：25 μ L 2 \times PCR Master Mix (0.05 units/ μ L Taq DNA Polymerase in reaction buffer、4 mM MgCl₂、0.4 mM dNTPs of each, Fermentas)，12.5 μ M 每一引子各 1 μ L，模版 10 μ L，以二次蒸餾水加到 50 μ L。

10.3 PCR 反應條件：Predenature 95°C 2 min，Denature 95°C 30 sec，Annealing 55°C 30 sec 鐘，Extension 72°C 1 min，以上 35 Cycle，Post extension 72°C 10 min，4°C 保存。

10.4 PCR 產物之確認：將 8 μ L 的 PCR 增殖產物加 2 μ 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 μ 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°C，30 min 高壓後，依本局廢棄物處理作業程序。

行政院衛生署疾病管制局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 72 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

13.2 Ethidium bromide 為 carinogen 倒掉前加入分解劑後再作處理。


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.

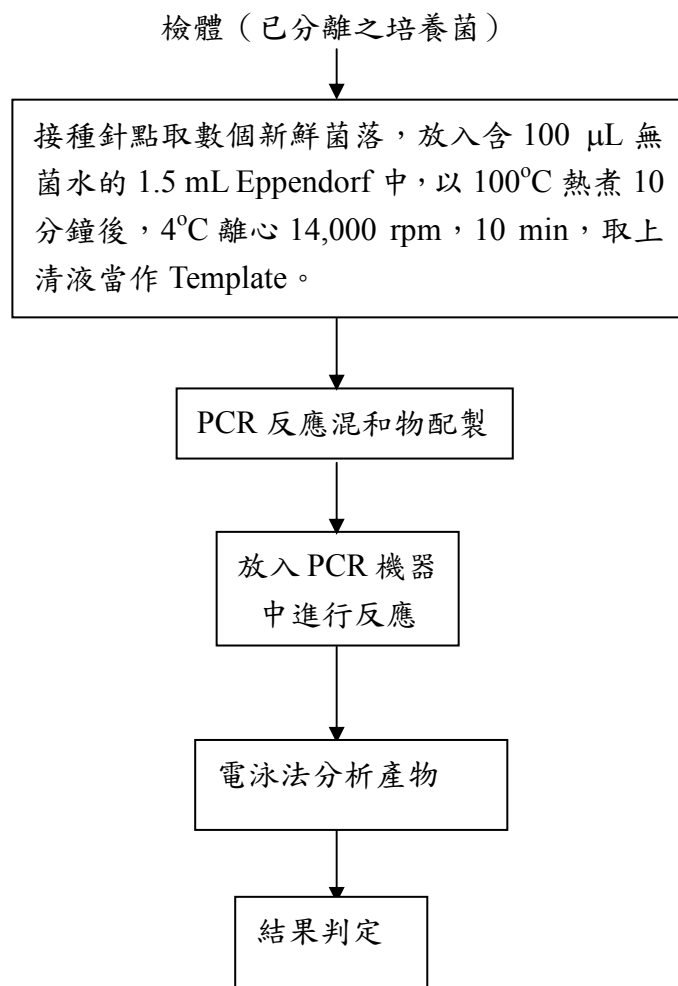
15 附錄

15.1 白喉毒素聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 快速診斷鑑定流程圖。


行政院衛生署疾病管制局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 73 頁/共 1091 頁		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。



行政院衛生署疾病管制局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 74 頁/共 1091 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（疾病管制局血清疫苗研製中心）。

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 μ L、200 μ L 與 10 μ L 三種。

5.7 接種針（環）：鎳鉻合金、鉑鉍或鉻線，或可拋棄式。

5.8 可拋棄式塑膠手套。

5.9 試管：10×100 mm，13×100 mm 試管或其他合適者。

5.10 無菌濾膜：孔徑 0.45 μ m 之親水性醋酸纖維膜。

5.11 7×1.5 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。

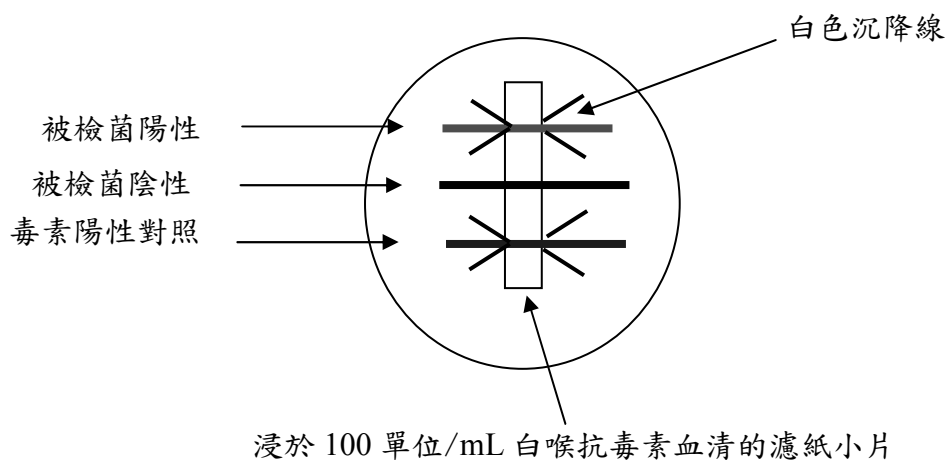
6.5 pH 值測定儀。

6.6 攪拌器。

行政院衛生署疾病管制局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 75 頁/共 1091 頁	(Elek's plate virulence test)	修訂日期： 年 月 日

- 6.7 35°C 培養箱。
- 6.8 電動 Pipetaid。
- 6.9 微量吸管 Pipetman：需 1,000 μ L、200 μ L、2 μ 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
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 (1.5×7 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
 - (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。
 - (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



- 10.2 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。

行政院衛生署疾病管制局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 76 頁/共 1091 頁	(Elek's plate virulence test)	修訂日期： 年 月 日

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, 7th 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, 5th edition. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, P.A.

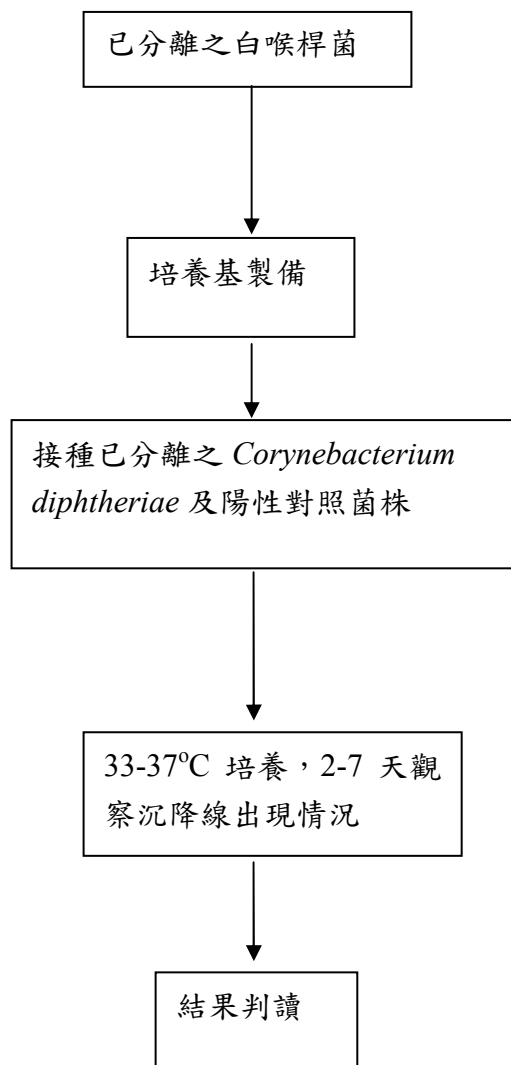
14 附錄

- 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。


行政院衛生署疾病管制局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 77 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局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 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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：

檢驗員：

行政院衛生署疾病管制局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 79 頁/共 1091 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，以確定病例與感染原。

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；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：CMP，台灣。

5.1.2 HE (Hektoen Enteric) agar：CMP，臺灣。

5.1.3 TSIA (triple sugar iron agar)：CMP，臺灣。

5.1.4 LIA (lysine iron agar)：CMP，臺灣。

5.1.5 SIM (sulfide indole motility) agar：杏友，臺灣。

5.1.6 TSB (tryptic soy broth)：CMP，臺灣。

5.1.7 BAP (blood agar plate)：CMP

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。

行政院衛生署疾病管制局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 80 頁/共 1091 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

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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

行政院衛生署疾病管制局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 81 頁/共 1091 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

hr。

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，加入等量無菌生理食鹽水（0.85%）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 水浴加熱 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%

行政院衛生署疾病管制局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 82 頁/共 1091 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

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 ^a	K/A	K/A	K/A
	Gas	-	+	+
	H ₂ S	+	-	+
LIA		+	-	+
SIM-IND		-	-	-
SIM-MOT		+	+	+
SIM-IPA		-	-	-
O 群抗原型別 ^b		O ₉ , [Vi]	O ₂	Poly O 陽性, 型別依抗血清反應決定
H 抗原型別		d	a:[1, 5]	

^a 斜面/底部之反應變化，K:不變色或呈紅色，A:酸化，呈黃色。

^b []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 使用陽性反應標準菌株 *S. typhi* #52344 T6 (局內保存並經過測試之菌株); *S. paratyphi A* ATCC 9150; *S. choleraesuis* ATCC 10708; 陰性反應標準菌株 *E.coli* ATCC 25922，進行試驗。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	分離與鑑定	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。

13 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，再以 121°C，30 min 高壓滅菌後，依本局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, Sckrekenberger PC, Winn WC. 1997. Enterobacteriaceae : color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th 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 , 8th edition. , American Society for Microbiology, Washington DC. pp. 55-66, 286-330, 636-671.

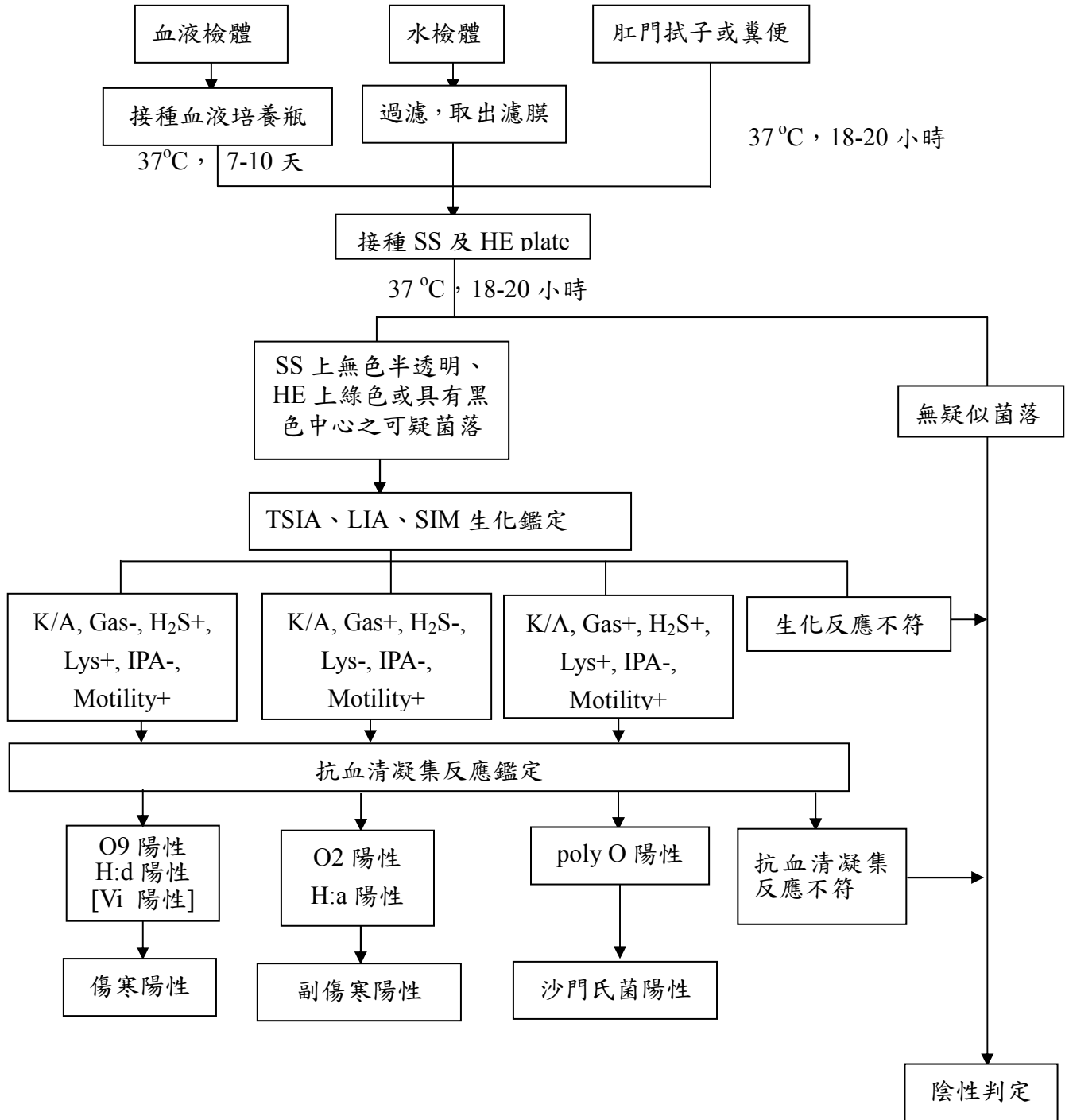
15 附錄

- 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。


行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	分離與鑑定	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




行政院衛生署疾病管制局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 85 頁/共 1091 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 ₂ 及 H ₂ 之能力。	無任何氣泡產生。
	H ₂ 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)

行政院衛生署疾病管制局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 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
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 ₂ 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 ₂ 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 ₂ 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：

行政院衛生署疾病管制局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 87 頁/共 1091 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 適用範圍

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組織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 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, Biological 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 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。

5.3.1 登革病毒第一型 (8700828)。

5.3.2 登革病毒第二型 (454009)。

5.3.3 登革病毒第三型 (8700829)。

5.3.4 登革病毒第四型 (9201818)。

5.4 單株抗體

5.4.1 抗黃病毒單株抗體 (ATCC HB-112)。

5.4.2 抗登革病毒單株抗體 (ATCC HB-114)。

5.4.3 抗登革病毒第一型單株抗體 (ATCC HB-47)。

5.4.4 抗登革病毒第二型單株抗體 (ATCC HB-46)。

5.4.5 抗登革病毒第三型單株抗體 (ATCC HB-49)。

5.4.6 抗登革病毒第四型單株抗體 (ATCC HB-48)。

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 (H₂O)。

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。

行政院衛生署疾病管制局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 88 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 μ L、1,250 μ L 之吸管尖。
- 6 儀器設備
 - 6.1 28°C CO₂ 培養箱 (Astec, Japan, SCI-165DC)。
 - 6.2 37°C CO₂ 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。
 - 6.6 5-40 μ L Pipette 及 40-200 μ L 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 18M Ω -CM 以上超純水。
- 8 檢驗採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9 檢體運送及保存


參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 10 檢驗步驟
 - 10.1 在 96 孔組織培養盤中將患者血清 5 μ L 以細胞培養液做 20、40、80、160 倍連續稀釋，每孔加入 50 μ L 之 2 倍連續稀釋血清。每孔中再加入 100 μ L 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，以細胞刮杓刮下細胞→以血球計術器計算細胞數。配製成 1 \times 10⁶/mL 細胞懸浮液】。
 - 10.2 置 28°C 5% CO₂ 培養箱培養 7 天。
 - 10.3 將每一孔中培養液移至另一無菌盤中，置於 -80°C 保存。
 - 10.4 取 20 μ 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°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°C 冰箱中或直接染色。
 - 10.8 在抹片上加上 25 μ L 抗黃病毒單株抗體。
 - 10.9 將抹片放置在潮濕的培養皿中，置於 37°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。

行政院衛生署疾病管制局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 89 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 μ 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。
 - 10.17 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)。
 - 10.18 重複 10.5 至 10.16，其中 10.8 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 在螢光顯微鏡下將檢測檢體與 Positive control 及 Negative control 比對判讀。
 - 11.2 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。
- 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
- 13.1 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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序辦理。
 - 13.2 未使用完血清放回 -80°C 冰箱保存。
- 14 參考資料
- 14.1 Igarashi A. 1978. solation 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.

行政院衛生署疾病管制局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 90 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

15 附錄

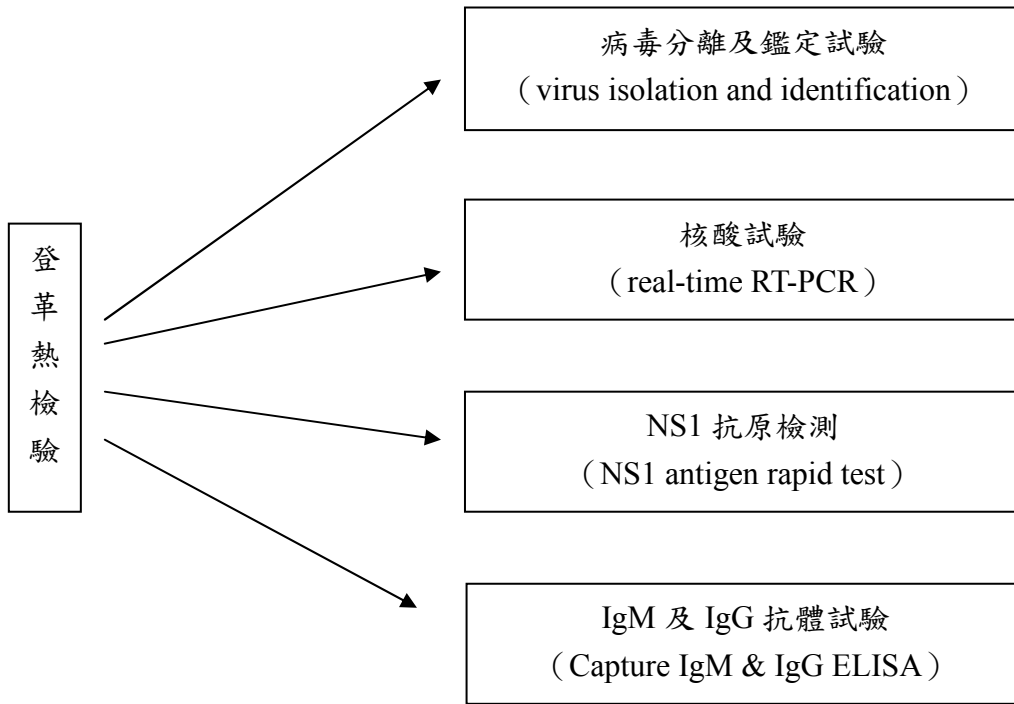
15.1 登革熱檢驗流程表。

15.2 登革病毒分離與鑑定流程圖。


行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

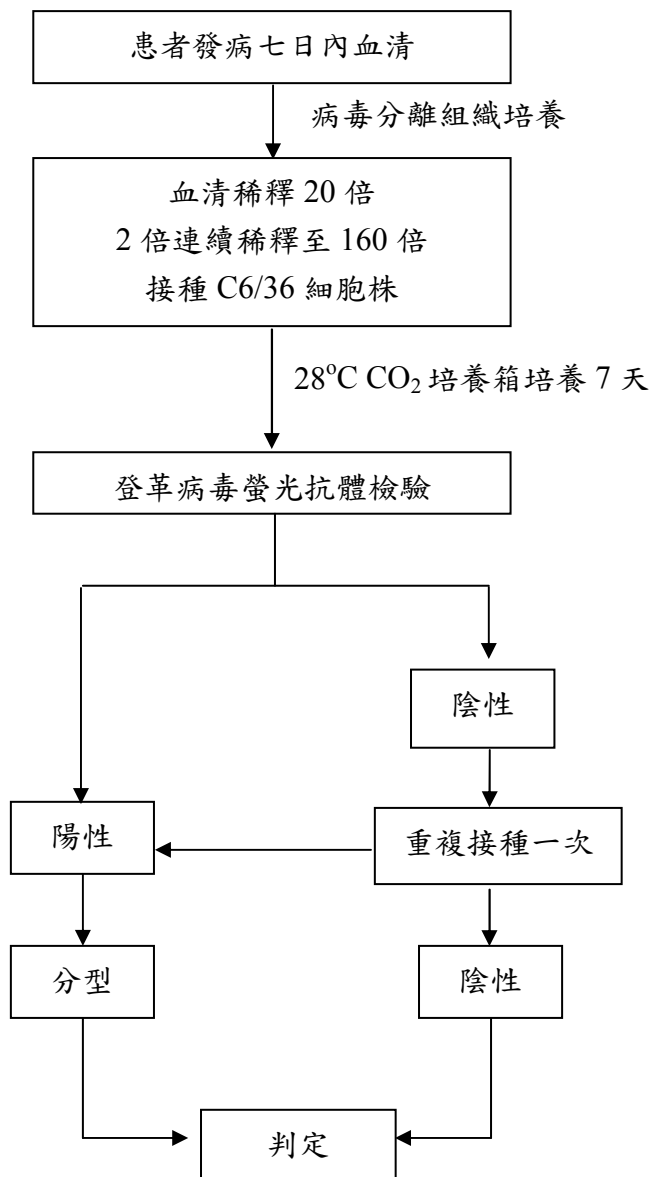
附錄 15.1 登革熱檢驗流程表




行政院衛生署疾病管制局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 92 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 登革病毒分離與鑑定流程圖。



行政院衛生署疾病管制局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 93 頁/共 1091 頁		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登革病毒核酸。

2 適用範圍

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 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 QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, Cat. no. 52906)

5.1.1 QIAmp spin columns。

5.1.2 2 mL 收集管。

5.1.3 溶解液 (AVL)。

5.1.4 運送 RNA (carrier RNA)。

5.1.5 清洗液 (AW1)。

5.1.6 清洗液 (AW2)。

5.1.7 萃取液 (AVE)。

5.1.8 氣密管。

5.2 Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix, 1-step kit (Stratagene, Cat. no.600835)

5.2.1 RT-PCR master mix。

5.2.1.1 2X Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix:

(a) RT-PCR buffer。

(b) SureStarTaq DNA polymerase。

(c) dNTP mix (GAUC)。

(d) SYBR green I。


(e) ROX (passive reference dye)。

(f) $MgCl_2$

5.2.1.2 RT/RNase block enzyme mixture。

(a) Moloney-based reverse transcriptase。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 94 頁/共 1091 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

(b) RNase。

- 5.3 陽性對照組 (境外移入株當對照組) (positive control RNA)：各型登革病毒以 C6/36 細胞培養 7 天，取上清液，當 RT-PCR PC 來源。
 - 5.3.1 登革病毒第一型 (S9702199)。
 - 5.3.2 登革病毒第二型 (DN9200491A)。
 - 5.3.3 登革病毒第三型 (DN9200439A)。
 - 5.3.4 登革病毒第四型 (DN8700544A)。
- 5.4 陰性對照組 (negative control RNA)：
 - 5.4.1 DNase, RNase-free H₂O。
 - 5.4.2 過去檢驗過的陰性血清。
- 5.5 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透可達 18Ω-CM 以上超純水。
- 5.6 定量 PCR 專用八連排反應管 (QPCR 8-strip tubes) (Stratagene, USA Cat. no.410022)。
- 5.7 定量 PCR 專用八連排反應蓋 (QPCR 8-strip caps) (Stratagene, USA Cat. no.410024)。
- 5.8 無菌過濾型 10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1,000 μL 吸管尖。
- 5.9 無菌 1.5 mL 微量離心管。
- 5.10 無粉手套。

6 儀器設備

- 6.1 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 6.2 Mx4000 multiple quantitative PCR system (Stratagene, U.S.A)。
- 6.3 10 μL、20 μL、40 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL 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°C。
- 6.7 冷凍櫃：-20°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。
- 7.2 檢驗操作在生物安全第一等級 (BSL-1) 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 檢驗採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 95 頁/共 1091 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 試劑之準備

10.1 AVL buffer

10.1.1 新開封時要加一瓶 carrier RNA，先取 1 mL AVL buffer 至 carrier RNA tube 中（紅頭螺旋管），待完全溶解再 Transfer 回 AVL buffer 瓶中，混合均勻。

10.1.2 每次使用時先檢查是否有結晶產生，若有結晶則以 80°C 水浴槽回溫 3 至 5 min，不可超過 5 min，回溫次數不可超過六次，AVL buffer/carrier RNA 若保存於室溫不可超過二星期。

10.2 AW1 buffer

10.2.1 新開封時依瓶身指示加入 125 mL 絕對酒精，得到總體積 220 mL，室溫下可保存 1 年。

10.3 AW2 buffer

10.3.1 新開封時依瓶身指示加入 160 mL 絕對酒精，得到總體積 226 mL，室溫下可保存 1 年。

11 檢驗步驟

11.1 萃取病毒 RNA

11.1.1 先吸取 560 μ L Lysis buffer (AVLbuffer 加 carrier RNA) 放入 1.5 mL 微量離心管，再加入 140 μ L 的血清檢體，震盪混合，室溫靜置反應 10 min。

11.1.2 加入 560 μ L 絕對酒精，震盪混合 1 min，以終止反應。

11.1.3 將上述混合液以抽氣方式通過管柱(column)，檢體中的 RNA 會吸附在管柱底部的膜上。

11.1.4 加清洗液 (AW1) 850 μ L，抽氣 3 min，做第一次沖洗，以清洗膜上所吸附的雜質。


11.1.5 以清洗液 (AW2) 850 μ L，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。抽氣後再離心 3,000 rpm，3 min，以徹底去除膜上殘留酒精。

11.1.6 加入萃取液 (AVE) 75 μ L，室溫靜置 10 min，在 4°C 離心 3,000 rpm，3 min，取得 RNA。

11.2 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (one-step real-time RT-PCR)。

11.2.1 取 5 μ L RNA 做模板，加入黃病毒及登革病毒共通引子組 (FL-F, FL-R; DN-F, DN-R1, DN-R2 primers 參考附錄 16.2)，置於冰上。

行政院衛生署疾病管制局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 96 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

11.2.2 加入反應溶液（成分如下表），調整反應總體積至 25 μ L。

初始濃度	加入體積	最終濃度
2X brilliant II SYBR green QRT-PCR low Rox master mix	12.5 μ L	1X
Primer A	Variable	如參考附錄 15.2
Primer B	Variable	如參考附錄 15.2
RT/RNase block enzyme mixture	1 μ L	
RNase-free H ₂ O	Variable	

11.2.3 單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應：使用 Mx4000 quantitative PCR system (Stratagene, USA)

- (1) R.T.作用：50°C，30 min。
- (2) Taq polymerase activation：95°C，15 min。
- (3) Denaturation：94°C，15 sec。
- (4) Annealing：55°C，30 sec。
- (5) Extension：72°C，20 sec。
- (6) 77°C，30 sec。收集螢光值。
- (7) 重複（3）至（6）步驟 45 Cycle。

11.2.4 Melting curve analysis：

- (1) 95°C，1 min。
- (2) 68°C → 90°C +1°C /30 sec/cycle。
- (3) 重複（2）步驟 45 Cycles。


12 結果判定

- 12.1 以 Mx4000 軟體分析結果，可以從 Amplification plots 與 T_m 值作判斷，結果是陽性或陰性。
- 12.2 在陽性對照與陰性對照組的 C_t 值符合設定值下，凡樣品經登革病毒共通及分型引子之 C_t 值均小於 40 者，判為登革熱陽性。
- 12.3 觀看 Melting curve 時，一般來說，須 T_m 值 > 80°C 的 PCR 產物，才為較具專一性之產物，而 < 75°C 之 PCR 產物，通常為非專一性的產物。

13 品質管制

- 13.1 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。
- 13.2 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。
- 13.3 Mx4000 機器定時作檢測與較正。
- 13.4 Pipettman 做定期的校對。
- 13.5 注意檢測套組的使用期限與適當的儲放溫度。

行政院衛生署疾病管制局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 97 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

14 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 min 高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序（編號：G-xx-2006-D）辦理。

15 參考資料

- 15.1 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.
- 15.2 Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Gunther S. 2002. Rapid detection and quantitation of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift valley fever virus, dengue virus, and Yellow fever virus by real-time reverse transcriptase-PCR. *J Clin Microbiol* 40: 2323-2330.
- 15.3 Houg 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.
- 15.4 Callahan JD, Wu SJ, Dion-Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, Porter KR, Murpgy GR, Suharyono W, King CC, Hayes CG, Temenak JJ. 2001. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J Clin Microbiol* 39: 4119-4124.

16 附錄

- 16.1 登革病毒鑑定（單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應）流程圖。
- 16.2 登革病毒診斷用引子組序列列表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法



編號：

登革病毒核酸檢測

核准日期： 年 月 日

頁次：第 98 頁/共 1091 頁

(Real-time RT-PCR)

修訂日期： 年 月 日

附錄 16.1 登革病毒鑑定 (單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應)


血清 (血漿)

病毒 RNA 萃取

單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應
(one-step real-time RT-PCR)

結果判定


行政院衛生署疾病管制局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 99 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.2 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>
DN-F 5'-CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA-3'	100 nM
DN-R1 5'-CCC CAT CTA GCC AAA ATT CCT GCT-3'	100 nM
DN-R2 5'-CCC CAT CTC TTC AGA ATC CCT GCT-3'	100 nM
<u>Flavivirus-specific primers</u>	
FL-F 5'-GCC ATA TGG TAC ATG TGG CTG GGA GC-3'	100 nM
FL-R1 5'-GTG/T ATT CTT GTG TCC CAT/A CCG GCT GTG TCA TC-3'	100 nM
FL-R2 5'-GTG ATG CGG/A GTG TCC CAG CCA/G GCT/G GTG TCA TC-3'	100 nM
<u>Dengue-serotype specific primers</u>	
<u>Dengue serotype 1:</u>	
DN-F, D1-R 5'-CGC TCC ATA CAT CTT GAA TGA G-3'	100, 100 nM
<u>Dengue serotype 2:</u>	
DN-F, D2-R 5'-AAG ACA TTG ATG GCT TTT GA-3'	400, 200 nM
<u>Dengue serotype 3:</u>	
DN-F, D3-R 5'-AAG ACG TAA ATA GCC CCC GAC-3'	100, 100 nM
<u>Dengue serotype 4:</u>	
DN-F, D4-R 5'-AGG ACT CGC AAA AAC GTG ATG AAT-3'	150, 150 nM

行政院衛生署疾病管制局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 100 頁/共 1091 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 適用範圍
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) 上的金膠體粒子 (gold colloidal 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) 上所包覆之抗 NS1 抗體抓住，出現藍紫色線條。
- 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 x 75 mm 圓底試管。
 - 5.3 丟棄式 200 μ L 吸管尖。
 - 5.4 手套。
- 6 儀器設備
 - 6.1 100 μ L 或 200 μ L 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一等級 (BSL-1) 實驗室進行。
- 8 檢驗採集
參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9 檢體運送及保存
參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 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 μ L 之血清，置入 12 x 75 mm 圓底試管底部。
 - 10.3 於 12 x 75 mm 圓底試管上方，垂直滴入一滴 (約 50 μ L) 液體移動輔助液，輕輕搖晃試管以混合血清及液體移動輔助液。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒 NS1 抗原檢測 (Dengue virus NS1 antigen rapid test)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 101 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.4 取一測試條，依指示方向，置入 12 x 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 結果判定應於反應後 15-30 min 內進行。
- 11.2 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。
- 11.3 測試條中間出現之橫條訊號，代表測試結果為陽性。
- 11.4 典型之陽性測試結果，應出現上方及中間之兩條橫條訊號。
- 11.5 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有相當大差異；惟陰性結果並不保證被測人未被登革病毒感染。
- 11.6 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。

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 min 高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序（編號：G-xx-2006-D）辦理。

14 參考資料


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

行政院衛生署疾病管制局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 102 頁/共 1091 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 適用範圍
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异性抗體。
- 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 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 照射一 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 抗黃病毒屬外套抗原 (envelope) 之單株抗體腹水 (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)
 - 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 (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,

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日


台灣尖端公司)。

- 5.9 八連排稀釋管。
- 5.10 丟棄式 250 μ L、1,000 μ 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 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1,000 μ L (pipettors)。
 - 6.4 震盪器。
 - 6.5 冰箱：4°C。
 - 6.6 冷凍櫃：-20°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一等級 (BSL-1) 實驗室進行。
- 8 檢驗採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9 檢體運送及保存


參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 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。日本腦炎病毒細胞培養液以 Dilution buffer 四倍稀釋後，加入 1：1,000 之抗黃病毒屬抗原單株抗體腹水 FL0232。
 - 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 μ L 加入 Dilution buffer 0.7 mL 稀釋 100 倍。若是腦脊髓液檢體，則取 70 μ 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 Coating goat anti-human IgM 及 Coating goat anti-human IgG 之 96 孔真空乾燥盤。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 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 含抗黃病毒屬抗原單株抗體腹水 FL0232 之四型登革病毒細胞培養稀釋液及日本腦炎病毒細胞培養稀釋液（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 (OD₄₀₅₋₆₃₀)。
- 11 結果判定
- 11.1 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。
 - 11.2 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。
 - 11.3 Dengue primary positive control 應符合 IgM OD 值 > 2.0，IgG OD 值 > 1.0。
 - 11.4 Dengue secondary positive control 應符合 IgM OD 值 > 1.0，IgG OD 值 > 2.0。
 - 11.5 JE positive control 應符合 IgM OD 值 > 1.5，IgG OD 值 > 1.0。
 - 11.6 JE negative control 應符合 IgM OD 值 < 0.2，IgG OD 值 < 0.2。
- 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 min 高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序（編號：G-xx-2006-D）辦理。
- 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)

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日

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. Diagn 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。

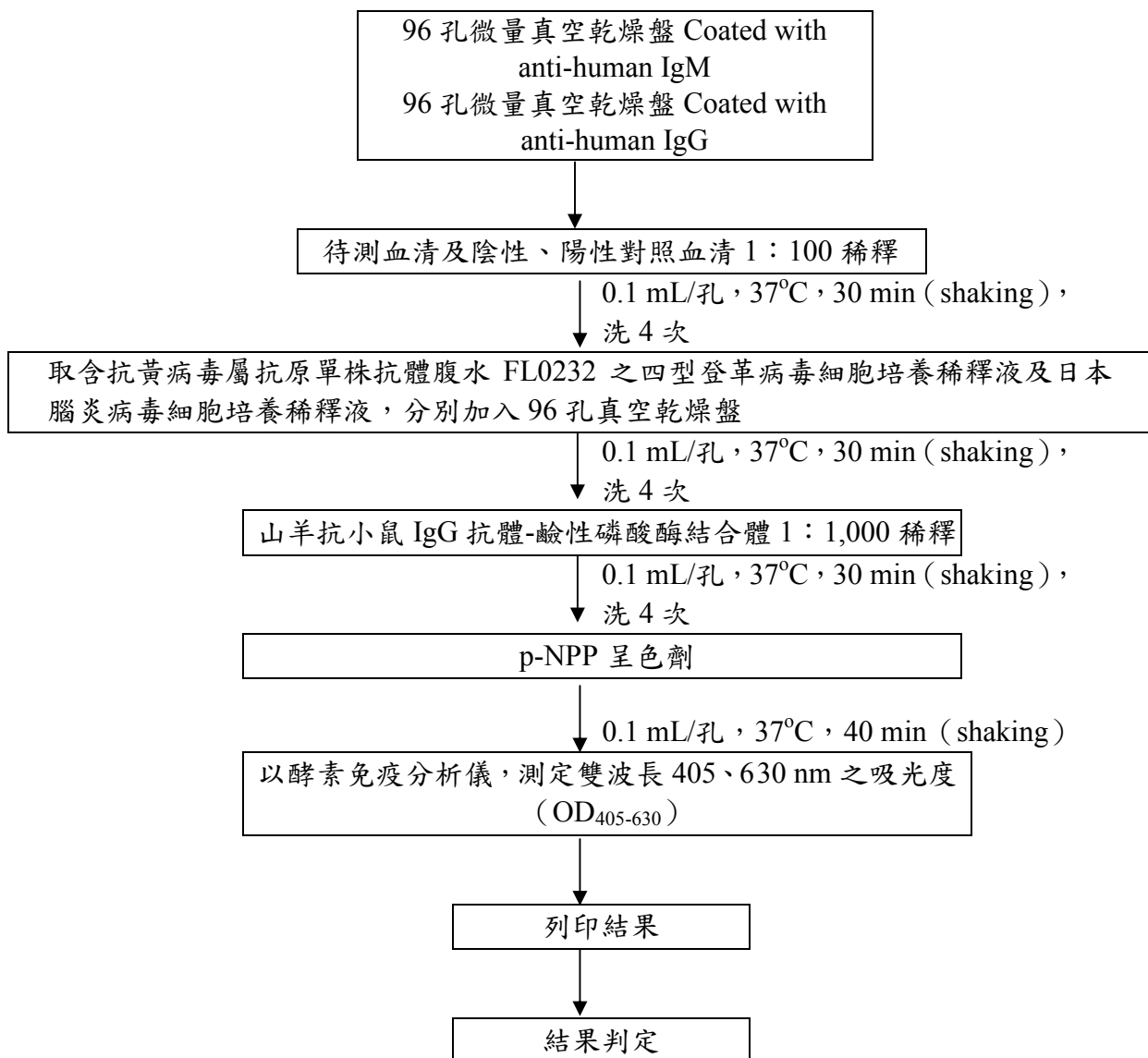
15 附錄

15.1 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。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 106 頁/共 1091 頁		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。



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏腦膜炎雙球菌 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 107 頁/共 1091 頁		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)：CMP，台灣。
- 5.2 MTM (modified Thayer-Martin agar)：CMP，台灣。
- 5.3 BHI (brain heart infusion) broth：CMP，台灣。
- 5.4 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution)：Difco，美國或武藤化學，日本。
- 5.5 API NH 生化鑑定套組：BioMérieux，法國。
- 5.6 抗血清：*Neisseria meningitidis* agglutinating sera A、B、C、Y、W135, Muréx Biotech，法國。
- 5.7 氧化酶試劑 (oxidase strips)：MAST，英國或 BioMérieux，法國。
- 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。
- 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)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏腦膜炎雙球菌 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 108 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

7 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

- 8.1 病患血液已置入嗜氧血液培養瓶、腦脊髓液、分離菌株。
- 8.2 請參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

- 9.1 常溫運送及保存。
- 9.2 請參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 分離培養

10.1.1 檢體接種：

- (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。
- (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% CO₂ 二氧化碳培養箱保留到檢驗結果登錄後。
- (3) 菌株：挑取菌落，接種巧克力平板。


10.1.2 培養：35°C，3-7% CO₂ 二氧化碳培養箱培養。

10.1.3 觀察：

- (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。
- (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。
- (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。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

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

- (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。
- (2) API-NH 生化鑑定套組，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：

- (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="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%; text-align: center;">A</td> <td style="width: 33%; text-align: center;">B</td> <td style="width: 33%; text-align: center;">C</td> </tr> </table>	A	B	C	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%; text-align: center;">Y</td> <td style="width: 33%; text-align: center;">W135</td> <td style="width: 33%; text-align: center;">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）。

- (2) 在每一格分別滴入 1 滴（約 40 μ L）無菌 0.85% 食鹽水，用 1 μ L 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 陽性判定標準：

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 μ m 左右
3. Oxidase 試驗	藍色或藍紫色
4. 快速生化鑑定系統 API-NH	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>

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：


- (1) 血清型 A：*N. meningitidis* agglutinating sera A 產生凝集，

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏腦膜炎雙球菌 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 110 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 其他抗血清無凝集。
- (2) 血清型 B：*N. meningitidis* agglutinating sera B 產生凝集，其他抗血清無凝集。
- (3) 血清型 C：*N. meningitidis* agglutinating sera C 產生凝集，其他抗血清無凝集。
- (4) 血清型 Y：*N. meningitidis* agglutinating sera Y 產生凝集，其他抗血清無凝集。
- (5) 血清型 W135：*N. meningitidis* agglutinating sera W135 產生凝集，其他抗血清無凝集。
- (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。
- 11.4 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。
- 11.5 緊急通報
無。
- 11.6 干擾因素
11.6.1 病人因素：病程發展階段、抗生素使用。
11.6.2 採樣運送時：採檢部位、運送時間和溫度。
- 11.7 潛在變異的來源
11.7.1 接種劃線技術。
11.7.2 菌落型態辨識。
- 11.8 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，實驗室每季進行一次品管測試。
- 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 μ L 的 Loop 取菌液接種於測試培養基上，35°C，3-7% CO₂ 二氧化碳培養箱培養。
- 12.1.4 觀察結果紀錄：預期結果 *N. meningitidis* BCRC10714=ATCC13090，24hr 後可見 1-2 mm 菌落。*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228，24hr 後沒有菌落生長

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏腦膜炎雙球菌 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 111 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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，之後每隔 3 個月再進行試驗。

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 min 高壓滅菌後，依本局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, 9th 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。

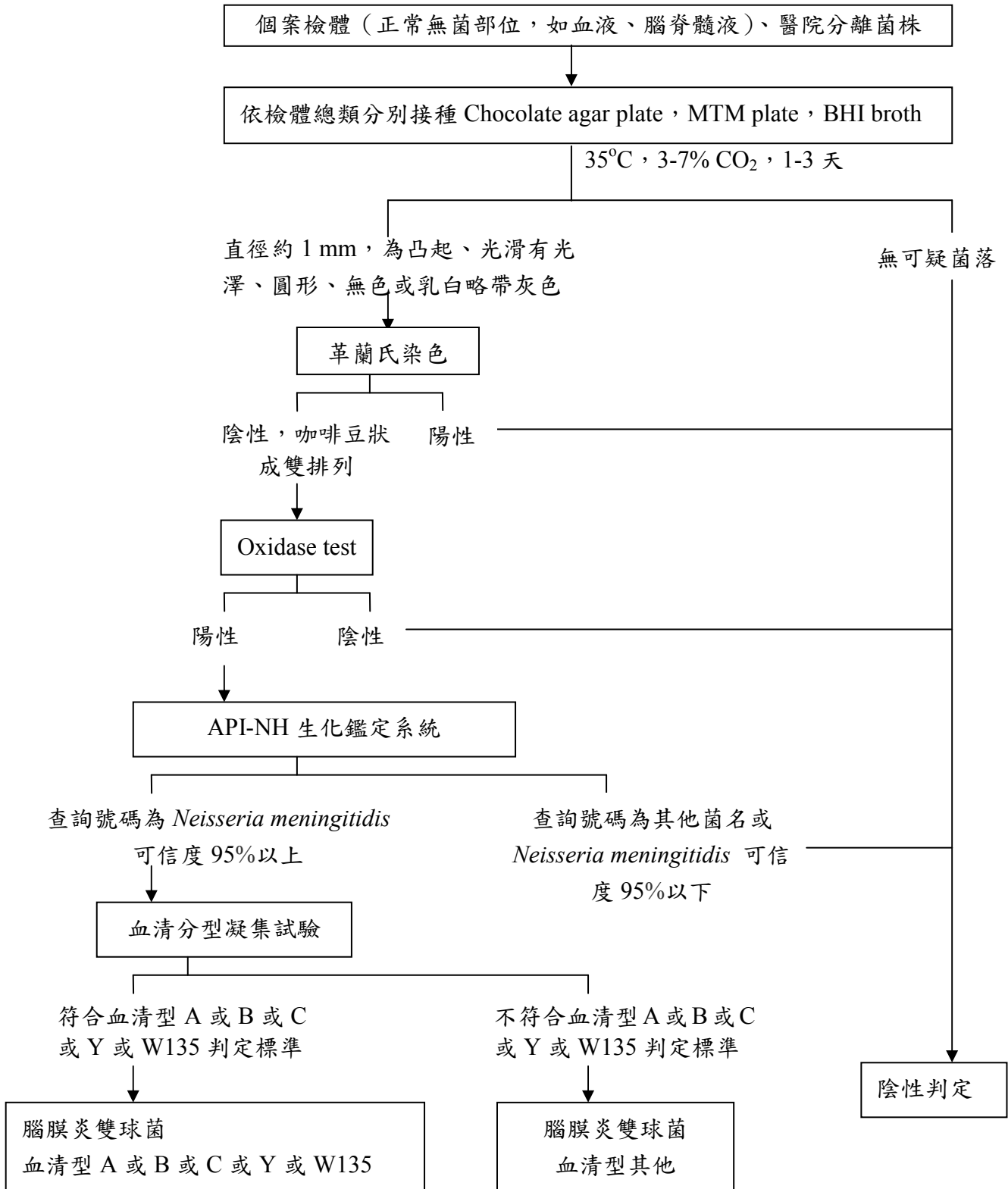
15.2 奈色氏腦膜炎雙球菌分離與鑑定紀錄表。

15.3 _____ Plate 品質管制紀錄表。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏腦膜炎雙球菌 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 112 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局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 113 頁/共 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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：

行政院衛生署疾病管制局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 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

_____ 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：

行政院衛生署疾病管制局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 115 頁/共 1091 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)：TPM，臺灣。
 - 5.1.2 CHROM shigella 培養基：TPM，臺灣。
 - 5.1.3 TSIA (Triple Sugar Iron agar)：CMP，臺灣。
 - 5.1.4 LIA (Lysine Iron agar)：CMP，臺灣。
 - 5.1.5 SIM (Sulfide Indole Motility agar)：杏友，臺灣。
 - 5.1.6 TSA (Tryptic soy agar)：TPM，臺灣。
 - 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
 - (1) 多價血清：A 多價，A1 多價。
 - (2) 因子血清：型血清 1 型—12 型。
 - 5.2.2 B 亞群
 - (1) 多價血清：B 多價。
 - (2) 因子血清：型血清 I 型—VI 型。
 - (3) 因子血清：群血清 (3) 4 群，6 群，7 (8) 群。
 - 5.2.3 C 亞群
 - (1) 多價血清：C 多價。
 - (2) 因子血清：型血清 1 型—18 型。
 - 5.2.4 D 亞群多價血清
 - (1) 多價血清：D 多價。
 - (2) 因子血清：相血清 I 相—II 相。
 - 5.3 API 20 E 生化鑑定套組：bioMerieux，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)。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

5.9 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 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

人體糞便、直腸拭子，參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

低溫運送及保存，參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 分離培養

10.1.1 接種：

- (1) 糞便：以棉棒拭子沾取微量，直接塗抹於 SS 或 HE 培養基上。
- (2) 直腸拭子：拭子直接塗抹於 SS 或 HE 培養基上。
- (3) 環境擦拭拭子：擦拭拭子直接塗抹於 SS 或 HE 培養基上。
- (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：

- (1) 三管生化反應：TSIA：k/A、Gas (－)、H₂S (－)，LIA：K/A，SIM：Motility (－)、Indole (－)、H₂S (－)、IPA (－) 則為疑似痢疾桿菌。(生化反應判定請參照附錄 15.4)。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(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。

(3) API 20 E 生化鑑定套組試驗。
依照本局「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：

- (1) 以痢疾桿菌 A-D 混合型多價血清作玻片凝集反應。
- (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痢疾桿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。

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 分鐘高壓滅菌後，依本局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, 5th 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。


行政院衛生署疾病管制局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 118 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

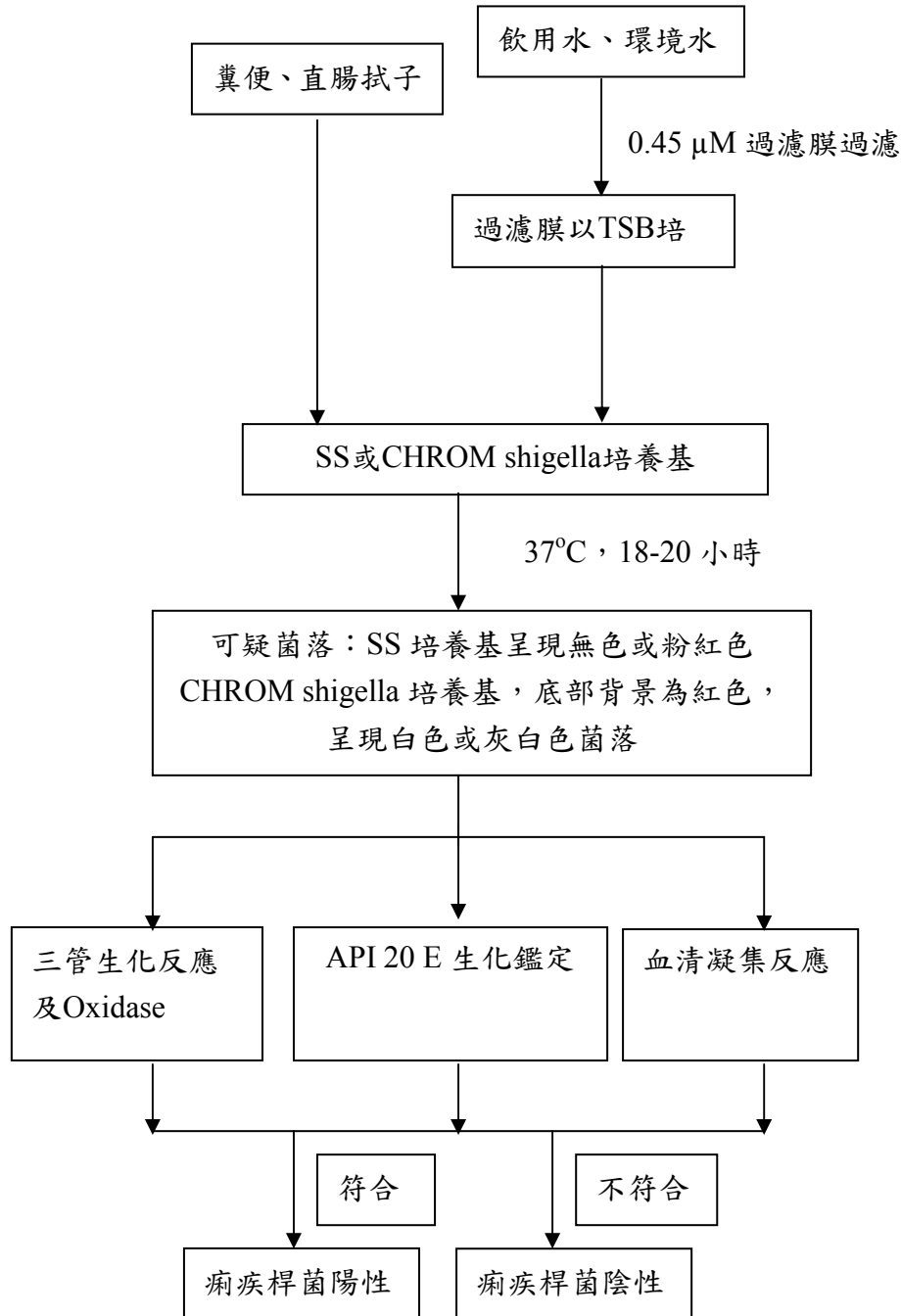
15 附錄

- 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


行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 痢疾桿菌分離與鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 120 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 痢疾桿菌分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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：

行政院衛生署疾病管制局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 1091 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


行政院衛生署疾病管制局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 1091 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 ₂ 及 H ₂ 之能力。	無任何氣泡產生。
	H ₂ 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	痢疾阿米巴檢測（鏡檢法）	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 123 頁/共 1091 頁		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 適用範圍

新鮮糞便。

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 魯氏碘液（Lugol's iodine solution）

- | | | |
|-------|---|--------|
| 5.1.1 | 蒸餾水 | 100 mL |
| 5.1.2 | 碘化鉀（potassium iodide crystals, KI） | 10 g |
| 5.1.3 | 結晶碘（iodine crystals） | 5 g |
| 5.1.4 | 先將碘化鉀溶於蒸餾水後再加結晶碘，完全溶解後過濾，保存於棕色瓶內，每 2-3 週換新。 | |

5.2 M 儲存液

- | | | |
|-------|------------------|--------|
| 5.2.1 | Merthiolate | 1 g |
| 5.2.2 | 95% Ethanol | 500 mL |
| 5.2.3 | Acetone | 100 mL |
| 5.2.4 | Eosin | 2 g |
| 5.2.5 | 以上加蒸餾水至 1,000 mL | |

5.3 MF 儲存液

- | | | |
|-------|--|--------|
| 5.3.1 | M 儲存液 | 200 mL |
| 5.3.2 | 蒸餾水 | 250 mL |
| 5.3.3 | Formaldehyde（37%） | 25 mL |
| 5.3.4 | Glycerol | 5 mL |
| 5.3.5 | 配製好之儲存液應存放於棕色瓶中，標示配製日期，遠離日光，並於一週內使用完畢。 | |


5.4 帶蓋塑膠標本盒

5.5 竹棒

5.6 紗布、不銹鋼濾網或鐵絲網


5.7 漏斗

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	痢疾阿米巴檢測（鏡檢法）	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 124 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

- 5.8 10 mL 尖底離心管
- 5.9 醋酸乙酯（或乙醚）
- 5.10 塑膠滴管
- 5.11 載玻片
- 5.12 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。
- 7 環境與設施安全
 - 7.1 操作處理醋酸乙酯（或乙醚）之步驟需在抽風櫃中進行。
- 8 檢體採集
 - 8.1 新鮮大便 1 g（約拇指大，解出不超過 1hr），置於帶蓋塑膠標本盒。
 - 8.2 配以 MF 儲存液:魯氏碘液=15：1 比例，配製適量之 MIF 溶液。混合配製，在使用前才混合，混合後須立即使用。
 - 8.3 加入 10 ml MIF 溶液，以竹棒充分攪拌均勻，靜置 24hr。檢體運送及保存。
 - 8.4 室溫或冷藏運送。
- 9 檢體運送及保存
室溫或冷藏運送。
- 10 檢驗步驟
 - 10.1 以沾濕雙層紗布（或不銹鋼濾網、鐵絲網）之漏斗過濾 MIF 糞液
 - 10.2 濾液以 10 mL 離心管承接，以 MIF 溶液補足至 7 mL。
 - 10.3 加入 1 mL 醋酸乙酯（或乙醚），加蓋塞住管口，上下振盪 30 sec。
 - 10.4 以 500xg 離心 5 min，以竹棒沿管壁旋轉一圈鬆動糞層，倒掉上清液，保留沉澱物約 0.5 mL，立即以大棉花棒擦拭管壁周圍。
 - 10.5 以塑膠滴管吸取沉澱物一滴於載玻片上，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）或油鏡檢查之。
 - 10.6 記錄鏡檢結果。
- 11 結果判定
 - 11.1 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。
 - 11.2 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

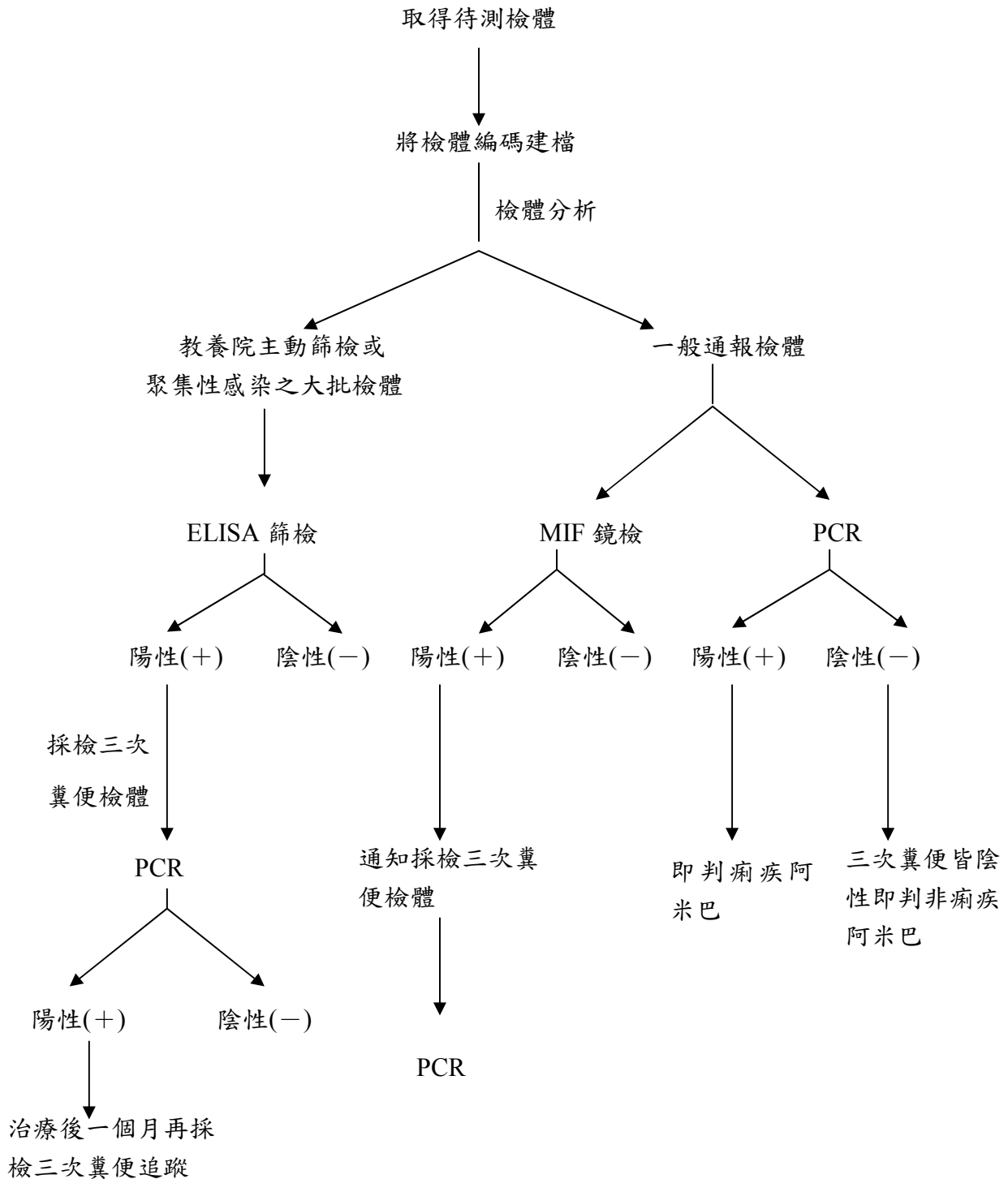
	編號：	痢疾阿米巴檢測（鏡檢法）	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 125 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

- 11.3 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」。但若活動體中發現吞噬紅血球則可判定為 *E. histolytica*（痢疾阿米巴）。
- 11.4 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局進行鑑別診斷，原始判定陽性之檢體須伴同送驗單移送疾管局。
- 12 品質管制
- 12.1 操作前檢視魯氏碘液是否過期。
- 12.2 顯微鏡之接目鏡測微尺每年需校正一次。
- 12.3 每季校正離心機一次。
- 12.4 每次操作時應加以紀錄，並定期由寄生蟲實驗室主管審閱。
- 13 廢棄物處理
- 檢體、廢液及剩餘檢體以高壓蒸氣滅菌後依一般垃圾處理。
- 14 參考資料
- 14.1 Brown HW, Neva FA. 1983. Basic clinical parasitology, 5th 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 Blagg 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.
- 15 附錄
- 15.1 痢疾阿米巴檢驗流程圖。


行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	痢疾阿米巴檢測（鏡檢法）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 126 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 痢疾阿米巴檢驗流程圖。



行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便核酸檢測 (兩階段巢式 PCR)	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 127 頁/共 1091 頁		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 適用範圍

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, 聚合酶連鎖反應) 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)

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：

頁次：第 128 頁/共 1091 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 PCR 試劑

- 5.5.1 5 μ M Outer 1 primer (5'-GAA ATT CAG ATG TAC AAA GA-3')。
- 5.5.2 5 μ M Outer 1R primer (5'- CAG AAT CCT AGA ATT TCA C-3')。
- 5.5.3 10 μ M Eh 1 primer (5'- AAG CAT TGT TTC TAG ATC TG-3')。
- 5.5.4 10 μ M Eh 2 primer (5'- CAC GTT AAA AGA GGT CTA AC-3')。
- 5.5.5 10 μ M Ed1 primer (5'- AAA CAT TGT TTC TAAATC CA-3')。
- 5.5.6 10 μ 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 MgCl₂。
- 5.5.11 AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 units/ μ 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 μ 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 環境與設施安全

無。

8 檢體採集

- 8.1 檢體：新鮮糞便、潰瘍組織刮除物及膿瘍抽出物。
- 8.2 容器需求：可蓋緊之乾淨、乾燥、防水、廣口塑膠容器。
- 8.3 採集時避免水、尿之污染。
- 8.4 採集前禁服抗生素及顯影劑。
- 8.5 使用鹽水通便劑，勿用含甘油及礦物油之浣腸劑。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	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 1091 頁	(兩階段巢式 PCR)	修訂日期： 年 月 日

8.6 檢體蓋應鎖緊，並個別以夾鏈袋密封，避免檢體互相污染。

9 檢體運送及保存

9.1 新鮮糞便、潰瘍組織刮除物或膿瘍抽出物以冷藏或冷凍運送，24 hr 內送達實驗室。

9.2 檢體處理：檢體送達後，取 0.5 g 糞便、潰瘍組織刮除物或膿瘍抽出物加入 2.0 mL 檢體保存液 (5.3M GIT; guanidine thiocyanate)，震盪混合均勻，分裝至 1.5 mL 離心管於 4°C 冰箱冷藏保存。

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

10.2.2 分裝 22.5 μ 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 μ 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 μ L)：

PCR 反應期	溫度(°C)	時間(分： sec)	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	∞	1

10.3 第二階段 PCR：

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便核酸檢測 (兩階段巢式 PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 130 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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(μL)	體積(μL)	濃度(總體積 25μL)
10 μM Eh1 primer	1.25	-	0.5 μM
10 μM Eh2 primer	1.25	-	0.5 μM
10 μM Ed1 primer	-	1.25	0.5 μM
10 μM Ed2 primer	-	1.25	0.5 μM
10X PCR buffer	2.5	2.5	1X
2 mM dNTP	2.5	2.5	200 μM
10X Dye	2.5	2.5	1X
25 mM MgCl ₂	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：sec)	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 品質管制

11.1 每次操作應包含陽性及陰性對照檢體。

11.2 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便核酸檢測 (兩階段巢式 PCR)	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 131 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

- 11.3 陰性對照：純水。
- 11.4 每次操作時加以記錄，並定期由寄生蟲實驗室主管審閱。

12 結果判定

- 12.1 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。
- 12.2 *E. histolytica* 陽性：447 bp。
- 12.3 *E. dispar* 陽性：603 bp。
- 12.4 *E. histolytica* 及 *E. dispar* 陽性：447 bp 及 603 bp。(附錄 15.2)
- 12.5 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，聚合酶連鎖反應，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)。

13 廢棄物處理

檢體、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。


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* 在巢氏聚合酶連鎖反應之結果。


行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	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 1091 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

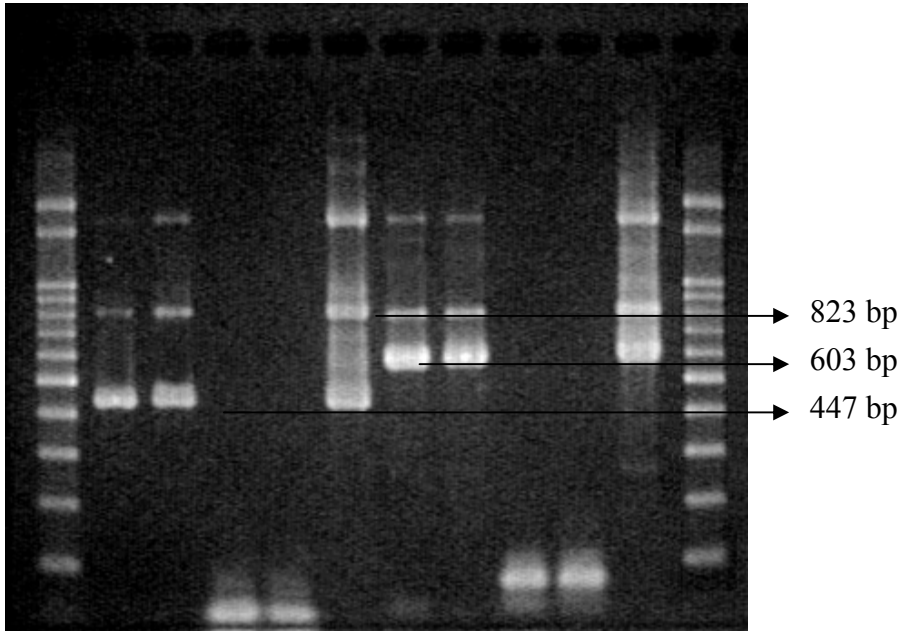
Category	Primer pairs(forward+reverse)	PCR product size
<i>Primers for Entamoeba histolytica/dispar</i> SSU-rDNA		
1 st step PCR	Outer1: 5'- GAA ATT CAG ATG TAC AAA GA -3' Outer1R : 5'- CAG AAT CCT AGA ATT TCA C -3'	823 bp
<i>Primers for Entamoeba histolytica/dispar</i> differentiation		
2 nd step PCR	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

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	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 1091 頁	(兩階段巢式 PCR)	修訂日期： 年 月 日


附錄 15.2 *E. histolytica* 與 *E. dispar* 在巢氏聚合酶連鎖反應之結果

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 μ 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 μ L H₂O 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）。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便抗原 (酵素免疫篩檢法)	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 134 頁/共 1091 頁		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 適用範圍

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 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：

頁次：第 135 頁/共 1091 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

8 檢體採集

- 8.1 採檢管貼上辨識標籤。
- 8.2 直腸拭子：以沾濕（無菌生理食鹽水）無菌棉棒插入肛門內約 3 公分，旋轉後取出，檢視確保棉棒沾有糞便，立刻插入採檢管，並於 1-2 hr 內處理。
- 8.3 採集之檢體，可暫時保存於 2-8°C，於 48 hr 內完成檢測。若無法於 48 hr 內完成檢測者，應置於-20-70°C 冷凍保存。檢體以 Cary blair 運送培養基收集者，應置 2-8°C 冷藏保存，並於一週內完成檢測。
- 8.4 糞便檢體若已經過濃縮，或加入 10% Formalin、SAF、PVA 等固定液者，不適用於此方法。

9 檢體運送及保存


- 9.1 直腸拭子：必須於現場處理檢驗。
- 9.2 冷藏保存及置 Cary Blair 運送培養基之糞便檢體，應以冷藏運送，並於 48 hr 內處理檢驗。
- 9.3 冷凍保存之糞便檢體，以乾冰運送。

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 μ 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 μ L） Negative control、Positive control 各加入對應之孔中；取 6 滴（200 μ 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 μ 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 μ 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 μ L）呈色受質。
- 10.12 室溫下靜置 10 min。
- 10.13 加 1 滴（50 μ L）反應終止液。輕輕敲擊 Strip well holder 邊緣混合至

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	痢疾阿米巴糞便抗原 (酵素免疫篩檢法)	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 136 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

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 品質管制

- 11.1 操作前確認試劑在有效期限內。
- 11.2 每次操作應包含陽性及陰性對照檢體。
- 11.3 陽性對照：黃色（至少呈 2+）。
- 11.4 陰性對照：無色。
- 11.5 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。
- 11.6 每次操作時應加以記錄，定期由寄生蟲實驗室主管審閱。

12 結果判定

- 12.1 目測：以肉眼比較孔盤內及呈色判讀卡之顏色判讀。
- 12.2 陽性：黃色 (>1+)。
- 12.3 陰性：無色。
- 12.4 篩檢結果為「陽性」者，必須於 24 hr 內通報轄區衛生單位，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°C 保存），併同送驗單，於每次採檢後 24 hr 內冷藏送至疾病管制局進行鑑別診斷。

13 廢棄物處理

高壓蒸氣滅菌後依一般垃圾處理。

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)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：


頁次：第 137 頁/共 1091 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



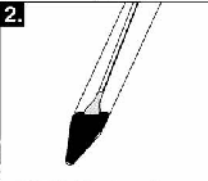
ProSpec[®] *E. histolytica* Microplate Assay Procedure Card

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.

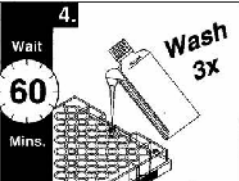
2. 

Suspend stool in Specimen Dilution Buffer.


Test Procedure

3. 

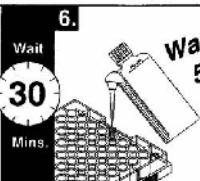
Add 4 drops (200 µl) Negative Control, Positive Control, or diluted patient specimen into microplate wells.

4. 


Wash wells 3 times with Wash Buffer.

5. 


Add 4 drops (200 µl) Enzyme Conjugate.

6. 

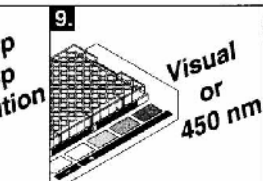
Wash wells 5 times with Wash Buffer.

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.

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



ProSpec[®] *E. histolytica* Microplate Assay Interpretation of Results

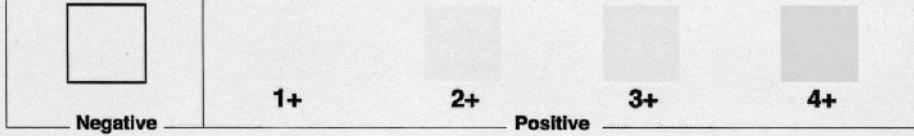
Refer to Package Insert for complete details.

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.



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

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	痢疾阿米巴血清學抗體檢測	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 138 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

1 目的

檢測病患是否曾經感染過痢疾阿米巴 (*Entamoeba histolytica*)，協助腸道外痢疾阿米巴感染之診斷。

2 適用範圍

血清。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

以固相酵素免疫分析法 (ELISA)，偵測病患血清中之抗痢疾阿米巴特異性抗體。將稀釋後之病患血清檢體，加入已吸附痢疾阿米巴抗原之微量分析孔盤。若血清中有抗痢疾阿米巴之特異性抗體，則會被孔盤上之阿米巴抗原捕捉，隨後加入標幟有 Horseradish peroxidase 酵素的 Anti-human IgG，最後加入受質，受質被酵素催化後呈現黃色，可於 620 nm 判讀吸光度值。

5 試劑耗材

- 5.1 經 TFDA IVD 認證之痢疾阿米巴酵素免疫分析試劑組。
- 5.2 採血針筒：須消毒完善，每支限用一人。
- 5.3 脫脂棉花。
- 5.4 70%酒精：用於採血前皮膚消毒。
- 5.5 採血管 (17×100 mm)。

6 儀器設備

- 6.1 離心機。
- 6.2 微量分注吸管。
- 6.3 ELISA reader 及 Washer。

7 設施安全

- 7.1 部分試劑溶液對皮膚、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，需避光儲存。若已變色，應丟棄勿用。


8 檢體採集

- 8.1 採血管貼上辨識標籤。
- 8.2 採得之血液應先分離出血清。若無法馬上處理，可暫時保存於 2-8°C。

9 檢體運送及保存

- 9.1 檢體，應冷藏運送並於一週內處理檢驗。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	痢疾阿米巴血清學抗體檢測	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 139 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

10 檢驗步驟

依所使用之痢疾阿米巴酵素免疫分析試劑組廠牌建議之檢驗步驟進行。

11 品質管制

11.1 依所使用之痢疾阿米巴酵素免疫分析試劑組說明進行。

11.2 每次操作時應加以記錄，並定期由寄生蟲實驗室主管審閱。

12 結果判定

依所使用之痢疾阿米巴酵素免疫分析試劑組說明判定。

13 廢棄物處理


高壓蒸氣滅菌後依一般垃圾處理。

14 參考資料

14.1 Haque R, Ali IKM, Akther S, Petri WA Jr. 1998. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J Clin Microbiol 36: 449-452.

14.2 Healy, GR. Serology. 1988. In: Ravdin JI, ed. Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley & Sons, pp. 650-719.

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 140 頁/共 1091 頁		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 μ L)。
- 5.2 I、III 混合型 Poliovirus antiserum (each 20 U/ 50 μ L)。
- 5.3 II、III 混合型 Poliovirus antiserum (each 20 U/ 50 μ L)。
- 5.4 I、II、III 混合型 Poliovirus antiserum (each 20 U/ 50 μ 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 μ L。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：

頁次：第 141 頁/共 1091 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

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。

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 CO₂ 培養箱。

6.5 分注器。

6.6 Vortex。

6.7 200 µL Pipetmen。

6.8 4°C 冰箱

6.9 -20°C 及 -80°C 冷凍櫃。

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

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及儲存

9.1 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9.2 檢體使用完後保存於-80°C。

10 檢驗步驟

10.1 檢驗前處理

10.1.1 檢體處理

(1) 糞便檢體以 PBS⁽⁺⁾ 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 xg 離心 15 分鐘。

(2) 上清液移至耐氯仿的離心管，加 1/10 量冰冷氯仿，振盪混合 15 分鐘。

(3) 於 4°C，2,100 xg 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 cm² 的培養瓶為例。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：

頁次：第 142 頁/共 1091 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) 在生物安全櫃中，使用無菌器具，一次操作一種細胞株。
- (2) 在顯微鏡下先觀察確認細胞形態正常，且沒有污染。
- (3) 移除生長培養基。
- (4) 加入 5 mL 的 PBS 清洗殘餘之生長培養基，清洗兩次。
- (5) 加入 5 mL 的 0.25% trypsin-EDTA (已事先在 37°C 加溫) 作用 1 分鐘。
- (6) 抽掉 trypsin-EDTA 並靜置 30 秒至 1 分鐘。
- (7) 以 10 mL 生長培養基由下往上將細胞沖下。
- (8) 計算細胞數。
- (9) 稀釋細胞至適當濃度作接種與繼代。
- (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。
- (11) 放入 36°C、5% CO₂ 保溫箱中培養。
- (12) 填寫細胞繼代培養紀錄，備查。

10.2 檢驗步驟

10.2.1 接種

- (1) 發育完成之 RD、HEp-2C 及 L20B 細胞更換成維持培養基。
- (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。
- (3) 置於 36°C，5% CO₂ 培養箱繼續培養。


10.2.2 觀察

- (1) 由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態。
- (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。
- (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 xg 離心 15 分鐘。取上清液再接再種一次，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)

- (1) 將 culture tube 以 4°C，1,000 xg 離心 15 分鐘，上清液存於 2 mL 的塑膠小瓶。
- (2) 經離心沉澱之細胞加入 0.5 mL 之 PBS，混合。
- (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。
- (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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法


	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 143 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

- (5) 以 PBS-0.5% Tween 20 溶液清洗玻片後風乾。
- (6) 每個孔加二級螢光標幟抗體 (FITC、Goat anti-mouse IgG)。每滴約 10 μ L 左右，將玻片置於 Moisture chamber，置於 36°C 恆溫培養箱 30 min。
- (7) 以 PBS-0.5% Tween 20 溶液清洗玻片後風乾。
- (8) 以 Mounting fluid 封片後，以螢光顯微鏡鏡檢。
- (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) 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。
- (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

- (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 TCID₅₀，接著為 back titration 的 10^{-1} (10 TCID₅₀)、 10^{-2} (1 TCID₅₀)、 10^{-3} (0.1 TCID₅₀)。
- (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。
- (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。
- (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 μ L (各型 20 單位) --- 縱向操作，如附錄 15.6。
- (5) A 列 (1-12 孔) 加入 CV1 攻擊病毒 50 μ L，B 列 (1-12 孔) 加入 CV2 攻擊病毒 50 μ L，C 列 (1-12 孔) 加入 CV3 攻擊病毒 50 μ L，細胞對照組為 100 μ L 的 DMEM-2% FCS (維持培養基) 8-10 Well back titration：每個孔加入 50 μ L 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。
- (6) 使其混合均勻，蓋上蓋子置 36°C，5% CO₂ 培養箱 1hr。
- (7) 每孔加入 100 μ L RD 細胞懸浮液，置 36°C，5% CO₂ 培養箱。
- (8) 於 3-4 天每天以倒立顯微鏡觀察 CPE，以判定型別。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 144 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

11 結果判定

11.1 在對照細胞形態無異，而攻擊病毒量在 32—1,000 TCID₅₀ 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	++++	++++	++++	++++

11.2 若初次無法鑑定時再重復一次，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。

11.3 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 145 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

13 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 分鐘高壓滅菌後，依本局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, 4th edition, Yale University Press, New Haven, NY, pp. 46-55.
- 14.4 WHO. 2004. Polio laboratory manual, 4th 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。


行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 146 頁/共 1091 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


行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 147 頁/共 1091 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 μ 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


行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 148 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

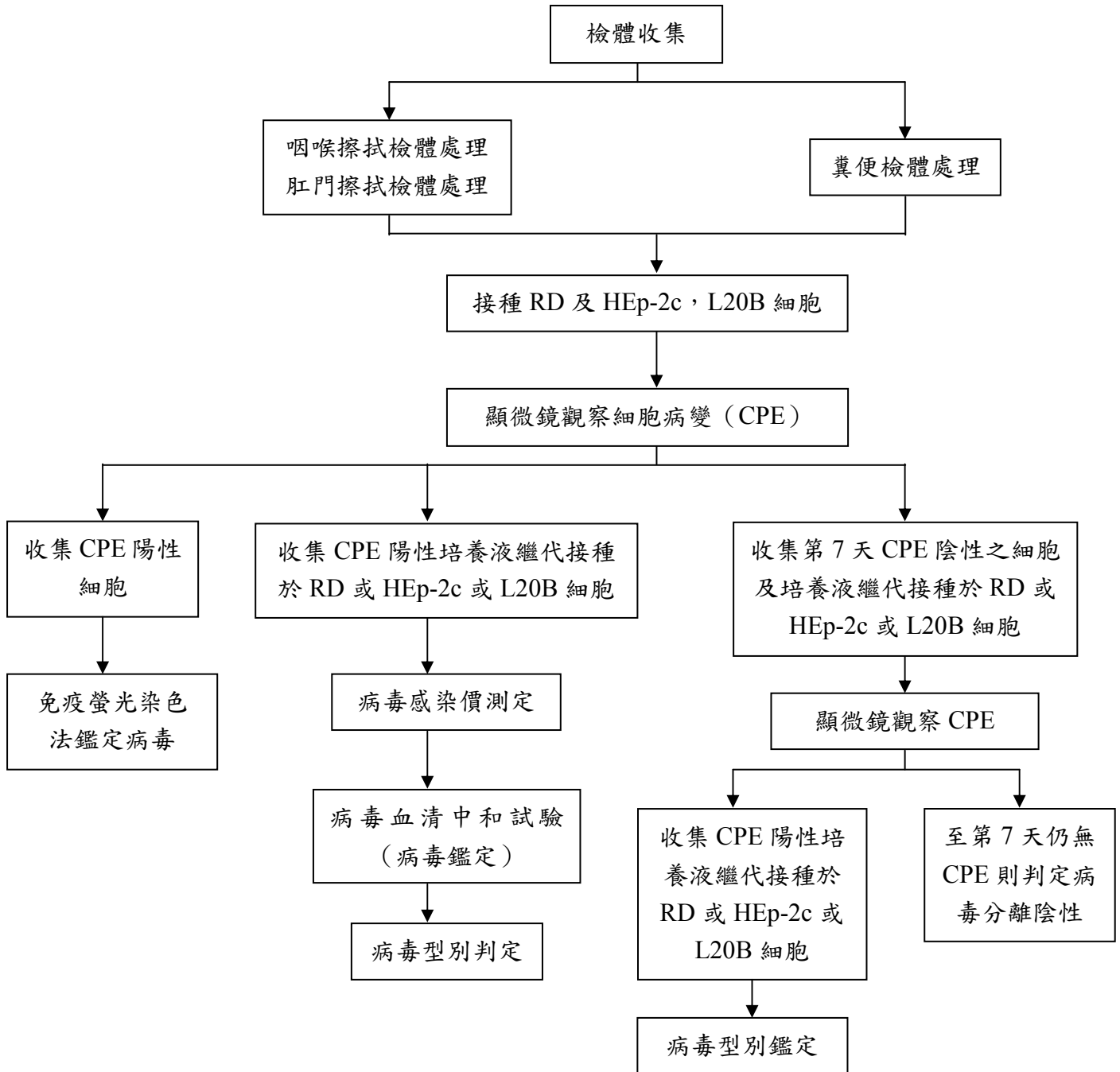
附錄 15.3 Poliovirus antiserum 混合型別稀釋法

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


行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 149 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法


	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 150 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 Back titration 盤子圖

(直列 8 個孔，50 μL medium + 病毒 50 μL + RD cell 100 μL)

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						

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 152 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

附錄 15.7 細胞繼代紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
細胞繼代紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

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 _____ 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 CO₂ incubator

Remarks:

檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：
頁次：第 153 頁/共 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

小兒麻痺病毒分離紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

Date : Exp. :	Date : Exp. :																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px;"></td> <td style="width: 20px; text-align: center;">1</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">2</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">3</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">4</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">5</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">6</td> <td style="width: 20px; 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: 20px;"></td> <td style="width: 20px; text-align: center;">1</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">2</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">3</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">4</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">5</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">6</td> <td style="width: 20px; 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：

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：
頁次：第 154 頁/共 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

小兒麻痺病毒感染價測定紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

Date : Exp. :										Date : Exp. :										
1										1										
2										2										
3										3										
4										4										
5										5										
6										6										
7										7										
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：

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：

頁次：第 155 頁/共 1091 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 15.10 小兒麻痺病毒感染價結果紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗組
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：

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：
頁次：第 156 頁/共 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
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. :																									
<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width:10%;"></td><td style="width:10%; text-align: center;">1</td><td style="width:10%; text-align: center;">2</td><td style="width:10%; text-align: center;">3</td><td style="width:10%; text-align: center;">4</td><td style="width:10%; text-align: center;">5</td><td style="width:10%; text-align: center;">6</td><td style="width:10%; 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:10%;"></td><td style="width:10%; text-align: center;">1</td><td style="width:10%; text-align: center;">2</td><td style="width:10%; text-align: center;">3</td><td style="width:10%; text-align: center;">4</td><td style="width:10%; text-align: center;">5</td><td style="width:10%; text-align: center;">6</td><td style="width:10%; 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																												
Back titration of	CV 1	1									10 ⁻²	1																							
		2										2																							
		3										3																							
		4										4																							
		5										5																							
		6										6																							
		7										7																							
		8										8																							
	CV 2	1									10 ⁻³	1																							
		2										2																							
		3										3																							
		4										4																							
		5										5																							
		6										6																							
		7										7																							
		8										8																							
	CV 3	1									CC																								
		2																																	
		3																																	
		4																																	
		5																																	
		6																																	
		7																																	
		8																																	
	10 ⁻¹	1																																	
		2																																	
		3																																	
		4																																	
		5																																	
		6																																	
		7																																	
		8																																	
Cell : RD	Generation : N+				Culture : day0					Cell :	Generation :				Culture :																				
G. M. :										G. M. :																									
D. M. :										D. M. :																									
Inoculum : 50ul/well	Absorption :									Inoculum :	Absorption :																								

檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：
頁次：第 157 頁/共 1091 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 15.12 小兒麻痺病毒鑑定中和試驗 (neutralization) 紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
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. :											
CV1	II, III	1									II, III	1									
		2										2									
		3										3									
	I III	1									I III	1									
		2										2									
		3										3									
	I II	1									I II	1									
		2										2									
		3										3									
I II III	1									I II III	1										
	2										2										
	3										3										
CV2	II, III	1								II, III	1										
		2										2									
		3										3									
	I III	1									I III	1									
		2										2									
		3										3									
	I II	1									I II	1									
		2										2									
		3										3									
I II III	1									I II III	1										
	2										2										
	3										3										
CV3	II, III	1								II, III	1										
		2										2									
		3										3									
	I III	1									I III	1									
		2										2									
		3										3									
	I II	1									I II	1									
		2										2									
		3										3									
I II III	1									I II III	1										
	2										2										
	3										3										
Cell:RD Generation:N+ Culture:day 0																					
GM:																					
M.M:																					
Inoculum : 50ul/well Absorption : 1 hr																					

檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	小兒麻痺病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 158 頁/共 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
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：

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：

頁次：第 159 頁/共 1091 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 適用範圍

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 Giemsa 原液：

5.1.1 Giemsa 粉末（azure B type）3.0 g。

5.1.2 以甘油（glycerol）250 mL 加溫溶解（約 60°C）。

5.1.3 再添加甲醇 250 mL（60°C）。

5.1.4 放置 24hr 後以濾紙濾去雜質，即製成原液，存放於棕色瓶內。

5.1.5 Giemsa 原液已商品化，可直接購買使用。

5.1.6 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 載玻片：先以酒精除去油污。

5.3 油鏡油：使用 100 倍物鏡觀察時，可避免光線因折射而減弱。

5.4 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。

5.5 拭鏡紙：檢驗完畢後，用於擦拭物鏡。

5.6 採血針：須消毒完善，每支限用一人。

5.7 脫脂棉花。

5.8 70%酒精：用於採血前皮膚消毒。

5.9 血片保存盒。

6 儀器設備

顯微鏡：雙眼光學顯微鏡具 10X 之目鏡及 100 X 之物鏡。

7 環境與設施安全

無。

8 檢體採集

8.1 採血步驟

8.1.1 消毒：(1).選擇病患耳垂（左右均可）下方三分之一位置，以酒精棉球消毒採血部位。(2).亦可選擇病患中指尖側邊（左右均可）

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：

頁次：第 160 頁/共 1091 頁

瘧原蟲檢測（鏡檢法）

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

以酒精棉球消毒採血部位。

8.1.2 針血：(1).病患耳垂消毒後待酒精乾燥，以左手拇指與食指固定耳垂，右手拇指與食指執針，中指固定針頭使其凸出約一公厘，並將中指頭穩貼在欲行針刺之耳垂皮上，以劃半圓形手勢旋轉劃破耳垂。(2).病患中指尖側邊消毒後待酒精乾燥，以左手拇指與食指固定並擠壓病患中指，右手拇指與食指執針刺破病患中指尖側邊。

8.1.3 擠血：(1).針血後左手拇指與食指放鬆一次再輕輕捏住病患耳垂，習慣上用右手中指或食指向耳朵上方輕壓，使力量成三角集中一點，擠出血液，為防止酒精污染血液，原則上第一滴血不予採用，以玻璃片之一角邊刮掉，接著擠出約同火柴棒火藥頭大小之第二滴血。(2).針血後左手拇指與食指輕輕擠壓病患中指，擠出血液，為防止酒精污染血液，原則上第一滴血不予採用，以玻璃片之一角邊刮掉，接著擠出約同火柴棒火藥頭大小之第二滴血。

8.1.4 刮血：(1).左手拇指與食指捏穩病患耳朵，右手拇指與食指執玻璃片邊緣中段，以玻璃片角由上向下輕輕刮取前項所述之第二滴血。(2).左手拇指與食指捏穩病患中指，右手拇指與食指執玻璃片邊緣中段，以玻璃片角由上向下輕輕刮取前項所述之第二滴血。

8.2 血片製作

8.2.1 厚層血片製作：取約一米粒大（10-15 μL ）之血滴置於載玻片一端 $\frac{1}{3}$ 處，以另一玻片之片角（持 45 度斜度），以同心圓軌跡塗抹攪拌 15 次，達直徑約 1 公分大小，自然乾燥後進行染色。若無法立即染色，可滴數滴蒸餾水於上述厚層血片處溶血 3-5 min 後，棄水乾燥，可暫時存放乾燥處等待染色。

8.2.2 薄層血片製作：另取約半米粒大小（5-10 μL ）之血滴置於載玻片另一端之邊緣中間，以另一玻片之一端接觸血滴移動形成稜線，並使血液均勻分散到全部稜線上，再以 30 度角斜推至稜線上血液消失為止，待自然乾燥，以 100% 甲醇固定後染色。

9 檢體運送及保存

血片須置入血片保存盒，室溫運送。

10 檢驗步驟


10.1 Giesma 染色法

10.1.1 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。

10.1.2 染色：以 5%之 Giemsa 染色液覆滿於載玻片，染色約 40-50 min。

10.1.3 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	瘧原蟲檢測（鏡檢法）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 161 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.1.4 磷酸緩衝液之 pH 以 7.0-7.2 最適宜。
- 10.2 磷酸緩衝液（phosphate buffer, 6.7mM, pH 7.1）：
0.41 g KH_2PO_4
0.65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Bring to 1 L and pH 7.1
- 10.3 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。
- 10.4 記錄鏡檢結果。
- 11 品質管制
- 11.1 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。
- 11.2 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。
- 11.3 每一次血液檢體製作抹片標本，應加作陽性對照組之品管。
- 11.4 每次操作時應加以記錄，並定期由寄生蟲實驗室主管審閱。
- 12 結果判定
- 12.1 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。
- 12.2 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。
- 13 廢棄物處理
- 13.1 高壓滅菌後依一般垃圾處理。
- 13.2 任何尖銳廢棄物（ex：tip、pipette、刀片、針頭或玻璃等），不可直接丟置於塑膠袋內，須以紙箱、鐵罐或塑膠罐收集，並於丟棄前密封完整，外表標示內含物品種類，以避免清理人員發生意外傷害。
- 14 參考資料
- 14.1 Ljungstrom I, Perlmann H, Schlichtherle M, Scherf A, Wahlgren M. 2004. Methods malaria research, 4th 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：

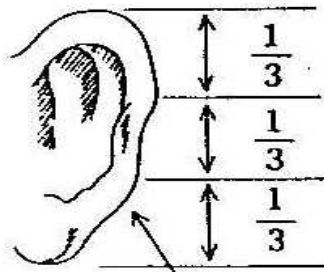
頁次：第 162 頁/共 1091 頁

瘧原蟲檢測（鏡檢法）

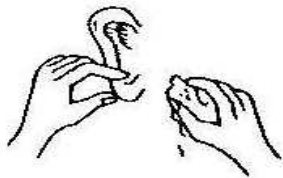
核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 採血步驟及血片製作



採血部位



1 消毒

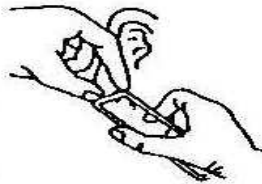
2 針血



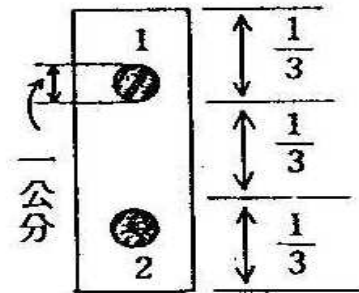
3 擠血



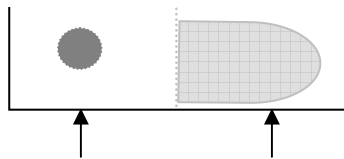
4 刮血



5 塗抹



6 完成血片




厚片

約 1 cm²

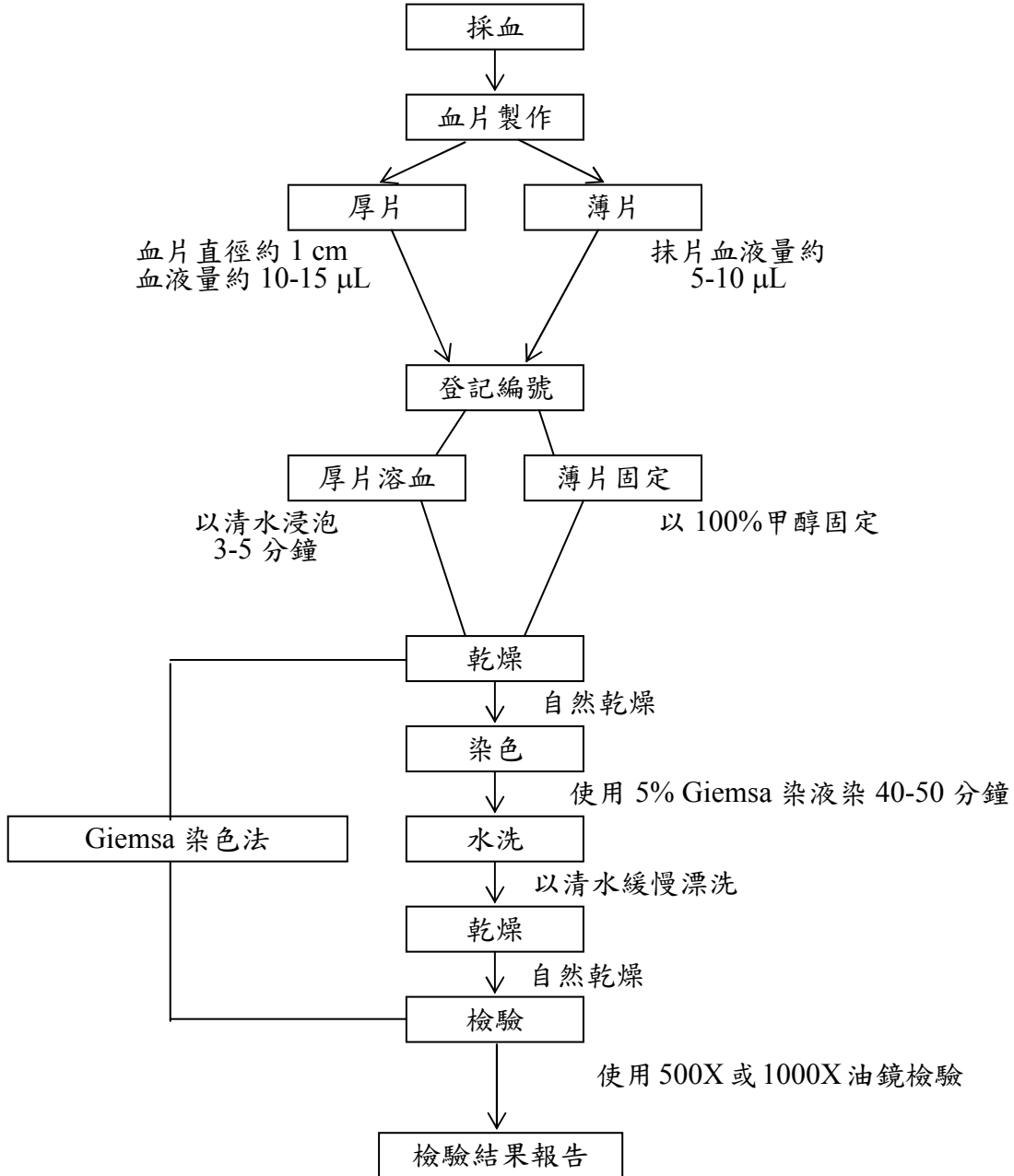
薄片

約 3 × 2 cm²

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法


	編號：	瘧原蟲檢測（鏡檢法）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 163 頁/共 1091 頁		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)

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢氏 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 164 頁/共 1091 頁		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 適用範圍

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 檢體保存劑：5.4 mg K₂EDTA/tube

5.2 3-5 mL 採血管

5.3 核酸萃取試劑組：QIAamp DNA blood mini kit (Cat. no.51106)

5.3.1 蛋白質水解酵素 (protease)

5.3.2 溶解緩衝液 AL (buffer AL)

5.3.3 96-100%乙醇 (ethanol)

5.3.4 緩衝液 AW1 (buffer AW1)

5.3.5 緩衝液 AW2 (buffer AW2)

5.3.6 萃取緩衝液 (buffer AE)

5.4 核酸萃取 (QIAamp DNA blood mini kit) 耗材

5.4.1 萃取濾管 (QIAamp spin column)

5.4.2 2 mL 收集管 (2 mL collection tube)

5.5 PCR 試劑

5.5.1 5 μM rPLU1 primer (5'-tcaaagattaagcca tgcaagtga -3') (附錄 14)

5.5.2 5 μM PL1 primer (5'-ttaaattgttcagttaaaacg -3') (附錄 14)

5.5.3 5 μM PL2 primer (5'-cctgtgtgccttaaacttc -3') (附錄 14)

5.5.4 5 μM PL3 primer (5'-ttttataaggataactacggaaaagctgt -3') (附錄 14)

5.5.5 5 μM PL4 primer (5'-taccgcatagccatgttaggccaatacc -3') (附錄 14)

5.5.6 5 μM Pf1 primer (5'-ttaaactggtttggaaaaccaaataatatt -3') (附錄 14)

5.5.7 5 μM Pf2 primer (5'-acacaatgaactcaatcatgactaccgctc -3') (附錄 14)

5.5.8 5 μM Pv1 primer (5'-cgcttctagcttaatccacataactgatac -3') (附錄 14)


5.5.9 5 μM Pv2 primer (5'-actccaagccgaagcaagaaagtcctta -3') (附錄 14)

5.5.10 5 μM Pm1 primer (5'-ataacatagttgtacgttaagaataaccgc -3') (附錄 14)

5.5.11 5 μM Pm2 primer (5'-aaaattccatgcataaaaaattatacaaa -3') (附錄 14)


5.5.12 5 μM Po1 primer (5'-atctctttgctatttttagtattggaga -3') (附錄 14)

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢氏 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 165 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.5.13 5 μ M Po2 primer(5'-ggaaaaggacacattaattgtatcctagtg -3')(附錄 14)
- 5.5.14 10X PCR buffer
- 5.5.15 2 mM dNTP (dGTP, dCTP, dTTP, dATP 2 mM each)
- 5.5.16 10X Dye (20%[w/v] sucrose, 1mM Cresol Red)
- 5.5.17 25 mM MgCl₂
- 5.5.18 AmpliTaq gold DNA polymerase (5 units/ μ L)
- 5.5.19 5 mg/mL BSA
- 5.5.20 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 μ 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 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 環境與設施安全
無。
- 8 檢體採集
 - 8.1 檢體：血液。
 - 8.2 容器需求：紫頭管 (含 EDTA 抗凝劑)。
 - 8.3 以常溫或冷藏運送，24 hr 內送達實驗室。
- 9 檢驗步驟
 - 9.1 檢體 DNA 萃取：
 - 9.1.1 取 200 μ L 檢體，置於 1.5 mL 離心管，並加入 20 μ L Protease。
 - 9.1.2 加 200 μ L Buffer AL，震盪 15 sec，置於 56°C，10 min。
 - 9.1.3 加 200 μ L 酒精，震盪 15 sec，吸取全部置入萃取濾管中。
 - 9.1.4 以 8,000 rpm 離心 1 min。
 - 9.1.5 加 500 μ L Buffer AW1，以 8,000 rpm 離心 1 min，換新收集管。
 - 9.1.6 加 500 μ L Buffer AW2，以 14,000 rpm 離心 3 min，換新收集管。
 - 9.1.7 以 14,000 rpm 離心 1 min，將收集管換為 1.5 mL 離心管。
 - 9.1.8 加 200 μ L Buffer AE，靜置 1 min。
 - 9.1.9 以 8,000 rpm 離心 1 min。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測	核准日期：	年 月 日
	頁次：第 166 頁/共 1091 頁	(兩階段巢氏 PCR 法)	修訂日期：	年 月 日

9.1.10 置於 4°C 冰箱冷藏保存。

9.2 Genus 鑑定第一階段 PCR：

9.2.1 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(μL)	濃度(總體積 20 μL)
5 μM rPLU1 primer	1	0.25 μM
5 μM PL1 primer	1	0.25 μM
10X PCR buffer	2	1X
2 mM dNTP	1.25	125 μM
25 mM MgCl ₂	1.6	2 mM
AmpliTaq gold(5 U/μL)	0.1	0.025 U/μL
Pure Water	11.05	
總體積	18	

9.2.2 分裝 18 μL PCR 反應混合液至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管。

9.2.3 每一 PCR 反應管加入 2 μL 檢體 DNA。

9.2.4 將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應器進行反應(總體積 20 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	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	∞	1

9.3 Genus 鑑定第二階段 PCR：


9.3.1 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 (μL)	濃度(總體積 20 μL)
5 μM PL3 primer	1	0.25 μM
5 μM PL4 primer	1	0.25 μM
10× PCR buffer	2	1X
2 mM dNTP	1.25	125 μM
25 mM MgCl ₂	1.6	2 mM
AmpliTaq Gold (5 U/μL)	0.1	0.025 U/μL
Pure water	12.05	
總體積	19	

9.3.2 分裝 PCR 反應混合液 19.0 μL 至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管

9.3.3 每一 PCR 反應管加入 1.0 μL 第一階段 PCR 產物

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢氏 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 167 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

9.3.4 將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應器進行反應(總體積 20 μ L)：

PCR 反應期	溫度($^{\circ}$ C)	時間(分： sec)	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	∞	1

9.4 Sepcies 鑑定第一階段 PCR：

9.4.1 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(μ L)	濃度(總體積 20 μ L)
5 μ M PL1 primer	1	0.25 μ M
5 μ M PL2 primer	1	0.25 μ M
10 \times PCR buffer	2	1X
2 mM dNTP	1.25	125 μ M
25 mM MgCl ₂	1.6	2 mM
AmpliTaq Gold(5 U/ μ L)	0.1	0.025 U/ μ L
Pure Water	11.05	
總體積	18	

9.4.2 分裝 18 μ L PCR 反應混合液至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管。

9.4.3 每一 PCR 反應管加入 2 μ L 檢體 DNA。

9.4.4 將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應器進行反應(總體積 20 μ L)：


PCR 反應期	溫度($^{\circ}$ 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

9.5 Species 鑑定第二階段 PCR：

9.5.1 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(μ L)	濃度(總體積 20 μ L)
5 μ M Species primer 1	1	0.25 μ M
5 μ M Species primer 2	1	0.25 μ M
10X PCR buffer	2	1X
2 mM dNTP	1.25	125 μ M
25 mM MgCl ₂	1.6	2 mM
AmpliTaq Gold(5 U/ μ L)	0.1	0.025 U/ μ L

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 168 頁/共 1091 頁	(兩階段巢氏 PCR 法)	修訂日期： 年 月 日

Pure water	12.05	
總體積	19	

- 9.5.1.1 *Plasmodium falciparum* species primer 為 Pf1、Pf2
- 9.5.1.2 *Plasmodium vivax* species primer 為 Pv1、Pv2
- 9.5.1.3 *Plasmodium malariae* species primer 為 Pm1、Pm2
- 9.5.1.4 *Plasmodium ovale* species primer 為 Po1、Po2
- 9.5.2 分裝 PCR 反應混合液 19.0 μ L 至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管
- 9.5.3 每一 PCR 反應管加入 1.0 μ L 第一階段 PCR 產物
- 9.5.4 將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應器進行反應(總體積 20 μ L):

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	06:00	1
停止反應	4	∞	1

- 9.6 PCR 產物電泳分析：
 - 9.6.1 配製 2% 洋菜膠片 (含 1X TBE 電泳緩衝液)。
 - 9.6.2 電泳分析：將第二階段 PCR 反應 A 及 B 管等量混合，取 10 μ L 置於膠片孔洞，與 2.5 μ 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。
 - 9.6.3 膠片染色：將洋菜膠片置於 0.5 μ g/mL Ethidium bromide 染色 10 min，繼以蒸餾水脫色 10 min。
 - 9.6.4 將膠片置於紫外線照相系統，擷取圖片，記錄結果。


10 品質管制

- 10.1 每次操作應包含陽性及陰性對照檢體。
- 10.2 陽性對照檢體：已確定為瘧原蟲陽性 DNA。
- 10.3 陰性對照：純水。
- 10.4 每次操作時加以記錄，定期由寄生蟲實驗室主管審閱。

11 結果判定

- 11.1 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。
- 11.2 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。
- 11.3 瘧原蟲陽性：238 bp。(附錄 14.2)
- 11.4 *P. falciparum* 陽性：205 bp。(附錄 14.3)
- 11.5 *P. vivax* 陽性：120 bp。(附錄 14.3)

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢氏 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 169 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

11.6 *P. malaria* 陽性：144 bp。(附錄 14.3)

11.7 *P. ovale* 陽性：800 bp。(附錄 14.3)

12 廢棄物處理

檢體、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 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.

13.2 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.


14 附錄

14.1 瘧疾分子生物學確認檢驗所用引子之序列。

14.2 *Plasmodium* genus 在巢氏聚合酶連鎖反應之結果。

14.3 *Plasmodium* species 在巢氏聚合酶連鎖反應之結果。


行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢氏 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 170 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

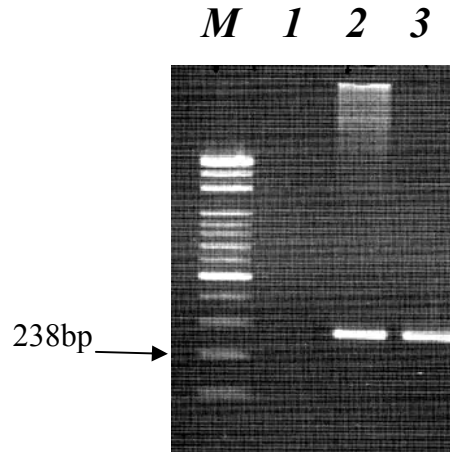
附錄 14.1 瘧疾分子生物學確認檢驗所用引子之序列

Category	Primer pairs(forward+reverse)	PCR product size
Primers for Genus		
1 st step PCR	Outer1: 5'-tcaaagattaagcca tgcaagtga -3' Outer1R : 5'-ttaaattggtgcagttaaaacg -3'	
2 nd step PCR	Inner F:5'-ttttataaggataactacggaaaagctgt -3' Inner R:5'-taccgctatagccatgtaggccaatacc -3'	238 bp
Primers for Species		
1 st step PCR	PL1:5'-ttaaattggtgcagttaaaacg -3' PL2: 5'-cctggttgccttaaacttc -3'	
2 nd step PCR	Pf1: 5'-ttaaactggttggaaaaccaaataatatt -3' Pf2: 5'-acacaatgaactcaatcatgactaccgctc -3'	205 bp
	Pv1: 5'-cgcttctagcttaatccacataactgatac -3' Pv2: 5'acttccaagccgaagcaaagaaagtcctta-3'	120 bp
	Pm1: 5'-ataacatagttgtacgttaagaataaccgc -3' Pm2: 5'-aaaattcccatgcataaaaaattatacaaaa -3'	144 bp
	Po1: 5'-atctctttgctatttttagtattggaga -3' Po2: 5'-ggaaaaggacacattaattgtatcctagtg -3'	800 bp

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法


	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢氏 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 171 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

14.2 *Plasmodium* genus 在巢氏聚合酶連鎖反應之結果



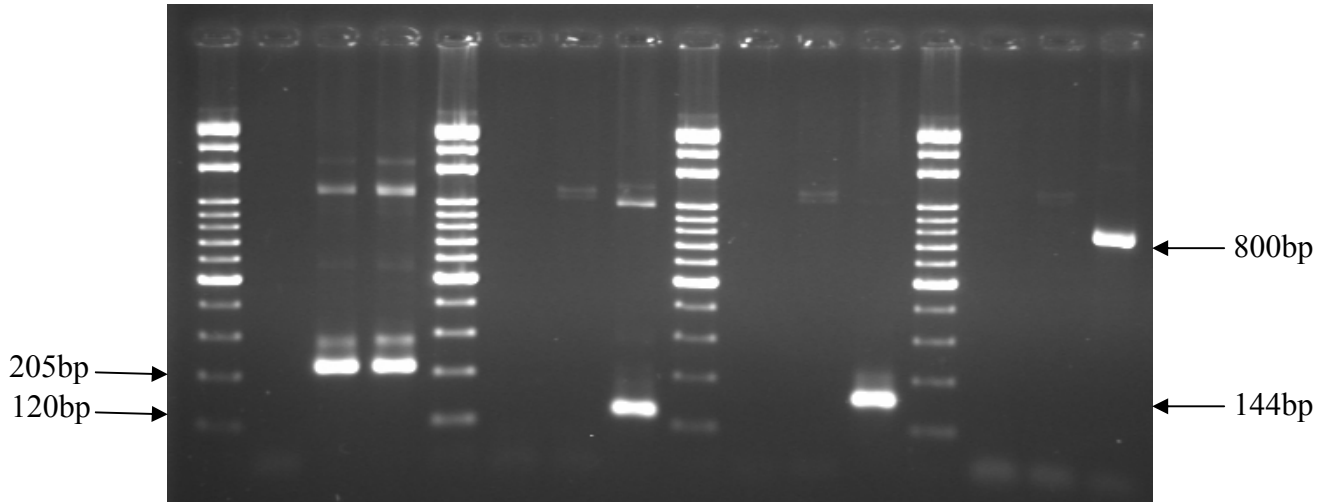
Lane M: 100 bp Marker; Lane 1 是對照組 ddH₂O(以 ddH₂O 取代 DNA template 進行兩階段之 PCR 反應); Lane 2 為檢驗檢體; Lane 3 為陽性檢體

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	瘧原蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢氏 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 172 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

14.3 *Plasmodium* species 在巢氏聚合酶連鎖反應之結果

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 ddH₂O (以 ddH₂O 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 。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：

頁次：第 173 頁/共 1091 頁

瘧原蟲血清學抗原檢測
(瘧疾快速診斷試驗法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用「瘧疾快速診斷試驗法」偵測病患血液中之瘧原蟲抗原，協助瘧疾防治工作。

2 適用範圍

新鮮血液。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

「瘧疾快速診斷試驗法」是利用快速免疫色層分析試驗 (ICT) 技術，偵測受檢者血液中之瘧原蟲抗原。將採自受檢者手指或耳垂之血液檢體，加入已吸附抗泛瘧原蟲單株抗體或抗惡性瘧原蟲 HRPII 蛋白單株抗體之免疫色層分析 Nitro-cellulose strip，再加入含抗泛瘧原蟲單株抗體及抗惡性瘧原蟲 HRPII 蛋白單株抗體/膠體金複合體之展開劑，利用毛細現象將檢體展開推升。最後觀察免疫色層分析 Nitro-cellulose strip，經由紅色色帶之產生，藉以判定受檢者是否感染惡性瘧原蟲或是其他瘧原蟲。

5 試劑耗材

- 5.1 採血針：須消毒完善，每支限用一人。
- 5.2 脫脂棉花。
- 5.3 70%酒精：用於採血前皮膚消毒。
- 5.4 經 TFDA IVD 認證之瘧疾快速診斷試驗試劑組。

6 儀器設備

依所使用之瘧疾快速診斷試驗試劑組說明配置。

7 環境與設施安全

無。

8 檢體採集

依所使用之瘧疾快速診斷試驗試劑組說明採集。

9 檢體運送及保存


依所使用之瘧疾快速診斷試驗試劑組說明運送及保存。

10 檢驗步驟

- 10.1 依所使用之瘧疾快速診斷試驗試劑組檢驗步驟進行。
- 10.2 簡易操作流程，如附錄 15.1。

11 品質管制

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	瘧原蟲血清學抗原檢測 (瘧疾快速診斷試驗法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 174 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 11.1 依所使用之瘧疾快速診斷試驗試劑組說明進行。
- 11.2 每次操作時應加以記錄，並定期由寄生蟲實驗室主管審閱。

12 結果判定

依所使用之瘧疾快速診斷試驗試劑組說明判讀。

13 廢棄物處理

高壓蒸氣滅菌後依一般垃圾處理。

14 參考資料

- 14.1 Binax now malaria test kit 試劑組說明書。
- 14.2 Cunningham J, Bell D. 2009. WHO-FIND-CDC malaria RDT product testing methods manual (version 1) - 05/2008. WHO.
- 14.3 How to use a rapid diagnostic test (RDT): A guide for training at a village and clinic level (modified for training in the use of the Generic Pf Test for falciparum malaria). 2008. The USAID Quality Assurance Project (QAP), University Research Co., LLC, and the World Health Organization (WHO), Bethesda, MD, and Geneva.

15 附錄

- 15.1 簡易操作流程 (取自參考資料 14.3 及 WHO 網站資料)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：

頁次：第 175 頁/共 1091 頁

瘧原蟲血清學抗原檢測
(瘧疾快速診斷試驗法)

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 簡易操作流程 (取自參考資料 14.3 及 WHO 網站資料)

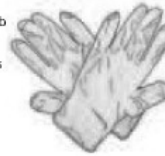
How To Do the Rapid Test for Malaria

Modified for training in the use of the **Generic Pf Test for falciparum malaria**



Collect:

- NEW unopened test packet
- NEW unopened alcohol swab
- NEW unopened lancet
- NEW pair of disposable gloves
- Buffer
- Timer



Disposable gloves



Alcohol swab



Lancet



Timer



Buffer



Test packet

READ THESE INSTRUCTIONS CAREFULLY BEFORE YOU BEGIN.

1. Check the expiry date on the test packet.

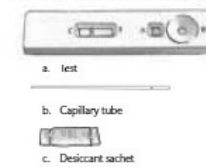


Expiry date

2. Put on the gloves. Use new gloves for each patient.



3. Open the packet and remove:



4. Write the patient's name on the test.



5. Open the alcohol swab. Grasp the 4th finger on the patient's left hand. Clean the finger with the alcohol swab. Allow the finger to dry before pricking.



6. Open the lancet. Prick patient's finger to get a drop of blood.



7. Discard the lancet in the Sharps Box immediately after pricking finger. **Do not set the lancet down before discarding it.**



8. Use the capillary tube to collect the drop of blood.



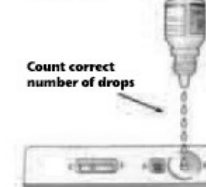
9. Use the capillary tube to put the drop of blood into the square hole marked "A."



10. Discard the capillary tube in the Sharps Box.



11. Add buffer into the round hole marked "B."



Count correct number of drops

12. Wait 15 minutes after adding buffer.



13. Read test results. **(NOTE: Do Not read the test sooner than 15 minutes after adding the buffer. You may get FALSE results.)**

14. How to read the test results:

POSITIVE

A line near letter "C" and a line near letter "T" means the patient is POSITIVE for malaria.



P. falciparum

The test is **positive** even if the line near "T" is faint.



P. falciparum (faint +)

NEGATIVE

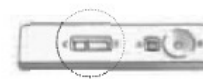
A line near letter "C" and **NO LINE** near letter "T" means the patient **DOES NOT** have malaria.



Negative

INVALID RESULT

NO LINE near letter "C" and one or no line near letter "T" means the test is INVALID.



Repeat the test using a new RDT if no control line appears.

If no line appears near the letter "C," repeat the test using a **NEW unopened** test packet and a **NEW unopened** lancet.

15. Dispose of the gloves, alcohol swab, desiccant sachet and packaging in a non-sharps waste container.



16. Record the test results in your CHW register. Dispose of cassette in non-sharps waste container.



NOTE: Each test can be used ONLY ONE TIME. Do not try to use the test more than once.



行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：
頁次：第 176 頁/共 1091 頁

瘧原蟲血清學抗原檢測
(瘧疾快速診斷試驗法)

核准日期： 年 月 日
修訂日期： 年 月 日

Generic instruction for malaria rapid test cassette. *P. falciparum* only

1 FIRST, read carefully these instructions.

2 Collect:

- 1) alcohol
- 2) cotton
- 3) gloves
- 4) lancet
- 5) buffer
- 6) timer

3 Look at the expiry date at the back of the package.

Use another package if expiry date has passed.

4 Open the package and look for the following:

1) Dessicant (Check correct colour)

2) Device

3) Loop

5 Write patient's name at the back of the device.

6 Clean the patient's finger with alcohol. The finger MUST be dry before pricking.

7 Prick the patient's finger to get a drop of blood.

8 Touch the loop to the blood.

A film of blood fills the loop.

9 Immediately touch the loop with blood on the square hole marked "A."

10 Put six (6) drops of buffer into the round hole marked "B."

11 Read results exactly fifteen (15) minutes after adding buffer.

Do not read the results before fifteen (15) minutes. Reading too early or too late can give false results.

15 mins.

12 HOW TO READ:

NEGATIVE (no falciparum malaria) - one line in window "C" at left.

POSITIVE falciparum malaria - one line in window "C" at left and one line in window "T" at right.

It is positive even if test line is faint.

NO RESULT - no line in "C" or "T."

If the control line does NOT appear, any other lines should be disregarded. The test should be repeated!

13 Record results.

14 Dispose of infectious waste properly.

Use new package and lancet for each patient.

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法



編號：
頁次：第 177 頁/共 1091 頁

瘧原蟲血清學抗原檢測
(瘧疾快速診斷試驗法)

核准日期： 年 月 日
修訂日期： 年 月 日

Generic instructions for malaria rapid test dipstick. Modify for specific product

1 **FIRST, read carefully these instructions.**

2 Collect:

- 1) alcohol
- 2) cotton
- 3) gloves
- 4) lancet
- 5) tube wells
- 6) buffer
- 7) timer

3 Look at the expiry date at the back of the package.

Use another package if expiry date has passed.

4 Open the package and look for the following:

- 1) Dessicant
- 2) Dipstick
- 3) Tube

(Check correct colour)

5 Clean the patient's finger with alcohol. The finger **MUST** be dry before pricking.

6 Prick the patient's finger to get a small drop of blood.

7 Touch the tip of the tube to the blood until the tube is half full.

8 Immediately touch the tip of the tube with blood on the dipstick where the arrow is pointing.

9 Dispose of tube in sharps container.

10 Put four (4) drops of buffer into the tube well.

11 Place the dipstick with blood into the tube well where you have put buffer drops.

Leave for fifteen (15) minutes.

12 Read results exactly fifteen (15) minutes after adding buffer.

Do not read the results before fifteen (15) minutes. Reading too early or too late can give false results.

15 mins.

13 **HOW TO READ:**

NEGATIVE (no malaria)
- one control line.

POSITIVE *falciparum* malaria
- two lines.

It is positive even if second line is light.

NO RESULT
- no control line


If the control line does **NOT** appear, any other lines should be disregarded. The test should be repeated!

14 Record Results.

15 Dispose of infectious waste properly


Use new package and lancet for each patient.

行政院衛生署疾病管制局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 178 頁/共 1091 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)。
 - (1) Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)。
 - (a) With 4,500 mg/L D-glucose (high glucose)。
 - (b) With L-glutamine。
 - (c) Without sodium pyruvate。
 - (2) Fetal bovine serum (FBS)：以 56°C heat inactivate 後開封，以 15mL 離心管分裝，-20°C 儲存。
 - (3) Pen-strep solution (100X)。
 - (a) With 10,000 units/mL penicillin G。
 - (b) 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 2X pen-strep solution 之 DMEM 組成)。
 - 5.1.3 Trypsin-EDTA。
 - (1) With 0.05% trypsin。
 - (2) With 0.53 mM EDTA in Hanks' balanced salt solution (HBSS) without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺，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-paqueTM PLUS：Amersham Biosciences，17-1440-02，Sweden。
 - 5.1.6 Light diagnostics measles IFA Kit：Chemicon，3187，USA，store at 2-8°C。
 - (1) Measles IFA Ab，5030。
 - (2) Gt X Ms IgG FITC，5008。

行政院衛生署疾病管制局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 179 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- (3) Measles control slide, 5031。
- (4) Mounting fluid, 5013。
- (5) Tween 20/sodium azide, 100X, 5037。
- (6) PBS packet, 5087。

5.1.7 IFA wash solution：將 5.1.6 (6) 試劑溶於 1 L distilled H₂O 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-cm² 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 針頭過濾網。
- 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

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及儲存

行政院衛生署疾病管制局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 180 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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

(1) 全血

(a) 以針筒吸取 3 mL 的 Ficoll-paque 置於 15 mL 離心管下層。

(b) 取 2 mL 血液與 2 mL 的 HBSS 混合後，輕輕的置放於 Ficoll-paque 上層。

(c) 400 xg，室溫下離心 40 min。

(d) 以乾淨吸管小心吸去上層液。

(e) 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。

(f) 加入取出淋巴層細胞三倍體積的 HBSS，輕輕以吸管混合均勻。

(g) 100 xg，室溫下離心 10 min 後移除上清液。

(h) 加入 5 mL HBSS，以吸管輕輕上下混合原沉澱細胞，重複 10.2.1 (7)。

(i) 加入 2 mL Sample pretreat medium 後，接種細胞或暫時置於-80°C 保存。

(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。

(3) 尿液：以 400 xg 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% CO₂ 的培養箱培養。

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

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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

(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。

(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。

(3) 取 10 μ L 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。

(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。

(5) 以 5.1.7 IFA wash solution 清洗玻片後置於乾浴器烘乾。

(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。

(7) 重覆 10.3.6 (5)。

(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 判定標準：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 病毒培養觀察記錄表、附錄 15.4 螢光鑑定記錄表，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

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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，依本局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。

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。

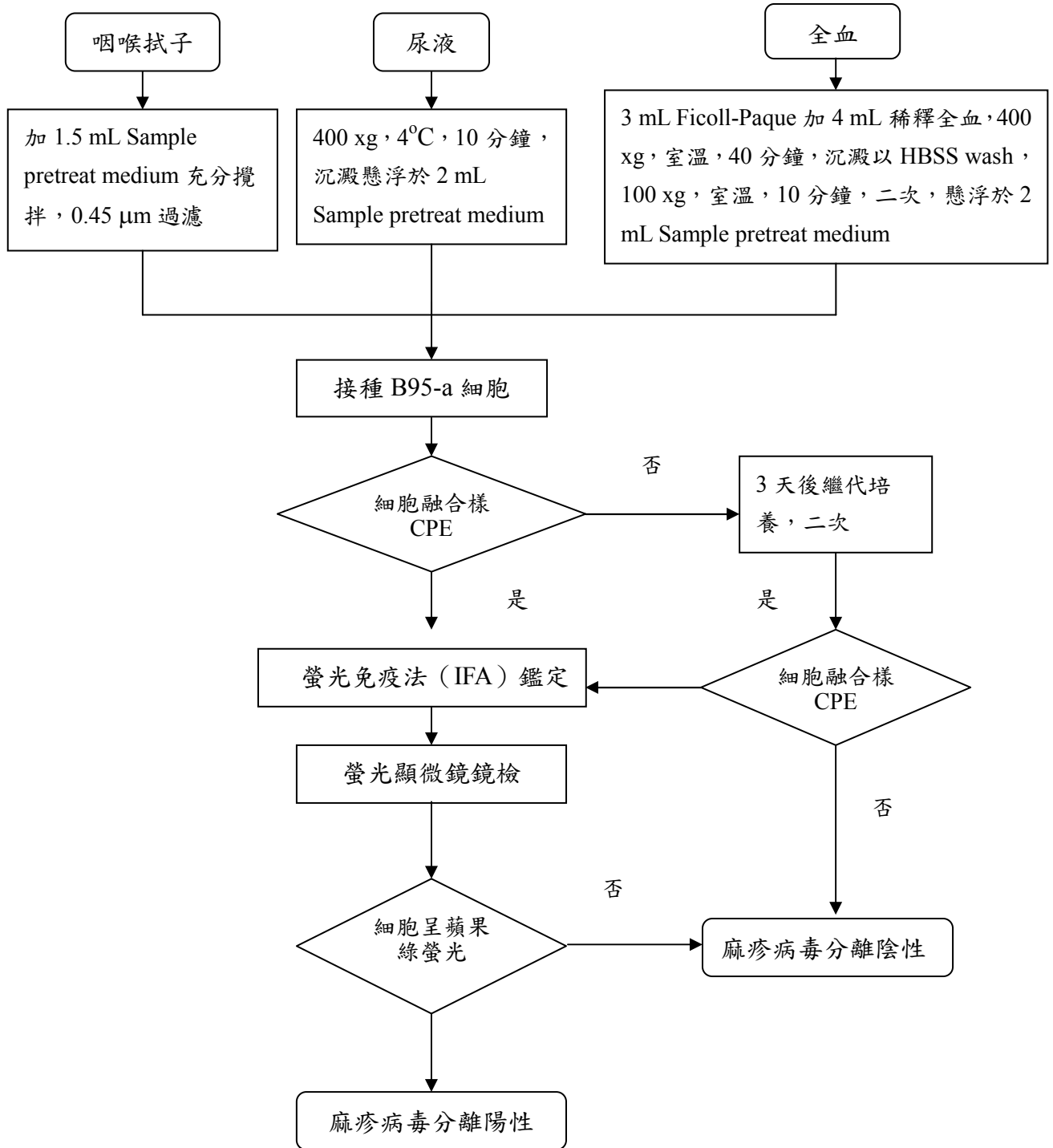
15.4 螢光鑑定紀錄表。

15.5 麻疹病毒檢驗判定總流程圖。


行政院衛生署疾病管制局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 183 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 麻疹病毒分離與鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 184 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 細胞繼代培養紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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：

行政院衛生署疾病管制局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 185 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


附錄 15.3 病毒培養觀察記錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
DATA SHEET FOR TISSUE CULTURE STUDIES (DAILY RECORD)

Sample I.D.	Date: Exp: inoculate							Date: Exp: pass-1							Date: Exp: pass-2							Note	
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7		
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	* contaminate, medium turbid # cell detach	
Cell:	Generation:	Culture:						Generation:	Culture:						Generation:	Culture:							
M. M.:	Inoculum:	Absorption:						M. M.:	Inoculum:	Absorption:						M. M.:	Inoculum:	Absorption:					

檢驗者：
實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局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 186 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

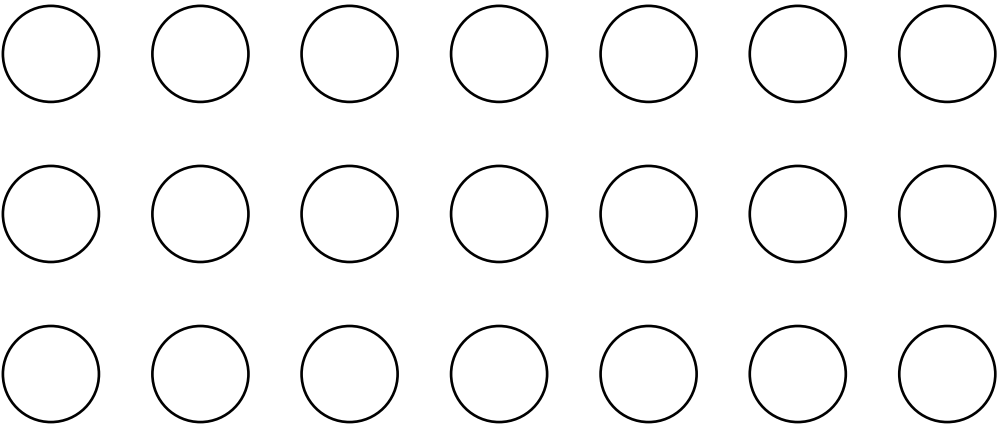
附錄 15.4 螢光鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

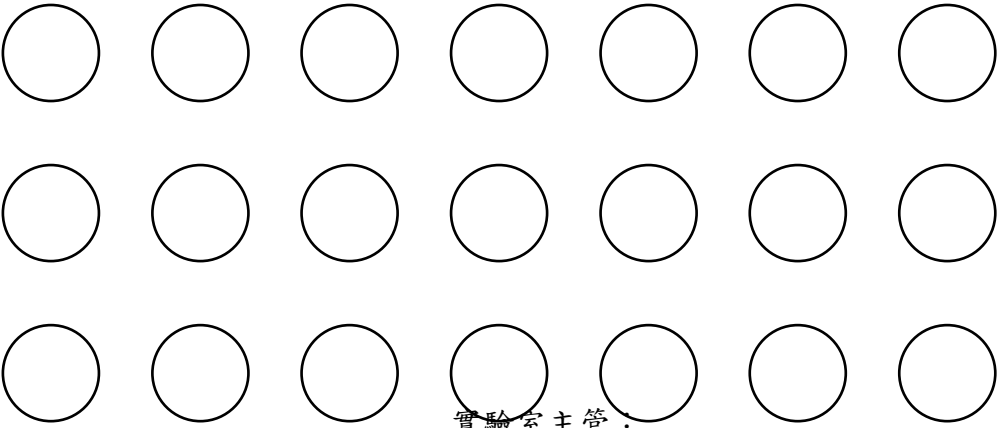
螢光鑑定紀錄表

Date :


頁數：第 頁/共 頁

	
--	--

Date :

	
<p>檢驗者：</p>	<p>實驗室主管：</p>

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒分子生物學核酸檢測 (RT-nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 188 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

以分子生物學的技術利用反轉錄酶－巢式聚合酶鏈反應 (RT-nested PCR) 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血清、咽喉拭子、尿液等。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

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 cDNA，並將擴增放大。

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 PCR kit。

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

5.1.5 陽性對照組 (positive control)：採用已知麻疹陽性個案尿液檢體作對照；陰性對照組 (negative control)：以水作陰性對照。

5.1.6 Agarose。

5.1.7 DEPC 水。

5.1.8 無菌 PCR 反應管。

5.1.9 無菌 2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L Tips。

5.1.10 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.1.11 手套。

5.2 儀器設備

5.2.1 PCR thermal cycler。

5.2.2 電泳槽。

5.2.3 DNA 電泳膠體觀察設備。

5.2.4 2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L Pipetman。


6 環境與設施安全

儘量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。

7 檢體採集與檢體前處理

7.1 檢體採集參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒分子生物學核酸檢測 (RT-nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 189 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

7.2 檢體前處理

7.2.1 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。

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

7.2.2.1 檢體的採集量並無嚴格限制。

7.2.2.2 檢體的運送：4°C。

7.2.2.3 採集後之檢體，以 3,000 rpm 離心 10 min，以分離出的血清備用。

7.2.3 咽喉拭子檢體

7.2.3.1 棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。

7.2.3.2 分裝標示號碼，取 140 µL，其餘保存於-80°C。

7.2.4 尿液檢體：

7.2.4.1 採集後之檢體，以 1,500 rpm 離心 10 min。

7.2.4.2 將沉澱物與 1-2 mL 含 2x 抗生素的 DMEM 混合均勻後，取 140 µL，其餘保存於-80°C。

8 檢體運送及保存

檢體運送以低溫快速為原則，需使用檢體專用運送箱，運送箱內需維持低溫（4°C），檢體若無法即刻送檢則可暫時儲存於 4°C 冰箱中。

9 檢驗步驟

9.1 萃取病毒 RNA（以 Qiagen QIAamp Viral RNA mini kit 為例）。

(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。

(2) 加入純酒精 560 µL 終止反應。

(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。

(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。

(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。

(6) 離心 14,000 rpm，1 min，以徹底去除膜上殘留酒精。


(7) 加入萃取液 (AVE) 50 µL，室溫靜置 1 min，在 4°C 離心 8,000 rpm，1 min，取得 RNA。

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

(1) 試劑添加量

RNase-free H ₂ O	10.85 µL
5X RT-PCR buffer	5.0 µL

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒分子生物學核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 190 頁/共 1091 頁	(RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

Forward primer MV59 (10 μM)	1.0	μL
Reverse primer MV64 (10 μM)	1.0	μL
RT-PCR enzyme mix	1.0	μL
dNTP mix (10 μM)	1.0	μL
RNase inhibitor 40 U/μL	0.15	μL
RNA sample	5.0	μL
		25.0 μL

- (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 (1)
- (3) 使用 PCR thermal cycler。
 - (a) R.T.作用, 50°C 30 min。
 - (b) Taq 活化作用, 95°C 15 min。
 - (c) Denaturation, 94°C 30 sec。
 - (d) Annealing, 51°C 30 sec。
 - (e) Extension, 72°C 60 sec。
 - (f) 重複 (c) 至 (e) 步驟 35 Cycle。
 - (g) Final extension, 72°C 5 min。


9.3 巢式聚合酶鏈反應 (nested PCR) (以 Qiagen HotStarTaq PCR Kit 為例)。

(1) 試劑添加量

RNase-free H ₂ O	20.0	μL
2X master mix	25.0	μL
Forward primer MV60 (10 μM)	1.0	μL
Reverse primer MV63 (10 μM)	1.0	μL
1 st PCR product	3.0	μL
		50.0 μL

- (2) 取 3 μL 9.2 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 RT-PCR 試劑試劑添加量如 (1)。
- (3) 使用 PCR thermal cycler。
 - (a) Taq 活化作用, 95°C 15 min。
 - (b) Denaturation, 94°C 30 sec。
 - (c) Annealing, 63°C 30 sec。
 - (d) Extension, 72°C 60 sec。
 - (e) 重複 (b) 至 (d) 步驟 30 cycle。
 - (f) Final extension, 72°C 5 min。
- (4) 膠片電泳分析
 - (a) 置備 1.5% 洋菜膠：1.5 g Agarose 溶於 100 mL (1X) TBE buffer。
 - (b) 選擇 100 bp DNA size marker：5 μL (2 ng/μL)。
 - (c) 取二次產物 5 μL，各加入 1 μL 6X Loading dye。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒分子生物學核酸檢測 (RT-nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 191 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(d) 進行電泳分離：100V，25 min。

(e) 膠片染色：1 μ L/mL SYBR safe DNA gel stain 染色 10-15 min。

(f) 使用 UV light 觀察，並照相紀錄。

9.4 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。

9.5 結果判定

RT-PCR 產物各取 5 μ 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 580 bp，若出現上述 RT-PCR 產物，檢驗結果為陽性。

10 注意事項

10.1 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。

10.2 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。

10.3 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。

11 參考文獻

11.1 WHO. 2007. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, 2nd edition, WHO/IVB/07.01.


11.2 Cheng WY, Lee L, Rota PA, Yang DC. 2009. Molecular evolution of measles viruses circulated in Taiwan 1992-2008. Virol J 6: 219.

12 附錄

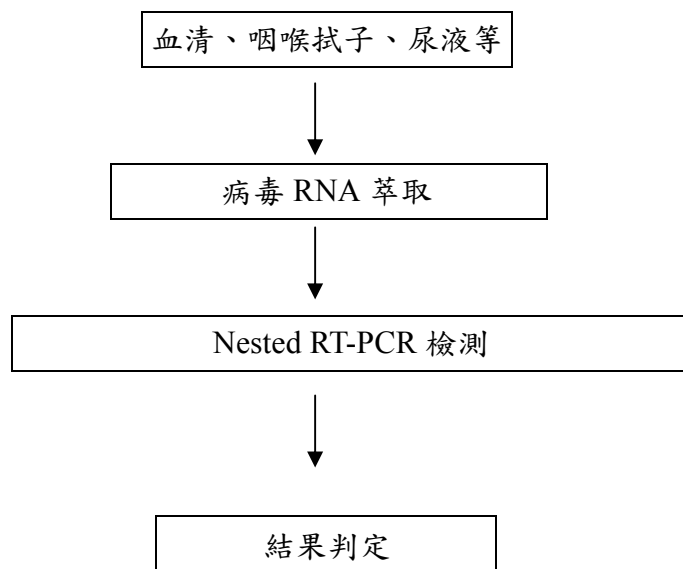
12.1 麻疹病毒鑑定流程圖。

12.2 麻疹病毒診斷用引子組序列表。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒分子生物學核酸檢測 (RT-nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 192 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 12.1 麻疹病毒鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	麻疹病毒分子生物學核酸檢測 (RT-nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 193 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 12.2 麻疹病毒診斷用引子組序列表

一、First round RT-PCR primer

MV59 :5'-GATATGTGACATTGATACATATAT-3'

MV64 :5'-TATAACAATGATGGAGGGTAG-3'


二、Second round nested-PCR primer

MV60:

5'-GCTATGCCATGGGAGTAGGAGTGG-3'

MV63: 5'-GGCCTCTCGCACCTAGTCTAG-3'

行政院衛生署疾病管制局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 194 頁/共 1091 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。再利用吸覆有麻疹病毒抗原的微量盤與待測血清中具有的麻疹專一性 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」。

- (1) Anti-measles virus/IgM test plate : 2 x 6 Strips。
- (2) Anti-measles virus reference P/P : 0.65 mL。
- (3) Anti-measles virus reference P/N : 0.45 mL。
- (4) Sample buffer POD : 2 x 50 mL。
- (5) Anti-human IgM/POD conjugate (μ -chain specific) : 1 mL。
- (6) Conjugate buffer microbiol : 4 x 12.5 mL。
- (7) RF absorbent : 4 x for 5 mL。
- (8) Polyethylene bag for storing unused test strip。
- (9) Barcode table of value。

5.1.2 「Supplementary reagents for enzygnost/TMB : Dade Behring, OUV 17, Germany, 4°C 儲存」。

- (1) Washing solution POD : 3 x 100 mL。
- (2) Colour solution blue for enzygnost : 1 x 12.5 mL。
- (3) Buffer/substrate TMB : 4 x 30 mL。
- (4) Chromogen TMB : 4 x 3 mL。
- (5) Stopping solution POD : 2 x 100 mL。
- (6) Adhesive foils for microtiter plates : 24 pcs。

行政院衛生署疾病管制局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 195 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(7) Empty bottle for the working Chromogen solution : 1 pcs. °

(8) Instruction for use : 1 pcs. °

5.2 耗材

5.2.1 tips : 200 μ L、1,000 μ 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 μ L、200 μ L、1,000 μ L °

6.2 八爪 Pipetman : 200 μ L °

6.3 電動分注器 : 50 μ L-1,000 μ 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 環境與設施安全

於生物安全第一等級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作 °

8 檢體採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版 °

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf> °

9 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版 °

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf> °

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 °

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 °

行政院衛生署疾病管制局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 196 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 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 μ 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 μ L Working Chromogen solution。
- 10.3.8 室溫，避光，培養 30 min。
- 10.3.9 每個孔加入 100 μ 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 判定標準


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 IgM 陽性，麻疹 IgM 陰性，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 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”，並在背面蓋職章，相關檢驗記錄及檢體送陳核實驗室主管審核，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 Qualitative evaluation： $\Delta A_{\text{Reference P/P}} \geq 0.2$ 。
- 12.2 Quantitative evaluation：

行政院衛生署疾病管制局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 197 頁/共 1091 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

Reference P/P, at start of series	ΔA	0.474
With margins ?		yes
Reference P/P, at end of series	ΔA	0.388
With margins ?		yes
Mean value	ΔA	0.431
Reference P/P, nominal value	ΔA	0.518
Correction factor 0.518:0.431	=	1.2
Corrected ΔA <small>待測血清</small>	= 1.2 x ΔA <small>待測血清</small>	

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，依本局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。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		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

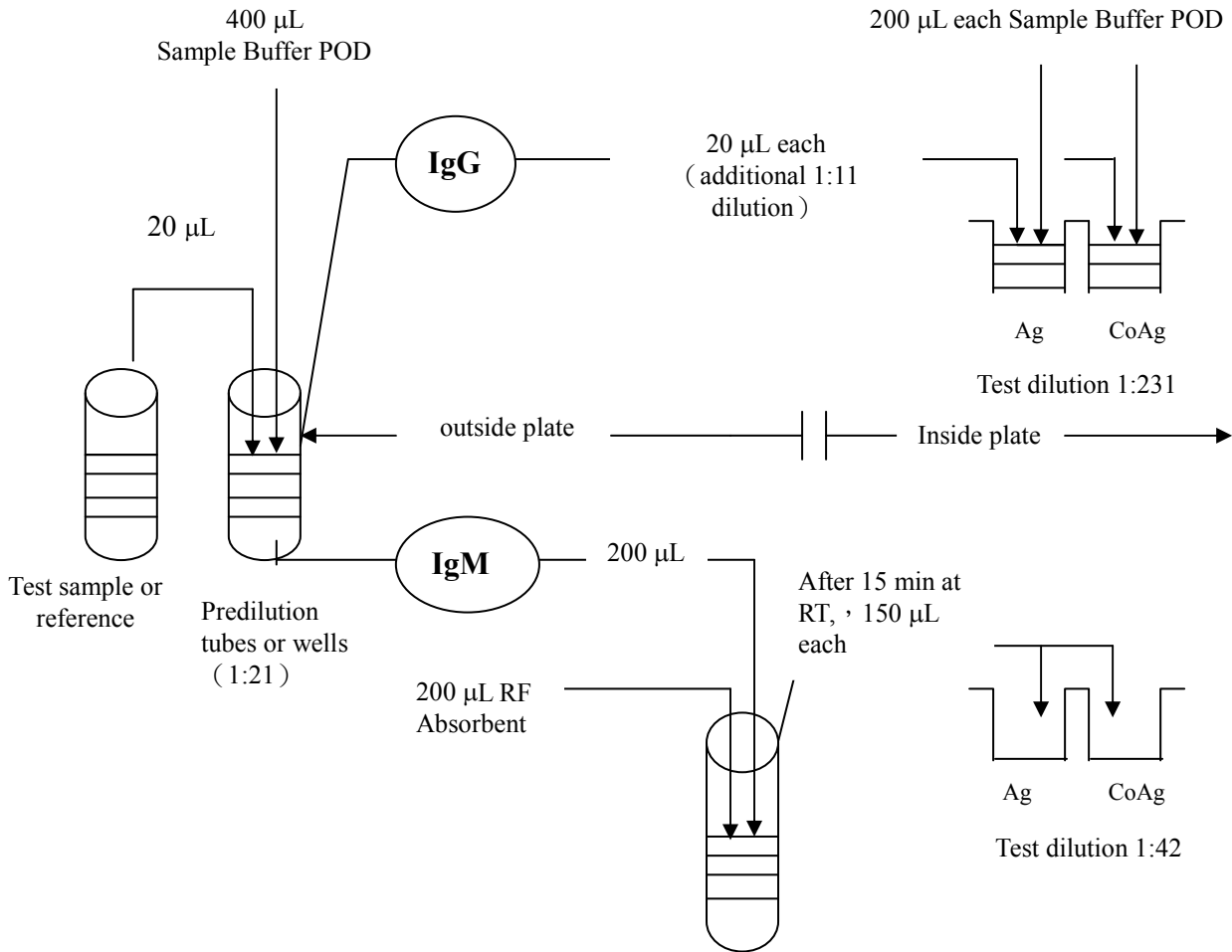
Reference P/P

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

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

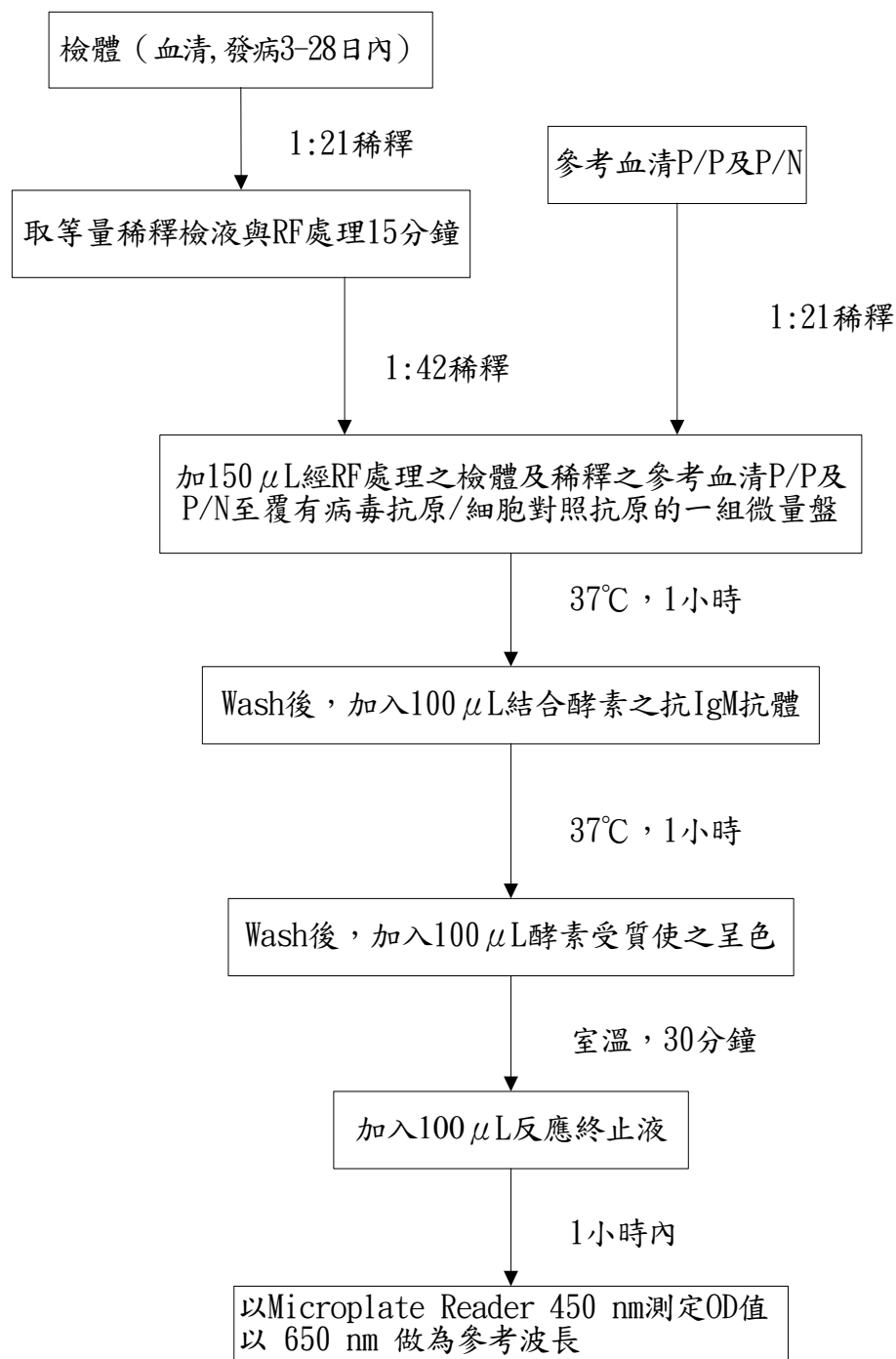
附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖




行政院衛生署疾病管制局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 200 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 麻疹 ELISA 實驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

麻疹ELISA實驗紀錄表

Date :


Name	Measles IgM					Measles IgG				
	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	Result	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	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 ≥ 0.2 2. P/P within lower and upper margin 3. Individual P/P within $\pm 20\%$ 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 ≥ 0.5 2. P/N within lower and upper margin 3. Individual P/N within $\pm 20\%$ 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	

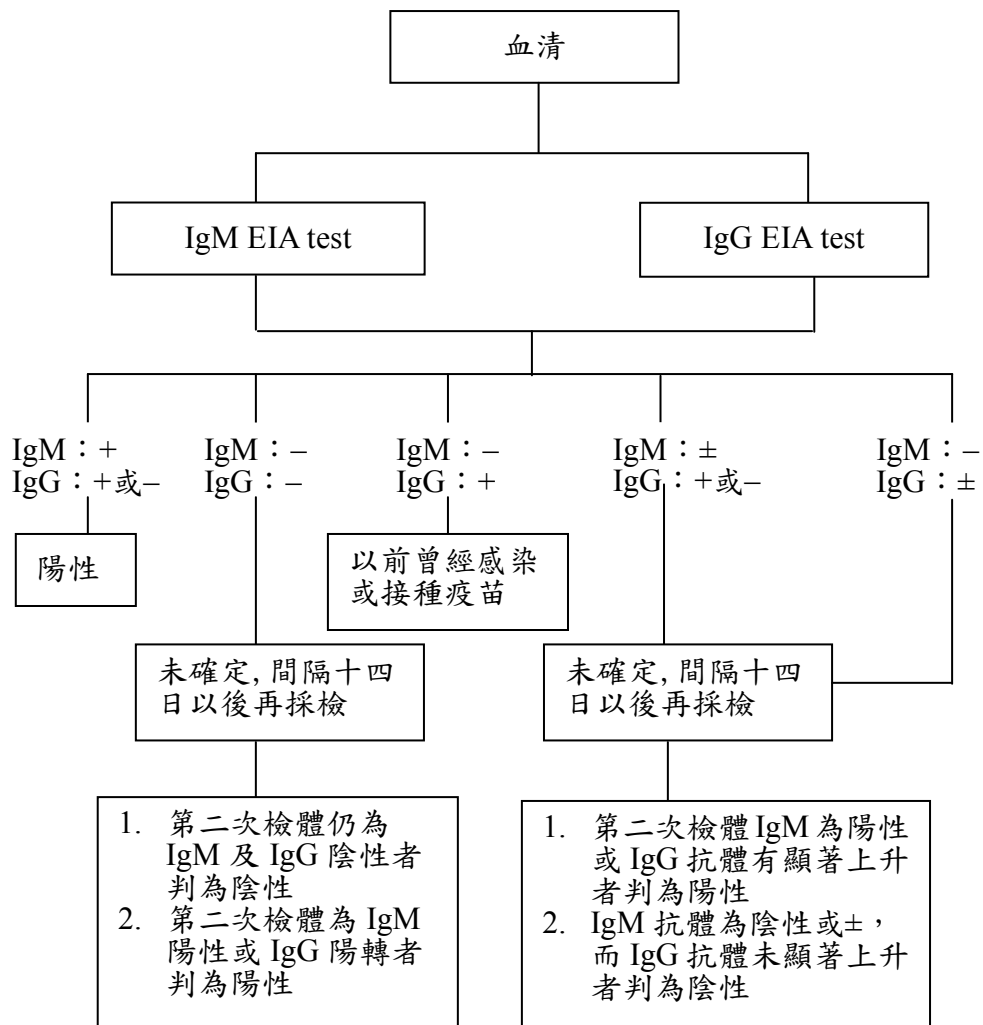
檢驗者：

實驗室主管：


行政院衛生署疾病管制局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 202 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局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 203 頁/共 1091 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-measles-virus/IgG : Dade Behring, OWLN 15, Germany, 4°C 儲存」。

(1) Anti-measles virus/IgG test plate : 2 x 6 strips。

(2) Anti-measles virus Reference P/N : 0.4 mL。

(3) Sample buffer POD : 2 x 50 mL。

(4) Anti-human IgG/POD conjugate : 1 mL。

(5) Conjugate buffer microbiol : 4 x 12.5 mL。

(6) Polyethylene bag for storing unused test strip。

(7) Barcode table of value。

5.1.2 「Supplementary reagents for enzygnost/TMB : Dade Behring, OUVF 17, Germany, 4°C 儲存」。

(1) Washing solution POD : 3 x 100 mL。

(2) Colour solution blue for enzygnost : 1 x 12.5 mL。

(3) Buffer/substrate TMB : 4 x 30 mL。

(4) Chromogen TMB : 4 x 3 mL。

(5) Stopping solution POD : 2 x 100 mL。

(6) Adhesive foils for microtiter plates : 24 pcs.。


(7) Empty bottle for the working Chromogen solution : 1 pcs.。

(8) Instruction for use : 1 pcs.。

5.2 耗材

5.2.1 tips : 200 μ L、1,000 μ L。

行政院衛生署疾病管制局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 204 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 μ L、200 μ L、1,000 μ L。
- 6.2 八爪 Pipetman：200 μ L。
- 6.3 電動分注器：50 μ L-1,000 μ 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 環境與設施安全

於生物安全第一等級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作。

8 檢體採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。


9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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。
 - 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。

行政院衛生署疾病管制局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 205 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 啓動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.4 每個細胞格加入 100 μ L Working conjugate solution。
- 10.3.5 置放 37°C 溫箱培養 60 min。
- 10.3.6 啓動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.7 每個孔加入 100 μ L Working Chromogen solution。
- 10.3.8 室溫，避光，培養 30 min。
- 10.3.9 每個孔加入 100 μ 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 判定標準


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 15.2 麻疹 ELISA 實驗記錄表，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陳核實驗室主管審核，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 Quantitative evaluation： $\Delta A_{\text{Reference P/N}} \geq 0.5$ 。
- 12.2 Quantitative evaluation。
 - 12.2.1 Lower margin $\leq \Delta A_{\text{Reference P/N}} \leq$ upper margin
 - 12.2.2 任一 $\Delta A_{\text{Reference P/N}}$ 介於 Reference P/N 平均值 $\pm 20\%$ 。
- 12.3 Measurement correction：利用 Reference P/N 來校正實驗值，改善結果的再現性。

行政院衛生署疾病管制局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 206 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

計算範例

Reference P/N , at start of series	ΔA	1.374
With margins ?		yes
Reference P/N , at end of series	ΔA	1.188
With margins ?		yes
Mean value	ΔA	1.281
Reference P/P,nominal value	ΔA	1.024
Correction factor 1.024:1.281	=	0.8
Corrected ΔA 待測血清	=0.8 x ΔA 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，依本局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.

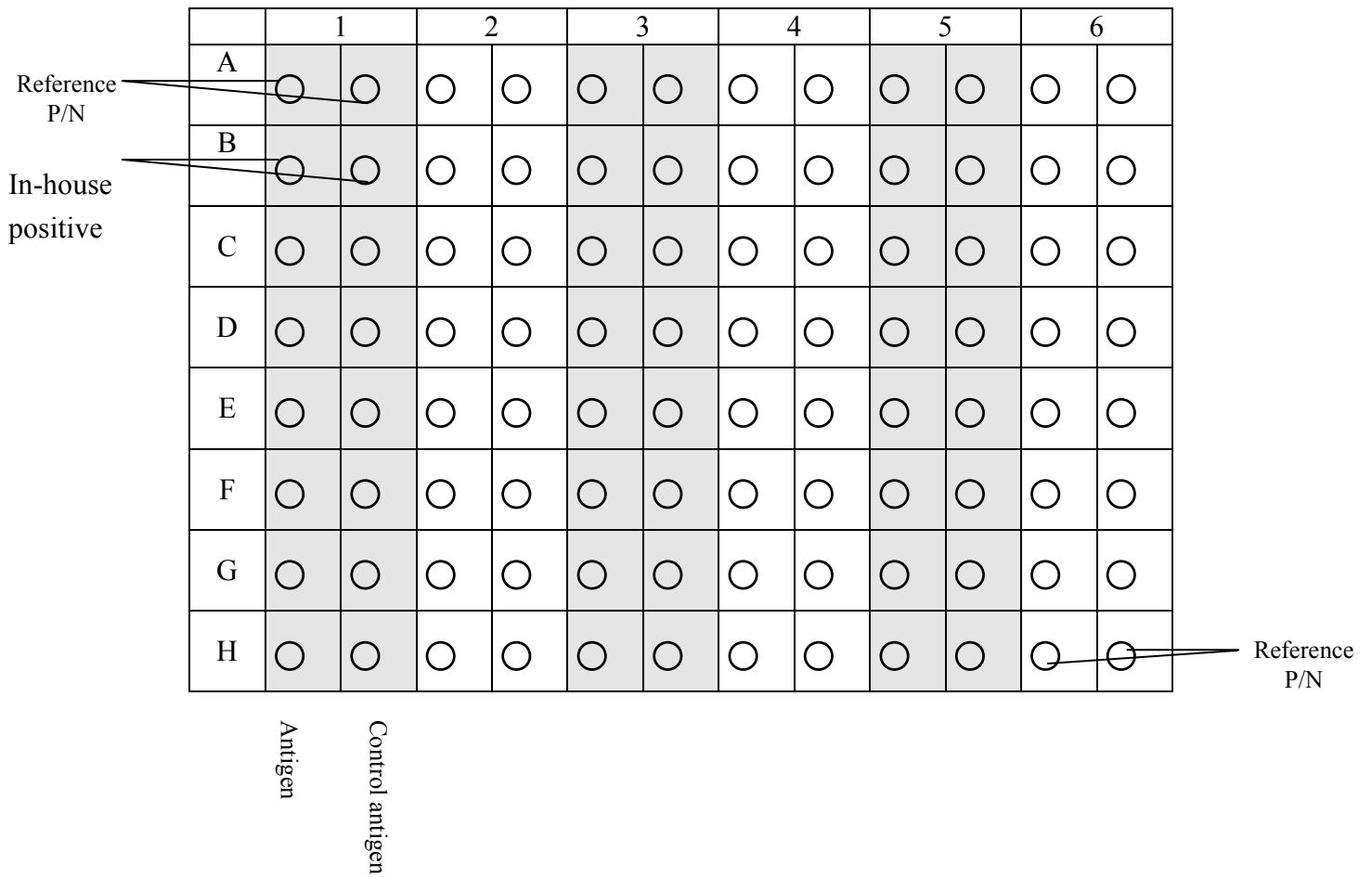
15 附錄

- 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。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 檢體排列位置圖

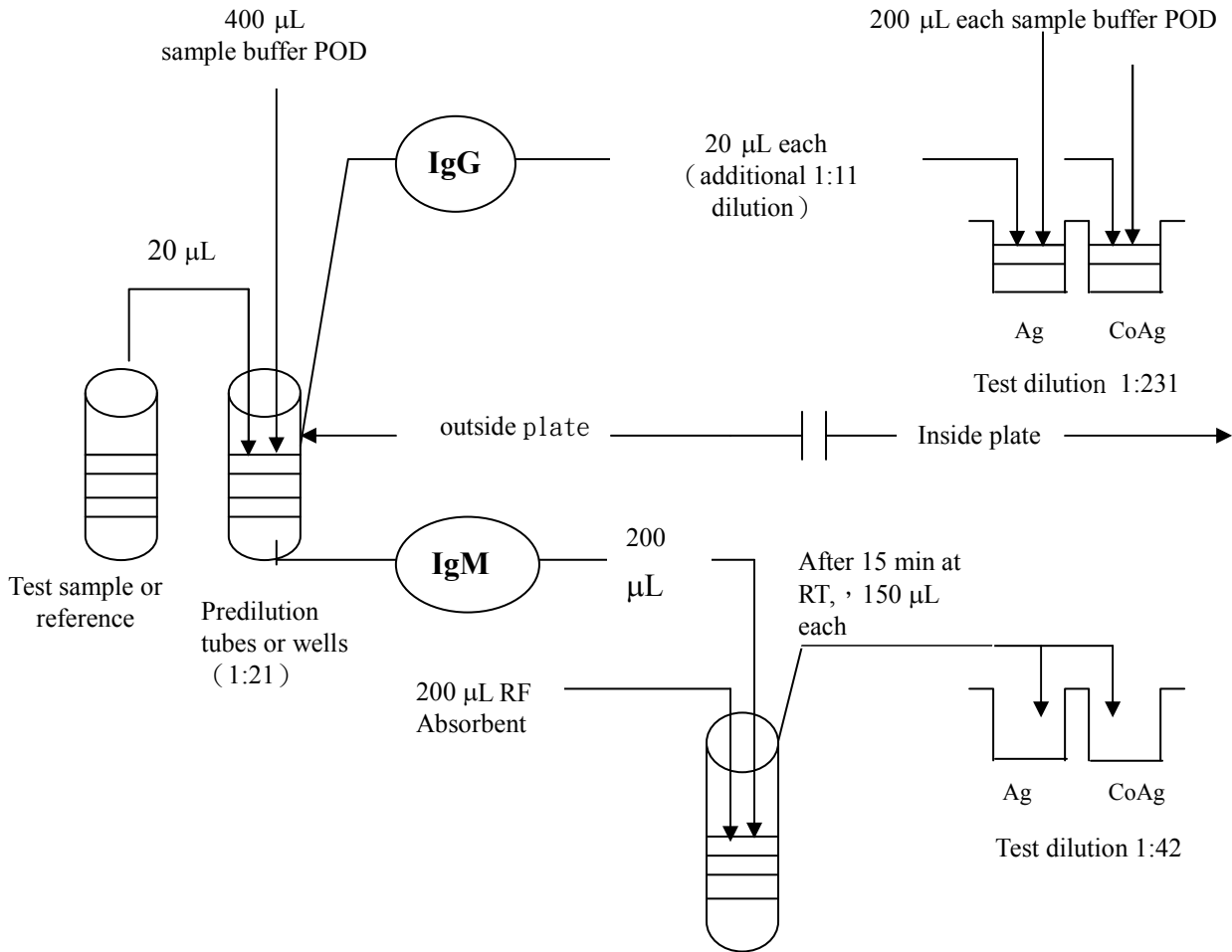


1. 從 C1 開始置放待測檢體。
2. Reference P/P 除 A1 位置固定外，另一 Reference P/P 位置視檢體量而定，在最後一個試劑條 H 對應位置。


行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

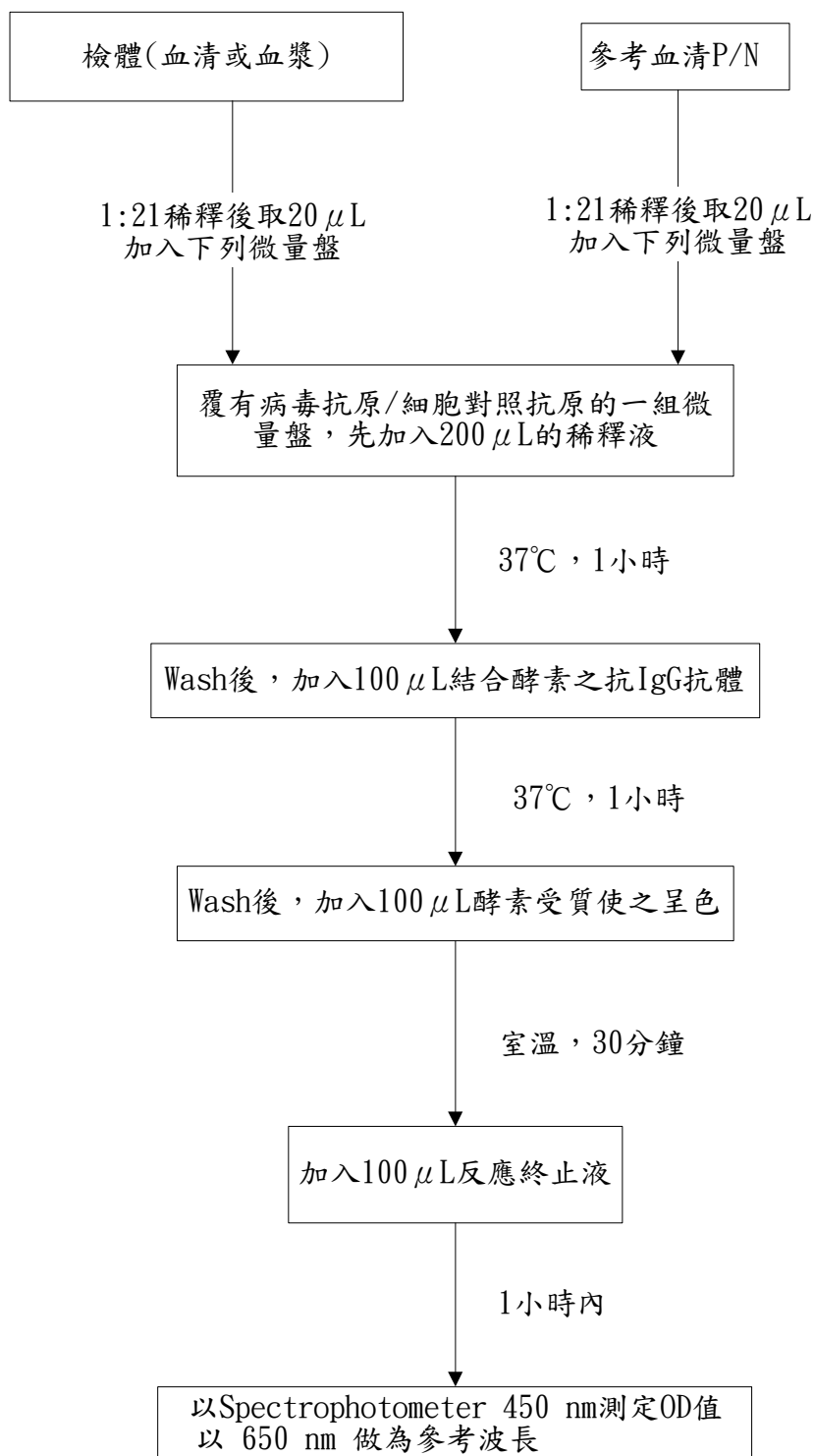
附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖




行政院衛生署疾病管制局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 209 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

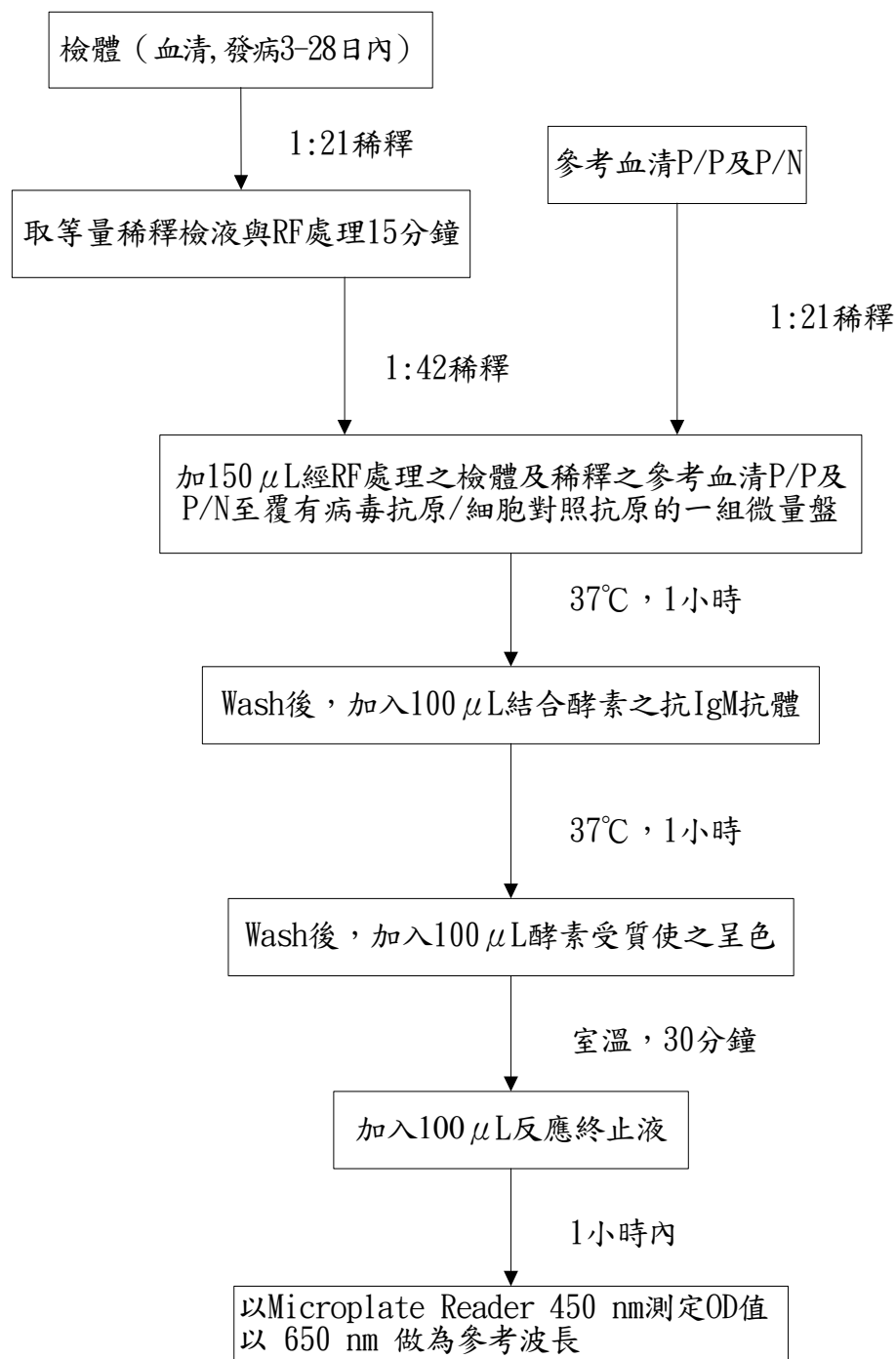
附錄 15.3 麻疹病毒 IgG 抗體試驗（間接酵素免疫分析法）流程圖




行政院衛生署疾病管制局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 210 頁/共 1091 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(續)



行政院衛生署疾病管制局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 211 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 麻疹 ELISA 實驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

麻疹ELISA實驗紀錄表

Date :


Name	Measles IgM					Measles IgG				
	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	Result	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	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 ≥ 0.2 2. P/P within lower and upper margin 3. Individual P/P within $\pm 20\%$ 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 ≥ 0.5 2. P/N within lower and upper margin 3. Individual P/N within $\pm 20\%$ 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	

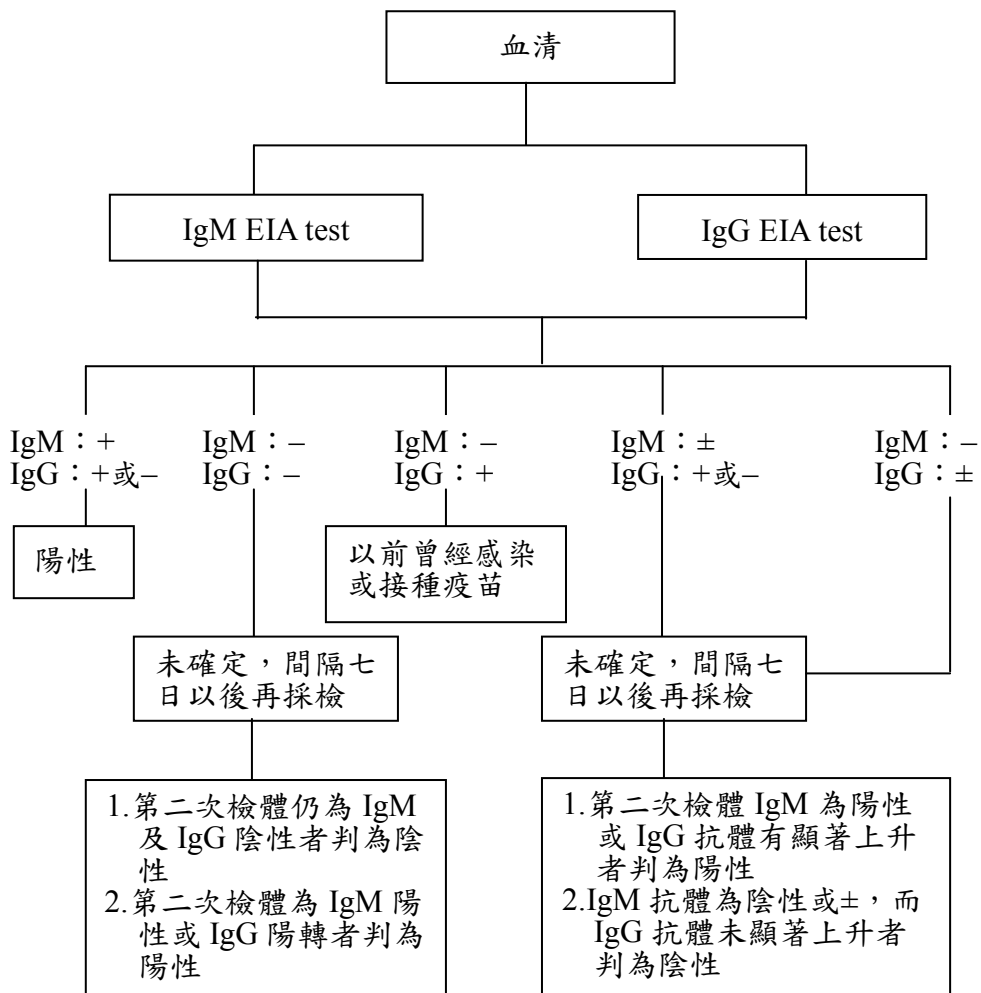
檢驗者：

實驗室主管：


行政院衛生署疾病管制局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 1091 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



行政院衛生署疾病管制局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 213 頁/共 1091 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。

行政院衛生署疾病管制局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 214 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 5.1.5 ARCHITECT i 啟動溶液 (Trigger Solution)：含 0.35M 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)。
- 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 μ L、200 μ L、100 μ 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 μ L、200 μ L、100 μ L。
- 6.4 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。
- 6.5 4°C 冰箱。
- 6.6 -20°C 冷凍櫃。
- 6.7 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

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

行政院衛生署疾病管制局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 215 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

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 xg 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 μ L，每多一次測試增加檢體 20 μ L，將樣本杯依序放置於檢體架上。

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 HAVAB-M 項目，按 Add order。

10.3.2 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。

10.3.3 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 HAVAB-M。

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

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，HAV 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

行政院衛生署疾病管制局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 216 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

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 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

11.2 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。

$S/CO = \text{樣本 RLU} / \text{臨界值 RLU}$

例如：若樣本 RLU=2161 且臨界值 RLU=512.25

則 $S/CO = 2161/512.25 = 4.22$

11.3 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。

11.4 結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。

11.5 報告核發：IgM-anti-HAV (陽性)、IgM-anti-HAV (陰性)。


11.6 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，由本局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。

11.7 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。

11.8 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

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

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) ≤ 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。

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，依本局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。

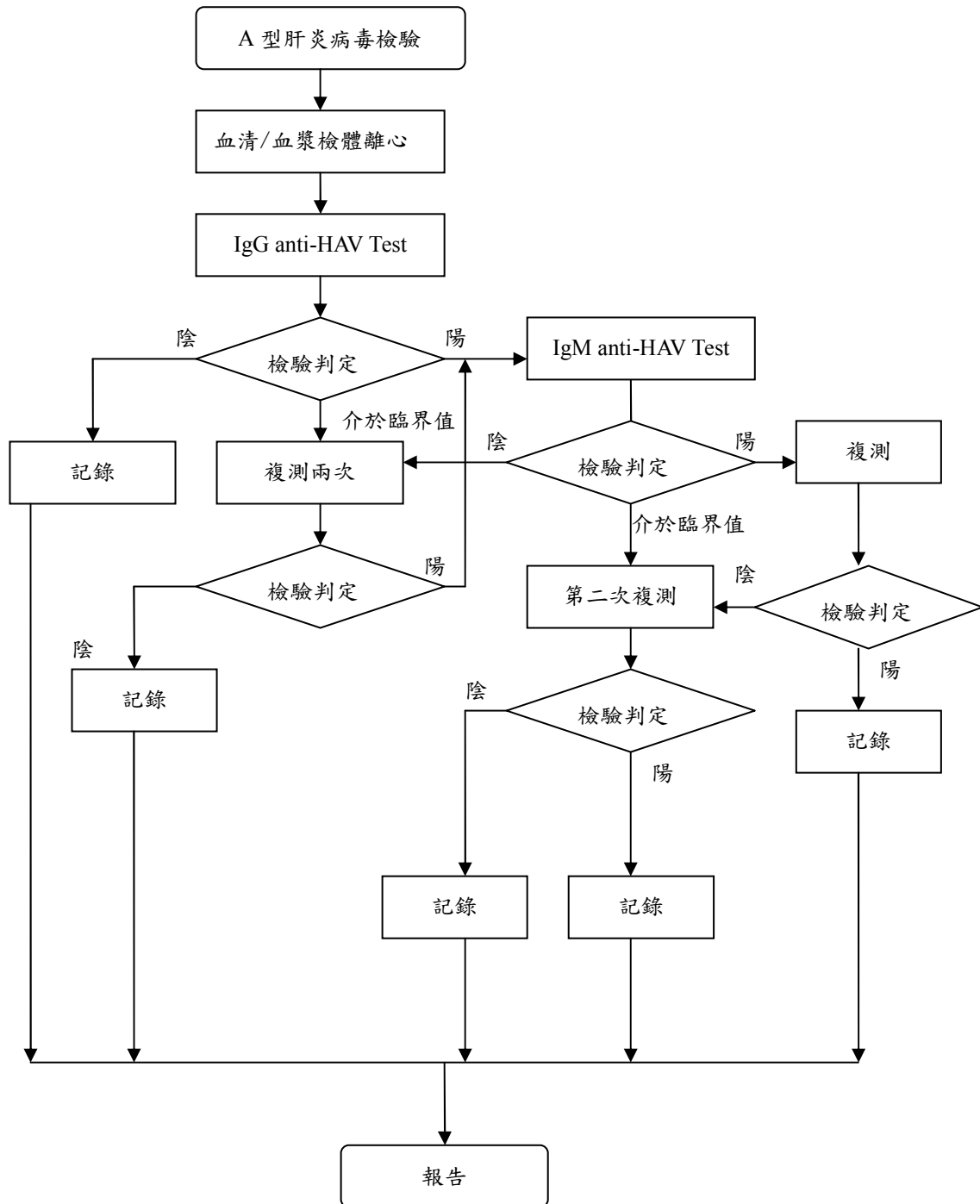
15 附錄

- 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。


行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

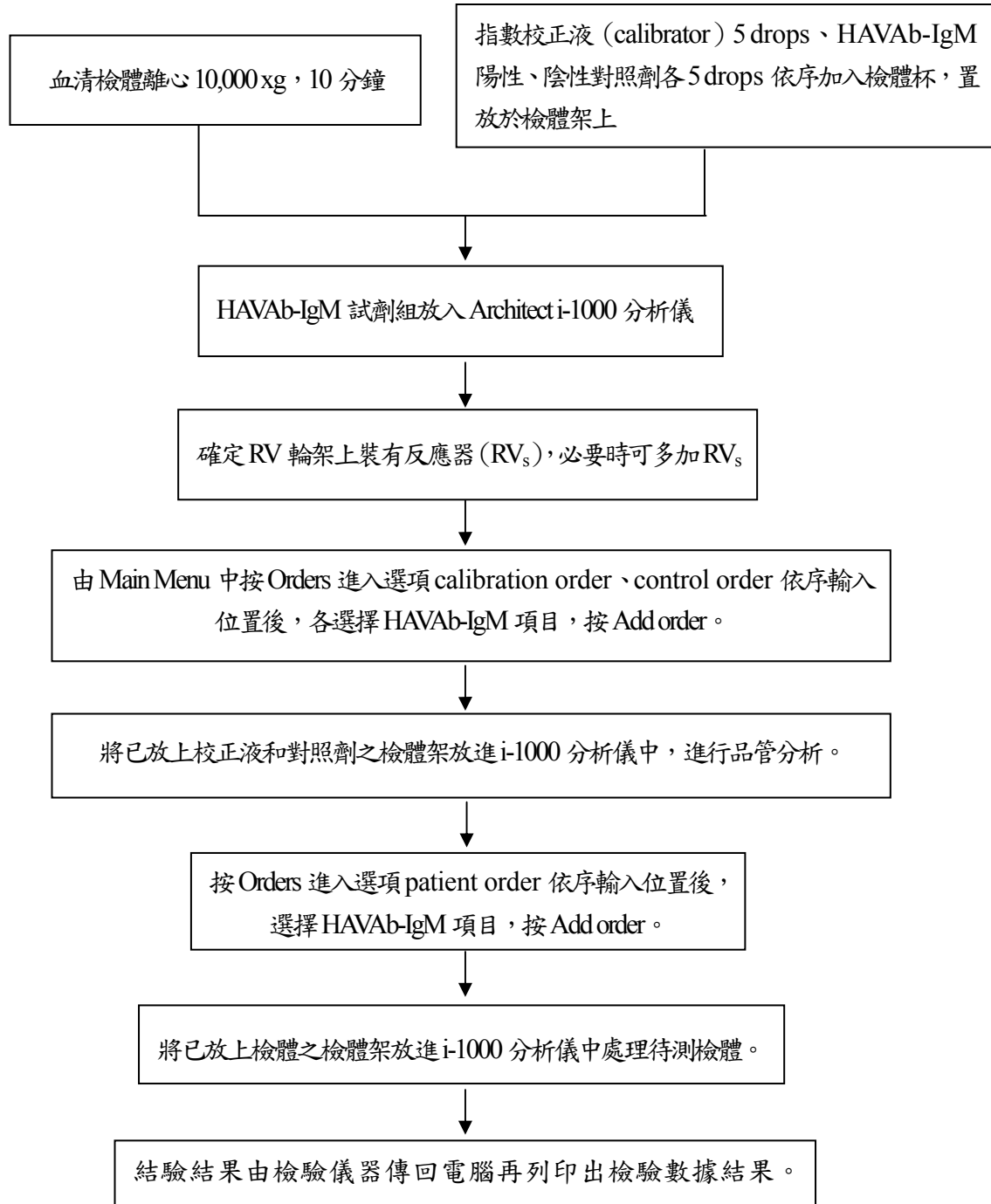
附錄 15.1 急性 A 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖




行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	A 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 220 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

1. 目的

定性測試人類血清或血漿中之 A 型肝炎病毒 IgG 抗體 (IgG anti-HAV)。

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 IgG 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，配合可調整式分析過程(亦即 Chemiflex®)，定性測試人體血清及血漿中之 IgG anti-HAV。在第一步驟中，樣本、分析稀釋液和覆被 A 型肝炎病毒(人類)之磁性微粒混合，存於樣本中的 IgG anti-HAV 會與覆被 A 型肝炎病毒(人類)之微粒結合。經清洗後，IgG anti-HAV 會與在第二步驟加入的標幟 acridinium 之抗人類 IgG 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 IgG 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 IgG anti-HAV 存在與否，經由比較反應之化學冷光訊號及由 ARCHITECT HAVAb-IgG 校正液測得之臨界值來判定。

5. 試劑耗材

5.1 檢驗試劑

- 5.1.1 ARCHITECT HAVAb-IgG 試劑組(No.6C29):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)標幟 acridinium 之抗人類 IgG(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：抗菌劑。
- 5.1.3 1 或 4 瓶(10.0 mL)HAVAb-IgG 分析稀釋液含蛋白質穩定劑(山羊)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 0.35M 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-IgG calibrator 校正液 (No. 6C29-01)。
- 5.1.8 ARCHITECT i HAVAb-IgG control 對照劑 (No. 6C29-10)。
- 5.1.9 ARCHITECT i probe conditioning solution 探針清洗液。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	A 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 221 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

5.1.10 漂白水。

5.2 耗材

5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ 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 第二級生物安全櫃 (Class II BSC)。

6.3 微量吸管 (pipettes)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ L。

6.4 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。

6.5 4°C 冰箱。

6.6 -20°C 冷凍櫃。

6.7 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

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9. 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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：

10.2.3 待測檢體 (血清、血漿) 需先震盪混合均勻並以 10,000 xg 離心 10 分鐘去除雜質，取其上清液。


10.2.4 第一次測試最小樣本杯檢體體積為 150 μ L，每多一次測試增加檢體 25 μ L，將樣本杯依序放置於檢體架上。

10.3 檢驗步驟

10.2.1 由 Main Menu 中按 Orders 進入選項 calibration order、control order 依序輸入位置後，各選擇 HAVAB-G 項目，按 Add order。

10.2.2 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	A 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 222 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 10.2.3 點選 Orders 後再點選 Patient order。
- 10.2.4 輸入 Carrier 號碼。
- 10.2.5 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)
- 10.2.6 點取測試項目 HAVAB-G。
- 10.2.7 點取 F3 Add order。
- 10.2.8 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

10.3.1 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。

10.3.2 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。

10.5 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 計算結果原理

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 × 0.29

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 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。

11.2 生物參考區間


以分析檢體 S/CO 值 < 1.000, 視為 IgG anti-HAV 無反應性 (陰性)。

以分析檢體 S/CO 值 > 1.000, 視為 IgG anti-HAV 有反應性 (陽性)。

11.3 報告核發

IgG anti-HAV (陽性)、IgG anti-HAV (陰性)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	A 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 223 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

11.4 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，由本局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。

11.5 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。

11.6 臨床意義

IgG anti-HAV 分析可測定人體血清或血漿中是否有 IgG anti-HAV 的存在。若 IgG anti-HAV 存在且 IgM anti-HAV 測試結果為無反應性，則表示過去曾遭 A 型肝炎病毒感染 (HAV) 或接種過 A 型肝炎病毒疫苗。

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-IgG 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) ≤ 0.56

陽性對照劑 (SCO) 1.03-3.53

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，最後再重新以對照劑完成品管檢測作業，然後才進行檢體的測定。

13. 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 分鐘高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。

14. 參考資料


ARCHITECT IgG HAVAb 原廠試劑說明書。

15. 附錄

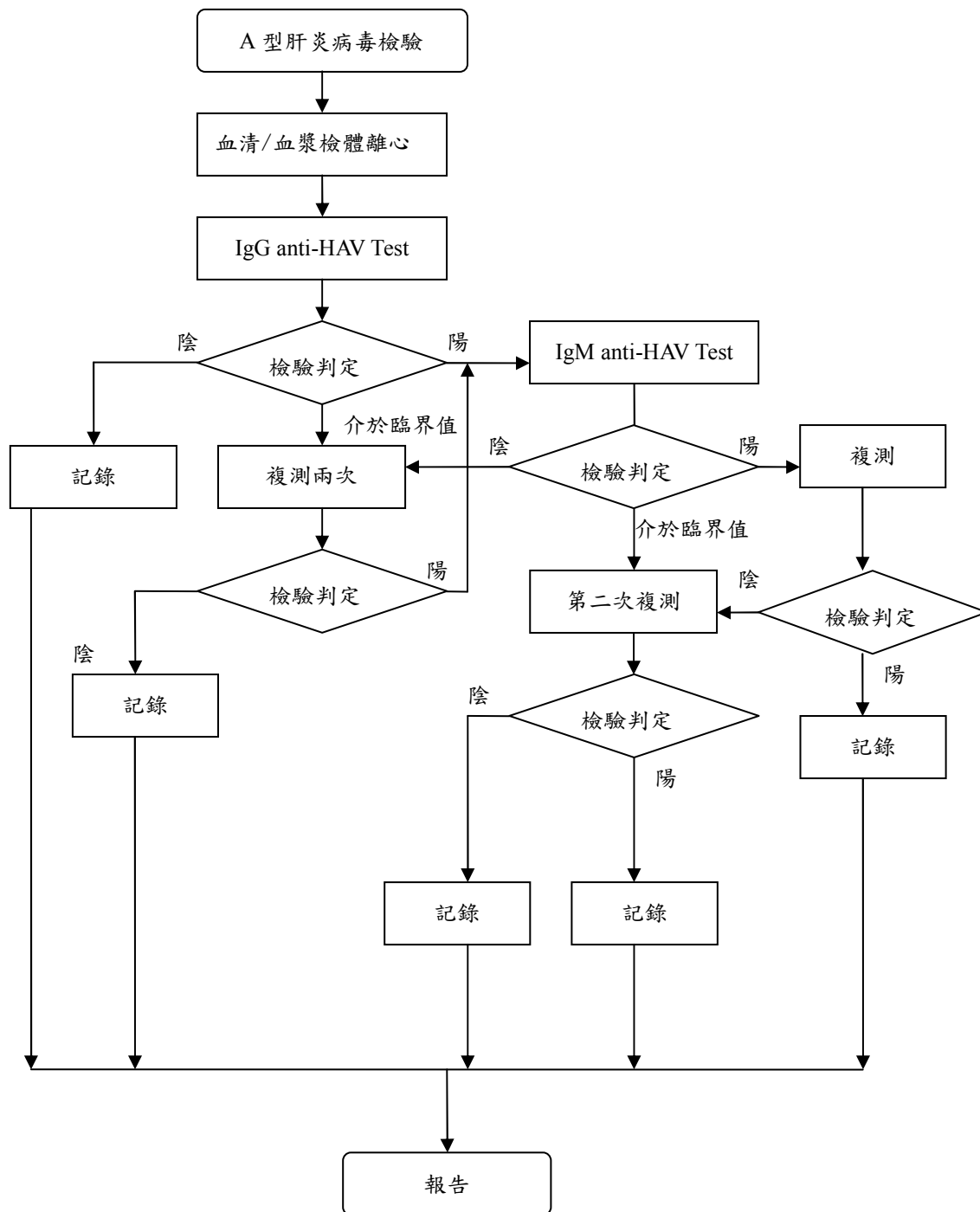
15.1 急性 A 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖。

15.2 A 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗 (化學冷光微粒免疫分析法) 流程圖


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	A 型肝炎病毒 IgG 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 224 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

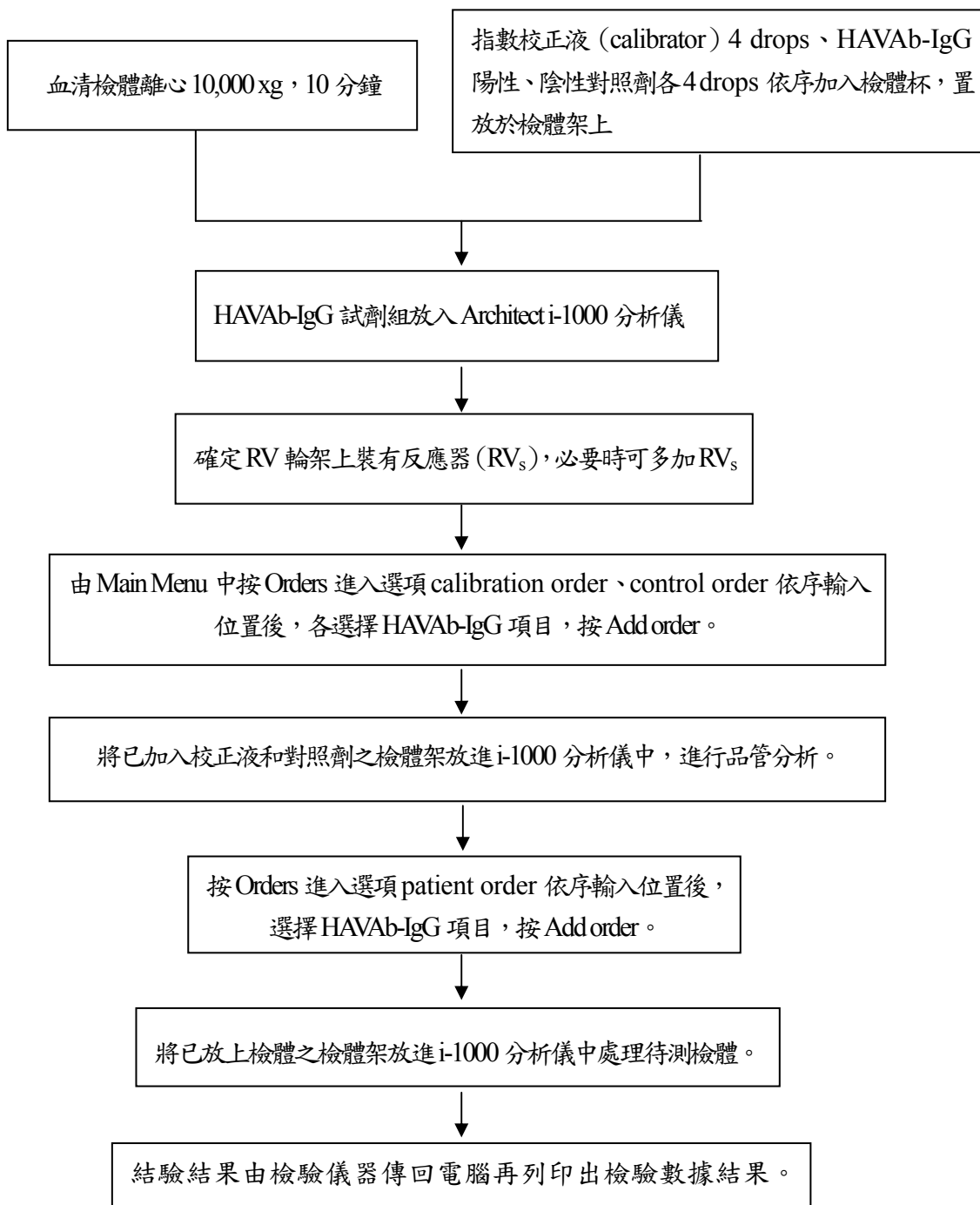
附錄 15.1 急性 A 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖




行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	A 型肝炎病毒 IgG 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 225 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 A 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗 (化學冷光微粒免疫分析法) 流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 226 頁/共 1091 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 適用範圍

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 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 QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, Cat. no. 52906)。

5.1.1 QIAmp spin columns。

5.1.2 2 mL 收集管。

5.1.3 溶解液 (AVL)。

5.1.4 運送 RNA (carrier RNA)。

5.1.5 清洗液 (AW1)。

5.1.6 清洗液 (AW2)。

5.1.7 萃取液 (AVE)。

5.1.8 氣密管。

5.2 Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix, 1-Step kit (Stratagene, Cat. no.600835)。

5.2.1 RT-PCR Master Mix

5.2.1.1 2X Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix:

(a) RT-PCR buffer

(b) SureStarTaq DNA polymerase

(c) dNTP mix (GAUC)

(d) SYBR green I

(e) ROX (passive reference dye)

(f) $MgCl_2$


5.2.1.2 RT/RNase block enzyme mixture

(a) Moloney-based reverse transcriptase

(b) RNase


5.3 陽性對照組 RNA (positive control RNA)。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 5.4 陰性對照組 (negative control RNA) :
 - 5.4.1 DNase, RNase-free H₂O。
 - 5.4.2 過去檢驗過的陰性血清。
 - 5.5 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透去離子可達 18MΩ-CM 以上超純水。
 - 5.6 定量 PCR 專用八連排反應管 (QPCR 8-strip tubes) (Stratagene, USA Cat. no.410022)。
 - 5.7 定量 PCR 專用八連排反應蓋 (QPCR 8-strip caps) (Stratagene, USA Cat. no.410024)。
 - 5.8 無菌過濾型 10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1,000 μL 吸管尖。
 - 5.9 無菌 1.5 mL 微量離心管。
 - 5.10 無粉手套。
- 6 儀器設備
 - 6.1 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC)。
 - 6.2 Mx4000 multiple quantitative PCR system (Stratagene, USA)。
 - 6.3 10 μL、20 μL、40 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL 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°C。
 - 6.7 冷凍櫃：-20°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。
 - 7.2 檢驗操作在生物安全第一等級 (BSL-1) 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 檢驗採集
參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
 - 9 檢體運送及保存
參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
 - 10 試劑之準備
 - 10.1 AVL buffer。
 - 10.1.1 新開封時要加一瓶 carrier RNA，先取 1 mL AVL buffer 至 Carrier RNA tube 中 (紅頭螺旋管)，待完全溶解再 transfer 回 AVL buffer 瓶中，混合均勻。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 228 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.1.2 每次使用時先檢查是否有結晶產生，若有結晶則以 80°C 水浴槽回溫 3-5 min，不可超過 5 min，回溫次數不可超過六次，AVL buffer/carrier RNA 若保存於室溫不可超過二星期。

10.2 AW1 buffer。

10.2.1 新開封時依瓶身指示加入 125 mL 絕對酒精，得到總體積 220 mL，室溫下可保存 1 年。

10.3 AW2 buffer。

10.3.1 新開封時依瓶身指示加入 160 mL 絕對酒精，得到總體積 226 mL，室溫下可保存 1 年。

11 檢驗步驟

11.1 萃取病毒 RNA。

11.1.1 先吸取 560 μ L Lysis buffer (AVL buffer 加 carrier RNA) 放入 1.5 mL 微量離心管，再加入 140 μ L 的血清檢體，震盪混合，室溫靜置反應 10 min。

11.1.2 加入 560 μ L 絕對酒精，震盪混合 1 min，以終止反應。

11.1.3 將上述混合液以抽氣方式通過管柱 (column)，檢體中的 RNA 會吸附在管柱底部的膜上。

11.1.4 加清洗液 (AW1) 850 μ L，抽氣 3 min，做第一次沖洗，以清洗膜上所吸附的雜質。

11.1.5 以清洗液 (AW2) 850 μ L，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。抽氣後再離心 3000 rpm，3 min，以徹底去除膜上殘留酒精。

11.1.6 加入萃取液 (AVE) 75 μ L，室溫靜置 10 min，在 4°C 離心 3000 rpm，3 min，取得 RNA。

11.2 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (one-step real-time RT-PCR)。


11.2.1 取 5 μ L RNA 做模板，加入漢他病毒專一性引子 (參考附錄 16.2)，置於冰上。

11.2.2 加入反應溶液 (成分如下表)，調整反應總體積至 25 μ L。

初始濃度	加入體積	最終濃度
2X Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix	12.5 μ L	1X
Primer A	Variable	如參考附錄 15.2
Primer B	Variable	如參考附錄 15.2
RT/RNase block enzyme mixture	1 μ L	
RNase-free H ₂ O	Variable	

11.2.3 單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (one-step real-time RT-PCR)：使用 Mx4000 quantitative PCR system

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 229 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(Stratagene, USA)。

- (1) R.T.作用：50°C，30 min。
- (2) Taq polymerase activation：95°C，15 min。
- (3) Denaturation：94°C，15 sec。
- (4) Annealing：55°C，30 sec。
- (5) Extension：72°C，20 sec。
- (6) 77°C，30 sec。收集螢光值。
- (7) 重複(3)至(6)步驟45 cycle。

11.2.4 Melting curve analysis：

- (1) 95°C，1 min。
- (2) 68°C → 90°C +1°C/30 sec/cycle。
- (3) 重複(2)步驟45 Cycles。

12 結果判定

- 12.1 以 Mx4000 軟體分析結果，可以從 Amplification plots 與 Tm 值作判斷，結果是陽性或陰性。
- 12.2 在陽性對照與陰性對照組的 Ct 值符合設定值下，凡樣品經漢他病毒專一性引子之 Ct 值小於 40 者，判為漢他病毒陽性。
- 12.3 觀看 Melting curve 時，一般來說，須 Tm 值 > 80°C 的 PCR 產物，才為較具專一性之產物，而 < 75°C 之 PCR 產物，通常為非專一性的產物。

13 品質管制

- 13.1 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。
- 13.2 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。
- 13.3 Mx4000 機器定時作檢測與較正。
- 13.4 Pipetman 做定期的校對。
- 13.5 注意檢測套組的使用期限與適當的儲放溫度。


14 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 min 高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序（編號：G-xx-2006-D）辦理。

15 參考資料

- 15.1 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.
- 15.2 Qiagen, QIAamp viral RNA mini kit handbook. pp.18-19.


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 230 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

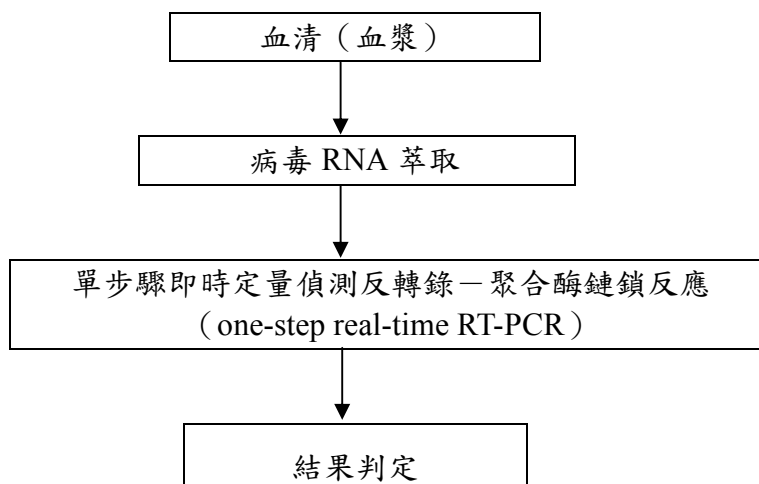
16 附錄

- 16.1 漢他病毒鑑定（單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應）流程圖。
- 16.2 漢他病毒診斷用引子組序列表。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 231 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.1 漢他病毒鑑定(單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應)流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 232 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.2 漢他病毒診斷用引子組序列表

RR Arthur et al., Am. J. Trop. Med. Hyg., 47, 210 (1992)

RT-PCR primer (S segment, N protein)

Hantavirus specific primer :

參與反應的濃度

HTN-S4 +994 GAI IGI TGT CCA CCA ACA TG 300nM


HTN-S6 -1253 AGC TCI GGA TCC ATI TCA TC 300nM

Hantavirus specific primer (M segment)

RH-28 +3257 GAA AAC GAG AAA GTT TAT GAT GA 350nM

RH-30 -3441 TTT TTA TGC TTT CTA AGA GGA CAC A 350nM

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 233 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測漢他病毒 IgM 及 IgG 抗體，可用於漢他病毒出血熱的血清學診斷。

2 適用範圍

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，目的主要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 漢他病毒出血熱酵素免疫吸附分析法檢測套組

廠牌: 【Focus hantavirus Dx Select™ (IgM/IgG) ELISA】。

5.1.1 陽性對照組 (positive control)。

5.1.2 陰性對照組 (negative control)。

5.1.3 Cut-Off calibrator。

5.1.4 檢體稀釋液 (sample diluent)。

5.1.5 清洗液 (10X washing buffer)。

5.1.6 96 孔微量滴定盤 (coating recombinant antigen of hantavirus)。

5.2 GαH IgG/IgM-AP (山羊抗人 IgG/IgM 抗體-鹼性磷酸酶結合體) (Jackson Code 109-056-098/109-056-129)。

5.3 p-nitrophenyl-phosphate (pNPP) (Chemicom ES009 500 mL)。

5.4 丟棄式 250 μL、1,000 μL 吸管尖。

5.5 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.6 手套。

5.7 水質：25°C，RO 逆滲透去離子可達 18M Ω-CM 以上之無菌水 (去離子水)。

5.8 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) (Tecan) (操作方法參見文件編號：CDC-LAB-ISOP-000)。

6.2 恆溫培養箱 (Zeta, zc-4000)。

6.3 免疫酵素分析儀 (ELISA plate spectrophotometer) (Dynex MRX-II) (操作方法參見文件編號：CDC-LAB-ISOP-000)。

6.4 2 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL 微量滴管分注器 (pipettors)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 234 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


(finnpipette)

- 6.5 震盪器。
 - 6.6 冰箱：4°C。
 - 6.7 冷凍櫃：-20°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°C 水浴 30 min，以降低病毒活性。
 - 7.3 檢驗操作在生物安全第一等級 (BSL-1) 實驗室進行。
 - 8 檢驗採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
 - 9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
 - 10 檢驗步驟
 - 10.1 檢體編號登錄。
 - 10.2 取 250 μ L/孔 1X PBS 浸潤 96 孔真空乾燥微量滴定盤 5 min。
 - 10.3 取待測血清 2 μ L 加入檢體稀釋液 (sample diluent) 200 μ L 稀釋 100 倍。
 - 10.4 取 100 μ 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。
 - 10.5 放置於溫度設定為 37°C 的恆溫培養箱中 1 hr，之後清洗 4 次，拍乾。
 - 10.6 取 100 μ 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。
 - 10.7 置於溫度設定為 37°C 的恆溫培養箱中 30 min，之後清洗 4 次，拍乾。
 - 10.8 取 100 μ L/孔 呈色劑 (pNPP) 加入 96 孔微量滴定盤中呈色。
 - 10.9 室溫下搖盪 30 min。
 - 10.10 置微量滴定盤於波長設定為 405/630 nm 的分光儀中讀取吸光度 (OD)。
 - 11 結果判定
 - 11.1 陽性對照組 (positive control) >0.9 ；陰性對照組 (negative control) <0.2 。O.D.值 >0.5 判為陽性。
 - 12 品質管制

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 235 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 min 高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序（編號：G-xx-2006-D）辦理。


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.

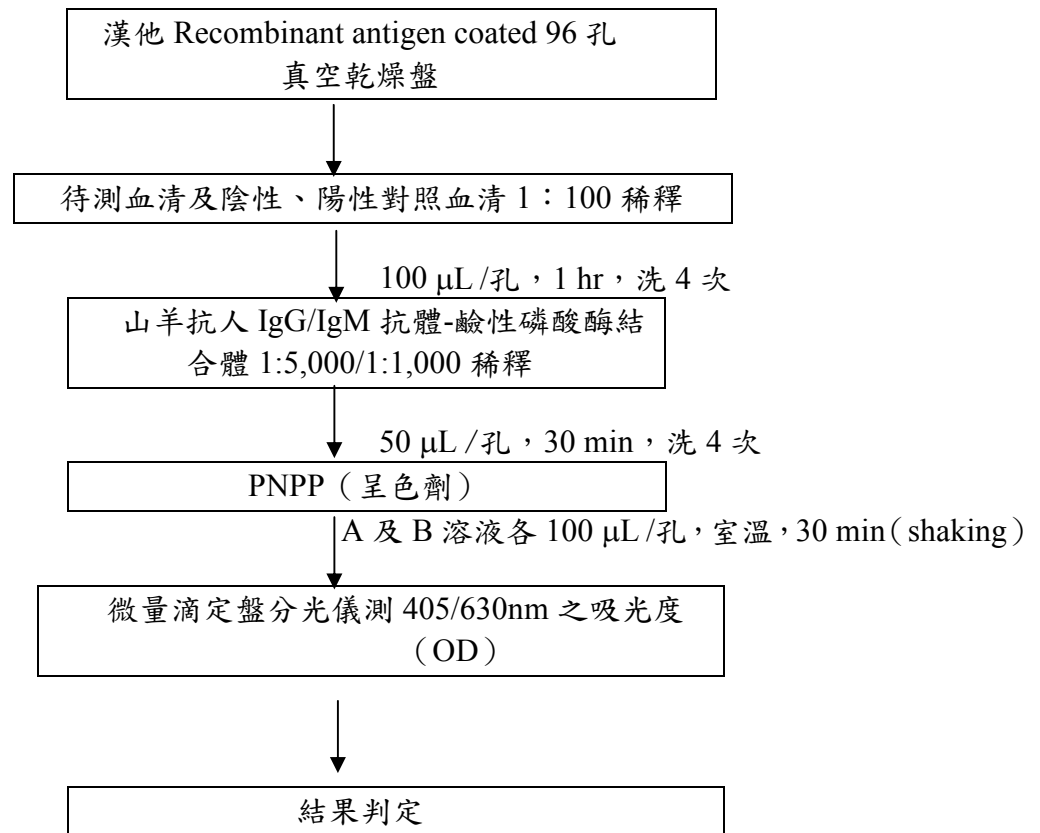
15 附錄

- 15.1 漢他病毒 IgM 及 IgG 抗體試驗（酵素免疫分析法）流程圖。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	漢他病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 236 頁/共 1091 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




行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		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、環境檢體。
- 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)：CMP，臺灣。
 - 5.1.2 CHROMagar：杏友，臺灣。
 - 5.1.3 TSIA (triple sugar iron agar)：CMP，臺灣。
 - 5.1.4 LIA (lysine iron agar)：CMP，臺灣。
 - 5.1.5 SIM (sulfide-indole-mobility medium)：杏友，臺灣。
 - 5.1.6 mEC (modified *Escherichia coli*) broth：杏友，臺灣。
 - 5.1.7 H-semi agar：CMP，臺灣。
 - 5.1.8 BHI broth (brain heart infusion broth)：CMP，臺灣。
 - 5.1.9 TSA (trypticase soy agar)：CMP，臺灣。
 - 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 μ L、200 μ 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。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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

人體糞便、直腸拭子檢體、菌株，參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」，第四版。<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

低溫運送及保存，參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 分離培養

10.1.1 檢體接種：

- (1) 糞便檢體：以棉棒沾取少許糞便塗抹於 SMAC 或 CHROM 培養基。
- (2) 直腸拭子：直接塗抹於 SMAC 或 CHROM 培養基。
- (3) 醫院送驗之菌株：次培養於 SMAC 或 CHROM 培養基。
- (4) 環境檢體：於 mEC broth 43°C 增菌培養 18 hr 後，再以接種環塗抹於 SMAC 或 CHROM 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：

- (1) 三管生化反應：TSIA，A/A、Gas (+ 或 -)、H₂S (-)；LIA，K/K；SIM，Indole (+)，Motility (+ 或 -)，IPA (-) 則為疑似大腸桿菌。
- (2) Oxidase test (氧化酶試驗)：挑選 TSA 培養基上菌落進行試驗。
- (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。
- (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：

- (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 水煮 1 hr 後，經過 900g 20 min 離心後，移去上清液，再加入 0.5 mL 的生理食鹽水製成菌液，作玻片凝集步驟，

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

若有凝集者則為陽性。

- (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)，加入等量無菌生理食鹽水 (0.85%) 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 μ 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 H7 血清型別鑑定。

10.2.3 出血性大腸桿菌之毒素檢測：

依照本局「出血性大腸桿菌之毒素檢測 (乳膠凝集反應法)」檢驗標準方法。

10.2.4 出血性大腸桿菌毒素基因鑑定：

依照本局「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出血性大腸桿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。

12 品質管制


用陽性反應標準菌株 *E.coli* O157:H7 ATCC 35150，陰性反應標準菌株 *E.coli* ATCC 25922，進行試驗。

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，依本局廢棄物處理作業程序處理。


14 參考資料

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

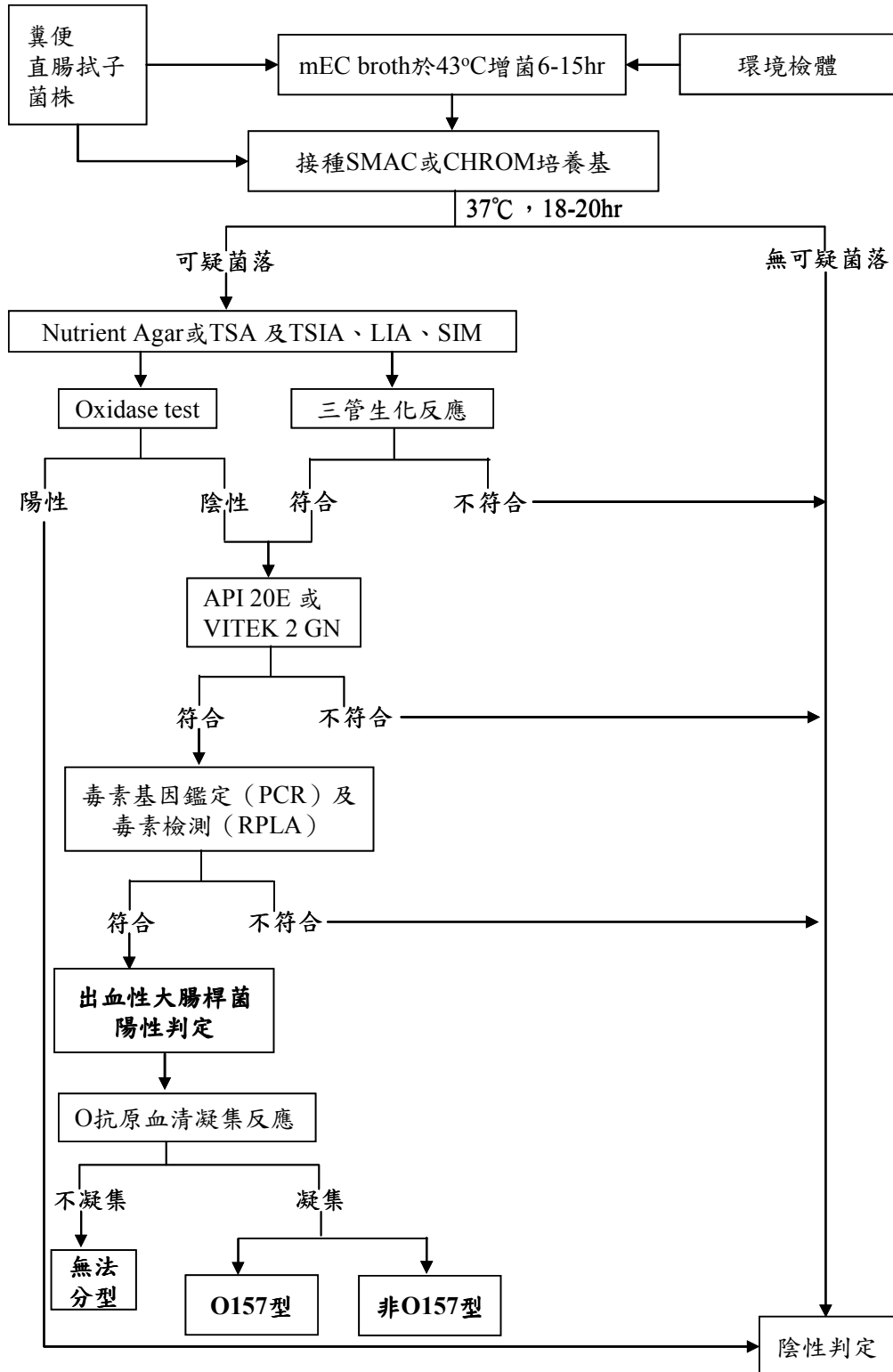
	編號：	出血性大腸桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 240 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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。

行政院衛生署疾病管制局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 241 頁/共 1091 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

行政院衛生署疾病管制局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 242 頁/共 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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 ₂ S -)											
LIA (K/K)											
SIM (Motility+或-、H ₂ 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：


行政院衛生署疾病管制局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 243 頁/共 1091 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 ₂ 及 H ₂ 之能力。	無任何氣泡產生。	多數屬正反應
	H ₂ 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


行政院衛生署疾病管制局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 244 頁/共 1091 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

行政院衛生署疾病管制局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 245 頁/共 1091 頁		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 CAYE medium：CMP，台灣。
 - 5.1.2 TSA (Trypticase soy agar)：CMP，臺灣。
 - 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 μL 、200 μL 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°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 μL 、200 μL 、50 μL 等規格。
- 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
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 10 mL CAYE broth 培養基，置 37°C

行政院衛生署疾病管制局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 246 頁/共 1091 頁	(RPLA)	修訂日期： 年 月 日

下振盪培養 (120-150 轉/min) 16-20 hr。

- 10.2 取 1 mL 培養液至 1.5 mL eppendorf 無菌管，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 μ 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 μ L 稀釋液。
- 10.5 檢體第一孔放 25 μ L 檢體，由第一孔取 25 μ L 檢體至第二孔，使充份混合，移 25 μ 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 μ L 敏感化乳膠 VT1 (sensitized latex VT1)，第二排各孔加入 25 μ L 敏感化乳膠 VT2 (sensitized latex VT2)，第三排各孔加入 25 μ 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 μ L 敏感化乳膠 VT1，第二排各孔加入 25 μ 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出血性大腸桿菌產毒性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

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，依本局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

行政院衛生署疾病管制局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 247 頁/共 1091 頁		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).

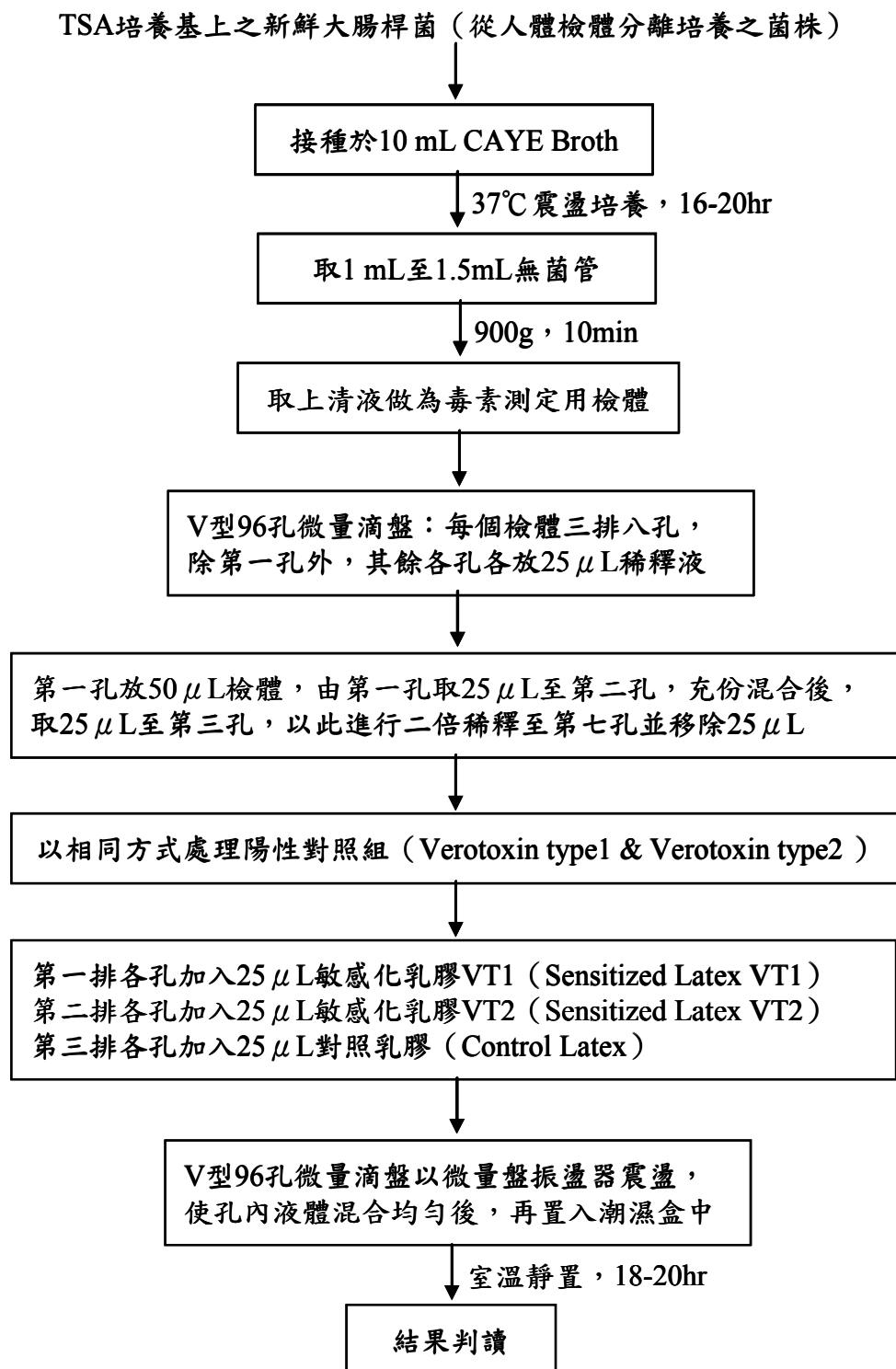
15 附錄

- 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。

行政院衛生署疾病管制局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 248 頁/共 1091 頁	(RPLA)	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



出血性大腸桿菌毒素測定（乳膠凝集試驗RPLA）流程圖

行政院衛生署疾病管制局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 249 頁/共 1091 頁		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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心 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 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
VT1										
VT2										
附註										
綜合結果										
報告日期										

檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局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 250 頁/共 1091 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 12 032 953 001，德國。成分含 Taq DNA polymerase (5 U/μL)、10X 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 10X 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。

行政院衛生署疾病管制局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 251 頁/共 1091 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

- 6.5 水浴槽。
- 6.6 電泳槽。
- 6.7 微量吸管 Pipetman：1,000 μ L、200 μ L、2 μ L 三種規格。
- 6.8 GeneAmp PCR system 9600/9700：Perkin Elmer，USA。

7 環境與設施安全

- 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 μ L 無菌水的 1.5 mL Eppendroff 中，以 100°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 μ L
10X buffer	5 μ L
10 mM dNTP	1 μ L
Each primer (10 μ M)	0.5 μ L
Taq polymerase (5 U/ μ L)	0.4 μ L
無菌水	39.6 μ L
Total volume	50 μ L

10.3 Internal control 反應混和物配製如下：

Component	Volume
DNA template	3 μ L
10X buffer	5 μ L
10 mM dNTP	1 μ L
Each primer (10 μ M)	0.5 μ L

行政院衛生署疾病管制局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 252 頁/共 1091 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

Taq polymerase (5U/μL)	0.4 μL
無菌水	39.6 μL
Total volume	50 μL

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 μg/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 10.3 至 10.5。

10.6.2 試驗陰性對照：Template 以無菌水取代。參照 10.3 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

將檢體之檢驗結果紀錄並加蓋檢驗者，送實驗室主管審核及蓋章。

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，依本局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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	出血性大腸桿菌毒素基因鑑定 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 253 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. J Microbiol Immunol Infect 37: 327-334.

- 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.

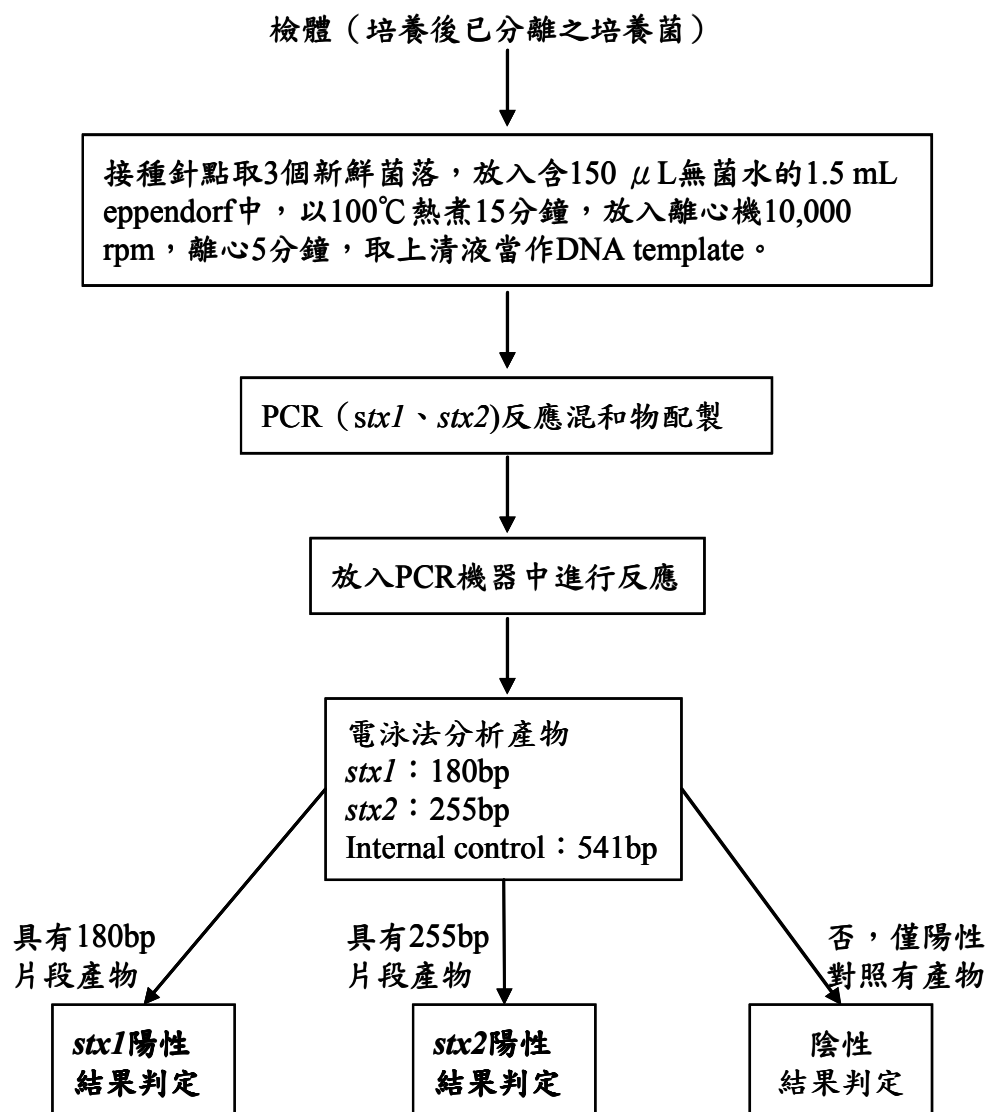
15 附錄

- 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法


	編號：	出血性大腸桿菌毒素基因鑑定 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 254 頁/共 1091 頁		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

行政院衛生署疾病管制局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 255 頁/共 1091 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 1X pen-strep solution 之 DMEM 組成）。
 - (1) Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)。
 - (a) With 4,500 mg/L D-glucose (high glucose)。
 - (b) With L-glutamine。
 - (c) Without sodium pyruvate。
 - (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。
 - (3) Pen-strep solution (100X)。
 - (a) With 10,000 units/mL penicillin G。
 - (b) 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 2X pen-strep solution 之 DMEM 組成)。
 - 5.1.3 Maintain Medium（由含 2% FBS 與 1X pen-strep solution 之 DMEM 組成）。
 - 5.1.4 Trypsin-EDTA。
 - (1) With 0.05% trypsin。
 - (2) With 0.53 mM EDTA in Hanks'balanced salt solution (HBSS) without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺，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-PaqueTM PLUS：Amersham Biosciences，17-1440-02，Sweden。
 - 5.1.7 Rubella, E1, clone EI-20：Chemicon，MAB925，USA，store at 2-8°C。

行政院衛生署疾病管制局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 256 頁/共 1091 頁		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,100X：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 H₂O 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-cm² 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
 - 參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
 - <http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

行政院衛生署疾病管制局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 257 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

9 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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

(1) 全血

(a) 以針筒吸取 3 mL 的 Ficoll-paque 置於 15 mL 離心管下層。

(b) 取 2 mL 血液與 2 mL 的 HBSS 混合後，輕輕的置放於 Ficoll-paque 上層。

(c) 400 xg，室溫下離心 40 min。

(d) 以乾淨吸管小心吸去上層液。

(e) 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。

(f) 加入取出淋巴層細胞三倍體積的 HBSS，輕輕以吸管混合均勻。

(g) 100 xg，室溫下離心 10 min 後移除上清液。

(h) 加入 5 mL HBSS，以吸管輕輕上下混合原沉澱細胞，重複 10.2.3 (7)。

(i) 加入 2 mL Sample pretreat medium 後，接種細胞或暫時置於-80°C 保存。


(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。

(3) 尿液：以 400 xg 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% CO₂ 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% CO₂ 的培養箱培養。

行政院衛生署疾病管制局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 258 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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

(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。

(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。

(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。

(4) 用無菌水以 1:100 稀釋 5.1.7 Rubella, E1, clone EI-20。

(5) 取出風乾後滴一滴 10.3.6 (4) Rubella Ab，將玻片置於 moisture chamber，置於 37°C 恆溫箱 30 min。

(6) 以 5.1.12 IFA wash solution 清洗玻片後置於乾浴器烘乾。

(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。

(8) 重覆 10.3.5 (6)。

(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 判定標準：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 病毒培養觀察記錄表、附錄 15.4 螢光鑑定記錄表，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。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 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，依本局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.

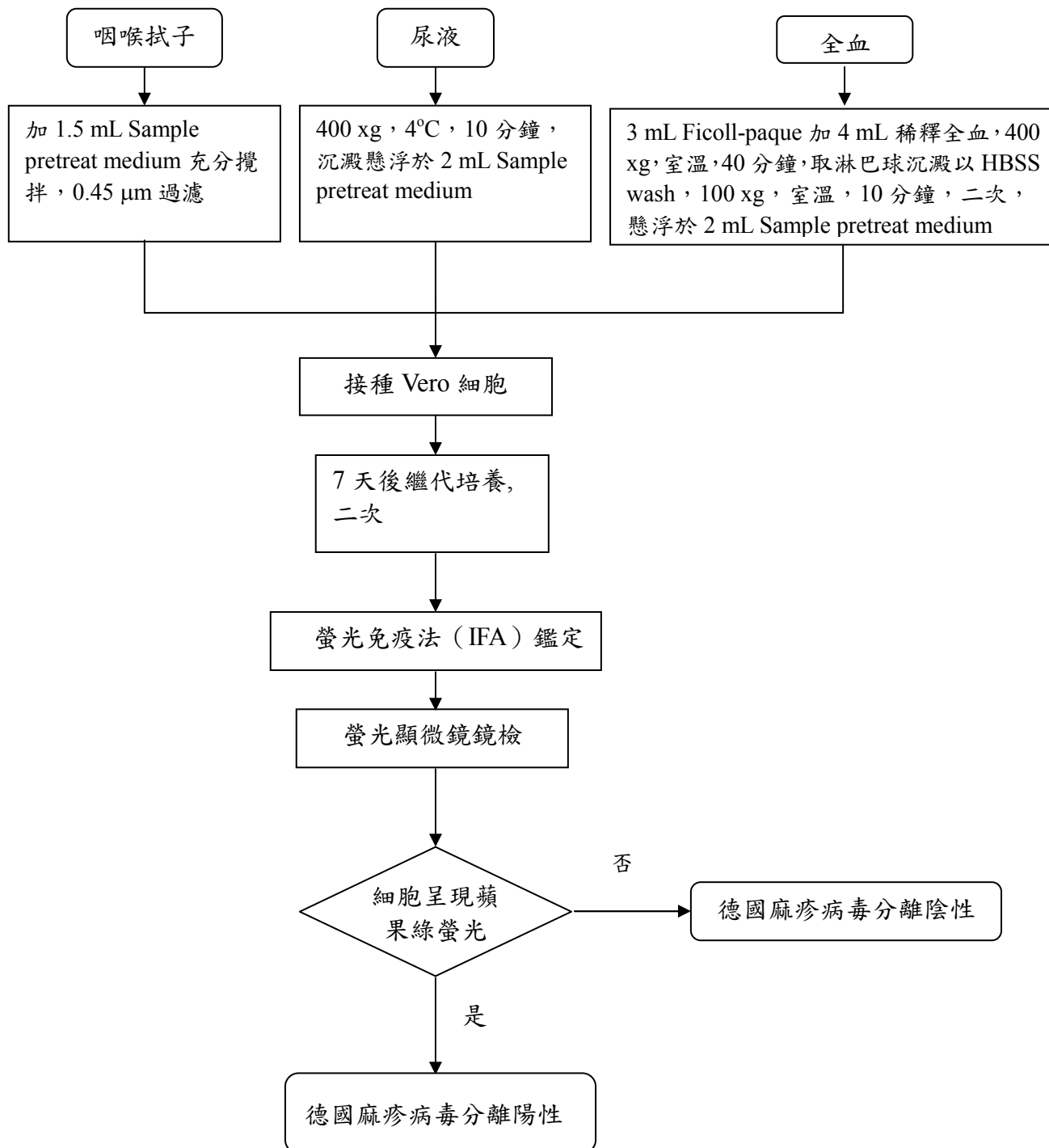
15 附錄

- 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 螢光鑑定記錄表。
- 15.5 德國麻疹病毒檢驗判定總流程圖。


行政院衛生署疾病管制局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 260 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局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 261 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 細胞繼代培養紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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
Transfer	Date/time	Person in charge
Flask no	Container	Medium

檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局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 262 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


附錄 15.3 病毒培養觀察紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
DATA SHEET FOR TISSUE CULTURE STUDIES (DAILY RECORD)

	Date: Exp: inoculate							Date: Exp: pass-1							Date: Exp: pass-2							Note
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	
Sample I.D.	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	* contaminate, medium turbid # cell detach
Cell: Inoculum:	Generation: Absorption:							Generation: Absorption:							Generation: Absorption:							
M. M.:	Culture:							Culture:							Culture:							Culture:
Inoculum:	M. M.:							M. M.:							M. M.:							M. M.:
	Inoculum:							Inoculum:							Inoculum:							Inoculum:

檢驗者： _____ 實驗室主管： _____

行政院衛生署疾病管制局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 263 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 螢光鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心 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"/>

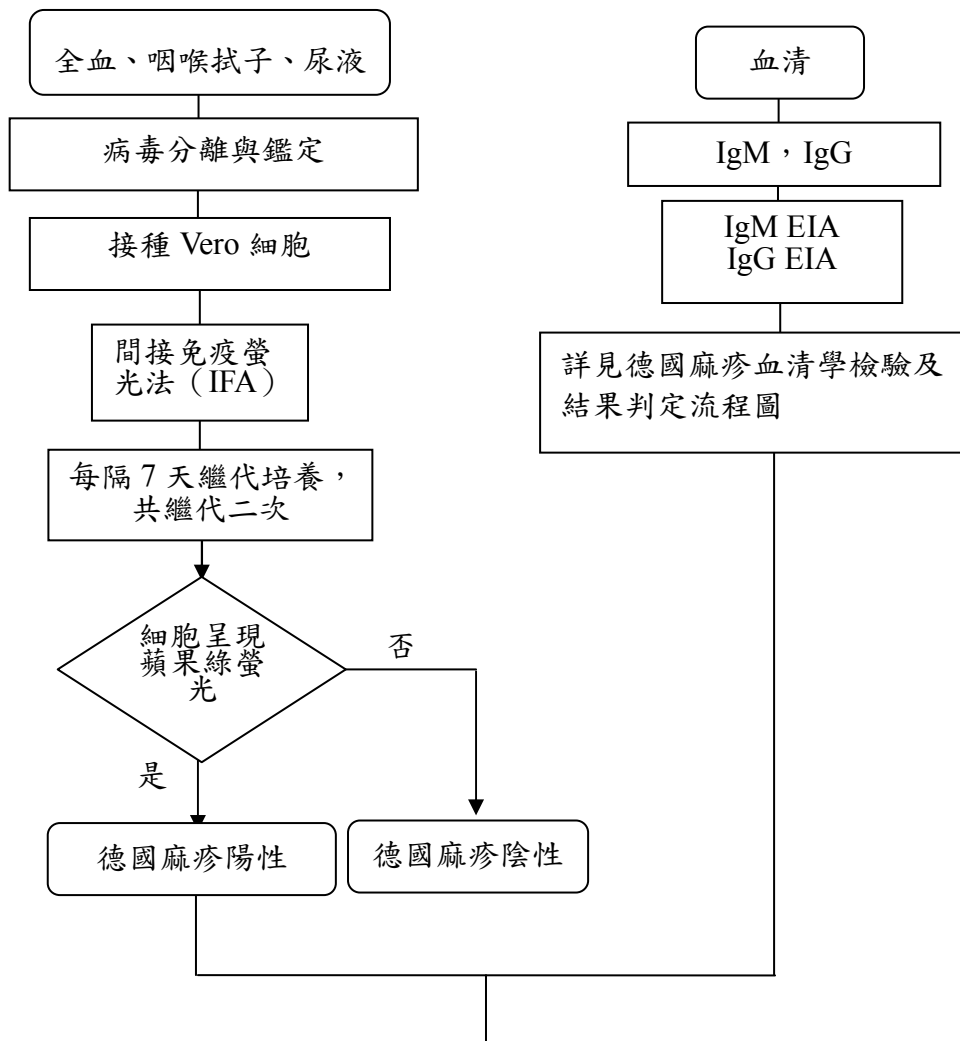
檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局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 264 頁/共 1091 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 265 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

1 目的

以分子生物學的技術利用反轉錄酶－巢式聚合酶鏈反應 (RT-nested PCR) 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：咽喉拭子。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

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德國麻疹病毒 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 cDNA，並將擴增放大。

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 5X Betain。

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。

5.1.6 Agarose。

5.1.7 DEPC 水。

5.1.8 無菌 PCR 反應管。

5.1.9 無菌 2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L Tips。

5.1.10 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.1.11 手套。

5.2 儀器設備

5.2.1 PCR thermal cycler。

5.2.2 電泳槽。

5.2.3 DNA 電泳膠體觀察設備。

5.2.4 2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L Pipetman。


6 環境與設施安全

儘量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。

7 檢體採集與檢體前處理

7.1 檢體採集參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 266 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

7.2 檢體前處理

7.2.1 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。

7.2.2 咽喉拭子檢體

(1) 棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。

(2) 分裝標示號碼，取 140 μ L，其餘保存於-80°C。

8 檢體運送及保存

檢體運送以低溫快速為原則，需使用檢體專用運送箱，運送箱內需維持低溫 (4°C)，檢體若無法即刻送檢則可暫時儲存於 4°C 冰箱中。

9 檢驗步驟

9.1 萃取病毒 RNA (以 Qiagen QIAamp viral RNA mini kit 為例)。

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

(2) 加入純酒精 560 μ L 終止反應。

(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。

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

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

(6) 離心 14,000 rpm，1 min，以徹底去除膜上殘留酒精。

(7) 加入萃取液 (AVE) 50 μ L，室溫靜置 1 min，在 4°C 離心 8,000 rpm，1 min，取得 RNA。

9.2 反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) (以 Promega access quick RT-PCR system 為例)。


(1) 試劑添加量

RNase-free H ₂ O	7.0 μ L
2X master mix	25.0 μ L
Forward primer 1100F (10 μ M)	1.0 μ L
Reverse primer 1100R (10 μ M)	1.0 μ L
AMV RT 5 U/ μ L	1.0 μ L
5X Betain	10.0 μ L
RNA sample	5.0 μ L
	<hr/>
	50.0 μ L

(2) 取 5 μ L 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 (1)。

(3) 使用 PCR thermal cyclor。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 267 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

- (a) R.T.作用, 45°C 45 min。
- (b) Taq 活化作用, 94°C 2 min。
- (c) Denaturation, 94°C 30 sec。
- (d) Annealing, 60°C 30 sec。
- (e) Extension, 68°C 60 sec。
- (f) 重複 (c) 至 (e) 步驟 40 Cycle。
- (g) Final extension, 68°C 5 min。

9.3 巢式聚合酶鏈反應 (nested PCR) (以 Promega access quick RT-PCR system 為例)。

(1) 試劑添加量

RNase-free H ₂ O	10.0 μL
2X 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
1 st PCR product	3.0 μL
50.0 μL	

(2) 取 3 μL 9.2 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 RT-PCR 試劑試劑添加量如(1)

(3) 使用 PCR thermal cycler。

- (a) Taq 活化作用, 94°C 2 min。
- (b) Denaturation, 94°C 30 sec。
- (c) Annealing, 60°C 30 sec。
- (d) Extension, 68°C 60 sec。
- (e) 重複 (b) 至 (d) 步驟 40 Cycle。
- (f) Final extension, 68°C 5 min。


(4) 膠片電泳分析

- (a) 置備 1.5% 洋菜膠：1.5 g Agarose 溶於 100 mL (1X) TBE buffer。
- (b) 選擇 100 bp DNA size Marker：5 μL (2 ng/μL)。
- (c) 取二次產物 5 μL，各加入 1 μL 6X Loading dye。
- (d) 進行電泳分離：100V，25 min。
- (e) 膠片染色：1 μL/mL SYBR safe DNA gel stain 染色 10-15 min。
- (f) 使用 UV light 觀察，並照相紀錄。

10 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 268 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

11 結果判定

RT-PCR 產物各取 5 μ 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。

12 注意事項

- 12.1 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。
- 12.2 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。


13 參考文獻

- 13.1 Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, 2nd edition, WHO/IVB/07.01.
- 13.2 Abernathy E, Cabezas C, Sun H, Zheng Q, Chen MH, Castillo-Solorzano C, Ortiz AC, Osorio 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.

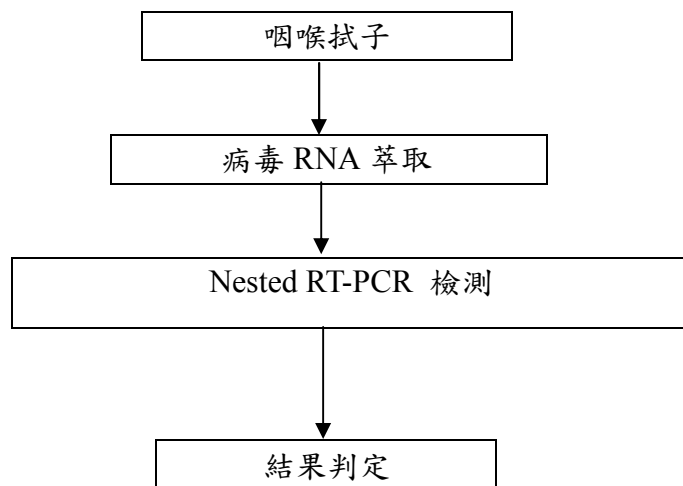
14 附錄

- 14.1 德國麻疹病毒鑑定流程圖。
- 14.2 德國麻疹病毒診斷用引子組序列表。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學 核酸檢測 (RT-nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 269 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 14.1 德國麻疹病毒鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 270 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

附錄 14.2 德國麻疹病毒診斷用引子組序列表

一、First round RT-PCR primer

1100F :5'-CCCCACCGACACCGTGATGAG-3'


1100R :5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTATACAGCAACAGGTGC-3'

二、Second round nested-PCR primer

875F: 5'-GTGATGAGCGTGTTCCGCCCTT-3'

875R: 5'-TGGTGTGTGTGCCATAC-3'

行政院衛生署疾病管制局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 271 頁/共 1091 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 RFabsorbent 吸附，以除去類風濕因子及 IgG，降低對所測試 IgM 反應的干擾。再利用吸覆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」。

- (1) Anti-Rubella virus/IgM test plate : 2 x 6 strips。
- (2) Anti-Rubella virus reference P/P : 0.65 mL。
- (3) Anti-Rubella virus reference P/N : 0.45 mL。
- (4) Sample buffer POD : 2 x 50 mL。
- (5) Anti-human IgM/POD conjugate (μ -chain specific) : 1 mL。
- (6) Conjugate buffer microbiol : 4 x 12.5 mL。
- (7) RF absorbent : 4 x for 5 mL。
- (8) Polyethylene bag for storing unused test strip。
- (9) Barcode table of value。

5.1.2 「Supplementary reagents for enzygnost/TMB : Dade Behring, OUVF 17, Germany, 4°C 儲存」。

- (1) Washing solution POD : 3 x 100 mL。
- (2) Colour solution blue for enzygnost : 1 x 12.5 mL。
- (3) Buffer/substrate TMB : 4 x 30 mL。
- (4) Chromogen TMB : 4 x 3 mL。
- (5) Stopping solution POD : 2 x 100 mL。
- (6) Adhesive foils for microtiter plates : 24 pcs。

行政院衛生署疾病管制局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 272 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(7) Empty bottle for the working Chromogen solution : 1 pcs. °

(8) Instruction for use : 1 pcs. °

5.2 耗材

5.2.1 Tips : 200 μ L、1,000 μ 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 μ L、200 μ L、1,000 μ L °

6.2 八爪 Pipetman : 200 μ L °

6.3 電動分注器 : 50-1,000 μ 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 環境與設施安全

於生物安全第一等級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作 °

8 檢體採集

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版 °

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf> °

9 檢體運送及儲存

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版 °

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf> °

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 °

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 °

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 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 μ 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 μ L Working Chromogen solution。
- 10.3.8 室溫，避光，培養 30 min。
- 10.3.9 每個孔加入 100 μ 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 判定標準


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 15.2 德國麻疹 ELISA 實驗記錄表，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陳核實驗室主管審核，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

行政院衛生署疾病管制局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 274 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 12.1 Qualitative evaluation : $\Delta A_{\text{Reference P/P}} \geq 0.2$ 。
- 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

Reference P/P , at start of series	ΔA	0.474
With margins ?		yes
Reference P/P , at end of series	ΔA	0.388
With margins ?		yes
Mean value	ΔA	0.431
Reference P/P,nominal value	ΔA	0.518
Correction factor 0.518:0.431	=	1.2
Corrected ΔA 待測血清	=1.2 x ΔA 待測血清	

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，依本局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.

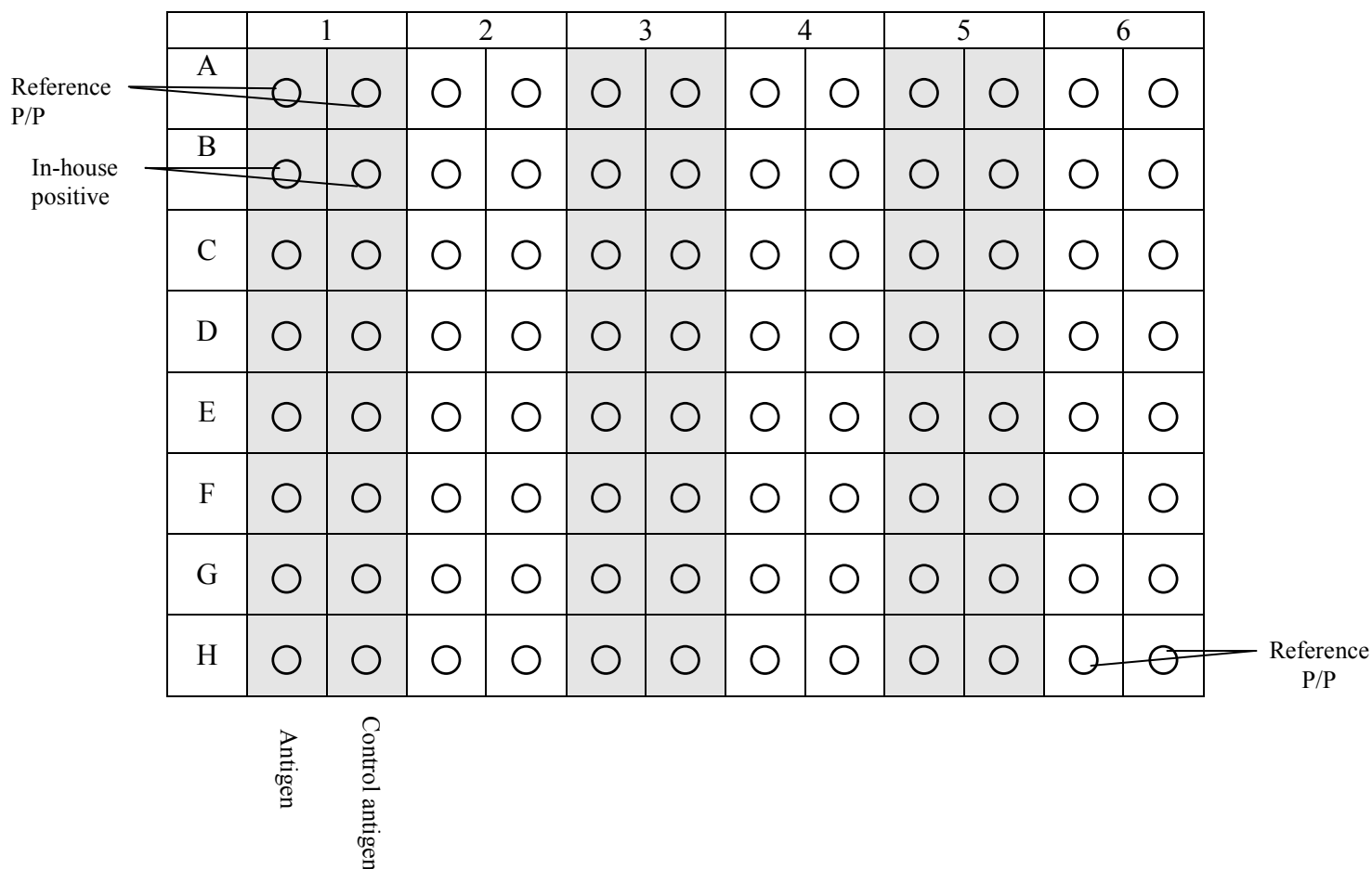
15 附錄

- 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。

行政院衛生署疾病管制局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 275 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 檢體排列位置圖

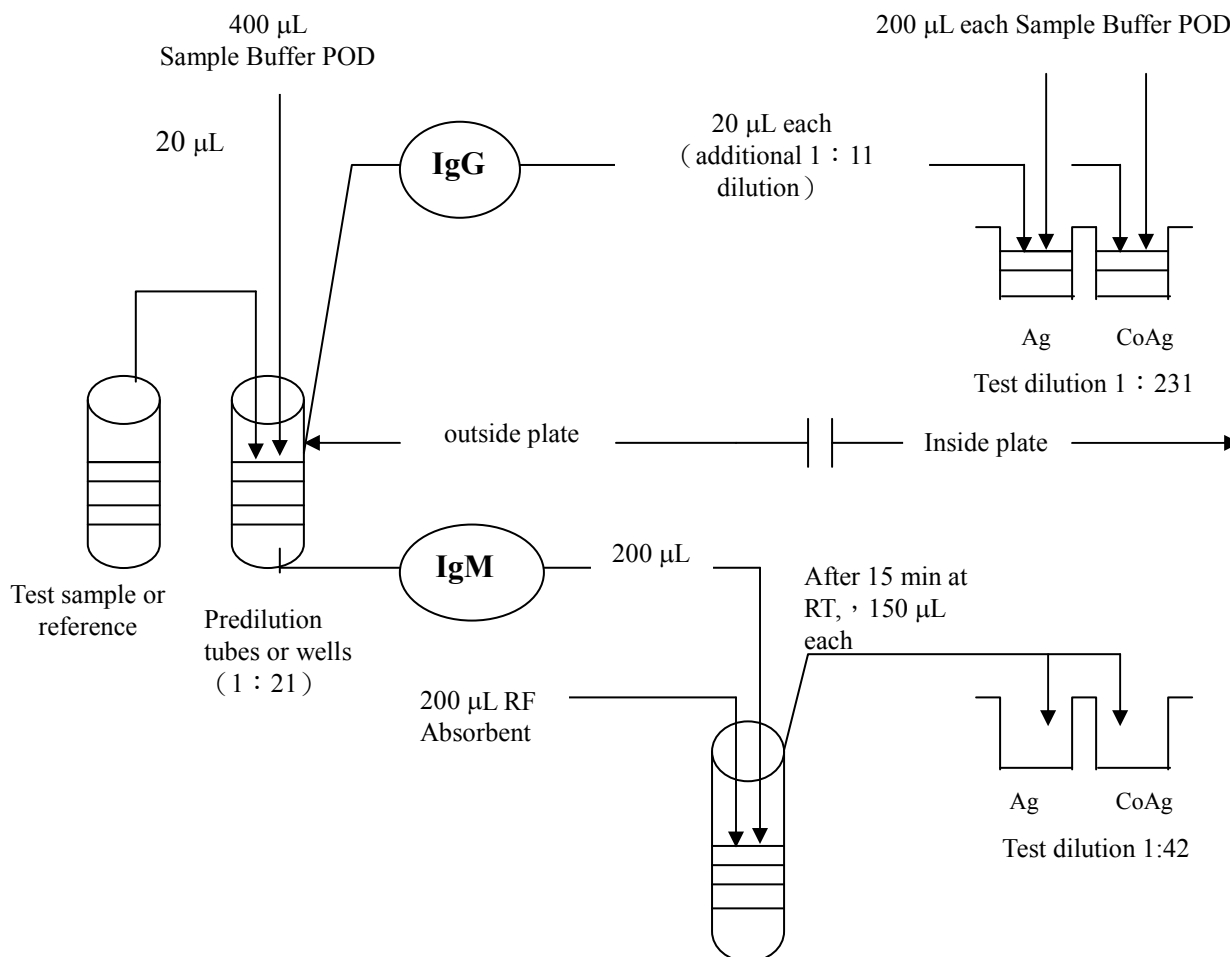


1. 從 C1 開始置放待測檢體
2. Reference P/P 除 A1 位置固定外，另一 Reference P/P 位置視檢體量而定，在最後一個試劑條 H 對應位置

行政院衛生署疾病管制局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 276 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

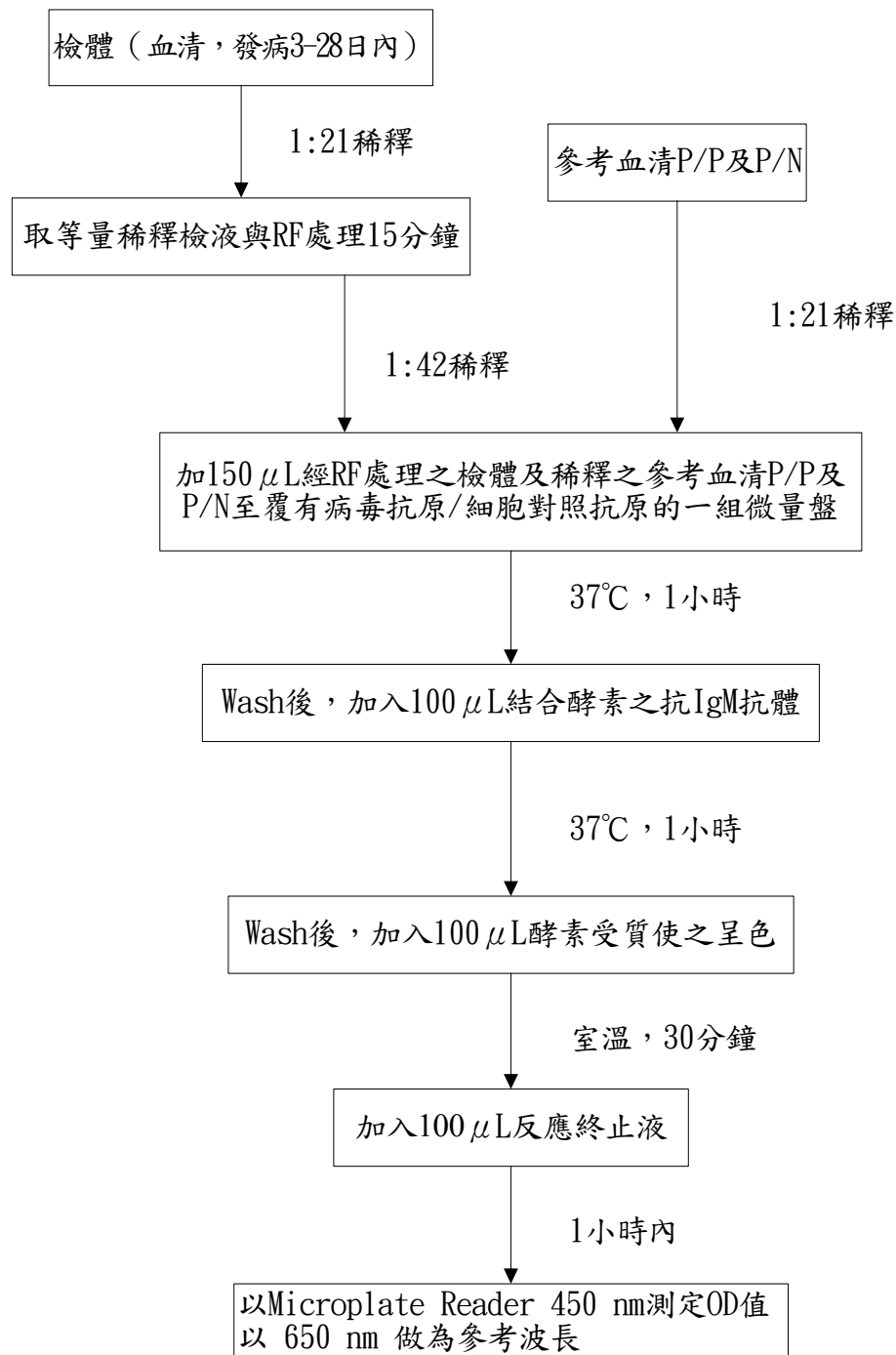
附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



行政院衛生署疾病管制局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 277 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局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 278 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 德國麻疹 ELISA 紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

德國麻疹ELISA實驗紀錄表

Date :

Name	Rubella IgM					Rubella IgG				
	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	Result	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	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 \geq 0.2 2. P/P within lower and upper margin 3. Individual P/P within \pm 20 % 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 \geq 0.5 2. P/N within lower and upper margin 3. Individual P/N within \pm 20 % 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	

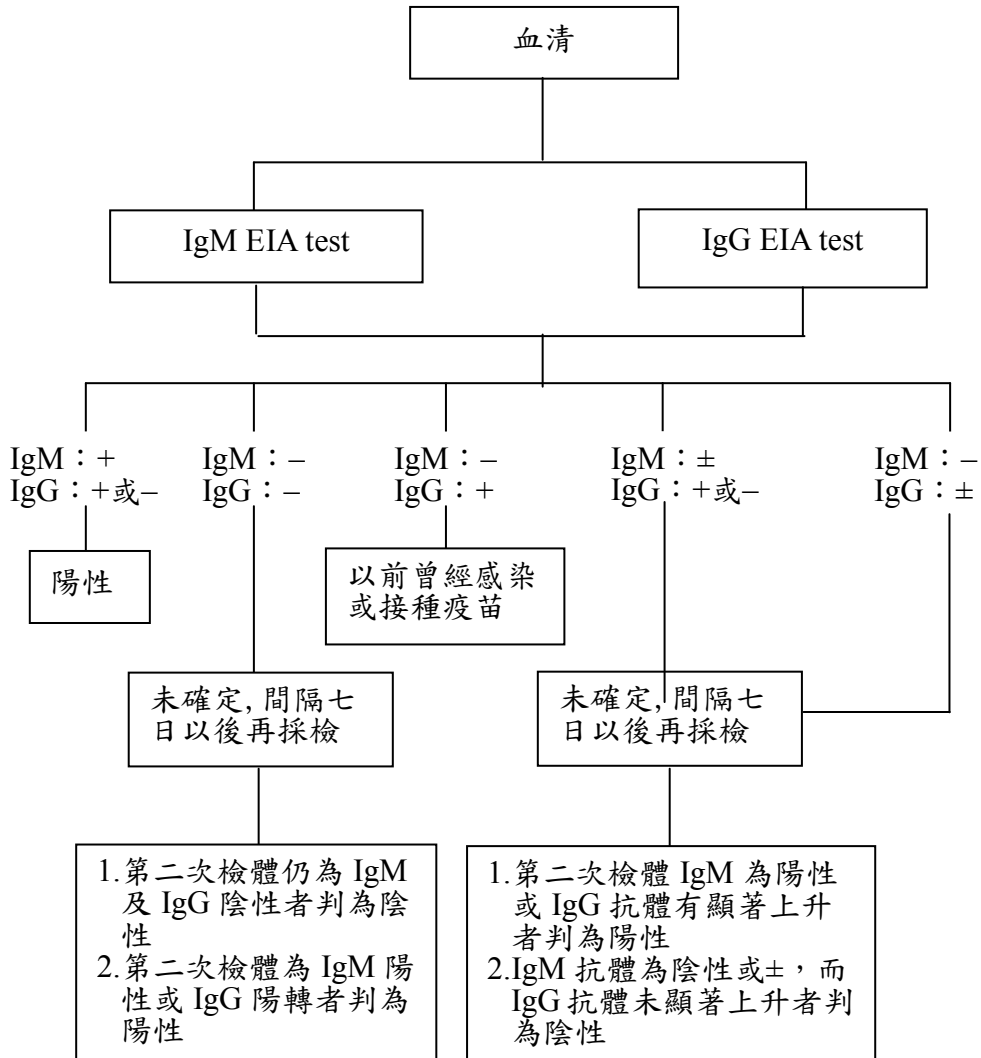
檢驗者：

實驗室主管：


行政院衛生署疾病管制局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 279 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局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 280 頁/共 1091 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」

- (1) Anti-Rubella virus/IgG test plate : 2 x 6 strips。
- (2) Anti-Rubella virus reference P/N : 0.4 mL。
- (3) Sample buffer POD : 2 x 50 mL。
- (4) Anti-human IgG/POD conjugate : 1 mL。
- (5) Conjugate buffer microbiol : 4 x 12.5 mL。
- (6) Polyethylene bag for storing unused test strip。
- (7) Barcode table of value。


5.1.2 「Supplementary reagents for enzygnost/TMB : Dade Behring, OUVF 17, Germany, 4°C 儲存」。

- (1) Washing solution POD : 3 x 100 mL。
- (2) Colour solution blue for enzygnost : 1 x 12.5 mL。
- (3) Buffer/substrate TMB : 4 x 30 mL。
- (4) Chromogen TMB : 4 x 3 mL。
- (5) Stopping solution POD : 2 x 100 mL。
- (6) Adhesive foils for microtiter plates : 24 pcs.。
- (7) Empty bottle for the working Chromogen solution : 1 pcs.。
- (8) Instruction for use : 1 pcs.。

5.2 耗材

5.2.1 Tips : 200 μ L、1,000 μ L。

行政院衛生署疾病管制局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 281 頁/共 1091 頁		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 μ L、200 μ L、1,000 μ L。
- 6.2 八爪 Pipetman：200 μ L。
- 6.3 電動分注器：50 μ L-1,000 μ 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 環境與設施安全

於生物安全第一等級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作。

8 檢體採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。


9 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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。
 - 10.2.6 Microplate washer 先以配置好的 Working wash solution 進行

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

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 啓動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.4 每個孔加入 100 μ L Working conjugate solution。
- 10.3.5 置放 37°C 溫箱培養 60 min。
- 10.3.6 啓動 Microplate washer 以 Wash solution 清洗三次。
- 10.3.7 每個孔加入 100 μ L Working Chromogen solution。
- 10.3.8 室溫，避光，培養 30 min。
- 10.3.9 每個孔加入 100 μ 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 判定標準

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 實驗記錄表，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陳核實驗室主管審核，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 Qualitative evaluation： $\Delta A_{\text{Reference P/N}} \geq 0.5$ 。


12.2 Quantitative evaluation

12.2.1 Lower margin $\leq \Delta A_{\text{Reference P/N}} \leq$ upper margin。

12.2.2 任一 $\Delta A_{\text{Reference P/N}}$ 介於 Reference P/N 平均值 $\pm 20\%$ 。

12.3 Measurement correction：利用 Reference P/N 來校正實驗值，改善結果的再現性。

行政院衛生署疾病管制局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 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

計算範例

Reference P/N , at start of ΔA series		1.374
With margins ?		yes
Reference P/N , at end of series ΔA		1.188
With margins ?		yes
Mean value ΔA		1.281
Reference P/P,nominal value ΔA		1.024
Correction factor 1.024:1.281 =		0.8
Corrected ΔA 待測血清	$=0.8 \times \Delta A$ 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，依本局廢棄物處理作業程序處理。

14 參考資料

Dade Behrin 公司操作說明書。

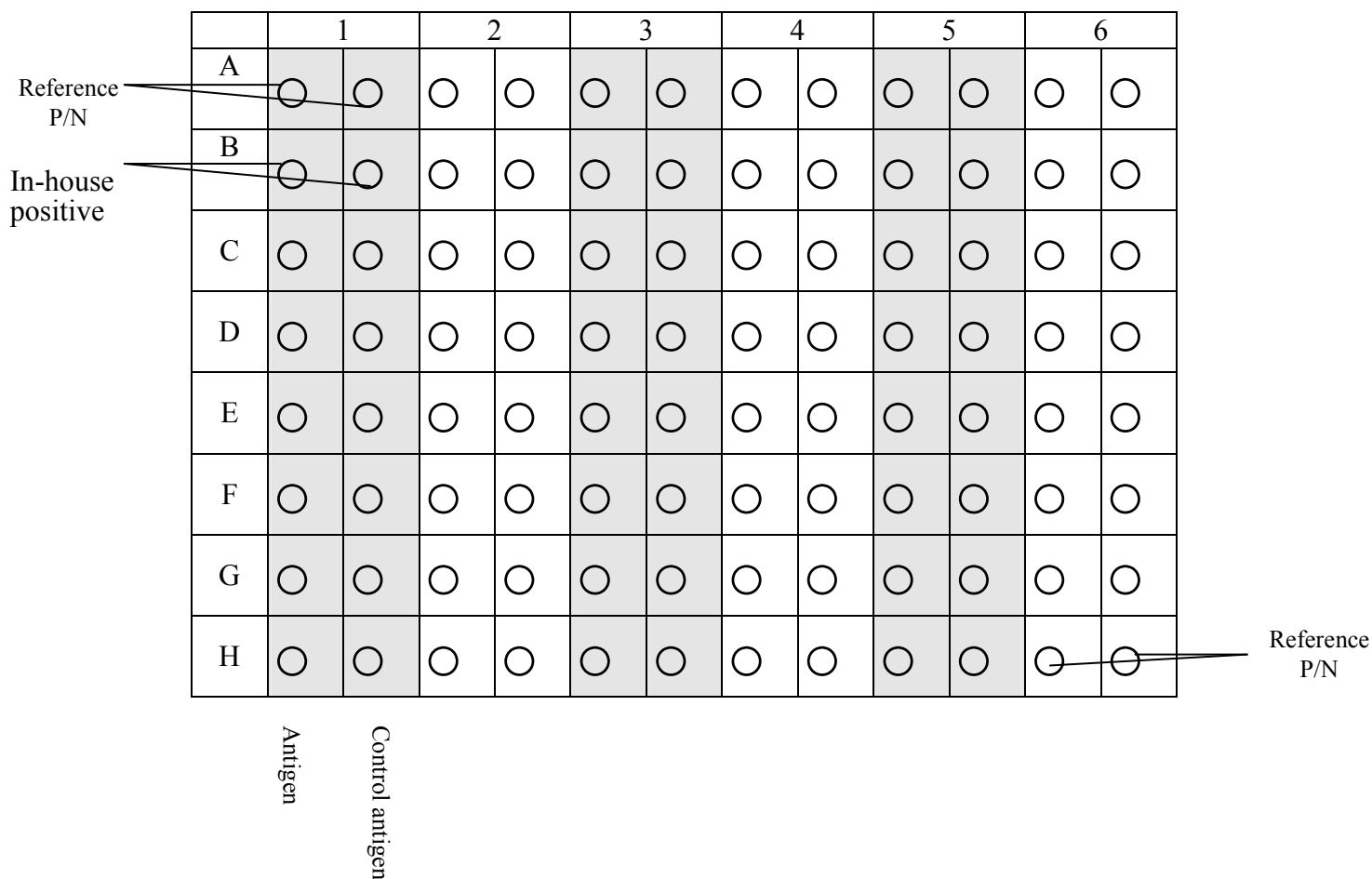
15 附錄

- 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 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。

行政院衛生署疾病管制局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 284 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 檢體排列位置圖

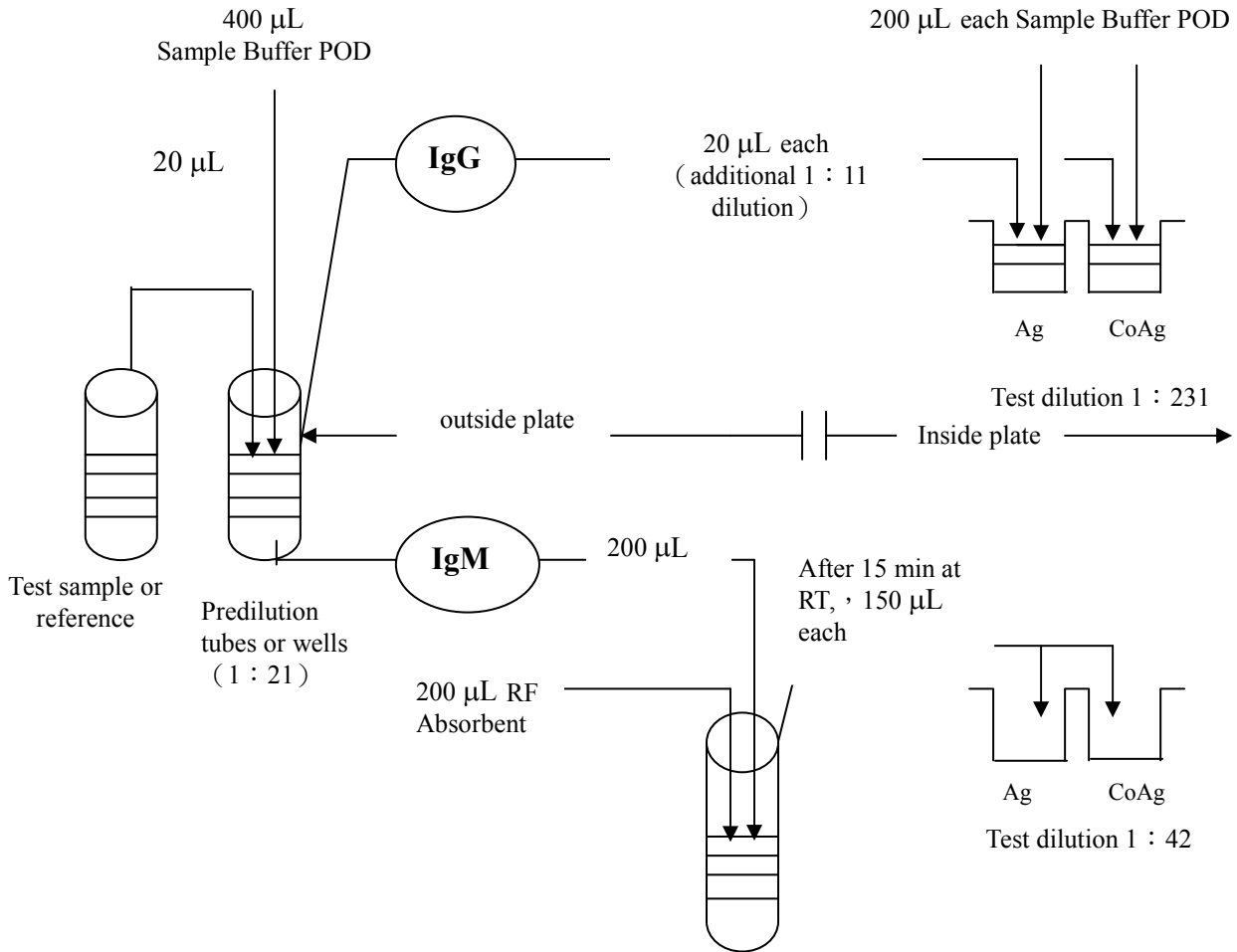


1. 從 C1 開始置放待測檢體。
2. Reference P/P 除 A1 位置固定外，另一 Reference P/P 位置視檢體量而定，在最後一個試劑條 H 對應位置。

行政院衛生署疾病管制局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 285 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

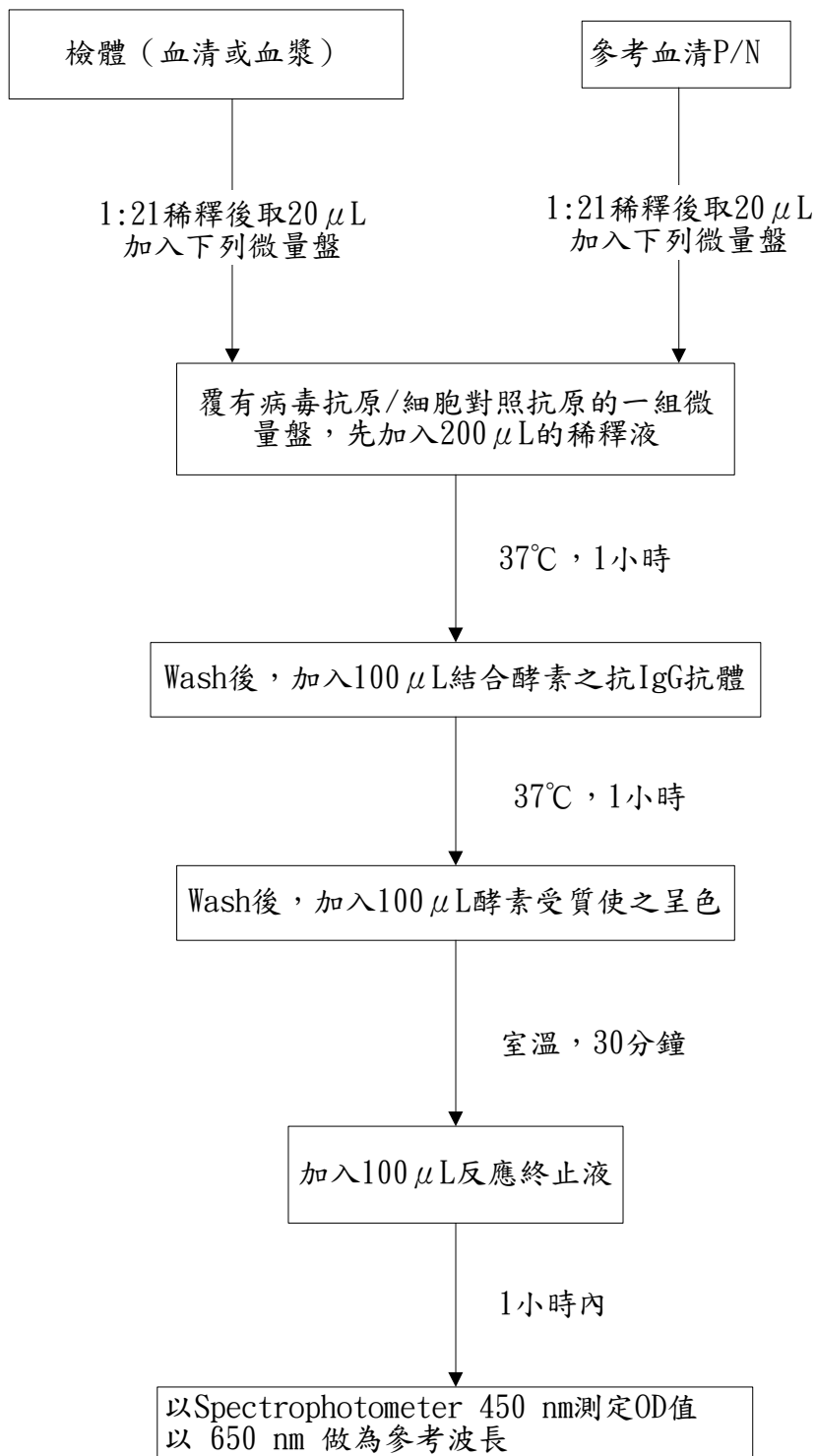
附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



行政院衛生署疾病管制局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 286 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局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 287 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 德國麻疹 ELISA 實驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

德國麻疹ELISA實驗紀錄表

Date :

Name	Rubella IgM					Rubella IgG				
	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	Result	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	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 \geq 0.2 2. P/P within lower and upper margin 3. Individual P/P within \pm 20 % 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 \geq 0.5 2. P/N within lower and upper margin 3. Individual P/N within \pm 20 % 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	

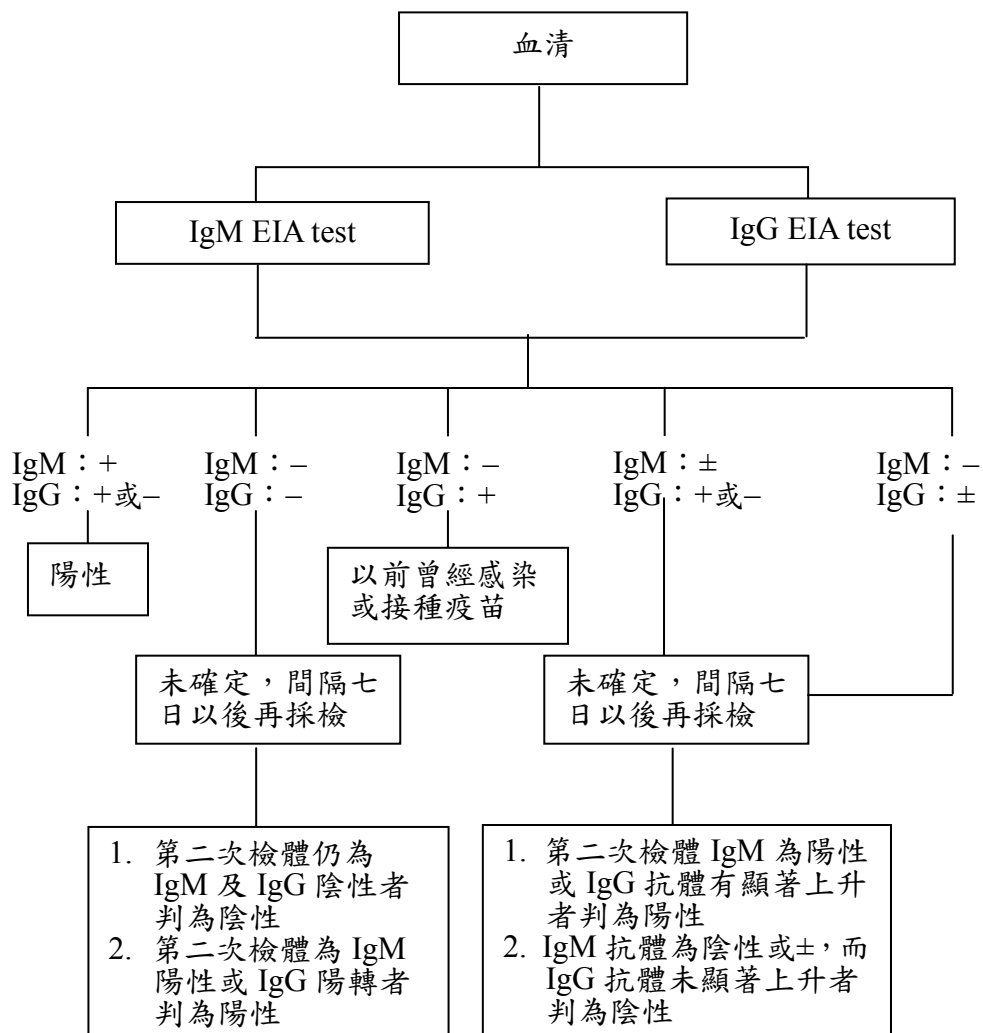
檢驗者：

實驗室主管：


行政院衛生署疾病管制局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 288 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 289 頁/共 1091 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屈公病毒。

2 適用範圍

適用於病患急性期發病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組織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 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 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, Biological 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 屈公病毒 (台灣境外株當控制組): 屈公病毒以 C6/36 細胞培養 3 天, 取上清液, 當屈公病毒來源。(CK9500004)
- 5.4 抗屈公病毒抗體【chikungunya (ATCC VR64) mouse hyperimmune ascitic fluid (NIH research reference reagent)】
- 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 (H₂O)。
- 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/Eire 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 CO₂ 培養箱 (Astec, Japan, SCI-165DC)。
- 6.2 37°C CO₂ 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 290 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

6.6 5-40 μL Pipette 及 40-200 μL 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 $18\Omega\text{-CM}$ 以上超純水。

8 檢驗採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 在 96 孔組織培養盤中將患者血清 5 μL 以細胞培養液做 20、40、80、160 倍連續稀釋，每孔加入 50 μL 之 2 倍連續稀釋血清。每孔中再加入 100 μL C6/36 細胞懸浮液【培養 C6/36 cell 於 75 T flask，加 15 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→以血球計術器計算細胞數。配製成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 細胞懸浮液】。

10.2 置 28°C 5% 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°C 保存。

10.4 取 20 μL PBS 刮下培養盤中之細胞，在 24 孔玻璃片上做抹片。

10.5 於室溫中風乾後，置於 -20°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°C 冰箱中或直接染色。

10.8 在抹片上加上 25 μL 抗屈公病毒單株抗體。

10.9 將抹片放置在潮濕的培養皿中，置於 37°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 μL 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。

11 結果判定

11.1 在螢光顯微鏡下將檢測檢體與 Positive control 及 Negative control 比對

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 291 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

判讀。

- 11.2 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。

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 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

- 13.1 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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序辦理。
- 13.2 未使用完血清放回-80°C 冰箱保存。


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 Micro 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。

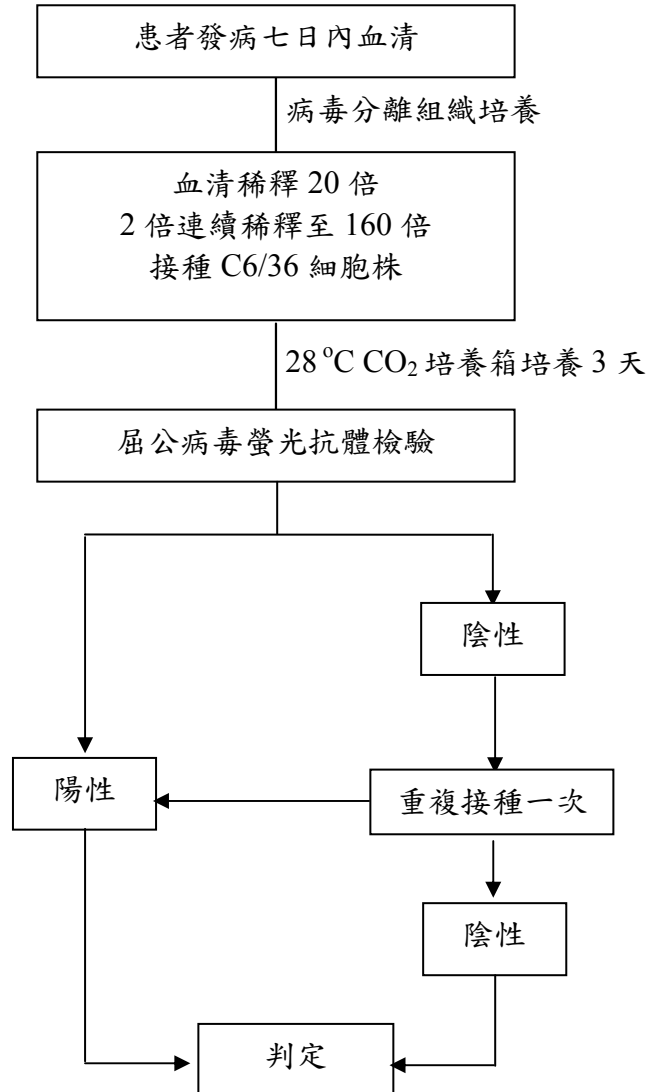
15 附錄

- 15.1 屈公病毒分離與鑑定流程圖。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 292 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 屈公病毒分離與鑑定流程圖。



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 293 頁/共 1091 頁		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屈公病毒核酸。

2 適用範圍

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 DNA/RNA 的含量越多。

4 原理概述

利用對屈公病毒具有專一性之引子 (primers) 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 QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, Cat. no. 52906)。

5.1.1 QIAmp spin columns。

5.1.2 2 mL 收集管。

5.1.3 溶解液 (AVL)。

5.1.4 運送 RNA (carrier RNA)。

5.1.5 清洗液 (AW1)。

5.1.6 清洗液 (AW2)。

5.1.7 萃取液 (AVE)。

5.1.8 氣密管。

5.2 Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix, 1-step kit (Stratagene, Cat. no.600835)。

5.2.1 RT-PCR master mix。

5.2.1.1 2X Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix：

(a) RT-PCR buffer。

(b) SureStarTaq DNA polymerase。

(c) dNTP mix (GAUC)。

(d) SYBR green I。

(e) ROX (passive reference dye)。

(f) $MgCl_2$ 。


5.2.1.2 RT/RNase block enzyme mixture。

(a) Moloney-based reverse transcriptase。

(b) RNase。

5.3 陽性對照組 RNA (positive control RNA)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 294 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.4 陰性對照組 RNA (negative control RNA)：
 - 5.4.1 DNase, RNase-free H₂O。
 - 5.4.2 過去檢驗過的陰性血清。
- 5.5 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透去離子可達 18MΩ-CM 以上超純水。
- 5.6 定量 PCR 專用八連排反應管(QPCR 8-strip tubes) (Stratagene, USA Cat. no.410022)。
- 5.7 定量 PCR 專用八連排反應蓋(QPCR 8-strip caps) (Stratagene, USA Cat. no.410024)。
- 5.8 無菌過濾型 10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1,000 μL 吸管尖。
- 5.9 無菌 1.5 mL 微量離心管。
- 5.10 無粉手套。

6 儀器設備

- 6.1 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 6.2 Mx4000 Multiple Quantitative PCR System (Stratagene, USA)。
- 6.3 10 μL、20 μL、40 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL 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°C。
- 6.7 冷凍櫃：-20°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。
- 7.2 檢驗操作在生物安全第一等級 (BSL-1) 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 檢驗採集

- 參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存


- 參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 試劑之準備

10.1 AVL buffer

- 10.1.1 新開封時要加一瓶 carrier RNA，先取 1 mL AVL buffer 至 carrier RNA tube 中 (紅頭螺旋管)，待完全溶解再 Transfer 回 AVL buffer 瓶中，混合均勻。

行政院衛生署疾病管制局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 295 頁/共 1091 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

10.1.2 每次使用時先檢查是否有結晶產生，若有結晶則以 80°C 水浴槽回溫 3-5 min，不可超過 5 min，回溫次數不可超過六次，AVL buffer/carrier RNA 若保存於室溫不可超過二星期。

10.2 AW1 buffer

10.2.1 新開封時依瓶身指示加入 125 mL 絕對酒精，得到總體積 220 mL，室溫下可保存 1 年。

10.3 AW2 buffer

10.3.1 新開封時依瓶身指示加入 160 mL 絕對酒精，得到總體積 226 mL，室溫下可保存 1 年。

11 檢驗步驟

11.1 萃取病毒 RNA

11.1.1 先吸取 560 μ L Lysis buffer (AVLbuffer 加 carrier RNA) 放入 1.5 mL 微量離心管，再加入 140 μ L 的血清檢體，震盪混合，室溫靜置反應 10 min。

11.1.2 加入 560 μ L 絕對酒精，震盪混合 1 min，以終止反應。

11.1.3 將上述混合液以抽氣方式通過管柱 (column)，檢體中的 RNA 會吸附在管柱底部的膜上。

11.1.4 加清洗液 (AW1) 850 μ L，抽氣 3 min，做第一次沖洗，以清洗膜上所吸附的雜質。

11.1.5 以清洗液 (AW2) 850 μ L，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。抽氣後再離心 3000 rpm，3 min，以徹底去除膜上殘留酒精。

11.1.6 加入萃取液 (AVE) 75 μ L，室溫靜置 10 min，在 4°C 離心 3000 rpm，3 min，取得 RNA。

11.2 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (one-step real-time RT-PCR)。


11.2.1 取 5 μ L RNA 做模板，加入屈公病毒專一性引子組 (參考附錄 16.2)，置於冰上。

11.2.2 加入反應溶液 (成分如下表)，調整反應總體積至 25 μ L

初始濃度	加入體積	最終濃度
2X Brilliant II SYBR green QRT-PCR Low ROX master mix	12.5 μ L	1X
Primer A	Variable	如參考附錄 16.2
Primer B	Variable	如參考附錄 16.2
RT/RNase block enzyme mixture	1 μ L	
RNase-free H ₂ O	Variable	

11.2.3 單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (one-step real-time RT-PCR)：使用 Mx4000 quantitative PCR system (Stratagene, USA)

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 296 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- (1) R.T.作用：50°C，30 min。
- (2) Taq polymerase activation：95°C，15 min。
- (3) Denaturation：94°C，15 sec。
- (4) Annealing：55°C，30 sec。
- (5) Extension：72°C，20 sec。
- (6) 77°C，30 sec。收集螢光值。
- (7) 重複(3)至(6)步驟45 cycle。

11.2.4 Melting curve analysis：

- (1) 95°C，1 min。
- (2) 68°C→90°C+1°C/30 sec/cycle。
- (3) 重複(2)步驟45 Cycles

12 結果判定

- 12.1 以 Mx4000 軟體分析結果，可以從 Amplification plots 與 Tm 值作判斷，結果是陽性或陰性。
- 12.2 在陽性對照與陰性對照組的 Ct 值符合設定值下，凡樣品經屈公病毒專一性引子之 Ct 值小於 40 者，判為屈公病毒陽性。
- 12.3 觀看 Melting curve 時，一般來說，須 Tm 值 >80°C 的 PCR 產物，才為較具專一性之產物，而 <75°C 之 PCR 產物，通常為非專一性的產物。

13 品質管制

- 13.1 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。
- 13.2 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。
- 13.3 Mx4000 機器定時作檢測與較正。
- 13.4 Pipettman 做定期的校對。
- 13.5 注意檢測套組的使用期限與適當的儲放溫度。


14 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 min 高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序（編號：G-xx-2006-D）辦理。

15 參考資料

- 15.1 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.
- 15.2 Qiagen. QIAamp viral RNA mini kit handbook. pp.18-19.


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 297 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

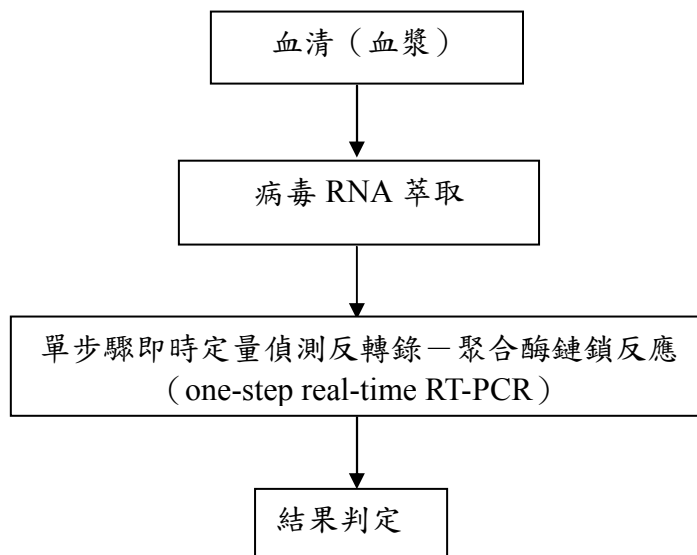
16 附錄

- 16.1 屈公病毒鑑定（單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應）流程圖。
- 16.2 屈公病毒診斷用引子組序列表。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 298 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附件 16.1 屈公病毒鑑定(單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應)流程




行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	屈公病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 299 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附件 16.2 屈公病毒診斷用引子組序列表


Chikungunya virus specific primer：		參與反應的濃度
ChikV-F	AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA G	800nM
ChikV-R	CCA AAT TGT CCY GGT CTT CTT	800nM

行政院衛生署疾病管制局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 300 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的
屈公病毒 IgM 和 IgG 抗體檢測。
- 2 適用範圍
適用於人體血清之檢體。
- 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) -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 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) 單株抗體腹水 (α -3581, Santa Cruz, Cat. no. sc-58088)。
 - 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 (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 μ L、1,000 μ L 吸管尖。

行政院衛生署疾病管制局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 301 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 μ l、20 μ l、100 μ l、200 μ l、1,000 μ L (pipettors)。
- 6.4 震盪器 (vortex mixer)。
- 6.5 冰箱：4°C。
- 6.6 冷凍櫃：-20°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一等級 (BSL-1) 實驗室進行。

8 檢驗採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。


9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

- 10.1 檢體編號登錄。
- 10.2 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 α -3581。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 α -3581。
- 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 μ L 加入 Dilution buffer 0.7 mL 稀釋 100 倍。
- 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 Coating 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 Alpha 屬抗原單株抗體 α -3581 之屈公病毒細胞培養稀釋液及羅斯河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)

行政院衛生署疾病管制局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 302 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 (OD₄₀₅₋₆₃₀)。

11 結果判定

11.1 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。

11.2 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。

11.3 屈公病 Positive control serum 應符合 IgM OD 值 > 1.0, IgG OD 值 > 0.5。

11.4 羅斯河病 Positive control serum 應符合 IgM OD 值 > 1.0, IgG OD 值 > 0.5。

11.5 Negative control serum 應符合 IgM OD 值 < 0.2, IgG OD 值 < 0.2。

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 min 高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序 (編號：G-xx-2006-D) 辦理。


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 Diagn 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

行政院衛生署疾病管制局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 303 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. Am J trop Med Hyg 40: 418-427.

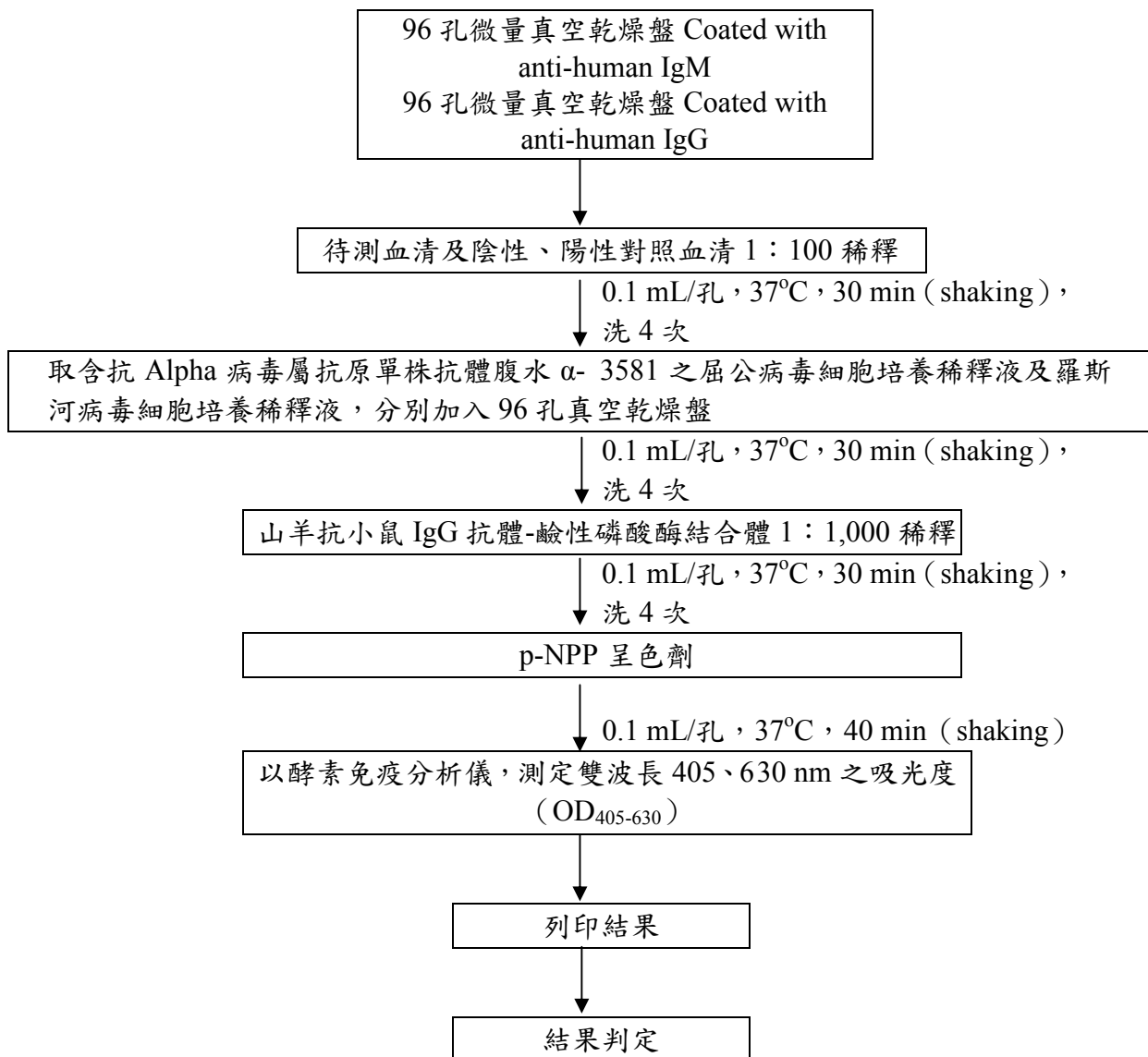
15 附錄

15.1 屈公病毒 IgM 及 IgG 抗體試驗（酵素免疫分析法）流程圖。


行政院衛生署疾病管制局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 304 頁/共 1091 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




行政院衛生署疾病管制局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 305 頁/共 1091 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：CMP，臺灣。
 - 5.1.2 含 1% NaCl 之 10 倍濃度 Alkaline peptone water pH 9.2：CMP，臺灣。
 - 5.1.3 TCBS (thiosulfate citrate bile salt sucrose) 培養基：杏友，臺灣。
 - 5.1.4 PMT 培養基：杏友，臺灣。
 - 5.1.5 Nutrient agar plate：CMP，臺灣。
 - 5.1.6 TSA (tryptic soy agar) plate：CMP，臺灣。
 - 5.1.7 TSIA (triple sugar iron agar)：CMP，臺灣。
 - 5.1.8 LIA (lysine iron agar)：CMP，臺灣。
 - 5.1.9 SIM (sulfide indole motility agar)：杏友，臺灣。
 - 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 環境與設施安全

行政院衛生署疾病管制局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 306 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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，參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。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

低溫運送及保存，參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 分離培養

10.1.1 檢體接種：

- (1) 糞便、直腸拭子：直接塗抹於 TCBS、PMT 培養基上。
- (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。
- (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)

- (1) 三管生化反應，若 TSIA 呈現 A/A 反應，Gas (-)，H₂S (-)，Lysine (+)，IND (+)，IPA (-)，運動性 (+) 時則可能為霍亂弧菌。
- (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。
- (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。
- (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。

10.2.3 血清凝集反應

行政院衛生署疾病管制局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 307 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(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。

(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 霍亂弧菌毒素檢測（乳膠凝集反應）

依照本局「霍亂弧菌毒素檢測（乳膠凝集反應法）」檢驗標準方法。

10.2.5 霍亂弧菌毒素基因鑑定

依照本局「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 符合菌落型態、Oxidase 反應、生化反應、血清凝集反應、PCR 毒性基因鑑定及毒素試驗皆符合者時，即依血清型別判定為 O1-Ogawa、O1-Inaba 或 O139 型霍亂弧菌陽性，有產毒性。

11.1.2 若僅菌落型態、Oxidase 反應、生化反應及血清凝集反應符合，而 PCR 毒性基因鑑定及毒素試驗不符合者時，即依血清型別判定為 O1-Ogawa、O1-Inaba 或 O139 型霍亂弧菌陽性，非產毒性、非法定傳染病。

11.1.3 若僅菌落型態、Oxidase 反應及生化反應符合，而與 O1 及 O139 抗血清不凝集，即判定為 Non-O1、Non-O139 型霍亂弧菌陽性、非法定傳染病。

11.1.4 若皆不符合者，即判定為霍亂弧菌陰性。

11.2 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於霍亂弧菌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 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。


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，依本局廢棄物處理作業程序處理。

行政院衛生署疾病管制局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 308 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


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。

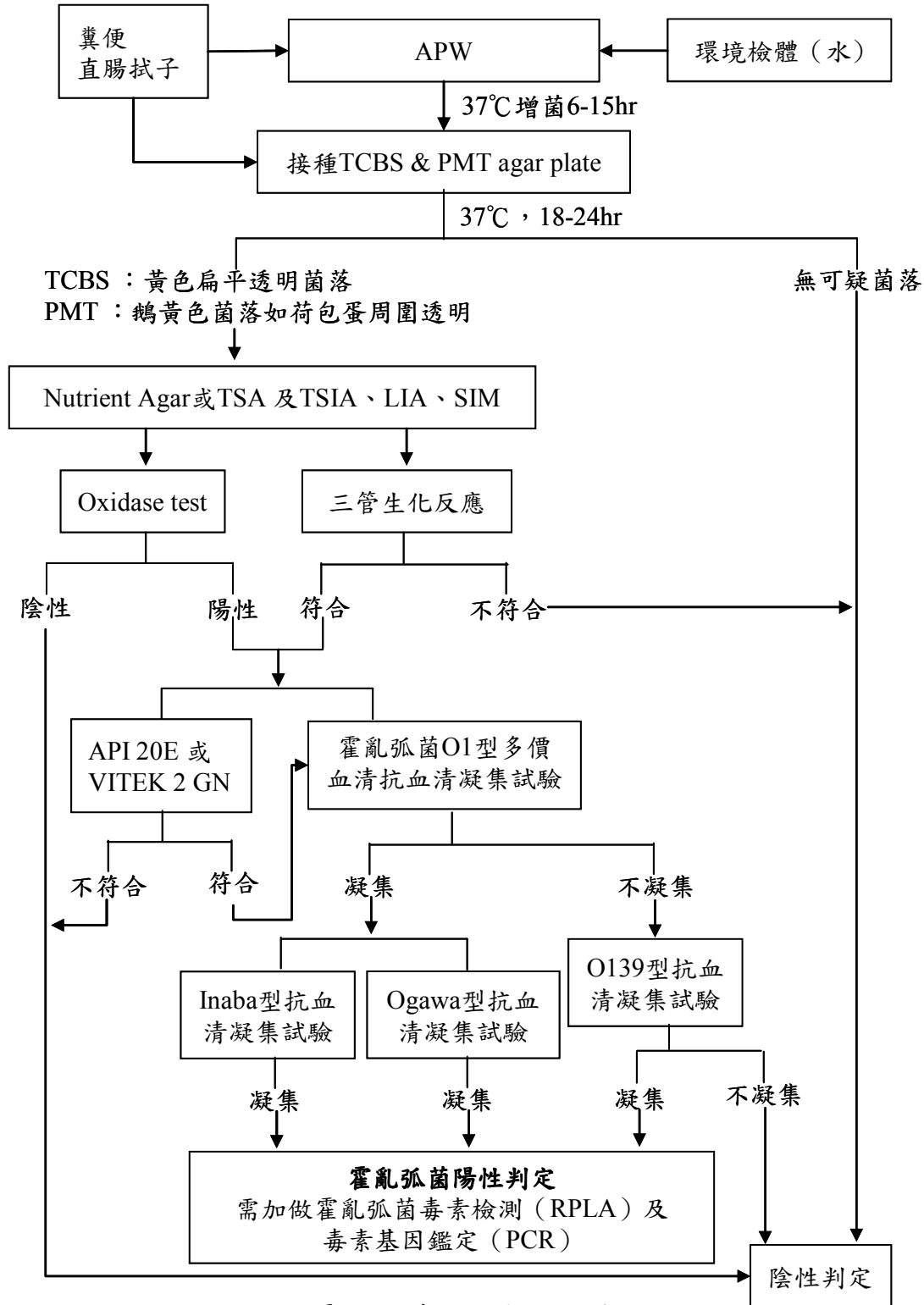
15 附錄

- 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。

行政院衛生署疾病管制局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 309 頁/共 1091 頁		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


行政院衛生署疾病管制局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 310 頁/共 1091 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 ₂ 及 H ₂ 之能力。	無任何氣泡產生。
	H ₂ 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)

行政院衛生署疾病管制局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 311 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 霍亂弧菌分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否	
PMT agar plate 生長型態：鵝黃色菌落如荷包蛋周圍透明	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否	
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：


行政院衛生署疾病管制局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 312 頁/共 1091 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	任一項 不符合		
	毒素基因 (PCR)				
	毒素試驗				
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

行政院衛生署疾病管制局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 313 頁/共 1091 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 12 032 953 001，德國。成分含 Taq DNA polymerase (5 U/μL)、10X 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 10X 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。

6.7 微量吸管 Pipetman：1,000 μL、200 μL、20 μL 三種規格。

行政院衛生署疾病管制局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 314 頁/共 1091 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

6.8 GeneAmp PCR system 9600/9700：Perkin Elmer，USA。

7 環境與設施安全

7.1 於生物安全第一等級 (BSL-1) 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

請參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>

9 檢體運送及保存

請參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>

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 μL 無菌水的 1.5 mL Eppendorf tube 中，以 100°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°C 直到測試。

10.2 PCR (*ctxA*、*ctxB*) 反應混和物配製如下：

Component	Volume
DNA template	1 μL
10X buffer (15 mM MgCl ₂)	5 μL
10 mM dNTP	1 μL
Primer-1 (100 μM)	0.5 μL
Primer-2 (100 μM)	0.5 μL
Taq polymerase (5 U/ μL)	0.25 μL
無菌水	41.75 μL
Total volume	50 μL

10.3 PCR 反應條件設定

10.3.1 94°C 5 min，1 cycle。

10.3.2 94°C 30 sec，53°C 30 sec，72°C 50 sec，30 cycles。

10.3.3 72°C 7 min，1 cycle。


10.3.4 4°C， ∞ 。

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 μL PCR mixture 跑電泳，電泳條件：於 0.5X TBE，100 voltage，40 min。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素基因鑑定 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 315 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.4.3 膠片染色：0.5 µg/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 5×10^5 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 µL 重測一次。

11.2 報告核發

將檢體之檢驗結果紀錄並加蓋檢驗者，送實驗室主管審核及蓋章。

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°C，30 min 高壓滅菌後，依本局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 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.

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法


	編號：	霍亂弧菌毒素基因鑑定 (PCR)	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 316 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

- 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.

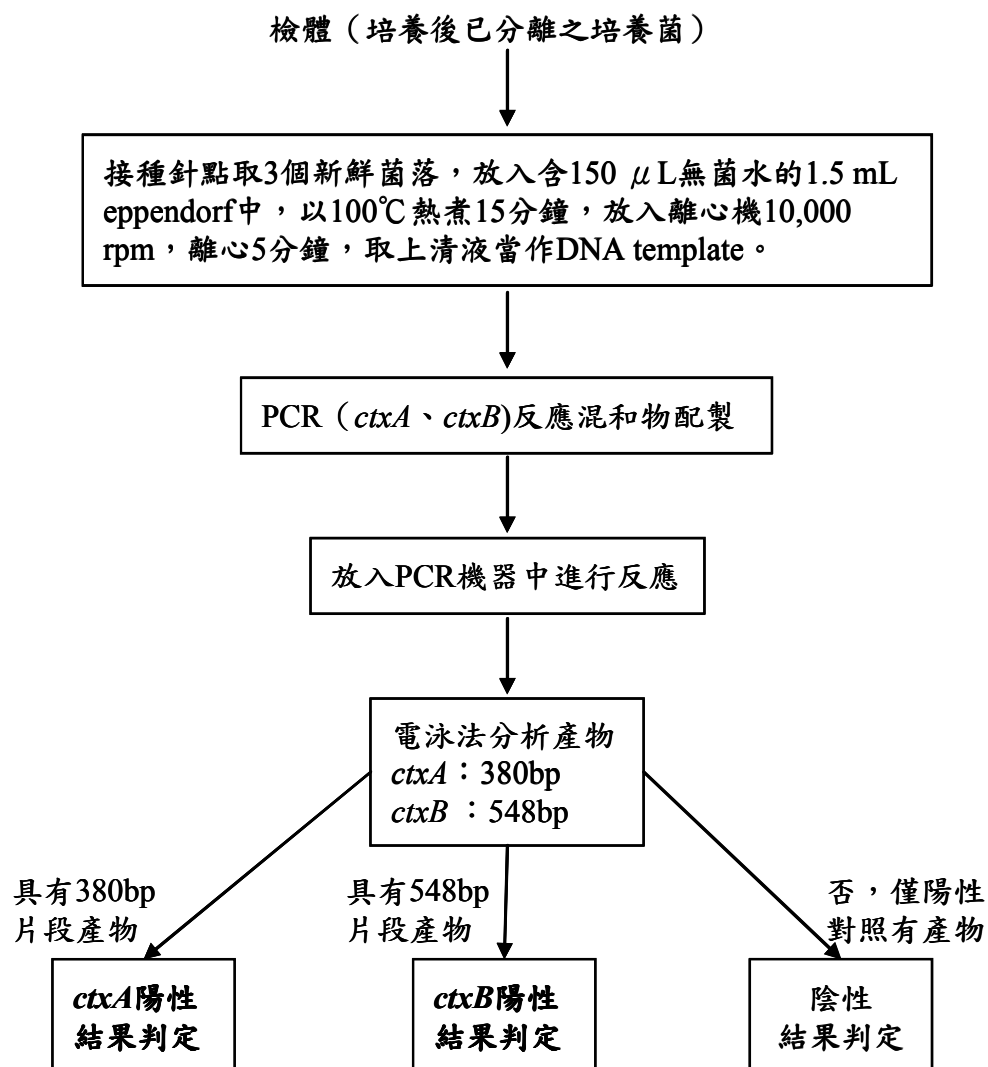
15 附錄

- 15.1 霍亂弧菌毒素基因檢測（聚合酶鏈鎖反應法）流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法


	編號：	霍亂弧菌毒素基因鑑定 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 317 頁/共 1091 頁		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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素檢測 (RPLA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 318 頁/共 1091 頁		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 μ L、200 μ 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°C 溫箱。
 - 6.2 30°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 μ L、200 μ L、50 μ L 等規格。
- 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
請參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9 檢體運送及保存
請參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素檢測 (RPLA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 319 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

下振盪培養 (120-150 轉/分) 16-20 hr。

- 10.2 隔天取 1 接種環 (10 μ 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 μ L 稀釋液。
- 10.6 第一孔放 50 μ L 檢體，由第一孔取 25 μ L 檢體至第二孔，充份混合後，移 25 μ 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 μ L。
- 10.7 第一排各孔加入 25 μ 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 μ 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 μ L 溶解之腸毒素與 25 μ L 敏感化乳膠 Sensitized latex 混合作陽性對照組。
- 10.9 取 25 μ L 溶解之腸毒素與 25 μ 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，依本局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.foodinfonet.com/publication/fdaBAM.htm>
- 14.2 Clements JD, Finkelstein RA. 1978. Demonstration of Shared and Unique Immunological Determinants in Enterotoxins from *Vibrio cholerae* and

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	霍亂弧菌毒素檢測 (RPLA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 320 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


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 14th Joint Conf., U.S.-Japan Coop. Med. Sci. Program, Cholera. Panel, Toho Univ., Tokyo, 266.

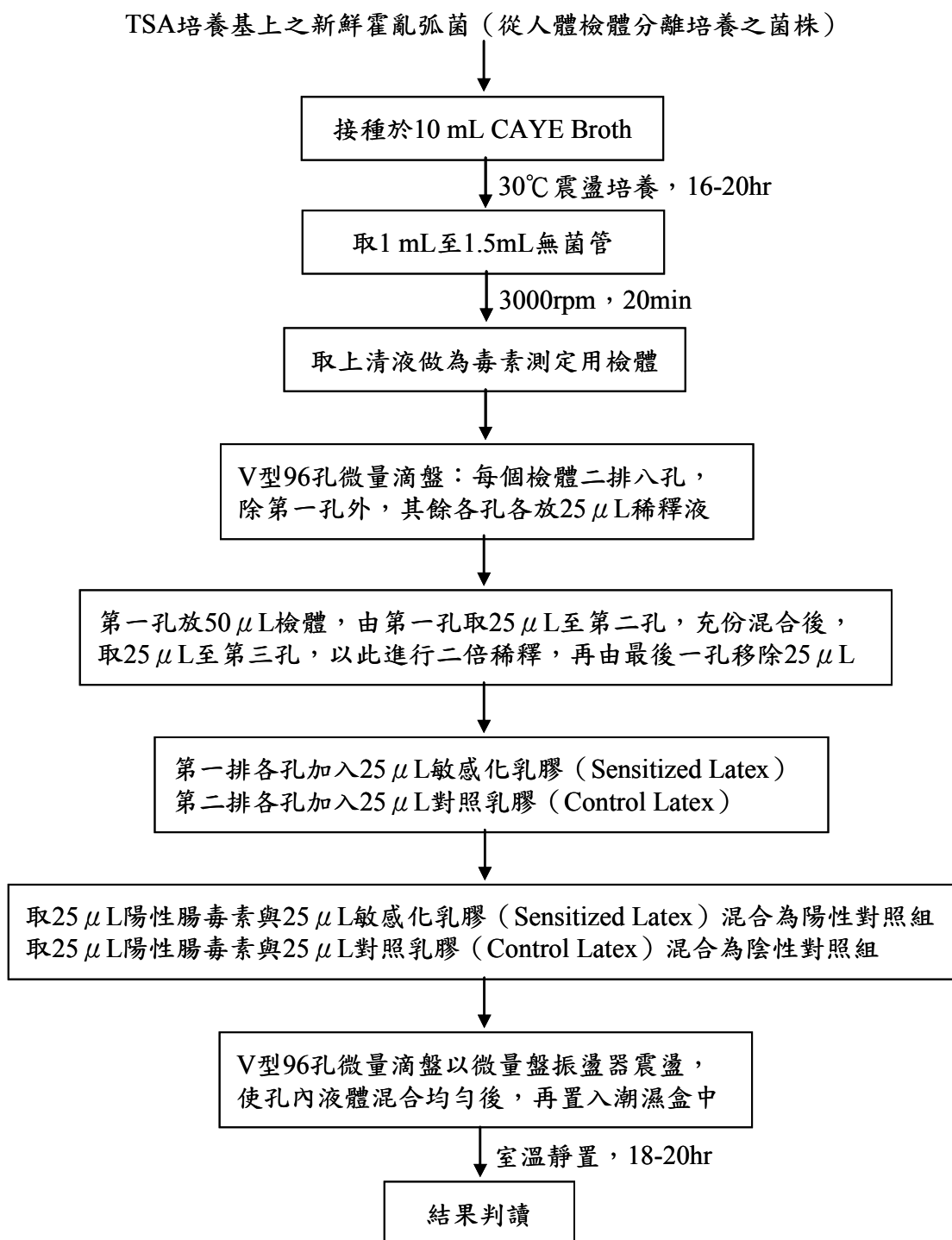
15 附錄

- 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法


	編號：	霍亂弧菌毒素檢測 (RPLA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 321 頁/共 1091 頁		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

行政院衛生署疾病管制局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 322 頁/共 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
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：

行政院衛生署疾病管制局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 323 頁/共 1091 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。

- (1) 取 NaOH 4 g 加入 100 mL 蒸餾水配製備用。
- (2) 取 2.6 g sodium citrate anhydrate 加入 100 mL 蒸餾水配製備用。
- (3) 將(1)及(2)混合後高溫高壓蒸氣滅菌，保存於 2°C-8°C，效期 6 個月。
- (4) NALC—NaOH：取 0.25 g NALC（Sigma；美國）（如有需要時呈比例增加），加 50 mL（3）。此試劑效期 24 小時。

5.1.2 phosphate buffer。


- (1) 取 Na₂HPO₄ 94.7 g 加入 1,000 mL 蒸餾水配製備用。
- (2) 取 KH₂PO₄ 90.7 g 加入 1,000 mL 蒸餾水配製備用。
- (3) 將(1)及(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（Becton, Dickinson and Company；美國）：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。

- (1) Middlebrook 7H11 培養基。
- (2) selective Middlebrook 7H11（Mitchison's）選擇性培養基。
- (3) Lowenstein—Jensen（LJ）斜面培養基。
- (4) BACTEC™MGIT™960 培養管（Becton, Dickinson and Company；美國）。

行政院衛生署疾病管制局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 324 頁/共 1091 頁		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 5%來舒液 (Lysol®)。
 - 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% CO₂ 溫箱。
- 6.3 低溫離心機，離心力 (RCF) 至少可達到 3,000 xg，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 環境與設施安全

- 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

- 8.1 痰液：檢體量需至少 5 mL，採集於無菌痰盒或 50 mL 離心管內 (參考防疫檢體採檢手冊第四版)。
- 8.2 胸水、腹膜液：取 5 mL 加入等量的無菌蒸餾水，一同放置於 15 mL 離心管內中以避免凝固。
- 8.3 血液：8-10 mL 加入 50 mL 含 Tween80 的液體培養基 (如：Middlebrook 7H9 broth)。
- 8.4 尿液：將前段尿液排掉，收集中段尿液至少 50 mL 於採集管中。
- 8.5 腦脊髓液：以無菌透明含蓋子玻璃試管收集 1-2 mL。
- 8.6 其他檢體以無菌技術採集後，放入無菌試管內送檢。

行政院衛生署疾病管制局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 325 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 8.7 膿 (pus) 及拭子 (swab)：拭子需浸泡於少量磷酸緩衝液中，以防檢體乾掉。
- 8.8 胃抽出液：收集 10 mL 置於無菌試管。內含 1 mL 10% NaHCO₃，以中和胃酸。需儘速送檢，因此，本項不建議為外送檢驗項目。
- 8.9 組織：收集於含 7H9 broth 之無菌容器。
- 8.10 糞便：收集於無菌容器內。

9 檢體運送及保存

- 9.1 儘速將檢體送檢驗。檢體運送時，應妥善包裝避免漏出或運送箱破損。
- 9.2 第一層為防水材料，並含有螺旋蓋可防止檢體液體滲漏，上面標示有生物危害標誌及正確之內含檢體名稱及種類。
- 9.3 第二層為防水之材質，含有螺旋蓋防止滲漏，能承受 1.2 公尺高度落下之撞擊而不破裂，內含碰撞緩衝材質可包覆第一層物品，另含吸附性物質以吸附意外滲漏之第一層檢體。
- 9.4 第三層包裝必須裝有適當碰撞緩衝材質，可固定第二層物質並防止運送途中任何震動所可能造成之傷害破損，外面必須標示有詳細之送件者及收件者姓名及地址，並且標示有國際通用之生物感染性物質之安全標示。
- 9.5 如果在第二層內裝有多支檢體，每支檢體應個別使用防水包裝再裝入第二層內，以防止檢體互相碰撞而破裂。
- 9.6 更詳細運送包裝方法請參考國際航空運輸組織 (International Air Transport Association, IATA) 所制定之危險物質運送包裝方法 (Packing Instruction 650) 及本局全球資訊網刊載之「防疫檢體採檢手冊」第四版，<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9.7 保存於 2°C-8°C。

10 檢驗步驟

10.1 檢體處理


10.1.1 痰液

- (1) 以無菌滴管吸取 3-5 mL 痰液至 50 mL 離心管。
- (2) 加等量的無菌 NALC-NaOH(5.1.1) 液化痰液。
- (3) 振盪器振盪約 15-20 秒。
- (4) 室溫靜置 15 分鐘。
- (5) 加無菌 phosphate buffer 至 40 mL 刻度處，鎖緊蓋子。
- (6) 以 3,000 xg 離心 15 分鐘，將上清液倒入廢液桶。
- (7) 添加 2 mL phosphate buffer 以中和酸鹼值，準備接種。

10.1.2 胃抽出液

- (1) 經採得的胃抽出液應於 4 小時內處理完畢。
- (2) 若檢體呈水樣，直接依步驟 (4) 處理。
- (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。

行政院衛生署疾病管制局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 326 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- (4) 3,000 xg 離心，15 分鐘。
- (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。
- (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

- (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。
- (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

- (1) 胸水以 3,000 xg 離心 15 分鐘，倒掉上清液。
- (2) 取沈澱物進行接種。
- (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

- (1) 緩慢加入 10% CaCl₂ 至沉澱物形成。
- (2) 以 3,000 xg 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 xg 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

- (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)。
- (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。
- (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。
- (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

行政院衛生署疾病管制局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 327 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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% CO₂ 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。
若為淺表層病灶檢體及傷口檢體，需另接種一組培養基置於 30°C-32°C 溫箱培養。

- 10.3.2 MGIT™960 培養管培養於 BACTEC™MGIT™960 系統，機器設定 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

11.1 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。
- 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。

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。

行政院衛生署疾病管制局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 328 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12.2.1 接種：製備 0.5 McFarland 品管菌株之菌液，吸取 10 μ L 接種，置入 35°C-37°C，5%-10% CO₂ 溫箱培養 21 天。

12.2.2 品管菌株及結果判讀

陽性品管

M. tuberculosis ATCC 25177

M. kansasii ATCC 12478

M. scrofulaceum ATCC 19981

M. intracellulare ATCC 35763

M. fortuitum ATCC 6841

陰性品管（使用於選擇性培養基）

E. coli ATCC 25922

品管結果

有生長菌落

有生長菌落

有生長菌落

有生長菌落

有生長菌落

品管結果

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 分鐘高壓滅菌後，依本局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.
- 14.5 Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 18th 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

行政院衛生署疾病管制局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 329 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 5% 來舒液 (Lysol® 成分為鄰甲苯酚) 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 5% 來舒液，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。

行政院衛生署疾病管制局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 330 頁/共 1091 頁		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 NaNO₃，0.117 g KH₂PO₄，0.485 g Na₂HPO₄·12H₂O 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。

行政院衛生署疾病管制局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 331 頁/共 1091 頁		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 環境與設施安全

- 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

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存


- 9.1 檢體運送採三層包裝。
 - 9.1.1 第一層為防水材質，並含有螺旋蓋可防止檢體液體滲漏，上面標示有生物危害標誌及正確之內含檢體名稱及種類。
 - 9.1.2 第二層為防水之材質，含有螺旋蓋防止滲漏，能承受高度落下之撞擊而不破裂，內含碰撞緩衝材質可包覆第一層物品，另含吸附性物質以吸附意外滲漏之第一層檢體。
 - 9.1.3 第三層包裝必須裝有適當碰撞緩衝材質，可固定第二層物質並防止運送途中任何震動所可能造成之傷害破損，外面必須標示有詳細之送件者及收件者姓名及地址，並且標示有國際通用之生物感染性物質之安全標示。
 - 9.1.4 如果在第二層內裝有多支檢體，每支檢體應個別使用防水包裝再裝入第二層內，以防止檢體互相碰撞而破裂。
 - 9.1.5 更詳細運送包裝方法請參考國際航空運輸組織（International Air Transport Association, IATA）所制定之危險物質運送包裝方法（Packing Instruction 620）及本局全球資訊網刊載之「防疫檢體採檢手冊」第四版，
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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

行政院衛生署疾病管制局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 332 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 x 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。

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 niacin 試驗

11.1.1 陽性反應：黃色。

11.1.2 陰性反應：不變色。

11.2 硝酸鹽還原試驗

11.2.1 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。

11.2.2 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。

11.3 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*」。

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

(1) 陽性品管：H37Rv-fully susceptible (ATCC 27294)。

行政院衛生署疾病管制局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 333 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(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：

(1) 陽性品管：H37Rv-fully susceptible (ATCC 27294)。

(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。

13 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 分鐘高壓滅菌後，依本局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。

行政院衛生署疾病管制局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 334 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄15.2 結核桿菌群生化試驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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

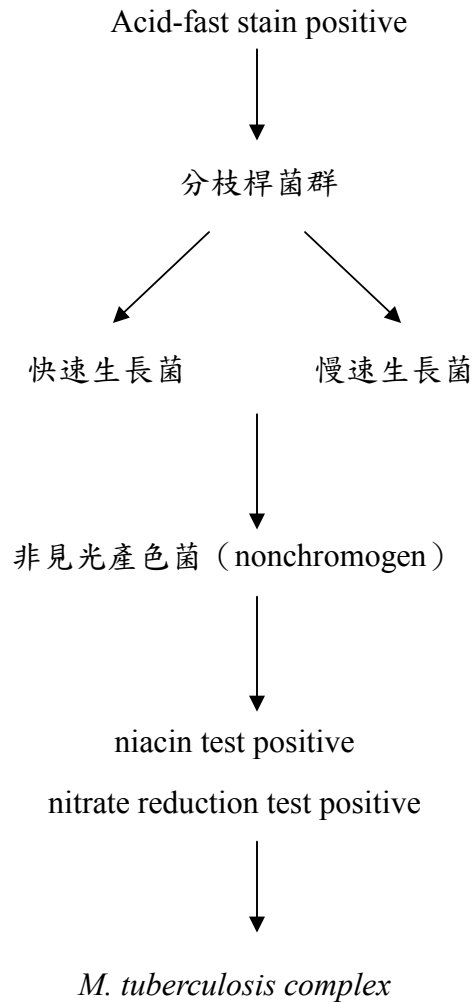
檢驗者：

實驗室主管：


行政院衛生署疾病管制局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 335 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄15.3 結核桿菌群生化鑑定流程




行政院衛生署疾病管制局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 336 頁/共 1091 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 μ 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/ μ L) (GenoType MTBDR*plus* 試劑組)。
 - 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 MgCl₂)。
 - 5.5 無菌水 (Sterilized deionized H₂O, ddH₂O)。
 - 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 Concetrtrate) (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 μ L 具過濾塞之微量吸管尖。
 - 5.18 100 μ L 具過濾塞之微量吸管尖。
 - 5.19 200 μ L 具過濾塞之微量吸管尖。
 - 5.20 1000 μ L 具過濾塞之微量吸管尖。

行政院衛生署疾病管制局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 337 頁/共 1091 頁		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[®])
- 6.4 1-10 μ L 微量吸管分注器。
- 6.5 10-100 μ L 微量吸管分注器。
- 6.6 10-200 μ L 微量吸管分注器。
- 6.7 10-1000 μ L 微量吸管分注器。

7 環境與設施安全

- 7.1 於生物安全第一等級 (BSL-1) 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

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

檢體採集當天低溫運送，參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 (μ L)
PNM (GenoType MTBDR _{plus} 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	0.3
檢體	5.0
總體積為 50 μ 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 μ 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 μ L (2.1 不活化處理離心後之上清菌液)。

行政院衛生署疾病管制局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 338 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

11 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	∞


12 雜交

- 12.1 預熱核酸雜交反應槽至 45 °C。
- 12.2 將 HYB 和 STR 預熱至 37-45 °C。
- 12.3 在室溫下，將 20 µL 之 DEN 加入反應盤中之專用溝槽。
- 12.4 加入 20 µL 之核酸聚合酶產物與 DEN 混和均勻，反應 5 分鐘。
- 12.5 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。
- 12.6 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。
- 12.7 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。
- 12.8 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。
- 12.9 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。
- 12.10 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。
- 12.11 倒掉無菌水，加入 SUB 溶液（10 µL SUB-C 加 1 mL SUB-D），避光靜置 3-20 分鐘，直到核酸線性探針反向雜交紙片呈色完成。
- 12.12 加入無菌水 1 mL 擺動清洗 1 分鐘 2 次停止顯色。

13 結果判定（註）

- 13.1 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 16.1），依核酸線性探針反向雜交紙片之顯色位點與比對表（附錄 16.2）對照，得到檢體之抗藥性結果。
- 13.2 雜交紙片需同時出現 Conjugate control (CC)、Amplification control

行政院衛生署疾病管制局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 339 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(AC)、*M.tuberculosis* complex (TUB) 三種陽性反應時，抗藥結果判定始為可信。

- 13.3 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。
- 13.4 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。]

14 品質管制

- 14.1 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。
- 14.2 每次實驗前確保所有儀器功能正常。


15 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 分鐘高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。

16 附錄

- 16.1 GenoType MTBDR_{plus} 評估表。
- 16.2 核酸線性探針反向雜交紙片之顯色位點與比對表。


行政院衛生署疾病管制局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 340 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

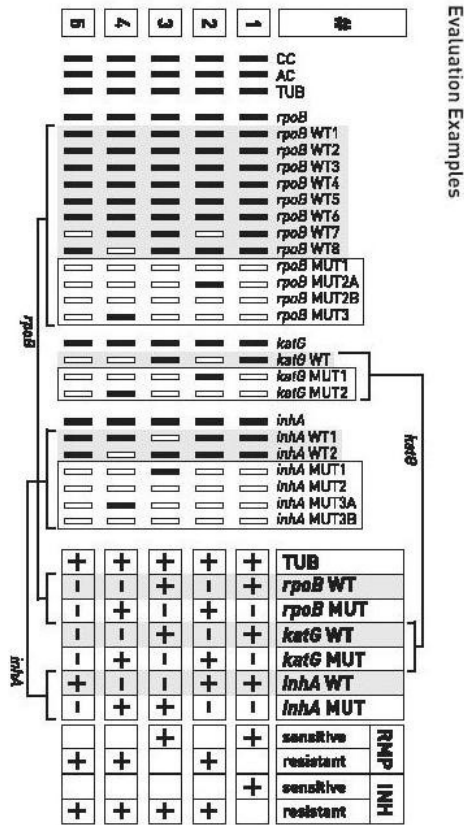
附錄 16.1 GenoType MTBDRplus 評估表

	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


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號： 頁次：第 341 頁/共 1091 頁	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 修訂日期： 年 月 日
---	----------------------------	-----------------------------	----------------------------

附錄 16.2 核酸線性探針反向雜交紙片之顯色位點與比對表



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	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
	頁次：第 342 頁/共 1091 頁		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 適用檢體範圍

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 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 µg/mL Isoniazid (INH)。

1.0 µg/mL Isoniazid (INH)。

1.0 µg/mL Rifampin (RMP)。

5.1.2 一片含：2.0 µg/mL Streptomycin (SM)。

10.0 µg/mL Streptomycin (SM)。

5.0 µg/mL Ethambutol (EMB)。

10.0 µg/mL Ethambutol (EMB)。

5.2 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。

5.3 含 4.5 mL 生理食鹽水之無菌平底玻璃小瓶。

5.4 塑膠滴管。

5.5 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% CO₂ 溫箱。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	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
	頁次：第 343 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

7 環境與設施安全

- 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

無。

9 檢體運送及保存

9.1 檢體運送採三層包裝

- 9.1.1 第一層為防水材質，並含有螺旋蓋可防止檢體液體滲漏，上面標示有生物危害標誌及正確之內含檢體名稱及種類。
- 9.1.2 第二層為防水之材質，含有螺旋蓋防止滲漏，能承受高度落下之撞擊而不破裂，內含碰撞緩衝材質可包覆第一層物品，另含吸附性物質以吸附意外滲漏之第一層檢體。
- 9.1.3 第三層包裝必須裝有適當碰撞緩衝材質，可固定第二層物質並防止運送途中任何震動所可能造成之傷害破損，外面必須標示有詳細之送件者及收件者姓名及地址，並且標示有國際通用之生物感染性物質之安全標示。
- 9.1.4 如果在第二層內裝有多支檢體，每支檢體應個別使用防水包裝再裝入第二層內，以防止檢體互相碰撞而破裂。
- 9.1.5 更詳細運送包裝方法請參考國際航空運輸組織 (International Air Transport Association, IATA) 所制定之危險物質運送包裝方法 (Packing Instruction 620) 及本局全球資訊網刊載之「防疫檢體採檢手冊」第四版，
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。


9.2 檢體需保存於 2°C-8°C。

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	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
	頁次：第 344 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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% CO_2 之 35°C - 37°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 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。
- 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	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
	頁次：第 345 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

13 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 分鐘高壓滅菌後，依本局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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 346 頁/共 1091 頁		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西尼羅病毒。

2 適用範圍

適用於急性期發病病患七病日內血液檢體、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組織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，加入抗西尼羅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，測定是否有西尼羅病毒。


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, Biological 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 西尼羅病毒 (ATCC VR-1510): 西尼羅病毒以 C6/36 細胞培養 3 天, 取上清液, 當西尼羅病毒來源。
- 5.4 抗西尼羅病毒抗體 (monoclonal antibody WNV3A3, BioReliance, UK, Cat. no. CN#:80-524-WNV3A3)。
- 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 (H₂O)。
- 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、1,250 μL 之吸管尖。

6 儀器設備

- 6.1 28°C CO₂ 培養箱 (Astec, Japan, SCI-165DC)。
- 6.2 37°C CO₂ 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)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法


	編號：	西尼羅病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 347 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 6.5 吹風機。
- 6.6 5-40 μL Pipette 及 40-200 μL Pipette。
- 6.7 -20°C 及 -80°C 冷凍櫃。
- 7 環境與設施安全
 - 7.1 檢驗操作在生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室進行。
 - 7.2 水質： 25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透可達 $18\Omega\text{-CM}$ 以上超純水。
- 8 檢驗採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 10 檢驗步驟
 - 10.1 在 96 孔組織培養盤中將患者血清 5 μL 以細胞培養液做 20、40、80、160 倍連續稀釋，每孔加入 50 μL 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 μL 以細胞培養液做 2、4、8、16 倍連續稀釋，每孔加入 50 μL 之 2 倍細胞培養液連續稀釋腦脊髓液。)每孔中再加入 100 μL 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 天，以細胞括杓括下細胞→以血球計術器計算細胞量。配製成 $1\times 10^6/\text{mL}$ 細胞懸浮液】。
 - 10.2 置 28°C 5% 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°C 保存。
 - 10.4 取 20 μL PBS 刮下培養盤中之細胞，在 24 孔玻璃片上做抹片。
 - 10.5 於室溫中風乾後，置於 -20°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°C 冰箱中或直接染色。
 - 10.8 在抹片上加上 25 μL 抗西尼羅病毒單株抗體。
 - 10.9 將抹片放置在潮濕的培養皿中，置於 37°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 μL 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 348 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

11 結果判定

- 11.1 在螢光顯微鏡下將檢測檢體與 Positive control 及 Negative control 比對判讀。
- 11.2 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。

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-3 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 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

- 13.1 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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序辦理。
- 13.2 未使用完血清放回 -80°C 冰箱保存。


14 參考資料

- 14.1 Garmendia AE, Kruijning HJV, French RA, Anderson JF, Andreadis TG, Kumar A, West AB. 2000. Recovery and identification of West Nile virus from a hawk in winter. J Clin Microbiol 38: 3110-3111。
- 14.2 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。

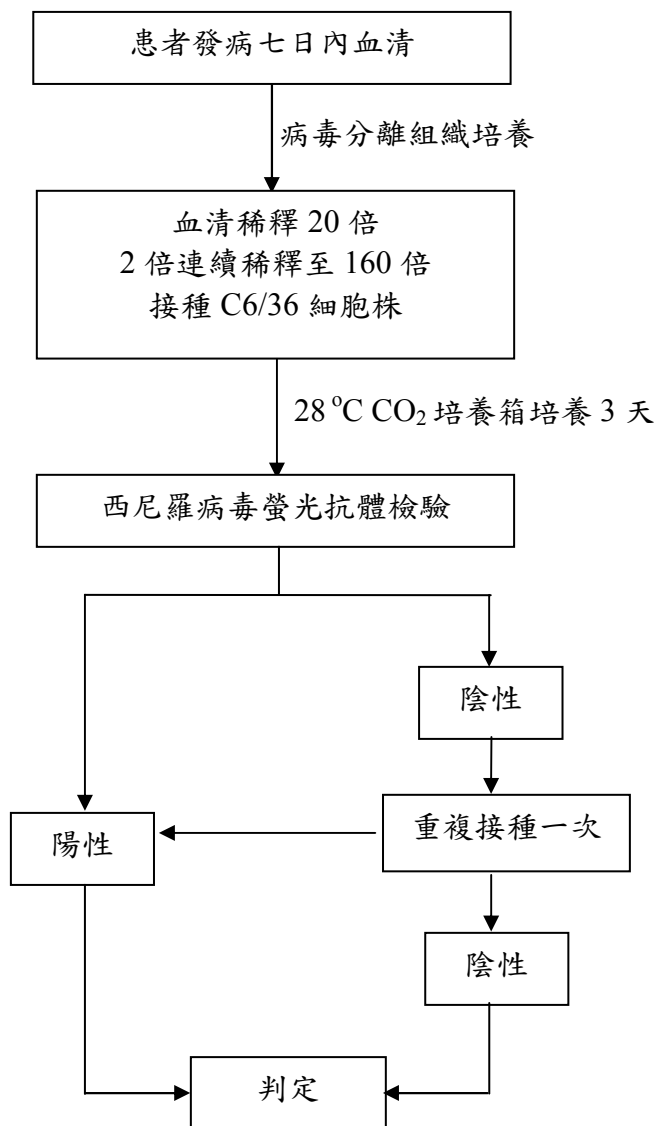
15 附錄

- 15.1 西尼羅病毒分離與鑑定流程圖。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 349 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 西尼羅病毒分離與鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 350 頁/共 1091 頁		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西尼羅病毒核酸。

2 適用範圍

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 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 QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, Cat. no. 52906)。

5.1.1 QIAmp spin columns。

5.1.2 2 mL 收集管。

5.1.3 溶解液 (AVL)。

5.1.4 運送 RNA (carrier RNA)。

5.1.5 清洗液 (AW1)。

5.1.6 清洗液 (AW2)。

5.1.7 萃取液 (AVE)。

5.1.8 氣密管。

5.2 Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix, 1-step kit (Stratagene, Cat. no.600835)。

5.2.1 RT-PCR master mix

5.2.1.1 2X Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix：

(a) RT-PCR buffer。

(b) SureStarTaq DNA polymerase。

(c) dNTP mix (GAUC)。

(d) SYBR Green I。

(e) ROX (passive reference dye)。


(f) $MgCl_2$ 。

5.2.1.2 RT/RNase block enzyme mixture。

(a) Moloney-based reverse transcriptase。


(b) RNase。

行政院衛生署疾病管制局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 351 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.3 陽性對照組 RNA (positive control RNA)。
 - 5.4 陰性對照組 RNA (negative control RNA)：
 - 5.4.1 DNase, RNase-free H₂O。
 - 5.4.2 過去檢驗過的陰性血清。
 - 5.5 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透去離子可達 18MΩ-CM 以上超純水。
 - 5.6 定量 PCR 專用八連排反應管(QPCR 8-strip tubes) (Stratagene, USA Cat. no. 410022)。
 - 5.7 定量 PCR 專用八連排反應蓋(QPCR 8-strip caps) (Stratagene, USA Cat. no.410024)。
 - 5.8 無菌過濾型 10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1,000 μL 吸管尖。
 - 5.9 無菌 1.5 mL 微量離心管。
 - 5.10 無粉手套。
- 6 儀器設備
- 6.1 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC)。
 - 6.2 Mx4000 multiple quantitative PCR system (Stratagene, USA)。
 - 6.3 10 μL、20 μL、40 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL 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°C。
 - 6.7 冷凍櫃：-20°C。
 - 6.8 高壓滅菌鍋。
- 7 環境與設施安全
- 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一等級 (BSL-1) 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 檢驗採集
- 參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9 檢體運送及保存
- 參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 10 試劑之準備
- 10.1 AVL buffer
 - 10.1.1 新開封時要加一瓶 carrier RNA, 先取 1 mL AVL buffer 至 Carrier RNA tube 中 (紅頭螺旋管), 待完全溶解再 Transfer 回 AVL

行政院衛生署疾病管制局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 352 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

buffer 瓶中，混合均勻。

- 10.1.2 每次使用時先檢查是否有結晶產生，若有結晶則以 80°C 水浴槽回溫 3 至 5 min，不可超過 5 min，回溫次數不可超過六次，AVL buffer/carrier RNA 若保存於室溫不可超過二星期。

10.2 AW1 buffer

- 10.2.1 新開封時依瓶身指示加入 125 mL 絕對酒精，得到總體積 220 mL，室溫下可保存 1 年。

10.3 AW2 buffer

- 10.3.1 新開封時依瓶身指示加入 160 mL 絕對酒精，得到總體積 226 mL，室溫下可保存 1 年。

11 檢驗步驟

11.1 萃取病毒 RNA

- 11.1.1 先吸取 560 μ L Lysis buffer (AVL buffer 加 carrier RNA) 放入 1.5 mL 微量離心管，再加入 140 μ L 的血清檢體，震盪混合，室溫靜置反應 10 min。

- 11.1.2 加入 560 μ L 絕對酒精，震盪混合 1 min，以終止反應。

- 11.1.3 將上述混合液以抽氣方式通過管柱 (column)，檢體中的 RNA 會吸附在管柱底部的膜上。

- 11.1.4 加清洗液 (AW1) 850 μ L，抽氣 3 min，做第一次沖洗，以清洗膜上所吸附的雜質。

- 11.1.5 以清洗液 (AW2) 850 μ L，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。抽氣後再離心 3000 rpm，3 min，以徹底去除膜上殘留酒精。

- 11.1.6 加入萃取液 (AVE) 75 μ L，室溫靜置 10 min，在 4°C 離心 3000 rpm，3 min，取得 RNA。

11.2 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (one-step real-time RT-PCR)。


- 11.2.1 取 5 μ L RNA 做模板，加入西尼羅病毒專一性引子組 (參考附件 15.2)，置於冰上。

- 11.2.2 加入反應溶液 (成分如下表)，調整反應總體積至 25 μ L。

初始濃度	加入體積	最終濃度
2X Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix	12.5 μ L	1X
Primer A	Variable	如參考附錄 16.2
Primer B	Variable	如參考附錄 16.2
RT/RNase block enzyme mixture	1 μ L	
RNase-free H ₂ O	Variable	

- 11.2.3 單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應：使用 Mx4000 quantitative PCR system (Stratagene, USA)。

行政院衛生署疾病管制局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 353 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- (1) R.T.作用：50°C，30 min。
- (2) Taq polymerase activation：95°C，15 min。
- (3) Denaturation：94°C，15 sec。
- (4) Annealing：55°C，30 sec。
- (5) Extension：72°C，20 sec。
- (6) 77°C，30 sec。收集螢光值。
- (7) 重複(3)至(6)步驟45 Cycle。

11.2.4 Melting curve analysis：

- (1) 95°C，1 min。
- (2) 68°C → 90°C +1°C/30 sec/cycle。
- (3) 重複(2)步驟45 cycles。

12 結果判定

- 12.1 以 Mx4000 軟體分析結果，可以從 Amplification plots 與 Tm 值作判斷，結果是陽性或陰性。
- 12.2 在陽性對照與陰性對照組的 Ct 值符合設定值下，凡樣品經西尼羅病毒專一性引子組之 Ct 值均小於 40 者，判為西尼羅熱陽性。
- 12.3 觀看 Melting Curve 時，一般來說，須 Tm 值 > 80°C 的 PCR 產物，才為較具專一性之產物，而 < 75°C 之 PCR 產物，通常為非專一性的產物。

13 品質管制

- 13.1 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。
- 13.2 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。
- 13.3 Mx4000 機器定時作檢測與較正。
- 13.4 Pipettman 做定期的校對。
- 13.5 注意檢測套組的使用期限與適當的儲放溫度。


14 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 min 高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序（編號：G-xx-2006-D）辦理。

15 參考資料

- 15.1 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。
- 15.2 Qiagen, QIAamp viral RNA mini kit handbook pp.18-19。


行政院衛生署疾病管制局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 354 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

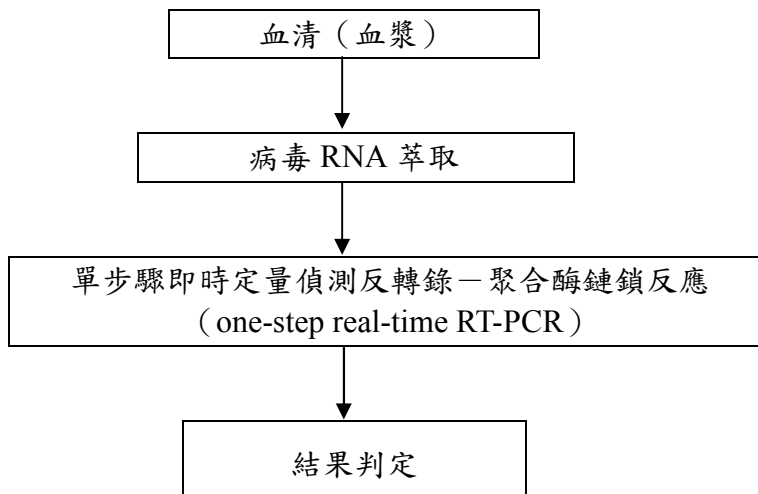
16 附錄

- 16.1 西尼羅病毒鑑定(單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應)流程圖。
- 16.2 西尼羅病毒診斷用引子組序列表。


行政院衛生署疾病管制局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 355 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.1 西尼羅病毒鑑定 (單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應) 流程圖




行政院衛生署疾病管制局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 356 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.2 西尼羅病毒診斷用引子組序列表


West Nile virus specific primer：		參與反應的濃度
WNENV-forward	TCA GCG ATC TCT CCA CCA AAG	500nM
WNENV-reverse	GGG TCA GCA CGT TTG TCA TTG	500nM

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 357 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的
西尼羅病毒 IgM 和 IgG 抗體檢測。
- 2 適用範圍
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异性抗體。
- 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 358 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

conjugate, Jackson, Code no. 115-006-071, USA)

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 μ L、1,000 μ 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 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1,000 μ L (pipettors)。

6.4 震盪器。

6.5 冰箱：4°C。

6.6 冷凍櫃：-20°C。

6.7 高壓滅菌鍋。

7 環境與設施安全

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一等級 (BSL-1) 實驗室進行。

8 檢驗採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 之抗黃熱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 μ L 加入 Dilution buffer 0.7 mL 稀釋 100 倍。

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)，

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 359 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 (OD₄₀₅₋₆₃₀)。

11 結果判定

- 11.1 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。
- 11.2 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。
- 11.3 WN positive control serum 應符合 IgM OD 值 > 1.0，IgG OD 值 > 0.5。
- 11.4 JE positive control serum 應符合 IgM OD 值 > 1.0，IgG OD 值 > 0.5。
- 11.5 Negative control serum 應符合 IgM OD 值 < 0.2，IgG OD 值 < 0.2。

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 min 高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序(編號：G-xx-2006-D)辦理。

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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 360 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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.

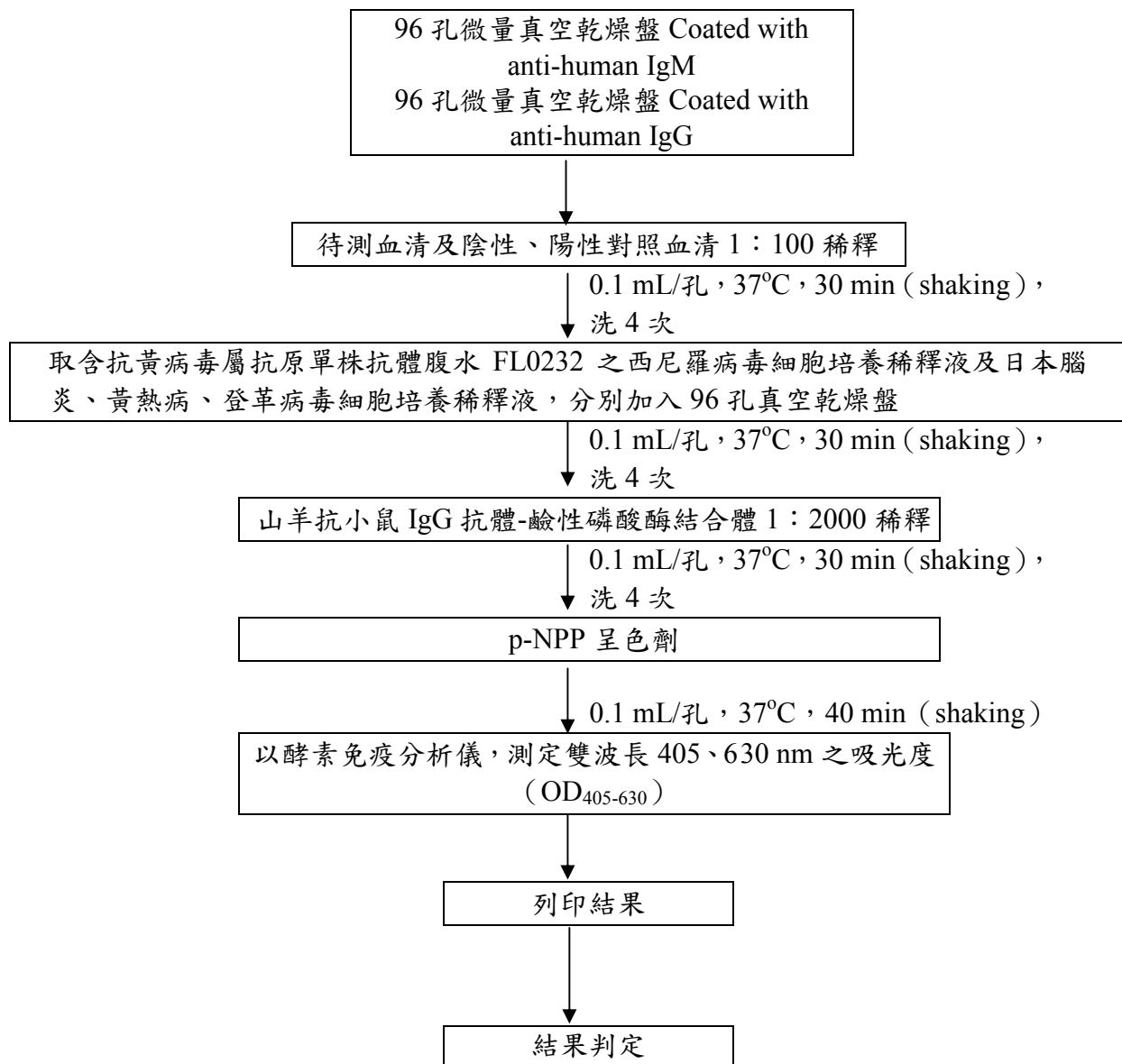
15 附錄

15.1 西尼羅病毒IgM及IgG抗體試驗（酵素免疫分析法）流程圖


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 361 頁/共 1091 頁		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。



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	普氏立克次體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 362 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測疑似病患的血液或組織檢體中是否含有流行性斑疹傷寒立克次體 (*R. prowazeki*)。

2 適用檢體種類

適用於病患急性期發病七病日內血液或組織檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用細胞培養方法分離流行性斑疹傷寒立克次體 (*R. prowazeki*)，並以間接免疫螢光法鑑定。


5 試劑耗材

- 5.1 Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Sweden, Cat. no. 17-1440-02)。
- 5.2 DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) (Gibco, USA, Cat. no. 14040-133)。
- 5.3 MEM 細胞生長培養基 (minimum essential medium; MEM) (Gibco, USA, Cat. no. 11095-080)。
- 5.4 Medium 199 細胞生長培養基 (Gibco, USA, Cat. no. 11150-059)。
- 5.5 胎牛血清 (fetal calf serum; FCS) (Biological Industries, Israel, Cat. no. 04-001-1A)。
- 5.6 15 mL 離心管。
- 5.7 2 mL 保存瓶。
- 5.8 Shell-vial 培養瓶 (Sigma, U.K., Cat. no. Z645338)。
- 5.9 病人血清：2-8°C 保存、400 倍稀釋。
- 5.10 螢光標幟抗體 FITC-goat anti-human IgG + A + M (H+L) (Zymed, USA, Cat. no. 62-8311)。
- 5.11 DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma, USA, Cat. no. D2650)。
- 5.12 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透去離子可達 18M Ω -CM 以上超純水。
- 5.13 細胞株 L929 (ATCC CCL-1)。
- 5.14 細胞株 Vero (ATCC CCL-81)。

6 儀器設備

- 6.1 倒立顯微鏡。
- 6.2 螢光顯微鏡。
- 6.3 37°C、CO₂ 培養箱。
- 6.4 37°C 溫箱。
- 6.5 離心機。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	普氏立克次體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 363 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

7 環境與設施安全

7.1 避免吸入及接觸傳染，病人的血液或組織檢體，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三等級（BSL-3）實驗室進行。

8 檢體採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 檢驗前處理

10.1.1 將 1-4 mL 的抗凝固全血，以 Ficoll-paque 分離周邊血液淋巴細胞，最後回溶於 1,000 μ L 不含 FCS 的 MEM。

10.1.2 將分離好的周邊血液淋巴細胞（1,000 μ L）移至 PP 材質保存管，標示號碼及日期，接種細胞後，其餘檢體保存於-70°C。

10.2 接種

10.2.1 取培養 1-2 天，已成單層之 L929 細胞或 Vero 細胞的 shell-vial 培養瓶，吸除舊有生長培養基，以 DPBS 溶液清洗一次，加入 1 mL MEM-4% FCS 或 1 mL Medium199-4% FCS。

10.2.2 每一檢體接種兩支 shell-vial 細胞培養瓶，每瓶接種 200 μ L 周邊血液淋巴細胞。輕輕搖晃使接觸所有細胞。

10.2.3 於 22°C，以 700 xg 離心 1 hr。

10.2.4 以 MEM 清洗兩次後，加入 1 mL MEM-4% FCS 或 1 mL Medium199-4% FCS。

10.2.5 培養於 32°C，5% CO₂ 培養箱。

10.2.6 感染後持續觀察 shell-vial 內細胞情況，如生長培養基顏色過紫則更換或添加生長培養基。

10.2.7 感染 10 天後，進行 IFA，觀察感染情況。


10.2.8 感染兩週後，PCR 陽性或 IFA 陽性者，利用 tip 刮起細胞並以每管 500 μ L 分裝至抗凍管-80°C 凍藏之。

10.2.9 若為 PCR 陽性而感染兩週後無病原體生長則將原冰存之檢體細胞重複冷凍解凍 3 次後（重複置-70°C→37°C），再行細胞接種。

10.3 觀察

10.3.1 自接種檢體後翌日起每天輕搖 shell-vial，觀察生長培養基顏色變化，若呈現紅紫色，則更換或添加新的生長培養基。並觀察玻片上細胞的貼附情形，受感染的細胞會產生細胞病變

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	普氏立克次體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 364 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(C.P.E.) 而造成單層細胞的空隙。

- 10.3.2 接種細胞產生顯著 C.P.E.者，立即收集細胞及培養液進行鑑定。
- 10.3.3 細胞未產生顯著 C.P.E.者，待培養 10 天後，收集細胞及培養液，以螢光試劑進行鑑定。
- 10.4 間接螢光免疫法鑑定
 - 10.4.1 取出 Shell-vial 內的玻片，待細胞風乾後置入含有 -20°C 丙酮之玻片槽，固定 10 min。
 - 10.4.2 取出風乾後以病人血清作為一級抗體滴於玻片上（約 20 μL 左右），將玻片置於保濕盒（moisture chamber），置於 37°C 恆溫箱反應 60 min。
 - 10.4.3 以含有 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液清洗玻片三次後風乾。
 - 10.4.4 每個玻片加二級螢光抗體（FITC-goat anti-human IgG+A+M）。每滴約 20 μL 左右，將玻片置於保濕盒，置於 37°C 恆溫培養箱反應 30 min。
 - 10.4.5 以含有 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液清洗玻片三次後風乾。
 - 10.4.6 以封存劑（配方為 PBS：甘油=1：1）封片後，以螢光顯微鏡鏡檢。

11 結果判定

在螢光顯微鏡下，陽性檢體所培養出之立克次體，可呈現圓桿狀且大小一致之綠色菌體，無綠色菌體即為陰性。

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操作箱內進行。
- 12.3 使用過之器材必須加以消毒處理。
- 12.4 Shell-vial 細胞培養時細胞生長培養基應添加 10% FCS；感染後細胞生長培養基則添加 4% FCS。
- 12.5 培養基中不可添加四環黴素及氯黴素等抗生素。


13 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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序（編號：G-xx-2006-D）處理。

14 參考資料

- 14.1 Tsai KH, Wang HC, Chen CH, Huang JH, Lu HY, Su CL, Shu PY. 2008. Isolation and identification of a novel spotted fever group Rickettsia, strain IG-1, from *Ixodes granulatus* ticks collected on Orchid island (Lanyu), Taiwan. Am J Trop Med Hyg 79: 256-261。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	普氏立克次體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 365 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

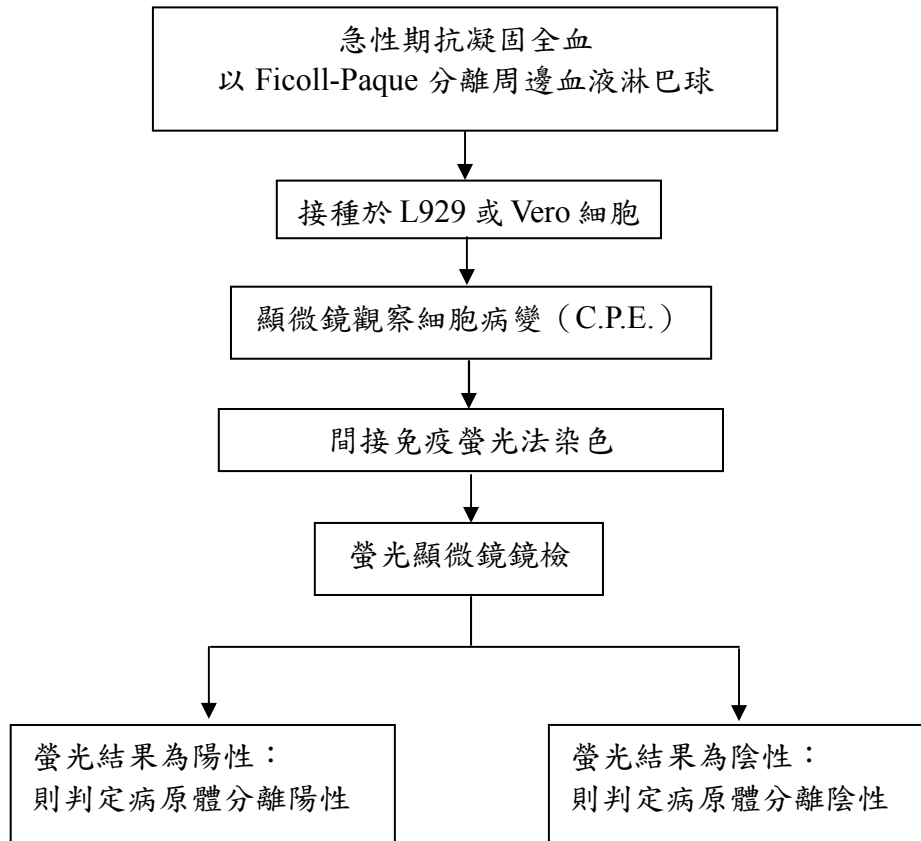
15 附錄

15.1 流行性斑疹傷寒立克次體 (*R. prowazeki*) 分離與鑑定流程圖。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	普氏立克次體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 366 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 流行性斑疹傷寒立克次體 (*R. prowazeki*) 分離與鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 367 頁/共 1091 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 56kDa 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 QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen, Cat. no. 51106)。

5.1.1 Lysis buffer (AL)。

5.1.2 清洗液 (AW1)。

5.1.3 清洗液 (AW2)。

5.1.4 萃取液 (AVE)。

5.2 QuantiTect SYBR green PCR kit (Qiagen, Cat. no. 204143)。

5.2.1 PCR master mix。

(1) 2X QuantiTect SYBR green PCR master mix :

(a) QuantiTect SYBR green PCR buffer。

(b) HotStarTaq DNA polymerase。

(c) dNTP mix including dUTP。

(d) SYBR hreen I。

(e) ROX (passive reference dye)。

5.2.2 DNase, RNase-free H₂O。

5.3 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。


5.3.1 *Rickettsia typhi* (970432)。

5.3.2 *R. sibirica*。

5.3.3 *R. japonica*。

5.3.4 *R. kato*。

行政院衛生署疾病管制局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 368 頁/共 1091 頁	病原體核酸檢測	修訂日期： 年 月 日

5.3.5 *R. karp*。

5.4 陰性對照組 (negative control RNA)：

5.4.1 DNase, RNase-free H₂O。

5.5 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透去離子可達 18M Ω-CM 以上超純水。

5.6 定量 PCR 專用八連排反應管 (QPCR 8-strip tubes) (Stratagene, USA Cat. no.410022)。

5.7 定量 PCR 專用八連排反應蓋 (QPCR 8-strip caps) (Stratagene, USA Cat. no.410024)。

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 無粉手套。

6 儀器設備

6.1 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。

6.2 Mx3000P Multiple Quantitative PCR System (Stratagene, USA)。

6.3 微量滴管分注器 2 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL (pipettors)。

6.4 高速離心機。

6.5 4°C 冰箱。

6.6 -20°C 冷凍櫃。

6.7 高壓滅菌鍋。

7 環境與設施安全

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一等級 (BSL-1) 實驗室進行。

7.3 應有獨立的操作空間，盡量與操作核酸相關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

8 檢驗採集

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。


10 檢驗步驟

10.1 萃取立克次體 DNA

10.1.1 先吸取 20 μL Protease (or proteinase K) 與 200 μL Lysis buffer (AL) 放入 1.5 mL Microtube，再加入 200 μL 的抗凝固全血檢體，震盪混合，56°C 下靜置反應 10 min。

10.1.2 加入 200 μL 酒精(96–100%)後，震盪混合以抽氣方式(1 min)

行政院衛生署疾病管制局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 369 頁/共 1091 頁	病原體核酸檢測	修訂日期： 年 月 日

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 (AW1) 750 μ 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 (AW2) 750 μ 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 (AE) 75 μ 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 μ L DNA 做模板，加入 (A)立克次體 16S rRNA 基因、(B)恙蟲病立克次體 56kDa 外膜蛋白基因、(C)斑點熱立克次體 17 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 μ L。


初始濃度	加入體積	最終濃度
2X QuantiTect SYBR green PCR master mix PCR buffer	25 μ L	1X
Primer	Variable	參考附錄 15.2
RNase-free H ₂ O	Variable	

10.2.4 即時定量聚合酶鏈鎖反應：使用 MX3000P quantitative PCR system (Stratagene, USA)。

- (1) Taq polymerase activation : 95°C , 15 min 。
- (2) Denaturation : 94°C , 15 sec 。
- (3) Annealing : 55°C , 30 sec 。
- (4) Extension : 72°C , 20 sec 。
- (5) 77°C , 30 sec 。收集螢光值 。
- (6) 重複 (3) 至 (6) 步驟 45 cycle 。

10.2.5 Melting curve analysis :

行政院衛生署疾病管制局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 370 頁/共 1091 頁	病原體核酸檢測	修訂日期： 年 月 日

- (1) 95°C, 1 min。
- (2) 68°C→90°C +1°C /30 sec/cycle。
- (3) 重複 (2) 步驟 45 cycles。

11 結果判定

- 11.1 以 MxPro 軟體分析結果，可以從 Amplification plots 與 Tm 值作判斷，結果是陽性或陰性。
- 11.2 在陽性對照與陰性對照組的 Ct 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 Ct 值小於 40 者，判為恙蟲病或斑疹傷寒陽性。
- 11.3 觀看 Melting curve 時，一般來說，須 Tm 值 >80°C 的 PCR 產物，才為較具專一性之產物，而 <75°C 之 PCR 產物，通常為非專一性的產物。

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 做定期的校對。
- 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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序(編號:G-xx-2006-D)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.

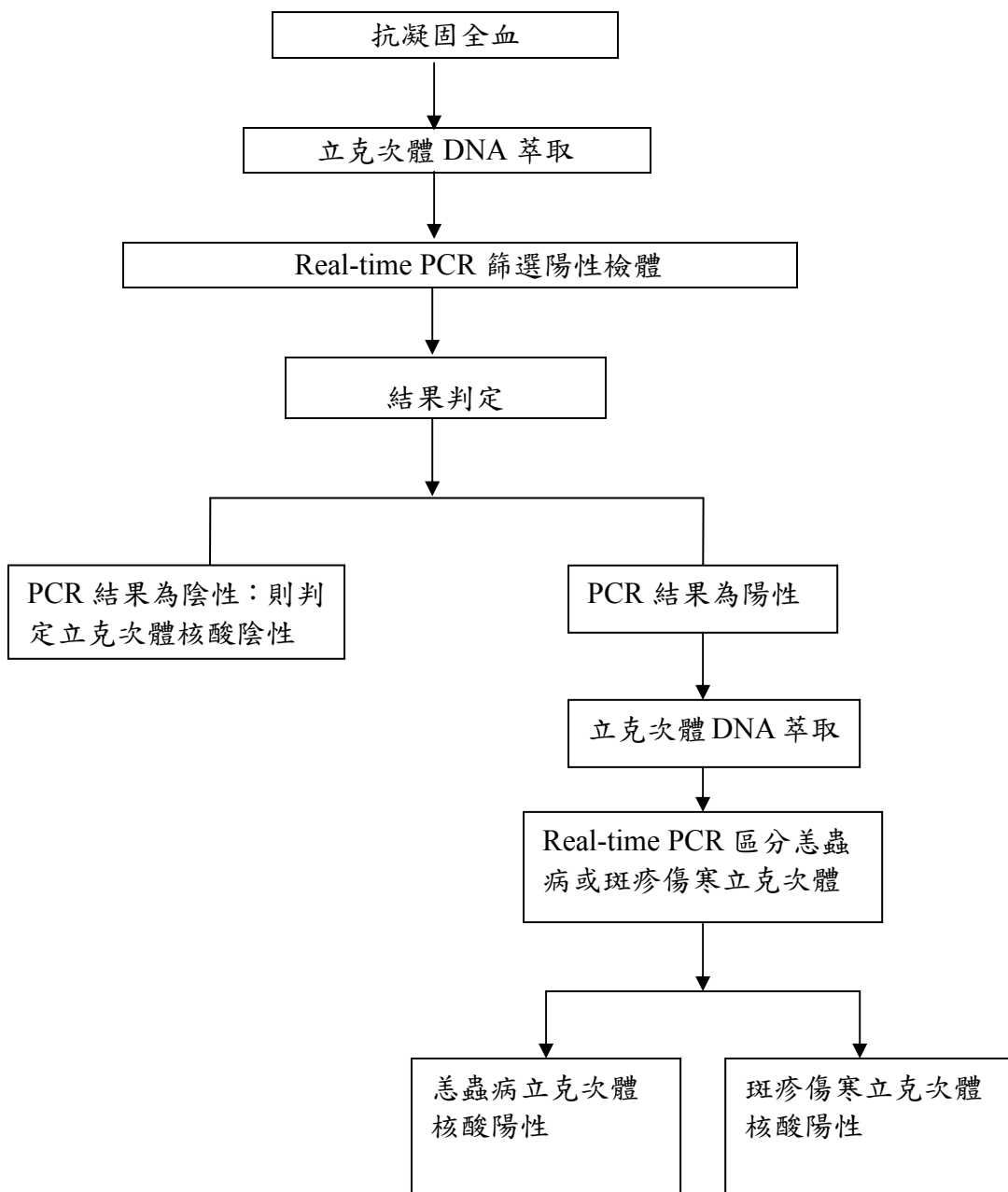
15 附錄

- 15.1 立克次體鑑定(即時定量聚合酶鏈鎖反應)流程圖。
- 15.2 立克次體診斷用引子組序列表。


行政院衛生署疾病管制局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 371 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局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 372 頁/共 1091 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 56kDa 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	普氏立克次體血清學抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 373 頁/共 1091 頁	(IgM 與 IgG, IFA)	修訂日期： 年 月 日

- 1 目的
以免疫螢光抗體方法檢測斑疹傷寒抗體以確定病例。
- 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 PBS (10X stock solution) 0.1 M pH 7.4 (Gibco BRL, USA, Cat. no. 70011-044)。
 - 5.2 螢光標幟抗體 FITC-goat anti-human IgG +A + M (H+L chain) (Zymed, USA, Cat. no. 62-8311)。
 - 5.3 螢光標幟抗體 FITC-goat anti-human IgM (Zymed, USA, Cat. no. 62-7511)。
 - 5.4 螢光標幟抗體 FITC-goat anti-human IgG (Zymed, USA, Cat. no. 62-7111)。
 - 5.5 地方性斑疹傷寒螢光抗原玻片 (*R. typhi* IFA slide) (Scimedx Corporation, USA, Cat. no. I-RTY01X)。
 - 5.6 流行性斑疹傷寒螢光抗原玻片 (*R. prowazekii* IFA slide) (Scimedx Corporation, USA, Cat. no. I-RPR01X)。
 - 5.7 IgG 去除劑 (focus diagnostics, USA, Cat. no. IF0209)。
 - 5.8 96-well U 型盤 (Greiner Bio-One, Germany, Cat. no. 650101)。
 - 5.9 50 mL 儲液槽 (Costar, USA, Cat. no. 4870)。
 - 5.10 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。
 - 5.11 *R. typhi* positive control serum (Scimedx Corporation, USA, Cat. no. CC196)：2-8°C 保存、直接使用不需稀釋。
 - 5.12 *R. prowazekii* positive control serum (Scimedx Corporation, USA, Cat. no. CC074)：2-8°C 保存、直接使用不需稀釋。
 - 5.13 Rickettsiae Universal Negative Control (Scimedx Corporation, USA, Cat. no. CC076)：2-8°C 保存、直接使用不需稀釋。
- 6 儀器設備
 - 6.1 螢光顯微鏡。
 - 6.2 37°C 溫箱。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法


	編號：	普氏立克次體血清學抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 374 頁/共 1091 頁	(IgM 與 IgG, IFA)	修訂日期： 年 月 日

- 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。
- 8 檢體採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 10 檢驗步驟
 - 10.1 檢驗前處理
 - 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 μ L 待測 IgM 力價之檢體，加入 70 μ L IgG 去除劑，以 1:8 稀釋比例混和後，靜置 5 min 備用。
 - 10.2 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 μ 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 μ 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)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	普氏立克次體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG, IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 375 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.3 IgM & IgG 抗體力價測定：

10.3.1 血清稀釋

(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 1:640 或以上。

(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。

10.3.2 將稀釋血清及陽性、陰性對照組血清各取 50 μ L 點入 12 孔抗原玻片上。

10.3.3 將玻片置於保濕盒，並於 37°C 恆溫箱作用 30 min。

10.3.4 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。

10.3.5 以蒸餾水沖洗玻片，風乾。

10.3.6 每孔內加二級螢光標幟抗體 (FITC-goat anti-human IgM 或 IgG)，每滴約 50 μ L。

10.3.7 將玻片置於保濕盒，並於 37°C 恆溫箱作用 30 min。

10.3.8 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。

10.3.9 以蒸餾水沖洗玻片，風乾。

10.3.10 加封存劑封片後，以螢光顯微鏡 400 倍鏡檢。

10.3.11 判定抗體力價。

11 結果判定

11.1 陽性的判定：若單支血清 IgM 有 1:80 以上，且 IgG 有 1:320 以上或配對血清 IgG 力價有 4 倍以上上升者，可判為陽性。

11.2 陰性的判定：IgM 以及 IgG 力價皆低於 1:40 者，可判為陰性。

11.3 無法判定：若 1:40 倍稀釋血清之 IFA- anti-human IgG+A+M 初步篩選 (screening) 結果為陽性，但血清 IgM 力價低於 1:80，且配對血清 IgG 力價無 4 倍以上上升者，則判為無法判定。

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	普氏立克次體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG, IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 376 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

13 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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序(編號:G-xx-2006-D)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.

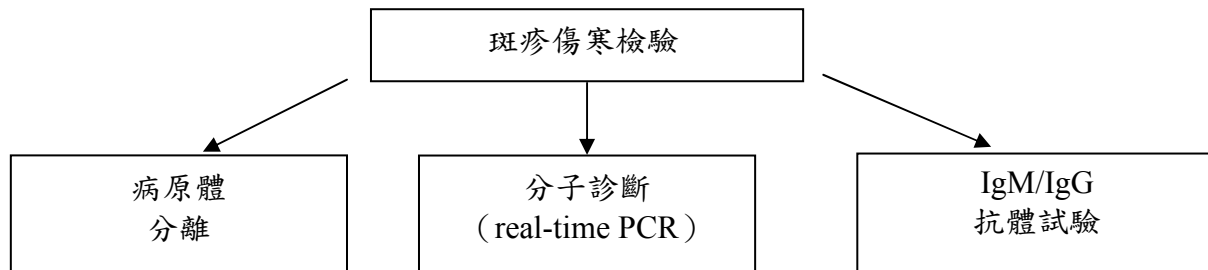
15 附錄

- 15.1 斑疹傷寒檢驗流程圖。
- 15.2 斑疹傷寒抗體試驗(免疫螢光抗體法)流程圖。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	普氏立克次體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG, IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 377 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

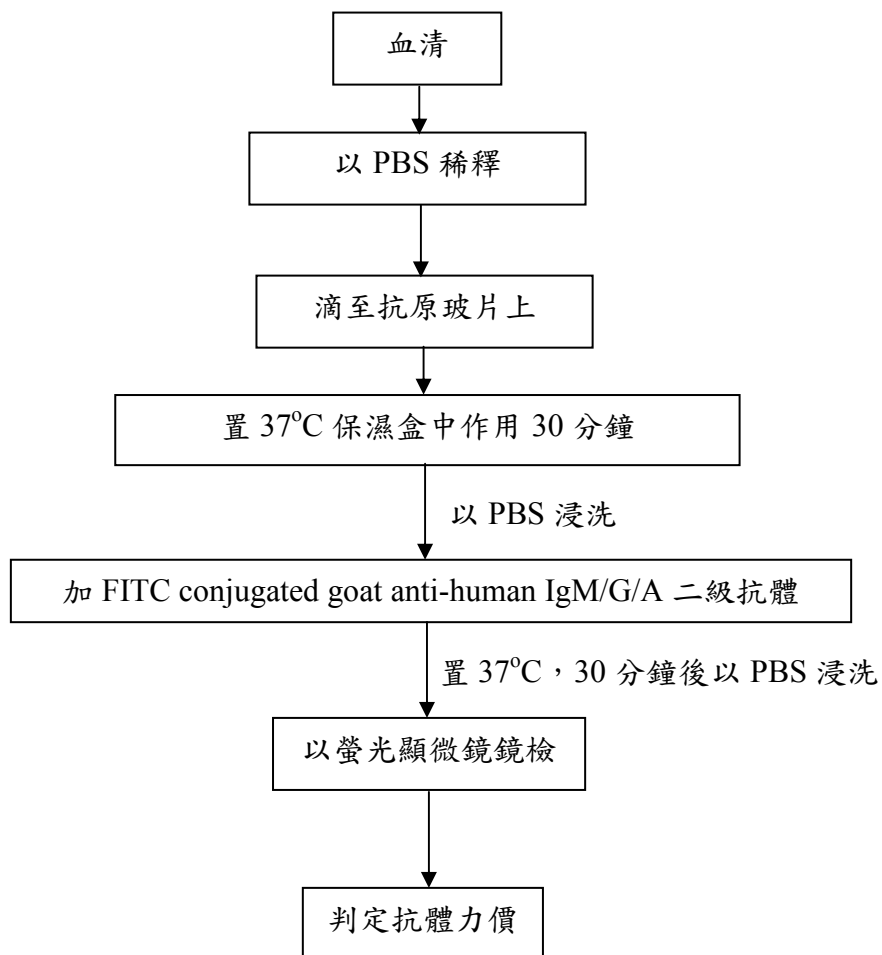
附錄 15.1 斑疹傷寒檢驗流程圖




行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	普氏立克次體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG, IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 378 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 斑疹傷寒抗體試驗（免疫螢光抗體法）流程圖




行政院衛生署疾病管制局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 379 頁/共 1091 頁		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)：CMP，台灣。
 - 5.2 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution)：Difco，美國或武藤化學，日本。
 - 5.3 氧化酶試劑 (oxidase strips)：MAST，英國或 BioMérieux，法國。
 - 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。
 - 5.9 抗血清：Bacto-*Bordetella parapertussis* Antiserum, Difco，美國。
 - 5.10 標準菌株：*Neisseria meningitides* 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 1,000X 油鏡。
 - 6.4 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 7 環境與設施安全
 - 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
鼻咽拭子，請參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

行政院衛生署疾病管制局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 380 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

9 檢體運送及保存

9.1 低溫運送及保存。

9.2 請參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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）：

(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）。

(2) 在每一格分別滴入 1 滴（約 40 μ L）無菌 0.85% 食鹽水，以 1 μ 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。

(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。

行政院衛生署疾病管制局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 381 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


11 結果判定

- 11.1 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。
- 11.2 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。
- 11.3 報告核發：百日咳菌陽性或百日咳菌陰性，副百日咳菌陽性或副百日咳菌陰性。
- 11.4 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。
- 11.5 結果的可報告區間
陽性：*Bordetella pertussis*
陰性：*Bordetella parapertussis*，non-*Bordetella pertussis*，non-*Bordetella parapertussis*，No growth。
- 11.6 緊急通報
無
- 11.7 干擾因素
 - 11.7.1 病人因素：病程發展階段、抗生素使用。
 - 11.7.2 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。
 - 11.7.3 培養溼度、溫度。
- 11.8 潛在變異的來源
 - 11.8.1 接種劃線技術。
 - 11.8.2 菌落型態辨識。
- 11.9 檢驗性能之規格

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，進行試驗同一批號試劑，之後每隔 3-6 個月再取一組進行試驗。
 - 12.1.2 測試菌株：陽性品管菌株，*Neisseria meningitidis* BCRC10714=ATCC13090，陰性品管菌株，*Escherichia coli* BCRC11509=ATCC25922。

行政院衛生署疾病管制局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 382 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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，實驗室每季進行一次品管測試。

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 μ L 的 loop 取菌液依四區畫線接種於測試培養基上，35°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，之後每隔 3 個月再進行試驗。

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 min 高壓滅菌後，依本局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。

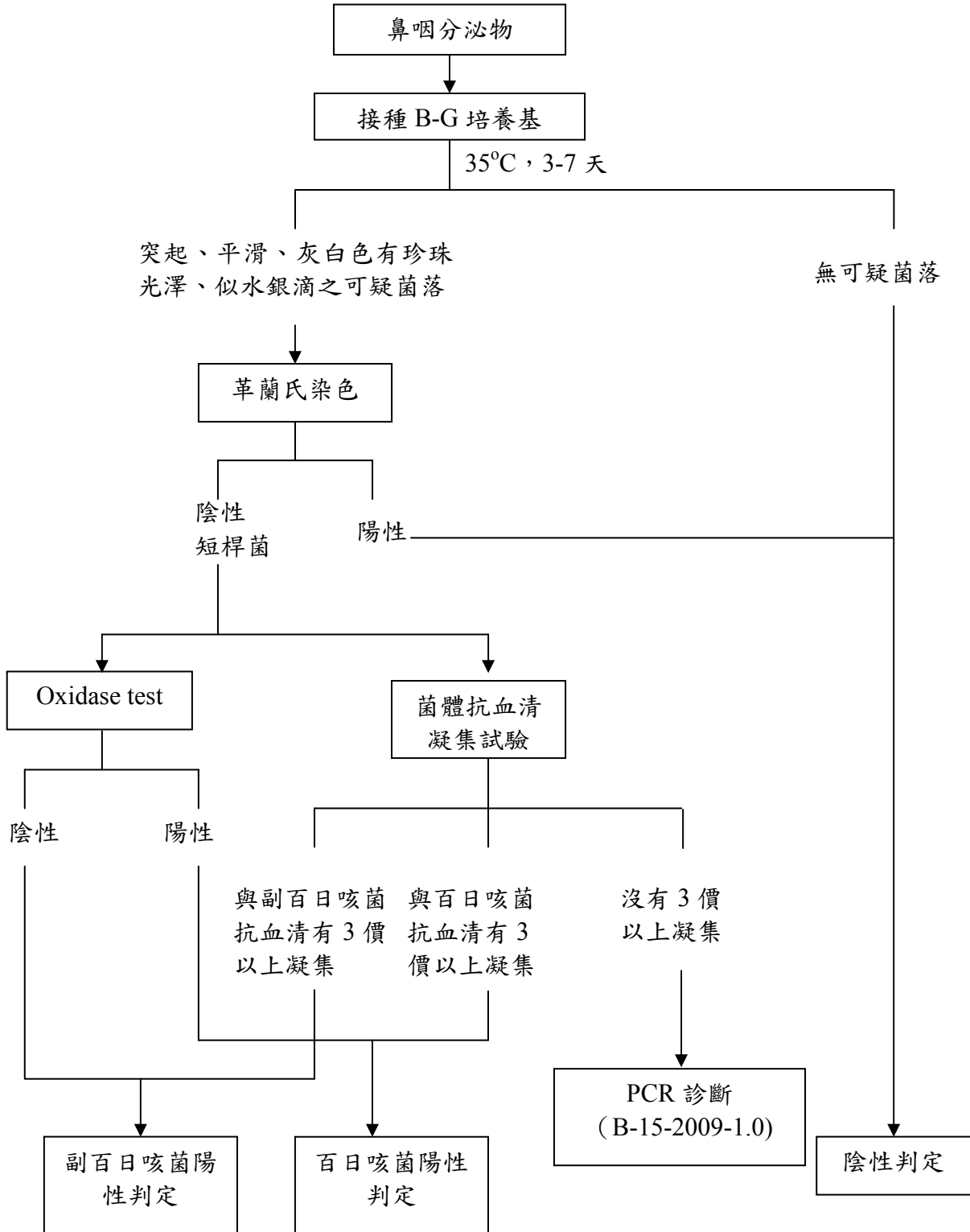
15.2 百日咳菌分離與鑑定紀錄表。

15.3 _____ Plate 品質管制紀錄表。


行政院衛生署疾病管制局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 383 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 百日咳菌分離與鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 384 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附件 15.2 百日咳菌分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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										
	第 8 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：

行政院衛生署疾病管制局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 385 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 _____ Plate 品質管制紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

_____ 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：

行政院衛生署疾病管制局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 386 頁/共 1091 頁		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 18Ω 超純水，滅菌 121°C，15 min。

5.2 PCR 反應管：LTK，台灣。成分 Taq DNA polymerase 2U，dNTP 1 mM，Buffer salt，Stabilizer。

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。

行政院衛生署疾病管制局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 387 頁/共 1091 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 環境與設施安全

- 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

實驗室已分離菌株。

9 檢體運送及保存

無。

10 檢驗步驟

10.1 檢體處理

- 10.1.1 分離的菌體：以 1 μ L 接種環挑取 1/2 Loop 的新鮮菌落，放入含 100 μ 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 xg (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 μ L
Each primer (5 μ M)	1 μ L
PCR 反應管商品內含 (Taq DNA polymerase、dNTP、Buffer salts、Stabilizer)	
Total volume (加無菌水)	20 μ 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 μ L
Each primer (5 μ M)	1 μ L
PCR 反應管商品內含 (Taq DNA polymerase、dNTP、Buffer salts、Stabilizer)	
Total volume (加無菌水)	20 μ L

- 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。

行政院衛生署疾病管制局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 388 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

72°C/10 min，1 cycle。

10.4 PCR 電泳分析。

11 結果判定

11.1 陽性判定標準：

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，副百日咳菌陽性或副百日咳菌陰性。

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。

11.4 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。

11.5 緊急通報

無。

11.6 干擾因素

培養基上物質。

11.7 潛在變異的來源

環境中核酸污染。

11.8 檢驗性能之規格

11.8.1 Sensitivity：*Bordetella pertussis* limited DNA concentration 39 pg，*Bordetella parapertussis* limited DNA concentration 156 pg。

11.8.2 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。

13 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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。

行政院衛生署疾病管制局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 389 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


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。

行政院衛生署疾病管制局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 390 頁/共 1091 頁		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

檢體 (已分離之培養菌)

以 1 μ L 接種環挑取 1/2 loop 的新鮮菌落，放入含 100 μ L 無菌水的 1.5 mL eppendorf 無菌管中，以 100°C 熱煮 10 分鐘，放入離心機 5,000 xg (12,000 rpm) 離心 5 分鐘，取上清液當作 template

PCR (P1/P2/P3) 反應混和物配製，放入 PCR 機器中進行反應

PCR 電泳分析

產物片段
121 bp

產物片段
159 bp

沒有產物
片段

副百日咳菌
陽性

百日咳菌
陽性

PCR (8AU/519B) 反應混和物配製，放入 PCR 機器中進行反應

PCR 電泳分析


產物片段
512 bp

沒有產物
片段

陰性

結果不合理
重新進行實驗

行政院衛生署疾病管制局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 391 頁/共 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心 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 (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, 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：

行政院衛生署疾病管制局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 392 頁/共 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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 μ L)		
Each primer (5 μ M) 1 μ L		
Total volume (加無菌水) 20 μ L		
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：

行政院衛生署疾病管制局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 393 頁/共 1091 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啟始引發與後續「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：0.2 mL thermo-strip (Abgene Cat no. AB-0266)。
- 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 (QSP，宏屹科技代理)。
- 5.3 可拋棄式鼻咽拭子及採集管 Eswab (Copan Cat no. 482C，亞醫代理)。
- 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 (Cat no. LMP 206)。
- 5.8 Eiken fluorecent detection reagent (Cat no. LMP 221)
- 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)。

行政院衛生署疾病管制局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 394 頁/共 1091 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)：Eppendorf。
- 6.7 微量吸管 Pipetman：需 1,000 μ L、200 μ L、20 μ 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 環境與設施安全

- 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

病患鼻咽拭子檢體，請參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

冷藏運送，請參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 μ L ATL buffer。

10.2.3 加 20 μ 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 μ L AL buffer 及 1 μ L Carrier RNA (1 μ g/ μ L)，震盪 (vortex) 混勻 15 sec。

10.2.5 加 200 μ 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。

10.2.7 加入 500 μ L AW1 buffer，離心 1 min (8,000 rpm)，更換新的 Collection tube。

行政院衛生署疾病管制局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 395 頁/共 1091 頁	(PCR LAMP 法)	修訂日期： 年 月 日

- 10.2.8 加入 500 μ 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 μ L Buffer AE，直接滴在中央過濾膜上，於室溫 (15-25°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 μ L
- | | |
|--|-------------------------------|
| 2x Reaction Mixture | 12.5 μL |
| Primer set | 5 μL |
| Bst DNA polymerase | 1 μL |
| FD (fluorecent detection reagent) | 1 μL ※ |
| 滅菌水 | 4.5 μL |
| 萃取之 DNA | 1 μL |
- ※使用 LA-320C 偵測の場合，不添加 FD，滅菌水加入量改為 5.5 μ L
- 10.3.3 配製完成後放入核酸增幅儀，溫度條件如下：
65°C 40 min → 80°C 3 min。
- 10.3.4 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 陽性判定標準：
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。
- 11.4 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。
- 11.5 緊急通報
無。
- 11.6 干擾因素
拭子檢體內物質。
- 11.7 潛在變異的來源

行政院衛生署疾病管制局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 396 頁/共 1091 頁	(PCR LAMP 法)	修訂日期： 年 月 日

環境中核酸污染。

11.8 檢驗性能之規格

11.8.1 Sensitivity：*Bordetella pertussis* 10 copies。

11.8.2 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 min 高壓滅菌後，依本局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 林子勤, 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。

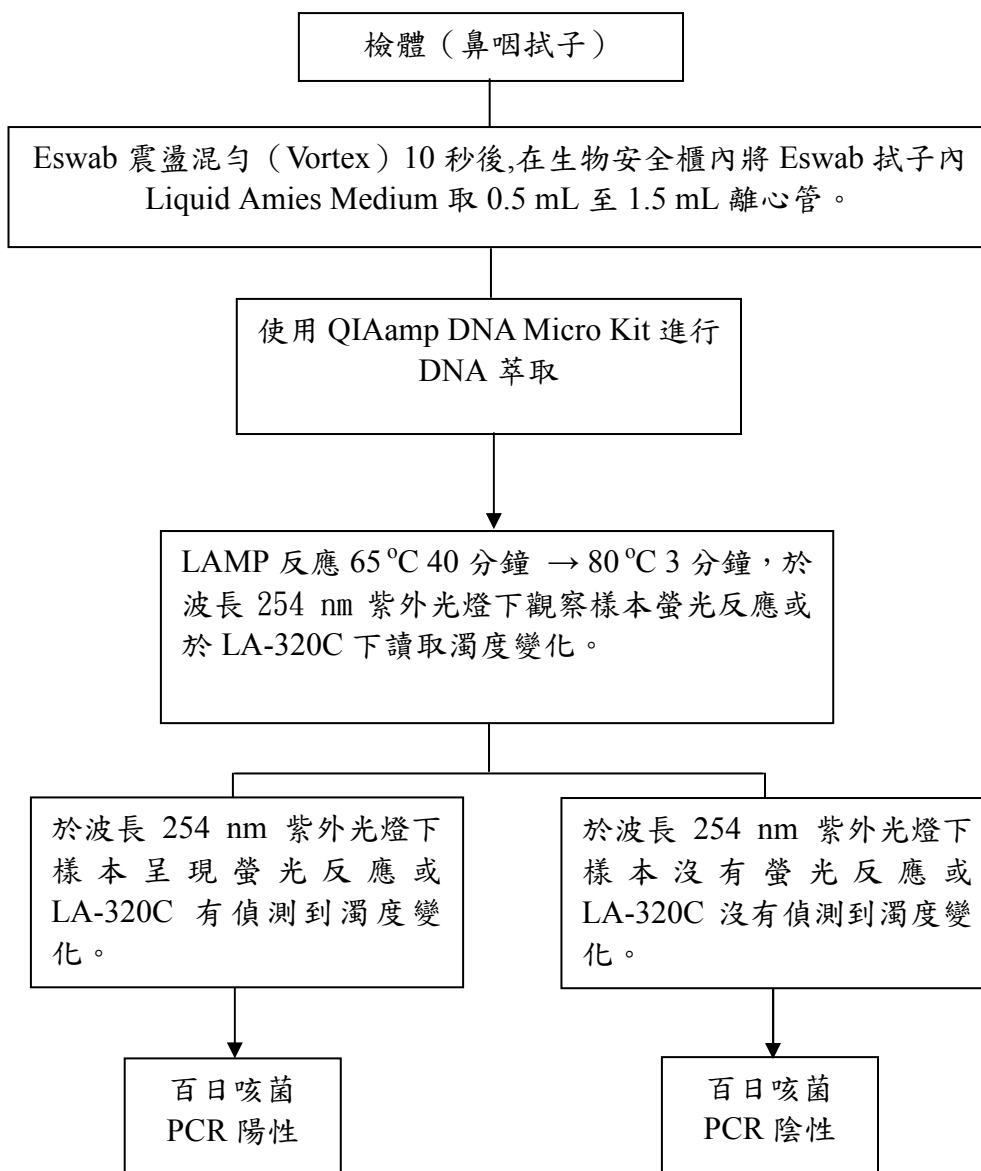
15.2 百日咳菌分子生物學鑑定 (LAMP) 紀錄表-1。

15.3 百日咳菌分子生物學鑑定 (LAMP) 紀錄表-2。

行政院衛生署疾病管制局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 397 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局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 398 頁/共 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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 μL		
DW 4.5 μL (使用 LA-320C 偵測的場合 5.5 μL)		
Bst 1 μL		
FD 1 μL (使用 LA-320C 偵測的場合 0 μL)		
Primer set 5 μL		
DNA template 1 μL		
Total volume (加無菌水) 25 μL		
LAMP 反應 65°C 40 min → 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)					
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：

行政院衛生署疾病管制局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 399 頁/共 1091 頁		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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

百日咳桿菌核酸萃取程序紀錄表


頁數：第 頁/共 頁

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：

行政院衛生署疾病管制局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 400 頁/共 1091 頁		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 適用範圍

適用於急性期發病病患七病日內血液檢體、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組織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, Biological 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 (H₂O)。
- 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 CO₂ 培養箱 (Astec, Japan, SCI-165DC)。
- 6.2 37°C CO₂ 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。

行政院衛生署疾病管制局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 401 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

6.6 5-40 μL Pipette 及 40-200 μL 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負壓 (BSL-2 plus) 實驗室進行。

7.2 水質： 25°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 檢驗採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 在 96 孔組織培養盤中將患者血清 5 μL 以細胞培養液做 20、40、80、160 倍連續稀釋，每孔加入 50 μL 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 μL 以細胞培養液做 2、4、8、16 倍連續稀釋，每孔加入 50 μL 之 2 倍細胞培養液連續稀釋腦脊髓液。)每孔中再加入 100 μL C6/36 細胞懸浮液【培養 C6/36 cell 於 75T flask，加 15 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→以血球計術器計算細胞數。配製成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 細胞懸浮液】。

10.2 置 28°C 5% 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°C 保存。

10.4 取 20 μL PBS 刮下培養盤中之細胞，在 24 孔玻璃片上做抹片。

10.5 於室溫中風乾後，置於 -20°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°C 冰箱中或直接染色。

10.8 在抹片上加上 25 μL 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°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 μL 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。

11 結果判定

行政院衛生署疾病管制局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 402 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 11.1 在螢光顯微鏡下將檢測檢體與 Positive control 及 Negative control 比對判讀。
- 11.2 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。

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

- 13.1 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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序辦理。
- 13.2 未使用完血清放回 -80°C 冰箱保存。


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.

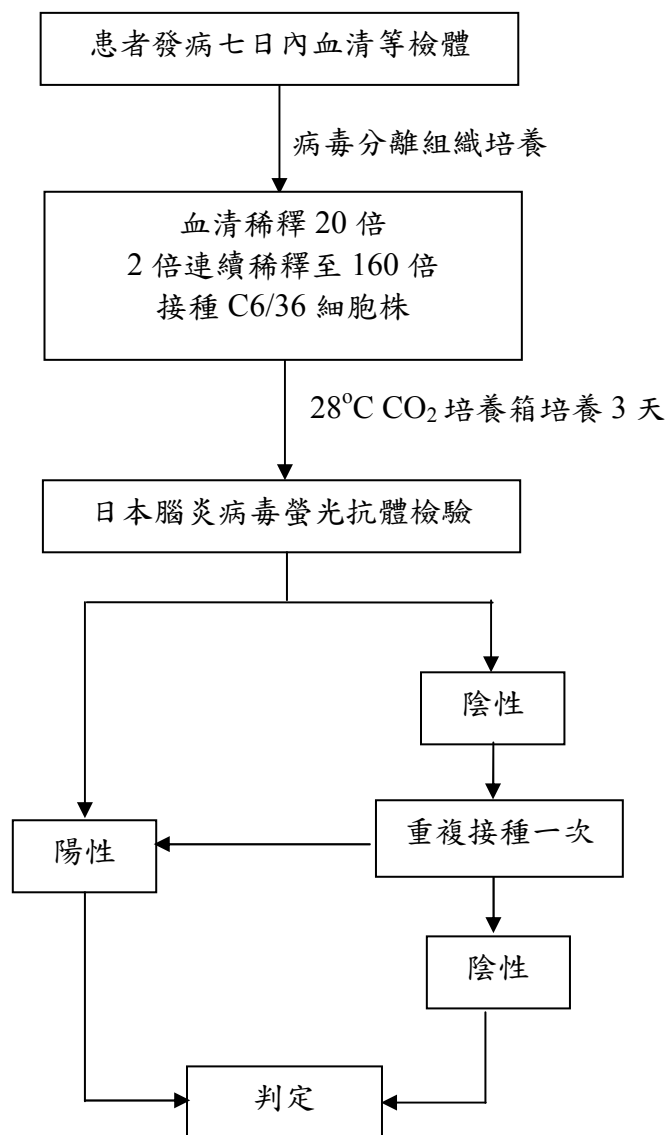
15 附錄

- 15.1 日本腦炎病毒分離與鑑定流程圖。


行政院衛生署疾病管制局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 403 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	日本腦炎病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 404 頁/共 1091 頁		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日本腦炎病毒核酸。

2 適用範圍

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 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 QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, Cat. no. 52906)。

5.1.1 QIAmp spin columns。

5.1.2 2 mL 收集管。

5.1.3 溶解液 (AVL)。

5.1.4 運送 RNA (carrier RNA)。

5.1.5 清洗液 (AW1)。

5.1.6 清洗液 (AW2)。

5.1.7 萃取液 (AVE)。

5.1.8 氣密管。

5.2 Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix, 1-step kit (Stratagene, Cat. no.600835)。

5.2.1 RT-PCR master mix

5.2.1.1 2X Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX Mmaster mix :

(a) RT-PCR buffer。

(b) SureStarTaq DNA polymerase。

(c) dNTP mix (GAUC)。

(d) SYBR green I。

(e) ROX (passive reference dye)。


(f) $MgCl_2$ 。

5.2.1.2 RT/RNase block enzyme mixture。

(a) Moloney-based reverse transcriptase。


(b) RNase。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	日本腦炎病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 405 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.3 陽性對照組 RNA (positive control RNA)
 - 5.4 陰性對照組 (negative control RNA)：
 - 5.4.1 DNase, RNase-free H₂O。
 - 5.4.2 過去檢驗過的陰性血清。
 - 5.5 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透可達 18Ω-CM 以上超純水。
 - 5.6 定量 PCR 專用八連排反應管(QPCR 8-strip tubes)(Stratagene, USA Cat. no. 410022)。
 - 5.7 定量 PCR 專用八連排反應蓋(QPCR 8-strip caps)(Stratagene, USA Cat. no. 410024)。
 - 5.8 無菌過濾型 10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1,000 μL 吸管尖。
 - 5.9 無菌 1.5 mL 微量離心管。
 - 5.10 無粉手套。
- 6 儀器設備
- 6.1 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC)。
 - 6.2 Mx4000 Mmultiple quantitative PCR system (Stratagene, USA)。
 - 6.3 10 μL、20 μL、40 μL、100 μL、200 μL、1,000 μL 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°C。
 - 6.7 冷凍櫃：-20°C。
 - 6.8 高壓滅菌鍋。
- 7 環境與設施安全
- 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一等級 (BSL-1) 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 檢驗採集
- 參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9 檢體運送及保存
- 參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 10 試劑之準備
- 10.1 AVL buffer
 - 10.1.1 新開封時要加一瓶 Carrier RNA，先取 1 mL AVL buffer 至 Carrier RNA tube 中 (紅頭螺旋管)，待完全溶解再 transfer 回 AVL buffer 瓶中，混合均勻。

行政院衛生署疾病管制局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 406 頁/共 1091 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

10.1.2 每次使用時先檢查是否有結晶產生，若有結晶則以 80°C 水浴槽回溫 3-5 min，不可超過 5 min，回溫次數不可超過六次，AVL buffer/carrier RNA 若保存於室溫不可超過二星期。

10.2 AW1 buffer

10.2.1 新開封時依瓶身指示加入 125 mL 絕對酒精，得到總體積 220 mL，室溫下可保存 1 年。

10.3 AW2 buffer

10.3.1 新開封時依瓶身指示加入 160 mL 絕對酒精，得到總體積 226 mL，室溫下可保存 1 年。

11 檢驗步驟

11.1 萃取病毒 RNA

11.1.1 先吸取 560 μ L Lysis buffer (AVLbuffer 加 carrier RNA) 放入 1.5 mL 微量離心管，再加入 140 μ L 的血清檢體，震盪混合，室溫靜置反應 10 min。

11.1.2 加入 560 μ L 絕對酒精，震盪混合 1 min，以終止反應。

11.1.3 將上述混合液以抽氣方式通過管柱 (column)，檢體中的 RNA 會吸附在管柱底部的膜上。

11.1.4 加清洗液 (AW1) 850 μ L，抽氣 3 min，做第一次沖洗，以清洗膜上所吸附的雜質。

11.1.5 以清洗液 (AW2) 850 μ L，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。抽氣後再離心 3,000 rpm，3 min，以徹底去除膜上殘留酒精。

11.1.6 加入萃取液 (AVE) 75 μ L，室溫靜置 10 min，在 4°C 離心 3000 rpm，3 min，取得 RNA。

11.2 單步驟即時定量反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (one-step real-time RT-PCR)。

11.2.1 取 5 μ L RNA 做模板，加入日本腦炎病毒專一性引子 (參考附錄 16.2)，置於冰上。


11.2.2 加入反應溶液 (成分如下表)，調整反應總體積至 25 μ L

初始濃度	加入體積	最終濃度
2X Brilliant II SYBR green QRT-PCR low ROX master mix	12.5 μ L	1X
Primer A	Variable	如參考附件 16.2
Primer B	Variable	如參考附件 16.2
RT/RNase block enzyme mixture	1 μ L	
RNase-free H ₂ O	Variable	

11.2.3 單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應 (one-step real-time RT-PCR)：使用 Mx4000 quantitative PCR system (Stratagene, USA)。

(1) R.T.作用：50°C，30 min。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	日本腦炎病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 407 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- (2) Taq polymerase activation : 95°C , 15 min .
- (3) Denaturation : 94°C , 15 sec .
- (4) Annealing : 55°C , 30 sec .
- (5) Extension : 72°C , 20 sec .
- (6) 77°C , 30 sec . 收集螢光值 .
- (7) 重複 (3) 至 (6) 步驟 45 cycle .

11.2.4 Melting curve analysis :

- (1) 95°C , 1 min .
- (2) 68°C → 90°C+1°C/30 sec/cycle .
- (3) 重複(2)步驟 45 cycles

12 結果判定

- 12.1 以 Mx4000 軟體分析結果，可以從 Amplification plots 與 Tm 值作判斷，結果是陽性或陰性。
- 12.2 在陽性對照與陰性對照組的 Ct 值符合設定值下，凡樣品經日本腦炎病毒專一性引子之 Ct 值小於 40 者，判為日本腦炎病毒陽性。
- 12.3 觀看 Melting curve 時，一般來說，須 Tm 值 > 80°C 的 PCR 產物，才為較具專一性之產物，而 < 75°C 之 PCR 產物，通常為非專一性的產物。

13 品質管制

- 13.1 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。
- 13.2 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。
- 13.3 Mx4000 機器定時作檢測與校正。
- 13.4 Pipettman 做定期的校對。
- 13.5 注意檢測套組的使用期限與適當的儲放溫度。

14 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 min 高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序（編號：G-xx-2006-D）辦理。

15 參考資料

- 15.1 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 .
- 15.2 Qiagen. QIAamp viral RNA mini kit handbook. pp.18-19 .


16 附錄

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

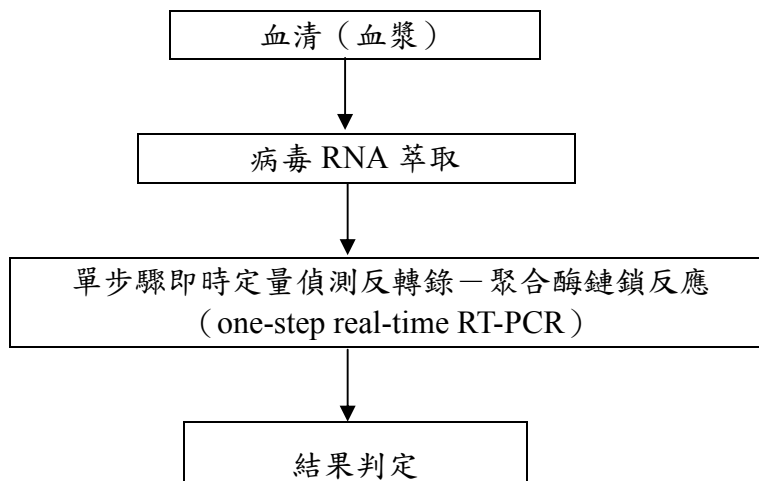
	編號：	日本腦炎病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 408 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 16.1 日本腦炎病毒鑑定（單步驟即時定量反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應）流程圖。
- 16.2 日本腦炎病毒診斷用引子組序列表。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	日本腦炎病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 409 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.1 日本腦炎病毒鑑定 (單步驟即時定量偵測反轉錄－聚合酶鏈鎖反應)
流程圖




行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	日本腦炎病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 410 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.2 日本腦炎病毒診斷用引子組序列表


Japanese encephalitis virus specific primer :	參與反應的濃度
JE3F1 CCC TCA GAA CCG TCT CGG AA	200nM
JE3R1 CTA TTC CCA GGT GTC AAT ATG CTG T	200nM

行政院衛生署疾病管制局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 411 頁/共 1091 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 適用範圍
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异性抗體。
- 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 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 抗黃病毒屬外套抗原 (Envelope) 之單株抗體腹水 (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)
 - 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。

行政院衛生署疾病管制局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 412 頁/共 1091 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日

5.10 丟棄式 250 μ L、1,000 μ L 吸管尖 (disposable tips)。

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 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1,000 μ L (pipettors)。

6.4 震盪器 (vortex mixer)。

6.5 冰箱：4°C。

6.6 冷凍櫃：-20°C。

6.7 高壓滅菌鍋。

7 環境與設施安全

7.1 病人血清檢體應在第 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一等級 (BSL-1) 實驗室進行。

8 檢驗採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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。日本腦炎病毒細胞培養液以 Dilution buffer 四倍稀釋後，加入 1：1,000 之抗黃病毒屬抗原單株抗體腹水 FL0232。

10.4 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體以 Dilution buffer 1：4,000 稀釋。


10.5 取待測血清 7 μ L 加入 Dilution buffer 0.7 mL 稀釋 100 倍。若是腦脊髓液檢體，則取 70 μ 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 Coating goat anti-human IgM 及 Coating goat 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 含抗黃病毒屬抗原單株抗體腹水 FL0232 之四型登革病毒細胞培養稀釋液及日本腦炎病毒細胞培養稀釋液 (步驟 10.3) 分別加

行政院衛生署疾病管制局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 413 頁/共 1091 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日

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 (OD₄₀₅₋₆₃₀)。

11 結果判定

11.1 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。

11.2 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。

11.3 Dengue primary positive control 應符合 IgM OD 值 > 2.0，IgG OD 值 > 1.0。

11.4 Dengue secondary positive control 應符合 IgM OD 值 > 1.0，IgG OD 值 > 2.0。

11.5 JE positive control 應符合 IgM OD 值 > 1.5，IgG OD 值 > 1.0。

11.6 Negative control 應符合 IgM OD 值 < 0.2，IgG OD 值 < 0.2。

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 min 高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序 (編號：G-xx-2006-D) 辦理。

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 Diagn Lab Immunol 10: 622-630.

行政院衛生署疾病管制局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 414 頁/共 1091 頁	抗體檢測 (ELISA)	修訂日期： 年 月 日


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。

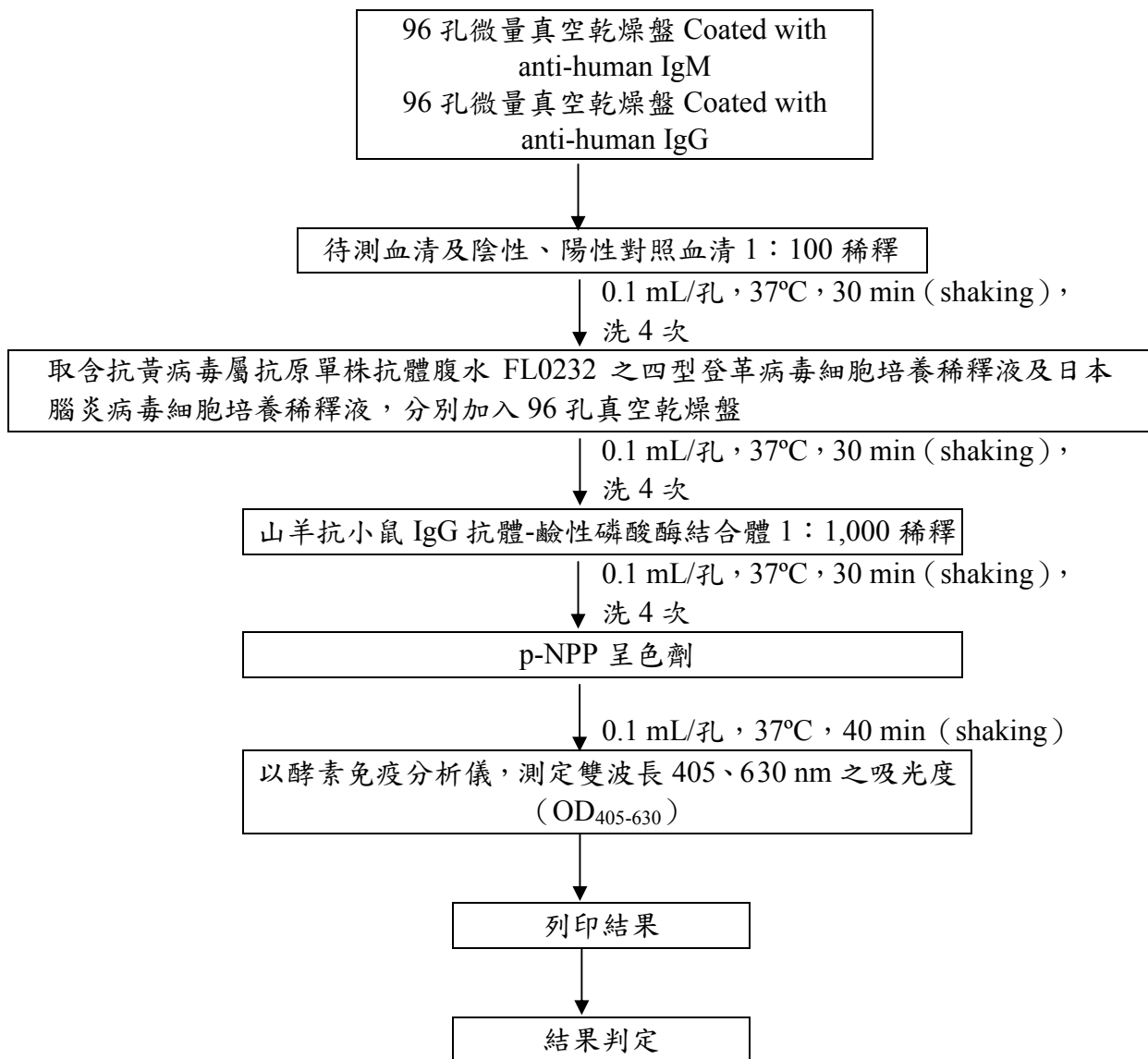
15 附錄

15.1 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。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 415 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群培養	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 416 頁/共 1091 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。

- (1) 取 NaOH 4 g 加入 100 mL 蒸餾水配製備用。
- (2) 取 2.6 g sodium citrate anhydrate 加入 100 mL 蒸餾水配製備用。
- (3) 將(1)及(2)混合後高溫高壓蒸氣滅菌，保存於 2°C-8°C，效期 6 個月。
- (4) NALC—NaOH：取 0.25 g NALC（Sigma；美國）（如有需要時呈比例增加），加 50 mL（3）。此試劑效期 24 小時。

5.1.2 phosphate buffer。


- (1) 取 Na₂HPO₄ 94.7 g 加入 1,000 mL 蒸餾水配製備用。
- (2) 取 KH₂PO₄ 90.7 g 加入 1,000 mL 蒸餾水配製備用。
- (3) 將(1)及(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 BACTECTMMGITTM960 試劑（Becton, Dickinson and Company；美國）：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。

- (1) Middlebrook 7H11 培養基。
- (2) selective Middlebrook 7H11（Mitchison's）選擇性培養基。
- (3) Lowenstein—Jensen（LJ）斜面培養基。
- (4) BACTECTMMGITTM960 培養管（Becton, Dickinson and Company；美國）。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群培養	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 417 頁/共 1091 頁		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 5%來舒液 (Lysol®)。
- 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% CO₂ 溫箱。
- 6.3 低溫離心機，離心力 (RCF) 至少可達到 3,000 xg，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 環境與設施安全

- 7.5 實驗應於生物安全第二等級以上之負壓實驗室中進行。
- 7.6 檢體前處理與接種必須於生物安全櫃中進行。
- 7.7 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。
- 7.8 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

- 8.1 痰液：檢體量需至少 5 mL，採集於無菌痰盒或 50 mL 離心管內 (參考防疫檢體採檢手冊第四版)。
- 8.2 胸水、腹膜液：取 5 mL 加入等量的無菌蒸餾水，一同放置於 15 mL 離心管內中以避免凝固。
- 8.3 血液：8-10 mL 加入 50 mL 含 Tween80 的液體培養基 (如：Middlebrook 7H9 broth)。
- 8.4 尿液：將前段尿液排掉，收集中段尿液至少 50 mL 於採集管中。
- 8.5 腦脊髓液：以無菌透明含蓋子玻璃試管收集 1-2 mL。
- 8.6 其他檢體以無菌技術採集後，放入無菌試管內送檢。
- 8.7 膿 (pus) 及拭子 (swab)：拭子需浸泡於少量磷酸緩衝液中，以防檢體

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群培養	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 418 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

乾掉。

- 8.8 胃抽出液：收集 10 mL 置於無菌試管。內含 1 mL 10% NaHCO₃，以中和胃酸。需儘速送檢，因此，本項不建議為外送檢驗項目。
- 8.9 組織：收集於含 7H9 broth 之無菌容器。
- 8.10 糞便：收集於無菌容器內。

9 檢體運送及保存

- 9.1 儘速將檢體送檢驗。檢體運送時，應妥善包裝避免漏出或運送箱破損。
- 9.2 第一層為防水材料，並含有螺旋蓋可防止檢體液體滲漏，上面標示有生物危害標誌及正確之內含檢體名稱及種類。
- 9.3 第二層為防水之材質，含有螺旋蓋防止滲漏，能承受 1.2 公尺高度落下之撞擊而不破裂，內含碰撞緩衝材質可包覆第一層物品，另含吸附性物質以吸附意外滲漏之第一層檢體。
- 9.4 第三層包裝必須裝有適當碰撞緩衝材質，可固定第二層物質並防止運送途中任何震動所可能造成之傷害破損，外面必須標示有詳細之送件者及收件者姓名及地址，並且標示有國際通用之生物感染性物質之安全標示。
- 9.5 如果在第二層內裝有多支檢體，每支檢體應個別使用防水包裝再裝入第二層內，以防止檢體互相碰撞而破裂。
- 9.6 更詳細運送包裝方法請參考國際航空運輸組織（International Air Transport Association, IATA）所制定之危險物質運送包裝方法（Packing Instruction 650）及本局全球資訊網刊載之「防疫檢體採檢手冊」第四版，<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9.7 保存於 2°C-8°C。

10 檢驗步驟

10.1 檢體處理


10.1.1 痰液

- (1) 以無菌滴管吸取 3-5 mL 痰液至 50 mL 離心管。
- (2) 加等量的無菌 NALC-NaOH (5.1.1) 液化痰液。
- (3) 振盪器振盪約 15-20 秒。
- (4) 室溫靜置 15 分鐘。
- (5) 加無菌 phosphate buffer 至 40 mL 刻度處，鎖緊蓋子。
- (6) 以 3,000 xg 離心 15 分鐘，將上清液倒入廢液桶。
- (7) 添加 2 mL phosphate buffer 以中和酸鹼值，準備接種。

10.1.2 胃抽出液

- (1) 經採得的胃抽出液應於 4 小時內處理完畢。
- (2) 若檢體呈水樣，直接依步驟 (4) 處理。
- (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。
- (4) 3,000 xg 離心，15 分鐘。
- (5) 離心完成後，倒掉上清液，加入 2-5 mL 無菌蒸餾水做成

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群培養	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 419 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

懸浮液。

- (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

- (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。
- (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

- (1) 胸水以 3,000 xg 離心 15 分鐘，倒掉上清液。
- (2) 取沈澱物進行接種。
- (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

- (1) 緩慢加入 10% CaCl₂ 至沉澱物形成。
- (2) 以 3,000 xg 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 xg 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

- (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)。
- (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。
- (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。
- (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

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群培養	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 420 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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% CO₂ 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。

若為淺表層病灶檢體及傷口檢體，需另接種一組培養基置於 30°C-32°C 溫箱培養。

10.3.2 MGIT™960 培養管培養於 BACTEC™MGIT™960 系統，機器設定 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

11.1 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。

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。


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% CO₂ 溫箱培養 21 天。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群培養	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 421 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12.2.2 品管菌株及結果判讀

陽性品管

M. tuberculosis ATCC 25177

品管結果

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 分鐘高壓滅菌後，依本局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.
- 14.5 Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 18th 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群培養	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 422 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 5%來舒液（Lysol®成分為鄰甲苯酚）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 5%來舒液，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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	分枝桿菌屬鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 423 頁/共 1091 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 適用範圍

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 5%來舒液（Lysol®）、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 H₂O，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 KMnO₄ 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。

6.2 第二級生物安全櫃。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	分枝桿菌屬鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 424 頁/共 1091 頁	(抗酸性抹片鏡檢法)	修訂日期： 年 月 日

- 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 xg，附有轉子保護蓋。

7 環境與設施安全

- 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


- 8.1 痰液：檢體量需至少 5 mL，採集於無菌痰盒或 50 mL 離心管內 (參考防疫檢體採檢手冊第四版)。
- 8.2 胸水、腹膜液：取 5 mL 加入等量的無菌蒸餾水，一同放置於 15 mL 離心管內中以避免凝固。
- 8.3 尿液：將前段尿液排掉，收集中段尿液至少 50 mL 於採集管中。
- 8.4 腦脊髓液：以無菌透明含蓋子玻璃試管收集 1-2 mL。
- 8.5 其他檢體以無菌技術採集後，放入無菌試管內送檢。
- 8.6 拭子 (swab)：需浸泡於少量 7H9 broth 以防檢體乾掉。
- 8.7 胃抽出液：收集 10 mL 於無菌試管，內含 1 mL 10% NaHCO₃ 以中和胃酸，需儘速送檢，因此，本項不建議為外送檢驗項目。
- 8.8 組織：收集於含 7H9 broth 之無菌容器。

9 檢體運送及保存

- 9.1 儘速將檢體送實驗室檢驗，檢體運送時，應妥善包裝避免漏出或破損。
- 9.2 檢體需保存於 2-8°C。
- 9.3 第一層為防水材質，並含有螺旋蓋可防止檢體液體滲漏，上面標示有生物危害標誌及正確之內含檢體名稱及種類。
- 9.4 第二層為防水之材質，含有螺旋蓋防止滲漏，能承受 1.2 公尺高度落下之撞擊而不破裂，內含碰撞緩衝材質可包覆第一層物品，另含吸附性物質以吸附意外滲漏之第一層檢體。
- 9.5 第三層包裝必須裝有適當碰撞緩衝材質，可固定第二層物質並防止運送途中任何震動所可能造成之傷害破損，外面必須標示有詳細之送件者及收件者姓名及地址，並且標示有國際通用之生物感染性物質之安全標示。
- 9.6 如果在第二層內裝有多支檢體，每支檢體應個別使用防水包裝再裝入第二層內，以防止檢體互相碰撞而破裂。
- 9.7 更詳細運送包裝方法請參考國際航空運輸組織 (International Air Transport Association, IATA) 所制定之危險物質運送包裝方法 (Packing Instruction 650) 及本局全球資訊網刊載之「防疫檢體採檢手冊」第四版，<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

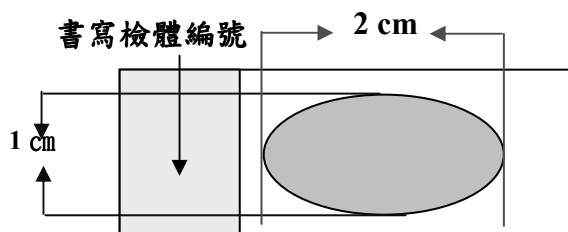
	編號：	分枝桿菌屬鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 425 頁/共 1091 頁	(抗酸性抹片鏡檢法)	修訂日期： 年 月 日

10.1 痰檢體

10.1.1 濃縮法：

- (1) 以無菌滴管吸取 3-5 mL 痰液至 50 mL 離心管。
- (2) 加等量的無菌 NALC-NaOH 液化痰液。
- (3) 振盪器振盪約 15-20 秒。
- (4) 室溫靜置 15 分鐘。
- (5) 加無菌 phosphate buffer 至 40 mL 刻度處，蓋緊蓋子。
- (6) 以 3,000 xg 離心 15 分鐘，將上清液倒入廢液桶。
- (7) 以無菌吸管取 1 滴 (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。



10.2 其他檢體：

10.2.1 胸水

- (1) 胸水以 3,000 xg 離心 15 分鐘，倒掉上清液。
- (2) 取沈澱物進行塗片檢查。
- (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 xg 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	分枝桿菌屬鑑定 (抗酸性抹片鏡檢法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 426 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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，高錳酸鉀溶液復染背景為黑色。

11 廢棄物處理

檢體與棄置之耗材依感染性廢棄物處理。

12 結果判定

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
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+


13 品質管制

- 13.1 每次進行染色時均需一組陽性及陰性對照組。
- 13.2 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。
- 13.3 染色劑應在效期內使用。
- 13.4 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。

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

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	分枝桿菌屬鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 427 頁/共 1091 頁	(抗酸性抹片鏡檢法)	修訂日期： 年 月 日

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, 18th 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，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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群鑑定 (生化)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 428 頁/共 1091 頁		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 NaNO₃，0.117 g KH₂PO₄，0.485 g Na₂HPO₄·12H₂O 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 429 頁/共 1091 頁	(生化)	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 環境與設施安全

- 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

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存


- 9.1 檢體運送採三層包裝。
 - 9.1.1 第一層為防水材質，並含有螺旋蓋可防止檢體液體滲漏，上面標示有生物危害標誌及正確之內含檢體名稱及種類。
 - 9.1.2 第二層為防水之材質，含有螺旋蓋防止滲漏，能承受高度落下之撞擊而不破裂，內含碰撞緩衝材質可包覆第一層物品，另含吸附性物質以吸附意外滲漏之第一層檢體。
 - 9.1.3 第三層包裝必須裝有適當碰撞緩衝材質，可固定第二層物質並防止運送途中任何震動所可能造成之傷害破損，外面必須標示有詳細之送件者及收件者姓名及地址，並且標示有國際通用之生物感染性物質之安全標示。
 - 9.1.4 如果在第二層內裝有多支檢體，每支檢體應個別使用防水包裝再裝入第二層內，以防止檢體互相碰撞而破裂。
 - 9.1.5 更詳細運送包裝方法請參考國際航空運輸組織（International Air Transport Association, IATA）所制定之危險物質運送包裝方法（Packing Instruction 620）及本局全球資訊網刊載之「防疫檢體採檢手冊」第四版，
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群鑑定 (生化)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 430 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 x 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。
 - 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 niacin 試驗
 - 11.1.1 陽性反應：黃色。
 - 11.1.2 陰性反應：不變色。
 - 11.2 硝酸鹽還原試驗
 - 11.2.1 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。
 - 11.2.2 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。
 - 11.3 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*」。
- 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
 - (1) 陽性品管：H37Rv-fully susceptible (ATCC 27294)。
 - (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：
 - (1) 陽性品管：H37Rv-fully susceptible (ATCC 27294)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群鑑定 (生化)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 431 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(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。

13 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 分鐘高壓滅菌後，依本局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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 432 頁/共 1091 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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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

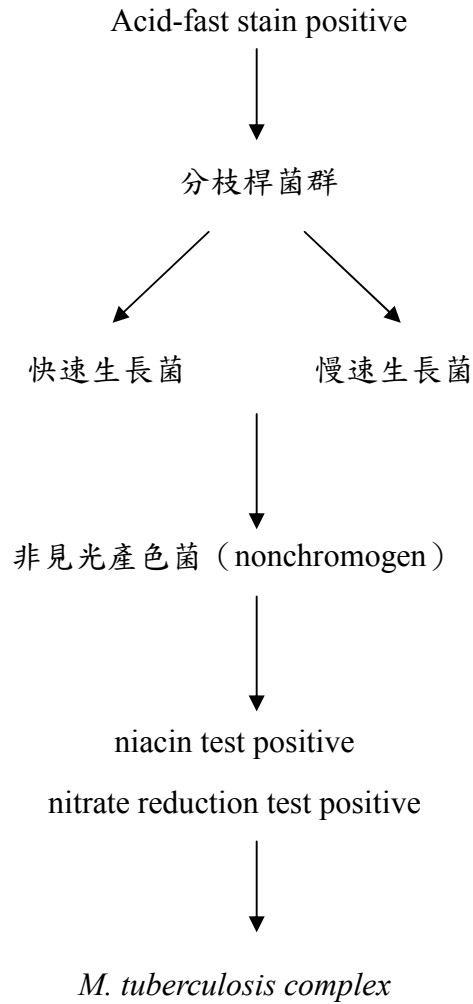
檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	結核菌群鑑定 (生化)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 433 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄15.3 結核桿菌群生化鑑定流程



行政院衛生署疾病管制局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 434 頁/共 1091 頁	(rRNA 直接檢測法)	修訂日期： 年 月 日

1 目的

由於結核菌生長緩慢，若以一般傳統檢驗方法（如菌落型態、生長速度、色素產生、生化鑑定等），因為須經由培養以獲得足夠菌數方可進行鑑定，因此相當耗時。結核菌 RNA 直接檢測法為使用 Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct (MTD) Test 核酸檢驗試劑組，該試劑組於 1995 年通過美國藥物食品管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 核准上市，具有高敏感性及專一性，可直接以疑似結核病患者（具有肺結核臨床表徵與症狀患者）之檢體進行結核菌群 (*M. tuberculosis* complex) Ribosomal ribonucleic acid (rRNA) 之檢測，因此可作為結核菌群快速、準確之檢驗工具。

2 適用檢體種類

適用於痰、氣管或支氣管抽取物等檢體，並經消化去污染處理後之沉澱物。

3 名詞解釋

結核菌群：包括結核菌 (*M. tuberculosis*)、*M. bovis*、*M. africanum*、*M. microti* 及 *M. canetti*。

4 原理概述

4.1 結核菌 rRNA 直接檢測法可分為增幅和檢測兩個部分，可於同一個試管中連續進行反應，減少人為的操作程序以避免污染。

4.2 結核菌 rRNA 直接檢測法的原理是利用反轉錄增幅反應 (transcription-mediated amplification) 和雜交保護偵測反應 (hybridization protection assay)，檢測檢體是否具有結核桿菌群的 rRNA。

4.2.1 利用超音波震盪將核酸從結核桿菌群的細菌體中釋放出來，並經加熱促使核酸變性。

4.2.2 首先以 rRNA 為模版，進行反轉錄增幅反應，利用反轉錄酶與 RNA 聚合酶將 RNA 反轉錄為 DNA，再以 DNA 為模版增幅出 RNA，兩反應交互進行。採用一個恆定的 42°C 溫度，增幅特定的結核桿菌群 rRNA 片段。

4.2.3 接著進行雜交保護偵測反應，利用化學冷光標記之特定探針偵測結核桿菌群 rRNA 增幅產物的特定序列。此探針可與增幅產物之序列互補，當探針和此特定序列形成穩定的 RNA:DNA 雜合體後，再將未形成雜合體探針進行水解反應，最後利用化學發光檢測儀進行檢測。

5 試劑耗材

5.1 Amplified *M. tuberculosis* Direct (MTD) Test 核酸檢驗試劑組 (GEN-PROBE)，置於 2-8°C 儲存，於有效期限內使用。

5.1.1 溶解試管。

5.1.2 增幅試驗。

(1) 檢體稀釋緩衝液 (SDB)。

行政院衛生署疾病管制局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 435 頁/共 1091 頁	(rRNA 直接檢測法)	修訂日期： 年 月 日

- (2) 增幅試劑 (A)。
- (3) 增幅緩衝液 (AB)。
- (4) 礦物油 (O)。
- (5) 酶試劑 (E)。
- (6) 酶稀釋緩衝液 (EDB)。

5.1.3 雜交試驗

- (1) 雜交試劑 (H)。
- (2) 雜交緩衝液 (HB)。
- (3) 選擇試劑 (S)。

5.1.4 封口貼紙

- 5.2 MTD 對照組 (Gen-Probe：含陽性對照組、陰性對照組，置於 2-8°C 儲存，於有效期限內使用)。
- 5.3 12 x 75 mm 聚丙烯試管 (Gen-Probe)。
- 5.4 12 x 75 mm 聚丙烯試管蓋 (Gen-Probe)。
- 5.5 200 µL 具過濾塞之微量吸管尖 (Axygen)。
- 5.6 1,000 µL 具過濾塞之微量吸管尖 (Neptune)。

6 儀器設備

- 6.1 超音波震盪儀架 (Gen-Probe)。
- 6.2 超音波震盪儀 (Gen-Probe)。
- 6.3 乾熱器 (42±1°C，60±1°C，95±5°C) (Gen-Probe)。
- 6.4 化學發光檢測儀 (leader 50I) (Gen-Probe)。
- 6.5 10-200 µL 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.6 10-1,000 µL 微量吸管分注器 (eppendorf)。

7 環境與設施安全

生物安全第二級負壓以上之實驗室及生物安全第三級實驗室人員防護裝備，參照世界衛生組織 (WHO)「實驗室生物安全手冊 (laboratory biosafety manual, third edition)」。

8 檢體採集

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

- 9.1 檢體採集當天低溫運送。
- 9.2 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 檢體前處理

參照本局「分枝桿菌屬培養」檢驗標準方法 (編號：B-07-2006-1.0)

行政院衛生署疾病管制局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 436 頁/共 1091 頁	(rRNA 直接檢測法)	修訂日期： 年 月 日

將檢體以 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。注意含大量血液之檢體不適用。

10.2 檢體溶解

- 10.2.1 在溶解試管上各別標記檢體編號。
- 10.2.2 在每個溶解試管中加入 50 μ L 的檢體稀釋緩衝液 (SDB)。
- 10.2.3 各別將 450 μ L 的檢體沉澱物加至已標記之相對應溶解試管中。
- 10.2.4 蓋上溶解試管蓋。
- 10.2.5 振動 (vortex) 3 sec。
- 10.2.6 將溶解試管插入超音波震盪儀架中，試管底部須位於水中，試管蓋須位於水面以上。將超音波震盪儀架置於超音波震盪儀上。避免試管接觸超音波震盪儀的內壁。
- 10.2.7 超音波震盪 15 min，不可超過 20 min。

10.3 增幅

- 10.3.1 在聚丙烯試管上分別標記檢體編號、陽性對照組、陰性對照組。
- 10.3.2 取 1 瓶冷凍乾燥的增幅試劑 (A)，加入 3 mL 增幅緩衝液 (AB) 進行復溶。
- 10.3.3 於每個試管的底部各加入 50 μ L 復溶的增幅試劑後，再各加入 200 μ L 礦物油 (O)。
- 10.3.4 分別取 10.2 溶解後之檢體、陽性對照組、陰性對照組 25 μ L，加至已標記之相對應試管中，注意須加至礦物油層下方之增幅試劑水層中。
- 10.3.5 以封口貼紙封口或加試管蓋，將試管置於 95°C 乾熱器中加熱 15 min，不可超過 20 min。
- 10.3.6 取 1 瓶冷凍乾燥的酶試劑 (E)，加入 1.5 mL 酶稀釋緩衝液 (EB) 進行復溶。旋轉混勻，不要振動。
- 10.3.7 將試管移至 42°C 乾熱器中，冷卻 5 min。
- 10.3.8 在 42°C 時於每個試管中加入 25 μ L 復溶的酶試劑，旋轉混勻，以封口貼紙封口或加試管蓋，於 42°C 反應 30 min，不可超過 60 min。
- 10.3.9 42°C 反應 30 min 完成後以封口貼紙封口或加試管蓋的試管可以在 2-8°C 保存 2 hr，或在 -20°C 保存隔夜。如果經 -20°C 保存隔夜，試管必須在雜交前於室溫或低於 60°C 的溫度下完全解凍。

10.4 雜交

- 10.4.1 取 1 瓶冷凍乾燥的雜交試劑 (H) 及雜交試劑緩衝液 (HB) 先回溫至室溫後，再於雜交試劑 (H) 中加入 6 mL 雜交試劑緩衝液 (HB) 進行復溶。於復溶之雜交試劑瓶上標記復溶日期，復溶後之雜交試劑於 2-8°C 可保存 1 個月，於 -20°C 或更低溫度可保存 2 個月。超過期限不可使用。冷藏後的雜交試劑於使

行政院衛生署疾病管制局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 437 頁/共 1091 頁	(rRNA 直接檢測法)	修訂日期： 年 月 日

用前，必須先置於 60°C 加熱，並輕搖使所有成分完全溶解。

- 10.4.2 在每個試管中加入 100 μ L 復溶的雜交試劑。並以封口貼紙封口或加試管蓋。振動 3 次，每次至少 1 sec。
- 10.4.3 在 60°C 乾熱器中加熱 15 min，不可超過 20 min。
- 10.4.4 將選擇試劑 (S) 先回溫至室溫後，於各試管再加入 300 μ L 的選擇試劑 (S)，此目的為將未形成雜合體之探針進行水解反應。並以封口貼紙封口或加試管蓋，振動 3 次，每次至少 1 sec。充分振動後，試管中的溶液須為均一的粉紅色。
- 10.4.5 在 60°C 乾熱器中加熱 15 min，不可超過 16 min。
- 10.4.6 將試管取出，在室溫下至少冷卻 5 min，但不可超過 1 hr。在檢測前掀開封口貼紙或將蓋子打開。

10.5 檢測

- 10.5.1 使用化學發光檢測儀之前必須先清洗管路。
- 10.5.2 用擦手紙或拭鏡紙將每個試管外壁擦拭乾淨，之後再將試管放入化學發光檢測儀，蓋上化學發光儀的上蓋後，儀器即自動讀取發光值並列印。
- 10.5.3 當檢測讀值完成後，即可從化學發光檢測儀中取出已檢測之試管，並放入下一支待檢測之試管。所有試管必須在 10.4 完成後 1 hr 內檢測完畢

11 結果判定

- 11.1 陰性對照組和陽性對照組必須符合以下讀值，才能表示該次實驗有效：陰性對照組 $< 20,000$ RLU，陽性對照組 $\geq 500,000$ RLU。
- 11.2 結果判讀：
 - 11.2.1 讀值 $\geq 500,000$ RLU：結核桿菌群 rRNA 陽性。
 - 11.2.2 讀值 $< 30,000$ RLU：結核桿菌群 rRNA 陰性。
 - 11.2.3 讀值介於 30,000 RLU 與 500,000 RLU 之間：無法判定。

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 每次實驗試管數不超過 25 管，每次進行實驗必須同時包含陽性對照組及陰性對照組，且陽性對照組及陰性對照組之讀值須符合 11.1 方為有效實驗。

13 廢棄物處理

- 13.1 實驗完成後的試管須放入含有 2-5% 來舒消毒水的容器中浸泡至少 1 hr，以避免實驗室環境被增幅之核酸污染。
- 13.2 實驗過程中使用之任何試管架於實驗後須完全浸泡於 2-5% 來舒消毒水中消毒，至少 15 min。
- 13.3 用 2-5% 來舒消毒水進行實驗區域和儀器表面之消毒。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (rRNA 直接檢測法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 438 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

13.4 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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。


14 參考資料

- 14.1 Gen-Probe 公司 Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct (MTD) Test 核酸檢驗試劑組使用說明書。
- 14.2 Arnold LJ, Hammond PW, Wiese WA, Nelson NC. 1989. Assay formats involving acridinim-ester-labeled DNA probes. Clin Chem 35: 1588-1594.
- 14.3 Bradley SP, Reed SL, Catanzaro A. 1996. Clinical efficacy of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 153: 1606-1610.
- 14.4 Collins FM. 1989. Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. Clin Microbiol Rev 2: 360-377.
- 14.5 Pitchenik AE, Fertel D, Bloch AB. 1988. Mycobacterial disease: epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. Clin Chest Med 9: 425-441.
- 14.6 Roberts GD, Koneman EW, Kim YK. 1991. *Mycobacterium*, p. 304-339. In A. Balows, et al. (ed.), Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, DC.

15 附錄

無。

行政院衛生署疾病管制局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 439 頁/共 1091 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 H₂O, ddH₂O)。
- 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 2X SSPE / 0.1% SDS：25 mL 20X SSPE (Amresco) 及 2.5 mL 10% SDS 加二次水至 250 mL。新鮮配製。
- 5.7 2X 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 2X SSPE：50 mL 20X 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。

行政院衛生署疾病管制局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 440 頁/共 1091 頁	(間隔寡核酸分子分型法)	修訂日期： 年 月 日

- 5.13 100 μ L 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.14 200 μ L 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.15 1,000 μ 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 μ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.8 10-100 μ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.9 10-200 μ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.10 10-1,000 μ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。

7 環境與設施安全

- 7.1 於生物安全第一等級 (BSL-1) 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

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存


- 9.1 檢體採集當天低溫運送。
- 9.2 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 μ L) 挑出 1 環的菌，放入裝有 400 μ L 1X TE 的 2 mL 微量離心管中，於乾熱器以 95°C 不活化處理 5 min，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：參照本局「IS6110 結核桿菌限制酶片段長度多型性分型法」檢驗標準方法 (編號：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	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
	頁次：第 441 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

B-05-2006-1.0)，配製成 10 ng/μL 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 μL 無菌水，各 2.5 μL DRa、DRb，25 μL 礦物油後蓋上管蓋。
- 10.2.3 其餘管內添加 17 μL 無菌水後，依序加入各 2.5 μL DRa、DRb，最後加入檢體 3 μL。
- 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 μL 無菌水後，依序加入各 2.5 μL DRa、DRb，最後加入陽性對照組 1 μL。
- 10.2.5 執行 PCR：

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	95°C	5 min
2. Denature	95°C	1 min
3. Annealing	55°C	1 min
4. Extension	72°C	30 sec
步驟2.至步驟4.循環重複25次		
5. Final extension	72°C	5 min
6. Store for o/n	4°C	∞


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 2X 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 μL 2X SSPE / 0.1% SDS。
- 10.3.6 分別注入 20 μL PCR 產物於上述含有 150 μL 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 min。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 2X 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 min。
- 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 μL 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。

10.4 呈色及沖片

- 10.4.1 將 500 mL 2X SSPE / 0.5% SDS 血清瓶置入 60°C 水浴槽預熱。

行政院衛生署疾病管制局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 442 頁/共 1091 頁	(間隔寡核酸分子分型法)	修訂日期： 年 月 日

- 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 2X 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 min。
- 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 µL Streptavidin-HRP 加入 10 mL 2X 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 min。
- 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 2X 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 min。
- 10.4.9 之後於室溫下以 250 mL 2X SSPE 溶液清洗雜交膜，共清洗 2 次，每次 5 min。
- 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 min 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 5 min 後，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 60 min。
 - 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 將底片之結果以掃描器掃描後電腦存檔。
- 11.2 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)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	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
	頁次：第 443 頁/共 1091 頁		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)

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 min 高壓滅菌後，依本局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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 巢式聚合酶連鎖反應法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 444 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用分子生物方法，直接從病人檢體中偵測是否含有結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex) 的 DNA，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 Löwenstein-Jensen 蛋基培養基培養出之結核菌群。
- 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二甲苯脫蠟後所萃取之核酸檢體。

3 名詞解釋

結核菌群：包括結核菌 (*M. tuberculosis*)、結核菌屬包含：結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、非洲型結核菌 (*Mycobacterium africanum*)、牛型結核菌 (*Mycobacterium bovis*)、*Mycobacterium canettii*、*Mycobacterium microti*、*Mycobacterium pinnipedii* 及 *Mycobacterium mungi*。


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，設計具有對結核菌群 IS6110 專一性的引子，進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 以增幅此段基因，並配合巢式 (nested) PCR 法的應用，可相對提高檢體檢測之專一性與敏感性。

5 試劑耗材

- 5.1 Qiagen DNA 萃取套組 (Qiagen)。
- 5.2 引子 (primer)。
INS-1 : 5'-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3'
INS-2 : 5'-GCG TAG GCG TCG GTG ACAAA-3'
INS-3 : 5'-AGA TGC ACC GTC GAA CGG-3'
INS-4 : 5'-GCC ACG TAG GCG AAC CCT G-3'
加無菌水調整濃度為 100 pmole/μL，儲存於-20°C 冰箱為保存濃度。
- 5.3 25 mM Deoxyribonucleotide tri-phosphate (dNTP) (Amersham Biosciences)。
- 5.4 DNA 聚合酶 (AmpliTaq Gold Polymerase, 5U/μL) (Applied Biosystems)。
- 5.5 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems)。
- 5.6 不含 MgCl₂ 之 10X 緩衝液 (10X buffer w/o MgCl₂) (Applied Biosystems)。
- 5.7 無菌水 (sterilized deionized H₂O, ddH₂O)。
- 5.8 洋菜 (Seakem LE agarose) (BMA)。
- 5.9 1X TBE 緩衝液 (Amresco)。
- 5.10 10X gel-loading 緩衝液：0.42%(w/v) bromophenol blue, 0.42%(w/v) xylene cyanol FF, 66.7%(w/v) sucrose in H₂O。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 巢式聚合酶連鎖反應法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 445 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.11 100 bp 核酸標準品 (Biolabs)。
- 5.12 溴化乙錠染劑: Ethidium bromide 溶於 1X TBE, 最終濃度為 0.5 µg/mL。
- 5.13 10 µL 具過濾塞之微量吸管尖 (Neptune)。
- 5.14 100 µL 具過濾塞之微量吸管尖 (Axygen)。
- 5.15 200 µL 具過濾塞之微量吸管尖 (Axygen)。
- 5.16 1,000 µL 具過濾塞之微量吸管尖 (Neptune)。
- 5.17 2 mL 微量離心管。
- 5.18 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 10-1,000 µL 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.8 影像分析儀 (Vilber Lourmat)。

7 環境與設施安全

- 7.1 於生物安全第一等級 (BSL-1) 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

- 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存


- 9.1 檢體採集當天低溫運送。
- 9.2 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 µL) 挑出 1 環的菌，放入裝有 400 µL 1X TE 的 2 mL 微量離心管中，於乾熱器以 95°C 不活化處理 5 min，離心後取上清菌液進行實驗。
- 10.1.2 痰檢體：參照本局「分枝桿菌屬培養」檢驗標準方法 (編號：B-07-2006-1.0) 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：經過二甲苯脫蠟，以 Qiagen DNA 萃取套

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 巢式聚合酶連鎖反應法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 446 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

組萃取 DNA。

10.2 配製第一次 PCR 液，單一檢體之 PCR 液含以下配方：

試劑	體積 (μL)
無菌水	4.7
INS-1 引子 (1.6 pmole/μL)	5.0
INS-2 引子 (1.6 pmole/μL)	5.0
25 mM dNTP	0.2
25 mM MgCl ₂	2.5
不含 MgCl ₂ 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，總體積為檢體管數加 3 管 (1 管陽性對照組、1 管陰性對照組及 1 管預留量)。

10.4 第一次 PCR 為增幅 IS6110 基因中 245 bp 核酸片段。取濃度為 100 pmole/μL INS-1、INS-2 引子各 2 μL，加入各含 123 μL 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、MgCl₂、不含 MgCl₂ 之 10X 緩衝液，最後加入 DNA 聚合酶，混合均勻後分別於 PCR 微量反應管內加入 20 μL 試劑混合液，操作時均在冰上操作，以維持 DNA 聚合酶活性。

10.6 最後加入檢體 5 μL (如不活化處理離心後之上清菌液取 2 μL 加入 3 μL 無菌水、痰檢體取去污染後之沉澱物、純化 DNA 取 5 μL，濃度為 100 ng)。

10.7 陽性對照組為 *M. tuberculosis* H37Rv strain DNA，濃度 100 ng/μL，取 1 μL 加 4 μL 無菌水；陰性對照組取 5 μL 無菌水。

10.8 執行第一次 PCR


步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	96°C	10 min
2. Denature	96°C	1 min
3. Annealing	67°C	1 min
4. Extension	72°C	2 min
步驟2.至步驟4.循環重複35次		
5. Final extension	72°C	6 min
6. Store for o/n	16°C	∞

10.9 將第一次 PCR 產物稀釋 10 倍，即取 PCR 反應產物 2 μL 加入內含 18 μL 無菌水的 2 mL 微量離心管中。

10.10 配製第二次 PCR 液，每管總體積為 25 μL，方式同 10.2-10.5。引子為 INS-3 及 INS-4。

10.11 第二次 PCR 為增幅第一次 PCR 產物中 203 bp 核酸片段。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測 (IS6110 巢式聚合酶連鎖反應法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 447 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.12 PCR 微量反應管最後加入 10.9 稀釋產物 5 μ L，陽性及陰性對照組亦同。

10.13 執行第二次 PCR。

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	96°C	10 min
2. Denature	96°C	1 min
3. Annealing	65°C	1 min
4. Extension	72°C	2 min
步驟2.至步驟4.循環重複30次		
5. Final extension	72°C	6 min
6. Store for o/n	16°C	∞

10.14 配製 2%核酸電泳洋菜膠：

10.14.1 溶解 3 g 洋菜(w/v)於 150 mL 1X TBE 緩衝液中。

10.14.2 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。

10.14.3 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 1X TBE 緩衝液盒內保存。

10.15 取第二次 PCR 產物 2 μ L，加入 10X gel-loading 緩衝液 1 μ L 及 7 μ 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 μ L 100 bp 核酸標準品，加入 10X gel-loading 緩衝液 1 μ L 及 8 μ L 無菌水，混合均勻後注入膠孔內。

10.16 以 100 伏特電壓，進行電泳 40 min 後，取出洋菜膠浸泡於溴化乙錠染劑內 5 min。

10.17 取出洋菜膠以清水退染。

10.18 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 以 IS6110 為標的基因設計的引子，可以對結核菌群的模板 (template) DNA 產生陽性 PCR 反應，其他非結核桿菌群 (nontuberculous mycobacteria) 則無法被偵測出來。

11.2 呈現 203 bp 的專一性 PCR 產物之檢體為陽性，反之為陰性。


PCR 反應結果	陽性對照組	陰性對照組	結果判讀
陽性	陽性	陰性	陽性
陰性	陽性	陰性	陰性
陰性或陽性	陽性	陽性	重新實驗
陰性或陽性	陰性	陰性	重新實驗

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測(IS6110 巢式聚合酶連鎖反應法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 448 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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方為有效實驗。

12.4 若 PCR 增幅失敗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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。

14 參考資料

14.1 Hermans PW, van Soolingen D, Dale JW, Schuitema AR, McAdam RA, D. Catty, van Embden J. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 28: 2051-2058.

14.2 Noordhoek GT, Kaan JA, Mulder S, Wilke H, Kolk AH. 1995. Routine application of the polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Pathol 48: 810-814.

14.3 Sambrook J, Rusell DW. 2001. Molecular cloning : A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.


14.4 Su WJ, Tsou AP, Yang MH, Huang CY, Perng RP. 2000. Clinical experience in using polymerase chain reaction for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. Chin Med J (Taipei) 63: 521-526.

14.5 Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL. 1990. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Res 18: 188.

15 附錄

15.1 IS6110 巢式聚合酶連鎖反應法檢驗記錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	結核菌群核酸檢測(IS6110 巢式聚合酶連鎖反應法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 449 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 IS6110 巢式聚合酶連鎖反應法檢驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

IS6110 巢式聚合酶連鎖反應法檢驗紀錄表


頁數：第 頁/共 頁

檢體編號	檢體來源	檢體種類	檢驗日期	結果日期	PCR 反應結果	陽性對照組	陰性對照組	結果判讀

檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局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 450 頁/共 1091 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置點上切割雙股螺旋 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)。

Tb11：5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'

Tb12：5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3'

加無菌水調整濃度為 100 pmole/μL，儲存於-20 °C 冰箱為保存濃度。

5.2 25 mM Deoxyribonucleotide tri-phosphate (dNTP) (Amersham Biosciences)。

5.3 DNA 聚合酶 (AmpliTaq Gold Polymerase, 5 U/μL) (Applied Biosystems)。

5.4 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems)。

5.5 不含 MgCl₂ 之 10X 緩衝液 (10X buffer w/o MgCl₂) (Applied Biosystems)。

5.6 無菌水 (Sterilized deionized H₂O, ddH₂O)。


5.7 洋菜 (Seakem LE agarose) (BMA)。

5.8 1X TBE 緩衝液 (AMRESCO)。

5.9 10X gel-loading 緩衝液：0.42% (w/v) bromophenol blue, 0.42% (w/v) xylene cyanol FF, 66.7% (w/v) sucrose in H₂O。

5.10 100 bp 核酸標準品 (Biolabs)。

行政院衛生署疾病管制局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 451 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.11 溴化乙錠染劑:Ethidium bromide 溶於 1X TBE, 最終濃度為 0.5 µg/mL。
- 5.12 *Bst*II (10 U/µL)、*Hae*III (10 U/µL) 限制酶 (Biolabs)。
- 5.13 10X 限制酶緩衝液 (Biolabs)。
- 5.14 高解析洋菜 (NuSeieve 3 : 1 agarose) (Cambrex)。
- 5.15 25 bp 核酸標準品 (100 ng/µL) (Invitrogen)。
- 5.16 10 µL 具過濾塞之微量吸管尖 (Neptune)。
- 5.17 100 µL 具過濾塞之微量吸管尖 (Axygen)。
- 5.18 200 µL 具過濾塞之微量吸管尖 (Axygen)。
- 5.19 1000 µL 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 環境與設施安全

- 7.1 於生物安全第一等級 (BSL-1) 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

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存


檢體採集當天低溫運送，參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 1X 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。
- 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

行政院衛生署疾病管制局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 452 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


Tb11 引子 (1.6 pmole/ μ L)	5.0
Tb12 引子 (1.6 pmole/ μ L)	5.0
25 mM dNTP	0.2
25 mM MgCl ₂	2.5
不含 MgCl ₂ 之 10X 緩衝液	2.5
DNA 聚合酶	0.1
檢體	5.0
總體積為 25 μ L	

- 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/ μ L Tb11、Tb12 引子各 2 μ L，加入各含 123 μ L 無菌水中，即為實際實驗引子濃度 (1.6 pmole/ μ L)。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、MgCl₂、不含 MgCl₂ 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 20 μ L 試劑混合液，操作時均在冰上操作，以維持 DNA 聚合酶活性。
- 10.6 最後加入檢體 (不活化處理離心後之上清菌液) 5 μ L。
- 10.7 陽性對照組為 *M. tuberculosis* H37Rv strain DNA，濃度 100 ng/ μ L，取 1 μ L 加 4 μ L 無菌水；陰性對照組取 5 μ L 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 1X 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 1X TBE 緩衝液盒內保存。
- 10.10 取 PCR 產物 2 μ L，加入 10X gel-loading 緩衝液 1 μ L 及 7 μ 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 μ L 100 bp 核酸標準品，加入 10X gel-loading 緩衝液 1 μ L 及 8 μ 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

行政院衛生署疾病管制局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 453 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 *BstEII*、*HaeIII* 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 (μL)
無菌水	5
10X 限制酶緩衝液	3
限制酶 <i>BstEII</i> (10 U/μL) 或 <i>HaeIII</i> (10 U/μL)	2
PCR 產物	20
總體積為 30 μL	

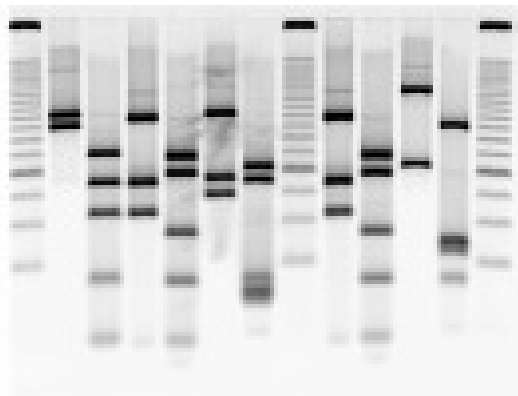
- 10.15 含 *BstEII* 之反應管置於 PCR 機器，並執行程式 60°C 1.5 小時；含 *HaeIII* 之反應管置於 PCR 機器，並執行程式 37°C 1.5 小時。
- 10.16 配製 4% 核酸電泳洋菜膠，步驟同 10.9，僅洋菜換為 Nuseieve 3：1 高解析洋菜，依濃度調整高解析洋菜重量。
- 10.17 取每一限制酶反應後產物 18 μL，加入 10X gel-loading 緩衝液 2 μL，混合均勻後注入每一膠孔內；以 100 bp 及 25 bp 核酸標準品為分子量標的組。
- 10.18 以 100 伏特電壓，進行電泳 80 分鐘後，取出洋菜膠浸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 分別就 *BstEII* 及 *HaeIII* 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 *BstEII*、*HaeIII* 限制酶切割之核酸片段。

1 2



行政院衛生署疾病管制局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 454 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

11.2 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)。

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方為有效實驗。
- 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 分鐘高壓滅菌後，依本局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*. 3rd 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.
- 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。

行政院衛生署疾病管制局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 455 頁/共 1091 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。

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)：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。

5.3 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 二次水中，加熱攪拌使其溶解，儲存於室溫勿超過六個月。


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)。

行政院衛生署疾病管制局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 456 頁/共 1091 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 1X TBE 緩衝液 (Amresco)。
- 5.15 10X gel-loading 緩衝液：0.42%(w/v) Bromophenol blue, 0.42%(w/v) Xylene cyanol FF, 66.7%(w/v) Sucrose in H₂O。
- 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 µg/mL。
- 5.19 Supercoiled DNA ladder (SDL) (Invitrogen)。
- 5.20 *PhiX174-HaeIII* (NEB)。
- 5.21 λ -*HindIII* (NEB)。
- 5.22 0.25 M HCl：100 mL 1 M HCl (Merck) 加二次水至 400 mL。新鮮配製。
- 5.23 4 M NaOH：160 g NaOH (Merck) 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：200 mL 4 M NaOH 加二次水至 2,000 mL。新鮮配製。
- 5.25 雜交膜 (hybond N⁺) (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 5X SSC：250 mL 20X SSC (Amresco) 加二次水至 1,000 mL，儲存於室溫勿超過一年。
- 5.28 引子 (primer)。
INS-1：5'-CGT GAC 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/µL，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 µU/µL) (Applied Biosystems)。
- 5.31 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems)。
- 5.32 不含 MgCl₂ 之 10X 緩衝液 (10X buffer w/o MgCl₂) (Applied Biosystems)。
- 5.33 無菌水 (sterilized deionized H₂O, ddH₂O)。
- 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。
- 5.37 初級清洗液 (primary wash buffer, 0.5X SSC / 0.4% SDS)：25 mL 20X

行政院衛生署疾病管制局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 457 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

SSC (Amresco) 及 40 mL 10% SDS 加二次水至 1,000 mL。新鮮配製。

- 5.38 二級清洗液 (secondary wash buffer, 2X SSC) : 100 mL 20X SSC (Amresco) 加二次水至 1,000 mL。新鮮配製。
- 5.39 清除液 (Strip buffer, 0.1X SSC / 0.1% SDS) : 2.5 mL 20X SSC (Amresco) 及 5 mL 10% SDS 加二次水至 500 mL。新鮮配製。
- 5.40 雜交滾動瓶 (roller bottle) (Thermo Hybaid)。
- 5.41 底片 BioMax Film (Kodak)。
- 5.42 10 μ L 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.43 100 μ L 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.44 200 μ L 具過濾塞之微量吸管尖。
- 5.45 1,000 μ L 具過濾塞之微量吸管尖。

6 儀器設備


- 6.1 化學物質操作用排煙櫃 (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 (μ Quant) (Bio-Tek Instruments, Inc.)。
- 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 (Hofer 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 (Hofer 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 μ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.18 10-100 μ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.19 10-200 μ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。
- 6.20 10-1,000 μ L 微量吸管分注器 (eppendorf)。

7 環境與設施安全

- 7.1 於生物安全第一等級 (BSL-1) 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

行政院衛生署疾病管制局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 458 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

9.1 檢體採集當天低溫運送。

9.2 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第三版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 μ L) 挑出至少 2 環的菌 (不超過 3 環)，放入裝有 400 μ L 1X TE 的 2 mL 微量離心管中。80°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 μ L 50 mg/mL lysozyme，均勻混合，於 37°C 乾熱器中作用 2 hr。

10.1.4 加入 100 μ L 10% SDS 和 45 μ L proteinase K，均勻混合，於 56°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 μ L 的 5 M NaCl 與 100 μ L 的 CTAB/NaCl (已 65°C 預熱)，輕微搖晃至溶液成乳白色後，於 65°C 乾熱器中作用 10 min。

10.1.6 加入 750 μ L chloroform/isoamyl alcohol (24:1)，均勻混合。以 11,000 xg 離心 15 min (4°C)，將上清液吸出至另一乾淨微量離心管中。

10.1.7 加入 750 μ L phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)，均勻混合。以 11,000 xg 離心 15 min (4°C)，將上清液吸出至另一乾淨微量離心管中。

10.1.8 加入 750 μ L chloroform，均勻混合。以 11,000 xg 離心 15 min (4°C)，將上清液吸出至另一乾淨微量離心管中。

10.1.9 加入 0.7 倍體積的 isopropanol，輕晃，加速 DNA 沉澱下來。置於 -20°C 冰箱中至隔日 (至少 2 hr)。


10.1.10 以 11,000 xg 離心 15 min (4°C)，倒掉上清液。

10.1.11 加入 1 mL 的 70% Ethanol (-20°C)。以 11,000 xg 離心 15 min (4°C)，倒掉上清液。

10.1.12 加入 1 mL 的 100% Ethanol (-20°C)。以 11,000 xg 離心 15 min (4°C)，倒掉上清液。

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

行政院衛生署疾病管制局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 459 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 1X TE 將 DNA pellet 溶解，加入的量視 pellet 大小而定（約 30-100 μL ）。

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 1X 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.₂₆₀ = 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 μL
10X 限制酶緩衝液	2 μL
限制酶 <i>Pvu</i> II (10 U/ μL)	1 μL
DNA (4.5 μg)	X μL
總體積	20 μL

10.3.3 輕輕混合均勻後，以 11,000 xg 離心 5 sec 鐘。

10.3.4 於 37°C 中作用至少 6 hr (可以使用 PCR 機器)。作用完畢放置 4°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。

(1) 溶解 0.8 g 洋菜(w/v) 於 100 mL 1X TBE 緩衝液中，依所需體積配製。

(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。

(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 1X TBE 緩衝液盒內保存。


10.4.2 取 2 μL 片段 DNA，加入 10X gel-loading 緩衝液 1 μL 及 7 μL 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 μL 1 kb 核酸標準品，加入 10X gel-loading 緩衝液 1 μL 及 8 μL 無菌水，混合均勻後注入膠孔內。

10.4.3 以 100 伏特電壓，進行電泳 25 min 後，取出洋菜膠浸泡於溴化乙錠染劑內 5 min。

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。

行政院衛生署疾病管制局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 460 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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。

(1) 使用酒精沉澱法純化 Supercoiled DNA ladder (SDL)

(a) 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

(b) 以 11,000 xg 離心 15 min，倒掉上清液，等沉澱物乾後，溶於 58 μL 0.1X TE。

(2) 以限制酶 *PvuII* 切割(1)經純化之 SDL，使成為 SDL-*PvuII*。

(a) 於微量離心管中加入以下溶液，混合均勻，置於 37°C 至少 2 hr

純化之 SDL	58 μL
10X 限制酶緩衝液	7 μL
限制酶 <i>PvuII</i>	5 μL
總體積	70 μL

(b) 進行電泳 (0.8%核酸電泳洋菜膠) 確認 SDL-*PvuII* 切割完全。

(c) 使用分光光度計測量 SDL-*PvuII* 濃度。

(3) 以 3 : 4 混合 SDL-*PvuII* 與 PhiX174-*HaeIII* 使成為 SDL/phi，置於 4°C 或 -20°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
10X gel-loading 緩衝液	100 μL
總體積	1,000 μL

10.5.2 製備 electrophoresis marker λ/phi 存放至 4°C 或 -20°C 備用。於微量離心管中加入以下溶液：

λ- <i>HindIII</i> (500 ng/μL)	16 μL
PhiX174- <i>HaeIII</i> (1,000 ng/μL)	10 μL
1X TE	154 μL
10X gel-loading 緩衝液	20 μL
總體積	200 μL


10.5.3 配製 300 mL 0.8%核酸電泳洋菜膠，方法同 10.4.1，於 10.4.1

行政院衛生署疾病管制局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 461 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- (1) 中加入 10 μ L 溴化乙錠染劑。
- 10.5.4 於 10.4 所得每一管片段 DNA 中加入 5 μ L internal marker SDL/phi。
- 10.5.5 洋菜膠孔兩端膠孔注入 5 μ L electrophoresis marker λ /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 7 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
- (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)。
 - (2) 將此洋菜膠浸泡於 0.25 M HCl 10 min。
 - (3) 將洋菜膠用二次水清洗。
 - (4) 將此洋菜膠浸泡於 0.4 M NaOH 20 min。
 - (5) 重複步驟 (3) 和步驟 (4)。
- 10.6.2 DNA 轉漬，使用真空轉漬法 (vacuum blotting)
- (1) 製備 50 mL 的 1% 洋菜膠溶液，存放在 70°C 的水浴槽中。
 - (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。
 - (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。
 - (4) 將雜交膜 (Hybond N+) 裁剪成適當大小 (17.5 cm x 19 cm)，用原子筆寫上編號並做邊框記號。使用毛筆將 Marking mix (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。
 - (5) 用二次水將雜交膜浸溼後，放在濾紙上。
 - (6) 在雜交膜的四邊壓上橡膠墊，壓的距離約 0.5 cm。
 - (7) 將真空轉漬裝置的蓋子蓋上，確定可以真空抽取。
 - (8) 將洋菜膠放在雜交膜上。
 - (9) 用 1% 洋菜膠溶液將洋菜膠四邊填滿，等洋菜膠溶液凝固。
 - (10) 在洋菜膠上倒入 10X SSPE，讓洋菜膠完全覆蓋。

行政院衛生署疾病管制局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 462 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(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 10X SSPE 完全吸入洋菜膠為主，約 60-90 min。

10.6.3 轉漬後 DNA 雜交膜的處理

- (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。)
- (2) 將 DNA 雜交膜浸潤於 5X SSC。
- (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

- (1) INS-1 引子 5'-CGT GAC GGC ATC GAG GTG GC-3'；
INS-2 引子 5'-GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3'。
- (2) Template DNA 為 *M. bovis* BCG P3。
- (3) 配製 PCR 液：


Template DNA (100 ng/μL)	1 μL
INS-1 引子 (50 ng/μL)	5 μL
INS-2 引子 (50 ng/μL)	5 μL
25 mM dNTP	1 μL
不含 MgCl ₂ 之 10X 緩衝液	5 μL
25 mM MgCl ₂	5 μL
DNA 聚合酶	0.2 μL
無菌水	27.8 μL
總體積	50 μL

(4) 執行 PCR

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	96°C	10 min
2. Denature	96°C	1 min
3. Annealing	67°C	1 min
4. Extension	72°C	2 min
步驟2.至步驟4.循環重複20次		
5. Final extension	72°C	6 min
6. Store for o/n	4°C	∞

- (5) 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。
- (6) 使用 QIAquick PCR purification kit 純化 PCR 產物。
- (7) 使用分光光度計定量純化後的產物(方法同 10.2)。
- (8) 以無菌水將純化後的產物(探針 DNA)稀釋至濃度為 10 ng/μL，每 10 μL 分裝成一管，存放至 4°C 或-20°C 備用

行政院衛生署疾病管制局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 463 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(一次製造大量備用)，使用期限依 PCR 產物質量而定，一般為三個月。

10.7.2 製備 internal marker 探針

- (1) 以 1:1 混合 SDL-*Pvu*II 與 PhiX174-*Hae*III 成 internal marker 探針 (10 ng/μL)。於微量離心管中加入以下溶液 (以 SDL-*Pvu*II 濃度 100 ng/μL 為例)：

SDL- <i>Pvu</i> II (100 ng/μL)	20 μL
PhiX174- <i>Hae</i> III (1,000 ng/μL)	2 μL
1X TE	378 μL
總體積	400 μL

- (2) 混合均勻後，每 10 μL 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

- (1) 取出製備好的探針 (100 ng/10 μL)，99.9°C 加熱 6 min 後，馬上插入冰浴 5 min。
- (2) 以 11,000 xg 轉速離心數 sec。加入等體積 (10 μL) 的標記溶液 (labeling reagent)。以微量吸管尖抽吸數次以均勻混合。
- (3) 加入與標記溶液相同體積 (10 μL) 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，以最大轉速離心數 sec。
- (4) 37°C 作用至少 30 min (可用 PCR 機器)。


10.7.4 雜交

- (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)。
- (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。
- (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

- (1) 預熱初級清洗液至 55°C。
- (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。
- (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。

行政院衛生署疾病管制局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 464 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(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。

(5) 重複步驟 (4)。

10.7.6 偵測

(1) 使用 ECL detection kit，試劑與雜交膜作用時間為 1-1.5 min。

(2) 用保鮮膜將雜交膜包覆，含 DNA 的面朝上放入壓片卡匣中。

(3) 底片放在 DNA 薄膜上壓緊卡匣，壓片時間約 5-120 min。

(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。

(5) 雜交膜可以重複使用，需保持潮濕儲存在 4°C 冰箱（超過一週存於-20°C）。

10.7.7 DNA 雜交膜上 DNA 的清除

(1) 預熱清除液至 65°C。

(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 hr。

(3) 儲存於 5X SSC。

(4) 取出後即可再用不同探針偵測。

11 結果判定

結果底片用掃描器掃描後電腦存檔，利用 UPGMA 軟體分析，依 Internal 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。

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，測試完成後才可以使用於未知檢體的 DNA 雜交膜。

13 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 min 高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。

行政院衛生署疾病管制局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 465 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


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。

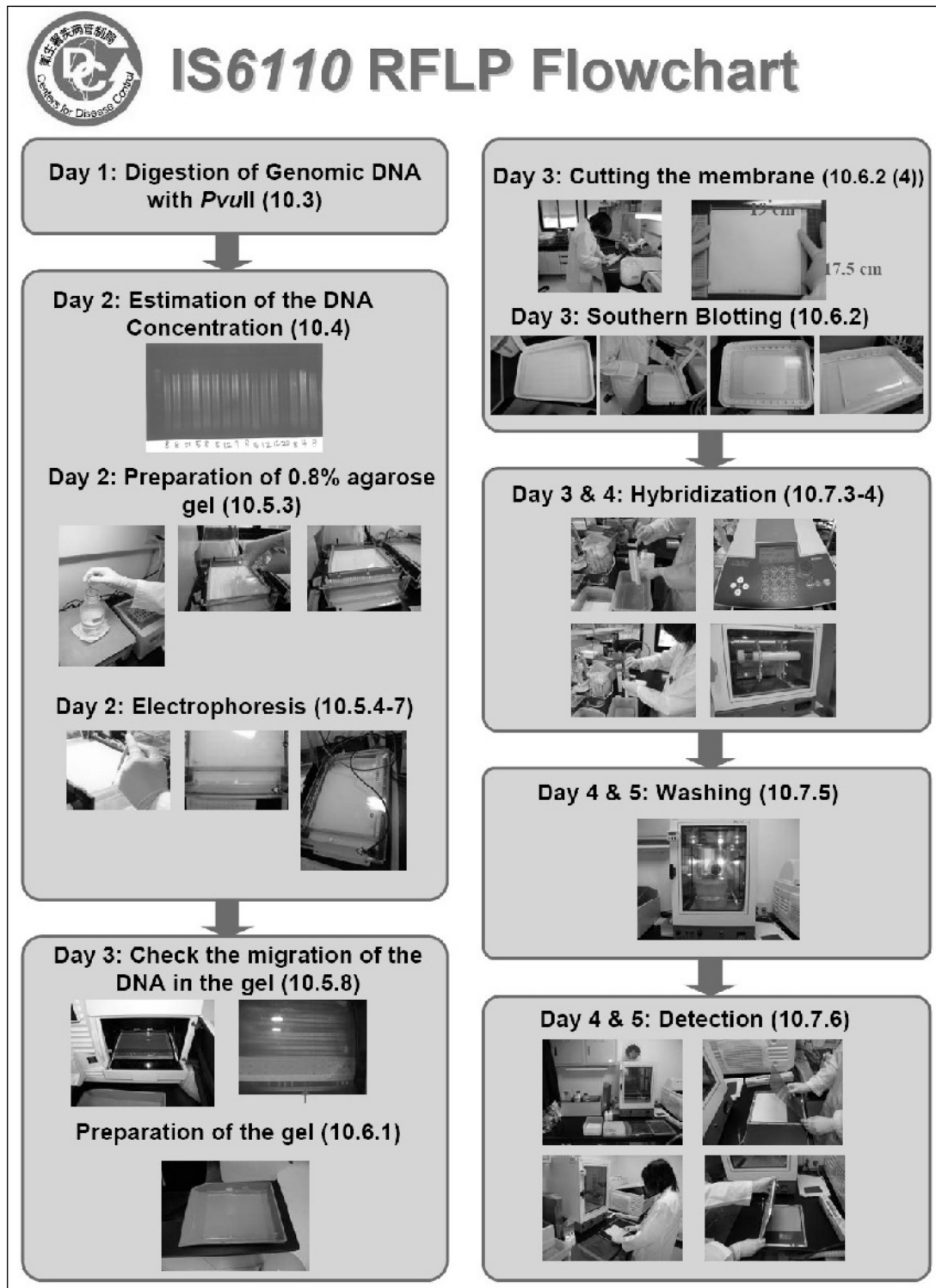
15 附錄

- 15.1 流程圖。


行政院衛生署疾病管制局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 466 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 467 頁/共 1091 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)GCGCGAGAGCCCCGAAGTGC-3' 5'-GCGCAGCAGAAACGCCAGC-3'
	MIRU-26	51	5'-TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC-3' 5'-(HEX)CATAGGCGACCAGGCCGAATAG-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)TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT-3'
	MIRU-23	53	5'-(HEX)CTGTGATGGCCGCAACAAAACG-3' 5'-AGCTCAACGGGTTTCGCCCTTTTGTC-3'

行政院衛生署疾病管制局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 468 頁/共 1091 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'-GGAGACCGCGACCAGGTAAGTGTGTA-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'-CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT-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 MgCl₂ (Applied Biosystems)。
- 5.5 不含 MgCl₂ 之 10X 緩衝液 (super therm gold buffer, 10X buffer w/o MgCl₂) (JMR Holding Inc.)。
- 5.6 無菌水 (sterilized deionized H₂O, ddH₂O)。
- 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)。

行政院衛生署疾病管制局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 469 頁/共 1091 頁		修訂日期：年 月 日

7 環境與設施安全

- 7.1 於生物安全第一等級（BSL-1）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

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及保存

- 9.1 檢體採集當天低溫運送。
- 9.2 參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 Multiplex PCR反應，每管反應含：

試劑	體積（ μL ）
無菌水	3.5
25 mM MgCl_2	1.2
不含 MgCl_2 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 min
2. Denature	95°C	1 min
3. Annealing	59°C	1 min
4. Extension	72°C	1 min30 sec
步驟2至步驟4重複35次		
5. Final extension	72°C	8 min
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。

行政院衛生署疾病管制局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 470 頁/共 1091 頁		修訂日期：年 月 日

11 結果判定

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 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			

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。


13 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 min 高壓滅菌後，依本局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

行政院衛生署疾病管制局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 471 頁/共 1091 頁		修訂日期：年 月 日

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	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
	頁次：第 472 頁/共 1091 頁		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 適用檢體範圍

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 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 µg/mL Isoniazid (INH)。

1.0 µg/mL Isoniazid (INH)。

1.0 µg/mL Rifampin (RMP)。

5.1.2 一片含：2.0 µg/mL Streptomycin (SM)。

10.0 µg/mL Streptomycin (SM)。

5.0 µg/mL Ethambutol (EMB)。

10.0 µg/mL Ethambutol (EMB)。

5.2 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。

5.3 含 4.5 mL 生理食鹽水之無菌平底玻璃小瓶。

5.4 塑膠滴管。

5.5 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% CO₂ 溫箱。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	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
	頁次：第 473 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

7 環境與設施安全

- 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

無。

9 檢體運送及保存

9.1 檢體運送採三層包裝

- 9.1.1 第一層為防水材質，並含有螺旋蓋可防止檢體液體滲漏，上面標示有生物危害標誌及正確之內含檢體名稱及種類。
- 9.1.2 第二層為防水之材質，含有螺旋蓋防止滲漏，能承受高度落下之撞擊而不破裂，內含碰撞緩衝材質可包覆第一層物品，另含吸附性物質以吸附意外滲漏之第一層檢體。
- 9.1.3 第三層包裝必須裝有適當碰撞緩衝材質，可固定第二層物質並防止運送途中任何震動所可能造成之傷害破損，外面必須標示有詳細之送件者及收件者姓名及地址，並且標示有國際通用之生物感染性物質之安全標示。
- 9.1.4 如果在第二層內裝有多支檢體，每支檢體應個別使用防水包裝再裝入第二層內，以防止檢體互相碰撞而破裂。
- 9.1.5 更詳細運送包裝方法請參考國際航空運輸組織 (International Air Transport Association, IATA) 所制定之危險物質運送包裝方法 (Packing Instruction 620) 及本局全球資訊網刊載之「防疫檢體採檢手冊」第四版，
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。


9.2 檢體需保存於 2°C-8°C。

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	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
	頁次：第 474 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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% CO_2 之 35°C - 37°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 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。

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，顯示應生長菌量過低，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

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	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
	頁次：第 475 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

121°C，30 分鐘高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。


14 參考資料

- 14.5 行政院衛生署疾病管制局，結核菌檢驗手冊，第二版，2004。
- 14.6 Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333, Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A guide for the level II laboratory, 1981.
- 14.7 The National Committee for Clinical Laboratory Standards, Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; tentative standard – second edition, 2000.
- 14.8 Clinical Microbiology Procedures Handbook, Henry D. Isenberg, Vol2, section 7.7.1, 2004.

15 附錄


無。

行政院衛生署疾病管制局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 476 頁/共 1091 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，最後再以螢光的方法確認。
- 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)。
 - (1) Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)。
 - (a) With 4,500 mg/L D-glucose (high glucose)。
 - (b) With L-glutamine。
 - (c) Without sodium pyruvate。
 - (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。
 - (3) Pen-strep solution (100X)。
 - (a) With 10,000 units/mL penicillin G。
 - (b) 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 2X pen-strep solution 之 DMEM 組成)。
 - 5.1.3 Maintain Medium(由含 2% FBS 與 1X pen-strep solution 之 DMEM 組成)。
 - 5.1.4 Trypsin-EDTA。
 - (5) With 0.05% trypsin。
 - (6) With 0.53 mM EDTA in Hanks'balanced salt solution (HBSS) without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺，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-PaqueTM PLUS：Amersham Biosciences，17-1440-02，Sweden。
 - 5.1.7 Rubella, E1, clone EI-20：Chemicon，MAB925，USA，store at 2-8°C。
 - 5.1.8 Gt X Ms IgG FITC：Chemicon，5008，USA，store at 2-8°C。

行政院衛生署疾病管制局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 477 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.1.9 Mounting fluid：Chemicon，5013，USA，store at 2-8°C。
- 5.1.10 Tween 20/sodium azide,100X：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 dist.H₂O 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-cm² Culture vessels (T-25)。
- 5.2.2 24 孔盤。
- 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。
- 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
- 參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9 檢體運送及儲存
- 參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

行政院衛生署疾病管制局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 478 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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

(1) 全血

(a) 以針筒吸取 3 mL 的 Ficoll-paque 置於 15 mL 離心管下層。

(b) 取 2 mL 血液與 2 mL 的 HBSS 混合後，輕輕的置放於 Ficoll-paque 上層。

(c) 400 xg，室溫下離心 40 min。

(d) 以乾淨吸管小心吸去上層液。

(e) 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。

(f) 加入取出淋巴層細胞三倍體積的 HBSS，輕輕以吸管混合均勻。

(g) 100 xg，室溫下離心 10 min 後移除上清液。

(h) 加入 5 mL HBSS，以吸管輕輕上下混合原沉澱細胞，重複 10.2.3 (7)。

(i) 加入 2 mL Sample pretreat medium 後，接種細胞或暫時置於-80°C 保存。

(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。


(3) 尿液：以 400 xg 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 孔盤長滿單層之 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% CO₂ 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。一 hr 後加入 1 mL Maintain medium，置於 37°C 含 5% CO₂ 的培養箱培養。

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，

行政院衛生署疾病管制局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 479 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

再將上清液取 100 μ L 接種於新的 24 孔盤的單層 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

(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。

(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。

(3) 取 10 μ L 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。

(4) 用無菌水以 1:100 稀釋 5.1.7 Rubella, E1, clone EI-20。

(5) 取出風乾後滴一滴 10.3.6 (4) Rubella Ab，將玻片置於 Moisture chamber，置於 37°C 恆溫箱 30 min。

(6) 以 5.1.12 IFA wash solution 清洗玻片後置於乾浴器烘乾。

(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。

(8) 重覆 10.3.5 (6)。

(9) 以 5.1.9 Mounting fluid 封片後，以螢光顯微鏡鏡檢。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 判定標準：經 Rubella IFA 測定有綠色螢光反應者，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 病毒培養觀察記錄表、附錄 15.4 螢光鑑定記錄表，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。

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，依本局廢棄物處理作業程序處理。

行政院衛生署疾病管制局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 480 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日


14 參考資料

Rubella Laboratory Network, available at
http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/measles/rubella_index.htm.

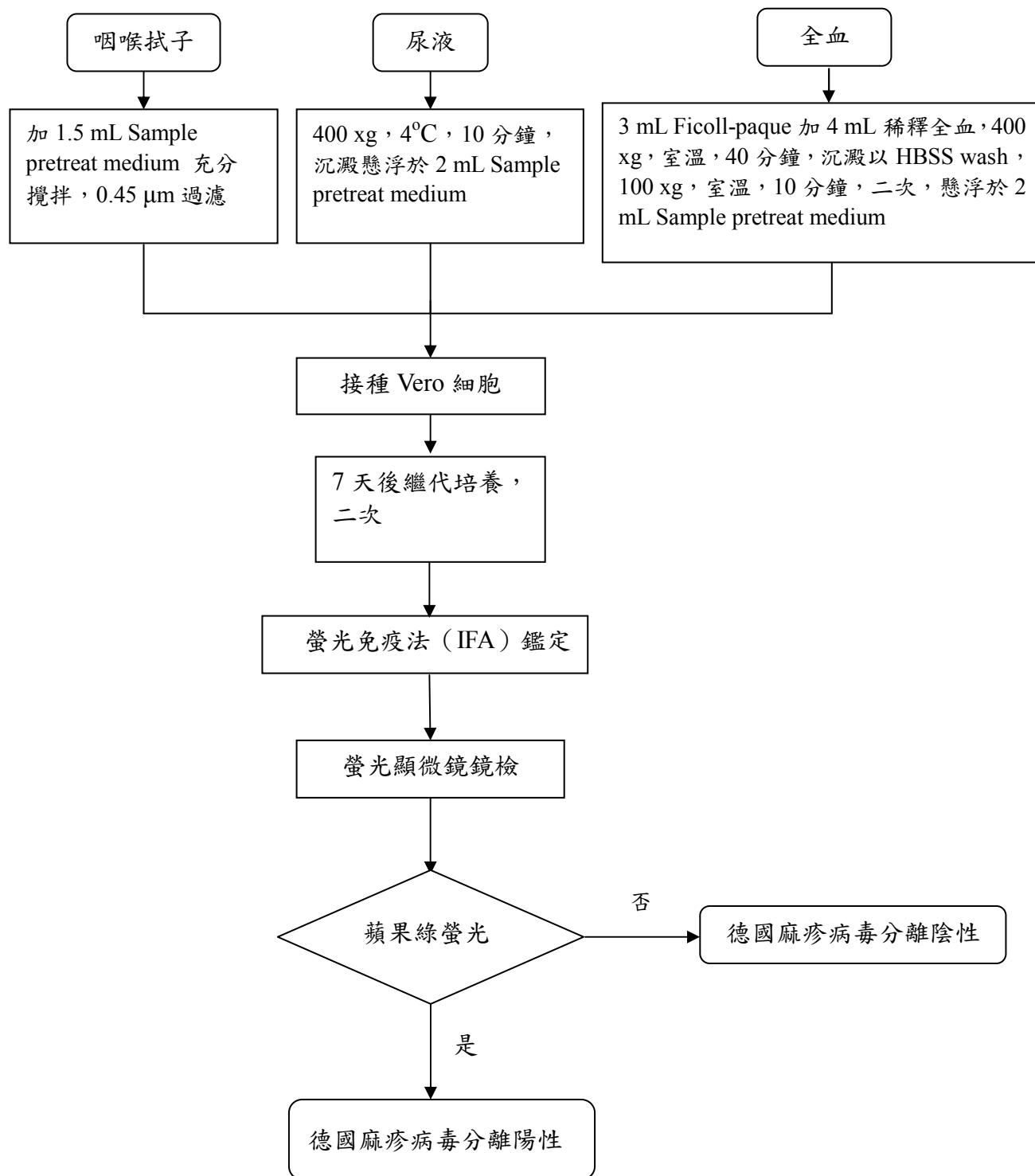
15 附錄

- 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 螢光鑑定記錄表。
- 15.5 德國麻疹病毒檢驗判定總流程圖。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

 編號： 頁次：第 481 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局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 482 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 細胞繼代培養紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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：

行政院衛生署疾病管制局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 484 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 螢光鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

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"/>

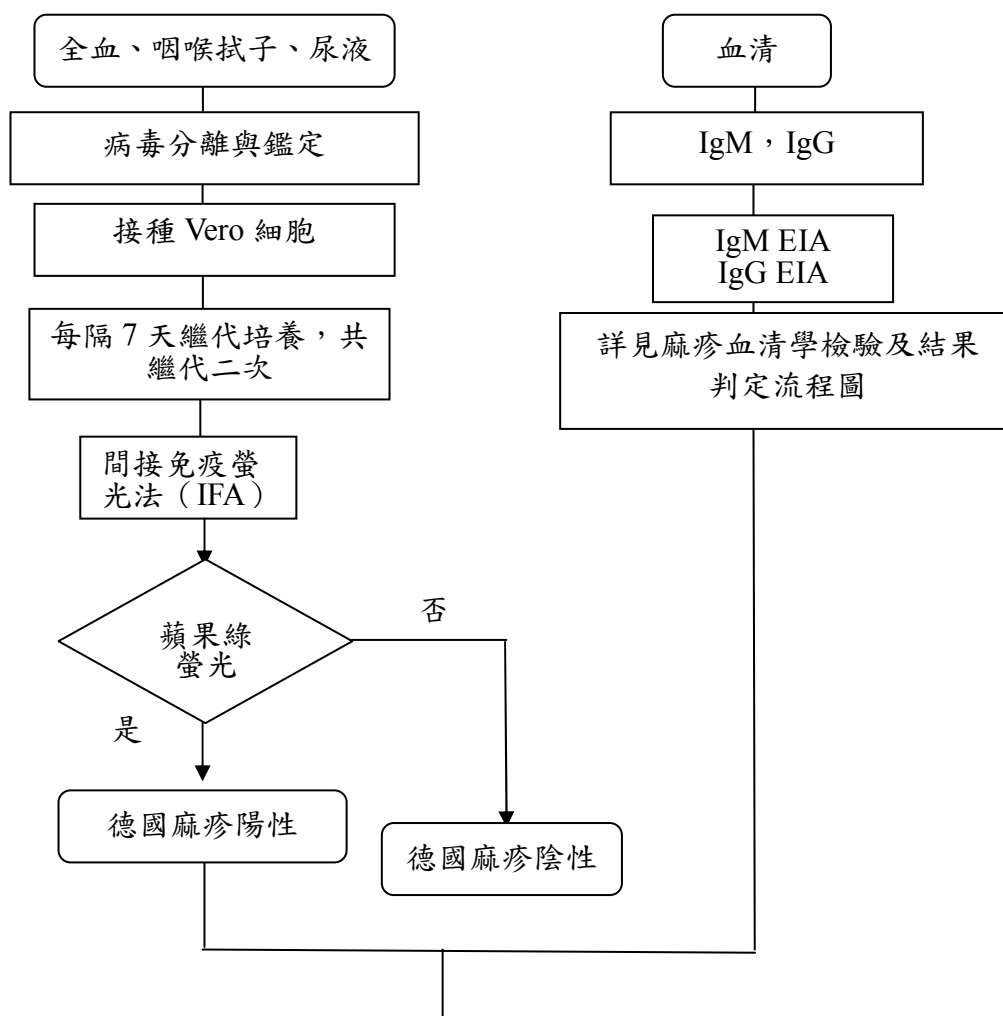
檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局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 485 頁/共 1091 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 486 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested 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－巢式聚合酶鏈反應 (RT-nested PCR) 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：咽喉拭子。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

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德國麻疹病毒 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，並將擴增放大。

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 5X Betain。

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。

5.1.6 Agarose。

5.1.7 DEPC 水。

5.1.8 無菌 PCR 反應管。

5.1.9 無菌 2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L Tips。

5.1.10 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.1.11 手套。

5.2 儀器設備

5.2.1 PCR thermal cycler。

5.2.2 電泳槽。

5.2.3 DNA 電泳膠體觀察設備。

5.2.4 2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L Pipetman。

6 環境與設施安全


儘量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。

7 檢體採集與檢體前處理

7.1 檢體採集參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 487 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

7.2 檢體前處理

7.2.1 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。

7.2.2 咽喉拭子檢體

- (1) 棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。
- (2) 分裝標示號碼，取 140 μ L，其餘保存於-80 $^{\circ}$ C。

8 檢體運送及保存

檢體運送以低溫快速為原則，需使用檢體專用運送箱，運送箱內需維持低溫 (4 $^{\circ}$ C)，檢體若無法即刻送檢則可暫時儲存於 4 $^{\circ}$ C 冰箱中。

9 檢驗步驟

9.1 萃取病毒 RNA (以 Qiagen QIAamp viral RNA mini kit 為例)。

- (1) 吸取 140 μ L 的檢體，加入 560 μ L Lysis buffer (AVL)，震盪混合，室溫靜置反應 10 min。
- (2) 加入純酒精 560 μ L 終止反應。
- (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。
- (4) 以清洗液 (AW1) 500 μ L，離心 8,000 rpm, 1 min，作第一次沖洗，清洗膜上所吸附的雜質。
- (5) 以清洗液 (AW2) 500 μ L，離心 14,000 rpm, 3 min，作第二次沖洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。
- (6) 離心 14,000 rpm, 1 min，以徹底去除膜上殘留酒精。
- (7) 加入萃取液 (AVE) 50 μ L，室溫靜置 1 min，在 4 $^{\circ}$ C 離心 8,000 rpm, 1 min，取得 RNA。

9.2 反轉錄酶—聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) (以 Promega access quick RT-PCR system 為例)。


(1) 試劑添加量

RNase-free H ₂ O	7.0 μ L
2X master mix	25.0 μ L
Forward primer 1100F (10 μ M)	1.0 μ L
Reverse primer 1100R (10 μ M)	1.0 μ L
AMV RT 5U/ μ L	1.0 μ L
5X Betain	10.0 μ L
RNA sample	5.0 μ L

50.0 μ L

- (2) 取 5 μ L 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 (1)。
- (3) 使用 PCR thermal cycler。
 - (a) R.T.作用, 45 $^{\circ}$ C 45 min。
 - (b) Taq 活化作用, 94 $^{\circ}$ C 2 min。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 488 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

- (c) Denaturation, 94°C 30 sec。
- (d) Annealing, 60°C 30 sec。
- (e) Extension, 68°C 60 sec。
- (f) 重複 (c) 至 (e) 步驟 40 Cycle。
- (g) Final extension, 68°C 5 min。

9.3 巢式聚合酶鏈反應 (nested PCR) (以 Promega access quick RT-PCR system 為例)。

(1) 試劑添加量

RNase-free H ₂ O	10.0 μL
2X 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
1 st PCR product	3.0 μL

50.0 μL

- (2) 取 3 μL 9.2 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 RT-PCR 試劑試劑添加量如 (1)

(3) 使用 PCR thermal cycler。

- (a) Taq 活化作用, 94°C 2 min。
- (b) Denaturation, 94°C 30 sec。
- (c) Annealing, 60°C 30 sec。
- (d) Extension, 68°C 60 sec。
- (e) 重複 (c) 至 (d) 步驟 40 cycle。
- (f) Final extension, 68°C 5 min。

(4) 膠片電泳分析

- (a) 置備 1.5% 洋菜膠：1.5 g Agarose 溶於 100 mL (1X) TBE buffer。
- (b) 選擇 100 bp DNA size Marker：5μL (2 ng/μL)。
- (c) 取二次產物 5 μL，各加入 1 μL 6X loading dye。
- (d) 進行電泳分離：100V，25 min。
- (e) 膠片染色：1 μL/mL SYBR Safe DNA Gel Stain 染色 10-15 min。
- (f) 使用 UV light 觀察，並照相紀錄。

10 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

RT-PCR 產物各取 5 μL，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。

12 注意事項

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 489 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

12.1 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。

12.2 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。

13 參考文獻

13.1 WHO. 2007. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, 2nd edition, WHO/IVB/07.01.


13.2 Abernathy E, Cabezas C, Sun H, Zheng Q, Chen MH, Castillo-Solorzano C, Ortiz AC, Osoreo F, Oliveira L, Whittembury A, Andrus JK, Helfand RF, Icenogle J. 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.

14 附錄

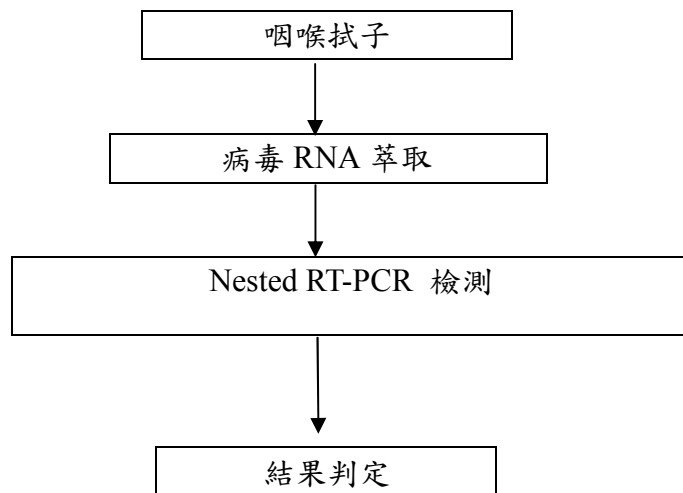
14.1 德國麻疹病毒鑑定流程圖。

14.2 德國麻疹病毒診斷用引子組序列表。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 490 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

附錄 14.1 德國麻疹病毒鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	德國麻疹病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 491 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

附錄 14.2 德國麻疹病毒診斷用引子組序列表

一、First round RT-PCR primer

1100F :5'-CCCCACCGACACCGTGATGAG-3'

1100R :5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTATACAGCAACAGGTGC-3'

二、Second round nested-PCR primer

875F: 5'-GTGATGAGCGTGTTTCGCCCTT-3'

875R: 5'-TGGTGTGTGTGCCATAC-3'

行政院衛生署疾病管制局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 492 頁/共 1091 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。再利用吸覆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 650 nm 為參考波長以吸光光度計測定 450 nm 波長的吸光值。

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」。

- (1) Anti-rubella virus/IgM test plate : 2 x 6 strips。
- (2) Anti-rubella virus reference P/P : 0.65 mL。
- (3) Anti-rubella virus reference P/N : 0.45 mL。
- (4) Sample buffer POD : 2 x 50 mL。
- (5) Anti-human IgM/POD conjugate (μ -chain specific) : 1 mL。
- (6) Conjugate buffer microbiol : 4 x 12.5 mL。
- (7) RF absorbent : 4 x for 5 mL。
- (8) Polyethylene bag for storing unused test strip。
- (9) Barcode table of value。

5.1.2 「Supplementary reagents for enzygnost/TMB : Dade Behring, OUVV 17, Germany, 4°C 儲存」。

- (1) Washing solution POD : 3 x 100 mL。
- (2) Colour solution blue for enzygnost : 1 x 12.5 mL。
- (3) Buffer/substrate TMB : 4 x 30 mL。
- (4) Chromogen TMB : 4 x 3 mL。
- (5) Stopping solution POD : 2 x 100 mL。
- (6) Adhesive foils for microtiter plates : 24 pcs.。
- (7) Empty bottle for the working Chromogen solution : 1 pcs.。

行政院衛生署疾病管制局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 493 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

(8) Instruction for use : 1 pcs. °

5.2 耗材

- 5.2.1 tips : 200 μ L、1,000 μ 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 μ L、200 μ L、1,000 μ L °
- 6.2 八爪 Pipetman : 200 μ L °
- 6.3 電動分注器 : 50 μ L-1,000 μ 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 環境與設施安全

於生物安全第一等級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作 °

8 檢體採集

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf> °


9 檢體運送及儲存

參照本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf> °

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 °
 - 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

行政院衛生署疾病管制局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 494 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 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 μ 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 每個細胞格加入 100 μ L Working Chromogen solution。
- 10.3.8 室溫，避光，培養 30 min。
- 10.3.9 每個細胞格加入 100 μ L Stopping solution。
- 10.3.10 以 650 nm 做為參考波長，用 Microplate reader 測定 450 nm 吸光度。

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 判定標準

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 15.2 德國麻疹 ELISA 實驗記錄表，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陳核實驗室主管審核，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 Qualitative evaluation： $\Delta A_{\text{Reference P/P}} \geq 0.2$ 。

12.2 Quantitative evaluation。

12.2.1 Lower margin $\leq \Delta A_{\text{Reference P/P}} \leq$ upper margin。

行政院衛生署疾病管制局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 495 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

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

Reference P/P, at start of series	ΔA	0.474
With margins ?		yes
Reference P/P, at end of series	ΔA	0.388
With margins ?		yes
Mean value	ΔA	0.431
Reference P/P, nominal value	ΔA	0.518
Correction factor 0.518:0.431	=	1.2
Corrected ΔA 待測血清	= $1.2 \times \Delta A$ 待測血清	

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，依本局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, Metzel 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.

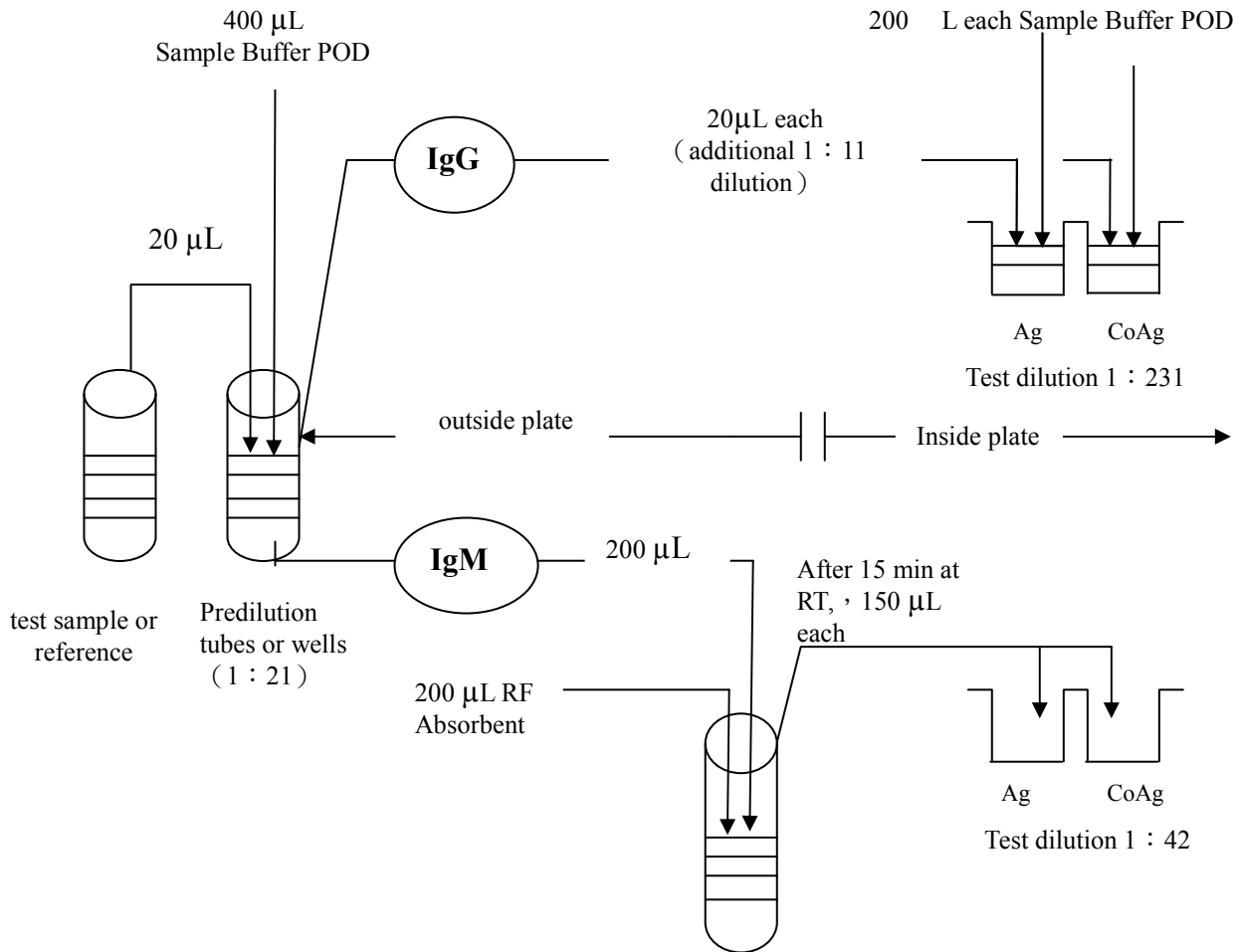
15 附錄

- 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。

行政院衛生署疾病管制局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 497 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

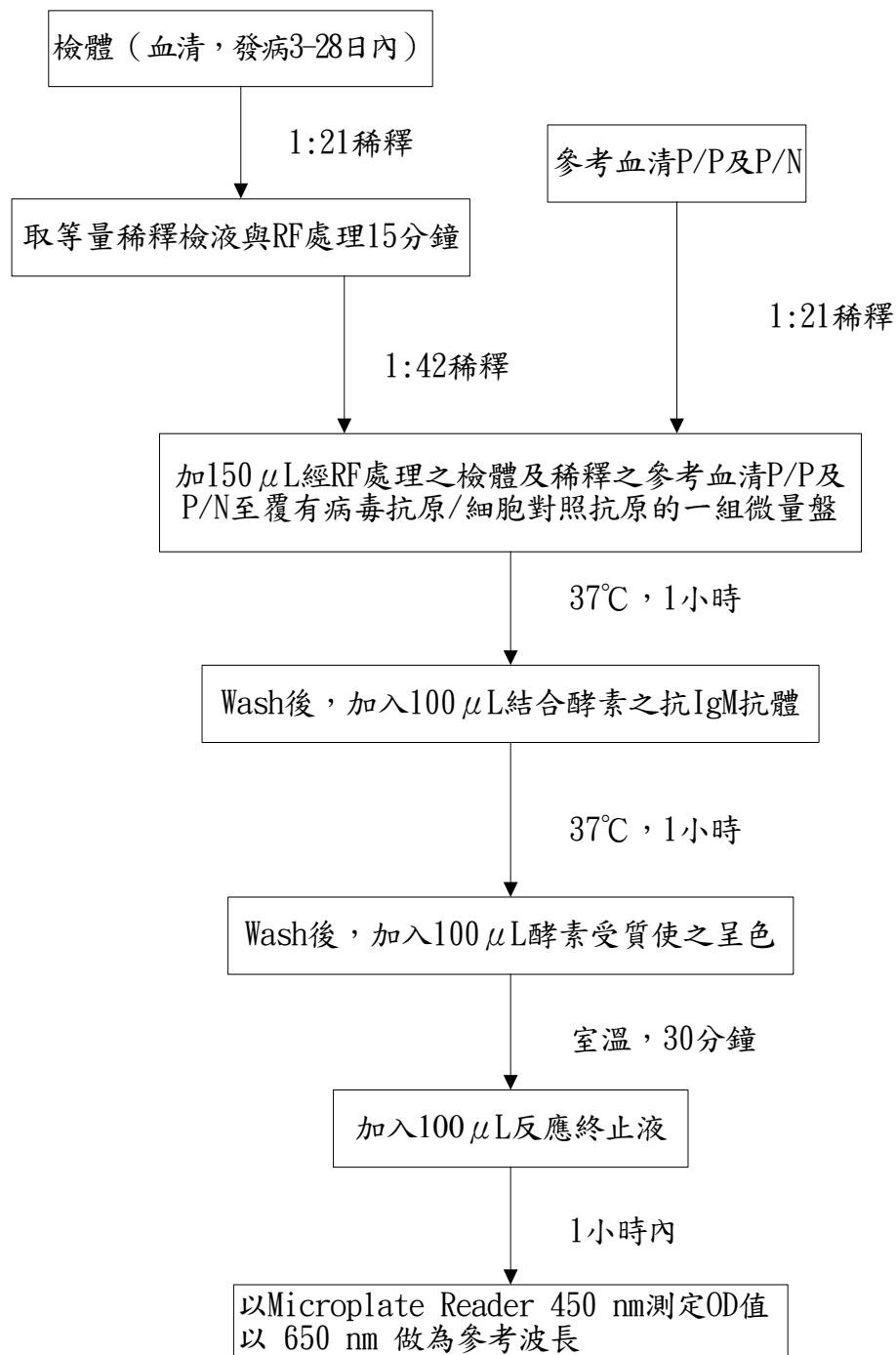
附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



行政院衛生署疾病管制局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 498 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局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 499 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 德國麻疹 ELISA 紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
德國麻疹ELISA實驗紀錄表

Date :

Name	Rubella IgM					Rubella IgG				
	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	Result	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	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 style="text-align: center;">Validation Check</th></tr> <tr><td>1. $P/P \geq 0.2$</td></tr> <tr><td>2. P/P within lower and upper margin</td></tr> <tr><td>3. Individual P/P within $\pm 20\%$ mean P/P</td></tr> </table> <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>	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	Kit Batch :	Expiry :	Lower margin :	Upper margin :	Nominal Value :	Mean P/P :	Correction Factor :	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><th style="text-align: center;">Validation Check</th></tr> <tr><td>1. $P/N \geq 0.5$</td></tr> <tr><td>2. P/N within lower and upper margin</td></tr> <tr><td>3. Individual P/N within $\pm 20\%$ mean P/N</td></tr> </table> <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>	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	Kit Batch :	Expiry :	Lower margin :	Upper margin :	Nominal Value :	Mean P/N :	Correction Factor :
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																							
Kit Batch :																							
Expiry :																							
Lower margin :																							
Upper margin :																							
Nominal Value :																							
Mean P/P :																							
Correction Factor :																							
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																							
Kit Batch :																							
Expiry :																							
Lower margin :																							
Upper margin :																							
Nominal Value :																							
Mean P/N :																							
Correction Factor :																							

Result Interpretation
(-)Negative < 0.10 (+)POSITIVE > 0.20 (+/-)EQUIVOCAL : 0.10-0.20

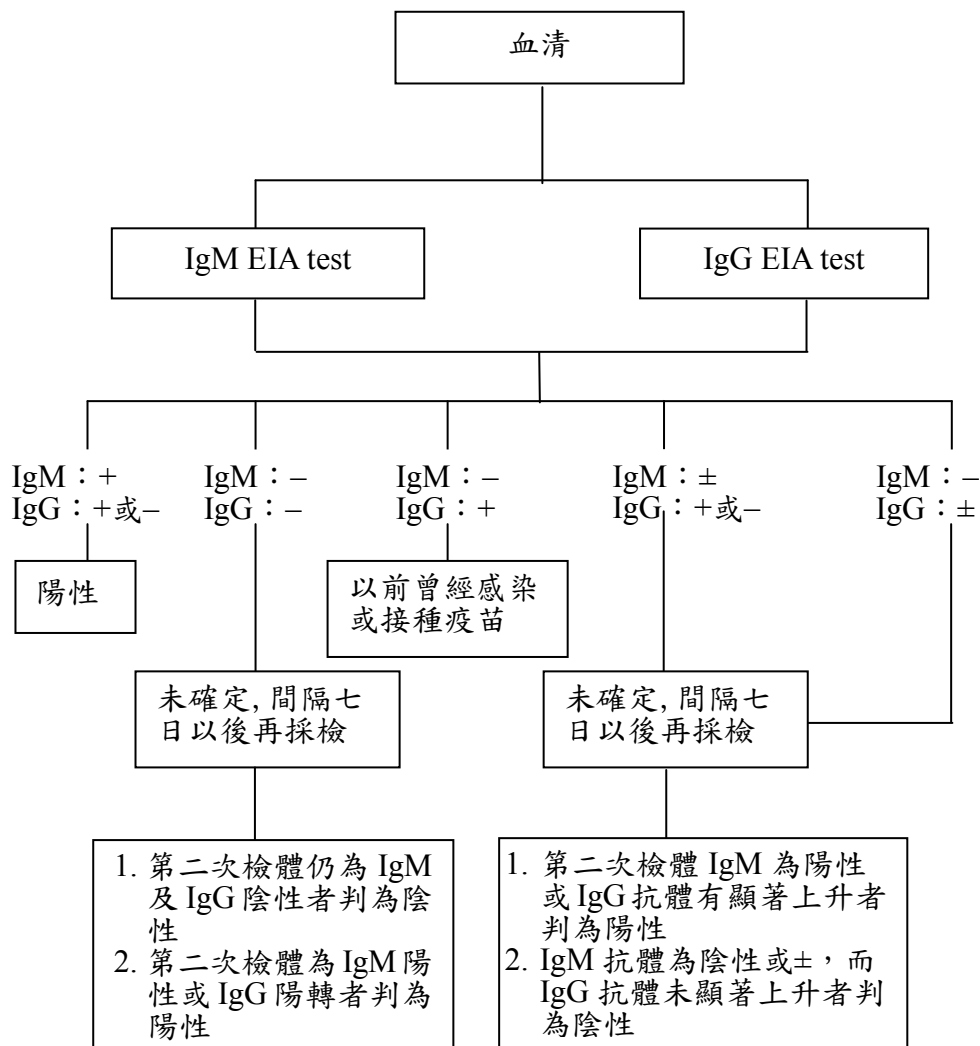
檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局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 500 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局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 501 頁/共 1091 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 650 nm 為參考波長以吸光光度計測定 450 nm 波長的吸光值。

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」

- (1) Anti-rubella virus/IgG test plate : 2 x 6 strips。
- (2) Anti-rubella virus reference P/N : 0.4 mL。
- (3) Sample buffer POD : 2 x 50 mL。
- (4) Anti-human IgG/POD conjugate : 1 mL。
- (5) Conjugate buffer microbiol : 4 x 12.5 mL。
- (6) Polyethylene bag for storing unused test strip。
- (7) Barcode table of value。

5.1.2 「Supplementary reagents for enzygnost/TMB : Dade Behring, OUVF 17, Germany, 4°C 儲存」。

- (1) Washing solution POD : 3 x 100 mL。
- (2) Colour solution blue for enzygnost : 1 x 12.5 mL。
- (3) Buffer/substrate TMB : 4 x 30 mL。
- (4) Chromogen TMB : 4 x 3 mL。
- (5) Stopping solution POD : 2 x 100 mL。
- (6) Adhesive foils for microtiter plates : 24 pcs.。
- (7) Empty bottle for the working Chromogen solution : 1 pcs.。
- (8) Instruction for use : 1 pcs.。

5.2 耗材

5.2.1 Tips : 200 μ L、1,000 μ L。

5.2.2 1.5 mL Eppendorf。

行政院衛生署疾病管制局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 502 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 μ L、200 μ L、1,000 μ L。
- 6.2 八爪 Pipetman：200 μ L。
- 6.3 電動分注器：50 μ L-1,000 μ 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 環境與設施安全

於生物安全第一等級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作。

8 檢體採集

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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。
- 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。

行政院衛生署疾病管制局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 503 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 μ 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 每個細胞格加入 100 μ L Working Chromogen solution。
- 10.3.8 室溫，避光，培養 30 min。
- 10.3.9 每個細胞格加入 100 μ L Stopping solution。
- 10.3.10 以 650 nm 做為參考波長，用 Microplate reader 測定 450 nm 吸光度。

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 判定標準

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 實驗記錄表，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陳核實驗室主管審核，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 Qualitative evaluation： $\Delta A_{\text{Reference P/N}} \geq 0.5$ 。
- 12.2 Quantitative evaluation
 - 12.2.1 Lower margin $\leq \Delta A_{\text{Reference P/N}} \leq$ upper margin。
 - 12.2.2 任一 $\Delta A_{\text{Reference P/N}}$ 介於 Reference P/N 平均值 $\pm 20\%$ 。
- 12.3 Measurement correction：利用 Reference P/N 來校正實驗值，改善結果的再現性。

行政院衛生署疾病管制局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 504 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

計算範例		
Reference P/N , at start of series	ΔA	1.374
With margins ?		yes
Reference P/N , at end of series	ΔA	1.188
With margins ?		yes
Mean value	ΔA	1.281
Reference P/P,nominal value	ΔA	1.024
Correction factor 1.024:1.281	=	0.8
Corrected ΔA <small>待測血清</small>	$=0.8 \times \Delta A$ <small>待測血清</small>	

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，依本局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。

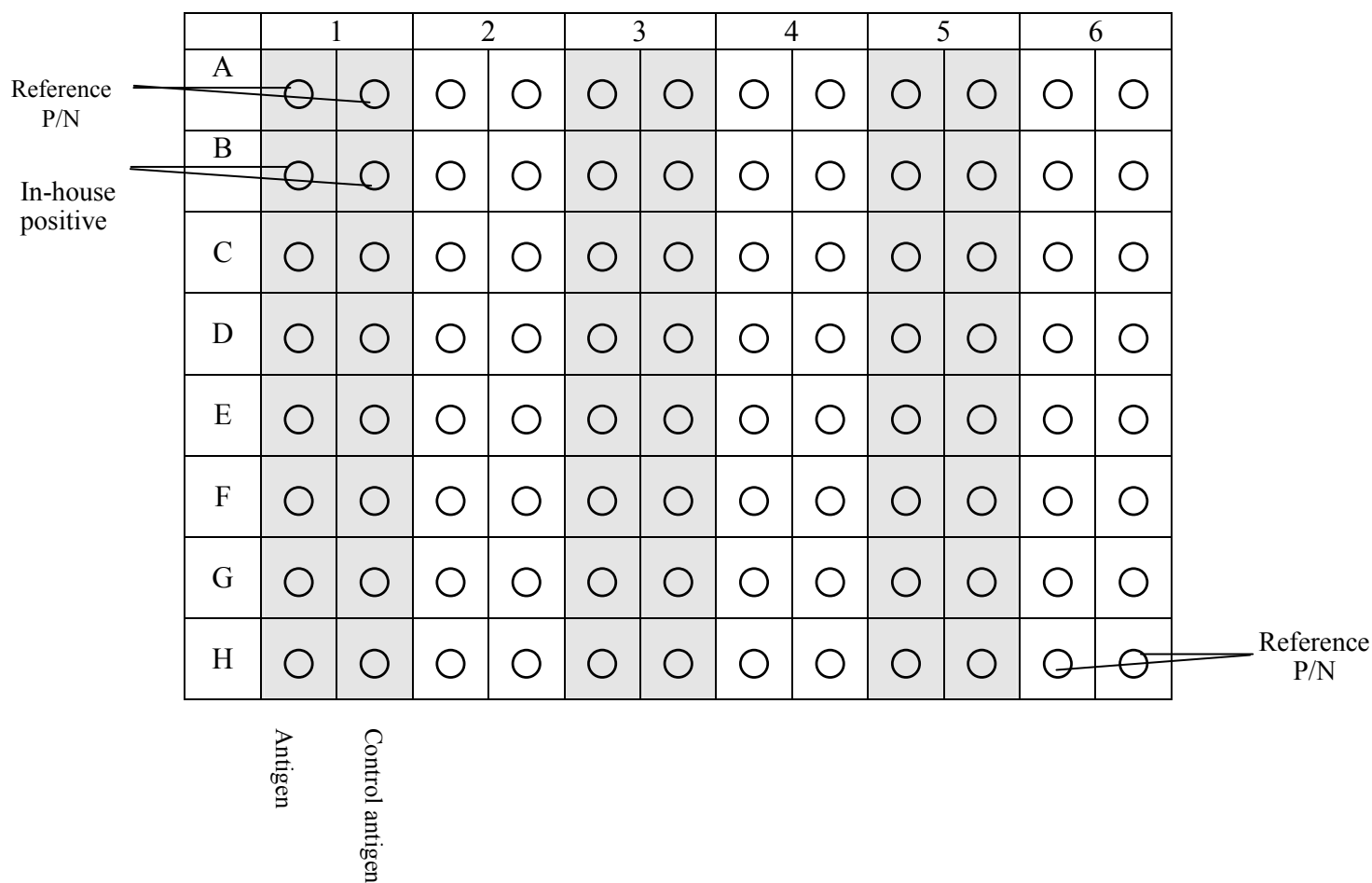
15.4 德國麻疹 ELISA 實驗紀錄表。

15.5 德國麻疹 ELISA 血清學檢驗及結果判定流程圖。

行政院衛生署疾病管制局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 505 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 檢體排列位置圖

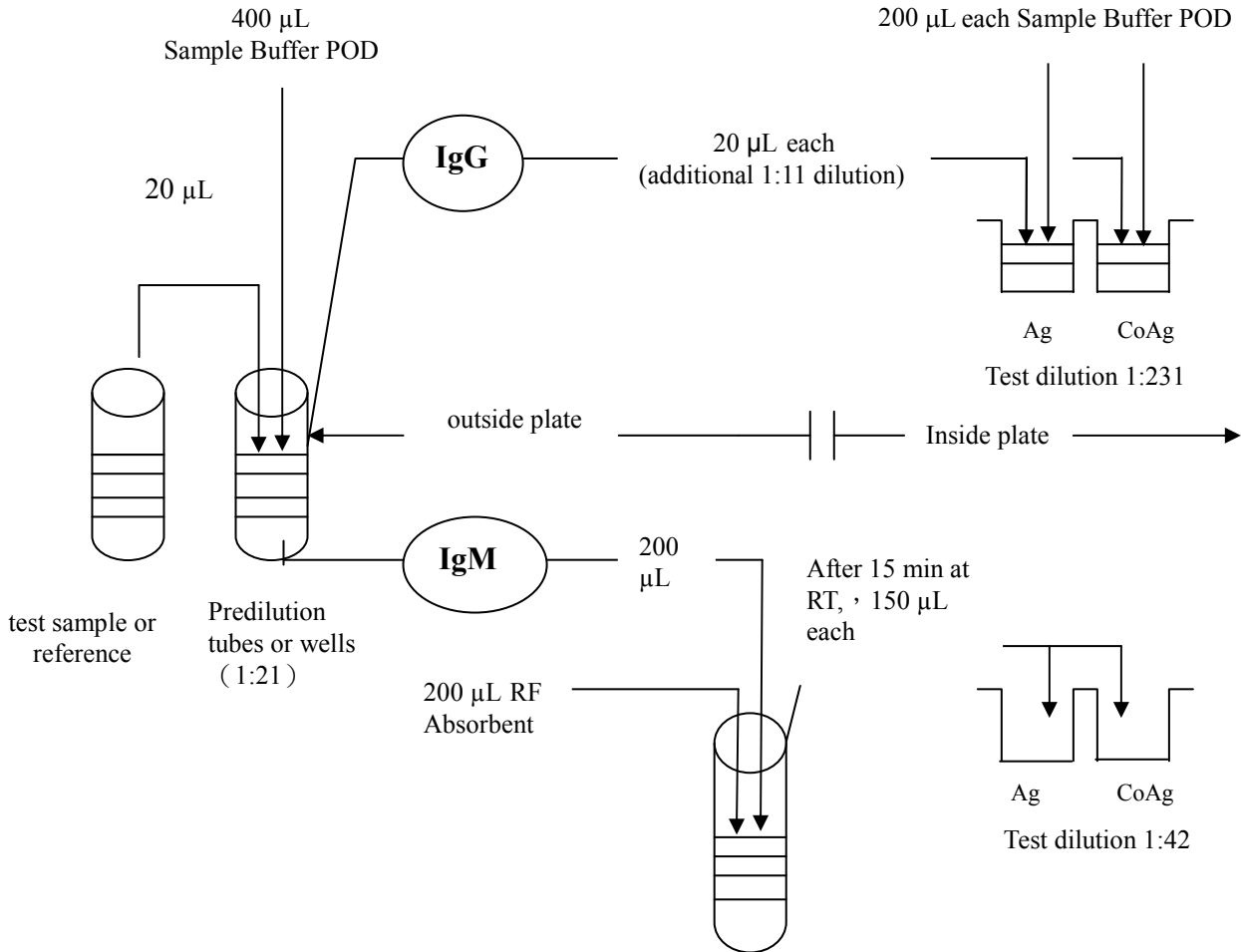


1. 從 C1 開始置放待測檢體。
2. Reference P/P 除 A1 位置固定外，另一 Reference P/P 位置視檢體量而定，在最後一個試劑條 H 對應位置。

行政院衛生署疾病管制局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 506 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

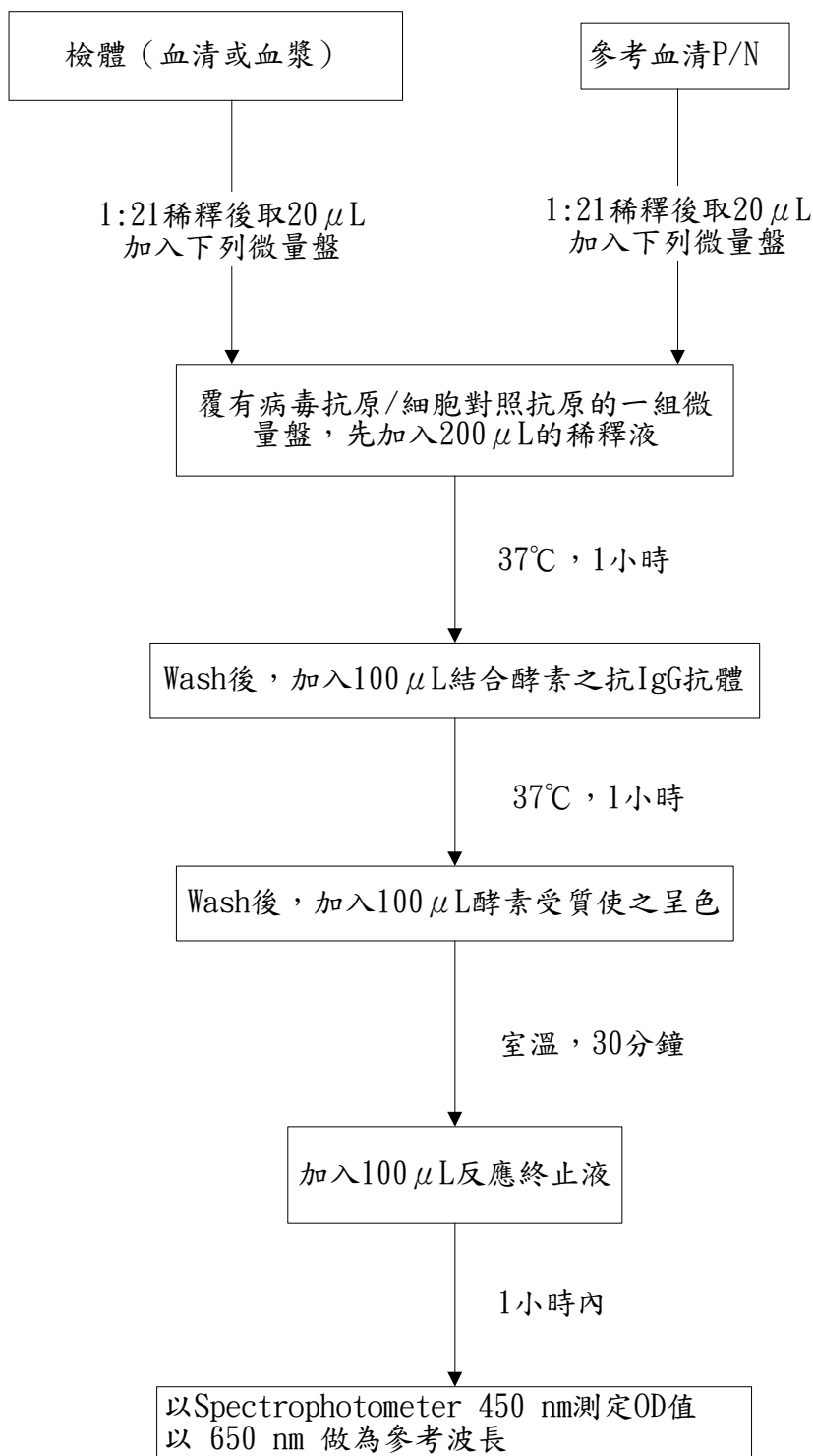
附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



行政院衛生署疾病管制局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 507 頁/共 1091 頁		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



行政院衛生署疾病管制局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 508 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 德國麻疹 ELISA 實驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心 德國麻疹ELISA實驗紀錄表

Date :

Name	Rubella IgM					Rubella IgG				
	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	Result	Well	Sample No.	ΔA	Corrected ΔA	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> <div style="padding: 5px;"> 1. P/P \geq 0.2 2. P/P within lower and upper margin 3. Individual P/P within \pm 20 % mean P/P </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> 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> <div style="padding: 5px;"> 1. P/N \geq 0.5 2. P/N within lower and upper margin 3. Individual P/N within \pm 20 % mean P/N </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> 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

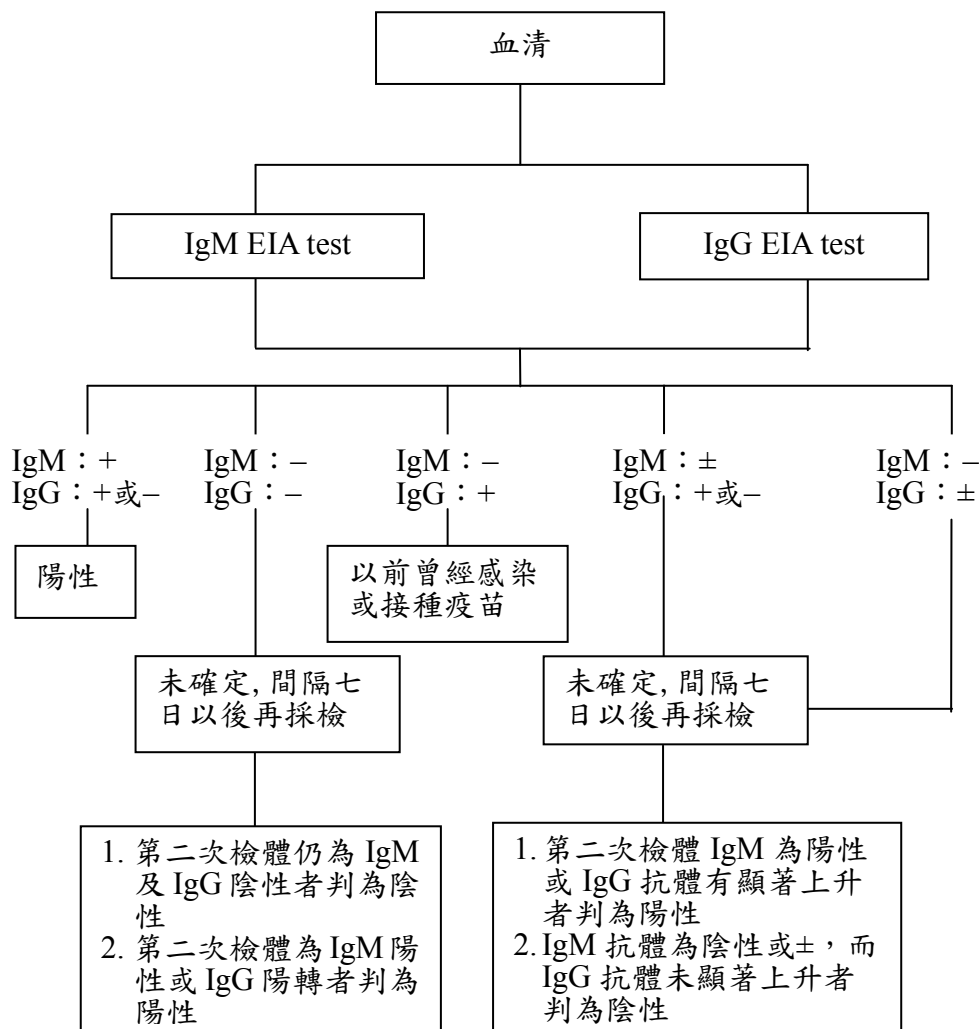
檢驗者：

實驗室主管：


行政院衛生署疾病管制局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 509 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局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 510 頁/共 1091 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 0.35M 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)。
- 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。

行政院衛生署疾病管制局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 511 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

5.1.10 漂白水。

5.2 耗材：

5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ 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 (pipetmen)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ L。

6.4 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。

6.5 4°C 冰箱。

6.6 -20°C 冷凍櫃。

6.7 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

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。

<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 xg 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 μ L，每多一次測試增加檢體 20 μ L，將樣本杯依序放置於檢體架上。


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 HAVAB-M 項目，按 Add order。

10.3.2 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。

10.3.3 點選 Orders 後再點選 Patient order。

行政院衛生署疾病管制局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 512 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 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 HAVAB-M。
- 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
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, HAV 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 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。

$$\text{臨界值 RLU} = \text{校正液 1 平均 RLU 值} \times 0.375$$

儲存每一批號試劑校正之臨界值 RLU

- 11.2 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。

$$S/CO = \text{樣本 RLU} / \text{臨界值 RLU}$$


例如：若樣本 RLU=2161 且臨界值 RLU=512.25

$$\text{則 } S/CO = 2161/512.25 = 4.22$$

- 11.3 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)

行政院衛生署疾病管制局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 513 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

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。

- 11.4 結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。
- 11.5 報告核發：IgM-anti-HAV (陽性)、IgM-anti-HAV (陰性)。
- 11.6 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，由本局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。
- 11.7 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。
- 11.8 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) ≤ 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。


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，依本局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。

行政院衛生署疾病管制局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 514 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

15 附錄

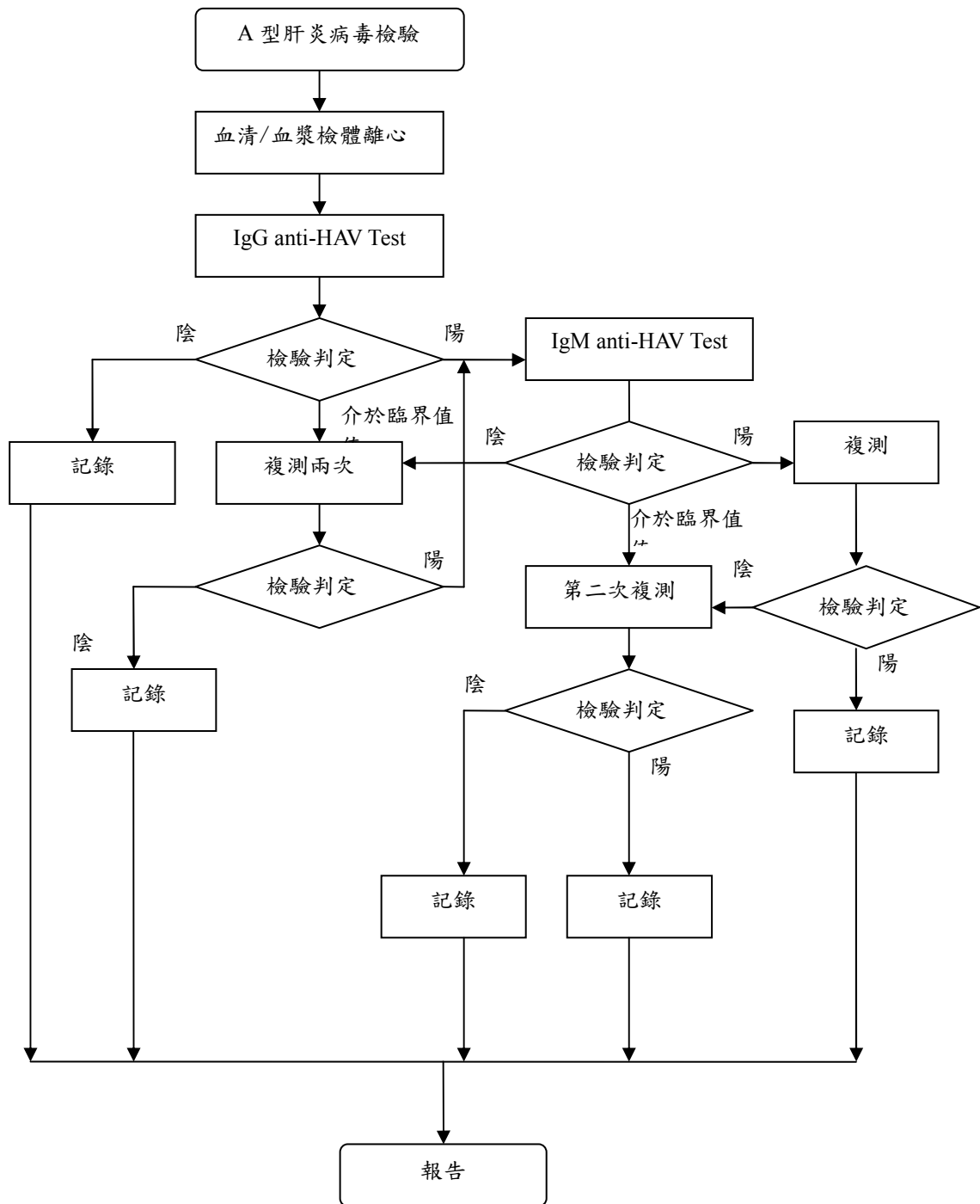
15.1 急性 A 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖。

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。


行政院衛生署疾病管制局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 515 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

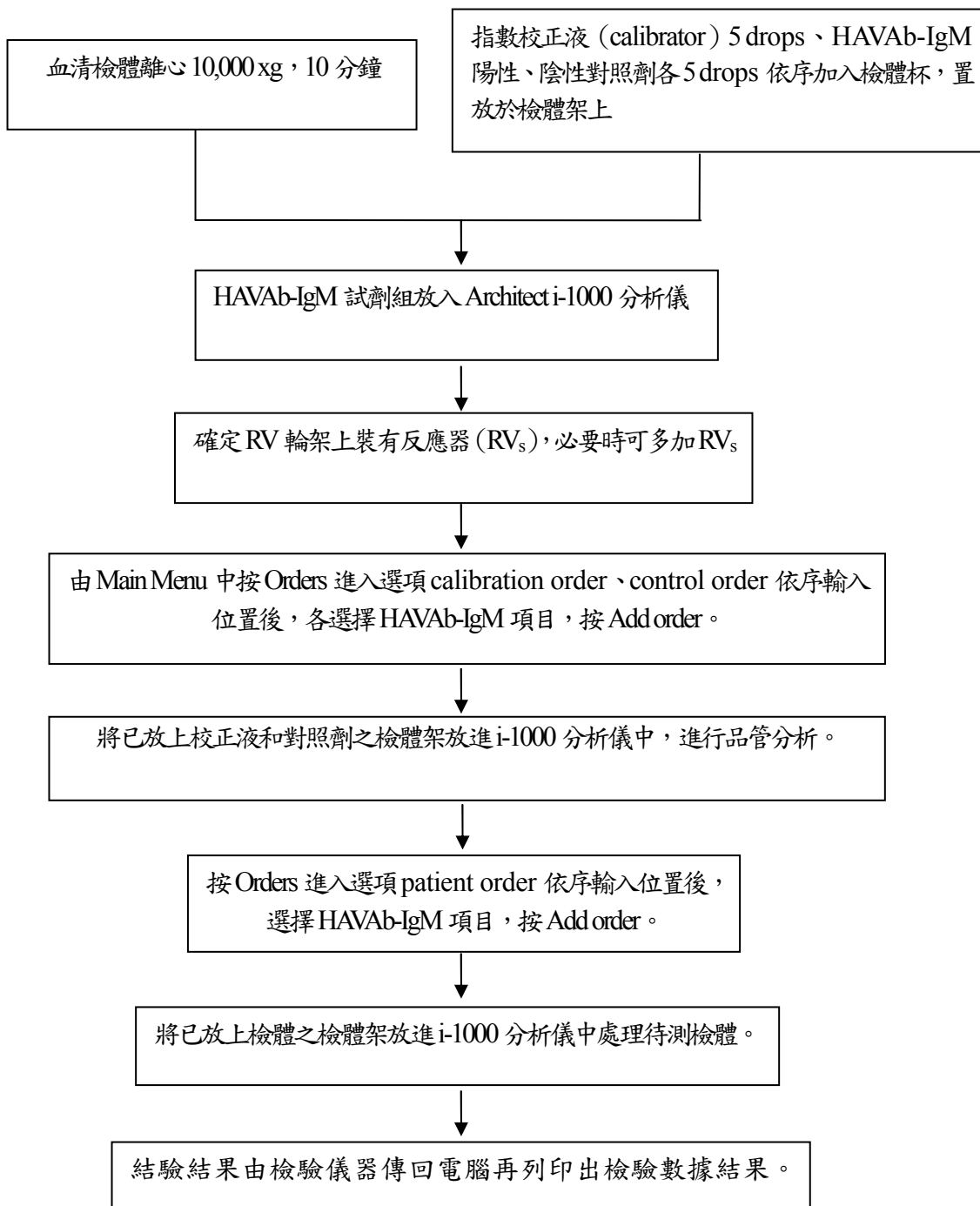
附錄 15.1 急性 A 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖




行政院衛生署疾病管制局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 516 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	B 型肝炎病毒表面抗原檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 517 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	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 B 型肝炎病毒表面抗原。

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 HBsAg 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，定量測試人類血清及血漿中之 HBsAg。在第一步驟，樣本與覆被 anti-HBs 的磁性微粒混合，存於樣本中的 HBsAg 會與覆被 anti-HBs 之微粒結合，經清洗後，標幟 acridinium 的 anti-HBs 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 HBsAg 含量與 ARCHITECT i-1000 光學系統所測得 RLUs 有直接相關性。檢體中 B 型肝炎表面抗原濃度經由先前產生之 ARCHITECT HBsAg 校正曲線來測得。若檢體濃度大於或等於 0.05 IU/mL，則檢體視為 HBsAg 有反應性。

5 試劑耗材

5.1 試劑

5.1.1 ARCHITECT HBsAg 試劑組 (List No. 6C36)。1 或 4 瓶 (每 100 次測試瓶裝 6.6 mL/每 500 次測試瓶裝 27.0 mL) 覆被 anti-HBs (小鼠，單株，IgM, IgG) 之微粒於含蛋白質穩定劑之 MES 緩衝液。最小濃度：0.0675% 固體。保存劑：ProClin 300。

5.1.2 1 或 4 瓶 (每 100 次測試瓶裝 5.9 mL/每 500 次測試瓶裝 26.3 mL) 偶合物：標幟 acridinium 之 anti-HBs (山羊，IgG) 偶合物於含蛋白質穩定劑 (牛及人類血漿，對 HBsAg、HIV-1 Ag、anti-HCV 及 anti-HIV-1/HIV-2 無反應性) 之 MES 緩衝液。最小濃度：0.25 ug/mL。保存劑：ProClin 300。

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 0.35N 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 HBsAg calibrator 校正液 (No. 3M61-01)。

5.1.7 ARCHITECT i HBsAg control 對照劑 (No. 6C36-10)。


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 μ L、200 μ L、100 μ L。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	B 型肝炎病毒表面抗原檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 518 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 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 第二及生物安全操作櫃 (Class II BSC)。
- 6.3 微量吸管 (pipettes)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ L。
- 6.4 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。
- 6.5 4°C 冰箱。
- 6.6 -20°C 冷凍櫃。
- 6.7 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

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。


9 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 xg 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 μ L，每多一次測試增加檢體 75 μ 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 HBsAg 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 HBsAg。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	B 型肝炎病毒表面抗原檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 519 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 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。
- 10.5 檢驗後處理
- 10.5.1 完成檢驗，HBsAg 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 計算結果原理
ARCHITECT HBsAg 分析利用 4 參數對數曲線適當資料減少法 (4PLC, Y 加權) 來產生校正曲線。
檢體濃度值 < 0.05 IU/mL, 依 ARCHITECT HBsAg 標準視為 HBsAg 無反應性 (陰性)。
檢體濃度值 ≥ 0.05 IU/mL, 依 ARCHITECT HBsAg 標準視為 HBsAg 有反應性 (陽性)。
- 11.2 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。
- 11.3 結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。
- 11.4 報告核發：HBsAg (陽性)、HBsAg (陰性)。
- 11.5 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，由本局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。
- 11.6 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。
- 11.7 臨床意義：
HBsAg 的檢驗其目的是在篩檢血液及血液製劑中有無 HBsAg, 以預防

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	B 型肝炎病毒表面抗原檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 520 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

這些製劑造成 B 型肝炎病毒 (HBV) 的傳染，HBsAg 分析亦常被用來檢驗疑似 HBV 感染和追蹤已感染病人的情況，亦即該病人是否已痊癒或已成為一慢性帶原者，此外，藉著追蹤病人血清或血漿中的 HBsAg 值，此分析法亦可用來評估抗病毒藥物的效果，在美國疾病控制中心業已建議所有孕婦均應做出生前篩檢，以使 HBV 帶原母親的新生兒可以獲得免疫治療。

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 HBsAg 校正液及對照液量，垂直握住瓶子，滴 10 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： ≤ 0.04 (IU/mL)

陽性對照劑 1： $0.16-0.34$ (IU/mL)

陽性對照劑 2： $113.75-236.25$ (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，依本局廢棄物處理作業程序處理。

14 參考資料


ARCHITECT HBsAg 原廠試劑說明書。

15 附錄

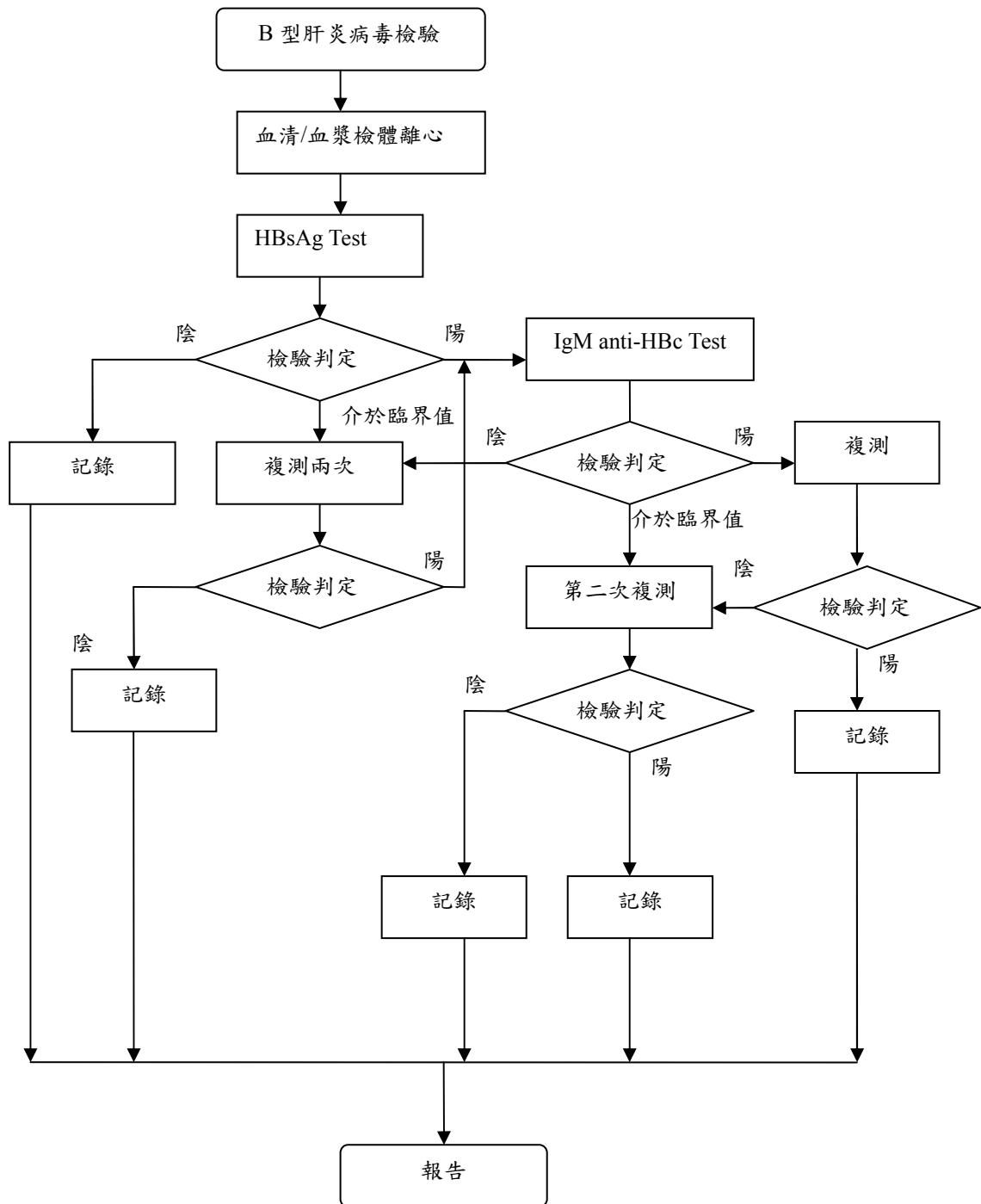
15.1 急性 B 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖。

15.2 B 型肝炎病毒表面抗原試驗 (化學冷光微粒免疫分析法) 流程圖。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	B 型肝炎病毒表面抗原檢測 (化學冷光微粒免疫分析法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 521 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

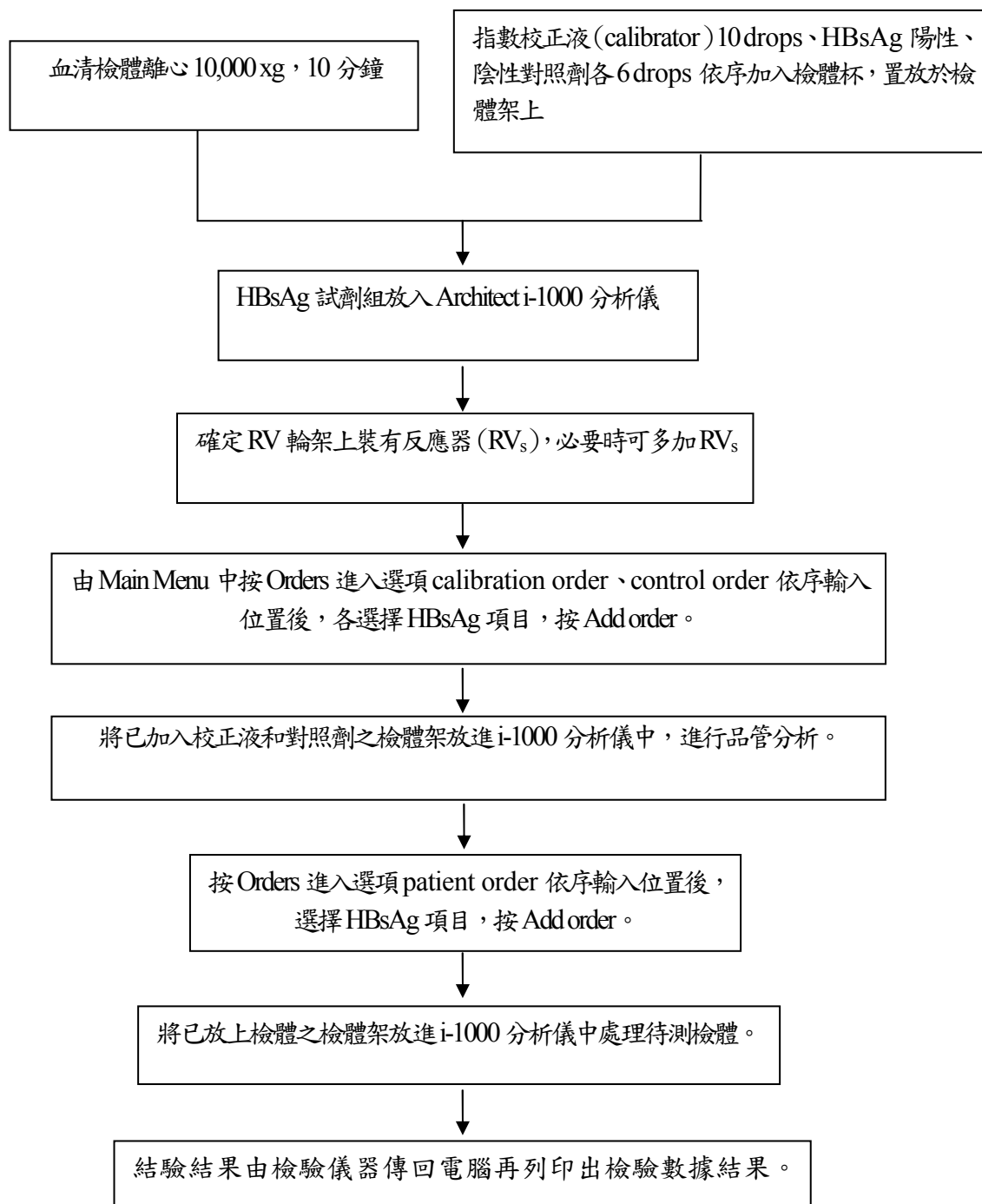
附錄 15.1 急性 B 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖




行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	B 型肝炎病毒表面抗原檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 522 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 B 型肝炎病毒表面抗原試驗 (化學冷光微粒免疫分析法) 流程圖



行政院衛生署疾病管制局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 523 頁/共 1091 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 0.35N 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)。
- 5.1.7 ARCHITECT i Anti-HBc IgM control 對照劑 (No. 6C33-10)。

行政院衛生署疾病管制局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 524 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 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 μ L、200 μ L、100 μ 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 μ L、200 μ L、100 μ L。
 - 6.4 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。
 - 6.5 4°C 冰箱。
 - 6.6 -20°C 冷凍櫃。
 - 6.7 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
參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9 檢體運送及儲存
參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 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：
 - 10.2.5 待測檢體 (血清、血漿) 需先震盪混合均勻並以 10,000 xg 離心 10 分鐘去除雜質，取其上清液。
 - 10.2.6 第一次測試最小樣本杯檢體體積為 150 μ L，每多一次測試增加檢體 14 μ L，將樣本杯依序放置於檢體架上。
 - 10.3 檢驗步驟：
 - 10.2.1 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。
 - 10.2.2 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。

行政院衛生署疾病管制局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 525 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 10.2.3 點選 Orders 後再點選 Patient order。
- 10.2.4 輸入 Carrier 號碼。
- 10.2.5 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)。
- 10.2.6 點取測試項目 IgM anti-HBc。
- 10.2.7 點取 F3 Add order。
- 10.2.8 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:
 - 10.3.1 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。
 - 10.3.2 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
 - 10.5.1 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 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，視為無反應性 (陰性)。以 ARCHITECT IgM anti-HBc 分析檢體 S/CO 值 ≥ 1.00，視為有反應性 (陽性)。

- 11.2 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。

行政院衛生署疾病管制局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 526 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 11.3 結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。
- 11.4 報告核發：IgM anti-HBc (陽性)、IgM anti-HBc (陰性)。
- 11.5 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，由本局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。
- 11.6 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。
- 11.7 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。大部份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
陰性對照劑： ≤ 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。

行政院衛生署疾病管制局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 527 頁/共 1091 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 分鐘高壓滅菌後，依本局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

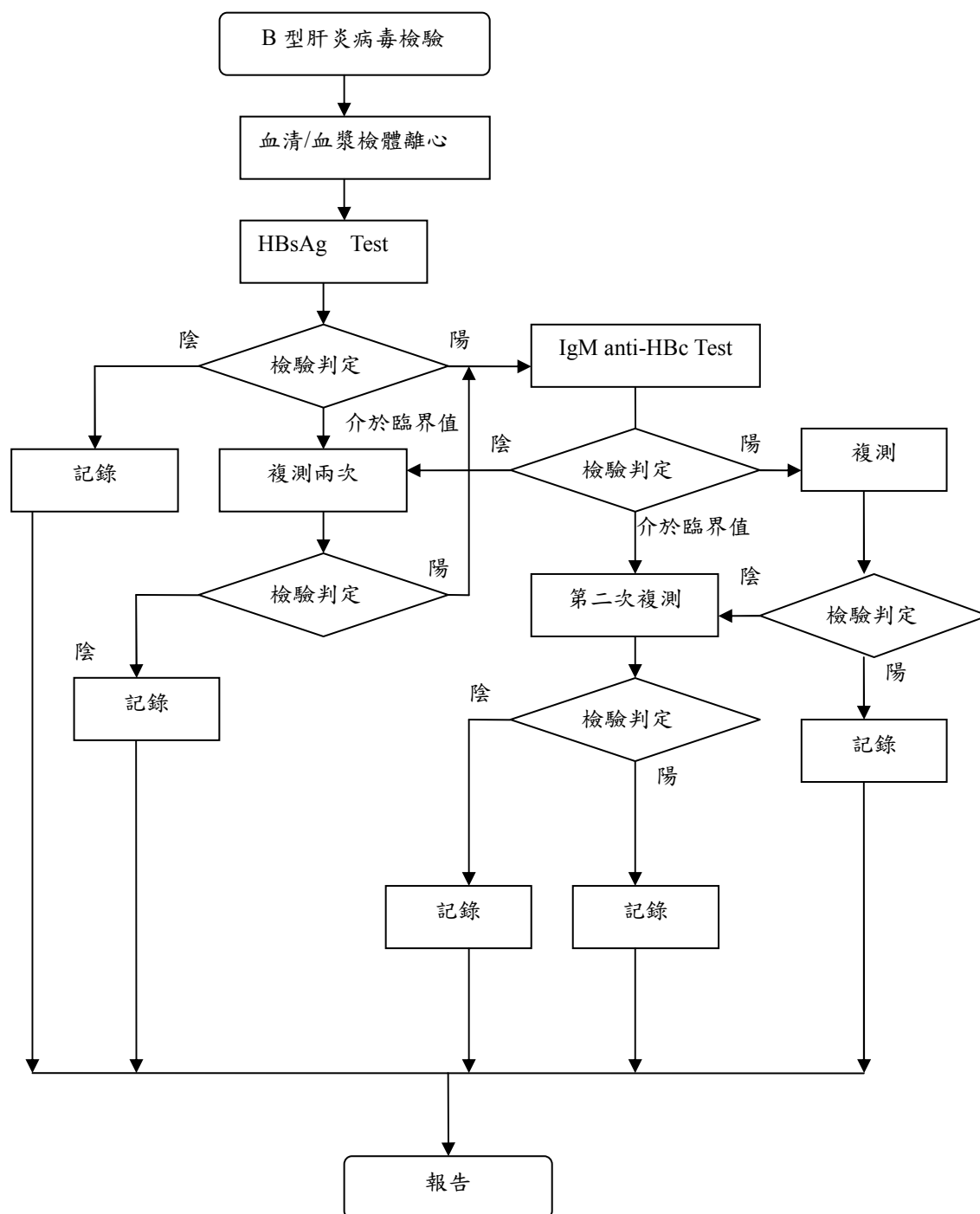
15.1 急性 B 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖。

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。


行政院衛生署疾病管制局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 528 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

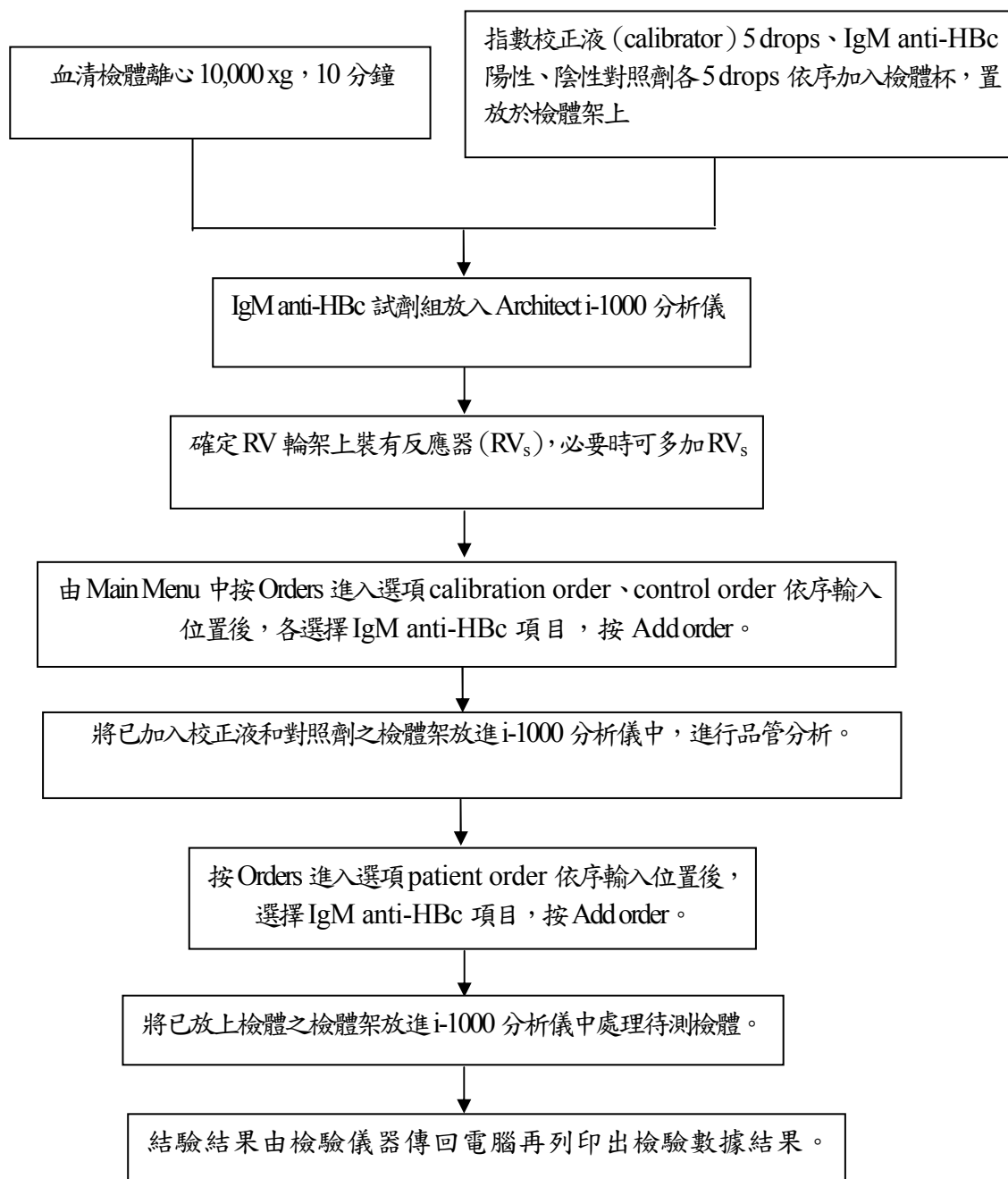
附錄 15.1 急性 B 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖




行政院衛生署疾病管制局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 529 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局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 530 頁/共 1091 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 5.9 mL 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。


5.1.7 ARCHITECT i HAVAb-IgM calibrator 校正液 (No.6C37-01)。

行政院衛生署疾病管制局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 531 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 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 μ L、200 μ L、100 μ 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 第二及生物安全操作櫃 (Class II BSC)。
 - 6.3 微量吸管 (pipettes)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ L。
 - 6.4 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。
 - 6.5 4°C 冰箱。
 - 6.6 -20°C 冷凍櫃。
 - 6.7 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
參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 9 檢體運送及儲存
參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。
- 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 xg 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 μ L，每多一次測試增加檢體 20 μ L，將樣本杯依序放置於檢體架上。
 - 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。

行政院衛生署疾病管制局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 532 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 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 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
- 11.2 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。
- 11.3 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。
- 11.4 初驗於灰區 (Gray zone) 範圍內 (S/CO 0.80-0.99) 之檢體, 應以 10,000 xg 離心 15 分鐘, 取其上清液, 再重測二次 (duplicate)。
- 11.5 結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。

行政院衛生署疾病管制局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 533 頁/共 1091 頁	(化學冷光微粒免疫分析法)	修訂日期： 年 月 日

- 11.6 報告核發：anti-HCV (陽性)、anti-HCV (陰性)。
- 11.7 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，由本局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。
- 11.8 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。
- 11.9 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) ≤ 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。

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，依本局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。

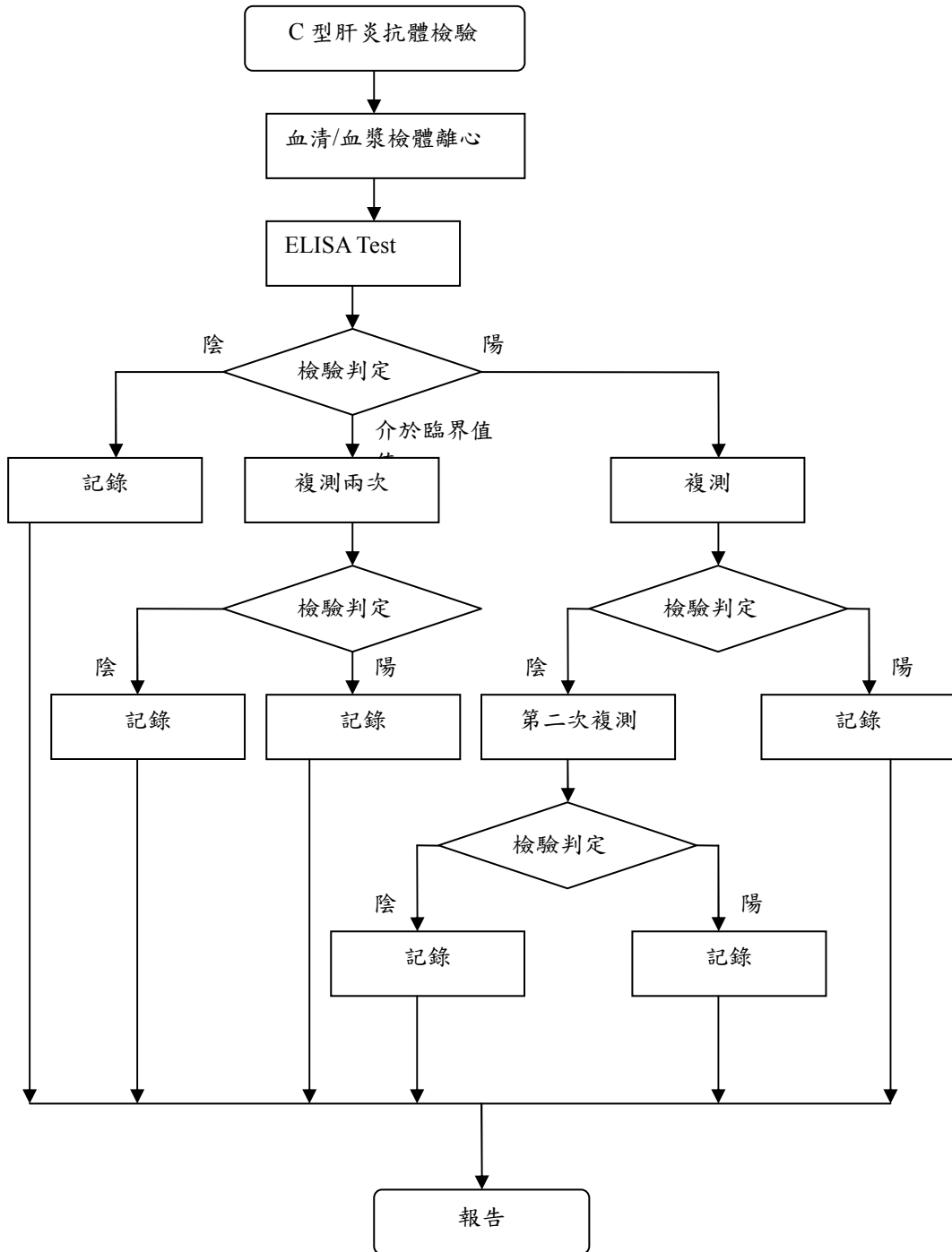
15 附錄

- 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。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	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
	頁次：第 534 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

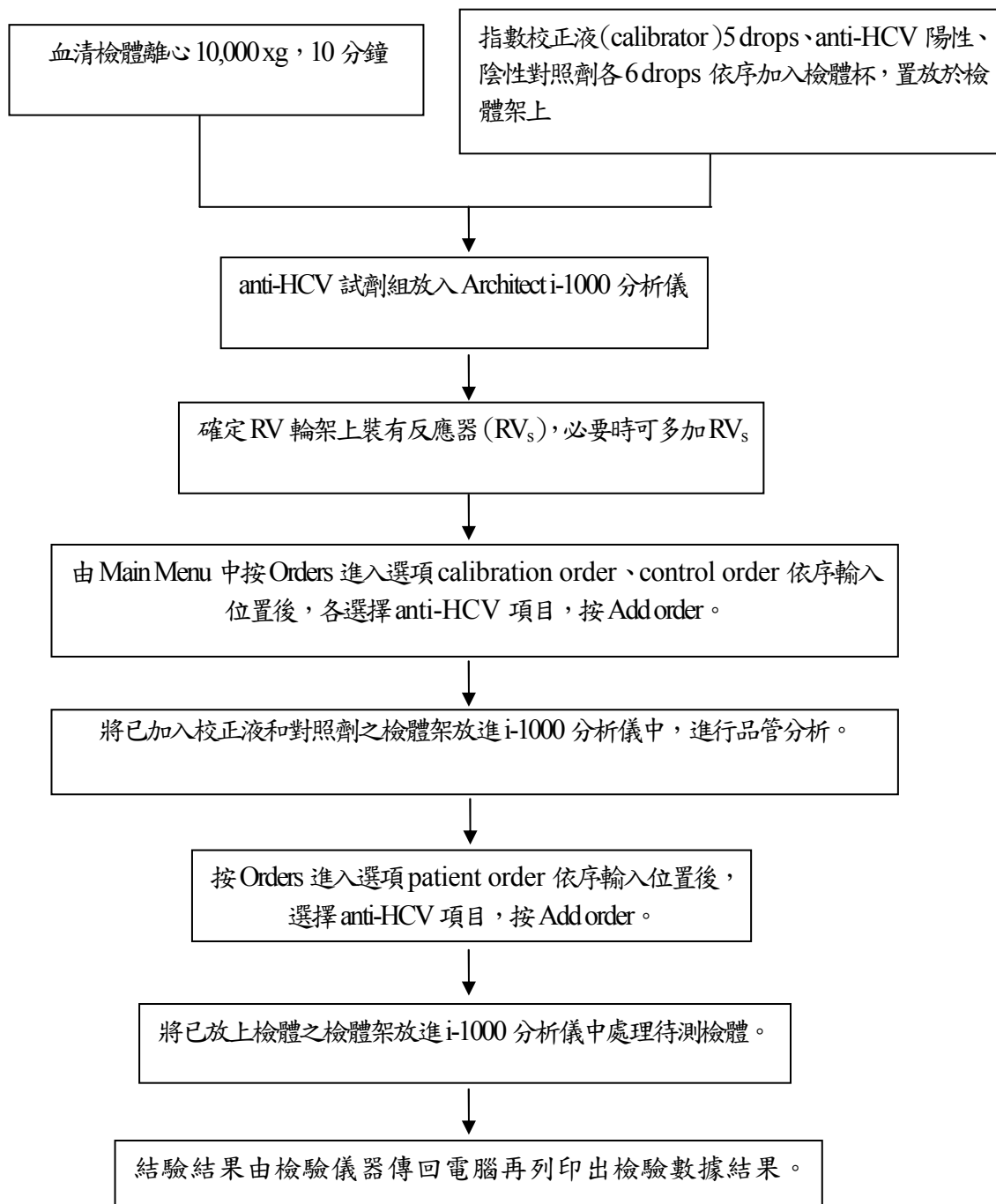
附錄 15.1 急性 C 型肝炎病毒感染鑑定總流程圖




行政院衛生署疾病管制局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 535 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局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 536 頁/共 1091 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，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 (20X)：試劑組 (5) 保存 4°C 冰箱。

5.1.6 酵素 Conjugate (20X)：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 Speciman 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 H₂SO₄)：試劑組 (11) 保存 4°C 冰箱。

行政院衛生署疾病管制局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 537 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

5.2 耗材：

- 5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ 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 (pipetmen)：1000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ L。
- 6.4 振盪器 (vortexer)。
- 6.5 離心機 (KM-15200)，KUBOTA，日本。
- 6.6 4°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°C 冷凍櫃。
- 6.10 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

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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°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°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。

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

行政院衛生署疾病管制局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 538 頁/共 1091 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

孔，不可加入檢體在此試孔。


- 10.3.2 Diluted sample (1:200)：預先將 5 μ 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 μ L 陰性對照組 (B1, C1, D1) 及 100 μ L 校正組 (E1, F1) 與 100 μ L 陽性對照組 (G1) 依序於試孔內。
- 10.3.4 加入 100 μ 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 μ L 酵素 Conjugate (20X)，均勻混合。
- 10.3.8 配製 (20X) 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ L Sulphuric Acid (0.3 M H₂SO₄) 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 H₂SO₄) 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。

11 結果判定

行政院衛生署疾病管制局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 539 頁/共 1091 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 11.1 陰性對照值 (NRC_X)：3個陰性對照孔吸光度平均值。
- 11.2 陽性對照值 (RC_X)：1個陽性對照孔吸光值。
- 11.3 臨界值 (Cut off Value) = 0.250 + NRC_X (陰性對照平均值)。
- 11.4 空白試孔OD值 < 0.100 OD450nm value，校正值與臨界值吸光度之比 (S/Co) 需 > 2.5。
- 11.5 計算待測檢體與臨界值吸光度之比 (S/Co)，如果檢體之比小於 0.9，即為陰性反應 (Negative)。
- 11.6 若檢體比值介於 0.9-1.1，則表示為不確定反應 (Equivocal)。
- 11.7 若檢體之比大於 1.1，則表示為陽性反應 (Positive)。
- 11.8 如果檢體之比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。
- 11.9 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。
- 11.10 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。
- 11.11 報告核發：IgM anti-HDV (陽性)、IgM anti-HDV (陰性)。
- 11.12 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，由本局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。
- 11.13 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 (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 分鐘高壓滅菌後，依本局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.
- 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.

行政院衛生署疾病管制局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 540 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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.

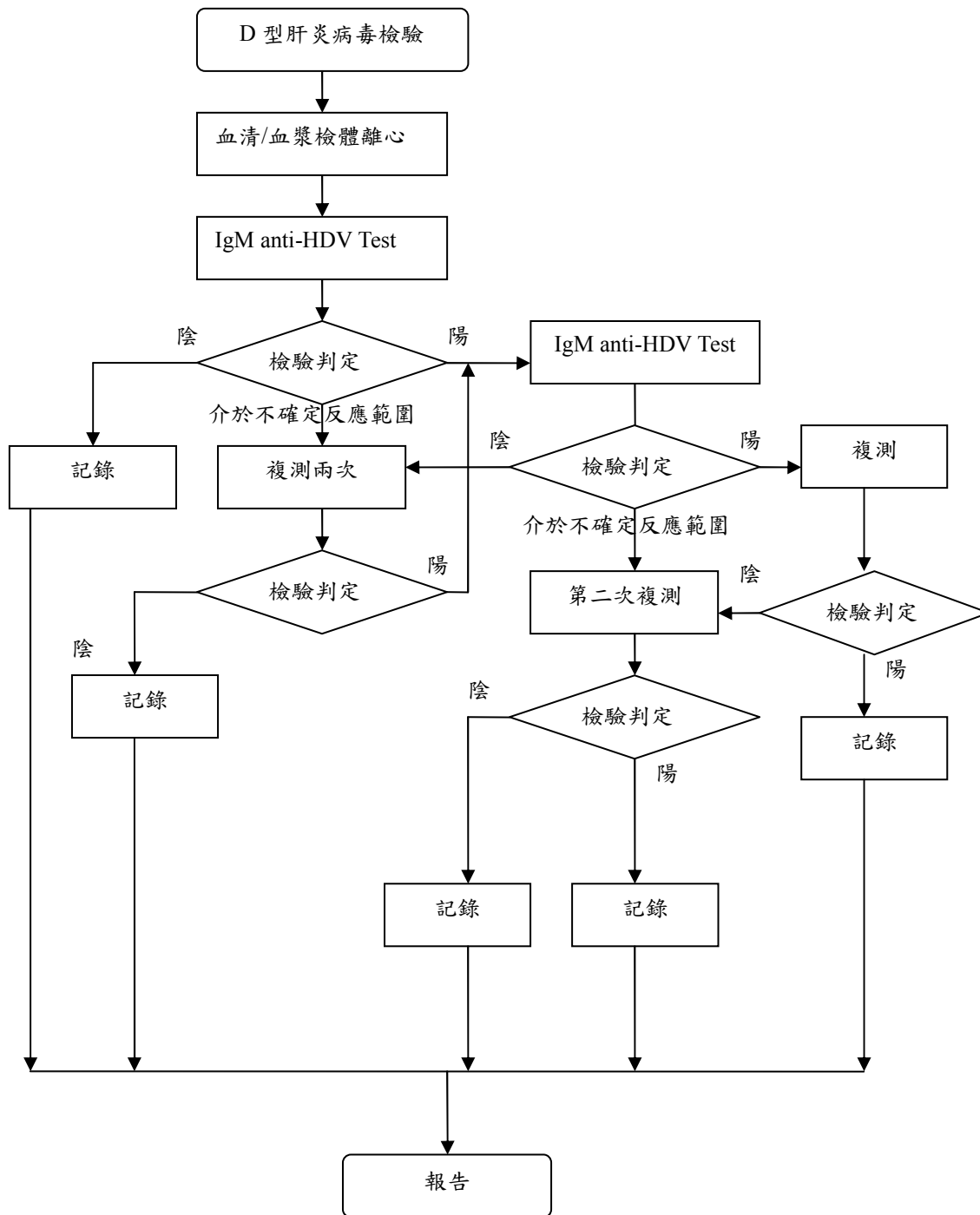
15 附錄

- 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。


行政院衛生署疾病管制局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 541 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

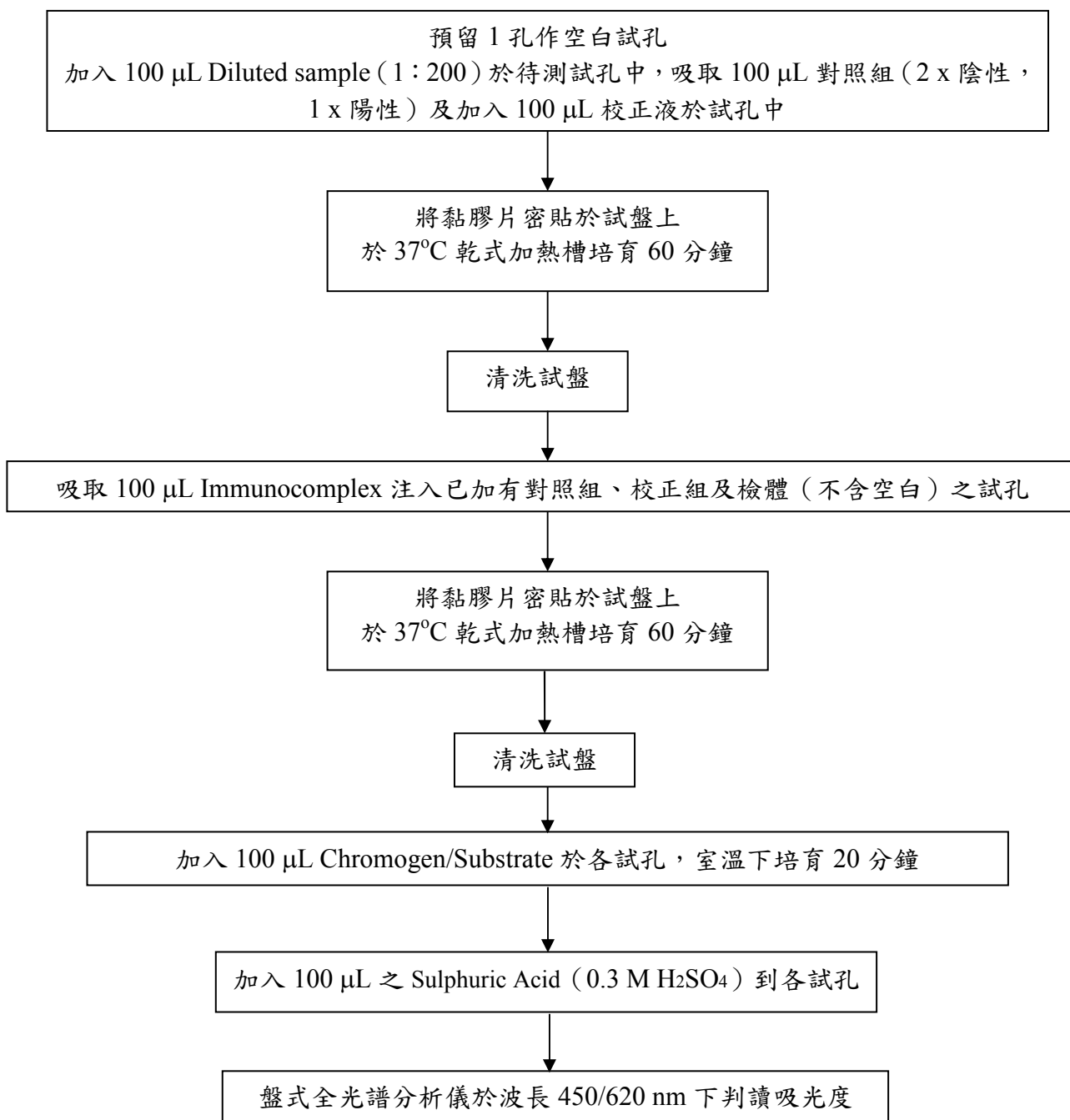
附錄 15.1 D 型肝炎病毒抗體試驗總流程圖




行政院衛生署疾病管制局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 542 頁/共 1091 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



行政院衛生署疾病管制局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 543 頁/共 1091 頁		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

衛生署疾病管制局研究檢驗中心 D 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗劑檢體紀錄表

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	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33	Sample 41	Sample 49	Sample 57	Sample 65	Sample 73	Sample 81

檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 544 頁/共 1091 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，檢測是否存在 D 型肝炎病毒 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

檢體中若有 HDV Ab 存在，則會與具病毒專一性的 polyclonal IgG 競爭，此 IgG 上標誌有過氧化氫酶 (HRP)，兩者皆會與 microplate 上 coated 固定量的 HDV 抗原產生反應。

HDV Ab 的檢測是採用兩次孵育步驟的競爭法來完成。首先將檢體加入盤內，HDV Ab 會與盤內 coated 的 HDV 抗原反應，經過清洗後，再加入 conjugated 酵素的 polyclonal IgG，polyclonal IgG 會與未反應的 HDV 抗原結合。再次清洗後，注入呈色劑/基質溶液，連結於盤內的酵素的濃度會與檢體中的 HDV Ab 的量成反比例關係，且酵素的活性透過加入呈色劑/基質溶液及可測得。

檢體中的 HDV Ab 濃度可藉由 cut-off 值來求得，藉此即可半定量檢測 HDV Ab。

5 試劑耗材

5.1 試劑組：HDV ELISA，(Cat No.21150-096T)，DIA.PRO Diagnostics，義大利。

5.1.1 96 試孔盤：adsorbed recombinant HDV -specific antigen：試劑組 (1) 保存 4°C 冰箱。

5.1.2 陰性對照組 Negative Control：試劑組 (2) 保存 4°C 冰箱。

5.1.3 陽性對照組 Reactive Control：試劑組 (3) 保存 4°C 冰箱。

5.1.4 校正組 Calibrator：試劑組 (4) 保存 4°C 冰箱。

5.1.5 清洗液 Wash buffer Concentrate (20X)：試劑組 (5) 保存 4°C 冰箱。

5.1.6 抗體 Enzyme Conjugate (Goat anti-human IgG labelled with horseradish Peroxidase)：試劑組 (6) 保存 4°C 冰箱。

5.1.7 基質緩衝液 Chromogen/Substrate：試劑組 (7) 保存 4°C 冰箱。

5.1.8 硫酸 Sulphuric Acid (0.3 M H_2SO_4)：試劑組 (8) 保存 4°C 冰箱。


5.2 耗材：

5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 545 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 mL、200 mL、100 mL。
- 6.4 振盪器 (vortexer)。
- 6.5 離心機 (KM-15200), KUBOTA, 日本。
- 6.6 4°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°C 冷凍櫃。
- 6.10 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

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。


9 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 IgG 試劑套組和待測檢體使回復室溫 (20-30 °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 °C。
 - 10.2.2 待測檢體 (血清、血漿) 需先混合均勻並以 3,000 xg 離心 10 分鐘。
- 10.3 檢驗步驟
 - 10.3.1 取出 D 型肝炎 IgG 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 吸取 100 μL 陰性對照組 (B1, C1, D1) 及 100 μL 校正組 (E1, F1) 與 100 μL 陽性對照組 (G1) 依序於試孔內。
 - 10.3.3 加入 100 μL 待測檢體於每個試孔內, 由 H1 開始。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法


	編號：	D 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 546 頁/共 1091 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 10.3.4 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。
- 10.3.5 置於 37°C 乾式加熱槽培育 60 分鐘。
- 10.3.6 配製 (20X) 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。
- 10.3.7 撕去黏膠片，清洗試盤每孔至少每次以 350 μ 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。
- 10.3.8 加入 100 μ L Enzyme Conjugate 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。
- 10.3.9 置於 37°C 乾式加熱槽培育 60 分鐘。
- 10.3.10 撕去黏膠片，清洗試盤每孔至少每次以 350 μ 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。
- 10.3.11 加入 100 μ 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。
- 10.3.12 加入 100 μ L Sulphuric Acid (0.3 M H₂SO₄) 於每個試孔內，包含 1 個空白試孔。
- 10.3.13 以 ELISA Reader 分析儀測定每試孔的吸光度，波長設定 450 /620 nm，需於加入 Sulphuric Acid (0.3 M H₂SO₄) 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。

11 結果判定

- 11.1 空白試孔 OD 值 < 0.100 OD_{450 nm} value，校正組數值需介於 NC/10 < OD_{450nm} < NC/5。
- 11.2 陰性對照值 (NRC_X)：3 個陰性對照孔吸光度平均值，
- 11.3 陽性對照值 (PC_X)：1 個陽性對照孔吸光度值。
- 11.4 臨界值 (Cut off Value) = (NRC_X + PC_X) / 5。
- 11.5 計算臨界值與待測檢體吸光度之比值 (Co/S)，如果檢體之比值小於 0.9 即為陰性反應 (Negative)。
- 11.6 若檢體之比值介於 0.9-1.1，則表示為不確定反應 (Equivocal)。
- 11.7 若檢體之比值大於 1.1，則表示為陽性反應 (Positive)。
- 11.8 如果檢體之比值介於不確定反應範圍 (Equivocal) 內，該檢體需重新

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 547 頁/共 1091 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

複檢二次 (Duplicate)，以求正確結果。

- 11.9 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。
- 11.10 結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。
- 11.11 報告核發：IgG anti-HDV (陽性)、IgG anti-HDV (陰性)。
- 11.12 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，由本局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。
- 11.13 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 ，校正組吸光值需介於 $NC/10 < OD_{450\text{ nm}} < NC/5$ 。
- 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 $> 1.000 OD_{450\text{ nm}}$ 。
- 12.3 陽性對照值 (RC_x) 吸光值扣除空白試孔測定吸光值必須 $< NC/10 OD_{450\text{ nm}}$ 。

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，依本局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 Chaggar K. Et al.. Journal of Virological Methods. 32: 193-199, 1991.
- 14.3 Lazinski D.W. et al.. Journal of Virol.. 67: 2672-2680, 1993.
- 14.4 Govindarajan S. et al.. Microbiol. And Immunol.. 95: 140- 141, 1990.
- 14.5 Shattock A.G. et al.. J.Clin.Microbiol.. 29: 1873-1876, 1991.
- 14.6 Forbes B.A. et al.. Clin.Microbiol.News.. 13: 52-54, 1991.
- 14.7 Bergmann, K. et al. J.Immunol. 143:3714-3721, 1989.

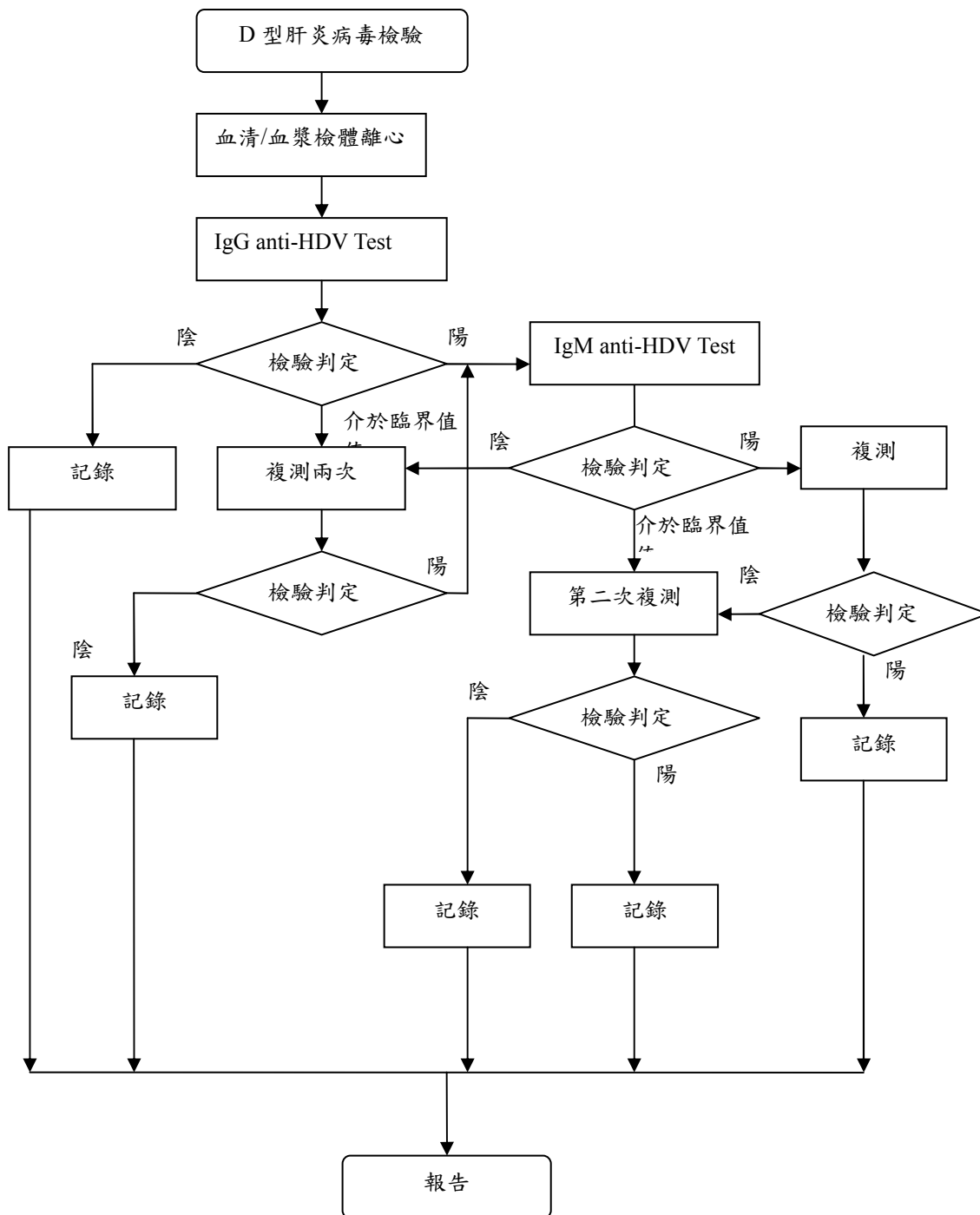
15 附錄

- 15.1 D 型肝炎病毒抗體試驗總流程圖。
- 15.2 D 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗 (酵素免疫分析法) 流程圖。
- 15.3 D 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗檢體位置紀錄表。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 548 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

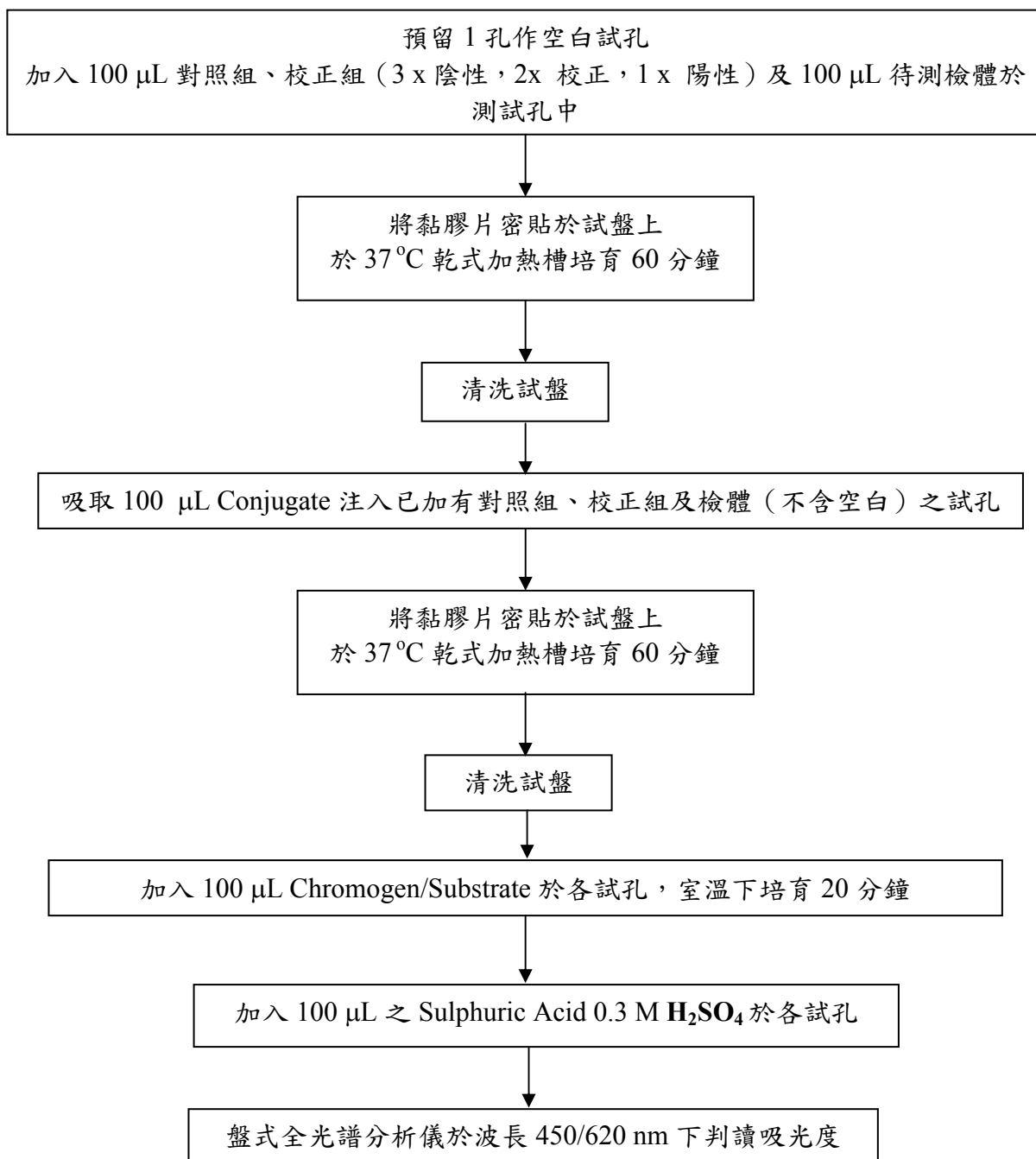
附錄 15.1 D 型肝炎病毒抗體試驗總流程圖




行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 549 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 D 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗（酵素免疫分析法）流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	D 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 550 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 D 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗劑檢體紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心 D 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗劑檢體紀錄表

Date :

頁數：第 頁/共 頁

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：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 551 頁/共 1091 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 E 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 上具 HEV 專一性的人工合成的抗原，此抗原是由墨西哥及緬甸病毒株衍生而來，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 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 polyclonal specific anti-Human IgM antibodies 進行第二次孵育，polyclonal specific anti-human IgG antibodies 上標記有過氧化氫酶 (HRP)，可用來偵測 HEV IgM 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 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 陽性或陰性結果。於檢測流程中，HEV IgG 及類風濕因子會於盤內被中和反應掉以避免干擾的發生。

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：HEV specific synthetic antigens derived from ORF2 and ORF3 regions：試劑組 (1) 保存 4°C 冰箱。

5.1.2 陰性對照組 Negative Control：試劑組 (2) 保存 4°C 冰箱。

5.1.3 陽性對照組 Reactive Control：抗 HEV 抗原的人類抗體 IgM：試劑組 (3) 保存 4°C 冰箱。

5.1.4 清洗液 Wash buffer Concentrate (20X)：試劑組 (4) 保存 4°C 冰箱。

5.1.5 抗體 Enzyme Conjugate (Goat anti-human IgM labelled with horseradish Peroxidase)：試劑組 (5) 保存 4°C 冰箱。

5.1.6 基質緩衝液 Chromogen/Substrate：試劑組 (6) 保存 4°C 冰箱。

5.1.7 硫酸 Sulphuric Acid (0.3 M H₂SO₄)：試劑組 (7) 保存 4°C 冰箱。

5.1.8 檢體稀釋液 Specimen Diluent：試劑組 (8) 保存 4°C 冰箱。


5.1.9 中和劑 Neutralizing Reagent：試劑組 (9) 保存 4°C 冰箱。

5.2 耗材：

5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000 μL、200 μL、100 μL、20 μL。

5.2.2 無菌微量離心試管：1.5 mL。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 552 頁/共 1091 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 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 (pipetmen): 1000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ L。
- 6.4 振盪器 (vortexer)。
- 6.5 離心機 (KM-15200), KUBOTA, 日本。
- 6.6 4°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°C 冷凍櫃。
- 6.10 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

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

9 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 試劑和待測檢體使回復室溫 (20-30°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°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。

10.3 檢驗步驟

- 10.3.1 取出 E 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 (1:101): 預先將 10 μ L 檢體加入 1 mL 檢體稀釋液於新的試管中並均勻混合。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 553 頁/共 1091 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 10.3.3 吸取 100 μ L 陰性對照組(B1, C1)及 100 μ L 陽性對照組(D1)依序於試孔內。
- 10.3.4 吸取 50 μ L 中和液於於每個試孔內，由 E1 開始。
- 10.3.5 加入 100 μ L Diluted sample (1:101) 於每個試孔內，由 E1 開始。
- 10.3.6 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。
- 10.3.7 置於 37 $^{\circ}$ C 乾式加熱槽培育 60 分鐘。
- 10.3.8 配製 (20X) 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 $^{\circ}$ 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 μ 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 μ L Enzyme Conjugate 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 $^{\circ}$ 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 μ 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 μ 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 $^{\circ}$ C) 反應作用 20 分鐘。
- 10.3.14 加入 100 μ L 硫酸 Sulphuric Acid (0.3 M H₂SO₄) 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，需於加入硫酸 Sulphuric Acid (0.3 M H₂SO₄) 20 分鐘內判讀結果。


10.4 檢驗後處理

- 10.4.1 完成檢驗，HEV 試劑組貯存於 4 oC 冰箱保存。
- 10.4.2 檢驗後之檢體應依序歸回檢體盒，放置 -20 $^{\circ}$ 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。

11 結果判定


- 11.1 陰性對照值 (NRC_X): 2個陰性對照孔吸光度平均值。
- 11.2 陽性對照值 (RC_X): 1個陽性對照孔吸光值。
- 11.3 臨界值 (Cut off Value) = 0.250 + NRC_X (陰性對照平均值)。
- 11.4 空白試孔 OD 值需 < 0.100 OD 450 nm value。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 554 頁/共 1091 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 11.5 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 1.0，即為陰性反應 (Negative)。
 - 11.6 若檢體比值介於 1.0-1.2，則表示為不確定反應 (Equivocal)。
 - 11.7 若檢體之比值大於 1.2，則表示為陽性反應 (Positive)。
 - 11.8 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。
 - 11.9 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。
 - 11.10 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。
 - 11.11 報告核發：IgM anti-HEV (陽性)、IgM anti-HEV (陰性)。
 - 11.12 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，由本局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。
 - 11.13 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 OD 450 nm。
 - 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 <0.1 OD 450 nm。
 - 12.3 陽性對照值 (RC_X) 吸光值必須 >0.5 OD 450 nm。
- 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，依本局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 Ellner PD, Neu HC. Viral agents of gastroenteritis. In “Understanding infectious disease. St.Louis: Mosby-Year Book, 1992, pp183-186.
 - 14.3 Hollinger FB, Dreesman GR. Hepatitis virus. In “Rose NR, de Macario EC, Fahey JL, et al. (eds), Manual of clinical laboratory immunology, 4th ed. Washington, DC: ASM, 1992, pp634-650.
 - 14.4 Fody EP, Johnson DF. J Med Technol 1987, 4:54-59.
 - 14.5 Bradley D.W. et al.. Br.Med.Bull. 46: 442-461, 1990.
 - 14.6 Dawson G.J. et al.. J.Virol.Methods 38: 175-186, 1992.
 - 14.7 Favorov M.O. et al.. J.Med.Virol.. 36: 246-250, 1992.
 - 14.8 Purdy M. et al.. J.Arch.Virol. 123: 335-349, 1992.
 - 14.9 Tam A.W. et al.. Virology 185: 120-131, 1991.
- 15 附錄
 - 15.1 E 型肝炎病毒抗體試驗總流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 555 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

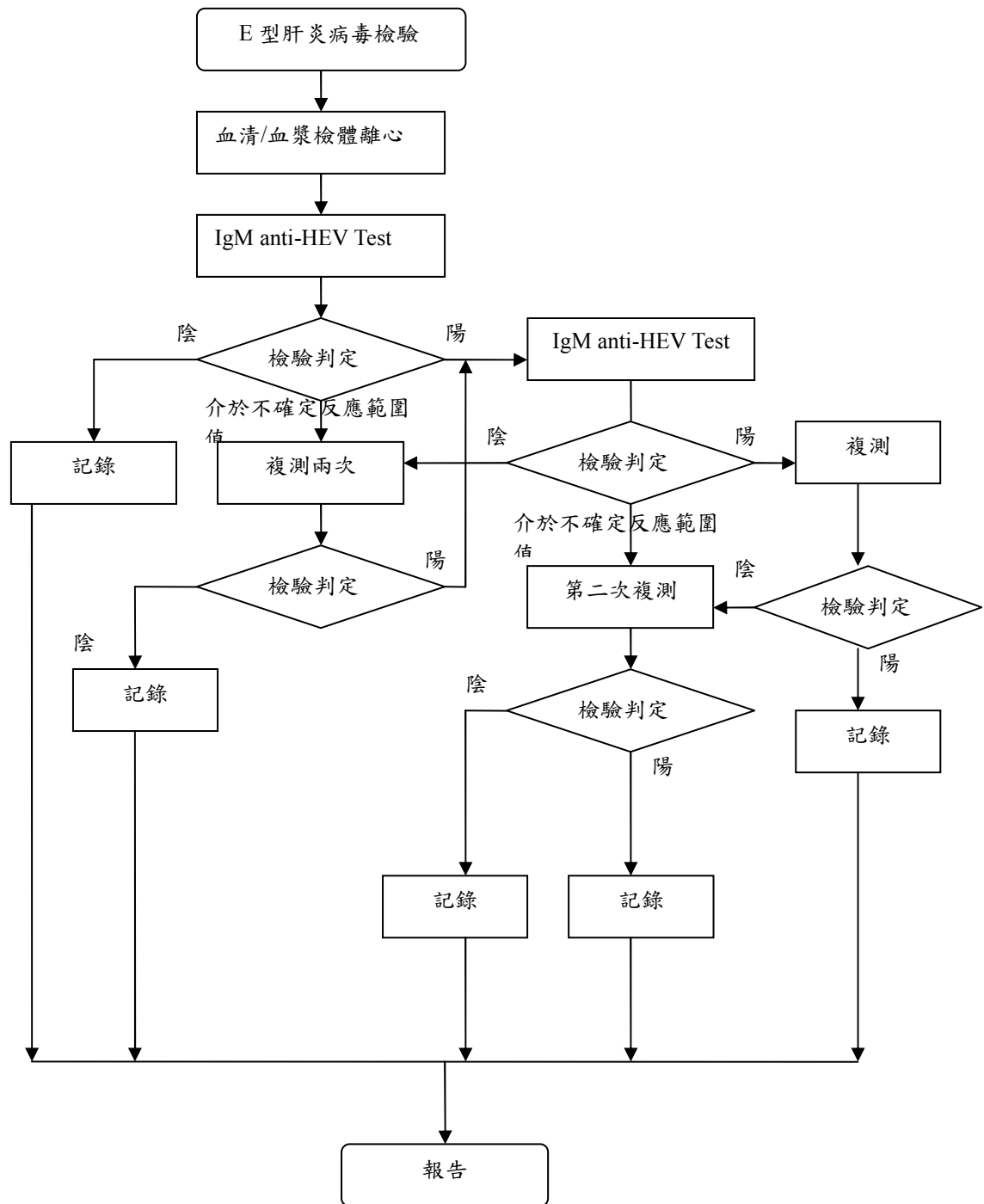
15.2 E 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗（酵素免疫分析法）流程圖。

15.3 E 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗檢體位置紀錄表。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 556 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

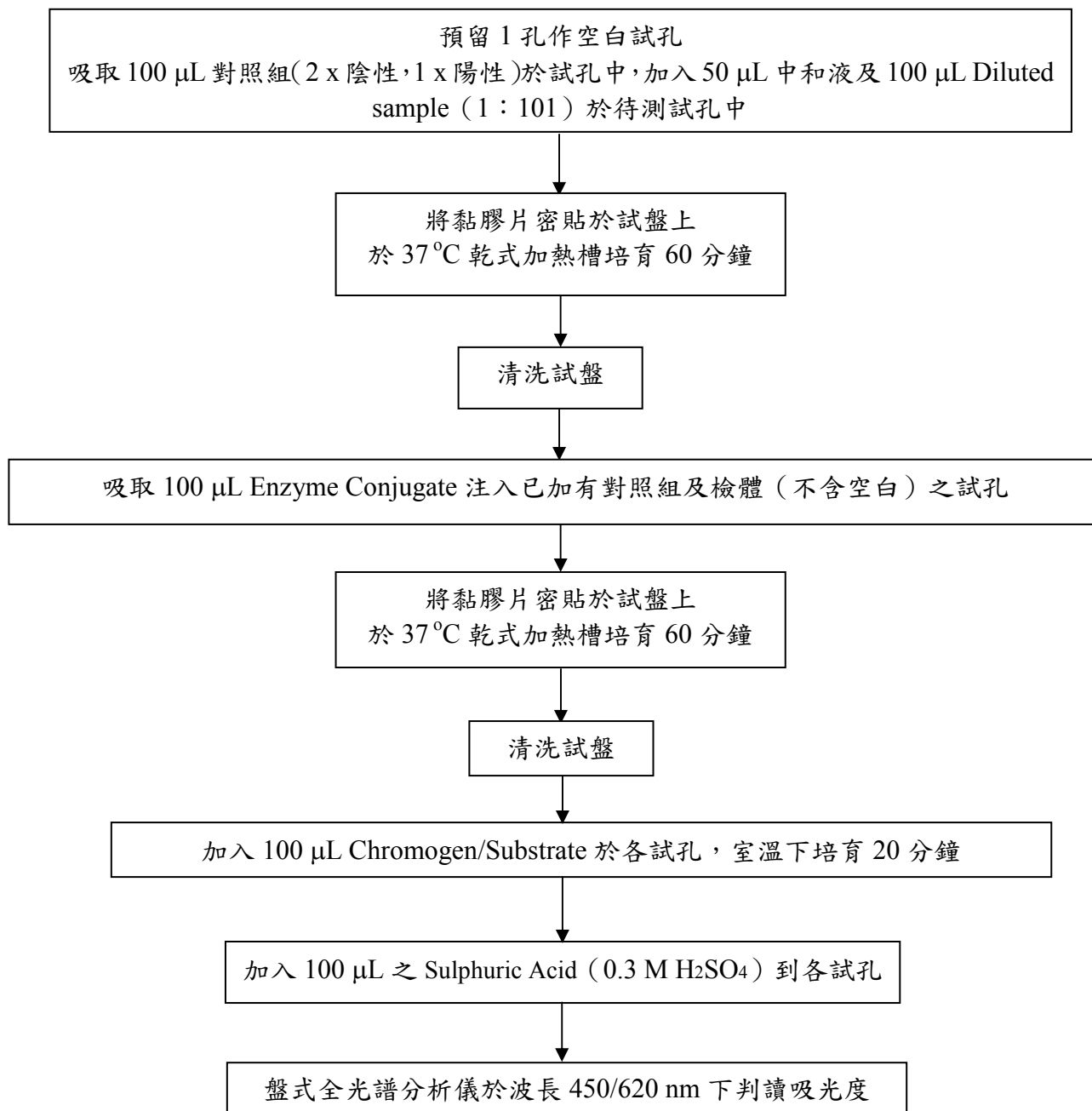
附錄 15.1 E 型肝炎病毒抗體試驗總流程圖




行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 557 頁/共 1091 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 E 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗 (酵素免疫分析法) 流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 558 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 E 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗劑檢體紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心 E 型肝炎病毒 IgM 抗體試驗劑檢體紀錄表

頁數：第 頁/共 頁


Date :
Test :
Kit :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37	Sample 45	Sample 53	Sample 61	Sample 69	Sample 77	Sample 85
B	NC	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38	Sample 46	Sample 54	Sample 62	Sample 70	Sample 78	Sample 86
C	NC	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39	Sample 47	Sample 55	Sample 63	Sample 71	Sample 79	Sample 87
D	PC	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40	Sample 48	Sample 56	Sample 64	Sample 72	Sample 80	Sample 88
E	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33	Sample 41	Sample 49	Sample 57	Sample 65	Sample 73	Sample 81	Sample 89
F	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34	Sample 42	Sample 50	Sample 58	Sample 66	Sample 74	Sample 82	Sample 90
G	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35	Sample 43	Sample 51	Sample 59	Sample 67	Sample 75	Sample 83	Sample 91
H	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36	Sample 44	Sample 52	Sample 60	Sample 68	Sample 76	Sample 84	Sample 92

檢驗者：

實驗室主管：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 559 頁/共 1091 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，檢測是否存在 E 型肝炎病毒 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 coated 上具 HEV 專一性的人工合成的抗原，此抗原是由墨西哥及緬甸病毒株衍生而來，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 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 polyclonal specific anti-Human IgG antibodies 進行第二次孵育，polyclonal specific anti-human IgG antibodies 上標記有過氧化氫酶 (HRP)，可用來偵測 HEV 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 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 IgG 陽性或陰性結果。

5 試劑耗材

5.1 試劑組：HEV ELISA，DIA.PRO Diagnostics，義大利。

5.1.1 96 試孔盤：HEV specific synthetic antigens derived from ORF2 and ORF3 regions：試劑組 (1) 保存 4°C 冰箱。

5.1.2 陰性對照組 Negative Control：試劑組 (2) 保存 4°C 冰箱。

5.1.3 陽性對照組 Reactive Control：抗 HEV 的人類抗體：試劑組 (3) 保存 4°C 冰箱。

5.1.4 校正組 Calibrator：試劑組 (4) 保存 4°C 冰箱。

5.1.5 清洗液 Wash buffer Concentrate (20X)：試劑組 (5) 保存 4°C 冰箱。

5.1.6 抗體 Enzyme Conjugate (Goat anti-human IgG,IgM labelled with horseradish Peroxidase)：試劑組 (6) 保存 4°C 冰箱。

5.1.7 基質緩衝液 Chromogen/Substrate：試劑組 (7) 保存 4°C 冰箱。

5.1.8 測定稀釋液 Assay Diluent：試劑組 (8) 保存 4°C 冰箱。

5.1.9 硫酸 Sulphuric Acid (0.3 M H_2SO_4)：試劑組 (9) 保存 4°C 冰箱。

5.1.10 檢體稀釋液 Sample Diluent：試劑組 (10) 保存 4°C 冰箱。


5.2 耗材：

5.2.1 微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 560 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 (pipetmen): 1000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ 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

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。


9 檢體運送及儲存

參考本局出版之「防疫檢體採檢手冊」第四版。
<http://www.cdc.gov.tw/public/Data/181610372371.pdf>。

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 IgG 試劑套組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 xg 離心 10 分鐘。
- 10.3 檢驗步驟
 - 10.3.1 取出 E 型肝炎 IgG 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 吸取 200 μ L 陰性對照組 (B1, C1, D1) 及 200 μ L 校正組 (E1, F1) 與 200 μ L 陽性對照組 (G1) 依序於試孔內。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法


	編號：	E 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 561 頁/共 1091 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 10.3.3 吸取 200 μL 檢體稀釋液於每個試孔內，由 H1 開始。
- 10.3.4 再加入 10 μL 檢體於每個試孔內，由 H1 開始。
- 10.3.5 吸取 50 μL 測定稀釋液於每個試孔內，不包含 1 個空白 (A1) 試孔。
- 10.3.6 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。
- 10.3.7 置於 37°C 乾式加熱槽培育 45 分鐘。
- 10.3.8 配製 (20X) 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 μL 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 μL Enzyme Conjugate 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 45 分鐘。
- 10.3.12 撕去黏膠片，清洗試盤每孔至少每次以 350 μL 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 μL 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 15 分鐘。
- 10.3.14 加入 100 μL Sulphuric Acid (0.3 M H_2SO_4) 於每個試孔內，包含 1 個空白試孔。
- 10.3.15 以 ELISA Reader 分析儀測定每試孔的吸光度，波長設定 450 /620 nm，需於加入 Sulphuric Acid (0.3 M H_2SO_4) 20 分鐘內判讀結果。
- 10.4 檢驗後處理
 - 10.4.1 完成檢驗，HEV 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。

11 結果判定

- 11.1 陰性對照值 (NRC_X)：3 個陰性對照孔吸光度平均值。
- 11.2 陽性對照值 (PC_X)：1 個陽性對照孔吸光度值。
- 11.3 臨界值 (Cut off Value) = $0.350 + \text{NRC}_X$ (陰性對照平均值)。
- 11.4 空白試孔 OD 值 < 0.100 OD 450 nm value，校正值與臨界值比值 > 1.0。
- 11.5 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)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 562 頁/共 1091 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

- 11.6 若檢體之比值介於0.9-1.1，則表示為不確定反應 (Equivocal)。
- 11.7 若檢體之比值大於1.1，則表示為陽性反應 (Positive)。
- 11.8 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。
- 11.9 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。
- 11.10 結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。
- 11.11 報告核發：IgG anti-HEV (陽性)、IgG anti-HEV (陰性)。
- 11.12 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，由本局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。
- 11.13 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 ，校正值與臨界值比值需 > 1.0 。
- 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 < 0.050 OD 450 nm。
- 12.3 陽性對照值 (RC_X) 吸光值扣除空白試孔測定吸光值必須 > 1.000 OD 450 nm。

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，依本局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 Ellner PD, Neu HC. Viral agents of gastroenteritis. In “Understanding infectious disease. St.Louis: Mosby-Year Book, 1992, pp183-186.
- 14.3 Hollinger FB, Dreesman GR. Hepatitis virus. In “Rose NR, de Macario EC, Fahey JL, et al. (eds), Manual of clinical laboratory immunology, 4th ed. Washington, DC: ASM, 1992, pp634-650.
- 14.4 Fody EP, Johnson DF. J Med Technol 1987, 4:54-59.
- 14.5 Bradley D.W. et al.. Br.Med.Bull. 46: 442-461, 1990.
- 14.6 Dawson G.J. et al.. J.Virol.Methods 38: 175-186, 1992.
- 14.7 Favorov M.O. et al.. J.Med.Virol.. 36: 246-250, 1992.
- 14.8 Purdy M. et al.. J.Arch.Virol. 123: 335-349, 1992.
- 14.9 Tam A.W. et al.. Virology 185: 120-131, 1991.

15 附錄

- 15.1 E 型肝炎病毒抗體試驗總流程圖。
- 15.2 E 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗 (酵素免疫分析法) 流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

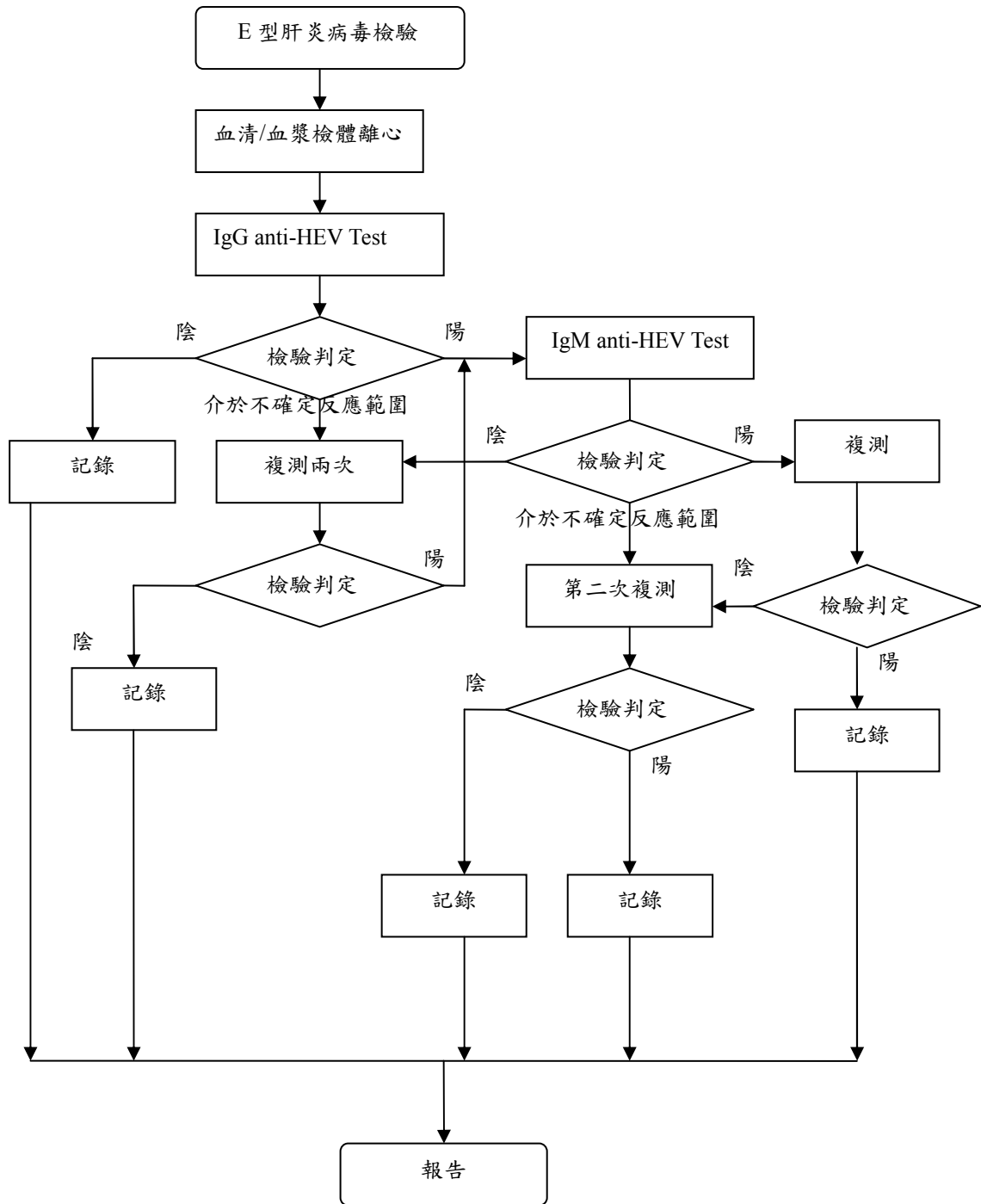
	編號：	E 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 563 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

15.3 E 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗檢體位置紀錄表。


行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 564 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

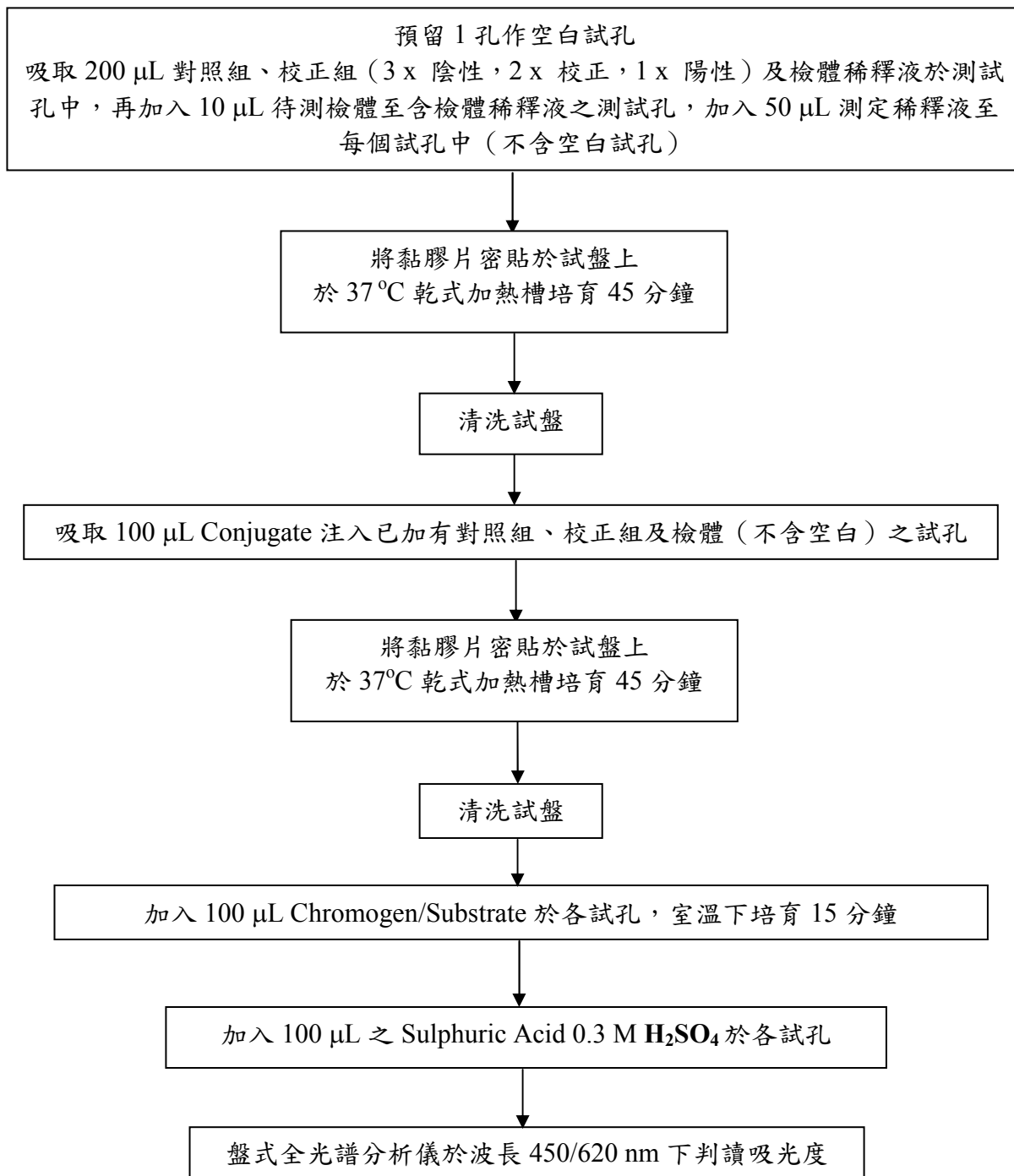
附錄 15.1 E 型肝炎病毒抗體試驗總流程圖




行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 565 頁/共 1091 頁	(ELISA)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 E 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗（酵素免疫分析法）流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	E 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 566 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 E 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗劑檢體紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心 E 型肝炎病毒 IgG 抗體試驗劑檢體紀錄表

Date :

頁數：第 頁/共 頁

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：

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 =Manual of Standard Operation
Procedure of Communicable Diseases / 行政院衛生署疾
病管制局編. -- 第二版. -- 臺北市：衛生署疾管局，
2011.09

上冊； 公分. -- (防疫學苑系列；035-1)

POD 版

ISBN 978-986-02-9133-9 (全套：平裝)

1. 檢驗醫學 2. 傳染病疾病 3. 手冊

415.12026

100018252

防疫學苑系列 035-1

傳染病標準檢驗方法手冊(上)

Manual of Standard Operation Procedure of Communicable Diseases (I)

編者：行政院衛生署疾病管制局

編輯群：行政院衛生署疾病管制局研究檢驗中心

出版機關：行政院衛生署疾病管制局

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：2011年9月

版次：第二版(POD一刷)

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)2758-9689

五南文化台大法學店 地址：(100) 台北市中正區銅山街1號 電話：(02)3322-4985

台中 五南文化台中總店 地址：(400) 台中市中山路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

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.tw>

GPN：1010002895

ISBN：978-986-02-9133-9 (全套：平裝)

請尊重智慧財產權，欲利用內容者，須徵求本局同意或書面授權

