

防疫學苑系列 035-2

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

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

	編號：	腮腺炎病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 567 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腮腺炎病毒。

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（vero）培養腮腺炎病毒，經二次繼代培養後，最後再以腮腺炎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 4500 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-Paque™ PLUS：Amersham Biosciences，17-1440-02，Sweden。

5.1.7 Light diagnostics mumps IFA kit：Chemicon，3140，USA，store at 2-8°C。

(1) Mumps monoclonal antibody，5028。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 568 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- (2) Mumps control slides, 5029。
- (3) Anti-mouse IgG/FITC conjugate, 5008。
- (4) PBS packet, 5087。
- (5) Tween 20/sodium azide solution (100X), 5037。
- (6) Mounting fluid, 5013。

5.1.8 IFA wash solution：將 5.1.7 (4) 試劑溶於 1 L distilled H₂O 再加入 5.1.7 (5) 試劑以乾淨密封容器室溫儲放。

5.1.9 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 針頭過濾網。
- 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：	腮腺炎病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 569 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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：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 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。1 hr 後加入 1 mL Maintain medium，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，是否出現融合狀 CPE，連續觀察 7 天。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 570 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.3.3 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 孔盤的單層 Vero cell，此即為 Passage 1。

10.3.4 重複步驟 10.3.2-10.3.3，此即為 Passage 2。

10.3.5 再繼續培養 7 天後進行 IFA 鑑定。

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 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) 取出風乾後滴一滴 5.1.7 (1) Mumps monoclonal antibody，將玻片置於 Moisture chamber，置於 37°C 恆溫箱 30 min。

(5) 以 5.1.8 IFA wash solution 清洗玻片後置於乾浴器烘乾。

(6) 每個孔加一滴 5.1.7 (3) Anti-mouse IgG/FITC conjugate。將玻片置於 Moisture chamber，置於 37°C 恆溫箱 30 min。

(7) 重覆 10.3.6 (6)。

(8) 以 5.1.7 (6) 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 Mumps IFA 測定有綠色螢光反應細胞者，判定為陽性。

11.2 報告核發：腮腺炎病毒分離陽性，腮腺炎病毒分離陰性。

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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 571 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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

Chemicon mumps IFA kit 所附操作說明。

15 附錄

15.1 腮腺炎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。

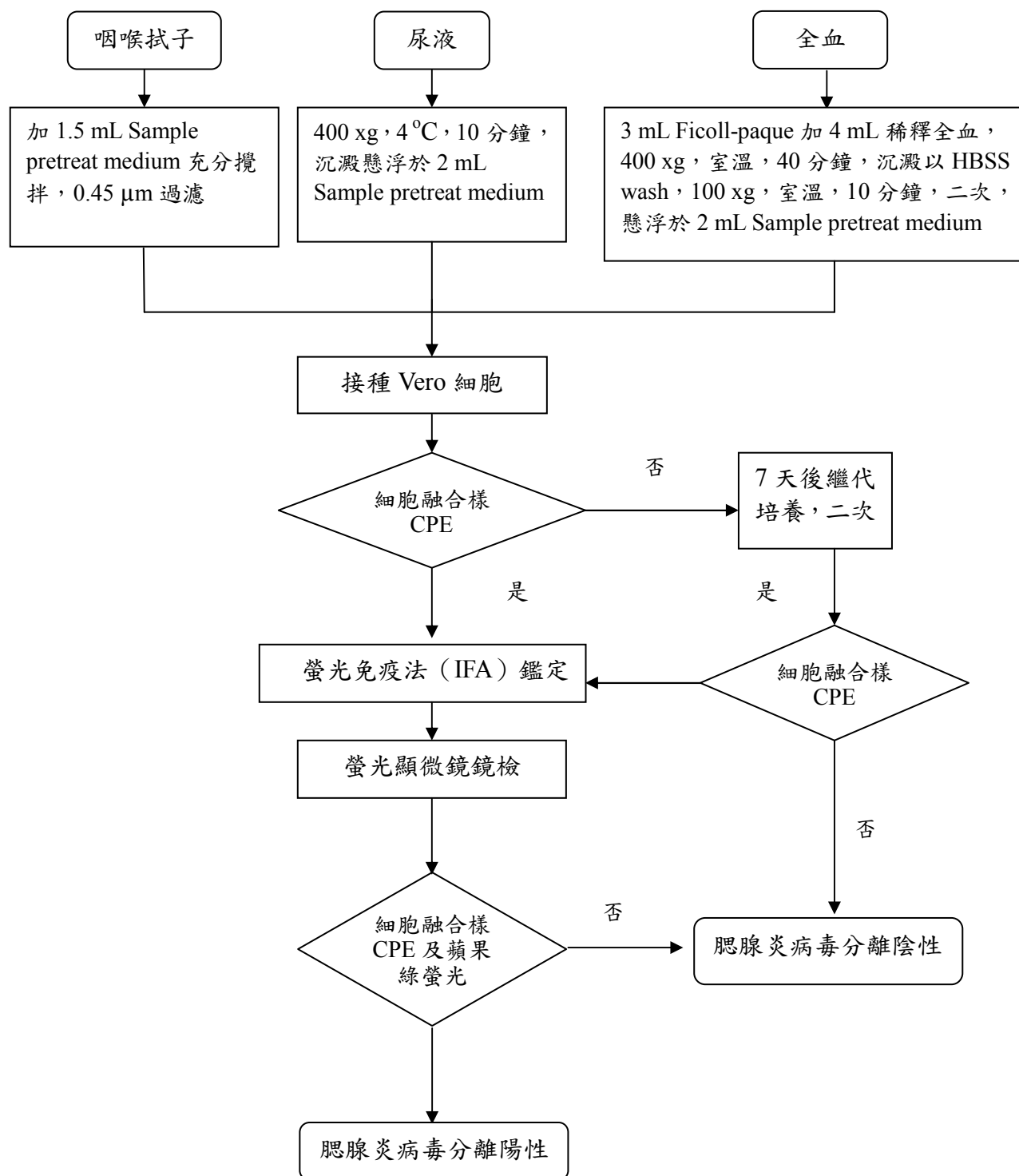
15.4 螢光鑑定紀錄表。

15.5 腮腺炎病毒檢驗判定流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 572 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 腮腺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：	腮腺炎病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 573 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：	腮腺炎病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 574 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)[illegible]

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：	腮腺炎病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 575 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：

	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

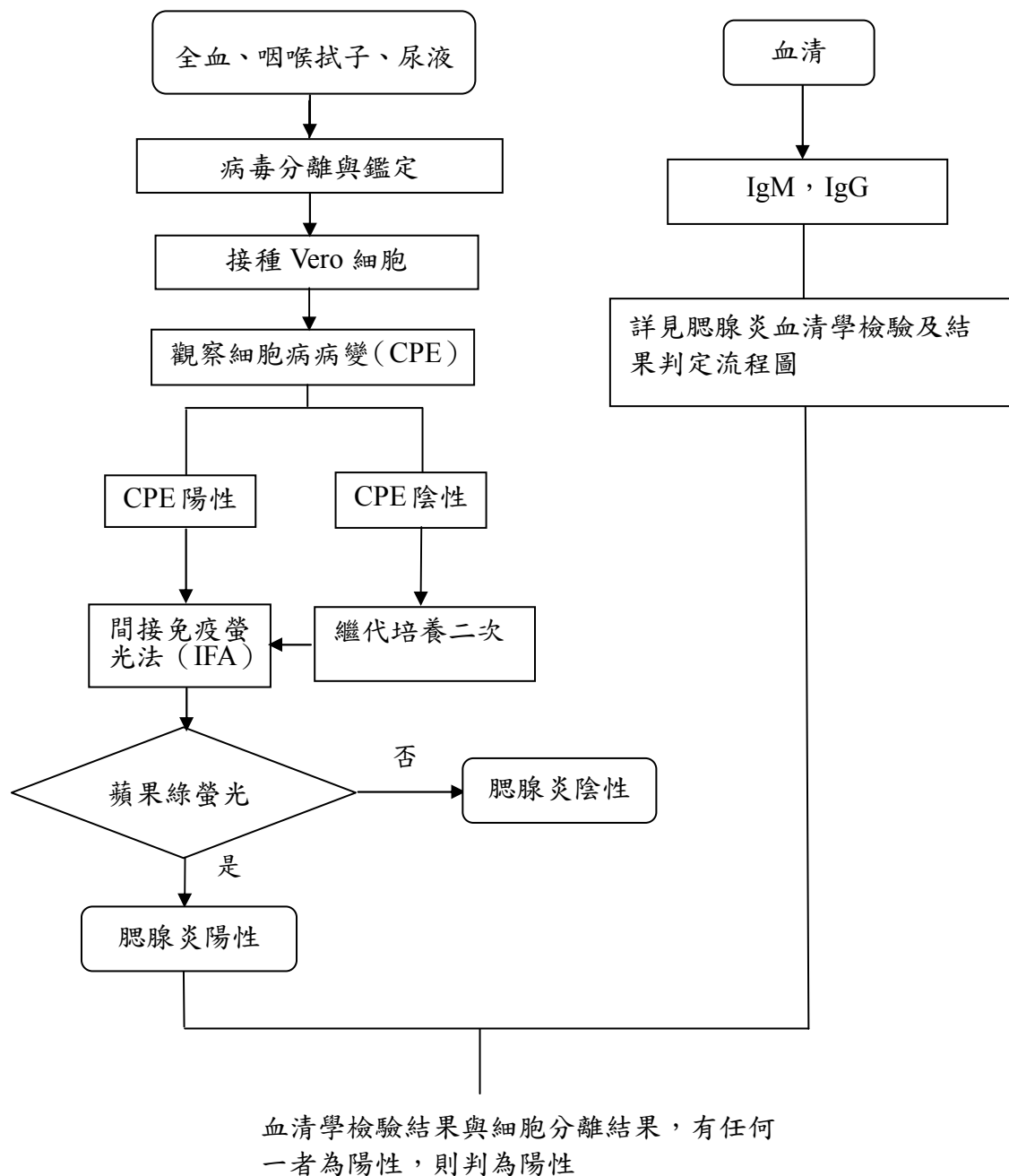
檢驗者：

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：	腮腺炎病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 576 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 腮腺炎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：	腮腺炎病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 577 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) 檢測檢體中是否有麻疹病毒。

2 適用檢體種類

適用之檢體種類包括咽喉拭子、尿液等。

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 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 PCR kit。

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

5.1.5 陽性對照組 (positive control)：採用吸附有腮腺炎病毒抗原的市售 IgG 檢測試劑組微量盤作對照；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： 頁次：第 578 頁/共 1091 頁	腮腺炎病毒分子生物學 核酸檢測 (RT-nested PCR)	核准日期： 年 月 日 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

7.2.2.1 棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。

7.2.2.2 分裝標示號碼，取 140 μ L，其餘保存於-80°C。

7.2.3 尿液檢體

7.2.3.1 採集後之檢體，以 1,500 rpm 離心 10 min。

7.2.3.2 將沉澱物與 1-2 mL 含 2X 抗生素的 DMEM 混合均勻後，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 Qiagen one-step RT-PCR kit 為例)。

(1) 試劑添加量

RNase-free H ₂ O	10.85 μ L
5X RT-PCR buffer	5.0 μ L
Forward primer F1F (10 μ M)	1.0 μ L
Reverse primer HN3R (10 μ M)	1.0 μ L
RT-PCR enzyme mix	1.0 μ L
dNTP mix (10 μ M)	1.0 μ L
RNase inhibitor 40 U/ μ L	0.15 μ L

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒分子生物學	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 579 頁/共 1091 頁	核酸檢測 (RT-nested PCR)	修訂日期： 年 月 日

RNA sample 5.0 μ L

25.0 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, 50°C 30 min。

(b) Taq 活化作用, 95°C 15 min。

(c) Denaturation, 94°C 30 sec。

(d) Annealing, 55°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 HotStar Taq PCR kit 為例)。

(1) 試劑添加量

RNase-free H₂O 20.0 μ L

2X Master Mix 25.0 μ L

Forward primer P1 (10 μ M) 1.0 μ L

Reverse primer P2 (10 μ M) 1.0 μ L

1st PCR product 3.0 μ L

50.0 μ L

(2) 取 3 μ L 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, 45°C 30 sec。

(d) Extension, 72°C 60 sec。

(e) 重複 (c) 至 (e) 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 μ L (2 ng/ μ L)。

(c) 取二次產物 5 μ L，各加入 1 μ L 6X Loading dye。

(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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒分子生物學 核酸檢測 (RT-nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 580 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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。腮腺炎增幅產物片段約 450 bp，若出現上述 RT-PCR 產物，檢驗結果為陽性。

10 注意事項

- 10.1 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。
- 10.2 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。

11 參考文獻

- 11.1 Lee JY, Kim YY, Shin GC, Na BK, Lee JS, Lee HD, Kim JH, Kim WJ, Kim J, Kang C, Cho HW. 2003. Molecular characterization of two genotypes of mumps virus circulated in Korea during 1998-2001. Virus Res 97: 111-116.
- 11.2 Wu L, Bai Z, Li Y, Rima BK, Afzal MA. 1998. Wild type mumps viruses circulating in China establish a new genotype. Vaccine 6: 281-285.

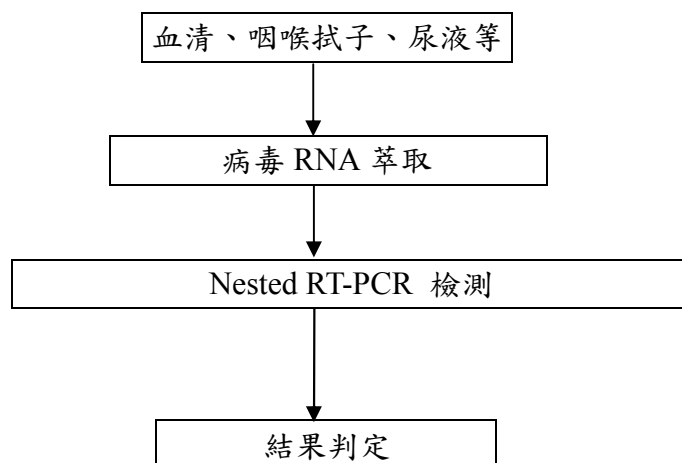
12 附錄

- 12.1 腮腺炎病毒鑑定流程圖。
- 12.2 腮腺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：	腮腺炎病毒分子生物學 核酸檢測（RT-nested PCR）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 581 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 12.1 腮腺炎病毒鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒分子生物學 核酸檢測（RT-nested PCR）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 582 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 12.2 腮腺炎病毒診斷用引子組序列表

一、First round RT-PCR primer

F1F :5'-GTAGCAGCCTTAGTTTTGAGCAT-3'
HN3R:5'-TGAAGAGTTTTGAGGGCTCCAT-3'

二、Second round nested-PCR primer

P1: 5'-CAATATCAAGTAGTGTCG-3'
P2: 5'-TTCTGTGTTGTATTGTGA-3'

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 583 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) 檢測人體是否有腮腺炎專一性 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。再利用吸覆有腮腺炎病毒抗原的微量盤與待測血清中具有的腮腺炎專一性 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 snti-parotitis-virus/IgM : Dade Behring, OWNT 15, Germany, 4°C 儲存」。

- (1) Anti-parotitis virus/IgM test plate : 2 x 6 strips。
- (2) Anti-parotitis virus reference P/P : 0.65 mL。
- (3) Anti-parotitis 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.。
- (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：	腮腺炎病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 584 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(8) Instruction for use : 1 pcs.。

5.2 耗材

- 5.2.1 Tps : 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 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：	腮腺炎病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 585 頁/共 1091 頁		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：腮腺炎 IgM 陽性，腺腮炎 IgM 陰性，腮腺炎 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 腮腺炎 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 $\text{Lower margin} \leq \Delta A_{\text{Reference P/P}} \leq \text{upper margin}$ 。

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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 586 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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

Dade Behring 公司試藥說明書。

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 腮腺炎病毒 IgM 抗體試驗（間接酵素免疫分析法）流程圖。
- 15.4 腮腺炎 ELISA 實驗紀錄表。
- 15.5 腮腺炎 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：	腮腺炎病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 587 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 檢體排列位置圖

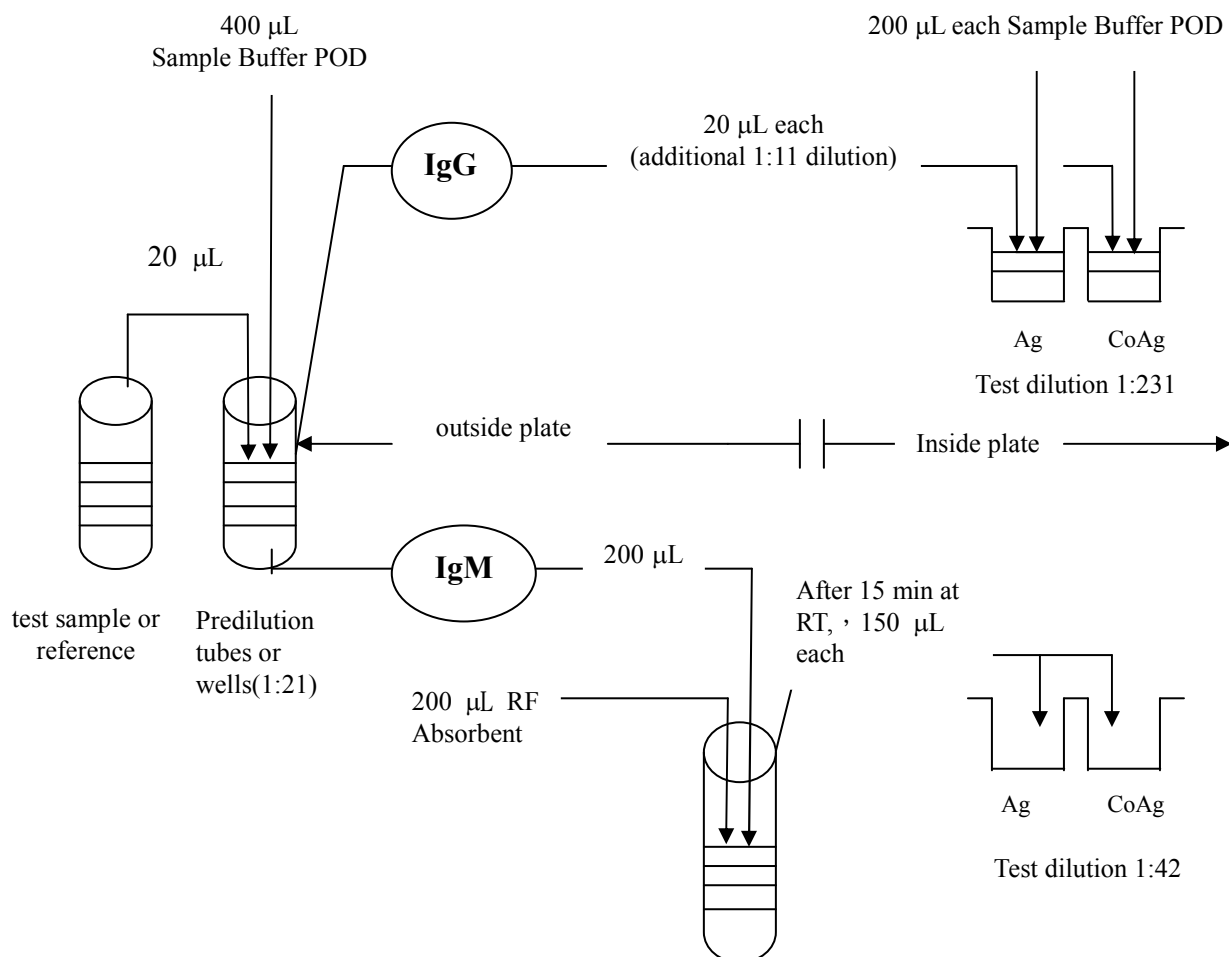
		1		2		3		4		5		6	
Reference P/P	A												
In- house positive	B												
	C												
	D												
	E												
	F												
	G												
	H												
		antigen		control antigen									

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：	腮腺炎病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 588 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

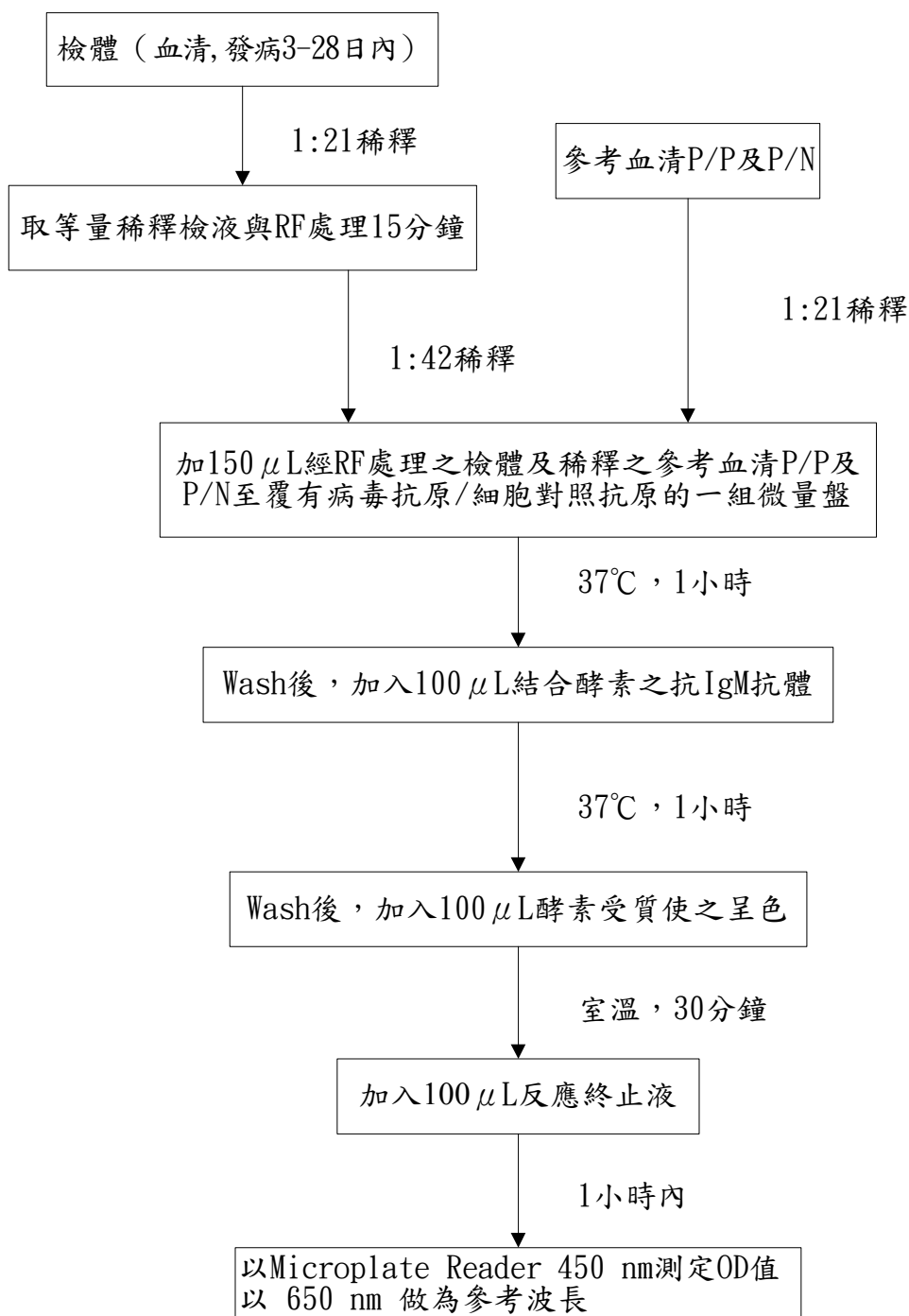
附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 589 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 腮腺炎病毒 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：	腮腺炎病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 590 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 腮腺炎 ELISA 實驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

腮腺炎ELISA實驗紀錄表

Date：

Mumps IgM						Mumps IgG				
Name	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				

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

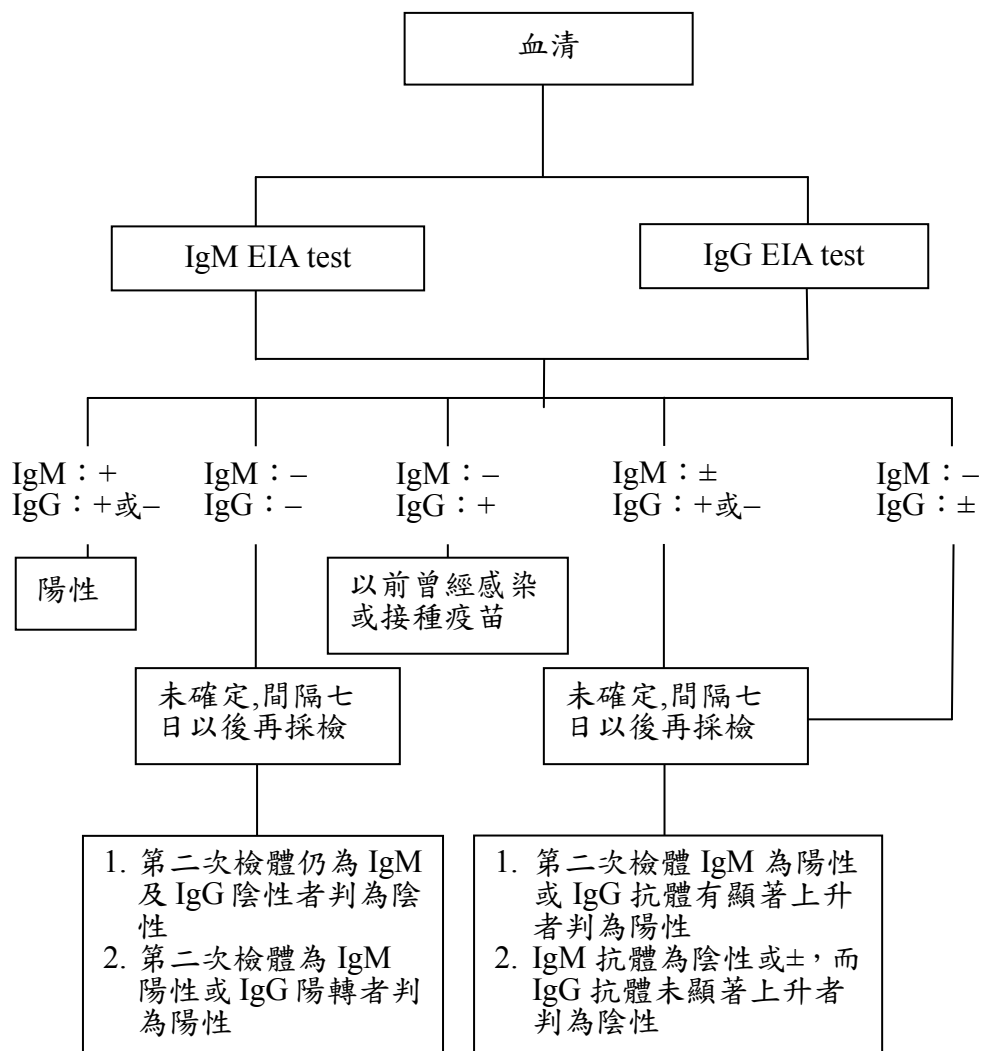
檢驗者：

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：	腮腺炎病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 591 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 腮腺炎血清學檢驗結果判定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 592 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) 檢測人體是否有腮腺炎專一性 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 孔微量盤底覆有腮腺炎病毒抗原的測試盤與待測血清中具有腮腺炎專一性 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-parotitis-virus/IgG : Dade Behring, OWLP 15, Germany, 4°C 儲存」

- (1) Anti-parotitis virus/IgG test plate : 2 x 6 strips。
- (2) Anti-parotitis 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：	腮腺炎病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 593 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：	腮腺炎病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 594 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：腮腺炎 IgG 陽性，腮腺炎 IgG 陰性，腮腺炎 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 腮腺炎 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：	腮腺炎病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 595 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	$= 0.8 \times \Delta A$ 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 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 腮腺炎病毒 IgG 抗體試驗（間接酵素免疫分析法）流程圖。
- 15.4 腮腺炎 ELISA 實驗紀錄表。
- 15.5 腮腺炎 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：	腮腺炎病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 596 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 檢體排列位置圖

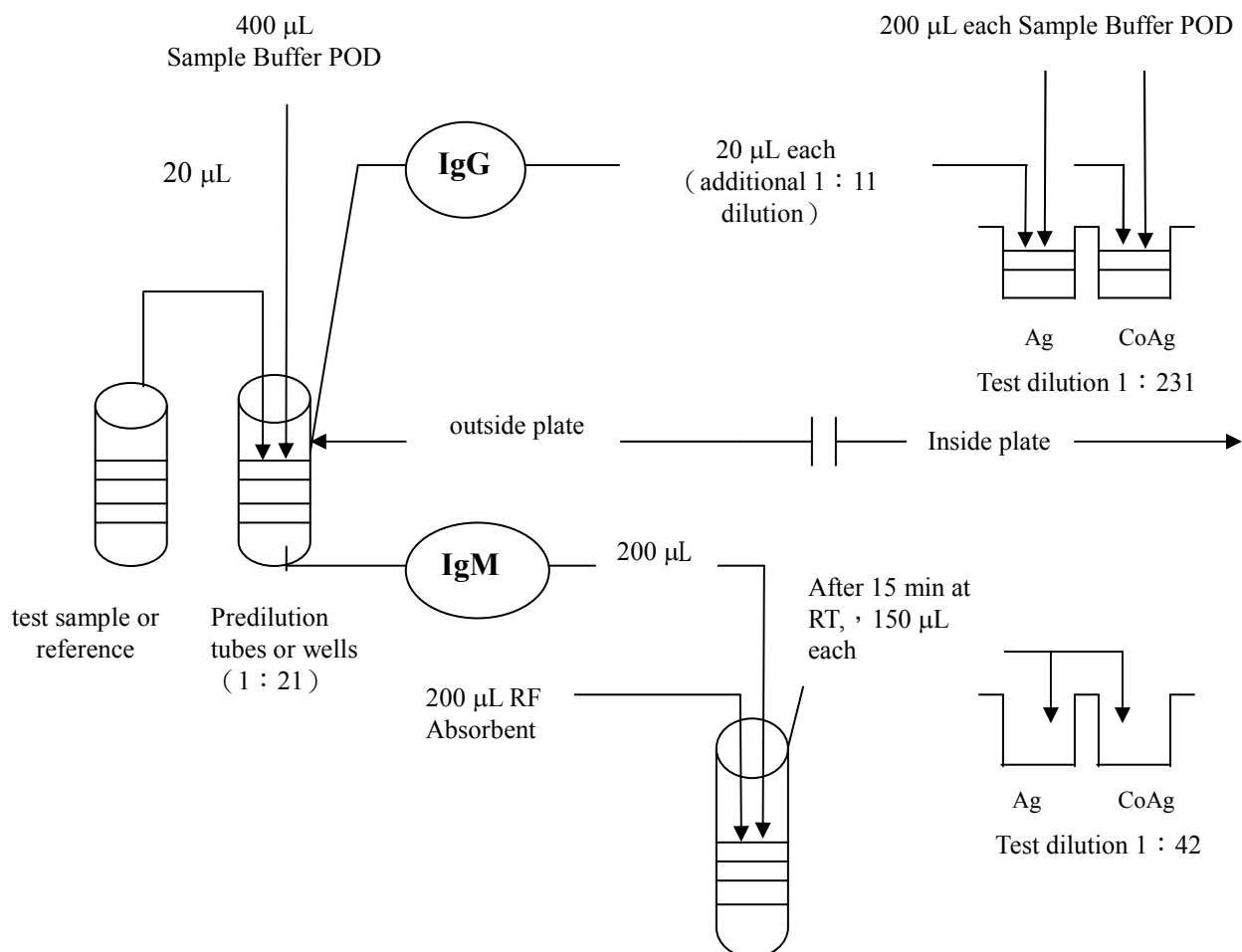
		1		2		3		4		5		6	
Reference P/N	A												
In-house positive	B												
	C												
	D												
	E												
	F												
	G												
	H												
		antigen	control antigen										Reference P/N

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：	腮腺炎病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 597 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

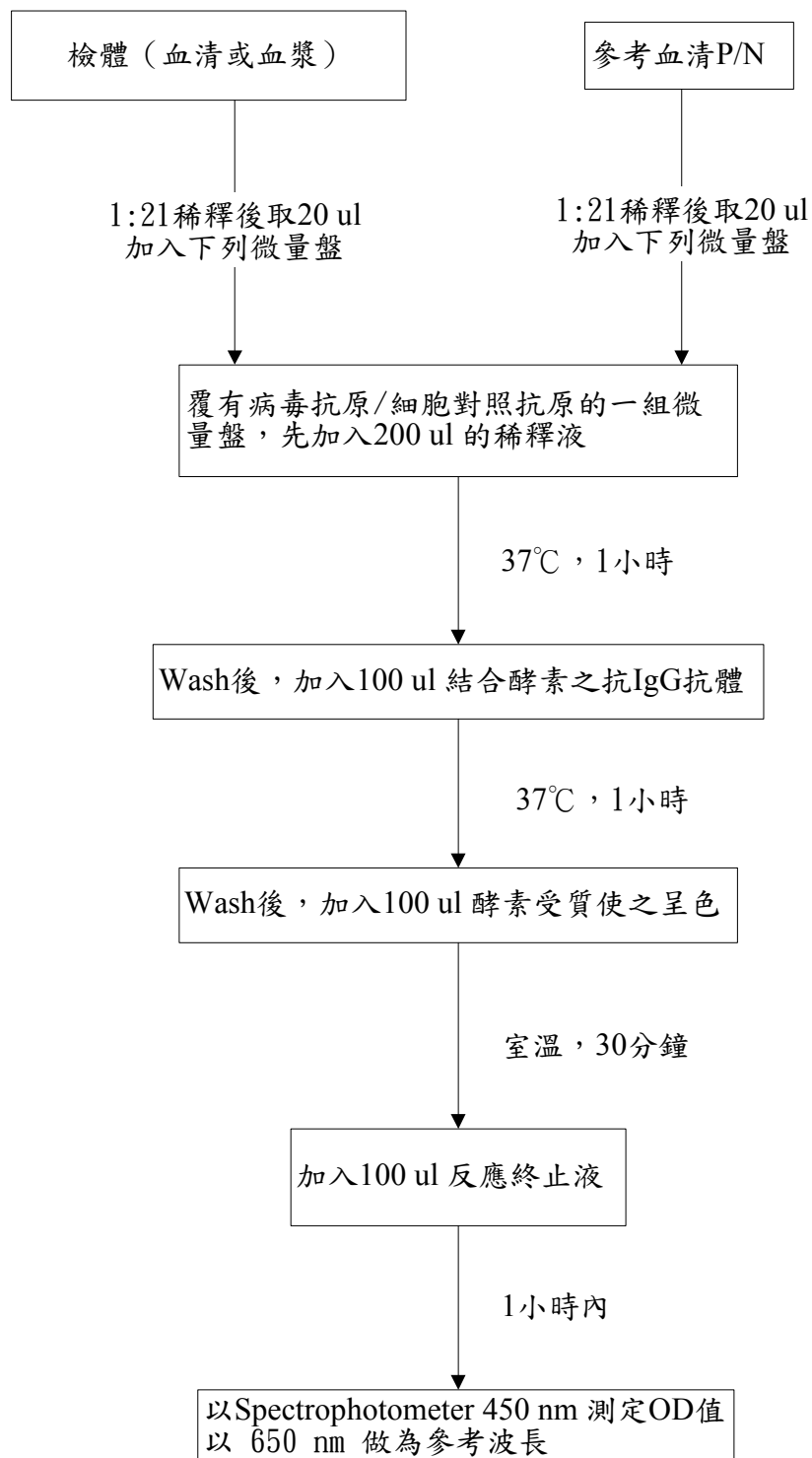
附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腮腺炎病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 598 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 腮腺炎病毒 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：	腮腺炎病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 599 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 腮腺炎 ELISA 實驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

腮腺炎ELISA實驗紀錄表

Date :

Name	Mumps IgM					Mumps IgG				
	Well	Sample No.	Δ A	Corrected Δ A	Result	Well	Sample No.	Δ A	Corrected Δ A	Result
	1A	P/P				1A	P/N			
	B	in-house P				B	in-house P			
	C					C				
	D					D				
	E					E				
	F					F				
	G					G				
	H					H				
	2A					2A				
	B					B				
	C					C				
	D					D				
	E					E				
	F					F				
	G					G				
	H					H				

Validation Check

1. P/P ≥ 0.2

2. P/P within lower and upper margin

3. Individual P/P within ± 20 % mean P/P

Kit Batch :

Expiry :

Lower margin :

Upper margin :

Nominal Value :

Mean P/P :

Correction Factor :

Validation Check

1. P/N ≥ 0.5

2. P/N within lower and upper margin

3. Individual P/N within ±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

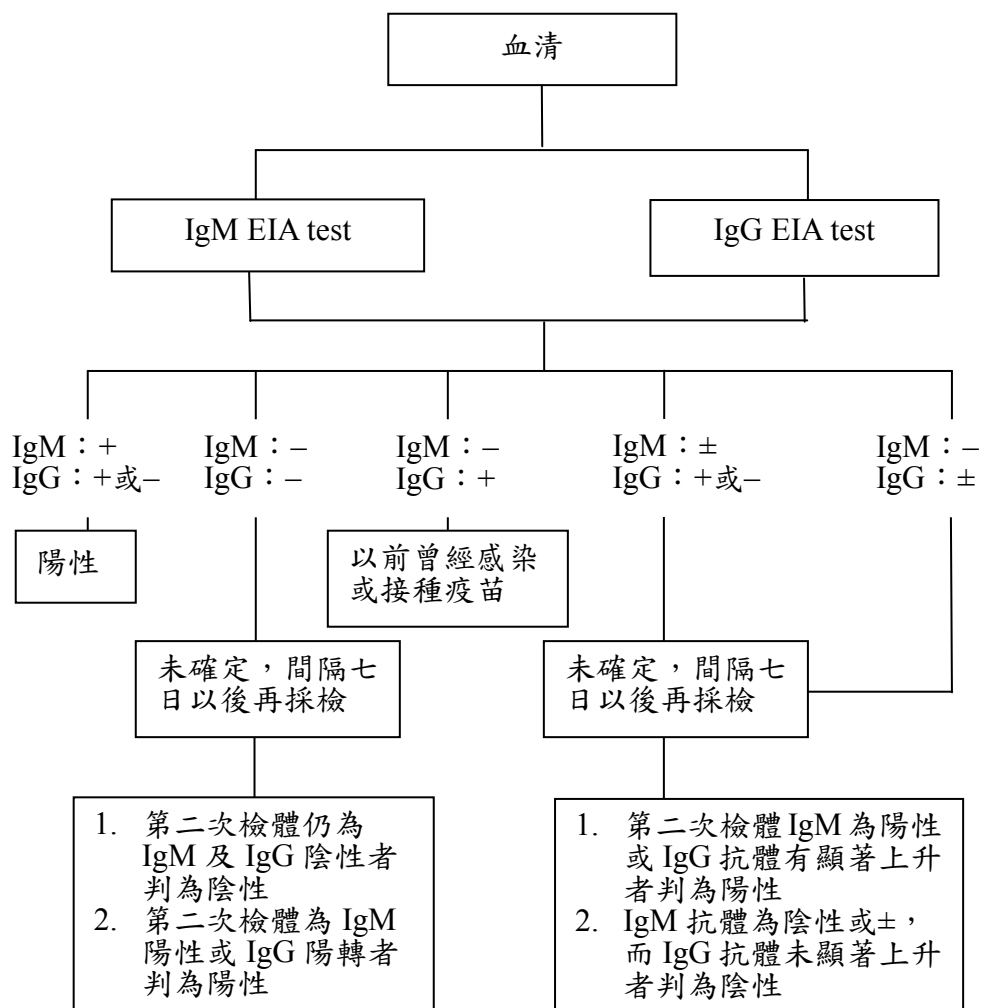
檢驗者：

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：	腮腺炎病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 600 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 腮腺炎血清學檢驗結果判定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	退伍軍人病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 601 頁 / 共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用微生物的分離培養檢查病患檢體中是否有退伍軍人菌，並加以鑑定。

2 適用檢體種類

適用人體痰液、肋膜液、肺部組織液、呼吸道抽出液、支氣管沖洗液。

3 解釋名詞

無。

4 原理概述

退伍軍人菌 (*Legionella*)，包括嗜肺性退伍軍人菌 (*Legionella pneumophila*) 及其它退伍軍人菌種 (*Legionella* species)，目前已被確認的至少有 48 個 Species 及 70 種血清型。造成人類肺炎的退伍軍人菌中，90% 以上為 *L. pneumophila*，可分為 15 種血清型，其中以第一型最為普遍。退伍軍人菌為革蘭氏陰性、菌落圓形平滑、白色（或藍白、藍灰、藍綠、藍紅）半透明、邊緣完整、輕度隆起、黏稠、需氧、無莢膜、不產孢子，長約 1.5-2 μm 、寬約 0.3-0.9 μm 的桿菌，在人體組織或體液中呈瘦短型，但在培養基中生長可達 20 μm 長。培養基須使用含 Yeast extract、Charcoal、Iron 及 L-cysteine 的特殊培養基。以特定培養基分離退伍軍人菌後，利用菌落形態、生理特徵、生化特性、乳膠凝集試驗及直接螢光抗體試驗等方法鑑定。

5 試劑耗材

5.1 檢體酸處理劑及中和劑

5.1.1 HCl-KCl 酸處理劑

稱量 7.46 g KCl 溶於 500 mL 蒸餾水中成 0.2 M KCl，以 0.2 M HCl 調整 pH 值至 2.0。

5.1.2 KOH 中和劑(退伍軍人菌對鈉敏感，不可用 NaOH 為中和劑)。

稱 1.123 g KOH 溶於 100 mL 蒸餾水成 0.1 N KOH，取 50 mL 0.1 N KOH 加 500 mL 蒸餾水混合均勻，以 0.1 N KOH 或蒸餾水調整此稀釋 KOH 溶液的 pH 值，使其當與 HCl-KCl 酸處理劑以 1：1 體積混合時 pH 值恰好等於 6.9。

5.1.3 將以上兩種溶液以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。(滅菌後再確認酸處理劑與 KOH 中和劑中和成 pH 6.9 的相對體積)

5.2 2 N KOH，自行配製 BCYE 培養基時製備。

稱 22.44 g KOH 於 250 mL 血清瓶中，加蒸餾水至約 180 mL，溶解混合均勻後倒入量筒中，以蒸餾水補至 200 mL，倒回血清瓶中，以 121°C 滅菌 15 分鐘後使用。

5.3 1 N HCl，裝血清瓶中，滅菌後使用。

5.4 BCYE w/ L-cystein 培養基 (Buffered Charcoal Yeast Extract Agar 含 L-cysteine (半胱氨酸))：可購買通過 IVD-GMP 之商品化產品，或自行製備。

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 602 頁 / 共 1091 頁	退伍軍人病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

5.4.1 配方：每 1 L 含量

Yeast extract	10.0 g
Charcoal	1.5 g
ACES buffer	10.0 g
Ferric pyrophosphate	0.25 g
Alpha-ketoglutarate	1.0 g
Agar	15.0 g
L-cysteine	0.4 g

5.4.2 配製 500 mL：使用 1 L 錐形瓶，稱取 19.0 g BCYE agar base (Remel Inc., USA)，以 500 mL 量筒量取 485 mL 蒸餾水加入，放入一粒中型磁力攪拌子，以加熱電磁攪拌器加熱攪拌使粉末完全溶解，並加入 10 mL 2 N KOH 使 pH 約在 6.9 附近，於高壓滅菌鍋 121°C 滅菌 15 分鐘，置於 50°C 水浴槽冷卻至 50°C，加入已經先以無菌蒸餾水溶解之 L-cysteine growth supplement tab (含 0.2 g L-cysteine-HCl：MAST Group Ltd., UK)，以攪拌子充份混合均勻後，以 10 mL 無菌吸管吸取 10 mL 培養基置入 50 mL 小燒杯內，測 pH 值 (溫度 sensor 需一起測，測過的培養基已不是無菌，丟棄之，不要倒回原瓶)，以 2 N KOH 或 1 N HCl 調整培養基為 pH 6.90 ± 0.05，倒平板，90 mm 內徑培養皿倒 20 mL，高度約 0.3 cm。靜置待凝固後將培養皿翻面，隔夜在培養皿上標示培養基種類、製作日期及保存期限 (三個月)，裝入塑膠袋中並束緊袋口，保存於 4°C 冰箱。

5.5 BCYE w/o L-cysteine 培養基 (BCYE 不含 L-cysteine)：可購買通過 IVD-GMP 之商品化產品，或自行製備。製備 500 mL 方法如 5.4，但是不加 L-cysteine，亦可使用血液平板培養基取代。

5.6 血液平板培養基 (BAP, Blood Agar Plate)：通過 IVD-GMP 之商品化產品。

5.7 PNV 選擇性培養基 (BCYE 含 L-cysteine、抗生素 Polymyxin B、Natamycin 和 Vancomycin)：可購買通過 IVD-GMP 之商品化產品，或自行製備。製備 500 mL 方法如 5.4，加入 L-cysteine 時，也加入已經先以 5 mL 無菌蒸餾水溶解之 PNV supplement (MAST, UK)，最終濃度為 Polymyxin B 79,200 IU/L、Natamycin 200 mg/L 和 Vancomycin 3 mg/L。

5.8 PAV 選擇性培養基 (BCYE 含 L-cysteine、抗生素 Polymyxin B、Anisomycin、Vancomycin 及染料)：可購買通過 IVD-GMP 之商品化產品，或自行製備。製備 500 mL 方法如 5.4，加入 L-cysteine 時，也加入已經先以 5 mL 無菌蒸餾水溶解之 PAV supplement (MAST, UK)，最終濃度為 Polymyxin B 80,000 IU/L、Anisomycin 40 mg/L、Vancomycin 1 mg/L、Bromocresol purple 10 mg/L 及 Bromothymol blue 10 mg/L。

5.9 革蘭氏染色染劑組 (Gram stain set)：武藤化學，日本或 DIFCO, USA。含有 Crystal Violet、Gram Iodine、Decolorizer 及 Carbol-fuchsin 四劑。

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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	退伍軍人病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 603 頁 / 共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.11 退伍軍人菌乳膠凝集試驗試劑 (Legionella Latex Agglutination Test) : Oxoid Limited, England。
- 5.12 退伍軍人菌直接螢光抗體檢驗試劑 (Direct Fluorescent Antibody Test, DFA) : Zeus Scientific, Inc., USA。
- 5.13 品質管制菌種：*L. pneumophila* 標準株 ATCC 33152。
- 5.14 無菌蒸餾水。
- 5.15 玻璃錐形瓶：1,000 mL (Pyrax)。
- 5.16 量筒：500 mL。
- 5.17 玻璃小燒杯：50 mL。
- 5.18 無菌培養皿：內徑約 90 mm。
- 5.19 無菌滴管 (dropper)：3 mL。
- 5.20 無菌吸管 (pipette)：10 mL (每 0.1 mL 一刻度)。
- 5.21 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ L。
- 5.22 接種針 (環)。
- 5.23 可拋棄式無菌塑膠手套、口罩。
- 5.24 無菌離心管：50 mL、15 mL。
- 5.25 革蘭氏染色用載玻片。
- 5.26 螢光染色專用玻片及蓋玻片：60 x 24 mm。
- 5.27 血清瓶：1,000 mL、250 mL。
- 5.28 無菌玻璃珠：4 mm。
- 5.29 菌種保存管：PROTECT bacterial preservers, UK。

6 儀器設備

- 6.1 微量天平。
- 6.2 藥杓、稱藥紙、剪刀、鑷子。
- 6.3 電磁攪拌器 (可加熱) 及磁力攪拌子。
- 6.4 高壓滅菌鍋。
- 6.5 水浴槽。
- 6.6 pH 值測定儀及 pH 7.0、pH 4.0 標準液。
- 6.7 電動吸管輔助器 (pipette aid)。
- 6.8 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 6.9 二氧化碳培養箱。
- 6.10 振盪器 (vortexer)。
- 6.11 計時器。
- 6.12 本生燈或酒精燈。
- 6.13 立體解剖顯微鏡。
- 6.14 光學顯微鏡：能放大至 1,000X 油鏡。
- 6.15 螢光顯微鏡：能放大至 400X。
- 6.16 微量吸管 Pipetman：需 1,000 μ L、200 μ L、20 μ L 三種規格。
- 6.17 紫外光燈：365 nm。

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：	退伍軍人病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 604 頁 / 共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之第二級生物安全櫃 (Class II BSC) 內操作。

8 檢體採集

8.1 採集人體痰液、肋膜液、肺部組織液、呼吸道抽出液、支氣管沖洗液；尿液和血液檢體一般不適合做退伍軍人菌之培養。退伍軍人菌之培養必須在病患使用抗生素前收集檢體，以達到最佳之分離效果。

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/113111593271.pdf>。

9 檢體運送及保存

9.1 由於呼吸道檢體中之常在菌很多，在數量與繁殖速度上常造成競爭性抑制，因此正確的採檢、運送及保存很重要。退伍軍人菌於 4°C 保存下約可存活至少一週，於冷凍下則可存活更久，因此為了避免過度污染，檢體應以低溫 (4°C) 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/113111593271.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 分離培養

10.1.1 檢體前處理：痰與其他呼吸道分泌物可能有許多雜菌污染，且有些黏稠須先均質化。先以玻璃珠均質化及以酸處理減低雜菌之生長。

(1) 均質化方法：加等量無菌去離子水，再加十數顆滅菌玻璃珠以振盪器振盪 30 秒，均質後，取 0.5 mL 進行酸處理。(註：加水及玻璃珠的數量視痰的黏稠度適度增減)

(2) 酸處理法：取已均質化痰檢體 0.5 mL 置入 15 mL 無菌離心管中，加入 0.2 M KCl-HCl (pH 2.0) 溶液 2.0 mL，以振盪器振盪混合後放置 4 分鐘，再加入 2.0 mL KOH 中和劑，振盪混合。

10.1.2 接種：取 0.1 mL 及 0.3 mL 處理過的檢體，分別接種到 PNV 或 PAV 選擇性培養基。(註：為增加分離率，每件檢體至少接種兩盤)

10.1.3 培養：置於二氧化碳培養箱中 35°C，2.5-5.0% CO₂，及相對濕度 60-90% 條件下培養。

10.1.4 觀察：培養 7 至 14 天，並每天觀察。若次日已長滿雜菌，則取新培養基減少檢體量重新接種。酸處理後之檢體及未酸處理之檢體保留於 4°C 至少 2 週。

10.2 鑑定

10.2.1 菌落觀察

退伍軍人菌生長緩慢，約需 3-5 天才可觀察到，以肉眼觀察

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 605 頁 / 共 1091 頁	退伍軍人病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

菌落型態，必要時再以立體解剖顯微鏡進行菌落觀察，菌落圓形平滑、白色半透明(在 PNV 選擇性培養基為白色，在 PAV 選擇性培養基則呈藍白或藍灰、藍綠、藍紅)、邊緣完整、具毛玻璃外觀、輕度隆起。隨著菌落老化，呈中央微白邊緣淡紫色虹光，以接種環挑取，呈黏稠狀。在波長 365 nm 的紫外燈下觀察，部份退伍軍人菌株會產生藍白色自發性螢光，如 *L. bozemanni*、*L. dumoffi*、*L. cherrii*、*L. gormanii*、*L. parisiensis*、*L. steigerwaltii*、*L. tucsonensis*、*L. anisa*；某些菌株則產生紅色自發性螢光，如 *L. rubrilucens* 和 *L. erythre*。

10.2.2 L-cysteine (半胱胺酸) 需求試驗：挑選可疑菌落接種於 BCYE w/ L-cysteine 及 BCYE w/o L-cysteine (或 BAP) 培養基上進行培養。若 BCYE w/ L-cysteine 可生長而 BCYE w/o L-cysteine (或 BAP) 不長，則可能是退伍軍人菌屬，挑取菌株再做進一步鑑定。

10.2.3 革蘭氏染色

- (1) 抹片製作：挑取 BCYE 上之疑似菌落，於載玻片上製成薄抹片，風乾並過火數次固定。
- (2) 初染：將已固定之抹片，用結晶紫染液 (Crystal Violet) 染 1 分鐘，水洗，水洗應不超過 5 秒。
- (3) 媒染：加革蘭氏碘液 (Gram Iodine) 染 1 分鐘，水洗。
- (4) 脫色：用脫色液 (Decolorizer) 洗至不再有紫色褪出時，數秒即可，再以自來水沖洗。
- (5) 複染：用複染液 (Carbolfuchsin) 染 30 秒，水洗。
- (6) 自然風乾。
- (7) 以顯微鏡鏡檢，觀察細菌是否為革蘭氏陰性桿菌，無莢膜、不產孢子、短胖型或成長短不一的長絲型。註：退伍軍人菌為革蘭氏陰性桿菌，無莢膜、不產孢子、短胖型、較老的菌會成長短不一的長絲型。

10.2.4 退伍軍人菌乳膠凝集試驗 (Legionella Latex Agglutination Test)：詳見退伍軍人菌抗原試驗 (乳膠凝集試驗法)。此法可以區分嗜肺性退伍軍人菌血清型第 1 型 (*L. pneumophila* serogroup 1)、嗜肺性退伍軍人菌血清型第 2-14 型 (*L. pneumophila* serogroups 2-14) 及其他退伍軍人菌屬菌種 (*Legionella* species)。

10.2.5 退伍軍人菌直接螢光抗體試驗 (Direct Fluorescent Antibody Test, DFA)：詳見退伍軍人菌抗原試驗 (直接螢光抗體檢驗法)。

10.2.6 菌種保存：經鑑定之菌株，純培養後以菌種保存管保存。標示菌種保存管後，取一個 10 µL 接種環菌量之純培養菌落置於保存液中，混合均勻後，至少靜置 30 秒，將冷凍保存液吸出，隨後旋緊保存管蓋子，放入 -70°C 冰櫃保存，並做詳細的菌種保存記錄。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	退伍軍人病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 606 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

11 結果判定

- 11.1 陽性判定標準：由檢體培養分離之疑似菌株經過 L-cysteine 生長需求試驗、革蘭氏染色、乳膠凝集試驗、或直接螢光抗體試驗均符合退伍軍人菌之結果，即判為退伍軍人菌陽性。
- 11.2 陰性判定標準：無符合退伍軍人菌之結果，即判為退伍軍人菌陰性。
- 11.3 報告內容：退伍軍人菌陽性、退伍軍人菌陰性。
- 11.4 結果登錄：檢驗人員於完成檢驗後，將檢驗結果登錄於退伍軍人病病原菌分離與鑑定紀錄表。將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果”欄，並於檢體送驗單背面加蓋檢驗者職章，送實驗室主管審核及蓋章，並上網登錄於傳染病通報系統。

12 品質管制

- 12.1 PNV 選擇性培養基、PAV 選擇性培養基之品質管制
每批取 2 片培養基進行生長品管測試，並取一盤前一批號之培養基為對照。方法：取生長 2 日之 *L. pneumophila* 標準株 1-2 菌落置於 1 mL 無菌蒸餾水中，配製成 McFarland 0.5 菌液 (1.5×10^8 cfu/mL)，取 100 μ L 上述菌液加 900 μ L 蒸餾水 (1.5×10^7)，繼續 1:10 序列稀釋至 1.5×10^3 ，吸取 30 μ L 入待測培養基中，均勻塗開，置 35°C 培養箱中培養 3-4 日，觀察生長情形並紀錄之。若無菌落生長或生長遲緩之批號培養基，宜丟棄不用。若連對照培養基也不生長，則品管試驗必須重做。
- 12.2 BCYE w/ L-cysteine 培養基之品質管制
每批取 2 片培養基進行生長品管測試，方法同 PNV 選擇性培養基之品質管制。若無菌落生長或生長遲緩之批號培養基，宜丟棄不用。若連對照培養基也不生長，則品管試驗必須重做。若有，雜菌生長則觀察是否於製備過程中污染，若是，則需重新製備。

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 Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover CC. 2007. Manual of Clinical Microbiology. 9th edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 835-49.
- 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 869-878 頁。
- 14.3 Fields BS, Benson RF, Besser RE. 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev 15: 506-526.
- 14.4 Yu VL. 1995. *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease). In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 4th edition. Churchill Livingstone New York, pp. 2087-2097.

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	退伍軍人病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 607 頁 / 共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

14.5 Benenson AS. 1990. Control of communicable diseases in man. 15th edition. American Public Health Association. Washington, DC. pp. 235-238.

14.6 Oxoid。 *Legionella* latex test 操作說明書。

14.7 Zeus Scientific, Inc.。 *Legionella* DFA test system 操作手冊。

15 附錄

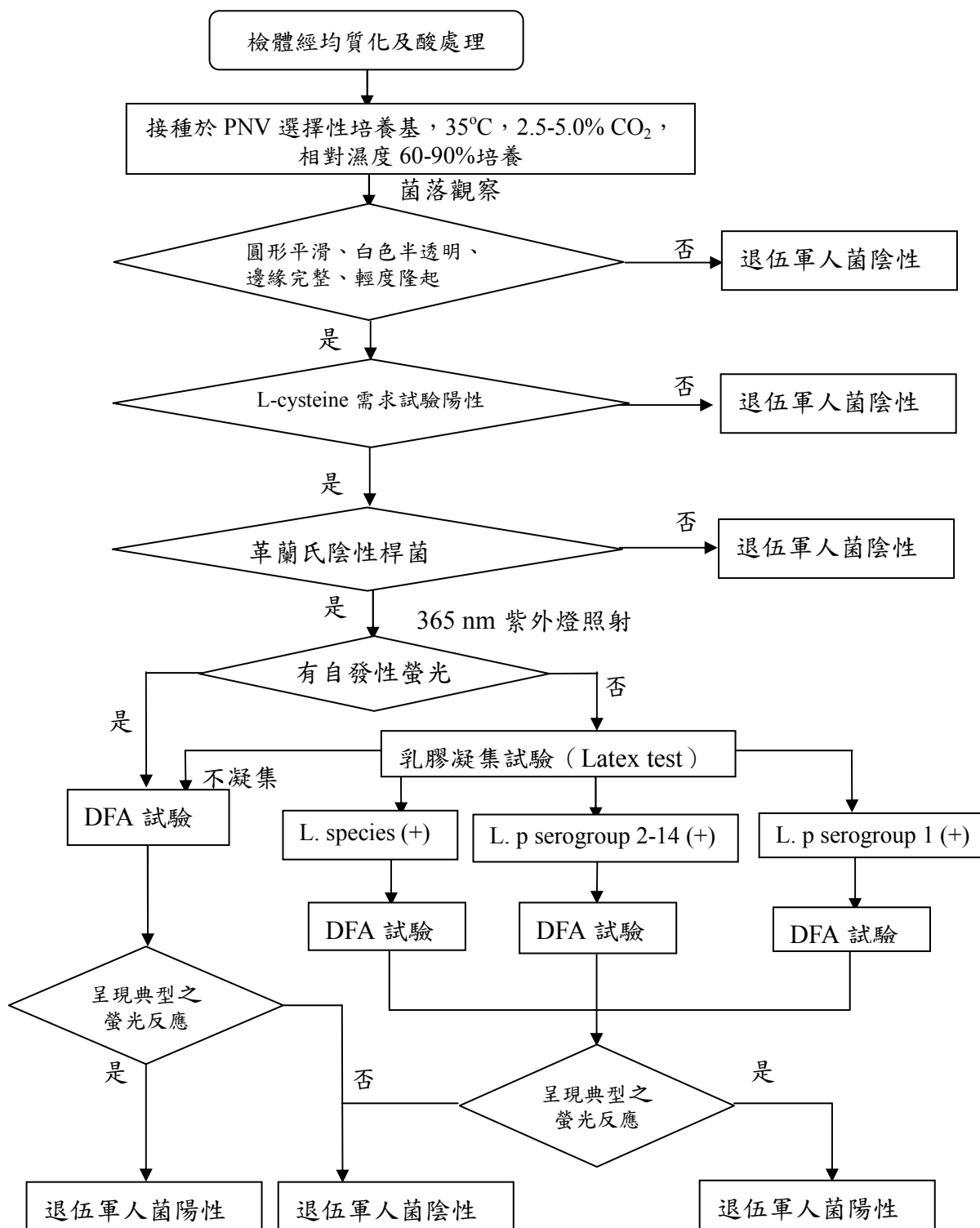
15.1 退伍軍人病病原菌分離與鑑定流程圖。

15.2 退伍軍人病病原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：	退伍軍人病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 608 頁 / 共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 退伍軍人病病原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：	退伍軍人病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 609 頁 / 共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 退伍軍人病病原菌分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

退伍軍人菌分離與鑑定紀錄表

頁數：第 頁 / 共 頁

檢體編號									
項目									
檢體種類 (採檢日期)									
檢體採檢運送狀況適當	是	否	是	否	是	否	是	否	
檢體酸處理	是	否	是	否	是	否	是	否	
PNV 選擇性培養基上菌落外觀特徵，有菌落微突、呈圓形、具毛玻璃外觀之可疑菌落。	是	否	是	否	是	否	是	否	
L-cysteine 需求試驗	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	
革蘭氏染色	陰性桿菌	非陰性桿菌	陰性桿菌	非陰性桿菌	陰性桿菌	非陰性桿菌	陰性桿菌	非陰性桿菌	
自發性螢光 (365 nm 紫外燈)	有	無	有	無	有	無	有	無	
乳膠凝集試驗	確認退伍軍人菌	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
	L. p serogroup 1								
	L. p serogroup 2-14								
綜合結果	L. species								
	直接螢光抗體試驗 (DFA) 鑑定型別								
	退伍軍人菌	陰性		陰性		陰性		陰性	
		陽性		陽性		陽性		陽性	
	血清型別								
	備註								

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：	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (EIA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 610 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用酵素免疫試驗法 (Enzyme Immunoassay, EIA) 測定患者尿液中是否有嗜肺退伍軍人菌第一型抗原 (*Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen)。

2 適用檢體種類

患者尿液。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

EIA 測定抗原，在已經披覆 Polyclonal rabbit antibody specific for *L. pneumophila* serogroup 1 IgG 的微量滴定盤中，加入患者尿液，若有任何抗原存在即會為 Antibody 所吸附，Anti-*Legionella* HRP conjugate (抗體-酵素結合體) 與尿液檢體同步加入，經反應後，以洗液洗去未接合之尿液及抗體-酵素結合體，最後加入酵素反應的受質，與酵素反應呈色，經 stop solution 中止反應後，利用酵素免疫分析儀測定吸光值，再與陽性對照血清比較判定其結果。

5 試劑耗材

5.1 退伍軍人病尿液抗原酵素免疫檢驗試劑組 (*Legionella* urine antigen Elisa kit: BINAX, Inc., USA)。置 2-8°C 保存。

5.1.1 Microtiter wells: 96 孔微量滴定盤已披覆純化之 Rabbit antibody specific for *L. pneumophila* serogroup 1 IgG。

5.1.2 Wash concentrate: 0.1 M phosphate buffered saline (PBS)，以蒸餾水 1:10 倍稀釋後使用。

5.1.3 Positive control urine: 含有 *L. pneumophila* serogroup 1 antigen 的 human urine。

5.1.4 Negative control urine: Normal human urine。

5.1.5 HRP conjugate: Purified rabbit anti-*L. pneumophila* serogroup 1 IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) in Tris buffer with a protein stabilizer。

5.1.6 Color developer: Tetramethylbenzidine (TMB) + Hydrogen peroxide。

5.1.7 Stop solution: 1 N H₂SO₄。

5.2 乳膠或 PVC 手套。

5.3 微量吸管尖: 200 µL。

5.4 量筒: 500 mL。

5.5 計時器。

5.6 蒸餾水。

5.7 儲液瓶。

5.8 儲液槽。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (EIA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 611 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.9 吸水紙。
- 5.10 96 孔盤蓋。
- 5.11 無菌刻度滴管：3 mL。

6 儀器設備

- 6.1 離心機。
- 6.2 微量吸管：1,000 μ L、200 μ L。
- 6.3 八頻道（或十二頻道）微量吸管（multi-channel pipettor）：200 μ L。
- 6.4 酵素免疫分析儀（ELISA reader）：MRX-II, 450 nm 波長。

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

取中段尿 10 mL 裝於無菌容器中，標示並冷藏。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/113111593271.pdf>。

9 檢體運送及保存

- 9.1 低溫運送。保存於 2-8°C 可 14 天，-10°C 以下保存可維持更久。
- 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/113111593271.pdf>。

10 檢驗步驟

- 10.1 尿液檢體及使用之試劑回溫後使用，試劑中之酵素連結免疫分析盤只取出所需使用之部份孔洞。尿液若有混濁需離心後取上清液使用。
- 10.2 於檢驗記錄表上標示 Blank (A1)、NC1 (陰性對照 1)、NC2 (陰性對照 2)、PC1 (陽性對照 1)、PC2 (陽性對照 2) 及待測檢體放置位置。
- 10.3 A1 (96 孔盤第一行第一個洞) 設為受質空白對照 (substrate blank)，不加檢體及 HRP conjugate。
- 10.4 酵素連結免疫分析盤孔洞中依記錄表標示分別加入 100 μ L 的陰性對照 Negative control (2 重覆)，陽性對照 Positive control (2 重覆)，待測尿液檢體 (patient specimen) (2 重覆)。
- 10.5 除 A1 外，其餘各孔洞加入 100 μ L 的 HRP conjugate (使用八頻道微量吸管)。
- 10.6 以八頻道微量吸管上下吸放數次 (或輕敲檢驗盤)，使 Conjugate 與檢體均勻混合，但需避免濺出造成交叉污染。
- 10.7 蓋上盤蓋，於室溫 (20-25°C) 反應 2 小時。
- 10.8 反應後，將混合液吸出或倒掉 (如果倒掉混合液，需以吸水紙吸乾)。
- 10.9 每一個孔洞加入 250 μ L 的洗液，再吸出或倒掉，重複至少 4 次。
- 10.10 加入 200 μ L 的呈色劑 (包括 A1)。
- 10.11 蓋上黑蓋子或置於暗處室溫 (20-25°C) 反應 15 分鐘。
- 10.12 反應後，每孔洞中加入 50 μ L 的反應停止液 (包括 A1)。

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 612 頁/共 1091 頁	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (EIA)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

- 10.13 輕敲檢驗盤，使混合液均勻混合（注意：所有的孔洞應呈無色或黃色，若為綠色，則為混合不足）。
- 10.14 立即放入酵素免疫分析儀，以波長 450 nm 測讀吸光值，以 A1 作為空白對照。

11 結果判定

11.1 數據計算

尿液抗原測定結果判讀：

- 11.1.1 以 A1 作為受質空白，讀取陰性對照尿液、陽性對照尿液及病患尿液的吸光值。

$$11.1.2 \text{ 吸光平均值} = \frac{\text{吸光值}(1) + \text{吸光值}(2)}{2}$$

$$11.1.3 \text{ 比值} = \frac{\text{陽性對照尿液吸光平均值或病患尿液吸光平均值}}{\text{陰性對照尿液吸光平均值}}$$

$$11.1.4 \text{ 典型的陽性結果可以是 } \frac{0.300 \text{ 吸光值}}{0.040 \text{ 吸光值}} = 7.5 \text{ 比值}$$

11.2 結果解說

- 11.2.1 尿液檢體的比值大於或等於 3 表示陽性（含有 *L. pneumophila* serogroup 1 抗原）。陽性結果可以再測試以確認結果。
- 11.2.2 尿液檢體的比值小於 3 表示陰性。陰性結果無法排除可能是其他血清型 *Legionella* 菌的感染。

11.3 報告核發：

- 符合陽性判定標準，嗜肺退伍軍人菌尿液抗原第一型陽性。
- 符合陰性判定標準，嗜肺退伍軍人菌尿液抗原第一型陰性。

- 11.4 結果登錄：檢驗人員於完成檢驗後，將檢驗結果登錄於嗜肺退伍軍人菌抗原檢驗（酵素免疫分析法）紀錄表。將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果”欄，並於檢體送驗單背面加蓋檢驗者職章，送實驗室主管審核及蓋章，並上網登錄於傳染病通報系統。

11.5 注意事項

- 11.5.1 過期的試劑不要再使用。
- 11.5.2 不同批號之試劑不可混用。
- 11.5.3 試劑需保存於 2-8°C，已經混濁的試劑不可再用。
- 11.5.4 在退伍軍人菌感染中，由嗜肺退伍軍人菌（*L. pneumophila*）所造成者約佔報告病例的 80-90%，其中血清型第一型（serogroup 1）又佔大多數。在發病後第三天便可測得尿液中的特定可溶性抗原（*L. pneumophila* serogroup 1 antigen）。非因 *L. pneumophila* serogroup 1 所造成之退伍軍人病無法由此檢驗測知。
- 11.5.5 早期使用適當的抗生素可能減低某些病患排出抗原的量。
- 11.5.6 本試劑靈敏度 97.7%，特異性 100%。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (EIA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 613 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12 品質管制

- 12.1 每次檢驗一定要作空白對照、陰性對照及陽性對照。
- 12.2 陰性對照的平均值必須小於 0.100，陽性對照的平均值必須是陰性對照值的三倍以上，否則實驗必須重做。

13 廢棄物處理

- 13.1 剩餘檢體置-20°C 冷凍保存，試劑用後立刻放回 4°C 冰箱保存。
- 13.2 過程使用過之廢液及塑膠尖管等皆需以滅菌袋裝妥密封，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 Binax。 *Legionella* urinary antigen EIA 操作說明書。
- 14.2 Berdal BP, Farshy CE, Feeley JC. 1979. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. J Clin Microbiol 9: 575-578.
- 14.3 Tilton RC. 1979. Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Ann Intern Med 90: 697-698.
- 14.4 Kohler RB, Zimmerman SE, Wilson E, Allen SD, Edelstein PH, Wheat LJ, and White A. 1981. Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' Disease. Ann Intern Med 94: 601-605.
- 14.5 Bibb WF, Arnow PM, Thacker L, McKinney RM. 1984. Detection of soluble *Legionella pneumophila* antigens in serum and urine specimens by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal and polyclonal antibodies. J Clin Microbiol 20: 478-482.
- 14.6 Tang PW, Toma S. 1986. Broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Legionella* soluble antigens. J Clin Microbiol 24: 556-558.

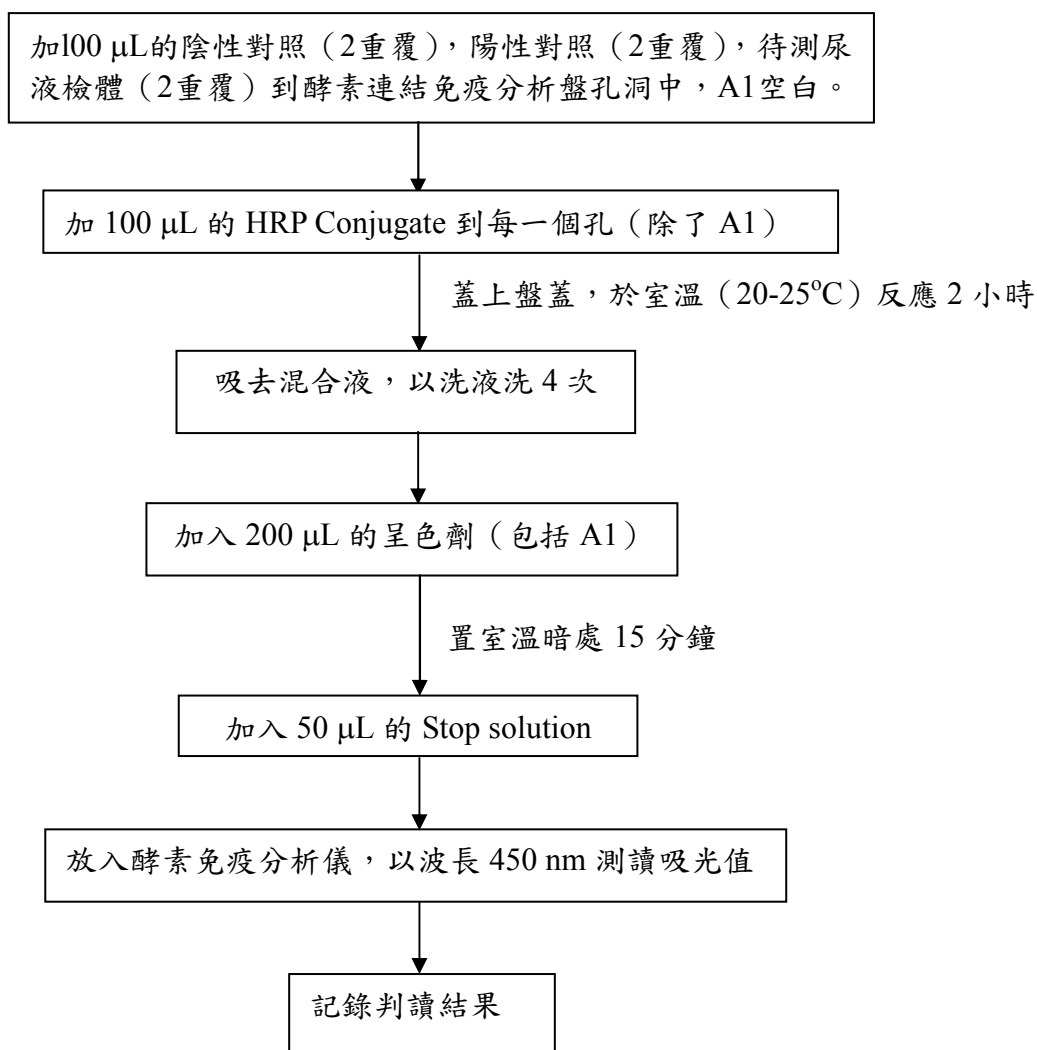
15 附錄

- 15.1 嗜肺退伍軍人菌抗原試驗（酵素免疫試驗法）流程圖。
- 15.2 嗜肺退伍軍人菌抗原檢驗（酵素免疫試驗法）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：	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (EIA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 614 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 嗜肺退伍軍人菌抗原試驗（酵素免疫試驗法）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：	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (EIA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 615 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 嗜肺退伍軍人菌抗原檢驗（酵素免疫試驗法）紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

嗜肺退伍軍人菌抗原檢驗（酵素免疫試驗法）紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

	1	2	3	4	5	6
<i>A</i> OD450 判定	A1					
<i>B</i> OD450 判定	NC1	NC2				
<i>C</i> OD450 判定	PC1	PC2				
<i>D</i> OD450 判定						
<i>E</i> OD450 判定						
<i>F</i> OD450 判定						
<i>G</i> OD450 判定						
<i>H</i> OD450 判定						

陰性對照平均值：

備註：

陽性對照平均值：

陽性判定值：

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：	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (RIMA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 616 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用快速免疫呈色膜法 (Rapid Immunochromatographic Membrane Assay, RIMA) 測定患者尿液中是否有嗜肺退伍軍人菌第一型抗原 (*Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen)。

2 適用檢體種類

患者尿液。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用快速免疫呈色膜法 RIMA 檢驗患者尿液中 *L. pneumophila* serogroup 1 可溶性抗原。Nitrocellulose membrane 上有兩條呈色線，Sample line 上已吸附 Rabbit anti-*L. pneumophila* serogroup 1 antibody，而 Control line 上吸附有 Goat anti-rabbit IgG。Sample line 上的 Rabbit anti-*L. pneumophila* serogroup 1 antibody 與可見粒子結合，乾燥後嵌入纖維支撐物中，由此 Conjugate pad 及 Striped membrane 構成整個測試條；測試條與檢體棉纖插入孔分別位於測試片的兩側。操作時，將棉纖放入尿液檢體中沾溼，插入測試片孔中，滴入試劑 A，黏上測試片後，檢體與測試條接觸，抗原被固定不動的抗體抓住後與 conjugated antibody 結合，同時固定不動的 Goat anti-rabbit IgG 也與 Visualizing conjugate 作用而形成 Control line。檢體中抗原量愈多陽性結果出現愈快。

5 試劑耗材

5.1 嗜肺退伍軍人病尿液抗原快速檢驗試劑套組 (now *Legionella* urinary antigen test kit)：Binax, Inc., USA。

5.1.1 Test devices：為覆有 Rabbit anti-*L. pneumophila* serogroup 1 antibody 以及 Goat anti-rabbit IgG 的薄膜。

5.1.2 試劑 A：Citrate/phosphate 含 Tween 20 及 Azide。

5.1.3 Swabs：專為此檢驗試劑設計的棉纖，不可用其他棉纖代替。

5.1.4 Positive control：含加熱去活化的 *L. pneumophila* serogroup 1 陽性吸取液體乾燥棉纖。

5.1.5 Negative control：含加熱去活化的正常人吸取液體乾燥棉纖。

5.2 乳膠或 PVC 手套。

5.3 計時器。

6 儀器設備

6.1 離心機。

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (RIMA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 617 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

8 檢體採集

取中段尿 10 mL 裝於無菌容器中冷藏。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/113111593271.pdf>。

9 檢體運送及保存

低溫運送。於 2-8°C 可保存 14 天，-20°C 可保存更久。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/113111593271.pdf>。

10 檢驗步驟

- 10.1 測試前檢體須回溫至室溫。尿液若有混濁需離心後取上清液使用。
- 10.2 將測試片外包裝剪開，取出測試片。
- 10.3 將棉纖伸入尿液檢體中，沾取尿液，在管壁輕輕擠壓掉多餘之液體。
- 10.4 右半邊測試片上有兩個孔洞，依箭頭指示將棉纖自下方的孔洞插入，向上推入至棉纖頂端進入上方孔洞中頂端位置。
- 10.5 自下方孔洞中垂直滴入 2 滴試劑 A 於棉纖上。
- 10.6 撕下右邊邊緣的貼紙，將測試片左右片粘住，放置 15 分鐘，觀察結果。

11 廢棄物處理

- 11.1 剩餘檢體置 -20°C 冷凍保存。
- 11.2 檢驗完畢，棉棒及測試片以滅菌袋裝妥密封，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。。

12 結果判定

- 12.1 視窗中只有標示 control 的位置出現一條粉紅色線條時，表示此次檢驗操作正確，但是未偵測到嗜肺退伍軍人菌 Serogroup 1 抗原。
- 12.2 視窗中出現兩條粉紅色線條，一條在 Control 位置，一條 Sample 位置，表示已測得嗜肺退伍軍人菌 Serogroup 1 抗原。含量較低的檢體可能在 Sample line 出現淡淡的紅線，任何可見的線條皆算陽性。若有需要，可用別種方法再測一次。
- 12.3 報告內容：
符合陽性判定標準，嗜肺退伍軍人菌尿液抗原第一型陽性。
符合陰性判定標準，嗜肺退伍軍人菌尿液抗原第一型陰性。
- 12.4 結果登錄：檢驗人員於完成檢驗後，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果”欄，並於檢體送驗單背面加蓋檢驗者職章，送實驗室主管審核及蓋章，並上網登錄於傳染病通報系統。
- 12.5 注意事項
 - 12.5.1 只可使用試劑所附的棉纖，不可使用其他棉纖。
 - 12.5.2 Binax now *Legionella* urinary antigen test 只可用於測定尿液中的抗原，不適用於其他檢體，如血清、血漿及其他環境檢體。
 - 12.5.3 Control 位置未出現線條時表示檢驗結果無效。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (RIMA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 618 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 12.5.4 此檢查不能用以診斷由 *L. pneumophila* 其他血清型或 *Legionella* spp. 引起的感染。抗原檢查陰性亦不能排除 *L. pneumophila* serogroup 1 感染的可能性。
- 12.5.5 尿液中 *Legionella* 抗原的分泌因人而異，可能早在發病後第三天出現，也可能持續一年，因此尿液抗原陽性可能發生於現在或過去感染，也正因為如此，本項檢查並無法做確認診斷。
- 12.5.6 本試劑靈敏度 95%，特異性 95%。

13 品質管制

使用試劑所附之陽性對照棉纖及陰性對照棉纖做測試，陽性棉纖測試結果應有兩條粉紅色線條，一條在 Control 位置，一條在 Sample 位置。陰性對照棉纖測試結果應只有一條粉紅色線條在 Control 位置。若結果不符則此試劑不可再用。

14 參考資料

- 14.1 Binax. now Legionella urinary antigen Test 操作說明書。
- 14.2 Kohler RB. 1988. Antigen detection for the rapid diagnosis of Mycoplasma and *Legionella pneumophila*. Diagn Microbiol Infect Dis 4: 47S-59S.
- 14.3 Tilton RC. 1979. Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Ann Intern Med 90: 697-698.
- 14.4 Kohler RB, Zimmerman SE, Wilson E, Allen SD, Edelstein PH, Wheat LJ, White A. 1981. Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease. Ann Intern Med 94: 601-605.

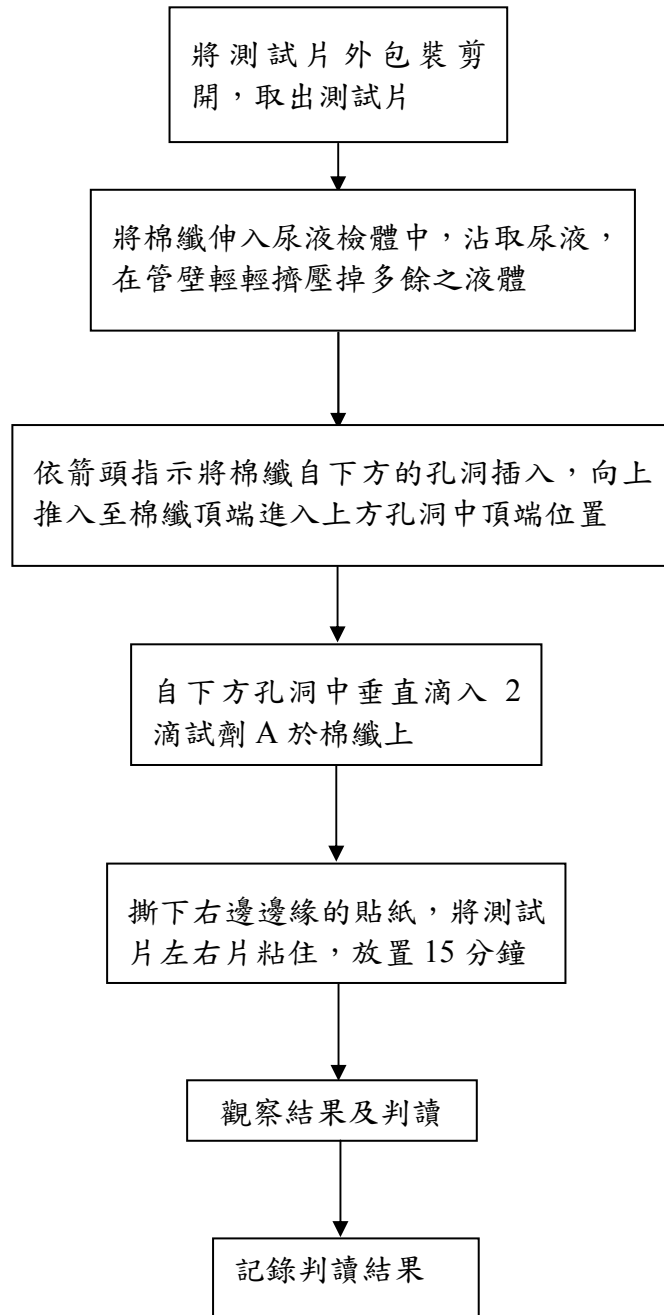
15 附錄

- 15.1 嗜肺退伍軍人菌抗原試驗（快速免疫呈色膜法）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：	嗜肺退伍軍人菌抗原檢測 (RIMA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 619 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 嗜肺退伍軍人菌抗原試驗（快速免疫呈色膜法）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：	嗜肺退伍軍人菌抗體檢測 (IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 620 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用間接螢光抗體試驗法 (Indirect Fluorescent Antibody test, IFA) 檢測病人血清中 anti-*Legionella pneumophila* 抗體效價。

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

檢體血清經過兩倍序列稀釋後，加入已披覆 *L. pneumophila* 的玻璃片中，經 37°C 保溫反應後，洗去未吸附的血清，再加入螢光標幟抗體，又經 37°C 保溫反應後，洗去未吸附的螢光標幟抗體，在螢光顯微鏡下觀察結果。若有典型菌體螢光反應，則表示血清中含有 *L. pneumophila* 的抗體，並由稀釋終點判定其抗體效價。

5 試劑耗材

5.1 *Legionella* Indirect Fluorescent Antibody (IFA) test system: Zeus scientific Inc., USA。

5.1.1. *L. pneumophila* substrate slides: 立即可用，保存於 -20°C，開啟前需回至室溫。解凍後玻片應當天用完，開啟後不可再放回冷凍。

5.1.2. 陽性對照血清 *L. pneumophila* positive control serum (monkey): 依照瓶子標示加入蒸餾水溶解，使力價在 1:128，2-8°C 保存 90 天，-20°C 以下可保存一年。效價標示於瓶子上。註：因人抗血清取得不易，故以猴抗血清代替人抗血清，其與 anti-human FA conjugate 反應情形與人抗血清力價相當。

5.1.3. 陰性對照血清 *L. pneumophila* negative control serum (human): 依照瓶子標示加入蒸餾水溶解，2-8°C 保存 90 天，-20°C 以下可保存一年。

5.1.4. 多價螢光抗體共軛物 (FITC-polyvalent conjugate): 標幟 FITC 的山羊抗人類免疫球蛋白 (goat anti-human globulin-IgG、IgA、IgM)，含 1.25% Bovine albumin，冷凍乾燥品。加入 2 mL 蒸餾水溶解，溶解後 2-8°C 保存 90 天，-20°C 以下保存 6 個月，解凍後勿再冰凍。

5.1.5. 磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffered saline, PBS): 每包含 10 g，加入 1 L 蒸餾水溶解，保存於 2-8°C，可保存 30 天，PBS 粉末保存於 2-25°C。

5.1.6. 封片膠 (mounting medium): 含 3 mL Buffered glycerol，2-8°C 保存至有效期限。

5.2 乳膠或 PVC 手套。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	嗜肺退伍軍人菌抗體檢測 (IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 621 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.3 無菌吸管：3 mL。
- 5.4 檢體貯存小瓶及放置架。
- 5.5 無菌去離子水。
- 5.6 微量吸管尖：100 μ L。
- 5.7 96 孔 U 型微量滴定盤。
- 5.8 十二頻道儲液槽。
- 5.9 玻璃染缸。
- 5.10 標示筆。
- 5.11 貯液瓶：1 L。
- 5.12 計時器。
- 5.13 尖頭洗瓶。
- 5.14 溼潤盒。
- 5.15 蓋玻片：24 x 60 mm。

6 儀器設備

- 6.1 離心機。
- 6.2 微量吸管 (micropipette)：100 μ L。
- 6.3 十二頻道微量吸管 (multi-channel pipette)：100 μ L。
- 6.4 37°C 溫箱。
- 6.5 螢光顯微鏡：能放大至 400 倍。

7 環境與設施安全

血清檢體之處理應於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內進行。其餘操作過程則不限定。

8 檢體採集

- 8.1 無菌真空採血步驟新鮮採檢正確保存之血清，不可添加抗凝劑或防腐劑，且避免溶血、脂血或細菌污染。
- 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/113111593271.pdf>。

9 檢體的運送及保存

- 9.1 低溫運送。室溫可保存 8 小時，2-8°C 可保存 48 小時，長時間保存宜存放 -20°C 以下，並避免來回解凍及冷凍。
- 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/113111593271.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 檢驗前處理

若送檢檢體為血液，則檢體先以 1,500 rpm 離心 30 分鐘，用無菌吸管抽取血清部份置於檢體貯存小瓶中，並加以標示。

- 10.2 取出所需之玻片 (*L. pneumophila* substrate slides) 及試劑回溫。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	嗜肺退伍軍人菌抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 622 頁/共 1091 頁	(IFA)	修訂日期： 年 月 日

- 10.3 取 U 型 96 孔微量滴定盤，標示盤號及檢體號碼，陽性對照血清及每個血清檢體須要一排 8 孔洞 (A-H)，作為 2 倍序列連續稀釋用。
- 10.4 以十二頻道微量吸管依檢體數量加各 50 μ L PBS 於微量滴定盤孔洞中。
- 10.5 將陽性對照血清或者病人血清 50 μ L 加入第一格孔洞中，以 PBS 做連續稀釋自 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128 至 1:256。以 12 頻道微量吸管自第一格孔洞中連續上下吸放 20 次混合，最後吸取 50 μ L 稀釋血清至下一格孔洞中，連續上下吸放混合後 2 倍序列稀釋至 1:256。
- 10.6 剪開已回溫之玻片包裝袋，取出玻片，標示檢體號碼。
- 10.7 以微量吸管加 1:128 及 1:256 稀釋之血清 15 μ L 到玻片圈孔中，同時作 1:128 稀釋之陽性對照血清及不稀釋之陰性對照血清，注意不同血清不可混合，玻片放入濕潤盒中，於 37°C 溫箱內反應 30 分鐘。
- 10.8 取出玻片用 PBS 輕輕沖洗，放入 PBS 中浸泡 10 分鐘，利用尖頭洗瓶裝蒸餾水沖洗去 PBS，自然風乾。
- 10.9 玻片每圈孔各加 10 μ L 多價螢光抗體共軛物。
- 10.10 玻片放入濕潤盒中，於 37°C 溫箱內反應 30 分鐘。
- 10.11 取出玻片用 PBS 輕輕沖洗，放入 PBS 中浸泡 10 分鐘，蒸餾水沖去 PBS，自然風乾。
- 10.12 加 2-3 滴 Mounting medium，蓋上蓋玻片，用螢光顯微鏡鏡檢，先用 20 倍物鏡觀察，再以 40 倍物鏡觀察之。

11 結果判定

- 11.1 血清抗體效價判定判讀標準
 - 11.1.1 4+：菌體呈耀眼黃綠螢光。
 - 11.1.2 3+：明亮黃綠螢光。
 - 11.1.3 2+：明確但微暗螢光。
 - 11.1.4 1+：一點點螢光。
 - 11.1.5 Neg：無黃綠色反應，但有可能出現黃棕色反應。
只要出現 1+ 反應就可判為陽性，並以出現陽性之最高稀釋濃度為抗體力價。例如稀釋倍數為 1:512，則力價=512。
- 11.2 病人陽性判定標準：發病初期與恢復期血清抗體力價有 4 倍以上差距，且最高力價等於或大於 128 以上。
- 11.3 病人陰性判定標準：發病初期與恢復期血清抗體力價無 4 倍以上差距，或最高力價小於 128。
- 11.4 若恢復期血清抗體力價大於或等於 128，且發病期血清抗體力價未達 128，則應取出前後二次血清一起做抗體力價測定，以確認其血清抗體力價上升情形，是否有 4 倍以上差距。
- 11.5 力價大於 256 者則視需要再做更高倍數之稀釋及測定。
- 11.6 報告核發：

退伍軍人病血清陽性：符合陽性判定標準之血清。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	嗜肺退伍軍人菌抗體檢測 (IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 623 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

退伍軍人病血清陰性：符合陰性判定標準之血清。

未確定，需再採檢：發病初期血清 IFA < 128 或 IFA = 128 或 IFA > 128，無法一次判定者。

- 11.7 結果登錄：檢驗人員於完成檢驗後，將檢驗結果登錄於嗜肺退伍軍人菌抗體試驗（間接螢光抗體法）檢驗紀錄表，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果”欄，並於檢體送驗單背面加蓋檢驗者職章，送實驗室主管審核及蓋章，並上網登錄於傳染病通報系統。

12 品質管制

每一次操作此檢驗，必須同時做陰性及陽性對照。陰性對照血清結果必須陰性，陽性對照血清結果必須陽性，若陽性血清與陰性血清實驗結果與標準不符，則此實驗結果不能採用，須再重做。

13 廢棄物處理

- 13.1 剩餘檢體置-20°C 冷凍保存，試劑用後立刻放回 4°C 冰箱保存。
13.2 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 Zeus Scientific, Inc.。 *Legionella* indirect fluorescent antibody (IFA) test system 操作說明書。
14.2 Chen MSG, Yang YR, Shen HD. 1983. *Legionella pneumophila* antibodies as detected by IFA. Proc. NSC 7: 249-254.
14.3 McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. 1977. Legionnaires' disease. Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory diseases. New Engl J Med 297: 1197-1203.

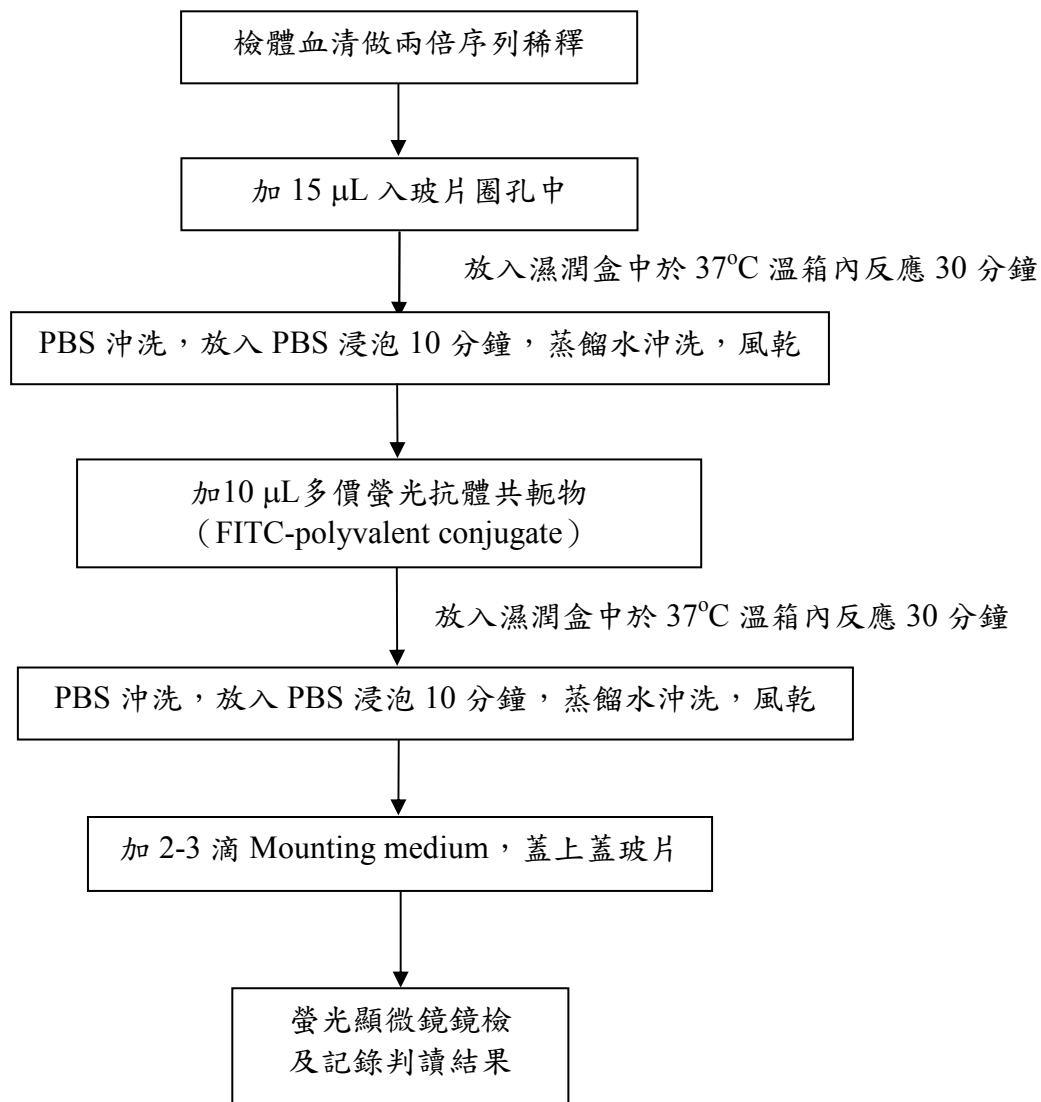
15 附錄

- 15.1 嗜肺退伍軍人菌抗體試驗（間接免疫螢光抗體法）流程圖。
15.2 嗜肺退伍軍人菌抗體試驗（間接免疫螢光抗體法）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：	嗜肺退伍軍人菌抗體檢測 (IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 624 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 退伍軍人菌抗體試驗（間接螢光抗體法）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：	嗜肺退伍軍人菌抗體檢測 (IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 625 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 嗜肺退伍軍人菌抗體試驗（間接螢光抗體法）紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心 嗜肺退伍軍人菌血清抗體試驗紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

玻片#	1	2	3	4
IFA 倍數 結果判定				
檢體姓名				
編號				
送驗日期				
備註				
	8	7	6	5
IFA 倍數 結果判定				
檢體姓名				
編號				
送驗日期				
備註				

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：	退伍軍人菌抗原檢測 (LATEX)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 626 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用乳膠凝集試驗法篩檢病患檢體或環境分離之疑似菌株是否為退伍軍人菌種。

2 適用檢體種類

適用人體及環境分離菌株。

3 名詞解釋

乳膠凝集試驗 (latex agglutination)：首先將抗體與乳膠顆粒結合，若檢體中含有專一性抗原將會交叉聯結而產生凝集反應。

4 原理概述

已吸附抗體的藍色乳膠粒子會與特定的退伍軍人菌細胞壁抗原作用產生肉眼可見的凝集現象，藉此原理為病原性退伍軍人菌提供簡單而快速的篩檢。

5 試劑耗材

5.1 退伍軍人菌乳膠凝集試驗試劑組 (*Legionella* latex agglutination test Kit：Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, England)。

5.1.1 *L. pneumophila* serogroup 1 test reagent：含接有兔子抗 *L. pneumophila* serogroup 1 antigen 抗體的藍色乳膠粒子。

5.1.2 *L. pneumophila* serogroup 2-14 test reagent：含接有兔子抗 *L. pneumophila* serogroup 2-14 antigen 抗體的藍色乳膠粒子。

5.1.3 *Legionella* species test reagent：含接有兔子抗下列 *Legionella* species 及 Serotypes 抗體的藍色乳膠粒子，包括

(1) *L. longbeachae* 1 and 2。

(2) *L. bozemanii* 1 and 2。

(3) *L. dumoffii*。

(4) *L. gormanii*。

(5) *L. jordanis*。

(6) *L. micdadei*。

(7) *L. anisa*。

5.1.4 Positive control suspension (陽性對照菌液)：含有多種 *Legionella* 的菌液。

5.1.5 Negative control suspension (陰性對照菌液)：含有 *L. spiritensis* 的菌液，不與試劑反應。

5.1.6 Control latex：含接有不反應兔免疫球蛋白的藍色乳膠粒子。

5.1.7 Suspension buffer：磷酸鹽緩衝溶液，pH 7.3。

5.1.8 Reaction cards：供反應用紙卡。

5.1.9 試劑保存於 2-8°C，不可冷凍。

5.2 0.85% saline。

5.3 小試管或微量離心管。

5.4 微量吸管尖：1,000 µL。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	退伍軍人菌抗原檢測 (LATEX)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 627 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

5.5 接種針（環）。

5.6 消毒水（例如 sodium hypochlorite solution >1.3% W/V）。

5.7 乳膠或 PVC 手套。

6 儀器設備

6.1 無菌操作台或生物安全櫃。

6.2 本生燈。

6.3 1,000 µL 微量吸管。

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

從臨床檢體及環境檢體經過退伍軍人菌篩選培養基培養，並經 L-cysteine 需求陽性確認之革蘭氏陰性桿菌菌株。

9 檢體運送及保存

無。

10 檢驗步驟

10.1 取出 latex 試劑回室溫。將四瓶 latex 懸浮液劇烈振盪充份混合均勻。

10.2 在凝集試驗紙之四個圓圈內一角各滴一滴 Latex reagent（四瓶分滴四個圓圈中）。

10.3 在四個圓圈中另一角各加入一滴 Suspension buffer，注意不要碰到 latex reagent。

10.4 使用接種環挑出可疑菌落（至少 1 mm，若菌落太小則 2 個或多個）各與 Suspension buffer 混合均勻。若待檢測之分離株為絲狀且粘稠，則以接種環挑選 4-10 個相似菌株，置入含 0.4 mL 0.85% Saline 試管（或微量離心管）中與 Saline 混合均勻。以振盪器劇烈混合 5 秒鐘後取 1 滴使用（不必再加 suspension buffer）。

10.5 用接種環或牙籤將圓圈內兩種液體混合均勻，塗佈於整個圓圈內。

10.6 將試驗紙以圓形旋轉方式輕輕搖勻 1 分鐘。

10.7 觀察凝集結果以判定血清型別。若藍色乳膠粒子在 1 分鐘內凝集，且對照（control latex）的圓圈內無凝集反應即判為陽性，陽性結果表示所偵測的菌落含有該種血清型抗原。若藍色乳膠粒子在 1 分鐘以上仍沒有凝集反應，且維持均勻藍色懸浮液，即判為陰性。

10.8 實驗完畢後將反應卡片丟入適當的消毒水中。

10.9 將試劑的蓋子蓋好，並放回冰箱中保存。

11 廢棄物處理

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	退伍軍人菌抗原檢測 (LATEX)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 628 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12 結果判定

- 12.1 檢體在 1 分鐘內產生凝集反應，且陰性對照沒有凝集反應者為陽性；
檢體在 1 分鐘以上仍無凝集反應且維持均勻之藍色懸浮液則為陰性。
- 12.2 若 Control latex 產生凝集現象，則表示此菌會造成自我凝集，反應結果無法判定。可以使用其他方法（例如 DFA）再做進一步檢驗。
- 12.3 若有粒狀或絲狀反應，則陽性判定以反應試劑的藍色背景可以見到明顯清澈為標準。
- 12.4 報告內容：檢驗結果匯入退伍軍人菌之分離與鑑定，不另發報告。
- 12.5 注意事項
 - 12.5.1 試劑使用時不可以讓瓶口接觸到檢體，以避免造成污染。使用後要蓋好瓶蓋，存放冰箱中。
 - 12.5.2 本實驗只用來分辨退伍軍人菌不同的血清型群別。除了嗜肺退伍軍人菌血清第一型外，無法區分其他的個別血清型別以及非嗜肺退伍軍人菌種。需使用退伍軍人菌直接螢光抗體檢驗法（Direct Fluorescent Antibody test, DFA）來做更進一步的菌種確認。
 - 12.5.3 陰性反應只表示所測試菌株非 *L. pneumophila* serogroup 1、*L. pneumophila* serogroups 2-14、*L. longbeachae* 1 and 2、*L. bozemanii* 1 and 2、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、*L. jordanis*、*L. micdadei* 和 *L. anisa*。不代表一定不是 *Legionella* species。
 - 12.5.4 *L. pneumophila* serogroup 1 與 *L. pneumophila* serogroup 9 可能產生交叉反應；如果 *L. pneumophila* serogroup 1 及 2-14 試劑都有凝集現象，則應考慮此交叉反應的可能性。
 - 12.5.5 已知偶而會產生交叉反應的 *Legionella* 菌株有 *L. parisiensis*、*L. Sainthelensi*、*L. steigerwaltii*、*L. tusconensis*、*L. gratiana* 和 *L. cincinnatiensis*。
 - 12.5.6 本試劑特異性達 100%，靈敏度 99%。

13 品質管制

品管試驗須在例行檢驗之前進行：陽性對照菌液必須在 1 分鐘內產生凝集反應；陰性對照菌液在 1 分鐘內必須不可以有凝集反應。若品管結果不符則該試劑不可再使用。

14 參考資料

Oxoid。 *Legionella* latex test 操作說明書。

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：	退伍軍人菌抗原檢測 (DFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 629 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用直接螢光抗體試驗法 (Direct Fluorescent Antibody test, DFA) 偵測病患檢體及環境檢體中分離的退伍軍人菌株。

2 適用檢體種類

人體及環境分離菌株。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

抗原先固定於玻片上，再加入少量與抗原有專一性之 FITC 抗體，抗原會與抗體結合，形成抗原-抗體複合體，在螢光顯微鏡下，可見到亮黃綠色桿狀的退伍軍人菌，藉此原理為病原性退伍軍人菌提供簡單而快速的確認。

5 試劑耗材

5.1 直接螢光抗體檢驗試劑 (Direct Fluorescent Antibody test, DFA)：Zeus Scientific, Inc., USA。

5.1.1 FITC 標定，對 *Legionella pneumophila* 有專一性之單一及多價抗體 (含有以 PBS 稀釋之伊文斯藍[Evans Blue]，來自以管上標定之 *Legionella* 種類注射而獲得免疫之兔血清)：稀釋液中含有之伊文斯藍染劑可以幫助於組織切片及痰檢體中，退伍軍人菌的辨識。此抗體已為最佳使用條件，使用時不須再稀釋。抗體以 2 mL 小瓶包裝，經冷凍乾燥，呈粉末狀。以 2 mL，pH 7.6 之 PBS 溶液加以溶解後即可使用。註：單一抗體含嗜肺退伍軍人菌血清型第一型至第六型及 *L.micddedia* 等七種抗血清，多價抗體為以上七種抗體之混合。

5.1.2 FITC 標定，*Legionella* 陰性對照組抗體 (含有以 PBS, pH 7.6 稀釋之伊文斯藍[Evans Blue]，來自正常兔血清)：抗體以 2 mL 小瓶包裝，經冷凍乾燥，呈粉末狀。以 2 mL，pH 7.6 之 PBS 溶液加以溶解後即可使用。一旦以 pH 7.6 之 PBS 溶液溶解後，於 2-8°C 可以穩定保存 90 天，如事先予以分裝並保存於 -20°C，甚至更低的溫度，則可以穩定保存達 6 個月。避免重複冷凍-解凍的步驟，因為抗體之活性會被破壞。

5.1.3 *Legionella* 對照組抗原。經人工培養，再以福馬林滅菌之 *Legionella* 對照組抗原 (溶於含有福馬林之 PBS)：此抗原已為最佳使用條件。以 1 mL 小瓶包裝，同時含有 0.02% 之 Sodium Azide 作為保存劑。保存於 2-8°C。

5.1.4 磷酸鹽緩衝溶液 (Phosphate-Buffered-Saline, PBS)，pH 7.6：每包含有 10 g，可配製成 1 L 之溶液。袋上標有保存期限。包裝袋

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	退伍軍人菌抗原檢測 (DFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 630 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

保存於 2-25°C，至有效期限內均可保證其品質。一旦配製成溶液後，可於 2-8°C 穩定保存 30 天。

5.1.5 甘油緩衝液封片膠 (buffered glycerol, mounting media), pH 9.0 : 3 mL 瓶裝。保存於 2-8°C。

5.2 直接螢光抗體檢驗試劑 (Direct Fluorescent Antibody test, DFA) : m-TECH, Monoclonal Technologies, Inc., USA。

單一抗體共軛物 (monovalent conjugate) 及多價抗體共軛物 (polyvalent conjugate)，稀釋於含有 0.1% BSA、Evans Blue 及 0.01% Thimerosal 之 PBS 中，每瓶 2 mL，可直接使用。註：單一抗體含嗜肺退伍軍人菌血清型第一型至第十五型共十五種抗體，及其他非嗜肺退伍軍人菌種等十九種抗體。多價抗體有二種：一種是嗜肺退伍軍人菌的抗體混合，另一種是非嗜肺退伍軍人菌的抗體混合。

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

5.4 滅菌蒸餾水。

5.5 1%中性福馬林 (neutral formalin)。

5.6 無菌微量吸管尖 (tip) : 1,000 μ L、200 μ L 與 10 μ L。

5.7 無菌離心管：1.5 mL。

5.8 玻片及蓋玻片 (60 x 24 mm)：螢光染色專用。

5.9 染色缸。

5.10 接種針 (環)。

5.11 乳膠或 PVC 手套。

6 儀器設備

6.1 生物安全櫃。

6.2 本生燈。

6.3 微量吸管 Pipetman：1,000 μ L、200 μ L、20 μ L。

6.4 螢光顯微鏡：能放大至 400 倍。

7 環境與設施安全

抹片製作需於生物安全櫃中製備，其餘操作過程則不限定。

8 檢體採集

從臨床檢體及環境檢體經過退伍軍人菌篩選培養基培養並經 L-cysteine 需求陽性確認之菌株。

9 檢體運送及保存

無。

10 檢驗步驟

10.1 抹片製作 (培養分離之菌株)。

10.1.1 將48小時培養菌加在1%中性福馬林中，製成濃度為McFarland no.1的懸浮液 (約 3×10^8 CFU/mL)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	退伍軍人菌抗原檢測 (DFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 631 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.1.2 螢光染色專用的玻片上每個圓圈中滴入菌液。

10.1.3 吸去多餘菌液，自然風乾。

10.1.4 過火固定。

10.2 螢光抗體染色

先以多價抗體及陰性對照組抗體進行檢體之篩選。再以合適之單一抗體檢驗以多價抗體篩選為陽性反應，同時陰性對照組抗體篩選為陰性反應之檢體。

10.2.1 製備對照組抗原：將對照組抗原劇烈搖晃混勻後，滴於螢光染色專用的玻片圓圈內，吸去多餘抗原，自然風乾，過火三次固定。可與檢體或菌株抹片同時製作。

10.2.2 將相同之多價抗體共軛物 (polyvalent conjugate) 或單一抗體共軛物 (monovalent conjugate) 滴至每個檢體及相對應之對照組抗原，每個檢體都要做一個陰性對照 (將陰性對照組抗體共軛物滴至檢體)。

10.2.3 放入濕潤盒中於室溫染色作用20分鐘，注意不同專一性抗體不可混淆。

10.2.4 取出玻片輕敲除去多餘之抗體，用PBS輕輕沖洗，放入PBS中浸泡10分鐘。

10.2.5 用蒸餾水沖洗，風乾。

10.2.6 加一滴Mounting medium，蓋上蓋玻片，圓圈中避免有氣泡產生，以免防礙鏡檢。

10.2.7 以螢光顯微鏡 (Nikon, Model UFX-IIA) 鏡檢，先用低倍 (10X) 物鏡選擇可見到病原體之視野，再轉至高倍 (40X) 物鏡進行快速篩檢。

11 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。

12 結果判定

12.1 由鏡檢中可見到退伍軍人菌為單一桿狀，或是周圍有強烈染色但是中心為黑色之絲狀物，可再以 1,000X 油鏡確認結果。

觀察到病原體細胞壁之螢光染色強度

強度	細胞壁之染色定義
4+	細菌被染上非常耀眼之黃綠色
3+	亮黃綠色
2+	可觀察到，但是有點模糊之染色
1+	可觀察到，但是很微弱之染色
—	沒有任何細胞出現黃綠色，但是可能出現黃褐色之背景值

12.2 培養分離之細菌結果如呈現典型之形狀，同時出現非常亮之螢光 (3+~4+)，則認定為陽性結果。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	退伍軍人菌抗原檢測 (DFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 632 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12.3 判定標準：

符合陽性判定標準，判為退伍軍人菌陽性。

不符合陽性判定標準，判為退伍軍人菌陰性。

檢驗結果匯入退伍軍人菌之分離與鑑定，不另發報告。

12.4 注意事項

12.4.1 每個檢體都應該要同時進行陰性對照組，如此才能確定陽性結果確實具有血清學上之專一性。

12.4.2 勿二度冷凍/解凍任何試劑及檢體。重複的冷凍/解凍會破壞抗體活性。也請勿使用會自動除霜之冰箱保存檢體及試劑。

13 品質管制

13.1 對照組抗原主要是用來鑑定抗體是否保有良好的品質。任何一種對照組抗原，以同種抗體染色後，都應該出現4+強度之染色結果，如果無法得到此結果，該次檢驗即不具有任何效力。

13.2 每個檢體都應該要同時進行陰性對照組，如此才能確定陽性結果確實具有血清學上之專一性。

13.3 如有需要，也可以同時進行其他種類之對照組。

14 參考資料

14.1 Zeus Scientific, Inc. Legionella DFA Test System 操作手冊。

14.2 Cherry WB, Pittman B, Harris PP, Hebert GA, Thomason BM, Thacker L, Weaver RE. 1978. Detection of Legionnaires' disease bacteria by direct immunofluorescent staining. J Clin Microbiol 8: 329-338.

14.3 McKinney RM, Thacker L, Harris PP, Lewallen KR, Hebert GA, Edelstein PH, Thomason BM. 1978. Four Serogroups of Legionnaires' disease bacteria defined by direct immunofluorescence. Ann Intern Med 90: 621-624.

14.4 McKinney RM, Wilkinson HW, Sommers HM, Fikes BJ, Sasseville KR, Youngbluth MM, and Wolf JS. 1980. Legionella pneumophila serogroup: Six Isolation from cases of Legionellosis identification by immunofluorescent staining and immunologic response to infection. J Clin Microbiol 12: 395-401.

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： 頁次：第 633 頁/共 1091 頁	水中退伍軍人菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用微生物的分離培養檢查醫院環境水中是否有退伍軍人菌，並加以鑑定。

2 適用檢體種類

適用醫院環境水檢體。

3 解釋名詞

無。

4 原理概述

以含 yeast extract、charcoal、iron、L-cysteine 及抗生素的特定培養基分離退伍軍人菌後，利用菌落形態、生理特徵、生化特性、乳膠凝集試驗、直接螢光抗體試驗及分子生物學試驗等方法鑑定。

5 試劑耗材

5.1 檢體酸處理劑及中和劑

5.1.1 HCl-KCl 酸處理劑

稱量 7.46 g KCl 溶於 500 mL 蒸餾水中成 0.2 M KCl，以 0.2 M HCl 調整 pH 值至 2.0。

5.1.2 KOH 中和劑（退伍軍人菌對鈉敏感，不可用 NaOH 為中和劑）

稱 1.123 g KOH 溶於 100 mL 蒸餾水成 0.1 N KOH，取 50 mL 0.1 N KOH 加 500 mL 蒸餾水混合均勻，以 0.1 N KOH 或蒸餾水調整此稀釋 KOH 溶液的 pH 值，使其當與 HCl-KCl 酸處理劑以 1：1 體積混合時 pH 值恰好等於 6.9。

5.1.3 將以上兩種溶液以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。

5.2 2 N KOH，自行配製 BCYE 培養基時製備。

稱 22.44 g KOH 於 250 mL 血清瓶中，加蒸餾水至約 180 mL，溶解混合均勻後倒入量筒中，以蒸餾水補至 200 mL，倒回血清瓶中，以 121°C 滅菌 15 分鐘後使用。

5.3 1 N HCl，裝血清瓶中，滅菌後使用。

5.4 BCYE w/ L-cystein 培養基（Buffered Charcoal Yeast Extract Agar 含 L-cysteine（半胱氨酸））：可購買通過 IVD-GMP 之商品化產品，或自行製備。

5.4.1 配方：每 1 L 含量

Yeast Extract	10.0 g
Charcoal	1.5 g
ACES Buffer	10.0 g
Ferric Pyrophosphate	0.25 g
Alpha-Ketoglutarate	1.0 g
Agar	15.0 g
L-cysteine	0.4 g

5.4.2 配製 500 mL：使用 1 L 錐形瓶，稱取 19.0 g BCYE Agar Base (REMEL Inc., USA)，以 500 mL 量筒量取 485 mL 蒸餾水加入，

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 634 頁/共 1091 頁	水中退伍軍人菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

放入一粒中型磁力攪拌子，以加熱電磁攪拌器加熱攪拌使粉末完全溶解，並加入 10 mL 2 N KOH 使 pH 約在 6.9 附近，於高壓滅菌鍋 121°C 滅菌 15 分鐘，置於 50°C 水浴槽冷卻至 50°C，加入已經先以無菌蒸餾水溶解之 L-cysteine growth supplement tab (含 0.2 g L-cysteine-HCl: MAST Group Ltd., UK)，以攪拌子充份混合均勻後，以 10 mL 無菌吸管吸取 10 mL 培養基置入 50 mL 小燒杯中測 pH 值 (溫度 sensor 需一起測，測過的培養基已不是無菌，丟棄之，不要倒回原瓶)，以 2 N KOH 或 1 N HCl 調整為 pH 6.90 ± 0.05 ，倒平板，90 mm 內徑培養皿倒 20 mL，高度約 0.3 cm。靜置待凝固後將培養皿翻面，隔夜在培養皿上標示培養基種類、製作日期及保存期限 (三個月)，裝入塑膠袋中並束緊袋口，保存於 4°C 冰箱。

- 5.5 BCYE w/o L-cysteine 培養基 (BCYE 不含 L-cysteine)：可購買通過 IVD-GMP 之商品化產品，或自行製備。製備 500 mL 方法如 5.4，但是不加 L-cysteine，亦可使用血液平板培養基取代。
- 5.6 血液平板培養基 (BAP, Blood Agar Plate)：通過 IVD-GMP 之商品化產品。
- 5.7 MWY 選擇性培養基 (BCYE 含 L-cysteine、Polymyxin B、Amphotericin B、Vancomycin 及染料)：可購買通過 IVD-GMP 之商品化產品，或自行製備。製備 500 mL 方法如 5.4，加入 L-cysteine 時，也加入已經先以無菌蒸餾水溶解之 MWY supplement (MAST, UK)，最終濃度為 Polymyxin B 50,000 IU/L、Amphotericin B 8.0 mg/L、Vancomycin 1 mg/L、Bromocresol purple 10 mg/L、Bromothymol blue 10 mg/L 及 Glycine 3.0 g/L。
- 5.8 DGVP 選擇性培養基 (BCYE 含 L-cysteine、染料、Glycine、Vancomycin 及 Polymyxin B)：可購買通過 IVD-GMP 之商品化產品，或自行製備。製備 500 mL 方法如 5.4，加入 L-cysteine 時，也加入已經先以無菌蒸餾水溶解之 DGVP supplement (市售商品化抗生素添加劑)，最終濃度為 Bromocresol purple 10 mg/L、Bromothymol blue 10 mg/L、Glycine 3.0 g/L、Vancomycin 1 mg/L 及 Polymyxin B 50,000 IU/L。
- 5.9 CCVC 選擇性培養基 (BCYE 含 L-cysteine、Cycloheximide、Colistin、Vancomycin 及 Cephalothin)：可購買通過 IVD-GMP 之商品化產品，或自行製備。製備 500 mL 方法如 5.4，加入 L-cysteine 時，也加入已經先以無菌蒸餾水溶解之 CCVC supplement (市售商品化抗生素添加劑)，最終濃度為 Cycloheximide 80.0 mg/L、Colistin 16.0 mg/L、Vancomycin 0.5 mg/L 及 Cephalothin 4.0 mg/L。
- 5.10 GVPC 選擇性培養基 (BCYE 含 L-cysteine、Glycine、Vancomycin、Polymyxin B 及 Cycloheximide)：可購買通過 IVD-GMP 之商品化產品，或自行製備。製備 500 mL 方法如 5.4，加入 L-cysteine 時，也加入已經先以無菌蒸餾水溶解之 GVPC supplement (市售商品化抗生素添加劑)，最終濃度為 Glycine 3.0 g/L、Vancomycin 1 mg/L、Polymyxin B 80,000 IU/L 及 Cycloheximide 80 mg/L。

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 635 頁/共 1091 頁	水中退伍軍人菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

- 5.11 革蘭氏染色染劑組 (Gram stain set)：武藤化學，日本或 DIFCO，USA。
含有 Crystal Violet、Gram Iodine、Decolorizer 及 Carbol-fuchsin 四劑。
- 5.12 馬克法藍氏濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)。
- 5.13 退伍軍人菌乳膠凝集試驗試劑 (Legionella Latex Agglutination Test)：
Oxoid Limited，England。
- 5.14 退伍軍人菌直接螢光抗體檢驗試劑 (Direct Fluorescent Antibody Test, DFA)：Zeus Scientific, Inc., USA。m-TECH, Monoclonal Technologies, Inc., USA。
- 5.15 品質管制菌種：*Legionella pneumophila* 標準株 ATCC 33152。
- 5.16 無菌蒸餾水。
- 5.17 3% 硫代硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)。
- 5.18 採樣容器：容量 500 mL 以上無菌之硼矽玻璃瓶或無菌塑膠有蓋容器，
或市售無菌袋。
- 5.19 玻璃錐形瓶：1,000 mL (Pyrax)。
- 5.20 量筒：500 mL。
- 5.21 玻璃小燒杯：50 mL。
- 5.22 無菌培養皿：內徑約 90 mm。
- 5.23 無菌滴管 (dropper)：3 mL。
- 5.24 無菌吸管 (pipette)：10 mL (每 0.1 mL 一刻度)。
- 5.25 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000 μL 、200 μL 、100 μL 。
- 5.26 接種針 (環)。
- 5.27 可拋棄式無菌塑膠手套、口罩。
- 5.28 無菌離心管：50 mL、15 mL。
- 5.29 載玻片。
- 5.30 螢光染色專用玻片及蓋玻片：60 x 24 mm。
- 5.31 血清瓶：1,000 mL、250 mL。
- 5.32 無菌玻璃珠：4 mm。
- 5.33 菌種保存管：PROTECT Bacterial Preservers，UK。

6 儀器設備

- 6.1 微量天平。
- 6.2 藥杓、稱藥紙、剪刀、鑷子。
- 6.3 電磁攪拌器 (可加熱) 及磁力攪拌子。
- 6.4 高壓滅菌鍋。
- 6.5 水浴槽。
- 6.6 pH 值測定儀及 pH 7.0、pH 4.0 標準液。
- 6.7 電動吸管輔助器 (pipette aid)。
- 6.8 第二級生物安全櫃 (Class II BSC)。
- 6.9 二氧化碳培養箱。
- 6.10 振盪器 (vortexer)。
- 6.11 過濾裝置：能耐高溫高壓滅菌的玻璃、塑膠、陶瓷或不鏽鋼等材質構成
之無縫隙漏斗，以鎖定裝置、磁力或重力固定於底部。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水中退伍軍人菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 636 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 6.12 抽氣幫浦：水壓式或吸氣式，壓力差最好在 138 至 207 kPa 者。
- 6.13 濾膜：直徑 47 mm，孔徑 0.22 μm 的無菌聚碳酸濾膜 (polycarbonate membrane)。
- 6.14 離心機：轉速可達 6,000 g，10 分鐘以上，能控制溫度在 $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 者。
- 6.15 計時器。
- 6.16 本生燈或酒精燈。
- 6.17 立體解剖顯微鏡。
- 6.18 光學顯微鏡：能放大至 1,000X 油鏡。
- 6.19 微量吸管 pipetman：需 1,000 μL 、200 μL 、20 μL 三種規格。
- 6.20 紫外光燈：365 nm。

7 環境與設施安全

濃縮檢體與酸處理可以在生物安全第二等級 (BSL-2) 之實驗室內操作；若有疑似退伍軍人菌菌落生長，建議在第二級生物安全櫃 (Class II BSC) 內操作後續鑑定。

8 檢體採集

- 8.1 採集醫院環境水檢體 300-500 mL，採樣時應避免受到污染。若為水龍頭等流動水，依採檢目的採集放流前的水或者放流後的水；若為運行中之冷卻水塔，採集滴落之水；若為無運轉之冷卻水塔等靜止水源，將採樣容器沉入水面下約 10 公分逕行採集，注意避免採集過多的沉積物。

9 檢體運送及保存

- 9.1 檢體以低溫 (4°C) 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/113111593271.pdf>。

10 檢驗步驟

10.1 分離培養

- 10.1.1 濃縮檢體：以過濾或是離心方式濃縮檢體。

- 10.1.1.1 過濾：檢體過濾前須劇烈搖晃 25 次以上使充分混合均勻，以 0.22 μm 無菌濾膜過濾 300 mL 檢體，將濾膜取出置入 15 mL 離心管中，加入 3 mL 無菌蒸餾水並加以震盪，為 100 倍濃縮檢體。

- 10.1.1.2 離心：檢體濁度高時應以離心方式進行濃縮，取 300 mL 檢體入離心管內，以 6,000 g 離心 10 分鐘以上，或以 3,000 g 離心 30 分鐘以上，吸取上清液丟棄，以無菌蒸餾水調整剩餘上清液至 3 mL 並加以震盪，置入 15 mL 無菌離心管中，為 100 倍濃縮檢體。

- 10.1.2 酸處理法：對 3 mL 100 倍濃縮檢體，加入 1.5 mL HCl-KCl 酸處理劑，放置 4 分鐘，加入 1.5 mL KOH 中和劑，振盪混合。經酸處理後之檢體保留於 4°C 至少 2 週。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水中退伍軍人菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 637 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.1.3 接種：取 0.1 mL 酸處理過的檢體，接種到 MWY 或其他選擇性培養基，並使均勻分佈於培養基表面，每個檢體需進行二重複。
- 10.1.4 培養：置於二氧化碳培養箱中 35°C，2.5-5.0% CO₂，及相對濕度 60-90%條件下培養。
- 10.1.5 觀察：培養 7-14 天，並每天觀察。若次日已長滿雜菌，則以較少的檢體量重新接種於新的選擇性培養基。
- 10.2 鑑定
 - 10.2.1 菌落觀察

退伍軍人菌生長緩慢，約需 3-5 天才可觀察到，以肉眼觀察菌落型態，必要時再以立體解剖顯微鏡進行菌落觀察，典型菌落圓形、邊緣完整平滑、輕度隆起、白色或白灰色半透明具毛玻璃外觀，但有些菌株呈藍白、藍灰、藍綠、藍紅、淡綠、淡紅或棕色菌落，隨著菌落老化，呈中央微白邊緣淡紫色虹光，以接種環挑取，呈黏稠狀。在波長 365 nm 的紫外燈下觀察，有些菌株產生藍綠色、藍白色或者紅色自發螢光，如 *L. bozemannii*、*L. dumoffi*、*L. cherrii*、*L. gormanii*、*L. parisiensis*、*L. steigerwaltii*、*L. tucsonensis*、*L. anisa*、*L. rubrilucens* 和 *L. erythre*。
 - 10.2.2 L-cysteine 需求試驗：挑選疑似菌落接種於 BCYE w/ L-cysteine 及 BCYE w/o L-cysteine(或 BAP)培養基上進行培養。若 BCYE w/ L-cysteine 可生長而 BCYE w/o L-cysteine (或 BAP) 不長，則可能是退伍軍人菌屬，挑取菌株再做進一步鑑定。
 - 10.2.3 革蘭氏染色
 - 10.2.3.1 抹片製作：挑取 BCYE w/ L-cysteine 培養基上之疑似菌落，於載玻片上製成薄抹片，風乾並過火數次固定。
 - 10.2.3.2 初染：將已固定之抹片，用結晶紫染液(Crystal Violet)染 1 分鐘，水洗，水洗應不超過 5 秒鐘。
 - 10.2.3.3 媒染：加革蘭氏碘液(Gram Iodine)染 1 分鐘，水洗。
 - 10.2.3.4 脫色：用脫色液(Decolorizer)洗至不再有紫色褪出時，數秒即可，再以自來水沖洗。
 - 10.2.3.5 複染：用複染液(Carbolfuchsin)染 30 秒鐘，水洗。
 - 10.2.3.6 自然風乾。
 - 10.2.3.7 以光學顯微鏡觀察。註：退伍軍人菌為革蘭氏陰性桿菌，無莢膜、不產孢子、短胖型、較老的菌會成長短不一的長絲型。
 - 10.2.4 退伍軍人菌乳膠凝集試驗(Legionella Latex Agglutination Test)：詳見退伍軍人菌抗原試驗(乳膠凝集試驗法)。此法可以區分嗜肺性退伍軍人菌血清型第 1 型(*L. pneumophila* serogroup 1)、嗜肺性退伍軍人菌血清型第 2-14 型(*L. pneumophila* serogroups 2-14)及其他退伍軍人菌屬菌種(*Legionella* species)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水中退伍軍人菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 638 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.2.5 退伍軍人菌直接螢光抗體試驗(Direct Fluorescent Antibody Test, DFA)：詳見退伍軍人菌抗原試驗(直接螢光抗體檢驗法)。
- 10.2.6 退伍軍人菌分子生物學試驗：可用 PCR、即時 PCR (real-time PCR)或其他分子生物學方法確認退伍軍人菌，同時區分為嗜肺性退伍軍人菌 (*L. pneumophila*) 及其他退伍軍人菌屬菌種 (*Legionella species*)。
- 10.2.7 菌種保存：經鑑定之菌株，純培養後以菌種保存管保存。標示菌種保存管後，取一個 10 μ L 接種環菌量之純培養菌落置於保存液中，混合均勻後，至少靜置 30 秒，將冷凍保存液吸出，隨後旋緊保存管蓋子，放入-70°C 保存，並做詳細的菌種保存記錄。

11 結果判定

- 11.4 判定標準：由檢體培養分離之疑似菌株經過 L-cysteine 生長需求試驗、革蘭氏染色、乳膠凝集試驗、直接螢光抗體試驗或分子生物學試驗均符合退伍軍人菌之結果，即判為退伍軍人菌陽性。無符合退伍軍人菌之結果，即判為退伍軍人菌陰性。
- 11.5 結果計算：每一培養皿之疑似退伍軍人菌菌落，依據菌落形態、顏色及自發螢光加以歸類，每一類至少挑選 1 個菌落進行 10.2 鑑定，再依挑選菌落數之陽性比例，回推計算該類陽性菌落數數量。環境水檢體之退伍軍人菌濃度 (cfu/L) = 二重複培養基上陽性菌落數之總和/0.2 mL (取出塗抹之水檢體體積總和) x 2 (酸處理及中和時的 2 倍稀釋)/100 (100 倍濃縮檢體) x 1000 mL/L (將每 mL 換算為每 L)；依此公式運算，退伍軍人菌濃度 = 二重複培養基上陽性菌落數之總和 x 100 (cfu/L)。
- 11.6 結果表示：若二重複培養基上未鑑定出退伍軍人菌菌落生長，則以每公升小於 100 個菌落數 (< 100 cfu/L) 表示；若二重複培養基上鑑定出退伍軍人菌菌落小於 300 時，取兩位有效數字表示，例如菌落數為 35 時以 3.5×10^3 cfu/L 表示，菌落數為 153 時以 1.5×10^4 cfu/L 表示；若二重複培養基上鑑定出退伍軍人菌菌落大於 300 時，菌落數以 $> 3.0 \times 10^4$ cfu/L 表示。
- 11.7 結果登錄：檢驗人員於完成檢驗後，將檢驗結果登錄於水中退伍軍人菌病原菌分離與鑑定紀錄表，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果”欄，並於檢體送驗單背面加蓋檢驗者職章，送實驗室主管審核及蓋章。

12 品質管制

12.1 MWY 選擇性培養基之品質管制

每批取 2 片培養基進行生長品管測試，並取一盤前一批號之培養基為對照。方法：取生長 2 日之 *L. pneumophila* 標準株 1-2 菌落置於 1 mL 無菌蒸餾水中，配製成 McFarland 0.5 菌液(1.5×10^8 cfu/mL)，取 100 μ L 上述菌液加 900 μ L 蒸餾水(1.5×10^7)，繼續 1:10 序列稀釋至 1.5×10^3 ，

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水中退伍軍人菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 639 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

吸取 30 μ L 入待測培養基中，均勻塗開，置 35°C 培養箱中培養 3-4 日，觀察生長情形並記錄之。若無菌落生長或生長遲緩之批號培養基，宜丟棄不用。若連對照培養基也不生長，則品管試驗必須重做。

12.2 BCYE w/ L-cysteine 培養基之品質管制

每批取 2 片培養基進行生長品管測試，方法同 MWY 選擇性培養基之品質管制。若無菌落生長或生長遲緩之批號培養基，宜丟棄不用。若連對照培養基也不生長，則品管試驗必須重做。若有雜菌生長，則觀察是否於製備過程中污染，若是，則需重新製備。

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 Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC. 2007. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp.835-49.
- 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。臺北。臺灣。869-878。
- 14.3 Fields BS, Benson RF, Besser RE. 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. 15: 506-26.
- 14.4 Yu, VL. 1995. *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease). In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone. pp. 2087-97.
- 14.5 Benenson, AS. 1990. Control of communicable diseases in man. 15th Ed. American Public Health Association. Washington, DC. pp. 235-8.
- 14.6 Oxoid。Legionella Latex Test 操作說明書。
- 14.7 水中退伍軍人菌檢測方法 (NIEA W238.50C)。中華民國 99 年 3 月 9 日環署檢字第 0990020517 號公告。

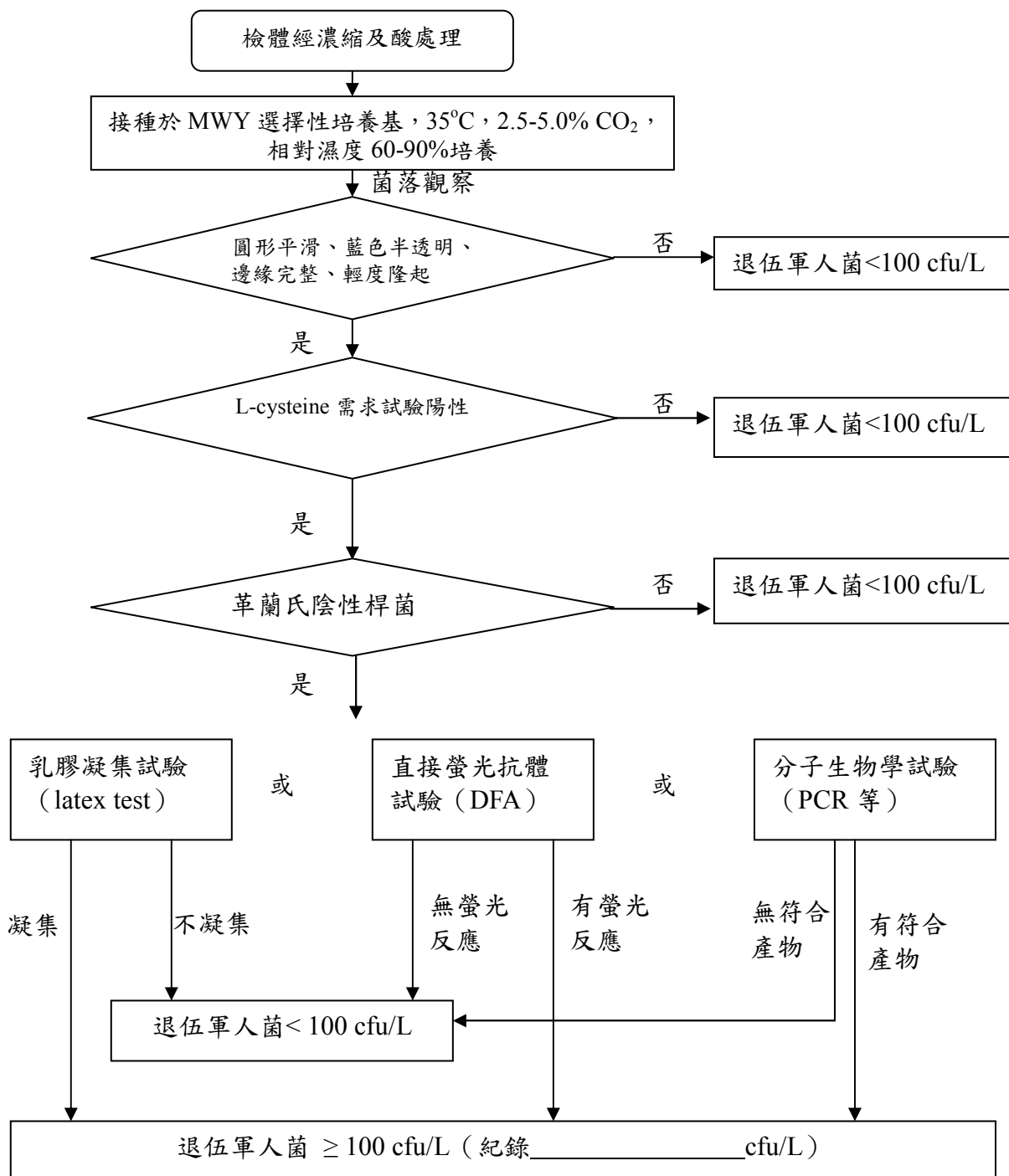
15 附錄

- 15.1 水中退伍軍人病病原菌分離與鑑定流程圖。
- 15.2 水中退伍軍人病病原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：	水中退伍軍人菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 640 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 水中退伍軍人病病原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：	水中退伍軍人菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 641 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 水中退伍軍人病病原菌分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心 水中退伍軍人菌分離與鑑定紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

檢體編號									
項目									
檢體種類（採檢日期）									
檢體採檢運送狀況適當	是	否	是	否	是	否	是	否	
檢體酸處理	是	否	是	否	是	否	是	否	
MWY 選擇性培養基上菌落外觀特徵，有菌落微突、呈圓形、具毛玻璃外觀之可疑菌落（若是，記錄菌落數）	是	否	是	否	是	否	是	否	
L-cysteine 需求試驗	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	
革蘭氏染色	陰性桿菌	非陰性桿菌	陰性桿菌	非陰性桿菌	陰性桿菌	非陰性桿菌	陰性桿菌	非陰性桿菌	
自發性螢光（365 nm 紫外燈）	有	無	有	無	有	無	有	無	
乳膠凝集試驗	確認退伍軍人菌	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
	L. p serogroup 1								
	L. p serogroups 2-14								
	L. species								
直接螢光抗體試驗型別									
分子生物學試驗									
綜合結果	退伍軍人菌	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	
	血清型別								
	濃度（cfu/L）								
	備註								

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：	侵襲性 b 型嗜血桿菌 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 642 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

自疑似受感染個案所採集檢體中，分離與鑑定 b 型流行性嗜血桿菌。

2 適用檢體種類

適用於病患血液、腦脊髓液、其他無菌檢體與醫院送驗菌株。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

b 型流行性嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae* b) 為革蘭氏陰性球桿菌 (coccobacilli)，需培養在含有 X 及 V factor 之培養基上 (如 chocolate agar)，目前已有商品化之生化鑑定套組來鑑定菌種，以及使用莢膜抗血清將之區分其莢膜多醣體型別。b 型流行性嗜血桿菌為上呼吸道之正常菌叢，但當侵入性感染會造成較嚴重之疾病 (如菌血症、敗血性關節炎及腦膜炎等症狀)，因此針對人體無菌部位檢體 (如血液、腦脊髓液及關節液等)，以細菌培養分離，生化代謝與血清學特性等方法鑑定。

5 試劑耗材

5.1 培養基

5.1.1 巧克力培養基 (chocolate agar plate)：CMP，臺灣。

5.1.2 BHI (brain heart infusion) broth：CMP，臺灣。

5.1.3 TSA (tryptic soy agar) plate：CMP，臺灣。

5.1.4 Fildes enrichment：BD，USA。

5.2 嗜氧性血液培養瓶 (Bactec)：BD，USA。

5.3 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution)：Difco，USA 或武藤化學，日本。

5.4 API NH 生化鑑定套組：BioMérieux，法國。

5.5 抗血清：Bacto *Haemophilus influenzae* antisera，BD，USA。

5.6 X factor, V factor, XV factor 生長需求區別紙片：Taxo X, V, XV factor, BD, USA。

5.7 氧化酶試劑 (oxidase strips)：MAST, UK 或 BioMérieux, France。

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

5.9 標準菌株：*H. influenzae* ATCC 10211 及 *H. parainfluenzae* ATCC 7901。

5.10 無菌生理食鹽水：0.85% NaCl。

5.11 消毒水 (例如 sodium hypochlorite solution > 1.3% W/V)。

5.12 無菌滴管 (dropper)：3 mL。

5.13 無菌離心管：5 mL、1.5 mL。

5.14 接種針 (環)。

5.15 載玻片。

5.16 蓋玻片。

5.17 可拋棄式無菌塑膠手套、口罩。

5.18 無菌棉棒。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	侵襲性 b 型嗜血桿菌 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 643 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

5.19 無菌牙籤。

5.20 鑷子。

6 儀器設備

6.1 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。

6.2 培養箱：5%二氧化碳、35°C。

6.3 37°C 恆溫箱。

6.4 4°C 冰箱。

6.5 -20°C 冷凍櫃。

6.6 離心機：3,000 rpm 以上。

6.7 微量離心機。

6.8 光學顯微鏡：能放大至 1,000X 油鏡。

6.9 立體解剖顯微鏡：有變焦功能，至少可放大 4.5X。

6.10 振盪器 (vortexer)。

6.11 本生燈。

6.12 高壓滅菌鍋。

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 檢體編號登錄。

10.2 檢體前處理：腦脊髓液及其他無菌部位體液前處理：

10.2.1 檢體體積超過 1 mL：以 3,000 xg 離心 20 min，吸除大部分上清液，留下約 0.5 mL 的液體，經劇烈震盪至少 30 sec 以重新懸浮沉澱。

10.2.2 檢體體積少於 1 mL：劇烈震盪至少 30 sec。

10.3 分離培養

10.3.1 接種

(1) 血液：檢體量至少 0.5 mL。將血液檢體以 1：5-1：10 的比例接種於血液培養瓶。

(2) 腦脊髓液及其他無菌部位體液：取 1-2 滴液體接種於巧克力培養基及 BHI 液態培養基 (備用)。

10.3.2 培養：35°C 含有 5%二氧化碳培養箱培養。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	侵襲性 b 型嗜血桿菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 644 頁/共 1091 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

10.3.3 觀察：

- (1) 血液培養：14-17 hr 後觀察，然後每天觀察，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培養基，培養 48 hr，培養條件同前述；否則，14-17 hr、48 hr 及 7 天時，未觀察到混濁情形者，仍取少量培養液次培養到巧克力培養基，培養 48 hr，血液培養瓶即可依適當程序滅菌銷毀。
- (2) 巧克力培養基每天觀察，觀察期為 48-72 hr；液態培養每天觀察連續 7 天，若有細菌生長，次接種巧克力培養基。

10.4 鑑定

- 10.4.1 菌落型態：在巧克力培養基上之菌落顏色呈無色至淺灰色、半透明、潮濕、平滑、凸起、帶有鼠臭味 (mousy odor) 或漂白水味 (bleach-like odor)，菌落周圍的培養基顏色不會改變，具有莢膜菌株之菌落較無莢膜菌株大且更黏。挑取 2-5 個可疑菌落次接種至巧克力培養基，培養於 35°C 含有 5% 二氧化碳培養箱培養、18-24 hr，以供進行鑑定。
- 10.4.2 革蘭氏染色 (Gram's stain)：依照本局「革蘭氏染色法」檢驗標準方法 (編號：B-48-2006-1.0)。
- 10.4.3 Oxidase test (氧化酶試驗)：依照本局「氧化酶試驗」檢驗標準方法 (編號：B-49-2006-1.0)。
- 10.4.4 Catalase test (觸酶試驗)：依照本局「觸酶試驗」檢驗標準方法 (編號：B-50-2006-1.0)。
- 10.4.5 X 及 V 生長因子需求試驗
以 TSA 為培養基，並挑取新鮮菌落 (18-24 hr 培養)。先製備 McFarland no.1 的細菌懸浮液於無菌生理食鹽水 (注意：從 chocolate agar 挑取菌落時不要 carry over 培養基成分)，以滅菌棉棒沾取菌液，塗抹於培養基平板上，待菌液風乾，接著以無菌鑷子分別夾取 X factor、V factor 及 XV factor 紙片，密貼於平板表面，紙片間距離要大於 20 mm，再於 35°C 含有 5% 二氧化碳培養箱培養 18-24 hr。*H. influenzae* 的生長需要 X factor 及 V factor，故應只在 X、V factor 紙片周圍可見到有細菌生長。
- 10.4.6 快速生化鑑定 API NH 試驗：依照本局「API NH (奈瑟氏/嗜血桿菌鑑定組) 細菌鑑定法」檢驗標準方法 (編號：B-56-2006-1.0)。
- 10.4.7 血清凝集鑑定試驗
 - (1) 將載玻片用蠟筆分格並標示編號，滴適量血清及無菌生理食鹽水 (陰性對照組) 於分格中，再以無菌牙籤挑取適量新鮮菌落於各分格中，並塗勻，均勻搖晃玻片約 1 min，觀察並紀錄凝集情形，其間需避免液體乾掉。
 - (2) 一般先用多價抗血清做篩選，若多價抗血清為陽性，再用單價血清進一步鑑定。
 - (3) 菌株可能因次培養而失去莢膜，故儘量於分離出菌株後

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	侵襲性 b 型嗜血桿菌 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 645 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

即進行血清分型，如有必要，於進行血清分型前一天，將菌株接種於 Fildes Enrichment agar，於 35°C 含有 5% 二氧化碳培養箱培養 18-24 hr 後，再分型。

11 結果判定

11.1 依據 10.4 鑑定結果，對照下表並紀錄於附錄 15.2 侵襲性 b 型流行性嗜血桿菌分離與鑑定紀錄表。

鑑定試驗名稱	陽性反應	陰性反應	b 型嗜血桿菌反應
於巧克力培養基上典型菌落外觀特徵	顏色呈無色至淺灰色、潮濕、平滑、凸起	非左述現象	陽性反應
革蘭氏染色試驗	革蘭氏陰性多形性球桿菌	非左述現象	陽性反應
Catalase 試驗	有氣泡產生	無氣泡產生	陽性反應
Oxidase 試驗	藍色或藍紫色	不變色	陽性反應
X 及 V 生長因子需求試驗	只在 XV factor 紙片周圍可見到有細菌生長，而 X factor 及 V factor 紙片周圍則無	非左述現象	陽性反應
API-NH 生化鑑定系統	可由結果直接判定菌株是否為 <i>H. influenzae</i>	--	陽性反應
血清分型檢測	以 <i>H. influenzae</i> 多價血清及 type b 單價血清檢測有凝集現象，而生理食鹽水無凝集現象	非左述現象	陽性反應

11.2 綜合結果判斷標準：符合上表 b 型流行性嗜血桿菌所有反應結果，即判斷為侵襲性 b 型流行性嗜血桿菌陽性；若其中一項不符合者，即判斷為侵襲性 b 型嗜血流行性桿菌陰性。

11.3 報告核發：侵襲性 b 型流行性嗜血桿菌陽性，侵襲性 b 型流行性嗜血桿菌陰性。

11.4 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果登錄於附錄 15.2 侵襲性 b 型流行性嗜血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，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 X 及 V 生長因子需求試驗試劑之品質管制

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。

12.1.2 使用 *H. influenzae* ATCC 10211 及 *H. parainfluenzae* ATCC 7901 標準菌株，進行試驗。

12.1.3 進行檢驗步驟 10.3.4，結果必須符合下表反應，始可使用。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	侵襲性 b 型嗜血桿菌 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 646 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

標準菌株	XV	V	X
<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	+	-	-
<i>H. parainfluenzae</i> ATCC 7901	+	+	-

+表示紙錠周圍有菌生長 -表示紙錠周圍無菌生長

12.2 血清凝集鑑定之品質管制

12.2.1 應於有效期限內使用，同一批號試劑，第一次使用時取一組進行試驗。

12.2.2 使用陽性反應標準菌株 *H. influenzae* ATCC 10211 及陰性反應標準菌株 *H. parainfluenzae* ATCC 7901，進行試驗。

12.3 鑑定結果必須符合陽性及陰性反應（判定標準依 11.1 節），始可使用。

13 廢棄物處理

13.1 未接種檢體保留於室溫一星期（不可冷藏）。

13.2 超過期限之檢體、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 846-858 頁。

14.2 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. 1977. Color atlas textbook of diagnostic microbiology, 5th edition. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, PA.

14.3 Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 2007. Manual of Clinical Microbiology, 9th edition, American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 636- 648.

15 附錄

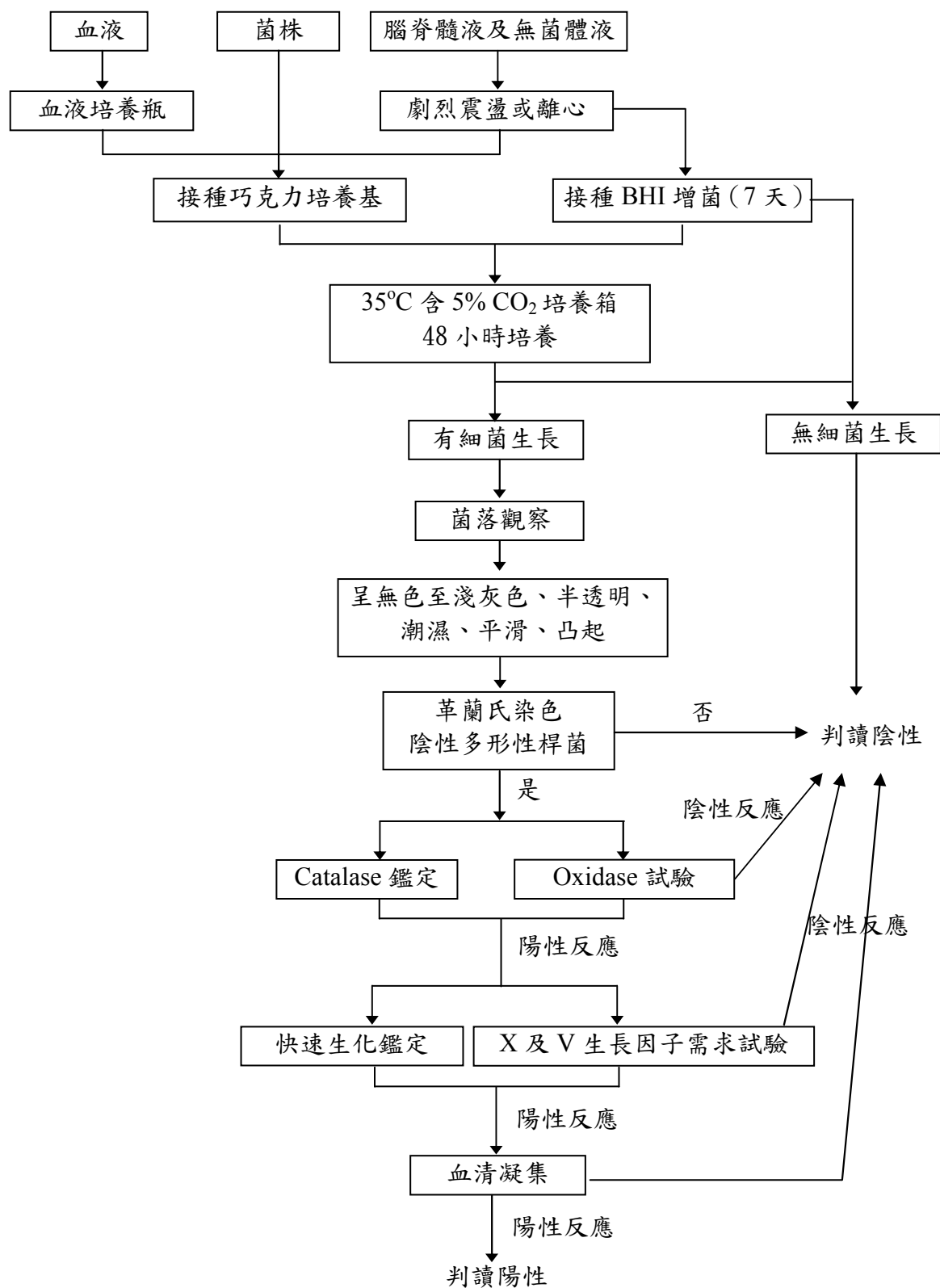
15.1 侵襲性 b 型流行性嗜血桿菌分離與鑑定流程圖。

15.2 侵襲性 b 型流行性嗜血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： 頁次：第 647 頁/共 1091 頁	侵襲性 b 型嗜血桿菌 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 侵襲性 b 型流行性嗜血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：	侵襲性 b 型嗜血桿菌 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日	
	頁次：第 648 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日	

附錄 15.2 侵襲性 b 型流行性嗜血桿菌分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

侵襲性 b 型流行性嗜血桿菌分離與鑑定紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

檢驗者：

實驗室主管：

檢體編號											
項目											
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	
巧克力培養 基上菌落：無 色至淺灰色 半透明、潮 濕、平滑凸 起、帶有鼠臭 味或漂白水 味菌落	培養/觀察	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
	第 2 天										
	第 3 天										
革蘭氏染色： 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	
	球菌	桿菌	球菌	桿菌	球菌	桿菌	球菌	桿菌	球菌	桿菌	
Catalase test	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	
Oxidase test	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	
血清分型凝集試驗 (圈選凝集型別)	無凝集 Poly、a、b、c、 d、e、f		無凝集 Poly、a、b、c、 d、e、f		無凝集 Poly、a、b、c、 d、e、f		無凝集 Poly、a、b、c、 d、e、f		無凝集 Poly、a、b、c、 d、e、f		
生化試驗 API-NH (紀錄檢索碼)											
綜合結果											
報告日期											
附註											

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (RPR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 649 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的
測試血清或血漿中反應素 (reagin)。
- 2 適用檢體種類
血清 (serum) 或血漿 (plasma)。
- 3 名詞解釋
 - 3.1 血清 (serum)：血液凝固後，除去固態成份後的清亮液體，不含纖維蛋白原。
 - 3.2 血漿 (plasma)：血液的液體部分，約佔血量的 55%，含有血清及纖維蛋白原，後者在凝血上具有一定作用。
- 4 原理概述
 - 4.1 當梅毒螺旋體侵入體內 4-6 週，患者血清內會出現一種抗脂質抗體，稱之為反應素 (reagin)。反應素是由梅毒螺旋體和宿主細胞被破壞所釋出的類脂物質，刺激宿主免疫系統而產生的抗體。雖然反應素不具有特異性，但是可當作診斷或篩檢梅毒之檢查檢查。
 - 4.2 反應素檢查又稱為梅毒血清檢查 (serologic test for syphilis, STS)。反應素可和試劑中的牛心脂 (cardiolipin) 產生凝集反應，碳顆粒和牛心脂結合，可幫助肉眼容易觀察結果。
- 5 試劑耗材
 - 5.1 試劑：
 - 5.5.1 RPR carbon antigen：Carbon approximately 0.2g/L， 0.003% Cardiolipin， 0.02% Lecithin and 0.09% Cholesterol。
 - 5.5.2 Positive control：Serum containing antibodies against *Treponema pallidum*。
 - 5.5.3 Weak positive control：Serum containing antibodies against *Treponema pallidum*。
 - 5.5.4 Negative control：Serum free of antibodies against *Treponema pallidum*。
 - 5.2 耗材
 - 5.2.1 拋棄式攪拌棒/吸管 (試劑組已附)。
 - 5.2.2 測試紙卡 (試劑組已附)。
- 6 儀器設備
 - 6.1 水平搖擺式混合器 (rotator)。
 - 6.2 計時器。
- 7 環境與設施安全
於生物安全第一級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (RPR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 650 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

8 檢體採集

8.1 血液量至少 5 mL、血清量至少 1 mL。

8.2 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，給予編號。

10.2 檢驗前處理

10.2.1 血液放置常溫 30 分鐘以上，離心 2,000 rpm、15 分鐘，取血清/血漿至 2 mL 檢體保存管，標示號碼。

10.2.2 取出實驗所需用量後，將檢體移放-80°C 冰箱保存。

10.3 試劑準備

10.3.1 將試劑、對照組及檢體放置於室溫 (20-25°C) 回溫。

10.3.2 不同批號的試藥請勿混合使用。

10.4 檢驗程序

10.4.1 定性法

10.4.1.1 以試劑組所附的拋棄式吸管吸取檢體一滴(或以微量吸管取 50 µL)滴在測試卡片圓圈內並均勻塗滿於圓圈內。

10.4.1.2 試劑混合均勻，滴一滴(或以微量吸管取 16 µL)在測試卡圓圈內，切記勿混合檢體與試劑。

10.4.1.3 將測試卡放置於 rotator 上以轉速 180 rpm，作用 8 分鐘。

10.4.1.4 於明亮燈光下觀察結果。

10.4.2 半定量法

若定性法結果為 Reactive 時，將檢體以生理食鹽水或 PBS 連續 2 倍稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64... 等) 重複步驟 10.4.1.1 至 10.4.1.4，直至 Non-Reactive 為止。

11 結果判定

11.1 判定標準

11.1.1 陽性 (Reactive)：出中型或大型現凝集現象 (請參考圖例)。

11.1.2 弱陽性 (Weak Reactive)：出現輕微凝集現象。

11.1.3 陰性 (Non-Reactive)：無凝集現象或出現平滑灰色現象 (請參考圖例)。

11.1.4 RPR 檢驗結果圖例如下：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (RPR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 651 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日



11.2 報告核發

RPR 陽性 (效價：)，RPR 陰性。

11.3 結果登錄

完成檢驗後，將檢驗結果登錄於「RPR (rapid plasma reagin) 快速血漿反應素試驗紀錄表」(QR-M-06 -01)。

12 品質管制

12.1 室內品管

12.1.1 品管種類

12.1.1.1 Positive control：Serum containing antibodies against *Treponema pallidum*。

12.1.1.2 Weak positive control：Serum containing antibodies against *Treponema pallidum*。

12.1.1.3 Negative control：Serum free of antibodies against *Treponema pallidum*。

12.1.2 品管頻率：每批次操作檢驗時、新開試劑組或更改檢驗程序時。

12.1.3 品管操作步驟：與檢體相同。

12.1.4 品管測試結果必須符合下列標準。

12.1.4.1 Negative control (陰性對照血清)：無凝集現象或出現平滑灰色現象。

12.1.4.2 Weak positive control (弱陽性對照血清)：稀釋倍數 1:2±1 個稀釋倍數 (1:1-1:4) 出現凝集現象。

12.1.4.3 Positive control (陽性對照血清)：稀釋倍數 1:4±1 個稀釋倍數 (1:2-1:8) 出現凝集現象。

12.1.5 品管測試結果若有違背品管允收標準應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正，必要時採取預防措施。

12.2 室外品管

12.2.1 CAP microbiology survey。

12.2.2 每年進行 3 次，於每年底提出下一年度之參加計畫。

12.2.3 接獲 CAP 能力測試檢體時，應立即打開包裝，檢視檢體是否完整，若有洩漏或破損，應立即通知第二科或代理廠商處理。

12.2.4 每支 CAP 能力測試檢體應比照防疫檢體的操作步驟測定，不應特別處理。用剩之品管檢體應於-20°C 保存，以供日後必要時之複驗。

12.2.5 CAP 能力測試結果，應於規定時間內寄出，同時影印副本保存。

12.2.6 CAP 能力測試結果，應作為重要品管參考依據若有偏離允許

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (RPR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 652 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

範圍之情形發生，應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正及採取預防措施。

12.2.7 每次能力測試處理過程登記於「能力試驗摘要紀錄表」(RDC-QR-2101-02)。

13 檢驗效能

1995 年英國 Bristol Public Health Laboratory 的 Syphilis Reference Centre 評估 IMMUTREP RPR 檢驗效能結果如下

	IMMUTREP RPR	
	+	-
Negative sample	0	645
Positive sample	30	0

所有檢體以 IMMUTREP RPR 檢測呈現正確結果。

14 干擾與交互反應

- 14.1 溶血或是遭細菌污染以及嚴重脂血症的檢體不可供 RPR 檢驗。乳糜血不會影響抗原反應，但檢體嚴重乳糜血會模糊抗原顆粒，最好不要使用。
- 14.2 所有帶有 cardiolipin 形式的抗原都會造成偽陽性。麻瘋 (leprosy)、紅斑性狼瘡 (lupus erythromatosus)、感染性單核球病 (infectious mononucleosis)、瘧疾 (malaria)、牛痘 (vaccina) 和生命攸關的肺炎 (vital pneumonia) 等疾病有可能造成偽陽性。
- 14.3 許多報告顯示懷孕、自體免疫疾病和藥癮者也可能引起偽陽性。

15 廢棄物處理

- 15.1 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 分鐘高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。
- 15.2 試劑內含 0.095% sodium azide 當抑菌劑，可能與管路的鉛或銅形成爆炸性鹽類化合物。倒入水管丟棄時，應隨之沖以大量水。

16 參考資料

- 16.1 Omega diagnostics Immutrep RPR 試劑說明書。
- 16.2 Omega diagnostics Immutrep RPR Control 試劑說明書。

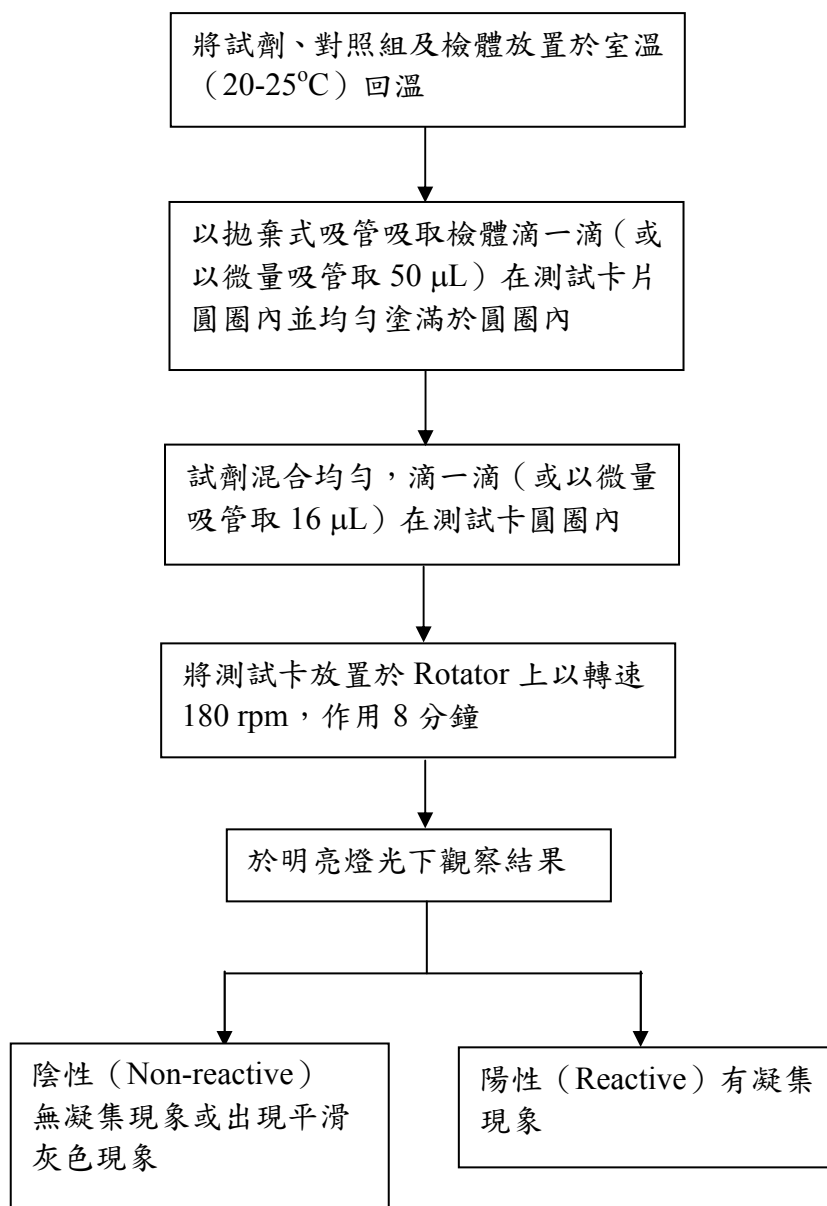
17 附錄

- 17.1 RPR (rapid plasma reagin) 快速血漿反應素試驗流程圖。
- 17.2 RPR (rapid plasma reagin) 快速血漿反應素試驗紀錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (RPR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 653 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 17.1 RPR (rapid plasma reagin) 快速血漿反應素試驗流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (RPR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 654 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 17.2 RPR (Rapid Plasma Reagin) 快速血漿反應素試驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

RPR (Rapid Plasma Reagin) 快速血漿反應素試驗紀錄表

試劑批號：_____

有效期限：_____

檢驗日期：_____年_____月_____日

LAB NO _____		RPR CARD TEST		
NO DE LAB _____		18 mm CIRCLE		
1	2	3	4	5
6	7	8	9	10
USE ONCE ONLY N'UTILISER QU'UNE SEULE FOIS		FORM NO. 10651 REVISION JANUARY 1997		

	1	2	3	4	5
檢體編號					
稀釋倍數					
結果					
	6	7	8	9	10
檢體編號					
稀釋倍數					
結果					

檢驗者：

核驗者：

實驗室 PI：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (VDRL)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 655 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

以梅毒螺旋體侵入體內所產生的一種抗脂質抗體，稱之為反應素 (reagin)。
作為診斷或篩檢梅毒之檢查。

2 適用檢體種類

血清、血漿或腦脊髓液檢體。

3 名詞解釋

3.1 血清 (serum)：血液凝固後，除去固態成份後的清亮液體，不含纖維蛋白原。

3.2 血漿 (plasma)：血液的液體部分，約佔血量的 55%，含有血清及纖維蛋白原，後者在凝血上具有一定作用。

4 原理概述

4.1 當梅毒螺旋體侵入體內 4-6 週，患者血清內會出現一種抗脂質抗體，稱之為反應素 (Reagin)。反應素是由梅毒螺旋體和宿主細胞被破壞所釋出的類脂物質，刺激宿主免疫系統而產生的抗體。雖然反應素不具有特异性，但是可當作診斷或篩檢梅毒之檢查。

4.2 利用抗原懸浮液，測定血清中之反應素是否存在。使用牛心脂素 (cardiolipin)，且含有卵磷脂 (lecithin)，另加入膽固醇 (cholesterol) 以增加抗原之有效反應。

5 試劑耗材

5.1 試劑

5.1.1 VDRL antigen：0.03% Cardiolipin，0.2% Lecithin，0.9% Cholesterol。

5.1.2 Buffered Saline。

5.1.3 Positive control：Serum containing antibodies against *Treponema pallidum*。

5.1.4 Weak positive control：Serum containing antibodies against *Treponema Pallidum*。

5.1.5 Negative control：Serum free of antibodies against *T. Treponema pallidum*。

5.2 耗材

5.2.1 10 μ L，100 μ L，1,000 μ L Tips。

5.2.2 Slide test：環圈玻片 (glass ring slide)。

5.2.3 Tube test：玻璃試管 12×5 mm。

5.2.4 0.9% NaCl 生理食鹽水。

6 儀器設備

6.1 離心機。

6.2 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：	梅毒螺旋體抗體檢測 (VDRL)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 656 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

6.3 混合器

6.3.1 Slide test：水平搖擺式混合器 (Rotator)。

6.3.2 Tube test：試管震盪混合器。

6.4 計時器。

6.5 顯微鏡。

7 環境與設施安全

於生物安全第一級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作。

8 檢體採集

8.1 血液量至少 5 mL、血清、腦脊髓液量至少 1 mL。

8.2 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，給予編號。

10.2 檢驗前處理

10.2.1 血液 (紫頭管 (不含抗凝劑) 完全凝固後或紅頭管 (含抗凝劑))，離心 3,000 轉，5 分鐘後，取血清/血漿至 2 mL 檢體保存管，標示號碼。

10.2.2 血清檢體則直接分裝至標示號碼的檢體保存管中。

10.2.3 取出實驗所需用量後，將檢體移放 -80°C 冰箱保存。

10.2.4 血清/血漿檢體 56°C，30 分鐘不活化。

10.3 試劑準備

10.3.1 將試劑、控制組及檢體放置於室溫 (20°C-25°C) 回溫。

10.3.2 將試劑輕輕搖勻、勿產生泡沫。

10.3.3 不同批號的試藥請勿混合使用。

10.3.4 Slide test

10.3.4.1 加 0.4 mL 的食鹽緩衝液於平底有蓋的玻璃小管，置於搖擺式混合器 (Rotator) 上以 150 rpm 水平搖動。

10.3.4.2 以乾淨的 pipette 取 0.5mL 的抗原溶液，於六秒鐘內逐滴加入食鹽緩衝液內。加完抗原溶液後繼續水平搖動 150 rpm，10 秒。

10.3.4.3 再緩緩加入 4.1 mL 食鹽緩衝液，接著水平搖動 180 rpm，3 分鐘。

10.3.4.4 用手輕輕搖晃混和均勻，靜置 20 分鐘以上。

10.3.4.5 操作檢體時再用手輕輕混勻。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (VDRL)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 657 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.3.4.6 此混合好的抗原試劑儲存於 2-8°C 在 24 小時內可使用。

10.3.5 Tube test

10.3.5.1 稀釋 VDRL Antigen：取 1X 體積前述 (10.3.4.4) 配置好的抗原溶液加入 4 X 體積生理食鹽水混合均勻，靜置 5 分鐘以上。

10.3.5.2 此稀釋好的抗原試劑需在 2 小時內使用。

10.4 檢驗程序

10.4.1 Slide test

10.4.1.1 定性法

10.4.1.1.1 取 50 µL 不活化血清到測試玻片圓圈內並均勻塗滿於環圈內。

10.4.1.1.2 取 22µL 稀釋的 VDRL Antigen 到測試卡環圈內，切記不需先混合檢體與試劑。

10.4.1.1.3 將環穴玻片放置於 Rotator 上以轉速 180 rpm，作用 4 分鐘。

10.4.1.1.4 立即於 100x 顯微鏡下觀察結果。

10.4.1.2 半定量法

10.4.1.2.1 若結果為 Reactive 時以生理食鹽水或 PBS 將檢體做 2 倍序列稀釋(1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64...等)，重複 10.4.1.1.1 到 10.4.1.1.4 步驟，直至 Non-Reactive 為止。

10.4.2 Tube test

10.4.2.1 取 0.5mL 不活化血清到試管內。

10.4.2.2 加入 0.5mL 稀釋好的抗原試劑(10.3.5.2)

10.4.2.3 於試管震盪混合器震盪 5 分鐘

10.4.2.4 試管離心 2000rpm, 10 分鐘。

10.4.2.5 搖晃試管 1 分鐘，並立即判讀結果。

11 結果判定

11.1 判定標準

11.1.1 Slide test：

11.1.1.1 定性試驗：

11.1.1.1.1 陽性 (Reactive)：有大~中顆粒的凝集現象(請參考圖例)。

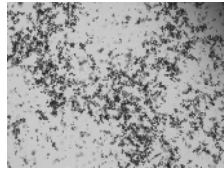
11.1.1.1.2 弱陽性 (Weak Reactive)：小而平均的凝集顆粒(請參考圖例)。

11.1.1.1.3 陰性 (Non-Reactive)：無凝集現象或出現平滑灰色現象(請參考圖例)

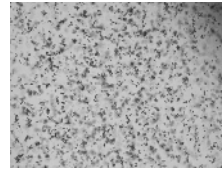
11.1.1.1.4 VDRL 檢驗結果圖例如下

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

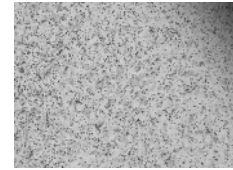
	編號： 頁次：第 658 頁/共 1091 頁	梅毒螺旋體抗體檢測 (VDRL)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日



Reactive



Weak reactive



Non-reactive

11.1.1.2 半定量法：呈陽性反應的最終稀釋倍數即為效價。

11.1.2 Tube test：

11.1.2.1 陽性 (Reactive)：有凝集現象。

11.1.2.2 陰性 (Non-Reactive)：無凝集現象。

11.2 報告核發

VDRL 陽性 (效價：)，VDRL 陰性。

11.3 結果登錄

完成檢驗後，將檢驗結果登錄於「VDRL (Venereal Disease Research laboratory) 快速血漿反應素試驗紀錄表」(QR-M-10-01)。

12 品質管制

12.1 室內品管

12.1.1 品管種類

12.1.1.1 Positive control：Serum containing antibodies against *Treponema pallidum*。

12.1.1.2 Weak positive control：Serum containing antibodies against *Treponema pallidum*。

12.1.1.3 Negative control：Serum free of antibodies against *Treponema pallidum*。

12.1.2 品管頻率：每批次操作檢驗時、新開試劑組或更改檢驗程序時。

12.1.3 品管測試結果必須符合下列標準。

12.1.3.1 Negative control：(陰性對照血清)：無凝集現象或出現平滑灰色現象。

12.1.3.2 Weak positive control (弱陽性對照血清)、Positive control (陽性對照血清) 出現凝集現象。

12.1.4 品管測試結果若有違背品管允收標準應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正，必要時採取預防措施。

12.2 室外品管

12.2.1 CAP microbiology survey。

12.2.2 每年進行 3 次，於每年底提出下一年度之參加計畫。

12.2.3 接獲 CAP 能力測試檢體時，應立即打開包裝，檢視檢體是否完整，若有洩漏或破損，應立即通知第二科或代理廠商處理。

12.2.4 每支 CAP 能力測試檢體應比照防疫檢體的操作步驟測定，不應特別處理。用剩之品管檢體應於-20°C 保存，以供日後必要時之複驗。

12.2.5 CAP 能力測試結果，應於規定時間內寄出，同時影印副本保存。

12.2.6 CAP 能力測試結果，應作為重要品管參考依據若有偏離允許範

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (VDRL)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 659 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

圍之情形發生，應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正及採取預防措施。

- 12.2.7 每次能力測試處理過程登記於「能力試驗摘要紀錄表」(RDC-QR-2101-02)。

13 檢驗效能

- 13.1 IMMUTREP VDRL 分析靈敏度：88.5%。
IMMUTREP VDRL 分析特異性：98.9%。

	Immutrep VDRL		Totals
	+	-	
Untreated Syphilis	20	1	21
Treated Syphilis	26	5	31
Normal samples	5	448	453
	51	454	505

- 13.2 IMMUTREP VDRL 分析再現性：100%。

14 干擾與交互反應

- 14.1 溶血或是遭細菌污染以及嚴重脂血症的檢體不可供 VDRL 檢驗。乳糜血不會影響抗原反應，但檢體嚴重乳糜血會模糊抗原顆粒，最好不要使用。
- 14.2 所有帶有 cardiolipin 形式的抗原都會造成偽陽性。麻瘋 (leprosy)、紅斑性狼瘡 (lupus erythromatosus)、感染性單核球病 (infectious mononucleosis)、瘧疾 (malaria)、牛痘 (vaccina) 和生命攸關的肺炎 (vital pneumonia) 等疾病有可能造成偽陽性。
- 14.3 許多報告顯示懷孕、自體免疫疾病和藥癮者也可能引起偽陽性。

15 試劑儲存

- 15.1 於室溫 (20-25°C) 下儲存，避光、避熱。
- 15.2 切勿冷凍。
- 15.3 以乾的 pipette 汲取 antigen 溶液 (濕的會造成抗原沈澱)，取完蓋緊瓶口。若發現 antigen 溶液有結晶出現，可緩慢加熱至 50°C 使其溶解。

16 廢棄物處理

- 16.1 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 分鐘高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。
- 16.2 試劑內含 0.095% sodium azide 當抑菌劑，可能與管路的鉛或銅形成爆炸性鹽類化合物。倒入水管丟棄時，應隨之沖以大量水。

17 參考資料

- 17.1 Omega diagnostics Immutrep VDRL 試劑說明書。
- 17.2 Omega diagnostics Immutrep RPR Control 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：	梅毒螺旋體抗體檢測（VDRL）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 660 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

18 附錄

- 18.1 VDRL（Venereal Disease Research laboratory）試驗流程圖。
- 18.2 VDRL（Venereal Disease Research laboratory）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：	梅毒螺旋體抗體檢測 (VDRL)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 661 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 18.1 VDRL (Venereal Disease Research laboratory) 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：	梅毒螺旋體抗體檢測（VDRL）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 662 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 18.2 VDRL（Venereal Disease Research laboratory）試驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

VDRL（Venereal Disease Research laboratory）試驗紀錄表

試劑批號：_____

有效期限：_____

檢驗日期：_____年_____月_____日

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12

	1	2	3	4
檢體編號				
稀釋倍數				
結果				
	5	6	7	8
檢體編號				
稀釋倍數				
結果				
	9	10	11	12
檢體編號				
稀釋倍數				
結果				

檢驗者：

核驗者：

實驗室 PI：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 663 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測血清或血漿檢體中梅毒螺旋抗體 (*Treponema pallidum* antibody) 及抗體力價。

2 適用檢體種類

血清 (serum) 或血漿 (plasma)。

3 名詞解釋

3.1 血清 (serum)：血液凝固後，除去固態成份後的清亮液體，不含纖維蛋白原。

3.2 血漿 (plasma)：血液的液體部分，約佔血量的 55%，含有血清及纖維蛋白原，後者在凝血上具有一定作用。

4 原理概述

將病原性梅毒螺旋體 (*T. pallidum* – Nichol's strain) 的精製菌體成份吸著在粒子化 gelatin 的人工擔體上，此感作粒子能與梅毒螺旋抗體 (*T. pallidum* antibody) 產生凝集反應 (particle agglutination)，因此可作為血清及血漿檢體中梅毒螺旋抗體的檢出及抗體力價測定用試藥。

5 試劑耗材

5.1 試劑：

5.1.1 溶解用液。

5.1.2 血清稀釋用液。

5.1.3 感作粒子 (凍乾品)，使用前加入定量溶解用液。

5.1.4 未感作粒子 (凍乾品)，使用前加入定量溶解用液。

5.1.5 對照用陽性血清 0.5 mL/瓶。

5.2 耗材

5.2.1 96 well U-shaped microplate (96 孔 U 型盤)。

5.2.2 10 μ L、100 μ LTips。

6 儀器設備

6.1 100 μ L、25 μ L Pipette (微量吸管)。

6.2 U 型盤置振盪器。

6.3 計時器。

7 環境與設施安全

於生物安全第一級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作。

8 檢體採集

8.1 血液量至少 5 mL、血清量至少 1 mL。

8.2 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：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 664 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 血液放置常溫 30 分鐘以上，離心 2,000 rpm、15 分鐘，取血清/血漿至 2 mL 檢體保存管，標示號碼。

10.2.2 取出實驗所需用量後，將檢體移放-80°C 冰箱保存。

10.3 試劑準備

10.3.1 將試劑、對照組及檢體放置於室溫 (20-25°C 回溫)。

10.3.2 感作粒子 (凍乾品)，使用 30 分鐘前在室溫加入定量 (1.5 mL) 溶解用液。

10.3.3 未感作粒子 (凍乾品)，使用 30 分鐘前在室溫加入定量 (1.5 mL) 溶解用液。

10.3.4 不同批號的試藥請勿混合使用。

10.4 檢驗程序

10.4.1 定性法

10.4.1.1 用微量吸管滴入血清稀釋用液於 96 孔 U 型盤，第 1 孔加 100 μ L，第 2-4 孔各加 25 μ L。

10.4.1.2 用微量吸管取 25 μ L 待測檢體加入 96 孔 U 型盤第 1 孔，混合均勻後吸出 25 μ L 加入第 2 孔，依此類推 2 倍序列稀釋至第 4 孔混合均勻後吸出 25 μ L 丟棄。稀釋倍數為 1:5-1:40。

10.4.1.3 陽性對照血清視同檢體，取 25 μ L 加入檢體 96 孔 U 型盤第一排第 1 孔，序列稀釋方法同 10.4.1.2。

10.4.1.4 用微量吸管於第 3 孔滴入 25 μ L 未感作粒子，第 4 孔滴入 25 μ L 感作粒子。第 3 孔最終稀釋倍數為 1:40，第 4 孔最終稀釋倍數為 1:80。

10.4.1.5 將 U 型盤置於振盪器，以不使內容物被振的程度出振搖 30 秒混勻之，加蓋於室溫 (15-30°C) 水平靜置，2 小時後觀察箱上觀察反應像並記錄。

10.4.2 定量法

10.4.2.1 用微量吸管滴入血清稀釋用液於 96 孔 U 型盤，第 1 孔加 100 μ L，第 2-12 孔各加 25 μ L。

10.4.2.2 用微量吸管取 25 μ L 待測檢體加入 96 孔 U 型盤第 1 孔，混合均勻後吸出 25 μ L 加入第 2 孔，依此類推 2 倍序列稀釋至第 12 孔混合均勻後吸出 25 μ L 丟棄。

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 665 頁/共 1091 頁	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

稀釋倍數為 1:5-1:10240。

- 10.4.2.3 陽性對照血清視同檢體，取 25 μ L 加入檢體 96 孔 U 型盤第一排第 1 孔，序列稀釋方法同 10.4.2.2。
- 10.4.2.4 用微量吸管於第 3 孔滴入 25 μ L 未感作粒子，第 4 孔到第 12 孔滴入 25 μ L 感作粒子。第 3 孔最終稀釋倍數為 1:40，第 4 孔到第 12 孔最終稀釋倍數為 1:80-1:20480。
- 10.4.2.5 U 型盤置振盪器，以不使內容物被振的程度出振搖，加蓋於室溫 (15-30°C) 水平靜置，2 hr 後觀察箱上觀察反應像並記錄。

10.5 吸收操作

若判讀時未感作粒子及感作粒子同時呈現 ($\pm$) 以上的凝集，需作吸附程序試驗。

- 10.5.1 取 50 μ L 檢體加 950 μ L 未感作粒子混合均勻室溫 (15-30°C) 放置 20 分鐘以上。
- 10.5.2 離心分離 (2000 rpm，5 分鐘)，取上清液 50 μ L 加入 96 孔 U 型盤第 3 孔 (1:20)，96 孔 U 型盤第 4-12 孔各加 25 μ L 血清稀釋用液，由第 3 孔吸出 25 μ L 加入第 4 孔序列稀釋依此類推序列稀釋至第 12 孔混合均勻後吸出 25 μ L 丟棄。
- 10.5.3 操作步驟同 10.4.2.2，10.4.2.4。

11 結果判定

11.1 判定標準

11.1.1 反應像判讀：U 型盤靜置於判定用觀察箱上，觀察粒子的反應像，請參照表 1 及圖例判讀之。

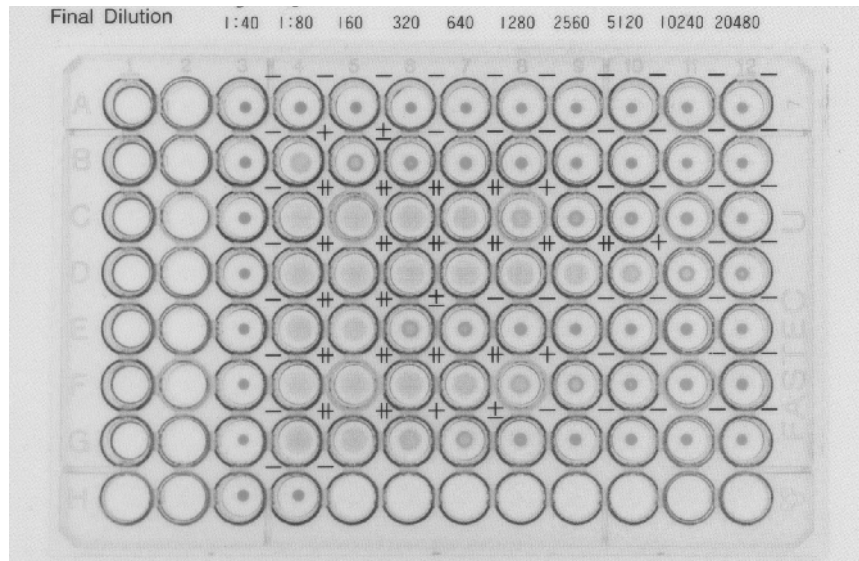
表 1

反 應 像	判 讀
粒子凝集如鈕釦狀，外緣呈現均等的平滑圓形	(-)
粒子形成小指環狀，外緣呈現均等的平滑圓形	($\pm$)
粒子形成明顯且較大的指環狀，外緣可見不均等的凝集現象	(+)
粒子呈均一凝集狀，凝集粒子如膜狀廣佈 well 底部全體	(++)

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 666 頁/共 1091 頁	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

判讀圖例



11.2 梅毒血清效價判定標

11.2.1 陽性：未感作粒子（最終稀釋倍數 1:40）的反應為（-），而感作粒子（最終稀釋倍數 1:80 以上）的反應像為（+）時，可判定為陽性。定量法中最終稀釋倍數反應像為（+）其所對應的稀釋倍數就是抗體價，如 1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560、1:5120、>1:5120。

11.2.2 陰性：比對未感作粒子的反應像，若感作粒子稀釋倍數（最終稀釋倍數 1:80 以上）的反應像為（-），則可判定為陰性（-）。

11.2.3 保留：未感作粒子（最終稀釋倍數 1:40）的反應像為（-），而感作粒子（最終稀釋倍數 1:80）的反應像為（±）時，則予以保留。

11.3 報告核發

TPPA 陽性（效價： ），TPPA 陰性。

11.4 結果登錄

完成檢驗後，將檢驗結果登錄於「TPPA (*Treponema pallidum* particle agglutination) 梅毒螺旋體粒子凝集試驗紀錄表」(QR-M-07-01)。

12 品質管制

12.1 室內品管

12.1.1 品管種類

陽性對照血清（positive control serum）。

12.1.2 品管頻率：每批次操作檢驗時、新開試劑組或更改檢驗程序時。

12.1.3 品管測試結果：

12.1.3.1 各檢體與未感作粒子（最終稀釋倍數 1:40）的反應

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 667 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

為 (一)。

12.1.3.2 陽性對照血清 (positive control serum) 效價應為 1 : 80 (最終稀釋倍數)。

12.1.4 品管測試結果若有違背品管允收標準應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正，必要時採取預防措施。

12.2 室外品管

12.2.1 CAP microbiology survey。

12.2.2 每年進行 3 次，於每年底提出下一年度之參加計畫。

12.2.3 接獲 CAP 能力測試檢體時，應立即打開包裝，檢視檢體是否完整，若有洩漏或破損，應立即通知第二科或代理廠商處理。

12.2.4 每支 CAP 能力測試檢體應比照防疫檢體的操作步驟測定，不應特別處理。用剩之品管檢體應於-20°C 保存，以供日後必要時之複驗。

12.2.5 CAP 能力測試結果，應於規定時間內寄出，同時影印副本保存。

12.2.6 CAP 能力測試結果，應作為重要品管參考依據若有偏離允許範圍之情形發生，應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正及採取預防措施。

12.2.7 每次能力測試處理過程登記於「能力試驗摘要紀錄表」(RDC-QR-2101-02)。

13 干擾與交互反應

13.1 避免使用溶血或是遭細菌污染以及嚴重脂血症的檢體。

13.2 若病人患有結締組織病，癩瘋病及傳染性單核球增多症，易有偽陽性的結果。

13.3 操作過程有氣泡的產生或混合不完全，皆會造成不正確的結果。

14 廢棄物處理

14.1 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 分鐘高壓滅菌後，依本局廢棄物處理作業程序處理。

14.2 試劑之溶解用液、血清稀釋用液、對照陽性血清含有 1% 的 sodium azide 防腐劑，廢棄時為避免爆炸性的金屬 azide 化合物，請用大量的水沖淡放流。

15 參考資料

台富 FTI-SERODIA®-TPPA 試劑說明書。

16 附錄

16.1 TPPA (*Treponema pallidum* particle agglutination) 梅毒螺旋體粒子凝集試驗定性法檢體稀釋操作簡圖。

16.2 TPPA (*Treponema pallidum* particle agglutination) 梅毒螺旋體粒子凝集試驗定量法檢體稀釋操作簡圖。

16.3 TPPA (*Treponema pallidum* particle agglutination) 梅毒螺旋體粒子凝集

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	核准日期： 年 月 日		
	頁次：第 668 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日		

試驗定性法流程圖。

- 16.4 TPPA (*Treponema pallidum* particle agglutination) 梅毒螺旋體粒子凝集
試驗定量法流程圖。

- 16.5 TPPA (*Treponema pallidum* particle agglutination) 梅毒螺旋體粒子凝集
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：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 669 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.1 TPPA (*Treponema pallidum* particle agglutination) 梅毒螺旋體粒子凝集試驗定性法檢體稀釋簡圖

Well No.	1	2	3	4
血清稀釋用液 (μL)	25	25	25	25
檢體或對照用陽性血清 (μL)	100	25	25	25
檢體稀釋倍數	1:5	1:10	1:20	1:40
未感作粒子 (μL)			25	
感作粒子 (μL)				25
最終稀釋倍數			1:40	1:80

25 μL 丟棄

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 670 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.2 TPPA (*Treponema pallidum* particle agglutination) 梅毒螺旋體粒子凝集試定量法驗檢體稀釋簡圖

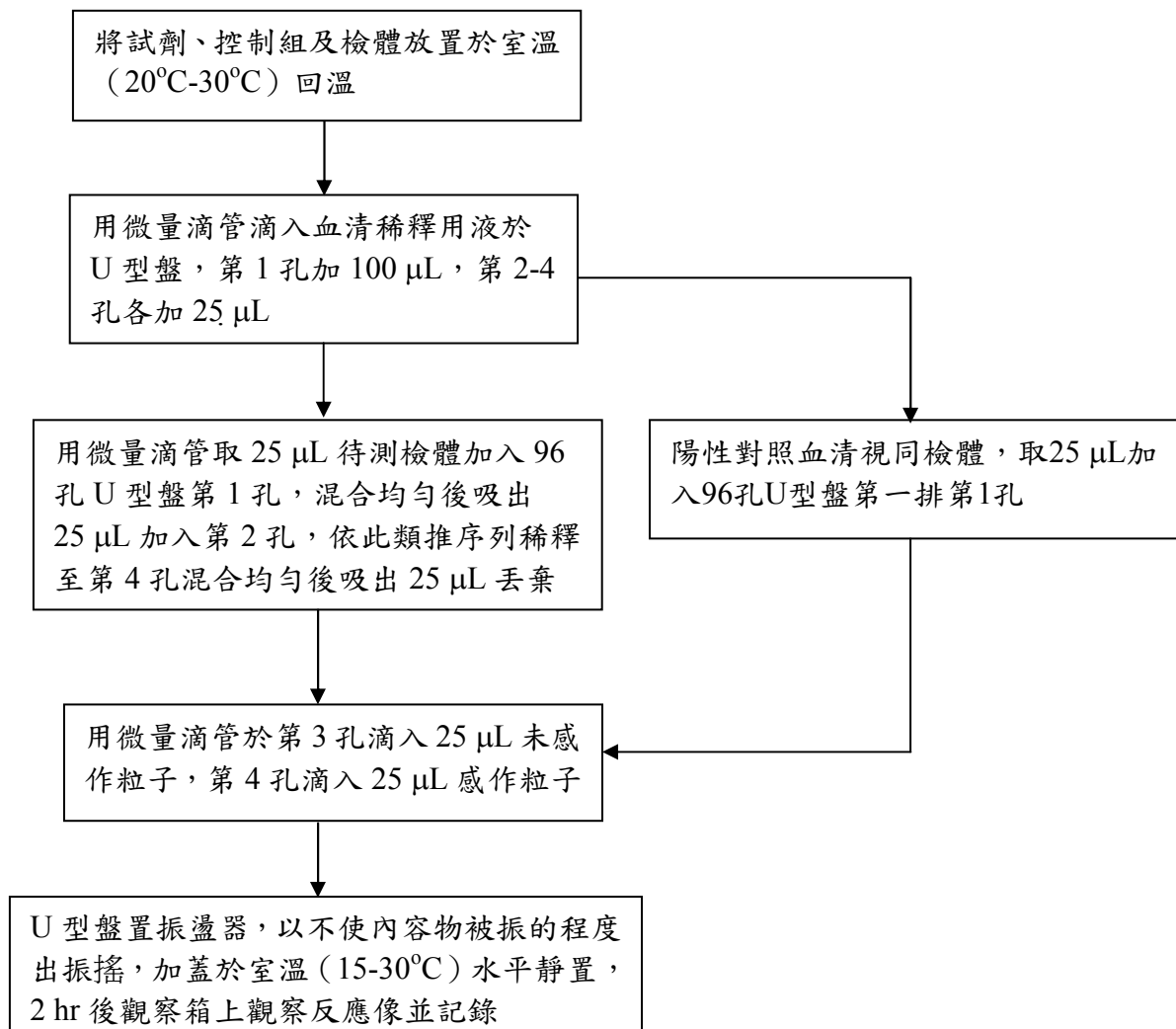
Well No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
血清稀釋用液 (μL)	100	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
檢體或對照用 陽性血清 (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
檢體稀釋倍數	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
未感作粒子 (μL)			25									
感作粒子 (μL)				25	25	25	25	25	25	25	25	25
最終稀釋倍數			1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480

25
 μL
丟棄

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 671 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

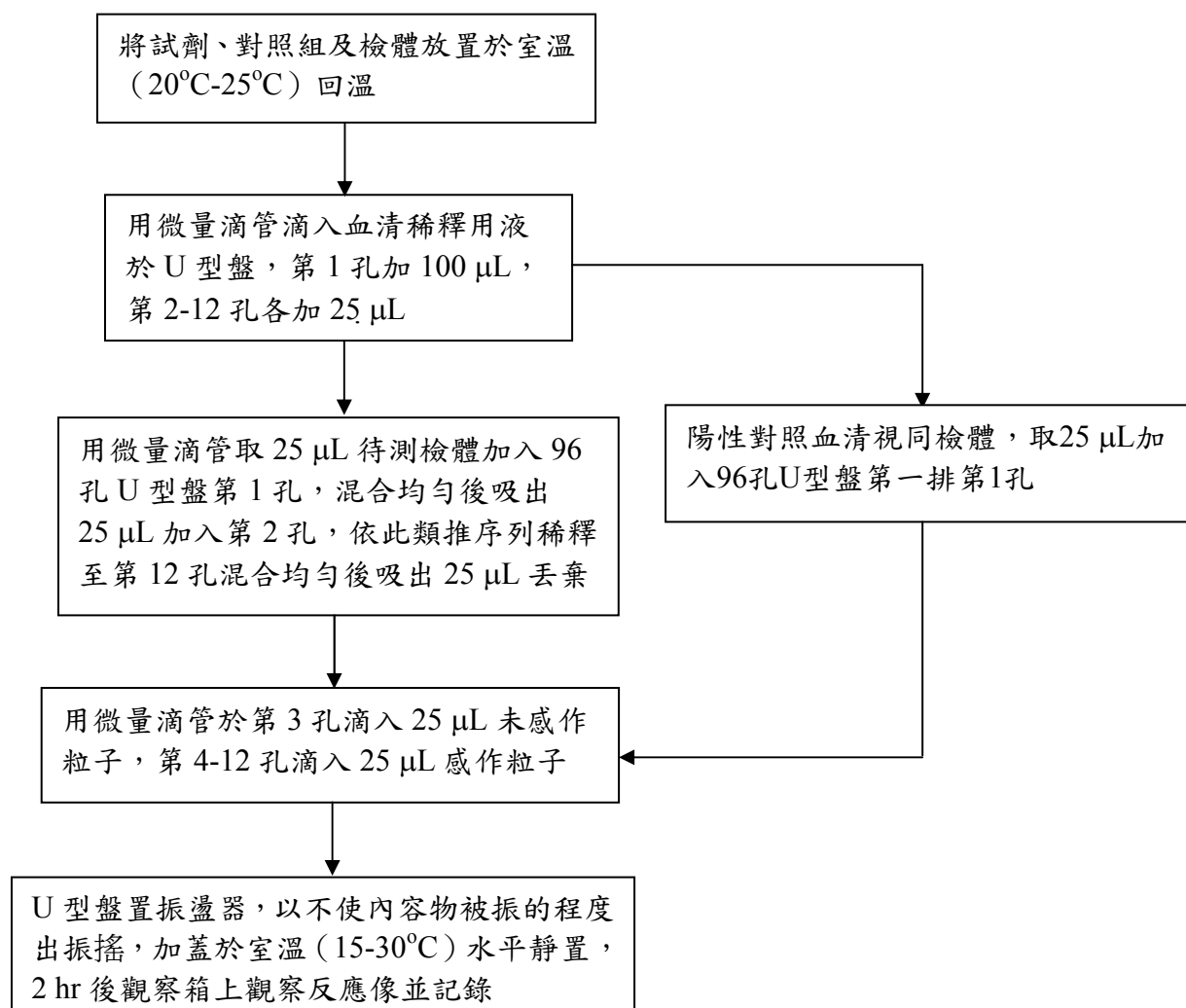
附錄 16.3 TPPA (Treponema Pallidum Particle Agglutination) 梅毒螺旋體粒子凝集試驗定性法流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號： 頁次：第 672 頁/共 1091 頁	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

附錄 16.4 TPPA (Treponema Pallidum Particle Agglutination) 梅毒螺旋體粒子凝集試驗定量法流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA)	核准日期： 年 月 日		
	頁次：第 673 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日		

附錄 16.5 TPPA (Treponema Pallidum Particle Agglutination) 梅毒螺旋體粒子凝集試驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

TPPA (*Treponema pallidum* Particle Agglutination)

梅毒螺旋體粒子凝集試驗紀錄表

試劑批號：_____

有效期限：_____

檢驗日期：_____年_____月_____日

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				1:40*	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480
A	陽性對照組												
B	Sample 01												
C	Sample 02												
D	Sample 03												
E	Sample 04												
F	Sample 05												
G	Sample 06												
H	Sample 07												

1.*加入未感作粒子為陰性對照。

2. 陽性填入(+)、陰性填入(-)、保留填入(±)。

檢驗者：

核驗者：

實驗室 PI：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 674 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測血清或血漿檢體中梅毒螺旋抗體 (*Treponema pallidum* antibody) 及抗體力價。

2 適用檢體種類

血清 (serum) 或血漿 (plasma)。

3 名詞解釋

3.1 血清 (serum)：血液凝固後，除去固態成份後的清亮液體，不含纖維蛋白原。

3.2 血漿 (plasma)：血液的液體部分，約佔血量的 55%，含有血清及纖維蛋白原，後者在凝血上具有一定作用。

4 原理概述

先以梅毒螺旋體做為抗原吸附在雞紅血球上，在加入患者血清時，紅血球表現上的抗原即與血清抗體反應進行特異性結合，從而使紅血球被動地凝集在一起，根據紅血球凝集程度即可判讀結果。

5 試劑耗材

5.1 試劑：

5.1.1 Test Cells：*Treponema pallidum* antigen coated preserved fowl erythrocytes (approx 0.36% w/v) in buffer。

5.1.2 Diluent：Selected rabbit serum (approximately 0.4%) in buffer。

5.1.3 Control Cells：Preserved fowl erythrocytes (approx 0.36% w/v) in buffer。

5.1.4 Positive Control：Serum prediluted (1/20) in buffer containing antibodies to *Treponema pallidum*。

5.1.5 Negative Control：Serum prediluted (1/20) in buffer free of antibodies to *Treponema pallidum*。

5.2 耗材

5.2.1 96 well U-shaped microplate (96 孔 U 型盤)。

5.2.2 10 μ L、100 μ L Tips。

6 儀器設備

6.1 100 μ L、25 μ L Pipette (微量吸管)。

6.2 U 型盤置振盪器。

6.3 計時器。

7 環境與設施安全

於生物安全第一級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作。

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：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 675 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 8.1 血液量至少 5 mL、血清量至少 1 mL。
- 8.2 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，給予編號。

10.2 檢驗前處理

- 10.2.1 血液放置室溫 30 分鐘以上，離心 2,000 rpm、15 分鐘，取血清/血漿至 2 mL 檢體保存管，標示號碼。
- 10.2.2 取出實驗所需用量後，將檢體移放 -80°C 冰箱保存。

10.3 試劑準備

- 10.3.1 將試劑、控制組及檢體放置於室溫 (20-25°C) 回溫。
- 10.3.2 不同批號的試藥請勿混合使用。

10.4 檢驗程序

10.4.1 定性法：4 孔稀釋

- 10.4.1.1 用微量吸管滴入血清稀釋用液於 96 孔 U 型盤，第 1、3、4 孔各加 25 μ L，第 2 孔各加 100 μ L。
- 10.4.1.2 用微量吸管取 25 μ L 待測檢體加入 96 孔 U 型盤第 1 孔，混合均勻後吸出 25 μ L 加入第 2 孔混合均勻。
- 10.4.1.3 自第 2 孔分別取出 25 μ L 加入第 3 孔及第 4 孔混合均勻後吸出 25 μ L 丟棄。第 3 孔及第 4 孔稀釋倍數為 1:20。
- 10.4.1.4 試劑所附之已稀釋陽性及陰性對照血清，直接取 25 μ L 加入 96 孔 U 型盤第 3 孔及第 4 孔。
- 10.4.1.5 用微量吸管於第 3 孔滴入 75 μ L Control Cells (表面未帶有梅毒抗原的雞紅血球細胞)，第 4 孔滴入 75 μ L Test Cells (表面帶有梅毒抗原的雞紅血球細胞)。第 3 孔及第 4 孔最終稀釋倍數為 1:80。
- 10.4.1.6 將 U 型盤置於振盪器，以不使內容物被振出的程度出振搖 30 秒混勻之，加蓋於室溫 (20-25°C) 水平靜置，45~60 分鐘 (或過夜) 後觀察箱上觀察反應像並記錄。

10.4.2 定性法：1 孔稀釋

- 10.4.2.1 用微量吸管取 190 μ L 血清稀釋用液滴入 96 孔 U 型盤第 1 孔。
- 10.4.2.2 用微量吸管取 10 μ L 待測檢體加入 96 孔 U 型盤第 1

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 676 頁/共 1091 頁	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

- 孔混合均勻後吸出 150 μ L 丟棄，稀釋倍數為 1:20。
- 10.4.2.3 用微量吸管於第 1 孔滴入 75 μ L Control Cells (表面未帶有梅毒抗原的雞紅血球細胞)，第 2 孔滴入 75 μ L Test Cells (表面帶有梅毒抗原的雞紅血球細胞)。第 1 孔及第 2 孔最終稀釋倍數為 1:80。
- 10.4.2.4 將 U 型盤置於振盪器，以不使內容物被振的程度出振搖 30 秒混勻之，加蓋於室溫(15-30°C)水平靜置，45~60 分鐘(或過夜)後觀察箱上觀察反應像並記錄。
- 10.4.3 定性量
- 10.4.3.1 用微量吸管滴入血清稀釋用液於 96 孔 U 型盤，第 1 孔加 25 μ L，第 2 孔加 100 μ L，第 3-8 孔各加 25 μ L。
- 10.4.3.2 用微量吸管取 25 μ L 待測檢體加入 96 孔 U 型盤第 1 孔，混合均勻後吸出 25 μ L 加入第 2 孔。用微量吸管取第 2 孔的稀釋檢體 25 μ L 加入第 3 孔混合均勻後吸出 25 μ L 丟棄。第 3 孔稀釋倍數為 1:20。
- 10.4.3.3 用微量吸管取第 2 孔的稀釋檢體 25 μ L 加入第 4 孔混合均勻後取 25 μ L 加入第 5 孔，依此類推 2 倍序列稀釋至第 10 孔混合均勻，並自第 10 孔吸出 25 μ L 丟棄第 4-10 孔稀釋倍數為 1:20-1:1280。
- 10.4.3.4 陽性及陰性對照血清稀釋
- 10.4.3.4.1 用微量吸管滴入 25 μ L 血清稀釋用液 96 孔 U 型盤的第 5-10 孔。
- 10.4.3.4.2 陽性及陰性對照血清 (1:20 稀釋)，分別取 25 μ L 加入 96 孔 U 型盤第 3-4 孔。
- 10.4.3.4.3 用微量吸管取陽性及陰性對照血清 25 μ L 加入第 5 孔混合均勻後取 25 μ L 加入第 6 孔，依此類推序列稀釋至第 10 孔混合均勻後吸出 25 μ L 丟棄。第 5-10 孔稀釋倍數為 1:40-1:1280。
- 10.4.3.5 用微量吸管於第 3 孔滴入 75 μ L Control Cells (表面未帶有梅毒抗原的雞紅血球細胞)，第 4-10 孔滴入 75 μ L Test Cells (表面帶有梅毒抗原的雞紅血球細胞)。第 3 孔及第 4 孔最終稀釋倍數為 1:80，第 4 孔-18 孔最終稀釋倍數為 1:160-1:5120。
- 10.4.3.6 將 U 型盤置於振盪器，以不使內容物被振出的程度出振搖 30 秒混勻之，加蓋於室溫(20-25°C)水平靜置，45~60 分鐘(或過夜)後觀察箱上觀察反應像並記錄。

10.5 吸附操作

若結果為保留(not valid)，應將待測血清進行吸附前處理後重做試驗。

- 10.5.1 將待測血清與 Control Cells 1:4 混合稀釋後，置於室溫 45-60 分

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 677 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

鐘。

- 10.5.2 離心分離 (1000 rpm, 5 分鐘) 取出上清液與稀釋液 1:5 混合稀釋後，取此稀釋後血清檢體與 Test Cells 和 Control Cells 懸浮液進行測試。

11 結果判定

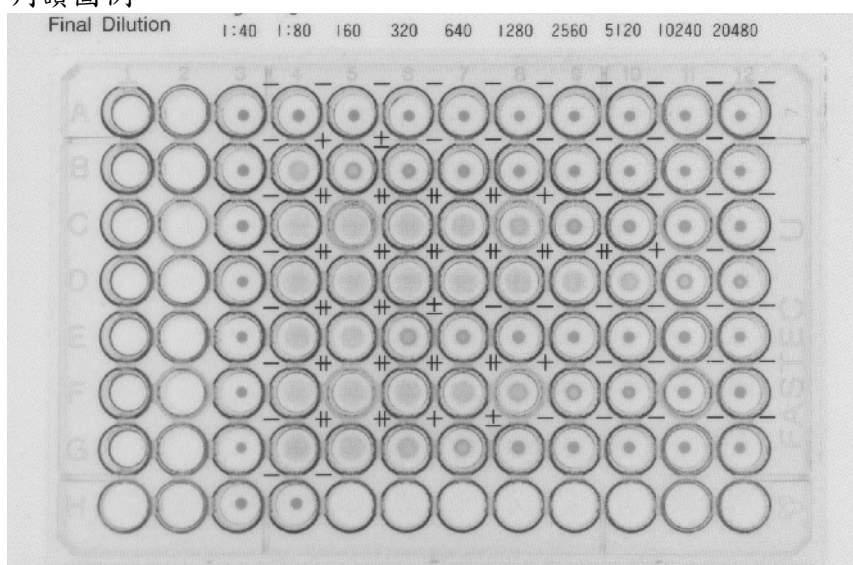
11.1 判定標準

- 11.1.1 反應像判讀：U 型盤靜置於判定用觀察箱上，觀察粒子的反應像，請參照表 1 及圖例判讀之

表 1

反 應 像	判 讀
粒子凝集如鈕釦狀，外緣呈現均等的平滑圓形	(-)
粒子形成小指環狀，外緣呈現均等的平滑圓形	(±)
粒子形成明顯且較大的指環狀，外緣可見不均等的凝集現象	(+)
粒子呈均一凝集狀，凝集粒子如膜狀廣佈 well 底部全體	(++)

判讀圖例



11.2 梅毒血清效價判定標

- 11.2.1 陽性：Control Cells (最終稀釋倍數 1:40) 的反應像為 (-)，而 Test cells (最終稀釋倍數 1:80 以上) 的反應像為 (+) 時，可判定為陽性。定量法中最終稀釋倍數反應像為 (+) 其所對應的稀釋倍數就是抗體價，如 1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560、1:5120、>1:5120。

- 11.2.2 陰性：比對 Control Cells 的反應像，若 Test cells (最終稀釋倍

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 678 頁/共 1091 頁	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

數 1：80) 的反應像為 (-)，則可判定為陰性 (-)。

- 11.2.3 保留：Control Cells (最終稀釋倍數 1：40) 的反應像為 (-)，而 Test cells (最終稀釋倍數 1：80) 的反應像為 (±) 時，則予以保留。

11.3 報告核發

TPHA 陽性 (效價：)，TPHA 陰性，TPHA 保留。

11.4 結果登錄

完成檢驗後，將檢驗結果登錄於「TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutination agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗紀錄表」(QR-M-11-01)。

12 品質管制

12.1 室內品管

12.1.1 品管種類

陽性對照血清 (positive control serum)，陰性對照血清 (negative control serum)。

12.1.2 品管頻率：每批次操作檢驗時、新開試劑組或更改檢驗程序時。

12.1.3 品管測試結果：

12.1.3.1 各檢體與 Control Cells 的反應 (最終稀釋倍數 1：40) 為 (-)。

12.1.3.2 陽性對照血清 (Positive control serum) 效價應為 1：2560±1 個稀釋倍數 (最終稀釋倍數)，陰性對照血清 (Negative control serum) 為陰性反應。

12.1.4 品管測試結果若有違背品管允收標準應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正，必要時採取預防措施。

12.2 室外品管

12.2.1 CAP microbiology survey。

12.2.2 每年進行 3 次，於每年底提出下一年度之參加計畫。

12.2.3 接獲 CAP 能力測試檢體時，應立即打開包裝，檢視檢體是否完整，若有洩漏或破損，應立即通知第二科或代理廠商處理。

12.2.4 每支 CAP 能力測試檢體應比照防疫檢體的操作步驟測定，不應特別處理。用剩之品管檢體應於-20°C 保存，以供日後必要時之複驗。

12.2.5 CAP 能力測試結果，應於規定時間內寄出，同時影印副本保存。

12.2.6 CAP 能力測試結果，應作為重要品管參考依據若有偏離允許範圍之情形發生，應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正及採取預防措施。

12.2.7 每次能力測試處理過程登記於「能力試驗摘要紀錄表」(RDC-QR-2101-02)。

13 檢驗效能

13.1 依 European reference centre 使用 Immutrip TPHA 檢測來自 Antenatal

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 679 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Clinics, Genito – Urinary Medical Clinicals 和 Public Health Laboratories

檢體之結果

	Positive samples	Negative samples	Total
Syphilis positive	406	6	412
Syphilis negative	3	669	672
	409	675	1084

結果顯示：

Immutrep TPHA 分析靈敏度：98.5%。

Immutrep TPHA 分析特異性：99.6%。

Immutrep TPHA 再現性：100% (±1 個稀釋倍數)

14 干擾與交互反應

- 14.1 避免使用溶血或是遭細菌污染以及嚴重脂血症的檢體。
- 14.2 若病人患有結締組織病，癲瘋病及傳染性單核球增多症，易有偽陽性的結果。
- 14.3 操作過程有氣泡的產生或混合不完全，皆會造成不正確的結果。

15 廢棄物處理

- 15.1 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處理。
- 15.2 試劑內含 0.095% sodium azide 當抑菌劑，可能與管路的鉛或銅形成爆炸性鹽類化合物。倒入水管丟棄時，應隨之沖以大量水

16 參考資料

Omega diagnostics Immutrep TPHA 試劑說明書

17 附錄

- 17.1 TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutination agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗定性法檢體稀釋操作簡圖。
- 17.2 TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutination agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗定量法檢體稀釋操作簡圖。
- 17.3 TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutination agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗定性法流程圖。
- 17.4 TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutination agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗定量法流程圖。
- 17.5 TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutination agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗流程圖。
- 17.6 TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutination agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗紀錄表。

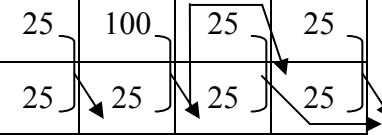
行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 680 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 17.1 TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutination agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗定性法檢體稀釋操作簡圖

Well No.	1	2	3	4
血清稀釋用液 (μL)	25	100	25	25
檢體 (μL)	25	25	25	25
檢體稀釋倍數	1:2	1:10	1:20	1:20
Control Cells (μL)			75	
Test Cells (μL)				75
最終稀釋倍數			1:80	1:80

25 μL 丟棄



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 681 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 17.2 TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutination agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗定量法檢體稀釋操作簡圖

Well No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
血清稀釋用液 (μL)	25	100	25	25	25	25	25	25	25	25
檢體 (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
檢體稀釋倍數	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
Control Cells (μL)			75							
Test Cells (μL)				75	75	75	75	75	75	75
最終稀釋倍數			1:80	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120

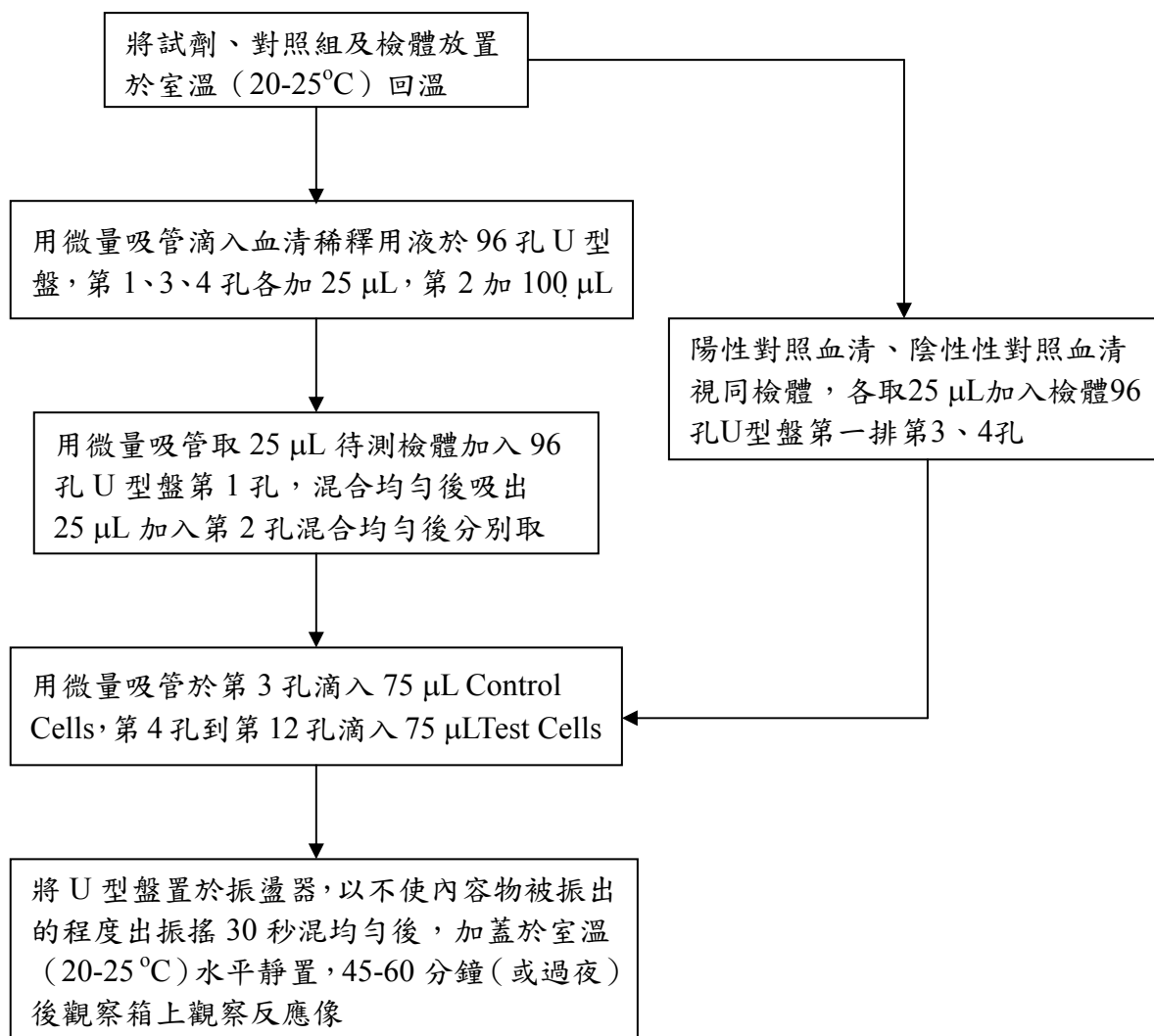
25 μL 丟棄

25 μL 丟棄

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 682 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

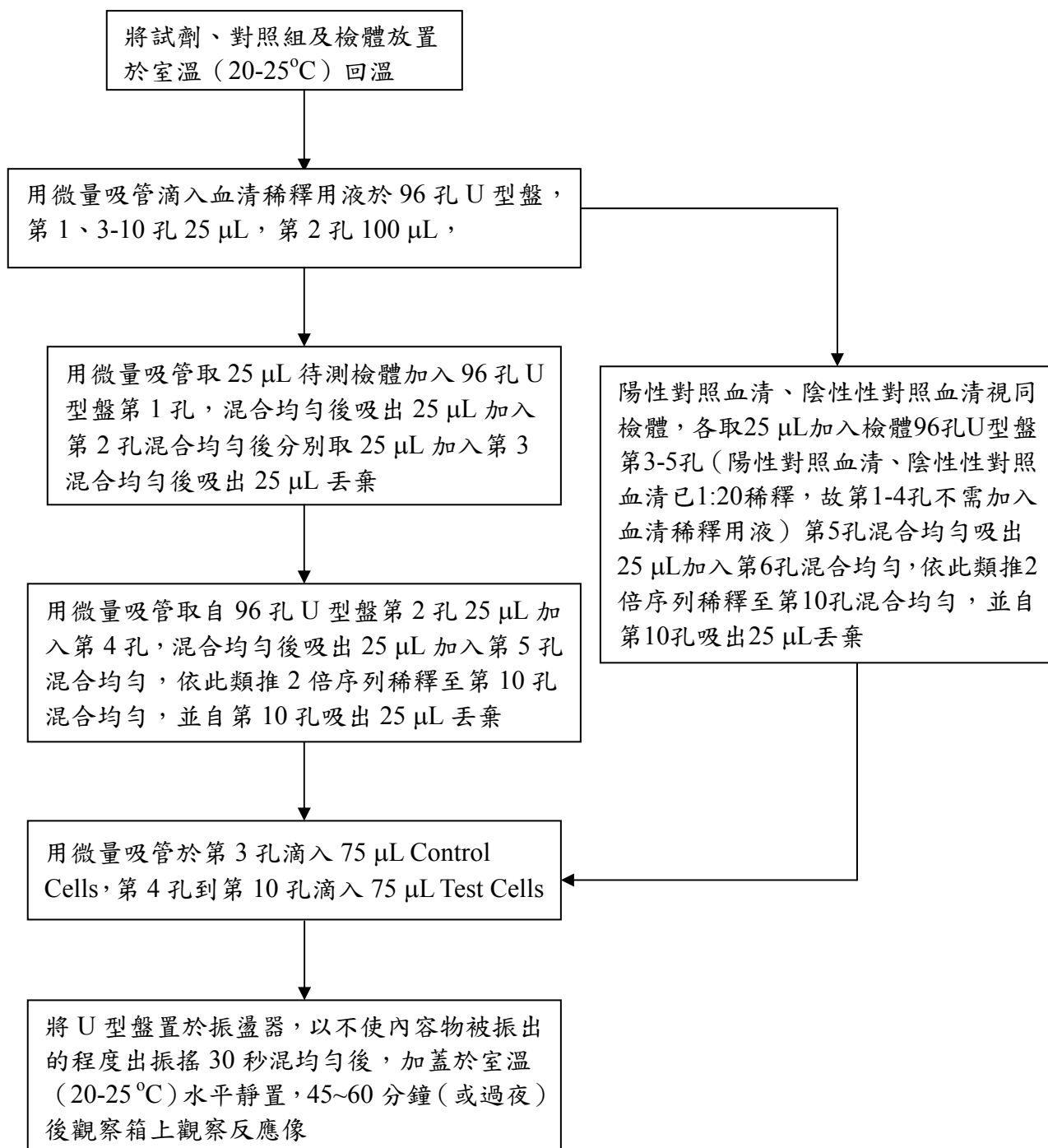
附錄 17.3 TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination Agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗定性法流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號： 頁次：第 683 頁/共 1091 頁	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

附錄 17.4 TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination Agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗定量法流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA)	核准日期： 年 月 日		
	頁次：第 684 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日		

附錄 17.4 TPHA (*Treponema pallidum* Hemagglutination Agglutination) 梅毒螺旋體血球凝集試驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

TPHA (*Treponema pallidum* Hemagglutination Agglutination)

梅毒螺旋體血球凝集試驗紀錄表

試劑批號：_____

有效期限：_____

檢驗日期：_____年_____月_____日

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				1:80	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
A	陽性 對照組										
B	陰性 對照組										
C	Sample 01										
D	Sample 02										
E	Sample 03										
F	Sample 04										
G	Sample 05										
H	Sample 06										

陽性填入(+)、陰性填入(-)、保留填入(±)。

檢驗者：

核驗者：

實驗室 PI：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏淋病雙球菌染色鏡檢 (革蘭氏染色法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 685 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

鑑定細菌的型態、大小、外觀、以及對革蘭氏染色的反應。

2 適用檢體種類

適用於檢體及分離菌株。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用細菌細胞壁構造的差異，以染色液將細菌染成不同顏色，被染成紫色的細菌為革蘭氏陽性菌，被染成紅色的細菌為革蘭氏陰性菌，為目前細菌分類的重要依據。

5 試劑耗材

5.1 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution)：Gram-Hucker's stain，武藤化學株式會社，Japan。

5.2 標準菌株：*Staphylococcus aureus* ATCC 75923 及 *Escherichia coli* ATCC 75922。

5.3 無菌吸管：10 mL，應該有 0.1 mL 刻度。

5.4 無菌生理食鹽水：取氯化鈉 8.5 g 溶於 1,000 mL 蒸餾水中，以 121°C 滅菌 15 min。

5.5 接種針（環）。

5.6 載玻片及蓋玻片。

5.7 可拋棄式無菌塑膠手套。

5.8 試管：10 x 100 mm，13 x 100 mm 試管或其他合適者。

6 儀器設備

6.1 高壓滅菌鍋。

6.2 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。

6.3 顯微鏡：能放大至 1,000 倍油鏡之一般光學顯微鏡。

6.4 微量吸管 pipetmen：1,000 μ L、200 μ L、2 μ L 三種規格。

6.5 滅菌用容器：10 L 不鏽鋼容器。

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 檢體運送及保存

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏淋病雙球菌染色鏡檢 (革蘭氏染色法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 686 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 抹片製作：

- 10.1.1 菌株：使用接種針（環），挑取 1-5 個生長於培養基上之菌落，於載玻片上塗布製成薄抹片，待菌液完全風乾後，將載玻片在火燄上來回數次固定。
- 10.1.2 陰道、子宮頸、尿道、咽、與結膜等之黏膜或上皮層檢體：用拭子於載玻片上塗布製成薄抹片，待完全風乾後，將載玻片在火燄上來回數次固定。
- 10.1.3 尿液：以 3,000 xg 離心 20 min，吸除大部分上清液，留下約 0.5 mL 的液體，經劇烈震盪至少 30 sec，取 1 滴置於載玻片上，不要塗開液體，待其自然風乾後，將載玻片於火燄上過火數次固定。

10.2 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫染液染 1 min，水洗，水洗應不超過 5 sec 鐘。

10.3 媒染：加革蘭氏碘液作用 1 min，水洗。

10.4 脫色：用 95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再以自來水沖洗，此步驟需時甚短，僅數 sec 即可，惟視抹片之厚薄而定。

10.5 複染：用哈克氏複染液染 30 sec 鐘，水洗。

10.6 自然風乾。

10.7 鏡檢：以顯微鏡觀察。

11 結果判定

11.1 革蘭氏陽性：深藍色、藍紫色或紫色。

11.2 革蘭氏陰性：粉紅色或紅色。

12 品質管制

試劑之有效性試驗

12.1 所使用試劑應於有效期內使用。

12.2 同一批號試劑取一組進行試驗。

12.3 使用革蘭氏陽性球菌標準菌株 *Staphylococcus aureus* ATCC 75923 及革蘭氏陰性標準菌株 *Escherichia coli* ATCC 75922，進行試驗。

12.4 試驗結果必須符合革蘭氏陽性及革蘭氏陰性反應，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，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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏淋病雙球菌染色鏡檢 (革蘭氏染色法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 687 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

公司，臺灣。第 1477-1480 頁。

- 14.2 Murray PR, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, RH Tenenbaum, R Tenenbaum. 2003. Manual of clinical microbiology, 8th edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 758-260.

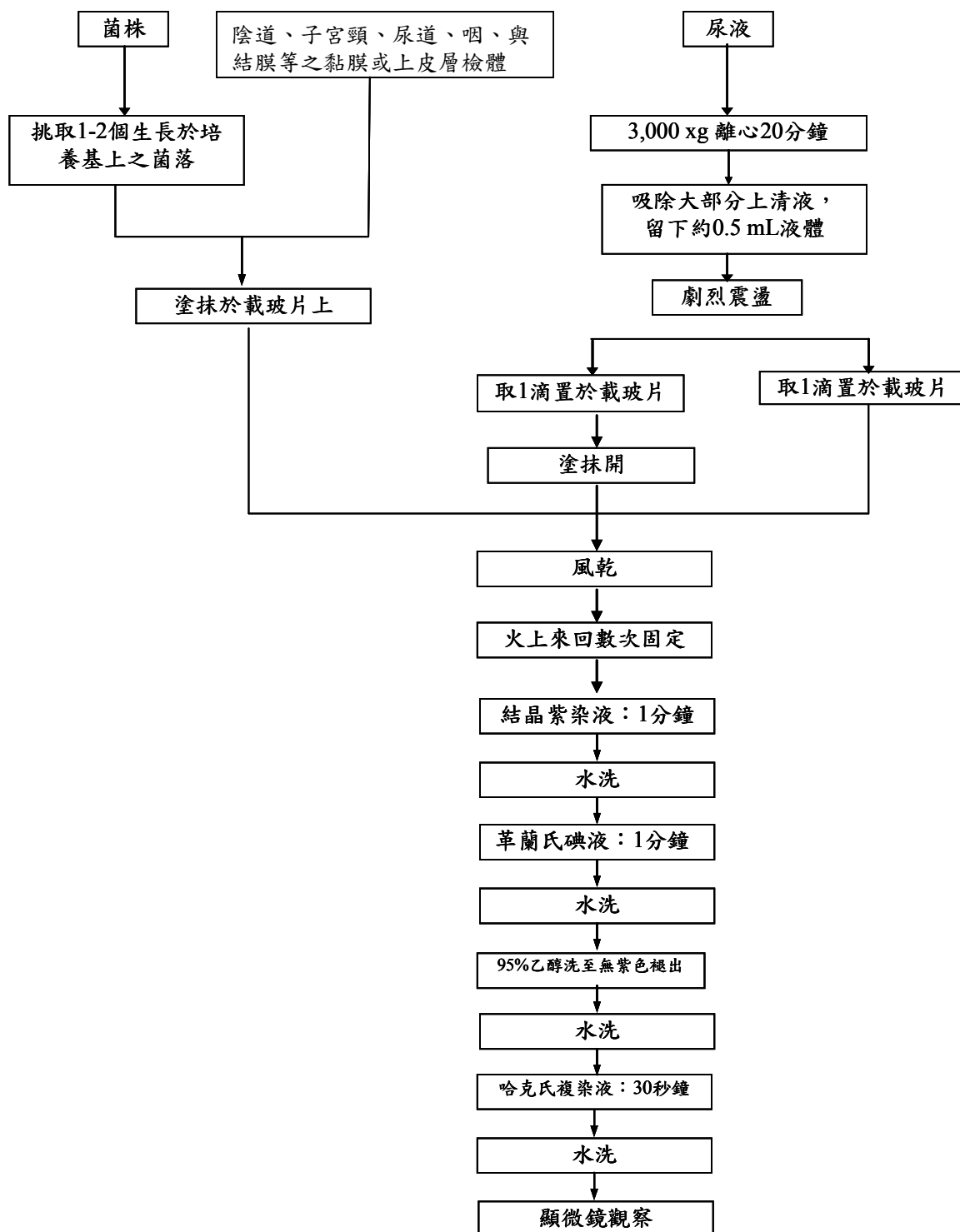
15 附錄

- 15.1 革蘭氏染色流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏淋病雙球菌染色鏡檢 (革蘭氏染色法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 688 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 革蘭氏染色流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 689 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

培養鑑定泌尿生殖道感染之奈色氏淋病雙球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)。

2 適用檢體種類

新鮮尿液、泌尿生殖道分泌物與原始純培養菌株。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

藉由巧克力平板 (chocolate agar plate) 及 MTM (modified Thayer-Martin agar) 分離菌種，並利用菌落特性、菌體顯微型態及生化代謝特性將奈色氏淋病雙球菌鑑定出來。

5 試劑耗材

5.1 試劑

5.1.1 巧克力平板 (chocolate agar plate)：CMP，台灣。

5.1.2 MTM (modified Thayer-Martin agar)：CMP，台灣。

5.1.3 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution)：Difco，美國或武藤化學，日本。

5.1.4 API NH Vitek 2 鑑定套組：BioMérieux，法國。

5.1.5 氧化酶試劑 (oxidase strips)。

5.1.6 無菌生理食鹽水。

5.2 耗材

5.2.1 接種環。

5.2.2 載玻片。

6 儀器設備

6.1 第 II 級生物安全操作櫃 (class II BSC)。

6.2 二氧化碳培養箱。

6.3 光學顯微鏡：能放大至 1,000X 油鏡。

6.4 高壓滅菌鍋。

7 環境與設施安全

7.1 於生物安全第 2 級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作。

7.2 處理檢體、接種時於第 II 級生物安全操作櫃。

8 檢體採集

8.1 採集新鮮尿液後以 3,000 轉離心 15 min，並去掉上清液，再以 1 μ L 無菌接種環取 1 Loop 尿液濃縮液接種於 MTM (modified Thayer-Martin agar) 培養。

8.2 以無菌棉棒採集泌尿生殖道分泌物直接接種於 MTM (modified

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 690 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Thayer-Martin agar) 培養。

- 8.3 以細菌拭子之棉棒採集尿道或陰道分泌物，插入 Cary-Blair 保存輸送培養管。

9 檢體運送及保存

- 9.1 常溫運送及保存。

- 9.2 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 分離培養

10.2.1 檢體接種

- 10.2.1.1 生殖泌尿道分泌物：將輸送培養基上之拭子旋轉接種於 MTM 培養基。

- 10.2.1.2 原始純培養菌株：挑取菌落，接種於巧克力平板 (chocolate agar plate)。

- 10.2.2 培養：35°C，3-7% CO₂，二氧化碳培養箱培養。

10.2.3 觀察

- 10.2.3.1 生殖泌尿道分泌物：培養 16-18 hr 後，開始觀察有無可疑菌落，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。

- 10.2.3.2 原始純培養菌株：培養 16-18 hr 後，進行鑑定。

10.3 鑑定

- 10.3.1 菌落型態及染色：挑取巧克力平板上直徑約 1 毫米，微凸起、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，腎形狀成雙排列。

10.3.2 生化鑑定

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

- 10.3.2.2 API-NH 生化鑑定套組，依據套組說明製備菌液、接種菌液於專用之試管中，再置入鑑定卡等待判讀結果是否為 *N. gonorrhoeae*，可信度需達 95% 以上。

11 結果判定

11.1 判定標準

奈色氏淋病雙球菌 (*N. gonorrhoeae*) 陽性需符合以下條件，若其中有一不符合者，即判定為奈色氏淋病雙球菌陰性。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 691 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

試驗或基質	<i>Neisseria gonorrhoeae</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，腎形狀成雙排列，直徑約在 0.6 至 0.8 μm 左右
3.Oxidase 試驗	藍色或藍紫色
4.快速生化鑑定系統 API-NH Vitek 2	依生化反應的顏色變化得到一組 Numerical profile，依照說明書查尋號碼簿，判定菌株是否為 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>

11.2 報告核發

奈色氏淋病雙球菌陽性，奈色氏淋病雙球菌陰性。

11.3 結果登錄

完成檢驗後，將檢驗結果登錄於「奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定紀錄表」(QR-M-08-01)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 室內品管

12.1.1 MTM (modified Thayer-Martin) plate 之品質管制。

12.1.2 品管頻率：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。

12.1.3 測試菌株：*N. gonorrhoeae* ATCC 49226、*Staphylococcus epidermidis* ATCC14990。

12.1.4 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 mL 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。

12.1.5 品管測試結果必須符合下列標準：

12.1.5.1 *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226，24 hr 後可見 1-2 mm 菌落。

12.1.5.2 *Staphylococcus epidermidis* ATCC14990，24 hr 後沒有菌落生長或生長菌落稀少。

12.1.6 品管測試結果若有違背品管允收標準應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正，必要時採取預防措施。

12.2 室外品管

12.2.1 CAP microbiology survey。

12.2.2 每年進行 3 次，於每年底提出下一年度之參加計畫。

12.2.3 接獲 CAP 能力測試檢體時，應立即打開包裝，檢視檢體是否完整，若有洩漏或破損，應立即通知第二科或代理廠商處理。

12.2.4 每支 CAP 能力測試檢體應比照防疫檢體的操作步驟測定，不應

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 692 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

特別處理。用剩之品管檢體應於-20°C 保存，以供日後必要時之複驗。

12.2.5 CAP 能力測試結果，應於規定時間內寄出，同時影印副本保存。

12.2.6 CAP 能力測試檢體培養出之菌株應至於-70°C 保存，作為能力試驗結果判定之處理依據。

12.2.7 CAP 能力測試結果，應作為重要品管參考依據若有偏離允許範圍之情形發生，應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正及採取預防措施。

12.2.8 每次能力測試處理過程登記於「能力試驗摘要紀錄表」(RDC-QR-2101-02)。

13 干擾與交互反應

13.1 培養箱的溫度及 CO₂ 含量太低會導致細菌生長不好。

13.2 菌落型態觀察，染色及各項生化反應需選用單純菌株，以避免誤判。

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，依本局廢棄物處理作業程序處理。

15 參考資料

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 538-544 頁。

16 附錄

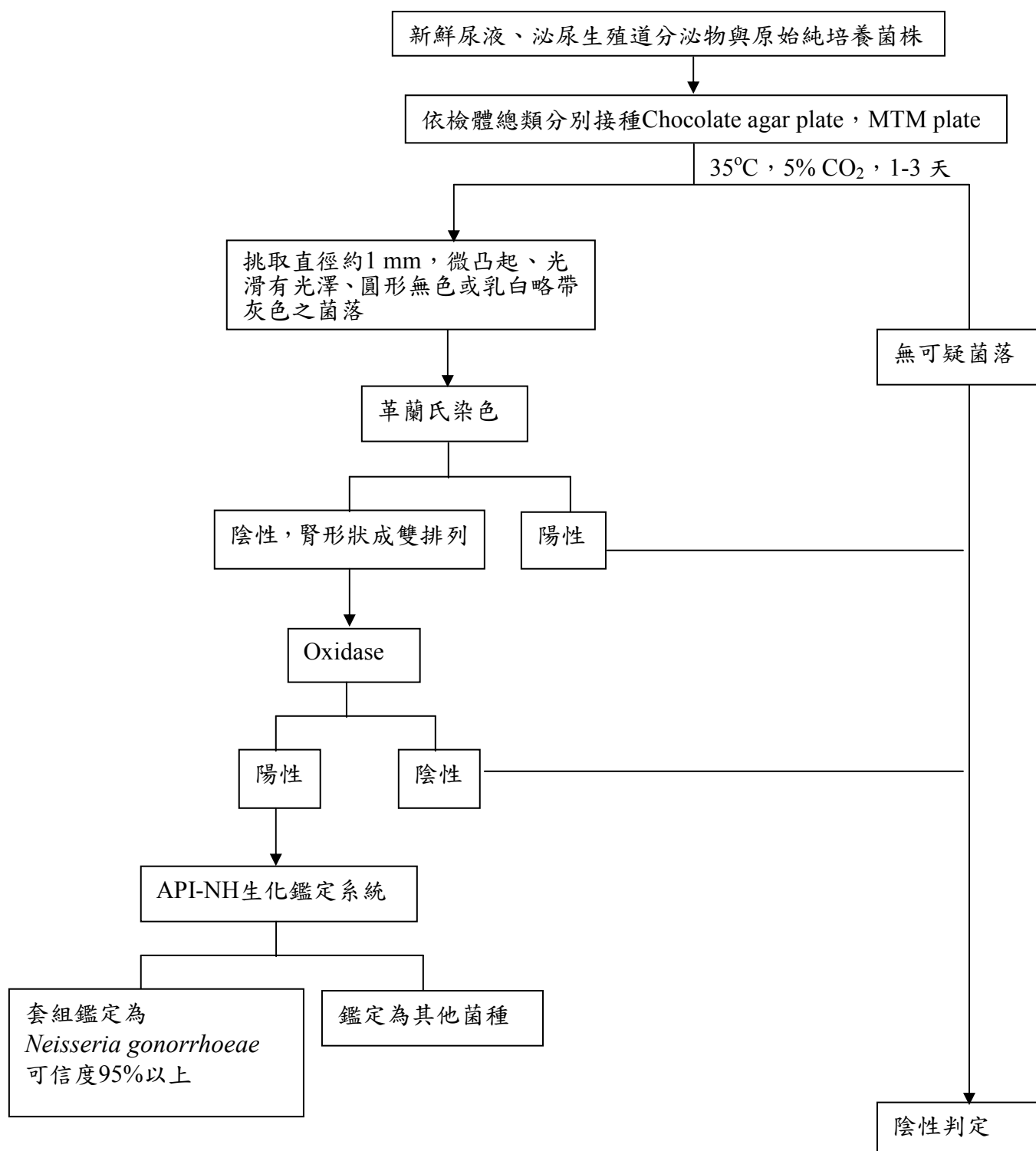
16.1 奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定流程圖。

16.2 奈色氏淋病雙球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：	奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 693 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.1 奈色氏淋病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：	奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 694 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.2 奈色氏淋病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

奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定紀錄表

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	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		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：

核驗者：

實驗室 PI：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏淋病雙球菌分子生物學 檢測 (real-time-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 695 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

以分子生物學之技術利用即時聚合酶連鎖反應 (real-time-PCR) 來檢測檢體中是否有砂眼披衣菌及奈色氏淋病雙球菌。

2 適用檢體種類

尿液，女性子宮頸、陰道拭子檢體及男性尿道拭子檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用具特殊專一性之引子 (primers) 和探針 (probe)，把檢體中細菌的核酸分子經由 PCR 的過程來複製放大具有砂眼披衣菌及奈色氏淋病雙球菌的核酸，以 probe 進行螢光偵測，篩選檢體是否感染砂眼披衣菌及奈色氏淋病雙球菌。

5 試劑耗材

5.1 試劑

5.1.1 Sample preparation system (Abbott, Order. no. 06K12-24)

5.1.1.1 Lysis buffer。

5.1.1.2 Wash 1。

5.1.1.3 Wash 2。

5.1.1.4 Elution buffer。

5.1.1.5 Microparticles。

5.1.2 Abbott real time CT/NG amplification reagent kit (Abbott, Order. no. 02G28-91)

5.1.2.1 Abbott real time CT/NG internal control。

5.1.2.2 Abbott real time CT/NG amplification reagent pack。

(1) AmpiTaq gold enzyme。

(2) Amplification reagent。

(3) Activation reagent。

5.1.3 Abbott real time CT/NG control kit (Abbott, Order. no. 02G28-80)

5.1.3.1 Abbott real time CT/NG negative control。

5.1.3.2 Abbott real time CT/NG cutoff control。

5.2 耗材

5.2.1 Dropper。

5.2.2 Deep well plate。

5.2.3 DiTis (1 mL tips)、DiTis (200 μ L tips)。

5.2.4 Reagent vessels。

5.2.5 Reaction vessels。

5.2.6 Master mix tube。

5.2.7 96-well optical reaction plate。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏淋病雙球菌分子生物學 檢測 (real-time-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 696 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

5.2.8 光學增強膜。

6 儀器設備

- 6.1 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 6.2 m2000spTM 全自動核酸萃取系統。
- 6.3 m2000rt 即時定量聚合酶連鎖反應系統。

7 環境與設施安全

- 7.1 病人拭子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 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。

8 檢體採集

- 8.1 尿液檢體採集，病人採集前至少 1-2 hr 不曾排尿。取前段尿液 7-10 mL 至容器中。
- 8.2 女性子宮頸、陰道拭子檢體及男性尿道拭子檢體採集。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

- 9.1 冷藏運送。
- 9.2 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 檢驗處理

- 10.1.1 取 1 mL 檢體加入 Reaction vessel，將 Reaction vessel 和 CT/NG cutoff control (二支)、CT/NG negative control 置於檢體架上 (若有條碼，將條碼朝向檢體架右方)。
- 10.1.2 將檢體架放置於 m2000spTM 工作台上，確定有放穩並卡入後方之卡榫。
- 10.2 將 5 mL 的 Reaction vessel 放進 1 mL Subsystem carrier (先將 subsystem carrier 的 cover 拿開再放入 reaction vessel)，蓋上 Cover，放到 Magnetic zone。
- 10.3 放入新的 1,000 µL DiTis 到 Carrier，並將 Carrier 放置於 m2000spTM 工作台上 (一隻檢體需要約 10 支 1,000 µL DiTis tips)。
- 10.4 放入空的 DiTi tray 及 Deep well 在 DiTi reuse rack 上，另外再放置一個 Deep well 到 Output deck (A1 朝左上方，有缺角的朝左下方)。
- 10.5 萃取試劑準備
 - 10.5.1 Internal control 充分混合均勻，取 750 µL 加到 Lysis buffer。
 - 10.5.2 取 70 mL USP Grade 190-200 Proof ethanol (95-100% ethanol)

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 697 頁/共 1091 頁	奈色氏淋病雙球菌分子生物學 檢測 (real-time-PCR)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

加到 Wash 2。

- 10.5.3 準備劑槽 (reagent vessel)：先將試劑貼紙靠試劑槽右邊的邊緣貼好 (barcode 朝右)，將試劑槽依照 Reagent carrier 上的標示放到 carrier 上。
- 10.5.4 再依試劑槽上的標籤，倒入試劑 (lysis buffer 及 wash buffer 儘量避免有氣泡產生)。
- 10.5.5 試劑都加好後，依照指定位置放到 m2000sp™ 工作台上，確定有將 Reagent vessel carriers 推到底部。
- 10.6 檢查 System liquid container (液壓系統用水儲存桶)、Solid waste container (固態廢棄物垃圾桶) 及 Liquid waste container (液體廢棄物垃圾桶)，如果超過下列標準，則系統無法開始進行萃取。

Container	Liquid/Solid Level
Solid Waste	<½ Full
Liquid Waste	<¾ Full
System Liquid	>¼ Full

10.7 萃取細菌 DNA

- 10.7.1 打開 m2000sp™ 機器和電腦的電源，電腦開機完成後會自動進入 m2000sp™ 的系統輸入帳號密碼後進入主畫面登入之後，此時點選畫面左方的 Start 進行初始，初始化完成後系統呈現 Ready 狀態。
- 10.7.2 由 <Instrument Status> 點選 **Orders**，再點選 **Sample Extraction**。
- 10.7.3 在 <Application Specification> list 下，選取所要進行的 Protocol 後，由畫面左邊的項目中點選 **Set Up Run**。
- 10.7.4 依序輸入以下項目的資料：
<Run Name> 可自己設定名稱，<Comment> 輸入要補充的資料。
- 10.7.5 點選 **Next** 後會出現進入 <Sample Extraction：Assay Details> 畫面：輸入 <Control Information>、<Calibrator Information>，包括 lot number、Expiration date 及濃度；若是同一批號，可直接選擇上次保存的批號資料。
註：Calibration 只要作一次系統就會記憶，不需要每次都重作，除非 Amplification Reagent Kit 或 Sample Preparation System 換批號。
- 10.7.6 點選 **Next** 後會出現 <Sample Extraction：Sample Scan> 畫面，選擇 **Scan**，完成後若有條碼會直接顯示在螢幕上，無條碼需輸入檢體編號。
- 10.7.7 點選 **Next** 後會出現 <Sample Extraction：Assay Assignment>，再次確認檢體排列及要進行的 protocol 是否正確。
- 10.7.8 點選 **Next** 進到 <Sample Extraction：Control and Calibrator

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 698 頁/共 1091 頁	奈色氏淋病雙球菌分子生物學 檢測 (real-time-PCR)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

- Warning>** 畫面，如果沒有任何 Warning 出現，則點選 **Next**。
- 10.7.9 點選 **Next** 後出現 **<Sample Extraction : Worktable Setup>** 的畫面。
- 10.7.10 點選 **Next** 後，進到 **<Checking Worktable locations>**，系統會去檢查 subsystem carrier 是否放對位置，檢查完畢畫面進到 **<Sample Extraction : Disposable Tip Status>** 畫面：依照是否有補充 Tips 來勾選需要 update 的項目，點選畫面右下方 **Update**，系統開始檢查 shelves 1 是否為空的。
- 10.7.11 點選 **Next** 後出現 **<Sample Extraction : Reagent Setup>** 的畫面，輸入以下資料：**<Deep Well Plate ID>**、**<Reagent Lot Number>**、**<Expiration Date>** (月/年)。
- 10.7.12 點選 **Next** 後出現 **<Sample Extraction : Reagent Scan>**，點選 **Scan** 進行 scan。如果沒有錯誤，會出現 **Next** (如果 Reagent Vessel Carriers 有放錯位置，則會以紅字標出放錯的位置，更正之後再點選 **Rescan** 重新掃描)，點選後出現 **<Sample Extraction : Run Start>** 畫面。
- 10.7.13 確認後選擇 **Start** 開始進行萃取。
- 10.7.14 當萃取結束後會出現一個結束的對話框，選擇 **Close**，由畫面左方選 **Close Process**，系統回復到 READY 狀態。
- 10.8 Real-time PCR master mix 之配製
- 10.8.1 放入所需的 Master mix tube (蓋子須取下) 和 96-Well optical reaction plate 於 m2000spTM 工作台上。
- 10.8.2 放入 1,000 mL、200 mL 的 DiTi tips。
- 10.8.3 拿掉已解凍好的 Reagent pack 的蓋子 (操作前半 hr 從 -20°C 拿出來解凍，完全解凍後若還沒要操作則先置於 4°C)，確定完全解凍及是否有氣泡，依照順序放到架上。
- 10.8.4 由主畫面選擇 **Orders**，再點選 **Master Mix Addition** 進入 **<Run Master Mix Addition>** 的畫面。
- 10.8.5 點選剛完成的 Deep well name，選擇畫面左側的 **Set Up** **Run**，接著會出現 **<Master Mix Addition : Plate Details>** 的畫面，選擇 **Next**。
- 10.8.6 出現 **<Master Mix Addition: Worktable Setup>** 輸入 PCR plate 的名稱，選擇 **Next**。
- 10.8.7 出現 **<Master Mix Addition: Disposable Tip Status>** 的畫面，選擇 **Next**。
- 10.8.8 出現 **<Master Mix Addition : Assay Specific Reagent Scan>** 的畫面，點選 **Scan**，掃描成功後出現 Assay reagent IDs、Lot 及 Expiration date。
- 10.8.9 選擇 **Next**，出現 **<Master Mix Addition : Run Start>** 畫面：依照指示完成再次確認的動作，點選 **Start** 開始進行 Master mix 配製。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	奈色氏淋病雙球菌分子生物學 檢測 (real-time-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 699 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.9 封膜

- 10.9.1 撕下光學增強膜白色的部分 (protective backing)，手盡量壓住邊緣 (end tab)，避免直接接觸到會覆蓋在 96 孔盤的範圍 (seal)。
- 10.9.2 將光學增強膜覆蓋在 96 孔盤上，以 Applicator 刮平光學增強膜，再以 Applicator 壓住膜的邊緣，按虛線撕下，最後再以 Applicator 刮 96 孔盤的邊緣區來增加膜跟 96 孔盤的密合度。
- 10.9.3 將封好膜的 96 孔盤移到 m2000rt 進行 Real-time PCR。

10.10 Real-time PCR

- 10.10.1 在 m2000spTM 電腦的螢幕上方的工具列 **<Result>**，點選 **<View by PCR plate>**，選擇剛剛完成的 Protocol，在畫面左邊點選 Export，將 CD-ROM 放入電腦中，選 **Start**。
- 10.10.2 打開 m2000rtTM 機器和電腦的電源，進入 m2000rt 使用者輸入的畫面 **<User Logon>**，輸入 **<User name>** 及 **<Password>**。
- 10.10.3 在 **<Instrument Status>** 畫面的左邊，選擇 **Start**，開始機器的初始化 (約 15 min)，當初始化進行完成，**<Instrument Status>** 會顯示 **<Ready>**；此時即可開始進行試驗。
- 10.10.4 點選主畫面的 **<Order>**，點選 **<Test Orders>**，螢幕會顯示 **<Pending Test Orders>**，點選螢幕左方 **<Create Tasks>** 中的 **<Import and Set Up Run>**，將存有 m2000spTM 資料的 CD 放入電腦中，選擇要進行的反應盤名稱，點選 **Next**，檢查是否有錯誤，再選 **Next**，打開 tray drawer，放入 PCR plate，點選 **Start** 即可。
- 10.10.5 反應進行完成後，點選主畫面上方的 **<Result>** 選擇 **<View by Plate>**，螢幕會出現本次實驗偵測的結果，若在 Error code 出現紅色的代碼，即表示這個樣本反應失敗。

11 結果判定

11.1 判定標準

陽性對照組與陰性對照組的結果必須符合設定值範圍之內，同時 Internal control 也要在認可範圍內，有偵測出砂眼披衣菌、奈色氏淋病雙球菌者，判為砂眼披衣菌、奈色氏淋病雙球菌核酸檢測陽性；未偵測出砂眼披衣菌、奈色氏淋病雙球菌者，判為砂眼披衣菌、淋菌核酸檢測陰性。

11.2 報告核發

砂眼披衣菌核酸檢測陽性，砂眼披衣菌核酸檢測陰性。
奈色氏淋病雙球菌核酸檢測陽性，奈色氏淋病雙球菌核酸檢測陰性。

11.3 結果登錄

完成檢驗後列印反應結果，將檢驗結果登錄於「檢體送驗單」並加蓋檢驗者印章，送實驗室主管審核及蓋章。

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：	奈色氏淋病雙球菌分子生物學 檢測 (real-time-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 700 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12.1 室內品管

12.1.1 品管種類

12.1.1.1 Abbott real time CT/NG internal control。

12.1.1.2 Abbott real time CT/NG control kit (Abbott, Order. no. 02G28-80)。

12.1.2 品管頻率：同批次操作檢驗時、新開試劑組或更改檢驗程序時。

12.1.3 品管測試結果必須符合下列標準。

12.1.3.1 CT/NG internal control 在認可範圍內。

12.1.3.2 CT/NG cutoff control 符合設定值範圍。

12.1.3.3 CT/NG negative control 應為陰性。

12.1.4 品管測試結果若有違背品管允收標準應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正，必要時採取預防措施。

12.2 室外品管

12.2.1 CAP microbiology survey。

12.2.2 每年進行 3 次，於每年底提出下一年度之參加計畫。

12.2.3 接獲 CAP 能力測試檢體時，應立即打開包裝，檢視檢體是否完整，若有洩漏或破損，應立即通知第二科或代理廠商處理。

12.2.4 每支 CAP 能力測試檢體應比照防疫檢體的操作步驟測定，不應特別處理。用剩之品管檢體應於-20°C 保存，以供日後必要時之複驗。

12.2.5 CAP 能力測試結果，應於規定時間內寄出，同時影印副本保存。

12.2.6 CAP 能力測試結果，應作為重要品管參考依據若有偏離允許範圍之情形發生，應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正及採取預防措施。

12.2.7 每次能力測試處理過程登記於「能力試驗摘要紀錄表」(RDC-QR-2101-02)。

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

Abbot m2000sp™ operations manual、Abbott m2000rt™ operations manual。

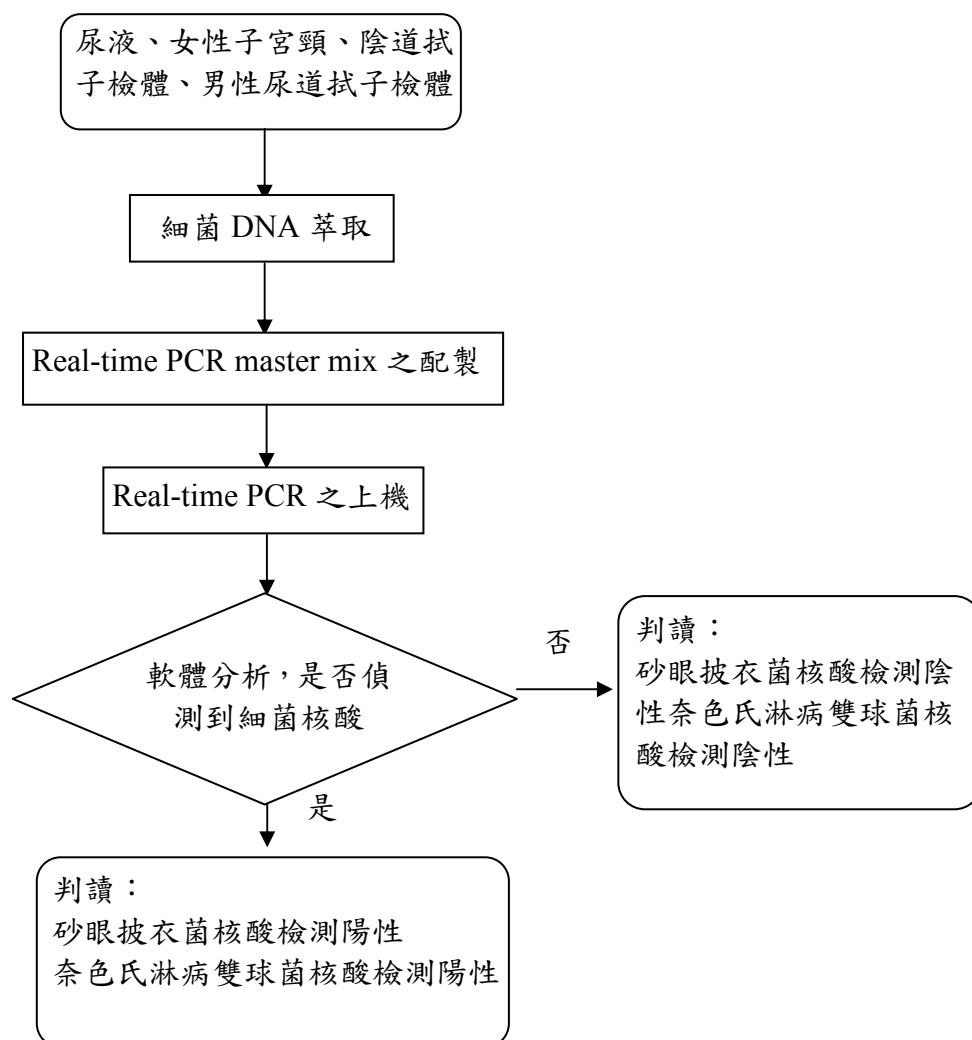
15 附錄

15.1 砂眼披衣菌及奈色氏淋病雙球菌核酸檢測（即時聚合酶鏈鎖反應）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：	奈色氏淋病雙球菌分子生物學 檢測 (real-time-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 701 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 砂眼披衣菌及奈色氏淋病雙球菌核酸檢測（即時聚合酶鏈鎖反應）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：	腸病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 702 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

分離腸病毒，並鑑定病毒之血清型別。

2 適用檢體種類

適用於糞便 (stool)、肛門拭子 (rectal swab)、咽喉拭子 (throat swab)、胸膜液 (pleural fluid)、心包液 (pericardial fluid)、腹水 (ascites)、腦脊髓液 (cerebrospinal fluid, CSF)、血清 (serum)、結膜拭子 (conjunctival swab) 及臟器 (如腦部組織、肺臟、心臟、小腸、淋巴結) 等檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

檢體之腸病毒和細胞之受器結合即進入細胞內，藉細胞之機制複製病毒。病毒不斷的複製造成細胞形態改變 (細胞病變 cytopathic effect; CPE)，終至凋死。單株抗體可與複製之病毒形成複合物，之後再加入結合螢光物質之第二抗體，便可於螢光顯微鏡下觀察而確認腸病毒之血清型別。

5 試劑耗材

- 5.1 Dulbecco's modified eagle medium ; DMEM。
- 5.2 Essential modified eagle medium ; EMEM。
- 5.3 RD 細胞株 (Victorian Infectious Disease Reference Laboratory passage 228)。
- 5.4 HEp-2c 細胞 (from Centers for Disease Control and Prevention, USA)。
- 5.5 細胞培養管 (25 cm²、75 cm²、150 cm²)。
- 5.6 Trypsin。
- 5.7 細胞培養瓶。
- 5.8 尖形吸量管 (250 µL、300 µL、1,250 µL)。
- 5.9 胎牛血清 (fetal calf serum)。
- 5.10 吸管 (1 mL、5 mL、10 mL、25 mL)。
- 5.11 抗生素 (penicillin、streptomycin、amphotericin B ; PSA)。
- 5.12 檢體保存瓶 (cryotube 2 mL/管)。
- 5.13 病毒採檢拭紙 (culture swab)。
- 5.14 二氧化碳。
- 5.15 PBS buffer。
- 5.16 商品化抗體 (chemicon Cat.no.3340, 3345, 3324, 3350, 3360, 5008, 5013, 5000 等)。
- 5.17 玻片。
- 5.18 丙酮。
- 5.19 蓋玻片。
- 5.20 口罩。
- 5.21 可拋棄塑膠手套。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腸病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 703 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

5.22 Virkon 消毒液。

6 儀器設備

- 6.1 倒立顯微鏡。
- 6.2 螢光顯微鏡。
- 6.3 二氧化碳培養箱 (incubator)。
- 6.4 吸管輔助器。
- 6.5 第二級生物安全櫃。
- 6.6 離心機。
- 6.7 4°C 冰箱。
- 6.8 -20°C 及 -80°C 冷凍櫃。
- 6.9 Vortex。
- 6.10 加熱器。
- 6.11 高壓滅菌器。

7 環境與設施安全

應於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行所有檢測之操作流程。

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 檢體編號

10.2 檢體前處理

10.2.1 咽喉或肛門擦拭檢體：

- (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 xg 離心 15 min。
- (3) 收集上清液裝於 Cryotube 標示號碼及日期並接種於細胞，其餘保存於 -70°C。

10.2.2 糞便檢體

- (1) 取糞便 1 g 加入 10 mL BS⁽⁺⁾ 液調成 10% 懸浮液。
- (2) 於 4°C 2,100 xg 離心 15 min，上清液移至耐氯仿的離心管，視上清液之總體積量依比率加入 1/10 量氯仿，振盪混合 15 min。
- (3) 於 4°C 2,100 xg 離心 15 min。
- (4) 收集上清液分裝於 2-3 支 Cryotube，標示號碼及日期，其中一支接種於細胞，其餘保存於 -70°C。

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 704 頁/共 1091 頁	腸病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

10.3 細胞繼代

- 10.3.1 由液態氮桶中取欲 Recover 之細胞株一管。
- 10.3.2 迅速置於 37°C 水浴箱中回溫，以 Virkon 消毒液擦拭瓶蓋接合處。
- 10.3.3 緩慢滴入 10 mL 含有 10%胎牛血清但未含抗生素生長培養基後，將細胞放入 75 cm² 培養瓶中，置入含有 5%二氧化碳培養箱。
- 10.3.4 隔夜後觀察細胞生長狀況並吸取上清液。
- 10.3.5 再放入 10 mL 10%含有胎牛血清但未含抗生素生長培養基。
- 10.3.6 觀察細胞生長狀況以為繼代使用。
- 10.3.7 吸取上清液。
- 10.3.8 放入適量（約 2 mL）0.25% trypsin-EDTA，反應 1 min。
- 10.3.9 吸取 trypsin-EDTA 丟棄並靜置 30 sec 至 1 min。
- 10.3.10 取 10 mL 含有 10%胎牛血清及抗生素之培養基由下往上將細胞沖下。
- 10.3.11 計算細胞數。
- 10.3.12 稀釋每 1 mL 含有 1 x 10⁵ 細胞，以為檢體接種培養之用。
- 10.3.13 填寫細胞繼代培養紀錄。

10.4 接種

- 10.4.1 發育完成之 RD 及 HEp-2 細胞將生長培養基丟棄，加入等量（1 mL）之維持培養基。
- 10.4.2 每一檢體分別接種至 4 支培養細胞中（RD 及 HEp-2 各二支），每支接種 0.2 mL。另取 2 支培養細胞各接種 Hank's 液 0.2 mL 做為對照。
- 10.4.3 置於 36°C，5% CO₂ 培養箱繼續培養。

10.5 觀察

- 10.5.1 由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態是否改變。
- 10.5.2 填寫每日細胞培養分離紀錄表。
- 10.5.3 當檢體接種細胞呈細胞病變時，收集細胞及培養液。
- 10.5.4 4°C，2,100 xg 離心 10 min。
- 10.5.5 上清液移至 Cryotube。
- 10.5.6 收集之細胞則依 10.6 進行鑑定。
- 10.5.7 若接種細胞觀察至第 7 天仍無病變，則於-70°C 及 37°C 冷凍、解凍二次，收集細胞及培養液於 4°C 以 2,100 xg 離心 10 min。取上清液再按 10.4 步驟接種一次，若觀察至第 7 天仍無細胞病變，則以間接免疫螢光法（IFA）鑑定之。

10.6 間接免疫螢光法（IFA）：（本法以市售“chemicon”試劑為主，操作流程依說明書進行）。

- 10.6.1 病毒培養呈現 2⁺⁺ CPE 反應。
 - （1）先以 2,100 xg 離心 15 min，收集上清液放入 Cryotube 中，保存於-70°C。
 - （2）在已移除上清液的細胞培養管中，加入少許（約 1 mL）

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 705 頁/共 1091 頁	腸病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

PBS，用 dropper 將壁上的細胞沖下，再加 PBS 至 5 mL，並將細胞沖散。

- (3) 於 4°C，2,100 xg 離心 15 min。
- (4) 移除上清液，視分離細胞的量，約留下 0.1-0.3 mL 的 PBS，再用 Vortex 將細胞打成懸浮液，用來製作螢光抹片。
- (5) 取兩片 21 孔的載玻片，用鉛筆(不可用原子筆或簽字筆)分別標上日期及檢體編號，一片是作為染各種腸病毒之 Blend；另一片是為分型之用。
- (6) 每孔之檢體量為 10 μ L/孔；另於玻片的最後一排，加入正常細胞 (normal cell) 為陰性對照 (negative control) 及市售或 in house 為陽性對照組 (positive control)。
- (7) 風乾後，放入-20°C 的丙酮液中固定 15 min。
- (8) 取出風乾，加入各型腸病毒 blend 依次為 Pan-Entero、Polio blend、Echo blend、CoxB blend、Entero Blend、EV71 and CA16、EV71 及 CA9、CA24 第一劑抗體 (約 10 μ L/孔)，次序如下：
- (9) 將玻片置入潮濕盒內 37°C，Incubation 30 min。
- (10) 取出用 PBS 浸洗 3-5 min 再風乾。
- (11) 加二級螢光抗體標幟物 (goat anti-mouse IgG FITC)，再置入潮濕盒中 37°C，30 min。
- (12) 重覆步驟 10。
- (13) 封片。
- (14) 以螢光顯微鏡觀察，並記錄結果。
- (15) 若 Blend 中判定螢光染色結果出為陽性反應，則進行 Blend 分型，放入分型之螢光抗體第一劑 (腸病毒分型試劑；monoclonal antibody)，步驟 (8) - (14)，鑑定出最後型別。

10.6.2 病毒培養 14 天後無 CPE。

- (1) 先離心 2,100 xg，15 min，收集上清液至另一管中。
- (2) 在已移除上清液的細胞培養管中，加入少許 (約 1 mL) PBS，用 dropper 將附在管壁上的細胞沖下，再加 PBS 至 5 mL，並將細胞沖散。
- (3) 於 4°C，離心 2,100 xg，15 min。
- (4) 移除上清液，視細胞的量，約留下 0.1-0.3 mL 的 PBS。再用 vortex 將細胞打成懸浮液，用來製作螢光抹片。
- (5) 取一片 21 孔的載玻片標上日期及檢體編號。
- (6) 每支檢體點 1 個孔 (10 μ L/孔)，並加做 Negative control。
- (7) 風乾後，放入-20°C 的丙酮液中固定 15 min。
- (8) 取出風乾，加入 pan-Entero 抗體第一劑。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腸病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 706 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- (9) 將玻片置入潮濕盒內 37°C，Incubation 30 min。
- (10) 取出用 PBS 浸洗 3-5 min 再風乾。
- (11) 加二級螢光抗體標幟物 (goat anti-mouse IgG FITC)，(FITC)，再置入潮濕盒中 37°C，30 min。
- (12) 重覆步驟 (10)。
- (13) 封片。
- (14) 螢光顯微鏡觀察並記錄結果。
- (15) 如結果為陽性反應，則依 CPE 陽性反應之染色法鑑定血清型別。

11 結果判定

- 11.1 病毒分離：以 14 日為分離終止日，當細胞出現細胞病變 (CPE)，則判定分離陽性，細胞若維持原來形態，則判定為陰性。
- 11.2 免疫螢光法 (IFA)：在螢光顯微鏡下觀察，若感染細胞之細胞質呈現蘋果綠 (apple green)，判為陽性；細胞呈現紅色則判為陰性。
- 11.3 報告核發：檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果”欄之“病原體分離”欄位，填入分離腸病毒分離陰性或腸病毒鑑定之血清型。
- 11.4 結果登錄：相關檢驗紀錄及檢體送驗單背面蓋職章，陳核實驗室主管審核，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 培養基配製在放入抗生素前，應進行無菌試驗。
- 12.2 細胞株自液態氮取出進行繼代約 2-3 代後，應進行黴漿菌及敏感性試驗，以確保細胞不受污染及保持良好之感受性。
- 12.3 除離心、去活化及培育步驟外，操作過程都要在二級生物安全櫃 (class II BSC) 內進行。

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 Rotbart HA, Romero JR. 1995. Laboratory diagnosis of enteroviral infections. In Robart HA, ed, Human enterovirus infections. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp.401-418.
- 14.2 Schmidt NJ. 1989. Cell culture procedures for diagnostic virology, p.51-100. In Schmidt NJ, Emmons RW, eds, Diagnostic Procedure for Viral, Rickettsia, and Chlamydial Infections. 6th edition. American Public Health Association, Washington DC.
- 14.3 Essential Procedure for Clinical Microbiology.
- 14.4 Johnston SL, Siegel CS. 1990. Presumptive identification of enteroviruses with RD, Hep-2 and RMK cell line. J Clin Micro 28: 1049-1050.
- 14.5 Parter SL, Dagan R, Jenista JA, Menegus MA. 1984. The isolation of

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腸病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 707 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

enteroviruses from blood : a comparison of four processing methods. J Med Virol 14: 221-227.

- 14.6 Schmidt NJ, Ho HH, Lennette EH. 1975. Propagation and isolation of group A coxsackievirus in RD cells. J Clin Microbiol 2: 183-185.
- 14.7 WHO. 1990. Manual for the Virology Investigation of Poliomyelitis. WHO/EPI/CDS/Polio/ 90.1. pp. 63-71.

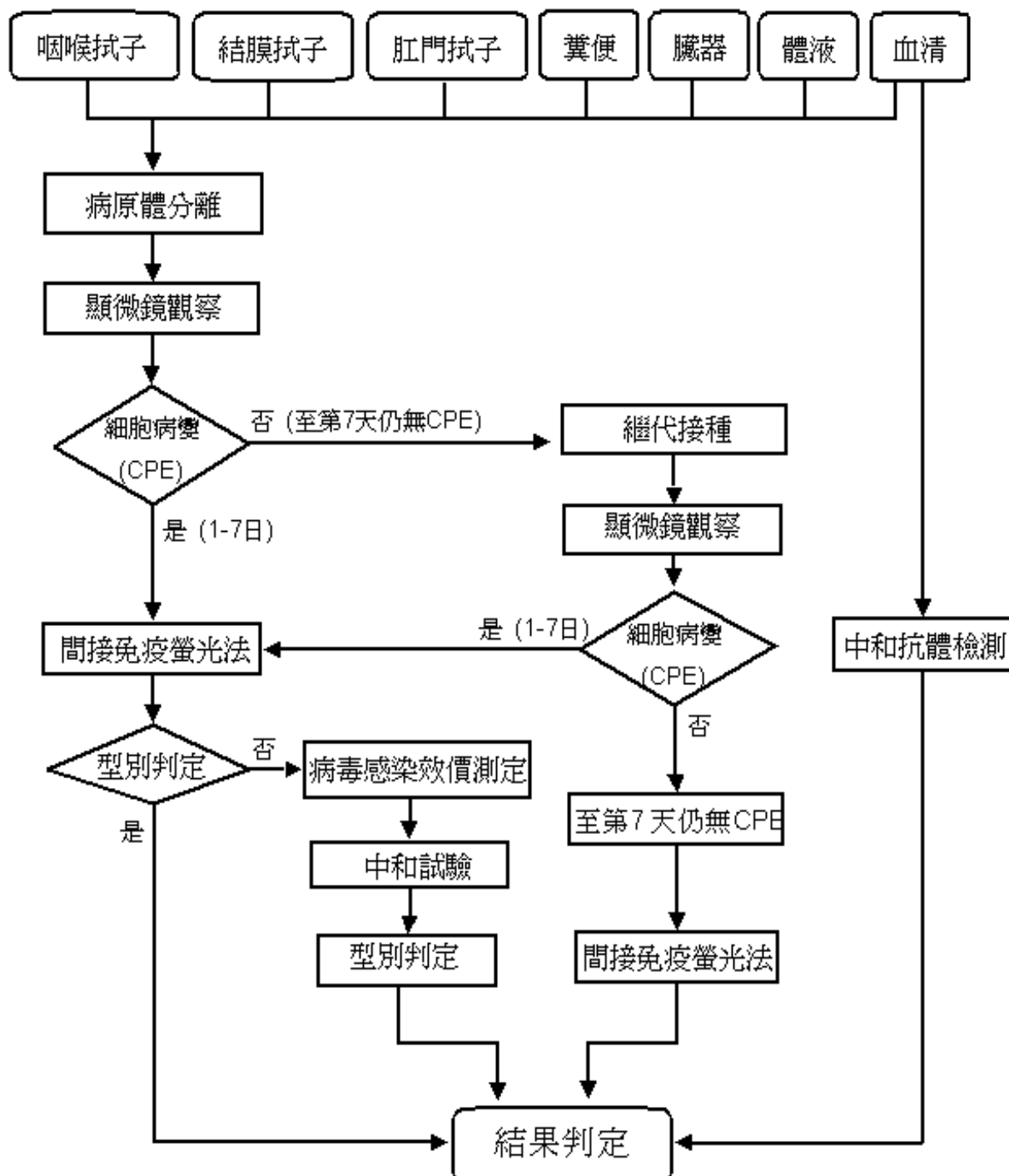
15 附錄

- 15.1 腸病毒檢驗總流程圖。
- 15.2 細胞繼代紀錄。
- 15.3 病毒分離每日觀察紀錄表。
- 15.4 間接免疫螢光測定紀錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腸病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 708 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 腸病毒檢驗總流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腸病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 709 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 細胞繼代紀錄

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 : _____

Procedure :

Discard old Growth Medium

_____ Add the trypsin-EDTA mixture to monolayer

_____ Trypsinization at RT Temperature for min

Remove the Trypsin-EDTA , add mL of fresh growth medium

Disperse cells by gentle pipetting

Final cell number /mL

Above suspension of cells was seeded as follows :

Flask no.	Container	Flask no.	Container

Incubated at 36°C CO₂ incubator

Remark :

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：	腸病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 710 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

附錄 15.3 病原體分每日觀察紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

頁 數：第 頁/共 頁

病原體分離每日觀察紀錄表

[illegible]

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：	腸病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 711 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 間接免疫螢光測定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

間接免疫螢光測定紀錄表

頁 數：第 頁/共 頁

測定日期： 年 月 日

檢體 \ 型別								

結果：

測定日期： 年 月 日

檢體 \ 型別								

結果：

測定日期： 年 月 日

檢體 \ 型別								

結果：

測定日期： 年 月 日

檢體 \ 型別								

結果：

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：	腸病毒中和抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 712 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

測定人體血清中腸病毒抗體之力價，用以佐證感染或曾感染腸病毒之現況。

2 適用檢體種類

人體血清。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用腸病毒對特有宿主細胞 (host cell) 可產生病變。當人體血清與特定腸道病毒株形成抗原-抗體複合物時，可中和病毒，導致無多餘之病毒可使細胞產生病變之現象。此方式可計算人體血清中腸病毒抗體之力價。

5 試劑耗材

- 5.1 不同血清型腸病毒種毒。
- 5.2 Dulbecco's modified eagle medium；DMEM。
- 5.3 細胞 (RD cell line；Victorian Infectious Disease Reference Laboratory passage 228)。
- 5.4 胎牛血清 (fetal calf serum)。
- 5.5 抗生素 (penicillin、streptomycin、amphotericin B；PSA)。
- 5.6 尖形吸量管 (250 μ L、300 μ L、1,250 μ L)。
- 5.7 吸管 (1 mL、5 mL、10 mL、25 mL)。
- 5.8 96 孔培平底養盤。
- 5.9 PBS buffer。
- 5.10 二氧化碳。
- 5.11 陽性對照血清。
- 5.12 陰性對照血清。
- 5.13 口罩。
- 5.14 可拋棄塑膠手套。
- 5.15 Virkon 消毒液。
- 5.16 4 mL 血清瓶。

6 儀器設備

- 6.1 倒立顯微鏡。
- 6.2 螢光顯微鏡。
- 6.3 二氧化碳培養箱 (incubator)。
- 6.4 吸管輔助器。
- 6.5 12 Channel micropipette。
- 6.6 第二級生物安全櫃。
- 6.7 離心機。
- 6.8 -20°C 及 -80°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：	腸病毒中和抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 713 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 6.9 Vortexer。
- 6.10 4°C 冰箱。
- 6.11 加熱器。
- 6.12 高壓滅菌器。

7 環境與設施安全

應於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行所有檢測之操作流程。

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>。

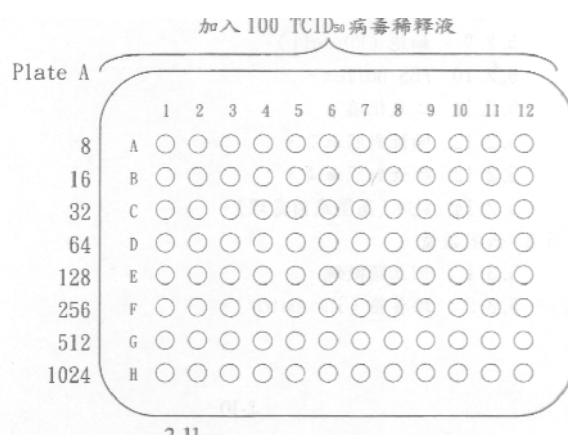
9 檢體運送及保存

參考疾病管制局出版之「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 將血清樣本以 1：8 的比例稀釋 (血清 100 μ L 加 PBS 700 μ L)，而後予以 56°C 加熱 30 min。
- 10.2 將 Plate A：B-H 列橫向 1-12 孔，每孔加 50 μ L 2% DMEM 細胞維持培養基。
- 10.3 Plate A：A 及 B 列橫向 1-12 孔加入疑似腸病毒患者 1：8 稀釋血清 100 μ L (每個檢體加於 2 孔)。
- 10.4 Plate A：B-H 列橫向以 12 Channel micropipette 由 A 列吸 50 μ L 至 B 列混合後吸出 50 μ L 至 C 列 (血清對照只需 1：8 即可)，依序混合稀釋至 H 列吸出 50 μ L 丟棄，最後稀釋倍數為 1：1024 (H 列)。

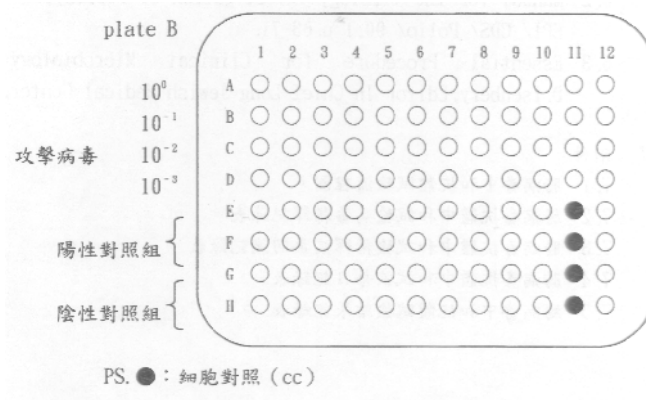


- 10.5 將已知腸病毒種毒感感染效價以 2% DMEM 細胞維持培養液稀釋成 50 μ L 含 100 TCID₅₀ 病毒。
- 10.6 將 100 TCID₅₀ 病毒再以細胞維持培養液作 10⁻¹-10⁻³ 稀釋。
- 10.7 每孔加入 50 μ L 之 100 TCID₅₀ 欲測腸病毒之病毒株。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腸病毒中和抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 714 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.8 另 Plate B 之 A-D 各列橫向 1-10 孔。先放置 50 μ L，2% DMEM 再分別加入 100、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 欲測腸病毒病毒株稀釋液 50 μ L。



- 10.9 放置 36°C，CO₂ 培養箱中和 1 hr。
- 10.10 取出 Plate 每孔加 100 μ L (5×10^4 細胞) RD 細胞懸浮液。
- 10.11 置 36°C，CO₂ 培養箱培養。
- 10.12 翌日以顯微鏡觀察細胞病變 (CPE)。
- 10.13 連續觀察 4 天、記錄並做結果判定。
- 10.14 第 4 天判定血清中和抗體價，即對照細胞形態正常，而對照血清檢體對細胞發育無不良影響或者是有毒性，但其倍數不影響中和抗體價之判定者，則最高血清稀釋倍數之 50% 能完全阻止 CPE，即為該血清之中和抗體價。對照細胞形態無異而攻擊病毒量在 32-1,000 TCID₅₀。
- 11 結果判定
- 11.1 報告核發：檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果”欄之“血清學結果”欄位，填入血清中和抗體效價。
- 11.2 結果登錄：相關檢驗紀錄及檢體送驗單背面蓋職章陳核實驗室主管審核，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 培養基配製在放入抗生素前，應進行無菌試驗。
- 12.2 細胞株自液態氮取出進行繼代約 2-3 代後，應進行黴漿菌及敏感性試驗，以確保細胞不受污染及保持良好之感受性。
- 12.3 除離心、去活化及培育步驟外，操作過程都要在二級生物安全櫃 (class II BSC) 內進行。
- 12.4 注意事項
- 12.4.1 嚴防病原體散佈或污染，工作時帶手套。
- 12.4.2 操作中病毒株務必保持於低溫。
- 13 廢棄物處理
- 13.1 剩餘之血清檢體應妥善保存於 -80°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：	腸病毒中和抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 715 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

13.2 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 Schmidt NJ, Lennette EH. 1973. Advances in the serodiagnosis of viral infections. Prog Med Virol 15: 244-308.
- 14.2 WHO. 1990. Manual for the Virology Investigation of Poliomyelitis. WHO/ EPI/ CDS/ Polio/ 90.1, pp. 63-71.
- 14.3 Isenberg HD. 1998. Essential procedure for clinical microbiology. ASM Press, Washington, DC.

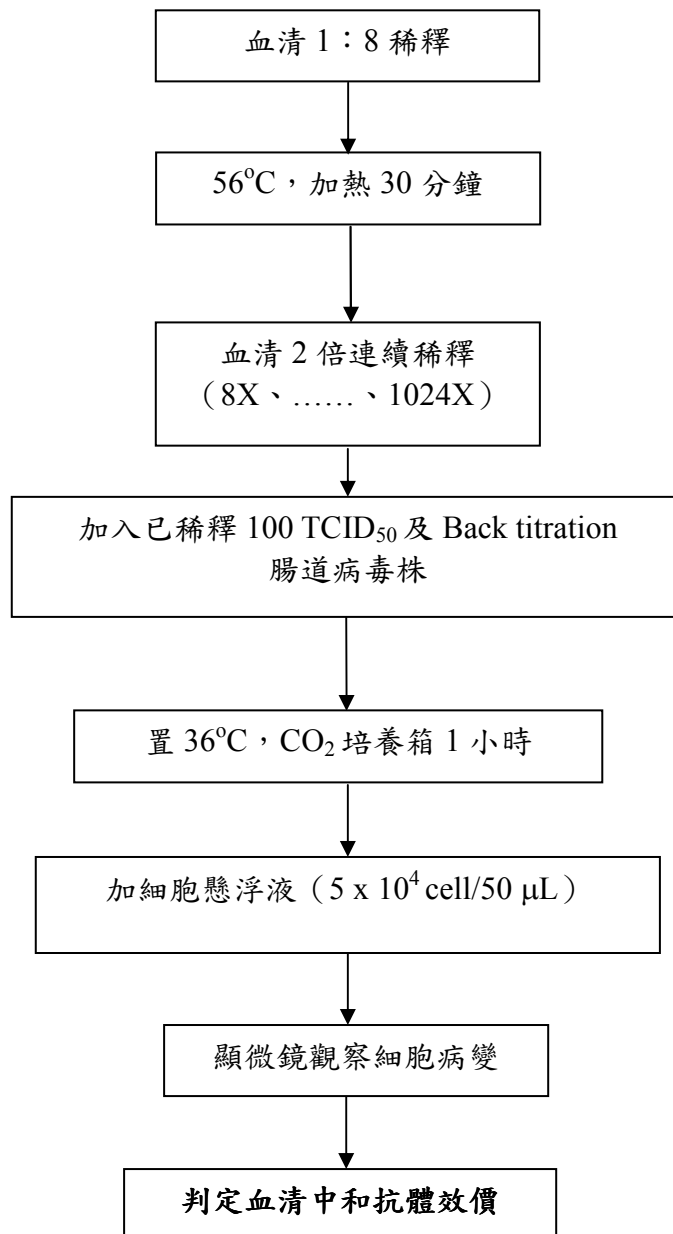
15 附錄

- 15.1 腸病毒中和抗體試驗流程圖。
- 15.2 腸病毒抗體中和試驗病毒稀釋紀錄表。
- 15.3 腸病毒中和試驗稀釋病毒回溯表。
- 15.4 腸病毒抗體中和試驗每日紀錄表。
- 15.5 腸病毒中和抗體試驗結果紀錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腸病毒中和抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 716 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 腸病毒中和抗體試驗流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腸病毒中和抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 717 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 腸病毒抗體中和試驗病毒稀釋紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

中和抗體試驗病毒稀釋紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

Test no. : _____

Date : _____

1. Serum Preparation :

_____ Sera are taken out from the D.F.

Serum Code : _____

_____ Each serum is diluted as follows.

Diluent Code : _____

Serum (mL) : _____

Diluent (mL) : _____

Date : _____

2. Challenge Virus preparation :

_____ Viruses are taken out from the D.F.

_____ They are dilute as follows. Diluent Code : _____

_____ TCID₅₀/

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Virus	(mL) :	0.2	0.2							

		1.8	1.8							

_____ TCID₅₀/

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Virus	(mL) :	0.2	0.2							

		1.8	1.8							

_____ TCID₅₀/

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Virus	(mL) :	0.2	0.2							

		1.8	1.8							

_____ TCID₅₀/

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Virus	(mL) :	0.2	0.2							

		1.8	1.8							

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：	腸病毒中和抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 718 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 腸病毒抗體中和試驗攻擊病毒劑量紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
中和抗體試驗攻擊病毒劑量紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

Date : Exp. :										Date : Exp. :									
日期		1 2 3 4 5 6 7							日期		1 2 3 4 5 6 7								
攻擊病毒	10 ⁰	1							血清對照	NC	1								
		2									2								
		3									1								
		4									2								
		5									1								
		6									2								
		7									1								
		8									2								
	10 ⁻¹	1								PC	8								
		2									2								
		3									1								
		4									2								
		5									1								
		6									2								
		7									1								
		8									2								
	10 ⁻²	1									128								
		2									2								
		3									1								
		4									2								
		5									1								
		6									2								
		7									1								
		8									2								
10 ⁻³	1								1024										
	2								2										
	3																		
	4																		
	5																		
	6																		
	7																		
	8																		
CC	1																		
	2																		
	3																		
	4																		
	5																		
	6																		
	7																		
	8																		
Cell : G. M. : D. M. : Inoculum : Absorption :								Cell : G. M. : D. 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：	腸病毒中和抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 719 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 腸病抗體中和試驗每日紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
中和抗體試驗檢體觀察紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

Date : Exp. :										Date : Exp. :														
日期 檢體編號																								
		1	2	3	4	5	6	7																
8	1																							
	2																							
	16	1																						
		2																						
	32	1																						
		2																						
	64	1																						
		2																						
	128	1																						
		2																						
256	1																							
	2																							
512	1																							
	2																							
1024	1																							
	2																							
8	1																							
	2																							
	16	1																						
		2																						
	32	1																						
		2																						
	64	1																						
		2																						
	128	1																						
		2																						
256	1																							
	2																							
512	1																							
	2																							
1024	1																							
	2																							
8	1																							
	2																							
	16	1																						
		2																						
	32	1																						
		2																						
	64	1																						
		2																						
	128	1																						
		2																						
256	1																							
	2																							
512	1																							
	2																							
1024	1																							
	2																							
Cell : G. M. : D. M. : Inoculum :		Generation :							Culture :															
		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：	腸病毒中和抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 720 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 腸病毒中和抗體試驗結果紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
中和抗體試驗檢驗結果紀錄總表

頁數：第 頁/共 頁

Date : _____

Exp. no. : _____

TCID₅₀ of Challenge Virus :

Code no.	Test no.	Initial dilution	Results	

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：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (粒子凝集法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 721 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

以粒子凝集法篩檢人體是否受到人類免疫缺乏病毒第一型或第二型感染之定性試驗。

2 適用檢體種類

血清及血漿檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

以人工膠粒 (Gelatin Particle) 做載體 (Carriers)，再分別吸附 (Coating) 一層第一型或第二型去活化人類免疫缺乏病毒病毒抗原。若血液中存在第一型或第二型抗體，基於免疫反應原理，則會形成凝集現象，故可藉此判定人體血清或血漿中是否含有人類免疫缺乏病毒之抗體。

5 試劑耗材

5.1 試劑名稱：SERODIA HIV-1/2；廠牌：Fujirebio Inc；國別：Japan。(依據七十六年十一月二日之衛署藥字第 700404 號公告規定及監測第二型個案所需選用此商品)，內含物：

5.1.1 復原液 (A)。

5.1.2 血清稀釋液 (B)。

5.1.3 人類免疫缺乏病毒敏感化粒子抗體第一型 (C1)。

5.1.4 人類免疫缺乏病毒敏感化粒子抗體第二型 (C2)。

5.1.5 未敏感化粒子 (D)。

5.1.6 對照用陽性血清 (E)。

5.2 Fastec Microplate U 型盤—隨試劑採購由原廠提供。

5.3 250 μ L 吸管尖。

5.4 40 μ L 吸管尖。

5.5 八爪分注器。

5.6 手套。

5.7 0.5 mL 尖底離心管。

5.8 2 mL 血清瓶。

6 儀器設備

6.1 觀察箱。

6.2 第二級生物安全櫃 (Class II BSC)。

6.3 tray mixer (廠牌：Fujirebio Inc；型號：PMX-01)。

6.4 離心機。

6.5 tube mixer。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (粒子凝集法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 722 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

血清或血漿約 0.5 mL (需複驗或疑義檢體則不在此限)。

9 檢體運送及儲存

冰寶低溫運送，4°C 儲存，驗畢應儲存至-20°C。

10 檢驗步驟

10.1 檢體編號。

10.2 檢驗前處理：

10.2.1 確認檢體與送驗單資料一致，如有特殊規格檢體瓶不易儲存時，置換成 2 mL 之血清瓶。

10.2.2 確認試劑組於有效使用期限內，使用前需先置於室溫至少 30 分鐘後才可使用。

10.2.3 新開封試劑應於試劑盒上備註使用日期，冷凍乾燥之粒子其復原方式為：未敏感化粒子 D 瓶加入復原液 (A) 2 mL；第一型抗原敏感化粒子 (C1) 及第二型抗原敏感化粒子 (C2) 則各加入復原液 (A) 1.5 mL，已完成復原粒子應註明復原日期，溫和搖晃後置於室溫三十分鐘，待粒子完整復原始可使用。

10.2.4 將 96 孔微量測定盤上標記檢體編號及加入試劑之代號。

10.3 加入血清稀釋液 (B)。實驗組：於第一孔滴入血清稀釋液 (B) 75 μ L，第二孔至第四孔各 25 μ L，陽性對照組：第一型 (PC1) 與第二型 (PC2) 之對照組需分別測定，第一孔滴入血清稀釋液 (B) 75 μ L，而第二至第八孔則均滴入 25 μ L。

10.4 二倍連續稀釋。實驗組：以微量吸管分別吸取 25 μ L 血清檢體加入第一孔中，並在液面下吸放混合至少五次，吸 25 μ L 移入第二孔，同樣混勻後，再取 25 μ L 移入第三孔，同樣混勻後，於第四孔吸 25 μ L 連同微量吸管丟棄於可高壓滅菌之廢棄物容器內。陽性對照組：取對照用陽性血清 (E) 各 25 μ L 分別加入第一型 (PC1) 及第二型 (PC2) 之第一孔，然後作二倍連續稀釋至第八孔後再丟棄 25 μ L。

10.5 實驗組及陽性對照組均於第二孔加入 25 μ L 未敏感化粒子 (D)，當作陰性血清對照；實驗組：加 25 μ L 第一型敏感化粒子 (C1) 於第三孔，加 25 μ L 第二型敏感化粒子 (C2) 於第四孔。陽性對照組：第一型 (PC1) 的第三孔至第八孔各加 25 μ L (C1)，第二型 (PC2) 的第三孔至第八孔各加 (C2) 敏感化粒子 25 μ L。

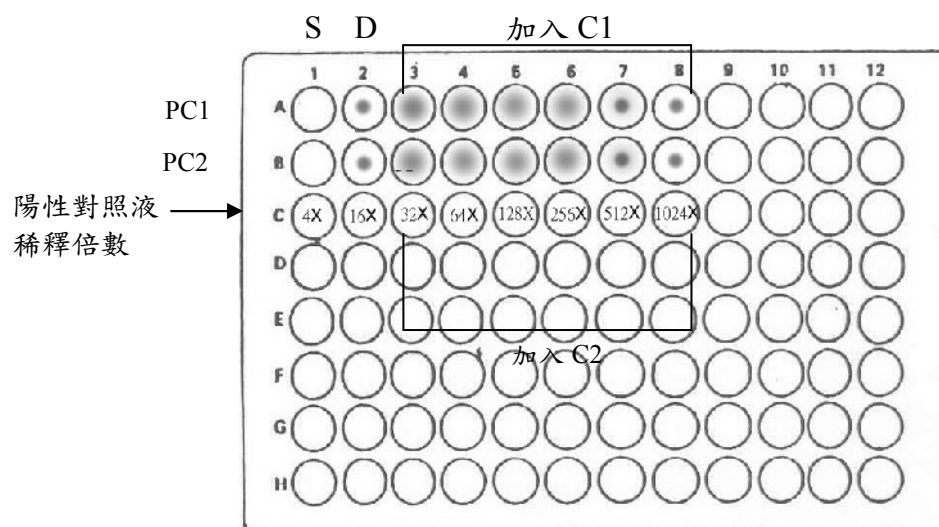
修訂日期： 年 月 日

[illegible]

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (粒子凝集法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 724 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

陽性對照組 (圖例二)



- 10.6 將 96 孔微量滴定盤振盪混合均勻後，加透明封膜於盤上，並註明實驗起訖時間，靜置於不易接觸及震動之平面上，於室溫下靜置二小時，使血清中之特異性抗體與抗原結合形成凝集；如未敏感化粒子呈現凝集現象則需進行 10.7 至 10.10 步驟。
- 10.7 取已經溶解復原的未敏感化粒子 350 μL ，加入一尖底離心管中。
- 10.8 再將 50 μL 血清檢體加入離心管中，使用 tube mixer 加以完成混合，在室溫下放置 20 分鐘以上（靜置期間可震盪 1-2 次）。
- 10.9 將試管進行離心沉澱（2,000 rpm/5 分鐘/室溫）完全分離，取得上清液 50 μL 置入 U 型盤第 2 孔中。
- 10.10 重複 10.4-10.5 步驟。

11 結果判定

- 11.1 將 U 型盤輕置於觀察箱上（透過間接光線），將檢體與對照組加以比較，最終稀釋倍數 $\geq 1:32$ 呈現凝集反應時判定為第一型陽性；最終稀釋倍數 $\geq 1:64$ 呈現凝集反應時判定為第二型陽性（參見下表）。

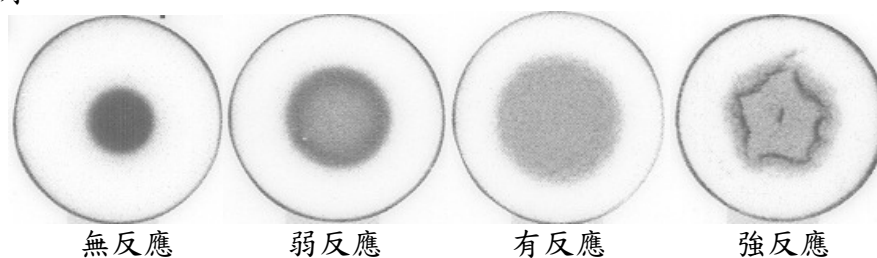
11.2 凝集像之狀態敘述

粒子凝集像	結果
粒子聚集於穴的中心成鈕釦 (button) 狀實心圓，並帶有圓形規則狀的外緣。	無反應
粒子聚集於穴的中心成鈕釦 (button) 狀，具規則狀外緣之空心圓。	弱反應
粒子呈明顯的大環，外緣呈不規則狀粗糙之凝集現象。	有反應
粒子如膜狀凝集，圓盤狀週邊呈現內摺現象。	強反應

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (粒子凝集法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 725 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

圖例：



11.3 最終判定

此法依下表判定為陽性之檢體，應再進行西方墨點法確認試驗。

致敏化粒子	結果	判定
C-1 致敏化粒子	無反應	人類免疫缺乏病毒抗體第一型陰性
C-2 致敏化粒子	無反應	人類免疫缺乏病毒抗體第二型陰性
C-1 致敏化粒子	有反應	人類免疫缺乏病毒抗體第一型陽性
C-2 致敏化粒子	無反應	
C-1 致敏化粒子	無反應	
C-2 致敏化粒子	有反應	人類免疫缺乏病毒抗體第二型陽性
C-1 致敏化粒子	有反應	人類免疫缺乏病毒抗體第一型陽性
C-2 致敏化粒子	有反應	人類免疫缺乏病毒抗體第二型陽性

12 品質管制

- 12.1 每次操作均需伴隨進行陽性對照組、且確認人類免疫缺乏病毒第一型陽性對照組最終稀釋 1:128±1 管稀釋呈現凝集；人類免疫缺乏病毒第二型陽性對照組之效價是 1:256±1 管稀釋呈現凝集。
- 12.2 應確認實驗組及對照組之未致敏化粒子皆呈現不凝集之陰性反應。
- 12.3 如血清檢體與未敏感化粒子反應，皆出現凝集反應時，則依 10.9-10.12 進行吸收操作法重新試驗。

13 廢棄物處理

- 13.1 當次實驗用畢之污染物須於當次實驗完成後立即攜至洗滌室。
- 13.2 由專人以高壓滅菌法 (121°C; 1 小時以上) 去污染。

14 參考資料

台富製藥股份有限公司製造說明書 (Fujirebio Inc)。

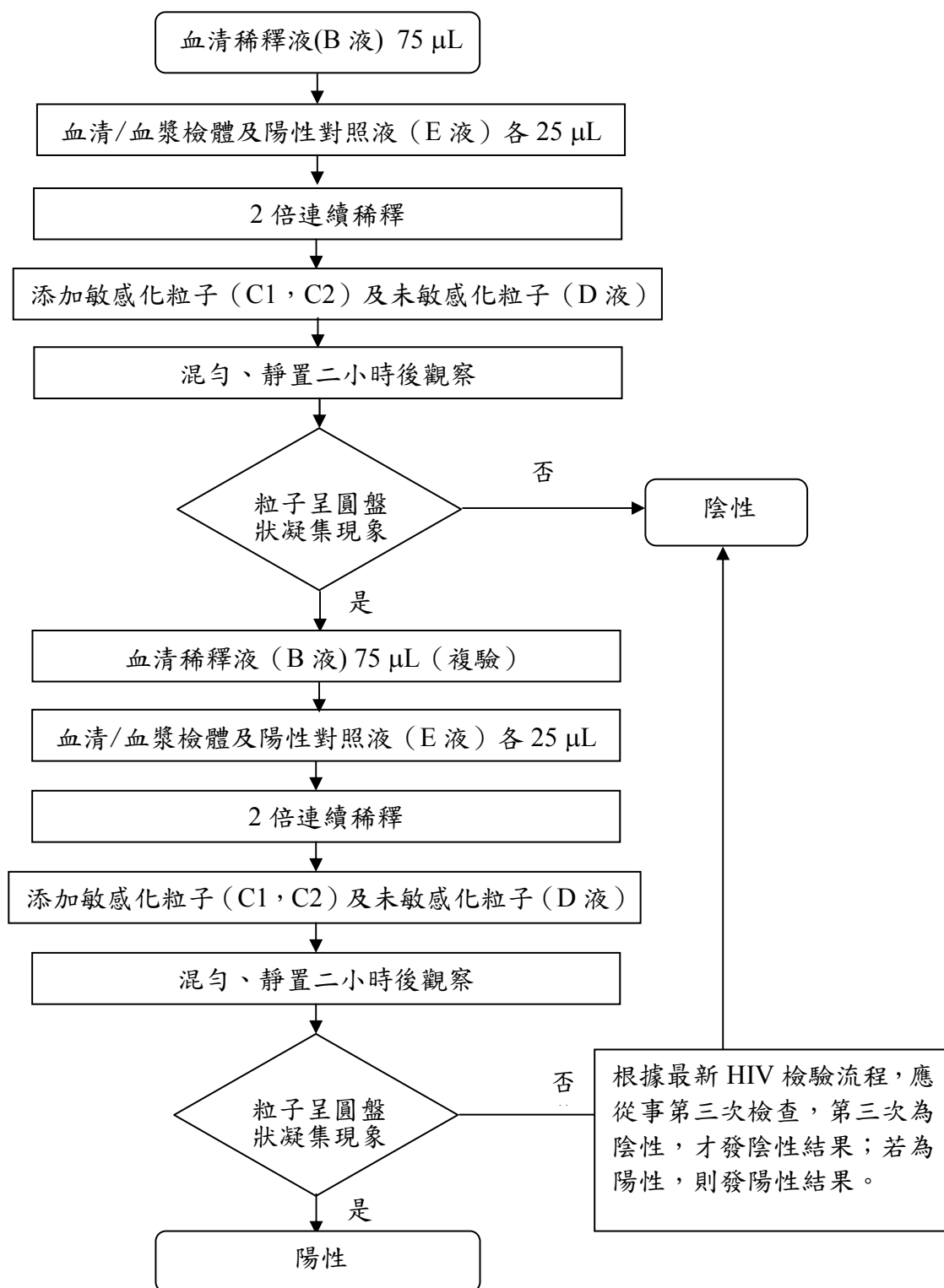
15 附錄

- 15.1 人類免疫缺乏病毒抗體試驗之粒子凝集法流程圖。
- 15.2 人類免疫缺乏病毒抗體試驗之粒子凝集法實驗紀錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 726 頁/共 1091 頁	(粒子凝集法)	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 人類免疫缺乏病毒抗體試驗（粒子凝集法）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：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (粒子凝集法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 727 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 人類免疫缺乏病毒抗體試驗之粒子凝集法實驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

人類免疫缺乏病毒抗體試驗之粒子凝集法實驗紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

檢驗日期：

試劑批號：

試劑名稱：

有效日期：

檢體編號 S D C1 C2 | S D C1 C2 檢體編號

H	G	F	E	D	C	B	A	1
								2
								3
								4
								5
								6
								7
								8
								9
								10
								11
								12

+有反應 -無反應 ±弱反應

S：sample

D：unsensitized particles

C1：HIV-1 sensitized particles

C2：HIV-2 sensitized particles

PC1：HIV-1 positive control

PC2：HIV-2 positive control

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：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 728 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

以西方墨點法確認人體是否受到人類免疫缺乏病毒第一型的感染。

2 適用檢體種類

血清及血漿檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用電泳原理，將人類免疫缺乏病毒之蛋白質依不同分子量大小分離，再運用轉印技術將電泳膠內之蛋白質移轉至硝化纖維膜試紙表面作保存，以偵測人體血清或血漿中之相對應抗體。

5 試劑耗材

5.1 試劑名稱：New Lav Blot I；廠牌：Bio-Rad；國別：France；code no：72251(依據七十六年十一月二日之衛署藥字第 700404 號公告規定及監測第二型個案所需選用此商品)，內含物：

5.1.1 共計十八條硝化纖維膜試紙條 (R1)。

5.1.2 五倍濃縮洗滌液 (R2)。

5.1.3 對照用陰性血清 (R3)。

5.1.4 對照用陽性血清 (R4)。

5.1.5 結合液 (R5)。

5.1.6 呈色液 (R6)。

5.2 40 μ L 吸管尖 (tip)。

5.3 玻璃或塑膠無菌吸管。

5.4 塑膠鑷子。

5.5 量筒。

5.6 2 mL 血清瓶。

5.7 10%漂白水。

5.8 可拋棄式無菌塑膠手套。

5.9 口罩，眼罩。

6 儀器設備

6.1 第二級生物安全櫃 (Class II BSC)。

6.2 翹翹板式震盪器。

6.3 分注器。

6.4 25 μ L 微量吸管。

6.5 負壓抽吸幫浦。

6.6 4°C 冰箱。

6.7 -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： 頁次：第 729 頁/共 1091 頁	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日 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

血清或血漿約 0.5 mL (需複驗或疑義檢體則不在此限)。

9 檢體運送及儲存

冰寶低溫運送，4°C 儲存，驗畢應儲存至 -20°C。

10 檢驗步驟

10.1 檢體編號。

10.2 檢驗前處理：

10.2.1 確認檢體與送驗單資料一致，如有特殊規格檢體瓶不易儲存時，置換成 2 mL 之血清瓶。

10.2.2 先確認試劑組效期無誤後，使用前試劑組需先置於室溫至少 30 分鐘後才可使用；以二次蒸餾水將 (R2) 濃縮液做五倍稀釋，並標註配置日期，使用期限為一個月。

10.2.3 新開封試劑應於試劑盒上備註使用日期。

10.2.4 在反應槽上標記試劑批號及檢驗日期。

10.2.5 於廢液瓶內加入 10% 漂白水。

10.2.6 以塑膠鑷子依序夾取硝酸試紙條之末端，調整正面置於反應槽中，號碼應朝上，每批次實驗所需試紙條之數量，除檢體數外需再加二條 (陽性、陰性) 進行對照組之平行測試。

10.2.7 於反應槽下方以油性筆註明檢體編號、陰性、陽性對照組。

10.3 於各凹槽內加入 2 mL 洗滌液後開啟震盪板搖 5 分鐘，使試紙條充分濕潤。

10.4 分別加入各 20 µL 血清檢體、陰性及陽性對照液於相對應之反應槽中，加蓋於室溫下搖擺作用 2 個小時。

10.5 以負壓抽吸器吸乾各反應槽內之液體。

10.6 各注入 2 mL 洗滌液，搖擺後吸乾，再注入 2 mL 洗滌液搖擺作用 5 分鐘重複此清洗步驟二次。

10.7 各注入 2 mL 的結合液，加蓋後在室溫中搖擺作用一小時。

10.8 重複 10.6 步驟洗滌三次。

10.9 各注入 2 mL 之呈色液，搖擺作用約 5 分鐘使之呈色。

10.10 以負壓抽吸器吸乾反應槽內液體並以二次蒸餾水清洗三次，以停止反應。

10.11 以負壓抽吸器盡可能吸淨反應槽內液體。

10.12 檢驗後處理：

10.12.1 抽吸管尖以 10% 漂白水消毒後再以清水沖洗。

10.12.2 比對呈色反應判讀後發報告，反應後之試紙條則陰乾後黏貼於黏貼表，詳如附表一。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 730 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.12.3 檢驗完成後之檢體依序放入冰箱之檢體保存盒中-20℃ 冷凍儲存。

10.12.4 將試藥放回試劑組內，置入 4-8℃ 冰箱保存。

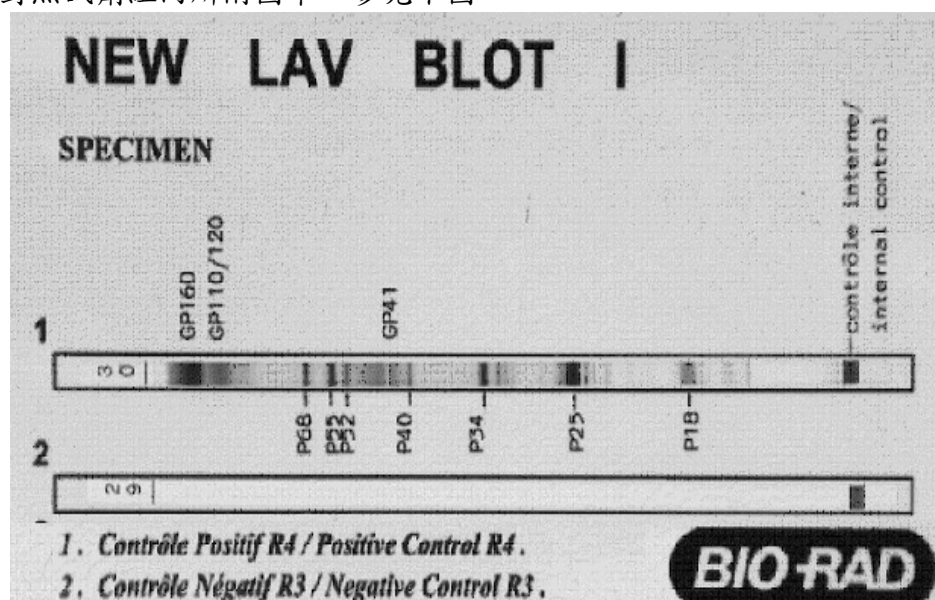
10.12.5 操作箱之桌面以 10%漂白水消毒，再以清水擦拭。

11 結果判定

11.1 根據陽性對照檢體之不同蛋白位置及呈色帶之特性（參見下表），判讀各血清檢體之抗體蛋白，將出現之反應線記錄在西方墨點法紀錄表上（詳如附表二）。

Molecular Weight	Gene	Antigen
GP160	ENV	Clear band
GP110/120	ENV	Diffuse band
P68	POL	Clear band
P55	GAG	Clear band (doublet)
P52	POL	Clear band
GP41	ENV	Diffuse band
P40	GAG	Clear band
P34	POL	Clear band
P24/ 25	GAG	Clear band
P18	GAG	Clear band (sometimes a doublet)

11.2 圖卡對照應以該批號試劑組內所提供之圖卡為比對依據。對照試劑組內所附圖卡，參見下圖。



11.3 結果判定標準：依據使用試劑之建議判讀標準即 gp41、gp120、gp160 三者之中出現任何兩條反應線就判斷為“陽性”；沒有任何反應線出現者判斷為“陰性”；有反應線出現但無法到達陽性標準者，則判斷

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 731 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

為“未確定”。

11.4 報告核發：西方墨點法陽性，西方墨點法陰性，西方墨點法未確定。西方墨點法未確定者則備註三個月再採檢。

11.5 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果”欄，並將紀錄表背面蓋職章，相關檢驗紀錄及檢體送驗單陳核實驗室主管審核，俟實驗室主管核章後，再將影印本加蓋檢驗專用章之後以限時掛號寄發給送驗單位，陽性個案則加寄轄區主管衛生局及權責疾病組。

12 品質管制

12.1 每次操作均需伴隨進行陽性、陰性對照組各一。

12.2 確認每一檢體試紙條內之 anti-IgG 內控反應線為顯著之呈色反應。

12.3 確認陰性對照應完全不呈現任何特異性之反應線。

12.4 陽性對照檢體應出現所有之特異性蛋白反應線 (p18、p25、p31、p40、gp41、p52、p55、p68、gp110/120、gp160)。

13 廢棄物處理

13.1 當次實驗用畢之污染物須於當次實驗完成後立即攜至洗滌室。

13.2 由專人以高壓滅菌法 (121°C；1 小時以上) 去污染，收集之廢液待隔夜後才取至洗滌室以高溫高壓滅菌器滅菌法依感染性醫療廢棄物處理。

14 參考資料

Bio-Rad 製藥股份有限公司製造說明書。

15 附錄

15.1 人類免疫缺乏病毒抗體檢驗總流程圖。

15.2 人類免疫缺乏病毒抗體試驗之西方墨點法流程圖。

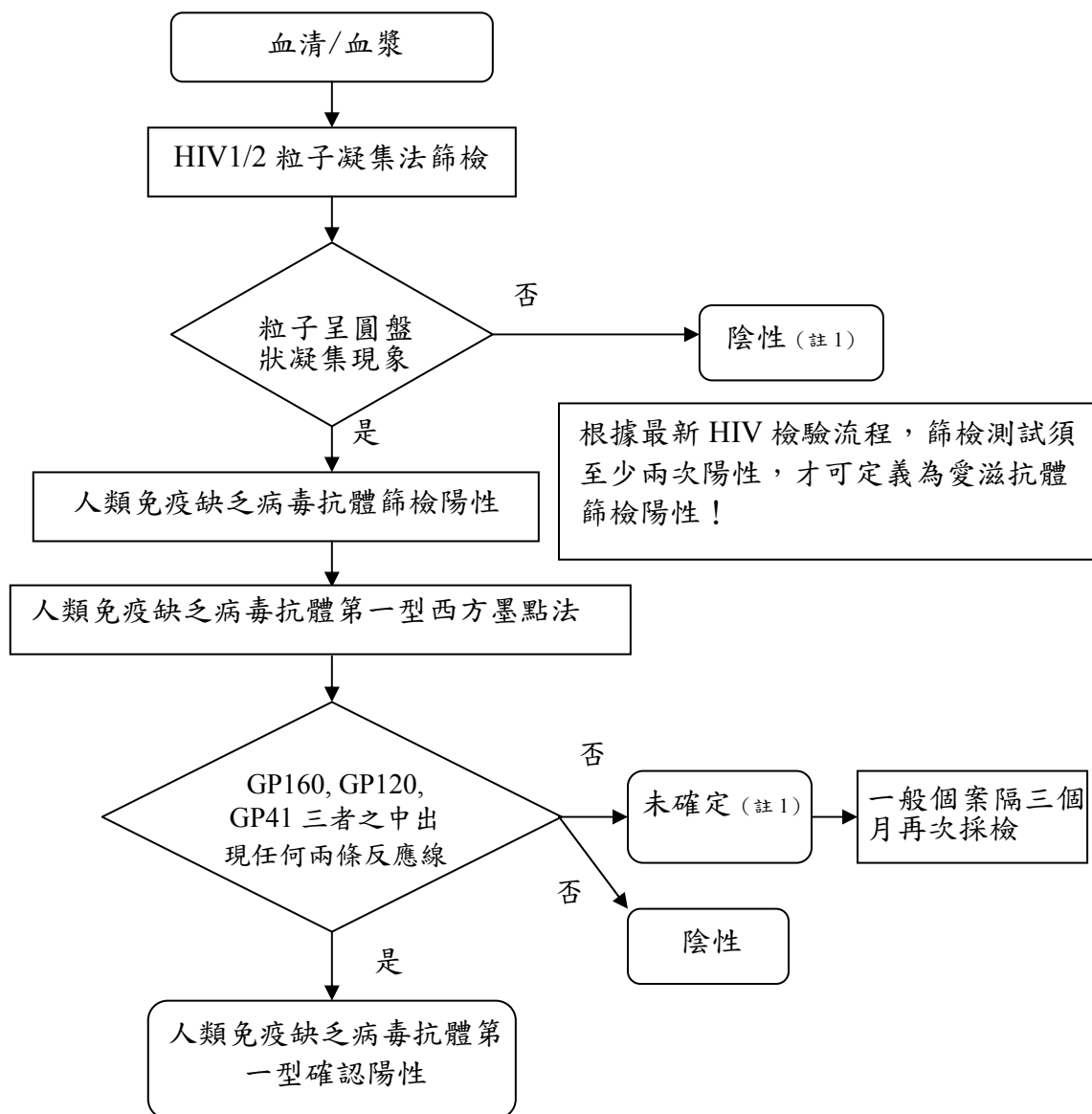
15.3 人類免疫缺乏病毒抗體試驗之西方墨點法試紙黏貼表。

15.4 人類免疫缺乏病毒抗體試驗之西方墨點法結果紀錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 732 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 人類免疫缺乏病毒抗體檢驗總流程圖

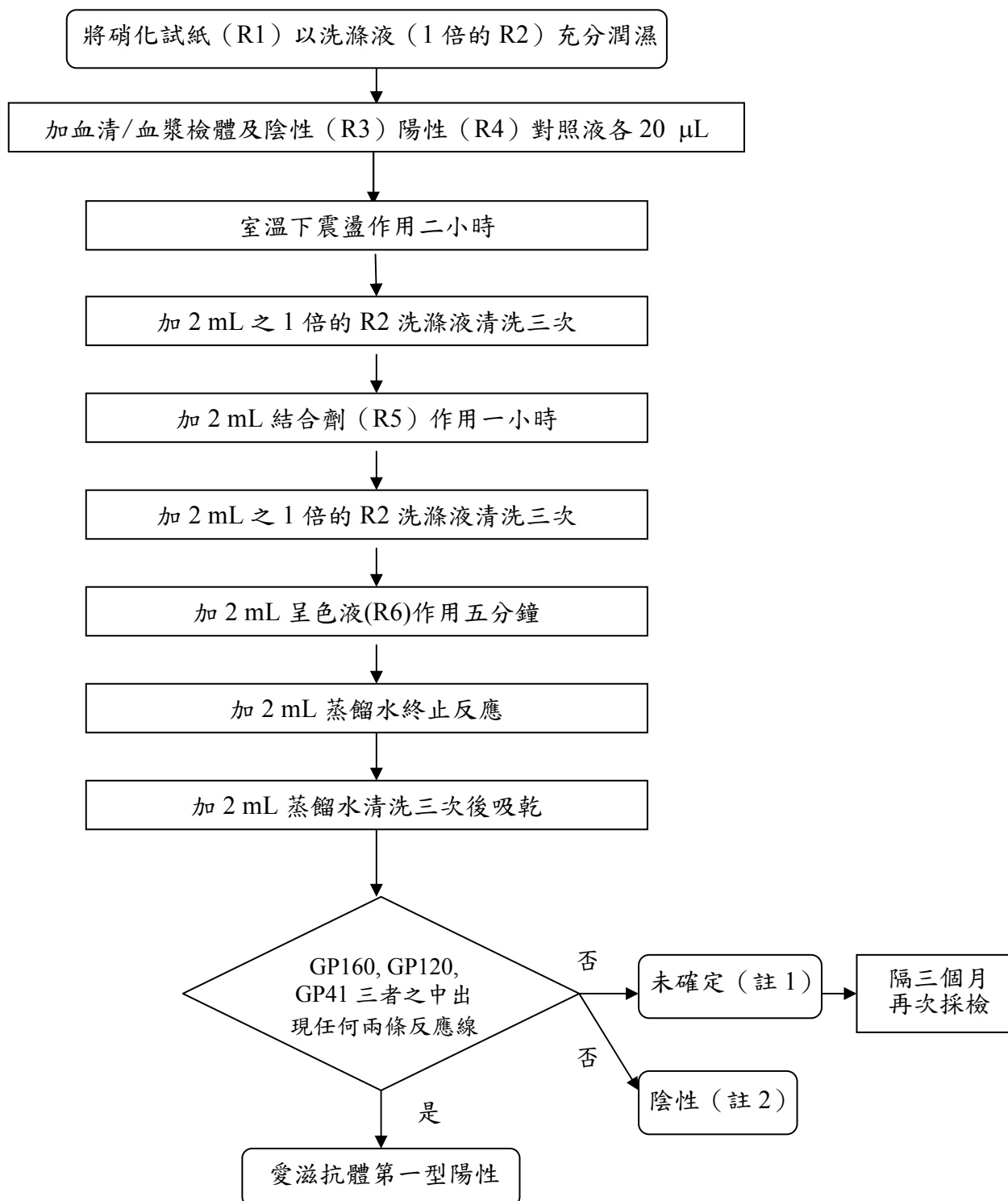


註 1.特殊案件加作核酸檢測

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 733 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 人類免疫缺乏病毒抗體試驗（西方墨點法）流程圖



註 1：有反應線出現但無法到達陽性標準者，則判斷為“未確定”。

註 2：沒有任何反應線出現者判斷為“陰性”。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 734 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 人類免疫缺乏病毒抗體試驗之西方墨點法試紙條黏貼表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

人類免疫缺乏病毒抗體試驗之西方墨點法試紙條黏貼表

頁數：第 頁/共 頁

檢驗日期：

試劑批號：

試劑名稱：

有效日期：

檢體編號	黏 貼 處	備註

檢驗者：

實驗室主管：

	編號：	人類免疫缺乏病毒抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 735 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

頁數：第 頁/共 頁

[illegible]

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：	人類免疫缺乏病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 736 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

以分子生物學之技術利用即時反轉錄酶-聚合酶連鎖反應 (Real time-RT-PCR) 來檢測檢體中是否有人類免疫缺乏病毒之核酸。

2 適用檢體種類

適用於人體之血清及血漿檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用具特殊專一性之 primers，把檢體中的病毒 RNA 經由 RT-PCR 來複製放大具有人類免疫缺乏病毒的核酸，再以 probe 進行螢光偵測，以篩選檢體中是否含有人類免疫缺乏病毒。

5 試劑耗材

5.1 Sample Preparation System：Abbott, Germany。

5.1.1 Lysis buffer。

5.1.2 Microparticles。

5.1.3 Wash 1 buffer。

5.1.4 Wash 2 buffer。

5.1.5 Elution Buffer。

5.2 Abbott RealTime HIV-1 Assay：Abbott, Germany。

5.2.1 Abbott RealTime HIV-1 Amplification Reagent：含 internal control、rTth polymerase Enzyme、HIV-1 Oligonucleotide reagent、activation reagent。

5.2.2 Abbott RealTime HIV-1 Control Kit：含 high positive control、low positive control、negative control。

5.2.3 Abbott RealTime HIV-1 Calibrator Kit：含 Calibrator A、Calibrator B。

5.3 Deep well plate。

5.4 DiTis (1 mL tips)、DiTis (200 μ L tips)。

5.5 Reagent vessels。

5.6 Reaction vessels。

5.7 master mix tube。

5.8 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ L、10 μ L。

5.9 96-well Optical Reaction Plate。

5.10 光學增強膜。

6 儀器設備

6.1 第 II 級生物安全櫃 (Class II BSC)。

6.2 m2000spTM 全自動核酸萃取系統。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 737 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 6.3 m2000rt 即時定量聚合酶連鎖反應系統。
- 6.4 微量吸管 (pipettement)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ L、10 μ L。
- 6.5 振盪器 (vortexer)。
- 6.6 採血管離心機。
- 6.7 冰箱：4°C。
- 6.8 冷凍櫃：-20°C、-80°C。
- 6.9 高壓滅菌鍋。
- 6.10 Applicator。

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

參考本局之「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 檢驗前處理

- 10.2.1 血清或添加 EDTA 抗凝劑的血漿皆可使用。
- 10.2.2 採集後之檢體，以 3,000 $\times g$ 離心 10 分鐘，將分離出的血清備用。
- 10.2.3 檢體分裝：將處理好之血清檢體分成兩管：一管放置 -20°C 供 PCR 檢驗用；另一管放置 -80°C 儲存。
- 10.2.4 吸取檢體 800 μ L 加入 reaction vessel，將 reaction vessel 和 control (包括 high positive control、low positive control 和 negative control 各一管)、calibrator (Calibrator A 和 Calibrator B 各三管) 置於檢體架上，並檢體架放置於工作台上，確定放置穩定並卡入後方之卡榫。
- 10.2.5 放入空的 DiTi tray 及 Deep Well 在 DiTi reuse rack 上，另外再放置一個 deep well plate 到 output deck (A1 朝左上方，有缺角的朝左下方)。
- 10.2.6 放入新的 1,000 μ L DiTis 到 carrier，並將 carrier 放置於工作台上 (一隻待測檢體需要約 10 隻 1,000 μ L 的 DiTis tips)。
- 10.2.7 將 reaction vessel 放進 subsystem carrier，蓋上 cover，放至 heater zone 1。
- 10.2.8 Internal Control 充分的 vortex，取 500 μ L 加到 Lysis Buffer；準備劑槽 (Reagent Vessel)：先將試劑貼紙靠試劑槽右邊的邊緣

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 738 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

貼好 (Barcode 朝右)，再依照 reagent carrier 上的標示放入，依標籤上的試劑號碼倒入。(Lysis Buffer 及 Wash Buffer 儘量避免有氣泡產生)。

10.2.9 試劑都加好後，依照指定位置放到工作台上，確定有將 Reagent vessel Carriers 推到底部。

10.2.10 檢查 System Liquid container (液壓系統用水儲存桶)、Solid waste container (固態廢棄物垃圾桶) 及 Liquid waste container (液體廢棄物垃圾桶)，如果超過下列標準，則系統無法開始進行萃取

Container	Liquid/Solid Level
Solid Waste	<½ Full
Liquid Waste	<¾ Full (以 RO 水補充)
System Liquid	>¼ Full

10.3 萃取病毒 RNA

10.3.1 打開 m2000sp™ 機器和電腦的電源，電腦開機完成後會自動進入 m2000sp™ 的系統輸入帳號密碼後進入主畫面登入之後，此時點選畫面左方的 Start 進行初始，初始化完成後系統呈現 Ready 狀態。

10.3.2 由 Instrument Status 點選 **Orders**，再點選 **Sample Extraction**。

10.3.3 在 Application Specification list 下，再選取 **m2000 0.6 ml HIV-1 RNA**。選好 protocol 後，由畫面左邊的項目中點選 **Set Up Run**。

10.3.4 依序輸入以下項目的資料：

<Run Name> 可自己設定名稱

<Comment> 輸入要補充的資料

<Control Information> <Calibrator Information> 包括 lot number、Expiration date 及濃度；若是同一批號，可直接選擇上次保存的批號資料。

註：Calibration 只要作一次系統就會記憶，不需要每次都重作，除非 Amplification Reagent Kit 或 Sample Preparation System 換批號。

10.3.5 點選 **Next** 後會出現 Sample Extraction: Sample Scan 畫面，選擇 **Scan**，完成後若有條碼會直接顯示在螢幕上，無條碼需輸入檢體編號。

10.3.6 點選 **Next** 進到 Sample Extraction: Control and Calibrator Warning 畫面，如果沒有任何 Warning 出現，則點選 **Next**。

10.3.7 點選 **Next** 後出現 Sample Extraction: Reagent Setup 的畫面，輸入以下資料：

輸入<Deep Well Plate ID>

輸入<Reagent Lot Number>

輸入<Expiration Date>，月/年

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 739 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.3.8 點選 **Next**，Sample Extraction：Reagent Scan，點選 **Scan** 進行 scan。如果沒有錯誤，會出現 **Next** (如果 Reagent Vessel Carriers 有放錯位置，則會以紅字標出放錯的位置，更正之後再點選 **Rescan** 重新掃描)，點選後出現 Sample Extraction：Run Start 畫面。
- 10.3.9 確認後選擇 **Start** 開始進行萃取。
- 10.3.10 當萃取結束後會出現一個結束的對話框，選擇 **Close**，由畫面左方選 **Close Process**，系統回復到 READY 狀態。
- 10.4 real-time PCR Master Mix 之配製
- 10.4.1 放入所需的 master mix tube 和 96-Well Optical Reaction Plate 於工作台上。
- 10.4.2 放入 1,000 μ L、200 μ L 的 DiTi Tips。
- 10.4.3 將已退冰好的 reagent pack 的蓋子打開 (操作前半小時從 -20°C 拿出來退冰，完全回溶後若還沒要操作則先置於 4°C)，置於架上。
- 10.4.4 由主畫面選擇 Orders，再點選 **Master Mix Addition** 進入 Run Master Mix Addition 的畫面。
- 10.4.5 點選剛完成的 protocol，選擇畫面左側的 **Set Up Run**，接著會出現 Master Mix Addition：Plate Details 的畫面，選擇 **Next**。
- 10.4.6 輸入 PCR plate 的名稱，選擇 **Next**。
- 10.4.7 出現 Master Mix Addition：Assay Specific Reagent Scan 的畫面，點選 **Scan**，掃描成功後出現 assay reagent IDs，lot 及 expiration date。
- 10.4.8 選擇 **Next**，出現 Master Mix Addition：Run Start 畫面：依照指示完成再次確認的動作，點選 **Start** 開始進行 Master Mix 配製。
- 10.5 封膜
- 10.5.1 撕下光學增強膜白色的部分 (protective backing)，手盡量壓住邊緣 (end tab)，避免直接接觸到會覆蓋在 96 孔盤的範圍 (seal)。
- 10.5.2 將光學增強膜覆蓋在 96 孔盤上，以 Applicator 刮平光學增強膜，再以 Applicator 壓住膜的邊緣，按虛線撕下，最後再以 Applicator 刮 96 孔盤的邊緣區來增加膜跟 96 孔盤的密合度。
- 10.5.3 將封好膜的 96 孔盤移到 m2000rt 進行 real-time PCR。
- 10.6 real-time PCR 之上機
- 10.6.1 在 m2000spTM 電腦的螢幕上方的工具列 Result，點選 **View by PCR plate**，選擇剛剛完成的 protocol，在畫面左邊點選 **Export**，將 CD-ROM 放入電腦中，選 **Start**。
- 10.6.2 打開 m2000rtTM 機器和電腦的電源，電腦開機完成後會自動進入 m2000rtTM 的系統輸入帳號密碼後進入主畫面登入之後，此時點選畫面左方的 Start 進行初始化 (約 15 分鐘)，初始化完成後系統呈現 Ready 狀態。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 740 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.6.3 選擇 m2000rt™ 電腦的螢幕上方的工具列 Orders，點選 **Test Orders**，螢幕會顯示 Pending Test Orders，點選螢幕左方 Create Tasks 中的 **Import Order**，將存有 m2000sp 資料的 CD-ROM 放入電腦中，將 Test Order 加到 Pending Test Order，選 **Finish**。
- 10.6.4 選擇 Orders 中的 **Test Orders**，螢幕會出現 Pending Test Orders，從 Run Tasks 中點選 **Set Up Run**，再從右側的 Test Orders 選擇要進行反應的 plate order。
- 10.6.5 螢幕會顯示 Run Test Order: Order Details，確定顯示的 PCR Plate Id 是否為要進行的 plate order (螢幕下方的 Sample List 中的 Sample ID 是否正確)，再點選 **Next**。
- 10.6.6 進入 Run Test Order: Run Start，打開機器的 tray drawer，將 PCR plate 放在 tray drawer 上，在推入 tray drawer；選擇有下方的 **Start**，開始進行反應。

11 結果判定

- 11.1 反應進行完成後，點選主畫面上方的 Result，選擇 **View by Plate**，螢幕會出現本次實驗偵測的結果，在 Result 欄中會顯示樣本的病毒量。
- 11.2 陽性對照組與陰性對照組的結果必須符合設定值範圍之內，同時 internal control 也要在認可範圍內，有偵測出病毒量者，判為人類免疫缺乏病毒核酸檢測陽性；未偵測出病毒量者，判為人類免疫缺乏病毒核酸檢測陰性。
- 11.3 在螢幕左方的 Result tasks 中選擇 **View Plate Details**、**View All Results Details** 或是 **View Selected Results**。
 - 11.3.1 選擇 **View Plate Details**，可以顯示單一個樣品或是所有樣品的 Target 及 IC 在進行 PCR 的反應曲線，可用以判定每一個樣品 PCR 的反應效率及結果。
 - 11.3.2 選擇 **View All Results Details**，呈現每一單個樣品的結果，從螢幕右上方的 Test Information 可知樣品的病毒量、即時定量反應的 Target Cycle Number 及 IC Cycle Number，亦可從 Error Code/Description 得知反應失敗的原因。
 - 11.3.3 選擇 **View Selected Results**，可以看單一個樣品的結果。
- 11.4 檢視反應的校正曲線 (Calibration Curve)：選擇螢幕上方的工具列 Results 選單中的 **View Assay Calibrations**，會出現不同次的校正品結果，點選要看的結果進入 Assay Calibration Details，會有 CALA、CALB 各三點校正品的 Cycle Number 及其中間值，另有校正曲線圖。

12 品質管制

- 12.1 每次操作均需帶入 high positive control、low positive control、negative control 各一隻。
- 12.2 一般試劑之品質管制：參照本局傳染病檢驗標準方法：病毒實驗室品質管制程序辦理。

行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 741 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12.3 國際標準品之品質管制

12.3.1 應於有效期限內使用，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。

12.3.2 使用國際標準品 NIBSC HIV-1 PWS-2 和 PWS-3 進行試驗。

12.3.3 試驗結果必須符合陽性反應。

12.4 m2000sp 和 m2000rt 機器定時作檢驗與校正。

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 分高壓滅菌後，參照本局傳染病檢驗標準方法：廢棄物處理作業程序辦理。

14 參考資料

ABBOTT *m2000sp* Operations Manual、ABBOTT *m2000rt* Operations Manual

15 附錄

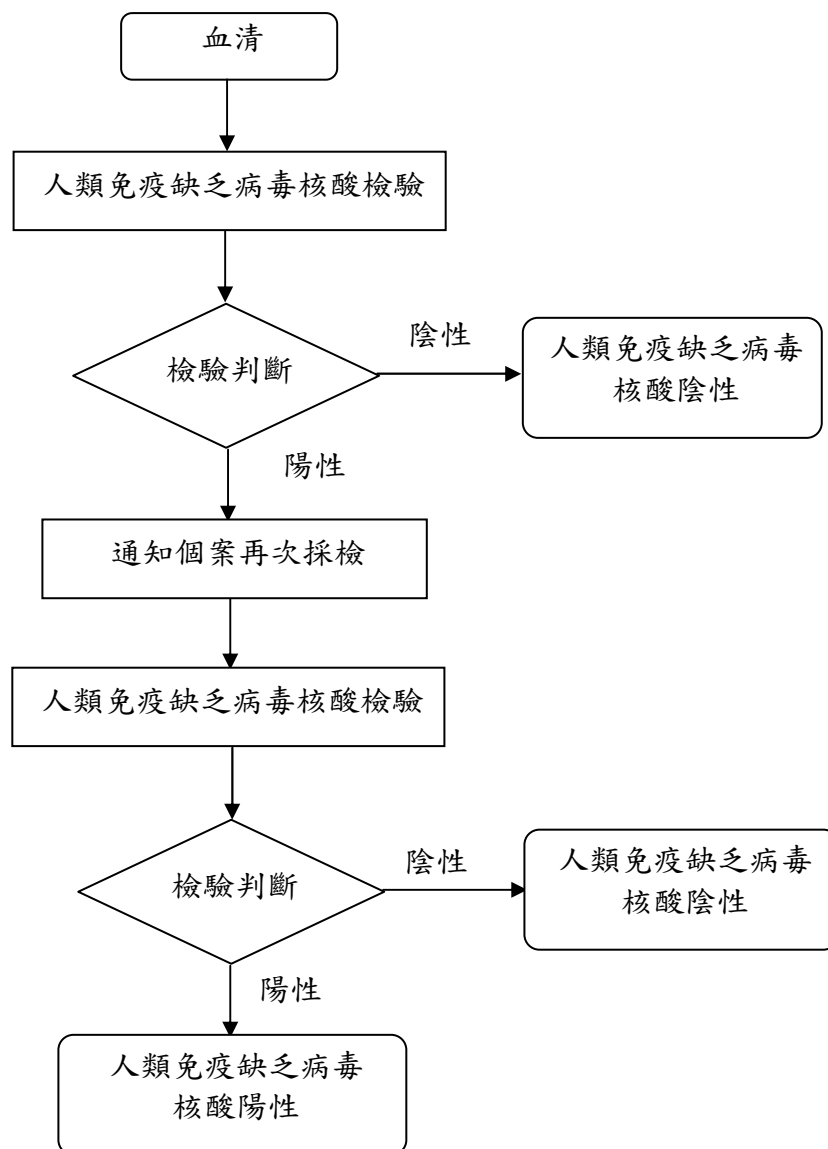
15.1 人類免疫缺乏病毒核酸鑑定（即時反轉錄酶－聚合酶連鎖反應）總流程圖。

15.2 人類免疫缺乏病毒核酸檢驗（即時反轉錄酶－聚合酶連鎖反應）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：	人類免疫缺乏病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 742 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

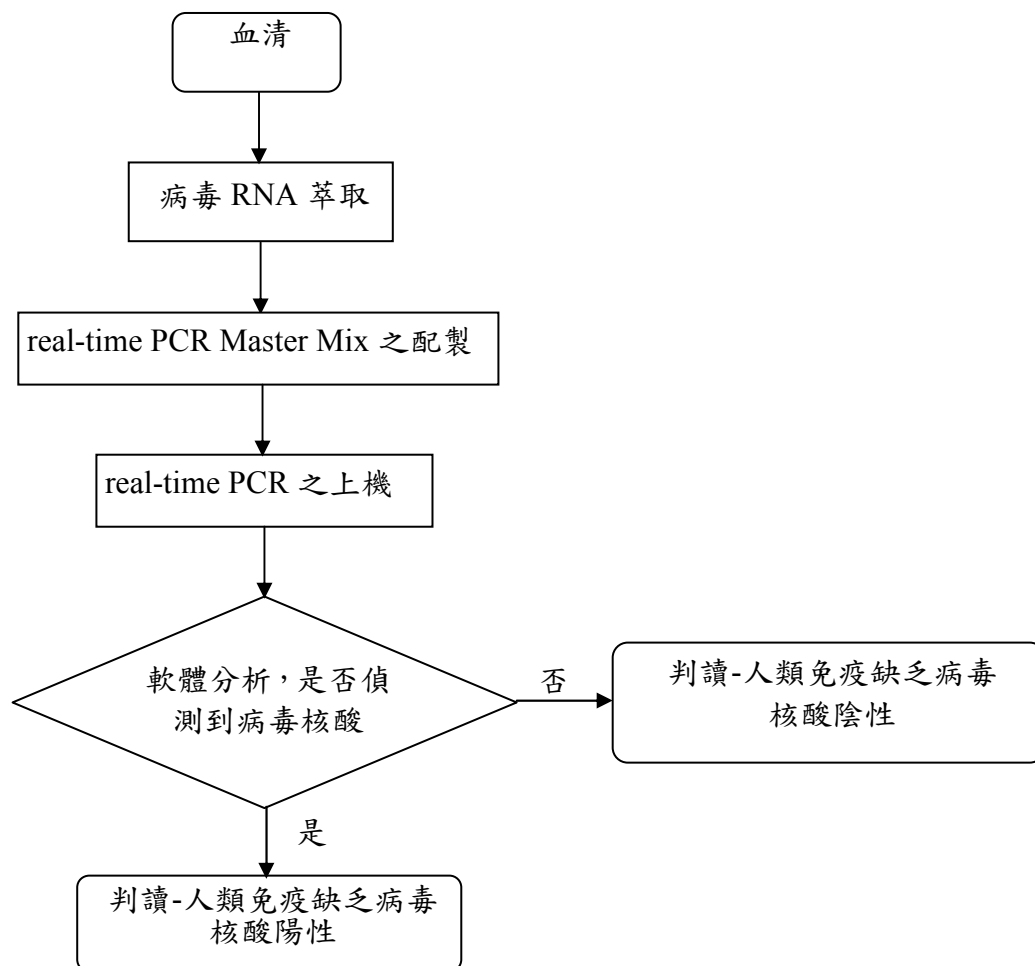
附錄 15.1 人類免疫缺乏病毒核酸鑑定(即時反轉錄酶－聚合酶連鎖反應)總流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病檢驗標準方法

	編號：	人類免疫缺乏病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 743 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 人類免疫缺乏病毒核酸檢驗（即時反轉錄酶－聚合酶連鎖反應）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：	疱疹 B 病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 744 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疱疹 B 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

將檢體血清或組織液，經 0.22 μ M 的過濾膜過濾，一部份利用即時定量 PCR 直接進行反應，如有反應，再進行細胞培養。

5 試劑耗材

5.1 QIA DNA blood mini kit (QIAgen cat#51104)。

5.2

Primer set-1 gGS4(5'-CCGCGTACGACTACGAGATCC-3')

gGAS4(5'-GTTCGCGGCCACGATCCA-3')

Primer set-2 gGBV-323F(5'-TGGCCTACTACCGCGTGG-3')

gGBV-446R(5'-TGGTACGTGTGGGAGTAGCG-3')

Primer set-2 HSV-P1(5'-GTGGTGGACTTTGCCAGCCTGTACCC-3')

HSV-P2(5'-TAAACATGGAGTCCGTGTCGCCGTAGATGA-3')

5.3 QuantiTect SYBR green DNA kit。

5.4 合成基因作為 Positive control。

5.5 Eagles' minimum essential medium。

5.6 Fetal calf serum。

5.7 Trypsine-EDTA。

5.8 25T Flask。

6 儀器設備

6.1 第 II 級生物安全櫃 (class II BSC)。

6.2 離心機 (sigma 1K-15)。

6.3 Lightcycler 2.01 (roche)。

6.4 LC Carousel centrifuge (roche)。

6.5 1-20 μ L、40-200 μ L Pipette。

6.6 -20°C 及 -80°C 冷凍櫃。

6.7 第 III 級生物安全櫃 (class III BSC)。

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 實驗室進行。

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

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 745 頁/共 1091 頁	疱疹 B 病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

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 病毒檢測

10.1.1 使用 QIA DNA blood mini kit 抽取病毒的 DNA。

10.1.2 配置反應的溶液,必須包含有待測檢體, Positive control 以及 Negative control

component	Volume/ 50 μ L reaction
H ₂ O	add to 50 μ L
5x reaction buffer	10 μ L
10 mM dNTPs	1 μ L
primer A	4 μ L
primer B	4 μ L
template DNA	x μ L
(DMSO, optional)	(1.5 μ L)
DNA polymerase	0.5 μ L

10.1.3 進行聚合酶反應, 使用 Roche 之 lightcycler2.01

Cycle step	Temp.	Time	Number of cycles
Initial denaturation	98°C	30 s	1
Denaturation	98°C	5-10 s	25-35
Annealing	45-72°C*	10-30 s	
Extension	72°C	15-30 s **/1 kb	
Final extension	72°C 4°C	5-10 min hold	1

10.1.4 進行判讀

10.2 病毒分離

10.2.1 Vero E6 細胞以 Eagles' minimum essential medium (EMEM, 內含 10% 加熱去活化胎牛血清) 在 37°C, 5% CO₂ 的條件下培養

10.2.2 細胞接種後, 改以 2% FBS EMEM 做繼代培養

10.2.3 送檢樣本先經過濾除去雜質後, 以 EMEM 培養液調整成 10% 的懸浮液, 以 100 μ L 之該懸浮液, 於 37°C 接種至 70% 細胞滿的 25 cm² 的培養瓶

10.2.4 接種 2 hr 後, 再加入 5mL 2% EMEM 培養液, 置入 37°C, 5% CO₂ 培養箱

10.2.5 每兩週做一次繼代培養, 先吸出上層培養液, 以 0.25% Trypsine-EDTA 處理分離細胞

10.2.6 再混入原吸出之培養液, 而後將 1/3 量置入新的 25 cm² 培養

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	疱疹 B 病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 746 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

瓶，並以 2% EMEM 補足至 5 mL。

10.2.7 另 1/3 置於-70°C 凍存，另 1/3 量留做抗原檢測用。

11 結果判定

Lightcycler 即時定量聚合酶反應的結果,與 Positive control，Negative control 之間互相比較來做為判讀的結果。

12 品質管制

- 12.1 嚴防病原散佈或污染，工作時帶手套。
- 12.2 實驗過程遵循 S.O.P 的作業規範與流程，並在 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 溫箱染色時應注意保持溼度。
- 12.5 必須要有未感染病毒之細胞及感染病毒之細胞分別做為陰性與陽性對照組。

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 未使用完血清放回-80°C 冰箱保存。

14 參考資料

- 14.1 Igarashi AI. 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 Liouyou 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.

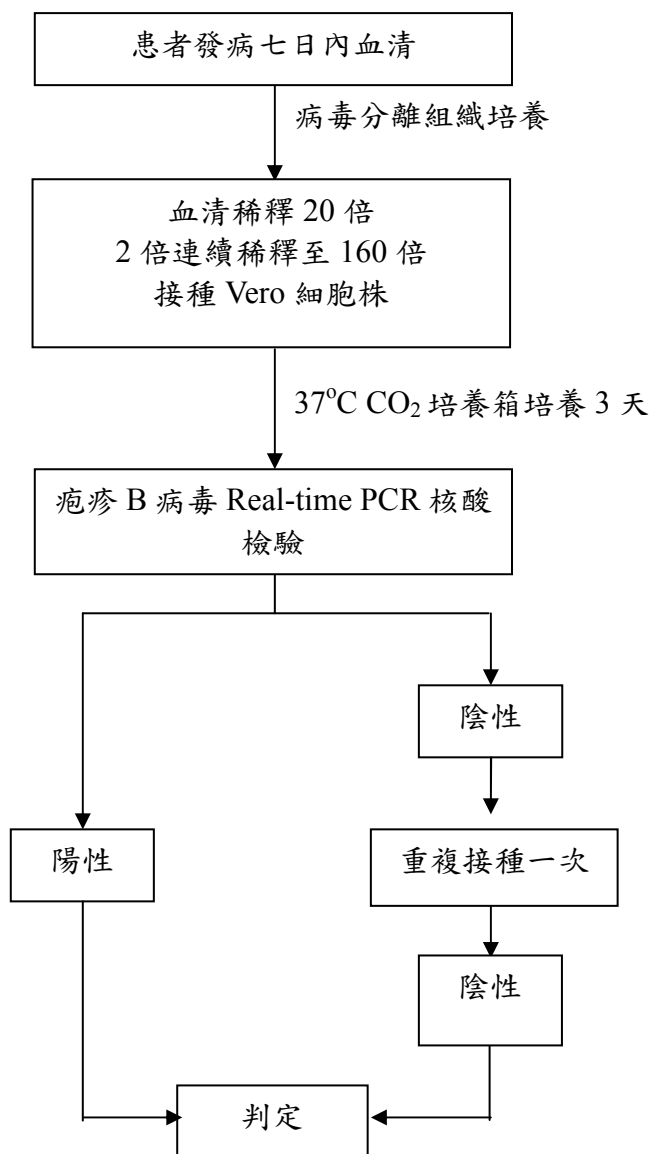
15 附錄

- 15.1 疱疹 B 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：	疱疹 B 病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 747 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 疱疹 B 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：	疱疹 B 病毒核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 748 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測疱疹 B 病毒核酸。

2 適用檢體種類

適用於符合疱疹 B 病毒病徵之病患血清檢體。

3 名詞解釋

Herpes B virus：疱疹 B 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 FastStart DNA master SYBR green I (Cat. no. 03 003 230 001)。
- 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疱疹病毒之合成基因取代完整病毒。
- 5.9 引子與探針的合成：疱疹病毒的引子合成，在選定偵側的病毒序列後 (gB (UL27) gene、RhCMV gB 及 BV US4 三段序列)，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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	疱疹 B 病毒核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 749 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Herpes B virus		
引子名稱	引子序列	備註
第一組 primer		
RhBVgB forward	5-GGTGATCGACAAGATCAACGC-3	
RhBVgB reverse	5-GCCGTGCTCTCCATGTTGTT-3	
第二組 primer		
RhCMVgB forward	5-TGCGTACTATGGAAGAGACAATGC-3	
RhCMVgB reverse	5-ACATCTGGCCGTTCAAAAAAAC-3	
第三組 primer		
BV US4-323 Forward	5-TGGCCTACTACCGCGTGG-3	
BV US4-446 Reverse	5-TGGTACGTGTGGGAGTAGCG-3	

6 儀器設備

- 6.1 The LightCycler instrument system。
- 6.2 微量吸管 (pipetmen)：5 μ L、10 μ L、200 μ L。
- 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 P4 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 (P2)
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 P4 (BSL-4) 實驗室操作。

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

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>。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	疱疹 B 病毒核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 750 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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）經過濾處理後分裝為三部份：
 - (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。
 - (3) 加入最終濃度為 10%福馬林中進行抗體檢測。
- 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 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 mini kit (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 加熱至液體呈現清澈（約 5-10 min）。
- 10.2.3 短暫離心（spin down），後加入 200 μ L Buffer AL 並混合均勻。
- 10.2.4 70°C 加熱，10 min 後短暫離心。
- 10.2.5 再加入 200 μ L 酒精（96-100%）混合均勻。
- 10.2.6 並將液體移置 Spin column。以 8,000 rpm 離心 1 min 後丟棄濾液收集管。
- 10.2.7 更換新的收集管後加入 500 μ L Buffer AW1，於 8,000rpm 離心 1 min 後丟棄濾液收集管。
- 10.2.8 更換新的收集管加入 500 μ L Buffer AW2，以 14,000 rpm 離心 3 min 後丟棄濾液收集管。
- 10.2.9 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）。
- 10.2.10 該濾液檢體即可進行即時定量聚合酶鏈反應或存於 -20°C 備用。

10.3 Real-Time PCR Amplification

10.3.1 製備試劑：

- (1) 製備 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X conc.:
將 LightCycler FastStart enzyme (colorless cap) 取出 10 μ L 加入一管 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I,

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	疱疹 B 病毒核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 751 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10X conc. (green cap) 中，可進行 32 tests (保存於 4°C 可放置 1 週)。

(2) 製備 Primer:

以 H₂O 將 Forward 及 Reverse primer 溶解，使其濃度為 100 μM，再以 H₂O 將 Primer 稀釋至最終濃度 5 μM。

10.3.2 製備 Real time PCR mix：

DNA template	4 μL
5 μM forward primer (F)	2 μL x Z
5 μM reverse primer (R)	2 μL x Z
LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X conc.	2 μL x Z
25 mM MgCl ₂ stock solution	2 μL x Z
H ₂ O	8 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 16 μL 的 Real time PCR mix 至 LightCycler 專用毛細管中。

10.3.4 加入 DNA template 各 4 μL。

10.3.5 將各毛細管封上專用蓋子。

10.3.6 離心 700 xg，5 sec (或 spin down)。

10.3.7 將毛細管依序放入檢體轉盤。

10.3.8 Run real-time PCR：

【Pre-incubation】

95°C 10 min 1 cycle

【Amplification】

Denaturing	95°C	10 sec	45 cycles
Annealing	55°C	10 sec	
Extension	72°C	25 sec	

Acquisition mode: single

【Melting curve analysis】

Denaturing	95°C	0 sec
Annealing	65°C	15 sec
Melting	95°C	0 sec

Slope = 0.1°C/sec

Acquisition mode: continuous

【Cooling】

40°C 30 sec

10.3.9 利用儀器軟體中的 Melting curve analysis 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 T_m 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：	疱疹 B 病毒核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 752 頁/共 1091 頁		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、Melting curve analysis 分析正確，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

14.1 Huff JL, Eberle R, Capitanio J, Zhou SS, Barry PA. 2003. Differential detection of B virus and rhesus cytomegalovirus in rhesus macaques . J Gen Virol 84: 83-92.

14.2 Perelygina L, Patrusheva I, Manes N, Wildes MJ, Krug P, Hilliard JK. 2003. Quantitative real-time PCR for detection of monkey B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) in clinical samples. J Virol Methods 109: 245-251.

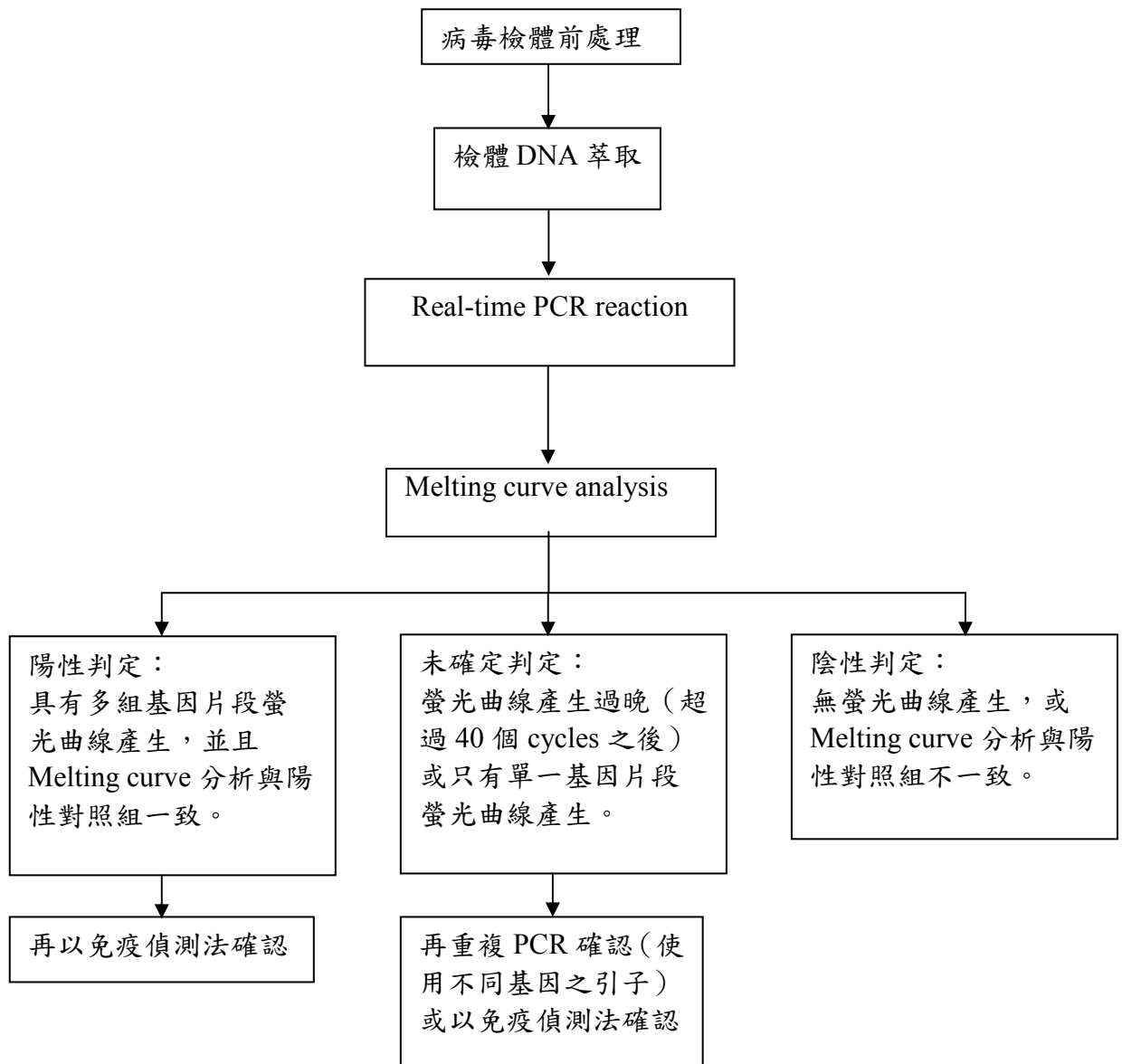
15 附錄

15.1 疱疹 B 病毒核酸檢測分析法流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	疱疹 B 病毒核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 753 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 疱疹 B 病毒病毒核酸檢測 (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：	疱疹 B 病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 754 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測疱疹 B 病毒抗體。

2 適用檢體種類

適用於符合疱疹 B 病毒之病患血清檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用 Dot immunobinding assay 套組來測定病人血清中是否有抗體。

5 試劑耗材

此組 DIAdot kit (VRL Laboratories, USA) 包含

- 5.1 Nitrocellulose (NC) sheet on a filter paper pad。
- 5.2 Precut filter paper strips。
- 5.3 Powdered phosphate buffer (PBS)。
- 5.4 5.0 mL 20% Tween-20 (green top vial)。
- 5.5 1.0 mL 10X Goat anti-human IgG conjugated with alkaline phosphatase。
- 5.6 9.0 mL Conjugate dilutant。
- 5.7 10.0 mL Chromogen- BCIP/NBT: (amber bottle)。
- 5.8 0.2 mL Positive control serum (do not dilute)。
- 5.9 0.2 mL Negative control serum (do not dilute)。
- 5.10 10.0 mL EDTA (stopping solution)。

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 鑷子。
- 6.3 震盪器。

7 環境與設施安全

於生物安全第四等級實驗室內檢體分裝、去活化。於第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。

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

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	疱疹 B 病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 755 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 取出 NC sheet，放於含 20 mL PBS Tween-20 的 Filter paper pad 上。
- 10.2 滴除過多的 PBS，表面不要有過多的 PBS tween-20。
- 10.3 每一個 NC filter 上必須包含一個 Cell culture control site (C)，以及一個 B virus test antigen site (V)。
- 10.4 血清可以做不同濃度的稀釋。
- 10.5 用鑷子取出一片 Filter paper strip，放入檢體血清中，滴除過多的血清，直接放於 NC filter 上。
- 10.6 同樣取 Filter paper strip 放入 NEG 以及 POS（不要稀釋）對照血清中，滴除過多的血清，直接放於 NC filter 上。
- 10.7 在室溫中反應 30 min。
- 10.8 加入 50 mL PBS tween-20，讓所有反應的 Filter paper strip 漂浮起來，必要時用鑷子去除所有的 Filter paper strip。
- 10.9 將 NC sheet 放在一個 Plastic lid 中，加入 10 mL PBS tween-20 清洗三次，一次 5 min。
- 10.10 加入 1.0 mL 10X Conjugate to 9.0 mL 稀釋液中，加以混合。
- 10.11 10 mL 的混合物放入 NC sheet 中，室溫反應 30 min。
- 10.12 倒除混合物，加入 20 mL PBS tween-20 清洗三次，一次 5 min。
- 10.13 加入 10 mL 的 Chromogen。
- 10.14 輕搖 NC sheet，直到陽性對照組出現 3-4+。
- 10.15 在水龍頭下清洗 1 min，加入 EDTA 終止反應，反應 1 min 後取出 NC Sheet 晾乾。
- 10.16 進行判讀。

11 結果判定

由 NC 上的染色的強度判定是否為陽性，若無染色，則判定為陰性。

12 品質管制

每次執行陽性及陰性對照血清。

13 廢棄物處理

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

14 參考資料

Woods GL, Iwen PC. 1990. Comparison of a dot immunobinding assay, latex agglutination, and cytotoxin assay for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 28: 855-857

15 附錄

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

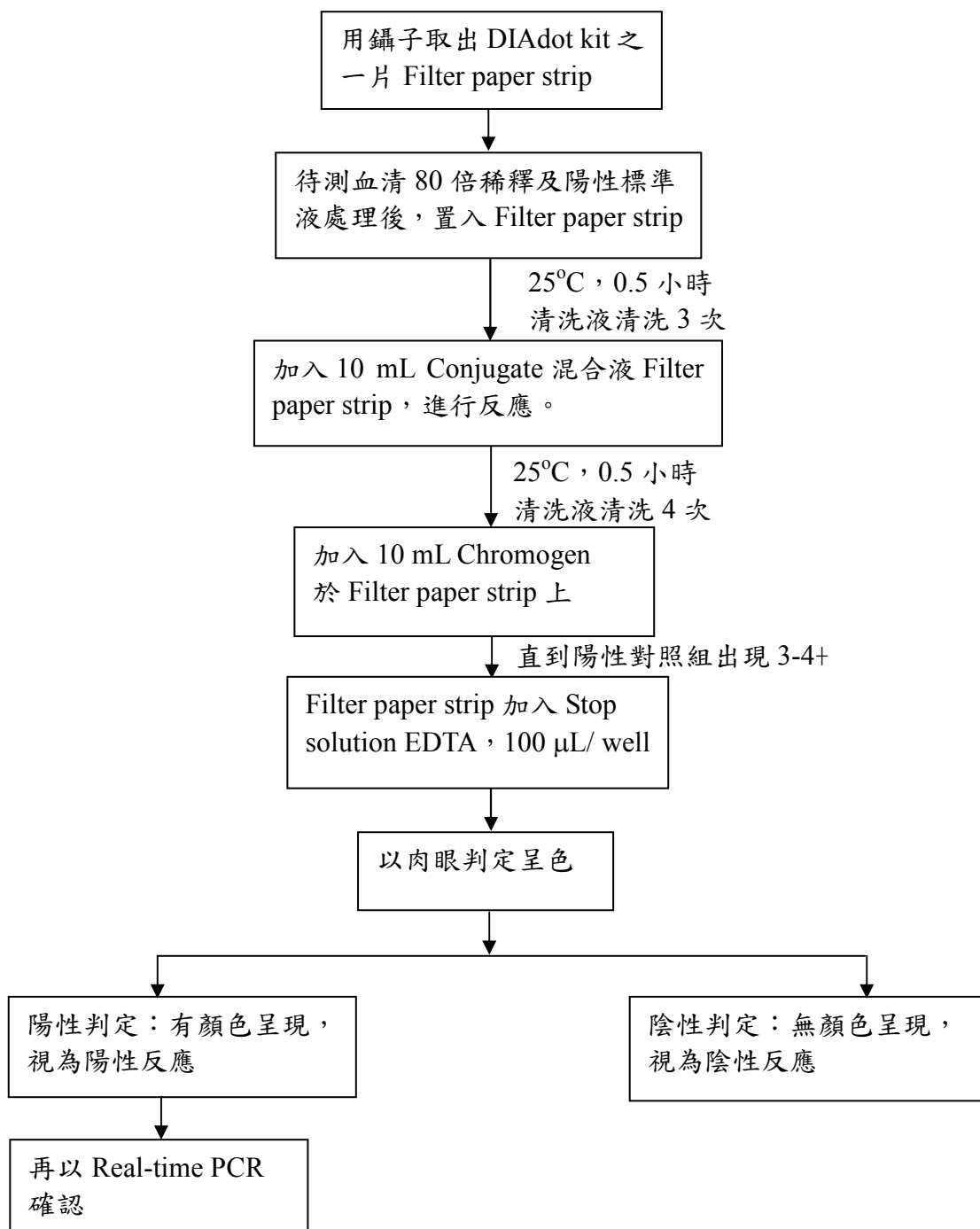
	編號：	疱疹 B 病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 756 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

15.1 疱疹 B 病毒抗體試驗（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：	疱疹 B 病毒抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 757 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 疱疹 B 病毒抗體試驗（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：	鉤端螺旋體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 758 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

疑似鉤端螺旋體病人檢體中鉤端螺旋體的分離與鑑定。

2 適用檢體種類

適用於符合鉤端螺旋體病徵之病患，發病於 10 天內採檢之血液檢體或發病超過 7 天之尿液檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

以培養方式分離培養鉤端螺旋體，以聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）法進行鉤端螺旋體的鑑定。

5 試劑耗材

5.1 無菌吸管（pipette）：20 mL、10 mL、1 mL 有 0.1 mL 刻度。

5.2 載玻片。

5.3 蓋玻片。

5.4 EMJH 培養基，配方如下：

5.4.1 EMJH base 按 Difco 商品指示秤取，溶入 900 mL 蒸餾水中。

5.4.2 攪拌至完全溶解。

5.4.3 加入 15 克的 Agar。

5.4.4 121°C，溼熱滅菌 15 min，待冷卻至 50°C 以下。

5.4.5 將 100 mL Enrichment 以無菌操作加入培養基，每 6 mL 分裝至螺旋蓋試管中。

5.5 GoTaq green master mix: Promega Corp., Cat no. M7122。

5.6 Primer：G1，10 μM。

5.7 Primer：G2，10 μM。

5.8 Primer：B64I，10 μM。

5.9 Primer：B64II，10 μM。

5.10 PCR 專用八連排反應管。

5.11 PCR 專用八連排反應蓋。

5.12 TBE 緩衝液。。

5.13 陽性對照：本實驗採用 *Leptospira* 血清型 *Icterohaemorrhagiae* 參考菌株作對照；陰性對照：以水作陰性對照。

5.14 Agarose。

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

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

5.17 無菌微量離心管：1.5 mL，0.2 mL。

5.18 手套。

5.19 PBS（phosphate buffered saline）。

5.20 100 bp 核酸標定物。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	鉤端螺旋體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 759 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

6 儀器設備

- 6.1 微量吸管 (pipetteman)：1,000 μ L、200 μ L、30 μ L。
- 6.2 暗視野顯微鏡。
- 6.3 震盪器。
- 6.4 核酸增幅儀：Biometra。
- 6.5 電泳槽。
- 6.6 DNA 電泳膠體觀察照相設備。
- 6.7 水浴槽。
- 6.8 冰桶。
- 6.9 28°C 培養箱。
- 6.10 離心機：4,000 rpm 以上。
- 6.11 微量離心機。
- 6.12 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 菌株處理、PCR 反應混合物配製、PCR 反應進行、電泳皆需於獨立區域操作。

8 檢體採集

尿液與血液檢體的採集，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

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：血液、尿液 3-5 滴各置入 6 mL EMJH 培養基的試管。
- 10.1.2 培養：28°C 培養箱培養。
- 10.1.3 觀察：每隔一至二週吸取一滴培養基置於載玻片上，以暗視野顯微鏡觀察疑似鉤端螺旋體菌體，連續觀察 12 週。

10.2 鑑定

- 10.2.1 萃取核酸：萃取每批核酸應同時以水作萃取品管樣品。
 - (1) 吸取有可疑菌體之 EMJH 培養液 1 mL 於 1.5 mL 微量離心管以 10,000 rpm 離心 5 min，除去上清液。加入 1 mL PBS 清洗。以 10,000 rpm 離心 5 min，除去上清液。加入含 100 μ L 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	鉤端螺旋體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 760 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

模板 DNA。

10.2.2 PCR 鑑定

(1) PCR 反應混和物配製如下：

每個檢體各應分別分管檢驗 Primer G1/G2 與 Primer B64I/B64II	Final conc. Or volume
Component	
Template (陽性 DNA、水、檢體)	2 μL
Each primer (10 μM)	1 μL
GoTaq green master mix	25 μL
加無菌水	21 μL

(2) 放入儀器中進行反應，反應條件設定：

- (a) 94°C / 3 min, 1 cycle。
- (b) 94°C / 60s, 55°C / 60s, 72°C / 120s, 30 Cycles。
- (c) 72°C / 300s, 1 Cycle。
- (d) 維持在 4°C。

(3) PCR 電泳分析。

11 結果判定

11.1 判讀標準：

11.1.1 未發現細線樣螺旋活動快速之細菌，判定為陰性。當有細線樣螺旋活動快速之細菌，需以聚合酶鏈鎖反應進行鑑定：當以 Primer G1/G2 反應出現 285 bp 之片斷判定為陽性，未出現 285 bp 之片斷判定為陰性；當以 Primer B64I/B64II 反應出現 563 bp 之片斷判定為陽性，未出現 563 bp 之片斷判定為陰性。

11.1.2 綜合檢驗結果判讀標準：符合鉤端螺旋體形態，聚合酶鏈鎖反應 Primer G1/G2 與 Primer B64I/B64II 兩者其一為陽性或兩者全數為陽性者，判讀為陽性。符合鉤端螺旋體形態，聚合酶鏈鎖反應 Primer G1/G2 與 Primer B64I/B64II 兩者均為陰性者，判讀為未分離到鉤端螺旋體。未符合鉤端螺旋體形態，判讀為未分離到鉤端螺旋體。

11.2 報告核發：未分離到鉤端螺旋體，鉤端螺旋體陽性。

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

12.1 電泳結果之檢視，應以 100 bp Marker 會在洋菜膠上呈現出 100-1,000 bp 的 Ladder band，並以此作片段大小之識別依據。

12.2 Primer G1/G2 其陽性對照之結果需符合設定值，即有 285 bp 之片斷，才可進行研判否則需重做檢驗。

12.3 Primer B64I/ B64II 其陽性對照之結果需符合設定值，即有 563 bp 之片斷，才可進行研判否則需重做檢驗。

12.4 陰性對照與萃取品管樣品之結果均需符合設定值，即不能有增幅片

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	鈎端螺旋體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 761 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

斷，才可進行研判否則需重做檢驗。

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 WHO. 2003. Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.
- 14.2 Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 1999. Leptospira and Leptospirosis, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 14.3 Qiagen, Dneasy tissue hand book. Pp. 19-20.

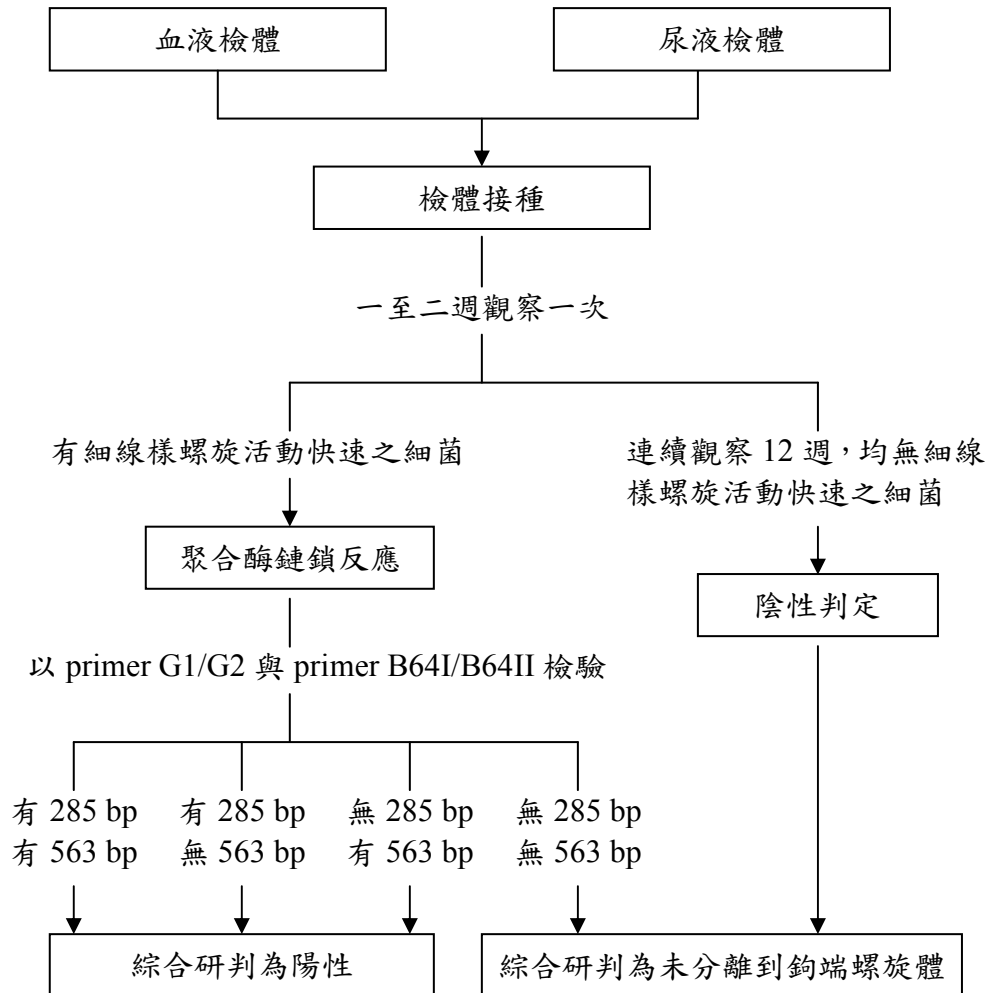
15 附錄

- 15.1 鈎端螺旋體分離與鑑定流程圖。
- 15.2 鈎端螺旋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：	鉤端螺旋體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 762 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 鉤端螺旋體分離與鑑定流程圖。



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	鈎端螺旋體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 763 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 鈎端螺旋體診斷用引子組序列表

G1： 5'-CTGAATCGCTGTATAAAAGT-3'
G2： 5'-GGAAAACAAATGGTCGGAAG-3'
,
B64I： 5'-ACTAACTGAGAACTTCTAC-3'
B64II： 5'-TCCTTAAGTCGAACCTATGA-3'

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	鉤端螺旋體抗體檢測 (顯微凝集法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 764 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測鉤端螺旋體病抗體。

2 適用檢體種類

適用於符合鉤端螺旋體病徵之病患血清。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用活菌作為抗原，與病患血清進行抗原抗體反應，以暗視野顯微鏡觀察是否有菌體聚集之凝集現象。

5 試劑耗材

5.1 EMJH 培養之鉤端螺旋體活菌，血清型：canicola、kennewicki、icterohaemorrhagiae、patoc、shermani、lyme、poi、tarassovi、pomona、bataviae、javanica (2939)。

5.2 PBS (phosphate buffered saline)。

5.3 無菌微量吸管尖 (tip)：200 μ L、1,000 μ L。

5.4 96 孔微量滴定盤 (microtiter plate)：U 型。

5.5 96 孔微量滴定盤封膜。

5.6 八連排血清稀釋管。

5.7 八連排血清稀釋架。

5.8 載玻片。

5.9 手套。

6 儀器設備

6.1 微量吸管 (pipetteman)：1,000 μ L、200 μ L、30 μ L。

6.2 暗視野顯微鏡。

6.3 震盪器。

6.4 37°C 溫箱。

6.5 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

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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	鈎端螺旋體抗體檢測 (顯微凝集法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 765 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 檢驗前處理

10.1.1 檢體以 2,000 rpm 離心 10 min，分離出血清備用。

10.2 檢驗步驟

10.2.1 篩檢檢驗，以抗體稀釋 100 倍做篩檢依據。

10.2.1.1 待測血清以 PBS 稀釋 50 倍。

10.2.1.2 PBS 及稀釋後的待測血清各取 25 μ L 加入 96 孔微量滴定盤孔格中。

10.2.1.3 每個 PBS 及待測血清分別與鈎端螺旋體各個血清型菌液各 25 μ L 反應。

10.2.1.4 覆上 96 孔微量滴定盤封膜，震盪後放置 37°C 恆溫箱中，反應 30 min。

10.2.1.5 由各孔格中吸取 5 μ L 置於載玻片上，以暗視野顯微鏡觀察。

10.2.1.6 結果判定：50%以上之菌體產生凝集現象，即需要做進一步抗體力價確認。

10.2.2 血清抗體力價確認

10.2.2.1 將需測定血清抗體力價血清自 50 倍，以 PBS 開始 2 倍稀釋至 6,400 倍。

10.2.2.2 將 PBS 及各個稀釋血清取 25 μ L 依序滴入 96 孔盤中，第一孔格為 PBS，第二孔以後依序為稀釋 50 倍、100 倍、200 倍、400 倍、800 倍、1,600 倍、3,200 倍、6,400 倍之稀釋血清。

10.2.2.3 各孔格加入待確定之血清型菌液 25 μ L，使最終反應血清稀釋倍數依序為 100 倍、200 倍、400 倍、800 倍、1,600 倍、3,200 倍、6,400 倍、12,800 倍。

10.2.2.4 覆上封膜，震盪後放置 37°C 恆溫箱中，反應 30 min。

10.2.2.5 由各孔格中吸取 5 μ L 置於載玻片上，以暗視野顯微鏡觀察。

10.2.2.6 結果判定：50%菌體凝集之血清稀釋倍數，即為該血清之血清型抗體力價。

11 結果判定

11.1 判讀標準：

11.1.1 抗體效價判讀標準：未達 100 倍抗體效價之血清檢體，顯微凝集判為陰性。檢體血清抗體效價 $\geq$ 100 倍，以配對檢體經由下列判讀標準判定。

11.1.2 綜合檢驗結果判讀標準：

11.1.2.1 一採檢體：綜合檢驗結果均判為未確定需再採檢。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	鉤端螺旋體抗體檢測 (顯微凝集法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 766 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

11.1.2.2 配對檢體：

- 配對血清均 ≤ 100 倍抗體效價者，其綜合檢驗結果判為陰性。
- 配對血清未達四倍上升者，其綜合檢驗結果判為不明（無法確定）。
- 配對血清抗體檢測達四倍（含）上升者，其綜合檢驗結果判為陽性。

11.2 報告核發：鉤端螺旋體病抗體陰性，鉤端螺旋體病抗體未確定需再採檢，鉤端螺旋體病抗體不明（無法確定），鉤端螺旋體病抗體陽性。

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

12 品質管制

12.1 每次檢驗之菌株，需使用培養 4 到 10 天內之菌株，濃度約 $1-2 \times 10^8$ leptospire/mL。

12.2 試驗中判斷菌體是否達 50%凝集，需與 PBS 反應之血清型菌液比較。

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 WHO. 2003. Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.

14.2 Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, Florida.

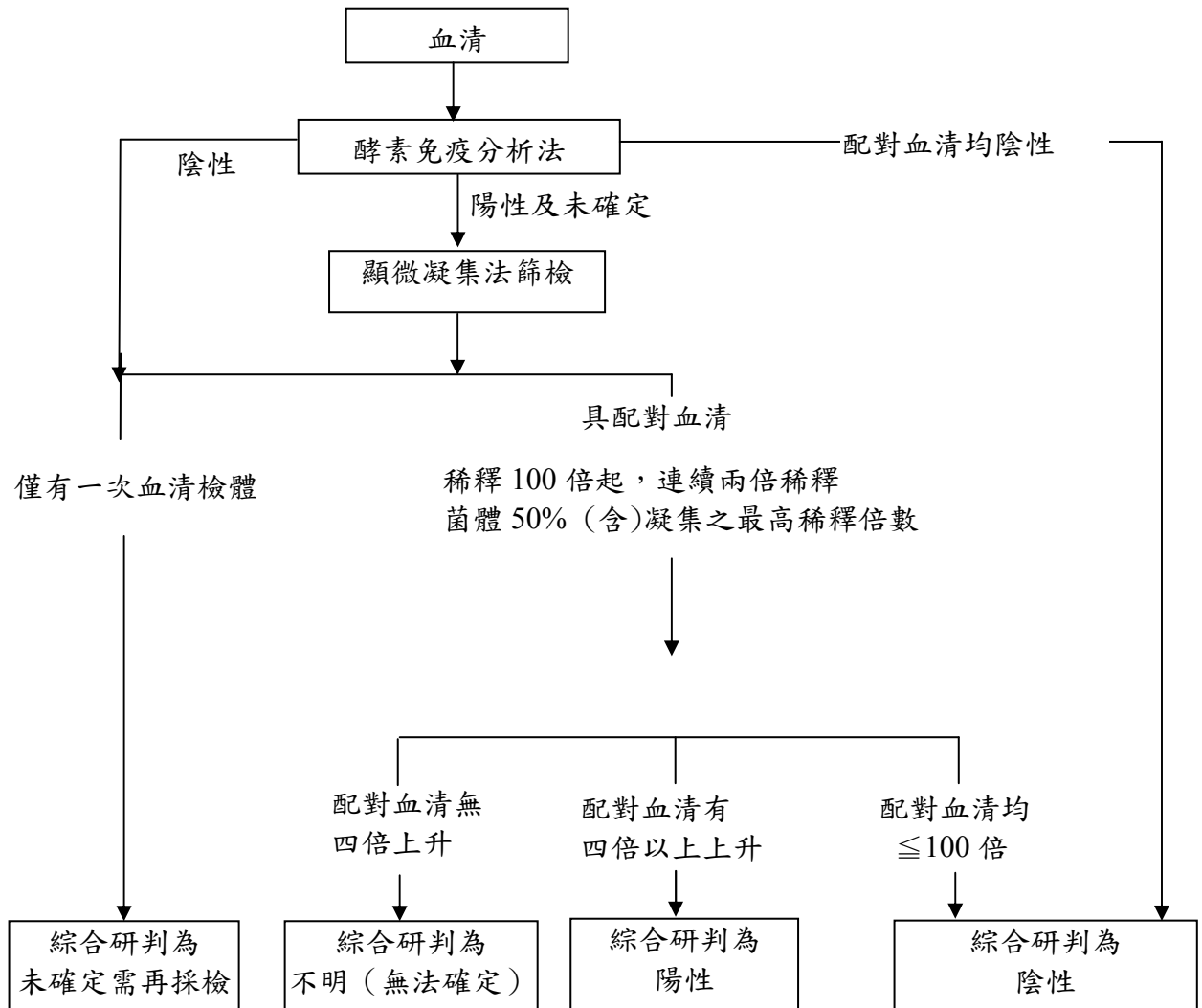
15 附錄

15.1 鉤端螺旋體抗體顯微凝集試驗流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	鈎端螺旋體抗體檢測 (顯微凝集法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 767 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 鈎端螺旋體抗體顯微凝集試驗抗體力價判讀流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	鉤端螺旋體抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 768 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測鉤端螺旋體病抗體。

2 適用檢體種類

適用於符合鉤端螺旋體病徵之病患血清檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用鉤端螺旋體作為抗原，與病患血清進行抗原抗體反應，以酵素標幟抗體間接地將此反應轉成顏色訊號，由全自動酵素免疫分析儀讀取結果。

5 試劑耗材

- 5.1 清洗液 PBST (PBS pH 7.2 含 0.05% Tween 20)。
- 5.2 檢體稀釋液 (PBST 含 0.5% BSA)。
- 5.3 已吸附鉤端螺旋體抗原之 96 孔微量滴定盤。
- 5.4 抗人類 IgM 之 HRP (horseradish peroxidase) 酵素結合抗體 (peroxidase conjugated affinity purified anti-human IgM μ 【goat】)，Rockland，USA。
- 5.5 HRP 穩定液 (HRP stabilizer)，KPL，USA。
- 5.6 呈色劑 (TMB 受質) (SureBlue™ TMB microwell peroxidase substrate)，KPL，USA。
- 5.7 終止液 (TMB stop solution)，KPL，USA。
- 5.8 陽性標準液。
- 5.9 無菌蒸餾水。
- 5.10 八連排血清稀釋管。
- 5.11 八連排血清稀釋架。
- 5.12 無菌微量吸管尖 (tip)：200 μ L、1,000 μ L。
- 5.13 96 孔微量滴定盤封膜。
- 5.14 可拋棄式無菌塑膠手套。

6 儀器設備

- 6.1 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 6.2 全自動酵素免疫分析儀 (ELISA reader)：Multiskan EX (450 nm 波長)，Thermo，Finland。
- 6.3 全自動清洗器。
- 6.4 微量吸管 (pipetmen)：1,000 μ L、100 μ L、30 μ L。
- 6.5 計時器。
- 6.6 37°C 溫箱。

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	鉤端螺旋體抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 769 頁/共 1091 頁		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

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 檢驗前血清處理

檢體以 2,000 rpm 離心 10 min，分離出血清備用。

10.2 微孔盤處理

10.2.1 微孔盤注入清洗液放置 5 min，以清洗液清洗 3 次。

10.2.2 微孔盤注入 100 μ L 檢體稀釋液，室溫靜置 10 min，拍乾微孔盤。

10.3 陽性對照血清（亦即陽性標準液）

10.3.1 A1、B1、C1 至 H1，加入 100 μ L 檢體稀釋液。

10.3.2 B1 孔格加入 80 μ L 檢體稀釋液。

10.3.3 B1 孔格加入 20 μ L 陽性對照血清，混合均勻。

10.3.4 從 B1-H1 作序列兩倍稀釋：B1 孔取出 100 μ L，置入 C1 孔格內混合均勻；最後至 H1 孔格，捨棄 H1 孔格多餘的 100 μ L 液體。

10.4 待測血清

10.4.1 待測血清稀釋 80 倍：血清稀釋管分別加入 395 μ L 檢體稀釋液，與 5 μ L 待測血清檢體。

10.4.2 A2 孔格後分別加入稀釋後之血清檢體，各檢體需二重複試驗。

10.5 37°C 反應 30 min 後，以清洗液清洗 4 次，拍乾微孔盤。

10.6 微孔盤加入 100 μ L 抗人類 IgM 之 HRP 酵素結合抗體（以 1：6,000 稀釋於 HRP 穩定液），37°C 反應 30 min，清洗液清洗 4 次，拍乾微孔盤。

10.7 微孔盤注入 100 μ L 已回溫之受質（TMB），室溫反應 4 min。

10.8 微孔盤再注入 100 μ L 停止液。

10.9 ELISA reader 判讀，使用波長 450 nm 判讀。

11 結果判定

11.1 判讀標準：以陽性標準品測得最高吸光值之 1/2，作為陽性標準吸光值。以次於陽性判定標準 OD 值之孔格實測 OD，作為臨界值（borderline OD）。當檢體吸光值高於陽性標準值（含），以「陽性」註記，再以顯微凝集法確認（依鉤端螺旋體病抗體檢測（顯微凝集法）操作程序進行）；當檢體吸光值低於陽性標準值且高於臨界值，以「未確定」註記，再以顯微凝集法確認；當檢體吸光值低於臨界值，判定為鉤端螺旋體抗體「陰性」。

11.2 報告核發：以顯微凝集法之結果為判定標準，鉤端螺旋體病抗體陰性，

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	鉤端螺旋體抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 770 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

鉤端螺旋體病抗體未確定需再採檢。

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

12 品質管制

每次執行陽性及陰性對照血清。

13 廢棄物處理

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

14 參考資料

- 14.1 WHO. 2003. Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.
- 14.2 Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, Florida.

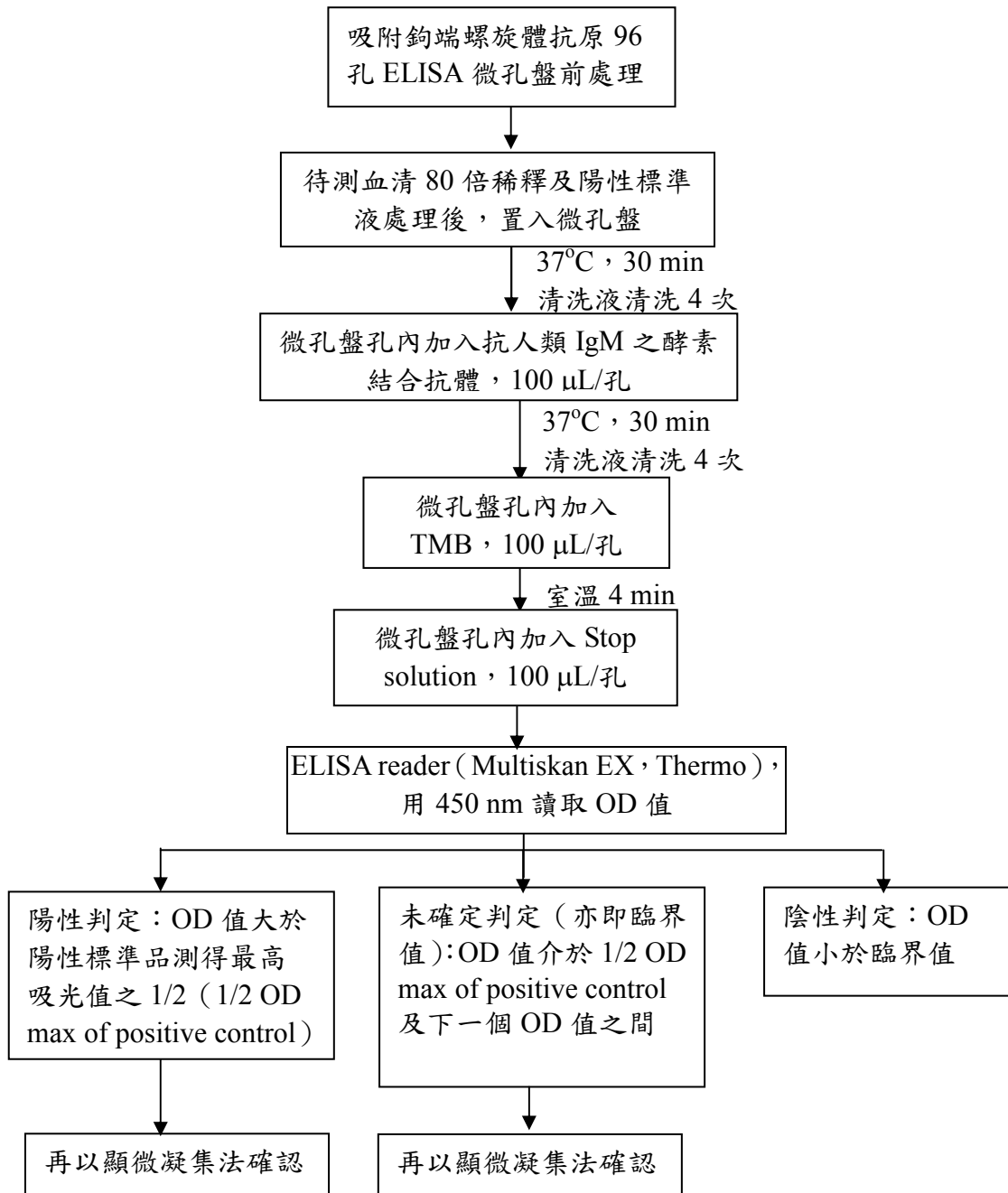
15 附錄

- 15.1 鉤端螺旋體抗體試驗-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：	鉤端螺旋體抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 771 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 鉤端螺旋體抗體試驗（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：	類鼻疽伯克氏菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 772 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的
類鼻疽伯克氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*) 的分離與鑑定。
- 2 適用檢體種類
適用於疑似類鼻疽感染症個案之血液、喉部擦拭液或分泌物、膿汁、菌株。
- 3 名詞解釋
無。
- 4 原理概述
以特定培養基分離類鼻疽伯克氏菌，利用細菌生長型態、染色及醣類、胺基酸代謝特性鑑定。
- 5 試劑耗材
 - 5.1 無菌吸管。
 - 5.2 無菌 tip：需 1,000 μ L、200 μ L 與 10 μ L 等三種規格。
 - 5.3 滅菌培養皿：內徑約 90 mm 及 150 mm，深度約 15 mm。
 - 5.4 可拋棄式接種環（針）。
 - 5.5 0.22 μ m 孔徑無菌濾膜。
 - 5.6 15 mL 離心管，100 μ L 及 1.5 mL 微量離心管。
 - 5.7 無菌 3 mL 塑膠吸管。
 - 5.8 可拋棄式無菌塑膠手套。
 - 5.9 馬克法藍氏濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)。
 - 5.10 蓋玻片、懸滴凹槽玻片。
 - 5.11 培養基。
 - 5.11.1 MacConkey agar。
 - 5.11.2 Blood agar plate (BAP)。
 - 5.11.3 Ashdown medium 選擇性培養基。
 - (1) 配方如下

TSB	10 g
Glycerol	40 mL
Agar	15 g
Aqueous crystal violet (0.1%, w/v)	5 mL
蒸餾水	940 mL
 - (2) 121°C，滅菌 15 min，待冷卻至約 50°C。
 - (3) 秤 0.005 g gentamicin 溶於 10 mL 蒸餾水中，以濾膜過濾除菌，再加入上述之培養基中。
 - (4) 倒入平盤，存放於 4°C 冰箱中，有效期 2 星期。
 - 5.11.4 Arginine broth。
 - 5.11.5 Gelatin medium。
 - 5.11.6 *Burkholderia pseudomallei* selective broth。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	類鼻疽伯克氏菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 773 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.12 Gram's staining 染劑：Difco，USA。
- 5.13 Oxidase reagent solution：取 1 µg N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydro-chloride 溶於 100 mL 蒸餾水中，儲存於褐色瓶，保存於冰箱，使用期限以一週為宜。另可選用商品化試劑，如榮研、DIFCO、BBL、ROSCO 等均有 Oxidase 試劑，型態有 Strips、Disks、Tablets 等。
- 5.14 快速生化鑑定套組試劑：有多組商品可選用，如 API-20 NE，Vitek GNI 或 GNI+卡片等。

6 儀器設備

- 6.1 高壓滅菌鍋。
- 6.2 電動 Pipetaid。
- 6.3 37°C CO₂ 培養箱。
- 6.4 水浴槽。
- 6.5 電子式微量天平。
- 6.6 酸鹼值測定儀。
- 6.7 光學顯微鏡。
- 6.8 攪拌器。
- 6.9 37°C 培養箱 (incubator)。
- 6.10 震盪器。
- 6.11 Pipetman：需 1,000 µL、200 µL、10 µL、2 µL 等四種規格。
- 6.12 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。

7 環境與設施安全

- 7.1 臨床檢體於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。
- 7.2 大量操作時需至生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室之設施內操作。

8 檢體採集

- 8.1 血液檢體量應 6-20 mL 以上才足夠。喉部檢體、痰、尿液、傷口、膿汁、胸腔液、腹膜液、氣管吸取液。
- 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 檢體以低溫保存運送，血液培養瓶以常溫運送。
- 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 分離培養

- 10.1.1 血液：檢體量應 6-20 mL 以上才足夠。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

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 774 頁/共 1091 頁	類鼻疽伯克氏菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

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 及 BAP 培養基中，於 37°C CO₂ 培養箱中培養，約 24-48 hr 後，挑選疑似菌落作革蘭氏染色及次培養。目前商品化已發展出半自動化偵測血液培養裝置，利用細菌代謝培養基內成份產生 CO₂ 後，作為電腦偵測依據，並將結果自動呈現告知實驗者。

10.1.2 喉部檢體、痰、尿液、傷口、膿汁、胸腔液、腹膜液、氣管吸取液：將檢體接種於 MacConkey 及 BAP 培養基中，於 37°C CO₂ 培養箱中培養，約 24-48 hr 後，挑選疑似菌落作革蘭氏染色及次培養。有時需 72 hr 或更長時間才可以看到典型肚臍眼狀皺縮菌落。或將檢體接種於 *B. pseudomallei* selective broth 後，於 37°C CO₂ 培養箱中培養，培養 24-48 hr，若有疑似 *B. pseudomallei*，會在培養液上層形成乾薄膜，具有蓬亂表面；再將此菌移轉至 Ashdown medium，於 37°C CO₂ 培養箱中培養，若純菌可於 24-48 hr 以後看見典型藍紫色-紫色之皺縮乾燥菌落。

10.2 鑑定：

10.2.1 菌落型態：*B. pseudomallei* 於培養基上菌落呈乾酪狀、皺縮（似肚臍眼狀）、表面乾燥，具泥土味（注意：不可用鼻子直接吸聞）。於 MacConKey agar 上菌落為乳糖不發酵及 BAP 培養基上菌落為白色；於 *B. pseudomallei* selective broth 培養液上層形成乾薄膜，具有蓬亂表面；於 Ashdown medium 為典型藍紫色—紫色之菌落。

10.2.2 革蘭氏染色：挑選疑似之菌落以革蘭氏染色，特性為革蘭氏陰性，短小桿菌，形狀似別針—菌體中心空狀無法染色，菌體二端濃染。

10.2.3 Oxidase test：取一滴 Oxidase reagent 溶液，滴於新鮮菌落上，若反應後菌落呈藍色或藍紫色為陽性，不變色為陰性。*B. pseudomallei* 為 Oxidase 陽性。

10.2.4 快速生化鑑定系統：挑取革蘭氏染色陰性、菌體形狀特徵類似且 Oxidase test 陽性之菌落，依套組說明製備菌液、接種菌液於鑑定盤各反應格、培養、判讀結果。*B. pseudomallei* 主要生化特性為 Oxidase 陽性、Nitrate 反應產生 N₂、Arginine dihydrolase 陽性、Gelatinase 陽性、TSIA 反應為 A/K 斜面酸化（可利用 lactose 及 sucrose）。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	類鼻疽伯克氏菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 775 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

11 結果判定

試驗或基質	正反應	負反應	<i>B. pseudomallei</i> 之反應
MacConKey agar 及 BAP	MacConKey agar 上菌落為乳糖不發酵，但培養4-7 天後因氧化乳糖菌落成為深粉紅色；BAP 上菌落為白色乾酪狀、皺縮（似肚臍眼狀）、表面乾燥菌落，具泥土味	非左述狀況	正反應
Ashdown medium	藍紫色-紫色，皺縮（似肚臍眼狀）、表面乾燥菌落，具泥土味	非左述狀況	正反應
革蘭氏染色	陰性，短小桿菌，形狀似別針--菌體中心空泡狀無法染色，菌體二端濃染	非左述狀況	正反應
Oxidase test	藍色或藍紫色	不變色	正反應
快速生化試驗	依套組指示可直接判定結果	--	正反應

12 品質管制

判定感染應配合臨床症狀，培養菌落性狀，菌落生化反應。

13 廢棄物處理

檢驗過程之物品及廢液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。
- 14.2 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Sckrekenberger PC, Winn WC. 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th edition. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, PA.

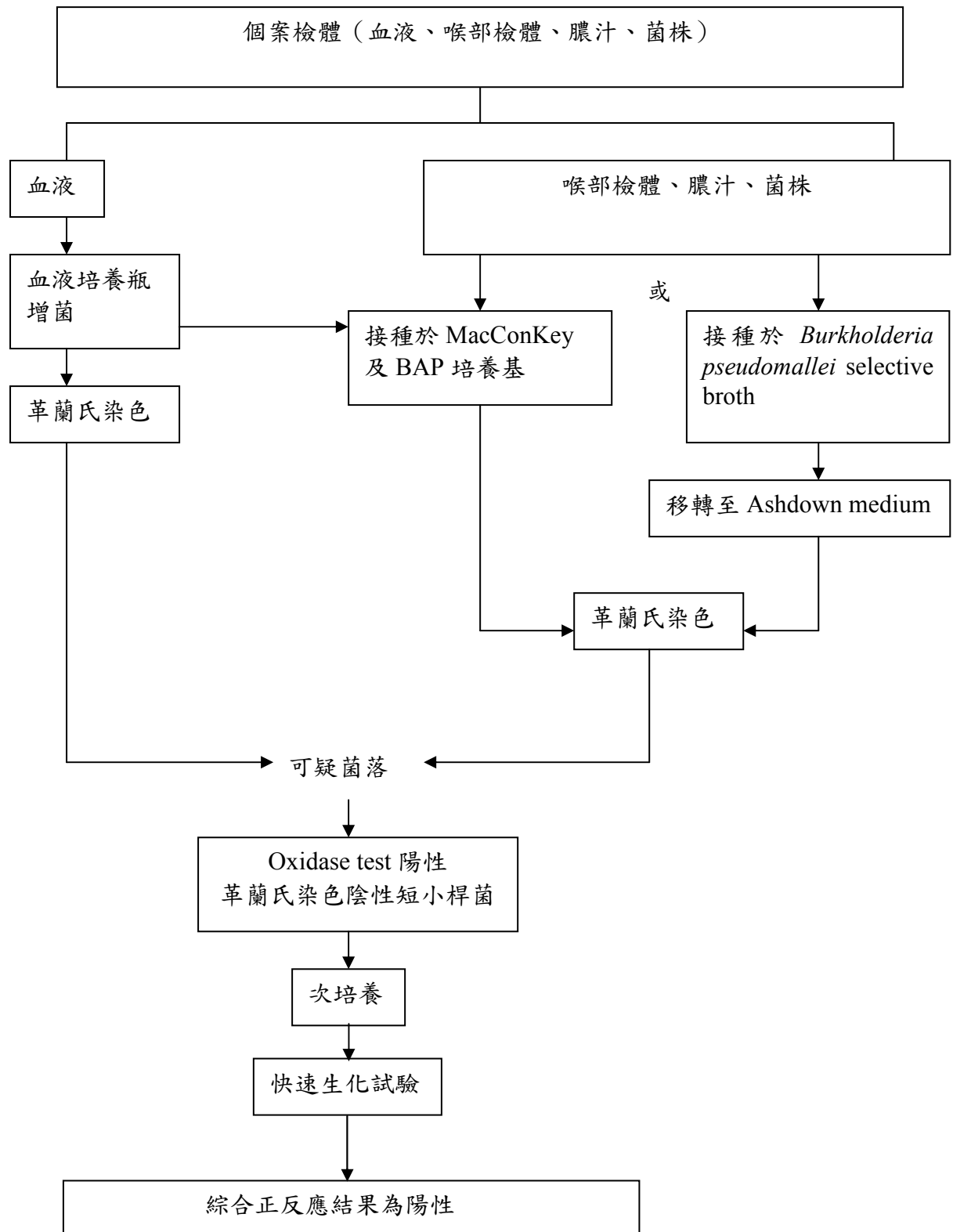
15 附錄

- 15.1 類鼻疽伯克氏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：	類鼻疽伯克氏菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 776 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 類鼻疽伯克氏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：	肉毒桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 777 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢查食品中毒案件中送驗檢體是否含有肉毒桿菌。

2 適用檢體種類

適用於人體糞便、嘔吐物及食品檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

藉由 Egg yolk agar plate (EYA) 蛋黃分離培養肉毒桿菌，利用是否產生 Lipase 與 Lecithinase 的特性及染色後肉毒芽胞的型態鑑定，做為初步鑑定的標準。

5 試劑耗材

5.1 培養基

5.1.1 Chopped meat-glucose-starch (CMGS medium)：TPM，臺灣。

5.1.2 Modified McClung-Toabe egg yolk agar plate (EYA)：TPM，臺灣。

5.2 0.2% Gel-phosphate diluent。

5.3 標準菌株：肉毒桿菌 ATCC3802。

5.4 無菌吸管：10 mL，應該有 0.1 mL 刻度。

5.5 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L 與 10 μ L。

5.6 無菌培養皿：內徑約 90 或 100 mm，深度約 15 mm，外面應平坦、無氣泡、刮痕或其他缺點。

5.7 接種針 (環)。

5.8 載玻片及蓋玻片。

5.9 可拋棄式無菌塑膠手套。

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

5.11 附密封蓋離心管。

5.12 無菌濾膜：孔徑 0.45 μ M 之親水性醋酸纖維膜。

5.13 革蘭氏染色液 (Gram stain solution)。

5.14 0.85%滅菌生理食鹽水。

5.15 70%酒精。

5.16 85% N₂, 5%CO₂ 混和氣。

5.17 厭氧產氣包。

6 儀器設備

6.1 顯微鏡：能放大至 1,000 倍之一般光學顯微鏡。

6.2 相位差或亮視野 (bright field) 顯微鏡。

6.3 微量吸管 Pipetman：1,000 μ L、200 μ L、2 μ L。

6.4 電動 Pipetaid。

6.5 高壓滅菌鍋。

6.6 生物安全櫃。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肉毒桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 778 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 6.7 4°C 冰箱
- 6.8 -20°C 冷凍櫃。
- 6.9 厭氧箱。
- 6.10 厭氧缸。
- 6.11 35°C 培養箱。
- 6.12 水浴槽。

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 實驗操作儘可能於生物安全櫃中進行。
- 7.3 檢體應置於密封且具有安全杯之離心機內離心。

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 分離

10.1.1 檢驗前處

- (1) 取 10-50 g 食物檢體於無菌研钵內，加等體積 Gel-phosphate diluent 研磨，置 4°C 過夜後，離心 4,000 rpm 10 min，去上清液，取一個接種環之沉澱物進行培養。
- (2) 糞便檢體則取約 0.5 g，以 1:1 比例進行酒精處理 (alcohol treatment)，每 15 min 混搖一次，共處理 60 min 後，取 0.5 mL 進行培養。
- (3) 取 0.5 g 糞便檢體加等體積 Gel-phosphate diluent，於試管內 80°C、10 min 加熱處理 (heat treatment) 後，取 0.5 mL 檢體進行培養。接種：取前處理過之檢體，接種到 CMGS medium 及 EYA 上，接種 CMGS medium 時宜種到底部，並避免產生氣泡。

10.1.2 培養：37°C 厭氧培養。培養 2 天之 CMGS medium 再接種一次 EYA，增加菌體分離之可能性。

10.1.3 觀察：每天觀察 EYA 生長情形，至少 7 天。

10.2 鑑定

10.2.1 菌落型態：肉毒桿菌在 EYA 培養基上的典型菌落形態凸起或扁平、平滑或粗造菌落，周圍輪廓不規則狀擴散。以斜角度檢視培養基時，菌落常呈現珍珠光澤不透明，Lipase (+)、Lecithinase (-)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肉毒桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 779 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.2.2 革蘭氏染色：肉毒桿菌為革蘭氏陽性且具有 Subterminal spore。
- 10.2.3 生化鑑定：依 API 20A 操作說明書指示，作生化鑑定。
- 10.2.4 毒素及中和試驗；接種 CMGS medium 後進行。

11 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。

12 結果判定

- 12.1 肉毒桿菌在 EYA 培養基，典型菌落形態凸起或扁平、平滑或粗造菌落，有周緣輪廓不規則狀擴散。以斜角度檢視培養基時，菌落常呈現珍珠光澤。肉毒桿菌為 Lipase (+)，Lecithinase (-)，且革蘭氏染色呈現藍色芽胞 (+)。
- 12.2 報告核發：肉毒桿菌培養陽性、革蘭氏染色陽性及 API 20A 反應陽性，初步判斷為肉毒桿菌陽性。若肉毒桿菌培養陰性，初步判斷為肉毒桿菌陰性。所有檢體皆須作肉毒桿菌毒素及中和試驗，才能進行綜合研判。

13 品質管制

- 13.1 培養基之品質管制
每一批購置或自行配製的培養基，應置入 4°C 冰箱，標誌有效期限，依廠商批次產品建議，使用時檢視有無污染菌產生，用完即應丟棄，不得再使用。
- 13.2 利用 ATCC3802 標準菌株進行菌株分離品管，試驗結果必須符合陽性反應，確保培養基的有效性。
- 13.3 全部的培養基及試劑應保存於 4-6°C，於有效期限內使用。

14 參考資料

- 14.1 FDA. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th edition. pp. 17.01-17.10.
- 14.2 Murry PR, Baron EJ. 1999. Manual of clinical microbiology, 7th edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 658-662.
- 14.3 Laboratory methods in anaerobic bacteriology (CDC laboratory manual), 1979.
- 14.4 行政院衛生署.1998「食品微生物之檢驗方法--肉毒桿菌及其毒素之檢驗」。87 年 12 月 31 日衛署食字第 87074866 號公告。

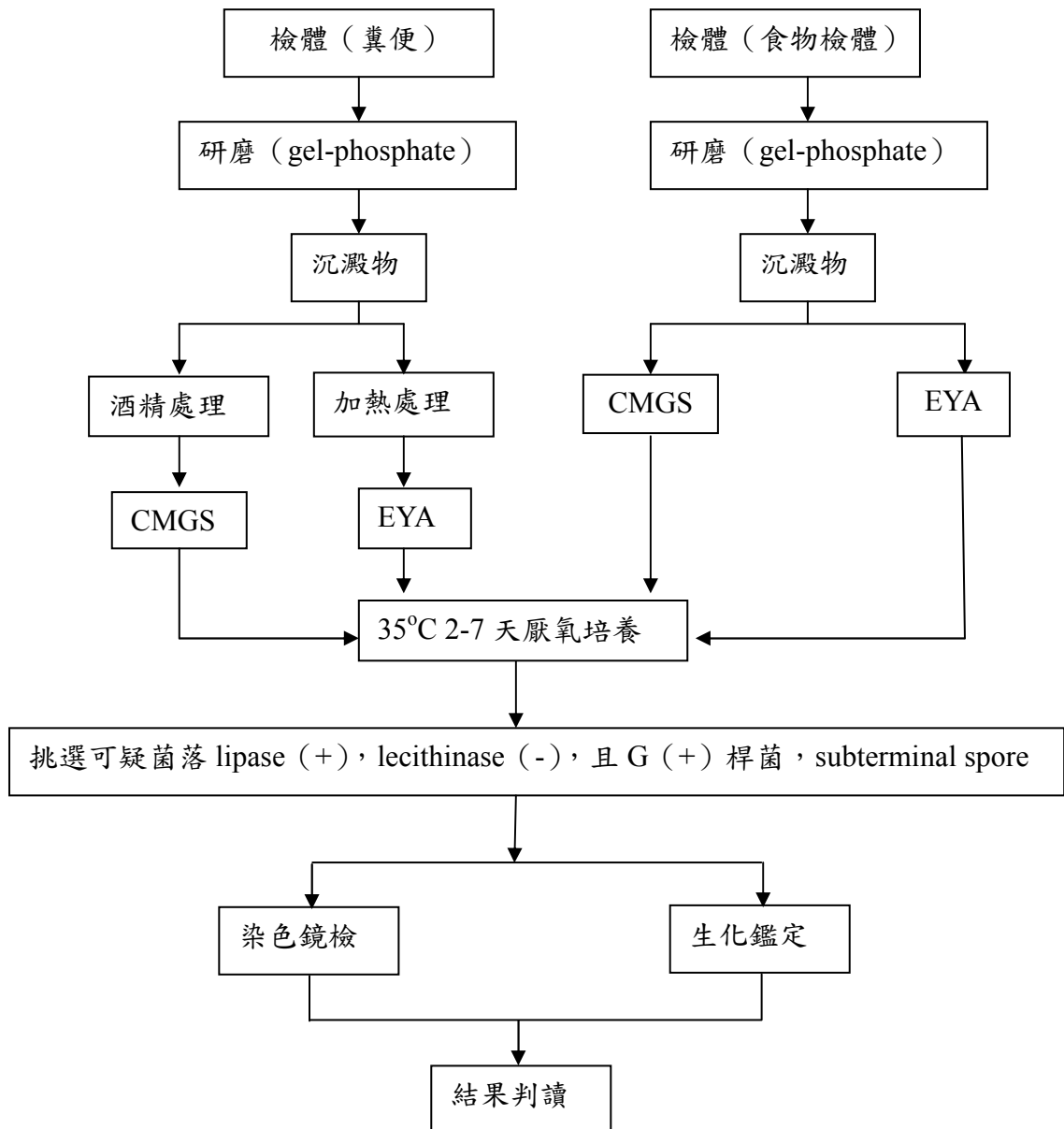
15 附錄

- 15.1 肉毒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：	肉毒桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 780 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 肉毒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：	肉毒桿菌中和試驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 781 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

食品中毒案件中肉毒桿菌毒素型別的鑑定。

2 適用檢體種類

適用於人體血清及含肉毒桿菌毒素上清液。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用肉毒桿菌毒素 A、B、E 與 F 型的抗血清，分別與肉毒桿菌毒素進行動物體內的中和試驗，用來鑑定毒素之型別。

5 試劑耗材

5.1 培養基

5.1.1 CMGS (chopped meat-glucose-starch) plate：TPM，臺灣。

5.1.2 Modified McClung-Toabe egg yolk agar plate：TPM，臺灣。

5.2 無菌吸管：10 mL，應該有 0.1 mL 刻度。

5.3 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L 與 10 μ L。

5.4 無菌培養皿：內徑約 90 或 100 mm，深度約 15 mm，外面應平坦、無氣泡、刮痕或其他缺點。

5.5 接種針 (環)。

5.6 載玻片及蓋玻片。

5.7 可拋棄式無菌塑膠手套。

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

5.9 附密封蓋離心管。

5.10 無菌濾膜：孔徑 0.45 μ m 之親水性醋酸纖維膜。

5.11 注射筒：1 mL 及 3 mL，附 25 號 (5/8) 吋的注射針。

5.12 小鼠：小白鼠，雄性體重 16-24 g，年齡 6-8 週。

5.13 0.85%滅菌生理食鹽水。

5.14 A-F 型單價肉毒桿菌抗毒素與 A-F 型多價肉毒桿菌抗毒素：冷凍乾燥之抗毒素以無菌 50%甘油水依標示配製，分裝至無菌 Eppendorf 試管內，-20°C 保存。

5.15 10%胰蛋白酵素溶液：取胰蛋白酵素 1.0 g 置乾淨培養試管中，加蒸餾水 10 mL 振搖，微熱至溶解

6 儀器設備

6.1 高速低溫離心機：可達 7,500 xg 以上。

6.2 微量吸管 Pipetman：1,000 μ L、200 μ L、2 μ L。

6.3 電動 Pipetaid。

6.4 高壓滅菌鍋。

6.5 生物安全櫃。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肉毒桿菌中和試驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 782 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 6.6 4°C 冰箱
- 6.7 -20°C 冷凍櫃。
- 6.8 35°C 恆溫培養箱。
- 6.9 水浴槽。

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 實驗操作儘可能於生物安全櫃中進行。
- 7.3 檢體應置於密封且具有安全杯之離心機內離心。

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 檢驗前處理

- 10.1.1 抗毒素製備：將多價、單價 A、B、E 及 F 型抗毒素，以無菌生理食鹽水稀釋至每毫升含有 2 個國際單位當作原液，不可以使用 50% 甘油水稀釋，再繼續進行 10、100、1,000 倍數稀釋。
- 10.1.2 檢液製備：以毒素試驗結果中致死的最高稀釋倍數，如果使用經胰蛋白酵素處理的檢液，必須處理後立即進行。

10.2 檢驗步驟

- 10.2.1 肉毒桿菌抗毒素共 20 種，包括原液及其稀釋液，分別以腹腔注射 0.4 mL 至小鼠，進行二重複試驗。
- 10.2.2 經 30 min 至 1 hr 後，再以腹腔注射檢液 0.4 mL 至已注射抗毒素之小鼠。
- 10.2.3 作為對照組，每一檢液亦注射二隻未經任何抗毒素保護之小鼠。
- 10.2.4 持續觀察小鼠 48 hr，並紀錄肉毒桿菌毒素中毒症狀及死亡。

11 廢棄物處理

- 11.1 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。
- 11.2 動物死屍送進焚化爐焚毀。

12 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：	肉毒桿菌中和試驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 783 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 12.1 注射單價肉毒桿菌抗毒素之小鼠，再注射檢液可免於死亡，即可確認檢體中含有肉毒桿菌毒素及其毒素型別。
- 12.2 小鼠若無法受到一種單價肉毒桿菌抗毒素的保護，仍然有死亡發生時，可能是檢體肉毒桿菌毒素量太高，或檢體中存有一種以上肉毒毒素，亦有可能由其他不明原因引起的。此時須對含毒性之檢液進行高倍率稀釋，且以多價肉毒桿菌抗毒素取代單價肉毒桿菌抗毒素。
- 12.3 報告核發：肉毒桿菌毒素型別。肉毒毒素綜合研判時中和試驗與毒素試驗結果須一致。

13 品質管制

- 13.1 培養基之品質管制
每一批購置或自行配製的培養基，應置入 4°C 冰箱，標誌有效期限一個月，使用時檢視有無污染菌產生，用完即應丟棄，不得再使用。
- 13.2 動物（老鼠）選擇
以雄性老鼠體重介於 16-24 g 之健康老鼠。
- 13.3 使用單價肉毒桿菌抗毒素之品質管制
將 A-F 型單價肉毒桿菌抗毒素置於-20°C 下保存。
- 13.4 利用 ATCC3802 標準菌株進行毒素中和試驗品管。
- 13.5 試驗結果必須符合陽性反應始可使用，確保實驗的中和抗毒素有效性。

14 參考資料

- 14.1 FDA. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th edition. pp.17.01-17.10.
- 14.2 Murry PR, Baron EJ. 1999. Manual of clinical microbiology, 7th edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 658-662.
- 14.3 Laboratory methods in anaerobic bacteriology (CDC laboratory manual), 1979.
- 14.4 行政院衛生署。1998。食品微生物之檢驗方法--肉毒桿菌及其毒素之檢驗。87 年 12 月 31 日衛署食字第 87074866 號公告。

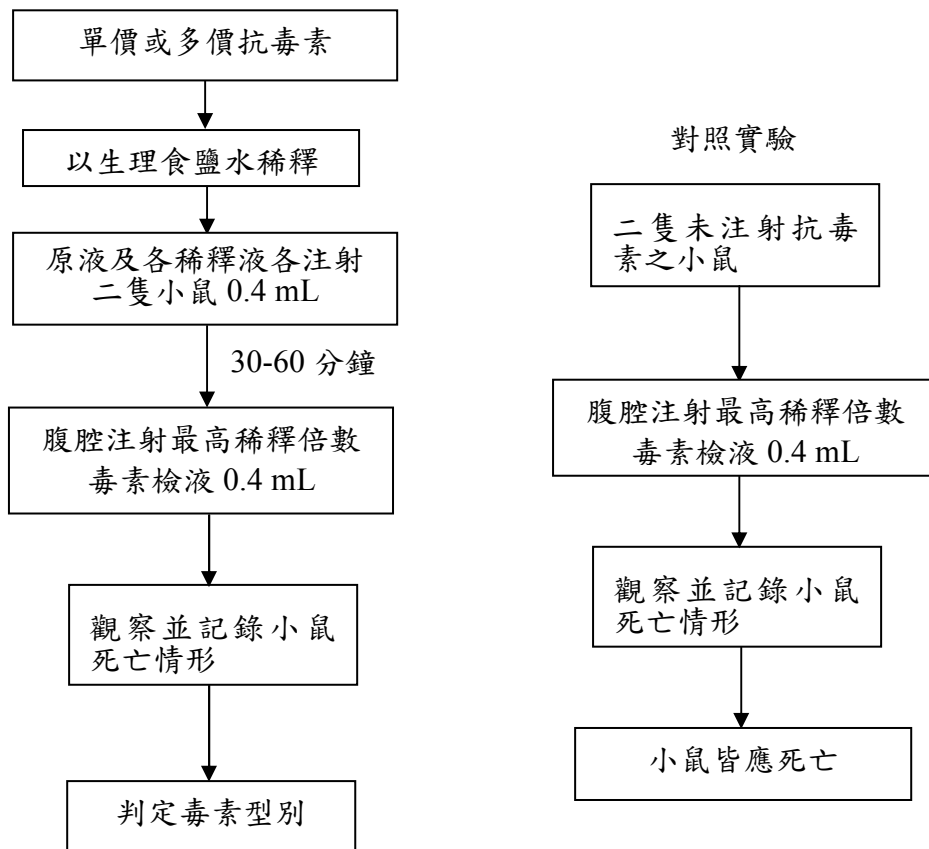
15 附錄

- 15.1 肉毒桿菌中和試驗流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肉毒桿菌中和試驗	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 784 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 肉毒桿菌中和試驗流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肉毒桿菌毒素檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 785 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢查中毒案件中檢體是否產生肉毒桿菌毒素。

2 適用檢體種類

適用於人體糞便、血清、肉毒桿菌懸浮液或食物懸浮液。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用動物毒力試驗檢查患者糞便、血清是否產生肉毒桿菌之毒素。

5 試劑耗材

- 5.1 CMGS (chopped meat-glucose-starch) plate：TPM，臺灣。
- 5.2 無菌吸管：10 mL，應該有 0.1 mL 刻度。
- 5.3 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L 與 10 μ L。
- 5.4 無菌培養皿：內徑約 90 或 100 mm，深度約 15 mm，外面應平坦、無氣泡、刮痕或其他缺點。
- 5.5 接種針 (環)。
- 5.6 載玻片及蓋玻片。
- 5.7 可拋棄式無菌塑膠手套。
- 5.8 10 倍 gelatin 稀釋液
- 5.9 馬克法藍氏濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)。
- 5.10 附密封蓋離心管。
- 5.11 無菌濾膜：孔徑 0.45 μ M 或 0.22 μ M 之親水性醋酸纖維膜。
- 5.12 注射筒：1 mL 及 3 mL，附 25 號 (5/8) 吋的注射針。
- 5.13 小鼠：雄性體重 16-24 g。
- 5.14 革蘭氏染色液 (Gram stain solution)。
- 5.15 0.85%滅菌生理食鹽水。
- 5.16 A-F 型單價肉毒桿菌抗毒素與 A-F 型多價肉毒桿菌抗毒素：冷凍乾燥之抗毒素以滅菌 50%甘油水依標示復水 (或依購買之說明書操作)，供作抗毒素備用。以生理食鹽水對抗毒素原液 5 倍稀釋，供注射小鼠用。
- 5.17 10%胰蛋白酵素溶液：取胰蛋白酵素 1.0 g 置乾淨培養試管中，加蒸餾水 10 mL 振搖，微熱至溶解。

6 儀器設備

- 6.1 高速低溫離心機，可達 7,500 xg 以上。
- 6.2 微量吸管 Pipetman：需 1,000 μ L、200 μ L、2 μ L 三種規格。
- 6.3 電動 Pipetaid。
- 6.4 高壓滅菌鍋。
- 6.5 生物安全櫃。
- 6.6 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：	肉毒桿菌毒素檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 786 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 6.7 -20°C 冷凍櫃。
- 6.8 厭氧箱。
- 6.9 恆溫培養箱，35°C 和 26°C。
- 6.10 電子式微量天平。
- 6.11 pH 值測定儀。
- 6.12 攪拌器及震盪器。
- 6.13 水浴槽。

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 實驗操作於生物安全櫃中進行。
- 7.3 檢體應置於密封且具有安全杯之離心機內離心。

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 檢驗前處理

- 10.1.1 食品檢體 10-50 g 置於無菌研钵內，加 1 mL Gelatin 稀釋液研磨，置 4°C 過夜後離心，離心後取上清液作小白鼠毒力試驗。
- 10.1.2 血液須離心，取血清作小白鼠毒力試驗。
- 10.1.3 疑似菌落，經 CMGS 培養 3 天後，離心再經 0.22 μ M 過濾滅菌後，取過濾液作小白鼠毒力試驗。

10.2 檢驗步驟

- 10.2.1 取待測血清、已前處理過之食物檢體、或已過濾之培養上清液，以 Gel-phosphate diluent 將檢液稀釋成 5、10 及 100 倍之稀釋檢液。所有檢液包括原液及各稀釋檢液，對小老鼠腹腔注射 0.4 mL，進行二重複試驗。所有檢液包括原液及各稀釋檢液，經胰蛋白酵素在 37°C 作用 1 hr 後，於 100°C 加熱 10 min，對小老鼠腹腔注射 0.4 mL，進行二重複試驗。另外取 1.5 mL 原液於 100°C 加熱 10 min，待冷卻後，對小老鼠腹腔注射 0.4 mL，進行二重複試驗。
- 10.2.2 48 hr 內定時觀察試驗小鼠有無肉毒桿菌毒素中毒症狀及死亡，並作成記錄。典型之肉毒桿菌毒素中毒症狀，在注射檢液 24 hr 內引起呼吸困難、四肢軟弱，有典型的腹式呼吸症狀，終至呼吸麻痺，衰竭死亡。經 48 hr 觀察，若小鼠皆亡，僅有接受胰蛋白酵素處理組檢液之小鼠存活，則需使用更高倍數的

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肉毒桿菌毒素檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 787 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

稀釋檢液，重複此一毒性試驗。此毒性試驗中必須要有殺死小鼠的稀釋倍數及不會殺死小鼠的稀釋倍數。

11 廢棄物處理

- 11.1 檢驗後工作人員應親自將所使用過之器材及廢棄物立即送進滅菌釜滅菌，動物死屍送進焚化爐焚毀。
- 11.2 使用過之器材必須加以消毒處理。

12 結果判定

- 12.1 試驗初起 24 hr，是小鼠之症狀和死亡關鍵時刻，98%之試驗動物於 24 hr 內死亡。典型之肉毒桿菌毒素中毒症狀和死亡，可能發生在注射含肉毒桿菌毒素之檢液後 4-6 hr 內。
- 12.2 若死亡發生在 24 hr 之後，除非有非常明確的典型肉毒桿菌毒素中毒之症狀，否則僅屬疑似個案。
- 12.3 若注射稀釋檢液的小鼠死亡，但注射原液的小鼠存活死亡，則僅屬疑似個案，小鼠死亡可能是不明原因所致。

13 品質管制

- 13.1 培養基之品質管制
每一批購置或自行配製的培養基，應置入 4°C 冰箱，標誌有效期限一個月，使用時檢視有無污染菌產生，用完即應丟棄，不得再使用。
- 13.2 動物（老鼠）選擇
以雄性老鼠體重介於 16-24 g 之健康老鼠。
- 13.3 每次進行毒素試驗，皆須使用肉毒桿菌標準菌株 ATCC 3802 作為陽性對照，以利對照實驗動物組結果，確保實驗正確性。

14 參考資料

- 14.1 FDA. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th dition. pp. 17.01 -17.10.
- 14.2 Murry PR, Baron EJ. 1999. Manual of clinical microbiology, 7th edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp.658-662.
- 14.3 Laboratory methods in anaerobic bacteriology (CDC laboratory manual), 1979.
- 14.4 行政院衛生署。1998。食品微生物之檢驗方法--肉毒桿菌及其毒素之檢驗。87 年 12 月 31 日衛署食字第 87074866 號公告。

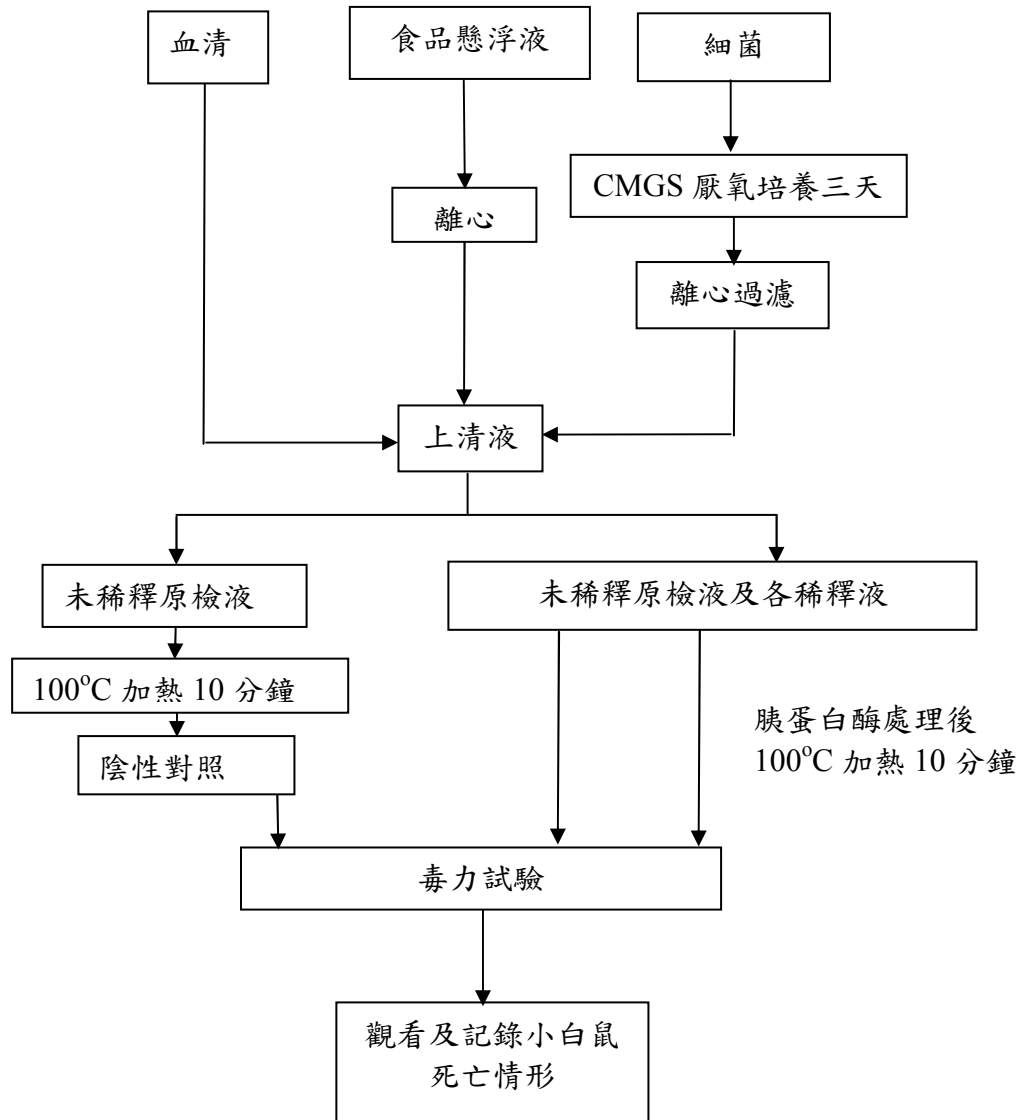
15 附錄

- 15.1 肉毒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：	肉毒桿菌毒素檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 788 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 肉毒桿菌毒素型別測定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	侵襲性肺炎鏈球菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 789 頁/共 1091 頁	分離與血清型別鑑定	修訂日期： 年 月 日

1 目的

在疑似受感染個案之採集檢體中，分離與鑑定肺炎鏈球菌。

2 適用檢體種類

適用於病患血液、腦脊髓液、其他無菌部位檢體（如胸膜液、腹膜液等）與醫院送驗菌株。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 為兼性厭氧性革蘭氏陽性球菌，直徑約為 0.5-1.25 μm ，呈單個、成對或數個鏈狀排列，周圍繞以明顯莢膜。在含綿羊血液培養基上生長良好，最適溫度為 35-37°C，大部分菌落由中央凹陷而呈火山口狀，菌落周圍會形成 α 溶血環。對 Optochin 具有感受、且具有膽鹽溶解 (bile soluble) 等性質。目前利用抗莢膜多醣類 (anti-capsular polysaccharide) 抗體，可將肺炎鏈球菌分為 90 種不同血清型別。

5 試劑耗材

5.1 培養基：

5.1.1 血液培養基 (blood agar plate, BAP)：TSA 含 5% 脫纖維綿羊血液，BD，USA。

5.1.2 BHI (brain heart infusion) broth：CMP，台灣。

5.2 嗜氧性血液培養瓶 (Bactec)：BD，USA。

5.3 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution)：Difco，美國或武藤化學，日本。

5.4 抗血清：Antisera Pneumococcus (Omni、Pool、Type、Group、Factor)，Statens sSerum Institut，Denmark。

5.5 3% H_2O_2 溶液：ID color catalase，BioMérieux，France。

5.6 PYR (L-pyrrolidonyl aminopeptidase) test reagent：CMP，台灣。

5.7 Optochin 紙錠：Taxo P Discs，BD，USA。

5.8 10% Sodium deoxycholate：CMP，台灣。

5.9 無菌生理食鹽水：0.85% NaCl。

5.10 標準菌株：*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 及 *S. pneumoniae* ATCC 49619。

5.11 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000 μL 、200 μL 、100 μL 、10 μL 。

5.12 無菌微量離心管：1.5 mL。

5.13 載玻片。

5.14 蓋玻片。

5.15 接種針 (環)。

5.16 可拋棄式無菌塑膠手套、口罩。

5.17 鑷子。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	侵襲性肺炎鏈球菌 分離與血清型別鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 790 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

6 儀器設備

- 6.1 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 6.2 培養箱：5%二氧化碳、35°C。
- 6.3 恆溫箱：37°C。
- 6.4 血瓶培養箱：Bactec 9050。
- 6.5 冰箱：4°C。
- 6.6 顯微鏡：能放大至 1,000 倍之相位差光學顯微鏡。
- 6.7 冷凍櫃：-20°C。
- 6.8 微量吸管 (pipetteman)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ L、10 μ L。
- 6.9 振盪器 (vortexer)。
- 6.10 本生燈。
- 6.11 高壓滅菌鍋。

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

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 檢體編號登錄。
- 10.2 檢體前處理：腦脊髓液及其他無菌部位體液前處理：
 - 10.2.1 檢體體積超過 1 mL：以 3,000 xg 離心 20 min，吸除大部分上清液，留下約 0.5 mL 的液體，經劇烈震盪至少 30 sec 以重新懸浮沉澱。
 - 10.2.2 檢體體積少於 1 mL：劇烈震盪至少 30 sec。
- 10.3 分離培養
 - 10.3.1 接種
 - (1) 血液：檢體量至少 0.5 mL。將血液檢體以 1：5-1：10 的比例接種於血液培養瓶。
 - (2) 腦脊髓液及其他無菌部位體液：取 1-2 滴液體接種於血液培養基及 BHI 液態培養基 (備用)。
 - 10.3.2 培養：35°C 含有 5%二氧化碳培養箱培養。
 - 10.3.3 觀察：
 - (1) 血液培養：14-17 hr 後觀察，然後每天觀察，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 培養液次培養於血液培養基，培養 48 hr，培養條件同前

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	侵襲性肺炎鏈球菌 分離與血清型別鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 791 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

述；否則，14-17 hr、48 hr 及 7 天時，未觀察到混濁情形，仍取少量培養液次培養於血液培養基，培養 48 hr，血液培養瓶即可依適當程序滅菌銷毀。

- (2) 血液培養基每天觀察，觀察期為 48-72 hr；液態培養每天觀察連續 7 天，若有細菌生長，次接種血液培養基。

10.4 鑑定

- 10.4.1 菌落型態：在血液培養基上之菌落光滑 (glossy)、灰白色、周圍有明顯 α 溶血環，大部分菌落中央凹陷而呈火山口狀。挑取 2-5 個可疑菌落次接種至血液培養基，培養於 35°C 含有 5% 二氧化碳培養箱培養、18-24 hr，以供進行鑑定。

- 10.4.2 革蘭氏染色 (Gram's stain)：依照本局「革蘭氏染色法」檢驗標準方法 (編號：B-48-2006-1.0)。

10.4.3 生化鑑定

- (1) Catalase test (觸酶試驗)

依照本局「觸酶試驗」標準檢驗方法 (編號：B-50-2006-1.0)。

- (2) Optochin 生長抑制試驗

將血液培養基上可疑之單一菌落進行次培養，並於第一劃線區貼上含 5 μ g Optochin 的紙錠，於 35°C 含有 5% 二氧化碳培養箱培養 18-24 hr 後，若有大於 14 mm 之抑制環產生即為陽性反應。

- (3) Bile solubility test (膽鹽溶解試驗)

將幾滴 10% Sodium deoxycholate 直接加到血液培養基上的菌落，觀察 30 min，如溶解無漂浮菌落，即為陽性反應。

10.4.4 血清型別鑑定

- (1) 鏈球菌血清型之確認係以莢膜腫脹試驗進行。
- (2) 取血液培養基上隔夜培養之新鮮菌落，溶於 50 μ L 生理食鹽水，混合均勻成細菌懸浮液。
- (3) 取 2 μ L 細菌懸浮液滴在載玻片上，再滴 2 μ L 生理食鹽水，混合均勻當做對照組。
- (4) 另外再取 2 μ L 細菌懸浮液，加上 2 μ L 測試之抗血清，混合均勻做為試驗組。
- (5) 使用相位差光學顯微鏡以 1,000 倍油鏡觀察，若滴加抗血清之試驗組有菌體莢膜膨脹，觀察到菌體輪廓清晰變厚甚至有聚集現象，便判斷為該測試之抗血清型別。
- (6) 若無此現象，繼續使用其他型別之抗血清測試，直到找出該現象產生為止。
- (7) 測試抗血清順序：先鑑定為何種 Pool sera (A~I)，然後測試其內所包含之 Type sera 或 Group sera，若為 Group 則還要再測試其所包含的 Factor sera。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	侵襲性肺炎鏈球菌 分離與血清型別鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 792 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

11 結果判定

11.1 依據 10.4 鑑定結果，對照下表並紀錄於附錄 15.2 侵襲性肺炎鏈球菌分離與鑑定紀錄表。

鑑定試驗名稱	陽性反應	陰性反應	肺炎鏈球菌反應
生長於血液培養基上典型菌落外觀特徵	光滑 (glossy)、灰白色、周圍有明顯 α 溶血環	非左述現象	陽性反應
革蘭氏染色試驗	革蘭氏陽性球菌，單球雙球或鏈狀	非左述現象	陽性反應
觸酶試驗	有氣泡產生	無氣泡產生	陰性反應
Optochin 生長抑制試驗	大於 14 mm 之抑制環	非左述現象	陽性反應
膽鹽溶解試驗	溶解無漂浮菌落	非左述現象	陽性反應
血清型別鑑定	菌體輪廓清晰變厚甚至有聚集現象	非左述現象	判定陽性反應之血清型

11.2 綜合結果判斷標準：符合上表肺炎鏈球菌所有反應結果，即判斷為侵襲性肺炎鏈球菌陽性，及其血清型；若其中一項不符合者，即判斷為侵襲性肺炎鏈球菌陰性。有時膽鹽溶解試驗為陽性但 optochin 為陰性或相反結果時也有可能是肺炎鏈球菌。要注意!!

11.3 報告核發：侵襲性肺炎鏈球菌陽性、及其血清型，侵襲性肺炎鏈球菌陰性。

11.4 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果登錄於附錄 15.2 侵襲性肺炎鏈球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呈實驗室主管審核，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 Optochin 生長抑制試驗之品質管制

- 12.1.1 應於有效期限內使用，同一批號試劑，第一次使用時取一組進行試驗。
- 12.1.2 使用陽性反應標準菌株 *S. pneumoniae* ATCC 49619 及陰性反應標準菌株 *S. pyogenes* ATCC 19615 進行試驗。
- 12.1.3 試驗結果必須符合陽性反應及陰性反應（判定標準依 11.1 節），始可使用。

12.2 膽鹽溶解試驗之品質管制

- 12.2.1 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。
- 12.2.2 使用陽性反應標準菌株 *S. pneumoniae* ATCC 49619 及陰性反應標準菌株 *S. pyogenes* ATCC 19615 進行試驗。
- 12.2.3 試驗結果必須符合陽性反應及陰性反應（判定標準依 11.1

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	侵襲性肺炎鏈球菌 分離與血清型別鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 793 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

節)，始可使用。

13 廢棄物處理

- 13.1 接種後檢體保留於 4°C 冰箱一星期。
- 13.2 超過期限之檢體、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 483-509 頁。
- 14.2 Isenberg HD. 1998. Essential procedures for clinical microbiology, American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 78-79, 108, 125.
- 14.3 Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 2007. Manual of clinical microbiology, 9th edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 412- 429.
- 14.4 Statens Serum Institute, Denmark。Antisera Pneumococcus 操作說明書。

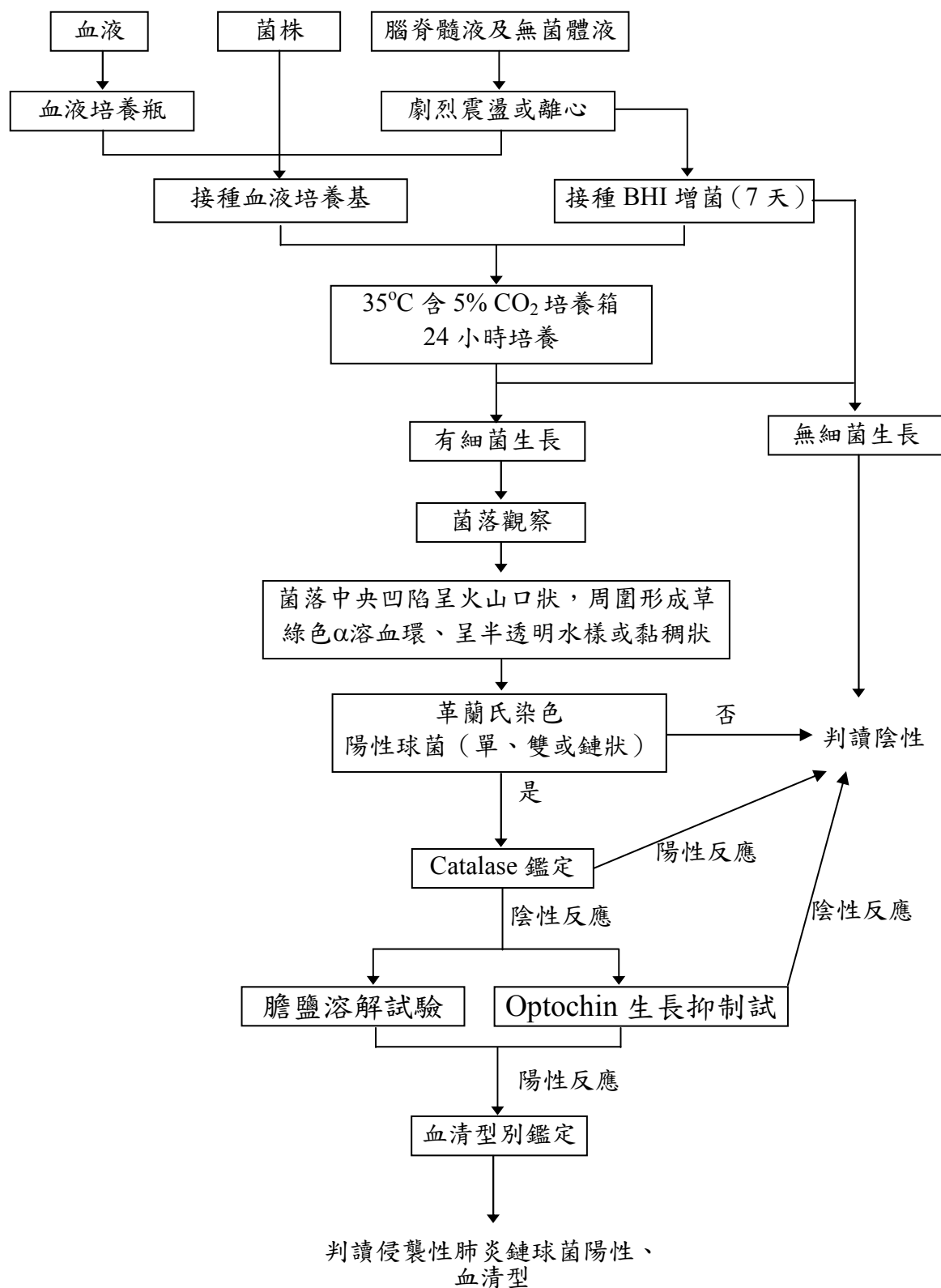
15 附錄

- 15.1 侵襲性肺炎鏈球菌分離與血清型鑑定流程圖。
- 15.2 侵襲性肺炎鏈球菌分離與血清型鑑定紀錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	侵襲性肺炎鏈球菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 794 頁/共 1091 頁	分離與血清型別鑑定	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 侵襲性肺炎鏈球菌分離與血清型鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	侵襲性肺炎鏈球菌	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 795 頁/共 1091 頁	分離與血清型別鑑定	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 侵襲性肺炎鏈球菌分離與血清型鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

侵襲性肺炎鏈球菌分離與鑑定紀錄表

頁 數：第 頁/共 頁

檢體編號											
項目											
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
血液培養 基生長呈 火山口 狀，周圍 草綠色α 溶血環、 呈半透明 水樣或黏 稠狀菌落		培養/觀察		是	否	是	否	是	否	是	否
		第 2 天									
		第 3 天									
Catalase test		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
Optochin 生長抑制試驗		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
膽鹽溶解試驗		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
血清型別											
綜合結果											
報告日期											
附註											

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：	貝氏考克斯菌核酸檢測 (STN-RT PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 796 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

採單管即時定量巢氏聚合酶鏈鎖反應 (single tube nested real-time PCR (STN-RT PCR)) 分子診斷方法檢測檢體中是否有貝氏考克斯菌核酸。

2 適用檢體種類

血清、血液、體液、拭子等檢體。

3 名詞解釋

Threshold cycle (C_t): 聚合酶鏈鎖反應產物之複製量，累積到足以被偵測的第一個循環點。 C_t 的值越小，表示檢體中原始菌體 RNA 或 DNA 的量越多。

4 原理概述

採用專一性之引子 (primers)，貝氏考克斯菌 (*Coxiella burnetii*) 的核酸分子 (DNA) 經由 STN-RT PCR 方法複製增多放大，篩選確認是否為貝氏考克斯菌。

5 試劑耗材

5.1 MagNA pure LC total nucleic acid isolation kit-large volume (Roche Cat. no.03 264 793 001)。

5.1.1 清洗液 I (wash buffer I)。

5.1.2 清洗液 II (wash buffer II)。

5.1.3 清洗液 III (wash buffer III)。

5.1.4 Lysis buffer。

5.1.5 Proteinase K。

5.1.6 Magnetic class particles suspension。

5.1.7 Elution buffer。

5.1.8 Sample cartridge。

5.2 核酸引子 (Primer)。

5.2.1 QF9 (5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGTC-3') 0.1 μ M。

5.2.2 QF10 (5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC-3') 0.1 μ M。

5.2.3 QF11 (5'-GAG CGA ACC ATT GGT ATC G-3') 10 μ M。

5.2.4 QF12 (5'-CTT TAA CAG CGC TTG AAC GT-3') 10 μ M。

5.3 QuantiTect SYBR green PCR kit (Qiagen, Cat. no.204143)。

5.3.1 2X QuantiTect SYBR green PCR master mix：

5.3.2 DNase，RNase-free H₂O。

5.4 對照組

5.4.1 陽性對照組 (positive control DNA)，含 *C. burnetii* 基因序列之 Plasmid DNA。

5.4.2 陰性對照組 (negative control DNA)，DNase 或 RNase-free H₂O 或陰性檢體抽取之 DNA 產物。

5.5 水質：RO 逆滲透可達 18 Ω -CM 以上之無菌水 (去離子水)，25°C。(distilled water or deionized water)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	貝氏考克斯菌核酸檢測 (STN-RT PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 797 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

5.6 專用試管

5.6.1 定量 PCR 專用八連排反應管 (QPCR 8-strip tubes) (Stratagene, USA Cat. no.410022)。

5.6.2 定量 PCR 專用八連排反應蓋 (QPCR 8-strip caps) (Stratagene, USA Cat. no.410024)。

5.6.3 無菌過濾型 2 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1,000 μ L 吸管尖 (aerosol resistant pipetting tips)。

5.6.4 無菌 1.5 mL 微量離心管 (sterile eppendorf tubes)。

5.7 手套。

6 儀器設備

6.1 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。

6.2 Roche MagNAPure 核酸自動萃取機。

6.3 Mx4000 multiple quantitative PCR system (Stratagene, USA)。

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

6.5 高速離心機。

6.6 4°C 冰箱。

6.7 -20°C 冷凍櫃。

6.8 高壓滅菌鍋。

7 環境與設施安全

7.1 貝氏考克斯菌核酸可經由吸入感染，所以病人血清檢體應在第二級生物安全櫃內處理。

7.2 後續核酸檢驗可在生物安全第一等級 (BSL-1) 實驗室操作。

7.3 應有獨立的操作空間與操作 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染。

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 檢體編號登錄。

10.2 Roche MagNAPure 核酸自動萃取機萃取細菌 DNA

10.2.1 開啟電腦及機器。

10.2.2 開啟 MagNAPure 3.0。

10.2.3 點選 Sample ordering。

10.2.4 Protocol 點選 DNA LV 選擇 DNA LV Blood_300_500.blk。

10.2.5 Sample volume 改成 400 μ L。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	貝氏考克斯菌核酸檢測 (STN-RT PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 798 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.2.6 輸入 Sample 名稱。
- 10.2.7 點選 Stage setup。
- 10.2.8 依畫面檢查各 Reagent 位置及量及相關耗材等位置。
- 10.2.9 確認後逐一點選反白。
- 10.2.10 確認後出現 OK 選項點選。
- 10.3 單管即時定量巢氏一聚合酶鏈鎖反應 (single tube nested Real-Time PCR)。

- 10.3.1 取 5 μ L DNA 做模板，加入偵測的 *Coxiella burnetii* 的引子組置於冰上。
- 10.3.2 加入反應溶液 (成分如附表)，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	25 μ L	1X
QF9	Variable	參考 5.2 核酸引子
QF10	Variable	參考 5.2 核酸引子
QF11	Variable	參考 5.2 核酸引子
QF12	Variable	參考 5.2 核酸引子
RNase-free H ₂ O	Variable	

- 10.3.3 使用 Mx4000 quantitative PCR system (Stratagene) 的上機步驟：
- (1) External amplification
95°C/10 min, and 5 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing temperature followed a touchdown profile from 66°C to 62°C for 30 sec that decreased -1°C for each cycle of amplification, and extension at 72°C for 60 sec followed by 10 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 61°C for 30 sec, and extension at 72°C for 60 sec。
- (2) Internal amplification
35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 54°C for 30 sec, and extension at 72°C for 60 sec，
Denaturation：94 °C，30 sec。
- 10.3.4 Melting curve analysis：
- (1) 95°C，1 min。
- (2) 66 °C→95 °C+1 °C /30 sec/cycle，共 30 Cycles。

11 結果判定

- 11.1 以 Mx4000 軟體分析結果，可以從 Amplification plots 與 T_m 值作判斷。
- 11.2 Q 熱陽性對照和陰性對照組的 C_t 值符合預定值。樣品之 C_t 值小於 40 者判為陽性。C_t 值大於或等於 40 (或無 C_t 值) 者判為陰性。
- 11.3 Melting curve (T_m) 81-83°C 可作為判別是否為 Q 熱之特異性 PCR 產物。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	貝氏考克斯菌核酸檢測 (STN-RT PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 799 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12 品質管制

- 12.1 擺放對照組作檢測，陽性與陰性對照組的 C_t 值及 T_m 值需符合設定值。
- 12.2 遵循 S.O.P 的作業規範與流程，在個別獨立的操作空間內操作避免污染。
- 12.3 Mx4000 機器定、微量滴管分注器定時做檢測與校正。
- 12.4 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，依廢棄物處理作業程序處理。

14 參考資料

- 14.1 Parisi A, Fraccalvieri R, Cafiero M, Miccolupo A, Padalino I, Montagna C, Capuano F, Sottili R. 2006. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Vet Microbiol* 118: 101-106.
- 14.2 Roche. MagNA pure LC system handbook.

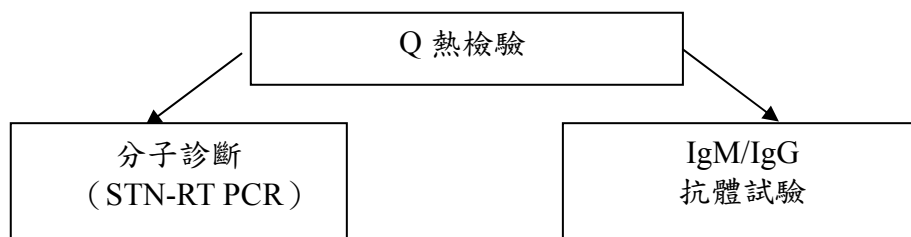
15 附錄

- 15.1 Q 熱檢驗流程圖。
- 15.2 貝氏考克斯菌核酸檢測（單管即時定量巢氏一聚合酶鏈鎖反應）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：	貝氏考克斯菌核酸檢測 (STN-RT PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 800 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

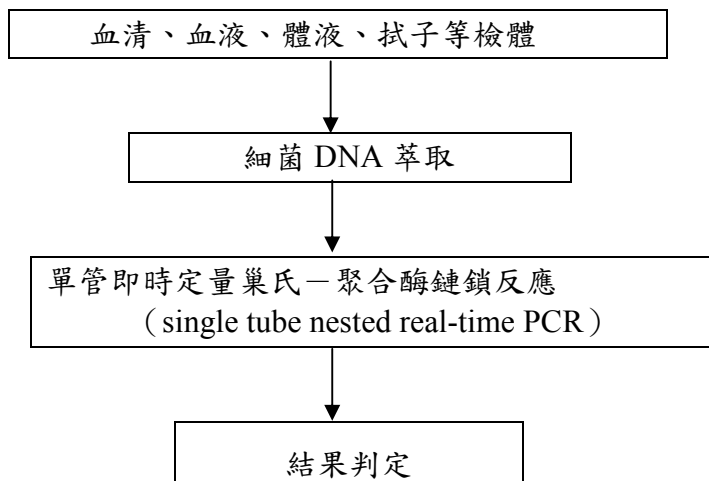
附錄 15.1 貝氏考克斯菌核酸檢測（單管即時定量巢氏－聚合酶鏈鎖反應）流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	貝氏考克斯菌核酸檢測 (STN-RT PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 801 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 貝氏考克斯菌核酸檢測（單管即時定量巢氏－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：	Q 熱病原體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG, IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 802 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的
以免疫螢光抗體方法檢測Q熱抗體以確定病例。
- 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) (Invitrogen, USA, Cat. No. 62-8311)。
 - 5.3 螢光標幟抗體 FITC-goat anti-human IgM (Invitrogen, USA, Cat. No.62-7511)。
 - 5.4 螢光標幟抗體 FITC-goat anti-human IgG (Invitrogen, USA, Cat. No.62-7111)。
 - 5.5 Q fever IFA IgM kit (Focus Diagnostics, USA, Cat. No.IF0200M)。
 - 5.6 Q fever IFA IgG kit (Focus Diagnostics, USA, Cat. No.IF0200G)。
 - 5.7 IgG去除劑 (Focus Diagnostics, USA, Cat. No. IF0209)。
 - 5.8 96孔U型盤 (Greiner Bio-One, Germany, Cat. No.650101)。
 - 5.9 水質：25°C蒸餾水或RO逆滲透可達18Ω-CM以上超純水。
- 6 儀器設備
 - 6.1 螢光顯微鏡。
 - 6.2 37°C培養箱。
- 7 環境與設施安全
 - 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	Q 熱病原體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG, IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 803 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 µL待測IgM力價之檢體，加入70 µL 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Q熱專用之IgG檢體稀釋液（含3% yolk sac）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 µL點入8孔抗原玻片上。
- 10.2.3 將玻片置於保濕盒（moisture chamber），並於37°C培養箱作用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 µL。
- 10.2.7 將玻片置於保濕盒，並於37°C培養箱作用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）。

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Q熱專用之IgG檢體稀釋液（含3% yolk sac）做1：40倍稀釋。再以pH 7.4，0.01 M PBS自1：80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 µL點入8孔抗原玻片上。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	Q 熱病原體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG, IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 804 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.3.3 將玻片置於保濕盒，並於37°C培養箱作用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培養箱作用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：單支血清Phase II IgM力價達1：80以上或配對血清Phase II IgG力價有4倍以上上升者，判為陽性。
- 11.2 陰性的判定：
 - 11.2.1 IgM及IgG力價皆低於1：40者，判為陰性。
 - 11.2.2 1：40倍稀釋血清之IFA- anti-human IgG + A + M初篩（screening）結果為陽性，但血清Phase II IgM力價低於1：80，且配對血清Phase II IgG力價無4倍以上上升者，判為陰性。
- 11.3 不明（無法判定）：單支血清或配對血清無IgM抗體力價，Phase I IgG力價大於Phase II IgG力價，且Phase I IgG抗體力價大於1：640者，判為不明（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，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

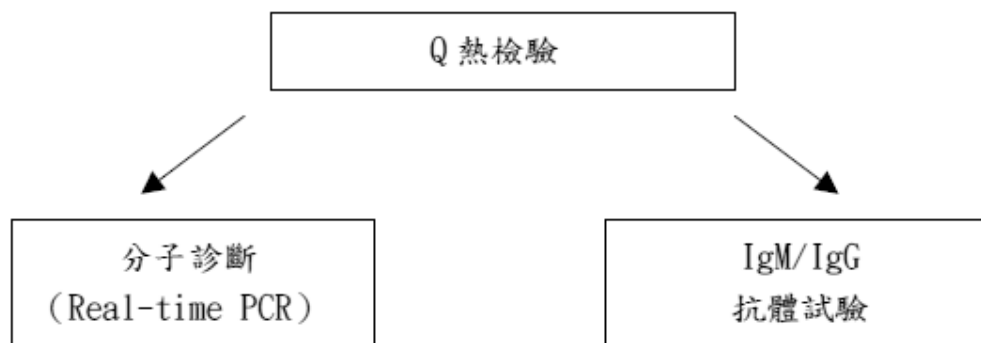
	編號：	Q 熱病原體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG, IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 805 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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, et al. 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 Q熱檢驗流程圖。
 - 15.2 Q熱抗體試驗（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：	Q 熱病原體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 806 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

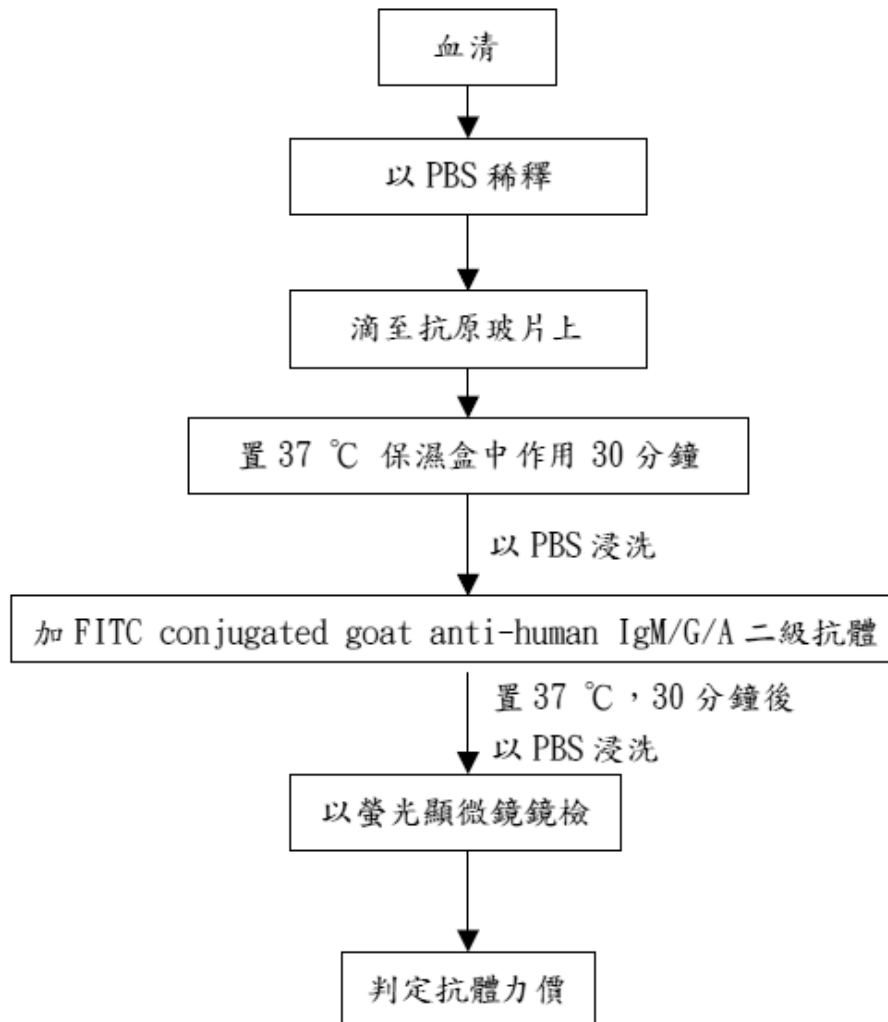
附錄 15.1 Q 熱檢驗流程圖。



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	Q 熱病原體血清學抗體檢測 (IgM 與 IgG IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 807 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 Q 熱抗體試驗（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：	恙蟲病及地方性斑疹傷寒	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 808 頁/共 1091 頁	病原體分離與鑑定	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恙蟲病或地方性斑疹傷寒立克次體。

2 適用檢體種類

適用於急性期發病病患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恙蟲病及地方性斑疹傷寒立克次體，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 胎牛血清 (fetal calf serum; FCS) (Biological Industries, Israel, Cat. no. 04-001-1A)。
- 5.5 15 mL 離心管。
- 5.6 2 mL 保存瓶。
- 5.7 Shell-vial 培養瓶。
- 5.8 螢光標幟抗體 FITC-goat anti-human IgG + A + M (H + L) (Zymed, USA, Cat. no. 62-8311)。
- 5.9 DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma, USA, Cat. no. D2650)。
- 5.10 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透去離子可達 18MΩ-CM 以上超純水。
- 5.11 Anti-*O. tsutsugamushi* 56kDa antibody (谷元, 台灣, Cat. no. ST5609010)：2-8°C 保存、1,000 倍稀釋。
- 5.12 病人血清：2-8°C 保存、400 倍稀釋。
- 5.13 細胞株 L929 (ATCC CCL-1)。

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。

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：	恙蟲病及地方性斑疹傷寒	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 809 頁/共 1091 頁	病原體分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

7.1 避免吸入及接觸傳染，所以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。

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 1mL MEM-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 500 μ L 為體積分裝至抗凍管凍藏之。

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冷凍凍解 3 次後（重複置-70°C→37°C），再行細胞接種 1-2 次。

10.3 觀察

10.3.1 自翌日起每天輕搖 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（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，收集細胞及培養液，立即進行鑑定，或暫時保存於 4°C。

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 810 頁/共 1091 頁	恙蟲病及地方性斑疹傷寒 病原體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

10.3.3 細胞未產生顯著 C.P.E.者，待培養 10 天後，一起收集細胞及培養液，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 Anti-*O. tsutsugamushi* 56kDa antibody 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 MEM 應添加 10% FCS；感染後 MEM 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

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.

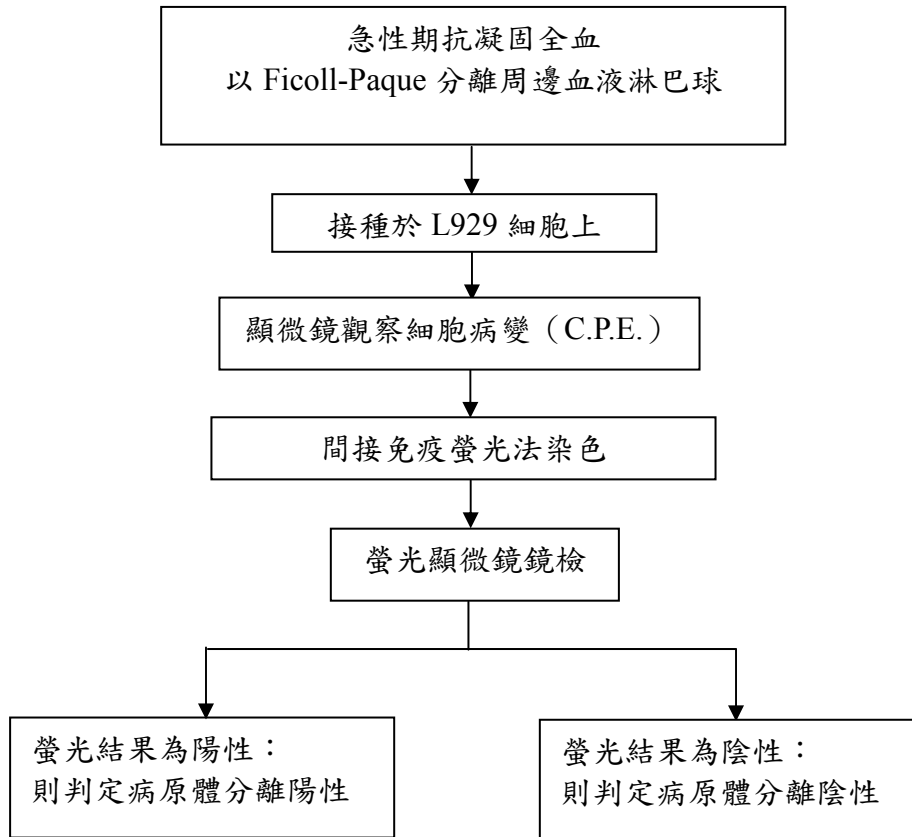
15 附錄

15.1 恙蟲病立克次體分離與鑑定流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	恙蟲病及地方性斑疹傷寒 病原體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 811 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 恙蟲病立克次體分離與鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	恙蟲病及斑疹傷寒病原體核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 812 頁/共 1091 頁		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) 分子診斷方法檢測恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒立克次體核酸。

2 適用檢體種類

適用於病人血液、體液或組織檢體。

3 名詞解釋

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

4 原理概述

利用恙蟲病及斑疹傷寒立克次體專一性之引子 (primers), 與檢體中之立克次體核酸分子結合配對, 並利用 PCR 的複製過程及特殊的螢光定量化學方法偵測 PCR 產物, 以決定檢體中是否含有立克次體核酸序列。檢體先以立克次體 16S rRNA 基因、恙蟲病立克次體 56 kDa 外膜蛋白基因以及斑疹傷寒立克次體 17 kDa 基因之引子混合進行篩檢, 當檢體呈陽性時, 再以不同立克次體基因專一性引子做立克次體種類的鑑定。

5 試劑耗材

5.1 QI Amp 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。

2X QuantiTect SYBR green PCR master mix:

(a) QuantiTect SYBR green PCR buffer。

(b) HotStarTaq DNA polymerase。

(c) dNTP mix including dUTP。

(d) SYBR green 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 PC 來源。

5.3.1 *Rickettsia typhi* (970432)。

5.3.2 *R. sibirica*。

5.3.3 *R. japonica*。

5.3.4 *R. kato*。

5.3.5 *R. karp*。

5.4 陰性對照組 (negative control RNA): DNase, RNase-free H₂O。

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 813 頁/共 1091 頁	恙蟲病及斑疹傷寒病原體核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

- 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 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, U.S.A.)。
- 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)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 μL，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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	恙蟲病及斑疹傷寒病原體核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 814 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 56 kDa 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 (Real-Time PCR)：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：

(1) 95°C，1 min。

(2) 68°C→90°C+1°C/30 sec/cycle。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	恙蟲病及斑疹傷寒病原體核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 815 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(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 $>80^{\circ}\text{C}$ 的 PCR 產物，才為較具專一性之產物，而 $<75^{\circ}\text{C}$ 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 做定時的校對。
- 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處理。

14 參考資料

- 14.1 Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, Lin TH, Huang JH. 2003. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. J Clin Microbiol 41: 2408-2416.
- 14.2 Tsai KH, Lu HY, Tsai JJ, Yu SK, Huang JH, Pei-Yun Shu PY. 2008. Human case of *Rickettsia felis* infection, Taiwan. Emerg Infect Dis 14: 1970-1972.

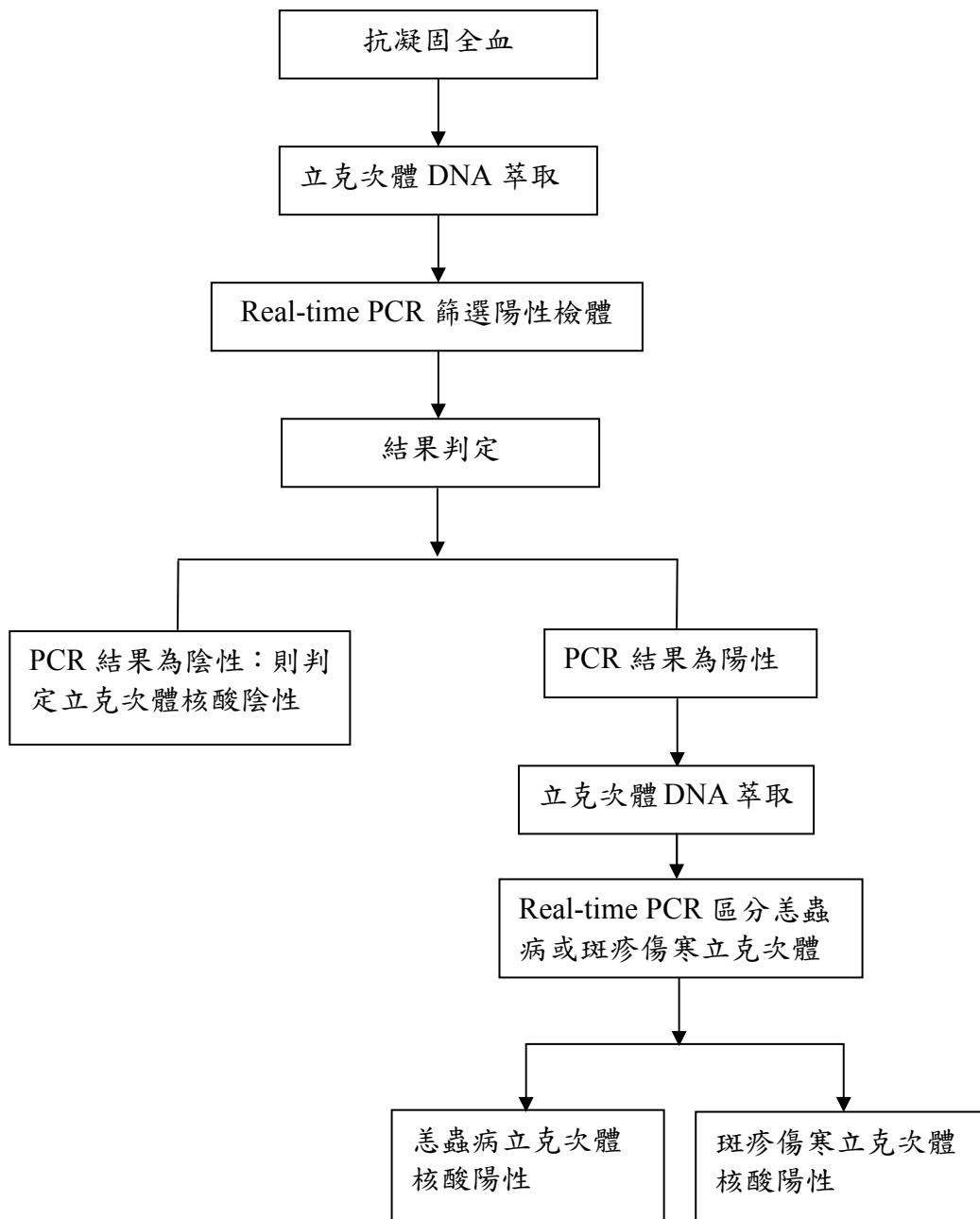
15 附錄

- 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：	恙蟲病及斑疹傷寒病原體核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 816 頁/共 1091 頁		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：	恙蟲病及斑疹傷寒病原體核酸檢測 (Real-time PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 817 頁/共 1091 頁		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：	恙蟲病抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 818 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

以免疫螢光抗體方法檢測恙蟲病抗體以確定病例。

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 自製 21 孔恙蟲病抗原玻片 (國際標準株 Gilliam、Kato、Karp)。
- 5.6 IgG 去除劑 (Focus Diagnostics, USA, Cat. no. IF0209)。
- 5.7 96-孔 U 型盤 (Greiner Bio-One, Germany, Cat. no. 650101)。
- 5.8 50 mL 貯液槽 (Costar, USA, Cat. no. 4870)。
- 5.9 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透去離子可達 18MΩ·CM 以上超純水。
- 5.10 Positive control for *O. tsutsugamushi* (Scimedx Corporation, USA, Cat. no. CC066)：2-8°C 保存、直接使用不需稀釋。
- 5.11 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。

7 環境與設施安全

- 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	恙蟲病抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 819 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 20 μ L 點入 21 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 20 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)。

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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	恙蟲病抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 820 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 20 μ L 點入 21 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 20 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。

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

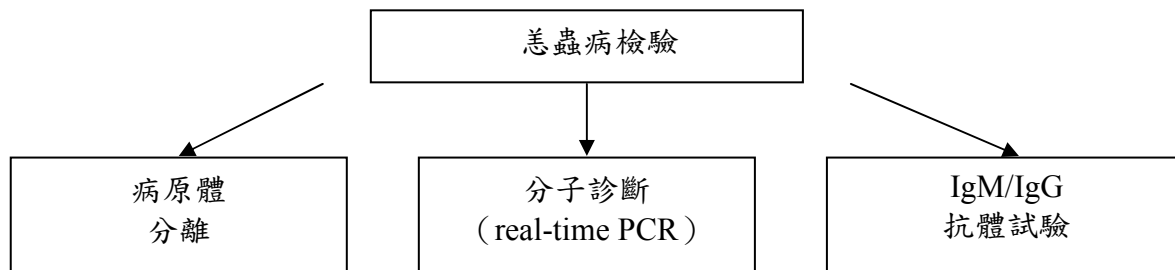
	編號：	恙蟲病抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 821 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 14.2 Tamura A, Takahashi K, Tsuruhara T, et al. 1984. Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp and Gilliam strains from patients. Microbil Immunol 28: 873-882.
- 14.3 Department of Health and Human Services Public Health Service. Indirect fluorescent antibody technique for the detection of *Coxiella burnetii* antibodies, 1987.
- 15 附錄
 - 15.1 恙蟲病檢驗流程圖。
 - 15.2 恙蟲病病原體抗體試驗（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：	恙蟲病抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 822 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

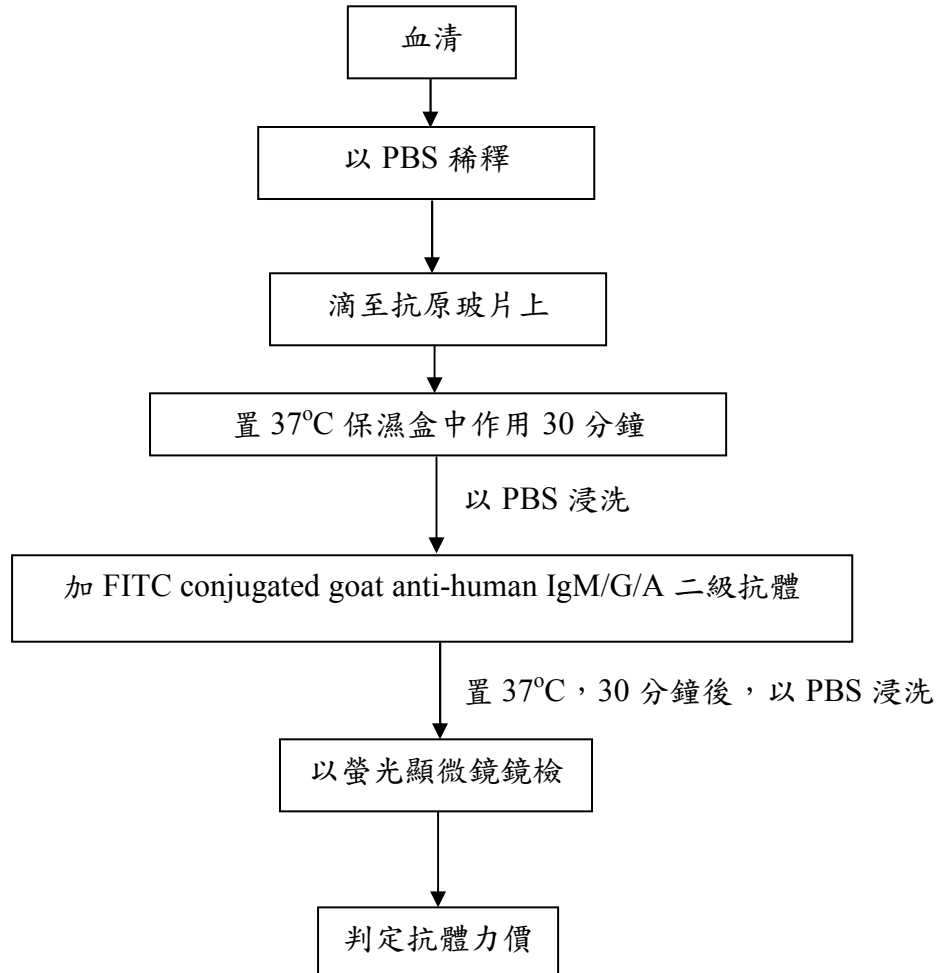
附錄 15.1 恙蟲病檢驗流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	恙蟲病抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 823 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 恙蟲病病原體抗體試驗（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： 頁次：第 824 頁/共 1091 頁	斑疹傷寒抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日 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 逆滲透去離子可達 18MΩ-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。

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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	斑疹傷寒抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 825 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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)。

10.3 IgM & IgG 抗體力價測定：

10.3.1 血清稀釋

(1) IgM 測定：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	斑疹傷寒抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 826 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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。

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	斑疹傷寒抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日		
	頁次：第 827 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日		

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, et al. 1984. Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp and Gilliam strains from patients. Microbil 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.

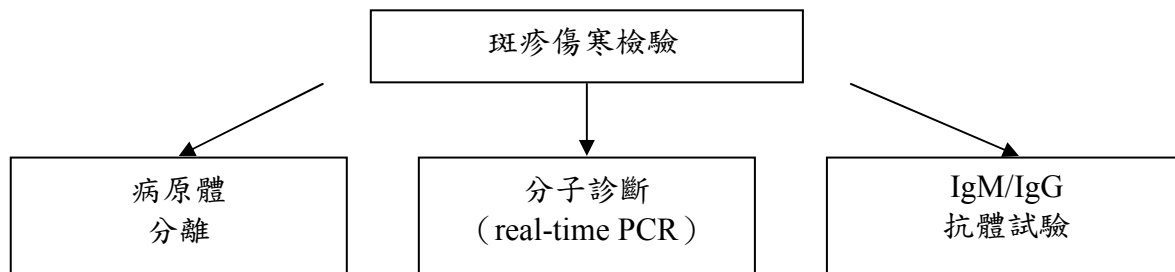
15 附錄

- 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：	斑疹傷寒抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 828 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

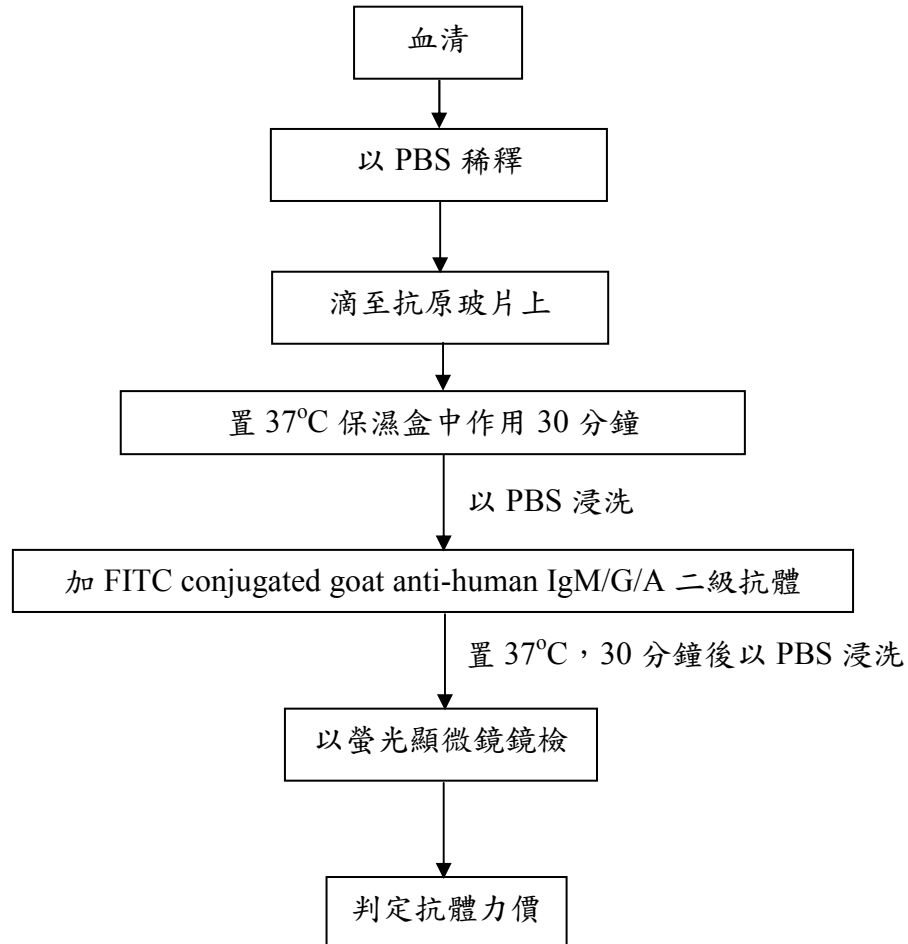
附錄 15.1 斑疹傷寒檢驗流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	斑疹傷寒抗體檢測 (間接免疫螢光抗體法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 829 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：	萊姆病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 830 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測疑似病患的組織檢體或體液中是否含有萊姆病病菌。

2 適用檢體種類

適用於病患出現遊走性紅斑的皮膚組織，神經系統症狀的腦脊髓液或關節病變的關節囊液等檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用培養方法分離萊姆病病原體並以聚合酶鏈鎖反應法（PCR）鑑定。

5 試劑耗材

- 5.1 BSK-H 培養液（Sigma Corp., Cat no. B8291）。
- 5.2 無菌 2 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1,000 μ L Tips。
- 5.3 無菌 1.5 mL 微量離心管。
- 5.4 無菌拋棄式研磨棒。
- 5.5 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透可達 18 Ω -CM 以上超純水。
- 5.6 陽性對照組（positive control DNA）：*Borrelia burgdorferi*（ATCC 35210）。
- 5.7 陰性對照組（negative control DNA）：DNase，RNase-free H₂O。
- 5.8 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透可達 18 Ω -CM 以上超純水。
- 5.9 PCR 專用八連排反應管。
- 5.10 PCR 專用八連排反應蓋。
- 5.11 GoTaq green master mix（Promega Corp., Cat no. M7122）。
- 5.12 引子序列 23SN1：5'-ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC-3'。
- 5.13 引子序列 23SC1：5'-TAAGCTGACTAATACTAATTACCC-3'。

6 儀器設備

- 6.1 35°C、CO₂ 培養箱。
- 6.2 手術剪刀。
- 6.3 不鏽鋼鑷子。
- 6.4 手術刀 1 柄，no.4。
- 6.5 手術刀片，no.23。
- 6.6 離心機。
- 6.7 生物安全櫃。
- 6.8 桌上型離心機。
- 6.9 4°C 冰箱。
- 6.10 -20°C 冷凍櫃。
- 6.11 微量吸管 Pipetman：需 1,000 μ L、200 μ L、20 μ L 等三種規格。
- 6.12 核酸增幅儀：Biometra。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	萊姆病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 831 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

6.13 DNA 電泳膠體觀察照相設備。

6.14 暗視野顯微鏡。

7 環境與設施安全

7.1 病人的皮膚組織、腦脊髓液和關節囊液，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

將皮膚組織研磨成碎屑。

10.2 分離培養

10.2.1 檢體接種：

（1）取出 50 μ L 的腦脊髓液或關節囊液接種於 4.5 mL 的 BSK-H 培養液。

（2）研磨後的淋巴組織加入 100 μ L BSK-H 培養液，混合後取出並接種於 4.5 mL 的 BSK-H 培養液。

10.2.2 培養：置於 35°C，5%二氧化碳培養箱培養。

10.2.3 觀察：每週以暗室野顯微鏡觀察一次，至少需培養 8-12 週，有可疑螺旋體則進行鑑定。

10.3 鑑定

10.3.1 暗視野顯微鏡觀察：呈細長螺旋狀，螺旋稀疏而不規則，約有 5-10 個扭轉。行特異的螺旋旋轉運動方式。

10.3.2 繼代培養：從初代培養液分別吸取 0.1、0.5 與 1 mL 之菌液，接種於三管 4.5 mL 的 BSK-H 培養液，置於 35°C，5%二氧化碳培養箱培養，用以放大菌量便於進行 PCR 鑑定。

10.3.3 PCR 鑑定：

（1）選擇生長密度最高的培養管，吸取 1.2 mL 的菌液置於 1.5 mL 微量離心管中，以 13,000 rpm 離心 10 min，捨去液體後添加 100 μ L 無菌水，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。

（2）PCR 反應混和物配製如下：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	萊姆病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 832 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Component	Final conc. or volume
Template (陽性 DNA、水、檢體)	2 μ L
Each primer (10 μ M)	1 μ L
GoTaq green master mix	25 μ L
加無菌水	21 μ L

- (3) 放入儀器中進行反應，反應條件設定：
 - (a) 95°C / 2 min, 1 cycle。
 - (b) 95°C / 30s, 56°C / 30s, 72°C / 30s, 30 Cycles。
- (4) PCR 產物以 1:10 稀釋，取 1 μ L 進行第二次 PCR 反應(條件同第一次)。
- (5) PCR 電泳分析，若電泳分析發現具 380-400 bp 之產物，須送定序加以確認。

11 結果判定

- 11.1 判讀標準：根據細菌型態、運動方式、PCR 鑑定與定序結果進行病原分離的結果，判讀是陽性或是陰性。
- 11.2 報告核發：萊姆病陽性，萊姆病陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於萊姆病紀錄表及列印表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 判定感染應配合臨床症狀，分離菌株之菌型態特性。
- 12.2 PCR 以陽性菌株 DNA 做對照組檢驗比較，必要時可利用 16S DNA 加以鑑別。

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

Pecchioli E, Hauffe HC, Tagliapietra V, Bandi C, Genchi C, Rizzoli A. 2007. Genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodes ricinus ticks from the autonomous province of Trento, Italy. Int J Med Microbiol 297: 53-59.

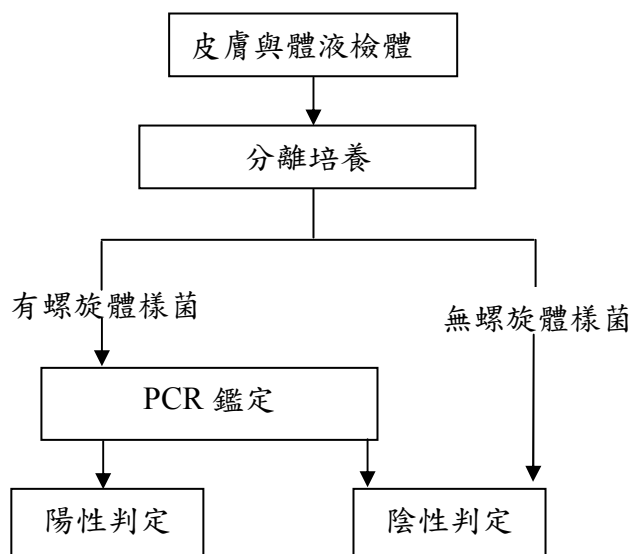
15 附錄

- 15.1 萊姆病病原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：	萊姆病病原菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 833 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 萊姆病病原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：	萊姆病病原菌抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 834 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

篩檢萊姆病抗體。

2 適用檢體種類

適用於符合萊姆病病徵之病患血清檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用合成的短鏈胺基酸鏈 (C6 peptide) 為抗原，與病人血清中之萊姆病特異性抗體結合，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。

5 試劑耗材

5.1 Immunetics C6 *B. burgdorferi* (lyme) ELISA kit : Immunetics, USA., Cat no. DK-E352-096。

5.1.1 96 孔微反應槽，吸附 C6 peptide 抗原。

5.1.2 10 倍清洗液。

5.1.3 檢體稀釋液。

5.1.4 山羊抗人 IgG/IgM 酵素結合抗體 (horseradish peroxidase)。

5.1.5 陽性標準液。

5.1.6 陰性標準液。

5.1.7 臨界校正液。

5.1.8 呈色劑 (TMB 受質)。

5.1.9 終止液。

5.2 無菌微量吸管尖 (tip) : 100 μ L、1,000 μ L。

5.3 無菌蒸餾水。

5.4 96 孔 U 型微量滴定盤。

5.5 可拋棄式無菌塑膠手套。

6 儀器設備

6.1 全自動酵素免疫分析儀 (ELISA reader) : 450 nm 波長，與 630 nm 波長。

6.2 微量吸管 (pipetteman) : 1,000 μ L、300 μ L、30 μ L。

6.3 8 爪微量吸管。

6.4 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

8.1 血清檢體沒有添加抗凝劑，沒有溶血且量不少於 200 μ L。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	萊姆病病原菌抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 835 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 低溫運送及保存。

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 試藥回溫。

10.2 96 孔 U 型微量滴定盤各孔格加入 200 μ L 檢體稀釋液。

10.2.1 第一個孔格加入 10 μ L 陽性標準液。

10.2.2 第二個孔格加入 10 μ L 陰性標準液。

10.2.3 第三、四、五孔格各加入 10 μ L 臨界校正液。

10.2.4 其餘各孔格加入 10 μ L 血清檢體。

10.3 各吸取 100 μ L 稀釋後的液體，分別加入於各微反應槽，室溫反應 30 min。

10.4 每個微反應槽加入 300 μ L 清洗液清洗，重複清洗四次。

10.5 每個微反應槽加入 100 μ L 山羊抗人 IgG/IgM 之酵素結合抗體，室溫反應 25 min。

10.6 每個微反應槽加入 300 μ L 清洗液清洗，重複清洗四次。

10.7 加入 100 μ L 受質，室溫反應 4 min。

10.8 加入 100 μ L 中止液。

10.9 於 5 min 內以全自動酵素免疫分析儀讀取 450 nm 之吸光值，參考濾片 (reference filter) 設定為 630 nm。

11 結果判定

11.1 判讀標準：計算各血清檢體的萊姆指數，並根據萊姆指數進行判讀。各個檢體的萊姆指數計算方式為：血清檢體吸光值 $\div$ (臨界校正液吸光值之平均值 $\div$ 2.150)。

11.1.1 當萊姆指數 $\leq$ 0.9：為陰性反應，判為抗體陰性。

11.1.2 當萊姆指數界於 0.91-1.09：為不確定反應，需繼以西方墨點法確認。

11.1.3 當萊姆指數 $\geq$ 1.1：為陽性反應，需繼以西方墨點法確認。

11.2 報告核發：萊姆病抗體未確定，萊姆抗體陽性，萊姆病抗體陰性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於萊姆病紀錄表及列印表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

若陽性標準液、陰性標準液或臨界校正液之吸光值未達下述之標準時，必須重做檢驗。

12.1 陽性標準液吸光值須大於 1.2。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	萊姆病病原菌抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 836 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12.2 陰性標準液吸光值須小於 0.18。

12.3 臨界校正液吸光值須界於 0.4-2.0。

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 CDC (USA). 1995. Recommendations for test performance and interpretation from the second National Conference on serologic diagnosis of lyme disease. MMWR 44: 590-591.

14.2 Immnuetics® C6 *B. burgdorferi* (lyme) ELISA kit 說明書，Cat. no. DK-E352-096, Immnuetics, USA.

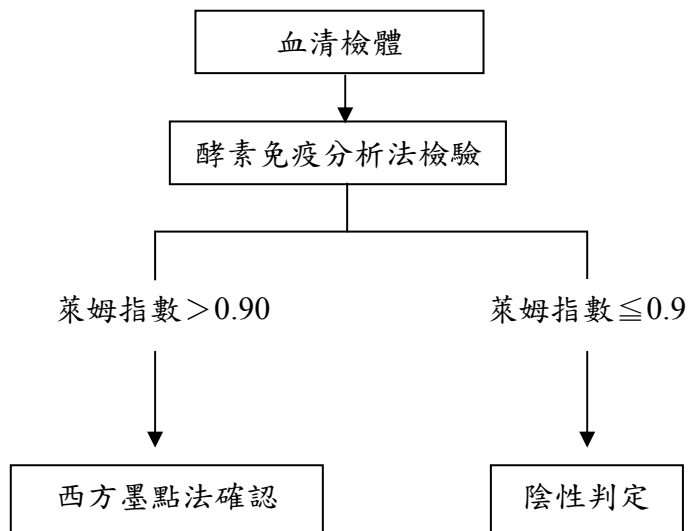
15 附錄

15.1 萊姆病抗體試驗流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	萊姆病病原菌抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 837 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 萊姆病抗體試驗流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	萊姆病病原菌抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 838 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測萊姆病抗體。

2 適用檢體種類

適用於經酵素免疫分析法篩檢出，需要再確認之病患血清檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用電泳將伯氏疏螺旋體 (*Borrelia burgdorferi*) 菌體蛋白，依照分子量大小分開，並轉漬於尼龍膜上。以尼龍膜上的抗原與病人血清進行專一性結合的免疫反應，加上酵素標幟抗體將此反應轉成顏色訊號，得以觀察血清與特定蛋白的反應結果。

5 試劑耗材

5.1 *B. burgdorferi* (IgG) MARBLOT STRIP TEST SYSTEM：Cat. No. 40-5065G，MarDx，USA。

5.1.1 *B. burgdorferi* IgG 試藥條。

5.1.2 陰性標準液。

5.1.3 *B. burgdorferi* IgG 陽性標準液。

5.1.4 *B. burgdorferi* IgG 弱陽性標準液。

5.1.5 10 倍抗體稀釋液/清洗液。

5.1.6 10 倍抗人類 IgG 酵素結合抗體 (alkaline phosphatase conj.)。

5.1.7 呈色液。

5.2 *B. burgdorferi* (IgM) MARBLOT STRIP TEST SYSTEM：Cat. No. 40-5065M，MarDx，USA。

5.2.1 *B. burgdorferi* IgM 試藥條。

5.2.2 陰性標準液。

5.2.3 *B. burgdorferi* IgM 陽性標準液。

5.2.4 *B. burgdorferi* IgM 弱陽性標準液。

5.2.5 10 倍抗體稀釋液/清洗液。

5.2.6 10 倍抗人類 IgM 酵素結合抗體 (alkaline phosphatase conj.)。

5.2.7 呈色液。

5.3 無菌微量吸管尖 (tip)：200 μ L、1,000 μ L。

5.4 血清瓶：1 L。

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

5.6 檢體反應槽。

5.7 手套。

5.8 紙巾。

6 儀器設備

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	萊姆病病原菌抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 839 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 6.1 鑷子。
- 6.2 水平搖盪器。
- 6.3 微量吸管 (pipetteman)：200 μ L、1,000 μ L。
- 6.4 分注器。
- 6.5 真空幫浦。

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

- 8.1 血清檢體沒有添加抗凝劑，沒有溶血且量不少於 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

- 9.1 低溫運送及保存。
- 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 試藥回溫。
- 10.2 檢驗前處理
 - 10.2.1 配製 1 倍抗體稀釋液/清洗液：取 1 份 10 倍抗體稀釋液/清洗液，加入 9 份去離子水之血清瓶。
 - 10.2.2 配製 1 倍抗人類 IgG 酵素結合抗體：以 9 份 1 倍抗體稀釋液/清洗液與 1 份 10 倍抗人類 IgG 酵素結合抗體作稀釋，需現泡現用。
 - 10.2.3 配製 1 倍抗人類 IgM 酵素結合抗體：以 9 份 1 倍抗體稀釋液/清洗液與 1 份 10 倍抗人類 IgM 酵素結合抗體作稀釋，需現泡現用。。
- 10.3 同時分開進行 IgG 及 IgM 抗體檢測。
- 10.4 依試藥條的編號順序取出試藥條，數字部分面朝上依序放入檢體反應槽，避免用手接觸試藥條。
- 10.5 各檢體反應槽加入 2 mL 抗體稀釋液/清洗液，試藥條需完全浸泡於清洗液中，搖盪 5 min 以上。
- 10.6 將標準液與檢體分別加入各個檢體反應槽。
 - 10.6.1 僅於檢驗套組開封後第一次檢驗時使用陽性標準液，加入 80 μ L。
 - 10.6.2 陰性標準液加入 20 μ L。
 - 10.6.3 弱陽性標準液 20 μ L。
 - 10.6.4 檢體加入 20 μ L。
- 10.7 置於搖盪器上，室溫反應 30 min，除去液體。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	萊姆病病原菌抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 840 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.8 加入 2 mL 抗體稀釋液/清洗液，搖盪 5min，除去液體，再重複此步驟二次。
- 10.9 加入 2 mL 稀釋的抗人類 IgG 酵素結合抗體或稀釋的抗人類 IgM 酵素結合抗體於相對應的檢體反應槽。
- 10.10 置於搖盪器上，反應 15 min，除去液體。
- 10.11 加入 2 mL 抗體稀釋液/清洗液，搖盪 5 min，除去液體，再重複此步驟二次。
- 10.12 加入 2 mL 去離子水，搖盪 1 min，除去液體。
- 10.13 加入 2 mL 呈色液後置於搖盪器上反應，直到使用弱陽性標準液試藥條出現淡淡的 41 kDa 反應條帶時終止呈色反應。反應時間約在 4-12 min 間。
- 10.14 除去液體，加入 2 mL 去離子水，用手搖盪 3-4 次。再重覆此步驟二次。
- 10.15 取出試藥條置於紙巾上風乾，待完全乾燥後進行結果判讀。

11 結果判定

11.1 陽性判讀標準：

- 11.1.1 檢體試藥條的條帶顏色，必須比作弱陽性標準液檢測之試藥條上 41 kDa 位置的條帶顏色深，方可判為陽性條帶。
- 11.1.2 IgG 抗體檢測結果判定：檢體試藥條上位於 93、66、58、45、41、39、30、28、23 與 18 kDa 的十個條帶中，任五個以上（含）呈陽性反應，判讀為陽性；任四個條帶以下（含）呈陽性反應，判讀為陰性。
- 11.1.3 IgM 抗體檢測結果判定：檢體試藥條上位於 41、39 和 23 kDa 的三個條帶中，任兩個以上（含）呈陽性反應，判讀為陽性；任一個以下（含）呈陽性反應，判讀為陰性。
- 11.2 報告核發：萊姆病抗體未確定，萊姆抗體陽性，萊姆病抗體陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於萊姆病紀錄表及列印表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 於 IgG 抗體檢測中，若任一標準液條帶反應結果未達下列所述之標準時，必須重做 IgG 抗體檢驗。
 - 12.1.1 陽性標準液試藥條上須可見這些條帶：血清添加確認條帶、酵素結合抗體確認條帶、93、66、58、45、41、39、30、28、23 與 18 kDa 條帶。
 - 12.1.2 弱陽性標準液試藥條上須可見這些條帶：血清添加確認條帶、酵素結合抗體確認條帶與 41 kDa 條帶。
 - 12.1.3 陰性標準液試藥條上只能出現這些條帶：血清添加確認條帶與酵素結合抗體確認條帶。
- 12.2 於 IgM 抗體檢測中，若任一標準液條帶反應結果未達下列所述之標準時，必須重做 IgM 抗體檢驗。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	萊姆病病原菌抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 841 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 12.2.1 陽性標準液試藥條上須可見這些條帶：血清添加確認條帶、酵素結合抗體確認條帶、41、39 和 23 kDa。
- 12.2.2 弱陽性標準液試藥條上須可見這些條帶：血清添加確認條帶、酵素結合抗體確認條帶與 41 kDa 條帶。
- 12.2.3 陰性標準液試藥條上只能出現這些條帶：血清添加確認條帶與酵素結合抗體確認條帶。

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 CDC (USA). 1995. Recommendations for test performance and interpretation from the second National Conference on serologic diagnosis of lyme disease. MMWR 44: 590-591.
- 14.2 *B. burgdorferi* (IgG) MARBLOT STRIP TEST SYSTEM 說明書, Cat. No. 40-5065G (MarDx®)
- 14.3 *B. burgdorferi* (IgM) MARBLOT STRIP TEST SYSTEM 說明書, Cat. No. 40-5065M (MarDx®)。

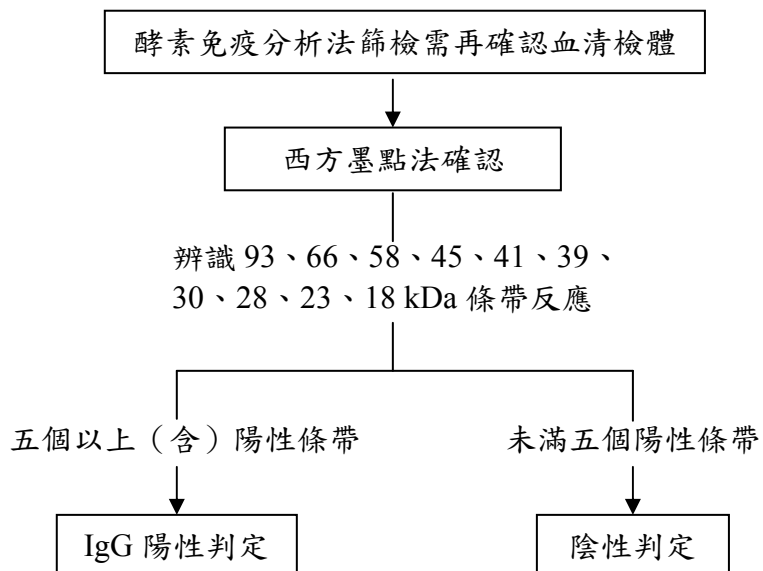
15 附錄

- 15.1 萊姆病西方墨點法 IgG 抗體試驗流程圖。
- 15.2 萊姆病西方墨點法 IgM 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：	萊姆病病原菌抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 842 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 萊姆病西方墨點法 IgG 抗體試驗流程圖



	編號：	萊姆病病原菌抗體檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 843 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

```

graph TD
    A[酵素免疫分析法篩檢需再確認血清檢體] --> B[西方墨點法確認]
    B --> C[辨識 41、39、23 kDa 條帶反應]
    C --> D[兩個以上（含）陽性條帶]
    C --> E[未滿兩個陽性條帶]
    D --> F[IgM 陽性判定]
    E --> G[陰性判定]
  
```

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	兔熱病原菌抗體檢測 (微量平板法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 844 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的
篩檢兔熱病抗體。
- 2 適用檢體種類
適用於符合兔熱病病徵之病患血清檢體。
- 3 名詞解釋
無。
- 4 原理概述
利用兔熱病菌多醣體，與病人血清中之兔熱病特異性抗體結合，產生凝集反應，直接觀察讀取結果。
- 5 試劑耗材
 - 5.1 試藥
 - 5.1.1 以 safranin-O 染色的兔熱病菌體多醣體。
 - 5.1.2 陽性標準液，兔血清、人血清。
 - 5.1.3 陰性標準液，人血清。
 - 5.1.4 生理食鹽水。
 - 5.2 96 孔微量滴定盤，U 型。
 - 5.3 無菌微量吸管尖 (tip)：10 μ L、100 μ L。
 - 5.4 96 孔微量滴定盤封膜。
 - 5.5 可拋棄式無菌塑膠手套。
- 6 儀器設備
 - 6.1 微量吸管 (Pipetman)：100 μ L、30 μ L。
 - 6.2 12 爪微量吸管 (multi-channel Pipetman)：50 μ L。
 - 6.3 37°C 溫箱。
 - 6.4 水浴槽。
 - 6.5 震盪器。
 - 6.6 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 7 環境與設施安全
血清檢體處理應於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。其餘操作過程則不限定。
- 8 檢體採集
 - 8.1 血清檢體沒有添加抗凝劑，沒有溶血，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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	兔熱病原菌抗體檢測 (微量平板法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 845 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 檢驗前處理

檢體以 2,000 rpm 離心 30 min，分離出血清備用。

10.2 試藥回溫。

10.3 96 孔微量滴定盤孔格中每格加入 25 μ L 生理食鹽水 (A1 孔格除外)。

10.4 將陽性標準液 10 μ L 加入 A1 孔格 (已加入 90 μ L 生理食鹽水)，陰性標準液 25 μ L 加入 A2 孔格，檢體 25 μ L A3 等孔格中。

10.5 將陽性標準液以連續 2 倍稀釋至 1,280 倍、陰性標準液與檢體以連續 2 倍稀釋至 256 倍，最後捨去 H 列多餘之 25 μ L 液體。

10.6 覆上 96 孔微量滴定盤封膜，震盪 15 sec。

10.7 放置室溫，隔夜觀察。

10.8 凝集結果記錄

(1) 陰性：血球沉澱於孔格底部中心。

(2) 陽性：凝集抗原分散於孔格底部，紀錄有產生凝集反應之最高血清稀釋倍數，即為該檢體之抗體效價。

11 結果判定

11.1 判讀標準：當陽性標準液抗體效價高於 160 倍，陰性標準液無抗體效價時，且急性期與恢復期檢體之抗體效價相差達 4 倍 (含) 以上，則判定為野兔病抗體陽性。

11.2 報告核發：兔熱病抗體陽性，兔熱病抗體不明 (無法確定)，兔熱病抗體陰性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於兔熱病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

若陽性標準液或陰性標準液之抗體效價倍數未達上述之標準時，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

略。

15 附錄

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

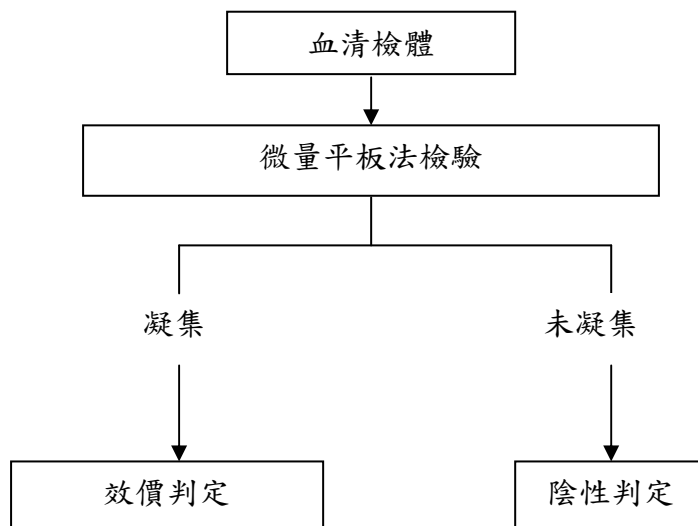
	編號：	兔熱病病原菌抗體檢測 (微量平板法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 846 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

15.1 兔熱病抗體試驗流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	兔熱病病原菌抗體檢測 (微量平板法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 847 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 兔熱病抗體試驗流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	兔熱病病原菌抗體檢測 (IHA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 848 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 1 目的
篩檢兔熱病抗體。
- 2 適用檢體種類
適用於符合兔熱病病徵之病患血清檢體。
- 3 名詞解釋
無。
- 4 原理概述
利用吸附於紅血球上的兔熱病菌多醣體，與病人血清中之兔熱病特異性抗體結合，藉由血球產生凝集反應，直接觀察讀取結果。
- 5 試劑耗材
 - 5.1 試藥
 - 5.1.1 吸附兔熱病多醣體雞紅血球。
 - 5.1.2 陽性標準液，兔血清。
 - 5.1.3 陰性標準液，人血清。
 - 5.1.4 生理食鹽水。
 - 5.2 96 孔微量滴定盤，U 型。
 - 5.3 無菌微量吸管尖 (tip)：10 μ L、100 μ L。
 - 5.4 96 孔微量滴定盤封膜。
 - 5.5 可拋棄式無菌塑膠手套。
- 6 儀器設備
 - 6.1 微量吸管 (Pipetman)：100 μ L、30 μ L。
 - 6.2 12 爪微量吸管 (multi-channel Pipetman)：50 μ L。
 - 6.3 37°C 溫箱。
 - 6.4 水浴槽。
 - 6.5 震盪器。
 - 6.6 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 7 環境與設施安全
血清檢體之處理應於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室之設施內操作。其餘操作過程則不限定。
- 8 檢體採集
 - 8.1 血清檢體沒有添加抗凝劑，沒有溶血，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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	兔熱病原菌抗體檢測 (IHA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 849 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 檢驗前處理

10.1.1 檢體以 2,000 rpm 離心 30 min，分離出血清備用。

10.1.2 血清需經 56°C 水浴處理 30 min。

10.2 試藥回溫。

10.3 96 孔微量滴定盤孔格中每格加入 25 µL 生理食鹽水。

10.4 將陽性標準液 25 µL 加入 A1 孔格，陰性標準液 25 µL 加入 A2 孔格，檢體 25 µL A3 等孔格中。

10.5 將陽性標準液、陰性標準液與檢體以連續 2 倍稀釋至 256 倍，最後捨去 H 列多餘之 25 µL 液體。

10.6 覆上 96 孔微量滴定盤封膜，震盪 15 sec。

10.7 放置 37°C 恆溫箱中，反應 60 min。

10.8 凝集結果記錄

(1) 陰性：血球沉澱於孔格底部中心。

(2) 陽性：凝集抗原分散於孔格底部，紀錄有產生凝集反應之最高血清稀釋倍數，即為該檢體之抗體效價。

11 結果判定

11.1 判讀標準：當陽性標準液抗體效價高於 32 倍，且陰性標準液無抗體效價時，如果檢體之抗體效價高於 32 倍（含），判定為野兔病抗體陽性。

11.2 報告核發：兔熱病抗體陽性，兔熱病抗體不明（無法確定），兔熱病抗體陰性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於兔熱病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

若陽性標準液或陰性標準液之抗體效價倍數未達上述之標準時，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

Sato T, Fujita H, Watanabi Y, Ohara Y, Homma M. 1992. Microbiology and immunological techniques currently used for the diagnosis of tularemia in laboratory of Ohara General Hospital. Ann Rep Ohara Hosp 35: 1-10.

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	兔熱病病原菌抗體檢測 (IHA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 850 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

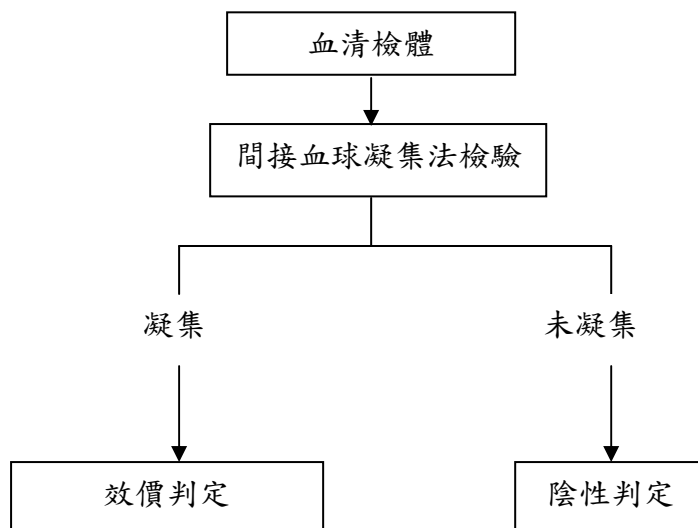
15 附錄

15.1 兔熱病抗體試驗流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	兔熱病病原菌抗體檢測 (IHA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 851 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 兔熱病抗體試驗流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 852 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水痘病毒。

2 檢體

適用於水泡液及水泡底部細胞。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

選擇適當的細胞株（MRC-5）培養水痘病毒，經三次繼代培養後，最後再以抗水痘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、0.1 mM non-essential amino acid、1.0 mM sodium pyruvate 與 1X pen-strep solution 之 MEM 組成）。

(1) MEM/EBSS

(a) With 2.0 mM L-glutamine。

(b) With Earle's balance salts。

(2) MEM non-essential amino acid solution (100X)。

(a) 0.1 μM sterile filtered。

(3) Sodium pyruvate 100 mM solution

(a) With 11.0 mg/mL sodium pyruvate。

(b) 0.1 μM sterile filtered。

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

(5) 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)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 853 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.1.6 Varicella-Zoster virus, Glycoprotein I 單株抗體：Chemicon，MAB8612。
- 5.1.7 Gt X Ms IgG FITC：Chemicon，5008，USA，store at 2-8°C。
- 5.1.8 Mounting fluid：Chemicon，5013，USA，store at 2-8°C。
- 5.1.9 Tween 20/sodium azide, 100X：Chemicon，5037，USA，store at 2-8°C。
- 5.1.10 PBS packet：Chemicon，5087，USA，store at 2-8°C。
- 5.1.11 IFA wash solution：將 5.1.9 試劑溶於 1 L dist.H₂O 再加入 5.1.8 試劑以乾淨密封容器室溫儲放。
- 5.1.12 MRC-5 細胞株：由 ATCC 所購入之細胞株 Vero：CCL-171。

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 854 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

<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：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 溫或解凍。

10.2.3 檢體前處理

水泡液：棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出，將溶液吸出置於 2 mL 無菌試管保存，可直接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 MRC-5 細胞，吸出 Growth medium，接種檢體 100 μ L，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。

10.3.2 培養至 7 天後，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，混合均勻後取 100 μ L 接種於新的 24 孔盤的單層 MRC-5 cell。

10.3.3 再繼續培養 7 天後進行 IFA 鑑定。

10.3.4 間接螢光免疫法鑑定

10.3.4.1 取 1 mL 受感染細胞的懸浮液於小離心管中，以 3,000 rpm 離心 15 min。

10.3.4.2 取出上清液另存於乾淨試管，沉澱之細胞加入 0.5-1 mL PBS，以 Pipette 上下混合均勻。

10.3.4.3 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。

10.3.4.4 用無菌水以 1：100 稀釋 5.1.6 Varicella-Zoster, Glycoprotein I 單株抗體。

10.3.4.5 取出風乾後滴一滴 10.3.4.4 Varicella-Zoster 單株抗體，將玻片置於 Moisture chamber，置於 37°C 恆溫箱 30 min。

10.3.4.6 以 5.1.11 IFA wash solution 清洗玻片後置於乾浴器烘乾。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 855 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.3.4.7 每個孔加一滴 5.1.7 Gt X Ms IgG FITC。將玻片置於 Moisture chamber，置於 37°C 恆溫箱 30 min。

10.3.4.8 重覆 10.3.4.6。

10.3.4.9 以 5.1.8 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 Varicella-Zoster IFA 測定有綠色螢光反應細胞者，判定為陽性。

11.2 報告核發：水痘病毒分離陽性，水痘病毒分離陰性。

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

Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases, 4th edition. 2008.
available at
<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt17-varicella.htm#7>.

15 附錄

15.1 水痘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。

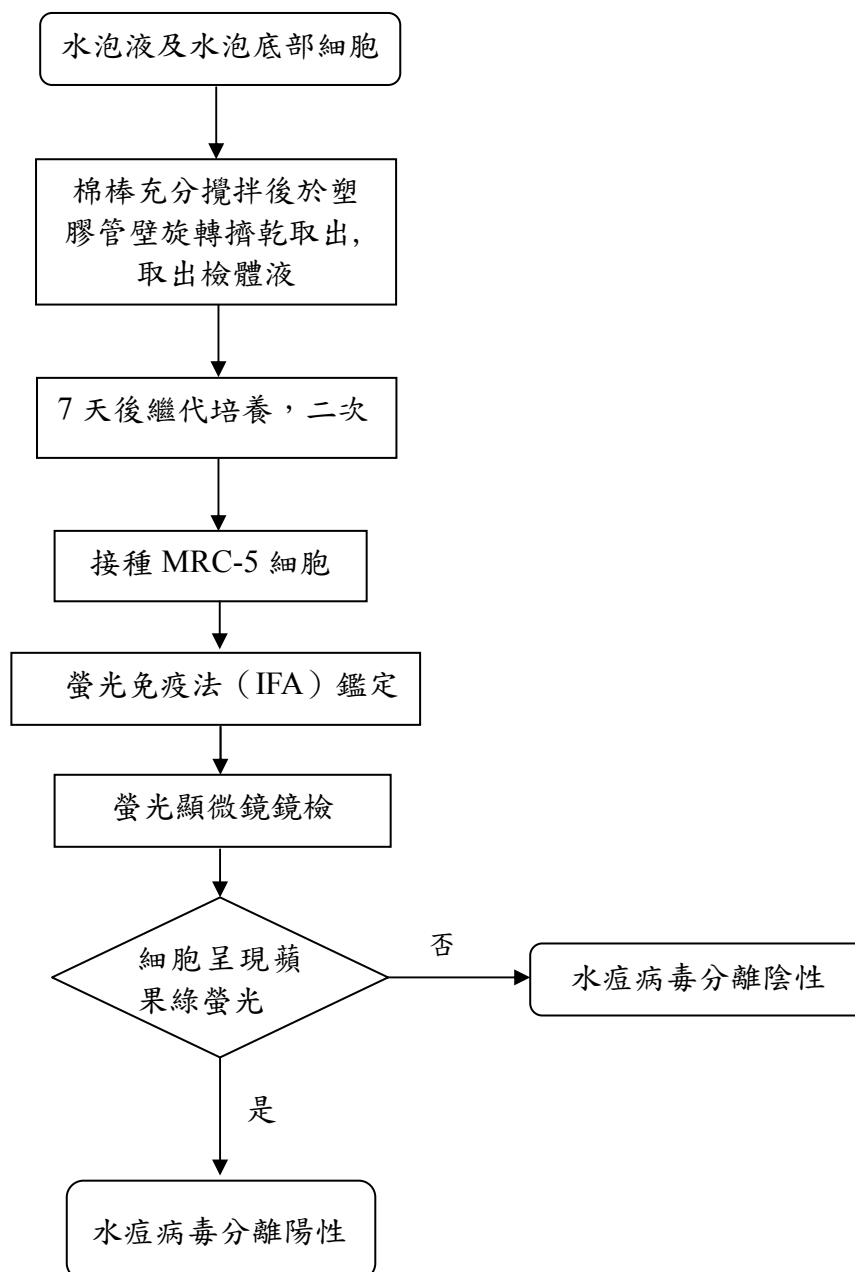
15.4 螢光鑑定記錄表。

15.5 水痘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：	水痘病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 856 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 水痘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：	水痘病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 857 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

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：	水痘病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 858 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

附錄 15.3 病毒培養觀察紀錄表

[illegible]

驗檢

審核

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 859 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：

	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Date：

	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

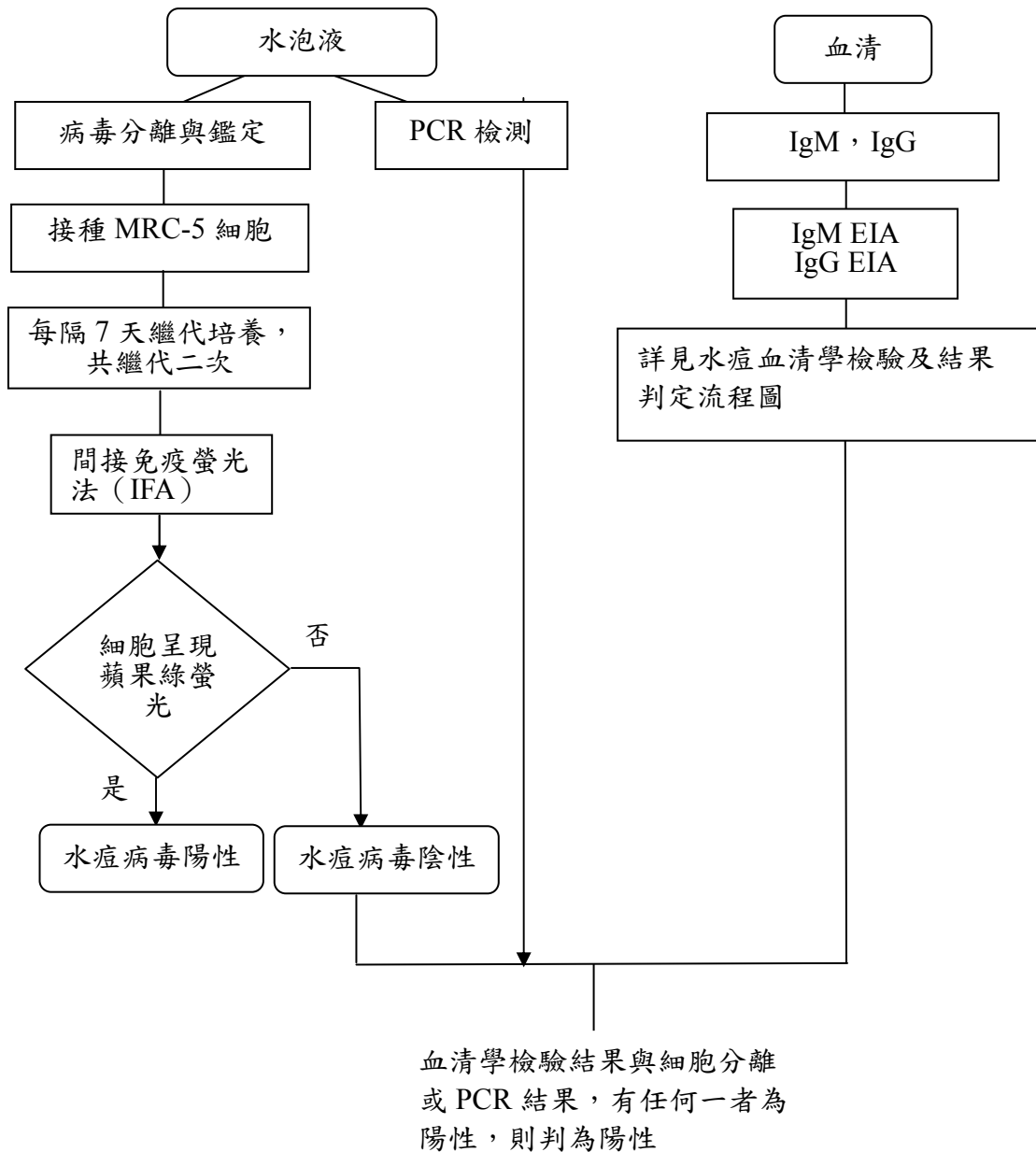
檢驗者：

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：	水痘病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 860 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 水痘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：	水痘病毒分子生物學核酸檢測 (Nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 861 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巢式聚合酶鏈反應 (nested PCR) 檢測檢體中是否有水痘病毒。

2 適用檢體種類

適用之檢體種類包括水泡液、水泡底部細胞、腦脊髓液等。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用分子生物學技術 PCR 高敏感度的方法來檢測檢體中的水痘病毒 DNA。PCR 之原理為設計專一性之引子 (primers)，把檢體中的病毒 cDNA 擴增放大。

5 試劑耗材

5.1 試劑

5.1.1 QIAmp viral DNA kit。

5.1.2 PCR kit。

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

5.1.4 陽性對照組 (positive control)：採用水痘病毒株作對照；陰性對照組 (negative control)：以水作陰性對照。

5.1.5 Agarose。

5.1.6 DEPC 水。

5.1.7 無菌 PCR 反應管。

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

5.1.9 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.1.10 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>。

7.2 檢體前處理

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒分子生物學核酸檢測 (Nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 862 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 水泡液

7.2.2.1 棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。

7.2.2.2 分裝標示號碼，取 200 μ L，其餘保存於-80°C。

7.2.3 腦脊髓液

7.2.3.1 無特殊前處理，取 200 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。

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 檢驗步驟

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

9.1.1 取 20 μ L Proteinase K 於 1.5 mL 微量離心管，依序加入檢體 200 μ L 與 Buffer AL 混合均勻。

9.1.2 56°C 加熱 10 min。

9.1.3 短暫離心（spin down），後加入 200 酒精（96%-100%）混合均勻。

9.1.4 短暫離心（spin down）後，將液體移置 Spincolumn。以 8,000 rpm 離心 1 min 後丟棄濾液收集管。

9.1.5 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。

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

9.1.7 更換新的收集管後再以 14,000 rpm 離心 1 min，以徹底去除膜上殘留酒精。

9.1.8 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）。

9.1.9 該濾液檢體即可進行聚合酶鏈反應或存於-20°C 備用。

9.2 聚合酶鏈鎖反應（PCR）（以 Qiagen HotStarTaq PCR kit 為例）。

（1）試劑添加量

RNase-free H₂O 18.0 μ L

2X Master mix 25.0 μ L

Forward primer gpO1（10 μ M） 1.0 μ L

Reverse primer gpO2（10 μ M） 1.0 μ L

DNA sample 5.0 μ L

50.0 μ L

（2）取 5 μ L DNA 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）。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒分子生物學核酸檢測 (Nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 863 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- (3) 使用 PCR thermal cycler。
 - (a) Taq 活化作用, 95°C 15 min。
 - (b) Denaturation, 95°C 30 sec。
 - (c) Annealing, 65°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。

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	18.0 µL
2X Master mix	25.0 µL
Forward primer gpI1 (10 µM)	1.0 µL
Reverse primer gpI2 (10 µM)	1.0 µL
DNA sample (1 st PCR product)	5.0 µL
	50.0 µL

- (2) 取 5 µL 9.2 步驟所得的 PCR 反應產物做模板，加入引子組 (primers 參考引子組序列表) 與 PCR 試劑試劑添加量如 (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, 65°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。
- (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。

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

PCR 產物各取 5 µL，在 1.5% 洋菜膠進行分析，檢視分析結果。水痘第一次增幅產物片段約 680 bp，第二次增幅產物片段約 480 bp，若出現上述 PCR 產物，檢驗結果為陽性。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒分子生物學核酸檢測 (Nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 864 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10 注意事項

10.1 序列分析：將經 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

Ito M, Nishihara H, Mizutani K, Kitamura K, Ihara T, Kamiya H, Sakurai M. 1995. Detection of varicella-zoster virus (VZV) DNA in throat swabs and peripheral blood mononuclear cells of immunocompromised patients with herpes zoster by polymerase chain reaction. Clin Diagn Virol 4: 105-112.

12 附錄

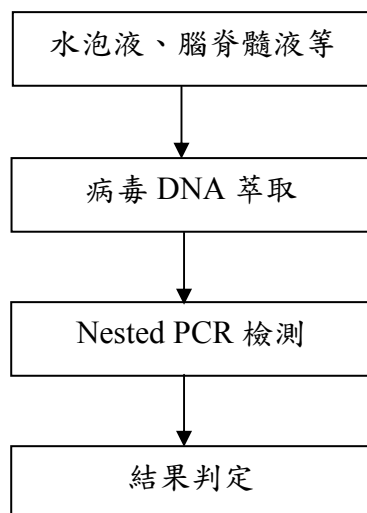
12.1 水痘病毒鑑定流程圖。

12.2 水痘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：	水痘病毒分子生物學核酸檢測 (Nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 865 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 12.1 水痘病毒鑑定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒分子生物學核酸檢測 (Nested PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 866 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附件 12.2 水痘病毒診斷用引子組序列表

一、First round PCR primer

gpO1:5'-CCGTATATGAGCCTTACTACCATTTC-3'

gpO2:5'-GAGTTCATCAAACAGTGTGCTCGTG-3'

二、Second round nested-PCR primer

gpI1: 5'-TATGGCCACGTAATGATTATGATGG-3'

gpI2: 5'-CCACGTCTTGAAAGCATGTTGTATG-3'

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 867 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) 檢測人體是否有水痘專一性 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。再利用吸覆有水痘病毒抗原的微量盤與待測血清中具有的水痘專一性 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-VZV-virus/IgM : Dade Behring, OWLW 15, Germany, 4°C 儲存」。

- (1) Anti-VZV virus/IgM test plate : 2 x 6 strips。
- (2) Anti-VZV virus reference P/P : 0.65 mL。
- (3) Anti-VZV 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.。
- (7) Empty bottle for the working Chromogen solution : 1 pcs.。
- (8) Instruction for use : 1 pcs.。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 868 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 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 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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 869 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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：水痘 IgM 陽性，水痘 IgM 陰性，水痘 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 水痘 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。

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 870 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12.4

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

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 水痘病毒 IgM 抗體試驗（間接酵素免疫分析法）流程圖。
- 15.4 水痘 ELISA 實驗紀錄表。
- 15.5 水痘 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：	水痘病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日		
	頁次：第 871 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日		

附錄 15.1 檢體排列位置圖

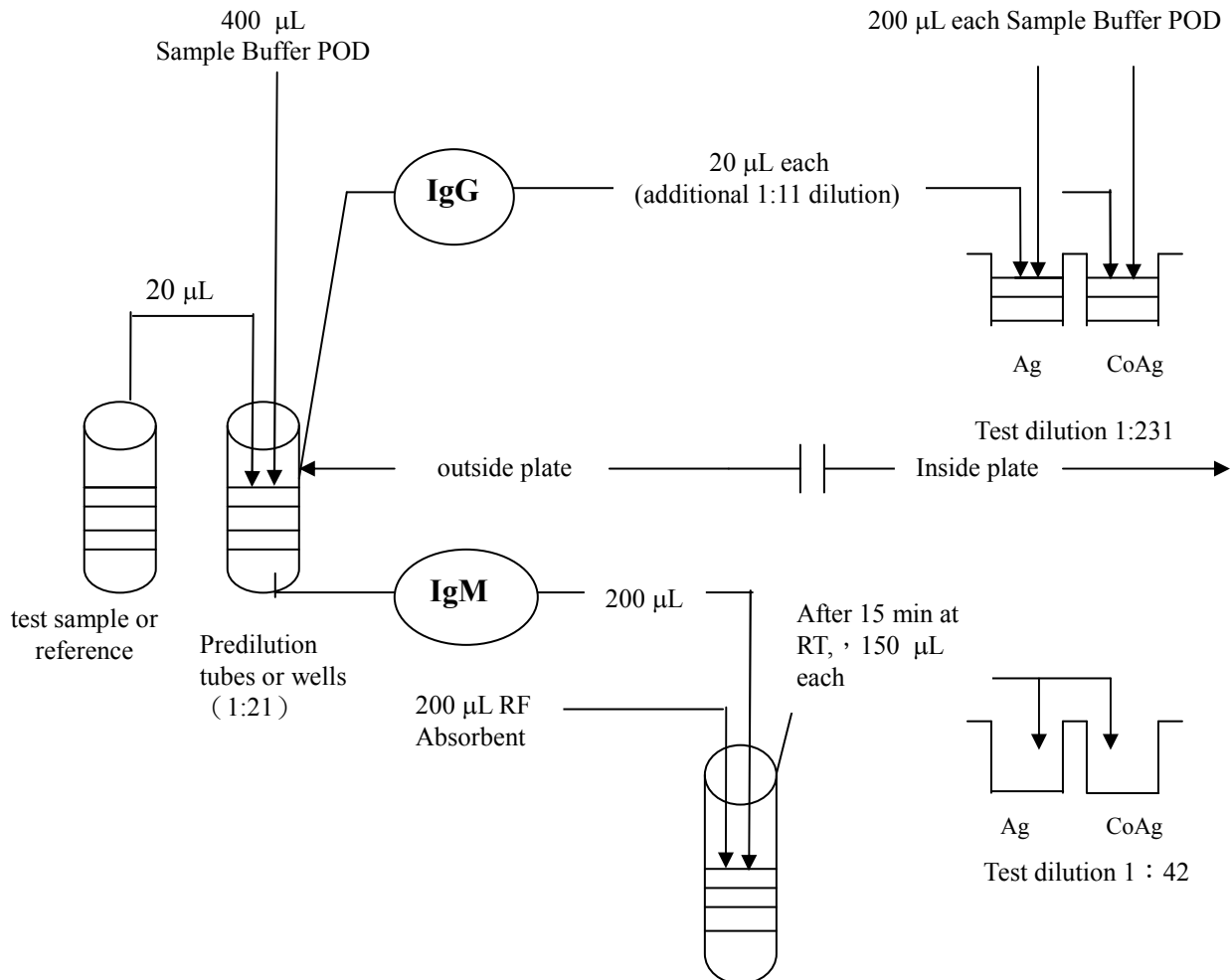
		1		2		3		4		5		6	
Reference P/P	A												
In-house positive	B												
	C												
	D												
	E												
	F												
	G												
	H												
		antigen	control antigen										Reference P/P

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：	水痘病毒 IgM 抗體檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 872 頁/共 1091 頁	(Indirect ELISA)	修訂日期： 年 月 日

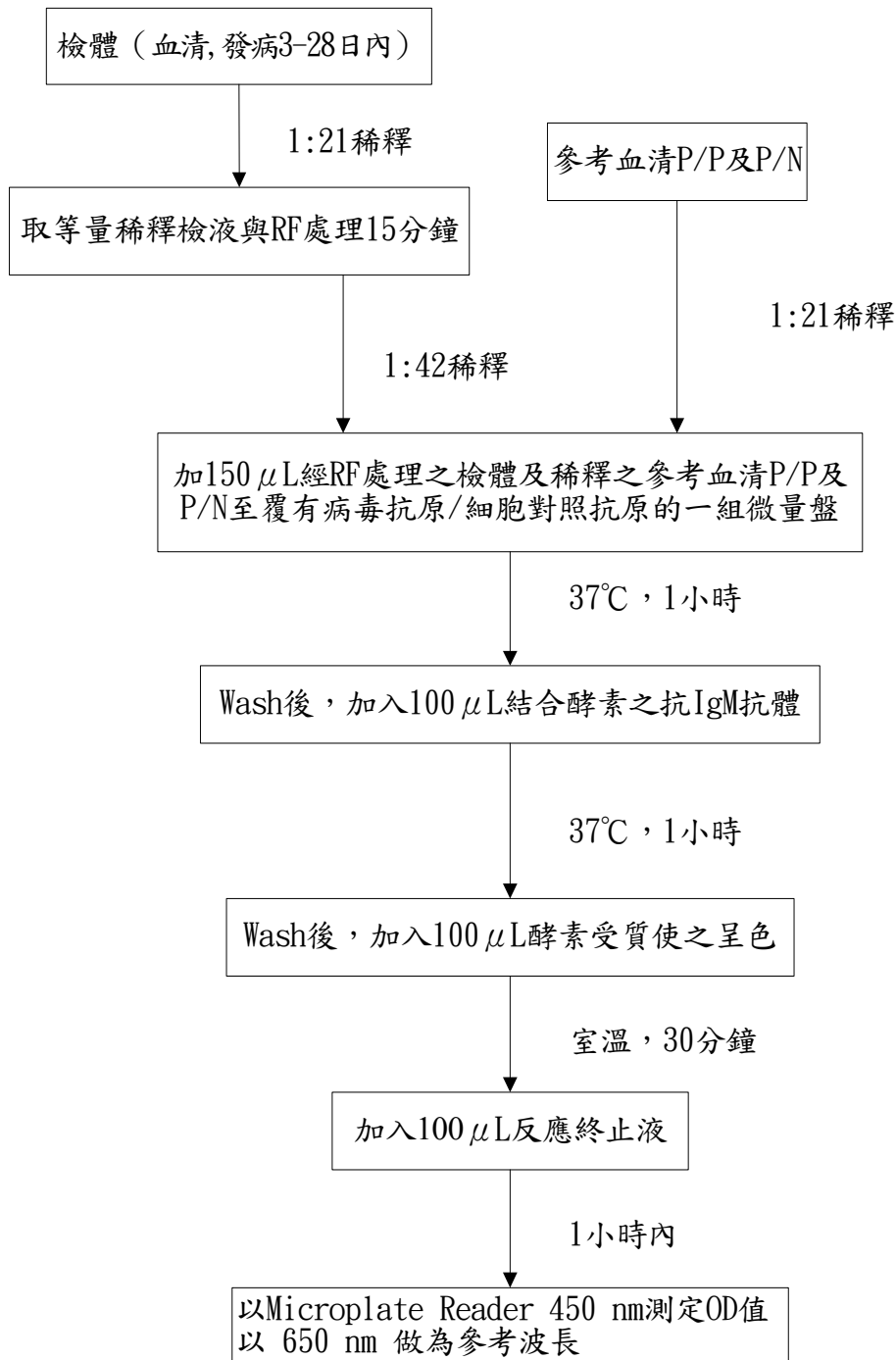
附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 873 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 水痘病毒 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：	水痘病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日
	頁次：第 874 頁/共 1091 頁		

附錄 15.4 水痘 ELISA 實驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

水痘ELISA實驗紀錄表

Date：

VZV IgM						VZV IgG				
Name	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				

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

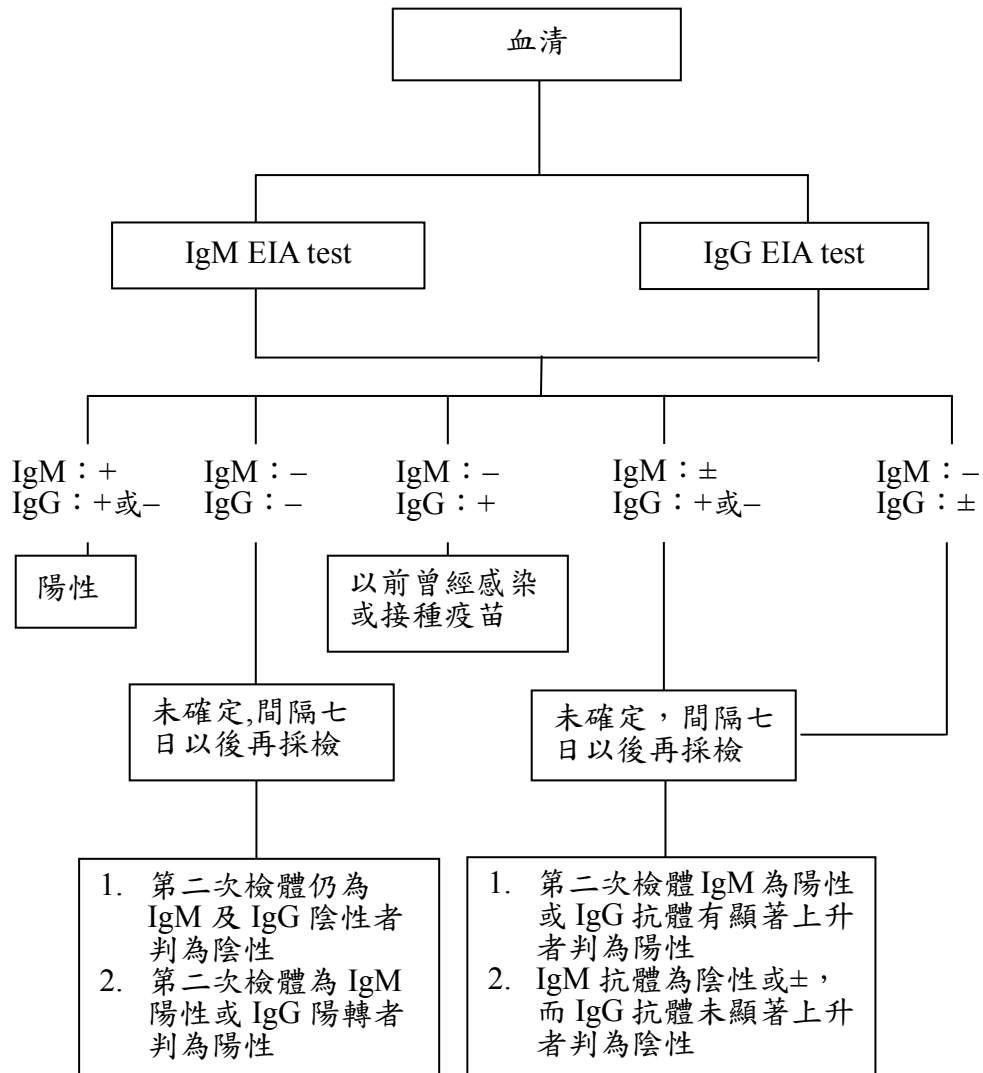
檢驗者：

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：	水痘病毒 IgM 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 875 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 水痘病毒血清學檢驗結果判定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 876 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) 檢測人體是否有水痘專一性 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 孔微量盤底覆有水痘病毒抗原的測試盤與待測血清中具有的水痘專一性 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-VZV-virus/IgG : Dade Behring, OWLT 15, Germany, 4°C 儲存」

(1) Anti-VZV virus/IgG test plate : 2 x 6 Strips。

(2) Anti-VZV virus teference 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：	水痘病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 877 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：50-1,000 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：	水痘病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 878 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：水痘 IgG 陽性，水痘 IgG 陰性，水痘 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 水痘 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：	水痘病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 879 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	$=0.8 \times \Delta A$ 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 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 水痘病毒 IgG 抗體試驗（間接酵素免疫分析法）流程圖。
- 15.4 水痘 ELISA 實驗紀錄表。
- 15.5 水痘 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：	水痘病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日	
	頁次：第 880 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日	

附錄 15.1 檢體排列位置圖

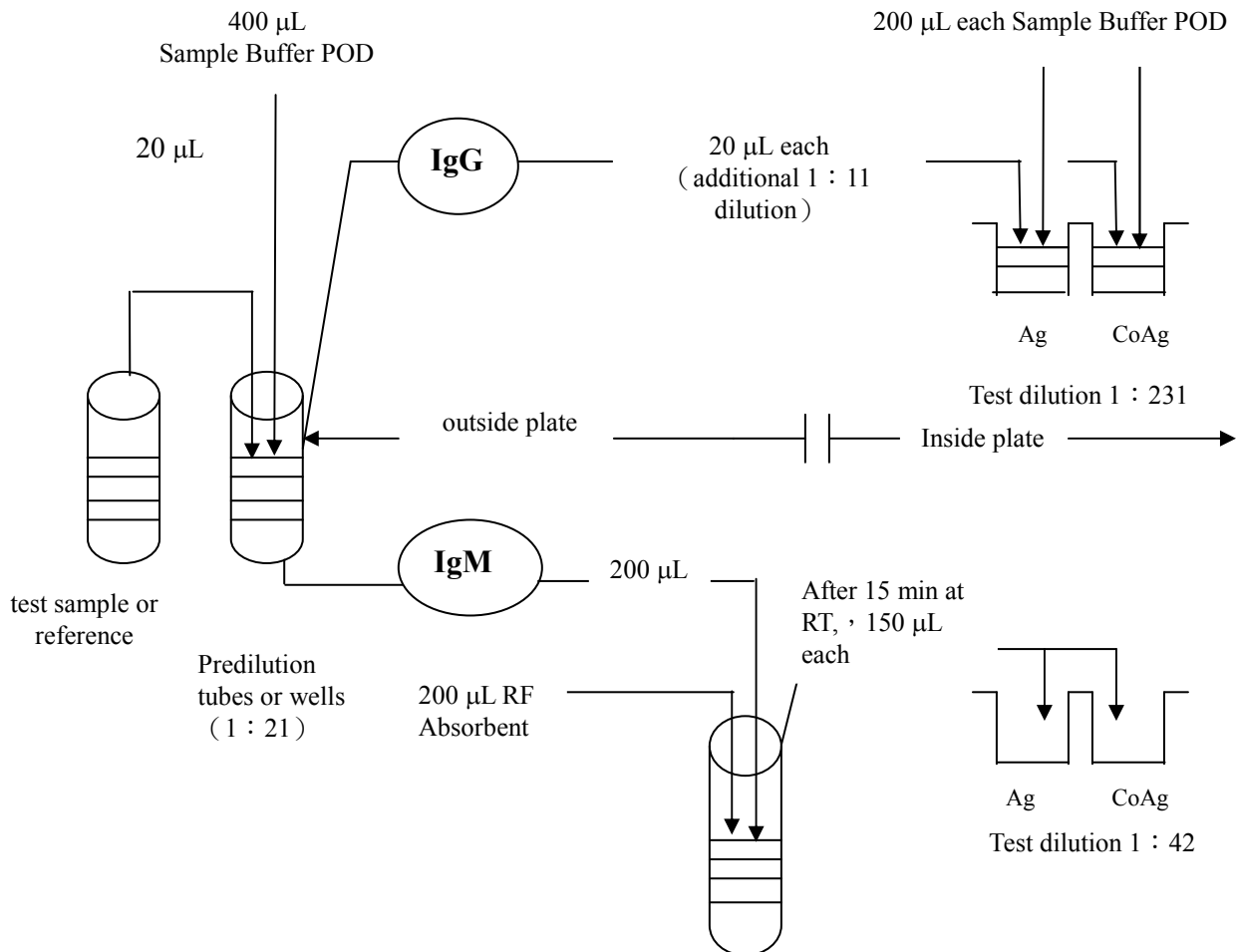
		1	2	3	4	5	6	
Reference P/N In-house positive	A							
	B							
	C							
	D							
	E							
	F							
	G							
	H							
		antigen	control antigen					Reference P/N

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：	水痘病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 881 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

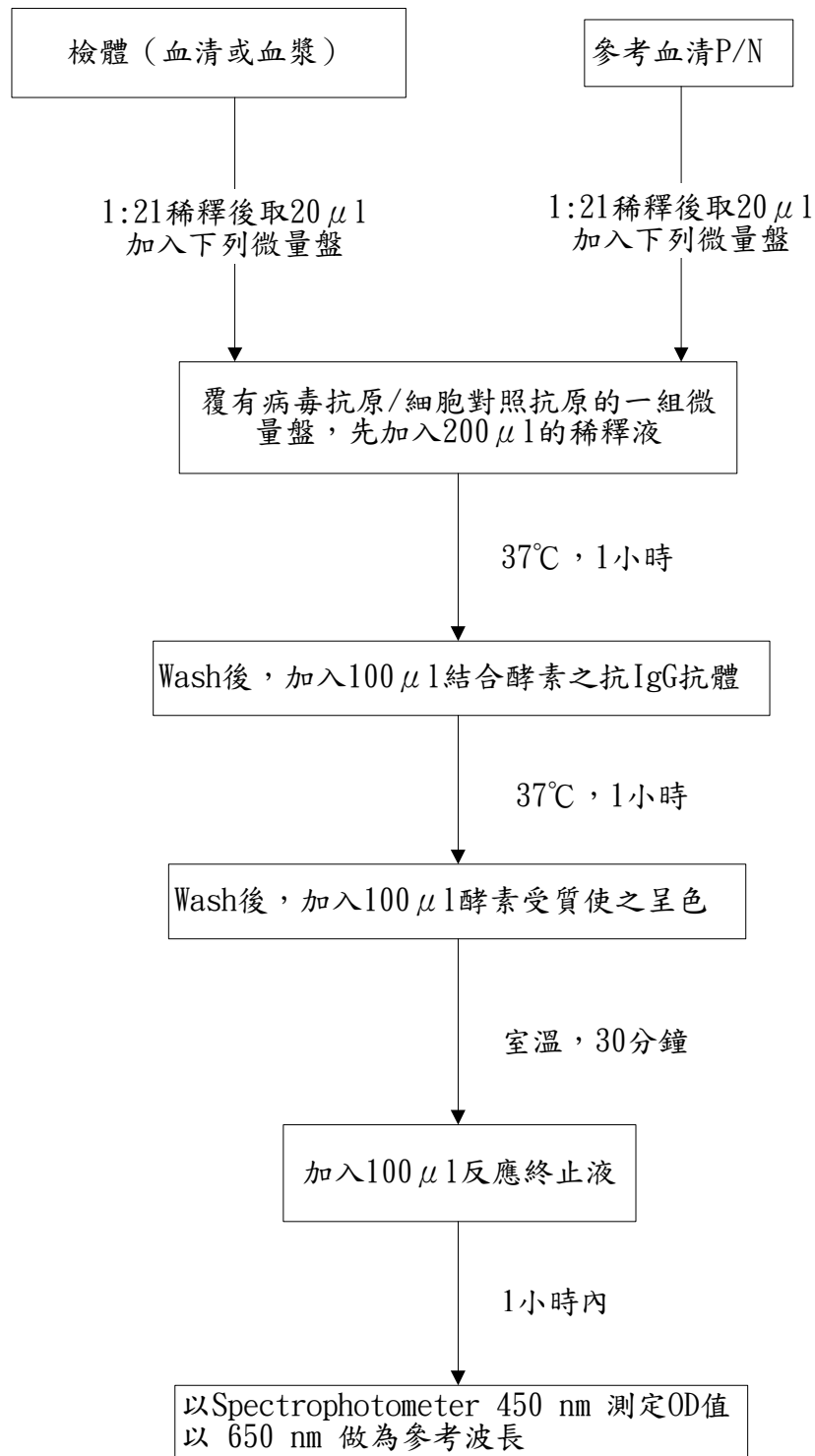
附錄 15.2 檢體稀釋至加入微量盤步驟圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	水痘病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 882 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 水痘病毒 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：	水痘病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 883 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 水痘 ELISA 實驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

水痘ELISA實驗紀錄表

VZV IgM						VZV IgG				
Name	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				

Validation Check

1. $P/P \geq 0.2$

2. P/P within lower and upper margin

3. Individual P/P within $\pm 20\%$ mean P/P

Validation Check

1. $P/N \geq 0.5$

2. P/N within lower and upper margin

3. Individual P/N within $\pm 20\%$ mean P/N

Kit Batch :

Expiry :

Lower margin :

Upper margin :

Nominal Value :

Mean P/P :

Correction Factor :

Kit Batch :

Expiry :

Lower margin :

Upper margin :

Nominal Value :

Mean P/N :

Correction Factor :

Result Interpretation

(-)Negative < 0.10 (+)POSITIVE > 0.20 (+/-)EQUIVOCAL : 0.10-0.20

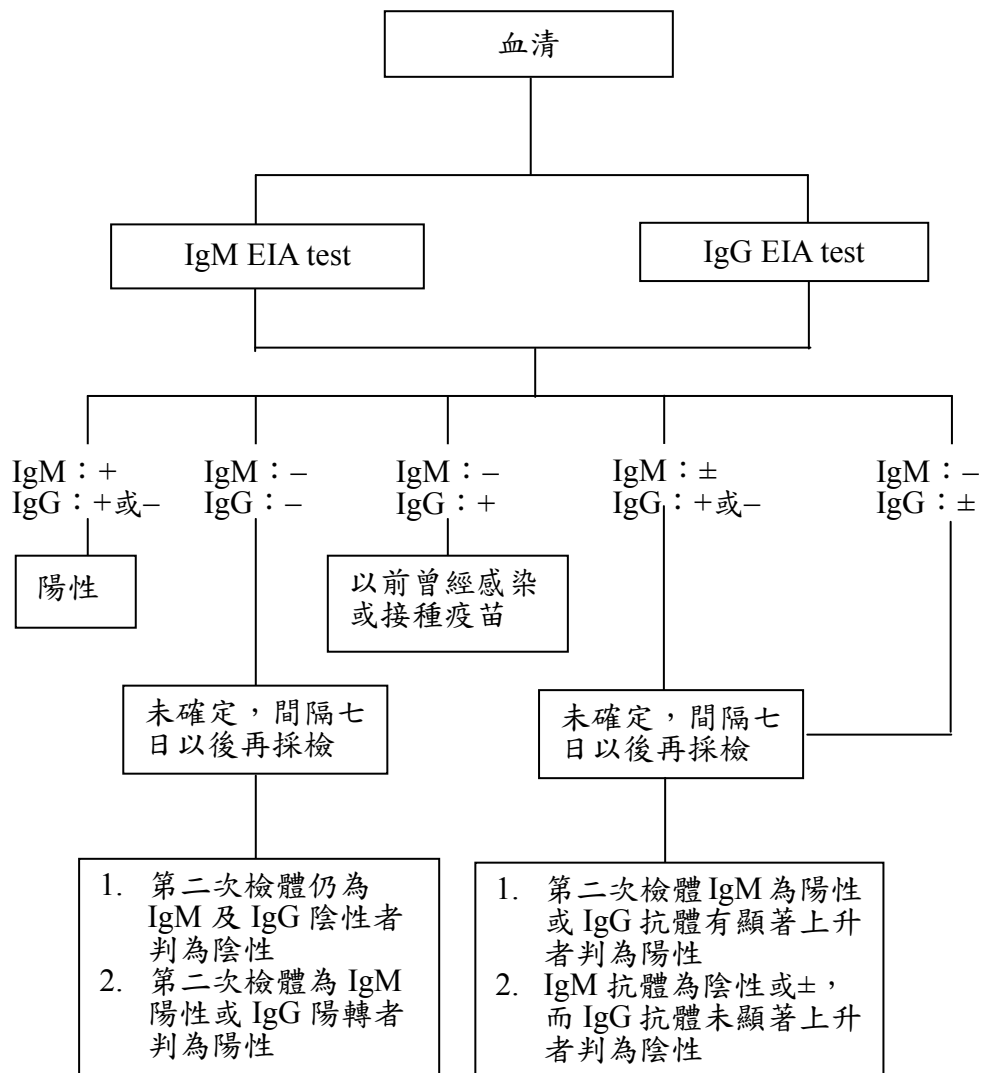
檢驗者：

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：	水痘病毒 IgG 抗體檢測 (Indirect ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 884 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 水痘病毒血清學檢驗結果判定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	貓抓病病原體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 885 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貓抓病病原體。

2 適用檢體種類

適用於病患急性期發熱七日內且未投抗生素治療前血液，或臨床診斷為疑似病例且具有腫大淋巴結之配合案例淋巴組織檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用培養方法分離貓抓病病原體，並以聚合酶鏈鎖反應法鑑定。

5 試劑耗材

- 5.1 Medium 199, Power：Invitrogen Corp., Cat no. 31100-035。
- 5.2 Heart infusion agar，10%兔血液。
- 5.3 巧克力培養基。
- 5.4 透氣膠帶。
- 5.5 無菌 20 μ L、200 μ L、1,000 μ L Tips。
- 5.6 無菌 1.5 mL 微量離心管。
- 5.7 無菌拋棄式研磨棒。
- 5.8 水質：25°C 蒸餾水或 RO 逆滲透可達 18 Ω -CM 以上超純水。
- 5.9 陽性對照組 (positive control DNA)： *Bartonella henselae* (ATCC49882)。
- 5.10 陰性對照組 (negative control DNA)：DNase，RNase-free H₂O。
- 5.11 PCR 專用八連排反應管。
- 5.12 PCR 專用八連排反應蓋。
- 5.13 GoTaq green master mix：Promega Corp., Cat no. M7122。
- 5.14 BhCS.781p 引子序列：GGGGACCAGCTCATGGTGG，10 μ M。
- 5.15 BhCS.1137n 引子序列：AATGCAAAAAGAACAGTAAACA，10 μ M。

6 儀器設備

- 6.1 35°C、CO₂ 培養箱。
- 6.2 離心機。
- 6.3 -80°C 超低溫冷凍櫃。
- 6.4 生物安全櫃。
- 6.5 桌上型離心機。
- 6.6 4°C 冰箱。
- 6.7 -20°C 冷凍櫃。
- 6.8 電泳槽。
- 6.9 微量吸管 Pipetman：需 1,000 μ L、200 μ L、30 μ L 等三種規格。
- 6.10 核酸增幅儀：Biometra。
- 6.11 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：	貓抓病病原體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 886 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

7 環境與設施安全

7.1 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 含有 EDTA 之血液放置-80 度超低溫冷凍櫃中至少 24 hr。

10.1.2 培養前將檢體取出於室溫回溫，以 3,800 rpm 離心 75 min。

10.1.3 將淋巴組織研磨成碎屑。

10.2 分離培養

10.2.1 檢體接種：

(1) 血液檢體捨去上清液，取出 50 μ L 血球與 50 μ L Medium 199 培養液混合，分別取 50 μ L 塗滿 Heart infusion agar 和巧克力培養基。

(2) 研磨後的淋巴組織加入 50 μ L Medium 199 培養液混合，分別取 25 μ L 塗滿 Heart infusion agar 和巧克力培養基。

10.2.2 培養：培養基貼上透氣膠帶保持溼度，置於 35°C，5%二氧化碳培養箱培養。

10.2.3 觀察：每隔 3-4 天觀察一次，至少需培養 70-84 天，有可疑針尖樣菌落則進行鑑定。

10.3 鑑定

10.3.1 菌落型態及染色：菌落型態有兩種類型，一種為細密平滑而銀亮的小點狀菌落，另一種為較為乾燥且外膜稍硬的乳白色菌落。

10.3.2 繼代培養：挑取三個單一菌落分別進行繼代培養，以便進行 PCR 鑑定。

10.3.3 革蘭氏染色：挑選疑似之菌落以革蘭氏染劑染色，特性為革蘭氏陰性，短小多型性短桿菌。

10.3.4 PCR 鑑定：

(1) 刮取數個可疑新鮮菌落，放入含 100 μ L 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	貓抓病病原體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 887 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(2) PCR 反應混和物配製如下：

Component	Final conc. or volume
Template (陽性 DNA、水、檢體)	2 μ L
Each primer (10 μ M)	1 μ L
GoTaq green master mix	25 μ L
加無菌水	21 μ L

(3) 放入儀器中進行反應，反應條件設定：

(a) 95°C/2 min，1 Cycle。

(b) 95°C/30 sec，56°C/30 sec，72°C/30 sec，30 Cycles。

(4) PCR 電泳分析，若電泳分析發現具 380-400 bp 之產物，須送定序加以確認。

11 結果判定

- 11.1 判讀標準：根據菌落形態、革蘭氏染色特性、PCR 鑑定、電泳分析與定序結果進行病原分離的結果，判讀是陽性或是陰性。
- 11.2 報告核發：貓抓病陽性，貓抓病陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於貓抓病紀錄表及列印表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 判定感染應配合臨床症狀，培養菌落性狀。
- 12.2 PCR 以陽性菌株 DNA 做對照組檢驗比較，必要時可利用 16S DNA 加以鑑別。

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

Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. 1995. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. J Clin Microbiol 33: 1797-1803.

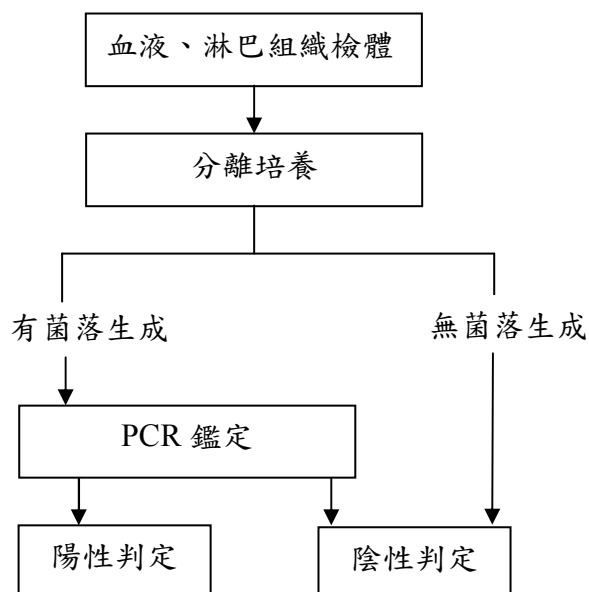
15 附錄

- 15.1 貓抓病病原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：	貓抓病病原體分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 888 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 貓抓病病原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：	貓抓病病原體抗體檢測 (IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 889 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測貓抓病抗體。

2 適用檢體種類

適用於符合貓抓病病徵之病患血清檢體。

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，而以螢光顯微鏡觀察結果。

5 試劑耗材

- 5.1 無菌微量吸管尖 (tip)：10 μ L、200 μ L。
- 5.2 10X PBS 0.1 M pH 7.4：GibcoBRL，USA。
- 5.3 抗人類 IgG 螢光標幟抗體：Focus，USA。
- 5.4 抗人類 IgM 螢光標幟抗體：Focus，USA。
- 5.5 陽性對照樣品：Focus，USA。
- 5.6 陰性對照樣品：Focus，USA。
- 5.7 IgG 稀釋液：Focus，USA。
- 5.8 IgM 稀釋液：Focus，USA。
- 5.9 Bartonella IgG 螢光抗原玻片，Focus，USA。
- 5.10 Bartonella IgM 螢光抗原玻片，Focus，USA。
- 5.11 96 孔微量滴定盤 (microtiter plate)：U 型。
- 5.12 蓋玻片。
- 5.13 封片膠，Focus，USA。
- 5.14 無菌蒸餾水。
- 5.15 手套。

6 儀器設備

- 6.1 微量吸管 (pipetteman)：300 μ L、30 μ L。
- 6.2 計時器。
- 6.3 螢光顯微鏡。
- 6.4 不銹鋼垃圾筒。
- 6.5 震盪器。
- 6.6 37°C 溫箱。
- 6.7 保濕盒。

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：	貓抓病病原體抗體檢測 (IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 890 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

8.1 血清檢體沒有添加抗凝劑，沒有溶血且量不少於 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

9.1 低溫運送及保存。

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 採集後之檢體，以 2,000 rpm 離心 30 min，以分離出的血清備用。

10.1.2 將抗原玻片取出並風乾。

10.1.3 試藥回溫。

10.2 檢驗步驟

10.2.1 篩檢檢驗：同時分開檢測 IgG 抗體與 IgM 抗體。

(1) 患者血清稀釋。

(a) 檢測 IgG 以 IgG 稀釋液做血清 1:64 稀釋。

(b) 檢測 IgM 以 IgM 稀釋液做血清 1:20 稀釋，靜置 5 min。

(2) 陽性對照樣品以 PBS 做 1:8 稀釋。

(3) 將陽性對照樣品、稀釋之陽性對照樣品、陰性對照樣品、待測血清各取 20 μ L 分別點入 8 孔抗原玻片各孔格上。

(a) 檢測 IgG 者，各樣品分別點入 IgG 玻片孔格。

(b) 檢測 IgM 者，各樣品分別點入 IgM 玻片孔格。

(4) 將玻片置於保濕盒，並於 37°C 溫箱作用。

(a) 檢測 IgG 反應 30 min。

(b) 檢測 IgM 反應 90 min。

(5) 吸乾玻片上反應液體。

(6) 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。

(7) 以蒸餾水沖洗玻片，風乾。

(8) 加二級螢光標幟抗體 20 μ L。

(a) 檢測 IgG 者，抗人類 IgG 螢光標幟抗體分別點入 IgG 玻片孔格。

(b) 檢測 IgM 者，抗人類 IgM 螢光標幟抗體分別點入 IgM 玻片孔格。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	貓抓病病原體抗體檢測 (IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 891 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- (9) 將玻片置於保濕盒，並於 37°C 溫箱作用 30 min。
- (10) 吸乾玻片上反應液體。
- (11) 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。
- (12) 以蒸餾水沖洗玻片，風乾。
- (13) 加封片膠以蓋玻片封片後，以螢光顯微鏡 400 倍鏡檢。
- (14) 結果判定：螢光反應高於（含等於）稀釋之陽性對照品者，為疑似陽性病例，需進一步測定力價。

10.2.2 血清抗體力價確認：僅需進行疑似陽性抗體種類之力價確認。

- (1) 患者血清稀釋。
 - (a) 檢測 IgG 以 IgG 稀釋液做血清 1:64 稀釋後，自 1:128 始以 PBS 做 2 倍血清序列稀釋至 1:1,024 或以上。
 - (b) 檢測 IgM 以 IgM 稀釋液做血清 1:20 稀釋後，以 PBS 作 2 倍血清序列稀釋。
- (2) 參照 10.2.1 之 (2) 到 (14) 步驟進行檢驗以判定抗體力價。

11 結果判定

11.1 判讀標準：

- 11.1.1 陽性的判定：IgM $\geq$ 1:20 以上或配對血清 IgG 力價有 4 倍以上上升者，判為陽性。
- 11.1.2 陰性的判定：IgM 力價 $\leq$ 1:20 以及 IgG 力價皆低於 1:64 者，判為陰性。
- 11.1.3 無法判定：IgM $\leq$ 1:20 且配對血清 IgG 力價無 4 倍以上上升者，則判為無法判定。

11.2 報告核發：貓抓病抗體陰性，貓抓病抗體未確定需再採檢，貓抓病抗體不明（無法確定），貓抓病抗體陽性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於貓抓病紀錄表及列印表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 每次螢光判定須與稀釋 8 倍之陽性對照樣品比對，螢光強度高於等於稀釋之陽性對照樣品者，方為陽性螢光反應。
- 12.2 未稀釋之陽性對照樣品螢光強度，遠高於稀釋 8 倍之陽性對照樣品。
- 12.3 陰性對照樣品不得有螢光反應。

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

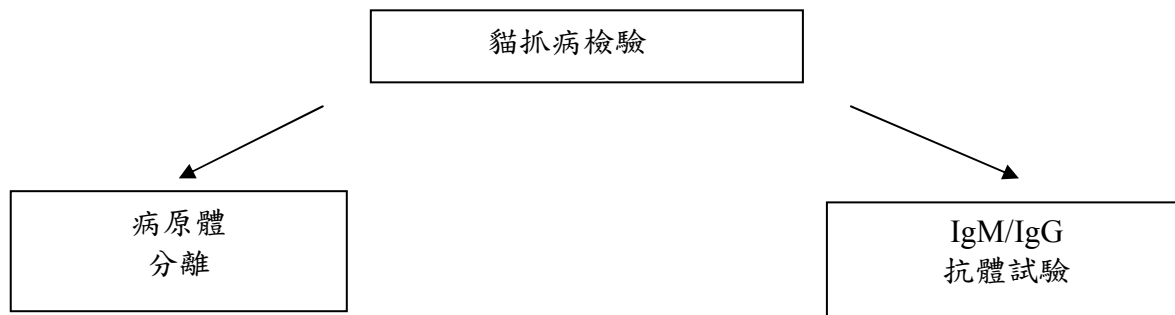
	編號：	貓抓病病原體抗體檢測 (IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 892 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 14.1 Maurin M, Rolain JM, Raoult D. 2002. Comparison of in-house and commercial slides for detection by immunofluorescence of immunoglobulins G and M against *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. Clin Diagn Lab Immunol 9: 1004-1009.
- 14.2 *Bartonella* IFA IgG 檢驗套組說明書，Cat. no. IF1300G (Focus®)。
- 14.3 *Bartonella* IFA IgM 檢驗套組說明書，Cat. no. IF1300M (Focus®)。
- 15 附錄
 - 15.1 貓抓病檢驗流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	貓抓病病原體抗體檢測 (IFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 893 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 貓抓病檢驗流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	弓形蟲分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 894 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，檢測是否弓形蟲(*Toxoplasma gondii*)存在。

2 檢體種類

適用於體液(血液、腦脊髓液、臍帶血或羊水)、組織檢體(淋巴結、胎盤)。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用弓形蟲可感染哺乳動物特性，於 6-9 週大 BALB/c 品系小白鼠腹腔接種病材，1 週後以聚合酶連鎖反應檢測病鼠之腹水。

5 試劑耗材

5.1 Antibiotic saline。

5.2 0.5×24 mm 針頭。

5.3 5 mL 注射器。

5.4 無菌剪刀。

5.5 無菌鉗子。

6 步驟

將待檢體液或組織懸浮液，接種於小白鼠腹腔內，造成感染並找到病原體，第一代接種呈陰性時，應盲目繼代 3 次。或做組織(Hela 細胞)培養以分離、鑑定弓形蟲。

6.1 使用無菌剪刀剪取少量組織(約 0.5 立方公分)至研鉢。

6.2 研磨組織後加入約 1.5–2 mL Antibiotic saline，混合均勻後、靜置。(如果為腦脊髓液、羊水，於 2,000 rpm 離心 10 min，取沉澱物加入約 1.5-2 mL Antibiotic saline)。

6.3 以 2 mL 注射器與 0.5×24 mm 針頭吸取上清液，以腹腔注射接種 3 隻小鼠，每隻 0.5 mL，另以 0.5 mL Antibiotic saline 接種 3 隻小鼠當作對照。

6.4 6-8 週後，取小鼠腹水、腦及心臟組織進行聚合酶連鎖反應。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	弓型蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢式 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 895 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

建立分子生物學檢驗方法，以利法定傳染病弓形蟲 (*Toxoplasma gondii*) 個案確認及防疫工作之進行。

2 適用範圍

血液、腦脊髓液、組織、羊水、臍帶血檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

針對弓形蟲的B1基因設計引子對，以巢式 (nested) 兩階段式 (two step) 以增加敏感度，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 1.5mL 離心管

5.2 核酸萃取試劑組：QIAampTm blood/tissue kit (Qiagen)。

5.2.1 清洗緩衝液 I (wash buffer I)。

5.2.2 清洗緩衝液 II (wash buffer II)。

5.2.3 溶解緩衝液 (lysis buffer)。

5.2.4 萃取緩衝液 (elution buffer)。

5.3 PCR 試劑

5.3.1 10 μ M primer。

5.3.2 10X PCR buffer。

5.3.3 1.25 mM dNTP (dGTP, dCTP, dTTP, dATP)。

5.3.4 25 mM MgCl₂。

5.3.5 AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 units/ μ L)。

5.3.6 純水 (pure water)。

5.4 電泳分析試劑。

5.4.1 洋菜膠 (agarose)。

5.4.2 1X TBE 電泳緩衝液：1X TBE (tris-borate-EDTA) buffer。

5.4.3 DNA 分子量指標：100bp Ladder marker。

5.4.4 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-Well GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, CA, USA)。

6.5 電泳槽 (Mupid II)。

6.6 紫外線照相系統。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	弓型蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢式 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 896 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

7 環境與設施安全
無。

8 檢體採集

檢體：血液、腦脊髓液、組織、羊水、臍帶血檢體冷藏輸送。

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>。

9 檢驗步驟

9.1 檢體 DNA 萃取：

9.2 採用 QIAamp™ blood kit (Qiagen)，依據其標準步驟萃取 DNA。

9.3 第一階段 PCR：

9.3.1 配置 PCR 反應混合液，每一檢體所需反應液成分如下：

PCR 試劑	體積(μL)
10 μM TG1 primer	1
10 μM TG2 primer	1
10X PCR buffer	4.5
1.25 mM dNTP	6
25 mM MgCl ₂	1.5
AmpliTaq gold (5 U/μL)	0.5
Pure water	5.5
總體積	20.0

9.3.2 分裝 20 μL PCR 反應混合液至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管。

9.3.3 每一 PCR 反應管加入 5 μL 檢體 DNA。

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 25 μL)：

PCR 反應期	溫度(°C)	時間(分：sec)	循環數
酵素活化	94	5:00	1
DNA 解離	94	01:00	35
Primer 黏合	52	01:00	
聚合反應	72	01:00	
後聚合反應	72	10:00	1
停止反應	4	∞	1

9.4 第二階段 PCR：

9.4.1 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：

PCR 試劑	體積 (μL)
10 μM TG3 primer	1
10 μM TG4 primer	1
10X PCR buffer	4.5
1.25 mM dNTP	6
25 mM MgCl ₂	1.5

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	弓型蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢式 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 897 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

AmpliTaq gold (5 U/μL)	0.5
Pure water	5.5
總體積	20.0

9.4.2 分裝 PCR 反應混合液 20.0 μL 至 0.2 mL 薄壁 PCR 反應管。

9.4.3 每一 PCR 反應管加入 5.0 μL 第一階段 PCR 產物。

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 25 μL)：

PCR 反應期	溫度(°C)	時間 (分:sec)	循環數
酵素活化	94	5:00	1
DNA 解離	94	01:00	35
Primer 粘合	52	01:00	
聚合反應	72	01:00	
後聚合反應	72	10:00	1
停止反應	4	∞	1

9.5 PCR 產物電泳分析：

9.5.1 配製 2% 洋菜膠片 (含 1 倍 TBE 電泳緩衝液)。

9.5.2 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 100bp Ladder marker 一併於 100 伏特電壓下 (1 倍 TBE 電泳緩衝液)，電泳 30 min。

9.5.3 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。

9.5.4 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：*T. gondii* ATCC 蟲株。

10.3 陰性對照：純水。

10.4 每次操作時加以記錄，並定期由寄生蟲實驗室室主管審閱。

11 結果判定

11.1 以第二階段 PCR 反應產物長度與 DNA 分子量指標比較判讀。

11.2 *T. gondii* 陽性：97 bp。(附錄 13.1)。

11.3 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 (*T. gondii*) 或陰性 (未分離到病原體)。

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 附錄

13.1 弓形蟲分子生物學確認檢驗所用引子之序列。

附錄 13.1 弓形蟲分子生物學確認檢驗所用引子之序列

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	弓型蟲分子生物學核酸檢測 (兩階段巢式 PCR 法)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 898 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Category	Primer pairs(forward+reverse)	PCR product size
1st step PCR	5'-CCTTTGAATCCCAAGCAAAACATGAG-3'	194 bp
	5'-GCGAGCCAAGACATCCATTGCTGA-3	
2nd step PCR	5'-GTGATAGTATCGAAAGGTAT-3'	97 bp
	5'-ACTCTCTCTCAAATGTTTCCT-3'	

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	弓形蟲 IgM 及 IgG 抗體檢測 (EIA 及 ELFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 899 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

在採自疑似受感染個案之檢體中，檢測是否存在抗弓形蟲(*Toxoplasma gondii*) 抗體 IgM 及 IgG。

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

結合酵素免疫分析 (EIA) 和螢光檢測法 (enzyme-linked fluorescent assay, ELFA)，透過 SPR (solid phase receptacle) 在分析中當做固相及吸量液體裝置。所有檢測步驟由儀器自動執行。反應試劑在 SPR 內外抽吸若干次。在 Vidas® Toxo IgM kit，血清檢體於稀釋過程後，其中的 IgM 會被 SPR 內預先吸附之多株抗體捕捉。抗弓形蟲 IgM 可經去活性的弓形蟲抗原 (RH strain) 特異性偵測，該抗原可與標示 Alkaline phosphatase 的抗弓形蟲單株抗體 anti-30 結合，酵素會催化螢光受質 (4-methylumbelliferyl phosphate) 水解為 4-methylumbelliferone。結果可於波長 450nm 測量吸光度值。在 Vidas® Toxo IgG kit，血清或血漿檢體於稀釋過程後，抗弓形蟲 IgG 會被 SPR 內預先吸附之弓形蟲抗原捕捉。標示 Alkaline phosphatase 的小鼠抗人類 IgG 會與吸著於 SPR 壁上之人類 IgG 結合。最後加入的螢光受質 (4-methylumbelliferyl phosphate) 可被酵素催化水解為 4-methylumbelliferone。結果可於波長 450 nm 測量吸光度值。

5 試劑耗材

5.1 試劑種類和成分：

60 TXG Strips	Ready-to-use
60 TXG SPRs 2x30	Ready-to-use SPR 內部吸附弓形蟲細胞膜和細胞質抗原 (RH Sabin 株)
C1 control TXG 陽性對照 1 × 2 mL (液體) C2 control TXG 陰性對照 1 × 3 mL (液體)	含抗弓形蟲抗體 IgG 的人血清* + 蛋白穩定劑 + 疊氮化鈉 1g/L 最小滴定量以 IU/mL (每毫升國際單位) 表示：信賴範圍以 IU/mL 表示標示在 MLE 卡上：“Control C1 (+) Dose Value Range” 後。 抗弓形蟲抗體 IgG 陰性的人血清* + 蛋白穩定劑 + 疊氮化鈉 1g/L。
S1 Standard TXG 校正液 1 × 1mL (液體)	含抗弓形蟲抗體 IgG 的人血清* (按 2nd WHO 國際標準) + 蛋白穩定劑 + 疊氮化鈉 1g/L 最小滴定量 IU/mL：濃度單位 IU/mL 標示在 MLE 卡上：“Calibrator (S1) Dose Value” 後。相對螢光值 (RFV) 信賴範圍標示在 MLE 卡上：“Calibrator (S1) RFV Range” 後。
1MLE card	含有工廠總校正資料的規格單，供校正用。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	弓形蟲 IgM 及 IgG 抗體檢測 (EIA 及 ELFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 900 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1Package insert	操作說明

5.2 SPR 固相包被針

5.2.1 在 Vidas®Toxo IgM kit，SPR 內部已吸附山羊抗人類 μ -chain 抗體；在 Vidas®Toxo IgG kit，內部已吸附弓形蟲細胞膜和細胞質抗原（RH Sabin 株）。

5.2.2 每一個 SPR 都被標 TXG 條碼。

5.2.3 只需從保存袋中取出需要數目的 SPR 即可。打開後務必將保存袋重新密封好。

5.3 試劑條

5.3.1 試條上有 10 個孔，上面有貼有標籤的金屬薄片密封。

5.3.2 標籤包括條碼，條碼指示所進行試驗的類型，試劑盒批號和有效日期。

5.3.3 第一個孔的金屬薄片被打孔，以利檢體的放入。

5.3.4 每個試劑條的最後一個孔都是一個比色皿 (cuvette)，可以在其中進行螢光測定。試劑條其餘的反應孔則含有分析需要的各種試劑。

6 儀器設備

6.1 Mini-Vidas 分析儀

6.2 微量吸管 (pipetteman)：1,000 μ L、200 μ L、100 μ L。

6.3 振盪器 (vortexer)。

6.4 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

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 檢體運送及保存

低溫運送及保存，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 確定該試劑標準曲線已設立好且為有效期限內。品管結果落於可接受範圍內。

10.2 核對檢體與檢驗單患者資料無誤。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	弓形蟲 IgM 及 IgG 抗體檢測 (EIA 及 ELFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 901 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.3 將檢體放入離心機中離心 (3,000 rpm、10 min)。
- 10.4 從冰箱試劑盒中取出一個試劑條 (strip) 及一支 SPR (取出後務必將包裝密封條壓緊，以免受潮)。小心不要碰觸到試劑條進行比色反應的區域 (最後一個槽位)。
- 10.5 取 100 μ L 檢體加入試劑條第一個檢體置放位置。
- 10.6 選擇一個測試室狀況為『Available』可進行新檢體分析的測試室 (例如 Section A) 作為測試檢體之用，將測試室灰色門往上打開，小心平緩的沿著凹槽將試劑條推入最底部。
- 10.7 打開 SPR 置放管外門，比照先前試劑條放置位置將 SPR 放入 SPR 置放槽內。
- 10.8 依所放置檢體之測試室，按【Start】鍵開始工作鍵。
- 10.9 待測試完成後，儀器會自動列印報告，顯示結果。
- 10.10 將使用過之試藥條及 SPR 丟棄，並將報告黏貼於檢驗單上後將報告發出。

11 結果判定

- 11.1 操作結束時，電腦自動分析結果。
- 11.2 IgM 判讀

指數	Interpretation
$i < 0.55$	陰性
$0.55 \leq i < 0.65$	可疑
$i \geq 0.65$	陽性

- 11.3 IgG 判讀

滴定量：IU/mL	Interpretation
<4	陰性
$4 \leq \text{滴定量} < 8$	可疑
≥ 8	陽性

- 11.4 報告核發：
 - 11.4.1 IgG 陽性且 IgM 陽性，則弓形蟲抗體陽性。
 - 11.4.2 兩次 IgG 抗體四倍上升，則弓形蟲抗體陽性。
 - 11.4.3 IgG 陽性且 IgM 陰性，則弓形蟲抗體為非急性期陽性。
 - 11.4.4 IgM 及 IgG 陰性，則弓形蟲抗體陰性。
- 11.5 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於弓形蟲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 每一試劑組附陽性對照液 (C1) 及陰性對照液 (C2) 各一瓶，在試劑或儀器經過變動更換後操作此二標準液，以確保儀器能夠偵測標準值。
- 12.2 試劑批號更換時，於重新設立標準曲線後，需執行 C1, C2 品管檢體。
- 12.3 工程師保養儀器或更換零件後，需執行 C1, C2 品管液。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	弓形蟲 IgM 及 IgG 抗體檢測 (EIA 及 ELFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 902 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12.4 標準曲線經 14 天過期後，需重新設立標準曲線，並執行 C1，C2 品管液。

12.5 品管檢體在拆封後，需盡快操作使用完畢，以確保試劑效能。

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 Biomerieux mini-Vidas 原廠操作手冊。
- 14.2 Ambroise-Thomas P, et al. 1993. Le toxoplasme et sa pathologie Médecine et Maladies infectieuses 23 special : 121-128.
- 14.3 Zufferey J, Sugar A, Rudaz P, Bilie PJ, Glauser MP, Chave JP. 1993. Prevalence of latent toxoplasmosis and serological diagnosis of active infection in HIV-positive patients. Eu J Clin Microbiol Infect Dis 12: 591-595.
- 14.4 Berrebi A, Kobuch WE. 1994. Toxoplasmosis in pregnancy. Lancet 344: 950.

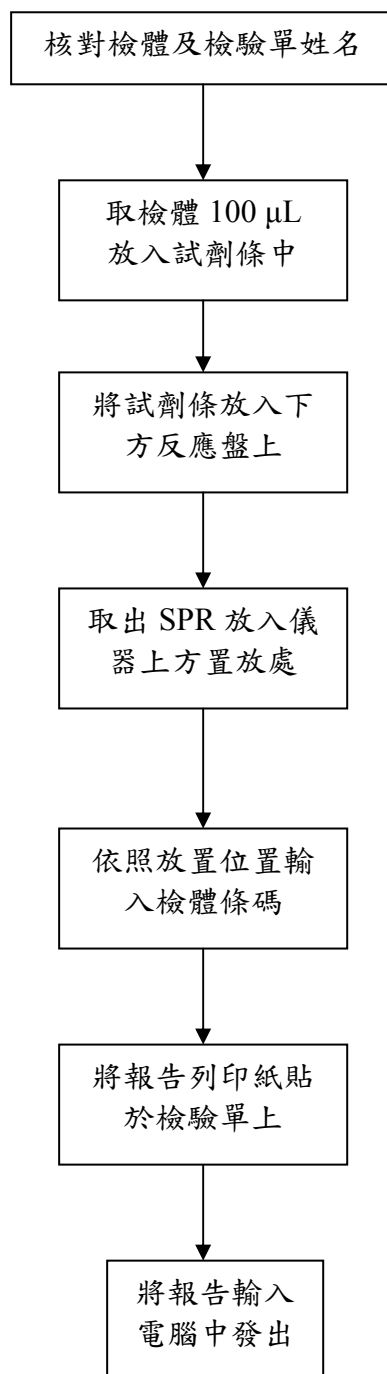
15 附錄

- 15.1 弓形蟲抗體檢測流程圖。
- 15.2 弓形蟲抗體檢測紀錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	弓形蟲 IgM 及 IgG 抗體檢測 (EIA 及 ELFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 903 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 弓形蟲抗體檢測流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	弓形蟲 IgM 及 IgG 抗體檢測 (EIA 及 ELFA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 904 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 弓形蟲抗體檢測紀錄表

個案編號			
送驗單位			
第一次檢體	種類： ☐ 血清 ☐ 血液 ☐ 其他	備註：_____	
檢體編號			
收件日期			
檢驗日期			
檢體採檢運送狀況適當		是	
		否	
檢驗結果	IgG		
	IgM		
第二次檢體	種類： ☐ 血清 ☐ 血液 ☐ 其他	備註：_____	
檢體編號			
收件日期			
檢驗日期			
檢體採檢運送狀況適當		是	
		否	
檢驗結果	IgG		
	IgM		
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：	流感病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 905 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測流感病毒病原體。

2 適用檢體種類

適用之檢體種類包括咽喉拭子、鼻咽拭子、鼻咽抽出液、支氣管肺泡灌洗液等。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用流感病毒可感染 MDCK 細胞株之特性，進行病毒病原體之培養，以流感病毒之專一性抗體，以間接或直接螢光免疫法（IFA）標記螢光染劑後，觀察細胞染上螢光與否，以進行病毒型別的鑑定。

5 試劑耗材

5.1 試劑

5.1.1 緩衝液：PBS，GibcoBRL，美國。

5.1.2 DMEM 培養基：GibcoBRL，美國。

（1）生長培養基：添加 10%胎牛血清，100 U/mL 抗生素。

（2）維持培養基：添加 100 U/mL 抗生素，2.0 µg/mL 之 tpck-trypsin，不添加胎牛血清。

5.1.3 胰蛋白酶：Tpck treated trypsin，Sigma。

5.1.4 IFA 用之一級及二級抗體。

5.1.5 WHO 提供之流感病毒鑑定試劑組。

5.2 耗材

5.2.1 25T 細胞培養盒。

5.2.2 75T 細胞培養盒。

5.2.3 5 mL 針筒。

5.2.4 0.45 µm 針筒用過濾膜。

5.2.5 刻度吸管：10 mL、5 mL、1 mL。

5.2.6 21 孔螢光檢測玻片。

5.2.7 96 孔 U 型底孔盤。

5.2.8 96 孔盤封盤膠膜。

5.2.9 八爪分注器。

5.2.10 手套、口罩等個人安全防護用品。

6 儀器設備

6.1 第二級生物安全櫃。

6.2 35°C 二氧化碳恆溫培養箱。

6.3 高速離心機。

6.4 倒立顯微鏡。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	流感病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 906 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

6.5 螢光顯微鏡。

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 除離心及螢光染色試驗步驟外全程作業都要在第二級生物安全櫃 (class II BSC) 內進行。

8 檢體採集

8.1 咽喉檢體

使用病毒專用採檢運送器材，以壓舌板固定舌頭，採檢棉棒刮取扁桃腺附近病灶部位。

8.2 鼻咽檢體

使用病毒專用採檢運送器材，採檢棉棒插入鼻腔吸取鼻腔分泌物。

8.3 鼻咽沖洗液

使用無菌之生理食鹽水或 PBS 沖洗，收集沖洗液於無菌可鎖緊之檢體瓶。

8.4 其他送驗檢體參照本局出版之「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，**絕不可儲存於 -20°C 冷凍**。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 接種

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

10.1.2 每一檢體接種 2 支 Culture tube，每支 Tube 接種 100 µL 檢體，培養於 35°C，CO₂ 培養箱 7-10 日。

10.2 觀察

10.2.1 自接種後翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態。

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

10.2.3 細胞未產生顯著病變者，待培養 10 日後一起收集細胞及培養液，以螢光試劑進行盲染 (blind stain)。

10.3 間接螢光免疫法鑑定 (以 Chemicon respiratory viral screen kit 為例)。

10.3.1 將 Culture tube 以 4°C，3,000 rpm 離心 15 min，上清液分別存於容積 4 mL 的塑膠小瓶。

10.3.2 經離心沉澱之細胞加入與原培養基等量之 PBS，以吸量管上

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	流感病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 907 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

下混合數次後，將細胞懸浮液移至另一塑膠小管。

- 10.3.3 分別將各管細胞取 20-30 μL 點入 21 孔玻片，待細胞於室溫下風乾後置入含有 4°C 丙酮之玻片槽，固定 10 min。
- 10.3.4 取出風乾後以 Respiratory reagent 一級抗體滴於每個孔（每滴約 20 μL 左右），將玻片置於 Moisture chamber，置於 37°C 恆溫培養箱 30 min。
- 10.3.5 以含有 1% Tween 20 之 PBS 溶液清洗玻片三次後 10 min 風乾。
- 10.3.6 每個孔加二級螢光抗體（FITC）。每滴約 20 μL 左右，將玻片置於 Moisture chamber，置於 37°C 恆溫培養箱 30 min。
- 10.3.7 以含 1% Tween 20 之 PBS 溶液清洗玻片三次後風乾並以 Mounting fluid 封片。
- 10.3.8 流感病毒經螢光抗體鑑定為陽性之檢體，則重複步驟 10.3.3，並做兩個重複，分別滴上 Influenza A 及 Influenza B 之一級抗體，將玻片置於 Moisture chamber，置於 37°C 恆溫培養箱 30 min。
- 10.3.9 重複 10.3.5 至 10.3.8 步驟，以螢光顯微鏡鏡檢，鑑定分離株為 A 型或 B 型流感病毒。
- 10.3.10 有關 Chemicon respiratory viral screen kit 之注意事項請參閱附錄。

10.4 血球凝集試驗

- 10.4.1 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 50 μL 的 PBS 溶液。
- 10.4.2 於第一列加入 100 μL 的病毒抗原原液，Negative control 行則以 100 μL PBS 取代抗原。
- 10.4.3 取第一列的抗原 50 μL 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 50 μL 加入第三列，如此序列稀釋至第八列。
- 10.4.4 分別加入以 PBS 稀釋的 0.75% 的天竺鼠紅血球 50 μL /孔，以手輕微搖晃孔盤後，之後以膠膜封住孔盤，置於室溫或 4°C 下靜置 30-60 min，之後記錄結果。
- 10.4.5 進行血球凝集抑制試驗前，須先以 PBS 溶液稀釋抗原原液至每 50 μL 稀釋液中含有 8 HA unit 的抗原。（1 HA unit 約為 10^7 個病毒量）

10.5 血球凝集抑制試驗

- 10.5.1 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 25 μL 的 PBS 溶液。
- 10.5.2 於第一列加入 50 μL 的各標準病毒株的標準抗血清，Negative control 行則以 25 μL PBS 取代抗血清。
- 10.5.3 取第一列的抗體 25 μL 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 25 μL 加入第三列，如此序列稀釋至第八列。
- 10.5.4 分別加入 25 μL 已稀釋至 8 HA unit/50 μL 的待測抗原及標準抗原，以手輕微搖晃孔盤後，置於室溫下反應 10-15 min。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	流感病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 908 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.5.5 加入以 PBS 稀釋的 0.75% 的天竺鼠紅血球 50 μ L/孔，之後以膠膜封住孔盤，至於室溫或 4°C 下靜置 30-60 min，之後記錄結果。

10.6 檢驗後處理

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

11 結果判定

11.1 依據 10.3 鑑定結果，經螢光顯微鏡鏡檢，螢光顯微鏡鏡檢細胞呈現蘋果綠螢光則為陽性，紅色則為陰性。

11.2 依據 10.5 鑑定結果，血球凝集抑制試驗以紅血球無凝集反應孔數最高者為所片定之型別。

11.3 綜合結果判定標準：符合 10.3 或 10.5 之檢測結果為陽性者，均可判定為流感病毒陽性。

11.4 報告核發：流感病毒陽性，流感病毒陰性。

11.5 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果欄”，並在送驗單背面蓋職章後陳核實驗室主管審核，俟實驗室主管核章後，在上網登錄於傳染病通報系統。

12 品質管制

12.1 實驗室每半年進行內部檢驗能力評估，每季進行人員檢驗流程熟悉度檢視。

12.2 每年接受三次美國病理協會（CAP）外部能力試驗。

13 廢棄物處理

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

14 參考資料

14.1 WHO. 1982. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. (distributed by the Viral Disease Unit, W.H.O, Geneva)

14.2 WHO. 1997. Diagnosis of influenza and other respiratory viruses. PAHO/WHO/ CDC.

15 附錄

15.1 流感病毒分離與鑑定總流程圖。

15.2 細胞繼代紀錄表。

15.3 流感病毒感染觀察紀錄表。

15.4 流感病毒螢光鑑定紀錄表。

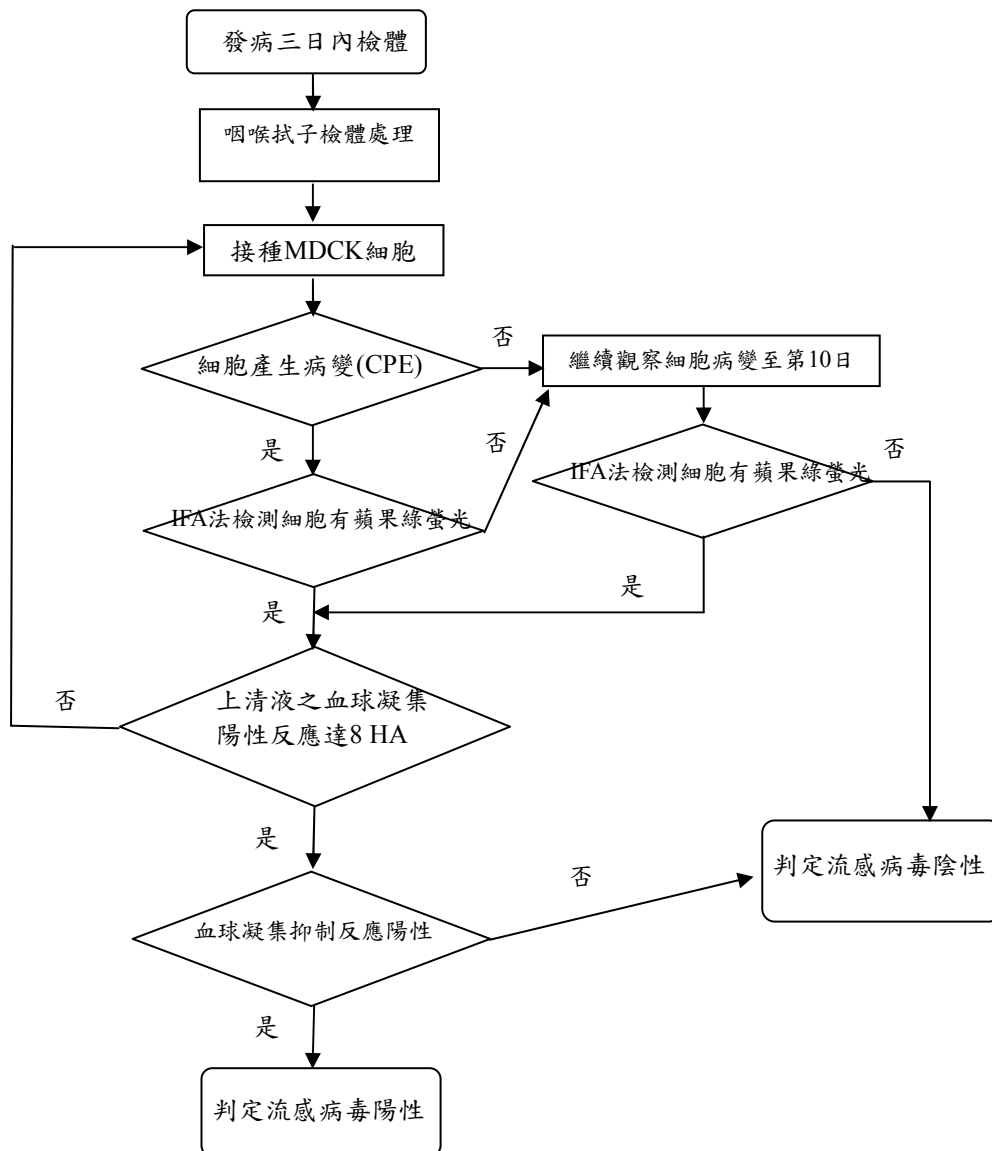
15.5 HA/HI 紀錄表。

15.6 Chemicon respiratory viral screen kit 之注意事項。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	流感病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 909 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 流感病毒分離與鑑定總流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	流感病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 910 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 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: _____
Date: _____	Person in charge: _____
Cell: Seeded on _____	Container: _____
Medium: _____	
Appearance: _____	
PBS (-) : _____	Trypsin-EDTA: _____
Medium at this transfer: _____	
Procedure:	
Discard old GM:	
_____ Add the Trypsin-EDTA mixture to monolayer	
_____ Trypsinization at Rt temperature for _____ min	
Remove the trypsin-EDTA, add _____ mL of fresh GM	
Disperse cells by gentle pipetting	
Final cell numbers _____ mL	
Above suspension of cells was seeded as follows	
Number	container
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
Incubated at 37°C CO ₂ incubator	
Remarks:	

檢驗者：

實驗室主管：

	編號：	流感病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 911 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
流感病毒感染觀察紀錄表

[illegible]

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：	流感病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 912 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 流感病毒螢光鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

流感病毒螢光鑑定紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

檢驗者：

實驗室主管：

	編號：	流感病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 913 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

頁數：第 頁/共 頁

備註 _____

[illegible]

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：	流感病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 914 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.6 Chemicon respiratory viral screen kit 之注意事項

(1) 樣品穩定性及保存方式 (stability and storage)

當儲存於 2-8°C 的情況下，在 kit 標記的使用期限內試劑均可維持穩定的品質，試劑勿置於過高或過低的溫度環境中，已過使用期限的試藥切勿再繼續使用。

若實驗中發現螢光值降低，可能是抗體或是接合劑產生變質情況，在每一次實驗進行過程中均須有陽性對照組以確保試劑及染色過程無誤。若經過測試螢光染色的效果仍然不佳，則建議更換試劑組。

(2) A 型及 B 型流感病毒陽性之檢體，被螢光染色部位包括細胞核或細胞質或二者皆有細胞核的亮度較為均勻，而細胞質的螢光亮度隨大顆包涵體存在的位置而呈較為點狀的分布。

(3) 試劑之專一性測試 (Specificity)

美國七個臨床實驗室測試呼吸道檢體經細胞培養後以 Chemicon respiratory viral screen 檢測試劑專一性，結果如下表：

MONOCLONAL ANTIBODIES:	Adeno	RSV	Infl A	Infl B	Para 1	Para 2	Para 3
True Positive	43	66	11	4	11	5	28
False Positive	0	0	0	0	0	0	0
True Negative	602	580	635	642	635	641	618
False Negative	1	0	0	0	0	0	0
Sensitivity (%)	97.7	100	100	100	100	100	100
Specificity (%)	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value Positive %	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value Negative %	99.8	100	100	100	100	100	100

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	流感病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 915 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流感病毒。

2 適用檢體種類

適用之檢體種類包括咽喉拭子、鼻咽拭子、鼻咽抽出液、支氣管肺泡灌洗液等。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

4.1 RT-PCR：

利用分子生物學技術 RT-PCR 高敏感度的方法來檢測檢體中的流感病毒 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。

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 Qiagen PCR core kit。

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

5.1.4 陽性對照組 (positive control)：採用已知流感病培養液對照；陰性對照組 (negative control)：採用以水作陰性對照。

5.1.5 試劑 TaqMan one-step RT-PCR master mix reagents (SN:4309169) 4°C 保存與 LightCycler 480 RNA master hydrolysis probes (Roche, Cat. no. 04 991 885 001)、TaqMan exogenous internal positive control (VIC) (SN:4308323) -20°C 保存。

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 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1,000 µL tips。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	流感病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 916 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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，給予編號。

7.2.2 咽喉拭子、鼻咽拭子等檢體

(1) 棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。

(2) 分裝並標示號碼及日期，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需保存於 4°C 冰箱中。

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 檢驗步驟

9.1 萃取病毒 RNA

(1) 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	流感病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 917 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(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 FLUA/B 即時反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應

9.2.1 ABI 系統

(1) 試劑添加量

2X Master mix buffer	12.5 μL
FluA-F primer (10 μM)	1.0 μL
FluA-R primer (10 μM)	1.0 μL
FluB-F primer (10 μM)	1.0 μL
FluB-R primer (10 μM)	1.0 μL
FluA probe (5 μM)	0.5 μL
FluB probe (5 μM)	0.5 μL
RNA enzyme mix	0.67 μL
RNase-free water	1.83 μL
template	5.0 μL
	25.0 μL

(2) Real-time RT-PCR 反應條件

(a) RT reaction：48°C，30 min。

(b) Taq activation：9°C，10 min。

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

9.2.2 Roche 系統

(1) 試劑添加量

RNase-free water	0.3 μL
FluA-F primer (10 μM)	1.0 μL
FluA-R primer (10 μM)	1.0 μL
FluB-F primer (10 μM)	1.0 μL
FluB-R primer (10 μM)	1.0 μL
FluA probe (5 μM)	0.5 μL
FluB probe (5 μM)	0.5 μL
Enzyme master mix	7.4 μL
Enhancer	1.0 μL
Activator	1.3 μL
RNA sample	5.0 μL
Total	20.0 μL

(2) Real-time RT-PCR 反應條件

(a) RT reaction：63°C，3 min。

(b) Taq activation：95°C，30 sec。

(c) PCR reaction：95°C，10 sec；58°C，30 sec；72°C，3 sec (45 replication cycles)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	流感病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 918 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

9.3 FLUA H1/H3 反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)

(1) PCR 反應 (Qiagen one-step RT-PCR kit)

試劑添加量如下：

RNase-free water	15 µL
5 x Qiagen one step RT-PCR buffer	10 µL
dNTP mix (containing 10mM of each dNTP)	2 µL
H1-F or H3-F primer (10 µLM)	3 µL
H1-R or H3-R primer (10 µM)	3 µL
Qiagen one step RT-PCR enzyme mix (5 U/µL)	2 µL
Q solution	10 µL
RNA sample	5 µL
Total	50 µL

(2) PCR 反應條件：

Reverse transcription	50°C	30 min
Initial PCR activation	95°C	15 min
Denaturation	94°C	1 min
Annealing	55°C	2 min
Extension	72°C	3 min
Number of cycles	45	
Final extension	72°C	10 min

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

11.1 Real-time RT-PCR：若 FLUA 或 FLUB 有螢光訊號產生，即可判定為該型流感陽性。

11.2 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。增幅產物片段若為約 1200 bp，則判定為 A 型流感 H1 亞型，增幅產物片段若約為 550 bp，則判定為 A 型流感 H3 亞型。

12 注意事項

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。

13 參考文獻

Ward CL, Dempsey MH, Ring CJ, Kempson RE, Zhang L, Gor D, Snowden BW, Tisdale M. 2004. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. J Clin Virol 29: 179-88.

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	流感病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 919 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

14 附錄

14.1 流感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：	流感病毒核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 920 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 14.1 流感病毒診斷用引子組序列表

Real-time RT-PCR

FluA-F :5'- AAG ACC AAT CCT GTC ACC TCT GA -3'

FluA-R :5'- CAA AGC GTC TAC GCT GCA GTC C -3'

FluB-F: 5'- GAG ACA CAA TTG CCT ACC TGC TT -3'

FluB-R: 5' – TTC TTT CCC ACC GAA CCA AC -3'

FluA probe- FAM -5' TTT GTG TTC ACG CTC ACC GT 3'-TAMRA

FluB probe -VIC-5'AGA AGA TGG AGA AGG CAA AGC AGA ACT AGC 3'-TAMRA

FluA probe: 5'FAM - TTTGTGTTTCACGCTCACCGT -3'BBQ

FluB probe: 5'HEX-AGAAGATGGAGAAGGCAAAGCAGAACTAGC-3'BBQ

RT-PCR

H1-F: 5'-AGC AAA AGC AGG GGA AAA TAA

H1-R: 5'-GTA ATC CCG TTA ATG GCA

H3-F: 5'-ACT ATC ATT GCT TTG AGC

H3-R: 5'-TGG CAT AGT CAC GTT CAG

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	庫賈氏病標示蛋白檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 921 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用蛋白質電泳與西方墨點法檢測通報個案腦脊髓液檢體中的蛋白質 14-3-3 的表現量並綜合相關臨床病症做病例的研判。

2 適用檢體種類

報疑似庫賈氏症的腦脊髓液檢體 (CSF)。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

- 4.1 經相關文獻報導，有 (93.6%) 庫賈氏症病人的於發病過程中，其原本存在於正常人體細胞中的蛋白質 14-3-3 會大量表現於腦脊髓液中，因此該蛋白質可為一檢測之生物標誌。
- 4.2 該檢驗技術的敏感度 90-97%，專一性 87-100%。
- 4.3 先利用蛋白質電泳將腦脊髓液中的所有蛋白質進行分離，再利用對 Protein14-3-3 具有專一性之抗體與 CSF 檢體中之蛋白質 14-3-3 結合反應，並在冷光偵測儀下檢測蛋白質 14-3-3 是否有大量表現。

5 試劑耗材

5.1 試劑

5.1.1 蛋白質電泳專用試劑

- 5.1.1.1 Tris-glycine SDS sample buffer (2X)。
- 5.1.1.2 2-mecaptoethanol (2-ME)。
- 5.1.1.3 Pre-cast gel (4-20%) Tris-glycine, 1.5mm X 10 well。
- 5.1.1.4 See blue plus2 pre-stained protein standard。
- 5.1.1.5 Tris-glycine SDS running buffer (10X)。

5.1.2 西方墨點法專用試劑

- 5.1.2.1 iBlot® transfer stack, PVDF regular。
- 5.1.2.2 Skim milk。
- 5.1.2.3 Tris-glycine transfer buffer(10X)(Tris base7.28g, Glycine 36g, ddH₂O 500ml)。
- 5.1.2.4 PVDF membrane-immobilon-P。
- 5.1.2.5 Tris-Glycine transfer buffer (1x): Tris-Glycine transfer buffer(10x) 100 mL, methanol 200 mL, ddH₂O 700 mL。
- 5.1.2.6 Methanol (HPLC grade)。
- 5.1.2.7 TTBS 5X (tris base 30g, NaCl 22.5 g, Tween-20 2.5 mL, ddH₂O 配至 500 mL)。
- 5.1.2.8 Blocking buffer tris base 12g, NaCl 9 g, ddH₂O 配至 1 L。
- 5.1.2.9 一級抗體:14-3-3β (K-19) Primary antibody (rabbit IgG), SantaCruz Cat no.SC-629。
- 5.1.2.10 二級抗體:Goat-anti-rabbit IgG-HRP, SantaCruz Cat no.

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	庫賈氏病標示蛋白檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 922 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

SC-2004。

5.1.3 陽性對照組：Positive 14-3-3 Sigma Ab-1 control (MS-11185-PCL, Neomarkers, CA, USA)。

5.1.4 陰性對照組：Sample loading buffer。

5.2 耗材

5.2.1 無菌 10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1,000 μ L Tips。

5.2.2 無菌 1.5 mL Eppendorf。

5.2.3 無粉手套。

6 儀器設備

6.1 2.5 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1,000 μ L Pipetteman。

6.2 第二級生物安全櫃 (class B II BSC)。

6.3 直立式 Mini-cell 蛋白質電泳槽 (含全濕式轉印夾)。

6.4 電源供應器。

6.5 半乾式轉漬槽 (iBlot® dry blotting system)。

6.6 水平震盪器。

6.7 乾浴槽。

7 環境與設施安全

7.1 檢體箱開啟及檢體狀態確認應在生物安全操作櫃中進行。

7.2 檢驗操作在生物安全第三等級 (BSL-3) 負壓實驗室進行，並依本中心台南生物安全第三等級實驗室訂定之標準操作程序書執行業務。

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 病人 CSF 檢體分裝與檢驗應在第二級生物安全櫃內處理。

7.5 實驗完畢須在生物安全櫃中噴灑消毒劑，於 10 min 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

CSF 檢體採集方法，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 檢體運送與保存

常溫運送。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 去活化腦脊髓液檢體中的蛋白質

10.1.1 生物安全操作櫃(BSC)先鋪一層吸水紙。

10.1.2 再將檢體與所需之試劑移至 BSC 依序放好。

10.1.3 準備 2X Sample buffer 與 2-mecaptoethanol (2-ME)。

10.1.4 標示檢體編號、陽性對照組、蛋白質分子標誌與陰性對照組

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	庫賈氏病標示蛋白檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 923 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

於 1.5 mL 離心管蓋上。

10.1.5 配置 Sample loading buffer (SLB)，其配方如下：

16.2 μ L of 2X Sample buffer +1.8 μ L of 2-mecaptoethanol
=18 μ L SLB

10.1.6 檢體(S)取 18 μ L 加入含有 18 μ L SLB 的 1.5 mL 離心管中。

10.1.7 陽性對照組(PC)與陽性病人檢體對照組(PP)取 2 μ L 加入含有 34 μ L SLB 的離心管中，陰性對照組(NC)為 SLB。

10.1.8 蛋白質分子標誌(M)取 7 μ L 加入含有 29 μ L SLB 的 1.5 mL 離心管中。10.1.6-10.1.8 簡易配製如下表：

Sample	檢體編號									
	M	PC	PP	S1	S2	S3	S4	S5	S6	NC
Vol (μ L)	7	2	18	18	18	18	18	18	18	0
SLB (μ L)	29	34	18	18	18	18	18	18	18	36

10.1.9 混合均勻後轉至乾浴槽 100°C，5 min。

10.1.10 加熱去活化結束後轉至 4°C 冰箱靜置 5 min。

10.1.11 取出商用含有電泳膠片的卡夾(pre-cast gel)，並將卡夾下方的白色膠帶撕掉，架置於直立式 Mini-cell 蛋白質電泳槽。

10.1.12 配製 400 mL 1X 電泳溶液(tris-glycine SDS running buffer)，並加入以架置好之直立式蛋白質電泳槽中，溶液蓋過內槽的 Loading well 即可，外槽電泳溶液適量蓋過底下白金電極即可。

10.1.13 拔掉電泳膠上的齒模，將整個電泳槽移入 BSC 中，並小心依序取出 10.1.6-10.1.8 處理後的樣本，緩慢加入電泳膠片的孔中。

10.1.14 蓋上上蓋，並依正負極顏色插入電源供應器中，先設定電壓 120V 通電 1 小時，之後增加電壓至 150V 通電 1 小時。

10.2 西方墨點法檢測(直立式 Mini-cell 蛋白質電泳槽(含全濕式轉印夾))

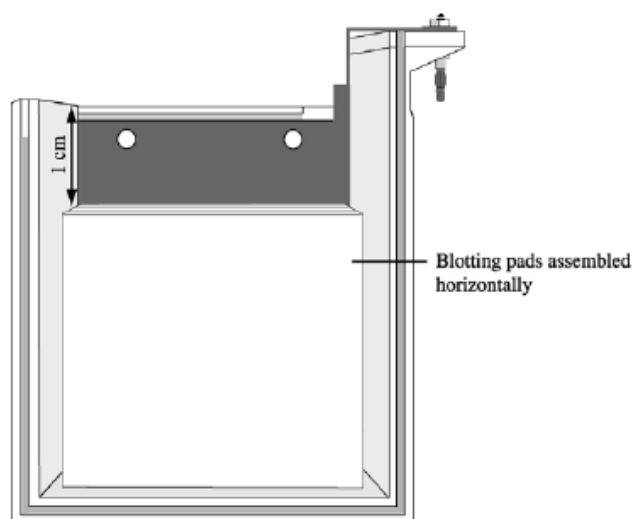
10.2.1 先配製 800 mL 的轉漬溶液。

10.2.2 取用適當大小的盒子(約 7cm*12cm*4cm)將 PVDF 膜放置其中，加入一定量的甲醇浸泡 30 sec，再進入去離子水 30 sec，最後與濾紙、海棉等必要輔助器材浸泡於轉漬溶液 10 分鐘，並放置於 BSC 中。

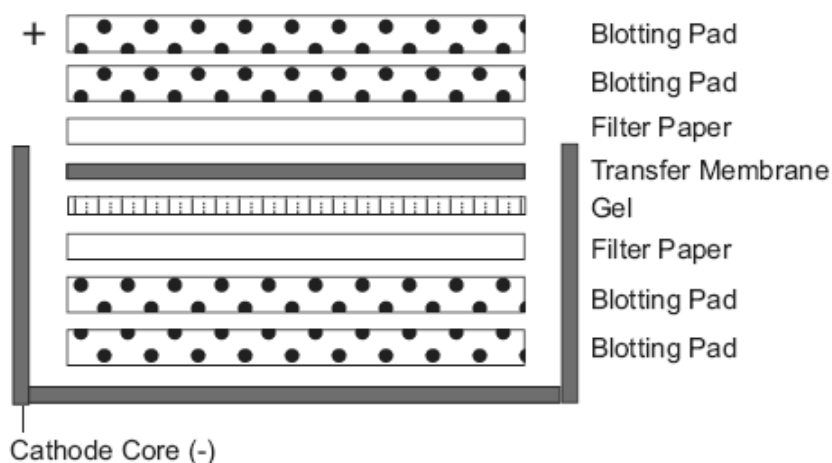
10.2.3 取出全濕式轉印夾，如下圖。將浸泡於轉漬溶液的海綿(2 片)與濾紙取出，先放 2 片海綿於底部的負極，再其上加一片濾紙。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	庫賈氏病標示蛋白檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 924 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日



- 10.2.4 蛋白質電泳完成後關閉電源，取用一個 PP 浸泡盤放入 BSC 中，並將整個電泳槽移置浸泡盤上，槽內之緩衝溶液倒入 BSC 內的廢液桶中。
- 10.2.5 小心含有電泳膠的卡夾取下，並使用原廠配附的鑷子將卡夾分開。將膠片上方含有孔部分的膠片剷除，並使用鑷子將膠體取下。
- 10.2.6 將取下的膠片放置於 10.2.3 的濾紙上方，再將 PVDF 膜蓋於電泳膠片上，再依序覆蓋一片濾紙、2 片海綿（如下圖）。並小心將氣泡去除。



- 10.2.7 將架置好全濕式轉印夾放入電泳槽內，並加入使適量之轉漬溶液於轉印夾中，不需過滿。加入約 650 mL 的去離子水，水的高度約兩公分即可。
- 10.2.8 蓋上上蓋，設定電壓 25V，進行 2 hr 的蛋白質轉漬。
- 10.2.9 先配製 20 mL 含有 5% Skim milk 的 Blocking 緩衝液。
- 10.2.10 先取出轉印夾，將其中的緩衝液到入廢液桶中，並放置於一層新的吸水紙上，依序將海綿、濾紙取出。
- 10.2.11 將完成轉漬的 PVDF 膜放入含有 10.2.9 緩衝液的有蓋子的容

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	庫賈氏病標示蛋白檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 925 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

器中，並於室溫反應 1 小時（或於 4°C 靜置隔夜），並放置於水平震盪器上以 30 rpm 進行反應。

- 10.2.12 反應完成前 5 min，配製 20 mL 含有 5% Skim milk 與一級抗體:14-3-3 β (K-19) Primary antibody (rabbit IgG) 的 Blocking 緩衝液。
- 10.2.13 反應 1 小時後，將 10.2.11 的緩衝液到入廢液桶中，加入 10.2.12 的緩衝液，並放置於水平震盪器上以 30 rpm 進行反應 2 小時。
- 10.2.14 反應完成前 5 分鐘，配製 20 mL 含有 5% Skim milk 與二級抗體:Goat-anti-rabbit IgG-HRP 的 Blocking 緩衝液。
- 10.2.15 反應 2 小時後，將 10.2.13 的緩衝液到入廢液桶中，加入適量 TTBS 緩衝液清洗 PVDF 膜，並放置於水平震盪器上以 30 rpm 反應 5 分鐘，該步驟須進行三次。
- 10.2.16 清洗結束後，加入 10.2.14 的緩衝液，並放置於水平震盪器上以 30 rpm 進行反應 1 小時。
- 10.2.17 重複 10.2.15 的步驟。並將清洗液倒乾淨。
- 10.2.18 配製 ECL 溶液 6 mL，與 PVDF 膜反應 1 min。
- 10.2.19 妥善以保鮮膜將 PVDF 包覆起來，放入卡夾中避光。
- 10.2.20 進暗房進行 X-Ray 底片曝光或使用冷光偵測曝光 1-5 分鐘。

11 結果判定

11.1 判定標準

膠片中檢體蛋白顯影位置如與陽性對照組、陽性病人檢體對照組(PP)位置一致，則判定為 14-3-3 蛋白質西方墨點法檢測陽性。

11.2 報告核發

西方墨點法陽性，西方墨點法陰性。

11.3 結果登錄

完成檢驗後，將檢驗結果登錄於「蛋白質 14-3-3 檢測紀錄表」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 室內品管

12.1.1 控制組

12.1.1.1 Positive control : Positive 14-3-3 Sigma Ab-1 control。

12.1.1.2 Sample loading buffer。

12.1.2 每次試驗應執行品管測試。

12.1.3 品管測試結果 Positive control，Negative control。

12.1.4 品管測試結果若有違背品管允收標準應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正，必要時採取預防措施。

13 廢棄物處理

13.1 可拋棄、可燃之實驗廢棄物

13.1.1 所有反應過後產生的緩衝液皆需倒入內含有 4 層滅菌袋包裝

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	庫賈氏病標示蛋白檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 926 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

廢液桶中，俟檢驗結束後將滅菌袋綁好，整袋放入滅菌桶中。

13.1.2 操作所存留廢液與耗材等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥密封並貼上滅菌帶，整桶連同包裝好之醫療廢棄物放入雙門高溫高壓滅菌鍋中，以 134°C，18 min 高壓滅菌。

13.1.3 滅菌後之廢棄物將先暫存於 4°C 冰箱中，由具甲級醫療廢棄物處理廠商固定每週收取並記錄於表單。

13.2 可重複使用器具消毒處理流程：

13.2.1 新配製之 1N NaOH (40 g NaOH 溶於 1 L 的去離子水中)，以吸水紙沾取 1N NaOH，擦拭電泳槽 (因槽體不耐鹼性溶液的長時間浸泡)，其餘器具須浸泡於 1N NaOH 溶液中 1 小時。

13.2.2 消毒過後的器具泡在含有去離子水的容器中，換水清洗數次，可以酸鹼指示試紙確認器具表面是否回復中性。

14 參考資料

- 14.1 庫賈氏病及其他人類傳播性海綿樣腦症感染控制與病例通報指引手冊。
- 14.2 本局實驗室廢棄物清理流程及圖解。
- 14.3 Pennington, C., et al., The role of cerebrospinal fluid proteins as early diagnostic markers for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett*, 2009. 455(1): p. 56-9.
- 14.4 Kretzschmar, H.A., Diagnosis of prion diseases. *Clin Lab Med*, 2003. 23(1): p. 109-28, viii.

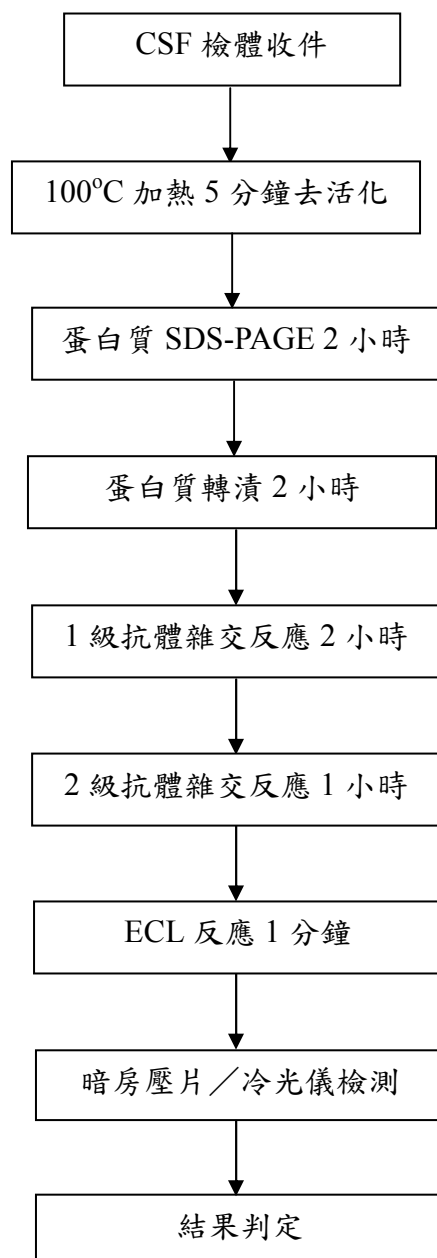
15 附錄

- 15.1 庫賈氏症蛋白質 14-3-3 標準檢驗方法流程圖。
- 15.2 庫賈氏症蛋白質 14-3-3 實驗紀錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	庫賈氏病標示蛋白檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 927 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 庫賈氏症蛋白質 14-3-3 標準檢驗方法流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	庫賈氏病標示蛋白檢測 (WB)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 928 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 庫賈氏症蛋白質 14-3-3 實驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

庫賈氏症蛋白質 14-3-3 實驗紀錄表

檢驗日期：

	檢體編號									
sample	M	PC	PP	S1	S2	S3	S4	S5	S6	NC
Vol (μL)	7	2	18	18	18	18	18	18	18	0
SLB(μL)	29	34	18	18	18	18	18	18	18	36
結果判定 (P/N)										
膠片日期	年 月 日									
膠片編號:	膠 片 黏 貼 處									
(西元/月 日/第幾片) 如於 2010 年 10 月 1 日 進行 1 片膠 片的西方墨 點實驗即為 2010100101										

註：陽性為 P，陰性為 N。

檢驗者：

表單編號:

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：	裂谷熱病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 929 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裂谷熱病毒。

2 適用範圍

適用於病患急性期發病七日內血液檢體或組織檢體。

3 名詞解釋

Rift Valley Fever：裂谷熱病毒。

4 原理概述

利用非洲綠猴腎臟上皮細胞株 Vero E6 於組織培養盤中接種病患血清或組織研磨液，於 37°C 培養箱中培養 7 日，取其細胞於 12 孔玻璃片上，加入抗裂谷熱病毒多株抗體及螢光標記的山羊抗兔抗體，於螢光顯微鏡下檢查，測定是否有裂谷熱病毒。

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% (1X) 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 裂谷熱病毒 (合成蛋白)：以合成蛋白作為裂谷熱病毒之陽性對照組。
- 5.4 多源抗體：抗裂谷熱病毒多源抗體。
- 5.5 FITC-goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA, Cat. No. 81-6111)。
- 5.6 丙酮 (Acetone, Merck, Germany, Cat. No. : 1.00020)。
- 5.7 磷酸鹽緩衝液 (PBS, Gibco, USA, Cat. No. 14200-075) 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 12 孔玻璃片 (BioMerieux., France, Cat. no. 7-571-1)。
- 5.12 蓋玻片。
- 5.13 無菌 20 μ L、200 μ L、1,000 μ L 之吸管尖。

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 (steril GARD III Advance, USA, Baker Company)。
- 6.4 螢光顯微鏡 (Olympus, Japan, IX71)。
- 6.5 5-40 μ L、40-200 μ L、200-1,000 μ L Pipette。
- 6.6 -20°C 及 -80°C 冷凍櫃 (Thermo Scientific, USA)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	裂谷熱病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 930 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 Vero E6 細胞以 Eagles' minimum essential medium (EMEM，內含 10% 加熱去活化胎牛血清) 在 37°C，5% CO₂ 的條件下培養。

10.2 細胞貼附後，改以 2% EMEM 做繼代培養。

10.3 送檢樣本先經過濾除去雜質後，上清液以 EMEM 培養液調整成 10% 的懸浮液。

10.4 以 100 μL 之該懸浮液，於 37°C 接種至 70%細胞滿的 25cm² 的培養瓶。

10.5 接種 2 hr 後，再加入 5 mL 2% EMEM 培養液，置入 37°C，5% CO₂ 培養箱培養，每兩週做一次繼代培養。

10.6 先吸出上層培養液，以 0.25% Trypsine-EDTA 處理分離細胞，再混入原吸出之培養液，而後將 1/3 量置入新的 25 cm² 培養瓶，並以 2% EMEM 補足至 5 mL，另 1/3 置於-70°C 凍存，另 1/3 量留做免疫螢光檢測用。

10.7 置 37°C 5% CO₂ 培養箱培養 7 天。

10.8 將適量經 Trypsin-EDTA 處理分離下來的 Vero-E6 細胞，滴至 12 孔玻片上，置於抽氣櫃中抽乾。

10.9 而後以-20°C 1：1 之甲醇/丙酮溶劑固定 2 min，再放入抽氣櫃以揮發甲醇/丙酮固定液。

10.10 此檢體抹片可保存於-20°C 冰箱中或直接染色。

10.11 以 PBS 沖洗各 well 後，在抹片上加上 25 μL 抗裂谷熱病毒單株抗體 (1：100 in PBS)。

10.12 將抹片放置在潮濕的培養皿中，置於 37°C 溫箱 30 min。

10.13 於 37°C 反應 30 min，以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 min。

10.14 在室溫中將玻璃片以冷風吹乾或陰乾。

10.15 將抹片加上 25 μL 螢光 FITC 標記之山羊抗兔抗體 (FITC-Goat Anti-Rabbit IgG (1：100 in PBS)，於 37°C 反應 30 min。

10.16 以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 min。

10.17 滴上甘油緩衝液，然後以蓋玻片覆蓋。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	裂谷熱病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 931 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.18 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，檢體需在 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 溫箱染色時應注意保持溼度。
- 12.5 必須要有未感染病毒之細胞及感染病毒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 Mariner JC, Morrill J, Ksiazek TG. 1995. Antibodies to hemorrhagic fever viruses in domestic livestock in Niger: Rift Valley fever and Crimean-Congo hemorrhagic fever. Am J Trop Med Hyg 53: 217-221
- 14.2 Morrill JC, Carpenter L, Taylor D, Ramsburg HH, Quance J, Peters CJ. 1991. Further evaluation of a mutagen-attenuated Rift Valley fever vaccine in sheep. Vaccine 9: 35-41.

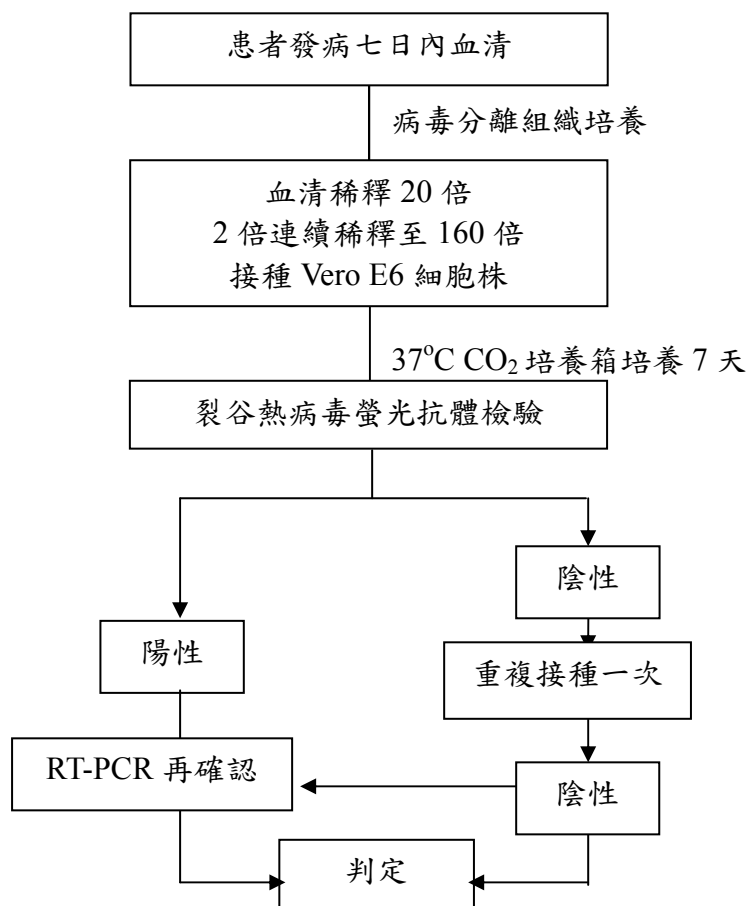
15 附錄

- 15.1 裂谷熱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：	裂谷熱病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 932 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 裂谷熱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：	裂谷熱病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 933 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測裂谷熱病毒基因。

2 適用檢體種類

適用於符合裂谷熱病毒病徵之病患血清檢體。

3 名詞解釋

Rift Valley fever virus：裂谷熱病毒。

4 原理概述

其技術原理是將待測的病毒 RNA 序列經反轉錄酶 (reverse transcriptase) 的作用轉錄成 cDNA，再利用 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 RNA 抽取試劑組。
- 5.3 Qiagen one-step RT-PCR kit。
- 5.4 Real-time PCR 儀器 LightCycler 所需之檢體毛細管。
- 5.5 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I (Cat. no. 03 003 230 001)。
- 5.6 Nuclease-free (RNase/DNase-free) 無菌微量吸管尖 (tip)：5 μ L、10 μ L、200 μ L。
- 5.7 Nuclease-free (RNase/DNase-free) 無菌蒸餾水。
- 5.8 可拋棄式無菌 Nuclease-free (RNase/DNase-free) 塑膠手套。
- 5.9 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裂谷熱病毒之合成 G2 基因取代完整病毒。
- 5.10 引子與探針的合成：
裂谷熱病毒的引子與探針合成，在選定偵側的病毒序列後 (G2 gene)，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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	裂谷熱病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 934 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Rift Valley fever virus (G2 gene Synthesis)		
引子名稱	引子序列	備註
RVS-349-371 Forward	5-AAAGGAACAATGGACTCTGGTCA-3	94 bp
RVAs-443-417 Reverse	5-CACTTCTTACTACCATGTCCTCCAAT-3	

6 儀器設備

- 6.1 The LightCycler instrument system。
- 6.2 微量吸管 (pipetmen)：5 μ L、10 μ L、200 μ L。
- 6.3 8 爪微量吸管。
- 6.4 全自動清洗器。
- 6.5 計時器。
- 6.6 37°C 水浴箱。

7 環境與設施安全

於生物安全第四等級 (BSL-4) 實驗室之設施內操作。

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

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 檢驗前檢體處理

檢體以 2,000 rpm 離心 30 min，分離出上清液備用。

10.2 血清檢體病毒或細胞培養病毒液 RNA 之萃取：

使用 Quagen 廠牌之 QIAamp Viral RNA 抽取試劑組，依廠牌步驟指示，略述如下。

10.2.1 取 140 μ L 血清加入 560 μ L AVL 溶液。

10.2.2 室溫靜置 10 min。

10.2.3 再加入 560 μ L 絕對酒精，混勻後，10,000 rpm 轉速離心使通過 QIAamp spin column。

10.2.4 續以 500 μ L AW 溶液清洗管柱兩次。

10.2.5 最後以 80°C 之 60 μ L RNase-free ddH₂O 沖流出病毒 RNA。

10.3 反轉錄-聚合酵素連鎖反應 (reverse transcription-PCR)：

10.3.1 在由細胞培養液或血清檢體萃取出之 RNA 溶液中，加入上、

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	裂谷熱病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 935 頁/共 1091 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

下端引子 (100 μ L) 後，將此混合物於 90°C 加熱 5 min，置於冰上 3 min。

10.3.2 短暫離心收集溶液於管底。

10.3.3 取 20 μ L 此模版/引子溶液於 0.2 mL 離心管中。

10.3.4 並加入 5 μ L 10X 緩衝液 (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH8.3, 15 mM MgCl₂, 0.01% (v/v) gelatin) 4 μ L 2.5 mM dNTPs (BRL), 0.5 μ L 0.1M DTT (dithiothreitol), 0.5 μ L 核糖核酸酵素抑制劑 (ribonuclease inhibitor, RNasin, 10U/ μ L, BRL), 0.5 μ L SuperScript™ II reverse transcriptase (RNase H-, 20U/ μ L, BRL) 0.5 μ L AmpliTaq DNA polymerase (5U/ μ L, Perkin Elmer)。

10.3.5 以 RNase-free ddH₂O 無菌水將總體積補至 50 μ L。

10.3.6 混合均勻後，於 LightCycler 進行反轉錄反應，以製作出 cDNA。

10.4 Real-Time PCR Amplification

10.4.1 製備試劑：

(1) 製備 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X conc.:

將 LightCycler FastStart enzyme (colorless cap) 取出 10 μ L 加入一管 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X conc. (green cap) 中，可進行 32 tests (保存於 4°C 可放置 1 週)。

(2) 製備 Primer:

以 H₂O 將 Forward 及 Reverse primer 溶解，使其濃度為 100 μ M，再以 H₂O 將 primer 稀釋至最終濃度 5 M。

10.4.2 製備 Real Time PCR Mix：

DNA template	4 μL
5 μM forward primer (F)	2 μL x Z
5 μM reverse primer (R)	2 μL x Z
LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X conc.	2 μL x Z
25 mM MgCl₂ stock solution	2 μL x Z
H₂O	8 μL x Z
Total 20 μL	

(Z=總反應數+1)

以微量吸管混合均勻，勿 Vortex。

10.4.3 取 16 μ L 的 Real time PCR Mix 至 LightCycler 專用毛細管中。

10.4.4 加入 DNA template 各 4 μ L。

10.4.5 將各毛細管封上專用蓋子。

10.4.6 離心 700 x g, 5 sec (或 spin down)。

10.4.7 將毛細管依序放入檢體轉盤。

10.4.8 Run real-time PCR：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	裂谷熱病毒核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 936 頁/共 1091 頁	(Real-time RT-PCR)	修訂日期： 年 月 日

【Pre-incubation】

95°C 10 min 1 cycle

【Amplification】

Denaturing	95°C	10 sec	
Annealing	55°C	10 sec	45 cycles
Extension	72°C	25 sec	

Acquisition mode: single

【Melting curve analysis】

Denaturing	95°C	0 sec	
Annealing	65°C	15 sec	
Melting	95°C	0 sec	

Slope = 0.1°C/sec
Acquisition mode: continuous

【Cooling】

40°C 30 sec

10.4.9 利用儀器軟體中的 melting curve analysis 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 Tm 曲線的鑑定過程在 30 min 內，經螢光放射分析即可得到結果。並將陽性對照組之模板 DNA 用量為 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg 等核酸濃度，測定核酸與循環數之標準曲線，可應用於檢體之定量分析。
- 11.2 報告核發：有螢光曲線產生、melting curve analysis 分析正確，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

Peters CJ, Liu CT, Anderson GW Jr, Morrill JC, Jahrling PB. 1989. Pathogenesis of viral hemorrhagic fevers: Rift Valley fever and Lassa fever contrasted. Rev Infect Dis 11 Suppl 4: S743-S749.

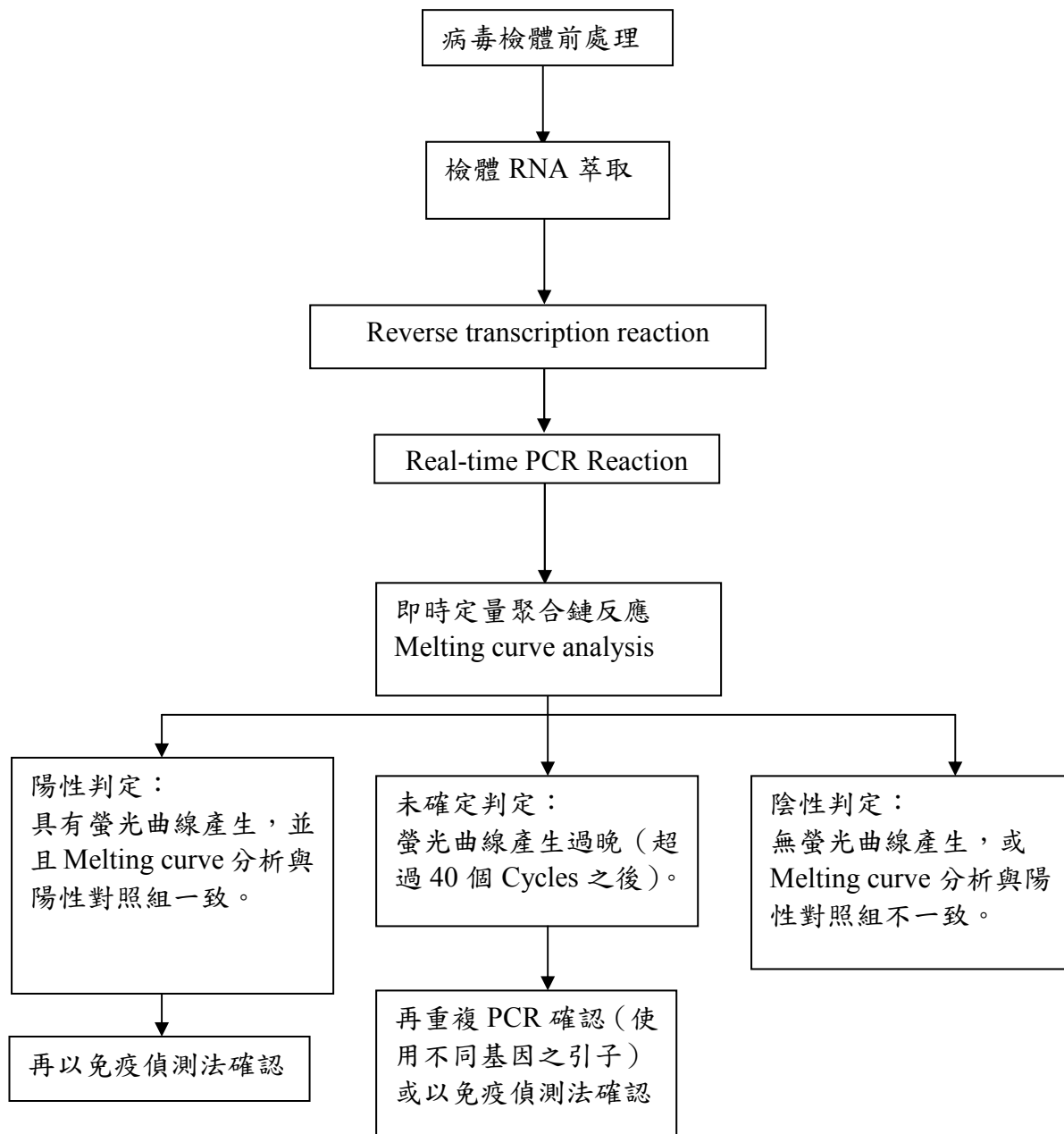
15 附錄

- 15.1 裂谷熱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：	裂谷熱病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 937 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 裂谷熱病毒基因檢測 (real-time RT-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：	裂谷熱病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 938 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測裂谷熱病毒抗體。

2 適用檢體種類

適用於符合裂谷熱病毒病徵之病患血清檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用裂谷熱病毒合成蛋白作為抗原，與病患血清進行抗原抗體反應，以酵素標幟抗體間接地將此反應轉成顏色訊號，由全自動酵素免疫分析儀讀取結果。

5 試劑耗材

- 5.1 清洗液 PBST (PBS pH 7.2 含 0.05 % Tween 20)。
- 5.2 檢體稀釋液 (PBST 含 0.5% BSA)。
- 5.3 已吸附裂谷熱病毒合成蛋白之 96 孔微量滴定盤。
- 5.4 抗人類 IgM 之 HRP (horseradish peroxidase) 酵素結合抗體 (peroxidase conjugated affinity purified anti-human IgM μ 【goat】)，Sigma，USA。
- 5.5 HRP 穩定液 (HRP stabilizer)，Sigma，USA。
- 5.6 呈色劑 (TMB 受質) Sigma，USA。
- 5.7 終止液 (2M H₂SO₄)，Merck，Germany。
- 5.8 陽性裂谷熱病毒合成蛋白標準液。
- 5.9 無菌蒸餾水。
- 5.10 八連排血清稀釋管。
- 5.11 八連排血清稀釋架。
- 5.12 無菌微量吸管尖 (tip)：10 μ L、200 μ L、1,000 μ L。
- 5.13 96 孔微量滴定盤封膜。
- 5.14 可拋棄式無菌塑膠手套。

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 全自動酵素免疫分析儀 (ELISA reader：BioTek μ Quant, USA)。
- 6.3 全自動清洗器。
- 6.4 微量吸管 (pipetmen)：1,000 μ L、100 μ L、30 μ L。
- 6.5 8 爪微量吸管。
- 6.6 計時器。
- 6.7 37°C 溫箱。

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：	裂谷熱病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 939 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

於生物安全第四等級實驗室內檢體分裝、去活化。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

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 檢驗前血清處理

10.1.1 檢體以 2,000 rpm 離心 10 min，分離出血清備用。

10.2 酵素免疫分析盤處理

10.2.1 將 96 孔酵素免疫分析盤加入 100 μ L 1：2,000 稀釋之病毒抗原混合液。

10.2.2 將製備抗原之 96 孔酵素免疫分析盤靜置於 4°C，隔夜後即可使用。把製備備好的酵素免疫分析盤先以 Washing machine 以磷酸緩衝液 PBST 洗淨。

10.2.3 酵素免疫分析盤注入清洗液放置 5 min，以 PBST 清洗 3 次。

10.3 陽性對照血清（亦即陽性標準液）

10.3.1 陽性對照血清乃利用裂谷熱病毒合成蛋白所生成之兔子多源抗體。

10.3.2 操作方式與待測血清相同，但使用不同種源的二級抗體（goat anti-rabbit IgG-HRP, Cappel）。

10.3.3 作為酵素免疫分析盤 coating 裂谷熱蛋白是否良好的對照組。

10.4 待測血清

10.4.1 將待測血清以 10%脫脂乳（skimmed milk）以 1：100 濃度稀釋，分別加入 100 μ L 稀釋血清於盤中之對照組及實驗組中。

10.4.2 分別加入稀釋後之血清檢體，各檢體需二重複試驗。

10.4.3 於 37°C 中作用 1 hr 後，以 PBST 清洗酵素免疫分析盤。

10.4.4 以 PBS 清洗 4 次，拍乾酵素免疫分析盤。

10.4.5 在酵素免疫分析盤中之孔內，各加入 100 μ L 以 1：2,000 稀釋之第二抗體（goat anti-human IgM-HRP, Cappel）。

10.4.6 再置於 37°C 反應 1 hr。

10.4.7 以清洗液清洗 4 次，拍乾酵素免疫分析盤。

10.4.8 清洗酵素免疫分析盤後，每孔加入 100 μ L 之呈色劑（TMB-0.035% H_2O_2 , in citrate-citrate buffer, pH5.5）置於室溫於黑暗中作用 15-20 min。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	裂谷熱病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 940 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.4.9 每孔加入 50 μ L 反應終止溶液 (2M H_2SO_4)。

10.4.10 以分光光度計 OD_{450} 測其吸光值。

11 結果判定

判讀標準：將 OD_{450} 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 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 WHO. 2010. Rift Valley fever virus: guidance for diagnosis, surveillance and control.
- 14.2 van Vuren PJ, Paweska JT. 2009. Laboratory safe detection of nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus in human and animal specimens by a sandwich ELISA. J Virol Methods 157: 15-24

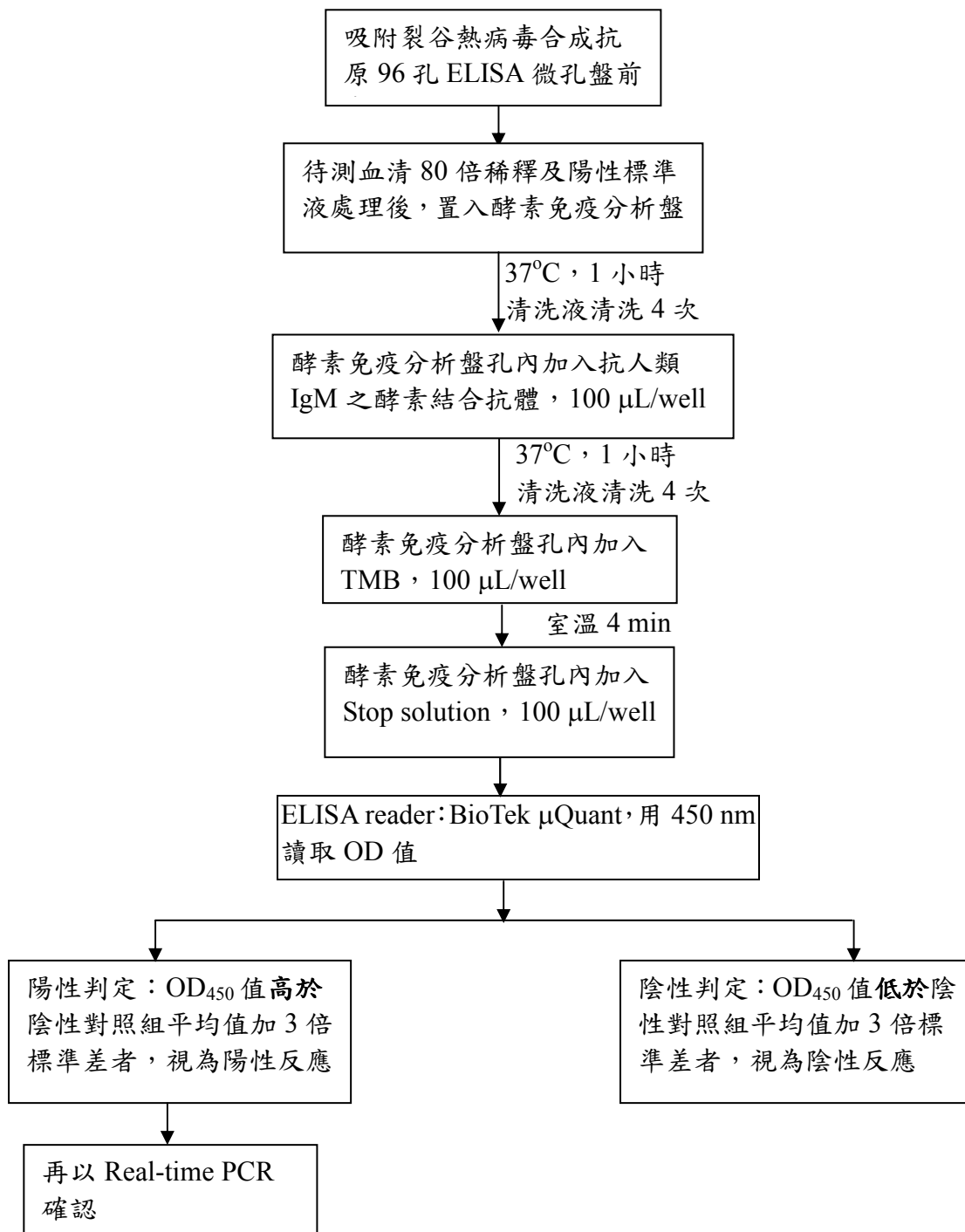
15 附錄

- 15.1 裂谷熱病毒抗體試驗-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：	裂谷熱病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 941 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 裂谷熱病毒抗體試驗（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：	馬堡病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 942 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馬堡病毒。

2 適用範圍

適用於病患急性期發病七日內血液檢體或組織檢體。

3 名詞解釋

Marburg Virus：馬堡病毒。

4 原理概述

利用非洲綠猴腎臟上皮細胞株 Vero E6 於組織培養盤中接種病患血清或組織研磨液，於 37°C 培養箱中培養 7 日，取其細胞於 12 孔玻璃片上，加入抗馬堡病毒多株抗體及螢光標記的山羊抗兔抗體，於螢光顯微鏡下檢查，測定是否有伊波拉病毒。

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 馬堡病毒 (合成蛋白)：以合成蛋白作為馬堡病毒之陽性對照組。

5.4 多株抗體：抗馬堡病毒多株抗體。

5.5 FITC-goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA, Cat. no. 81-6111)。

5.6 丙酮 (acetone, Merck, Germany, Cat. no. : 1.00020)。

5.7 磷酸鹽緩衝液 (PBS, Gibco USA, Cat. no. 14200-075) 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 12 孔玻璃片 (BioMerieux., France, Cat. No. 7-571-1)。

5.12 蓋玻片。

5.13 無菌 20 μ L、200 μ L、1,000 μ L 之吸管尖。

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 (SterilGARD III Advance, USA, Baker Company)。

6.4 螢光顯微鏡 (Olympus, Japan, IX71)。

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

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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	馬堡病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 943 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 Vero E6 細胞以 Eagles' minimum essential medium (EMEM，內含 10% 加熱去活化胎牛血清) 在 37°C，5% CO₂ 的條件下培養。

10.2 細胞貼附後，改以 2% FBS EMEM 做繼代培養。

10.3 送檢樣本先經過濾除去雜質後，上清液以 EMEM 培養液調整成 10% 的懸浮液。

10.4 以 100 μL 之該懸浮液，於 37°C 接種至 70%細胞滿的 25cm² 的培養瓶。

10.5 接種 2 hr 後，再加入 5 mL 2% FBS EMEM 培養液，置入 37°C，5% CO₂ 培養箱培養，每兩週做一次繼代培養。

10.6 先吸出上層培養液，以 0.25% Trypsine-EDTA 處理分離細胞，再混入原吸出之培養液，而後將 1/3 量置入新的 25 cm² 培養瓶，並以 2% EMEM 補足至 5 mL，置 37°C 5% CO₂ 培養箱培養 7 天。

10.7 另 1/3 置於 -70°C 凍存，另 1/3 量留做免疫螢光檢測用。

10.8 將適量經 Trypsin-EDTA 處理分離下來的 Vero-E6 細胞，滴至 12 孔玻片上，置於抽氣櫃中抽乾。

10.9 而後以 -20°C 1:1 之甲醇/丙酮溶劑固定 2 min，再放入抽氣櫃以揮發甲醇/丙酮固定液。

10.10 此檢體抹片可保存於 -20°C 冰箱中或直接染色。

10.11 以 PBS 沖洗各 well 後，在抹片上加上 25 μL 抗馬堡病毒單株抗體 (1:100 in PBS)。

10.12 將抹片放置在潮濕的培養皿中，置於 37°C 溫箱 30 min。

10.13 於 37°C 反應 30 min，以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 min。

10.14 在室溫中將玻璃片以冷風吹乾或陰乾。

10.15 將抹片加上 25 μL 螢光 FITC 標記之山羊抗兔抗體 (FITC-goat anti-rabbit IgG (1:100 in PBS))，於 37°C 反應 30 min。

10.16 以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 min。

10.17 滴上甘油緩衝液，然後以蓋玻片覆蓋。

10.18 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：	馬堡病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 944 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，檢體需在 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 溫箱染色時應注意保持溼度。
- 12.5 必須要有未感染病毒之細胞及感染病毒之細胞分別做為陰性與陽性對照組。

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 未使用完血清放回 -80°C 冰箱保存。

14 參考資料

- 14.1 Johnson ED, Johnson BK, Silverstein D, Tukei P, Geisbert TW, Sanchez AN, Jahrling PB. 1996. Characterization of a new Marburg virus isolated from a 1987 fatal case in Kenya. Arch Virol Suppl. 11: 101-114.
- 14.2 Conrad JL, Isaacson M, Smith EB, Wulff H, Crees M, Geldenhuys P, Johnston J. 1978. Epidemiologic investigation of Marburg virus disease, southern Africa, 1975. Am J Trop Med Hyg 27: 1210-1215.

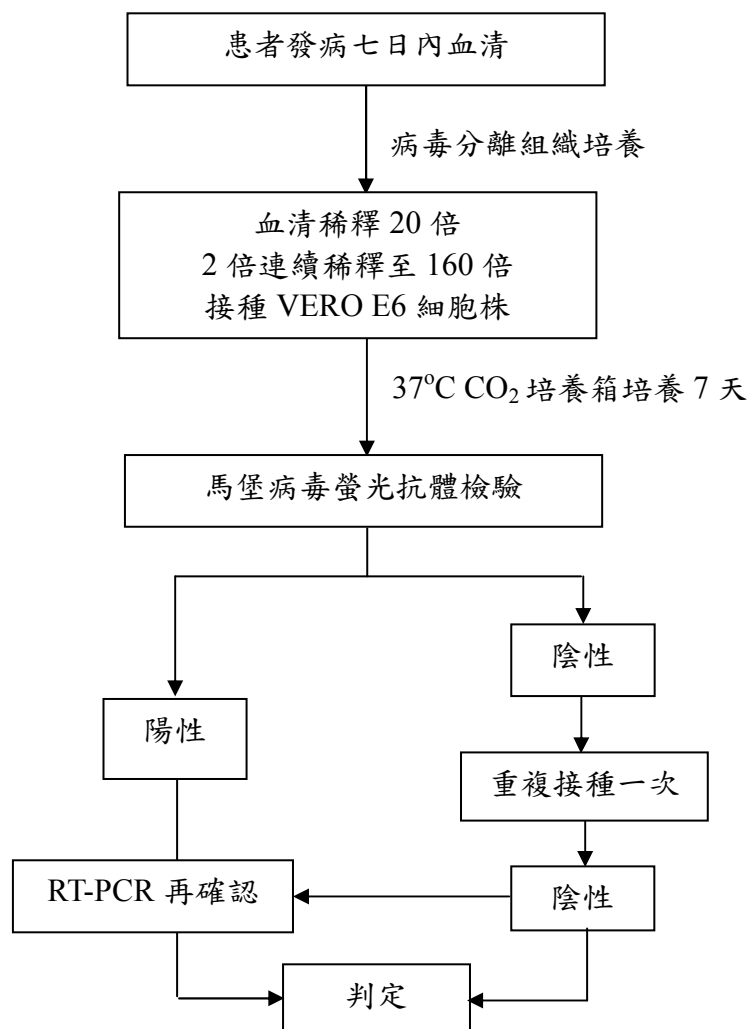
15 附錄

- 15.1 馬堡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：	馬堡病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 945 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 馬堡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：	馬堡病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 946 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測馬堡病毒核酸。

2 適用檢體種類

適用於符合馬堡病毒病徵之病患血清檢體。

3 名詞解釋

Marburg virus：馬堡病毒。

4 原理概述

其技術原理是將待測的病毒 RNA 序列經反轉錄酶 (Reverse Transcriptase) 的作用轉錄成 cDNA，再利用 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 RNA 抽取試劑組。

5.3 Qiagen one-step RT-PCR kit。

5.4 Real-Time PCR 儀器 LightCycler 所需之檢體毛細管。

5.5 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I (Cat. no. 03 003 230 001)。

5.6 Nuclease-free (RNase/DNase-free) 無菌微量吸管尖 (tip)：5 μ L、10 μ L、200 μ L。

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

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

5.9 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馬堡病毒之合成 VP40 基因取代完整病毒。

5.10 引子與探針的合成：

馬堡病毒的引子與探針合成，在選定偵測的病毒序列後 (VP40 gene)，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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	馬堡病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 947 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Filovirus (L gene Synthesis Marburg/Ebola)		
引子名稱	引子序列	備註
VP40 Forward	5'-GGACCACTGCTGGCCATATC-3'	
VP40 Reverse	5'-GTCGGCAGGAGGIGAAATCC-3'	

6 儀器設備

- 6.1 The LightCycler Instrument System。
- 6.2 微量吸管 (pipetmen)：5 μ L、10 μ L、200 μ L。
- 6.3 8 爪微量吸管。
- 6.4 全自動清洗器。
- 6.5 計時器。
- 6.6 37°C 水浴箱。

7 環境與設施安全

送檢樣本在 P4 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 (P2) 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 P4 (BSL-4) 實驗室操作。

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

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 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) 經過濾處理後分裝為三部份：
 - (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 RT-PCR 之實驗。

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 948 頁/共 1091 頁	馬堡病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

(3) 加入最終濃度為 10%福馬林中進行抗原之檢測。

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 RT-PCR 或 real-time RT-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 血清檢體病毒或細胞培養病毒液 RNA 之萃取：

使用 Qiagen 廠牌之 QIAamp Viral RNA 抽取試劑組，依廠牌步驟指示，略述如下：

10.2.1 取 140 μ L 血清加入 560 μ L AVL 溶液。

10.2.2 室溫靜置 10 min。

10.2.3 再加入 560 μ L 絕對酒精，混勻後，10,000 rpm 轉速離心使通過 QIAamp spin column。

10.2.4 續以 500 μ L AW 溶液清洗管柱兩次。

10.2.5 最後以 80°C 之 60 μ L RNase-free ddH₂O 沖流出病毒 RNA。

10.3 反轉錄反應 (reverse transcription)：

10.3.1 在由細胞培養液或血清檢體萃取出之 RNA 溶液中，加入上、下端引子 (100 μ L) 後，將此混合物於 90°C 加熱 5 min，置於冰上 3 min，

10.3.2 短暫離心收集溶液於管底。

10.3.3 取 20 μ L 此模版/引子溶液於 0.2 mL 離心管中。

10.3.4 並加入 5 μ L 10x 緩衝液 (500 mM KCl, 100 mM tris-HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 0.01% (v/v) gelatin)，4 μ L 2.5 mM dNTPs (BRL)，0.5 μ L 0.1 M DTT (dithiothreitol)，0.5 μ L 核糖核酸酵素抑制劑 (ribonuclease inhibitor, RNasin, 10U/ μ L, BRL)，0.5 μ L SuperScript™ II reverse transcriptase (RNase H-, 20U/ μ L, BRL)。

10.3.5 以 RNase-free ddH₂O 無菌水將總體積補至 50 μ L。

10.3.6 混合均勻後，於 LightCycler 進行反轉錄反應。

10.4 Real-Time PCR Amplification

10.4.1 製備試劑：

(1) 製備 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X conc.:

將 LightCycler FastStart enzyme (colorless cap) 取出 10 μ L 加入一管 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X Conc. (green cap) 中，可進行 32 Tests (保存於 4°C 可放置 1 週)。

(2) 製 Primer：

以 H₂O 將 forward 及 reverse primer 溶解，使其濃度為 100 μ M，再以 H₂O 將 primer 稀釋至最終濃度 5 μ M。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	馬堡病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日		
	頁次：第 949 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日		

10.4.2 製備 Real Time PCR Mix：

DNA template	4 μ L	
5 μ M Forward primer (F)	2 μ L	x Z
5 μ M Reverse primer (R)	2 μ L	x Z
LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X conc.	2 μ L	x Z
25 mM MgCl ₂ stock solution	2 μ L	x Z
H ₂ O	8 μ L	x Z
Total 20 μ L		

(Z=總反應數+1)

以微量吸管混合均勻，勿 vortex。

10.4.3 取 16 μ L 的 Real Time PCR Mix 至 LightCycler 專用毛細管中。

10.4.4 加入 DNA template 各 4 μ L。

10.4.5 將各毛細管封上專用蓋子。

10.4.6 離心 700 x g，5 sec (或 spin down)。

10.4.7 將毛細管依序放入檢體轉盤。

10.4.8 Run Real-Time PCR：

【Pre-incubation】

95°C 10 min 1 cycle

【Amplification】

Denaturing	95°C	┌ ├ └	10 sec	45 cycles
Annealing	55°C		10 sec	
Extension	72°C		25 sec	

Acquisition mode: single

【Melting curve analysis】

Denaturing	95°C	0 sec
Annealing	65°C	15 sec
Melting	95°C	0 sec

Slope = 0.1°C /sec

Acquisition mode: continuous

【Cooling】

40°C 30 sec

10.4.9 利用儀器軟體中的 melting curve analysis 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 T_m 曲線的鑑定過程在 30 min 內，經螢光放射分析即可得到結果。並將陽性對照組之模板 DNA 用量為 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg 等核酸濃度，測定核酸與循環數之標準曲線，可應用於檢體之定量分析。

11.2 報告核發：有螢光曲線產生、melting curve analysis 分析正確，則可判定為陽性。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	馬堡病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 950 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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

12 品質管制

- 12.1 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 必須要有未感染病毒之細胞及感染病毒之細胞分別做為陰性與陽性對照組。

13 廢棄物處理

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

14 參考資料

Towner JS, Khristova ML, Sealy TK, Vincent MJ, Erickson BR, Bawiec DA, Hartman AL, Comer JA, Zaki SR, Ströher U, da Silva FG, del Castillo F, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. 2006. Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. J Virol 80: 6497-6516.

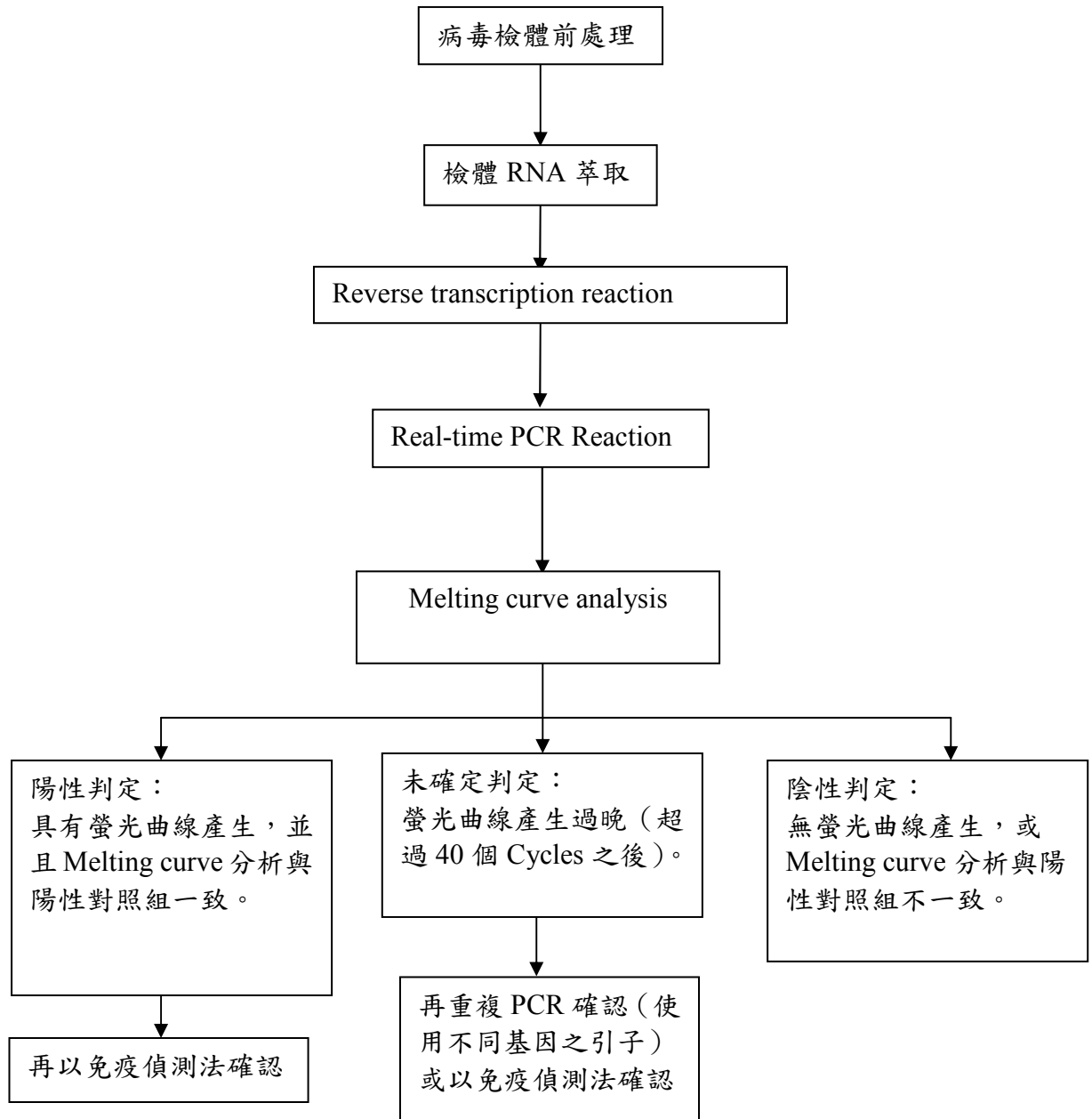
15 附錄

- 15.1 馬堡病毒核酸檢測分析法流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	馬堡病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 951 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 馬堡病毒核酸檢測 (real-time RT-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：	馬堡病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 952 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測馬堡病毒抗體。

2 適用檢體種類

適用於符合馬堡病毒病徵之病患血清檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用馬堡病毒合成蛋白作為抗原，與病患血清進行抗原抗體反應，以酵素標幟抗體間接地將此反應轉成顏色訊號，由全自動酵素免疫分析儀讀取結果。

5 試劑耗材

- 5.1 清洗液 PBST (PBS pH 7.2 含 0.05% Tween 20)。
- 5.2 檢體稀釋液 (PBST 含 0.5% BSA)。
- 5.3 已吸附馬堡病毒合成蛋白之 96 孔微量滴定盤。
- 5.4 抗人類 IgM 之 HRP (horseradish peroxidase) 酵素結合抗體 (peroxidase conjugated affinity purified anti-human IgM μ 【goat】)，Sigma，USA。
- 5.5 HRP 穩定液 (HRP stabilizer)，Sigma，USA。
- 5.6 呈色劑 (TMB 受質) Sigma，USA。
- 5.7 終止液 (2 M H₂SO₄)，Merck，Germany。
- 5.8 陽性馬堡病毒合成蛋白標準液。
- 5.9 無菌蒸餾水。
- 5.10 八連排血清稀釋管。
- 5.11 八連排血清稀釋架。
- 5.12 無菌微量吸管尖 (tip)：10 μ L、200 μ L、1,000 μ L。
- 5.13 96 孔微量滴定盤封膜。
- 5.14 可拋棄式無菌塑膠手套。

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 全自動酵素免疫分析儀 (ELISA reader：BioTek Quant, USA)。
- 6.3 全自動清洗器。
- 6.4 微量吸管 (pipetmen)：1,000 μ L、100 μ L、30 μ L。
- 6.5 8 爪微量吸管。
- 6.6 計時器。
- 6.7 37°C 溫箱。

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：	馬堡病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 953 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

於生物安全第四等級實驗室內檢體分裝、去活化。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

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 檢驗前血清處理

10.1.1 檢體以 2,000 rpm 離心 10 min，分離出血清備用。

10.2 酵素免疫分析盤處理

10.2.1 將 96 孔酵素免疫分析盤加入 100 μ L 1：2000 稀釋之病毒抗原混合液。

10.2.2 將製備抗原之 96 孔酵素免疫分析盤靜置於 4°C，隔夜後即可使用。把製備備好的酵素免疫分析盤先以 washing machine 以磷酸緩衝液 PBST 洗淨。

10.2.3 酵素免疫分析盤注入清洗液放置 5 min，以 PBST 清洗 3 次。

10.3 陽性對照血清（亦即陽性標準液）

10.3.1 陽性對照血清乃利用馬堡病毒合成蛋白所生成之兔子多源抗體。

10.3.2 操作方式與待測血清相同，但使用不同種源的二級抗體（goat anti-rabbit IgG-HRP, Cappel）。

10.3.3 作為酵素免疫分析盤 coating 馬堡蛋白是否良好的對照組。

10.4 待測血清

10.4.1 將待測血清以 10%脫脂乳（skimmed milk）以 1：100 濃度稀釋，分別加入 100 μ L 稀釋血清於盤中之對照組及實驗組中。

10.4.2 分別加入稀釋後之血清檢體，各檢體需二重複試驗。

10.4.3 於 37°C 中作用 1 hr 後，以 PBST 清洗酵素免疫分析盤。

10.4.4 以 PBS 清洗 4 次，拍乾酵素免疫分析盤。

10.4.5 在酵素免疫分析盤中之孔內，各加入 100 μ L 以 1：2,000 稀釋之第二抗體（goat anti-human IgM-HRP）。

10.4.6 再置於 37°C 反應 1 hr。

10.4.7 以清洗液清洗 4 次，拍乾酵素免疫分析盤。

10.4.8 清洗酵素免疫分析盤後，每孔加入 100 μ L 之呈色劑（TMB-0.035% H₂O₂, in citrate buffer, pH5.5）置於室溫於黑暗中作用 15-20 min。

10.4.9 每孔加入 50 μ L 反應終止溶液（2 M H₂SO₄）。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	馬堡病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 954 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.4.10 以分光光度計 OD₄₅₀ 測其吸光值。

11 結果判定

判讀標準：將 OD₄₅₀ 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 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

Gonzalez JP, Nakoune E, Slenczka W, Vidal P, Morvan JM. 2000. Ebola and Marburg virus antibody prevalence in selected populations of the Central African Republic. Microbes Infect 2: 39-44.

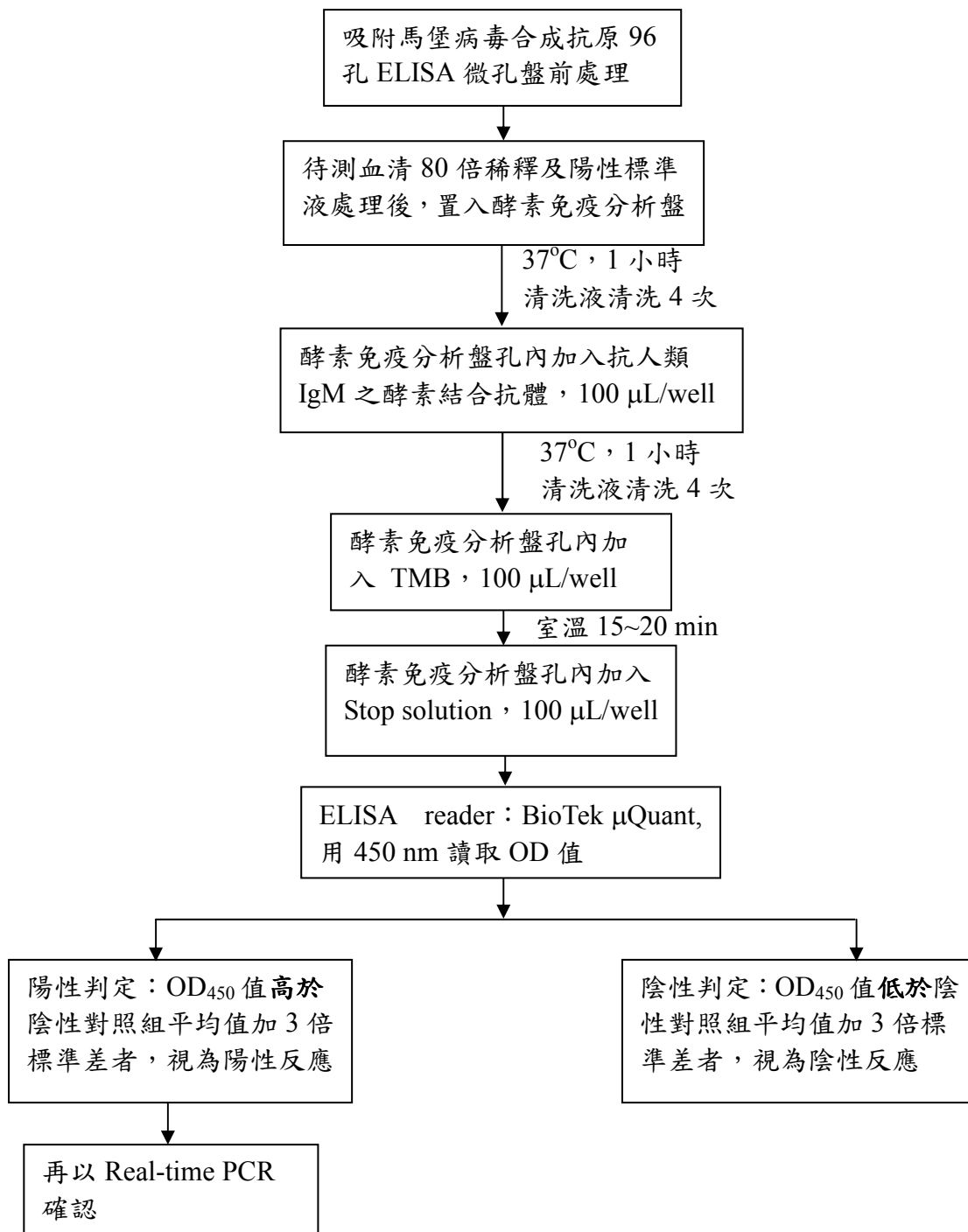
15 附錄

15.1 馬堡病毒抗體試驗-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：	馬堡病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 955 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 馬堡病毒抗體試驗（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： 頁次：第 956 頁/共 1091 頁	黃熱病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測疑似病患的血液或組織中是否含有黃熱病毒。

2 適用範圍

適用於急性期病患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 7 日，取其細胞於 24 孔玻璃片上，加入抗黃熱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，測定是否有黃熱病毒。

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 黃熱病毒 (17D, 疫苗株)：黃熱病毒以 C6/36 細胞培養 7 天，取上清液，當黃熱病毒來源。
- 5.4 單株抗體
抗黃病毒單株抗體 (ATCC HB-112)。
- 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 μ L、1250 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 40-00 μ L Pipette。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	黃熱病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 957 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 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 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 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 1×10^6 /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 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。

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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	黃熱病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 958 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12 品質管制

- 12.1 嚴防病原散佈或污染，工作時帶手套。
- 12.2 實驗過程遵循 S.O.P 的作業規範與流程，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 Liouchyou Shiang, Pingtung County in 1981. Chin J Microbio 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.

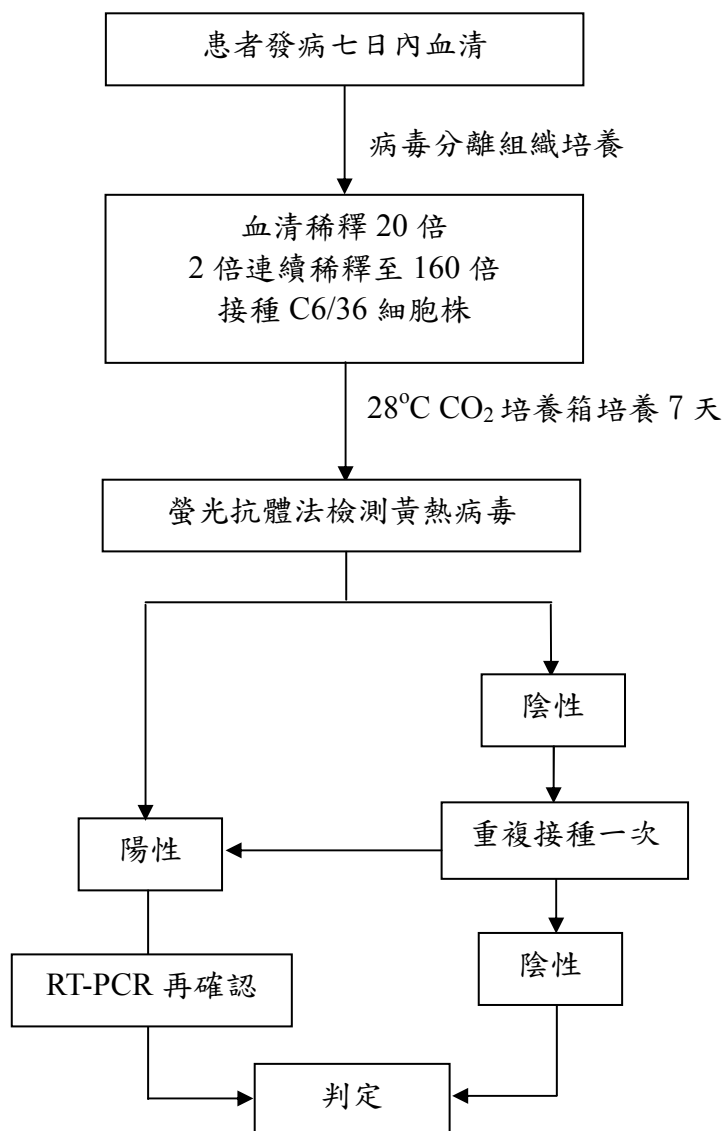
15 附錄

- 15.1 黃熱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：	黃熱病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 959 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 黃熱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：	黃熱病毒分子生物學核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 960 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

以反轉錄酶－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黃熱病病毒核酸。

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

4 原理概述

利用對黃熱病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黃熱病病毒核酸序列，所用之引子選自於黃熱病病毒之保守性序列 (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) MgCl₂。

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：	黃熱病毒分子生物學核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 961 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 逆滲透去離子可達 18 MΩ-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：	黃熱病毒分子生物學核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 962 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酶－聚合酶鏈鎖反應 (one-step real-time RT-PCR)。

11.2.1 取 5 μ L RNA 做模板，加入黃熱病病毒專一性引子組 (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	如參考附件 15.2
Primer B	Variable	如參考附件 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酶－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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	黃熱病毒分子生物學核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 963 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(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，凡樣品經黃熱病病毒專一性引子之 Ct 值小於 40 者，判為黃熱病陽性。

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存溫度。

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 Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerd-Chambaz Y, Colombani S, Moste C, Barban V. 2008. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. J Virol Methods 151: 40-46.

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：	黃熱病毒分子生物學核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 964 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

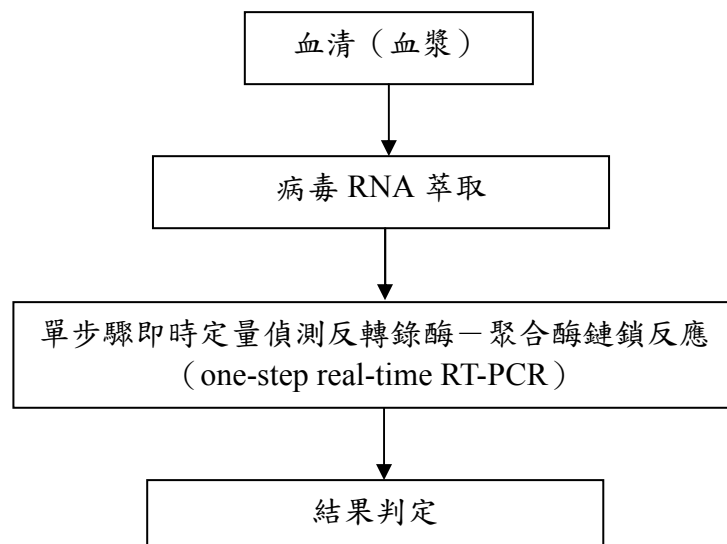
16 附錄

- 16.1 黃熱病病毒鑑定（單步驟即時定量反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應）流程圖。
- 16.2 黃熱病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：	黃熱病毒分子生物學核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 965 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.1 黃熱病病毒鑑定（單步驟即時定量偵測反轉錄酶－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：	黃熱病毒分子生物學核酸檢測 (RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 966 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.2 黃熱病病毒診斷用引子組序列表

yellow fever virus specific primer：		參與反應的濃度
YF-NS5-F	GCA CGG ATG TAA CAG ACT GAA GA	200 nM
YF-NS5-R	CCA GGC CGA ACC TGT CAT	200 nM

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 967 頁/共 1091 頁	黃熱病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

- 1 目的
黃熱病毒 IgM 和 IgG 抗體檢測。
- 2 適用範圍
適用於病人血清檢體。
- 3 名詞解釋
無。
- 4 原理概述
利用 Capture IgM 與 IgG 酵素免疫分析法,測定病人血清中之黃熱病毒特異性抗體。
- 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 黃熱病陽性對照血清 (以 dilution buffer 1 : 100 稀釋)。
 - 5.3.2 日本腦炎陽性對照血清 (以 dilution buffer 1 : 100 稀釋)。
 - 5.3.3 陰性對照血清 (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 黃熱病毒 : YFV, strain 17D。
 - 5.4.2 日本腦炎病毒 : JEV, strain JaGAR。
 - 5.5 抗黃病毒屬外套抗原 (envelope) 單株抗體腹水 (Glyconex, Cat. no. FL0232, Taiwan)。
 - 5.6 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體。(goat anti-mouse IgG-AP conjugate, Jackson, Code no. 115-006-071, USA)
 - 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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	黃熱病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 968 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

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 黃熱病與日本腦炎病毒的細胞培養液分別以 Dilution buffer 不同倍稀釋後，各取等量混合加入 1：1,000 之抗黃病毒屬抗原單株抗體腹水 FL0232。
- 10.3 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體以 Dilution buffer 1：2,000 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 含抗黃病毒屬抗原單株抗體腹水 FL0232 之黃熱病病毒細胞培養稀釋液及日本腦炎細胞培養稀釋液 (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。

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 969 頁/共 1091 頁	黃熱病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

10.13 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 若血清檢體之黃熱病毒特異性 IgM 抗體之 OD 值大於 0.5，且黃熱病毒 IgM OD 值/日本腦炎病毒 IgM OD 值大於或等於 2，判為黃熱病 IgM 陽性。
- 11.2 若血清檢體之黃熱病毒特異性 IgG 抗體之 OD 值大於 0.5，判為黃熱病 IgG 陽性。
- 11.3 黃熱病陽性對照血清應符合 IgM OD 值 > 1.0，IgG OD 值 > 0.5。
- 11.4 日本腦炎陽性對照血清應符合 IgM OD 值 > 1.0，IgG OD 值 > 0.5。
- 11.5 陰性對照血清應符合 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 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.

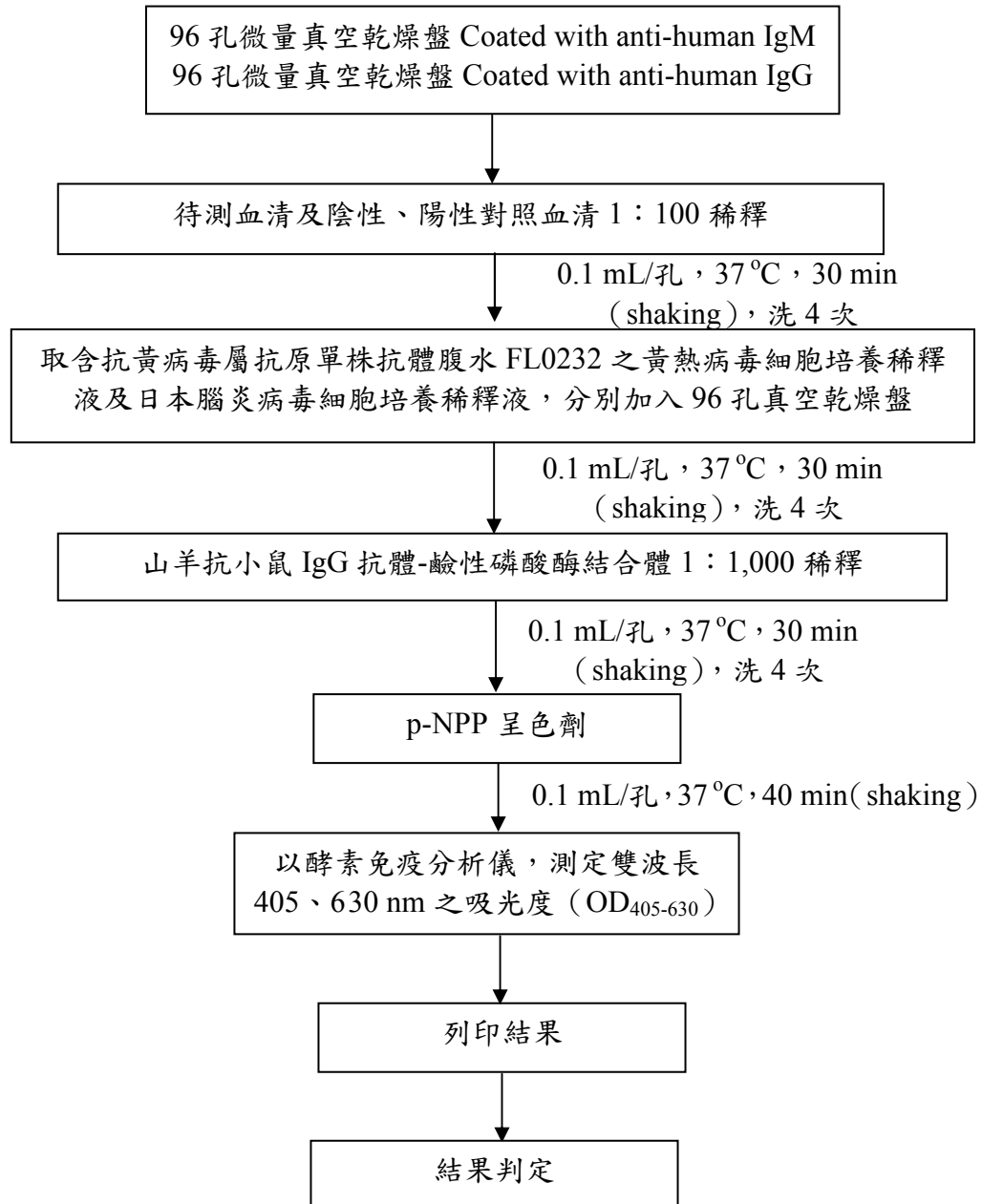
15 附錄

- 15.1 黃熱病毒 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：	黃熱病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA)	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 970 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

附錄 15.1 黃熱病毒 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：	伊波拉病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 971 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伊波拉病毒。

2 適用範圍

適用於病患急性期發病七日內血液檢體或組織檢體。

3 名詞解釋

Ebola virus：伊波拉病毒。

4 原理概述

利用非洲綠猴腎臟上皮細胞株 Vero E6 於組織培養盤中接種病患血清或組織研磨液，於 37°C 培養箱中培養 7 日，取其細胞於 12 孔玻璃片上，加入抗伊波拉病毒多株抗體及螢光標記的山羊抗兔抗體，於螢光顯微鏡下檢查，測定是否有伊波拉病毒。

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 伊波拉病毒 (合成蛋白)：以合成蛋白作為伊波拉病毒之陽性對照組。

5.4 多株抗體：抗伊波拉病毒多株抗體。

5.5 FITC-Goat Anti-Rabbit IgG (Invitrogen, USA, Cat. no. 81-6111)。

5.6 丙酮 (Acetone, Merck, Germany, Cat. no. : 1.00020)。

5.7 磷酸鹽緩衝液 (PBS, Gibco, USA, Cat. no. 14200-075) 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 12 孔玻璃片 (BioMerieux., France, Cat. No. 7-571-1)。

5.12 蓋玻片。

5.13 無菌 20 μ L、200 μ L、1,000 μ L 之吸管尖。

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 (SterilGARD III Advance, USA, Baker Company)。

6.4 螢光顯微鏡 (Olympus, Japan, IX71)。

6.5 5-40 μ L、40-200 μ L、200-1,000 μ L Pipette。

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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	伊波拉病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 972 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

7 環境設施安全

7.1 檢驗操作在生物安全等級 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 Vero E6 細胞以 Eagles' minimum essential medium (EMEM，內含 10% 加熱去活化胎牛血清) 在 37°C，5% CO₂ 的條件下培養。

10.2 細胞貼附後，改以 2% FBS EMEM 做繼代培養。

10.3 送檢樣本先經過濾除去雜質後，上清液以 EMEM 培養液調整成 10% 的懸浮液。

10.4 以 100 μL 之該懸浮液，於 37°C 接種至 70% 細胞滿的 25cm² 的培養瓶。

10.5 接種 2 hr 後，再加入 5mL 2% FBS EMEM 培養液，置入 37°C，5% CO₂ 培養箱培養，每兩週做一次繼代培養。

10.6 先吸出上層培養液，以 0.25% Trypsine-EDTA 處理分離細胞，再混入原吸出之培養液，而後將 1/3 量置入新的 25 cm² 培養瓶，並以 2% FBS EMEM 補足至 5 mL，置 37°C，5% CO₂ 培養箱培養 7 天。

10.7 另 1/3 置於 -70°C 凍存，另 1/3 量留做免疫螢光檢測用。

10.8 將適量經 Trypsin-EDTA 處理分離下來的 Vero-E6 細胞，滴至 12 孔玻片上，置於抽氣櫃中抽乾。

10.9 而後以 -20°C 1:1 之甲醇/丙酮溶劑固定 2 min，再放入抽氣櫃以揮發甲醇/丙酮固定液。

10.10 此檢體抹片可保存於 -20°C 冰箱中或直接染色。

10.11 以 PBS 沖洗各孔後，在抹片上加上 25 μL 抗伊波拉病毒單株抗體 (1:100 in PBS)。

10.12 將抹片放置在潮濕的培養皿中，置於 37°C 溫箱 30 min。

10.13 於 37°C 反應 30 min，以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 min。

10.14 在室溫中將玻璃片以冷風吹乾或陰乾。

10.15 將抹片加上 25 μL 螢光 FITC 標記之山羊抗兔抗體 (FITC-goat anti-rabbit IgG (1:100 in PBS)，於 37°C 反應 30 min。

10.16 以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 min。

10.17 滴上甘油緩衝液，然後以蓋玻片覆蓋。

10.18 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：	伊波拉病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 973 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，檢體需在 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 溫箱染色時應注意保持溼度。
- 12.5 必須要有未感染病毒之細胞及感染病毒之細胞分別做為陰性與陽性對照組。

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 未使用完血清放回 -80°C 冰箱保存。

14 參考資料

- 14.1 Le Guenno B, Formenty P, Wyers M, Gounon P, Walker F, Boesch C. 1995. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. Lancet 345: 1271-1274.
- 14.2 Volchkov VE, Volchkova VA, Mühlberger E, Kolesnikova LV, Weik M, Dolnik O, Klenk HD. 2001. Recovery of Infectious Ebola Virus from Complementary DNA: RNA Editing of the GP Gene and Viral Cytotoxicity. Science 291 (5510): 1965-1969.

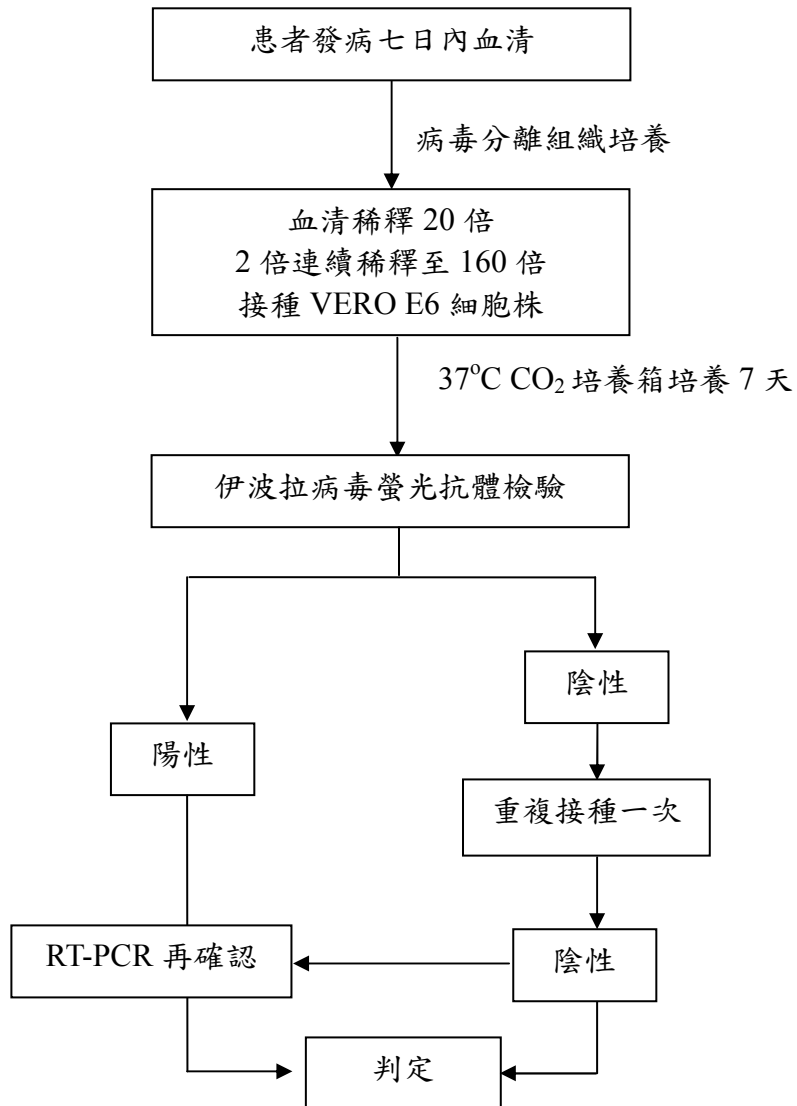
15 附錄

- 15.1 伊波拉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：	伊波拉病毒分離與鑑定	核准日期：	年	月	日
	頁次：第 974 頁/共 1091 頁		修訂日期：	年	月	日

附錄 15.1 伊波拉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：	伊波拉病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 975 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測伊波拉病毒核酸。

2 適用檢體種類

適用於符合伊波拉病毒病徵之病患血清檢體。

3 名詞解釋

Ebola virus：伊波拉病毒。

4 原理概述

其技術原理是將待測的病毒 RNA 序列經反轉錄酶 (reverse transcriptase) 的作用轉錄成 cDNA，再利用 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 RNA 抽取試劑組。

5.3 Qiagen one-step RT-PCR kit。

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

5.5 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I (Cat. no. 03 003 230 001)。

5.6 Nuclease-free (RNase/DNase-free) 無菌微量吸管尖 (tip)：5 μ L、10 μ L、200 μ L。

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

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

5.9 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伊波拉病毒之合成 L 基因取代完整病毒。

5.10 引子與探針的合成：

伊波拉病毒的引子與探針合成，在選定偵測的病毒序列後 (L gene)，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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	伊波拉病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 976 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Filovirus (L gene Synthesis Ebola virus)		
引子名稱	引子序列	備註
Filo A-13213-34 Forward	5-ATCGGAATTTTCTTTCTCATT-3	419 bp
Filo B-13631-01 Reverse	5-ATGTGGTGGGTATAATAATCACTGACATG-3	

6 儀器設備

- 6.1 The LightCycler instrument Ssystem。
- 6.2 微量吸管 (pipetemen)：5 μ L、10 μ L、200 μ L。
- 6.3 8 爪微量吸管。
- 6.4 全自動清洗器。
- 6.5 計時器。
- 6.6 37°C 水浴箱。

7 環境與設施安全

送檢樣本在 P4 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 Thiocynate 處理才可進入分生 (P2)
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 P4 (BSL-4) 實驗室操作。

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

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 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
分裝為三部份：
 - (1) 感染細胞株進行病毒培養。
 - (2) 加入 Guanidine thiocynate 溶液中進行病毒核酸抽取及
RT-PCR 之實驗。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	伊波拉病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 977 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(3) 加入最終濃度為 10%福馬林中進行抗體檢測。

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 RT-PCR 或 Real-time RT-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 血清檢體病毒或細胞培養病毒液 RNA 之萃取：

使用 Qiagen 廠牌之 QIAamp viral RNA 抽取試劑組，依廠牌步驟指示，略述如下：

10.2.1 取 140 μ L 血清加入 560 μ L AVL 溶液。

10.2.2 室溫靜置 10 min。

10.2.3 再加入 560 μ L 絕對酒精，混勻後，10,000 rpm 轉速離心使通過 QIAamp Spin Column。

10.2.4 續以 500 μ L AW 溶液清洗管柱兩次。

10.2.5 最後以 80°C 之 60 μ L RNase-free ddH₂O 沖流出病毒 RNA。

10.3 反轉錄反應 (reverse transcription)：

10.3.1 在由細胞培養液或血清檢體萃取出之 RNA 溶液中，加入上、下端引子 (100 μ L) 後，將此混合物於 90°C 加熱 5 min，置於冰上 3 min。

10.3.2 短暫離心收集溶液於管底。

10.3.3 取 20 μ L 此模版/引子溶液於 0.2 mL 離心管中。

10.3.4 並加入 5 μ L 10x 緩衝液 (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH8.3, 15 mM MgCl₂, 0.01% (v/v) gelatin)，4 μ L 2.5 mM dNTPs (BRL)，0.5 μ L 0.1M DTT (dithiothreitol)，0.5 μ L 核糖核酸酵素抑制劑 (ribonuclease inhibitor, RNasin, 10U/ μ L, BRL)，0.5 μ L SuperScript™ II reverse transcriptase (RNase H-, 20U/ μ L, BRL)。

10.3.5 以 RNase-free ddH₂O 無菌水將總體積補至 50 μ L。

10.3.6 混合均勻後，於 LightCycler 進行反轉錄反應。

10.4 Real-time PCR amplification

10.4.1 製備試劑：

(1) 製備 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X conc.:

將 LightCycler FastStart enzyme (colorless cap) 取出 10 μ L 加入一管 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X conc. (green cap) 中，可進行 32 Tests (保存於 4°C 可放置 1 週)。

(2) 製備 primer：

以 H₂O 將 Forward 及 Reverse primer 溶解，使其濃度為 100 μ M，再以 H₂O 將 Primer 稀釋至最終濃度 5 μ M。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	伊波拉病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日		
	頁次：第 978 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日		

10.4.2 製備 Real time PCR mix：

DNA template	4 μ L	
5 μ M Forward primer (F)	2 μ L	x Z
5 μ M Reverse primer (R)	2 μ L	x Z
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, 10X conc.	2 μ L	x Z
25 mM MgCl ₂ stock solution	2 μ L	x Z
H ₂ O	8 μ L	x Z
Total 20 μ L		

(Z=總反應數+1)

以微量吸管混合均勻，勿 Vortex。

10.4.3 取 16 μ L 的 Real time PCR mix 至 LightCycler 專用毛細管中。

10.4.4 加入 DNA template 各 4 μ L。

10.4.5 將各毛細管封上專用蓋子。

10.4.6 離心 700 xg，5 sec (或 spin down)。

10.4.7 將毛細管依序放入檢體轉盤。

10.4.8 Run Real-Time PCR：

【Pre-incubation】

95°C 10 min 1 cycle

【Amplification】

Denaturing	95°C	┌ ├ └	10 sec	45 cycles
Annealing	55°C		10 sec	
Extension	72°C		25 sec	

Acquisition Mode: single

【Melting curve analysis】

Denaturing	95°C	0 sec
Annealing	65°C	15 sec
Melting	95°C	0 sec

Slope = 0.1°C/sec

Acquisition Mode: continuous

【Cooling】

40°C 30 sec

10.4.9 利用儀器軟體中的 melting curve analysis 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 T_m 曲線的鑑定過程在 30 min 內，經螢光放射分析即可得到結果。並將陽性對照組之模板 DNA 用量為 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg 等核酸濃度，測定核酸與循環數之標準曲線，可應用於檢體之定量分析。

11.2 報告核發：有螢光曲線產生、melting curve analysis 分析正確，則可判定為陽性。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	伊波拉病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 979 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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

12 品質管制

- 12.1 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 必須要有未感染病毒之細胞及感染病毒之細胞分別做為陰性與陽性對照組。

13 廢棄物處理

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

14 參考資料

- 14.1 Sanchez A, Ksiazek TG, Rollin PE, Miranda MEG, Trappier SG, Khan AS, Peters CJ, Nichol ST. Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. J Infect Dis179 (Supp.1): S164-S169.
- 14.2 Duh D, Saksida A, Petrovec M, Dedushaj I, Avšič-Županc T. 2006. Novel one-step real-time RT-PCR assay for rapid and specific diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever encountered in the Balkans. J Virol Methods 133: 175-179.

15 附錄

- 15.1 伊波拉病毒核酸檢測分析法流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

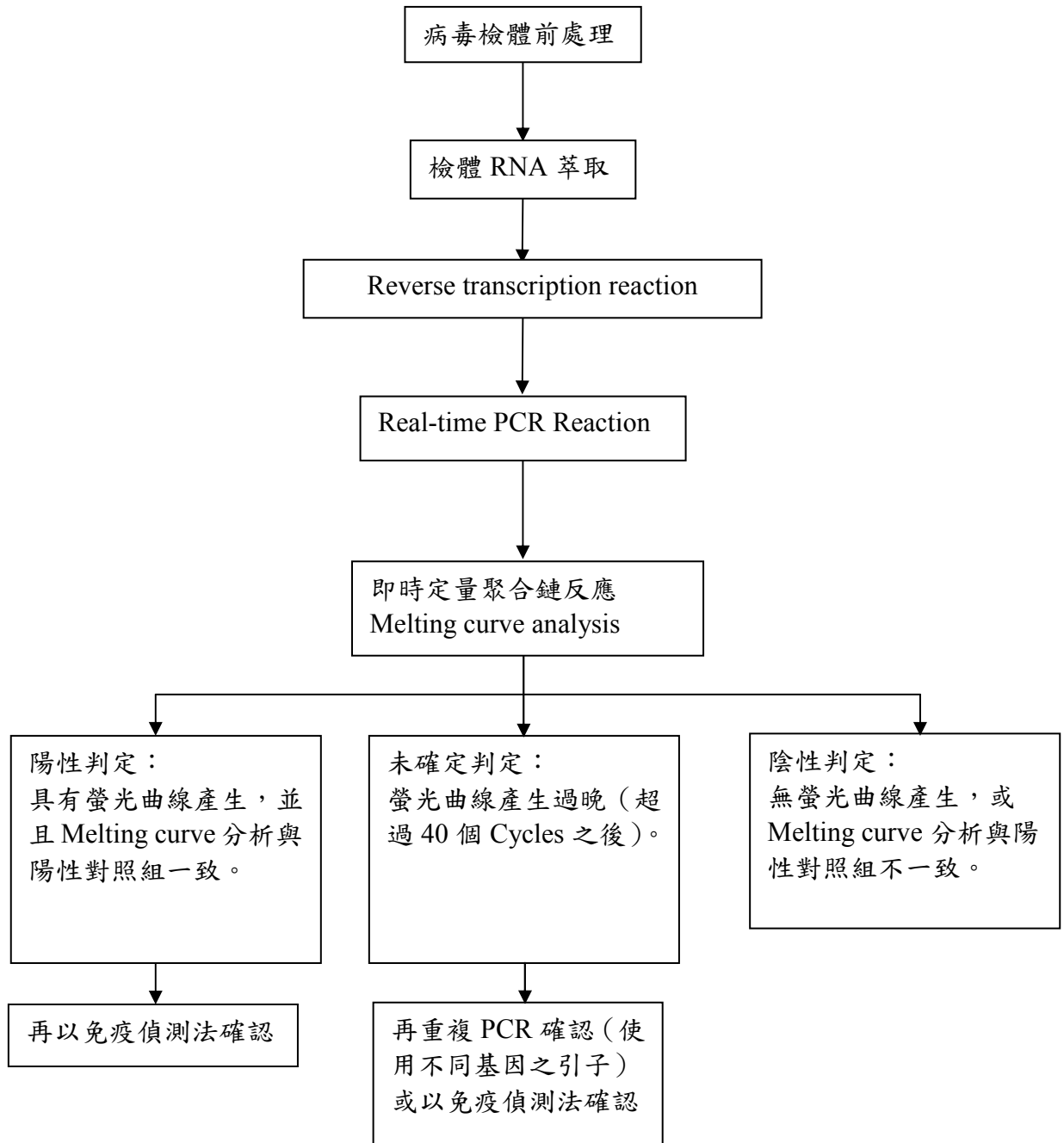


編號：
頁次：第 980 頁/共 1091 頁

伊波拉病毒核酸檢測
(Real-time RT-PCR)

核准日期： 年 月 日
修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 伊波拉病毒核酸檢測 (real-time RT-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：	伊波拉病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 981 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測伊波拉病毒抗體。

2 適用檢體種類

適用於符合伊波拉病毒病徵之病患血清檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用伊波拉病毒合成蛋白作為抗原，與病患血清進行抗原抗體反應，以酵素標幟抗體間接地將此反應轉成顏色訊號，由全自動酵素免疫分析儀讀取結果。

5 試劑耗材

- 5.1 清洗液 PBST (PBS pH 7.2 含 0.05% Tween 20)。
- 5.2 檢體稀釋液 (PBST 含 0.5% BSA)。
- 5.3 已吸附伊波拉病毒合成蛋白之 96 孔微量滴定盤。
- 5.4 抗人類 IgM 之 HRP (Horseradish Peroxidase) 酵素結合抗體 (Peroxidase Conjugated Affinity Purified Anti-human IgM μ 【goat】)，Sigma，USA。
- 5.5 HRP 穩定液 (HRP Stabilizer)，Sigma，USA。
- 5.6 呈色劑 (TMB 受質) Sigma，USA。
- 5.7 終止液 (2 M H_2SO_4)，Merck，Germany。
- 5.8 陽性伊波拉病毒合成蛋白標準液。
- 5.9 無菌蒸餾水。
- 5.10 八連排血清稀釋管。
- 5.11 八連排血清稀釋架。
- 5.12 無菌微量吸管尖 (tip)：10 μ L、200 μ L、1,000 μ L。
- 5.13 96 孔微量滴定盤封膜。
- 5.14 可拋棄式無菌塑膠手套。

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 全自動酵素免疫分析儀 (ELISA reader：BioTek Quant, USA)。
- 6.3 全自動清洗器。
- 6.4 微量吸管 (pipetmen)：1,000 μ L、100 μ L、30 μ L。
- 6.5 8 爪微量吸管。
- 6.6 計時器。
- 6.7 37°C 溫箱。

7 環境與設施安全

於生物安全第四等級實驗室內檢體分裝、去活化。於生物安全第二等級

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	伊波拉病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 982 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(BSL-2) 實驗室之設施內操作。

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

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 檢驗前血清處理

10.1.1 檢體以 2,000 rpm 離心 10 min，分離出血清備用。

10.2 酵素免疫分析盤處理

10.2.1 將 96 孔酵素免疫分析盤加入 100 μ L 1：2000 稀釋之病毒抗原混合液。

10.2.2 將製備抗原之 96 孔酵素免疫分析盤靜置於 4°C，隔夜後即可使用。把製備備好的酵素免疫分析盤先以 washing machine 以磷酸緩衝液 PBST 洗淨。

10.2.3 酵素免疫分析盤注入清洗液放置 5 min，以 PBST 清洗 3 次。

10.3 陽性對照血清（亦即陽性標準液）

10.3.1 陽性對照血清乃利用伊波拉病毒合成蛋白所生成之兔子多株抗體。

10.3.2 操作方式與待測血清相同，但使用不同種源的二級抗體（goat anti-rabbit IgG-HRP, Cappel）。

10.3.3 作為酵素免疫分析盤 coating 伊波拉蛋白是否良好的對照組。

10.4 待測血清

10.4.1 將待測血清以 10% 脫脂乳（skimmed milk）以 1：100 濃度稀釋，分別加入 100 μ L 稀釋血清於盤中之對照組及實驗組中。

10.4.2 分別加入稀釋後之血清檢體，各檢體需二重複試驗。

10.4.3 於 37°C 中作用 1 hr 後，以 PBST 清洗酵素免疫分析盤。

10.4.4 以 PBS 清洗 4 次，拍乾酵素免疫分析盤。

10.4.5 在酵素免疫分析盤中之孔內，各加入 100 μ L 以 1：2000 稀釋之第二抗體（goat anti-human IgM-HRP）。

10.4.6 再置於 37°C 反應 1 hr。

10.4.7 以清洗液清洗 4 次，拍乾酵素免疫分析盤。

10.4.8 清洗酵素免疫分析盤後，每孔加入 100 μ L 之呈色劑（TMB-0.035% H₂O₂, in Citrate buffer, pH 5.5）置於室溫於黑暗中作用 15-20 min。

10.4.9 每孔加入 50 μ L 反應終止溶液（2 M H₂SO₄）。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	伊波拉病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 983 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.4.10 以分光光度計 OD₄₅₀ 測其吸光值。

11 結果判定

判讀標準：將 OD₄₅₀ 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 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 Ksiazek TG, West CP, Rollin PE, Jahrling PB, Peters CJ. 1999. ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. J Infect Dis 179 (suppl. 1): S192-S198.
- 14.2 Gonzalez JP, Nakoune E, Slenczka W, Vidal P, Morvan JM. 2000. Ebola and Marburg virus antibody prevalence in selected populations of the Central African Republic. Microbes Infect 2: 39-44.

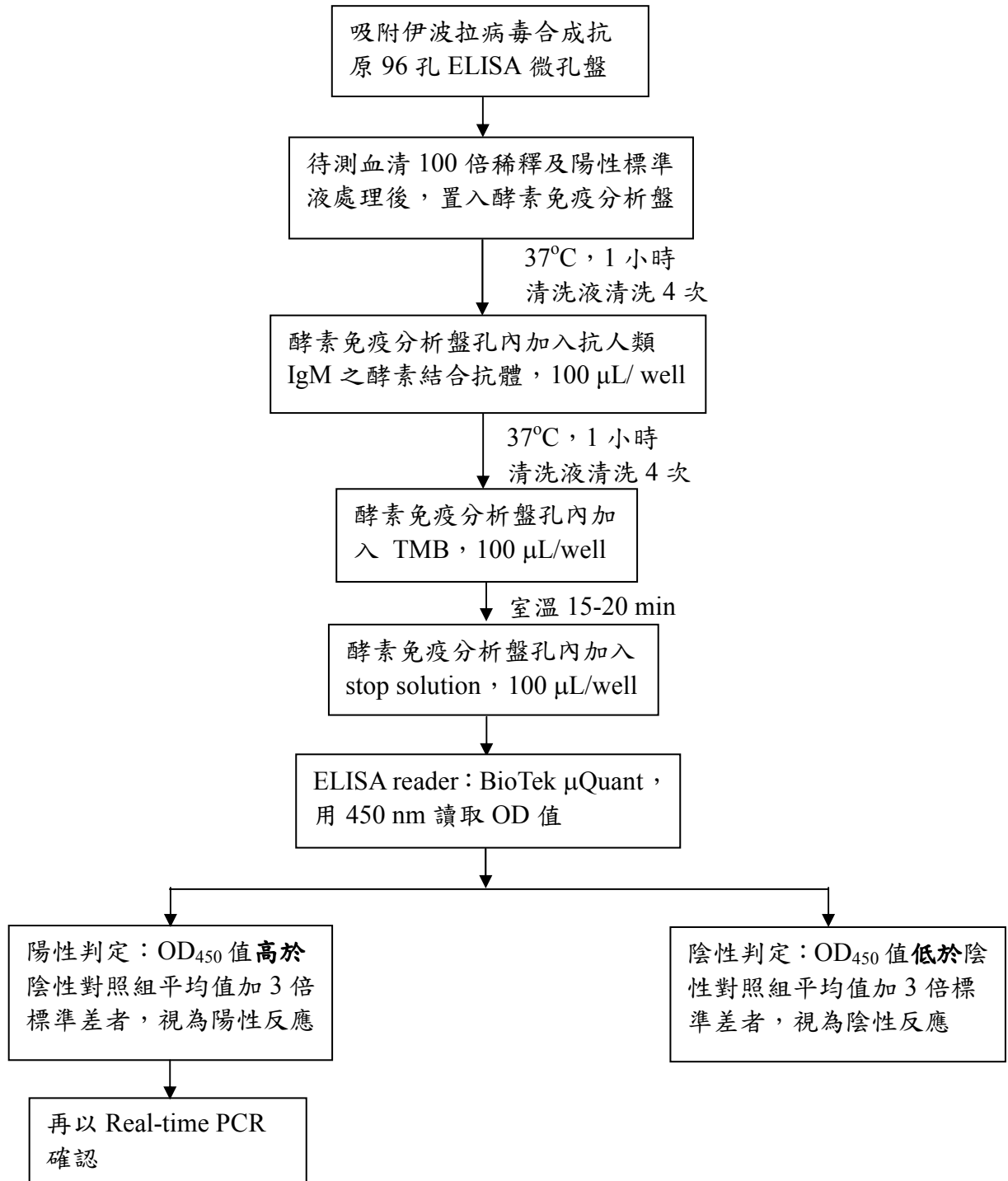
15 附錄

- 15.1 伊波拉病毒抗體試驗（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：	伊波拉病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 984 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 伊波拉病毒抗體試驗（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：	拉薩病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 985 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拉薩病毒。

2 適用範圍

適用於病患急性期發病七日內血液檢體或組織檢體。

3 名詞解釋

Lassa virus：拉薩病毒。

4 原理概述

利用非洲綠猴腎臟上皮細胞株 Vero E6 於組織培養盤中接種病患血清或組織研磨液，於 37°C 培養箱中培養 7 日，取其細胞於 12 孔玻璃片上，加入抗拉薩病毒多株抗體及螢光標記的山羊抗兔抗體，於螢光顯微鏡下檢查，測定是否有拉薩病毒。

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 拉薩病毒 (合成蛋白)：以合成蛋白作為拉薩病毒之陽性對照組。
- 5.4 多株抗體：抗拉薩病毒多株抗體。
- 5.5 FITC-goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA, Cat. no. 81-6111)。
- 5.6 丙酮 (acetone, Merck, Germany, Cat. no. : 1.00020)。
- 5.7 磷酸鹽緩衝液 (PBS, Gibco, USA, Cat. no. 14200-075) 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 12 孔玻璃片 (BioMerieux., France, Cat. No. 7-571-1)。
- 5.12 蓋玻片。
- 5.13 無菌 20 μ L、200 μ L、1,000 μ L 之吸管尖。

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 (SterilGARD III Advance, USA, Baker Company)。
- 6.4 螢光顯微鏡 (Olympus, Japan, IX71)。
- 6.5 5-40 μ L、40-200 μ L、200-1,000 μ L Pipette。
- 6.6 -20°C 及 -80°C 冷凍櫃 (Thermo Scientific, USA)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	拉薩病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 986 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 Vero E6 細胞以 Eagles' minimum essential medium (EMEM，內含 10% 加熱去活化胎牛血清) 在 37°C，5% CO₂ 的條件下培養。

10.2 細胞貼附後，改以 2% FBS EMEM 做繼代培養。

10.3 送檢樣本先經過濾除去雜質後，上清液以 EMEM 培養液調整成 10% 的懸浮液。

10.4 以 100 μL 之該懸浮液，於 37°C 接種至 70%細胞滿的 25cm² 的培養瓶。

10.5 接種 2 hr 後，再加入 5ml 2% FBS EMEM 培養液，置入 37°C，5% CO₂ 培養箱培養，每兩週做一次繼代培養。

10.6 先吸出上層培養液，以 0.25% Trypsine-EDTA 處理分離細胞，再混入原吸出之培養液，而後將 1/3 量置入新的 25 cm² 培養瓶，並以 2% FBS EMEM 補足至 5 mL，置 37°C 5% CO₂ 培養箱培養 7 天。

10.7 另 1/3 置於 -70°C 凍存，另 1/3 量留做免疫螢光檢測用。

10.8 將適量經 Trypsin-EDTA 處理分離下來的 Vero-E6 細胞，滴至 12 孔玻片上，置於抽氣櫃中抽乾。

10.9 而後以 -20°C 1:1 之甲醇/丙酮溶劑固定 2 min，再放入抽氣櫃以揮發甲醇/丙酮固定液。

10.10 此檢體抹片可保存於 -20°C 冰箱中或直接染色。

10.11 以 PBS 沖洗各 well 後，在抹片上加上 25 μL 抗拉薩病毒單株抗體 (1:100 in PBS)。

10.12 將抹片放置在潮濕的培養皿中，置於 37°C 溫箱 30 min。

10.13 於 37°C 反應 30 min，以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 min。

10.14 在室溫中將玻璃片以冷風吹乾或陰乾。

10.15 將抹片加上 25 μL 螢光 FITC 標記之山羊抗兔抗體 (FITC-goat anti-rabbit IgG (1:100 in PBS)，於 37°C 反應 30 min。

10.16 以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 min。

10.17 滴上甘油緩衝液，然後以蓋玻片覆蓋。

10.18 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：	拉薩病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 987 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，檢體需在 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 溫箱染色時應注意保持溼度。
- 12.5 必須要有未感染病毒之細胞及感染病毒之細胞分別做為陰性與陽性對照組。

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 未使用完血清放回 -80°C 冰箱保存。

14 參考資料

- 14.1 McCormick JB, Webb PA, Krebs JW, Johnson KM, Smith ES. 1987. A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. J Infect Dis 155: 437-444.
- 14.2 McCormick JB, King IJ, Webb PA, Johnson KM, O'Sullivan R, Smith ES, Trippel S, Tong TC. 1987. A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. J Infect Dis 155: 445-455.

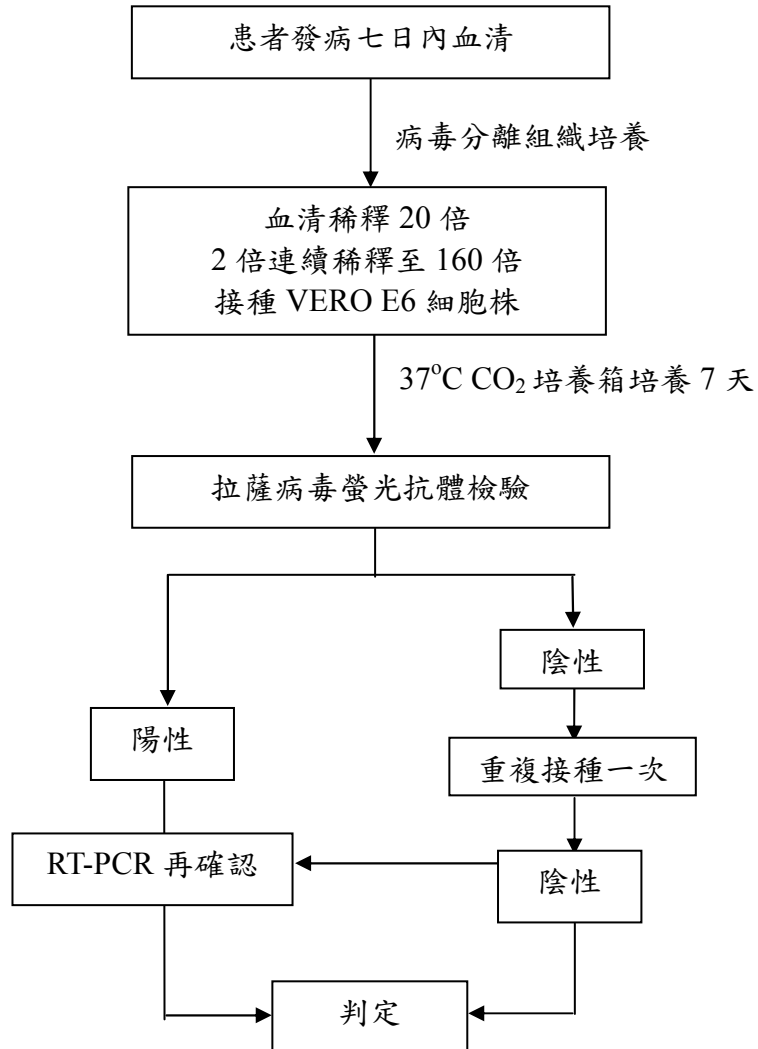
15 附錄

- 15.1 拉薩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：	拉薩病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 988 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 拉薩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：	拉薩病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 989 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測拉薩病毒核酸。

2 適用檢體種類

適用於符合拉薩病毒病徵之病患血清檢體。

3 名詞解釋

Lassa virus：拉薩病毒。

4 原理概述

其技術原理是將待測的病毒 RNA 序列經反轉錄酶 (reverse transcriptase) 的作用轉錄成 cDNA，再利用 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 RNA 抽取試劑組。

5.3 Qiagen one-step RT-PCR kit。

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

5.5 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I (Cat. no. 03 003 230 001)。

5.6 Nuclease-free (RNase/DNase-free) 無菌微量吸管尖 (tip)：5 μ L、10 μ L、200 μ L。

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

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

5.9 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拉薩病毒之合成 GPC 基因取代完整病毒。

5.10 引子的合成：

拉薩病毒的引子合成，在選定偵側的病毒序列後 (G2 gene)，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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	拉薩病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 990 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Lassa Virus (GPC gene Synthesis)		
引子名稱	引子序列	備註
LASV-36E2-5-24 forward	5-ACCGGGGATCCTAGGCATTT-3	334 bp
LASV-80F2-339-11 reverse	5-ATATAATGATGACTGTTGTTCTTTGTGCA-3	

6 儀器設備

- 6.1 The LightCycler instrument system。
- 6.2 微量吸管 (pipetmen)：5 μ L、10 μ L、200 μ L。
- 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 P4 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 thiocynate 處理才可進入分生 (P2)
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 P4 (BSL-4) 實驗室操作。

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

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 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
裝為三部份：
 - (1) 感染細胞株進行病毒培養。
 - (2) 加入 Guanidine thiocynate 溶液中進行病毒核酸抽取及
RT-PCR 之實驗。
 - (3) 加入最終濃度為 10%福馬林中進行疑似致病源抗體之檢
測。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	拉薩病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 991 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 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 Real-time RT-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 血清檢體病毒或細胞培養病毒液 RNA 之萃取：

使用 Qiagen 廠牌之 QIAamp viral RNA 抽取試劑組，依廠牌步驟指示，略述如下。

 - 10.2.1 取 140 μ L 血清加入 560 μ L AVL 溶液。
 - 10.2.2 室溫靜置 10 min。
 - 10.2.3 再加入 560 μ L 絕對酒精，混勻後，10,000 rpm 轉速離心使通過 QIAamp spin column。
 - 10.2.4 續以 500 μ L AW 溶液清洗管柱兩次。
 - 10.2.5 最後以 80°C 之 60 μ L RNase-free ddH₂O 沖流出病毒 RNA。
- 10.3 反轉錄反應 (reverse transcription)：
 - 10.3.1 在由細胞培養液或血清檢體萃取出之 RNA 溶液中，加入上、下端引子 (100 μ L) 後，將此混合物於 90°C 加熱 5 min，置於冰上 3 min。
 - 10.3.2 短暫離心收集溶液於管底。
 - 10.3.3 取 20 μ L 模版/引子溶液於 0.2 mL 離心管中。
 - 10.3.4 並加入 5 μ L 10X 緩衝液 (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH8.3, 15 mM MgCl₂, 0.01% (v/v) gelatin) 4 μ L 2.5 mM dNTPs (BRL), 0.5 μ L 0.1 M DTT (dithiothreitol), 0.5 μ L 核糖核酸酶抑制劑 (ribonucleaseinhibitor, RNAsin, 10U/ μ L, BRL), 0.5 μ L SuperScript™ II Reverse transcriptase (RNase H-, 20U/ μ L BRL)。
 - 10.3.5 以 RNase-free ddH₂O 無菌水將總體積補至 50 μ L。
 - 10.3.6 混合均勻後，於 LightCycler 進行反轉錄反應，以製作出 cDNA。
- 10.4 Real-time PCR amplification
 - 10.4.1 製備試劑：
 - (1) 製備 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X Conc.:
將 LightCycler FastStart enzyme (colorless cap) 取出 10 μ L 加入一管 LightCycler FastStart DNA master SYBR green I, 10X Conc. (green cap) 中，可進行 32 Tests (保存於 4°C 可放置 1 週)。
 - (2) 製備 Primer：
以 H₂O 將 Forward 及 Reverse primer 溶解，使其濃度為 100 μ M，再以 H₂O 將 Primer 稀釋至最終濃度 5 μ M。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	拉薩病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日		
	頁次：第 992 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日		

10.4.2 製備 Real time PCR mix：

DNA template	4 μ L	
5 μ M Forward primer (F)	2 μ L	x Z
5 μ M Reverse primer (R)	2 μ L	x Z
LightCycler FastStart DNA master SYBg green I, 10X conc.	2 μ L	x Z
25 mM MgCl ₂ stock solution	2 μ L	x Z
H ₂ O	8 μ L	x Z
Total 20 μ L		

(Z=總反應數+1)

以微量吸管混合均勻，勿 Vortex。

10.4.3 取 16 μ L 的 Real time PCR Mix 至 LightCycler 專用毛細管中。

10.4.4 加入 DNA template 各 4 μ L。

10.4.5 將各毛細管封上專用蓋子。

10.4.6 離心 700 x g，5 sec (或 spin down)。

10.4.7 將毛細管依序放入檢體轉盤。

10.4.8 Run real-time PCR：

【Pre-incubation】

95°C 10 min 1 cycle

【Amplification】

Denaturing	95°C	┌ ├ └	10 sec	45 cycles
Annealing	55°C		10 sec	
Extension	72°C		25 sec	

Acquisition mode: single

【Melting curve analysis】

Denaturing	95°C	0 sec
Annealing	65°C	15 sec
Melting	95°C	0 sec

Slope=0.1°C/sec

Acquisition mode: continuous

【Cooling】

40°C 30 sec

10.4.9 利用儀器軟體中的 Melting curve analysis 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 T_m 曲線的鑑定過程在 30 min 內，經螢光放射分析即可得到結果。並將陽性對照組之模板 DNA 用量為 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg 等核酸濃度，測定核酸與循環數之標準曲線，可應用於檢體之定量分析。
- 11.2 報告核發：有螢光曲線產生、Melting curve analysis 分析正確，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，

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	拉薩病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 993 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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

Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS. 1994. Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 32: 2898-2903.

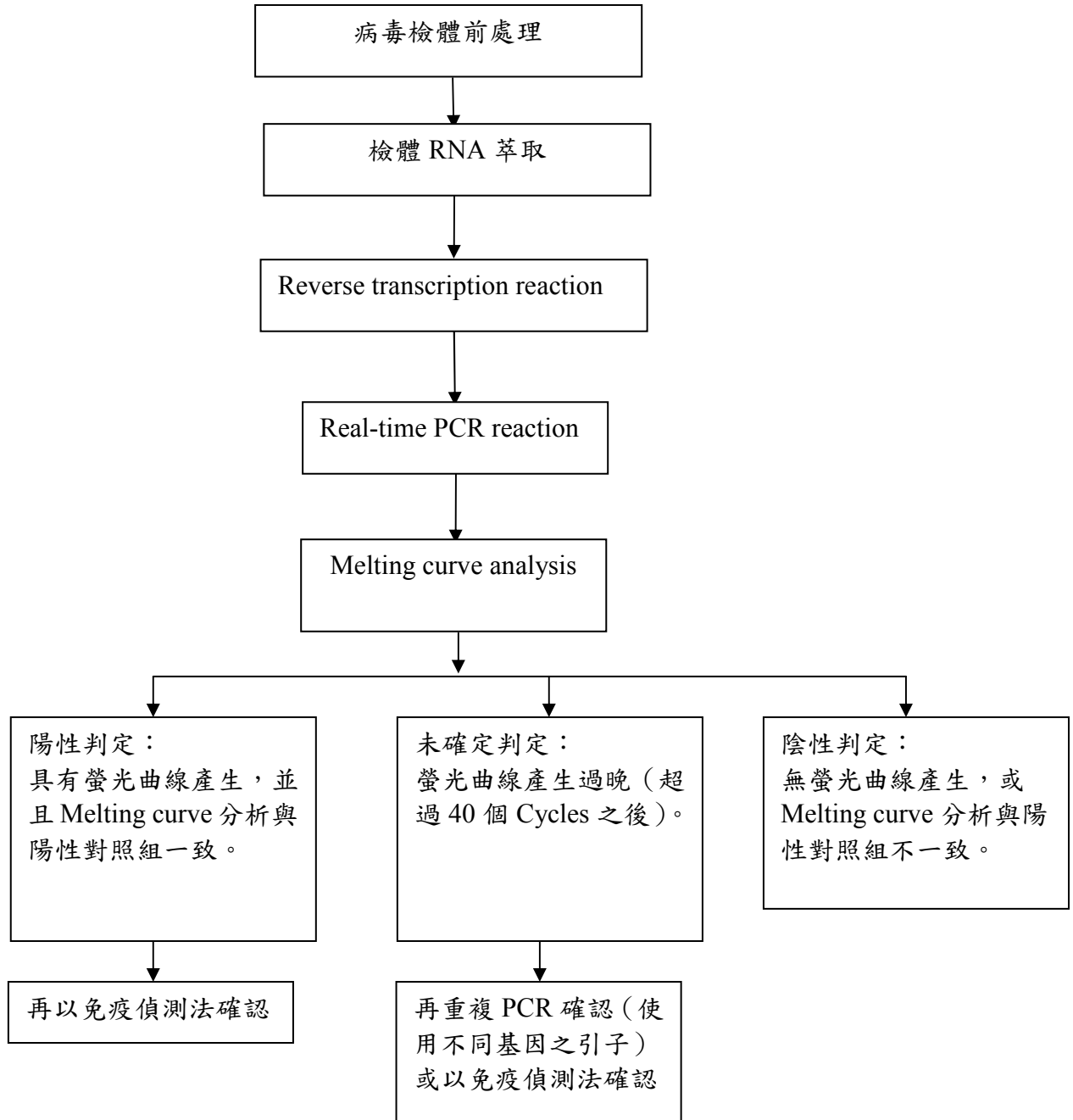
15 附錄

15.1 拉薩病毒核酸檢測分析法流程圖。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	拉薩病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 994 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 拉薩病毒核酸檢測 (real-time RT-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：	拉薩病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 995 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測拉薩病毒抗體。

2 適用檢體種類

適用於符合拉薩熱病徵之病患血清檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用拉薩病毒合成蛋白作為抗原，與病患血清進行抗原抗體反應，以酵素標幟抗體間接地將此反應轉成顏色訊號，由全自動酵素免疫分析儀讀取結果。

5 試劑耗材

- 5.1 清洗液 PBST (PBS pH 7.2 含 0.05 % Tween 20)。
- 5.2 檢體稀釋液 (PBST 含 0.5% BSA)。
- 5.3 已吸附拉薩病毒合成蛋白之 96 孔微量滴定盤。
- 5.4 抗人類 IgM 之 HRP (Horseradish Peroxidase) 酵素結合抗體 (peroxidase conjugated affinity purified anti-human IgM μ 【goat】)，Sigma，USA。
- 5.5 HRP 穩定液 (HRP Stabilizer)，Sigma，USA。
- 5.6 呈色劑 (TMB 受質) Sigma，USA。
- 5.7 終止液 (2 M H_2SO_4)，Merck，Germany。
- 5.8 陽性拉薩病毒合成蛋白標準液。
- 5.9 無菌蒸餾水。
- 5.10 八連排血清稀釋管。
- 5.11 八連排血清稀釋架。
- 5.12 無菌微量吸管尖 (tip)：10 μ L、200 μ L、1,000 μ L。
- 5.13 96 孔微量滴定盤封膜。
- 5.14 可拋棄式無菌塑膠手套。

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 全自動酵素免疫分析儀 (ELISA reader：BioTek μ Quant, USA)。
- 6.3 全自動清洗器。
- 6.4 微量吸管 (pipetmen)：1,000 μ L、100 μ L、30 μ L。
- 6.5 8 爪微量吸管。
- 6.6 計時器。
- 6.7 37°C 溫箱。

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：	拉薩病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 996 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

於生物安全第四等級內檢體分裝、去活化。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

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 檢驗前血清處理

10.1.1 檢體以 2,000 rpm 離心 10 min，分離出血清備用。

10.2 酵素免疫分析盤處理

10.2.1 將 96 孔酵素免疫分析盤加入 100 μ L 1：2000 稀釋之病毒抗原混合液。

10.2.2 將製備抗原之 96 孔酵素免疫分析盤靜置於 4°C，隔夜後即可使用。把製備備好的酵素免疫分析盤先以 washing machine 以磷酸緩衝液 PBST 洗淨。

10.2.3 酵素免疫分析盤注入清洗液放置 5 min，以 PBST 清洗 3 次。

10.3 陽性對照血清（亦即陽性標準液）

10.3.1 陽性對照血清乃利用拉薩病毒合成蛋白所生成之兔子多株抗體。

10.3.2 操作方式與待測血清相同，但使用不同種源的二級抗體 (goat anti-rabbit IgG-HRP, Cappel)。

10.3.3 作為酵素免疫分析盤 coating 拉薩病毒蛋白是否良好的對照組。

10.4 待測血清

10.4.1 將待測血清以 10%脫脂乳 (skimmed milk) 以 1：100 濃度稀釋，分別加入 100 μ L 稀釋血清於盤中之對照組及實驗組中。

10.4.2 分別加入稀釋後之血清檢體，各檢體需二重複試驗。

10.4.3 於 37°C 中作用 1 hr 後，以 PBST 清洗酵素免疫分析盤。

10.4.4 以 PBS 清洗 4 次，拍乾酵素免疫分析盤。

10.4.5 在酵素免疫分析盤中之孔內，各加入 100 μ L 以 1：2000 稀釋之第二抗體 (goat anti-human IgM-HRP)。

10.4.6 再置於 37°C 反應 1 hr。

10.4.7 以清洗液清洗 4 次，拍乾酵素免疫分析盤。

10.4.8 清洗酵素免疫分析盤後，每孔加入 100 μ L 之呈色劑 (TMB-0.035% H₂O₂, in citrate buffer, pH 5.5) 置於室溫於黑暗中作用 15-20 min。

10.4.9 每孔加入 50 μ L 反應終止溶液 (2M H₂SO₄)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	拉薩病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 997 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.4.10 以分光光度計 OD₄₅₀ 測其吸光值。

11 結果判定

判讀標準：將 OD₄₅₀ 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 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 Jahrling PB, Niklasson BS, McCormick JB. 1985. Early diagnosis of human Lassa fever by ELISA detection of antigen and antibody. Lancet 325(8423): 250-252.
- 14.2 Bausch DG, Rollin PE, Demby AH, Coulibaly M, Kanu J, Conteh AS, Wagoner KD, McMullan LK, Bowen MD, Peters CJ, Ksiazek TG. 2000. Diagnosis and clinical virology of Lassa fever as evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent-antibody test, and virus isolation. J Clin Microbiol 38: 2670-2677.

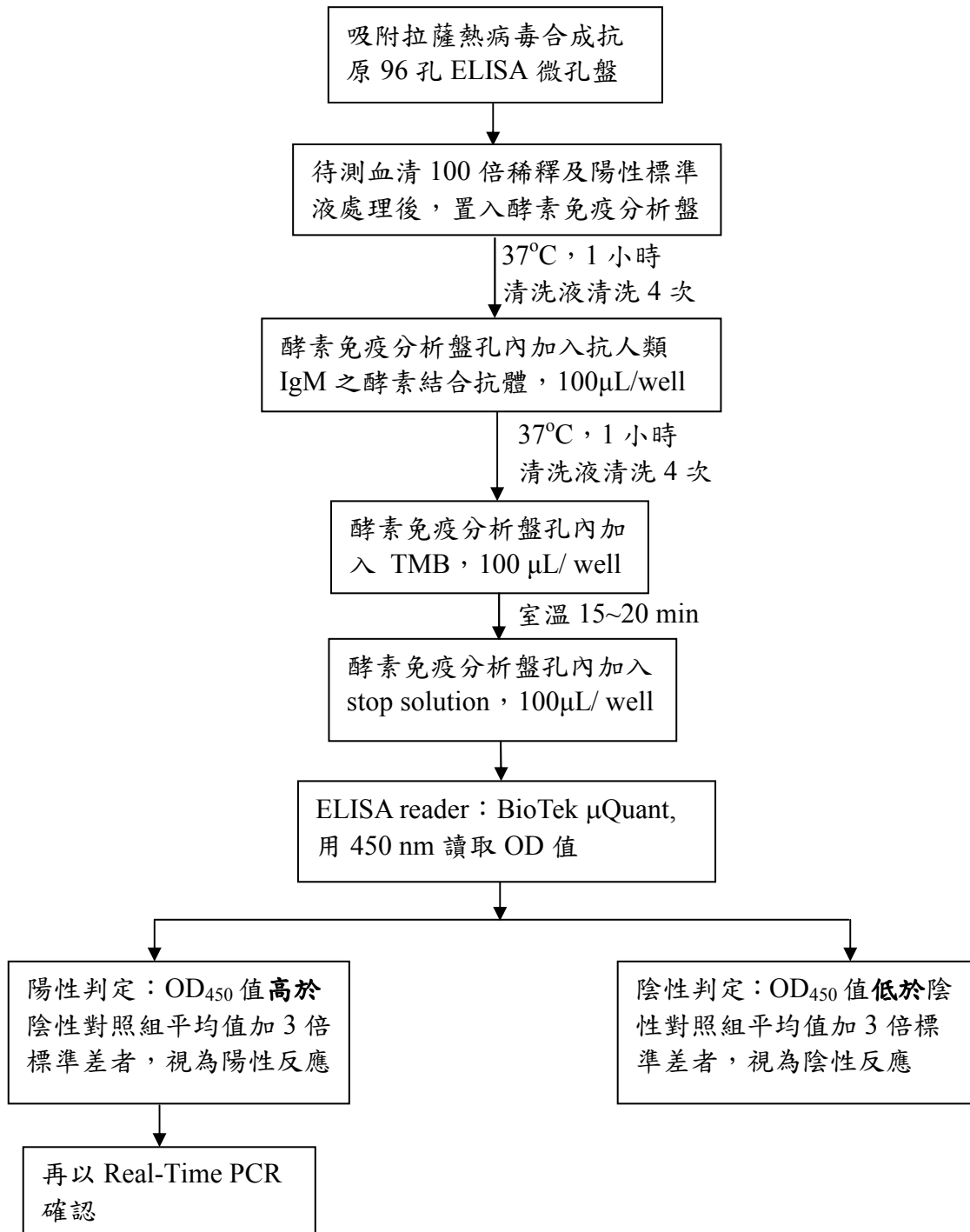
15 附錄

- 15.1 拉薩病毒抗體試驗-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：	拉薩病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 998 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 拉薩病毒抗體試驗（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：	金黃色葡萄球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 999 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢查食品中毒案件人體檢體中是否含有金黃色葡萄球菌。

2 適用檢體種類

適用於人體糞便、嘔吐物、直腸拭子 (Rectal swab)、手部檢體、鼻腔檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

以特定培養基分離培養，並利用生化代謝特性鑑定。

5 試劑耗材

5.1 培養基

5.1.1 BP (baird-parker agar base) plate：CMP，台灣。

5.1.2 TSA (tryptic soy agar) plate：CMP，台灣。

5.2 革蘭氏染色液 (Gram stain solution)：Difco，美國。

5.3 EDTA 兔血漿 for coagulase：Difco，美國。

5.4 Staphylase riagonstic reagent：Oxoid Ltd.，英國。

5.5 API ID 32 STAPH：BioMérieux，法國。

5.6 VITEK 2 革蘭氏陽性菌鑑定卡 (VITEK 2 GP)：BioMerieux，法國。

5.7 標準菌株：*Staphylococcus aureus* ATCC25923 及 *S. aureus* ATCC6538。

5.8 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L。

5.9 無菌滴管 (dropper)：1 mL。

5.10 接種針 (環)。

5.11 載玻片。

5.12 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 微量吸管 (Pipetman)。

6.3 光學顯微鏡：能放大至 1,000X 油鏡。

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、嘔吐物、直腸拭子、手部檢體、鼻腔檢體，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

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	金黃色葡萄球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1000 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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、嘔吐物：以無菌棉花棒沾取少許或以無菌滴管吸取少許接種於 BP 培養基上。
- (2) 直腸拭子、手部檢體、鼻腔檢體：將輸送培養基上之直腸拭子、手部檢體、鼻腔檢體旋轉接種於 BP 培養基上。

10.1.2 培養：37°C 培養箱培養。

10.1.3 觀察：24-48 hr 後，開始觀察有無可疑菌落，如有即進行鑑定，如無繼續培養及隔日觀察，至少需培養 48 hr。

10.2 鑑定

10.2.1 菌落形態及染色：挑選黑色發亮、圓弧隆起且具透明環之獨立可疑菌落，作革蘭氏染色，符合革蘭氏陽性呈堆狀或葡萄狀球菌，再次接種於 TSA agar，BHI broth，37°C 培養箱培養 18-24 hr 後作生化鑑定。

10.2.2 生化鑑定

(1) Staphylase test

於玻片上各滴一滴 Staphylase test reagent 及 Control reagent，再以 loop 取一顆菌落分別在 Staphylase test reagent 及 Control reagent 上塗均勻，以 Loop 輕撥，觀察是否有凝集反應，有凝集則為陽性。

(2) Coagulase test (凝固酶試驗) — 試管法

如 Staphylase test 有疑問則作 Coagulase test。取 0.5 mL EDTA 兔血漿置於一乾淨之無菌試管，以接種環取部分菌落接種於兔血漿中，輕搖試管混合，培養在 35-37°C 水浴中，若在 1-4 hr 內完全凝結或部分凝結為陽性；若在 4hr 後仍為陰性，則隔夜再判讀，若仍無凝結則為陰性。

(3) Catalase test (觸酶試驗)

挑選 TSA 培養基上菌落進行試驗，金黃色葡萄球菌反應為陽性。

(4) API ID 32 STAPH 生化鑑定套組：依照原廠 API ID 32 STAPH (葡萄球菌鑑定組) 操作步驟執行。

(5) VITEK 2 革蘭氏陽性菌鑑定卡 (VITEK 2 GP)：依照原廠全自動微生物分析儀 VITEK 2 標準操作流程執行。

11 結果判定

11.1 陽性判定標準：符合革蘭氏陽性堆狀或葡萄狀球菌，Catalase test 陽性，Staphylase test 陽性、凝固酶試驗陽性者、API ID 32 STAPH 生化鑑定

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	金黃色葡萄球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1001 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

套組或自動微生物分析儀 VITEK 2 GP 反應結果為金黃色葡萄球菌者，即判定為金黃色葡萄球菌陽性；若其中有一不符合者，即判定為金黃色葡萄球菌陰性。

- 11.2 報告核發：金黃色葡萄球菌陽性，金黃色葡萄球菌陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於金黃色葡萄球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 BP 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：*S. aureus* ATCC 25923。
- 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 取菌液依四區畫線接種於測試培養基上，37°C 培養箱培養。
- 12.1.4 觀察結果紀錄：預期結果 3-4 天後，可見 1-3 mm 菌落，菌落至少生長至第三區。

12.2 TSA plate 之品質管制：

- 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：*S. aureus* ATCC 6538。
- 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，37°C 培養箱培養。
- 12.2.4 觀察結果紀錄：預期結果 3-4 天後，可見突起大菌落，菌落至少生長至第三區。

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。九州圖書文物有限公司，臺灣。
- 14.2 Murrays PR, Baron EJ, Pfaller MA. 1999. *Staphylococcus and Micrococcus*, manual of clinical microbiology, 7th edition. ASM Press, Washington, DC. pp.264-282.
- 14.3 FDA. 2001. *Staphylococcus aureus*, Chapter 12. Bacteriological analytical manual U.S. <http://www.foodinfonet.com/publication/fdaBAM.htm>

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	金黃色葡萄球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1002 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

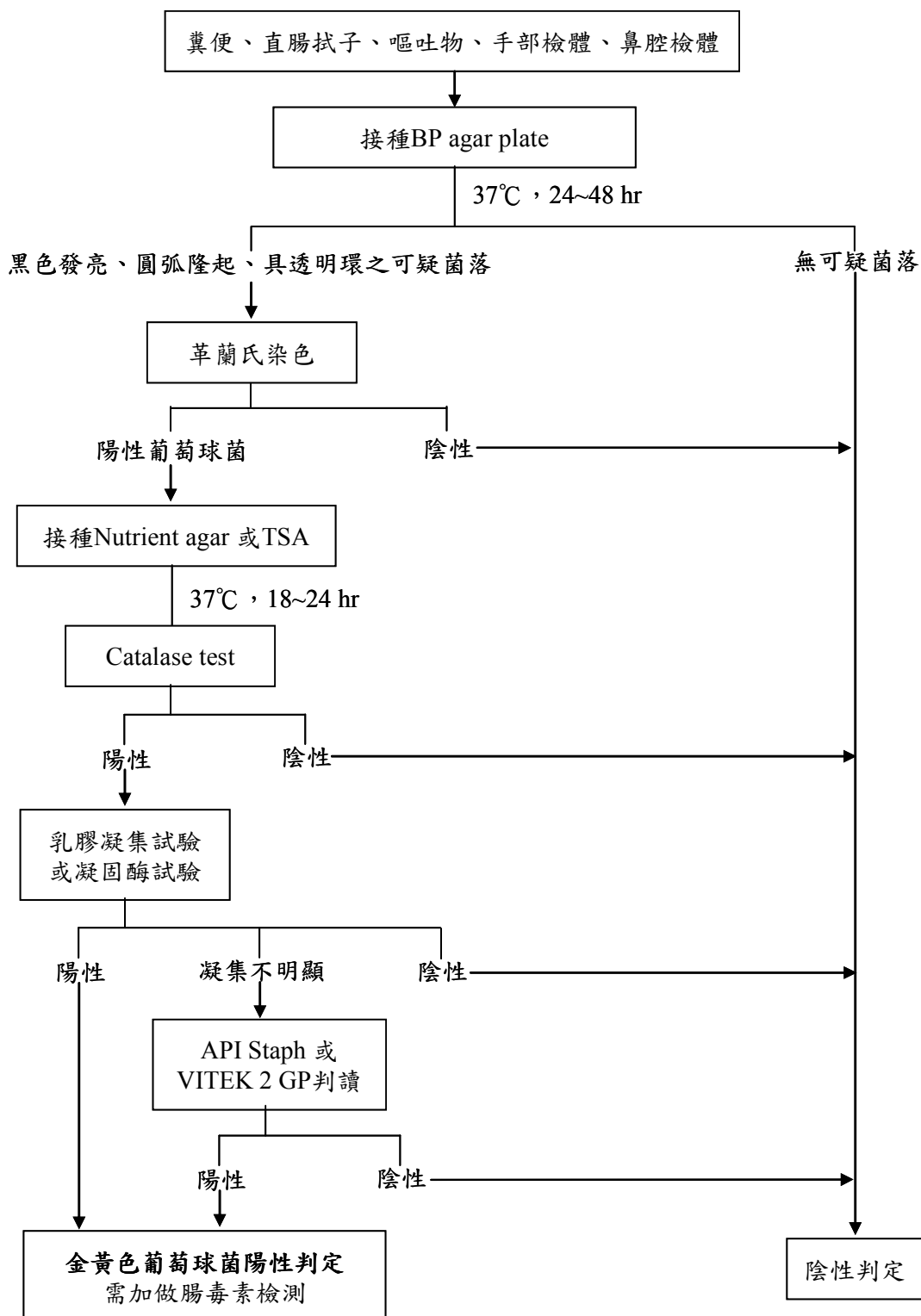
15 附錄

- 15.1 金黃色葡萄球菌分離與鑑定檢驗流程圖。
- 15.2 金黃色葡萄球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： 頁次：第 1003 頁/共 1091 頁	金黃色葡萄球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 金黃色葡萄球菌分離與鑑定流程圖



金黃色葡萄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：	金黃色葡萄球菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1004 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 金黃色葡萄球菌分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

金黃色葡萄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											
檢體採檢運送狀況適當		是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
BP 平板上生長型態：黑色、發亮、周圍有明顯透明環之菌落	培養/觀察	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
	第 2 天										
	第 3 天										
	第 4 天										
革蘭氏染色：陽性或陰性，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
		球菌	桿菌	球菌	桿菌	球菌	桿菌	球菌	桿菌	球菌	桿菌
Catalase test：陽性起泡，陰性不起泡		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
Staphylase test (coagulase test)		凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無	凝集	無
API ID 32 Staph 或 VITEK 2 GP											
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：	金黃色葡萄球菌腸毒素檢測 (RPLA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1005 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

偵測金黃色葡萄球菌的腸毒素 (staphylococcal enterotoxins)。

2 適用檢體種類

適用於金黃色葡萄球菌菌株。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用反轉被動乳膠凝集試驗 (RPLA) 檢測金黃色葡萄球菌之腸毒素，並鑑定腸毒素型別。

5 試劑耗材

5.1 Enterotoxin-F：Denka Seiken，日本。

5.1.1 抗體試劑

- (1) Latex sensitized with anti-enterotoxin A：抗葡萄球菌 enterotoxin A 之專一性抗體(兔 IgG)致敏化之乳膠懸浮液。
- (2) Latex sensitized with anti-enterotoxin B：抗葡萄球菌 enterotoxin B 之專一性抗體(兔 IgG)致敏化之乳膠懸浮液。
- (3) Latex sensitized with anti-enterotoxin C：抗葡萄球菌 enterotoxin C 之專一性抗體(兔 IgG)致敏化之乳膠懸浮液。
- (4) Latex sensitized with anti-enterotoxin D：抗葡萄球菌 enterotoxin D 之專一性抗體(兔 IgG)致敏化之乳膠懸浮液。
- (5) Latex sensitized with anti-enterotoxin E：抗葡萄球菌 enterotoxin E 之專一性抗體(兔 IgG)致敏化之乳膠懸浮液。

5.1.2 對照試劑

- (1) Latex control (對照乳膠)：以非免疫之兔子球蛋白致敏化之乳膠懸浮液。
- (2) Staphylococcal enterotoxin A control (腸毒素 A 對照組)。
- (3) Staphylococcal enterotoxin B control (腸毒素 B 對照組)。
- (4) Staphylococcal enterotoxin C control (腸毒素 C 對照組)。
- (5) Staphylococcal enterotoxin D control (腸毒素 D 對照組)。
- (6) Staphylococcal enterotoxin E control (腸毒素 E 對照組)。

5.1.3 稀釋液：為含有 Bovine serum albumin (牛血清蛋白) 及 Sodium hexametaphosphate 之 Phosphate buffered saline。

5.2 培養液：BHI (brain heart infusion) broth：CMP，台灣。

5.3 無菌微量吸管尖 (tip)：1,000 μ L、200 μ L。

5.4 無菌滴管 (dropper)：1 mL。

5.5 接種針 (環)。

5.6 無菌塑膠手套。

5.7 無菌微量離心管：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：	金黃色葡萄球菌腸毒素檢測 (RPLA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1006 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

5.8 密閉式保濕盒。

6 儀器設備

6.1 微量吸管 (Pipetman)。

6.2 微量離心機。

6.3 震盪器。

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

無。

9 檢體運送及保存

無。

10 檢驗步驟

10.1 分離培養

10.1.1 檢體接種：將金黃色葡萄球菌接種於 5 mL BHI broth。

10.1.2 培養：於 37°C 培養箱，震盪培養 18-20 hr。

10.2 腸毒素鑑定

10.2.1 取 1 mL 之細菌培養液 (BHI broth) 於 1.5 mL 無菌微量離心管，以 13,000 rpm 離心 1 min，取上清液用於毒素含量分析。

10.2.2 將 96 孔 V 型塑膠微量滴盤排好，每一個檢體需要使用 5 個凹槽。

10.2.3 每個凹槽加入 25 μ L 稀釋液和 25 μ L 檢體上清液，混合均勻後，取 25 μ L 丟棄。

10.2.4 第一個凹槽加入 25 μ L 之抗腸毒素 A 致敏化的乳膠懸浮液。

10.2.5 第二個凹槽加入 25 μ L 之抗腸毒素 B 致敏化的乳膠懸浮液。

10.2.6 第三個凹槽加入 25 μ L 之抗腸毒素 C 致敏化的乳膠懸浮液。

10.2.7 第四個凹槽加入 25 μ L 之抗腸毒素 D 致敏化的乳膠懸浮液。

10.2.8 第五個凹槽加入 25 μ L 之抗腸毒素 E 致敏化的乳膠懸浮液。

10.2.9 第六個凹槽加入 25 μ L 之對照乳膠懸浮液作陰性對照。

10.2.10 同時以腸毒素 A、B、C、D、E 五型對照組分別加入相對應的抗腸毒素致敏化的乳膠懸浮液當作陽性對照。

10.2.11 以震盪器將凹槽內容物混合均勻。

10.2.12 滴盤放於潮濕盒中以避免蒸發，並置室溫 18-20 hr，第二天觀察。

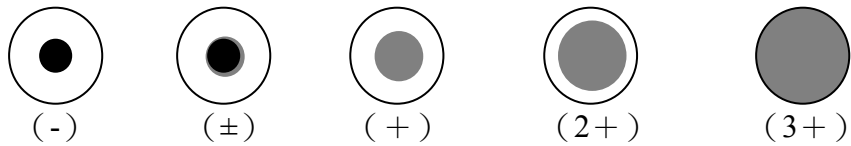
11 結果判定

11.1 陽性判定標準：

凝集的形式

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 1007 頁/共 1091 頁	金黃色葡萄球菌腸毒素檢測 (RPLA)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日



- 11.1.1 凝集強於 (+) 即為陽性。
- 11.1.2 含有對照乳膠懸浮液的凹槽應為陰性，但有時會發生非專一性凝集現象，此時，當檢體加入致敏化乳膠懸浮液之凝集比加入對照乳膠懸浮液之凝集強時，其反應判為陽性。
- 11.1.3 符合 11.1.1 及 11.1.2 項則判定為陽性。
- 11.1.4 若其中有一不符合者，即判定為陰性。
- 11.2 報告核發：
 - 11.2.1 腸毒素陽性：
 - 11.2.1.1 病原體分離、鑑定：
 - 11.2.1.1.1 金黃色葡萄球菌陽性及腸毒素型別 (A-E)。
 - 11.2.1.2 綜合研判：陽性非法定傳染病。
 - 11.2.2 腸毒素陰性：
 - 11.2.2.1 病原體分離、鑑定：
 - 11.2.2.1.1 金黃色葡萄球菌陰性。
 - 11.2.2.2 綜合研判：陰性。
- 11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於金黃色葡萄球菌腸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

- 12.1 試劑之有效性試驗：所使用試劑皆應於有效期內用完。
- 12.2 同一批號試劑內陽性對照乳膠及陰性對照乳膠，於每一次使用時，皆須進行對照試驗。不同批號之試劑，不可互用。

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。

14 參考資料

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

15 附錄

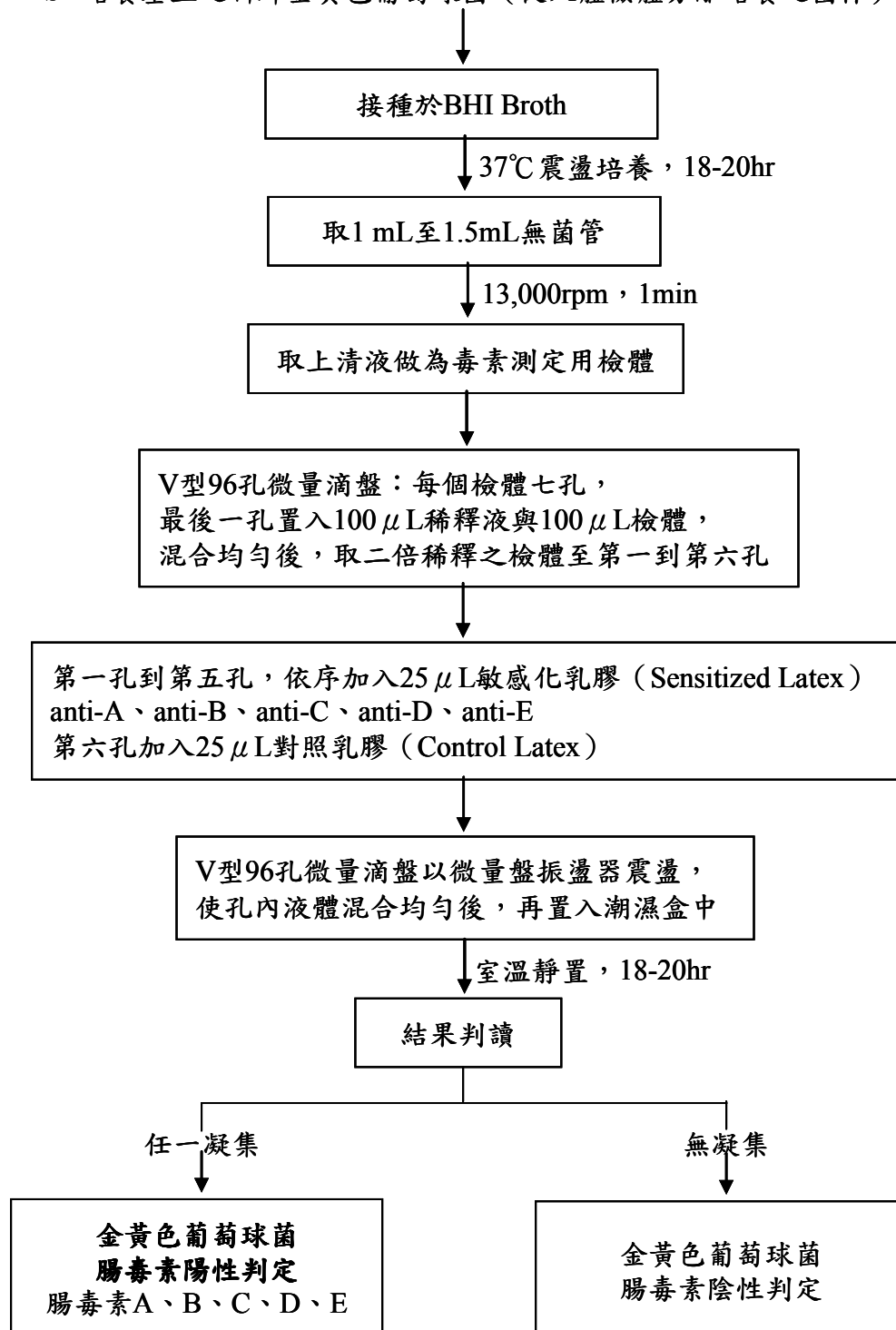
- 15.1 金黃色葡萄球菌腸毒素測定檢驗流程圖。
- 15.2 金黃色葡萄球菌腸毒素測定紀錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	金黃色葡萄球菌腸毒素檢測 (RPLA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1008 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 金黃色葡萄球菌腸毒素測定檢驗流程圖

TSA培養基上之新鮮金黃色葡萄球菌（從人體檢體分離培養之菌株）



金黃色葡萄球菌毒素測定（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：	金黃色葡萄球菌腸毒素檢測 (RPLA)	核准日期： 年 月 日	
	頁次：第 1009 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日	

附錄 15.2 金黃色葡萄球菌腸毒素測定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

頁數：第 頁/共 頁

金黃色葡萄球菌腸毒素測定紀錄表

檢體編號										
收件日期										
檢驗日期										
檢驗套組取出回溫	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
套組懸浮液使用前是否充分振盪混合均勻	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
使用之試劑為同批號	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
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：	腸炎弧菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1010 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

腸炎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。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

以特定培養基分離腸炎弧菌，並利用生化代謝特性及血清學方法鑑定腸炎弧菌與血清型別。

5 試劑耗材

5.1 培養基

5.1.1 含 1% NaCl 之 Peptone water pH8.6：CMP，臺灣。

5.1.2 TCBS (thiosulfate citrate bile salt sucrose) 培養基：杏友，臺灣。

5.1.3 含 1% NaCl 之 TSA (tryptic soy agar) plate：CMP，臺灣。

5.1.4 含 1% NaCl 之 TSIA：CMP，臺灣。

5.1.5 含 1% NaCl 之 LIA (lysine iron agar)：CMP，臺灣。

5.1.6 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)：BioMérieux，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 腸炎弧菌 K 抗原血清套組：Seiken，日本。詳見附錄說明

5.6 無菌生理食鹽水：0.85% NaCl。

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

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」第三版。

<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：	腸炎弧菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1011 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 培養基上。
- (2) 糞便、直腸拭子：除了直接分離培養外，應將糞便、直腸拭子放入含 1% NaCl 之 Peptone water 內，於 37°C 經 6-15 hr 之增菌培養後，再塗抹在 TCBS 培養基上。

10.1.2 培養：37°C 培養箱培養 18-24 hr。

10.1.3 觀察：有無可疑菌落，如有則進行鑑定。

10.2 鑑定

10.2.1 於 TCBS 培養基挑取綠色粘稠的可疑菌落，使用接種環接種於含 1% NaCl 之 TSA，並使用接種針以穿刺劃線法接種於含 1% NaCl TSIA 及 LIA，以穿刺法接種於 SIM，置 37°C 培養箱培養 18-24 hr 後，觀察其生化反應及鑑定。

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 K/A 反應，Gas（-），H₂S（-），Lysine（+），Indole（+）、運動性（+）時則可能為腸炎弧菌。
- (2) 氧化酶試驗（Oxidase test）：挑選 TSA 培養基上菌落進行試驗，腸炎弧菌反應為陽性。
- (3) 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。
- (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

- (1) 以腸炎弧菌 K 混合 I 至 IX 型多價血清作玻片凝集反應。
- (2) 若多價血清為陽性，次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 陽性判定標準：符合菌落型態、Oxidase 反應陽性、生化反應、血清學腸炎弧菌 K 型別時，即判定為腸炎弧菌陽性。若不符合者，即判定為腸炎弧菌陰性。

11.2 報告核發：腸炎弧菌陽性，腸炎弧菌陰性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於腸炎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。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腸炎弧菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1012 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

12 品質管制

TCBS 應保存在 4-6°C，兩週內使用完。每次取出不得有任何污染菌產生，用完即應丟棄，不得再使用。

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。

14 參考資料

- 14.1 FDA. 2004. *Vibrio*, Chapter 9. Bacteriological analytical manual, U.S. available at <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。

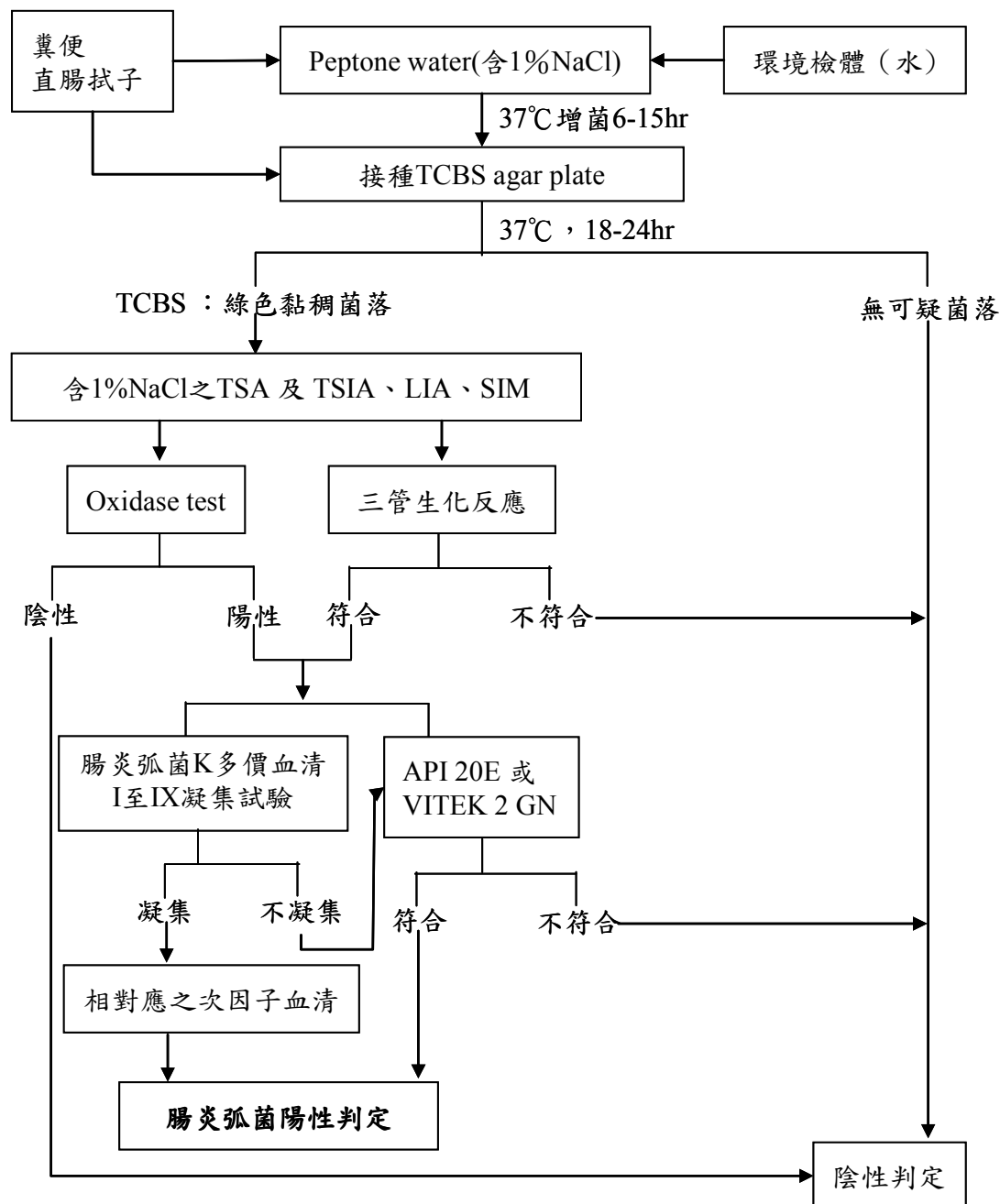
15 附錄

- 15.1 腸炎弧菌分離與鑑定流程圖。
- 15.2 生化反應判定表。
- 15.3 腸炎弧菌分離與鑑定紀錄表。
- 15.4 腸炎弧菌 K 抗原血清混合型多價血清與次因子血清對照表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腸炎弧菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1013 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 腸炎弧菌分離與鑑定流程圖



腸炎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：	腸炎弧菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1014 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：	腸炎弧菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1015 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 腸炎弧菌分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

腸炎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 綠色粘稠菌落	培養/觀察	是	否	是	否	是	否	是	否	是	否
	第 2 天										
Oxidase test：陽性藍色或藍紫色，陰性不變色		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
生化三管(名稱及反應)：		符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合
TSIA (K/A, GAS -,H2S -)											
LIA (+)											
SIM (motility +)											
SIM (indole +)											
血清凝集試驗：		凝集 型別	無	凝集 型別	無	凝集 型別	無	凝集 型別	無	凝集 型別	無
腸炎弧菌 K 混合 I 至 IX 型多價血清											
相對應之次因子血清											
API 20E 或 VITEK 2 GN											
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：	腸炎弧菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1016 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 腸炎弧菌 K 抗原血清混合型多價血清與次因子血清對照表

K 混合 I	K1	K3	K4	K5	K6	K7	K8
K 混合 II	K9	K10	K11	K12	K13	K15	K17
K 混合 III	K18	K19	K20	K21	K22	K23	K24
K 混合 IV	K25	K26	K28	K29	K30	K31	K32
K 混合 V	K33	K34	K36	K37	K38	K39	K40
K 混合 VI	K41	K42	K43	K44	K45	K46	K47
K 混合 VII	K48	K49	K50	K51	K52	K53	K54
K 混合 VIII	K55	K56	K57	K58	K59	K60	K61
K 混合 IX	K63	K64	K65	K66	K67	K68	K69
	K70	K71					

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	布氏桿菌抗體檢測 (RBT 及 CFT)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1017 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

布氏桿菌病血清抗體之檢驗。

2 適用範圍

本方法適用於實驗室中布氏桿菌病血清抗體檢驗。

3 名詞定義

OIEISS：國際標準血清（OIE international standards Serum）。

RBT：玫瑰苯試驗（Rose Bengal test），為一種簡單的點凝集試驗，使用之抗原添加色素玫瑰苯，並使用低pH的緩衝環境（ $\text{pH } 3.65 \pm 0.05$ ）。

CFT：補體結合試驗（complement fixation test），利用補體與抗原抗體複合物結合後破壞目標物之特性所發展之試驗方法。

4 原理概述

利用抗原抗體血清學之交互作用，以流產布氏桿菌之抗原檢測出受感染者之特異性抗體，而發展出平板凝集試驗以及補體結合試驗等血清學檢測方法。

5 試劑耗材

- 5.1 標準陽性血清：採用 OIEISS，每 mL 含 1,000 International unit (IU) 及 1,000 International complement fixation test unit (ICFTU)。
- 5.2 實驗室標準血清：利用 OIESS 為參考物質，實驗室保存之陽性測試血清。
- 5.3 無菌水（sterilized deioned H_2O , dd H_2O ）。
- 5.4 Phenol saline（0.5% phenol in 0.85% NaCl 溶液）。
- 5.5 玫瑰苯試驗用抗原（*Brucella abortus* RBT antigen）：合格實驗室所生產之商品化抗原，4°C 保存。
- 5.6 補體結合試驗用抗原（*Brucella abortus* CFT antigen）：合格實驗室所生產之商品化抗原，4°C 保存。
- 5.7 補體試驗稀釋用緩衝液（CFT buffer）：Barbital sodium（Sigma） 3.75 g、Barbital（Sigma） 5.75 g、NaCl（Sigma） 85 g、 MgCl_2 （Sigma） 0.475 g、 CaCl_2 （Sigma） 0.185 g，加無菌水至 10,000 mL。
- 5.8 補體：測試補體力價後之天竺鼠血清，分裝保存於-70°C。可使補體系統產生 50%溶血之補體力價稱為 1 單位，試驗使用之補體力價為 4 單位。
- 5.9 溶血素 Hemolysin（Sigma）：以綿羊紅血球基質為抗原，由兔子產生之抗血清所製成之粉末，使用時添加 2 mL 無菌水。
- 5.10 敏感紅血球：新鮮之綿羊全血估算紅血球體積，並以 CFT buffer 稀釋成 3%之紅血球液，再與溶血素 CFT buffer（以 CFT buffer 稀釋溶血素至適當濃度）混勻，於 4°C 感作一夜，配製好之敏感紅血球保存於 4°C。
- 5.11 玻璃棒或塑膠棒。
- 5.12 U 型底 96 孔盤。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	布氏桿菌抗體檢測 (RBT 及 CFT)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1018 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

7 儀器設備

- 7.1 低溫離心機。
- 7.2 -70°C 冷凍冰庫。
- 7.3 玻璃板。
- 7.4 微量吸管。
- 7.5 恆溫水浴槽。
- 7.6 八爪微量吸管。
- 7.7 4°C 恆溫冰箱。
- 7.8 震盪式恆溫培養箱。
- 7.9 37°C 恆溫培養箱。

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 µL。
- 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 檢驗程序

10.1 玫瑰苯試驗：

- 10.1.1 玫瑰苯試驗用抗原：使用之抗原濃度在 OIEISS 以 0.5% Phenol saline 1:45 倍稀釋可產生陽性凝集反應，並且在 OIEISS 以 0.5% Phenol saline 1:55 倍稀釋則為陰性反應。
- 10.1.2 玫瑰苯試驗操作步驟
 - 10.1.2.1 取測試所需之試劑回溫至室溫。
 - 10.1.2.2 將待測血清 25-30 µL 置於適當之玻璃板或是塑膠板上。
 - 10.1.2.3 將抗原溫和搖勻，滴同量之抗原於待測血清之一側。
 - 10.1.2.4 以塑膠或玻璃棒將抗原及血清充分混勻。
 - 10.1.2.5 室溫下搖晃約 4 min 後判讀。
 - 10.1.2.6 玫瑰苯試驗結果判讀：任何可見之凝集都視為陽性反應，並進行補體結合試驗作為最終確認，陰性反應則結束檢驗並判定為結果陰性。

10.2 補體結合試驗：

- 10.2.1 補體結合試驗用抗原：抗原濃度為使補體系統在 OIEISS 1:200 倍稀釋下產生 50%之溶血，並且補體系統在 OIEISS 較低稀釋倍數下會完全溶血，且不能產生抗補體現象。
- 10.2.2 補體結合試驗操作步驟：
 - 10.2.2.1 將實驗所需之試劑自冰箱取出回至室溫備用。
 - 10.2.2.2 待測血清及標準陽性血清於 58°C 水浴槽中非動化

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 1019 頁/共 1091 頁	布氏桿菌抗體檢測 (RBT 及 CFT)	核准日期： 年 月 日 修訂日期： 年 月 日

後，再加入 CFT buffer 成 1：5 稀釋血清。

- 10.2.2.3 使用 96 孔標準「U」型盤進行實驗，將待測血清或陽性血清加 30 μ L 於實驗孔，並以 CFT buffer 連續兩倍稀釋。稀釋倍數依序為 1：5、1：10、1：20、1：40、1：80、1：160 及 1：320。
- 10.2.2.4 依序加入 30 μ L 抗原。
- 10.2.2.5 將補體以 CFT buffer 稀釋，補體使用之力價為 4 單位。
- 10.2.2.6 依序加入 30 μ L 稀釋過之補體，最終每孔總體積為 90 μ L。
- 10.2.2.7 37°C 30 min 或是 4°C 隔夜充分感作。
- 10.2.2.8 將敏感紅血球回溫至室溫備用，每孔添加 60 μ L 敏感紅血球然後置於 37°C 30 min 充分作用。
- 10.2.2.9 移回 4°C 2-3 hr。
- 10.2.2.10 為輔助結果判定，需製備 100%及 50%溶血對照。
- 10.2.2.11 為確保檢驗品質需有敏感紅血球組、補體對照組、抗原對照組以及抗補體檢驗組。
- 10.2.2.12 CFT 結果判讀：
 - 10.2.2.12.1 先判讀各項對照組，若不符合預期，則試驗需重新進行直至對照組結果符合預期。抗補體檢驗組結果如出現不完全溶血，則此血清樣品無法以補體結合試驗檢驗，結果無法判定。
 - 10.2.2.12.2 當檢驗血清出現 50%以上不溶血判為陽性，產生陽性之最高稀釋倍數即為待測血清之力價。陽性血清抗體力價應高於 1：160。

10.3 綜合結果判讀如下：

- 10.3.1 玫瑰苯試驗陰性或玫瑰苯試驗陽性但 CFT 陰性（抗體力價小於 1：5）均判定為陰性。
- 10.3.2 玫瑰苯試驗陽性且 CFT 抗體力價等於或大於 1：5 均判定為陽性。

11 品質管制作業

- 11.1 本項試驗確定困難時應予複檢。
- 11.2 複檢時若有需要，可取前一批檢驗合格品，一起測試。
- 11.3 如有適當機會，可參加實驗室比對或能力試驗。或不定期以標準血清或檢驗合格品進行全程測試以進行控管。
- 11.4 為確保試驗所需抗原、補體及敏感紅血球之品質，品質管理紀錄表內容應包括配製日期、外觀及有效性試驗等。

12 參考資料

OIE. 2009. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2009,

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	布氏桿菌抗體檢測 (RBT 及 CFT)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1020 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Chapter 2.4.3 Bovine brucellosis. Available at
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_index.htm.

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌核酸檢測 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1021 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 分子診斷方法檢測肺炎披衣菌核酸。

2 適用檢體種類

病患咽喉、鼻腔黏膜擦抹棉棒。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用對肺炎披衣菌具有專一性之引子 (primers) 與檢體中之細菌核酸分子結合配對，並利用 Real-time 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肺炎披衣菌核酸序列。

5 試劑耗材

5.1 試劑

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

5.1.1.1 QIAamp mini spin columns。

5.1.1.2 Collection tubes (2 mL)。

5.1.1.3 Buffer AVL。

5.1.1.4 Buffer AW1。

5.1.1.5 Buffer AW2。

5.1.1.6 Buffer AVE。

5.1.1.7 Carrier RNA (poly A)。

5.1.2 EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen, Cat. no. 953034)

5.1.2.1 Reagent cartridge, tissue。

5.1.2.2 Disposable tip holders。

5.1.2.3 Disposable filter-tips。

5.1.2.4 Sample tubes (2.0 mL)。

5.1.2.5 Elution tubes (1.5 mL)。

5.1.2.6 Buffer G2。

5.1.2.7 Proteinase K。

5.1.3 LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS HybProbe (Roche Applied Science, Cat. no. 03515575001)

5.1.3.1 Master Mix (5X conc.) : Ready-to-use hot start PCR Reaction mix (after pipetting 10 mL from vial 1a into one vial 1b) Contains FastStart Taq DNA Polymerase, reaction buffer, MgCl₂, SYBR Green I dye, and dNTP mix (with dUTP instead of dTTP)。

(1) Enzyme (1a, white cap) : 1X vial。

(2) Reaction mix (1b, green cap) : 3X vial。

5.1.3.2 Water (2, colorless cap) : PCR grade, 2X1 mL。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌核酸檢測 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1022 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.1.4 陽性對照組 (positive control DNA) : *Chlamydia pneumoniae* quantitated bacterial DNA control (Advanced Biotechnologies Inc, 08-932-250, CDC-CWL-011 strain)。
- 5.1.5 陰性對照組 (negative control DNA) : DNase、RNase-free H₂O₂。
- 5.2 耗材
 - 5.2.1 LightCycler® Capillaries (20 µL) (Roche Applied Science, Cat. no. 909339001)。
 - 5.2.2 無菌 10 µL、20 µL、100 µL、200 µL、1,000 µL Tips。
 - 5.2.3 無菌 1.5 mL Eppendorf。
 - 5.2.4 無粉手套。
- 6 儀器設備
 - 6.1 2.5 µL、10 µL、100 µL、200 µL、1,000 µL Pipetteman。
 - 6.2 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
 - 6.3 快速核酸純化系統 (BioRobot EZ1 workstation, Qiagen)。
 - 6.4 核酸生化分析儀 (LightCycler® 1.0 Real-time PCR system, Roche Applied Science)。
 - 6.5 LC carousel centrifuge (Roche Applied Science)。
- 7 環境與設施安全
 - 7.1 病人拭子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 DNA 有關的實驗室分開，以避免污染，影響結果。
- 8 檢體採集
 - 8.1 投藥前立即採集，棉棒採檢後需浸入保存液中保存潮濕。
 - 8.2 鼻腔、咽喉拭子檢體採集方法，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

冷藏運送，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 萃取細菌 DNA
 - 10.1.1 QIAmp viral RNA mini kit 萃取細菌 DNA 方法
 - 10.1.1.1 於 1.5 mL 的離心管中加入 560 µL 含有 Carrier RNA 的 AVL buffer。
 - 10.1.1.2 再加入 140 µL 拭子檢體，用最高速震盪 (vortexing) 15 sec。
 - 10.1.1.3 於室溫中 (15-25°C) 靜置 10 min。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌核酸檢測 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1023 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 10.1.1.4 加入 560 μ L 酒精 (96-100%) 於檢體中，高速震盪 15 sec。
- 10.1.1.5 取出 630 μ L 的體積加入 QIAamp mini spin column 中，6,000 xg (8,000 rpm) 離心 1 min。
- 10.1.1.6 更換新的離心管，把剩餘的檢體量加入 QIAamp spin column 中，重複 10.1.1.5。
- 10.1.1.7 加入 500 μ L 的 Buffer AW1 於 QIAamp mini spin column 中，6,000 xg (8,000 rpm) 離心 1 min。
- 10.1.1.8 更換新的離心管，加入 500 μ L 的 Buffer AW2 於 QIAamp mini spin column 中，20,000 xg (14,000 rpm) 離心 3 min。
- 10.1.1.9 為避免 Buffer AW2 殘留於 column 中，更換新的離心管，再 20,000 xg (14,000 rpm) 離心 1 min。
- 10.1.1.10 更換新的離心管，加入 60 μ L 的 Buffer AE，室溫靜置 1 min，6,000 xg (8,000 rpm) 離心 1 min，將 DNA 溶出。
- 10.1.2 Qiagen BioRobot EZ1 萃取細菌 DNA 方法
 - 10.1.2.1 於生物安全操作台內取出咽喉拭子檢體，14,000 rpm 離心 10 min。
 - 10.1.2.2 取咽喉拭子檢體離心後之底層液 90 μ L、G2 Buffer 100 μ L、Proteinase K 10-20 μ L 後，置於 56°C 乾式恆溫加熱器，反應作用隔夜。
 - 10.1.2.3 利用 BioRobot EZ1 workstation (Qiagen) 完成核酸萃取。
- 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，加入肺炎披衣菌專一引子組 (CP primerF, CP primerR CP HP1, CP HP2；primers 參考附錄 15.2)，置於冰上。
 - 10.2.2 加入反應溶液 (成分如下表)，調整反應總體積至 20 μ L。

初始濃度	加入體積	最終濃度
5X Master mix	4 μ L	1X
CP primerF (10 μ M)	0.5 μ L	250 nM
CP primerR (10 μ M)	0.5 μ L	250 nM
CP HP1 (4 μ M)	0.5 μ L	100 nM
CP HP2 (4 μ M)	0.5 μ L	100 nM
Template	5 μ L	
RNase-free H ₂ O	9 μ L	
Total	20 μ L	

- 10.2.3 即時定量偵測聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR)：使用

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌核酸檢測 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1024 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

LightCycler® 1.0 real time PCR system (Roche Applied Science)。

10.2.3.1 Taq polymerase activation：95°C，7 min。

10.2.3.2 Amplification

(1) Denaturation：94°C，5 sec。

(2) Annealing：58°C，5 sec。

(3) Extension：72°C，20 sec。

(4) 重複 (2) 至 (3) 步驟 50 Cycle。

10.2.3.3 Melting curve

(1) Denaturation：95°C，0 sec。

(2) Annealing：60°C，90 sec。

(3) Melting：95°C，0 sec。

10.2.3.4 Cooling：40°C，90 sec。

11 結果判定

11.1 判定標準

11.1.1 以 LightCycler® 軟體分析結果， T_m 值與陽性對照組相符者為陽性。

11.1.2 若 T_m 值與陽性對照組有些許偏差者，以 2% 瓊脂 (agarose) 電泳方式，觀察膠圖中檢體的片段大小是否與標準菌株一致。

11.2 報告核發

肺炎披衣菌陽性，肺炎披衣菌陰性。

11.3 結果登錄

完成檢驗後，將檢驗結果登錄於「肺炎披衣菌核酸檢測紀錄表」(QR-M-05-01) 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 Control

12.1.1 Positive control：C. pneumoniae quantitated bacterial DNA control (Advanced Biotechnologies Inc，08-932-250，CDC-CWL-011 strain)。

12.1.2 Negative control：DNase、RNase-free H₂O。

12.2 每次試驗應執行品管測試。

12.3 品管測試結果 Positive control 應為陽性，Negative control 應為陰性。

12.4 品管測試結果若有違背品管允收標準應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正，必要時採取預防措施。

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：	肺炎披衣菌核酸檢測 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1025 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

14 參考資料

- 14.1 Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulia-Barrett SL, Lafe K, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. 2001. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. J Clin Microbiol 39: 4042-51.
- 14.2 Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, Chen YC, Liao MH, Lin YH, Li SY. 2003. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. J Med Microbiol 52(Pt 12): 1071-1076.
- 14.3 Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagmeyer L, Schumacher U and Einsele H. 2000. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. J Clin Microbiol. 38: 586-589.
- 14.4 Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. 1998. Rapid identification of Candida species with species-specific DNA probes. J Clin Microbiol 36: 3260-3265.
- 14.5 Reischl U, Lehn N, Simnacher U, Marre R. 2003. Rapid and standard detection of *Chlamydia pneumoniae* using LightCycler Real-time Fluorescence PCR. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22: 54-57.

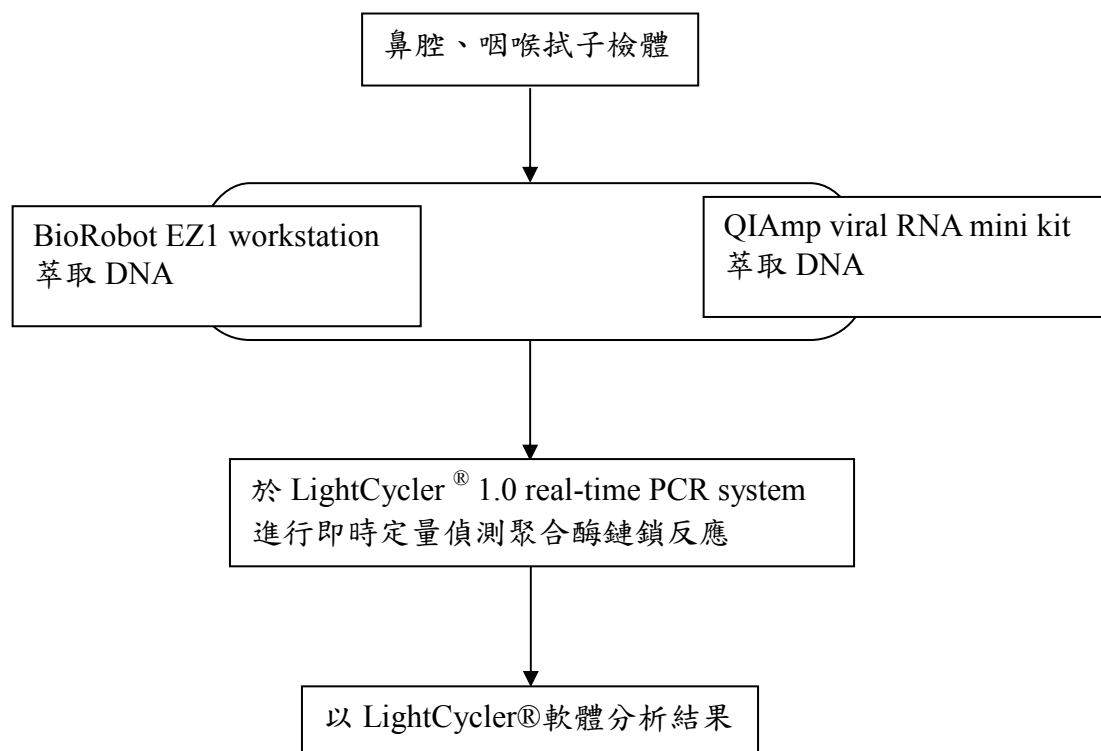
15 附錄

- 15.1 肺炎披衣菌核酸檢測（即時定量偵測-聚合酶鏈鎖反應）流程圖。
- 15.2 肺炎披衣菌診斷用引子組序列表。
- 15.3 肺炎披衣菌核酸檢測紀錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌核酸檢測 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1026 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 肺炎披衣菌鑑定（即時定量偵測－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：	肺炎披衣菌核酸檢測 (PCR)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1027 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附件 15.2 肺炎披衣菌菌診斷用引子組序列。

Chlamydia pneumoniae- specific primers

參與反應的濃度

CP PrimerF	5'- TgA CAA CTg Tag AAA TAC AgC -3'	250 nM
CP PrimerR	5'- CgC CTC TCT CCT ATA AAT -3'	250 nM
CP HP1	5'- CCC CAT CTC TTC AGA ATC CCT GCT -3'-FL	100 nM
CP HP2	LC-5'- TCC TAA Aag CTA gCC CCA gTT C -3'-PH	100 nM

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌核酸檢測	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1028 頁/共 1091 頁	(PCR)	修訂日期： 年 月 日

附件 15.3 肺炎披衣菌核酸檢測紀錄表。

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

肺炎披衣菌核酸檢測紀錄表

檢驗日期：____年____月____日

DNA 萃取

DNA 萃取	____年____月____日
DNA 萃取方法	☐ QIAmp Viral RNA mini Kit ☐ BioRobot EZ1 Workstation (EZ1 DNA Tissue Kit)
試劑批號	
有效日期	

PCR Mix

Component	Stock Conc.	Final Conc.	Volume Per Reaction (μL) (to total 20μL)	Volume for ____sample + 1
MASTER Mix	5X	1X	4 μL	μL
CP PrimerF	10 μM	250 nM	0.5 μL	μL
CP PrimerR	10 μM	250 nM	0.5 μL	μL
CP HP1	4 μM	100 nM	0.5 μL	μL
CP HP2	4 μM	100 nM	0.5 μL	μL
RNase-free H ₂ O	—	—	9 μL	μL
DNA	—	—	5 μL	—
試劑批號				
有效日期				

即時定量偵測聚合酶鏈鎖反應 (Real-Time PCR)

編號	檢體編號	Tm	結果	備註	編號	檢體編號	Tm	結果	備註

檢驗者：

核驗者：

實驗室 PI：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1029 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

利用微量免疫螢光法 (micro-immunofluorescence, MIF) 檢測人體是否有肺炎披衣菌專一性抗體。

2 適用檢體種類

血清 (serum)。

3 名詞解釋

血清 (serum)：血液凝固後，除去固態成份後的清亮液體，不含纖維蛋白原。

4 原理概述

利用微量免疫螢光法 (micro-immunofluorescence, MIF)，檢測血清中肺炎披衣菌抗體的表現與否。

5 試劑耗材

5.1 試劑

Chlamydia pneumoniae IgG / IgM Micro-IF Test kit (Ani Labsystems, Cat. no. 6108380)

5.1.1 Antigens dotted slide：20 x 12 well slides。

5.1.2 Sample diluent：50 mL Phosphate buffered saline, pH 7.4 ± 0.2, proprietary additives and 15 mM sodium azide as preservative。

5.1.3 *C. pneumoniae* IgG positive control (human) (black cap)：0.30 mL, diluted human serum, proprietary additives and 15 mM sodium azide as preservative。

5.1.4 *C. pneumoniae* IgM Positive control (human) (red cap)：0.30 mL, diluted human serum, proprietary additives and 15 mM sodium azide as preservative。

5.1.5 *C. pneumoniae* negative control (human) (white cap)：0.30 mL, diluted human serum, proprietary additives and 15 mM sodium azide as preservative。

5.1.6 Anti-human IgG-FITC-conjugate (rabbit) (black cap)：1 × 2.5 mL (1 × 2.5 mL)，FITC conjugated anti-human IgG, 0.001 % Evan's Blue counterstain, proprietary additives and 15 mM sodium azide as preservative。

5.1.7 Anti-human IgM-FITC-conjugate (rabbit) (red cap)：1 × 2.5 mL (1 × 2.5 mL)，FITC conjugated anti-human IgM, 0.001 % Evan's Blue counterstain, proprietary additives and 15 mM sodium azide as preservative。

5.1.8 Mounting fluid：7 mL, Glycerol, proprietary additives and 15 mM sodium azide as preservative。

5.1.9 IgG blocking reagent (Ani Labsystems, Cat. no.6106020)。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1030 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

5.2 耗材

- 5.2.1 96 孔盤。
- 5.2.2 10 μ L、200 μ L、1,000 μ L Tip。
- 5.2.3 1.5 mL Eppendorf。
- 5.2.4 4 mL Tube。

6 儀器設備

- 6.1 10 μ L、200 μ L、1,000 μ L 單爪 Pipetteman。
- 6.2 50 μ L、300 μ L 八爪 Pipetteman。
- 6.3 螢光顯微鏡。
- 6.4 潮濕盒。
- 6.5 離心機。
- 6.6 水浴槽。

7 環境與設施安全

於生物安全第一級 (BSL-1) 實驗室之設施內操作。

8 檢體採集

- 8.1 檢體不加任何添加物，血液量至少 5 mL、血清量至少 1 mL。
- 8.2 共需採檢 2 次：
 - 急性期：第 7 病日內。
 - 恢復期：與急性期血清間隔 4 週。

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 血液（不含抗凝劑）放置常溫 30 min 以上，離心 2,000 rpm、15 min，取血清至 2 mL 檢體保存管，標示號碼。
- 10.2.2 取出實驗所需用量後，將檢體移放 -80°C 冰箱保存。
- 10.2.3 血清檢體 56°C，30 min 不活化。

10.3 試劑準備

- 10.3.1 所有試藥 (FITC-conjugate 除外) 在使用前請放置於室 (20-30°C) 1 hr 方可使用，不同批號的試藥不可混在一起使用。
- 10.3.2 依當日檢體數多寡計算所需取出的玻片數，其餘玻片則儘速密封後放回 4°C 保存。
- 10.3.3 所有試藥 (anti-human IgG-FITC-conjugate、anti-human IgM-FITC-conjugate 除外) 在使用前請放置於室溫 (20-30°C)

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1031 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 hr 方可使用，不同批號的試藥不可混在一起使用。

10.3.4 依當日檢體數多寡計算所需取出的玻片數，其餘玻片則儘速密封後放回 4°C 保存。

10.4 IgM 檢驗

10.4.1 取檢體血清 2 µL 與 IgG blocking reagent 14 µL 混合均勻 (1:8 稀釋)，於室溫反應 15 min。

10.4.2 再加入血清稀釋液 (diluent) 16 µL 混合均勻 (1:16 稀釋)。

10.4.3 取出 10 µL，點於 Slides 上，置於潮濕盒中，於 37°C 烘箱內反應 3 hr。

10.4.4 Slide 以 0.01 M Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) 浸泡 10 min，再以 ddH₂O 將 PBS 洗盡，於 37°C 烘箱中烘乾。

10.4.5 將 Anti-human- IgM-FITC-conjugate 點在對應的 Slides 上，於 37°C 烘箱內反應 30 min。

10.4.6 Slide 以 0.01 M Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) 浸泡 10 min，再以 ddH₂O 將 PBS 洗盡，於 37°C 烘箱中烘乾。

10.4.7 於 Slides 上點 3 滴 Mounting fluid，再取蓋玻片進行密封。

10.4.8 以螢光顯微鏡使用藍光觀測。

10.5 IgG 檢驗

10.5.1 取檢體血清 5 µL，加入血清稀釋液 (diluent) 155 µL 於 96 孔盤中以八爪微量分注器混合均勻 (1:32 稀釋)。

10.5.2 再自 1:32 的血清稀釋液中取 25 µL，加入 Diluent 75 µL 混合均勻 (1:128 稀釋)。

10.5.3 自 1:128 的血清稀釋液中取 25 µL，加入 Diluent 75 µL 混合均勻 (1:512 稀釋)。

10.5.4 將不同倍數的血清稀釋液取出 10 µL，點於 Slides 上，置於潮濕盒中，37°C 烘箱內反應 30 min。

10.5.5 Slide 以 0.01 M Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) 浸泡 10 min，再以 ddH₂O 將 PBS 洗盡，於 37°C 烘箱中烘乾。

10.5.6 將 Anti-human-IgM-FITC-conjugate 點在對應的 Slides 上，於 37°C 烘箱內反應 30 min。

10.5.7 以 PBS 浸泡 10 min，再以 ddH₂O 將 PBS 洗盡，於 37°C 烘箱中烘乾。

10.5.8 於 Slides 上點 3 滴 Mounting fluid，再取蓋玻片進行密封。

10.5.9 以螢光顯微鏡使用藍光觀測。

11 結果判定

11.1 判定標準：

在螢光顯微鏡下以 200X 或 400X 的倍數觀察，將檢體血清與 Positive control 做比較，以螢光亮度強弱與亮點數分佈均勻與否做觀察。亮度強弱與亮點數分佈須與 Positive control 相仿始判為陽性 (見 16.5)。

11.1.1 IgG 螢光亮度與亮點數分佈於 1:512 仍有表現時，判定檢體為

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1032 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

IgG 陽性。

11.1.2 IgM 螢光亮度與亮點數分佈於 1:16 有表現時，判定檢體為 IgM 陽性。

11.1.3 檢體最終以 IgG 與 IgM 做綜合判斷，只要 IgG 或 IgM 為陽性者，即判斷檢體患者有肺炎披衣菌感染的現象。

11.1.4 如果第一次採檢，IgG 或 IgM 為陽性者，即正在感染中；若為陰性，則發病日後四週做第二次採檢，其結果需 IgM 大於等於 1:16，或 IgG 有四倍上升的趨勢，始判為陽性。

11.2 報告核發

肺炎披衣菌抗體陽性，肺炎披衣菌抗體陰性，肺炎披衣菌抗體未確定。

11.3 結果登錄

完成檢驗後，將檢驗結果登錄於「肺炎披衣菌抗體試驗紀錄表」(QR-M-02-01) 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 Control: *C. pneumoniae* IgG positive control (human)、*C. pneumoniae* IgM positive control (human)、*C. pneumoniae* negative control (human)。

12.2 每次試驗應執行品管測試。

12.3 品管測試結果 Positive control 應呈現中度到強烈蘋果綠螢光，Negative control 應無蘋果綠螢光。

12.4 品管測試結果若有違背品管允收標準應依矯正及預防措施作業程序，加以矯正，必要時採取預防措施。

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 干擾與交互反應

14.1 品質不佳的檢體會降低抗體效價影響結果判定，因此避免使用溶血或是遭細菌污染以及嚴重脂血症的檢體。

14.2 類風溼因子 (rheumatoid factor, RF) 的存在可能會導致 IgM 呈現偽陽性反應，肺炎披衣菌的 IgG 抗體 (specific IgG) 會直接的影響 IgM 抗體檢測，因此 IgM 檢驗需先使用 IgG blocking reagent 將 IgG 抗體吸附之後再做結果確認。

14.3 長時間保存的血清 (冰箱中冷凍超過一年)、加熱去活化及反覆解凍血清會降低抗體的效價。

15 參考資料

ANI LabSystems *Chlamydia pneumoniae* IgG / IgM Micro-IF Test kit 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：	肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1033 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

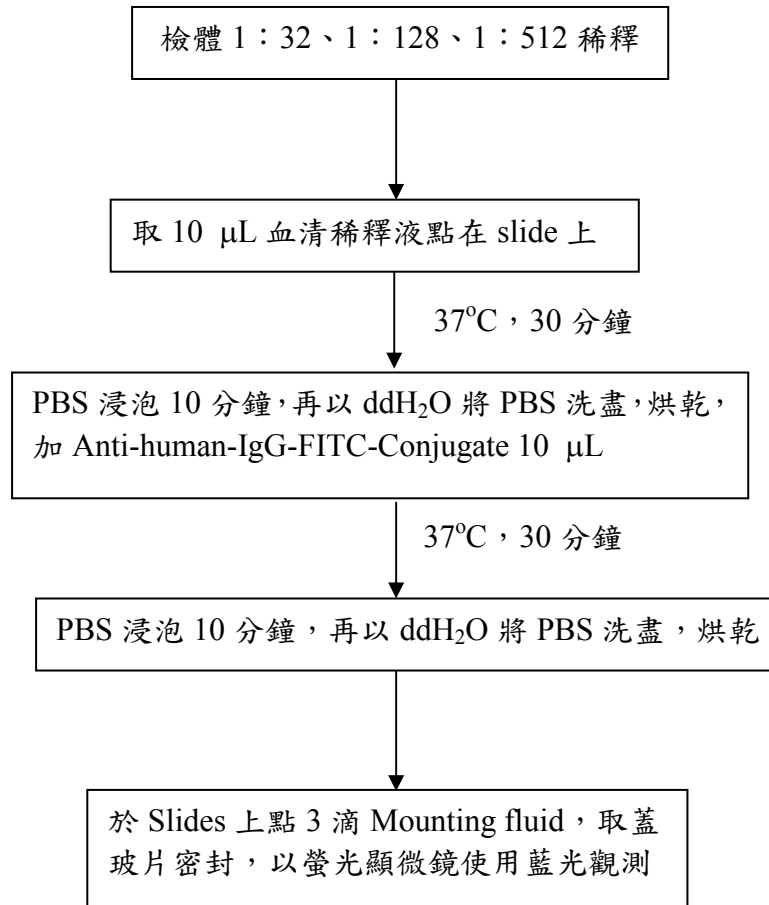
16 附錄

- 16.1 肺炎披衣菌 IgM 抗體試驗（微量免疫螢光法）流程圖。
- 16.2 肺炎披衣菌 IgG 抗體試驗（微量免疫螢光法）流程圖。
- 16.3 肺炎血清學檢驗及結果判定流程圖。
- 16.4 肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體試驗紀錄表。
- 16.5 肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體試驗結果判定圖例。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1034 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

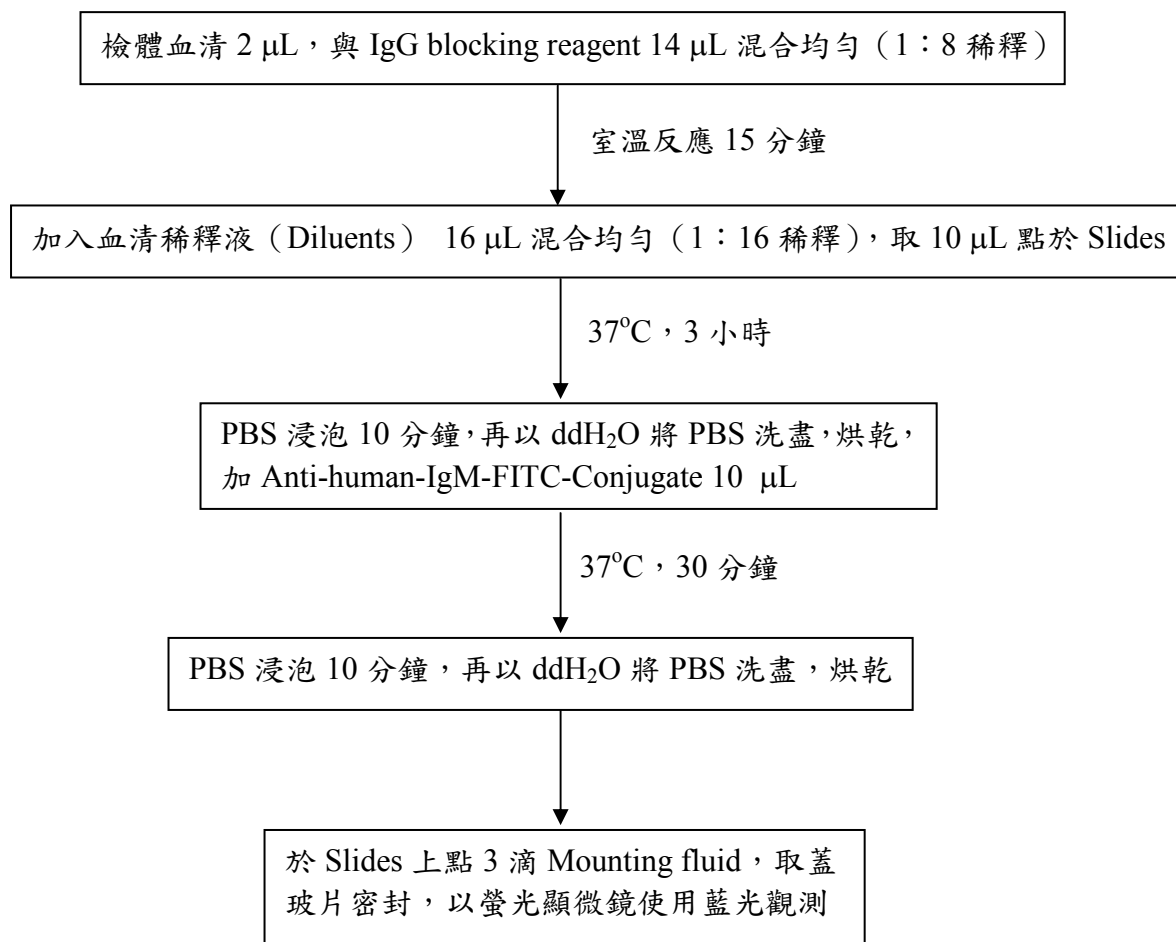
附錄 16.1 肺炎披衣菌 IgG 抗體試驗（微量免疫螢光法）流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1035 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

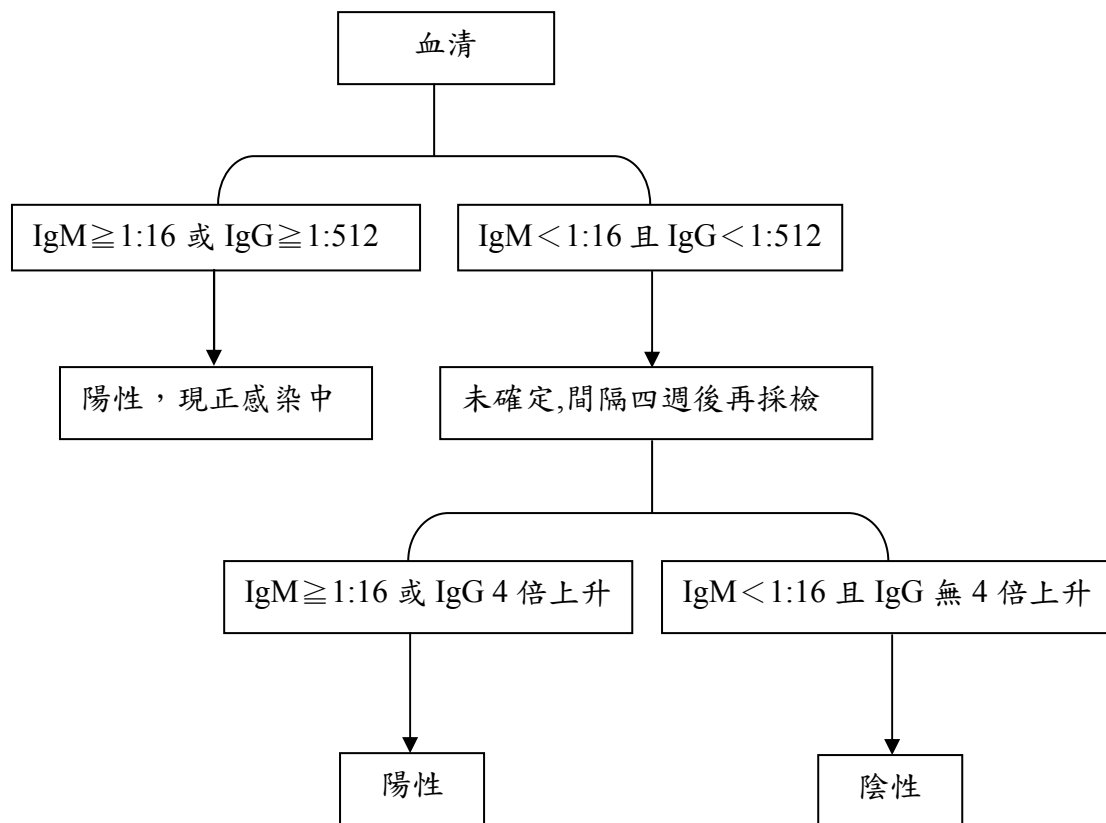
附錄 16.2 肺炎披衣菌 IgM 抗體試驗（微量免疫螢光法）流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1036 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.3 肺炎披衣菌血清學檢驗之結果判定流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

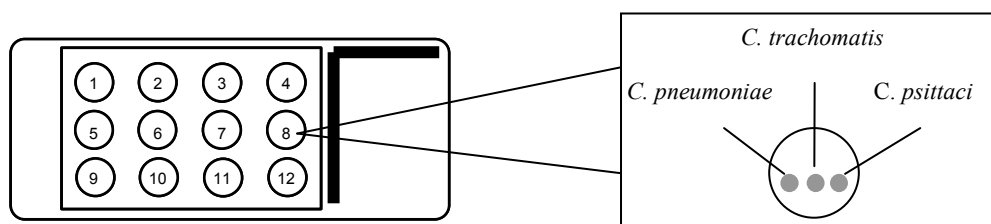
	編號：	肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1037 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.4 肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體試驗紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體試驗紀錄表

試劑批號： _____
 有效期限： _____
 檢驗日期： _____年____月____日
 玻片編號： _____



	1	2	3	4
檢體編號				
抗體種類				
稀釋倍數				
<i>C. pneumoniae</i> 結果				
<i>C. trachomatis</i> 結果				
<i>C. psittaci</i> 結果				
	5	6	7	8
檢體編號				
抗體種類				
稀釋倍數				
<i>C. pneumoniae</i> 結果				
<i>C. trachomatis</i> 結果				
<i>C. psittaci</i> 結果				
	9	10	11	12
檢體編號				
抗體種類				
稀釋倍數				
<i>C. pneumoniae</i> 結果				
<i>C. trachomatis</i> 結果				
<i>C. psittaci</i> 結果				

檢驗者：

核驗者：

實驗室 PI：

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1038 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 16.5 肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體試驗結果判定圖例

Chlamydia pneumoniae Interpretation chart

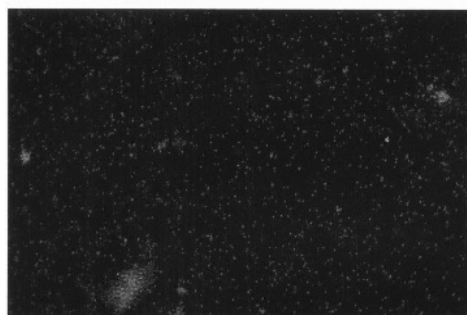


Figure 1. Positive IgG

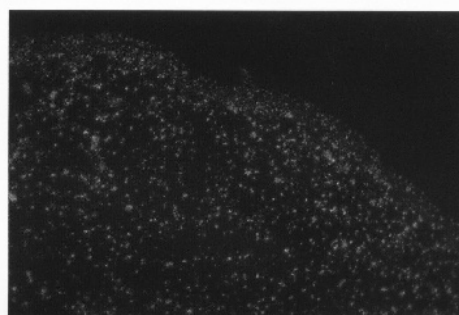


Figure 2. Positive IgM

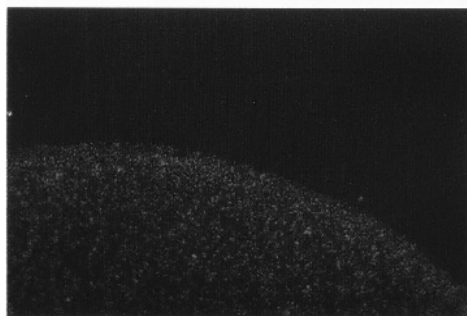


Figure 3. Positive IgA

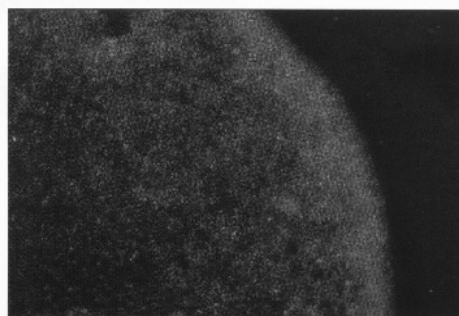


Figure 4. Positive LpS



Figure 5. Negative

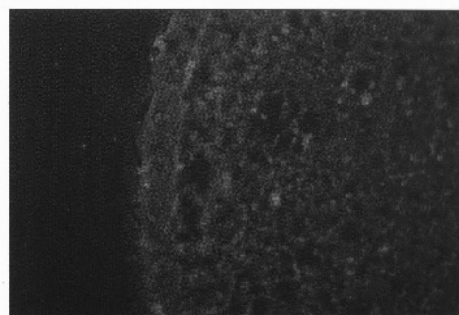


Figure 6. Negative

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	諾羅病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1039 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，檢測是否存在諾羅病毒抗原。

2 適用檢體種類

新鮮糞便檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

本酵素免疫分析法的原理主要為利用 Sandwich-type 檢測方式。使用抗諾羅病毒外套膜抗原之單株抗體，已先結合在試劑盤孔上。檢測時，先加入檢體或對照組至試劑盤孔洞中進行結合反應，再加入經生物素偶合之諾羅病毒抗體，然後加入卵白素過氧化酶偶合物。如果檢體內有諾羅病毒，將會在加入受質反應後時呈色。

5 試劑耗材

5.1 試劑套組：Ridascreen® Norovirus 3rd generation (C 1401)，r-biopharm，德國。

5.1.1 96 試孔盤 (plate)：12 條微孔條 (可分次使用)，已接合上抗諾羅病毒單株抗體 (NoV-mAb coated plate)，試劑 (1)，保存 4°C 冰箱。

5.1.2 稀釋液 (dilution buffer)：樣品稀釋液，試劑 (2)，保存 4°C 冰箱。

5.1.3 清洗液 (wash buffer)：10X 濃度，試劑 (3)，保存 4°C 冰箱。

5.1.4 陽性對照組：recombinant norovirus antigens，試劑 (4)，保存 4°C 冰箱。

5.1.5 諾羅病毒抗體-生物素偶合物：biotin-conjugated anti-NoV Ab，試劑 (5)，保存 4°C 冰箱。

5.1.6 卵白素過氧化酶偶合物：streptavidin peroxidase conjugate，試劑 (6)，保存 4°C 冰箱。

5.1.7 受質：hydrogen peroxide/TMB solution，試劑 (7)，保存 4°C 冰箱。

5.1.8 終止劑：1 N H₂SO₄，試劑 (8)，保存 4°C 冰箱。

5.2 耗材：

5.2.1 微量吸管尖 (tip)：200 µL。

5.2.2 無菌冷凍保存管：2.0 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 膠膜。

5.2.7 黑膠蓋。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	諾羅病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1040 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

5.2.8 滅菌水或去離子水。

6 儀器設備

- 6.1 第二級生物安全櫃 (class II BSC)。
- 6.2 微量吸管 (pipetteman) 200 μ L。
- 6.3 震盪器 (vortexer)。
- 6.4 計時器 (stop clock)。
- 6.5 離心機 (Kubota 5800)。
- 6.6 4°C 冰箱。
- 6.7 盤式自動洗滌機 (ELx 405), Bio-Tex, 美國。
- 6.8 盤式全光譜分析儀 (u Quant), Bio-Tex, 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 取糞便 1 g 加入 10 mL PBS 及適量玻璃珠，震盪 10 min 混合均勻，調成 10% 均質混合液。
- 10.2.2 於 4°C，3,000 rpm 離心 15 分鐘。
- 10.2.3 先將無菌冷凍保存管，標示號碼及日期，取出離心後之上清液至該標示之無菌冷凍管，-20°C 保存。

10.3 檢驗步驟

- 10.3.1 在實驗進行前將所有的試劑及試孔盤放置室溫 (約 20-25°C) 回溫，使用前先搖勻試劑及待測檢體。
- 10.3.2 加入 100 μ L 待測檢體至每個試孔中，預留 2 個試孔，分別加入 100 μ L 的陽性或陰性對照組。
- 10.3.3 加入 100 μ L 的試劑 (5)，於室溫 (約 20-25°C) 下反應 60 分鐘。
- 10.3.4 配製清洗緩衝液：取 1 份 10 倍濃縮清洗液加 9 份蒸餾水，依所需試驗容量配製。
- 10.3.5 清洗試驗盤：每孔每次至少以大於 300 μ L 清洗緩衝液，共約清

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	諾羅病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1041 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

洗 5-7 次，清洗完成後，將試盤倒置於乾淨擦手紙上輕輕拍打，以完全除去試孔內殘餘水分。

10.3.6 分別加入 100 μ L 的試劑（6），於室溫（約 20-25°C）反應 30 分鐘。

10.3.7 清洗試驗盤：每孔每次至少以大於 300 μ L 清洗緩衝液，共約清洗 5-7 次，清洗完成後，將試盤倒置於乾淨擦手紙上輕輕拍打，以完全除去試孔內殘餘水分。

10.3.8 加入 100 μ L 試劑（7）於每個試孔內，蓋上黑膠蓋避光放置於室溫（約 20-25°C）反應作用 15 分鐘。

10.3.9 掀開黑膠蓋，加入 50 μ L 試劑（8）於每個試孔內以終止酵素呈色反應。

10.3.10 以盤式全光譜分析儀測定每個試孔的吸光度，波長設定 450/620 nm。

10.4 檢驗後處理

10.4.1 完成檢驗後將未用完的試劑組再儲存於 4°C 冰箱保存。

10.4.2 檢驗後之檢體應依序歸回檢體盒，放置於 -80°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、手套、口罩，包裝於廢棄物滅菌塑膠袋。

11 結果判定

11.1 臨界值（cut off value）= Negative control + 0.15。

11.2 陰性對照組之吸光值需小於 0.2，陽性對照組之吸光值需大於 0.5。

11.3 如果檢體之吸光值大於 1.1 倍臨界值，判定為陽性反應。

11.4 若檢體之吸光值小於 0.9 倍臨界值，判定為陰性反應。

11.5 檢驗結果由檢驗儀器傳回電腦再列印出檢驗數據結果，並於列印紙上蓋章。

11.6 報告核發：諾羅病毒（陽性）。諾羅病毒（陰性）。

11.7 結果登錄：相關檢驗紀錄及檢體送驗單背面蓋職章，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。

11.8 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。

12 品質管制

應於有效期限內使用，每次進行檢測試驗皆需加入對照組（陰性、陽性），不同批號試劑組，其試劑不可混合使用。

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，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 Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard SR, Glass RI, Monroe SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virol 346:

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	諾羅病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1042 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

312-323.

- 14.2 Chan MCW, Sung JJY, Lam RKY, Chan PKS, Lee NLS, Lai RWM, Leung WK. 2006. Fecal viral load and norovirus associated gastroenteritis. Emer Infect Dis 12 : 1278-1280.
- 14.3 Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamijo S, Sato T, Yagyu F, Müller WEG, Ushijima H. 2006. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay kit. J Clin Microbiol 44: 3784-3786.
- 14.4 Castriciano S, Luinstra K, Petrich A, Smieja M, Lee C, Jang D, Portillo E, Chernesky M. 2007. Comparison of the RIDASCREEN® norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools assayed by RT-PCR and electron microscopy. J Virol Methods 141: 216-219.

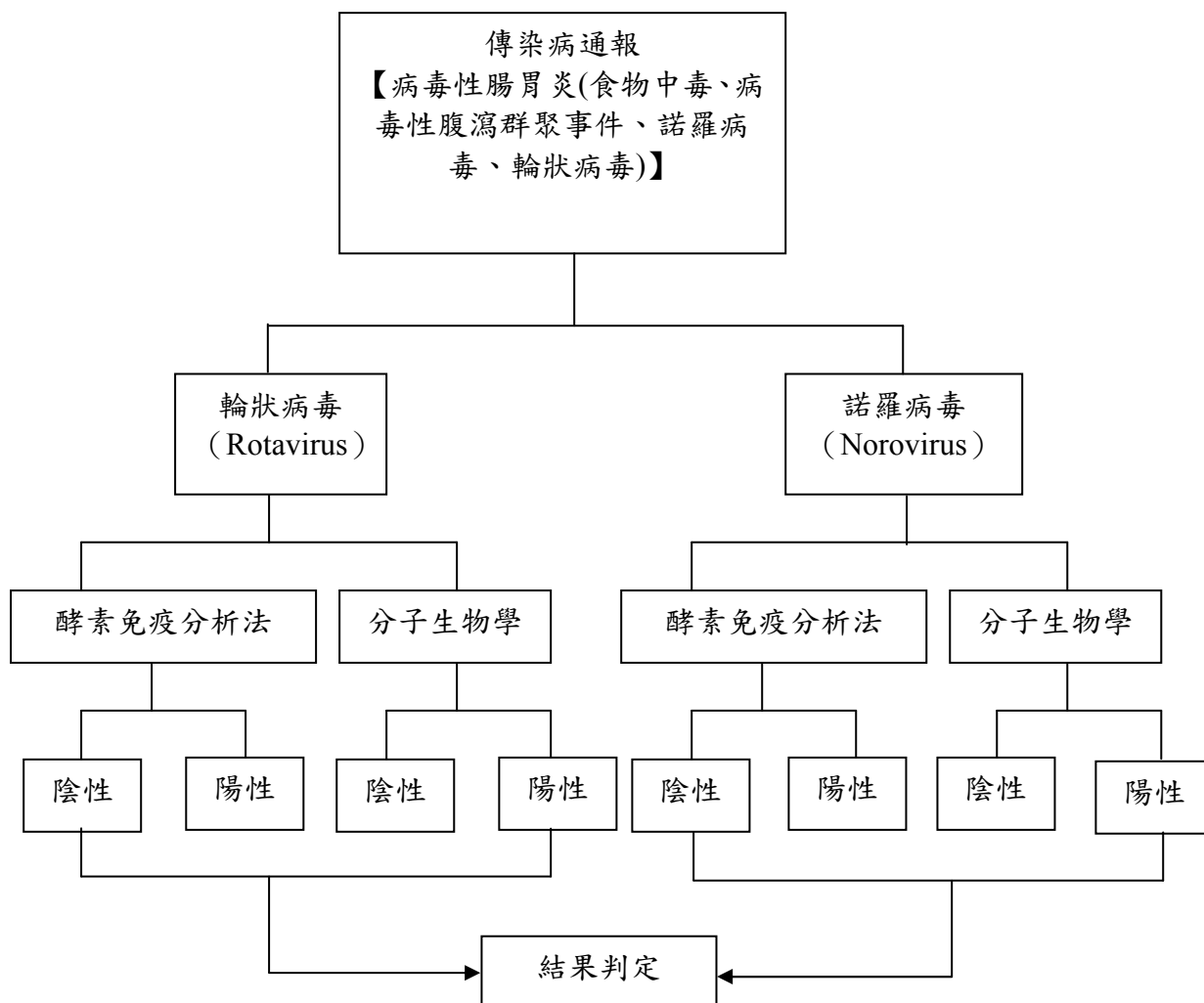
15 附錄

- 15.1 病毒性腸胃炎檢驗總流程圖。
- 15.2 諾羅病毒抗原試驗（酵素免疫分析法）流程圖。
- 15.3 諾羅病毒抗原試驗（酵素免疫分析法）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：	諾羅病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1043 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

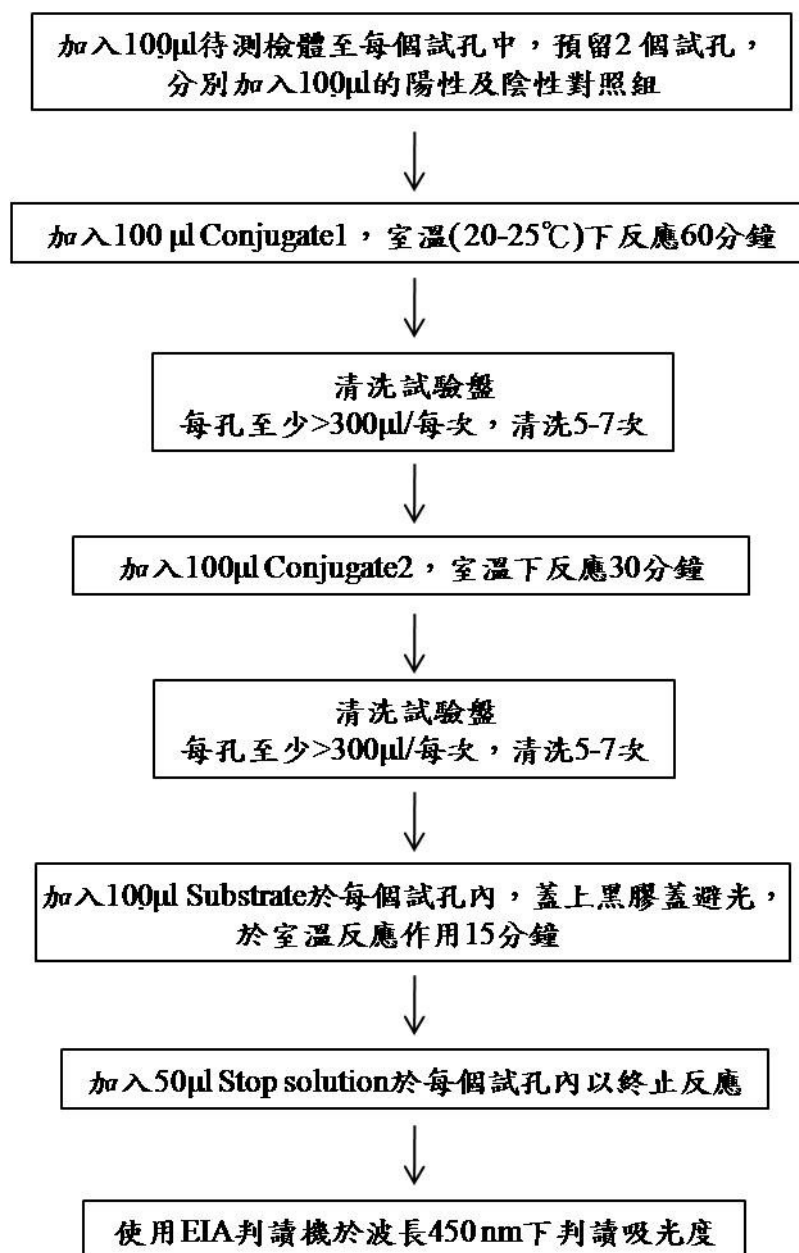
附錄 15.1 病毒性腸胃炎檢驗總流程圖。



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	諾羅病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1044 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 諾羅病毒抗原試驗（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：	諾羅病毒抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1045 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 諾羅病毒抗原試驗（酵素免疫分析法）檢體位置紀錄表。

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
諾羅病毒抗原試驗檢體位置記錄表

頁數：第 頁/共 頁

Date：
Test：
Kit Catalog Number：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33	Sample 41	Sample 49	Sample 57	Sample 65	Sample 73	Sample 81	Sample 89
B	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34	Sample 42	Sample 50	Sample 58	Sample 66	Sample 74	Sample 82	Sample 90
C	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35	Sample 43	Sample 51	Sample 59	Sample 67	Sample 75	Sample 83	Sample 91
D	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36	Sample 44	Sample 52	Sample 60	Sample 68	Sample 76	Sample 84	Sample 92
E	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37	Sample 45	Sample 53	Sample 61	Sample 69	Sample 77	Sample 85	Sample 93
F	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38	Sample 46	Sample 54	Sample 62	Sample 70	Sample 78	Sample 86	Sample 94
G	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39	Sample 47	Sample 55	Sample 63	Sample 71	Sample 79	Sample 87	NC
H	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40	Sample 48	Sample 56	Sample 64	Sample 72	Sample 80	Sample 88	PC

PC：陽性對照組。NC：陰性對照組。

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：	輪狀病毒法抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1046 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，檢測是否存在輪狀病毒抗原。

2 適用檢體種類

新鮮糞便檢體。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

本酵素免疫分析法的原理主要為利用 Sandwich-type 方式加以偵測。所使用之抗輪狀病毒套膜 VP6 抗原之單株抗體，已先結合在試劑盤孔上。反應時，先加入檢體或對照組溶液至試劑盤孔洞中進行結合反應，再加入過氧化酶偶合 (conjugated) 之抗輪狀病毒單株抗體。如果檢體內有輪狀病毒，將會在加入受質反應後時呈色。A 群輪狀病毒是主要感染人類的病毒群，本試劑套組中使用之抗輪狀病毒套膜 VP6 抗原，是以 A 群輪狀病毒株製備。

5 試劑耗材

5.1 試劑套組：Ridascreen[®] Rotavirus (C 0901)，r-biopharm，德國。

5.1.1 96 試孔盤 (Plate)：12 微孔條 (可分割) 已接合上老鼠抗輪狀病毒單株抗體，試劑 (1)，保存 4°C 冰箱。

5.1.2 老鼠抗輪狀病毒單株抗體-過氧化酶偶合物 (conjugated)：含有 0.1% Kathon 防腐劑，溶液呈綠色：試劑 (2)，保存 4°C 冰箱。

5.1.3 對照組陽性 (positive control)，不活化的猴子輪狀病毒 (SA-11)：試劑 (3)，保存 4°C 冰箱。

5.1.4 受質 (TMB substrate)：試劑 (4)，保存 4°C 冰箱。

5.1.5 終止溶液 (1 N 硫酸)：試劑 (5)，保存 4°C 冰箱。

5.1.6 10X 清洗液 (wash buffer)：試劑 (6) 保存 4°C 冰箱。

5.1.7 稀釋液 (sample-dilution buffer)：用於稀釋檢體，也用於陰性對照組，含有 0.1% Kathon 防腐劑，溶液呈藍色，試劑 (7)，保存 4°C 冰箱。

5.2 耗材

5.2.1 微量吸管尖 (tip)。

5.2.2 無菌離心管 (15 mL)。

5.2.3 無菌微量離心管 (tubes) (2 mL)。

5.2.4 無菌吸管 (dropper) (2 mL)。

5.2.5 可拋棄式無菌塑膠手套。

5.2.6 口罩。

5.2.7 擦手紙。

5.2.8 黑膠蓋。

6 儀器設備

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	輪狀病毒法抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1047 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 6.1 第二級生物安全櫃。
- 6.2 震盪器 (vortexer)。
- 6.3 冷凍離心機 (Kubota 5800)。
- 6.4 微量吸管 (pipetman)。
- 6.5 4°C 冰箱。
- 6.6 -80°C 冷凍櫃。
- 6.7 盤式自動洗滌機 (ELx 405)，Bio-Tex，美國。
- 6.8 盤式全光譜分析儀 (μ Quant)，Bio-Tex，美國。
- 6.9 高壓滅菌鍋。

7 環境與設施安全

於生物安全第二等級 (BSL-2) 實驗室進行所有檢測之操作流程。

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。

10.2 檢體前處理：

- 10.2.1 取糞便 1 g 加入 10 mL PBS 及適量玻璃珠，震盪 10 min 混合均勻，調成 10% 均質混合液。
- 10.2.2 於 4°C，3,000 rpm 離心 15 min。
- 10.2.3 先將無菌冷凍保存管，標示號碼及日期，取出離心後之上清液至該標示之無菌冷凍管，-20°C 冷凍保存。

10.3 檢驗步驟

- 10.3.1 在實驗進行前將所有的試劑及試孔盤放置室溫下 (約 20-25°C) 回溫。
- 10.3.2 加入 100 μ L 待測檢體至每個檢體之試孔中，預留 2 個試孔，各別加入 100 μ L 的陽性或陰性對照組。
- 10.3.3 加入 100 μ L 試劑 (2)，於室溫 (約 20-25°C) 下，反應 60 分鐘。
- 10.3.4 配製清洗緩衝液：取 1 份 10X 濃縮清洗液加 9 份蒸餾水，依所需試驗容量配製。
- 10.3.5 清洗試驗盤，每孔每次至少以大於 300 μ L 清洗緩衝液清洗，共約 5-7 次，每次清洗完成後，將試盤倒置於乾淨擦手紙上輕輕拍打，以完全除去試孔內殘餘清洗液。
- 10.3.6 加入 100 μ L 試劑 (4) 於每個試孔內，蓋上黑膠蓋避光放置於室溫 (約 20-25°C) 反應作用 15 分鐘。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	輪狀病毒法抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1048 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.3.7 掀開黑膠蓋，加入 50 μ L 試劑 (5)，至每個試孔內以中止酵素呈色反應。

10.3.8 以盤式全光譜分析儀測定每個試孔的吸光值，波長設定於 450 nm。

10.4 檢驗後處理

10.4.1 完成檢驗後將未用完的輪狀病毒試劑組，繼續儲存於 4°C 冰箱保存。

10.4.2 檢驗後之檢體應依序歸回檢體盒，放置於 -80°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、手套、口罩，包裝於廢棄物滅菌塑膠袋。

11 結果判定

11.1 臨界值 (cut off value) = Negative control (NC) + 0.15。

11.2 陰性對照組之吸光值需小於 0.2，陽性對照組之吸光值需大於 0.8。

11.3 如果檢體之吸光值大於 1.1 倍臨界值，判定為陽性反應。

11.4 若檢體之吸光值小於 0.9 倍臨界值，判定為陰性反應。

11.5 檢驗結果由檢驗儀器傳回電腦再列印出檢驗數據結果，並於列印紙上蓋章。

11.6 報告核發：輪狀病毒 (陽性)。輪狀病毒 (陰性)。

11.7 結果登錄：相關檢驗紀錄及檢體送驗單背面蓋職章，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。

11.8 檢體送驗單及原始列印檢驗結果自行歸檔。

12 品質管制

應於有效期限內使用，每次進行檢測試驗皆需加入對照組 (陰性、陽性)。不同批號試劑組，其試劑不可混合使用。

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，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 Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F. 1992. Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol Suppl. 2: 140-144.

14.2 Estes MK, Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. microbiological Reviews 53: 410-419.

14.3 Cukor G, Perron DM, Hudson R, Blacklow NR. 1984. Detection of rotavirus in human stools by using monoclonal antibody. J Clin Microbiol 19: 888-892.

14.4 Herrmann JE, Blacklow NR, Perron DM, Cukor G, Krause PJ, Hyams J S, Barrett HJ, Ogra P L. 1985. Enzyme immunoassay with Monoclonal Antibody Enzyme Immunoassay for Detection of Rotavirus in Stool

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	輪狀病毒法抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1049 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Specimens. J Infect Dis 152: 830-832.

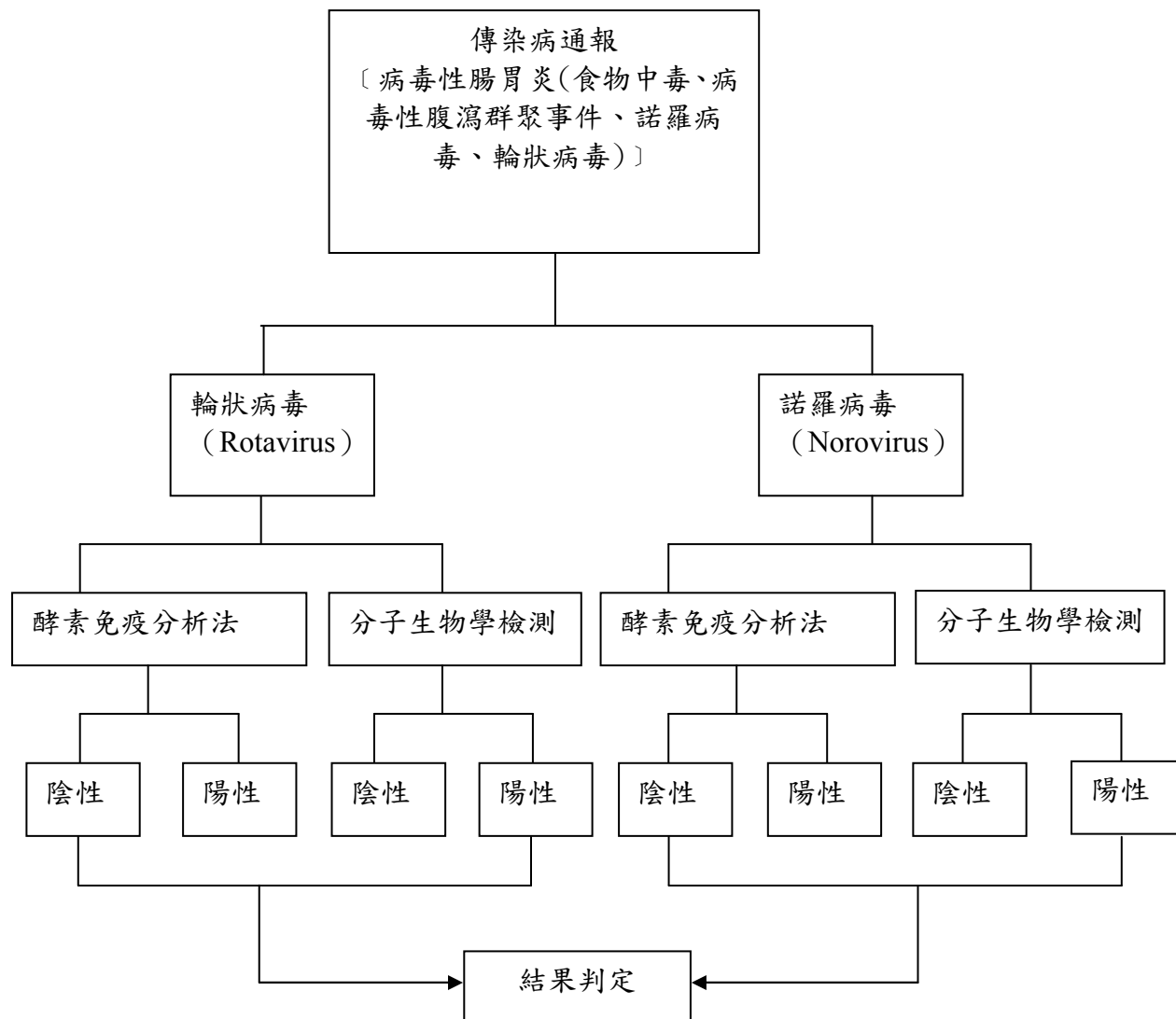
15 附錄

- 15.1 病毒性腸胃炎檢驗總流程圖。
- 15.2 輪狀病毒抗原檢驗（酵素免疫分析法）檢驗流程圖。
- 15.3 輪狀病毒抗原試驗檢體位置記錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	輪狀病毒法抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1050 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

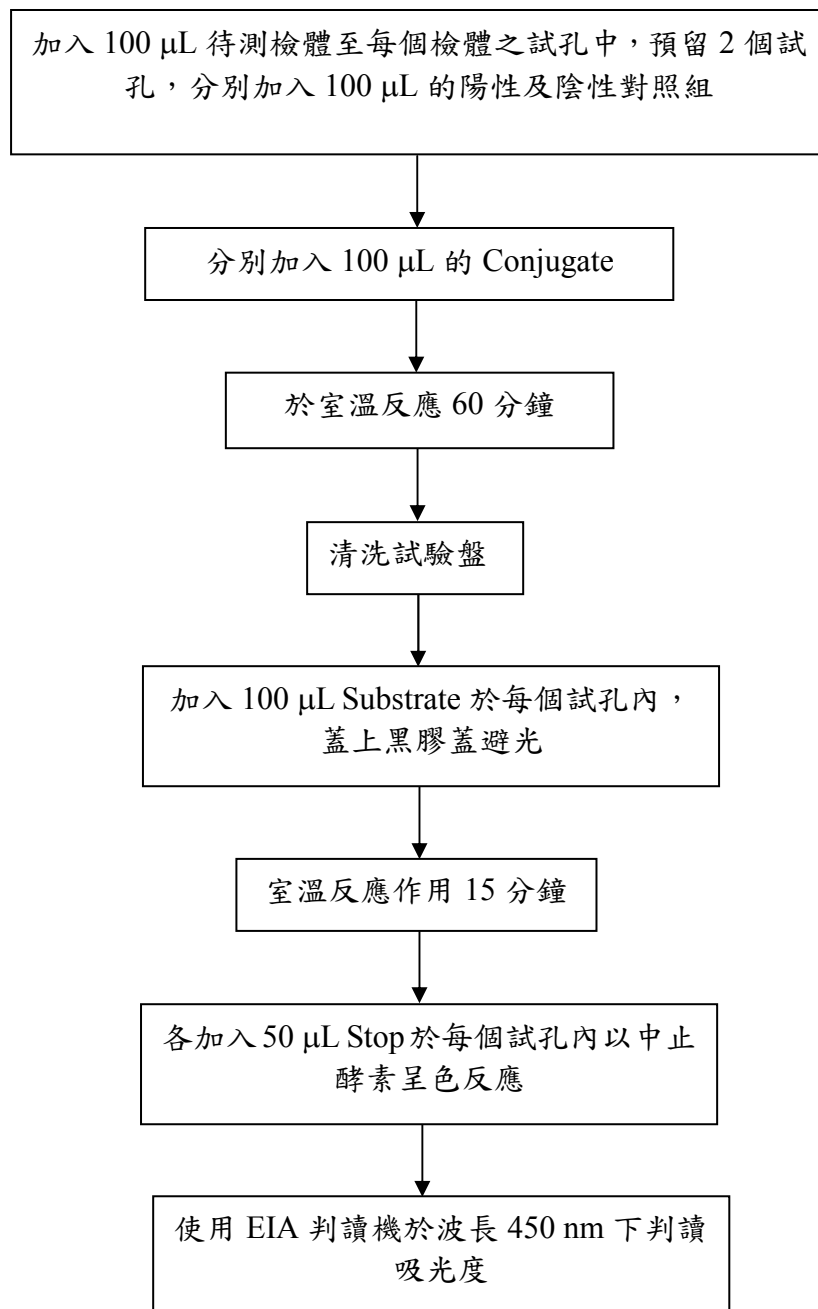
附錄 15.1 病毒性腸胃炎檢驗總流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	輪狀病毒法抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1051 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 輪狀病毒抗原檢驗（酵素免疫分析法）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：	輪狀病毒法抗體檢測 (ELISA)	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1052 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.3 輪狀病毒抗原試驗檢體位置記錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心
輪狀病毒抗原試驗檢體位置記錄表

頁數：第 頁/共 頁

Date：

Test：

Kit：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33	Sample 41	Sample 49	Sample 57	Sample 65	Sample 73	Sample 81	Sample 89
B	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34	Sample 42	Sample 50	Sample 58	Sample 66	Sample 74	Sample 82	Sample 90
C	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35	Sample 43	Sample 51	Sample 59	Sample 67	Sample 75	Sample 83	Sample 91
D	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36	Sample 44	Sample 52	Sample 60	Sample 68	Sample 76	Sample 84	Sample 92
E	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37	Sample 45	Sample 53	Sample 61	Sample 69	Sample 77	Sample 85	Sample 93
F	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38	Sample 46	Sample 54	Sample 62	Sample 70	Sample 78	Sample 86	Sample 94
G	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39	Sample 47	Sample 55	Sample 63	Sample 71	Sample 79	Sample 87	NC
H	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40	Sample 48	Sample 56	Sample 64	Sample 72	Sample 80	Sample 88	PC

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：	猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌） 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1053 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 A 群鏈球菌。

2 適用檢體種類

適用於人體咽喉拭子（throat swab）、痰檢體與醫院送驗菌株。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

A 群鏈球菌即化膿性鏈球菌（*Streptococcus pyogenes*），在含綿羊血液培養基上生長良好，最適溫度為 35°C，於生長菌落周圍會形 β-溶血環，尤其在無氧時溶血更明顯。依據其對枯草桿菌素（bacitracin）具有感受性、能夠水解 PYR、對 catalase 呈陰性反應及與 Lancefield 分類法之 A 型抗血清有凝集現象等特性作鑑定。

5 試劑耗材

5.1 培養基：血液培養基（blood agar plate，BAP）：TSA 含 5% 脫纖維綿羊血液，CMP，臺灣。

5.2 抗血清：Phadebact *Streptococcus* test（A、B、C、D、F、G），Boule，Sweden。

5.3 3% H₂O₂ 溶液：ID color catalase，BioMérieux，France。

5.4 PYR（L-pyrrolidonyl aminopeptidase）test reagent：CMP，臺灣。

5.5 枯草桿菌素（bacitracin）紙錠：Taxo A Discs，BD，USA。

5.6 無菌生理食鹽水：0.85% NaCl。

5.7 標準菌株：*S. pyogenes* ATCC 19615 及 *S. agalactiae* ATCC 13813。

5.8 無菌微量吸管尖（tip）：1,000 μL、200 μL、100 μL。

5.9 無菌微量離心管：1.5 mL。

5.10 接種針（環）。

5.11 可拋棄式無菌塑膠手套、口罩。

5.12 鑷子。

6 儀器設備

6.1 第二級生物安全櫃（class II BSC）。

6.2 培養箱：5% 二氧化碳、35°C。

6.3 恆溫箱：37°C。

6.4 冰箱：4°C。

6.5 冷凍櫃：-20°C。

6.6 微量吸管（pipetmen）：1,000 μL、200 μL、100 μL。

6.7 振盪器（vortexer）。

6.8 本生燈。

6.9 高壓滅菌鍋。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌） 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1054 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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

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 檢體編號登錄。

10.2 檢體前處理：痰液檢體必須先均質化，加等量無菌去離子水，再加數顆滅菌玻璃珠震盪 30 sec。

10.3 分離培養

10.3.1 接種：將咽喉拭子檢體、均質化後之痰液、醫院送驗菌株接種於血液培養基上，依四區劃線法將檢體劃開，並於接種處穿刺培養基數次，令β-溶血現象更為明顯。

10.3.2 培養：35°C 含有 5%二氧化碳培養箱培養。

10.3.3 觀察（及次培養）：18-24 hr 後，觀察有無可疑菌落，如有直徑約在 0.5-1.5 mm、呈黏液狀（muroid）、光滑（glossy）、灰白色、周圍有明顯溶血環（clear hemolytic zone）之菌落，即環內之紅血球完全被破壞，呈現β-溶血現象，即為可疑菌落，如有則挑取 2-5 個菌落次接種至血液培養基上，同 10.3.2 步驟培養 18-24 hr 後進行生化及血清凝集鑑定；如無則繼續培養及隔日觀察，至少需培養 48 hr。

10.4 鑑定

10.4.1 生化鑑定

（1）Catalase test（觸酶試驗）

依照本局「觸酶試驗」標準檢驗方法（編號：B-50-2006-1.0）。

（2）枯草桿菌素感受性試驗

將血液培養基上可疑之單一菌落進行次培養，並於第一劃線區貼上含 0.04 單位枯草桿菌素的紙錠，於 35°C 含有 5%二氧化碳培養箱培養 18-24 hr 後，若有抑制環存在即為陽性反應。

（3）PYR 試驗

挑取 2-5 個可疑菌落，塗抹在含有 PYR 基質的紙錠上，各加 1 滴呈色劑，若呈紅色為陽性反應，若呈黃色為陰性反應。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌） 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1055 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.4.2 血清凝集鑑定

- (1) 鏈球菌血清型之確認係以乳膠凝集試劑進行，先於白色反應紙卡上標示檢體編號。
- (2) 取出 A、B、C、D、F、G 各血清型及 Negative control 之 Reagent 恢復至室溫，使用前先混搖均勻後，各滴一滴於白色反應紙卡上。
- (3) 取至少 5 個以上的菌落於白色反應紙卡上與試劑混合均勻，1-5 min 內，肉眼觀看，與陰性對照比較是否有凝集現象。

11 結果判定

- 11.1 依據 10.4 鑑定結果，對照下表並紀錄於附錄 15.2 猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌）分離與鑑定紀錄表。

鑑定試驗名稱	陽性反應	陰性反應	A 群鏈球菌反應
生長於血液培養基上典型菌落外觀特徵	光滑 (glossy)、灰白色、周圍有明顯溶血環	非左述現象	陽性反應
Catalase 試驗	有氣泡產生	無氣泡產生	陰性反應
枯草桿菌素感受性試驗	抑制環存在	非左述現象	陽性反應
PYR 試驗	紅色	不變色	陽性反應
血清凝集試驗	以 A 型抗血清檢測有凝集現象	非左述現象	陽性反應

- 11.2 綜合結果判斷標準：符合上表 A 群鏈球菌所有反應結果，即判斷為 A 群鏈球菌陽性；若其中一項不符合者，即判斷為 A 群鏈球菌陰性。
- 11.3 報告核發： β 溶血型 A 群鏈球菌陽性， β 溶血型 A 群鏈球菌陰性。
- 11.4 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果登錄於附錄 15.2 猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌）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，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 枯草桿菌素感受性試驗之品質管制

- 12.1.1 應於有效期限內使用，同一批號試劑，第一次使用時取一組進行試驗。
- 12.1.2 使用陽性反應標準菌株 *S. pyogenes* ATCC 19615 及陰性反應標準菌株 *S. agalactiae* ATCC 13813 進行試驗。
- 12.1.3 試驗結果必須符合陽性反應及陰性反應（判定標準依 11.1 節），始可使用。

12.2 PYR 試驗之品質管制

- 12.2.1 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。
- 12.2.2 使用陽性反應標準菌株 *S. pyogenes* ATCC 19615 及陰性反應標準

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌） 分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1056 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

準菌株 *S. agalactiae* ATCC 13813，進行試驗。

12.2.3 試驗結果必須符合陽性反應及陰性反應（判定標準依 11.1 節），始可使用。

12.3 血清凝集鑑定之品質管制

12.3.1 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。

12.3.2 使用陽性反應標準菌株 *S. pyogenes* ATCC 19615 及陰性反應標準菌株 *S. agalactiae* ATCC 13813，進行試驗。

12.3.3 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

13.1 接種後檢體保留於 4°C 冰箱一星期。

13.2 超過期限之檢體、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 483-505 頁。

14.2 Isenberg HD. 1998. Essential procedures for clinical microbiology, American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 73-86.

14.3 Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 2007. Manual of clinical microbiology, 9th edition, American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 412- 429.

15 附錄

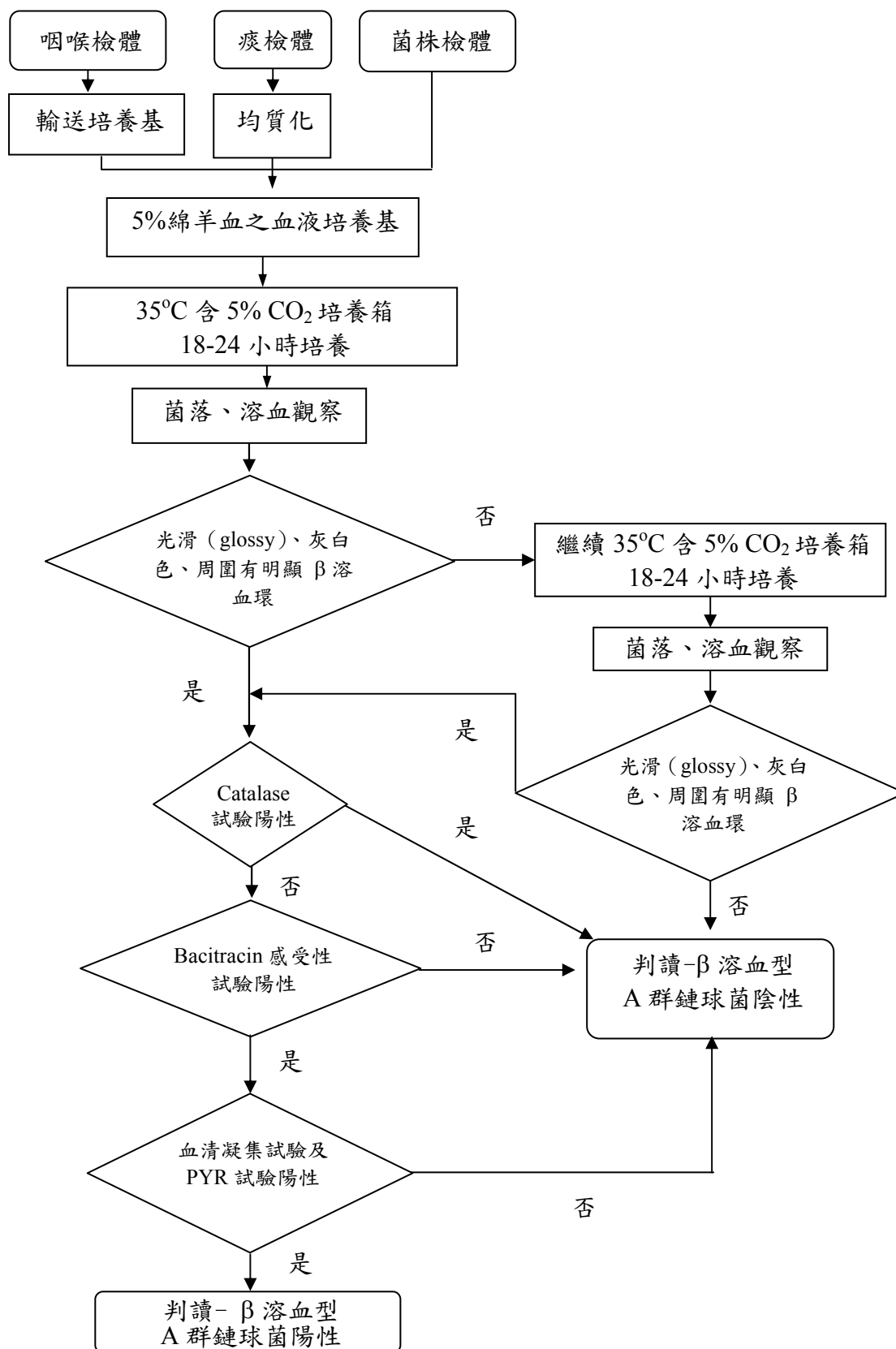
15.1 猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌）分離與鑑定總流程圖。

15.2 猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌）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：	猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1057 頁/共 1091 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌）分離與鑑定總流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌）	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1058 頁/共 1091 頁	分離與鑑定	修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌）分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

猩紅熱病原菌（A 群鏈球菌）分離與鑑定紀錄表

頁 數：第 頁/共 頁

檢體編號											
項目											
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
血液培養 基生長呈 黏液狀、 光滑、乳 白色、周 圍有明顯 溶血環之 菌落		培養/觀察		是	否	是	否	是	否	是	否
		第 2 天									
		第 3 天									
Catalase test		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
PYR 試驗		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
Bacitracin 感受性試驗		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 (圈選凝集型別)		無凝集 A、B、C D、F、G		無凝集 A、B、C D、F、G		無凝集 A、B、C D、F、G		無凝集 A、B、C D、F、G		無凝集 A、B、C D、F、G	
綜合結果											
報告日期											
附註											

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：	仙人掌桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1059 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

食品中毒案件人體檢體中之仙人掌桿菌的分離與鑑定。

2 適用檢體種類

適用於人體糞便、嘔吐物、直腸拭子 (rectal swab)。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

以特定培養基分離仙人掌桿菌，並利用生化代謝特性鑑定。

5 試劑耗材

5.1 培養基

5.1.1 MYP (mannitol-egg yolk-polymyxin agar) plate：CMP，臺灣。

5.1.2 Nutrient agar plate：CMP，臺灣。

5.1.3 TSA：CMP，臺灣。

5.2 革蘭氏染色液 (Gram stain solution)：Difco，美國。

5.3 API 50 CH 及 API 20 E 生化鑑定套組：BioMérieux，法國。

5.4 VITEK 2 BCL 鑑定卡 (VITEK 2 BCL)：BioMerieux，法國。

5.5 標準菌株：*Bacillus cereus* ATCC11778 及 *E. coli* ATCC25922。

5.6 無菌微量吸管尖 (ip)：1,000 μ L、200 μ L。

5.7 無菌滴管 (dropper)：1 mL。

5.8 接種針 (環)。

5.9 載玻片。

5.10 無菌塑膠手套。

6 儀器設備

6.1 37°C 培養箱。

6.2 微量吸管 (Pipetman)。

6.3 光學顯微鏡：能放大至 1,000X 油鏡。

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、嘔吐物、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>。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	仙人掌桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1060 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10 檢驗步驟

10.1 分離培養

10.1.1 檢體接種：

- (1) 糞便、嘔吐物：以無菌棉花棒沾取或以無菌滴管吸取少許接種於 MYP 培養基上。
- (2) 直腸拭子：將輸送培養基內之直腸拭子接種於 MYP 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，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 48 hr。

10.2 鑑定

10.2.1 菌落型態及染色：挑選淡粉紅色，且有大沉澱環之獨立可疑菌落，進行革蘭氏染色，符合革蘭氏陽性產芽孢桿菌，再次接種於 Nutrient agar plate 或 TSA，37°C 培養箱培養 18-24 hr 後作生化鑑定。

10.2.2 生化鑑定

- (1) Catalase test (觸酶試驗)：挑選 TSA 培養基上菌落進行試驗，仙人掌桿菌反應為陽性。
- (2) API 50CH 及 API 20E 生化鑑定套組試驗：依照原廠 API 50CH+CHB (腸內菌鑑定組) 及 API 20 E (腸內菌鑑定組) 操作步驟執行。
- (3) VITEK 2 BCL 鑑定卡 (VITEK 2 BCL)：依照原廠全自動微生物分析儀 VITEK 2 標準操作流程執行。

11 結果判定

11.1 陽性判定標準：符合革蘭氏陽性產芽孢桿菌，Catalase test 陽性，及 API 50CH、API 20E 生化鑑定套組或 VITEK 2 BCL 鑑定卡反應結果為仙人掌桿菌者，即判定為仙人掌桿菌陽性；若其中有一不符合者，即判定為仙人掌桿菌陰性。

11.2 報告核發：仙人掌桿菌陽性，仙人掌桿菌陰性。

11.3 結果登錄：將檢體之檢驗結果登錄於仙人掌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 MYP 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：*B. cereus* ATCC11778。

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 µL 的 Loop 取菌液依四區畫線接種於測試培養基上，35°C

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	仙人掌桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1061 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

培養箱培養。

12.1.4 觀察結果紀錄：預期結果 3-4 天後，可見 3-8 mm 菌落，菌落至少生長至第三區。

12.2 Nutrient agar plate 之品質管制：

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：*E. coli* ATCC25922。

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。

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。九州圖書文化有限公司，臺灣。

14.2 Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. 1999. *Bacillus* and recently derived genera, Manual of clinical microbiology, 7th edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 357-369.

14.3 FDA (USA). 2001. *Bacillus cereus*, Chapter 14. Bacteriological analytical manual. available at <http://www.foodinfonet.com/publication/fdaBAM.htm>

15 附錄

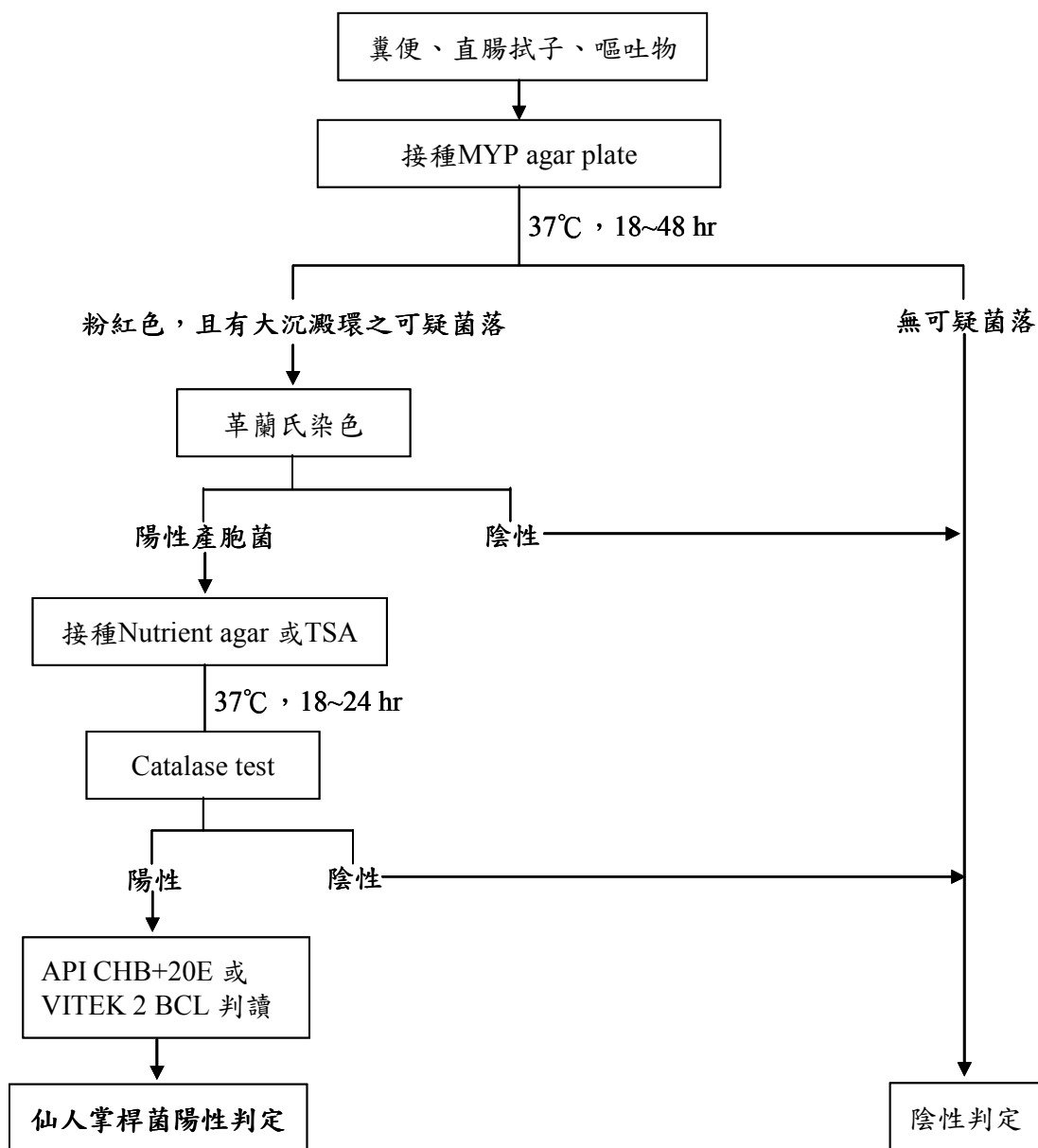
15.1 仙人掌桿菌分離與鑑定流程圖。

15.2 仙人掌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：	仙人掌桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1062 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 仙人掌桿菌分離與鑑定流程圖



仙人掌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：	仙人掌桿菌分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1063 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 仙人掌桿菌分離與鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

頁數：第 頁/共 頁

仙人掌桿菌分離與鑑定紀錄表

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
MYP 平板上生長型態：淡粉紅色，且有大沉澱環之獨立可疑菌落	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										
革蘭氏染色：陽性或陰性，產孢桿菌或不產孢桿菌	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性
	產孢桿菌	不產孢桿菌	產孢桿菌	不產孢桿菌	產孢桿菌	不產孢桿菌	產孢桿菌	不產孢桿菌	產孢桿菌	不產孢桿菌	產孢桿菌
Catalase test：陽性起泡，陰性不起泡	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性
API 50CH +API20E 或 VITEK 2 BCL											
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：	腺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1064 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

檢測導致呼吸道感染之腺病毒。

2 適用檢體種類

檢體種類包括咽喉拭子、鼻咽拭子等。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用腺病毒可感染對其敏感性高之 H292 細胞株特性，進行病毒病原體之培養，之後利用抗體抗原間的反應機制，以間接螢光免疫法在專一性抗體上標記螢光染劑，觀察細胞產生螢光與否進行病毒型別的鑑定。

5 試劑耗材

5.1 試劑

- 5.1.1 緩衝液：PBS，GibcoBRL，美國。
- 5.1.2 RPMI 培養基，GibcoBRL，美國。
- 5.1.3 生長培養基：添加 10%胎牛血清，100 U/mL 抗生素。
- 5.1.4 IFA 用之一級及二級抗體。
- 5.1.5 WHO 提供之流感病毒鑑定試劑組。

5.2 耗材

- 5.2.1 25T 細胞培養盒。
- 5.2.2 75T 細胞培養盒。
- 5.2.3 5 mL 針筒。
- 5.2.4 0.45 μ m 針筒用過濾膜。
- 5.2.5 刻度吸管：10 mL、5 mL、1 mL。
- 5.2.6 21 孔螢光檢測玻片。
- 5.2.7 0.2 mL PCR 反應管。
- 5.2.8 洋菜膠 (Agarose)。
- 5.2.9 EtBr 藥劑。
- 5.2.10 手套、口罩等個人安全防護用品。

6 儀器設備

- 6.1 第二級生物安全櫃。
- 6.2 35°C 二氧化碳恆溫培養箱。
- 6.3 高速離心機。
- 6.4 倒立顯微鏡。
- 6.5 螢光顯微鏡。
- 6.6 微量吸管 1.0 mL，200 μ L，100 μ L，20 μ L，10 μ L，2 μ L。
- 6.7 PCR 增幅反應儀。
- 6.8 電泳槽。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1065 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

7 環境與設施安全

- 7.1 於生物安全第二等級（BSL-2）實驗室之設施內操作。
- 7.2 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櫃（class II BSC）內進行。

8 檢體採集

8.1 咽喉檢體

使用病毒專用採檢運送器材，以壓舌板固定舌頭，採檢棉花棒刮取扁桃腺附近病灶部分。

8.2 鼻咽檢體

使用病毒專用採檢運送器材，採檢棉花棒插入鼻腔吸取鼻腔分泌物。

8.3 其他送驗檢體參照本局出版之「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），檢體若無法即刻送驗則可暫時儲存於 4°C 冰箱中。

10 檢驗步驟

10.1 檢驗前處理

- 10.1.1 將咽喉拭子棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。
- 10.1.2 將保存液加入 1 mL 不含血清的 RPMI medium 混合均勻後移至離心管，於 4°C，2,100 xg（1,500 rpm）離心 15 min。
- 10.1.3 上清液移至 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 -80°C。

10.2 接種

- 10.2.1 取已接種於 Culture tube 並長滿平面之 H292 細胞，吸除舊有生長培養基，以不含 Mg 離子的 PBS 溶液清洗兩次後，加入 1 mL 之維持培養基。
- 10.2.2 每一檢體接種 2 支 Culture tube，每支 tube 接種 100 µL 檢體。
- 10.2.3 培養於 35°C，CO₂ 培養箱 7-10 日。

10.3 觀察

- 10.3.1 自翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態。
- 10.3.2 接種細胞產生顯著病變者（CPE 達三至四價），收集細胞及培養液，立即進行鑑定，或暫時保存於 4°C。
- 10.3.3 細胞未產生顯著病變者，待培養 10 日後一起收集細胞及培養液，以螢光試劑進行鑑定。

10.4 間接螢光免疫法鑑定（以 Chemicon respiratory viral screen kit 為例）

- 10.4.1 將 Culture tube 以 4°C，3,000 rpm 離心 15 min，上清液分別存於容積 4 mL 的塑膠小瓶。
- 10.4.2 經離心沉澱之細胞加入與原培養基等量之 PBS，以吸量管上

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1066 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

下混合數次後，將細胞懸浮液移至另一塑膠小管。

- 10.4.3 分別將各管細胞取 10-20 μ L 點入 21 孔玻片，待細胞於室溫下風乾後置入含有 4°C 丙酮之玻片槽，固定 10 min。
- 10.4.4 取出風乾後以 Respiratory reagent 一級抗體滴於每個孔（每滴約 20 μ L 左右），將玻片置於 Moisture chamber，置於 37°C 恆溫培養箱 30 min。
- 10.4.5 以含有 1% Tween 20 之 PBS 溶液清洗玻片三次後風乾。
- 10.4.6 每個孔加二級螢光抗體（FITC）。每滴約 20 μ L 左右，將玻片置於 Moisture chamber，置於 37°C 恆溫培養箱 30 min。
- 10.4.7 以含有 1% Tween 20 之 PBS 溶液清洗玻片三次後風乾。
- 10.4.8 以 Mounting fluid 封片後，以螢光顯微鏡鏡檢。
- 10.4.9 有關 Chemicon respiratory viral screen kit 之注意事項請參閱附錄。

10.5 分子生物學鑑定試驗

- 10.5.1 DNA 純化（以 Qiagen, QIAamp DNA blood mini kit 為例）
 - （1）取 200 μ L 經培養之病毒液，加入 20 μ L 蛋白質分解酶（protease），vortex 數次。
 - （2）加入 200 μ L Buffer AL，間歇性 Vortex 15 sec 後，置於 56°C 恆溫槽 10 min。
 - （3）將殘留於管壁的液體以 Short spin 離心下來。
 - （4）加入 200 μ L 95-100%酒精，均勻混合後全部移至 Spin column。
 - （5）以 6,000 xg（8,000 rpm）離心 1 min 後，移除廢液。
 - （6）加入 500 μ L buffer AW1，以 6,000 xg（8,000 rpm）離心 1 min 後，移除廢液。
 - （7）加入 500 μ L Buffer AW2，以 20,000 xg（14,000 rpm）離心 3 min 後，移除廢液。
 - （8）將 Spin column 移至 1.5 mL 離心管，加入 100 μ L buffer AE，以 6,000 xg（8,000 rpm）離心 1 min，收取離出之 DNA。
 - （9）將 DNA 存放於 4°C 或 -20°C 冰箱中。
 - （10）QIAamp DNA blood mini kit 之適用檢體包括血液、血清、細胞培養過的檢體以及咽喉拭子之原始檢體，抽出之 DNA 片段長度約 20-30 kb 以內，純化效果較佳。試劑組除 Protease 需冷藏外，其餘均存放於 4°C。
- 10.5.2 PCR reaction：Two sets of primer sequence。
 - （1）Adenovirus type 7 hexon gene（from U.S. CDC）。
 - （2）For adenovirus identification, the forward primer is 5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC- 3' and the reverse primer is 5'-CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT- 3'，Excepted product size is 301 bp。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1067 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(3) 每個反應包含成份如下所示：

Template	1 μ L
10X buffer	5 μ L
Q-solution	10 μ L
25 mM MgCl ₂	10 μ L
dNTP mix	4 μ L
Primer 1	1 μ L
Primer 2	1 μ L
Taq polymerase	0.5 μ L
H ₂ O	17.5 μ L
Final volume	50 μ L

(4) 判定方法以膠片上在 301 bp 位置出現產物訊號時判定為陽性。

(5) 反應條件

95°C	3 min	} 45 cycles
95°C	30 sec	
50°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	4 min	
4°C	∞	

10.6 檢驗後處理

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

11 結果判定

- 11.1 依據 10.3 鑑定結果，經螢光顯微鏡鏡檢，螢光顯微鏡鏡檢細胞呈現蘋果綠螢光則為陽性，紅色則為陰性。
- 11.2 依據 10.5 鑑定結果，PCR 反應產生片段長度為 301 bp 之產物則判定為腺病毒陽性。
- 11.3 綜合結果判定標準：符合 10.3 或 10.5 之檢測結果為陽性者，均可判定為流感病毒陽性。
- 11.4 報告核發：腺病毒檢驗陽性，腺病毒檢驗陰性。
- 11.5 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果欄”，並在送驗單背面蓋職章後陳核實驗室主管審核，俟實驗室主管核章後，在上網登錄於傳染病通報系統。

12 品質管制

- 12.1 實驗室每半年進行內部檢驗能力評估，每季進行人員檢驗流程熟習度檢視。
- 12.2 每年接受三次美國病理協會 (CAP) 外部能力試驗。

13 廢棄物處理

檢驗過程之物品、廢液及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以滅菌袋裝妥

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1068 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

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 Cardoso MJ, Krishnan S, Tio PH, Perera D, Wong SC. 1999. Isolation of subgenus B adenovirus during a fatal outbreak of enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease in Sibu, Sarawak. Lancet 354: 987-991.
- 14.2 QIAamp viral DNA spin protocol.

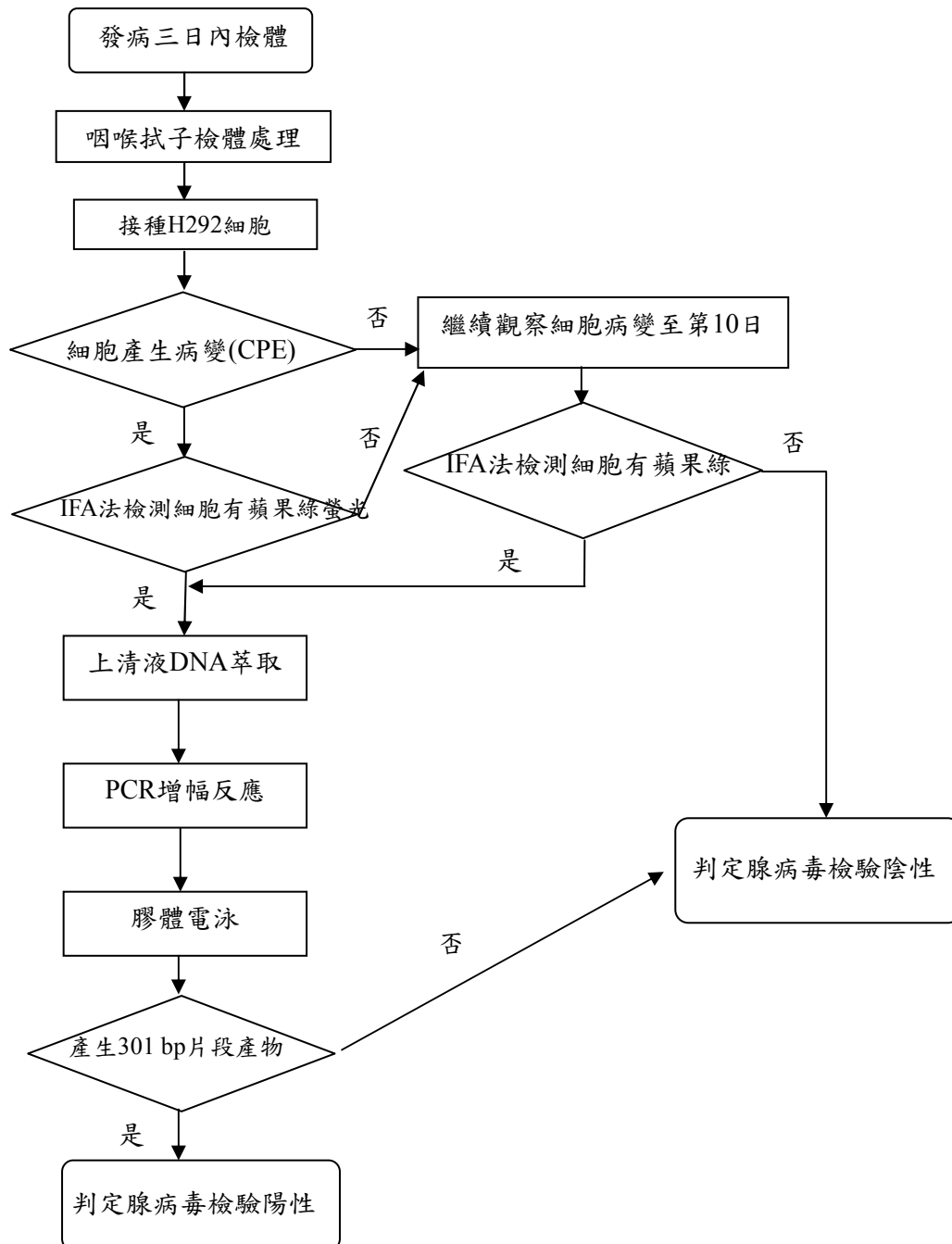
15 附錄

- 15.1 腺病毒分離與鑑定總流程圖。
- 15.2 細胞繼代紀錄表。
- 15.3 腺病毒感染觀察紀錄表。
- 15.4 腺病毒螢光鑑定紀錄表。
- 15.5 Chemicon respiratory viral screen kit 之注意事項。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1069 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 腺病毒分離與鑑定總流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	腺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1070 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 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: _____
Date: _____	Person in charge: _____
Cell: Seeded on _____	Container: _____
Medium: _____	
Appearance: _____	
PBS (-) : _____	Trypsin-EDTA: _____
Medium at this transfer: _____	
Procedure:	
Discard old GM:	
_____ Add the Trypsin-EDTA mixture to monolayer	
_____ Trypsinization at Rt temperature for _____ min	
Remove the trypsin-EDTA, add _____ mL of fresh GM	
Disperse cells by gentle pipetting	
Final cell numbers _____ mL	
Above suspension of cells was seeded as follows	
Number	container
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
Incubated at 37 °C CO ₂ incubator	
Remarks:	

檢驗者：

實驗室主管：

頁次：第 1071 頁/共 1091 頁

核准日期： 年 月 日

修訂日期： 年 月 日

腺病毒感染觀察紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

[illegible]

Inoculum:

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：	腺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1072 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.4 病毒螢光鑑定紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

腺病毒螢光鑑定紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

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：	腺病毒分離與鑑定	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1073 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.5 Chemicon respiratory viral screen kit 之注意事項

(1) 樣品穩定性及保存方式 (stability and storage)

當儲存於 2-8°C 的情況下，在 kit 標記的使用期限內試劑均可維持穩定的品質，試劑勿置於過高或過低的溫度環境中，已過使用期限的試藥切勿再繼續使用。

若實驗中發現螢光值降低，可能是抗體或是接合劑產生變質情況，在每一次實驗進行過程中均須有陽性對照組以確保試劑及染色過程無誤。若經過測試螢光染色的效果仍然不佳，則建議更換試劑組。

(2) 腺病毒陽性之檢體，被螢光染色部位包括細胞核或細胞質或二者皆有的被染色之細胞核亮度為均勻分布，而細胞質的螢光亮度則通常為點狀分布。

(3) 試劑之專一性測試 (specificity)

美國七個臨床實驗室測試呼吸道檢體經細胞培養後以 Chemicon Respiratory Viral Screen 檢測試劑專一性，結果如下表：

MONOCLONAL ANTIBODIES:	Adeno	RSV	Infl A	Infl B	Para 1	Para 2	Para 3
True Positive	43	66	11	4	11	5	28
False Positive	0	0	0	0	0	0	0
True Negative	602	580	635	642	635	641	618
False Negative	1	0	0	0	0	0	0
Sensitivity (%)	97.7	100	100	100	100	100	100
Specificity (%)	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value Positive %	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value Negative %	99.8	100	100	100	100	100	100

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	16S rDNA 細菌鑑定法	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1074 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

1 目的

PCR 增幅及定序 16S rDNA 基因，並與資料庫比對以進行菌種鑑定。

2 適用檢體種類

適用於已經由人體檢體分離培養之菌株。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

利用商用試劑套組 PCR 增幅並定序細菌的 16S rDNA 基因序列，經由軟體分析序列並與資料庫裡已知菌種的 16S rDNA 基因序列比對，以鑑定菌種。先進行能鑑別絕大多數菌種的第一個基因片段（約 500 bp）的 PCR、定序與分析比對（使用 MicroSeq 500 系列產品）；如果結果不足以適當鑑定菌種，再針對全長基因進行定序與分析比對（使用 MicroSeq Full Gene 系列）。

5 試劑耗材

5.1 MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification PCR kit (PN 4348229) : Applied Biosystems, USA。

5.1.1 2X PCR master mix。

5.1.2 Positive control DNA。

5.1.3 Negative control (water)。

5.2 MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification sequencing kit (PN 4346479) : Applied Biosystems, USA。

5.2.1 Forward sequencing mix。

5.2.2 Reverse sequencing mix。

5.3 MicroSeq gull gene 16S rDNA bacterial identification PCR kit (PN 4349161) : Applied Biosystems, USA。

5.3.1 2X PCR master mix 1, 2, 3。

5.3.2 Positive control DNA。

5.3.3 Negative control (water)。

5.4 MicroSeq Full gene 16S rDNA bacterial identification sequencing kit (PN 4347483) : Applied Biosystems, USA。

5.4.1 Forward sequencing mix 1, 2, 3。

5.4.2 Reverse sequencing mix 1, 2, 3。

5.5 QIAamp DNA Mini Kit : Qiagen, USA。

5.5.1 QIAamp Spin columns。

5.5.2 Qiagen proteinase K (20 µg/mL, 保存在 4°C)。

5.5.3 96-100% Ethanol。

5.5.4 Buffers (AL, ATL, AW1, AW2)。

5.5.5 Collection tubes。

5.6 1 L 接種環。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	16S rDNA 細菌鑑定法	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1075 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

- 5.7 1.5 mL 離心管。
- 5.8 無菌微量塞棉吸管 (filtered tip)。
- 5.9 0.2 mL PCR 反應管。
- 5.10 洋菜膠。
- 5.11 TBE buffer。
- 5.12 EtBr 染劑。

6 儀器設備

- 6.1 第二級生物安全櫃 (class II BSC)，於檢驗步驟 10.1 與 10.2.1 使用。
- 6.2 水浴槽。
- 6.3 微量吸管 (pipetmen)：1,000 μ L、200 μ L、20 μ L。
- 6.4 微量震盪器。
- 6.5 桌上型微量離心機。
- 6.6 聚合酶連鎖反應儀。
- 6.7 電泳槽裝置。
- 6.8 紫外光照相系統。
- 6.9 MicroSeq ID Analysis Software Version 1.0：Applied Biosystems，USA。

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 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

將待測菌株純培養在適於該菌生長之培養基。

9 檢體運送及保存

冷藏運送及保存。

10 檢驗步驟

10.1 檢體前處理

收到之菌株檢體如果是經過培養後已放置了 3-5 天以上，則將其次培養於適合其生長之培養基，再進行試驗。

10.2 細菌 DNA 純化

10.2.1 在 1.5 mL 離心管中加入 180 μ L Buffer ATL，以 1 μ L 接種環取約 10-15 個菌落的菌量震盪溶解於其中，再加入 20 μ L Proteinase K，混合均勻。針對革蘭氏陽性或比較難溶解的菌，可在加入 Proteinase K 前，先加入 5 μ L Lysozyme (100 μ mg/mL)，室溫作用 10-30 min 處理。

10.2.2 將上述離心管置於 56°C 水浴槽，進行溶菌反應作用 2-3 hr。

	編號：	16S rDNA 細菌鑑定法	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1076 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

-
- 1)- (500 Kit) 3)- 724 nt
- 5F 532R 786F 1513R
- 2)- 742 nt
- 338F 1080R
- 1 192 385 577 770 962 1155 1347 1541
- 16S rDNA PCR 增幅反應示意圖

(a) <u>Positive Control</u>	
PCR master mix	15 µL
E.coli positive control DNA	10 µL
Total	30 µL
(b) <u>Negative Control</u>	
PCR master mix	15 µL
Nuclease-free water	15 µL
Total	30 µL

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	16S rDNA 細菌鑑定法	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1077 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

(c) Samples

PCR master mixes 1 or 2 or 3	15 µL
ddH ₂ O	10 µL
Samples	5 µL
Total	30 µL

(1) Negative control 管應置於最後，是最後一管取量配製的。

(2) (c) 中使用 MicroSeq 500 產品時，只需使用 PCR master mix 1；使用 FullGene 產品時，使用 PCR master mix 1、2、3，其分別含有不同組的 primer，需分三管進行之，所以最後每個 sample 會有三管 PCR products。

10.3.3 將配製好的 PCR 反應管置於聚合酶連鎖反應儀，反應條件為：

Pre-denature	95°C	10 min	} 30 or 32 cycles
Denature	95°C	30 sec	
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	72°C	45 sec	
Post-extension	72°C	10 min	
Final	4°C	∞	

所得的 PCR 產物可保存於-20°C。

10.4 電泳分析 PCR 產物

10.4.1 配製 1.5% 洋菜膠（使用 0.5% TBE buffer 溶液）。

10.4.2 取 5 µL PCR 產物混合 1 µL 6X loading dye，分注於洋菜膠齒孔中，以電壓 100 V 跑膠 30-40 min。

10.4.3 以 EtBr 染劑染膠 10 min 後，以紫外光照相系統，照相並列印出膠片圖。

10.5 外送定序

將 PCR 產物、電泳圖及分裝的定序試劑（使用 MicroSeq 500 或 FullGene sequencing kit，每個樣品 Forward sequencing mix 及 Reverse sequencing mix 各 13 µL）交給負責的定序廠商，約經 1-2 個工作天廠商會將定序結果以電子檔及紙本兩種方式傳送回來。

10.6 軟體分析及資料庫比對

點選進入 MicroSeq 軟體，點選 new project。

10.6.1 Create a project：設定分析檔名，勾選每個樣本希望顯示出幾個比對結果，在使用 MicroSeq 500 kit 時，勾選使用的商用套組為 Bacterial500Kit，勾選比對的資料庫 Bacterial500Lib；使用 MicroSeq Full Gene kit 時，勾選使用的商用套組為 BacterialFullGeneKit，勾選比對的資料庫 BacterialFullGeneLib；完成勾選後，點選 next。

10.6.2 Analyze the project：勾選並 input 欲分析的*.AB1 的定序結果檔進入軟體，點選 Finish and Analyze 鍵，軟體將自動進行分析比對；待分析結束後會顯示出以 16S rDNA 基因相似百分比比例表示的菌種鑑定結果。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	16S rDNA 細菌鑑定法	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1078 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

10.6.3 Evaluate and edit data：視定序結果清晰度、訊號值強弱、雜訊的嚴重程度等狀況，有數個參數可以修改分析的條件。

10.6.4 Export or print reports：確定分析結果後，可以使用軟體的此功能列印出結果報告，及輸出.pdf 或.txt 的報告檔。

11 結果判定

11.1 陽性 16S rDNA PCR 增幅反應判定：在陽性對照組有一個約 500 bp 的單一產物，陰性對照組沒有任何產物的前提下，在使用 MicroSeq 500 kit 時，樣品應有一個約 460-560 bp 的單一產物；而使用 MicroSeq FullGene kit 時，每個樣品的三個片段產物應分別是一個 460-560 bp、一個約 742 bp、及一個約 724 bp 的單一產物；並以此些產物送定序以進行後續鑑定事宜。

11.2 結果報告：將經軟體分析比對的菌種鑑定結果列印或以電子檔傳送至實驗室主管處，以作為發送相關報告之參考。

11.3 軟體會自動判讀序列的品質是否足堪比對上之使用，若該序列的品質被判定為不合格，則需重覆該組試驗。

11.4 在序列品質合格的前提下，原則上結果判讀可以接受的標準為，比對結果中與該序列最為符合的第一順位菌種，且其相似度達 99% 以上。

12 品質管制

每次實驗皆必須同時進行陽性或陰性對照組的試驗，其結果應達 11.1 所述之標準，且序列品質為判定合格，否則必須重做該次實驗。

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 MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification Kits Protocol (2005)，Applied Biosystems, USA.
- 14.2 MicroSeq full gene 16S rDNA bacterial identification kits protocol. 2005. Applied Biosystems, USA.
- 14.3 MicroSeq ID analysis software version 1.0 getting started guide.2003. Applied Biosystems, USA.
- 14.4 Caroline MO, Weinstein MP, Miller JM. 2003. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms: manual of clinical microbiology, Vol. 1, 8th edition. American Society for Microbiology, Washington DC. pp.185-207.
- 14.5 Woo PCY, Ng KHL, Lau SKP, Yip KT, Fung AMY, Leung KW, Tam DMW, Que TL, Yuen KY. 2003. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. J Clin Microbiol 41: 1996-2001.

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	16S rDNA 細菌鑑定法	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1079 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

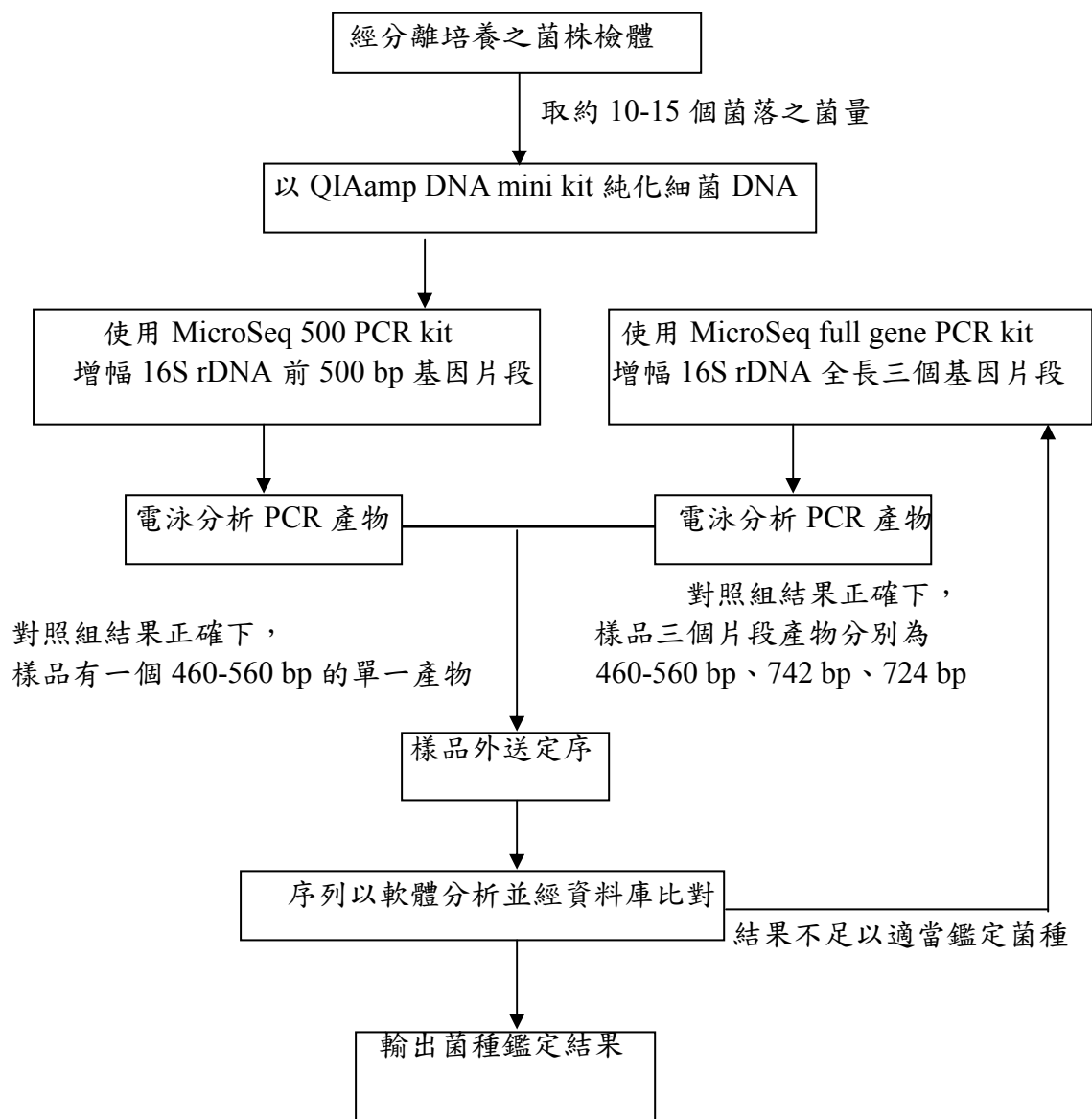
15 附錄

- 15.1 16S rDNA 細菌鑑定法流程圖。
- 15.2 16S rDNA 細菌鑑定法紀錄表。

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	16S rDNA 細菌鑑定法	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1080 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.1 16S rDNA 細菌鑑定法流程圖



行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	16S rDNA 細菌鑑定法	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1081 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

附錄 15.2 16S rDNA 細菌鑑定法紀錄表

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

16S rDNA 細菌鑑定法紀錄表

頁數：第 頁/共 頁

Received Date： _____ ； Institute name： _____

Description： _____

Specimen type： _____ ； Specimen Number： _____

Specimens pretreatment or pre-culture procedure： _____

Date _____

Specialty of DNA purification (QIAamp DNA mini kit)：

Date		<i>Bact and bfr ATL amount</i>	
Lysozyme treat (μ L, temp, time)		Proteinase K treat (μ L, temp, time)	
Elute (μ L)		Other	

PCR： _____ ； machine： _____

Mixture (μ L)			
DNA (μ L)		Pos cont (μ L)	
H ₂ O (μ L)		Neg cont (μ L)	
Total (μ L)		Cycle no.	

Lane designations： gel: _____ ； running time: _____

Product Loading (μ L)： _____

- 1 _____
- 2 _____
- 3 _____
- 4 _____
- 5 _____
- 6 _____
- 7 _____
- 8 _____

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：	中文索引	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1082 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

中文索引

一劃

16S rDNA 細菌鑑定法 1074
C 型肝炎病毒抗體檢測(化學冷光微粒
免疫分析法) 530
SARS 病毒核酸檢測(RT-PCR) 22

二劃

D 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測(ELISA)
544
D 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測(ELISA)
536
Q 熱 796, 802
Q 熱病原體血清學抗體檢測(IgM 與
IgG, IFA) 802
人類免疫缺乏病毒抗體檢測(WB)
728
人類免疫缺乏病毒抗體檢測(粒子凝集
法) 721
人類免疫缺乏病毒核酸檢測(Real-time
RT-PCR) 736
人類免疫缺乏病毒感染與後天免疫缺
乏症候群(AIDS) 721,
728, 736

三劃

A 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測(化學冷
光微粒免疫分析法) 220
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 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
E 型肝炎病毒 IgG 抗體檢測(ELISA)
559
E 型肝炎病毒 IgM 抗體檢測(ELISA)
551

H5N1 流感 59
H5N1 流感病毒核酸檢測(RT-PCR)
59
小兒麻痺 140
小兒麻痺病毒分離與鑑定 140
弓形蟲 IgM 及 IgG 抗體檢測(EIA 及
ELFA) 899
弓形蟲分子生物學核酸檢測(兩階段
巢式 PCR 法) 895
弓形蟲分離與鑑定 894
弓形蟲感染症 894, 895, 899

四劃

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
分枝桿菌屬鑑定(抗酸性抹片鏡檢
法) 423
天花 1, 5
天花病毒分離與鑑定 1
天花病毒核酸檢測(real-time PCR)
5
日本腦炎 400, 404, 411
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
水中退伍軍人菌分離與鑑定 633
水痘 852, 861, 867, 876
水痘病毒 IgG 抗體檢測(indirect
ELISA) 876
水痘病毒 IgM 抗體檢測(indirect
ELISA) 867
水痘病毒分子生物學核酸檢測
(nested PCR) 861
水痘病毒分離與鑑定 852
五劃
仙人掌桿菌分離與鑑定 1059
仙人掌菌 1059
出血性大腸桿菌分離與鑑定 237
出血性大腸桿菌毒素基因鑑
定(PCR) 250

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	中文索引	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1083 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

出血性大腸桿菌毒素檢測 (RPLA)
245

布氏桿菌抗體檢測 (RBT 及 CFT)
1017

布氏桿菌病 1017

白喉 63, 70, 74

白喉桿菌分離與鑑定 63

白喉桿菌毒素檢測 (Elek's plate
virulence test) 74

白喉桿菌核酸檢測 (PCR) 70

六劃

伊波拉毒核酸檢測 (Real-time
RT-PCR) 975

伊波拉病毒分離與鑑定 971

伊波拉病毒出血熱 971, 975, 981

伊波拉病毒抗體檢測 (ELISA) 981

先天性德國麻疹症候群 476, 486,
492, 501

多重抗藥性結核病 323, 330, 336, 342

百日咳 379, 386, 393

百日咳菌分離與鑑定 379

百日咳菌核酸檢測 (PCR LAMP 法)
393

百日咳菌核酸檢測 (PCR) 386

肉毒桿菌中和試驗 781

肉毒桿菌中毒 777, 781, 785

肉毒桿菌分離與鑑定 777

肉毒桿菌毒素檢測 785

地方性斑疹傷寒 808, 812, 824

西尼羅病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測
(ELISA) 357

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

西尼羅熱 346, 350, 357

七劃

狂犬病 30, 33, 40

狂犬病病毒分離與鑑定 30

狂犬病病毒抗原檢測 (直接螢光抗體
染色法) 40

狂犬病病毒核酸檢測 (RT-PCR) 33

阿米巴性痢疾 123, 127, 134, 138

貝氏考克斯菌核酸檢測 (STN-RT
PCR) 796

八劃

兔熱病 844, 848

兔熱病病原菌抗體檢測 (IHA) 848

兔熱病病原菌抗體檢測 (微量平板
法) 844

奈色氏淋病雙球菌分子生物學檢測
(real-time-PCR) 695

奈色氏淋病雙球菌分離與鑑定 689

奈色氏淋病雙球菌染色鏡檢 (革蘭氏
染色法) 685

奈色氏腦膜炎雙球菌分離與鑑定
107

屈公病 289, 293, 300

屈公病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測
(ELISA) 300

屈公病毒分離與鑑定 289

屈公病毒核酸檢測 (Real-time
RT-PCR) 293

金黃色葡萄球菌分離與鑑定 999

金黃色葡萄球菌食品中毒 999,
1005

退伍軍人菌抗體檢測 (DFA) 629

庫賈氏病標示蛋白檢測 (WB) 921

庫賈氏症 921

恙蟲病 808, 812, 818

恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒病
原體核酸檢測 367

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

病毒性腸胃炎 1039, 1046

馬堡病毒分離與鑑定 942

馬堡病毒出血熱 942, 946, 952

馬堡病毒抗體檢測 (ELISA) 952

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	中文索引	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1084 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

馬堡病毒核酸檢測 (real-time RT-PCR) 946

金黃色葡萄球菌腸毒素檢測 (RPLA) 1005

拉薩病毒分離與鑑定 985

拉薩病毒抗體檢測 (ELISA) 995

拉薩病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR) 989

拉薩熱 985

九劃

肺炎披衣菌 1021, 1029

肺炎披衣菌 IgM 及 IgG 抗體檢測 (MIF) 1029

肺炎披衣菌核酸檢測 (PCR) 1021

侵襲性 b 型嗜血桿菌分離與鑑定 642

侵襲性 b 型嗜血桿菌感染症 642

侵襲性肺炎鏈球菌分離與血清型別鑑定 789

侵襲性肺炎鏈球菌感染症 789

急性病毒性肝炎 (除 A 型外) 510, 517, 523, 530, 536, 544, 551, 559

急性病毒性 A 型肝炎 213, 220

流行性斑疹傷寒 362, 367, 373

流行性腮腺炎 (群聚感染) 567, 577, 583, 592

流行性腦脊髓膜炎 107

流感併發重症 905

流感病毒分離與鑑定 905, 915

流感病毒核酸檢測 (RT-PCR) 915

炭疽病 42, 48, 54

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

炭疽桿菌分離與鑑定 42

炭疽桿菌血清學抗體檢測 54

退伍軍人病 601, 610, 620, 626, 629, 633

退伍軍人病病原菌分離與鑑定 601

退伍軍人菌抗原檢測 (LATEX) 626

麻疹病毒分子生物學核酸檢測 (RT-nested PCR) 188

十劃

疱疹 B 病毒分離與鑑定 744

疱疹 B 病毒抗體檢測 754

疱疹 B 病毒核酸檢測 (Real-time PCR) 748

疱疹 B 病毒感染症 744, 748, 754

十一劃

桿菌性痢疾 115

梅毒 649, 655, 663, 674

梅毒螺旋體抗體檢測 (RPR) 649

梅毒螺旋體抗體檢測 (TPHA) 674

梅毒螺旋體抗體檢測 (TPPA) 663

梅毒螺旋體抗體檢測 (VDRL) 655

淋病 685, 689, 695

麻疹 178, 188, 194, 203

麻疹定毒 IgG 抗體檢測 (indirect ELISA) 203

麻疹病毒 IgM 抗體檢測 (indirect ELISA) 194

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 (rRNA 直接檢測法) 434

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

結核菌群核酸檢測 (間隔寡核酸分子分型法) 439

結核菌群培養 323

結核菌群培養 416

結核菌群間接藥物感受性試驗 (瓊脂平板法) 342

結核菌群間接藥物感受性試驗 (瓊脂平板法) 472

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

結核菌群鑑定 (生化) 330

結核菌群鑑定 (生化) 428

萊姆病 830, 834, 838

萊姆病病原菌分離與鑑定 830

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	中文索引	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1085 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

萊姆病病原菌抗體檢測(ELISA) 834
 萊姆病病原菌抗體檢測(WB) 838
 麻疹病毒分離與鑑定 178

十二劃

斑疹傷寒抗體檢測(間接免疫螢光抗體法) 824
 普氏立克次體分離與鑑定 362
 普氏立克次體血清學抗體檢測(IgM 與 IgG, IFA) 373
 猩紅熱 1053
 猩紅熱病原菌(A 群鏈球菌)分離與鑑定 1053
 痢疾阿米巴血清學抗體檢測 138
 痢疾阿米巴抗原檢測(酵素免疫篩檢法) 134
 痢疾阿米巴核酸檢測(兩階段巢氏 PCR) 127
 痢疾阿米巴檢測(鏡檢法) 123
 痢疾桿菌分離與鑑定 115
 登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測(ELISA) 102
 登革病毒、日本腦炎病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測(ELISA) 411
 登革病毒 NS1 抗原檢測(Dengue virus NS1 antigen rapid test) 100
 登革病毒分離與鑑定 87
 登革病毒核酸檢測(Real-time RT-PCR) 93
 登革熱 87, 93, 100, 102
 結核病(除多重抗藥性結核病外) 416, 423, 428, 434, 439, 444, 450, 455, 467, 472
 結核菌群核酸檢測(IS6110 巢式聚合酶連鎖反應法) 444
 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
 腸炎弧菌分離與鑑定 1010
 腸炎弧菌食品中毒 1010
 腸病毒中和抗體檢測 712

腸病毒分離與鑑定 702
 腸病毒感染併發重症 702, 712
 腸道出血性大腸桿菌感染症 237
 菌種鑑定 1074
 裂谷熱 929, 933, 938
 裂谷熱病毒分離與鑑定 929
 裂谷熱病毒抗體檢測(ELISA) 938
 裂谷熱病毒核酸檢測(real-time RT-PCR) 933
 黃熱病 956, 960, 967
 黃熱病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測(ELISA) 967
 黃熱病毒分子生物學核酸檢測(RT-PCR) 960
 黃熱病毒分離與鑑定 956

十三劃

傷寒、副傷寒 79
 傷寒、副傷寒及沙門氏桿菌分離與鑑定 79
 嗜肺退伍軍人菌抗原檢測(EIA) 610
 瘧原蟲檢測(鏡檢法) 159
 瘧疾 159, 164, 173

十五劃

德國麻疹 255, 265, 271, 280
 德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測(indirect ELISA) 280
 德國麻疹病毒 IgG 抗體檢測(indirect ELISA) 501
 德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測(indirect ELISA) 271
 德國麻疹病毒 IgM 抗體檢測(indirect ELISA) 492
 德國麻疹病毒分子生物學核酸檢測(RT-nested PCR) 265
 德國麻疹病毒分子生物學核酸檢測(RT-nested PCR) 486
 德國麻疹病毒分離與鑑定 255
 德國麻疹病毒分離與鑑定 476
 輪狀病毒抗體檢測(ELISA) 1046

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	中文索引	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1086 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

腮腺炎病毒 IgG 抗體檢測 (indirect ELISA) 592
 腮腺炎病毒 IgM 抗體檢測 (indirect ELISA) 583
 腮腺炎病毒分子生物學核酸檢測 (RT-nested PCR) 577
 腮腺炎病毒分離與鑑定 567
 腺病毒 1064
 腺病毒分離與鑑定 1064
 鉤端螺旋體分離與鑑定 758
 鉤端螺旋體抗體檢測 (ELISA) 768
 鉤端螺旋體抗體檢測 (顯微凝集法) 764
 鉤端螺旋體病 758, 764, 768
 鼠疫 11, 18
 鼠疫桿菌 F1 抗體檢測 (酵素免疫分析法) 18
 鼠疫桿菌分離與鑑定 11

十四劃

漢他病毒 IgM 及 IgG 抗體檢測 (ELISA) 233
 漢他病毒核酸檢測 (real-time RT-PCR) 226

漢他病毒症候群 226, 233
 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
 諾羅病毒抗體檢測 (ELISA) 1039

十六劃

貓爪病 885, 889
 貓爪病病原體分離與鑑定 885
 貓抓病病原體抗體檢測 (IFA) 889
 霍亂 305, 313, 318
 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

十九劃

類鼻疽 772
 類鼻疽伯克氏菌分離與鑑定 772

二十劃

嚴重急性呼吸道症候群 (SARS) 22

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	英文索引	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1087 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

英文索引

16S rDNA bacterial identification 1074	<i>Brucella</i> antibody detection (RBT & CFT) 1017
Acute viral hepatitis (except A) 510, 517, 523, 530, 536, 544, 551, 559	Brucellosis 1017
Acute viral hepatitis A 213, 220	<i>Burkholderia pseudomallei</i> isolation and identification 772
Adeno virus 1064	Cat-scratch disease 885, 889
Adeno virus isolation and identification 1064	Chikungunya 289, 293, 300
Amoebiasis 123, 127, 134, 138	Chikungunya virus IgM 及 IgG antibody detection (ELISA) 300
Amoebiasis stool examination screening method 123	Chikungunya virus isolation and identification 289
Antigen test of <i>Plasmodia</i> human parasite (malaria rapid test) 173	Chikungunya virus nucleic acid detection (real-time RT-PCR) 293
Antibody detection of <i>Leptospira</i> spp. (ELISA) 768	<i>Chlamydia pneumoniae</i> 1021, 1029
<i>Bacillus anthracis</i> nucleic acid detection (real time PCR) 48	<i>Chlamydia pneumoniae</i> IgM & IgG antibody detection (MIF) 1029
<i>Bacillus anthracis</i> isolation and identification 42	<i>Chlamydia pneumoniae</i> nucleic acid detection (PCR) 1021
<i>Bacillus anthracis</i> antibody detection 54	Cholera 305, 313, 318
<i>Bacillus cereus</i> isolation and identification 1059	<i>Clostridium botulinum</i> neutralization test 781
<i>Bacillus cereus</i> 1059	<i>Clostridium botulinum</i> isolation and identification 777
Bacterial culture Identification 1074	<i>Clostridium botulinum</i> toxic detection 785
<i>Bartonella henselae</i> isolation and identification 885	Congenital rubella syndrome 476, 486, 492, 501
<i>Bartonella henselae</i> antibody detection (IFA) 889	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> isolation and identification 63
Botulism 777, 781, 785	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> toxic detection (Elek's plate virulence test) 74
<i>Borrelia burgdorferi</i> isolation and identification 830	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> nucleic acid detection (PCR) 70
<i>Borrelia burgdorferi</i> antibody detection (ELISA) 834	<i>Coxiella burnetii</i> nucleic acid detection (STN-RT PCR) 796
<i>Borrelia burgdorferi</i> antibody detection (WB) 838	Creutzfeldt-Jakob disease 921
<i>Bordetella pertussis</i> isolation and identification 379	Creutzfeldt-Jakob disease marked protein detection (WB) 921
<i>Bordetella pertussis</i> nucleic acid detection (PCR LAMP) 393	Dengue virus NS1 antigen rapid test 100
<i>Bordetella pertussis</i> nucleic acid detection (PCR) 386	

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	英文索引	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1088 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

Dengue virus isolation and identification 87	H5N1 influenza virus nucleic acid detection (RT-PCR) 59
Dengue virus nucleic acid detection (real-time RT-PCR) 93	<i>Haemophilus influenza</i> type b isolation and identification 642
Dengue fever 87, 93, 100, 102	<i>Haemophilus influenza</i> type b infection 642
Diphtheria 63, 70, 74	Hantavirus IgM 及 IgG antibody detection (ELISA) 233
Drug susceptibility testing of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex isolates on agar 472	Hantavirus nucleic acid detection (real-time RT-PCR) 226
Ebola hemorrhagic fever 971, 975, 981	Hantavirus syndrome 226, 233
Ebola virus nucleic acid detection (real-time RT-PCR) 975	Hepatitis A virus IgG antibody test (CMIA) 220
Ebola virus isolation and identification 971	Hepatitis A virus IgM antibody test (CMIA) 213, 510
Ebola virus antibody detection (ELISA) 981	Hepatitis B virus surface antigen detection (CMIA) 517
<i>Entamoeba histolytica</i> antigen detection (ELISA screening method) 134	Hepatitis B virus core IgM antibody test (CMIA) 523
<i>Entamoeba histolytica</i> nucleic acid detection (two-step nested PCR) 127	Hepatitis C virus antibody detection (CMIA) 530
<i>Entamoeba histolytica</i> antibody detection 138	Hepatitis D virus IgG antibody detection (ELISA) 544
Endemic typhus 808, 812, 824	Hepatitis D virus IgM antibody detection (ELISA) 536
Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> infection 237	Hepatitis E virus IgG antibody detection (ELISA) 559
Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> infection isolation and identification 237	Hepatitis E virus IgM antibody detection (ELISA) 551
Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> toxic genotyping (PCR) 250	Herpesvirus B antibody test (ELISA) 952
Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> toxic detection (RPLA) 245	Herpesvirus B isolation and identification 744
Enteroviruses neutralization antibody detection 712	Herpesvirus B antibody detection 754
Enteroviruses isolation and identification 702	Herpesvirus B nucleic acid detection (real-time PCR) 748
Enteroviruses infection complicated severe case 702, 712	Herpesvirus B infection 744, 748, 754
Epidemic typhoid 362, 367, 373	HIV antibody test (western blot) 728
<i>Francisella tularensis</i> antibody detection (IHA) 848	HIV virus antibody detection (Particle agglutination) 721
<i>Francisella tularensis</i> antibody detection (Micro-plate method) 844	HIV virus nucleic acid detection (real-time RT-PCR) 736
Gonorrhea 685, 689, 695	Human immunodeficiency virus infection (AIDS) 721, 728, 736
H5N1 influenza 59	

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	英文索引	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1089 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

IgM & IgG antibody detection of dengue virus and Japanese virus (ELISA) 102, 411	Leptospirosis 758, 764, 768
Influenza severe case 905	Lyme disease 830, 834, 838
Influenza virus isolation and identification 905, 915	Malaria diagnosis (Microscopic examination) 159
Influenza virus nucleic acid detection (RT-PCR) 915	Malaria 159, 164, 173
Invasive pneumococcal disease 789	Marburg virus nucleic acid detection (real-time RT-PCR) 946
Isolation and identification of <i>Legionella</i> in water 633	Marburg virus isolation and identification 942
Isolation and identification of <i>Leptospira</i> species 758	Marburg virus hemorrhagic fever 942, 946, 952
Isolation and identification of <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> A & <i>Salmonella</i> species 79	Measles 178, 188, 194, 203
Isolation of <i>Mycobacteria</i> 323, 416	Measles virus IgG antibody test 203
Japanese encephalitis 400, 404, 411	Measles virus IgM antibody test 194
Japanese encephalitis virus isolation and identification 400	Measles virus isolation and identification 178
Japanese encephalitis virus nucleic acid detection (real-time RT-PCR) 404	Measles virus nucleic acid detection (RT-nested PCR) 188
Lassa virus antibody detection (ELISA) 995	Melioidosis 772
Lassa virus nucleic acid detection (real-time RT-PCR) 989	Meningococcal meningitis 107
Lassa fever 985	Multidrug-resistant tuberculosis 323, 330, 336, 342
Lassa virus isolation and identification 985	Mumps (Cluster infection) 567, 577, 583, 592
<i>Legionella pneumophila</i> antigen test (EIA) 610	Mump virus IgG antibody detection (Indirect ELISA) 592
<i>Legionella pneumophila</i> antigen test (RIMA) 616	Mumps virus IgM antibody detection (Indirect ELISA) 583
<i>Legionella</i> isolation and identification 601	Mumps virus nucleic acid detection (RT-nested PCR) 577
<i>Legionella</i> antigen detection (LATEX) 626	Mumps virus isolation and identification 567
<i>Legionella</i> antibody detection (DFA) 629	<i>Mycobacteria</i> nucleic acid detection (Interspersed repeat unit - variable repeats molecular typing method) 467
<i>Legionella pneumophila</i> antibody detection (IFA) 620	<i>Mycobacteria</i> nucleic acid detection (Interval oligonucleotide molecular typing method) 439
Legionellosis 601, 610, 620, 626, 629, 633	<i>Mycobacteri</i> ai indirect drug susceptibility tests (Agar plate method) 342
Leptospirosis antibody test (microscopic agglutination) 764	

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	英文索引	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1090 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

<i>Mycobacteria</i> drug susceptibility test (Detection of multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> drug resistance gene) 336	<i>Orientia tsutsugamushi</i> & <i>Rickettsia</i> species isolation and identification 808
<i>Mycobacteria</i> nucleic acid detection (IS6110 nested polymerase chain reaction method) 444	<i>Orientia tsutsugamushi</i> & <i>Rickettsia</i> species nucleic acid detection (real-time PCR) 812
<i>Mycobacteria</i> nucleic acid detection (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> IS6110 restriction fragment length polymorphism typing method) 455	Paratyphoid 79
<i>Mycobacteria</i> nucleic acid detection (rRNA direct detection) 434	Pertussis 379, 386, 393
<i>Mycobacteria</i> identification (biochemical) 330, 428	Plague 11, 18
<i>Mycobacteria</i> nucleic acid detection (Restriction fragment length polymorphism molecular identification method) 450	Poliomyelitis 140
<i>Mycobacteria</i> identification (Acid-fast smear microscopy method) 423	Poliovirus isolation and identification 140
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> nucleic acid detection (real-time-PCR) 695	Q fever 796, 802
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> isolation and identification 689	Q fever pathogen antibody detection (IgM & IgG, IFA) 802
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> staining (Gram stain) 685	Rabies 30, 33, 40
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> isolation and identification 107	Rabies virus isolation and identification 30
Norovirus antibody detection (ELISA) 1039	Rabies virus antigen detection (DFA) 40
Nucleic acid detection of <i>Plasmodia</i> human parasite (two step nested PCR) 164	Rabies virus nucleic acid detection (RT-PCR) 33
<i>Orthopoxvirus variola</i> nucleic acid detection (Real-time PCR) 5	<i>Rickettsia prowazekii</i> isolation and identification 362
<i>Orthopoxvirus variola</i> isolation and identification 18	<i>Rickettsia prowazekii</i> antibody detection (IgM & IgG, IFA) 373
<i>Orientia tsutsugamushi</i> , <i>Rickettsia typhi</i> & <i>Rickettsia prowazekii</i> nucleic acid detection 367	<i>Rickettsia</i> antibody detection (IFA) 824
	Rift valley fever 929, 933, 938
	Rift Valley virus isolation and identification 929
	Rift Valley virus antibody detection (ELISA) 938
	Rift Valley virus nucleic acid detection (real-time RT-PCR) 933
	Rotavirus antibody detection (ELISA) 1046
	Rubella 255, 265, 271, 280
	Rubella virus IgG antibody detection (indirect ELISA) 280, 501
	Rubella virus IgM antibody test 271, 492
	Rubella virus nucleic acid detection (RT-nested PCR) 265, 486
	Rubella virus isolation and identification 255, 476

行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法

	編號：	英文索引	核准日期： 年 月 日
	頁次：第 1091 頁/共 1091 頁		修訂日期： 年 月 日

SARS virus nucleic acid detection (RT-PCR) 22	Tularemia 844, 848
Scarlet fever 1053	Typhoid fever 79
Scarlet fever pathogen (Group A <i>Streptococcus</i>) isolation and identification 1053	Varicella 852, 861, 867, 876
Scrub typhus antibody detection (IFA) 818	Varicella virus isolation and identification 852
Shigellosis 115	Varicella virus IgG antibody detection (indirect ELISA) 876
<i>Shigella</i> isolation and identification 115	Varicella virus IgM antibody detection (indirect ELISA) 867
Syphilis 649, 655, 663, 674	Varicella virus nucleic acid detection (nested PCR) 861
Scrub typhus 808, 812, 818	West Nile virus IgM& IgG antibody detection (ELISA) 357
Severe acute respiratory syndrome (SARS) 22	<i>Vibrio cholerae</i> isolation and identification 305
Small pox 1, 5	<i>Vibrio cholerae</i> toxic getyping (PCR) 313
<i>Staphylococcus aureus</i> isolation and identification 999	<i>Vibrio cholerae</i> toxic detection (RPLA) 318
<i>Staphylococcus aureus</i> food poisoning 999, 1005	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolation and identification 1010
<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin detection (RPLA) 1005	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> food poisoning 1010
<i>Streptococcus pneumoniae</i> isolation & serotyping 789	Viral gastroenteritis 1039, 1046
<i>Toxoplasma gondii</i> IgM & IgG antibody detection (EIA & ELFA) 899	Yellow fever 956, 960, 967
<i>Toxoplasma gondii</i> nucleic acid detection (two-step nested PCR) 895	Yellow fever virus IgM and IgG antibody detection (ELISA) 967
<i>Toxoplasma gondii</i> isolation and identification 894	Yellow fever virus nucleic acid detection (RT-PCR) 960
Toxoplasmosis 894, 895, 899	Yellow fever virus isolation and identification 956
<i>Treponema pallidum</i> antibody detection (RPR) 649	West Nile virus isolation and identification 346
<i>Treponema pallidum</i> antibody detection (TPHA) 674	West Nile virus nucleic acid detection (real-time RT-PCR) 350
<i>Treponema pallidum</i> antibody detection (TPPA) 663	West Nile fever 346, 350, 357
<i>Treponema pallidum</i> antibody detection (VDRL) 655	<i>Yersinia pestis</i> F1 antibody detection (ELISA) 18
Tuberculosis (except MDR-TB) 416, 423, 428, 434, 439, 444, 450, 455, 467, 472	<i>Yersinia pestis</i> isolation and identification 11

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

下冊；公分. -- (防疫學苑系列；035-2)

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 035-2

傳染病標準檢驗方法手冊(下)

Manual of Standard Operation Procedure of Communicable Diseases (II)

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

