


衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	中東呼吸症候群冠狀病毒病原體	核准日期：104 年 06 月 10 日
	頁次：第 1 頁	分離、鑑定	修訂日期：104 年 06 月 10 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中東呼吸症候群冠狀病毒(MERS-CoV)。

2 適用檢體種類

痰、糞便、咽喉拭子。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

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

5 試劑耗材

5.1 試劑

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

5.1.1.1 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)。

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

5.1.1.1.2 With L-glutamine。

5.1.1.1.3 Without sodium pyruvate。

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

5.1.1.3 Pen-strep solution (100 X)。

5.1.1.3.4 With 10,000 units/mL penicillin G。

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

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

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

5.1.4 Trypsin-EDTA。

5.1.4.1 With 0.05 % trypsin。


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

5.1.5 Vero E6 細胞株。

5.2 耗材：

5.2.1 25-cm² Culture vessels (T-25)。

衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	中東呼吸症候群冠狀病毒病原體	核准日期：104 年 06 月 10 日
	頁次：第 2 頁	分離、鑑定	修訂日期：104 年 06 月 10 日

- 5.2.2 24 well Plate。
- 5.2.3 Pipette：1 mL、5 mL、10 mL、25 mL。
- 5.2.4 200 μ L Tip。
- 5.2.5 3 mL 無菌塑膠吸管。
- 5.2.6 1.5 mL Eppendorf tube。
- 5.2.7 無菌螺旋試管：2 mL、4 mL。
- 5.2.8 無菌離心管：15 mL、50 mL。
- 5.2.9 5 mL 針筒。
- 5.2.10 0.45 μ M 針頭過濾網。
- 5.2.11 抗凍標籤紙。
- 5.2.12 油性細字筆。

6 儀器設備

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

7 環境設施安全

於生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室之設施內操作。

8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

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

9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

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

10 檢驗步驟

10.1 檢體編號：收件檢體依通報疾病及種類編號。

10.2 檢驗前處理


10.2.1 開啓生物安全櫃之紫外光照射操作枱面 20 min。

10.2.2 將 5.1.1-5.1.4 試劑先置於 37 °C 回溫或解凍。

10.2.3 檢體前處理

10.2.3.1 咽喉拭子：加 1.5 mL Sample pretreat medium 至採檢

衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	中東呼吸症候群冠狀病毒病原體	核准日期：104 年 06 月 10 日
	頁次：第 3 頁	分離、鑑定	修訂日期：104 年 06 月 10 日

管充分攪拌，將溶液吸出至 4 mL 滅菌塑膠檢體瓶中，以 5 mL 針筒吸取溶液後，拔去針頭，接上 0.45 μm 過濾器過濾後置於 2 mL 無菌試管保存，接種細胞或暫時置於 -80°C 保存。

10.3 檢驗步驟：

- 10.3.1 接種：取長滿單層之 Vero E6 細胞，吸出 Growth medium，接種檢體 100 μL ，輕輕搖動使檢體佈滿細胞層，置於 37°C 含 5% CO_2 的培養箱培養，其間約間隔 15 min，即輕輕搖動 plate，使檢體能均勻散佈於細胞層並防止細胞層乾燥。1 hr 後加入 1 mL Maintain medium，置於 37°C 含 5% CO_2 的培養箱培養。
- 10.3.2 每天觀察細胞是否產生細胞病變(CPE)，可培養 7 天，若發現細胞病變，收集細胞培養液，進行病毒核酸檢測方法鑑定確認。

11 結果判定

- 11.1 判讀標準：培養液經病毒核酸檢測方法測定為陽性者，判定為陽性。
- 11.2 報告核發：中東呼吸症候群冠狀病毒分離陽性，中東呼吸症候群冠狀病毒分離陰性。
- 11.3 結果登錄：完成檢驗後，將檢驗結果填寫於檢體送驗單之“檢驗結果欄”，並上網登錄於實驗室資訊管理系統，傳送實驗室主管審核，待審核通過後發佈結果。


12 品質管制

- 12.1 全程作業都要在生物安全櫃內進行。
- 12.2 二氧化碳培養箱內壁每月要定期以抗黴菌劑擦拭及水盤添加抑菌劑的無菌水以保持培養箱內溼度。

13 廢棄物處理

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

衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	中東呼吸症候群冠狀病毒核酸檢	核准日期：104 年 06 月 10 日
	頁次：第 4 頁	測 (Real time RT-PCR)	修訂日期：104 年 06 月 10 日

1 目的

以分子生物學的技术利用反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 檢測檢體中是否有中東呼吸症候群冠狀病毒。

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、痰液等。

3 名詞解釋

無。

4 原理概述

即時定量 RT-PCR：

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

5 試劑耗材

5.1 試劑

5.1.1 QIAmp viral RNA kit。

5.1.2 LightCycler 480 RNA master hydrolysis probes (Roche, Cat. no. 04 991 885 001)。

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

5.1.4 陽性對照組 (positive control)：以建立之 H7 與 N9 陽性標準 Plasmid DNA 作對照；陰性對照組 (negative control)：採用 H7N9 陰性的檢體作對照或以水作陰性對照。

5.1.5 Agarose。

5.1.6 DEPC 水。

5.2 耗材

5.2.1 無菌 PCR 反應管。

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

5.2.3 無菌 1.5 mL 微量離心管。

5.2.4 手套。


6 儀器設備

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

6.2 PCR thermal cycler。

6.3 電泳槽。

衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	中東呼吸症候群冠狀病毒核酸檢測 (Real time RT-PCR)	核准日期：104 年 06 月 10 日
	頁次：第 5 頁		修訂日期：104 年 06 月 10 日

6.4 DNA 電泳膠體觀察設備。

6.5 2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L Pipetman。

7 環境設施安全

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

8 檢體採集

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

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

9 檢體運送及保存

參照本署出版之「傳染病檢體採檢手冊」第二版。

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

10 檢驗步驟

10.1 檢體前處理

10.1.1 檢體編號：核對檢驗單之個案與檢體是否相符，給予疾病編號。

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

10.1.2.1 檢體的採集量並無嚴格限制。

10.1.2.2 檢體的運送：4 $^{\circ}$ C。

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

10.1.3 咽喉拭子檢體

10.1.3.1 棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。

10.1.3.2 於 4 $^{\circ}$ C，2,100 \times g 離心 15 min。

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

10.1.4 痰檢體

10.1.4.1 取 PBS 緩衝液與痰檢體約 1：1 的比例混合

10.1.4.2 攪拌使其均質化並於 4 $^{\circ}$ C，2,100 \times g 離心 15 min。

10.1.4.3 收集上清液，取 140 μ L，其餘保存於-70 $^{\circ}$ C。

10.2 萃取病毒 RNA


10.2.1 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。

10.2.2 加入純酒精 560 μ L 終止反應。

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

10.2.4 以清洗液 (AW1) 500 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。

衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	中東呼吸症候群冠狀病毒核酸檢	核准日期：104 年 06 月 10 日
	頁次：第 6 頁	測 (Real time RT-PCR)	修訂日期：104 年 06 月 10 日

10.2.5 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。

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

10.2.7 加入 DEPC 水，室溫靜置 9 min，在 4 $^{\circ}$ C 離心 8,000 rpm，1 min，取得 RNA。

10.3 即時螢光定量轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (real time RT-PCR) (以 LightCycler 480 RNA master hydrolysis probes kit 為例)

10.3.1 試劑添加量

RNase-free water	2.8 μ L
upE-Fwd/EMC-Orf1a-Fwd primer (10 μ M)	1.0 μ L
upE-Rev/Orf1a-Rev primer (10 μ M)	1.0 μ L
upE-Prb/EMCORf1a-Prb probe (5 μ M)	0.5 μ L
Enzyme master mix	7.4 μ L
Enhancer	1.0 μ L
Activator	1.3 μ L
RNA sample	5.0 μ L
Total	20.0 μ L

10.3.2 Real-time RT-PCR 反應條件

10.3.2.1 RT reaction：63 $^{\circ}$ C，3 min。

10.3.2.2 Taq activation：95 $^{\circ}$ C，30 sec。

10.3.2.3 PCR reaction：95 $^{\circ}$ C，10 sec；58 $^{\circ}$ C，30 sec；72 $^{\circ}$ C，3 sec (45 replication cycles)。

10.4 檢驗後處理

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

11 結果判定

11.1 判讀標準

Real-time RT-PCR：若 upE 或 EMC 反應有螢光訊號產生，即可判定為中東呼吸症候群冠狀病毒陽性。

11.2 報告核發：中東呼吸症候群冠狀病毒 real-time PCR 陽性，中東呼吸症候群冠狀病毒 real-time PCR 陰性。

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


12 品質管制

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

12.2 陰性對照組：陰性對照組(二次水)需無任何螢光訊號產生。

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

衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	中東呼吸症候群冠狀病毒核酸檢測 (Real time RT-PCR)	核准日期：104 年 06 月 10 日
	頁次：第 7 頁		修訂日期：104 年 06 月 10 日

13 廢棄物處理

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

14 參考資料

- 14.1 Corman VM, Müller MA, Drosten C. Et al., Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. Euro Surveill. 2012 Dec 6;17(49).
- 14.2 Corman VM, Eckerle I and Drosten C. et al., Detection of novel human coronavirus by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Euro Surveill. 2012 Sep 27;17(39). pii: 20285


15 附錄

15.1 中東呼吸症候群冠狀病毒診斷用引子組序列表

15.2 注意事項

- 15.2.1 以 Heparin 為抗凝劑的血漿或溶血檢體可能會干擾 Taq polymerase 的作用，降低檢驗敏感性。
- 15.2.2 13.2 病毒 RNA 的萃取，除了最後一步 RNA 的洗脫 (elution) 是在 4 °C 下離心之外，其餘步驟皆可在室溫下進行。
- 15.2.3 13.3 序列分析：將經 RT-PCR 增幅的 DNA 片段作定序分析，並將定序的結果利用 NCBI 的基因庫作序列分析。

衛生福利部疾病管制署傳染病標準檢驗方法

	編號：	中東呼吸症候群冠狀病毒核酸檢測 (Real time RT-PCR)	核准日期：104 年 06 月 10 日
	頁次：第 8 頁		修訂日期：104 年 06 月 10 日

15.1 中東呼吸症候群冠狀病毒診斷用引子組序列表

upE-Fwd-5'-GCA ACG CGC GAT TCA GTT-3'

upE-Rev-5'-GCC TCT ACA CGG GAC CCA TA-3'

upE-Prb-5'FAM-CTC TTC ACA TAA TCG CCC CGA GCT CG-TAMRA3'

Orf1a-Fwd-5'-CCA CTA CTC CCA TTT CGT CAG-3'

Orf1a-Rev-5'-CAG TAT GTG TAG TGC GCA TAT AAG CA-3'

Orf1a-Prb-5'FAM-TTG CAA ATT GGC TTG CCC CCA CT-TAMRA3'

ORF1b-Fwd-5'-TTC GAT GTT GAG GGT GCT CAT-3'

ORF1b-Rev-5'-TCA CAC CAG TTG AAA ATC CTA ATT G-3'

ORF1b-Prb-5'FAM-CCC GTA ATG CAT GTG GCA CCA ATG T-TAMRA3'