

禽流感病毒(H5N1)標準檢驗操作程序:

修訂日期:101/11/7

1. 檢體種類

1.1 呼吸道檢體包括咽喉拭子、鼻咽拭子、鼻咽抽出液、支氣管肺泡灌洗液等用於病毒培養、抗原檢測與核酸分子檢測。

1.2 血清檢測包括急性期(發病 1~5 天)與恢復期(發病 14~20 天之間)之血清。

2. 檢驗方法

3. 抗原檢測(快速檢測試劑)、核酸分子檢測(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)、病毒培養、血球凝集抑制試驗(Hemagglutinin inhibition, HI)與抗體中和試驗(Microneutralization, MN)。

4. 環境與設施安全

涉及病毒繁殖(如病毒培養與抗體中和試驗)須於第三等級(BSL-3)實驗室進行；無涉及病毒繁殖則可於第二等級(BSL-2)實驗室進行。核酸分子檢測於獨立的操作空間，以避免污染，影響結果。

5. 檢體採集與檢體前處理

5.1 檢體採集參照本局之防疫檢體採檢手冊。

5.2 檢體前處理:核對檢驗單之個案與檢體是否相符,咽喉拭子、鼻咽拭子等檢體,拭子棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾,取出上清液,進行病毒抗原檢測、核酸分子檢測與細胞培養。收集急性期與恢復期之血清,進行血球凝集試驗(HI)與抗體中和試驗。

6. 核酸分子檢測

6.1 萃取病毒 RNA:

6.1.1 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 分鐘。加入純酒精 560 μ l 終止反應。

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

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

6.1.4 以清洗液(AW2) 500 μ l,離心 14,000 rpm, 3 分鐘,作第二次沖

洗，清洗膜上剩餘吸附的雜質。

6.1.5 離心 14,000 rpm，1 分鐘，以徹底去除膜上殘留酒精。加入 100 μ l DEPC 水，室溫靜置 9 分鐘，在 4 $^{\circ}$ C 離心 8,000 rpm，1 分鐘，取得 RNA。

6.1.6 加入 100 μ l DEPC 水，室溫靜置 9 分鐘，在 4 $^{\circ}$ C 離心 8,000 rpm，1 分鐘，取得 RNA。

6.2 流感 A 型與 B 型即時反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應(real-time RT-PCR)

6.2.1 試劑添加量(依照 Applied Biosystems TaqMan $^{\circledR}$ One-Step RT-PCR

Master Mix Reagents Kit 之操作步驟)

2 X Master mix buffer	12.5 μ l
FluA-F primer (10 μ M)	1 μ l
FluA-R primer (10 μ M)	1 μ l
FluB-F primer (10 μ M)	1 μ l
FluB-R primer (10 μ M)	1 μ l
FluA & FluB probe (5 μ M)	0.5 μ l
RNA enzyme mix	0.67 μ l
DEPC treatment H ₂ O	2.33 μ l
RNA sample	5 μ l
	<hr/>
	25 μ l

6.2.2 Real-time RT-PCR 反應條件

RT reaction : 48 $^{\circ}$ C , 30 mins .

Taq activation : 95 $^{\circ}$ C , 10 min (1 replication cycle) .

PCR reaction : 95 $^{\circ}$ C , 15 s ; 60 $^{\circ}$ C , 1 min (45 replication cycles) .

6.3 流感 A 型 H5N1 反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)

6.3.1 試劑添加量(依照 QIAGEN $^{\circledR}$ OneStep RT-PCR Kit 之操作步驟)

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

6.3.2 反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應條件

RT reaction : 50°C , 30 min .

Taq activation : 95°C , 15 min (1 replication cycle) .

PCR reaction : 95°C , 30 sec ; 50°C , 30 sec ; 72°C , 60 sec
(40 replication cycles)

Final extension, 72°C , 10 min .

6.3.3 膠片電泳分析: RT-PCR 產物, H5 增幅片段約 424 bp ; N1 增幅出的
片段約 343 bp .

6.4 流感病毒診斷用引子組序列列表。

FluA-F :5'- AAGACCAATCCTGTACCTCTGA -3'

FluA-R :5'- CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC -3'

FluB-F: 5'- GAGACACAATTGCCTACCTGCTT -3'

FluB-R: 5' - TTCTTTCCACCGAACCAAC -3'

FluA probe: 5'FAM - TTTGTGTTACGCTCACCGT -3'BBQ

FluB probe:

5'HEX-AGAAGATGGAGAAGGCAAAGCAGAACTAGC-3'BBQ

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

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

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

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

7. 病毒培養檢驗步驟

7.1 接種: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 麴g/mL tpck-trypsin 維持培養基。每一檢體接種 2 支 culture tube, 每支 tube 接種 100 麴L 檢體 培養於 35 °C , CO₂ 培養箱 7—10 日。

7.2 觀察:自接種後翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態。接種細胞產生 50% 以上細胞病變者, 收集細胞及培養液, 立即進行鑑定。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。

7.3 間接螢光免疫法鑑定: 將 culture tube 以 4 °C , 3,000 rpm 離心 15 分鐘, 上清液分別存於容積 4 mL 的塑膠小瓶。經離心沉澱之細胞加入與原培

養基等量之 PBS，以吸量管上下混合數次後，將細胞懸浮液移至另一塑膠小管。

- 7.4 分別將各管細胞取 20—30 麵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 分鐘。取出風乾後以 respiratory reagent 一級抗體滴於每個 well（每滴約 20 μL 左右），將玻片置於 moisture chamber，置於 37°C 恆溫培養箱 30 分鐘。以含有 1% tween 20 之 PBS 溶液清洗玻片三次後 10 分鐘風乾。每個 well 加二級螢光抗體（FITC）。每滴約 20 麵L 左右，將玻片置於 moisture chamber，置於 37 °C 恆溫培養箱 30 分鐘。以含有 1% tween 20 之 PBS 溶液清洗玻片三次後風乾並以 mounting fluid 封片，經螢光顯微鏡鏡檢，螢光顯微鏡鏡檢呈現蘋果綠螢光則為陽性，紅色則為陰性。

8. 血清學抑制血球凝集試驗(HI)與抗體中和試驗(MN)

8.1 血球凝集試驗

- 8.1.1 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 50 μL 的 PBS 溶液。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。
- 8.1.2 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。
- 8.1.3 分別加入以 PBS 稀釋的 1% 的馬紅血球 50 μL/well，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 分鐘，之後記錄結果，引起血球凝集之病毒抗原最高稀釋倍數倒數為 HA unit。
- 8.1.4 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。

8.2 血球凝集抑制試驗

- 8.2.1 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 25 μL 的 PBS 溶液。於第一列加入 50 μL 的血清，negative control 行則以 25 μL PBS 取代血清。
- 8.2.2 取第一列的血清 25 μL 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取

25 μ L 加入第三列，如此序列稀釋至第八列。

8.2.3 分別加入 25 μ L 已稀釋至 8 HA unit/50 μ L 的抗原，以手輕微搖晃孔盤後，置於室溫下反應 10—15 分鐘。

8.2.4 加入以 PBS 稀釋的 1% 的馬紅血球 50 μ L/well，之後以膠膜封住孔盤，至於室溫或 4°C 下靜置 30—60 分鐘，之後記錄結果，抑制血球之最高稀釋倍數倒數為抗血清之效價。

9. 流感血清中和試驗

9.1 準備 96 孔盤含有 1.5×10^4 /well 之 MDCK cell 37°C 培養一天備用。

9.2 取 50 麵l 血清加入 150 麵l RDE 於 37°C 處理隔夜，並於 56°C 30 分鐘去活化血清(血清處理量視需求等比例增加)，以 PBS 稀釋至 5x 備用。

9.3 以病毒培養溶液(no serum DMEM + TPCK-trypsin)將病毒稀釋至 100 TCID₅₀ / 50 麵L 備用 (200 TCID₅₀/ 100 麵L)。

9.4 將步驟 b 之血清 50 麵l 以 PBS 做 2 倍序列稀釋 (如 5x 10x 20x 40x 80x 160x 320x 640x 1280x)。

9.5 每個稀釋血清之 well 加入 50 麵l 100 TCID₅₀ 病毒液混合後放入 37°C 作用 2 小時。

9.6 取出 96 孔盤之 MDCK cell，每 well 用 200 麵l PBS wash 2 次並用病毒培養溶液潤洗一次，後將與血清作用過之病毒 (步驟 e) 100 麵l 加入(每一稀釋倍數 4 重複)，在 34°C 培養兩小時後去除，並加入新的培養溶液。

9.7 放入 34°C 培養箱，每天以倒立顯微鏡觀察細胞病變之血清稀釋倍數。

參考文獻

1. Ward CL, Dempsey MH, Ring CJ, Kempson RE, Zhang L, Gor D, Snowden BW, Tisdale M. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. J Clin Virol. 2004; 29 (3):179-88.
2. WHO. Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases. http://www.who.int/csr/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html
3. WHO guidelines for investigation of human cases of avian influenza A(H5N1). http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_EPR_GIP_2006_4/en/index.html