

出國報告（ 出國類別： 研習 ）

麻疹相關檢驗技術研習

服務機關：衛生署疾病管制局

出國人職稱：薦任技士

出國人姓名：鄭雯月

出國地區：澳洲墨爾本

出國期間：民國 94 年 7 月 31 日至 8 月 14 日

報告日期：民國 94 年 9 月 27 日

摘要：

麻疹被視為繼小兒麻痺根除後，下一個要努力走向根除的疾病，我國自 81 年以來全面推展 MMR 接種，成效卓著，感染人口數快速下降，在疾病發生率大幅降低下，傳統經由臨床症狀診斷疾病的正確率也大幅下降，故需藉由檢驗確認陽性個案，而檢驗結果的準確性也相形重要。

由於我們非 WHO 會員國，許多相關的國際性會議或新的發展，我們較無法即時得知，此次的研習單位 VIDRL(Victorian infectious disease reference laboratory)本身屬於 WHO 在西太平洋區的小兒麻痺及麻疹的參考實驗室，在 94 年 5 月下旬 WHO 還在此地舉辦了麻疹實驗診斷技術研討會，可惜在 4 月初經由與 VIDRL 聯繫研習事宜而得知此消息時，WHO 已不接受我們參加。故此行主要的目的除研習麻疹及德國麻疹相關檢驗方法，檢討實驗室尚待改進之處，同時也藉由向相關領域的專家請益，希望能建立彼此互動的管道，跟上全球在此疾病根除議題中，實驗室所應扮演的腳色。



目 錄

	頁 碼
1-4 出國行程簡介	3
5 研習重點報告	
5.1 感染性物品運送規範	4-6
5.2 良好實驗規範	7-8
5.3 實驗室品保	9-10
5.4 如何對濾紙上的乾燥血漬進行 ELISA 抗體檢測	11-14
5.5 解決 ELISA 試驗遇到的問題	15-16
5.6 WHO 全球實驗室麻疹 IgM 血清學能力試驗	17-19
5.7 麻疹 PCR 檢驗與基因分型	20-22
5.8 參觀 Viral identification laboratory	23-25
5.9 分子演化分析工具	26-28
6 心得	29
7 建議	30



出國時間：2005.07.30~2005.08.14。

- 1 研習地點：澳洲墨爾本
- 2 研習機構：Victoria Infectious Disease Reference Laboratory，簡稱 VIDRL。
- 3 出國人員：研究檢驗中心技士：鄭雯月。
- 4 行程概要：
 - 4.1 7/30~7/31：出國。
 - 4.2 8/1：Good Laboratory Practice/Quality Assurance/Shipping。
 - 4.3 8/2-8/5：Serology Laboratory。Principle of ELISA/ELISA Routine、ELISA for Dry Blood Spots、ELISA trouble shooting/Active Surveillance。
 - 4.4 8/6-8/7：Weekend
 - 4.5 8/8-8/9：Viral identification Laboratory。PCR for measles diagnosis and genotyping、Herpes virus multiplex assay。
 - 4.6 8/10：Surveillance in Australia and Vaccine Policy
 - 4.7 8/11：Phylogenetics。
 - 4.8 8/12：Rubella confirmation test-Sucrose Density Gradient
 - 4.9 8/13-8/14：回國



5 研習重點報告：

5.1 感染性物品運送規範：

5.1.1 感染性物質分類-UN Class 6

5.1.1.1 Division 6.1 toxic substance

5.1.1.2 Division 6.2 infectious substance

5.1.1.2.1 Category A 定義：在輸送過程中若外漏會威脅人類生命並對人類造成致命或永久性傷害者，例如：伊波拉病毒、B 肝病毒、小兒麻痺病毒、麻疹病毒

5.1.1.2.2 Category B 定義：所有不屬於 A 類的其他傳染性物品，例如：血清、咽喉拭子、試紙上乾燥的唾液或血液檢體

5.1.2 感染性物品航空運輸規範

5.1.2.1 依循 IATA-International Air Transport Association

5.1.2.2 IATA 規範中屬於 Division 6.2 infectious substance 包括

5.1.2.2.1 Diagnostic specimen

5.1.2.2.2 Infectious substance

5.1.2.2.3 Biological product(eg Vaccine)

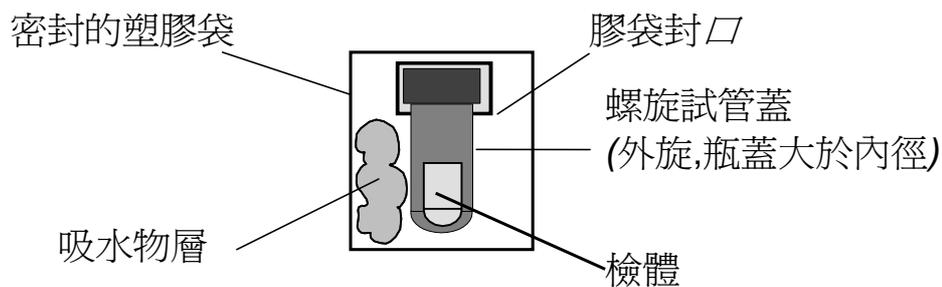
5.1.2.2.4 Genetically modified Micro-organism

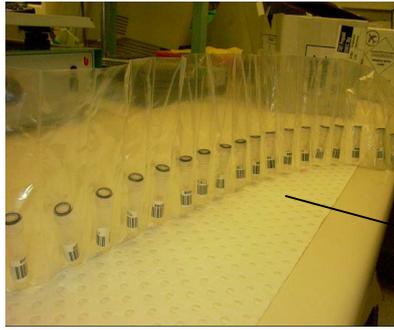
5.1.2.2.5 Clinical and medical waste

5.1.3 感染性物品包裝

5.1.3.1 所有感染性物品運輸至少有三層包裝

5.1.3.1.1 第一層包裝

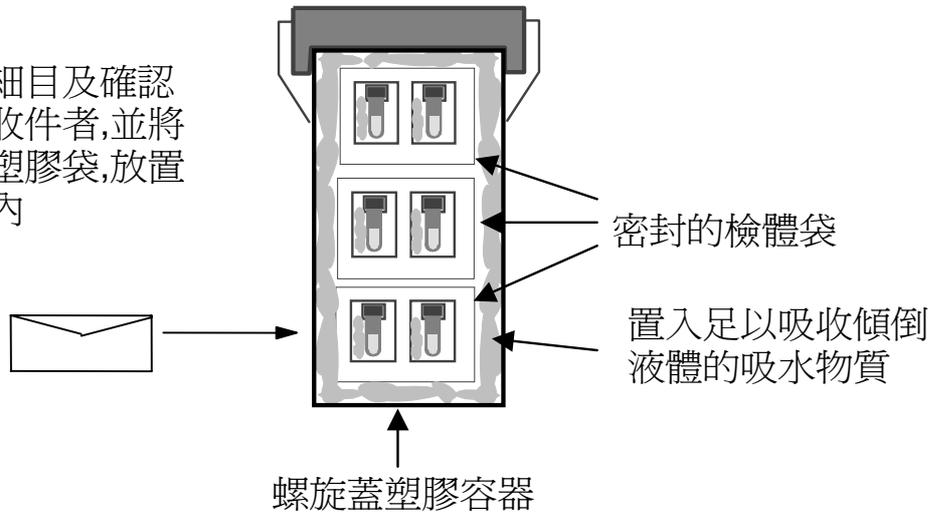




血清檢體各別封於密封袋內

5.1.3.1.2 第二層包裝

詳列檢體細目及確認寄件者與收件者,並將其密封於塑膠袋,放置於外包裝內



5.1.3.1.3 硬質外包裝

List of contents between secondary receptacle and outer packaging



Attach AQIS import permit and customs declaration on outside of packaging

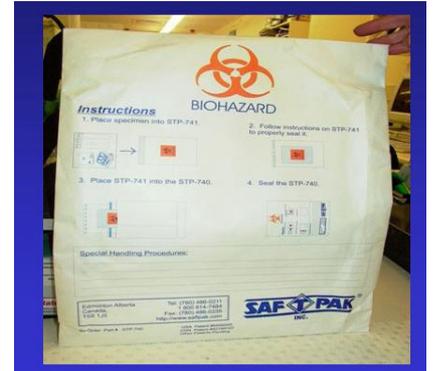
密封於 SafTPak 的檢體瓶組



密封的塑膠袋



密封袋內置放吸水物質



置於 SAFTPAK 外包裝袋

5.1.3.2 Infectious substance category B 運送

5.1.3.2.1 Shipping name : "Diagnostic specimen" 或 "Biological substance, category B"

5.1.3.2.2 UN shipping number : UN3373

5.1.3.2.3 IATA packaging instruction 650

5.1.3.2.4 Maximum net quantity of specimens 4 liters or 4 Kg

5.1.3.3 Infectious substance category A 運送

5.1.3.3.1 IATA packaging instruction 602

5.2 良好實驗規範(Good Laboratory Practise)：

5.2.1 新版實驗手冊(Current laboratory manual)

5.2.1.1 隨時更新

5.2.1.2 目錄

5.2.1.3 實驗步驟：記載試劑組名稱、試劑、批號、供應商、儲存條件、計算過程及測試標準等

5.2.1.4 附件：各式記錄表單

5.2.1.5 在實驗室及辦公室皆有複製版可隨時查閱

5.2.2 生物安全(Biosafety)

5.2.2.1 WHO 實驗室生物安全手冊，詳如

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/

5.2.2.2 操作人員之疫苗接種：針對實驗人員及廢棄物處理人員進行必要的疫苗接種

5.2.2.3 處理傳染性物質後記得洗手

5.2.2.4 離開實驗室以前，務必洗手

5.2.2.5 勤於更換手套

5.2.3 品保計劃(Quality assurance program)

5.2.3.1 In-house controls

5.2.3.2 每天記錄冷藏箱及冷凍箱的溫度

5.2.3.3 定期校正儀器

5.2.3.4 內部稽查計畫

5.2.4 實驗空間設計(Physical layout of work area)

5.2.4.1 足夠寬廣的空間可安全操作實驗

5.2.4.2 區隔傳染性物質及非傳染性物質：如檢體與試劑組置放於不同的冰箱

5.2.4.3 儲放空間的規劃

5.2.4.4 良好的照明

5.2.5 衣著(Clothing)

5.2.5.1 在實驗室操作時要穿實驗衣

5.2.5.2 穿適當的鞋子：最好能包住腳趾，以防危險物質不小心濺到腳上

5.2.5.3 適當的眼鏡：防止操作物噴濺到眼睛內

5.2.5.4 戴手套操作實驗

5.2.6 技術(Technique)

5.2.6.1 遵守操作手冊的步驟操作實驗

5.2.6.2 詳讀試劑組操作說明及注意試劑儲放條件

5.2.6.3 檢查試劑組的有效期限

5.2.6.4 避色氣霧產生，儘量使用吸管而不用傾倒方式處理液體試劑



- 5.2.6.5 避免微量吸管組的前端深入裝有試劑的容器：儘量使用有較長吸管尖的微量吸管，以防試劑污染
- 5.2.6.6 良好溝通(Good communication)
 - 5.2.6.6.1 與機關內其他同事或
 - 5.2.6.6.2 其他組室或
 - 5.2.6.6.3 合約實驗室



5.3 實驗室品保(Laboratory quality assurance)

5.3.1 為何全球實驗室皆需做品保工作

5.3.1.1 維持一致的標準

5.3.1.2 確保所有實驗室所得的數據品質

5.3.1.3 依同一標準作業來提高偵測到麻疹的機會，在進入麻疹消除階段更形重要

5.3.2 實驗室品保的目的

5.3.2.1 發現錯誤

5.3.2.2 發現與期望值的偏遠情形，如較差的試劑組

5.3.2.3 改善效率

5.3.2.4 建立可溯性

5.3.3 實驗室品保的要求

5.3.3.1 管理

5.3.3.2 人員訓練

5.3.3.3 儀器

5.3.3.4 操作流程

5.3.3.5 文件：**詳細的文件記錄目的為建立可追溯性(Traceability)**

5.3.3.5.1 標準操作流程(SOP)

5.3.3.5.1.1 詳細描述實驗步驟，包括有效試驗的判定標準

5.3.3.5.1.2 提供完成試驗的一致性及可信度報告

5.3.3.5.1.3 提供新進人員訓練與指導

5.3.3.5.1.4 降低系統性錯誤

5.3.3.5.2 人員訓練記錄：表列人員的專長，確認需再加強訓練的項目

5.3.3.5.3 儀器維護記錄：確保儀器維持在最佳狀況

5.3.3.5.4 實驗記錄表

5.3.3.5.4.1 日期

5.3.3.5.4.2 操作人員及審核人員

5.3.3.5.4.3 試劑廠牌

5.3.3.5.4.4 試劑批號

5.3.3.5.4.5 有效日期

5.3.3.5.4.6 原始數據

5.3.3.5.4.7 判定結果

5.3.3.5.4.8 判定標準

5.3.3.5.5 庫存管理

5.3.3.5.5.1 檢體存放

5.3.3.5.5.2 試劑存放地點

5.3.3.5.5.3 試劑庫存量

5.3.3.5.5.4 試劑供應商



5.3.3.5.5 各項目負責人

5.3.3.5.5.6 訂貨負責人

5.3.3.6 數據管理及報告

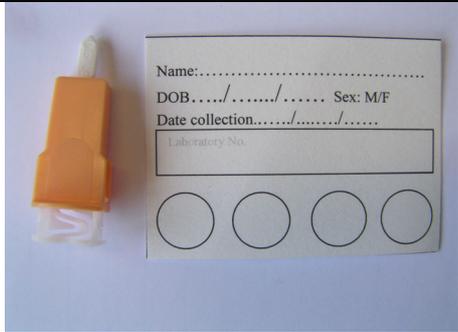
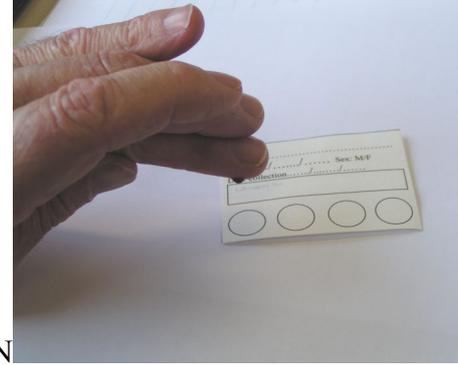
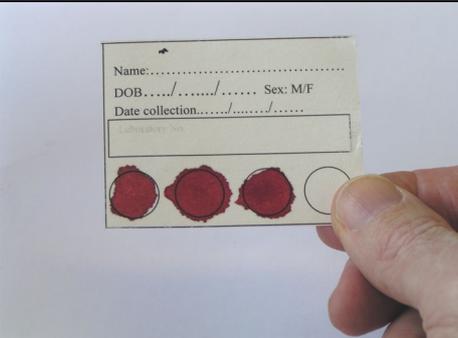
5.3.3.7 庫存管理

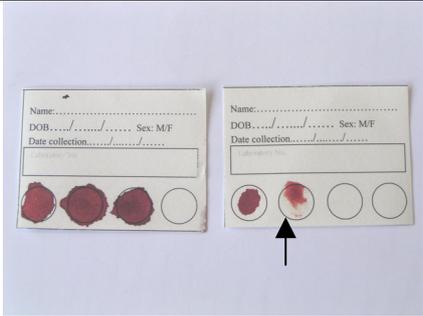
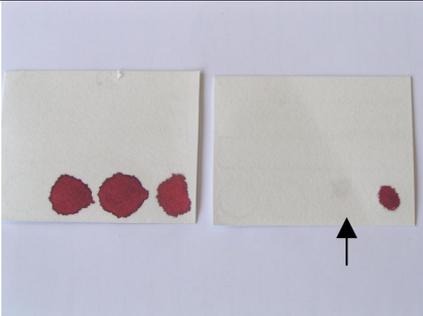
5.3.3.8 取得認證



5.4 如何對濾紙上的乾燥血漬進行 ELISA 抗體檢測(ELISA for dry blood spot)

5.4.1 檢體採集

	<p>採檢用品：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Disportable Sterile lancet 2. Schleicher & Schuell filter paper # 903
	<p>將中指指尖以酒精消毒後，刺入 lancet</p>
	<p>按摩指尖增加血液流到中指指尖</p>
	<p>將血液佈於濾紙片圓圈內，儘可能塗滿卡片上三個圓圈</p>

 <p>採血濾紙正面：箭頭所指處為不合格的檢體，血液量太少</p>	 <p>採血濾紙背面：箭頭所指處為不合格的採檢，血液未浸溼濾紙</p>
	<p>採血卡置放於室溫下風乾，注意沾有血液的部分不要碰到桌面，待濾紙風乾後，即可裝於乾淨夾鍊袋，貯存於 4°C</p>

5.4.2 必備工具及其他試藥與耗材

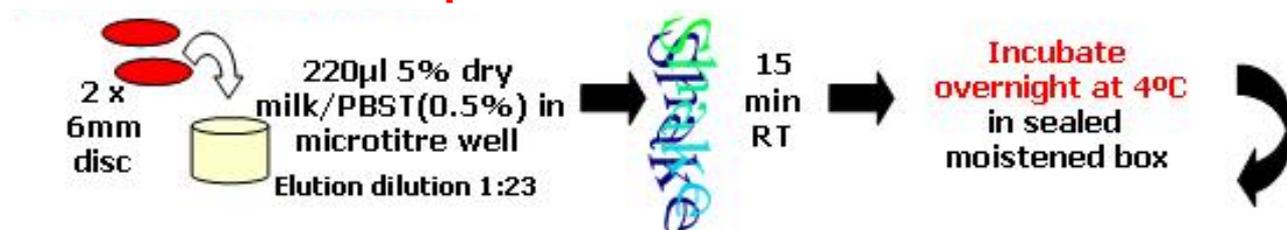
			<p>必備工具：打孔機(6 mm)、微盤震盪器、微盤離心機(選配)</p>
			<p>耗材：溶出 dry blood disk 的容器，96 孔微量平底盤、圓底血清管或微量離心管(較不佳)</p>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Dry milk powder(blotting grade, non fat dry milk, Biorad, Hercules CA, cat# 170-6404) 2. Phosphate buffered saline(Dulbecco A) Oxoid Basingstoke England, cat# BR0014G 3. Tween®20, Merck Hohenbrun Germany, cat# 8.22184.0500 4. 1.2 ml Micro titertube QSP USA (Quantum Scientific) cat#845-Q 			<p>額外準備試藥</p>

5.4.3 實驗步驟

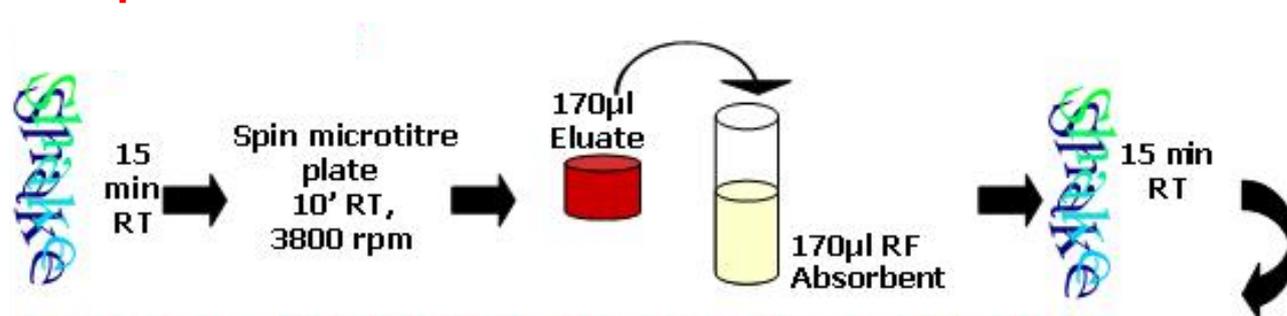
5.4.3.1 針對二個 6 mm dry blood disk



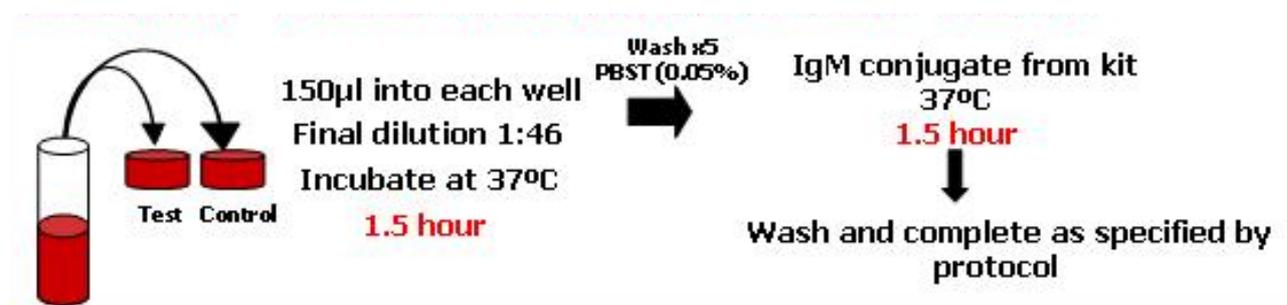
Elution of dried blood spot



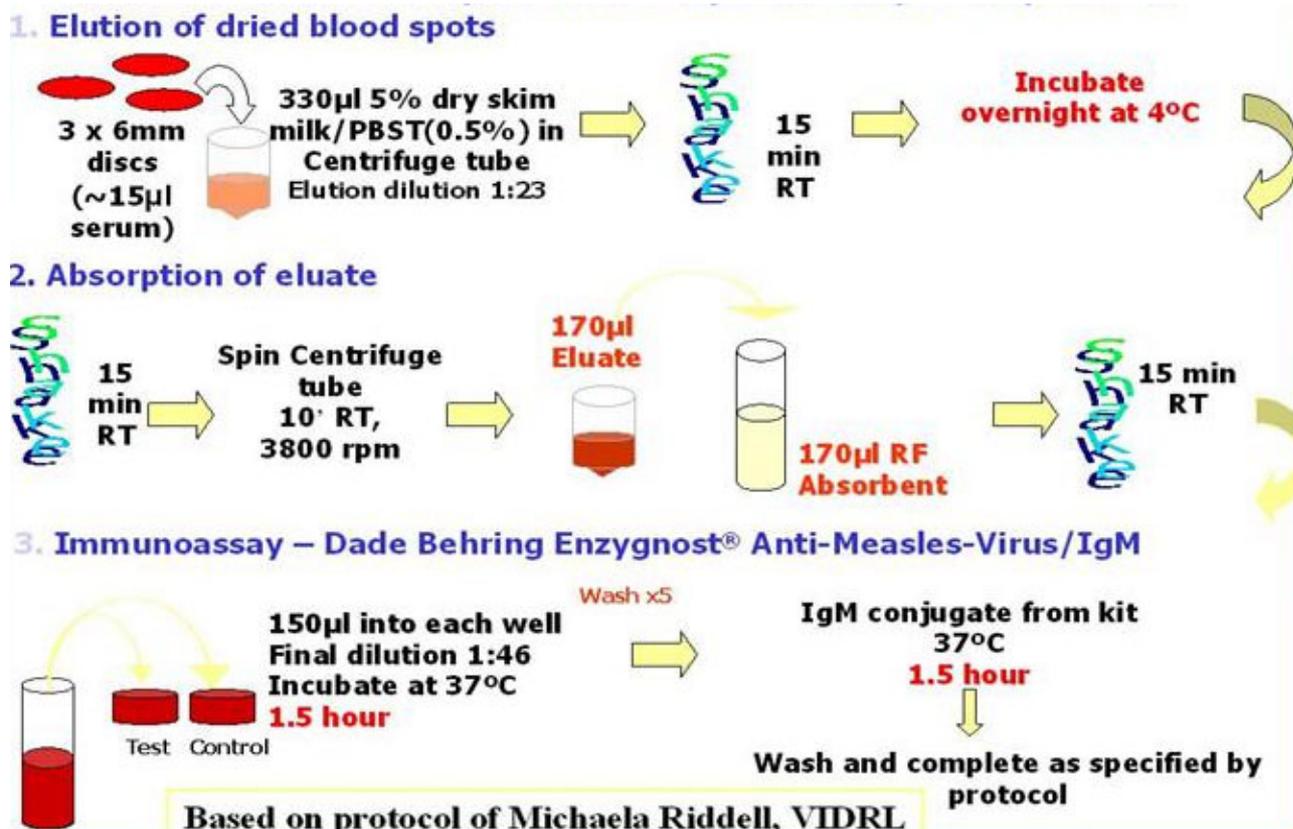
Absorption of eluate



Immunoassay – Dade Behring Enzygnost® Anti-masern-Virus/IgM



5.4.3.2 針對三個 6 mm dry blood disk



5.5 解決 ELISA 試驗遇到的問題(eg Behring meales IgM)

5.5.1 吸光度偏低時的查核項目

- 5.5.1.1 檢體或對照組稀釋比例正確否
- 5.5.1.2 對照組是否多做了吸附動作
- 5.5.1.3 反應溫度正確否
- 5.5.1.4 吸光值波長設定正確否
- 5.5.1.5 試劑是否過期
- 5.5.1.6 試劑使用前是否先於室溫回溫
- 5.5.1.7 對照抗原格吸光值是否偏高(> 0.2)
- 5.5.1.8 conjugate 的稀釋倍率正確否
- 5.5.1.9 substrate 的稀釋倍率正確否
- 5.5.1.10 各試劑使用量正確否
- 5.5.1.11 使用之稀釋試劑的保存期限是否符合試劑組標示

5.5.2 吸光度偏高時的查核項目

- 5.5.2.1 檢體或對照組稀釋比例正確否
- 5.5.2.2 反應溫度正確否
- 5.5.2.3 conjugate 的稀釋倍率正確否
- 5.5.2.4 substrate 的稀釋倍率正確否及是否用乾淨的試管稀釋
- 5.5.2.5 substrate 作用時間是否未避光
- 5.5.2.6 substrate 作用時間是否過長
- 5.5.2.7 微盤清洗儀是否出問題
- 5.5.2.8 是否操作過程中與其他 well 交叉污染
- 5.5.2.9 使用之稀釋試劑的保存期限是否符合試劑組標示

5.5.3 整個微量盤皆呈現陰性反應

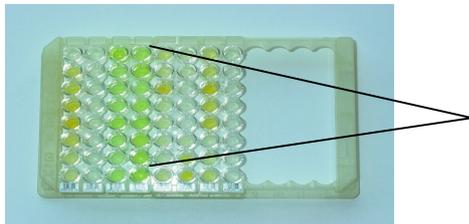


- 5.5.3.1 檢體未加入微量盤
- 5.5.3.2 conjugate 過度稀釋
- 5.5.3.3 呈色質未加入受質稀液
- 5.5.3.4 加入受質後又將誤將其清洗掉
- 5.5.3.5 試劑過期

5.5.4 整個微量盤皆呈現陽性反應

- 5.5.4.1 加入 conjugate 反應後清洗不完全
- 5.5.4.2 substrate 受污染

- 5.5.4.3 加入 substrate 後反應時間過長
- 5.5.4.4 加入 substrate 後未置於室溫反應(如仍放在 37°C)
- 5.5.5 內部品管檢體或二重複試驗檢體再現性不佳
 - 5.5.5.1 檢體與稀釋液混合不當
 - 5.5.5.2 檢體噴濺
 - 5.5.5.3 殘留過量清洗液
 - 5.5.5.4 原檢體污染
 - 5.5.5.5 操作中未更換微量吸管而造成交叉污染
 - 5.5.5.6 微盤吸光度檢測儀出問題
 - 5.5.5.7 微盤清洗儀出問題
 - 5.5.5.8 反應試劑稀釋比率錯誤
- 5.5.6 操作二盤以上的微量盤皆在同一位置出現異常反應



- 5.5.6.1 multichannel pipette 的特定 channel 故障
- 5.5.6.2 微盤清洗儀某一 channel 阻塞
- 5.5.6.3 微盤吸光度檢測儀的
- 5.5.7 操作二盤以上的微量盤皆在同一行出現異反應
 - 5.5.7.1 multichannel pipette 出問題或
 - 5.5.7.2 微盤清洗儀出問題或
 - 5.5.7.3 微盤吸光度檢測儀出問題
- 5.5.8 如何減少錯誤發生
 - 5.5.8.1 記得記錄試劑組批號及有效期限
 - 5.5.8.2 記錄所有試劑稀釋過程及加入反應的體積
 - 5.5.8.3 記錄當次實驗的操作人員
 - 5.5.8.4 記得實驗操作最好放入內部品管之陽性檢體
 - 5.5.8.5 記得更換微量吸管尖及隨時注意儀器校正
 - 5.5.8.6 隨時留意試劑組內附使用說明(不可過度依賴自己的筆記)，因試劑組可能有新的變動

5.6 WHO 全球實驗室麻疹 IgM 血清學能力試驗

5.6.1 目的

5.6.1.1 試驗敏感性：確認真正的 IgM 陽性血清

5.6.1.2 試驗專一性：確認真正的 IgM 陰性血清

5.6.2 實施紀要：

5.6.2.1 panel 00801

5.6.2.1.1 日期：2001-2002

5.6.2.1.2 地區：非洲區(AFRO)、東地中海區(EMRO)、西太平洋區(WPRO)、歐洲區(EURO)、東南亞區(SEARO)

5.6.2.2 panel 00702

5.6.2.2.1 日期：2002/8

5.6.2.2.2 地區：東地中海區(EMRO)

5.6.2.3 panel 01002

5.6.2.3.1 日期：2002/10, 2002/11, 2003/2

5.6.2.3.2 地區：非洲區(AFRO)、歐洲區(EURO)、東南亞區(SEARO)

5.6.2.4 panel 00703

5.6.2.4.1 日期：2004/2, 2004/5, 2004/8, 2004/10

5.6.2.4.2 地區：東南亞區(SEARO)、歐洲區(EURO)、東地中海區(EMRO)、非洲區(AFRO)

5.6.2.5 panel 00704

5.6.2.5.1 日期：2004/8, 2004/9, 2004/12-2005/1, 2005/2-2005/3, 2005/5

5.6.2.5.2 地區：非洲區(AFRO)、東地中海區(EMRO)、東南亞區(SEARO)、歐洲區(EURO)、西太平洋區(WPRO)

5.6.3 測試血清組

5.6.3.1 組合(eg panel 00801)

5.6.3.1.1 麻疹 IgM 陽性(10)

5.6.3.1.2 麻疹 IgM 陰性(5)

5.6.3.1.3 parvo IgM 陽性(2)

5.6.3.1.4 德國麻疹 IgM 陽性(2)

5.6.3.1.5 登革熱 IgM 陽性(1)

5.6.3.2 確認(validation)

5.6.3.2.1 panel 00801

5.6.3.2.1.1 at VIDRL

5.6.3.2.1.1.1 Dade Behring Enzygnost anti-measles virus IgM

5.6.3.2.1.1.2 Chemicon Light Diagnostic Measles IgM Capture Enzyme Immunoassay

5.6.3.2.1.2 at CDC Atlanta USA



5.6.3.2.1.3 at Central Public Health Laboratory, Colindale UK

5.6.3.2.2 其他 panel

5.6.3.2.2.1 at VIDRL

5.6.3.2.2.1.1 Dade Behring Enzygnost anti-measles virus IgM

5.6.3.2.2.1.2 Chemicon Light Diagnostic Measles IgM Capture Enzyme Immunoassay

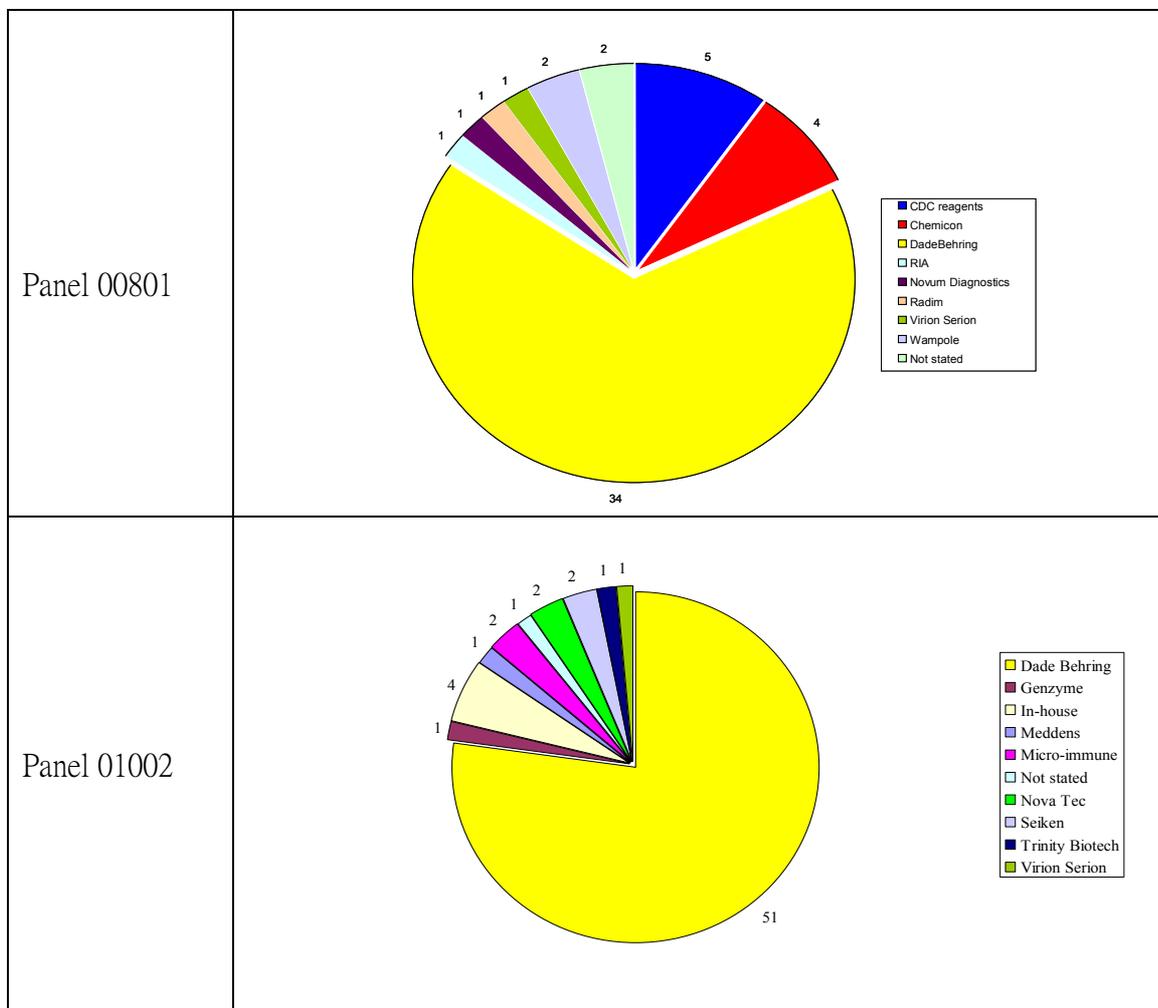
5.6.3.2.2.1.3 Backmen Access anti-rubella virus IgM

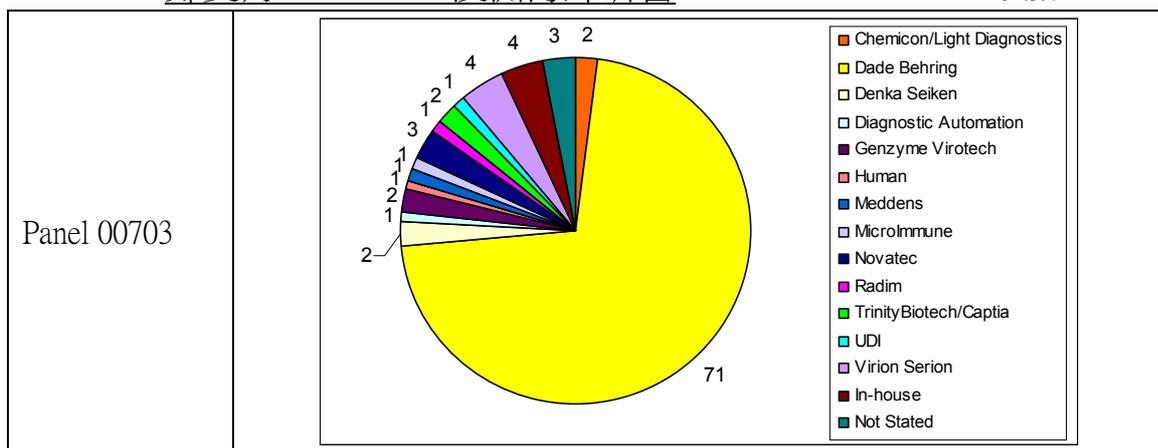
5.6.3.2.2.1.4 Diasorin Rubella IgM Capture Enzyme Immunoassay

5.6.4 全球麻疹 IgM 檢驗使用試劑種類統計

5.6.4.1 以 Dade Behring Enzygnost anti-measles virus IgM 最多，約 75 %

5.6.4.2 其他如 Chemicon Light Diagnostic Measles IgM Capture Enzyme Immunoassay、In-house ELISA、Human、Novatec、Denka Seiken、Trinity.....不到 5 %





5.6.5 Dabe Behring 麻疹 IgM 試劑組與其他試劑組 Performance 比較

Panel No.	Assay	No. of laboratory using assay	Proportion of laboratories with all positives correct	Proportion of laboratories with all negatives correct
01002	Dade Behring	51	82 %	90 %
	Other kits/not stated	11	64 %	64 %
	In-house assay	4	100 %	75 %
07003	Dade Behring	71	72 %	93 %
	Other kits	27	59 %	89 %

5.6.6 歷年 Measles Panel Performance 比較

Panel No.	100 % correct	90-95 % correct	80-85 % correct	<80 % correct
00801 N=46	65 %	31 %	2 %	2 %
00702 N=17	70%	18 %		12 %
01002 N=66	68 %	27 %	3 %	2 %
00703 N=99	58 %	32 %	7 %	3 %



5.7 麻疹 PCR 檢驗與基因分型

5.7.1 目的

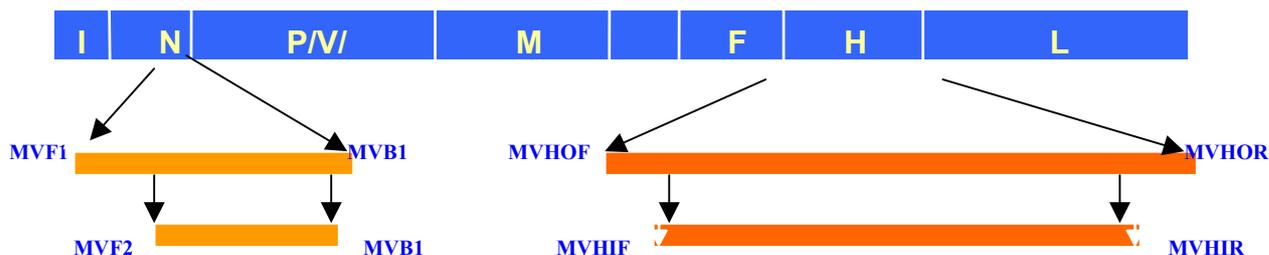
5.7.1.1 監測傳播路徑與

5.7.1.2 境外移入感染源追蹤

5.7.2 基因分型的標的基因片段

5.7.2.1 N 基因-COOH 端 456 核苷酸序列

5.7.2.2 H 基因全部序列

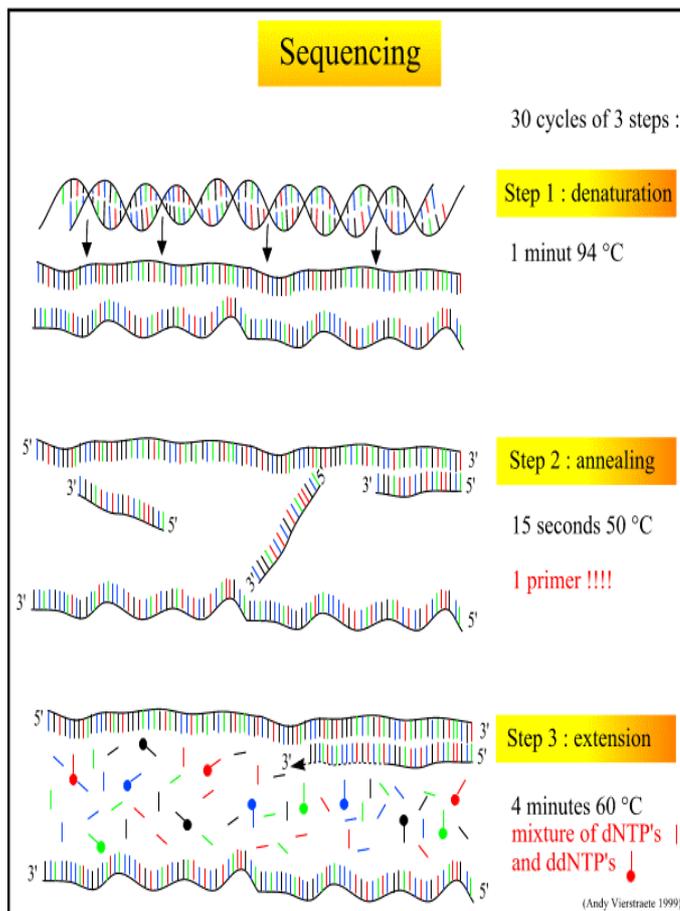


5.7.3 步驟

5.7.3.1 RT-PCR-Nested PCR

5.7.3.2 PCR 產物純化

5.7.3.3 PCR 產物定序(含 forward 及 reverse)



3 steps involved

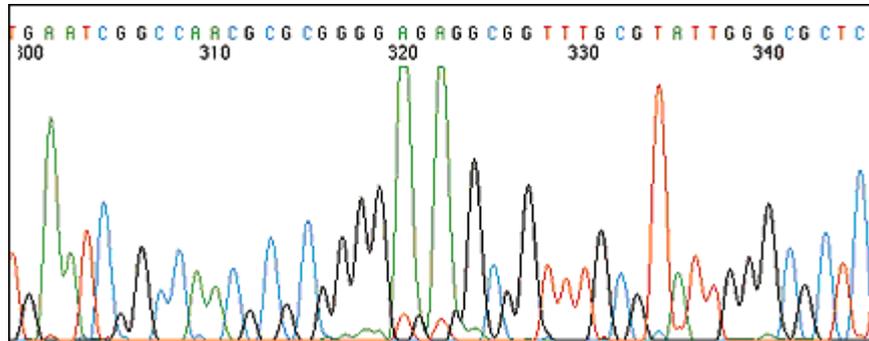
1. Denaturation (96°C): double stranded DNA template separates

2. Annealing (50°C): sequencing primer anneals to target

3. Extension (60°C): Bases (dNTPS and ddNTPs) complementary to template are added to the annealed primer by DNA polymerase.
When a ddNTP is incorporated, the extension reaction stops.

5.7.3.4 產生定序圖譜(Electropherogram)

- 5.7.3.4.1 螢光標記片段通過 gel 或毛細管
- 5.7.3.4.2 獨特的螢光發射後透過像機記錄
- 5.7.3.4.3 軟體決定每一個位置最可能的核苷酸
- 5.7.3.4.4 產生定序圖



5.7.3.5 定序資料分析

- 5.7.3.5.1 排列 forward 及 reverse 的定序資料
- 5.7.3.5.2 完成 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)搜尋
- 5.7.3.5.3 透過演化樹的繪製決定基因型別

5.7.4 麻疹基因型命名

- 5.7.4.1 目前共有 8 群組(Clade) A-H 共 22 種基因型
- 5.7.4.2 每一基因型皆有特定的參考病毒株(記錄分離之地理區及年代)
- 5.7.4.3 WHO 對新基因型的認定標準
 - 5.7.4.3.1 N 基因-COOH 端 456 個核苷酸序列與標準株的序列差異達 2.5 %以上
 - 5.7.4.3.2 H 基因全長核苷酸序列與標準株差異達 2 %以上

Table 1. Reference strains to be used for genetic analysis of wild-type measles viruses: 2003

Tableau 1. Souches de référence pour l'analyse génétique des virus rougeoleux sauvages: 2003

Genotype Génotype	Status ^a Activité ^a	Reference strains (MVi) ^b Souche de référence (MVi) ^b	H gene accession Accession au gène H	N gene accession Accession au gène N
A	Active	Edmonston-wt.USA/54	U03669	U01987
B1	Inactive	Yaounde.CAE/12.83 "Y-14"	AF079552	U01998
B2	Inactive	Libreville.GAB/84 "R-96"	AF079551	U01994
B3	Active	New York.USA/94	L46752	L46753
		Ibadan.NIE/97/1	AJ239133	AJ232203
C1	Active	Tokyo.JPN/84/K	AY047365	AY043459
C2	Active	Maryland.USA/77 "JM"	M81898	M89921
		Erlangen.DEU/90 "WTF"	Z80808	X84872
D1	Inactive	Bristol.UNK/74 (MVP)	Z80805	D01005
D2	Active	Johannesburg.SOA/88/1	AF085198	U64582
D3	Active	Illinois.USA/89/1 "Chicago-1"	M81895	U01977
D4	Active	Montreal.CAN/89	AF079554	U01976
D5	Active	Palau.BLA/93	L46757	L46758
		Bangkok.THA/93/1	AF009575	AF079555
D6	Active	New Jersey.USA/94/1	L46749	L46750
D7	Active	Victoria.AUS/16.85	AF247202	AF243450
		Illinois.USA/50.99	AY043461	AY037020
D8	Active	Manchester.UNK/30.94	U29285	AF280803
D9	Active	Victoria.AUS/12.99	AY127853	AF481485
E	Inactive	Goettingen.DEU/71 "Braxator"	Z80797	X84879
F	Inactive	MVs/Madrid.SPA/94 SSPE	Z80830	X84865
G1	Inactive	Berkeley.USA/83	AF079553	U01974
G2	Active	Amsterdam.NET/49.97	AF171231	AF171232
G3	Active	Gresik.INO/17.02	AY184218	AY184217
H1	Active	Hunan.CHN/93/7	AF045201	AF045212
H2	Active	Beijing.CHN/94/1	AF045203	AF045217

^a Active genotypes that have been isolated within the past 15 years. – Génotypes actifs qui ont été isolés au cours des 15 dernières années.

^b WHO name. Other names that have been used in the literature appear in quotation marks. – Nom OMS. Les autres noms utilisés dans la littérature apparaissent entre guillemets.



5.8 參觀 Virus Identification laboratory

5.8.1 病毒檢測方法

5.8.1.1 病毒分離

5.8.1.1.1 耗時

5.8.1.1.2 提供基因分型及參考材料

5.8.1.2 直接抗原螢光檢測

5.8.1.2.1 快速

5.8.1.2.2 需要感染的細胞

5.8.1.3 PCR

5.8.1.3.1 快速

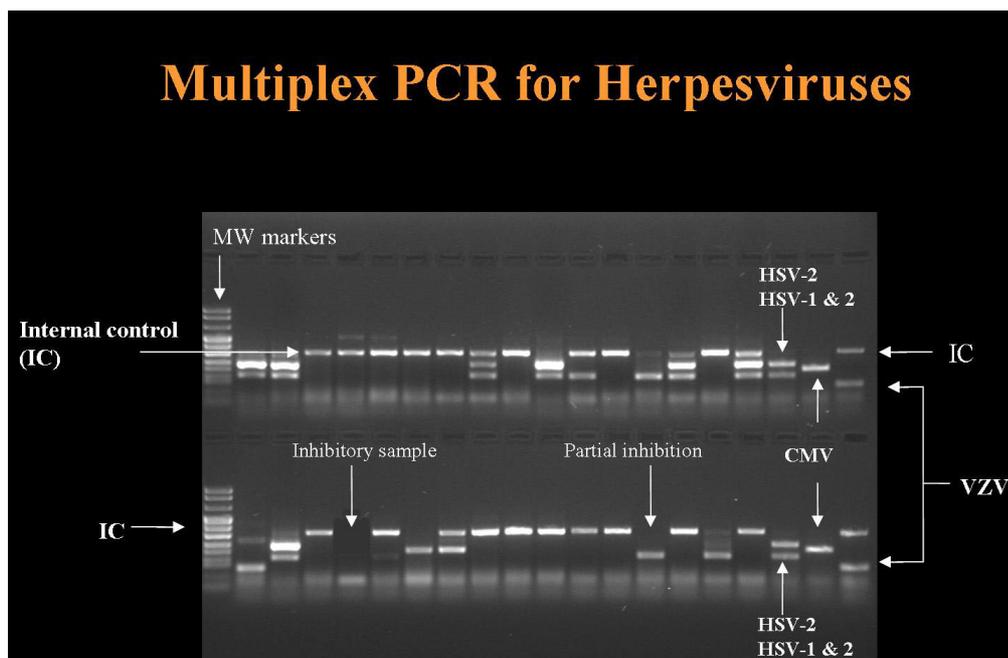
5.8.1.3.2 靈敏度高

5.8.1.3.3 可同步檢測多種病毒

5.8.1.3.4 適用各種檢體類型

5.8.2 提供的病原檢測 PCR 服務

5.8.2.1 HSV 複合檢測：同時偵測 HSV-1、HSV-2、CMV 及 VZV



5.8.2.2 呼吸道病毒 PCR：Influenza(A、B)、RSV、Parainfluenza(1,2,3)、Adenovirus、Rhinovirus

5.8.2.3 腸病毒 PCR

5.8.2.4 其他 DNA 病毒：HHV-6、HHV-8、EBV、Parvovirus、Toxoplasma、Chlamydia pneumoniae/psittaci、Mycoplasma pneumoniae、Borbetella pertussis

5.8.2.5 其他 RNA 病毒：Rubella、Mumps、Measles、Coronavirus、Flavivirus、hMPV

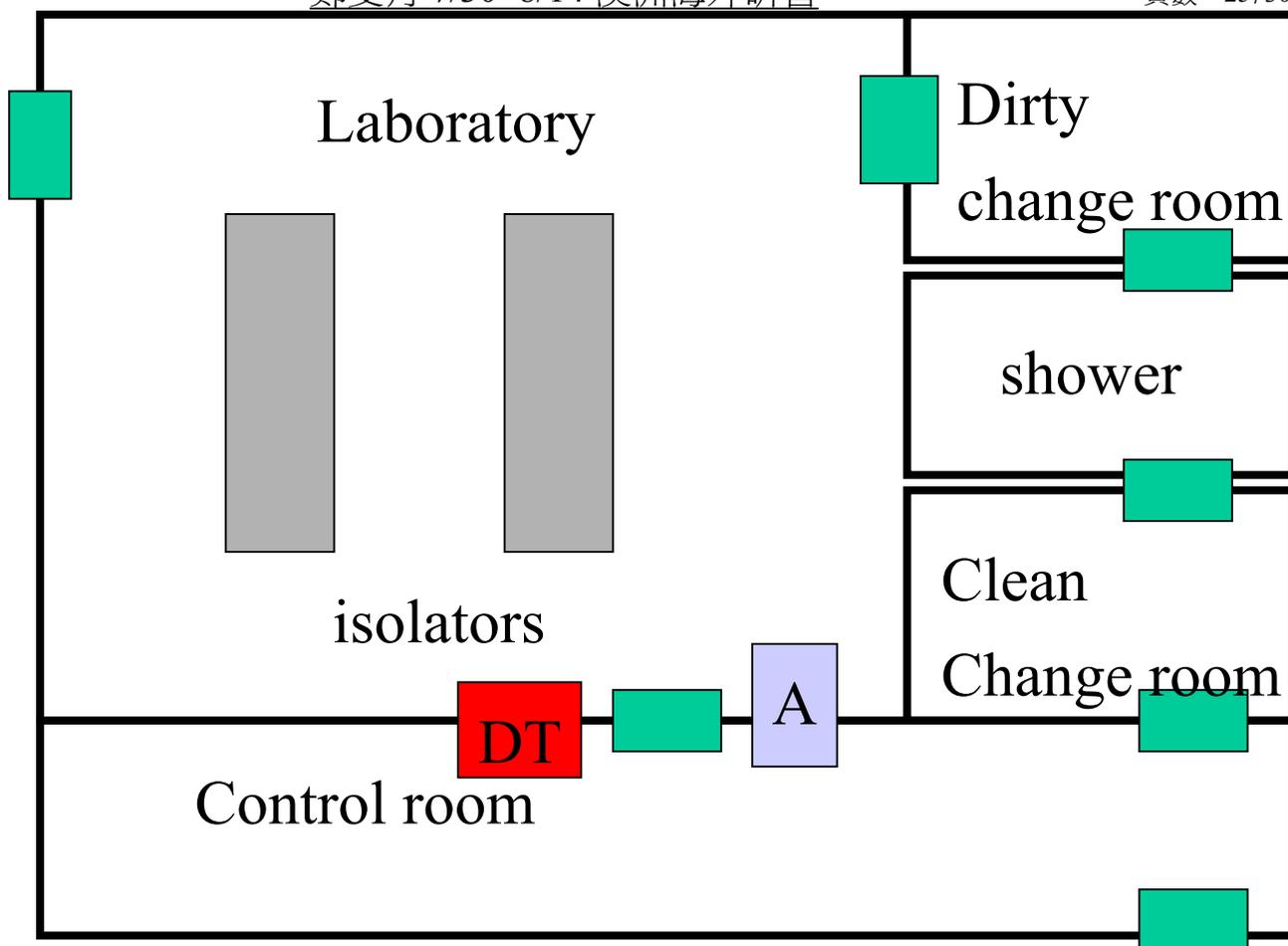
5.8.3 其他試驗

5.8.3.1 HSV 抗藥性實驗

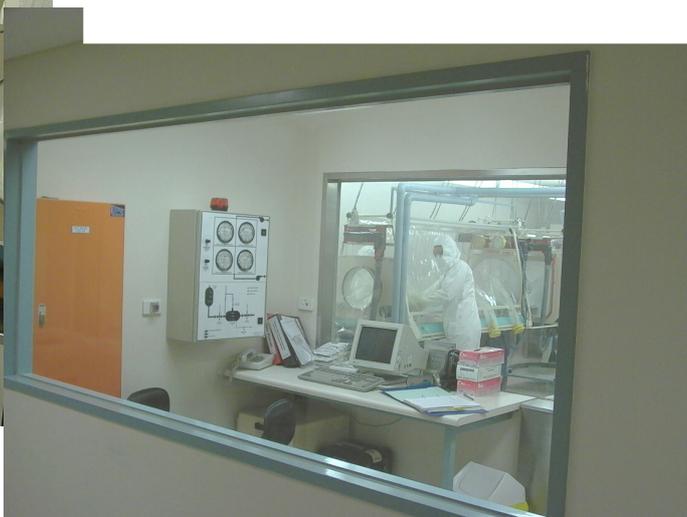


- 5.8.3.1.1 HSV 造成的臨床表徵
 - 5.8.3.1.1.1 HSV-1：主要為口唇疱疹
 - 5.8.3.1.1.2 HSV-2：生殖器潰瘍
- 5.8.3.1.2 HSV 感染的治療：Acyclovir
- 5.8.3.1.3 抗藥性產生原因
 - 5.8.3.1.3.1 HIV 感染
 - 5.8.3.1.3.2 器官或骨髓移植後的藥物治療
- 5.8.3.1.4 抗藥性測試方法：Phenotyping
 - 5.8.3.1.4.1 做法：在含有比平常高劑量的藥物下培養病毒
 - 5.8.3.1.4.2 適用於容易培養的病毒及
 - 5.8.3.1.4.3 抗藥性的突變尚不清楚者
- 5.8.3.2 CMV 抗藥性實驗
 - 5.8.3.2.1 CMV 感染
 - 5.8.3.2.1.1 Congenital infection
 - 5.8.3.2.1.2 Grandular fever-like syndrome
 - 5.8.3.2.1.3 Pre-emptive therapy for solid organ or bone marrow transplant
 - 5.8.3.2.2 CMV 感染的治療：Ganciclovir
 - 5.8.3.2.3 抗藥性產生原因
 - 5.8.3.2.3.1 HIV 感染
 - 5.8.3.2.3.2 器官或骨髓移植後的藥物治療
 - 5.8.3.2.4 抗藥性測試方法：Genotyping
 - 5.8.3.2.4.1 分析基因中與抗藥性有關的序列以指出突變
 - 5.8.3.2.4.2 適用於不易培養的病毒
 - 5.8.3.2.4.3 抗藥性突變位置已知者
 - 5.8.3.2.4.4 HSV Phenotypic resistance 建立後的參考方法
- 5.8.4 國家高安全性檢疫實驗室(National High Security Quarantine Laboratory)
 - 5.8.4.1 安全防護第四等級設備(Physical containment level 4 facility)
 - 5.8.4.1.1 提供實驗空間及
 - 5.8.4.1.2 測試方法及
 - 5.8.4.1.3 有能力處理致死病毒的人員
 - 5.8.4.2 PC4 病毒的定義
 - 5.8.4.2.1 高致死率
 - 5.8.4.2.2 外來的
 - 5.8.4.2.3 通常沒有特殊治療方法者
 - 5.8.4.2.4 例如：Ebola virus、Smallpox、SARS、Avain flu
 - 5.8.4.3 PC4 的配置及相關照片





Inside PC4 Laboratory



Control Room



5.9 分子演化分析工具

5.9.1 Phylip 分析軟體

5.9.1.1 免費的分析軟體，用於繪製演化樹圖

5.9.1.2 bootstrap protocol

5.9.1.2.1 open Genedoc(as previously derived from phylogenetic protocol)

5.9.1.2.2 Select Export, prepare infile

5.9.1.2.3 Open Seqboot.exe

5.9.1.2.4 For random number: select 389

5.9.1.2.5 Type R, then enter

5.9.1.2.6 Number of replicates: type 1000

5.9.1.2.7 When prompted to save, say Yes. This now becomes an outfile

5.9.1.2.8 Delete existing infile and rename outfile to infile

5.9.1.2.9 Open DNADist.exe

5.9.1.2.10 Type in D, then enter

5.9.1.2.11 Type in D, then enter

5.9.1.2.12 Type in M and 1000 data sets, then enter. This generates another outfile

5.9.1.2.13 Delete infile and rename outfile to infile

5.9.1.2.14 Open Neighbour.exe

5.9.1.2.15 Type in J

5.9.1.2.16 Type in 389

5.9.1.2.17 Type in M, then enter

5.9.1.2.18 Type in 1000, then enter.(ie. 1000 data sets). This generates another outfile and treefile

5.9.1.2.19 Open Consense.exe

5.9.1.2.20 No changes to be made here, so type in Yes. This creates another treefile

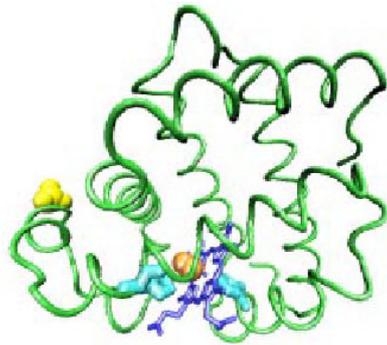
5.9.1.2.21 Go to Tree, Show internal edge labels

5.9.1.2.22 Need to transfer the percentages derived from the bootstrap process back to the Treefile (non-boot)

5.9.2 VMD 軟體

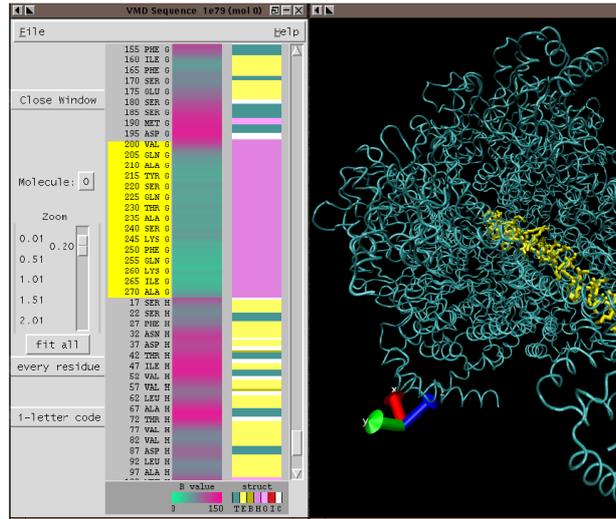
分子圖型程式用以立體顯示與分析如蛋白質、核酸等的交互作用





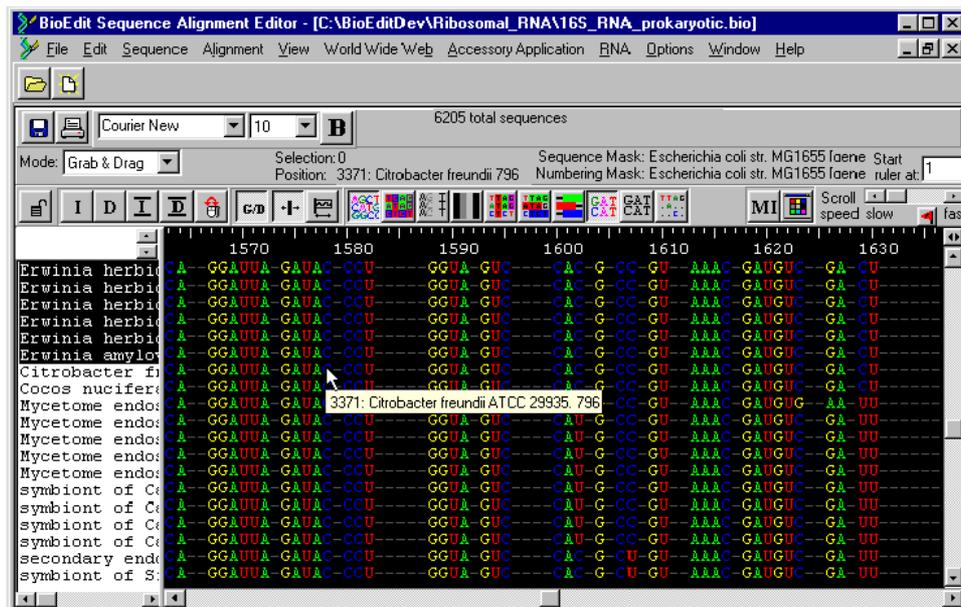
在 VMD 軟體呈現下 myoglobin

查看蛋白質分子某段胺基酸序列的立體位置圖



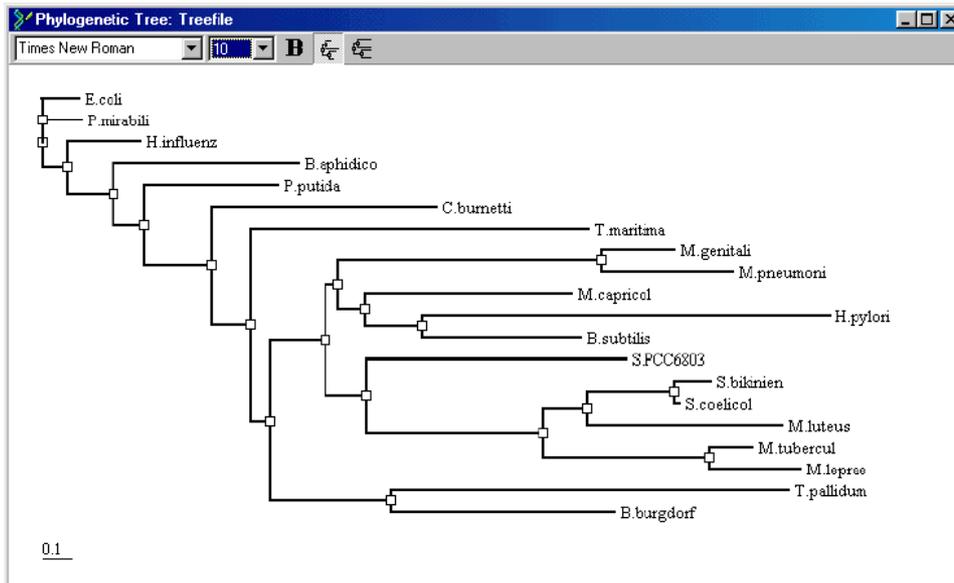
5.9.3 Bioedit 軟體

提供蛋白質或核酸序列的編輯、比對、操作與分析



核酸序列比對





開啓 phylip 軟體繪製之演化樹



開啓 ABI 定序儀產生的檔案

6 心得：

6.1 新技術研習…利用 Dry blood spot 檢驗麻疹 IgM 抗體：

最初研發的目的是針對開發中國家落後的醫療及冷藏設備，其優點是血液採集較一般靜脈採血的技術訓練要求低，且採集後的檢體可在室溫下放置且方便運送(採血的濾紙片以郵件方式於室溫輸送即可)。希望能在本實驗室建立此檢驗系統，對於嬰幼兒通報個案必需採血而又有實際困難者用此方法採檢。

本中心目前麻疹血清學 IgM 診斷所使用的試劑組與 VIDRL 使用的相同(Dade Behring)，在全球麻疹 IgM 血清學能力試驗分析報告中約 70 %參與國家皆使用此一廠牌試劑，而 Dry blood spot 的發展也是配合此一廠牌試劑稍做 Modify 後進行。

6.2 麻疹 IgM 血清學能力試驗：

2002 年開始，WHO 針對麻疹根除議題開始對各區域內的麻疹相關實驗室進行能力試驗，由於我們非 WHO 的會員國，故未包含在其中，先前藉由電子郵件聯繫 VIDRL(WHO 在西太平洋區的麻疹及小兒麻痺參考實驗室)時，已要求其將我們納入測試國家，讓實驗室可借由測試報告的詳細數據分析，瞭解實驗室檢驗數據是否存在系統性誤差，以為實驗室品管改進依據。

此次到 VIDRL 研習的同時再度要求參與麻疹 IgM 血清學能力試驗，在回國之前 20 隻血清學的測試檢體已隨同小兒麻痺的測試檢體先行寄回國內，檢測項目為麻疹及德國麻疹 IgM，測試結果有一隻答案不符-麻疹 IgM 陽性，但我們的檢測結果為 Equivocal，德國麻疹 IgM 檢驗結果則完全相符。由於是第一次參加，我們的 PANEL 不確定是否為重新組合或是前五次測試中的任何一組，已去信要求可否分析我們的原始數據與其他實驗室比較是否有系統性的偏高或偏低，以找出測試結果不符合的原因，同時亦再次要求，以後針對西太平洋區域的國家或東南亞區域國家進行能力測試可否將我們的實驗室一併納入其中。

6.3 麻疹疑似新基因型的發現：

在與 viral identification unit 之麻疹參考實驗室人員請教有關麻疹基因分型的問題時，針對已完成的研究計劃部份數據(N 基因片段)分析發現，疑似出現除 WHO 最新公佈的 22 種麻疹病毒株基因型外的**新型(suspected H3)**，由於數據尚未完整，需再加入 H 基因的分析資料，再將數據與美國 CDC 確認，刻正進行中。



7 建議：

7.1 品保工作再加強

7.1.1 pipette 定期校正

7.1.2 timer 校正

7.1.3 監控冷藏及冷凍設備溫度變化：確保試藥及檢體品質

7.1.4 記錄留存

7.2 血清學試驗除試劑本身的控組外，需再帶入 in-house positive control，加強對試劑品管的監控

7.3 PCR 試驗除 positive 及 negative control 外，可考慮在原檢體中加入 internal control，確保檢體中未有 PCR 反應的抑制性物質存在而造成反應的偽陰性，主要依賴 PCR 檢驗發報告的項目需注意

7.4 實驗衣著 VIDRL 與本地實驗室用者不同(見下圖)，較像外科手術衣由後面綁帶子，袖口則是鬆緊帶設計，以防上液體噴濺及寬大袖口在操作實驗中不小心揮倒物品，而實驗室不像我們進門需要換鞋，但要求在實驗場所不得穿涼鞋類等未包住腳趾頭的鞋子，以防操作中實驗液體不小心滴落造成傷害，我們進實驗室所換拖鞋可考慮改換全包式似乎較符合實驗室安全規範。



實驗衣後扣式，
前面無接縫



鬆緊帶袖口

包住腳趾頭的鞋