

保存型與去活化型病毒檢體運送培養基的效能評估

徐邦晏，趙育德*，曾冠錡，歐柏廷，龔思豪#

國立陽明大學醫學生物技術暨檢驗學系，台北市，台灣

摘要

病毒檢體運送培養基(transport media)的主要功能是保存檢體中病原體的活性、抗原及核酸，其可避免檢體在運送過程中受到污染。由於新冠病毒(SARS-CoV-2)肺炎疫情(COVID-19)的爆發，其診斷係以拭子(swab)採集呼吸道檢體進行分子檢測及/或養殖細胞接種。啟新生物科技有限公司於2020年上市兩種通用型病毒檢體運送培養裝置，一為保存型CMP™ viral transport medium w/oropharyngeal and/or nasopharyngeal flocked swab (VTM)，可供 P2+或 P3 等級檢驗室分離病毒及進行分子檢測；另一為去活化型 CMP™ inactivated viral transport medium w/oropharyngeal and/or nasopharyngeal flocked swab (I-VTM)，僅可供檢驗室進行病毒之分子檢測。為了驗證此兩種病毒檢體運送培養基的效能，吾等根據 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)之病毒運送系統之規範 M40-A2 (2014)，選取與 SARS-CoV-2 同屬 RNA 病毒的腸病毒 71 型(Enteroviruses 71, EV 71)進行效能評估。測試時分別將 10^3 PFU (plaque forming unit) 病毒量接種至 VTM 或 I-VTM 中，並模擬病毒檢體的運送及保存條件，分別將兩種裝置的運送培養基置於 4°C、-80°C 及室溫，並分別貯存不同的指定時間點（在 4°C 保存 6、24、48、72 及 96 小時，而在 -80°C 及室溫保存 48、72 及 96 小時。此外，I-VTM 在各測試溫度額外保存 10 分鐘、30 分鐘、1、2、3 及 4 小時）後將 VTM 或 I-VTM 內的 EV 71 分別移種於人類橫紋肌肉瘤細胞(human rhabdomyosarcoma cell line, RD cell)中，接著在 5% CO₂ 培養箱中，培養 48-72 小時後觀察 RD cell 的細胞病變效應(cytopathic effects, CPE)以及利用反轉錄-即時聚合酶鏈反應(quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)偵測 EV 71 核酸 (RNA)。本研究亦利用 SARS-CoV-2 檢測所用的三對基因片段 (E gene、RdRp gene 及 N gene)，以如同 EV 71 在 VTM/I-VTM 的測試條件下進行測試，結果顯示：(i) VTM 在 4°C、-80°C 及室溫的貯存指定時間點皆能完整保存 EV 71 之活性，而在 RD cell 產生 CPE；(ii) I-VTM 在與 EV 71 接觸 2 小時後可將 10^6 PFU 的病毒完全裂解而將病毒去活化(滅活)；(iii) VTM 及 I-VTM 在各種測試條件下皆能保存 EV 71 核酸及 SARS-CoV-2 之核酸而分別可被 qRT-PCR 方法檢出。基於上述的發現，吾等認為 VTM 及 I-VTM 適合用於病毒檢體的運送，個別檢驗室可根據病毒的檢驗方法、檢驗室設施的安全等級、檢驗標的病毒的風險等級(risk group)等選擇保存型或去活化型病毒檢體運送裝置輔助各種病原的檢測。

關鍵字：腸病毒 71 型、新冠病毒、病毒檢體運送培養裝置、細胞病變效應、反轉錄-即時聚合酶鏈反應

言

臨床上，病毒的感染需要進行診斷，才

能提供醫師治療的依據、流行病學的訊息以及病毒感染的防治。病毒的實驗室診斷方法包括以養殖細胞分離病毒、組織學、血清學、電子顯微鏡觀察、免疫分析以及核酸(DNA 或 RNA)偵測等方法^[1-2]，操作這些方法前，須從疑似病毒感染的患者適當的部位採集各種檢體，並儘速運送至檢驗室進行實驗室診斷^[2]。病毒感染的診斷準確性受到各種因子

* 同第一作者具有相等的貢獻度

通訊地址：國立陽明大學醫學生物技術暨檢驗學系
龔思豪

112 台北市北投區立農街二段 155 號
生醫工程館 3 樓

電話：02-28267034

E-mail address：szkung@ym.edu.tw

影響：(i)檢體的採檢時機：檢體通常在症狀出現後的3天內採檢；(ii)採檢部位的選擇：如呼吸道感染，選擇利用拭子(swab)採集呼吸道檢體；(iii)檢體的方式：如採檢體液或利用拭子採檢後放入無菌的空容器、小瓶(vials)或裝有液體運送培養基(transport medium)的容器(如試管)；(iv)採檢的拭子的本質：拭子的材質以植絨(flock)材質為佳^[2-3]，並具有塑膠或鋁材質的硬柄或軟柄，不可使用木柄的棉棒，因其對養殖細胞具有毒性；也不可使用海藻酸鈣(calcium alginate)成分的拭子，因其對含包膜(envelope)的病毒具有毒性、並可干擾螢光抗體試驗以及抑制一些核酸物質而影響核酸的分子生物檢測；(v)檢體的運送時間、儲存環境以及(vi)其它：如採集技術、採集的檢體量、檢體標示以及患者的臨床資訊等^[1,3]。

有些病毒感染的實驗室診斷是必要的，例如檢測會引起嚴重症狀的病毒[如後天免疫缺乏症候群(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)的愛滋病毒(HIV)]或是長期的潛伏的病毒〔如長期潛伏於肝臟的B型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)和C型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)〕；或在短時間內能快速傳播及引起高致死率的病毒，如：2003年爆發流行的SARS病毒(SARS-CoV)^[4]及2019年爆發流行的新型冠狀病毒(SARS-CoV-2, COVID-19病毒)^[5]。此外，已經有藥物可以治療的病毒感染，或為了流行病學調查、醫院感染控制、公共衛生如隔離等目的而進行檢體的採集並進行各類病毒的檢測。

病毒檢測檢體除了體液〔如支氣管肺泡灌洗(BAL)、腦脊髓液(CSF)、尿、血液〕外，若以拭子採集的檢體需放入空的無菌容器或含有運送培養基的容器內，立即以適當的條件送至檢驗室或儲存在適當的環境一段時間再送至檢驗室。因此，病毒檢測檢體中的抗原、活性、病毒量與核酸將受到拭子的本質、

運送培養基的成分、運送的條件、儲存的時間與環境等之影響^[1,3]。為了保存病毒的活性以及核酸，檢驗室有必要使用良好品質與材質的拭子以及適當的檢體運送培養基種類。

對少數引起嚴重疾病的病毒而言，檢測病毒必須在P2+或P3甚至P4等級的負壓實驗室中進行，以SARS-CoV及SARS-CoV-2而言，更是如此。然而，有此些安全等級的實驗室在醫院中並不普遍，因此，對高傳染性的病毒而言，整體的檢驗能量將受到限制。在SARS-CoV-2疫情期間，增加全國的檢測能量以早期偵測感染或潛伏的患者將有其重要性及必要性。對不進行病毒分離培養而僅提供核酸擴增試驗的檢驗室而言，只要檢測檢體先經去活化(inactivate, 滅活)處理，則檢測的場所僅需在P2等級的實驗室即可進行操作，如此，將可擴展全國對SARS-CoV-2病毒的整體檢測能量。

在台灣，具有病毒檢測能力的檢驗室雖有能力配製一般病毒檢體的運送培養基，但其使用前大多未進行實用的效能評估或進行效能的品管，且常沒有使用正確材質成分的拭子，有鑑於此，啟新生物科技公司開發兩種病毒檢測檢體的運送裝置：一為CMP™病毒運送保存管[viral transport medium (VTM)]，另一為CMP™去活化型病毒運送保存管[inactivated viral transport medium (I-VTM)](圖1A)，兩者皆可搭配鼻咽及/或口咽植絨拭子(flocked swab)。植絨拭子皆具有斷點(圖1B)，可將拭子前端折進運送管內。為了瞭解VTM與I-VTM輔助病毒(包含SARS-CoV-2)偵測的效能，有必要以適當的病毒進行實用性評估。

早期，對於運送檢體裝置的病毒回收率並沒有標準的方法，只有少數的研究從臨床取得的檢體，經由不同運送裝置來比較病毒的回收率；或是添加某種病毒檢體至運送裝置，檢視回收率。為了將運送培養裝置的

評估加以標準化，Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M40-A2^[6]提出明確規範，包括病毒檢體的種類、運輸時間、保存溫度及病毒接種濃度上限範圍。在規範中，將裝置保存在指定溫度，模擬運輸時間（24、48、72 及 96 小時），再分別製備十倍連續稀釋液，吸取 0.2 mL 接種至養殖細胞中，若產生細胞病變效應(cytopathic effects, CPE)，代表病毒具有活性，即運送裝置保存病毒的性能符合規範之要求。

本研究將根據 CLSI 建議選用第二級病毒^[6]之一的腸病毒 71 型(Enterovirus 71, EV 71) 進行測試，EV 71 屬於微小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)，不具包膜(envelope)的單股正股 RNA 病毒，由於不具包膜，對於環境的耐受力較高^[7]，且其與冠狀病毒科(Coronaviridae)中的 SARS-CoV 與 SARS-CoV-2 皆屬於 RNA 病毒^[4-5]。實驗時，將 EV 71 分別與 VTM 或 I-VTM 兩種運送培養基混合，保存於三種溫度，然後於不同指定時間後，分別接種至人類橫紋肌肉瘤細胞(human rhabdomyosarcoma cell, RD 細胞)中，之後觀察 CPE 及利用反轉錄-即時聚合酶鏈反應(quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)偵測 RD 細胞內 EV 71 之正股及負股 RNA，其中細胞內正股 RNA 代表 EV 71 成功感染細胞，而細胞內負股 RNA 為 EV 71 複製其 RNA 的中間產物，可間接證明 EV 71 於 RD 細胞內複製。另外，本研究利用 SARS-CoV-2 的三對基因^[8-9]分別與 VTM 或 I-VTM 混合，亦進行如同 EV 71 在不同保存溫度及時間條件下的 qRT-PCR 檢測，以了解此 VTM 及 I-VTM 保存 SARS-CoV-2 核酸的能力。

材料及方法

測試細胞與病毒株

人類橫紋肌肉瘤細胞株 (human rhabdomyosarcoma cell line, RD, ATCC CCL-136)、

非洲綠獼猴腎細胞株(vero cell line, ATCC CCL-81)及 EV 71 (BrCr, ATCC VR784)均購自食品工業發展研究所，台灣。SARS-CoV-2 的三對引子(primers)基因片段 (E gene、RdRp gene 及 N gene)，購自 MicroBioLogics® (型號: HE0062S)，USA。

試劑與藥品

一倍基本培養液(1x minimal essential medium, MEM)與抗生素(antibiotic-antimycin, 內含 penicillin、streptomycin、amphotericin B)購自 Corning Incorporated 公司，美國。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶(Trypsin)與一倍磷酸鹽緩衝液(1x phosphate buffer saline, PBS)來自 GE Healthcare 公司，美國。甘油(Glycerol)、氯仿(chloroform)、75% 酒精 (EtOH)、異丙醇(isopropanol)與 DEPC (diethylpyrocarbonate)處理水從 Merck 公司(德國)取得。螢光定量試劑盒(FastStart Universal SYBR Green Master)購自 Roche 公司，瑞士。而 cDNA 反轉錄試劑盒 (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit)及 trizol (分離 RNA、DNA、蛋白質的試劑)來自 Thermo Fisher Scientific 公司，美國。

細胞培養液配製(10% MEM、2% MEM)

取總體積 10% 的 FBS 及 1% 的抗生素的加入 1x MEM，此為生長培養液(10% MEM)，存放於 4°C 用於細胞繼代及培養。取總體積 2% 的 FBS 及 1% 的抗生素加入 1x MEM，此為維持培養液(2% MEM)，存放於 4°C 用於稀釋藥物及維持受病毒感染的細胞株。FBS 使用前需在 56°C 水浴槽加熱 30 分鐘，去除血清中補體，分裝後保存於 -20°C 備用。將 10x PBS 利用去離子蒸餾水 (double-distilled H₂O, ddH₂O)稀釋成 1x PBS，再經滅菌冷卻後存放於 4°C 備用。此外，glycerol 以 ddH₂O 稀釋成 30% glycerol，再經滅菌冷卻後，存放

於 4°C 備用。

RD 細胞培養／繼代培養

RD 細胞於培養瓶中生長至 80% 時，進行繼代培養。在無菌操作箱（型號：Revcoelite II）中，將經過培養的 T25 培養瓶（購自 Corning Incorporated 公司，美國）以 3 mL 1x PBS 潤洗後去除培養液，接著加入 0.5 mL Trypsin，混合均勻後置入 37°C 之 5% CO₂ 培養箱中放 1 分鐘，取出培養瓶後以拍擊方式震散細胞，然後加入 4.5 mL 10% MEM 以中和 Trypsin 的繼續作用，將 RD 細胞沖下並均勻打散，接著將細胞與 10% MEM 以 1:4 至 1:9 的比例回種到新的細胞培養皿中，置於 37°C 之 5% CO₂ 培養箱培養。

EV 71 之溶斑試驗

利用溶斑試驗(plaque assay)測定 EV 71 濃度，實驗時，將 RD 細胞培養於 6 孔培養盤中，之後以 2% MEM 將待測病毒液進行連續 10 倍稀釋後(10⁻²-10⁻⁶)進行感染，其中 1 孔為不加病毒液之陰性控制組，將細胞於 37°C 的 5% CO₂ 培養箱中 1 小時進行感染。

於感染的過程中，配製等體積的 1.2% 瓊脂溶液與 2x 培養液，置於 44°C 水浴中。待病毒感染完成後去除病毒液，將等體積之 1.2% 瓊脂溶液與 2x 培養液均勻混合後，分別於培養盤中每一孔緩慢加入 4 mL 瓊脂培養液，待凝固後，置於 37°C 的 5% CO₂ 培養箱中，於 3 天後加入第二層瓊脂，然後繼續培養。

當產生明顯 CPE 時（通常於感染後第 5 天），於每培養盤中每孔加入 1 ml 3.7% 甲醛，於 4°C 固定。隔天輕輕敲除 6 盤中的瓊脂培養基，並加入 2-3 滴的 0.5% 結晶紫，染色 5 分鐘後，以清水沖洗乾淨。當培養盤完全乾燥後，受到 EV 71 感染的 RD 細胞由於死亡脫落而無法被染上色，形成肉眼可見

的空洞，稱為溶斑(plaque)。藉由感染不同稀釋倍數的病毒液所造成的溶斑數目推算原始病毒的效價(titer)，單位為 plaque forming unit (PFU)/mL，代表每 mL 病毒液可產生的病毒溶斑數目。

EV 71 RNA 之萃取

1.5 mL 含有 EV 71 的培養液於 4°C 下 1,000 rpm，離心 5 分鐘，將上清液去除後加入 1 mL 的 trizol 將沉澱物打散，將混合液移至另一個 1.5 mL 微量離心管中，於室溫靜置 5 分鐘，接著加入 200 μL chloroform，利用振盪器(vortex genie 2)震盪 1 分鐘，直至溶液顏色變成粉紅色後，然後再於室溫靜置 2-3 分鐘。將離心管於 4°C，12,000 rpm 離心 15 分鐘後，小心吸取上層含 RNA 之透明液（至 450 μL）移至新的 1.5 mL 微量離心管中，然後加入 0.5 mL isopropanol 後，上下搖晃約 10 次，將溶液混合均勻後，靜置於室溫 10 分鐘，接著將離心管於 4°C，12,000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液後，再加入 1 mL 的 75% EtOH 於 4°C，12,000 rpm 離心 10 分鐘後小心去除上清液，將白色沉澱物(pellet)風乾至半透明後加入 20 μL DEPC 處理水回溶沉澱物，將樣本置於冰上以測定 EV 71 濃度。

反轉錄-即時聚合酶鏈反應(quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)

反轉錄 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR)^[9]：將萃取出之 EV 71 RNA 以 20 μL DEPC 處理水 20 倍稀釋，使用超微量分光光度計(ND-1000, NanoDrop Spectrophotometer)測量其濃度。然後根據測得的濃度，加入 1 μg 濃度 RNA、2 μL 10x RT buffer、0.8 μL 25x dNTP Mix (100 mM)、2 μL 10x RT random primers、1 μL MultiScribe™ reverse transcriptase 及 1 μL RNase inhibitor 之後補 ddH₂O 至總體積 20 μL，再以 25°C 保持 10 分

鐘、37°C 保持 120 分鐘、最後 85°C 保持 5 分鐘的順序循環 1 次，進行 RT-PCR。

qPCR 之操作流程^[10]：將萃取出之 EV 71 RNA 進行反轉錄聚合酶鏈反應，得到的 cDNA 後進行 qRT-PCR 檢測。取 5 μ L cDNA、0.5 μ L Forward primer (30 M)、0.5 μ L Reverse primer (30 M)、25 μ L FastStart Universal SYBR Green Master 及 19 μ L ddH₂O 入 StepOnePlus™ real-time-PCR 儀器 (Thermo Fisher Scientific 公司，美國) 中擴增 40 次進行量測，利用 StepOnePlus™ 之內建軟體進行螢光偵測，再將偵測到的訊號轉換為數值，並以 GAPDH 為內部控制組，將各組待測基因之 CT 值標準化以取得 Δ CT 值，而後實驗組扣除控制組之 Δ CT 值，得到 $\Delta\Delta$ CT。 $2^{-\Delta\Delta$ CT 可表示不同組別之待測基因與控制組之基因相對表現量。

Primer: EV 71 RNA

Positive strand

F: (GAGAGTTCTATAGGGGACAGT)

R: (AGCTGTGCTATGTGAATTAGGAA)

Negative strand

F: (ACTGTCCCCTATAGAACTCTC)

R: (TTCCTAATTCACATAGCACAGCT)

VTM 與 I-VTM 的效能評估

效能評估時，將 EV 71 分別與 VTM 或 I-VTM 混合，然後保存在 3 種溫度，在不同保存時間後接種 RD 細胞，觀察 EV 71 的活性 (有能力產生 CPE) 以及偵測核酸的存在 (能被 qRT-PCR 方法檢出)。根據 CLSI M40-A2 建議的病毒檢體運送裝置評估標準^[6]，本研究使用的 EV 71 原液濃度為 1×10^6 PFU/mL，在保存型 VTM 組別中將培養基中病毒濃度稀釋至 2×10^5 PFU/mL，取 0.2 mL 病毒加入 2 mL VTM 中 (約 1.8×10^4 PFU/mL)；另外 I-VTM 組別，取 50 μ L 病毒與 50 μ L I-VTM 混合後放入離心管中 (約 5×10^5 PFU/mL)。個別在

4°C、-80°C 及室溫存放。由於在台灣，交通運送便利且距離較近，病毒檢體運送時間短，且通常存放在 4°C。所以在 4°C 組別中增加 6 小時及 24 小時兩個組別，以模擬病毒檢體實際運送狀況。保存在 4°C 分為 6、24、48、72 及 96 小時共 5 組，而保存在 -80°C 及室溫為 48、72 及 96 小時共 3 組。此外，為了確認 I-VTM 裂解病毒的能力，額外將 EV 71 接種於 I-VTM 中存放 10 分鐘、30 分鐘、1、2、3 及 4 小時，然後接種 RD 細胞並觀察 CPE。

當 EV 71 接種至 VTM 存放至預設的時間點後，VTM 組別分別取 0.2 mL (約 10^3 PFU) 接種至 RD 細胞中，再加入 0.2 mL 2% MEM 進行混合，而 I-VTM 組別則取 40 μ L，加至 9.96 mL 2% MEM，稀釋後 (約 2×10^3 PFU/mL) 取 1 mL (約 2×10^3 PFU) 接種至 RD 細胞中。隨後，將接種 EV 71 的 VTM 及 I-VTM 組別分別放置於 37°C 之 5% CO₂ 培養箱培養中，1 小時後，移除細胞培養液，以 1x PBS 潤洗過後，再加入 2% MEM，然後分別培養 48 及 72 小時，最後以倒立式顯微鏡觀察 CPE。同時，將只加入 VTM 或 I-VTM 作為保存液之 RD 細胞及含有 2% MEM 的 RD 細胞分別作為陰性控制組。培養至指定時間後，分別觀察 RD 細胞的 CPE 及操作 qRT-PCR 以分析 VTM 或 I-VTM 的效能。

VTM 或 I-VTM 保存 EV 71 與 SARS-CoV-2 核酸的測試

為了確認 EV 71 與 SARS-CoV-2 的 RNA 可以直接保存在 VTM/I-VTM 中，本研究分別取 1 mL EV 71 (1×10^6 PFU/mL) 加至 1 mL VTM 或 I-VTM 中 (約 1×10^3 PFU/mL)，以及取 10 μ L SARS-CoV-2 檢測所用的 E、RdRp 及 N 基因片段之混和庫存液 (mix stock)，分別保存在 4°C、-80°C 及室溫，然後存放至 24 及 96 小時，最後再抽取兩種病毒之核酸進行 qPCR 檢測。

結 果

在不同溫度及時間下 VTM 保存 EV 71 活性與核酸的狀況

本研究將 EV 71 保存於 VTM 中，然後於特定的時間點時移種至 RD 細胞中進行培養，經過 72 小時後觀察細胞形態，並與未接種 EV 71 之 RD 細胞進行比較。相較於控制組，無論在 4°C、室溫及 -80°C，RD 細胞皆呈現皺縮、變圓、出現空泡、凝聚、和脫落等現象（圖 2A），此結果顯示 RD 細胞發生 CPE（表 1），代表 EV 71 具有活性。另外，qRT-PCR 檢測 RD 細胞內 EV 71 之正股與負股 RNA 片段，結果皆呈現陽性（表 1），此指出 VTM 可良好保存病毒之核酸。

在不同溫度及時間下 I-VTM 去除 EV 71 活性與保存 EV 71 核酸的狀況

本研究將 EV 71 保存於 VTM 中，然後於特定的時間點時移種至 RD 細胞中進行培養，經過 72 小時後觀察細胞形態，並與未接種 EV 71 之 RD 細胞進行比較。結果顯示在 4°C、室溫及 -80°C 細胞皆無 CPE（圖 2B）。同時利用 qRT-PCR 檢測細胞內 EV 71 正股及負股 RNA 片段，觀察細胞內病毒核酸保存情形，結果皆呈現陰性（表 1），顯示 I-VTM 可以去除病毒活性（感染力）。同時觀察將 EV 71 保存於 I-VTM 中於三種不同時間點（4°C、室溫及 -80°C）保存 10 分鐘、30 分鐘、1、2、3 及 4 小時，結果顯示 4°C 及室溫於 2 個小時可以完全去除 EV 71，而 -80°C 僅需 30 分鐘即可（表 2 與圖 3）。

VTM/I-VTM 在不同溫度及時間下保存 EV 71 及 COVI-19 病毒核酸的狀況

在臨床檢驗中，由於檢體採集包含組織、痰液、血液及糞便等不同樣本，為了確保 VTM 及 I-VTM 能直接保存核酸樣本，將 EV 71 與 SARS-CoV-2 檢測所用的 E、RdRp 及 N

基因片段加入 VTM 及 I-VTM 中於 4°C、室溫及 -80°C 各別保存 24 及 96 小時，利用 qRT-PCR 檢測 EV 71 核酸及 SARS-CoV-2 基因的號。結果顯示 VTM 及 I-VTM 至少可保存病毒核酸至 96 小時（表 3）。

討 論

自患者檢體中分離病毒的方法為病毒疾病診斷法之一。含有液體的檢體，例如腦脊液、尿液、及糞便檢體可直接置於無菌的容器中送到病毒檢驗室。必須以拭子採集的檢體如喉嚨、鼻咽、直腸等，則須將採集檢體後的拭子立刻放入無菌的運送培養基中。病毒檢體運送培養基至少具有三個功能^[11]：(i) 提供給水分，防止乾燥將病毒去活化(inactivated)。 (ii) 含有蛋白質穩定劑 (protein stabilizer) 以保持拭子上病毒的活性。以及 (iii) 含有抗生素而可抑制採檢時受到採檢部位棲息細菌和真菌的污染。無論是否使用運送培養基裝置，所有的檢體須立刻送到檢驗室，因為病毒在活細胞外十分不穩定。

冠狀病毒中 SARS-CoV 與 SARS-CoV-2 是屬於傳染力極強的飛沫傳染病毒，感染者都會伴隨著嚴重的呼吸道症狀及高致死率者於 2002-2003 共造成全球 8,096 例感染，其中 774 例死亡，致死率為 9.56%；而後者於 2019-2020/9 月中共造成全球 3,131 萬人感染，其中 96.6 萬人死亡，致死率為 3.09%^[12]，且兩種病毒有最長 10 及 14 天的高感染力潛伏期。面對傳播如此快速又高致死率的病毒，臨床上有效且安全地篩檢 COVID-19 確診患者將是一項重大的考驗。

病毒的聚合酶鏈反應(PCR)檢測，不能含有外來的 DNA/RNA 及 DNases/RNases，但棉拭和海藻酸鹽棉拭均存在這些酶，將會抑制 PCR 反應^[3]。VTM 或 I-VTM 所附帶的拭子均為植絨的吸頭，其為聚醯胺的一種，植絨纖維束間的毛細管作用促進了液體樣品

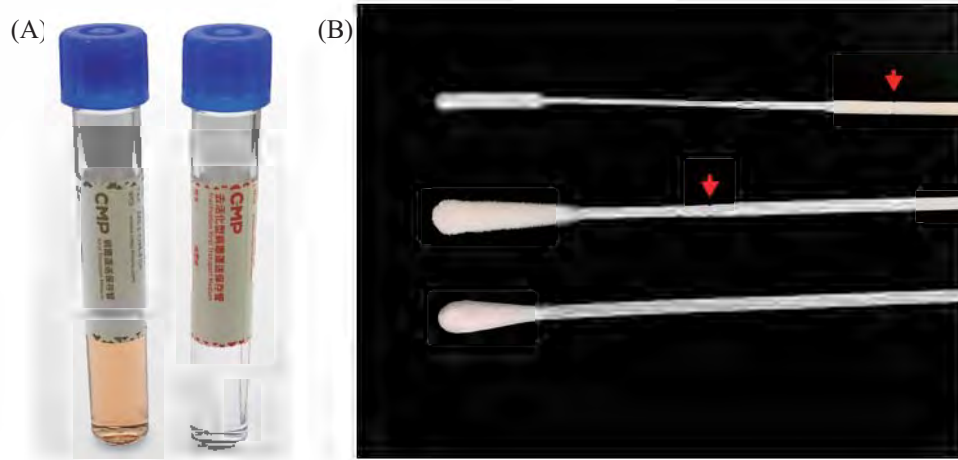


圖 1. 保存型/去活化型病毒運送培養基裝置

(A) CMP™ 病毒運送保存管[viral transport medium (VTM, 左方橘色培養液)]與 CMP™ 去活化型病毒運送保存管[inactivated viral transport medium (I-VTM, 右方透明培養液)]，兩者皆可搭配鼻咽及/或口咽植絨拭子(flocked swab)；(B)由上到下分別為nasopharyngeal flocked swab（鼻咽植絨拭子）、oropharyngeal flocked swab（口咽植絨拭子）及一般人造絲棉棒。植絨拭子皆具有斷點（紅色箭頭處），可將拭子前端折進運送管內。

表 1. EV 71 分別接種於 VTM 或 I-VTM 中在不同溫度及儲存時間下對 RD 細胞產生 CPE 及 RD 細胞內核酸檢測結果

貯存溫度/貯存時間	Control (控制組)		4°C					RT			-80°C		
	Medium only	EV 71 only	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	48 hr	72 hr	96 hr	48 hr	72 hr	96 hr
測試產品	VTM												
CPE ^a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Positive strand ^b	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Negative strand ^c	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
測試產品	I-VTM												
CPE ^a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Positive strand ^b	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Negative strand ^c	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aCPE: +, 代表RD細胞產生細胞病變 (CPE); -, 代表RD細胞無CPE; ^bPositive strand: +, 表示樣品中含有EV 71 顆粒。-, 表示樣品中無 EV 71 顆粒; ^cNegative strand: +, 代表 EV 71 核酸進行複製; -, 代表 EV 71 核酸無進行複製。
縮寫: VTM, 病毒運送保存管; I-VTM 去活化型病毒運送保存管; RT, 室溫。

的強力吸收，且將樣品吸附在靠近表面的位置，因此，易再溶於液體中。因此，植絨拭子可有效收集和釋放包括細胞在內的顆粒物^[13]，適合採檢含有病毒的檢體^[1-3]。適當的運送培養基的組成對保護檢體中病毒免受環境損傷，維持病毒活性極其重要^[11]。實際上，病毒的傳染性會隨著時間的流逝而降低，且

衰減率通常與貯存溫度有關^[14]，藉由冷藏可維持其核酸穩定性。採集含有較多病毒顆粒的細胞培養物及縮短病毒檢體的運送與接種時間，將會增加成功分離病毒的可能性，此對高危險性傳染病毒的精準診斷將有所助益。

本研究將 EV 71 保存於 VTM 中，結果發現無論是 4°C、室溫及 -80°C 保存於指定時間點

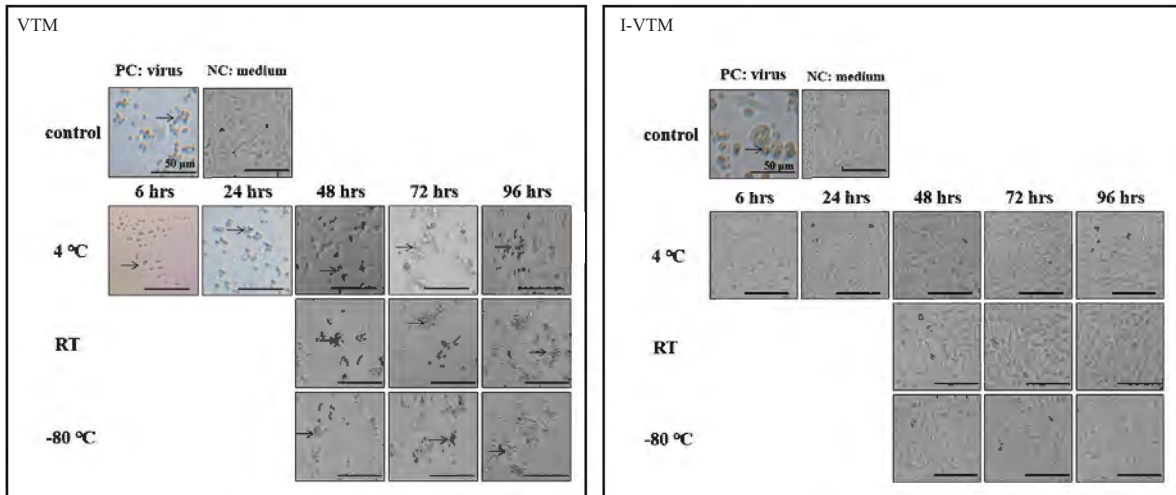


圖 2. EV 71 分別接種於 VTM 或 I-VTM 中在不同溫度及時間貯存後感染 RD 細胞所顯示的細胞形態。圖中包括含陽性控制組(PC: virus)、陰性控制組(NC: medium)與實驗組(4°C、RT 及 -80°C)之細胞形態。顯微鏡(200x)觀察。(A) VTM 的陰性控制組顯示細胞完整，無細胞病變(CPE)；陽性控制組與實驗組在所有溫度及時間下皆發現 CPE：細胞呈現皺縮、變圓、出現空泡、凝聚、和脫落等現象(箭頭)。(B) I-VTM 的陰性控制組與實驗組細胞皆無 CPE，而陽性控制組則有 CPE。

縮寫：VTM，病毒運送保存管；I-VTM 去活化型病毒運送保存管；RT，室溫。

後(最久 96 小時)接種於 RD 細胞，結果顯示 RD 細胞皆呈現 CPE；此外，檢測細胞內正股及負股 RNA 亦皆呈現陽性，顯示 VTM 可以良好保存病毒活性(表 1 和圖 2A)。當 EV 71 保存於 I-VTM 中，無論是 4°C、室溫及 -80°C 保存於指定時間點後接種於 RD 細胞，結果顯示細胞皆無呈現 CPE，細胞內的 EV 71 正股及負股 RNA 亦皆呈現陰性(表 1 與圖 2B)，此指出 EV 71 喪失活性。另外研究亦指出 I-VTM 可於 2 小時完整的去除 EV 71 活性(表 2 和圖 3)。此外，將 EV 71 與 SARS-CoV-2 的片段

表 2. 接種 EV 71 於 I-VTM 在不同溫度下貯存不同時間裂解病毒(不產生 CPE)的效能

溫度 \ 時間	10 min	30 min	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
4°C	+*	+	+	-	-	-
RT	+	+	+	-	-	-
-80°C	+	-	-	-	-	-

*+, 表示接種到 RD 細胞後於 72 小時內出現細胞病變(CPE)；-, 表示未出現 CPE。

縮寫：I-VTM 去活化型病毒運送保存管；RT，室溫。

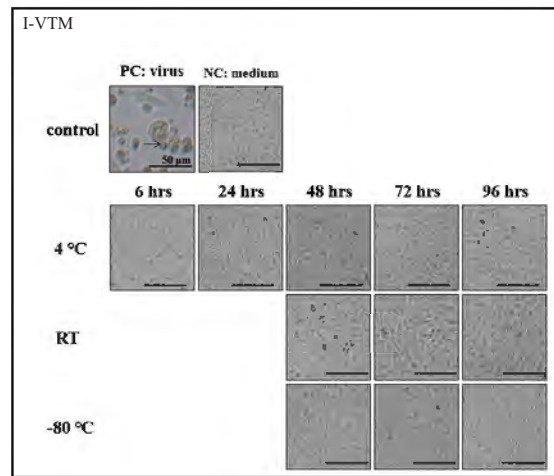


圖 3. 接種 EV 71 於 I-VTM 中儲存不同溫度及不同時間後分別移種 RD 細胞所顯示 EV 71 不產生 CPE(喪失活性)的情形

圖中包括含陽性控制組(PC: virus)、陰性控制組(NC: medium)與實驗組(4°C、RT 及 -80°C)之細胞形態。顯微鏡(200x)觀察，箭頭代表產生 CPE 細胞。結果顯示控制組細胞完整無 CPE，而實驗組中貯存在 -80°C，1 小時後以及貯存在 4°C 及 RT(室溫)，2 小時後完全無 CPE(代表 EV 71 喪失活性)。

縮寫：I-VTM 去活化型病毒運送保存管；RT，室溫。

表 3. VTM 與 I-VTM 在不同溫度下保存 EV 71 及 SARS-CoV 2 核酸情形

時間 溫度	EV 71 RNA				SARS-CoV 2 基因片段 (E gene、RdRp gene 及 N gene)			
	VTM		I-VTM		VTM		I-VTM	
	24 hr	96 hr	24 hr	96 hr	24 hr	96 hr	24 hr	96 hr
4°C	+	+	+	+	+	+	+	+
4°C	+	+	+	+	+	+	+	+
RT	+	+	+	+	+	+	+	+
-80°C	+	+	+	+	+	+	+	+

+, 表示樣品中含 EV 71 或 SARS-CoV-2 核酸, 可被 qRT-PCR 檢出。
縮寫: VTM, 病毒運送保存管; I-VTM 去活化型病毒運送保存管; RT, 室溫。

基因直接加入 VTM/I-VTM 中於 4°C、室溫及 -80°C 保存 24 及 96 小時, 然後進行兩種病毒的核酸偵測, 結果皆為陽性, 指出 VTM/I-VTM 皆可完整保存病毒的核酸 (表 3)。

上述結果顯示 VTM 或 I-VTM 不論在 4°C、室溫及 -80°C 皆可以在指定時間內有效保存病毒的可檢測性, 其中 VTM 為保存型運送管, 可以完整保存病毒的活性, 以利後續的體外活體細胞培養、抗原檢測、核酸檢測...等鑑定及研究用途, 而 I-VTM 的特點則在於運送過程中 (2 小時) 即可裂解病毒顆粒, 僅保存核酸供作核酸檢測, 而不具感染能力, 其設計目的為增加臨床第一線檢測人員的安全, 降低感染風險。根據本研究所獲得的數據顯示, 啟新生物科技有限公司生產的 VTM 及 I-VTM 可做為臨床檢驗室選用病毒檢體運送裝置的參考。

參考文獻

- Dunn JJ, Pinsky BA. Specimen collection, transport, and processing: Virology. In Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Richter SS, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology. 12th ed. 2019:1446-61. ASM press, Washington DC, USA.
- Daley P, Castriciano S, Chernesky M, Smieja M. Comparison of flocced and rayon swabs for collection of respiratory epithelial cells from uninfected volunteers and symptomatic patients. J Clin Microbiol 2006; 44:2265-7.
- Walsh P, Overmyer CL, Pham K *et al.* Comparison of respiratory virus detection rates for infants and toddlers by use of flocced swabs, saline aspirates, and saline aspirates mixed in universal transport medium for room temperature storage and shipping. J Clin Microbiol 2008; 46:2374-6.
- Gadsby NJ, Templeton KE. Coronaviruses. In Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Richter SS, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology. 12th ed. 2019:1606-24. ASM press, Washington DC, USA.
- Singhal T. A Review of coronavirus disease-2019 (COVID 19). Indian J Pediatr 2020; 87:281-6.
- Clinical & Laboratory Standard Institute (CLSI). Quality control of microbiological transport systems; Approved standard M40-A2. 2014. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Solomon T, Lewthwaite P, Perera D *et al.* Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. Lancet Infect Dis 2010; 10:778-90.
- Corman VM, Landt O, Kaiser M *et al.* Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. Euro Surveill 2020; 25: 2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- 衛生福利部疾病管制署-檢驗及疫苗研製中心。2019-nCoV 病毒核酸檢測。https://www.cdc.gov.tw/File/Get/BHL7va9Hwyc3kDX9aXn6-A. 2020.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 2001; 25:402-8.
- Johnson FB. Transport of viral specimens. Clin Microbiol 1990; 3:120-31.
- 衛生福利部疾病管制署。Google-COVID-19 Outbreak. https://sites.google.com/cdc.gov.tw/2019ncov/global. 2020.
- Faoagali J. Swabs then and now: cotton to flocced nylon. Microbiology Australia 2010; 31:133-6.
- Hambling, MH. Survival of the respiratory syncytial virus during storage under various conditions. Br J Exp Pathol 1964; 45:647-55.

Evaluation of Preserved and Inactivated Virus Specimen Transport Media

Bang-Yan Syu, Yu-Te Chao, Kuan-Chi Tseng, Po-Ting Ou, Szu-Hao Kung*

Faculty of Biotechnology and Laboratory Science in Medicine, Institute of Biotechnology in Medicine, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

Abstract

The main function of virus specimen transport media is to preserve the viability, antigen, and nucleic acid of viruses and to prevent the specimen from being contaminated during transportation. As diagnosis of the new pneumonia-causing coronavirus (SARS-CoV-2, COVID-19 virus) is based on swab collection of respiratory specimens for molecular testing and/or cell culture, the Creative Lifesciences Co., Ltd. (啟新生物科技股份有限公司) has launched two kinds of universal virus specimen transporting devices in 2020. One is CMP™ preserved viral transport medium w/ oropharyngeal and/or nasopharyngeal flocked swab (VTM); it can be used in P2+ or P3 level laboratory for virus isolation and molecular detection. The other is CMP™ inactivated viral transport medium w/ oropharyngeal and/or nasopharyngeal flocked swab (I-VTM); it can be used in P2 laboratory for virus molecular detection. To assess the effectiveness of these two virus specimen transport media, we tested them for transport of enteroviruses 71 (EV 71), which is also an RNA virus like the COVID-19 virus, according to the CLSI virus transport system specification M40-A2 (2014). During the test, both VTM and I-VTM were inoculated with 10^3 PFU of EV 71 placed at 4°C, -80°C and room temperature, and then examined at 6, 24, 48, 72, and 96 hours for those stored at 4°C and at 48, 72, and 96 hours for those stored at -80°C and room temperature. EV 71 inoculated I-VTMs were also

examined at 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, and 4 h. The inoculated VTMs and I-VTMs were used to infect cells of the human rhabdomyosarcoma cell line (RD cell). The infected cells were incubated in a 5% CO₂ incubator for 48-72 hours and then examined for cytopathic effect (CPE) and proliferation of EV 71, and analyzed for viral nucleic acid by the reverse transcription real-time polymerase chain reaction (quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR). In this study, both VTM and I-VTM were also inoculated with three different sets of primers coded for E, RdRP, and N genes of SARS-CoV-2, and placed at 4, -80, and room temperature and analyzed for viral nucleic acid by the qRT-PCR at 24 and 96 hours. Results showed that: (i) VTM can effectively preserve EV 71 viability at 4°C, -80°C, and room temperature; (ii) I-VTM can completely inactivate and lyse 10^6 PFU of viruses in 2 hours; (iii) VTM/I-VTM can effectively preserve EV 71 and SARS-CoV-2 nucleic acids for qRT-PCR analysis. Based on results of this study, we conclude that VTM or I-VTM is suitable for transport of virus specimens and suggest that Virology laboratories can select VTM or I-VTM based on their virus detection methods, safety level of the laboratory, and risk group of the target virus.

Keywords: Enteroviruses 71, SARS-CoV-2, virus transport system, cytopathic effects, qRT-PCR