

SARS-CoV-2核酸國家標準品暨呼吸道病毒套組建立

巫博智 吳明憲 林伯霖 陳昕梅 彭怡瑄 許家銓 林美智 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

全球嚴重特殊傳染性肺炎(COVID-19)疫情嚴峻，現行實驗室大多以核酸擴增技術檢測方式篩檢嚴重急性呼吸系統症候群冠狀病毒2 (SARS-CoV-2)，參據衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)公告「因應新型冠狀病毒疫情緊急使用，核酸檢測試劑申請專案製造參考文件」，須有相對應標準品評估產品之效能，為扶植國內產業研發量能，食藥署國家實驗室旋即著手建立臺灣SARS-CoV-2核酸國家標準品以及呼吸道病毒套組。SARS-CoV-2核酸國家標準品透過細胞培養製備病毒原液，並以0.01%福馬林去活化，經初步定量，共製備SARS-CoV-2候選核酸國家標準品共324管(0.5 mL/管)。為增加標準品的客觀性及公信力，邀集國內外7機構進行共同標定研究，涵蓋4種不同分析方法及3個目標基因，經統計分析濃度訂定為6.35 log copies/mL。另，呼吸道病毒套組蒐集常見之呼吸道病毒HCoV-OC43、HCoV-229E、HCoV-NL63、Influenza A/B、Adenovirus、Respiratory syncytial virus、Rhinovirus以及Parainfluenza共9種病毒經適當方式去活化及定量，並於分裝後逐項供應。建立完成之SARS-CoV-2核酸標準品與呼吸道病毒套組已全數對外供應，提供業界作為核酸診斷試劑之研發及品質控管之依據，增加國內取得標準品之管道，加速我國產業相關試劑研發量能，守護國人健康。

關鍵詞：病毒核酸標準品、新型冠狀病毒、呼吸道病毒、共同標定研究、SARS-CoV-2、COVID-19

前 言

SARS-CoV-2引起的嚴重特殊傳染性肺炎(COVID-19)疫情在全球快速擴散，2020年1月30日，世界衛生組織(World health organization, WHO)宣布疫情為國際關注的突發公共衛生事件(Public Health Emergency of International Concern, PHEIC)，並於2020年3月11日宣布為全球大流行，截至2021年7月，確診病例已超過兩億人，死亡人數超過四百萬人。

即時與正確的診斷能使患者獲得立即的治

療並且對於政府實施相關防疫措施(如隔離與檢疫)亦極為重要，因此世界各國皆盡可能滿足檢測之需求。目前透過核酸擴增技術(NAT)檢測為確認感染的主要臨床診斷依據。隨著疫情全球快速擴展，國內外各個研究機構與診斷試劑製造商亦積極投入檢測試劑之開發。食藥署為確保檢測試劑之效能品質，制定「因應新型冠狀病毒(COVID-19)疫情緊急使用核酸檢測試劑申請專案製造參考文件」作為申請此類產品專案製造之準則。然而由於疫情發展迅速，各廠開發檢驗試劑時缺乏具國際單位(IU)

之國際標準品(IS)進行校正與比對，使得試劑間之檢測效能難以互相比較，在臨床診斷恐產生模糊的判斷空間。亦缺乏相似病毒與呼吸道常見病毒進行檢測套組之專一性分析。為此，食藥署早於疫情初始即積極投入SARS-CoV-2核酸國家標準品與呼吸道病毒套組的建立，希望能提供一具有公信力之標準品，使不同的檢測平台間的分析數據將能進行分析與校正，使檢測SARS-CoV-2 RNA的平台間具有更高的可比性。

此外，肇因於疫情發展之快讓全球多國難以掌控，WHO亦無法及時供應國際標準品，食藥署本次製備SARS-CoV-2核酸標準品即以建立原級標準品(Primary Standard)為目標，且為使所製備之標準品具客觀及公信力，在SARS-CoV-2候選核酸國家標準品建立後同時辦理國際共同標定研究，邀集包含美國食品藥物管理局生物製劑評估研究中心(Center for Biologics Evaluation and Research/US Food and Drug Administration, CBER-USFDA)、英國生物標準暨管制國家研究所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC UK)、德國疫苗暨生物藥品聯邦研究所(Paul-Ehrlich-Institut, Germany Federal Institute for Vaccines and Biomedicines, PEI)在內的WHO collaborating center、義大利官方藥品管制實驗室(OMCL)國家藥品管制與評估中心(National Centre for the Control and Evaluation of Medicines, CNCF)及我國衛生福利部疾病管制署與食品藥物管理署等7個官方權威研究機構參與，涵蓋數位式核酸聚合酶連鎖反應(Digital PCR)、即時核酸聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)、隔絕式恆溫聚合酶連鎖反應(Insulated isothermal PCR, iiPCR)以及轉錄媒介增幅反應(Transcription-Mediated Amplification, TMA)等4種方法及RdRP、E及N等3個目標基因，彙整資料後經統計以幾何平均數計算共標平均數值，訂定SARS-CoV-2核酸國家標準品

最終濃度。

材料與方法

一、材料與設備

(一)材料

- (1)SARS-CoV-2 (長庚醫院, CGMH-CGU-01/2020)
- (2)HCoV-OC43 (ATCC, Cat. No. VR-1558™, USA)
- (3)HCoV-229E (ATCC, Cat. No. VR-740™, USA)
- (4)HCoV-NL63 (BEI Resources, NR-470, USA)
- (5)Influenza A virus (國光生技股份有限公司, A/Brisbane/02/2018/E3/D8 (H1N1))
- (6)Influenza B virus (國光生技股份有限公司, B/Maryland/15/2016/E3/E11)
- (7)Human parainfluenza virus (臺大醫院, Type 3)
- (8)Respiratory syncytial virus (國家衛生研究院, Type B1)
- (9)Adenovirus 5 (國家衛生研究院, Adenoid 75)
- (10)Rhinovirus (BEI Resources, 164A, NR-51452, USA)
- (11)Vero E6 cells (ATCC, Cat. No. CRL-1586™, USA)
- (12)RD cells (ATCC, Cat. No. CCL-136™, USA)
- (13)MRC-5 (ATCC, Cat. No. CCL-171™, USA)
- (14)MK2 cells (ATCC, Cat. No. CCL-7™, USA)
- (15)HEp2 cells (ATCC, Cat. No. CCL-23™, USA)
- (16)293A cells (ATCC, Cat. No. CRL-1573™, USA)

- (17) 10% Formaldehyde solution (Formalin, Sigma, Cat. No. 11-0735, Germany)
- (18) TANbead Virus Nucleic Acid Extraction Kit (TANBead, Cat. No. 665S46, Taiwan)。內含Proteinase K、萃取試劑組裝條及可拋式藍色攪拌條
- (19) Primers and TaqMan probes (Integrated DNA Technologies, USA)
- (20) SuperScript™ IV reverse transcriptase kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 18090010 USA)
- (21) LightCycler® Multiplex RNA Virus Master Kit (Roche, Switzerland)
- (22) QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix v2 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A26358, USA)
- (23) QuantStudio™ 3D Digital Chip Kit v2 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A26316, USA)。內含Chip、Chip lid、Sample Loading Blade、Immersion Fluid
- (24) LightCycler® Multiplex RNA Virus Master Kit (Roche, Switzerland)
- (25) iBolt™ 4-12%蛋白質電泳膠體 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- (26) iBlot Gel transfer stacks PVDF Regular (Thermo Fisher Scientific, USA)
- (27) PageRule Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- (28) Anti-Spike SARS-CoV/SARS-CoV-2 spike antibody (GeneTex, Cat. No. GTX01555, USA)
- (29) Recombinant HRP Anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein antibody (Abcam, Cat. No. ab273168, USA)
- (30) Goat anti-human IgG-HRP antibody (Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 109-035-008, USA)
- (二) 設備
 - (1) CO₂培養箱 (MCO-19AIC, SANYO, Taiwan)
 - (2) SAFZONE生物安全操作櫃 (Class-II-A2, Yakos65, Taiwan)
 - (3) 圓點核酸自動萃取儀 (SLA-32, TANBead, Taiwan)
 - (4) 多功能基因核酸分析儀 (LightCycler 480 II, Roche, Switzerland)
 - (5) QuantStudio™ 3D Digital PCR Instrument (4489084, Thermo Fisher Scientific, USA)
 - (6) QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader (4482592, Thermo Fisher Scientific, USA)
 - (7) ProFlex™ 2 × Flat PCR System (4484078, Thermo Fisher Scientific, USA)
 - (8) QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™ Software (Ver. 3.1.6, Thermo Fisher Scientific, USA)
 - (9) MiniGel Tank (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - (10) iBlot® Gel Transfer Device (Thermo Fisher Scientific, USA)

二、方法

本研究為製備我國SARS-CoV-2候選核酸國家標準品及呼吸道病毒套組，病毒來源與基本資訊見表一。濃度規劃分別為SARS-CoV-2病毒核酸標準品6.4 log copies/mL及呼吸道病毒套組需大於等於6 log copies/mL，預計製備各品項100瓶以上。參照世界衛生組織製備核酸國際標準品之方法與食藥署血液病毒核酸標準品製備經驗，進行病毒候選核酸標準品之建構。首先以Vero E6細胞株培養SARS-CoV-2病毒株，其為臺灣長庚醫院分離出之病毒株(CGMH-CGU-01/2020)。在病毒培養過程中，透過觀察細胞病變作用(cytopathic effect, CPE)來確認病毒感染之情形。待產生明顯CPE現象時收集病毒液，並做初步的病毒核酸濃度

表一、病毒基本資料

名稱	病毒株 (Strain/Isolate)	來源	處理狀況	宿主	去活化方式	核酸濃度 (Log opies/mL)
SARS-CoV-2	CGMH- CGU-01/2020	長庚醫院	增殖	Vero E6 cells	0.01% Formalin	6.35±0.30
HCoV-OC43	OC43(VR-1558™)	ATCC	增殖	RD cells	熱去活化	8.25±0.07
HCoV-229E	229E(VR-740™)	ATCC	增殖	MRC5 cells	熱去活化	8.43±0.06
HCoV-NL63	NL63(NR-470)	BEI Resources	增殖	MK2 cells	熱去活化	7.90±0.10
Influenza A virus	A/Brisbane/ 02/2018/E3/D8	國光生技股份 有限公司	定量後分裝	雞胚蛋	Beta- Propiolactone	6.61±0.09
Influenza B virus	B/Maryland/15/ 2016/E3/E11	國光生技股份 有限公司	定量後分裝	雞胚蛋	Beta- Propiolactone	7.30±0.02
Human parainfluenza virus	3	臺大醫院	定量後分裝	MK2 cells	熱去活化	6.01±0.06
Respiratory syncytial virus	B1	國衛院	定量後分裝	HEp2 cells	熱去活化	6.40±0.04
Adenovirus 5	Adenoid 75	國衛院	定量後分裝	293A cells	熱去活化	6.06±0.04
Rhinovirus	164A	BEI Resources	增殖	MRC5 cells	熱去活化	6.04±0.05

分析，並參考過去文獻以0.01% Formalin於4℃中反應7天進行病毒去活化^(1,2)。接著將去活化病毒液取1 mL接種到Vero E6細胞，7天後取培養液接種到一批新的細胞中，一共培養3代，除了觀察每一代細胞是否產生CPE，也取每一代的培養液以RT-qPCR與西方墨點法(Western blot)進行核酸及蛋白質監測，確認病毒液去活化成果，並重新定量分析確認病毒原液之核酸含量。呼吸道病毒套組由食藥署向國外購買或由臺灣研究機構及醫療機構提供(表一)，部分病毒以適合之相應細胞進行培養(表一)，亦透過觀察CPE來確認病毒感染之情形。待產生明顯CPE現象時收集病毒液，再以65℃於水浴中加熱30分鐘進行病毒去活化。病毒核酸定量分析部分，由於無一級標準品作為參考，採用實驗室自行開發之Digital PCR系統分別進行定量評估。將去活化之病毒原液以PBS作適當稀釋，製備完成之標準液隨即進行定量分析與充填分裝作業，國家標準品每管分裝0.5 mL以上、呼吸道病毒套組每管分裝1.0 mL以上，

製備成之核酸標準品置於-80℃冰箱保存。SARS-CoV-2病毒候選核酸國家標準品製備完成後舉辦國際共同標定研究邀集7個官方權威研究機構參與，參與之實驗室使用建議方法(即Digital PCR、real-time PCR)或實驗室內部自行開發之方法進行3次獨立試驗測定，將各單位回傳之數據進行計算以訂定國家標準品最終濃度。

(一)細胞培養與凍存

將FBS按10%比例添加至相應培養基配製成專用培養基。於無菌操作台內取上述之專用培養基15 mL加入T-75 flask後置於37℃、5% CO₂培養箱10分鐘進行回溫及平衡酸鹼值。從液態氮桶中取出細胞凍管，立即放入37℃水中快速解凍，並移入操作櫃內，以微量分注器取出細胞懸浮液，加入含專用培養基之T-75 flask，混合均勻後置於37℃、5% CO₂培養箱培養，隔天觀察細胞之生長狀態同時更換新鮮培養基。細胞為貼附型細胞，每3-4天繼代

培養，繼代條件為1:3-1:5。細胞經大量培養後，去除培養基並以DPBS清洗，加入0.25% (w/v) trypsin-0.53 mM EDTA 溶液置於37°C、5% CO₂培養箱培養3分鐘，以專用培養基中和trypsin，將細胞液移至離心管1,000 rpm離心5分鐘後去除上清液。以含有5% DMSO之專用培養基回溶細胞。計數細胞後以含有5% DMSO之專用培養基稀釋至所需細胞數並裝至凍管，細胞濃度約為 5×10^6 cells/vial。將細胞凍管放入漸凍盒後置於-80°C冰箱，隔天將凍管放入液態氮中保存。

(二)病毒感染與培養

將細胞培養至80 - 90%滿盤之單層細胞(約分盤後18 - 48小時)進行感染，從-80°C冰箱中取出相應病毒凍管並以無血清之培養基稀釋至最後體積3 mL，去除細胞中培養基並以DPBS清洗，加入稀釋後之病毒液並輕輕搖晃flask使病毒液均勻分布於細胞表面後置於37°C、5% CO₂培養箱培養，並且每20分鐘取出flask輕輕搖晃均勻，感染1.5小時後加入含2% FBS之培養基，置於37°C、5% CO₂培養箱培養3~7天，觀測CPE，當CPE超過80%，其上清液即為病毒液，將病毒液分裝至凍管並置於-80°C冰箱保存。

(三)病毒去活化

將100 mL SARS-CoV-2病毒原液加入10 % Formalin 100 μ L，使病毒液中的Formalin最終濃度為0.01%後置於4°C冰箱反應7天即為去活化病毒液^(1,2)。呼吸道病毒套組Influenza A/B virus以beta-propiolactone去活化⁽³⁾，其他病毒皆以65°C於水浴中加熱30分鐘去活化^(4,5)。

(四)SARS-CoV-2病毒去活化驗證

取去活化SARS-CoV-2病毒液1 mL接種到Vero E6細胞進行長時間培養進行去活化病毒的感染活性測試，7天後取培養液接

種到一批新的細胞中，測試過程中，病毒液加入細胞培養後不移除，並於細胞中連續培養3代，每代皆於第7天收取培養液，進行新的感染；除了觀察每一代細胞是否會產生CPE，每代皆收取病毒液進行RT-qPCR檢測。

(五)細胞培養之病毒核酸定量分析方法

以Thermo Fisher Scientific QuantStudio™ 3D Digital PCR(以下簡稱QS3D)之自行開發之Digital PCR系統進行定量評估，分析方法概要敘述如下：

(1)病毒核酸萃取方法

開啟圓點核酸自動萃取儀，使其自動預熱至50°C，取適量之病毒萃取試劑組裝條插入96孔底座盤中，並移除萃取試劑組裝條上之鋁箔封膜。先將10 μ L Proteinase K加至萃取試劑組裝條最左側之Lysis Buffer反應槽，再於同一反應槽加入200 μ L病毒檢體。接著掀開儀器門板，將可拋式藍色攪拌條插入儀器內部上方攪拌棒之相對應卡槽。於96孔底座盤下方放入導熱板，小心放入儀器內之樣品架位置。然後操作面板，選擇program「VIRUS-40-5」，進行自動萃取。萃取完畢後，將96孔底座盤與導熱板取出，並利用含有filter之微量吸管尖吸取位於萃取試劑組裝條最右邊之Elution Buffer反應槽中之病毒核酸至新的1.5 mL微量離心管，將病毒核酸萃取液接續進行Digital PCR步驟或保存於-20°C冰箱。

(2)Reverse Transcription (RT)

取病毒核酸10 μ L，加入0.5 μ M dNTP, 1 μ M primer試劑混合液中，以ddH₂O調至反應體積為13 μ L後進行pre-RT (65°C，5分鐘；4°C，1分鐘)，然後加入1 $\times$ RT buffer、5 mM DTT、2 U/ μ L RNaseOUT及10 U/ μ L SuperScript IV

reverse transcriptase之master mix，使總體積為20 μL 後進行RT (50°C，10分鐘；80°C，5分鐘)。

(3) RT-qPCR

取10 μM Forward與Reverse primer各1 μL 、5 μM probe 0.5 μL (表二)、RT enzyme solution 0.1 μL 及RT-qPCR reaction mix (5X) 5 μL ，並補ddH₂O以配製成總體積15 μL 之RT-qPCR mix，並加入至96孔盤。取病毒核酸5 μL 個別加入至相對應96孔盤中，取sealing foils封膜96孔盤後進行RT-qPCR反應。反應條件依序為於50°C作用10分鐘，95°C作用30秒，95°C作用5秒，53°C作用15秒，60°C作用15秒，上述三個溫階重複循環45次。

(4) Digital PCR

取RT後之核酸產物1 μL ，加入10 μM Forward與Reverse primer各0.6 μL 、1.5 μM probe 1.2 μL (表二)及3D Digital PCR Master Mix v2 (2X) 7.5 μL ，並補ddH₂O以配製成總體積15 μL 之dPCR mix。將Chip Lid、Sample Loading Blade及Chip取出並裝於Chip Loader上，確認上述三樣材料皆正確安裝，並剝除Chip Lid上的膠帶。接著將dPCR mix 14.5 μL 加入Loading Blade中，按下Chip Loader的loading按鈕，使sample均勻塗抹於Chip上，待塗抹完畢後，緩慢將Immersion Fluid滴至Chip的晶片反應區域直至覆蓋。再透過Chip Loader旋轉旋臂按壓後使上蓋與晶片黏合Chip Lid與Chip黏合，手壓至少20秒後，再從Chip Lid上的注射孔注入Immersion Fluid至與注射孔齊高為止，最後撕除Chip Lid內側之封口貼紙，反覆按壓封口黏合處約6 - 8秒，確保封口已黏合緊密。將製備完成之sample chip放入ProFlex™ 2 $\times$ Flat

PCR System進行PCR反應。反應條件依序為於96°C作用10分鐘，55°C作用15秒，60°C作用1分鐘，98°C作用30秒，上述三個溫階重複循環39次，最後於60°C作用2分鐘。接著將PCR反應完畢之sample chip轉移放入QuantStudio™ 3D Digital PCR Instrument中讀取結果，再利用QuantStudio AnalysisSuite cloud Software分析數據。

(六) 西方點墨法(Western blot)

利用十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)分離蛋白後將蛋白轉漬在聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene Difluoride, PVDF)膜上，再利用anti-Spike與anti-nucleocapsid之抗體(1:1000)做為探針，之後使用HRP anti-mouse IgG抗體(1: 5000)進行偵測，並透過Pierce ECL Western blotting substrate顯現。

(七) SARS-CoV-2核酸標準品之共同標定

為使所製備之標準品具客觀及公信力，於SARS-CoV-2病毒候選核酸國家標準品製備完成後舉辦國際共同標定研究，邀集包含美國CBER-USFDA、英國NIBSC、德國PEI在內的WHO collaborating center、義大利OMCL CNCF及我國衛福部疾管署與食藥署等7個官方權威研究機構參與(表三)。SARS-CoV-2候選核酸國家標準品以去活化的冷凍SARS-CoV-2病毒顆粒形式保存在凍管中。參與共同標定研究之實驗室使用建議方法(即Digital PCR、Real-time PCR)或實驗室內部自行開發之方法進行3次獨立試驗測定SARS-CoV-2候選核酸國家標準品，各實驗室在完成所有試驗後回覆基本資訊、原始數據讀值(例如Ct、copies、positive/negative)，以及實驗室初步分析結果。根據回覆之原始數據計算SARS-CoV-2候選核酸國家標準品之核

表二、SARS-CoV-2與呼吸道相關病毒之引子與探針序列

Target position	Type of oligonucleotide	Sequence (5'-3')	Ref
SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)	Forward primer (F2)	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	(11)
	Reverse primer (R2)	CAATGTATAAAACACTATTAGCATA	
	Probe (P2)	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-IBFQ	
Sarbecovirus Envelope protein (E) gene	Forward primer (F1)	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	(11)
	Reverse primer (R2)	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	
	Probe	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-IBFQ	
Sarbecovirus Nucleocapsid protein (N) gene	Forward primer (F1)	CACATTGGCACCCGCAATC	(11)
	Reverse primer (R1)	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	
	Probe	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-IBFQ	
HCoV 229E Membrane glycoprotein gene	Forward primer	TTCCGACGTGCTCGAACTTT	(12)
	Reverse primer	CCAACACGGTTGTGACAGTGA	
	Probe	FAM-TCCTGAGGTCAATGCA-IBFQ	
HCoV OC43 Membrane glycoprotein gene	Forward primer	ATGTTAGGCCGATAATTGAGGACTAT	(12)
	Reverse primer	AATGTAAAGATGGCCGCGTATT	
	Probe	FAM-CATACTCTGACGGTCACAAT-IBFQ	
HCoV NL63 N gene	Forward primer (F2)	GCGTGTTCCTACCAGAGAGGA	(13)
	Reverse primer (R2)	GCTGTGGAACCTTTGGCA	
	Probe	FAM-ATGTTATTCAGTGCTTTGGTCCTCGTGAT-IBFQ	
Influenza A virus non-structural 1 (NS1) gene	Forward primer	AAAGCGAATTTCAAGTGTGAT	(14)
	Reverse primer	GAAGGCAATGTGAGATTT	
	Probe	FAM-CCCTCTTCGGTGAAAGCCCT-IBFQ	
Influenza B virus Hemagglutinin (HA) gene	Forward primer	AAATACGGTGGATTAAATAAAAGCAA	(15)
	Reverse primer	CCAGCAATAGCTCCGAAGAAA	
	Probe	FAM-CACCCATATTGGGCAATTCCTATGGC-IBFQ	
Parainfluenza virus 3 Matrix gene	Forward primer	TGCTGTTCGATGCCAACAA	(15)
	Reverse primer	ATTTTATGCTCCTATCTAGTGGAAGACA	
	Probe	FAM-TTGCTCTTGCTCCTCA-IBFQ	
Respiratory syncytial virus Matrix gene	Forward primer (A/B)	GGAAACATACGTGAACAAGCTTCA	(15)
	Reverse primer (A/B-R1)	CATCGTCTTTTCTAAGACATTGTATTGA	
	Probe (A/B)	FAM-TGTGTATGTGGAGCCTT-IBFQ	
Adenovirus Hexon gene	Forward primer	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT	(15)
	Reverse primer	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACAT	
	Probe	FAM-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-IBFQ	
Rhinovirus 5' untranslated region (5' UTR)	Forward primer	TGGACAGGGTGTGAAGAGC	(14)
	Reverse primer	CAAAGTAGTCGGTCCCATCC	
	Probe	FAM-TCCTCCGGCCCCTGAATG-IBFQ	

表三、參與共同標定之成員與研究機構

Participant	Organisation	Country
Arifa Khan, Sandra Fuentes	Center for Biologics Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration (CBER, USFDA)	USA
Giulio Pisani, Matteo Simeoni, Antonio Martina	National Centre for the Control and Evaluation of Medicines, Istituto Superiore di Sanità (CNCF)	Italy
Giada Mattiuzzo, Emma Bentley	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)	UK
Julia Gerbeth, Sally Baylis	Paul-Ehrlich-Institute (PEI)	Germany
Chi-Jung Yang, Chuan-Yi Kuo	Taiwan Centers for Disease Control (TCDC)	Taiwan
Der-Yuan Wang, Jia-Chuan Hsu, Po-Chih Wu, Po-Lin Lin, Hsin-Mei Chen, Yi-Hsang Peng	Section of Biologics, Division of Research and Analysis, Taiwan Food and Drug Administration (TFDA)	Taiwan
Der-Yuan Wang, Che-Yang Lin, Yu-Chih Chen	Section of Food Biology, Division of Research and Analysis, Taiwan Food and Drug Administration (TFDA)	Taiwan

酸含量。定量數據以幾何平均數進行計算，並在適當的情況下校正檢品分析體積、稀釋倍率與稀釋階線性。根據幾何平均數計算核酸含量，以log10 copies/mL呈現。定性數據為回覆“positive/negative”或僅回覆Ct值而無copies之試驗數據，定性數據以該方法提供之LOD (copies/mL) 推估核酸含量，並在適當的情況下校正檢品分析體積。其為將各個獨立試驗中的檢品數據合併以提供每個稀釋階中檢測到的陽性數進行分析，並以內插法計算LOD，評估終點為95%的測試樣品為陽性之稀釋倍率。經統整分析研究結果後確定標準品中SARS-CoV-2 RNA濃度。將各單位回傳之數據取對數後平均，排除超出平均值 $\pm 2SD$ 之數值後計算平均，所得結果即為共同標定值。

(八) SARS-CoV-2核酸標準品之安定性評估

參照衛生福利部(簡稱衛福部)公布之藥品安定性試驗基準、國際醫藥法規協和會(The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 安定性試驗相關指引以及WHO國際標

準品安定性評估模式^(6, 7)，並考量標準品儲存條件之耐受性、運送及使用狀況規劃設計安定性評估研究，將標準品存放於-80℃、-20℃、4℃以及24℃四種不同溫度之儲存環境，其時程設計如圖五，在特定時間取出測試，評估病毒核酸濃度是否穩定。每個時間點各進行3次獨立試驗，每次試驗均以進行二重複試驗。將存放於不同溫度之標準品各時間點之定量結果進行統計分析評估，以儲存前後之定量結果是否具有統計上之顯著差異($p < 0.05$)來確認標準品之儲存穩定性。

結 果

一、SARS-CoV-2病毒原液核酸定量分析結果

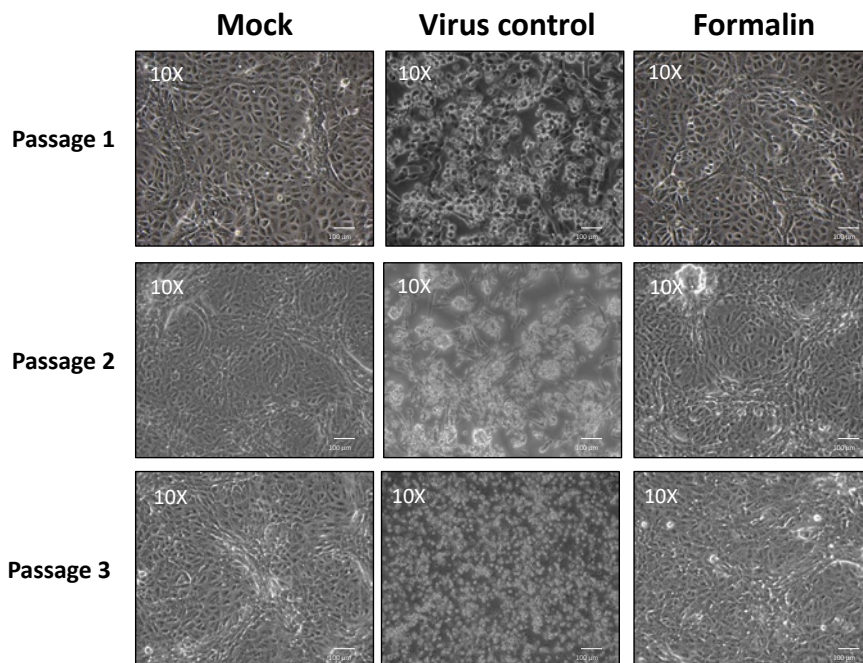
以SARS-CoV-2感染Vero E6細胞後每2天觀測CPE，細胞於第3日出現CPE，至第5日CPE超過80%，即選定收取第5日之培養液為病毒原液，共收取100 mL。將取得之病毒原液進行核酸之定量分析，採用實驗室自行開發之Digital PCR，其定量結果如表四，其平均濃度為8.10 log copies/mL，大於所需之6.4 log

copies/mL。考量標準品製備所需的病毒濃度與總量後，確認製備之病毒原液可作為製備 SARS-CoV-2 病毒候選核酸標準品之原液。

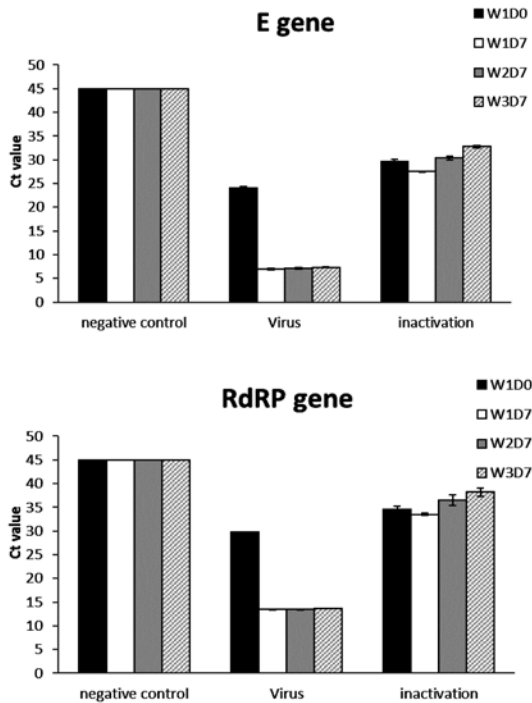
二、SARS-CoV-2 病毒原液去活化及其結果驗證

將 100 mL 病毒原液加入 10 % Formalin 100 μ L，使病毒液中的 Formalin 最終濃度為 0.01% 後置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱反應 7 天即為去活化病毒液。接著將去活化病毒液取 1 mL 接種到 Vero E6，7 天後取培養液接種到一批新的細胞中，一共培養 3 代，觀察每一代細胞是否會產生 CPE，並且取每一代之培養液以 RT-qPCR 進行核酸監測。在細胞 CPE 觀測中，活病毒組每一代細胞在第 5 天皆可見明顯 CPE，而在去活化組的三代觀測中則無 CPE 產生且細胞型態與 MOCK 組相同(圖一)。核酸監測的部分透過 RT-qPCR 其結果呈現為實際得到之 Ct 值，MOCK 組完全

沒有偵測到病毒核酸，活病毒組在繼代培養中相較於第 0 天皆有約 15 Ct 之明顯下降，並且每一次繼代的結果相似，顯示病毒具有複製能力，而去活化組之培養液在每一次繼代培養中相較於第 0 天 Ct 值略微上升，並且到第三代已達到 Ct 值 30 以上，顯示病毒無複製能力(圖二)。此外，利用西方墨點法檢測低病毒量 (0.001 Multiplicity of Infection, MOI) 與高病毒量 (0.1 MOI) 感染細胞後的病毒蛋白表現，結果顯示活病毒組可表現 spike 蛋白，而去活化組則無(圖三)。綜合以上細胞型態、蛋白以及核酸表現結果，確認此批病毒原液成功去活化。為確認去活化對於病毒核酸之影響，以前述定量分析方法進行核酸含量測定，結果顯示去活化後之核酸平均濃度為 7.43 log copies/mL (表四)，大於所需之 6.4 log copies/mL，確認製備之去活化病毒原液可作為製備 SARS-CoV-2 病毒候選核酸標準品之原液。



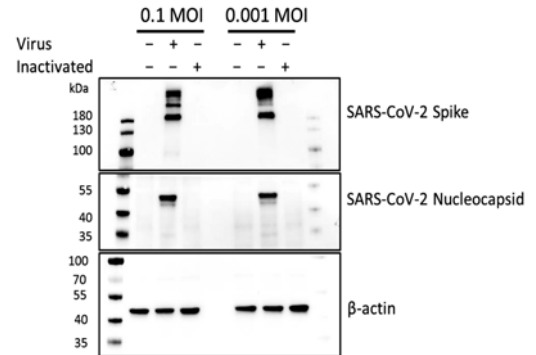
圖一、以 CPE 細胞型態分析驗證 SARS-CoV-2 去活化效果



圖二、以RT-qPCR驗證不活化SARS-CoV-2之E、RdRP基因Ct值

三、SARS-CoV-2候選核酸標準品製備

本計畫製備我國SARS-CoV-2候選核酸國家標準品濃度分別規劃為6.4 log copies/mL。綜觀前述結果，取去活化病毒原液以PBS進行稀釋並進行分裝充填作業，最終總計製備完成SARS-CoV-2候選核酸國家標準品(Lot 109-03)共324管(0.5 mL/管)。分裝完成之候選標準品均存放於-80℃保存，並依分裝順序各取分裝前段、中段與後段檢體分析方法評估SARS-



圖三、以western blot驗證不活化SARS-CoV-2之Spike與Nucleocapsid蛋白質表現

CoV-2病毒核酸含量，確認分裝全程之濃度一致性，並以前、中、後三段之濃度之平均值作為初步定量之濃度。結果顯示候選國家標準品分裝前段、中段與後段樣品之平均濃度均相近(表五)，平均濃度為候選國家標準品6.3 log copies/mL符合本計畫之規劃(表五)。分裝完成之候選標準品除部分供作安定性評估研究檢體外，其餘均存放於-80℃保存。

四、SARS-CoV-2病毒核酸標準品共同標定

為使所製備之SARS-CoV-2候選核酸國家標準品具客觀性及公信力，依循食藥署之前製備標準品模式，邀請國內外相關機構參與國際共同標定研究計畫，共同標定食藥署所製備之SARS-CoV-2候選核酸國家標準品，參與標定研究單位總計5個國家共7個單位(表三)。其中涵蓋5種試驗平台，Digital PCR、Real-time PCR、iiPCR以及TMA等4種方法，RdRP、E

表四、SARS-CoV-2病毒原液之去活化前後濃度

SARS-CoV-2 培養第5日病毒液100 mL	SARS-CoV-2 conc. (Log copies/mL)			
	E (n=6)	RdRP (n=6)	N (n=6)	Average
SARS-CoV-2 病毒原液	8.22 ± 0.07	8.05 ± 0.05	8.04 ± 0.11	8.10 ± 0.11
SARS-CoV-2去活化病毒原液	7.64 ± 0.05	7.26 ± 0.10	7.40 ± 0.12	7.43 ± 0.19

以及N等3個目標基因(表六)，共計17筆試驗結果，其中12筆為定量方法，5筆為定性方法。參與單位以各實驗室例行使用之SARS-CoV-2核酸定量分析方法，針對SARS-CoV-2國家標準品進行3次獨立試驗，最後將標定結果及相關資料回傳。取12筆定量方法進行分析，定量濃度落於5.53-7.16 log copies/mL之間，

高低差異約為42倍。各定量數據之Geometric Coefficient of Variation (GCV)值皆小於40%，顯示各方法內之可重複性良好(表七)。綜合12筆定量數據計算幾何平均濃度為6.35 log copies/mL，GCV值為213%，此為無統一之校正標準下獲得之數值，顯示SARS-CoV-2核酸國家標準品在各方法之間亦具有再現性。將12

表五、SARS-CoV-2候選核酸國家標準品(NS)分裝後定量結果

SARS-CoV-2 NS (Lot. 109-03)	SARS-CoV-2 conc. (Log copies/mL)				
	E (n=9)	RdRP (n=9)	N (n=9)	Average	CV(%)
分裝前段	6.73 ± 0.02	6.30 ± 0.04	6.07 ± 0.13	6.36 ± 0.28	4.40
分裝中段	6.74 ± 0.03	6.42 ± 0.05	6.10 ± 0.03	6.42 ± 0.29	4.51
分裝後段	6.75 ± 0.01	6.35 ± 0.03	5.92 ± 0.04	6.29 ± 0.32	5.09
Total average	6.74 ± 0.01	6.36 ± 0.06	6.03 ± 0.10	6.35 ± 0.30	4.72

表六、國際共同標定研究之標定方法詳細資料

Lab Code	Extraction method	NAT method	Assay type	Target	Use	Reported Readout
1a	QIAamp Viral RNA Mini Kit	dPCR Bio-Rad	Quantitative	N1	In-house	copies
1b	QIAamp Viral RNA Mini Kit	dPCR Bio-Rad	Quantitative	RdRP	In-house	copies
1c	QIAamp Viral RNA Mini Kit	dPCR <i>in-house</i> method	Quantitative	E	In-house	copies
1d	QIAamp Viral RNA Mini Kit	RT-PCR	Quantitative	E	In-house	Ct; copies
2	QIAamp Viral RNA Mini Kit	RT-PCR	Quantitative	E	In-house	Ct; IU
3a	QIAamp Viral RNA Mini Kit	dPCR Bio-Rad	Quantitative	N1	In-house	copies
3b	QIAamp Viral RNA Mini Kit (DNase treated)	dPCR Bio-Rad	Quantitative	N1	In-house	copies
4a	TANBead Nucleic Acid Extraction Kit	dPCR Bio-Rad	Quantitative	RdRP	In-house	copies
4b	TANBead Nucleic Acid Extraction Kit	dPCR Bio-Rad	Quantitative	E	In-house	copies
5a	TANBead Nucleic Acid Extraction Kit	dPCR QS3D	Quantitative	RdRP	In-house	copies
5b	TANBead Nucleic Acid Extraction Kit	dPCR QS3D	Quantitative	E	In-house	copies
5c	TANBead Nucleic Acid Extraction Kit	dPCR QS3D	Quantitative	N	In-house	copies
5d	POCKIT™ Central Cartridge Set	POCKIT™ Central SARS-CoV-2 (iiPCR)	Qualitative	orf 1ab	CE; EUA	+/-
6a	TANBead Nucleic Acid Extraction Kit	RT-PCR	Qualitative	RdRP	In-house	Ct
6b	TANBead Nucleic Acid Extraction Kit	RT-PCR	Qualitative	E	In-house	Ct
6c	TANBead Nucleic Acid Extraction Kit	RT-PCR	Qualitative	N	In-house	Ct
7	Procleix Panther System	Procleix SARS-CoV-2 Assay (TMA)	Qualitative	RdRP	CE; EUA	+/-

表七、SARS-CoV-2核酸國家標準品共同標定之定量試驗結果

ab Code	Target	Mean (Log copies/mL)	SD	GCV(%)
1a	N1	5.80	0.06	18.07
1b	RdRP	5.53	0.08	15.52
1c	E	5.63	0.02	20.01
1d	E	6.16	0.08	3.91
2	E	6.33	0.07	19.2
3a	N1	6.51	0.05	12.61
3b	N1	7.11	0.07	17.51
4a	RdRP	6.79	0.12	32.26
4b	E	7.16	0.14	38.15
5a	RdRP	6.35	0.06	16.07
5b	E	6.74	0.02	4.36
5c	N	6.01	0.09	23.03
Calculated value		6.35	0.50	213.32

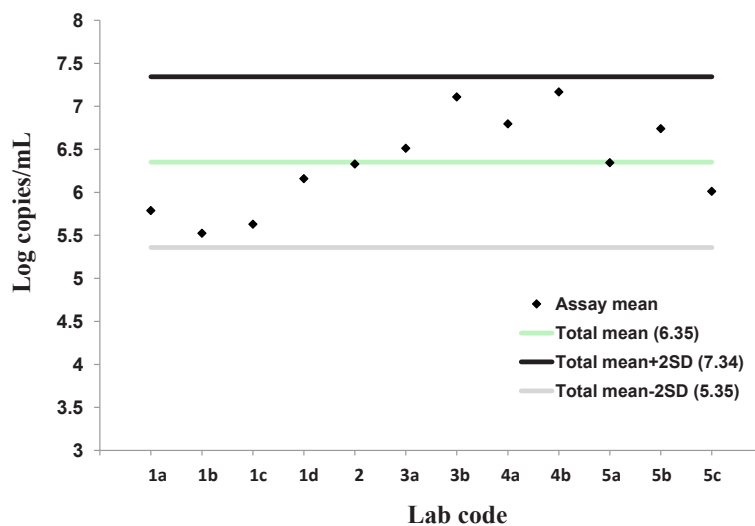
筆定量數據製成結果分布圖(圖四)，各數據亦皆在整體平均值 $\pm 2SD$ 範圍內，因此採計所有定量數據，故標定濃度為6.35 log copies/mL，換算回病毒核酸濃度為 2.2×10^6 copies/mL。

五、呼吸道病毒套組製備

呼吸道病毒套組規劃之濃度需大於等於6 log copies/mL。其病毒由食藥署向國外購買或由臺灣研究機構及醫療機構提供(表一)，部分病毒以適合之相應細胞進行培養(表一)，透過觀察CPE來確認病毒感染之情形。待產生明顯CPE現象時收集病毒液。Influenza A virus與Influenza B virus以beta-propiolactone去活化，其他病毒皆以65°C於水浴中加熱30分鐘去活化。取去活化病毒原液以PBS進行稀釋並分裝。分裝之候選標準品均存放於-80°C保存，並各取3份檢體依Digital PCR評估病毒核酸含量。結果顯示呼吸道病毒套組之平均濃度大於等於6 log copies/mL (表一)，符合原規劃濃度。

六、SARS-CoV-2核酸國家標準品安定性評估

SARS-CoV-2核酸標準品建議儲存的條件為-80°C，為了評估標準品的安定性，參照衛福部公布之藥品安定性試驗基準等相關規範，及考量標準品依儲存條件不同的耐受性，模擬



圖四、SARS-CoV-2核酸國家標準品共同標定之定量結果分佈

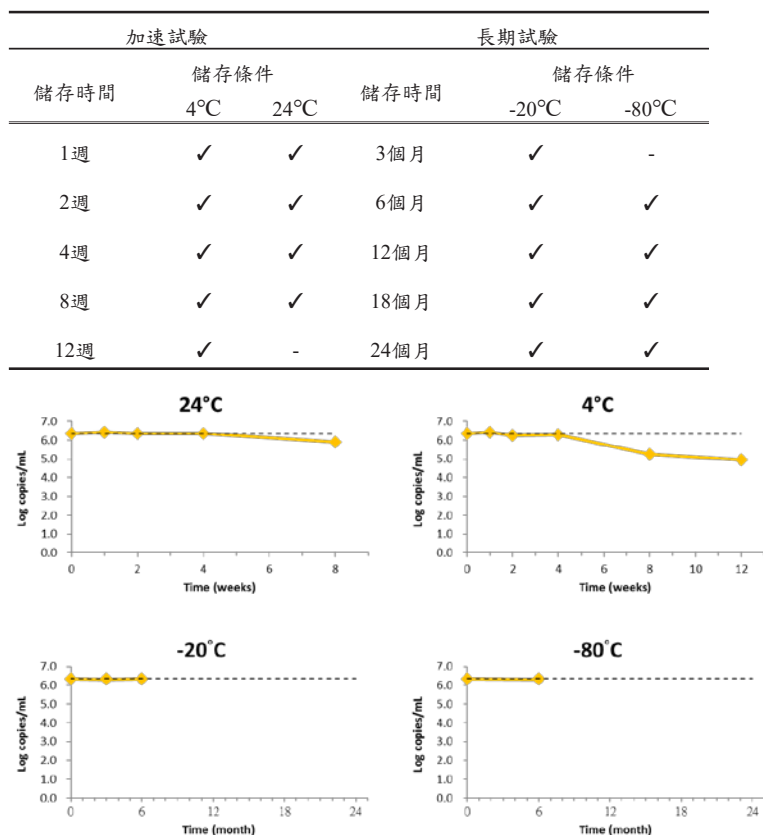
標準品在運送及使用時可能的溫度環境設計規劃SARS-CoV-2病毒核酸標準品的安定性評估研究(圖五)。將標準品存放於-80°C、-20°C、4°C及24°C等四種不同溫度，在特定時間點評估其濃度變化，以RT-qPCR進行3次獨立試驗，每次試驗均進行二重複，將相同溫度下不同時間點之定量結果以統計分析確認標準品之安定性。

本研究目前已完成儲放至6個月之安定性試驗，由實驗結果可見，核酸國家標準品於24°C與4°C儲存時，病毒核酸含量在儲放4週後並無顯著差異，而於第8週開始下降(圖五)，顯示SARS-CoV-2病毒核酸國家標準品4°C環境下至少可儲放4週；在長期安定性試驗中，國家標準品及工作標準品於-20°C與-80°C儲存至

6個月時，病毒核酸含量與起始濃度均無顯著差異(圖五)。顯示SARS-CoV-2病毒核酸國家標準品於-20°C及-80°C的條件下能穩定儲存至少6個月，後續仍會持續進行長期安定性評估研究。

討 論

分析5筆定性方法，其皆透過方法之LOD估算SARS-CoV-2核酸標準品濃度，經計算濃度落於5.87-9.36 log copies/mL之間(數據未列)，高低差異約為3,000倍，相較於定量方法所得數值差異較大。分析其原因，係各個廠牌(實驗室)定性方法建立時之LOD分析所使用的對照品類型皆不相同，評估基準存在差異，當



圖五、SARS-CoV-2核酸國家標準品安定性試驗評估結果

以其他類型檢品分析時，因基質以及核酸性質不同，產生的誤差難以評估，且SARS-CoV-2核酸標準品為Formalin去活化之病毒顆粒，在不同的萃取系統上可能產生干擾，此外，試驗中所使用的稀釋階倍率亦會影響回推濃度時之準確度。綜合以上原因導致定性方法在估算標準品濃度時可能有較大的變異，因此本研究在評估共同標定濃度時並未列入實際計算。

食藥署進行SARS-CoV-2候選核酸國家標準品國際共同標定研究時，WHO亦正同步辦理SARS-CoV-2 NAT國際標準品之國際標定研究(食藥署亦獲邀參與)，故若參考WHO生物製劑標準化專家委員會(Expert committee on biological standardization, ECBS)於2020年11月18日公布之「Collaborative Study for the Establishment of a WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA」研究報告⁽⁸⁾，其內容指出國際標準品標定濃度平均為7.61 log copies/mL，並將其訂定為7.4 log IU/mL，換算得1 IU約等於1.62 copies。若將SARS-CoV-2核酸國家標準品之標定結果追溯至國際標準品，換算後標定濃度為6.14 log IU/mL (1.38×10^6 IU/mL)，但該換算值僅簡單估計，食藥署囿於時間，尚無實際取國際標準品進行比對驗證。

Digital PCR技術為近年各國官方實驗室積極建立之技術，其為基於Taqman PCR之核酸絕對定量方法，特點是不須透過標準曲線即可對目標物進行定量分析。本實驗室目前建置之方法為晶片式Digital PCR，透過將Taqman PCR反應混合液均勻的塗到約20,000個小孔之晶片上，在適當的濃度下核酸隨機分布於晶片小孔中，接著在晶片上進行PCR反應，存在目標序列的小孔就會有螢光訊號，後續透過儀器判讀，並以軟體分析晶片上有訊號小孔的比例，即可得到反應混合液核酸中含有多少個目標序列。在本次共同標定試驗中由於疫情發展迅速，缺乏公定標準品與市售之IVD定量試劑組，因此各個實驗室多以內部自行發展之

Digital PCR參與共同標定，然而由結果發現在12筆定量數據中，定量濃度落於5.53-7.16 log copies/mL之間，高低差異約為42倍，推測為不同的萃取方式、Digital PCR平台與目標序列皆可能導致定量結果之差異。而在過去辦理的共同標定試驗中因具有一公定標準品進行校正⁽⁹⁻¹⁰⁾，因此各單位定量之數據較為一致，濃度落差皆小於10倍。此一狀況在定性實驗中更為顯著其濃度落於5.87-9.36 log copies/mL之間(數據未列)，高低差異約為3,000倍。由此顯示一公定標準品在不同方法間之重要性，故即使Digital PCR可絕對定量，但在不同平台間在具有公信力之標準品進行校正下，可獲得更精確之數據。

結 論

本研究已完成SARS-CoV-2核酸國家標準品與呼吸道病毒套組共10株病毒之製備，並根據共同標定研究結果，定量SARS-CoV-2核酸國家標準品濃度為6.35 log copies/mL (2.2×10^6 copies/mL)。建立完成之標準品與病毒套組於2020年8月完成全數對外供應，截至2021年3月31日為止，已有27個產官學研機構申請，分讓SARS-CoV-2標準品及呼吸道病毒套組共計294支，其中已有7個機構取得食藥署核准專案製造，期望可加速我國產業相關試劑研發量能，守護國人健康。

致 謝

感謝長庚醫療財團法人長庚紀念醫院、國立臺灣大學醫學院附設醫院、國家衛生研究院、國光生技股份有限公司以及美國BEI Resources提供相關病毒株。感謝美國食品藥物管理局生物製劑評估研究中心(CBER-USFDA)、英國生物標準暨管制國家研究所(NIBSC)、德國疫苗暨生物藥品聯邦研究所

(PEI)在內的WHO collaborating center、義大利國家藥品管制與評估中心(CNCF)及我國衛生福利部疾病管制署參與共同標定。

參考文獻

1. Darnell ME., Subbarao K., Feinstone, S.M., Taylor, D.R. 2004. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *J Virol Methods*, 121(1): 85-91.
2. Jureka A.S., Silvas J.A., Basler C.F. 2020. Propagation, Inactivation, and Safety Testing of SARS-CoV-2. *Viruses*. 12(6): 622.
3. Bonnafous P., Nicolaï M.C., Taveau J.C., Chevalier M., Barrière F. and *et al.* 2014. Treatment of influenza virus with beta-propiolactone alters viral membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*. 1838(1): 355-63.
4. Rogers W. 2012. in *Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices*. Elsevier, Nederland.
5. Wigginton K.R., Pecson B.M., Sigstam T., Bosshard F., Kohn T. 2012. Virus Inactivation Mechanisms: Impact of Disinfectants on Virus Function and Structural Integrity. *Environmental Science & Technology*. 46(1): 12069-12078.
6. World Health Organization. 2005. World Health Organization. Technical Workshop on Stability of reference materials for biological medicines and in vitro diagnostics. World Health Organization, Switzerland.
7. 衛生福利部。2016。藥品安定性試驗基準，105.03.11衛生福利部部授食字第1041408733號。
8. World Health Organization. 2020. Collaborative Study for the Establishment of a WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA. WHO/BS/2020.2402
9. 楊依珍、鍾嘉瑩、胡卉欣、陳仕軒等。2013。建立血液製劑病毒安全檢測體系-HCV genotype 2病毒核酸國家標準品之建立。衛生福利部食品藥物管理署102年度自行研究計畫報告。計畫編號：DOH101-FDA-72005。
10. 許家銓、巫博智、林伯霖等。2019。第二代HBV genotype B病毒核酸候選標準品之建立。衛生福利部食品藥物管理署108年度自行研究計畫報告。計畫編號：MOHW108-FDA-B-315-000751。
11. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A. and *et al.* 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 25(3): 2000045.
12. Vijgen L., Keyaerts E., Moës E., Maes P., Dusion G. and *et al.* 2005. Development of one-step, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR assays for absolute quantitation of human coronaviruses OC43 and 229E. *J Clin Microbiol*. 43(11): 5452-5456.
13. Schildgen O., Jebbink M.F., de Vries M., Pyrc K., Dijkman R. and *et al.* 2006. Identification of cell lines permissive for human coronavirus NL63. *J Virol Methods*. 138(1-2): 207-210.
14. Vargas H., Diaz Á., Celis Y., Díaz L., Gómez S. and *et al.* 2016. In-house standardization and validation of a multiplex RT-PCR assay for the detection of 13 respiratory viruses. 14(26): 9-15.
15. Kwofie T.B., Anane Y.A., Nkrumah B., Annan A., Nguah S.B. and *et al.* 2012. Respiratory viruses in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection in Ghana. *Virol J*. 10(9): 78.

Establish the National Standard for SARS-CoV-2 and Respiratory Virus panel for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAAT)

PO-CHIH WU, MING-HSIEN WU, PO-LIN LIN, HSIN-MEI CHEN,
YI-HSUAN PENG, JIA-CHUAN HSU, MEI-CHIN LIN, SU-HSIANG TSENG
AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

In respond to the public health event of global SARS-CoV-2 epidemic, most laboratories use nucleic acid amplification techniques to screen for SARS-CoV-2. In reference to Taiwan Food and Drug Administration (TFDA), proclamation on manufacturing document for nucleic acid testing reagents in respond to coronavirus emergency usage, it is required to use the corresponding reference materials for evaluateing the products' efficiency. To support the domestic research and development industry, TFDA emergently made the SARS-CoV-2 national standards and respiratory relevant virus panel. The SARS-CoV-2 nucleic acid national standard was prepared by cell culture and inactivated with 0.01% formalin. The inactivated stock was divided into 324 vials (0.5 mL/vial) candidate National Standard (Lot: 109-03). To enhance the objectivity and credibility, the international collaborative study for the SARS-CoV-2 National Standard was held with 7 institutes, covering 4 different analytical methods and 3 target genes. The mean contents of the candidate National Standard was 6.35 log copies/mL. In addition, the respiratory virus panel collected 9 respiratory viruses including HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, Influenza A/B, Adenovirus, Respiratory syncytial virus, Rhinovirus, and parainfluenza, which were inactivated and quantified by appropriate methods. The established SARS-CoV-2 nucleic acid standards and respiratory virus panel had all been provided to the manufacturer, which served as a basis for the research and development and quality control of IVD kits.

Key words: virus nucleic acid reference materials, SARS-CoV-2, COVID-19, respiratory related viruses, collaborative study.