新冠病毒感染力價檢驗方法

Determination of SARS-CoV-2 Infectious Titer

1. 適用範圍：本方法適用於測定細胞增殖之新型冠狀病毒感染力價。
2. 檢驗方法：將已離心移除細胞碎片之具感染力價病毒液檢體，經稀釋並感染Vero E6細胞3-5天後，以相位差顯微鏡(phase contrast microscope)觀察細胞是否出現病變效應(cytopathic effect, CPE)，記錄與計算新冠病毒感染力價。

2.1. 工作環境[註1]：新冠病毒相關檢驗需在生物安全第三等級(BSL-3)實驗室中進行，新冠病毒感染與稀釋等相關操作應在符合Class II，Type B2或A2之生物安全操作櫃中進行，並依衛生福利部疾病管制署相關規範[註2]操作。

註1：本試驗全程使用第三級危險群(risk group 3, RG3)病原體，需在生物安全第三等級(BSL-3)實驗室中進行，操作時應遵守生物安全相關規範。

註2：感染性生物材料管理辦法、衛生福利部感染性生物材料管理作業要點、實驗室生物風險管理、新型冠狀病毒(SARS-CoV-2)定點照護檢驗(POCT)之使用安全指引及新型冠狀病毒(SARS-CoV-2)之實驗室生物安全指引。

2.2. 裝置

2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)，Class II, Type B2或A2者。

2.2.2. 高壓滅菌釜：可達121℃以上，且每平方英吋15磅以上之壓力者。

2.2.3. 冰箱：可維持5 ± 3℃者。

2.2.4. 冷凍櫃：可維持-30 ± 3℃者。

2.2.5. 超低溫冷凍櫃：可維持-80 ± 5℃者。

2.2.6. 二氧化碳細胞培養箱：可設定35℃或37℃，並維持5% CO_2者。

2.2.7. 細胞計數器：Beckman Coulter cell counter Z2，或同級品。

2.2.8. 相位差顯微鏡：可達400倍放大倍率。

2.2.9. 即時聚合酶鏈反應器：Roche LightCycler 480 Instrument II，或同級品。

2.2.10. 冷凍離心機：可供15 mL及50 mL離心管使用，可達2000 ×g以上，具有低溫(4℃)溫控效果者。

2.2.11. 照相設備：具備照相以及檔案傳輸功能者。

2.3. 試藥

2.3.1. 細胞株：Vero E6細胞株(ATCC CRL-1586)，使用代數不超過15代，且經細菌、黴菌及黴漿菌檢測結果均呈陰性反應。

2.3.2. 病毒株：SARS-CoV-2，如Wuhan strain、Omicron (BA.1)或Omicron (BA.4 / BA.5)等，且必須已知全基因序列，建議病毒株自取得後，繼代培養不超過3代。

2.3.3. 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)。

2.3.4. 達爾柏克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)：Sigma-Aldrich D5796，或同級品。

2.3.5. 磷酸鹽緩衝溶液(Phosphate buffered saline, PBS)。

2.3.6. 胰蛋白酶(Trypsin)：Thermo Fisher Scientific 25300054，或同級品。

2.3.7. 抗生素：含盤尼西林(penicillin) 10,000 units/mL及鏈黴素(streptomycin) 10,000 units/mL。

2.3.8. 二甲基亞碸(Dimethyl sulfoxide, DMSO)。

2.3.9. QIAamp Viral RNA Mini Kit，或同級品。

2.3.10. Roche LightCycler Multiplex RNA Virus Master，或同級品。

2.4. 器具及材料

2.4.1. 可調式微量分注器：2 µL、10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.2. 濾膜吸管尖頭(Filter pipette tips)：10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.3. 刻度吸管：5 mL及10 mL吸管應有0.1 mL之刻度；25 mL吸管應有1 mL之刻度。

2.4.4. 微量離心管：1.5 mL。

2.4.5. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。

2.4.6. 細胞冷凍小管：2.0 mL。

2.4.7. 細胞培養盤：T75 flask、T150 flask及96孔細胞培養盤(96-well plate)。

2.4.8. 稀釋盤：96深孔盤(96 deep well plate)。

2.4.9. 細胞漸凍盒：可存放細胞冷凍小管(2.0 mL)，置於-80℃可穩定降溫者。

2.5. 試劑之調製

2.5.1. DMEM-10%FBS：取DMEM 890 mL、FBS 100 mL及抗生素10 mL，混合均勻。

2.5.2. DMEM-2%FBS：取DMEM 970 mL、FBS 20 mL及抗生素10 mL，混合均勻。

2.5.3. DMEM-5%FBS：取DMEM 950 mL及FBS 50 mL，混合均勻。

2.5.4. 細胞凍存液：取DMEM-5%FBS 9.5 mL及DMSO 0.5 mL，混合均勻。

2.6. 細胞培養

2.6.1. Vero E6細胞以DMEM-10%FBS於T75 flask進行培養，置於37℃、5% CO_2 之細胞培養箱培養，供後續實驗使用。

2.6.2. 以相位差顯微鏡觀察Vero E6細胞，待細胞生長至90% confluence即移除舊有細胞培養液，加入PBS 5 mL清洗一次，移除PBS，接著緩慢地加入trypsin 2 mL並輕微搖晃細胞培養盤直至trypsin完整覆蓋盤面，再移除trypsin，置於37℃、5% CO_2細胞培養箱作用2分鐘，加入DMEM-10%FBS 10 mL中和trypsin的反應並沖洗使細胞分離，收集細胞液至離心管。

2.6.3. 使用細胞計數器計算細胞數量，依照實驗需求凍存細胞或培養至96孔細胞培養盤供後續實驗使用。

2.6.3.1. 凍存細胞：

將細胞漸凍盒及新鮮配製之細胞凍存液靜置於冰上。取2.6.2節之細胞液先經細胞計數器計算細胞數量，經750 ×g、5分鐘離心後，移除舊有細胞培養液，再加入適量細胞凍存液，以刻度吸管混勻避免細胞結成團塊，配製成1×10^6 - 5×10^6 cells/mL。將前述細胞液以每管1 mL分裝至細胞冷凍小管後放入細胞漸凍盒，蓋上盒蓋置於-80℃超低溫冷凍櫃暫存，至少1天後再將細胞移入液態氮中保存。

2.6.3.2. 病毒感染力價測定用細胞：

計算Vero E6細胞數量並以DMEM-10%FBS配製成1×10^5 cells/mL，接種於96孔細胞培養盤，每孔100 µL，置於37℃、5% CO_2細胞培養箱培養16-18小時後，供2.7.節使用。

2.7. 病毒感染力價測定(註3)

2.7.1. 於進行病毒感染前1小時，將2.6.3.2.節96孔細胞培養盤中舊有細胞培養液完全移除後，每孔以PBS 100 µL清洗一次，移除PBS，加入新鮮配製之DMEM-2%FBS細胞培養液，每孔100 µL。

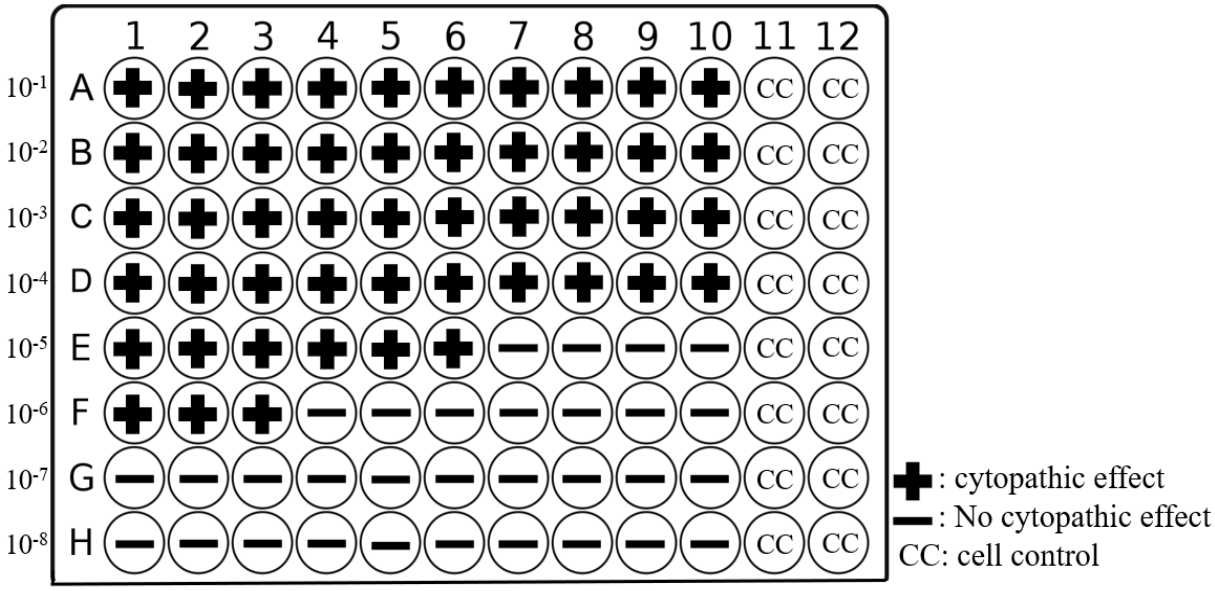
2.7.2. 自冷凍櫃取出待測定感染力價之病毒液(以下稱病毒液)，置於BSC操作台之試管架上直至解凍。

2.7.3. 取1稀釋盤進行10倍序列稀釋，於稀釋盤之A1~H1(依獨立稀釋階數，每個獨立稀釋階1行)各別加入DMEM-2%FBS 1350 µL。取2.7.2.節已解凍之病毒液150 µL加入A1中，更換新濾膜吸管尖頭後進行20次之移液(pipetting)，再取出該稀釋階150 µL加入B1，再次更換新濾膜吸管尖頭後進行20次之移液，以此類推共進行8階序列稀釋。

2.7.4. 以八爪可調式微量分注器，將2.7.3節稀釋病毒液進行20次移液。自稀釋盤(A1~H1)取出100 µL稀釋病毒液加入2.7.1.節96孔細胞培養盤中，每個稀釋階10重複，96孔細胞培養盤最後2行為無病毒感染之陰性對照組，

每孔加入DMEM-2%FBS 100 μL。置於35℃、5% CO_2細胞培養箱中培養3-5天，以相位差顯微鏡觀察細胞病變，於第5天利用Reed-Muench方法計算病毒之50%細胞感染力價(fifty-percent cell culture infective dose/mL, $CCID_{50}$/mL)。

病毒感染力價測定計算方式：



Dilution	CPE negative	CPE positive	Cumulative		Infection rate (%, B/A+B)
			Negative (A)	Positive (B)	
10^{-1}	0	10	0	49	100.0
10^{-2}	0	10	0	39	100.0
10^{-3}	0	10	0	29	100.0
10^{-4}	0	10	0	19	100.0
10^{-5}	4	6	4	9	69.2
10^{-6}	7	3	11	3	21.4
10^{-7}	10	0	21	0	0

病變效應判定：受病毒感染之細胞於第5天觀察時出現異於陰性對照組之生長現象，即判定該孔細胞產生病變效應。

1. 計算50%細胞死亡之比例距離(proportionate distance)：

   [大於50%死亡率-50%] / [(大於50%死亡率) - (小於50%死亡率)]

   = (69.2% - 50%) / (69.2% - 21.4%)

   = 19.2% / 47.8% = 0.402

2. 計算50%細胞死亡最低稀釋倍率之對數值= $\log 10^{-5}$

3. 計算比例距離與稀釋倍率之總和：$CCID_{50}$之對數計算= $10^{-5-0.402}$

4. 原始添加之病毒液體積：100 μL = 0.1 mL

   每mL病毒之50%細胞感染力價：

   $CCID_{50}/mL = (1 / 10^{-5.402}) / 0.1 = 2.52 \times 10^{6}$

註3：第2.7.1.節及第2.7.4.節建議以反向移液(reverse pipetting)方式進行，將濾膜吸管尖頭斜靠孔壁將液體加至96孔細胞培養盤，勿直接沖洗細胞。

2.8. 儀器測定病毒核酸濃度

2.8.1. 每次稀釋病毒後，以核酸萃取方法萃取病毒RNA後，利用即時聚合酶鏈反應器(real-time PCR)檢驗不同稀釋階病毒感染力價之病毒核酸濃度。

2.8.2. 上述試驗經至少3次獨立試驗後，計算病毒核酸濃度之平均值、標準偏差及其他相關統計數據。

2.8.3. 核酸濃度可參考本署生產之新冠病毒國家標準品或WHO國際標準品。

參考文獻

1. Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Epidemiol. 27: 493-497.
2. Mautner, L., Hoyos, M., Dangel, A., Berger, C., Ehrhardt, A. and Baiker A. 2022. Replication kinetics and infectivity of SARS-CoV-2 variants of concern in common cell culture models. Virol. J. 19: 76.
3. 衛生福利部食品藥物管理署。2020。新冠病毒抗體中和力價檢驗方法(RA05I001.001)。109 年 12 月 10 日公開。
4. 衛生福利部食品藥物管理署。2022。新型冠狀病毒抗原檢測試劑檢驗方法(RA04B001.001)。111 年 12 月 30 日公開。