

行政院衛生署疾病管制局科技研究發展計畫原始數據資料庫

計畫名稱：RD 細胞適應培養(Adaptation)建立各型腸病毒標準病毒株庫

計畫編號：DOH94-DC-2004

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：林翠莉

計畫主持人服務單位：行政院衛生署疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人職稱：副研究員

研究報告中文摘要：

關鍵詞：腸病毒、標準株、橫紋肌瘤細胞株、適應培養

腸病毒是非常廣泛的存在世界各地，人類是它的自然宿主，實驗室診斷以病毒培養為主，一般需一至二週的時間，由於腸病毒群由於其特性及對不同的細胞株有著不同的感受性(Susceptibility)，現今尚無單一的細胞株可以適用在所有腸病毒群的分離與增殖。

RD 細胞株被選用為腸病毒標準株適應培養的細胞株，主要是它對於克沙奇 A 群病毒有良好之感受性、在繼代的過程中可維持良好之敏感性、實驗室較易維持細胞之穩定性、具有 HEL 細胞株之特性但更容易維持繼代增殖及目前為疾病管制局各合約實驗室唯一共同採用之細胞株等因素。

本計畫首先建立 RD(Rhabdomyosarcoma)細胞株之細胞庫(Master cell stock)，保存之細胞株需証明無細菌(包括黴漿菌)真菌及外來病毒的污染並經感受性(Susceptibility)測試，方可將腸病毒標準株以傳統培養方法盲目繼代(Blind passage)使其適應(Adaptation)在 RD 細胞增殖。當病毒在 RD 細胞明顯產生細胞病變時，就增量培養保存，適應培養之病毒經感染價測定(TCID₅₀)，腸病毒標準抗血清中和試驗及 VP1 基因定序比對証明病毒血清型無誤方可當種毒使用。

計劃結果初步顯示，已有 44 株腸病毒標準株被適應培養 RD 細胞株，並可進一步增殖及備為種毒，這些標準株接種在 RD 細胞株時，在適應培養的第一代或第二代時即有明顯的細胞病變出現，逐能順利的進行增量，繼代代數平均 3~4 代，產生的病毒量也較高，平均每一株標準株之 TCID₅₀ 皆 $10^{6.0}/50\text{ul}$

(除 Echo4, 14, 31, E V68 及 BrCr)；另有 23 株之標準株未能到達增量備種為種毒之原因為接種培養在 RD 細胞株上，歷經 4 次繼代，仍無細胞病變出現或標準株在繼代 2~3 代時，雖可觀察到細胞病變，但細胞病變之狀況尚無法進一步進行大量增殖備為種毒之工作，或許需再多次繼代以提高其感受性以便進行增量；若就其原因在於根本無法適應在 RD 細胞株上生長，可將接種到 sulking mouse 中或尋求其他敏感性較高的細胞株，以建立更多的病毒株庫保有種毒。

以一個實驗室而言，必須具備多種不同的細胞株，方可將所有的腸病毒標準株保有其種毒，但勢必會增加實驗室的負荷量，RD 細胞株的適應培養，著實改善的人力的負擔，更重要的是建立了腸病毒的標準病毒株庫。

中文摘要

關鍵詞：腸病毒、標準株、橫紋肌瘤細胞株、適應培養

腸病毒是非常廣泛的存在世界各地，人類是它的自然宿主，實驗室診斷以病毒培養為主，一般需一至二週的時間，由於腸病毒群由於其特性及對不同的細胞株有著不同的感受性(Susceptibility)，現今尚無單一的細胞株可以適用在所有腸病毒群的分離與增殖。

RD 細胞株被選用為腸病毒標準株適應培養的細胞株，主要是它對於克沙奇 A 群病毒有良好之感受性、在繼代的過程中可維持良好之敏感性、實驗室較易維持細胞之穩定性、具有 HEL 細胞株之特性但更容易維持繼代增殖及目前為疾病管制局各合約實驗室唯一共同採用之細胞株等因素。

本計畫首先建立 RD(Rhabdomyosarcoma)細胞株之細胞庫(Master cell stock)，保存之細胞株需證明無細菌(包括黴漿菌)真菌及外來病毒的污染並經感受性(Susceptibility)測試，方可將腸病毒標準株以傳統培養方法盲目繼代(Blind passage)使其適應(Adaptation)在 RD 細胞增殖。當病毒在 RD 細胞明顯產生細胞病變時，就增量培養保存，適應培養之病毒經感染價測定(TCID₅₀)，腸病毒標準抗血清中和試驗及 VP1 基因定序比對證明病毒血清型無誤方可當種毒使用。

計劃結果初步顯示，已有 44 株腸病毒標準株被適應培養 RD 細胞株，並可進一步增殖及備為種毒，這些標準株接種在 RD 細胞株時，在適應培養的第一代或第二代時即有明顯的細胞病變出現，逐能順利的進行增量，繼代代數平均 3~4 代，產生的病毒量也較高，平均每一株標準株之 TCID₅₀ 皆 $10^{6.0}/50\mu\text{l}$ (除 Echo4, 14, 31, E V68 及 BrCr)；另有 23 株之標準株未能到達增量備為種毒之原因為接種培養在 RD 細胞株上，歷經 4 次繼代，仍無細胞

病變出現或標準株在繼代 2~3 代時，雖可觀察到細胞病變，但細胞病變之狀況尚無法進一步進行大量增殖備為種毒之工作，或許需再多次繼代以提高其感受性以便進行增量；若就其原因在於根本無法適應在 RD 細胞株上生長，可將接種到 sulking mouse 中或尋求其他敏感性較高的細胞株，以建立更多的病毒株庫保有種毒。

以一個實驗室而言，必須具備多種不同的細胞株，方可將所有的腸病毒標準株保有其種毒，但勢必會增加實驗室的負荷量，RD 細胞株的適應培養，著實改善的人力的負擔，更重要的是建立了腸病毒的標準病毒株庫。

Abstract

Keyword: Prototype 、 Enterovirus 、 Rhabdomyosarcoma cell line

Enteroviruses are a group of ubiquitous viruses with humans being their natural host. Virus culture has played a major role in laboratory diagnosis, and normally it takes one to two weeks to complete. However, there has been no single cell line suitable for culturing all enterovirus serotypes because cells exhibit diverse susceptibility to enteroviruses.

The Rhabdomyosarcoma (RD) cell line has been chosen as a standard cell line for culturing of Coxsackievirus A viruses since RD cells are highly susceptible to infection, stable while passaging, easy to propagate and a common cell line used by all contracted laboratories.

We attempted to establish a RD master cell stock, proving that the preserved cell line is germ-free and free from infection by exogenous viruses. Then the RD master stock was assessed for its susceptibility before subsection to blind passage with enterovirus prototypes for adaptation. After infected RD cells showed cytopathic effect (CPE), viruses were propagated, titrated, subjected to neutralization test and VP1 sequencing before they were used as seed viruses.

The data indicated that there have been forty-four enterovirus prototypes adapted to RD cell culturing, with them being further propagated as seed viruses. The RD cells infected by the prototype enteroviruses showed typical CPE following first or second passaging, with progressive viral yield at the amount averaging greater than $10^6/50 \mu\text{l}$ TCID₅₀ after three to four passages (except the ECHO-4, -14, EV68 and BrCr strains). There are twenty-three prototypes that were not qualified as seed viruses because they either failed to show CPE after four passages or showed atypical CPE after two to three passages. We assumed

that these viruses were not able to adapt in the RD cells, and recommended that they be inoculated into suckling mice or other potential cell lines for development of seed viruses.

The adaptation of enteroviruses in the RD cell line is thought to lower the number of cell lines used in a virus laboratory, and thus the workload. More importantly, we have established a stock bank for prototype viruses for future use.

前言

腸病毒是非常廣泛的存在世界各地，且人類是它的自然宿主，其傳染途徑主要是經糞口傳染方式，在溫帶氣候地區，腸病毒活於夏季病毒；在熱帶及亞熱帶地區，則傾向於全年或雨季流行，所以台灣地區全年皆可能有感染個案發生，且在臨床上的表現相當多樣性，如疱疹性咽峽炎，手足口病、無菌性腦膜炎、腦炎、心肌炎、肋肌痛、麻痺症等表徵，實驗室診斷以病毒培養為主，病毒可從病患之喉嚨、水泡液、大便、血清(小於3日內之急性期血清)及脊髓液等檢體中分離，一般需一至二週的時間，但因型別不同及實驗室的條件、細胞株之選取有時觀察三~四週仍有少數之病毒株分離出。而腸病毒在一年的流行趨勢中，無論是在台灣地區、美國或者是日本，其流行並非單一血清型別的病毒，而是由好幾種血清型別的病毒在交互流行，它不但反應出病原體、宿主及環境的特性，也包括傳染模式⁽¹⁾。每一種傳染模式不僅反應病原體的特性，也決定了流行病學上及臨床上的表現。

一九九八年全台灣爆發腸病毒疫情後，政府、醫界及相關學術單位莫不積極投入人力及物力，蒐集及研究腸病毒疫情流行趨勢、防治及治療方法。更建立了各項腸病毒監測網，其中疾病管制局對於病毒性合約實驗室檢驗能力之扶植與提昇更是不遺餘力，使得分佈於全國十二家合約實驗室在腸病毒的防治工作上也扮演了相當重要的角色，除進行例行性的腸病毒檢驗工作外，更負責法定傳染病-腸病感染併發重症之實驗室診斷工作，以利

衛生單位即時掌握國內腸病毒之流行趨勢及流行病毒型別的變動情形，並可長期累積腸病毒感染症之本土性資料庫，可以讓我們了解腸病毒在國內不同地區及季節的活動狀況。另疾病管制局亦持續於腸病毒相關研究發展，開發致病原快速鑑定方法及血清流行病學調查，例如 Real time RT-PCR(即時定量聚合酶連鎖反應)來即時偵測腸毒的感染以及建立以 Pool-antiserum 來鑑定 PAN-Enterovirus 之血清型別，由於交通往來的頻繁以及隨著時日群體免疫消失等因素，將會有其它不同血清型別的腸病毒或已存在而尚未被鑑定出不同型別病毒出現，基於以上的種種原因，標準株不僅是研究開發檢驗試劑不可欠缺的對照病毒株，同時亦為腸病毒單價及多價抗血清製備時必備的毒株。再者目前各合約實驗室所使用之市售螢光標幟抗體作病毒型別鑑定時所遭遇到的非特異螢光反應問題，借助單一化中和試驗定可解決其病毒型別判定之難題。

由於腸病毒群由於其特性及對不同的細胞株有著不同的感受性 (Susceptibility)，所以並沒有單一的細胞株可以適用在所有腸病毒群的分離與增殖⁽²⁾，早期都是採用 primary monkey kidney 細胞，如 CMK(Cynomolgus monkey kidney)、HK(Human Kidney)、RMK(Rhesus monkey)及 BGM(Baffero green monkey kidney)等，但受限於其來源、價格及實驗室如何維持恆定系統等問題，陸續有不同的細胞株被應用，如 HEL(Human Embryo Lung；

WI-38, MRC5)、GPE(Guinea Pig Embryo), RD(Rhabdomyosarcoma)、HEp-2(源自於 Human carcinoma of the larynx) 及 Vero 等細胞，有很多的實驗室工作者致力於不同細胞組合之腸病毒分離率探討，無論是從臨床檢體的病毒分或標準毒株之感染模式都顯現有相當不同的血清型毒株差異。

在臨床上被採用的細胞株中，若以 RMK 及 WI-38 之細胞株來分離克沙奇病毒 A 群及伊科病毒群則會遠優於 Hela 細胞株；另外 CMK 及 HEL 也是一個不錯的選擇，若以 RMK 及 Hela 細胞株來分離小兒麻痺病毒及克沙奇病毒 A 群則會遠優於 WI-38；克沙奇 B 群病毒對於 BGM 細胞株的感受性相當不錯皆可反應在分離率及速度上(即 CPE 出現之時間)，而 Hela 及 Vero 等細胞株也可做為分離該群病毒之選擇之一^(3,4,5,6,7)。RD 細胞株源自於 Rhabdomyosarcoma)，是由 McAllister 等人所建立的^(8,9)，有很多的資料顯示它對於大部份克沙奇 A 群病毒有很好的感受性，且可反應較高的感染效價；而對於克沙奇 B 群病毒不僅感受性不高，且感染效價低。雖然說 HEL 細胞株在分離伊科病毒群有類似於 RD 細胞株之感受性，但在實驗室上之供應不如 RD 細胞穩定，且 HEL 細胞繼代超過 25 代以上對病毒的感受性就遞減。基於現今尚無單一細胞株適應培養所有血清型腸病毒標準株之報告；目前 RD 細胞株則為各合約實驗室所共同選用的細胞株以為臨床檢體腸病毒分離之用，要使這麼多種的腸病毒適應培養於單一細胞株需要花很多的時間

及人力，且在學術上的發表不見得會受重視，但對於實驗室檢驗工作將會
是一大助力，更是重要的基礎工作。

材料與方法

材料

標準株之來源則以

- 一、 購自 American Type Culture Collection (ATCC) 之腸病毒標準株
- 二、 美國亞特蘭大病管制中心贈予
- 三、 日本 Nation Institute Health 及 National Institute of Infectious Disease 等
贈予

方法

A.RD 細胞株繼代培養^(10,11)

1. 由液態氮桶中取欲 recover 之 RD 細胞株一管
2. 迅速置於 37°C 水浴箱中回溫，以 Virkon 消毒液擦拭瓶蓋接合處
3. 緩慢滴入 10cc10%DMED 未含抗生素生長培養基後，將細胞放入 75cm² 培養瓶中，置入 36°C 二氧化碳培養箱
4. 隔夜後觀察細胞生長狀況並吸取上清液
5. 再放入 10cc 10%DMED 未含抗生素生長培養基
6. 觀察細胞生長狀況以為繼代使用
7. 吸取上清液
8. 放入適量 0.25%trypsin-EDTA
9. 吸取 trypsin-EDTA
10. 取適量 10%DMEM 培養基充散細胞
11. 計算細胞數目
12. 稀釋每 1CC 含有 1×10^5 細胞，以為繼代培養之用
13. 細胞繼代代數約為 15-20 代，重新由細胞庫取出繼代使用

B. 徵漿菌之測定(Mycoplasma Detection) (採用 ATCC 之試劑套組)

1. 取至少經繼代二次而未加抗生素之細胞且不經 trypsin-EDTA 處理
2. 去掉上清液，以細胞括杓將細胞括下於殘存液體中，取 1CC 放入 1.5CC 之 ependoff 管中
3. 於 4 °C 下離心 20 分鐘 12000xg，並去除上清液
4. 加入 100ul 的 Lysis Buffere 混合均勻
5. 加 熱 95 °C 10 分鐘
6. 取出 5ul 之檢體量(含待測檢體及陽性與陰性對照組)
7. 加入 1ul 之引子、45ul Taq polymerase buffer 及 0.2ul(1umit)Taq polymerase
8. 混合均勻離心， 94°C 2 分鐘
9. 設定 30cycles(Denature : 94°C , 30 秒 ; Annealing : 55°C , 30 秒 ; Extention : 72°C , 60 秒)，由第一階段完成 PCR 之產物中取出 5ul
10. 放入 1ul 之引子、45ul Taq polymerase buffer 及 0.2ul(1umit)Taq polymerase，混合均勻離心，94°C 2 分鐘
11. 設定 30cycles(Denature : 94°C , 30 秒 ; Annealing : 55°C , 30 秒 ;

Extention : 72°C , 60 秒)

12. Hold 4°C , 取出第二階段 PCR 產物 10ul 以電泳分析觀察最後結果

C. 腸病毒標準株 RD 細胞適應培養(Adaptation)^(8,9,10,11)

1. 將已發育完成 RD 細胞之培養基液體丟棄
2. 接種 0.2ml 的腸病毒標準株
3. 置入 36°C 二氧化碳培養箱培育 1 小時，每間隔 15 分鐘搖晃培養管之底部，使接種之檢體均勻散佈在細胞之表層，以利吸附
4. 加入 2%FCS DMEM 維持培養基
5. 另取二支培養細胞管各接種 Hank's 液 0.2ml 做為對照之用
6. 置於 36°C 二氧化碳培養箱繼續培養
7. 由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態是否改變

當接種細胞呈現細胞病變(CPE)時，則置於-70°C 及 37°C 冷凍、解凍二次

8. 4°C , 2100g 離心 15 分鐘
9. 將上清液移至 Cryotube 中，放置於 -70°C 冰箱中並記錄之
10. 將已呈現細胞病變之標準株再依步驟 2~10 培養繼代增量
11. 若經 4-5 代仍無 CPE 時，則改為 RD 細胞酵素處重新病毒重新繼代

或初生乳 RD 細胞交互繼代感染

12. 如無細胞病變則於第 6-7 天細胞培養液冷凍、解凍三次再次繼代直到細胞產生明顯病變，如此繼代 5-6 次，觀察細胞病變之狀況再決定終

D、動物接種⁽³⁾

1. 選擇出生 24 小時之乳鼠
2. 取 0.1ml 之標準株皮下注入乳鼠的 dorsa fat
3. 連續觀察 14 日
4. 待出現 Flaccid paralysis 和 hind leg Flaccid 之症狀

止時間

5. 取鼠酮體處理後接種 RD 細胞觀察細胞病變至作不見細胞病變，則細胞及培養液冷凍、解凍三次
6. 4°C 2100g 離心 15 分鐘
7. 上清液接種初生乳鼠，如此乳鼠、細胞交互繼代接種

E、Viral Titration and Determination of TCID₅₀⁽¹²⁾

1. 把欲被測定的腸病毒標準株增殖於 150cm² 的培養瓶
2. 當呈現+++~++++細胞病變時(CPE)，則置於-70℃及 37℃冷凍、解凍二次
3. 4℃，2100g 離心 15 分鐘
4. 將上清液分裝於 Cryotube 中(0.5ml/管)，放置於 -70℃冰箱中並記錄之
5. 取 8 支 4ml 容量塑膠管依序標示 1, 2...8 各加 1.8ml 之細胞維持培養基。
6. 取已增量之標準株上清液 0.2ml 加入第 1 管混合後取 0.2ml 至第 2 管，依次稀釋至第 8 管。病毒稀釋液由 10^{-1} 至 10^{-8} 每一稀釋倍數 10 孔 (Micro plate)，每孔加 50μl 稀釋病毒、細胞對照 10 孔，每孔加 100μl 細胞維持培養基。
7. 置入 36℃二氧化碳培養箱繼續培養
8. 由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態是否改變
9. 觀察終止依 Reed&Muench 法計算病毒感染價 (TCID₅₀)。

F. 中和試驗(型別鑑定)^(13, 14)

1. 取已測定感染價之腸病毒標準株。
2. 以細胞維持培養基稀釋為 50 μ l 含有 100 TCID₅₀ 之病毒液。
3. 取 100 TCID₅₀ 病毒液 200 μ l 再以細胞維持培養基作 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 稀釋
(Back titration 用)。
4. 96 孔微量平底盤 E - H 列橫向 1 - 12 孔各加 50 μ l 細胞維持培養基。
5. A 列橫向 1 - 12 孔各加入已知組合型別之腸病毒抗血清 50 μ l、每組 2
孔(每組五種抗清，每型 100 單位)
6. A 列橫向 1 - 12 孔各加 100 TCID₅₀ 攻擊病毒 50 μ l。
7. E-H 列橫向 1-10 孔加 Back titration 用稀釋病毒，每一稀釋倍數加
10 孔，第 11 孔加 50 μ l 細胞培養基當細胞對照用(control cell)，
置入 36°C，CO₂ 培養箱 1 小時。
8. 每孔加 100 μ l (5x10⁴ 細胞) RD 細胞懸浮液。
9. 置 36°C，CO₂ 培養箱繼續培養。
10. 於 3~7 天，每天以倒立顯微鏡觀察細胞病變。
11. 結果判定：對照細胞形態無異常而攻擊病毒量在 32~1000 TCID₅₀，
而試驗組病毒被二組組合抗血清完全中和者(無細胞病變)，則該病毒判
定為與二組組合血清中所含之共同血清型相同型別。

G. RT-PCR^(15, 16, 17)

病毒 RNA 萃取(採用 QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Cat.No. 52906))

取 560 μ l AVL Buffer(含 carrier RNA) 至 eppendorf 微量管內，加入 140 μ l 檢體(病毒液)，震盪 15 秒，放置室溫 10 分鐘，加入 560 μ l 100% 酒精，震盪 15 秒，將混合之溶液吸至 QIAamp Spin Column，離心 8000rpm 1 分鐘，加入 500 μ l Buffer AW1，離心 8000rpm 1 分鐘，加入 500 μ l Buffer AW2，離心 8000rpm 1 分鐘後，再離心 12000rpm 1 分鐘，加入 60 μ l Buffer AVE，放置室溫 5 分鐘以上，離心 8000rpm 2 分鐘收集所 elute 之液體。

RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

將下列試劑及 RNA 抽取物放入, 同一微量管內，RNA 抽取物 10 μ l，F' Primer 3 μ l，R' Primer 6 μ l，ddH₂O 22 μ l，利用 PCR 機器加熱 70°C，10 分鐘，加入下列試劑，2X RT-PCR Buffer 50 μ l，Taq DNA Polymerase 2 μ l，Reverse Transcriptase 2 μ l，RNASEOUT 2 μ l，放入 PCR 機器，設定條件如下：42°C，50 分鐘、95°C 3 分鐘、94°C 30 秒、48°C，1 分 30 秒，40 個循環，72°C，1 分 30 秒，72°C，7 分鐘，4°C， ∞ 跑電泳

利用 1X TBE buffer 泡成 1.5% Agarose gel，加熱 3 分鐘完全溶解，降

溫至 50°C 左右，加至電泳 cassette 內，放入齒狀物，待凝固，將凝固後的 gel 放入電泳槽內，取 1~2 μ l 6X loading dye 與 8 μ l RNA 產物混合，加至 gel 孔洞內，跑 100V，30 分鐘，EtBr 染色，在 UV 下，觀察最後結果(分子量為 450bp)

所採用之引子如下：

012-ATGTAYGTICCCICGIGG	(2875-2894)
040-ATGTAYRTICCIMCIGGIGC	(2905-2924)
011-GCICCGAYTGITGCCRAA	(3311-3292)

結果

本次計劃共計 67 株腸病毒標準株，其中 44 株之標準株已被適應培養 RD 細胞株上，並可完成增量之工作，每一株標準株均測得其 TCID₅₀，並採用腸病毒 VP1 進行部份基因定序及中和試驗確定型別，詳細結果如表一；另外尚有 23 株之標準株在 RD 細胞株經歷了 3~4 代的繼代(passage)出現細胞病變或經歷 4 代仍不見細胞病變的發生，增加了本計劃在時效的困難性，結果詳見表二。

討論

在 1930 年代 Paul 及 Trask 從麻痺性脊髓灰白質炎病人糞便檢體中分出病毒，確認了這類病是由腸道感染的觀念，繼而 Enders 等人利用人類組織培養方式，成功的培養出小兒麻痺病毒，隨即在 1950 年代起，有愈來愈多與小兒麻痺病毒有相似物理、化學特性之病毒被發現，如感染老鼠會造成肌肉癱軟(flaccid paralysis)的 A 群沙奇病毒(coxsackie group A)及造成痙攣性麻痺(spastic paralysis)的 B 群克沙奇病毒(coxsackie group B)。當以組織培養方式在無菌性腦膜炎(aseptic meningitis)或健康人的糞便中，發現一些無法在靈長類或齧齒類動物中傳播的腸道病毒，統稱為 enteric cytopathogenic human orphn viruses，簡稱 ECHO 病毒，由於上述小兒麻痺、克沙奇及 ECHO 病毒皆可由糞便檢體中分離到，便將這類病毒命名為腸病毒(enterovirus)。

所以我們都可以了解到對於腸病毒的發跡，是由小兒麻痺病毒在動物實驗的病理特性而走向組織培養，才陸續發現到不同特性的腸病毒，所以 sucking mouse 對 A 群沙奇病毒(coxsackie group A)及 B 群克沙奇病毒(coxsackie group B)有其良好的感受性；也由於腸病毒群特性及對不同的細胞株感受性(Susceptibility)不同，所以並沒有單一的細胞株可以適用在所有腸病毒群的分離與增殖，除動物接種外，在組織培養早期都是採用 primary monkey kidney 細胞，如 CMK(Cynomogus monkey kidney)、HK(Human Kidney)、RMK(Rhesus monkey)及 BGM(Baffero green monkey kidney)等，

但受限於其來源、價格及實驗室如何維持恆定系統等問題，陸續有不同的細胞株被應用，如 HEL(Human Embryo Lung；WI-38，MRC5)、GPE(Guinea Pig Embryo)，RD(Rhabdomyosarcoma)、HEp-2(源自於 Human carcinoma of the larynx) 及 Vero 等細胞，有很多的實驗室工作者致力於不同細胞組合之腸病毒分離率探討，無論是從臨床檢體的病毒分或標準毒株之感染模式都顯現有相當不同的血清型毒株差異。

在本次的計劃中，嘗試利用單一的 RD 細胞株欲將所我們收集或購買了 67 株腸病毒標準株進行適應培養及增量，RD 細胞株之所以被選用為適應培養的細胞株，其原因為 1. 對於克沙奇 A 群病毒有良好之感受性 2. 細胞株在繼代的過程中可維持良好之敏感性 3. 實驗室較易維持細胞之穩定性 4. 目前為各合約實驗室唯一共同採用之細胞株 5. 具有 HEL 細胞株之特性，但更容易繼代增殖。

整體計劃結果顯示，已有 44 株腸病毒標準株可被適應培養 RD 細胞株，並進一步增殖，這些標準株原來增殖的細胞株為 HAm、HED、MkK 等細胞株或直接接種於 SM，當接種在 RD 細胞株時，往往於第一代或第二代時即有明顯的細胞病變出現，逐能順利的進行增量，且繼代的代數不長(平均 3~4 代)，產生的病毒量也較高，平均每一株標準株之 TCID₅₀ 皆 $10^{6.0}/50\mu\text{l}$ (除 Echo4, 14, 31, EV68 及 BrCr)，這樣的病毒量不僅可作為種毒之庫存亦可適用於中和試驗的檢測；另有 23 株之標準株未能到達增量之原因在於 1. 接種在 RD 細胞株上，歷經 4 次繼代，仍無細胞病變出現，如 CA1, 19, 22, 24. echo1, 2, 15, 16, 17, 18, 23 等標準株 2. 部份標準株則在繼代 2~3 代時，雖可觀察到細胞病變，但需在繼代以提高其感受性方可進行增量，如 CA6, 7, Echo22, 23 等標準株，3. 克沙奇 B1, 2, 3, 4, 6 目前尚未接種於

RD 細胞株中，所以尚無適應之資料，但亦已完種毒之備種，由於這些標準株均接種於 Vero 細胞株中，我們亦可將其轉適應 RD 細胞株上進行適應與增殖工作。

結論與建議

- 一、由於標準株原來增殖的細胞株為 HAm、HED、MkK 等細胞株或直接接種於 sulking mouse，但當接種於 RD 細胞株上，但因標準株本身的特性不同所以在 RD 細胞株上所表現的適應能力也不同，這點可由已適應或未適應標準株的歷代紀錄及病毒量即可觀察得到，並且和原增殖的細胞株並無直接之正比關係。
- 二、RD 是一種被廣泛使用在分離腸病毒的細胞株，腸病毒標準株對其適應之培養，目前已有 44 株(表一)適應培養完作，均每一株標準株之 TCID₅₀ 皆 $10^{6.0}/50\text{ul}$ (除 Echo4, 14, 31, EB68 及 BrCr)，這樣的病毒量不僅可作為種毒之庫存亦可適用於中和試驗的檢測；對於 TCID₅₀ 未達 $10^{6.0}/50\text{ul}$ 之標準株，雖然未能適用於中和試驗，但仍可做為研發腸病毒檢驗方法之對照株使用及評估。
- 三、以一個實驗室而言，必須具備多種不同的細胞株，方可將所有的腸病毒標準株保有其種毒，但勢必會增加實驗室的負荷量，RD 細胞株的適應培養，著實改善的人力的負擔，更重要的是建立了腸病毒的標準病毒株庫。
- 四、對於尚未無法做為種毒之標準株，若就其原因在於根本無法適應在 RD 細胞株上生長，如 CA1, 19, 22 則以 sulking mouse 為最具感受性之物種，在尋求其他敏感性較高的細胞株前，已將其接種到 sulking mouse 中，保有種毒。
- 五、若是繼代培養至 3~4 代細胞病變的反應並不明顯，我們則不會因計劃的結束而停止，仍會繼續嘗試適應培養並尋求其他敏感性較高的細胞株，以建立更多的病毒株庫。
- 六、對於增量在 Vero 細胞株之克沙奇 B1, 2, 3, 4, 6，則可轉適應 RD 細胞株

上，以減少一個細胞株之負荷。

七、就整體的結果顯示，RD 細胞株確實具備感受性較廣泛的細胞株，無論是對於腸病毒標準株或臨床的分離株。

參考文獻

1. Assaad,F.,and W.C.cockburd.1972.fouryears study of WHO virus reports on enteroviruses other than poliovirus.bull.WHO 46:329-336
2. Lee,L.H.,C .A.Phillips,M.A.South,J.L.Melnick,and M. D.yow1965 : Enteric virus isolation in dfferent cell culture.Bull.WHO 32:657-663
3. Lipson,S.M.,R.Walderman,P.Costello,and K.Szabo.1988.Sensitivity of rhabdomyosarcoma and guinea pig embryo cell cultures to field isllates of difficult-to-cultivate group A coxsackieviruses.J.clin.Microbio.26:1298-1303
4. Herrmann EC, Person DA,Smith TF(1972) : Experience in laboratory diagnosis of enterovirus infections in routine medical practice.Mayo Clinic Proceedings 47:577-586
5. Schmidt NJ,Ho HH,Lennette EH(1975) : Propagation and isolation of group Acoxsackieviruses in RD cells.Journal of clinical Microbiology 2:183-185
6. Menegus, M. D., and G. E. Hollick. 1982.Increase efficiency of group B coxsackievirus isolation from clinical specimens by use of BGM cells . *J. Clin. Microbio.* 15:945-948.
7. Schimdt, N,J.,H.H. Ho, and E.H. Lennette.1976.Comparative sensitivity of the BGM cell line for isolation of enteric viruses.health Lab.sci. 13:115-117
8. Bell EJ, Cosgrove BP(1980) : Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line.Bullectin of the World Health organization 58:423-428
9. McAllister RM,Melnyk J, Finkelstein JZ, Adams EC Jr.,Gardner MB(1969) : Cultivation in vitro of cells derived from a human

rhabdomyosarcoma. Cancer 24:520-526

10. Bird, B., and F. T. Forrester. 1981. Basic Laboratory Techniques in Cell Culture. U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
11. Henny D. Isenberg, Editor In Chief Long Island Jewish Medical Center. Essential Procedure for Clinical Microbiology p451-560
12. Reed, L. J., and H. Miemc. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints Am. J. Hyg. 27:493-497
13. Schmidt, N. J. 1989. Cell culture procedures for diagnostic virology, p. 51-100. In N. J. Schmidt and R. W. Emmons (ed.), *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections*. 6th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
14. Schidt N-J and Lennette E-H. 1973. Advances in the serodiagnosis of viral infections. Prog Med Virol 15:244-308
15. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. 1999. Molecular evolution of the human picornavirus classification. J virol 73:1941-1948
16. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. 1999. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. J Clin microbial 37:1288-1293. Stevin Oberste, David
17. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. J Clin Microbiol 1999, 37 : 1288-1293

表一 腸病毒適應培養 RD 細胞株之標準株(1)

血清型	標準株名稱	適應增殖代數	TCID ₅₀
CA2	Fleetwood	4	10 ^{7.17} /50ul
CA3	Olson	4	10 ^{7.37} /50ul
CA4	High Point	4	10 ^{7.09} /50ul
CA5	Swartz	6	10 ^{7.3} /50ul
CA8	Donovan	4	10 ^{7.5} /50ul
CA9	Criggs	5	10 ^{5.17} /50ul
CA10	Kowalik	4	10 ^{7.57} /50ul
CA12	Texas	3	10 ^{8.0} /50ul
CA16	G-10	3	10 ^{6.83} /50ul
CA21	Kuykendall	3	10 ^{7.2} /50ul
Echo3	Morrissey	5	10 ^{7.2} /50ul
Echo4	Pesascek	3	10 ^{5.6} /50ul
Echo5	Noyce	5	10 ^{7.3} /50ul
Echo6	D' mori	2	10 ^{8.67} /50ul
Echo7	Wallace	5	10 ^{8.5} /50ul
Echo8	Bryson	5	10 ^{5.8} /50ul
Echo9	Hill	4	10 ^{6.0} /50ul
Echo11	Gregory	3	10 ^{8.4} /50ul
Echo12	Tavos-85	3	10 ^{7.0} /50ul
Echo13	Del Carmen	5	10 ^{7.43} /50ul
ECHO14	Tow	3	10 ^{4.8} /50ul
Echo19	Burke	2	10 ^{8.5} /50ul
Echo20	JV-1	3	10 ^{7.8} /50ul
Echo21	Farina	5	10 ^{7.19} /50ul
Echo24	DeCamp	3	10 ^{6.89} /50ul
Echo25	JV-4	3	10 ^{7.8} /50ul
Echo26	Coronel	4	10 ^{7.4} /50ul
Echo27	Bacon	4	10 ^{6.67} /50ul
Echo29	Jv-10	4	10 ^{7.0} /50ul
Echo30	Bastianni	4	10 ^{6.55} /50ul

腸病毒適應培養 RD 細胞株之標準株(2)

表二 腸病毒尚未適應培養 RD 細胞株之標準株

血清型	標準株名稱	適應增殖代數	TCID ₅₀
CV1	Tompkins	5	
CA6	Gdula	4	
CA7	CA7	4	
CA11	Bejium	4	ND
CA13	Flores	5	ND
CA14	G14	4	ND
CA15	G-9	4	ND
CA17	G-12	4	ND
CA18	G-13	4	ND
CA19	Dohi	4	ND
CA22	Chulman	4	ND
CA24	Joseph	4	ND
ECH01	Farous	5	ND
Echo2	Cornelis	5	ND
ECH015	Charleston	5	ND
ECH016	Harrington	4	ND
ECH017	CHHE-29	5	ND
ECH018	Metacalf	5	ND
Echo22	Harris	4	ND
Echo23	Williamson	5	ND
CB1	Conn-5	ND	ND
CB2	Ohio-1	ND	ND
CB3	Nancy	ND	ND
CB4	Benschoten	ND	ND
CB6	Schmitt	ND	ND