

# 藥試所毒理研究之SPF動物房微生物監測系統

## II · 黴漿菌及病毒監測系統

蔡三福 廖俊旺 王順成

### 前 言

本所在八十四年度已建立SPF動物房環境及實驗動物之細菌監測系統，內容包括傳統細菌鑑定法及各種快速細菌鑑定套組系統之組合，建立初步監測病原菌之體系。至於病毒及黴漿菌之微生物病原血清抗體監測系統，目前國內則尚無完整的毒理實驗動物檢疫系統，其中如實驗動物中可造成眼瞼痙攣、流鼻水及頸部水腫的唾液腺淚腺炎病毒（Sialodacryoadenitis virus / Rat coronavirus；SDA / RCV），造成肝局部或瀰漫性壞死及下痢的鼠病毒性肝炎（Mouse hepatitis virus；MHV），甚至傳染力強，常造成嚴重性肺炎的黴漿菌等重要病原之檢測均不完整。而此等病原均可影響實驗正確性，尤其對於呼吸毒及肺急毒的相關試驗影響甚大。

本文主要敘述繼細菌監測系統後，本所對新購實驗動物及進行長期動物毒理試驗時的監測流程中，對黴漿菌及病毒的檢測流程，所採用之酵素免疫分析法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay；ELISA）檢測病原血清抗體，並對具致病性及病原特性加以說明，以期進一步建立SPF動物房監測體系，俾利各種毒理研究之進行。

### 取樣與鑑定步驟

以乙醚將老鼠麻醉後放血，收集5ml血液，取離心後之血清，以診斷試劑（Charles River kit）進行病原血清抗體檢查。檢測實驗動物品系主要以本所常用的大鼠為主，監測病原體包括黴漿菌（*Mycoplasma pulmonis*）、鼠肺炎病毒（Pneumonia virus of mice；PVM）、仙臺病毒（Sendai virus）、唾液腺淚腺炎病毒（Sialodacryoadenitis virus）及大鼠小病毒（Parvovirus）等主要病原。鑑定流程中則依本所SPF動物房需要做適度修正，若發現呈陽性反應時，立即進行組織病理學檢查，以建立檢疫試驗程序。茲將流程步驟說明如下。

## 一、血清抗體之取樣

### (一) 動物之採樣

1. 新購入動物之取樣：新購實驗動物經由無菌盒送達後，以隨機取樣方法取5%之動物或至少雌雄各4隻，進行解剖。

2. 試驗期內動物之取樣：對於長期性的試驗研究每13週，從各飼育室依試驗組分別隨機取樣，至少雌雄各4隻進行解剖。

3. 解剖過程：實驗動物以乙醚麻醉後，於操作台上，以仰臥方式固定於軟木板上，先剪開皮膚至下顎，再剪開腹腔，以採血針插入腹部動脈後放血，取血液5ml裝於血球血清分離管內，再置於離心機以775Xg離心15分鐘，取上清液裝於血清瓶中，並置於-18°C中備用。

## 二、血清抗體之鑑定步驟

### (一) 鑑定流程：

1. 將測試血清以 Blotto 溶液 (Milk Diluent Solution Concentrate) 進行稀釋60倍。

2. 將上述稀釋液取50  $\mu$ l的血清，滴入含有：(1) 抗原及(2) 對照的組織抗原的分析盤條中 (microplate) 與抗原結合。

3. 判讀時使用對照血清共6孔 (well)，對照血清組共分3種等級，依高、低及空白等級排列，並均以 Blotto 溶液稀釋1倍 (每一等級2孔)，每孔加50  $\mu$ l稀釋液。空白組所供應的血清為5倍稀釋液，需再稀釋12倍後使用。

4. 將分析盤置於37°C下作用40分鐘。

5. 將上述之分析盤進行清洗，步驟(1)之清洗程序為將沖洗液 (wash solution) 蓋滿整個分析盤上的每一個孔後，立刻倒掉，重覆沖洗3次。步驟(2)之清洗程序為同(1)之清洗程序，但不馬上倒掉，靜置3分鐘後再倒掉，並重覆沖洗3次。

6. 將6,000倍的稀釋結合液50  $\mu$ l加入分析盤上的每一個孔中。

7. 將盤組置於37°C下作用40分鐘。

8. 重覆5之清洗步驟，以去除未結合的抗體接合物 (conjugate)。

9. 加入100  $\mu$ l的呈色劑 (ABTS Peroxidase Substrate System) 到分析盤上的每一個孔中。

10. 置於室溫下作用呈色40分鐘 (顏色最快在第15分鐘開始變化)。

11. 加入100  $\mu$ l呈色反應抑制劑 (ABTS Peroxidase stop solution) 到分析盤上的每一個孔，以終止呈色反應(圖1)。

12.利用ELISA判讀機判讀。

13.使用波長405nm ELISA判讀機進行判讀。

(二) 鑑定原理：

1.Milk Diluent/Blocking Solution Concentrate：

(1)使用原理：主要有二種目的，一為阻斷 (blocking) 溶液，當抗原或抗體與固相表面 (Solid phase surface) 結合後，可與剩餘位置結合。另一為做抗原、抗體及標示抗體之稀釋液，以使反應物之間和固相表面間，產生最低的非特異性反應。

(2)使用方法：

a.配製：將2% non-fat dry milk溶於borate buffer中。使用前再依不同的用途以去離子水進行稀釋，使用於ELISA的稀釋用途及阻斷用途稀釋倍數均為20倍，並限當天使用。

b.應用：若使用於阻斷溶液作用時，分析盤上的塑膠 (plastic) 表面應先感作 (sensitization) 抗體或抗原。若為稀釋液時，於稀釋抗體或抗原及標示抗體之前，應先以稀釋液感作分析盤上的塑膠表面。

c.使用量及作用時間：需計算好應配製量，當做阻斷溶液時至少應作用10分鐘。

2.Wash Solution Concentrate：

(1)使用原理：清洗液目的適用於各種分析系統及有效的減少蛋白和標示抗體表面間非特異性的結合，此溶液內含Tween20，具有濕潤作用，可減少非特異性物質與固相表面附著。

(2)使用方法：以0.002M imidazole buffered saline、0.02% Tween20及去離子水稀釋20倍。

3.ABTS Peroxidase Substrate System：

(1)使用原理：此套組溶液與含標示結合體的過氧化酶作用後會產生藍綠色的呈色反應。

(2)使用方法：溶液A之配製，為將每升中含0.6 g的2,2'-azino-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate)6]溶於 glycine 緩衝溶液中。溶液B之配製，為以含0.02%過氧化氫的 Peroxidase 溶液，溶於 Citric Acid 溶液中。再將等量溶液A (ABTS) 及溶液B於使用前混合，並保持於4°C的溫度下。

#### 4. ABTS Peroxidase stop solution :

(1)使用原理：ABTS Peroxidase stop 溶液主要目的為抑制ABTS Peroxidase Substrate呈色劑的反應。

(2)使用方法：配製ABTS Peroxidase stop 使用液時，將1份含5% sodium dodecyle sulfate的ABTS Peroxidase stop 儲存液加入4份蒸餾水，配製成1% 溶液，於進行ELISA分析盤的呈色抑制反應時應用。

#### 5. 吸光值的測定：

(1)原理：當ABTS substrate 產生藍綠色反應時，可使用波長405-410nm的ELISA判讀機判讀。

(2)判讀時機：加入呈色液抑制劑後，待呈藍綠色時判讀之。

## 討 論

由於黴漿菌及病毒在培養與鑑定上非常繁瑣，進行監測系統檢驗常需耗時多日，不符合實驗動物快速健康監測流程之需要，因此本實驗特別設計完整的流程，針對不同的微生物種類做有效的監控。本流程以商品化的酵素免疫分析法來監測病原血清抗體，目的除確保時效性外，並可避免因培養病毒進行監測時，使實驗動物受到污染，影響動物毒理實驗進行的正確性。

唯利用酵素免疫分析法進行病原血清抗體監測時，對整個操作程序需加以瞭解及熟練，而對於鑑定原理，如抗原與抗體的結合反應，酵素的標識及呈色反應等亦需通盤瞭解，才能對監測結果作正確的判讀，並找出問題之所在。例如每一血清樣品需進行2孔的反應，當對照孔的OD值比抗原孔的OD值高或對照孔值超出抗原組時，必須捨棄此次的監測結果，並檢討每一步驟誤差的原因及重新操做整個實驗。若呈色太快，則應減少溶液中的反應物，以適當的稀釋標識結合物及抗體。

目前本所對國內生產實驗動物檢疫除發現細菌病原外，其他病原最主要有下列3種，即黴漿菌 (*Mycoplasma pulmonis*)、鼠肺炎病毒 (*Pneumonia virus of mice*) 及唾液腺淚腺炎病毒 (*Sialodacryoadenitis virus*)，由於此3種

病原之重要性，因此對大鼠的致病性及該病原特性加以分述如下 (Poole, 1987; Cassell *et al.*, 1981; Barthold, 1984)：

### 一、黴漿菌 (*Mycoplasma pulmonis*)

主要為引起慢性呼吸道疾病，近來亦被認為可引發生殖道疾病之重要病原菌。大鼠呼吸道黴漿菌疾病，多年以來並無一明確的定義，其中造成大鼠傳染性卡他熱、傳染性肺塌陷症、慢性呼吸道疾病及慢性肺炎，目前均認為黴漿菌造成。

有關黴漿菌與其臨床症狀的關係，直到1969年以後才逐漸被確認 (Kohn and Kirk, 1969; Lindsey *et al.*, 1971; Whittlestone *et al.*, 1972)。一般黴漿菌於商品化繁殖中心或動物中心流行普遍，病原具有相當高的傳染性，潛伏感染一段時間後，可造成大鼠衰弱，甚至死亡。

黴漿菌呼吸道的臨床症狀，可從不明顯到全身產生症狀及肺炎等變化甚大。最常見的症狀如：鼻塞、漿液性或膿樣分泌物，而咽喉處的感染可經耳咽管上行感染，造成中耳炎或嚴重的內耳感染，歪頭、繞圈等症狀。感染後，上呼吸道症狀的出現時間因個體而異，往往是感染後數週內發生。引發之肺炎症狀則包括：呼吸困難、肺水泡音 (rale)、體重減輕、皮毛粗剛及犬坐姿。肺炎症狀往往是感染後數月內發生，且症狀輕重易受到外在環境因子，如籠內氨濃度及宿主免疫力之影響。在極少數的病例中，患鼠之肺炎病變，並無明顯臨床症狀。

至於黴漿菌所造成生殖道的感染，一般臨床症狀不明顯，但會造成母鼠不孕及死胎。而呼吸道感染黴漿菌症時，亦可造成輸卵管及子宮的感染，子宮感染的發生究是血源性或生殖道上行感染，則尚無研究可知。

黴漿菌的傳播途徑包括水平 (horizontally) 傳染，以空氣傳染最普遍，且對任何年齡的大鼠均可發生；此病原亦可經母鼠垂直 (vertically) 傳染下一代，其傳染均發生分娩後的直接接觸。當母鼠的生殖道受感染，仔鼠出生前的感染即已發生。

黴漿菌的致病機制至今未完全明瞭，目前已確知之機制為黴漿菌進入呼吸道後吸附於纖毛、柱狀及立方等上皮細胞膜上。這種吸附的過程可能是黴漿菌釋放細胞毒性產物，與細胞膜上的補體 (complement) 產生交叉反應。

至於此病原對動物所造成之肉眼病變及組織病理病變情形，在上呼吸道肉眼病變可見於鼻腔、鼻竇及中耳黏稠的膿樣滲出液，長期感染滲出液變成乾酪樣。於下呼吸道可見肺實質 (parenchyma) 塌陷，因支氣管性肺炎，使氣管、支氣管、細支氣管產生膿樣滲出物，此滲出物可造成支氣管阻塞，使

肺塌陷；肺表面呈現乳白色結節散布，乃長期感染，由於絨毛遭破壞、剝離及脫落，直接影響絨毛清除粘液的功能，造成支氣管的病變擴張，這種病變可局限於某一肺小葉或涵蓋所有的肺實質。

黴漿菌於生殖道之肉眼病變，可見化膿性卵巢炎、輸卵管炎及子宮蓄膿。至於病原之組織病理病變主要特徵為炎症反應，包括黏膜下層淋巴球及漿細胞浸潤（infiltration），鼻腔、耳咽管、中耳、支氣管嗜中性球浸潤，支氣管周圍的淋巴樣增生使肺變得厚實。支氣管、細支氣管內的粘液及嗜中性滲出液在肺塌陷的過程中，逐漸增多，同時支氣管上皮由纖毛柱狀變成鱗狀上皮，此種上皮結構的改變可能與嗜中性球自溶時釋放的毒性酵素有關。黴漿菌於生殖道內亦吸附於上皮細胞與感染呼吸道時類似，其組織病理病變，以輸卵管最常見，特徵包括管腔內嗜中性球聚集、輸卵管上皮增生及黏膜下層淋巴樣反應（Cassell *et al.*, 1981）。

一般實驗動物繁殖中心及實驗動物試驗中心，對預防呼吸道黴漿菌症最有效方式為建立隔離系統，以阻止黴漿菌的進入。為確保無感染黴漿菌之實驗動物，以無菌操作的方式行帝王切開術，由無黴漿菌感染的子宮直接取出胎兒，唯此方式技術成本十分高昂、施行不易，僅在大規模動物繁殖中心才可能進行。目前本所及國內一般試驗研究單位使用的大鼠常需購自不同的動物中心，在尚無完整實驗動物檢疫文件前，瞭解或監測每一批動物來源是否受黴漿菌感染是相當重要的步驟。

以往利用組織病理學及細菌培養瞭解大鼠黴漿菌感染情形速度遲緩，使用ELISA方法進行實驗動物健康監測，操作快速、敏感性高（Cassell *et al.*, 1981），且可避免人為疏忽導致動物房的動物受到污染，是十分進步且符合檢驗快速要求之方法。

對試驗研究而言，黴漿菌扮演相當重要的角色。本菌往往在動物感染數月後才發病，對毒理學、致癌物、營養及老人疾病等長期性研究實驗造成相當大的影響。

## 二、鼠肺炎病毒（Pneumonia virus of mice；PVM）

為副粘液病毒屬，可感染多種動物。自然情況下大鼠或齧齒科動物均無臨床症狀，但此菌污染性高且散播快速，當動物族群免疫力隨感染增加，感染即消退，但數月之後具敏感性的族群增加，感染又回復。

PVM病毒可於大鼠肺造成壞死性氣管炎及間質性肺炎等病變，當血管及支氣管周圍淋巴浸潤病變及間質性肺炎持續數週後，感染力可維持一週左右。PVM病毒致病機制的研究以小鼠居多。低量病毒感染小鼠時，病鼠內

PVM病毒複製時並未造成上呼吸道粘膜明顯的細胞溶解。高量病毒感染，則造成支氣管上皮及肺泡壁的細胞溶解 (Brownstein, 1981)。診斷上，先確定非其他呼吸道病原時，才能針對PVM病毒監測其抗體力價。

### 三、唾液腺淚腺炎病毒 (Sialodacryoadenitis virus / Rat coronavirus ; SDA/RCV)

此病原種類屬冠狀病毒，是一種較大且具多形性封套的RNA病毒，病毒顆粒上的突起物使它看起來像皇冠一般。這一群病毒包括 SDAV、RCV 及 MHV (Mouse hepatitis virus ; MHV) 等，其抗原性相當複雜，具共同的抗原性，SDAV及RCV屬同種病毒，但不同株，對大鼠具致病力。MHV病毒對大鼠致病性不清楚，目前只瞭解它經鼻內接種後能在呼吸道增殖及複製 (Taguchi *et al.*, 1979)。一般由大鼠血清抗體監測出MHV的抗體，這可能是由於它的抗原性與SDAV及RCV太相似所致，而非真的感染了MHV病毒 (Barthold, 1984)。

SDAV病毒可透過空氣或直接接觸途徑傳播，傳染性相當高且散播速率快。任何年齡動物對此病毒均相當敏感，受SDAV感染的臨床症狀嚴重程度不一，如造成唾液腺及淚腺管上皮壞死，形成鼻炎，同時併發激烈的炎症反應、水腫、支氣管炎及支氣管周圍淋巴樣增生等。一般而言，除舌下腺外，頸部淋巴結也會腫脹。若未離乳仔鼠感染，可能有間質性肺炎症狀，成鼠則無症狀。

動物感染後由於淚腺功能喪失，易得結膜炎及惡化之角膜潰瘍。唯通常眼睛的病變可恢復，但可能造成慢性角膜炎、巨眼及視網膜退化等症狀。至於RCV病毒的感染所引起鼻氣管炎及局部的間質性肺炎，病程類似SDAV病毒 (Barthold, 1984; Jacoby *et al.*, 1979)。SDAV病毒對試驗研究所造成影響，包括因引起呼吸道分泌物增加而提高試驗時動物麻醉死亡的機率，或引起神經症狀，干擾有關眼睛研究試驗。

其他目前本所監測動物檢疫系統中尚未檢測到之大鼠重要病原性病毒，尚包括仙臺 (Sendai) 及小病毒 (Parvovirus) 兩種病毒。

(一) 仙臺病毒屬副粘液病毒中的副流行性感第一型病毒。副粘液病毒為RNA病毒具多形性、有封套，對熱不穩定。Sendai病毒透過呼吸道具高污染性且散播快速，當族群免疫力因感染而漸增時，感染消退。數月後當敏感族群增加，則感染率上升，此現象類似PVM病毒。

國外包括歐美及亞洲的日本 (Itoch, 1995)，實驗室大鼠感染Sendai病毒相當普遍。臨床症狀為鼻炎、一週內出現支氣管炎、肺臟肉眼病變呈現硬實及梅干色的點狀分佈 (多發於前腹葉)。組織病變可見壞死性的細支氣管

炎、局部間質性非化膿性肺炎、血管及氣管周圍的漿淋巴球浸潤 (Brownstein *et al.*, 1981)。感染Sendai病毒動物，對試驗動物易造成肺組織改變，當與黴漿菌共同感染時，可引起鱗狀上皮化生 (metaplasia) 及增生，易干擾致癌症研究及判讀，並引起長時間的免疫抑制作用 (Garlinghouse and Vanhoosier, 1978)。

(二) 大鼠小病毒 (Parvovirus)：主要感染大鼠的小病毒有大鼠冠狀病毒 (Kilham rat virus; KRV或稱 Rat virus) 及小病毒 (Toolan H-1 virus; H-1)。Parvoviruses病毒小而無封套，耐高溫、耐酸鹼及耐乾燥。KRV病毒感染成鼠時並無臨床症狀，唯部份懷孕雌鼠會出現胎數減少，仔鼠矮小，共濟失調或黃疸等症狀。KRV及H-1病毒常同時感染，一般感染途徑為經口或呼吸道，但KRV病毒部分毒株能排毒於乳汁及子宮中。首次感染KRV病毒之動物會出現臨床症狀，隨著病毒散佈加速，受感染動物抗體力價升高，KRV病毒潛伏著，一旦已感染動物體免疫力降低，病毒可再度肆虐。

感染KRV病毒之仔鼠子宮內，進行組織病理檢查，可見小腦內顆粒層嚴重地減少及Purkinje cells的結構被破壞；肝細胞、Kupffer氏內皮細胞 (endothelial cells) 及膽管上皮細胞 (biliary epithelial cells) 可見核內包涵體；導致壞死性肝炎及繼發性膽汁鬱積、黃疸、膽管增生、結節樣增生等 (Colema *et al.*, 1982; Jacoby *et al.*, 1979) 現象。KRV病毒的感染通常亦可水平及垂直感染，因此有效控制法，即撲滅感染族群，去除污染源，再造無病毒環境。並應不斷地進行血清抗體篩檢及維持無KRV病毒的鼠源。此病毒常因其為潛在帶原者而引起抑制動物免疫系統，造成動物衰弱、死亡，影響試驗結果。

本所至今已完成毒理研究SPF動物之微生物病原血清抗體監測系統，並利用已知的標準陽性血清抗體進行測試，以確保本監測系統之準確性。配合已建立之細菌監測系統，對於確保本所完整之微生物監測GLP準則及長期毒理試驗正確性至為重要。本系下一個目標即將對實驗動物的寄生蟲進行監測，對於內外寄生蟲檢測的完成後，將可使動物毒理實驗之微生物監測系統標準化及完整化，對促進國內及國際動物實驗研究正確性之提昇，將有實質之助益。

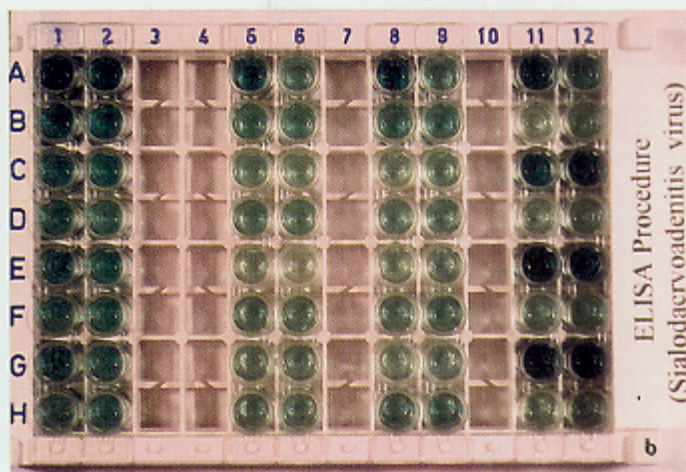
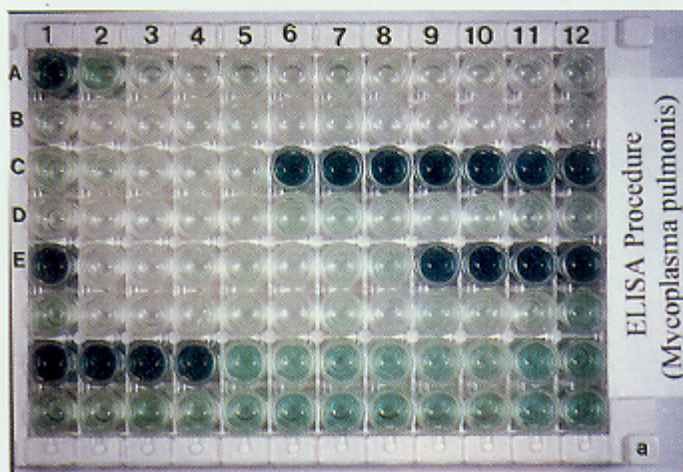


圖1.(a)ELISA測定病原血清抗體。1、2.高、低陽性對照組[A1,A2]，3.陰性對照組[A3]，4.呈現陽性血清抗體樣品[C6-C12,E1等]。  
 (b)ELISA分析盤組，活動式測試條，依不同監測血清抗體樣品數目進行調整。

附錄：農藥毒理SPF動物房病原血清抗體監測記錄表格

日期：\_\_\_\_\_

編號：\_\_\_\_\_

|  | H<br>TC | G<br>AG | F<br>TC | E<br>AG | D<br>TC | C<br>AG | B<br>TC | A<br>AG |    |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----|
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 1  |
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 2  |
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 3  |
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 4  |
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 5  |
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 6  |
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 7  |
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 8  |
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 9  |
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 10 |
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 11 |
|  |         |         |         |         |         |         |         |         | 12 |

TC：表分析盤中此行屬組織對照組(已吸附空白抗原)

AG：表分析盤中此行屬抗原處理組(已吸附病原抗原)