

## SARS 病毒於 BALB/c 小鼠免疫反應之探討

### 前 言

SARS 疫情在今年爆發後，造成世人相當程度的恐慌及關注，主要原因在於這一種由新病原所引起的傳染病，會使患者出現非典型肺炎，嚴重時更導致瀰漫性肺炎及呼吸衰竭等症狀，較過去所知由病毒或細菌引起的非典型肺炎嚴重，因此被命名為嚴重急性呼吸道症候群(**severe acute respiratory syndrome, SARS**)[1-4]。WHO 在今(九十二)年三月十二日首度發出全球警訊，四月十六日正式宣布 SARS 的致病原是一種新發現的冠狀病毒，並將此病毒正式命名為「SARS 病毒」。由於這種病毒是一種新變種的病毒，一般大眾體內皆無抗體提供保護，所以在受到感染之後，對人體產生的毒性及致病力都可能比較強，病患在發生肺部嚴重病變如纖維化後，會進一步引發呼吸衰竭而導致死亡。臺灣地區在三月間開始出現相關病例的通報，四月底可能病例數急速上升，許多醫院因此而封院，甚至造成多名直接與病患接觸的第一線醫護人員的死亡，由於民眾對於這種疾病一知半解，在當時確實造成社會普遍的不安與恐慌，幸而在政府及民眾的努力之下，疫情已告平息。

SARS 為世人帶來的恐懼和其所引發的死亡率有絕對的相關性，而病人是否及早得到適當的醫療救護，將是影響死亡率的一個最重要因素。因此，早期快速且正確的診斷，益顯其重要性。雖然目前實驗室已經可以檢測這種病毒的存在，但是有些檢測法仍屬試驗階段，專一性及敏感性尚待進一步的評估，而有些依賴傳統技術的檢查方法，因為所需時間較長或者需要較高等級實驗室及相當熟練的技術，在時間或操作上的限制，容易造成病毒的擴散而影響後續防疫工作之進行。本研究嘗試開發以去活化 SARS 病毒預先鍍盤之酵素免疫分析法 (**enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA**)，檢測預期會產生抗體反應之老鼠 IgG 及 IgM 變化情形，同時以中

和抗體試驗 (neutralization test, NT) 進行對照評估, 期望以此模式, 找出最佳的反應條件, 進一步應用於 SARS 患者發病早期 IgM 或恢復期 IgG 之相關檢驗。

## 材料與方法

### **1. SARS全病毒之製備**

將 SARS 病毒於 Vero E6 細胞中大量培養, 待細胞出現明顯細胞病變 (cytopathic effect, CPE) 後, 取病毒液於  $-70^{\circ}\text{C}$  及  $37^{\circ}\text{C}$  連續冷凍解凍三次, 以 3500rpm 離心 30 分鐘, 上清液取出定量後再以鈷 60 照射去活化, 失去活性的病毒液需以中和試驗再重複測試二次以確定其安全性後, 再置於  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。去活化的病毒進一步以 Centricon Plus-20 Centrifugal Filter Devices 加以濃縮純化, 首先將病毒液置入濃縮管中, 以 3500rpm 離心 10 分鐘以去除分子量小於 100kd 之蛋白 (如 BSA 等), 此時 filter member 上殘餘液體即為濃縮後之病毒液, 將 filter 與 retentate cup 接合後倒置, 再以低於 2000 rpm 之轉速離心 10 分鐘, retentate cup 內之液體即為濃縮完成之病毒液。

### **2. BALB/c小鼠免疫**

首先將老鼠以 M1~M6 編號, 在進行初次免疫前先採取 6 隻老鼠血液做為陰性對照, 然後將  $0.2\text{ml } 10^{7.5} \text{ TCID}_{50} / 50\mu\text{l}$  之病毒與等量的 Freund's 佐劑以雙向針筒完全混合後, 皮下及腹腔各同時免疫三隻 BALB/cByJ 小鼠 (M1~M3: 皮下免疫; M4~M6: 腹腔免疫), 在第 14 天及第 28 天分別進行追加免疫並採血檢測抗體, 並視其效價變化情況決定進行後續追加免疫的時間, 第 49 天再度採血檢測, 至第 56 及第 63 天再次進行追加免疫, 之後於第 73 及 80 天再度採血檢測 (詳細免疫及採血時程如圖一)。在老鼠免疫的過程中, 第 2 次追加免疫時, 將佐劑更換為 lipopolysaccharide (from *Salmonella Minnesota*)  $50\mu\text{g} / \text{mouse}$ , 至於每次採取的老鼠血液, 皆先行

靜置及離心以取得血清，然後再分別以 NT 及 ELISA 檢測其抗體力價變化趨勢。

### **3. 中和抗體試驗[5-8]**

所有血清檢體皆以中和抗體檢驗判定中和抗體效價，首先將血清樣本以 1 : 8 的比例稀釋（血清 100 $\mu$ l 加 PBS 700 $\mu$ l），於 56 $^{\circ}$ C 的水浴中加熱 30 分鐘後，在 96 孔培養盤中將血清做 2 倍連續系列稀釋，再加入 SARS 病毒液，置於 36 $^{\circ}$ C 的 CO<sub>2</sub> 培養箱 1 小時，取出加入細胞懸浮液（ $2.5 \times 10^4$  cell/100 $\mu$ l），每天於顯微鏡下觀察細胞病變，至第 5 天判定血清中和抗體價。

### **4. ELISA IgM 及 IgG 檢測**

96 microwell immunoassay strips 先吸附病毒 ( $10^{4.2}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l)，4 $^{\circ}$ C 靜置隔夜，以 phosphate buffered saline-Tween20 (PBST) 清洗四次後，加入 50 $\mu$ l 之系列稀釋待測血清，放置 37 $^{\circ}$ C 培養箱 1 小時，清洗四次後加入 100 $\mu$ l 稀釋 4000 倍之 horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgG 及 IgM (Chemicon, California, US)，37 $^{\circ}$ C 作用 1 小時，清洗後加入 100 $\mu$ l TMB/E substrate (Chemicon, California, US)，避光置於室溫作用 30 分鐘後，以 2N sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 終止反應，於 450nm 以 EIA reader 測量吸光度 (OD)。在進行 IgM 及 IgG 檢測時，皆同時以不含病毒之細胞培養液鍍盤做為對照組。

## **結 果**

### **1. BALB/c 小鼠對病毒的反應**

不論是以皮下或腹腔進行免疫，老鼠在活動力及外觀上和正常老鼠都沒有顯著的不同，可見 SARS 病毒在感染老鼠後並不會使其發病，不過隨著追加免疫次數的增加，M2、M4 及 M5 三隻老鼠在第 4 次追加免疫後當晚 (M5) 及隔天 (M2 及 M4) 相繼死亡，這三隻老鼠死亡前皆出現身體抽搐、活動力降低及毛髮倒豎現象。另外三隻老鼠在第 4 次追加免疫後也出

現活動力稍微變差及食慾不振情形，但幾天後即恢復正常。

## **2. 中和抗體反應結果**

所有老鼠的 NT 反應結果如圖二，免疫前中和抗體價皆為  $< 1:8$ ，2 週後除第 2 隻老鼠稍微上升 ( $1:16$ ) 外，其他仍未出現，經過第 1 次追加免疫後於第 4 週可測得明顯上升的中和抗體 (除 M1 及 M4 為  $1:64$  之外，其他皆為  $1:128$ )，第 2 次追加免疫後，第 49 天再測定，發現大多數老鼠的抗體效價已無明顯的變化，有些甚至出現下降的現象，不過，第 1 隻老鼠的效價仍持續上升至  $1:1024$ 。至第 56 天再度開始追加免疫後，第 63、73 及 80 天的 NT 效價又開始逐漸上升，雖然有 3 隻老鼠死亡，但其他 3 隻至第 80 天的 NT 效價分別高達  $1:1024$  (M1) 及  $1:512$  (M3 及 M6)。

## **3. ELISA IgM 及 IgG 結果**

血清檢體、SARS 病毒、HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 及 IgM 皆先行以棋盤滴定法 (checkerboard titration) 來決定最適當稀釋濃度分別為  $1:100$ 、 $10^{4.2} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{l}$  及  $1:4000$ ，檢測值必須大於陰性對照組 4 倍以上且高於培養液對照組至少 2 倍以上方判定為陽性。依此得到每一個時期採血的 IgM 及 IgG 最終效價結果標示於圖三及圖四。在 6 隻老鼠體內，除了 M6 的 IgG 反應較慢之外，其他不論 IgM 或 IgG，都在初次免疫的 14 天後即出現抗體明顯上升的情形，而其中 IgM 的效價又比 IgG 來的高，除了 M6 之外，另外 5 隻老鼠的血清在稀釋 800 倍後仍可測得 IgM。至於其他各次採血所得到的結果，和中和試驗所呈現的結果相比較，也顯得相當一致，例如，在第 49 天測得的 IgM 和 IgG 反應，亦或多或少呈現下降或停滯現象，而在再度追加免疫後，於第 63、73 及 80 天皆可觀察到再度明顯上升的 IgM 及 IgG 抗體。

當我們把 IgM 和 IgG 抗體做比較時，發現二者在效價上有些許的差異，IgM 出現的時間除了比 IgG 早之外，在效價上也比 IgG 來的高，例如在最後一次採血 (第 80 天) 的結果就顯示，三隻老鼠體內的 IgM 就比 IgG

高出 2~8 倍，而 M1 的血清在稀釋倍數高達 102400 倍時，仍然呈現 ELISA IgM 的陽性反應。

## 討 論

目前對於 SARS 病毒的實驗室診斷方法，包括：(1)·病毒偵測，如 RT-PCR[7、8]，這種方法可在發病的早期及短時間內檢測出病毒的 RNA，是國內 SARS 疫情出現後，最主要的檢驗方法，RT-PCR 雖然可以在發病早期偵測出病毒的存在，但是較容易產生偽陽性反應，而且採取病毒性咽喉拭子時，因危險性較高，容易造成採檢者的感染。(2)·抗體測試：如 ELISA[9] 及 NT 等，因為尚未研發出單株抗體，所以目前的 ELISA 檢測仍以 IgG 為主，也就是必需在發病的較晚期，患者體內出現 IgG 後才容易被偵測到，因此對早期診斷較無助益。中和抗體試驗雖然專一性頗高，但由於需以活病毒進行檢測，因此必需受限於 P3 級實驗室中進行，相對的危險性也較高，加上繁複的實驗過程及較長的檢測時間，比較不適用於大量檢體及早期的篩檢。

ELISA 是實驗室鑑定病毒感染時常使用的一種方法，由於它具有反應靈敏、快速、機器判讀減少主觀誤差以及可同時處理大量檢體等優點，目前已發展出相當多種類的快速試劑供實驗室使用[10]。目前局內檢測 SARS 所採用的 ELISA 試劑是由美國 CDC 所提供，惟其在步驟及結果判讀上皆稍嫌繁瑣，而且無法區分 IgM 及 IgG，有鑑於此，本研究即針對其流程稍加修改，再以同樣的病毒免疫老鼠後，預期其體內免疫反應的發生及各種抗體產生的情形用於此檢驗方法的評估，期能更進一步應用於 SARS 患者的血清檢體檢測。

我們基於動物產生免疫反應的模式，設計整個實驗流程，首先，以高濃度的去活化病毒多次誘發小鼠的免疫反應，當老鼠體內抗體濃度持續上升後，即停止追加免疫，等待數週待其抗體稍微下降之後再進行第二階段

的追加免疫，這樣的做法有二個目的：首先是當老鼠體內抗體極高時，若再打入病毒，會被抗體破壞掉，不但失去追加免疫的效果且徒然浪費病毒而已，其次是當等待一段較長的時間，讓抗體稍微下降後再進行追加免疫，可以誘發老鼠產生更強的免疫反應。

在本實驗進行中，由於第 28 天的血清檢測結果顯示抗體效價已顯著上升，因此於同日進行追加免疫後，即基於前述理由，不再繼續對這 6 隻老鼠追加免疫。間隔三週之後（第 49 天），再度採血觀察及比較抗體效價，發現果如預期般，各種抗體皆呈停滯或稍微下降，但因 M1 的 NT 抗體效價仍高，且 M3 及 M6 的 IgM 抗體仍稍有上升，因此決定再隔一週，也就是第 56 天才再度開始第二階段的免疫工作 (boost3)，隔週再追加一次 (boost4)。不過，這一次的追加免疫卻造成 M2、M4 及 M5 的死亡，由 ELISA 的結果顯示，這三隻死亡的老鼠，在第 49 天和第 63 天的二次抗體效價上升幅度遠大於另外三隻存活者，尤其是追加免疫後當夜即死亡的 M5，其 IgM 及 IgG 抗體效價在二週之內就分別上升了 64 (由 1600 上升至 102400) 及 16 倍 (由 1600 上升至 25600) 之多，故推測老鼠體內所產生急劇和過度的免疫反應可能是造成其死亡的原因，在 NT 抗體方面，由於敏感度不如 ELISA，因而看不出如此大的變化。至於其他三隻老鼠雖然幸運存活，但也在第 63 天的追加注射後，於外觀及活動力上出現不正常的狀況，所幸數天後即恢復正常。由於擔心再次免疫可能會再度造成老鼠死亡，加上存活的老鼠在第 80 天的抗體反應（不論是 NT 或 ELISA）皆令人滿意，因此決定停止免疫並繼續下一階段的單株抗體研發工作。

由本研究的結果顯示，NT 和 ELISA 確實可以有效的偵測出老鼠體內抗體的出現情形，而且抗體效價的變化也和我們模擬的狀況吻合，在 NT 方面，多數老鼠的中和抗體至免疫的第 14 天仍未出現，直到第 28 天之後才有顯著的上升。至於 ELISA，IgM 在第 14 天就有明顯的上升，當稀釋至 800 倍後，除了 M6 之外，仍然呈現陽性反應，第 28 天和第 49 天的血清最高

稀釋到 3200 倍仍可測得抗體的存在，在IgG方面，抗體出現的時間比IgM略晚，且效價也明顯不如IgM來得高。經由NT和ELISA的結果相比較，發現ELISA確實可以在抗體出現的較早期就發揮作用，而且可以在較高的稀釋倍數下測得抗體的存在(如M1 最後一次血清中的抗體效價，IgG ELISA及IgM ELISA分別高出NT 50 至 100 倍之多)，由此可以證明ELISA的敏感度高於NT，不但可以檢測出相當低濃度的抗體，甚至在其他血清學方法尚無法確認時，就可偵測出抗體的存在。

非專一性反應 (non-specific reaction) 是進行ELISA檢測時最感困擾的一個問題[11-12]，目前受限於SARS病毒的單株抗體尚未開發，無法以專一性更高的抗原(或抗體)-捕捉法(antigen or antibody-capture ELISA)來設計ELISA試劑，而僅能以間接反應來測試抗體的存在與否，此時預鍍(pre-coated)抗原的純度勢必影響整體反應的專一性，本研究中所使用的抗原在經過Centricon Plus-20 Centrifugal Filter Devices 的處理之後，和未經純化的抗原對照，發現確實可以有效的降低因BSA所引發的非專一性反應。

本研究所設計的 ELISA 方法，全部檢測時間約需 2.5 小時，可以有效的縮短 SARS 抗體檢測的時間，目前這種檢驗方法正在進行 SARS 患者血清的測試及評估，同時也利用健康族群的大量血清檢體訂定其陽性篩選值，希望以此模式設計的相關快速檢驗試劑，未來能有效應用於大量血清檢體之篩檢，不致延誤病患就診治療之首要時機。

**撰稿者：**王聖予、王明琴、李惟宸、陳豪勇、林鼎翔  
衛生署疾病管制局研究檢驗組

## 參考文獻

1. Tan YM, Chow PK, Soo KC: Severe acute respiratory syndrome: clinical

- outcome after inpatient outbreak of SARS in Singapore. *BMJ* 2003, 326:1394.
2. Wong RS, Wu A, To KF, *et al.* Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome: retrospective analysis. *BMJ* 2003, 326: 1358-1362.
  3. Rainer TH, Cameron PA, Smit D, *et al.* Evaluation of WHO criteria for identifying patients with severe acute respiratory syndrome out of hospital: prospective observational study. *BMJ*. 2003,326:1354-1358.
  4. Nicholls JM, Poon LL, Lee KC: Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2003,361:1773-1778.
  5. Schmidt N-J and Lennette E-H. Advances in the serodiagnosis of viral infections. *Prog Med Virol*. 1973,15:244-308.
  6. Hsiung G-D. Diagnostic virology; An Illustrated Handbook. Revised and Enlarged Edition. New Haven and London, Yale University Press, 1973, pp. 62-64.
  7. Peiris JS, Lai ST, Poon LL: Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003, 361:1319-1325.
  8. Yang J, Wang ZH, Chen JJ, *et al.* Clinical detection of polymerase gene of SARS-associated coronavirus *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003, 23(5):424-427
  9. WHO Multicentre Collaborative Networks for Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) diagnosis. *Wkly Epidemiol Rec* 2003, 78(15): 121-122.
  10. Bidwell D-E, Buck A-A. The enzyme-linked immunosorbent assay. *Bull WHO* 1976, 54:129-139.
  11. Frazier CL, Shope RE: Detection of antibodies to alphaviruses by Enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1979, 10: 583-585.
  12. Chow L, Tseng TC. Detection of serum antibody to herpes simplex virus type I by Enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin J Microbiol Immunol* 1981, 14:46-53.

圖一 6 隻老鼠的詳細免疫及採血時程表

圖二 6 隻老鼠於不同時期血清之中和抗體效價

圖三 6 隻老鼠於不同時期之血清 ELISA IgM 效價

圖四 6 隻老鼠於不同時期之血清 ELISA IgG 效價