

广西地区恒河猴 (Rhesus Monkey) B病毒相关抗体的检查研究 On Detecting B Virus Related Antibody in Rhesus Monkey from Guangxi

麻秀珍

Ma Xiuzhen

(中华人民共和国南宁动物检疫所
南宁市友爱北路5号 530001)

(Nanning Animal Quarantine Service of P. R. China,
51 North You'ailu, Nanning, Guangxi, 530001)

唐文红

Tang Wenhong

(广西师范大学生物系
桂林市三里店 541004)

(Dept. of Biology, Guangxi Normal Univ.,
Salidian, Guilin, Guangxi, 541004)

胡刚

Hu Gang

(西南林学院 云南昆明 650224)

(Southwest China Forestry
College, Kunming, Yunnan, 650224)

翁健

Weng Jian

(原广西农业大学附属中学
南宁市秀灵路13号 530001)

(Middle School of Guangxi Agriculture University,
13 Xiulinglu, Nanning, Guangxi, 530001)

韦毅

Wei Yi

刘自民

Liu Zimin

(广西林业厅野生动植物和自然保护区管理站 南宁市七星路 530022)

(The Wildlife and Natural Reserve Managing Station of Guangxi
Department of Forestry, Qixinglu, Nanning, Guangxi, 530022)

摘要 采用玻片免疫酶法 (IEA) 和酶联免疫吸附试验法 (ELISA), 检查了来自广西不同来源恒河猴 B病毒的相关抗体。结果表明: 广西野生恒河猴受 B病毒的感染较为普遍, 来自龙虎山及扶绥保护区的猴, B病毒相关抗体阳性率分别是 79.7% 和 75.3%。来自穿洞河及布柳河保护区的猴, B病毒相关抗体阳性率分别是 26.1% 和 28.9%。大新保护区猴阳性率为 57.1%。在不同组猴中, 小群关养组猴相关抗体阳性率最高, 野生猴次之, 自繁猴最低。三组间, 猴 B病毒相关抗体阳性率的差异极显著 ($P < 0.05$), 经 ELISA检查确定为阴性的猴, 用 IEA 检查出 7.5% (15/200) 的猴被判定为阳性猴。

关键词 恒河猴 B病毒 玻片免疫酶法 酶联免疫吸附试验法

Abstract The related antibody to B virus (BVRA) of Rhesus monkey from different regions of Guangxi were detected by IEA and ELISA. The results showed that the wild monkeys were generally infected with B virus. The positive rate of BVRA of the Longhu Monkey was 79.7%, the Fusui was 75.3%, the Daxin was 57.1%, the Chuandonghe was 26.1%, and the Buliuhe was 28.9%. The positive rate of BVRA of the small colony captive group was the highest, following by the wild captive group, and the self-reproduction captive group was the lowest. In these three groups, the differences of the positive of BVRA among them were significant ($P < 0.05$). Of the monkeys with negative in B virus related antibody detected by ELISA, there were 7.5% showing positive by IEA. It showed that IEA was better than ELISA in Quarantine work.

Key words Rhesus monkey, B virus, IEA, ELISA

中图法分类号 S865.1; R455.6

B病毒在分类上属疱疹病毒科, 甲型疱疹病毒亚科。B病毒的自然宿主为恒河猴, 在亚洲受 B病毒感染

的恒河猴广泛存在^[1-4]。猴在与人接触中, 虽然可以感染 I型单纯疱疹病毒, 产生 I型单纯疱疹病毒抗体, 但由于猴的 B病毒 (HS) 具有宿主特异性, 相互感染是很局限的。采用人单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-

I) 作为抗原, 所检出的猴 B 病毒相关抗体大多数是由猴 B 病毒感染引起的。猴一旦感染上 B 病毒, 病毒就可长期潜伏在体内, 早期感染可引起口腔粘膜损伤为特征的口龈炎, 多数情况下不显症状^[9]。但猴 B 病是一种人畜共患病原, 可使人畜产生致死性脑炎或上行性脑脊髓炎。^[9]因此, B 病毒是影响实验猴质量的重要因素, 饲养或使用恒河猴的国家都非常重视 B 病毒的检疫。为了了解广西恒河猴 B 病毒的感染情况, 为广西恒河猴资源的保护管理以及合理开发利用提供基础资料和依据, 我们对广西恒河猴 B 病毒的感染情况进行研究。

1 材料和方法

1.1 检测对象

1.1.1 野生猴组: 野生猴来自广西龙虎山、扶绥、大新、穿洞河、布柳河等保护区, 捕获后直接送至检疫区, 单笼隔离, 7 d 内采血, 制备血清, 待检。共检测 999 只。

1.1.2 小群关养组: 猴来自广西各保护区和恒河猴产区, 捕获后直接送到广西灵长类研究中心, ♂, ♀ 隔离小群笼养, 每群 20 只~ 25 只, 笼的规格为 5M × 6M。笼养 60 d 后采血, 制备血清待检。共检测 群, 115 只。

1.1.3 自繁猴组: 广西灵长类研究中心自繁猴离乳后, ♂, ♀ 分群笼养, 每笼 1 只~ 20 只。共检测 笼, 132 只。

1.1.4 取 200 只用 ELISA 检查确定为阴性的猴, 单笼隔离饲养 6 个月, 其间取 3 次血清, 用 IEA 检查 B 病毒相关抗体。

1.2 血清制备

后肢静脉采血, 经 5000 r/min 离心制备血清, 低温 (-30°C) 保存待检。

1.3 检查方法

表 1 不同来源野生恒河猴 B 病毒相关抗体阳性率的比较

Table 1 Comparisons of positive rate of B virus related antibody of Rhesus Monkeys from five reserves

年龄/岁 Age/year	B 病毒相关抗体阳性率 Positive rate of B virus related antibody (%)				
	龙虎山保护区猴 Monkey of Longhushan reserve	扶绥保护区猴 Monkey of Fusui reserve	大新保护区猴 Monkey of Daxin reserve	穿洞河保护区猴 Monkey of Chuangonghe reserve	布柳河保护区猴 Monkey of Buliuhe reserve
≤ 2.5	61.1 (33/54)	59.2 (29/49)	35.1 (20/57)	5.1 (2/39)	8.5 (4/47)
2.6~4.0	76.7 (46/60)	68 (34/50)	43.3 (26/60)	8.5 (4/47)	19.1 (12/63)
4.1~6.5	85.7 (60/70)	83.9 (47/56)	67.7 (46/68)	44.4 (16/36)	45.0 (18/40)
> 6.5	95.7 (45/47)	90.7 (39/43)	90.2 (37/41)	54.3 (19/35)	54.1 (20/37)
平均 Mean	79.7 (184/231)	75.3 (149/198)	57.1 (129/226)	26.1 (41/157)	28.9 (54/187)

1.3.1 玻片免疫酶法^[6]: 以人单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 为抗原片, 检查血清 B 病毒相关抗体, 血清稀释为 1:4, 正常细胞孔无色, 病毒抗原细胞棕色为阳性。抗原片及酶结合物购自中国医学科学院动物研究所。

1.3.2 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法: 检查血清中 B 病毒相关抗体。HSV-1 超离抗原由广西灵长类实验动物研究中心提供。包板后 4°C 过夜, 洗涤, 每孔加封闭液 100 μL, 37°C 30 min 用洗涤液洗 3 遍, 拍干。加待测血清 (1:10) 稀释。每份血清加一孔特抗和一孔正常, 同时设阳性血清、阴性血清、稀释液加照, 37°C 1 h; 取出洗涤, 加酶标 SPA 37°C 1 h; 取出洗涤, 加底物, 37°C 30 min, 加终止液, 测 OD 值, 以 OD 值大于正常血清均值加 3 个 SD 为阳性。

2 结果

2.1 野生恒河猴 B 病毒相关抗体的检测结果

在野生猴中, 不同来源猴 B 病毒相关抗体阳性率的差异较大。龙虎山保护区和扶绥保护区的猴, B 病毒相关抗体阳性率较高, 前者是 79.7%, 后者是 75.3%。穿洞河以布柳河保护区猴 B 病毒相关抗体阳性率较低, 前者是 26.1%, 后者是 28.9%。来自大新保护区的猴 B 病毒相关抗体阳性率是 57.1% (见表 1)。

2.2 不同生境恒河猴 B 病毒相关抗体的检查结果

小群关养组猴 B 病毒相关抗体阳性率最高, 为 100%; 野生猴组次之, 为 55.8%; 自繁猴组最低, 为 12.9%。三组间, B 病毒相关抗体阳性率的差异极显著 ($P < 0.05$) (见表 2)。

2.3 200 只经 ELISA 检查确定为阴性的恒河猴, 经 IEA 检测, 有 15 只判定为阳性。18 只经过 ELISA 以及 IEA 检测都被判定为阴性的猴, 在半年之间用 IEA 作 3 次血清抗体检查, 第 1 次没有阳性猴出现。

但第 2 第 3 次检测均有阳性猴出现 (见表 3)

表 2 恒河猴 B 病毒相关抗体的检查结果

Table 2 The results of B virus related antibody in Rhesus Monkey

年龄 / 岁 Age / year	B 病毒相关抗体阳性率 Positive rate of B virus related antibody (%)		
	野生猴组 Wild captive group	小群关养组 Small colony captive group	自繁猴组 Self-reproduction captive group
≤ 2.5	35.8 (88/246)	100 (27/27)	8.1 (4/49)
2.6~4.0	41.8 (117/280)	100 (33/33)	13.5 (5/37)
4.1~6.5	64.8 (175/270)	100 (34/34)	17.4 (8/46)
> 6.5	72.9 (148/203)	100 (21/21)	—
平均 Mean	55.8 (557/999)	100 (115/115)	12.9 (17/132)

表 3 恒河猴 B 病毒的检疫结果

Table 3 The result of B virus quarantine in Rhesus Monkeys

检疫时间 Date of quarantine	阴性 Negative (只 individual)	阳性 Positive (只 individual)
1999 年 12 月 Sept. 1994	185	0
1999 年 3 月 Mar. 1995	180	5
1999 年 6 月 June 1995	171	9

3 讨论

B 病毒的检疫方法以检查相应抗体为主。过去一般采用中和试验法, 但该方法操作费时, 不适用于大批量标本检查和动物出口检疫。吴小闲等 1989 年以中和试验为基础, 建立了比中和试验法敏感、快速, 适用于大批量检疫的 ELISA 和 IEA 法^[6]。近年来, 广西主要采用 ELISA 和 IEA 两种方法检疫猴 B 病毒。经过几年的检疫实践, 证明 ELISA 作为检查猴 B 病毒血清抗体的常用方法, 具有简便、经济的特点, 适合较大饲养猴群的血清抗体作检查。但是, 用 ELISA 确定为阴性的猴 (食蟹猴、红面猴) 出口到日本、荷兰等国家时, 曾遇到麻烦。客户对我们检测结果有争议, 甚至发生过拒绝付款的现象。为了确保广西实验用猴的质量, 1999 年起, 我们一律采用 IEA 法检疫猴 B 病毒。在出口之前, 经过 2~3 次 B 病毒相关抗体检测都被确定为阴性的猴才放行出口。1999 年至今尚未发生因猴 B 病毒检疫质量问题而引起客户拒绝付款现象。本研究用 ELISA 确定为阴性的 200 只恒河猴, 经 IEA 检测有 15 只被判为阳性。用 ELISA、IEA 检测都被确定为阴性的猴, 在半年之内作了 3 次血清抗体检查, 第 1 次没有阳性猴出现, 而第 2 第 3 次检测都有阳性猴出现, 这就足以说明出口前对猴 B 病毒抗体进行多次检测是必要的。

实验人员因接触猴而感染 B 病毒致死或致残的事实, 引起了各国学者对猴 B 病毒潜在危险的关注。

国内外不少学者调查猴 B 病毒流行情况后指出: 猴 B 病毒抗体或相关抗体阳性率, 随动物年龄的增长而增高, 并认为性交、接触感染是 B 病毒传播的主要途径^[3~6,8]。本研究与上述观点基本一致。本研究结果表明: 广西野生恒河猴受 B 病毒的感染较为普遍, 但是不同来源的野生恒河猴 B 病毒相关抗体阳性率差异较大 (表 1)。来自龙虎山的猴, B 病毒相关抗体阳性率高达 79.7%。其原因可能是采用定点定时对野生恒河猴进行人工招引的方法, 使愈来愈多的猴高密度地聚集于各食场, 从而增加了猴群中各成员之间的接触机会。而扶绥保护区猴 B 病毒相关抗体阳性率较高的原因可能是, 从野外捕获后的运输过程中没有采用防止交叉感染的设施, 从而导致动物之间直接抓伤、咬伤或粪便污染。小群关养组的猴来自广西各保护区及恒河猴产区, 该组的猴在运至检疫区之前, 多数猴有过 B 病毒感染, 运到检疫区小群关养后, B 病毒很快就在猴群中传播开来, 60 d 后猴 B 病毒感染高达 100%。所以从野外捕获的猴应及时单笼隔离饲养, 作 B 病毒相关抗体检测, 分群饲养, 降低病毒扩散。本研究的野生猴组 B 病毒相关抗体阳性率为 52.9%, 明显高于自繁猴组。这可能与野生猴呈群居生活, 直接接触频繁, 间接接触机会增多有关。

B 病毒是一种人畜共患病原, 可使人产生致死性感染^[9]。目前尚无有效的疫苗可以使用, 而广西野生恒河猴以及各灵长类实验动物养殖场的猴受 B 病毒的感染又比较普遍。因此, 各养殖场饲养管理人员、临床兽医和研究人员均应注意自身防护, 建议广西各灵长类实验动物养殖场应实行单笼饲养, 定期检疫, 淘汰阳性猴, 逐步建立无 B 病毒猴群。

参考文献

- Zwartoun H T et al. Lab Anim. 1984, 18: 125.
- Daniel M D et al. Lab Anim Sci. 1975, 25: 303.
- Palmer A E. J Med Primatol. 1987, 16: 99.
- Orcutt R P et al. Lab Anim Sci. 1976, 26: 70.
- Weigler B J et al. Lab Anim Sci. 1990, 40: 257.
- 吴小闲. 恒河猴 B 病毒相关抗体检测方法的比较. 病毒学杂志, 1989, 1: 80~83.
- 段幸生, 李绍东, 周亚敏等. 猕猴 B 病毒相关抗体的调查. 上海实验动物科学, 13 (2): 61~64.
- 韦毅, 刘自民, 黄广宾等. 食蟹猴 (*M. fascicularis*) B 病毒相关抗体的初步探讨. 广西科学, 1996, 3 (1): 74~76.
- 军事医科院实验动物中心主编. 实验动物病毒性疾病. 北京: 北京农业出版社, 1992.

(责任编辑: 蒋汉明)