

## 恒河猴B病毒相关抗体检测方法的比较

吴小闲 蒋虹 曲立荣 时建东

(中国医学科学院实验动物研究所, 北京)

### 提 要

以 NT 方法为基础比较了 ELISA 和 EIA 方法, 共检测 84 份猴 B 病毒相关抗体的敏感性, 结果 ELISA 和 EIA 阳性各 50 份(59.5%), NT 阳性 45 份(53.6%)。三种方法相符者 71 份, 符合率 84.5%。ELISA 和 EIA 均较 NT 敏感, 而且快速、简便、经济, 可应用于大批标本的检查。

**关键词:** 恒河猴, B 病毒相关抗体, 中和试验, 酶免疫试验

恒河猴是医学科学研究中非常重要的实验动物, 我国有一定的资源。近年来国内已建立了多所恒河猴养殖场和灵长类养殖中心。据报道野生恒河猴 B 病毒〔猕猴疱疹病毒 (B 病毒)〕〔Herpesvirus simiae (B Virus)〕的感染率相当高<sup>[1,2]</sup>, 猴一旦感染, 病毒长期潜在上呼吸道和/或泌尿生殖器官附近的神经节, 还可以长期潜伏在组织器官内, 产生 B 病毒抗体。在急性感染期, 病毒可直接在猴群内传播, 而潜在感染时可通过交配传播<sup>[2,3]</sup>。B 病毒是一种人畜共患病原, 若感染人可引起致死性疾病。因此, 建立简易敏感的检测 B 病毒抗体的方法, 密切观察猴群中 B 病毒感染的动态, 保护人群的健康, 为建立无 B 病毒感染的 SPF 猴群提供依据。本文报道了应用中和试验(NT), 免疫酶试验(EIA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 B 病毒相关抗体的方法比较。

### 材 料 和 方 法

1. **标本来源** 野生恒河猴大多数为 3 岁以上的成年猴, 少数为 3 岁以下幼猴, 静脉采血后分离血清, 56℃30 分钟灭活, 冻存备用。

2. **中和试验** 用人单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)作抗原(毒种和相应抗血清来自预防医学科学院病毒研究所)。用 Vero 细胞培养病毒和滴定病毒。试验时血清从 1:5 开始对倍系列稀释于 96 孔平底培养板孔内, 每稀释度 2 孔, 每孔 0.05ml, 然后每孔加病毒 0.05ml 含 400 TCID<sub>50</sub>(以病毒对照孔孵育 3 天出现“++”病变的病毒量为合适), 室温(22℃)中和 1<sup>1</sup>/<sub>4</sub>—1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>小时, 每孔加入 Vero 细胞 0.1ml(以 2 天每孔长成单层的细胞量为合适), 置 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱 5 天, 观察并记录结果。以最高稀释度血清完全抑制病变为滴度。

3. **免疫酶试验** HSV-1 接种 Vero 细胞, 待病变达“+++”时, 收获细胞涂片(涂在印有

本文于 1987 年 7 月 7 日收到

小孔玻片上)。同时以未感染的 Vero 细胞涂片作对照, 涂片用冷丙酮固定, 低温干燥保存待用。抗体定性试验时待检血清作 1:5 稀释, 加 1 孔正常细胞, 2 孔含 HSV-1 细胞, 同批试验滴加阳性和阴性血清作对照。试验玻片置湿盒内置于 37°C, 30 分钟, 玻片经 pH 7.2 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 分钟, 吹干, 滴加合适浓度的 SPA-酶, 复置 37°C, 30 分钟, 同上法洗 3 次, 吹干, 用底物液 (3,3'-二胺基联苯胺 40mg, 丙酮 5ml, 33% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100μl, pH7.2 PBS 100ml) 显色 5 分钟, 洗涤, 干燥, 在普通显微镜下观察, 对照细胞无色为阴性, 含病毒细胞染成浅棕黄色至深棕黄色为阳性。如作抗体定量试验则系列稀释血清, 同上法进行试验。

4. 酶联免疫吸附试验 HSV-1 感染 Vero 细胞, 当病变“++++”时收获, 脱水浓缩 3-5 倍, 经超声波粉碎, 3000r/m 离心 20 分钟, 收获上清液, 冻存备用。同法制备 Vero 细胞抗原。试验时以合适抗原量包被板, 4°C 过夜, 常规洗涤后用 10% 小牛血清 PBS-封闭 20 分钟, 然后加 1:10 稀释的待检血清 (如作滴度则血清系列稀释) 37°C, 30 分钟, 经洗涤 3 次, 加入合适浓度的 SPA-酶 37°C 作用 30 分钟, 经洗涤 3 次, 加底物液和终止液, 测定 OD 值, OD 值大于平均  $\bar{x} + 3SD$  为阳性。

## 结 果

一、NT、ELISA 和 EIA 三种方法检测 84 份恒河猴血清标本 B 病毒相关抗体的结果。NT 阳性 45 份 (53.6%), 平均滴度 1:51.1, ELISA 阳性 50 份 (59.5%), 平均滴度 1:180.8, EIA 阳性 50 份 (59.5%), 平均滴度 1:18.6。三种方法相符者 71 份, 符合率 84.5%。两种方法符合者 13 份 (15.5%), 均见于抗体低滴度标本 (见表)。ELISA 和 EIA 较 NT 敏感。

三种方法检测 84 只恒河猴血清 B 病毒相关抗体的比较  
Comparison of three monitoring methods for detection of B virus related antibody in 84 Rhesus monkey sera

Number of tested animals	Antibody titers		
	NT	ELISA	EIA
29	<5	<10	<5
4	1- $\frac{1}{5}$ 100	10-1280	5-80
5	<5	10-40	5-40
1	5	10	<5
2	5	<5	<5
2	<5	10	<5
3	<5	<10	5

二、NT、ELISA 和 EIA 三种方法的相比较, NT 是检查猴 B 病毒相关抗体最常用的方法<sup>[1,2]</sup>, 也是被公认的方法, 但是 NT 方法复杂费时, 实际应用有困难。我们以 NT 方法为基础, 比较了 ELISA 和 EIA 的方法, 共检查标本 84 份, 结果 NT 和 ELISA 相比较 (图 1), 二种方法结果相符者 75 份, 符合率 89.3%。NT 和 EIA 相比较 (图 2),

二种方法结果相符者73份,符合率86.9%。NT阳性ELISA阴性者2份(2.4%),反之,ELISA阳性NT阴性者7份(8.3%)。NT阳性EIA阴性者3份(3.6%),反之,EIA阳性NT阴性者8份(9.5%)。结果表明ELISA和EIA虽仍有少数标本出现假阴性,但总的还是比NT敏感,且方法快速简便,可应用于大批量标本的检查。

ELISA和EIA同是免疫酶技术,二者比较(图3),两种方法相符者78份,符合率93.3%。结果表明两种方法均可应用于实际。

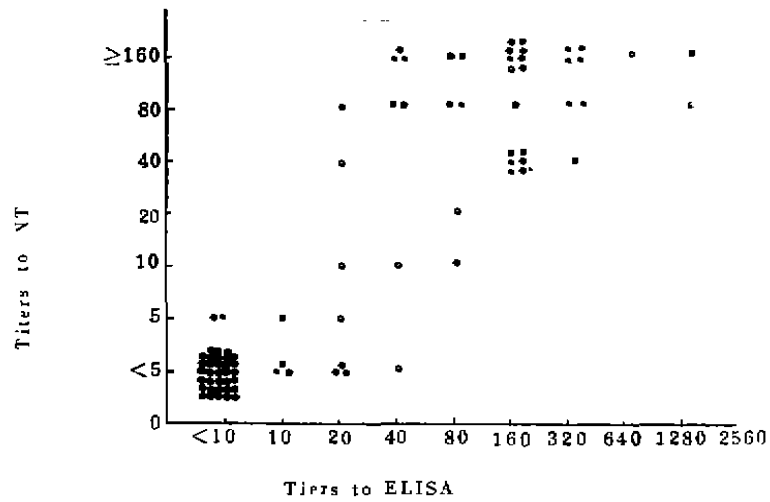


图1 NT和ELISA检测84只恒河猴血清B病毒相关抗体的比较  
Fig.1 Relationship between NT and ELISA antibody titers in 84 Rhesus monkey sera

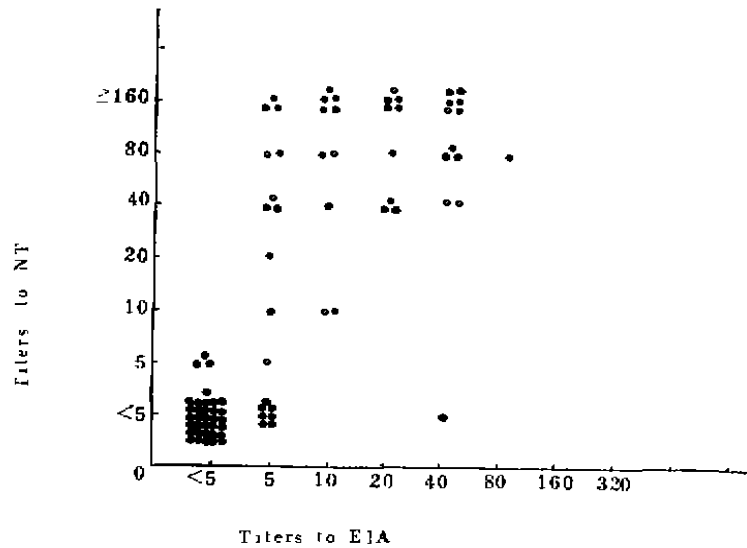


图2 NT和EIA检测84只恒河猴血清B病毒相关抗体的比较  
Fig.2 Relationship between NT and EIA antibody titers in 84 Rhesus monkey sera

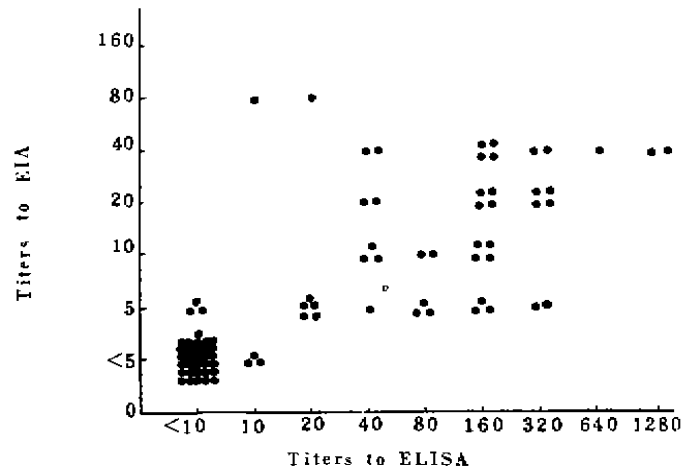


图3 ELISA 和 EIA 检测84只恒河猴血清B病毒相关抗体的比较  
Fig.3 Relationship between ELISA and EIA antibody titers in 84 Rhesus monkey sera

## 讨 论

B病毒、SA<sub>8</sub>病毒(见于非洲绿猴和狒狒的一种疱疹病毒)和人单纯疱疹病毒(HSV-1和HSV-Ⅱ)具有密切的抗原关系,因此给三种病毒的鉴别带来困难。用血清学检查抗体亦难区分抗体的来源。由于B病毒对人的危害性极大,因而近年来 Heberling 和 Kalter(1985)使用灭活的同源和异源抗原进行斑点免疫试验(DIA)以对这2种抗原颜色反应的强弱来判别抗体来源的病毒种类。Katz等(1986)使用去垢剂溶解的感染细胞作抗原和结合生物素的蛋白A以及碱性磷酸酶标记的亲合素作试剂建立了快速的(3.5小时)ELISA法检测HSV-1, B病毒和SA<sub>8</sub>抗体,并用这三种抗原分别作简单竞争试验便可区分这3种病毒的抗体。作者检查了13份人血清,除3份阴性外均是HSV-1抗体;33份恒河猴血清,其中27份为B病毒抗体,只1份为HSV-1抗体;7份非洲绿猴血清除2份阴性外均是SA<sub>8</sub>抗体。以上结果显示恒河猴主要是B病毒感染产生的抗体。鉴于疱疹病毒有宿主特异性,虽然互相感染也是很局限的。所以虽然本试验检出的B病毒相关抗体是用HSV-1作抗原的,但仍然可以认为大多数是由于B病毒感染而引起的。今后也有必要建立鉴别疱疹病毒型特异抗体的方法,以证实我国恒河猴B病毒感染的确实情况。

## 参 考 文 献

- [1] Zwartouw, H.T et al., 1984, *Lab. Anim* 18: 126—130.
- [2] Sasagawa, A et al., 1986, *Exp. Anim* 35: 59—63.
- [3] Zwartouw, H.T and Bouter E.A., 1984, *Lab Anim* 18: 65—70.
- [4] Heberling, R.L, and, Kalter S. S., 1985, *Am Soc Microbiol*, 85th Annu Mtg, Las Vegas, Abstr p.21 (S 10).
- [5] Katz D, et al, 1986, *J Virol. Methods* 14: 99—109.

## Study on the Monitoring Methods for B Virus Related Antibody in Rhesus Monkey

Wu Xiao-Xian et al

(*Institute of Medical Laboratory Animal, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

ELISA and EIA as well as NT in detecting B virus related antibody of 84 Rhesus monkey sera were compared. The results showed that there were 50 positive specimens (59.5%) in ELISA and EIA and 45 positive specimens (53.6%) in NT. 71 specimens of the 84 tested specimens were in the same result by 3 methods, and the concordance among them was 84.5%. ELISA and EIA were more sensitive than NT method, and they are also simple, fast and economical, so they might be used in the examination of a lot of monkey specimens.

**Key words,** Rhesus monkey, B virus related antibody, neutralization test, enzyme immunoassay