

甲型肝炎病毒在恒河猴中 连续传代的实验观察

浙江医学研究院 医学微生物学研究所 郭杏英 黄海鹰 余佩华 余哲 毛江森

摘要 本文报告了用人HAV直接感染恒河猴并连续传代的结果。三代共四只恒河猴感染HAV后SGPT反应曲线相似,有两个异常高峰。四只猴感染前及恢复期的双份血清测定抗-HAV,结果恢复期血清抗-HAV均阳转。抗-HAV阳转的时间,三代猴都在接种HAV后7~10周之间。第一代和第二代猴的粪便经放射免疫和IEM检查证明HAAg阳性。传代感染的成功,证明了此第1、2代猴粪便排泄HAV的事实。另外,三只人工饲养2~8个月的恒河猴抗-HAV阳性,说明还能获得自然感染。

关键词 HAV 恒河猴

恒河猴在我国分布广泛,资源丰富;是一种容易获得,而且较易在实验室适应、饲养的灵长类动物。我们实验室在证明恒河猴^[1]对在红面猴(短尾猴)体中经过一代的甲型肝炎病毒(HAV)敏感^[2]以后,又用从甲型肝炎病人潜伏期粪便分离的杭州甲-1^[3]直接感染,并连续传三代。现将结果报告如下。

材料与方 法

一、恒河猴来源:第一代猴2只(编号R-1-1, R-1-2)捕自闽北山区。均为雌性。体重分别为1.7及2.0公斤。第二代猴(R-2-1),是同批购进的怀孕母猴,到我院动物供应室两个月后娩出的小猴,雄性,饲养至13月龄、体重1.5公斤时使用。第三代猴(R-3-2)系从浙南山区捕获,雌性,体重3.5公斤。

二、感染接种及观察

1. HAV来源:第一代猴(R-1-1, R-1-2)接种的HAV,是从杭州市郊农村一次流行中的病人潜伏期粪便分离到、命名为杭州甲-1的^[3]。第二代猴(R-2-1)接种的,是第一代猴R-1-1感染后排泄,经放射免疫检查反应阳性和免疫电镜(IEM)观察看到HAV样颗粒的三份粪便的混合提取液。第三代猴

(R-3-2)接种的,是第二代猴R-2-1感染后排泄经IEM观察看到HAV样颗粒较多的四份粪便混合提取液。

2. 接种材料处理及接种途径:接种材料处理同文献^[1,2]。接种途径,无论原代或传代,均采用口服加上下肢静脉注射。静脉注射相当于0.4~0.5克粪便的提取液,口服1克粪便的提取液。

3. 接种前动物检疫观察:所有实验猴,均于接种HAV前放实验动物房检疫观察三周以上。在此期间,采正常血三次以上,收集正常粪便30~50克,接种HAV前称一次体重。血清测GPT正常,测抗-HAV阴性的猴子用于实验。

4. 接种后观察及标本采集:

接种后每天观察动物的食欲、精神状态、粪便性状。每月称体重一次。每周抽静脉血一次,采血当天测SGPT,其余血清冻-20℃冰箱。接种病毒后第3或第4天开始,每天收集粪便,每两天的粪便放一个塑料袋中作为一份,-20℃冰箱冻存。一般收集粪便到接种后60天左右。

三、血清GPT测定:采用改良穆氏法,临床病人>40单位为异常值。

四、猴血清抗甲型肝炎病毒抗体(抗-HAV)检测:

1. 接种前及接种后70天以上的双份血清用Abbott公司H \bar{A} VAB EIA试剂盒测定抗-HAV。操作方法按该试剂盒使用说明书,测光密度(OD)仪器为上海第三分析仪器厂出品的510酶标比色计。比色杯厚度1cm,波长492nm。

2. 感染猴系列血清检测方法:按上述H \bar{A} VAB EIA稍加改变的固相抗原竞争法。具体方法简述如下:上海塑料三厂出品的4×10孔聚苯乙烯微孔板,用适当稀释的提纯组织培养甲型肝炎病毒抗原(HAAg)包被,置37℃ 2小时后移4℃过1~2夜,然后洗去。每孔加待测血清10 μ l及适当稀释的辣根过氧化物酶结合抗-HAV50 μ l,混匀后放40℃水浴温育2小时后加基质显色。每份血清平行两孔。每块板上都设有同一只猴经H \bar{A} VAB EIA试剂盒检测过的已知阴性和已知阳性血清作为对照。用上述同一酶标比色计测定,记录OD值。按下列公式计算抑制百分率。

$$\frac{\text{阴性对照OD} - \text{待测血清OD}}{\text{阴性对照OD} - \text{阳性对照OD}} \times 100 = \text{抑制}\%$$

测定血清的抑制%≥50%,判为抗-HAV阳性。

五、猴粪便HAAg检测:

用于HAAg检测的粪便抗原提取,同用于感染接种的粪便HAV提取,即差速离心-PEG沉淀-氯仿提取。

1. 放射免疫测HAAg,方法同文献^[4]。

2. 免疫电镜(IEM)观察HAAg颗粒:同本实验室以前报告^[5]。

结 果

一、猴接种HAV后一般状况观察:猴接种后早期食欲稍差,大便量也减少,有的不很活泼。每月称体重一次,接种病毒后前两个月内,体重不增或稍减。如果没有其他病,第三个月后体重开始恢复增长。

二、血清GPT测定:实验猴接种病毒前采血至少三次,接种后每周采血一次,SGPT测定在采血当天进行,结果见图1。由图可见,在观察20周之内,SGPT出现两个升高过程。第一个高峰在接种病毒后7天即已开始上升,第2~7周达顶巅,第8周左右下降。第12~16周出现第二个高峰。同时间测定SGPT的第一代两只猴是如此,不同时间测定SGPT的第二代、第三代猴也是如此。

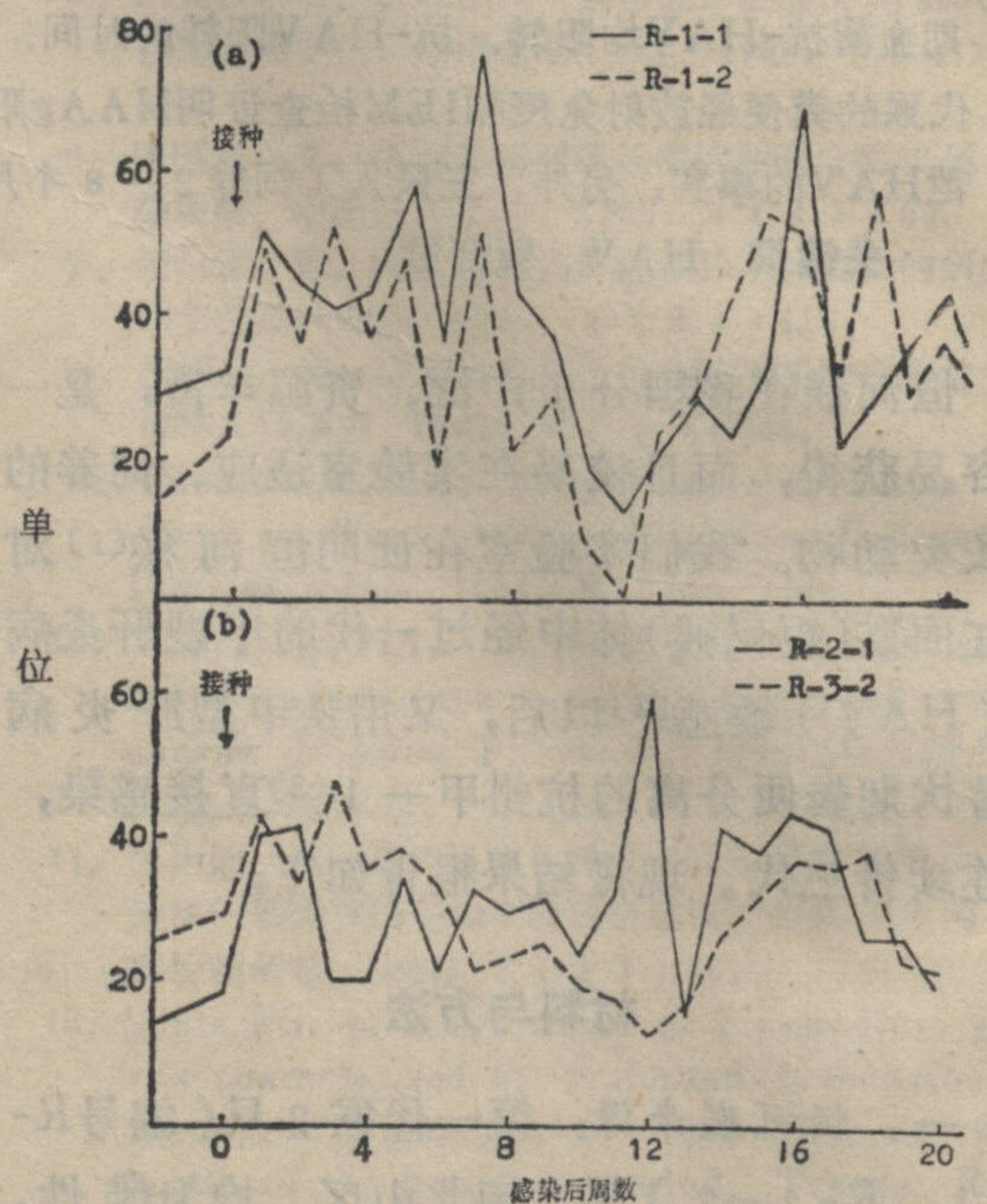


图1 恒河猴接种HAV后SGPT测定结果

三、血清抗-HAV测定

1. 实验猴接种病毒前及接种后70天以上的双份血清用Abbott公司的H \bar{A} VAB EIA试剂盒检测结果见表1。由表1可见,这三代四只猴接种HAV后抗-HAV均阳转。

三只饲养在我院正常动物室(位于杭州市环城东路侧),与实验动物房(位于杭州市西,天目山路侧)相距5公里以上的恒河猴,其血清同时用H \bar{A} VAB EIA试剂盒检测,OD值为.020、.067、.035,抗-HAV均为阳性。采血时这三只猴在我院正常动物室饲养的时间,分别为58、238、238天。见表2。

2. 恒河猴接种HAV后血清抗-HAV阳转

表1 恒河猴接种HAV后血清抗-HAV的阳转(a)

代次	猴号	采血时间 (接种前、后天数)	结 果		
			OD (492nm)	B/A(b)	判定(c) (-)或(+)
1	R-1-1	- 52	.460		(-)
		189	.029	15.9	(+)
	R-1-2	- 52	.390		(-)
		189	.022	17.7	(+)
	R-2-1	- 14	.468		(-)
		70	.050	9.4	(+)
152		.038	12.3	(+)	
R-3-2	- 33	.515	1	(-)	
	146	.030	17.2	(+)	

(a) 用美国Abbott公司H_{AV}VAB EIA试剂盒检测
 (b) B = 接种前血清OD值, A = 接种后血清OD值
 (c) 与对照的阈值比较, 阈值为.253~.270。大于阈值为(-), 小于阈值为(+)

表2 饲养在正常动物室的恒河猴血清抗-HAV测定(a)

猴号	采血时间 (在正常动物室饲养天数)	测定结果	
		O.D (492nm)	判定(b) (+)或(-)
1	58	.020	(+)
2	238	.067	(+)
3	238	.035	(+)

(a) 同表1(a)
 (b) 同表1(c)

时间:

用国产塑料板包被HAAg的固相抗原竞争法, 检测了三代各1只实验猴各自的连续系列血清。计算出每份血清的抑制%。以采血时间为横坐标, 抑制%为纵坐标作图, 如图2。由图2看出, 三只猴接种HAV后, 血清抗-HAV均在10周之内阳转。第一代R-1-1猴在第9至10周之间阳转, 第2代R-2-1猴在第7周阳转, 第三代R-3-2猴在第7~8周之间阳转。

四、粪便HAAg的检测结果

1. 放射免疫检测: 第一代R-1-1及R-1-2猴接种人HAV前、后收集的粪便, 提取悬液, 作放射免疫检测。以每只猴自身接种病毒前的粪便提取液作为对照。同位素放射性计数

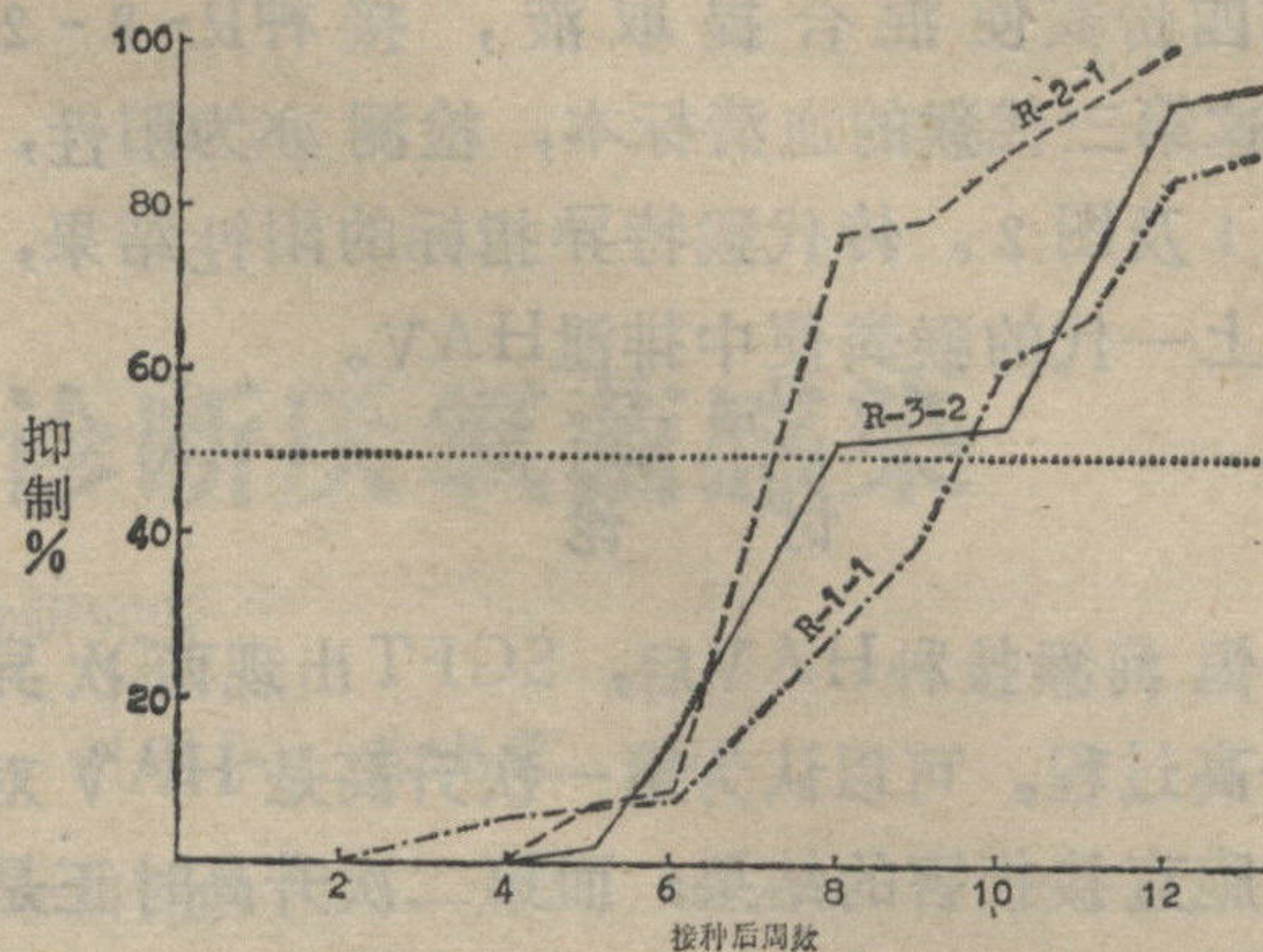


图2 恒河猴接种HAV后血清抗-HAV EIA固相抗原竞争法

结果P/N ≥ 2.1为阳性。R-1-1接种HAV后第9(10)(以下括号中的天数省略)天、27、29、47、53天的粪液标本中均测出HAAg。R-1-2猴第35、37天的粪便标本中测出HAAg。

2. 粪便HAAg颗粒的免疫电镜观察:

R-1-1猴粪液经放射免疫法测得特异cpm较高的27、47、53天的三份标本液混合作免疫电镜观察, 摄得HAV样颗粒照片, 从照片上可看到, 空心 and 实心、直径27nm左右的颗粒, 颗粒周围有抗体包绕, 并有棘状突起与另外的颗粒互相连结。

因提取系列粪便标本, 工作浩繁。故第二代R-2-1猴, 我们凭过去经验选择六份粪便标本, 分别提取, 制成6个电镜铜网作IEM观察。在接种HAV38天后的5个铜网上都看到HAV样颗粒团。仅将46天标本铜网上IEM观察到并拍下照片。从照片中可看出一团大小、形态、结构符合HAV的颗粒。

五、传代试验

恒河猴R-1-1、R-1-2接种人HAV后, 其中R-1-1猴的经放射免疫检测证明HAAg为阳性的三份粪便混合提取液, 接种R-2-1猴。R-2-1猴接种后的血清标本及粪便材料经各种检查, 见表1及图2, 结果均为阳性。又将R-2-1猴的在IEM中看到HAV样颗粒较

多的四份粪便混合提取液，接种R-3-2猴。这第三代猴的血清标本，检测亦为阳性，见表1及图2。传代猴特异指标的阳性结果，证明上一代的猴粪便中排泄HAV。

讨 论

恒河猴接种HAV后，SGPT出现两次异常升高过程。可以认为第一次升高是HAV对肝细胞直接损害的结果；而第二次升高时正是抗-HAV已经产生的时候，所以可能是免疫复合物作用于肝细胞所引起的。

恒河猴不仅对HAV实验感染易感，我们在三只饲养在远离实验动物房数公里以外的恒河猴血清中也查到明确的抗-HAV阳性，说明恒河猴也能获得自然感染。我们的结果进一步证实了1975年Purcell等^[6]和Miller等^[7]分别报告的结果；他们用其他不同检测方法作动物血清学调查，发现有不同比例的恒河猴血中存在抗-HAV。所以，在选择实验用恒河猴时，必须用敏感、可靠的方法排除抗-HAV已经阳性的动物，实验才能获得预期的结果。

本实验是我们实验室以前工作^[1]的继续和进一步证明。虽然所用动物数目不多，但传了三代共四只猴全部都获得一致的规律、明确的阳性结果，说明恒河猴对HAV相当敏感。

从我们的实验结果看，恒河猴感染HAV后，SGPT异常升高，血清抗-HAV在7~10周阳转，大便排泄HAV，可以感染其他恒河猴，经过相应的时间也获得同样特异指标的阳转。因此，我们认为恒河猴具有作为甲型肝炎动物模型的可能性。

An Experimental Observation on Rhesus Monkeys Continuously Transmitted with Human Hepatitis A Virus (HAV) Guo Xing-ying, et al., Department of Virology, Institute of Medical Microbiology, Zhe-

jiang Academy of Medicine, Hangzhou

An animal model of hepatitis A was performed with rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Three passages of human hepatitis A virus with four infantile seronegative monkeys were proved by seroconversion and HAV fecal shedding. The primary material of HAV for transmitting to monkeys was fecal suspension extracted from a hepatitis A patient in latent phase.

All of the animals, two peaks of SGPT appeared within twenty weeks post inoculation the first peak was in about 1st-7th weeks, and the second was arranged in 12th-16th weeks. Seroconversion of anti-HAV antibody was observed in all of four monkeys within ten weeks after inoculation. The hepatitis A virus antigen shedding in feces of first and second passage rhesus monkeys had detected by RIA and immune electron microscopy. It presented in stools of three animals was proved.

In addition, three rhesus monkeys which were manfed 2-8 months appeared positive anti-HAV reaction, It means that the rhesus monkeys could be naturally infected.

We consider that the rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) may act as an animal model of hepatitis A.

Key Words HAV Rhesus Monkey

参 考 文 献

1. 郭杏英, 等. 甲型肝炎病毒实验感染猕猴的研究—恒河猴对甲型肝炎病毒的易感性. 中华微生物学和免疫学杂志 1981; 1(2): 84.
2. 毛江森, 等. 甲型肝炎病毒实验感染猕猴的研究. 中国科学 1981; (6): 765.
3. 毛江森, 等. 从病人粪便中分离的甲型肝炎病毒抗原. 微生物学报 1980; 20(2): 222.
4. 毛江森, 等. 甲型肝炎患者粪便中排甲型肝炎病毒抗原动态的放射免疫研究. 浙江医学 1980; 2(1): 8.
5. 毛江森, 等. 甲型肝炎病毒在一株传代细胞(ME RN株)中的繁殖. 微生物学报 1984; 24(1): 86.
6. Purcell RH, et al. Relationship of hepatitis A antigen to viral hepatitis. Am J Med Sci 1975; 270: 61.
7. Miller WJ, et al. Specific immune adherence assay for human hepatitis A antibody. application to diagnostic and epidemiology investigation. Proc Soc Exp Biol Med 1975; 149: 254.