

恒河猴 SV₄₀ 病毒的调查研究

赵 玫 叶 萌 秦田生 贾玉芳
陈淑范 李云塘 张新生 王映纯

(中国医学科学院医学生物学研究所 昆明)

恒河猴是 SV₄₀ (*Simian vacuolating agent*) 的天然宿主, 恒河猴肾组织培养细胞 (RMK) 常因污染该病毒而致试验失败、疫苗废弃。迄今虽无确切证据表明 SV₄₀ 对人类有害, 但鉴于它对新生地鼠致癌, 在体外转化人源细胞、自人类进行性全脑白质炎患者曾查到该病毒及其抗体, 且发现病毒基因与细胞基因整合, 故对于 SV₄₀ 能否引起人类新生物、慢性神经系统疾病或其它持久性潜伏性感染的问题一直处于严密的医学监测之中。国内因条件所限, 对 SV₄₀ 的检测与控制问题长期未能解决。

作者应用非洲绿猴肾传代细胞及胰酶处理的 RMK, 通过中和试验及免疫电泳技术分离、纯化并系统地鉴定了 RMK 中的 SV₄₀, 进行了恒河猴实验性感染观察, 检测了 456 份恒河猴及 60 份人血清的 SV₄₀ 中和抗体, 并对控制 SV₄₀ 污染及提高疫苗质量的问题进行了讨论, 提出了建议。

材料与方 法

病毒 Rh₁/KM/82 (简称 Rh₁) 系 1982 年在昆明自本所疫苗生产研究室制备的原代 RMK 中分离的病毒。对照病毒 SV₄₀A-426 株来自联合国世界卫生组织 (WHO)。

免疫血清 SV₄₀ 猴抗血清由 WHO 供给。作者自制 SV₄₀ 兔抗血清及小白鼠腹水抗体经用 WHO 抗血清标准化。自制 Rh₁ 兔抗血清经用 SV₄₀ 及 Rh₁ 病毒鉴定。脊髓灰质炎羊抗血清由 WHO 肠道病毒参考研究中心供给。

被检血清 血清标本取自恒河猴静脉血、人末梢血。置 -20°C 保存, 用前 56°C 30 分钟灭活。所有标本于 1982 年 9 月至 1983 年 10 月采集。

细胞 试验用 RMK (本所)、BSC-1、CV₁、Vero、HeLa 及 MRC-5 传代细胞 (WHO 及英国 NIBSC) KMB-17 (本所建立的人二倍体细胞株) 及 Hep-2 (辛辛那提市) 传代细胞。

中和试验 采用 Dömök 微量技术 (Dömök 等, 1979)。血清——病毒混和物置 36°C

作者向徐维民、杨春栢、金椿翔、潘藻华及一切支持本工作、协助采集标本的同志致以谢意。
本文 1984 年 5 月 5 日收到。

中和3小时, 试验观察21—28天。

蔗糖——氯化铯双垫层超离心技术 氯化铯/蔗糖密度为1.404/1.081, 样品经32000转/分离心2小时(胥爱源等, 1981)。

理化试验、血凝试验及电镜检查 采用病毒实验室常规技术。

结 果

一、RMK中的SV₄₀

来源于RMK的Rh₁置电镜下观察, 大小为50nm左右、圆形、子粒清晰、在胞核内复制、呈典型晶格状排列(图1)。该病毒在BSC-1等非洲绿猴肾传代细胞上出现明显病变(CPE)。在RMK上之早期病变细胞呈不规则圆形、胞浆布满颗粒、胞膜清晰、病变细胞聚积、但无融合现象, 晚期病变细胞全部退变, 自瓶壁脱落, 数个或数十个连在一起浮于液体表面。CPE出现时间较迟, 一般于种毒后17—21天。加大病毒接种量、以胰蛋白酶预先处理细胞或通过传代, CPE可提早出现。Rh₁及SV₄₀在HeLa、Hep-2、MRC-5及KMB-17细胞上无明显CPE。

Rh₁及经蔗糖——氯化铯双垫层离心的Rh₁病毒均可被SV₄₀标准抗血清(WHO)所中和。SV₄₀A-426(WHO)病毒亦可被Rh₁兔抗血清或鼠腹水抗体所中和。Rh₁及SV₄₀间有双向交叉中和反应。但Rh₁病毒不被脊髓灰质炎抗血清中和。

免疫电镜观察结果也表明Rh₁及SV₄₀具有双向交叉反应。1:10—1:80抗血清或鼠腹水抗体皆可使被检病毒聚积, 包有蛋白分子, 形成抗原——抗体复合物, 可见清晰的抗体桥(图2)。试验设有无SV₄₀抗体的正常猴血清对照。

理化试验结果表明Rh₁耐酸(pH3.0), 耐乙醚。50°C加温1小时无明显灭活, 但在1M MgCl₂的溶液中50°C加温3—15分钟即被灭活。在1:2,000—1:4,000福尔马林溶液中36°C加温3—7日, 约90%以上Rh₁病毒被灭活, 但不能完全灭活。在β-丙内脂中较稳定。核酸类型属DNA。在4°、28°及36°C对人“0”型、豚鼠、鸡、牛及树鼯红血球无凝集反应。

以上结果一致证明Rh₁为SV₄₀。本所RMK中SV₄₀检出率1982年为22.22%(26/117) 1983年为7.96%(16/201)。

二、恒河猴实验性感染SV₄₀

SV₄₀Rh₁株可经静脉、鼻腔、胃内及皮下途径感染恒河猴。动物于受染1周后自粪便排毒, 至少持续3周。尿液偶可查出病毒。静脉、鼻腔感染后, 动物血清中和抗体滴度较高(GMT_{112.2}及40.0), 其肾脏所制备的组织培养细胞中可见到由Rh₁引起的CPE(表1)。

三、恒河猴及人群SV₄₀中和抗体调查

不同来源的8组猴的中和抗体调查结果列于表2。A组野生猴之抗体阳性率及水平最低(32.14%, GMT 2.75)。F组猴园猴(80.74%, GMT 88.72)、G组试验猴

(84.91%, GMT \geq 56.23)及H组猴岛猴(100%, GMT \geq 45.45)明显地高。抗体阳性率的组间差列于表3, A、B、C组野生或笼养猴与F、G、H组群养或密切接触猴有组间显著性差异。说明猴群密度、通风与日照条件、隔离状况及猴只流动频率与SV₄₀的传播有密切关系, 而猴龄(表4)、饲养地(成都E组或昆明F、H组)或采标本之季节无明显关系。

表1 恒河猴实验性感染SV₄₀结果摘要Table 1 Experimental infection of rhesus monkeys with SV₄₀

采样时间(周)	感 染 途 径				未感染对照
	静脉	皮下	胃内	鼻内	
病毒学检查 1	+	+	+	+	-
粪便 2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
1	-	+	-	+	-
尿液 2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	+	-
RMK 3	+	-	-	+	-
血清学检查					
中和抗体 1	14.1	20.0	<5.0	14.1	<5.0
2	20.0	5.0	<5.0	14.1	<5.0
3	112.2	20.0	7.1	40.0	<5.0
临床观察 3	-	-	-	+	-

表2 不同猴群SV₄₀中和抗体调查Table 2 Neutralizing antibodies to SV₄₀ in different rhesus monkey groups

组 别	阳性例数/检测例数	阳性率(%)	GMT
A 野生	9/28	32.14	2.75
B 露天大笼	7/20	35.00	2.85
C 病猴房	10/20	50.00	10.72
D 现场关养月余	24/39	61.54	7.35
E 成都生研所群养	25/34	73.52	26.30
F 猴园	47/54	80.74	88.72
G 试验猴	50/59	84.91	\geq 56.23
H 猴岛	30/30	100.00	\geq 45.45

说明: 1. 除E组外, 其余猴均捕自云南、广西饲养于昆明或江川县

2. G组试验猴有密切接触史, 猴子流动频繁。

表3 不同猴群SV₄₀中和抗体阳性率的组间差
Table 3 Statistical differences of positive percentages among rhesus monkey groups*

组别*	A	B	C	D	E	F	G	H
A		-	-	+	++	++	++	++
B	-		-	-	++	++	++	++
C	-	-		-	-	++	++	++
D	+	-	-		-	+	++	++
E	++	++	-	-		-	+	+
F	++	++	++	+	-		+	+
G	++	++	++	++	+	+		
H	++	++	++	++	+	+		

说明: 1. - 无差异 ($P > 0.05$)
+ 有差异 ($0.01 < P < 0.05$)
++ 显著性差异 ($P < 0.01$)
2. * 分组情况见表2.

表4 不同年龄组猴群的SV₄₀中和抗体
Table 4 Neutralizing antibodies to SV₄₀ in monkeys at different ages

年龄	阳性例数/检测例数	阳性率(%)	GMT
< 1—4	65/104	62.50	12.48
5—14	34/52	63.88	13.85

表5 不同人群SV₄₀中和抗体调查
Table 5 Neutralizing antibodies to SV₄₀ in different human groups

组别	接 触 史		OPV 疫苗史	阳性例数/检测例数	GMT
	恒河猴	SV ₄₀			
居民	-	-	不明	7/30	1.24
实验人员A组	+	+	+	8/8	207.13
B组	+	-	+	18/18	98.86
C组	-	-	+	0/4	0.00

人群抗体调查结果列于表5。A组实验人员与恒河猴及SV₄₀有密切接触史者8/8例有高水平抗体, GMT207.13。B组饲养人员18/18例亦有高水平抗体, GMT98.86。

C组无猴或SV₄₀接触史的另一实验室工作人员4例均未查出抗体。同一时期自外地城市居民采集的血清标本, 仅7/30例可查到低水平抗体, GMT 1.24。

A组28只野生猴以露天大笼隔离于云南省江川县, 远离其它猴群, 2个月期间无一例抗体阳转。F组猴园猴以小笼单只隔离, 笼间装隔板。定期检测抗体的结果(表6)表明SV₄₀中和抗体可维持7—8个月, 然抗体水平逐渐下降(GMT88.72→77.09→37.95→22.65)。隔离猴肾脏所制备的RMK仅1批查出SV₄₀。

表 6 隔离猴SV₄₀中和抗体消长动态
Table 6 Surveys of neutralizing antibodies in monkeys during isolation period

组别	隔离期	阳性例数/检测例数	阳性率(%)	GMT
A (野生)	0时	9/28	32.14	2.75
	2个月	9/26	34.62	2.57
F (猴园)	0时	47/54	80.04	88.72
	3个月	49/53	92.45	77.09
	6个月	32/37	86.49	37.95
	7—8个月	27/32	84.38	22.65

12对母胎猴抗体测定结果说明SV₄₀中和抗体可以胎传, 母、胎猴抗体水平相近。

讨 论

作者对42株来源于RMK的Rb₁鉴定结果证实为SV₄₀。报告了1982及1983年RMK中SV₄₀的检出率(22.22%及7.96%)。国外以恒河猴肾制备的RMK中SV₄₀的检出率可达19—47%(Magrath, 1961; Чумаков等, 1963)。

456份中和抗体调查说明SV₄₀在我国云南、广西一带野生猴及本所饲养的恒河猴中广泛传播(32.14~100%)。我国台湾及毗邻的越南恒河猴于新捕捉后即可查出抗体, 印度野生恒河猴抗体阳性率为35.1%(Kalter等, 1967; Heberling, 1971; Коляскина, 1963)。苏联苏呼密饲养场关养的中国猴(21/21)、越南猴(30/31)可查出SV₄₀中和抗体(Чумакова等, 1963)。SV₄₀的传播与地区、季节、猴龄无关, 与猴种、饲养环境、隔离条件有密切关系。

实验性感染及抗体调查结果均证明了密切接触导致猴对猴、猴对人的传染。粪—→口途径是主要方式, 但不排除呼吸道及创伤感染的可能。

群养有利于猴子活动, 可增强体质, 但如猴园、猴岛每只猴占地面积平均在20—60平方米时, 则显过分拥挤, 容易造成病毒传播。单只猴小笼隔离不适于长期饲养, 且需一定设备。如能于野外捕捉后就将猴子单只分笼运回实验室, 以5—8只为一群固定饲养于露天大笼, 保持空气流通、日照充分, 注意卫生消毒、用具隔离, 可有效地控制

SV₄₀的传播。

人员防护问题值得强调。60份人血清抗体调查结果说明凡有恒河猴或SV₄₀接触史的人均有高水平中和抗体 (GMT98.36—207.13)。Horváth (1972) 于1964年自60% (9/15)、1969年自42% (14/33) 接触猴或其脏器的实验人员血清中查出SV₄₀抗体。一般居民具有低水平抗体可能系由于用过污染SV₄₀的疫苗或接触过人类Papovaviruses所致 (Penney, 1971; Shah, 1976)。

加强猴只隔离检疫, 查到SV₄₀的RMK予以废弃, 脊髓灰质炎活疫苗病毒液中加1M MgCl₂后加温灭活SV₄₀等措施可以提高疫苗的质量。

参 考 文 献

蒋爱源等 1981 中华医学杂志 6:674

Domok, I. et al. 1979 *Guide to poliovirus isolation and serological techniques for poliomyelitis surveillance*. WHO offset publications.

Heberling, R. L. 1971 Viral diseases of nonhuman primate in the wild. *Lab. Animal Sci.* 21 (6): 1019—1022.

Horváth, L. B. 1972 SV₄₀ neutralizing antibodies in the sera of man and experimental animals. *Acta Virol.* 18:141—146.

Kalter, S. S. et al. 1967 A survey of primate sera for antibodies to viruses of human and simian origin. *Am. J. Epidemiol.* 86:562—568.

Magrath, D. J. et al. 1961 Vacuolating agent. *Brit. Med. J.* 2 (5247):287—288.

Penney, J. B. et al. 1973 Studies of the antigenic relationships of the new human papovaviruses by electron microscopy agglutination. *Infection & Immunity.* 8 (2):299—300.

Shah, K. et al. 1976 Human exposure to SV₄₀. *Am. J. Epidemiol.* 103 (1):1—12.

Коляскина, Г. И. 1963 Вирусологические и серологические данные о латентной инфекции у макака резус, вызванной вирусом ОВ₄₀ (SV₄₀). *Воп. Вирусол.* 4:450—452.

Чумаков, М. П. и др. 1963 Методы и результаты изготок ления живой полиомиелитной вакцины, не содержащей примесей вакуолизирующего вируса (ОВ₄₀—SV₄₀). *Воп. Вирусол.* 4:446—449.

Чумакова, М. Я. и др. 1963 Антитела к ОВ₄₀ (SV₄₀) у обезьян различных пород. *Воп. Вирусол.* 4:452—456.

STUDIES ON SV₄₀ IN RHESUS MONKEYS

Zhao Mei Ye Meng Qin Tiansheng Jia Yufang
Cheng Shufan Li Yuntang Zhang Xinsheng Wang Yangchun
(*Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming*)

Rh₁/KM/82 virus was recovered from uninoculated primary cell cultures of rhesus monkeys in Kunming in 1982. The features of Rh₁ were similar to SV₄₀ in the size, morphology, the presence of DNA, the absence of essential lipid, relative thermal stability, exceeding labile at 50°C in 1 M MgCl₂, being active in β-propylactone and partly inactive in formalin. No hemagglutination was found. The virus showed high antigenic activity and low growth cycle. Biphasic cross positive reaction has been found between Rh₁ and SV₄₀ (WHO) by neutralizing and IEM tests. Forty two batches of RMK were discarded due to the contaminating of SV₄₀ (Rh₁) in 1982 (26/117) and 1983 (16/201).

Unimmunized rhesus monkeys were readily infected by the route of intravenous, intranasal, subcutaneous or intragastric administration with Rh₁ virus. Excretion of viruses in feces and urine occurred in all the 4 groups. Neutralizing antibodies appeared with high titers in the i.v. and i.n. groups. Rh₁ virus was found in kidney cell cultures made from the i.v. and i.n. groups.

Serological survey of 456 sera collected from different rhesus monkey groups showed the widespread infection of SV₄₀ in Chinese rhesus monkeys under housed and air-opened conditions even in the wild. The incidences were remarkable higher in crowded groups (73.52—100%, GMT, 45.45—88.72) than in groups new captured (32.14%, GMT 2.75). RMK from these monkeys that were in quarantine for 7—8 months individually in closed cages were nearly SV₄₀ free.

Thirty sera from technical staffs in our laboratories were tested. Twenty six of them having contacted with either rhesus monkeys and SV₄₀ virus or rhesus monkeys all possessed antibodies to SV₄₀ (26/26). Four staffs who did not get in touch with monkeys or virus had no antibodies to SV₄₀. However, incidences of antibodies to SV₄₀ in sera of 30 residences living far from laboratories were low (23.30%, GMT 1.24).

Isolation, conditions of hygiene, air ventilation and sun lightening in monkey breeding areas would be emphasized.