

試管內間接法測定馬傳染性貧血病毒

謝快樂、馬丁雷渥因

(麻薩諸塞州州立大學、安城、麻薩諸塞州)

摘 要

以標準抗 EIA (馬傳染性貧血) 血清, 利用免疫擴散沈降反應 (ID test) 和補體結合反應 (CF test) 檢查馬肌肉細胞培養是否有 EIA 病毒之感染。

有 EIA 病毒感染及無病毒感染之同一繼代數馬肌肉細胞培養分別接種 EEE 病毒 (東部馬腦炎病毒) 後二天, 以中性紅 (neutral red) 染色, 前者無 EEE 之 plague 出現, 而後者則有, 此干涉法比 ID test 或 CF test 操作簡單。

緒 言

Kobayashi 和 Kono (1967) 發展了馬白血球培養技術, 使得試管內培養和分析馬傳染性貧血病毒 (EIA virus) 成爲可能, 不過這種方法有一缺點就是由 EIA 病毒所引起的細胞變性與正常培養細胞偶發生變化很難於區分。此外 Bagust (1972) 和 Kemeny (1970) 發現馬感染疱疹病毒 (herpesvirus) 的比率相當高, 因此適合於採血供應白血球的馬匹較難找到。

Coggins (1970) 所報告的免疫擴散沈降反應是目前美國用來測定 EIA 抗體的標準方法; Malmquist (1973) 則由感染 EIA 病毒的細胞培養液可大量製出該沈降反應所需之抗原。EIA 病毒可在細胞培養上發育, 但無法產生可見的細胞變性。

本篇是報告一種測定試管內馬細胞培養是否有感染 EIA 病毒的方法。

材料和方法

病毒: 由 Coggins (康乃爾大學) 分讓的 Wyoming 株, EIA 病毒, 培養於馬的肌肉細胞培養, 而後連續繼代供試。

東部馬腦炎病毒 (Eastern Equine Encephalitis Virus, EEE) 非5034株 (由麻州大學 Weinack 教授分讓) 繼代於10日齡雞胚胎, 在接種後約48小時採取尿囊液, 經遠心分離 (1000×g, 10分鐘) 去雜質後, 分裝儲存於 -20°C 備用。

細胞培養: 年幼馬胚胎 (約3個月齡) 的大腿肌肉無菌的取下, 切碎, 以胰蛋白酶 (trypsin) 消化、培養、培養液爲 medium 199 添加10%的胚胎牛血清和抗生素, 細胞形成完整單層之後, 即以 TV 溶液 (Trypsin-versene solution) 消化後再培養繼代, 再繼代間隔時間4~6天; 有 EIA 病毒感染的細胞和無病毒感染的細胞, 均以上述方法繼代。

EIA 病毒之測定: 分別採集有 EIA 病毒感染和無病毒感染的細胞培養液, 抗原之濃縮則依 malmquist (1973) 所述方法, 簡言之即含抗原之培養液加入6%的聚乙醯基 (polyethylene glycol) 置 4°C 一夜後遠心 (10,000×g, 30分鐘), 其沈澱物以原來液體 2%體積的緩衝溶液 (PBS, PH7.2) 溶解之, 而後加等量的乙醯充份混合後置 4°C 4小時, 以真空吸氣機將乙醯吸盡, 餘者即爲抗原, 此抗原與標準的抗 EIA 血清行免疫擴散沈澱反應測定其是否含 EIA 抗原。

以橡皮刷將 EIA 感染和無感染細胞分別刷下，懸浮於適量培養液，經三次急速凍結融解，而後遠心 (1,000g, 5 分鐘) 上清液供補體反應測定抗原。(依美國農業部公布之補體結合反應標準診斷法行之，補體使用 5C'H₆₀)。

干涉試驗：EIA 感染的肌肉細胞和無感染的細胞，當繼代培養 4 天形成單層後，分別每瓶 (25 ml 裝) 各接種 200 PFU 之東部馬腦炎病毒(EEE Virus)置 37°C, 3 小時後將培養基抽掉，後以加 1% 瓊脂的培養基覆蓋，37°C 培養 3 天，再以含 1% 瓊脂和 3% 中性紅 (neutral red 1:300) 之培養基予以染色。

結 果

免疫擴散沈降反應：EIA 感染和無感染之細胞培養液分別以聚乙醯苷濃縮後，以免疫擴散沈降反應與標準抗 EIA 血清反應，在 24 小時內 EIA 感染之濃縮培養液與標準 EIA 抗血清間即有沈降線出現，而無感染之濃縮培養液與 EIA 標準血清間則一直到 96 小時後仍無任何沈降線出現。圖一顯示 EIA 感染之細胞培養液抗原與已知之標準 EIA 抗原和 EIA 抗血清之沈降線完全一致。

補體結合反應：表一顯示 EIA 感染細胞培養含有 32 倍之補體結合反應抗原，而無感染之對照細胞則無任何可測出之補體結合反應抗原。

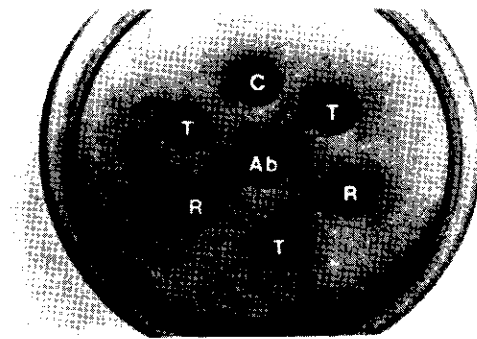
干涉試驗：第 20 代之 EIA 感染細胞與同代之無感染對照細胞，每瓶分裝接種 200 PFU 之東部馬腦炎病毒三天後以中性紅染色，圖二左邊為無 EIA 感染之對照細胞，有 EEE 之 plaque 出現。而右邊有 EIA 感染之細胞則完全無 EEE 之 plaque 出現。圖四 EIA 感染細胞在接種 EEE 病毒之後，以顯微鏡檢查並無細胞變性，而圖三對照細胞在 EEE 病毒接種後顯微鏡下可見到 CPE (cytopathic effect)。換言之，先感染之 EIA 病毒可干涉 EEE 細胞變性之產生。

討 論

病毒在組織培養內發育，有的可引起細胞變性，有的不引起任何形態上的改變，而 EIA 病毒則屬後者。

可引起細胞變性的病毒，諸如：新城雞瘟病毒，水疱性口炎病毒，在研究上有很大方便，這些病毒的感染力和病毒定量可以 plaque-forming-units 亦即細胞染色計算 plaque 之數目即可，而測定抗體之中和試驗亦可以 plaque 數減少試驗行之。不過不引起細胞變性的病毒則無法直接以 plaque 分析的方法測定之，例如：在豬腎細胞培養無法引起 CPE 的豬傳染性胃腸炎病毒 (TGE Virus) 感染豬腎細胞後再接種牛病毒性下痢病毒則可阻止該病毒在豬腎細胞產生 CPE。而 Kumagai (1961) 報告了 END 試驗，他利用無法產生 CPE 的豬瘟病毒來刺激新城雞瘟病毒使之在豬睪丸細胞上能產生 CPE，而此方法隨後很普遍的被使用於無法產生 CPE 的豬瘟病毒之分析。

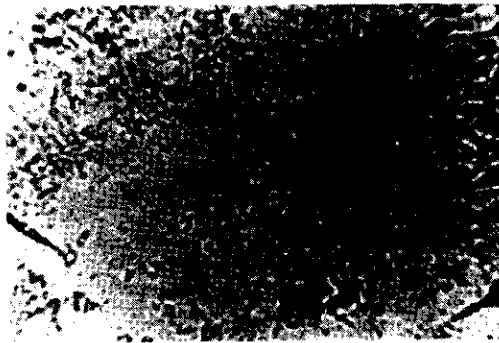
本報告利用補體結合反應和免疫擴散沈降反應來確定細胞是否感染 EIA 病毒，馬的細胞培養在感染 EIA 病毒後很顯然的可阻止 EEE 病毒 CPE 之產生。如何利用此干涉方法於 EIA 的研究和診斷有待進一步努力。



圖一、免疫擴散沉降反應：T：由 EIA 感染細胞之抗原 C：由無 EIA 感染細胞之抗原，R：標準 EIA 抗原 Ab：標準抗 EIA 血清



圖二、無 EIA 感染細胞接種 EEE 後形成之 Plaque (左)
感染 EIA 之細胞接種 EEE 後無 Plaque 形成 (右)



圖三、無 EIA 感染細胞在接種 EEE 後顯微鏡下可見到 CPE



圖四、EIA 感染之細胞接種 EEE 後，顯微鏡下無 CPE 產生

Table 1 Complement Fixation Test of EIA-infected and Non-infected Culture

	EIA-infected culture extract dilution					Non-infected culture extract dilution					Reference EIA Ag dilution		Complement controls CH ₅₀ (units)		
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:8	1:16	5	2.5	1.25
Reference EIA															
serum dilution															
1:6	0 ^a	0	0	10	40	40	80	95	100	100	0	0	100	100	60
1:12	0	0	0	30	60	50	85	95	100	100	0	0	100	100	70
VBD ^b	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	70
Known EIA															
negative serum (1:2)	75	95	100	100	100	80	100	100	100	100	90	100	100	100	60

a. Number represents percentage of hemolysis. Degree of hemolysis less than 30% is considered as positive.

b. VBD: veronal buffered diluent.

REFERENCES

1. Bachrach H. L. ; J. J. Callis ; and W. R. Hess (1955) . The growth and cytopathogenicity of vesicular stomatitis virus in tissue culture. *J. Immunol.* 75 : 186.
2. Baquist, T. J. ; R. R. Pascoe ; and T. J. Harden (1972) . Studies on equine herpesviruses. 3. The incidence in Queensland of three different equine herpesvirus infections. *Aust. Vet. J* 48 : 47.
3. Bower, R. K. (1958) . Studies on Newcastle disease virus by the plaque method. *J. Bacteriol.* 75 : 496.
4. Coggins, L. ; and N. S. Norcross (1970) . Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Vet.* 60 : 330.
5. Kalter, S. S. (1963) . Disc method for identification and titration of cytopathic viruses and detection of antibodies resulting from their infection. *J. Lab. Clin. Med.* 62 : 525.
6. Kemney, L., and J. E. Pearson (1970) . Isolation of herpesvirus from equine leukocytes ; Comparison with equine rhinopneumonitis virus. *Canad. Comp. Med.* 34 : 59.
7. Kobayashi, K. and Y. Kono (1967) . Propagation and titration of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* 7 : 8.
8. Kumagai, T. ; T. Shimizu ; S. Ikeda ; and M. Matumoto (1961) . A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. I. Establishment of standard procedure. *J. Immunol.* 87 : 245.
9. Malmquist, WaA. ; D. Barnett ; and C. S. Becvar (1973) . Production of equine infectious anemia antigen in a persistently infected cell line. *Arch. ges. Virusfor.* 42 : 361.
10. McClurkin, A. W. (1965) . Studies on transmissible gastroenteritis of swine. I. The isolation and identification of a cytopathogenic virus of transmissible gastroenteritis in primary swine kidney cell cultures. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 29 : 46.
11. Sheckmeister, I. L. ; J. Strechfuss ; and R. C. St. John (1967) . Comparative pathogenicity of vesicular stomatitis virus and its plaque type mutants *Arch. ges. Virusforsch.* 21 : 127.

An Indirect Assay in Vitro for the Detection of Equine Infectious Anemia Virus

Happy K. Shieh and Martin Sevoan

University of Massachusetts

Aimherst, Mass.

Summary

Standard EIA (Equine infectious anemia) antisera were applied in immunodiffusion test (ID test) and complement fixation test (CF test) in order to detect whether the equine muscle cell cultures were infected with EIA virus.

The same passage (20th) of equine muscle cell subcultures, either EIA infected or non-infected, were inoculated with EEE virus (Eastern equine encephalitis virus), incubated in 37°C for 2 days, and then stained with neutral red. No visible plaque was observed on the EIA infected cell cultures, whereas plaques were seen on the non-infected cell cultures.

The technique of this interference test is much simpler than that of ID test or CF test.