牛腸內病毒之分離與鑑定

鍾　明　華

(臺灣省家畜衛生試驗所)

P. Hummel

(西德柏林自由大學)

摘　　要

從罹患嚴重下痢牛糞便病材中，分離到病毒三株；亦從罹患呼吸道疾病牛鼻汁中，分離得病毒一株。這些病毒在初代牛睪丸細胞及 AUBEK 牛腎臟株化細胞中皆能增殖而產生小而圓化之 CPE，且不受 5-Iodo-2′-Deoxyurdiine (IUDR) 及 Chloroform 之影響；在 PH 3.0 buffer 中甚爲安定；而 I M $MgCl_2$ 可保護分離病毒抵抗熱之處理；又經牛腸內病毒抗血淸鑑定經果，證實其皆屬於牛腸內病毒 (Bovine enterovirus)。

緒　　言

牛腸內病毒首於 1957 年由 Klein 等（4）報告，爾後在世界各地陸續地分離到，其中有很多是從健康牛隻分離到，但也有不少的腸內病毒是從呼吸道、腸道及生殖器官疾病中分離到的 (4,5)，Moll 等（8）曾從罹患呼吸道疾病之牛糞便中及從流產胎兒的胃液、腹水及尿囊液中分離到腸內病毒。本省牛隻於夏季亦常有下痢及呼吸道疾病發生之報告，惜均未進行病毒之分離及從血淸學方面加以診斷。筆者首於1973年從罹患嚴重下痢牛糞便病材及罹患呼吸道疾病牛鼻汁病材中分離得病毒數株。本篇即爲有關這些分離毒株經生化性狀及血淸學鑑定，證實其皆屬於牛腸內病毒之試驗成績報告。

材料與方法

PSV 病毒家兎抗血淸製備：取 1.5 ml 之病毒液與同量之 Incomplete Freund Adjvant 以超音波震碎器混合成 Water-in-oil 乳劑，肌肉內接種於家兎。然後每隔兩週靜脈內注射病毒液 5 ml 共三次，接種家兎花最後一次接種後10天放血，分離血淸。

病毒分離：糞便病材，以加有 10 倍量抗生素之培養液（內含 2 %無球蛋白牛胎兒血淸）做成混懸液。鼻腔粘汁則以棉棒採取後，置於上述之培養液內，以 3,000 rpm 離心20分鐘，取上淸液接種於 BT 單層細胞上。

病毒核酸鑑別法：以含有 IUDR 50 mcg/ml 之 MEM 培養液及不含 IUDR 之培養液，分別加入試管中單層細胞中，於 37°C 培養 4 小時，然後把培養液抽棄，再接種 0.1 ml 10 倍稀釋列病毒，經 37°C 感作 60—90 分鐘後抽棄接種液，以 Hank's 液洗滌細胞兩次，再分別加入含與不含 IUDR 50 mcg/ml 之培養液，再繼續培養於 37°C ，觀察 CPE，比較其力價

分離毒對 PH 3.0 緩衝液之敏感性：依 Kelter 法行之（3）。

分離毒氯仿 (Chloroform) 之敏感性：依 Feldman 法行之（2）

$MgCl_2$ 對分離毒之安定試驗：依 Wallis 等（9）方法行之。

分離毒中和試驗：將分離毒以培養液做成 10 倍稀釋列，以微測滴管將各稀釋階病毒滴注於滴定盤內，每滴爲 0.025 ml，然後再加一滴 20 單位的家兎抗血淸，混合均勻後，置於 37°C 暖房內感

作60—90 分鐘，然後再加一滴含有 300,000/ml 細胞混懸液，以膠帶封之，37°C 繼續培養。另外以不含抗體之血淸做爲對照。比較兩組之病毒力價，計算中和指數。

結　　果

一、自牛隻下痢糞便病材中分離得病毒三株，分別命名爲 73-B1, 73-B2 及 73-B3。病毒接種於 BT 細胞 9 小時後，即產生小而圓化的 CPE，24 小時後全部細胞圓化脫落。在 AuBEK 株化細胞上的 CPE 亦相同（圖 3，4）。

二、由進口乳牛鼻腔粘汁中分離得病毒一株，命名爲 73-B4。病毒接種於 BT 細胞 9 小時後亦產生小而圓化的 CPE，24 小時後全部細胞脫落，在 AuBEK 上的 CPE 亦同（圖 5，6）。

Fig 1. Normal AuBEK Cell. 4×5

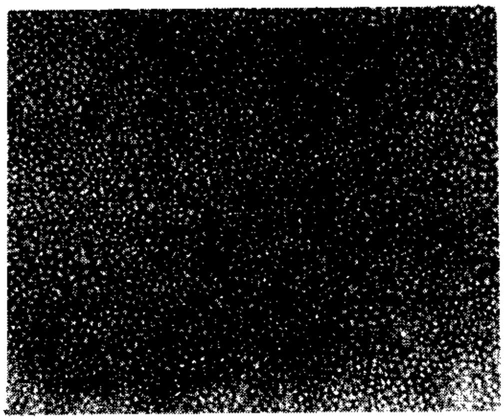


Fig 2. Normal AuBEK Cell. 10×5

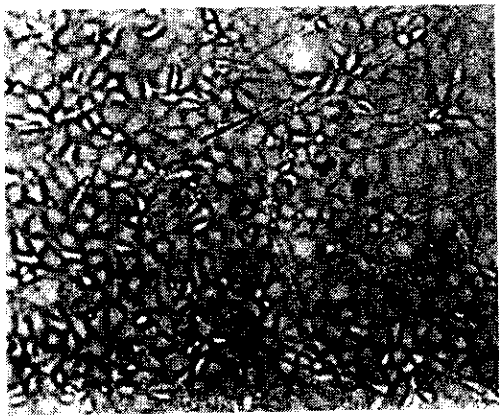


Fig 3. CPE Caused by 73-B1 Virus in AuBEK at 24 hours postinoculation. 4×5

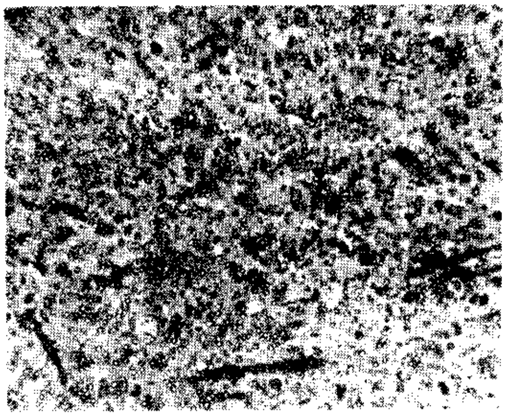
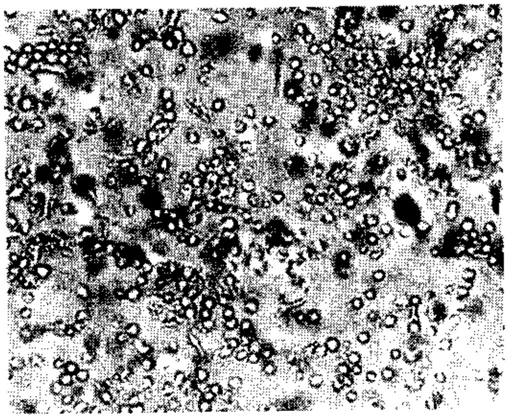


Fig 4. CPE Caused by 73-B1 Virus in AuBEK at 24 hours postinoculation. 10×5



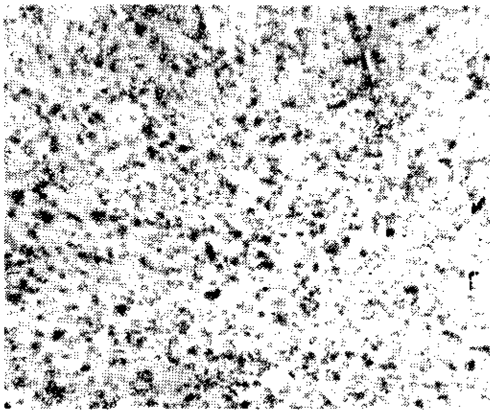


Fig 5. CPE Caused by 73-B4 Virus in AuBEK at 24 hours postinoculation. 4×5

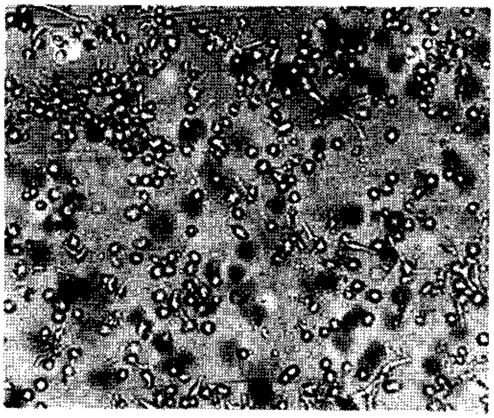


Fig 6. CPE Caused by 73-B4 Virus in AuBEK at 24 hours postinoculation. 10×5

三、分離毒株與 IBR 病毒同時以 IUDR 測定其對病毒增殖之抑制能力，結果 IUDR 不能抑制 73-B1 及 73-B4 病毒之增殖（表 1）。由此可知分離毒皆屬於 RNA 病毒。

Table 1. Effect of IUDR on Virus Replication of 73-B1, 73-B4, and IBR Viruses.

Virus	Without IUDR	With IUDR
73-B1	$10^{5.5}$ $TCID_{50}$/0.1ml	$10^{5.3}$ $TCID_{50}$/0.1ml
73-B4	$10^{5.7}$	$10^{5.5}$
IBR	$10^{6.0}$	$10^{1.7}$

四、分離毒株以 Chloroform 處理後，病毒之增殖未受影響（表 2）。

Table 2. Effect of Chloroform on The Titer of 73-B1, 73-B4, and IBR Viruses.

Virus	Untreated	Treated
73-B1	$10^{6.3}$ $TCID_{50}$/0.1ml	$10^{6.0}$ $TCID_{50}$/0.1ml
73-B4	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$
IBR	$10^{6.5}$	$10^{1.0}$

五、分離病毒株對 PH 3.0 buffer 之感受性試驗結果如表 3。73-B1 及 73-B4 如同腸內病毒 PSV-1一樣安定。

Table 3. Stability of 73-B1, 73-B4, IBR, and PSV-1 Viruses in PH 3.0 Buffer.

Virus	PH 3.0 Buffer	Hank's Sol.
73-B1	$10^{6\cdot5}$TCID$_{50}$/0.1ml	$10^{6\cdot5}$TCID$_{50}$/0.1ml
73-B4	$10^{6\cdot5}$	$10^{6\cdot5}$
IBR	$10^{2\cdot5}$	$10^{6\cdot0}$
PSV-1	$10^{7\cdot0}$	$10^{7\cdot0}$

六、1 M $MgCl_2$ 離子能安定分離毒株對熱的反應（50°C, 60分鐘），一如腸內病毒 PSV-1 及 PSV-3，但 IBR 病毒則否（表4）。

Table 4. Effect of 1M $MgCl_2$ on Thermostability

Treatment		73-B1	73-B4	PSV-3	IBR
Hank's	30 min 50 C	<1.0[a]	<1.0	<1.0	1.7
	60 min 50 C	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	120 min 50 C	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
1M $MgCl_2$	30 min 50 C	5.3	5.7	6.3	<1.0
	60 min 50 C	5.0	5.3	5.7	<1.0
	120 min 50 C	4.7	4.5	5.5	<1.0

a. Vius titer (log TCID$_{50}$/0.1ml)

七、分離病毒株以牛腸內病毒 PSV-1 及 PSV-3 家兎抗血清中和結果如表5。

Table 5. Neutralization Test of 73-B1 and 73-B4 Virus Isolates with Anti-PSV-1 and Anti-PSV-3 Sera

Virus	Antiserum	Virus titer	NI
73-B1	—	6.1[a]	—
	Anti-PSV-1	5.6	0.5
	Anti-PSV-3	3.3	2.8
73-B4	—	6.1	—
	Anti-PSV-1	5.6	0.5
	Anti-PSV-3	3.6	2.5
PSV-1	—	6.3	—
	Anti-PSV-1	2.3	4.0
	Anti-PSV-3	3.1	3.2

	—	6.6	—
PSV-3	Anti-PSV-1	6.1	0.5
	Anti-PSV-3	2.6	4.0
	—	5.6	—
IBR	Anti-PSV-1	5.6	0
	Anti-PSV-3	5.6	0

a. log $TCID_{50}$/0.1ml

討　　論

自下痢病材及呼吸道疾病鼻腔滲出液中分離到能使牛睪丸及 AUBEK 牛腎臟株化細胞產生典型的小而圓化 CPE 的病毒，且在接種後 24 小時內使所有的單層細胞圓化脫落。由於病毒的增殖不受 IUDR 的影響，顯示其乃屬於 RNA 病毒；對氯仿亦具抵抗力，可證明其未具蛋白衣 (Envelope)，更由二價陽離子 (Mg^{++}) 在 50°C 之下對病毒有保護的現象（9），以及經牛腸內病毒抗血清中和鑑定之後，證實分離病毒株皆屬於牛腸內病毒。

牛腸內病毒雖可從狀似健康的牛糞便中分離到（4，5），但 Moll 等（8）從罹患呼吸道疾病牛隻糞便中分離到腸內病毒，且從血清抗體之顯著上升證實牛腸內病毒是引起疾病的禍首。本試驗未能對患畜繼續追踪，也因受環境限制未做動物接種試驗，但由於 Moll 等之人工接種試驗的結果及在本試驗中未能分離出其他更能引起呼吸道疾病及下痢的病毒，如 IBR, Adenovirus, PI-3 及 BVD 病毒，顯示牛腸內病毒在此兩種疾病中扮演着一份角色。

從鼻腔粘汁滲出液中分離到腸內病毒之報告不多，本試驗中從牛隻鼻腔粘汁滲出液分離到腸內病毒，據推斷可能來自糞便的污染。而分離病毒株之血清型別，由於目前根據報告已有爲數衆多不同的牛腸內病毒之血清型（1），在本試驗因祇有三種可資比較，是以不能對其所屬之血清型作一確論。

誌　　謝

本試驗蒙農復會經費資助，謹申謝忱。同時對黃士則先生在工作上之協助致謝。

參 考 文 獻

1. Barya, M. A., Moll, T. and Mattson, D. E. 1967. : Antigenic Analysis of Bovine Enteroviruses through Studies of the Kinetics of Neutralization. AmJVR., 28 : 1283-1294.
2. Feldman, H. A. and Wang, S. S. 1961. : Sensitivity of various Viruses to Chloroform. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 106 : 736-738.
3. Kelter, A., Hamparian, V. and Hilleman, M. 1962. : "Characterization and classification of ECHO 28-Rhinovirus-Coryzavirus Agent", Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 110 : 821-831.
4. Klein, M. and Early, E. 1957. : The Isolation of Enteric Cytopathogenic Bovine Orphan (ECBO) Viruses from Calves. Bact. Pro., 21 ; 73.

5. Kunin, C. M. and Minuse, E. 1958. : The Isolation in Tissue Culture, Chick Emrbyo, and Suckling Mice of Hiltrable Agents from Healthy Dairy Cows. J. Immunol., 80 : 1-11.
6. Mattson, D. E., Moll, T. and Barya, M. A. 1969. : Physiochemical Characteristics of A Bovine Enterovirus Prototype. Am JVR., 30 : 1577-1585.
7. Moll, T. and Finlayson, A. V. 1957. : Isolation of Pathogenic Viral Agent from Feces of Cattle. Science, 126 : 401-402.
8. Moll, T. and Davis, A. D. 1959. : Isolation and Characterization of Cytopathogenic Enterovirus from Cattle with Respiratory Disease. AmJVR., 20 : 27-32.
9. Wallis, C. and Melnick, J. L. 1962. : Cation Stabilization-A New Property of Enteroviruses. Virology, 16 : 504-505.

Studies on Bovine Viral Respiratory Diseases in Taiwan

II. Isolation and Identification of Bovine Enterovirus from Feces and Nasal Discharge of Cows.

M. H. Jong

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

P. Hummel

(Free University, Berlin)

Summary

Three viral agents were isolated from feces of cows suffered from severe diarrhea, and one strain of virus was isolated from nasal discharge of imported cow suffered from respiratory disease. Both of them grew well in primary bovine testicle cell culture and in AUBEK bovine kidney cell line, and produced typical rounding CPE. Both of the virus strains were characterized as bovine enterovirus on the bases of the uninhibitory effect of 5-iodo-2′-deoxyuridine on virus replication, chloroform resistance, stabilization effect by molar magnesium ions for 1 hour at 50°C, and serological identification with antiserum of bovine enterovirus.