

# 從罹患呼吸道疾病之牛隻分離IBR病毒 及其性狀檢討

林敬覆、邱朝齊、呂榮修、詹益波

(臺灣省家畜衛生試驗所)

## 摘 要

由罹患呼吸道疾病之牛隻鼻分泌物，以BK (Bovine kidney cell cultures) 細胞所分離出之病毒株，經 plaque形成方法 cloning後，再經過BK細胞增殖三代，其病毒力價為  $10^{5.0-6.0}$  TCID<sub>50</sub>。本分離毒以 5-iodo—2'-deoxyuridine (IUDR) 之核酸間接測定法鑑定為含 DNA 型核酸之病毒。其對 Ether, Acetone及 Ethanol無抵抗力，於PH值7至8間穩定，但經56°C, 30分鐘處理及60°C, 15分鐘處理後則被不活化，於含1M之MgCl<sub>2</sub>溶液中經50°C, 30分鐘處理後則被破壞。

本分離毒以抗IBR—C株之家兔高力價抗血清同定結果，證明其與IBR—C株同一血清型之IBR病毒，並命名為IBR—Chitin株。本病毒對牛、山羊及綿羊之0.3% RBC saline solution, 不起凝集反應，其於沉降反應試驗對抗IBR—C之家兔血清呈陽性，對抗PI<sub>3</sub>—SF—4及抗BVD—NADL之家兔血清則為陰性。

本分離毒於BT (Bovine testicle cell culture), BK (Bovine kidney), Au BEK (Au Bovine embryo kidney), SK (Swine kidney), ESK (Embryonic swine kidney), PK—15及Hela等細胞均能增殖而產生CPE (Cytopathic effect)

## 緒 言

自從本省大量引進乳肉牛種牛以便加速發展本省養牛業後，本省牛隻之呼吸道疾病病例日益增多，本所因鑑於此，曾對本省乳肉牛實施病毒性疾病抗體調查，結果發現IBR之中和抗體陽性率佔受檢總數7.3% (326)<sup>3</sup>，且於其中和抗體力價曲線之上分佈情形，而知受檢所採之血清當時為正在陽轉發病之時期，故於秋冬及春夏之交時，特別注意病例之發生，以便於病毒之分離，結果於竹南鎮某牧場之放牧肉牛羣中，於民國六十四年四月初，發現二頭六月齡左右之聖達肉牛發生眼腫水樣之結膜炎，接着眼腺液轉稠，口唇口腔有潰斑，鼻鏡乾裂，罹患小母牛之陰道上發現有膿疱狀之病灶，罹患小公牛之包皮及陰莖上亦有類似之病灶，患牛均呈倦怠，無食慾，精神不振，筆者囑以抗生素治療以免其他細菌感染，於症狀極期二週後漸癒，於第三週時患牛則有角膜炎出現，筆者請以aureomyion每日治療二次數日而癒。今就當時採回之患牛鼻分泌物分離病毒之結果，分述於下，敬請指正。

## 材料和方法

一、病材：以經滅菌之棉棒，採取患牛之鼻分泌物 (Nasal secretions)，置入含有 Penicillin 200μ/ml及 streptomycin 200μg/ml之 Hank's solution 0.5ml之試管內，於4°C感作30分鐘

後，放入  $-40^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。以備為病毒分離<sup>2,4,6,8,13</sup>。

二、組織培養<sup>4,5,15</sup>：供試之細胞 BT (Bovine Testicle cell cultures) . BK (Bovine Kidney cell cultures) , AuBEK (Au Bovine Embryo Kidney cell cultures) , SK (Swine kidney cell cultures) , ESK (Embryonic Swine Kidney) , PK-15 (Porcine Kidney) , 及 HeLa (Human Epidermoid cancer of Larynx) 等細胞所用之培養液為 Hank's Growth Medium (10% Fetal calf serum, 100 $\mu$ /ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml Streptomycin) , 而於病毒接種後，其細胞維持液為 Hank's Maintenance medium (即特 Growth medium 之 10% Fetal calf serum 以 5.5% 之 Bovine Albumin fraction V solution 代替，加入 2%) 。

三、標準毒株：供試之標準毒株 cooper strain of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR-C) , SF-4 strain of parainfluenza 3 (PI<sub>3</sub>-SF-4) 及 The National Animal Disease Laboratory strain of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVD-NADL) 等病毒，係由蔡紹前先生由美國 Alburn 獸醫學院携回贈與本所保存者，此三種標準毒均以 BK 細胞增殖保存於  $-40^{\circ}\text{C}$  備用。

四、抗標準毒血清之製備<sup>1,10</sup>：各抗標準毒抗血清之製備，所採用之動物均為家兔，即將重量 2.5—3.0kg 且無 IBR, PI<sub>3</sub> 及 BVD 之抗體存在之家兔各二隻，首先於肌肉注射 3ml 毒液，其接種病毒之含量分別為 IBR-C 為  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml, PI<sub>3</sub>-SF-4 為  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml, BVD-NADL 為  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml，之後每隔 7 天肌肉注射 5ml，同時於每隔 5 天靜脈注射 2ml，直至 45 日止，於第 60 日時全放血，分離血清，於  $56^{\circ}\text{C}$ 、不活化 30'，保存於  $-40^{\circ}\text{C}$  備用。

五、病毒增殖曲線測定法：將分離毒含量  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml 之毒液 0.1ml 接種於 30 支含 BK 單層細胞之小試管內，於  $37^{\circ}\text{C}$  感作 1 小時後以 PBS 洗滌三次，加入維持液置入  $33^{\circ}\text{C}$  恆溫箱內<sup>1</sup>，每隔一段時間收集三支小試管之細胞內外病毒，至接種後第七日為止，以便測定其病毒之增殖曲線。

六、分離毒之純化<sup>4,6,8,10,13</sup>：將業經培養於 Petri dishes 四天之 BK 單層細胞之培養液抽棄，以 PBS 洗滌三次後，接種經稀釋  $10^{-5}$ ~ $10^{-8}$  階之分離毒，於  $37^{\circ}\text{C}$  感作 2 小時後抽棄接種液，以 PBS 洗滌三次，加入第一層固體培養基 (first overlay medium) 後，置入  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫箱，於次日倒置，至第三日加入第二層固體培養基 (second overlay medium) ，次日選擇其 Plaque，如此 cloning 後接種於 BK 細胞內增殖。

七、患牛體內中和抗體消長之測定：於採取患牛病材時採血一次，於其後 21~28 天間再採血一次，以測定其血清中抗體力價，其方法已詳述於以前報告<sup>3</sup>。

八、分離毒所含核的鑑別去：以含有 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUDR) 50 $\mu$ g/ml 之 Hank's Maintenance Medium，將分離毒稀釋 10 倍接種於業經以 PBS 洗滌三次之 BK 單層細胞，於  $37^{\circ}\text{C}$ ，感作一小時，加入含有 IUDR 50 $\mu$ g/ml 之 Hank's Maintenance Medium，置入恆溫箱 5 日觀察，同時以不含 IUDR 之分離毒與不含 IUDR 之 maintenance medium 組為對照。

九、對乙醚、丙酮及乙醇之感受性<sup>4,13,15</sup>：將分離毒與 Ether, Acetone 及 Ethanol 以 4 : 1 混合，於  $4^{\circ}\text{C}$  充分震盪混合後放入  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱感作 18 小時，以 3,000rpm，遠心 10 分鐘抽棄 Ether 及 acetone 及上層液，再置入乾燥器 (desiccator) 內，以真空除去其 Ether, Acetone 及 Ethanol，然後測定其病毒力價。

十、對酸鹼之穩定性：以 1N 之 HCl 及 1N 之 NaOH 調整其 Hank's solution 之 PH 值 3 至 9 各階液，再以各階液與分離毒 4 : 1 充分混合，置於室溫 3 小時後測定其病毒力價<sup>4,13,15</sup>。

十一、對溫度之穩定性：將分離毒分裝於 3 支小試管內各為 1.0ml，然後分別於 Water bath  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $56^{\circ}\text{C}$  及  $60^{\circ}\text{C}$  各處理 30 分鐘後，測定其病毒力價。

十二、熱處理中對二價氧鎂離子之穩定性<sup>4,13,15</sup>：以二度蒸餾水將分離毒稀釋 5 倍，再以稀釋 5 倍之分離毒液與 1M 之 MgCl<sub>2</sub> 等量混合，於  $50^{\circ}\text{C}$  水浴中處理 30 分鐘，然後測定其病毒力價。

十三、同定：將分離毒及標準毒株分別以 10 倍階稀釋法稀釋，由  $\times 10^1$  至  $10^{10}$  階，再以抗 IBR-C

之家兔血清分別等量加入各稀釋階於37°C感作30分鐘後，各階中和液分別接種於含 BK 之小試管四支。以測定其中和指數<sup>2,4,5,6,7,8</sup>。

十四、紅血球凝集反應：將分離依 2 倍階稀釋，由  $\times 2$  稀釋至  $\times 1,028$  階，於各階加入牛或山羊或綿羊之 0.3% 之 RBC saline solution 0.2ml 後，置入 4°C 感作 18 小時後，觀察其是否有凝等現象。

十五、沉降反應<sup>9</sup>：所用之培養基為含 0.01% 之 merthiolate, 8% Na cl 及 1% 之 special agar-noble 調配而成，再以 0.15M 之  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  及 0.15M 之  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  調節 PH 值至 7.40，其沉降盤大小為  $7.5 \times 1.5\text{cm}$ 。其沉降盤內之井孔 (Wells) 直徑為 5mm。孔間距離為 3mm。沉降反應之試驗即將抗 IBR—C，抗 PI<sub>3</sub>—S F—4 及抗 BVD—NADL 之免化於體血清經 10 倍稀釋後分別加入於分離毒之各稀釋階稀釋液之中與井孔中；然後置入 37°C 恆溫箱中五日，每日觀察。本試驗應注意恆溫箱之濕度，以免沉降盤內之 ager gel medium 乾裂。

十六、分離毒在各種組織細胞之增殖情形：即將分離毒接種於 BT, BK, AuBEK, SK, PK—15, ESK 及 Hela 內，觀察七日，以明瞭其增殖情形<sup>2,4,6,7,8,10,12,13,15</sup>。

## 結 果

一、病毒分離：將罹患呼吸道疾病之牛隻鼻分泌物接種於 BK 細胞內，於第四天產生 CPE，至第五天收集病毒 (harvest)，經凍結解凍二次後、遠心取上清液，再接種於 BK 細胞內增殖三代後，以 plaque 形成法將分離 cloning 接種於 BK 細胞增殖，並予以保存。並命名為 IBR—Chitin。

二、分離毒於 BK 細胞內增殖情形：將 cloning 後，並於 BK 內增殖三代之病毒接種於 BK 細胞內測定其增殖曲線，見 Fig 1。

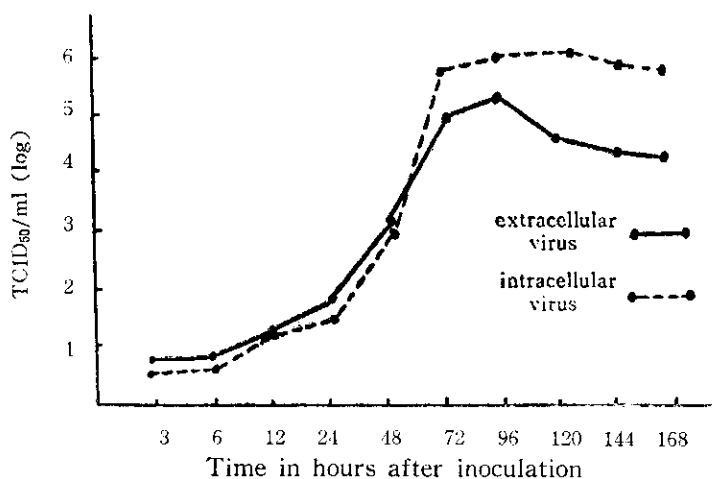


Fig 1. Growth curves of IBR—Chitin BK cell cultures

三、患牛之體內抗體消長情形：於患牛發病時及其後 28 天所採之血清，經中和試驗結果，見 Table 1。

Table 1. SN titer after infection by IBR—Chitin

Calf No.	Sex	SN titer days after infection	
		7	28
7	(♀)	$\times 2$	$\times 32$
11	(♂)	$\times 2$	$\times 64$

四、IUDR對分離毒之增殖情形有抑制作用，見 Table 2. ，故本分離毒為含 DNA 型核酸之病毒

Table 2 Effect of IUDR on replication of IBR-Chitin and IBR-C Virus

Virus	treatment	Virus titer TCID <sub>50</sub> /ml (log)
IBR-chitin	IUDR	< 1.0
	control	5.7
IBR-C	IUDR	< 1.0
	control	7.3

五、乙醚、丙酮及乙醇對分離毒深具感受性，見表 3

Table 3. Stability of IBR-Chitin strain to the treatment with Ether, acetone and ethanol

Treatment	Virustiter TCID <sub>50</sub> /ml (log)	
	IBR-Chitin	IBR-C
Control	5.7	4.3
Ether	< 1.0	< 1.0
Acetone	< 1.0	< 1.0
Ethanol	< 1.0	< 1.0

六、分離毒於 50°C, 56°C 及 60°C 經 30 分鐘處理之結果，經 56°C 及 60°C 均被不活化。之後再將分離毒於 60°C 下處理 15 分鐘後亦被不活化。

七、分離毒對 PH 值之感受性試驗結果，見 Fig. 2.

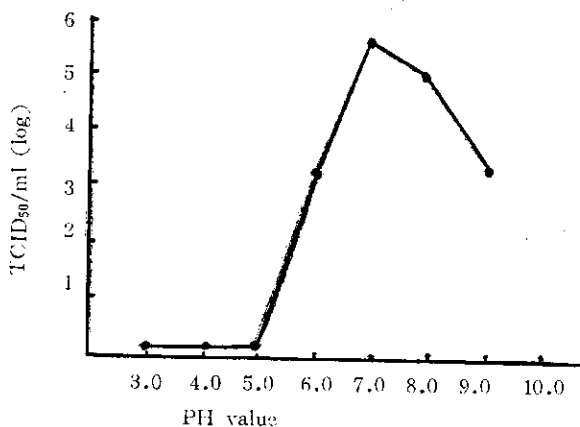


Fig. 2. PH sensitivity of IBR-Chitin strain

八、分離毒於MI之MgCl<sub>2</sub>溶液經50°C處理50分鐘後，病毒全被破壞，見 Table 5。

Table. 5. Divalent cationic rtabilization at 50°C of IBR-Chitin strain

Virus	treatment	Infocinity TC ID <sub>50</sub> /ml (gol)
IBR-chitin	1M Mgcl <sub>2</sub>	< 1.0
Control	Distilled water	4.0
IBR-C	1M Mgcl <sub>2</sub>	< 1.0
Control	Distilled water	6.5

九、沉降反應試驗：分離毒只對抗 IBR—C之家兔血清有沉降線出現，見 Fig 3，而對抗 Pl<sub>3</sub>—SR—4及抗 BVD—NADL 之家兔血清不起沉降反應。

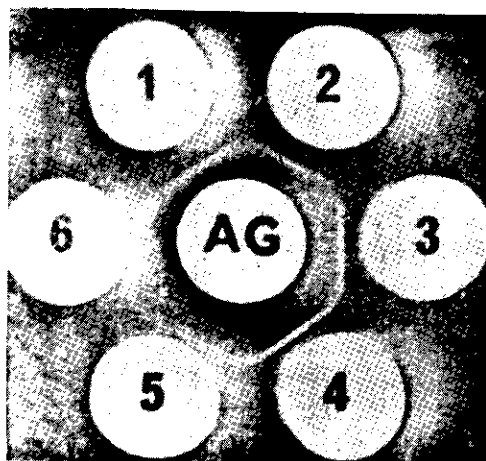


Fig. 3. Agar gel immunodiffusion test of IBR-Chitin (AG) against anti IBR-C rabbit serum (anti-serum undiluted (1), diluted 1:2 (2), diluted 1:4 (3), diluted 1:8 (4), diluted 1:16, diluted 1:32.

十、分離毒對牛、山羊及綿羊之紅血球不起凝集作用，見 Table. 5。

Table. 5. Results of (H. A) tests of IBR-Chitin, IBR-C, and Pl<sub>3</sub>-SF-4 in 4°C for 18 hours

RBC of animal (0.30% roline robr)	H A titer		
	IBR-Chitin	IBR-C	Pl <sub>3</sub> -SF-4
Calf	< × 2	< × 2	× 1024
Goat	< × 2	< × 2	× 512
Sheep	< × 2	< × 2	× 512

十一、同定：分離毒與抗IBR—C，抗 Pl<sub>3</sub>—SF—4及抗 BVD—NADL之抗體血清實施中和試驗，結果證明分離毒為與 IBR—C同一血清型之 IBR病毒，見 Table 6.

Table. 6 SN test of isolation virus (IBR—Chitin) strain with anti IBR—C serum, anti P1<sub>3</sub>—SF—4 serum and anti BVD—NADL serum

Virus	Rabbit antiserum ×10 dilution	Virus dilution								Virus titer TC ID <sub>50</sub> /ml (log)	NT (log)
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>		
IBR—C	—			4/4	4/4	4/4	3/4	1/4	0/4	7.5	—
	IBR—C			4/4	4/4	1/4	0/4			5.7	1.8
	P1 <sub>3</sub> —SF—4			4/4	4/4	3/4	1/4	4/4		7.5	0
	BVD—NADL			4/4	4/4	4/4	1/4			7.7	0.2
IBR—Chitin	—		4/4	4/4	3/4	1/4	0/4	0/4		5.5	—
	IBR—C	4/4	3/4	1/4	0/4	0/4				3.5	2.0
	P1 <sub>3</sub> —SF—4			4/4	4/4	1/4	0/4	0/4		5.7	0.2
	BVD—NADL			4/4	3/4	1/4	0/4			5.5	0

十二、將分離毒接種於BT, BK, AuBEK, SK, ESK, PK—15、HeLa等細胞內，均能使細胞產生CPE，其產生之CPE過程是先使感染之細胞圓化萎縮，逐漸使感染細胞成粒狀或成團狀，猶如葡萄狀，終至使細胞全面脫落。見Fig. 4.

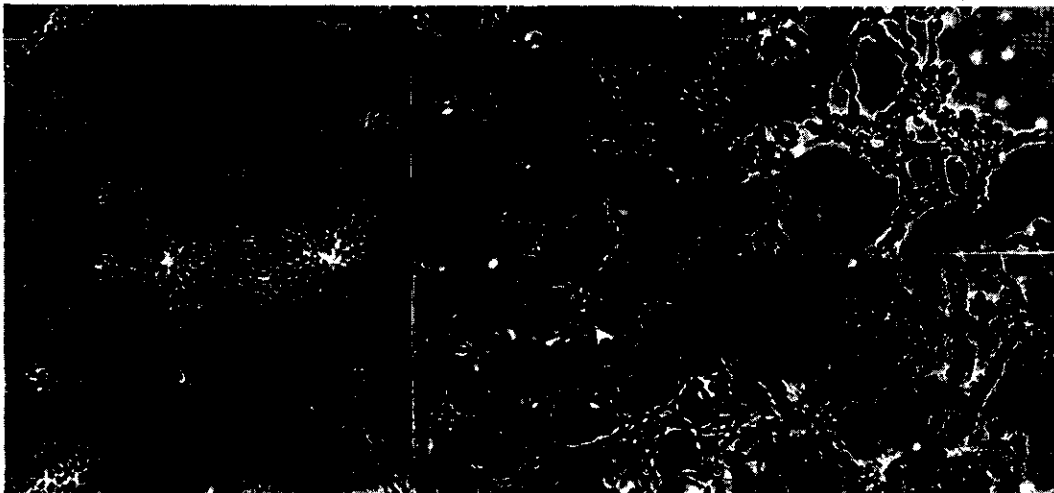


Fig. 4. CPE caused by IBR—C (B) and IBR—Chitin, strain (C) in AUBEK cell cultures (A)

## 討 論

早在1968年Otte及Kilz等曾表示本省牛隻體中有IBR及P1<sub>3</sub>抗體存在，1974年筆者調查本省七縣市乳肉牛之病毒性疾病—IBR、P1—3及Adeno—1之抗體分布情形，確證了本省乳肉牛之體內確含有該等抗體存在，而由其抗體力價之分佈情形推測，本省確有該等病毒之存在。故批定分離該等病毒加以確證，本報告是將分離所得病毒株以生物及免疫學檢討其性狀，確定其為IBR病毒。由

於本病毒載至目前為止，血清型上只有一種，本次分離者與 NADL 之病毒株各種性狀亦均屬一至。

### 致 謝

本研究承蒙國科會之補助得以完成，特此申謝。

### 參 考 文 獻

1. Ewald Otte 1968 : Virus Disease of Cattle in Taiwan. J. Taiw. Anim. Husb. & Vet. Med. No. 12. 1—22.
2. George T. Woods 1968 : The Natural History of Bovine Myxovirus Parainfluenza—3. J. A. V. M. A. Vol. 152, No. 6 771—776
3. Lin. K. F., Chiu. T. C. et al 1974 : Investigation on the serum anti-bodies of IBR, PI-3 and Adeno-1 in Taiwan Cattle. Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Eep. Rep. 11, 57—61.
4. Maramorosch K, & Koprowski, H. 1967 : Immunological Techniques for Animal Viruses. Methods in Virology 140—163
5. Lawrence Let. al 1963 : Epizootiology of Bovine Myxovirus Parainfluenza—3 (SF—4) in Nebresk Cattle as determined by Antibody Titers. J. A. V. M. A. 275—378
6. Medin S. H., York C. J. & Mckercher D. G. 1956 : Isolation of the Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. Science, 124 : 721
7. McIntyre R. W. 1955 : Experimental Studies of Acute Upper Respiratory Infection of Calves. J. A. V. M. A. 125 : 151—167
8. Mckercher D. G. & Straub O. C. 1960 : Isolation of the Virus of Infectious Bovins Rhinotracheitis from Range Cattle. J. A. V. M. A. 137 : 661—664
9. Okazaki. W., Purchase. H. G. and Noll. L., 1970 : Effect of Different Conditions on Precipitation in Agar between Marek's Disease Antigen and Antibody. Avain Disease. Vol. XIV No. 3, 532—537.
10. Robeet L. Sweat 1967 : Isolation of Myxovirus Parainfluenza-3 from Cattle with Respiratory Disease. J. A. V. M. A. 172—176
11. Rosen L. A. 1960 : Hemagglutination-Inhibition Technique for Typing Adenoviruses. Am. J. Hyg. 71 ; 120—128
12. Schrocder R. J. and Moys M. D. 1954 : An Acute Upper Respiratory Infection of Dairy Cattle. J. A. V. M. A. 125 : 471—477
13. Tousimis A. J., Howells W., V, Griffin T. P., Chaetham R. P. & Maurer F. P. 1958 : Biophysical Characterination of IBR Virus. Proc. Soc. Exp. Bio. and Med. 99 : 614—617
14. York C. J. 1968 : Infectious Bovine Rhinotracheitis. J. A. V. M. A. 152 : 758—762
15. York C. J., Schwarz A. F. & Estela L. A. 1957 : Isolation and Identification of IBR Rirus in Tissue Culture. Proc. Soc. Extpl. Biol. & Med. 94 : 740—744.

## Isolation of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus from Calves with Respiratory Disease

K. F. Lin., T. C. Chiu., Y. S. Lu., I. P. Chan

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

### Summary

One strain of infectious bovine rhiontracheitis was isolated from calves with respiratory disease in bovine kidney cell cultures, and purified by plaque forming method. The virus replication was inhibited in the present of 5-iodo -2'-deoxyuridine. It was stable at PH 7 to 8, but loses activity below PH5, It was inactivated by exposure at 56 °C for 30', and at 60°C for 15', and destroyed by treatment of 1 M, MgCl<sub>2</sub> at 50°C, for 30'.

The isolated virus was serologically related to the cooper strain of infectious bovine rhinotracheitis, It did not agglutinate bovine, goat and sheep red blood cell at 4°C. The precipitin line appeared when anti-IBR—C rabbit serum was allow to diffuse toward the isolated virus, but anti-BVD-NADL or anti-PI<sub>3</sub>-SF-4 rabbit serum did not react to the isolated virus.

The isolated virus produced cytopathic effect in BT, BK, AuBEK, ESK, PK—15, and HeLa cell cultures.