# 牛病毒性腹泻病毒的初步鉴定*

糜克永 丁清泉 王 蔷 董长垣
徐元珍 张雁滨
（中国科学院武汉病毒研究所，武汉）

张国芳 张恒顺 任向远 卢 岩 扎 那
（内蒙古自治区畜牧科学院，呼和浩特）

## 提 要

近年来，我们在内蒙羔羊下痢病流行区采集到一株牛病毒性腹泻病毒。83年到85年间，于内蒙三盟，二市，六旗（县），二个良种场的229份病粪样做了病毒检测，其阳性率达59%。

该病毒粒子为直径40—80nm，具有囊膜的球形颗粒，且与BVDV（牛病毒性腹泻病毒）的NADL株及Danish株有共同抗源。

该病毒感染羔羊已传至22代，经补体结合反应测定，其效价提高了6倍。病羔羊的解剖病变观察，说明有病毒性肠炎的病变。病羊的恢复期血清测定为阳性。

根据上述结果，我们初步鉴定该病毒为BVDV的一个株，暂命为BVDV的InL株。

国外已报道羔羊病毒性腹泻病原有轮状病毒[1]，腺病毒[2]，细小病毒[2]，星状病毒[3]，呼肠孤病毒[4]，冠状病毒[5]等，对牛病毒性腹泻病毒传染羊亦有报道[6]。该病原在各地分布不同，甚至同一地区，不同时期流行的病毒病原也可能不同。所以，病原的研究对于该病的防治是十分重要的。

国外已证明牛病毒性腹泻病毒可为羊的一种传染性病原[6]，并且说明其对新生羔羊感染的敏感性胜于成年羊[7]。国内尚无有关毒株分离与鉴定的报道。

本文将介绍我们在83年—85年间，于患下痢病羔羊上分离出一株病毒的研究结果。

## 材 料 与 方 法

**病样来源** 患下痢病羔羊粪便及肠内容物，在内蒙达茂旗等地采集。

**标准病毒** *BVDV* 的 *NADL* 株，由英国 *Compton* 动物病毒研究所 *E.J.Stott*

*本文于1986年元月19日收到。
中国科学院科学基金资助课题

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

博士赠送。*BVDV* 的 *Danish* 株由瑞典 *UppSala* 大学生物药学中心国立兽医研究所 *J·Moreno—lopez* 博士赠送。前者为该病毒在小牛睾丸细胞上培养液，后者为用细胞培养的病毒悬液提纯的病毒。

**猪瘟病毒** 由湖北省生物制品厂生产的猪瘟弱毒疫苗分离获得。

**病毒的提纯** 下痢病羔羊粪样采用*TNE*缓冲液(0.01mol/L*Tris—HCl*,0.1mol/L *NaCl*,0.001mol/L*EDTA* 钠盐，pH7.4）稀释，以常规聚乙二醇法浓缩病毒。聚乙二醇—6000为7%浓度，氯化钠为3%浓度。浓缩的病毒样品，用 *DEAE* 柱层析初步提纯，洗脱液分别用 0.2mol/L，0.4mol/L，0.6mol/L，0.8mol/L *NaCl* 的 *TNE* 缓冲液 100*ml*分部洗脱，洗脱液按每试管5*ml* 收集，在265*nm*波长处测定光密度，然后以管号对光密度绘制洗脱液的紫外吸收曲线，再将不同峰的洗脱液浓缩，应用电子显微镜作检查。含有病毒颗粒的部分再用蔗糖不连续密度梯度离心，蔗糖梯度浓度分别为69%，55%，35%，15%，在10℃，100000g 离心2小时（离心机 *MSE*75型，水平转子6×5.5）。离心后，分成数条乳白色的的带，取出各带，再对 *TNE* 缓冲液透析，以电子显微镜检查，并观察病毒粒子的大小和形态。

**琼脂糖对流免疫电泳** 按常规方法进行，琼脂糖浓度采用 0.8%，缓冲液为 pH8.2 的0.05mol/L巴比妥盐缓冲液。抗血清以我们提纯的 *InL* 株病毒以及英国 *Compton* 动物研究所赠送的*NADL*株病毒与 *Freund* 佐剂混合，注射豚鼠而制备。抗原采用*Danish* 株，*NADL*株，猪瘟病毒及我们所分离的*InL*株等病毒。

**免疫电子显微镜鉴定** 按常规血清-琼脂法进行。*BVDV*的*NADL* 株的豚鼠抗血清与我们分离的病毒，通过琼脂糖凝胶扩散产生凝聚反应。凝聚物以电子显微镜观察。用未经免疫血清处理的样品作对照。

**琼脂糖免疫双扩散测定** 琼脂糖浓度为0.8%，缓冲液采用0.01mol/L 磷酸盐缓冲液加0.14mol/L*NaCl* 的缓冲生理盐水(*pH*7.0—7.2)，在凝胶的中心孔中加入我们分离的病毒制备的抗血清，周围孔分别加入 *BVDV* 的两个标准株，猪瘟病毒以及 *BVDV* 的 *InL* 株等抗原，在37℃保温24小时，观察沉淀线。

**补体结合反应试验** 按常规方法进行。补体从五只豚鼠采集的血液中分离获得。血球采自本试验动物的绵羊红血球，经离心，生理盐水漂洗数次而获得。

**病毒回感羔羊试验** 应用病羔羊肠组织匀浆后的病毒悬浮液以及从病粪样提纯的病毒悬浮液，用无菌滤器过滤以后，通过口服，皮下以及肌肉注射三种途径同时接种每头48小时以内的新生健康羔羊。（受试羔羊粪便经电子显微镜检查无病毒粒子）。半月左右处死，并作肠道，心内膜，肝、脾，淋巴结等的病变检查。对照羔羊在同样条件下饲养，并作同样检查。感染病的羔羊肠内容物以*TNE* 缓冲液溶解，经无菌滤器滤过以后，再次感染羔羊，如此连续传至22代。对病毒样品作电子显微镜，琼脂糖免疫双扩散以及补体结合效价测定的检查。

## 结果与讨论

病毒的分离和提纯：*DEAE* 柱层析洗提液的紫外吸收曲线，如图1所示，0.4mol/L

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

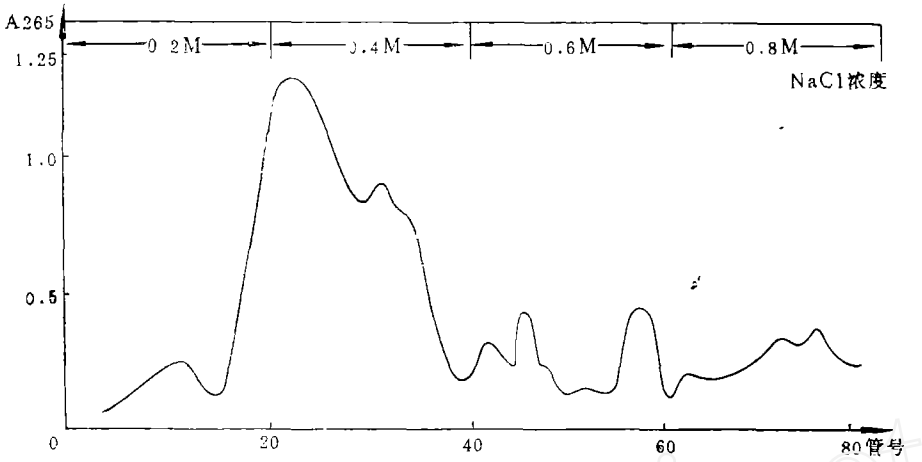


图1 DEAE柱层析流提浓的紫外吸收曲线，20—40管含病毒粒子
Fig.1. The ultra violet absorption curve of the eluent acquired by DEAE column chromatography
Eluent in No 20—40 of tubes contains virions

*NaCl* 浓度的峰。能检测到病毒粒子。该峰浓缩液经蔗糖不连续密度梯度离心后，形成数条乳白色的带，在15%与35%浓度的界面上形成的带，应用电子显微镜可以观察到大量病毒粒子。

电子显微镜观察：结果说明该病毒粒子为直径40—80*nm* 的球状病毒颗粒，外有囊膜，并可见到突出物，其形态特征与国外报道的 *BVDV* 类似[7]。与瑞典赠送 *BVDV*的 *Danish* 株形态类似（图3）。

琼脂糖对流免疫电泳：结果如图6所示，*BVDV* 的 *NADL* 株的抗血清与我们所分离的病毒*BVDV*的*InL*株，*BVDV*的*InL*株的抗血清与*BVDV*的*Danish*株，*NADL*株以及猪瘟病毒（*HCV*）都能产生免疫沉淀反应。所有对照都无此反应。结果说明 *BVDV* 的*InL* 株与猪瘟病毒、国外赠送的两个标准株有共同抗原。

琼脂糖免疫双扩散测定：*BVDV*的*InL* 株免抗血清与健羔羊粪样提取液孔间无免疫沉淀线，而与猪瘟病毒、*BVDV* 的两个株孔间有免疫沉淀线，而且此两株的沉淀线与*BVDV*的*InL*株孔的沉淀线部分融合，结果说明我们所分离的病毒与*BVDV*的*Danish*株及*NADL*株为同一种，可能为不同的株，结果如图7所示。

免疫电子显微镜鉴定：*BVDV*的*InL*株与*BVDV*的*NADL*株豚鼠抗血清，经血清凝胶扩散法处理以后，在电镜下可见该病毒粒子凝聚，如图5所示，未与免疫血清反应的病毒粒子未见凝聚现象，说明*BVDV*的*NADL*株抗血清能与*BVDV*的*InL*株病毒粒子发生特异性的凝聚。

病毒回感羔羊及病毒传代试验：83—85年间，共感染改良种羔羊48头，设对照10头。其中10头以自然采集的病肠组织提取液，经无菌滤器滤过以后接种，38头用病粪样提纯的病毒悬液，经无菌滤器过滤后接种。采用喂饲，皮下及肌肉注射三种途径接种给受试每一头羔羊后，前者出现肠道等病变以及腹泻临床症状，后者仅出现肠道病变。该病毒

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

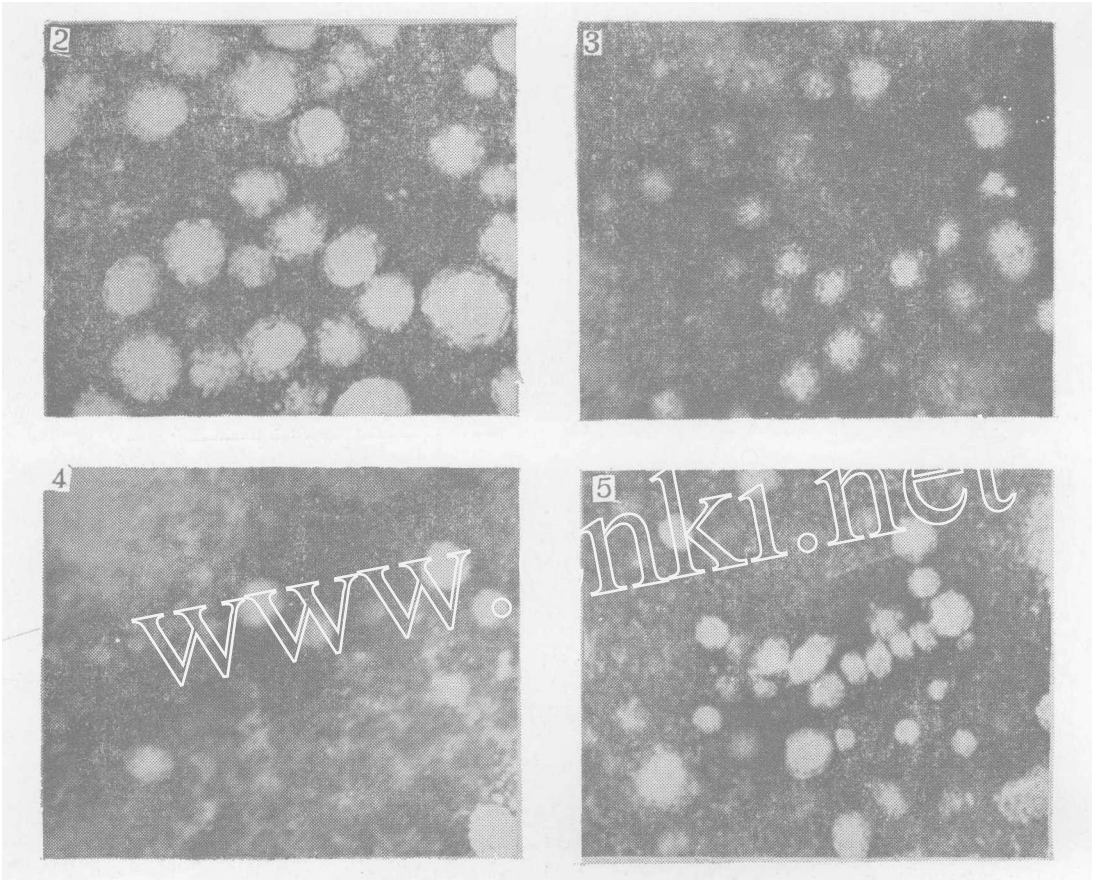


图2 从病羔粪样中分离的病毒粒子（BVDV的InL株），示有囊膜及突出物。×192,500

图3 BVDV的Danish株病毒粒子，BVDV的InL株与其形态相似。×148,500

图4 第14代病毒粒子，具有与传代前病毒同样的形态。×162,000

图5 BVDV的InL株病毒抗原与BVDV的NADL株的抗血清凝聚反应后的免疫电镜观察，示病毒粒子凝集，病毒粒子因抗体而连结。

Fig2. Virions from the fecal samples of ill lambs (BVDV strain lnL), show envelope with few prominant surface projections X 192500.

Fig3. Virions of BVDV strain Danish, the virions of BVDV strain lnL is similar to it in morphology X 148500.

Fig4. 14 passage virus, its virions are the same as the criginal virions in morphology. X 162000.

Fig5. Observation by immune electron microscopy after aggregate reaction produced between BVDV strain lnL and the antiserum of BVDV strain NADL, show aggregation of these virions.

接种羔羊后，在13天内体温出现过热或稽留热，体温可达40.5℃到40.8℃。变观察中，可见到小肠粘膜分段弥漫性的出血斑（图8a）。盲肠充气，严重时盲肠壁出现溃疡及坏死，大小结肠亦有轻重程度不同的病理变化，粪成条状，软泥状或堆状。胃，肝，脾，心及肾内壁亦有出血斑（图8c），淋巴结肿大成板栗大小，具有病毒性肠炎的典型病变。同样条件下饲养而不接毒的羔羊对照10头，既无腹泻也不产生肠道等病变。健康对照及接种前的羔羊粪样作电镜检查，不能检测到病毒粒子，患病后的羔羊粪

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

a b c

图6 琼脂糖对流免疫电泳测定：Aa、Ab、NADL株抗血清与InL株；AC、Ba：InL株抗血清与NADL株；Bb、Bc：InL株抗血清与Danish株；Ca、Cb：InL株抗血清与HCV；Cc、Db：InL株抗血清与InL株；Da：豚鼠对照血清与NADL株；Ea：兔对照血清与InL株；Eb：兔对照血清与NADL株；Fa：兔对照血清与Danish株；Fb：InL株抗血清与健康羔羊粪提取液。

图7 琼脂糖免疫双扩散测定：中心孔为InL株抗血清，A、C：健康羔羊粪提取液，B：猪瘟病毒，D：Danish株，E：InL株，F：NADL株

图8 羔羊感染InL株后的解剖病变：a.小肠解剖病变，示出血斑，b.健康对照，c.肾解剖病变，示出血斑。

Fig6. Assay of the agarose counter immuno-electrophoresis: AaAb. Antiserum of strain NADL and strain InL. AcBa. Antiserum of strain InL and strain NADF Bb. Bc Antiserum of strain InL and Danish. Ca. Cb Antiserum of InL and strain HCV. Cc. Db Antiserum of Strain InL and strain InL. Da. ControL serum of guinea and strain NADL. Ea. Control serum of rabbit and strain InL. Eb. Control serum of rabbit and strain NADLFa. Control serum of rabbit and strain Danish. Fb. Antiserum of strain InLand extract of fecal sampie from healthy lamb.

Fig7. Agarose gel double diffusion assay: central hole: antiserum of strain InL. A. C. Extract of fecal sample from healthy lamb. B. HCV. D. Strain Danish. E. Strain InL F. Strain NADL

Fig8. Examine of pathoanatomy of the lambs infected by the strain InL.
a. Symptom of small intestine, show intestinal oedemas and blood spots,
b. Heathy control
c. Symptoms of kidney, show blood spots,

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

样皆能检测到图 4 相同形态的病毒粒子，图 4 示第 14 代病羊粪样中传代的病毒粒子。病毒传代试验中，每代感染 1—2 头羔羊。自然采集的病样感染羔羊后，收集的病毒为第一代，如此传到22代，各代病粪样的补体结合反应，从第一代的稀释度50提高到第22代的300，其效价提高了 6 倍。

病羔羊恢复期的血清学测定：在羔羊接种病毒一月后，采集血清进行琼脂双扩散以及补体结合反应测定，都呈现阳性反应。

83—85年，我们以内蒙三盟，二市，六旗（县），三个国营牧场收集229份病粪样，通过血清学或电镜检查，发现阳性率达59%。对其中64份病样同时进行电镜和血清学检查，电镜检出病毒粒子23份，阳性率为31.9%。血清学检查，阳性样品33份，阳性率为51%。双阳性为19份，占28.1%。84年呼和浩特市黑河奶牛场，犊牛暴发流行性腹泻，在它们的粪样中，亦检测出相同形态的病毒粒子，并在免疫双扩散中，该样品乳的免疫沉淀线与BVDV的InL株病毒的免疫沉淀线完全吻合，说明其为同一病毒。

综上所述说明我们分离的病毒在形态上与 BVDV的Danish 株相同，在血清学上与 BVDV 的 Danish株，NADL 株具有共同抗原。根据 H·Laude[9]的观点，我们所分离的病毒应属于披盖病毒科，疫病毒属。根据免疫双扩散结果，以及该病毒感染羔羊，引起与 BVDV 相同的肠道性病变，而无边界病毒的毛发发育不正常，神经性颤抖等病理现象[10]。说明该病毒性质与 BVDV 相似而与边界病毒不同，所以初步鉴定我们从羔羊上获得的病毒为BVDV，并且暂命名为BVDV的InL株。

含该病毒的肠组织抽提液，经无菌滤器过滤后，感染羔羊能复制出自然界腹泻症状，而用粪样部分纯化的病毒悬浮液，接种羔羊，虽然经过传代毒力有所增强，表现在发烧及解剖病变症状趋于严重，但仍难以复制出自然界病例，这点与国外描述一致[10]，需进一步查明原因。该病毒在内蒙羔羊下痢病流行区内分布较广，但是否为该病流行的主要原因，以及其在自然发病中的作用与条件都需进一步研究。

## 参 考 文 献

〔1〕 Snodrass, D. R. et al., 1976 A rotavirus in lambs with diarrhea. Res. vet. Sci., 20:113—114.

〔2〕 Clarke, J. K. et al., 1979. Isolation of an adeno associated virus from sheep., Archive of virology, 60: 171—176

〔3〕 Snodgrass, D. R. et al., 1979 Pathogenesis of diarrhoea caused by astrovirus infections in lambs., Arch. Virol. 60: 217—296.

〔4〕 Elar. S. Palfl., 1974. Isolation of reovirus type from lambs with respiratory symptoms., Arch. ges. virus for sch., 44: 177—183

〔5〕 Pass, D. A., et al., 1982. Intestinal corana virus-like particles in sheep with diarrhoea., Vet Rec., 3:106—107

〔6〕 Parson, I. M., et al., 1979, The effects of bovine viral diarrhoea mucosal virus on the ovine foetus., Vet. Microbiol., 4: (147) 279—292.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[7] Mohanty, S. B., Dutta, S. K., 1981., in "Veterinary Virology", Balliere Tindall, London 127—129

[8] Plant, J. W., et al., 1977 Transmission of a mucosal disease virus infection between sheep., Aust. Vet. J. 53:574—577.

[9] Laude, H. 1979. Nonarbo-Togaviridae: Comparative Hydrodynamic properties of the peste virus genus, Achives of virology. 62:347-352

[10] Westbury, H, A. D. V. Napthine, E. Stroube, 1979 Border disease: Persistent infection infection with the virus. The veterinary Record, May 5:406-409.

[11] 盛彤笙译, 1981, 家畜的传染病(上册), 80—90页, 科学出版社

# PRELIMINARY IDENTIFICATION OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS

Mi Ke-yong Ding Qing-quan Wang Qiang
Dong Chang-yuan Xu Yuan-zhen Zhang Yan-bin

*(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)*

Zhang Guo-fang Zhang Heng-shun
Ren Xiang-yuan Nu Yan Zha Na

*(The Academy of Science of Animal Husbandry of Inner Mongol Autonomous Region, Hukehot)*

A strain of bovine viral diarrhea virus (BVDV) was isolated from epidemic area of lamb in Inner Mongol in recent years. During 1983-1985, we have detcted 229 shares of the fecal samples suffering from this illness in Inner Mongol, the shares of the viral samples account for 59 percent.

These virions appeared spherical and measured 40-80nm in diameter. Their surfaces have envelope structures. The virus can infect the lambs. 22 passages virus have been acquired. The results of the complementary fixation test of virus showed that its titre have increased 6 times. The examine of pathoanatomy of the lambs infected by the virus showed that viral enteritis symptoms appeared in the lambs. The lamb's serum in recovery of its disease is positive by using serological assay.

As the results described above, we preliminarily consider that this virus is a new strain of BVDV, called the InL strain of bovine viral diarrhea virus.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net