

从一次新生小牛腹泻流行中分离到牛轮状病毒

苏诚钦 吴亦伦 陈云华 何丽娜 董光锋*

(安徽省医学科学研究所, 合肥)

提 要

1985年3月下旬, 合肥市某牛奶场发生了一次新生牛非细菌性腹泻流行。用MA104细胞从牛粪便标本中分离到一株牛轮状病毒。电镜检查为典型轮状病毒形态。在MA104细胞上第三代开始呈现胞浆内颗粒状荧光并产生细胞病变(CPE)。PAGE核酸电泳图型与牛轮状病毒NCDV株完全一致。经ELISA鉴定属A群轮状病毒。

牛轮状病毒是引起新生小牛急性腹泻的病原之一。鉴于牛和人轮状病毒具有共同的抗原, 以及二者在生长方面有着许多共同性, 因此研究牛轮状病毒的组织培养性质往往为研究人轮状病毒的培养提供了有用资料^[1]。

1985年3月下旬, 合肥市某牛奶场发生了一次新生牛非细菌性腹泻流行, 病牛均为出生后40天内的小牛, 共有病牛40多头, 将近1/3死亡。

为了查明该次流行的病原, 我们对一部分病牛及死牛的粪便和肠组织进行了电镜检查、组织培养分离、免疫荧光检查、病毒核酸聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(PAGE)以及酶联免疫吸附试验(ELISA)。现将结果报告如下。

材料和方法

1. 标本来源 出生后40天内病牛粪或死牛肠组织, 经细菌培养未查到肠道致病菌, 放-30℃保存。

2. 电镜检查 将牛粪便用0.01mol/L, pH7.4PBS制成50%悬液, 3,000r/m离心20分钟, 取上清滴膜, 2%磷钨酸负染, 直接电镜观察。

3. 组织培养分离^[2] 将50%牛粪便悬液3,000r/m离心20分钟, 其上清再10,000r/m离心30分钟, 上清过滤(0.45μm微孔滤膜), 作细胞培养用。接种前先用Difco胰酶按500μg/ml, 37℃处理15分钟, 再用E-MEM液稀释20倍, 然后接种于MA104细胞, 37℃吸附1小时, 弃去便液, 加入维持液(含胰酶1μg/ml, 不含牛血清, 接种前以及加入维持液前均用Hanks液将细胞洗二次), 旋转培养, 72小时为一个传代周期, 传代前将细

*本文1986年7月26日收到

*安徽医科大学电镜室

胞培养物冻融三次,按上法接种,每日观察CPE。

4. 免疫荧光检查 采用间接法。将感染后24小时之细胞(刚出现CPE时)刮下滴片。直接吹干,冷丙酮固定后,按常规方法染色。第一抗体为牛轮状病毒NCDV株兔免疫血清(牛轮状病毒NCDV株由香港大学医学院周伯燕大夫赠与,兔抗NCDV株血清由本室制备,荧光抗体效价为1:1280)。第二抗体为羊抗兔IgG荧光血清(卫生部上海生物制品研究所生产)。荧光显微镜观察。

5. PAGE^[8] 取0.25ml细胞培养液,加入等量2% SDS-0.2mol/L醋酸缓冲液及0.5ml苯酚-间甲酚-氯仿混合液振荡2分钟,10,000r/m离心5分钟,吸上部水层即为RNA样品。垂直板式聚丙烯酰胺凝胶电泳采用3%样品胶、10%分离胶,单相电泳,室温进行4小时,电流20~40mA。泳毕将胶固定,硝酸银染色。

6. ELISA 普通轮状病毒ELISA试剂盒由卫生部兰州生物制品研究所提供。ELISA抗原为牛粪便悬液或其细胞培养物。

结 果

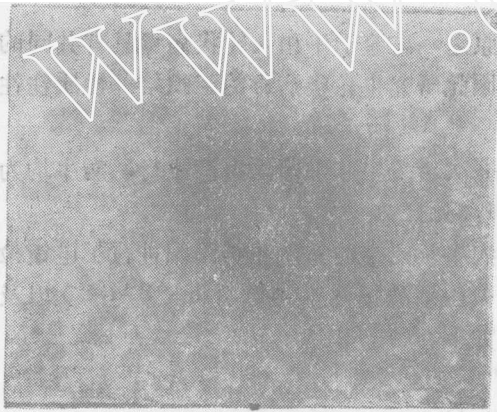


图1 直接电镜见到的轮状病毒颗粒

Fig. 1 Bovine rotavirus particles by direct electron microscopy.

1. 电镜检查:对5份牛粪便标本进行直接电镜观察,结果有一份标本(牛₁)可见典型的轮状病毒颗粒,直径约70nm,呈椭圆形,外层衣壳有车轮状物,病毒内部核心辐射出刺突(图1)。

2. 组织培养分离:牛粪便标本感染MA104细胞,盲传三代后,于感染第二天牛₁标本感染细胞出现CPE;细胞变圆,继而脱落,随着代次增高,细胞病变提前(图2)。

3. 免疫荧光:对出现CPE的牛₁粪便细胞培养物进行免疫荧光检查,结果发现胞浆内有散在的颗粒状荧光,抗体滴度>1:320(图3)。

4. PAGE:凝胶显色结果表明,从牛₁粪便标本第5代细胞培养液提取的核酸有11个片段,与牛轮状病毒标准株NCDV的核酸电泳图型完全一致(图4)。

5. ELISA:牛₁粪便及其第8代细胞培养物,经普通A群轮状病毒ELISA试剂盒检测,均呈阳性反应,证明其含有A群轮状病毒抗原。

讨 论

用以上几种方法对部分牛粪便进行了检查,并从牛₁标本中分离到一株轮状病毒。由于该牛突然死亡,没有采集到其第二份血清,未能从血清学证实其病原。但从流行病

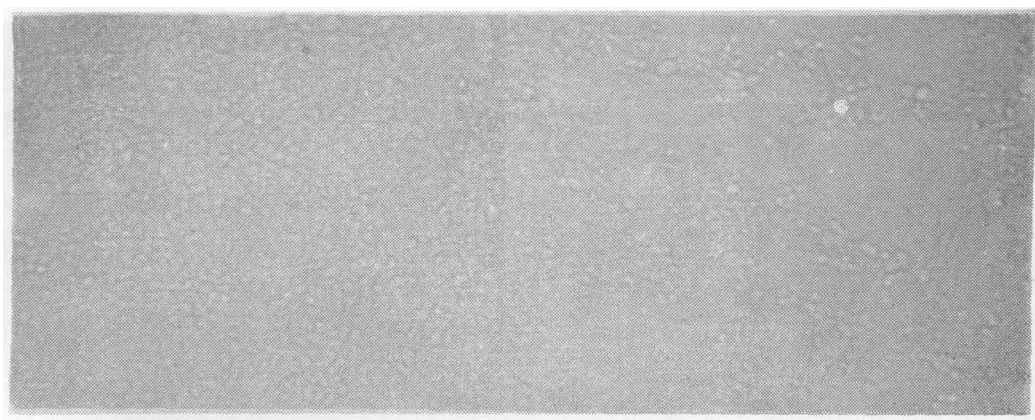


图2 牛₁便感染细胞(第四代)出现的CPE及正常MA104细胞(右方)
Fig 2 CPE in MA 104 cells infected by faecal sample No.1 (4th passage).
Normal MA 104 cells (right).



图3

图3 感染牛₁便标本后, 细胞浆中出现的荧光颗粒
Fig 3 Cytoplasmic fluorescence in MA 104 cells.

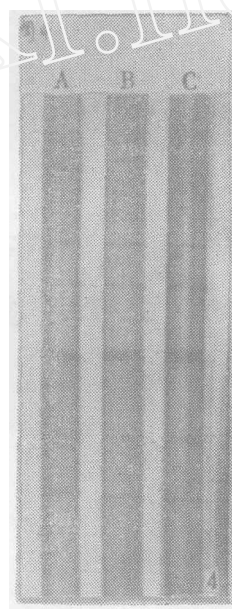


图4

图4 核酸电泳图型

- A——标准人轮状病毒Wa株
- B——标准牛轮状病毒NCDV株
- C——从牛₁粪便中分离的病毒

Fig. 4 RNA patterns of PAGE

- A—reference Wa strain of human rotavirus.
- B—reference NCDV strain of bovine rotavirus.
- C—new isolated virus from faecal sample No.1,

学及临床表现看, 这次奶牛场发生的乳牛腹泻流行是由牛轮状病毒引起的。

一般认为, 轮状病毒标本在接种前先用胰蛋白酶处理, 维持液中含有低浓度的胰蛋白酶及旋转培养是轮状病毒在细胞培养中分离和繁殖的三个主要条件^[4]。我们从第6代开始, 标本预先不用胰蛋白酶处理, 维持液中不加胰酶, 并用静止方法培养, 发现细胞出现病变的时间和程度无明显变化。

免疫荧光技术具有快速、简便和准确等特点, 是进行流行病学调查和实验室诊断的一项非常有用的方法。我们采用这种方法进行轮状病毒的病原学诊断, 取得与其它方法一致的结果。目前轮状病毒的免疫荧光技术国内尚少开展, 有待继续推广使用。

参 考 文 献

- [1] Hoshino Y et al., 1984, *J. Infect. Dis.* 149: 694.
 [2] 倪亚炜, 1985, 病毒学报 1(1): 84.
 [3] Su chengqin et al., 1986, *J. Med. Virool.* 19: 167.
 [4] Anna Maria Agliano et al., 1985, *Arch. Virool.* 84: 119.

BOVINE ROTAVIRUS ISOLATED FROM AN OUTBREAK OF ACUTE DIARRHEA IN NEWBORN CALVES

Su Cheng-qin, Wu Yi-lun, Chen Yun-hua, He Li-na
(Anhui Province Institute of Medical sciences, Hefei)

Dong Guang-feng
(Anhui Medical University, Hefei)

An outbreak of acute nonbacterial diarrhea occurred among the newborn calves of a dairy in Hefei. A strain of bovine rotavirus was isolated using MA104 cells. The isolated virus appeared as typical rotavirus by electron-microscopy. From the third passage it showed granulated fluorescence in the cytoplasm of MA104 cells and produced cytopathogenic effects (CPE). The RNA PAGE patterns of new isolated virus were indistinguishable from that of reference NCDV strain of bovine rotavirus. The new virus was identified as rotavirus in A group by ELISA test.