

建 所 十 周 年

# 论文选编

(1979—1989)



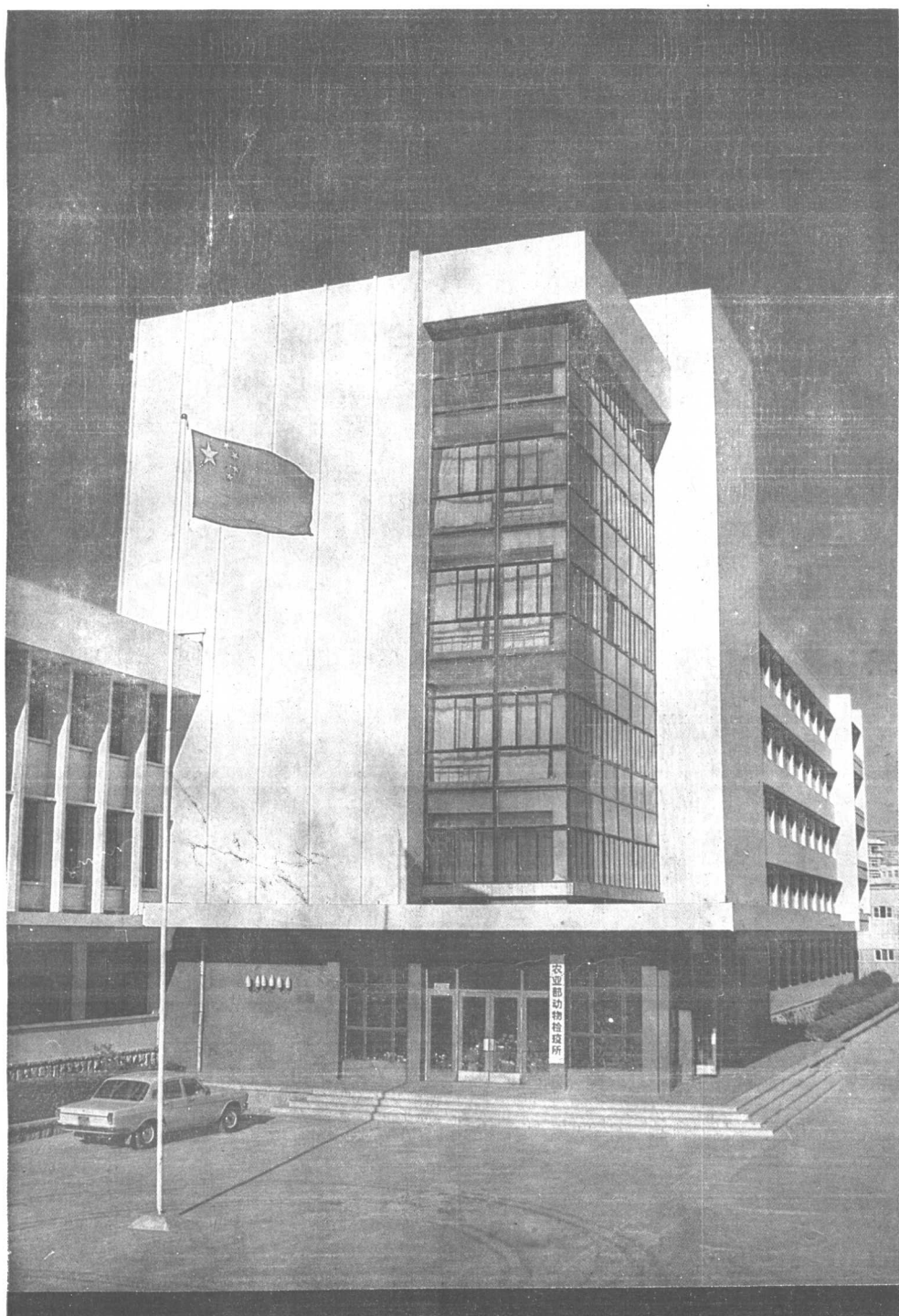
农业部动物检疫所·青岛



农业部动物检疫所建所十周年

(1979—1989)

# 论文选编



## 前 言

农业部动物检疫所自1979年筹建成立到1989年的十年间，在上级领导部门的关怀和指导下，经广大职工和科技人员的努力，动检业务和科研工作均取得了长足进展，为我国的动检事业作出了积极贡献。为了总结工作，交流经验，推广科研成果，特把同志们十年来在各种期刊上发表的及部分未发表的论文选编成册，出版《农业部动物检疫所建所十年论文选编》，供同行及有关人员参考交流。

为便于查阅，《选编》以动物疫病系统按文章发表先后顺序编排，其他按其内容编排。

在选编过程中，仅作个别文字订正，并删去其中部分图表。文献仍保持原样风格内容。由于编者水平有限，《选编》中错误在所难免，敬请读者、作者批评指正。

醫學

新編

陳嘉庚

一九九一年五月

科技论文

智慧的结晶。

为发表我国兽医事业  
贡献文章。

冯乾吉

一九九一年五月

# 目 录

|              |         |
|--------------|---------|
| 前言.....      | ( i )   |
| 陈耀春同志题词..... | ( ii )  |
| 冯静兰同志题词..... | ( iii ) |

## 牛传染性鼻气管炎

|                                                      |             |
|------------------------------------------------------|-------------|
| 1、牛传染性鼻气管炎病毒—血清细胞中和试验诊断及判定标准.....                    | 封启民等 ( 1 )  |
| 2、牛传染性鼻气管炎病毒的分离.....                                 | 仰惠芬等 ( 3 )  |
| 3、牛传染性鼻气管炎病毒的形态与理化特性的研究.....                         | 仰惠芬等 ( 5 )  |
| 4、从进口新西兰奶牛分离出牛传染性鼻气管炎毒株的回归试验报告.....                  | 封启民等 ( 10 ) |
| 5、人工感染牛传染性鼻气管炎的病理形态学研究.....                          | 洪尚文等 ( 14 ) |
| 6、我国牛传染性鼻气管炎血清抗体普查报告.....                            | 封启民等 ( 18 ) |
| 7、用微量间接血凝试验检出牛传染性鼻气管炎 (IBR) 病毒血清抗体的试验报告.....         | 张瑞珍 ( 21 )  |
| 8、从冷冻精液中分离牛鼻气管炎病毒 (IBRV).....                        | 封启民 ( 24 )  |
| 9、测定牛血清中抗牛鼻气管炎病毒抗体的酶联免疫吸附试验 I, 最适条件的建立.....          | 张兹钧等 ( 27 ) |
| 10、测定牛血清中抗牛鼻气管炎病毒抗体的酶联免疫吸附试验 II, 抗原的制备.....          | 张兹钧等 ( 31 ) |
| 11、测定牛血清中抗传染性牛鼻气管炎病毒抗体的酶联免疫吸附试验 III, 与细胞中和试验的比较..... | 张兹钧等 ( 35 ) |
| 12、牛传染性鼻气管炎微量中和试验.....                               | 封启民等 ( 37 ) |
| 13、直接荧光诊断牛传染性鼻气管炎.....                               | 李昌琳等 ( 40 ) |
| 14、应用 <sup>32</sup> P标记核酸探针检测牛传染性鼻气管炎病毒的研究初报.....    | 吴时友等 ( 43 ) |
| 15、用生物素标记核酸探针检测牛传染性鼻气管炎病毒的研究.....                    | 吴时友等 ( 46 ) |
| 16、用M13克隆系统建立牛传染性鼻气管炎病毒基因组无性繁殖系.....                 | 吴时友等 ( 49 ) |

## 口蹄疫

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| 17、过氧乙酸在实验室条件下对O型口蹄疫的消毒作用..... | 陈家庆 ( 51 ) |
|--------------------------------|------------|

## 牛病毒性腹泻/粘膜病

|                                        |             |
|----------------------------------------|-------------|
| 18、用血清中和试验方法检测新西兰进口绵羊粘膜病血清抗体结果.....    | 张兹钧等 ( 55 ) |
| 19、用免疫扩散试验测定牛和羊血清中牛病毒性腹泻/粘膜病抗体的研究..... | 张兹钧等 ( 57 ) |
| 20、牛病毒性腹泻/粘膜病血清阳性羊的病理形态学研究.....        | 洪尚文等 ( 61 ) |
| 21、用牛鼻甲细胞生产牛病毒性腹泻病毒可溶性抗原的研究.....       | 张兹钧 ( 64 )  |
| 22、用免疫扩散试验和病毒中和试验测定粘膜病抗体的比较.....       | 张兹钧等 ( 67 ) |
| 23、用不同免疫途径制备羊粘膜病高免血清效果比较.....          | 陈忠国等 ( 69 ) |
| 24、牛病毒性腹泻/粘膜病 (BVD/MD) 的微量中和试验.....    | 郑志刚等 ( 71 ) |

## 蓝舌病

|                     |             |
|---------------------|-------------|
| 25、蓝舌病凝胶免疫扩散试验..... | 张子春等 ( 75 ) |
|---------------------|-------------|

|                                   |         |         |
|-----------------------------------|---------|---------|
| 26、蓝舌病诊断抗原灭活方法的探索                 | 本所蓝舌病组  | ( 76 )  |
| 27、动物蓝舌病病毒灭活的研究                   | 本所蓝舌病组等 | ( 78 )  |
| 28、酶联免疫吸附试验诊断蓝舌病的研究: I, 检测抗体的试验程序 | 本所蓝舌病组  | ( 84 )  |
| 29、凝胶电泳技术在蓝舌病病毒核酸研究中的应用           | 吴明杰等    | ( 88 )  |
| 30、免疫扩散试验测定动物蓝舌病抗体                | 张子春等    | ( 90 )  |
| 31、安徽省滁州市绵羊蓝舌病病毒的分离和鉴定            | 张子春等    | ( 92 )  |
| 32、蓝舌病病毒核酸末端标记方法的研究               | 张兹钧等    | ( 95 )  |
| 33、蓝舌病病毒核酸杂交技术的研究                 | 张兹钧     | ( 98 )  |
| 34、用斑点酶联免疫吸附试验测定蓝舌病抗体的研究          | 张兹钧等    | ( 100 ) |
| 35、蓝舌病琼脂凝胶免疫扩散试验改良法与标准法的比较        | 张子春等    | ( 105 ) |
| 36、快速碱印渍转移RNA技术的建立                | 张兹钧等    | ( 107 ) |

## 牛白血病

|                 |      |         |
|-----------------|------|---------|
| 37、免疫扩散试验诊断牛白血病 | 封启民等 | ( 109 ) |
| 38、牛白血病微量合胞体试验  | 张瑞珍等 | ( 111 ) |
| 39、牛白血病的ELISA试验 | 方芷平等 | ( 114 ) |

## 猪嗜血杆菌胸膜肺炎

|                                      |      |         |
|--------------------------------------|------|---------|
| 40、猪胸膜肺炎嗜血杆菌的培养及其短期保存方法              | 朱士盛等 | ( 119 ) |
| 41、间接血凝试验用于猪胸膜肺炎嗜血杆菌特异性抗原及型间关系的测定    | 朱士盛等 | ( 121 ) |
| 42、猪嗜血杆菌胸膜肺炎血清学诊断——改良补体结合试验简介        | 朱士盛等 | ( 125 ) |
| 43、进口猪嗜血杆菌胸膜肺炎血清学检查                  | 朱士盛等 | ( 126 ) |
| 44、猪胸膜肺炎嗜血杆菌7型(HP7)人工感染和同居感染试验       | 朱士盛等 | ( 128 ) |
| 45、猪嗜血杆菌胸膜肺炎血清学研究初报——试管凝集反应          | 朱士盛等 | ( 131 ) |
| 46、应用HRP—SPA ELISA检测猪嗜血杆菌胸膜肺炎抗体的研究   | 徐 瑞等 | ( 133 ) |
| 47、应用改良补反试验检测猪流感、猪肺炎阳性血清与HP病原间的血清学关系 | 朱士盛等 | ( 137 ) |

## 猪流感

|                           |     |         |
|---------------------------|-----|---------|
| 48、猪流感血清学诊断方法——微量滴定血凝抑制试验 | 封启民 | ( 138 ) |
|---------------------------|-----|---------|

## 水貂阿留申病

|                                    |      |         |
|------------------------------------|------|---------|
| 49、水貂阿留申病对流免疫电泳(CIEP)的操作方法及结果判定    | 李增光等 | ( 140 ) |
| 50、水貂阿留申病毒猫肾传代细胞对流免疫电泳诊断抗原现场检疫结果初报 | 李增光等 | ( 142 ) |
| 51、水貂阿留申病的病理形态学研究                  | 洪尚文等 | ( 145 ) |
| 52、水貂阿留申病毒/猫肾传代细胞诊断抗原的研究报告         | 李增光等 | ( 147 ) |

## 水貂病毒性肠炎

|                               |      |         |
|-------------------------------|------|---------|
| 53、关于青岛市崂山县某种貂场暴发病毒性肠炎的实验诊断报告 | 李增光等 | ( 151 ) |
| 54、水貂病毒性肠炎免疫荧光抗体试验的研究         | 李增光等 | ( 154 ) |
| 55、应用对流免疫电泳试验诊断水貂病毒性肠炎的研究初报   | 李增光等 | ( 158 ) |

## 兔纤维瘤病

|                             |     |         |
|-----------------------------|-----|---------|
| 56、兔纤维瘤病毒疫苗株的传毒试验及实验病理学初步观察 | 李增光 | ( 162 ) |
|-----------------------------|-----|---------|

## 鸡传染性法氏囊病

- 57、鸡传染性法氏囊炎(IBM) 微量法ELISA抗原包被时间与程序的选择.....蒋貽海等( 167 )  
58、用阴阳比值ELISA法检测鸡传染性法氏囊炎抗体水平的研究.....蒋貽海等( 168 )

## 家畜寄生虫病

- 59、牛胎毛滴虫病的调查分析.....吴鉴三等( 171 )  
60、山东省栖霞县牛双芽巴贝斯焦虫病的调查报告.....吴鉴三等( 173 )  
61、双芽巴贝斯虫实验感染研究.....吴鉴三等( 175 )  
62、双芽巴贝斯虫牛体内培养研究.....吴鉴三等( 178 )  
63、间接血凝诊断牛双芽巴贝斯虫病.....吴鉴三等( 180 )  
64、牛双芽巴贝斯虫病补体结合试验研究.....吴鉴三( 183 )

## 新技术

- 65、用光生物素标记核酸探针的研究.....宫云浩等( 186 )  
66、几种回收核酸酶切片方法的比较.....宫云浩等( 188 )

## 微型计算机应用

- 67、0520微型计算机国际动物疫情数据库的建立.....吴时友等( 189 )

## 综合

- 68、动物检疫概略.....李增光( 192 )  
69、全国进口活畜疫情普查总结.....杨冰清( 196 )

陈凌风等同志题词.....( 封三 )

# 牛传染性鼻气管炎病毒—血清细胞中 和试验诊断技术及判定标准

葛启民 仰惠芬 李昌琳 张瑞珍 杨冰清

## 前 言

牛传染性鼻气管炎（简称IBR）是牛的一种急性呼吸道传染病。本病的流行趋向世界性，为防止本病传入我国及有效地控制本病，经实验室二千余份血清样品的试验，证明病毒—血清细胞中和试验方法对诊断该病具有重要价值。

## 材 料

### 一、细胞制备

本试验所用细胞为原代或次代牛肾细胞或牛睾丸细胞（一般不超过五代），按常规胰酶消化方法制备：原代细胞的培养液为含10%犊牛血清、pH6.8—7.0的乳汉液，次代细胞的营养液含10%犊牛血清和10—40%MEM、pH7.0—7.2的乳汉液（上述培养液内均含双抗200单位/毫升），根据需要量分装在扁瓶或青霉素瓶（1毫升悬液装供中和试验用）内培养，当细胞生长良好，90%以上形成单层时方可使用。试验时，细胞先用内含200单位/毫升的双抗，pH7.1—7.2的Hank's液洗1—2次。

### 二、抗原制备

1、种毒繁殖：用牛传染性鼻气管炎Bartha—Nu/67弱毒株做种毒，接种到原代或次代细胞培养繁殖，当80—90%的细胞产生典型的IBR病变时，收获细胞培

养物，反复冻融两次，以3000转/分离心10分钟，取上清冻结或冻干保存，并测定病毒滴度（TCID<sub>50</sub>），一般不低于10<sup>-6</sup>/0.1毫升。

### 2、中和试验用抗原：

（1）接种：将种毒用含200单位/毫升双抗的乳汉液（pH7.1—7.2）做10倍稀释，按细胞培养液的10%量接种细胞，接种后室温吸附60分钟，然后加内含200单位/毫升双抗的乳汉液（pH7.1—7.2）维持，置37℃继续培养。

（2）收获：接种后，细胞应在48小时内出现典型的IBR病变，即细胞园缩，聚集成聚核细胞，拉网，最后脱落，在细胞病变效应最大时（80—90%的细胞出现病变）收获，反复冻融两次，3000转/分离心10分钟，除去细胞碎片，收集上清液，以1毫升分装，测定病毒滴度（TCID<sub>50</sub>）后，置-70℃保存备用。每次试验取一支抗原溶解，用乳汉液稀释成100TCID<sub>50</sub>/0.1毫升。

（3）病毒感染力的测定：供滴定用的细胞在链霉素瓶中培养，每瓶分装1毫升细胞悬液，37℃温箱培养，待细胞形成良好单层后即可使用。滴定时用pH7.2的乳汉液将病毒原液按10倍递增稀释成10<sup>-1</sup>—10<sup>-8</sup>，每个稀释度接种4瓶细胞，每瓶0.1毫升，室温吸附一小时后，加入0.9毫升内含3%犊牛血清的细胞维持液，37℃培养7天，按Reed和Muench

方法计算细胞半数组织培养感染量 (TCID<sub>50</sub>)。

### 三、IBR标准阳性血清的制备

选择1—2岁龄的本地黄牛3头,免疫前,先测定血清中IBR抗体,阴性者方可使用。免疫时,用制备好的IBR—BK<sub>3</sub>代毒(毒价为TCID<sub>50</sub>=10<sup>-6.5</sup>),分两次臀部肌肉注射,第一次每头牛接种IBR—BK<sub>3</sub>代毒原液5毫升,14天后每头牛再肌肉接种IBR—BK<sub>3</sub>代毒原液20毫升。在第二次注射后7天采血,分离血清,测得三头牛的血清效价均为1:64(标准阳性血清效价不得低于1:32),分装并低温冻结保存,供本试验阳性血清对照。

### 四、阴性血清

采集健康牛群血清,经测定应无IBR抗体,并在犊牛肾细胞上连传三代,无任何细胞病变效应出现方可使用,然后分装,低温冻结保存备用。

### 五、血清处理

被检血清,标准阳性血清,阴性对照血清用前均于56℃灭活30分钟。

### 病毒—血清中和试验及结果判定

一、试验时,融化一支已知病毒滴度的新鲜抗原,用含200单位/毫升双抗的乳汉液(PH7.1—7.2)稀释成含100 TCID<sub>50</sub>/0.1毫升工作病毒抗原。例如抗原滴度为TCID<sub>50</sub>=10<sup>-6</sup>/0.1毫升时,工作病毒抗原为TCID<sub>50</sub>=10<sup>-4</sup>/0.1毫升。

二、取已灭活的被检血清原液0.5毫升(用于检疫)或经对倍稀释后各稀释度的血清0.5毫升(测定抗体滴度)加入0.5毫升100 TCID<sub>50</sub>/0.1毫升的工作病毒抗原。

三、抗原—抗体混合物,充分摇匀,置37℃中和一小时,其间轻微振摇数次,

使抗原和抗体充分作用。取0.2毫升抗原—抗体混合物,接种到已洗过的BK原代或次代细胞瓶中,每份被检血清样品(或每个血清稀释度样品)接种4瓶,然后置37℃温箱吸附一小时。

四、吸附后,每瓶加入内含3%犊牛血清,200单位/毫升双抗的维持液0.8毫升(pH7.2),置37℃继续培养,72小时后用显微镜检查细胞病变效应。

五、对照:与此试验的同时,设置正常细胞、阴性血清+抗原(100 TCID<sub>50</sub>)、阳性血清+抗原(100 TCID<sub>50</sub>)对照,其操作过程均与试验组相同。

还须设立下列对照,并在同一条件下操作。

(1)实际使用工作病毒抗原回归测定:将工作病毒抗原做10倍递增稀释至10<sup>-3</sup>,每个稀释度接种4瓶细胞,每瓶0.1毫升,计算每次试验TCID<sub>50</sub>/0.1毫升的实际用量。

(2)被检血清对照:每份血清样品原液接种2瓶细胞,每瓶0.1毫升。

以上两项最后加入0.9毫升细胞维持液。

### 六、全部工作须作记录。

七、结果判读:接种后72小时判读结果,当病毒抗原对照、阴性血清+抗原对照均出现细胞病变,阳性血清+抗原对照无细胞病变,被检血清对细胞无毒性 and 对照细胞正常时,方能判读试验结果,否则被认为无效。其判读标准是未稀释的血清能抑制50%或50%以上的细胞出现细胞病变者判为阳性。

(原载《动物检疫》1982.1)

# 牛传染性鼻气管炎病毒的分离

仰惠芬 张瑞珍 李昌琳 封启民 杨冰清 李 威

1980年3月,广东省光明华侨农场从新西兰进口一千余头奶牛。在检疫过程中,我们于四月首次从新西兰进口奶牛体内分离到一株病毒,其致细胞病变作用可被匈牙利Bartha—Nu/67IBR标准毒抗血清所中和。五月,周泰冲等同志也从新西兰进口牛中分离到了IBR病毒。本文就IBR病毒的分离及鉴定作一简要介绍。

## 一、临床观察

进口的一千余头奶牛来自新西兰的140个小农场。进场后可见整个牛群体况欠佳。其主要症状是部分牛(约300多头)眼结膜充血,一侧或两侧眼流泪或有粘液、脓性分泌物,有传染性。发现两头牛的一侧眼角膜上有绿豆大小的白色云雾状物。呼吸道症状主要是鼻粘膜轻度充血,鼻流浆液,脓性鼻漏;咳嗽。少数牛表现发热,流产,腹泻,阴道炎,乳房炎等不同症状。

## 二、病毒分离

根据临床观察,采集了“IBR”可疑牛的眼、鼻和阴道分泌物;流产胎儿的胸水及脏器(气管、肺、脾),放于pH 7.0,内含1000单位/ml青、链霉素的Han k's液中。当时放于4℃(因现场无低温冰箱)保存,后移至-30℃保存。

我们从光明农场带回所内病料共26份。其中胎儿胸水3份,胎牛脏器2份,眼分泌物9份,鼻粘膜拭子10份,阴道拭

子2份。病料用高浓度抗菌素处理后接种(脏器病料则制成20%乳剂)牛肾初代细胞(BK)。每份病料接种2瓶(1ml装),每瓶0.2ml,室温下吸附1小时后倾去接种液,用乳汁液洗三次,最后加入细胞维持液1ml,置37℃孵育。逐日观察细胞病变。

接种后48小时991\* (眼), 125\* (鼻), 002\* (眼)各一瓶出现细胞园化, 72小时后060\* (眼), 240\* (鼻)和697 (眼)出现同样的变化。胸水及脏器乳剂接种的各瓶均无变化。其它病料因有细菌或霉菌污染而废弃。但以上六份病料在7天内仅有125\* 和060\* 两份接种的各两瓶均出现变化。分别收获,冻融二次后再接种犊牛肾次代细胞(5ml瓶装)。一周内细胞病变不明显,但细胞界限不清,有融合趋势,部份细胞之间有较大的空隙。收获,冻融后用以上六份病料的PBK<sub>2</sub>代培养物再接种4日龄牛肾初代细胞,每份4瓶(1ml瓶装)。52小时后125\* 出现细胞病变,但病变发展缓慢,至5天才收毒。其它的只是部分细胞出现碎裂,有的有部分细胞园化,未收而废之。因125\* PBK<sub>2</sub>代培养物细胞病变明显,故又将此培养物接种了一大瓶(15ml装)和7小瓶(1ml装)BK初代细胞。24小时内所有接种瓶均出现细胞病变,且已达“卅”加号以上,收获,冻融二次,离心后分装,-30℃保存。

### 三、分离物的鉴定

为了确定此分离物是否是“IBR”病毒，我们用“IBR”高免牛血清（效价1:64）与该分离物作细胞中和试验（固定血清，稀释病毒法）来鉴定。经五天观察，测得中和指数为（158500）。（见表一）。

为了证明125\*牛分离物与本群牛血清之间的关系，我们在测得该分离物的细胞半数感染量后，按“IBR中和试验操作规程”进行该分离物与本群牛血清的中和试验。并将此结果与用IBR病毒（匈牙利Bartha—Nu/67疫苗株）作的中和试验

结果作一比较，结果见表二。

另外用IBR病毒测定了不同时间采的125\*牛血清。结果是在采病料的同时采的血清，经中和试验测定是阴性；采病料后22天的血清为阳性。

根据以上结果，我们认为125\*牛分离物与国外报道的IBR病毒是一致的。

为了了解125\*牛分离物的理化特性和形态特征，我们又作了该病毒的理化特性测定和电镜形态观察。其结果进一步证明了125\*牛分离物确实是“IBR”病毒（详见“IBR病毒的形态与理化特性一文”）。

表一 125\*牛分离物的中和试验鉴定

|                                                        | 观察时间  | 稀释度      |          |          |          |          |          |          |          |          | 正常细胞   |
|--------------------------------------------------------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|
|                                                        |       | -1<br>10 | -2<br>10 | -3<br>10 | -4<br>10 | -5<br>10 | -6<br>10 | -7<br>10 | -8<br>10 | -9<br>10 |        |
| 对照组<br>125—P BK <sub>4</sub><br>代细胞培养物 +<br>标准阴性血清     | 23小时  | ##<br>## | ++<br>++ | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 48小时  |          | ##<br>## | ##<br>## | ++<br>++ | ++<br>++ | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 72小时  |          |          |          | ##<br>## | ##<br>## | ++<br>++ | ++<br>++ | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 86小时  |          |          |          |          | ##<br>## | ++<br>++ | ++<br>++ | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 95小时  |          |          |          |          |          | ##<br>## | ++<br>++ | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 110小时 |          |          |          |          |          | ##<br>## | ++<br>++ | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 119小时 |          |          |          |          |          |          | ++<br>++ | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
| 试验组<br>125—P BK <sub>4</sub><br>代细胞培养物 +<br>1 BR标准阳性血清 | 23小时  | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 48小时  | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 72小时  | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 86小时  | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 95小时  | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 110小时 | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |
|                                                        | 119小时 | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>—   | —<br>— |

按Reed—Muench法计算对照组和试验组的TCID<sub>50</sub>。

$$\text{对照组 TCID}_{50} = 6 + \frac{100 - 50}{100 - 25} = 6.70$$

$$\text{试验组 TCID}_{50} = 1 + \frac{75 - 50}{75 - 25} = 1.5$$

二者之差为5.2。中和指数为5.2的反对数即158500。

表二 待检牛血清分别与IBR标准毒和125\*牛分离毒中和试验的结果比较

| 牛 号      | 1—117 | 1—191 | 1—189 | 2—158 | 1—981 | 1—213 | 2—330 | 4—1262 | 2—747 | 3—803 | 6—824 | 5—132 | 6—697 | 1—159 | 2—141 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 标准毒      | —     | —     | —     | —     | +     | +     | +     | +      | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |
| 125*牛分离物 | —     | —     | —     | —     | +     | +     | +     | +      | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |

本工作得到了广州、深圳、福州等口岸动植物检疫所参加检疫的同志们的大

力协助，在此深表谢意。

(原载《动物检疫》82.1)

## 牛传染性鼻气管炎病毒的形态与理化特性的研究

农业部动物检疫所：仰惠芬 李昌琳 封启民 张瑞珍 杨冰清  
 北京大学生物系：霍中和 丁明孝  
 北京市农科院畜牧兽医研究所：李汉秋

### 提 要

从新西兰进口奶牛分离的IBR<sub>125</sub>-BK毒株经鉴定研究,证明是DNA型病毒,病毒粒子直径约160—230nm,外有厚的囊膜、核壳体直径约为100—110nm,衣壳每边有5个子粒。核壳体是在宿主细胞核内装配,通过细胞质成熟与释放。病毒粒子对有机溶剂敏感,经胰蛋白酶作用后明显降低感染力。耐碱、不耐酸,耐受10次冻融而不降低毒价,根据上述特点,并参考血清学鉴定资料证明:该毒株与国外流行的牛鼻气管炎病毒完全一致,是属于疱疹病毒属。

### 前 言

牛传染性鼻气管炎(简称IBR)是牛的一种急性呼吸道传染病。在该病的暴发

区常造成严重的经济损失。

自1955年美国首次报道本病以来,澳大利亚、新西兰、日本及许多欧洲国家也都有该病的疫情报道。分布渐趋世界性。

至今,我国尚未发现有IBR流行。但随着我国对外贸易的不断发展,每年都有大量的活畜及畜产品进口,因而IBR也可能随之传入我国,从而严重威胁我国养牛业的发展。为了确保我国畜牧业的兴旺发达,迫切需要对IBR的病原作一全面的研究。到目前为止,在我国尚未见到有关IBR病毒的研究报道。我们从新西兰进口的奶牛分离到一个毒株,经农业部动物检疫所鉴定初步确定为牛传染性鼻气管炎病毒。我们对该毒株又作了理化特性与形态学研究,确证从新西兰进口奶牛分离到的是IBR病毒,并对这株IBR病毒的理化特性与形态学做了较详细的叙述。

## 材料和方法

### 病毒

待鉴定病毒：为1980年农业部动物检疫所在广东省从新西兰进口的奶牛125号鼻腔采集病料，经在犊牛肾细胞培养分离的IBR<sub>125</sub>—BK毒株。在牛肾细胞上传三代后滴度基本稳定在 $10^8$ TCID<sub>50</sub>/0.1ml一般于接毒后24—48小时内出现细胞病变效应(CPE)。其特点是细胞圆缩，折光增强，并聚集，最后脱落。当85%左右的细胞出现CPE时，收获培养物，反复冻融两次，3000转/分离心10分钟，取上清保存备用。用此法获得的毒液供继代和实验用。供本实验用的毒是在犊牛肾细胞上繁殖的第7—11代毒，代号为125—BK7和125—BK<sub>11</sub>。

对照病毒：在进行核酸定型与有无囊膜研究时，我们选取两种已知病毒作为对照，以检验操作技术的可靠性。

1、鸭瘟病毒：鸭瘟病毒是已知的DNA型病毒，具有囊膜。本实验所用种毒是农业部兽医生物药品监察所供给的，经我们适应于鸭胚上传第16代的毒，即PPV—CEC<sub>16</sub>。

2、口蹄疫病毒：口蹄疫是已知的RNA型病毒，无囊膜。本实验室所用的种毒是程绍迥教授实验室保存的毒株，经我们在猪肾原代细胞上传10代，又在BHK<sub>21</sub>细胞上传若干代的毒。

### 细胞培养

用犊牛肾原代和次代细胞(不超过5代)培养IBR病毒。原代细胞的培养液为含10%犊牛血清与10%MEM液的乳汉液，pH6.8—7.0。次代细胞的培养液为含10%犊牛血清与40%MEM液的乳汉液，pH7.2左右。接毒后的维持液是含3%犊牛血清的乳汉液，pH7.2—7.4。供实验

用的细胞均选择长成良好单层的细胞。

用鸡胚原代细胞培养鸭瘟病毒。培养细胞的营养液是含10%犊牛血清的乳汉液，pH6.8—7.0。接毒后的维持液是含5%犊牛血清的乳汉液，pH7.2—7.4。

用BHK<sub>21</sub>细胞系培养O型口蹄疫病毒。细胞营养液成份为10%犊牛血清，30%199液，30%MEM液与30%乳汉液，pH7.0左右。维持液的成份是将营养液中的犊牛血清减为5%，pH7.4。

### 病毒感染力的滴定

供滴定用的细胞培养在青霉素瓶中，每瓶分装1ml细胞悬浮液。待细胞形成单层后即可使用。滴定样品时用pH7.2的乳汉液将样品作10倍递增稀释，每个稀释度接种4瓶细胞，每瓶0.1ml，室温吸附1小时后加入0.9ml细胞维持液，37℃培养，观察5天，按Reed和Muench的方法计算细胞半数感染量(TCID<sub>50</sub>)。

### 病毒理化特性的测定

1、用DNA合成抑制物—5′—碘—2′—脱氧尿嘧啶核苷(以下简称IudR)测定病毒的核酸型，同时用电镜检查其在细胞内复制与装配的部位。

2、用不同孔径的微孔滤膜过滤法及电镜测定病毒粒子的大小。

3、用有机溶剂氯仿与乙醚处理病毒液，然后分别测定病毒的感染力，根据其滴度的变化确定有无囊膜。

以上测定方法的具体操作过程与其它一些理化特性的测定在实验结果中一并叙述。

### 电子显微镜研究方法

1、超薄切片。被病毒125—BK代毒感染的牛肾细胞培养物，待病变细胞达50—70%时，用1.25%戊二醛溶液预固定1—1.5小时，再用1%锇酸溶液固定2—3小时。丙酮脱水后用国产环氧树脂

“618”（固化剂为DDSA、增塑剂为DBP、催化剂为DMP<sub>30</sub>）包埋。切片指示厚度500—600Å。切片用醋酸双氧铀与柠檬酸铅双染色，在JEM<sub>6C</sub>与Phillips EM400电镜下观察。

2、提纯病毒负染法。被病毒125—BK毒株感染的牛肾细胞培养物，当其CPE达85%以上时收毒，毒液经反复冻融二次后混合，置3000转/分离心15分钟。取上清液经450nm孔径微孔滤膜过滤。滤液再经140000g(35000转/分)低温超速离心1小时。去上清液，沉淀物用极少量的Hank's液悬浮。在敷有Formvar膜（再喷镀上一层碳膜）的铜网上悬滴。用2%磷钨酸负染后电镜观察。为检验病毒超速离心后的沉淀状态，将上清液的上、中、下三部份分别测定滴度。

3、免疫电镜。即125—BK<sub>10</sub>代毒和IBR的羊高免血清（效价分别为1:128和1:64，由中监所惠赠）先分别用12000转/分离心40分钟，然后分别取毒液9ml加血清1ml与毒液7ml加血清3ml，充分混合，室温下作用3—4小时，再经12000转/分离心1小时，取下层溶液，搅匀，滴在敷有Formvar膜的碳膜铜网上，用2%磷钨酸负染电镜观察。

## 实验结果

### 一、病毒核酸型的鉴定

1、DNA合成抑制剂IUdR对病毒繁殖的影响：IUdR能抑止DNA病毒在组培细胞中的繁殖，但不能抑制RNA病毒的繁殖。这是鉴别病毒核酸型的简便方法之一。

实验分两步进行，先用125—BK<sub>10</sub>代毒液接种2方瓶牛肾细胞，吸附30分钟后，取其中1瓶加入含IUdR的维持液，IUdR终浓度为100μg/ml，另1瓶的维

持液不含IUdR（维持液均不含血清）。37℃培养。待未加IUdR样品CPE达85%以上时，将两细胞培养物同时收获。反复冻融两次后，分别测其滴度。表1结果说明，本病毒的复制受IUdR抑制，因此是属于DNA型病毒。同时用已知的DNA病毒—鸭瘟病毒和已知的RNA病毒—口蹄疫病毒作对照实验。分别在鸡胚细胞和BHK<sub>21</sub>细胞上进行测定，操作过程同上，结果见表1。鸭瘟病毒完全抑制，而口蹄疫病毒复制完全不受影响，说明我们的实验技术与结果是可靠的。此实验结果与国外文献所记载的用IUdR病毒的效应是相似的。

2、病毒形态发生的电镜观察：从细胞超薄切片上可以观察到核内有核壳体与衣壳，说明该病毒主要成份是在细胞核内复制与装配。病毒粒子在细胞质内成熟，最后向细胞外释放，这说明其装配与成熟过程是符合DNA病毒，尤其是疱疹病毒的一般规律的。并与文献报道的IBR病毒的特征是相似的。

表1 IUdR对病毒复制的影响

| 病 毒             | 组 别         | 滴 度<br>(TCID <sub>50</sub> /0.1ml) |
|-----------------|-------------|------------------------------------|
| 牛鼻气管炎<br>病 毒    | IUdR<br>对 照 | 0<br>10 <sup>0</sup>               |
| 鸭瘟病毒<br>(DNA型)  | IUdR<br>对 照 | 0<br>10 <sup>0</sup>               |
| 口蹄疫病毒<br>(RNA型) | IUdR<br>对 照 | 10 <sup>7</sup><br>10 <sup>7</sup> |

### 二、病毒粒子的大小和形态

1、用微孔滤膜测定毒粒大小：取125—BK<sub>10</sub>代毒液15ml，留1ml作对照样品，其余的依次用负压通过孔径为450nm、300nm、220nm和100nm各级微孔滤膜，从每通过一级滤膜后的滤液中取

2 ml作样品，余下的再通过次一级滤膜。各份样品同时测定滴度。

从表2可看出，病毒能够自由地通过220nm，300nm孔径的滤膜，当通过220nm孔径滤膜时虽然滴度大大下降，但仍有部份感染性的病毒能通过。然而完全不能通过100nm孔径的滤膜。由此可以说明毒粒大小是在100—220nm之间或更大一些。

表2 经滤过后IBR病毒的滴度

| 滤膜孔径  | 滴度 (TCID <sub>50</sub> /0.1ml) |
|-------|--------------------------------|
| 滤过前   | 10 <sup>5.67</sup>             |
| 450nm | 10 <sup>4</sup>                |
| 300nm | 10 <sup>4</sup>                |
| 220nm | 10 <sup>1</sup>                |
| 100nm | 0                              |

2、病毒颗粒的超速离心沉淀：对IBR病毒液经140000g低温超速离心1小时后的上清液之上、中、下三层进行滴定。结果说明在此离心速度下，病毒粒子基本上都可以沉淀下来。（见表3）

表3 超速离心前后毒液的滴度

| 处 理         | 滴 度<br>(TCID <sub>50</sub> /0.1ml) |
|-------------|------------------------------------|
| 离 心 前       | 10 <sup>5</sup>                    |
| 离 心 后 上 清 液 | 0                                  |
| 上1/3        | 0                                  |
| 上清液中1/3     | 0                                  |
| 上清液下1/3     | 10 <sup>0.5</sup>                  |

3、电镜观察病毒颗粒形态与大小：经提纯浓缩的毒液悬滴负染，可观察到病毒粒子为球形，具有很厚的囊膜。病毒粒子直径约160—230nm。部分裸露的核壳体直径约100—110nm，核壳体有一电子致密的核心。其衣壳由整齐排列的子粒构成，衣壳每边有5个子粒。说明本病毒的核壳体是立体对称病毒。推算出衣壳由

162个子粒组成，这是典型的疱疹病毒。在超薄切片的样品中，可以观察到成熟释放的病毒粒子，其直径为140—190nm，具有典型的厚囊膜，并可见到囊膜小体。核壳体内有一个很致密的核心，衣壳清晰可辨。

用免疫电镜法所获得的样品说明，与血清结合的病毒颗粒不能观察到完整的形态结构。

### 三、对有机溶剂的敏感性

凡是有囊膜的病毒经有机溶剂处理后，囊膜被破坏，病毒感染力随即丧失，而无囊膜的病毒则能抵抗有机溶剂的作用。实验如下：

1、氯仿处理：在10ml离心管中加分析纯氯仿0.1ml，再加125—BK<sub>7</sub>代毒液1.9ml，用手猛烈摇成乳浊，在室温静置10分钟，3000转/分离心10分钟。氯仿沉于管底，取上层水相测定滴度，结果表明本病毒能被氯仿完全灭活。

2、乙醚处理：在100ml离心管中加麻醉用乙醚0.4ml，再加125—BK<sub>7</sub>代毒1.6ml，盖紧管口，猛烈振摇成乳剂，室温静止10分钟，3000转/分离心10分钟，乙醚浮在液面，吸去上层乙醚，用三层无菌纱布包裹管口，4℃冰箱过夜，以便残余乙醚充分挥发。测定滴度时吸取下层水相进行测定。试验结果说明本病毒能被乙醚灭活。

3、对照实验：用已知有囊膜的鸭瘟病毒和已知无囊膜的口蹄疫病毒作对照实验。用氯仿和乙醚以同样的方法处理这两种病毒，结果见表4，说明操作过程与方法是可靠的。试验数据说明本毒株的病毒与文献所记载的IBR病毒是具有囊膜的病毒完全符合。