

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.02.11

牛传染性鼻气管炎诊断方法研究进展

杨 飞¹, 宋志峰², 刘 丹¹, 黄小洁¹, 侯力丹¹, 郎洪武^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150000)

[收稿日期] 2019-10-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 02-0065-08 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 牛传染性鼻气管炎是由牛传染性鼻气管炎病毒引起的一种牛的热性、急性、接触性传染病。该病是世界动物卫生组织(OIE)规定的必须上报的疾病之一,在我国也被列为二类疫病。牛传染性鼻气管炎可降低牛的肥育率、繁殖率和产奶量,给养牛业造成了重大经济损失。从病毒的分离鉴定、血清学以及分子生物学等方面对该病的诊断方法进行综述,以期对牛传染性鼻气管炎的检测和防控提供参考。

[关键词] 牛传染性鼻气管炎; 诊断; 方法

Progress about the Diagnosis of Infectious Bovine Rhinotracheitis

YANG Fei¹, SONG Zhi-feng², LIU Dan¹, HUANG Xiao-jie¹, HOU Li-dan¹, LANG Hong-wu^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Northeast Agricultural University, Harbin 150000, China)

Corresponding author: LANG Hong-wu, E-mail: zhjshcvlhw@126.com

Abstract: Infectious bovine rhinotracheitis is a hot, acute, and contagious disease caused by infectious bovine rhinotracheitis virus. The disease is one of the diseases that must be reported by the World Organisation for Animal Health (OIE) and is also classified as a Class II disease in China. Infectious bovine rhinotracheitis can reduce the fattening rate, reproductive rate and milk production of cattle, cause significant economic losses to the cattle industry. In this paper, the diagnosis methods of virus isolation, serology and molecular biology are reviewed in order to provide reference for the detection and prevention of infectious bovine rhinotracheitis.

Key words: infectious bovine rhinotracheitis; diagnosis; method

牛传染性鼻气管炎(infectious bovine rhinotracheitis, IBR)在临床上主要以呼吸困难、气管黏膜发炎等呼吸道症状为特征,又因会同时引起脓疱性

外阴阴道炎,故又称为传染性脓疱性外阴阴道炎,还可引起公牛龟头炎、母牛流产、结膜炎、幼牛脑膜炎等,被认为是可由同一种病原引起的多种病症

基金项目: 国家重点研发计划“牛羊重要疫病免疫防控新技术研究”(2017YFD0500900)

作者简介: 杨 飞,硕士研究生,从事动物病毒学相关研究工作。

通讯作者: 郎洪武。E-mail: zhjshcvlhw@126.com

的疫病^[1]。牛传染性鼻气管炎病毒 (infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV) 又名牛疱疹病毒 1 型 (bovine herpesvirus 1, BHV - 1), 属于疱疹病毒科水痘病毒属, 有 4 个亚型和一个血清型。IBRV 感染牛后可在三叉神经形成潜伏感染和持续性感染, 病牛终生带毒。在应激条件下, 该病毒可被激活使机体排毒而引起该病在牛群中的传播流行, 这也为消灭和根除该病理下了隐患, 增加了困难。

20 世纪 50 年代, 以传染性鼻气管炎症状为特征的疾病最先见于美国科罗拉多州的育肥牛群, 后因贸易交易使得 IBRV 广泛流行于欧洲^[2]。该病在全世界流行, 目前只有少数欧洲国家采取消灭扑杀、禁止疫苗接种等方式根除了该病, 如瑞士、奥地利、芬兰等, 其他国家均有该病的报道^[3]。2002 年至 2009 年的血清调查报告结果表明, 欧洲牛群中 IBR 血清阳性率为 50% ~ 90%, 比 2000 年的调查结果有明显提高。2013 年, 巴西发现一例 IBR 病例。2015 年, 澳大利亚出口的活牛 IBR 血清阳性率已高达 39%。在我国, IBR 属于外来病, 首次被发现是在 1980 年, 周泰冲等从新西兰进口奶牛中分离得到, 此后该病在我国的流行趋势也是不断上升。2007 年, gE - ELISA 方法检测奶牛血清的数据结果显示, 我国 IBR 血清学个体阳性率为 35.8%^[4]。2016 年有文献报道我国上海崇明岛地区两个规模化奶牛场的 IBRV 抗体阳性率分别为 41.2% 和 74.3%, 新疆五个规模化牧场 IBR 血清学检测阳性率为 80.7%, 宁夏地区 IBRV 抗体检测平均阳性率高达 85.1%^[5-7]。这些数据表明了 IBR 在我国牛群中感染的普遍性和严重性。但我国是养牛大国, 根除 IBR 耗资巨大, 对于发展中国家很不适用, 所以为有效控制 IBRV 的扩散传播, 建立有效的诊断方法以及时监测和预防 IBR 才是关键。本文综述了 IBRV 的最新国内外检测方法研究进展, 以期检测和防控 IBR 提供参考。

1 病原学诊断

1.1 病毒的分离鉴定 IBRV 可在多种原代或传代细胞中生长, 如牛胎肾、肾上腺、甲状腺、睾丸、鼻

甲骨等细胞中生长, 目前普遍使用的是牛肾传代细胞 (MDBK) 和牛气管传代细胞 (BTC)。一般根据病牛的临床症状, 选择不同的部位进行病料的采集, 呼吸道型病牛主要采集鼻液或眼分泌物; 眼结膜型病牛主要采集眼分泌物; 脑膜脑炎型病牛主要采集脑组织; 生殖道型母牛主要采集外阴阴道分泌物和外阴部黏膜, 公牛主要采集精液和包皮; 流产型病牛可采集肺脏、肝脏、肾脏等实质性器官或胸腔积液。IBRV 首次分离不易出现典型的病变 (CPE), 需要盲传 2 ~ 3 代后再进行观察。将采集的病料处理后接种到适宜的细胞上, 细胞病变一般在 3 ~ 5 d。典型的 CPE 为细胞圆缩、聚集成葡萄样的细胞团, 细胞团之间形成空洞以及多核巨大细胞的产生。若要进一步鉴定是否为 IBRV 感染, 可用 IBRV 单克隆抗体或者抗血清进行中和试验, 或间接免疫荧光试验。孔繁德等^[8]将采集的鼻拭子和血清混合震荡后离心, 其上清液接种于单层的 MDBK 细胞, 盲传 3 代后出现典型 CPE, IBR 阳性血清作用于该单层细胞后, CPE 被明显抑制。冷雪等^[9]采集内蒙古发病牛的鼻拭子液并经过 MDBK 细胞传代培养以及 PCR、间接免疫荧光试验和动物回归试验分离鉴定出一株 IBRV。病毒分离鉴定方法虽然可靠, 但整个过程比较复杂, 费时费力, 效率不高, 所以在临床上不推荐使用。

1.2 病毒核酸检测

1.2.1 聚合酶链式反应 (PCR) 1985 年, Mullis 等^[10]向全世界推广 PCR 方法以后, 由于该技术快速、特异、敏感、费时少的优点, 已广泛应用于分子生物学领域, 可用于检测血清、组织、鼻拭子、精液中的病毒。研究者针对 IBRV 基因组编码蛋白的不同, 设计特异性引物, 建立 PCR 方法, 用于检测 IBRV。林梅等^[11]根据 IBRV TK 基因设计引物, 建立了可鉴别 TK 基因缺失株与野毒株的 PCR 方法。徐娜等^[12]根据 GenBank 中 IBRV gE 和 gB 基因序列, 设计了 2 对特异性引物, 建立了特异性强、准确、快速的 PCR 方法。同时还可根据病原种类的不同, 建立同时检测多种病原的多重 PCR 方法, 可

达到更高效、简便的目的。范晴等^[13]建立了同时检测牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、牛支原体和 IBRV 的三重二温式 PCR 方法,为这 3 种病原的诊断提供了一种方便使用的方法。杨帆等^[14]建立了同时检测牛副流感病毒 3 型、IBRV、BVDV 和牛支原体多重 PCR 检测方法,可鉴别诊断 4 种病原,具有特异性强,灵敏度高的特点。PCR 是一种用于放大扩增特定的 DNA 片段的分子生物学技术,能将微量的 DNA 以指数方式增加,且对模板提取物纯度要求低,能达到灵敏度高、简便、快速的要求,但是该方法易出现假阳性、假阴性的结果,也有一定的缺陷。

1.2.2 荧光定量 PCR (qPCR) 荧光定量 PCR 是通过荧光染料或荧光标记的特异性探针,标记跟踪 PCR 产物进行实时监测反应,利用与之相适应的软件对产物进行分析,计算待测样品模板的初始浓度。该方法已广泛应用于分子生物学、医学、食品检测和环境监测等多个领域,且与普通 PCR 相比,具有更高的特异性和敏感性。目前实验室常用的荧光化学方法有两种,分别是 DNA 结合染料(SYBR Green I)和标记上荧光染料的特异性寡核苷酸探针(TaqMan 探针、杂交探针)。季新成等^[15]根据 BHV-1 gB 基因序列,设计高度保守的引物和荧光探针,建立了含有内标物的荧光定量 PCR 检测体系,灵敏度比常规 PCR 和病毒分离高出 10~100 倍,与不加内标的荧光 PCR 检测灵敏度相当,且内标模板可监测、指示并校正假阴性结果,从而提高 PCR 检测准确率。该方法的建立可实现临床样品中 BHV-1 的快速检测,加强实验室的质量控制。谢志勤等^[16]根据 IBRV gB 基因序列和 BVDV 5'端非编码区序列的保守区域,分别设计 1 对 IBRV 的特异性引物和 1 条 FAM 标记的 TaqMan 探针,1 对 BVDV 的特异性引物和 1 条 ROX 标记的 TaqMan 探针,建立了双重荧光定量 PCR 方法,适用于临床样品的鉴别检测。宋爽等^[17]根据高度保守的 BVDV 的 5' UTR 基因、IBRV 的 gB 基因和口蹄疫病毒(FMDV)的 3D 基因,分别设计了 3 对对应的特异性引物和 3 种不同发光基团标记的 TaqMan

探针,建立了同时检测这 3 种病毒的多重荧光定量 PCR 方法,可同时快速鉴别检测 BVDV、IBRV 和 FMDV。张颖慧等^[18]首次建立了检测 IBRV 核酸的恒温隔绝式 PCR(iiPCR)方法,该方法配合 PetNAD 核酸萃取试剂盒,从核酸提取到报告检测结果仅需 1 h,具有操作简便、快速、可现地化的特点。Shubhada K Chothe 等^[19]开发了一种新型的基于核苷酸多态性(SNP)的 PCR 检测方法,通过 illumina Miseq 平台对来自宾夕法尼亚州和明尼苏达州的 18 株 BHV-1 分离株和 5 株 BHV-1 疫苗株进行全基因组测序,基于 SNP 可将序列分为两个不同的疫苗株组和一个野毒株组。该方法可以区分疫苗株和野生型毒株,帮助准确确定 BHV-1 的发病率以及疫苗接种与牛临床发病的关系。

1.2.3 等温扩增技术 环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP),能在等温(60~65℃)条件下,短时间(通常是 1 h 内)内进行核酸扩增,是一种简便、快速、精确、低价的基因扩增方法。与常规 PCR 方法相比,该方法不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程,是一种全新的核酸扩增方法,可不依赖任何专门的仪器设备实现现场高通量快速检测,检测成本远低于荧光定量 PCR,也为 IBRV 的快速检测提供了新的技术。郭利等^[20-21]从 NCBI 数据库中获得的 IBRV 的保守 gE 序列,分别建立了 LAMP 可视化检测方法和应用金纳米颗粒与 PCR 结合的纳米 PCR(nano-PCR)新型检测方法。LAMP 方法可检测到 2.23×10^3 copies/ μL 的 BHV-1 基因含量,其临床样品的阳性检出率高于普通 PCR。Nano-PCR 方法的敏感性是 LAMP 和普通 PCR 方法的 10 倍,其敏感性和特异性更适合于临床样品的检测,且可与 LAMP 配合使用,为 IBRV 的筛查和治疗预防提供了技术支撑。高峰等^[22]根据 GenBank 中发表的 IBRV 全基因序列,利用 MEGA 3.1 进行同源性比对,选择基因中的高度保守区域设计了 LAMP 引物,建立了可视化 IBRV LAMP 检测方法,适用于口岸进出口动物的 IBRV 快速检测。董世娟等^[23]根据

IBRV gB 基因保守序列设计了 3 对 LAMP 引物建立了 IBRV 可视化 LAMP 方法,该方法可以检测到 10 copies/ μL 的质粒 DNA,与 nested-PCR 方法的敏感性相当,比 PCR 方法敏感 1000 倍,适合基层和现场对临床样本进行快速检测。聚合酶螺旋反应(PSR)是等温技术领域的新成员,Malla J A 等^[24]已成功建立了 PSR 方法,用于检测流产的牛胎儿组织和牛精液中的 BHV-1。该方法比传统 PCR 灵敏 100 倍,与实时 PCR 相当,可在冷冻精液站和奶牛群中快速、准确、灵敏地检测 BHV-1。

1.2.4 基因芯片技术 随着人类基因组计划的逐步实施以及分子生物学相关学科的迅猛发展,越来越多的动植物、微生物基因组序列得以测定,一种新型、高效、快速检测和分析遗传信息的杂交和测序方法得以建立,即基因芯片技术。季新成^[25]将标有荧光染料的 PCR 产物变性后与芯片上寡核苷酸探针杂交,对 IBRV 重组 DNA 的检测灵敏度均为 10^3 copies/ μL ;同时还建立了 IBRV、BVDV 和犬新孢子虫 3 种病原的悬浮液态芯片检测技术,对 IBRV 的检测灵敏度为 10^3 copies/ μL ,具有较好的特异性和可重复性。陈圣军等^[26]根据 IBRV gB 基因和赤羽病病毒 S 基因序列设计合成了 2 对特异引物和探针,建立了同时快速检测这两种病毒的基因芯片检测方法。魏春霞等^[27]建立了牛布鲁氏菌病、结核、炭疽、FMD、BVD、副流感、IBR 可视化基因芯片检测方法,根据已公布的各病原核酸序列,设计了引物和探针,并将 PCR 产物与探针特异性杂交,从而实现了一次试验即可对 7 种病原的同时快速检测。该基因芯片检测方法单一病原灵敏度检测可达 1.0×10^{-6} ng/ μL ,混合病原灵敏度检测可达 1.4×10^{-5} ng/ μL ,具有高通量、高灵敏度、高特异性等特点。

2 血清学诊断

2.1 酶联免疫吸附试验(ELISA) ELISA 方法已被广泛应用于多种细菌和病毒等疾病的诊断。在动物检疫方面,ELISA 在猪传染性胃肠炎、牛副结核病、牛传染性鼻气管炎、猪伪狂犬病、蓝舌病等的

诊断中已为广泛采用的标准方法,也是 OIE 指定的检测 IBRV 的方法之一。该方法是将已知的抗原或抗体吸附在固相载体(聚苯乙烯微量反应板)表面,使酶标记的抗原抗体反应在固相表面进行,用洗涤法将液相中的游离成分洗除,具有灵敏、快速、特异、操作简单等优点。常用的 ELISA 法有双抗体夹心法和间接法,目前在市场上占据主导地位的是间接 ELISA 试剂盒。IBRV 的 gB、gC、gD、gE 和 gG 为其主要的免疫原性蛋白,这些蛋白已先后被学者研究作为 IBRV 检测的靶蛋白用于建立 ELISA 方法。曹翀等^[28]建立了 IBRV gB 蛋白为检测抗原的间接 ELISA 方法。Bertolotti 等^[29]建立了检测 IBRV gE 抗体的间接 ELISA 方法。马辉^[30]、周跃辉^[31]等分别制备了 gC 和 gD 的单克隆抗体,建立了双抗体夹心 ELISA 方法。向文杰^[32]制备了 IBRV VP8 蛋白单克隆抗体并以全病毒为抗原制备了阻断 ELISA 方法。张帆^[33]对我国 IBR 的流行情况做了 Meta 分析并建立了 gE 间接 ELISA 方法,可用于奶牛场中 IBR 的流行病学调查。Barbara Colitti 等^[34]利用 IBRV gE 间接 ELISA 方法检测混合牛奶样品中的 IgG 浓度,该方法显现出了非常好的诊断性能,且降低了检测成本,可用于控制游离和接种标记的奶牛群中的 IBR。

2.2 中和试验(VN) 中和试验是最标准、最经典的血清抗体检测方法,也是 OIE 指定的试验检测方法之一。由于 IBRV 只有一个血清型,只要用标准毒株的免疫血清在细胞培养后进行中和试验就可鉴定,但受病毒效价、血清与病毒的孵育时间长短等因素的影响,使得该方法具有耗时费力结果易受外界因素影响等缺点。因为 IBRV 可以潜伏感染,所以,即使牛群血清抗体检测为阴性,仍不能保证牛无病毒感染^[35]。

2.3 间接血凝试验(IHA) 间接血凝试验是一种简单易行的血清抗体检测方法,可用常规的试管凝集法和微量凝集法进行。但 IHA 易受诸多因素影响,出现假阳性的结果。陈天祥^[36]、杨春明^[37]等分别建立了 IBRV 的 IHA 方法,结果较好。

2.4 间接免疫荧光试验 (IFA) IFA 主要用于检测抗原,是一种操作简便、快速、特异性高的检测方法。该方法中可用 BALB/c 小鼠制备的 IBRV 单克隆抗体为一抗,加到接种 IBRV 的细胞培养物中,以 FITC(异硫氰荧光素)标记的抗鼠免疫球蛋白为二抗,置荧光显微镜下观察荧光结果即可。IBRV 单克隆抗体的高特异性使得 IFA 方法可不局限于只用 IBR 阳性血清作为一抗才能检测出抗原,更加丰富了该方法的内容。

2.5 琼脂扩散试验 (AGP) AGP 既可用于检测抗原,也可检测抗体,操作简便,但敏感性较低,只有感染牛抗体呈现出很高的滴度时才能被检出,应用价值不高。

2.6 胶体金检测技术 胶体金检测方法也是一种快速简单的检测抗原或抗体的方法。王武军等^[38]建立了斑点免疫金渗滤法 (DIGFA) 检测 IBRV 抗体,仅需 5 min 即可判定结果。梅力等^[39]用胶体金将 sD 昆虫细胞-杆状病毒系统重组表达的 IBRV-gD 蛋白标记作为示踪抗原,未标记的 gD 蛋白作为捕获抗原,以羊抗牛 IgG 抗体作为质控抗体,建立了 IBRV 双抗原夹心法胶体金检测试纸条,该试纸条与 IDEXX 的 IBRV 抗体 ELISA 检测试剂盒的阳性符合率为 93.5%,阴性符合率为 96%,可用于临床 IBRV 抗体的检测和诊断。

3 结 语

IBR 在我国区域内分布不均,且在奶牛中阳性率呈上升趋势,说明近年来我国 IBRV 在奶牛群中感染越来越严重。我国是养牛大国,养牛业正向集约化、规模化发展迅速,且进出口奶牛数量巨大,贸易频繁,这更加速了 IBR 的流行与传播,给我国养牛业带来了巨大损失。欧洲几个国家采取了根除 IBR 的计划,也取得了显著成效,但综合考虑各种因素,根除计划并不适用于我国。国内商品化的 IBR 疫苗近两年才获得新兽药证书并上市,为牛病毒性腹泻/黏膜病、牛传染性鼻气管炎二联灭活疫苗,这为国内 IBR 疫苗的研发打下了基础,同时也说明加强病原检测技术和方法研究对预防和控制

该病的重要性。

综上所述,检测 IBRV 的方法各种各样,但是每种方法都有其优缺点和实用性,qPCR 方法、LAMP 方法和基因芯片技术相较于 PCR 方法,敏感性高、特异性强、高效、不易出现假阴性结果,且 LAMP 方法和基因芯片技术是近期出现的较为先进和有代表性的新型检测方法,操作简便,临床上可达到高通量、快速检测的目的。血清学检测中 ELISA 方法为 OIE 指定的检测 IBRV 的方法之一,且在国外也有商品化的试剂盒应用,而间接免疫荧光方法虽然需要病毒接种细胞后才能进行,但该方法相较于 ELISA 方法特异性强,敏感性高,不会出现假阳性,这两种方法均成本低,可实现大批量检测。但在实际情况下还应因地制宜,具体情况具体分析。胶体金检测技术和 LAMP 方法特别适合于广大基层检验人员以及大批量检测和大面积普查等,其结果快速且肉眼可见,具有巨大的发展潜力和广阔的应用前景。而 qPCR、ELISA、间接免疫荧光和中和试验等需要在实验室条件下进行,中和试验结果虽然易受多种因素影响,耗时费力,但却是最标准、最经典的血清抗体检测方法,也是 OIE 指定的试验检测方法之一。以上方法均可推荐使用,并且随着分子生物学技术的不断发展与革新,IBRV 的检测方法会越来越具有高效、敏感、快速、特异的特点,能在 IBR 的控制和根除中起到重要作用,同时我国也应该制定更严格的进口检疫政策,及时实施免疫预防措施,并加强饲养管理,控制环境卫生,从而使养牛业向着更加健康的方向发展。

参考文献:

- [1] 薛飞,朱远茂,马磊.我国牛传染性鼻气管炎研究现状及防控展望[J].中国奶牛,2016,6:39-43.
Xue F, Zhu Y M, Ma L. Research status and prevention and control of bovine infectious rhinotracheitis in China[J]. China Dairy Cattle, 2016, 6: 39-43.
- [2] Benoit Muylkens, Julien Thiry, Philippe Kirten, et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis[J]. Vet Res, 2007, 38(2): 181-209.

- [3] Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [M]. Edited by OIE, 2018.
- [4] 颜邦芬. 牛传染性鼻气管炎病毒抗体间接 ELISA 的建立及其在流行病学研究中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007. Yan B F. Establishment of indirect ELISA for infectious bovine rhinotracheitis virus antibody and its application in epidemiological studies[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007.
- [5] 谢春芳, 于瑞嵩, 李震, 等. 规模化奶牛场牛传染性鼻气管炎与牛病毒性腹泻的流行病学调查[J]. 中国奶牛, 2016, 4: 38-41. Xie C F, Yu R S, Li Z, *et al.* Epidemiological survey of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea in large-scale dairy farms [J]. China Dairy Cattle, 2016, 4: 38-41.
- [6] 刘洁琼, 张鲁安. 新疆部分规模化牛场牛传染性鼻气管炎的流行病学调查[J]. 草食家畜, 2016(2): 37-39. Liu J Q, Zhang L A. Epidemiological survey of infectious bovine rhinotracheitis in some large-scale cattle farms in Xinjiang[J]. Grass-Feeding Livestock, 2016(2): 37-39.
- [7] 何小丽, 李凡飞, 张凯, 等. 国内外牛传染性鼻气管炎的流行现状及防控措施的研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2018(6): 53-57. He X L, Li F F, Zhang K, *et al.* Epidemiology and control of infectious bovine rhinotracheitis in the domestic and overseas[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018(6): 53-57.
- [8] 孔繁德, 徐淑菲, 周斌华, 等. 进口奶牛牛传染性鼻气管炎病毒的分离与鉴定[J]. 中国动物检疫, 2006, 23(4): 29-30. Kong F D, Xu S F, Zhou B H, *et al.* Isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus in imported cows[J]. Chinese Journal of Animal Quarantine, 2006, 23(4): 29-30.
- [9] 冷雪, 李东丽, 葛桂阳, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒的分离鉴定及其遗传进化分析[J/OL]. 中国兽医科学. <https://doi.org/10.16656/j.issn.1673-4696.2019.0125>. Leng X, Li D L, Ge G Y, *et al.* Isolation, identification and genetic evolution analysis of infectious bovine rhinotracheitis virus [J/OL]. Veterinary Science in China. <https://doi.org/10.16656/j.issn.1673-4696.2019.0125>.
- [10] Mullis K B, Faloona F A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction [J]. Methods in Enzymology, 1987, 155: 335-350.
- [11] 林梅, 缪德年, 黄克和, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 PCR 检测方法的建立[J]. 中国奶牛, 2015(14): 23-26. Lin M, Miao D N, Huang K H, *et al.* Establishment of PCR detection method for infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. China Dairy Cattle, 2015(14): 23-26.
- [12] 徐娜, 杨帆, 雷宇, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒双重 PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2017, 38(12): 5-8. Xu N, Yang F, Lei Y, *et al.* Establishment of double PCR detection method for infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2017, 38(12): 5-8.
- [13] 范晴, 谢芝勋, 谢志勤, 等. 牛支原体、牛病毒性腹泻病毒和牛传染性鼻气管炎病毒三重二温式 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 动物医学进展, 2018, 39(2): 43-48. Fan Q, Xie Z X, Xie Z Q, *et al.* Establishment and application of triple two-temperature PCR detection method for bovine mycoplasma, bovine viral diarrhea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2018, 39(2): 43-48.
- [14] 杨帆, 徐娜, 雷宇, 等. 牛副流感 3 型病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛病毒性腹泻病毒和牛支原体多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(5): 411-415. Yang F, Xu N, Lei Y, *et al.* Establishment of multiple PCR detection methods for bovine para-influenza virus type 3, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine viral diarrhea virus and bovine mycoplasma [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2018, 40(5): 411-415.
- [15] 季新成, 牛国辉, 员丽娟, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒内标荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(6): 738-743, 747. Ji X C, Niu G H, Yuan L J, *et al.* Establishment and application of internal standard fluorescent quantitative PCR detection method for infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2010, 30(6): 738-743, 747.
- [16] 谢志勤, 谢芝勋, 范晴, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒和牛病毒性腹泻病毒双重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2019, 40(3): 20-25. Xie Z Q, Xie Z X, Fan Q, *et al.* Establishment of dual fluorescent quantitative PCR assay for infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine viral diarrhea virus [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2019, 40(3): 20-25.
- [17] 宋爽, 赵柏林, 曲萍, 等. 牛病毒性腹泻病毒、牛传染性鼻气管炎病毒和口蹄疫病毒多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方

- 法建立[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(2): 133–136.
- Song S, Zhao B L, Qu P, *et al.* Establishment of multiple TaqMan real-time PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and foot-and-mouth disease virus[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(2): 133–136.
- [18] 张颖慧, 岳华, 汤承, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒恒温隔绝式荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 419(6): 601–604, 640.
- Zhang Y H, Yue H, Tang C, *et al.* Establishment of thermostatic isolation fluorescent PCR assay for infectious bovine rhinotracheitis virus[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 419(6): 601–604, 640.
- [19] Shubhada K Chothe, Aswathy Sebastian, Asha Thomas, *et al.* Whole-genome sequence analysis reveals unique SNP profiles to distinguish vaccine and wild-type strains of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1)[J]. Virology, 2018, 522: 27–36.
- [20] 郭利, 李家伟, 姚庆, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 LAMP 方法的建立与 PCR 方法的对比研究[J]. 中国奶牛, 2017(11): 25–29.
- Guo L, Li J W, Yao Q, *et al.* Establishment of infectious bovine rhinotracheitis virus by LAMP and comparison of PCR[J]. China Dairy Cattle, 2017(11): 25–29.
- [21] 郭利, 李建友, 李家伟, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 nano-PCR 与 LAMP 及 PCR 检测方法的对比研究[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(8): 951–956.
- Guo L, Li J Y, Li J W, *et al.* Comparison of infectious bovine rhinotracheitis virus nano-PCR with LAMP and PCR[J]. Veterinary Science in China, 2017, 47(8): 951–956.
- [22] 高峰, 王建峰, 于伯华, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(5): 87–90.
- Gao F, Wang J F, Yu B H, *et al.* Establishment of LAMP detection method for infectious bovine rhinotracheitis virus[J]. Chinese Journal of Animal Quarantine, 2018, 35(5): 87–90.
- [23] 董世娟, 冯蒙, 于瑞嵩, 等. 牛传染性鼻气管炎 LAMP 检测方法的建立和应用[J]. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1587–1595.
- Dong S J, Feng M, Yu R S, *et al.* Establishment and application of LAMP detection method for infectious bovine rhinotracheitis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(10): 1587–1595.
- [24] Malla J A, Chakravarti S, Gupta V, *et al.* Novel polymerase spiral reaction (PSR) for rapid visual detection of bovine herpesvirus 1 genomic DNA from aborted bovine fetus and semen[J]. Gene, 2017, 4: 1–6.
- [25] 季新成. 牛传染性鼻气管炎病毒和牛病毒性腹泻病毒分子生物学检测技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- Ji X C. Molecular biological detection technology of infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine viral diarrhea virus[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2010.
- [26] 陈圣军, 孔繁德, 徐淑菲, 等. 牛传染性鼻气管炎和赤羽病基因芯片检测方法的建立和应用[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(12): 980–984.
- Chen S J, Kong F D, Xu S F, *et al.* Establishment and application of gene chip detection method for infectious bovine rhinotracheitis and red feather disease[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(12): 980–984.
- [27] 魏春霞, 孙森, 赵炜, 等. 牛布鲁氏菌病、结核、炭疽、口蹄疫、病毒性腹泻黏膜病、副流感、传染性鼻气管炎可视化基因芯片检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(4): 6–15.
- Wei C X, Sun M, Zhao W, *et al.* Establishment of visible gene chip detection method for brucella, anthrax, bovine tuberculosis, foot-and-mouth disease, bovine viral diarrhea, bovine parainfluenza, and infectious bovine rhinotracheitis[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(4): 6–15.
- [28] 曹翀, 曹永生, 宋林, 等. 牛传染性鼻气管炎病 gB 蛋白的截短表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(2): 123–127.
- Cao C, Cao Y S, Song L, *et al.* Truncated expression of gB protein in infectious bovine rhinotracheitis and establishment of indirect ELISA[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2015, 37(2): 123–127.
- [29] Bertolotti L, Muratore E, Nogarol C, *et al.* Development and validation of an indirect ELISA as a confirmatory test for surveillance of infectious bovine rhinotracheitis in vaccinated herds[J]. BMC Veterinary Research, 2015, 11(1): 300.
- [30] 马辉, 边传周, 王永芬, 等. 牛传染性鼻气管炎 gC 蛋白单克隆抗体的制备与初步应用[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(10): 1637–1644.
- Ma H, Bian C Z, Wang Y F, *et al.* Preparation and preliminary application of monoclonal antibody against infectious bovine rhinotracheitis gC protein[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2013, 44(10): 1637–1644.

- [31] 周跃辉. 牛传染性鼻气管炎病毒糖蛋白 gD 单抗制备及其抗原表位鉴定与双抗夹心 ELISA 的建立[D]. 哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 2015.
- Zhou Y H. Identification of an antigen epitope on the glycoprotein D with monoclonal antibody and establishment of a double antibody sandwich ELISA for infectious bovine rhinotracheitis virus [D]. Harbin: Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015.
- [32] 向文杰. 牛传染性鼻气管炎病毒单克隆抗体的制备及阻断 ELISA 方法的建立[D]. 哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 2019.
- Xiang W J. Preparation of monoclonal antibody against bovine infectious rhinotracheitis virus and establishment of blocking ELISA method [D]. Harbin: Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.
- [33] 张帆. 我国奶牛 IBR 流行情况 Meta 分析及其 gE-iELISA 方法的建立[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- Zhang F. Meta-analysis of IBR epidemic situation in dairy cows in China and establishment of gE-iELISA [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2019.
- [34] Barbara Colitti, Elvira Muratore, Maria Elena Careddu, *et al.* Field application of an indirect gE ELISA on pooled milk samples for the control of IBR in free and marker vaccinated dairy herds [J]. BMC Veterinary Research, 2018, 14: 387.
- [35] 霍蕾. 用 PCR 法检测牛传染性鼻气管炎病毒方法的建立及初步应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.
- Huo L. Establishment and preliminary application of PCR method for detection of infectious bovine rhinotracheitis virus [D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2005.
- [36] 陈天祥, 李有成. 间接血凝检测牛传染性鼻气管炎抗体的探讨[J]. 中国畜禽传染病, 1987(5): 35-36.
- Chen T X, Li Y C. Discussion of indirect hemagglutination detection method of antibodies against infectious bovine rhinotracheitis [J]. Chinese Journal of Animal and Poultry Infections Diseases, 1987(5): 35-36.
- [37] 杨春明. 刚察地区牛传染性鼻气管炎的血清学调查[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2003, 33(2): 39.
- Yang C M. Serological investigation of infectious bovine rhinotracheitis in Gangcha area [J]. Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2003, 33(2): 39.
- [38] 王武军, 徐淑菲, 孔繁德, 等. 牛传染性鼻气管炎抗体的纳米胶体金斑点免疫渗滤法检测[J]. 中国兽医科学, 2012, 42(8): 831-836.
- Wang W J, Xu S F, Kong F D, *et al.* Detection of bovine infectious rhinotracheitis antibody by nano-colloidal gold spot immunofiltration assay [J]. Veterinary Science in China, 2012, 42(8): 831-836.
- [39] 梅力, 李永清, 宋彦军, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒抗体胶体金检测试纸条的制备[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(1): 39-43, 45.
- Mei L, Li Y Q, Song Y J, *et al.* Preparation of infectious bovine rhinotracheitis virus antibody colloidal gold test strip [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(1): 39-43, 45.

(编辑:李文平)