

牛传染性鼻气管炎可视化 LAMP 检测方法的建立和应用

董世娟*, 冯蒙*, 于瑞嵩, 谢春芳, 陈冰清, 李震

上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106

董世娟, 冯蒙, 于瑞嵩, 等. 牛传染性鼻气管炎可视化 LAMP 检测方法的建立和应用. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1587-1595.
Dong SJ, Feng M, Yu RS, et al. Establishment and application of visual LAMP detection method of infectious bovine rhinotracheitis virus. Chin J Biotech, 2018, 34(10): 1587-1595.

摘要: 根据牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)*gB* 基因保守序列(GenBank Accession No. DQ006857.1), 利用 Primer Explorer V4 软件设计 3 对 LAMP 引物, 通过反应体系的优化、敏感性试验和特异性试验, 建立 IBRV 的 LAMP 检测方法, 并对 393 份临床样本进行了检测应用。结果显示, 建立的 IBRV LAMP 方法在 65 °C、50 min 条件下可扩增出 LAMP 特征性梯状条带, 并可通过颜色变化判定结果。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 1 000 倍, 且与牛病毒性腹泻病毒、猪伪狂犬病毒、水泡口炎病毒等均无交叉反应。应用该方法检测 301 份鼻腔拭子和 92 份血清样本, 阳性率分别为 87.6% 和 58.8%, 表明鼻腔棉拭子更适用于 IBRV 的临床检测。文中建立的 IBRV LAMP 方法具有可视化、快速、特异、灵敏性强的优势, 适合基层和现场对临床样本进行快速检测, 为 IBR 的防控提供了技术支持。

关键词: 牛传染性鼻气管炎病毒, 环介导等温扩增方法, *gB* 基因

Establishment and application of visual LAMP detection method of infectious bovine rhinotracheitis virus

Shijuan Dong*, Meng Feng*, Ruisong Yu, Chunfang Xie, Bingqing Chen, and Zhen Li

Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Animal Husbandry and Veterinary Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

Abstract: Three pairs of primers were designed according to the conserved region of IBRV *gB* gene published in GenBank(GenBank Accession No. DQ006857.1) using the software Primer Explorer V4. The loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay was established by optimization of the reaction system and then evaluated through sensitivity and specificity tests. In total 393 clinical specimens were detected for IBRV using the established LAMP assay performed at 65 °C for 50 min, which produced a ladder-like pattern of amplification bands and the detection result could be judged by color change. The sensitivity of the assay was 10 copies/μL plasmid DNA which was 1000 times higher than that by PCR method and equivalent to nested-PCR. There was no cross-reactivity of the assay with bovine viral diarrhea virus (BVDV),

Received: January 5, 2018; **Accepted:** May 10, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31602060).

Corresponding author: Zhen Li. Tel: +86-21-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (No. 31602060) 资助。

pseudorabies virus (PRV) and vesicular stomatitis virus (VSV). The positive rate of 301 nasal swabs and 92 serum specimens were 87.6% and 58.8%, respectively, which meant nasal swab specimen was more suitable for clinical IBRV detection by the method. The IBRV LAMP method established in this study has the advantages of visualization, quickness, specificity and sensitivity and be suitable for rapid detection of clinical IBRV detection on the spot.

Keywords: infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV), Loop mediated isothermal amplification (LAMP), *gB* gene

牛传染性鼻气管炎 (IBR) 是由牛传染性鼻气管炎病毒 (IBRV) 又名牛疱疹病毒 I 型 (BHV-1), 引起的以高热、呼吸困难和上呼吸道炎症为主的接触性传染病^[1], 在世界范围内流行, 被世界卫生组织定为 B 类传染病。IBRV 可侵袭多种组织和器官, 引起严重的呼吸道疾病和生殖道疾病, 导致动物产奶量降低、全身性感染及流产等, 是奶牛场的一个主要的病原, 给奶牛场造成了巨大的经济损失^[2-3]。牛感染 IBRV (包括减毒疫苗株)^[4]后, 易发生潜伏感染而长期带毒, 由此造成群体感染, 使得病原清除和防控都极其困难。目前只有欧洲启动了 IBR 的根除计划^[5], 一些国家已经成功根除该病^[6-7]。我国部分地区牛场的 IBRV 抗体阳性率为 28%–93%^[8], 说明 IBRV 在我国牛群中已普遍存在。准确、快速、特异地检测出 IBRV 是有效诊断和预防 IBR 的关键。目前, 普遍应用 PCR、ELISA、免疫组化、病毒分离及中和试验等方法检测 IBRV^[9-11], 这些方法存在操作繁杂、敏感性不高、费时费力、需要专业仪器等缺陷, 使得这些方法均很难在基层牛场应用, 因此迫切需要建立一种敏感、特异和简便的 IBRV 检测方法。

环介导等温扩增 (LAMP) 方法, 是由 Notomi 等^[12]于 2000 年开发的一种新的核酸等温扩增方法, 在等温条件下, 可快速、高效、灵敏地扩增目的基因序列。由于其灵敏度高、特异性强、不需要复杂的仪器和专业人员, 更适合在基层部门和现场应用。近年来, 该方法已广泛应用于病原微生物检测、医疗卫生、食品安全检测等方面。为了能有效快速地检测 IBRV, 本研究拟以 IBRV 的 *gB* 基因为靶基因, 选择高度保守区域设计 3 对特异性引物, 建立检测 IBRV 的 LAMP 方法, 为

IBR 的早期诊断及防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 毒株与样品

IBRV 毒株由华中农业大学农业微生物国家重点实验室郭爱珍教授惠赠; 水泡性口炎病毒 (VSV)、伪狂犬病毒 (PRV)、牛病毒性腹泻 (BVDV) 由本实验室保存。301 份鼻腔拭子和 92 份血清样本分别来自上海市崇明岛的两个奶牛场。

1.2 试剂与仪器

甜菜碱 (Betaine)、羟基萘酚蓝 (HNB) 等购自 Sigma 公司。Bst 2.0 DNA 聚合酶购自 NEB 公司。电热恒温水浴锅为上海精宏实验设备有限公司产品。凝胶成像系统为上海天能科技有限公司产品。

1.3 引物设计与合成

基于 NCBI 数据库中发表的 IBRV 的 *gB* 基因序列 (GenBank Accession No. DQ006857.1), 分析比对后, 选择其保守区域, 利用在线软件 Primer Explorer V4 设计 IBRV 的 3 对特异性 LAMP 引物和 nested-PCR 引物 (表 1), 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.4 病毒 DNA 抽提

采用 AxyPrep 基因组 DNA 小量试剂盒提取 IBRV 及临床样本 DNA, 按照试剂盒说明书进行操作。

1.5 阳性质粒的制备

以 IBRV 细胞培养物提取的 DNA 为模板, P1、P2 为引物, 进行 PCR 扩增, 在 25 μ L 反应体系中依次加入 DNA 1.0 μ L, 引物 P1、P2 1.0 μ L (10 μ mol/L); Taq 聚合酶 MiX 12.5 μ L; ddH₂O 9.5 μ L。按如下程序进行扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s,

64 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 目的片段克隆至 pMD18-T 载体, 转入 DH5 α 感受态细菌中, 摇菌后, 提取质粒并纯化, 将回收的质粒经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 送博尚生物公司进行测序。经测序验证的阳性质粒作为 DNA 标准品, 利用核酸蛋白分析仪检测质粒的浓度及纯度, 进行 10 倍系列稀释, 用于 LAMP 方法的敏感性实验。

1.6 LAMP 反应及反应体系的优化

1.6.1 LAMP 反应

利用 3 对特异性引物, 以 IBRV 细胞培养物提取的 DNA 为模板进行 LAMP 扩增, 设置阴性对照 (以 ddH₂O 为模板)。25 μ L 反应体系中依次加入: 10 \times Isothermal Amplification Buffer (20 mmol/L

Tris-HCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 10 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgSO₄, 0.1% Tritonx -100, pH 8.8) 2.5 μ L, 混合引物 (FIP/BIP: LF/LB: F3/B3 按浓度比为 40 μ mol/L: 10 μ mol/L: 5 μ mol/L 的等量混合) 6 μ L, 10 mmol/L dNTPs 3.5 μ L, 100 mmol/L MgSO₄ 2.0 μ L, 4.0 mol/L 甜菜碱 1.0 μ L, 8 000 U/mL Bst 2.0 DNA 聚合酶 1.0 μ L, 3 mmol/L HNB 1.0 μ L 和 DNA 1.0 μ L 模板, DEPC 水补至 25 μ L, 充分涡旋、混匀, 置于 65 °C 水浴锅或金属浴中保温 50 min 后终止反应。

1.6.2 LAMP 反应体系的优化

通过改变 LAMP 反应体系中 dNTPs、MgSO₄ 以及混合引物的浓度从而优化反应体系, 体系配比见表 2, 要求 LAMP 体系配置完成后, 反应管

表 1 LAMP 引物序列表

Table 1 Primers for LAMP

	Primers	Sequence (5'-3')	Location in <i>gB</i> gene	Length (bp)
Lamp	F3	CGAGCACACCAGCTACTCG	981-999	
	B3	TCTCGCAGCATTTTCGTCC	1 170-1 187	
	FIP	AGACCGGCTCCTTGAGGCGCGG AGCGCTTCCAGCA		
	BIP	CGCGGAACTTTTTCGCTACACA GCCAGCGAGCACACGT		
	LF	TCGCGCTTGTAGTAGCCCTC	1 021-1 040	
	LB	TGGGTGCCCAAGCGCAA	1 120-1 137	
	Nested-PCR	Outer forward primer (P1)	GGCTCTACCGCACGGGCACCTCT	836-858
Outer reverse primer (P2)		GCGGCTCTCGTCTCGCAGCATTT	1 175-1 197	
Inner forward primer (P3)		GCGCTCTCGACCGGGGACATT	916-936	245
Inner reverse primer (P4)		CACTTGGCCAGCGAGCACACG	1 140-1 160	

表 2 LAMP 反应体系的优化

Table 2 Optimization of LAMP reaction system

No.	Mg ²⁺ (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	Rate of primers concentration (inner:loop:outer)
1	6.0	1.0	20 μ mol/L:5 μ mol/L:2.5 μ mol/L
2	6.0	1.4	40 μ mol/L:10 μ mol/L:5 μ mol/L
3	6.0	1.6	40 μ mol/L:20 μ mol/L:5 μ mol/L
4	8.0	1.0	40 μ mol/L:10 μ mol/L:5 μ mol/L
5	8.0	1.4	40 μ mol/L:20 μ mol/L:5 μ mol/L
6	8.0	1.6	20 μ mol/L:5 μ mol/L:2.5 μ mol/L
7	10.0	1.0	40 μ mol/L:20 μ mol/L:5 μ mol/L
8	10.0	1.4	20 μ mol/L:5 μ mol/L:2.5 μ mol/L
9	10.0	1.6	40 μ mol/L:10 μ mol/L: 5 μ mol/L

溶液呈紫色，反应后阳性对照呈蓝色，阴性对照颜色不变，并且琼脂糖凝胶电泳条带清晰分明。

1.7 结果的判定

在 LAMP 扩增结束后，肉眼直接观察阳性对照和阴性对照管的反应液颜色是否改变。另取扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳，80 V、55 min 后，用紫外凝胶成像系统进行分析。

1.8 LAMP 反应的敏感性试验

将已知拷贝数的质粒稀释至拷贝数为 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 、 1×10^0 和 1×10^{-1} ，分别作为模板，进行 LAMP 反应。反应结束后，通过肉眼直接判断结果。LAMP 敏感性试验独立重复 3 次，3 次结果完全一致认为可信，并与实验室建立的 nested-PCR 方法的敏感性进行对比。nested-PCR 反应体系如下：2×Taq Plus Master Mix 12.5 μL、ddH₂O 9.5 μL、IBRV 上游引物和 IBRV 下游引物各 1 μL、DNA 模板 1 μL；第一轮 PCR 反应条件为：94 °C 4 min；94 °C 30 s，64 °C 30 s，72 °C 30 s，30 个循环；72 °C 10 min。第二轮 PCR 反应条件为：94 °C 4 min；94 °C 30 s，60 °C 30 s，72 °C 25 s，20 个循环；72 °C 10 min。

1.9 LAMP 反应的特异性试验

分别用经过 PCR 或 RT-PCR 鉴定过的 PRV、VSV 及 BVDV 作为 LAMP 反应的模板，IBRV 细胞培养物作为阳性对照，DEPC 水作为阴性对照，按照建立的体系和条件进行 LAMP 反应。

1.10 临床样本检测

应用建立的 IBRV-LAMP 体系对采集到的上海市崇明岛奶牛场的 301 份奶牛鼻腔拭子和 92 份血清样本进行检测，通过可视化判断结果。重复试验 3 次，3 次结果完全一致认为可信。另外，应用 nested-PCR 对这些临床样本进行对比检测，运用 EXCEL 计数资料检验，分别配对分析 LAMP 和 nested-PCR 检测鼻拭子与血清样本中 IBRV 的结果。

2 结果与分析

2.1 LAMP 基础反应

按照 LAMP 反应体系配制反应液，阴、阳对照管均呈紫色；反应后，阳性对照管呈天蓝色，阴性对照管颜色不变（图 1）。LAMP 反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳，阳性对照呈现 LAMP 反应特有的梯状条带，阴性对照只有小于 100 bp 的引物聚集物条带（图 2）。

2.2 LAMP 反应体系的确定

以 IBRV 的 DNA 为模板，按照表 2 中的优化体系进行 LAMP 扩增，结果显示表中 2 和 3 的配比产物在反应前颜色已变为蓝色，所以 2 和 3 的配比弃掉。其余配比扩增产物反应后颜色均变为蓝色，经琼脂糖凝胶电泳后均呈现梯形条带（图 3），但



图 1 LAMP 反应的可视化验证

Fig. 1 Visual identification of LAMP reaction. 1: positive control; 2: negative control.

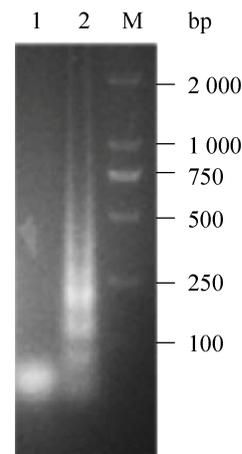


图 2 LAMP 反应产物凝胶电泳分析

Fig. 2 Gel electrophoresis analysis of LAMP products. 1: negative control; 2: positive control; M: marker.

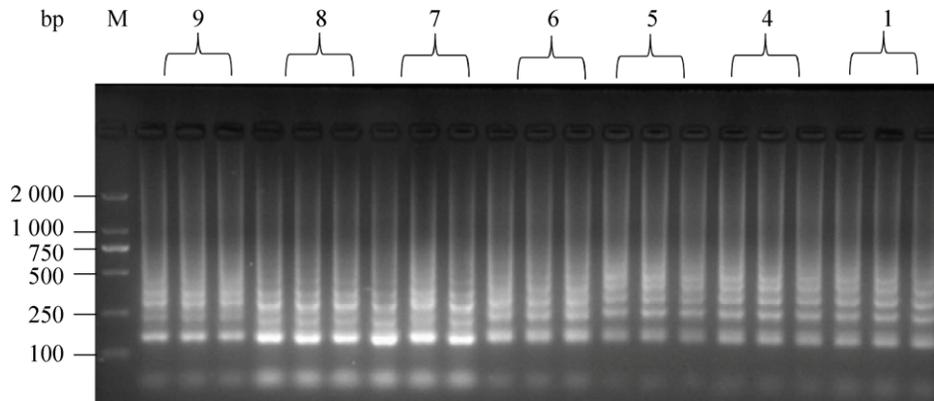


图3 LAMP 反应体系的优化

Fig. 3 Optimization of LAMP reaction system. 1,4-9: different reaction systems according to the table 2 were repeated three times.

配比 5 的条带更清晰, 选择配比 5 作为优化后的体系。体系中 MgSO_4 的浓度调整为 6 mmol/L, 即 100 mmol/L MgSO_4 加入的体积调整为 1.5 μL , 混合引物 FIP/BIP: LF/LB: F3/B3 按浓度比调整为 40 $\mu\text{mol/L}$: 20 $\mu\text{mol/L}$: 5 $\mu\text{mol/L}$ 的等量混合, 其余组分不变。

2.3 LAMP 与 nested-PCR 的敏感性比较

将已知拷贝数的阳性质粒, 进行 10 倍系列稀释, 拷贝数分别为 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 、 1×10^0 、 1×10^{-1} , 分别进行 LAMP、nested-PCR、PCR 扩增。LAMP 反应通过可视化可以检测到 10 copies/ μL 的质粒, 3 次独立重复试验结果一致 (图 4), 凝胶电泳结果显示 nested-PCR 方法可以检测到 10 copies/ μL 的质粒 (图 5A), PCR 检测到 1×10^4 copies/ μL 的质粒 (图 5B)。上述数据表明, LAMP 反应与 nested-PCR 反应敏感性相当, 比 PCR 敏感 1 000 倍。

2.4 LAMP 反应特异性

分别以 PRV、VSV 及 BVDV 作为 LAMP 反应的模板, IBRV 作为阳性对照, ddH₂O 作为阴性对照, 按照建立的体系和条件进行 LAMP 扩增。凝胶电泳结果显示只有阳性对照出现 LAMP 特征性条带, 其他病毒均未检测到 LAMP 反应特征性

条带 (图 6)。可视化结果显示, 阳性对照管的反应液呈现天蓝色, 其余病毒的反应液均呈紫色, 与阴性对照一致 (图 7)。

2.5 LAMP 方法临床应用

利用建立的 LAMP 方法对来自上海市崇明岛地区两个奶牛场的 301 份鼻腔拭子和 92 份血清样本进行 IBRV 检测, 部分阳性样品的凝胶电泳图见图 8。同时应用 nested-PCR 进行对比检测, 检测结

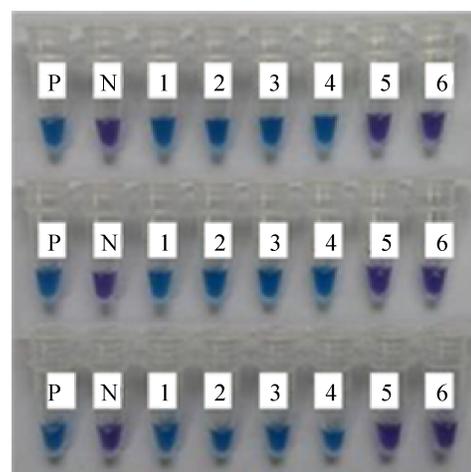


图4 LAMP 反应敏感性

Fig. 4 Sensitivity of LAMP. 1-6: the concentration of standard plasmid is 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1×10^0 , 1×10^{-1} copies/ μL .

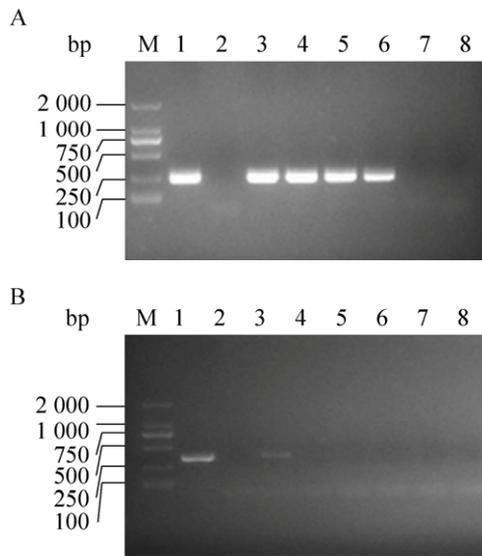


图5 Nested-PCR 与 PCR 反应敏感性

Fig. 5 Sensitivity of nest-PCR and PCR. (A) Nested-PCR. (B) PCR. M: marker; 1: positive control; 2: negative control; 3–8: the concentration of standard plasmid is 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1×10^0 , 1×10^{-1} copies/ μ L.

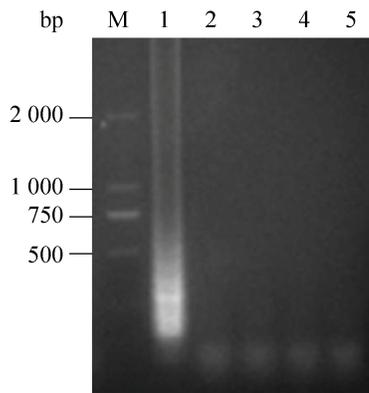


图6 LAMP 反应特异性

Fig. 6 Specificity of LAMP. M: marker; 1: IBRV; 2: negative control; 3: PRV; 4: BVDV; 5: VSV.

果见表 3。两种方法的检测结果，以配对计数资料形式列出，如表 4 和表 5 所示。nested-PCR 和 LAMP 对鼻拭子和血清样本的检测结果的符合率按以下公式计算：

$$\text{两法符合率} = \frac{a+d}{n}, (n=a+b+c+d)$$

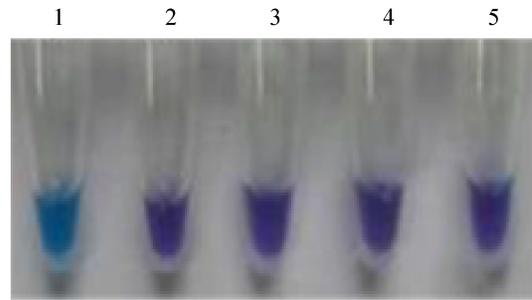


图7 LAMP 反应特异性的可视化

Fig. 7 Visual detection of LAMP specificity. 1: positive control; 2: negative control; 3: PRV; 4: BVDV; 5: VSV.

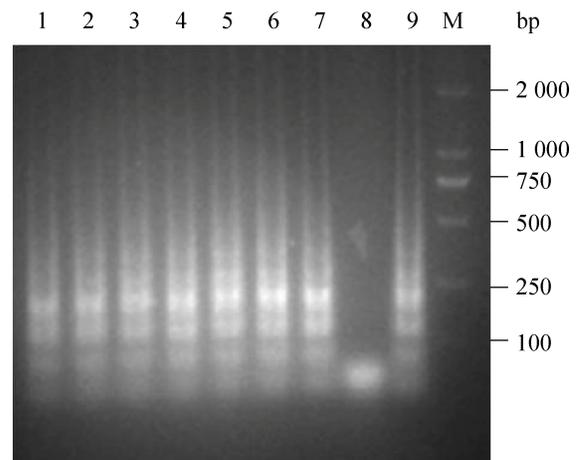


图8 部分阳性样品凝胶电泳分析

Fig. 8 Gel electrophoresis analysis of partial positive samples. 1–7: positive samples, 8: negative control, 9: positive control, M: marker.

计算得到，两种方法检测鼻拭子的符合率为 97.01%，符合率极高；而对血清样本检测，两种方法符合率为 77.2%，低于对鼻拭子检测的符合率，两种方法检测所有样本的总符合率为 92.4%。应用配对资料的卡方检验 (McNemar 检验) 比较 nested-PCR 和 LAMP 对 IBRV 的检出率是否存在差别，结果两种方法对鼻拭子和血清样本的检出率的 P 值均大于 0.05，说明这两种检测方法对于鼻拭子样本和血清样本的检出率差异不显著。

表 3 应用 LAMP 及 nested-PCR 方法检测奶牛场 IBRV 的结果

Table 3 IBRV detection results by LAMP and nested-PCR in farm

Farm	Origin	Sample number	Number of positive samples		Positive rate (%)		Total positive rate (%)	
			LAMP	Nested-PCR	LAMP	Nested-PCR	LAMP	Nested-PCR
No.1	Nasal swab	209	166	162	79.4	77.5	87.6	87.1
No.2	Nasal swab	92	88	89	95.7	96.7		
No.1	Serum	56	27	28	48.2	50.0	58.8	51.4
No.2	Serum	36	25	19	69.4	52.8		

表 4 LAMP、nested-PCR 方法检测鼻拭子样本的结果对比

Table 4 Comparison of results from nasal swabs by LAMP and nested-PCR

Paired count data	LAMP		
	+	-	Total
Nested-PCR +	248 (a)	3 (b)	251 (a+b)
Nested-PCR -	6 (c)	44 (d)	50 (c+d)
Total	254 (a+c)	47 (b+d)	301 (N)

表 5 LAMP、nested-PCR 检测血清样本的结果对比

Table 5 Comparison of results from serums by LAMP and nested-PCR

Paired count data	LAMP		
	+	-	Total
Nested-PCR +	39 (a)	8 (b)	47 (a+b)
Nested-PCR -	13 (c)	32 (d)	45 (c+d)
Total	52 (a+c)	40 (b+d)	92 (N)

3 讨论

牛传染性鼻气管炎是牛常见的传染病之一，在全球范围内流行，具有高发病率和死亡率，每年给养牛业造成巨大的经济损失，引起越来越多的科学家和公共卫生部门的高度重视。由于 IBRV 感染牛后，病毒可在三叉神经节或腰荐神经节建立潜伏感染，目前还没有能完全清除该病毒的有效策略。因此，早期快速诊断在 IBR 防治中起着至关重要的作用。

由于基层部门和养殖场检测条件的限制，现

有的检测方法如 PCR、ELISA、病毒分离及中和试验方法等很难在现场实施。LAMP 检测技术是一种在恒温反应条件下进行的核酸扩增技术，在水浴锅内即可完成，反应结果可以进行可视化观察，且具有较高的灵敏性和特异性，已广泛应用于动物疫病的检测。本研究根据数据库中 IBRV gB 基因的保守序列设计引物，优化反应体系，在碱土金属离子指示剂羟基萘酚蓝 (HNB) 的作用下建立了 IBRV 的可视化 LAMP 检测方法。用该方法检测牛病毒性腹泻病毒、猪伪狂犬病毒、水泡性口炎病毒等病毒，均未检测到 LAMP 特异的梯状条带和反应液颜色的变化，表明该方法与上述病毒无交叉反应，特异性强。敏感性试验显示 LAMP 方法的敏感性与 nested-PCR 方法相当，较常规 PCR 提高 1 000 倍，可以检测到 10 copies/ μL ，显著高于其他研究建立的 IBRV LAMP 检测方法（分别为 2.23×10^3 copies/ μL 、 1.68×10^4 copies/ μL ）^[13-14]的灵敏度。与 Fan 等^[15]利用 GeXP 技术检测单一的 IBRV 基因的敏感性相当，高于检测 6 种牛病毒的多重 GeXP-PCR 方法的敏感性。本方法在反应体系中加入了 HNB 染料，由于反应副产物焦磷酸根离子和反应体系中的 Mg^{2+} 生成焦磷酸镁沉淀，不断消耗游离 Mg^{2+} ，反应前后的颜色显著改变，从而使 IBRV 的检测可视化，也避免开盖加入染料造成产物污染。综合敏感性和特异性试验，本研究建立的 LAMP 方法是高度灵敏和特异的，且具有检测程序便捷、所需设备简单和肉眼能判断结果的优势，适合基层部门及牛场对 IBRV 的快

速检测。

运用所建立的 LAMP 方法对来自上海市崇明岛地区两个奶牛场的 301 份鼻腔拭子和 92 份血清样本进行检测,两个奶牛场鼻腔拭子的阳性率分别为 79.4%、95.7%,血清病原阳性率分别为 48.2%、69.4%,与 nested-PCR 的检出率相比没有显著差异,证明 LAMP 方法在基层养殖场可以代替 nested-PCR 进行临床样本的检测。无论鼻拭子还是血清样本,1 号奶牛场的阳性率均低于 2 号奶牛场,在现场采样过程中,发现 1 号奶牛场的饲养管理条件远好于 2 号奶牛场,说明饲养管理条件是控制 IBR 的一个关键环节,良好的饲养条件能明显减少 IBR 的流行。2 号奶牛场棉拭子阳性率偏高,可能由于邻栏奶牛的采食不受限制,采集过程中会有交叉污染的现象,导致阳性率偏高。鼻腔拭子的检出率高于血清样本,分析原因是 IBRV 感染牛体后可通过鼻腔、泪液、流产胎儿以及阴道分泌物不定期向外界环境排毒,尤其在原发感染时,主要通过神经纤维向上呼吸道方向侵染,因此鼻腔拭子中 IBRV 的病毒载量高于血清,使得鼻腔拭子的检出率高于血清,证明鼻腔拭子样品更适用于 IBRV 的检测。鼻腔拭子样本 IBRV 的总阳性率为 87.6%,血清样本 IBRV 的总阳性率为 58.8%,证明这两个奶牛场大部分牛都携带 IBRV 病原,IBRV 防控形势严峻。

本实验室曾对这两个奶牛场采集血清样品进行 IBRV 抗体检测,共采集样品 385 份,抗体阳性率分别为 41.2%和 74.3%^[16],和其他地区 IBRV 抗体阳性率在同一范围(40%–90%)^[8,17]。本次检测到这两个场的棉拭子病原阳性率分别为 79.4%、95.7%,均相应高于该场的抗体阳性率。这种现象可能与 IBRV 侵染特性容易造成奶牛隐性感染有关,因此,还需在检测病原的同时,对全场进行血清抗体的检测,与病原检测结果进行比对,筛查潜伏感染的牛,及时进行排查和清除潜伏感染牛,提高 IBRV 的防控效率。

REFERENCES

- [1] Cai BX. Domestic Animal Infectious Disease. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1980: 186–187 (in Chinese).
蔡宝祥. 家畜传染病学. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1980: 186–187.
- [2] Raaperi K, Orro T, Viltrop A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. *Vet J*, 2014, 201(3): 249–256.
- [3] Newcomer BW, Givens D. Diagnosis and control of viral diseases of reproductive importance: infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 2016, 32(2): 425–441.
- [4] Van Der Maaten MJ, Miller JM, Whetstone CA. Ovarian lesions induced in heifers by intravenous inoculation with modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus on the day after breeding. *Am J Vet Res*, 1985, 46(9): 1996–1999.
- [5] Nardelli S, Farina G, Lucchini R, et al. Dynamics of infection and immunity in a dairy cattle population undergoing an eradication programme for infectious bovine rhinotracheitis (IBR). *Prevent Vet Med*, 2008, 85(1/2): 68–80.
- [6] Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol*, 2006, 113(3/4): 293–302.
- [7] Nandi S, Kumar M, Manohar M, et al. Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Health Res Rev*, 2009, 10(1): 85–98.
- [8] Zou SY, He QN, Liu L, et al. Epidemiological analysis of infectious bovine rhinotracheitis in six provinces and cities of North China. *Chin J Vet Med*, 2012, 48(2): 47–48 (in Chinese).
邹世颖, 何倩妮, 刘蕾, 等. 中国北方六省市牛传染性鼻气管炎病流行病学分析. *中国兽医杂志*, 2012, 48(2): 47–48.
- [9] Biswas S, Bandyopadhyay S, Dimri U, et al. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1)-a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Vet Quart*, 2013, 33(2): 68–81.
- [10] Graham DA, Mawhinney KA, Mcshane J, et al. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for quantitative estimation of

- antibodies specific for infectious bovine rhinotracheitis virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest*, 1997, 9(1): 24–31.
- [11] Yang SH, Wang CF, Gao YD, et al. Fast diagnosis of IBRV by nested-PCR Method. *Acta Ecol Anim Domast*, 2007, 28(4): 81–83 (in Chinese).
杨少华, 王长法, 高运东, 等. 利用巢氏 PCR 快速鉴定牛传染性鼻气管炎. *家畜生态学报*, 2007, 28(4): 81–83.
- [12] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): e63.
- [13] Huang FHP, Shi DM, Xu WB, et al. Development of a LAMP assay for detecting gE gene of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Chin J Vet Med*, 2016, 52(6): 14–16 (in Chinese).
皇甫和平, 石冬梅, 许文博, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 gE 基因 LAMP 检测方法的建立. *中国兽医杂志*, 2016, 52(6): 14–16
- [14] Guo L, Li JW, Yao Q, et al. Establishment of LAMP method for bovine herpesvirus type 1 and comparison with PCR. *Chin Dairy Cattl*, 2017(11): 25–29 (in Chinese).
- 郭利, 李家伟, 姚庆, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 LAMP 方法的建立及与 PCR 方法的对比研究. *中国奶牛*, 2017(11): 25–29.
- [15] Fan Q, Xie ZX, Xie ZQ, et al. Development of a GeXP-multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of six cattle viruses. *PLoS ONE*, 2017, 12(2): e0171287, doi: 10.1371/journal.pone.0171287.
- [16] Xie CF, Yu RS, LI Z, et al. Epidemiological investigation of bovine viral diarrhea and infectious bovine rhinotracheitis in dairy herds. *Chin Dairy Cattl*, 2016, 4: 38–41 (in Chinese).
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. *中国奶牛*, 2016, 4: 38–41.
- [17] Li DL, Zhao JY, Shen JL, et al. Risk assessment and epidemiological characteristics of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea in dairy herds in Beijing. *Chin Dairy Cattl*, 2013, 11: 31–33 (in Chinese).
李栋梁, 赵景义, 沈俊乐, 等. 北京地区奶牛场牛传染性鼻气管炎、牛病毒性腹泻风险评估及流行情况分析. *中国奶牛*, 2013, 11: 31–33.

(本文责编 郝丽芳)