

研究报告

可视化牛传染性鼻气管炎病毒快速检测

侯梦媛, 张铁男*, 白无忌

哈尔滨商业大学 食品科学与工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150028

侯梦媛, 张铁男, 白无忌. 可视化牛传染性鼻气管炎病毒快速检测[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4633-4643.

HOU Mengyuan, ZHANG Tienan, BAI Wuji. A visual rapid detection method for bovine infectious rhinotracheitis virus[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4633-4643.

摘要: 【背景】牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)是牛常见的易感病原体, 给畜牧业带来了重大经济损失, 亟须建立一种快速检测 IBRV 的方法。【目的】建立一种重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)和微流控芯片技术相结合的 IBRV 可视化快速检测方法。【方法】实验选择 IBRV 的 *ul52* 基因作为分子检测的目标片段。选择伪狂犬病毒、火鸡疱疹病毒、鸭瘟疱疹病毒作为对照组。通过不同稀释倍数 IBRV 的 DNA 提取液确定灵敏度。通过对 34 份疑似感染 IBRV 急性期病牛的血清和鼻拭子样本病原分离株的检测来分析本方法的适用性。【结果】*ul52* 基因扩增子大小为 403 bp, 扩增子测序结果显示, 得到的目标片段核酸序列与 IBRV 的 *ul52* 基因(NC_063268.1)相似性达 100%, 对照组未见扩增子, 检测限为 6.9×10^3 copies/ μ L。对 34 份疑似感染 IBRV 急性期病牛血清和鼻拭子样本病原分离株的检测结果显示, 编号分别为 SD0213、SD0518 和 SD0701 的牛感染了 IBRV, 血清和鼻拭子样本病原分离株检测结果一致。另外, 从样本 DNA 提取到获得检测结果的全流程时长为 110 min。【结论】本研究将 RPA、磁性探针捕获和微流控技术相结合, 建立了一种 IBRV 病毒的快速可视化分子检测方法, 该方法具有良好的特异性和灵敏度。

关键词: 传染性牛鼻气管炎病毒; 重组酶聚合酶扩增; 磁捕获; 微流控芯片技术

资助项目: 哈尔滨商业大学横向课题(HSDHX202104061)

This work was supported by the Harbin University of Commerce Horizontal Project (HSDHX202104061).

*Corresponding author. E-mail: 102615@hrbcu.edu.cn

Received: 2024-04-10; Accepted: 2024-07-01; Published online: 2024-07-24

A visual rapid detection method for bovine infectious rhinotracheitis virus

HOU Mengyuan, ZHANG Tienan^{*}, BAI Wuji

Key Laboratory for Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] Bovine infectious rhinotracheitis virus (IBRV) represents a common pathogenic threat to cattle, causing substantial economic losses in the livestock industry. Therefore, it is urgent to establish a rapid detection method for IBRV. [Objective] To establish a visual rapid detection method for IBRV by leveraging recombinase polymerase amplification (RPA) in conjunction with microfluidic chip. [Methods] The *ul52* gene of IBRV was selected as the target fragment for molecular detection. Pseudorabies virus, herpesvirus of turkey, and duck plague herpesvirus were selected as the controls. The DNA extract dilutions of IBRV were used to evaluate the sensitivity of the established method. Thirty-four serum and nasal swab specimens from the cattle exhibiting symptoms of acute IBRV infection were used to evaluate the applicability of the established method. [Results] The size of *ul52* gene amplicon was 403 bp. Sequencing results confirmed the amplicon as the *ul52* gene (NC_063268.1) of IBRV, with the homology of 100%, and no amplification was observed in the control groups. The limit of detection of the established method was 6.9×10^3 copies/ μL . Furthermore, the established method detected IBRV in cattle with the identification number of SD0213, SD0518, and SD0701, which were consistent with the strain isolation results from both serum and nasal swab specimens. The entire process, from sample preparation to result acquisition, required 110 min. [Conclusion] We successfully developed a visual rapid molecular detection method for IBRV by combining RPA, magnetic probe capture, and microfluidic chip. The established method demonstrates good specificity and sensitivity.

Keywords: infectious bovine rhinotracheitis virus; recombinase polymerase amplification; magnetic capture; microfluidic chip

牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)是一种引起牛呼吸道疾病的常见病毒。牛传染性鼻气管炎(infectious bovine rhinotracheitis, IBR)是一种高传染性疾病,临床症状包括上呼吸道感染、鼻炎、外阴阴道炎、气管炎、肠炎、结膜炎、流产和脑炎,甚至会导致犊牛发生全身性感染直至死亡^[1],目前也成为了全球性导致牛死亡率较高的病原体^[2-4],给畜牧养殖业造成巨大的经济损失^[5-6]。

因此,IBRV快速检测对减少畜牧养殖业经济损失具有重要的作用。目前,传统检测方法用时长且对检测人员的专业操作要求高。酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒多为进口,成本较高。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和荧光定量PCR这2种分子检测方法时间较短,灵敏度较高,但受限于精密仪器和专业技术人员,难以打破实验室的壁垒。因此,建立一种快速、

准确且灵敏的检测方法对于 IBRV 的快速诊断至关重要。

重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)是基于重组酶、单链结合蛋白和链置换 DNA 聚合酶的一种等温核酸扩增技术^[7]。该技术不需要模板的热变性,可在某一恒定温度下实现核酸扩增^[8]。RPA 的扩增产物可以通过琼脂糖凝胶电泳、侧流试纸和实时荧光检测设备进行可视化检测^[9]。微流控芯片技术能够解决样品前处理难度大、核酸扩增过程中不稳定、检测步骤烦琐等方面的问题,不仅能提高检测效率,最大限度地减少操作误差,还能降低检测成本。将 RPA 技术与微流控技术相结合,能够不依赖核酸扩增仪、凝胶成像系统等仪器的情况下实现对核酸的扩增及检测。目前,将 RPA 与微流控芯片联合使用的技术已成功应用于白斑综合征病毒、虾血细胞荧光病毒、沙门氏菌(*salmonella*)、SARS-CoV-2 等病原微生物的分子诊断^[10-12]。

相较于常规 PCR 分子检测方法,本研究不依赖大型实验仪器设备(PCR 仪、凝胶成像系统等),在特定恒定温度下可完成目标分子扩增,降低检测成本。此外,通过设计不同的特异性 RPA 引物和核酸探针,增加微流控芯片通道的数量,以期实现高通量的快速可视化分子检测,对病原微生物分子检测系统的构建提供参考价值。

1 材料与方法

1.1 病毒

牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV, 菌种保藏编号 CVCC AV1547)、伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV, CVCC AV25)、火鸡疱疹病毒(herpesvirus of turkey, HVT, CVCC AV1543)、鸭

瘟疱疹病毒(duck plague virus, DPV, CVCC AV1221)均购自国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心,所有样本均在-70 °C条件下保存。34 份疑似感染 IBRV 急性期病牛的血清和鼻拭子来自山东省某养牛场。

1.2 主要试剂和仪器

动物病毒 DNA/RNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;链霉亲和素磁珠,Invitrogen 公司。

垂直混合仪,常州德杜精密仪器有限公司;紫外可见分光光度仪,上海元析仪器有限公司;微流控芯片,苏州中芯启恒科学仪器有限公司;荧光显微镜,奥林巴斯(广州)工业有限公司。

1.3 芯片设计

微流控系统由微型注射泵和“一”字形通道的微流控芯片组成。微流控芯片材质是聚二甲基硅氧烷。芯片的直线通道距离是 41 mm,而通道的横截面尺寸是 100 μm×100 μm(长×宽)。磁铁置于微流控芯片底部,位于芯片的中央位置(图 1)。

1.4 病毒 DNA 的提取

按照动物病毒 DNA/RNA 提取试剂盒说明书提取 IBRV、PRV、HVT 和 DPV 样本的 DNA, DNA 提取液于-20 °C条件下保存备用。

1.5 IBRV 的 RPA 引物和探针设计

GenBank 数据库中检索到牛疱疹病毒 1 型[IBRV 属于牛疱疹病毒 1 型属(bovine herpesvirus 1, BHV-1)^[13]]的高度保守区 *ul52* 基因(NC_063268.1),使用 Primer 6.0 设计引物,扩增子大小为 403 bp,根据核酸扩增子中间序列设计与链霉亲和素磁珠偶联的探针,使用 FAM 标记下游引物的 5'端,探针 5'端含有 4 bp 不与扩增子互补的序列(减少 Biotin 引起空间位阻效应)。引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司

合成(表 1)。

1.6 磁性探针的合成

将链霉亲和素磁珠涡旋 20 s, 重悬磁珠。取 100 μL 磁珠(10 mg/mL)到新的离心管中, 磁吸去掉磁悬液, 用 1 mL PBS (pH 7.2)重悬磁珠, 加入 500 μL 用 1 mL PBS (pH 7.2)稀释的生物素修饰探针, 充分振荡重悬磁珠, 将离心管置于垂直混合仪上, 室温混合 30 min。磁吸去掉磁悬液, 再用 1 mL PBS (pH 7.2)重悬磁珠, 合成磁性探针, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。通过磁性探针浓度($\lambda=260\text{ nm}$ 吸光度)与初始探针浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)计算探针@磁珠的偶联率。

$$\text{偶联率} = \frac{C_1}{C_2} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中: C_1 为探针@磁珠浓度($\mu\text{mol/L}$), C_2 为初始探针浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)。

1.7 RPA 反应体系的建立

RPA 反应体积为 50 μL , 向反应管中依次

加入缓冲液 25 μL 、引物 F (10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL 、引物 R (10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , DNA 提取液 1 μL , 超纯水 15 μL , 混合均匀后置于掌上离心机中短暂离心, 添加醋酸镁(280 mmol/L) 5 μL 启动反应, 混合均匀后再次离心并进行重悬。将反应管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅静置 4 min, 取出反应管离心再次重悬, 最后将反应管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅 40 min。采用琼脂糖凝胶电泳初步分析 RPA 扩增子。

1.8 RPA 扩增子磁捕获及观察

使用 50 μL 酚:氯仿溶液(1:1)去除 RPA 产物中的蛋白, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 5 μL 上清液(RPA 扩增子溶液)和 25 μL 探针@磁珠(2 mg/mL)混合。95 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱孵育 5 min, 转移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 5 min, 完成 RPA 扩增子与探针的杂交, 合成磁性复合物(扩增子@探针@磁珠)。将磁性复合物溶液通过微流控注射泵流(流速: 5 $\mu\text{L}/\text{min}$)加载到芯片上, 然后用一定量的 PBS (pH 7.2, 流速: 3 $\mu\text{L}/\text{min}$)冲洗芯片通道, 冲

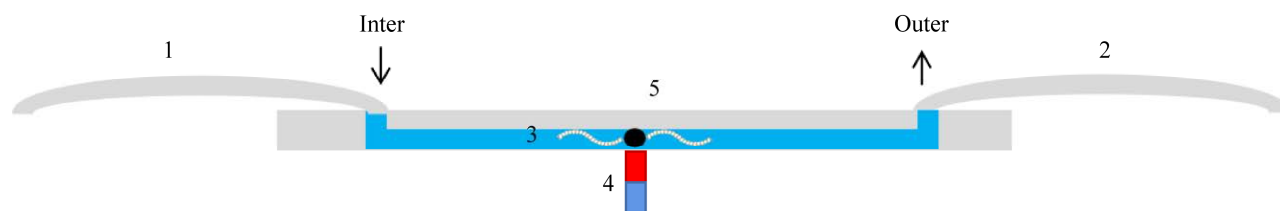


图 1 芯片描述 1: 输入管; 2: 输出管; 3: 直线通道; 4: 磁铁; 5: 磁捕获位点

Figure 1 Chip description. 1: Input tube; 2: Output tube; 3: Straight channel; 4: Magnet; 5: Magnetic capture site.

表 1 RPA 引物和探针序列

Table 1 RPA primer and probe sequences

引物和探针	序列	扩增子大小	位置
Primer and probe	Sequence (5'→3')	Amplicon length (bp)	Locus
F	CAAGTTCATCGCCACCAAGAAGACTTGCGCCTGCG	403	4 404-5 606
R	FAM-GGGAACCAGGGTGAATTTAGCGACGAGCTTGC		
Probe	Biotin-TTACTAGCATGTACAAGCACTACAACCG		

下游引物 5'端 FAM 标记; 核酸探针 TTAC 序列与扩增子序列不互补

Downstream primer 5' FAM marker; The nucleic acid probe TTAC sequence is not complementary to the amplicon sequence.

洗时间为 10 min。最后，将微流控芯片置于荧光显微镜(激发波长，434 nm)下观察。

1.9 IBRV 检测特异性试验

以 IBRV、PRV、HVT、DPV 的 DNA 提取液作为 RPA 模板，无酶水作为阴性对照，按照 1.7 和 1.8 进行分子检测，通过凝胶成像仪和荧光显微镜分析 IBRV 检测的特异性。

1.10 IBRV 检测灵敏度试验

将 DNA 提取液(6.9×10^7 copies/ μ L)进行 10 倍比稀释，稀释液浓度分别为 6.9×10^7 、 6.9×10^6 、 6.9×10^5 、 6.9×10^4 、 6.9×10^3 和 6.9×10^2 copies/ μ L，取不同浓度的 DNA 提取液的稀释液(1 μ L)作为 RPA 反应模板，确定 IBRV 检测的灵敏度。

1.11 临床样本和 IBR 分离株检测

用本研究建立的检测方法对 34 份疑似感染 IBRV 急性期病牛的血清样本进行检测。参考高亚桃等^[14]建立的 IBRV 分离方法对 34 份疑似感染 IBRV 急性期病牛的鼻拭子样本进行病原分离。同时，用本研究建立的检测方法对不同 IBR 分离株进行检测。将 IBR 分离株 RPA 扩增子送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序后，运用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis 10 (MEGA 10)软件构建本研究中的分离株与国内外 IBRV 分离株的系统进化树。

2 结果与分析

2.1 RPA 反应体系扩增子鉴定

以 IBRV 病毒株提取的 DNA 溶液作为模板进行 RPA 扩增，扩增子大小为 403 bp，与预期大小一致(图 2)。扩增子测序结果显示，得到的目标片段与 IBRV 的高度保守区(NC_063268.1)核苷酸相似性达 100%。

2.2 磁珠与探针的偶联率

经紫外可见分光光度计测定链霉亲和素磁珠与生物素修饰的探针偶联率见表 2，结果显示

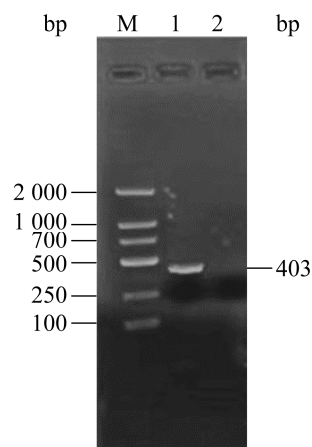


图 2 RPA 扩增子凝胶电泳 M: DNA Marker 2000; 1: IBRV 的 RPA 扩增子; 2: 阴性对照
Figure 2 RPA amplicon gel electrophoresis. M: DNA Marker 2000; 1: Amplification products; 2: Negative control.

表 2 磁珠与探针的偶联率

Item	Result
磁性探针 Magnetic probe	Streptavidin magnetic microspheres @ probe 1
OD_{260}	0.043
磁性探针浓度 Magnetic probe concentration (nmol/L)	144.440
偶联率 Coupling rate (%)	72.220

偶联率为 72.220%，表明探针与磁珠已成功偶联，可满足下一步实验。

2.3 IBRV 检测特异性

以 IBRV、PRV、HVT 和 DPV 的 DNA 为模板进行 RPA 扩增，验证 IBRV 的 RPA 扩增特异性。如图 3A 所示，仅 IBRV 病毒株提取的 DNA 溶液作为模板时 RPA 反应有扩增子，其他病毒株均未出现扩增子条带。微流控芯片的荧光显微镜结果显示，仅 IBRV 病毒株对应的微流控芯片可以观察到绿色荧光带(图 3C)，其他病毒株的微流控芯片均未观察到荧光(图 3B)。这些结

果表明本方法检测 IBRV 具有特异性。

2.4 IBRV 检测灵敏度

不同浓度的 IBRV 病毒株 DNA 提取液作为 RPA 反应模板, 琼脂糖凝胶电泳结果显示浓度为 6.9×10^3 copies/ μL 的 DNA 提取液作为 RPA 反应模板能够获得扩增子, 模板核酸浓度低于 6.9×10^3 copies/ μL 未能检测到扩增子(图 4A)。微流控芯片的荧光显微镜结果与琼脂糖凝胶电泳结果一致(图 4B), 说明本检测方法 IBRV 的检测限是 6.9×10^3 copies/ μL 。

2.5 临床血清样本检测结果

采用本研究建立的 IBRV 检测方法对 34 份疑似感染 IBRV 急性期病牛的血清样本进行检测, 检出 3 份样本为 IBRV 阳性, 病牛编号分别为 SD0213、SD0518 和 SD0701 (图 5)。本研究建立的方法从样本提取到获得检测结果的全流程时间是 110 min (包括病毒样本 DNA 提取, 26 min; RPA 扩增, 44 min; 扩增子@探针@磁珠合成, 10 min; 磁捕获, 30 min), 相对于普

通 PCR 方法, 缩短了一半时间。

2.6 IBR 分离株检测结果

采用本研究建立的 IBRV 检测方法对 34 份疑似感染 IBRV 急性期病牛的鼻拭子分离株进行检测。病牛编号分别为 SD0213、SD0518 和 SD0701 的鼻拭子 IBR 分离株检测为阳性(图 6A 和 6B)。RPA 扩增子序列经系统发育树分析, 将本实验毒株的扩增子序列与 GenBank 公布的 IBR 毒株进行比较, 结果显示 BHV-1.ab1(本研究的分离株)与 BHV1.2 (OP035381.1)首先集合在一起, 其亲缘关系最近, 与 BHV-1.1 (AJ004801.1)遗传距离相对较近, 而与其他毒株遗传距离较远(图 6C)。结果表明, 本研究建立的 IBRV 检测方法同样适用于 IBR 病原分离株检测。

3 讨论

目前, IBRV 常规检测采用细胞培养、聚合酶链式反应、免疫组织病理学、酶联免疫吸附测定以及病毒中和试验^[15-17]。这些诊断方法需

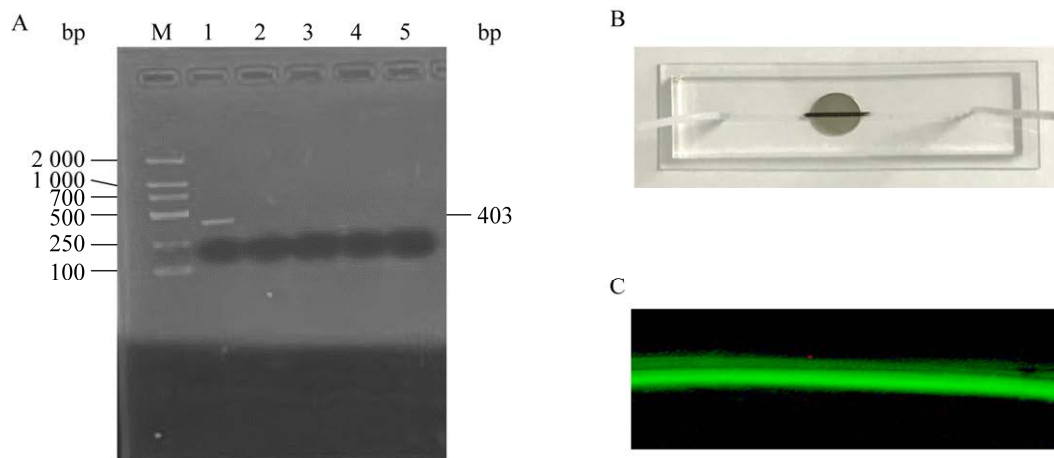


图 3 IBRV 检测特异性 A: RPA 扩增子琼脂糖凝胶电泳图(M: DNA Marker 2000; 1: IBRV; 2: PRV; 3: HVT; 4: DPV; 5: 无酶水). B: 自然光下磁捕获结果. C: 荧光显微镜下磁捕获结果

Figure 3 Specificity of RPA detection. A: Agarose gel electrophoresis of RPA amplicon (M: DNA Marker 2000; 1: IBRV; 2: PRV; 3: HVT; 4: DPV; 5: Enzyme-free water). B: Results of magnetic capture under natural light. C: Results of magnetic capture under fluorescence microscope.

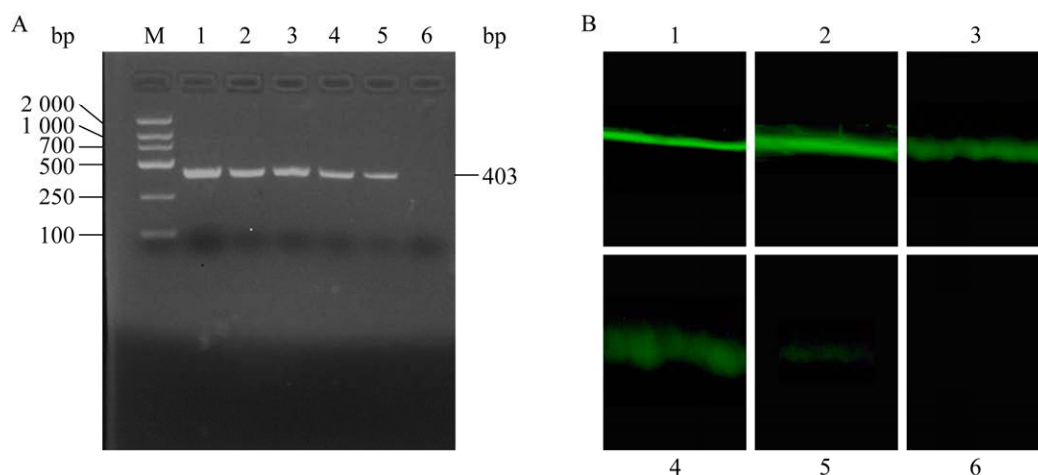


图 4 IBRV 检测灵敏度 A:IBRV 的 DNA 提取液进行倍比稀释(10×) RPA 扩增子琼脂糖凝胶电泳图. B: RPA 扩增子磁捕获荧光显微镜图. 1: IBRV 浓度为 6.9×10^7 copies/ μ L; 2: IBRV 浓度为 6.9×10^6 copies/ μ L; 3: IBRV 浓度为 6.9×10^5 copies/ μ L; 4: IBRV 浓度为 6.9×10^4 copies/ μ L; 5: IBRV 浓度为 6.9×10^3 copies/ μ L; 6: IBRV 浓度为 6.9×10^2 copies/ μ L

Figure 4 Sensitivity of IBRV detection. A: The DNA extract of IBRV diluted (10×) RPA amplicon agarose gel electrophoresis. B: Magnetic capture fluorescence microscopy images of RPA Amplicons. 1: IBRV concentration was 6.9×10^7 copies/ μ L; 2: IBRV concentration was 6.9×10^6 copies/ μ L; 3: IBRV concentration was 6.9×10^5 copies/ μ L; 4: IBRV concentration was 6.9×10^4 copies/ μ L; 5: IBRV concentration was 6.9×10^3 copies/ μ L; 6: IBRV concentration was 6.9×10^2 copies/ μ L.

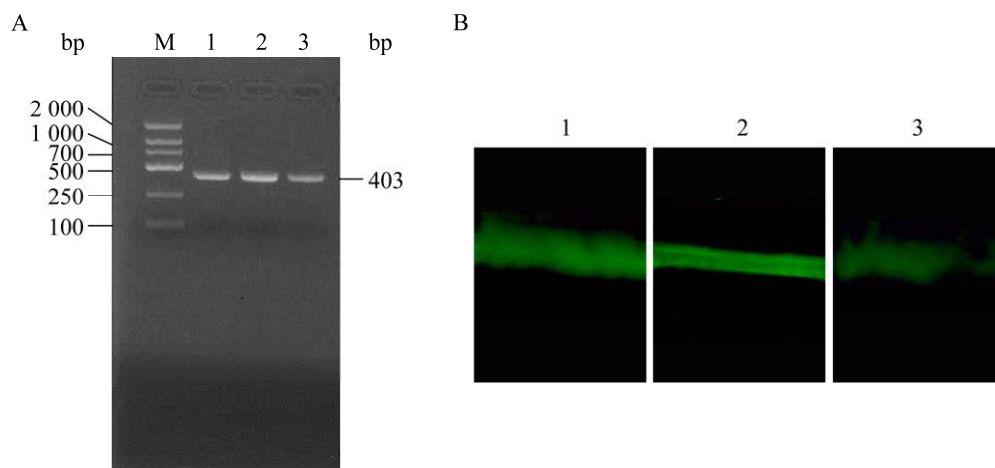


图 5 临床血清样本检测 A: 血清样本 RPA 扩增子琼脂糖凝胶电泳图. B: 血清样本 RPA 扩增子磁捕获荧光显微镜图. M: DNA Marker 2000; 1: SD0213; 2: SD0518; 3: SD0701

Figure 5 Detection of clinical serum samples. A: RPA amplicon agarose gel electrophoresis images of serum samples. B: RPA amplicon magnetic capture fluorescence microscope images of serum samples. M: DNA Marker 2000; 1: SD0213; 2: SD0518; 3: SD0701.

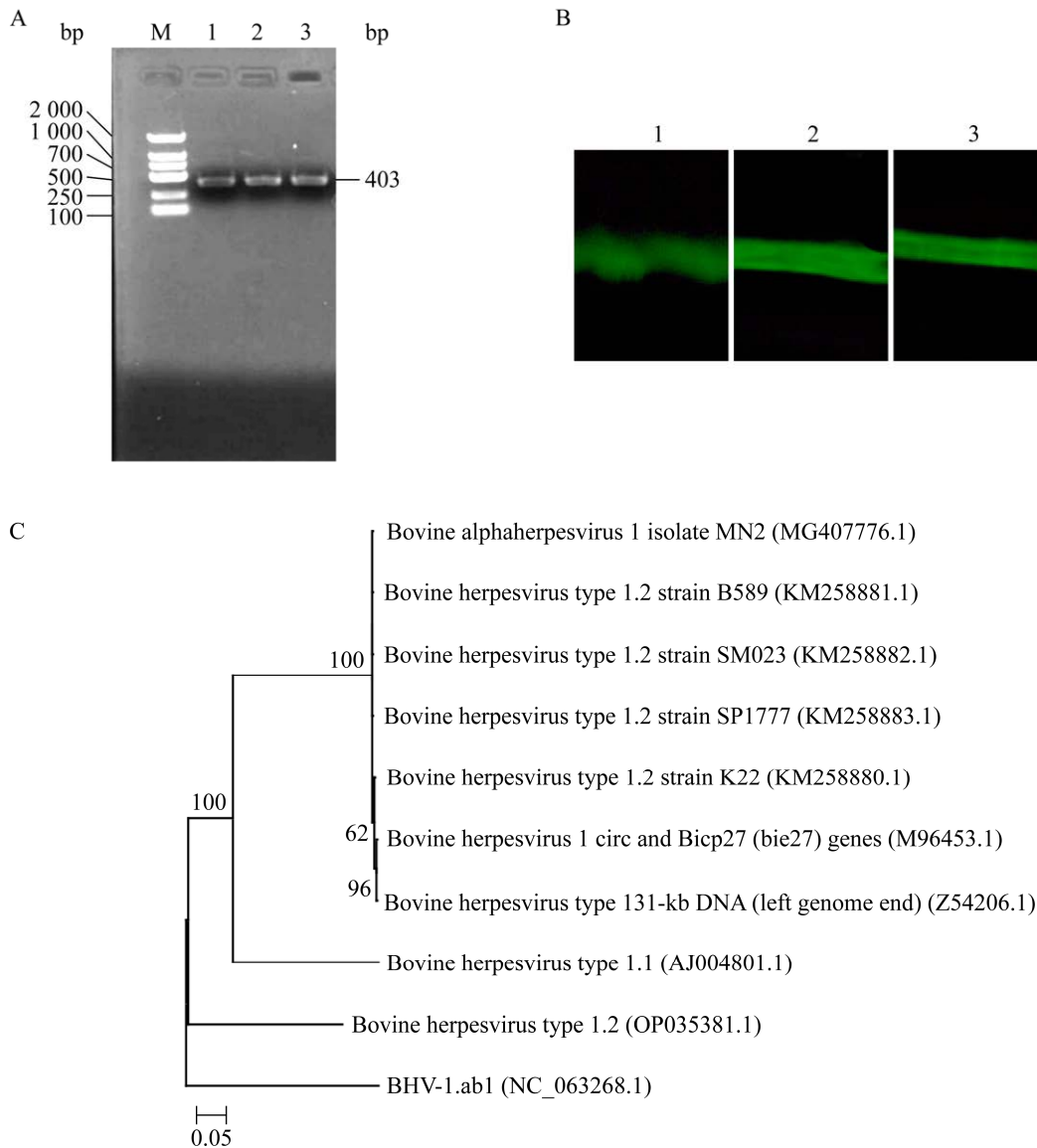


图 6 IBR 分离株的 RPA 扩增子琼脂糖凝胶电泳结果(A)、磁捕获荧光显微镜图(B)和系统发育树(C) M: DNA Marker 2000; 1: SD0213, 2: SD0518, 3: SD0701. 括号内的序号为毒株的 GenBank 登录号; 标尺表示进化距离; 分支点上的数字表示置信限度

Figure 6 RPA amplicon agarose gel electrophoresis (A), magnetic capture fluorescence microscopic images (B) and phylogenetic tree (C) of IBR isolates. M: DNA Marker 2000; 1: SD0213, 2: SD0518, 3: SD0701. The serial number in brackets was the GenBank accession number of the strain; The value of 0.05 represents the evolutionary distances; The number at the node means the percentage of confidence limits.

要专业人员进行烦琐操作且仪器成本高, 很难完成现场快速检测任务。

最近的研究表明, 利用 RPA 和环介导等温扩

增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术来扩增核酸, 这些技术不依赖高精度仪器, 也不需要复杂的扩增产物检测方法^[18]。RPA 技

术的主要优点在于 RPA 反应仅使用 2 个引物、1 个探针和 3 个结合位点, 相比之下, LAMP 测定需要至少 4 个引物和 6 个结合位点。此外, 以冻干粉形式提供的 RPA 试剂即使在 45 °C 环境下, 仍可以稳定存放 3 周, 不依赖于冷链运输^[19]。因此, RPA 是一种具有优势的核酸检测方法, 适用于资源匮乏的环境^[20-21]。

本研究将 RPA 技术作为获得目的片段扩增子的工具, RPA 扩增子测序结果显示与 IBRV *ul52* 基因(NC_063268.1)序列相似性为 100%。用本方法检测 PRV、HVT、DPV 均未检测到特异的条带以及绿色荧光(图 3A 和 3B), 表明该方法与上述病毒无交叉反应, 检测特异性强。目前, 针对 IBRV 检测, 鲍显伟等^[22]建立的 IBRV 的 PCR 检测, 需要用到 PCR 仪和凝胶成像系统, IBRV DNA 的最低检测限为 10^4 copies/ μ L, 并且该方法结果采用琼脂糖凝胶电泳进行分析。然而, 本研究可以在荧光显微镜下直观地看到检测结果, 不需要通过琼脂糖凝胶电泳分析结果。因此, 相较于 PCR 检测, RPA 与微流控芯片相结合的检测方法更适合于现场检测。皇甫和平等^[23]利用同样属于等温扩增技术的 LAMP 检测 IBRV, 检测限为 1.68×10^4 copies/ μ L, 本研究的检测限为 6.9×10^3 copies/ μ L, 较上述检测方法更为灵敏。为了评估本方法的实际应用价值, 对收集的 34 份疑似感染 IBRV 急性期病牛的血清和 IBRV 分离株进行检测, 结果显示本方法检测到 34 例样本中有 3 例样本检测结果呈现阳性(图 6), 由病原分离株引起的细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)符合率为 100%。陈九等^[24]建立的 IBRV 病原分离检测技术获得检测结果至少需要 3-5 d, 鲍显伟等^[22]建立的 IBRV 的 PCR 检测时间需要 3 h 以上, 本检测方法从样本到获得检测结果的全流程所需时间约 110 min, 节省了检测时间。

4 结论

本研究建立的检测方法具有灵敏度高、检测结果准确、快速、操作简便、成本低等优点。另外, 通过改变引物和探针的序列, 能够对不同病原微生物的分子检测, 通过增加微流控芯片通道数量和引物种类可实现高通量分子进行检测, 提高检测效率, 为病毒分子检测节省大量时间。在本研究建立的分子检测技术基础上也可开发相应的自动化系统, 实现真正的“样本进, 结果出”的模式, 实现更加方便的分子检测。

REFERENCES

- [1] 袁晓娟, 杨胜红. 牛传染性鼻气管炎的诊断及防控[J]. 中国乳业, 2023(1): 41-44.
YUAN XJ, YANG SH. Diagnosis and control of infectious bovine rhinotracheitis[J]. China Dairy, 2023(1): 41-44 (in Chinese).
- [2] 杨兰兰, 吴海兴, 金卫华, 王安奎, 高月娥, 杨凯. 牛传染性鼻气管炎及病毒性腹泻流行病学调查及防控建议[J]. 中国畜禽种业, 2023, 19(3): 117-120.
YANG LL, WU HX, JIN WH, WANG AK, GAO YE, YANG K. Epidemiological investigation of infectious rhinotracheitis and viral diarrhea in cattle and suggestions for prevention and control[J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2023, 19(3): 117-120 (in Chinese).
- [3] 何小丽, 李凡飞, 张凯, 程成, 王文佳, 许立华. 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 XL, LI FF, ZHANG K, CHENG C, WANG WJ, XU LH. 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 (in Chinese).
- [4] VERMA N, AGARWAL N, MISRA L. Review of some diseases of dairy animals and treatment by ethnoveterinary medicines[J]. Advances in Medicinal Plants Research, 2023, 11: 9-32.
- [5] KANOKUDOM S, MAHONY TJ, SMITH DR, ASSAVALAPSAKUL W. Modulation of bovine

- herpesvirus 1 infection by virally encoded microRNAs[J]. *Virus Research*, 2018, 257: 1-6.
- [6] 侯冠欣, 孙欣艺, 安瑞, 张春晓, 王利丽, 李红, 朱思萍, 史秋梅, 张志强. 牛传染性鼻气管炎实时荧光 RAA 检测方法的建立与应用[J]. *中国动物传染病学报*, 2024. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20240402.001. HOU GX, SUN XY, AN R, ZHANG CX, WANG LL, LI H, ZHU SP, SHI QM, ZHANG ZQ. Establishment and Application of a Real-Time Fluorescent RAA Assay for Bovine Infectious Rhinotracheitis[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2024. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20240402.001 (in Chinese).
- [7] BOYLE DS, LEHMAN DA, LILLIS L, PETERSON D, SINGHAL M, ARMES N, PARKER M, PIEPENBURG O, OVERBAUGH J. Rapid detection of HIV-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification[J]. *mBio*, 2013, 4(2): e00135-13.
- [8] YANG Y, QIN XD, SONG YM, ZHANG W, HU GW, DOU YX, LI YM, ZHANG ZD. Development of real-time and lateral flow strip reverse transcription recombinase polymerase Amplification assays for rapid detection of peste des petits ruminants virus[J]. *Virology Journal*, 2017, 14(1): 24.
- [9] JUNG W, HAN J, CHOI JW, AHN CH. Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies[J]. *Microelectronic Engineering*, 2015, 132: 46-57.
- [10] LI Q, DUAN LJ, JIN DS, CHEN YX, LOU YR, ZHOU QJ, XU ZJ, CHEN FJ, CHEN HX, XU GZ, YAN MC, YANG GJ, LU JF, ZHANG YJ, CHEN J. A real-time fluorogenic recombinase polymerase amplification microfluidic chip (on-chip RPA) for multiple detection of pathogenic microorganisms of penaeid shrimp[J]. *Aquaculture*, 2024, 578: 740017.
- [11] CHOI G, JUNG JH, PARK BH, OH SJ, SEO JH, CHOI JS, KIM DH, SEO TS. A centrifugal direct recombinase polymerase amplification (direct-RPA) microdevice for multiplex and real-time identification of food poisoning bacteria[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(12): 2309-2316.
- [12] LI RX, SU N, REN XD, SUN XG, LI WM, LI YW, LI J, CHEN C, WANG H, LU WP, DENG SL, HUANG Q. Centrifugal microfluidic-based multiplex recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of SARS-CoV-2[J]. *iScience*, 2023, 26(3): 106245.
- [13] 殷震, 刘景华. *动物病毒学*[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- YIN Z, LIU JH. *Animal Virology*[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997 (in Chinese).
- [14] 高亚桃, 王紫燕, 马亚宾, 蒋桂娥, 倪俊卿, 张明勇, 李妍, 武二斌, 秦建华, 赵月兰. 河北省奶牛场牛呼吸道疾病综合征病原分离鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(7): 1247-1258.
- GAO YT, WANG ZY, MA YB, JIANG GE, NI JQ, ZHANG MY, LI Y, WU EB, QIN JH, ZHAO YL. Pathogen isolation and identification of bovine respiratory disease complex in dairy farm of Hebei Province[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 41(7): 1247-1258 (in Chinese).
- [15] BISWAS S, BANDYOPADHYAY S, DIMRI U, PATRA PH. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1): a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis[J]. *The Veterinary Quarterly*, 2013, 33(2): 68-81.
- [16] GRAHAM DA, MAWHINNEY KA, MCSHANE J, CONNOR TJ, ADAIR BM, MERZA M. 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]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1997, 9(1): 24-31.
- [17] 杨少华, 王长法, 高运东, 刘文浩, 李彦芹, 仲跻峰. 利用巢式 PCR 快速鉴定牛传染性鼻气管炎[J]. *家畜生态学报*, 2007, 28(4): 81-83.
- YANG SH, WANG CF, GAO YD, LIU WH, LI YQ, ZHONG JF. Fast diagnosis of IBRV by nested-PCR method[J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2007, 28(4): 81-83 (in Chinese).
- [18] NIEMZ A, FERGUSON TM, BOYLE DS. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases[J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(5): 240-250.
- [19] LILLIS L, SIVERSON J, LEE A, CANTERA J, PARKER M, PIEPENBURG O, LEHMAN DA, BOYLE DS. Factors influencing Recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2016, 30(2): 74-78.

- [20] BABU B, OCHOA-CORONA FM, PARET ML. Recombinase polymerase amplification applied to plant virus detection and potential implications[J]. *Analytical Biochemistry*, 2018, 546: 72-77.
- [21] MUNAWAR MA. Critical insight into recombinase polymerase amplification technology[J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2022, 22(7): 725-737.
- [22] 鲍显伟, 李小龙, 石亚楠, 梁晓珊, 李昊, 王雪妍, 许立华. 牛传染性鼻气管炎病毒和牛病毒性腹泻病毒双重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. *中国动物检疫*, 2023, 40(1): 115-120.
- BAO XW, LI XL, SHI YN, LIANG XS, LI H, WANG XY, XU LH. Establishment and application of a dual PCR assay for detection of infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine viral diarrhoea virus[J]. *China Animal Health Inspection*, 2023, 40(1): 115-120 (in Chinese).
- [23] 皇甫和平, 石冬梅, 许文博, 徐超, 王军, 王岩, 沈永恕, 史静柯. 牛传染性鼻气管炎病毒 gE 基因 LAMP 检测方法的建立[J]. *中国兽医杂志*, 2016, 52(6): 14-16.
- HUANGFU HP, SHI DM, XU WB, XU C, WANG J, WANG Y, SHEN YS, SHI JK. Development of a LAMP assay for detecting gE gene of Infectious Bovine Rhinotracheitis virus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(6): 14-16 (in Chinese).
- [24] 陈九, 张亮, 张作龙, 李嘉豪, 杨宏军. 绍兴一株牛传染性鼻气管炎病毒的分离与鉴定[J]. *畜牧产业*, 2021(8): 70-72.
- CHEN J, ZHANG L, ZHANG ZL, LI JH, YANG HJ. Isolation and identification of an infectious bovine rhinotracheitis virus in Shaoxing[J]. *Animal Agriculture*, 2021(8): 70-72 (in Chinese).