

分类号:

学号: 2013108027

密级: 公开

单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



新疆部分地区规模化奶牛场犊牛呼吸道疾病相关病毒感染的调查研究

研 究 生 倪 宏 斌

指 导 教 师 刘根强 教授

申请学位门类级别 农 学 硕 士

学 科 、 专 业 名 称 预 防 兽 医 学

研 究 方 向 动 物 传 染 病 诊 断 与 防 治

所 在 学 院 动 物 科 技 学 院

中国·新疆·石河子

2016年5月

分类号：
学 号：2013108027

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



新疆部分地区规模化奶牛场犊牛呼吸道疾 病相关病毒感染的调查研究

研 究 生	倪 宏 斌
指 导 教 师	剡根强 教 授
申请学位门类级别	农 学 硕 士
学 科、专 业 名 称	预 防 兽 医 学
研 究 方 向	动 物 传 染 病 诊 断 与 防 治
所 在 学 院	动 物 科 技 学 院

中国·新疆·石河子

2016年5月

**Investigation on related virus of calves' respiratory disease in
large-scale dairy farms of some areas in Xinjiang**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of

Master of Agriculture

By

Ni Hong-bin

(Preventive Veterinary Medicine)

Dissertation Supervisor: Prof. Yan Gen-qiang

May, 2016

课题来源

本课题来源于国家科技支撑课题-《奶牛标准化规模养殖主要疾病综合防控技术集成与示范》(课题任务书编号: 2012BAD43B02)

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师指导下进行的研究工作及取得的科研成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已发表和撰写过的科研成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示感谢。

研究生签名： 

时间：2016年 6 月 3 日

学位论文版权授权书

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门和指定机构送交论文的电子版或纸质版。有权将学位论文用于赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅。有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索。有权将论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 

时间：2016年 6 月 3 日

导师签名： 

时间：2016年 6 月 3 日

摘要

牛传染性鼻气管炎病毒 (IBRV)、牛副流感病毒 3 型 (BPIV3) 和牛呼吸道合胞体病毒 (BRSV) 是引起奶牛病毒性呼吸道疾病的主要病原, 牛感染后会影响奶牛的产奶量、公牛的繁殖力、育肥牛的增重以及牛的免疫功能, 易继发细菌或支原体感染, 从而导致奶牛严重的支气管炎和肺炎, 给养牛业造成严重的经济损失。为调查新疆部分地区奶牛场 3 种病毒的感染情况, 本研究从新疆石河子、奎屯、库尔勒、沙湾、阿克苏地区的五个规模化奶牛场采集 1 月龄以内犊牛鼻拭子 226 份, 其中发病犊牛 180 份, 相同日龄健康犊牛 46 份, 通过采用抗原双抗体夹心 ELISA、PCR 和 RT-PCR 的方法检测 3 种病毒的感染情况, 并对检测的病毒进行核苷酸序列分析与基因分型。研究结果如下:

1. ELISA 方法检测 IBRV 的平均感染率为 17.96%, 不同地区感染率为 10.20% -29.17%; PCR 方法检测 IBRV 的平均感染率为 55.83%, 奎屯、石河子、沙湾、库尔勒、阿克苏地区的五个奶牛场的感染率分别为 44.90%、46.67%, 48.33%, 66.67%和 72.22%; 表明在检测的新疆部分地区 IBRV 的感染较为普遍; 实验毒株与美国和巴西参考株由共同祖先进化而来。

2. ELISA 方法检测 BPIV3 的平均感染率为 2.43%; PCR 方法检测 BPIV3 的平均感染率为 35.44%, 奎屯、石河子、沙湾、阿克苏、库尔勒地区的五个奶牛场的感染率分别为 24.49%、28.00%、31.67%、44.44%和 45.83%; 表明在被检测的新疆部分地区 BPIV3 的感染较为普遍。对其中 8 株阳性样品进行 gM 基因序列分析, 比较其同源性为 97.90%, 同 BPIV3a 亚型参考毒株的同源性为 93.0%-95.7%, 与澳大利亚 BP13JCU 和美国 Kansas 毒株由共同祖先进化而来, 将其划分为 BPIV3a 亚型。

3. PCR 方法检测 IBRV, 发病犊牛与健康犊牛的平均感染率分别为为 56.67%和 28.26%; RT-PCR 方法检测 BPIV3, 发病犊牛与健康犊牛的平均感染率分别为为 36.11%和 13.04%。表明两种病毒在检测的新疆部分地区的犊牛呼吸道疾病中发挥致病作用, 且 IBRV 和 BPIV3 均存在隐性感染。

4.在检测的新疆部分地区, 存在 IBRV 和 BPIV3 的混合感染, 整体混合感染率为 9.73%。

5.抗原双抗体夹心 ELISA 方法和 RT-PCR 方法均未检测到 BRSV 阳性样品。表明本次所检测的新疆部分地区奶牛场的犊牛样品中不存在 BRSV。

本研究初步调查了新疆部分地区 IBRV、BPIV3 和 BRSV 的感染情况, 丰富了流行病学资料, 并为 3 种病毒在新疆地区的免疫预防和疫苗研发提供了初步的理论依据。

关键词: 犊牛; 牛呼吸道疾病相关病毒; ELISA; PCR; 序列分析

Abstract

Infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV), bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV) are the main pathogen of bovine viral respiratory disease, they can cause great influence to dairy cows' milk production, bulls' fertility and fattening cattle's weight gaining, and can decrease the immune function of cattle, easy to cause cows severe bronchitis and pneumonia when the cows secondly infecting bacterial or mycoplasma infection, causing serious economic losses to the cattle raising industry. In order to investigate the infections of the 3 virus in some areas of Xinjiang, we had collected 226 calf nasal discharge samples at less than one-month-old from main dairy in Shihezi, Sawan, Kuitun, Akesu and Kuerle, among them there were 180 sick calves' nasal discharge samples and 40 nasal discharge samples of healthy calves at same age, by using double-antibody sandwich ELISA, PCR and RT-PCR to detect the infection of these three viruses, and analysing the virus' nucleotide sequence and genotyping. The results are as follows:

1. The infection rate of antigen sandwich ELISA method for detecting IBRV was 17.96%, the infection rates from different regions were 10.20% to 29.17%; and the infection rate of PCR method for detecting IBRV was 55.83%, the infection rates of five dairy farms in Kuitun, Shihezi, Shawan, Korla, Aksu areas were respectively 44.90%, 46.67%, 48.33%, 66.67% and 72.22%; it showed that the IBRV infection was widespread in the detected areas of Xinjiang. And tested virus strains evolved from a common ancestor with the reference strains of the United States and Brazil.

2. The infection rate of antigen sandwich ELISA method for detecting BPIV3 was 2.34%; and the infection rate of RT-PCR method for detecting BPIV3 was 35.44%, the infection rates of five dairy farms in Kuitun, Shihezi, Shawan, Korla, Aksu areas were respectively 24.49%、28.00%、31.67%、44.44% and 45.83%; it showed that the BPIV3 infection was widespread in the detected areas of Xinjiang. Picking 8 detected BPIV3 virus analysing and comparing gM gene sequence, the homology was 97.90%, having a 93.0% -95.7% homology with the reference BPIV3a subtype, and they evolved from a common ancestor with the reference strains of Australia BP13JCU and the United States Kansas. we divided it into BPIV3a subtype.

3. PCR method to detect IBRV, the average infection rates of sick calves and healthy calves were respectively 56.67% and 28.26%; RT-PCR method to detect BPIV3, the average infection rates of sick calves and healthy calves were respectively 36.11% and 13.04%. It showed that both viruses play a role in bovine respiratory disease in detected dairy farms of part areas in Xinjiang, and the negative infections are present of IBRV and BPIV3.

4. In the detected part areas of Xinjiang, there was a mixed infection of IBRV and BPIV3, the overall mixed infection rate was 9.73%.

5. BRSV positive samples had not detected by using antigen sandwich ELISA method and RT-PCR method. It suggested there were no BRSV in detected samples from the main dairy farms of part areas in Xinjiang.

The investigation had preliminarily investigating the infection of IBRV, BPIV3 and BRSV in part areas of Xinjiang, providing a preliminary theoretical basis for the prevention and control and vaccine development of the three viruses in Xinjiang areas.

Keywords: calves; related virus of calves' respiratory disease; ELISA; PCR; sequence analysis

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	II
英文缩略词表.....	V
第一章 文献综述.....	1
第一节 牛传染性鼻气管炎的研究概况.....	1
1 IBR的发展史.....	1
2 IBR的病原学.....	2
3 IBR流行病学.....	3
4 IBR临床症状.....	4
5 IBR诊断方法.....	5
6 IBR防治措施.....	6
7 IBR疫苗研究.....	7
第二节 牛副流感病毒3型病的研究概况.....	8
1 病原学.....	9
2 流行病学.....	11
3 临床症状与病理变化.....	11
4 诊断技术.....	12
5 防治措施.....	12
第三节 牛呼吸道合胞体病毒病的研究概况.....	12
1 病原学.....	13
2 流行病学.....	15
3 临床症状.....	16
4 病理变化.....	16
5 诊断方法.....	16
6 防治措施.....	17
第二章新疆部分地牛传染性鼻气管炎病毒的检测与gD基因序列分析.....	18
1 材料与方法.....	18
1.1 材料.....	18
1.2 方法.....	19
2 结果.....	23
2.1 ELISA检测结果.....	23
2.2 PCR的检测结果.....	23
2.3 DNA测序结果及序列分析.....	24
3 讨论.....	25
4 本章小结.....	26
第三章 新疆部分地区牛副流感病毒3型的检测与基因分型.....	27
1 材料与方法.....	28
1.1 材料.....	28
1.2 方法.....	28
2 结果.....	30
2.1 ELISA检测结果.....	30

2.2 RT-PCR 检测结果.....	30
2.3 测序结果分析.....	31
3 讨论.....	33
4 本章小结.....	34
第四章 新疆部分地区牛呼吸道合胞体病毒感染的检测与基 因分型.....	35
1 材料与方 法.....	36
1.1 材料.....	36
1.2 方 法.....	36
2 结 果.....	38
2.1 ELISA 检测结果.....	38
2.2 RT-PCR 检测结果.....	38
3 讨 论.....	38
4 本 章 小 结.....	39
全文结论.....	40
创新点.....	41
参考文献.....	42
附录部分.....	48
致 谢.....	49
作 者 简 介.....	50
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表.....	51

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
IBRV	<i>Infectious bovine rhinotracheitis virus</i>	牛传染性鼻气管炎病毒
BPIV3	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>	牛副流感病毒 3 型
BRSV	<i>Bovine respiratory syncytial virus</i>	牛呼吸道合胞体病毒
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	反转录聚合酶链式反应
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
OIE	Office International Des Epizooties	世界动物卫生组织
ORF	Open reading frame	开放阅读框架
HRSV	Human respiratory syncytial virus	人呼吸道合胞体病毒
Rnase	Ribonuclease	核糖核酸酶
TRIZOL	Total RNA Isolation	总核糖核酸抽提试剂
s	Second	秒
Min	minute	分钟
h	hour	小时
mL	milliliter	毫升
pH	pH value	pH 值
°C	Centigrade	摄氏度
L	Liter	升
LB	Luria-Bertani broth	LB 培养基
rpm	Revolutions per minute	每分钟转数
bp	base pair	碱基对
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
g	gram	克
uL	Microliter	微升
mRNA	messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
GenBank	gene bank	核苷酸序列基因库
5'UTR	5'Untranslated Region	5'端非编码区
3'UTR	3'Untranslated Region	3'端非编码区
IFA	indirect immunofluorescent assay	间接免疫荧光试验
IFN	Interferon	干扰素
SNT	serum neutralization test	血清中和试验
CFT	complement fixation test	补体结合试验
BVDV	<i>bovine viral diarrhea-mucosal disease virus</i>	牛病毒性腹泻病毒

前 言

牛传染性鼻气管炎病毒 (IBRV)、牛副流感病毒 3 型 (BPIV3) 和牛呼吸道合胞体病毒 (BRSV) 是引起奶牛病毒性呼吸道疾病的主要病原^[1], 牛感染后会影响奶牛的产奶量、公牛的繁殖力、育肥牛的增重以及使役牛的使役力, 造成牛免疫功能下降, 易继发细菌或支原体感染, 从而导致牛严重的支气管炎和肺炎, 给养牛业造成严重的经济损失^[2]。

牛传染性鼻气管炎 (Infectious bovine rhinotracheitis, IBR) 又称“红鼻病”或“坏死性鼻炎”, 病原为牛传染性鼻气管炎病毒 (Infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)^[3]。自 1956 年 Madin 等首次从患牛中分离 IBRV^[4]以来, 美国、澳大利亚、新西兰、俄罗斯、墨西哥等国家相继出现 IBRV 感染的报道; 我国于 20 世纪 70 年代从荷兰进口牛中发现该病, 80 年代初由周太冲等^[5]首次从新西兰进口的奶牛中分离到 IBRV, 颜邦芬^[6]、邹世颖^[7]等的调查表明, 我国大部分地区都已存在 IBRV 感染; 只有瑞典、丹麦、芬兰、奥地利等极少数国家没有 IBRV 感染或者已宣布成功消除该病^[8-9], 世界动物卫生组织 (OIE) 将该病列为 B 类疾病^[10]。目前没有治疗 IBR 的特效药物, 国内也没有有效的上市疫苗。

牛副流感病是由牛副流感病毒 3 型 (Bovine parainfluenza virus 3, BPIV3) 引起的一种热性接触性传染病。BPIV3 属于单股负链 RNA 病毒目副黏病毒科副黏病毒亚科呼吸道病毒属, 又被称为运输热病毒^[11]。自 1959 年 Reisinger^[12]等首次在美国从奶牛中分离到 BPIV3 之后, 法国、日本、前苏联、澳大利亚、加拿大、丹麦、巴拿马和意大利等国家也相继出现该病毒感染报道^[13]; 我国在近期才开始研究该病毒, 根据最近几年的文献报道, BPIV3 已经在我国内蒙古、黑龙江、吉林、山东和山西等地存在^[14-15]。目前该病在世界范围内流行, 尤其是美洲和亚洲, 每年都给养牛业造成严重的经济损失^[16]。我国对该病的研究较少, 也没有相关有效的疫苗。

牛呼吸道合胞体病是由牛呼吸道合胞体病毒 (Bovine respiratory syncytial virus, BRSV) 引起的一种急性、热性呼吸道传染病^[11]。自 1967 年 Paccaud 和 Jacquier^[17]在瑞士首次分离 BRSV 以来, 美国、加拿大、比利时、日本和意大利等国家相继报道出现该病毒感染的报道^[18-22]; 我国对 BRSV 的研究报道较少, 2008 年由冯军科等^[23]首次报道分离到 BRSV 毒株, 证实了 BRSV 在我国的存在。该病发病率一般很高, 可达 80%-100%, 但病死率很低, 仅为 1%-20%, 发病情况与种群密度和年龄结构密切相关^[2]。在欧盟国家 BRS 被列为仅次于牛黏膜病 (BVD) 及牛传染性鼻气管炎 (IBR) 的三大重要牛病之一^[24]。目前没有治疗 BRS 的特效药物, 国内也没有有效的上市疫苗。

为调查新疆部分地区奶牛场 3 种病毒的感染情况, 本研究从新疆石河子、奎屯、库尔勒、沙湾、阿克苏地区的五个规模化奶牛场采集 1 月龄以内犊牛鼻液 226 份, 其中发病犊牛 180 份, 相同日龄健康犊牛 46 份, 通过采用抗原双抗体

夹心 ELISA、PCR 和 RT-PCR 的方法检测 3 种病毒的感染情况，并对检测的病毒进行核苷酸序列分析与基因分型，为新疆地区 3 种牛呼吸道病毒性疾病的防控提供流行病学依据。

第一章 文献综述

第一节 牛传染性鼻气管炎的研究概况

牛传染性鼻气管炎(Infectious bovine rhinotracheitis, IBR)又称“红鼻病”或“坏死性鼻炎”，是由牛传染性鼻气管炎病毒(*Infectious bovine rhinotracheitis virus*, IBRV)感染引起的牛的一种急性、热性、接触性传染病，表现为呼吸困难、流鼻涕及上呼吸道及气管黏膜发炎等症状^[3]，还可引起结膜炎、乳腺炎、犊牛脑膜炎、脓疱性外阴-阴道炎、龟头炎、流产等疾病，是一种由同一病原引起多种病状的传染病^[25]。该病对于牛的危害性主要在于牛感染该病毒后，病毒可在牛体内长期存在甚至终身带毒，从而成为潜在的感染源，造成牛的持续性感染，对奶牛的产奶量、育肥牛的增重、公牛的繁殖力及使役牛的使役力均造成较大损害^[26]。继发细菌与支原体感染可导致牛的支气管炎和/或肺炎，治疗不及时往往引起牛的死亡^[27]，增高了牛群的淘汰率和死亡率，给养牛业造成严重的经济损失。所以，世界动物卫生组织(OIE)将该病列为 B 类疾病^[10]，也是我国进境动物必检疾病之一。

1 IBR 的发展史

20 世纪 50 年代初，最早在美国科罗拉多州的育肥牛群发现以传染性鼻气管炎症状为特征的疾病，随后该病相继出现在洛杉矶和加利福尼亚州等地，并被命名为 IBR^[11]。IBRV 于 1956 年首次被 Madin 等从患牛中分离出来^[7]，并于 1964 年被 Huck 确认属于疱疹病毒^[4]。自牛传染性鼻气管炎被发现以来，各大洲均有 IBRV 感染牛的报道，在美国 IBRV 抗体情况调查中，34 个州中有 31 个州均检测出抗体阳性，且阳性率高达 35%；2002 年澳大利亚对牛只 IBRV 的调查显示，IBR 的阳性率介于 15%-17%之间；2002 年，新西兰对其国内 200 多家牛场展开 IBRV 抗体检查，检查结果表明抗体阳性率高达 76.4%；2003 年俄罗斯检查出 1461 例 IBRV 抗体阳性牛；2003 年墨西哥对 IBRV 抗体的检测结果为，阳性率 54.5%；Zwart 报道，非洲部分地区 IBRV 抗体阳性率介于 30%-60%之间。目前在全球大多数国家的牛群中都能不同程度的检测出 IBRV 抗体，只有在瑞典、丹麦、芬兰、奥地利等极少数国家没有 IBRV 感染或者已宣布成功消除该病毒^[8-9]，总之，IBR 在全球范围内传播扩散开来。

我国于 20 世纪 70 年代从荷兰进口牛中发现该病，80 年代初由周太冲等^[5]首次从新西兰进口的奶牛中分离到 IBRV；1995 年肖定汉^[28]对北京牛场 IBRV 检测结果表明，新出生的犊牛中 IBR 阳性率为 72.41%；2003 年对青海某地区血清样品的调查中，IBRV 阳性率为 30.61%；2007 年颜邦芬^[6]等对全国 29 个省份，

共 1344 份奶牛血清样品利用 gG-ELISA 方法进行流行病学调查, 结果显示平均阳性率为 35.8%, 各省份阳性率差别较大, 从 12.1%到 77.8%不等; 2012 年, 邹世颖^[7]等对山东、内蒙古等北方六省的 IBR 流行病学的调查结果表明, 山东、河北、河南、内蒙古、新疆、北京的阳性率分别为 46%、28%、86%、58%、68%、40%。以上调查结果说明了 IBR 感染在我国的普遍性和严重性, 我国大部分地区都已存在 IBRV 感染。

2 IBR 的病原学

2.1 病毒分类

IBRV 又称牛疱疹病毒 1 型 (*Bovine herpesvirus 1*, BHV-1)、坏死性鼻炎病毒、传染性脓疱性外阴-阴道炎病毒, 属于疱疹病毒科 (*Herpesviridae*) 疱疹病毒亚科 (*Alphaherpesviridae*) 水痘病毒属 (*Varicellovirus*)。该病毒与伪狂犬病病毒 (PRV)、传染性喉气管炎病毒 (ILTV)、马疱疹病毒 1 型 (EHV-1) 和水痘带状疱疹病毒 (VZV) 都属于 α -疱疹病毒亚科^[29]。

2.2 病毒形态与结构

IBRV 是球形双股 DNA 病毒, 病毒粒子由核酸芯髓、衣壳和囊膜 3 部分组成, 直径大约为 150-220 nm。衣壳为正二十面体立体对称, 外观呈六角形, 有 162 个壳粒^[11]。其双股 DNA 大小约为 138 kb, 其中 G+C 含量高达 72%, 基因组被 2 个各 11 kb 的 RS 重复序列单位分割成两个独特区, 长短特区 (UL) 大小为 106kb, 小独特区 (US) 大小为 10 kb。其中短独特区可以与两个 RS 重复序列沿轴旋转 180 度, 使病毒 DNA 基因组有两种异构体结构^[30]。IBRV 基因组可编码大约 70 个蛋白质, 含 25-33 种结构蛋白, 其中包括 11 种糖基蛋白, 其主要糖蛋白 gB、gC、gD 和 gE 负责病毒的吸附、渗透与病毒在细胞之间的扩散, 同时 gB、gC、gD 蛋白也是刺激宿主免疫应答的主要抗原蛋白, gD 蛋白的免疫原性最好, 可诱导产生高水平的细胞免疫与体液免疫^[31-32]。下面对几种主要功能基因蛋白作简要介绍:

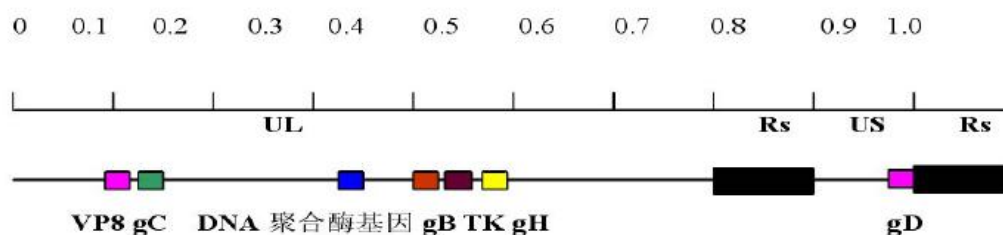


图 1 IBRV 基因组结构图

Fig.1 Construction of IBRV genome

gB 基因位于 IBRV 基因组物理图谱的 0.405-0.434 位置上。gB 蛋白是刺激宿主产生免疫应答的主要抗原蛋白, 具有很好的免疫原性与反应性, 为疱疹病毒最保守的蛋白之一, 被鉴定为病毒检测的主要免疫原之一^[33]。

gC 基因位于 IBRV 基因组物理图谱的 0.122-0.135 位置上。gC 蛋白是病毒最

重要的吸附蛋白^[34],与细胞肝素样受体相互作用,构成病毒重要的吸附机制,从而促进病毒的穿透,也可以参与病毒复制的其他过程,同时也是 IBRV 免疫反应的主要识别为点之一。

gD 基因位于 IBRV 基因组物理图谱的 0.892-0.902 位置处。gD 蛋白存在于 IBRV 病毒囊膜以及被感染的细胞表面上,参与病毒穿透、进入宿主过程,能够诱导宿主产生持久的体液与细胞免疫,是病毒复制的必要蛋白。gD 蛋白具有高度保守型,被视为 IBRV 特异性抗原研究的首选蛋白^[35]。

gE 蛋白是 IBRV 病毒粒子的主要成分之一,不是病毒体外复制增殖所必需的,但对于病毒在宿主体内潜伏是必需的。它可以在病毒粒子表面以及被病毒感染的 cell 表面高度表达,是中和抗体的主要作用靶位,是 IBRV 最主要的功能蛋白之一,在 IBR 诊断鉴别和疫苗开发上有重要参考意义^[36]。

TK 基因位于病毒基因组 Hind III A 片段上的 2.7 kb 或 Sal I 亚片段上的 3.5 kb 处,编码的蛋白为病毒胸腺激酶 (TK),参与核酸代谢。TK 基因是 IBRV 重要的毒力基因,该基因缺失后,病毒虽然可以增殖,但增殖力很低,其毒株毒力明显降低,故 TK 基因是 IBRV 疫苗研究中的常用靶基因^[37]。

2.3 病毒抗原性

到目前为止,已经从世界各地分离到几十个 IBRV 毒株,并经过研究表明这些分离株均具有相同抗原,为同一基因型。也有人认为有不同抗原成分的毒株存在 (Kurogi 1975),建议进一步分型,但该观点未被广泛采纳^[38]。IBRV 只有 1 个血清型,经试验证明 IBRV 与马立克氏病病毒、马鼻肺炎病毒及伪狂犬病病毒之间有某些共同抗原成份^[39]。

2.4 病毒抵抗力

IBRV 具有较强的环境抵抗力。据 Griffin 等报道,病毒在 pH 7.0 的细胞培养液中非常稳定,4℃ 以下能保存 30 天以上,22℃ 条件下可保存 5 天;37℃ 病毒的半衰期为 10 h;病毒在 56℃ 条件下 20 min 可被灭活;在 0.01% HgCl₂、1% 漂白粉、1% 酚类和 0.5% NaOH 溶液中只需数秒钟即可被灭活;在 5% 的甲醛溶液需要 1 min 可被灭活;所有的毒株均对氯仿敏感,对乙醚的敏感性差异则较大;病毒的感染力均可被酒精、丙酮或紫外线破坏;IBRV -70℃ 以下保存可活存数年^[11]。

3 IBR 流行病学

3.1 传染源

病牛、隐性感染牛和持续感染牛是本病的主要传染源。IBRV 感染牛后,病毒常存在于病牛的鼻腔、气管、眼睛以及流产胎儿和胎盘等组织结构内,在自然条件下可不定期排毒,主要随鼻液、阴道粘液和精液等分泌物和排泄物排出体外。凡感染过 IBRV 的牛,在其腰荐神经节和三叉神经节内都可能终生存在该病毒,即形成持续感染,当长途运输、饲养环境发生剧烈变化和分娩时,潜伏的病毒活

化并出现于鼻液和阴道粘液中，向外界排出^[26]。

3.2 传播途径

本病毒可通过空气扩散或与病牛的直接接触而感染牛，主要经飞沫、交配和身体接触等途径传播。病毒随鼻液、眼泪以及阴道分泌物、精液等排出体外，易感动物通过被污染的空气飞沫和交配而水平传播，也可通过胎盘而垂直传播。吸血昆虫也可传播本病^[40]。

3.3 易感动物

牛是 IBRV 自然感染的唯一宿主,主要是肉牛，其次是奶牛，以 20-60 日龄的犊牛最为易感。人工感染实验证明，经多种途径可感染鹿，出现与牛相似临床症状，且可检测到阳性抗体；人工感染山羊时可引起山羊的发热；而绵羊、猪、马、犬、猫、小鼠和豚鼠等动物都对该病毒具有一定的抵抗力^[26]。

3.4 流行特点

该病的流行具有明显的季节性，在晚秋、冬季寒冷季节高发。且在一些应激因素如饲养空间狭窄、过分拥挤、牛群接触密切的条件下会加速疾病的传播、蔓延，同时在环境突变、断奶、饲养方式骤变以及长途运输等因素的影响下可诱导此病的发生^[11]。

4 IBR 临床症状

IBRV 具有典型的泛嗜性，能够侵害宿主动物的多种组织器官，可引起多种临床症状。根据侵害组织的不同，可分为呼吸道型感染、生殖道型感染、脑膜炎型感染、结膜炎型感染和流产型感染等 5 种类型^[25]。

呼吸道型感染 最常见，发病率高，死亡率低。人工感染潜伏期为 2-3 d，自然感染潜伏期较长，可达 7 d。病牛发热可达 40℃ 以上，以鼻、气管炎症状为主，临床表现为精神沉郁，厌食，咳嗽，鼻孔两翼及鼻镜坏死、溃疡，鼻镜发炎充血，呈火红色，故称“红鼻子病”。急性 IBR 感染 7-10 d 后经常继发细菌或支原体感染，引起支气管炎和/或肺炎。有些病牛伴有眼结膜炎，因眼睑水肿和眼结膜充血而大量流泪，重症者眼结膜上呈现针头大小的黄色颗粒，有脓样渗出物渗出^[41]。

生殖道型感染 又称交媾疹、交合疹。主要见于性成熟的母牛及公牛，多由交配而感染。以母牛脓疱性外阴-阴道炎为主，潜伏期为 1-3 d，随后呈现数天的轻度波浪式体温反应，外阴肿胀，黏膜充血、潮红，表面散在大量小脓疱，附着淡黄色渗出物，脓疱破溃后可形成黄色斑块，随阴道分泌物的增加，黏性或脓性分泌物积贮在阴道内，孕牛病程约 2 周，一般不发生流产。公牛本病型又称传染性脓疱性包皮-龟头炎，潜伏期为 2-3 d，生殖道黏膜充血，并伴有一过性体温升高，数天后可痊愈，重者高度发热，包皮、阴茎上出现脓疱，随即包皮肿胀及水肿，种公牛失去生殖能力^[42]。

脑膜脑炎型感染 主要发生于 3-6 月龄的犊牛，主要表现为脑膜脑炎。病犊

共济失调，先沉郁后兴奋，或者沉郁和兴奋交替，表现圆圈运动、乱撞和阵发性痉挛等症状，最终倒地、角弓反张、磨牙、口吐白沫和四肢划动而死亡。病程可持续 4-5d，发病率较低，但死亡率很高，可达 50%^[25]。

结膜炎型感染 临床上常以结膜和角膜混浊为特征。一般无明显全身反应，主要表现角膜轻度浑浊，引起流泪，结膜充血、水肿，并可引起结膜坏死，呈颗粒状外观。病程一般持续 7-9 d，随后很快好转，恢复正常。有时并发呼吸道症状^[25]。

流产型感染 常见于初产青年母牛。妊娠母牛感染时，IBRV 可经血流循环通过胎盘传播给胎儿，感染胎儿而使孕牛发生流产。流产可发生在妊娠的任何时期，但多数见于妊娠的第 5-8 个月，多无前期症状，流产后胎衣不滞留。胎儿感染多表现急性经过，一般感染 7-10 d 后死亡，再经 1-2 d 排出体外^[25]。

5 IBR 诊断方法

本病的典型病列可根据临床症状并结合流行病学作出初步诊断，但因该病大多数为不典型的，且多呈现混合感染症状，所以，必须依靠实验室检测来确诊本病感染。

5.1 包涵体检查

IBRV 在多种培养细胞中均可生长，并形成一种核内包涵体，因此可对感染的单层细胞进行涂片，用 Lendrum 染色法进行染色，细胞核会被染成蓝色，而包涵体被染成红色，胶原染成黄色，镜检观察细胞核内是否存在包涵体。另外，还可将病牛病变部位的上皮组织直接制作切片后染色、镜检^[11]。

5.2 病毒分离鉴定

根据不同的临床症状，采集相应的检测样品。呼吸道型时，应以棉拭子采集处于发热期的鼻液和眼分泌物；脑膜脑炎时，采集脑组织；生殖道型时，采集外阴部黏膜和阴道分泌物，在有流产胎儿时，采集胎儿胸水、心包液、心血以及肺等实质脏器^[43]。采集的样品，立即放入含 0.5% 乳白蛋白水解物或 10% 犊牛血清的 Hanks 液内，在冷藏状态下，尽快送到实验室。将检测样品接种于 MDBK 细胞后，每天观察细胞的病变情况。一般在接种后 3-5 d 内产生细胞变圆变暗，聚集成葡萄样群落，在单层细胞上形成空洞，有时还会出现有数个细胞核的巨大细胞等特征性病变。若 1 周内还未出现细胞病变，应再盲传 2 次，培养物反复冻融后离心取上清，并接种新的单层细胞，做进一步病毒分离^[44]。

5.3 血清学诊断

目前主要的血清学诊断方法包括血清中和试验(Serum Neutralization Test, SN)和酶联免疫吸附试验(ELISA)，以及琼脂扩散试验、间接免疫荧光试验和间接血凝试验等(耿德春和李志林，2009)。

5.3.1 血清中和试验

中和试验是血清抗体检测最经典、最标准、也是最常用的方法，其即可检测

抗原，亦可检测抗体^[2]。一般使用已知血清/抗原与被检抗原/被检血清抗原混合孵育后，接种 MDBK 细胞，37℃培养 72h 后判定。该方法费时、费力、试验周期长，且易受病毒毒价、细胞情况、孵育时间和操作人员的熟练程度等不确定因素影响。

5.3.2 琼脂扩散试验

该方法可用已知的 IBR 抗原来检查被检测血清中的沉淀抗体，也可用 IBR 阳性血清来检测细胞培养物或病料标本中的相应抗原。Suresh 报道用免疫扩散法和对流免疫扩散法可检测出 IBRV，该方法简单适用，成本较低，但是其敏感性也较低^[44]。

5.3.3 间接血凝试验

间接血凝试验（IHA）是一种快速、简单、准确的血清学诊断方法。将已知抗原结合在鞣酸处理过的绵羊红细胞上，采用常规的试管凝集法或微量凝集法来检查被检血清中的相应抗体。该方法法检出率高于 SN 法（陈天祥，1987），但最佳致敏抗原的选择、浓度，绵羊红细胞的处理方法，致敏红细胞的 pH 值、温度、作用时间等因素均会影响试验结果。

5.3.4 酶联免疫吸附试验（ELISA）

ELISA 是目前发展最快，应用最广泛的一种血清学检测技术，被 OIE 指定为国际贸易 IBR 检测的标准试验方法之一。其原理为将抗原或抗体吸附于固相载体上，在载体上用免疫酶染色，底物显色后以肉眼观察或酶标仪检测判定结果^[25]。与中和试验比较，ELISA 法具有简便、快速、敏感、易于标准化和可以同时检测大量样品等优点。但是，由于 IBRV 具有潜伏感染的特性，所以，即使抗体检测为阴性，也不能保证牛群中没有 IBRV 的感染^[42]。

5.4 分子生物学诊断

5.4.1 聚合酶链式反应（PCR）

目前检测 IBRV 最快速、简单和灵敏的方法就是 PCR，其主要通过扩增 IBRV 中的特异性保守片段来确定检测结果，可以快速检测样品中微量的病毒。将 PCR 技术应用到牛传染性鼻气管炎病毒的检测，将有效地降低检测成本，缩短检疫时间，提高检出率。近年研究发现，LUXTM 荧光 PCR 方法、实时荧光 PCR 方法和巢式 PCR 方法更适合应用于牛及其遗传物质的进出口检验检疫以及养牛业疾病防控等领域对 IBRV 的快速检测^[45-46]。

5.4.2 核酸探针技术

核酸探针技术是一种比较敏感的病原核酸检测方法，比传统的血清学方法更为敏感特异，检测结果可直接判定被检宿主感染病毒的阴阳性。Pandita 等^[47]于 1995 年建立了用斑点杂交检测 IBRV 病原的方法，可正确鉴别感染 IBRV 的阳性细胞和阴性细胞。

6 IBR 防治措施

世界各国对于 IBR 的控制采取不同的方法。例如，瑞典、丹麦和芬兰等少

数几个国家已经通过禁止接种 IBR 疫苗、扑杀血清阳性牛以及其他预防措施而根除了 IBR。也有一些国家用疫苗来控制 IBR，但即使有各种免疫控制计划，但该病仍在继续扩散增加^[48]。

预防本病应在加强兽医防疫卫生措施以及牛群饲养管理的基础上，强化冷冻精液的检疫、管理制度，严格控制从有 IBR 流行的国家或地区引进牛只或其精液，若必须引进时必需经隔离观察，并进行严格的病原学、血清学或分子生物学检查，经证明在未被感染或精液未被污染的情况下才可以投入使用^[11]。

目前，没有特效药物治疗 IBR，但是为了阻止细菌或支原体的继发感染，降低死亡率，可选用一些广谱抗生素或磺胺类药物，并进行综合性对症处置。如果牛群中暴发 IBR，应立即采取隔离、封锁、消毒等措施，与此同时，对所有牛（除孕牛之外）接种弱毒疫苗，扑杀抗体阳性牛，淘汰康复后的种牛^[49]。

7 IBR 疫苗研究

7.1 传统常规疫苗

传统的常规疫苗包括弱毒疫苗和灭活苗。

7.1.1 弱毒苗

Todd（1971 年）报道了 1 种经兔肾细胞连续传代而获得的弱毒疫苗，该疫苗具有产生免疫效应快、不会对接种牛产生任何不良反应以及不会致使怀孕母牛流产的优点，广泛使用于美国各个地区^[50]。但是，弱毒疫苗存在着以下缺点：疫苗毒株与野毒株之间可能存在交叉反应性，接种之后无法辨别接种牛和野毒感染牛；疫苗在牛群之间传播时可能会引起毒力返祖增强，从而使免疫牛群成为 IBR 潜在的传染源。

7.1.2 灭活苗

有些研究人员用乙醇皂苷制成灭活苗，接种于鼻黏膜内，效果较好，特别对孕畜比较安全。也有些灭活苗中加入弗氏不完全佐剂或者氢氧化铬胶等，可以起到提高疫苗保护效果的作用^[51]。虽然灭活苗相对安全，但是免疫强度不高，不能够保护强毒的攻击。Kilari 研究证明，IBRV 油佐剂疫苗不能阻止病毒的持续性感染。

7.2 新型疫苗

新型疫苗包括基因缺失疫苗、亚单位疫苗、DNA 疫苗和活载体重组疫苗等。

7.2.1 基因缺失疫苗

研究发现，gB、gC、gE、TK 等基因是牛传染性鼻气管炎病毒基因组中病毒复制的非必需基因，成为了构建基因缺失疫苗的首选对象。目前，已陆续成功地构建了单基因、双基因，甚至是三基因缺失的疫苗。1984 年，美国首先使用牛传染性鼻气管炎病毒 TK 基因缺失苗，该疫苗接种牛后既能够有效地起到保护作用，又能够区别野毒株和疫苗株之间的感染，但存在具有潜伏性的缺点。1994 年澳大利亚学者 Smith 构建了 1 株牛疱疹病毒的 TK 基因缺失疫苗，经肌肉或静

脉接种后能产生较好的免疫原性，且没有任何明显的副作用。现如今 IBR-TK 基因缺失苗已经广泛应用于 IBR 的预防^[52]。

7.2.2 亚单位疫苗

亚单位疫苗既有效又安全，不存在潜伏感染的危险性，但是因其存在着不能在宿主体内复制、所需接种量大、成本高等缺点，故该疫苗并没有被广泛使用。

7.2.3 DNA 疫苗

近年来疫苗研发的新方向即为 DNA 疫苗，它能够刺激宿主产生持久的体液免疫和细胞介导的免疫作用，并且容易制备成多价疫苗。但是，由 Gupta P K 等用编码 gC 基因的片段制备的 DNA 疫苗，经皮内和肌肉接种方式免疫犊牛后进行攻毒试验，结果表明，肌肉接种免疫效果优于皮内接种，但两种接种方式的保护效果均不佳。根据进行的相关动物试验，国外学者认为该疫苗对大型动物的免疫作用并不理想。

7.2.4 活载体重组疫苗

以重组病毒制备的基因工程活载体疫苗具有以下优点：可同时刺激宿主产生体液免疫和细胞免疫，既无弱毒苗可能恢复毒力带来的威胁，又克服了灭活苗免疫原性不高的缺陷，同时还可以构建多价或多联疫苗。根据加拿大学者 Reddy P S 的研究，其选择具有复制能力、但存在复制缺陷的 BAV-3（牛腺病毒-3）为载体表达 IBRV 的 gD 糖蛋白，进而制作了 IBRV 的重组疫苗，免疫结果显示该疫苗能使试验牛得到较好的保护并减少了散毒的风险，但不能彻底地解决免疫后散毒和免疫效力不足等地缺点^[53]。

第二节 牛副流感病毒 3 型病的研究概况

牛副流感病毒 3 型病是由牛副流感病毒 3 型（*Bovine parainfluenza virus 3*, BPIV3）引起的一种热性接触性传染病。BPIV3 是单股负链 RNA 病毒目（*mononegavirales*）、副黏病毒科（*paramyxoviridae*）、副黏病毒亚科（*paramyxovirinae*）、呼吸道病毒属（*respirovirus*）的成员，为牛呼吸道疾病的主要病原之一，又被称为运输热病毒^[11]。自 1959 年 Reisinger^[12]等首次在美国从奶牛中分离到 BPIV3 之后，法国、日本、前苏联、澳大利亚、加拿大、丹麦、巴拿马和意大利等国家也相继报道分离出该病毒^[13]；我国在近期才开始研究该病毒，根据最近几年的文献报道^[14-15]，BPIV3 已经在我国内蒙古、黑龙江、吉林、山东和山西等地存在。BPIV3 感染临床症状表现变化很大：从无症状到严重的呼吸道疾病，大部分牛感染 BPIV3 后仅表现出咳嗽、发热、流涕等症状，但某些存在应激的牛则表现出严重的组织损伤和免疫抑制，从而引起细菌的继发感染，表现为肺炎以及肺部、胸腔的出血性败血症；并且该病毒常与牛呼吸道合胞体病毒混合感染，使病情更加复杂^[25]。该病在世界范围内流行，尤其是美洲和亚洲，每年都给养牛业造成严重的经济损失。目前我国对该病的研究较少，也没有相关有效的

疫苗。

1 病原学

1.1 BPIV3 的分类地位

BPIV3 最初分离时因其与流感症状相似,被归类于粘病毒属;1962年, Waterson 鉴于 BPIV3 具有与流感病毒不同的生物学及理化性质,将原来的流感病毒列为第一类粘病毒,而将 BPIV3 列为第二类粘病毒;直到1982年的第四次国际病毒命名会议上,才将 BPIV3 列为副粘病毒属;第六次国际病毒分类委员会会议报道, BPIV3 属于副粘病毒科副粘病毒亚科副粘病毒属成员^[54]。该属成员还包括人和动物的副流感 1-4 型病毒。

1.2 BPIV3 的形态结构

BPIV3 的病毒粒子呈多形性,多为球形,直径位于 150-250 nm 之间。病毒核衣壳呈左旋方向的螺旋对称,螺旋数目大约为 200-220 个,直径为 14-18 nm,螺距大约 5.0-6.5 nm。核衣壳外包裹有囊膜,囊膜表面有直径为 8-10 nm 的纤突。核衣壳内是病毒基因组,为单股负链、不分节段的 RNA 分子,长度约为 15460 bp^[11]。

病毒基因组主要由 6 个基因组成,分别为 NP、P、M、F、HN 和 L 基因,其排列次序为 3'-NP-P-M-F-HN-L-5'。6 个基因分别编码核蛋白(NP)、磷蛋白(P),基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素神经氨酸酶蛋白(HN)和大聚合酶亚单位(L),见图 2。6 个基因及其编码的蛋白简介如下:

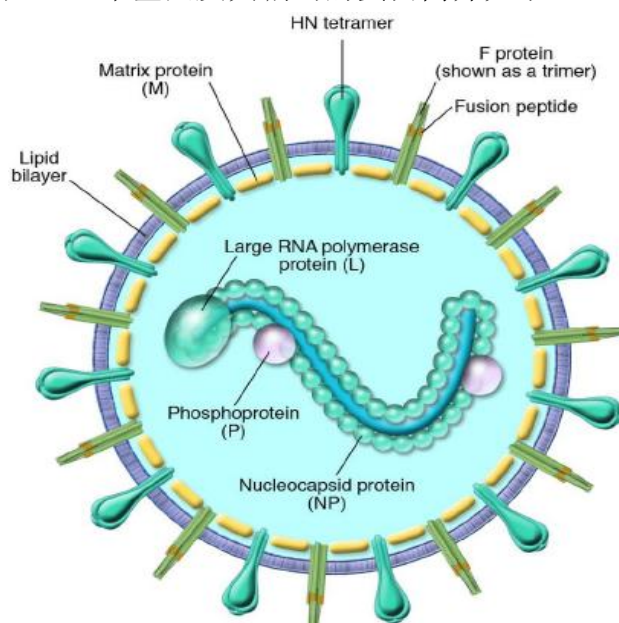


图 2 牛副流感病毒 3 型各蛋白示意图

Fig. 2 A schematic diagram of the bovine Parainfluenza virion

NP 蛋白 核衣壳 (NP) 蛋白由 NP 基因编码,包含约 515 个氨基酸,是病毒核衣壳蛋白的主要成分。每个基因组中约有 2200-2600 个拷贝,大量的 NP 蛋白包裹着病毒基因组,控制着核衣壳的稳定性和可变性。NP 蛋白含有两个结构

域: N 端结构域与 RNA 结合, 高度保守; C 端结构域位于完整的核衣壳表面, 含有对蛋白酶敏感的抗原决定位点和磷酸化位点, 与基因组模板活性有着密切的关系。NP 蛋白虽然有很好的免疫原性, 但它不能有效地介导宿主的体液免疫^[55]。

P 蛋白 BPIV3 的 P 基因存在两个 RNA 的编辑位点: 第一个位点 (5'AAAAAAGGGG3') 在 P 基因的 794-803nt; 第二个位点 (5'AAAGGAAAGAGAGG3') 在 P 基因的第 1105-1118nt。P 基因是一个重叠基因, 可以通过重叠的阅读框编码出 3 种蛋白。P 蛋白是一种高度磷酸化的蛋白, 约由 596 个氨基酸组成, 其分子量大小约为 66 KD。它是副流感病毒 RNA 聚合酶的两个亚基之一, 和 L 蛋白共同组成 RNA 聚合酶复合体。不同分离株的 P 蛋白氨基酸同源性高达 95%, 且与 HPIV3 P 蛋白的同源性仅为 56%。

M 蛋白 M 基因是 BPIV3 最保守的基因, 其 mRNA 长度为 1150 bp, 在 ORF 起始处存在一个很强的核糖体结合位点, 序列为 5'-AAAUGA-3'(Kozak, 1986)。编码的 M 蛋白由 351 个氨基酸组成, 位于核衣壳与囊膜之间, 在病毒粒子的装配过程中参与囊膜的形成, 介导囊膜与核衣壳之间的识别, 使病毒粒子能够顺利装配和成熟起来, 以维持病毒粒子结构的完整性。进一步研究表明, M 蛋白的不稳定表达, 是导致病毒在培养细胞中培养传代缺陷的原因; 另外这种不稳定的蛋白与 NP 蛋白的相互作用可能对病毒基因组的转录有抑制作用(Collins, 1996)。最近, 有研究报道, M 蛋白与细胞微管蛋白的相互作用是病毒引起机体自身免疫性疾病的原因之一。总之, M 蛋白在病毒的组装、持续性感染的建立以及病毒的发病机理上发挥着重要作用^[56]。

F 蛋白 BPIV3 的 F 基因长度为 1845-1851 bp, 编码的 F 蛋白含有约 540 个氨基酸。F 蛋白为病毒表面的第二种糖蛋白, 属于糖蛋白 I 型, 由头部、颈部和柄部 3 个区域组成, 是病毒入侵宿主的关键成分, 也是病毒囊膜与宿主细胞表面脂蛋白膜融合所必需的^[57]。F 蛋白变异性较大, 不同毒株在 F0 蛋白水解位点的精氨酸和赖氨酸的数量和距离都不同, 两种氨基酸成对标志着水解作用加强, 会导致病毒侵袭力增强; 水解后, 形成一个大的疏水性单位 F1, 能够插入宿主细胞膜, 介导融合, F1 蛋白氨基端的 20 个氨基酸尤为保守; 另外还产生一个较小的亚单位 F2。F 蛋白存在着亮氨酸拉链, 使 F 蛋白发生低聚化, 而且能够通过这种模体结构与细胞蛋白相作用, 对病毒在细胞中的定位与装配发挥重大作用^[58]。

HN 蛋白 HN 蛋白由 572 个氨基酸组成, 包括羧基端结构域、跨膜结构域和氨基端结构域三部分, 属于糖蛋白 II 型。其氨基端具有很好的疏水性, 故 HN 蛋白可以牢固的嵌入到病毒的囊膜上。HN 蛋白也是病毒吸附到宿主细胞表面的主要辅助蛋白, 它能够通过与宿主细胞膜表面的唾液酸受体结合而将病毒和细胞紧紧结合在一起, 从而启动病毒感染过程^[59]。

L 蛋白 L 基因是 BPIV3 最大的基因, L 蛋白是 L 基因唯一阅读框的编码产物, 大小约 200 kD, 包含约 2233 个氨基酸。L 基因对病毒 RNA 复制起着重要的调控作用, 而 L 蛋白具有蛋白激酶活性, 能够磷酸化 P 蛋白上的两个磷酸

化位点，这两个位点的激活都是为病毒转录所必需。L 蛋白是一种多功能蛋白，参与病毒的复制、转录、转录后加工加帽、甲基化以及多聚腺苷酸化等过程^[56]。

1.3 BPIV3 的基因分型

对 BPIV3 进行基因分型的研究报道最早是见于 2008 年，Horwood^[60]等根据全基因组和 M 基因之间的相似性，将 BPIV3 分为 BPIV3a 基因亚型和 BPIV3b 基因亚型，两种亚型之间基因的相似率最高只有 82.6%-83.1%，而亚型内的相似率在 92.3%-100%，其中，BPIV3b 基因型仅见于澳大利亚和阿根廷。2008 年，由朱远茂在山东分离的 BPIV3 毒株 SD0835 与国外公开发表的 BPIV3 a 亚型和 BPIV3b 亚型基因序列亦有较大差异，被命名为基因 C 型。因为目前世界上只报道了数株 BPIV3 序列，故很难精确断定这种变异分型是否适用于全球范围内的 BPIV3 变异株，因此，此分型方法是否准确有效有赖于进一步的免疫学验证，这将在 BPIV3 疫苗发展中发挥重要作用。

1.4 BPIV3 的理化特征

BPIV3 对热敏感，在 50℃ 水浴 30 min 可使病毒感染力降低 90% 以上，55℃ 水浴 30 min 可将其彻底灭活。该病毒对氯仿、乙醚等有机溶剂敏感，与等量氯仿在 22℃ 处理 10 min 即可使其灭活；用 20% 乙醚 4℃ 处理该病毒 16 h 也可使其彻底失活^[11]。

1.5 BPIV3 的培养特性

在鸡胚的羊膜腔中接种 BPIV3，该病毒能够生长良好，可以在鸡胚液中产生血凝素。但当在尿囊腔接种 BPIV3 时，病毒不会生长，这是 BPIV3 与其它副流感病毒的鉴别要点。BPIV3 在犊牛、猪等动物的肾细胞培养物中均能够生长良好^[39]。

2 流行病学

本病在自然条件下只感染牛，其中以舍饲的育肥牛多发，放牧牛少发。病牛和带毒牛是本病主要的传染源，易感牛与排毒牛接触后，通过空气飞沫经呼吸道而感染，另外 BPIV3 也能够孕畜体内通过血液循环而感染胎儿。血清学研究，认为本病毒广泛分布于世界各地，但健康牛血清中存在 BPIV3 阳性抗体的现象非常普遍。本病诱因复杂，动物多因长途运输、受到环境应激或因有其它病原微生物的协同作用而发病，具有明显季节性，多见于晚秋和冬季等寒冷季节^[2]。

3 临床症状与病理变化

临床症状表现变化很大：从无明显发病症状到严重的呼吸道疾病。病牛一般仅表现为体温升高（可达 41℃ 以上）、精神不振、食欲减退、产奶量下降、流粘液性鼻涕、流泪、脓性结膜炎等症状，孕畜也可引发流产。咳嗽一般是湿性的，呼吸困难，有时张口呼吸，有时出现腹泻。但某些存在应激的牛则表现出严重的组织损伤和免疫抑制，从而引起细菌和支原体的继发感染，表现为肺炎以及肺部

和胸腔的出血性败血症；并且该病毒常与牛呼吸道合胞体病毒混合感染，使病情更加复杂^[25]。

病牛尸检可见病变主要集中在肺的心叶、隔叶和间叶。主要表现为肺间质增宽、水肿，病变部位呈灰色及暗红色，肺切面呈特殊斑状，可见有灰色或红色肝变区，气管内充满浆液，肺门和纵隔淋巴结肿大，部分有坏死病灶。心内外膜有出血点，胃肠道粘膜有出血斑点^[25]。

4 诊断技术

根据流行病学、临床症状和病理变化可做出初步鉴别诊断，但需要实验室诊断进行确诊。实验室诊断方法包括病毒的分离鉴定、血清学方法及分子生物学检测等^[56]。目前，血清学方法应用最多的是病毒中和试验（VN）、间接免疫荧光（IFA）、补体结合试验（CFT）及多种酶联免疫吸附试验（ELISA），其中以 ELISA 最为普遍。分子生物学检测应用最多的是 RT-PCR，其具有很高的敏感性、特异性和准确性，能在体外特异地将待测基因序列的拷贝数快速扩增 10^4 - 10^7 倍，但是 RT-PCR 反应的条件选择非常严格，扩增所用引物需要较强的特异性^[61]。

5 防治措施

5.1 免疫预防

疫苗免疫是预防 BPIV3 的主要措施，常用灭活疫苗和减毒活疫苗^[39]。灭活疫苗以 BPIV3 感染的细胞培养物为原料，用甲醛或者 β -丙内酯等灭活，添加铝胶和佐剂制造而成；由于本病常见混合感染，因此 BPIV3 减毒疫苗可以与 BRSV、IBRV 与 BVDV 等做成多联苗，能起到更好的免疫效果^[11]。

5.2 治疗方法

目前，对于本病没有特效药物，发病时根据临床症状进行强心、平喘、止咳等对症治疗，及时补充体液及维生素，同时辅以抗病毒和抑菌药物等防止继发感染。发现病畜应立即隔离，并对畜舍进行严格消毒。

5.3 综合防治

牛副流感在长途运输、环境及气候骤变等应激条件下极易发生，因此要做到以下几个方面：养殖人员应加强对牛只平时的饲养管理，保证饲料营养全价，保证环境稳定舒适；冬季做好保暖工作，夏季保证供水充足，注意避暑；在对牛进行长途运输时，做好对牛的福利工作，定时安排牛休息进食；坚持自繁自养，尽量少引种，对外界引进的牛只，一律做好隔离、检疫工作，确诊不携带 BPIV3 后方能入群；制定合理的免疫程序，定期免疫。

第三节 牛呼吸道合胞体病毒病的研究概况

牛呼吸道合胞体病毒病是由牛呼吸道合胞体病毒（*Bovine respiratory*

syncytial virus, BRSV) 引起的一种急性、热性呼吸道传染病。BRSV 属于副粘病毒科肺病毒属, 因其在组织培养过程中可使培养细胞产生独特的细胞融合病变, 而被命名为牛呼吸道合胞体病毒, 是引起牛和其它反刍动物呼吸道疾病的主要病毒之一^[62]。BRSV 自 1967 年首次在瑞士被 Paccaud 和 Jacquier^[17] 分离报道以来, 美国、加拿大、比利时、日本和意大利等国家相继报道分离到该病毒^[18-22]; 我国对 BRSV 的研究报道较少, 2008 年由冯军科等^[23] 首次报道分离到 BRSV 毒株, 证实了 BRSV 在中国的存在。该病发病率一般很高, 可达 80%-100%, 但病死率很低, 仅为 1%-20%, 发病情况与种群密度和年龄结构密切相关^[2]。BRSV 感染后病畜一般无临床症状, 但集约化养殖的刚断奶犊牛及青年牛感染后可出现肺炎、间质性肺水肿及肺气肿等严重病变, 给养牛业造成严重的经济损失^[39]。在欧盟国家 BRSV 被列为仅次于牛黏膜病病毒 (BVDV) 及牛传染性鼻气管炎病毒 (IBRV) 的三大重要牛病病毒之一^[24]。

1 病原学

1.1 分类地位

牛呼吸道合胞体病毒属于副粘病毒科肺病毒亚科肺病毒属成员, 与火鸡鼻气管炎病毒 (TRT)、鼠肺炎病毒 (PVM)、山羊呼吸道合胞体病毒 (CRSV) 和绵羊呼吸道合胞体病毒 (ORSV) 同属。研究发现, BRSV 与 PVM、TRT 虽然形态相似, 但抗原结构不同; BRSV 与人呼吸道合胞体病毒 (HRSV) 有共同抗原, 与山羊呼吸道合胞体病毒抗原结构最相似^[11]。

1.2 形态特征

BRSV 病毒粒子呈多态性, 大部分呈球形, 直径为 60-100 nm, 有的呈细丝状, 长度可达 5 μm ^[63]。核衣壳厚度为 7-15 nm, 呈螺旋对称, 上面有 7-19 nm 长的尖棒状纤突。病毒粒子之间通过 12 nm 长的桥相互连接形成网状结构, 但网状结构之间的桥连功能尚不清楚^[11]。

1.3 理化特性

牛呼吸道合胞体病毒在蔗糖中的浮密度为 1.18-1.20 g/cm^3 , 在 CsCl_2 中的浮密度为 1.23 g/mL , 沉降系数 50 S。对热敏感, 将病毒在室温中放置 24 h, 其感染力会明显下降; 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 可以完全灭活。对酸敏感, 最适宜保存 pH 值为 7.5; 对脂类溶剂如氯仿和乙醚等敏感, 对 0.25% 胰脲和脱氧胆酸盐敏感。在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中可保存数月^[39]。

1.4 培养特性

BRSV 适合在牛胚胎肾、肺、睾丸、滑膜、主动脉、脾、鼻甲和气管等多种牛源初代细胞上培养, 且在呼吸系统的细胞培养物上生长最好。BRSV 在牛源细胞上培养数代之后, 可见培养细胞出现细胞融合病变, 且胞浆内有嗜酸性包涵体出现。BRSV 可接种 1 日龄小鼠的脑组织中培养, 但接种或感染后的鼠, 虽可检测出低滴度的特异性中和抗体, 但均无临床病变^[64]。

1.5 基因组结构

牛呼吸道合胞体病毒基因组是单股负链 RNA,由 15140 个碱基组成,转录 10 种 mRNA,分别翻译 11 种特异性病毒蛋白^[1]。这 11 种蛋白为融合蛋白 F、M2-1、M2-2、大聚合酶蛋白 L、NS1、NS2、核衣壳蛋白 N、磷蛋白 P、基质蛋白 M、小疏水蛋白 SH 和附着蛋白 G。其中核蛋白 N、磷蛋白 P、大聚合酶蛋白 L 为核壳体蛋白,融合蛋白 F、附着蛋白 G、小疏水蛋白 SH 为跨膜蛋白, M、M2-1、M2-2 为非糖基化的基质蛋白,NS1、NS2 为非结构蛋白。L、N、P 蛋白是核衣壳的主要成分,G、F、M2、SH 蛋白是病毒囊膜的主要成分,M 蛋白位于囊膜和核衣壳之间(见图 3)。现简要介绍以下主要蛋白:

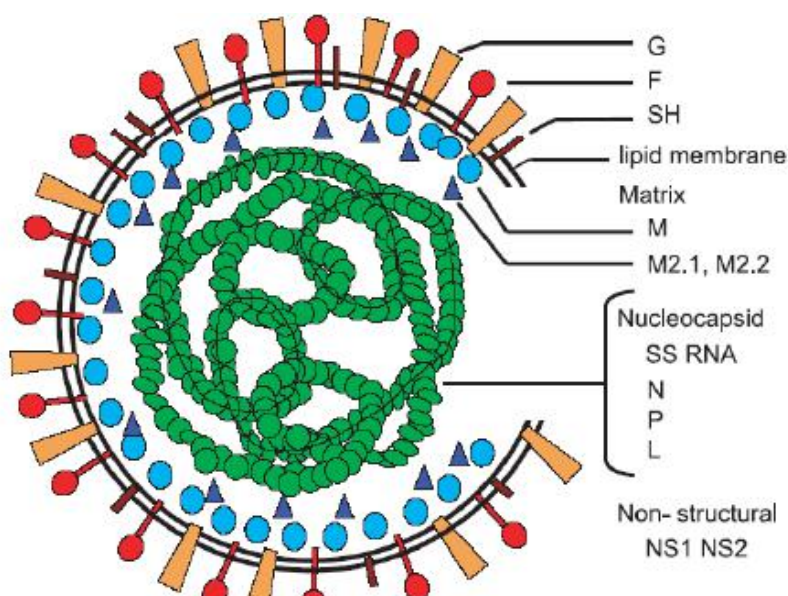


图 3 牛呼吸道合胞体病毒示意图

Fig. 3 Diagram of bovine respiratory syncytial virus

N 蛋白(核蛋白) N 蛋白是核衣壳的重要组成部分,由 391 个氨基酸残基组成,分子量是 42.6 KD,是 BRSV 11 个蛋白中保守性最高的蛋白^[65],与 P 蛋白、L 蛋白以及 M2-1 蛋白、M2-2 蛋白共同组成 BRSV 的 RNA 聚合酶复合体^[66]。研究发现,BRSV 感染宿主后,宿主细胞内病毒 N 蛋白含量最高,被感染宿主血清中含有高水平的抗 N 蛋白的抗体^[67]。

F 蛋白(融合蛋白) F 蛋白含 574 个氨基酸,分子量约为 70 KD,是 BRSV 复制过程中的必需蛋白^[68]。F 蛋白通过促进细胞膜与病毒融合,使病毒顺利进入并感染细胞,并进一步促进受感染的细胞与相邻细胞融合,从而导致合胞体形成。病毒复制过程中,BRSV 在宿主细胞内先合成没有活性的 F 蛋白前体 F0,F0 被蛋白酶的切割后,形成了能够介导细胞融合的 F1 和唯一能够决定 BRSV 感染宿主细胞特异性的 F2,F1 与 F2 通过二硫键相连^[69-70]。

G 蛋白(附着蛋白) G 蛋白是一种 II 型跨膜糖蛋白,根据分离毒株的不同,可包含 257 或 263 个氨基酸残基^[71]。G 蛋白由胞浆区、锚定区和外功能区 3 个独

立的区域组成。其中外功能区包含两个富含 Ser、Thr 和 Pro 的区域，具有高度可变性，含有大量由 O 和 N 连接的寡糖,4 个非常保守的 Cys 残基形成两个二硫桥,但这些结构不会影响 G 蛋白的粘附活性^[72]。G 蛋白能够与宿主细胞的膜受体结合，从而介导病毒进入宿主细胞，与其他副粘病毒相比，BRSV 的 G 蛋白无血凝和神经氨酸酶活性^[73]。G 蛋白抗原决定簇高度折叠，是 BRSV 抗原性和遗传性差异最大的蛋白，也是 BRSV 重要的保护性抗原，其特异性抗体能够阻断病毒与细胞的结合^[74-75]。

M 蛋白（基质蛋白）与其他副粘病毒不同，BRSV 有 3 种基质蛋白。M 蛋白位于病毒囊膜内，分子量约为 25 KD，包含 256 个氨基酸，对病毒粒子的形成起关键作用^[76]。BRSV 的 M2 基因处于 F 基因与 L 基因之间，编码 M2-1 和 M2-2 两种假定的蛋白。M2-1 蛋白能够促进 RNA 的转录与延伸，从而减慢 RNA 转录的中止，在 RNA 转录时有利于促进顺利读过每个基因连接点^[77]；M2-2 蛋白对 RNA 的转录和复制起调控作用^[78]。

SH 蛋白（小疏水蛋白）根据 BRSV 分离株不同，SH 蛋白分别含有 64-81 个不等的氨基酸^[79]，是 BRSV 一个小的表面糖蛋白，在病毒感染的细胞中遍及所有细胞质。在其感染的细胞内，非糖基化的 SHo、糖基化的 SHg 以及 SHg 产生的 SHp 是 SH 蛋白三种主要的存在形式，非糖基化的 SHt 是其次要的存在形式，这四种 SH 蛋白表现形式都与细胞膜有关，除 SHt 外，都在细胞表面表达^[80]。SH 蛋白可能在病毒的感染和合胞体形成过程中不起主要作用，但在病毒逃逸宿主免疫中起作用^[81]。

NS 蛋白 NS 蛋白包括含有 136 个氨基酸的 NS1 和含有 124 个氨基酸的 NS2 两种蛋白。NS 蛋白一般出现在被侵染的宿主细胞中，成熟的病毒粒子中没有 NS 蛋白的存在，故被称为非结构蛋白，是肺病毒属与其他副粘病毒的主要区别之一。NS 蛋白对 BRSV 侵染的宿主的 IFN 有抑制作用，但该抑制作用的机理尚不清楚^[82]。

1.6 亚型的划分及其血清型

针对 BRSV 的基因分型，研究表明可利用抗原亚型和遗传亚型两种方法划分 BRSV 的亚型。抗原亚型分类可根据 G 蛋白抗原性的不同，把 BRSV 划分为 A 型、B 型、AB 型和未知型 4 种抗原亚型^[83]，同种亚型内氨基酸序列的同源性为 88%-100%；遗传亚型分类可根据 G 蛋白、F 蛋白和 N 蛋白核苷酸序列的同源性比较及系统发育分析，分别把 BRSV 划分为 I-VI 6 个、I-V 5 个和 I-V 5 个遗传亚型，各遗传亚型之间的变异率低于 15%，而 HRSV 一个亚型内部各毒株间的变异率比它都高。目前，世界各地已经分离到 BRSV 几十株，但是交叉中和试验的结果表明，BRSV 只有一个血清型^[84]。

2 流行病学

BRSV 自 1967 年首次在瑞士被 Paccaud 和 Jacquier^[17]分离报道以来,美国、加

拿大、比利时、日本和意大利等国家相继报道已分离到该病毒^[18-22]；我国对 BRSV 的研究较少，2008 年由冯军科等^[23]首次报道分离到 BRSV 毒株，证实了 BRSV 在中国的存在。随着动物贸易的全球化，BRSV 感染在全世界广泛存在。

本病具有明显的季节性，多发于秋末春初和冬季等寒冷季节，发病率一般很高，可达 80%-100%，但病死率很低，仅为 1%-20%，发病情况与种群密度和年龄结构密切相关。感染的牛是本病最主要的传染源，易感动物为牛、山羊、猪和马等，牛对 BRSV 的易感性因品种、年龄和性别有所差异，其中犊牛最为易感。本病主要通过牛体间的直接接触传播，也可通过空气飞沫经呼吸道传播^[11]。目前还不明了 BRSV 能否垂直传播，但是有学者已从牛胚胎血清中检测出抗 BRSV 的阳性抗体^[64]。

3 临床症状

本病的潜伏期 2-7 d，大多数牛一般为无症状感染，发病牛临床症状主要表现为食欲不振、体温升高、精神萎靡、咳嗽、呼吸急促、流泪、流鼻液以及流涎等。体温升高到 39.5-41.5℃，稽留 5-6 d。一般为湿性咳嗽，症状一般持续 10 天左右。病牛呼吸急促，在咳嗽时常排出粘稠脓性粘液。呼吸道症状严重的病牛，由于气管粘膜肿胀或渗出物堵塞气管引起气管狭窄，听诊能听到喘鸣音。病牛流出鼻液大量，最初呈水样，以后变为粘稠脓样，有时混有血液。在病牛的口角周围和牛舍里可看到泡沫性流涎，这是本病的必发症状。病重的牛常卧地不起，并伴有白血球减少症。病程长的牛在继发细菌感染后白血球会增多。BRSV 感染泌乳奶牛可使其泌乳量显著下降；BRSV 感染怀孕母牛可使其发生流产^[25]。

4 病理变化

自然病例尸检呈典型的组织间隙性肺炎，特征是亚胸膜的出现及间隙性气肿和肺炎。亦可见渗出性间隙性肺炎、肺泡壁变厚、细支气管上皮及肺上皮增生、透明膜形成以及肺水肿等病变。在心气囊、肾等处组织也可见到气肿，也可发现小范围粘合、广泛性小叶粘连、气肿性大泡以及小支气管和细支气管分泌物增多^[85]。试验感染牛有混合性鼻炎和卡他性细支气管炎的病灶，也可见上皮损伤、细支气管上皮的增生和组织变形、肺中膈增厚以及肺渗出物增多。

电镜检查发现肺组织中 II 型肺细胞增多及支气管和细支气管上皮细胞的坏死。在细支气管上皮和肺实质可发现巨细胞或者合胞体。在支气管、细支气管的纤毛和无纤毛上皮细胞及肺细胞中含有许多聚集的病毒核蛋白和成熟的病毒粒子^[86]。

5 诊断方法

对牛呼吸道合胞体病的诊断可根据流行病学、临床症状及病理变化上的特征

进行初步诊断，但确诊需要进行实验室诊断。目前国内对牛呼吸道合胞体病诊断的研究较少，主要集中在人呼吸道合胞体病的研究上。而国外报道的牛呼吸道合胞体病的诊断方法有多种，其中包括病毒的分离与鉴定、病毒抗原性检测、血清学方法及分子生物学检测等。目前，应用最多的是针对 BRSV 血清抗体进行的一系列检测方法，如血清中和试验（SNT）、间接免疫荧光（IFA）、补体结合试验（CFT）及多种酶联免疫吸附试验（ELISA），其中以 ELISA 最为常用。近年来，分子生物学检测方法中的 RT-PCR 也已广泛用于 BRSV 的检测^[87]。

6 防治措施

6.1 免疫预防

经过多年的研究，国外对 BRSV 疫苗的研究已取得了较大的进展，但截至现在国内外市面上仍未出现有效的 BRSV 疫苗。目前国外研制的用牛疱疹病毒作载体表达 BRSV G 蛋白的重组疫苗，可诱导粘膜免疫而使牛得到保护^[88]，有望为 BRSV 的免疫提供一种可靠有效地疫苗。

6.2 治疗方法

目前，对于本病没有特效药物，发病时根据临床症状进行退热、平喘、止咳等对症治疗，及时补充体液及维生素，同时辅以抗病毒和抑菌药物防止继发感染，用皮质类固醇药物控制过敏反应。一旦发现感染 BRSV 的病畜，应立即采取隔离措施，并对畜舍及其周边环境进行严格消毒。

6.3 综合防治

养殖人员应加强对牛平时的饲养管理，保证饲料营养全价、环境稳定舒适；对牛场粪便及时清理，做好牛场消毒工作；定期视察牛群，发现感染牛应立即隔离，及时进行治疗或者淘汰；冬季做好保暖工作，夏季保证供水充足，注意避暑；对外界引进的牛只，一律做好隔离、检疫工作，确诊不携带 BRSV 后方可入群；对于受威胁的牛群，制定合理的免疫程序，预防本病发生。

第二章 新疆部分地牛传染性鼻气管炎病毒的检测与 gD 基因序列分析

摘要: 为调查新疆部分地区牛传染性鼻气管炎病毒的感染情况, 从新疆石河子、奎屯、库尔勒、沙湾、阿克苏地区的五个规模化奶牛场采集 1 月龄以内犊牛鼻液 226 份, 其中发病犊牛 180 份, 相同日龄健康犊牛 46 份, 通过采用双抗体夹心 ELISA 的方法检测牛传染性鼻气管炎病毒抗原, PCR 方法检测牛传染性鼻气管炎病毒 gD 基因, 并挑选不同地区的 9 株病毒进行序列分析比较其同源性。结果: ELISA 方法检测的感染率为 17.96%, PCR 方法检测的感染率为 55.83%, gD 基因序列同源性为 77.80%到 99.80%; 所有的试验毒株与参考的美国和巴西毒株亲缘关系最近, 由共同祖先进化而来。结果表明新疆部分地区牛传染性鼻气管炎病毒感染较为普遍, 且多数毒株之间基因变异较大, 本研究结果为新疆地区 IBR 的免疫预防与疾病控制奠定了基础。

关键词: 牛传染性鼻气管炎病毒, ELISA, PCR, 序列分析

临床感染 IBRV 可导致牛表现流鼻涕、呼吸困难、上呼吸道及气管黏膜发炎等症状^[1], 还可引起牛的结膜炎、乳腺炎、幼牛脑膜炎、脓疱性外阴-阴道炎、龟头炎、流产等疾病^[11]。本病对养牛业的危害主要在于, IBRV 可在牛体内长期存在甚至终身带毒, 从而造成牛的持续性感染, 对奶牛的产奶量、育肥牛的增重、使役牛的使役力及公牛的繁殖力均有严重影响^[2]; 继发细菌与支原体感染可引起牛的支气管炎和/或肺炎, 治疗不及时往往导致牛的死亡^[27], 大大增高了牛群的淘汰率和死亡率。我国自 1980 年首次从新西兰进口种牛中分离到此病毒^[5]后, 该病呈逐年上升趋势, 目前在全国大部分省份的黄牛、水牛和乳牛中均有 IBRV 感染^[8], 给养牛业造成了严重的经济损失。

为了揭示新疆部分地区犊牛 IBR 的感染情况, 本试验共采集新疆部分地区的 5 个疑似犊牛 IBR 的奶牛场的 226 份发病及未发病样品, 通过采用双抗体夹心 ELISA、PCR 的方法检测牛传染性鼻气管炎病毒的感染, 通过序列分析比较不同牛场阳性样品克隆产物的同源性, 为本地区犊牛牛传染性鼻气管炎的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

分别于 2014 年 10-12 月和 2015 年 1-2 月、9-10 月采集新疆石河子、库尔勒、沙湾、阿克苏、奎屯地区 5 个主要规模化奶牛场 1 月龄以内疑似牛传染性鼻气管

炎症状（红鼻子）的犊牛鼻拭子样品 180 份，健康犊牛鼻拭子样品 46 份，保存于-80℃低温冰箱备用。

1.1.2 主要试剂

主要试剂见表 1。

表 1 主要试剂

Table.1 The main reagent

试剂名称	提供厂商
IBRV 双抗体夹心 ELISA 试剂盒 (TSZ)	上海酶联生物科技有限公司
病毒 DNA 提取试剂盒	宝生物 (Takara) 工程大连公司
pMD19-T 载体	宝生物 (Takara) 工程大连公司
PCR Mix、DL 2000 DNA Marker	广州东盛生物科技有限公司
Trans5q 化学感受态细胞	全式金生物科技有限公司
少量琼脂糖凝胶回收试剂盒	诺维森 (北京) 生物科技有限公司
质粒小提试剂盒	天根生化科技有限公司
基因引物	上海生物工程有限公司

1.1.3 实验仪器

-80℃超低温冰箱 (Haier)；-40℃低温冰箱 (中科美菱)；4℃常温冰箱 (中科美菱)；ZHWY-2102C 型恒温培养振荡器 (上海智城分析仪器制作有限公司)；TC-512 PCR 扩增仪 (德国 Hettich)；电子天平 (美国 Adventurer)；MIKRO 220R 冷冻高速离心机 (德国 Hettich)；超速离心机 (德国 Hettich)；旋涡混合器 (金坛市医疗器械厂)；水平电泳仪 (北京六一仪器厂)；微波炉 (GALANZ)；暗箱式紫外透射仪 (美国 BIO-RAD)；超净工作台 (美国 Baker)；精密鼓风干燥箱 (上海施都凯仪器有限公司)；HVE-50 高压灭菌器 (日本 Hirayama)；GSP-9720MBE 型隔水式恒温培养箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)；酶标仪 (美国 Gene 有限公司)；微量移液器 (德国 Eppendorf)；FM70-FM100-FM130 制冰机 (GRANT)；优普超纯水机 (成都超纯科技有限公司)；KDM 型控温电热套 (甄城华鲁电热仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

将样品从-80℃低温冰箱取出，置于 4℃冰箱融化。将 2 mL 的生理盐水加入装有采样棉签的 5 mL 冻存管中，在漩涡混匀器上充分振荡摇匀，完全溶解棉签上的鼻液，吸取 1.2 mL 的鼻液悬液于 1.5 mL 的离心管中，8000 r/min 4℃离心 15 min，将上清液用移液枪转移到新的 1.5 mL 离心管中，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，即得到待分离的病毒样品，-80℃保存备用。

1.2.2 IBRV 抗原 ELISA 检测

采用商品化的牛传染性鼻气管炎病毒抗原双抗体夹心 ELISA 试剂盒，按照试剂盒说明书 (见附录) 进行具体操作。操作流程如下：

稀释样品→加样→盖膜，37℃孵育→洗涤，拍板→加酶标复合物，置 37℃反应→洗涤，拍板，加底物作用→加终止液，读数。

1.2.3 IBRV PCR 检测

1.2.3.1 病毒 DNA 提取

将待分离的病毒样品从-80℃低温冰箱取出，置于4℃冰箱融化。IBRV DNA提取按照 TaKaRa 病毒提取试剂盒（Cat:9766）步骤操作。提取的病毒 DNA 立即使用或者保存于-20℃冰箱中。

- 1) 取 200uL 处理过的样品溶液装于 1.5 mL 的 EP 管中，加入 200 uL Buffer VGB、20uL Proteinase K 和 1.0 uL Carrier RNA，充分混匀后，放入 56℃水浴锅温浴反应 10 min。
- 2) 加入 200 uL 无水乙醇，用移液枪充分吸打均匀。
- 3) 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上，溶液移至 Spin Column 中，12000 rpm 离心 2 min，弃滤液。
- 4) 将 500 uL 的 Buffer RWA 加入至 Spin Column 中，12000 rpm 离心 1 min，弃滤液。
- 5) 将 700 uL 的 Buffer RWB 沿管壁加入至 Spin Column 中，12000 rpm 离心 1 min，弃滤液。
- 6) 重复步骤 5)。
- 7) 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上，12000 rpm 离心 2 min。
- 8) 将 Spin Column 安置于新的 1.5 mL Rnase free collection tube 上，再向 Spin Column 膜的中央加入 30-50 uL 的 Rnase free dH₂O，室温静置 5 min。
- 9) 12000 rpm 离心 2 min 洗脱 DNA，即得到病毒 DNA。

1.2.3.2 引物设计与合成

根据 GenBank 上登录的 IBRV 基因 gD 基因序列(登录号:NC_001847.1),利用 Primer 5.0 软件设计了 1 对引物,上游引物: 5-ACTGAACGCTGGCACACTAC-3, 下游引物 : 5 - TAGCCCTTCGACTCCTCAAA -3, 预期扩增片段大小为 671 bp。

1.2.3.3 PCR 扩增

PCR 反应组分: PCR Mix 10 uL, 上、下游引物各 0.5 uL, 模板 3 uL, ddH₂O 补至 25 uL。经反复实验摸索,确定 PCR 扩增条件为: 预变性 95℃ 5min, 变性 94℃ 45 s, 退火 58℃ 45 s, 延伸 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃延伸 10 min。

1.2.3.4 PCR 扩增产物的纯化回收

用天平称取 0.5 g 琼脂糖，加热 2 min 溶解于 50 mL 0.5xTBE 溶液中，配制 1% 的琼脂糖凝胶，以 0.5xTBE 为缓冲液，取 10 uL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，在紫外检测仪下观察结果。以 PCR 产物中出现 671 bp 大小条带的样品为阳性，用刀片将含有目的片段的琼脂糖凝胶尽可能地全部切下，装入干净的 1.5 mL 离心管中，用诺维森少量琼脂糖凝胶回收试剂盒回收病毒 DNA。回收产物立即使用或者保存于-20℃冰箱中。

- 1) 向盛有胶块的 1.5mL 离心管中加入 2 倍体积的溶胶液, 55℃ 水浴 15 min, 每隔 1 min 温和地上下翻转离心管。
- 2) 将融化的胶块加入到新的吸附柱中, 室温静置 5 min, 12000 rpm 离心 2 min, 将收集管中的滤液弃掉。
- 3) 将 700 uL 漂洗液 W2 加入到吸附柱中, 静置 5 min, 12000 rpm 离心 2 min, 将收集管中的滤液弃掉。
- 4) 重复步骤 3)。
- 5) 将吸附柱重新放入收集管中, 12000 rpm 空离 3 min, 把吸附柱在酒精灯下放置 30 min, 使其完全干燥。
- 6) 用新的 1.5 mL 离心管装干燥的吸附柱, 像吸附膜中心滴加 40 uL dH₂O, 室温环境下放置 5 min, 12000 rpm 离心 2 min, 得到的滤液即为回收产物。

1.2.3.5 连接 T 载体

本实验使用 TaKaRa 公司的 pMD 19-T 作为 Vector 克隆载体。连接体系如下 (10 uL):

表 2 T 载体连接反应体系

Table.2 Enzyme digestion reaction system of recombinant plasmid

组分	加入体积 (uL) /管
pMD19-T simple Vector	0.5
PCR 纯化回收产物	4.5
Solution I	5.0
Total	10

将上述反应体系混匀后, 放于 4℃ 冰箱中反应 20 个小时左右。

1.2.3.6 连接产物转化

1) 从 -80℃ 冰箱取出感受态细胞 DH5 α , 迅速放置新制冰盒内溶解, 待其溶解后分装, 每管 50 uL;

2) 将 5 uL 连接产物加入到分装后的感受态细胞中, 混匀后放置于新制冰盒内反应 25 min;

3) 将反应产物放入 42℃ 水浴锅内, 瞬时热激 90 s, 迅速放入新制冰盒内;

4) 向热激产物中加入 800-1000 uL 不含氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 在 37℃、220 rpm 的摇床中摇菌 1h, 使细胞恢复抗药性;

5) 将培养的菌液 8000 rpm 离心 2 min, 弃掉大部分上清液, 管底留 150 uL 左右液体, 用移液枪轻轻吹打以悬浮沉淀的细菌并混匀;

6) 用移液枪取 80 uL 菌液加入到含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上, 用涂布器充分涂匀, 封口, 标记好日期型号;

7) 将用封口膜封好的 LB 琼脂平板倒置于 37℃ 恒温培养箱中, 培养过夜, 第二天观察培养基上是否有单个菌落生长。

1.2.3.7 菌液 PCR 鉴定

挑取 4-6 个 LB 琼脂平板上的单菌落，将其接种到 1.5 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，在 37°C、220 rpm 的摇床中培养 3-4 个小时，然后进行菌液 PCR 鉴定。反应组分为：PCR Mix 10 uL，上、下游引物各 0.5 uL，模板 3 uL，ddH₂O 补至 25 uL；扩增条件为：预变性 95°C 5min，变性 94°C 30 s，退火 58°C 30 s，延伸 72°C 50 s，30 个循环，72°C 延伸 10 min。

挑选 PCR 鉴定结果为阳性的菌液，取 200 uL 阳性菌液接种于盛 50 mL 氨苄青霉素 LB 液体培养基的大离心管中，在 37°C、220 r/min 的摇床中培养过夜。

1.2.3.8 质粒提取

利用 TIANGEN 公司的质粒小提试剂盒提取菌液质粒。

- 1) 用收集管盛一个新的吸附柱，将 500 uL 的平衡液 BL 加入到吸附柱中，12000 rpm 离心 3 min，弃掉收集管中的滤液，静置备用；
- 2) 将过夜培养的菌液 12000 rpm 离心 5 min，留 1.5 mL 左右上清液，用移液枪轻轻吹打悬浮沉淀的菌体并混匀，移装于 1.5 mL 的离心管中，12000 rpm 离心 3 min，弃掉上清液；
- 3) 将试剂盒中的溶液 P1 用移液枪加 250 uL 于上一步的离心管中，彻底吹打混匀细菌沉淀；
- 4) 将试剂盒中的溶液 P2 用移液枪加 250 uL 于上一步的离心管中，用 1000 uL 的移液枪轻轻地来回吹打几次，完全裂解菌体；
- 5) 将试剂盒中的溶液 P3 用移液枪加 350 uL 于上一步的离心管中，马上将离心管上下温和地翻转 7-9 次，使各溶液成分完全混匀，12000 rpm 离心 15 min；
- 6) 用移液枪将离心产生的全部上清液加入至吸附柱中，12000 rpm 离心 3 min，将收集管中的滤液弃掉；
- 7) 将试剂盒中的漂洗液 PW 用移液枪加 600 uL 于吸附柱中，12000 rpm 离心 3 min，将收集管中的滤液弃掉；
- 8) 重复步骤 7)；
- 9) 用收集管盛装吸附柱，12000 rpm 空离 3 min，除去吸附柱中残余的漂洗液；
- 10) 用一个干净的 1.5 mL 离心管装吸附柱，用 100 uL 移液枪滴加 60 uL ddH₂O 于吸附膜的中心位置，室温放置 6min，12000 rpm 离心 3 min；
- 11) 向吸附柱中重新加入上一步的滤液，室温静置 6 min，12000 rpm 离心 3 min，得到的滤液即为质粒溶液。

1.2.3.9 DNA 序列测定和分析

将提取的质粒送公司测序。选取石河子地区的 SHZ 34、SHZ 94、SHZ 159，沙湾地区的 SW 167、SW 941，库尔勒地区的 KEL 03、KEL 10，阿克苏地区 AKS 12、AKS 151 共 9 份质粒样品，采用 DNAMAN、DNAS_tar、MEGA5 等软件分析基因序列。

2 结果

2.1 ELISA 检测结果

通过双抗体夹心 ELISA 方法检测 226 份样品的 IBR 感染情况，结果表明石河子某牛场患病牛感染率为 23.63%，健康牛感染率为 10.00%，整体感染率为 20.00%；奎屯某牛场患病牛感染率为 10.00%，健康牛感染率为 11.11%，整体感染率为 10.20%；沙湾某牛场患病牛感染率为 16.27%，健康牛感染率为 5.88%，整体感染率为 13.33%；库尔勒和阿克苏地区只采集了患病犊牛样品，感染率分别为 29.17%和 22.22%，均比石河子、沙湾和奎屯地区要高。见表 3。

表 3 IBRV 感染 ELISA 检测结果

Tab.3 The detection results of IBRV infection using ELISA

样品来源	患病牛样品数	阳性(份)	阳性率(%)	健康牛样品数	阳性(份)	阳性率(%)
石河子某牛场	55	13	23.63	20	2	10.00
奎屯某牛场	40	4	10.00	9	1	11.11
沙湾某牛场	43	7	16.27	17	1	5.88
库尔勒某牛场	24	7	29.17	0	0	0
阿克苏某牛场	18	4	22.22	0	0	0
总体	180	35	19.44	46	4	8.7

2.2 PCR 的检测结果

将采集的样品经 PCR 检测，可扩增得到预期 671bp 大小的基因片段，不同牛场部分样品 PCR 检测结果见图 4。

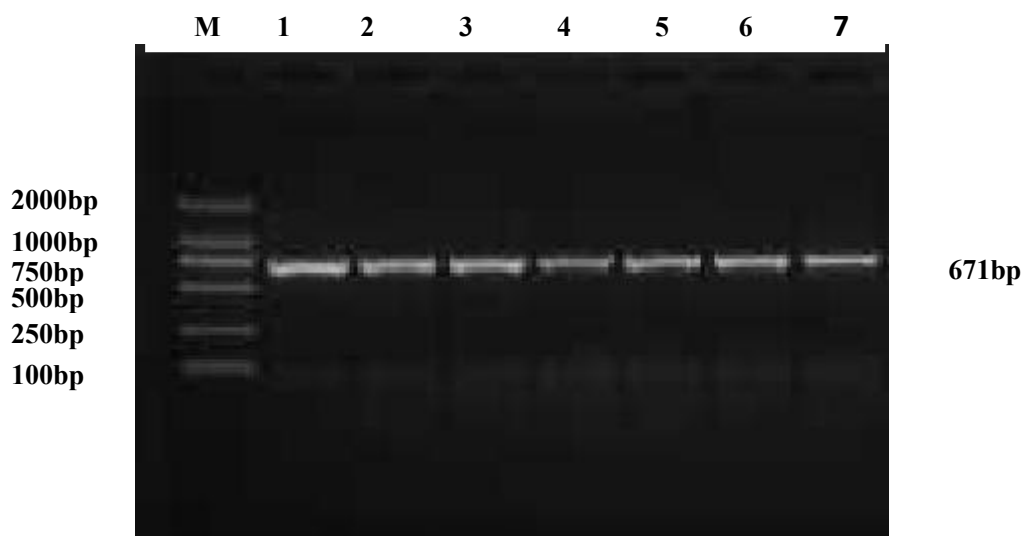


图 4 PCR 检测结果

M. DNA Marker DL2000, 1-7. 牛传染性鼻气管炎病毒 D 基因克隆产物

Fig.4 The test results of PCR

M. DNA Marker DL2000, 1-7. represent production D gene of IBRV

PCR 检测结果表明石河子某牛场患病牛感染率为 54.54%，健康牛感染率为 25.00%，整体为 46.67%；奎屯某牛场患病牛感染率为 47.50%，健康牛感染率为 33.33%，整体为 44.90%；沙湾某牛场患病牛感染率为 55.81%，健康牛感染率为 29.41%，整体为 48.33%；库尔勒和阿克苏地区只采集了患病犊牛样品，感染率分别为 66.67%和 72.22%。见表 4。

表 4 IBRV 感染 PCR 检测结果

Tab. 4 The detection results of IBRV infection using PCR

样品来源	患病牛样品数	阳性 (份)	阳性率 (%)	健康牛样品数	阳性 (份)	阳性率 (%)
石河子某牛场	55	30	54.54	20	5	25.00
奎屯某牛场	40	19	47.50	9	3	33.33
沙湾某牛场	43	24	55.81	17	5	29.41
库尔勒某牛场	24	16	66.67	0	0	0
阿克苏某牛场	18	13	72.22	0	0	0
总体	180	102	56.67	46	13	28.26

2.3 DNA 测序结果及序列分析

使用 DNASTAR 软件中 MegAlign Clustal V 方法，将测序的基因与 GenBank 上的参考毒株基因进行同源性分析比较，参考毒株基因分别为瑞士的 NC_001847.1 和 AJ004801.1，美国的 KC840323.1、KC840321.1、JX898220.1 和 KM258883.1，巴西的 KU198480.1，埃及的 AY690484.1。结果显示所有的试验毒株 gD 基因同源性在 80.7%-99.8%之间，地区内毒株同源性均高于 89.3%，地区间一些毒株同源性不高，未超过 90%；试验毒株与参考毒株 gD 基因同源性在 57.7%-99.8%之间。见图 5。

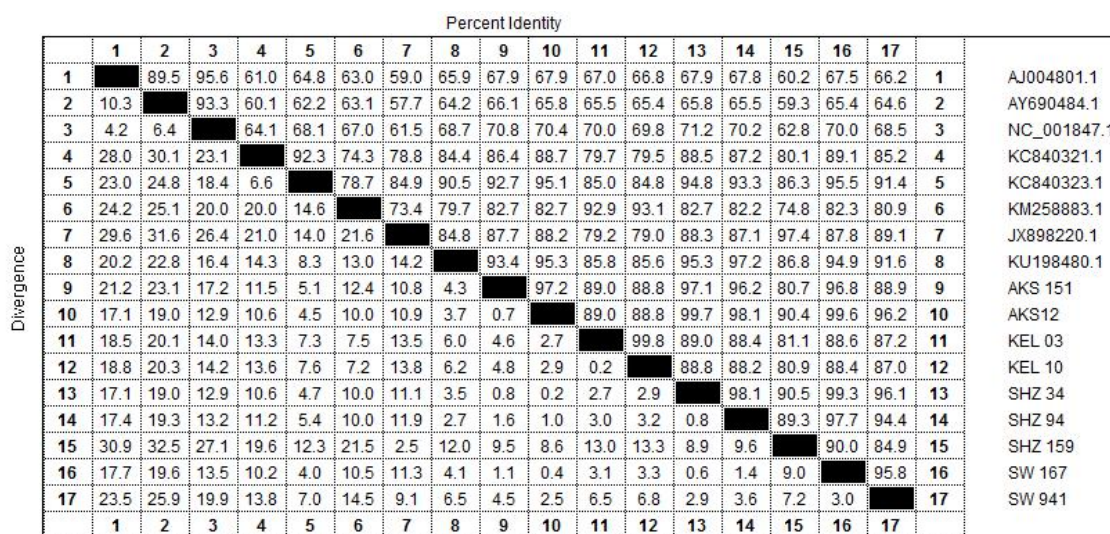


图 5 各株基因与 GenBank 上参考基因的同源性比较

Fig .5 The homology comparison between each strain' gene with reference gene in GenBank

用 MAGE version 5.0.1 将测序的 9 个 IBRV 毒株 gD 基因与所有参考的 GenBank 上登录的毒株基因做系统遗传进化树,结果显示所有的试验毒株与参考的美国和巴西毒株亲缘关系最近,由共同祖先进化而来。试验毒株与参考毒株分为 3 个进化分支:实验毒株 KEL03、KEL10 与美国 KM258883.1 组成一个进化分支,同源性的 92.9%-99.8%;其他实验毒株与美国 JX898220.1、KC840321.1、KC840323.1 毒株和巴西 KU198480.1 毒株组成一个进化分支,同源性的 80.1%-99.6%;瑞士 AJ004801.1、NC_001847.1 毒株与埃及的 AY690484.1 毒株组成一个进化分支,同源性的 89.5%-95.6%。见图 6。

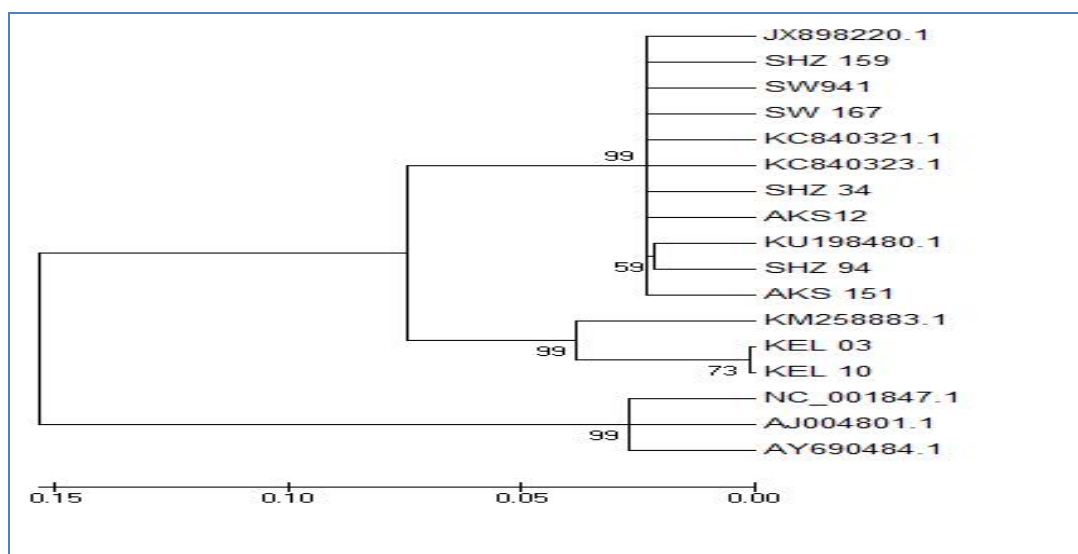


图 6 系统进化树

Fig.6 The phylogenetic tree

3 讨论

本试验通过采用 ELISA 与 PCR 的方法检测新疆地区部分奶牛场 IBRV 的感染状况,结果显示在被检的五个规模化奶牛场均有较高的 IBRV 感染率,表明在新疆地区 IBRV 的感染较为普遍;在患病奶牛和健康奶牛中均检测出 IBRV,但部分奶牛感染 IBRV 后并不表现出临床症状,这可能与奶牛场的环境因素、有无细菌继发感染和 IBRV 的潜伏机制有关^[2],病毒可在处于隐性感染的犊牛体内长期存在甚至终身带毒,从而成为潜在的感染源。

抗原双抗体夹心 ELISA 和 PCR 两种方法的检测结果对比发现,PCR 检测的感染率明显高于 ELISA,这可能与被检样品为鼻拭子,病毒抗原含量较低,而 PCR 的检测灵敏度高于 ELISA 有关,这种检测差异同 W.Socha,J.Rola 报道的一致^[90]。

M.T.C. WINKLER 等人曾报道牛传染性鼻气管炎病毒在不同地区间存在一定的变异性^[91],本研究结果也表明在检测的新疆部分地区之间,一些毒株同源

性不高，未超过 90%，这可能与 IBRV 在不同地区牛场间存在变异有关。系统进化树显示所有的试验毒株与参考的美国和巴西毒株亲缘关系最近，由共同祖先进化而来。

本研究通过抗原 ELISA 和 PCR 方法检测 IBRV 的感染情况，为 IBRV 在新疆地区的流行病学和免疫预防初步奠定了基础。

4 本章小结

1.在被检新疆部分地区 IBRV 的感染较为普遍，在犊牛呼吸道疾病中，IBRV 发挥致病作用，且存在隐性感染。

2.抗原双抗体夹心 ELISA 检测 IBR 的感染率为 17.96%，PCR 检测 IBR 的感染率为 55.83%，针对 IBRV 抗原检测，PCR 的灵敏性明显高于 ELISA。

3.所有的试验毒株与参考的美国和巴西毒株亲缘关系最近，由共同祖先进化而来。

第三章 新疆部分地区牛副流感病毒 3 型的检测与基因分型

摘要: 为调查新疆部分地区牛副流感病毒 3 型的感染情况,从新疆石河子、奎屯、库尔勒、沙湾、阿克苏地区的五个规模化奶牛场采集 1 月龄以内犊牛鼻液 226 份,其中发病犊牛 180 份,相同日龄健康犊牛 46 份,通过采用抗原双抗体夹心 ELISA 的方法检测牛副流感病毒 3 型抗原,RT-PCR 方法检测牛副流感病毒 3 型 gM 基因,并挑选不同地区的 8 株病毒进行序列分析比较其同源性,进行基因分型。结果:ELISA 方法检测的感染率仅为 2.43%,PCR 方法检测的感染率为 35.44%;扩增的 gM 基因序列同源性为 97.90%,与参考的 BPIV3a 亚型毒株的同源性为 93.0%-95.7%,将其划分为 BPIV3a 亚型。本研究结果为新疆地区 BPIV3 型感染的防治与疫苗研究奠定了初步基础。

关键词: 牛副流感病毒 3 型, ELISA, RT-PCR, 序列分析,基因分型

牛副流感病毒 3 型是单股负链 RNA 病毒目(*mononegavirales*)、副黏病毒科(*paramyxoviridae*)、副黏病毒亚科(*paramyxovirinae*)、呼吸道病毒属(*respirovirus*)的成员,是牛病毒性呼吸道疾病的主要病源之一,又被称为运输热病毒^[11]。自从 Reisinger^[12]等 1959 年首次在美国分离到 BPIV3,法国、丹麦、日本、前苏联、澳大利亚、巴拿马、意大利和加拿大等国家也相继报道分离出 BPIV3^[13];我国在近期才开始研究该病毒,根据最近几年的文献报道^[14-15],BPIV3 已经在我国内蒙古、黑龙江、吉林、山东和山西等地存在。BPIV3 感染临床症状表现变化很大:从无临床症状到严重的呼吸道疾病,大部分感染 BPIV3 的牛仅表现出流鼻涕、咳嗽、发热等症状,但某些存在应激的牛则表现出严重的组织损伤和免疫抑制,从而引起细菌的继发感染,表现为肺炎以及肺部、胸腔的出血性败血症;并且该病毒常与牛呼吸道合胞体病毒混合感染,使病情更加复杂^[25]。目前该病在世界范围内流行,尤其是美洲和亚洲,每年都给养牛业造成严重的经济损失^[16]。我国对该病的研究较少,也没有相关有效的疫苗。

目前通过基因序列和进化树分析将 BPIV3 分为 A 型、B 型和 C 型三个基因亚型。其中 2008 年,Horwood^[60]等根据全基因组和 M 基因之间的相似性,将 BPIV3 分为 BPIV3a 基因亚型和 BPIV3b 基因亚型两种基因型,两种亚型之间基因的相似率最高只有 82.6%-83.1%,而亚型内的相似率为 92.3%-100%;2008 年,朱远茂^[92]在山东分离的 BPIV3 毒株 SD0835 与国外公开发表的 BPIV3a 亚型和 BPIV3b 亚型基因序列有较大差异,被命名为基因 C 型。由于目前世界上只报道了数株 BPIV3 序列,因此很难精确断定这种变异分型是否适用于全球范围内的 BPIV3 变异株,此分型方法是否准确有效有待于进一步的免疫学验证,这将在 BPIV3 疫苗发展中发挥重要作用。

为了揭示新疆部分地区犊牛 BPIV3 的感染和基因分型情况,本试验共采集新疆部分地区的 5 个疑似犊牛 BPIV3 感染的奶牛场的 226 份发病及未发病样品,通过采用双抗体夹心 ELISA、RT-PCR 的方法检测 BPIV3 的感染,通过序列分析

比较不同牛场阳性样品克隆产物的同源性,并根据序列对比和进化树分析确定其基因亚型,为本地区犊牛牛副流感病毒 3 型感染的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

分别于 2014 年 10-12 月和 2015 年 1-2 月、9-10 月采集新疆石河子、库尔勒、沙湾、阿克苏、奎屯地区 5 个主要规模化奶牛场 1 月龄以内疑似 BPIV3 感染的犊牛鼻拭子样品 180 份,健康犊牛鼻拭子样品 46 份,保存于-80℃低温冰箱备用。

1.1.2 试剂与仪器

试剂与仪器见表 5。

表 5 试剂与仪器

Table.5 Reagents and instruments

试剂名称	提供厂商
BPIV3 抗原双抗体夹心 ELISA 试剂盒	上海酶联生物科技有限公司
反转录试剂盒、pMD19-T 克隆载体	宝生物 (Takara) 工程大连公司
2×PCR MIX、DNA Marker	广州东盛生物科技有限公司
PCR 产物回收试剂盒	维森 (北京) 生物科技有限公司
质粒小提试剂盒购	天根生化科技有限公司
基因引物	上海生物工程有限公司
Trizo	美国 Invitrogen 生命技术有限公司
主要仪器	见试验 1

1.2 方法

1.2.1 样品处理

同 IBRV: 将样品从-80℃低温冰箱取出,置于 4℃冰箱融化。将 2 mL 的生理盐水加入装有采样棉签的 5 mL 冻存管中,在漩涡混匀器上充分振荡摇匀,完全溶解棉签上的鼻液,吸取 1.2 mL 的鼻液悬液于 1.5 mL 的离心管中,8000 r/min 4℃离心 15 min,将上清液用移液枪转移到新的 1.5 mL 离心管中,用 0.22um 微孔滤膜过滤除菌,即得到待分离的病毒样品,-80℃保存备用。

1.2.2 BPIV3 抗原 ELISA 检测

采用商品化牛副流感病毒 3 型抗原双抗体夹心 ELISA 试剂盒,按照试剂盒说明书 (见附录) 进行具体操作。

1.2.3 BPIV3 RT-PCR 检测

1.2.3.1 总 RNA 提取

使用 Trizol 对全部处理过的样品提取病毒总 RNA。

- 1) 取200 μ l样品上清液加入到经1%DEPC水浸泡且高压灭菌过的1.5 mL离心管中, 加入1 mL Trizol, 充分振荡混匀,冰上放置15 min;
- 2) 加入200 μ L氯仿, 混匀, 冰上放置8 min, 12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心15 min;
- 3) 将离心产生的上清液全部用移液枪移入一个新的1.5 mL 离心管内(注意不要吸到沉淀), 等体积的异丙醇加入到离心管中, 冰上放置20 min, 12000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心15 min, 弃上清, 超净台内干燥20 min;
- 4) 沿管壁加入75% DEPC水乙醇1 mL, 7 500 r/min 4 $^{\circ}$ C离心5 min,弃乙醇; 超净台中干燥30 min;
- 5) 向离心管中加入15 μ L DEPC水,溶解后即得到病毒RNA, -40 $^{\circ}$ C冻存备用或直接用反转录。

1.2.3.2 反转录

使用 TaKaRa 反转录试剂盒, 具体操作如下:

- 1) DNA 的除去反应, 反应组分见表 6.

表 6 DNA 除去反应组分

Table.6 The components of DNA removal reaction

组分	体积
5 \times gDNA Erase Buffer	2 μ L
gDNA Erase	1 μ L
Total RNA	1 μ L
Rnase free dH ₂ O	6 μ L

42 $^{\circ}$ C水浴 2 min。

- 2) 反转录反应, 反应组分见表 7.

表 7 反转录反应组分

Table.7 The components of reverse transcription reaction

组分	体积
5 \times gDNA Primer Script Buffer2	4 μ L
Primer Script RT Enzyme Mix I	1 μ L
RT Primer Nix	1 μ L
1) 的反应液	10 μ L
Rnase free dH ₂ O	4 μ L

37 $^{\circ}$ C水浴 15 min

- 3) 85 $^{\circ}$ C瞬时热激 5 s 即得到反转录产品。

1.2.3.3 引物设计

根据 GenBank 上登录的 BPIV3a 亚型的部分蛋白 M 基因(登录号: EF108224)设计了一对引物, 上游引物: 5'-TGA TGA TGC CCA TAT AAC CAGA-3', 下游引物: 5'-ATT CAA AAT CCC CAA GTC CA-3', 预期扩增片段大小为 394 bp, 记为引物 1。

根据 GenBank 上登录的 BPIV3b 亚型的部分蛋白 M 基因(登录号:EF108223)设计了一对引物,上游引物:5'-ATC AAA CCC GAA TTG TAC CC-3',下游引物:5'-GCT AAT ACC TCC AAC CAG TCC-3',预期扩增片段大小为 422 bp,记为引物 2。

参考文献朱元茂^[92]等设计的 BPIV3c 亚型的部分蛋白 M 基因引物合成一对检测引物,上游引物:5'-GCA TCA CAA ACT CCG CAA TAT-3',下游引物:5'-TGC TTG ATT TTT CCG ACT CCT-3',预期扩增片段大小为 1048 bp,记为引物 3。

1.2.3.4 RT-PCR 反应

RT-PCR 反应组分:PCR Mix 10 uL,上、下游引物各 0.5 uL,模板 3 uL,ddH₂O 补至 25 uL。引物 1 的扩增条件为:预变性 95℃5 min,变性 94℃30 s,退火 56.6℃30 s,延伸 72℃45 s,35 个循环,72℃延伸 10 min。引物 2 的扩增条件为:预变性 95℃5 min,变性 94℃30 s,退火中间温度 56℃、 $\Delta T=10^\circ\text{C}$ 、30 s,延伸 72℃45 s,35 个循环,72℃延伸 10 min。引物 3 的扩增条件为:预变性 95℃5 min,变性 94℃1 min,退火中间温度 56℃、 $\Delta T=10^\circ\text{C}$ 、1 min,延伸 72℃1 min 20 s,35 个循环,72℃延伸 10 min。

1.2.3.5 M 基因的测序与基因分析

将上一步的 M 基因 PCR 产物进行 1%的琼脂糖凝胶电泳,对目的条带进行切胶,用诺维森小量琼脂糖凝胶回收试剂盒回收,具体操作同试验 1。将上一步的 DNA 回收产物连接到 pMD19-T 克隆载体上,然后转化 DH5 α 感受态细胞,涂布于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上培养过夜,随机挑选 4-6 个单个菌落,接种于含 1000 uL 氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中,37℃、220 r/min 摇床培养 3-4 小时。取 2 μL 菌液作为模板进行重组质粒的菌液 PCR 验证,将鉴定正确的阳性菌大量培养后提取质粒,分装 20 uL 质粒送上海生物工程股份有限公司测序。采用 DNAMAN、DNASar、MEGA5 等软件分析核苷酸序列。

2 结果

2.1 ELISA 检测结果

采用 BPIV3 抗原双抗体夹心 ELISA 方法检测 226 份样品的感染情况,结果只检测出 5 份阳性样品,分别为石河子地区 3 份,沙湾地区 2 份,整体检出率为 2.43%。

2.2 RT-PCR 检测结果

将采集的所有样品分别用以上三组基因引物做 RT-PCR 检测,结果只有引物 1 跑出目的条带,即可扩增得到预期 394 bp 大小的基因片段,不同牛场部分样品 PCR 检测结果见图 7。

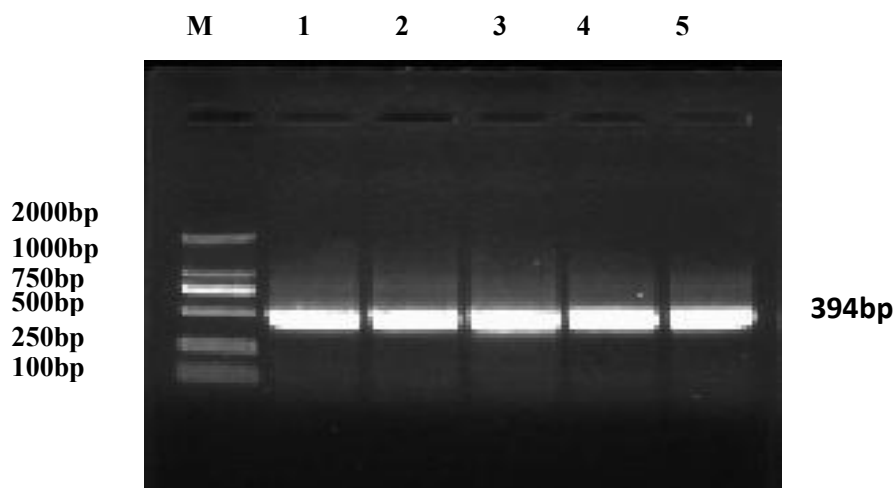


图 7 RT-PCR 检测结果

M. DNA Marker DL2000, 1-5. 牛副流感病毒 3 型 M 基因克隆产物

Fig .7 The test results of RT- PCR

M. DNA Marker DL2000, 1-5. represent production M gene of BPIV3

RT-PCR 检测结果表明石河子某牛场患病牛感染率为 32.72%，健康牛感染率为 15.00%，整体为 28.00%；奎屯某牛场患病牛感染率为 27.50%，健康牛感染率为 11.11%，整体为 24.49%；沙湾某牛场患病牛感染率为 39.53%，健康牛感染率为 11.76%，整体为 31.67%；库尔勒和阿克苏地区只采集了患病犊牛样品，感染率分别为 45.83%和 44.44 %。见表 8。

表 8 BPIV3 感染 RT-PCR 检测结果

Table.8 The detection results of BPIV3 infection using RT-PCR

样品来源	患病牛样品数	阳性 (份)	阳性率 (%)	健康牛样品数	阳性 (份)	阳性率 (%)
石河子某牛场	55	18	32.72	20	3	15.00
奎屯某牛场	40	11	27.50	9	1	11.11
沙湾某牛场	43	17	39.53	17	2	11.76
库尔勒某牛场	24	11	45.83	0	0	0
阿克苏某牛场	18	8	44.44	0	0	0
总体	180	65	36.11	46	5	13.04

2.3 测序结果分析

2.3.1 同源性比较

8 份牛副流感病毒 3 型阳性样品经过 PCR 扩增、测序后,使用 DNAMAN 软件比较其同源性为 97.90%。使用 MegAlign 软件将测序结果与 GenBank 所记载的以下 BPIV3 参考毒株进行序列比对：BPIV3a 亚型的澳大利亚毒株 BP13JCU（登录号：EF108221）与美国毒株 Kansas（登录号：AF178654）；BPIV3b 亚型的澳大利亚毒株 BP4169(登录号：EF108223)与 BP6128(登录号：EF108225)；

BPIV3c 亚型的韩国毒株 12Q061(登录号: JX969001.1)与山东毒株 SD0835(登录号: HQ530153.1); 结果显示扩增序列与 BPIV3a 亚型的同源性为 93.0%-95.7%, 与 BPIV3b 亚型的同源性为 77.1%-80.0%, 与 BPIV3c 亚型的同源性为 74.1%-78.4%。见图 8。

		Percent Identity															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Divergence	1	■	92.2	93.0	94.3	92.2	92.2	92.6	92.3	93.7	93.2	77.1	75.2	75.6	78.4	1	SW612
	2	5.1	■	93.0	94.1	92.2	92.2	92.5	92.2	93.6	93.2	77.8	75.7	74.2	76.3	2	SW355
	3	3.8	3.5	■	95.1	93.1	93.2	93.4	93.0	94.4	94.0	78.5	76.4	74.9	77.5	3	SHZ872
	4	3.1	2.8	1.6	■	94.3	94.4	94.6	94.1	95.7	95.3	79.4	77.3	75.6	78.2	4	SHZ546
	5	5.1	5.1	3.8	3.1	■	92.3	93.1	92.9	93.8	93.6	77.5	75.7	74.5	77.1	5	KT9411
	6	5.2	4.9	3.7	2.9	5.2	■	92.7	92.5	93.9	93.3	77.5	75.4	74.1	76.7	6	KT1022
	7	4.7	4.4	3.2	2.5	4.1	4.6	■	92.9	94.0	93.6	78.0	75.9	74.2	77.0	7	KEL915
	8	5.2	4.7	3.8	3.1	4.4	4.9	4.3	■	93.6	93.0	77.8	75.7	74.8	77.4	8	AKS6224
	9	3.7	3.5	2.3	1.6	3.5	3.5	3.2	3.8	■	94.6	80.0	77.9	74.6	77.4	9	BPI3JCU
	10	4.3	4.0	2.8	2.0	4.0	4.1	3.7	4.3	2.8	■	78.5	76.4	74.6	77.3	10	Kansas
	11	22.4	21.8	20.8	20.0	22.1	22.0	21.3	21.7	19.1	21.2	■	95.4	61.3	63.2	11	BP4169
	12	24.7	24.4	23.4	22.6	24.2	24.5	23.9	24.3	21.7	23.8	2.2	■	59.3	61.3	12	BP6128
	13	22.9	24.1	23.9	23.1	24.3	25.1	24.5	24.9	24.3	24.5	41.7	44.5	■	94.3	13	12Q061
	14	19.1	21.2	20.2	19.5	21.0	21.4	20.8	21.2	20.6	20.8	39.2	41.9	3.1	■	14	SD0835
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			

图 8 扩增序列与 GenBank 上参考基因的同源性比较

Fig. 8 The amplification sequence between each strain' gene with reference gene in GenBank

2.3.2 系统进化树分析

用 MAGE version 5.0.1 将测序结果与本试验参考的 GenBank 登录的基因做系统进化树, 将 14 条核苷酸序列分为 3 组。第一组包括参考的 BPIV3a 亚型毒株基因 (澳大利亚 BP13JCU, 美国 Kansas) 与本试验测序的所有毒株基因 (SHZ546、SHZ872、SW355、SW612、AKS6224、KEL915、KT9411 与 KW1022), 属于 BPIV3 genotype A, 表明试验毒株与澳大利亚 BP13JCU 和美国 Kansas 毒株由共同祖先进化而来; 第二组属于 BPIV3 genotype B, 仅包括参考的 BPIV3b 亚型毒株基因 (澳大利亚的 BP4169 与 BP6128); 第三组属于 BPIV3 genotype C, 也仅包括参考的 BPIV3c 亚型毒株基因 (韩国 12Q061, 山东 SD0835)。见图 9。

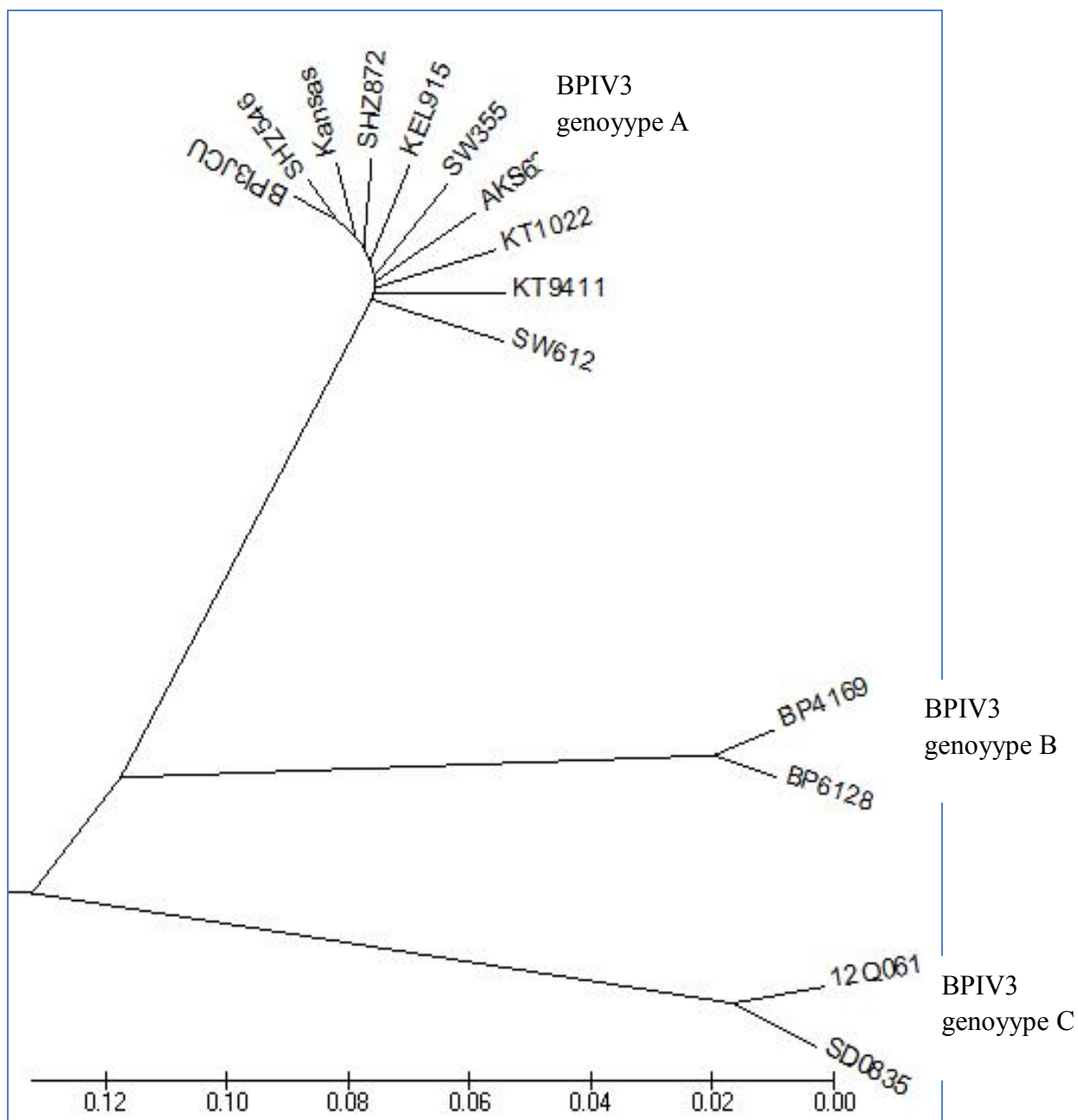


图 9 系统进化树 (参考株: BP13JCU, Kansas, BP4169, BP6128, 12Q061, SD0835)
 Fig.9 The phylogenetic tree (Reference strain: BP13JCU, Kansas, BP4169, BP6128, 12Q061, SD0835)

3 讨论

1. RT-PCR 方法检测结果表明, BPIV3 感染在新疆各地区普遍存在, 整体感染率为 35.44%。且在健康犊牛中也检测出 BPIV3, 这与该病毒的致病机制与犊牛的自身耐受力有关^[25]。发病犊牛与健康犊牛的平均感染率分别为为 36.11%和 13.04%, 表明 BPIV3 在被检测的新疆部分地区的犊牛呼吸道疾病中发挥致病作用, 且存在隐性感染现象。

2. 通过抗原双抗体夹心 ELISA 方法检测 BPIV3 感染, 检出率很低, 仅为 2.43%, 这可能与被检样品为鼻拭子, 病毒抗原含量较低有关, 也可能说明抗原双抗体夹心 ELISA 方法并不适合鼻拭子中 BPIV3 的检测。国内有学者^[93]用 ELISA 方法检测牛血液中的 BPIV3 抗体, 检出率高达 100%。但采用双抗体夹心 ELISA 法检测血液中的 BPIV3 抗原是否也同样高尚不清楚。

3. 根据 Horwood^[60]BPIV3 基因分型的方法, 即针对 gM 基因, 不同毒株之间基因相似性高于 92.3%即为相同亚型, 本试验扩增的 gM 核苷酸序列与参考的 BPIV3a 亚型的 gM 基因相似性为 93.0%-95.7%, 故被分为 BPIV3a 亚型, 且与澳大利亚 BP13JCU 和美国 Kansas 毒株由共同祖先进化而来。

4. 在检出的 70 份阳性样品中, 有 22 份样品同时也检测出 IBRV, 混合感染率为 9.73%。

4 本章小结

1. BPIV3 感染在检测的新疆部分地区较为普遍, 在犊牛呼吸道疾病中, 发挥致病作用, 且存在隐性感染; 抗原双抗体夹心 ELISA 方法的检出率仅为 2.43%, 表明抗原双抗体夹心 ELISA 方法并不适合检测犊牛鼻拭子中的 BPIV3。

2. 在检测的新疆部分地区存在 BPIV3 和 IBRV 的混合感染, 整体混合感染率为 9.73%。

3. 扩增的 gM 基因序列同源率为 97.90%, 与参考的 BPIV3a 亚型毒株的同源率为 93.0%-95.7%, 将其划分为 BPIV3a 亚型, 与澳大利亚 BP13JCU 和美国 Kansas 毒株由共同祖先进化而来。本研究结果为新疆地区 BPIV3 感染的防治与疫苗研究奠定了基础。

第四章 新疆部分地区牛呼吸道合胞体病毒感染的检测与基因分型

摘要: 为调查新疆部分地区牛呼吸道合胞体病毒的感染情况,从新疆石河子、奎屯、库尔勒、沙湾、阿克苏地区的五个规模化奶牛场采集 1 月龄以内犊牛鼻液 226 份,其中发病犊牛 180 份,相同日龄健康犊牛 46 份,通过采用双抗体夹心 ELISA 的方法检测牛呼吸道合胞体病毒抗原,合成三对引物用 RT-PCR 方法检测牛呼吸道合胞体病毒 gN 基因。结果:ELISA 方法和 PCR 方法的检测率均为 0。结果表明在检测的犊牛鼻拭子中并未出现牛呼吸道合胞体病毒,这为新疆地区的引种检测以及对该病的预防控制提供一定的理论基础。

关键词: 牛呼吸道合胞病毒, ELISA, RT-PCR, 引种检测

牛呼吸道合胞体病毒 (*Bovine respiratory syncytial virus*, BRSV) 属于副粘病毒科肺病毒属,因其在组织培养过程中可使培养的细胞产生独特的细胞融合病变,因而被命名为牛呼吸道合胞体病毒,是引起牛和其它反刍动物呼吸道热性、急性疾病的主要病毒之一^[62]。该病毒自 1967 年首次在瑞士被 Paccaud 和 Jacquier^[17]分离报道以来,美国、加拿大、比利时、日本和意大利等国家相继报道分离到牛呼吸道合胞体病毒^[18-22];我国对 BRSV 的研究报道较少,2008 年由冯军科等^[23]首次报道分离到 BRSV 毒株,证实了 BRSV 在我国的存在。该病发病率一般很高,可达 80%-100%,但病死率很低,仅为 1%-20%,发病情况与种群密度和年龄结构密切相关^[2]。感染后病畜一般无临床症状,但集约化养殖的刚断奶犊牛及青年牛感染后可出现肺炎、间质性肺水肿及肺气肿等严重病变。在继牛黏膜病 (BVD) 及牛传染性鼻气管炎 (IBR) 之后,欧盟国家把 BRS 列为三大重要牛病之一^[24]。

针对 BRSV 的基因分型,研究表明可利用抗原亚型和遗传亚型两种方法划分 BRSV 的亚型。抗原亚型分类可根据 G 蛋白抗原性的不同,把 BRSV 划分为 A 型、B 型、AB 型和未知型 4 种抗原亚型^[83],同种亚型内氨基酸序列的同源性为 88%-100%;遗传亚型分类可根据 G 蛋白、F 蛋白和 N 蛋白核苷酸序列的同源性比较及系统发育分析,分别把 BRSV 划分为 I-VI 6 个、I-V 5 个和 I-V 5 个遗传亚型^[84],各遗传亚型之间的变异率低于 15%。目前,世界各地已经分离到 BRSV 几十株,但是根据交叉中和试验的结果,表明 BRSV 只有一个血清型^[84]。

为了揭示新疆部分地区犊牛 BRSV 的感染和基因分型情况,本试验共采集新疆部分地区的 5 个疑似犊牛 BPIV3 感染的奶牛场的 226 份发病及未发病样品,通过采用抗原双抗体夹心 ELISA、RT-PCR 的方法检测 BRSV 的感染的情况,如有感染则通过序列分析比较不同牛场阳性样品克隆产物的同源性,并根据序列对比和进化树分析确定其基因亚型,为本地区 BRSV 感染的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

分别于2014年10-12月和2015年1-2月、9-10月采集新疆石河子、库尔勒、沙湾、阿克苏、奎屯地区5个主要规模化奶牛场1月龄以内疑似BRSV感染的犊牛鼻拭子样品180份,健康犊牛鼻拭子样品46份,保存于-80℃低温冰箱备用。

1.1.2 试剂与仪器

试剂与仪器见表9。

表9 试剂与仪器

Table. 9 Reagents and instruments

试剂名称	提供厂商
BPIV3 抗原双抗体夹心 ELISA 试剂盒	上海酶联生物科技有限公司
反转录试剂盒、pMD19-T 克隆载体	宝生物 (Takara) 工程大连公司
2×PCR MIX、DNA Marker	广州东盛生物科技有限公司
PCR 产物回收试剂盒	维森 (北京) 生物科技有限公司
质粒小提试剂盒	天根生化科技有限公司
基因引物	上海生物工程技术有限公司
Trizo	美国 Invitrogen 生命技术有限公司
主要仪器	见试验 1

1.2 方法

1.2.1 样品处理

同 IBRV: 将样品从-80℃低温冰箱取出,置于4℃冰箱融化。将2 mL的生理盐水加入装有采样棉签的5 mL冻存管中,在漩涡混匀器上充分振荡摇匀,完全溶解棉签上的鼻液,吸取1.2 mL的鼻液悬液于1.5 mL的离心管中,8000 r/min 4℃离心15 min,将上清液用移液枪转移到新的1.5 mL离心管中,用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,即得到待分离的病毒样品,-80℃保存备用。

1.2.2 BRSV 抗原 ELISA 检测

采用商品化牛呼吸道合胞体病毒抗原双抗体夹心 ELISA 试剂盒,按照试剂盒说明书(见附录)进行具体操作。

1.2.3 BRSV RT-PCR 检测

1.2.3.1 总 RNA 提取

使用 Trizol 对全部处理过的样品提取病毒总 RNA。

1) 取 200 μL 样品上清液加入到经 1%DEPC 水浸泡且高压灭菌过的 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL Trizol,充分振荡混匀,冰上放置 15 min;

2) 加入 200 μL 氯仿,混匀,冰上放置 8 min,12 000 r/min 4℃离心 15 min;

3) 将离心产生的上清液全部用移液枪移入一个新的 1.5 mL 离心管内(注意

不要吸到沉淀), 等体积的异丙醇加入到离心管中, 冰上放置20 min, 12000 r/min 4℃离心15 min, 弃上清, 超净台内干燥20 min;

4) 沿管壁加入75% DEPC水乙醇1 mL, 7 500 r/min 4℃离心5 min, 弃乙醇; 超净台中干燥30 min;

5) 向离心管中加入15 μL DEPC水, 溶解后即得到病毒RNA, -40℃冻存备用或直接用反转录。

1.2.3.2 反转录

使用 TaKaRa 反转录试剂盒, 具体操作如下:

1) DNA 的除去反应, 反应组分见表 10.

表 10 DNA 除去反应组分

Table.10 The components of reverse transcription reaction

组分	体积
5×gDNA Erase Buffer	2 uL
gDNA Erase	1 uL
Total RNA	1 uL
Rnase free dH ₂ O	6 uL

42℃水浴 2 min。

2) 反转录反应, 反应组分见表 11.

表 11 反转录反应组分

Table 11 The components of DNA removal reaction

组分	体积
5×gDNA Primer Script Buffer2	4 uL
Primer Script RT Enzyme Mix I	1 uL
RT Primer Nix	1 uL
1) 的反应液	10 uL
Rnase free dH ₂ O	4 uL

37℃水浴 15 min

2) 85℃瞬时热激 5 s 即得到反转录产品。

1.2.3.3 设计合成引物

根据 GenBank 上登录的 BRSV 的部分 gN 基因 (登录号: FJ543091) 设计了一对检测引物, 上游引物: 5'-CCT CTC CCA TCT CTT TTAGCA-3', 下游引物: 5'-GAC ACT TTC AAC AAG GAC CAA-3', 预期扩增片段大小为 406 bp, 记为引物 1。

参考文献王红等^[94]设计的 BRSV 部分 gN 基因检测引物合成了一对引物, 上游引物: 5'-TAT GCT ATG TCC CGA TTG G-3', 下游引物: 5'-ACT GAT TTG GCT AGT ACA CCC-3', 预期扩增片段大小为 596 bp, 记为引物 2。

参考文献童钦等^[95]设计的 BRSV 部分 gN 基因检测引物合成了一对引物, 上

上游引物: 5'-TAC AGA CAT GAC GCA CCT GAC T -3, 下游引物: 5'-GCA AAG ATT CCT TCT ACC CTA CT-3', 预期扩增片段大小为 287 bp, 记为引物 3。

以上基因均由上海生物工程有限公司合成。

1.2.3.4 RT-PCR 反应

RT-PCR 反应组分: PCR Mix 10 uL, 上、下游引物各 0.5 uL, 模板 3 uL, ddH₂O 补至 25 uL。引物 1 的扩增条件为: 预变性 95℃ 5 min, 变性 94℃ 30 s, 退火中间温度 56℃、 $\Delta T=10^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 延伸 72℃ 40 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。引物 2 的扩增条件为: 预变性 95℃ 5 min, 变性 94℃ 30 s, 退火中间温度 52℃、 $\Delta T=10^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 延伸 72℃ 45 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。引物 3 的扩增条件为: 预变性 95℃ 5 min, 变性 94℃ 1 min, 退火中间温度 50℃、 $\Delta T=10^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 延伸 72℃ 40 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

2 结果

2.1 ELISA 检测结果

采用 BRSV 抗原双抗体夹心 ELISA 方法检测 226 份样品, 均未检测出有牛呼吸道合胞体病毒感染。

2.2 RT-PCR 检测结果

使用以上三对基因引物, 对所有的 226 份样品跑梯度, 均未出现目的条带, 未检测出牛呼吸道合胞体病毒感染。

3 讨论

1. 因为牛呼吸道合胞体病毒基因组为 RNA, 极易被污染酶解, 所以提取中要全程佩戴手套、口罩, 尽量选择人员流动小的试验操作台; 所用的 Trizol 4℃ 冰箱保存, 氯仿、异丙醇和乙醇 -20℃ 冰箱保存, 随用随取, 75% DEPC 水酒精要现用现配。

2. 抗原双抗体夹心 ELISA 和 PCR 方法均未检测出 BRSV, 而本试验所用的病毒 RNA 与试验二所用的病毒 RNA 为同时提取和反转录, 实验二能够成功检测出 BPIV3, 说明提取的病毒 RNA 基因组及后续的反转录没有问题; 所引用的基因引物, 都已报道可以成功检测 BRSV^[86-87], 故基因引物没有问题。所以试验结果说明在检测的新疆部分地区奶牛场的犊牛样品中不存在 BRSV。

4 本章小结

本试验采用抗原双抗体夹心 ELISA 方法和 RT-PCR 方法，针对从新疆部分地区采集的 226 份犊牛鼻拭子样品，检测 BRSV 的感染情况。ELISA 和 RT-PCR 方法均未检出阳性样品。说明在所检测新疆部分地区奶牛场的犊牛样品中不存在 BRSV。

全文结论

1. 采用 PCR 及 RT-PCR 方法检测新疆 5 个不同地区规模化奶牛场犊牛鼻拭子中的 IBRV、BPIV3 和 BRSV3 三种病毒，结果表明各牛场均检出 IBRV 和 BPIV3，阳性率分别为 44.90%-72.22%和 24.49%-45.83%，揭示在不同地区的不同牛场均存在 IBRV 和 BPIV3 的感染；而 BRSV 在 5 个牛场均未检出，初步说明被检牛场犊牛样品中不存在 BRSV。

2. 在具有呼吸道症状的发病犊牛的鼻拭子中，IBRV 和 BPIV3 的阳性检出率分别为 47.50%-72.22%和 27.50%-45.83%；健康犊牛的鼻拭子，IBRV 和 BPIV3 的阳性检出率分别为 25.00%-33.33%和 11.11%-15.00%。揭示此两种病毒在检测的新疆部分地区的犊牛呼吸道疾病中均发挥致病作用，且均存在隐性感染现象，是否发病可能受多种因素影响。

3.所有的 IBRV 试验毒株与参考的美国和巴西毒株亲缘关系最近，由共同祖先进化而来。测序的 BPIV3 gM 基因同源性的 97.90%，与 BPIV3a 亚型参考毒株的同源性为 93.0%-95.7%，将其划分为 BPIV3a 亚型，与澳大利亚 BP13JCU 和美国 Kansas 毒株由共同祖先进化而来。

4.采用抗原双抗体夹心 ELISA 方法检测新疆 5 个不同地区规模化奶牛场犊牛鼻拭子中的 IBRV 和 BPIV3，平均检出率分别 17.96%和 2.43%，远低于 PCR 及 RT-PCR 检测方法。表明对犊牛鼻拭子样品中病毒的检测采用 PCR 或者 RT-PCR 更合适。

5.在检测的新疆部分地区，存在 IBRV 和 BPIV3 的混合感染，整体混合感染率为 9.73%。

创新点

在新疆通过抗原双抗体夹心 ELISA、PCR 和 RT-PCR 方法，同时检测新疆 5 个地区的 5 个规模化奶牛场中犊牛的 IBRV、BPIV3 和 BRSV 感染情况，并对 BPIV3 进行了基因分型。

参考文献

- [1]马春霞,李军,覃勇,等.牛呼吸道疾病综合征病例的病原分析[J].中国畜牧兽医,2015,09:2481-2486.
- [2]陈溥言,王川庆,陈陆,等.兽医传染病学[M].中国农业出版社,2006.8:280-282.
- [3]Gibbse P J,RweyemanuMM.Bovine herpesviruses.Part I.Bovine herpesvirus1[J].Vet BuLL,1977,47: 317-343.
- [4] Madn S H,York C J,Mckercher D G.Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus[J].Science,1956,124:721 -722.
- [5]周太冲.从新西兰进口奶牛中分离牛传染性鼻气管炎病毒[J].兽医科技杂志,1981,1:6-9.
- [6]颜邦芬,陈铮,张书环,等.牛传染性鼻气管炎病毒 gG-蛋白的表达及 gG-ELISA 的建立[J].生物工程学报,2007,23:806-811.
- [7]邹世颖,何倩妮,刘蕾,等.中国北方六省份牛传染性鼻气管炎病毒流行病学分析[J].中国兽医杂志,2012,48(2):47-48.
- [8]Madin S H,York C J,Mckercher D G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus[J].Science,1956,124(3225):721-722.
- [9]Zwart D. The virus of infectious bovine rhinotracheitis in Northern Nigeria[J]. Bulletin of epizootic diseases of Africa.Bulletin des epizooties en Afrique,1966,14(4):405 -408.
- [10]OIE.Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals[M/OL].http: / /www.oie. int /eng/normes/mmanual /a -00035. htm.
- [11]殷震,刘景华.动物病毒学[M].北京:科学出版社,1985:722-727.
- [12]Andrewes C H,Bang F B,Chanock R M,et al.Para-influenza viruses 1,2 and 3: suggested names for recently described myxoviruses [J].Virology,1959,8(1): 129-130.
- [13]Ellis J A.Bovine parainfluenza-3[J].Vet Clin North Am Food Anim Pract,2010,26 (3):575-593.
- [14]刘鹏,侯喜林,周玉龙,等.牛副流感病毒 3 型的分离鉴定[J].微生物学通报,2009, 36(9): 1384-1389.
- [15]周玉龙,吴海涛,任亚超,等.牛副流感病毒 3 型的分离鉴定及感染牛抗体消长规律的研究[J].中国人兽共患病学报,2011,27 (1): 23-28.
- [16]Stott E J,Thomas L H,Collins A P,et al.Asurvey of virus infections of the respiratory tract of eattle and their association Withdisease[J].J Hyg(Lond),1980, 85(2): 257 - 270.
- [17] Paccaud M F,Jacquier C.A respiratory syncytial virus of bovine origin[J]. Arch Gesamte Virusforsch,1970,30(4): 327-342.
- [18]Baker J C,Frey M L.Bovine respiratory syncytial virus[J].Vet Clin North Am Food Anim Praet,1985,1(2):259-275.
- [19]Stott E J,Taylor G.Respiratory syneytial virus:brief review[J].ArehViroI,1985,84 (1-2):1-52.
- [20]Stott E J,Thomas L H,Collins A P,et al.Asurvey of virus infections of theres Pirat-ory tract of cattle And their association With disease[J].J Hyg(Lond),

- 1980,85(2):257-27.
- [21] Kelly J, Henriksen. Parainfluenza Viruses[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 16:242-264.
- [22] Ronald G. Marshall. Isolation of bovine Parainfluenza-3 virus in chick embryos[J]. *J Bacteriol*, 1964, 88:267.
- [23] 冯军科, 薛飞, 李娇等. 牛呼吸道合胞体病毒 G 蛋白的截短表达与鉴定[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(12):24-29.
- [24] 欧阳志明. 牛呼吸道合胞体病毒感染[J]. *中国畜禽传染病*, 1995, 1: 62-63.
- [25] 高丰, 贺文琦. 动物疾病病理诊断学[M]. 科学出版社, 2010, 1:281-283.
- [26] 吴清民主编. 兽医传染病学[M]. 农业大学出版社, 2002.2:280-282.
- [27] 周斌华, 孔繁德, 徐淑菲, 王景明. 牛传染性鼻气管炎的危害和防检对策分析[J]. *检验检疫科学*, 2007, Z1:149-152.
- [28] 肖定汉. 犊牛传染性鼻气管炎的临床诊断[J]. *中国奶牛*, 1995, 3:57-58.
- [29] 肖定汉. 牛传染性鼻气管炎[J]. *动物保健*, 2005, (9):39-40.
- [30] Mayfield J E, Good P J, Vanoort H J, et al. cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1[J]. *Virology*, 1983, 49(1):259-264.
- [31] Woodbine K A, Medley G F, Moore S J, et al. A four year longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type- 1(BHV- 1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west England[J]. *BMC Veterinary Research*, 2009, 5:5.
- [32] Lasse Nuotio, Erkki Nruvonen, Mauno Hyyti Imen. Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis(IBR/IPV) virus in Finland[J]. *Acta Vet Scand*, 2007, 49 (1) : 3.
- [33] Van Drunen Little-van den Hurk S, Tikoo S K, Liang X P, et al. Bovine herpesvirus 1 Vaccines[J]. *Immunol Cell Biol*, 1993, 71(5):405-420.
- [34] Liang X P, Babiuk L A, Zamb T J, et al. An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1(BHV-1) mutant expressing B-galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infection and its use as a vector for mucosal immunization [J]. *Virology*, 189:629-639.
- [35] Abdelmagid O Y, Oten D J, Xue W, et al. Anti-idiotypic antibodies to bovine herpesvirus-1 inhibit virus infection in cell culture[J]. *Arch Virol*, 1992, 122 (1-2):163-173.
- [36] Hutchings D L, van Drunen Little-van den Hurk S, Babiuk L A. Lymphocyte proliferative responses to separate bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle[J]. *J Virol*, 1990, 64(10):5114-5122.
- [37] Kit S, Otsuka H, Kit M. Expression of porcine pseudorabies virus gene by a bovine herpesvirus-1(infectious bovine rhinotracheitis virus)vector[J]. *Arch Virol*, 1992, 124 (1-2):1-20.
- [38] 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]. 内蒙古农业大学, 硕士学位论文, 2005:1-14.
- [39] 吴清民主编. 兽医传染病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002:389-392.
- [40] 何昭阳. 动物传染病导读[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007:105-107.
- [26]] 张伟中, 张桂芬, 李晓辉. 牛传染性鼻气管炎的临床诊断及防制措施[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2007, 2:52.

- [41]王勇.奶牛牛传染性鼻气管炎的鉴别诊断[J].畜牧兽医科技信息,2007,7:49-50.
- [42]王丽荣,董永军,姚四新.牛传染性鼻气管炎病毒病的病原学及诊断[J].动物科学与动物医学,2004,21(3):60-61.
- [43]白文彬,于震康主编.动物传染病诊断学[M].北京:中国农业出版社,2002:549-553.
- [44]Schwyzer M, Ackermann M. Molecular virology of ruminant herpesviruses [J]. Vet Microbiol, 1996,53: 17-29.
- [45]陈茹,毕英佐,曹永长,等.牛传染性鼻气管炎病毒 LUX™ 新型荧光 PCR 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2007,29(4):303-307.
- [46]杨少华,王长法,高运东,等.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.
- [33]陈茹,赵吟,林志雄,等.牛传染性鼻气管炎病毒实时荧光 PCR 检测方法的建立[J].检验检疫科学,2005,增刊:5-7.
- [47]Pandita T K,Hittelman W N.1995. Evidence of a chromatin basis for increased mutagen sensitivity associated with multiple primary malignancies of the head and neck.Int J Cancer 61(5):738-43.
- [48]李佐波,曹兴春.牛传染性鼻气管炎的临床诊断及预防[J].畜牧兽医科技信息,2006,6:47-48.
- [49]李继昌,童光志,张秀英,等.牛传染性鼻气管炎的生物学诊断与防治[J].中国兽药杂志,2001,35(6):45-48.
- [50]Todd J D,Volenec F J,Paton I M,et al.Intranasal vaccination against infectious bovine rhinotracheitis:Studies on early onset of protection and use of the vaccine in pregnant cows[J].JAVMA,1971,159:1370-1371.
- [51]邓艳,魏冬霞,姚美兰.牛传染性鼻气管炎诊断及防治研究进展[J].中国动物保健,2005, 6:21-22.
- [52]张桂红,童光志,王柳,等.牛传染性鼻气管炎病毒 TK 基因缺失株的构建[J].中国预防兽医学报,2001,21(4):275-277.
- [53]李继昌,鲁成武,殷会成.1 型疱疹病毒活载体疫苗的构建及研究进展[J].东北农业大学学报,2004,35(3):369-372.
- [54]Kelly J, Henrickson. Parainfluenza Viruses [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2003, 16:242-264.
- [55]Calain P, Roux L. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA [J]. J Virol, 1993, 67(8):4822-4830.
- [56]Henrickson K J. Parainfluenza viruses [J]. Clinical microbiology reviews, 2003, 16(2): 242-264.
- [57]Colman P M, Lawrence M C. The structural biology of type 1 viral membrane fusion [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4:309-319.
- [58]Baldwin D E, Marshall R G, Wessman G E. Experimental infection of calves with myxovirus parainfluenza-3 and Pasteurella haemolytica [J]. American journal of veterinary research, 1967, 28(127):1773-1782.
- [59]Thompson S D. Isolation of a biologically active soluble form of the hemagglutinin-neuraminidase protein of Sendai virus [J]. J Virol, 1988, 62(12): 4653-4660.
- [60]Horwood P F, Gravel J L, Mahony T J. Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes [J]. J Gen Virol, 2008, 89(7):1643-1648.

- [61] Echevarria J E, Erdman D D, Swierkosz E M, et al. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2 and 3 from clinical samples by multiplex PCR [J]. Clin Microbiol, 1998, 36: 1388-1391.
- [62] Stott E J, Taylor G. Respiratory syncytial virus [J]. Arch Virol, 1985, 84: 1-52.
- [63] Trudel M, Nadon F, Simard C, et al. Comparison of caprine, human and bovine strain of respiratory syncytial virus [J]. Arch Virol, 1989, 107: 141-149.
- [64] 王丽荣. 牛呼吸道合胞体病毒的病原与诊治 [J]. 兽医临床, 2006 (6) : 70-71.
- [65] Mallipeddi S K, Lupiani B, Samal S K. Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P interaction using a two-hybrid system [J]. J Gen Virol, 1996(77): 1019-1023.
- [66] Mallipeddi S K, Samal S K, Mohanty S B. Analysis of polypeptides synthesized in bovine respiratory syncytial virus-infected cells [J]. Arch Virol, 1990(115): 23-36.
- [67] Westenbrink F, Kimman T G, Brinkhof J M. Analysis of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus proteins in calves [J]. J GEN Virol, 1989(70): 591-601.
- [68] Zimmer G, Budz L, Herrler G. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 31642-31650.
- [69] Zimmer G, Conzelmann K K, Herrler G. Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR(109) and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture [J]. J Virol, 2002, 76(18): 9218-9224.
- [70] Zimmer G, Rohn M, McGregor G P, et al. Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus [J]. J Biol Chem, 2003, 278(47): 46854-46861.
- [71] Mallipeddi S K, Samal S K. Sequence variability of the glycoprotein gene of bovine respiratory syncytial virus [J]. J Gen Virol, 1993, 74: 2001-2004.
- [72] Langedijk J P, Schaaper W M, Muelen R H, et al. Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus [J]. J Gen Virol, 1996, 77: 1249-1257.
- [73] Langedijk J P, Muelen R H, Taylor G, et al. Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus [J]. J Virol, 1997, 71: 4055 - 4061.
- [74] Wertz G W, Collins P L, Huang Y, et al. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of membrane protein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 4075-4079.
- [75] Hendricks D A, Baradaran K, McIntosh K, et al. Appearance of a soluble form of the G protein of respiratory syncytial virus in fluids of infected cells [J]. J Gen Virol, 1987, 68: 1705-1714.
- [76] Teng M N, Collins P L. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles [J]. J Virol, 1998, 72: 5707-5716.
- [77] Hardy R W, Wertz G W. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription [J]. J Virol, 1998, 72: 520-526.

- [78]Bermingham A,Collins P L.The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a reguLatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription[J].Proc Natl Acad Sci USA,1999,96:11259-11264.
- [79]Samal S K,Zamora M.Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus[J].J Gen Virol,1991,72:1715-1720.
- [80]Anderson K,King A M,Lerch R A,et al.Polylactosaminoglycan modification of the respiratory syncytial virus small hydrophobic (SH) protein: a conserved feature among human and bovine respiratory syncytial viruses[J].Virology,1992,191: 417 - 430.
- [81]Bukreyev A,Whitehead S S,Murphy B R,et al.Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse[J].Virology, 1997, 71(12):8973-8982.
- [82]Schlender J,Bossert B, Buchholz U,et al.Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response[J]. J Virol,2000,74(18):8234-8242.
- [83]Schrijver R S,Daus F,Kramps J A,et al.Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strains detected in lung tissue[J]. Vet Microbiol, 1996, 53: 253-260.
- [84]Valarcher J F,Schelcher F,Bourhy H.Evolution of bovine respiratory syncytial virus[J].J Virol,2000,74:10714-10728.
- [85] Bryson D E.Necroscopy findings associated with BRSV pneumonia[J].Vet Med, 1993,88:894-899.
- [86]Viuff B,Tjornehoj K,Larsen L E,et al.Replication and clearance of respiratory syncytial virus:Apoptosis is an important pathway of virus clearance after experimental infection with bovine respiratory syncytial virus[J].Am J Pathol,2002, 161(6): 2195 - 2207.
- [87]Larsen L E,Tjornehoj K,Viuff B,et al.Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle:reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle[J].J Vet Diagn Invest,1999,11(5): 416-422.
- [88] Taylor G,Thomas L H,Furze J M,et al.Recombinant vaccinia viruses expressing the F,G or N,but not the M2,protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions[J].J Gen Virol,1997,78:3195-3206.
- [89]李继昌,于少军,刘忠贵.牛传染性鼻气管炎病的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医, 2002(4):50-51.
- [90]Socha W, Rala J,Use of rapid human respiratory syncytial virus strip tests for detection of bovine respiratory syncytial virus in experimentally vaccinated calves [J].Polish Journal of Veterinary Sciences,2012,15(4):629-634.
- [91]Winkler M T C, Doster A, Jones C.Persistence and Reactivation of Bovine Herpesvirus 1 in the Tonsils of Latently Infected Calves[j].Journal of Virology, 2000,

6: 5337-5346.

- [92]朱远茂,蔡红,董秀梅,等.我国牛副流感病毒 3 型山东分离株的研究[C].中国畜牧兽医学会家畜传染病学分会、解放军军事医学科学院军事兽医研究所:2013:4.
- [93]刘鹏.牛副流感病毒 3 型的分离鉴定和间接 ELISA 方法建立及初步应用[D].黑龙江八一农垦大学,2010.
- [94]王红,朴范泽,侯喜林.牛呼吸道合胞体病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J].动物医学进展,2008,11:1-4.
- [95]童钦.牛呼吸道病毒病血清学调查及其多重 RT-PCR 诊断方法的建立与初步应用[D].吉林农业大学,2012.

附录部分

双抗体夹心 ELISA 试剂盒操作步骤:

1. 编号: 将样品对应微孔按序编号, 每板应设阴性对照 2 孔、阳性对照 2 孔、空白对照 1 孔 (空白对照孔不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同)。
2. 加样: 分别在阴、阳性对照孔中加入阴性对照、阳性对照 50 μ l。然后在待测样品孔先加样品稀释液 40 μ L, 然后再加待测样品 10 μ L。加样将样品加于酶标板孔底部, 尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀。
3. 温育: 用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
4. 配液: 将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用
5. 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 秒后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。
6. 加酶: 每孔加入酶标试剂 50 μ L, 空白孔除外。
7. 温育: 操作同 3。
8. 洗涤: 操作同 5。
9. 显色: 每孔先加入显色剂 A 50 μ L, 再加入显色剂 B 50 μ L, 轻轻震荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 分钟。
10. 终止: 每孔加终止液 50 μ L, 终止反应 (此时蓝色立转黄色)。
11. 测定: 以空白空调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

计算和结果判定:

试验有效性: 阳性对照孔平均值 \geq 1.00; 阴性对照平均值 \leq 0.10。

临界值 (CUT OFF) 计算: 临界值=阴性对照孔平均值+0.15。

阴性判定: 样品 OD 值 < 临界值 (CUT OFF) 者为感染阴性。

阳性判定: 样品 OD 值 \geq 临界值 (CUT OFF) 者为感染阳性。

致 谢

首先,我要衷心感谢我的导师刻根强教授和师母王静梅老师。从论文的选题、试验的操作到论文的撰写都凝聚着他们无尽的心血。只身一人在新疆,导师和师母在学术上的谆谆教诲、生活中的体贴关怀,都使我时刻感受着来自实验室大家庭的温暖,使我能够克服生活和学习中的种种困难,最终完成此论文。他们高尚的人格、博大的胸怀、渊博的知识、孜孜不倦的科学态度、严谨求实的治学方法和一丝不苟的工作作风将是我今后工作和生活中的明灯。在此向刻老师、王老师表示最深的感谢和最崇高的敬意!

此外,还要衷心感谢乔军教授和马勋教授在研究过程中给予我专业的指导和帮助。

衷心感谢杨霞老师、齐亚银老师、蒋建军老师和王晓兰老师在试验和生活中给予的帮助和关怀!

衷心感谢杨铭伟师哥、王超丽师姐对我试验经验的传授及实验室设备操作的指导,感谢他们对我生活的帮助。

感谢张坤、许丹丹、古丽孜帕、邝佳丽、欧都、曹树珠、陈云飞等研究生同学给予的支持与帮助;尤其感谢欧都和许丹丹,感谢她们的风雨同舟、和衷共济,感谢她们的信任、鼓舞和支持。

感谢 14 级研究生凌晨、冯广余、宋康和师艳霞等师弟师妹帮助采集病料,感谢他们在试验中给予的支持与帮助。

最后,特别感谢长期给予我精神和物质支持的父母与亲人,感谢他们的理解、支持、关怀与照顾。

作者简介

倪宏斌，男，汉族，出生于1990年3月17日，籍贯山东潍坊。2013年毕业于青岛农业大学动物医学专业，获农学学士学位；同年考取石河子大学预防兽医学硕士研究生，研究方向为动物传染病诊断与防治。


在学期间主要参与的研究项目

参加了国家科技支持计划资助项目《奶牛标准化规模养殖主要疾病综合防控技术集成与示范》（2012BAD43B02）的部分研究工作。

在学期间发表的文章：

1. 倪宏斌,剡根强,张坤,等.新疆部分地区牛传染性鼻气管炎病毒感染的检测与gD基因序列分析[J].黑龙江畜牧兽医,待刊.
2. 倪宏斌,剡根强,张坤,等.新疆部分地区牛副流感病毒3型的检测与基因分型[J].畜牧与兽医,待刊.

石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表

研究生姓名	倪宏斌	学制	三年
专业	预防兽医学	研究方向	动物传染病诊断与防治
学术评语:			
<p>该硕士学位论文为国家科技支撑计划课题研究任务。论文采用了分子生物学及免疫学方法,对新疆 5 个地区的代表性规模化奶牛场牛传染性鼻气管炎、牛副流感 3 型和牛呼吸道合胞体病毒感染进行了调查,并对阳性病毒核酸进行了部分序列分析及基因型分型,结果表明被检牛场普遍存在牛传染性鼻气管炎病毒和牛副流感病毒 3 型的感染,且存在隐性感染及多重病毒感染。研究结果为新疆地区三种犊牛病毒性呼吸道疾病的免疫预防及疫苗研究提供了理论基础,具有重要的学术及应用价值。</p> <p>通过论文写作,该生查阅了大量国内外相关文献,了解并熟悉了相关研究进展,学习并掌握了免疫学及分子生物学相关技术,并在国内核心期刊上发表了论文两篇,具备了独立从事动物传染病诊断的研究及专业技能。</p> <p>论文写作规范、层次分明、语言流畅、重点突出、分析问题的逻辑性强,反映了该生具有分析与解决问题的能力。论文中的试验材料翔实、数据客观、结果可信。整体论文达到了预防兽医学硕士学位论文水平与要求,同意参加答辩。</p>			
指导教师签字: 			
2016年6月3日			