



温靖,于佳梁,李丹,包福祥.基于gB蛋白的牛传染性鼻气管炎间接ELISA检测方法的建立[J].中国农业大学学报,2024,29(01):119-126.
WEN Jing, YU Jialiang, LI Dan, BAO Fuxiang. Establishment of indirect ELISA method for detection of bovine infectious rhinotracheitis based on gB protein [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(01): 119-126.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.01.11

基于gB蛋白的牛传染性鼻气管炎间接ELISA检测方法的建立

温靖¹ 于佳梁¹ 李丹² 包福祥^{1*}

(1. 内蒙古农业大学兽医学院/农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室,呼和浩特010018;
2. 内蒙古自治区生态与农业气象中心,呼和浩特010052)

摘要 为建立一种针对牛传染性鼻气管炎病毒(Infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)的早期快速检测方法,并能判定免疫后是否再次发生感染,本研究利用原核表达IBRV gB蛋白,通过SDS-PAGE和Western blot检测gB蛋白的表达,初步建立基于gB蛋白检测IBRV的间接ELISA方法。结果表明:1)对IBRV标准阳性血清,本试验方法的最低检测限为1:4 096,说明建立的gB-ELISA检测方法具有较高的敏感性。2)该方法对其他4种常见的牛疫病阳性血清检测均为阴性,不存在交叉反应,表明该方法具有良好的特异性。3)在对200头牛的临床样品的检测中,该方法与IDEXX(IBRV gB X3)抗体检测试剂盒符合率高达97.5%。综上,本研究建立的gB-ELISA检测方法敏感性高,特异性好,该方法为开发一种在感染早期快速对疾病进行诊断,并可以判定疫苗免疫后是否再次发生IBRV感染的试剂盒奠定基础。

关键词 牛传染性鼻气管炎病毒; gB蛋白; ELISA

中图分类号 S852.65 文章编号 1007-4333(2024)01-0119-08 文献标志码 A

Establishment of indirect ELISA method for detection of bovine infectious rhinotracheitis based on gB protein

WEN Jing¹, YU Jialiang¹, LI Dan², BAO Fuxiang^{1*}

(1. Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Techniques for Animal Diseases/College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;
2. Ecological and Agrometeorological Center of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010052, China)

Abstract To establish an early and rapid detection method for bovine infectious rhinotracheitis virus (IBRV) and determine whether infection occurs again after immunization, the IBRV gB protein was expressed in prokaryotic cell and verified by SDS-PAGE and western blot. And an indirect ELISA was preliminarily established. The results indicated that: 1) For IBRV standard positive serum, the minimum detection limit of this experimental method was 1:4 096, indicating that the established gB-ELISA detection method had high sensitivity. 2) The method was negative to other 4 common bovine blight positive serological tests without cross-reaction, and the method had good specificity. 3) In the detection of 200 clinical samples of cattle, the coincidence rate of this method with IDEXX (IBRV gB X3) antibody detection kit was as high as 97.5%. In summary, the gB-ELISA detection method established in this study had high sensitivity and specificity. This method lays the foundation for developing a rapid diagnostic kit for diseases in the early stages of

收稿日期: 2023-05-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260893);内蒙古自治区自然科学基金项目(2022MS03019);内蒙古自治区“高等学校青年科技人才发展项目”(NJYT23094);内蒙古农业大学兽医学院教学改革项目(SYJG202305)

第一作者: 温靖(ORCID: 0000-0002-4529-7026), 实验师, 主要从事兽医微生物学与免疫学研究, E-mail: wenjingolive@163.com

通讯作者: 包福祥(ORCID: 0000-0003-4807-6277), 副教授, 主要从事传染病学与兽医公共卫生学研究, E-mail: baofuxiang@imau.edu.cn

infection and can determine whether IBRV infection occurs again after vaccine immunization.

Keywords bovine infectious rhinotracheitis virus; gB protein; ELISA

牛传染性鼻气管炎(Infectious bovine rhinotracheitis, IBR)是一种由牛传染性鼻气管炎病毒(Infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)引起的疾病,具有急性、热性和接触性传播的特征^[1]。该病被世界动物卫生组织(OIE)列为B类传染病,且是我国进出境动物和国际贸易中的重点检疫对象。自1955年在美国被首次分离以来,IBRV已经在全球广泛分布,除意大利(波尔查诺省)、奥地利、挪威、瑞士、丹麦和芬兰等少数国家消灭该病外,世界其他国家都有该病的报道^[2-9]。在我国,该病毒自20世纪70年代被发现后,几乎所有牛群均受到感染^[10],全国IBRV血清阳性率约为35.8%^[11-12]。

诊断IBRV感染的传统方法包括病原学方法和血清学方法。病原学方法包括病毒分离鉴定^[13]和病毒核酸检测。然而,病毒分离鉴定方法因耗时不适于快速诊断^[14],而核酸检测方法则需提取动物血液或病变组织样品中的DNA并进行PCR或重组聚合酶扩增^[13, 15-16]。血清学方法包括免疫荧光法、胶体金、琼脂扩散、间接血凝试验、中和试验和ELISA等^[17]。虽然琼脂扩散试验操作简单,但敏感性较低^[18],临床检测应用不普遍。相比之下,ELISA法操作简便快速,可以肉眼观察和大量检测,因此是目前使用最为广泛的方法。

国内现有IBRV检测方法,一般利用IBRV病毒gD、gB、gC、gG、gE和gL等重组蛋白或纯化后的IBRV全蛋白作为包被抗原,进行牛只抗体水平检测^[19-22]。欧洲一些发达国家通过使用gE基因缺失疫苗并利用gE-ELISA诊断试剂盒对gE抗体进行检测,在接种gE基因缺失疫苗的牛群中鉴别出感染野生型IBRV的牛,以此达到控制并清除IBRV的目的。但是,该试剂盒无法诊断国内采用非gE基因缺失疫苗免疫后的牛是否出现野生型IBRV感染的情况。gB是IBRV复制所必需的蛋白,并且是病毒穿入靶细胞和IBRV从感染细胞直接传播到相邻未感染细胞的膜融合过程所必需的^[23]。因此可以通过检测gB蛋白抗体滴度,判定牛是否感染IBRV,从而早期诊断IBRV感染。由于IBRV灭活疫苗不存在病毒复制过程,且gB蛋白量甚少,免疫动物体内几乎无法检测到gB蛋白抗体,因此通过检测gB蛋白抗体还可以判断免疫后牛只是否发生IBRV二

次感染。国内,郭良帅^[24]成功克隆牛传染性鼻气管炎gB基因的表达片段,并以包涵体形式表达了gB蛋白。他们建立的gB间接ELISA检测方法,与IDvet公司的gB-ELISA商品化试剂盒进行了比较,结果表明,阳性符合率为86.5%。尽管建立的ELISA诊断方法降低了IBRV检测成本,但由于阳性符合率不足,难以满足准确诊断IBRV感染的需求,所以还有待改进。

目前,IDEXX(IBRV gB X3)试剂盒是国内牧场广泛使用的IBRV诊断试剂盒,被认为是IBRV检测的金标准。然而,由于IDEXX(IBRV gB X3)试剂盒价格昂贵,使得在国内基层的广泛使用变得非常困难。因此,本研究致力于开发一种价格低廉,且符合率高的IBRV检测方法,以解决这一问题,进而提高IBRV大规模筛查能力,降低牧场经济压力,并改善牛的健康状况。本研究通过扩增IBRV *UL27*基因并表达具有良好反应原性的重组蛋白,从而建立gB-ELISA检测方法,将使得牧场主能够更准确地诊断IBRV早期感染以及判断是否存在免疫后牛只再次感染IBRV活病毒的情况。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌株和载体:IBRV NMHS-1株由农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室分离保存。大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1 Phage Resistant 和 BL21(DE3)购自北京全式金生物技术股份有限公司, IDEXX (IBRV gB X3) 抗体检测试剂盒购自内蒙古净农农牧业科技发展有限公司。表达载体 pET-32a 由农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室保存。

60份IBRV阴性血清样品、4份IBRV阳性血清、BVDV阳性血清、BPIV3阳性血清、BRSV阳性血清、牛支原体阳性血清均由农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室保存。具有呼吸系统综合征症状的200头份牛血清样品采集于内蒙古呼和浩特市周边某牛场。

血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;高保真酶(PrimeSTAR HS DNA Polymerase)、DNA聚合酶和T4 DNA连

接酶均购自于 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *Bam* HI、*Hind* III 和 DAB 显影液购自于 Thermo 生物公司;HRP 标记的兔抗牛 IgG 购自博奥森生物技术有限公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 公布的 IBRV 全基因组序列 (NC_001847), 利用 DNA Star 对 gB 基因开放阅读框 (*UL27* 基因) 的抗原区、亲水区及表面展示概率进行分析, 筛选出位于胞外区的目的片段长度为 7~228 aa (633 bp) 的主要抗原域。利用 Primer 5.0 软件针对该区域序列设计了一对引物, 并在上下游引物中分别引入 *Bam* HI 和 *Hind* III 限制性酶切位点。IBRV *UL27* 基因序列特异性引物 (gB Forward, 5'-CGCGGATCCGAGATCACGGACCTGGTGGACAAGA-3'; gB Reverse, 5'-CCCAAGCTTATTCTGCAACGCGAAGGTGTGGCTG-3')

1.3 *UL27* 基因克隆

按照试剂盒说明书提取的 IBRV NMHS-1 株基因组为模板, 通过 PCR 扩增 *UL27* 基因。反应体系为 50 μ L: 模板 1 μ L, 5 \times Prime STAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μ L、对应上下游引物各 1 μ L、dNTP Mixture 4 μ L、Prime STAR HS DNA Polymerase 0.5 μ L、dd H₂O 32.5 μ L。

经优化后扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 重复 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 结束后, 取 5 μ L 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

PCR 扩增产物经 *Bam* HI 和 *Hind* III 限制性内切酶酶切后与 pET-32a 载体连接, 转化至 Trans T1 感受态细胞。酶切鉴定正确后, 菌液测序, 将重组质粒命名为 pET-32a-gB。

1.4 *UL27* 基因的原核表达及鉴定

重组质粒 pET-32a-gB 转化到 BL21 (DE3) 宿主菌中, 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导 4 h 后, 分别收集诱导前和诱导后细菌培养物 1 mL, 10 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 弃上清后加入 2 \times SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min 后 12 000 r/min 离心 10 min, SDS-PAGE 检测蛋白表达情况, 并以 IBRV 阳性血清作为一抗, 以 HRP 标记的兔抗牛 IgG 为二抗, Western blot 检测该蛋白的免疫学活性。将菌体超声波裂解后, 洗涤包涵体, 8 mol/L 尿素溶解, 体外复性后经

Ni-NTA 层析介质纯化。

1.5 抗原最适包被浓度和血清最佳稀释度的确立

重组蛋白包被浓度和血清稀释度用方阵滴定法确定, 按照浓度梯度为 8、4、2、1、0.5 和 0.25 μ g/mL 将抗原包被于 96 孔酶标板, 将 IBRV 标准阳性血清、阴性血清按照 1:25、1:50、1:100、1:200 稀释作为一抗, 将 HRP 标记的兔抗牛 IgG 按 1:6 000 稀释作为二抗。按间接 ELISA 方法操作进行。酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。以阳性对照 OD₄₅₀ 值为 1 左右, 且阳性对照 OD₄₅₀/阴性对照 OD₄₅₀ (P/N) 比值最大时, 抗原包被浓度和抗体稀释度为最佳工作浓度。

1.6 阴阳临界值的确定

利用本研究建立的间接 gB-ELISA 检测方法对本实验室保存的 60 份 IBRV 阴性牛血清样品进行检测, 根据 OD₄₅₀ 值计算平均值和标准偏差, 样本 OD₄₅₀ \geq 阴性样本 OD₄₅₀ 平均值 (\bar{X}) + 3 \times 标准方差 (SD) 时, 判断为阳性, 反之为阴性。

1.7 特异性分析

利用本研究建立的间接 gB-ELISA 检测方法分别对 IBRV 阴性血清、IBRV 阳性血清、BVDV 阳性血清、BPIV3 阳性血清、BRSV 阳性血清、牛支原体阳性血清进行盲检, 分析建立的 ELISA 方法的特异性。

1.8 敏感性分析

利用本研究建立的间接 gB-ELISA 检测方法, 将 IBRV 的标准阳性血清从 1:2 倍比稀释, 确定 ELISA 方法的最低检测限度。

1.9 重复性分析

用不同批次的酶标板包被抗原, 将 4 份 IBRV 阳性血清与 4 份 IBRV 阴性血清利用本试验建立的间接 gB-ELISA 检测方法进行检测, 每份血清重复 6 次, 分析检测方法的重复性。

1.10 临床样品的检测

用建立的 gB-ELISA 检测方法和 IDEXX (IBRV gB X3) 抗体检测试剂盒对采集于呼和浩特周边牧场具有呼吸系统综合征症状的 200 头牛血清样品进行检测, 根据流行病学分析, 计算二者的符合率。

2 结果与分析

2.1 *UL27* 基因扩增及序列分析

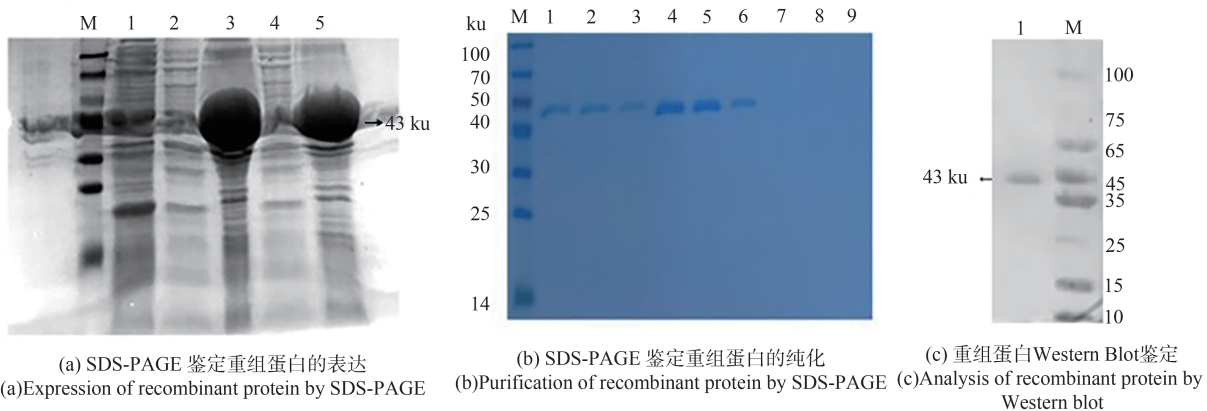
以 IBRV NMHS-1 株基因组为模板, PCR 方法进行扩增, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后在

630 bp左右出现特异性条带,与预期相符。将PCR产物进行测序并与NCBI上公布的UL27基因进行比对,结果显示其与已公布的UL27基因相似性达99%,一处核苷酸变异位点为无义突变,不影响gB蛋白表达。

2.2 gB蛋白原核表达和鉴定

pET-32a-gB质粒转化大肠杆菌感受态细胞,经IPTG诱导后,SDS-PAGE分析发现在细菌破碎后的沉淀中出现43 ku蛋白条带,证明该蛋白以包涵体形式表达(图1(a))。重组蛋白经Ni-NTA纯

化,将纯化后的蛋白通过SDS-PAGE分析,结果显示蛋白经过50 mmol/L咪唑洗脱后,目的蛋白几乎无杂带,且洗脱量最大,证明蛋白纯化成功(图1(b))。将纯化后的蛋白进行Western blot分析,以IBRV阳性血清为一抗(1:100),4℃过夜孵育,HRP标记的兔抗牛IgG为二抗(1:6 000),室温孵育1 h,结果在大约43 ku处出现特异性条带,表达产物可以被IBRV阳性血清识别,证明重组蛋白具有良好的免疫原性(图1(c))。



M: 蛋白质分子量标准;(a) 1: 诱导表达的pET-32a(+)空载体;2和4: 细菌破碎上清;3和5: 细菌破碎沉淀。(b) 1~9分别为20、30、40、50、80、100、150、200和500 mmol/L咪唑洗脱蛋白。(c) 1: pET-32a-gB重组蛋白。

M: Protein molecular weight standard;(a) 1: Induced expression of pET-32a(+) empty body; 2 and 4: The supernatant of bacteria lysates; 3 and 5: The supernatant of bacteria lysates. (b) 1-9: 20, 30, 40, 50, 80, 100, 150, 200 and 500 mmol/L imidazole eluted protein. (c) 1: PET-32a-gB recombinant protein.

图1 IBRV gB蛋白表达、纯化与鉴定

Fig. 1 Expression, purification and identification of IBRV gB protein

2.3 间接ELISA最佳反应条件的摸索

通过正交筛选,结果显示抗原最佳包被量为4 μg/mL,一抗血清最佳稀释度为1:100时,P值为1左右,P/N值最大为3.046,结果如表1所示。所以选择抗原包被浓度为4 μg/mL,一抗稀释度为1:100。

2.4 gB-ELISA检测方法判定标准的确定

60份IBRV阴性血清样品经本试验建立的gB-ELISA检测方法进行检测,阴性血清的平均值(\bar{x})为0.187,标准差(SD)为0.017,确定阴阳性临界值为 $\bar{X}+3SD=0.238$,即当血清样本OD₄₅₀值 ≥ 0.238 时判定为阳性,反之则为阴性。

2.5 gB-ELISA检测方法特异性分析

经本研究建立的gB-ELISA检测方法检测

IBRV阳性血清、BVDV阳性血清、BPIV3阳性血清、BRSV阳性血清和牛支原体阳性血清,结果如表2所示,IBRV阳性血清检测结果OD₄₅₀为0.751,其余被检测血清结果均为阴性,表明该方法具有较好的特异性。

2.6 gB-ELISA检测方法的敏感性分析

将IBRV阳性血清进行倍比稀释,利用本试验建立的gB-ELISA检测方法进行检测,当血清稀释至1:4 096(即1:2¹²)时检测,OD₄₅₀为0.453,结果判定为阳性,表明建立的gB-ELISA检测方法具有较高敏感性(图2)。

2.7 gB-ELISA检测方法的重复性分析

用不同批次的酶标板包被抗原检测4份阳性血

表 1 gB-ELISA 方阵滴定结果

Table 1 Results of gB-ELISA phalanx titrimetry

血清稀释 Dilution of serum	抗原包被量/($\mu\text{g}/\text{mL}$) Antigen coating amount					
	8	4	2	1	0.5	0.25
1:25(+)	1.531	1.466	1.389	1.321	1.296	1.233
1:25(-)	0.379	0.430	0.399	0.404	0.380	0.395
P/N	4.040	3.049	3.481	3.270	3.411	3.122
1:50(+)	1.376	1.301	1.190	0.836	0.797	0.661
1:50(-)	0.416	0.376	0.361	0.287	0.271	0.250
P/N	3.308	3.460	3.296	2.913	2.941	2.644
1:100(+)	1.140	0.993	0.761	0.685	0.499	0.457
1:100(-)	0.398	0.326	0.285	0.261	0.205	0.214
P/N	2.864	3.046	2.670	2.625	2.434	2.136
1:200(+)	0.787	0.751	0.687	0.511	0.421	0.349
1:200(-)	0.311	0.285	0.274	0.230	0.197	0.173
P/N	2.531	2.635	2.507	2.222	2.137	2.017

注:黑体数值为 P/N 最大比值。

Note: The values in bold represent the maximum ratio of P/N values.

表 2 gB-ELISA 检测方法特异性分析

Table 2 Analysis of the specificity of gB-ELISA detection method

项目 Item	牛传染性鼻气管炎 病毒 IBRV	牛病毒性腹泻病毒 BVDV	牛流感病毒 3 型 BPIV 3	牛呼吸道合胞体 病毒 BRSV	牛支原体 <i>Mycoplasma bovis</i>
OD ₄₅₀ 值 OD ₄₅₀ value	0.751	0.213	0.196	0.202	0.164
判定结果 Result	阳性 Positive	阴性 Negative	阴性 Negative	阴性 Negative	阴性 Negative

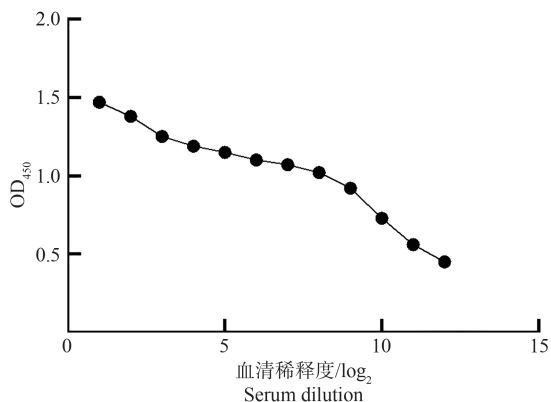


图 2 gB-ELISA 检测方法敏感性分析

Fig. 2 Sensitivity analysis of gB-ELISA detection method

清和 4 份阴性血清, 计算 gB-ELISA 检测方法变异系数。结果显示阳性血清批内变异系数为 3.76%~5.58%, 阴性血清批内变异系数为 6.51%~7.94%。阳性血清批间变异系数为 3.66%~6.88%。阴性血清批间变异系数为 3.55%~8.05%。本方法批内变异系数与批间变异系数均小于 10%, 表明该方法具有良好的重复性。

2.8 建立的 gB-ELISA 检测方法的临床样品检测

利用本研究建立的 gB-ELISA 检测方法对 200 份临床样品进行检测的结果(表 4)显示: 检测出 176 份阳性血清和 24 份阴性血清, 用 IDEXX

(IBRV gB X3)抗体检测试剂盒检测出181份阳性血清和19份阴性血清。以IDEXX (IBRV gB X3)抗体检测试剂盒为金标准,总符合率为97.5%。

表3 gB-ELISA检测方法重复性分析

Table 3 Repeatability analysis of gB-ELISA detection method

样品 Sample	批次内变异系数 Coefficient of variation within a batch		批次间变异系数 Coefficient of variation between batches		
	$\bar{X} \pm SD$	CV/%	$\bar{X} \pm SD$	CV/%	
	阳性血清 Positive serum	1 2 3 4	1.018±0.045 1.010±0.038 0.986±0.055 0.982±0.042	4.42 3.76 5.58 4.28	0.968±0.040 0.925±0.052 0.984±0.036 0.974±0.067
阴性血清 Negative serum	1 2 3 4	0.198±0.014 0.126±0.010 0.261±0.017 0.205±0.016	7.07 7.94 6.51 7.80	0.185±0.010 0.174±0.014 0.230±0.014 0.197±0.007	5.41 8.05 6.09 3.55

表4 gB-ELISA检测方法的评价

Table 4 Evaluation of gB-ELISA detection method

gB-ELISA 检测方法 gB-ELISA detection method	IDEXX (IBRV gB X3) 抗体检测试剂盒 IDEXX (IBRV gB X3) Antibody detection kit		
	阳性 Positive	阴性 Negative	合计 Total
阳性 Positive	176	0	176
阴性 Negative	5	19	24
合计 Total	181	19	200

3 讨论

牛传染性鼻气管炎病毒,属于疱疹病毒科,又名牛疱疹病毒I型。IBRV能够引发牛的各种疾病,其中包括呼吸系统疾病如鼻气管炎和肺炎,以及生殖系统疾病如阴道炎和包皮龟头炎等。IBRV最初在20世纪60年代于美国被发现。从此,IBRV在全球范围内广泛流行,包括欧洲、美洲、亚洲以及非洲的牛群中,均有IBRV被检测出来。IBRV对全球的畜牧业,特别是牛群健康,构成了重大威胁。近年来,国内各地陆续出现了IBRV疫情报告。疫情持续蔓延并对中国的牛群健康以及整个畜牧业产生了严重影响。目前,防控IBRV的任务依然严峻。

目前国内外的IBRV ELISA检测试剂盒中包被的抗原主要集中在gD、gB、gC、gG、gE和gL等蛋白。gB是病毒粒子囊膜表面的包膜糖蛋白,主要在病毒与宿主细胞的结合以及未感染细胞与感染细胞细胞膜融合过程中起到关键作用,因此以gB蛋白为包被抗原建立的诊断方法可以实现早期快速对疾病进行诊断,并能判定免疫后牛是否发生再次感染。2015年,费玮彦^[25]利用gD、gB、gB+gD蛋白作为包被抗原建立ELISA检测方法,与使用单个蛋白相比,gB+gD的灵敏度更高(95.67%)。美国IDEXX (IBRV gB X3)抗体检测试剂盒常作为金标准用以评价IBRV检测方法的准确性。与之相比,本研究团队魏鑫等^[29]制备的IBRV gD抗体间接

ELISA 检测方法总符合率为 96%; 本研究团队吴倩等^[19]制备的 IBRV gE 抗体间接 ELISA 检测方法总符合率为 95%; 曹翀等^[22]制备的 IBRV gB 抗体间接 ELISA 检测方法通过设计引物扩增 gB 蛋白第 190~524 氨基酸残基并以包涵体形式进行表达, 建立 ELISA 检测方法, 与 IDEXX (IBRV gB X3) 抗体检测试剂盒进行比对阳性符合率为 84.28%, 阴性符合率为 85.71%。上述研究中, 虽然吴倩和魏鑫建立的 ELISA 方法与美国 IDEXX (IBRV gB X3) 抗体检测试剂盒总符合率较为接近, 然而由于包被抗原并非是 gB 蛋白, 因此无法对免疫后牛是否发生二次感染进行判断。曹翀建立的 ELISA 检测方法虽以 gB 蛋白第 190~524 氨基酸作为包被抗原, 但其准确率尚待提高。本研究选择 IBRV 复制过程中所必须参与的关键糖蛋白 gB 蛋白作为包被抗原, 表达 gB 蛋白的 7~228 氨基酸序列 (633 bp), 通过检测牛血清中的 gB 抗体水平来推断其是否感染 IBRV。本研究建立的 gB-ELISA 检测方法 with IDEXX (IBRV gB X3) 抗体检测试剂盒总符合率高达 97.5%, 符合率最高。

相比于传统的病毒分离和鉴定的方法, gB-ELISA 检测方法具有检测灵敏度高、特异性好、操作简便、结果可靠等优点。如果这种新的检测方法可以作为 IDEXX 的平价替代品, 那么它会大大降低临床筛查成本, 实现早期快速检测, 使得大规模筛查 IBRV 成为可能。另一方面, 可以帮助检测人员准确地诊断免疫后牛只的 IBRV 二次感染, 从而及时采取措施防止病情恶化和传播, 提高牛的健康状况和生产力。

综上, 本研究建立的 gB-ELISA 的检测方法可较为准确地诊断 IBRV 感染, 具有实际应用意义和推广价值。由于本研究 gB-ELISA 检测方法仅在实验室内进行初步研究, 未来还需要进一步扩大样本量, 在不同环境条件下进行验证以及进行临床应用测试, 以进一步验证其在诊断实践中的应用价值。

参考文献 References

- [1] Potgieter L N D. Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhoea virus[J]. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1997, 13(3): 471-481
- [2] Mina M J, Klugman K P. The role of influenza in the severity and transmission of respiratory bacterial disease[J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2014, 2(9): 750-763
- [3] Segura-Correa J C, Solorio-Rivera J L, Sánchez-Gil L G. Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herds of Michoacan, Mexico[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2010, 42(2): 233-238
- [4] Jessett D M, Rampton C S. The incidence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus in Kenyan cattle[J]. *Research in Veterinary Science*, 1975, 18(2): 225-226
- [5] Martin S W, Bateman K G, Shewen P E, Rosendal S, Bohac J E. The frequency, distribution and effects of antibodies, to seven putative respiratory pathogens, on respiratory disease and weight gain in feedlot calves in Ontario [J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1989, 53(3): 355-362
- [6] Kipyego E S, Gitau G, Vanleeuwen J, Kimeli P, Abuom T O, Gakuya D, Muraya J, Makau D. Sero-prevalence and risk factors of infectious bovine rhinotracheitis virus (type 1) in Meru County, Kenya [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 175: 104863
- [7] Paisley L G, Tharaldsen J, Jarp J. A retrospective analysis of the infectious bovine rhinotracheitis (bovine herpes virus-1) surveillance program in Norway using Monte Carlo simulation models[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2001, 50(1/2): 109-125
- [8] Valas S, Ngwa-Mbot D, Stourm S, Mémeteau S, Tabouret M. A retrospective evaluation of pooled serum ELISA testing in the frame of the French eradication program for infectious bovine rhinotracheitis[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2023, 214: 105890
- [9] Msolla P M, Wiseman A, Selman I E. The prevalence of serum neutralizing antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in Scotland[J]. *The Journal of Hygiene*, 1981, 86(2): 209-215
- [10] Yang N, Cui X A, Qian W F, Yu S S, Liu Q. Survey of nine abortifacient infectious agents in aborted bovine fetuses from dairy farms in Beijing, China, by PCR[J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2012, 60(1): 83-92
- [11] 温靖, 李丹, 郭婷, 武春霞, 周雅坪, 田广原, 罗玉霞, 郝永清. 中国奶牛牛支原体流行病学调查分析[J]. *中国农业大学学报*, 2022, 27(3): 75-82
- [12] Wen J, Li D, Guo T, Wu C X, Zhou Y P, Tian G Y, Luo Y X, Hao Y Q. Epidemiological investigation and analysis of *Mycoplasma bovis* in different dairy farming areas in China[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2022, 27(3): 75-82 (in Chinese)
- [13] Yan B F, Chao Y J, Chen Z, Tian K G, Wang C B, Lin X M, Chen H C, Guo A Z. Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 127(1/2): 136-141
- [14] Hou P L, Wang H M, Zhao G M, He C Q, He H B. Rapid detection of infectious bovine Rhinotracheitis virus using recombinase polymerase amplification assays[J]. *BMC Veterinary Research*, 2017, 13(1): 1-9
- [15] 张芳, 刘瑞宁, 陈颖钰, 郭爱珍. 牛传染性鼻气管炎诊断方法研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2017, 38(4): 93-97
- [16] Zhang F, Liu R N, Chen Y Y, Guo A Z. Progress on diagnosis method of infectious bovine rhinotracheitis [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2017, 38(4): 93-97 (in Chinese)
- [17] Marin M S, Quintana S, Leunda M R, Recavarren M, Pagnuco I, Spáth E, Pérez S, Odeón A. A new method for simultaneous detection and discrimination of Bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) using real time PCR with high resolution melting (HRM) analysis [J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, 227: 14-22
- [18] Thonur L, Maley M, Gilray J, Crook T, Laming E, Turnbull D, Nath M, Willoughby K. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3[J]. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8: 37
- [19] Kit S, Otsuka H, Kit M. Blocking ELISA for distinguishing infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV)-infected animals from those vaccinated with a gene-deleted marker vaccine[J]. *Journal of Virological Methods*, 1992, 40(1): 45-56
- [20] Biuk-Rudan N, Cvetnić S, Madić J, Rudan D. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders [J].

- Theriogenology*, 1999, 51(5): 875-881
- [19] 吴倩, 张建华, 郝永清. 牛传染性鼻气管炎病毒gE蛋白原核表达及间接ELISA检测方法研究[J]. 中国动物传染病学报, 2021, 29(2): 22-27
Wu Q, Zhang J H, Hao Y Q. Prokaryotic expression of infectious bovine rhinotracheitis virus gE protein and indirect ELISA detection method [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2021, 29(2): 22-27 (in Chinese)
- [20] 张鹿, 付祥, 柳翠翠, 陈钰彬, 郭珂宇, 赵桂新, 张志强, 史秋梅, 吴同垒. 基于gL蛋白的牛传染性鼻气管炎间接ELISA检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(12): 2363-2367
Zhang L, Fu X, Liu C C, Chen Y B, Guo K Y, Zhao G X, Zhang Z Q, Shi Q M, Wu T L. Establishment and preliminary application of indirect elisa for detection of infectious bovine rhinotracheitis based on gl protein [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(12): 2363-2367 (in Chinese)
- [21] Subramaniam R, Herndon C N, Shanthalingam S, Dassanayake R P, Bavananthasivam J, Potter K A, Knowles D P, Foreyt W J, Srikumaran S. Defective bacterial clearance is responsible for the enhanced lung pathology characteristic of Mannheimia haemolytica pneumonia in bighorn sheep[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 153(3): 332-338
- [22] 曹翀, 曹永生, 宋林, 高明春, 彭统全, 张树栋, 王君伟. 牛传染性鼻气管炎病毒gB蛋白的截短表达及间接ELISA方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(2): 123-127
Cao C, Cao Y S, Song L, Gao M C, Peng T Q, Zhang S D, Wang J W. Development of an indirect ELISA for detection of antibodies against infectious bovine rhinotracheitis virus truncated glycoprotein B [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2015, 37(2): 123-127 (in Chinese)
- [23] Keil G M, Höhle C, Giesow K, König P. Engineering glycoprotein B of bovine herpesvirus 1 to function as transporter for secreted proteins: a new protein expression approach. [J] *Journal of Virology*, 2005, 79(2): 791-799
- [24] 郭良帅. 牛传染性鼻气管炎病毒gB和gE基因蛋白原核表达及其间接ELISA检测方法的建立[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2022
- Guo L S. Prokaryotic expression of gB and gE gene proteins of bovine infectious rhinotracheitis virus and establishment of indirect ELISA detection method[D]. Ala'er: Tarim University, 2022 (in Chinese)
- [25] 费玮彦. 牛传染性鼻气管炎病毒SH7株gB、gD基因的原核表达及ELISA方法的建立[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2015
Fei W Y. Prokaryotic Expression of gB and gD genes of IBRV SH7 strain and establishment of ELISA method [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [26] 毕莹, 闻晓波, 倪宏波. 牛传染性鼻气管炎病毒gD蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(10): 1050-1054
Bi Y, Wen X B, Ni H B. Preparation and identification of monoclonal antibodies against gD protein of bovine infectious rhinotracheitis virus[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2017, 30(10): 1050-1054 (in Chinese)
- [27] 杨木娇, 林俊, 张娟, 王婉, 向文杰, 薛飞, 朱远茂. 牛传染性鼻气管炎病毒gE蛋白在杆状病毒中的表达及抗原性鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(1): 34-40
Yang M J, Lin J, Zhang J, Wang W, Xiang W J, Xue F, Zhu Y M. Expression and antigenic reactivity of gE glycoprotein of infectious bovine rhinotracheitis virus in baculovirus expression system[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, 44(1): 34-40 (in Chinese)
- [28] 定明. 牛传染性鼻气管炎TK/gE基因缺失重组病毒的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010
Ding M. Study on the recombinant virus with TK/gE gene deletion in bovine infectious rhinotracheitis [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010 (in Chinese)
- [29] 魏鑫, 张建华, 郭婷, 吕天星, 周雅坪, 张新竹, 吴倩, 陈新迪, 王艳芳, 白帆, 郝永清. IBRV gD蛋白的原核表达及其间接ELISA检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(11): 2129-2134
Wei X, Zhang J H, Guo T, Lyv T X, Zhou Y P, Zhang X Z, Wu Q, Chen X D, Wang Y F, Bai F, Hao Y Q. Prokaryotic expression for gD protein of infectious bovine rhinotracheitis virus and establishment of indirect ELISA-linked testing method [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 39(11): 2129-2134 (in Chinese)

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 温靖, 农学硕士, 实验师, 主要从事兽医微生物与免疫学方面的教学、科研工作。主要包括细菌与病毒混合感染, 宿主抗感染免疫应答等方面的研究。先后主持多项科研项目及教改项目, 并参与多项国家自然科学基金项目。先后发表多篇科研及教学改革论文, 其中SCI论文3篇, 核心期刊论文2篇。



通讯作者简介: 包福祥, 博士, 副教授, 内蒙古农业大学兽医学院副院长, 兽医学院动物医学国家级一流本科专业建设点负责人, 中国畜牧兽医学会兽医食品卫生学分会理事, 内蒙古实验动物学会副理事长。主持国家自然科学基金地区基金项目2项、内蒙自然科学基金面上项目2项、教育部留学归国人员科研启动基金1项、横向科研项目3项。发表学术论文25篇, 参编国家级统编专业教材2部, 专著1部。