

牛传染性鼻气管炎病毒流行株分离鉴定及感染性分析

王瑾^{1,2}, 杨行^{2,3}, 马雪青², 温建维⁴, 黎映胜⁴, 宋晓琛^{2,5}, 李平花²,
杜晓华¹, 卢曾军², 刘霞^{1*}, 孙普^{1,2*}

- 1 甘肃农业大学 生命科学技术学院, 甘肃 兰州
- 2 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州
- 3 宁夏大学 动物科技学院, 宁夏 银川
- 4 临洮县畜牧兽医站, 甘肃 定西
- 5 西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州

王瑾, 杨行, 马雪青, 温建维, 黎映胜, 宋晓琛, 李平花, 杜晓华, 卢曾军, 刘霞, 孙普. 牛传染性鼻气管炎病毒流行株分离鉴定及感染性分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(11): 4889-4904.

WANG Jin, YANG Hang, MA Xueqing, WEN Jianwei, LI Yingsheng, SONG Xiaochen, LI Pinghua, DU Xiaohua, LU Zengjun, LIU Xia, SUN Pu. A predominant strain of bovine infectious rhinotracheitis virus: isolation, identification, and preliminary investigation into its infectivity in cattle[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(11): 4889-4904.

摘要: 【目的】进一步掌握当前我国牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)流行株的分子特征及生物学特性, 为科学防控牛传染性鼻气管炎(infectious bovine rhinotracheitis, IBR)提供病原学参考。【方法】采集牛肺脏组织, 利用 PCR 方法检测牛呼吸道常见病毒; 使用 MDBK 细胞分离病毒, 并应用病毒宏基因组测序技术测定与分析病毒的全基因组序列; 蚀斑纯化病毒, 连续传至第 9 代(F9), 测定病毒 TCID₅₀、绘制一步生长曲线并观察病毒粒子形态; 将 F9 代细胞毒以滴鼻方式接种 2 头 IBRV 抗体阴性健康成年牛, 每鼻孔 2.5 mL, 同时让 1 头牛与之同居, 观察体温和排毒变化等临床表现。【结果】PCR 检测显示, 该牛肺脏组织含有 IBRV 和牛冠状病毒(bovine coronavirus, BCoV)。接种 MDBK 细胞传至第 3 代时出现明显细胞病变, 宏基因组测序确定为 IBRV, 其基因组全长为 134 678 bp, 命名为 IBRV GSLT/04/2024 株。F9 代病毒 TCID₅₀ 为 10^{5.5} TCID₅₀/mL, 且 *gB*、*gC*、*gD* 和 *gE* 基因均未发生突变。依据 *gC* 基因和全基因组序列将该毒株划分为 IBRV 1.2b 亚型谱系。牛滴鼻后第 5 天开始向外排毒, 同居牛第 10 天开始向外排毒, 约持续排毒 10 d, 排毒量依次为鼻拭子>口拭子>肛拭子>眼拭子; 接种第 30 天仅从结肠组织中检测出 IBRV 基因; 接种牛约于第 7 天、同居牛第 10 天出现 IBR 特异性抗体。【结论】本研究成功分离出 1 株新的 IBRV 1.2b 亚型流行毒株, 初步证明其对成年牛具有较强感染能

资助项目: 甘肃省科技计划(25CXNA045, 25CXNA034)

This work was supported by the Gansu Provincial Science and Technology Program (25CXNA045, 25CXNA034).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Xia, liux@gsau.edu.cn; SUN Pu, sunpu@caas.cn

Received: 2025-03-29; Accepted: 2025-05-20; Published online: 2025-07-03

力，这为进一步溯源我国 IBRV 感染率增高现象提供了重要的流行病学和病原学依据。

关键词：牛传染性鼻气管炎病毒；分离；鉴定；遗传变异分析

A predominant strain of bovine infectious rhinotracheitis virus: isolation, identification, and preliminary investigation into its infectivity in cattle

WANG Jin^{1,2}, YANG Hang^{2,3}, MA Xueqing², WEN Jianwei⁴, LI Yingsheng⁴, SONG Xiaochen^{2,5}, LI Pinghua², DU Xiaohua¹, LU Zengjun², LIU Xia^{1*}, SUN Pu^{1,2*}

1 College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, China

2 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu, China

3 College of Animal Science and Technology, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia, China

4 Livestock and Veterinary Station of Lintao County, Dingxi, Gansu, China

5 College of Life Sciences and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou, Gansu, China

Abstract: [Objective] The outbreaks of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) have been reported in multiple regions across China. To systematically characterize the molecular features and biological properties of the predominant strains of infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) and provide etiological insights for evidence-based prevention and control against IBR. **[Methods]** We collected the bovine lung tissue for detection of common bovine respiratory viruses by PCR. Viral isolation was performed with MDBK cells, and then metagenomic sequencing was conducted to determine and analyze complete genome sequences of the viruses. Viruses were purified *via* the plaque assay and subcultured to the 9th generation (F9) for determination of the 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀), monitoring of one-step growth kinetics, and observation of viral particle morphology *via* electron microscopy. Two IBRV-seronegative healthy adults of cattle were intranasally inoculated with the F9 suspension (2.5 mL/nostril), while one additional head of cattle was housed in close contact. The clinical manifestations were monitored, including body temperature fluctuations and viral shedding dynamics. **[Results]** PCR detection revealed the presence of both IBRV and bovine coronavirus (BCoV) in the bovine lung tissue. After inoculation into MDBK cells, obvious cytopathic effects were observed at the third passage. Metagenomic sequencing confirmed the virus as IBRV, with a whole genome length of 134 678 bp. This isolate was designated as IBRV GSLT/04/2024. The TCID₅₀ of F9 was 10^{5.5} TCID₅₀/mL, and no mutation was detected in the *gB*, *gC*, *gD*, or *gE* gene. Based on the *gC* gene and whole genome sequences, this strain was classified into the IBRV 1.2b subtype lineage. Viral shedding began on day 5 post-inoculation in the inoculated cattle and on day 10 in the contact cattle, lasting for approximately 10 days. The amount of viral shedding followed the order of nasal swabs>oral swabs>rectal swabs>ocular swabs. On day 30 post-inoculation, IBRV genes were only detected in the colon tissue. IBR-

specific antibodies were detected on approximately day 7 in the inoculated cattle and on day 10 in the contact cattle. **[Conclusion]** We successfully isolated a novel IBRV subtype 1.2b strain with high infectivity in adult cattle. The findings provide epidemiological and etiological evidence to trace the recent surge in IBRV prevalence across China.

Keywords: infectious bovine rhinotracheitis virus; isolation; identification; genetic variation analysis

牛传染性鼻气管炎 (infectious bovine rhinotracheitis, IBR)是由牛传染性鼻气管炎病毒 (infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)引起的一种牛急性、热性、接触性传染病^[1], 该病也被称为“红鼻病”或“坏死性鼻炎”, 被我国列为二类动物传染病^[2]。IBRV 是牛呼吸道疾病综合征的主要病原体之一, 常与其他细菌、支原体和病毒协同感染, 对我国牛产业的健康发展构成巨大障碍。IBRV 可通过呼吸道或生殖道侵入感染, 最终会藏匿于三叉神经节, 形成长期带毒现象。在长途运输或寒冷季节, 带毒牛易诱发排毒, 导致牛群重新感染, 这是通过疫苗免疫难以根除净化 IBRV 的主要原因。通常, IBRV 对犊牛的致死率较高, 对成年牛一般不会造成死亡, 但会严重影响公牛的使役力、母牛的繁殖力和产奶量, 给养牛业造成巨大经济损失^[3]。2024 年全国主要动物疫病报告情况统计发现, IBR 的死亡率达 7.89%; 本研究小组诊断出 IBRV 感染的 4 个牛场, 感染率为 15%–20%, 犊牛病死率将近 100%, 1 岁以上的牛病死率为 13%。由此可见, 当前流行的 IBRV 生物学特性可能出现了新的变化。因此, 必须尽早开展对牛群 IBRV 的深入调查, 并强化疫苗免疫防控工作。

IBRV 属于牛甲型疱疹病毒 I 型 (bovine herpesvirus 1, BoHV-1), 是疱疹病毒科 (Herpesviridae) 水痘病毒属 (Varicellovirus) 成员^[4]。它是一种具有囊膜的双链 DNA 病毒, 由囊膜、核心与衣壳 3 部分组成, 衣壳直径为 80–120 nm, 病毒直径为 150–200 nm, 呈正二十面体结构, 电镜观测为六角形病毒粒子^[5]。其基因组全长约

为 138 kb, 由一个独特长序列区 (unique long sequence region, UL) 和一个独特短序列区 (unique short sequences region, US) 组成, US 区侧翼分别为内部重复序列 (internal repeat sequences region, IR) 和末端反向重复序列区 (terminal repeat sequences region, TR), 编码 70 种蛋白, 其中 UL 区编码 6 种糖蛋白 (gB、gC、gH、gL、gK 和 gM)、US 区编码 4 种糖蛋白 (gG、gD、gI 和 gE)^[6]。gB、gC、gD 和 gE 是 IBRV 囊膜表面的主要糖蛋白, gB、gC 和 gD 是感染牛血清识别的主要病毒免疫原基因^[7], 常作为流行毒株抗原性变异分析的靶基因。根据抗原和基因组的差异, BoHV-1 型可分为 4 种亚型: BoHV-1.1、BoHV-1.2a、BoHV-1.2b 和 BoHV-1.2c。此外, 还存在 BoHV-2 型和 BoHV-3 型, 其中 BoHV-3 被重新归类为 BoHV-5^[8]。

为及时掌握甘肃地区牛群 IBRV 流行株的分子特征及其对牛的感染与传播能力, 本研究利用病毒宏基因组学测定 IBRV 流行毒株的全基因组序列, 分离鉴定病毒后进行动物回归实验, 以期了解最新 IBRV 流行株的分子生物学特征, 这对制定 IBR 防控方案具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 病料来源

2024 年 4 月, 某牛场从外地调运一批半岁左右的西门塔尔牛 (动物实验获中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物伦理委员会批准, 编号为 LVRIAEC-2024-088), 长途运输 1 000 km 多至场内第 7 天后, 牛陆续出现咳嗽、流鼻涕、发烧、腹泻等症状, 同时伴有流泪和流口水现

象, 个别牛鼻分泌物带血, 鼻镜发红。第 14 天病牛开始死亡, 病死率约 10%。采集牛的肺脏、气管、鼻拭子和血液等组织, 低温保存并运输至实验室进行诊断检查。

1.2 试验动物、细胞及主要试剂

选用 3 头 2 岁龄健康成年秦川红牛, 其 IBR 病原和抗体检测均为阴性; 牛肾细胞(MDBK)由中国农业科学院兰州兽医研究所保存供应; FastPure[®] Viral DNA/RNA Mini Kit、HiScript II One Step RT-PCR Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *LA Taq*[®] with GC Buffer、Premix *Taq*[™]、Probe qPCR Mix MultiPlus, TaRaKa 公司; Rabbit anti Bovine IgG 的荧光抗体(FITC 标记), 赛默飞公司; DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶, Gibco 公司; IDEXX IBR gB X3 抗体检测试剂盒, IDEXX 公司。

1.3 引物设计与合成

以 GenBank 数据库中 16453/07 TN 毒株 (OR211605.1) 的基因序列为参考, 使用 Primer Premier 5 软件设计 *gB*、*gC*、*gD* 和 *gE* 基因扩增引物; 采用世界动物卫生组织推荐的 IBRV 实时荧光定量 PCR 检测方法进行病原检测, 引物与探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合

成, 引物序列如表 1 所示。

1.4 组织样品处理及核酸提取

在生物安全柜内处理组织样品, 取少量牛肺组织, 加入灭菌石英砂充分研磨后, 用 PBS 缓冲液(pH 7.4)按 1:3–1:5 比例制备悬液。反复冻融 3 次后 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 取 300 μL 上清液, 使用 FastPure[®] Viral DNA/RNA Mini Kit 提取总 DNA/RNA, 操作步骤参照试剂盒说明书。

1.5 PCR 检测

根据临床症状和发病史, 使用常见牛呼吸道感染病毒的实验室诊断检测引物进行 PCR/RT-PCR 扩增, 所用引物见表 2。DNA 病毒 PCR 反应体系 (25 μL): Premix *Taq* (*LA Taq* version 2.0 plus dye) 12.5 μL, 上、下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μL, 核酸 2 μL, 灭菌水 9.5 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。RNA 病毒 RT-PCR 反应体系 (25 μL): 2×One Step Mix (Dye Plus) 12.5 μL, One Step Enzyme Mix 1.5 μL, 上、下游引物 (10 mmol/L) 各 1 μL, 核酸 3 μL, 灭菌水 6 μL。RT-PCR 反应程序: 50 °C 反转录 30 min; 94 °C

表1 IBRV基因扩增和诊断检测的引物和探针序列

Table 1 Primers and probe sequences for IBRV genome amplification and diagnostic test

引物名称 Primers name	引物序列 Primer sequences (5'→3')	片段长度 Fragment length (bp)
gB-F1	GGGCGGAACACTACCGAGGGCAT	3 153
gB-R2	CACCGCGGCCAAACATAAGTAAAG	
gC-F	ACGAAAACACTACGACGAGGCCCGCG	1 962
gC-R	TTCTGCGTCGGGGCTGCTGGGTCT	
gD-F	CCAACGTTGGTGCCTGTCG	1 578
gD-R	CACCATCCAGAGCAACAGGCACCG	
gE-F	TCGCTCGCGTGTGTCTTGGTTTCTG	2 098
gE-R	GGACTCTCCATGCCTTCGAAGC	
IBRV-F	TGTGGACCTAAACCTCACGGT	20
IBRV-R	GTAGTCGAGCAGACCCGTGTC	20
IBRV-Probe	FAM-AGGACCGCGAGTTCTTGCCGC-TANRA	20

表2 扩增潜在病毒基因组序列所用引物

Table 2 Primers used for amplifying potential viral genome sequences

病原名称 Pathogens name	引物序列 Primer sequences (5'→3')	片段长度 Fragment length (bp)
IBRV	F: CGCCTCCAGAGCGACTCGAG R: AAGGAGAACATCGCGCCGTA	381
BVDV	F: CTCTGCTGTACATGGCACAT R: GAGCAGCTGZZTGACCCATA	524
BCoV	F: GGACCCAAGTAGCGATGAGG R: CGAGTTCTGCAAGAATGGGG	457
BRSV	F: TACAGACATGACGCACCTGACT R: GCAAAGATTCTTCTACCCTACT	287

预变性 3 min; 94 °C 变性 45 s, 57 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析后, 目的条带使用 DNA 片段回收试剂盒纯化, 由生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。

1.6 病毒分离与纯化

将牛肺组织研磨悬液反复冻融后, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 取上清, 无菌过滤后接种 MDBK 细胞, 37 °C 吸附 2 h 后更换含 2% 胎牛血清和 2% 双抗的 DMEM 培养基培养 3–4 d。将细胞培养物冻融后传代, 待细胞出现致细胞病变效应(cytopathic effects, CPE)后进行病毒纯化。将病毒原液梯度稀释至 10^{-2} – 10^{-6} , 分别接种至长满 MDBK 细胞的 6 孔板, 500 μ L/孔, 37 °C 吸附 1.5 h, 弃液后用 PBS 洗细胞 2 次, 缓慢加入 1% 琼脂糖胶(2% 低熔点琼脂糖胶与 2×DMEM 培养基按 1:1 混匀, 42 °C 预热), 2 mL/孔。待凝固后将平板倒置于 37 °C 温箱, 连续培养 48 h, 再覆盖一层含终浓度为 0.002% 中性红的 1% 琼脂糖, 1.5 mL/孔, 继续培养 24 h; 挑取空斑进行病毒繁殖, 待细胞病变时间稳定后进行测序验证和毒价测定。同时将牛肺脏组织悬液委托基因帮公司进行病毒宏基因组测序。

1.7 TCID₅₀ 测定

待细胞病变稳定后, 将 F9 代病毒扩繁 500 mL,

按照常规方法测定病毒 TCID₅₀, 每个稀释度重复 2 次, 持续观察 72 h, 记录 CPE 情况, 通过 Reed-Muench 法计算 IBRV GSLT/04/2024 株 F9 代 TCID₅₀ 值。

1.8 一步生长曲线测定

取 IBRV GSLT/04/2024 株 F9 代病毒, 以 1 MOI 接毒量接种 MDBK 细胞, 分别于接种后 2、4、8、12、18、24、30 和 48 h 收集病毒液; 样品冻融 2–3 次后, 按 1.7 节中的方法测定各时间点病毒 TCID₅₀, 绘制一步生长曲线以确定最佳收毒时间。

1.9 gB、gC、gD 和 gE 基因序列的扩增与分析

取第 9 代病毒液提取病毒 DNA, 分别用引物对 gB-F1/gB-R2、gC-F/gC-R、gD-F/gD-R、gE-F/gE-R 进行常规 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μ L): 2×GC Buffer 25 μ L, *LA Taq* (5 U/ μ L) 0.5 μ L, dNTPs Mix 8 μ L, MgCl₂ 2 μ L, 上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 灭菌水 10.5 μ L。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 65 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 3 min, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 纯化回收目的条带, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 分析传代后是否影响病毒主要抗原基因的突变, 并进一步确定分离病毒基因型。

1.10 病毒基因组全序列遗传进化分析

采用病毒宏基因组学技术, 将从牛肺脏组织中测定的 IBRV 全基因组序列与 16 株完整的牛疱疹病毒亚科全基因组序列及 gC (*UL44*) 基因利用 DNA STAR 软件和 MEGA 10 软件比对分析, 构建系统发育树, 分析核苷酸同源性, 参考毒株信息详见表 3。

1.11 病毒粒子透射电镜观察

将 500 mL F9 病毒液反复冻融 2–3 次后, 在 4 °C、10 000 r/min 离心 1 h, 去除细胞碎片,

表3 疱疹病毒参考毒株信息

Table 3 Reference strains information of herpesvirus

基因型 Current type	代表毒株 Prototype strain	分离地 Discretely	基因分析 Gene analyzed	GenBank 登录号 GenBank accession number
Bovine herpesvirus type 1	MN2	USA	Complete genome	MG407776.1
	C14 CSU 034-10640	USA	Complete genome	MH598936.1
	MN1	USA	Complete genome	MG407775.1
	IBR/225/2012/M-24	India	Complete genome	PQ658045.1
Bovine herpesvirus subtype 1.1	Cooper	Sweden	Complete genome	AJ004801.1
	NVSL challenge 97-11	USA	Complete genome	NC063268.1
	MN5	USA	UL44	KJ652525.1
Bovine herpesvirus subtype 1.2	SM023	USA	Complete genome	KM258882.1
	SP1777	USA	Complete genome	KM258883.1
	B589	Australia	Complete genome	KM258881.1
	BHV SHJS	China	Complete genome	OP035381.1
	SV265	Brazil	UL44	DQ173718.1
	LN1 2018	China	UL44	MT179815.1
	LN2 2019	China	UL44	MT179816.1
	JL1 2016	China	UL44	MT179813.1
	JL2 2017	China	UL44	MT179814.1
	HL4 2019	China	UL44	MT179811.1
	EVI14	Brazil	UL44	DQ173739.1
	HL3 2018	China	UL44	MT179810.1
	UY2002	Uruguay	UL44	DQ173731.1
	NM4 2019	China	UL44	MT179820.1
	NM2 2016	China	UL44	MT179818.1
	HL2 2019	China	UL44	MT179809.1
HL5 2019	China	UL44	MT179812.1	
HL1 2016	China	UL44	MT179808.1	
NM3 2017	China	UL44	MT179819.1	
Bovine herpesvirus type 5	166/84	Argentina	Complete genome	MZ364295.1
	A663	Argentina	Complete genome	MW829288.1
	ISO 97/45	Brazil	Complete genome	KY549446.1
	India/2018/Bhilwar	India	Complete genome	PP897810.1
Bovine herpesvirus type 2	C1Z FZR	Germany	Complete genome	MT862163.1
	Riems 8/85	Germany	Complete genome	MT862164.1

然后使用 BEI 进行灭活^[9]和浓缩纯化 IBRV 粒子^[10]。用 PBS 充分溶解纯化的病毒粒子后, 采用磷钨酸负染法处理样品, 制备透射电镜碳膜, 在透射电子显微镜下观察病毒粒子的形态及大小。

1.12 间接免疫荧光

待 MDBK 细胞长满单层后, 弃去培养基, 用 PBS 溶液洗涤细胞 3 次。按 1 MOI 病毒量接种细胞, 设置正常细胞和阴性牛血清对照孔(阴

性对照), 将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h 后, 用固定液(丙酮:甲醇=1:1)在低温下固定 30 min; 用含 0.1% Triton X-100 的 PBST 溶液在常温下通透 15 min; 加入封闭液(含 5% BSA 的 PBST 溶液), 于 37 °C 孵育 1 h; 再加入 IBRV 阴、阳性牛血清作为一抗, 4 °C 孵育过夜。此后所有操作均需避光, 加入兔抗牛 IgG 的荧光抗体, 于 37 °C 孵育 1 h; 用 DAPI 在室温下染色 15 min。以上所有操作后均用 PBS 浸洗 5 min, 重复 3 次, 加入 PBS 后置倒置荧光显微镜下观察。

1.13 感染动物实验

使用 IDEXX IBR gB X3 抗体检测试剂盒和 PCR 方法筛选试验牛, 选用 IBRV 抗体和病原均为阴性的 3 头成年牛进行感染性试验。其中 2 头牛以滴鼻方式接种 IBRV GSLT/04/2024 株 F9 代病毒, 每鼻孔接种 2.5 mL, 病毒含量为 10^{5.5} TCID₅₀/mL, 另 1 头牛同居。接种后第 3 天开始测量体温, 考察排毒和病毒血症情况, 观察记录临床症状, 连续观察 27 d, 不间断测量直肠温度, 隔天采集鼻拭子、肛拭子、口拭子和眼拭子以考察排毒情况。攻毒牛第 30 天后对其实施安乐死, 采集各脏器组织, 检测 IBRV 基因。采用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 进行病毒基因检测。反应体系(20 μL): Probe qPCR Mix MultiPlus 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, 探针 0.8 μL, Rox Reference Dye II (50×) 0.4 μL, 核酸 2 μL, 灭菌水 6 μL。反应程序: 95 °C 预变性 20 s; 95 °C 变性 1 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 45 个循环, 每个样品重复 3 次。使用 IDEXX IBR gB X3 抗体检测试剂盒分析诱导抗体产生的时效情况, 抗体阻断率的计算如公式(1)所示。

$$\text{阻断率} = \frac{\text{NCxA450} - \text{样品}A_{450}}{\text{NCxA450}} \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 组织样品的实验室诊断

使用表 2 引物对牛的肺脏、气管、鼻拭子和血液等组织进行实验室诊断检测。电泳结果表明, 肺脏和气管均扩增出 IBRV 和 BCoV 目的基因条带, 片段大小与预期结果一致; 鼻拭子和血液样本中也存在 IBRV 基因, 但相对较弱, 电泳图略。目的基因片段的测序结果经 NCBI 网站 BLAST 检索, 确定为 IBRV 和 BCoV 基因。结合 2 种病原的致病特点, 推测该养殖场牛死亡的主要病毒可能为 IBRV, 毒株命名为 IBRV GSLT/04/2024 株。

2.2 全基因组序列测定和遗传进化分析

对牛肺脏组织进行病毒宏基因组测序鉴定, 使用 DNBSEQ-17 测序平台测序, 平均覆盖深度为 1 328, 数据过滤标准为碱基质量值阈值设为 Q5。IBRV GSLT/04/2024 株全基因组长度为 134 678 bp, 包含长度为 102 729 bp 的 UL 区、11 451 bp 的 IR 区以及 20 498 bp 的 US 区。利用 DNA STAR 软件的 Clustal W 方法分析 IBRV GSLT/04/2024 株与 16 株参考毒株全基因组序列的相似性。结果显示, 按照全基因组序列将 IBRV GSLT/04/2024 株划分为 BoHV-1.2 亚型毒株可能是一个新的分支毒株, 与参考毒株的核苷酸相似性为 46.7%–99.3%, 其中与美国 SM023 和 SP1777 株相似性最高, 其次是中国 BHV SHJS 株、澳大利亚 B589 株和美国 MN2 株, 相似性约为 99.2%, 与德国 Riems 8/85 株相似性最低(46.7%)。遗传发育树如图 1 所示。

2.3 病毒的分离与纯化

在 MDBK 细胞上盲传至第 3 代, 24 h 细胞可见典型致细胞病变效应(CPE), 表现为细胞圆缩、拉网、聚集成葡萄串状, 形成火山状溃疡空洞(图略)。对第 3 代细胞培养物经空斑纯化病毒, 获得纯净的 IBRV GSLT/04/2024 株。

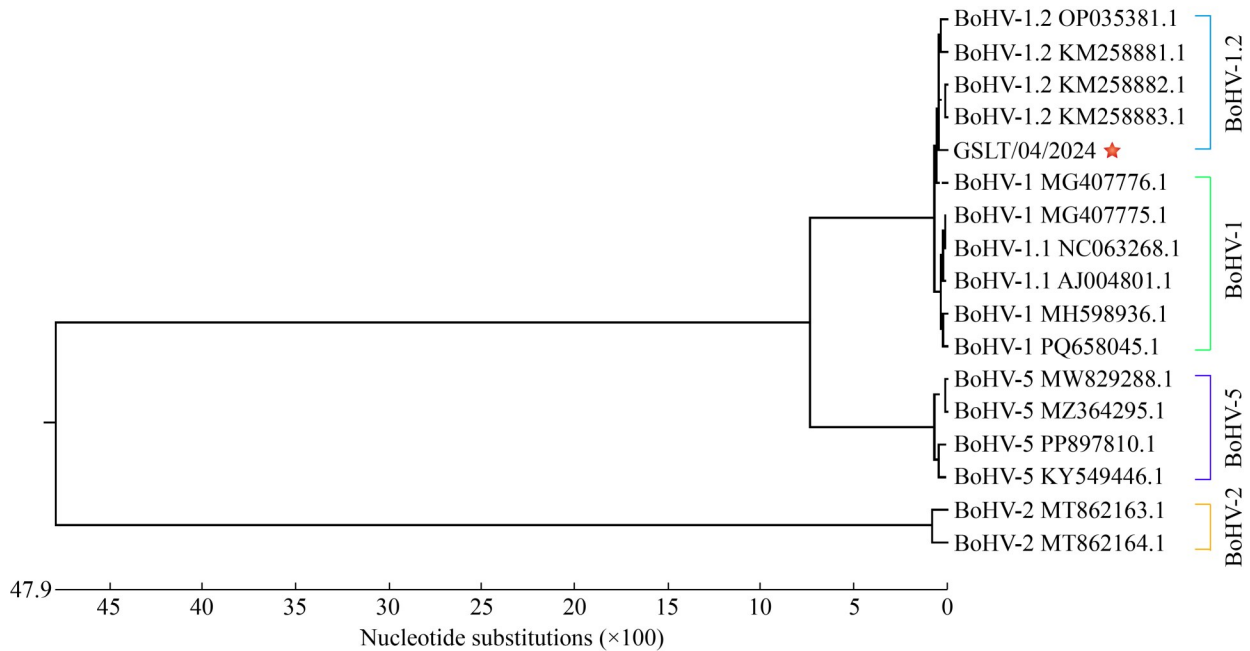


图1 基于牛疱疹病毒亚科基因组全序列构建的遗传发育树

Figure 1 The phylogenetic tree based on the complete genome sequences of the subfamily Herpesviridae.

2.4 TCID₅₀ 和一步生长曲线测定

取 IBRV GSLT/04/2024 株第 9 代病毒，按 10 倍比系列稀释至 10^{-7} ，每个稀释度(10^{-3} – 10^{-7})接种 8 孔，同时设置 8 孔正常细胞对照，连续观察 3 d。重复 3 次，取平均值绘制病毒一步生长曲线，结果图 2 所示。结果显示，对照孔细胞生长正常，采用 Reed-Muench 法计算 IBRV GSLT/04/2024 株第 9 代病毒的 TCID₅₀ 为 $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL。

2.5 *gB*、*gC*、*gD* 和 *gE* 基因序列分析

将第 9 代病毒的 *gB*、*gC*、*gD* 和 *gE* 基因进行扩增测序，结果显示其与肺脏组织测定的 IBRV GSLT/04/2024 全基因组序列相似性为 100.0%，这表明分离病毒在传代过程中这 4 个主要免疫原基因具有遗传稳定性。将我国 IBRV LN01/08 灭活疫苗株^[11]与 IBRV GSLT/04/2024 的 *gB*、*gC*、*gD* 和 *gE* 基因序列进行比对发现：*gB* 基因的核苷酸相似性为 99.5%，氨基酸相似性为 99.5%；*gC* 基因的核苷酸相似性为 98.2%，氨基

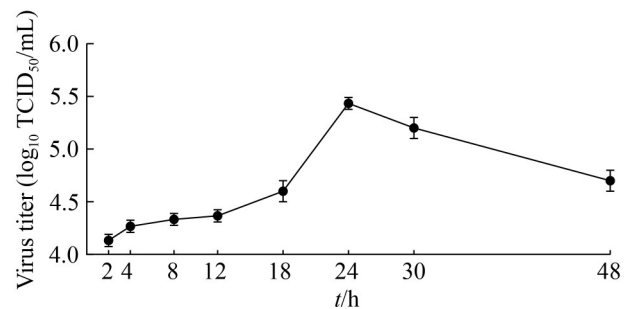


图2 IBRV GSLT/04/2024株一步生长曲线

Figure 2 One-step growth kinetics of the IBRV GSLT/04/2024 strain.

酸相似性为 99.2%；*gD* 基因的核苷酸相似性为 99.6%，氨基酸相似性为 99.5%；*gE* 基因的核苷酸相似性为 99.8%，氨基酸相似性为 97.9% (图略)。

使用 MEGA 10 软件构建 IBRV GSLT/04/2024 株与参考毒株 *gC* (*UL44* 基因) 基因的遗传进化发育树。采用邻接法 (neighbor-joining 法)，以 1 000 个重复对 bootstrap 进行分析，选用最大复合似然法 (maximum composite likelihood, MCL)

作为核苷酸替换模型，同时考虑转换和颠换，设定位点间为均匀速率和同质性谱系模式。如图 3 所示，IBRV GSLT/04/2024 株被划分为 BoHV-1.2b 亚型，其与表 3 中 31 个参考毒株 gC 基因的核苷酸序列相似性为 43.4%–100.0%，氨基酸相似性为 25.4%–100.0%。该毒株与中国 HL1 2016 株和 NM3 2017 株的相似性最高，与德国 C1Z FZR 株和 Riems 8/85 株 gC 基因的核

苷酸序列的相似性最低，均为 43.4%。

2.6 全基因组图谱

根据 DNA 病毒宏基因组测序结果，使用 CGView 绘制 IBRV GSLT/04/2024 株基因组圈图 (图 4)，该图展示了基因和碱基的分布规律。病毒核苷酸序列全长为 134 678 bp，由于 7 个片段的 CDs 在数据库中无匹配序列，无法确定其编码的蛋白名称，仅有 63 个 CDs 确定了相应的编

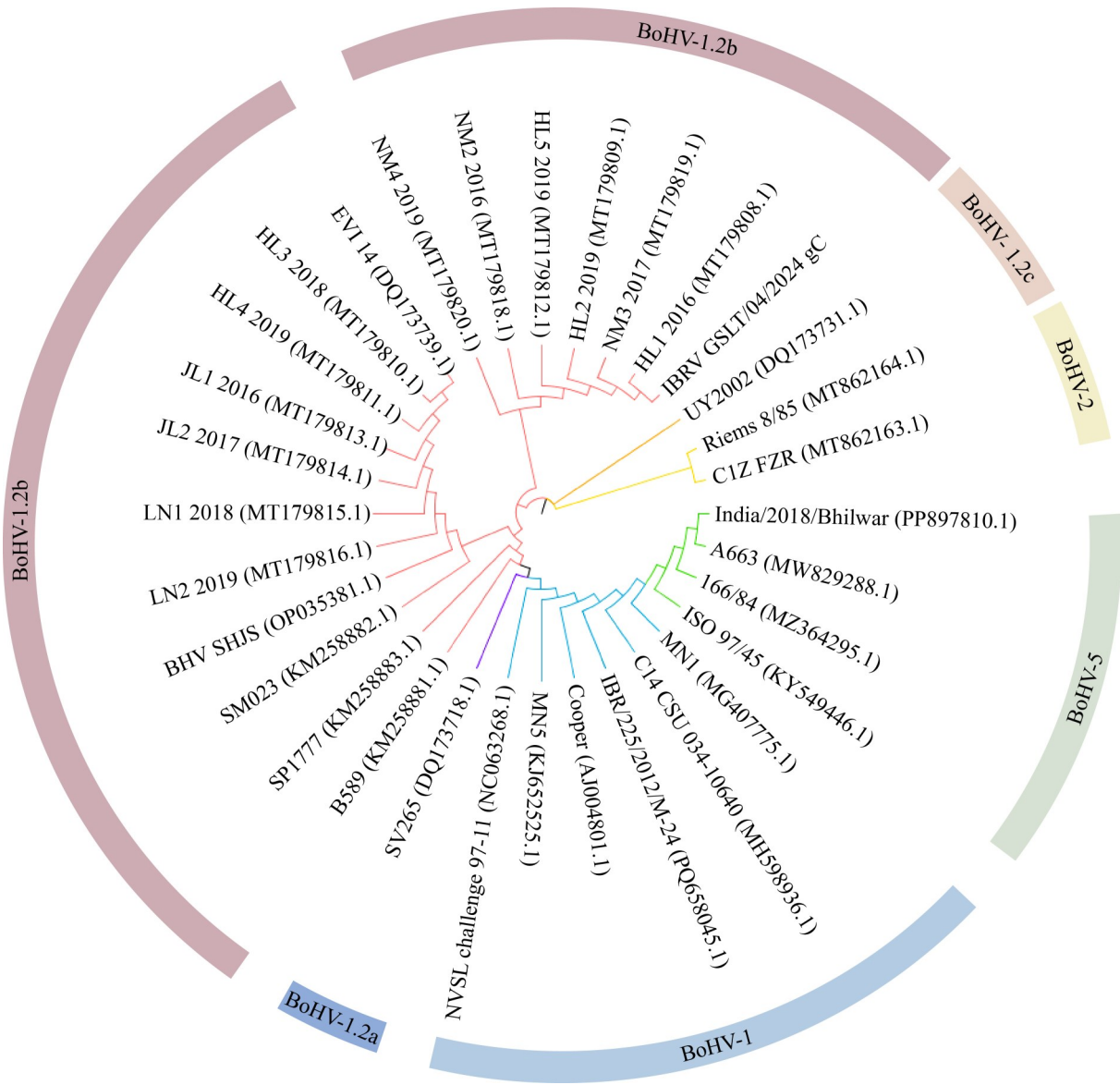


图3 IBRV GSLT/04/2024株与参考毒株gC基因的发育树

Figure 3 The phylogenetic tree of the IBRV GSLT/04/2024 strain based on the gC genes of the reference strains.

MDBK 细胞 12 h 后进行间接免疫荧光检测。图 6 显示, IBRV 抗体阳性牛血清孔呈现明显的绿色荧光信号, 主要分布于细胞质及细胞膜周围; 而对照组(IBRV 抗体阴性牛血清孵育孔)未见特异性荧光。DAPI 染色证实所有观察区域的细胞核完整, 排除了非特异性细胞损伤的干扰。

2.9 动物感染性试验

通过滴鼻方式开展 IBRV GSLT/04/2024 株感染牛试验。观察期间 3 头牛出现鼻腔有脓性分泌物、鼻内黏膜溃疡等临床症状(图 7), 且体温在 38–39 °C 之间(图 8), 未出现发烧症状。采集牛的鼻拭子、肛拭子、口拭子和眼拭子, 使用 IBRV 探针法实时荧光定量 PCR 方法监测排毒情况, 当 TaqMan 探针荧光定量 PCR 结果呈阴性时停止采集样品。结果表明鼻拭子病毒载量最高, 肛拭子和眼拭子病毒载量较低(图 9)。1 号牛和 2 号牛在第 4 天后开始排毒, 第 6–8 天出现排毒高峰, 1 号牛第 7 天鼻拭子的病毒载量可达 1.559×10^4 拷贝/mL, 2 号牛第 6 天鼻拭子的病毒载量达到 108.9×10^4 拷贝/mL, 随后逐渐降低; 同居的 3 号牛在第 10 天开始排毒, 第 12 天出现排毒高峰, 鼻拭子的病毒载量为 1.025×10^4 拷贝/mL, 随后逐渐降低。TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测血清中的病毒载量发现, 1 号牛在第 7 天病毒载量最高, 为 3.28×10^4 拷贝/mL; 2 号牛在第 6 天病毒载量最高, 达到 30.69×10^4 拷贝/mL; 3 号牛也出现排毒高峰, 为 3.75×10^4 拷贝/mL。3 头牛的排毒时间均持续约 10 d。使用 ELISA 方法检测 3 头牛的 IBRV 抗体, 按照试剂盒的判断标准, 阻断率 $\geq 55\%$ 为阳性。结果显示, 阴性对照(negative control, NC)的平均吸光度值(A_{450}) $\overline{NC}A_{450}$ 为 1.276 5, 阳性对照(positive control, PC)的平均吸光度值 \overline{PCA}_{450} 为 0.205 5。1 号牛在第 7 天血清中 IBRV 抗体开始上升, 2 号牛在第 6 天血清中 IBRV 抗体开始上升, 3 号牛在第 10 天血清中 IBRV 抗体开始上升。1 号牛在第 20 天血清

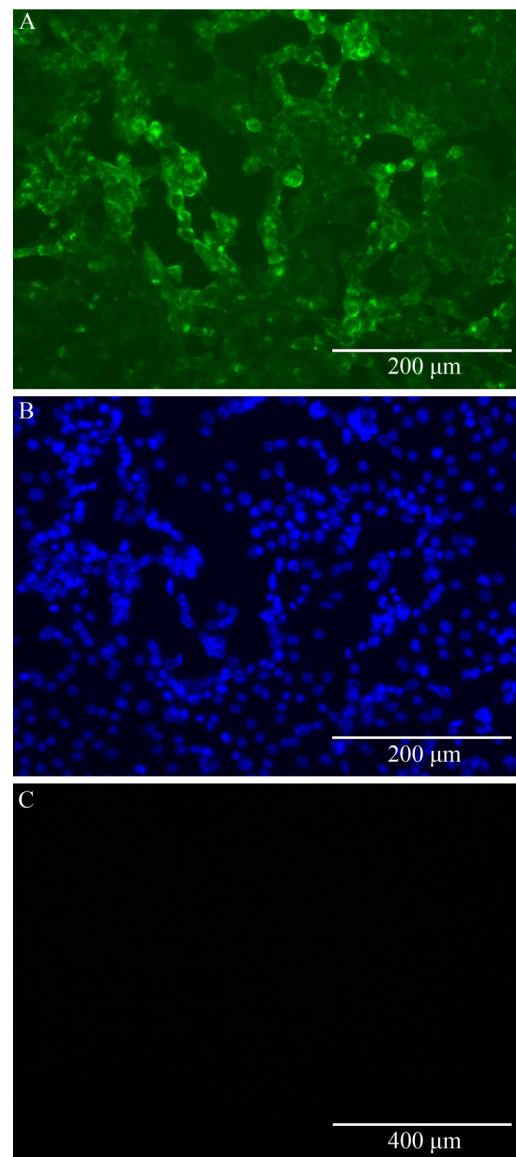


图6 动物感染性实验牛血清荧光抗体的结果(200×)。A: IBRV抗体阳性牛血清孵育孔免疫荧光结果; B: IBRV抗体阳性牛血清反应孔DAPI染色结果; C: IBRV抗体阴性牛血清孵育孔免疫荧光结果。
Figure 6 Results of fluorescent antibody testing in bovine serum from animal infection experiments (200×). A: Immunofluorescence results of wells incubated with IBRV antibody-positive bovine serum; B: DAPI staining results of wells reacted with IBRV antibody-positive bovine serum; C: Immunofluorescence results of wells incubated with IBRV antibody-negative bovine serum.



图7 牛出现鼻黏膜溃疡

Figure 7 Nasal mucosal ulceration in experimental animals.

中 IBRV 抗体趋于平缓, 2 号牛和 3 号牛在第 16 天血清中 IBRV 抗体趋于平缓。

3 讨论与结论

IBR 作为全球性分布的牛传染病, 严重制约我国养牛业的可持续发展和国际贸易, 造成了巨大的经济损失。1955 年, 美国首次发现 IBR 病例; 1956 年, Madin 等从患牛体内分离出 IBRV^[12], 自此该病流行范围不断扩大。近几十年, 巴西、墨西哥和澳大利亚^[13]等多个国家均有 IBR 疫情报道, 仅有丹麦、瑞士和瑞典等少

数国家通过扑杀血清反应阳性的动物或接种疫苗减少病毒传播来根除该病^[14]。我国于 1980 年首次发现并成功分离出 IBRV^[15], 随后在青海省、辽宁省和宁夏回族自治区^[16]等多个地区检出该病毒。随着分子流行病学的深入研究, 我国学者相继分离鉴定出多株 IBRV 毒株。李东丽在内蒙古分离出 IBRV NM8 株^[17], 陈九等在绍兴分离出 SX 株^[18], 这 2 个分离毒株均为 BoHV-1.1 型; 蒋娇娇分离出 2 株牦牛源 (IBRV/2022/SCLT24 株和 IBRV/2022/SCLT25 株) 以及 4 株肉牛源毒株 (IBRV/2022/SC37 株、IBRV/2022/SC22 株、IBRV/2022/NMG19 株和 IBRV/2022/NMG39 株), 以上分离株均为 BoHV-1.2 型^[19]; 张闫在河北分离出 HBKS-IBRV 株, 为 BoHV-1.2 型^[20], 结合 2023 年肖敏等^[21]对甘肃地区 3 个县牛群血清学调查结果, 阳性率达 30.3%, 表明甘肃省牛群普遍存在 IBRV 感染。由此可见, IBRV 在我国牛群中的流行范围越来越广泛。鉴于甘肃省以陇东肉牛、河西肉牛和甘南牦牛为主体的三大肉牛产业带, 若不能有效控制 IBR 疫情将对区域养牛产业的健康发展构成重大威胁。本研究从甘肃某牛场死亡牛组织中成功分离出一株 IBRV, 并获得了全基因组序列, 为进一步研究 IBRV 流行毒株的生物学特性和防控产品奠定了基础。

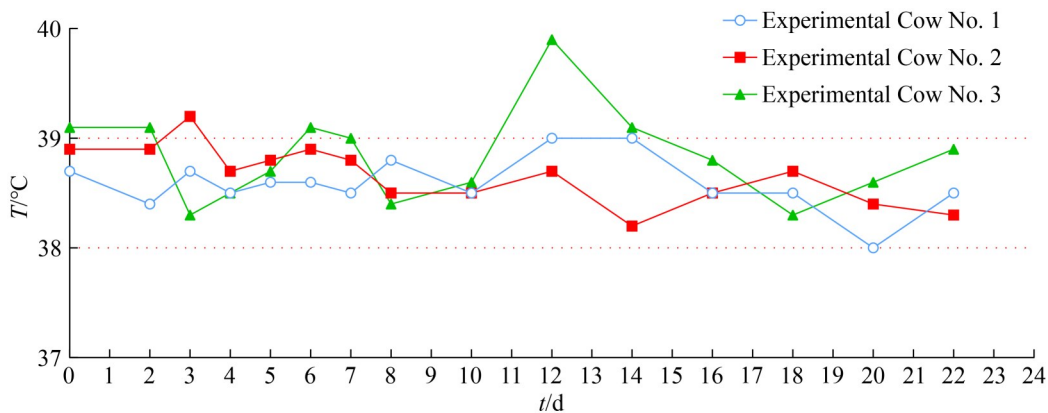


图8 牛的体温变化曲线

Figure 8 Temperature curves of animal after challenge.

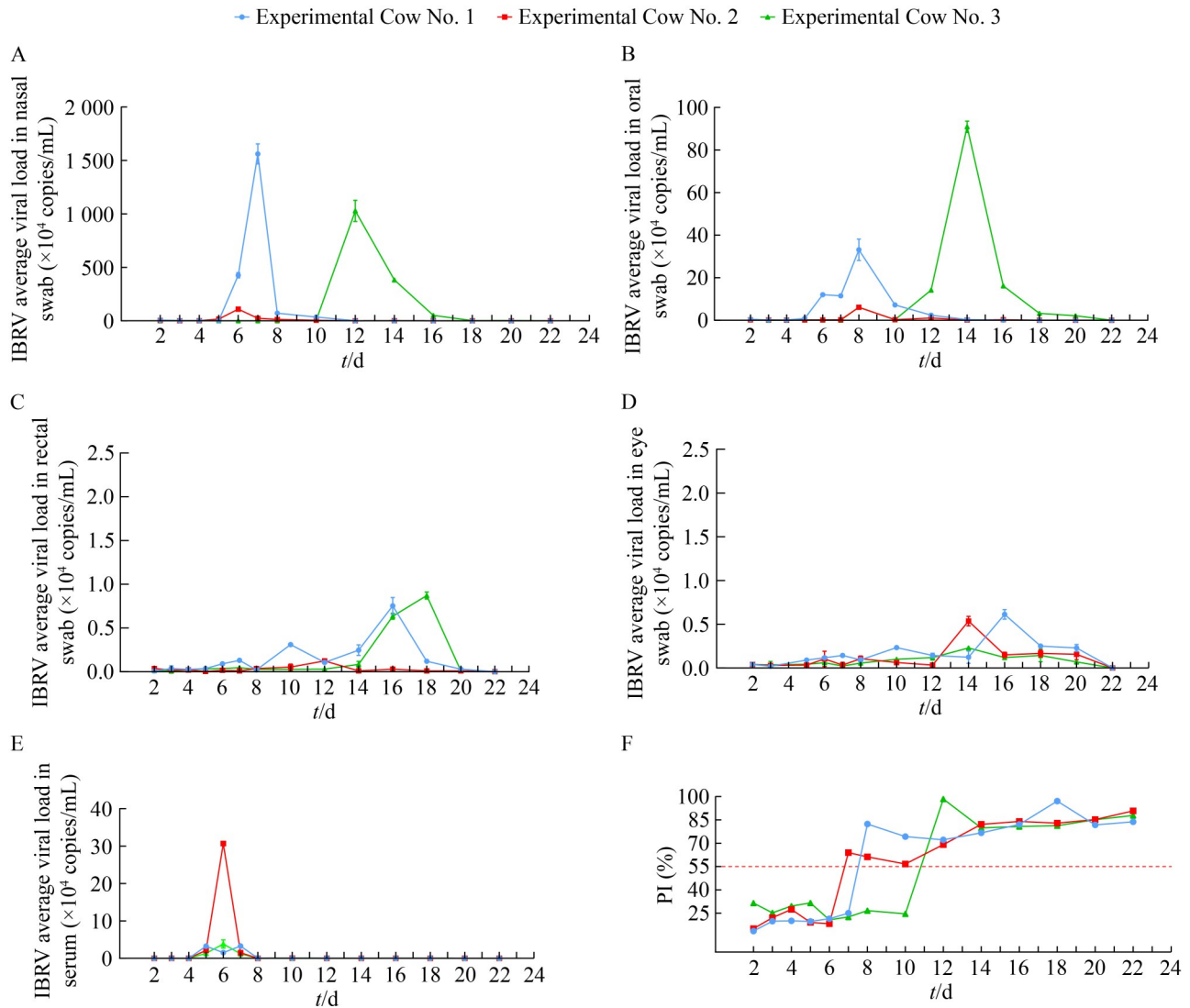


图9 牛组织、血清的病毒载量和抗体水平检测结果。A: 鼻拭子; B: 口拭子; C: 肛拭子; D: 眼拭子; E: 血清; F: 血清的抗体水平。

Figure 9 Test results of viral load and antibody levels in bovine tissues and serum. A: Nasal swabs; B: Oral swabs; C: Anal swabs; D: Ocular swabs; E: Serum; F: Serum antibody level.

基于全基因组核苷酸序列的遗传进化分析, 我国流行的 IBRV 1.2b 亚型毒株可能与主要进口来源国美国和澳大利亚密切相关。系统发育树分析显示, 本研究分离株 IBRV GSLT/04/2024 与美国毒株 SM023 和 SP1777 具有最高的核苷酸相似性, 其次分别与中国 BHV SHJS 株、澳大利亚 B589 株以及美国 MN2 株有较近的亲缘关系。为进一步明确该毒株的遗传特征, 本研

究对 *gB*、*gC*、*gD* 和 *gE* 关键基因的核苷酸及氨基酸序列进行了遗传进化分析。结果显示, 本研究分离株与 BoHV-1 型代表毒株具有最高的相似性和最近的遗传距离, 归属于同一进化分支, 而与其他 BoHV 型参考毒株相似性显著降低, 遗传距离最远。然而, 全基因组序列比对发现, 本研究分离株在基因组多个区域存在独特的核苷酸突变(如 *gB* 基因第 56 393 位点 C→T)和基

因缺失(如 UL 区第 58 665–58 672 位点缺失 8 bp), 提示 IBRV GSLT/04/2024 可能为 1.2b 亚型新的进化分支。

gC 蛋白作为主要病毒附着蛋白, 在 1.2b 亚型中表现出高度保守性, 是系统发育分析的理想靶标^[22]。与 31 株参考毒株的 gC 基因比对发现, IBRV GSLT/04/2024 株与中国 HL1 2016 株和 NM3 2017 株的 gC 核苷酸序列完全一致。进一步分析发现, 在 1.2b 亚型内部分支中该分离株与 HL5 2019、HL2 2019、NM2 2016、NM1 2016、HL1 2016、NM3 2017 和 NM4 2019 毒株聚为同一进化簇, 核苷酸相似性高达 99.8% 以上; 与 EVI14、HL4 2019、HL3 2018、JL2 2017、JL1 2016、LN2 2019、LN1 2018、BHV SHJS 和 SM023 毒株形成另一分支, 同源性较低, 核苷酸相似性为 98.0%–98.8%; 跨亚型比较分析, SV265 株属于 1.2a 亚型, 与 SP1777 株和 B589 株聚为一分支, 这些毒株均分离自呼吸道样本; UY2002 株被明确归类为 1.2c 亚型^[8], 在发育树上形成独立分支。根据 gC 基因遗传进化分析结果, 单一基因比对可能无法全面反映毒株间的遗传关系。为更准确地划分 IBRV 株的亚型, 建议使用全序列, 这样可整合所有编码与非编码区的核苷酸信息。根据病毒全基因组序列和 gC 基因遗传进化分析结果, 确认 IBRV GSLT/04/2024 分离株为 BoHV-1.2b 亚型的一个新分支毒株。值得注意的是, 我国现行疫苗毒株 IBRV LN01/08 属于 BoHV-1.1 亚型, 而流行病学调查表明我国 IBRV 以 1.2b 亚型流行为主, 现用疫苗是否对该亚型毒株有良好的保护效果, 需进一步开展免疫牛攻毒试验进行评估。

本研究选用约 2 岁健康牛开展动物感染试验, 初步评估了 IBRV GSLT/04/2024 分离株对牛的感染能力。结果显示, 感染牛与同居牛的直肠温度无明显差异变化, 但出现了鼻黏膜溃疡、流涎和结膜炎等 IBRV 感染的典型临床症状。排毒情况表明鼻拭子病毒载量最高, 口拭子次之, 肛拭子和眼拭子最低。可见, 感染牛

可通过多种途径排毒, 以呼吸道途径排毒最高。滴鼻接种后第 4 天可向外排毒, gB 特异性抗体第 6 天可检出, 提示该毒株可形成明显的病毒血症, 且牛体尽快启动了特异性免疫应答。病毒载量检测发现 1 号牛和 2 号牛的鼻拭子和血液中呈现显著差异, 1 号牛的鼻拭子病毒载量相对较高, 而血液中相对较低, 但 2 号牛产生特异性抗体略早于 1 号牛。这可能与采样或牛的个体差异有关。此外, 同居 3 号牛在 10–20 d 向外排毒, gB 特异性抗体于感染后第 10 天可检出, 推测第 10–14 天可能为病毒繁殖的高峰期。屠宰后检测多个组织, 仅结肠组织呈 IBRV 核酸阳性, 但未分离出活病毒。IBRV 一般会定居在牛的三叉神经, 但本研究从牛三叉神经节中未检测到 IBRV, 是否能形成持续带毒, 需要扩大实验牛头数, 并选用犊牛开展感染性研究, 这样可能效果更好。

不同亚型 IBRV 毒株的致病性存在显著差异。2023 年, 蒋娇娇^[19]采用 1.2 亚型 IBRV 株(病毒滴度为 $10^{7.19}$ TCID₅₀/0.2 mL, 以 2 mL/鼻孔滴鼻)对 30 只新西兰大耳兔进行攻毒实验, 结果显示实验动物均未出现体温升高, 攻毒 2 d 后仅 2 只实验兔出现鼻分泌物增多, 5 d 后全部出现发病症状, 14 d 后出现中和抗体, 与本研究结果相比, 两者均未观察到体温升高现象, 但抗体产生时间存在较大差异, 这可能与实验动物和毒株不同有关。2012 年, 郭利等^[23]使用 1.1 型 IBRV 毒株(病毒滴度为 10^7 TCID₅₀/mL, 以 2 mL/鼻孔滴鼻)感染 3 头犊牛, 结果显示牛体温连续 3 d 高于 40 °C, 特征性临床症状明显, 在第 3 天后发现排毒, 排毒持续时间约为 7 d。这提示 1.1 亚型毒株引起的临床症状可能较 1.2 亚型更为严重。2015 年, 李海涛等^[24]采用 JZ06-8 株(病毒滴度分别为 10^7 、 10^6 、 10^5 TCID₅₀/mL, 2 mL/鼻孔)感染犊牛; 1987 年, 王则兴等^[25]用 85-Y 株(病毒滴度为 $10^{7.7}$ TCID₅₀/mL, 3 mL/鼻孔)感染牦牛。因 2 个毒株的信息不详, 无法确定具体亚型, 但这 2 个动物实验均可造

成牛体温升高, 且病毒滴度升高会显著加重犊牛的临床症状。总之, 目前未见 1.2b 亚型 IBRV 株对牛致病性的研究报道。

本研究成功分离了一株新的 IBRV (BoHV-1.2b) 亚型流行毒株, 并利用病毒宏基因组测序获得其全基因组序列, 初步明确了对成年牛的感染能力。这不仅填补了中国最新流行的 IBRV 株全基因组序列的空白, 而且病毒的成功分离将为防控产品的开发提供关键材料, 对当前防控 IBRV 具有重要参考意义。

作者贡献声明

王瑾: 实验操作, 数据初步分析与文章撰写; 杨行: 协助动物实验与样本处理; 马雪青: 协助实验设计、数据收集与分析; 温建维: 观察与防治临床病牛, 采集样本; 黎映胜: 感染牛群防治与监督, 采集样本; 宋晓琛: 协助动物实验、样本采集; 李平花: 指导病毒分离与鉴定; 杜晓华、卢曾军: 协助实验设计和论文指导; 刘霞: 研究思路设计与论文修改; 孙普: 协助动物实验、论文整体设计构思与论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 陈凤梅, 程光民, 曹雷, 胡士林. 山东东部地区规模化奶牛场引起奶牛呼吸道综合征的 4 种常见病毒血清学调查[J]. 山东畜牧兽医, 2019, 40(5): 46-49.
- [2] NUOTIO L, NEUVONEN E, HYYTIÄINEN M. Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland[J]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2007, 49(1): 3.
- [3] 马青霞, 汪婷婷, 刘宏莹, 许立慧, 刘莹玉, 崔珍珍, 宫庆龙, 李健明, 时坤, 冷雪, 杜锐. 牛传染性鼻气管炎病毒感染 MDBK 细胞的转录组差异表达分析[J/OL]. *经济动物学报*, 2024: 1-11. (2024-03-28). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=JJDX20240325001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>. MA QX, WANG TT, LIU HY, XU LH, LIU YY, CUI ZZ, GONG QL, LI JM, SHI K, LENG X, DU R. Transcriptome analysis of MDBK cells infected with infectious bovine rhinotracheitis virus[J/OL]. *Journal of Economic Animal*, 2024: 1-11. (2024-03-28). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=JJDX20240325001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ> (in Chinese).
- [4] GATHERER D, DEPLEDGE DP, HARTLEY CA, SZPARA ML, VAZ PK, BENKŐ M, BRANDT CR, BRYANT NA, DASTJERDI A, DOSZPOLY A, GOMPELS UA, INOUE N, JAROSINSKI KW, KAUL R, LACOSTE V, NORBERG P, ORIGGI FC, ORTON RJ, PELLETT PE, SCHMID DS, et al. ICTV virus taxonomy profile: Herpesviridae 2021[J]. *Journal of General Virology*, 2021, 102(10): 001673.
- [5] 孙强, 于团, 刘刚. 牛传染性鼻气管炎的流行特点及综合防控[J]. *中国乳业*, 2023(12): 32-36. SUN Q, YU T, LIU G. Epidemic characteristics and comprehensive prevention and control of infectious bovine rhinotracheitis[J]. *China Dairy*, 2023(12): 32-36 (in Chinese).
- [6] MAYFIELD JE, GOOD PJ, VanOORT HJ, CAMPBELL AR, REED DE. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain)[J]. *Journal of Virology*, 1983, 47(1): 259-264.
- [7] COLLINS JK, BUTCHER AC, RIEGEL CA. Immune response to bovine herpes herpesvirus type 1 infections: virus-specific antibodies in sera from infected animals[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1985, 21(4): 546-552.
- [8] GUO WQ, XIE J, LIU JY, CHEN HJ, JUNG YS. The full-genome characterization and phylogenetic analysis of bovine herpesvirus type 1.2 isolated in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1033008.
- [9] 冷雪, 赵炳武, 郭利, 夏铭崎, 吴永旺, 徐晓琴, 武华. 牛传染性鼻气管炎病毒 LN01/08 株灭活疫苗的研制[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(1): 54-57, 61. LENG X, ZHAO BW, GUO L, XIA MQ, WU YW, XU XQ, WU H. Development of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis virus LN01/08 strain[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 33(1): 54-57, 61 (in Chinese).
- [10] 王春奕, 马军武, 伏小平. 口蹄疫病毒的纯化及鉴定[J]. *中国兽医科技*, 2004, 34(7): 66-69. WANG CY, MA JW, FU XP. Purification and examination of foot-and-mouth disease virus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2004, 34(7): 66-69 (in Chinese).
- [11] 徐晓琴. 牛传染性鼻气管炎病毒 LN01/08 株分离鉴定及其主要功能基因序列分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010. XU XQ. Isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus (ibrv) LN01/08 strain and sequences analysis of major functional genes[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 (in Chinese).
- [12] MADIN SH, YORK CJ, McKERCHER DG. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus[J]. *Science*, 1956, 124(3225): 721-722.
- [13] HUAMAN JL, PACIONI C, FORSYTH DM, POPLE A, HAMPTON JO, CARVALHO TG, HELBIG KJ. Serosurveillance and molecular investigation of wild deer in Australia reveals seroprevalence of pestivirus infection[J]. *Viruses*, 2020, 12(7): 752.

- [14] ISCARO C, CAMBIOTTI V, PETRINI S, FELIZIANI F. Control programs for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in European countries: an overview[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2021, 22(2): 136-146.
- [15] ZHOU ZJ. The malaria situation in the People's Republic of China[J]. *Bulletin of the World Health Organization*, 1981, 59(6): 931-936.
- [16] 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).
- [17] 李东丽. 牛传染性鼻气管炎病毒荧光定量PCR检测方法建立及IBRV NM8株的分离鉴定[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.
LI DL. The establishment of fluorescent quantitative PCR assay detection method for infectious bovine rhinotracheitis virus and isolation and identification of IBRV NM8 strain[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [18] 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.
- [19] 蒋娇娇. 牛传染性鼻气管炎病毒的分离鉴定及灭活疫苗候选毒株的筛选[D]. 成都: 西南民族大学, 2023.
JIANG JJ. Isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus and screening of candidate strains for inactivated vaccine[D]. Chengdu: Southwest University for Nationalities, 2023 (in Chinese).
- [20] 张闫. 牛病毒性呼吸道病多重PCR方法的建立及IBRV基因序列分析[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2023.
ZHANG Y. Establishment of a multiplex PCR method for bovine viral respiratory disease and analysis of IBRV gene sequences[D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science & Technology, 2023 (in Chinese).
- [21] 肖敏, 梁斌, 徐峥嵘, 李勇生. 甘肃省部分地区牛传染性鼻气管炎的流行病学调查与分析[J]. *今日畜牧兽医*, 2023, 39(6): 8-9.
- [22] DAGALP SB, FARZANI TA, DOGAN F, ALKAN F, OZKUL A. Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) strains from cattle with diverse clinical cases in Türkiye[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2020, 52(2): 555-564.
- [23] 郭利, 张淑琴, 冷雪, 王炜, 武华. 牛传染性鼻气管炎病毒攻毒方式的对比研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(4): 229-232.
GUO L, ZHANG SQ, LENG X, WANG W, WU H. Comparison research of infectious bovine rhinotracheitis virus challenge[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(4): 229-232 (in Chinese).
- [24] 李海涛, 苗利光, 朱言柱, 肖佳美, 刘艳环. 牛传染性鼻气管炎病毒JZ06-8株犊牛感染模型的建立[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(6): 115-118.
LI HT, MIAO LG, ZHU YZ, XIAO JM, LIU YH. Establishment of a calf infection model of infectious bovine rhinotracheitis virus strain IBRV/JZ06-8[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2015, 36(6): 115-118 (in Chinese).
- [25] 王则兴, 李崇华, 戴瑞良, 张克益, 程淑敏, 杨达昌, 毛全福, 郭康林, 卢定坤, 何锡池, 唐川. 牦牛传染性鼻气管炎病毒85-Y株回归本动物实验[J]. *中国兽医科技*, 1987, 17(5): 7-9.