

牛精液中 IBRV 荧光 PCR 检测方法的建立及 精液带毒与血清抗体的关系

季新成^{1,2}, 牛国辉³, 员丽娟², 段晓东², 张彦明¹, 于学辉², 曾新强²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 新疆出入境检验检疫局, 新疆 乌鲁木齐 830063;

3 新疆大学 生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **【目的】**建立牛精液中牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)的荧光 PCR 检测方法,并分析精液带毒与血清抗体的关系,为牛精液中 IBRV 的荧光 PCR 诊断和判定提供技术依据。**【方法】**采用 Sephacryl S-400 凝胶过滤法和蛋白酶 K 预消化法,分别对新鲜牛精液和冻存牛精液进行处理,用 DNA Zol 方法提取病毒核酸,通过 PCR 反应条件的优化,建立了牛精液中直接检测 IBRV 的荧光 PCR 方法,对该方法进行特异性和重复性检验;最后用该方法分别对 120 份新鲜牛精液和 40 份冻存牛精液进行检测,同时用普通 PCR 方法和病毒分离方法加以对比;并对其中的 10 头牛定期采集精液、鼻腔拭子和血清样品,用该荧光 PCR 方法进行病原检测,对血清样品进行 IBRV 抗体检测。**【结果】**建立的荧光 PCR 方法具有较好的特异性,重复性和稳定性很好。用该方法可检测到新鲜牛精液中 0.002 TCID₅₀ 的病毒粒子,检测到冻存牛精液中 0.02 TCID₅₀ 的病毒粒子,检测时间在 3 h 之内,是 OIE 已报道方法灵敏度的 40~400 倍,是病毒分离方法灵敏度的 100 倍。120 份新鲜牛精液和 40 份冻存牛精液中,检测到阳性样品 25 份,用普通 PCR 检测得到阳性样品 15 份,病毒分离检测得到阳性样品 12 份。检测结果表明,精液为阳性的牛血清抗体不一定为阳性,血清抗体阳性的牛精液中也不一定携带病毒。**【结论】**建立了牛精液中 IBRV 的荧光 PCR 检测方法;通过分析精液带毒与血清抗体的关系,进一步表明不能简单地以血清抗体阴阳性作为精液是否带毒的依据。鼻腔拭子带毒具有间歇性。

[关键词] 牛传染性鼻气管炎病毒;荧光 PCR;牛精液病毒;血清抗体

[中图分类号] S852.65⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)05-0001-07

Establishment of real-time PCR for direct detection of IBRV in semen and relation between semen carrying virus and serum antibody to IBRV

JI Xin-cheng^{1,2}, NIU Guo-hui³, YUAN Li-juan², DUAN Xiao-dong²,
ZHANG Yan-ming¹, YU Xue-hui², ZENG Xin-qiang²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Xinjiang Exit-import

Inspection and Quarantine Bureau, Urumqi, Xinjiang 830063, China; 3 College of Life Science,

Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to develop a real-time PCR for direct detection of infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) in bovine semen and analyze the relation between semen carrying virus and serum antibody to IBRV, providing technical support for IBRV detection and determination in bovine semen. **【Method】** The semen was treated with Sephacryl S-400 chromatography to remove seminal inhibi-

* [收稿日期] 2009-12-21

[基金项目] 国家质量监督检验检疫总局科研项目(2007IK023)

[作者简介] 季新成(1977—),男,内蒙古赤峰人,在读博士,主要从事进出口动物及其产品检验检疫技术研究。

E-mail:jixincheng@126.com

[通信作者] 张彦明(1956—),男,陕西南郑人,教授,博士,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究。

E-mail:ylzhangym@sohu.com

tors or the Proteinase K to liberate IBRV prior to DNA extraction. The primers and probe were designed, Mg^{2+} concentration, primers concentration and probe concentration were optimized, the real-time PCR method for direct detection of IBRV in bovine semen was developed. 120 bovine raw semen samples and 40 extended semen samples were detected with the real-time PCR, traditional PCR and virus isolation method respectively. Semen samples and nose swabs samples of 10 bulls were detected regularly with the real-time PCR, and the serum antibody against IBRV were detected at the same time. 【Result】 The detective limit was about 0.002 TCID₅₀ to fresh semen samples and 0.02 TCID₅₀ to extended semen samples. Compared with OIE reference method, the real-time PCR was 40 to 400 folds more sensitive in the detection of IBRV in semen samples, and that was 100 folds compared with conventional PCR and virus isolation. 120 bovine fresh semen samples and 40 extended semen samples were detected with the real-time PCR, 25 semen samples were positive, 15 of them were positive by PCR and 12 positive samples by virus isolation. And the relation between bovine semen carrying virus and serum antibody against IBRV was not clear. 【Conclusion】 A real-time PCR was developed for direct detection of IBRV in bovine semen and the relation between semen carrying virus and serum antibody against IBRV was analyzed. The results showed that the bull can not be confirmed whether the semen carrying virus through serum antibody. The nose swabs carried virus was intermittent.

Key words: IBRV; real-time PCR; bovine semen virus; serum antibody

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)引起的牛的一种病毒性传染病。世界动物卫生组织(OIE)将IBR列为B类动物疫病,我国进出口牛及其遗传物质的双边议定书中大多都有对该病进行检验检疫的规定,以便控制该病的发生与流行。牛精液中可携带IBRV,其广泛应用是将该病传播给未感染牛群及地区的重要途径^[1]。病毒分离是实验室检测IBRV的经典方法,但该方法存在检测灵敏度较低,操作复杂,检测周期较长等缺点,且受环境、人员等诸多因素的影响,容易发生污染,更重要的是,精液自身存在的细胞毒性和抗病毒活性,对病毒分离操作造成很大影响,远远不能满足出入境检验检疫的需要,也不适合于大批量样品的监测。

PCR方法具有快速、灵敏、特异性强等特点,已有很多采用PCR方法检测IBRV的报道^[2-3],但因临床精液及其冻存液中存在抑制PCR扩增的成分,使得检测灵敏度降低^[4]。本研究对新鲜牛精液和冻存牛精液中抑制PCR扩增的成分进行了分析,通过改进核酸提取程序和优化反应条件,建立了快速灵敏的IBRV检测方法;在检测精液中病毒的同时,同步检测了鼻腔拭子中的病毒和血清样品中IBRV抗体,并对它们之间的关系进行了分析,以期为进出境牛遗传物质检验检疫条款的制定提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样品和毒种 IBRV-Barth Nu/67 致弱毒株购自中国兽医药品监察所,由新疆出入境检验检疫局技术中心传代保存,毒价为 $10^{-6.29}$ TCID₅₀/50 μ L;牛肾传代细胞(MDBK)由新疆出入境检验检疫局技术中心保存;牛精液、鼻腔拭子和血清等样品采自新疆某牛场。

牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、牛白血病病毒(BLV)、蓝舌病病毒(BTV)、口蹄疫病毒(FMDV)、伪狂犬病病毒(PRV)、马立克氏病病毒(MDV)等核酸样品,均由新疆出入境检验检疫局技术中心实验室保存。

1.1.2 主要试剂 DNA Zol(DP3002)为百泰克公司产品;蛋白酶 K(Merker), Sephacryl S-400(Pharmacia), Taq DNA 聚合酶, 引物, Taqman 探针等,均为宝生物工程(大连)有限公司产品;IBRV 血清抗体检测试剂盒购自法国 Institute Pourquiers 公司。

1.1.3 主要仪器 倒置显微镜(Leica DMI 6000B)、微量加样器(eppendorf)、高速冷冻离心机(HITACHI CF16RX)、荧光定量 PCR 仪(ABI7300)、常规 PCR 仪(Biometra)、电泳仪(Bio-RAD)、数字图像分析仪(Alpha innotech corporation IS-2200)、酶标仪(Exl800)等。

1.2 方 法

1.2.1 引物、探针的设计合成 利用 Primer2.0 引物、探针设计软件,根据 IBRV *gB* 基因序列设计 2 条扩增 *gB* 基因 141 bp 片段的特异性引物(Ip2 和

Ir2)及 1 条探针(ITpro),并用 Blast 软件进行核苷酸同源性分析,验证序列的特异性。引物和探针的代号、序列、位置(参照 AJ004801.1 株)及核苷酸数见表 1。

表 1 引物和探针代号、序列、位置及核苷酸数
Table 1 Primers and probe code,sequences,location and nucleotide number

代号 Code	序 列 Sequence	位 置 Location(AJ004801.1)	核苷酸数 Nucleotide number
Ip2	GCT CGC GGA GCT GGA G	57 469~57 484	16
Ir2	CGC TGT ATC TCG CTG TAG TC	57 609~57 590	20
ITpro	FAM-CAG CAC CTT TGT GGA CCT AAA CCT CAC G-ECLIPSE	57 490~57 517	28

1.2.2 DNA 的提取 (1)样品处理。向 IBRV 检测为阴性的新鲜和冻存牛精液中添加已知量的病毒,待用。

Sephacryl S-400 凝胶过滤法:取 600 μ L 乙醇保存的 Sephacryl S-400 凝胶加入 1 mL 容积的凝胶过滤柱(该柱可自己用一次性注射器制作,底端要预先装有滤片),用约 3 mL pH 为 5.3 的醋酸钠溶液洗涤后,加入 200 μ L 精液,1 000 r/min 离心 2 min,收集滤出液,取 100 μ L 精液过滤液进行检测。

蛋白酶 K 预消化法:取精液样品 100 μ L,加蛋白酶 K 消化液(1.5 mg/mL 蛋白酶 K,0.75%十二烷基肌氨酸钠,0.15 mol/L NaCl)200 μ L,56 $^{\circ}$ C 水浴消化 30~60 min,12 000 *g* 离心 10 min,取上清液 150 μ L 进行检测。

(2)组织、细胞悬液和鼻腔拭子的核酸检测。按百泰克公司的 DNA Zol 试剂说明操作,将沉淀溶解于 8 mmol/L NaOH 中,置 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.3 荧光 PCR 扩增反应条件的优化 采用 ABI7300 荧光定量 PCR 仪,以 IBRV 经细胞培养增殖后的回收液提取的病毒 DNA 为模板,以 Ip2、Ir2 和 ITpro 为引物和探针进行扩增,反应体系为 25 μ L,设 Mg^{2+} 浓度分别为 1.0、1.5、2.0 和 2.5 mmol/L,dNTP 浓度分别为 0.1、0.2、0.3 和 0.4 mmol/L,引物浓度分别为 0.2、0.3、0.4 和 0.5 mmol/L,探针浓度分别为 0.1、0.2、0.3 和 0.4 mmol/L,*Taq* DNA 聚合酶分别为 1.25、2.0 和 2.5 U,退火温度(*T*_m)分别为 59、60 和 61 $^{\circ}$ C,循环参数分别为 40、45 和 50,优化一项时其他参数不变。

1.2.4 荧光 PCR 方法的特异性和重复性检验 用优化的 PCR 扩增体系分别对 BVDV、BLV、BTV、FMDV、PRV、MDV 等核酸样品进行扩增,以检验该方法的特异性。

对病毒含量为 10 000 TCID₅₀ 和 1 000 TCID₅₀ 的牛精液各进行 3 次重复检测,对不同试验获得的

Ct 值标准差和变异系数进行分析。

1.2.5 检测方法灵敏度的比较 (1)与 OIE^[5]报道的方法比较。将含量为 10⁵ TCID₅₀/50 μ L 的 IBRV 用经该荧光 PCR 检测为阴性的新鲜和冻存牛精液分别进行 10¹~10⁸ 系列稀释,每一稀释梯度取 100 μ L,用本研究建立的荧光 PCR 方法提取病毒核酸进行检测。荧光 PCR 以出现典型的 S 型扩增曲线,*Ct*<45,且阴性对照和空白对照均没有扩增曲线和 *Ct* 值作为阳性判定标准。按 OIE 方法^[5],取 10 μ L 上述梯度稀释牛精液进行检测。将呈阳性反应的最高稀释度换算成 TCID₅₀单位,每个反应均做重复检测,计算 *Ct* 值的平均值。

(2)与病毒分离方法的比较。病毒分离时,用含体积分数 2%胎牛血清的 MEM 维持液,对每一稀释度的精液再进行 10 倍稀释,每个稀释度各取 50 μ L 进行病毒分离,每个梯度接种 96 孔板的 8 孔单层 MDBK 细胞,37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h,加入 150 μ L/孔维持液,置 CO₂ 培养箱中培养 7 d,以出现 CPE 的最高稀释倍数作为病毒分离的灵敏度。

(3)与普通 PCR 方法的比较。将提取的 DNA 用去离子水 10 倍系列稀释后,进行普通 PCR 扩增^[6],25 μ L 反应体系中,dNTP(2.5 mmol)2 μ L,MgCl₂(25 mmol/ μ L)0.5 μ L,上、下游引物(10 pmol/ μ L)各 1 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 0.25 μ L,病毒 DNA 模板 2 μ L。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 1 min,65 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,10 个循环;95 $^{\circ}$ C 1 min,54 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,15 个循环;95 $^{\circ}$ C 1 min,60 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,10 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后观察结果,阳性结果扩增目的基因片段大小为 478 bp,以呈阳性反应的最高稀释度作为检测灵敏度。

1.2.6 荧光 PCR 方法的应用 (1)荧光 PCR 检测。用优化的荧光 PCR 方法,分别对 120 份临床牛精液(来源于 85 头公牛,部分样品为同一头公牛不

同时间收集获得)和 40 份冻存牛精液进行检测;对其中的 10 头牛在不同时间采集的精液、鼻腔拭子用 1.2.3 优化后的最佳条件进行检测。

(2) 病毒分离检测。对上述阳性样品用 1.2.5 (2)的方法进行检测。

(3) 普通 PCR 检测。对上述阳性样品用 1.2.5 (3)的方法进行普通 PCR 检测。

(4) 血清抗体检测。对采集的血清用 Institute Pourquiers 公司 IBRV 血清抗体检测试剂盒进行抗体检测,以明确精液带毒与血清抗体的关系。

2 结果与分析

2.1 荧光 PCR 扩增反应条件的优化

以已知的 IBRV DNA 为模板,对荧光 PCR 扩增反应条件中的 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、引物浓度、

探针浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、退火温度以及循环数分别进行优化,得到最佳反应条件为:25 μ L 反应体系中, Mg^{2+} 1.5 mmol/L,dNTP 各 0.2 mmol/L,上、下游引物各 0.4 mmol/L,探针 0.2 mmol/L,*Taq* DNA 聚合酶 1.25 U,模板 DNA 5 μ L;扩增条件为:50 $^{\circ}$ C 2 min;92 $^{\circ}$ C 10 min,92 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,45 个循环。

2.2 牛精液中 IBRV 核酸不同提取方法检测结果的比较

分别采用 Sephacryl S-400 凝胶过滤法和蛋白酶 K 预消化法对已知病毒含量(1 000 TCID₅₀ 和 100 TCID₅₀)的牛精液处理后,提取病毒核酸进行扩增检测,结果(图 1)显示,2 种提取方法检测灵敏度相当。

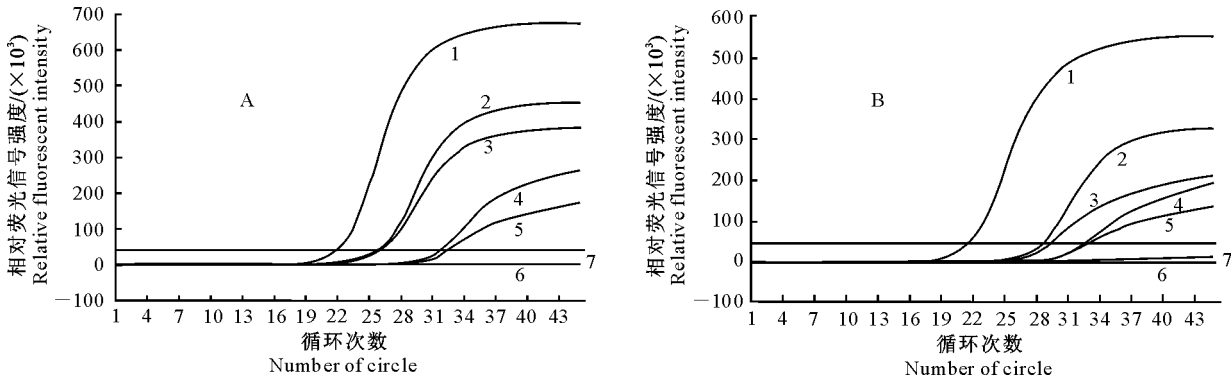


图 1 新鲜牛精液(A)和冻存牛精液(B)中不同方法提取 IBRV 核酸扩增曲线的比较

1. 阳性对照;2. 1 000 TCID₅₀(蛋白酶 K);3. 1 000 TCID₅₀(Sephacryl S-400 凝胶);
4. 100 TCID₅₀(蛋白酶 K);5. 100 TCID₅₀(Sephacryl S-400 凝胶);6. 阴性对照;7. 空白对照

Fig. 1 Comparison between real-time PCR amplification of different IBRV nucceocide extraction methods for fresh semen(A) and frozen semen(B)

1. Positive control;2. 1 000 TCID₅₀(Proteinase K);3. 1 000 TCID₅₀(Sephacryl S-400);
4. 100 TCID₅₀(Proteinase K);5. 100 TCID₅₀(Sephacryl S-400);6. Negative control;7. Blank control

2.3 荧光 PCR 检测方法特异性和重复性的检测

用优化的 PCR 扩增体系分别对 BVDV、BLV、BTV、FMDV、PRV、MDV 等核酸样品进行扩增,检测结果均为阴性,说明该方法具有较好的特异性。

对病毒含量为 10 000 TCID₅₀ 和 1 000 TCID₅₀ 的新鲜牛精液,分别用 Sephacryl S-400 过滤法处理后进行 3 次重复检测,结果见图 2。由图 2 可知,不同试验获得的 *C_t* 值标准差介于 0.23~0.29,变异系数为 0.87%~1.32%,表明该方法具有很好的重复性和稳定性。

2.4 检测方法灵敏度的比较

将病毒含量为 10⁵ TCID₅₀/50 μ L 的牛精液系列稀释后,分别用荧光 PCR 方法、OIE 报道的方法

和病毒分离方法检测,结果(表 2)表明,用荧光 PCR 方法可检测到新鲜牛精液 10⁷ 的稀释梯度(相当于 0.002 TCID₅₀ 的病毒含量),可检测到冻存牛精液 10⁶ 稀释梯度(相当于 0.02 TCID₅₀ 的病毒含量);OIE 方法只能检测到 10³ 的稀释梯度,因取样量少,相当于 0.5 TCID₅₀ 的病毒含量,比荧光 PCR 方法灵敏度低 40~400 倍;病毒分离可分别检测到新鲜牛精液中 10³ 和冻存牛精液中 10⁴ 的稀释梯度,因病毒接种是在荧光 PCR 检测样品的基础上又进行了 10 倍的稀释,故其检测灵敏度分别相当于 2 TCID₅₀ 和 0.2 TCID₅₀ 的病毒含量,对冻存牛精液中的病毒检测灵敏度稍高,可能是因为精液经冻存液稀释后进一步降低了细胞毒性。

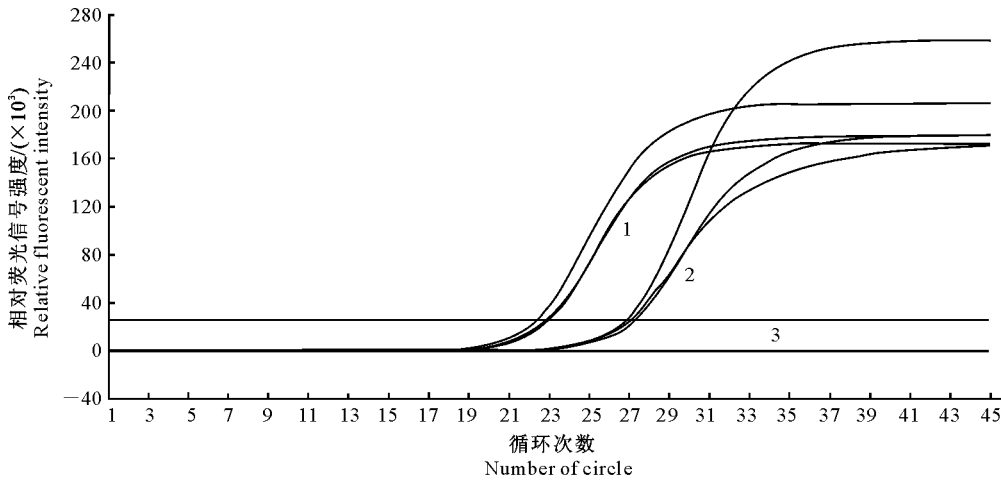


图 2 新鲜牛精液 Sepharcyl S-400 过滤法 IBRV Taq Man-PCR 重复性试验
1. 10 000 TCID₅₀ 精液; 2. 1 000 TCID₅₀ 精液; 3. 阴性对照

Fig. 2 Reproducibility experiment of real-time PCR of IBRV methods treated by Sepharcyl S-400
1. Semen of 10 000 TCID₅₀; 2. Semen of 1 000 TCID₅₀; 3. Negative control

表 2 不同方法对系列稀释牛精液中 IBRV 的检测结果

Table 2 Semen virus detection results with different methods

样品稀释 倍数 Dilution multiple	新鲜牛精液 Fresh semen				冻存牛精液 Frozen semen			
	荧光 PCR(<i>C_t</i>) Real-time PCR		OIE 方法 OIE method	病毒分离 (CPE 阳性孔数) Virus isolation (Number of CPE postive wells)	荧光 PCR (<i>C_t</i>) Real-time PCR		OIE 方法 OIE method	病毒分离 (CPE 阳性孔数) Virus isolation (Number of CPE postive wells)
	S-400 过滤	蛋白酶 K Proteinase K			S-400 过滤	蛋白酶 K Proteinase K		
	S-400 filter	K			S-400 filter	K		
10 ¹	17.43	17.24	28.54	8	16.81	17.13	27.31	8
10 ²	20.37	19.56	31.60	8	20.06	20.10	31.00	8
10 ³	25.14	24.02	37.81	6	23.69	23.12	34.74	8
10 ⁴	29.11	29.01	UN	0	27.96	28.18	UN	4
10 ⁵	32.02	31.36	UN	0	30.47	31.66	UN	0
10 ⁶	37.58	36.69	UN	0	35.05	36.48	UN	0
10 ⁷	40.46	38.05	UN	0	UN	UN	UN	0
10 ⁸	UN	UN	UN	0	UN	UN	UN	0

注:UN 表示无 *C_t* 值。
Note:UN means no *C_t* value.

2.5 荧光 PCR 方法对临床样品的检测

用荧光 PCR 方法分别对 120 份新鲜牛精液和 40 份冻存牛精液进行检测,结果显示,阳性样品有 25 份,其中新鲜牛精液 20 份,冻存牛精液 5 份。对荧光 PCR 检测为阳性的样品,用普通 PCR 检测,得到阳性样品 15 份,其中新鲜牛精液 12 份,冻存牛精液 3 份;用病毒分离法检测到阳性样品 12 份,其中新鲜牛精液 8 份,冻存牛精液 4 份。对其中的 10 头牛在一定的间隔时间段分别采集精液、鼻腔拭子样品,共采 4 次,用该荧光 PCR 进行病毒检测,同时采集血清样品,用 Institute Pourquiers 公司 IBRV 血清抗体检测试剂盒进行抗体检测,结果见表 3。

由表 3 可知,第 1 次检测到精液病毒阳性牛 5 头,血清抗体阳性牛 3 头,鼻腔拭子病毒阳性牛 1

头;其中 4 和 6 号牛精液病毒和血清抗体均呈阳性,2 号牛鼻腔拭子和血清抗体均呈阳性。第 2 次检测到精液病毒阳性牛 5 头,血清抗体阳性牛 3 头,鼻腔拭子阳性牛 2 头,其中 3 号牛精液病毒和血清抗体均呈阳性,9 号牛精液病毒和鼻腔拭子均呈阳性。第 3 次检测到精液病毒阳性牛 2 头,血清抗体阳性牛 1 头,鼻腔拭子阳性牛 2 头,其中 1 号牛鼻腔拭子和血清抗体均呈阳性。第 4 次检测到精液病毒阳性牛 4 头,血清抗体阳性牛 6 头,鼻腔拭子检测全为阴性,其中 7 号牛精液病毒和血清抗体均呈阳性。

从牛个体来看,4 和 5 号牛在所测时间段内精液均携带病毒,但其血清抗体始终呈阴性;7 号牛只有第 3 次检测精液中不携带病毒,且前 3 次血清抗体检测均为阴性,第 4 次检测为阳性;10 号牛精液

病毒、鼻腔拭子病毒和血清抗体一直为阴性,其余牛有偶然性。
精液中均有偶尔性带毒。说明鼻腔拭子携带病毒具

表 3 10 头牛不同时间牛精液、鼻腔拭子中 IBRV 与血清抗体检测结果

Table 3 Semen virus,nose swab virus and serum antibody against IBRV of 10 bovines in different time

牛编号 No. of bovine	第 1 次采样 First sample			第 2 次采样 Second sample			第 3 次采样 Third sample			第 4 次采样 Fourth sample		
	精液 Semen	鼻腔拭子 Nose swabs	血清 Serum	精液 Semen	鼻腔拭子 Nose swabs	血清 Serum	精液 Semen	鼻腔拭子 Nose swabs	血清 Serum	精液 Semen	鼻腔拭子 Nose swabs	血清 Serum
1	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—	+
2	—	+	+	—	—	+	—	+	—	—	—	+
3	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+
4	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—
5	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—
6	+	—	+	ND	+	—	—	—	—	—	—	+
7	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	+
8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
9	+	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	ND	ND

注:ND 表示未检测,+表示阳性结果,—表示阴性结果。
Note:ND means no detection,+means postive result,—means negative result.

在所测时间段内,1 号牛血清抗体从第 2 次转为阳性,直到第 4 次检测仍为阳性;2 和 3 号牛血清抗体第 3 次为阴性后,第 4 次检测又呈现阳性;4 号牛血清抗体从第 2 次检测开始一直呈现阴性;7 和 9 号牛血清抗体从第 4 次转为阳性,且所有牛第 4 次检测的血清抗体阳性率明显增高。

3 讨 论

目前,已有很多采用 PCR 方法直接检测牛精液 IBRV 的报道。Masri 等^[7]用 NP-40 结合蛋白酶 K 对精液进行处理,用 PCR 法检测 IBRV,结果显示该方法的灵敏度为 0.25~2.5 TCID₅₀。Santurde 等^[8]用 Sephacryl S-400 对精液过滤后,用 Chel-ex100 提取精液中的病毒核酸,用 PCR 法检测,其灵敏度为 1 TCID₅₀。Wiedmann 等^[9]针对 IBRV g-I 基因设计引物,用巢式 PCR 对精液中病毒核酸进行扩增,该方法检测灵敏度为 5×10³ TCID₅₀/0.5 mL 精液。Van der 等^[4]针对 IBRVg-C 基因设计引物,用 PCR 法检测,对精液中病毒的检测灵敏度为 3~5 个核酸分子/50 μL 和细胞培养物中 0.001 TCID₅₀的病毒。Yason 等^[10]对人工添加病毒的精液和人工感染病毒牛的精液进行检测,灵敏度分别为 1 TCID₅₀/0.5 μL 和 1 TCID₅₀/mL。OIE^[5]采用 Santurde 等^[8]的方法,用 Chelex100 提取精液中的病毒核酸,针对 g-I 基因设计引物和探针,用荧光 PCR 法检测,该方法对牛精液中 IBRV 的检测灵敏度为 0.5~5 TCID₅₀/50 μL。陈茹等^[11]用 LUXTM 荧光 PCR 方法检测牛精液中的 IBRV,结果显示该

方法对牛冻存精液中 IBRV 检测灵敏度为 40 TCID₅₀,对临床牛精液中 IBRV 检测灵敏度为 0.04 TCID₅₀。

本研究分别用 Sephacryl S-400 凝胶过滤法和蛋白酶 K 预消化法处理,再用商品化的 DNA Zol 提取病毒核酸,2 种方法均能有效去除精液及其稀释液中的抑制成分。针对 IBRV gB 基因设计特异性引物和荧光探针,通过反应条件优化,建立了从牛精液中直接检测 IBRV 的荧光 PCR 方法,检测灵敏度为 0.02~0.002 TCID₅₀,检测时间(包括核酸提取)不超过 3 h,且极大地提高了检测灵敏度。已有报道表明,精液污染病毒最可能是在射精过程中被感染的黏膜所污染^[12-13],所以精液中的病毒最可能存在于精子上清部分,但也有可能吸附到精子细胞上,对人工感染精液和自然感染牛产生的精液没有明显区别^[2]。

本研究采用向精液中添加病毒的方法,可精确定量,便于检测灵敏度,且经过进一步对自然感染的牛精液检验,与添加病毒检测结果一致,在精液上清部分和精子细胞中均能检测到病毒。用上述 2 种方法预处理精液后,精液中病毒检测的灵敏度基本相当,说明 2 种方法均可用对精液中 IBRV 荧光 PCR 检测的处理。该方法检测的灵敏度是 OIE 报道方法的 40~400 倍,是病毒分离法的 100 倍,是系列稀释的 IBRV 核酸扩增检测灵敏度的 100 倍,且具有较好的特异性和重复性。

精液生产中心也可通过供体牛血清 IBRV 抗体检测,判定精液中是否携带病毒,血清抗体呈阳性牛

的精液不能使用,但精液带毒与血清抗体的关系复杂,仅靠血清抗体检测难免造成误判,特别是对遗传价值较高的牛,造成一定的经济损失^[14-15],且单靠血清抗体判定精液是否带毒也可能造成精液阳性样品的漏检。为了进一步明确血清抗体和精液带毒、鼻腔拭子带毒的关系,本研究对供试牛中的10头牛在不同时间进行了检测,发现精液呈阳性的牛血清抗体不一定为阳性,血清抗体阳性牛精液中也不一定带毒,血清抗体阴性,可能存在亚临床感染或免疫耐受等因素。血清虽不产生抗体^[16-17],但病毒可在公牛生殖道复制进而污染精液,避开抗体检测,有些牛血清病毒抗体呈现阳性后,中和了精液中的病毒,用病毒分离方法分离不到病毒。试验中,将已知病毒含量的精液与系列稀释的阳性血清(抗体滴度为1:128,1:256,1:512,1:1024,1:2048)混合,4℃孵育1h后进行核酸提取,发现高抗体滴度血清对荧光PCR检测没有明显影响,在一定程度上证明了PCR方法检测精液病毒的优越性。Snowdon^[18]报道,牛鼻腔拭子在361d中只是间歇性地发现IBRV,本试验的检测结果也发现,牛鼻腔拭子带毒具有不确定性。

[参考文献]

- [1] Afshar A, Eaglesome M D. Viruses associated with bovine semen [J]. Vet Bull, 1990, 60: 93-109.
- [2] Jianwei Z, Japhet L, Robert A. Improved detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine semen by protein amplification [J]. J Virol Methods, 1999, 79: 181-189.
- [3] Xia J Q, Yason C V, Kibenge, et al. Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen [J]. Can J Vet Res, 1995, 59: 102-109.
- [4] Van der E, Maes F A C, Van der Oirschot R K, et al. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen [J]. J Clin Microbiol, 1993, 31: 3129-3135.
- [5] OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [J]. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis, 2008: 752-767.
- [6] Monika F, Peter H, Jan D. Detection of bovine herpes-virus type 1 in blood from naturally infected by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E [J]. Clinical Microbiology, 1999, 37: 2498-2507.
- [7] Masri S A, Olson W, Nguyen P T, et al. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction [J]. Can J Vet Res, 1996, 60(2): 100-107.
- [8] Santurde G, Silvaa N D, Villaresa R. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples [J]. Vet Microbiol, 1996, 49: 81-92.
- [9] Wiedmann M, Brandon R, Wagner P, et al. Detection of BHV-1 in bovine semen by a nested PCR assay [J]. J Virol Methods, 1993, 44: 129-140.
- [10] Yason C V, Harris L M, McKenna P K, et al. Establishment of conditions for detection of BHV-1 by PCR using primers in the thymidine kinase region [J]. Can J Vet Res, 1995, 59: 94-101.
- [11] 陈茹, 毕英佐, 曹永长, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 LUXTM 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.
Chen R, Bi Y Z, Cao Y C. Development of a LUXTM real time polymerase chain reaction assay for rapid detection of infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29(4): 303-307. (in Chinese)
- [12] Straub O C, Bohm H O. Untersuchungen ueber die lokalisaton und persistenz des virus der infektiösen rhinotracheitis und des bläseenausschlages in experimentell infizierten rindern [J]. Berl Munchn Tierarztl Wschr, 1964, 77: 458-462.
- [13] Snowdon W A. The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle [J]. Aust Vet J, 1965, 41: 135-142.
- [14] Ackermann M, Peterhans E, Wyle R. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis-virus infection diagnosis and control [J]. Vet Microbiol, 1990, 23: 361-363.
- [15] Rocha M A, Gouveia A M G, Leite R C. Deteccao de anticorpos para o herpesvirus bovino-1 em touros de uma central de semen [J]. Rev Bras Reprod Anim, 1995, 19: 181-186.
- [16] Parsonson I M, Snowdon W A. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. Aust Vet J, 1975, 51: 365-369.
- [17] Kupferschmied H U, Kihm U, Bachmann P, et al. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report [J]. Theriogenology, 1986, 25: 439-443.
- [18] Snowdon W A. The IBR/IPV virus reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle [J]. Aust Vet J, 1965, 41: 135-142.