

2019 年滨州地区及周边规模化场牛支原体血清流行病学调查

李书光^{1,2,3}, 肖跃强¹, 程立坤¹, 赵家磊⁴, 李来永⁵, 刘吉山^{1*}

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600; 2. 青岛农业大学动物医学院, 山东 青岛 266109; 3. 山东省滨州畜禽蜂胶疫苗研究开发推广中心, 山东 滨州 256600; 4. 山东绿都生物科技有限公司, 山东 滨州 256600; 5. 东营市河口区草原监理站, 山东 东营 257200)

摘要: [目的] 为了了解山东省滨州地区及周边规模化牛场支原体流行的基本情况, [方法] 对该区域 14 个规模化奶牛场和肉牛场进行了血清采集, 采用牛支原体 IgG 抗体 ELISA 检测方法进行牛支原体血清抗体检测, 并使用 SPSS 20 进行卡方统计学检验。 [结果] 山东省规模化牛场的牛支原体 IgG 抗体总阳性率为 77.86%, 奶牛场的阳性率为 74.29%, 肉牛场的阳性率为 81.43%, 奶牛场牛支原体 IgG 阳性率与肉牛场的统计学差异不显著 ($P > 0.05$); 奶牛场不同场区, 肉牛场不同场区之间, 牛支原体的 IgG 阳性率差异显著 ($P < 0.05$)。 [结论] 山东省滨州地区及周边规模化牛场存在不同程度的牛支原体感染, 牛支原体感染可能成为危害国内规模化奶牛场奶牛健康的主要疫病之一。

关键词: 滨州地区; 规模化牛场; 牛支原体; 血清抗体; ELISA

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2020)04-0030-03

支原体是已知最小、最简单的能自我复制的原核微生物, 普遍存在于自然界, 是许多动物、植物及人类的病原体。目前支原体已接近 200 个种, 其中有超过 20 种可感染牛。目前牛支原体病在世界上大部分的国家都有流行, 是一种严重的、不可治愈的细菌性疾病, 其病原为牛支原体, 牛支原体在 1961 年在美国被首次分离到, 能够感染所有日龄的牛, 影响动物生产性能, 并降低动物福利^[1]; 临床上以犊牛的肺炎、中耳炎、关节炎和奶牛的乳房炎为特征^[2], 也有文献报道心内膜炎的发病^[3], 呼吸道疾病是最严重和广泛的, 导致了肉牛和奶牛的疫病爆发和重要经济损失^[4], 并有一定的死亡率。应用 LAMP 和荧光定量 PCR 能够检测到奶样中牛支原体的病原^[5]。

2019 年对山东省滨州地区及周边部分规模化奶牛场肉牛场, 使用 ELISA 方法对 560 份血清进行了牛支原体的血清学抗体检测, 以期对规模化牛场的牛支原体感染情况有所了解, 为牛支原体病的科学防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 血清样本的采集病料来源

2019 年, 对山东省滨州地区及周边部分规模化奶牛场和肉牛场的血清样本进行跟踪采样调查, 选择 7 家规模化肉牛场 (10~12 月龄) 和 7 家规模化奶牛场 (24 月龄), 采集血清样本 560 份, 室温凝集后离心收集上清, 4℃ 保存备用。

1.2 ELISA 检测试剂盒

牛支原体间接 Elisa 试剂盒购自加拿大 Biovet 公司, 批号: 201012。

1.3 样品检测及分析

血清样品用稀释缓冲液做 1:100 倍稀释, 加入到事先包被好了的牛支原体抗原的微孔板上, 经孵育, 样品中的抗牛支原体抗体和包被好的支原体抗原发生结合; 经几遍洗涤并去除未发生反应的物质, 加入牛的酶标记抗体, 经孵育, 牛的酶标记抗体和样品中的抗体结合, 形成抗原抗体和酶复合物; 经第 2 次洗涤, 去除未反应的酶标记物抗体, 加入底物显色

收稿日期: 2020-03-20 修回日期: 2020-03-28

基金项目: 山东省农业产业技术体系牛创新团队项目 (SDAIT-09-12)

作者简介: 李书光 (1982—), 男, 副研究员, 博士, 主要从事分子细菌学研究和生物制品学研究。E-mail: lshug@163.com

* 通讯作者: 刘吉山 (1975—), 男, 研究员, 博士, 主要从事兽医临床技术诊疗与研究。

剂显色,加入终止液终止显色,用405 nm的单波长测定光密度值(OD值),颜色的强弱表明检测样品中牛支原体抗体的含量。计算每个样品和对照的平均值,获得Radio(S/P)比值($\text{Radio}(S/P) = \text{OD 样品值} / \text{阳性对照 OD 值平均值}$)。Radio(S/P) ≥ 0.4 为阳性。

1.4 数据分析

根据检测数据的结果,使用SPSS 20软件进行统计学分析。

2 结果与分析

滨州地区及周边,规模化奶牛场(存栏1 000头以上)牛支原体血清的阳性率介于30%~100%之间,奶牛支原体血清阳性率为74.29%;规模化肉牛场(存栏1 000头以上)牛支原体血清的阳性率介于67.5%~100%之间,肉牛支原体血清阳性率为81.43%;滨州地区及周边牛的支原体血清阳性率为77.86%。使用SPSS 20软件统计分析(表1)显示,奶牛场1~5号场之间无统计学差异,6号场和7号场之间无统计学差异,6号场和7号场与1~5号场之间差异极显著(Fisher双尾精确检验 $P=0$);肉牛场8~12号场之间无统计学差异,13号场与14号场之间无统计学差异,13号场和14号场与8~11号场之间统计学差异极显著(Fisher双尾精确检验 $P=0$);奶牛群体牛支原体血清阳性率与肉牛群体相比,差异不显著(Fisher双尾精确检验 $P=5.3$)。

表1 滨州地区及周边部分规模化牛场牛支原体血清学抗体阳性率及统计学分析

类别	场区编号	阴性数量/头	阳性数量/头	各场阳性率/%
奶牛	1#	8	32	80a
	2#	0	40	100a
	3#	8	32	80a
	4#	0	40	100a
	5#	4	36	90a
	6#	24	16	40b
	7#	28	12	30b
肉牛	8#	13	27	67.5a
	9#	13	27	67.5a
	10#	10	30	75.0a
	11#	9	31	77.5a
	12#	7	33	81.3ab
	13#	0	40	100b
	14#	0	40	100b

3 讨论

牛支原体能够定植在健康牛的上呼吸道,是引发牛呼吸道疾病的重要病原之一^[6]。牛支原体利用菌毛、表面可变脂蛋白、生物膜等能够侵入牛的免疫系统,牛支原体具有逃避中性粒细胞的特性^[7],宿主的免疫系统不能有效清除牛支原体的感染^[8],牛支原体感染后,免疫反应以TH2为主,产生的抗体类型以IgG1为主,并导致肺部炎症^[8]。

牛支原体缺乏有效的疫苗,该病的控制主要是依赖于良好的生产管理配合病原抗体检测和有效的抗生素治疗进行控制,有时与呼吸道病毒或者巴氏杆菌混合感染,常增加临床及实验室的有效诊断和检测的难度。疫苗研制方面,活疫苗的应用前景更理想一些^[9],灭活疫苗在有些报道中有一定的效果,特别是使用皂素灭活的疫苗,免疫效果较为理想,但是目前为止亚单位疫苗方面没有突破性进展^[10]。牛支原体具有导致免疫系统功能低下的特性^[11],在抗体阳性率较高的区域,应该加强对该疾病的关注,降低其对牛群的危害。细胞免疫对牛支原体的清除效果要比体液免疫更有效^[12]。以皂素和溶菌酶二聚体作为佐剂制备全菌体灭活疫苗,能够有效激发牛支原体的机体细胞免疫^[13]。史晓娜等成功利用家兔建立了牛支原体的感染模型,并证实灭活的牛支原体铝胶佐剂疫苗能够对家兔提供一定的保护,为疫苗回归本动物的研究提供了有力的数据支撑^[14]。Zhang等发现了膜蛋白P81和UgpB的抗体具有介导补体杀灭活性,具有作为疫苗候选抗原的特性^[15]。

牛支原体可在宿主体内长期存在,造成慢性感染,其对肉制品及奶制品行业的危害受到越来越多国家的关注。在美国,养殖场中牛支原体感染率最高可超过70%,每年对养牛业造成超过1.4亿美元的损失。在欧洲,25%~33%的牛肺炎与牛支原体有关^[16]。在我国,由辛九庆等人从犊牛肺脏中首次分离得到牛支原体^[17],随后在国内多个省市均发现牛支原体感染病例。2017—2019年,本实验室接诊多起犊牛肺炎的病例,通过病原的分离鉴定和PCR检测方法确诊为牛支原体感染^[18],为山东省首次分离到牛支原体病原,开创了山东省研究牛支原体的先河。

定期对牛群进行抗体或者抗原的检测,结合鼻拭子病原的PCR检测和血清抗体的检测,杜绝支原体的传入,是一种防控牛支原体的方法^[19]。犊牛支

原体的抗体可能会受到母源抗体的影响,因此在采集样本时肉牛选择 10~12 月龄、奶牛选择 24 月龄左右的相对稳定的群体进行随机采样。本文中山东省滨州地区及周边共 14 个规模化牛场进行了血清样本的采集,并进行了 IgG 抗体的 ELISA 检测。根据牛支原体血清 ELISA 检测结果可以看到,山东省滨州地区及周边规模化奶牛及肉牛场存在广泛的牛支原体感染。在数据分析上,可以看出肉牛的感染率略高于奶牛的感染率,但统计学上差异不显著。统计分析数据显示,不同的场区阳性率有差异,个别差异极显著,则不同的奶牛场和肉牛场,管理水平和硬件设施会影响支原体的感染率,管理水平较高、硬件设施较好、分区管理的场区,其阳性率较低;管理水平较低、硬件设施一般、混区饲养的场区,其阳性率较高。本实验室,使用实验室分离的牛支原体病原,培养自制牛支原体玻片凝集抗原,对 140 份血清进行了检测,总阳性率为 63%,低于本文中使用的 ELISA 方法,而且两者的符合率极低,后续需要进一步对该本实验室的检测方法进行优化。

4 结 论

通过对滨州地区及周边的牛场的牛支原体血清流行病学调查,试验数据显示该区域存在不同程度的牛支原体感染,且有的牛场感染率极高,牛支原体感染可能成为危害国内规模化奶牛场奶牛健康的主要疫病之一,并存在垂直传播的风险,为了促进牛的健康养殖,有必要采取加强对牛支原体的流行病学调查和制订相应的综合防控方案的研究和推广。

参考文献:

- [1] PETERSEN M B, ERSBOLL A K, KROGH K, et al. Increased incidence rate of undesired early heifer departure in *Mycoplasma bovis*-antibody positive Danish dairy cattle herds[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2019,166:86-92.
- [2] MORIMOTO M, KENRI T, OHMORI T, et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* strain KG4397, isolated from cattle in Japan[J]. Microbiology Resource Announcements, 2019,8(40):1-3.
- [3] MUHAMMAD J, RABBANI M, SHABBIR M Z, et al. Cross sectional study and risk factors analysis of *Francisella tularensis* in soil samples in Punjab province of Pakistan[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019,9:89.
- [4] WISSELINK H J, SMID B, PLATER J, et al. A European inter-laboratory trial to evaluate the performance of different PCR methods for *Mycoplasma bovis* diagnosis[J]. BMC Veterinary Research, 2019,15(1):86.
- [5] APPELT S, ALY S S, TONOOKA K, et al. Development and comparison of loop-mediated isothermal amplification and quantitative polymerase chain reaction assays for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk[J]. Journal of Dairy Science, 2019,102(3):1985-1996.
- [6] SCHIBROWSKI M L, GIBSON J S, HAY K E, et al. *Mycoplasma bovis* and bovine respiratory disease: A risk factor study in Australian feeder cattle[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2018,157:152-161.
- [7] GONDAIRA S, HIGUCHI H, NISHI K, et al. *Mycoplasma bovis* escapes bovine neutrophil extracellular traps[J]. Vet. Microbiol., 2017,199:68-73.
- [8] MAUNSELL F P, CHASE C. *Mycoplasma bovis*[J]. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2019,35(3):471-483.
- [9] PEREZ-CASAL J, PRYSLIAK T, MAINA T, et al. Status of the development of a vaccine against *Mycoplasma bovis*[J]. Vaccine, 2017,35(22):2902-2907.
- [10] PRYSLIAK T, VAN DER MERWE J, PEREZ-CASAL J. Vaccination with recombinant *Mycoplasma bovis* GAPDH results in a strong humoral immune response but does not protect feedlot cattle from an experimental challenge with *M. bovis*[J]. Microbial Pathogenesis, 2013,55:1-8.
- [11] FODOR L, JANOSI K, MAKRAI L, et al. Screening of Hungarian cattle herds for seropositivity to *Mycoplasma bovis*[J]. Acta Vet. Hung., 2017,65(2):166-172.
- [12] DUDEK K, BEDNAREK D, AYLING R D, et al. Analysis of the immune response of calves to various saponin-based adjuvants for an experimental *Mycoplasma bovis* vaccine[J]. Acta Veterinaria Hungarica, 2018,66(2):226-240.
- [13] DUDEK K, BEDNAREK D. T- and B-cell response analysis following calf immunisation with experimental *Mycoplasma bovis* vaccine containing saponin and lysozyme dimer[J]. Journal of Veterinary Research, 2017,61(4):433-437.
- [14] 史晓娜,张建华,李松建,等.牛支原体感染动物模型的建立及其在评估灭活疫苗免疫效力上的应用[J].畜牧与兽医,2018,50(2):72-78.
- [15] ZHANG Y K, LI X, ZHAO H R, et al. Antibodies specific to membrane proteins are effective in complement-mediated killing of *Mycoplasma bovis*[J]. Infect. Immun., 2019-11-18, doi:10.1128/iai.00740-19.
- [16] 季文恒,吴娅琴,翟肖辉,等.牛支原体疫苗的研究进展[J].中国畜牧兽医,2018,45(3):763-769.
- [17] 李强,赵泽慧,牛耀祖,等.牛支原体膜蛋白研究进展[J].动物医学进展,2016,37(6):84-86,87.
- [18] 李书光,王玉茂,刘吉山,等.山东首例牛支原体病的诊治报告[J].家畜生态学报,2017,38(2):64-66.
- [19] VAHANIKKILA N, POHJANVIRTA T, HAAPALA V, et al. Characterisation of the course of *Mycoplasma bovis* infection in naturally infected dairy herds[J]. Vet. Microbiol., 2019,231:107-115.

- 牛效果比较分析[J]. 中国牛业科学, 2006, 32(3): 11-13. 中国牛业科学, 2016, 42(4): 54-55.
- [14] 庞笑笑, 王荣成, 王文刚. 中国东北延边少数民族地区发展的障碍因素分析[J]. 世界地理研究, 2010, 38(9): 135. [16] 管林森, 林楚刚, 王洪程. 中国黄牛选育改良及肉牛种业发展建议[J]. 中国牛业科学, 2016, 42(6): 1-4.
- [15] 李少洋. 利用皮埃蒙特牛种质资源建立育种基地的探讨[J].

Thinking on Development and Utilization of Liangshan Yellow Cattle

ZHANG Zhi-min¹, GUO Da-qing², ZHOU Xue-fei^{3*}, WANG Si-lu¹, ZHI Li¹,
CHEN Bin-long¹, ZHAO Wei¹, ZHANG Mei-li⁴, WANG Yan⁴

(1. Department of Animal Science, Xichang University, Xichang, Sichuan 615013; 2. Nanyang Institute of Veterinary Drug Control, Nanyang, Henan 473003; 3. Jiaozuo Hefeng Feed Co., Ltd., Jiaozuo, Henan 454150; 4. Shaanxi Institute of Microbiology, Xi'an 710043)

Abstract: Liangshan prefecture is located in the second mid-levels in the southwest of Sichuan and is a deeply impoverished area. As one of the important family property and economic resources for people in minority areas, developing the cattle industry in Liangshan Prefecture had irreplaceable advantages. The steady development of the cattle industry was conducive to further improving the quality and output of the cattle and enhancing the domestic influence of the cattle brand. It will play an important role in industry support and demonstration to promote poverty alleviation and rural revitalization in Liangshan. However, due to the relatively closed region and the lack of the popularization of animal husbandry technology in Liangshan area, the inbreeding situation of normalization and serious deterioration had been brought about. So, it was the core of our thinking to help the farmers in ethnic areas rely on cattle breeding to improve quality and efficiency, and to get rid of poverty and running towards well-off society. In this paper, it was reviewed that the developmental situation of Liangshan cattle, the existing problems of improving quality and efficiency of the cattle, and the prospect of the cattle improvement.

Key words: Liangshan cattle; breed improvement; improving the quality and increasing the efficiency

(上接第32页)

Seroepidemiological Survey of *Mycoplasma bovis* in Large Scale Farms in Binzhou in 2019

LI Shu-guang^{1,2,3}, XIAO Yue-qiang¹, CHENG Li-kun¹, ZHAO Jia-lei⁴, LI Lai-yong⁵, LIU Ji-shan^{1*}

(1. Shandong Binzhou Animal Science and Veterinary Medicine Academy, Binzhou, Shandong 256600; 2. Qingdao Agricultural University Qingdao, Shandong 266109; 3. Shandong Binzhou Research, Development and Promotion Center for Livestock and Poultry Propolis Vaccine, Binzhou, Shandong 256600; 4. Shandong Lixu Biotechnology Co., Ltd., Binzhou, Shandong 256600; 5. Grassland Supervision Station, Hekou District, Dongying City, Dongying, Shandong 257200)

Abstract: [Objective] The authors want to understand the prevalence of *Mycoplasma bovis* in large-scale cattle farms in Shandong Binzhou area. [Methods] Some serum samples were collected from 14 large-scale dairy farms and beef farms in this area. The serum antibody of *Mycoplasma bovis* was detected by indirect ELISA Kit with IgG antibody of *Mycoplasma bovis*, and chi square statistical test was performed by SPSS 20. [Results] The results showed that the total positive rate of *Mycoplasma bovis* IgG antibody was 77.86%, and there was no significant difference between the positive rate of *Mycoplasma* in large-scale dairy farms (74.29%) and beef farms (81.43%) ($P > 0.05$). There was a significant difference in the IgG positive rate of *Mycoplasma bovis* between different dairy farm areas and beef farm areas ($P < 0.05$). [Conclusion] There are different degrees of *Mycoplasma bovis* infection in different farms in Binzhou Shandong province. *Mycoplasma bovis* infection may become one of the main diseases that harm the health of domestic large-scale cattle farms.

Key words: Binzhou area; large scale cattle farm; *Mycoplasma bovis*; serum antibody; ELISA