

宁夏固原部分地区肉犊牛呼吸道 6 种病原流行病学调查

郭亚男¹, 杨春莲², 谢文青³, 赵永红⁴, 摆世林⁵, 梁小军¹

(1. 宁夏农林科学院 动物科学研究所, 银川 750002; 2. 固原市畜牧技术推广服务中心, 宁夏 固原 756000;
3. 海原县畜牧产业发展服务中心, 宁夏 海原 755299; 4. 海原县国有林场和草原建设服务中心, 宁夏 海原 755299;
5. 宁夏向丰农牧业开发有限公司, 宁夏 西吉 756200)

摘要: [目的] 为了掌握宁夏固原地区示范村杨坪村和马沟村的肉犊牛呼吸道疾病的流行情况, [方法] 2019—2021 年对 2 村犊牛呼吸道疾病发病情况进行统计并采用分子生物学技术对采集的犊牛呼吸道鼻拭子样本进行 6 种病原的鉴定。 [结果] 2019—2021 年杨坪村犊牛呼吸系统疾病发病率呈下降趋势, 但不同年份间差异不显著 ($P > 0.05$); 马沟村犊牛呼吸系统疾病发病率呈下降趋势, 2021 年与 2019 年相比差异显著 ($P < 0.05$)。2019—2021 年, 病毒性呼吸道疾病呈下降趋势, 而牛支原体和多杀性巴氏杆菌由于没有有效的疫苗预防而呈现较高的阳性率。 [结论] 本研究揭示了牛支原体和多杀性巴氏杆菌为目前犊牛主要的呼吸道致病病原, 做好牛支原体病和多杀性巴氏杆菌病的预防、早期诊断和治疗可有效降低犊牛呼吸道疾病的发病率。

关键词: 肉犊牛; 呼吸道; 病原; 流行病学调查

中图分类号: S823 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2022)03-0040-05

目前在我国经济水平不断向前发展的大背景下, 大规模牛养殖产业得到进一步发展, 已经成为基层地区农民群众发家致富的一种主要途径。然而随着养殖规模不断扩大, 养殖密度不断增加, 面临的病毒性、细菌性、寄生虫性疾病愈来愈多, 给养殖场造成的损失也越来越多, 直接威胁到养殖场种群的稳定和扩繁, 进而影响养牛产业的经济效益。

在养殖中新生犊牛常见的传染性疾病, 主要包括消化道疾病和呼吸系统疾病^[1]。因新生犊牛适应环境的能力不足, 免疫系统不够强大, 呼吸道疾病成为犊牛养殖中的棘手问题, 该疾病病因复杂, 传染性强, 且具有一定的潜伏期, 不易被发现, 对肉牛养殖产业造成较大经济损失, 因此通过对疾病流行情况的检测和诊断, 对疾病的防治尤为重要^[2-4]。牛呼吸道疾病通常由多种病原体混合感染导致, 包括病毒、细菌、支原体, 常见的病原主要包括支原体、结核杆菌、巴氏杆菌、呼吸道合胞体病毒、牛传染性鼻气管炎、牛副流感病毒、牛病毒性腹泻病毒等^[5]。

呼吸道疾病在养殖场中发病相对较高, 一旦发生流行, 将会对整个养殖产业造成严重的威胁。随着牛养殖产业不断向前推进, 单一病原引发的牛呼吸道疾病的发生率呈现逐年下降趋势, 表现为多种病原混合感染继发感染, 使患病病例的临床症状不断向复杂化方向转变, 给疾病的诊断和防控工作带来很多困难^[6]。

本研究采用病原分子诊断技术, 针对固原 2 个肉牛养殖区开展为期 3 年的犊牛呼吸道疾病流行病学调查, 旨在掌握目前犊牛呼吸道疾病的发病及流行情况, 为针对性的实施疾病防控措施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

RNAiso Plus、PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver. 2、Premix Taq™、DL2000™ Marker 等均购自 TaKaRa 公司; RNA 专用氯仿、RNA 专用 75% 乙醇、异丙醇等购自上海生工公司。细菌基因组 DNA 提

收稿日期: 2021-12-22 修回日期: 2022-01-30

基金项目: 国家肉牛牦牛产业技术体系资助项目 (CARS-37); 国家科技部绿色宜居村镇技术创新重点专项 (2021YFD1100508); 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2022BBF3024)。

作者简介: 郭亚男 (1991—), 男, 副研究员, 主要从事兽医临床诊断技术研究。

* 通讯作者: 梁小军 (1971—), 男, 研究员, 主要从事肉牛养殖技术研究。

取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;胶回收试剂盒,购自 OMEGA 公司 D2500-01。

1.2 引物设计和合成

采用宁夏农林科学院动物科学研究所动物疫病研究室前期已建立的牛多病原 PCR 诊断技术方法。不同病原引物序列均由上海生工合成。

2 方法

2.1 样品采集

用无菌长棉签采集患牛鼻腔深部分泌物置于装有 2 mL 灭菌生理盐水中试管中,冷藏条件下保存。固原市杨坪村 2019—2021 年共计采集呼吸道鼻拭子 661 份,其中 2019 年共采集犊牛呼吸道样品 182 份;2020 年共采集犊牛呼吸道样品 204 份;2021 年共采集犊牛呼吸道样品 275 份。固原市马沟村 2019—2021 年共计采集呼吸道鼻拭子 736 份,其中 2019 年共采集犊牛呼吸道样品 224 份;2020 年共采集犊牛呼吸道样品 250 份;2021 年共采集犊牛呼吸道样品 262 份。

2.2 DNA/RNA 提取

DNA 提取:采集鼻拭子的试管使用旋涡振荡仪

振荡 1 min 后,12 000 r/min 离心 2 min,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒对菌体沉淀进行基因组 DNA 的提取,−80 ℃ 保存。

RNA 提取:采集鼻拭子的试管使用旋涡振荡仪振荡 1 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,取上清 12 000 r/min 离心 30 min,离心后取弃上清,收集沉淀用于 RNA 提取。根据 RNA 提取试剂盒(RNAiso Plus)操作程序对处理样本 RNA 进行提取。根据 Primescript™ 反转录试剂盒操作程序将提取的总 RNA 反转录为 cDNA,−80 ℃ 保存。

2.3 PCR 扩增及序列分析

不同病原体 PCR 引物和退火温度如表 1 所示。PCR 反应体系为 25 μL 体系:2 × Taq Mix 12.5 μL,上下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL,DNA 模板 2 μL,去离子水 9.5 μL。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 2 min、95 ℃ 变性 30 s、退火温度见表 1。20 s、72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 8 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

表 1 不同病原体引物序列、退火温度及产物长度

病原	引物名称	引物序列 5'-3'	退火温度/℃	产物长度/bp
牛支原体	uvrC-F	GAATTCAATGTGTCTACTAGTCCTGG	55	1620
	uvrC-R	AAGCTTAGCGTCATAGA TTTTGCATA		
多杀性巴氏杆菌	Pm-F	ATCCGCTATTTACCCAGTG	56	456
	Pm-R	GCTGTAAACGAACTCGCC		
牛病毒性腹泻病毒	BVD-F	TAGCAACAGTGGTGACTT	53	466
	BVD-R	TGCTATTACCCGACCTGC		
牛传染性鼻气管炎病毒	IBR-F	GGCTCTACCGCACGGGCACCTC	58	306
	IBR-R	GCGGCTCTCGTCTCGCAGCATTT		
牛副流感 3 型病毒	BPI-3-F	TATCAGGATTGAGGAAGG	53	258
	BPI-3-R	TGAAAAATGAAGCAAGAC		
牛合胞体病毒	BRS-F	GCTCTCAGCAAGGTCAAACATAA	55	224
	BRS-V	CTCCCCAATCGGGACATAGCA		

2.4 统计分析

采用不同软件处理数据,用 Excel 软件进行数据整合,采用 SAS 软件中的卡方检验进行差异性分析。

3 结果与分析

3.1 不同年份犊牛呼吸道系统疾病发情情况统计结果

2019—2021 年杨坪村犊牛呼吸系统疾病发病

率呈下降趋势,但不同年份间差异不显著($P > 0.05$)。2019 年,杨坪村犊牛呼吸系统性疾病发病率为 27.37%;2020 年,犊牛呼吸系统性疾病发病率为 26.84%;2021 年,犊牛呼吸系统性疾病发病率为 24.12% (表 2)。

2019—2021 年马沟村犊牛呼吸系统疾病发病

率呈下降趋势,2021 年与 2019 年相比差异显著($P < 0.05$)。2019 年,杨坪村犊牛呼吸系统性疾病发病率为 26.20%;2020 年,犊牛呼吸系统性疾病发病率为 21.93%;2021 年,犊牛呼吸系统性疾病发病率为 19.70% (表 2)。

表 2 2019—2021 年犊牛呼吸道疾病发病率统计

年份 (年)	杨坪村			马沟村		
	犊牛总数/头	发病牛数/头	阳性率/%	犊牛总数/头	发病牛数/头	阳性率/%
2019	665	182	27.37 ^a	855	224	26.20 ^a
2020	760	204	26.84 ^a	1140	250	21.93 ^{ab}
2021	1140	275	24.12 ^a	1330	262	19.70 ^{ab}

注:同列数据肩标小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)

2.2 犊牛呼吸道疾病 6 种病原检测结果

通过提取呼吸道鼻拭子样品 DNA 和 RNA,并采用特异性引物进行 6 种病原分子生物学诊断,结果发现,杨坪村 2019—2021 年 6 种病原平均阳性率呈下降趋势,但不同年份间差异不显著($P > 0.05$)。2019 年检测的 6 种病原中,平均阳性率为 18.97%,牛支原体感染率最高,为 45.05%;其次是牛病毒性腹泻病毒阳性率达 24.73%,牛传染性鼻气管炎病毒阳性率达 21.98%,多杀性巴氏杆菌阳性率达 10.99%,其他 2 种病原在 7% 以下。2020 年检测的 6 种病原中,平均阳性率为 18.79%,主要以牛支原体和巴氏杆菌为主。牛支原体感染率最高,为 59.80%,其次多杀性巴氏杆菌阳性率达 29.41%,其他 4 种病原阳性率均低于 7%。2021 年检测的 6 种病原中,平均阳性率为 17.21%,主要以牛支原体和巴氏杆菌为主。牛支原体感染率最高,为

45.09%,其次是多杀性巴氏杆菌阳性率达 33.45%,其他病原在 8% 以下(表 3)。

马沟村 2019—2021 年 6 种病原平均阳性率呈下降趋势,但不同年份间差异不显著($P > 0.05$)。2019 年检测的 6 种病原中,平均阳性率 21.95%,牛支原体感染率最高,为 53.57%;其次是多杀性巴氏杆菌阳性率达 41.07%,牛病毒性腹泻病毒阳性率达 24.73%,其他 3 种病原在 9% 以下。2020 年检测的 6 种病原中,平均阳性率为 21.00%,牛支原体感染率最高,为 59.80%;其次是多杀性巴氏杆菌阳性率达 33.60%,牛病毒性腹泻病毒阳性率达 13.60%,其他 3 种病原在 10% 以下。2021 年检测的 6 种病原中,平均阳性率为 17.24%,牛支原体感染率最高,为 61.07%,其次是多杀性巴氏杆菌阳性率达 22.90%,其他病原在 7% 以下(表 4)。

表 3 杨坪村 6 种病原发病情况

类型	2019 年			2020 年			2021 年		
	样本总数 /份	阳性样本 数/份	阳性率 /%	样本总数 /份	阳性样本 数/份	阳性率 /%	样本总数 /份	阳性样本 数/份	阳性率 /%
合胞体病毒	182	12	6.59	204	10	4.9	275	16	5.82
牛传染性鼻气管 炎病毒	182	40	21.98	204	12	5.88	275	18	6.55
牛副流感 3 型病毒	182	8	4.40	204	14	6.86	275	12	4.36
牛病毒性腹泻病毒	182	45	24.73	204	12	5.88	275	22	8.00
牛支原体	182	82	45.05	204	122	59.80	275	124	45.09
多杀性巴氏杆菌	182	20	10.99	204	60	29.41	275	92	33.45
平均值			18.97 ^a			18.79 ^a			17.21 ^a

注:同行数据肩标小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)

表 4 马沟村 6 种病原发病情况

类型	2019 年			2020 年			2021 年		
	样本总数 /份	阳性样本 数/份	阳性率 /%	样本总数 /份	阳性样本 数/份	阳性率 /%	样本总数 /份	阳性样本 数/份	阳性率 /%
合胞体病毒	224	18	8.04	250	25	10.00	262	12	4.58
牛传染性鼻气管 炎病毒	224	15	6.70	250	18	7.20	262	15	5.73
牛副流感 3 型病毒	224	10	4.46	250	12	4.80	262	6	2.29
牛病毒性腹泻病毒	224	40	17.86	250	34	13.60	262	18	6.87
牛支原体	224	120	53.57	250	142	56.80	262	160	61.07
多杀性巴氏杆菌	224	92	41.07	250	84	33.60	262	60	22.90
平均值			21.95 ^a			21.00 ^a			17.24 ^a

注:同行数据肩标小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)

3 讨 论

通过对宁夏固原地区 2 个示范村杨坪村和马沟村肉犊牛呼吸道疾病发病情况和 6 种常发病原的鉴定开展为期 3 年的追踪调查。2019—2021 年间犊牛呼吸道病毒性疾病发病率逐年减少,原因可能是由于近年来病毒性疫苗的使用,尤其是牛病毒性腹泻病毒和牛传染性鼻气管炎病毒疫苗的推广使用明显抑制了这两种疾病的发生,同时也证明疫苗可以作为预防疾病的首要手段;而牛支原体和多杀性巴氏杆菌阳性率占比较大,牛支原体目前美国已经有商品化的疫苗,但是成本较高,免疫效果没有数据可作参考,国内目前没有牛支原体的疫苗^[7],犊牛也可通过接触被感染的母牛或者被牛支原体污染的牛乳而造成感染,多杀性巴氏杆菌目前无可用的商品化疫苗而造成病原的广泛存在。当生活环境、饲料、气温、运输等诱因存在后,致使犊牛免疫力降低也会使犊牛感染牛支原体病和多杀性巴氏杆菌病^[8],造成犊牛呼吸系统疾病。各种病原感染后犊牛表现的临床症状没有特异性,病程刚开始时,犊牛的表现并不明显,因此就需要临床经验丰富的工作人员及早发现,及早治疗。

通过对 6 种病原的鉴定和流行情况追踪,揭示了宁夏固原地区犊牛目前存在多种呼吸道病原感染情况,不同养殖场疾病发病情况和病原发病比例不同,但均存在本研究中的 6 种病原体。研究还发现,注射过疫苗的犊牛发病率逐年降低,因此疫苗可以预防动物疾病的发生,但是牛支原体和多杀性巴氏杆菌的疫苗国内没有商品化的产品,这也为科研人员提供了今后的努力方向。由于没有科学有效的疫

苗预防疾病,发病后只能使用多种不同种类的抗生素治疗疾病,因此准确诊断疾病发生的原因,并给出科学的治疗方案十分重要。在养殖过程中,负责人员应注重犊牛健康培育,从饲养管理、营养、疫病的预防、疾病的早期诊断和治疗等方面建立一套适合本养殖场环境的犊牛培育及健康养殖技术体系,进而减少犊牛疾病的发病率和死淘率,保证基层肉牛养殖高效、健康发展^[1,9];基层兽医工作者也要经常参加培训,提高自身的理论知识,在工作中才能更早更准确的诊断出使何种疾病,对症下药,科学严谨的用药也可以降低病原的耐药性^[10]。

4 结 论

本研究对 2019—2021 年固原 2 个肉牛养殖区造成犊牛呼吸道疾病 6 种主要病原的发病率开展病原学研究。2019—2021 年杨坪村犊牛呼吸系统疾病发病率呈下降趋势,但不同年份间差异不显著($P > 0.05$);马沟村犊牛呼吸系统疾病发病率呈下降趋势,2021 年与 2019 年相比差异显著($P < 0.05$)。2019—2021 年,病毒性呼吸道疾病呈下降趋势,而牛支原体和多杀性巴氏杆菌由于没有有效的疫苗预防而呈现较高的阳性率。牛支原体和多杀性巴氏杆菌为目前犊牛主要的呼吸道致病病原,做好牛支原体病和多杀性巴氏杆菌病的预防、早期诊断和治疗可有效降低犊牛呼吸道疾病的发病率。

参考文献:

[1] 张建明. 新生犊牛饲养管理[J]. 畜牧兽医科学, 2020(12): 92-93.
[2] 陈平,王斐,何振富,等. 牛呼吸道疾病综合征防治研究进展

- [J]. 中国兽医学报, 2021, 41(10): 2064-2068.
- [4] 李发明. 犊牛呼吸道疾病的诊断与治疗[J]. 兽医导刊, 2021(11): 49-50.
- [5] 石柯, 刘巧玲, 张森, 等. 牛呼吸道疾病综合征的主要病原及检测方法概述[J]. 贵州畜牧兽医, 2021, 45(1): 52-57.
- [6] 张晓宇. 奶牛犊牛主要呼吸道疾病流行病学调查及牛支原体肺炎防治的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [7] 东笑, 陶攀, 王贵平, 等. 牛支原体疫苗研究进展[J]. 中国动物传染病学报: 1-7.
- [8] 郭亚男, 曹思婷, 何生虎, 等. 宁夏某肉牛场牛支原体分离鉴定及病理组织学观察[J]. 动物医学进展, 2017, 38(3): 38-43.
- [9] 崔燕燕. 新生犊牛饲养管理研究[J]. 中国畜牧业, 2021(8): 66.
- [10] 杨晶晶, 顾庆云, 王俊书, 等. 拉萨地区羊多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及基因型分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(3): 80-85.

Epidemiological Investigation on Six Pathogens of Respiratory Tract of Meat Calves in Guyuan, Ningxia

GUO Ya-nan¹, YANG Chun-lian³, XIE Wen-qing⁴, ZHAO Yong-hong⁵, FANG Shi-lin⁶, LIANG Xiao-jun¹

(1. Institute of Animal Sciences, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002;

2. Guyuan Animal Husbandry Technology Extension Service Center, Guyuan, Ningxia 756000;

3. Haiyuan County Animal Husbandry Industry Development Service Center, Haiyuan, Ningxia 755299;

4. Haiyuan County State Owned Forest Farm and Grassland Construction Service Center, Haiyuan, Ningxia 755299);

5. Ningxia Xiangfeng Agriculture and Animal Husbandry Development Co., Ltd., Xiji, Ningxia 756200)

Abstract: [Objective] In order to master the prevalence of respiratory diseases of meat calves in Yangping village and Magou village, Guyuan Region of Ningxia. [Methods] The incidence of respiratory diseases of calves in the two villages was counted from 2019 to 2021, and six pathogens were identified in the respiratory tract nasal swab samples of calves collected by molecular biological technology. [Results] The results showed that the incidence rate of respiratory diseases of calves in Yangping village decreased in 2019 – 2021, but there was no significant difference between different years ($P > 0.05$). The incidence rate of respiratory diseases of calves in Magou valley was decreasing, and there was a significant difference between 2021 and 2019 ($P < 0.05$). From 2019 to 2021, viral respiratory diseases showed a downward trend, while *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella multocida* showed a high positive rate due to the lack of effective vaccine prevention. [Conclusion] This study revealed that *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella multocida* were the main respiratory pathogens of calves. Prevention, early diagnosis and treatment of *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella multocida* could effectively reduce the incidence rate of calf respiratory diseases.

Key words: meat calf; respiratory tract; pathogeny; epidemiological investigation