牛 4 种主要传染病的检测与分析

谢丽华[1], 植枝林[2*], 戴光文[1], 梁锦钊[3]
(1. 梧州市动物疫病预防控制中心,广西 梧州 543002;2. 岑溪市动物疫病预防控制中心,广西 岑溪 543200;
3. 梧州市农业综合行政执法支队,广西 梧州 543002)

摘　要:[目的]旨在研究口蹄疫、布鲁氏菌病、牛结核病、牛结节性皮肤病等 4 种牛主要传染病的免疫效果和流行情况。[方法]采用疫苗对口蹄疫、牛结节性皮肤病免疫,针对性使用荧光 PCR、ELISA 方法以及虎红平板凝集试验、皮内变态反应试验对上述 4 种牛病进行检测。[结果]免疫牛口蹄疫 10.21 万头次,检测血清 1 534 份和组织样品 233 份,口蹄疫免疫抗体合格率 94.33%,口蹄疫病毒为阴性。使用山羊痘疫苗免疫牛结节性皮肤病 2.89 万头次,检测口鼻拭子/抗凝样品 200 份,牛结节性皮肤病病毒为阴性。监测牛布鲁氏菌病血清 2 380 份,阳性率为 0.17%。监测牛结核病 1 291 头,阳性率为 0.23%。[结论]口蹄疫、牛结节性皮肤病免疫效果良好,达到阻断病毒感染和传播目的。布鲁氏菌病、牛结核病总体上分别达到控制标准和净化标准,但"两病"仍有零星发生,需要加强牛只调运监管检疫。

关键词:口蹄疫; 布鲁氏菌病; 结核病; 牛结节性皮肤病; 检测与分析
中图分类号:S851.3　**文献标识码:**B　**文章编号:**1001-9111(2023)02-0043-03

牛的主要传染病有口蹄疫(foot-and-mouth disease,FMD)、布鲁氏菌病(brucellosis)、牛结核病(bovine tuberculosis,bTB)、牛结节性皮肤病(lumpy skin disease,LSD)等,其中口蹄疫为我国一类动物疫病,后 3 种为二类动物疫病。口蹄疫是由口蹄疫病毒引起的以偶蹄类动物为主的急性、热性、高度传染性疫病,临床上以牛呆立流涎,唇部、舌面、齿龈、鼻镜、蹄踵、蹄叉、乳房等部位出现水泡为特征,发病后期水泡破裂、结痂甚至蹄壳脱落,口蹄疫病毒可以通过直接或间接接触(飞沫等)方式随风远距离传播。牛布鲁氏菌病和牛结核病并称为牛"两病",是常见的人兽共患病。牛布病主要由牛种、羊种布鲁氏菌感染引起,该菌侵害淋巴系统和生殖系统,导致母畜流产和公畜睾丸炎。牛结核病是由牛结核分枝杆菌引起的慢性传染病,奶牛最易感,临床以渐进性消瘦、长期顽固性干咳的肺结核和乳房淋巴结肿大的乳房结核为特征。牛结节性皮肤病,又称牛疙瘩皮肤病,是由痘病毒科山羊痘病毒属牛结节性皮肤病病毒引起的牛全身性感染疫病,临床以发病牛发热消瘦、淋巴结肿大、皮肤出现结节为特征,主要通过吸血昆虫(蚊、蝇、蠓、虻、蜱等)叮咬传播。上述 4 种牛传染病虽然致死率不高,但传染性很强或净化根除难,一旦感染发病将严重影响牛体健康及其产品质量安全,甚至危害人类和其他动物种类,加强其防控和检测具有重要公共卫生学意义。

1　材料与方法

1.1　动物疫苗

牛口蹄疫免疫使用口蹄疫 O 型灭活疫苗、口蹄疫 O 型-A 型二价灭活疫苗,厂家有中牧股份、金宇保灵等,疫苗毒株为 OS 株、OJMS 株、O/HB/HK/99 株 + AF/72 株等。牛结节性皮肤病免疫使用山羊痘弱毒活疫苗,厂家有金宇保灵、哈药集团、新疆天康等,毒株为 CVCC AV41 弱毒株。

1.2　样品数量

按照农业农村部门主动监督检验和养殖场户委托检测方式,采集 2019—2021 年梧州市 7 个县(市、区)牛养殖场户牛血清 3 914 份,屠宰场和市场牛淋巴结等组织样品 233 份,牛口鼻拭子/抗凝血样品 200 份,监测牛结核病活牛 1 291 头,样品(活牛)由梧州市本级、4 个县(市)动物疫病预防控制中心兽医实验室检测。

收稿日期:2022-09-29　**修回日期:**2022-10-13
基金项目:2021 年梧州市科学研究与技术开发计划"牛羊繁育扩产和疫病防控关键技术研究与应用"项目(202102020)
作者简介:谢丽华(1981—),男,高级兽医师,硕士,主要从事动物传染病研究和动物疫病预防控制工作。
* **通讯作者:**植枝林(1973—),男,兽医师,主要从事动物疫病预防控制工作。

1.3 仪器设备

帝肯 Sunrise 酶标仪、ABI Q5 实时荧光 PCR 仪、艾本德微量移液器、赛默飞二级生物安全柜等。

1.4 检测试剂

兰州兽医研究所口蹄疫 O 型抗体液相阻断 ELISA 检测试剂盒、金诺 MEDIAN/JBT 口蹄疫 O 型抗体固相 ELISA 试剂盒、深圳梓健通用型口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒、青岛立见布鲁氏菌病虎红平板凝集试验抗原和竞争 ELISA 抗体检测试剂盒、哈药集团牛提纯结核菌素、青岛立见牛结节性皮肤病实时荧光 PCR 检测试剂盒等。

1.5 口蹄疫、牛结节性皮肤病免疫

牛口蹄疫的强制免疫:2019—2021 年实施,规模场犊牛 90 日龄左右使用 O 型口蹄疫首次免疫,间隔 1 个月后加强 1 次,以后每隔 4 个月免疫 1 次。散养户牛每年春秋两季集中免疫,每月对新增补栏牛免疫。奶牛使用口蹄疫 O 型-A 型二价灭活疫苗免疫。

牛结节性皮肤病的紧急免疫/全面免疫:2020 年 10 月起至 2021 年实施,使用国家批准的山羊痘疫苗进行尾根内侧或股内侧皮内注射,不论牛只大小,每头 0.5 mL(含 5 头份剂量)。

1.6 口蹄疫、牛结节性皮肤病监测

口蹄疫血清学和病原学:免疫 21 d 后,采集牛血清进行免疫抗体检测。参照国家标准 GB/T 18935—2018 口蹄疫诊断技术液相阻断 ELISA 检测方法,牛抗体效价≥27 判定为免疫合格个体;或使用固相阻断 ELISA 检测方法,牛抗体阳性,判定为免疫合格个体。免疫合格个体数量占群体总数的 70%(含以上),判定免疫合格群体。对屠宰场牛组织样品参照 GB/T 18935—2018 口蹄疫诊断技术荧光定量 RT-PCR 方法检测口蹄疫病毒。牛结节性皮肤病病原学:对牛口鼻拭子/抗凝血样品参照国家标准 GB/T 39602—2020 牛结节性皮肤病诊断技术实时荧光 PCR 方法检测牛结节性皮肤病病毒。

1.7 布鲁氏菌病、结核病监测

布鲁氏菌病和结核病采取非免疫学监测剔除方法。参照国家标准 GB/T 18646—2018 动物布鲁氏菌病诊断技术虎红平板凝集试验初筛检测牛血清,阳性样品用试管凝集反应或竞争酶联免疫吸附试验(cELISA)进行复核。参照国家标准 GB/T18645 动物结核病诊断技术牛分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验方法对牛活体进行检测。阳性动物分别按照农业部动物布鲁氏菌病、牛结核病防治技术规范予以扑杀、无害化处理。

2 结果与分析

2.1 口蹄疫免疫和监测情况

2019—2021 年累计免疫牛口蹄疫 10.21 万头次,累计监测牛养殖场户 93 个,群体免疫合格率为 91.40%,检测牛血清样品 1 534 份,个体免疫合格率为 94.33%。3 年来个体免疫抗体合格率每年均超过 90%,且合格率有增高趋势。检测屠宰场、市场牛组织样品 233 份,口蹄疫病毒均为阴性(详见表 1)。

表 1 牛口蹄疫免疫抗体和病毒检测情况

年份	免疫数/万头次	样品类型	检测血清/份	抗体合格率/%	监测群体/个	群体合格率/%	检测组织/份	病毒阳性率/%
2019	2.34	血清、组织	422	91.71	26	88.46	120	0
2020	3.81	血清、组织	283	92.23	27	92.59	20	0
2021	4.06	血清、组织	829	96.38	40	92.50	93	0
合计	10.21	血清、组织	1534	94.33	93	91.40	233	0

2.2 牛结节性皮肤病免疫和监测情况

2020—2021 年累计免疫牛结节性皮肤病 2.89 万头次,累计监测牛结节性皮肤病病毒养殖场户 12 个,检测口鼻拭子/抗凝样品 200 份,牛结节性皮肤病病毒均为阴性(详见表 2)。

表 2 牛结节性皮肤病免疫和病毒检测情况

年份	免疫数/万头次	样品类型	检测样品/份	样品阳性率/%	监测群体/个	群体阳性率/%
2020	1.70	—	—	—	—	—
2021	1.19	口鼻拭子/抗凝血	200	0	12	0
合计	2.89	口鼻拭子/抗凝血	200	0	12	0

2.3　布鲁氏菌病、结核病监测情况

2019—2021 年累计监测布鲁氏菌病 142 个牛群血清 2 380 份,发现 2 个群体的 4 份血清阳性,群体阳性率为 1.41%,样品阳性率为 0.17%,布病阳性样本来源于 2021 年奶牛,2019—2020 年未监测出牛布鲁氏菌病阳性。2019—2021 年累计监测牛结核病 73 个牛群牛体 1 291 头,发现 2 个牛群的 3 头牛阳性,群体阳性率为 2.74%,个体阳性率为 0.23%,结核病阳性牛来源于 2019、2020 年奶牛,2021 年未监测出牛结核病阳性(详见表 3)。

表 3　布鲁氏菌病、结核病非免疫检测情况

年份	动物种类	布鲁氏菌病(Brucellosis)						牛结核病(bTB)					
		检测样品/份	阳性样品/份	样品阳性率/%	监测群体/个	阳性群体/个	群体阳性率/%	检测个体/头	阳性个体/头	个体阳性率/%	监测群体/个	阳性群体/个	群体阳性率/%
2019	奶牛	120	0	0	20	0	0	123	2	1.63	18	1	5.56
	肉牛	204	0	0	7	0	0	239	0	0	8	0	0
	其他品种牛	338	0	0	21	0	0	120	0	0	4	0	0
	小计	662	0	0	48	0	0	482	2	0.41	30	1	3.33
2020	奶牛	133	0	0	15	0	0	93	1	1.08	11	1	9.09
	肉牛	560	0	0	32	0	0	215	0	0	10	0	0
	其他品种牛	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	小计	697	0	0	49	0	0	308	1	0.32	21	1	4.76
2021	奶牛	141	4	2.84	12	2	16.67	77	0	0	7	0	0
	肉牛	711	0	0	25	0	0	171	0	0	4	0	0
	其他品种牛	169	0	0	8	0	0	253	0	0	11	0	0
	小计	1021	4	0.39	45	2	4.44	501	0	0	22	0	0
	合计	2380	4	0.17	142	2	1.41	1291	3	0.23	73	2	2.74

3　讨　论

牛传染病的检测手段通常有血清学方法和病原学方法。本研究采用牛病诊断标准化前沿技术,严格按照国家推荐标准操作,并根据国家标准变化及时采用最新技术方法,如使用新增的口蹄疫病毒荧光定量 PCR 方法、口蹄疫抗体固相 ELISA 检测方法、布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验(cELISA)等,确保现行有效。使用的诊断检测试剂主要是以国家参考实验室为技术依托生产或进口改进的商品化试剂盒,结果准确,可以为广西梧州市口蹄疫、布鲁氏菌病、牛结核病、牛结节性皮肤病防控提供科学有效的数据支撑。

广西梧州市对牛口蹄疫实行强制免疫,采用 OS 株、OJMS 株、O/HB/HK/99 株 + AF/72 株等疫苗对普通牛、奶牛分别实行 O 型、O-A 型口蹄疫免疫,应免免疫密度达到 100%,2019—2021 年免疫数量逐年提高,个体和群体免疫抗体合格率分别达到91.71% ~ 96.38% 和 88.46% ~92.59%,超过国家要求的 70% 免疫合格率要求,连续 3 年监测口蹄疫病毒为阴性且没有牛口蹄疫临床病例和疫情发生,表明政府采购疫苗效果良好,总体上可以阻断口蹄疫流行毒株的感染和传播。然而,每年仍有 10% 左右的免疫不合格场群成为口蹄疫入侵风险场点,需要加强免疫。

牛结节性皮肤病于 2019 年 8 月首次由国外传入我国新疆伊犁地区,在不到一年内结节性皮肤病从我国最西北部传到包括广西在内的最东南部诸省,之后 LSD 疫情迅速传播和扩散[1]。为避免疫情传入,梧州市于 2020 年 10 月起对牛结节性皮肤病实行紧急全面免疫。因国内没有 LSD 疫苗,LSDV 与山羊痘病毒(GPTV)同属,二者在基因组序列上高度相似,具有抗原同源性和交叉保护性[1-2],因此可以选用异源性的山羊痘减毒疫苗紧急免疫 LSD。目前,中国对 LSD 疫情周围县区批准采取山羊痘疫苗 5 倍剂量的紧急免疫。从梧州市当地免疫和监测结果来看,山羊痘疫苗对牛结节性皮肤病免疫起到了预防作用。

牛布鲁氏菌病和结核病时有发生。梧州市 2019—2020 年牛布鲁氏菌病监测均为阴性,2021 年监测输入性奶牛布病阳性 4 头,个体阳性率为 0.39%,达到《国家布鲁氏菌病防治计划(2016—2020)》牛布病控制标准(连续 2 年以上牛布病个体阳性率在 1% 以下),但控制不稳定。2019—2021 年监测牛结核病分别阳性 2 头、1 头、0 头,个体阳性率分别为 0.41%、0.32%、0,阳性率逐年下降,控制效

(下转第 91 页)

持和控制提供了新的潜在靶点。Hu 等[55]发现了一个 lncRNA *TCONS*_00814106,它在高繁殖力母猪卵巢组织中上调并受生殖激素的影响。Yang 等[56]从猪卵母细胞中鉴定了一种新的 lncRNA(lncRNA2193)。lncRNA2193 在猪卵母细胞体外成熟过程中稳定表达,lncRNA2193 的敲除可降低生发囊泡分解(GVBD)和第一极体(PB1)的挤压率,破坏丝状肌动蛋白和减数分裂纺锤体的组织,降低 DNA 5mC 和 H3K4(K9/K27/K36)me3 修饰水平,改变与多个信号通路相关的基因表达,并诱导孤雌细胞碎裂。Wang 等[57]在荷斯坦公牛精子中鉴定的 11 561 个 lncRNA 中,2 517 个在高、低精子活力组中有差异表达。发现 tcon_00041733 lncRNA 靶向节点基因 EFNA1(ephrin A1),参与雄性生殖生理。

3　小结与展望

目前,对于 lncRNA 在家畜动物上的研究还处于起步阶段,现有的研究集中于性状相关 lncRNA 的鉴定,且一般通过抑制其表达(RNA 干扰等方法)并观察所产生的表型来研究 lncRNA 功能。lncRNA 位点与蛋白质编码基因的接近程度、其稳定性和拷贝数、其染色质特征和组织表达谱以及 lncRNA 的细胞定位等因素,对于证明表型是由 lncRNA 转录本的改变引起的相关实验极为重要。近十几年的研究,主要集中于与大众消费取向相直接关联的性状(如肌肉生长分化、脂肪沉积等),但对于其他与家畜健康相关的性状研究(如免疫、心脏发育、造血等)远不如上述性状深入。lncRNA 在家畜性状上的研究是必然趋势,但在未来仍有许多问题亟待解决,需要揭示 lncRNA 调控家畜动物的性状的具体调控机制,这将加快其应用于家畜经济性状改良和落实生产实践的速度,为优良动物品种资源的育种工作提供坚实可靠的科学依据。

参考文献:

[1] BRANNAN C I, DEES E C, INGRAM R S, et al. The product of the H19 gene may function as an RNA[J]. Molecular and Cellular Biology, 1990, 10(1): 28-36.

[2] BROWN C J, BALLABIO A, RUPERT J L, et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome[J]. Nature, 1991, 349(6304):38-44.

[3] OKAZAKI Y, FURUNO M, KASUKAWA T, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs[J]. Nature, 2002, 420(6915): 563-573.

[4] CARNINCI P, KASUKAWA T, KATAYAMA S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome[J]. Science, 2005, 309(5740): 1559-1563.

[5] DJEBALI S, DAVIS C A, MERKEL A, et al. Landscape of transcription in human cells[J]. Nature, 2012, 489(7414): 101-108.

[6] GUTTMAN M, AMIT I, GARBER M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals[J]. Nature, 2009, 458(7235): 223-227.

[7] OHHATA T, HOKI Y, SASAKI H, et al. Crucial role of antisense transcription across the Xist promoter in Tsix-mediated Xist chromatin modification[J]. Development, 2008, 135(2): 227-235.

[8] 夏天, 肖丙秀, 郭俊明. 长链非编码 RNA 的作用机制及其研究方法[J]. 遗传, 2013, 35(3):269-280.

[9] 李睿, 杨永芳, 李冉, 等. 长链非编码 RNA 的功能及其作用机制[J]. 生命科学, 2016, 28(6):703-711.

[10] MERCER T R, DINGER M E, MATTICK J S. Long non-coding RNAs: Insights into functions[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(3): 155-159.

[11] CAO X, YEO G, MUOTRI A R, et al. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system[J]. Annual Review of Neuroscience, 2006, 29(1):77-103.

[12] DERRIEN T, JOHNSON R, BUSSOTTI G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression[J]. Genome Research, 2012, 22(9): 1775-1789.

[13] 于红. 表观遗传学:生物细胞非编码 RNA 调控的研究进展[J]. 遗传, 2009, 31(11): 1077-1086.

[14] ZUCKERMAN B, ULITSKY I. Predictive models of subcellular localization of long RNAs[J]. RNA, 2019, 25: 557-572.

[15] MELé M, MATTIOLI K, MALLARD W, et al. Chromatin environment, transcriptional regulation, and splicing distinguish lincRNAs and mRNAs[J]. Genome Research, 2017, 27(1): 27-37.

[16] MA L, BAJIC V B, ZHANG Z. On the classification of long noncoding RNAs[J]. RNA Biology, 2013, 10(6): 924-933.

[17] PONTING C P, OLIVER P L, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 629-641

. [18] MUKHERJEE N, CALVIELLO L, HIRSEKORN A, et al. Integrative classification of human coding and noncoding genes through RNA metabolism profiles[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2016, 24: 86-96.

[19] ZUCKERMAN B, ULITSKY I. Predictive models of subcellular localization of long RNAs[J]. RNA, 2019, 25: 557-572.

[20] ULITSKY I. Evolution to the rescue: Using comparative genomics to understand long non-coding RNAs[J]. Natura Reviews Genetics, 2016, 17: 601-614.

[21] 苏晓娜, 谢青梅, 陈峰. 长链非编码 RNA 及其在畜禽生长调控中的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(1):197-203.

[22] ZHANG Z K, LI J, GUAN D, et al. A newly identified lncRNA MAR1 acts as a miR-487b sponge to promote skeletal muscle dif-