一例犊牛呼吸道疾病的病原学诊断

袁文焕[1]，陈静怡[2]，张天琦[2]，贾春涛[2]

1 天津市武清区农业发展服务中心，天津 301700
2 国家奶牛产业技术体系武清综合试验站，天津 301718

摘　要：[目的] 2023年8月，天津某牛场暴发以呼吸道症状为突出特征的传染病。为了确定病因，对发病犊牛进行相关病原的病原学诊断。[方法] 采集病死犊牛肺部病料，采用PCR方法对牛副流感病毒3型（BPIV-3）、牛呼吸道合胞体病毒（BRSV）、牛疱疹病毒1型（BHV-1）、牛腺病毒3型（BAdV-3）、牛分枝杆菌（Mycobacterium bovis）、牛肺炎克雷伯菌（Bovine Klebsiella pneumoniae）、牛支原体（Mycoplasma bovis）7 种牛呼吸道病原进行检测。[结果] 样本检测出BHV-1、BAdV-3共2 种病原，存在混合感染。其他病原未检出。[结论] 本研究证实BHV-1、BAdV-3在该牛场中存在和流行，为犊牛呼吸道疾病防控提供参考。

关键词：牛疱疹病毒1型；牛腺病毒3型；病原学

文章编号：1671-4393（2025）01-0041-05　　DOI:10.12377/1671-4393.25.01.08

0 引言

牛呼吸系统疾病（Bovine Respiratory Disease，BRD）是一种严重危害养牛业的疾病，主要症状除发热外，还有一系列呼吸道症状，如咳嗽、流涕、呼吸困难等，发病率和致死率较高[1]。该病在全球广泛存在，据统计，养牛业中65%的疾病与牛的呼吸道疾病有关，感染率达100%，死亡率高达35%，每年给全世界养牛业，造成巨大经济损失[2]。

牛腺病毒3型（Bovine Adenovirus Type 3，BAdV-3）属于腺病毒科（Adenoviridae）哺乳动物腺病毒属（Mastadenovirus），为无囊膜的线性双链DNA病毒，可引起牛发热、呼吸道症状、犊牛肺炎和轻微肠道症状，是导致牛呼吸道疾病的重要病原之一。BAdV-3感染牛的病理变化局限于肺，较典型的组织病理学变化为炎症细胞浸润、坏死性支气管炎[3]，Ⅱ型肺泡细胞增生、肺泡壁增厚等[4]。可感染

基金项目：国家奶牛产业技术体系项目（CARS-36-38）

作者简介：袁文焕（1972-），女，天津人，本科，高级兽医师，研究方向为畜牧兽医技术推广；
陈静怡（1997-），女，天津人，硕士，研究方向为农业经济分析；
张天琦（1997-），男，天津人，硕士，研究方向为农业经济分析；
贾春涛（1964-），男，天津人，大专，研究方向为奶牛养殖及牧场管理。

中国乳业线上阅读

任何品种、性别与年龄的牛。感染通常导致牛只胃肠道或呼吸道疾病，但不一定有临床症状。即使无临床症状的牛，病毒也可随身体分泌物与粪便排出，对外环境持续排毒。该病毒在全国牛群广泛存在和流行[5]。现有数据显示，腺病毒存在人畜共患风险，并被怀疑可能在人类和其他哺乳动物之间传播。

牛疱疹病毒1型（Bovine Herpesvirus Type 1，BHV-1）属于甲型疱疹病毒亚科的包膜病毒，是一种双链DNA病毒[6]，大小为135 k～140 kbp[7]，编码70 种蛋白质，其中13 种蛋白质与包膜相关。根据基因组分析和病毒肽型，BHV-1可细分为几个亚型，如BHV-1.1、BHV-1.2和BHV-1.3等。其中，BHV-1.1与呼吸系统综合征有关，BHV-1.2与生殖器感染有关，BHV-1.3/BHV-5与牛的神经系统疾病有关[8]。然而，所有亚型的抗原性相似。虽然相关疾病临床特征为非致命性，但宿主范围广泛，限制动物交易。该病毒具有特殊传播途径，其潜伏期在三叉神经节和骶神经节发育， 且急性感染可使上呼吸道、鼻腔或眼窝等出现临床症状，在全球造成巨大经济损失。诊断该病可用常规方法（如细胞培养、免疫组织学检查、酶联免疫吸附试验）以及高灵敏度的现代技术（如PCR、qPCR）。

2023年8月，天津某牛场暴发高热、气喘、咳嗽、呼吸困难等症状的疾病。该牛场奶牛存栏850头，其中犊牛120 头，发病15 头，发病率约1.7%，死亡率约1.0%，造成巨大经济损失，因此解剖采集肺部样本、进行实验室检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 引物与探针

（1）呼吸病毒四重qPCR引物与探针

根据BHV-1保守基因gB（KM252884.1）、BRSV的保守基因N（ATCC51908），以及通过MegAlign软件比对NCBI公布BPIV-3的5 株主要流行毒株：Kansas株（AF178654.1）、NM09株（JQ063064.1）、Q5592株（EU277658.1）、SD0835株（HQ530153.1）、Shipping Fever株（AF178655.1）和BAdV-3的主要流行株：WBR-1株（AF030154.1）、HLJ0955株（JN381195.1）以及完整基因（NC-001876.1），并使用Primer 5.0软件进行qPCR引物与探针设计，序列如表1所示。

表 1 呼吸病毒四重 qPCR 引物与探针的序列设计

引物与探针		产物大小（bp）	序列（5’-3’）
BHV-1	上游	91	CGTGGAAGAAGTGGAGG-CG
	下游		CCCGTAAAAGGGCGA-CATG
	探针		HEX-CCCGTACGACTC-GTT - MGB
BPIV-3	上游	130	AAGAGAGGACACAGAA-GAGAGC
	下游		ATTCGCCACACACA-CAACTCT
	探针		FAM-ACAGAAAGGGC-GATTACATT - MGB
BAdV-3	上游	100	CCGGGAGGACACWCAG-TA
	下游		ACCGCGGATRT-CAAAATACGTG
	探针		Texas Red-CAAAAC-CCGCTTCCAG-MGB
BRSV	上游	92	GCATTGCTCAATCCT-CAACTAGAG
	下游		CATCACTTGACCTGCTC-CATATG
	探针		Cy5-TCTTTGCAGGGT-TATTCATGAA-MGB

（2）呼吸细菌三重qPCR引物与探针

根据GenBank登录牛分枝杆菌的特异性序列229 bp序列（登录号：AJ003103）、牛支原体的uvrC基因（登录号：AF003959）和牛肺炎克雷伯菌的khe基因（登录号：AF293352），用Oligo7.0软件分别设计

中国乳业线上阅读

特异性引物、TaqMan探针，选取如下特异性引物、TaqMan探针。引物与探针序列如表2所示。

表 2 呼吸细菌三重 qPCR 引物与探针的序列设计

引物与探针		产物大小（bp）	序列（5’–3’）
牛分支杆菌	上游	136	GTGCGAGCTGAGCGATGT
	下游		GCCGTTGTAGGCCACTC
	探针		HEX–TTCATACAAGCCG–TAGTCGTGCAGA–BHQ1
牛支原体	上游	111	TGTGTCTACTAGTCCTGGT–GTT
	下游		GCGCCGTCAAAATACT–GAAGC
	探针		FAM–TGTCTTG–TATGTTGGTAAAG–CAAAGAATTT–BHQ1
牛肺炎克雷伯菌	上游	85	TCTGAAGTGTCTCATTTTC–GGGA
	下游		CATCGTCGGGCCCTTCCA
	探针		CY5–AAACGACCTGATTG–CATTCGCCAC–BHQ3

1.1.2 主要试剂和仪器

TIANamp Virus DNA/RNA 病毒基因组提取试剂盒、磁珠法动物组织基因组DNA提取试剂盒，天根生化科技有限公司；引物及探针，生工生物工程有限公司；T-PCR试剂盒，TaKaRa。

LightCycler 96荧光定量PCR仪，Roche罗氏。

1.2 试验方法

按照TIANamp Virus DNA/RNA 病毒基因组提取试剂盒（DP438）说明书操作流程，提取DNA/RNA用于呼吸病毒四重qPCR检测。

按照磁珠法动物组织基因组DNA提取试剂盒（DP341）说明书操作流程，提取DNA用于呼吸细菌三重qPCR检测。

1.2.1 呼吸病毒四重qPCR检测方法

（1）呼吸病毒四重qPCR反应体系

配制20 μL的qPCR体系，将4 种病毒的上下游引物与探针、模板和PrimeScript反应液混匀（表3）。

表 3 呼吸病毒四重 qPCR 反应体系

试剂成分	加样体积（μL）
2×PrimeScript™ 反应液（Probe qPCR）	10.0
BHV-1 上下游引物（10 μmol/L）	0.4
BHV-2 探针（10 μmol/L）	0.4
BPIV-3 上下游引物（10 μmol/L）	0.2
BPIV-3 探针（10 μmol/L）	0.4
BAdV-3 上下游引物（10 μmol/L）	0.4
BAdV-3 探针（10 μmol/L）	0.8
BRSV 上下游引物（10 μmol/L）	0.6
BRSV 探针（10 μmol/L）	0.2
模板	5.0

（2）呼吸病毒四重qPCR反应条件

将上述混合好的体系按照表4反应条件，设置荧光定量PCR仪并检测。

表 4 呼吸病毒四重 qPCR 反应条件

序号	温度（℃）	时间	荧光采集	循环数（次）
1	42	5 min		1
2	95	30 s		1
3	95	5 s		
4	54	30 s		45
5	72	10 s	采集	
6	37	30 s		1

1.2.2 呼吸细菌三重qPCR检测方法

（1）呼吸细菌三重qPCR反应体系

配制20 μL的qPCR体系，将3 种细菌的上下游引物与探针、模板和PrimeScript反应液混匀（表5）。

表 5 呼吸细菌三重 qPCR 反应体系

试剂成分	加样体积（μL）
2×PrimeScript™ 反应液（Probe qPCR）	10.0
各上游引物（10 μmol/L）	0.5
各下游引物（10 μmol/L）	0.5
各探针（10 μmol/L）	0.5
模板	5.5

（2）呼吸细菌三重qPCR反应条件

将上述混合好的体系按照表6中的反应条件，设置荧光定量PCR仪并检测。

中国乳业线上阅读

表 6 呼吸细菌三重 qPCR 反应条件

序号	温度（℃）	时间	荧光采集	循环数（次）
1	42	5 min		1
2	95	10 min		1
3	95	10 s		
4	60	10 s		45
5	72	20 s	采集	
6	37	30 s		1

2 结果

荧光定量PCR结果见（表7），送检病料中BHV-1、BAdV-3阳性，CT值分别为27.40、28.16（图1、图2），均小于30，结果可信。

表 7 送检病料荧光定量 PCR 检测结果

病原	结果
BHV-1	阳性（CT:27.40）
HPIV-3	阴性
BAdV-3	阳性（CT:28.16）
BRSV	阴性
牛分枝杆	阴性
牛支原体	阴性
牛肺炎克雷伯菌	阴性

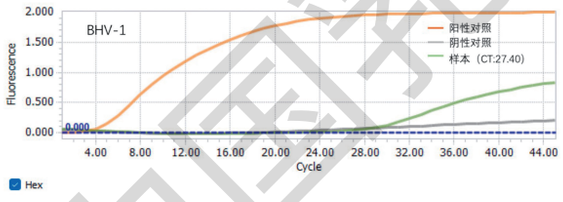


图 1 BHV-1 病毒荧光定量 PCR 结果

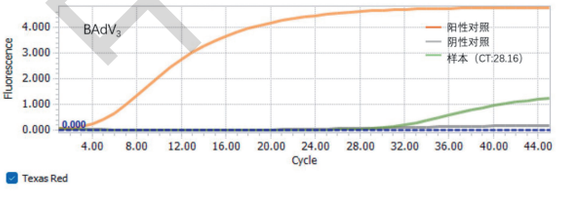


图 2 BAdV-3 病毒荧光定量 PCR 结果

3 讨论

该牛场以往每年11月、次年4月发病，且4～6 月龄多发。驻场兽医使用卡诺宁、赛可素进行治疗，以每1 mL/10 kg给药规格进行肌内注射。发病后用药治疗死亡率不高，但多预后不良，常见发育迟缓。该牛场对犊牛饲养管理如下：0～20日龄犊牛单独饲养管理，21～50日龄犊牛混群饲养，51～58日龄犊牛单独隔离、减少牛奶摄入量直至完全断奶，59～60日龄犊牛混群自由采食、后调到转群。免疫情况：泌乳天数30 天内、围产期前2 个月的成母牛、3月龄、4月龄和12月龄犊牛免疫BVDV、IBRV二联苗。布病于4～5月龄首免，8～9月龄时加强免疫。口蹄疫、梭菌、羊痘疫苗等每年免疫一次。口蹄疫后备牛额外每半年加强免疫一次。牧场管理未见异常。

该牛场BHV-1、BAdV-3感染引起犊牛呼吸道疾病，可能是环境压力改变、气候变化、通风不良导致犊牛免疫系统受影响，增加感染风险；或由于密集饲养，密度过大导致病毒细菌易传播；或运输转移犊牛时接触其他患有呼吸道疾病动物、导致感染风险增加。建议加强饲养管理、做好疫苗接种、强化健康监测、提高养殖管理水平等，全面提高牛群整体免疫能力，预防犊牛呼吸系统疾病[9]。

4 结论

通过对发病犊牛进行相关病原qPCR检测及分型鉴定，确诊该起BRD暴发由BHV-1、BAdV-3感染引起，证实BHV-1、BAdV-3在该地奶牛存在和流行，提示该牛场加强2种病原监测和饲养管理。

参考文献

[1] Baptista A L，Rezende A L，de Almeida Fonseca P，et al.Bovine respiratory disease complex associated mortality and morbidity rates in feedlot cattle from southeastern Brazil[J]. The Journal of Infection in Developing Countries，2017，11（10）：791-799.

[2] 刘志鹏，董秀梅，师东方，等.牛呼吸道疾病综合征的主要病原[J].畜牧兽医科技信息，2012（12）：9-11.

[3] Narita M，Yamada M，Tsuboi T，et al.Immunohistopathology of calf pneumonia induced by endobronchial inoculation with

中国乳业线上阅读

bovine adenovirus 3[J].Veterinary Pathology，2002，39（5）：565–571.

[4] Yamada M，Narita M，Nakamura K，et al.Apoptosis in calf pneumonia induced by endobronchial inoculation with bovine adenovirus type 3（BAV–3）[J].Journal of Comparative Pathology，2003，128（2/3）：140–145.

[5] 何姝凡，岳华，汤承，等.牛腺病毒3型的研究进展[J].畜牧兽医学报，2022，53（4）：1030–1040.

[6] Harrison S C. Principles of virus structure[J].Fields Virology，2001，1：53–85.

[7] Mayfield J E，Good P J，Vanoort H J，et al.Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1（cooper strain）[J].Journal of Virology，1983，47：259–264.

[8] Muylkens B，Thiry J，Kirten P，et al.Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis[J].Veterinary Research，2007，38（2）：181–209.

[9] 郭长梅.常见牛呼吸道疾病病因分析与综合防控探讨[J].中国乳业，2024（7）：64–68.

A Case of Etiological Diagnosis of Bovine Respiratory Disease

YUAN Wenhuan[1]，CHEN Jingyi[2]，ZHANG Tianqi[2]，JIA Chuntao[2]

[1]Tianjin Wuqing District Agricultural Development Service Center，Tianjin 301700

[2]Wuqing Comprehensive Experimental Station of National Dairy Cow Industry Technology System，Tianjin 301718

Abstract：[Objective] In August 2023，an outbreak of infectious disease characterized by respiratory symptoms was reported on one cattle farm in Tianjin. To determine the cause of the disease，we conducted etiological diagnosis of the relevant pathogens in the affected calves. [Method] Lung specimens were collected from dead calves. We used the PCR method to detect seven bovine respiratory pathogens，including Bovine parainfluenza virus type 3，Bovine respiratory syncytial virus，Bovine herpesvirus type 1，Bovine adenovirus type 3，Mycobacterium bovis， Bovine Klebsiella bovis and Mycoplasma bovis. [Result] The results showed that two pathogens，BHV-1 and BAdV-3，were detected in the samples，and there was mixed infection. No other pathogens were detected. [Conclusion] This study confirmed the existence and prevalence of BHV-1 and BAdV-3 in dairy cows in this cattle farm，which provided reference for the prevention and control of respiratory diseases.

Keywords：Bovine herpesvirus type 1；Bovine adenovirus type 3；etiology

中国乳业线上阅读