

国家奶牛产业技术体系疾病防控岗位科学家项目(何洪彬)
山东省“泰山学者特聘专家”人才项目

牛常见传染病及其防控

何洪彬 王洪梅 周玉龙 主编



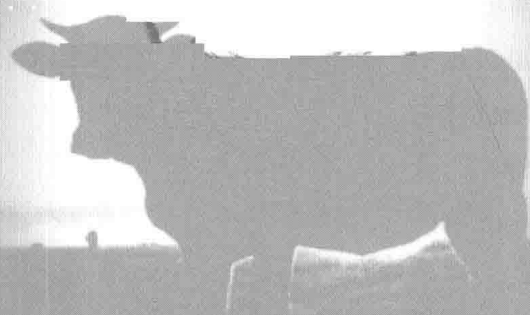
中国农业科学技术出版社

非外借

国家奶牛产业技术体系疾病防控岗位科学家项目(何洪彬)
山东省“泰山学者特聘专家”人才项目

牛常见传染病及其防控

何洪彬 王洪梅 周玉龙 主编



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

牛常见传染病及其防控 / 何洪彬, 王洪梅, 周玉龙主编. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2017. 11

ISBN 978-7-5116-3100-8

I. ①牛… II. ①何…②王…③周… III. ①牛病-传染病防治 IV. ①S858.23

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 118047 号

责任编辑 张孝安 崔改泵

责任校对 贾海霞

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电话 (010) 82109708 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)

(010) 82109709 (读者服务部)

传真 (010) 82106650

网址 <http://www.castp.cn>

经销者 各地新华书店

印刷者 北京富泰印刷有限责任公司

开本 787 mm×1 092 mm 1/16

印张 15.375

字数 270 千字

版次 2017 年 11 月第 1 版 2017 年 11 月第 1 次印刷

定价 60.00 元

《牛常见传染病及其防控》

编 委 会

主 编 何洪彬 王洪梅 周玉龙

参编人员 侯佩莉 赵贵民 朱洪伟
刘 宇 宋玲玲 郇延军
程凯慧 何成强 王晓声
高玉伟 贺文琦 李 杰

前 言

PREFACE

养牛业是重要的新兴产业，我国肉牛和奶牛存栏总量居世界第三位，但单产水平低、经济效益差，口蹄疫、牛传染性鼻气管炎、牛病毒性腹泻黏膜病、布鲁氏杆菌病等牛的主要传染病是影响单产和经济效益的主要因素。然而，与猪和禽传染病防控比较，牛传染病防控起步晚、底子薄，理论基础薄弱，诊断技术缺乏，流行背景不清，疫苗制品匮乏，面临严峻挑战。令人可喜的是，越来越多的人开始关注并积极参与牛病防控研究。经过多年研究实践，我们在“十二五”和“十三五”国家奶牛产业技术体系疾病防控岗位科学家项目及山东省人才项目“泰山学者特聘专家”的资助下，结合国内外的研究进展，针对我国牛传染病的流行情况，编写了《牛常见传染病及其防控》一书。书中重点介绍了牛常见传染病病原、致病机制、流行病学、诊断及防控等，涉及病毒病、细菌病及其他传染病累计 43 种，并简单介绍了牛常见传染病综合防控措施及无疫区建设的进展。本书立足常见传染病，突出简练实用的特点，可供牧场广大兽医技术人员阅读使用，亦可供农业院校相关专业师生、畜牧兽医科研工作者参考。

我国专业从事牛传染病防控研发的机构很少，专业从事牛病防控科技的研发和教学人员严重不足，牛传染病防控专业毕业的专业型人才也不多，牛常见传染病的流行病学数据不系统，防控理论和技术相对匮乏，可供参考的文献明显不足，加之笔者水平有限，书中错误、遗漏之处在所难免，敬请广大读者批评指正。

作 者

2017 年 3 月

目 录

CONTENTS

第一章 牛常见传染病	(1)
一、口蹄疫	(1)
二、传染性鼻气管炎	(9)
三、病毒性腹泻—黏膜病	(14)
四、流行热	(23)
五、副流行性感冒	(28)
六、轮状病毒腹泻	(34)
七、冠状病毒腹泻	(40)
八、呼吸道合胞体病	(43)
九、蓝舌病	(49)
十、白血病	(55)
十一、茨城病(类蓝舌病)	(59)
十二、肠道病毒病	(63)
十三、腺病毒感染	(66)
十四、水疱性口炎	(71)
十五、恶性卡他热	(77)
十六、伪狂犬病	(84)
十七、赤羽病	(87)
十八、牛乳头状瘤	(91)
十九、牛瘟	(95)
二十、伪牛痘	(101)
二十一、布鲁氏菌病	(104)
二十二、结核病	(118)
二十三、巴氏杆菌病	(126)
二十四、嗜血支原体病	(132)
二十五、犊牛大肠杆菌性下痢	(136)
二十六、李氏杆菌病	(140)

二十七、副结核病	(145)
二十八、放线菌病	(149)
二十九、柯克斯体病 (Q 热)	(152)
三十、沙门氏菌病	(156)
三十一、链球菌病	(161)
三十二、昏睡嗜血杆菌感染	(166)
三十三、弯曲杆菌性腹泻	(170)
三十四、生殖道弯曲菌病	(173)
三十五、坏死杆菌病	(176)
三十六、肠毒血症	(180)
三十七、化脓隐秘杆菌肺炎	(184)
三十八、钩端螺旋体病	(187)
三十九、无浆体病	(192)
四十、传染性角膜结膜炎	(197)
四十一、犊牛多发性关节炎	(199)
四十二、散发性脑脊髓炎	(203)
四十三、恶性水肿	(207)

第二章 牛常见传染病综合防控概述	(211)
一、牛规模化养殖疫病防控存在的主要问题	(211)
二、牛疫病流行状况	(212)
三、奶牛疫病防控的主要措施	(214)
四、疫病监测及暴发疫情后的处理措施	(217)

第三章 无规定动物疫病区	(219)
一、动物疫病区域化管理	(219)
二、我国无规定动物疫病区建设管理要求	(222)
三、无规定动物疫病区的建设与评估	(225)
四、无规定动物疫病屏障体系和生物安全隔离区	(226)
五、我国无规定动物疫病区建设评估进展	(230)
六、无规定动物疫病区建设、存在的问题和对策	(234)

第一章 牛常见传染病

一、口蹄疫

口蹄疫是由口蹄疫病毒引起的，发生于牛、羊、猪等偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病。世界动物卫生组织将口蹄疫列为动物 A 类烈性传染病，一旦暴发，所有感染和接触的动物都必须宰杀和无害化处理，经济损失巨大，严重危害畜牧业的健康发展以及相关产品的对外贸易，对国家的政治、经济具有深远的影响。口蹄疫以高热及口腔黏膜、蹄部和乳房皮肤等组织发生水疱、溃烂为主要特征。

（一）病原

1. 分类

口蹄疫病毒（Foot - and - mouth disease virus, FMDV）属于小 RNA 病毒科（Picornavirus）口蹄疫病毒属。口蹄疫病毒具有较高的遗传和抗原变异性，根据病毒在动物中引起交叉保护能力的不同，分为 A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2 和 SAT3 7 个血清型。口蹄疫病毒具有高度的传染性和变异性，流行强度与病毒株、宿主等多种因素有关。我国口蹄疫流行以 Asia 1 型、O 型和 A 型为主，自 2006 年以来主要流行 O 型和 A 型口蹄疫。我国 O 型口蹄疫流行病毒株主要有 3 个拓扑型：CATHAY 型、ME-SA 型（泛亚毒）和 SEA 型。

2. 形态和培养特性

口蹄疫病毒粒子直径 23~25nm，呈圆形或六角形，由 60 个拷贝的衣壳蛋白亚单位和结构蛋白 VP4 及单股正链 RNA 组成的二十面体，无囊膜。衣壳蛋白亚单位由结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3 组成，VP4 位于衣壳内表面与 RNA 紧密结合。其 RNA 具有感染性和遗传性，病毒的衣壳蛋白决定了抗原性、免疫性和血清学反应的能力，并保护基因组 RNA 免受核糖核酸酶等的降解。

口蹄疫病毒在病畜的水疱液、水疱皮内及其淋巴液中含毒量最高。在出现水疱 10~12h 后，病毒进入血液，随血液分布于全身的组织 and 体液，形成病毒血症；水疱破溃后，在病畜的乳、尿、泪、涎水、粪便及各脏器中均含有一定量的病毒。

口蹄疫病毒能在多种细胞内培养增殖，并产生细胞病变。由于口蹄疫病毒对上皮细胞具有很强的嗜性，常用的原代细胞有牛舌上皮细胞、牛甲状腺细胞、猪和羊胎肾细胞等，其中以犊牛甲状腺细胞最为敏感，产生病毒滴度高，常用于病毒的分离与鉴定。传代细胞

系 PK15、BHK-21 和 IBRS-2 等细胞较敏感，常用于本病毒的增殖。培养方法主要为单层培养法和悬浮培养法，后者主要用于疫苗的生产，获得高滴度的病毒液。

豚鼠和乳鼠是较常用实验动物。在豚鼠后肢跖部皮内接种或刺划，常于 24~48h 后在接种部位形成原发性水疱，血液中能检测到病毒，在感染 2~5d 后在口腔等处出现继发性水疱。乳鼠对口蹄疫病毒非常敏感，能检测出病料中少量病毒，3~5d 的乳鼠，皮下或腹腔接种，10~14h 表现呼吸急促、四肢和全身麻痹等症状，于 16~30h 内死亡。牛、犬、猫、大鼠、仓鼠、家兔等人工接种亦可感染。

3. 抵抗力

口蹄疫病毒对外界环境的抵抗力较强。在自然条件下，感染病毒的组织和污染的饲料、饲草、土壤等可保持传染性达数周至数月之久。高温和紫外线对病毒有杀灭作用。水疱液中的病毒经 80~100℃ 很快被杀死，在 60℃ 5~15min 和 37℃ 12~24h 条件下可被灭活。鲜牛奶中的病毒在 37℃ 可存活 12h，在 18℃ 可存活 6d，酸奶中的病毒难以存活。本病毒对酸、碱敏感，2%~4% 的氢氧化钠、3%~5% 福尔马林溶液、0.2%~0.5% 过氧乙酸、5% 次氯酸钠、5% 的氨水等均为较好的消毒剂。

4. 分子特征

病毒基因组为单股正链 RNA，全长约 8 500 个核苷酸 (nt)，由 5' 端非编码区 (5'-NCR)、开放阅读框 (ORF) 和 3' 端非编码区 (3'-NCR) 组成。5'-NCR 和 3'-NCR 包含了与基因表达和病毒复制有关的顺式作用元件，距离基因组 5' 末端约 400nt 处有特征性的 poly C 序列，poly C 的长短与病毒的毒力有关。在 ORF 的起始密码子的上游有内部核糖体进入位点 (IRES)，小 RNA 病毒科病毒可以借助 IRES 进行非帽子依赖性的翻译。ORF 编码病毒多聚蛋白，它们依赖于自身编码的蛋白酶 (L、2A、3C) 及少数的宿主因子，经过 3 级裂解后，形成病毒结构蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4) 和非结构蛋白 (L、2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D)。VP1、VP2、VP3 和 VP4 四种结构蛋白，组装成病毒衣壳；L 蛋白通过裂解起始因子 eIF4G 来终止宿主细胞蛋白的合成；2A 蛋白能诱导 P1/2A 的释放；2B 蛋白会造成细胞核周围内质网 ER 蛋白的累积，提高膜的渗透性，引起细胞病变；2C 蛋白高度保守，具有 ATPase 和 RNA 结合活性，在感染细胞中与膜囊泡的形成有关；2BC 蛋白可以阻止宿主细胞蛋白质转运进而抑制其加工修饰；3A 是一种与膜相关蛋白，与宿主嗜性有关；3B 编码了 3 种不同拷贝的 VPg 蛋白，可充当引发 RNA 复制的引物和病毒衣壳化的信号，其拷贝数与口蹄疫病毒毒力密切相关；3C 为丝氨酸蛋白酶，负责细胞组蛋白 H3 和真核翻译起始因子 eIF4G 和 eIF4A 的裂解，影响宿主细胞基因组的转录；3D 是一种 RNA 依赖的 RNA 聚合酶，可以催化病毒 RNA 的合成。病毒 RNA 以 VPg 为引物，在 3D RNA 聚合酶的催化下，和 3A、2B、2C 及一些宿主细胞蛋白形成复制复合体参与合成病毒 RNA，新合成的模板 RNA 在衣壳的包被下组装形成成熟的病毒粒子。

(二) 致病机制

1. 病毒感染机制

口蹄疫病毒可以与宿主细胞表面的受体分子结合，通过胞吞作用进入细胞，在细胞质内复制和增殖。病毒 RNA 通过 IRES 利用不依赖帽子结构的形式起始翻译，合成结构蛋白 VP0、VP1、VP3 和非结构蛋白 2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D。在 3D RNA 聚合酶作用

下,进行RNA的复制,先合成负链RNA,再以负链RNA为模板合成子代正链RNA。正链RNA进入衣壳形成前病毒粒子,随后VP0裂解为VP2和VP4,成为有感染力的子代病毒粒子。新的感染性病毒粒子通常在感染后4~6h生成。

病毒与受体的结合是致病感染的第一步。整联蛋白和硫酸乙酰肝素是目前已知的两类口蹄疫病毒的受体。据报道,整联蛋白 $\alpha V\beta 1$ 、 $\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha V\beta 5$ 、 $\alpha V\beta 6$ 、 $\alpha V\beta 8$ 可以识别口蹄疫病毒衣壳蛋白VP1的RGD基序,其中, $\alpha V\beta 6$ 只存在于上皮细胞中,相比于其他受体,病毒在体内更易于与其结合。然而,在口蹄疫自然感染过程中,何种整联蛋白发挥关键作用及整联蛋白间的协同功能尚不清楚。硫酸乙酰肝素是体外培养时口蹄疫病毒利用的受体,最初被认为是某些O型口蹄疫病毒进入细胞的受体,后来发现A、C、Asia1和SAT-1等其他血清型病毒也能以其为细胞受体。

病毒进入细胞后脱衣壳,140S病毒粒子分裂为五聚体组成的12S,然后释放出RNA,在核糖体上通过不依赖帽子结构的机制开始RNA翻译。口蹄疫病毒正链RNA的IRES可与翻译起始因子eIF4G、eIF4B和PTBP等大量的细胞蛋白相互作用。RNA翻译启动后,首先合成一条多聚蛋白链,L蛋白自我催化从多聚蛋白链上裂解下来,然后2A也自我催化从P2蛋白上脱离。

病毒RNA在膜复制复合体内合成,该复合体为含有P2和P3区域编码的非结构蛋白的内质网和高尔基体膜。其中2B、2C定位于复合体外表面,为病毒基因组的复制起始位置,而2C是启动负链RNA合成的必需蛋白。3A是小RNA病毒复合物与内膜结构结合的锚定蛋白;3B的pUpU结构可与基因组RNA的3'端polyA结合,作为病毒RNA复制的引物蛋白;3A和3B可形成稳定的3AB,3AB可与基因组RNA的三叶茎环结构和3D RNA聚合酶结合,并作为3D的辅助蛋白发挥作用。3C蛋白酶能与正链RNA结合,可在病毒感染后期切割宿主翻译起始因子eIF4A,裂解组蛋白H3,抑制宿主细胞的翻译。3D RNA聚合酶在复合体内与正链RNA结合,以VPg为引物,合成负链RNA,再以负链RNA为模板合成正链RNA。

病毒的衣壳包装与成熟是病毒复制的最后一步。P1被3C蛋白酶分解为VP0、VP1和VP3,装配成衣壳,组装成五聚体,然后12个五聚体再装配成病毒衣壳结构。正链RNA进入衣壳形成前病毒粒子,随后前病毒粒子的VP0裂解为VP2和VP4,成为成熟的具有感染力的子代病毒粒子。

2. 持续感染机制

反刍动物自然感染后,主要在上呼吸道咽部的上皮细胞中复制病毒。在口蹄疫形成期间,病毒扩散到全身,在许多上皮组织复制。临床的口蹄疫病毒感染通常在7d内被清除,然而病毒却能储藏在宿主的咽喉部位,形成持续感染。口蹄疫病毒可在牛和绵羊体内形成持续感染,在其咽部软腭可检测到口蹄疫病毒,而不表现临床症状。

口蹄疫病毒衣壳蛋白上的氨基酸突变能够影响病毒抗原性的改变,有利于病毒亚群逃脱宿主免疫系统的清除作用,并在宿主体内建立持续感染。口蹄疫病毒RNA聚合酶在病毒基因组复制过程中会错误掺入 10^{-5} ~ 10^{-3} 左右的核苷酸,并且没有校对机制消除错误掺入的核苷酸。口蹄疫病毒抗原的变异能使病毒种群连续复制和传染,动物机体通过呈递未变异前病毒衣壳而产生的抗体,并不能完全中和新病毒,如果病毒连续变异,感染过程就

会逐步发展,进而形成持续感染。

动物若在口蹄疫病毒感染的急性期未能及时清除病毒,将形成持续性感染,在持续感染部位分泌低水平口蹄疫病毒,并能逃脱宿主的免疫监控系统。口蹄疫病毒在感染细胞后调节 MHC I 类分子的表达,介导关闭宿主细胞的蛋白质合成系统,导致宿主细胞不能提呈病毒肽,不能刺激机体产生免疫应答,进而帮助口蹄疫病毒逃脱宿主的免疫监控。由于宿主体液免疫和细胞免疫功能的损害,减缓体内病毒的清除,这将在感染组织中产生更多的病毒突变株。因而,宿主免疫系统的损伤为口蹄疫病毒的持续感染创造了前提条件。

3. 逃逸宿主天然免疫机制

免疫系统可分为天然免疫和获得性免疫两大类,是机体抵御病原微生物入侵、监视并清除异物和外来病原微生物的重要保护系统。在口蹄疫病毒感染早期,免疫抑制往往具有优势,其主要表现为病毒能在呼吸系统中快速增殖,然后传播到其天然的感染部位。因而,口蹄疫病毒必须突破宿主的第一道防线——天然免疫。

口蹄疫病毒能引起宿主淋巴细胞的减少。口蹄疫病毒的多数病毒株可能引起机体外周血淋巴细胞出现急性短暂的减少,并伴随着严重的病毒血症。此外,严重的病毒血症以及淋巴细胞的减少会导致 T 细胞受到破坏。这类功能缺陷的 T 细胞不能有效增殖,其分泌干扰素的能力也受到抑制,为口蹄疫病毒的快速复制和传播提供机会。

口蹄疫病毒抑制干扰素的产生。宿主树突状细胞是最主要的抗原递呈细胞,在抵抗病原体的天然免疫过程中起着重要作用。浆细胞来源的树突状细胞能够分泌大量 α 干扰素,并在抗口蹄疫免疫血清存在的情况下抵抗病毒的感染。在口蹄疫病毒感染的急性期,外周血中的口蹄疫病毒可抑制骨髓来源的树突状细胞分泌 α 干扰素的能力,在病毒感染 48h 内抑制作用最明显。

口蹄疫病毒破坏自然杀伤细胞的功能。自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞通过细胞应激信号识别被病毒感染的细胞,并且能激发细胞产生毒性。因此,病毒往往通过破坏 NK 细胞应答逃逸宿主的免疫系统。研究表明,口蹄疫病毒的急性感染可导致 NK 细胞的功能紊乱。在口蹄疫病毒感染 2~3d 后,猪 NK 细胞的应答能力明显下降,持续 2~3d 后恢复到正常水平。同时有证据表明,从口蹄疫病毒感染猪中所分离的 NK 细胞不能分泌 $\text{IFN-}\gamma$,这可能是由于口蹄疫病毒破坏 NK 细胞的功能。

口蹄疫病毒蛋白酶参与宿主的免疫抑制。口蹄疫病毒 L 蛋白主要通过阻碍转录起始因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 基因的表达和调节 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的活性、抑制干扰素及 MHC-I 的合成等途径抑制宿主细胞先天性免疫反应和炎症反应。L 蛋白具有裂解翻译起始因子 eIF4G 的功能,使 eIF4G 因子与 eIF4E、eIF4A 和 eIF3 因子相互分离,从而阻断宿主细胞依赖加帽 mRNA 的蛋白翻译,而抑制细胞蛋白合成。L 蛋白还能影响 $\text{IFN-}\beta$ mRNA 的转录。研究表明,3C 蛋白能负调控宿主蛋白的转录以及翻译,从而逃避宿主抗病毒天然免疫。3C 蛋白不仅能切割组蛋白 H3,还能在病毒 RNA 翻译开始减弱时,部分切割诱导翻译起始因子 eIF4A,在口蹄疫病毒感染晚期切割 eIF4G,阻碍宿主细胞转录。此外,口蹄疫病毒的 2B 蛋白和 2C 蛋白以及它们的前体蛋白 2BC 能够利用内质网和高尔基体途径阻止宿主细胞蛋白的交流。

4. 诱导细胞凋亡机制

在病毒感染早期,病毒需要抑制宿主细胞凋亡以完成其复制,生成子代病毒;而在病毒感染后期,又需要宿主细胞凋亡崩解释放子代病毒,使子代病毒扩散感染周围细胞组织。

研究证实,通过重组表达的口蹄疫病毒 VP1 蛋白处理 BHK-21 细胞,可以使 AKT 失活,且可以通过去磷酸化糖原合成激酶,切割 caspase-3、caspase-7 和 caspase-9 前体的方式来促进 BHK-21 细胞凋亡。口蹄疫病毒还能利用 VP1 的“RGD”基序结合细胞表面受体后诱导宿主细胞的凋亡。另外,口蹄疫病毒的 3C 蛋白具有诱导 BHK-21 细胞凋亡的功能,2C 蛋白可与 N-myc 和 STAT 相互作用因子(Nmi)作用,从而诱导细胞发生凋亡。

在经典的凋亡诱导过程中, caspase-3 通过裂解 eIF4G I 和 eIF2A 来抑制宿主的帽子依赖性蛋白的翻译。口蹄疫病毒也采用相似的策略,在感染细胞中 L 蛋白协同细胞内蛋白酶(但不依赖 caspase)抑制宿主细胞的翻译过程,直接或间接地裂解 eIF4G I。因而, L 蛋白在口蹄疫病毒诱导宿主细胞凋亡中发挥重要作用。研究证实, L 蛋白能够诱导牛肾细胞凋亡,并且细胞的凋亡与致病性有关;此外,研究还发现 L 蛋白还阻碍了 α -IFN 的翻译,抑制双链 RNA 依赖蛋白激酶 R(PKR)的合成, α -IFN 可使 FasL 表达增加,通过 Fas/FasL 途径诱导细胞凋亡,而 PKR 不仅可以阻断病毒蛋白的合成,而且还可以通过磷酸化 eIF-2 α 、激活 p53 等通过内源性途径诱发细胞凋亡。

(三) 流行病学

1. 易感动物

口蹄疫可侵害多种动物,偶蹄动物更为易感,其中黄牛、奶牛最易感,其次是牦牛、水牛和猪,再次是绵羊、山羊、骆驼等。黄羊、野羊、野牛、野猪和鹿等野生动物也有发病的报道。一般幼畜较成年家畜易感。

2. 传播途径

口蹄疫传播媒介多样,可通过直接接触、间接接触、气源性传播等。病牛与健康易感牛可通过直接接触而感染;病牛的分泌物、排泄物可造成饲料、草场、水源等污染,通过消化道及受损伤的皮肤黏膜而引起易感动物间接接触而传染;空气也是口蹄疫的重要传播媒介,可发生远距离的气源性传播。

3. 传染源

带毒动物;与病牛或带毒牛直接接触或通过被污染的垫料、地面等间接接触感染;被污染的河流和池塘的水成为重要的传染源;病毒气溶胶。

4. 流行特点

本病不分年龄和季节均可发生,呈散发或地方流行性,牧场呈大规模流行。该病具有周期性,表现为秋冬开始、冬春加剧、春末减缓、夏季平息的规律。

(四) 症状与病理变化

1. 症状

牛口蹄疫病毒感染潜伏期为 2~7d,病牛体温可高达 40~41℃,精神萎靡,食欲减退;流涎,1~2d 后很快就在唇内、齿龈、舌面、颊部黏膜出现水疱,同时或随后蹄趾间、蹄冠部柔软皮肤及乳房皮肤红肿、疼痛、迅速发生水疱;口角大量流涎,呈白色泡沫状,少

食、拒食或反刍停止；水疱经一昼夜破裂形成红色糜烂，之后糜烂逐渐愈合，也可能发生溃疡，愈合后形成瘢痕，体温恢复正常。若病牛管理不当，糜烂部位发生继发性感染化脓、坏死，出现纤维性蛋白坏死性口膜炎、咽炎和胃肠炎等并发症；蹄部疼痛造成站立不稳、跛行甚至蹄壳脱落；乳腺水疱可引起乳腺炎，泌乳量减少，甚至停止泌乳。

犊牛患病时，水疱症状不明显，主要表现为出血性肠炎和心肌麻痹，死亡率高。

本病一般呈良性经过，一周即可痊愈。若蹄部出现病变，病期可延长至2周以上，病死率一般为1%~3%。但在某些情况下，病牛趋向恢复时，可突然恶化，病牛全身虚弱，肌肉震颤，特别是心跳加快、节律失调、食欲废绝、反刍停止，行走摇摆不稳，因病毒侵害心肌，心脏麻痹而突然倒地死亡，被称为恶性口蹄疫，病死率高。

2. 病理变化

良性口蹄疫是最多见的一种病型，多呈良性转归，病畜很少死亡。组织学变化主要表现为皮肤和皮肤型黏膜的棘细胞肿大，变圆而排列疏松，细胞间有浆液性浸出物积聚，随后随病程发展，肿大的棘细胞发生溶解性坏死直至完全溶解，溶解的细胞形成小泡状体或球形体，故称之为泡状溶解或液化。口蹄疫水疱破溃后遗留的糜烂面可经基底层细胞再生而修复。如病变部继发细菌感染，除于感染局部见有化脓性炎症外，还可见肺脏的化脓性炎、蹄深层化脓性炎、骨髓炎、化脓性关节炎及乳腺炎等病变。

恶性口蹄疫病例多由于机体抵抗力弱或病毒致病力强所致的特急性病例，剖检本型病例的主要变化见于心肌和骨骼肌，口蹄水疱病变不明显，口腔多无水疱与糜烂病变，故诊断较困难。成龄动物骨骼肌变化严重，而幼畜则心肌变化明显。心肌主要表现为稍柔软、表面呈灰白、浑浊，于室中隔、心房与心室面散在有灰黄色条纹状与斑点样病灶，好似老虎身上的斑纹，故称“虎斑心”。镜检见心肌纤维肿胀，呈明显的颗粒变性与脂肪变性，严重时呈蜡样坏死并断裂，崩解呈碎片状。病程稍长的病例，在病性肌纤维的间质内可见有不同程度的炎性细胞浸润和成纤维细胞增生，并有钙盐沉着。骨骼肌变化多见于股部、肩胛部、前臂部和颈部肌肉，病变与心肌变化类似，即在肌肉切面可见有灰白色或灰黄色条纹与斑点，具斑纹状外观。镜检见肌纤维变性、坏死，有时也有钙盐沉着。软脑膜呈充血、水肿，脑干与脊髓的灰质与白质常散发点状出血，镜检见神经细胞变性，神经细胞周围水肿，血管周围有淋巴细胞和胶质细胞增生围绕而具“血管套”现象，但噬神经细胞现象较为少见。

(五) 诊断

口蹄疫根据流行病学、临床症状和病理变化特点一般即可做出初步诊断，确诊需进行实验室的病原学诊断，参见口蹄疫诊断技术标准（GB/T 18935—2003）。牛口蹄疫应注意与牛瘟、牛黏膜病、牛恶性卡他热和传染性水泡性口炎鉴别，见附表1。

1. 牛食道一咽部分泌物（O-P液）的病毒检查试验

(1) 样本采集、保存与处理。

①样本采集：被检动物在采样前禁食12h，采样用经2%柠檬酸或2%氢氧化钠浸泡消毒并自来水冲洗的特制探杯。采样时动物站立稳定，操作者左手打开牛口腔，右手握探杯，随吞咽动作将探杯送入食道上部10~15cm处，轻轻来回移动2~3次，然后将探杯拉出。每采完一头动物，探杯都要进行消毒和清洗。

②样本保存：将采集到的8~10ml O-P液倒入容量25ml以上，事先加有8~10ml细胞培养维持液，或0.04mol/L PB (pH值为7.4)的灭菌容器如广口瓶，细胞培养瓶或大试管中。加盖翻口胶塞后充分摇匀。贴上防水标签，并写明样品编号、采集地点、动物种类、时间等，尽快放入装有冰块的冷藏箱内。然后转往-60℃冰箱保存。

③样本处理：先将O-P液样品解冻。在无菌室内将O-P液(1份)倒入100ml灭菌塑料离心管内，再加入不少于该样品1/3体积的三氯三氟乙烷(TTE)。用高速组织匀浆机10 000r/min搅拌3min使其乳化，然后3 000r/min离心10min。将上层水相分装入灭菌小瓶中，作为RT-PCR检测萃取总RNA或分离病毒(接种细胞管)的材料。

(2) 病毒分离培养。

①制备单层细胞：按常规法将仔猪肾(IB-RS-2)或幼仓鼠肾(BHK21)传代细胞分装在25ml培养瓶中，每瓶分装细胞悬液5ml。细胞浓度 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ /ml，37℃静止培养48h。接种样品前挑选已形成单层，细胞形态正常的细胞瓶。

②样品接种：每份样品接种2~4瓶细胞；另设细胞对照2~4瓶。接种样品时，先倒去细胞培养瓶中的营养液，加入1ml已经TTE处理过的O-P液，室温静置30min。然后再加4ml细胞维持液(pH值为7.6~7.8)。细胞对照瓶不接种样品，倒去营养液后加5ml细胞维持液。37℃静止培养48~72h。

③观察和记录：每天观察并记录。如对照细胞单层完好，细胞形态基本正常或稍有衰老，接种O-P液的细胞如出现口蹄疫病毒典型CPE，及时取出并置-30℃冻存。无CPE的细胞瓶观察至72h，全部-30℃冻存，作为第1代细胞/病毒液再作盲传。

④盲传：将第1代细胞/病毒液1ml接种单层细胞培养物，吸附1h加4ml细胞维持液。37℃静止培养48~72h，接种后每天观察1~2次。对上一代出现可疑CPE的样品更要注意观察。记录病变细胞形态和单层脱落程度，及时收集细胞/病毒液以备进行诊断鉴定试验。未出现CPE的观察至72h，置-30℃冻存，作为第2代细胞/病毒液，再作盲传。至少盲传3代。

(3) 结果判定。以接种O-P液样品的细胞出现典型CPE为判定依据。凡出现CPE的样品判定为阳性，无CPE的为阴性。为了进一步确定分离病毒的血清型，将出现CPE的细胞/病毒液作间接夹心ELISA确定血清型。或接种3~4d乳鼠，视乳鼠发病及死亡时间盲传1~3代。再以发病致死乳鼠组织为抗原材料作微量补体结合试验，鉴定病毒的血清型。

2. 液相阻断一酶联免疫吸附试验(LpB-ELISA)

(1) 材料。

①样品采集：无菌采血，每头不少于10ml。自然凝固后无菌分离血清装入灭菌小瓶中，可加适量抗菌素，加盖密封后冷藏保存。每瓶贴标签并写明样品编号、采集地点、动物种类、时间等。

②所需试剂：0.1mol/L PBS、0.04mol/L PBS、50%甘油-PBS、0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$ pH值为9.6(包被缓冲液)、稀释液A、3.3mmol/L OPD(邻苯二胺)、柠檬酸-PB(pH值为5.0)。

③捕获抗体：用不同血清型的口蹄疫病毒146S抗原的兔抗血清，将该血清用pH值为9.6碳酸盐/重碳酸盐缓冲液稀释成最适浓度。

④抗原：用 BHK-21 细胞培养增殖口蹄疫毒株制备，并进行预滴定，以达到某一稀释度，加入等体积稀释剂后，滴定曲线上限大约 1.5，稀释剂为含 0.05% 吐温-20，酚红指示剂的 PBS (PBST)。

⑤检测抗体：豚鼠抗口蹄疫病毒 146S 血清，预先用 NBS (正常牛血清) 阻断，稀释剂为含 0.05% 吐温 20，5% 脱脂奶的 PBS (PBSTM)。将该检测抗体稀释成最适浓度。

⑥酶结合物：兔抗豚鼠 Ig-辣根过氧化物酶 (HRP) 结合物，用 NBS 阻断，用 PBSTM 稀释成最适浓度。

(2) 试验程序。

①包被：ELISA 板每孔用 50 μ l 兔抗病毒血清包被，室温下置湿盒过夜。

②洗涤：用 PBS 液洗板 5 次。

③加被检血清：在另一酶标板中加入 50 μ l 被检血清 (每份血清重复做 2 次) >2 倍连续稀释起始为 1:4。

④加抗原：向被检血清酶标板中加抗原，每孔内加入相应的同型病毒抗原 50 μ l，混合后置 4 $^{\circ}$ C 过夜，或在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h，加入抗原后使血清的起始稀释度为 1:8。将 50 μ l 的血清/抗原混合物转移到兔血清包被的 ELISA 板中，置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。用 PBS 液洗板 5 次。

⑤加抗血清：每孔滴加 50 μ l 同型病毒抗原的豚鼠抗血清，置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。用 PBS 液洗板 5 次。

⑥加酶结合物：每孔加 50 μ l 酶结合物，置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。用 PBS 液洗板 5 次。

⑦加显色底物：每孔加 50 μ l 含 0.05% H_2O_2 (3% 质量浓度) 的邻苯二胺。

⑧加终止液：加 50 μ l 1.25mol/L 硫酸中止反应，15min 后，将板置于分光光度计上，在 492nm 波长条件下读取光吸收值。每次试验时，设立强阳性、弱阳性和 1:32 牛标准血清以及没有血清的稀释剂抗原对照孔，阴性血清对照孔。

(3) 结果判定。抗体滴度以 50% 终滴度表示，即该稀释度 50% 孔的抑制率大于抗原对照孔抑制率均数的 50%。滴度大于 1:40 为阳性，滴度接近 1:40，应用病毒中和试验重检。

(六) 防控措施

新中国成立以来我国曾多次发生口蹄疫，造成巨大的经济损失。我国出台了强制免疫政策，形成了免疫预防为主结合局部扑杀的防控策略。市场上常用的疫苗主要为灭活疫苗，分别为牛口蹄疫 O 型、亚洲 1 型、A 型三价灭活疫苗、牛口蹄疫 O 型-亚洲 1 型二价灭活疫苗及口蹄疫 A 型灭活疫苗，其中牛口蹄疫 O 型、Asia 1 型、A 型三价灭活浓缩疫苗引起的应激反应小，产生较长的免疫期，免疫效果较好。一般口蹄疫疫苗分别于春、秋两季各免疫一次，或按免疫时间免疫，肌肉注射，成年牛 3~5ml/头，犊牛 2ml/头，瘦弱、病牛、临产前 1.5 个月、怀孕初期 (3 个月内)、4 月龄以下的犊牛禁用。近两年发生过口蹄疫的地区实行每年免疫四次，免疫 1 个月后再加强免疫 1 次。

口蹄疫防控的总原则是首先做好预防，规模化牛场要高度重视，做好卫生防疫、生物安全等综合防控措施。牛场的选址要符合动物防疫条件，设计规划合理；开展科学免疫，定期进行抗体水平监测并及时补免；加强疫情监测及预警，建立疫情报告制度；注意引种安全，禁止从疫区进口动物及其产品并加强入境检疫；加强动物饲养管理，提高动物抗病能力；强化病害动物的无害化处理；限制奶牛场人员、运输车辆及用具的流动；健全消毒

卫生制度,强化消毒控制措施,减少病原微生物等各种因素对畜群造成的影响,降低疫病发生风险。

在发现口蹄疫疫情后,首先迅速诊断,上报疫情,划定疫点、疫区,严格封锁疫区。若疫点少、疫情已扩散时,则采用严格封锁疫区、疫点,扑杀病畜及同群牲畜,尸体要进行深埋、焚烧或化制等无害化处理,拔除疫点,消灭疫源,达到扑灭目的。若疫点分布广、疫情已扩散时,则要严格封锁疫区、疫点,扑杀病畜及同群可疑感染牲畜,实行强制免疫、强制检疫、强制封锁、强制扑杀、强制消毒等措施。疫区内各疫点周围及受威胁地区,用疫苗进行环形包围免疫注射,建立免疫带。口蹄疫疫区若解除封锁,必须在疫点和疫区最后一头病畜痊愈后 14d,再无口蹄疫发生时,经上一级畜牧兽医部门检查验收后,并对疫点及周围被污染的场所、栏圈、用具、车辆等物品,进行全面的严格消毒处理,由原发布封锁令的政府宣传解除封锁。

农业部在《关于加快推进动物疫病区域化管理工作的意见》(农医发〔2010〕39号)中,明确了动物疫病区域化管理目标,即用五年时间在全国范围内分区域、分类型、分阶段、分病种对动物疫病实行区域化管理,进行动物疫病区域控制和净化,全面推进无疫区建设。吉林永吉县、辽宁省已经建成口蹄疫无疫区,从而达到有效控制和净化口蹄疫,提高了畜产品质量安全水平,促进了畜产品国际贸易。

(撰写人:王洪梅;校稿人:何洪彬、王洪梅)

二、传染性鼻气管炎

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) 引起的牛的一种急性、热性、接触性传染病,症状以高热、呼吸困难、鼻炎和上呼吸道炎症为主,导致牛流产、肺炎等。病毒的组织嗜性较广,可感染呼吸系统、生殖系统、神经系统、眼结膜和胎儿。由于病毒的急性感染造成机体免疫力低下,可继发细菌感染,延缓育肥牛群的生长和增重,影响成年牛的产奶量及繁殖力,若治疗不及时常常导致死亡。该病在世界范围内流行,给全球养牛业造成重大经济损失。目前,对于 IBR 的防控主要采取两种手段,即疫苗接种和净化。养牛业发达国家主要利用灭活疫苗和减毒疫苗进行免疫预防,并结合净化持续性感染牛的措施有效地控制了 IBR;我国尚没有安全有效的商品化疫苗可以应用,防控形势极为严峻。

(一) 病原

1. 分类

牛传染性鼻气管炎病毒 (Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus, IBRV) 即牛疱疹病毒 1 型 (Bovine Herpesvirus-1, BHV-1) 是疱疹病毒科 (Herpesviridae) 甲疱疹病毒亚科 (Alphaherpesvirinae) 水痘病毒属 (Varicellovirus) 成员。

2. 形态及培养特性

病毒颗粒由内至外依次是核心、衣壳和囊膜 3 部分,直径约 150~220nm。核心由 DNA 与蛋白质缠绕而成,直径介于 30~70nm。衣壳为六角形正二十面体,由 3 层组成,中层和内层是无特定形态的蛋白质薄膜,外层衣壳的形态结构由 162 个互相连接呈放

射状排列且有中空轴孔的壳粒构成,囊膜表面分布有 10 种糖基化蛋白。

本病毒能在多种细胞上培养,如牛肾细胞、牛睾丸细胞、牛胎肾细胞,以及马、猪、羊、兔的肾细胞等细胞上都能生长,并可以使细胞聚团,产生巨核合胞体,出现细胞病变。一般常用牛肾传代细胞(MDBK)来培养本病毒。在 MDBK 细胞上增殖时,病毒能在短时间内迅速吸附到细胞表面,进而侵染细胞,此过程的发生在 2h 内。一般经过 36~48h 即可观察到细胞病变。

3. 生化特性

牛传染性鼻气管炎病毒耐碱而不耐酸,抗冻而不耐热。在 pH 值为 6.9~9.0 的碱性环境下十分稳定,而在 pH 值 6 以下很快就会失活死亡;在 -70℃ 内低温保存,病毒可存活数年,在 4℃ 中,能存活 30~40d,并且感染滴度几乎不发生变化,在 22℃ 里保存 5d 后,其感染滴度就会降低 10 倍;在 37℃ 时,约经 10h 病毒有一半死亡,而在 56℃ 下,21min 即可全部灭活。病毒在 0.5% NaOH、0.01% HgCl₂、1% 漂白粉、1% 酚类数秒即可灭活;在 5% 的甲醛溶液中只需要 1min 即会死亡。不同的毒株对乙醚的敏感性差异很大,但都对氯仿十分敏感。丙酮、酒精或紫外线均可破坏病毒的感染力,可在 24h 内将其完全杀死。

4. 血清学分型

目前,发现牛传染性鼻气管炎病毒只有一个血清型,根据病毒 DNA 核酸内切酶图谱,可将其分为几个亚型: BHV-1.1 (呼吸道亚型)、BHV-1.2 (生殖道亚型),BHV-1.2 又可分为 BHV-1.2a 和 BHV-1.2b。BHV-1.1 亚型是引起牛传染性鼻气管炎的经典病毒,可引起呼吸道型和流产型症状,此亚型病毒曾在欧洲的多个国家及美洲流行。BHV-1.2a 亚型可引起牛传染性鼻气管炎(IBR)、传染性脓疱性外阴阴道炎(IPV)和流产等多种疾病,此亚型病毒曾在巴西大面积流行,后来在欧洲也出现过,但近年来很少出现。BHV-1.2b 亚型也可引起 IBR、IPV,但其致病性比 BHV-1.1 亚型弱。

5. 分子特征

IBRV 基因组属双链线性 DNA 分子,全长 138kbp, G+C 含量高达 72.3%。由一个 106kb 的长独特区(UL)、一个 10kb 的短独特区(US)以及短独特区两端的 11kb 反向重复序列(IRS, TRS)组成,短独特区的正反异构使病毒 DNA 存在两种异构体。IBRV 基因组可编码约 70 个左右的蛋白质,包括 12 种囊膜蛋白,其中 10 种糖蛋白分别是位于 UL 区的 gB、gC、gH、gM、gL、gK 的 6 个糖蛋白和位于 US 区的 gD、gE、gG、gL 4 种糖蛋白,其余 2 种 gN 和 gJ 为非糖基化蛋白。负责病毒的吸附、渗透和在细胞之间扩散的主要糖蛋白是 gB、gC、gD 和 gE。

(二) 致病机制

病毒的糖蛋白在病毒与细胞以及病毒与宿主免疫系统的作用过程中具有重要功能。

由于病毒感染器官的不同而形成各种病型。病毒侵入呼吸道器官后进入上皮细胞,在细胞核内复制,并进入血液。病毒感染细胞一般有以下 3 个过程,首先是病毒通过糖蛋白 gB 和(或) gC 与细胞表面的结构形成低亲和力的结合,然后通过糖蛋白 gD 与细胞表面的特异性受体相结合,特别是 nectin-1 受体。最后病毒囊膜与细胞质膜融合,这一关键的步骤需要 BHV-1 的 4 种糖蛋白 gD、gB、gH 和 gL 形成的异源二聚体。病毒粒子进入细胞质之后,病毒蛋白与细胞动力蛋白复合物和微管共同作用使病毒到达核孔,并将病毒 DNA 释放进细胞