

# 流产奶牛4种病原血清流行病学 调查与分析 ——以廊坊市部分奶牛场为例

付新成

廊坊市农业农村局，河北廊坊 065000

**摘要：** [目的]旨在了解河北省廊坊市部分奶牛场流产奶牛布鲁氏杆菌病、弓形虫病、衣原体和犬新孢子虫病感染现状。 [方法]选取10家奶牛场有流产病史的荷斯坦牛采集血样265份，应用血清学检测方法对4种病原体进行检测。 [结果]布鲁氏杆菌、犬新孢子虫、弓形虫、衣原体的平均阳性率分别为1.13%、3.40%、5.28%和4.53%，最高分别为6.67%、8.70%、9.68%和13.33%。奶牛场阳性率分别为30%、60%、80%和70%。4种病原体总阳性率为14.34%。 [结论]廊坊市奶牛场流产奶牛群体种普遍存在4种流行病，虽然感染率偏低，但应引起重视，进一步强化防控和净化。

**关键词：** 奶牛；布鲁氏杆菌；弓形虫；衣原体；犬新孢子虫；血清学

文章编号：1671-4393 (2023) 08-0080-06

DOI:10.12377/1671-4393.23.08.14

## 0 引言

奶牛流产是指奶牛妊娠期不足28周，母体或者胎儿的生理机能出现异常，或者二者之间的正常关系被破坏，导致妊娠中断<sup>[1]</sup>。奶牛流产是奶牛养殖生产中常见的母牛繁殖障碍表现形式，可以缩短泌乳周期，降低奶牛繁殖性能和泌乳性能，影响牛奶品质，进而导致奶牛养殖经济效益严重损失的疾病。引起奶牛流产的因素较多，除了外界环境应激、遗

传、药物、机械损伤和饲养管理等因素造成奶牛流产外，病原微生物是奶牛流产的主要因素，在临床奶牛流产病例中比例可达90%以上<sup>[2]</sup>，如牛病毒性腹泻、布鲁氏杆菌、犬新孢子虫、沙门菌、弓形虫、衣原体等都是引起奶牛流产常见的病原体<sup>[3~6]</sup>。开展奶牛病原体性流产的血清学监测可以了解奶牛流产致病因素，有助于减少奶牛流产病例的发生，减少奶牛场的经济损失。为了解2021—2022年河北廊坊市奶牛场弓形虫、布鲁氏杆菌、衣原体及犬新孢子虫感染情况，本研究对采集10家奶牛场血清进行上

**作者简介：** 付新成（1978-），男，河北廊坊人，本科，高级兽医师，研究方向为动物疫病防控技术。

述4种病原体血清学调查，以期对弓形虫、布鲁氏杆菌、衣原体及犬新孢子虫流行病净化和综合防控，降低奶牛流产率提供参考。

1 材料与方法

1.1 血清样本

2021—2022年在河北省廊坊市10家奶牛场选取有流产病史的荷斯坦牛（年龄≥3年），使用兽用一次性采血针无菌采集奶牛颈静脉或尾静脉血液，5 mL/头，共265份，编号。4℃静置过夜，3 000 r/min离心10 min，收集上清液，分装在4支灭菌离心管，-20℃保存备检。血清样本来源信息见表1。

表 1 10家奶牛场血清样本采集信息表					
奶牛场 编号	规模 (头)	采样数 (份)	奶牛场 编号	规模 (头)	采样数 (份)
SH	120	27	BZ	250	22
YQ	220	33	XH	340	23
GA	185	15	WA	180	28
DCHE	327	31	DCHA	96	29
GY	386	27	AC	470	30

1.2 主要试剂和仪器

布鲁氏杆菌试管凝集试验（SAT）抗原及阳性血清、阴性血清，衣原体间接血凝试验诊断试剂盒，弓形虫改良凝集试验抗原及阳性血清、阴性血清，中国农业科学院兰州兽医研究所；犬新孢子虫抗体ELISA检测试剂盒，上海科博瑞生物科技有限公司。

高速离心机（型号：CR22N），Eppendorf公司；多功能酶标仪（型号：FK-SY96A），山东方科

仪器有限公司；96孔U型聚苯乙烯反应平板、湿盒、振荡器、微量移液器等由本实验室配置。

1.3 布鲁氏杆菌病检测

参照《GB/T 18646—2018 动物布鲁氏杆菌病诊断技术》<sup>[7]</sup>规定的试管凝集试验微量法进行奶牛布鲁氏杆菌病的诊断。具体步骤为：①：待检血清稀释。在聚苯乙烯反应板上用含0.5%石炭酸的生理盐水将待检血清稀释成浓度分别为1：25、1：50、1：100、1：200。②：添加抗原。按说明书要求分别添加稀释的抗原100 μL，加入上述稀释的待检血清中，振荡混匀，待检血清浓度分别为1：50、1：100、1：200、1：400。③：孵育。塑料薄膜封盖上述各反应孔，湿盒37℃孵育18~24 h。取出观察结果。同时每次试验设阳性、阴性血清和抗原对照。④：结果判定。试验成立前提条件是阳性血清凝集反应程度为“++++”、阴性血清和抗原对照均为“-”。具体判定标准见表2。

1.4 犬新孢子虫病检测

犬新孢子虫病的诊断操作步骤按说明书进行。试剂盒在室温平衡20 min后开始使用，主要包括编号、加样、温育、洗涤、加酶和显色等程序。最后，将空白孔调零，在450 nm波长下测定各孔吸光度值，测定应在添加终止液后10~15 min内完成。在阳性对照孔吸光度平均值≥1.00，且阴性对照孔吸光度平均值≤0.10时，试验成立，计算临界值。临界值=阴性对照孔吸光度平均值+0.15。待检血清吸光度值<临界值者判定为犬新孢子虫抗体阴性，判定为阴性，待检血清吸光度值≥临界值者判定为犬新孢子

表 2 布病试管凝集试验微量法结果判定标准

凝集程度	凝集反应情况	结果判定
++++	第1-4孔菌体完全凝集，凝集物铺于孔底	阳性
+++	菌体几乎完全凝集，其中第1-3孔凝集物铺于孔底，第4孔内呈现白色点状	阳性
++	菌体凝集明显，其中第1-2孔凝集物铺于孔底，第3-4孔内呈现白色点状	阳性
+	菌体凝集有少量沉淀，其中第1孔凝集物铺于孔底，第2-4孔内呈现白色点状	可疑
-	无凝集物产生，各孔内均呈现白色点状	阴性

虫抗体阳性。

1.5 衣原体病检测

参照《NY/T 562—2015 动物衣原体病诊断技术》<sup>[8]</sup>规定的间接血凝试验检测衣原体。①：待检血清稀释。在96孔U型聚苯乙烯反应板上第1~8孔分别添加含1%兔血清的磷酸盐缓冲稀释液（浓度0.15 mol/L，pH 7.2）50 μL，再在第1孔添加50 μL待检血清，混匀，吸取50 μL混合液加入第2孔，以此类推直至第8孔，最后第8孔弃去50 μL，此时第1~8孔待检血清稀释浓度依次为（1：2、1：4…1：256）。同时，每份血清检测试验设置敏化红细胞空白对照、阳性血清（血凝效价1：64）+敏化红细胞对照和阴性血清（血凝效价1：4）+敏化红细胞对照各1孔。②：加抗原。在上述各孔分别添加25 μL的敏化红细胞。③：振荡孵育。将96孔U型反应板放在振荡器上振荡2 min，37 ℃孵育培养2 h后，观察反应情况。④：结果判定。当空白对照孔无自凝、阴性血清对照孔无凝集和阳性血清对照孔完全凝集时，试验成立，方可判定结果。具体判定标准见表3。

1.6 弓形虫病检测

弓形虫血清学检测参考《NY/T 573—2022动物弓形虫病诊断技术》规定的改良凝集试验方法进行。经过对细胞培养的弓形体速殖子的纯化、固定和洗涤得到虫体悬液。在96孔U型反应板上每组第1孔加入抗体稀释液92 μL，其余各孔加入抗体稀释液50 μL，再分别将待检血清8 μL加入每组第1

孔，混匀，吸取混合液50 μL加入第2孔，依次至最后1孔，弃去50 μL。每孔中加入虫体悬液50 μL，混匀，37 ℃孵育16 h。同时设置的标准阳性血清滴度不低于1：200，标准阴性血清除第1孔有前滞现象（+）外，其余各孔均为（-）和稀释液对照孔为（-）外，观察结果。在标准阳性血清抗体滴度不低于1：100，待检血清抗体滴度达到1：25判为阳性。

2 试验数据统计分析

采用SPSS 20统计软件中的卡方检验对试验数据进行统计分析。以 $P<0.05$ 表示差异显著。

3 结果

对10家奶牛场265份血清样本检测4种病原体，共检出38份阳性血清样本，阳性率为14.34%，10家奶牛场均有病原体检出，且部分奶牛场阳性率差异显著（ $P<0.05$ ），见表4。

3.1 布鲁氏杆菌病检测

采用试管凝集试验微量法进行奶牛布鲁氏杆菌病对265份血清样本检测，有3份布鲁氏杆菌阳性样品，阳性率为1.13%。编号为GA、BZ、WA奶牛场检出布鲁氏杆菌，阳性率分别为6.67%、4.55%和3.57%，其余奶牛场均未检出布鲁氏杆菌。阳性奶牛场占比30%（3/10）。经统计，不同养殖场奶牛布鲁氏杆菌病的阳性率差异不显著（ $P$

表 3 衣原体间接血凝试验判定标准

凝集程度	凝集反应情况	结果判定
++++	红细胞完全凝集	阳性
+++	75% 红细胞凝集，孔底可见红细胞形成针尖大的圆点	阳性
++	50% 红细胞凝集，孔底可见红细胞形成大的圆点，且圆点周围薄膜边缘不规则	且血凝效价≥1：64 者为阳性； 血凝效价≤1：16 者为阴性，介于两者之间者为可疑。
+	25% 红细胞凝集，孔底可见红细胞形成较大的圆点	
±	孔底可见红细胞，且红细胞周围粗糙或者圆点中心有数量不等的空斑。	可疑
-	孔底可见光滑的红细胞大圆点	阴性

>0.05)。见表4。

3.2 犬新孢子虫病检测

采用犬新孢子虫抗体ELISA试剂盒检测，结果显示，265 份血清样本中检出阳性样本9 份，阳性率为3.40%。编号XH奶牛场阳性率最高，为8.70%，编号GA、GY、BZ、DCHA奶牛场未检出犬新孢子虫。阳性奶牛场占比60%（6/10）。经统计，不同养殖场奶牛犬新孢子虫的阳性率有显著差异（ $P<0.05$ ），见表4。

3.3 衣原体病检测

采用间接血凝试验检测衣原体，结果显示，265 份血清样本中检出阳性样本12 份，阳性率为4.53%。编号GA奶牛场阳性率最高，为13.33%，仅有编号BZ、WA、DCHA奶牛场未检出衣原体。阳性奶牛场占比70%（7/10）。经统计，GA场与其他阳性场奶牛衣原体的阳性率有显著差异（ $P<0.05$ ），见表4。

3.4 弓形虫病检测

改良凝集试验方法对弓形虫病检测，结果显示，265 份血清样本中检出阳性样本14 份，阳性率为5.28%。编号SH奶牛场阳性率最高，为11.11%，仅有2 家奶牛场未检出弓形虫。阳性奶牛场占比80%（8/10）。经统计，SH、YQ、DCHE场与

其他阳性场奶牛弓形虫的阳性率有显著差异（ $P<0.05$ ），见表4。

4 讨论

布鲁氏杆菌病是由布鲁氏杆菌引起的一种人兽共患细菌性传染病，奶牛感染后可导致母牛乳房炎、产奶量降低、流产和不孕，公牛生殖器官炎症或关节炎<sup>[10, 11]</sup>，对奶牛生产性能和繁殖性能造成重大负面影响。该病常规采用虎红平板凝集试验（RBPT）、标准凝集试验（SAT）和间接酶联免疫吸附试验（I-ELISA）3种血清学技术进行诊断<sup>[12]</sup>。本研究采用了GB/T 18646—2018<sup>[7]</sup>中规定的试管凝集试验对265 份血清样本进行4 种病原体检测，结果显示，布鲁氏杆菌阳性率为1.13%。Ran等<sup>[13]</sup>检索了2008—2018年期间收集的与中国奶牛布鲁氏杆菌病血清流行率相关的88 项研究，通过系统回顾和Meta分析，结果显示，在选定时期内，中国奶牛群中布鲁氏杆菌病的总体血清阳性率为1.9%，从2008—2012年的1.6%上升到2013—2018年的2.6 %。本研究结果表明，廊坊市奶牛布鲁氏杆菌血清阳性率低于我国奶牛群中布鲁氏杆菌病的总体血清阳性率。这与当地多年来加强布鲁氏杆菌病检测和净化防控措施落实以及奶牛场对布鲁氏杆菌病防控意识的提高密切相关，但研究结果也表明，部分

表 4 10 家奶牛场流产奶牛 4 种病原体检测结果 单位：%

奶牛场编号	布鲁氏杆菌	犬新孢子虫	弓形虫	衣原体	总阳性率
SH	0.00（0/27）	3.70（1/27）	11.11（3/27）	7.41（2/27）	22.22（6/27）
YQ	0.00（0/33）	6.06（2/33）	9.09（3/33）	9.09（3/33）	24.24（8/33）
GA	6.67（1/15）	0.00（0/15）	0.00（0/15）	13.33（2/15）	20.00（3/15）
DCHE	0.00（0/31）	3.23（1/31）	9.68（3/31）	3.23（1/31）	16.13（5/31）
GY	0.00（0/27）	0.00（0/27）	0.00（0/27）	3.70（1/27）	3.70（1/27）
BZ	4.55（1/22）	0.00（0/22）	4.55（1/22）	0.00（0/22）	9.09（2/22）
XH	0.00（0/23）	8.70（2/23）	4.35（1/23）	8.70（2/23）	21.74（5/23）
WA	3.57（1/28）	7.14（2/28）	3.57（1/28）	0.00（0/28）	14.29（4/28）
DCHA	0.00（0/29）	0.00（0/29）	3.45（1/29）	0.00（0/29）	3.45（1/29）
AC	0.00（0/30）	3.33（1/30）	3.33（1/30）	3.33（1/30）	10.00（3/30）
合计	1.13（3/265）	3.40（9/265）	5.28（14/265）	4.53（12/265）	14.34（38/265）



奶牛场阳性率偏高，廊坊市布病流行情况不容忽视，应进一步加强开展净化和检测。

奶牛犬新孢子虫病是由犬新孢子虫引起的寄生虫病，主要引起孕畜繁殖障碍（比如流产、死胎、不孕等）以及新生犊牛运动神经障碍等，目前世界有30多个国家报道了奶牛犬新孢子虫病发生，给奶牛养殖业造成严重的经济损失<sup>[14]</sup>。犬新孢子虫病最初是在1980年代发现的，此后已被确定为牛的一种地方病和流产的一个重要原因。犬新孢子虫是一种专性的、细胞内的原生动物寄生虫，依靠温血动物为中间宿主和犬为终末宿主来完成其生命周期。新孢子虫感染使牛流产的几率是健康动物的3~13倍。疾病传播既可以水平传播，也可以垂直传播<sup>[15, 16]</sup>。本研究结果显示，廊坊市部分奶牛场中犬新孢子虫病的总阳性率为3.40%，低于叶勇刚等<sup>[2]</sup>和王军等<sup>[14]</sup>分别报道的7.78%和14.44%。调查发现，犬新孢子虫病阳性奶牛场都有饲养犬、猫的现象，而未检出犬新孢子虫奶牛场均无宠物饲养，这可能是阳性奶牛场发病的主要原因。因此，应禁止饲养犬、猫等宠物，避免病原体在奶群中传播。

弓形虫是一种引起弓形虫病的原虫寄生虫。弓形虫病是由细胞内寄生原虫弓形虫感染引起的一种世界范围内的人畜共患传染病，在世界范围内均有发生，被认为是最重要的食源性寄生虫病之一。各年龄阶段奶牛均可感染弓形虫，临床表现为机体消瘦，体温升高，妊娠母畜流产，重症者体表淋巴结肿大，呼吸困难，甚至死亡。Ma等<sup>[17]</sup>采用酶联免疫吸附试验（ELISA）对河北省3个地区723份奶牛血清进行检测，结果显示，弓形虫抗体阳性率为19.92%。Jia等<sup>[18]</sup>采用弓形虫间接酶联免疫吸附试验对山西省11个行政市采集的978份牛血样进行弓形虫抗体检测，结果显示306份检测到弓形虫抗体，阳性率为31.28%。本研究结果显示，弓形虫阳性率为5.28%，阳性奶牛场占比80%，表明尽管奶牛个体感染率偏低，但是流行广泛。由于猫是弓形虫的终末宿主，奶牛场饲养猫会增加奶牛感染率，本次研究也证实了这一点，凡是弓形虫感染率高的奶牛场均存

在饲养猫或经常有猫在场内活动。此外，有文献报道，患弓形虫病奶牛的奶、毛等是弓形虫病是传染源之一<sup>[19]</sup>。研究结果提示，奶牛场应采取消毒防疫、杜绝猫科动物进场、患牛治疗等综合防控措施。

衣原体属于衣原体科衣原体属，是严格的寄生于真核细胞内的革兰氏阴性病原体，主要侵害感染动物的单核细胞、巨噬细胞和上皮细胞<sup>[20]</sup>。衣原体可导致感染母牛乳房炎、流产、肺炎、关节炎、泌乳牛产奶量下降和公牛睾丸炎。目前衣原体检测方法较多，间接血凝试验（IHA）具有灵敏度高、特异性强、操作简便、结果判定直观等特点，适合基层大批量检测，商品化检测试剂盒已得到广泛应用，但也存在出现假阳性、重复性差等缺点。本研究采用IHA方法对265份血清样本检测，阳性率为4.53%，场阳性率达70%，表明衣原体已成为奶牛场常见的流行病。年龄、牛群规模、消毒措施的应用和流产或死胎史与流产衣原体感染显著相关<sup>[21]</sup>。重点关注4岁以上奶牛及具有死胎史和流产史奶牛<sup>[21]</sup>。除此之外，淘汰阳性牛，疫苗接种都是有效应对衣原体病流行的关键措施。

## 5 小结

布鲁氏杆菌病、犬新孢子虫病、弓形虫病和衣原体病是奶牛场常见传染病，严重影响奶牛健康和乳品质量安全。本研究结果显示，廊坊市受检的10家奶牛场均存在上述4种传染病，布鲁氏杆菌、犬新孢子虫、弓形虫、衣原体的平均阳性率分别为1.13%、3.40%、5.28%和4.53%，表明加强疫病防控刻不容缓。C

### 参考文献

- [1] 邓丽.奶牛流产的病因、治疗和预防措施[J].现代畜牧科技, 2019, 56(8): 138-139.
- [2] 叶勇刚, 肖璐, 康润敏, 等.四川部分地区4种致奶牛流产病原的血清学调查与分析[J].黑龙江畜牧兽医, 2020(12): 73-76.
- [3] 邢保平.安阳市殷都区流产奶牛弓形虫病血清学调查[J].中国乳业, 2019, 211(7): 55-56.

- [4] 翟凯, 钱伟锋, 王天奇, 等. 河南洛阳地区流产奶牛感染性病原的分子检测[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51 (11): 16-19, 22.
- [5] 娄立稳. 引起奶牛流产的传染性因素与防控措施[J]. 当代畜牧, 2021, 476 (10): 55-56.
- [6] 王艾晶, 曹聚欣. 延庆区奶牛常见流产相关疫病的防治[J]. 中国畜牧业, 2022, 610 (19): 101-102.
- [7] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 18646-2018 动物布鲁氏菌病诊断技术[S].
- [8] 农业部. NY/T 562-2015 动物衣原体病诊断技术[S].
- [9] 农业农村部. NY/T 573-2022 动物弓形虫病诊断技术[S].
- [10] 吴心华, 张鑫, 郭启勇, 等. 布鲁氏菌导致奶牛流产的防控措施[J]. 中国乳业, 2020, 217 (1): 62-67.
- [11] 齐姗姗. 乌鲁木齐县奶牛布鲁氏菌病流行病学调查[J]. 草食家畜, 2019 (5): 33-37.
- [12] Saeed A, Karim A, Akram B, et al. Evaluation of serological diagnostic tests for bovine brucellosis in dairy cattle herds in an endemic area: A multicenter study[J]. Tropical Animal Health and Production, 2023, 55 (2): 104.
- [13] Ran X H, Cheng J J, Wang M M, et al. Brucellosis seroprevalence in dairy cattle in China during 2008-2018: A systematic review and meta-analysis[J]. Acta Tropica, 2019, 189: 117-123.
- [14] 王军, 皇甫和平, 石冬梅, 等. 河南省部分奶牛场新孢子虫血清抗体检测[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53 (5): 47-48.
- [15] Lucy J. Neospora in UK cattle[J]. Livestock, 2023, 28 (1): 13-18.
- [16] Nazari N, Khodayari M T, Hamzavi Y, et al. Systematic review and meta-analysis of role of felids as intermediate hosts in the life cycle of neospora caninum based on serological data[J]. Acta Parasitol, 2023, 68 (1): 266-276.
- [17] Ma L, Li S, Zhang Y B, et al. Seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum in dairy cows in Hebei province, China[J]. Animal biotechnology, 2020, 32 (4): 1-3.
- [18] Jia T, Zhang T H, Yu L M, et al. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in sheep and cattle in Shanxi Province, North China[J]. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 2023, 43: 100897.
- [19] 蒋业慧, 王正荣, 张艳艳, 等. 北疆部分地区奶牛弓形虫血清学调查[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51 (9): 56-57.
- [20] 谭启东, 李知新, 王晓亮, 等. 甘肃、宁夏地区奶牛衣原体血清流行病学调查及风险因素分析[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42 (5): 1283-1287.
- [21] Mohamed M, Abdelrahman M H, Mahmoud K, et al. Serosurvey and associated risk factors for Chlamydia abortus infection in cattle from Egypt[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2023, 96.

## Seroepidemiological Investigation and Analysis of Four Pathogens of Aborted Cows

### —Take some dairy farms of Langfang City as examples

FU Xincheng

Langfang Agricultural and Rural Bureau, Langfang Hebei 065000

**Abstract:** [Objective] The purpose of this study was to understand the infection status of *Brucellosis*, *Toxoplasmosis*, *Chlamydia* and *Neosporidiosis* in aborted cows in some dairy farms in Langfang City. [Method] Select 265 blood samples from Holstein cows with a history of miscarriage in 10 dairy farms, and use serological testing methods to detect four pathogens. [Result] The results showed that the average positive rates of *Brucella*, *Neosporidium canis*, *Toxoplasma gondii* and *Chlamydia* were 1.13%, 3.40%, 5.28% and 4.53%, respectively, and the highest positive rates were 6.67%, 8.70%, 9.68% and 13.33%, respectively. The field positive rates were 30%, 60%, 80%, and 70%, respectively. The total positive rate of the four pathogens was 14.34%. [Conclusion] The research shows that there are four kinds of epidemic diseases among aborted dairy cows in Langfang Dairy Farm. Although the infection rate is low, attention should be paid to further strengthen prevention and control and purification.

**Keywords:** cows; *Brucella*; *Toxoplasma gondii*; *Chlamydia*; *Neosporidium canis*; serology