

何艳飞,覃城皇,徐肖文,等.致犊牛腹泻常见病毒的检测及风险因素分析[J].华中农业大学学报,2025,44(1):174-182.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.01.019

致犊牛腹泻常见病毒的检测及风险因素分析

何艳飞^{1,2},覃城皇^{1,2},徐肖文^{1,2},冼茵儿^{1,2},
项志杰^{1,2},陈颖钰^{1,2,3},郭爱珍^{1,2,3}

1. 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室/华中农业大学动物科学技术学院、动物医学院,武汉 430070;
2. 生猪健康养殖协同创新中心/湖北省兽医流行病学国际科技合作基地,武汉 430070;
3. 湖北洪山实验室,武汉 430070

摘要 为了解犊牛腹泻主要病毒的流行现状和优势毒株,2021年11月至2023年10月间,运用RT-PCR技术对来自湖北、湖南、河南、广西、贵州、甘肃、山东和内蒙古等地41个牧场的264头腹泻犊牛的264份样品(58份肛拭子、15份肠组织和191份粪便)进行了牛轮状病毒(bovine rotavirus, BRV)、牛冠状病毒(bovine coronavirus, BCoV)、牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)的检测,进一步对以上3种病毒在不同地区、年龄、季节和品种的分布进行了分析。结果显示,BRV、BCoV和BVDV的个体阳性检出率分别为14.02%(95% CI: 8.44~16.68)、10.23%(95% CI: 6.85~14.53)和12.12%(95% CI: 10.06~18.80),78.05%(95% CI: 62.39~89.44)的牧场为犊牛腹泻病毒阳性场,29.27%(95% CI: 16.13~45.54)的牧场存在有混合感染,BRV与BCoV是最为常见的混合感染组合,检出率为3.42%(95% CI: 1.32~5.88)。BRV在我国北方地区、冬季和≤5周龄的犊牛中检出率较高,BCoV在我国北方地区和夏冬季节检出率高,而BVDV在各地区、年龄、品种等方面,检出率无显著差异。结果表明3种病毒在我国11个省份地区的41个牧场的腹泻犊牛中普遍存在,BRV和BCoV是导致犊牛腹泻的主要病毒,并且其流行情况受到地区、季节和年龄的影响,这提示在防控措施中应该考虑这些因素。

关键词 犊牛腹泻; BRV; BCoV; BVDV; 检测; 风险因素分析

中图分类号 S858.23 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)01-0174-09

犊牛腹泻是一种由环境因素和病原(细菌、寄生虫和病毒)共同作用所致的疾病,被认为是给养牛业造成最大经济损失的疾病之一^[1],严重影响着犊牛的健康。研究显示,美国南部奶牛场新生犊牛腹泻的发病率和死亡率分别为80%和20%^[2]。2017年日本的1项年度报告称因犊牛腹泻造成的经济损失约为10亿日元^[3]。在韩国本土肉牛和奶牛中,犊牛腹泻分别导致68.7%和43.6%的死亡率^[4]。随着我国养牛业的迅速发展,牛只的南北调运日益频繁,犊牛腹泻已成为制约行业健康发展的重要因素之一。

在致犊牛腹泻病原中,病毒性病原主要包括牛轮状病毒(bovine rotavirus, BRV)、牛冠状病毒(bovine coronavirus, BCoV)和牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)。有研究显示BRV在全球的流行率约为33.7%^[5],BCoV在欧洲国家的

流行率为2.80%~46.74%^[6],BVDV的抗原流行率高达15.74%,且在世界范围内广泛存在^[7]。我国的几项分析结果显示,BRV、BCoV和BVDV的流行率在30.8%~53.0%^[6,8-9]。这3种病毒存在易变异、传播速度快、难以治疗和混合感染严重等特点^[10]。国内有关致这3种犊牛腹泻病毒的监测数据十分有限,且现有研究多集中在北方地区,有关南方地区腹泻犊牛中重要病毒流行现状的研究很少。

本研究自2021年11月至2023年10月间,运用RT-PCR技术对来自全国8个省份41个牧场的腹泻犊牛样品进行BRV、BCoV和BVDV这3种病毒的检测,并进一步分析以上3种病毒在不同地区、年龄、季节和品种的分布,确定我国部分地区腹泻犊牛中BRV、BCoV和BVDV的感染现状及可能的风险因素,以为犊牛腹泻的精准防控提供重要的流行病

收稿日期: 2024-01-15

基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划项目(2021BEF02028);国家现代农业产业技术体系专项(CARS-37)

何艳飞, E-mail: heyafei@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 郭爱珍, E-mail: aizhen@mail.hzau.edu.cn

学基础参考。

1 材料与方法

1.1 样本来源

2021年11月至2023年10月间收集来自湖北、湖南、河南、广西、贵州、甘肃、山东和内蒙古等地的41个牧场的264头腹泻犊牛的264份样品(58份肛拭子、15份肠组织和191份粪便),每头牛取1个样品。具体分布和数量如表1所示。

表1 样品地区分布情况

Table 1 Regional distribution of samples

省份 Provinces	牧场数量 Number of ranches	样品数量/份 Number of samples
湖北 Hubei	17	111
甘肃 Gansu	5	38
湖南 Hunan	6	34
河南 Henan	3	27
贵州 Guizhou	2	16
山东 Shandong	2	14
浙江 Zhejiang	1	9
青海 Qinghai	2	4
河北 Hebei	1	3
内蒙古 Inner Mongolia	1	3
安徽 Anhui	1	2

1.2 材料和试剂

Virus DNA/RNA Extraction Kit FT 2.0 和反转录试剂盒 HiScript II Q RT Super Mix for qPCR 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。1.1×T3 Super PCR Mix、DNA Marker、TS-GelRed 核酸凝胶染料购自北京擎科生物科技股份有限公司。引物由北京擎科生物科技发展有限公司合成。

1.3 样品处理

1) 粪便样品。使用棉签取5~6 g 粪便样品,加入3倍体积的生理盐水充分振荡混匀,8 000 r/min 离心10 min 后吸取上清液,反复冻融后保存于-80 °C 冰箱,备用。

2) 肛拭子样品。在肛拭子样品加入约3倍体积的生理盐水充分振荡混匀,8 000 r/min 离心10 min 后吸取上清液,反复冻融后保存于-80 °C 冰箱,备用。

3) 组织样品。取有病变的组织(5 mm×5 mm 左右),使用无菌剪刀在2 mL 微量离心管中剪碎组织,加入无菌的研磨珠,使用匀浆机研磨,10 000 r/min 离心5 min,吸取上清液,反复冻融后保存于-80 °C 冰箱,备用。

1.4 核酸检测

取冻融后的上清液,按照DNA/RNA快速提取试剂盒使用说明书提取样本RNA并利用逆转录试剂盒 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper) 逆转录为cDNA,存放于-20 °C 冰箱备用。PCR以处理好的样本为模板进行BRV、BVDV 和BCoV的检测。本研究所用引物和目的片段大小如表2所示。BVDV和BRV采用PCR进行检测,反应条件分别为:98 °C 2 min;98 °C 10 s,退火温度分别为59.3 °C (BVDV)/55.4 °C (BRV) 12 s,72 °C 15 s,35个循环;72 °C 5 min。

BCoV采用巢式PCR进行检测,首轮反应条件为:98 °C 2 min;98 °C 10 s,50.3 °C 10 s;72 °C 15 s,35个循环;72 °C 5 min。取第1轮的产物作为模板进行第2轮PCR程序,98 °C 2 min;98 °C 10 s,49.3 °C 10 s;72 °C 15 s,35个循环;72 °C 5 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,大小正确的阳性条带送北京擎科生物公司测序,得到的序列利用NCBI网站的Blast功能进行比对。

表2 引物信息和序列

Table 2 Primer information and sequences

病毒 Virus (目的基因 Target gene)	引物 Primer	序列(5'-3') Sequences	长度/ bp Size	文献 Reference
BVDV (5'UTR)	F	GCCATGCCCTTAG- TAGGACTAGC	290	[11]
	R	CAACTCCATGTGC- CATGTACAGC		
BRV (VP6)	F	ACCACCAAATAT- GACACCAGC	294	[12]
	R	CATGCTTCTAATG- GAAGCCAC		
BCoV (S)	F	CTATACCCAATGG- TAGGA	885	[13]
	R	CTGAAACACGACC- GCTAT		
	F	GTTTCTGTTAG- CAGGTTTAA	488	
	R	ATATTA- CACCTATCCCCTTG		

1.5 风险因素分析

通过前期对犊牛信息的处理和筛选,选择犊牛年龄、季节、地区和品种作为风险因素,探究这4种因素与3种病毒的阳性检出率的关联。此外,为有效指导临床样本采集及监测,对不同类型的样本也进行了分析研究。采用卡方检验对年龄、季节、地区和品种等影响因素做单因素分析, $P < 0.05$,表示差异具

有统计学意义,采用广泛应用的Logistic回归分析方法对差异显著的风险因素进行二元Logistic回归分析^[14],判定各风险因素的影响程度。

2 结果与分析

2.1 腹泻犊牛信息统计

对收集的264头腹泻犊牛的品种、收集季节、收集地区、年龄和样本类型进行统计。在本研究中,基于样本数量匹配的原则,将年龄依照≤5周龄和>5周龄进行分类,季节按照春季(3—5月)、夏季(6—8月)、秋季(9—11月)和冬季(12、1和2月)分类,而牛的品种划分为肉牛(西门塔尔牛、安格斯牛和本土肉牛)和奶牛(荷斯坦牛),样品的地区以秦岭淮河为分界线被划分为南方和北方,此外将粪便作为1个类型,肠组织和肛拭子合并为1个类型(表3)。

2.2 BRV、BCoV和BVDV的阳性检出率

利用RT-PCR对264份临床样品进行检测,PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,大小正确的条带送公司测序,得到的所有BRV、BCoV和BVDV的序列,大小分别在294、488和290 bp左右,得到的序列利用NCBI网站的Blast功能进行比对,均为对应的病毒(图1)。其中检测到任意一种病毒的牧场被定义为阳性牧场。结果显示,78.05%(95% CI:62.39~89.44)的牧场为阳性牧场,个体水平上,BRV、BCoV和BVDV的阳性检出率分别为14.02%(95% CI:8.44~16.68)、10.23%(95% CI:6.85~14.53)和

表3 腹泻犊牛信息分布

Table 3 Distribution of information on diarrhea calves

腹泻犊牛信息 Diarrhea calf information		占比/% Percentage
周龄 Weeks of age	≤5	40.32(102/253)
	>5	59.68(151/253)
季节 Season	春季 Spring	24.24(64/264)
	夏季 Summer	24.24(64/264)
	秋季 Autumn	17.80(47/264)
	冬季 Winter	33.71(89/264)
品种 Species	肉牛 Beef cattle	70.75(179/253)
	奶牛 Dairy cattle	29.25(74/253)
地区 Area	南方 South	65.13(170/261)
	北方 North	34.87(91/261)
样品类型 Sam- ple type	粪便 Stool	66.29(175/264)
	肛肠拭子 Anorectal swab	33.71(89/264)

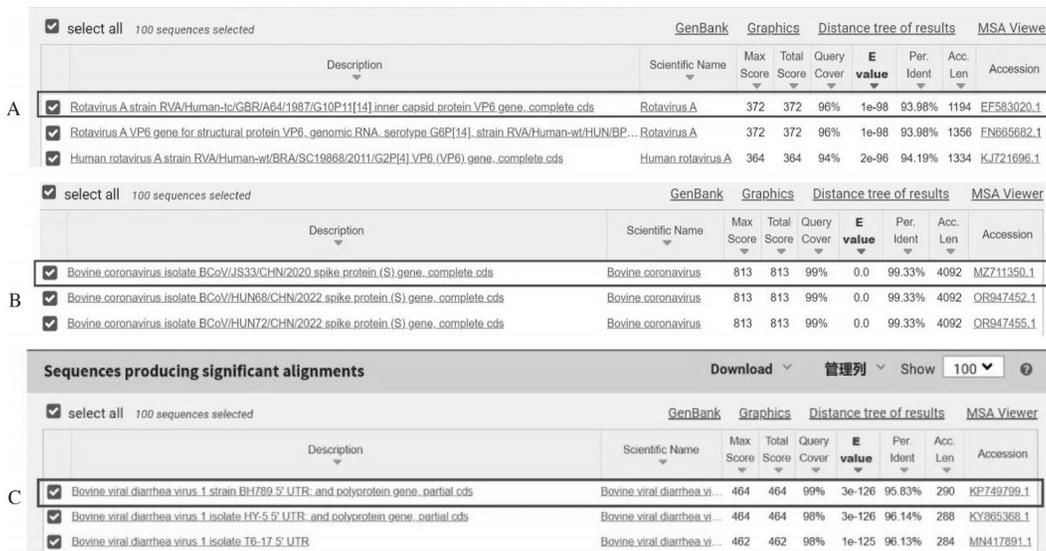
12.12%(95% CI:10.06~18.80),且这3种病毒的阳性检出率无显著差异($P>0.05$)(表4)。

表4 BRV、BCoV和BVDV的阳性检出率

Table 4 Positivity rate of BRV, BCoV and BVDV

病原 Pathogens	阳性检出率/% Positivity rate	95% CI
BRV	14.02(37/264)	10.1~18.8
BCoV	10.23(27/264)	6.8~14.5
BVDV	12.12(32/264)	8.4~16.7

进一步对多病毒混合感染情况进行了分析,结果发现最为常见的病毒感染组合为BRV与BCoV,阳性检出率最高3.03%(95% CI:1.32~5.88),而BRV与BVDV和BCoV与BVDV阳性检出率分别



黑色框表示同源性最高的序列。Black box indicates the sequence with the highest homology.

图1 BRV(A)、BCoV(B)和BVDV(C)的部分序列比对结果

Fig. 1 Partial sequence alignment results of BRV(A), BCoV(B) and BVDV(C)

为0.38% (95% CI: 0.01~2.09) 和0.76% (95% CI: 0.09~2.71), 具体信息如表5所示。

表5 病毒混合感染类型和混合感染率

Table 5 Types of viral co-infections and co-infection rates

病原 Pathogens	阳性检出率/% Positivity rate	95% CI
BRV+BCoV	3.03(8/264)	1.32~5.88
BRV+BVDV	0.38(1/264)	0.01~2.09
BCoV+BVDV	0.76(2/264)	0.09~2.71

2.3 不同年龄与犊牛感染BRV、BCoV和BVDV的关联

在264份犊牛样品中, 11份无年龄信息, 因此在进行年龄分析时将其剔除。由表6和表7可知, 余下的253头腹泻犊牛中, ≤5周龄犊牛中, BRV的阳性检出率达到了25.49% (95% CI: 17.38~35.08), 显著高于>5周龄的犊牛 ($P < 0.05$)。≤5周龄的腹泻犊牛感染BRV的风险是>5周龄腹泻犊牛的4.35倍 (OR=4.35, 95% CI: 2.04~9.29)。而在≤5周龄犊牛中, BCoV的阳性检出率是12.75% (95% CI: 6.96~20.81), 高出>5周龄的犊牛的阳性检出率9.27% (95% CI: 5.16~15.07)。BVDV在>5周龄的犊牛的阳性检出率为14.57% (95% CI: 9.36~

21.22), 高于≤5周龄犊牛的阳性检出率。BCoV与BVDV在>5周龄与≤5周龄的犊牛中阳性检出率无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.4 不同季节与犊牛感染BRV、BCoV和BVDV的关联

从表8和表9可以看出, BRV在四季都有检出, 其中在冬季的阳性检出率最高为23.60% (95% CI: 15.24~33.78), 最低是在秋季, 也高达8.51% (95% CI: 2.37~20.38), 在春、夏季的阳性检出率相同。此外, 犊牛感染BRV的风险在不同季节差异显著 ($P < 0.05$), 在冬季犊牛感染BRV的风险分别是春季、夏季和秋季的2.99、2.99和3.32倍 (OR=3.32, 95% CI: 1.07~10.33)。BCoV在夏季的阳性检出率最高, 为14.06% (95% CI: 5.16~15.07), 在其他季节的阳性检出率为6.38%~13.48% (95% CI: 0.98~22.37), 不同季节对这3种病毒无显著影响差异 ($P > 0.05$)。BVDV在四季的检出率为10.11%~14.06% (95% CI: 4.73~25.74), 每个季节阳性检出率差异不显著 ($P > 0.05$)。以上结果表明, 相对于其他季节, 冬季BRV发生的频率更高, 其他病毒在不同季节流行情况均无显著差异。

表6 不同周龄腹泻犊牛3种病毒阳性检出率

Table 6 Positivity rate of the 3 viruses in diarrhea calves at different weeks of age

周龄 Weeks of age	BRV		BCoV		BVDV	
	阳性率/% Positivity rate	95% CI	阳性率/% Positivity rate	95% CI	阳性率/% Positivity	95% CI
	≤5	25.49(26/102)	17.38~35.08	12.75(13/102)	6.96~20.81	6.86(7/102)
>5	7.28(11/151)	3.69~12.66	9.27(14/151)	5.16~15.07	14.57(22/151)	2.80~13.63

表7 周龄与3种病毒阳性检出率卡方检验的P值和相关系数比值(OR)

Table 7 The P values and correlation coefficient ratios (OR) of the chi-square test for weeks of age and positivity rate of the 3 viruses

周龄 Weeks of age	BRV			BCoV			BVDV		
	P值 P value	OR	95% CI	P值 P value	OR	95% CI	P值 P value	OR	95% CI
≤5		4.35	2.04~9.29		1.43	0.64~3.18		0.43	0.18~1.05
>5	<0.001	1.00	0.11~0.49	0.059	1.00	0.31~1.56	0.380	1.00	0.95~5.64

表8 不同季节腹泻犊牛3种病毒的阳性检出率

Table 8 Positivity rate of the 3 viruses in diarrhea calves in different seasons

季节 Season	BRV		BCoV		BVDV	
	阳性率/% Positivity rate	95% CI	阳性率/% Positivity rate	95% CI	阳性率/% Positivity rate	95% CI
春季 Spring	9.38(6/64)	3.52~19.30	4.69(3/64)	0.98~13.09	12.50(8/64)	5.55~23.15
夏季 Summer	9.38(6/64)	3.52~19.30	14.06(9/64)	6.64~25.02	14.06(9/64)	6.64~25.02
秋季 Autumn	8.51(4/47)	2.37~20.38	6.38(3/47)	1.34~17.54	12.77(6/47)	4.83~25.74
冬季 Winter	23.60(21/89)	15.24~33.78	13.48(12/89)	7.17~22.37	10.11(9/89)	4.73~18.33

表9 季节与3种病毒阳性检出率卡方检验的P值和相关系数比值(OR)

Table 9 P values and correlation coefficient ratios of the chi-square test for season and positivity rate of the 3 viruses

季节 Season	BRV			BCoV			BVDV		
	P值 P value	OR	95% CI	P值 P value	OR	95% CI	P值 P value	OR	95% CI
春季 Spring	0.017	1.11	0.30~4.18	0.176	1.00	0.19~5.15	0.899	1.27	0.46~3.49
夏季 Summer		1.11	0.30~4.18		3.33	0.86~12.92		1.45	0.54~3.90
秋季 Autumn		1.00	0.23~4.26		1.39	0.27~7.19		1.30	0.43~3.91
冬季 Winter		3.32	1.07~10.33		3.09	0.83~11.43		1.00	0.38~2.65

2.5 不同地区与犊牛感染BRV、BCoV和BVDV的关联

基于样本数量匹配的原则以及剔除未知地区来源的3份样品,将261份样品来源地区按照秦岭淮河分界线划分为南方地区和北方地区。表10和表11的结果显示,BRV在北方地区的阳性检出率为24.18%(95% CI: 15.81~34.28),远高于南方地区的阳性检出率8.82%(95% CI: 5.02~14.14),在南北两地区犊牛中BRV检出率差异显著($P < 0.05$),在北方地区犊牛检出BRV的风险是南方的3.29倍(OR=

3.29, 95% CI: 1.61~6.73)。同样值得注意的是,BCoV在北方的阳性检出率为20.88%(95% CI: 16.70~38.10)远高于南方地区的阳性率4.71%(95% CI: 2.05~9.06);此外,BCoV的阳性检出率在南北地区差异显著($P < 0.05$),在北方地区犊牛检出BCoV的概率是南方的5.34倍(OR=5.34, 95% CI: 2.24~12.71)。而BVDV在南方地区的阳性检出率要高于北方地区,南方地区的阳性检出率为12.35%(95% CI: 7.81~18.26),而北方的阳性检出率为8.79%(95% CI: 3.87~16.59),表明两者差异不显著($P > 0.05$)。

表10 不同地区3种病毒的阳性检出率

Table 10 Positivity rate of the 3 viruses in different area

地区 Area	BRV		BCoV		BVDV	
	阳性率/% Positivity rate	95% CI	阳性率/% Positivity rate	95% CI	阳性率/% Positivity rate	95% CI
南方 South	8.82(15/170)	5.02~14.14	4.71(8/170)	2.05~9.06	12.35(21/170)	7.81~18.26
北方 North	24.18(22/91)	15.81~34.28	20.88(19/91)	16.70~38.10	8.79(8/91)	3.87~16.59

表11 地区与3种病毒阳性检出率卡方检验的P值和相关系数比值(OR)

Table 11 P values and correlation coefficient ratios of the chi-square test for area and positivity rate of the 3 viruses

地区 Area	BRV			BCoV			BVDV		
	P值 P value	OR	95% CI	P值 P value	OR	95% CI	P值 P value	OR	95% CI
南方 South	<0.001	1.00	0.15~0.62	<0.001	1.00	0.08~0.45	0.761	1.00	0.62~3.45
北方 North		3.29	1.61~6.73		5.34	2.24~12.71		0.68	0.29~1.61

2.6 不同品种与犊牛感染BRV、BCoV和BVDV的关联

在264份犊牛样品中,11份无品种信息,将其剔除。表12、表13的结果显示,BRV、BCoV及BVDV在肉牛中的阳性检出率为15.64%(95% CI: 10.65~

21.81)、10.61%(95% CI: 6.51~16.08)和13.97%(95% CI: 9.25~19.92),在奶牛中的阳性检出率为12.16%(95% CI: 5.71~21.84)、10.81%(95% CI: 4.78~20.20)和5.41%(95% CI: 1.49~13.27)。不同品种的犊牛3种病毒的检出率无显著差异。

表12 不同品种3种病毒的阳性检出率

Table 12 Positivity rate of the 3 viruses in different species

品种 Species	BRV		BCoV		BVDV	
	阳性率/% Positivity rate	95% CI	阳性率/% Positivity rate	95% CI	阳性率/% Positivity rate	95% CI
肉牛 Beef cattle	15.64(28/179)	10.65~21.81	10.61(19/179)	6.51~16.08	13.97(25/179)	9.25~19.92
奶牛 Dairy cattle	12.16(9/74)	5.71~21.84	10.81(8/74)	4.78~20.20	5.41(4/74)	1.49~13.27

2.7 二元 Logistic 回归分析

单因素分析结果显示:对于BVDV,犊牛周龄、

季节、地区和品种不是风险因素,而BCoV只有地区因素是风险因素,犊牛的周龄、季节和品种并不是风

表 13 不同品种与 3 种病毒阳性检出率卡方检验的 *P* 值和相关系数比值 (OR)

Table 13 *P* values and correlation coefficient ratios of different species to the chi-square test for positivity rate of the 3 viruses

品种 Species	BRV			BCoV			BVDV		
	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	OR	95% CI	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	OR	95% CI	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	OR	95% CI
肉牛 Beef cattle	0.476	1.34	0.60~3.00	0.963	2.84	0.95~8.47	0.052	0.83	0.38~1.78
奶牛 Dairy cattle		1.00	0.33~1.67	1.00	0.12~1.05	1.00	0.56~2.60		

险因素,只有 BRV 符合多因素分析方法,分析方法使用二元 Logistic 回归分析,选择以犊牛的年龄、地区和季节等风险因素作为自变量,是否检出 BRV 为因变量建立二元 Logistic 回归模型,回归模型成立 (Omnibus 检验 χ^2 为 30.35, $P < 0.001$), 模型拟合度效果较好 (χ^2 为 3.58, $P = 0.893 > 0.05$)。

二元 Logistic 多因素回归分析结果如表 14 所示。由表 14 可知,相较南方地区,北方地区的检出 BRV 的风险更大,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, OR = 4.03, 95% CI: 10.65~21.81)。≤5 周龄的犊牛的检出 BRV 的风险是 >5 周龄犊牛的 4.59 倍,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, OR = 4.59, 95% CI: 1.41~11.55)。在冬季犊牛检出 BRV 的风险更大,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, OR = 3.42, 95% CI: 1.76~15.33)。

2.8 不同样本类型与 BRV、BCoV 和 BVDV 阳性检出率的关联

为了确定用于检测 BRV、BCoV 和 BVDV 的最佳采样方案,本研究对不同样本类型进行了分析。由表 15 可知,BRV、BCoV 和 BVDV 在粪便类型的样品阳性检出率分别为 11.43% (95% CI: 10.65~

表 14 二元 Logistic 多因素回归分析结果

Table 14 Results of binary logistic multifactor regression analysis

风险因素 Risk factors	B	SD	Wals	<i>P</i>	OR	置信区间 95% CI
周龄 Weeks of age	1.40	0.54	6.75	0.009	4.59	1.41~11.55
地区 Region	1.52	0.41	13.57	<0.001	4.03	2.04~10.31
季节 Season			3.01	0.39		
春季 Spring	1.04	0.68	2.31	0.13	2.82	0.74~10.80
夏季 Summer	0.91	0.73	1.57	0.21	2.49	0.60~10.38
冬季 Winter	1.23	0.77	2.57	0.02	3.42	1.76~15.33
常量 Constant	-4.08	0.72	32.57	<0.001	0.017	

注: B 为参数估计值, SD 为标准误差, OR (比数比: 为事件发生的概率与不发生的概率之比), Wals 为瓦尔德值; 95% CI 为 95% 置信区间。Note: B is the parameter estimate; SD is the standard error; OR (ratio: ratio of the probability of occurrence); Wals is Wald; 95% CI is 95% confidence interval.

11.43% (95% CI: 6.51~16.08) 和 11.43% (95% CI: 9.25~19.92), 低于肛肠拭子在 BRV、BCoV 和 BVDV 的阳性检出率。由表 16 可知, 3 种病毒的阳性检出率与样品类型之间差异均不显著 ($P > 0.05$), 表明样本类型不同并不会影响 3 种病毒的阳性检出率。

表 15 不同样本类型 3 种病毒的阳性检出率

Table 15 Positivity rate of the 3 viruses in different sample types

样品类型 Sample type	BRV		BCoV		BVDV	
	阳性率/% Positivity rate	95% CI	阳性率/% Positivity rate	95% CI	阳性率/% Positivity rate	95% CI
粪便 Stool	11.43(20/175)	10.65~21.81	9.34(16/175)	6.51~16.08	11.43(20/175)	9.25~19.92
肛肠拭子 Anorectal swab	19.10(17/89)	5.71~21.84	12.36(11/89)	4.78~20.20	12.50(12/89)	1.49~13.27

表 16 样本类型与 3 种病毒阳性检出率卡方检验的 *P* 值和相关系数比值 (OR)

Table 16 *P* value and correlation coefficient ratios of sample type to the chi-square test for positivity rate of the 3 viruses

样品类型 Sample type	BRV			BCoV			BVDV		
	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	OR	95% CI	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	OR	95% CI	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	OR	95% CI
粪便 Stool	0.090	0.55	0.27~1.11	0.415	0.71	0.32~1.61	0.629	0.83	0.38~1.78
肛肠拭子 Anorectal swab		1.00	0.90~3.70	1.00	0.62~3.16	1.00	0.56~2.60		

3 讨论

为了解 BRV、BCoV 和 BVDV 在腹泻犊牛中的流行情况,通过对不同年龄、地区、品种、季节和样品类型进行分析,发现这 3 种病毒在我国犊牛中感染严重,且存在混合感染,其中最为常见的感染组合为 BRV 与 BCoV,与其他研究结果类似^[8,15]。

本次腹泻犊牛中的 BRV 的总阳性检出率为 14.02% (95% CI: 8.44~16.68), 低于部分文献报道的国内 BRV 平均感染率 35.3%^[16] (例如在宁夏、河北唐山和山东 BRV 的感染率分别为 53.39%^[10]、29.44%^[17] 和 17.70%^[18]), 其原因主要是因为病毒的流行情况受到时间、空间和管理因素等多方面的影响^[19]。本项研究的样品主要来源于华中地区,相对北方地区,华中地区肉牛养殖规模略低,且防控水平略高,因此有着相对北方更低的检出率^[20]。但从结果而言,能够表现为较高的感染情况。对比 5 周龄以上的犊牛,5 周龄以下的犊牛检出 BRV 的风险更高,其他研究人员也报道了类似的发现^[19,21],不同年龄犊牛 BRV 的阳性检出率均差异显著 ($P < 0.05$),或许是由于犊牛的免疫系统不完善导致 BRV 的传播^[22],这表明更需要加强对 5 周龄以下的 BRV 的早期防控。从样品的采集季节来看,BRV 在冬季的阳性检出率最高 23.06% (95% CI: 15.24~33.78),这和以前显示 BRV 在冬季流行的结果一致^[23]。这意味着温度的下降,对于 BRV 的传播是有利的。就地区而言,中国北方地区 BRV 的阳性检出率显著高于南方地区 ($P < 0.05$),这可能是因为北方地区寒冷,以及饲养量大造成的。这提示我们需要对北方地区 5 周龄以下的犊牛进行更多的监测,特别是在冬季,以便尽早发现,及时采取控制措施。

BCoV 的流行与 BRV 有着相同的趋势。本研究中的检测结果略低于文献报道的北方流行情况。此外本次检测结果显示:BCoV 在冬季以及北方地区阳性检出率最高,且北方地区的阳性检出率与南方地区差异显著 ($P < 0.05$)。这部分结果不仅与我们的阳性检出情况相吻合,也表明在北方更要加强卫生管理和温度控制,加强圈舍、设备和工具的卫生管理,确保牧场清洁卫生。提供合适的牛舍供犊牛避寒,确保牛舍温度适宜,避免低温对犊牛的影响。

本研究在 32.20% (85/264) 的腹泻样品检测出 3 种病毒的核酸,其他的腹泻样品未检出病毒核酸,而造成犊牛腹泻的不仅有病毒,还有细菌和寄生虫。

在一项关于腹泻犊牛的病原学调查结果显示:细菌与寄生虫的检出率为 35.00% (77/220),病毒的检出率为 12.27% (27/220)^[21]。其次饲养环境和气候等也会影响犊牛腹泻发病率^[24],例如在本研究中,部分未检出病毒的样品是在特别寒冷或者是温差较大的时期得到的。因此,在预防和控制犊牛腹泻方面,除了关注病毒的防控外,还需要综合考虑细菌、寄生虫和环境等多方面因素,采取综合性的防控措施,以降低犊牛腹泻的发病率。

犊牛腹泻是养牛业中一项常见且重要的疾病,对养牛业经济造成了严重损失。确定我国部分省份犊牛腹泻病毒流行的现状和相关风险因素,有助于对养牛场犊牛腹泻病的精准防控。本研究结果显示 BRV、BVDV 和 BCoV 在中国部分省份地区广泛分布,且存在有混合感染。在北方地区,冬季和 ≤ 5 周龄的牛,BRV 的检出率高;北方地区的犊牛 BCoV 的检出率更高;BVDV 在犊牛中的检出率,不受地区、品种、季节和年龄的影响。

参考文献 References

- [1] WEI X, WANG W, DONG Z, et al. Detection of infectious agents causing neonatal calf diarrhea on two large dairy farms in Yangxin County, Shandong Province, China [J/OL]. *Frontiers in veterinary science*, 2020, 7: 589126 [2024-01-15]. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.589126>.
- [2] DALL AGNOL A M, LORENZETTI E, LEME R A, et al. Severe outbreak of bovine neonatal diarrhea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology [J]. *Brazilian journal of microbiology*, 2021, 52(4): 2547-2553.
- [3] ODAGIRI K, YOSHIZAWA N, SAKIHARA H, et al. Development of genotype-specific anti-bovine rotavirus a immunoglobulin yolk based on a current molecular epidemiological analysis of bovine rotaviruses a collected in Japan during 2017—2020 [J/OL]. *Viruses*, 2020, 12 (12): 1386 [2024-01-15]. <https://doi.org/10.3390/v12121386>.
- [4] KIM U H, JUNG Y H, CHOE C, et al. Korean native calf mortality: the causes of calf death in a large breeding farm over a 10-year period [J]. *Korean journal of veterinary research*, 2015, 55(2): 75-80.
- [5] PAPP H, LÁSZLÓ B, JAKAB F, et al. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle [J]. *Veterinary microbiology*, 2013, 165(3-4): 190-199.
- [6] GENG H L, MENG X Z, YAN W L, et al. Prevalence of bovine coronavirus in cattle in China: a systematic review and Meta-analysis [J/OL]. *Microbial pathogenesis*, 2023, 176:

- 106009 [2024-01-15]. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106009>.
- [7] SU N, WANG Q, LIU H-Y, et al. Prevalence of bovine viral diarrhea virus in cattle between 2010 and 2021: a global systematic review and Meta-analysis[J/OL]. *Frontiers in veterinary science*, 2022, 9: 1086180[2024-01-15]. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1086180>.
- [8] CHEN S, ZHANG W, ZHAI J, et al. Prevalence of bovine rotavirus among cattle in mainland China: a Meta-analysis[J/OL]. *Microbial pathogenesis*, 2022, 170: 105727 [2024-01-15]. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105727>.
- [9] RAN X, CHEN X, MA L, et al. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in dairy cattle in China[J]. *Acta tropica*, 2019, 190: 296-303.
- [10] 姜玲玲, 牛小霞, 刘强, 等. 宁夏地区肉牛腹泻相关病毒感染状况的分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(9): 3863-3871. JIANG L L, NIU X X, LIU Q, et al. Analysis of infection status of beef cattle diarrhea-related virus in Ningxia[J]. *Acta veterinaria et zootechnica sinica*, 2023, 54(9): 3863-3871 (in Chinese with English abstract).
- [11] 王克伟, 李玉峰, 王先炜, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒和牛病毒性腹泻病毒双重RT-PCR检测方法的建立[J]. *畜牧与兽医*, 2011, 43(1): 1-4. WANG K W, LI Y F, WANG X W, et al. Establishment of duplex RT-PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Animal husbandry & veterinary medicine*, 2011, 43(1): 1-4 (in Chinese).
- [12] MAES R K, GROOMS D L, WISE A G, et al. Evaluation of a human group A rotavirus assay for on-site detection of bovine rotavirus[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2003, 41(1): 290-294.
- [13] SINGASA K, SONGSERM T, LERTWATCHARASARAKUL P, et al. Molecular and phylogenetic characterization of bovine coronavirus virus isolated from dairy cattle in Central Region, Thailand[J]. *Tropical animal health and production*, 2017, 49(7): 1523-1529.
- [14] 朱梅红, 邹循东, 林泰南. 大学生干眼影响因素的二元 Logistic 回归分析[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2023, 44(5): 622-627. ZHU M H, ZOU X D, LIN T N. Binary logistic regression analysis on influencing factors of dry eye of college students[J]. *Journal of Huaqiao University (natural science)*, 2023, 44(5): 622-627 (in Chinese with English abstract).
- [15] 常丽云, 刘志勇, 李华伟, 等. 唐山地区奶犊牛主要腹泻相关病原的流行病学调查[J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(7): 2854-2864. CHANG L Y, LIU Z Y, LI H W, et al. Epidemiological investigation of the main diarrhea related pathogens in dairy calves in Tangshan area[J]. *China animal husbandry & veterinary medicine*, 2023, 50(7): 2854-2864 (in Chinese with English abstract).
- [16] QIN Y F, GONG Q L, ZHANG M, et al. Prevalence of bovine rotavirus among Bovidae in China during 1984—2021: a systematic review and Meta-analysis[J/OL]. *Microbial pathogenesis*, 2022, 169: 105661 [2024-01-15]. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105661>.
- [17] 常丽云. 唐山市奶犊牛传染性腹泻病原分布特征、主要病毒检测方法与治疗研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2021. CHANG L Y. Study on the pathogen distribution characteristics, main virus detection method and treatment of infectious diarrhea in Tangshan City[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [18] 张亮, 张云飞, 蒋仁新, 等. 2017—2018年山东省奶牛场犊牛腹泻相关病毒病原学检测[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(6): 16-20. ZHANG L, ZHANG Y F, JIANG R X, et al. Pathogenic detection of viruses related to calf diarrhea in dairy farms in Shandong Province during 2017 to 2018[J]. *China animal health inspection*, 2020, 37(6): 16-20 (in Chinese with English abstract).
- [19] UDDIN AHMED N, KHAIR A, HASSAN J, et al. Risk factors for bovine rotavirus infection and genotyping of bovine rotavirus in diarrheic calves in Bangladesh[J/OL]. *PLoS one*, 2022, 17(2): e0264577 [2024-01-15]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264577>.
- [20] 杨德新, 闫磊, 朱小洁, 等. 河南地区4种致犊牛腹泻病原的调查与分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2022(4): 73-77. YANG D X, YAN L, ZHU X J, et al. Investigation and analysis of four pathogens causing calf diarrhea in Henan Province[J]. *Heilongjiang animal science and veterinary medicine*, 2022(4): 73-77 (in Chinese with English abstract).
- [21] WANG D, GAO H, ZHAO L, et al. Detection of the dominant pathogens in diarrheal calves of Ningxia, China in 2021—2022[J/OL]. *Frontiers in veterinary science*, 2023, 10: 1155061 [2024-01-15]. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1155061>.
- [22] ZHU Q, QI S, GUO D, et al. A survey of fecal virome and bacterial community of the diarrhea-affected cattle in northeast China reveals novel disease-associated ecological risk factors[J/OL]. *mSystems*, 2024, 9(1): e0084223 [2024-01-15]. <https://doi.org/10.1128/msystems.00842-23>.
- [23] GHONAIM A H, HOPO M G, GHONAIM N H, et al. The epidemiology of circulating rotavirus associated with diarrhea in Egyptian kids and calves: a review[J/OL]. *Zoonoses*, 2023, 3(1): 985 [2024-01-15]. <https://doi.org/10.15212/ZOONOSES-2023-0004>.
- [24] CHO Y, YOON K J. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention[J]. *Journal of veterinary science*, 2014, 15(1): 1-17.

Detection of common viruses causing calf diarrhea and analysis of risk factors

HE Yanfei^{1,2}, QIN Chenghuang^{1,2}, XU Xiaowen^{1,2}, XIAN Yiner^{1,2},
XIANG Zhijie^{1,2}, CHEN Yingyu^{1,2,3}, GUO Aizhen^{1,2,3}

1. National Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Veterinary Medicine, College of Animal Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production/Hubei International Science and Technology Cooperation Base of Veterinary Epidemiology, Wuhan 430070, China;
3. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China

Abstract To understand the current epidemiological status and dominant strains of calf diarrhea viruses is important for disease prevention and control. 264 diarrheic calves samples (including 58 anal swabs, 15 intestinal tissues, and 191 feces) from 41 farms in Hubei, Hunan, Henan, Guangxi, Guizhou, Gansu, Shandong, and Inner Mongolia were collected between November 2021 and October 2023. RT-PCR was used for the detection of bovine rotavirus (BRV), bovine coronavirus (BCoV) and bovine viral diarrhea virus (BVDV). Results showed that the individual positive proportion of BRV, BCoV and BVDV were 14.02% (95% CI: 8.44-16.68), 10.23% (95% CI: 6.85-14.53) and 12.12% (95% CI: 10.06-18.80), respectively. The farm positive proportion was 78.05% (95% CI: 62.39-89.44), in which 29.27% (95% CI: 16.13-45.54) had mixed infections. 3.42% (95% CI: 1.32-5.88) samples were co-infected with both BRV and BCoV, which was the most commonly combination. Furtherly, the distribution of the above three viruses in different regions, ages, seasons and breeds was analyzed. There was a high risk of BRV infection in the northern China, winter and in calves ≤ 5 weeks old, and BCoV had a high risk of infection in northern China, and both summer and winter. There was no significantly difference BVDV infection in different regions, ages and breeds. The results indicate that the three viruses are prevalent in diarrheal calves across 41 farms in 11 provinces in China, with BRV and BCoV being the main viruses causing calf diarrhea. Their prevalence is influenced by region, season, and age, suggesting that these factors should be considered in prevention and control measures.

Keywords calf diarrhea; BRV; BCoV; BVDV; detection; risk factor analysis

(责任编辑:赵琳琳)