

王海燕,管远红,蔡丙严,等. 1 例冠状病毒、大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌引起的犊牛腹泻[J]. 江苏农业科学,2020,48(16):201-205.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.16.039

# 1 例冠状病毒、大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌引起的犊牛腹泻

王海燕,管远红,蔡丙严,郭广富,陈长春

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

**摘要:**犊牛腹泻对养牛业造成了极大威胁和损失,其病因复杂,以传染性病原体的威胁最大。2017 年 2—3 月,江苏某奶牛场的 50 多头新生乳犊牛陆续出现腹泻,发病率达到 30%,用多种药物治疗后无效,犊牛的病死率达到 100%。为了解其病因,笔者对病死犊牛进行了剖检,无菌采集肠系膜淋巴结、脾脏等进行细菌分离,并取腹腔渗液、肠道内容物进行处理和电镜观察。结果表明,从病样中分离鉴定得到大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌,通过对处理的病料进行电镜观察,发现了大量冠状病毒样颗粒;应用逆转录 PCR(RT-PCR)扩增冠状病毒 N 蛋白基因部分片段,得到特异性目的片段大小的产物。使用头孢唑啉、头孢噻吩、头孢曲松钠、氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、阿莫西林、卡那霉素、链霉素、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、大观霉素、四环素、氯霉素、利福平、呋喃唑酮等药物对分离菌进行耐药性试验,结果显示,分离菌对供试药物大多表现为耐药,仅对头孢唑啉、头孢噻吩、头孢曲松钠等表现为中度敏感。由研究结果可以看出,江苏某奶牛场的病例是由冠状病毒与 2 种细菌的混合感染所致,抗生素治疗效果不好,由于存在混合感染,消毒和预防措施显得更为重要。

**关键词:**冠状病毒;大肠杆菌;肺炎克雷伯氏菌;犊牛;腹泻;病原学

**中图分类号:** S858.237.3<sup>+</sup>4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)16-0201-04

犊牛腹泻是牛场生产过程中犊牛面临的最主要的健康问题之一,是犊牛死亡的最常见的原因<sup>[1]</sup>。犊牛腹泻是指新生 10 日龄左右的犊牛发生的一种以消化不良、腹泻为主要症状的胃肠消化道疾病<sup>[2-4]</sup>,该病一年四季均可发生,尤其在初春、夏末、秋初气候多变的季节多发,发病率高,哺乳期的犊牛更容易发生腹泻,在世界范围内,奶牛场犊牛腹泻发病率为 20%~100%<sup>[5-10]</sup>。腹泻往往是多种疾病的一种临床表现,犊牛腹泻的原因很多,包括犊牛本身的因素以及所处的环境、营养与传染性因子等多种因素<sup>[1,11]</sup>。因此,以上原因造成发病犊牛在临床上的表现各异,但是主要症状表现为腹泻,在犊牛发病初期,犊牛往往排稀软、水样粪便;随着病程的发展,犊牛可能表现出脱水的症状,如眼窝下陷、黏膜干燥、被毛焦燥等;随着脱水症状的加

重,患病犊牛可能表现出末梢发凉、食欲减退或废绝、喜卧或难以站立、昏迷等症状<sup>[1-2]</sup>。腹泻会造成新生犊牛死亡和发育不良,从而引起巨大经济损失,是牛场需要重点防控的疫病<sup>[1,12-13]</sup>。

2017 年初江苏某奶牛场产犊牛 50 多头,新生犊牛陆续出现腹泻,用多种药物治疗后均无明显效果。笔者对死亡犊牛进行剖检和病原学研究。

## 1 病例情况与病死犊牛剖检情况

某奶牛场存栏 500 头左右,奶产量较高,每头产奶牛平均每天产奶 34 kg 左右,2017 年 2 月开始陆续产犊,初期吃初乳基本没有问题,换常奶后发病。换常奶期间母牛饲料及饲养管理与以前相比没有任何变化。出现腹泻后,犊牛后躯被稀粪污染,使用拜有利、青霉素、百痢克等药物(按厂家推荐剂量使用)进行治疗,对于体温高的犊牛注射安乃近后,效果不佳,然后使用恩诺沙星、氟苯尼考等药物(按厂家推荐剂量使用),效果仍不佳,最后增加使用中药(白头翁、黄连、黄柏、陈皮等),仍然不见好转。一般病程为 2~3 周,发病率约 30%,病死率为 100%。

病死犊牛剖检情况如下:主要见极度消瘦,严

收稿日期:2020-04-20

基金项目:江苏省高等职业院校教师专业带头人高端研修(个人访学研修)项目(编号:2016GRFX024);江苏农牧科技职业学院项目(编号:NSFPT201708)。

作者简介:王海燕(1976—),女,内蒙古呼伦贝尔人,博士,副教授,主要研究方向为动物传染病学。E-mail:672355732@qq.com。

重脱水,体表被粪便污染(图1);齿龈出血、溃疡;胸腔、腹腔、心包积液(图2);全身淋巴结肿大,出血(图3);肠道空虚(图4),胃底出血。



图1 病死犍牛尸体脱水现象



图2 病牛的腹腔积液



图3 病死犍牛肠系膜淋巴结肿大现象



图4 病牛的肠道空虚现象

无菌采集病死犍牛脾脏、肝脏、肾脏、肠系膜淋巴结等脏器放入无菌收集袋中;将胸腔、腹腔渗液等放入高压处理的指形管中保存。

## 2 实验室病原学检查

### 2.1 病毒学检测

对采集的病死牛的脏器和渗液等进行处理和检测。

2.1.1 电镜观察 将采集的病死犍牛胸腔、腹腔渗液经离心、浓缩处理后进行负染,随后在扬州大学测试中心电镜室进行电镜观察。

2.1.2 分子生物学检测 通过逆转录 PCR(RT-PCR)扩增牛冠状病毒 N 蛋白编码基因,上游引物序列为 5'-CGATCAGTCCGACCAATCTA-3',下游引物序列为 5'-GAGGTAGGGTTCTGTTGGG-3'<sup>[14-15]</sup>,预期扩增的 N 基因产物片段大小为 597 bp。用 TRIzol 试剂提取病死犍牛肠道内容物病毒总 RNA 用于反转录,具体参照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书进行。采用 20 μL 扩增体系,其组成如下:1 μL cDNA,10 μL 2 × PCR Mix,各 0.5 μL 上、下游引物,8 μL 超纯水。反应条件如下:94 ℃ 5 min;94 ℃ 50 s,53 ℃ 50 s,72 ℃ 50 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。随后电泳观察扩增结果。

### 2.2 细菌的分离和鉴定

分别取病死犍牛脾脏、肠系膜淋巴结、肝脏并无菌接种于血琼脂平板上,同时进行有氧和厌氧培养,于 37 ℃ 培养 18 h 左右,观察是否有菌落生成,若有,则进行多次传代纯化,最终记录菌落结果。

2.2.1 染色镜检 对纯化得到的菌株进行革兰氏染色、镜检。

2.2.2 生化试验 利用细菌微量生化反应管(购自杭州微生物试剂有限公司)对分离所得菌株进行生化指标的测定,操作方法与判定标准参照说明书。在 37 ℃ 条件下培养 24 h 后,与对照管比对,观察反应结果并记录。

2.2.3 16S rDNA 基因的扩增与测序、分析 挑取 4 个典型菌落提取基因组 DNA,利用煮沸法煮沸 10 ~ 15 min 后离心、取上清,备用。PCR 参照宝生物工程(大连)有限公司的 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR kit 说明书进行,采用 25 μL 扩增体系,含有 2 μL DNA 模板,12.5 μL PCR Mix,各 0.25 μL 上、下游引物,10 μL 超纯水。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,53 ℃ 退火

1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。将 PCR 产物经电泳后观察结果, 再将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。对测定的 DNA 序列进行 BLAST 比对, 根据同源性高低确定细菌的种属。

### 2.3 药物敏感性试验

使用头孢唑啉、头孢噻肟、头孢曲松钠、氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、阿莫西林、卡那霉素、链霉素、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、大观霉素、四环素、氯霉素、利福平、呋喃唑酮等药物纸片对分离得到的细菌进行药物敏感性试验。

## 3 结果与分析

### 3.1 病毒学检测结果

由图 5 可以看出, 负染镜检可见大量冠状病毒样颗粒, 完整的病毒粒子直径为 120 ~ 130 nm, 花冠状的病毒纤突清晰可见。

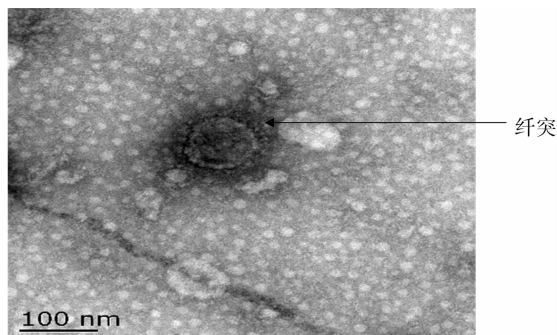
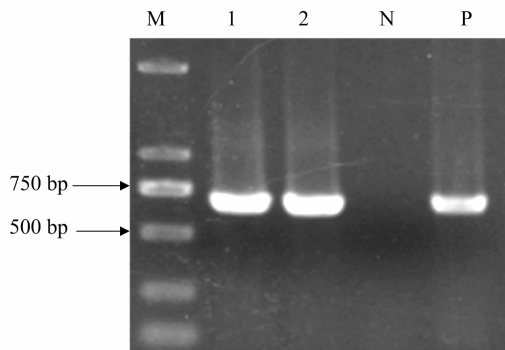


图5 电镜下样本中冠状病毒粒子形态和纤突

由图 6 可以看出, 从样本中扩增出了与牛冠状病毒 N 蛋白编码基因预期大小一致的核酸条带。



M—DL2000; 1—肠道内容物; 2—腹水; N—阴性对照; P—阳性对照

图6 牛冠状病毒 RT-PCR 检测结果

### 3.2 细菌分离结果和菌落形态

于 37 ℃ 培养 18 h 后, 在有氧培养和厌氧培养的血琼脂平板上均长出了菌落, 未见溶血, 其中有

氧培养的菌落相对厌氧培养的稍大; 肉眼观察发现, 在有氧和厌氧培养的菌落特征中, 除大小外无其他差异。进一步纯化发现, 有氧培养的菌落中的一种较大, 呈凸起、不透明、灰白状, 边缘整齐, 且边缘由于遮光性和水分而似透明状; 另一种菌落稍小一些, 呈稍凸起、不透明、灰白状, 边缘整齐。

染色后的镜检结果表明, 有氧和厌氧培养的细菌间无明显差异。染色镜检结果显示, 有氧和厌氧培养的细菌均为粗短直杆菌, 革兰氏染色结果呈阴性。16S rRNA 基因测序结果表明, 分离菌分别为肺炎克雷伯氏菌、大肠杆菌。此外, 生化发酵管试验结果也验证了这 2 种分离菌的生化特征。

### 3.3 药物敏感性试验结果

用头孢唑啉、头孢噻肟、头孢曲松钠、氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、阿莫西林、卡那霉素、链霉素、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、大观霉素、四环素、氯霉素、利福平、呋喃唑酮等药敏纸片进行药敏试验的结果表明, 分离菌对很多药物耐药, 对头孢唑啉、头孢噻肟、头孢曲松钠的敏感性稍强, 对大多数药物完全耐药。

## 4 结论和讨论

犊牛发生腹泻主要由饲养管理不当、应激、细菌、病毒及寄生虫等方面的原因引起<sup>[1]</sup>。细菌中的大肠杆菌<sup>[16-18]</sup>、沙门氏菌<sup>[19]</sup>、弯曲杆菌、产气荚膜梭状芽孢杆菌<sup>[1, 20-24]</sup>, 病毒中的轮状病毒<sup>[25-28]</sup>、冠状病毒<sup>[14-15]</sup>、星形病毒、微病毒, 寄生虫中的隐孢子虫等均可造成该病的传播和流行<sup>[1, 29-30]</sup>。近年来, 混合感染的报道越来越多, 王丹阳等曾报道了牛病毒性腹泻病毒、大肠杆菌和奇异变形杆菌混合感染引起的犊牛腹泻<sup>[31]</sup>; 吴城等对福建省牛流行性腹泻病毒和牛轮状病毒混合感染进行了调查<sup>[32]</sup>。此外, 还有一些研究针对细菌性或病毒性的多种感染进行了调查报道<sup>[29-30]</sup>。本研究中的病例是由冠状病毒、大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌混合感染引起的, 这也是首次报告。目前, 多种病原体造成混合感染的病例越来越多, 需要引起相关人员的重视。群体中的疾病发生时, 各种复杂因素综合作用会造成临床表现复杂, 剖检病变也很复杂, 此外, 由于混合感染的病例越来越多, 根据病史、临床症状也很难作出诊断。疾病的确诊必须依据肠道微生物、患犊粪便的检查, 甚至须要进行病原学、分子生物学检查或动物试验<sup>[1]</sup>。由于各种方法本身的限制性及临

床经验的差异,检测本身可能也存在漏检问题,也因此造成临床用药效果不佳。随着药的种类越来越多,量也可能越来越大,从而产生耐药性,这样就会形成恶性循环,因此,确诊就显得非常重要,筛检的项目也须要增加。在本试验剖检结果中出现了很多与腹泻无关的病变,可能是由病程长、施用多种干预措施与继发感染等导致的。所以,很多剖检变化不能作为指征性的病变,在这类疾病的诊断过程中要注意相关问题。

在本试验中检测出了 3 种病原体,其中 1 种是冠状病毒,该病毒虽然不是造成犊牛腹泻的主要病原体,但是在本例的肠道和渗出物中出现了大量病毒颗粒,说明该病原体在致病过程中起到重要作用。而在淋巴结和多种脏器中均分离到了 2 种细菌病原体(大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌),说明它们在致病过程中也有一定作用,但是由于各种因素的制约,很难对其致病性进行明确。

大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌均属于肠道杆菌,很多生物学特性相似,在区分时并不是非常明显,从而给诊断带来了一定困难,有时候甚至会出现漏诊。此外,在本试验中发现菌落稍有差异,因此在进行 16SrRNA 基因测序时选择几个不同的单个菌落进行测定才发现有 2 种菌落,进而进行回顾性菌落鉴定,差点造成误诊。2 种细菌的耐药谱广、耐药性强,与临床上用药效果不佳有一定关系。在本试验的治疗过程中虽然也使用了中药,但是由于中药以调理为主,因此在这种急性病例中的效果不明显。

在我国,种牛、冷冻精液的引进给我国的奶牛养殖带来了一定风险,虽然大多数养殖场都是从正规企业购进种牛的,但是多种病原体的间歇性带毒问题给检测工作带来了一定难度,再加上由于成本的增加,由非正规途径获得的冷冻精液的风险更高,例如很多西方国家牛场的牛病毒性腹泻非常严重。因此,规范引种、引进冷冻精液或胚胎至关重要<sup>[1-2]</sup>。加强生物安全是该病防控的重点<sup>[32-34]</sup>,但是生物安全是一系列工作的集成,一旦某个环节出现问题,将造成巨大经济损失<sup>[35]</sup>。奶牛场的管理者和兽医在平时工作中应对各种生物安全措施进行风险评估,查漏补缺,抓重点措施和影响较大的措施,这样即使出现问题,也是小的问题,从而将损失降到最低。

#### 参考文献:

[1] Andrews A H, Blowey R W, Boyd H, et al. 牛病学——疾病与管理

[M]. 2 版. 韩 博, 苏敬良, 吴培福, 等译. 北京: 中国农业大学出版社, 2006.

[2] 肖定汉. 奶牛病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.

[3] 曹明泽, 朱 阵, 王 磊, 等. 犊牛腹泻概述[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(14): 116-119.

[4] 钟细平. 新生牛犊腹泻的防治[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2016, 32(4): 112.

[5] Cho Y I, Yoon K J. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention[J]. J Vet Sci, 2014, 15(1): 1-17.

[6] Klein J D, Iwersen M, Drillich M. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: a case - control study to investigate risk factors for calf diarrhea[J]. J Dairy Sci, 2014, 97(8): 5110-5119.

[7] Mebus C A, Unerdabl N R, Rhodes M B, et al. Further studies on neonatal calf diarrhea virus[J]. Proc Annu Meet US Anim Health Assoc, 1969(73): 97-99.

[8] 刘国冰. 犊牛腹泻原因及综合防治措施[J]. 云南畜牧兽医, 2008, 4: 29-30.

[9] 任卫青, 王新庄. 犊牛腹泻的病因分析与治疗对策[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(10): 183-186.

[10] 王 静, 何生虎, 葛 松, 等. 犊牛腹泻的发病原因及治疗的研究进展[J]. 农业科学研究, 2013, 34(3): 59-62.

[11] 荔 霞, 王胜义, 刘永明, 等. 犊牛腹泻病因及其药物防治研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(10): 161-165.

[12] 周元军. 犊牛腹泻的综合防治措施[J]. 黄牛杂志, 2005, 31(3): 94-95.

[13] 陈真强. 犊牛腹泻的病因及防治措施探讨[J]. 现代畜牧兽医, 2005, 1: 28-29.

[14] Zhu W, Dong J B, Haga T, et al. Rapid and sensitive detection of bovine coronavirus and group a bovine rotavirus from fecal samples by using one - step duplex RT - PCR assay[J]. J Vet Med Sci, 2011, 73(4): 531-534.

[15] 关 新, 朴范泽, 侯喜林, 等. 牛冠状病毒的分离鉴定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007, 19(2): 55-58.

[16] 方光远, 张 莉, 陆宇超, 等. 犊牛腹泻大肠杆菌的分离鉴定和耐药性检测[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(9): 273-277.

[17] 喻华英, 贾桂珍, 邹开胜. 犊牛腹泻病中大肠杆菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(6): 67-68.

[18] Hur J, Jeon B W, Kim Y J, et al. *Escherichia coli* isolates from calf diarrhea in Korea and their virulent genetic characteristics[J]. J Vet Med Sci, 2013, 75(4): 519-522.

[19] 喻华英, 胡文兵, 贾桂珍, 等. 犊牛腹泻病中沙门氏菌的分离与鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(2): 41-42.

[20] 马广强. 犊牛细菌性腹泻快速诊断方法的建立与流行病学研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006.

[21] 刘明春, 于立辉, 何剑斌, 等. 犊牛腹泻病原菌的分离鉴定及敏感药物筛选[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005(12): 42-44.

[22] 赵宏涛, 薛 梅, 张振仓. 犊牛腹泻病原菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006(6): 40-41.

[23] Mawly J A, Grinberg A, Prattley D, et al. Risk factors for neonatal



宋尚桥,马国围,曾素先,等. 对猪小腔卵泡孤雌激活胚胎发育力的初步探索[J]. 江苏农业科学,2020,48(16):205-207.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.16.040

# 对猪小腔卵泡孤雌激活胚胎发育力的初步探索

宋尚桥<sup>1</sup>, 马国围<sup>1</sup>, 曾素先<sup>2</sup>, 严瑾<sup>1</sup>, 孙翠翠<sup>1</sup>, 李鑫<sup>1</sup>, 黎宗强<sup>1</sup>

(1. 广西大学动物科学技术学院, 南宁广西 530004; 2. 南宁市江南区沙井街道办事处水产畜牧兽医站, 南宁广西 530045)

**摘要:**为探讨直径为 2 mm 以下和 2~6 mm 猪卵泡卵母细胞的体外培养分裂率与囊胚率差异,采用相同体外成熟培养条件,来培养从不同直径的 2 种卵泡中所抽出的卵母细胞,在卵母细胞成熟培养后 44~48 h,对卵母细胞进行化学激活和体外培养,观察胚胎体外发育能力;在培养 48 h 时进行分裂数据统计,培养 168 h 时统计囊胚个数。结果发现,2 mm 以下猪卵泡卵母细胞孤雌激活后胚胎的体外培养平均分裂率与 2~6 mm 猪卵泡卵母细胞孤雌激活后胚胎的体外培养平均分裂率差异显著,分别为 62.46%、81.76% ( $P < 0.05$ );2 mm 以下猪卵泡卵母细胞孤雌激活后胚胎的体外培养平均囊胚率与 2~6 mm 猪卵泡卵母细胞孤雌激活后胚胎的体外培养平均囊胚率差异不显著,分别为 11.71%、15.30%。说明正常卵泡、小腔卵泡的卵母细胞在体外成熟后,孤雌激活胚分裂率依次降低,孤雌胚胎的分裂能力随卵泡直径的增大而增强;正常卵泡、小腔卵泡的卵母细胞体外成熟后,孤雌激活胚囊胚率随卵泡直径的增大有一定增高,但变化不显著。

**关键词:**猪;小腔卵泡;孤雌激活;分裂率;囊胚率

**中图分类号:** S852.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)16-0205-03

对于卵母细胞成熟体系、胚胎发育体系、胚胎干细胞体系的建立及体细胞核移植效率的提高仍需要依赖于各技术环节的进一步完善<sup>[1]</sup>,而孤雌激

活胚胎的准备是其中不可或缺的一个环节,也是非常重要的影响因素之一<sup>[2]</sup>。因此,对于小腔卵泡孤雌激活胚胎发育率的研究显得十分必要。在猪卵巢卵母细胞体外成熟、孤雌激活方面的研究,目前已取得关键性突破<sup>[3]</sup>。只有卵泡直径达 2 mm 时,卵泡内的卵母细胞才具有体外成熟的能力<sup>[4]</sup>。卵巢上分布着许许多多的细胞,不仅包括少量的大腔卵泡卵母细胞,还包括数以万计的腔前卵泡卵母细胞和小腔卵泡细胞,这些细胞是供给进行体外培养

收稿日期:2019-09-21

基金项目:广西壮族自治区科技计划-重点研发计划(编号:桂科 AB16380072)。

作者简介:宋尚桥(1995—),男,安徽滁州人,硕士研究生,主要从事动物繁殖生物学研究。E-mail:1157677030@qq.com。

通信作者:黎宗强,副教授,主要从事动物繁殖生物学特性研究。E-mail:zqingli@gxu.edu.cn。

calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms[J]. The Veterinary Journal, 2015, 203(2): 155-160.

[24] 高立战,刘军,赵学前,等. 犊牛腹泻主要病原菌多重 PCR 方法的建立[J]. 动物医学进展, 2010, 31(3): 30-34.

[25] 李决,林雪. 在犊牛腹泻粪便中检出轮状病毒[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 1987(1): 24-25.

[26] 关平原,郭延春. 应用直接透射电镜配合免疫电镜诊断牛轮状病毒性腹泻[J]. 中国兽医杂志, 1989, 15(12): 8-9.

[27] Dhamax K, Chauhan R S, Mahendran M, et al. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals[J]. Vet Res Commun, 2009, 33: 1-23.

[28] 荔霞,刘永明,齐志明,等. 兰州地区犊牛轮状病毒性腹泻的流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(2): 105-107.

[29] 穆杨,柯霓霞,许信刚,等. 犊牛腹泻病原的分离鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007(5): 79-81.

[30] 尹德琦,何润霞,龙森. 犊牛腹泻病原实验室诊断研究进展

[J]. 畜牧与饲料科学, 2015, 36(1): 90-94.

[31] 王丹阳,王旭荣,张康,等. 牛病毒性腹泻病毒、大肠杆菌和奇异变形杆菌混合感染致犊牛腹泻的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(1): 189-195.

[32] 吴城,金学浩,曾广谥,等. 福建省牛流行性腹泻病原——牛轮状病毒的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1984, 15(4): 249-256.

[33] Walker W L, Epperson W B, Wittum T E, et al. Characteristics of dairy calf ranches: morbidity, mortality, antibiotic use practices and biosecurity and biocontainment practices[J]. J Dairy Sci, 2012, 95(4): 2204-2214.

[34] Smith R L, Sanderson M W, Jones R, et al. Economic risk analysis model for bovine viral diarrhea virus biosecurity in cow-calf herds[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2014, 113(4): 492-503.

[35] George M B, John M G, James F E. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases[J]. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2002, 18(1): 7-34.