

# 牛病毒性腹泻研究进展

李高谦<sup>1</sup> 郝景锋<sup>2</sup> 刘立明<sup>3</sup>

1. 吉林农业大学动物医学学院, 长春;

2. 阿勒泰职业技术学院, 阿勒泰;

3. 吉林农业科技学院动物科技学院, 吉林

**摘要** | 牛病毒性腹泻 (Bovine Viral Diarrhea, BVD/ Mucosal Disease, MD), 是由牛病毒性腹泻病毒, 又称粘膜病病毒 (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) 引起的一种以腹泻、发热、黏膜坏死、白细胞减少、繁殖障碍的高致死率疾病, 临床上常见的多为隐性病例, 为更好防控牛病毒性腹泻, 本文拟从病原、临床症状、传播形式及其危害、BVDV 基因组结构、BVDV 的诊断方法以及防制等方面展开论述, 分析牛病毒性腹泻的最新研究进展, 为科学、有效预防该病提供一定的技术支持。

**关键词** | 牛病毒性腹泻; 病原; 临床症状; 防制

Copyright © 2021 by author (s) and SciScan Publishing Limited

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



牛病毒性腹泻 (Bovine Viral Diarrhea, BVD), 是由牛病毒性腹泻病毒 (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) 引起的一种疾病。BVDV 是黄病毒科 (Flaviviridae) 瘟病毒属 (Pestivirus) 的代表种, 是一种单链 RNA、有囊膜、球形、直径 35 ~ 55 nm 的病毒。与猪瘟病毒 (Classical Swine Fever Virus, CSFV)、羊边界

通讯作者: 郝景锋 (1977-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事临床兽医学教学及研究, E-mail: jlhj2012@163.com。

刘立明, 吉林农业科技学院, 博士, 讲师, 从事预防兽医学教学及研究, E-mail: aliuliming1984@126.com。

文章引用: 李高谦, 郝景锋, 刘立明. 牛病毒性腹泻研究进展 [J]. 农业科学进展, 2021, 3 (1): 1-11. <https://doi.org/10.35534/aas.0301001>

病毒 (Border Disease Virus, BDV) 同属<sup>[1, 2]</sup>, 有相关抗原性, 可以在多种细胞中培养。按临床症状突出表现分为典型肠炎型、呼吸型、生殖型和黏膜型, 按病程长短分为急性型、慢性型和隐性感染型。以直接接触或间接接触方式传播, 病牛分泌物、血液和脾脏等都含有病毒。20世纪80年代传入我国, 现今已在我国20余省发现 BVDV 存在<sup>[1, 2]</sup>, 世界动物卫生组织将其定为 B 类动物疫病, 并将其列为必须通报, 我国将其定为三类动物疫病。临床症状主要表现为突发性腹泻、持续间歇热、厌食、口腔黏膜溃烂、免疫抑制; 孕牛早期感染发生流产, 中后期感染可能产出木乃伊胎或先天畸形的胎儿; 黏膜型病例可见食欲废绝、持续性腹泻、严重脱水、口鼻流出黏脓性物质, 病程稍长者或见跛行。对本病尚无有效防制手段, 市场上有弱毒苗和灭活苗两种, 但临床应用会引起牛较强的免疫抑制反应, 且抗体效价降低速度较快, 因此 BVDV 的诊断、检测和防制技术的强化迫在眉睫。

## 1 病原

牛病毒性腹泻病毒 (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) 属黄病毒科、瘟病毒属, 猪瘟病毒 (CSFV)、羊边界病毒 (BDV) 与其同属。除牛外部分野生反刍动物、猪、骆驼、鹿等亦可感染。于1980年由李佑民首次在流产奶牛胎儿中分离出 BVDV, 命名为长春 184 株<sup>[1]</sup>。

病毒粒子受乙醚、氯仿及 pH3.0 以下环境影响较大。不耐热, 56℃即可杀灭病毒, 低温下稳定, 真空冻干情况下 (-60℃ ~ -70℃) 可在下保存多年。一般认为没有血凝性, 但曾出现过某些毒株能够凝集红细胞的报道。BVDV 能在胎牛肾、睾丸、脾脏、肺、皮肤、肌肉、气管、鼻甲、胎羊睾丸、猪肾等细胞培养物中增殖传代。

BVDV 的基因组包含约 12.3 kbp 正单链 RNA 分子。根据核苷酸序列识别分为两种 BVDV 基因型, 分别为“BVDV-I 型”和“BVDV-II 型”, BVDV-I 型有包括 12 个亚型, 即 Ia-Iq; BVDV-II 型又分为 4 个亚型, 即 IIa-IId。又根据其感染后可否造成细胞病变分为两种生物型, 可引起细胞病变的称为细胞病变型 (CP 型), 不能引起细胞病变的称为非细胞病变型 (NCP 型)。CP 型病毒可以

产生 NS2 和 NS3 两种蛋白，而 NCP 型病毒只能产生 NS2/3 蛋白。NCP 型 BVDV 经多次传代可能出现表型突变，转换为 CP 型，有研究表明将 NCP 型病毒与 CP 型病毒共同培养可使 NCP 型病毒发生表型突变。

## 2 临床症状

各型 BVDV 感染均能引起动物发病，但临床表现各不相同，主要取决于毒株的毒力、饲养水平、机体状态等因素<sup>[3]</sup>。

### 2.1 急性感染

急性感染主要症状为腹泻、食欲减退，鼻镜及周围粘膜糜烂，怀孕母牛可发生流产、死胎、畸胎，大多数牛会因腹泻产生的脱水引发高热。一般情况下首次感染的牛容易发生急性感染症状，犊牛出生后最为易感，且 CP 型和 NCP 型均可造成急性感染。急性感染的持续时间通常不到三周，这段时间内机体产生免疫应答，但不排毒，无法检测到病毒。BVDV 急性感染会造成白细胞减少，引起免疫抑制，使动物对其他疾病更易感。

### 2.2 持续性感染

BVDV 可突破胎盘屏障，感染胎儿，妊娠初期感染胎儿死亡率高，妊娠中后期感染时胎儿已有足够抗体，有清除病毒的可能。CP 型 BVDV 可被胎儿免疫系统识别清除，NCP 型可诱导免疫耐受，导致胎儿终生带毒，即 PI 牛。PI 牛出生时完全正常，经过一段时间的饲养可以发现生长性能低下，容易感染其他疾病。大多数 PI 牛在达到繁殖年龄之前就因体况不佳或各种疾病死亡或淘汰，在 BVDV 免疫后可迅速恶化为黏膜病<sup>[4]</sup>。PI 牛虽不表现明显症状，但可向环境持续排毒，是重要的传染源和病毒库。

### 2.3 黏膜病（Mucosal Disease, MD）

病程短，死亡快，来不及开展治疗工作，死亡率 100%，由已经感染 NCP 型病毒的 PI 牛感染 CP 型病毒引发。病牛便血，口、鼻、眼等黏膜大面积坏死

或糜烂，高热，呼吸急促，血小板降低，白细胞数量呈现一种夸张的降低。6月龄以上牛消化道病变显著，6月龄以下牛呼吸道变化显著。

### 3 传播形式及其危害

BVDV 呈世界性分布，1946年首次在纽约发现，此后多国发生 BVDV 流行，在欧洲、北美洲、亚洲、大洋洲较为严重<sup>[5]</sup>。我国肉牛产业与奶牛产业较弱，因此需要大量进口种牛、精粒及其他肉牛相关产品，并由此引入 BVDV。本病易感动物多，传播途径广泛，可通过分泌物、排泄物、精液传染，也可通过胎盘屏障在妊娠期间感染胎儿，导致流产、死胎、木乃伊胎。NCP 型感染胎儿后可导致免疫耐受，使胎儿终生带毒，即持续性感染（持续性感染牛（Persistent Infection, PI）牛，PI 牛产出后代仍为 PI 牛。PI 牛无明显临床症状，无法产生抗体，生长速率低。而 CP 型能够被免疫系统识别，感染后胎儿有痊愈可能，NCP 型病毒感染才能导致持续性感染。

PI 牛对养牛业危害巨大，无典型临床症状，潜藏在健康牛群中，终生带毒，可向环境中不断排毒，是重要的传染源。PI 母牛发情时间延后，配种成功率大幅下降，胎儿往往受高发的产科疾病影响而导致流产、死胎或畸胎。产奶量下降，各项营养指标有时甚至不到健康牛的 1/2，体细胞数居高不下。BVDV 隐性感染依然会使白细胞死亡，造成免疫抑制，从而受机会致病菌侵袭，感染其他疾病的概率高，也可能由此成为其他疾病的传染源，造成间接经济损失。

### 4 BVDV 基因组结构

BVDV 基因组为全长约 12.3 kbp 的单一线性正链 RNA 病毒，可分为三大部分，包括 5'-UTR、3'-UTR 及 1 个大的开放阅读框（ORF），可翻译成 1 个约 4000 个氨基酸的前体蛋白。该前体蛋白在各种蛋白酶作用下可产生至少 11 种成熟蛋白质，依次为 5'-Npro（P20）-C（P14）-Erns（gp48）-E1（gp25）-E2（gp53）-P7-NS2-3（P80-P125）-NS4A（P10）-NS4B（P30）-NS5A（P58）-NS5B（P75）-3'<sup>[6, 7]</sup>。其中 C、Erns、E1、E2 为结构蛋白，C 蛋白构成核衣壳蛋白，Erns、E1、E2 构成囊膜糖蛋白，其余为非结构蛋白。5' 端非编码区末端没有甲

基化的帽子结构,并且拥有稳定且保守的二级结构,该段序列在BVDV各毒株间拥有高度的同源性,5'-UTR被认为在BVDV转录翻译过程中起到重要作用。

## 4.1 结构蛋白

(1) C蛋白本身可以承担转录激活因子的功能,同时可以调节病毒的转录过程。

(2) Erns蛋白较为复杂,蛋白合成早期与E1构成异二聚体(Erns-E1前体蛋白),是瘟病毒属特有的蛋白可与宿主细胞表面特异性受体结合,也可以进行分离,对BVDV与宿主细胞的吸附与释放起到重要作用,但没有经典的跨膜锚,与细胞结合紧密型较差;具有神经细胞毒性,对神经细胞造成损伤;拥有核糖核酸酶活性。Erns蛋白是一种IFN拮抗剂,通过降解细胞外RNA(主要是抑制了IFN的表达)使BVDV逃避机体免疫系统的攻击,与PI牛的持续性感染有关<sup>[8]</sup>。该段基因在遗传过程中相对保守,在BVDV病毒粒子的衣壳上可以检测到多个该糖蛋白。目前检测PI牛的方法主要是免疫组化法或ELISA试剂盒,这些方法大多是针对BVDV Erns蛋白进行的。Erns的检测不局限于细胞内,也可由感染细胞向外分泌,因此在动物血清为样本也可以检测。有研究表明经一定浓度的苏拉名类似物CPD14、岩藻多糖、戊聚糖多硫酸酯或葡萄糖胺聚糖(GAGS)处理的培养细胞可抑制BVDV的感染性。CSFV Erns可诱导猪多种淋巴细胞凋亡。

(3) E1蛋白基因序列中有高度的疏水区,位于囊膜内,C端疏水区锚定在囊膜上,无免疫原性,与BVDV成熟有关。

(4) E2蛋白位于囊膜表面,N端在囊膜外,蛋白合成后期与Erns通过二硫键形成同二聚体。有诱导病毒中和抗体的作用,是BVDV抗原性的主要部位,变异几率大,是BVDV重要的抗原蛋白,也是疫苗免疫失败或失效的重要原因。

## 4.2 非结构蛋白

(1) CP型毒株与NCP型毒株的区别在于NCP型无P80蛋白,而该蛋白在病毒复制过程中起到重要作用。

(2) Npro 紧邻 3'-UTR, 是 BVDV 编码区第一个蛋白, 与 Erns 蛋白同为瘟病毒属特有, 保守性高, 一般依照该段基因序列分析结果对 BVDV 进行分型鉴定<sup>[9]</sup>。主要存在于宿主细胞质之中, 利用蛋白酶水解干扰素调控因子 (IRF3), 进而阻断干扰素 (IFN) 的产生<sup>[10, 11]</sup>, 是 PI 牛产生的重要蛋白。

(3) P7 蛋白与结构蛋白 E2 相连, 分子量极小, 仅 70 个氨基酸, 常与 E2 蛋白形成 E2-P7 复合物, 具体作用暂时不明。

(4) NS2-3 蛋白是 BVDV 基因组中最大的非结构蛋白, CP 型毒株与 NCP 型毒株的区别在于 CP 型 NS2-3 蛋白分解成为 NS2、NS3 两种蛋白, 而在 NCP 型中以 NS2-3 结合形式表达, 而 NS3 蛋白在病毒复制过程中起到重要作用<sup>[12]</sup>。NS3 蛋白可导致感染细胞产生 CPE, 而 NCP 型 BVDV 不能产生游离的 NS3 蛋白。NS2-3 蛋白 N 端具有疏水基, 但 NS3 蛋白 N 端缺少疏水基, 不能定位于内质网上, 在细胞质中游离的同时对细胞质中的重要蛋白进行破坏, 从而产生 CPE, 这可能就是 BVDV 被分为致细胞病变型和非细胞病变型的原因<sup>[13, 14]</sup>。

(5) NS4A、NS4B 蛋白参与病毒复制, 是病毒复制酶的组成部分, 但都没有免疫原性。

(6) NS5A、NS5B 蛋白的主要功能是复制起始病毒基因组, 也是编码区最后两个蛋白。

## 5 BVD 的诊断方法

BVD 对养殖业的危害巨大, 且猪患 BVD 出现的临床症状及病理变化类似于母源 CSF, 所以 BVD 猪瘟的防制也有一定程度的影响。同时, BVDV 还是牛源生物制品 (血清、冻精疫苗等) 中常见的污染源, 给畜牧业及相关领域造成了巨大的经济损失。由于我国多数养殖户和部分牛企对 BVD 没有一定的敏感性和防制意识, 也没有成体系牛病毒性腹泻的诊断、监测技术, 面对该病在我国有逐步扩大的趋势, 开展适合 BVD 的现场诊断和检测技术的研究迫在眉睫。

为了有效控制 BVD/MD, 监测抗体水平、淘汰 PI 牛是解决问题的关键, 血清学检测 BVD 抗体是牛群抗体水平监测的重要手段。而血清学检测的方法离不开分子生物学的支持, 寻找合适的抗原表位, 以构建简单快捷且精确的检测方

法势在必行。目前用于诊断 BVD 的方法有琼脂扩散试验、中和试验、病毒分离鉴定技术、免疫荧光技术、免疫过氧化物酶技术、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、反转录聚合酶链反应技术 (RT-PCR)、核酸探针技术、电镜技术等<sup>[15]</sup>。本文选择几种进行介绍:

## 5.1 琼脂扩散试验、血清中和试验、病毒分离鉴定技术

琼脂扩散试验法简单快速, 取样方便, 用病变组织无需处理直接与阳性血清反应即可观察结果。但缺点是特异性差, 容易受到 CSFV、BDV 影响, 假阳性几率大。

中和试验是一种流行病学调查中常用的检测方法, 其原理是检测血清中抗体含量进行判定, 是一种既定性又定量的检测技术。操作简单, 用培养的病毒与采集的血清作用后接种到 MDBK 细胞中, 观察可否造成致胞病变效应。由于本法检测的是血清中抗体, 对 PI 牛的检测无能为力, 因此临床上不能作为阴性场、群、个体的判定标准。

病毒分离鉴定技术诊断相对准确, 取疑似牛血液, 反复冻融获得病毒后接种 MDBK 细胞, 盲传几代后观察, 根据可否造成致胞病变效应判定是否为阳性。此方法缺点是操作复杂、时间长、通量低, 与中和试验一样无法对 PI 牛作出准确诊断。

## 5.2 免疫荧光技术

免疫荧光技术特异性强、敏感性高、时间短, 我国进出口检疫常用的方法, 相较前述几种检测方法最大的优点是可以检出 NCP 型 BVDV。原理是用与荧光染色剂结合的抗体对样品进行染色, 在荧光显微镜下观察样品中的病毒粒子, 也可以用间接免疫荧光法检测血清中抗体, 还能用免疫荧光抑制试验验证结果准确性。

## 5.3 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

ELISA 法是目前实验室检测的常规方法之一, 因具有极高的特异性、敏感性,



抗原、抗体做样本均可检测，检测的抗原位点多，NS3、E0、E2均有良好的检出率<sup>[16]</sup>，而广泛使用。市场上已有商品化的试剂盒，操作简单，3~4 h即可获得结果，适用于临床的诊断、检疫和流行病学调查。但目前没有精确检出或专用于NCP型BVDV的文献或商品试剂盒<sup>[17]</sup>。

#### 5.4 反转录聚合酶链反应技术 (RT-PCR)

RT-PCR法的优点是其特异性、灵敏性，可以对器官、组织、血液等多种样品进行检测，可检出BVDV的不同毒株，其意义是可以区别疫苗毒株与野毒株。可将BVDV、CSFV、BDV三种病毒区别诊断，也可以检出已失活的毒株。原理是将目的片段的RNA反转录得到cDNA，以该段cDNA为模板进行扩增进行检测。就已有的文献和实践表明，RT-PCR法的优点明显，但这个方法需要额试剂盒仪器昂贵，不适用于现场检测。

上述几种方法中，酶联免疫吸附试验因其具有高特异性、敏感性、快速等特点，且所需设备简单，通量高，逐渐成为广泛应用的检测方法；RT-PCR技术可检测出处于免疫耐受或持续性感染状态下的BVDV。

## 6 防制

传染病的防制在于控制传染源、切断传播途径、保护易感动物，BVDV如是。而规模化场区最为重要的就是前两者，因此防疫的重点必须保证牛群的长期净化，这就离不开高精确性的检疫措施、科学的免疫程序和净化措施。场区内普查，可一次性采集足够样品做多种疾病的检测，以节省人工、减少牛的应激，对BVDV进行抗原检测，淘汰阳性牛，这个步骤最关键的是淘汰PI牛，而后每四个月进行一次检测以了解牛群情况。一年以上或经过三次检疫未出现过阳性病例的动物群，可以认为是净化完成的群体或阴性场，原则上在能保证自繁自养和确实隔离的情况下，可以不进行免疫，但免疫仍是疫病防控的最佳方式。免疫时应注意三点：前文已经说明，为PI牛免疫接种会引发黏膜病，因此必须进行检测后再进行免疫；BVDV疫苗可导致免疫抑制，影响其他疫苗的免疫效果，在设计免疫程序时应与其他疾病的免疫时间分开；市场上BVD疫苗免疫后所产



生的抗体效价下降迅速,疫区应每隔两个月抽样检测抗体效价,及时补种疫苗。引入牛只时,至少要隔离9 d以上,如有其他疾病引入的可能,则至少要隔离到该病的一个潜伏期以上,原则上禁止从疫区引牛,如能做到自繁自养则可避免此类风险。

## 7 展望

腹泻是牛常见的一种疾病,犍牛更甚,但其病因并非只有BVDV一种。因此,检测技术的进步尤为重要。只有严格有效的防疫、检疫才能逐步在我国阻止BVDV的传播,减少其带来的损失,甚至可以在一定范围内将其消灭,这就是我们的最终目标。相信随着科技的进步、研究的深入,对病毒的了解会更加清晰,目标也会越来越近。

## 参考文献

- [1] 李佑民,刘振润,武银莲.牛病毒性腹泻—粘膜病病毒株(长春184)的分离与鉴定[J].兽医大学学报,1983(2):113-120.
- [2] Simmonds P, Becher P, Bukh J, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae [J]. J Gen Virol, 2017, 98(1): 2-3.
- [3] 薛飞,朱远茂,马磊.我国牛病毒性腹泻/黏膜病研究进展及防控策略[J].中国奶牛,2016(11):25-29.
- [4] 李树博.牛病毒性腹泻的临床表现及致病机制[J].畜牧兽医科技信息,2015(3):20-21.
- [5] Yesilbag K, Alpay G, Becher P. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus [J]. Viruses, 2017, 9(6).
- [6] Sato A, Tateishi K, Shinohara M, et al. Complete Genome Sequencing of Bovine Viral Diarrhea Virus 1, Subgenotypes 1n and 1o [J]. Genome Announc, 2016, 4(1).
- [7] Toplak I, Rihtaric D, Grom J, et al. Nearly Complete Genome Sequences of Two Bovine Viral Diarrhea Virus Isolates, Subtype 1f Strain SLO/1170/2000

- and Subtype 1d Strain SLO/2416/2002 [J]. *Microbiol Resour Announc*, 2019, 8 (46).
- [8] Iqbal M, Flick-Smith H, Mccauley J W. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E (rns) with cell surface glycosaminoglycans [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81 (2): 451-459.
- [9] Wernike K, Michelitsch A, Aebischer A, et al. The Occurrence of a Commercial N (pro) and E (rns) Double Mutant BVDV-1 Live-Vaccine Strain in Newborn Calves [J]. *Viruses*, 2018, 10 (5).
- [10] 翁晓刚. 北京市牛病毒性腹泻的流行病学调查、持续性感染牛 IFN- $\alpha/\beta$  反应及连翘酯苷 A 免疫调节作用的研究 [D]. 中国农业大学, 2015.
- [11] Alkheraif A A, Topliff C L, Reddy J, et al. Type 2 BVDV N (pro) suppresses IFN-1 pathway signaling in bovine cells and augments BRSV replication [J]. *Virology*, 2017, 507: 123-134.
- [12] Mahmoodi P, Shapouri M R, Ghorbanpour M, et al. Epitope mapping of bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 3 [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2014, 161 (3-4): 232-239.
- [13] Gamlen T, Richards K H, Mankouri J, et al. Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91 (1): 133-144.
- [14] Rajput M K S, Abdelsalam K, Darweesh M F, et al. Both cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhea virus (BVDV) induced autophagy at a similar rate [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2017, 193-194: 1-9.
- [15] 张宁, 秦建华, 赵博伟, 等. 牛病毒性腹泻—黏膜病诊断方法研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2008 (2): 93-97.
- [16] Sayers R G, Sayers G P, Graham D A, et al. Impact of three inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines on bulk milk p80 (NS3) ELISA test results in dairy herds [J]. *Vet J*, 2015, 205 (1): 56-61.

- [17] 范晴, 谢芝勋, 谢志勤, 等. 牛病毒性腹泻病毒非结构蛋白 NS3 的表达及 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(5): 85-89.

## The Recent Research of Bovine Viral Diarrhea

Li Gaoqian<sup>1</sup> Hao Jingfeng<sup>2</sup> Liu Liming<sup>3</sup>

1. College of Animal Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun;
2. Altay Vocational and Technical College, Altay;
3. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural Science and Technology, Jilin

**Abstract:** Bovine Viral Diarrhea (Bovine Viral Diarrhea, BVD/Mucosal Diseases, MD), is made up of Bovine Viral Diarrhea Virus, also known as the Mucosal disease Virus (Bovine Viral Diarrhea Virus comes, BVDV) caused by a kind of Diarrhea, fever, Mucosal necrosis, white blood cells reduce the deadly disease, reproductive disorders, clinical go up common recessive cases, for a better prevention and control of Bovine Viral Diarrhea. In this paper, the etiology, clinical symptoms, transmission forms and their hazards, BVDV genome structure, BVDV diagnostic methods and prevention and control are discussed. The latest research progress of bovine viral diarrhea was analyzed to provide some technical support for scientific and effective prevention of the disease.

**Key words:** Bovine viral diarrhea; Pathogen; Clinical symptoms; Morbidity control