

全国动检工作会议资料

西德兽医专家B. Liess博士

学 术 报 告

中华人民共和国动植物检疫总所翻印

一九八五年十一月于成都

牛病毒性腹泻——粘膜病的 持续感染和检疫

这是联邦德国汉奴威兽医大学病毒研究所所长B·Liess博士来我国讲学的又一篇报告，现整理出来供同志们参考。（1985·9）

牛病毒性腹泻——粘膜病在欧美各国广泛发生，是一个主要的检疫对象，从病名理解，牛病毒性腹泻病牛一定表现腹泻，但有时还有母牛流产，口腔粘膜表现出血性或坏死性糜烂等主要病状，容易从病牛鼻粘液和血清中分离出病毒。可是如果仅根据病牛拉稀、失水、眼窝下凹，流口涎以及口腔齿龈溃疡等病灶，则很难和牛瘟的以区别。死后或扑杀的尸解病变在食道粘膜以及小肠培氏淋巴结的水肿，出血性烂斑等都容易和牛瘟混淆。首先由Ramney及River(1975)报告有些病牛还在蹄叉趾间隙上皮出现溃疡烂斑，又象口蹄疫，经Ramney做出区别诊断不是口蹄疫而称之为牛的粘膜病（Mucosal disease），后来证明它和BVD是同一病原，自此后，统称为牛病毒性腹泻——粘膜病（BVD—MD）。

一、病毒学

牛病毒性腹泻病毒（BVDV）毒粒的直径约50纳米，外有囊膜，表面抗原易被脂溶剂破坏，所以肥皂对它也有消毒或灭活效果。

现将BVD病毒分类为披膜病毒科（Togaviridae）的瘟疫病

毒属 (Pestivirus) ,还有风疹病毒属, (Rubellavirus) ,瘟疫病毒属的代表株是BVD, 其他 还有猪瘟疫病毒, 绵羊边界病病毒 (Border disease virus) 等。已知瘟疫病毒的特性是:

毒粒直径大小	57 ± 7 纳米
核壳直径大小	28 ± 3 纳米
RNA	单股
基因组KeiDNA	正RNA→mRNA
乙醚/氯仿	敏感
胰旦白酶	敏感
PH3 (4°c)	敏感
血清型	1
病毒粒复制	严格的在细胞浆内

由于病毒对胰酶敏感, 所以进入胃则被灭活。

BVD病毒感染细胞(德国常用原代牛睾丸细胞,其他国家则常用原代牛肾细胞或牛肾细胞株及牛鼻甲骨细胞株(Bovine turbinate), 有的毒株不出现细胞病变(CPE), 可以用特异性荧光抗体标记做出诊断; 有的毒株则产生细胞病变,易于鉴别。国际间,不出现CPE的毒株有NY—1毒株,出现CPE的毒株则有美国分离的Oregon C24V株,广泛的用于诊断和疫苗;还有美国的Singer毒株,NVDL毒株,欧洲则有德国分离的Langranger毒株等。

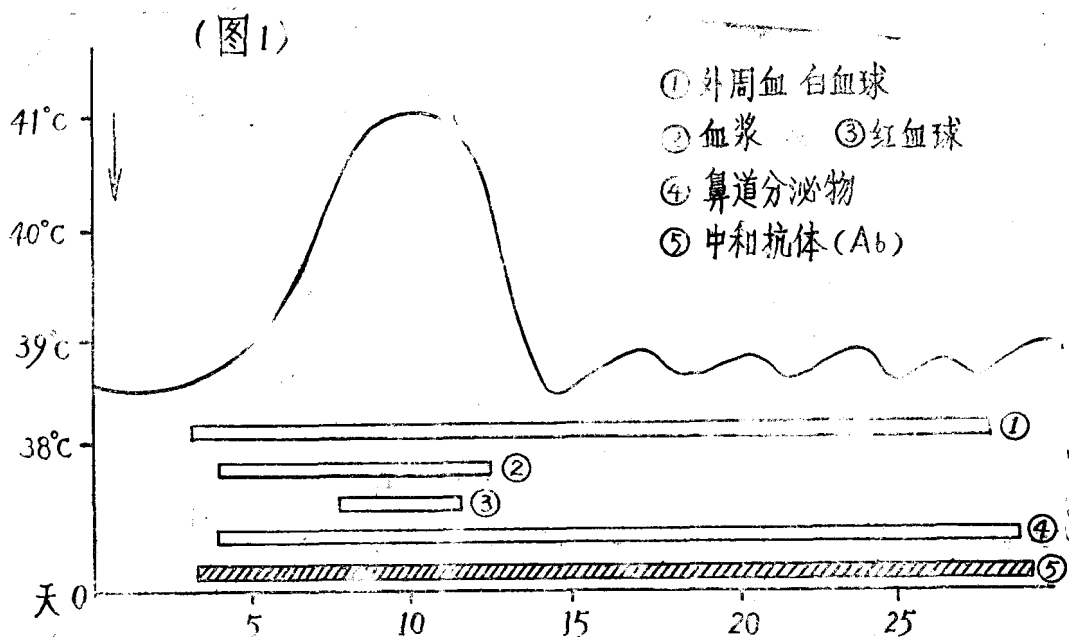
最近,欧洲经济共同体农业委员会在布鲁赛尔开会议定:在用细胞培养分离病毒时(病料取自病牛白细胞),致少要每5天传代一次,传三代共15天才可判定。特别是不出现CPE的野毒株,最后方可用荧光抗体技术加以判定。

在细胞培养物中出现蚀斑 (Plaque) 的大小, 似乎也与CPE有关系, 例如现已知OregonC24v毒株在牛睾丸细胞中出现大班, 德国Langranger株呈现大小混合蚀斑, 而分离出来的野毒株往往呈现小班。从理论上讲, 出现CPE的毒株, 应该是对细胞有较强的致病性, 但也许不全是事实, 如OregonC24v毒株, 都是国际上通用的弱毒疫苗株。

至于不同毒株的抗原性也存在差别, 以美国毒株为例, 1964年分离的NADL毒株就比1960年分离的OregonC24v毒株的抗原性要好些, NADL毒株激发牛产生的中和抗体滴度往往比OregonC24v毒株的抗体滴度要高,

二、BVD的持续感染和穿胎盘感染

在正常条件下, 人工接种定量BVD病毒于无抗体的易感犊牛后2天, 就可以从外周血白血球中出现病毒、产生病毒血症, 然后升温, 而疫苗株则无体温反应。牛在升温前两天就出现抗体, 所以说在外周血中, 抗体和病毒是同时以免疫复合物存在的。血浆和红血球上在短期内也可以找到病毒, 而在病牛的鼻道分泌物中则存在病毒较久较多, 存活到接种病毒25天以后, 所以从高温期的病牛白血球和鼻道分泌物中分离病毒的机率较高, (如图所示)。



犊牛接受母牛的初奶抗体可以抵抗感染。初奶抗体的半衰期随不同毒株而异。例如NADL毒株要高于AOB8/69毒株。一般讲，初奶抗体大概是10—21天减少一半。如能计算出初奶抗体的半衰期，则易于计算出犊牛抗体消失的日令，大体是6月令左右，往往也随各毒株不同。两个毒株的抗原性差别常由此可以表达出来。

这些牛如处于隔离条件下，到一定时期，抗体滴度下降到零；如一旦接触病毒感染，则中和抗体滴度又会再上升；另一些犊牛也可能在抗体滴度尚未完全下降到零时，例如在出生后16—20周左右时，一旦受到再感染，中和抗体滴度也会立即上升，如此出现血清阳转 (Sero—Conversion) 的牛可以达到70—80%；它们也可以终身免疫。一般讲，抗体随犊牛年令增长而提高，例如 ≥ 3 岁时，抗体增长率可达到90%。

BVD病毒是如何致病的？主要有下列途径：

1. 犊牛的先天感染。母牛在怀孕前期 (120 天前) 发生穿胎盘

感染 (Placental transmission)。

2. 成牛感染, 通过带病毒的精液感染母牛卵子。重要的问题是BVD病毒的怀孕期内穿胎盘感染。条件是以前没有发生感染的动物。一般讲, 血清抗体阳性的母牛, 往往不发生经胎盘感染犊牛, 反之, 另有20—30%左右的血清抗体阴性的母牛, 才可经胎盘感染胎犊, 这时母牛的日龄往往已 ≥ 12 月龄, 对病毒敏感。进行人工感染试验时, 只有选择这样犊牛才能成功, 经鼻腔接种病毒, 才可达到胎盘传递感染。

这些发生胎盘感染的母牛, 是否一定发生流产? 决定于怀孕期, 仅在怀孕前期120天内, 胎儿对病毒特别敏感, 结果产生各式各样的死胎流产, 胎儿畸形变态, 遗传性中央神经系统(CNS)缺陷, 持久病毒血症, 产时死亡, 隐性感染以及胎牛发生免疫耐受性等等。母牛要到180天后产生血清中和抗体, 才有免疫力, Liess博士归纳如图2。

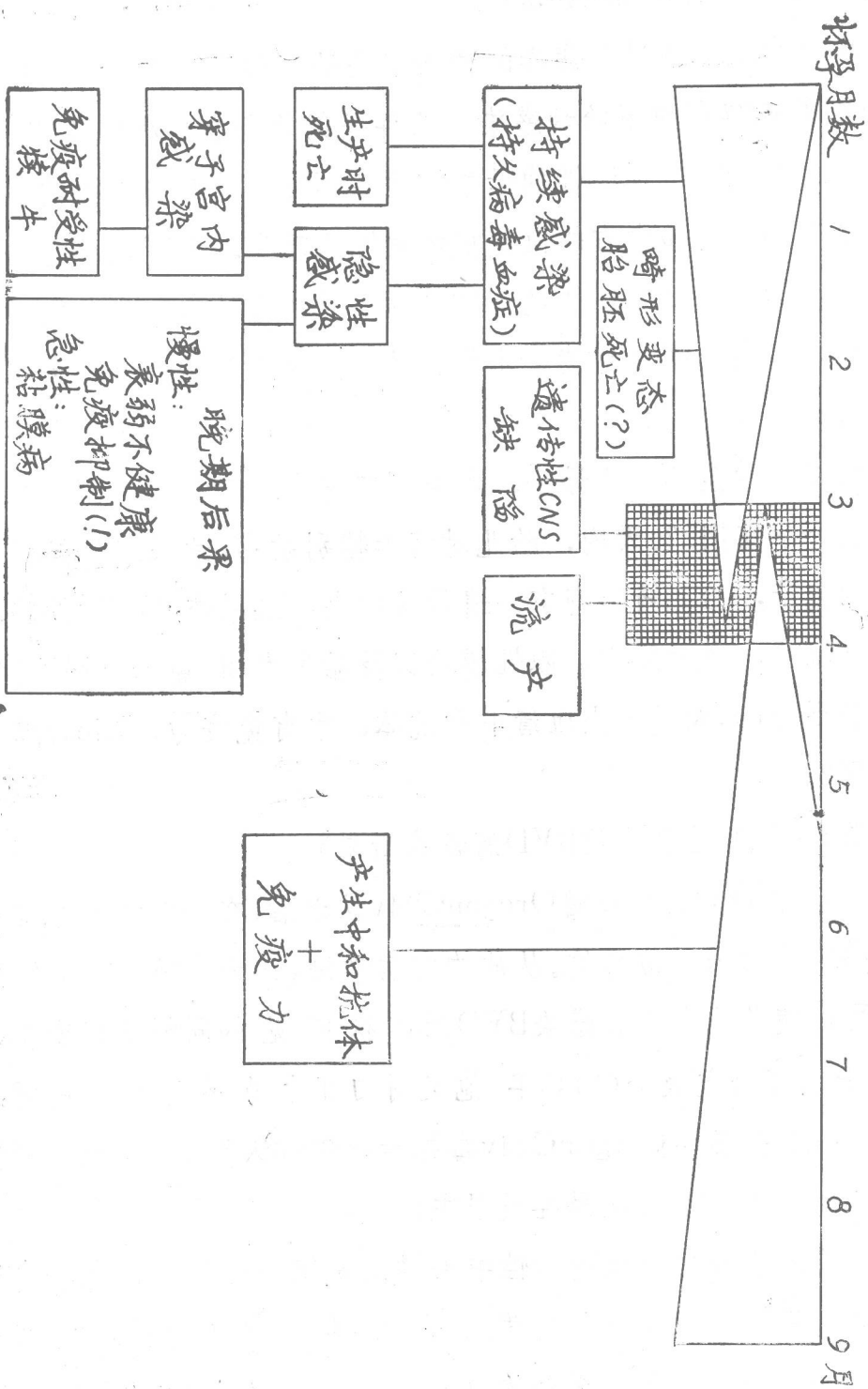
(图2 牛经胎盘感染BVD病毒的后果)

三、接种BVD弱毒疫苗OregonC24v株之后, 在一定程度上发生穿胎盘感染的后果是仿佛的。从病的发病学讲, 认为疫苗病毒的穿胎盘感染可以使胎儿产生和感染BVD野毒株所见的同样病理变化, Liess博士已有论文报告(1933年)他又用幻灯片揭示下列各病例:

有一头公牛接种OregonC24v毒株后一年86天至二年后, 保持持续性病毒血症, 仍可从鼻腔及尿中排毒。

有一头初生犊牛呈现遗传性中央神经系统缺陷, 头很大, 往后仰, 扑杀后尸解检查发现小脑发育不全和水脑症 (Hydrocephalus)。还有一罕见小牛, 生前并无脑症状, 但死后解剖也出现水脑

图 2 牛经胎盘感染 BVD 病毒的后果



症，从这类病犊的脑脊髓液中分出病毒。

还有一例母牛，中和抗体阴性，但头大，长相奇特，已知怀孕待产，血液检查是病毒血症。分娩后产牛犊，前肢无力衰弱不能站立，剖杀后检查，冰冻切片检查胎儿胎盘和胚层母牛胎盘层交界处均见到萤光阳性细胞，可证明病毒经胎盘感染胎儿。另外牛犊的肾小球及导管均呈现非常明亮的FA萤光细胞，对比成年牛只往往因肾组织有抗原抗体免疫复合物的沉着而FA细胞看不清，甚至出现假阴性。除此之外，这犊牛的第四胃贲门部及甲状腺上皮层切片都出现明亮的FA萤光细胞。

因此，要再三强调：母牛在怀孕期的前四个月内是发病的最敏感期，欧美牛只相同。也是最危险阶段，长途运输或其他逆境因素均可促使孕牛流产，排毒传染易感牛只成为疫源。根据这一情况，任何进口的孕牛应在隔离期内单独饲养直到生下小牛进行病毒及抗体检查，判明其确为阴性牛只后，才和本国牛群合群。注苗足以造成混乱，不待产犊就提早混群，一旦发现病牛，后果是无法挽回的。

四、免疫耐受性：BVDV穿胎盘感染使胎儿产生病毒血症，并且能够持续地带进牛的成年期。这在其他披膜病毒也可产生相似结果，例如绵羊的边界病病毒，猪的猪瘟病毒以及人的风疹病毒。仅是致病性不同而已。这种现象称之为免疫耐受性(Immuno-Competant)。病毒始终存在于新生小牛体内，而在出生后犊牛体内始终没有抗体出现，临床表现正常，体内却存在病毒。这与存在特异性的免疫耐受性有关系。

美国的McClurkin也试验证明(1984)，血清抗体阳性的母牛，在妊娠58—125天时对胎儿进行BVDV接种；血清阴性抗体的

母牛，在妊娠42—114天时，对胎儿作同样病毒接种，都可以生下临床上正常的牛犊，但这些犊牛血清抗同种或异种BVDV的抗体价都是阴性，可是都带毒，它们与其他牛只的接触感染源。

现已明白有免疫耐受性的BVDV毒株是一株抗原性特异的变异毒株，这些有免疫耐受性的犊牛保持病毒血症，可以从白血球分离出病毒，但却测不出对这毒株（X1）的中和抗体，可是这些牛却能对其他自然感染毒株（X2）或注射疫苗毒株产生抗体。而且这类免疫牛到后期受到其他BVDV株感染，亦即被BVDV重复感染时，则易于产生临床致死的粘膜病。即或使用弱毒疫苗也往往不能控制犊牛病毒血症的发展，适得其反，有些牛在疫苗免疫后还死于粘膜病。

至于如何引起致死性粘膜病发生的原因还不完全清楚。英国开普顿的Brownlie等人曾试验假设：病牛必须是先感染无CPE的BVDV株，随后再重复感染有CPE的毒株，才能表现致死性临床症状。Liess博士认为不一定必须如此，重复感染的不必全是有CPE的BVD毒株才发病，主要是由于重复感染毒株与始发感染毒株的抗原性存在区别所造成。他也提到美国的McClurkin等人（1984）的试验：认为在持续感染牛中，由一种抗原性不同的BVD—MD病毒株重复感染后而诱发了临床粘膜病。这要理解为病毒存在抗原变异株，而不是存在血清型的不同。这在猪瘟病毒也是一样，只有一个血清型，如近年来在猪瘟病毒中出现一些低毒力毒株，如何形成的毒力变异尚待阐明。

五、血清学检验及诊断检疫标准问题

（一）、中和抗体和微量中和试验：欧州惯用微量中和试验检测BVD的中和抗体。选用有CPE毒株以定量病毒变量血清在塑料滴定

板滴定血清抗体的终点滴度。如仅有无CPE病毒株,则应选用间接免疫荧光抗体技术,滴定抗体滴度。所测抗体滴度高低,也与所用毒株不同而出现差别,例如NADL毒株常表现较高滴度,而用A1138/69毒株则表现较低滴度。还有4072毒株的抗体反应强,检测时,对同源毒的抗体滴度。可高达1:5120,而对异源毒滴度却很低;有意义是它对Alford—187猪瘟毒株的抗体滴度却很高,可以达到1:2560,反过来将这株猪瘟Alford—187株接种牛,可产生7—8天的病毒血症,不显临床症状,也检不出抗体反应。

因此,在进行中和试验时,应固定使用病毒株,才能获得可比的稳定结果,国际间较广泛采用有CPE的OregonC24V毒株,但欧洲有些国家则采用自己分离的毒株。

至于使用什么细胞用于中和试验,Liess提示德国常用原代胎牛肾细胞或牛睾丸细胞较好,如1900年西德第一次分离出Langranger毒株即用牛睾丸细胞。美国的MDBK、PK—15以及BT(牛鼻甲骨细胞)细胞株虽然都对BVDV敏感,由于培养细胞所用胎牛血清常被BVDV污染,以致有些细胞株已被BVDV污染,需要排除后才能应用。另外,目前有一株猫肾传代细胞株CRFK(Crandall feline Kidney cell)已被用于制取疫苗,亦遭此污染的命运,要注意。

(二)、免疫应答,抗体持续期和滴度判定问题:

首先应认定牛对BVDV的局部免疫力很低,而且消失很快(四天左右)。因此,在天然条件下,牛一旦受到再感染则中和抗体又再上升,至于抗体持续期,估计以年计。有人问抗体低到什么程度才容易受到第二次感染?这决定于毒株差别和病毒量的差别,甚至

有少数牛虽保持高滴度抗体，仍有机会受到再感染。

初乳抗体和中和抗体不一样，它属于被动免疫性，是传递的，前已叙述它是短暂的。

还有，中和抗体和免疫力之间也不宜划等号，意思说，不等于有抗体就有免疫力；例如还有些猪瘟耐过猪，当抗体水平已下降到零，仍有免疫力，甚至维持几年。如有机会再被感染，则立刻抗体滴度上升。如回忆反应，测不出抗体，是由于干扰或决定于监测方法的敏感性不够。一般在感染后10—12天抗体到高峰，易于检出，如方法敏感，提前到10天前即可查出抗体。

在讨论BVD的进口牛检疫条款时，按中澳两国检疫条款的规定“血清中和试验作两次，隔离前在选牛时做一次，隔离期间作一次，采血期间隔不少于21天，血清稀释从1:5开始进行稀释（各国不尽相同），应第二次所检滴度不高于第一次，相差超过两个滴度则判阳性牛”这个阳性判定标准是与澳大利亚谈判时确定的。据澳方声称，这是根据欧洲经济共同体（EEC）统一规定的标准。

Liess博士采取完全否定的科学态度做了如下的申明和解释

1、首先指明，EEC他参加主要的兽医咨询工作，在Bruxelles的H.J.Bendixen是EEC的主要兽医行政负责人，EEC从来没有BVD检疫时中和抗体前后升两个滴度判阳性的统一规定，事实是并无统一规定。

2、抗体检查，应该在农场选牛时检两次，这是重点，然后将阴性牛进入隔离检疫站再检两次，一共四次再发运。而不仅是各检一次。

3、BVD中和抗体滴度隔三周两次检查相差1—2个滴度，例如由1:16→1:64，如此出现有两种可能性；一是生物学上的变化，或方法学上的差异是允许的，往往检测同一份血清样，前后出现1—2滴度之差也是可能的。二是三周后已被再感染，从而抗体滴度上升，这一定是上升得较明显，比1:64更高些，可判定阳性。包括技术问题在内，因此滴度相差必须要有一定幅度才可判阳性。

4、要根据病性来认识抗体阳性的意义。首先是BVD抗体不是传染性，仅表示以前被病毒感染过，如系牛鼻气管炎 检 疫 抗 体 阳 性，则意味引入潜伏感染的带毒牛，而牛粘膜病则不然，BVD应该主要放在长期查病毒分离而不仅是查抗体，从牛的白血球或鼻粘液查病毒，从流产胎儿或犊牛查病毒，这是主题；而IBR则查抗体就可判定是感染牛。

绵羊边界病的检疫要求完全同BVD相似。

但必须注意：牛和羊一样，它们在早期怀孕时，你很难判定它们是怀孕前还是怀孕后期被感染。早期感染，母牛可通过胎盘感染传给胎犊，但母牛在怀孕期并不排毒，构成亚临床感染，仅传毒给胎犊，有抗体保护自己。要到母牛分娩时才排出病毒，随胎衣，胎液羊水排毒。因此，在检疫后期要等到母牛生产，立即检查牛犊是否被感染。当然，流产牛、死胎、生后死亡，取到中央神经系统比较易于诊断，活牛犊查病毒血症常较费事困难些。

了解上述发病机理，故在母牛中和怀孕四个月时，查的抗体并无实际意义，如果真的抗体滴度增加很高，才可证明感染，否则如方法学无疑问，前后相差1—2滴度，并不能诊断判阳性。

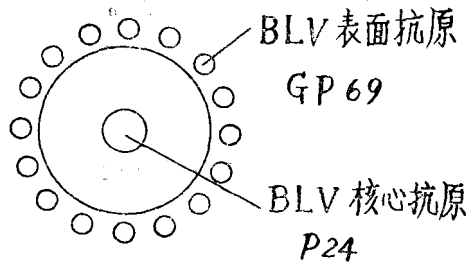
三、琼脂胶免疫扩散法和酶联免疫吸附试验：

1、用免疫扩散法检查的是血清中的沉淀抗体。早期琼扩抗原用病牛淋巴结乳剂，沉淀线表现非特异性，故较少使用。

如能用组织培养的病毒浓缩物或提纯病毒则效果会好得多，问题是这种抗原不易获得。

如将它和牛白血病毒毒粒比较而言，毒粒表面都有糖蛋白表面抗原。牛白血病毒抗原可以分出糖蛋白GP69和核心蛋白P24两种料，可以分别用来做琼扩抗原产生明显的沉淀线，用于检疫。

对于BVDV毒粒说要比BLV毒粒小1/3，糖蛋白抗原量较少，如提纯取得的浓度不够，质和量都差，则不易做出扩散反应。



一般讲：牛的沉淀抗体比中和抗体出现早，也消失的快。另外，对琼扩反应讲，核心抗原（P24）量多，而糖蛋白抗原GP69量少，宁可取用糖蛋白抗原进行琼扩反应，显示较强特异性。而在BVDV尚没有获得良好的糖蛋白抗原。

2.酶联免疫吸附试验(ELISA)：——亦正在试用于检测BVD抗体。高度免疫制取的血清用于标记荧光抗体，亦同样可以用来作为辣根过氧化物酶标记的抗体。ELISA所能检出的是抑制抗体而不是中和抗体，敏感性赶得上中和试验，操作方便有快速之效。但在取舍时，还要考虑它的特异性差，有时出现假阳性，还有成本贵些。到目前为止，上述两种方法似乎尚不能比微量中和试验更敏感更特异性，所

以尚未推广。

六 BVDV抗原的变化与荧光抗体技术：

BVD分布于全世界，可能流行来自西方和非洲，非洲野水牛感染率高，还有牛和长颈鹿同养。目前欧美各国仅仅有很少的隔离牛群能保持无BVD，亦即抗体阴性牛群很困难。如欲得到无BVD牛群，要费2~3年分群隔离检疫时间。

BVDV的抗原性决定于毒粒的表面抗原决定簇(表位epitopes)。从分子生物学角度讲都是由大分子蛋白构成。通过结构定位在毒粒表面有许多活性部位亦即抗原决定簇，各决定簇不同决定于氨基酸的序列不同；若序列发生重组变化，则会发生突变出现病毒抗原性的改变。而在另外一些病毒如流感付粘病毒，不仅是氨基酸序列的改变，并且在分子结构上还发生折叠(folding)的变化，这样变化愈多，则病毒的抗原性变异愈大。

对比而言，BVDV是单链RNA病毒，发生重组的机率极少；流感病毒也是RNA病毒，但核酸是分成4个片断(Segments)的，发生重组的机率高，所以病毒变异多。很可能，BVDV也还是存在极少重组的机会，即2个毒粒同时侵染同一宿主细胞，在同一细胞复制出许多病毒粒子。据资料报导，流感病毒同时在一个细胞中的复制毒粒达到 10^3 ，而BVDV和猪瘟病毒HCV仅有 10^1 ，可能HCV更少些。而另一种具有反转录酶的马传染性贫血病毒，在它的长期持续感染过程中，毒粒进入宿主细胞后的复制，每时都在变化，初感染病毒与后期病毒都不相同。

病毒抗原性变化并不影响抗原的检查诊断。发病或感染牛的白细胞，粪便、鼻分泌物的病毒可由细胞培养分离，无CPE的细胞

培养物以及组织脏器中的BVD抗原主要用荧光抗体技术进行确诊。在中央神经系统（CNS）中也可检出BVD抗原，主要在神经原（Neuron细胞及树突中找到，而延脑及脊柱绝少找到。另外，在脑组织亦可出现血管周的淋巴细胞浸润，亦即管套现象，这在猪瘟和绵羊边界病例都相似出现，而这在搔痒症(Scrapie)并无此病变可以区别之。

制取特异性强又敏感的荧光抗体的关键是制备高效价的免疫血清提取IgG。Liess博士根据他10年经验，用猪制取免疫血清，既可用于BVD又可用于猪瘟病毒的检查。其免疫过程及各阶段所测抗体滴度列如下表：

首先选用5—10头断奶猪，并严格检测全无对下列四种抗原病毒的抗体，滴度 $<1:5$ 。然后将易感猪各经鼻内接种下列四种病毒培养物各二ml，隔离饲养之。

- A: BVD Osloss/2482株野毒株。
- B: BVD NADL毒株（抗原性较好）
- C: HCV Alford/187（法国猪瘟强毒株）
- D: HCV HCV331（猪瘟低毒力变异株）

四周后，检测各组猪对四种病毒抗原的抗体滴度（对同原毒株的抗体滴度）结果是：

- A: 1:160—1:320
- B: 1:6
- C: 1:10—1:20（比对NADL还高）
- D: $0 < 5$

C组猪对Alford/187毒株的滴度比对牛毒的滴度还要高些。说明NADL毒株比Oregon C24V毒株更接近于猪瘟病毒。

八周后再测对同源毒的抗体滴度，结果是：

- A: 1:1600
- B: 1:40—80
- C: 1:20—40
- D: 1:20—40

八周时，这批免疫猪统一用法国Alford/187猪瘟病毒经鼻内加强接种一次。再二周后放血取血清，亦即全程十周后的抗体滴度达到：

- A: 1:2520—10240
- B: 1:640—1280
- C: 1:280—2560
- D: 1:640—1280

其要点说明如下：

- (1)、猪瘟病毒接种牛有反应，可以用于识别BVDV。
- (2)、免疫用病毒全来自细胞培养毒，即用粗培养液，不要提纯浓缩。
- (3)、办法和窍门是全部经猪鼻腔内接种可以不出现细胞抗原的非特异性，如经皮下途经免疫，则必然出现组织抗体。猪仅对病毒抗原产生应答，而对细胞及培养液中的牛血清无反应或极少。
- (4) 免疫过程仅两次接种抗原，其中一次加强注射，所以不是高免血清，很节省抗原。
- (5)、最后提取的免疫球蛋白效价很高，既可检测BVD，也可检测HC抗原。FA抗体工作液可达到1:125稀释，全无组织非特异性反应，

(6)、免疫日程等到8周时，抗体滴度在上升，加强注射时，鼻内接种2毫升HCV就可以，然后2周后放血，不要拖延太长，否则抗体滴度要下降。

七、BVD和牛瘟的区别诊断

开始时就讲到了在临床上BVD有些病状和牛瘟及口蹄疫相混淆，特别要与牛瘟做好区别诊断。这两种病的病原互不相关，牛瘟病毒属于付粘病毒科的麻疹病毒属 (morbillivirus)，而BVD病毒属于瘟疫病毒属。仅发病相似。

牛瘟最近在非亚又有流行，中国虽已消灭，但印度和东南亚一些国家还存在，最近流行传到土耳其各国，水牛发病剧，要严密注意发展。

有人称BVD为似牛瘟疾病(Rinderpest—like—disease)，但牛瘟有高度死亡率，达80—90%以上。发病过程和口腔发生烂斑似BVD。牛瘟对牛最易感而不感染猪，潜伏期4—10天，体温上升似BVD，高温稽留2—3天。病前期除发烧外，出现口腔粘膜发炎充血流口水等，然后进入粘膜发病期，特别可见在口唇齿龈等部粘膜，开始发生针尖状透明的孤立水泡及糜烂，继而融合成片，呈现明显的白喉状坏死糜烂区，这是典型病状。而BVD仅有轻度比较孤立的粘膜糜烂，绝少呈弥漫性的。牛瘟要厉害得多，流大量粘性口涎，水性腹泻，停食厌食，消瘦，病到末期大约全程8—10天倒毙死亡。

病牛大约在感染后第四天就出现抗体，存活牛到发病第8天都出现抗体。发病后第2天就出现病毒血症，直到最后8—10天死亡。病牛在第3—4天出现典型症状时，开始排毒，到病变深化，体温下降拉稀衰竭时，则排毒减少。大量病毒存在于口腔分泌物及