



## 综述与专论

# 牛病毒性腹泻/黏膜病病原学特征及其检测方法研究进展

陈伯祥, 王佳, 赵子惠, 杨明, 唐云娇

(甘肃省畜牧兽医研究所, 甘肃平凉 744000)

**摘要:**近年来,牛病毒性腹泻病/黏膜病(BVD-MD)在国内外流行广泛、对养牛业危害严重,仅通过临床症状和病理变化很难与其它腹泻病作出鉴别诊断。为了确诊和净化 BVD-MD,选择一种最佳的检测方法就显得十分重要。本文对牛病毒性腹泻病毒(BVDV)病原基本信息及流行毒株、检测方法和近年来的研究进行了综述,以期对牛病毒性腹泻/黏膜病的流行病学调查、致病机制、检测及防治提供参考。

**关键词:**牛病毒性腹泻病毒;病原学;检测方法

[中图分类号] S856.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1004-6704(2025)-02-0097-06

## Research Progress on Etiological Characteristics and Pathogen Detection Methods of Bovine Viral Diarrhoea-mucosal Disease

CHEN Boxiang, WANG Jia, ZHAO Zihui, YANG Ming, TANG Yunjiao

(Gansu Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Pingliang, Gansu 744000, China)

**Abstract:** In recent years, Bovine viral diarrhoeal disease/mucosal disease (BVD-MD) has been widely prevalent both domestically and internationally, causing serious harm to the cattle industry. It is difficult to differentiate BVD-MD from other diarrhoeal diseases only by clinical symptoms and pathological changes. In order to diagnose and purify BVD-MD, it is very important to choose the best detection method. In practical applications, the choice of suitable testing methods should consider various testing purposes comprehensively. This article provides a comprehensive review of BVDV pathogens, prevalent strains, and recent advancements in detection methods to serve as a reference for epidemiological investigations, pathogenic mechanisms, detection, and prevention of bovine viral diarrhoea/mucosal disease.

**Key words:** bovine viral diarrhoea virus; etiology; detection methods

牛病毒性腹泻/黏膜病 (bovine viral diarrhoea-mucosal disease, BVD-MD), 是由牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhoea virus, BVDV) 感染引起牛、羊、鹿、猪等多种动物的一种病毒性腹泻黏膜病, 患

病动物表现为发热、白细胞减少、腹泻、怀孕母牛流产或产出畸形胎儿为特征的传染病<sup>[1]</sup>。本病于 1946 年在美国纽约州首次报道, 现世界各地均有发生且有分离毒株的报道; 感染牛群具有长期带毒、持续性感染的特点<sup>[2]</sup>。本文就近年来牛病毒性腹泻/黏膜病病原学特征及其检测方法的研究进展进行概述, 为其防控提供参考。

### 1 病原基本特征及流行毒株

BVDV 在病毒分类上属于黄病毒科 (Flaviviri-

[收稿日期] 2024-10-10

[基金项目] 甘肃省崆峒区科技计划重点研发项目 (KTKJ-2023-01); 甘肃省重点研发计划 (23YFNL0001); 甘肃省科技计划项目 (20JR10TA490)

[第一作者] 陈伯祥 (1968-), 男, 研究员, 主要从事动物疫病防控技术研究。E-mail: chenboxiang001@163.com

dae)瘟病毒属(*Pestivirus*),是瘟病毒属的代表种,只有1个血清型,但依据其接种细胞后有无引发细胞病变又分2个生物型(致细胞病变型和非致细胞病变型)<sup>[3]</sup>。

BVDV病毒粒子呈球形、半球形,为单股正链有囊膜的RNA病毒。BVDV全基因组为12.3~12.5 kb,其组成由3'非编码区(3'-UTR)、开放阅读框(ORF)及5'非编码区(5'-UTR)。5'-UTR编码360个核苷酸,呈现稳定的茎环结构(1a发夹),参与BVDV RNA的翻译起始及复制。ORF编码的多聚蛋白含有3 900个氨基酸,聚合蛋白在细胞自身及病毒的酶作用下分为12个蛋白,从N端到C端依次为NH<sub>2</sub>-Npro-C-Erns-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH,核壳蛋白C、Erns、E1和E2为结构蛋白,其余8个蛋白为非结构蛋白<sup>[4]</sup>。其基因依次为5'-P20-P14-P48-gP25-gP53-P54/P80-P10-P30-P133-(P58/P75)-3'<sup>[5]</sup>。

不同BVDV分离病毒株,其5'-UTR基因序列保持高度的一致性。按照其5'-UTR基因序列的不同,将BVDV分成1型和2型;又按5'-UTR、Npro和E2的基因序列不同,再分为2个基因型26个基因亚型,其中:BVDV-1型分为22个基因亚型(1a~1v);BVDV-2型分为4个亚型(2a~2d)<sup>[6]</sup>。目前,在国内流行的BVDV毒株有1a、1b、1c、1d、1m、1o、1p、1q、1u、2a及2b型<sup>[7-8]</sup>;而北美和欧洲流行的病毒株为BVDV-1a型和BVDV-1b。

## 2 病原检测方法

BVD-MD没有其独特的病理变化和临床症状表现,很难在临床诊断上予以确诊,确诊还需要进一步实验室检查。目前,在BVDV的检测方法上研究和应用较多的是ELISA方法、间接免疫荧光法、PCR方法及荧光定量PCR方法。

### 2.1 病原的常规检测方法

2.1.1 病毒分离鉴定 病毒分离鉴定是确诊BVDV的基本方法之一。该病毒能在牛睾丸、牛肾细胞(MDBK)上生长,而MDBK细胞是该病毒培养最常用的细胞。该病毒可从病牛的全血、排泄物、血清、脾脏和肠系膜淋巴结等分离出。病毒分离鉴定对试验设施及工作环境、人员均有严格要求,对规模化的病毒检测和流行病学调查不适用。

2.1.2 电镜观察 电镜技术常用在病原学研究上,观察病原体的形态结构、大小,很少用于BVD-MD的实验室诊断上。将新鲜病料或细胞培养物直接负染或者制作成超薄切片,在电镜下观察其病毒粒子

形态特征和大小,以确定其病毒粒子来诊断。赵月兰等<sup>[9]</sup>将BVDV分离株用磷钨酸负染在电镜下观察病毒形态结构,显示病毒粒子直径为40~60 nm,形态略呈圆形,与BVDV颗粒基本一致。

2.1.3 酶联免疫吸附试验(ELISA) 牛病毒性腹泻病毒只有一种血清型,ELISA方法具有特异、敏感、快速和高通量、操作简单的优点,适用于大批量样品的检测,多用于流行病学调查和抗体检测,这为国内外BVDV的高能量检测提供了技术支持。宋文凤<sup>[10]</sup>以单克隆抗体3E10和3F5为捕获抗体,以单克隆抗体1B12标记在辣根过氧化物酶上为检测抗体,建立检测牛病毒性腹泻病毒的双抗夹心ELISA方法。王青青<sup>[11]</sup>采用大罐奶(bulk tank milk, BTM)代替血液样品进行抗体检测,进而判定整群牛的BVDV感染状况;BTM方法的样品易采集,可较短时间内对免疫背景清晰的整个牛群健康状况作出预判;在出现BTM检测抗体阳性结果时,可采用抗原ELISA检测法进一步确诊和筛选出感染牛和PI牛。范晴等<sup>[12]</sup>将兔抗BVDV多抗结合在固相载体上,兔抗BVDV NS3蛋白单克隆抗体作为捕获抗体,建立了ELISA捕获BVDV抗原法。经与RT-PCR检测方法对比,发现该方法相符率达到100%,最低能检测的病毒量为 $7.9 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>。

2.1.4 间接免疫荧光检测方法 间接免疫荧光检测方法常用于血清和疫苗等生物制品中BVDV的检查,以了解其感染BVDV情况。包振中等<sup>[13]</sup>建立了5种检测BVDV的方法,其中间接免疫荧光方法具有较高特异性和可靠性,在临床检测中可实现高效检测的目的。

2.1.5 RT-PCR方法 牛病毒性腹泻病毒包括1型和2型两种血清亚型,血清1型在临床上致病性较强。RT-PCR方法能很好地区分血清亚型、细胞病变型和同属病毒。李新培等<sup>[14]</sup>建立了牛病毒性腹泻病毒的分型RT-PCR检测方法,具有良好的特异性、敏感性和重复性,丰富了牛病毒性腹泻病的临床检测及流行病学检测的方法,为牛病毒性腹泻病毒病流行病学调查和病毒分型鉴定的提供了可靠的检测技术。李健友等<sup>[15]</sup>建立了牛病毒性腹泻病毒Nano-PCR新型分子生物学检测方法,以传统PCR技术与金纳米颗粒材料相结合而研制的,敏感性比普通PCR方法提高了10倍,最低核酸检测量为 $6.84 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L,能快速实现对临床样品的检测。侯佩莉等<sup>[16]</sup>建立了以BVDV 5'-UTR基因保守序列设计引物和探针的RT-PCR法。王伟利等<sup>[17]</sup>依BVDV的5'端非结构蛋白基因序列,设计1

对特异性引物并合成,建立一步法 RT-PCR 法,扩增片段大小 244 bp,敏感度 0.1 TCID<sub>50</sub>,对 BVDV-NADL、BVDV-OregonC24V 和 BVDV 长春 184 毒株的检测呈阳性,而对 IBRV、CSFV、BRV、BCoV 的培养物检测均呈阴性;对 460 份不同样品检测结果与病毒分离相比,符合率 100%,说明此方法特异性强,敏感性高,可用于牛病毒性腹泻/黏膜病的检测及流行病学调查。

因此,PCR 方法具有特异性强、敏感性高、重复性好,广泛用于临床上 BVDV 的检测;还可建立多重 PCR 法进行与病毒性腹泻相关病毒多重感染的检测,减少确认引发牛腹泻病原体的工作量。

**2.1.6 荧光定量 PCR 方法** 荧光定量 PCR (q-PCR)方法,是在 PCR 方法基础上建立的,引入了荧光染料,可对病毒核酸进行定性和定量检测,具有灵敏快速、特异性好等优点,可以检测极低含量的核酸,现广泛用于疾病病原的检测,是目前广泛应用的 BVDV 检测方法之一。范晴等<sup>[18]</sup>根据牛病毒性腹泻病毒(BVDV)5'端非编码区核苷酸序列,设计引物和 TaqMan 荧光探针,建立了 BVDV 的实时荧光定量 PCR 检测方法,与 CSFV、BRV、MT 及 IBRV 没有交叉反应,只能检测到 BVDV,具有高度的特异性,最低可检测到 100 个拷贝的阳性质粒,实现了对牛病毒性腹泻病毒的快速、低含量检测,对牛病毒性腹泻病毒的早期诊断、流行病学调查及防控提供了可靠方法。郭锐等<sup>[19]</sup>设计了一对特异的 PCR 引物和一条 TaqMan 荧光探针,建立了 BVDV 荧光定量 PCR 的检测方法,且证实此方法灵敏度是 RT-PCR 的 100 倍。陈其兵等<sup>[20]</sup>也建立此方法并对 20 份胎牛血样和猪瘟细胞疫苗半成品进行了牛病毒性腹泻病毒检测,能检测低至 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> 拷贝/mL 的病毒量,并与 RT-PCR 作了比较,表明此方法除有上述优点外,还能有效的解决 PCR 污染问题。王建昌等<sup>[21]</sup>针对 BVDV 的 1 型和 2 型病毒基因组中 5'-UTR 基因特异性保守序列区域,设计特异性引物和探针,建立了一步法双重荧光 RT-PCR 方法,可用于区分 BVDV 血清型,对 MFDV、CSFV、Hobi-like V、IBRV、SchmallenbergV 等病毒核酸的扩增均呈现阴性结果;对 BVDV1 和 BVDV2 的检测下限均为 10<sup>2</sup> 拷贝,临床样品进行检测,共检出 BVDV 阳性样品 45 份(45/665),其中 BVDV1 阳性样品 39 份(39/665),BVDV2 阳性样品 5 份(5/665),BVDV1 和 BVDV2 均阳性样品 1 份(1/665),说明此方法敏感性高、特异性强、重复性好,可应用于 BVDV 的快速检测、分型和流行病学调查。魏宇

等<sup>[22]</sup>建立了一种同时检测牛病毒性腹泻病毒(BVDV)和牛冠状病毒(BCoV)的双重纳米 RT-PCR 方法,对 IBRV、BRSV、BPIV3、BRV 检测均呈阴性,其敏感性是 RT-PCR 的 10 倍,检出最低限量 1fg;该方法具有快速、灵敏、简捷、较强的特异性和敏感性,适用于大批量临床样品检测。

## 2.2 病原的新型检测方法

**2.2.1 免疫胶体金检测技术(GICT)** GICT 具有操作简单、快速、结果判定可视化、操作人员要求低、无需专门仪器等特点,可在养殖场和基层防疫部门的现场检测,是一种新型的免疫标记层析技术。梅力等<sup>[23]</sup>用胶体金标记纯化鉴定的 sf9 昆虫细胞-杆状病毒系统重组表达牛病毒性腹泻病毒 P80 蛋白抗原作为示踪抗原,捕获抗原为未标记的 P80,质控抗体为羊抗牛 IgG 抗体,研制出灵敏度高、特异性好、且与 MFDV、IBRV 无交叉反应的牛病毒性腹泻病毒抗体快速诊断试纸条。与 IDEXX 牛病毒性腹泻病毒 ELISA 抗体检测试剂盒对比检测 80 头份牛血清,结果显示二者的阳性符合率为 86.7%,结果显示二者的阴性符合率为 100%,总符合率为 95%。

**2.2.2 病原的新型分子生物学检测方法** (1)环介导等温扩增检测方法(LAMP):LAMP 原理主要是基于靶基因 3'和 5'端的 6 个区域设计 4 种特异引物,包括 1 对外引物(F3 和 B3)、1 对环状引物(LF 和 LB)和 1 对内引物(FIP 和 BIP),在链置换 DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase)的作用下,60~65 °C 恒温扩增,15~60 min 左右即可实现 10<sup>9</sup>~10<sup>10</sup> 倍的核酸扩增。LAMP 具有扩增快,结果较直观,敏感度及特异性较高,仪器设备简单,适合临床快速检测,是目前研发和应用较广的核酸等温扩增技术之一。李家伟等<sup>[24]</sup>根据牛病毒性腹泻病毒 5'-UTR 基因序列设计 4 条特异性环介导等温扩增引物,建立了检测牛病毒性腹泻病毒的 RT-LAMP 方法,扩增效率高达 10<sup>9</sup>~10<sup>10</sup> 的数量级,具有简单、快速、灵敏度高和特异性强特点,为牛病毒性腹泻病毒临床检测提供了一种快速简单的检测手段。雷丽霞<sup>[25]</sup>基于 BVDV 基因组的 5'-UTR 保守序列,建立了 BVDV 的 LAMP 检测方法,其最适反应时间为 50 min,最适反应温度为 62 °C,特异性强,可区分 BVDV 毒株与腹泻相关的其他菌(毒)株,最低检测限为 1.9×10<sup>2</sup> copies/μL,灵敏度比 PCR 高 10 倍,对 107 份临床血清样本进行检测,其阳性检出率均为 1.87%(2/107)。(2)重组酶聚合酶核酸等温扩增技术(RPA):RPA 是由 Piepenburg 等建立的一种核酸等温扩增技术。其原理是使用重组酶与引物



结合形成的复合物能在模板上寻找同源序列,定位后就会引发链交换反应并启动 DNA 合成,在 25~42 °C 恒温条件下对模板上的目标区域进行指数式扩增,产物可以通过探针法和荧光定量进行实时监测,也可以与侧流层析试纸条、生物芯片、凝胶电泳等多种方法相结合进行检测。RPA 具有特异性强、灵敏度高、操作简单、设备要求不高、快速便捷、可视化、便于现场检测的特点,可实现恒温下、短时间内完成扩增反应,目前广泛用于病原体的核酸检查。李家伟等<sup>[26]</sup>针对 BVDV 5'-UTR 基因,建立了 LAMP 检测方法,扩增效率高达  $10^9 \sim 10^{10}$  的数量级,实现了快速检测 BVDV。马忠仁等<sup>[27]</sup>发明了基于 RPA 的牛病毒性腹泻病毒检测试剂盒及其应用,其中表明 RPA 引物对扩增靶基因有效,且特异性高、灵敏度高( $6 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ),在食品安全检测和动物疾病检测等方面应用广泛,具有良好的发展前景。李勇等<sup>[28]</sup>发明一种用于牛传染性鼻气管炎病毒和牛病毒性腹泻病毒双重 RPA 扩增的试剂盒。牛病毒性腹泻病毒、牛冠状病毒和牛轮状病毒的三重 RPA 检测试剂盒,在 37~41 °C 反应 20~40 min,操作简单、检测快速,能够实现 BVDV 和 IBRV 的双重-RPA 扩增检测,为牛病毒性腹泻病和牛传染性鼻气管炎病的现场检测提供了新的方法,为牛腹泻病毒的口岸或样品的现场筛查提供了快速检测试剂。雷丽霞针对 BVDV 基因组中 5'-UTR 保守序列设计 RPA 引物,建立了 BVDV 基础 RPA 和 RPA-LFD 检测方法,最适反应时间为 15 min,最适反应温度为 37 °C,以 cDNA 为模板其最低检出量为  $5.8 \times 10^{-2}$  ng/ $\mu\text{L}$ ,对 107 份临床血清样本进行检测,阳性检出率均为 2.80%(3/107)。Yang 等<sup>[29]</sup>分别针对 BVDV 的 5'-UTR 基因和 BPIV3 的磷蛋白 P 基因,设计引物和探针,建立了一种 RT-RPA-LFD 方法,可快速、简便地检测 BVDV 和 BPIV3。在 35 °C 条件下,利用 RT-RPA 可以在 25 min 内成功扩增 BVDV 和 BPIV3 RNA,在室温(RT)条件下,5 min 内 LFD 上就可以看到扩增产物条带。BVDV 最低检出限为 50 RNA 个分子,BPIV3 最低检出限为 34 RNA 个分子。(3)重组酶介导等温核酸扩增技术(RAA):RAA 技术是中国自主研发并申请专利的等温核酸快速检测技术,是一种利用重组酶、单链结合蛋白、DNA 聚合酶在等温条件下(最佳温度 37 °C)进行核酸扩增的技术。其具体原理为:重组酶、单链结合蛋白、引物形成复合体扫描双链 DNA,在与引物同源的序列处使双链 DNA 解旋,单链结合蛋白(SSB)防止单链 DNA 复性,在能

量和 dNTP 存在的情况下,由 DNA 聚合酶完成链的延伸,5~20 min 就可实现扩增,其扩增产物可通过侧流层析试纸条法进行快速检测(lateral flow dipstick, LFD)。陈楠楠等<sup>[30]</sup>建立了 BVDV-1 和 BVDV-2 的 RT-RAA-LFD 快速检测方法,30 min 出检测结果,且特异性、敏感性、重复性良好,其中, BVDV1 型的检测结果与国标 RT-qPCR 法的符合率高达 99%,适用于 BVDV1 型和 2 型的临床快速检测和病毒分型检测。(4)CRISPR/Cas 系统:1987 年 CRISPR 位点在细菌基因组中被发现,2002 年 CRISPR 相关蛋白被发现,随后证实 CRISPR-Cas 系统是一种 RNA 引导的适应性免疫系统,可以抵御病毒、质粒等入侵遗传元素。成簇有规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白(CRISPR/Cas)可分为两大类群:第 1 类以多个 Cas 组成的效应复合体行使功能为特征,包括 I、III 和 IV 型;第 2 类则只需单个多结构域的 Cas,包括 II (Cas9)、V (Cas12)和 VI (Cas13)型。用于分子检测有 Cas12a、Cas13、Cas14 检测系统。Cas12a 蛋白包括 LbCas12a、As-Cas12a 和 FnCas12a,其中 LbCas12a 的反式切割活性最强。Cas13 是 RNA 引导和 RNA 靶向的核酸酶,具有两个 HEPN 结构域,特异性作用于 RNA 靶标。Cas14 是一种靶向 ssDNA 的 CRISPR 内切酶,与 CRISPRCas12 相比,Cas14 识别和切割目标核酸序列不受 PAM 序列的限制,而且对 crRNA 与靶标模板之间的核苷酸错配的容忍性更低,内部序列对核苷酸错配更敏感,这一特性使 Cas14 能够实现高保真的区分 SNP。发展至目前 CRISPR/Cas 核酸检测技术优势具有高特异性,可实现单核苷酸点突变检测;具有高灵敏性,可实现单拷贝核酸检测;具有快速性,整个检测在 0.5~1.0 h 内完成;具有简便性,不需专业设备及人员,可现场完成;具有试剂耐受冷冻干燥,便于储存和携带;具有易开发性,可快速开发出新核酸检测试剂盒等。Yao 等<sup>[31]</sup>优化了 LwCas13a 蛋白的表达和纯化,验证了 Lw-Cas13a 在体外的 RNase 活性。CRISPR-LwCas13a 系统可以检测 BVDV 核酸,简便和特异性高。基于 CRISPR-Cas13a 建立了一种灵敏度高、特异性强、简便快捷的 BVDV 核酸检测方法,这为 BVDV 的实验室诊断提供了新的方法。

### 3 小结与展望

牛病毒性腹泻/黏膜病呈全球性分布,是当前对全球养牛危害严重的疾病之一。各种年龄的牛均易患此病,幼龄牛易感性最高。本病的传染源主要是

病畜,病牛的分泌物、排泄物、血液和脾脏等均能检测到本病毒,常以直接接触或间接接触传播。

高效、便捷、大通量的检测技术能够及时检测出 BVDV,便于及时采取防控措施,在一定程度上可以减少该病导致的经济损失和 BVDV 的污染面。因此,探索研发 BVDV 新型检测方法的重要性显得尤为重要。BVDV 现有的每种检测方法都有其各自的优缺点,应依实际使用场景的不同而择优选之。这样既可以提高检测的工作效率,缩短为防控本病采取措施的时间,而且还可提高检测结果的正确率。

随着生命科学的快速发展,随着牛病毒性腹泻/黏膜病病原学的研究深入,新型检测技术不断涌现,检测技术的不断优化、完善和创新,这为牛病毒性腹泻/黏膜病的鉴别诊断、防治和净化提供更多、更可靠的技术支撑。

#### 参考文献:

- [1] GIVENS M D, MARLEY M S. Immunology of chronic BVDV infections[J]. *Biologicals*, 2013, 41(1): 26-30.
- [2] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 645-652.  
YIN ZH, LIU J H. *Animal Virology*[M]. Beijing: Science Press, 1985: 645-652.
- [3] 王 炜, 武 华. 牛病毒性腹泻病毒的多型性及疫病防控[J]. *动物医学进展*, 2008, 29(4): 96-99.  
WANG W, WU H. Types of BVDV and methods to prevent and control the disease[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, 29(4): 96-99.
- [4] GIL L H V G, ANSARI I H, VASSILEV V, et al. The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus Npro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(2): 900-911.
- [5] FALKENBERG S M, DASSANAYAKE R P, NEILL J D, et al. Improved detection of bovine viral diarrhea virus in bovine lymphoid cell lines using PrimeFlow RNA assay[J]. *Virology*, 2017, 509: 260-265.
- [6] FALKENBERG S M, BAUERMANN F V, RIDPATH J F. Characterization of Thymus-associated lymphoid depletion in bovine calves acutely or persistently infected with bovine viral diarrhea virus 1, bovine viral diarrhea virus 2 or HoBi-like pestivirus[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(11): 3 473-3 480.
- [7] DA SILVA CARDOSO PINTO V, ALVES M F, DE SOUZA NUNES MARTINS M, et al. Effects of oocytes exposure to bovine diarrhea viruses BVDV-1, BVDV-2 and Hobi-like virus on in vitro-produced bovine embryo development and viral infection[J]. *Theriogenology*, 2017, 97: 67-72.
- [8] 郎一飞. 我国牛病毒性腹泻病毒 E2 基因的多态性分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.  
LANG Y F. Polymorphism analysis of E2 gene of bovine viral diarrhea virus in China[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014.
- [9] 赵月兰, 左玉柱, 范京惠, 等. 牛病毒性腹泻/黏膜病病毒河北分离株的生物学特性[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(12): 1-4.  
ZHAO Y L, ZUO Y ZH, FAN J H, et al. Biological characteristics of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus HB strain[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 22(12): 1-4.
- [10] 宋文凤. 牛病毒性腹泻病毒单克隆抗体的制备与双夹心 ELISA 方法的建立[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.  
SONG W F. Preparation of monoclonal antibodies against bovine viral diarrhea virus and establishment of a double-antibody sandwich ELISA method[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018.
- [11] 王青青. 新疆南疆部分规模奶牛场 BVD 流行病学调查及分析[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2017.  
WANG Q Q. Epidemiological investigation and analysis of BVD in some large-scale dairy farms in southern Xinjiang[D]. Aral: Tarim University, 2017.
- [12] 范 晴, 谢芝勋, 谢志勤, 等. 牛病毒性腹泻病毒抗原捕获 ELISA 方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(2): 21-24.  
FAN Q, XIE ZH X, XIE ZH Q, et al. Development of antigen capture ELISA for detecting bovine viral diarrhea virus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2015, 36(2): 21-24.
- [13] 包振中, 雷程红, 蔡元庆, 等. 牛病毒性腹泻-黏膜病病毒分离鉴定及生物学特性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(9): 2 391-2 398.  
BAO ZH ZH, LEI CH H, CAI Y Q, et al. Isolation, identification and biological characteristics analysis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 42(9): 2 391-2 398.
- [14] 李新培, 朱洪伟, 周伟光, 等. 牛病毒性腹泻病毒鉴定及分型 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2018, 39(10): 6-12.  
LI X P, ZHU H W, ZHOU W G, et al. Establishment of a RT-PCR assay for detection and distinguishing the genotypes of bovine viral diarrhea virus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2018, 39(10): 6-12.
- [15] 李健友, 刘泽余, 刘占悝, 等. 牛病毒性腹泻病毒 Nano-PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(5): 580-585.  
LI J Y, LIU Z Y, LIU ZH K, et al. Establishment and preliminary application of Nano-PCR for the detection of bovine viral diarrhea virus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48(5): 580-585.

- [16] 侯佩莉,杨宏军,宋玲玲,等.牛病毒性腹泻病毒山东株的分离与鉴定[J].山东农业科学,2013,45(2):41-44.  
HOU P L, YANG H J, SONG L L, et al. Isolation and identification of bovine viral diarrhoea virus Shandong strain [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2013, 45(2): 41-44.
- [17] 王伟利,肖成蕊,孟日增,等.牛病毒性腹泻病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报, 2007, 29(10): 806-809.  
WANG W L, XIAO CH R, MENG R Z, et al. Development of a one-step RT-PCR assay for detection of BVDV[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29(10): 806-809.
- [18] 范晴,谢芝勋,刘加波,等.牛病毒性腹泻病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J].动物医学进展, 2010, 31(10): 10-14.  
FAN Q, XIE ZH X, LIU J B, et al. Establishment of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of bovine viral diarrhoea virus[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31(10): 10-14.
- [19] 郭锐,陈平,田永祥,等.快速检测牛病毒性腹泻病毒实时荧光定量 PCR 技术建立及应用[J].湖北农业科学, 2011, 50(8): 1 640-1 643.  
GUO R, CHEN P, TIAN Y X, et al. The establishment and application of real-time fluorescent quantitative PCR method to rapidly detect bovine viral diarrhoea virus[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(8): 1 640-1 643.
- [20] 陈其兵,薛霜,漆世华,等.牛病毒性腹泻-粘膜病病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用[J].中国兽药杂志, 2012, 46(4): 4-6.  
CHEN Q B, XUE SH, QI SH H, et al. Establishment and initial application of fluorescent quantitative RT-PCR for detection of bovine viral diarrhoea virus[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 46(4): 4-6.
- [21] 王建昌,王金凤,崔元,等. BVDV 一步法双重荧光 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J].中国兽医学报, 2018, 38(2): 245-251.  
WANG J CH, WANG J F, CUI Y, et al. Development and application of a one-step dual real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea virus[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2018, 38(2): 245-251.
- [22] 魏宇,王海璐,孙飞雁,等.牛病毒性腹泻病毒和牛冠状病毒双重纳米 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J].畜牧与兽医, 2022, 54(3): 101-105.  
WEI Y, WANG H L, SUN F Y, et al. Establishment and application of a dual nano RT-PCR for the detections of bovine viral diarrhoea virus and bovine coronavirus[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 54(3): 101-105.
- [23] 梅力,杨春江,韦海涛,等.牛病毒性腹泻病毒抗体胶体金检测试纸条的制备[J].中国兽医杂志, 2019, 55(2): 45-48.  
MEI L, YANG CH J, WEI H T, et al. Development of colloidal gold test strip for detection antibody of Bovine Viral Diarrhoea Virus[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(2): 45-48.
- [24] 李家伟,郭利,杨勇,等.牛病毒性腹泻病毒 LAMP 检测方法的建立与应用[J].中国畜牧兽医, 2015, 42(12): 3 111-3 118.  
LI J W, GUO L, YANG Y, et al. Establishment and application of LAMP detection method of bovine viral diarrhoea virus[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(12): 3 111-3 118.
- [25] 雷丽霞.牛病毒性腹泻病毒核酸快速检测方法的建立[D].银川:宁夏大学, 2022.  
LEI L X. Establishment of a rapid nucleic acid detection method for bovine viral diarrhoea virus[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2022.
- [26] 李家伟,郭利,杨勇,等.牛病毒性腹泻病毒 LAMP 检测方法的建立与应用[J].中国畜牧兽医, 2015, 42(12): 3 111-3 118.  
LI J W, GUO L, YANG Y, et al. Establishment and application of LAMP detection method of bovine viral diarrhoea virus[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(12): 3 111-3 118.
- [27] 马忠仁,马晓霞,马鹏,等.一种基于 RPA 的牛病毒性腹泻病毒检测试剂盒及其应用; CN107974513A [P]. 2018-05-01.
- [28] 李勇,姜玲玲,张刚,等.一组用于牛传染性鼻气管炎病毒和牛病毒性腹泻病毒双重 RPA 扩增的引物、试剂盒和应用; CN116377133A [P]. 2023-07-04.  
LI Y, JIANG L L, ZHANG G, et al. A set of primers, kits and application for dual RPA amplification of bovine infectious rhinotracheitis virus and bovine viral diarrhoea virus; CN116377133A [P]. 2023-07-04.
- [29] YANG S, WANG Q Y, TAN B, et al. A lateral flow dipstick combined with reverse transcription recombinase polymerase amplification for rapid and visual detection of the BVDV and BPIV3[J]. Journal of Virological Methods, 2022, 299: 114 343.
- [30] 陈楠楠,李阳,金鑫,等.牛病毒性腹泻病毒 RT-RAA 检测体系及侧流层析检测方法; CN116024383A [P]. 2023-04-28.  
CHEN N N, LI Y, JIN X, et al. Bovine viral diarrhoea virus RT-RAA detection system and lateral flow chromatography detection method; CN116024383A [P]. 2023-04-28.
- [31] YAO R, XU Y R, WANG L, et al. CRISPR-Cas13a-based detection for bovine viral diarrhoea virus[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 603 919.