维普资讯 http://www.cqvip.com

第15卷4期 中国病毒学 Vol.15 No.4
2000年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 2000

373-378 (12)

老虎感染猫传染性鼻-结膜炎病毒的研究

S858.93

范泉水[1,2]，夏咸柱[1]，邱薇[2]，黄耕[1]，何洪彬[3]，张建滨[4]，乔军[5]，余春[1]，邹啸环[1]，李金钟[1]，武银莲[1]，殷震[1]

[1](中国人民解放军农牧大学军事兽医研究所，长春 130062)
[2](成都军区联勤部军事医学研究所，昆明 650032)
[3](东北农业大学，哈尔滨 150030)
[4](深圳野生动物园，深圳 518000)
[5](塔里木农垦大学，塔里木 843300)

摘要：用猫肾传代细胞从发病虎的病料中分到了一株杯状病毒粒子样病毒。该病毒大小为35～39 nm、无囊膜、在胞浆中病毒前体呈晶格状排列，抗乙醚、不能被5-IUDR所抑制，能被来源于标准疫苗的猫传染性鼻-结膜炎病毒(或杯状病毒 Feline calicivirus, FCV)抗血清所中和，人工感染猫出现典型的FCV感染症状。RT-PCR能扩增出与设计值相符的电泳带，PCR产物直接测序结果与Genebank发表的FCV序列比较，具有较高的同源性。系统鉴定证明所分离的这株病毒为FCV强毒株，从老虎中分到FCV在世界上尚属首次报道。

关键词：虎；猫；猫杯状病毒 传染性鼻-结膜炎病毒
中图分类号：S852.6596 **文献标识码**：A **文章编号**：1003-5125(2000)04-0373-06

猫杯状病毒感染，是猫的一种多发性口腔和呼吸道疾病，又称为猫传染性鼻-结膜炎。因毒株的毒力和动物的抵抗力不同，症状差别很大，单独FCV不引起猫严重的致死性疾病，主要引起猫口腔或上呼吸道感染，有些毒株会导致肺炎，但混合感染时往往会加重病情。该病发病率较高，但死亡率较低。自1957年Fastier等首次分离到FCV以后，人们又从世界上许多国家和地区的猫和澳大利亚的猎豹中分到FCV，Dowson等研制了FCV的灭活和弱毒疫苗，并常和猫瘟热疫苗联合作为猫的二联苗[1~6]。M.J Carter等已测得FCV的全基因序列[6]。目前认为，FCV呈世界性分布，并可能感染所有的猫科动物。

1997年10月间，广西某野生动物养殖场国家一级保护动物东北虎和华南虎大批发病死亡，临床表现发烧、厌食、鼻炎、腹泻和急性死亡症状，在作病源检查中，除了用虎的实质脏器和血液接种小鼠检出锥虫外，用猫肾细胞还分到了一株杯状病毒样病毒(TECV9710)；1998年5月间，该养殖场又发生了一次小规模的流行，有六只虎发病，其中4只幼虎2只大虎，临床表现口角溃烂，流涎，鼻炎、发烧、厌食症状，有2幼虎死亡，从死亡虎的脏器中又分到了一株杯状病毒样病毒(TFCV9805)，为此我们对其进行了系统鉴定，经生物学、理化学、病毒核酸的PCR

收稿日期：1999-05-31，修回日期：2000-03-15
作者简介：范泉水(1964年-)、男，山西，副研究员，博士，主要从事动物病毒研究。
现在通讯地址：昆明市大观路43-1号成都军区联勤部军事医学研究所。

维普资讯 http://www.cqvip.com

分析，证明所分离的这二株杯状病毒均为猫传染性鼻-结膜炎病毒（猫杯状病毒 Feline calicivirus, FCV）的强毒株，从老虎中分到 FCV 在世界上尚属首次报导，现报告如下：

1 材料与方法

1.1 病毒分离

1.1.1 样品与处理：取发病虎的口涎和死亡虎的肠内容物，用 MEM 液制成 1:10 的乳剂，经 3 000 r/min 离心 10 min 取上清，经 300 nm 微孔滤膜过滤后，置 −30 ℃ 冰柜待分离。

1.1.2 细胞与培养：所用的 F81 细胞从中国兽药监察所引进，按常规消化传代，37 ℃ 静置培养。

1.1.3 分离与判定：在 F81 细胞传代的同时，按培养液量的 1/10 接入待分离的样品，于 37 ℃ 静置培养 4～5 d，每天观察检查有无细胞病变。如无病变则于培养的第 4～5 天收取上清，细胞继续按常规传代培养，至第 5 代仍无病变时判为分离阴性，停止分离，如出现病变则冻融 3 次收毒，放 −30 ℃ 待鉴定。

1.2 常规病毒学鉴定

1.2.1 形态学观察：用 TFCV9710 株的第 4 代培养物（TFCV9710－4）单层接种 F81 细胞瓶，37 ℃ 静置培养，待出现典型的细胞病变后，将其中 1 瓶经 −30 ℃/37 ℃ 冻融 3 次，收毒，以 5 000 rpm 离心 10 min，取上清以 0.5% 磷钨酸负染作电镜负染观察；另一瓶收上清，细胞用无菌细胞刮子刮下，以戊二醛与锇酸双固定，F812 环氧树脂包埋、切片，染色作电镜超微结构观察。

1.2.2 病毒理化学特性试验：取 TFCV9710－4 培养物 60 mL 分成 6 瓶，第 1 瓶于 50 ℃ 水浴作用 30 min；第 2 瓶加 20% 乙醚振荡 10 min 放 4 ℃ 过夜后，无菌挥发除去全部乙醚；第 3 瓶先用 0.1 mol/L HCl 调 pH 至 3.0，于 4 ℃ 作用 2 h 后，用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2；第 4 瓶也是用 0.1 mol/L HCl 调 pH 至 5.0 于 4 ℃ 作用 2 h 后；再用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2；第 5 瓶加 5-碘脱氧尿核苷（5-IUDR）至每毫升 50 μg 于 4 ℃ 作用 12 h；第 6 瓶不处理作为正常对照。然后分别用 F81 测定这 6 瓶 TFCV9710-4 的 $TCID_{50}$。

1.2.3 细胞敏感谱试验：用 TFCV9710－4 接种 F81、CRFK、Vero、MDCK、BHK-21 与鸡胚成纤维细胞（CEF），于 37 ℃ 静置培养 4～5 d，每天观察 CPE，并以 CPE 为感染指标，计算各细胞培养物的 $TCID_{50}$。

1.2.4 红细胞血凝谱试验：用 pH7.4 的 15 mmol/L PBS（含 0.25 mol/L 葡萄糖、0.5% 兔血清）将豚鼠、猪、鸡、狗、兔、猫、羊、鼠和人"O"型红细胞分别配成 0.5% 的悬液，分别与 4 ℃ 和 37 ℃ 进行微量血凝试验测定同 1 份 TFCV9710－4 的 HA 效价，以 50% 以上红细胞凝集判为凝集阳性。

1.2.5 交叉中和试验：采用固定病毒稀释血清法，用 F81 细胞在微量细胞培养板中进行。用维持液将兔抗 TFCV9710－4 株毒和兔抗 FCV 疫苗标准毒株（F9 株）的灭活血清作 8～2 048 倍的稀释，分别与等量的含 100 $TCID_{50}$ 的 TFCV9710－4 和疫苗标准毒株（$TCID_{50}$ 为 $10^{-11.0}$/0.1 ml）混合，于 37 ℃ 感作 2 h，接入长成单层的传代细胞，以第 4 天的细胞病变为感染指标，按 Reed-Muenech 法计算各血清对 2 个病毒株的 50% 中和终点稀释度，以进行 2 个病毒株的抗原关系分析。

1.2.6 易感猫感染试验：取鼻-结膜炎中和抗体小于 1:2 的家猫 6 只，分为 3 组，每组 2 只，第 1、2 组分别经口鼻和肌肉接种 TFCV9710－4 和 TFCV9805－4 各 5 mL，第 3 组 2 只作为正常对照，隔离饲养观察 14 d，每天检查其体温、呼吸、精神、食欲与粪尿性状和采血作白细胞检查，于试验的第 14 天全部捕杀作病理解剖学与组织学检查。

1.3 RT-PCR 方法的建立与检测

1.3.1 总 RNA 的提取：按照 Chomczynski & Sacchi 1987 年发表的方法[7]，分别从接种 TFCV9710－4 和 TFCV9810－4 4 h 的 F81 细胞中用硫氰酸胍、酚、氯仿提取总 RNA。

1.3.2 cDNA 的合成（模板制备）：FCV 的核酸为单股、正链线性 RNA，根据已发表的 FCV 的核苷酸序列[3,4]，按照引物设计的原则，在 FCV ORF2 的核苷酸序列之间，合成其负链引物 I（5′TCCTCGCCAATCCCAGTGTA 3′），在反转录酶作用下反转录合成 cDNA。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3.3　PCR引物合成：在编码衣壳蛋白基因的两端(ORF2)，选择两段保守区域的20个碱基序列作为引物序列，合成上游引物Ⅱ(5′CATTTCGACTTTAACCAAGA 3′)，PCR的下游引物仍为合成cDNA的引物Ⅰ。扩增的核苷酸长度为500 bp左右。

1.3.4　PCR扩增试验和测序：按Saiki等所介绍的方法[8]，合成的引物Ⅰ与引物Ⅱ，进行DNA的PCR扩增和琼脂糖凝胶电泳观察。PCR产物在大连宝生物公司进行测序。

2　试验结果

2.1　病毒分离结果

应用F81细胞带毒传代的方法，先后从处理的样品中分离到了二株病毒，细胞常在24～48 h出现病变，细胞肿胀变园，折光性增强，呈散在鱼籽样(见图1,2)。

图1　正常F81细胞(×400)

Fig.1　Normal feline kindey cell (×400)

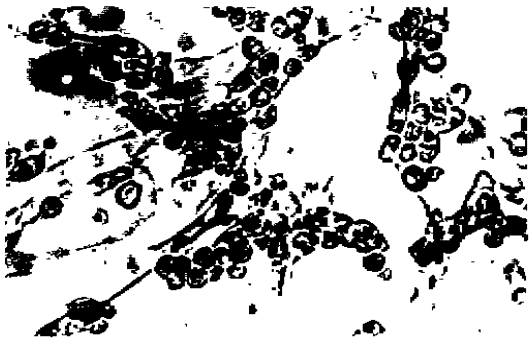

图2　接毒后24－48 h出现细胞病变，细胞逐渐变园核固缩，聚积成葡萄粒状(×400)

Fig.2　The viruses multiply 24－48 h in feline kidney cell and produce cytopathic effects: shrinkage, lysis, rounding and aggregation of cells in clusters.

2.2　病毒形态学观察结果

用培养物上清作电镜负染观察，没有囊膜，直径大小为35～39 nm(见图3)。

取接毒的细胞作电镜超微结构观察，结果在其细胞浆中，见有呈晶格状排列的FCV病毒样颗粒(见图4)。

2.3　理化特性试验结果

TFCV9710－4在F81细胞上的半数细胞感染量为10^{12} $TCID_{50}$/mL，而经50 ℃、20%乙醚、pH3.0和pH5.0和5-IUDR处理后，再测定其$TCID_{50}$，除用50 ℃处理失去感染性、pH3.0处理与不经处理的原毒相比均大于10^{6} $TCID_{50}$/mL，其余均小于或等于10^{11} $TCID_{50}$/mL，说明该毒株能抵抗乙醚、对pH3不稳定、对pH5稳定、在50 ℃经30 min能够被灭活，不能被DNA合成抑制剂5-IUDR所抑制，符合无囊膜、核酸型为RNA的杯状病毒特点。

2.4　细胞敏感谱试验结果

用TFCV9710－4接种F81、CRFK、Vero、MDCK、BHK-21与鸡胚成纤维细胞(CEF)后，以CPE为感染指标，通过计算各细胞培养物的$TCID_{50}$表明，来源于猫的细胞F81和CRFK最敏感，来源于狗和猴的细胞仅能有限生长，而来源于鸡胚、猪的细胞不能感染。

维普资讯 http://www.cqvip.com

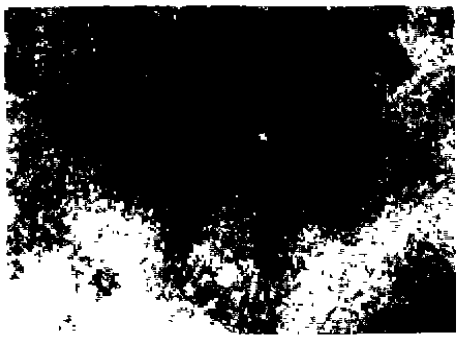

图3 培养物上清电镜负染，该病毒粒子呈立体对称、直径大小为35～39 nm，无囊膜（×80,000）

Fig.3 The viruses are negatively stained and observed in electron microscopy. The viruses apear cubic symmetry, nonenveloped, 35～39 nm in diameter. ×80,000

图4 接毒的细胞电镜超微结构观察，其细胞浆中可见呈晶格状排列的FCV病毒前体（×80,000）

Fig.4 Thin-section electron microscopy. The viruses particles apear a crystalline array in feline kiddney cell. ×80,000

2.5 红细胞血凝谱试验结果

采用微量血凝法测定的红细胞对TFCV9710－4的HA效价，结果均小于1:2，表明不凝集以上红细胞。

2.6 交叉中和试验

表1结果说明分得的病毒TFCV9710－4株与FCV疫苗标准毒株在抗原性上关系密切。

表1 病毒交叉中和试验结果

Table 1 The result of virus cross-neutralization test

病毒	兔抗TFCV9710－4株血清（保护50%的细胞的稀释度）	兔抗FCV疫苗标准毒株血清（保护50%的细胞的稀释度）
TFCV9710－4	550×	240×
FCV疫苗标准毒	250×	520×

2.7 易感猫感染试验结果

对10只鼻-结膜炎易感的家猫，无论是经口鼻接种还是经肌肉接种TFCV9710－4或TFCV9805－4，在接种2～5天后猫均出现鼻炎、口角溃烂、流涎、眼炎、发烧、厌食、贫血、清瘦等症状，取病猫的血接种下一代猫，也能出现同样症状，对照猫正常。捕杀后病理解剖学与组织学检查呈现出典型的鼻炎、口炎、有4只出现肺炎病变。

2.8 PCR扩增试验结果

按Saiki等所介绍的方法[8]，合成的cDNA模板和引物Ⅰ与引物Ⅱ进行PCR扩增，结果TFCV9710－4和TFCV9805－4的PCR产物经琼脂糖凝胶电泳均显示一大小为500 bp左右的电泳带，与设计的理论值相符。（见图5）

2.9 核苷酸序列测定和比较结果

TFCV9710－4株的PCR产物，经纯化后在大连宝生物公司进行测序，用Goldkey软件对测得的序列与Genebank中发表的序列进行同源性分析，两者的同源性达87%（详见另文）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨论

根据从老虎病料中分到的该病毒在电镜下的形态，和对猫细胞敏感性、对热、酸、乙醚、5-碘脱氧尿核苷的特性，以及中和试验和对猫接种后出现的典型猫传染性鼻结膜炎症状，等生物学、理化学系统鉴定证明：该病毒为猫传染性鼻-结膜炎病毒。

图 5　电泳显示一大小为 500 bp 左右的电泳带（右侧）。左侧为 DNA 分子量 Marker（DNA Ladder，从下到上为 1500 bp，1000 bp，900 bp，800 bp，700 bp，600 bp，500 bp，400 bp）

Fig. 8　Electronphoresis of the PCR Products was around 500 bp (Right) Left is Marker (DNA Ladder, from Under begin be 1500 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp)

利用 RT-PCR 技术，根据已发表的 FCV 核苷酸序列，按照引物设计的原则，在 FCV 的 ORF2 的核苷酸序列之间，合成其负链引物 Ⅰ，反转录合成 cDNA 作为 PCR 的模板，引物 Ⅰ 同时也是 PCR 的下游引物，上游引物 Ⅱ 也在 FCV 的 ORF2 的核苷酸序列之间，扩增的 FCV 的核苷酸设计长度为 500 bp，实际扩增结果与设计值相同，序列测定和比较进一步表明了我们所分离的病毒为猫传染性鼻-结膜炎病毒。

1997 年 10 月间，在老虎第一次发病作病原检查时，在虎的实质脏器和血液中发现了锥虫，经我所寄生虫研究室王祥生等[6]研究已证实为伊氏锥虫，我们还分到了一株猫传染性鼻-结膜炎病毒，资料报导伊氏锥虫感染动物很广[1~5]，也能引起老虎感染，但症状不严重，也不会引起老虎急性暴发死亡。猫传染性鼻-结膜炎病毒感染，因毒株的毒力和动物的抵抗力不同，症状差别很大，单独 FCV 感染不引起成年猫严重的致死性疾病，主要引起猫口腔或上呼吸道感染，有些毒株会导致肺炎，但混合感染时往往会加重病情，使死亡率提高。从 1997 年 10 月间发病情况看，发病较急死亡较多，这可能是由于伊氏锥虫与 FCV 混合感染，FCV 加重了疾病所致。

研究表明我国老虎之间也存在猫传染性鼻-结膜炎病毒，并对老虎的健康造成了极大的威胁，现流行于我国老虎之间的 FCV 与国外报导的 FCV 亲缘性如何，能否用国外的 FCV 弱毒苗来预防我国老虎间的 FCV，尚需进一步研究。从交叉中和试验的结果来看，国外的 F9 疫苗株有希望用来预防我国老虎之间的 FCV 感染。为保护我国珍贵华南虎和东北虎资源，迫切需要对该病的病原、诊断、免疫加以研究，以控制和消灭 FCV 在我国传播和流行。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

[1] 殷震，刘景华，主编. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京：科学出版社，1997，519－531

[2] John D, Neill. Nucleotide sequence of the capsid protein gene of two serotypes of San Migiel sea lion virus: Identification of conserved and non-conserved amino acid sequences among calicivirus capsid proteins [J]. Virus Research, 1992, 24：211－222

[3] Tohya Y, Yokoyama N, Maeda K, *et al*. Mapping of antigenic sites involved in neutralization on the capsid protein of feline calicivirus [J]. J Gen Virol, 1997, 78：303－305

[4] Guiver M, Littler E, Caul E, *et al*. The cloning, sequencing and expression of a major antigenic region from the feline calicivirus capsid protein [J]. J Gen Virol, 1992, 73：2429－2433

[5] Carter M, Milton I, Meanger J, *et al*. The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus [J]. Virology, 1992, 190：443－448.

[6] 王祥生，夏咸柱，范泉水，等. 虎暴发锥虫一起[J]. 中国兽医科技，1999，29(7)：34－35

[7] Chomczynski, P, Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanididinium thiocyanate-phenol-choroform extraction [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 162：156－157

[8] Saiki, R.K, Gelfand, D. H., Stoffel, S. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase [J]. Science, 1988, 239：487－491

Study on the Feline Calicivirus Infected Tiger

FAN Quan-shui[1,2], XIA Xian-zhu[1], QIU Wei[2], HUANG Geng[1], HE Hong-bin[3], ZHANG Jian-bin[4], QIAO Jun[5], YU Chun[1], LI Jin-zhong[1], WU Yin-lian[1], ZHOU Xiao-huan[1], YIN Zhen[1]

[1](*The Veterinary Institute, University of Agriculture and Animal Science, Changchun* 130062, *China*)

[2](*The Medical Institute, Kunming* 650032, *China*)

[3](*The Northeastern Agriculture University, Harbin* 150030, *China*)

[4](*The Shenzhen wild animal zoo, Shenzhen* 51800, *China*)

[5](*The Talimu Agriculture University, Talimu* 843300, *China*)

Abstract: A virus strain like-calicivirus was isolated from organs of tiger with feline kidney (FK) cell. The viruses were nonenveloped, 35～39 nm in diameter, multiplied in cytoplasm and put in crystal order. The viruses multipied easily in feline kidney cell cultures and produced cytopathic effects (CPE). Virus cross-neutralization (VN) showed that the virus is closely relation with standard vaccine virus strain. Felines infected with FK cell cultures viruses clinically appeared FCV signs. The RT-PCR amplified product around 540 bp which was the same as result of Designed. The PCR products were directly sequenced. The gene sequences were compared with FCV strains extracted from the GenBank database and showed 87% identity. Systematical identification has proved that the viruse isolated is feline calicivirus of tiger. This is the first report of feline calicivirus infected tiger in China.

Key word: Tiger; Feline; Feline calicivirus