余紫葳，蒋艳妹，宋金祥，等. 邯郸市猫疱疹病毒 HD1 株的分离与鉴定［J］. 畜牧与兽医，2024，56（7）：58-64.
YU Z W，JIANG Y M，SONG J X，et al. Isolation and identification of feline herpesvirus HD1 in Handan City［J］. Animal Husbandry & Veterinary Medicine，2024，56（7）：58-64.

邯郸市猫疱疹病毒 HD1 株的分离与鉴定

余紫葳[1]，蒋艳妹[1]，宋金祥[1]，崔德福[2]，刘永相[1*]，范春艳[1*]
（1. 河北工程大学生命科学与食品工程学院，河北 邯郸 056038；
2. 河北乐寿鸭业有限责任公司，河北 沧州 062250）

摘要：为了探究猫疱疹病毒（FHV）在邯郸地区的分子流行病学特征，从邯郸地区不同动物医院收集到有呼吸道症状猫的眼、鼻分泌物共 55 份，经 PCR 初检后，将阳性样本接种于猫肾细胞（CRFK），细胞产生病变，经过蚀斑纯化、分子生物学检测、血清学鉴定、病毒形态鉴定，得到 1 株 FHV。用 gD 基因引物扩增 FHV 分离株基因后能够得到特异性条带，且经过 3 轮蚀斑纯化后，得到 1 株亚克隆毒株，命名为 FHV HD1。FHV HD1 P3 代在 CRFK 上的病毒滴度为 10^6 $TCID_{50}$/100 μL，并检测生长过程中 8 个时间点的病毒滴度，绘制分离株生长曲线。使用 FHV-1 特异性抗体进行间接免疫荧光检测，结果 FHV HD1 能够出现特异性荧光。BLAST 分析表明 FHV HD1 株 gD 基因与其他 FHV-1 相似性达 98.25%~99.91%。进化树分析表明与猫科动物源 FHV-1 亲缘关系较近，处于同一大分支，与犬疱疹病毒和其他动物疱疹病毒亲缘关系较远。本研究结果为 FHV 的进化分析和现阶段疫苗研发奠定了基础，对猫病毒性鼻气管炎的病原学、免疫学、临床诊断及分子生物学的研究具有重要参考价值。

关键词：猫疱疹病毒 1 型；分离鉴定；生长动力学；gD 基因
中图分类号：S852.615 **文献标志码：**A **文章编号：**0529-5130(2024)07-0058-07

Isolation and identification of feline herpesvirus HD1 in Handan City

YU Ziwei[1], JIANG Yanmei[1], SONG Jinxiang[1], CUI Defu[2], LIU Yongxiang[1*], FAN Chunyan[1*]
(1. School of Life Science and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China;
2. Hebei Leshou Duck Co., Ltd., Cangzhou 062250, China)

Abstract: In order to explore the epidemic characteristics of feline herpesvirus in the Handan area, a total of 55 samples of eye and nose secretions of cats with respiratory symptoms were collected from different animal hospitals in the area. Initial PCR detection was performed, and positive samples were obtained and were inoculated on crandell reese feline kidney (CRFK) cells which showed pathological changes. Next, plaque purification, molecular biological detection, serological identification, and virus morphological identification were conducted, the positive samples were inoculated into the CRFK cells, and a strain of feline herpes virus (FHV-1) was obtained. Finally, specific bands were obtained by amplifying the FHV-1 gene using the gD gene primer, after three rounds of purification, a subclonal strain named FHV HD1 was obtained. The results showed that the virus titer of FHV HD1 P3 on CRFK was 10^6 $TCID_{50}$/100 μL. Virus titers were measured at 8 timing points during the growth, and the growth curve of the isolates was obtained. FHV-1 specific antibody was used for indirect immunofluorescence detection, and FHV-HD1 showed specific fluorescence. BLAST analysis showed that the gD gene of the FHV-HD1 strain was of 98.25%-99.91% similarity to the other FHV-1 strains. Phylogenetic tree analysis showed that it was closely related to feline source FHV-1 in the same clade, but was far related to canine herpesvirus and other animal herpesvirus. These results indicatd that the FHV-1 strain in the Handan area was evolutionarily stable at present, which laid a theoretical foundation for the evolutionary analysis of feline herpesvirus and the development of vaccine at the present stage. The results also possessedimportant reference value for the study of etiology, immunology, clinical diagnosis and molecular biology of feline viral rhinotracheitis.

Keywords: feline herpes virus type 1; separation and identification; growth kinetics; gD gene

---

收稿日期：2023-05-31；修回日期：2024-04-29
基金项目：河北省自然科学基金项目（C2021402005）
第一作者：余紫葳，女，硕士研究生
*通信作者：刘永相，博士，讲师，研究方向：兽医微生物，E-mail：liuyongxiang0726@foxmail.com；范春艳，博士，副教授，研究方向：兽医微生物，E-mail：252199396@qq.com。

猫病毒性鼻气管炎（feline viral rhiontracheitis，FVR）是由猫疱疹病毒 1 型（feline herpesvirus type 1，FHV-1）引起猫的一种急性、高度接触性上呼吸道传染病[1-2]，主要侵害幼猫，发病率可达 100%，死亡率约 50%。FHV-1 为双链 DNA 病毒，属于疱疹病毒科、α 疱疹病毒亚科、水痘疱疹病毒属。自美国 1958 年首次分离到 FHV-1 以来，加拿大、瑞士、英国、荷兰、匈牙利、日本等许多国家也陆续发现了 FHV-1[3]，我国也多次成功分离到 FHV-1[4-6]。目前研究确认 FHV-1 只有一种血清型，猫科动物均易感[7]，主要通过直接接触传播途径感染易感幼猫，并在其结膜、上呼吸道及舌上皮细胞内增殖，随分泌物排出体外。FHV-1 可进入感染猫的神经元内，当感染猫康复后在其体内进行周期性的病毒再激活，尤其是应激后免疫力下降更容易激活病毒复制，因此康复猫终身潜伏带毒，成为临床 FHV-1 的主要携带者[8]。感染猫临床症状表现为抑郁、发热、打喷嚏、眼鼻浆液性分泌物增多、结膜充血等，严重者还会出现皮肤溃疡。据统计，90%以上猫的 FHV-1 抗体呈阳性，约 80%的猫潜伏感染，45%的猫终生带毒、排毒[9]。因此 FHV-1 已经对猫科动物的健康产生了较大威胁，加强对该病毒研究尤为重要。

本研究从邯郸地区不同动物医院采集了 55 份有结膜充血、眼鼻分泌物增多、打喷嚏等呼吸道症状猫的眼鼻分泌物，经过 PCR 初步检测后，筛选出 6 份阳性样品，阳性率为 10.9%，将阳性样本接种于猫肾细胞（crandell reese feline kidney，CRFK）进行病毒分离纯化，通过 PCR 扩增、间接免疫荧光测定、FHV gD 基因序列分析、电子显微镜观察等病毒鉴定，为 FHV-1 的生物学特性研究及防控提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　病料与细胞

采集河北省邯郸市的动物医院疑似感染 FHV-1 猫的眼、鼻拭子共 55 份，患猫临床表现为发热、打喷嚏、口腔溃疡、眼鼻分泌物增多等症状；CRFK 保存于河北工程大学实验室。

1.2　主要试剂与仪器

EasyPure Viral DNA/RNA kit 纯化试剂盒、EasyScript®一步法 cDNA 反转录试剂盒，购自北京全式金生物技术有限公司；DMEM 高糖培养基、DMEM 粉末和胎牛血清，购自 Gibco 公司；2×*Taq*PCR StarMix 和 Sterile ddH_2O，购自北京康润诚业生物科技有限公司；50×TAE 购自生工生物技术有限公司；二氧化碳培养箱，购自海尔公司；PCR 仪，购自德国耶拿分析仪器股份有限公司；核酸琼脂糖凝胶电泳仪，购自北京六一生物科技有限公司；凝胶成像分析仪，购自通用电气健康护理生物科技有限公司。

1.3　病料处理

将采集到的疑似感染 FHV-1 猫的眼、鼻拭子置于 1 mL 含有青霉素（100 U/mL）和链霉素（0.1 mg/mL）的灭菌 PBS 中，反复搅动、挤压拭子使病料充分溶解于溶液中，然后 12 000 r/min 离心 2 min，取上清液无菌条件下经 0.22 μm 细菌滤器过滤后备用。

1.4　PCR 初步检测

用 FHV gD 引物对 55 份处理后的病毒液进行初步检测，从中筛选出阳性样本，进行后续分离培养。

1.5　病毒的分离

待 CRFK 生长至单层，弃掉培养液，无菌 PBS 清洗 2 次，加入无血清 DMEM 培养液 3 mL（T25 培养瓶），每瓶加入 200 μL 病料处理液，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱感作 2 h，加入 3 mL 含 2% FBS 的 DMEM 培养基，继续置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。待细胞出现圆缩、聚集成团、间隙增大、漂浮时，收取 CRFK 培养物，反复冻融 3 次后，12 000 r/min离心 3 min，取上清液分装后-80 ℃冻存备用。若无病变，需在培养第 5 天后进行细胞传代，盲传 3 代仍无病变，则弃掉。

1.6　病毒的纯化

将 1.4 中经 CRFK 细胞培养分离的初代病毒培养液进行蚀斑纯化[10]后，置于冰箱-20 ℃保存备用。

1.7　PCR 检测

特异性引物由天津擎科生物科技有限公司合成，其中 FHV gD 特异性引物自行设计（表 1），猫杯状病毒（feline calicivirus，FCV）和猫泛白细胞减少综合征病毒（feline parvovirus，FPV）引物参照文献［11-12］合成。用 EasyPure Viral DNA/RNA kit 病毒 DNA/RNA 纯化试剂盒提取病毒核酸，EasyScript®一步法 cDNA 反转录试剂盒对 RNA 进行反转录，使用 2×*Taq* PCR StarMix 进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后，送天津擎科生物科技有限公司进行测序。

表 1　FHV-1 的特异性引物

引物名称	引物序列（5′→3′）	产物长度/bp
FHV-gD-F	ATGATGACACGTCTACATTTTTGG	1 124
FHV-gD-R	TTAAGGATGGTGAGTTGTATGTAT	

1.8 病毒滴度检测

在含有 CRFK 单层细胞的培养瓶中加入胰酶，当细胞脱离瓶壁，悬浮于培养液中时，将其接种到 96 孔板上，每孔加 100 μL。将分离纯化的 FHV-1 上清液 10 倍倍比稀释，每个稀释度重复 6 孔分别接种于 CRFK 细胞中。37 ℃、5% CO_2培养箱中培养 6 d，观察并记录细胞出现病变的孔。按照 Reed-Muench，计算病毒滴度。

1.9 病毒生长动力学检测

以感染比（MOI）为 0.1 将 FHV-1 分离株接种于 CRFK，37 ℃、5% CO_2培养箱中培养，每 12 h 收集 1 次培养上清液，共收集了病毒生长过程中 8 个时间点的培养液，每个时间点 2 份重复组，分别检测每个时间点培养上清液的病毒滴度，以获取 FHV-1 分离株的生长动力曲线。

1.10 病毒形态鉴定

取 1 mL FHV-1 的 CRFK 培养液 10 000 r/min 离心 10 min，弃掉沉淀，然后 12 000 r/min 离心 30 min，弃掉上清液。将沉淀用 50 μL PBS 重悬，进行常规负染，电子显微镜下对病毒形态进行观察鉴定。

1.11 间接免疫荧光测定

将分离纯化的 FHV-1 上清液接种于单层 CRFK 的 96 孔板中，每孔加 100 μL 病毒滴度为 10^2 $TCID_{50}$/100 μL 的 FHV HD1，5% CO_2、37 ℃培养箱中培养，培养 24 h 后加入 100 μL 冷甲醇（-20 ℃）进行固定和透膜，20 min 后弃去甲醇，用 PBS 清洗培养板。将 FHV-1 阳性血清用 PBS 按 1∶100 稀释后加入培养板，每孔加 100 μL。作用 1 h 后，用 PBS 清洗培养板，将 FITC 标记山羊抗猫二抗 IgG 用 PBS 按 1∶100稀释后加入培养板，每孔加 100 μL，避光作用 1 h。PBS 清洗培养板后，用荧光显微镜观察。同时设置阴性对照组。

1.12 基因序列鉴定

通过在线分析网站 BLAST（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）的核酸 BLAST 界面对基因序列进行搜索和分析。基因序列进化分析从 NCBI（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）下载猫源 FHV gD 序列、猎豹源 FHV gD 序列和老虎源 FHV gD 序列，以及犬疱疹病毒（canine herpesvirus）、牛疱疹病毒（bovine herpesvirus）、山羊疱疹病毒（caprine herpesvirus）和猴疱疹病毒（monkey herpesvirus）等的 gD 序列（表 2），利用 MEGAX 软件采用邻接法，进行可靠性分析，构建基因系统发育树[13]。

表 2 构建基因系统发育树的毒株信息

序列	毒株	感染动物	病毒种类	地点	分离时间	登录号
1	MM-4	猎豹	猫疱疹病毒 1 型	美国	2016.6	OL410289.1
2	GZ001	老虎	猫疱疹病毒 1 型	中国	2013.5	KJ466150.1
3	Australian	犬	犬疱疹病毒 1 型	澳大利亚	2001.3	AF361076.1
4	RP	猴	猴疱疹病毒 1 型	美国	2001.11	AF447089.1
5	Ba-1	山羊	山羊疱疹病毒 1 型	意大利	2005.7	DQ139344.1
6	CYC	牛	牛疱疹病毒 1 型	蒙古	2018.12	MK314051.1
7	M27	牛	牛疱疹病毒 1 型	蒙古	2018.5	MH370856.1
8	AH02LA	猪	猪疱疹病毒 1 型	中国	2015.5	KR605321.1

2 结果

2.1 样本的 PCR 检测

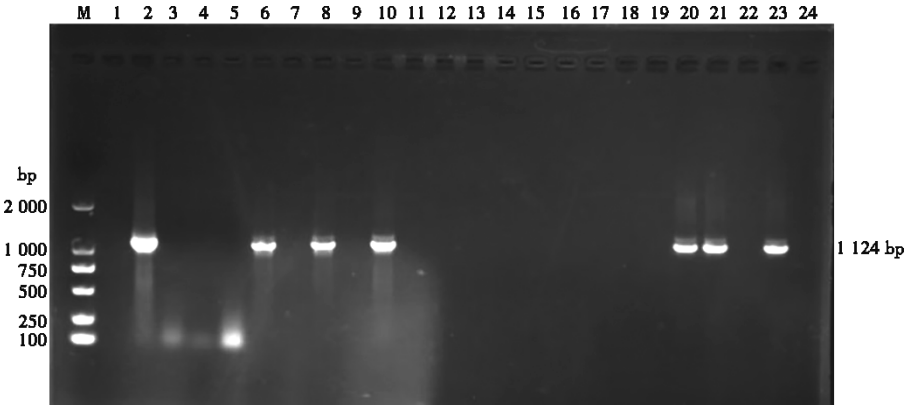
将 55 份处理后的样本用 FHV gD 引物进行 PCR 初步检测，其中 6 份出现目的条带，为 FHV-1 阳性（图 1）。

2.2 病毒的分离

CRFK 细胞在接种其中一份 PCR 检测为阳性的病料处理液后 3 d，开始出现圆缩、聚集成团、间隙增大、脱落等病变现象，接种后 5 d，细胞病变率（CPE）达 80%以上（图 2D~F），正常 CRFK 未出现 CPE（图 2A~C）。

2.3 病毒的纯化

经过 3 轮的病毒蚀斑纯化后，通过 PCR 检测仅可检测到 FHV-1，而检测不到 FPV 和 FCV。纯化蚀斑的 0.5%结晶紫染色结果见图 3。



M. DNA 分子量标准（DL2000）；1. 阴性对照；2. 阳性对照；3~24. 部分病料。

图 1　病料的 PCR 检测结果

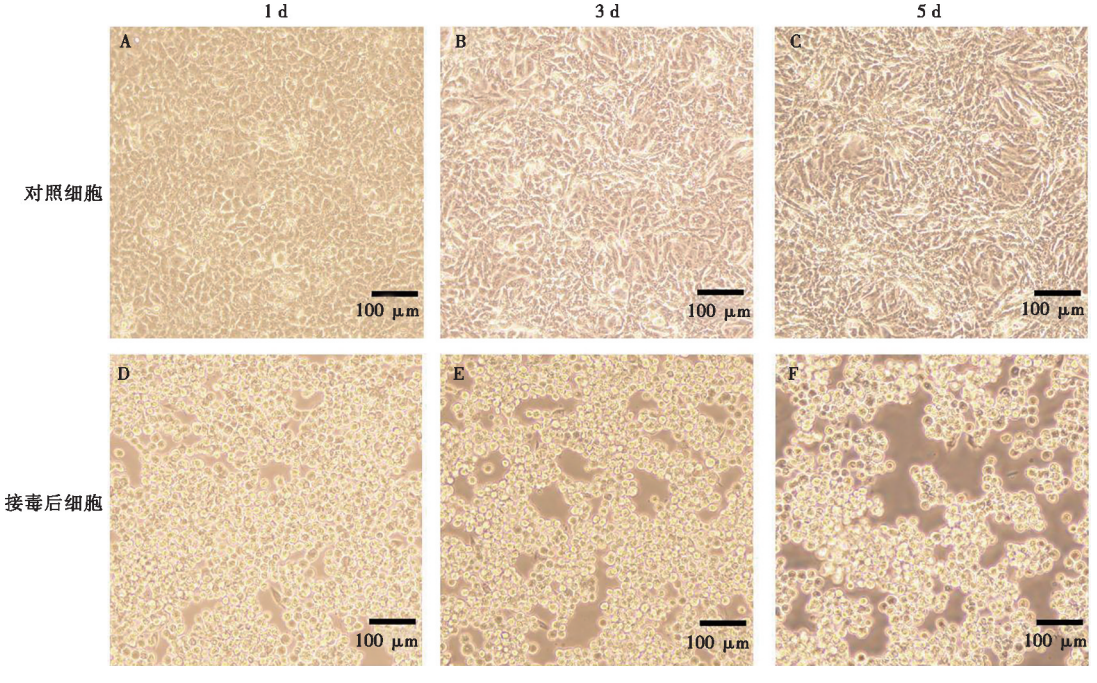
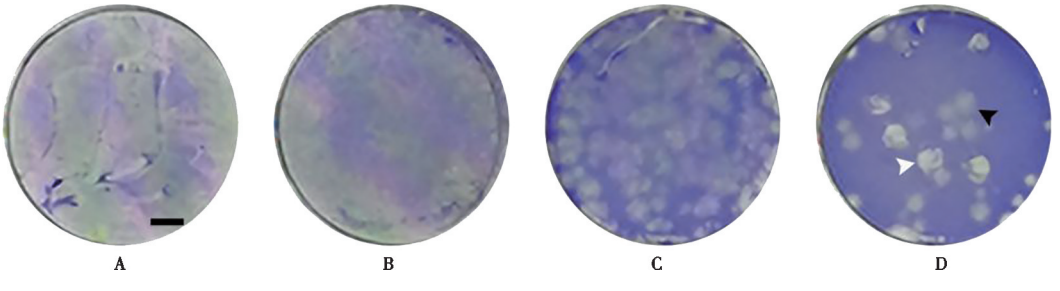


图 2　病料接种 CRFK 后细胞形态的变化

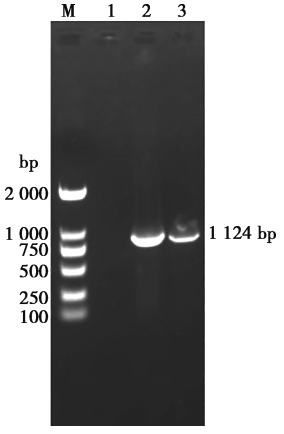


A. MOI=100；B. MOI=10；C. MOI=1；D. MOI=0.1，其中白色箭头表示已取蚀斑，黑色箭头表示未取蚀斑。

图 3　病毒的蚀斑纯化结晶紫染色

2.4 PCR 检测

FHV gD 引物扩增后得到的条带长度为 1 000 bp 左右（图 4），与预期结果一致，为 FHV-1 阳性。



M. DNA 分子量标准（DL2000）；1. 阴性对照；2. 阳性对照；3. gD 基因扩增结果。

图 4 gD 基因 PCR 扩增结果

2.5 病毒滴度检测

按照 Reed-Muench 法，经计算得出分离毒株病毒滴度为 10^6 $TCID_{50}$/100 μL。

2.6 病毒生长动力学检测

分别检测病毒生长过程中 12、24、36、48、60、72、84 和 96 h 共 8 个时间点培养上清液的病毒滴度，每个时间点 2 份重复组，取 2 组平均值，绘制出病毒分离株的生长曲线，见图 5。

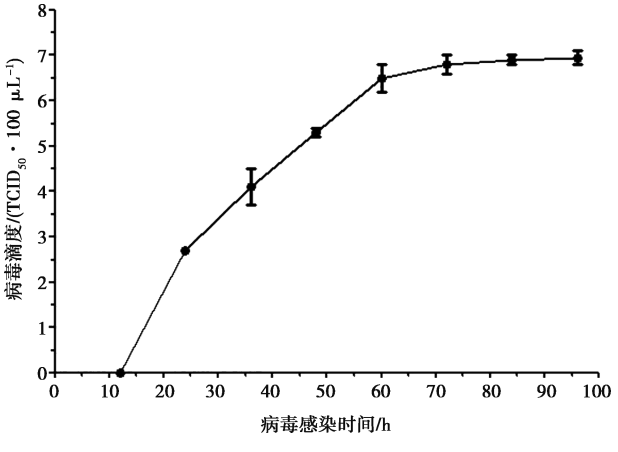


图 5 分离毒株生长曲线

2.7 病毒形态鉴定

在电子显微镜下观察负染后的病毒分离株培养上清液，可见病毒粒子为球形，外观呈椭圆形，直径为 160 nm 左右，病毒粒子外周有囊膜包裹，囊膜表面附有纤突，内部有核心和衣壳（图 6）。

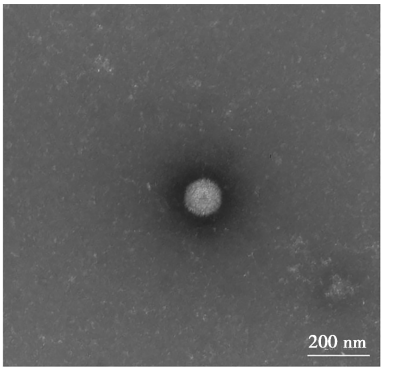
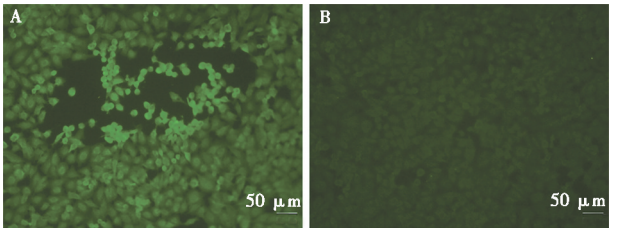


图 6 FHV-1 分离株病毒粒子形态鉴定

2.8 间接免疫荧光鉴定

荧光显微镜显示，感染分离株的病变细胞胞质中有特异性的绿色荧光，阴性对照细胞中无特异性荧光（图 7），表明细胞培养物中存在 FHV-1。



A. 分离株感染细胞；B. 阴性对照。

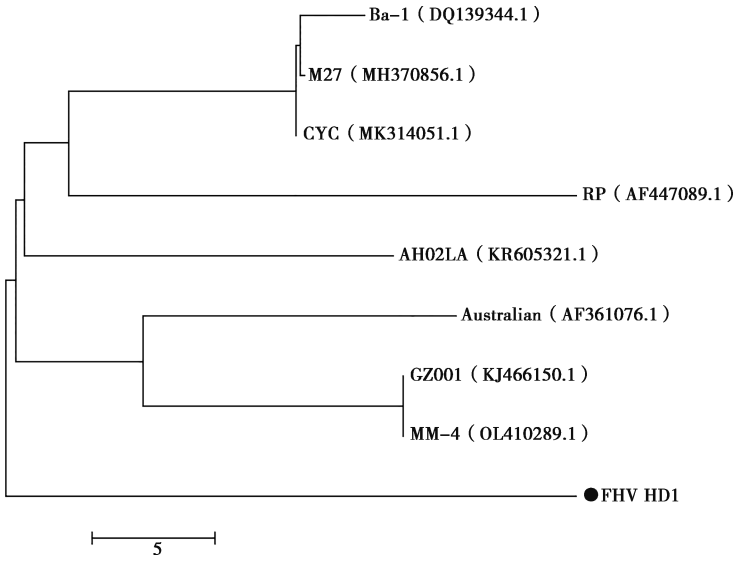
图 7 分离毒株的间接免疫荧光鉴定结果

2.9 基因序列鉴定

分离株的 gD 基因扩增产物序列与 NCBI 所录入的 FHV gD 基因的相似性达 98.25%～99.91%，表明该病毒分离株为 FHV-1，命名为 FHV HD1。

2.10 基因序列进化分析

分离毒株 FHV HD1 与猫源、猎豹源和老虎源等猫科动物疱疹病毒 FHV gD 序列亲缘关系最近，处于同一进化分支；与犬疱疹病毒亲缘关系较近，共处于较大的进化分支；而与牛疱疹病毒、猪疱疹病毒和猴疱疹病毒亲缘关系较远（图 8）。



注：●本试验分离株。

图 8　FHV HD1 分离株 gD 基因的分子进化树

3　讨论

近年来，随着我国城市化和老龄化进程不断加深，饲养猫的家庭越来越多，猫作为伴侣动物，其健康问题也引起了人们的广泛重视。FHV-1 是猫最易感染的病毒之一，对 FHV-1 的防控主要以接种疫苗为主，药物治疗效果欠佳[14]。目前临床最常用的是猫病三联灭活疫苗，但是疫苗仅仅能够阻止发病，并不能阻止感染。当猫感染 FHV-1 时，需要对症治疗，根据发病情况对呼吸道症状和眼睛溃疡进行治疗[15]。为避免 FHV-1 大范围传播，对本区域的猫进行 FHV-1 的分离鉴定及流行特征的研究极其重要。

本研究从邯郸地区不同动物医院采集有呼吸道症状、疑似感染 FHV-1 猫的眼、鼻分泌物拭子 55 份，通过对样本进行 PCR 检测，初步鉴定其中 6 份为 FHV-1 阳性，将阳性样本接种于 CRFK 细胞进行扩增培养，最终分离鉴定出 1 株 FHV-1 分离株。由此表明在病料的采集和运输过程中存在纰漏，导致病毒活性降低，分离难度增大。FHV-1 主要引起猫上呼吸道疾病（FURTD），但可引起 FURTD 的病原体不仅有猫疱疹病毒，还有猫杯状病毒、支原体、衣原体和部分细菌等，单从临床症状来看，很难对其做出判断，且感染 FHV-1 初期的猫出现症状但不一定对外排毒，因此仅以 FURTD 作为采样依据，难以准确采集到 FHV-1 样本。普通 PCR 检测方法敏感性不够，也存在一定的误差，萧晟等[16]对 3 种常见的 FHV-1 检测方法进行对比，荧光定量 PCR 和普通 PCR 的最低检限分别为 20 拷贝和 207 拷贝；荧光定量 PCR、普通 PCR 以及胶体金速测卡的检出率分别为 71%、57%和 29%。因此还需针对 FHV-1 建立出快速、准确的检测方法。

张国军等[17]从河北某宠物医院送检的病料中成功分离出 1 株 FHV-1，其 gD 基因序列与已发表序列同源性达 100%。本研究从河北邯郸地区分离出的 FHV HD1 株，其细胞培养产物在荧光显微镜下显示病变细胞胞质中有特异性的绿色荧光，其 gD 基因序列与 NCBI 所录入的 FHV gD 基因序列相似性达 98.25%~99.91%，进化树分析显示 gD 基因与猫源、猎豹源和老虎源等猫科动物疱疹病毒 FHV gD 序列亲缘关系最近，表明本研究成功分离出 1 株 FHV-1 毒株，由于 FHV-1 基因序列较保守，FHV HD1 未出现明显变异。近年来，FHV-1 毒株相对来说变异不是很大，但也在不断地变异之中，需要时刻监测病原的变化，FHV-1 新毒株的不断分离鉴定为 FHV-1 遗传进化和疫苗研发奠定了坚实基础。

参考文献：

[1]　GASKELL R, DAWSON S, RADFORD A, et al. Feline herpesvirus [J]. Veterinary Research, 2007, 38 (2): 337-354.

[2]　GASKELL R M , WARDLEY R C. Feline viral respiratory disease: a review with particular reference to its epizootiology and control [J]. The Journal of Small Animal Practice, 1978, 19 (1): 1-16.

[3]　DOWERS L K, HAWLEY R J, BREWER M M, et al. Association of *Bartonella* species, feline calicivirus, and feline herpesvirus 1 infection with gingivostomatitis in cats [J]. Journal of Feline Medicine

and Surgery，2009，12（4）：314-321.

［4］ HENZEL A，BRUM M C，LAUTERT C，et al. Isolation and identification of feline calicivirus and feline herpesvirus in Southern Brazil［J］. Brazilian Journal of Microbiology，2012，43（2）：560-568.

［5］ NAKAMURA K，IKEDA Y，MIYAZAWA T，et al. Comparison of prevalence of feline herpesvirus type 1，calicivirus and parvovirus infections in domestic and leopard cats in Vietnam［J］. The Journal of Veterinary Medical Science，1999，61（12）：1313-1315.

［6］ 张硕，李纯玲，汪葆玥，等. 猫疱疹病毒Ⅰ型的分离与鉴定［J］. 实验动物科学，2010，27（2）：21-25.

［7］ 刘宝山，林颖，尹荣焕，等. 猫疱疹病毒1型PCR检测方法的建立［J］. 畜牧与兽医，2010，42（1）：74-76.

［8］ 陶伟杰，刘雪娇，宋晓莉，等. 猫疱疹病毒1型的分离鉴定及生物学特性分析［J］. 病毒学报，2023，39（4）：1053-1061.

［9］ MAGGS D J，LAPPIN M R，REIF J S，et al. Evaluation of serologic and viral detection methods for diagnosing feline herpesvirus-1 infection in cats with acute respiratory tract or chronic ocular disease［J］. Journal of the American Veterinary Medical Association，1999，214（4）：502-507.

［10］ 刘晓晓，刘永相，张继凯，等. 猫疱疹病毒1型HR-1毒株的分离鉴定及致病性分析［J］. 中国兽医学报，2019，39（6）：1113-1117.

［11］ 刘维全，范泉水，江禹，等. 肉食兽细小病毒通用PCR诊断技术的建立［J］. 中国兽医学报，2001（3）：249-251.

［12］ LIU Y X，LIU X X，KANG H T，et al. Identification of feline interferon regulatory factor 1 as an efficient antiviral factor against the replication of feline calicivirus and other feline viruses［J］. BioMed Research International，2018，2018：2739830.

［13］ 王吉，付瑞，卫礼，等. 猫疱疹病毒Ⅰ型PCR检测方法的建立及初步应用［J］. 中国病毒病杂志，2014，4（3）：192-197.

［14］ 刘健，李鑫，徐锋，等. 猫传染性鼻气管炎病毒的分离与鉴定［J］. 中国动物传染病学报，2016，24（1）：22-26.

［15］ 孙春艳，钱鹏，王洁，等. 猫疱疹病毒1型的分离鉴定及gD基因序列分析［J］. 动物医学进展，2020，41（3）：30-35.

［16］ 萧晟，熊冉，苑文涛，等. 3种猫疱疹病毒Ⅰ型检测方法的比较［J］. 安徽农业大学学报，2019，46（3）：394-400.

［17］ 张国军，任洪林，杨举，等. 猫疱疹病毒Ⅰ型HB株的分离鉴定及其免疫原性初步评价［J］. 中国兽医学报，2022，42（5）：879-882.