



# 圈养东北虎猫冠状病毒的巢氏 PCR 检测

刘亚男<sup>1#</sup>, 谢薇<sup>1#</sup>, 徐海涛<sup>2</sup>, 王阳平<sup>1</sup>, 舒怡<sup>1</sup>, 梁美玉<sup>1</sup>, 王亚君<sup>1\*</sup>

- (1. 东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 哈尔滨, 150040;  
2. 黑龙江东北虎林园, 哈尔滨, 150028)

## 稿件运行过程

收稿日期: 2023-08-15

修回日期: 2024-02-20



关键词: 东北虎;

猫冠状病毒;

巢氏 PCR

**Keywords:** Amur tiger (*Panthera tigris altaica*);

Feline coronavirus;

Nested PCR

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2024)-04-0896-05

DOI: 10.12375/ysdwx.20240424

## 摘要

东北虎(*Panthera tigris altaica*)是全球生物多样性保护的旗舰物种,在维持生态系统功能中占据不可替代的重要地位。东北虎对于可感染家猫的病毒均易感,但目前关于东北虎病毒病的流行病学资料仍然十分有限。猫冠状病毒(Feline coronavirus, FCoV)感染,轻可导致猫科(Felidae)动物腹泻,重则呈现高致病性、致死性的猫传染性腹膜炎(Feline infectious peritonitis, FIP)。因此,采用巢氏 PCR 方法对来自黑龙江省东北虎林园的 6 份东北虎全血样本进行 FCoV 检测,结果显示 2 份样本为阳性(H-11-1241、H-11-1310),阳性率为 33.3%。所得 PCR 片段与其他参考株同源性为 99.3%~100.0%。研究结果丰富了圈养东北虎中猫冠状病毒流行病学数据,为其他圈养猫科动物的 FCoV 监测提供了参考,对野生猫科动物的保护与繁育具有重要意义。

## Nested PCR Detection of Feline Coronavirus in Captive Amur Tigers

LIU Yanan<sup>1#</sup>, XIE Wei<sup>1#</sup>, XU Haitao<sup>2</sup>,  
WANG Yangping<sup>1</sup>, SHU Yi<sup>1</sup>, LIANG Meiyu<sup>1</sup>, WANG Yajun<sup>1\*</sup>

- (1. College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, China;  
2. Heilongjiang Siberian Tiger Park, Harbin, 150028, China)

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(202210225035); 国家科技部“十四五”重点研发项目(2023YFF1305401)

第一作者简介: 刘亚男(2001—),女,本科生。E-mail: OliviaLiu0125@outlook.com

\* 共同第一作者: 刘亚男; 谢薇

\* 通信作者: 王亚君, E-mail: wangyajun@nefu.edu.cn

**Abstract:** Amur tiger (*Panthera tigris altaica*) is the flagship species for global biodiversity conservation. The tiger is susceptible to the viruses that can infect domestic cats, but the epidemiological data on the virus diseases of Amur tiger are exceedingly limited. Infection with Feline coronavirus (FCoV) usually causes general diarrhea in Felidae animals, while severe cases can present as highly pathogenic and lethal Feline infectious peritonitis (FIP). The nested PCR method was used to detect FCoV in six whole blood samples of Amur tiger from Siberian Tiger Park in Heilongjiang Province. The results showed that two samples were positive (H-11-1241, H-11-1310), and the positive rate was 33.3%. The homology between the obtained PCR fragments and other reference strains was 99.3% – 100.0%. The results enrich the epidemiological data of FCoV in captive Amur tigers, provided reference for FCoV monitoring of other captive felines, and have great significance to the protection and breeding of wild felines.

近年随着国家对野生动物保护力度的加大,圈养和野生猫科(Felidae)动物数量也在增加,人以及各种生态因素导致了病原体在不同种间的传播。病毒性传染病严重威胁着猫科动物的健康及种群数量,感染家猫的多数病原体都可感染野生猫科动物,并引起相似的临床症状。猫冠状病毒(Feline coronavirus, FCoV)主要感染半岁至两岁的猫,在全球范围内广泛存在,幼猫更易感染<sup>[1]</sup>。Kennedy *et al.*<sup>[2]</sup>对美国多种圈养猫科动物如猎豹(*Acinonyx jubatus*)、东北虎(*Panthera tigris altaica*)进行了FCoV检测,结果显示超过一半的样本呈现阳性反应。东北虎不仅是我国一级重点保护野生动物,还是全球生物多样性保护的旗舰物种,但目前关于东北虎的冠状病毒感染流行病学数据几乎是空白,因此,对东北虎等大型猫科动物进行冠状病毒感染的监测对于本病的防控具有重要意义。

FCoV于20世纪60年代被Holzworth<sup>[3]</sup>首次发现,属于尼多病毒目(Nidovirales),冠状病毒科(Coronaviridae),冠状病毒属(*Coronavirus*),它是一种不分节段的单股正链RNA病毒,拥有一个较为庞大的基因组(约30 kb)<sup>[4]</sup>。FCoV基因组含有11个开放阅读框(open reading frames, ORFs),主要编码4种结构蛋白和7种非结构蛋白,其中结构蛋白分别是刺突蛋白S、膜蛋白E、包膜蛋白M和核衣壳蛋白N;非结构蛋白主要是复制酶蛋白(1a和1b)、辅助蛋白(3a、3b、3c、7a和7b)<sup>[5]</sup>。FCoV具有两种生物型,一种为可导致猫传染性腹膜炎(Feline infectious peritonitis, FIP)的猫传染性腹膜炎病毒(Feline infectious peritonitis virus, FIPV),呈现高致病性、致死性特征,临床上根据腹腔和胸腔是否有渗出液,可将FIP分为干性、湿性和混合型3种;另一种为低致病性的猫

肠道冠状病毒(Feline enteric coronavirus, FECV)<sup>[6]</sup>,只存在于猫的消化道,通常引发猫轻微的肠胃腹泻,严重时会导致猫脱水。尽管在FCoV感染的猫中FIP的发病率比较低,但FIP是导致患猫死亡的主要原因<sup>[7]</sup>。根据S基因序列及抗原性的不同,可以将FCoV分为I型和II型,I型FCoV是猫科动物独有;II型FCoV是I型FCoV与犬冠状病毒(Canine coronavirus, CCoV)之间发生重组产生的,具有较强的遗传变异性,在亚洲地区II型约占FCoV感染的25%甚至更多<sup>[8]</sup>。

本研究采用巢氏PCR方法对来自黑龙江东北虎林园的6份东北虎全血样本进行FCoV检测,以期了解和掌握虎源FCoV的分子流行病学资料,为我国后续圈养猫科动物FCoV监测和预防提供数据参考。

## 1 实验动物及药品处理

2021年11月—2022年11月在黑龙江东北虎林园,由专业兽医采集6份(只)东北虎(0~6岁)的全血样本。所有东北虎在采血前禁食1d,用含有10 mg/kg氯胺酮飞镖麻醉(江苏中牧倍康药业有限公司,中国),每只虎由前肢静脉采血2 mL。采样后将所有样品血液放置于含有适量抗凝剂的采集管内并于-80℃储存备用。

## 2 方法

### 2.1 引物的设计与合成

参照Herrewegh *et al.*<sup>[9]</sup>研究基础设计引物,以FCoV的3'-UTR(untranslated region, UTR)部分基因作为目标片段,采用巢氏PCR方法对6份东北虎全血样本进行逐一筛查,引物序列以及反应条件见表1。

表1 FCoV 3'-UTR 片段序列引物  
Tab. 1 Primer sequences of FCoV 3'-UTR gene fragments

引物 Primers	序列(5'→3') Sequences(5'→3')	退火温度 /°C Annealing temperature	扩增长度 /bp Product
P205-F	GGCAACCCGATGTTTAAAACTGG	58	177
P211-R	CACTAGATCCAGACGTTAGCTC		
P276-F	CCGAGGAATTACTGGTCATCGCG		
P204-R	GCTCTTCCATTGTTGGCTCGTC		

## 2.2 病毒核酸的提取与反转录

核酸提取采用 Baypure 通用型磁珠法病毒 DNA/RNA 快速提取试剂盒(广州湾区生物科技有限公司, 中国), 并按照试剂盒说明书对全血样本核酸进行提取, 置于-80 °C 储存。将 4 μL 随机引物加入带有核酸且无 RNA 酶的 EP 管内, 置于干式恒温器中 70 °C 培养 5 min, 再于-20 °C 冰浴 5 min; 之后向 EP 管中加入 dNTP 8 μL, DEPC 水 6 μL, M-MLV 5 × Buffer 10 μL, RNase 抑制剂 1 μL 和 M-MLV 逆转录酶(Promega 公司, 美国) 1 μL, 于 37 °C 反应 1 h; 继续置于-20 °C 冰浴 5 min, 冷冻保存备用。

## 2.3 样品的 PCR 检测

以病毒核酸的反转录产物为模板进行第 1 轮 PCR 扩增, 扩增体系 25.0 μL, 包含 2 × Mix 12.5 μL,

上、下游引物各 1.0 μL, DNA/第 1 轮 PCR 扩增产物 1.0 μL; ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 45 个循环; 72 °C 终延伸 7 min。将该轮 PCR 产物进行第 2 轮扩增, 扩增程序与第 1 轮完全一致, 扩增产物大小为 177 bp。经琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 将 PCR 检测阳性产物送至吉林库美生物科技有限公司进行测序。

## 2.4 3'-UTR 基因片段的同源性分析

将测序结果与 NCBI 数据库收录的参考毒株进行 BLAST 比对分析, 使用 DNASTar 5.0 软件的 MegAlign 程序对测序所得序列和参考毒株序列(表 2) 进行同源性比对, 再采用 R 4.3 进行数据分析。组间比较采用卡方检验,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

表2 FCoV 基因片段参考毒株信息  
Tab. 2 Reference strain information of FCoV partial gene fragments

毒株名称 Name of virus strain	参考毒株登录号 Accession number	来源(国家·地区) Origin(Country·Area)	宿主 Host
HLJ/HRB/2016/11	KY566210	中国·黑龙江	家猫
HLJ/HRB/2016/10	KY566209	中国·黑龙江	家猫
HLJ/DQ/2016/01	KY292377	中国·黑龙江	家猫
HLJ-071	KY063616	中国·黑龙江	家犬
GH4-2	OM950729	中国·北京	貉
SH143_2011	MF095852	坦桑尼亚	斑鬣狗
79-1146	OQ311323		
WSU-79/1146_P1	KC461235		
WSU-79/1146_P8	KC461236		
WSU-79/1146_P50	KC461237		
DF-2	JQ408981		
DF-2 R3i	JQ408980		

注: 空白信息毒株为猫冠状病毒体外研究模型所获得的毒株序列。

Note: The virus strain with blank information in the table is the strain sequence obtained from the *vitro* study model of feline coronavirus.

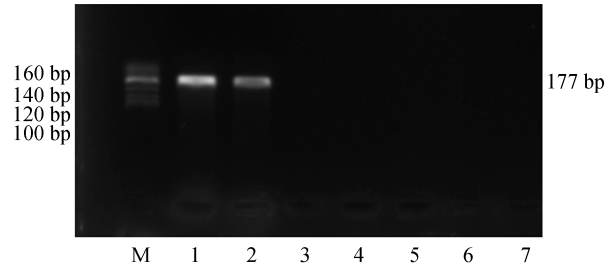
### 3 结果与分析

#### 3.1 PCR 鉴定结果

电泳结果显示,6份来自黑龙江东北虎林园的样本中仅有2份样本扩增到约177 bp的阳性目的条带,阳性率为33.3%,阳性产物电泳结果见图1。

#### 3.2 同源性比较分析

猫冠状病毒3'-UTR保守基因片段经巢氏PCR验证,所获得的2株阳性样本序列之间的同源性达100.0%,对该样本扩增产物进行BLAST分析,确定2株阳性样本(H-11-1241、H-11-1310)为FCoV。使用DNASar软件的MegAlign程序对2株测序毒株和参考毒株的FCoV部分基因进行同源性比对,两阳性株与参考株同源性比对相似性为99.3%~100.0%(图2)。其中,阳性株与来自黑龙江家猫



M. DL2000 Marker; 1 ~ 2. 阳性样本; 3 ~ 6. 阴性样本; 7. 阴性对照。

M. DL2000 Marker; 1 - 2. Positive sample; 3 - 6. Negative sample; 7. Negative control.

图1 东北虎血样样本中FCoV的PCR鉴定结果

Fig. 1 PCR identification results of FCoV in blood samples of Amur tiger

的KY566210、KY566209和KY292377的同源性为99.3%,结合阳性目的条带长约177 bp,即存在大约一个碱基的差异,与黑龙江家猫源毒株具有较高的同源性。

		相似性 /% Percent identity															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	登录号 Accession number	
分歧度 Divergence	1		100.0	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	100.0	100.0	100.0	99.3	100.0	100.0	1	H-11-1241
	2	0.0		99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	97.3	99.3	97.3	99.3	99.3	99.3	99.3	2	H-11-1310
	3	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	3	KY566210
	4	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	4	KY566209
	5	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	5	KY292377
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	6	KY063616
	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	7	OM950729
	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	8	MF095852
	9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	9	OQ311323
	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	10	KC461235
	11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	11	KC461236
	12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	12	KC461237
	13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	13	JQ408981
	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	14

图2 FCoV 3'-UTR 基因片段核苷酸序列同源性结果

Fig. 2 Homology analysis results of nucleotide sequences of FCoV 3'-UTR gene

### 4 讨论

近年来,我国对圈养东北虎的饲养管理措施逐渐完善,东北虎数量逐渐上升,但一些病毒(包括FCoV)性传染疾病给东北虎的繁育带来巨大压力。FCoV是一种常见的高传染性冠状病毒,可在家猫和野生猫科动物中传播,其传播方式主要为粪口传播。不同品种猫跨地区培育、流浪猫的增多和养殖市场环境恶劣等诸多因素导致猫冠状病毒的变异和

进化,FCoV不仅在猫群中广泛流行,还可能对东北虎造成潜在威胁。本研究采用巢氏PCR对6份东北虎全血样本进行FCoV检测,结果有2份全血样品显示阳性,阳性率为33.3%。同源性比对分析显示,本研究所获得的基因与黑龙江本地流行毒株具有较高同源性(99.3%),即存在流浪猫与圈养东北虎交互的可能性。

刘秋瑾等<sup>[10]</sup>在2015—2016年对黑龙江省3个地区的猫冠状病毒进行了分子流行病学调查,选取黑

龙江省哈尔滨市、大庆市和齐齐哈尔市不同宠物医院中初步诊断患 FIP 猫的腹水样品,结果显示我国 FCoV-I 型、FCoV-II 型均在国内流行,但以 FCoV-I 型流行为主。李少柏<sup>[11]</sup>通过对东北部分地区猫冠状病毒的病原学调查,不仅确定了我国东北地区的猫冠状病毒主要以 FCoV-I 型流行为主,还验证了 FCoV 感染与年龄及居住方式显著相关。这与 Klein-Richers *et al.*<sup>[12]</sup>在多变量试验所得到的结论基本相符,即在多猫科动物聚集环境中和在幼龄时更易感染 FCoV。在区分猫冠状病毒的血清型上,一般选取 FCoV 的 S 基因序列进行分析。本研究选取高度保守的 3'-UTR 基因序列不足以分辨东北虎源 FCoV 的血清型,但采样时圈养东北虎并未表现出明显的 FIP 症状(如黄疸、腹部膨大和腹围增大等),可以确定该阳性样本的生物型为 FECV。

Olarte-Castillo *et al.*<sup>[13]</sup>在粪便中长期检测 FCoV 的研究结果表明,个体持续的病毒脱落是 FCoV 持续感染的结果,而不是不同变体的再感染,即在探讨 FIP 的发病机制时,观察到患病个体具有一种逐渐增强的自身感染和排毒能力。这种增强的能力主要源于 FCoV 毒株在机体内引发的二次感染,而机体的抗依赖性增强作用(ADE)则进一步加剧了 FIP 的严重程度。目前,针对 FCoV 感染无疫苗和特效治疗的药物,一般的治疗方法是:及时补液以纠正酸中毒,使用抗炎抗病毒药物和适宜适量的抗生素药物防止继发感染。虎林园圈养东北虎有暴露风险,即可能存在流浪猫与东北虎之间交互传染的情况,故对于抑制 FCoV 传播的有效措施是加强圈养东北虎的饲养管理,在无症状或出现类似症状时,定期或及时地对其进行检查和药物预防,并做好患病虎的隔离措施避免交叉传播;同时对笼舍严格消毒,规范处理排泄物;提高饲料质量,提高免疫力;避免接触外界流浪猫,对进出笼舍人员或车辆消毒。

#### 参考文献:

- [1] 李少晗,张广智,崔尚金,等. 犬猫冠状病毒研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(12): 4059-4068.  
LI S H, ZHANG G Z, CUI S J, *et al.* Research progress of Canine coronavirus and Feline coronavirus[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(12): 4059-4068.
- [2] KENNEDY M, CITINO S, MCNABB A H, *et al.* Detection of feline coronavirus in captive Felidae in the USA[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2002, 14(6): 520-522.
- [3] HOLZWORTH J. Some important disorders of cats[J]. The Cornell Veterinarian, 1963, 53: 157-160.
- [4] GONZÁLEZ J M, GOMEZ-PUERTAS P, CAVANAGH D, *et al.* A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae[J]. Archives of Virology, 2003, 148(11): 2207-2235.
- [5] DYE C, SIDDELL S G. Genomic RNA sequence of Feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1146[J]. The Journal of General Virology, 2005, 86(Pt 8): 2249-2253.
- [6] TEKES G, THIEL H J. Feline coronaviruses: pathogenesis of feline infectious peritonitis[J]. Advances in Virus Research, 2016, 96: 193-218.
- [7] DRECHSLER Y, ALCARAZ A, BOSSONG F J, *et al.* Feline coronavirus in multicat environments[J]. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 2011, 41(6): 1133-1169.
- [8] 夏红月. 猫冠状病毒的检测和基因的分子进化研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.  
XIA H Y. Molecular evolutionary analyses and detection on genes of Feline coronavirus[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.
- [9] HERREWEGH A A P M, DE GROOT R J, CEPICA A, *et al.* Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(3): 684-689.
- [10] 刘秋瑾,孙东波,王欣宇,等. 2015—2016年黑龙江三个地区猫冠状病毒 N 基因分子流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(15): 130-134.  
LIU Q J, SUN D B, WANG X Y, *et al.* Molecular epidemiological investigation of N gene of Feline coronavirus in three regions of Heilongjiang Province from 2015 to 2016[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(15): 130-134.
- [11] 李少柏. 东北部分地区猫冠状病毒病原学调查[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.  
LI S B. Investigation on the etiology of Feline coronavirus in partial regions of northeast China[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2021.
- [12] KLEIN-RICHERS U, HARTMANN K, HOFMANN-LEHMANN R, *et al.* Prevalence of Feline coronavirus shedding in German catteries and associated risk factors[J]. Viruses, 2020, 12(9): 1000.
- [13] OLARTE-CASTILLO X A, LICITRA B N, ANDRÉ N M, *et al.* Intra-host variation in the spike S1/S2 region of a feline coronavirus type-1 in a cat with persistent infection [EB/OL]. bioRxiv [Preprint], 2023[2023-07-25]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.07.31.551356>.