

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.02.01

# 一株猫传染性腹膜炎病毒的 分离鉴定和遗传特征分析

赵辉<sup>1,2</sup>, 李双星<sup>1</sup>, 朱明哲<sup>1,2</sup>, 赵洋<sup>1</sup>, 杜吉革<sup>1</sup>, 刘业兵<sup>1</sup>, 张传美<sup>2\*</sup>, 印春生<sup>1\*</sup>

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 青岛农业大学动物医学院, 山东青岛 266109)

[收稿日期] 2021-10-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 02-0001-08 [中图分类号] S855.3

**[摘要]** 从北京地区临床疑似传染性腹膜炎患猫的粪便和腹水样品中分离猫传染性腹膜炎病毒(Feline infectious peritonitis virus, FIPV), 共采集 10 份样品进行 RT-PCR 检测, 并接种 MDCK 细胞进行病毒分离和鉴定。结果表明: 10 份样品的 RT-PCR 检测结果均为 FIPV 阳性, 将样品接种 MDCK 细胞并经连续传代培养, 成功分离到一株 FIPV, 经鉴定属于 FCoV-Ⅱ血清型, 将其命名为 FIPV/BJ01 株; 该毒株可以在 MDCK 细胞上增殖并产生典型的细胞病变, 病毒滴度为  $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL; S 和 N 基因的核苷酸与其他毒株的同源性分别为 63.3% ~ 99.4% 和 45.5% ~ 99.2%, 均与美国毒株同源性较高, 而与中国毒株的同源性较低。

**[关键词]** 猫传染性腹膜炎病毒; 分离鉴定; S 基因; N 基因; 遗传进化分析

## Isolation and Characterization of a Feline Infectious Peritonitis Virus

ZHAO Hui<sup>1,2</sup>, LI Shuang-xing<sup>1</sup>, ZHU Ming-zhe<sup>1,2</sup>, ZHAO Yang<sup>1</sup>,DU Ji-ge<sup>1</sup>, LIU Ye-bing<sup>1</sup>, ZHANG Chuan-mei<sup>2\*</sup>, YIN Chun-sheng<sup>1\*</sup>

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. College of Veterinary Medicine,

Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Corresponding authors: YIN Chun-sheng, E-mail: zjs62158844@sohu.com; ZHANG Chuan-mei, E-mail: zhangchuanmei100@163.com

**Abstract:** In this study, feline infectious peritonitis virus (FIPV) was isolated from feces and ascites samples of cats with clinically suspected infectious peritonitis collected in Beijing. A total of 10 samples were collected for RT-PCR detection, and MDCK cells were inoculated for virus isolation and identification. The results showed that the RT-PCR results of 10 samples were FIPV positive. After inoculating the samples with MDCK cells and continuous subculture, a FIPV strain was successfully isolated. It was identified as FCoV-Ⅱ serotype and named FIPV/BJ01 strain; the strain could proliferate on MDCK cells and produce typical cytopathy. The virus content was  $10^{5.5}$  (TCID<sub>50</sub>)/0.1 mL; the nucleotide homology of S and N genes with other strains was 63.3% ~ 99.4% and 45.5% ~ 99.2% respectively. They both had high homology with

作者简介: 赵辉, 硕士研究生, 从事宠物病原微生物与免疫方向研究。

通讯作者: 印春生, E-mail: zjs62158844@sohu.com; 张传美, E-mail: zhangchuanmei100@163.com

American strains and low homology with Chinese strains.

**Key words:** feline infectious peritonitis virus; isolation and identification; S gene; N gene; genetic variation

猫传染性腹膜炎是由猫传染性腹膜炎病毒 (Feline infectious peritonitis virus, FIPV) 引起的猫的一种全身性、致死性疾病<sup>[1]</sup>, 临床上以纤维性和肉芽肿性浆膜炎, 富含蛋白质的浆液性积液或脓性肉芽肿性病变为主要特征, 根据临床表现形式不同可分为湿性、干性以及混合性三种类型<sup>[2]</sup>。FIPV 的感染和发病率很低, 很少超过 5%, 幼猫 (6 月龄 ~ 2 岁) 易感染 FIPV<sup>[3-4]</sup>; 阿比西尼亚、比尔曼、喜马拉雅、拉格多尔和雷克斯等品种的猫更容易感染 FIPV<sup>[5]</sup>。唐小娟等<sup>[6]</sup>对武汉市 2017 - 2018 年的猫传染性腹膜炎阳性病例进行统计分析, 共收集了临床病例 1036 例, 其中猫传染性腹膜炎阳性病例数 61 例, 发现阳性检出率为 5.9%。Guan 等<sup>[7]</sup>对黑龙江省哈尔滨市家庭宠物猫和流浪猫进行了两年的 FIPV 感染流行病学评估, 利用 2017 年 7 月至 2019 年 7 月采集的 1523 份猫血样本进行实时 RT-PCR 检测, 共检出 189 份 FIPV 阳性血样, FIPV 感染率约为 12%。

FIPV 属于尼多病毒目 (Nidovirales), 冠状病毒科 (Coronaviridae),  $\alpha$  冠状病毒属 (Alphacoronavirus)。FIPV 与猫肠道冠状病毒 (Feline enteric coronavirus, FECV) 是猫冠状病毒 (Feline coronavirus, FCoV) 的两种生物型。FIPV 基因组全长约 30 kb, 包括 11 个开放阅读框, 编码 4 种主要结构蛋白, 即刺突蛋白 S、膜蛋白 E、包膜蛋白 M 和核衣壳蛋白 N; 编码 7 种非结构蛋白, 即复制酶蛋白 (1a 和 1b) 以及辅助蛋白 (3a、3b、3c、7a 和 7b)<sup>[8]</sup>。在 FCoV 的发病机理中, S 蛋白被认为是最重要的影响因素, 该蛋白还影响 FCoV 的嗜性和毒力, 以及从肠道疾病到猫传染性腹膜炎的转变<sup>[9]</sup>。S 蛋白是 FIPV 识别、进入宿主细胞过程中的重要因素, 它的 S1 区域识别并结合宿主细胞上的受体, S2 区域参与病毒和宿主细胞膜融合<sup>[10-11]</sup>。根据 S 蛋白氨基酸序列和抗体中和的差异, 将 FCoV 分两种血清型, FCoV - I 型和 FCoV - II 型<sup>[12-13]</sup>, 因此分析 S 基因是至关重

要的。N 基因编码病毒核衣壳蛋白, N 蛋白由 NTD 和 CTD 两个结构域组成, 这两个结构域是 N 蛋白结合病毒 RNA 所必需的<sup>[14]</sup>。N 基因相对保守, 常被用于研究病毒的遗传进化分析<sup>[15]</sup>。本研究从北京地区临床疑似患猫传染性腹膜炎的样品中成功分离获得一株 FIPV, 克隆测序分析该毒株的 S 基因和 N 基因, 以期掌握该地区目前 FIPV 的变异、流行特点, 为 FIPV 的疫苗研制和诊断方法的建立等进一步研究奠定基础。

## 1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 MDCK 细胞由中国兽医药品监察所保存; 胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司; DMEM 细胞培养液购自 Gibco 公司; FIPV 单克隆抗体 (FIPV3 - 70) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 免疫染色通透液 (TritonX - 100)、细胞核染料 DAPI 溶液均购自 Solarbio 公司; FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗购自 GenStar 公司; 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。反转录酶、高保真酶购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。

1.2 病毒的分离培养与鉴定 采集疑似患猫传染性腹膜炎的猫新鲜粪便或腹水, 用预冷的 MEM 培养基稀释后充分震荡, 12000 r/min 离心 3 min 取上清, 经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后接种于单层的 MDCK 细胞, 另设正常细胞做阴性对照, 每隔 12 h 观察细胞状态并记录。当 80% 的细胞发生病变时置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱冻融三次后, 6000 r/min 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min, 收获病毒液上清。取上清液提取病毒核酸, 进行 RT-PCR 鉴定。

1.3 间接免疫荧光试验 取病毒液接种于 48 孔板中单层的 MDCK 细胞, 感作 2 h, 并设置正常细胞对照, 待细胞出现病变还未脱落时, 吸弃培养液, PBS 洗涤 3 次; 每孔加入 100  $\mu$ L 预冷的 80% 丙酮溶液, 室温固定 15 min, PBS 洗涤 3 次; 用 100  $\mu$ L 0.5% 的 TritonX - 100 通透 10 min, PBS 洗涤 3

次;每孔加入 100  $\mu\text{L}$  5% 脱脂乳于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱内封闭 2 h, 吸弃封闭液, PBST 洗涤 3 次;加入 100  $\mu\text{L}$  1:200 稀释的 FIPV 单克隆抗体 (FIPV3-70), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次;加入 100  $\mu\text{L}$  1:500 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗, 避光孵育 1 h, PBST 洗 3 遍;加入 100  $\mu\text{L}$  DAPI 染核 3 min, PBST 洗 3 遍, 于倒置荧光显微镜下观察结果。

1.4 病毒滴度测定 MDCK 细胞消化重悬后, 对细胞进行计数, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^5/\text{mL}$  的悬液后加入到 96 孔细胞培养板中, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养, 待细胞铺满单层后,

将病毒按照 10 倍倍比稀释至  $10^{-10}$ , 每个稀释度设置 8 孔重复, 以未感染的 MDCK 细胞作为对照组, 连续观察 5 d, 记录每个稀释度的病变孔数, 利用 Reed-Muench 氏法计算病毒滴度。

1.5 RT-PCR 鉴定 根据 RNA 提取试剂盒说明书提取病毒 RNA, 并进行 S、N 基因序列的扩增。根据 GenBank 上发表的 FIPV 的基因序列设计 N 基因的特异性引物, 根据参考文献<sup>[6]</sup>合成部分 S 基因引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。S、N 基因引物序列信息见表 1。

表 1 引物序列信息

Tab 1 The information of primer sequences

引物名称	引物序列 5' - 3'	预计扩增长度/bp	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$
N	5' - ATGCCACACAGGACAAC - 3' 5' - TTAGTTCGTAACCTCATCAATCATCTCAACC - 3'	1073	55
S	5' - CACTYAATGCHTWTGTGTCTCARAC - 3' 5' - GCCACACATACCANGGCCATTTTAC - 3'	705	55

1.6 S、N 基因遗传进化分析 参考国内外 FCoV 毒株的基因组序列, 采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 使用 MEGA7.0 软件构建基于部分 S 基因序列和完整的 N 基因序列的遗传进化树, 并通过 S 基因的遗传进化树进行生物型和血清型分型鉴定。利用 Megalign 软件 S、N 基因序列进行核苷酸同源性分析。

## 2 结果与分析

2.1 病毒分离 将病料离心后接种于 MDCK 细胞, 并设置正常细胞做对照。3 d 后接毒细胞出现皱缩、脱落, 对照细胞无明显变化(图 1)。收取病毒上清液后提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 利用 1.5 中的引物进行 PCR 检测, 显示该细胞上清液 FIPV 阳性。

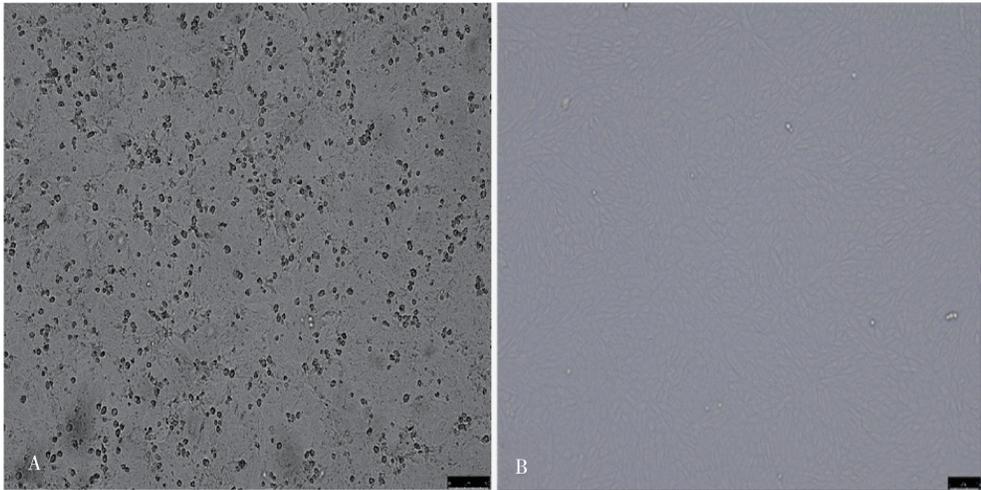
2.2 病毒间接免疫荧光鉴定 利用 FIPV 单克隆抗体 (FIPV3-70) 对分离的毒株进行间接免疫

荧光试验鉴定, 在倒置荧光显微镜下可见接种病毒的 MDCK 细胞有特异性绿色荧光, 对照细胞无荧光(图 2)。间接免疫荧光试验结果进一步证明该病毒为 FIPV。传至第 5 代时, 测定病毒滴度为  $10^{5.5}\text{TCID}_{50}/0.1\text{mL}$ 。

2.3 病毒 RT-PCR 检测 利用 1.5 中的引物对分离的 FIPV 进行 S、N 基因的 PCR 扩增, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳。结果显示, 分离病毒 RT-PCR 产物大小分别为 705 bp、1073 bp, 与预期相符(图 3、图 4)。将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果经 BLAST 比对确定, 该毒株为 FIPV, 将该分离株命名为 FIPV/BJ01。

2.4 S、N 基因遗传进化分析

2.4.1 S 基因遗传进化分析 根据 FCoV S 基因生物型遗传进化树分析结果显示, 分离株 FIPV/BJ01

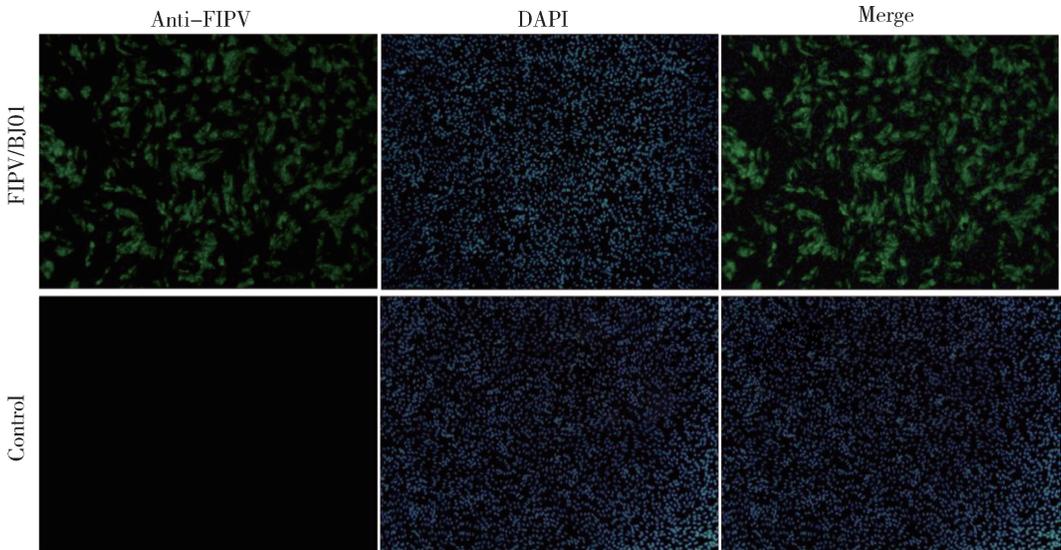


A: FIPV 感染的 MDCK 细胞; B: MDCK 细胞对照

A: MDCK cells infected with FIPV; B: Normal MDCK cells

图 1 分离毒株在 MDCK 细胞的 CPE(40 ×)

Fig 1 CPE of MDCK cells infected with isolates virus (40 ×)



Anti - FIPV : FIPV 单克隆抗体 (FIPV3 - 70) ; DAPI : 细胞核染色

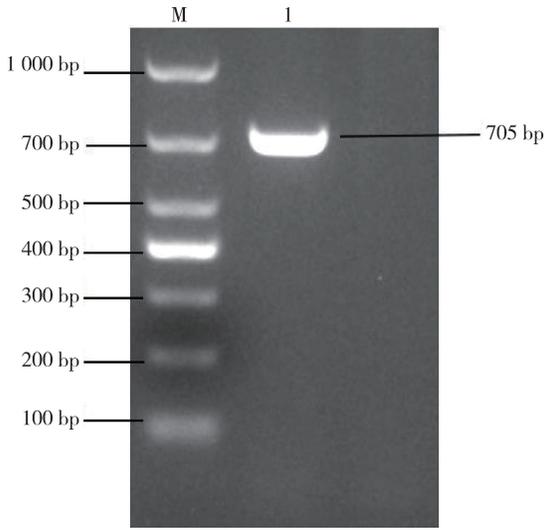
Anti FIPV : FIPV monoclonal antibody ( FIPV3 - 70 ) ; DAPI : nuclear staining

图 2 分离毒株的间接免疫荧光检测

Fig 2 Indirect immunofluorescence assay of isolates virus

属于 FIPV 生物型(图 5)。核苷酸同源性分析结果表明,FIPV/BJ01 分离株与各参考毒株核苷酸同源性为 63.3% ~99.4%。

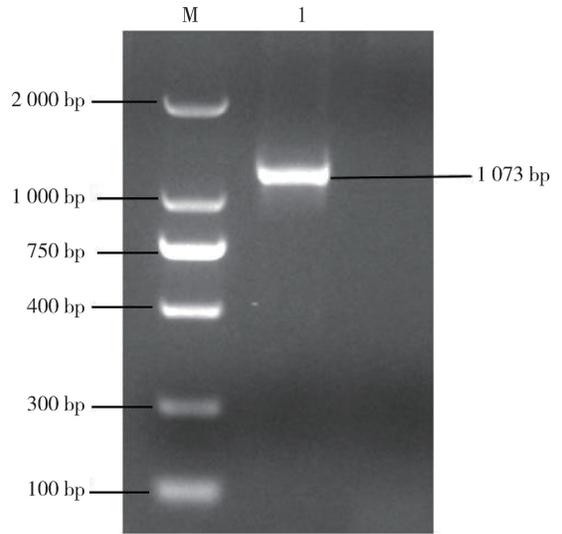
FCoV S 基因血清型遗传进化树结果表明,分离株 FIPV/BJ01 属于 FCoV - II 簇(图 6),与其他参考毒株的核苷酸同源性为 63.3% ~99.4%。



M: DNA 分子质量标准; 1: FIPV/BJ01 S 基因; -: 阴性对照  
M: DL-1 000 Marker; 1: S gene of FIPV/BJ01; -: control

图 3 FIPV S 基因 PCR 扩增结果

Fig 3 RT-PCR results of FIPV S gene



M: DNA 分子质量标准; 1: FIPV/BJ01 N 基因; -: 阴性对照  
M: DL-2 000 Marker; 1: N gene of FIPV/BJ01; -: control

图 4 FIPV N 基因 PCR 扩增结果

Fig 4 RT-PCR results of FIPV N gene

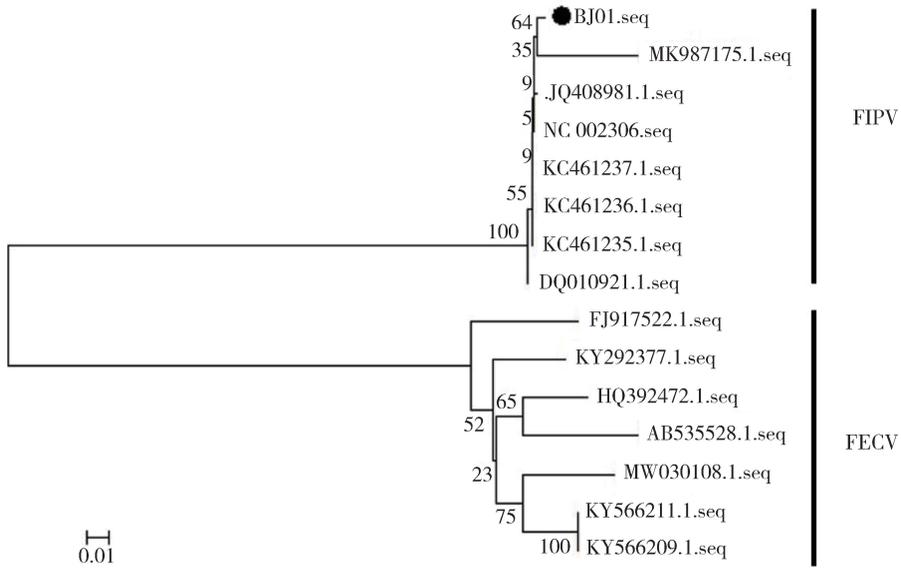
2.4.2 N 基因遗传进化分析 基于 N 基因的遗传进化树结果显示, FIPV/BJ01 分离株与美国分离株 (KC461237.1、KC461236.1、KC461235.1、AY994055.1) 亲缘关系较近, 而与中国分离株 (MK840958、KYS66208.1、KY566207.1、KY566210.1、KY587337.1、DQ160294.1、KY566206.1) 亲缘关系较远(图 7)。FIPV/BJ01 株与其他分离株核苷酸同源率为 45.5% ~ 99.2%。

### 3 讨论

猫传染性腹膜炎发病率较低, 但是导致猫高死亡率, 且世界范围流行, 严重危害猫的健康, 对宠物行业也造成较大的影响。猫传染性腹膜炎目前尚无有效的预防、治疗措施。FIPV 是导致猫传染性腹膜炎发生的病原, 与猫泛白细胞减少症病毒、猫疱疹病毒和猫杯状病毒是导致猫死亡的四大主要病因<sup>[16]</sup>。FCoV 在猫群中感染较为普遍, 但基本不会引起猫患病或仅引起肠道感染, 极少数才会发展成为猫传染性腹膜炎。有研究发现猫传染性腹膜炎感染的猫体内病毒突变产生了毒力增强的

FCoV, 但是致病机制尚不清楚。有学者认为 FIPV 是由 FECV 内部突变而来, 但这一理论也遭到其他学者的质疑<sup>[17-18]</sup>。

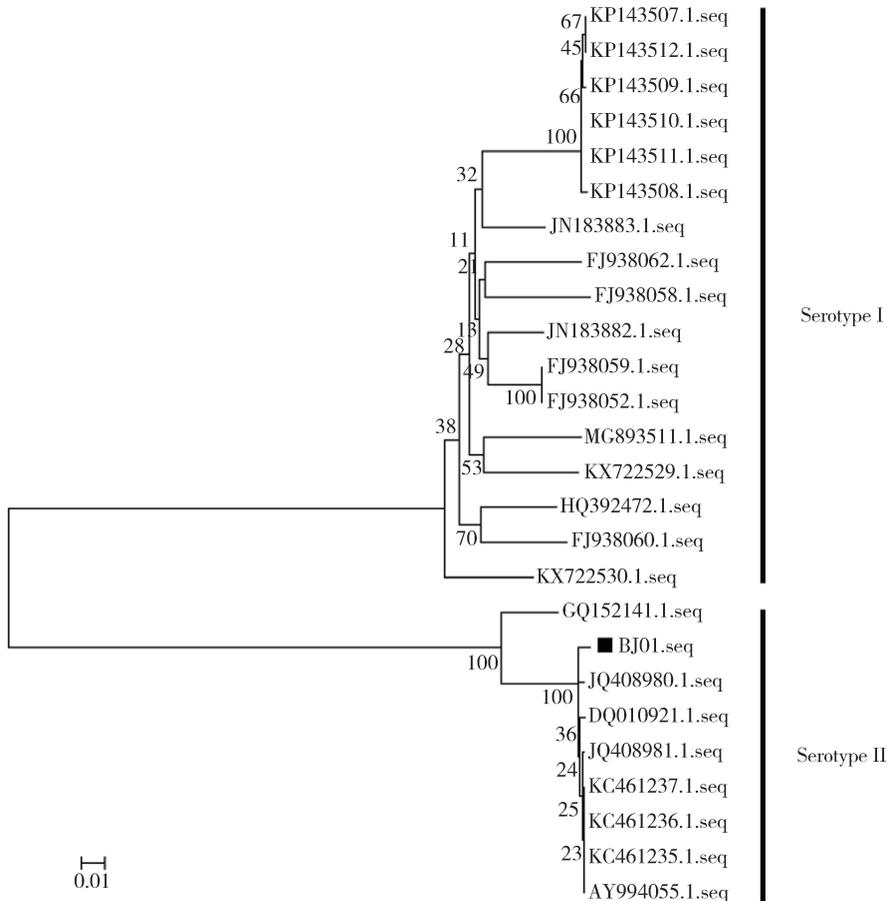
目前国内对 FIPV 的报道较少, 本研究成功分离得到一株 FIPV/BJ01 分离株, 属于 FCoV - II 血清型, 测定病毒滴度为  $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL。本研究针对分离的 FIPV 的部分 S 基因和完整的 N 基因序列进行遗传进化分析和核苷酸同源性分析, 结果表明 FIPV/BJ01 分离株与美国分离株亲缘关系较近, 而与中国分离株亲缘关系较远, 说明该病例可能是由于国外毒株输入引起的。研究证明, 猫感染 FCoV - I 是最为普遍, 在欧美国家流行率可达 80% ~ 95%, 而 FCoV - II 的感染却很少见, 但在亚洲各国 FCoV - II 感染率达到 25%<sup>[19-20]</sup>。有研究报道 FCoV - II 是由 FCoV - I 和犬冠状病毒重组产生, 相对容易在细胞中增殖并导致细胞病变<sup>[21]</sup>。本研究中分离到的毒株为后续开展相关研究奠定了基础。



●代表本试验离毒株

图 5 FCoV S 基因生物型遗传进化树

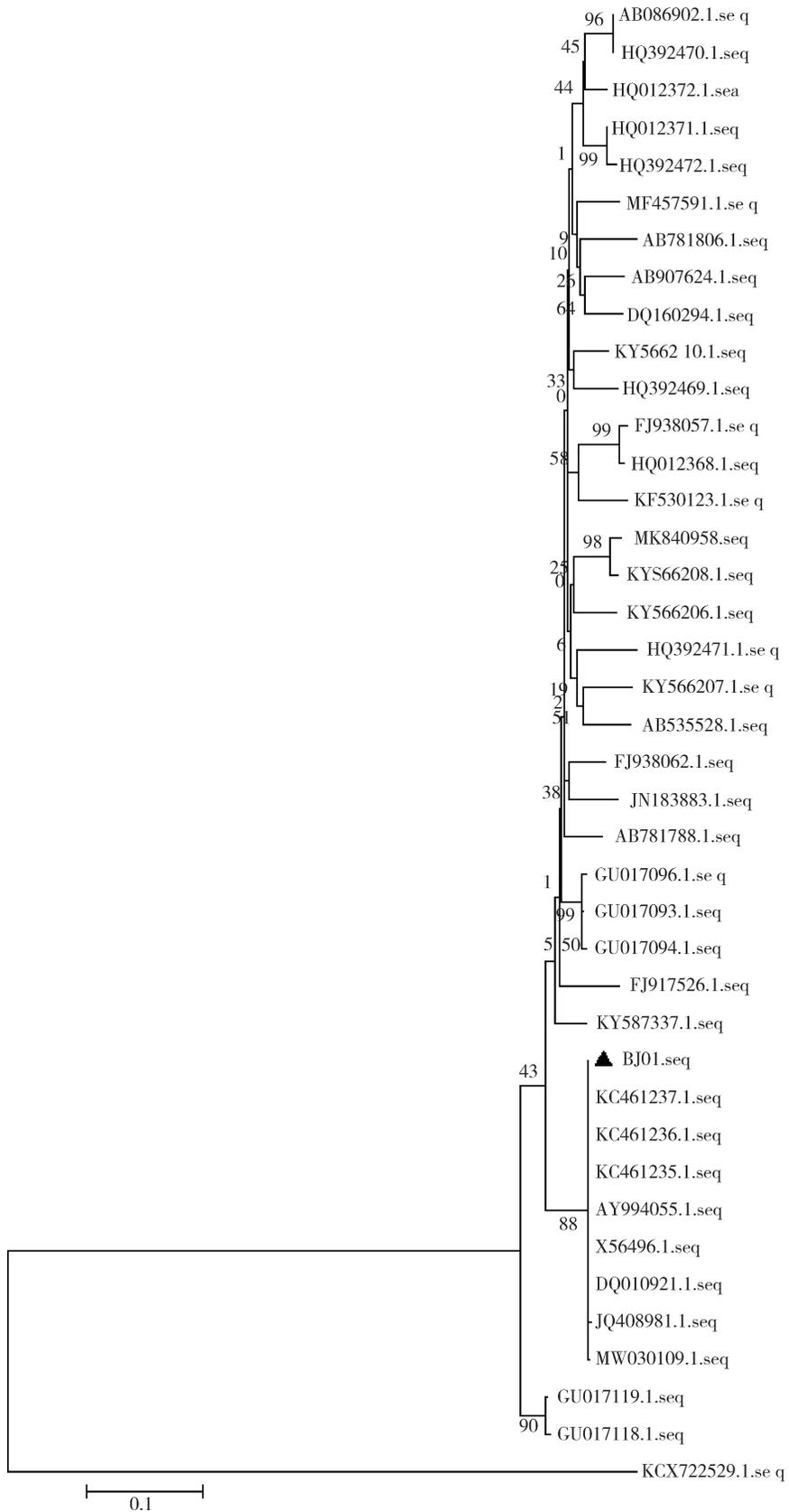
Fig 5 Phylogenetic tree of FCoV S gene by biotype



■代表本试验分离毒株

图 6 FCoV S 基因血清型遗传进化树

Fig 6 Phylogenetic tree of FCoV S gene by serotype



▲代表本试验分离毒株

图 7 FCoV N 基因遗传进化树

Fig 7 Phylogenetic tree of FCoV N gene

## 参考文献:

- [1] Bankwolf B R, Stallkamp I, Wiese S, *et al.* Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis [J]. *Vet Microbiol*, 2014, 173 (3/4): 177 - 188.
- [2] Tsai H Y, Chueh L L, Lin C N, *et al.* Clinicopathological findings and disease staging of feline infectious peritonitis: 51 cases from 2003 to 2009 in Taiwan [J]. *J Feline Med Surg*, 2011, 13(2): 74 - 80.
- [3] Drechsler Y, Alcaraz A, Bossong F J, *et al.* Feline coronavirus in multicat environments [J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2011, 41(6): 1133 - 1169.
- [4] Rohrbach B W, Legendre A M, Baldwin C A, *et al.* Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2001, 218 (7): 1111 - 1115.
- [5] Pesteanu - Somogyi L D, Radzai C, Pressler B M. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds [J]. *J Feline Med Surg*, 2006, 8(1): 1 - 5.
- [6] 唐小娟. 武汉市猫传染性腹膜炎病例分析及病毒的分离与鉴定[D]. 华中农业大学, 2019.
- Tang X J. Case analysis and virus isolation and identification of feline infectious peritonitis in Wuhan [D]. *Huazhong Agricultural University*, 2019.
- [7] Guan X, Li H, Han M, *et al.* Epidemiological investigation of feline infectious peritonitis in cats living in Harbin, Northeast China from 2017 to 2019 using a combination of an EvaGreen - based real - time RT - PCR and serum chemistry assays [J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 49:101495.
- [8] Gonzalez J M, Gomez - puertas P, Cavanagh D, *et al.* A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae [J]. *Arch Virol*, 2003, 148(11): 2207 - 2235.
- [9] Jaimes J A, Whittaker G R. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function [J]. *Virology*, 2018, 517: 108 - 121.
- [10] Bosch B J, Van Der Zee R, De Haan C A, *et al.* The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex [J]. *J Virol*, 2003, 77(16): 8801 - 8811.
- [11] Belouzard S, Millet J K, Licitra B N, *et al.* Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein [J]. *Viruses*, 2012, 4(6): 1011 - 1033.
- [12] Lewis C S, Porter E, Matthews D, *et al.* Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis [J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(Pt 6): 1358 - 1368.
- [13] Shiba N, Maeda K, Kato H, *et al.* Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test [J]. *Vet Microbiol*, 2007, 124(3 - 4): 348 - 352.
- [14] 李双星, 刘业兵, 柳方远, 等. 猫传染性腹膜炎病毒 N 蛋白在昆虫细胞 - 杆状病毒系统中的表达与鉴定 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(1): 273 - 279.
- Li S X, Liu Y, Liu F Y, *et al.* Expression and identification of cat infectious peritonitis virus N protein in insect cell baculovirus system [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary*, 2021, 48 (1): 273 - 279.
- [15] Woo P C, Huang Y, Lau S K, *et al.* Coronavirus genomics and bioinformatics analysis [J]. *Viruses*, 2010, 2 (8): 1804 - 1820.
- [16] Pedersen N C. A review of feline infectious peritonitis virus infection; 1963 - 2008 [J]. *J Feline Med Surg*, 2009, 11(4): 225 - 258.
- [17] Poland A M, Vennema H, Foley J E, *et al.* Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus [J]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(12): 3180 - 3184.
- [18] Dye C, Siddell S G. Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1 Je [J]. *J Feline Med Surg*, 2007, 9(3): 202 - 213.
- [19] Kummrow M, Meli M L, Haessig M, *et al.* Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland and [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(10): 1209 - 1215.
- [20] Amer A, Siti S A, Abdul R O, *et al.* Isolation and molecular characterization of type I and type II feline coronavirus in Malaysia [J]. *Virol J*, 2012, 9: 278.
- [21] Herrewegh A A, Smeenk I, Horzinek M C, *et al.* Feline coronavirus type II strains 79 - 1683 and 79 - 1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus [J]. *J Virol*, 1998, 72(5): 4508 - 4514.

(编辑:李文平)