

# 水貂犬瘟热病毒分离鉴定及其 H 基因序列分析

刘彩虹, 曹玉姣, 丁航天, 崔宁宁, 王凌霄, 贺雯熹, 霍宁宁, 黄柏成, 刘玉秀\*, 田克恭\*

(国家兽用药品工程技术研究中心, 河南洛阳 471000)

**摘要:**为了解山东地区水貂犬瘟热病毒(CDV)的基因遗传变异特征,采集水貂养殖场的发病水貂病料,通过 RT-PCR 鉴定为 CDV 阳性,将阳性病料接种 Vero/Dog SLAM 细胞进行病毒分离,通过间接免疫荧光、电镜负染、测序等方法鉴定,分离鉴定得到 4 株犬瘟热病毒,分别命名为 WD1 株、WD2 株、WX1 株和 WX2 株。分离株 H 基因测序结果显示,WD1 株、WD2 株、WX1 株均为 Asia-I 型,其中 WD1 和 WD2 与近年仅在水貂和狐狸养殖场流行的新犬瘟热毒株核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 97.5%~99.2%和 97%~99%;WX-1 型与国内犬源 HL001 株的同源性最高,核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 99.6%和 99.5%;WX2 与疫苗株同属于一个分支,与疫苗毒 Lederle 株核苷酸和氨基酸序列同源性高达 99.5%和 98.8%。结果表明,水貂养殖场存在多株犬瘟热病毒混合感染的情况,提醒养殖场注意防控,该结果也为犬瘟热病毒分子流行病学积累了资料。

**关键词:**水貂;犬瘟热病毒;分离;鉴定;H 基因;序列分析

中图分类号:S858.292;S852.659.5

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2020)01-0027-07

犬瘟热(Canine distemper)是由犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)感染引起的一种多种属动物共患的急性、高度接触性传染病,其发病率和病死率高达 30%~80%,其中雪貂最易感,病死率可达 100%<sup>[1]</sup>。临床症状主要包括眼鼻有分泌物、呕吐、发热、精神不振、腹泻、脚垫增厚、流涎等神经症状,甚至死亡<sup>[2-3]</sup>。自 1809 年首次报道犬瘟热以来,该病已经遍及全球,尽管疫苗的使用降低了 CDV 感染的发病率,由于病毒变异,世界各地仍有免疫犬、水貂、狐狸暴发 CDV 感染的报道<sup>[4-6]</sup>。

CDV 属于副黏病毒科(Paramyxoviridae)、麻疹病毒属(*Morbillivirus*)成员,为单股不分节段负链 RNA 病毒,大小约由 15 690 个核苷酸组成,共编码 6 种结构蛋白,即核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质膜蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝或附着蛋白(H)、大蛋白(L),其中 H 蛋白在免疫应答中起着关键作用,是诱导机体产生中和抗体的主要蛋白<sup>[7-8]</sup>。H 蛋白可糖基化,不同毒株的 H 蛋白糖基化位点不同,且糖基化位点与 CDV 对宿主的致病性有关<sup>[9]</sup>。研究表明,H 基因的变异与 CDV 对不同宿主的易感性有关,也可能是造成 CDV 跨宿主传播的原因之一<sup>[10]</sup>。H 蛋白较易发生变异,因此常以 H 基因的变化来评估 CDV 毒株间的遗传性变化<sup>[11-12]</sup>。

2018 年 7 月,山东省某地区水貂场出现疑似犬瘟热疫情,并造成大量死亡。本研究采集临床病死水貂组织脏器,分离到 4 株犬瘟热病毒,并对其 H 基因进行分析,以期探讨水貂 CDV 的分子流行病学特点和病原变异情况,为水貂犬瘟热的诊断及预防提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞与病料 Vero/Dog SLAM 细胞均由国家兽用药品工程技术研究中心保存;临床病料样品为山东省某地区水貂养殖场疑似 CDV 感染的水貂组织。

1.1.2 主要试剂 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒, Geneaid 公司产品;反转录试剂盒、pEasy-Blunt 载体,北京全式金生物技术有限公司产品;胶回收试剂盒, TIANGEN 公司产品;DNA Marker、PrimeSTAR Max PremixDNA, 宝生物工程(大连)有限公司产品;犬瘟热、传染性肝炎、细小病毒病、副流感四联活疫苗, 英特威公司产品;小鼠抗 CDV-F 单抗(1G5)<sup>[13]</sup>, 由国家兽用药品工程技术研究中心保存;FITC 标记 goat-anti mouse IgG, 碧云天公司产品;胎牛血清(FBS), Gibco 公司产品。

收稿日期:2019-03-15

基金项目:河洛英才计划项目;畜禽用安全高效新型疫苗研发及产业化(181200211700)

作者简介:刘彩虹(1989-),女,河南商丘人,硕士,主要从事宠物及毛皮经济动物疫苗方向的研究。\* 通讯作者

## 1.2 方法

1.2.1 病料 PCR 检测 按照病毒核酸提取试剂盒说明书提取病料样品核酸,然后按照反转录试剂盒说明书反转录成 cDNA,使用检测犬瘟热病毒的特异性引物(CDV-F:5'-CAGAGGATCATAGACGACCC TGA-3',CDV-R:5'-GGTGCTGTTTCACCCATCTGT-TG-3')和检测水貂肠炎病毒的特异性引物(MEV-F:5'-GAGACAATCTTGCACCAATGAG-3',MEV-R:5'-CCATAYATTTGTTGGTGTGCC-3')进行鉴定,预期扩增的目的片段分别为 668 bp 和 716 bp,以商品化四联活疫苗核酸为阳性对照,引物由金唯智生物科技有限公司合成。PCR 反应体系为 10  $\mu$ L,其中 cDNA 1  $\mu$ L,2 $\times$ TransStar Fast Pfu Super Mix 酶 5  $\mu$ L,上、下游引物各 0.5  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L。反应条件为:95  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,50  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 45 s,共 35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 病毒的分离培养 将病料置于组织研磨器并加入一定量的无血清 DMEM 匀浆研磨,以 5 000 r/min~8 000 r/min 离心 5 min~10 min,收集上清液,经 0.22  $\mu$ m 滤器过滤除菌,然后按 1:10 的体积比接种单层 Vero/Dog SLAM 细胞,37  $^{\circ}$ C 培养箱吸附 1 h,弃掉上清,PBS 洗 1 次,补加 5 mL 含 20 mL/L 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液,同时设立未接毒的正常 Vero/Dog SLAM 细胞对照,置 37  $^{\circ}$ C、体积分数为 5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱,每天观察细胞病变情况;若出现细胞病变,当 80%~90% 以上的 Vero/Dog SLAM 细胞出现病变时收毒,置 -80  $^{\circ}$ C 冻存备用;若未出现细胞病变,继续进行盲传。

1.2.3 分离病毒的形态学观察 对所分离的病毒进行形态学鉴定,取其中 1 个分离株的细胞上清,用 20 g/L 磷钨酸按常规方法进行负染后,在电镜下观察病毒粒子的形态和大小。

1.2.4 分离病毒的 IFA 鉴定 将病毒分离株分别接种单层 Vero/Dog SLAM 细胞,同时设正常细胞对照,培养 24 h 出现明显的 CPE 时,弃上清,PBS 洗涤 3 次,加 40 g/L 的多聚甲醛室温固定 20 min,弃去,加 anti-CDV 单抗(1G5),37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h<sup>[13]</sup>,PBS 洗涤 3 次,加 FITC 标记的羊抗鼠 IgG,37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,于倒置荧光显微镜下观察结果。

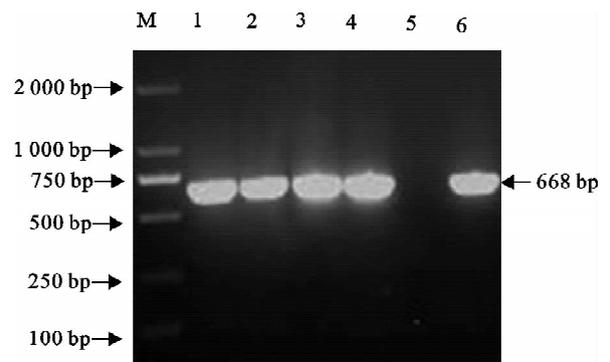
1.2.5 分离病毒 H 基因扩增与序列分析 提取分离毒 RNA,按反转录试剂盒说明书合成 cDNA,根据 GenBank 登录的 CDV H 基因全长,利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性上游引物 CDV-H-F (5'-TTAGGGCTCAGGTAGTCCA-3')和下游引物

CDV-H-R (5'-CTAAGKCCAATTGARATGTGT-3'),预期扩增目的片段约 1 824 bp,以商品化四联活疫苗核酸为阳性对照。引物由金唯智生物科技有限公司合成。反应体系总体积为 50  $\mu$ L:CDV H 基因上、下游引物各 2.5  $\mu$ L,cDNA 5  $\mu$ L,2 $\times$ TransStar FastPfu SuperMix 酶 25  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 15  $\mu$ L 补至 50  $\mu$ L。反应程序:95  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,53  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min 45 s;72  $^{\circ}$ C 10 min,共 35 个循环。按照胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物,克隆至 pEASY-blunt 载体中构建质粒,选取 5 个阳性重组质粒送苏州金唯智生物科技有限公司测序。然后使用 MegAlign 对测序结果和 NCBI 上已发表的 CDV H 基因核酸序列进行同源性比对分析,使用 MEGA5.10 软件根据 H 基因序列构建系统发育树,以 Bootstrap 值(1 000)进行进化树可靠性分析;并使用 NetNGlyc1.0 在线软件预测 H 蛋白潜在的 N-糖基化位点。

## 2 结果

### 2.1 病料样品中 CDV 鉴定

取 4 只病死的水貂的肺脏组织提取总 RNA 并反转录成 cDNA,利用检测犬瘟热病毒的特异性引物经 PCR 扩增后得到大小约 668 bp 的条带,与预期 CDV 阳性片段大小一致(图 1)。经检测,4 份病料均为 CDV 阳性,分别命名为 WD1 株、WD2 株、WX1 株和 WX2 株。但水貂肠炎病毒鉴定均为阴性(结果未附),说明病料中存在 CDV。



M. DNA 标准 DL 2 000;1. WD1 2. WD2 3. WX1 4. WX2; 5. 阴性对照; 6. 阳性对照

M. DNA Marker DL 2 000;1. WD1 2. WD2 3. WX1 4. WX2;5. Negative control;6. Positive control

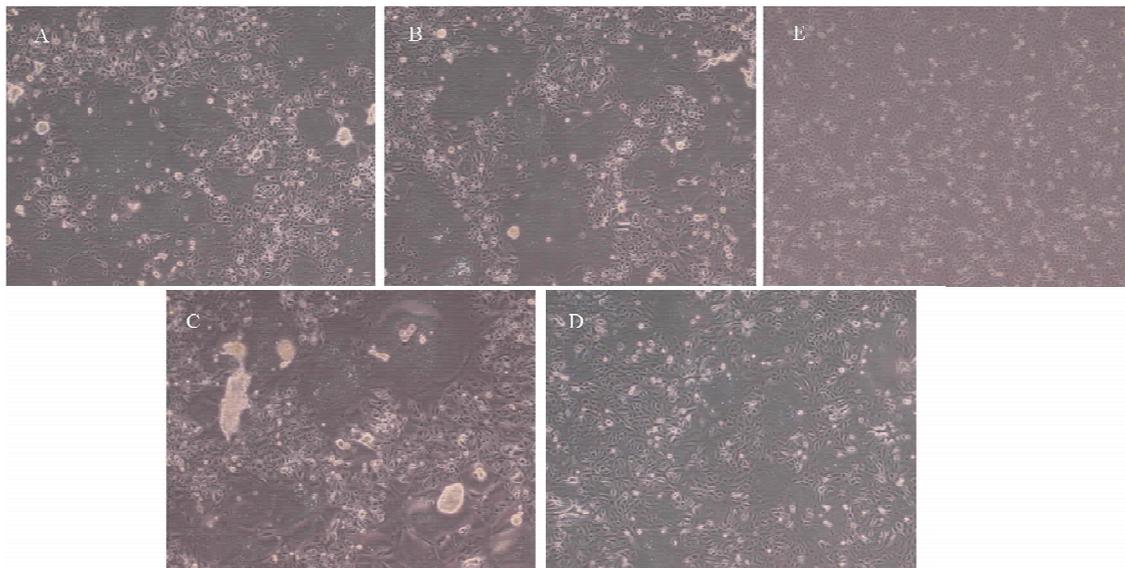
图 1 病料中 CDV 的 PCR 检测

Fig. 1 Detection of CDV in tissue samples by PCR

### 2.2 CDV 分离培养

将鉴定为阳性的 4 份病料接种 Vero/Dog SLAM 细胞,在接毒后 24 h,4 份病料接种的细胞均出现多核巨细胞、融合、变圆、拉网等 CPE,接毒 75

h, 细胞病变达 80% 以上, 正常 Vero/Dog SLAM 细胞未出现 CPE(图 2)。



A. WD1; B. WD2; C. WX1; D. WX2; E. 正常的 Vero/Dog SLAM 细胞

A. WD1; B. WD2; C. WX1; D. WX2; E. Normal Vero/Dog SLAM cells

图 2 不同株 CDV 感染 Vero/Dog SLAM 细胞的形态观察(200×)

Fig. 2 Morphological observation of Vero/Dog SLAM cells infected with different strains of CDV(200×)

### 2.3 分离毒株电镜观察结果

将分离株 WD1 株的培养液上清负染后, 可在电镜下观察到形状不规则, 接近圆形, 直径大约 200 nm, 有囊膜的病毒粒子, 囊膜上有纤突, 具有副黏病毒的形态特征(图 3)。

### 2.4 分离毒株 IFA 鉴定

以 CDV-F 单抗(1G5)为一抗, FITC 标记的 goat-anti mouse IgG 为二抗, 对分离病毒株进行 IFA 鉴定, 结果显示, 4 株病毒感染 Vero/Dog SLAM 细胞后, IFA 检测均出现特异性绿色荧光(图 4), 正常的 Vero/Dog SLAM 细胞无特异性荧光, 说明分离的病毒为 CDV。

### 2.5 分离毒株 H 基因片段扩增与序列分析

利用犬瘟热病毒 H 基因特异性引物, 经 PCR 扩增后获得大小 1 824 bp 大小的片段, 与预期大小相符(图 5)。

将 4 株病毒的 H 基因测序结果与已发表的 CDV 疫苗株和国内流行株的 H 基因序列进行同源性分析并构建系统进化树(图 6)。结果显示, 本研究分离的 4 株 CDV 毒株中(以 ▲ 标注), WD1 株、WD2 株、WX1 株均属于 Asia-I 型, WX2 株和北美 1 型(疫苗株)属于同一分支。其中 WD1 株和 WD2 株属于同一分支, WD1 株和 WD2 株的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 99.9% 和 99.8%, 这 2 个分

离株与国内毛皮经济动物里流行的新型犬瘟热病毒 SD(13)3 株遗传距离最近, 且这 2 个分离株与 SD(13)3 株的核苷酸和氨基酸序列同源性均相同, 分别为 99.2% 和 99%, WX-1 株与国内 HL001 株犬源的同源性最高, 核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 99.6% 和 99.5%, WX-2 株与疫苗株 Lederle 核苷酸和氨基酸序列同源性高达 99.5% 和 98.8%, 与国内流行其他野毒株同源性仅 89% 左右。

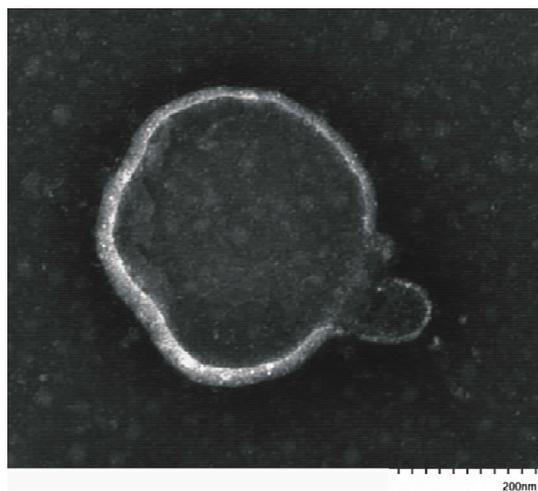
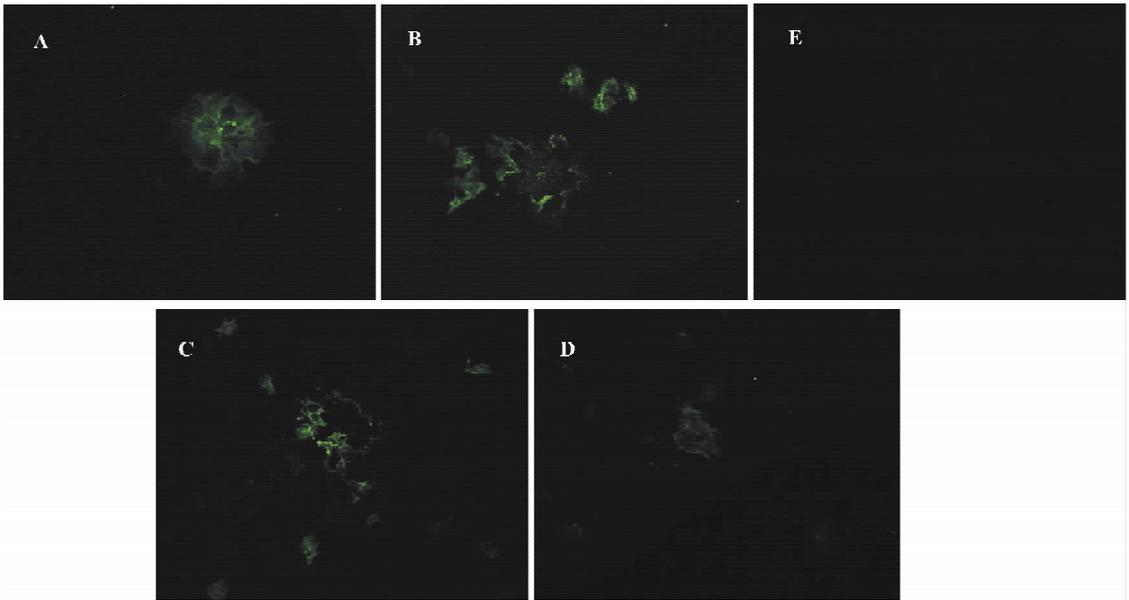


图 3 CDV 分离株病毒粒子形态鉴定(Bar=200 nm)

Fig. 3 Identification of CDV isolate by electron microscope (Bar=200 nm)

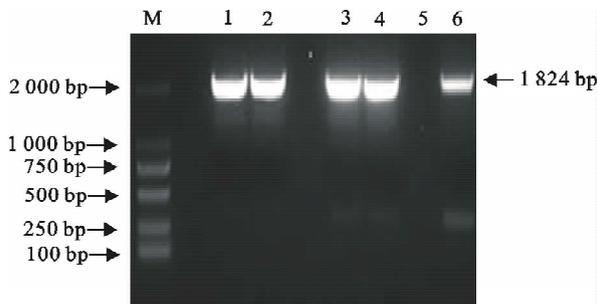


A. WD1; B. WD2; C. WX1; D. WX2; E. 正常的 Vero/Dog SLAM 细胞

A. WD1; B. WD2; C. WX1; D. WX2; E. Normal Vero/Dog SLAM cells

图 4 分离毒株的 IFA 鉴定结果(400×)

Fig. 4 Identification of CDV strain by IFA(400×)



M. DNA 标准 DL 2 000; 1. WD1 2. WD2 3. WX1 4. WX2; 5. 阴性对照; 6. 阳性对照

M. DNA Marker DL 2 000; 1. WD1 2. WD2 3. WX1 4. WX2; 5. Negative control; 6. Positive control

图 5 PCR 检测分离株中 CDV H 基因

Fig. 5 Detection of CDV H gene in isolates by PCR

对 4 株 CDV 的 H 蛋白潜在的糖基化位点进行分析,结果见表 1。WD1 株和 WD2 株有 10 个潜在的糖基化位点(19、149、309、391、422、456、542、584、587、603),与报道的免疫水貂犬瘟热疫苗后仍可导致毛皮经济动物发病及死亡的野毒株一致<sup>[4]</sup>; WX1 分离株有 9 个糖基化位点, WX2 有 6 个潜在的糖基化位点,后者与 Lederle 疫苗株的糖基化位点相同,潜在糖基化位点均在 19、149、391、422、456、587 位。

### 3 讨论

2018 年 7 月,山东省某地区多个水貂养殖场的水貂出现食欲减退甚至废绝、精神不振、眼鼻有分泌物、足垫增厚等临床症状,发病率达 70% 以上,病死

率高达 100%。本研究通过病毒的分离培养、电镜观察、IFA 鉴定、RT-PCR 特异性扩增及测序分析等,从病死水貂的肺脏组织中分离到 4 株犬瘟热病毒,经了解,该水貂养殖场已接种过犬瘟热疫苗,为了解该地区水貂犬瘟热的分子流行特点,对分离到的 4 株病毒的 H 基因进行了分析,以期水貂犬瘟热的诊断及预防提供理论依据。

犬瘟热是毛皮动物中常发的一种病毒性传染病。目前,我国毛皮动物中 CDV 感染引起的发病率和病死率有明显升高的趋势,近年来,常有免疫水貂和狐狸暴发大规模犬瘟热疫情的报道,给毛皮经济动物养殖业造成极大的经济损失<sup>[4]</sup>。为了分析原因,考虑到 H 蛋白是犬瘟热病毒的关键蛋白,也是诱导机体产生中和抗体的主要蛋白,且与宿主特异性有关,同时对细胞受体 SLAM 的黏附至关重要<sup>[14-17]</sup>。本研究对分离的 CDV H 基因进行分析,进化树分析结果表明,分离到的 3 株病毒(WD1、WD2、WX1)属于 Asia- I 型, WX1 分离株的 H 蛋白有 9 个潜在的糖基化位点,与国内犬群中的 CDV 流行毒株同源性极高, WD1 株和 WD2 株的 H 蛋白有 10 个潜在糖基化位点,与近年来国内报道在免疫水貂和狐狸里仍引起高病死率的 CDV 毒株同源性极高<sup>[4]</sup>,这些毛皮经济动物群中流行的新型犬瘟热病毒,其 H 蛋白多突变出 542 位糖基化位点。赵建军<sup>[18]</sup>已证明该位点突变使犬瘟热病毒致病力增强,与免疫水貂和狐狸后仍感染 CDV 有关。根据 H 基

因序列推导的氨基酸序列比对结果显示,这 3 株分离株的 H 基因发生了 Y549H 的变异,该位点的突变可能会增加病毒在非犬源动物体内的增殖能力,并引起动物死亡<sup>[19-21]</sup>。WX1 与犬源 HL001 株 CDV 距离最近,核苷酸和氨基酸序列同源性高达 99.6% 和 99.5%,推测该毒株对水貂和犬均有致病性,能在犬与水貂之间进行传播。WX2 株和疫苗株属于同一分支,其 H 蛋白有 6 个潜在的糖基化位点(19、149、391、422、456、587),与 Lederle 疫苗株的糖基化位点相同,而国内水貂犬瘟热活疫苗使用的疫苗株为 CDV-3 株,该疫苗株的 H 蛋白在 603 位点处有一潜在的糖基化位点,而分离株 WX2 没有,说明该地区目前流行的犬瘟热病毒发生了变异,存

在多种新的变异株混合感染的复杂局面。在同一地区同时分离到差异较大的几株 CDV,这一现象在国内外极少报道,这可能是导致接种疫苗后 CDV 感染仍发生的原因。此外,CDV 感染犬 4 d 后,可导致机体 T 细胞普遍处于抑制状态,导致感染动物免疫抑制,机体在免疫力低下的情况下易出现细菌等继发感染,导致病死率进一步升高<sup>[22-23]</sup>。由此推测,本次水貂养殖场免疫幼貂集中暴发由犬瘟热病毒感染引起的高致死性疫情,可能与水貂养殖场流行新犬瘟热毒株有关,也可能与细菌继发感染有关。提醒养殖场在出现犬瘟热疫情后,要密切关注细菌继发感染。

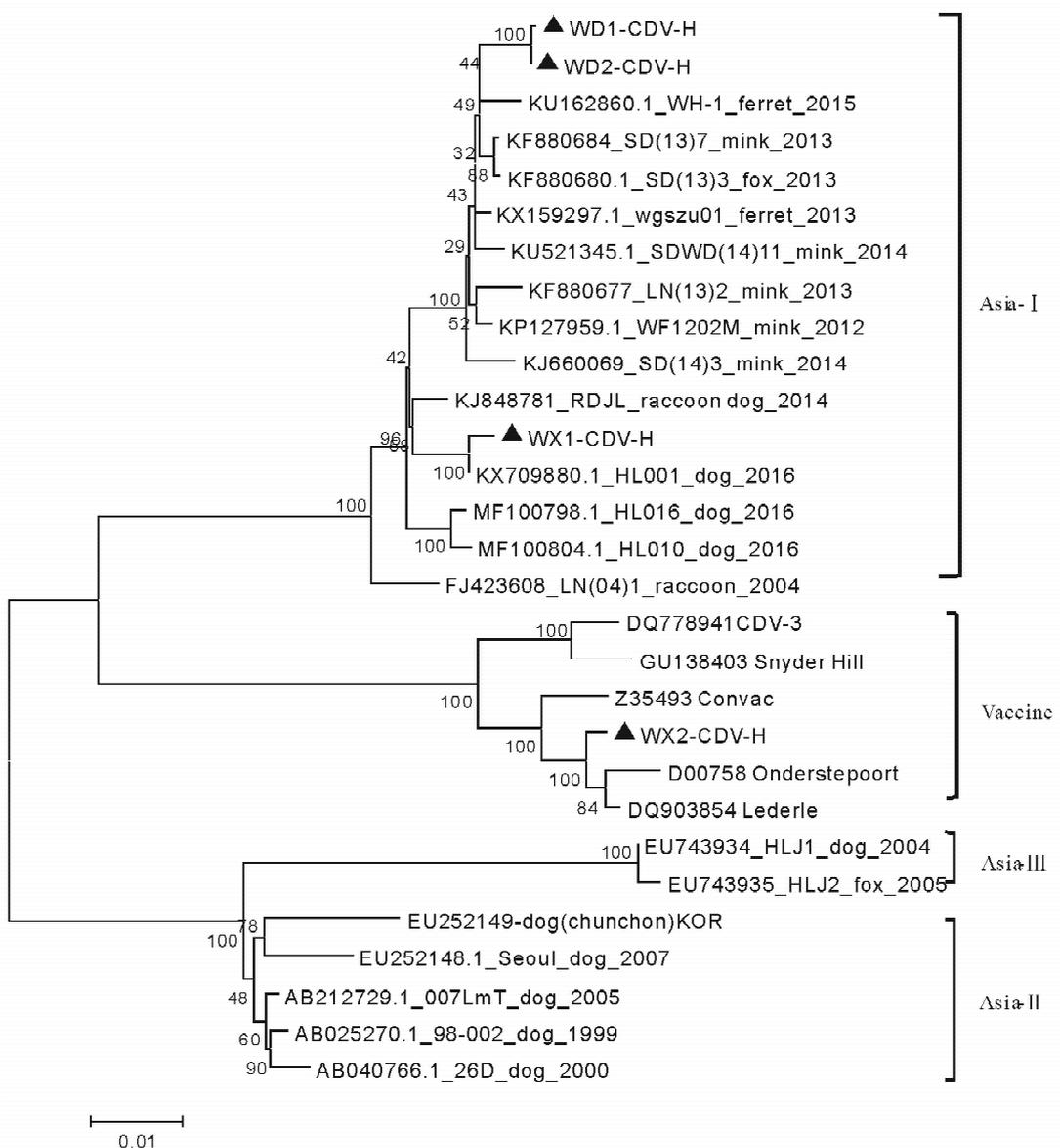


图 6 不同 CDV 毒株 H 基因核苷酸序列系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of CDV H gene of different strains

表1 CDV 国内野毒株和疫苗株 H 蛋白潜在的天冬酰胺糖基化位点分析结果

Table 1 Potential N-linked glycosylation sites with their numbers of H gene of Chinese field strains and vaccine strains of CDV

GenBank	位点 Site									
	19	149	309	391	422	456	542	584	587	603
WD1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
WD2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
WX1	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
WX2	N	N	-	N	N	N	-	-	N	-
Onderstepoort	N	N	-	-	N	-	-	-	N	-
Lederle	N	N	-	N	N	N	-	-	N	-
Convac	N	N	-	N	N	N	-	-	N	N
CDV3	N	N	-	N	N	N	-	-	N	N
SnyderHill	N	N	-	N	N	N	-	-	N	N
KJ660069SD(14)3-mink-2014	N	N	N	N	N	-	N	N	N	N
KP127959.1-WF1202M-mink-2012	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
KF880677-LN(13)2-mink-2013	N	N	N	N	N	-	N	N	N	N
KU521345.1-SDWD(14)11-mink-2014	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
KX159297.1-wgszu01-ferret-2013	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
KU162860-WH-1-ferret-2015	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
KF880684-SD(13)7-mink-2013	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
KF880680.1-SD(13)3-fox-2013	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
KJ848781-RDJL-raccoon dog-2014	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
KX709880.1-HL001-dog-2016	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
MF100798.1-HL016-dog-2016	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N
MF100804.1-HL010-dog-2016	N	N	-	N	N	N	-	N	N	N
FJ423608-LN(04)1-raccoon-2004	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N

注: N. 潜在的糖基化位点; - . 阴性。

Note: N. N-glycosylation sites; - . Negative.

近年来,随着毛皮动物养殖业的发展,疾病也越来越严重,出现了多种病原混合感染或继发感染的现象。针对这一现象,水貂场在免疫防治时应注意以下几个方面:①加强饲养管理,保持貂舍的清洁卫生,提供适宜的环境温度和湿度,防止貂舍温度过高或过低,减少对水貂的应激。保持适宜的密度及时扩群,避免拥挤并进行适量的通风。定期对貂舍进行正规熏蒸消毒,及时清扫粪便并做好污水处理。饲料少量多餐,及时检出料内污物,保证饲料及饮水的洁净。②免疫接种前应进行基础细菌和病毒病原学检测,若有细菌感染,可通过药敏试验选择合适的药物治疗,确保水貂在健康状态下再开展免疫接种。③使用疫苗预防接种,用本地分离菌株来制备灭活的油乳剂疫苗,通过2次接种可以让水貂能抵抗强毒入侵,具有比较好的免疫保护作用。目前还没有针对治疗犬瘟热的特效药物,故早期疫病的预防极其重要。

#### 参考文献:

- [1] BLIXENKRONE-MÖLLER M. Detection of intracellular canine distemper virus antigen in mink inoculated with an attenuated or a virulent strain of canine distemper virus[J]. Am J Vet Res, 1989, 50(9): 1616.
- [2] DEEM S L, SPELMAN L H, YATES R A, et al. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review [J]. J Zoo Wildl Med, 2000, 31(4): 441-451.
- [3] MAGANGA G D, LABOUBA I, NGOUBANGOYE B, et al. Molecular characterization of complete genome of a canine distemper virus associated with fatal infection in dogs in Gabon, Central Africa[J]. Virus Res, 2018, 247: 21-25.
- [4] ZHAO J, ZHANG H, BAI X, et al. Emergence of canine distemper virus strains with two amino acid substitutions in the haemagglutinin protein, detected from vaccinated carnivores in North-Eastern China in 2012-2013[J]. Vet J, 2014, 200(1): 191-194.
- [5] LI W, CAI C, XUE M, et al. Phylogenetic analysis of canine distemper viruses isolated from vaccinated dogs in Wuhan[J]. J Vet Med Sci, 2018, 80(11): 1688-1690.
- [6] ANIS E, NEWELL T K, DYER N, et al. Phylogenetic analysis of the wild-type strains of canine distemper virus circulating in the United States[J]. Virol J, 2018, 15(1): 118-127.
- [7] CAMPBELL J J, COSBY S L, SCOTT J K, et al. A Comparison of measles and canine distemper virus polypeptides[J]. J Gen

- Virol,1980,48(1):149-159.
- [8] IWATSUKI K, MIYASHITA N, YOSHIDA E, et al. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs[J]. J Gen Virol,1997,78(2):373-380.
- [9] SAWATSKY B, VON MESSLING V. Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression[J]. J Virol,2010, 84(6): 2753-2761.
- [10] NIKOLIN V M, KLAUS O, VERONIKA V M, et al. Antagonistic pleiotropy and fitness trade-offs reveal specialist and generalist traits in strains of canine distemper virus[J]. PLoS One,2012,7(12):e50955.
- [11] CHEN M, XIN T, HOU S, et al. Genotyping and pathogenic characterization of canine distemper virus based on mutations in the hemagglutinin gene in Chinese domestic dogs[J]. Pol J Vet Sci,2018,21(3):623-629.
- [12] MOLENAAR R J, BUTER R. Outbreaks of canine distemper in Dutch and Belgian mink farms[J]. Vet Quart,2018,38(1): 112-117.
- [13] LIU Y, HAO L, LI X, et al. Development and characterization of canine distemper virus monoclonal antibodies[J]. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother,2017,36(3):119-123.
- [14] OHISHI K, ANDO A, SUZUKI R, et al. Host-virus specificity of morbilliviruses predicted by structural modeling of the marine mammal SLAM, a receptor[J]. Comp Immunol Microb,2010,33(3):227-241.
- [15] RENDON-MARIN S, BUDASZEWSKI R D F, Canal C W, et al. Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus[J]. Virol J,2019,16(1):30-44.
- [16] SAWATSKY B, CATTANEO R, VON MESSLING V. Canine distemper virus spread and transmission to naive ferrets: Selective pressure on SLAM-dependent entry[J]. J Virol, 2018,92(15):e00669-18.
- [17] MIRA F, PURPARI G, DI BELLA S, et al. Update on canine distemper virus (CDV) strains of Arctic-like lineage detected in dogs in Italy[J]. Vet Ital,2018,54(3):225-236.
- [18] 赵建军. 犬瘟热病毒对毛皮动物致病性及变异株致病性增强机制的初步研究[D]. 吉林长春:中国农业科学院特产研究所,2016.
- [19] NIKOLIN V M, WIBBELT G, MICHLER F U F, et al. Susceptibility of carnivore hosts to strains of canine distemper virus from distinct genetic lineages[J]. Vet Microbiol,2012,156(1-2):45-53.
- [20] BHATT M, RAJAK K K, CHAKRAVARTI S, et al. Phylogenetic analysis of haemagglutinin gene deciphering a new genetically distinct lineage of canine distemper virus circulating among domestic dogs in India[J]. Transb Emerg Dis, 2019, doi:10.1111/tbed.13142. .
- [21] OGUZOGLU T C, YUCEL-TENEKECI G, CALISKAN M, et al. Detection and characterization of distemper virus in a mink (*Neovison vison*) in Turkey[J]. Vet Ital,2018,54(1): 79-85.
- [22] VON M V, MILOSEVIC D, CATTANEO R. Tropism illuminated: Lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system[J]. P Natl Acad Sci USA,2004,101(39):14216-14221.
- [23] BEINEKE A, PUFF C, SEEHUSEN F, et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper[J]. Vet Immunol Immunop,2009,127(1):1-18.

## Isolation and Identification of Canine Distemper Virus in Minks and Sequence Analysis of H Gene

LIU Cai-hong, CAO Yu-jiao, DING Hang-tian, CUI Ning-ning, WANG Ling-xiao, HE Wen-xi, HUO Ning-ning, HUANG Bai-cheng, LIU Yu-xiu, TIAN Ke-gong

(National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang, Henan, 471000, China)

**Abstract:** To understand the genetic variation characteristics of canine distemper virus of mink in Shandong province, the samples of minks suspected infected with CDV were collected in fur animal farms. The samples were diagnosed with canine distemper virus positive by RT-PCR. And then were cultured in Vero/Dog SLAM cells. Four strains of CDV were isolated, and were named as WD1, WD2, WX1, WX2, respectively. Sequence analysis of the CDV H gene showed that the isolation strains WD1, WD2 and WX1 were grouped in the Asia-1 genotype. The strains of WD1 and WD2 shared identities ranging from 97.5% to 99.2% at the nucleotide level and 97% to 99% at the amino acid level with the CDV strains which being spread in mink and fox farms recently. The strain WX1 shared the highest similarity with the strain HL001 which was isolated from dog, it displayed 99.6% nt identity and 99.5% aa identity. The strain WX2 was grouped in the vaccine strain, and it displayed 99.5% nt identity and 98.8% aa identity with the vaccine strain Lederle. This study showed that the minks were mixed with infections of different CDV strains in mink farms, which remind the farm to pay attention to the prevention and control and accumulate data for the research of the molecular epidemiology of the canine distemper virus.

**Key words:** mink; Canine distemper virus; isolation; identification; H gene; sequence analysis