

猫疱疹病毒 1 型的分离鉴定及 gD 基因序列分析

孙春艳^{1,2}, 钱 鹏², 王 洁^{2,3}, 曹玉娇², 崔宁宁², 霍宁宁², 黄柏成²

刁向锋², 刘玉秀², 林德贵^{1*}, 田克恭^{2,3*}

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100083; 2. 国家兽用药品工程技术研究中心, 河南洛阳 471000;

3. 河南农业大学牧医工程学院, 河南郑州 450002)

摘 要:为研究猫疱疹病毒 1 型(FHV-1)的分子流行病学特征,对 2016 年—2017 年从洛阳及天津地区多家宠物医院收集的具有上呼吸道感染症状的病猫眼鼻拭子样品,用 FK-81 细胞进行病毒分离,通过间接免疫荧光试验、电镜形态观察和 gD 基因测序分析等方法鉴定所分离的病毒,并进行病毒体外生长动力学研究。结果显示,病料在 FK-81 细胞上接种后 24 h~36 h 呈现变圆、融合、局灶性堆积聚团和脱落等细胞病变;分离毒株可被 FHV-1 单克隆抗体特异性识别;电镜下可观察到病毒粒子呈圆形、有囊膜、直径约 130 nm,具有疱疹病毒科的典型形态特征,将所分离到的 5 株 FHV-1 分别命名为 2016TJ1 株、2016TJ2 株、2017LY1 株、2017LY2 株和 2017LY3 株;病毒一步生长曲线测定结果显示,接种后 12 h~36 h 病毒快速增殖,40 h~60 h 病毒滴度达到高峰,72 h 病毒滴度开始下降;5 株 FHV-1 gD 基因序列之间的同源性为 100%,核酸序列高度保守且与国内外流行株及疫苗株的同源性极高。研究结果为我国宠物猫群中 FHV-1 的病原分离、分子流行病学调查等研究积累了资料。

关键词:猫疱疹病毒 1 型;gD 基因序列分析;分离鉴定;生长动力学

中图分类号:S855.3

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2020)03-0030-06

猫疱疹病毒 1 型(Feline herpesvirus type 1, FHV-1)是猫传染性鼻气管炎的致病原,是造成猫急性上呼吸道感染疾病的主要病原之一。在成年猫中,FHV-1 的中和抗体阳性率为 50%~75%^[1]。感染猫的临床症状主要包括结膜肿胀、眼鼻分泌物增多、打喷嚏、鼻塞、口腔溃疡、发热等一系列上呼吸道症状^[2],12%~31% 的猫为 FHV-1 携带者,感染后 80% 的猫会终身排毒^[3]。FHV-1 在世界范围内广泛流行^[4-9],对猫种群造成了严重威胁。

FHV-1 属于疱疹病毒科(Herpesviridae)、 α 疱疹病毒亚科(Alphaherpesvirinae)、水痘病毒属(Varicellovirus)成员,病毒粒子直径 120 nm~180 nm,呈 20 面体,由囊膜、核芯、衣壳组成,线性双链 DNA 基因组^[10],全长 126 kb~134 kb,G+C 含量约 50%,该基因组编码多种主要的包膜糖蛋白及非结构蛋白,其中已经报道相关功能的糖蛋白分别为 gB、gC、gD、gG、gE、gI,这些糖蛋白在诱导体液免疫和细胞免疫中发挥巨大作用。据报道,病毒诱导机体产生的中和抗体主要针对 gD 蛋白^[11],并且 gD 蛋白具有凝集猫红细胞的作用^[12]。因此,研究 gD 基

因的系统发育对了解 FHV-1 的分子进化具有一定的指导意义。本研究从 2016 年—2017 年在洛阳及天津地区多家宠物医院采集的有上呼吸道感染症状的病猫眼鼻拭子中,分离鉴定获得 5 株 FHV-1,并对其进行体外生长动力学研究及 gD 基因测序,以期探讨洛阳及天津地区 FHV-1 的分子流行病学特征和病原进化情况,并了解病毒的体外培养特性,为猫传染性鼻气管炎的诊断及预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病料 FK-81 细胞由国家兽用药品工程技术研究中心保存;临床病料样品为洛阳及天津地区宠物医院采集的具有上呼吸道感染症状的病猫眼鼻拭子;Trans5 α Chemically Competent Cell 购于北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂与仪器 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒为 Geneaid 公司产品;2 $\times$ Easy Taq PCR SuperMix、Easy Script One-Step RT-PCR SuperMix、Easy Script First-Strand cDNA Synthesis SuperMix

收稿日期:2019-04-12

作者简介:孙春艳(1979—),女,黑龙江人,博士,主要从事小动物临床疾病诊疗。* 通讯作者

万方数据

及 pEASY-Blunt 载体均为北京全式金生物技术有限公司产品;DNA Marker DL 2 000、PrimeSTAR Max Premix DNA 为宝生物工程(大连)有限公司产品;凝胶回收试剂盒为 TIANGEN 公司产品;FITC 标记羊抗鼠 IgG 为 Sigma 公司产品;抗 FHV-1 单抗为洛阳普泰生物技术有限公司产品;DMEM 培养基及胎牛血清(FBS)为 Gibco 公司产品;涡旋振荡仪(Vortex-Genie 2)为 Scientific Industries 公司产品;恒温水浴锅(HS-4)为华利达实验设备有限公司产品;二氧化碳培养箱(CCL-170T-8)、生物安全柜(AB2-3S1)均为 ESCO 公司产品;高速冷冻离心机(5424)为 Eppendorf 公司产品;冰箱(DW-86L626)为海尔股份有限公司产品;PCR 仪(C1000 Touch)、紫外凝胶成像仪(GelDoc XR+)、电泳仪(Power-Pac)均为 Bio-Rad 公司产品;倒置荧光显微镜(Ni-

kon Ts2)为 Nikon 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 病料 PCR 检测 参照商品化病毒 DNA/RNA 提取试剂盒说明书提取病料样品核酸,分别使用 FHV-1、猫泛白细胞减少症病毒(Feline panleukopenia virus,FPV)和猫杯状病毒(Feline caliciviruses,FCV)的特异性鉴定引物进行检测,引物序列见表 1,由金唯智生物科技有限公司合成。检测 FCV 的 RT-PCR 扩增体系为:EasyScript One-Step Enzyme Mix 0.2 μ L,2 $\times$ One-Step Reaction Mix 5 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L, RNA 1 μ L, ddH₂O 2.8 μ L。检测 FPV 和 FHV PCR 扩增体系为:2 $\times$ Easy Taq PCR Super Mix 5 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L, DNA 1 μ L, ddH₂O 3.0 μ L。反应程序见表 1,PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 引物序列信息

Table 1 Information of primer sequences

名称 Primer name	序列(5'~3') Primer sequence	扩增长度/bp Amplification length	扩增程序 Amplification program
FCV-JD	FCV-F:CAARGGAGAAAATTCDGACGA FCV-R:GTATTTWAGCACGTTAGCGCAGGT	321	42℃ 45 min; 95℃ 3 min; 95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 45 s,30 circles; 72℃ 10 min
FHV-JD	FHV-F:GACGTGGTGAATTATCAGC FHV-R:CAACTAGATTTCACACAGGA	288	95℃ 3 min; 95℃ 30 s; 56℃ 30 s,72℃ 30 s,30 circles; 72℃ 10 min
FPV-JD	FPV-F:AAAGAGTAGTTGTAAATAATA FPV-R:CCTATATCACCAAAGTTAGTAG	681	
FHV-CX	FHV-gD-F:AACTGCCCTCCATTCTACTC FHV-gD-R:TTGGTCCAGACTCCAACCTAT	1 269	95℃ 3 min; 94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 1 min 30 s,35 circles; 72℃ 7 min

1.2.2 病毒分离培养 将眼鼻拭子溶液涡旋振荡混匀后,加入无血清 DMEM 培养液进行 5 倍稀释,4℃、5 000 r/min 离心 10 min,取上清用 0.22 μ m 滤器过滤,将滤液接种单层 FK-81 细胞,37℃吸附 1 h 后,弃去病料处理液,用无血清 DMEM 培养液洗涤 1 次,补充适量含有 20 ml/L FBS 的 DMEM 培养液,同时设立健康 FK-81 细胞作为对照,在 37℃、5% CO₂ 培养箱进行培养,每天观察细胞状态。若出现细胞变圆、融合、局灶性堆积聚团、脱落等典型的细胞病变(cytopathic effect,CPE)且病变细胞量达 80%~90%时,收获感染细胞培养物,置-70℃以下冻存备用;若未出现 CPE,则进行盲传,盲传 3 代仍未出现 CPE 则视为未分离到病毒,弃去。

1.2.3 分离毒株间接免疫荧光试验(IFA) 将所分离的病毒接种于 FK-81 细胞单层,同时设健康 FK-81 细胞作为对照,培养 30 h~36 h 出现明显 CPE 时,弃上清,PBS 洗涤 3 次,加 800 ml/L 冷丙酮,4℃固定 20 min,弃去丙酮;PBS 洗涤 3 次,加鼠抗 FHV 单抗,37℃孵育 1 h;PBS 洗涤 3 次,加 FITC 标记的羊抗鼠 IgG,37℃孵育 1 h;PBS 洗涤 3 次,于

倒置荧光显微镜下观察结果。

1.2.4 分离毒形态鉴定 对所分离毒进行病毒粒子形态学鉴定,取 FHV 分离株的细胞培养上清,用 20 g/L 磷钨酸按常规方法负染后,在电镜下观察病毒粒子的大小及形态。

1.2.5 分离毒生长动力学试验 以病毒感染复数(MOI)为 0.01 感染 FK-81 单层细胞,吸附 1 h 后,用无血清 DMEM 清洗细胞,并补充适量含有 20 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液,在 37℃、体积分数为 5% CO₂ 环境中培养。分别收集在 12、24、36、48、60、72 h 的培养上清液以及用细胞刮收集感染细胞,重复 3 份,并分别测定每个时间点细胞上清及细胞中的病毒含量^[13]。

1.2.6 分离毒株 gD 基因序列扩增与测序分析 病毒 DNA 提取后,根据 GenBank 数据库中已发表的 FHV-1 gD 基因全长序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性扩增引物 FHV-CX(表 1)。反应体系为 50 μ L:2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix DNA Polymerase 25 μ L,FHV-gD 基因上、下游引物各 2 μ L, DNA 4 μ L, ddH₂O 17 μ L。扩增程序见表 1,

取全部 PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定。按照商品化凝胶回收试剂盒将 PCR 产物回收,连接 pEASY-blunt 载体后转化至 Trans 5α 化学感受中构建质粒,取 5 个阳性重组质粒送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。使用 Meg A-align 软件对测序结果和 NCBI 上已发表的 FHV-gD 基因核酸序列进行同源性比对分析,使用 MEGA 7.0 软件对 gD 基因序列构建系统发育树,采用邻接法(Neighbor Joining, NJ)以 Boot Strap 值 = 1000 进行可靠性分析。

2 结果

2.1 病料样品的 PCR 检测结果

共检测 90 份病猫眼鼻拭子样品,PCR 检测结果显示,FHV-1 阳性率为 21.1%(19/90),FPV 阳性率为 16.7%(15/90),FCV 阳性率为 17.8%(16/90)。其中有 5 份样品核酸检测结果为单纯 FHV-1 感染,PCR 扩增可见与预期片段大小一致的条带(图 1),而 FCV、FPV 特异性引物检测结果均为阴性。

2.2 FHV-1 的分离培养

接种眼鼻拭子处理液的 FK-81 细胞在接种病料处理液后 24 h~30 h,细胞出现变圆、融合、拉网型聚团等细胞病变(图 2A~图 2E),接毒后 36 h,CPE 达 80% 以上,而正常 FK-81 细胞未出现 CPE(图 2F)。

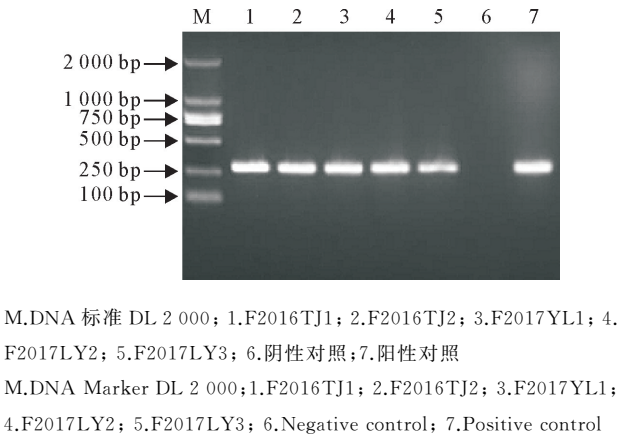


图 1 病料样品中 FHV-1 PCR 检测结果

Fig.1 Detection results of FHV-1 in tissue samples by PCR

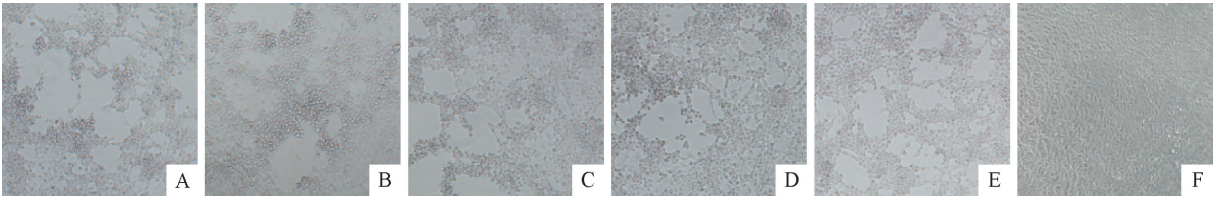


图 2 不同株 FHV-1 感染 FK-81 后的细胞形态观察(100×)

Fig.2 Morphological observation of FK-81 cells infected with different strains of FHV-1

2.3 分离毒株的 IFA 鉴定

以鼠抗猫疱疹病毒 1 型单抗作为一抗,FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,对分离病毒株进行 IFA 鉴定。结果显示,5 株病毒分离株接种的 FK-81 细

胞上均出现特异性绿色荧光,而正常 FK-81 细胞无特异性荧光(图 3),将所分离获得的猫疱疹病毒 1 型分别命名为 2016TJ1 株、2016TJ2 株、2017LY1 株、2017LY2 株和 2017LY3 株。

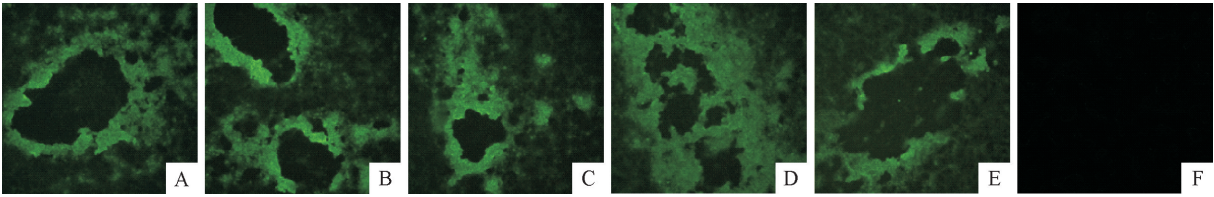


图 3 FHV-1 分离株的 IFA 鉴定结果(100×)

Fig.3 Identification results of FHV-1 strains by IFA

2.4 分离毒株电镜鉴定

将分离毒株 2016-TJ1 培养液上清负染后,在电镜下可观察到呈圆形、直径约 130 nm、有囊膜的病

毒粒子,囊膜上有纤突,具有疱疹病毒科的典型形态特征(图 4)。

2.5 分离毒株生长动力学研究

以 MOI 为 0.01 的 F2016TJ1 株接种 FK-81 单层细胞,每隔 12 h 取细胞上清及细胞进行病毒含量测定,每个时间点进行 3 次平行操作。结果显示,在接种后 24 h 即可见少量细胞病变,36 h 细胞病变达 70%~80%,60 h~70 h 细胞全部脱落。生长动力学曲线显示,12 h~36 h 病毒在 FK-81 细胞中快速复制,48 h~60 h 病毒增殖达到平台期,72 h 病毒增殖开始衰退,细胞中病毒含量始终高于培养上清,但是在感染 48 h 后,细胞培养上清中的病毒含量与细胞中相近,说明此时细胞开始死亡裂解,病毒释放入细胞培养上清中(图 5)。

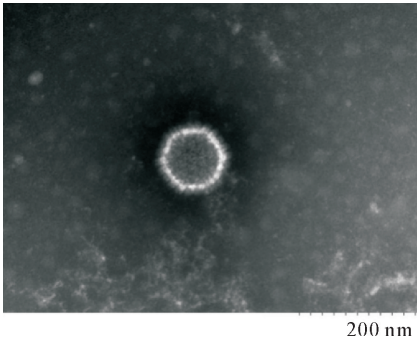


图 4 FHV-1 分离株 F2016TJ1 病毒粒子电镜鉴定
Fig.4 The examination of FHV-1 strain F2016TJ1 by electron microscope

2.6 分离毒株的 gD 基因序列扩增与分析

将 5 株病毒编码 gD 蛋白的全基因测序结果与已发表的疫苗株和国内流行的 FHV-1 及犬疱疹病毒 1 型(Canid hepevirus 1,CHV-1)gD 基因核酸序列进行同源性分析及基因进化树构建(图 6),结果显示,所分离到的 5 株 FHV-1 分离株(以▲标注)F2016TJ1 株、F2016TJ2 株、F2017YL1 株、F2017LY2 株、F2017LY3 株之间 gD 基因序列高度保守,分离毒株同源性 100%,与国内上海株、国外澳大利亚株(KR296657)、疫苗株(KR296657)及美国经典株(FJ478159)序列同源性极高,但是与犬疱疹病毒 1 型 gD 基因的同源性仅为 45.5%~48.1%,说明 FHV 的 gD 基因具有宿主特异性。

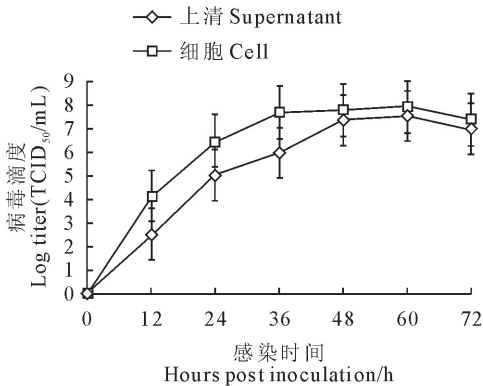


图 5 FHV-1 分离株 F2016TJ1 生长动力曲线
Fig.5 Growth dynamic curves of FHV-1 strain F2016TJ1

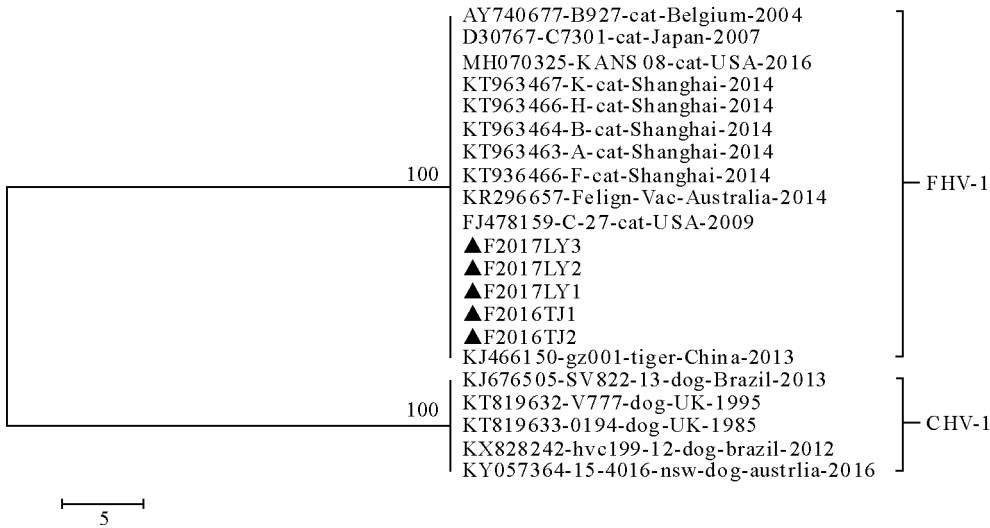


图 6 FHV-1 分离株 gD 基因核苷酸序列系统进化树
Fig.6 Phylogenetic tree of FHV-1 gD gene

3 讨论

2016 年—2017 年从洛阳及天津地区多家宠物医院收集具有结膜炎、口炎、鼻炎等上呼吸道感染症状病猫的眼鼻拭子,对其进行 FCV、FHV-1、FPV 鉴定,结果显示 FHV-1 阳性率为 21.1%,FPV 阳性

率为 17.8%,FCV 阳性率为 16.7%,单纯 FHV-1 感染占 5.5%。2017 年北京地区 FHV-1 阳性率为 26.3%^[14],内蒙古地区 FHV-1 阳性率为 61.54%^[15],说明洛阳及天津地区 FHV-1 的流行率较低。针对单纯 FHV-1 感染的阳性病料进行病毒

分离,分离率为 100%。国内 2010 年首次报道了猫疱疹病毒 1 型的分离^[16],本研究的病毒分离所产生的 CPE 与该报道中相似,细胞在 36 h~48 h 出现变圆、脱落、皱缩并且单层细胞出现局灶性坏死。分离毒株 F2016TJ1 在细胞上生长动力曲线显示,0 h~12 h 细胞形态正常,24 h 开始出现细胞变圆、细胞间隙增大,此时病毒开始大量繁殖,进入指数生长期,病毒滴度快速增加,36 h 细胞出现明显的病变,48 h~60 h 由于细胞受损、物质和能量代谢阻碍影响病毒的增殖,因而病毒滴度增长变慢,此时细胞出现严重 CPE,大量脱落,培养液中混有较多的破碎细胞,60 h 后病毒滴度下降,病毒开始衰退。有研究对 C-27 株的一步生长动力学试验结果显示,病毒在 MOI 为 0.01 感染细胞后 24 h~72 h 病毒快速增殖,72 h 病毒含量开始下降^[13]。本研究毒株比 C-27 株的增殖要快,在感染后 60 h 到达高峰,可能是本研究的毒株更适应细胞,因此能更快地在细胞中增殖。一步生长动力曲线的测定,有助于了解 FHV 在宿主细胞内的增殖情况和病毒感染的动力学,为 FHV-1 的培养最佳收获时间提供了依据,对 FHV-1 病毒感染机理的认识具有重要意义。

为了解猫疱疹病毒 1 型的分子流行病学特点,对所分离的 5 株 FHV 编码 gD 蛋白的基因进行序列分析。结果显示,分离株间的同源性为 100%,与文献[17]对猫疱疹病毒 gD 蛋白的报道结果一致。经对全球的 FHV-1 分离株进行全基因组系统进化分析,发现全球的 FHV-1 在全基因水平上分为 4 个主要亚群,并且亚群之间存在地区差异^[18]。有人对猫疱疹病毒的全基因组进行了系统进化分析^[19],发现猫疱疹病毒在全基因组水平上存在高度保守的现象,不同分离株的多样性水平仅 0.01%,存在地区流行性。本研究在 gD 基因水平上对分离到的毒株进行系统进化分析,发现 gD 基因高度保守,与国内外的分离株同源性为 100%,但是与 CHV-1 同源性仅为 45.5%~48.1%,说明 FHV 的 gD 基因具有一定的宿主特异性。gD 蛋白是疱疹病毒的主要免疫原性蛋白,在诱导中和抗体方面发挥主要作用,该基因高度保守的特点可能是病毒毒力和免疫原性稳定的一个主要因素,但是病毒毒力是多种基因调控的结果,gD 基因究竟如何影响 FHV 感染宿主及在宿主体内的增殖仍需进一步的研究来证明。

猫传染性鼻气管炎是猫科动物常发的一种病毒性传染病,可引起发热、鼻炎、结膜炎及口腔溃疡,该病毒常在结膜和呼吸道上皮细胞中复制并感染周围神经元^[20]。猫一旦感染 FHV-1,不论是否具有临

床症状都会成为潜在的病毒携带者并且成为一个重要的传染源^[21]。猫发病后一般采取支持性治疗,补充体液、眼部护理、鼻腔冲洗、雾化治疗及强化营养,使用广谱抗生素、赖氨酸、抗病毒药(三氟尿苷、碘苷、更昔洛韦、阿昔洛韦)及免疫调节剂(ω 干扰素、 α 干扰素)会对病情起到改善作用^[22]。商品化的猫疫苗一般为多联疫苗,包括弱毒苗和灭活苗,均可对预防猫鼻气管炎起到一定积极作用,能在猫感染病毒后减轻猫的临床症状,但是不能完全预防该病,定期接种疫苗可使猫产生较为持久的中和抗体,为预防二次感染提供充足的保障^[2]。疫苗接种应在 6 周龄~8 周龄进行,每 3 周~4 周接种 1 次,直到 12 周龄~15 周龄,之后应每 1~3 年内加强免疫 1 次^[23]。已经建立的相关的 PCR 鉴定方法可为临床上猫病毒病的检测提供可靠的诊断依据^[24-25],但是预防该疾病最主要的工作应该是做好环境的消毒及定期预防接种。

参考文献:

- [1] THAM K M,STUDDERT M.Antibody and cell-mediated immune responses to feline herpesvirus 1 following inactivated vaccine and challenge[M]. J Vet Med,1987;34(8):585-597.
- [2] STILES J.Feline herpesvirus[J].Clin Tech Small Anim Pract, 2003,18(3):178-185.
- [3] GASKELL R M,POVEY R C.Experimental induction of feline viral rhinotracheitis virus re-excretion in FVR-recovered cats [J].Vet Rec,1977,100(7):128-133.
- [4] NGUYEN D,BARRS V R,KELMAN M,et al.Feline upper respiratory tract infection and disease in Australia[J].J Feline Med Surg,2018, 21(10): 973-978.
- [5] FERNANDEZ M,MANZANILLA E G,LLORET A,et al. Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, *Chlamydomydia felis* and *Mycoplasma felis* DNA and associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease,conjunctivitis and/or gingivostomatitis[J].J Feline Med Surg,2016,19(4):461-469.
- [6] MAAZI N,JAMSHIDI S,KAYHANI P,et al.Occurrence of *Chlamydomydia felis*, feline herpesvirus 1 and calicivirus in domestic cats of Iran[J].Iranian J Microbiol,2016,8(5):312-315.
- [7] KANG B,PARK H.Prevalence of feline herpesvirus 1, feline calicivirus and *Chlamydomydia felis* in clinically normal cats at a Korean animal shelter[J].J Vet Sci,2008,9(2):207-209.
- [8] RAMPAZZO A,APPINO S,PREGEL P,et al.Prevalence of *Chlamydomydia felis* and feline herpesvirus 1 in cats with conjunctivitis in Northern Italy[J].J Vet Internal Med,2003,17 (6):799-807.
- [9] CAI Y,FUKUSHI H,KOYASU S,et al.An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan[J].J Vet Med Sci,2002,64(3):215-219.
- [10] POVEY R C.A review of feline viral rhinotracheitis (feline

- herpesvirus 1 infection)[J].Comp Immunol, Microbiol Infect Dis, 1979, 2(2): 373-387.
- [11] MAEDA K, HORIMOTO T, MIKAMI T. Properties and functions of feline herpesvirus type 1 glycoproteins[M].J Vet Med Sci, 1998, 60(8): 881-888.
- [12] MAEDA K, ONO M, KAWAGUCHI Y, et al. Expression and properties of feline herpesvirus type 1 gD (hemagglutinin) by a recombinant baculovirus[M].Virology, 2010, 401(2): 215-227.
- [13] TAI S H S, NIIKURA M, CHENG H H, et al. Complete genomic sequence and an infectious BAC clone of feline herpesvirus-1 (FHV-1)[J].Virology, 2010, 401(2): 215-227.
- [14] 许楚楚, 胡士玲, 陈宋杰, 等. 北京地区猫杯状病毒和疱疹病毒流行病学调查[J]. 中国兽医杂志, 2017(11): 23-26.
- [15] 李航, 刘俊平, 关平原, 等. 猫疱疹病毒 I 型 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 动物医学进展, 2017, 38(11): 86-90.
- [16] 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(2): 21-25.
- [17] 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(1): 22-26.
- [18] LEWIN A C, KOLB A W, MCLELLAN G J, et al. Genomic, recombinational and phylogenetic characterization of global feline herpesvirus 1 isolates[J]. Virology, 2018, 518: 385-397.
- [19] VAZ P, JOB N, HORSINGTON J, et al. Low genetic diversity among historical and contemporary clinical isolates of felid herpesvirus 1[M]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 704.
- [20] TOWNSEND W M, JACOBI S, TAI S, et al. Ocular and neural distribution of feline herpesvirus-1 during active and latent experimental infection in cats[J]. BMC Vet Res, 2013, 9(1): 185.
- [21] GASKELL R M, POVEY R C. Feline viral rhinotracheitis: sites of virus replication and persistence in acutely and persistently infected cats[J]. Res Vet Sci, 1979, 27(2): 167-174.
- [22] THIRY E, ADDIE D, BELAK S, et al. Feline herpesvirus infection. ABCD guidelines on prevention and management[J]. J Feline Med Surg, 2009, 11(7): 547-555.
- [23] POVEY R C. The efficacy of two commercial feline rhinotracheitis-calicivirus-panleukopenia vaccines[J]. Can Vet J, 1979, 20(10): 253-260.
- [24] SYKES J E, ALLEN J L, STUDDERT V P, et al. Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR[J]. Vet Microbiol, 2001, 81(2): 95-108.
- [25] LITSTER A, WU C C, LEUTENEGGER C M. Detection of feline upper respiratory tract disease pathogens using a commercially available real-time PCR test[J]. Vet J, 2015, 206(2): 149-153.

Isolation and Identification of Cat Herpesvirus Type 1 and Sequence Analysis of gD Gene

SUN Chun-yan^{1,2}, QIAN Peng², WANG Jie^{2,3}, CAO Yu-jiao², CUI Ning-ning², HUO Ning-ning², HUANG Bai-cheng², XI Xiang-feng², LIU Yu-xiu², LIN De-gui¹, TIAN Ke-gong^{2,3}

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing, 100836, China;

2. National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang, Henan, 471003, China;

3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, 450002, China)

Abstract: In order to study the molecular epidemiological characteristics of feline herpesvirus type 1 (FHV-1), samples of eye and nose swabs of diseased cats with upper respiratory tract infection signs were collected from several pet hospitals in Tianjin and Luoyang from 2016 to 2017. The virus was isolated by FK-81 cells and identified by indirect immunofluorescence assay, electron microscopic morphology observation and gD gene sequence analysis. Also we studied the viral growth kinetics *in vitro*. The results showed that the infected cells showed cytopathic effects such as roundness, fusion, focal accumulation and exfoliation between 24 and 36 hours after inoculation. The isolates could be specifically recognized by FHV-1 monoclonal antibodies. Under electron microscopy, the virions were round in shape, 130 nm in diameter, and with envelopes, which had the morphological characteristics of Herpesviridae. The five FHV isolates were named as 2016TJ1 strain, 2016TJ2 strain, 2017LY1 strain, 2017LY2 strain and 2017LY3 strain. According to one step growth curve, the virus grow rapidly between 12 h and 36 h after inoculation, reached the peak at 40 h-60 h, and began to decline at 72 h. The homology of FHV-1 gD gene sequences between five strains was 100%, and the nucleic acid sequence was highly conserved and highly homologous with the domestic and foreign epidemic strains and vaccine strains. This study laid a foundation for pathogen isolation and molecular epidemiological investigation of FHV-1 in pet cats in China.

Key words: Feline herpesvirus type 1; gD gene sequence analysis; isolation and identification; growth kinetics