

猫冠状病毒分子进化、免疫病理机制和疫苗研究进展

刘玉秀, 黄柏成, 田克恭

(国家兽用药品工程技术研究中心, 河南 洛阳 471000)

中图分类号: S858.293

文献标志码: A

文章编号: 0529-6005(2020)11-0077-04

猫冠状病毒(Feline coronavirus, FCoV)具有2种血清型(I型和II型),又分为2种生物型或病理型,一种是猫肠道冠状病毒(Feline enteric coronavirus, FECV),主要引起轻度到重度肠炎;另一种是猫传染性腹膜炎病毒(Feline infectious peritonitis virus, FIPV),主要引起感染猫腹膜炎、眼膜炎及神经症状等。FIPV被认为是FECV缺失突变体,其在猫群中不存在水平传播,具有抗体依赖性增强特性,接种疫苗后高水平的抗体反应会加快传染性腹膜炎(Feline infectious peritonitis, FIP)的发展。本文对猫冠状病毒的分子生物学、FECV/FIPV突变的组织嗜性改变机制、FIPV感染的病理学成因及免疫效力评估进行了总结,以期为国内猫冠状病毒的防控提供科学依据。

1 猫冠状病毒基因组

猫冠状病毒(FCoV)是冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒亚科(Coronavirinae)α冠状病毒属(Alphacoronavirus)成员,是家猫和野生猫科动物主要传染性病原之一。根据不同的临床表现形式,FCoV通常被认为具有2种生物型或病理型,一种是在大多数健康猫群中普遍存在的猫肠道冠状病毒,可引起轻度到重度肠炎;另一种是猫传染性腹膜炎病毒,以导致感染猫全身系统性、强致病力的传染性腹膜炎为特征,亦可引起感染猫肠炎、轻度至严重眼疾及神经系统疾病^[1]。

FCoV基因组约29 kb,11个开放性阅读框(ORFs),编码4种结构蛋白:棘突(S)蛋白、包膜(E)蛋白、膜(M)蛋白和核衣壳(N)蛋白,7种非结构蛋白3a、3b、3c、7a、7b及复制酶1a和1b^[2]。病毒

螺旋核衣壳由N蛋白包裹多个RNA拷贝而组成,N蛋白主要保护病毒基因组,可诱导机体产生细胞免疫^[1]。M蛋白是病毒含量最丰富的糖蛋白,其通过3个跨膜结构域随机分布在病毒包膜上。E蛋白是插入病毒包膜中的III型膜蛋白,含量远小于M蛋白和S蛋白,其缺失不影响病毒复制,但会减弱病毒毒力^[3]。S蛋白属于I型病毒融合蛋白,是病毒进入宿主细胞的主要调节因子。FCoV的16个非结构蛋白由1ab、3abc和7ab基因编码,1ab编码的复制酶复合物参与转录,生成用于转录结构蛋白和辅助蛋白的模板^[4]。3abc辅助蛋白中的3c与FCoV毒力和组织嗜性变化有关^[1]。7ab参与FCoV感染的免疫反应,7a蛋白是一种I型干扰素拮抗剂,7b蛋白可诱导自然感染猫的抗体反应^[5]。

2 猫冠状病毒血清型

FCoV根据S蛋白氨基酸序列和抗体交叉中和差异分为2种血清型:I型和II型^[6]。血清I型是主要流行毒株类型,其S蛋白完全来源于FCoV^[1]。血清II型FCoV临床不常见,由犬冠状病毒(Canine coronavirus, CCoV)和FCoV双重重组而来。生物信息学分析和抗体中和试验表明,血清II型FCoV和CCoV的S蛋白序列间相似度高^[6],79-1146株S基因与CCoV及猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)S基因相似率(分别为91%和81%)显著高于血清I型FCoV(46%)^[7-8]。多数体外分离和培养的FCoV毒株为血清II型,而临床流行更广的血清I型FCoV难以分离,严重阻碍了对FCoV的体外研究。

3 猫冠状病毒生物型

血清I型和II型FCoV毒株均存在2种在抗原和形态学上不同的生物型(或病理型):FECV和FIPV。FECV在野猫中感染率可达90%^[9],一般无症状或轻微肠炎症状,而FIPV则致病性极高,引起

收稿日期:2020-04-01

基金项目:洛阳市河洛英才计划

作者简介:刘玉秀(1985-),女,副研究员,博士,从事犬猫病毒学和疫苗研究,E-mail: qingqingyuxiu1@163.com

通讯作者:田克恭,E-mail: vetvac@126.com

感染猫致死性传染性腹膜炎。研究认为, FIPV 是感染猫体内 FECV 突变产生的一种变异生物型^[10-11]。2 种生物型的组织嗜性和生物特性存在较大差异, FECV 经粪口途径在猫群中传播, 而 FIPV 与感染动物细胞和组织紧密结合, 极少情况下才有可能在粪便或尿液中排毒, 不具有水平传播能力。这种机制类似于猫白血病病毒(Feline leukemia virus, FeLV) 感染猫后突变为猫肉瘤病毒(Feline sarcoma virus, FeSV), FeSV 在自然界中不能水平传播, 但 FeLV 可在猫的各种排泄物和分泌物中排出并可水平传播^[12]。

病毒嗜性的变化是病毒与宿主细胞相互作用的结果, 宿主细胞中受体、共受体、生化条件(如蛋白酶、离子、pH) 的存在或缺失都可能是这些变化的决定因素。突变理论表明, 无症状的 FECV 感染猫暴露于反复的“感染-康复-再感染”循环中, 体内 FECV 突变将致使病毒毒力和组织嗜性扩大而成为 FIPV, 但失去病毒传播特性^[1,13]。S、3abc 和 7ab 基因被证实存在这种突变^[14-17]。S 基因的突变可能是 FECV 突变为 FIPV 的关键, 特别是编码 S1/S2 裂解位点区域。FECV 具有一个可能被类胰蛋白酶裂解的 S1/S2 序列, 而 FIPV 具有一个可被其他蛋白酶激活的 S1/S2 突变序列, 这表明 FCoV 生物型转变需要 S 蛋白酶激活^[14]。位于 S 蛋白融合肽区域的突变也被认为与 FECV/FIPV 特异性突变有关。Chang 等发现 S2 蛋白存在的 M1058L 突变几乎可完全区分(>95%) 来自健康猫和病猫中的 FECV 和 FIPV 序列^[15]。Porter 等后期也发现, M1058L 突变与肠道或全身性 FCoV 感染一致性^[16], 77% 的 FIP 猫和 100% 的非 FIP 猫粪便样品中 FCoV S2 蛋白 1 058 位点为 Met, 而 91% 的 FIP 猫和 89% 的非 FIP 猫组织样本中此位点为 Leu, 但仅由 S 蛋白的突变不能完全将 FIP 从 FCoV 阳性样本中区分出来。3abc 和 7ab 的 ORFs 突变也与 FCoV 生物型转换有关, 多项研究认为 3c 基因的截短是 FECV 突变成 FIPV 的决定因素^[1,17], 3c 基因的截短或缺失常与 FIPV 生物型相关, 而完整或非截短的 3c 基因与 FECV 相关^[17]。在病猫组织中检测到的 FCoV 总存在 1 个或突变或截短或缺失的 3c 基因, 疑为 FIPV, 而健康猫体内的 FCoV 具有完整的 3c 基因^[1]。3c 基因功能的丧失并不能阻止病毒体内或体外复制, 但可通过增强巨噬细胞内 FIPV 的内化和复制来显著改变细胞趋向性。相反, 亲本 FECV 更倾向于感染肠道成熟的顶端上皮细胞。

4 发病机制

FCoV 感染潜伏期可从几周至几年不等, 感染初期具有轻微的上呼吸道或肠道症状, 但许多猫在感染 FCoV 后无任何临床症状^[1]; FECV 感染 1 周内就可通过粪便排出, 可持续 4~6 个月, 或在 6~8 个月内被清除, 或可持续排毒 18 个月^[18]。高抗体滴度(1:100) 的猫比低抗体滴度(1:25) 的猫可能更易排 FECV^[18]。

FIPV 感染细胞至少需要 2 种细胞受体, 第 1 种是细胞膜上的氨基肽酶 N(Aminopeptidase N, APN), 其具有 S 蛋白表位特异性, 猫 APN 是血清 I 型 FIPV 受体, 但不一定是血清 II 型 FIPV 的受体^[19]。有趣的是, 猪和人 APN 不能作为 FIPV 受体, 但两者的嵌合体能作为 FIPV 的受体^[20]。第 2 种是巨噬细胞上的 Fc 受体。FECV 一旦突变为 FIPV, 就获得识别巨噬细胞 Fc 受体和在巨噬细胞中大量复制的能力。巨噬细胞上的 Fc 受体能够结合病毒抗体复合物, 促使 FIPV 感染的巨噬细胞进入淋巴结区域进行病毒大量复制, 由此产生的病毒血症可使携带病毒的巨噬细胞沉积在血管内皮细胞中^[21], 之后巨噬细胞附着并通过静脉壁迁移, 引起血管周围的局部反应造成脓性肉芽肿, 从而形成组织内 FIP 基本病变。

猫免疫系统有几种机制来控制早期 FIPV 感染。抗体在体外可以中和 FIPV, 但在体内似乎有助于 FIP 的发生, 可能由 2 种原因造成: 首先, 抗体结合病毒可能阻断 APN 受体, 阻止病毒与细胞的粘附, 但通过补体结合(Fc) 受体增强了巨噬细胞对病毒的吸附, 这种抗体依赖增强(Antibody-dependent enhancement, ADE) 效应对猫抗体和巨噬细胞具有特异性, 并且可能涉及病毒 S 和 M 蛋白的抗体^[21]; 其次, 病毒抗原可能不会排列在受感染巨噬细胞表面, 从而限制中和抗体与病毒结合。感染抗体阶段以一种迅速蔓延的以浆膜/网膜为中心的炎症为标志, 这种反应集中在小静脉周围, 可造成脓性肉芽肿病变, 周围有大量富含蛋白质的水肿液和少量淋巴细胞、中性粒细胞和浆细胞, 这个反应称为阿尔萨斯型超灵敏反应^[22]。

FIP 具有渗出性(湿性) 和非渗出性(干性) 2 种临床形式, 主要由细胞介导及受感染巨噬细胞对病毒反应方式的改变造成。如果细胞免疫在感染早期产生并足够强可抑制病毒复制, 就不会出现 FIP 临床症状; 如果感染过程仅发生体液免疫且细胞免疫激活失败, 则会导致渗出性 FIP。也可能出现体

液免疫和细胞免疫都很强,病毒被控制的程度远大于渗出性疾病发展,但又未完全消除则会引起病毒复制和消除之间的拉锯战,导致非渗出性 FIP,后者以更典型的肉芽肿为特征。无论哪种感染表现的 FIP 都会导致致命性免疫介导的血管炎,从发病到死亡的时间因两种形式而异。渗出型病例常在发病 2 个月内死亡,具体临床症状取决于受血管炎影响的脏器系统;非渗出型病例猫常有眼部症状,25% 病例出现进行性神经症状,眼部和神经症状由这些组织中肉芽形成引起的慢性病程^[18]。

5 猫冠状病毒感染疫苗接种的风险与效益评价

幼猫在 6 周龄前因母源抗体保护,免受 FCoV 感染,此后 90% 猫暴露于 FCoV 后会发生血清抗体转阳,一旦出现 FIP,暂无有效治疗药物,死亡率 100%。FIP 潜伏期几周至几年不等,这种巨大差异给防疫工作带来严峻挑战。1991 年辉瑞制药有限公司开发的 Primucell FIP 减毒活疫苗,可局部刺激 IgA 和中和抗体产生^[23]。

研究发现,FIP 减毒活疫苗、灭活疫苗和亚单位疫苗免疫猫后均可观察到 ADE^[23-24],使 FIP 潜伏期缩短至 1~2 d,病程更短,死亡更快。FIP 疫苗在瑞士 2 个高危猫群临床应用显示^[25],猫在疫苗接种后 1 个月内出现 FIP,接种安慰剂猫则没有出现 FIP。虽然不能确定单个病例的 FIP 是否由 ADE 引起,但 FIP 疫苗的免疫带来的益处却远低于预期。在 FIP 流行地区,与接种安慰剂对照组相比,FIP 疫苗免疫的猫发病率没有任何下降。在 12 个不同区域进行为期 6 个月的疫苗田间试验中,349 只猫 2 次免疫 Primucell FIP 疫苗后有 3 例 FIP 发生(0.86%),352 只猫免疫安慰剂疫苗有 4 例发生(1.1%)^[26]。瑞士双盲安慰剂田间试验,138 只 16 周龄纯种猫在接种后 15~21 个月内,疫苗接种组有 7 例 FIP 死亡,安慰剂组有 5 例死亡^[27]。在地方性流行地区,幼猫多在 6~7 周龄感染,远早于疫苗推荐的首免时间(16 周龄),高危宠物猫群中疫苗保护效力有限甚至没有效力,如田间试验显示,免疫后 12 个月,免疫组 13/31 死亡,对照组 17/34 死亡^[25]。另一项研究显示,在免疫后 150 d 内免疫组死于 FIP 为 12 只,安慰剂组为 10 只,免疫后 250 d 内,2 组死于 FIP 数量相当,均为 13 只^[27]。在临床应用中,Primucell FIP 疫苗在免后 8~12 个月,均未能有效降低高危猫群 FIP 发病率。

Primucell FIP 疫苗免疫保护效果取决于免疫猫暴露于 FIPV 的剂量^[23,28],当免疫猫暴露于低剂量

强毒(<10 猫感染剂量)可见部分保护,当暴露于超过 10 个感染剂量(10^4 TCID₅₀)时,疫苗则不能保护。当感染较高剂量强毒时,多数免疫猫比未免疫猫更容易感染,表现更急性更严重疾病。

6 展望

FCoV 的感染致病机制因病原特殊性而变得越发独特复杂。APN 特定区域的细微差异可以从根本上改变物种,甚至血清型趋向性。FECV 巨噬细胞趋化性的获得似乎是其向 FIPV 转化的一个重要步骤,即从一种非致病性和局限性的肠细胞病原体向一种高毒性和全身性的单核细胞/巨噬细胞病原体转化。

FECV 及其转化的 FIPV 基因型毒株中存在由不同程度的单核苷酸多态性和插入/缺失现象。同一地区猫群中分离株间基因差异很少能超过 12%,但是不同地区猫群中冠状病毒差异可达 20% 以上,这给疫情防控带来极大挑战。

FIP 疫苗免疫的益处比想象的少。第一,免疫组和对照组免疫保护率没有明显区别;第二,免疫后由于 ADE 导致免疫组免后 1 个月死亡数高于未免疫组;第三,许多幼猫一般在 6~7 周感染 FCoV,远早于疫苗推荐首免时间。针对 FIP 的疫苗研发还需要更多的探索,如对最佳接种日龄的优化和克服 ADE 特性等。

参考文献:

- [1] Pedersen N C, Liu H, Dodd K A, *et al.* Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis [J]. *Viruses*, 2009, 1(2): 166-184.
- [2] Millet J K, Whittaker G R. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis [J]. *Virus Research*, 2015, 202: 120-134.
- [3] Pervushin K, Tan E, Parthasarathy K, *et al.* Structure and inhibition of the SARS coronavirus envelope protein ion channel [J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(7): e1000511.
- [4] Enjuanes L, Almazan F, Sola I, *et al.* Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2006, 60(1): 211-230.
- [5] Kennedy M A, Abd-Eldaim M, Zika S E, *et al.* Evaluation of antibodies against feline coronavirus 7b protein for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats [J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2008, 69(9): 1179-1182.
- [6] Kipar A, Meli M L. Feline infectious peritonitis: Still an enigma? [J]. *Veterinary Pathology*, 2014, 51(2): 505-526.
- [7] 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]. *Journal of Virology*, 1998, 72(5): 4508-4514.
- [8] Wesseling J G, Vennema H, Godeke G J, *et al.* Nucleotide se-

- quence and expression of the spike (S) gene of canine coronavirus and comparison with the S proteins of feline and porcine coronaviruses [J]. Journal of General Virology, 1994, 75(7): 1789-1794.
- [9] Pedersen N C, Sato R, Foley J E, *et al.* Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus [J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2004, 6(2): 83-88.
- [10] Gunn-Moore D A, Gruffydd-Jones T J, Harbour D A. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis [J]. Veterinary Microbiology, 1998, 62(3): 193-205.
- [11] Meli M, Kipar A, Muller C, *et al.* High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats [J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2004, 6(2): 69-81.
- [12] Pedersen N C, Johnson L, Theilen G H. Biological behavior of tumors and associated retroviremia in cats inoculated with Snyder-Theilen fibrosarcoma virus and the phenomenon of tumor recurrence after primary regression [J]. Infection and Immunity, 1984, 43(2): 631-636.
- [13] Pedersen N C, Boyle J F, Floyd K, *et al.* An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis [J]. American Journal of Veterinary Research, 1981, 42(3): 368-377.
- [14] Licitra B N, Millet J K, Regan A D, *et al.* Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus [J]. Emerging Infectious Diseases, 2013, 19(7): 1066-1073.
- [15] Chang H W, Egberink H F, Halpin R, *et al.* Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence [J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(7): 1089-1095.
- [16] Porter E, Tasker S, Day M J, *et al.* Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis [J]. Veterinary Research, 2014, 45(1): 49-60.
- [17] Vennema H, Poland A, Foley J, *et al.* Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses [J]. Virology, 1998, 243(1): 150-157.
- [18] Pedersen N C. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008 [J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2009, 11(4): 225-258.
- [19] Hohdatsu T, Izumiya Y, Yokoyama Y, *et al.* Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus [J]. Archives of Virology, 1998, 143(5): 839-850.
- [20] Hegyi A, Kolb A F. Characterization of determinants involved in the feline infectious peritonitis virus receptor function of feline aminopeptidase N [J]. Journal of General Virology, 1998, 79: 1387-1391.
- [21] Dewerchin H L, Cornelissen E, Nauwynck H J. Feline infectious peritonitis virus-infected monocytes internalize viral membrane-bound proteins upon antibody addition [J]. Journal of General Virology, 2006, 87(6): 1685-1690.
- [22] Cornelissen E, Dewerchin H L, Van Hamme E, *et al.* Absence of surface expression of feline infectious peritonitis virus (FIPV) antigens on infected cells isolated from cats with FIP [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 121(1-2): 131-137.
- [23] Gerber J D. Overview of the development of a modified live temperature-sensitive FIP virus vaccine [J]. Feline Pract, 1995, 23(7): 62-66.
- [24] Scott F W. Feline infectious peritonitis: Transmission and epidemiology [C]. New Perspectives on Prevention of Feline Infectious Peritonitis, ed Pollock RVH (SmithKline Beecham Animal Health, Lincoln, NB), 1991: 8-13.
- [25] 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]. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(12): 3180-3184.
- [26] Fanton R W. Field safety studies of an intranasal FIPV vaccine [C]. New Perspectives on Prevention of Feline Infectious Peritonitis, ed Pollock RVH (SmithKline Beecham Animal Health, Lincoln, NB), 1991: 47-50.
- [27] Fehr D, Holzeagel E, Bolla S, *et al.* Evaluation of the safety and efficacy of a modified live FIPV vaccine under field conditions [J]. Feline Pract, 1995, 23(3): 83-88.
- [28] Scott F W, Olsen C W, Corapi W V. Antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection [J]. Feline Pract, 1995, 23(3): 77-80.

启 事

1. 本刊热忱欢迎广大作者、读者积极投稿, 收稿网址: <http://zsyj.cbpt.cnki.net>, 或发送至电子邮箱 E-mail: vetzshi@cau.edu.cn, 本刊从不收取审稿费、稿件处理费等费用。
 2. 本刊不提前收取版面费, 而为文章刊登前一个月方通知作者收取。
 3. 本刊收取版面费只接受作者通过邮局汇款、个人或单位之间银行转账, 收款单位名称及发票公章均为中国农业大学。绝非私人之间通过银行卡结付(收款方绝非个人账户)。
 4. 近年不法分子猖獗, 汇款需谨慎, 以防上当受骗。有问题请拨打本刊编辑部电话(010-62733040) 咨询。
 5. 需要办理订阅 2021 年或补订 2020 年本刊的读者, 可通过邮局向本刊编辑部汇款订购, 2020 年每册 16.00 元, 全年 192.00 元, 2021 年每册 20.00 元, 全年 240.00 元, 不收邮费。
- 特此声明, 谢谢合作!

《中国兽医杂志》编辑部