

猫杯状病毒的进化与致病性研究进展

王洁^{1,2}, 廖均乐^{1,2}, 钱鹏², 陈亚磊², 刘玉秀^{1,2},
习向峰², 范伟³, 张渊魁³, 张许科^{1,2}, 田克恭^{1,2}

1. 河南农业大学动物医学院, 河南 郑州 450002; 2. 国家兽用药品工程技术研究中心, 河南 洛阳 471000;
3. 兆丰华生物科技(南京)有限公司, 江苏 南京 211102

中图分类号: S855.3

文献标志码: B

文章编号: 0529-6005(2021)02-0062-04

猫杯状病毒(Feline calicivirus, FCV)是猫上呼吸道感染疾病主要病原之一,对宠物猫的生命和野生猫科动物的生物多样性产生严重威胁。目前 FCV 仅有 1 个血清型,该病毒 RNA 依赖 RNA 聚合酶的低保真度和高错误率使 FCV 在复制中有较高的基因可塑性,在免疫压力下能较快发生突变,由此造成的免疫逃避是引起猫杯状病毒疫苗免疫失败的主要原因之一。过去 50 多年,猫杯状病毒在免疫压力下随着时间推移突变出多种可引起猫不同临床特征的新毒株,从传统的引起口腔溃疡和上呼吸道症状的毒株,逐渐突变出现引起猫严重下呼吸道症状如肺炎的高致病性毒株、引起猫跛行的毒株和引起猫毒性系统性疾病的毒株等。FCV 基因型众多,对临床诊断和预防带来全新挑战。本文对 FCV 病原学、病毒进化和致病机理等研究进行综述,对临床多变的 FCV 的诊断和预防进行思考,以期对 FCV

的防控提供理论参考。

1 猫杯状病毒分类与基因组

猫杯状病毒为杯状病毒科(Caliciviridae)水疱疹病毒属(*Vesivirus*)成员^[1],引起猫科动物口腔溃疡、气管炎、肺炎等呼吸道症状和慢性胃肠炎等症状,对宠物猫和大型野生猫科动物如老虎、狮子等带来极大危害^[2-4]。FCV 是无囊膜单股正链不分节段 RNA 病毒,直径 35~39 nm,核衣壳呈二十面体对称,基因组约 7.7 kb。FCV 基因组包含 3 个开放性阅读框(Open reading frame, ORF),ORF1 主要编码非结构蛋白 p5、p6、p32、p39、p30、p13(vPg)和 p76 蛋白,即 1 个蛋白酶和 RNA 依赖 RNA 聚合酶^[5]。其中 vPg 蛋白参与病毒的起始翻译和感染,该非结构蛋白的缺失会影响 FCV 的组装。ORF2 编码约 75 kDa 的衣壳蛋白前体,经蛋白酶切除 14 kDa 的前导衣壳蛋白(Leader of the capsid protein, LC)后形成成熟衣壳蛋白 VP1。VP1 蛋白分为 S、P1 和 P2 区域,FCV 中和表位多集中在 P2 区域^[6],VP1 蛋白在病毒致病性、病毒组装和抗原特异性方面起着重要作用。ORF2 包括 A~F 共 6 个区域,其中 A 区高度保守, B、D 区和 F 区相对比较保守, B 区组成病毒的核心结构,含潜在的肉豆蔻化甘氨酸和 ATP/GTP 结合

收稿日期: 2020-07-02

基金项目: 郑洛新自创区创新引领型产业集群专项(2012002111200)

作者简介: 王洁(1995-),女,硕士生,研究方向为猫病毒学与免疫学, E-mail: wangjie95118@163.com

通信作者: 张许科, E-mail: huihongsy@163.com; 田克恭, E-mail: vetvac@126.com

- [27] 杨亚,黄晶,钱俊,等. 多功能心腔内导管移植骨髓干细胞治疗犬心肌梗死 [J]. 中国医学影像技术, 2012, 28: 1615-1618.
- [28] 常学锋,于淼,初贵富,等. 微泡破坏促进骨髓间充质干细胞归巢治疗犬心肌梗死 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(21): 5228-5231.
- [29] 柳淑云,常学锋,刘旭光. 微泡破坏及骨髓间充质干细胞移植治疗犬急性心肌梗死模型的有效性 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(4): 903-906.
- [30] Quimby J M, Webb T L, Randall E, et al. Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: A randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats [J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2016, 18(2): 165-171.

- [31] Quimby J M, Webb T L, Habenicht L M, et al. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: Results of three sequential pilot studies [J]. Stem Cell Research & Therapy, 2013, 4(2): 1-12.
- [32] Da Costa F, Schaefer G, Valle S, et al. Clinical/research abstracts accepted for presentation at AAFP Conference 2018 [J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2019, 21(1): 47-55.
- [33] Zeira O, Asiag N, Aralla M, et al. Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: Safety, feasibility and preliminary clinical findings [J]. J Neuro Inflammation, 2015, 12: 181.

位点; F 区位于结构蛋白羧基端, 位于病毒的表面。B、D 区和 F 区是非中和单克隆抗体的靶点^[8]。C 区和 E 区是高变区, E 区分由 5' 端高变区、中心相对保守区和 3' 端高变区组成。E 区的 5' 端高变区和 C 区多为病毒中和表位区, 该区域的基因多变性是不同 FCV 毒株血清交叉反应低的原因, C、D 区和 E 区基因的突变会影响 FCV 的免疫原性^[9]。FCV B 细胞表位主要位于 E 区中心保守区域和 5' 端高变区^[8], 位于中心相对保守区域的 B 细胞表位是 FCV 可与异源 FCV 毒株血清发生交叉反应的原因。ORF3 编码的次要结构蛋白 VP2 参与病毒的正确组装, 在病毒的复制、成熟、蛋白合成及病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 的合成过程中起一定的作用^[8]。

FCV 感染的细胞中, 除 FCV 病毒基因组外, 还存在若干长度不一的亚基因组。亚基因组参与编码 ORF2 和 ORF3, 5' 端和 3' 端结构与基因组一致^[10]。FCV 复制过程中 RNA 依赖 RNA 聚合酶缺乏校对和低保真度性而具有很强的基因可塑性, 这种易于出错的病毒复制机制使病毒在免疫压力下快速做出反应, 易于突变逃避机体免疫清除^[11], 产生多个基因型 FCV, 不同基因型之间的同源性为 75.9%~98.7%^[12]。不同基因型 FCV 感染引起的主要临床症状有一定的差异, 并逐渐复杂化。随着时间推移, 感染猫杯状病毒的临床症状从典型的口腔溃疡等上呼吸道症状, 逐渐出现下呼吸道疾病 (如严重肺炎)、FCV 相关关节炎, 以及 2000 年前后出现的高致病性 FCV (Virulent-systemic calicivirus-es, VS-FCV) 引起的发热、口腔溃疡、皮肤溃疡、黄疸、肝等组织坏死的毒力系统性疾病, 死亡率高达 67%^[13]。

2 引起上呼吸道感染的猫杯状病毒

1957 年 Fastier 等^[14] 在新西兰首次从猫病料中分离到 FCV, FCV 主要在上呼吸道和口腔部位组织细胞中复制, 引起眼鼻分泌物和口腔、鼻镜溃疡, 发病率高但死亡率低, 多为良性经过。因 FCV 基因易变异, 不同地区流行毒株的基因型均不同, 不同毒株的 FCV 衣壳变异区的差异达到 20%~40%^[15]。中国广西省流行的引起猫上呼吸道症状的 FCV 毒株 (GX01-43 株) 的 ORF1、ORF2 和 ORF3 基因与疫苗 F9 株基因氨基酸相似性分别为 90.5%、86.5% 和 88.8%^[16]。巴西流行的可致上呼吸道症状的 FCV 毒株与疫苗 F9 株之间 ORF2 中 C 区和 E 区的核苷酸序列差异值均为 0.8%~50.1%^[17]。

3 引起肺炎的猫杯状病毒

FCV 不断进化变异出毒力更强、组织嗜性从上呼吸道扩散到下呼吸道的毒株。20 世纪 70 年代, FCV 感染猫出现肺炎症状, FCV 相关的轻度肺炎被认为是 FCV 典型症状, 重度肺炎是 FCV 非典型症状。FCV 自然引起肺炎的相关报道很少, 目前对 FCV 引起肺损伤的相关了解大多来自于试验研究。有研究称, FCV 导致肺部感染是由于试验中使用细胞培养中复制的高含量病毒对幼猫进行滴鼻感染^[18]。有一些学者提出不同的声音: 在自然感染的猫中严重肺炎可能并不罕见^[19]。1995 年美国密苏里州暴发了由肺炎型 FCV 21223 株引起的疫情, 流行毒株 FCV 21223 株与疫苗 F9 株基因组序列有显著差异 (20.4%)。系统进化分析发现, FCV 21223 株与 VS-FCV 毒株的 E 区序列无显著相关性, 且未在 FCV 21223 株序列上发现 VS-FCV 毒株的特异性突变; FCV 21223 株与经典 FCV 毒株氨基酸序列相似性达 51% 及以上^[20]。

4 引起跛行的猫杯状病毒

目前有多株 FCV 分离株被证实与感染猫产生跛行症状有关, 如英国的 F65 株和加拿大的 LLK 株、2280 株。早在 1960 年 Crandell 等^[21] 从美国有跛行症状猫中分离获得 1 株 FCV, 并首次复制出跛行综合征猫感染模型。1997 年, Geissler 等^[22] 研究发现, FCV 导致跛行症状与病毒衣壳蛋白序列无明显关联。系统进化分析显示, 猫杯状病毒 2280 株与其余 FCV 分离株处于不同分支上, 而猫杯状病毒 LLK 株与其他导致呼吸道症状 FCV 流行株分散在一起, 2280 株和 LLK 株与其他 FCV 分离株之间有 34%~46% 核苷酸是可变的, 但核苷酸插入现象少见。1999 年, Glenn 等^[23] 序列分析后发现 F65 株、LLK 株和 2280 株与其他 FCV 分离株在基因序列和系统发育上无明显统一差异。有研究利用肺炎型 255 株感染猫出现了跛行症状, 表明 255 株改变了原有组织嗜性, 获得了感染关节的能力, 但该变化是否稳定仍需进一步研究^[24]。目前, FCV 导致猫跛行的遗传标记尚未找到。少数猫接种 FCV 疫苗后出现 FCV 型跛行综合征, 研究发现部分与 FCV 疫苗毒株的进化相关^[25]。

5 引起全身性疾病猫杯状病毒

1998 年以来, 美国和欧洲^[13, 26-27] 相继出现以高死亡率及系列临床症状为特点的高毒性 FCV 毒株

(VS-FCV)。2000 年, Pedersen 等^[13]分离的 VS-FCV 可引起猫严重全身性系统疾病, 包括发热(40℃以上)、精神不振、呼吸道症状(眼鼻分泌物、口腔溃疡和结膜炎)、肺炎、脱发、皮下水肿、不同程度的皮肤溃疡等症状, 部分感染猫还会出现黄疸及病毒血症。VS-FCV 感染猫潜伏期短, 病死猫剖检可见多器官病变(如肺炎、胰腺炎和肝坏死等)。可引起猫上呼吸道症状和肺水肿、胰腺炎和肝坏死的上海 VS-FCV 分离株 FCV SH/14 株的 VP1 基因与其他 VS-FCV 毒株同源率为 84%~88.5%^[23]。猫源 FCV SH/14 株与虎源 TIG-1 株有较高相似性, TIG-1 株对猫有较高发病率和致死率, 表明 FCV 可在猫科动物间传播。对 57 株 FCV 衣壳蛋白 E 区氨基酸序列分析显示^[24], 部分 VS-FCV 毒株出现特征性氨基酸, 即 438T、448A 和 465S, 但某些经典毒株也有出现; 系统发育分析显示, VS-FCV 无明显独立的分支, VS-FCV 在 E 区高变异区域较短, 表明突变是在不同 FCV 毒株进化过程之中逐渐积累而成, 极少具有统一性; 多元对应分析显示, VS-FCV 与经典 FCV 相比可能有以下特征: 第 438 位氨基酸是具有脂肪链的非极性氨基酸、第 440 位和第 452 位不是小氨基酸、第 448 位是带极性的带正电荷的氨基酸、第 455 位不是带负电荷的氨基酸、第 465 位是极性氨基酸以及第 492 位是一种小氨基酸。

6 猫杯状病毒的致病机理

FCV 感染宿主首先吸附到细胞表面与受体结合, 通过内吞作用穿过细胞膜, 经过与 pH 相关的病毒脱壳过程, 病毒 RNA 进入细胞质进行复制。猫连接黏附分子-A(Feline junctional adhesion molecule, fJAM-A) 是 FCV 的细胞受体, 介导 FCV 在细胞表面附着和感染性病毒进入, 也是杯状病毒科所有病毒成员的主要细胞受体^[60]。

FCV 通过口腔、鼻腔和眼部分泌物排出, 也可在感染猫血液、尿液和粪便中检出。口腔是 FCV 主要复制部位, 口腔溃疡是 FCV 典型症状, 病毒入侵引起上皮细胞坏死, 舌头边缘首先出现水泡, 随后破裂形成溃疡, 鼻镜处也会出现溃疡。在口腔及鼻镜病变部位上覆上皮坏死和中性粒细胞浸润, 通常 2~3 周愈合^[13]。FCV 引起的肺炎最初由局灶性肺炎所致, 导致急性渗出性肺炎, 然后又发展成一种增生性间质性肺炎。Kahn 等^[61]用 255 株感染猫, 感染首日即在肺泡壁细胞检测特异性病毒荧光, 急性炎症后肺泡巨噬细胞增多, 胞浆内检测到病毒。随后在支气管和细支气管上皮中也观察到

特异性病毒荧光。FCV 感染跛行主要为急性滑膜炎、滑膜增厚和关节内滑液量增加, 伴有纤维性渗出和巨噬细胞增多。VS-FCV 与经典 FCV 不同, 多种组织器官出现病变, 包括肝脏(肝坏死)、胰腺(胰腺炎)和皮肤(皮肤水肿和溃烂)等, 感染猫死亡率高达 50% 以上^[13,32]。VS-FCV 感染的发病机制尚不清楚, 可能包括病毒变异、免疫介导因素以及环境和管理因素。

7 防控

FCV 在世界范围流行, 感染猫持续排毒数月至数年不等。目前, FCV 防控的主要措施是疫苗, FCV 疫苗分为弱毒活疫苗和灭活疫苗, 国内所用大多为 FCV 灭活苗。FCV 毒株抗原的易变性导致疫苗免疫效果不佳, 不能对所有流行毒株完全保护, 不能有效预防病毒传播, 仅能减轻临床症状。Sato 等^[62]研究显示, 现有疫苗对同源型 FCV 毒株保护效力较好, 但对异源型 FCV 不能提供有效的免疫保护。另外, FCV 毒株之间交叉反应性较差, 疫苗免疫后产生抗体对流行毒株的中和率较低。近年来, VS-FCV 毒株的出现极大增加了临床对 FCV 新型疫苗的迫切感。有免疫史的猫对 VS-FCV 仍易感, 研制 FCV 新型疫苗应考虑 FCV 基因型众多的问题, 可多分离不同地区 FCV 野毒株, 采用疫苗株阳性血清与其进行交叉保护性试验, 将试验数据作为疫苗株筛选的依据, 提高 FCV 疫苗对本国野毒株的交叉保护率。

8 展望

FCV 通过持续积累基因突变一直进化, 进而不同病毒株对宿主组织嗜性不断深入, 从而导致致病性的改变。利用反向遗传学研究病毒-宿主之间感染性与基因之间的关联, 进而利用基因手段研发基因重组疫苗和 DNA 疫苗。此外, 探索 VS-FCV 的相关遗传标记和明确分子致病机制仍是目前 FCV 需要不断深入探究的方向, 以期早日研发出针对 VS-FCV 的新型疫苗。

参考文献:

- [1] 扈荣良. 现代动物病毒学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 1220-1222.
- [2] 高玉伟, 夏咸柱, 扈荣良, 等. 猎豹与虎猫杯状病毒的分离及其超变区基因比较研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(3): 19-22.
- [3] 范泉水, 夏咸柱, 邱薇, 等. 老虎感染猫传染性鼻-结膜炎病毒

- 的研究 [J]. 中国病毒学, 2000, 15(4): 62-67.
- [4] Kadoi K, Kiryu M, Iwabuchi M, *et al.* A strain of calicivirus isolated from lions with vesicular lesions on tongue and snout [J]. New Microbiol, 1997, 20(2): 141-148.
- [5] Geissler K, Schneider K, Truyen U. Mapping neutralizing and non-neutralizing epitopes in the capsid protein of feline calicivirus [J]. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2002, 49(1): 55-60.
- [6] Ossiboff R J, Zhou Y, Lightfoot P J, *et al.* Conformational changes in the capsid of a calicivirus upon interaction with its functional receptor [J]. J Virol, 2010, 84(11): 5550-5564.
- [7] Horimoto T, Takeda Y, Iwatsuki-Horimoto K, *et al.* Capsid protein gene variation among feline calicivirus isolates [J]. Virus Gene, 2001, 23(2): 171-174.
- [8] Radford A D, Willoughby K, Dawson S, *et al.* The capsid gene of feline calicivirus contains linear B-cell epitopes in both variable and conserved regions [J]. J Virol, 1999, 73(10): 8496-8502.
- [9] Sosnovtsev S V, Belliot G, Chang K O, *et al.* Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions [J]. J Virol, 2005, 79(7): 4012-4024.
- [10] Herbert T P, Brierley I, Brown T D. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation [J]. J Gen Virol, 1997, 78(Pt 5): 1033-1040.
- [11] Domingo E, Menendez A L, Holland J J. RNA virus fitness [J]. Rev Med Virol, 1997(7): 87-96.
- [12] 李响. 吉林省宠物猫传染性鼻结膜炎病原学调查 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [13] Pedersen N C, Elliott J B, Glasgow A, *et al.* An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus [J]. Vet Microbiol, 2000, 73(4): 281-300.
- [14] Fastier L B. A new feline virus isolated in tissue culture [J]. Am J Vet Res, 1957, 18(67): 382-389.
- [15] Radford A D, Bennett M, McArdle F, *et al.* The use of sequence analysis of a feline calicivirus (FCV) hypervariable region in the epidemiological investigation of FCV related disease and vaccine failures [J]. Vaccine, 1997, 15(12-13): 1451-1458.
- [16] 何平, 杨文娟, 李法凯, 等. 猫杯状病毒的分离鉴定及其全基因组的序列分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2016, 24(1): 1-6.
- [17] Henzel A, Sáe Silva M, Luo S, *et al.* Genetic and phylogenetic analyses of capsid protein gene in feline calicivirus isolates from Rio Grande do Sul in southern Brazil [J]. Virus Res, 2012, 163(2): 667-671.
- [18] Gaskell R M, Dawson S, Radford A. Feline respiratory disease [M]. In: Greene, C. E. (Ed.). Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th ed. Saunders Elsevier, 2012: 151-162.
- [19] Pesavento P A, Chang K O, Parker J S. Molecular virology of feline calicivirus [J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2008, 38(4): 775-786.
- [20] Prikhodko V G, Sandoval-Jaime C, Abente E J, *et al.* Genetic characterization of feline calicivirus strains associated with varying disease manifestations during an outbreak season in Missouri (1995-1996) [J]. Virus Genes, 2014, 48(1): 96-110.
- [21] Crandell R A, Madin S H. Experimental studies on a new feline virus [J]. Am J Vet Res, 1960, 21(83): 551-556.
- [22] Geissler K, Schneider K, Platzer G, *et al.* Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestations [J]. Virus Res, 1997, 48(2): 193-206.
- [23] Glenn M, Radford A D, Turner P C, *et al.* Nucleotide sequence of UK and Australian isolates of feline calicivirus (FCV) and phylogenetic analysis of FCVs [J]. Vet Microbiol, 1999, 67(3): 175-193.
- [24] Terwee J, Lauritzen A Y, Sabara M, *et al.* Comparison of the primary signs induced by experimental exposure to either a pneumotropic or a 'limping' strain of feline calicivirus [J]. Vet Microbiol, 1997, 56(1-2): 33-45.
- [25] Church R E. Lameness in kittens after vaccination [J]. Vet Rec, 1989, 125(24): 609.
- [26] Schorr-Evans E M, Poland A, Johnson W E. An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England [J]. J Feline Med Surg, 2003, 5(4): 217-226.
- [27] Battilani M, Vaccari F, Carelle M S, *et al.* Virulent feline calicivirus disease in a shelter in Italy: A case description [J]. Res Vet Sci, 2013, 95(1): 283-290.
- [28] Guo H, Miao Q, Zhu J, *et al.* Isolation and molecular characterization of a virulent systemic feline calicivirus isolated in China [J]. Infect Genet Evol, 2018, 65: 425-429.
- [29] Brunet S, Sigoillot-Claude C, Pialot D, *et al.* Multiple correspondence analysis on amino acid properties within the variable region of the capsid protein shows differences between classical and virulent systemic feline calicivirus strains [J]. Viruses, 2019, 11(12): 1090.
- [30] Ossiboff R J, Parker J S. Identification of regions and residues in feline junctional adhesion molecule required for feline calicivirus binding and infection [J]. J Virol, 2007, 81(24): 13608-13621.
- [31] Kahn D E, Gillespie J H. Feline viruses: Pathogenesis of picornavirus infection in the cat [J]. Am J Vet Res, 1971, 32: 521-531.
- [32] Coyne K P, Jones B R, Kipar A, *et al.* Lethal outbreak of a disease associated with feline calicivirus infection in cats [J]. Vet Rec, 2006, 158(16): 544-550.
- [33] Sato H, Sehata G, Okada N, *et al.* Intranasal immunization with inactivated feline calicivirus particles confers robust protection against homologous virus and suppression against heterologous virus in cats [J]. J Gen Virol, 2017, 98(7): 1730-1738.