

貂、狐、貉源犬瘟热病毒分离株 *H* 和 *N* 基因的遗传多样性分析

王君玮^{1,2}, 姜平^{1*}, 王志亮^{2*}, 张维², 李林², 赵永刚²

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266114)

摘要: 为研究鼬科动物犬瘟热病毒 (CDV) 毒株的变异特性, 对来自不同地区的貂、狐、貉的 5 个 CDV 分离株 (其中 HD-m、LN-m 为貂源, HTP-r、THD1-r 为貉源, HB-f 为狐源) 和 1 个 CDV 国内弱毒疫苗株 (vCh) 的 *N* 基因和部分 *H* 基因进行了核苷酸测序, 并构建系统发生树。结果表明, 5 个分离株之间 *H* 基因核苷酸序列同源性均达到 97.5% 以上, 而 *N* 基因为 94.5% ~ 99.8%。vCh 与 5 个分离株的 *H* 基因和 *N* 基因核苷酸序列同源性普遍较低 (*H* 基因: 90.5% ~ 91.8%; *N* 基因: 90.9% ~ 93.5%), 而与国外疫苗株 vCon 和 vOnder 的 *H* 基因核苷酸同源性达 96.8% 和 97.2%。分离株之间 *H* 蛋白氨基酸同源性差别不大 (97.1% ~ 100%), 而 *N* 蛋白氨基酸同源性差别较大 (91.6% ~ 100%)。5 个 CDV 分离株与 vCh 疫苗株 *H* 蛋白和 *N* 蛋白同源性均普遍较低, *H* 蛋白为 89.7% ~ 91.8%, *N* 蛋白为 92.8% ~ 96.8%。vCh 与 vOnder、vCon 有很高的同源性, 其 *H* 蛋白氨基酸同源性分别为 97.1% 和 95.6%, vCh 与 vOnder *N* 蛋白氨基酸同源性达 97.3%。结果显示, 最近犬瘟热的流行和免疫失败现象的发生与国内所用疫苗毒株和野毒株的遗传关系甚远有关。

关键词: 犬瘟热病毒; *H* 基因; *N* 基因; 同源性; 遗传分析

中图分类号: S858.292; S858.92 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2007) 04-0108-06

Phylogenetic characterization of *H* gene and *N* gene of canine distemper virus detected in naturally infected raccoon dogs, foxes and minks

WANG Jun-wei^{1,2}, JIANG Ping^{1*}, WANG Zhi-liang^{2*}, ZHANG Wei², LI Lin², ZHAO Yong-gang²

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. China Animal Health and Epizootology Centre, Qingdao 266114, China)

Abstract: To characterize the variability of recent field isolates of 5 canine distemper virus (CDV) strains from different hosts and geographical areas, nucleotide sequence analysis of the *H* gene and the *N* gene encoding the haemagglutinin and the nucleocapsid protein were conducted, respectively. Pronounced differences between 5 field isolates were revealed in comparison to the attenuated vaccine strains vCh, vCon and vOnder. Phylogenetic trees were constructed with *H/N* gene of 5 CDV isolates, vaccine strain vCh and 12/11 CDV strains in GenBank. Results: The homology of nucleic acid sequences among the 5 isolates was high (*H* gene: 97.6%–99.9% and *N* gene: 94.5%–99.8%). While the homology of nucleic acid sequences between vCh and 5 isolates was low (*H*: 90.5%–91.8%; *N*: 90.9%–93.5%), but high with foreign vaccines, vCon (*H*: 96.8%) and vOnder (*H*: 97.2%). The difference of amino acid homology of H protein among 5 isolates was not high (97.1%–100%), but high of the N protein between 5 isolates (91.6%–100%). All the homology of H protein and N protein between vCh and 5-isolates were low, with H protein 89.7%–91.8% and N protein 92.8%–96.8%. vCh, vOnder and vCon had high homology of amino acid both H protein and N protein (H protein 97.1% and 95.6%, respectively, N protein of vCh and vOnder 97.3%). Conclusion: the canine distemper prevalent in several provinces of China may be due to the far heredity between vaccine strain and field strains.

Key words: canine distemper virus; *H* gene; *N* gene; homology; phylogenetic analysis

犬瘟热病毒 (canine distemper virus, CDV) 是犬科和鼬科动物最重要的病毒性疾病的病原, 也可以感染其他动物, 如熊猫、熊、狮子和老虎等, 世界各地均有发生^[1-2]。目前, 世界毛皮动物饲养国家多采用疫苗免疫接种控制犬瘟热。我国的犬瘟热防治由于疫苗质量、防疫及防疫防控工作不力, 以及频繁

收稿日期: 2006-09-28

基金项目: 青岛市科技发展计划项目 (05-2-JC-78)

作者简介: 王君玮, 副研究员, 博士研究生, 从事动物疾病诊断技术和基因工程疫苗研究, E-mail: yffs2000@sina.com。

* 通讯作者

引种、倒种等使狐狸、水貂、貉群免疫失败现象屡屡发生, 经济损失惨重。当前所用疫苗能否有效地保护新流行野毒株的感染成为兽医工作者争论和研究的热点。

CDV 基因长约 15.7 kb, 3'到 5'依次为 3'端前导序列及编码核衣壳蛋白 (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) 的相关基因和 5'端引导序列。H 蛋白是麻疹病毒属蛋白中最容易发生变异的蛋白之一, 常用来评估 CDV 毒株间的遗传变化^[3-5]。N 蛋白是保守性最强的免疫原性蛋白, 在病毒装配、转录和复制过程中起调控作用, 宿主受病毒感染时可引起强烈的抗体反应。笔者通过流行病学、临床症状、剖检病变和 CDV 特异的 TaqMan 实时荧光 RT-PCR 技术, 对 2006 年 6 月至 10 月在山东及其周边各省流行的 CDV 感染进行了确诊。从中选择具有代表性的 5 个地方分离株和目前在市场广泛使用的 CDV 弱毒苗毒株克隆其 *H* 基因和 *N* 基因并测序, 构建 CDV 毒株的系统进化发生树, 以期从分子水平上分析目前所用疫苗株与流行毒株之间的可能差异。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种、质粒 *E. coli* Competent Cell DH5 α 、pMD18-T simple vector, 购自 TaKaRa; pGEM-T Easy Vector (Amp^r), 购自 Promega 公司。

1.1.2 毒株、细胞 Vero 细胞由中国动物卫生与流行病学中心保存。CDV 弱毒疫苗株 vCh 购自国内某毛皮动物疫苗生产厂。取 CDV 弱毒疫苗株接种长满单层的 vero 细胞, 5% CO₂ 37 °C 培养, 待出现约 80% CPE 时 (约 48~72 h) 收获, 反复冻融 3 次后 -20 °C 保存备用。

1.1.3 主要试剂、设备 MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0, Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0, AMV、HPR-I、*Taq* 酶, *Pst* I、*Nco* I, 均为 TaKaRa 公司产品; High Pure Viral RNA Kit, Roche 公司产品; Taqman 探针和荧光 PCR 引物, 中国动物卫生与流行病学中心保存。MJ CyclorTM Thermal Cyclor PCR 仪、iCyclorTM Optical Module 荧光定量 PCR 仪, 购于 Bio-RAD 公司。

1.2 引物的设计与合成

参照 GenBank 已发表的 CDV Onderstepoort 毒株 (简称 vOnder) 全基因组序列 (GenBank 序列号: AF378705), 应用 Primer Premier 5.0 软件, 设计分别针对 *H* 基因和 *N* 基因的特异性扩增引物, 由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。*H* 基因的引物: A₁: 5'-taccaagacaaggtgggtgccttcta-3'; A₂: 5'-gagaccartg-caggcaccatccagg-3'。*N* 基因的引物: B₁: 5'-cagacaaagtggctaagg-3'; B₂: 5'-ctgagggccttgaggcatt-3'。

1.3 病料采集和处理

2006 年 6 月至 10 月, 采集或送检的貉、狐狸、水貂等 CDV 可疑病料 130 余份, 经 BIT RAPID CDV 检测试剂盒 (韩国 BIOINDIST CO. LTD 生产) 检测为 CDV 阳性。从阳性病料中选取有代表性的不同区域的病料 (脾脏和淋巴结混合) 5 份, 采用笔者建立的 TaqMan 一步法实时定量 RT-PCR 方法 (待发表) 分别对 5 份病料进一步作特异性检测。5 份病料均按照 1:5 (体积比) 的比例加 PBS 研磨后冻融 3 次, 4 °C、6 000 r·min⁻¹ 离心, 取上清液备用。

1.4 RNA 提取与 RT-PCR

用 High Pure Viral RNA Kit 从上述上清液和 CDV 弱毒苗株 vCh 细胞培养物中提取病毒的 RNA, -80 °C 保存备用。采用一步法 RT-PCR 扩增 5 份阳性样品和 CDV 弱毒苗株的 *H* 基因及 *N* 基因片段。

1.5 目的基因的克隆与鉴定

将各 RT-PCR 产物通过凝胶电泳获得目的条带, 用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒进行回收、纯化后与 pMD18-T simple vector 按照要求进行连接 (16 °C, 4 h), 转化至含 100 μ g·mL⁻¹ Amp、20% IPTG、2% X-gal 的 LB 平板, 进行蓝/白斑筛选; 挑取生长良好的单个白色菌落接种于含 100 μ g·mL⁻¹ Amp 的 LB 培养基中进行增菌培养; 按碱裂解法^[6]提取质粒。将筛选的阳性重组质粒应用 *Hind* III + *Xba* I 双酶切鉴定, 在 1% 琼脂糖凝胶电泳上进行检测; 同时, 以上述重组质粒为模板, 应用相同的引物对其进行扩增, 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6 目的基因的核苷酸序列测定与系统发育进化树分析

挑选上述经双酶切和 PCR 鉴定均为阳性的重组质粒, 送宝生物工程 (大连) 有限公司测序。参照

文献 [7] 的方法, 利用 DNASTAR 软件将 5 个 CDV 分离毒株、CDV 弱毒疫苗株 vCh 和 GenBank 中的 CDV 不同国家、地区代表株的 *H* 基因和 *N* 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列作同源性比较并绘制系统进化发生树, 采用 Totun Hein 方法分析各毒株之间 *H* 和 *N* 蛋白的差异情况。

2 结果与分析

2.1 CDV 分离株和弱毒疫苗株 *H* 基因和 *N* 基因的 RT-PCR 扩增、克隆和鉴定

5 个分离株样品经实时定量荧光 RT-PCR 方法检测, 均获得较强的荧光信号 (Ct 值为 18.9 ~ 23.5), 进一步确诊为 CDV 阳性。将上述 5 份阳性样品 RNA 和疫苗弱毒株 vCh RNA 分别以 CDV A₁ 和 A₂ 及 B₁ 和 B₂ 引物进行特异性扩增, 分别获得 1 093 bp 和 1 857 bp 的产物 (图 1)。将回收产物分别与 PGEM T-Vector 连接、转化, 并经 PCR 和 *Pst* I 与 *Nco* I 双酶切鉴定, 筛选阳性克隆送宝生物 (大连) 有限公司测序。

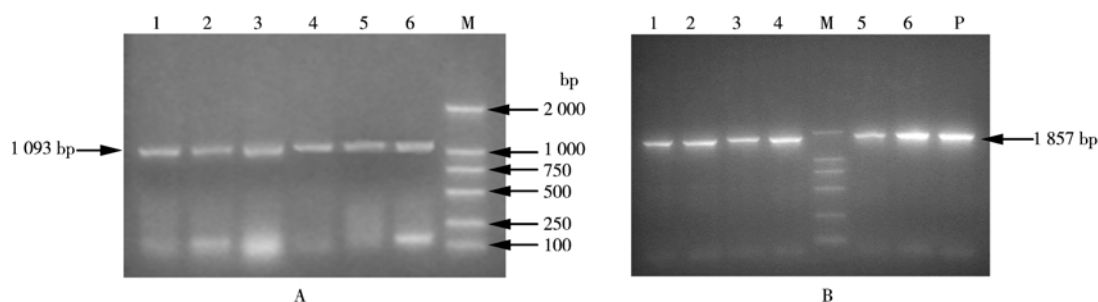


图 1 各毒株 *H* 基因 (A) 和 *N* 基因 (B) 的 RT-PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 RT-PCR products electrophorogram for *H* gene (A) and *N* gene (B) of isolates

1 ~ 5: 被检样品 Test sample; 6: vCh; M: DL2000; P: CDV 阳性对照 Positive control

2.2 各毒株 *H* 基因的核苷酸以及推导的氨基酸序列同源性比较

对 *H* 基因核苷酸序列分析表明, 5 个分离株之间核苷酸序列同源性均达到 97.5% 以上。HTp-r 与 THD1-r 的序列同源性最高 (99.9%)。二者与 HD-m、HB-f、LN-m 也有较高的核苷酸序列同源性, 为 98.1% ~ 98.8%。国内弱毒疫苗 vCh 株与分离株的核苷酸序列同源性在 90.5% ~ 91.8% 之间, 而与国外 CDV 弱毒疫苗株 vCon 和 vOnder 的核苷酸同源性高, 达到 96.8% 和 97.2%。2 个国外疫苗株同源性为 98.6% (表 1)。

表 1 CDV *H* 基因核苷酸和推导的氨基酸序列同源性

Table 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence identities of CDV *H* gene fragments %

毒株 Strains	分离株 Isolates					疫苗株 Vaccine		
	HD-m	HB-f	HTp-r	LN-m	THD1-r	vCon	vOnder	vCh
HD-m		97.9	99.1	97.4	99.1	90.0	91.5	91.8
HB-f	98.0		98.2	97.1	98.2	88.8	90.3	90.6
HTp-r	98.8	98.2		97.6	100	89.7	91.2	91.5
LN-m	98.0	97.6	98.2		97.6	87.9	89.4	89.7
THD1-r	98.7	98.1	99.9	98.1		89.7	91.2	91.5
vCon	91.4	90.4	91.0	90.1	90.9		97.9	95.6
vOnder	92.0	91.0	91.6	90.7	91.5	98.6		97.1
vCh	91.8	90.8	91.4	90.5	91.3	96.8	97.2	

注: 1) 上半部分为 8 个毒株之间推导的氨基酸序列同源性; 下半部分为核苷酸序列同源性。Upper is the amino acid aequence homology deduced from 8 strains. Under is their nuclear homology.

2) HD-m 分离自水貂, HTp-r、THD1-r 分离自貉群。vCh 为目前在国内养殖场广泛使用的弱毒疫苗株。vCon、vOnder 为国外疫苗株。HD-m is isolated from mink. HTp-r, THD1-r isolated from raccoon dogs. vCh is attenuated vaccine strain used broadly in fur-bearing animal populations in China. Both vCon and vOnder are foreign vaccine strains.

从氨基酸序列看, 分离株之间 *H* 蛋白的氨基酸序列同源性较高, 而与 3 个疫苗株的同源性低。HTp-r 与 THD1-r 的 *H* 蛋白氨基酸序列同源性为 100%, 而与其他毒株间同源性差别大 (87.9% ~ 99.1%)。5 个 CDV 分离株与 vCh 株同源性普遍较低, 为 89.7% ~ 91.8%。vCh 株与 vOnder、vCon 有着很高的同源性, 分别为 97.1%、95.6% (表 1)。

从图 2 可以看出，进行比较的分离株 H 蛋白潜在的 N-联糖基化位点为 3 个，其中 1 个与 vOnder、vCon 和 vCh 弱毒疫苗株完全相同，但有 2 个是 vOnder 株所没有的。vCh 株除 294 位的 N-联糖基化位点与分离株不同外，其余 2 个与分离株完全相同。5 个分离株的 3 个糖基化位点完全相同，而与 vCh 疫苗株有 1 个不同。

Majority	ARANSSKLSLVTEEQGGRRPPYLLFVLLILLIGILALLAIVTGRVHFQVSTSNMEFSRLLKEDMEKSEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDEIG	
vChP...H.....V.....	89
vOnderT.....H.....V.....	89
vConT.....H.....V..V.....	89
LN-mER.....	89
HB-fT.....	89
HD-m	89
HTp-r	89
THD1-r	89
Majority	LRLPQKLEIKQFILQKTNFFNPNREFDFRDLHWICINPPSKIKVNFNTNYCDTVGVKKSIAAANPIILSALSARGARDIFPPYRCSGATT	
vChV.....E.I.IR.....L.....G.S.....	178
vOnderV.....ESI.IR.A.....L.....G.S.....H.....	178
vCon	S.....V.....ESI.IR.A.....L.....P.G.S.....H.....	178
LN-mHL.....	178
HB-fK.....MG.....	178
HD-mW.....	178
HTp-r	178
THD1-r	178
Majority	SVGRVPPLSVLSMSLISRTSEIINMLTAISDGVYKTYLLVVDYIEGEFDSQKIRVFEIGFIKRWLNDMPLLQTTNVMVLPETSKAKV	
vCh	...K.....T.....D.R...T.E.....N.....	267
vOnder	...K.....D.R...T.E.....N.....	267
vCon	...K.....A.D.R...T.E.....S.....N.....	267
LN-mM.....	267
HB-fM.....	267
HD-m	267
HTp-rN.....	267
THD1-rN.....	267
Majority	CTIANGELTLASLCVDESTVLLYHDSNGSQDGLVVTLGIFGATPMDQVEEVIPIAHPSVERIHIITNHRGFI	
vChE.....R.....HI...V...M.K.....LK	339
vOnderE.....S.....W...HI...V...M.K.....	339
vConE.....S.....T...HI...V...M.K.....	339
LN-mN.....	339
HB-fN.....	339
HD-m	339
HTp-rN.....	339
THD1-rN.....	339

图 2 自分离株推导的 CDV H 蛋白的部分氨基酸序列

Fig. 2 Part amino acid sequence for H protein deduced from CDV isolates

图中仅显示与大多数氨基酸序列不同的氨基酸。N-联糖基化位点 (N-X-S/T)，以阴影显示。Here displays the amino acid which are different from the amount of amino acid sequence only. N-X-S/T are displayed by hatching.

2.3 CDV 毒株 H 基因系统发育进化树

从 CDV 系统进化树 (图 3) 可以看出，12 个参考毒株依次分布于 7 个分支中，各毒株间遗传关系与报道一致^[3,8]。5 个分离株中，THD1-r 和 HTp-r 同位于一个小分支，二者与 HD-m 又构成一次级分支，然后与 HB-f 和 LN-m 株构成的小分支以及参考株 raccoon dog Japan 共同分布在一个较大分支中。5 个分离毒株在该分支中的分布十分集中，和参考株 raccoon dog Japan、giant panda China 的遗传关系最近。参考株 mink Danish、01-2690 raccoon USA、ferrest German 以及 111 03BH Italy 共同构成另一主要分支，与分离株的分支具有相对较近的亲缘关系。而 vCh 与 vOnder、vCon 以及弱毒疫苗株 vaccine dog Japan 共同构成另一较大的分支，提示 4 个疫苗株之间有着非常近的遗传关系。

2.4 各毒株 N 基因的核苷酸以及推导的氨基酸序列同源性比较

CDV N 基因核苷酸序列分析表明，5 个分离株之间核苷酸序列同源性均达到 94.5% 以上，与 H 基因类似，HTp-r 与 THD1-r N 基因的核苷酸序列同源性最高，达 99.8%。二者与 HD-m 和 LN-m 的也有较高的同源性，说明 CDV 野毒株基因在相同区域非常相近。HD-m 和 LN-m 发病区域相距较远但具有较高的同源性，但与 HB-f 具有相对较低的序列同源性，提示野毒株在易感动物上可能存在种属差异。vCh 与 5 个分离株的 N 基因核苷酸序列同源性普遍较低 (90.9% ~ 93.5%)，而与国外 CDV 弱毒疫苗株 vOnder 的同源性高，达到 97.1%。从 N 蛋白氨基酸序列看，分离株之间除 HTp-r、THD1-r 与 HD-m 氨基

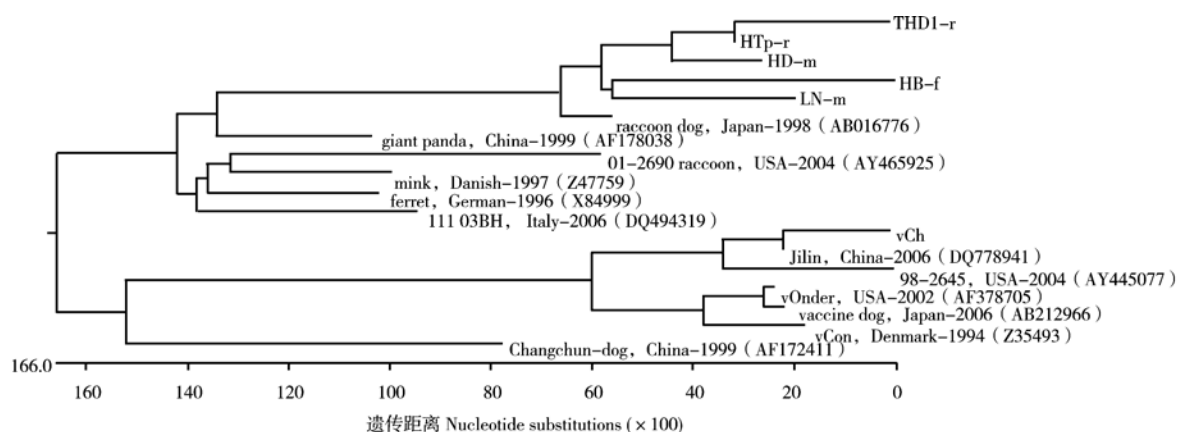


图 3 CDV *H* 基因的系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree for part *H* gene sequences of CDV

酸序列同源性较高 (99.0% 以上) 外, 其他分离株之间氨基酸序列同源性较低 (91.6% ~ 96.4%)。HTP-r、THD1-r 和 HD-m 与 vCh、vOnder 之间, 以及 2 个疫苗株间氨基酸序列也有较高的同源性 (96.8% ~ 97.7%), 而另外 2 个分离株与上述 3 个分离株及疫苗株间同源性较低 (92.8% ~ 95.8%)。

2.5 CDV 毒株 *N* 基因系统发生进化树

从 CDV *N* 基因系统发育进化树 (图 4) 可以看出, 5 个分离株中, THD1-r、HB-f 和 HTP-r 同位于一个小分支。LN-m 与 HD-m 构成另一小分支后, 与新疆分离株 XinJ-2003 同位于一小分支上, 然后与另 3 个分离株 THD1-r、HB-f 和 HTP-r 共在一个较大分支中。但与 vCh 及 vOnder 存在较远的亲缘关系。vCh 与 vOnder 较近, 与其他参考株距离较远, 说明二者有非常近的遗传关系。

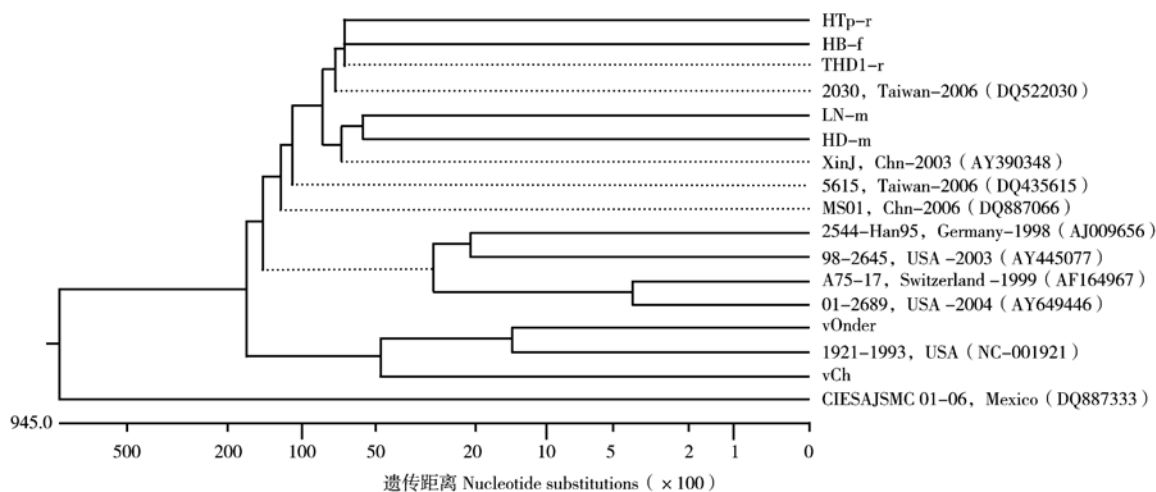


图 4 CDV *N* 基因的系统发生树

Fig. 4 Phylogenetic tree for complete *N* gene sequences of CDV

3 讨论

本研究发现分离株中 HTP-r 和 THD1-r 亲缘关系最近, 仅在第 203 位有 1 个碱基不同, HTP-r 为 C, 而 THD1-r 为 T。其次是 HD-m、HB-f、LN-m。对 *H* 基因的系统发育树分析表明, 5 个分离株与目前国内养殖场普遍使用的弱毒株 vCh 及国外疫苗株 vOnder、vCon 亲缘关系甚远。

Iwatsuki 等^[9]认为 *N*-联糖基化位点可能影响 H 蛋白抗原性, 目前国内弱毒疫苗株制备的疫苗不能提供有效的免疫保护可能与野毒株的 *N*-联糖基化位点不同有关。vOnder 株是从 30 年代北美爆发 CD 的狐狸病料中分离致弱的减毒活苗。受免疫、动物适应以及生态环境的长期作用, CDV 野毒株的抗原性可能发生了较大变异。因此, 目前所用的 CDV 疫苗株可能已经不能对所有的 CDV 流行株产生有效的保护。日本东京地区 2 个动物医院的调查表明, 被诊断为 CD 的犬中, 有 2/3 的犬已接种疫苗, 并且它们中的多数对 vOnder 株有较高的中和抗体滴度, 而对野毒株则很低, 表明野毒株和疫苗株 vOnder 之间与

中和抗体滴度有关的囊膜蛋白的表位抗原有所不同, 因为 H 蛋白在细胞吸附中起作用, 并且在免疫压力下最可能变异, 中和能力的改变意味着 H 蛋白抗原性的改变。本研究发现分离株 H 蛋白及其基因与 vOnder 疫苗株确实存在差别。糖基化位点的差异可能会使野毒株 H 蛋白的免疫原性发生改变, 这种改变可能是造成目前 CDV 免疫失败的原因之一。

CDV N 蛋白是保守性最强的免疫原性蛋白, 其在病毒感染时可引起强烈的抗体反应。此外, N 蛋白上含有 T 细胞表位, 在诱导细胞免疫反应方面发挥着重要作用^[10]。CDV 的毒力与 N 蛋白密切相关, 在中枢神经系统的持续感染中发挥着重要作用。Yoshida 等^[10] 研究证实 CDV N 蛋白在 160 ~ 407 位氨基酸高度保守, 而在 408 ~ 519 位氨基酸高度可变。李昌文等^[11] 等在比较了几株 CDV N 蛋白的氨基酸后发现, 在 N 蛋白的几个主要功能区域是比较保守的, 尤其 T 细胞表位高度保守。笔者在对几个分离株和疫苗株的氨基酸序列进行比较后也发现这几个主要功能区是比较保守的。但是, LN-m 和 HB-f 与其他几个分离株相比存在较多的氨基酸差异, 这些差异是否对毒力产生影响或产生多大影响有待于进一步研究。Beauverger 等^[12] 在比较分析后进一步证实, 在 CDV N 蛋白的 281 ~ 289 位氨基酸高度保守, 在细胞免疫中发挥重要作用的是 T 细胞表位。而本试验中同样发现 CDV N 蛋白高度保守的 T 细胞表位。

过去人们认为 CDV 抗原性保守, 不易发生变异, 只有单一血清型。但近年来, CDV 强毒株感染犬病例不时被报道^[13] 说明 CDV 可能存在不同的血清型, 本研究也证实了不同血清型的可能存在。H 基因的系统发育树分析表明本研究中的 5 个分离株与以往国内毒株 (Changchun-dog 和 Jilin) 和欧洲、美洲分离株在遗传关系上明显不同, 而与日本流行的部分 CDV 毒株具有较近的亲缘关系。5 个分离株中没有一个是与目前国内、国外使用的弱毒疫苗株具有近的亲缘关系。N 基因的系统发育树同样证明目前分离的野毒株与疫苗株之间亲缘关系较远, 而国内疫苗株与国外普遍使用的疫苗株存在非常近的亲缘关系, 说明国内疫苗株可能仍然在沿用 20 世纪 30 年代北美爆发 CD 的狐狸病料中分离致弱的 Onderstepoort 株, 和目前的主要流行毒株存在不同程度的抗原性差异。而近年来, 随着饲养密度和免疫密度加大, CDV 面临的压力也越来越大。为适应恶劣的环境, CDV 的局部变异正在悄悄发生。因此, 针对目前的犬瘟热流行毒株, 借助基因工程技术研制新型疫苗, 以对现有疫苗毒株进行改进已成为兽医研究领域的当务之急。

(感谢青岛恒康生物科技有限公司张莉、徐伟、钟永彬帮助采集大量病料, 并提供临床资料。)

参考文献:

- [1] Jubb K V F, Kennedy P C, Palmer N. Pathology of Domestic Animals [M]. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1993: 617-622
- [2] Murphy F A, Gibbs E P J, Horzinek M C, et al. Veterinary Virology [M]. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1999: 411-428
- [3] Bolt G, Jensen T D, Gottschalck E, et al. Genetic diversity of the attachment(H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus [J]. J Gen Virol, 1997, 78: 367-372
- [4] Carpenter M A, Appel M J, Roelke-Parker M E, et al. Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1998, 65: 259-266
- [5] Haas L, Martens W, Greiser-Wilke I, et al. Analysis of the haemagglutinin gene of current wildtype canine distemper virus isolates from Germany [J]. Virus Res, 1997, 48: 165-171
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1998: 49-55
- [7] Page R D M. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers [J]. Comp Appl Biosci, 1996, 12(4): 357-358
- [8] Lan N T, Yamaguchi R, Furuya Y, et al. Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs [J]. Vet Microbiol, 2005, 110: 197-207
- [9] 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: 373-380
- [10] Yoshida E, Yeon-Sil S, Kiyoko I, et al. Epitopes and nuclear localization analyses of canine distemper virus nucleocapsid protein by expression of its deletion mutants [J]. Vet Microbiol, 1999, 66: 313-320
- [11] 李昌文, 张洪英, 刘怀然, 等. 犬瘟热病毒 A 株 N 蛋白基因编码区的克隆与序列分析 [J]. 动物医学进展, 2003, 24(6): 93-95
- [12] Beauverger P, Buckland R, Wild T F. Measles virus antigens induce both type-specific and canine distemper virus cross-reactive cytotoxic T lymphocytes in mice: localization of a common Ld-restricted nucleoprotein epitope [J]. J Gen Virol, 1993, 74: 2357-2363
- [13] 孟庆玲, 乔军, 陈创夫. 犬瘟热病毒 TN 株血凝基因的克隆与序列分析 [J]. 微生物学通报, 2004, 31(6): 6-10

责任编辑: 周广礼