

3 种猫疱疹病毒 I 型检测方法的比较

萧 晟¹, 熊 冉¹, 苑文涛², 王广操², 徐 敏², 陈文华²

(1. 芜湖职业技术学院生物工程学院, 芜湖 241003; 2. 南京灵越检测技术有限公司, 南京 210000)

摘 要: 比较传统 PCR、荧光定量 PCR 以及胶体金速测卡对于猫疱疹病毒 I 型 (FHV-1) 检测的敏感性及其准确性。设计引物, 优化反应条件并扩增目的片段, 定向插入 pMD-19T 克隆载体, 最后用建立的 2 种 PCR 检测方法以及猫疱疹病毒 I 型快速检测卡对 21 份临床疑似猫疱疹病毒感染的分泌物进行检测。荧光定量 PCR 和传统 PCR 检测的最低拷贝数分别为 20 拷贝和 207 拷贝; 荧光定量 PCR、传统 PCR 以及胶体金快速检测卡的检出率分别为 71%、57% 和 29%。传统 PCR 及荧光定量 PCR 检测方法均具有良好的特异性, 其中荧光定量 PCR 特异性显著, 相比猫疱疹病毒 I 型快速检测卡敏感性高, 准确率更高。

关键词: 猫疱疹病毒 I 型; 传统 PCR; 荧光定量 PCR; 特异性; 敏感性

中图分类号: S858.293

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)03-0394-07

Comparison of detection on feline herpesvirus-1 by three methods

XIAO Sheng¹, XIONG Ran¹, YUAN Wentao², WANG Guangcao², XU Min², CHEN Wenhua²

(1. Wuhu Institute of Technology, Wuhu 241003; 2. Lingyue Technology Laboratory Co., Ltd., Nanjing 210000)

Abstract: This study compared the sensitivity and accuracy of detection on feline herpesvirus-1 by using three methods of traditional PCR, Real-time PCR and colloidal gold detection card. Two methods of traditional PCR and Real-time PCR based on Taq Man probe technology were established to detect feline herpesvirus-1 in our lab. The minimum of copies detected by fluorogenic quantitative PCR and traditional PCR were 20 and 207, respectively. The two well established methods in our lab and the rapid detection card of Feline herpesvirus-1 were used to detect 21 secretion suspected Feline herpesvirus infection clinically. It showed that the detection rates of Real-time PC, traditional PCR and quick test card were 71%, 57% and 29%, respectively. The result indicated that compared with the rapid detection card of cat herpesvirus type 1, the detection method of traditional PCR and Real-time PCR is more sensitive and accurate, especially Real-time PCR which can provide more accurate results for clinical diagnosis.

Key words: FHV-1; traditional PCR; fluorogenic quantitative PCR; accuracy; sensitivity

猫疱疹病毒 I 型 (feline herpesvirus-1, 简称 FHV-1) 是猫传染性鼻气管炎的病原, 能够引起猫的急性、高度接触性上呼吸道疾病^[1], 该病毒最早从美国患呼吸道疾病的仔猫体内分离^[2], 目前在世界范围内广泛流行。感染 FHV-1 的猫表现出多种临床症状, 包括鼻炎、口腔炎和结膜炎等^[3-4], 病猫精神沉郁、体温升高、食欲下降, 并常表现出深部的气管咳嗽。FHV-1 主要感染家猫, 其他猫科动物也可感染该病毒^[5]。不同年龄的猫感染该病毒其病死

率不同, 仔猫较成年猫症状更为严重, 死亡率也较高, 可达 50%^[6], 如合并细菌感染, 其死亡率更高。

FHV-1 引起的呼吸道疾病同其他几种病毒引起的疾病临床症状相似, 因此不能仅从临床症状上进行判断。FHV-1 的诊断方法主要有病毒的分离鉴定、免疫荧光试验以及分子生物学检测。由于病毒分离鉴定耗时较长, 免疫荧光试验操作繁琐且需要昂贵的仪器, 而分子生物学检测方法操作快捷、特异性和敏感性高, 因此被广泛用于 FHV-1 的实验室检测。

收稿日期: 2018-12-12

基金项目: 安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助重点项目(gxbjZD2016120), 安徽省特色(品牌)专业(2016tszy087)、安徽省高校科学研究项目(KJ2018A0693)共同资助。

作者简介: 萧 晟, 副教授。E-mail: xiaosheng28@126.com

刘宝山等^[7]建立了检测 FHV-1 的 PCR 方法, 其检测下限为 103 个病毒拷贝, 且用建立的间接免疫荧光方法同时对 30 个临床样品进行检测, 其阳性检出率为 77%, 阳性符合率为 95.8%。王吉等^[8]建立了 FHV-1 实时荧光定量 PCR 检测法, 检测下限可达 10 个病毒拷贝。然而传统 PCR 和荧光定量 PCR 法在宠物医院应用有限, 目前宠物医院一般使用胶体金速测卡对 FHV-1 进行检测。胶体金速测卡操作方便, 不需要提取病毒核酸, 但敏感性不好, 易出现假阳性结果。本试验通过建立传统 PCR 和 Taq Man 实时荧光定量 PCR 方法检测临床 21 个疑似 FHV-1 样本, 并与胶体金速测卡的检测结果对比, 从而比较这 3 种方法在检测 FHV-1 上的特异性和准确性。

1 材料与方 法

1.1 病毒及临床样品

猫疱疹病毒 FHV-NJ 株由本实验室分离保存, 临床样品为 2018 年 4 月以后收集的宠物猫眼结膜分泌物、鼻黏膜分泌物和口腔拭子, 共计 21 份(表 1)。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司; 10×Taq 酶、10×PCR Buffer、10 mmol·L⁻¹ dNTP、SYBR Green I、Taq DNATM、DNA Marker DL2000 购自 Vazyme 公司; ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪购自赛默飞世尔科技有限公司; 猫疱疹病毒 I 型胶体金速测卡购自韩国亚山公司; DH5 α 感受态、pMD-19T、胶体回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; 凝胶成像仪、核酸电泳槽购自上海天能科技有限公司; 核酸蛋白测定仪、PCR 仪购自 eppendorf 公司。

1.3 引物设计和合成

根据 Genbank 发表的 FHV TK 基因, 通过 MegAlign 比对选取保守性较强的区域(图 1), 同时依据质粒载体 pMD-19T 的多克隆位点及所需连接肽, 应用 Primer Primer 5.0 软件, 设计以下引物和探针(表 2)。

1.4 DNA 提取

按照 OMEGA Tissue DNA Kit D3396 试剂盒说明书对 FHV-1 细胞培养物、猫细小病毒疫苗毒、犬疱疹病毒和猪伪狂犬病病毒提取 DNA, 置于-20℃ 保存。

1.5 传统 PCR 方法的建立

1.5.1 PCR 反应体系和反应条件 采用正交试验设计选择 PCR 最优反应体系以及最佳退火温度, 优化后的 PCR 体系为 20 μ L, 其组分为 10×PCR Buffer 2

μ L, 0.5U Taq 酶 1 μ L, 10 mmol·L⁻¹ dNTP 2 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 12 μ L。PCR 循环参数为: 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72℃ 终延伸 10 min。

表 1 2018 年 4 月以后收集的宠物猫眼结膜分泌物、鼻黏膜分泌物和口腔拭子

Table 1 Eye conjunctival secretions, nasal mucosal secretions and oral swabs from 21 pet cats after April 2018

医院名称 Name of hospital	样本编号 Sample number	采集部位 Sample collection part
芜湖博爱宠物医院	Whba-1	口、鼻分泌物
	Whba-2	口、鼻分泌物
	Whba-3	口、鼻、眼分泌物
	Whba-4	鼻、眼分泌物
芜湖爱康宠物医院	Whak-1	口、眼分泌物
	Whak-2	口、鼻分泌物
	Whak-3	口、鼻、眼分泌物
芜湖青禾宠物诊所	Whqh-1	口、眼分泌物
	Whqh-2	口、鼻分泌物
芜湖田田宠物医院	Whht-1	口、鼻、眼分泌物
	Whht-2	口、鼻分泌物
南京艾贝尔宠物医院	Njab-1	口、鼻、眼分泌物
	Njab-2	口、鼻分泌物
	Njab-3	鼻、眼分泌物
	Njab-4	口、眼分泌物
	Njab-5	口、鼻分泌物
南京天圆宠物医院	Njty-1	口、鼻、眼分泌物
	Njty-2	口、眼分泌物
	Njty-3	鼻、眼分泌物
南京雅东宠物医院	Njyd-1	鼻、眼分泌物
	Njyd-2	口、鼻、眼分泌物

GGACAGCATAAAAGCGATTGTGGCATCGAATTCAGCCCGAGCCTCAA
TCCGACACTGCGTCGTTGTTACACGTTTCATCATACACAGATCAGACGATGG
CGAGTGGAAACCATCCCCGTTCCAGAATGAAGAGATTATTAATCACAGGTG
AATACTGTCCGCATTTACATAGATGGTCCATGGAATAGGTAAGAGTTTA
ACGGCGAAGTACCTGGTCAGAGCGGATGAAAATCGACCGGGATATACTTA
CTACTTCCAGAACCAATGCTATACTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTGATGTT
GTCGGTGGTATCTATGCCGTCCAGGACCGGAAACGACGTGGTGAATTATC
AGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGCCACTATCAAGCAAGATTGCGCGC
ACCATACTTCTTTACATTCCAGACTATCCACAATAACAGGATATCAGAAA
GTTGTATGTGAGGAACACCCCGACGTGACCCTAATCATAGATAGACACCT
CTCGCTCTGCTGTTTCCCACTCGCAAGATATTTGTGGGTGATATGA
CTCTGGGTCTGTACTTAGTCTAATGGCAACACTTCCACGAGAACCTCTG
GTGGAATCTAGTTG

加粗部分为荧光定量 PCR 扩增片段

The bold part is target fragment of FHV-1 TK gene

图 1 FHV-1 TK 基因目的片段

Figure 1 Target Fragment of FHV-1 TK gene

1.5.2 标准品制备 将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切下大小正确的 DNA 凝胶片段, 用 DNA 凝

胶回收试剂盒进行产物回收,将回收的片段与 pMD-19T 在 16℃ 条件下连接 2 h,产物转化进 DH5 α 感受态,涂布含有氨苄抗生素的 LB 固体培养基,置于恒温箱中培养 24 h 后挑取单菌落,经 PCR 鉴定为阳性后提取质粒,再经双酶切鉴定正确后送至金斯瑞公司测序。将鉴定正确的阳性质粒命名为 pMD-19T-FHV-TK,大量扩增含阳性质粒的菌液,提取质粒并测定浓度。

1.5.3 猫疱疹病毒 I 型传统 PCR 方法建立-特异性试验 将提取的猫细小病毒、犬疱疹病毒和猪伪狂犬

犬病毒核酸 DNA 作为模板,PCR 扩增目的片段,将产物经凝胶电泳检测,同时设立猫疱疹病毒 I 型阴阳性对照,验证该方法特异性。

1.5.4 猫疱疹病毒 I 型传统 PCR 方法建立-敏感性试验 将标准品质粒换算成拷贝数,并进行 10 倍比稀释,用建立好的方法进行检测,验证检测的最低病毒拷贝数,并设立阴性对照。

1.5.5 猫疱疹病毒 I 型传统 PCR 方法建立-重复性试验 用该方法重复 3 次各检测 5 份 FHV-1 阳性样品和 5 份阴性样品,比较其重复性。

表 2 传统 PCR 和 Taq Man 荧光定量 PCR 引物和探针

Table 2 Primers and probes for traditional and Taq Man fluorescent quantitative PCR

检测方法 Detection method	引物和探针 Primers and Probes	序列 (5'--3') Gene sequence	大小/bp Gene size
PCR	FHV-F	GGACAGCATAAAAGCGATTG	625
	FHV-R	CAACTAGATTTCACCAGGA	
	FHV-qF	GGACAGCATAAAAGCGATTG	
qPCR	FHV-qR	AACGTGAACAACGACGCAG	75
	探针 Probes	FAM-AATTCCAGCCCGGAGCCTCAAT-TAMRA	

1.6 Taq Man 荧光定量 PCR 方法的建立

1.6.1 Taq Man 荧光定量 PCR 反应体系和条件 采用矩阵法筛选最佳荧光定量 PCR 反应条件,经筛选确定体系为 25 μ L,其组分为 10 \times PCR Buffer 2 μ L,10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2 μ L,上下游引物各 1.0 μ L,探针 1.0 μ L, Taq DNATM 0.25 μ L,模板 1 μ L,其余用灭菌 ddH₂O 补足。PCR 反应条件为 95℃ 4 min,93℃ 10 s,54℃ 20 s,40 个循环,在 60℃ 时收集荧光信号。

1.6.2 Taq Man 荧光定量 PCR 特异性试验 将提取的猫细小病毒、犬疱疹病毒和猪伪狂犬病毒核酸 DNA 为模板,通过荧光定量 PCR 进行扩增,并设立猫疱疹病毒 I 型阴阳性对照,验证该方法特异性。

1.6.3 Taq Man 荧光定量 PCR 敏感性试验 取 FHV-NJ 株不同稀释度的 DNA 作为模板,用荧光定量 PCR 方法进行检测,验证其敏感性。

1.6.4 Taq Man 荧光定量 PCR 重复性试验 用该方法重复 3 次各检测 5 份 FHV-1 阳性样品和 5 份阴性样品,比较其重复性。

1.6.5 标准曲线的建立 将制备的标准模板用灭菌 ddH₂O 进行 10 倍比稀释,得到 8 个不同的稀释度的模板,每个稀释度的模板做 3 次重复,用建立的荧光定量 PCR 方法检测,记录数据,绘制标准曲线。

1.7 临床样品的检测

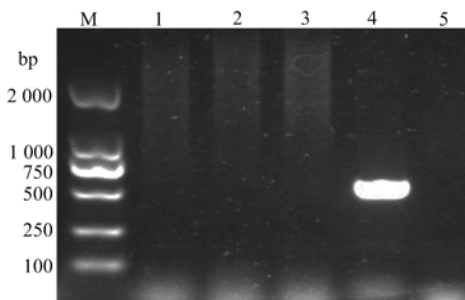
用建立好的 2 种检测 FHV-1 的方法和胶体金速

测卡同时对收集的 21 份临床疑似 FHV-1 感染的病猫拭子检测,并将阳性样品送南京金斯瑞生物科技有限公司测序,比较这 3 种方法的特异性、敏感性及各异的优缺点。

2 结果与分析

2.1 质粒标准品构建

将克隆所得阳性质粒送至金斯瑞生物科技有限公司测序,序列测定结果与 GenBank 上收录的 FHV-1 TK 基因序列作同源性分析,同源性达 99%,证明 PCR 扩增片段属 FHV-1 特异性片段。

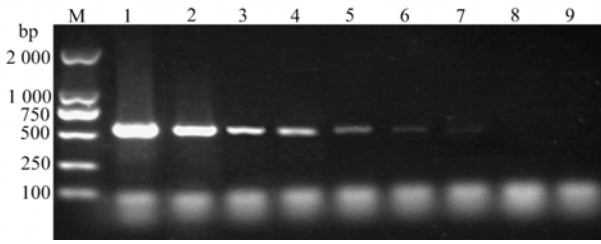


M. DL2000 DNA Marker; 1. 猫细小病毒; 2. 犬疱疹病毒; 3. 猪伪狂犬病毒; 4. 猫疱疹病毒 I 型; 5. 阴性对照

M. DL2000 DNA Marker; 1. Cat parvovirus; 2. Canine herpes virus; 3. Porcine pseudorabies virus; 4. Feline Herpesvirus-1; 5. Negative control

图 2 常规 PCR 特异性实验结果

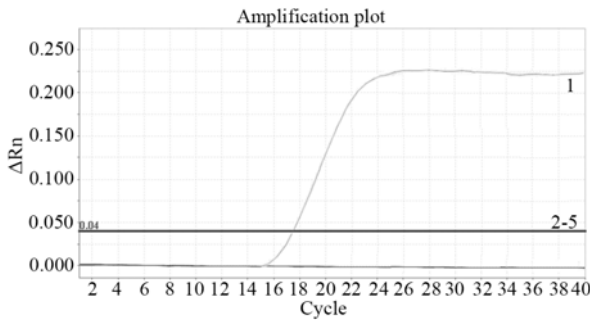
Figure 2 Specificity test results of routine PCR



M.DL2000 DNA Marker; 1-8.质粒 DNA 浓度 $2.07 \times 10^8 \sim 2.07 \times 10^1$ 拷贝; 9.阴性对照
M.DL2000 DNA Marker; 1-8.DNA $2.07 \times 10^8 \sim 2.07 \times 10^1$ copy; 9. Negative control

图 3 常规 PCR 敏感性试验结果

Figure 3 Sensitivity test results of routine PCR



1.FHV-1; 2-5.FPV、CHV、PRV、阴性对照
1.FHV-1; 2-5.FPV,CHV,PRV,negative control

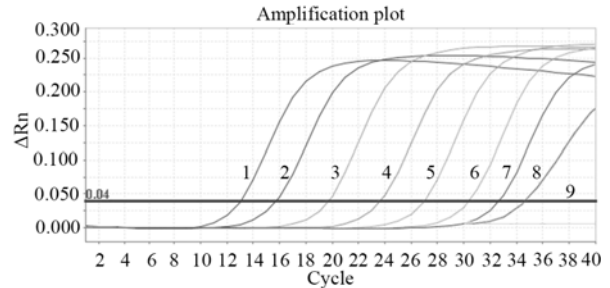
图 4 Taq Man 荧光定量 PCR 特异性试验

Figure 4 Taq Man fluorescence quantitative PCR specificity test

标准品质粒浓度为 $15.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 根据公式拷贝数 ($\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) = $[6 \times 10^{23} (\text{copies} \cdot \text{mol}^{-1}) \times 10^{-9} \times \text{质粒浓度} (\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})] / \text{重组质粒分子量} (\text{g} \cdot \text{mol}^{-1})$, 换算成拷贝数为 $2.07 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 10 倍梯度稀释后得到 $2.07 \times 10^7 \sim 2.07 \times 10^1 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 各浓度样品。

2.2 常规 PCR 特异性试验

对猫疱疹病毒、猫细小病毒、犬疱疹病毒和猪伪狂犬病毒提取 DNA, 用该方法进行检测, 验证该方法的特异性, 结果除猫疱疹病毒有特异性条带外, 其余病毒均未检测到特异性条带, 说明该方法特异性好 (图 2)。



1-8. 质粒 DNA 浓度 $2.07 \times 10^8 \sim 2.07 \times 10^1$ 拷贝; 9. 阴性对照

1-8. DNA $2.07 \times 10^8 \sim 2.07 \times 10^1$ copy; 9. Negative control

图 5 Taq Man 荧光定量 PCR 敏感性试验

Figure 5 Sensitivity test of Taq Man fluorescence quantitative PCR

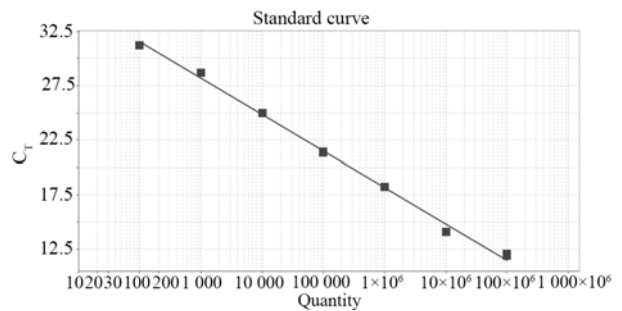
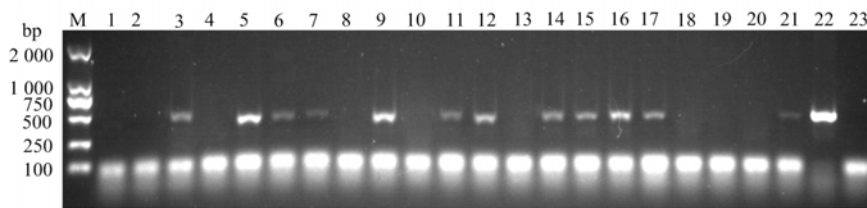


图 6 Taq Man 荧光定量 PCR 标准曲线

Figure 6 Standard curve of Taq Man fluorescence quantitative PCR



M.DL2000 DNA Marker; 1-21.临床样品; 22.阳性对照; 23.阴性对照

M.DL2000 DNA Marker; 1-21.Clinical samples; 22. Positive control; 23.Negative control

图 7 临床样品普通 PCR 检测结果

Figure 7 Detection results of common PCR in clinical samples

2.3 常规 PCR 敏感性试验

结果如图 3 显示, 从 $2.07 \times 10^2 \sim 2.07 \times 10^8$ 拷贝中均扩增到目的条带, 说明传统 PCR 的最低检测下限为 2.07×10^2 拷贝。

2.4 猫疱疹病毒 I 型传统 PCR 方法建立-重复性试验

用该方法重复 3 次检测 5 份 FHV-1 阳性样品和

5 份 FHV-1 阴性样品, 结果 3 次试验中 5 份阳性样品均扩增出特异性片段, 而 5 份阴性样品均未扩增出特异性片段, 说明该方法有可重复性。

2.5 荧光定量 PCR 特异性试验

对猫疱疹病毒、猫细小病毒、犬疱疹病毒和猪伪狂犬病毒提取 DNA, 用该方法进行检测, 验证该

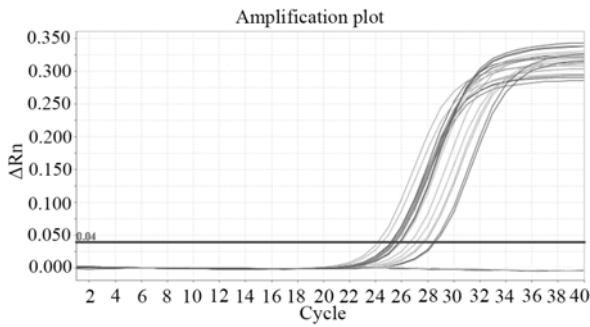


图 8 21 份临床样品荧光定量 PCR 检测结果
Figure 8 Detection results of fluorescence quantitative PCR in 21 clinical samples

方法的特异性, 结果只有猫疱疹病毒 DNA 具有扩增曲线, 说明该方法特异性良好 (图 4)。

2.6 荧光定量 PCR 敏感性试验

荧光定量 PCR 敏感性试验结果如图 5 所示, 从 $2.07 \times 10^1 \sim 2.07 \times 10^8$ 拷贝中均得到良好的扩增曲线, 即 Taq Man 荧光定量 PCR 的最低检测下线为 2.07×10^1 拷贝, 比传统 PCR 高出一个数量级。

2.7 Taq Man 荧光定量 PCR 重复性试验

用该方法重复 3 次检测 5 份 FHV-1 阳性样品和 5 份 FHV-1 阴性样品, 结果 3 次试验中 5 份阳性样品均出现扩增曲线, 而 5 份阴性样品均未出现扩增曲线, 说明该方法具有可重复性。

表 3 3 种检测方法同时检测 21 份样品结果比较

Table 3 Comparison of results of simultaneous detection of 21 samples by three detection methods

样品编号 Sample No.	普通 PCR 检测结果 Result of traditional PCR	Taq Man 荧光定量 PCR 检测结果 Result of Real time PCR	胶体金速检卡检测结果 Result of quick test card
1	-	+	-
2	-	-	-
3	+	+	+
4	-	-	-
5	+	+	+
6	+	+	-
7	+	+	-
8	-	-	+
9	+	+	-
10	-	-	-
11	+	+	-
12	+	+	+
13	-	-	-
14	+	+	-
15	+	+	-
16	+	+	+
17	+	+	-
18	-	-	+
19	-	+	-
20	-	+	-
21	+	+	-

注: +表示猫疱疹病毒阳性结果; -表示猫疱疹病毒阴性结果。

Note: + indicates a positive result for the feline herpes virus; - indicates a negative result for the feline herpes virus.

2.8 标准曲线的建立

如图 6 所示, 以起始模板的拷贝数为横坐标, CT 值为纵坐标绘制标准曲线, 所建立的 Taq Man 荧光定量 PCR 方法在 2.07×10^8 拷贝和 2.07×10^2 拷贝之间呈现良好的线性关系, 相关系数为 0.989, 扩增效率为 98%, 说明该方法可以用于定量检测。

2.9 3 种方法检测临床样品的比较

用建立的 2 种方法同胶体金速测卡对收集的 21

份临床病料进行检测, 结果显示: 传统 PCR 检测阳性率为 57% (12/21) (图 7), Taq Man 荧光定量 PCR 方法检测阳性率为 71% (15/21) (图 8), 胶体金速测卡检测阳性率为 29% (6/21) (表 3)。对 PCR 法检测到的所有阳性样品测序, 并将测序结果在 NCBI 上进行 Blast 比对 (图 9), 所有样品测序结果均与 FHV-1 序列相近, 同源率为 99%, 再次验证两种 PCR 方法均具有较好的特异性。

Felid alphaherpesvirus 1 strain KANS_02, complete genome
Sequence ID: [MH070348.1](#) Length: 135778 Number of Matches: 1

Range 1: 66276 to 66900 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1149 bits(622)	0.0	624/625(99%)	0/625(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGACAGCATAAAAGCGATTGTGGCATCGAATTCAGCCCGGAGCCTCAATCCGACACTGC			60
Sbjct 66276	GGACAGCATAAAAGCGATTGTGGCATCGAATTCAGCCCGGAGCCTCAATCCGACACTGC			66335
Query 61	GTCGTTGTTACCGTTTCATCATAACAGATCAGACGATGGCGAGTGGAAACATCCCGTT			120
Sbjct 66336	GTCGTTGTTACCGTTTCATCATAACAGATCAGACGATGGCGAGTGGAAACATCCCGTT			66395
Query 121	CAGAATGAAGAGATTATTAAATCACAGGTGAATACTGTCCGCATTTACATAGATGGTCC			180
Sbjct 66396	CAGAATGAAGAGATTATTAAATCACAGGTGAATACTGTCCGCATTTACATAGATGGTCC			66455
Query 181	TATGGAATAGGTAAAGATTTAACGGCGAAGTACCTGGTCAGAGCGGATGAAAATCGACCG			240
Sbjct 66456	TATGGAATAGGTAAAGATTTAACGGCGAAGTACCTGGTCAGAGCGGATGAAAATCGACCG			66515
Query 241	GGATATACTTACTACTTCCAGAACCAATGCTATACTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTGAT			300
Sbjct 66516	GGATATACTTACTACTTCCAGAACCAATGCTATACTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTGAT			66575
Query 301	GTTGTCGGTGGTATCTATGCCGTCCAGGACCGAAACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAA			360
Sbjct 66576	GTTGTCGGTGGTATCTATGCCGTCCAGGACCGAAACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAA			66635
Query 361	GATGCTGCTATATCACCGCCCACTATC AAGCAAGATTTGCCGACCATACCTTCTTTTA			420
Sbjct 66636	GATGCTGCTATATCACCGCCCACTATC AAGCAAGATTTGCCGACCATACCTTCTTTTA			66695
Query 421	CATTCAGACTATCCACAATAACAGGATATCAGAAAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGAC			480
Sbjct 66696	CATTCAGACTATCCACAATAACAGGATATCAGAAAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGAC			66755
Query 481	GTGACCCCTAATCATAGATAGACACCCCTTTCGCCCTCTCTGGTCTGTTTCCCACTCGCAAGA			540
Sbjct 66756	GTGACCCCTAATCATAGATAGACACCCCTTTCGCCCTCTCTGGTCTGTTTCCCACTCGCAAGA			66815
Query 541	TATTTTGTGGGTGATATGACTCTTGGGTCTGTACTTAGTCTAATGGCAACACTTCCACGA			600
Sbjct 66816	TATTTTGTGGGTGATATGACTCTTGGGTCTGTACTTAGTCTAATGGCAACACTTCCACGA			66875
Query 601	GAACCTCCTGGTGGAAATCTAGTTG		625	
Sbjct 66876	GAACCTCCTGGTGGAAATCTAGTTG		66900	

图 9 普通 PCR 检测阳性样品测序 blast 结果

Figure 9 Sequencing blast results of positive samples detected by common PCR

3 讨论

猫疱疹病毒 I 型 (FHV-1) 在全球范围内广泛分布, 该病毒常与猫杯状病毒及细菌混合感染。据报道, 某些猫科动物暴露该病毒的概率高达 97%^[9], 因此它是导致全球猫科动物临床疾病的一个重要原因。在这种情况下会造成超过 80% 的猫持续感染, 其中 45% 的猫在受到压力刺激条件下会向体外排毒^[10]。病猫在口腔、鼻腔和结膜的分泌物中排放该病毒, 这种现象可能持续 3 周, 健康猫需要与排毒的病猫直接接触才会导致感染。诊断该病毒感染的样本包括结膜、角膜分泌物或口咽拭子、角膜刮屑或活组织。目前, 实验室检测所需样本应严格规范, 并不建议对近期接种过活病毒疫苗的猫进行取样。而且对 PCR 阳性结果也需谨慎解读, 因为它们可能是由低水平排毒量等原因造成的, 或者仅仅是潜伏期的病毒。

经试验条件优化, 本试验建立的检测猫疱疹病毒 I 型的传统 PCR 以及荧光定量 PCR 方法均表现出较高的灵敏度及特异性, 对临床上疑似猫疱疹病毒样本检测结果表明, 传统 PCR 检测阳性率为 57% (12/21), Taq Man 荧光定量 PCR 方法检测阳性率为 71% (15/21), 扩增产物经测序后, 分析表明并

无假阳性出现, 说明两种方法的准确性较高。

在临床诊断中, 宠物医生需根据检测结果及时制定出治疗方案, 检测周期的长短, 常常会影响到动物疾病的治疗效果。由于快速检测卡方便快捷的特点, 被临床兽医广泛应用^[11], 然而在本次调查研究中发现, 快速检测卡在准确性及灵敏性上存在弊端, 在对临床收集的疑似猫疱疹病毒感染样品的检出阳性率为 29% (6/21), 其中 1 份 (8 号) 样本出现假阳性结果。

本次试验中, 通过构建 FHV-1 标准质粒, 确定了本实验室建立的荧光定量 PCR 方法和传统 PCR 方法的最低检出量分别为 20 拷贝和 207 拷贝。并通过对犬疱疹病毒、猫细小病毒和猪伪狂犬病毒检测, 表明 2 种方法均具有较好的特异性。准确的检测结果是保证疾病治疗效果的前提, PCR 检测方法以其特异性强, 灵敏性好, 准确性高的特点, 常被作为病毒分子生物学诊断的标准, 宠物医院可结合猫临床症状以及快速检测卡检测结果作为疾病的辅助诊断, 具体结果仍需以 PCR 检测的结果作为最终判定标准。

参考文献:

- [1] HARGIS A M, GINN P E. Feline herpesvirus 1-associated

- facial and nasal dermatitis and stomatitis in domestic cats[J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1999, 29(6): 1281-1290.
- [2] MAEDA K, HORIMOTO T, MIKAMI T. Properties and functions of feline herpesvirus type 1 glycoproteins[J]. *J Vet Med Sci*, 1998, 60(8): 881-888.
- [3] NASISSE M P, GLOVER T L, MOORE C P, et al. Detection of feline herpesvirus 1 DNA in corneas of cats with eosinophilic keratitis or corneal sequestration[J]. *Am J Vet Res*, 1998, 59(7): 856-858.
- [4] HENZEL A, BRUM M C S, LAUTERT C, et al. Isolation and identification of feline calicivirus and feline herpesvirus in Southern Brazil[J]. *Braz J Microbiol*, 2012, 43(2): 560-568.
- [5] 肖建雄, 单芬, 黄嘉欣, 等. 东北虎和华南虎源传染性鼻气管炎病毒的 PCR 检测和序列分析[J]. *野生动物*, 2013, 34(3): 146-151.
- [6] 高俊, 刘荻荻, 马月, 等. 疱疹病毒潜伏相关转录体的生物学特性[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(10): 855-860.
- [7] 刘宝山, 林颖, 尹荣焕, 等. 猫疱疹病毒 1 型 PCR 检测方法的建立[J]. *畜牧与兽医*, 2010, 42(1): 74-76.
- [8] 王吉, 卫礼, 付瑞, 等. 猫疱疹病毒 I 型实时荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(12): 47-54.
- [9] MAGGS D J, CLARKE H E. Relative sensitivity of polymerase chain reaction assays used for detection of feline herpesvirus type 1 DNA in clinical samples and commercial vaccines[J]. *Am J Vet Res*, 2005, 66(9): 1550-1555.
- [10] NICOLL M P, EFSTATHIOU S. Expression of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts does not influence latency establishment of virus mutants deficient for neuronal replication[J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt_11): 2489-2494.
- [11] 庄金秋, 梅建国, 沈志强. 胶体金免疫层析技术在兽医临床诊断中的应用进展[J]. *中国动物检疫*, 2012, 29(9): 70-75.