

分类号:

密级:



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

表达 Nectin4 受体细胞系的构建与犬瘟热病毒的
分离鉴定及致病性研究

CONSTRCUTION OF NECTIN4 RECEPTOR-EXPRESSING CELL
LINES AND ISOLATION, IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY
ASSESSMENT OF CANINE DISTEMPER VIRUS

研 究 生: 高雯慧
CANDIDATE: GAO WENHUI
学 号: 2021302120181
STUDENT NO.:

学位类别: 兽医硕士
DEGREE TYPE: MASTER OF PROFESSIONAL DEGREE
IN VETERINARY MEDICINE

导 师: 赵 凌 教 授
SUPERVISOR: PROFESSOR ZHAO LING
徐高原 高级兽医师
SENIOR VETERINARIAN XU GAOYUAN

中国 武汉
WUHAN, CHINA
二〇二四年六月
JUNE, 2024

华中农业大学硕士学位论文

表达 Nectin4 受体细胞系的构建与犬瘟热病毒的 分离鉴定及致病性研究

Construction of Nectin4 receptor-expressing cell lines and
isolation, identification and pathogenicity assessment of Canine
distemper virus

研 究 生: 高雯慧

学 号: 2021302120181

指导教师: 赵凌 教授
徐高原 高级兽医师

学位类别: 兽医硕士

领 域:

华中农业大学动物医学院

中国 武汉

College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University
Wuhan, China

本课题由

国家重点研发项目

(2022YFD1800100)

自然科学基金面上项目

(32373092)

项目资助

目 录

1 前言.....	1
1.1 文献综述.....	1
1.1.1 犬瘟热概述.....	1
1.1.2 CD 流行病学	1
1.1.3 CD 临床特征	2
1.1.4 CDV 病原学	3
1.1.5 CDV 蛋白功能	5
1.1.6 CDV 致病机制	7
1.1.7 CDV 诊断技术	8
1.1.8 CDV 分离培养	10
1.1.9 CDV 受体研究进展	11
1.2 目的与意义.....	16
2 材料与方法.....	17
2.1 实验材料.....	17
2.1.1 病料样本、病毒、实验动物.....	17
2.1.2 细胞、质粒和菌株.....	17
2.1.3 实验试剂、抗体.....	17
2.1.4 实验仪器.....	18
2.1.5 培养基、相关试剂的配制.....	18
2.1.6 生物学分析软件.....	19
2.2 实验方法.....	20
2.2.1 引物设计与合成.....	20
2.2.2 pLVX-Nectin4-BSD 真核表达载体构建.....	21
2.2.3 Vero 细胞对 BSD 耐受性测定试验	26
2.2.4 慢病毒包装与感染.....	27
2.2.5 细胞系筛选及鉴定.....	27
2.2.6 细胞系稳定性分析.....	29
2.2.7 不同 CDV 在细胞系上生长曲线分析	29
2.2.8 CDV 流行病学调查	30
2.2.9 CDV 分离与鉴定	31
2.2.10 CDV 致病性研究	33
3 结果.....	36
3.1 pLVX-Nectin4-BSD 真核表达载体构建	36
3.1.1 目的片段扩增及线性化载体的获取.....	36

3.1.2 pLVX-Nectin4-BSD 重组质粒的构建与鉴定	36
3.2 Vero 细胞对 BSD 耐受性测定试验	37
3.3 表达 Nectin4 受体细胞系的鉴定	37
3.3.1 RT-PCR 鉴定	37
3.3.2 IFA 鉴定	38
3.3.3 Western Blot 鉴定	39
3.4 细胞系稳定性分析	39
3.4.1 RT-PCR 鉴定	39
3.4.2 IFA 鉴定	40
3.4.3 Western Blot 鉴定	41
3.5 不同 CDV 在细胞系上生长曲线分析	42
3.6 CDV 分离与鉴定	43
3.6.1 阳性病料检测结果	43
3.6.2 分离培养	45
3.6.3 RT-PCR 鉴定	46
3.6.4 IFA 鉴定	46
3.6.5 病毒粒子形态鉴定	47
3.6.6 H 基因全长扩增	47
3.6.7 H 基因同源性分析	48
3.6.8 H 基因进化树分析	49
3.6.9 H 基因潜在糖基化位点分析	50
3.6.10 H 基因抗原表位预测分析	51
3.7 CDV 致病性研究	53
3.7.1 毒株制备及外源检测	53
3.7.2 临床症状变化	54
3.7.3 淋巴细胞数变化	56
3.7.4 攻毒后排毒检测	57
3.7.5 病理剖检变化	58
3.7.6 病理切片 HE 及 IHC 观察	59
3.7.7 病毒组织载量测定	60
3.7.8 生存曲线	60
4 讨论	62
4.1 表达 Nectin4 受体的细胞系	62
4.2 CDV 样品采集与分离	63
4.3 CDV 遗传进化分析及致病性研究	64
5 结论	67
参考文献	68

摘要

犬瘟热（Canine distemper, CD）是食肉科动物中高发病率的急性传染病，由犬瘟热病毒（Canine distemper virus, CDV）感染引起，感染后临床表现为免疫抑制、脓性眼鼻分泌物、呼吸道炎症、腹泻便血、神经损伤等多系统症状。近年来 CDV 在环境压力下不断变异进化，CDV 野毒株对疫苗株产生免疫逃逸，并获得跨物种传播能力，给养殖动物及野生动物造成极大损失和危害。病毒分离是研究当前 CDV 流行毒株的有效途径，但由于 CDV 对环境抵抗力低、传统细胞系对 CDV 敏感度较差等多种因素，对于野毒株的分离培养较为困难，严重限制 CDV 的深入研究。Nectin4 作为 CDV 的细胞受体，是 CDV 感染宿主上皮细胞的特异性受体且物种间保守性良好，目前表达受体的传代细胞在分离培养 CDV 时扮演重要角色。因此，构建出稳定高效的细胞工具用于分离培养 CDV，并对我国当前流行毒株进行鉴定分析，对 CD 防控具有重要意义。

本研究利用慢病毒系统构建表达 Nectin4 受体的 Vero 细胞，经 RT-PCR、IFA、Western Blot 鉴定 Nectin4 受体成功在 Vero 细胞中表达，外源表达受体 Nectin4 在连续传代 30 代后经检测依旧存在，稳定性良好。与普通 Vero 细胞相比，表达 Nectin4 的 Vero 细胞对不同 CDV 毒株的增殖均有促进作用，其中 wh15 株可从 $10^{4.33}$ TCID₅₀/mL 提升至 $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL。利用 RT-PCR 对湖南、湖北、江西、广西、河南五个省份收集的 1255 份样品进行 CDV 检测，经检测共 280 份 CDV 阳性，平均检出率为 22.3%，利用 Vero-Nectin4 细胞系成功分离 1 株能稳定传代的 CDV（WH03），接种细胞 24 h 就能出现明显细胞病变，大大缩短病毒分离时间。此外，还获得 1 株无法在细胞上传代但存在一定毒力的 CDV（WH29）。对 CDV 毒株的 H 基因测序进行遗传进化分析，发现 WH03 属于美洲 1 型，WH29 属于亚洲 1 型，与当前经典疫苗株的 H 基因在核苷酸、氨基酸、糖基化位点、抗原表位均有所差异，其中 WH03 毒株糖基化位点为 7 个，WH29 则进化为 9 个，为我国当前流行野毒株所特有。通过感染幼犬分析 CDV 毒株致病力，结果发现 WH03 对犬只不致病，而 WH29 对幼犬有高致病力，引起 100%发病（5/5）、40%死亡（2/5）。

综上，本研究构建表达 Nectin4 受体的 Vero 细胞系，利用该细胞系分离 1 株 CDV 毒株 WH03 及 1 株无法在细胞上传代的 CDV 毒株 WH29，经 H 基因遗传进化分析，

WH03、WH29 与经典疫苗株存在较大差异。致病性研究结果发现，WH03 对幼犬无致病性，WH29 则存在高致病性。本研究为 CDV 的临床分离和鉴定，以及疫苗的研发奠定基础。

关键词：犬瘟热病毒；Nectin4 受体；分离鉴定；H 基因分析；致病性

Abstract

Canine distemper (CD), caused by canine distemper virus (CDV), is an acute infectious disease with high morbidity among carnivores. Clinical symptoms of infection include immunosuppression, purulent ocular and nasal discharge, respiratory inflammation, diarrhoea and blood in stool, neurological symptoms and other multi-system symptoms. In recent years, CDV has been mutating and evolving under environmental pressure, and wild strains of CDV have escaped immunization against vaccine strains and acquired the ability to spread across species, causing great losses and harm to farmed and wild animals. Virus isolation is an effective way to study the current epidemic strains of CDV, but due to a variety of factors such as low resistance of CDV to the environment and poor sensitivity of traditional cell lines to CDV, it is difficult to isolate and culture wild strains of CDV, which severely limits in-depth research on CDV. Nectin4, as a cellular receptor for CDV, is a specific receptor for CDV-infected host epithelial cells and is well conserved among species. The current passaged cells expressing the receptor play an important role in isolating and culturing CDV. Therefore, it is of great significance for CD prevention and control to construct a stable and efficient cellular tool for isolation and culture of CDV, and to identify and analyze the current epidemic strains in China.

In this study, Vero cells expressing Nectin4 receptor were constructed using lentiviral system. Nectin4 receptor was successfully expressed in Vero cells as identified by RT-PCR, IFA, and WB, and the ectopically expressed receptor Nectin4 still existed after 30 consecutive passages, which was detected with good stability. Compared with normal Vero cells, Nectin4-expressing Vero cells promoted the proliferation of different CDV strains, among which wh15 strain could increase from $10^{4.33}$ TCID₅₀/mL to $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL. A total of 1255 samples collected from five provinces of Hunan, Hubei, Jiangxi, Guangxi and Henan, were tested for CDV. A total of 280 positive samples were detected, with an average detection rate of 22.3%. One stable transmissible CDV strain (WH03) was isolated using the Vero-Nectin4 cell line, the inoculated cells were able to

develop cytopathic lesions within 24 h. Besides, one CDV (WH29) was also obtained that could not be transmitted on cells, but had virulence. Genetic evolutionary analysis of the H gene revealed that WH03 was America type 1, and WH29 was Asia type 1, differed from the current classical vaccine strains in nucleotides, amino acids, glycosylation sites, and antigenic epitopes with mutations. The WH03 strain has 7 glycosylation sites, whereas WH29 has evolved to 9 sites. Pathogenicity studies showed that WH03 was non-pathogenic and weakly virulent in dogs, whereas WH29 was highly pathogenic in puppies, causing 100% morbidity (5/5) and 40% mortality (2/5) in dogs.

In this study, we constructed a Vero cell line expressing the Nectin4 receptor and used this cell line to isolate one CDV strain WH03 and one CDV strain WH29 that could not be passed on, and the genetic evolutionary analysis of the H gene showed that there were large differences between WH03 and WH29 and the classical vaccine strains. Pathogenicity studies revealed that WH03 was non-pathogenic in puppies and WH29 was highly pathogenic. This study lays the foundation for the clinical isolation and characterization of CDV and the development of vaccines.

Keywords: Canine distemper virus; Nectin4 receptor; isolation and identification; H gene analysis; pathogenicity

缩略语表 (Abbreviations)

英文缩写 Abbreviations	英文全称 English Name	中文全称 Chinese Name
aa	Amino acid	氨基酸
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Bb	Bordetella bronchiseptica	支气管败血波氏杆菌
bp	Base pair	碱基对
CAV	Canine adenovirus	犬腺病毒
CCV	Canine coronavirus	犬冠状病毒
CD	Canine distemper	犬瘟热
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
CNS	Central nervous system	中枢神经系统
CPE	Cytopathic effect	致细胞病变效应
CPV	Canine parvovirus	犬细小病毒
d	Day	天
ddH ₂ O	Double distilled H ₂ O	双蒸水
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	细胞培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	Deoxyrinediamine triphoshate	脱氧核糖核苷三磷酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
F	Fusion protein	融合蛋白
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	异硫氰基荧光素

μg, mg, g	Microgram,milligram,gram	微克，毫克，克
μL, mL, L	Microliter,milliliter,liter	微升，毫升，升
H	Hemagglutinin protein	血凝素蛋白
h, min, s	Hour, Minute, Second	小时，分钟，秒
IFA	Indirect immunofluorescent assay	间接免疫荧光试验
IFN	Interferon	干扰素
Igκ	Immunoglobulin kappa-chain	免疫球蛋白κ链
kDa	Kilodalton	千道尔顿
L	Large protein	大蛋白
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
M	Matrix protein	基质蛋白
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
MV	Measles virus	麻疹病毒
N	Nucleocapsid protein	核衣壳蛋白
nt	Nucleotide	核苷酸
P	Phosphoprotein	磷蛋白
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymrase chain reaction	聚合酶链式反应
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
RABV	Rabies virus	狂犬病毒
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RNP	ribonucleoprotein complex	核糖核蛋白复合物
TCID ₅₀	Median tissue culture infective dose	半数组织培养感染量

1 前言

1.1 文献综述

1.1.1 犬瘟热概述

犬瘟热(Canine distemper, CD)是由犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)引起的急性或亚急性高度接触性的多种属动物共患传染病。1905 年由莱尔(Carre')等人发现 CDV 是引起该病的致病因子,因此 CD 也被称为莱尔病。该病广泛分布于世界各地,一年四季均可发病,但寒冷季节多发且症状较为严重。典型症状为双相热,并伴有消化道、呼吸道炎症及神经系统损伤,同时易出现细菌、病毒等继发感染(Uhl et al 2019)。CD 死亡率与宿主种类关系密切,死亡率在 30% - 100%之间,其中雪貂最易感,死亡率为 100%(Rendon-Marin et al 2019)。关于 CD 的第一份可信报告由唐·安东尼奥·德·乌略亚(Don Antonio de Ulloa)撰写于 18 世纪 30 年代,最初仅限于新大陆(Blancou 2004)。CDV 可能起源于新大陆时期广泛肆虐的人类麻疹病毒(MV),感染 MV 的病死尸体组织被犬只啃食,进而造成犬只的感染(Uhl et al 2019)。这种暴露于病毒感染的身体分泌物和组织是 MV 向新物种传播的常见途径,也是 CDV 感染转移到野生和家养动物的传播方式(Uhl et al 2019)。CDV 传染源包括已感染动物(显性感染及隐性感染)及愈后带毒动物。传播方式除了通过接触传播,还能够借助空气飞沫,将带毒的鼻腔分泌物以气溶胶形式进行传播,也可以通过子宫或胎盘传播(de Vries et al 2017; Elia et al 2015)。

1.1.2 CD 流行病学

CD 在最初的报告中描述为感染驯养犬的疾病,但随着人类活动范围的扩大、动物栖息地环境变化、病毒基因突变及重组的发生(Domingo et al 1997; Panzera et al 2015; Yuan et al 2017)等一系列因素影响,CDV 的宿主正在不断扩大。目前共有 20 多个食肉动物和非食肉动物家族受到影响(Duque-Valencia et al 2019; Karki et al 2022),包括犬科、鼬科、鬣狗科、

浣熊科、熊科、猫科、猴科、海豹科等多科属动物。CDV 易感宿主范围的不断扩大,使得 CD 对于家养动物、野生动物类造成巨大威胁。家养动物种群数量十分庞大,目前我国的犬只数量已达 2 亿且地区分布十分广泛。相关报道称,犬类 CDV 阳性率为 20%以上,但约 50%的家犬感染后表现亚临床症状。此外,CD 在犬科及部分非犬科动物(如水貂等)免疫疫苗后疫情虽得到有效控制,但近年来免疫动物自然感染 CDV 野毒株的事件仍多有报道(Blixenkrone-Möller et al 1992; Decaro et al 2004; Liu et al 2021; Simon-Martínez et al 2008; Zhao et al 2014)。CDV 对野生动物的感染严重威胁到某些野生濒危物种,1993 年在坦桑尼亚狮子(*Panthera leo*)种群中 CDV 感染率超过 85%,约 35%的狮子在感染后 6 个月内死亡(Roelke-Parker et al 1996); 2001 年美国境内浣熊(*Procyon lotor*)因感染 CDV 导致的死亡率为 45%(Lednicky et al 2004a); 埃塞俄比亚狼(Ethiopian wolves)在埃塞俄比亚的野生种群中因 CDV 引起的死亡率高达 68%(Gordon et al 2015); 2016 年,中国野生动物救援和保护中心的大熊猫(*Giant panda*)CDV 的发病率为 27%,死亡率为 23%(Feng et al 2016b); 有报道称野生黑足雪貂(*Black-footed ferrets*)感染 CDV 后导致种群数量锐减,几近灭绝(Williams et al 1988)。2019 年、2022 年分别报道了在印度狮群及爪哇豹中的 CDV 感染死亡病例(Mourya et al 2019; Rahman et al 2022)。

CDV 对不同宿主具有广泛感染性,但需依赖于一定数量基础的种群才能持续存在及感染(Cleveland et al 2000)。犬科动物的高感染率、庞大种群数量、广泛分布对 CDV 的传播极为有利,提示了犬仍旧是 CDV 的主要传播源。因此,对犬只的监测及免疫防控仍至关重要。

1.1.3 CD 临床特征

CDV 感染易感动物的潜伏期根据传染源物种的差异性而有所不同,同源物种潜伏期约为 1 周左右,异源物种间潜伏期为 4 - 8 周不等。CD 在不同物种间的发病率与死亡率不同,但易感动物间的临床特征与发病机制呈现一致性(Jo et al 2019)。感染早期,CDV 与免疫细胞表面的 SLAM 受体结合,为病毒感染提供趋向性(Gradauskaite et al 2022),导致出现第一次病

毒血症并引起短暂性发热（持续期较短很快恢复正常），表现为扁桃体炎及眼鼻出现少量卡他性分泌物、上呼吸道感染、食欲下降、轻度抑郁。感染中期，最初的病毒血症将病毒通过血液循环感染扩散到全身的淋巴组织，进而导致伴有免疫抑制的第二次病毒血症出现。并由于 Nectin4 受体与病毒结合，使病毒趋向性的感染上皮细胞(Noyce et al 2013)，导致患犬出现发热、呼吸道症状、消化道症状和皮肤病变。具体表现为双相热、眼鼻出现大量脓性分泌物、结膜炎、脚垫鼻子严重角质化（变硬干裂），咳嗽、呼吸困难、肺脏啰音、呕吐、腹泻（粪便逐渐从水样发展为大量黏液及鲜血）、皮肤疱疹样病变、淋巴细胞下降(Appel et al 1995; Krakowka et al 1975)以及处于恒牙发育期的幼犬恒牙出现不规则的多灶性牙釉质损伤(Uhl et al 2019)。此外，因机体免疫抑制的发生，常继发细菌或病毒感染加剧临床症状，导致宿主极度消瘦，严重脱水引起死亡。其中以支气管败血波氏杆菌（*Bordetella bronchiseptica*, Bb）、犬腺病毒（*Canine adenovirus*, CAV）(Day et al 2020; Matsuu et al 2020)、犬细小病毒（*Canine parvovirus*, CPV）(Saltık 2023)为主要继发病原。感染后期，病毒可扩散到中枢神经系统，导致急性或持续的神经症状，临床表现为精神极度抑郁、部分或完全瘫痪、头部倾斜、眼球震颤、肌肉痉挛、癫痫发作、共济失调(Beineke et al 2009)。急性中枢神经系统疾病通常是致死性的，部分犬能够康复，但多数康复犬留有神经后遗症并伴随终身，表现为强迫性运动如头部震颤等(Martella et al 2008)。

1.1.4 CDV 病原学

犬瘟热病毒又称犬麻疹病毒（*Canine morbillivirus*），是副黏病毒科（*Paramyxoviridae family*）麻疹病毒属（*Morbillivirus genus*）中的一员(King et al 2018)。CDV 病毒形态呈多形性（大多为球状和丝状），成熟的病毒粒子直径在 150 - 300nm 之间，为单股负链不分节段的有囊膜 RNA 病毒，基因组包含 15690 个核苷酸，包括 6 个基因转录单位（N、P、M、F、H、L），基因组从 3' 端前导序列（约 58 个核苷酸）到 5' 端尾随序列（约 38 个核苷酸）呈线性排列，如图 1-1 所示。除 M 和 F 基因之间的非翻译区（Untranslated region, UTR）

大约有 405 个核苷酸外，其余转录单位由相对均匀的 UTR（107 - 155 个核苷酸）分开(Anderson et al 2008)，以独立且不重叠的转录单位组织编码 6 种结构蛋白和 2 种非结构蛋白:包括一个包膜相关蛋白(基质蛋白 M, Matrix protein)、两个糖蛋白（血凝素蛋白 H, Hemagglutinin protein 和融合蛋白 F, Fusion protein）、两个转录酶相关蛋白（磷酸化蛋白 P, Phosphoprotein 和大蛋白 L, Large protein）和一个包装病毒 RNA 的核衣壳蛋白 N（Nucleocapsid protein）; P 基因还编码 C 和 V 两种非结构蛋白(Martella et al 2008; Rendon-Marín et al 2019)。目前已知 CDV 基因型有 22 种(Wilkes 2022)，主要包括：美洲 1 型（America-1）至美洲 5 型（America-5），其中美洲 4 型（America-4）也称为北美/南美 4 型（North/South America-4），加拿大 1 型（Canada-1）、亚洲 1 型（Asia-1）至亚洲 6 型（Asia-6）、里海型（Caspian）、欧洲/南美 1 型（Europe/South America-1）、南美 2 型（South America-2）、南美 3 型（South America-3）、欧洲野生动物型（Europe wildlife）、类北极型（Arctic-like）、岩石型（Rockborn-like）、非洲 1 型（Africa-1）、非洲 2 型（Africa-2）、澳大利亚型（Australia）(Bi et al 2015a; Mourya et al 2019)。

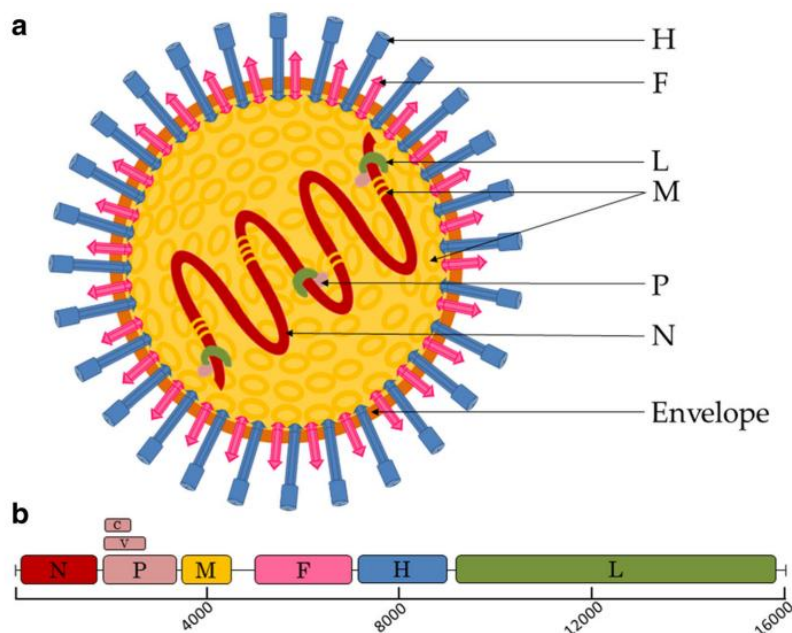


图 1-1 CDV 结构及基因组结构(Rendon-Marín et al 2019)

Fig.1-1 Structure and genome structure of CDV(Rendon-Marín et al 2019)

1.1.5 CDV 蛋白功能

N 基因(开放阅读框为 1572 个核苷酸)编码包裹病毒 RNA 的 N 蛋白, N 蛋白是病毒核衣壳的主要组成成分。基于 CDV 基因的表达, N 蛋白作为大蛋白 L 及磷酸化蛋白 P 转录和复制的模板, N、P、L 蛋白与病毒 RNA 组成核糖核蛋白复合物(Ribonucleoprotein complex, RNP)(von Messling et al 2001), 从而使病毒基因组具备复制和转录功能。此外, N 蛋白与 CDV 毒力有关, 有研究发现 CDV 野毒株对宿主中枢神经系统的持续性感染与 N 蛋白有着密切联系(Stettler et al 1995)。作为 CDV 结构蛋白中相对保守且含量丰富的蛋白, N 蛋白在诱导免疫反应方面也发挥重要的作用, 不仅能够发挥细胞免疫产生细胞毒性 T 细胞反应, 还能诱导中和抗体的产生(Cherpillod et al 2000)。有研究证实, N 蛋白能以 mTOR 依赖的方式诱导完全自噬, 促进病毒复制(Chen et al 2023)。

P 基因(开放阅读框为 1524 个核苷酸)在 CDV 中高度保守, 编码一个磷酸化蛋白 P 和两个非结构蛋白 V 和 C。P 蛋白能够在磷酸化作用下被激活发挥转录辅助因子作用(Liu et al 1997), 进而参与转录复制。有研究指出 C 蛋白对 CDV 毒力至关重要, 缺失 C 蛋白后 CDV 的毒力在体内外均被减弱(Siering et al 2021)。此外, 非结构蛋白 V 和 C 还能够参与调节免疫反应, 通过直接或间接调控干扰素(IFN), 从而参与宿主的免疫抑制(Nakatsu et al 2008; Sparrer et al 2012)。

基质蛋白 M 由 M 基因编码(具有 1008 个核苷酸), 是 CDV 中最小的蛋白, 位于核衣壳和包膜之间, 构成病毒包膜的内层(Liljeroos et al 2011), 参与病毒的转录、组装、出芽过程。M 蛋白作为包膜相关蛋白, 通过与 RNP 接触结合, 将其连接到包膜上, 从而在病毒的释放脱落中发挥作用(Bringolf et al 2017)。研究发现, M 蛋白不仅能够影响包膜糖蛋白(血凝素蛋白 H、融合蛋白 F)在细胞膜上的分布, 还对病毒致病力有一定影响(Dietzel et al 2011)。

F 基因(具有 1989 个核苷酸)编码构成病毒纤突的 F 蛋白, 属于 I 型糖蛋白, F 蛋白最初以无活性的 F0 前体蛋白形式存在, 后经裂解连结变

成有活性的 F1、F2 亚蛋白,加工折叠后才形成具有融合功能的 F 蛋白(Avila et al 2015)。F 蛋白在识别病毒细胞受体和进入宿主细胞中起关键作用。附着宿主细胞后,F 蛋白介导病毒包膜与宿主细胞膜的融合,从而使病毒 RNP 进入细胞质(Lamb 1993)。F 蛋白还能够促进宿主细胞之间的膜融合,形成合胞体(Smith et al 2009)。CDV 作为麻疹病毒属成员之一,与其他同属病毒(麻疹病毒等)具有免疫交叉保护性,这依赖于麻疹病毒属 F 蛋白抗原表位的高度同源性。此外,有研究发现 F 蛋白信号肽(F signal peptide, Fsp)有助于 CDV 的特性研究, Sarute 等人通过比较 Fsp 编码区与 H 基因的系统发育发现 Fsp 具有显著的遗传变异型,对于 CDV 遗传谱系有鉴定作用(Sarute et al 2013)。

H 基因开放阅读框含 1824 个核苷酸,编码血凝素 H 蛋白,与 F 蛋白共同组成病毒纤突。H 蛋白是 CDV 感染宿主的关键蛋白,因为病毒在感染早期利用 H 蛋白吸附在宿主细胞受体上,促进病毒与宿主细胞膜结合,进而决定病毒的趋向性并启动感染(von Messling et al 2001)。当 H 蛋白四聚体形成时,受体结合诱导 H 四聚体构象发生变化,释放 F 三聚体,进行不可逆的结构重排,在细胞膜表面形成融合孔,进而将病毒 RNP 引入宿主细胞质(Ader-Ebert et al 2015; Plattet et al 2016)。H 蛋白还是诱导机体产生中和抗体的重要蛋白之一,含多种 T 细胞、B 细胞抗原表位(Bi et al 2015b)。

有研究发现 H 基因突变导致病毒和宿主之间发生适应性补偿,进而一定程度上驱动 CDV 的进化(Martinez-Gutierrez et al 2016; Panzera et al 2015)。这种情况的发生,会导致 CDV 在感染宿主多样性及毒力方面受很大影响(Ke et al 2015)。McCarthy 等人研究发现 H 蛋白残基 549 处于正选择状态,该残基 Y549H 的突变(酪氨酸 Y 突变为组氨酸 H)可能与非犬宿主的感染有重要关系(McCarthy et al 2007)。有研究发现不同毒株间 H 基因的核苷酸差异性可达 11%(Ke et al 2015),目前 H 蛋白已成为研究 CDV 变异和进化最合适的靶点,被广泛用于 CDV 系统发育分析(Bolt et al 1997)。虽然 CDV 血清型只有一种,但由于 H 基因的高度分化,常根据 CDV H 基

因的差异，并结合地理位置对不同毒株进行分型，如美洲 1 型和亚洲 1 型等。

大蛋白 L 由 L 基因（6555 个核苷酸）编码形成病毒聚合酶，位于核衣壳内，L 蛋白为 CDV 结构蛋白中最大蛋白，高度保守，是病毒基因组转录和复制的重要基础，发挥多功能酶作用(Duque-Valencia et al 2019)。

1.1.6 CDV 致病机制

CDV 通过鼻腔或者口腔粘膜侵入宿主体内，穿过呼吸道，利用 H 蛋白识别并附着于气道巨噬细胞或树突状细胞上的 SLAM 受体(de Witte et al 2008)。然后通过 F 蛋白介导膜融合，使得病毒 RNP 感染细胞进行增殖。感染后的免疫辅佐细胞（Accessory cell, A cell）（巨噬细胞或树状突细胞）携带病毒侵入淋巴结进而感染免疫活性细胞（Immunocompetent cell, ICC）（主要是 T 细胞和 B 细胞），导致病毒大量扩增并引发原发性病毒血症(Leonard et al 2008)。之后病毒会扩散至脾脏、胸腺、肺脏和胃肠道淋巴结等，通过血液循环扩散感染至整个免疫循环系统(von Messling et al 2004)，导致继发性病毒血症，引起淋巴细胞数量一过性下降并伴有严重的免疫抑制。其中 T 细胞比 B 细胞受影响更大，特别是 CD4⁺淋巴细胞下降迅速并持续数周(Iwatsuki et al 1995; Wünschmann et al 2000)。CDV V 蛋白是介导免疫抑制的关键蛋白，有助于维持病毒在 T 细胞中的有效复制，抑制 α 干扰素和细胞因子如 IL-2、IL-6 等的表达(von Messling et al 2006)。感染中后期，受感染的淋巴细胞从循环中迁移到管腔上皮的基底外侧(von Messling et al 2004)，使得病毒与上皮细胞的 Nectin4 受体相互作用，侵入宿主上皮组织，破坏组织结构功能进而表现出相应的临床症状。之后 CDV 从上皮细胞的顶端脱落，排出宿主体外进而感染其他易感宿主(Sawatsky et al 2012)，如图 1-2 所示。感染后期根据毒株毒力及宿主免疫状态而呈现不同的感染结果。若宿主免疫反应强烈能清除体内多数病毒则愈后良好，但部分病毒依旧残留在葡萄膜、尿路上皮、皮肤脚垫、淋巴器官等组织中(Kapil et al 2015; Martella et al 2008)；若免疫反应较弱，病毒通常会穿过血脑屏障(Blood-brain barrier, BBB)，释放到脑脊液中(Cerebrospinal fluid,

CSF) (Klemens et al 2019), 与中枢神经系统 (CNS) 中的内皮细胞上的 Nectin4 受体及某些尚未识别的神经受体 GliaR 等结合并感染细胞 (Alves et al 2015; Lempp et al 2014; Takenaka et al 2016)。感染宿主的中枢神经系统病变包括脱髓鞘、神经元坏死、神经胶质瘤等 (Beineke et al 2009), 大多数在感染后 2 至 4 周死亡。

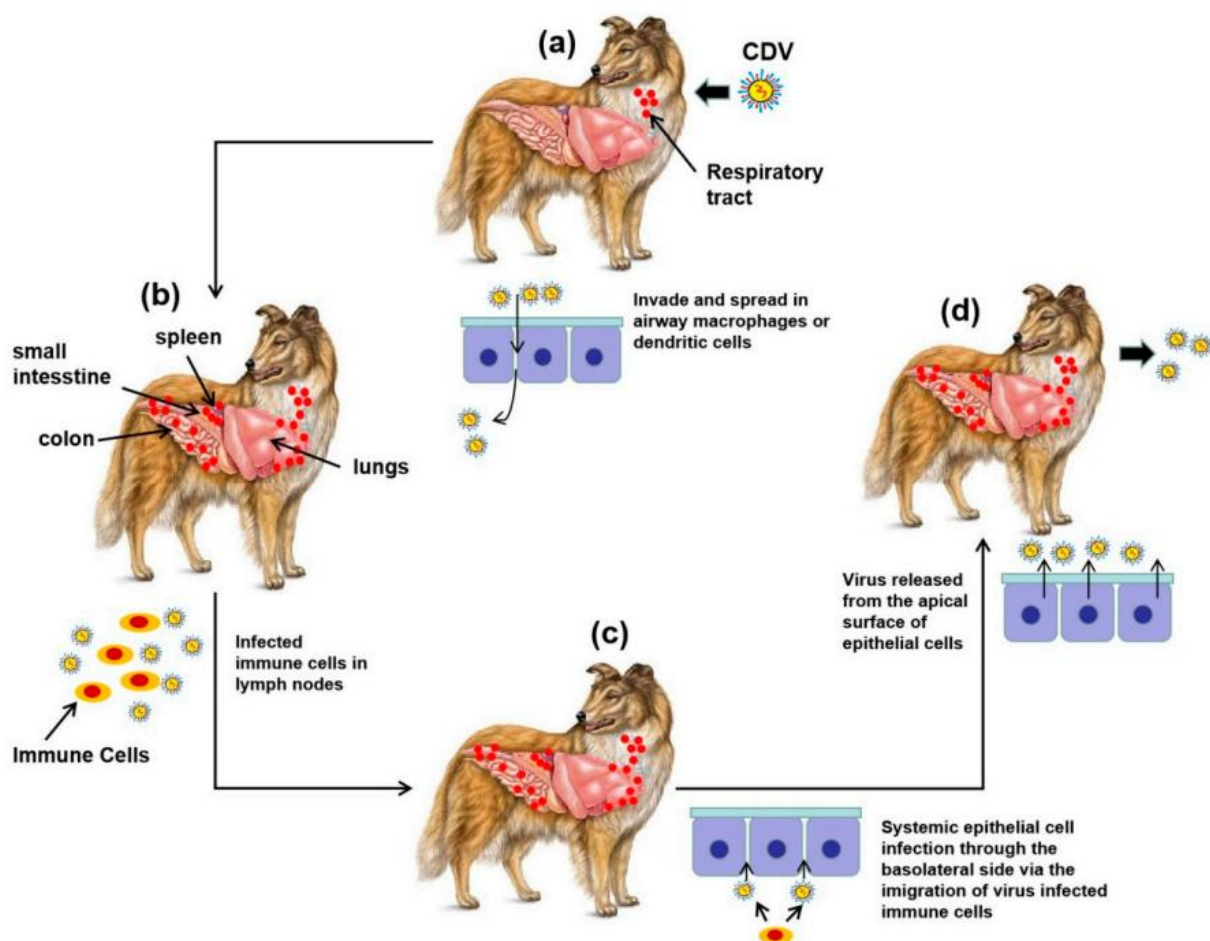


图 1-2 CDV 入侵宿主示意图 (Zhao et al 2020)

Fig.1-2 Schematic diagram of CDV invading the host (Zhao et al 2020)

1.1.7 CDV 诊断技术

CD 因宿主广泛及复杂的临床表现, 在全球范围内对易感动物造成巨大威胁。因此 CDV 的快速及可靠诊断, 为感染动物的确诊和治疗提供重要依据, 对 CD 的有效防控具有重要意义。

1、临床鉴别诊断

CD 的临床症状与 CPV、犬冠状病毒（Canine coronavirus, CCV）、CAV、狂犬病毒（Rabies virus, RABV）、及部分细菌性和寄生性疾病引起的其他疾病相似(Kim et al 2018)。临床诊断时需仔细辨别，易感动物出现任何发热情况时，应首先考虑 CDV。通过其他症状如结膜炎；卡他性或脓性眼鼻分泌物；皮肤裸露处出现红疹；咳嗽、呼吸困难等呼吸道症状；呕吐、腹泻等消化道症状等综合考虑。CDV 引起的血液变化包括淋巴细胞下降、炎性蛋白异常升高、血小板减少等。因此，在血液分析时出现以上指标变化可考虑 CDV。鉴别诊断可初步判断但不能确诊，必须进一步借助其他诊断技术方能确诊 CDV 感染。

2、剖检及病理变化诊断

病毒对细胞受体嗜性不同导致对组织趋向性不同，观察淋巴组织可见淋巴结出血肿大，上皮组织可见肺脏、肝脏、肠道、膀胱、生殖道等器官出血，神经组织可见脑肿胀出血。但由于组织病理学特异性相对较差，需要同时将病变组织固定进行病理切片如 HE 染色检测嗜酸性包涵体及免疫组化检测病毒感染组织器官的具体分布(Liu et al 2021; Rentería-Solís et al 2014)等，进行特异性验证诊断方可确证。

3、病毒分离诊断

病毒分离是诊断病毒性疾病的“金标准”。将含有活病毒的样品接种细胞经几代盲传后观察细胞病变，CDV 细胞病变作用与其他麻疹病毒，特别是麻疹病毒相似，光学显微镜下的特征是细胞脱落、空泡化和多核巨细胞（合胞体）的形成(Lednicky et al 2004b)。分离后的病毒可通过透射电镜观察是否符合副黏病毒科形态，但该技术由于特异性较低，不能区分其他同科病毒，还需要通过动物回归等实验进行进一步验证。而且因病毒分离方法因分离耗时久且成功率较低、操作过程难度较大，故作为临床诊断应用时效果不佳。

4、免疫学诊断

单克隆抗体在 CD 的免疫学诊断中的应用是必不可少的，Orvell 等人首先开发了针对 CDV N、F、H、P 蛋白的单克隆抗体(Orvell et al 1985)，

具有用于 CDV 免疫诊断和免疫治疗的潜力。免疫荧光技术是诊断 CDV 的通用法，根据抗原抗体特异性反应，能够通过荧光判定 CDV 诊断结果。同样在接种疫苗、亚临床或临床感染后的几个月内，CDV 特异性免疫球蛋白 M (IgM) 在感染后至少持续存在 3 个月，可由酶联免疫吸附实验(ELISA) 特异性识别(Jensen et al 2015)。病毒中和试验 (VNT) 是检测金标准，但检测过程用时较长，因此不适用于快速检测。免疫胶体金技术 (GICT) 目前由于快速诊断的优势广泛用于临床诊断，此技术耗时短操作简单，10 min 即可判读检测结果。但存在最低检出量的条件限制，在病毒感染初期或本身病毒含量低的情况下，灵敏度较差。

5、分子生物学诊断

分子生物学诊断主要包括逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和实时 RT-PCR 等，此技术不要求有活病毒且拥有少量抗原核酸即可进行检测鉴定，具有良好的敏感性、特异性、准确性，广受实验室诊断青睐。此外，该检测技术不局限于粪便、尿液、脑脊液等临床样本，大大提高了检测效率。Martella 等人建立的嵌套 RT-PCR 系统，使用针对 H 基因的特异性引物能够对不同 CDV 毒株进行基因分型，进而区分 CDV 野毒株及疫苗株 (Martella et al 2007)。巢式 PCR 与常规 RT-PCR 结合，具有较高的特异性 (Kim et al 2001)。Elia 及 Scagliarini 等人分别基于 CDV N、P 基因设计 TaqMan 探针建立的 qPCR 比其他 PCR 检测具有更高的敏感性和特异性 (Elia et al 2006; Scagliarini et al 2007)。但由于存在核酸提取要求的局限性，分子生物学检测虽然具有极高的准确及灵敏性，但目前局限于实验室阶段，不能广泛应用于现场临床诊断。

1.1.8 CDV 分离培养

病毒分离培养不仅是病毒诊断的“金标准”，同样也是后续相关研究展开的必要前提。CDV 为有囊膜 RNA 病毒，对环境抵抗力极低，特别对光照及温度高度敏感，极易在环境中降解，因此分离成功率较低(Karki et al 2022)。目前常用于分离 CDV 的细胞系主要分为两类：一类是原代细胞，包括易感动物外周血淋巴细胞、腹腔巨噬细胞及鸡胚成纤维细胞等，部分毒株还可以通过

鸡胚绒毛尿囊膜分离。最初 Appel 等人分离 CDV 时，通常需要补充肺泡巨噬细胞与有丝分裂源刺激的淋巴细胞共培养(Appel et al 1995)。利用腹腔巨噬细胞成功分离 CDV 的方法也有报道(Brügger et al 1992)。但由于获取原代细胞所需成本较高且传代次数少，因此原代细胞不适用于病毒的长期培养。另一类是传代细胞，包括犬肾细胞 (MDCK)、非洲绿猴肾细胞 (Vero)、狨猴 B 淋巴细胞 (B95a)、猫肾细胞 (CRFK) 等。其中 MDCK 和 Vero 细胞等常用于 CDV 的初代分离，但成功率较低且基因易发生突变 (Lednicky et al 2004b)，Kai 等人使用 B95a 细胞有效分离 CDV 毒株且致病力未发生改变(Kai et al 1993)。传代细胞在分离 CDV 时常需要盲传多代才能使病毒适应细胞进而产生细胞病变，且多数毒株 CPE 不明显或病毒适应细胞后随着传代次数的增加导致病变不明显。因此，传代细胞不适用于 CDV 的分离鉴定。自麻疹病毒属的细胞受体被发现后，Seki 等人利用 SLAM 受体在 Vero 细胞上的稳定表达可有效提高 CDV 野毒株的分离成功率(Seki et al 2003)。表达病毒细胞受体能够提高细胞对 CDV 的敏感度，使毒株缩短适应细胞的时间，从而大大增加分离效率。因此，在分离培养 CDV (包括其他相关的麻疹病毒) 时，表达病毒细胞受体的细胞系越来越受欢迎(Adombi et al 2011; Feng et al 2016a; Seki et al 2003)。

1.1.9 CDV 受体研究进展

1.1.9.1 信号淋巴细胞激活分子

信号淋巴细胞激活分子 (Signaling lymphocyte activation molecule, SLAM) 又被称为 CD150，是一种在细胞膜表面表达的分子质量约为 70 - 95 kDa 的 I 型糖蛋白(Tatsuo et al 2001)。分布于活化的 T、B 淋巴细胞、巨噬细胞、成熟树突状细胞上，具有 8 个潜在 N-糖基化位点，属于免疫球蛋白 CD2 超家族成员之一。其结构由一个远膜端可变 V 结构域和一个近膜端保守 C2 结构域 (C2 结构域中存在两个二硫键) 及胞浆区的三个独特的酪氨酸磷酸化基序组成(Tatsuo et al 2002)，如图 1-3 所示。最初由 Tatsuo 等人发现人 SLAM 是麻疹病毒的细胞受体，随后 Tatsuo 等人通过试验证实了大多数麻疹病毒属成员包括 CDV、牛瘟病毒 (Rinderpest virus, RPV) 等使用 SLAM 作为

细胞受体，是麻疹病毒属成员感染细胞的共同特性。CDV 的 H 蛋白与靶细胞上 SLAM 受体的 V 结构域之间的相互作用对病毒感染至关重要(Ono et al 2001)，SLAM 受体共有 39 个残基参与与 CDV 蛋白 H 的相互作用。Ohishi 等人发现 SLAM 受体的残基 K76 在宿主细胞识别和病毒结合中起着关键作用(Ohishi et al 2014)。其中病毒与细胞间的膜融合程度和效率，取决于 H 蛋白与 SLAM 的结合，这是因为对膜融合至关重要的残基位于 H 蛋白头部外侧区域(β 螺旋桨的 4 - 6 号叶片)与 SLAM 的 V 结构域前部对齐，并且基于 SLAM 的残基 E123 的关键作用，可以向 H 蛋白的头部结构域传递有效的融合触发信号(Khosravi et al 2016)。CDV H 蛋白与 SLAM 受体的结合启动了病毒入侵宿主，进而对靶细胞感染破坏的进程，抑制抗体和细胞因子的产生，从而导致病毒血症和免疫抑制的发生。

不同种属动物间 SLAM 受体的氨基酸序列差异显著，比较不同物种（人、犬、浣熊、水貂、狐狸、牛、老鼠）的 SLAM 受体氨基酸序列，发现各物种间 SLAM 同源性较低(Duque-Valencia et al 2019)。SLAM 的 V 结构域上关键残基的变化可能是导致不同宿主物种对病毒易感性差异的原因(Ohishi et al 2014; Yadav et al 2019)。目前有研究已经确定 CDV 可以通过 H 蛋白的某些特定突变，而获得与人 SLAM 受体结合的能力，进而感染人类细胞。Bieringer 等人用 CDV 感染表达人 SLAM 受体的 Vero 细胞，在接毒后第 3 代时可以观察到合胞体形成。对病毒 H 蛋白氨基酸序列分析，发现了 D540G 位点氨基酸的替换，使得 H 蛋白可以使用人 SLAM 受体引起细胞感染产生病变(Bieringer et al 2013)。另外，在 Otsuki 等人的研究中发现 CDV 在 H358 和 Vero-human-SLAM 细胞中连续培养 8 代获得 V、C、F、H 蛋白的氨基酸突变，适应于人类受体（SLAM、Nectin4 受体）进而感染细胞(Otsuki et al 2013)，在细胞受体水平上表现出了跨宿主传播人类能力。

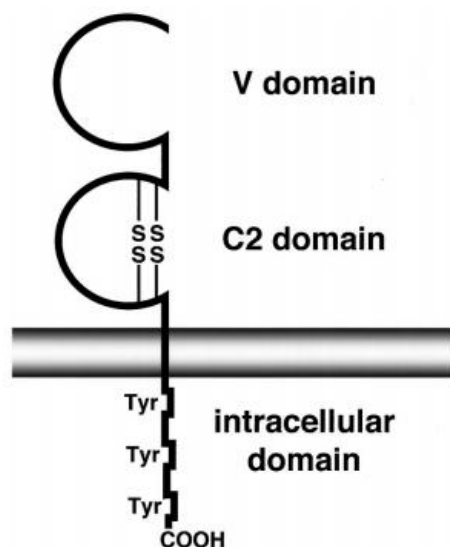


图 1-3 SLAM 结构示意图(Tatsuo et al 2002)

Fig.1-3 Schematic diagram of SLAM structure(Tatsuo et al 2002)

1.1.9.2 脊髓灰质炎病毒受体相关分子 4

脊髓灰质炎病毒受体相关分子 4 (Poliovirus-receptorlike-4, PVR4), 又称粘附连接蛋白 4 (Nectin4), 属于粘附连接蛋白家族的成员之一, 该家族由四个成员组成包括 Nectin1、2、3、4(Takai et al 2008a)。Nectin4 是一种 I 型跨膜糖蛋白, 具有三个 Ig 样外结构域(一个 V 结构域和 2 个 C2 结构域)、一个跨膜区和一个细胞质尾部(Fabre et al 2002), 如图 1-4 所示。Nectin 家族是介导细胞-细胞粘附系统中的重要组成成分, 在抑制细胞运动、促进细胞间通讯和调节增殖方面能够发挥关键作用(Kurita et al 2011; Takai et al 2008b)。Mühlebach 及 Noyce 等人先后于 2011 年分别证实了 Nectin4 是麻疹病毒的上皮细胞受体(Mühlebach et al 2011; Noyce et al 2011), 随后 Noyce 等人证实了 Nectin4 在 CDV 感染中的细胞受体作用(Noyce et al 2011)。Nectin4 在极化的上皮细胞及中枢神经系统的内皮细胞中表达(Delpeut et al 2014; Pratakpiriya et al 2012), 例如胎盘细胞、支气管、细支气管、肺、胃、肠腺上皮细胞以及移行上皮细胞、肾盂上皮、扁桃体上皮、表皮角质形成细胞以及中枢神经系统的多种神经细胞(神经元、室管膜细胞等)等(Zhao et al 2022)。

最初 CDV 侵染宿主通过 SLAM 受体与免疫细胞结合, 之后携带病毒

的免疫细胞利用气道上皮细胞基底外侧的 Nectin4 受体，通过膜融合侵入上皮细胞进而感染并释放病毒，促进病毒传播。Nectin4 受体通过 V 结构域与 CDV H 蛋白结合，V 结构域参与连接物之间的同型和异型相互作用，而 C2 结构域增强相互作用的亲和力。Delpeut 等人证明了 H 蛋白中的两个关键氨基酸残基（P493、Y539）与 Nectin4 受体上的四个关键氨基酸残基（F132、P133、A134 和 G135）是受体介导病毒进入上皮细胞所必需，并且以上氨基酸残基高度保守。有报道称 Nectin4 受体广泛参与 H 蛋白的 $\beta 4$ 和 $\beta 5$ 叶片并使用一个双残基基序渗透到 $\beta 4$ - $\beta 5$ 凹槽中心的疏水口袋中，接触界面以疏水相互作用为主，Nectin4 相比其他受体对 H 蛋白具有较强的结合亲和力(Zhang et al 2013)。

Nectin4 受体的 V 结构域氨基酸序列在不同物种中高度保守，通过序列比较发现氨基酸同源性较高(Yadav et al 2019)。与 SLAM 的差异性相比，Nectin4 能够有效利用 H 蛋白与人 Nectin4 受体作用结合，且 H 蛋白不需要发生突变来适应。有研究发现人与犬之间的 Nectin4 序列存在微小的差异，与人 Nectin4 受体序列相比，犬的 V 结构域只有三个氨基酸不同。因此，能够利用人 Nectin4 受体的能力是 CDV 毒株的特有表征(Noyce et al 2013; Otsuki et al 2013)。Nectin4 受体与 CDV 的结合，使得病毒对上皮组织具有一定的趋向性，进而表现出呼吸道、消化道、泌尿道、生殖道等临床症状。此外，近年来研究发现 Nectin4 在不同类型的上皮组织癌细胞表面表达上调，例如乳腺癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中过度表达。因此目前以 Nectin4 为靶点的抗体-药物共轭物（ADC）的研发备受关注，Nectin4 成为癌症治疗的重要潜在靶点(Bouleftour et al 2023; Chatterjee et al 2021)。

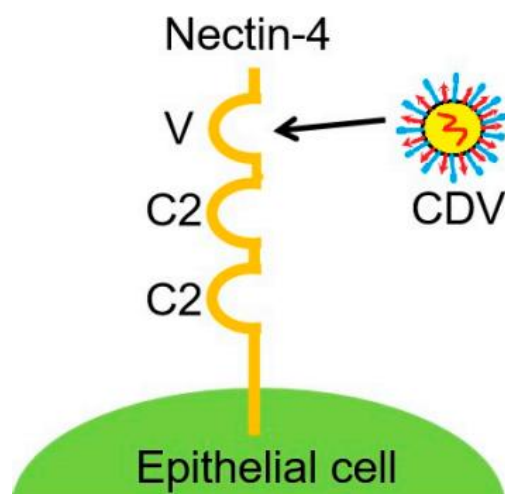


图 1-4 Nectin4 结构示意图(Zhao et al 2022)

Fig.1-4 Schematic structure of Nectin4(Zhao et al 2022)

1.2 目的与意义

近年来 CDV 在环境压力下不断变异造成易感宿主不断扩大，其中已免疫动物也多有 CD 爆发的报道，提示了目前市售 CDV 疫苗株可能无法提供完全保护，进而导致 CDV 野毒株在犬科动物及其他易感动物中引起多系统临床疾病甚至死亡，严重限制了宠物业、养殖业、野生动物保护业的发展。而 CDV 作为有囊膜 RNA 病毒，存在对外界环境抵抗力弱等缺点，导致不易在普通细胞上分离传代，制约了对 CDV 的深入研究。

Nectin4 作为 CDV 入侵宿主的重要细胞受体，在不同宿主中高度保守，因此本研究通过构建表达 Nectin4 受体的 Vero 细胞系，以快速有效的分离 CDV 野毒株且能够进行稳定连续的传代增殖，为 CDV 野毒株在分离培养研究中提供有效工具。同时对 CDV 毒株的 H 基因进行遗传进化分析，及在易感动物上探究毒株致病性强弱，充分阐明 CDV 流行毒株的生物学特性，为 CDV 疫苗研发提供候选疫苗毒株和效力检验用毒株，对 CD 防控具有重要意义。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 病料样本、病毒、实验动物

从全国 5 个省份（湖北、湖南、广西、江西，河南）采集犬只眼、鼻、肛分泌物及病死犬组织尸体等，-80℃保存以供检测和病毒分离。

CDV-wh15 株、CDV-SC 株均由本实验保存。

实验犬由武汉科前生物股份有限公司代购，饲养于科前生物股份有限公司 SPF 级动物房。

2.1.2 细胞、质粒和菌株

Vero 细胞系（非洲绿猴肾细胞）、HEK-293T 细胞系（人胚胎肾细胞系）均由本实验室保存。

慢病毒包装质粒 pMD2.G、psPAX2、pLVX 由本实验室保存，pMD18-T 克隆载体购自大连宝生物工程（TaKaRa）有限公司。

大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 由本实验保存。

2.1.3 实验试剂、抗体

各种限制性内切酶、高纯度耐热 DNA 聚合酶（2 $\times$ Taq Master Mix）、超保真聚合酶（Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase）、DNA Marker（DL2000、DL10000）、逆转录酶试剂（HiScript[®] II Reverse Transcriptase）、同源重组试剂（ClonExpress[®] MultiS One Step Cloning Kit）、SYBR 染料法 qPCR 酶（Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix）均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司（Vazyme）有限公司。

胎牛血清（FBS）购自美国 Gibco 公司；

细胞培养基 DMEM、青-链霉素（100 $\times$ ）购自美国 Sigma 公司；

杀稻瘟霉素（Blasticidin）购自美国 InvivoGen 公司；

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自美基生物公司；

去内毒素提取质粒试剂盒购自美国 Omega 公司；
jetPRIME 转染试剂购自 Polyplus 公司；
慢病毒浓缩液购自博奥龙公司；
蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自美国 Roche 公司；
裂解液 RIPA（强）购自武汉碧云天公司；
病毒 DNA/RNA 提取试剂盒（柱提法）购自科前生物股份有限公司；
鼠源 HA 标签抗体购自 Sigma 公司；
Alexa Fluor 488 标记羊抗鼠 IgG（H+L）购自 Invitrogen 公司；
HRP 标记兔抗鼠 IgG（H+L）购自 Signalway Antibody 公司；
抗 CDV-N 蛋白单抗 3E5，5A7 均由本实验制备并保存。

2.1.4 实验仪器

PCR 仪（东胜 ETC811，苏州东胜兴业仪器有限公司）；
电泳仪（DYY-III型-8B，中国北京六一仪器厂）；
紫外凝胶成像系统（GelDoc2000，美国 Bio-Rad 公司）；
CO₂ 恒温培养箱（MCO-20AIC，日本 SANYO 公司）；
生物安全柜（Nu-440，美国 LABCONCO 公司）；
生物光学显微镜（Nikon80i，日本 Nikon 公司）；
荧光倒置显微镜（IX51，日本 OLYMPUS 公司）；
-80℃超低温冰箱（DW-86L626，海尔公司）；
超净纯水仪（Milli-Q® IQ7000，美国 Milipore 公司）；
水浴锅（DK8D，上海精宏公司）；
离心机（5408R，德国 Eppendorf 公司）；
荧光定量 PCR 仪（GENTIER 96，天隆科技有限公司）。

2.1.5 培养基、相关试剂的配制

2.1.5.1 细胞培养相关试剂

细胞生长培养液：含 10%FBS 和 1%青-链霉素的 DMEM，4℃保存备用。
细胞维持培养液：含 2%FBS 和 1%青-链霉素的 DMEM，4℃保存备用。

1×磷酸盐缓冲液（1×PBS）：依次称取氯化钠（NaCl）8 g、氯化钾（KCl）0.2 g、磷酸氢二钠（Na₂HPO₄）1.42 g、磷酸二氢钾（KH₂PO₄）0.27 g，加入 800 mL 去离子水充分溶解，调节 pH 至 7.4，加入去离子水定容至 1000 mL，高压灭菌后室温保存备用。

0.25%胰蛋白酶消化液：称取胰酶 2.5 g 溶解于 1 L 1×PBS（PH=7.4）中，用 0.22 μm 过滤器过滤分装，-20 °C 保存备用。

2.1.5.2 细菌培养相关试剂

LB 液体培养基：依次称取胰蛋白胨（Tryptone）10 g、酵母浸出物（Yeast Extract）5 g、NaCl 10 g，加入 800 mL 去离子水充分溶解，调节 pH 至 7.0，加入去离子水定容至 1000 mL，高压灭菌后 4 °C 保存备用。

LB 固体培养基：在 LB 液体培养基中加入 1.5% 的琼脂粉，高压灭菌后待培养基冷却至 45 °C 左右，按比例加入相应的抗生素混匀，在生物超净台中，倒制平板，待培养基冷却凝固后，4 °C 保存备用。

氨苄青霉素（Amp）：称取 Amp 于去离子水中充分溶解，使浓度为 50 mg/mL，用 0.22 μm 过滤器过滤分装，-20 °C 保存备用。

2.1.5.3 其他相关试剂

50×电泳缓冲液（50×TAE）：称取 Tris base 242 g，加入 700 mL 去离子水充分溶解，再加入冰醋酸 57.1 mL、0.5 mol/L EDTA（pH=8.0）100 mL，加入去离子水定容至 1000 mL，室温保存备用。

5×SDS-PAGE 电泳缓冲液：称取 Tris base 15.1 g、甘氨酸 94 g、SDS 5 g，加入 800 mL 去离子水充分溶解，加入去离子水定容至 1000 mL，室温保存备用。

5×转膜缓冲液：称取甘氨酸 14.43 g、Tris base 3.03 g，加入到 700 mL 去离子水中，再加入甲醇 200 mL，加入去离子水定容至 1000 mL，室温保存备用。

TBST 缓冲液：称取 NaCl 8 g、KCl 0.2 g、Tris base 3 g，加入去离子水 800 mL，加入 1 mL 吐温 20 充分混匀，去离子水定容至 1000 mL，室温保存备用。

2.1.6 生物学分析软件

分子生物学分析软件包括：DNAMAN、DNASTAR、GraphPad Prism 软件、MEGA7、SnapGene、Signal IP、Image J 等。

2.2 实验方法

2.2.1 引物设计与合成

登录 NCBI，参考发表在 GenBank 基因库中的犬 Nectin4 序列（登录号：KJ623742），Nectin4 开放阅读框 ORF 通过 Signal IP 在线软件（[http://www.cbs.dtu.dk/services/Signal IP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/Signal_IP/)）预测分析信号肽位置及信号肽剪切位点，设计去除信号肽的 Nectin4 受体引物 no-Nectin4-F、Nectin4-R，扩增去信号肽 Nectin4 基因片段。参考含 HA 标签的 Igκ 膜定位信号肽序列，设计引物 HA-F1、HA-F2、HA-F3，扩增 Igκ-HA-Nectin4 片段。参考实验室 Lenticas9 质粒图谱设计引物 BSD-F、BSD-R，扩增 P2A-BSD 片段。

参考 CDV 国家标准引物（GB/T27532-2011），合成检测引物 CDV-GB-F、CDV-GB-R。下载 NCBI 上已发表 CDV H 编码区全长基因序列，比对各参考序列设计 H 基因扩增引物 CDV-H-F、CDV-H-R。参考地方标准（DB31T/954-2015），设计 CDV 荧光定量检测引物 Q-CDV-F、Q-CDV-R。引物均由北京擎科生物科技有限公司合成。引物序列如表 1 所示：

表 2-1 实验所用引物列表

Table 2-1 List of primers used in the experiment

引物名称	引物序列(5'→3')
no-Nectin4-F	AGACCTGGAGAACTGGAG
Nectin4-R	CTTGTCATCGTCGTCCT
HA-F1	ATTACCCTTACGATGTGCCCGATTACGCCGGCGCTCTGGAAAGA CCTGGAGAACTGGAG
HA-F2	CTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCTGGATCTACAGG AGATTACCCTTACGA
HA-F3	tagagcgtgccaccGAATTCGCCACCATGGAGACCGACACCCTGCTGC TGTGGGTGCT
BSD-F	AGGACGACGATGACAAGgcaacaaacttctctctgc
BSD-R	AAAAAGATCTGCTAGCTCGAGttagccctccacacat
CellYZ-F	AGCTCATCGATGCATGGT
CellYZ-R	ttagccctccacacata
CDV-GB-F	CGAGTCTTTGAGATAGGGTT
CDV-GB-R	CCTCCAAAGGGTTCCCATGA
CDV-H-F	AGGTAGTCCAACAATGCTC
CDV-H-R	GGCTATCTAGATGGACCTCA
Q-CDV-F	CGTCTCAGAATCAGCCATTTGTA
Q-CDV-R	GTCGCCCCCTAATGCATTGTT

2.2.2 pLVX-Nectin4-BSD 真核表达载体构建

2.2.2.1 去信号肽 Nectin4 基因扩增与纯化

使用灭菌组织剪将犬只肺脏剪成小块，放入 2.0 mL 灭菌离心管内，管内放 3 - 4 颗小钢珠，加入无血清 DMEM 进行研磨，待组织研磨均匀后，4 °C，10000 r/min，离心 10 min，取 200 μL 研磨液上清，参照 trizol 法提取犬只肺脏总 RNA，以提取的犬肺脏总 RNA 为模板，利用诺唯赞逆转录酶试剂（HiScript® II Reverse Transcriptase）合成 cDNA，反转录体系如表 2 所示：

表 2-2 反转录体系

Table 2-2 Reverse transcription systems

组分	体积
5×HiScript II Buffer	4 μL
HiScript® II Reverse Transcriptase	1 μL
dNTP Mix (10 μM)	1 μL
Oligo(dT) ₂₃ VN (50 μM)	1 μL
Total RNA	10 μL
RNase-free ddH ₂ O	2 μL

反应程序为：25 °C 5 min，50 °C 45 min，85 °C 2 min，反转录得到的 cDNA 产物立即用于 Nectin4 的扩增或-20 °C保存。

以反转录得到的 cDNA 为模板，以 no-Nectin4-F、Nectin4-R 为引物，进行 PCR 扩增去信号肽 Nectin4 基因片段，PCR 反应体系如表 3 所示：

表 2-3 扩增去信号肽 Nectin4 基因的 PCR 体系

Table 2-3 PCR system for amplification of No-signal Nectin4 gene

组分	体积
5×SF Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	10 μL
dNTP Mix (10 μM)	1 μL
no-Nectin4-F (10 μM)	2 μL
Nectin4-R (10 μM)	2 μL
Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μL
cDNA	4 μL
RNase-free ddH ₂ O	30 μL

反应程序：95 °C预变性 5 min，循环反应：95 °C 30 s，60 °C 30 s，72 °C 1 min，35 个循环，72 °C终延伸 10 min。反应结束后，PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，使用紫外凝胶成像系统观察结果，将含有目的片段 DNA 凝胶切下，按胶回收试剂盒说明书对目的片段回收纯化，回收产物立即用于后续使用或-20 °C存放。

2.2.2.2 Igκ-HA-Nectin4 基因扩增与纯化

以去信号肽 Nectin4 胶回收产物为模板，分别使用 HA-F1、Nectin4-R；HA-F2、Nectin4-R；HA-F3、Nectin4-R 三对引物，依次分段进行 PCR 扩增 Igκ-HA-Nectin4 基因片段，PCR 反应体系如表 4 所示：

表 2-4 扩增 Igκ-HA-Nectin4 基因的 PCR 体系

Table 2-4 PCR system for amplification of Igκ-HA-Nectin4 gene

组分	体积
5×SF Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	10 μL
dNTP Mix (10 μM)	1 μL
HA-F1/F2/F3 (10 μM)	2 μL
Nectin4-R (10 μM)	2 μL
Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μL
DNA	4 μL
RNase-free ddH ₂ O	30 μL

反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 循环反应: 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 终延伸 10 min。反应结束后, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 使用紫外凝胶成像系统观察结果, 将含有目的片段 DNA 凝胶切下, 按胶回收试剂盒说明书对目的片段回收纯化, 回收产物立即用于后续使用或 -20 °C 存放。

2.2.2.3 P2A-BSD 基因扩增与纯化

以 Lenticas9 质粒为模板, 以 BSD-F、BSD-R 为引物, 进行 PCR 扩增 P2A-BSD 基因片段, PCR 反应体系如表 5 所示:

表 2-5 扩增 P2A-BSD 基因的 PCR 体系
Table 2-5 PCR system for amplification of P2A-BSD gene

组分	体积
5×SF Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	10 μL
dNTP Mix (10 μM)	1 μL
BSD-F (10 μM)	2 μL
BSD-R (10 μM)	2 μL
Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μL
DNA	4 μL
RNase-free ddH ₂ O	30 μL

反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 循环反应: 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 72 °C 终延伸 10 min。反应结束后, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 使用紫外凝胶成像系统观察结果, 将含有目的片段 DNA 凝胶切下, 按胶回收试剂盒说明书对目的片段回收纯化, 回收产物立即用于后续使用或 -20 °C 存放。

2.2.2.4 pLVX 载体双酶切及纯化

使用 *KpnI*、*XhoI* 限制性酶切位点, 双酶切环状质粒 pLVX, 双酶切反应体系如表 6 所示:

表 2-6 pLVX 载体双酶切体系

Table 2-6 Double digestion system of PLVX Vector

组分	体积
10×QuickCut Green Buffer	5 μ L
DNA	1 μ g
QuickCut <i>KpnI</i>	1 μ L
QuickCut <i>XhoI</i>	1 μ L
RNase-free ddH ₂ O	Up to 50 μ L

反应程序：37 °C 水浴 30 min。反应结束后，酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，使用紫外凝胶成像系统观察结果，将含有目的片段 DNA 凝胶切下，按胶回收试剂盒说明书对目的片段回收纯化，回收产物立即用于后续使用或 -20 °C 存放。

2.2.2.4 同源重组构建 pLVX-Nectin4-BSD

将回收纯化后 Igk-HA-Nectin4 基因片段、P2A-BSD 基因片段、线性化载体 pLVX 片段使用分光光度计分别测定 DNA 浓度并记录，利用诺唯赞同源重组试剂 (ClonExpress® MultiS One Step Cloning Kit) 将线性载体与片段进行同源重组，反应体系如表 7 所示：

表 2-7 同源重组体系

Table 2-7 Homologous recombination reaction system

组分	体积
pLVX 线性化载体	100 ng
Igk-HA-Nectin4 基因片段	40 ng
P2A-BSD 基因片段	10 ng
5×CE MultiS Buffer	2 μ L
Exnase MultiS	1 μ L
RNase-free ddH ₂ O	Up to 10 μ L

反应程序：37 °C 反应 30 min。反应结束后，重组产物立即置于冰上待后续使用或 -20 °C 存放。

2.2.2.5 重组产物转化

- (1) 冰上解冻 100 μ L 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 。
- (2) 取 10 μ L 重组产物加入到感受态细胞中，轻弹管壁混匀，冰上静置 30 min。
- (3) 42 °C 水浴热应激 60 s - 90 s，再迅速转移至冰上冰浴 2 - 3 min。

(4) 加入 900 μL 液体 LB 培养基（不含抗生素），放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水平摇床上，以 200 r/min 转速摇菌 1 h。

(5) 将含有 Amp 抗性的 LB 平板固体培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中预热。

(6) 4000 - 5000 r/min 室温离心 5 min，弃掉 900 μL 上清，剩余培养基重悬菌体。

(7) 均匀涂布于含有 Amp 抗性的 LB 平板，倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 12 - 16 h。

2.2.2.6 重组产物鉴定

(1) 过夜培养后，在含有 Amp 抗性的 LB 平板上，挑选肉眼所见且大小一致的 5 - 10 个单菌落于含 10 μL 无菌 PBS 的 2 mL 离心管中吹打混匀，每管吸取 1 μL 重悬菌液进行 PCR 扩增鉴定。反应体系如表 8 所示。

表 2-8 阳性克隆菌落 PCR 体系
Table 2-8 PCR system of positive clones

组分	体积
2 $\times$ Taq PCR Master Mix	5 μL
CellYZ-F (10 μM)	0.5 μL
CellYZ-R (10 μM)	0.5 μL
重悬菌液	1 μL
RNase-free ddH ₂ O	Up to 10 μL

反应程序：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min，循环反应：95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s，30 个循环，72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。反应结束后，PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，使用紫外凝胶成像系统观察结果，将初步鉴定正确的阳性菌液编号记录。

(2) 离心管内添加 1 mL 含有 Amp 抗性的液体 LB 培养基，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水平摇床上，以 200 r/min 转速摇菌直至培养液变浑浊。

(3) 将 PCR 初步鉴定正确的阳性克隆菌，吸取部分菌液送至擎科生物科技有限公司进行序列测定比对。

2.2.2.7 重组克隆质粒提取

将测序比对正确的阳性菌液扩大培养，进行去内毒素质粒提取：

(1) 将菌液转移至 50 mL 离心管中。室温，8000 r/min，离心 5 min，弃上清。

- (2) 重复步骤（1），直至收集完所有菌液。
- (3) 弃上清，加入 250 μ L Solution I/RNase A，吹打均匀使菌液完全悬浮。
- (4) 向重悬液中加入 250 μ L Solution II，上下颠倒 5 - 7 次裂解细菌，避免剧烈的混匀，裂解反应不应超过 2 min。
- (5) 加入 125 μ L 预冷 N3 buffer，上下轻轻颠倒 5 - 7 次，避免剧烈的混匀，反应时间不应超过 2 min，室温，8000 r/min，离心 10 min。
- (6) 收集上清，加入 0.1 倍体积的 ETR，冰上冰浴 10 min，42℃孵育 5 min，室温，8000 r/min，离心 10 min。
- (7) 将上清转移到套有 2 mL 收集管的 HiBind DNA 结合柱中。室温，10000 r/min，离心 1 min，弃掉收集管中液体。重复该步骤，直至将上清过完结合柱。
- (8) 将 HiBind DNA 结合柱重新套到收集管上，向 HiBind DNA 结合柱中加入 500 μ L HBC Buffer。室温，10000 r/min，离心 1 min，弃掉收集管中液体。
- (9) 将 HiBind DNA 结合柱重新套到收集管上，向 HiBind DNA 结合柱中加入 700 μ L 含无水乙醇的 DNA Wash Buffer。室温，10000 r/min，离心 1 min，弃掉收集管中液体。
- (10) 重复步骤（9）。
- (11) 将 HiBind DNA 结合柱重新套到收集管上。室温，10000 r/min，离心 2 min，弃掉收集管中液体。
- (12) 将 HiBind DNA 结合柱装到新的 1.5 mL 离心管上，晾干残余的乙醇。垂直悬空加入 100 μ L Endo-Free Elution Buffer 到结合柱基膜上，室温静置 2 min。室温，10000 r/min，离心 2 min，洗脱质粒 DNA。质粒产物立即用于后续使用或 -20 °C 存放。

2.2.3 Vero 细胞对 BSD 耐受性测定试验

取对数生长期的 Vero 细胞，经胰酶消化后，用细胞生长培养液重悬细胞，调整细胞数量，以 5×10^5 每孔接种至 12 孔板中，十字法摇晃细胞板使细胞均匀铺在细胞板上，置于 5% CO₂ 培养箱，37 °C 培养，待细胞长满单层，弃去培养基，PBS 清洗 2 次，然后更换含不同浓度 BSD 的细胞维持培养液(浓度依次为 2、4、6、8、10、12、14、16 μ g/mL)，每浓度设 3 个重复孔，同时设立阴性细胞孔作

为对照。每天观察细胞死亡情况，以第 3 d 孔内细胞全部死亡的最低 BSD 浓度为最适筛选浓度。

2.2.4 慢病毒包装与感染

2.2.4.1 慢病毒包装

取对数生长期的 293T 细胞，经胰酶消化后，用生长培养液重悬细胞扩大至 T75 细胞瓶中进行培养，待细胞汇合度达到 80% - 90% 进行转染，按照质粒转染比例：pLVX: PSPAX: PMD2G= 12 μ g: 8 μ g: 4 μ g（共 24 μ g），三种质粒加入到 1 mL Jet Buffer 中，混匀 10 s，瞬离；加入 48 μ L Jet 转染试剂，混匀，瞬离，室温静置 10 min，最后轻轻加入到 293T 中，4 - 6 h 后换维持培养液，转染 48 h 观察细胞状态，收取慢病毒上清（暂于 -80 $^{\circ}$ C 存放），补足维持培养液，72 h 再次收取慢病毒上清。将慢病毒上清液离心，4 $^{\circ}$ C，5000 r/min，离心 20 min。

2.2.4.2 慢病毒浓缩

- (1) 慢病毒上清离心后，取上清使用 0.45 μ m 滤膜过滤。
- (2) 过滤后上清与浓缩液按体积比 4: 1 混合（上清液 4 份，浓缩液 1 份），涡旋 30 s 混匀后 4 $^{\circ}$ C 静置，每隔 30 min 涡旋混匀 1 次，共混匀 3 次。4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 或过夜。
- (3) 4 $^{\circ}$ C，6000 r/min，离心 30 min。
- (4) 于超净台内小心弃掉上清，将离心管倒扣于纸上吸除残余 DMEM。
- (5) 取 400 μ L 纯 DMEM 小心吹打重悬白色沉淀，混匀后分装于 4 支 EP 管内，浓缩产物立即用于后续使用或 -80 $^{\circ}$ C 存放。

2.2.4.3 慢病毒感染 Vero 细胞

取对数生长期的 Vero 细胞，经胰酶消化后，用生长培养液重悬细胞，调整细胞数量，以 5×10^5 每孔接种至 6 孔板，十字法摇晃细胞板使待细胞密度 30% 左右时，取一支慢病毒浓缩产物接种于细胞上，接毒后 6 - 8 h，更换生长培养液。

2.2.5 细胞系筛选及鉴定

2.2.5.1 细胞系筛选

待感染后细胞长满单层，使用含 BSD 最适筛选浓度的细胞维持生长液连续

加压 3 d（间隔 1 d 更换一次筛选维持液）筛选阳性细胞，同时设置阴性对照组。待 3 d 后阴性对照组细胞全部死亡，将加压后存活阳性细胞消化传代，使用细胞生长培养液（含筛选浓度的 BSD）扩大培养。

2.2.5.2 细胞系 RT-PCR 鉴定

待阳性细胞长满单层后，用细胞刮将细胞刮至培养液中，室温，1500 r/min，离心 5 min，收集细胞沉淀，提取细胞总 RNA，参照 2.2.2.1 反转录得到 cDNA，以 cDNA 为模板，参照 2.2.2.6 的方法扩增基因片段。

2.2.5.3 细胞系间接免疫荧光（IFA）鉴定

- (1) 在 12 孔板中接种阳性细胞，设置普通 Vero 细胞作为对照，培养 24 h。
- (2) 弃去培养液，PBS 清洗 2 次，室温下使用 1 mL 甲醇固定 10 min，弃掉甲醇，PBS 清洗 3 次。
- (3) 室温下使用含 0.25% TritonX-100 的 PBS 孵育 30 min，PBS 清洗 3 次。
- (4) 37 °C 孵育一抗 1 h（一抗为鼠源 HA 标签蛋白抗体，1: 1000 稀释使用），PBS 清洗 3 次。
- (5) 37 °C 避光孵育二抗 1 h（二抗为 Alexa Fluor 488 标记羊抗鼠 IgG（H+L），1: 3000 稀释使用），PBS 清洗 3 次。
- (6) 37 °C 避光孵育 DAPI 染核 10 min（1: 5000 稀释使用），PBS 清洗 3 次。
- (7) 暗室内，于荧光显微镜下进行观察并拍照保存。

2.2.5.4 细胞系 Western Blot 鉴定

待阳性细胞长满单层后，用细胞刮将细胞刮至培养液中，室温，1500 r/min，离心 5 min，收集细胞沉淀，用预冷的细胞裂解液 RAPI（含 1 mM PMSF、蛋白酶抑制剂）100 μ L 重悬细胞，冰上冰浴 10 - 15 min 充分裂解。4 °C，12000 r/min，离心 5 min，吸取含靶蛋白的上清产物，产物立即用于后续使用或 -80 °C 存放。

- (1) 按照 4:1 的比例混合上清产物与 5 $\times$ SDS Loading buffer，煮沸 5 - 10 min；取 10 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳。
- (2) 电泳结束后，凝胶采用湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜上。
- (3) 转膜结束后，将转好的膜置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中，4 °C 孵育过夜。

(4) 室温孵育一抗 2 h (一抗为鼠源 HA 标签蛋白抗体, 1: 10000 稀释使用), TBST 清洗 3 次。

(5) 室温孵育二抗 1 h (二抗为 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 1: 10000 稀释使用), TBST 清洗 3 次。

(6) 使用 BeyoECL 化学发光底物显色, 通过蛋白成像系统观察并拍照保存。

2.2.6 细胞系稳定性分析

经有限稀释法筛选单克隆细胞株, 筛选方法如下:

- (1) 将 Vero-Nectin4 细胞经胰酶消化, 吹打混匀制成单细胞悬液。
- (2) 取 96 孔板, 每孔预先加入 100 μ L 生长培养液。
- (3) 在 96 孔板的第一排加入 10 倍稀释的 100 μ L 细胞悬液, 吹打混匀。
- (4) 吸取 100 μ L 混合液加至第二排, 倍比稀释至最后一列, 弃去 100 μ L 混合液。

(5) 每孔再添加 100 μ L 生长培养液, 使终体积为 200 μ L。

(6) 置于 5% CO₂ 培养箱, 37 °C 培养, 每日观察并记录单细胞团编号。

(7) 等待 7 - 10 d, 待单细胞长满 96 孔板时, 消化传代扩大培养。

取经免疫荧光鉴定蛋白表达情况最好的细胞株进行连续传代, 为检测外源蛋白 Nectin4 受体的稳定表达情况, 对 5 代、10 代、20 代、30 代细胞参照 2.2.2.6、2.2.5.3、2.2.5.4 方法分别进行 RT-PCR 检测基因组表达、IFA 检测特异性荧光; Western Blot 检测蛋白表达情况。

2.2.7 不同 CDV 在细胞系上生长曲线分析

取 Vero-Nectin4 单克隆细胞株及普通 Vero 细胞, 对实验室保存 CDV 毒株进行生长曲线测定比较, 检测细胞系对于不同 CDV 毒株的扩增情况。

- (1) 将 Vero-Nectin4 及 Vero 细胞经胰酶消化, 计数后调整细胞数量。
- (2) 将细胞铺至 6 孔板, 待细胞贴壁后每孔加入 100 μ L CDV 病毒液。
- (3) 分别在 12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 收毒进行病毒滴度检测。
- (4) 绘制 CDV 毒株在不同细胞上的生长曲线。

2.2.8 CDV 流行病学调查

2.2.8.1 样品采集与处理

从全国 5 个省份（湖北、湖南、广西、江西，河南）的部分流浪犬基地、养殖场、宠物医院等采集犬只眼鼻肛分泌物及病死犬尸体等。拭子类样品，加入适量无菌 PBS 室温静置 1 h，涡旋 30 s，充分混匀，取混合液上清；组织类样品，用灭菌组织剪将组织剪成小块，按照适当比例加入无菌 PBS 或 DMEM 充分研磨，4 °C，10000 r/min，离心 10 min，取研磨液上清。处理后的样品产物立即用于后续使用或-80 °C 存放。

2.2.8.2 病毒基因组提取

使用购自武汉科前生物股份有限公司的病毒 DNA/RNA 提取试剂盒进行提取，操作方法如下：

- (1) 在 1.5 mL 离心管中依次加入 5 - 10 μ L 蛋白酶 K。
- (2) 加入 200 μ L 样品上清，混匀 5 s，再加入 200 μ L 裂解液，涡旋混匀 15 s，瞬时离心，55 °C 温育或水浴 10 min。
- (3) 加入 200 μ L 结合液至样品中，涡旋混匀 15 s。
- (4) 转移至吸附柱内（吸附柱放在收集管中），12000 r/min 离心 60 s。弃去收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
- (5) 向吸附柱中加入 500 μ L 漂洗液 1，12000 r/min 离心 60 s。弃去收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
- (6) 向吸附柱中加入 650 μ L 漂洗液 2，12000 r/min 离心 60 s。弃去收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
- (7) 12000 r/min 离心 2 min，空柱甩干柱子的基质。
- (8) 取出吸附柱至一个新的 1.5 mL 无核酸酶离心管内，打开管盖，室温放置 3 min，使膜片充分干燥。
- (9) 向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 μ L 无核酸酶水，盖上盖子，室温静置 1 min，12000 r/min 离心 1 min，弃吸附柱，1.5 mL 离心管中得到液体即为总 RNA。

2.2.8.3 RT-PCR 检测

参照 2.2.2.1 反转录得到 cDNA，以反转录得到的 cDNA 为模板，以 CDV-GB-F、

CDV-GB-R 为引物，进行 PCR 检测，反应体系如表 9 所示：

表 2-9 CDV 检测 PCR 体系
Table 2-9 PCR system of CDV detection

组成	体积
2 × Taq PCR Master Mix	5 μL
CDV-GB-F (10 μM)	0.5 μL
CDV-GB-R (10 μM)	0.5 μL
cDNA	2 μL
ddH ₂ O	Up to 10 μL

反应程序：95 °C 预变性 5 min，循环反应：95 °C 30 s，56 °C 30 s，72 °C 30 s，35 个循环，72 °C 终延伸 10 min。反应结束后，PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，使用紫外凝胶成像系统观察结果。

2.2.8.4 CDV 阳性率统计

将 RT-PCR 检测结果汇总记录，统计 CDV 阳性样品数，对不同地区、不同场所阳性率统计分析，绘制相应表格及图表

2.2.9 CDV 分离与鉴定

2.2.9.1 CDV 的分离培养

经 2.2.8.3 方法鉴定为 CDV 阳性的样品，经 0.45 μm 过滤器过滤除菌，待 Vero-Nectin4 细胞汇合度为 70% - 80% 时，按体积比为 1: 10 的比例接入病毒液，置于 5% CO₂ 培养箱，37 °C 吸附 1 - 2 h，中间每隔 20 min 摇匀一次使病毒均匀吸附，之后弃去上清，使用含 2% 双抗的维持培养液清洗 2 次，补齐培养液后置于 5% CO₂ 培养箱，37 °C 培养 4 - 5 d。每天观察细胞病变，当细胞出现细胞变圆，融合，拉丝等典型 CPE 现象时，将细胞冻存于 -80 °C，反复冻融 3 次，4 °C，10000 r/min，离心 10 min，取部分上清参照 2.2.8.2 进行基因组提取，2.2.8.3 方法进行 RT-PCR 鉴定；若细胞无 CPE，则第 5 d 时收毒鉴定。

2.2.9.2 RT-PCR 鉴定

所有阳性样品盲传 5 代，参照 2.2.8.3 方法经 RT-PCR 鉴定，第 2 - 5 代次检测均为 CDV 阳性时视为成功分离出能稳定传代的 CDV 毒株，若代次中检测出现 CDV 阴性则视为未成功分离。

2.2.9.3 间接免疫荧光鉴定

取第 5 代细胞毒接毒培养，观察细胞病变情况，出现细胞变圆，融合，拉丝现象，参照 2.2.5.3 方法（一抗为实验室保存 CDV 3E5 单克隆抗体，1:3000 稀释使用）进行 IFA 鉴定，同时设置阴性对照观察结果。

2.2.9.4 病毒粒子形态鉴定

病毒液使用超高速离心机，4 °C，28000 r/min，离心 2 h，小心吸取上清进行蔗糖梯度离心纯化，4 °C，28000 r/min，离心 2 h，将病毒样品使用戊二醛直接滴定在铜网上，使用 100 kV 透射电子显微镜进行观察并拍照保存。

2.2.9.5 H 基因全长扩增及测序拼接

参照 2.2.8.2 对分离后的 CDV 基因组进行提取，参照 2.2.2.1 反转录得到 cDNA，以 CDV-H-F、CDV-H-R 为引物，进行 H 基因的 PCR 扩增，反应体系如表 10 所示：

表 2-10 扩增 CDV-H 基因的 PCR 体系

Table 2-10 PCR system for amplification of CDV-H gene

组分	体积
5×SF Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	10 μL
dNTP Mix (10 μM)	1 μL
CDV-H-F (10 μM)	2 μL
CDV-H-R (10 μM)	2 μL
Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μL
cDNA	4 μL
RNase-free ddH ₂ O	30 μL

反应程序：95 °C 预变性 5 min，循环反应：95 °C 30 s，60 °C 30 s，72 °C 1 min 30 s，35 个循环，72 °C 终延伸 10 min。反应结束后，PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，使用紫外凝胶成像系统观察结果，将含有目的片段 DNA 凝胶切下，按胶回收试剂盒说明书对目的片段回收纯化，纯化后连接 pMD18-T 克隆载体，挑取阳性菌落送至擎科生物进行序列测定，使用 DNASTAR 中 SeqMan 软件对 H 基因进行拼接。

2.2.9.6 H 基因序列分析

登录 NCBI，从 Genbank 中下载 CDV 传统疫苗株及不同地区野毒株共 20 个参考毒株进行分析。利用 MEGA7 软件使用 Clustal W 方法将序列比对然后采用

Neighbor-joining Tree 方法绘制 CDV H 基因系统发育进化树。利用 Lasergene 中 Megalign 软件对 H 基因核苷酸序列及氨基酸序列进行同源性分析, 比较毒株与参考毒株亲缘关系远近。使用 NetNGlyc 1.0 Server 在线软件分析 H 蛋白的潜在 N-糖基化位点。使用 Protean 软件对 H 基因抗原表位进行预测分析, 分析 H 基因在野毒株与疫苗株之间抗原差异性。参考毒株信息如表 11 所示:

表 2-11 CDV 参考毒株信息
Table 2-11 Reference strain information of CDV

毒株名称	登录号	地区	基因分型
Onderstepoort	AF378705	USA	America-1(Vaccine)
Lederle	DQ903854	Hungary	America-1(Vaccine)
Convac	Z35493	USA	America-1(Vaccine)
CDV3	EU726268	China	America-1(Vaccine)
01-2689	AY649446	USA	America-2
5804	AY386315	USA	Europe
5804P	AY386316	USA	Europe
WT01SA	KY971528	South Africa	South Africa
CDV2784/2013	KF914669	Italy	Artic
CDV SY	KJ466106	China	Asia-1
CDV-RD-JL	KJ848781	China	Asia-1
JSNJ-21	MW048556	China	Asia-1
GD1818	MK275202	China	Asia-1
GS20-11	MW600730	China	Asia-1
007Lm	AB474397	Japan	Asia-2
Chunchon	EU252149	South Korea	Asia-2
HLJ1	EU743934	China	Asia-3
HLJ2	EU743935	China	Asia-3
CDV5_TH/2014	MH496778	Thailand	Asia-4
D11-5464/2016	MF964186	India	Asia-5

2.2.10 CDV 致病性研究

2.2.10.1 人工接种感染实验

选取 15 只 50 - 60 日龄健康幼犬 (CDV 抗体小于 1: 2) 随机分为 3 组, 每组 5 只, 第 1 组犬只滴鼻及后腿肌肉注射各 1 mL WH29 肺脏研磨液, 第 2 组犬只滴鼻及后腿肌肉注射各 1 mL WH03 第 3 代细胞毒 ($10^{6.5}$ TCID₅₀/mL), 第 3 组犬只滴鼻及后腿肌肉注射各 1 mL DMEM。攻毒后隔离饲养连续观察 21 d, 每

天固定时间对犬只称量体重，测量直肠温度，观察临床症状并进行评分，分别在 0 d、7 d、14 d、21 d 时抽取犬只前肢静脉血液，保存于抗凝血管内，利用血细胞计数仪进行淋巴细胞数测定。临床症状评分标准如表 12 所示：

表 2-12 临床症状评分标准
Table 2-12 Clinical symptom scoring criteria

临床症状名称	1 分	2 分
直肠温度	大于 39.2 °C	大于 40.0 °C
体重变化	减少 5%	减少 10%
神经症状	沉郁萎靡	俯卧或出现神经症状
食欲	减退	废绝
粪便	稀便或有黏液	便血或大量粘液
呕吐	干呕	大量呕吐物
眼鼻分泌物	少量分泌物	大量分泌物或化脓
脚垫角质化	少量增厚	大量增厚或龟裂
咳嗽及呼吸音	轻微干咳	阵咳或呼吸道杂音

2.2.10.2 排毒检测及病理剖检

分别采集犬只眼鼻咽及肛拭子，每隔 3 d 采集拭子直至观察期结束，采集后暂存于-20 °C保存备用。参照 2.2.8.2 进行基因组提取，参照 2.2.8.3 进行 RT-PCR 鉴定，检测攻毒后犬只分泌物中 CDV 排毒情况。对犬只实施安乐并进行剖检，剖检观察肺脏、脾脏、肝脏、肠道病理变化。

2.2.10.3 病理切片 HE 染色及 IHC 染色

采集犬只肺脏组织，使用手术剪小心取下固定于组织固定液（4%的多聚甲醛中）中 2 - 3 d，将固定的组织进行石蜡包埋，然后在切片机上进行切片。对于 HE 染色，切片脱蜡后用苏木素染色 5 min，用蒸馏水冲洗至灰蓝色，1%盐酸分化数秒，蒸馏水冲洗。用伊红染色 3 min，逐级升浓度酒精脱水，二甲苯透明。中性树胶封片，显微镜下观察并拍照保存。IHC 染色，切片常规脱蜡至水。30% H₂O₂ 室温灭活内源性酶 5 - 10 min，蒸馏水洗 3 次。0.01 M 枸橼酸钠盐缓冲液中热修复，待冷却后 PBS 洗 3 次。5% BSA 封闭液室温封闭 20 - 30 min。一抗为实验室保存 CDV 5A7 单克隆抗体，1: 200 稀释使用，4 °C 孵育过夜。PBS 洗 3 次，生物素化羊抗鼠 IgG 37 °C 孵育 30 min。PBS 洗 3 次，SABC 37 °C 孵育 20 min。PBS 洗 3 次，DAB 室温显色，镜下控制显色时间。苏木素复染，脱水，透明，封片，显微镜下观察并拍照保存。

2.2.10.4 qPCR 测定病毒组织载量

观察期结束后, 收集犬只下颌淋巴结、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、膀胱、肠道组织, 参照 2.2.8.2 及 2.2.2.1 方法, 得到 cDNA, 进行 qPCR 测定各组织病毒载量, 采用染料法, 以 Q-CDV-F、Q-CDV-R 为引物, 标准品为 pMD18-T 载体连接 CDV F 基因质粒, qPCR 反应体系如表 13 所示:

表 2-13 病毒载量测定 qPCR 体系**Table 2-13 qPCR system of viral load determination**

组分	体积
Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix	5 μ L
Q-CDV-F (10 μ M)	0.5 μ L
Q-CDV-R (10 μ M)	0.5 μ L
cDNA	1 μ L
RNase-free ddH ₂ O	3 μ L

反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 循环反应: 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 采集荧光。反应结束后根据标准曲线计算, 分析检测样品中病毒载量。

3 结果

3.1 pLVX-Nectin4-BSD 真核表达载体构建

3.1.1 目的片段扩增及线性化载体的获取

为获得构建重组质粒所必需的 Igκ-HA-Nectin4、P2A-BSD 目的片段及 pLVX 线性化载体，利用 PCR 对目的片段进行扩增，P2A-BSD 目的片段大小为 494 bp，Igκ-HA-Nectin4 目的片段大小为 1602 bp，PCR 扩增片段与目的片段大小一致，使用 *Kpn*I、*Xho*I 限制性酶切位点将 pLVX 环状载体线性化，酶切后载体与预计片段大小一致为 7935 bp。PCR 及酶切结果如图 3-1 所示。

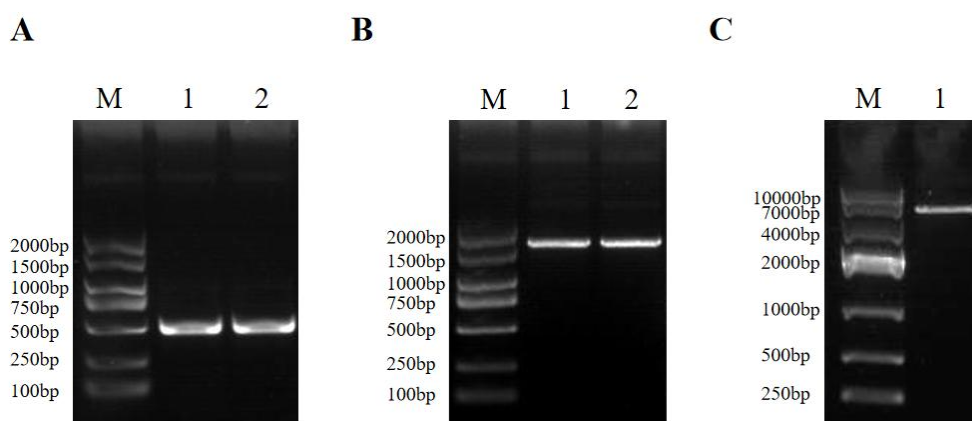


图 3-1 pLVX-Nectin4-BSD 的目的片段扩增

Fig.3-1 Amplification of the target fragment of pLVX-Nectin4-BSD

A: M: DL2000Marker; 1-2: P2A-BSD 基因 PCR 扩增; B: M: DL2000Marker; 1-2: Igκ-HA-Nectin4 基因 PCR 扩增; C: M: DL10000Marker; 1: pLVX 载体线性化

A: M: DL2000Marker; 1-2: PCR system of P2A-BSD gene; B: M: DL2000Marker; 1-2: PCR system of Igκ-HA-Nectin4 gene; C: M: DL10000Marker; 1: Linearization of pLVX vector

3.1.2 pLVX-Nectin4-BSD 重组质粒的构建与鉴定

为获得重组质粒 pLVX-Nectin4-BSD，将含同源臂的 Igκ-HA-Nectin4 及 P2A-BSD 目的片段与 pLVX 线性化载体同源重组转化 DH5α，使用菌落 PCR 挑选阳性菌落，PCR 扩增片段与目的片段大小一致，为 2070 bp，阳性菌液送至擎科生物科技有限公司进行测序比对，片段序列一致。扩大培养提取质粒，使用 *Kpn*I、*Xho*I 限制酶对重组质粒双酶切鉴定，得到 2070 bp 及 7935 bp 两条目的条带，说明 pLVX-Nectin4-BSD 重组质粒成功构建。结果如图 3-2 所示。

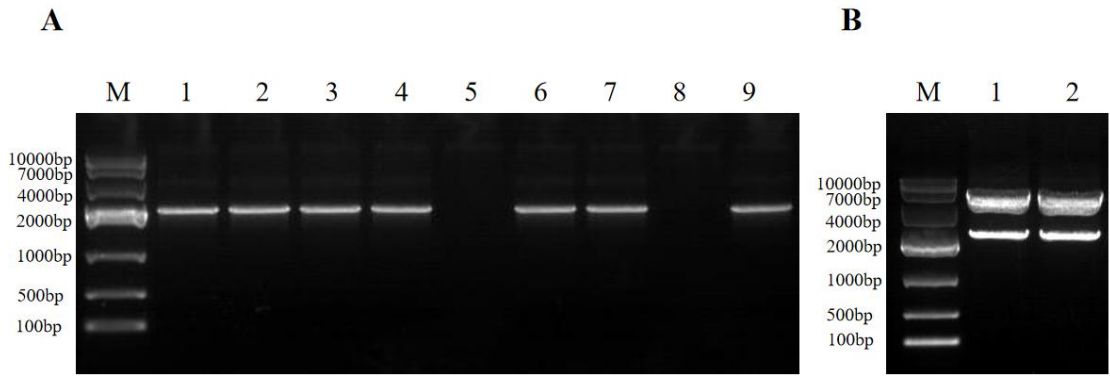


图 3-2 pLVX-Nectin4-BSD 重组质粒的鉴定

Fig.3-2 Identification of pLVX-Nectin4-BSD recombinant plasmid

A: M: DL10000Marker; 1-7: 阳性克隆菌 PCR 鉴定; 8: 阴性对照; 9: 阳性对照; B: M: DL10000Marker; 1-2: pLVX-Nectin4-BSD 重组质粒双酶切鉴定

A: M: DL10000Marker; 1-7: PCR identification of positive clones; 8:negative control ; 9:positive control ; B: M: DL10000Marker; 1-2: Identification of pLVX-Nectin4-BSD recombinant plasmid by double digestion

3.2 Vero 细胞对 BSD 耐受性测定试验

为后续通过药物加压筛选表达 Nectin4 受体及 BSD 耐药基因的阳性细胞，进而测定 Vero 细胞对不同浓度 BSD 的耐受性来确定最佳筛选条件。利用含不同浓度梯度 BSD 的细胞维持培养液（浓度依次为 2、4、6、8、10、12、14、16 $\mu\text{g/mL}$ ）培养 Vero 细胞，第 2 d 时，8、10、12、14、16 $\mu\text{g/mL}$ 组的细胞出现死亡，部分脱落，第 3 d 时，以上浓度组的细胞全部死亡脱落，6 $\mu\text{g/mL}$ 组的细胞约 95% 以上死亡脱落，但依旧存在少量活细胞，因此将 BSD 含量为 8 $\mu\text{g/mL}$ 确定为 Vero 细胞最佳筛选浓度。

3.3 表达 Nectin4 受体细胞系的鉴定

3.3.1 RT-PCR 鉴定

为鉴定 Vero-Nectin4 细胞系中 Nectin4 基因的表达情况，将经加压筛选后存活的阳性细胞扩大培养，刮取部分细胞，提取总 RNA 并反转录，以 cDNA 为模板进行扩增，RT-PCR 扩增片段与目的片段大小一致，为 2070 bp，且设立的普通 Vero 细胞对照无目的片段大小条带，说明 Nectin4 基因在 Vero-Nectin4 细胞系中成功表达。PCR 扩增结果如图 3-3 所示。

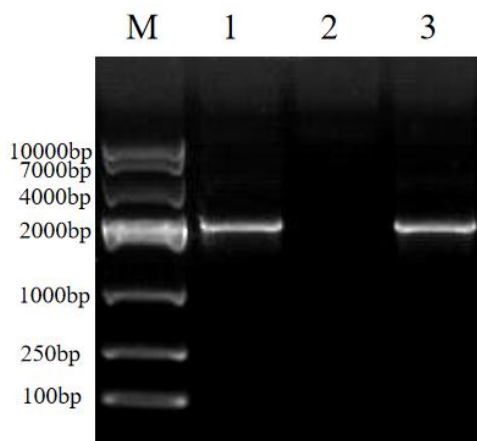


图 3-3 Nectin4 受体表达 RT-PCR 鉴定

Fig.3-3 RT-PCR identification of Nectin4 receptor expression

M: DL10000Marker; 1: 阳性细胞 PCR 扩增; 2: Vero 细胞阴性对照; 3: 阳性对照

M: DL10000Marker; 1: PCR amplification of positive cells; 2:negative control of Vero cell ; 3:positive control

3.3.2 IFA 鉴定

由于本实验在构建载体过程中，将 HA 标签蛋白与 Nectin4 蛋白串联表达，因此可通过检测标签蛋白来鉴定 Vero-Nectin4 细胞系中 Nectin4 受体的表达情况，利用 HA 标签蛋白抗体进行孵育，通过 IFA 鉴定 Nectin4 受体蛋白的表达情况，Vero-Nectin4 细胞系出现特异性荧光，Nectin4 受体表达情况良好。IFA 结果如图 3-4 所示。

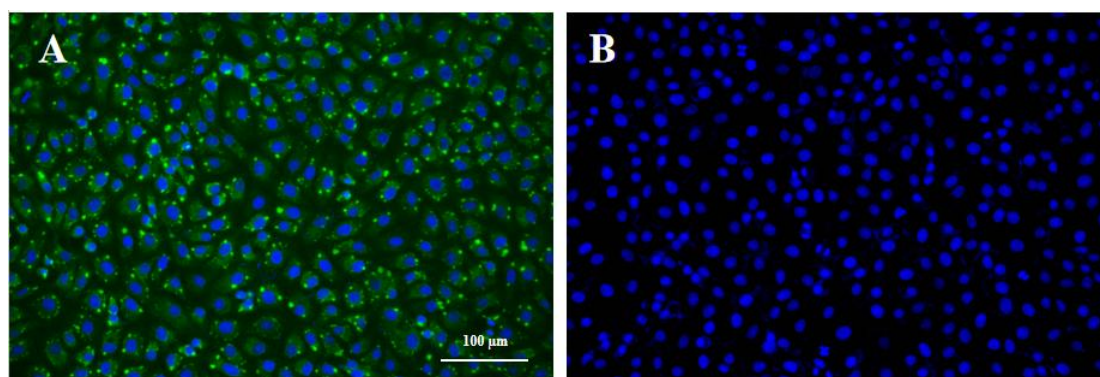


图 3-4 Nectin4 受体间接免疫荧光鉴定

Fig.3-4 Indirect immunofluorescence identification of Nectin4 receptor

A: 阳性细胞 Nectin4 受体荧光观察; B: Vero 阴性细胞对照

A: Fluorescence observation of Nectin4 receptor in positive cells; B:Negative control of Vero cell

3.3.3 Western Blot 鉴定

为探究 Vero-Nectin4 细胞系中 Nectin4 受体的蛋白表达情况，刮取 12 孔板内的长满单层的 Vero-Nectin4 细胞进行裂解并制备蛋白样品，经 SDS-PAGE 电泳后将蛋白转印至 PVDF 膜上进行 Western Blot 检测，同样使用 HA 标签蛋白抗体孵育，通过 Western Blot 鉴定 Nectin4 受体的蛋白表达情况，Vero-Nectin4 细胞系在约 75 kDa 处出现特异性条带，说明本实验成功构建表达 Nectin4 受体的 Vero 细胞系。Western Blot 结果如图 3-5 所示。

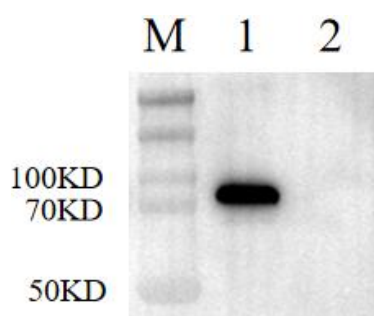


图 3-5 Nectin4 受体蛋白 Western Blot 鉴定

Fig.3-5 Identification of Nectin4 Receptor Protein by Western Blot

M: 蛋白 Marker; 1: 阳性细胞 Nectin4 受体蛋白鉴定; 2: Vero 细胞阴性对照

M: Protein Marker; 1: Identification of Nectin4 receptor protein in positive Cells; 2:negative control of Vero cell

3.4 细胞系稳定性分析

3.4.1 RT-PCR 鉴定

为验证 Vero-Nectin4 细胞系在传代过程中 Nectin4 基因是否会在细胞中发生丢失，对细胞系稳定性进行检测，取不同代次的细胞系进行基因组提取并反转录保存，通过 RT-PCR 鉴定 F5、F10、F20、F30 代细胞系中 Nectin4 基因的表达情况，不同代次细胞系扩增片段均为 2070 bp，与阳性对照一致。表明 Nectin4 基因在传代过程中能稳定表达。RT-PCR 扩增结果如图 3-6 所示。

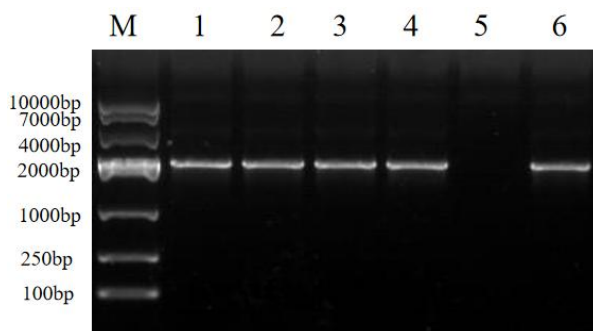


图 3-6 不同代次 Vero-Nectin4 细胞 RT-PCR 鉴定

Fig.3-6 RT-PCR identification of different generations of Vero-Nectin4 cells

M: DL10000Marker; 1: F5 代 Vero-Nectin4 细胞; 2: F10 代 Vero-Nectin4 细胞; 3: F20 代 Vero-Nectin4 细胞; 4: F30 代 Vero-Nectin4 细胞; 5: 阴性对照; 6: 阳性对照

M: DL10000Marker; 1: 5th generation Vero-Nectin4 cells; 2:10th generation Vero-Nectin4 cells ; 3:20th generation Vero-Nectin4 cells ; 4:30th generation Vero-Nectin4 cells ; 5:negative control ; 6:positive control

3.4.2 IFA 鉴定

为进一步对细胞系中 Nectin4 受体蛋白的表达稳定性情况进行验证，在 Vero-Nectin4 细胞系传代过程中，将不同代次细胞冻存并保存于液氮罐内，然后复苏不同代次细胞并铺于 12 孔板内，待细胞长满单层时固定并孵育抗体，通过 IFA 鉴定 F5、F10、F20、F30 代细胞系中 Nectin4 受体蛋白的表达情况，不同代次细胞系均出现特异性荧光，表明传代过程中受体未发生丢失，能够稳定传代。IFA 结果如图 3-7 所示。

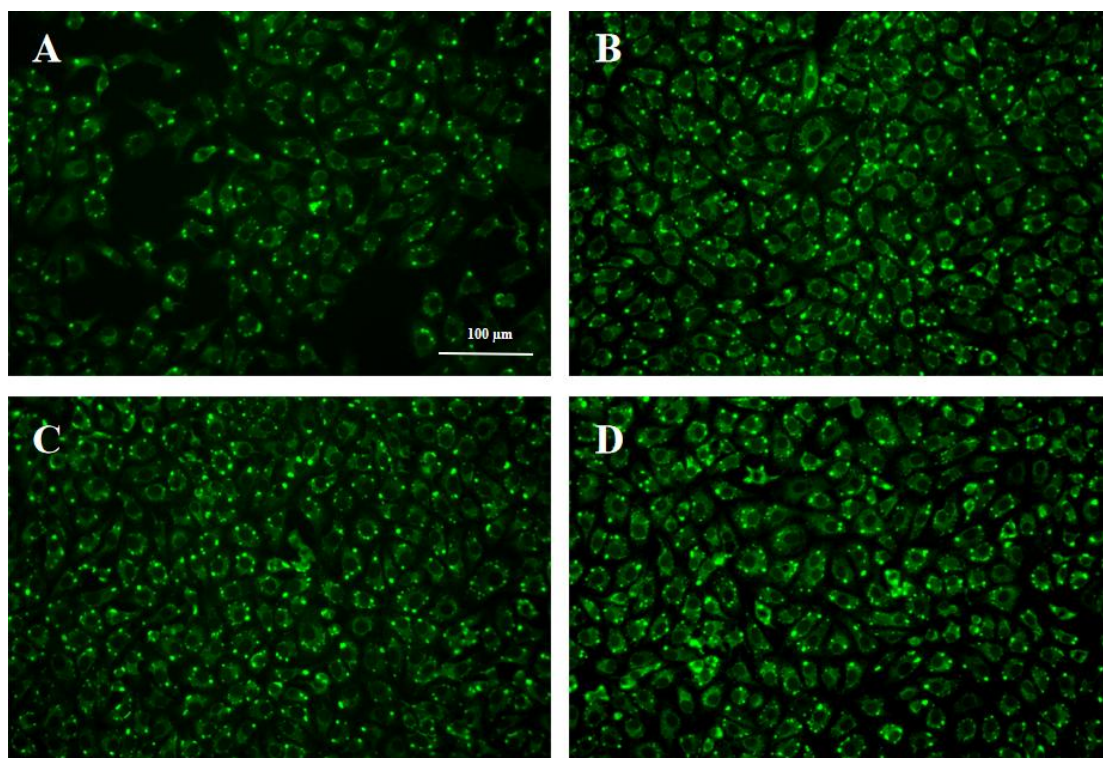


图 3-7 不同代次 Vero-Nectin4 细胞 IFA 鉴定

Fig.3-7 IFA identification of different generations of Vero-Nectin4 cells

A: F5 代 Vero-Nectin4 细胞荧光观察; B: F10 代 Vero-Nectin4 细胞荧光观察; C: F20 代 Vero-Nectin4 细胞荧光观察; D: F30 代 Vero-Nectin4 细胞荧光观察

A: Fluorescence observation of 5th generation Vero-Nectin4 cells; B: Fluorescence observation of 10th generation Vero-Nectin4 cells; C: Fluorescence observation of 20th generation Vero-Nectin4 cells; D: Fluorescence observation of 30th generation Vero-Nectin4 cells

3.4.3 Western Blot 鉴定

本实验还通过将不同代次细胞进行裂解制样，使用特异性标签抗体孵育，显影观察不同代次细胞中 Nectin4 受体的蛋白表达情况，通过 Western Blot 鉴定 F5、F10、F20、F30 代细胞系中 Nectin4 受体的蛋白表达情况，不同代次细胞系均在约 75 kDa 处出现特异性条带。Western Blot 结果如图 3-8 所示。说明表达 Nectin4 受体的 Vero 细胞系能够稳定传代且稳定性良好。

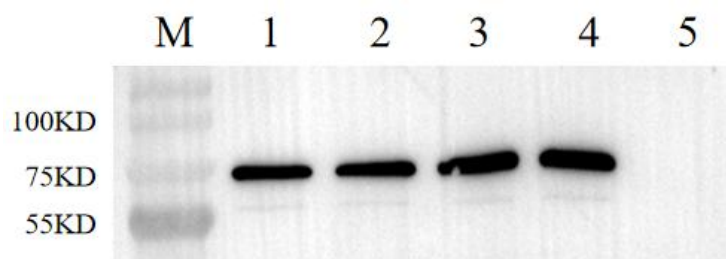


图 3-8 不同代次 Vero-Nectin4 细胞系 Western Blot 鉴定

Fig.3-8 Identification of different generations of Vero-Nectin4 cells by Western Blot

M: 蛋白 Marker; 1: F5 代 Nectin4 蛋白鉴定; 2: F10 代 Nectin4 蛋白鉴定; 3: F20 代 Nectin4 蛋白鉴定;
4: F30 代 Nectin4 蛋白鉴定; 5: Vero 细胞阴性对照

M: Protein Marker; 1: identification of 5th generation Nectin4 protein; 2: identification of 10th generation Nectin4 protein; 3: identification of 20th generation Nectin4 protein; 4: identification of 30th generation Nectin4 protein; 5: negative control of Vero cell

3.5 不同 CDV 在细胞系上生长曲线分析

为验证 Vero-Nectin4 细胞系对不同 CDV 毒株是否能够提高增殖滴度，利用本实验室保存 CDV 毒株分别感染 6 孔板内的 Vero-Nectin4 细胞及 Vero 细胞，按规定时间进行收样，统一暂存于 -80°C ，待所有时间段样品收集完毕后，统一测定不同 CDV 毒株在 Vero-Nectin4 细胞系及普通 Vero 细胞系上的生长曲线，分析 Vero-Nectin4 细胞系对 CDV 的特异性扩增能力。通过不同 CDV 毒株生长曲线比较，发现 Vero-Nectin4 细胞对 CDV 增殖滴度高于普通 Vero 细胞。其中 wh15 毒株在 24 h 时扩增滴度便高于普通 Vero，72 h 时扩增滴度从 $10^{4.33}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 提高至 $10^{5.5}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ，滴度提升约 15 倍。SC 毒株在 48 h 时扩增滴度稍高于普通 Vero，72 h 时滴度提升约 $10^{0.5}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ，提升效果不佳。分析可能是由于 SC 毒株在传代培养过程中对细胞产生了适应性，导致 SC 毒株对 Vero 细胞适应性较好，因此表达 Nectin4 的 Vero 细胞对 SC 毒株的滴度提高不佳。生长曲线结果如图 3-9 所示。

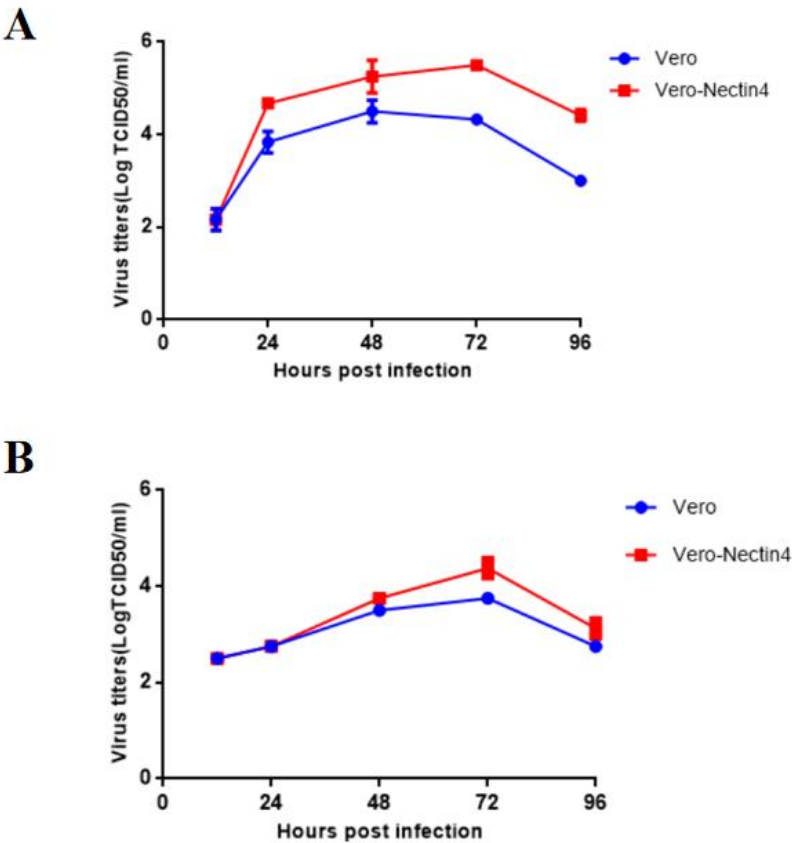


图 3-9 CDV 在不同细胞上生长曲线的比较

Fig.3-9 Comparison of CDV growth curves on different cells

A: CDV-wh15 生长曲线比较图; B: CDV-SC 生长曲线比较图

A: Comparison of growth curves for CDV-wh15; B: Comparison of growth curves for CDV-SC

3.6 CDV 分离与鉴定

3.6.1 阳性病料检测结果

从全国 5 个省份（湖北、湖南、广西、江西，河南）采集样品，使用 CDV 检测引物，以反转录得到的病毒 cDNA 为模板进行扩增，RT-PCR 扩增片段与目的片段大小一致，为 455 bp，部分采集样品 RT-PCR 扩增结果如图 3-10 所示。

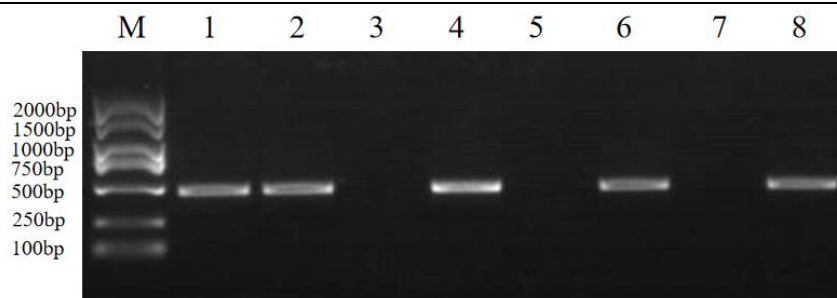


图 3-10 部分采集样品 CDV 的 RT-PCR 鉴定

Fig.3-10 RT-PCR identification of CDV in partially collected samples

M: DL2000Marker; 1-6: 样品中 CDV 扩增结果; 7: 阴性对照; 8: 阳性对照

M: DL2000Marker; 1-6: CDV amplification results in samples; 7:negative control ; 8:positive control

为分析 CDV 在易感动物中的阳性检出率，统计采集样品总数及阳性数计算 CDV 阳性率，结果如图 3-11 所示，共采集样品 1255 份，经 PCR 检测 CDV 阳性样品共 280 份，平均阳性率 22.3%。按不同地区划分，湖南省总样品数 100 份，阳性样品数 15 份，CDV 阳性检出率 15%；湖北省总样品数 583 份，阳性样品数 101 份，阳性率 17.3%；河南省总样品数 70 份，阳性样品数 6 份，阳性率 8.6%；江西省总样品数 168 份，阳性样品数 26 份，阳性率 15.5%；广西省总样品数 334 份，阳性样品数 133 份，阳性率 39.8%。结果显示，CDV 在各省份均有一定流行，且不同省份存在感染差异，广西省阳性率最高为 39.8%，河南省阳性率最低为 8.6%。

按不同场所划分，主要采集场所为流浪犬基地、宠物医院、养殖场。流浪犬基地采集样品共 757 份，阳性样品 94 份，阳性率 12.4%；宠物医院采集样品共 164 份，阳性样品 53 份，阳性率 33.5%；养殖场采集样品共 334 份，阳性样品 133 份，阳性率 39.8%。结果显示，CDV 在各场所均可发生，且不同场所存在感染差异，其中养殖场、宠物医院 CDV 阳性率显著高于流浪犬基地。

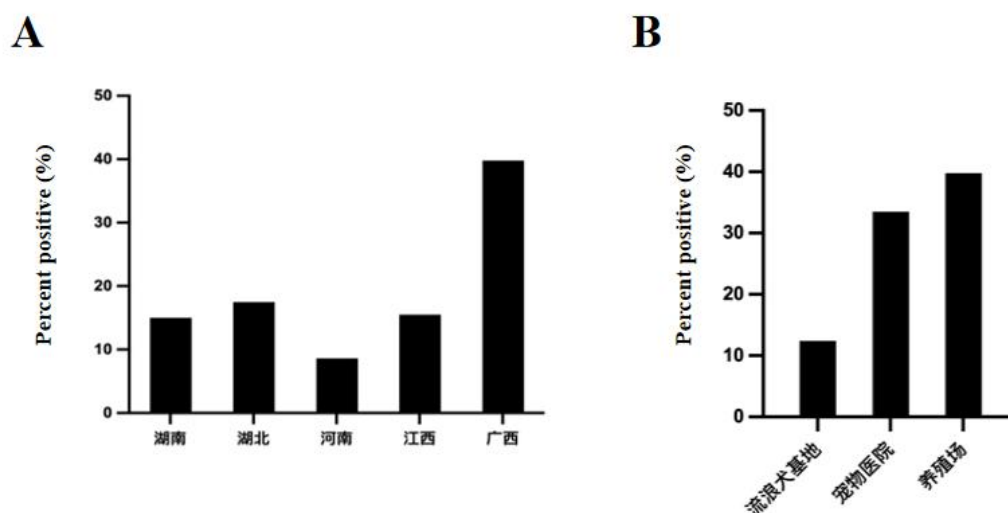


图 3-11 CDV 流行率统计结果

Fig.3-11 Results of CDV prevalence statistics

A: 不同地区 CDV 流行率统计; B: 不同场所 CDV 流行率统计

A: Prevalence statistics of CDV in different regions; B:Prevalence statistics of CDV in different places

3.6.2 分离培养

阳性样品经处理后接种 Vero-Nectin4 细胞，在接种细胞 24 h 后，出现犬瘟热特异性病变，表现为细胞变圆，融合拉丝，部分细胞死亡脱落，对照组无病变。初步判定成功分离 1 株 CDV，命名为 WH03。细胞病变如图 3-12 所示。

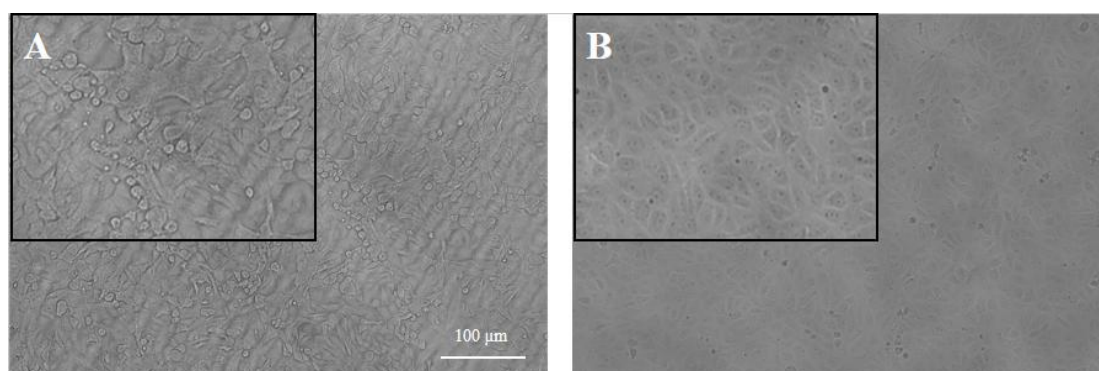


图 3-12 CDV 细胞病变 (CPE)

Fig.3-12 Cytopathic effect(CPE) of CDV

A: CDV 阳性样品接种后的细胞病变; B: 细胞对照

A: CPE after inoculation of CDV positive sample; B:Cells negative control

3.6.3 RT-PCR 鉴定

为进一步验证是否成功分离，将 WH03 分离株第 2、3、4、5 代次病毒液，使用 CDV 检测引物，以反转录得到的病毒 cDNA 为模板进行扩增，RT-PCR 扩增片段与目的片段大小一致，为 455 bp，经鉴定 WH03 分离株为 CDV，且能在细胞上稳定连续传代。RT-PCR 扩增结果如图 3-13 所示。

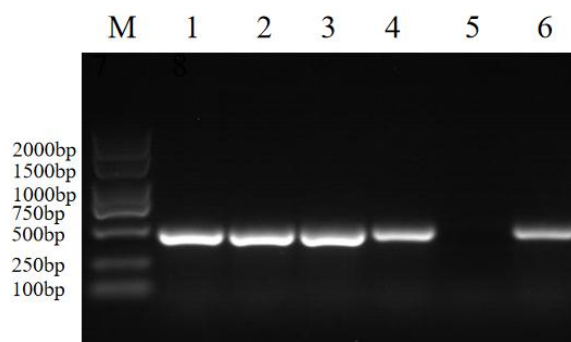


图 3-13 CDVWH03 不同代次病毒液的 RT-PCR 鉴定

Fig.3-13 RT-PCR identification of CDVWH03 viral fluids of different generations

M: DL2000Marker; 1-4: F2-F5 代病毒液 PCR 扩增; 5: 阴性对照; 6: 阳性对照

M: DL2000Marker; 1-4: PCR amplification of 2nd to 5th generation viral fluids ; 5:negative control ; 6:positive control

3.6.4 IFA 鉴定

WH03 分离株接种 Vero-Nectin4 细胞后，细胞病变较为明显，使用 CDV 3E5 抗体作为一抗孵育，对 WH03 分离株观察鉴定。IFA 结果显示，WH03 感染 Vero-Nectin4 细胞后，可以观察到特异性荧光，对照组无荧光，进一步说明 WH03 分离株为 CDV，且能在易感细胞中大量复制增殖。IFA 结果如图 3-14 所示。

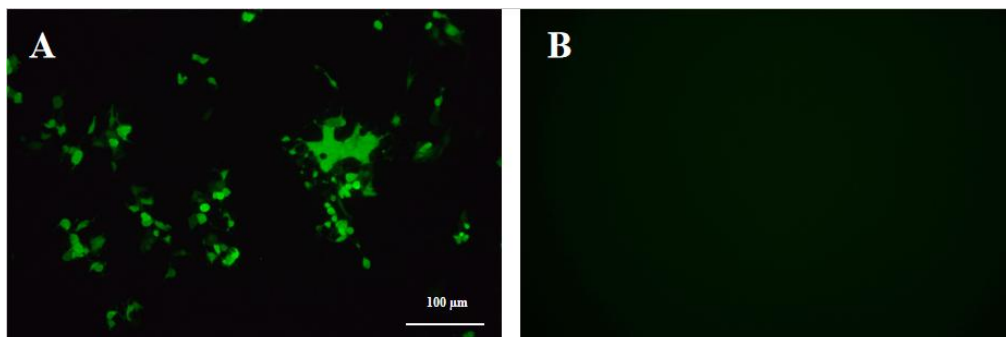


图 3-14 CDVWH03 IFA 鉴定

Fig.3-14 IFA identification of CDVWH03

A: CDVWH03 荧光观察; B: 细胞对照

A: Fluorescence observation of CDVWH03; B: Cells negative control

3.6.5 病毒粒子形态鉴定

为观察 WH03 病毒粒子形态是否符合副黏病毒科病毒形态, 取处理后病毒样品于透射电镜下进行观察。负染观察结果显示, WH03 病毒粒子形态为圆球状, 粒子直径约为 150 - 200 nm 之间, 外部有囊膜包裹, 鉴定为 CDV。电镜结果如图 3-15 所示。

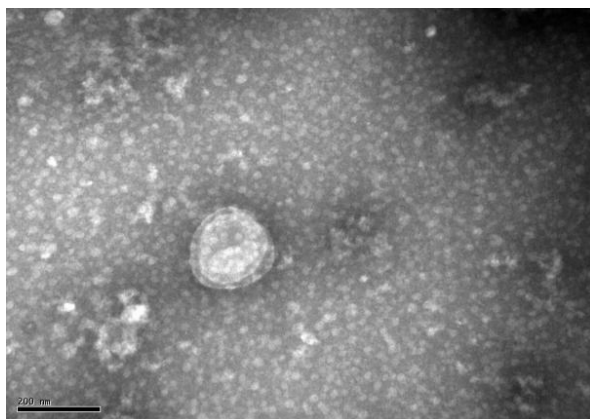


图 3-15 透射电镜下 CDVWH03 的形态观察

Fig.3-15 Morphological observation of CDVWH03 under transmission electron microscope

3.6.6 H 基因全长扩增

H 基因在 CDV 不同毒株间的核苷酸差异较大, 因此 H 基因是探究 CDV 变异及进化的最佳基因靶点, 通过不同毒株间的 H 基因序列能够对 CDV 进行系统发育分析。本研究发现除 WH03 株成功分离外, 还有一株虽未能在细胞上成功分离, 但临床收集时发现该毒株在已免疫犬上表现一定毒力并能引起死亡, 命名为 WH29。为探究 CDV 毒株的流行情况及特性, 对本研究中 CDV 毒株 H 基因进行全长扩增, 使用 CDV-H-F、CDV-H-R 引物, 以 WH03、WH29 病毒基因组 cDNA 为模板进行扩增, RT-PCR 扩增片段与目的片段大小一致, 为 2033 bp, 将目的片段纯化回收后连接 T 载送测序, 利用 Lasergene 中 SeqMan 软件将已测序序列进行整理拼接, 获得 H 基因全长序列。H 基因扩增结果如图 3-16 所示。

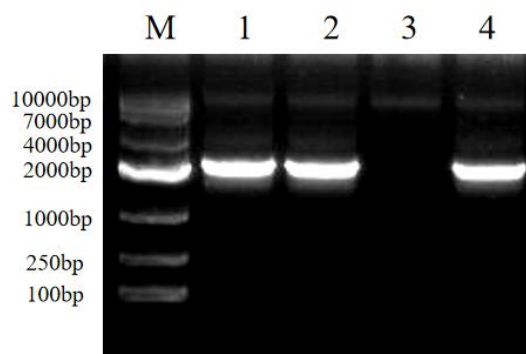


图 3-16 CDV H 基因 RT-PCR 扩增

Fig.3-16 RT-PCR amplification of the CDV H gene

M: DL10000Marker; 1: WH03 H 基因 PCR 扩增; 2: WH29 H 基因 PCR 扩增; 3: 阴性对照; 4: 阳性对照

M: DL10000Marker; 1: PCR amplification of WH03 H gene ; 2: PCR amplification of WH29 H gene ;5:negative control ; 6:positive control

3.6.7 H 基因同源性分析

使用 Lasergene 中 MegAlign 软件,利用 NCBI 中已发表的 20 株参考毒株(不同基因型) H 基因,与已测序 WH03、WH29 H 基因(H 基因为 1824 bp)进行同源性比较分析。核苷酸及氨基酸同源性分析分别如图 3-17、3-18 所示,首先 WH03 与 WH29 间核苷酸同源性为 90.4%,氨基酸同源性为 91.1%,二者间同源性较低,明显为不同 CDV 毒株。其次与 CDV 疫苗株进行比较,WH03 核苷酸同源性为 96.3% - 99%,氨基酸同源性为 94.2% - 97.5%,其中 WH03 与 CDV3 水貂源疫苗株在核苷酸及氨基酸同源性均较高,但存在部分差异;WH29 则分别为 89.9% - 90.5%, 89.3% - 91%,与疫苗株同源性较低。与其他参考毒株比较,WH03 核苷酸同源性为: 87.3% - 92.4%,氨基酸同源性为 82.6% - 92.3%,与野毒株同源性较低;WH29 的核苷酸及氨基酸同源性分别为 89.1% - 99.4%, 85.9% - 99.5%,其中与我国流行毒株 JSNJ-21、GD1818、GS20-11 同源性较高,核苷酸及氨基酸相似性达 99%以上。WH03、WH29 与 Asia-2、3 型代表毒株最低,说明亲缘关系较远。

Fig.3-17 Nucleotide homology analysis of the CDV H gene

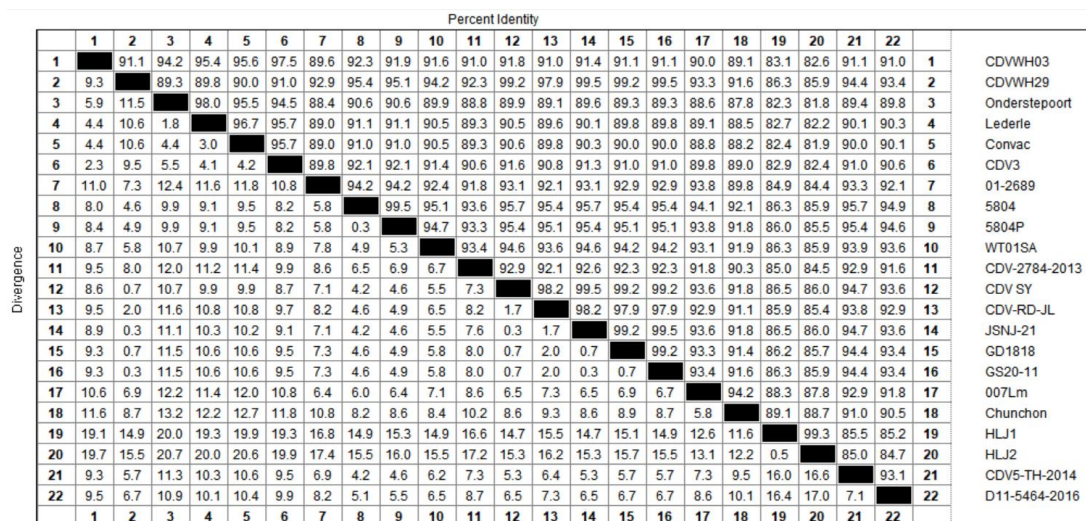


Fig.3-18 Amino acid homology analysis of CDV H gene

使用 MEGA7 软件对 WH03、WH29 与参考毒株的 H 基因序列进行聚类遗传进化结果如图 3-19 所示，其中 WH03 属于 America-1 型，与我国吉貂源 CDV3 疫苗株（Genbank 登录号：EU726268）亲缘关系最近；WH29 Asia-1 型，与我国犬源 GS20-11 株（Genbank 登录号：MW600730），犬源 11 株（Genbank 登录号：MW048556），犬源 GD1818 株（Genbank 登录号：KJ275202）亲缘关系最近，与疫苗株亲缘关系则较远。

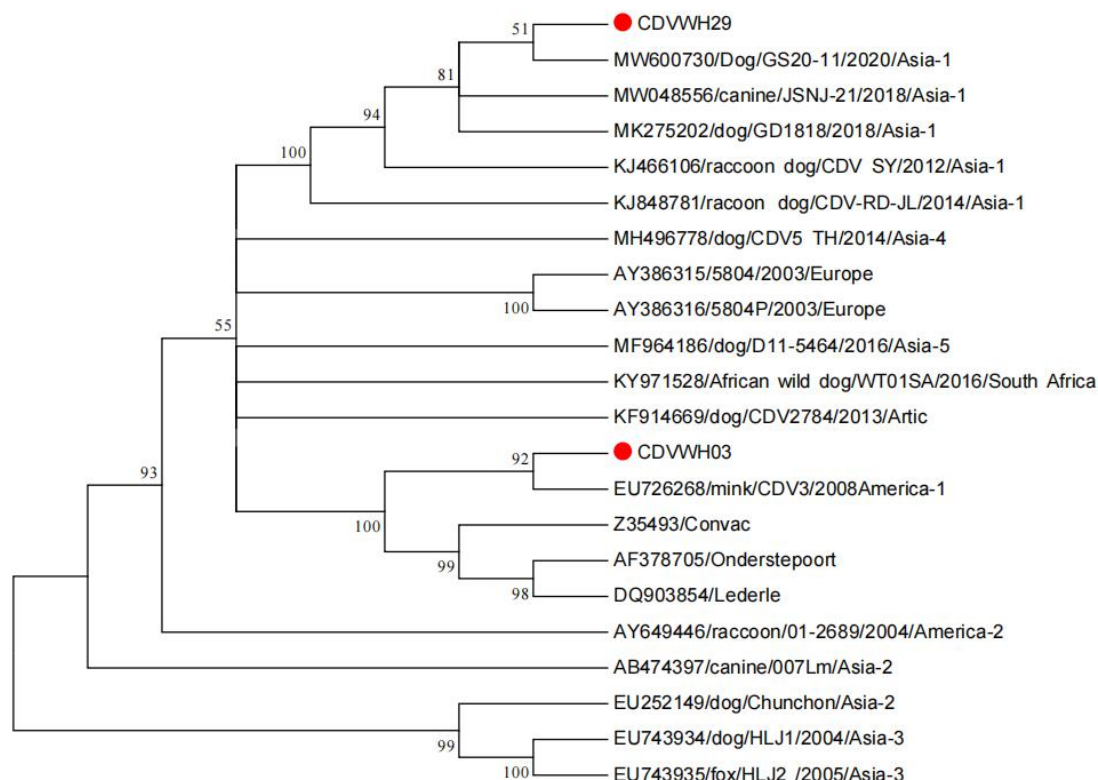


图 3-19 CDV H 基因遗传进化分析

Fig.3-19 Genetic evolutionary analysis of CDV H gene

3.6.9 H 基因潜在糖基化位点分析

糖基化位点与毒株的抗原性相关联，为探究 WH03、WH29 毒株与疫苗毒株及其余不同谱系参考毒株的差异性，使用 NetNGlyc 1.0 Server 在线软件，将所有毒株 H 基因的氨基酸序列上传后分析潜在 N-糖基化位点的差异，CDV 毒株潜在糖基化位点结果如图 3-20 所示。Onderstepoort 经典疫苗株有 4 个糖基化位点分别为（19、149、422、587），其余疫苗株为 6 - 7 个，WH03 株有 7 个潜在 N-糖基化位点，WH29 含有 9 个潜在 N-糖基化位点，与 Onderstepoort 经典疫苗株的糖基化位点相比较发现，WH03 株存在 3 个位点差异（391、456、603 位点），WH29 株有 5 个位点差异，其中包括 309、391、456、584、603 位点，其中 WH29 株与国内其他流行 Asia-1 型毒株位点一致均为 9 个，584 位点为 Asia-1 型特有。Asia-2 型至 Asia-5 型毒株糖基化位点为 7 - 8 个，此外可从结果中发现 126 位点在 South Africa 基因型中存在，其余基因型均无此位点。

毒株名称	潜在天冬酰胺糖基化位点										
	19	126	149	309	339	391	422	456	584	587	603
CDVWH03	N	-	N	-	-	N	N	N	-	N	N
CDVWH29	N	-	N	N	-	N	N	N	N	N	N
Onderstepoort	N	-	N	-	-	-	N	-	-	N	-
Lederle	N	-	N	-	-	N	N	N	-	N	-
Convac	N	-	N	-	-	N	N	N	-	N	N
CDV3	N	-	N	-	-	N	N	N	-	N	N
01-2689	N	-	N	N	-	N	N	N	-	N	N
5804	N	-	N	N	-	N	N	N	-	N	N
5804P	N	-	N	N	-	N	N	N	-	N	N
WT01SA	N	N	N	-	-	N	N	N	-	N	N
CDV2784/2013	N	-	N	N	-	N	N	N	-	N	N
CDV SY	N	-	N	N	-	N	N	N	N	N	N
CDV-RD-JL	N	-	N	N	-	N	N	N	N	N	N
JSNJ-21	N	-	N	N	-	N	N	N	N	N	N
GD1818	N	-	N	N	-	N	N	N	N	N	N
GS20-11	N	-	N	N	-	N	N	N	N	N	N
007Lm	N	-	N	N	-	N	N	N	-	N	N
Chunchon	N	-	N	N	-	N	N	N	-	N	N
HLJ1	N	-	N	N	N	-	N	N	-	N	N
HLJ2	N	-	N	N	N	-	N	N	-	N	N
CDV5_TH/2014	N	-	N	N	-	N	N	N	-	N	N
D11-5464/2016	N	-	N	-	-	N	N	N	-	N	N

图 3-20 CDV H 基因潜在糖基化位点分析

Fig.3-20 Potential glycosylation site analysis of CDV H gene

3.6.10 H 基因抗原表位预测分析

H 基因不仅与 CDV 毒株进化、致病力及易感宿主多样性相关,还能够刺激宿主机体产生免疫反应,为分析 H 基因的抗原表位,使用 Protean 软件中的 Jameson-Wolf 方法联合现有的蛋白质结构预测方法预测潜在的 CDV H 蛋白抗原决定簇,H 基因抗原表位预测分析图如图 3-21 所示。结果分析发现 WH03、WH29 毒株与 Onderstepoort 经典疫苗株之间,在 20 - 25 位、60 - 75 位、140 - 150 位、325 - 330 位、390 - 400 位、440 - 450 位、580 - 590 位抗原表位存在明显差异。结合图 3-22 氨基酸位点差异进行同步分析,发现第 20 位氨基酸 WH03 为 Pro,WH29 及疫苗株为 Ser;第 21 位氨基酸 WH03、WH29 由 Thr 突变为 Ser;第 62 位氨基酸,WH03 株为 Lys 与 WH29 及疫苗株位点的 Gln 存在差异;第 145 位 WH03、WH29 由 Thr 突变为 Lys;第 146 位 WH29 为 Ile;第 324 位点 WH03、WH29 为 Gly;第 330 位点

WH29 为 Gln, 331 位点 WH29 为 Val; 第 393 位点 WH03、WH29 为 Thr; 446 位点 WH29 为 Asp; 581 位点 WH03 为 Tyr; 584 位点 WH03、WH29 为 Asn; 585、586 位点 WH29 均发生突变 Thr。综上, WH03、WH29 与 Onderstepoort 经典疫苗株由于个别氨基酸的突变引起抗原表位的差异性, 进而导致不同毒株间存在免疫原性差异。

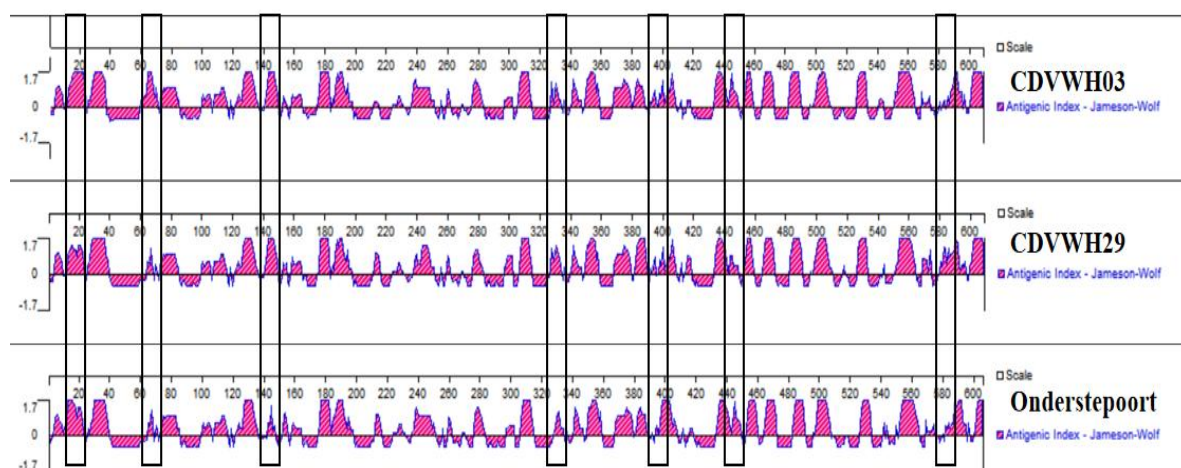


图 3-21 CDV H 基因抗原表位分析

Fig.3-21 Amino acid homology analysis of CDV H gene

Majority	MLSYQDKVGAFYKDNRANSSKLSLVTEEHGGRPPYLLFVLLI LLVGI LALLAI TGVRFHQVSTSNMEFSRLLKEDMEK
	10 20 30 40 50 60 70 80
CDVWH03	MLSYQDKVGAFYKDNRANSSKLSLVTEEHGGRPPYLLFVLLI LLVGI LALLAI TGVRFHQVSTSNMEFSRLLKEDMEK
CDVWH29	MLSYQDKVGAFYKDNRANSSKLSLVTEEGGRRPPYLLFVLLI LLI GI LALLAI TGVRFHQVSTSNMEFSRLLKEDMEK
Onderstepoort	MLPYQDKVGAFYKDNRANSTKLSLVTEGHGGRPPYLLFVLLI LLVGI LALLAI TGVRFHQVSTSNMEFSRLLKEDMEK
Majority	SEAVHHQVI DVLTPLFKI I GDEI GLRLPQKLNEI KQFI LQKTNFFNPNREFDFRDLHWCI NPPSKVKVNFTNYCETI GI R
	90 100 110 120 130 140 150 160
CDVWH03	SEAVHHQVI DVLTPLFKI I GDEI GLRLPQKLNEI KQFI LQKTNFFNPNREFDFRDLHWCI NPPSKVKVNFTNYCETI GI R
CDVWH29	SEAVHHQVI DVLTPLFKI I GDEI GLRLPQKLNEI KQFI LQKTNFFNPNREFDFRDLHWCI NPPSKI KVNFTNYCDTVGVK
Onderstepoort	SEAVHHQVI DVLTPLFKI I GDEI GLRLPQKLNEI KQFI LQKTNFFNPNREFDFRDLHWCI NPPSTVKVNFTNYCESI GI R
Majority	KSI ASAANPI LLSALSGGRGDI FPPYRCSGATTSGVKVFPLSVLSMSLI SRTSEI I NMLTAI SDGVYKTYLLVPDDI E
	170 180 190 200 210 220 230 240
CDVWH03	KSI ASAANPI LLSALSGGRSDI FPPYRCSGATTSGVKVFPLSVLSMSLI SRTSVI I NMLTAI SDGVYKTYLLVPDDI E
CDVWH29	KSI ASAANPI I LSTLSGARGDI FPPYRCSGATTSGRVFPLSVLSMSLI SRTSEI I NMLTAI SDGVYKTYLLVPDYI E
Onderstepoort	KAI ASAANPI LLSALSGGRGDI FPPHRCSGATTSGVKVFPLSVLSMSLI SRTSEVI NMLTAI SDGVYKTYLLVPDDI E
Majority	REFDTQEI RVFEI GFI KRWLNDMPLLQTTNYMVLPENSKAKVCTI AVGELTLASLCVEESTVLLYHDSXGSDGI LVVTL
	250 260 270 280 290 300 310 320
CDVWH03	REFDTQEI RVFEI GFI KRWLNDMPLLQTTNYMVLPENSKAKVCTI AVGELTLASLCVEESTVLLYHDSRGSDGI LVVTL
CDVWH29	GEFDSQKI RVFEI GFI KRWLNDMPLLQTTNYMVLPEPSKAKVCTI AVGELTLASLCVDESTVLLYHDSNGSDGI LVVTL
Onderstepoort	REFDTRI RVFEI GFI KRWLNDMPLLQTTNYMVLPKNSKAKVCTI AVGELTLASLCVEESTVLLYHDSGSDGI LVVTL
Majority	GI FGATPMDHI EEVI PVAHPSMEKI HI TNHRGFI KDSI ATWMVPALASEKQEEQKGCLESACQRKTYPMCNOTSWEPFGG
	330 340 350 360 370 380 390 400
CDVWH03	GI FGATSMCHI EEVI PVAHPSMEKI HI TNHRGFI KDSI ATWMVPALASEKQEEQKGCLESACQRKTYPMCNOTSWEPFGG
CDVWH29	GI FGATPMDQEEVI PI AHPSVERI HI TNHRGFI KDSI VTWMVPVLVSEKQEEQKNCLESACHRSYPMCNOTSWEPFGG
Onderstepoort	GI FWATPMDHI EEVI PVAHPSMKKI HI TNHRGFI KDSI ATWMVPALASEKQEEQKGCLESACQRKTYPMCNCASWEPFGG
Majority	GQLPSYGRLTLPLDASVDLQLNI SFTYGPVI LNGDGMDDYESPLLSGWLTI PPKNGTI LGLI NKASRGDQFTVXPHVLT
	410 420 430 440 450 460 470 480
CDVWH03	GQLPSYGRLTLPLDASVDLQLNI SFTYGPVI LNGDGMDDYESPLLSGWLTI PPKNGTI LGLI NKASRGDQFTVI PHVLT
CDVWH29	GQLPSYGRLTLPLDPSI DLQLNI SFTYGPVI LNGDGMDDYESPLLDGWLTI PPKNGTVLGLI NKASRGDQFTVTPHVLT
Onderstepoort	RQLPSYGRLTLPLDASVDLQLNI SFTYGPVI LNGDGMDDYESPLLSGWLTI PPKDGTI SGLI NKASRGDQFTVLPHVLT
Majority	FAPRESSGNCYLPI QTSQI XDRDVI ESNLVVLTQSFYRVI ATYDI SRXDHAI VYYYVDPI RTI SYTYPFRLTTKGRPD
	490 500 510 520 530 540 550 560
CDVWH03	FAPRESSGNCYLPI QTSQI I DRDVI ESNLVVLTQSFYRVI ATYDI SRNDHAI VYYYVDPFRTI FYTYPFRLTTKGRPD
CDVWH29	FAPRESSGNCYLPI QTSQI MDKDLTESNLVVLTQNFYRVI ATYDI SRGDHAI VYYYVDPI RTI SYTYPFRLTTKGRPD
Onderstepoort	FAPRESSGNCYLPI QTSQI RDRDVI ESNVVLVTQSI RYVI ATYDI SRSDHAI VYYYVDPI RTI SYTHPFRLTTKGRPD
Majority	FLRI ECFVWDDNLWCHQFYRFEANI ANSTTSVENLVRI RFSCNRSXP-
	570 580 590 600
CDVWH03	FLRI ECFVWDDNLWCHQFYRFEANI ANSTTSVENLVRI RFSCNRSNP.
CDVWH29	FLRI ECFVWDDDLWCHQFYRFEANTTNTSTTSVENLVRMRFSCNRSKP.
Onderstepoort	FLRI ECFVWDDNLWCHQFYRFEADI ANSTTSVENLVRI RFSCNR.

图 3-22 CDV H 基因氨基酸差异性分析

Fig.3-22 Amino acid difference analysis of CDV H gene

3.7 CDV 致病性研究

3.7.1 毒株制备及外源检测

本研究所用毒株中 WH03 为第 3 代细胞毒,WH29 为肺脏研磨液组织毒,经离心过滤处理后,统一保存于-80℃(WH03 共制备 30 mL 病毒液,WH29 共制备 90 mL 病毒液)。为验证毒株有无其他病原污染,我们利用 RT-PCR 进行外源检测。PCR 结果显示,常见犬传染病 CPV、CAV、CCV、CPIV 均无目的条带,表明 WH03 及 WH29 纯净性良好无常见外源病毒污染。扩增如图 3-23 所示。

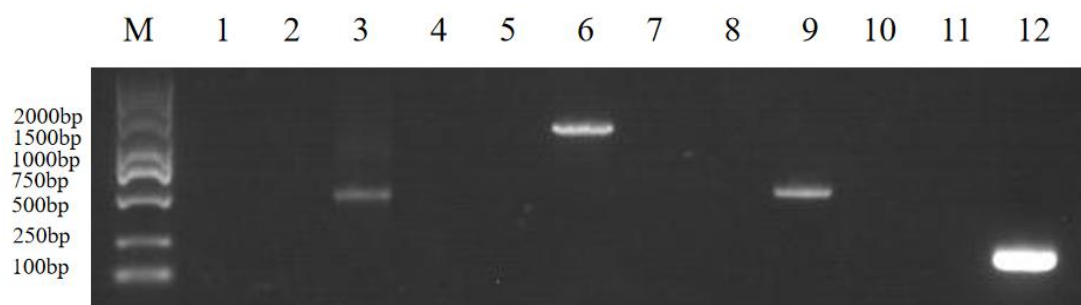


图 3-23 不同 CDV 毒株的外源病毒检测

Fig.3-23 Detection of exogenous viruses of different CDV strains

M: DL2000Marker; 1: WH03 CPV 扩增; 2: WH29 CPV 扩增; 3: CPV 阳性对照; 4: WH03 CAV 扩增; 5: WH29 CAV 扩增; 6: CAV 阳性对照; 7: WH03 CCV 扩增; 8: WH29 CCV 扩增; 9: CCV 阳性对照; 10: WH03 CPIV 扩增; 11: WH29 CPIV 扩增; 12: CPIV 阳性对照

M: DL2000Marker; 1: WH03 CPV amplification; 2: WH29 CPV amplification ; 3: CPV positive control; 4: WH03 CAV amplification; 5: WH29 CAV amplification; 6: CAV positive control; 7: WH03 CCV amplification; 8: WH29 CCV amplification ; 9: CCV positive control; 10: WH03 CPIV amplification; 11: WH29 CPIV amplification; 12: CPIV positive control

3.7.2 临床症状变化

攻毒前所有实验犬只食欲、饮欲正常，精神状态均良好。攻毒第 3 d，WH29 攻毒组部分犬只体温升高（39.4 °C - 39.7 °C）、眼角出现少量淡黄色眼分泌物，鼻孔流出清水样鼻液，高温持续 1 - 2 d 后，体温下降恢复正常持续 2 - 3 d，体温再次升高，之后体温升高持续时间不等，体温最高可达 40.4 °C，后期 WH29 攻毒组临床症状加重，眼分泌物大量出现且呈现脓性，鼻镜干燥，鼻孔流出黄色脓性鼻液，连续阵咳及出现呼吸道杂音，前掌爪垫增厚龟裂，部分犬只腹泻，食欲不振，精神萎靡。体重在第 10 d 出现负增长，且持续下降，犬只消瘦；观察期内，部分犬只食欲废绝，症状加剧相继死亡。观察期内，WH03 攻毒组犬只每日体温波动范围均在正常范围内，体重增长稳定，且未出现明显临床症状，无发病及死亡情况出现；DMEM 组犬只未见异常。临床症状变化结果显示，WH03 毒力较弱，对幼犬无明显致病力，WH29 毒力较强且组织嗜性较为稳定，能够引起犬只较为严重的呼吸道及消化道症状。体温、体重、临床评分及临床症状结果如图 3-24、3-25 所示。

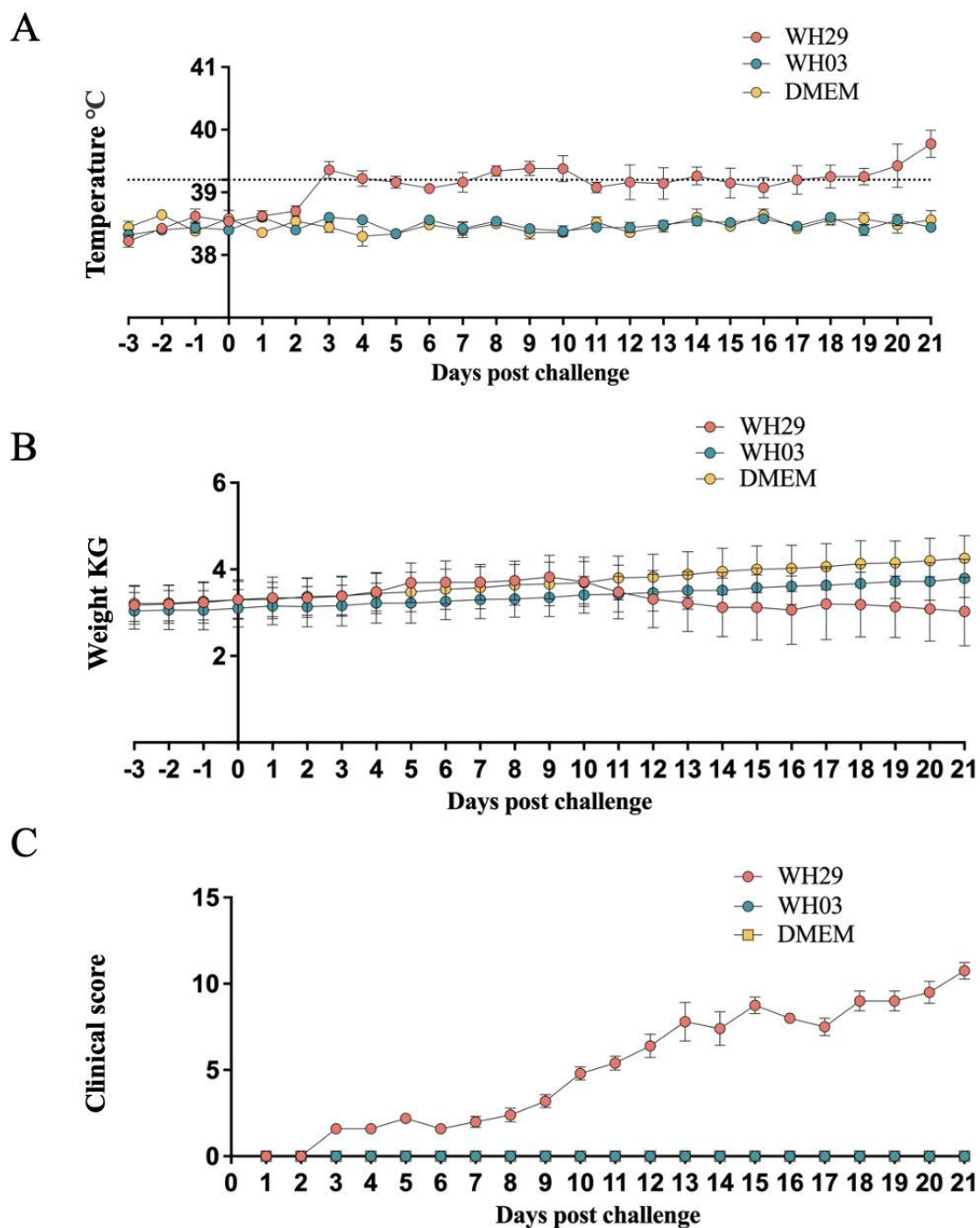


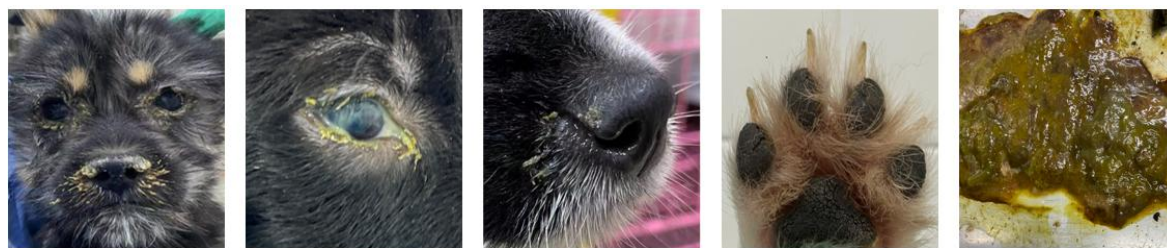
图 3-24 不同 CDV 毒株攻毒后犬只的临床变化

Fig.3-24 Clinical changes in dogs after attacked by different CDV strains

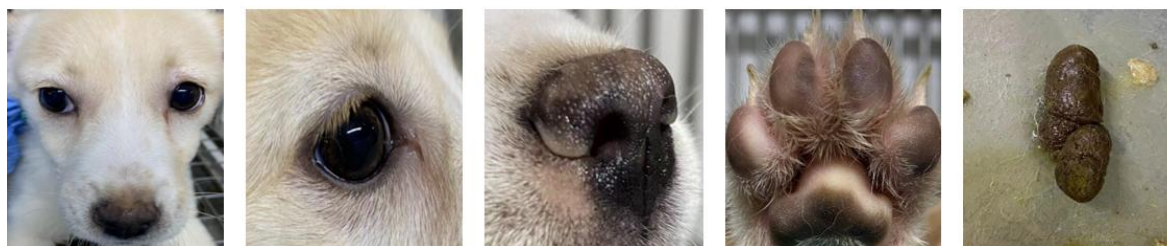
A: 体温变化图; B: 体重变化图; C: 临床评分图

A: Chart of body temperature changes; B: Chart of body weight changes; C: Chart of Clinical Score

A



B



C

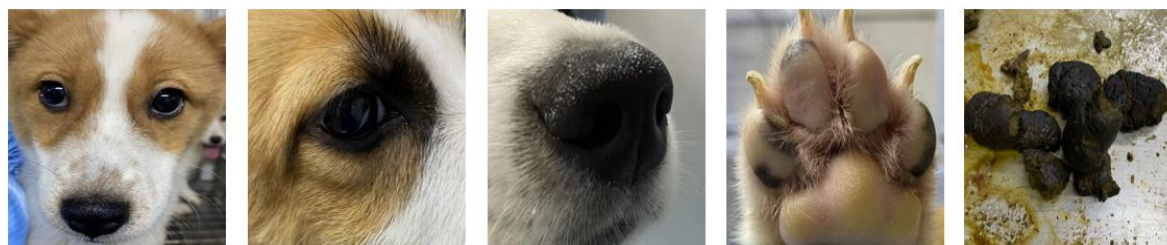


图 3-25 不同 CDV 毒株攻毒后犬只的临床症状

Fig.3-25 Clinical signs in dogs after virus attack by different CDV strains

A: WH29 攻毒后的临床症状; B: WH03 攻毒后的临床症状; C: 空白对照

A: Clinical signs after WH29 attacked ; B: Clinical signs after WH03 attacked ; C: Negative control

3.7.3 淋巴细胞数变化

为分析 CDV 毒株是否会引起免疫抑制,利用血细胞分析仪在 0 d、7 d、14 d、21 d 时对犬只抗凝血进行分析,通过淋巴细胞数量变化评价免疫抑制水平。结果发现 WH29 攻毒组犬只 0 - 7 d 时淋巴细胞数下降且低于正常范围,7 - 14 d 淋巴细胞数持续下降,14 - 21 d 淋巴细胞数略有增高,但依旧低于正常值;WH03 攻毒组犬只 0 - 7 d 时淋巴细胞数呈现小幅下降趋势,但处于正常范围内,14 d 及 21 d 时的淋巴细胞数已恢复至先前水平。淋巴细胞数结果表明,WH29 能够破坏淋巴细胞并抑制其生成,引起免疫抑制,造成免疫系统损伤,WH03 感染后能短暂引起淋巴细胞数减少,但在正常范围内,很快能恢复至正常水平,不能造成免疫细胞减少而引起免疫抑制。淋巴细胞数如图 3-26 所示。

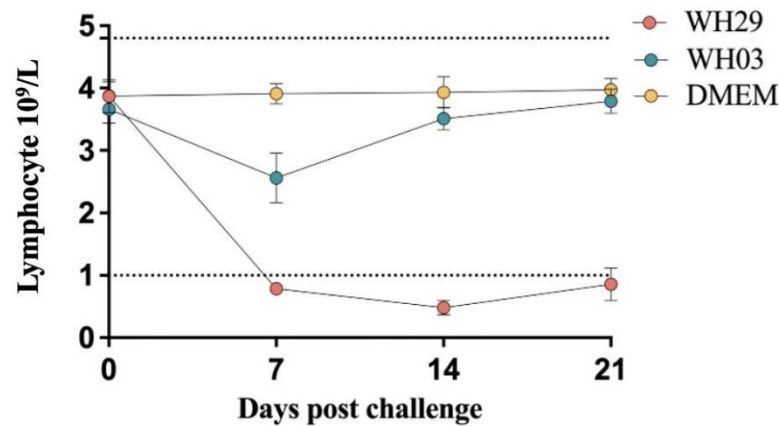


图 3-26 不同 CDV 毒株攻毒后犬只的淋巴细胞数变化

Fig.3-26 Changes in lymphocyte counts in dogs after attacked by different CDV strains

3.7.4 攻毒后排毒检测

为监测攻毒后犬只排毒情况，通过 RT-PCR 检测眼鼻咽及肠道分泌物排毒情况，结果发现 WH29 攻毒组犬只自第 3 d 起在不同分泌物中均能检测到 CDV 并一直持续到观察期结束，而 WH03 攻毒组犬只在观察期内，均未见排毒，说明犬只感染 WH29 后，该毒株能迅速感染各上皮组织且持续向外排毒，而 WH03 不引起犬只向外释放病毒。排毒检测情况如表 3-1、3-2 所示。

表 3-1 WH29 攻毒后的排毒检测

Table.3-1 Detoxification testing after WH29 attacked

犬只编号	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d
1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
2	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
3	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
5	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

注：/前后分别对应眼鼻咽及肛拭子检测结果

表 3-2 WH03 攻毒后的排毒检测

Table.3-2 Detoxification testing after WH03 attacked

犬只编号	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d
1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
4	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

注：/前后分别对应眼鼻咽及肛拭子检测结果

3.7.5 病理剖检变化

为探究 CDV 毒株通过细胞受体侵入组织后对不同组织的嗜性及破坏性，对攻毒犬只进行剖检，剖检观察发现 WH29 攻毒组犬只肺脏有大量出血，多处表现为实质性病变，形成间质性肺炎；脾脏肿大，边缘部分出血；肠道、肝脏少量出血，表明 WH29 对犬只具有一定的致病力，能造成各脏器不同程度损伤，尤其对肺脏损伤明显。WH03 攻毒组肺脏未见出血及实质性病变，其余脏器肉眼均未见异常。病理剖检结果如图 3-27 所示。

A



B



C



图 3-27 不同 CDV 毒株攻毒后犬只的病理剖检变化

Fig.3-27 Pathological profile changes in dogs after attacked by different CDV strains

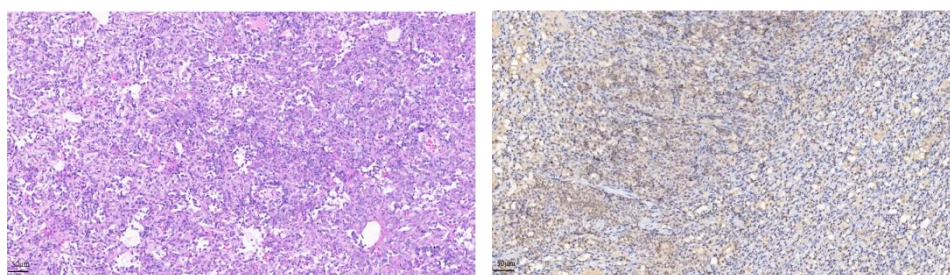
A: WH29 病理剖检变化; B: WH03 病理剖检变化; C: 空白对照

A: Pathological changes of WH29; B: Pathological changes of WH03; C: Negative control

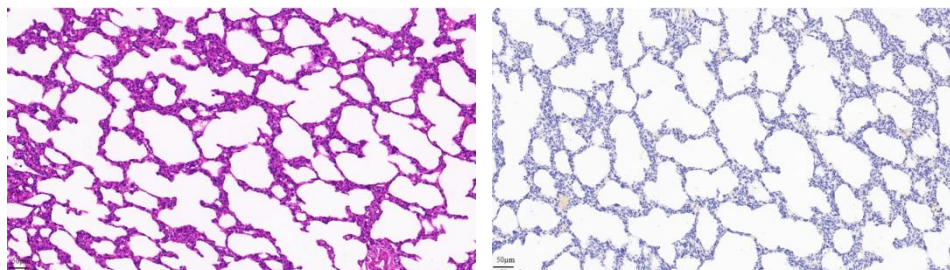
3.7.6 病理切片 HE 及 IHC 观察

采集感染犬只肺脏组织，进行 HE 及 IHC 染色观察。HE 切片结果显示，WH29 感染犬只肺脏实质化严重，肺泡结构不清晰大量消失，肺泡壁增厚，且伴有炎性细胞浸润，基于实验室 CDV 5A7 单抗的 IHC 染色结果显示，肺脏内 CDV 阳性信号大量分布，说明病毒侵染肺组织并大量增殖，破坏肺脏结构进而引起严重呼吸道症状；WH03 肺泡结构清晰，肺泡壁未见增厚，IHC 染色肺脏未见 CDV 阳性信号，说明病毒未侵染及破坏肺脏组织。HE 及 IHC 染色结果如图 3-28 所示。

A



B



C

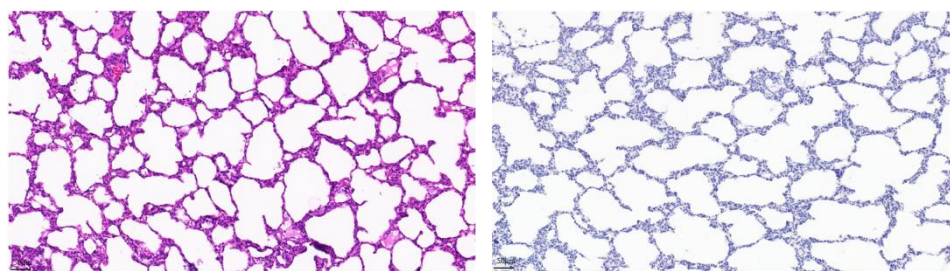


图 3-28 不同 CDV 毒株攻毒后肺脏 HE 及 IHC 结果

Fig.3-28 HE and IHC results of lungs after attacked by different CDV strains

A: WH29 攻毒后肺脏 HE 及 IHC 结果; B: WH03 攻毒后肺脏 HE 及 IHC 结果; C: 空白对照

A: HE and IHC results of lung after WH29 attacked; B: HE and IHC results of lung after WH03 attacked; C: Negative control

3.7.7 病毒组织载量测定

为检测 CDV 毒株在感染动物各组织器官中的病毒载量，分别采集不同组织利用 qPCR 检测组织脏器中 CDV 含量。qPCR 结果显示，WH29 感染犬只淋巴结中 CDV 载量最高，根据标准曲线计算病毒含量高达 2.5×10^8 copies/g，肺脏 CDV 载量其次，含量为 1.3×10^8 copies/g，膀胱及肝脏 CDV 载量较低，表明 WH29 对淋巴结及肺脏存在增殖嗜性，从而导致犬只出现免疫抑制及严重呼吸道症状；WH03 检测均无 CT 值，说明观察期结束时，先前经人工接种的 WH03 病毒已被犬只自身清除，未能在淋巴及各上皮组织内增殖。qPCR 结果如图 3-29 所示。

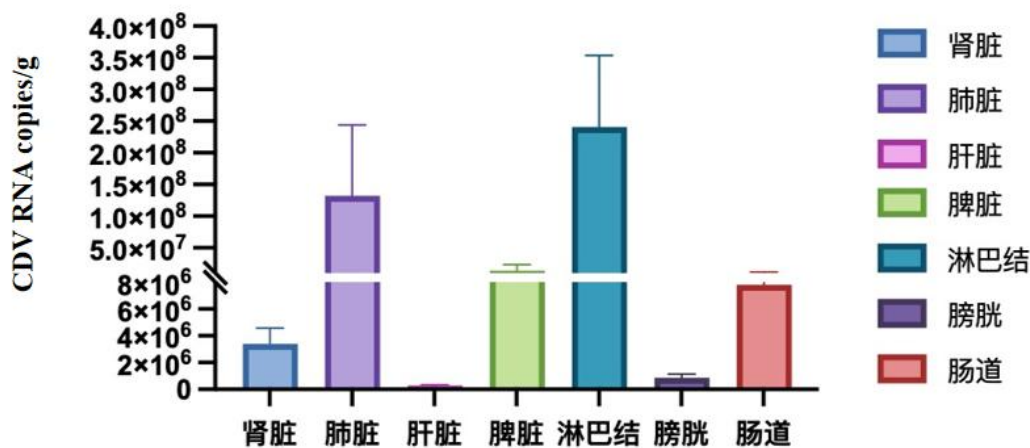


图 3-29 WH29 攻毒后不同组织的病毒载量测定

Fig.3-29 Determination of viral load in different tissues after WH29 attacked

3.7.8 生存曲线

将在试验过程中由 CDV 毒株感染后引起犬只的死亡情况统计并绘制相应图表。统计过程中，DMEM 组空白犬只体温较稳定、无任何临床变化及临床症状出现，因此判定对照成立。结果如图 3-30 所示，WH29 组在第 15 d 及第 21 d 各有一只试验犬出现死亡，死亡率为 40% (2/5)，说明 WH29 在犬只上具有一定致病性，对犬科动物及其他易感动物的健康存在一定威胁；WH03 组试验犬只则未出现发病及死亡情况，说明 WH03 对犬只无致病力，不能引起幼犬发病。

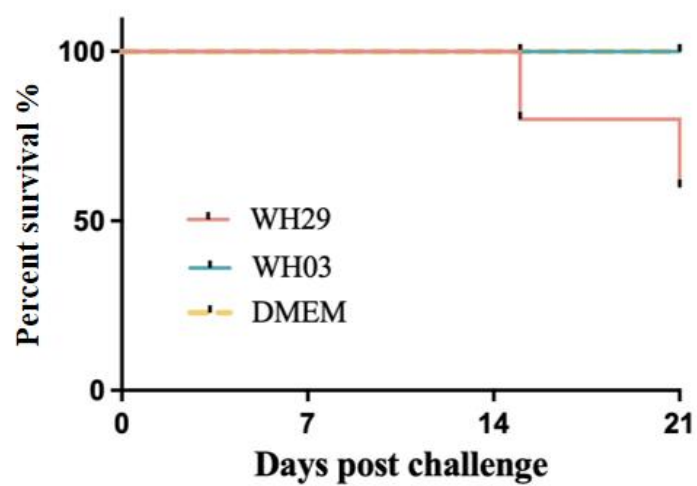


图 3-30 不同 CDV 毒株攻毒后犬只生存曲线 (n=5)

Fig.3-30 Survival curves of dogs after attacked by different CDV strains(n=5)

4 讨论

4.1 表达 Nectin4 受体的细胞系

传统方法对 CDV 野毒株进行体外分离时使用的原代细胞通常是易感动物的免疫细胞，原代细胞利用天然表达 SLAM 受体的优势，在早期分离 CDV 时有一定成效，但该类细胞获取时操作复杂极易污染，来源有限且不能多次传代；也有少数利用鸡胚绒毛尿囊膜分离培养 CDV，但利用该细胞分离率低，且存在需盲传多代才能使病毒适应细胞进而分离到毒株的可能性，分离成本昂贵。B95a 细胞是由 EB 病毒（Epstein-Barr virus, EBV）转化形成的猿猴淋巴细胞系，培养过程中可能存在分泌 EBV 的风险(Tatsuo et al 2000)，安全性有待考量，且猿猴为濒临灭绝的动物，B95a 细胞无法得到广泛使用；MDCK 细胞系在分离过程中，CPE 形成不明显且所需生长周期较长，有学者利用 MDCK 连续盲传 6 代才出现 CPE(Tan et al 2011)；Vero 细胞由于缺乏病毒吸附受体，毒株在适应细胞的传代过程中突变可能会导致毒力下降及氨基酸突变(Lednicky et al 2004b)。

随着麻疹病毒属细胞受体的研究不断深入，SLAM、Nectin4 受体在多种细胞系中的表达已被用于分离麻疹病毒属，包括 MV、CDV、PPRV 等(Ono et al 2001; Sato et al 2012; Seki et al 2003)，病毒分离效率大大提高。Seki 等人通过刺激外周血单核细胞获取 SLAM 基因，进而构建 pCAGDogSLAM 载体转染细胞后使 Vero 细胞成功表达 SLAM 受体，但此方法成功的阳性细胞数量较少，说明转染效率低(Seki et al 2003)，此外，刘玉秀等人在研究中通过瞬时转染构建的 Vero/SLAM 细胞，在传代过程中有外源蛋白丢失的情况发生，因此，该细胞不能连续传代使用。病毒利用 H 蛋白与受体的 V 结构域识别结合，SLAM 受体的氨基酸序列因物种而异且差异性显著，通常需要病毒特异性突变来适应不同物种宿主的 SLAM 受体，而 Nectin4 的蛋白序列在不同哺乳动物之间高度保守，这消除了病毒需要对受体特异适应的局限性，在识别多物种来源毒株时存在强有力优势。Muhlebach 等人研究发现 MV H 蛋白对 Nectin4 受体的亲和力是 SLAM 的 4 到 5 倍，相较于其他受体与蛋白作用时具有更高的亲和力(Muhlebach et al 2011)。SLAM 分布于淋巴细胞表面，只在感染早期发挥

作用，引起免疫抑制但不会产生临床症状，感染不易被发现，而 Nectin4 为感染中后期重要细胞受体，主要分布于上皮细胞，病毒必须借助 Nectin4 受体才能够在易感动物上引起明显临床症状并向外界持续排出，此时病毒在各上皮组织及分泌物中大量分布且含量丰富。因此，Nectin4 受体相较于 SLAM 受体，具有更广泛的应用潜力。

本研究通过构建重组慢病毒质粒，慢病毒感染细胞能有效改善受体表达效率，大大增加阳性细胞数量，经验证外源蛋白 Nectin4 能够在细胞系中稳定连续传代 30 代以上不丢失，本研究中利用 Vero、Vero-Nectin4 细胞系比较病毒生长动力学，发现 Vero-Nectin4 能有效提高病毒增殖滴度，与 Fakri 等人使用 Vero-Nectin4 细胞有效提高小反刍兽疫病毒（*Peste des Petits Ruminants virus*, PPRV）的增殖滴度表现一致。说明该细胞在提高疫苗病毒滴度方面可能具有一定优势(Fakri et al 2016)，为抗原生产节约成本提供可能性。本研究的细胞系除利用 Nectin4 细胞受体与病毒吸附结合加快病毒侵染细胞，还利用 Vero 细胞先天免疫/干扰素系统受损的优势，除 CDV 外的不同病毒均能在细胞上生长繁殖(Chew et al 2009)，使得该细胞系在面对不同病毒的分离培养具有显著广谱性。此外，细胞在代谢过程中积累的乳酸和氨，对生产产量及质量造成负面影响，有研究通过表达丙酮酸羧化酶，敲低丙酮酸脱氢酶激酶及其激活剂降低代谢影响，获得的重组病毒滴度提高了 30 倍(Abaandou et al 2021)，有效节约生产成本。本研究的细胞系在实验室阶段表现出对 CDV 高敏感的优势，未来有望通过基因工程化在促进生长、抵抗凋亡、调节代谢等方面进行改造，进一步提升抗原生产效率。

4.2 CDV 样品采集与分离

自 20 世纪 50 年代以来，以 Onderstepoort 毒株为主导的弱毒疫苗有效降低了 CD 疫情的爆发(Wilkes 2022)，疫苗接种失败的情况并不常见，但 CD 仍在已免疫个体和群体中发生，最常见的因素是免疫程序不完全、疫苗株的残余毒力，此外在环境压力下驱动的野生型 CDV 毒株发生抗原漂移也是疫苗保护失败的重要因素。本研究结果显示我国五个省份中 CDV 平均感染率高达 22.3%，病毒的

分离培养是深入研究当前流行毒株的必要前提条件,但病毒的成功分离除依赖于敏感细胞外,病料的新鲜程度也是病毒成功分离的重要因素。但 CDV 对环境抵抗力较低,极易在光热条件下被灭活。本研究在样品收集过程中可能由于样品保存温度、运输距离及时间等问题,导致大多数样品中的活病毒被光热破坏而破裂死亡;其次新鲜样品与冷冻样品存在较大差异,冷冻样品在冻融过程中降低了病毒的感染力,导致部分本身病毒含量较低的拭子类样品中 CDV 吸附侵染细胞的能力大打折扣。因此在经 RT-PCR 鉴定的 280 份阳性样品中,只成功分离出一株犬源 CDV (WH03),该毒株在 24 h 时能表现出明显的细胞病变,与 Seki 等人研究中利用 SLAM-Vero 细胞系接种病毒后出现细胞病变的时间一致,细胞系表现出对 CDV 毒株高度敏感性,且该毒株能够在细胞上稳定连续传代。本研究中除成功分离出 WH03 外,在样品采集过程中,获得 3 份 CDV 胶体金阳性病死犬尸体,PCR 病原鉴定结果显示,2 条病死犬除 CDV 外还混合感染 CPV 及 CCV,1 条病死犬为 CDV 单一感染,将该 CDV 命名为 WH29 并接种细胞尝试分离,但细胞盲传结果显示阴性,未能成功分离。组织类样品相对于拭子类样品,在外界环境下能够对病毒粒子起到一定保护作用,Fakri 等人的研究结果显示利用 CDV 新鲜组织病料的能有效提高病毒分离效率(Fakri et al 2016),但 CDV 流行野毒株与经传代致弱的弱毒疫苗株在细胞适应性上存在显著差异,考虑可能因部分野毒株 H 蛋白中特定氨基酸突变等多种因素,相较于疫苗株对细胞的高度适应性而言,导致部分野毒株难以适应细胞进而无法增殖,这可能是 WH29 流行毒株未成功分离的原因之一。因此,在样品收集时需严格遵守冷藏运输,相较于拭子类样品而言,应侧重于病死动物组织类样品的收集,注重不同地区、不同场所、不同物种间的流行毒株的收集,在提高组织类样品收集数量的同时,还要保证接种细胞时样品的新鲜程度,为 CDV 的分离培养提供高质量样品库,以期提高分离效率。

4.3 CDV 遗传进化分析及致病性研究

H 蛋白作为 CDV 囊膜糖蛋白之一,其遗传变异率显著高于其他基因,被

广泛用于分析 CDV 野毒株的遗传变异。WH03、WH29 毒株的 H 基因遗传进化结果显示, WH03 毒株与 America-1 型(大多数为疫苗株)属于同一分支, 这与 Zhao 等人研究中我国 CDV 流行毒株基因型(Asia-1、Asia-3、Arctic)有所差异(Zhao et al 2010), 经同源性分析, WH03 与疫苗株在核苷酸、氨基酸同源性较高, 推测 WH03 来自疫苗株, 但与疫苗株间存在 1% - 3.9%、2.3% - 5.9% 的差异, 考虑可能是受野生型和疫苗株之间发生同源重组事件的影响(da Fontoura Budaszewski et al 2016a; Yuan et al 2017), 进而导致减毒疫苗毒株在选择压力下产生部分突变引起差异, 具体原因还需进一步探究。WH29 毒株与我国 2020 年发表的犬源 GS20-11 株亲缘关系最近, 属于 Asia-1 型, 与疫苗株遗传距离较远, 属于我国当前流行野生型毒株, 这与其他有疫苗接种史的 CDV 阳性病例的报道结果相符合(Zhao et al 2010)。潜在糖基化位点是疫苗株与野毒株 H 蛋白间抗原性差异焦点, WH29 具有 9 个糖基化位点, 相较于疫苗株存在至少 2 个位点差异及以上, 包括 309、584 位点, 这与 Tan 等人研究一致(Tan et al 2011), 特别是野生型毒株特有的 309 位点, 提示了 WH29 的致病性, 而 WH03 无此位点, 这与本研究中 WH03、WH29 毒株的致病性结果表现一致, 但糖基化位点是否与 CDV 毒力有关还有待进一步研究。此外, Iwatsuki 等人认为不同的糖基化位点会影响 H 蛋白的免疫原性(Iwatsuki et al 2000), 因此糖基化位点和位置的变化可能导致 Onderstepoort 疫苗株无法对遗传变异毒株 WH29 提供有效保护。Liao 等人认为 530 及 549 位点在宿主适应性中具有重要作用, 研究发现犬在 530 (G/D/N/E/R/S/A/K) 位置上有 8 个可能的替代, 在 549 (H/Y) 位置上有 2 个替代(Liao et al 2015), 本研究中 WH03 突变为 530N, WH29 突变为 530G, 而 549 位置均为 Y, 两毒株均为犬源 CDV, 这与 Nikolin 等人的研究一致, 犬更倾向于呈现 549Y(Nikolin et al 2012), 提示 WH03、WH29 可能缺乏跨宿主传播的能力, 主要在犬科动物中广泛流行, 但不排除环境压力下跨物种感染其他宿主的可能性。CDV 作为麻疹病毒属的一员, 具有强跨宿主传播感染能力(Rendon-Marin et al 2019), 对不同动物如犬、狐狸、水貂等及多种野生动物致病力表现不一, 临床症状及致死率存在较大差异(Beineke et al 2009), 还有学者利用 CDV 动物感染模型模拟 MV, 为 MV 发病机

制或干预策略提供参考(da Fontoura Budaszewski et al 2016b; Schmitz et al 2024)。致病性研究结果显示, WH03 对幼犬无致病性; WH29 毒株则对犬只较为敏感, 能够引起多种典型犬瘟热临床症状, 观察期内, 犬瘟热典型神经症状如肌肉震颤、转圈等未观察到, 说明 WH29 的神经毒性可能较弱, 但不排除延长观察期后出现神经症状的可能性(Lan et al 2005)。淋巴细胞减少是反映免疫抑制最重要的临床指标, 因此 WH29 引起的淋巴细胞数急剧下降, 说明了免疫抑制的发生, 这就提示了自然环境下感染 WH29 的易感动物因免疫力低下极有可能混合感染其他病原, 引起严重临床症状甚至危及生命。此外, 本研究中 WH29 毒株对肺脏嗜性较强, 以肺瘀血斑和间质纤维化为主, 这与 Qiu 等人剖检结果一致(Qiu et al 2011), 动物表现为呼吸困难进而引起各脏器缺氧代谢紊乱, 最终呼吸衰竭导致死亡。

本研究通过遗传进化分析及致病性研究发现, WH03、WH29 与疫苗株 H 基因存在差异, 存在免疫逃逸的可能。其中 WH29 作为我国流行优势毒株, 其高致病性对犬类造成严重威胁, 可用于后续 CDV 动物感染模型的构建。为目前仍以 America-1 型为主的市售疫苗厂家, 提供改进思路, 以期易感动物提供更为有效的免疫保护。

5 结论

1. 本研究成功构建出稳定表达 Nectin4 受体的 Vero 细胞系，经鉴定受体在传代过程中稳定性良好，能有效提高 CDV 增殖滴度。
2. 流行病学调查结果显示我国五个省份中 CDV 阳性检出率为 22.3% (280/1255)，并利用细胞系成功分离出 1 株能稳定传代的 CDV 毒株 (WH03)，还获得 1 株无细胞适应性的 CDV 毒株 (WH29)。
3. 经 H 基因遗传进化分析，WH03 为美洲 1 型，WH29 为亚洲 1 型，与经典疫苗株比较，在同源性、糖基化位点、抗原表位均存在差异。
4. 致病性研究结果显示，WH03 毒力较弱，对犬只不致病，WH29 对犬只具有高致病力。

参考文献

1. Abaandou L, Quan D, Shiloach J. Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes. *Cells*, 2021, 10.
2. Ader-Ebert N, Khosravi M, Herren M, Avila M, Alves L, Bringolf F, Örvell C, Langedijk JP, Zurbriggen A, Plemper RK, Plattet P. Sequential conformational changes in the morbillivirus attachment protein initiate the membrane fusion process. *PLoS Pathog*, 2015, 11: e1004880.
3. Adombi CM, Lelenta M, Lamien CE, Shamaki D, Koffi YM, Traoré A, Silber R, Couacy-Hymann E, Bodjo SC, Djaman JA, Luckins AG, Diallo A. Monkey CV1 cell line expressing the sheep-goat SLAM protein: a highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens. *J Virol Methods*, 2011, 173: 306-313.
4. Alves L, Khosravi M, Avila M, Ader-Ebert N, Bringolf F, Zurbriggen A, Vandeveld M, Plattet P. SLAM- and nectin-4-independent noncytolytic spread of canine distemper virus in astrocytes. *J Virol*, 2015, 89: 5724-5733.
5. Anderson DE, von Messling V. Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *J Virol*, 2008, 82: 10510-10518.
6. Appel MJ, Summers BA. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet Microbiol*, 1995, 44: 187-191.
7. Avila M, Khosravi M, Alves L, Ader-Ebert N, Bringolf F, Zurbriggen A, Plemper RK, Plattet P. Canine distemper virus envelope protein interactions modulated by hydrophobic residues in the fusion protein globular head. *J Virol*, 2015, 89: 1445-1451.
8. Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgärtner W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 127: 1-18.

9. Bi Z, Wang Y, Wang X, Xia X. Phylogenetic analysis of canine distemper virus in domestic dogs in Nanjing, China. *Arch Virol*, 2015a, 160: 523-527.
10. Bi Z, Xia X, Wang Y, Mei Y. Development and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against canine distemper virus hemagglutinin protein. *Microbiol Immunol*, 2015b, 59: 202-208.
11. Bieringer M, Han JW, Kendl S, Khosravi M, Plattet P, Schneider-Schaulies J. Experimental adaptation of wild-type canine distemper virus (CDV) to the human entry receptor CD150. *PLoS One*, 2013, 8: e57488.
12. Blancou J. Dog distemper: imported into Europe from South America? *Hist Med Vet*, 2004, 29: 35-41.
13. Blixenkrone-Möller M, Svansson V, Appel M, Krogsrud J, Have P, Orvell C. Antigenic relationships between field isolates of morbilliviruses from different carnivores. *Arch Virol*, 1992, 123: 279-294.
14. Bolt G, Jensen TD, Gottschalck E, Arctander P, Appel MJ, Buckland R, Blixenkrone-Møller M. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *J Gen Virol*, 1997, 78 (Pt 2): 367-372.
15. Bouleftour W, Sargos P, Magne N. Nectin-4: a Tumor Cell Target and Status of Inhibitor Development. *Curr Oncol Rep*, 2023, 25: 181-188.
16. Bringolf F, Herren M, Wyss M, Vidondo B, Langedijk JP, Zurbriggen A, Plattet P. Dimerization Efficiency of Canine Distemper Virus Matrix Protein Regulates Membrane-Budding Activity. *J Virol*, 2017, 91.
17. Brügger M, Jungi TW, Zurbriggen A, Vandeveld M. Canine distemper virus increases procoagulant activity of macrophages. *Virology*, 1992, 190: 616-623.
18. Chatterjee S, Sinha S, Kundu CN. Nectin cell adhesion molecule-4 (NECTIN-4): A potential target for cancer therapy. *Eur J Pharmacol*, 2021, 911: 174516.

19. Chen F, Guo Z, Zhang R, Zhang Z, Hu B, Bai L, Zhao S, Wu Y, Zhang Z, Li Y. Canine distemper virus N protein induces autophagy to facilitate viral replication. *BMC Vet Res*, 2023, 19: 60.
20. Cherpillod P, Tipold A, Griot-Wenk M, Cardozo C, Schmid I, Fatzer R, Schobesberger M, Zurbriggen R, Bruckner L, Roch F, Vandeveld M, Wittek R, Zurbriggen A. DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper. *Vaccine*, 2000, 18: 2927-2936.
21. Chew T, Noyce R, Collins SE, Hancock MH, Mossman KL. Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Mol Immunol*, 2009, 46: 393-399.
22. Cleaveland S, Appel MG, Chalmers WS, Chillingworth C, Kaare M, Dye C. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. *Vet Microbiol*, 2000, 72: 217-227.
23. da Fontoura Budaszewski R, Streck AF, Nunes Weber M, Maboni Siqueira F, Muniz Guedes RL, Wageck Canal C. Influence of vaccine strains on the evolution of canine distemper virus. *Infect Genet Evol*, 2016a, 41: 262-269.
24. da Fontoura Budaszewski R, von Messling V. Morbillivirus Experimental Animal Models: Measles Virus Pathogenesis Insights from Canine Distemper Virus. *Viruses*, 2016b, 8.
25. Day MJ, Carey S, Clercx C, Kohn B, Marsillo F, Thiry E, Freyburger L, Schulz B, Walker DJ. Aetiology of Canine Infectious Respiratory Disease Complex and Prevalence of its Pathogens in Europe. *J Comp Pathol*, 2020, 176: 86-108.
26. de Vries RD, Ludlow M, de Jong A, Rennick LJ, Verburgh RJ, van Amerongen G, van Riel D, van Run P, Herfst S, Kuiken T, Fouchier RAM, Osterhaus A, de Swart RL, Duprex WP. Delineating morbillivirus entry,

- dissemination and airborne transmission by studying in vivo competition of multicolor canine distemper viruses in ferrets. *PLoS Pathog*, 2017, 13: e1006371.
27. de Witte L, de Vries RD, van der Vlist M, Yüksel S, Litjens M, de Swart RL, Geijtenbeek TB. DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes. *PLoS Pathog*, 2008, 4: e1000049.
28. Decaro N, Camero M, Greco G, Zizzo N, Tinelli A, Campolo M, Pratelli A, Buonavoglia C. Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol*, 2004, 27: 177-181.
29. Delpeut S, Noyce RS, Richardson CD. The tumor-associated marker, PVRL4 (nectin-4), is the epithelial receptor for morbilliviruses. *Viruses*, 2014, 6: 2268-2286.
30. Dietzel E, Anderson DE, Castan A, von Messling V, Maisner A. Canine distemper virus matrix protein influences particle infectivity, particle composition, and envelope distribution in polarized epithelial cells and modulates virulence. *J Virol*, 2011, 85: 7162-7168.
31. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*, 1997, 51: 151-178.
32. Duque-Valencia J, Sarute N, Olarte-Castillo XA, Ruíz-Sáenz J. Evolution and Interspecies Transmission of Canine Distemper Virus-An Outlook of the Diverse Evolutionary Landscapes of a Multi-Host Virus. *Viruses*, 2019, 11.
33. Elia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E, Di Trani L, Buonavoglia C. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, 2006, 136: 171-176.
34. Elia G, Camero M, Losurdo M, Lucente MS, Larocca V, Martella V, Decaro N, Buonavoglia C. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *J Virol Methods*, 2015, 213: 127-130.

35. Fabre S, Reymond N, Cocchi F, Menotti L, Dubreuil P, Campadelli-Fiume G, Lopez M. Prominent role of the Ig-like V domain in trans-interactions of nectins. Nectin3 and nectin 4 bind to the predicted C-C'-C"-D beta-strands of the nectin1 V domain. *J Biol Chem*, 2002, 277: 27006-27013.
36. Fakri F, Elarkam A, Daouam S, Tadlaoui K, Fassi-Fihri O, Richardson CD, Elharrak M. VeroNectin-4 is a highly sensitive cell line that can be used for the isolation and titration of Peste des Petits Ruminants virus. *J Virol Methods*, 2016, 228: 135-139.
37. Feng N, Liu Y, Wang J, Xu W, Li T, Wang T, Wang L, Yu Y, Wang H, Zhao Y, Yang S, Gao Y, Hu G, Xia X. Canine distemper virus isolated from a monkey efficiently replicates on Vero cells expressing non-human primate SLAM receptors but not human SLAM receptor. *BMC Vet Res*, 2016a, 12: 160.
38. Feng N, Yu Y, Wang T, Wilker P, Wang J, Li Y, Sun Z, Gao Y, Xia X. Fatal canine distemper virus infection of giant pandas in China. *Sci Rep*, 2016b, 6: 27518.
39. Gordon CH, Banyard AC, Hussein A, Laurenson MK, Malcolm JR, Marino J, Regassa F, Stewart AM, Fooks AR, Sillero-Zubiri C. Canine distemper in endangered Ethiopian wolves. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21: 824-832.
40. Gradauskaite V, Khosravi M, Plattet P. Selective SLAM/CD150 receptor-detargeting of canine distemper virus. *Virus Res*, 2022, 318: 198841.
41. Iwatsuki K, Okita M, Ochikubo F, Gemma T, Shin YS, Miyashita N, Mikami T, Kai C. Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. *J Comp Pathol*, 1995, 113: 185-190.
42. Iwatsuki K, Tokiyoshi S, Hirayama N, Nakamura K, Ohashi K, Wakasa C, Mikami T, Kai C. Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses. *Vet Microbiol*, 2000, 71: 281-286.

43. Jensen TH, Nielsen L, Aasted B, Pertoldi C, Blixenkrone-Møller M. Canine distemper virus DNA vaccination of mink can overcome interference by maternal antibodies. *Vaccine*, 2015, 33: 1375-1381.
44. Jo WK, Peters M, Kydyrmanov A, van de Bildt MWG, Kuiken T, Osterhaus A, Ludlow M. The Canine Morbillivirus Strain Associated with An Epizootic in Caspian Seals Provides New Insights into the Evolutionary History of this Virus. *Viruses*, 2019, 11.
45. Kai C, Ochikubo F, Okita M, Iinuma T, Mikami T, Kobune F, Yamanouchi K. Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. *J Vet Med Sci*, 1993, 55: 1067-1070.
46. Kapil S, Neel T. Canine distemper virus antigen detection in external epithelia of recently vaccinated, sick dogs by fluorescence microscopy is a valuable prognostic indicator. *J Clin Microbiol*, 2015, 53: 687-691.
47. Karki M, Rajak KK, Singh RP. Canine morbillivirus (CDV): a review on current status, emergence and the diagnostics. *Virusdisease*, 2022, 33: 309-321.
48. Ke GM, Ho CH, Chiang MJ, Sanno-Duanda B, Chung CS, Lin MY, Shi YY, Yang MH, Tyan YC, Liao PC, Chu PY. Phylodynamic analysis of the canine distemper virus hemagglutinin gene. *BMC Vet Res*, 2015, 11: 164.
49. Khosravi M, Bringolf F, Röthlisberger S, Bieringer M, Schneider-Schaulies J, Zurbriggen A, Origgi F, Plattet P. Canine Distemper Virus Fusion Activation: Critical Role of Residue E123 of CD150/SLAM. *J Virol*, 2016, 90: 1622-1637.
50. Kim HH, Yang DK, Seo BH, Cho IS. Serosurvey of rabies virus, canine distemper virus, parvovirus, and influenza virus in military working dogs in Korea. *J Vet Med Sci*, 2018, 80: 1424-1430.

51. Kim YH, Cho KW, Youn HY, Yoo HS, Han HR. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J Vet Sci*, 2001, 2: 59-63.
52. King AMQ, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adams MJ, Dutilh BE, Gorbalenya AE, Harrach B, Harrison RL, Junglen S, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Nibert ML, Rubino L, Sabanadzovic S, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, *et al.* Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). *Arch Virol*, 2018, 163: 2601-2631.
53. Klemens J, Ciurkiewicz M, Chludzinski E, Iseringhausen M, Klotz D, Pfankuche VM, Ulrich R, Herder V, Puff C, Baumgärtner W, Beineke A. Neurotoxic potential of reactive astrocytes in canine distemper demyelinating leukoencephalitis. *Sci Rep*, 2019, 9: 11689.
54. Krakowka S, Cockerell G, Koestner A. Effects of canine distemper virus infection on lymphoid function in vitro and in vivo. *Infect Immun*, 1975, 11: 1069-1078.
55. Kurita S, Ogita H, Takai Y. Cooperative role of nectin-nectin and nectin-afadin interactions in formation of nectin-based cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, 2011, 286: 36297-36303.
56. Lamb RA. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology*, 1993, 197: 1-11.
57. Lan NT, Yamaguchi R, Furuya Y, Inomata A, Ngamkala S, Naganobu K, Kai K, Mochizuki M, Kobayashi Y, Uchida K, Tateyama S. Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. *Vet Microbiol*, 2005, 110: 197-207.
58. Lednicky JA, Dubach J, Kinsel MJ, Meehan TP, Bocchetta M, Hungerford LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrak C, Houde CM. Genetically distant

- American Canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. *Virol J*, 2004a, 1: 2.
59. Lednicky JA, Meehan TP, Kinsel MJ, Dubach J, Hungerford LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrak C, Houde CM. Effective primary isolation of wild-type canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes. *J Virol Methods*, 2004b, 118: 147-157.
60. Lempp C, Spitzbarth I, Puff C, Cana A, Kegler K, Techangamsuwan S, Baumgärtner W, Seehusen F. New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. *Viruses*, 2014, 6: 2571-2601.
61. Leonard VH, Sinn PL, Hodge G, Miest T, Devaux P, Oezguen N, Braun W, McCray PB, Jr., McChesney MB, Cattaneo R. Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest*, 2008, 118: 2448-2458.
62. Liao P, Guo L, Wen Y, Yang Y, Cheng S. Phylogenetic features of hemagglutinin gene in canine distemper virus strains from different genetic lineages. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8: 6607-6612.
63. Liljeroos L, Huiskonen JT, Ora A, Susi P, Butcher SJ. Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 18085-18090.
64. Liu Y, Liu C, Ding H, Cao Y, Sun Z, Wu H, Wang L, He W, Huang B, Xi X, Tian K. A highly virulent canine distemper virus strain isolated from vaccinated mink in China. *Virus Genes*, 2021, 57: 266-275.

65. Liu Z, Huntley CC, De BP, Das T, Banerjee AK, Oglesbee MJ. Phosphorylation of canine distemper virus P protein by protein kinase C-zeta and casein kinase II. *Virology*, 1997, 232: 198-206.
66. Martella V, Elia G, Lucente MS, Decaro N, Lorusso E, Banyai K, Blixenkrone-Møller M, Lan NT, Yamaguchi R, Cirone F, Carmichael LE, Buonavoglia C. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Vet Microbiol*, 2007, 122: 32-42.
67. Martella V, Elia G, Buonavoglia C. Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2008, 38: 787-797, vii-viii.
68. Martinez-Gutierrez M, Ruiz-Saenz J. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. *BMC Vet Res*, 2016, 12: 78.
69. Matsuu A, Yabuki M, Aoki E, Iwahana M. Molecular detection of canine respiratory pathogens between 2017 and 2018 in Japan. *J Vet Med Sci*, 2020, 82: 690-694.
70. McCarthy AJ, Shaw MA, Goodman SJ. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proc Biol Sci*, 2007, 274: 3165-3174.
71. Mourya DT, Yadav PD, Mohandas S, Kadiwar RF, Vala MK, Saxena AK, Shete-Aich A, Gupta N, Purushothama P, Sahay RR, Gangakhedkar RR, Mishra SCK, Bhargava B. Canine Distemper Virus in Asiatic Lions of Gujarat State, India. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25: 2128-2130.
72. Mühlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prüfer S, Uhlig KM, Leonard VH, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PB, Jr., Cichutek K, von Messling V, Lopez M, Cattaneo R. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*, 2011, 480: 530-533.

73. Nakatsu Y, Takeda M, Ohno S, Shirogane Y, Iwasaki M, Yanagi Y. Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *J Virol*, 2008, 82: 8296-8306.
74. Nikolin VM, Wibbelt G, Michler FU, Wolf P, East ML. Susceptibility of carnivore hosts to strains of canine distemper virus from distinct genetic lineages. *Vet Microbiol*, 2012, 156: 45-53.
75. Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS, Richardson CD. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog*, 2011, 7: e1002240.
76. Noyce RS, Delpeut S, Richardson CD. Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology*, 2013, 436: 210-220.
77. Ohishi K, Suzuki R, Maeda T, Tsuda M, Abe E, Yoshida T, Endo Y, Okamura M, Nagamine T, Yamamoto H, Ueda M, Maruyama T. Recent host range expansion of canine distemper virus and variation in its receptor, the signaling lymphocyte activation molecule, in carnivores. *J Wildl Dis*, 2014, 50: 596-606.
78. Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, Aoki T, Minagawa H, Yanagi Y. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol*, 2001, 75: 4399-4401.
79. Orvell C, Sheshberadaran H, Norrby E. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against four structural components of canine distemper virus. *J Gen Virol*, 1985, 66 (Pt 3): 443-456.
80. Otsuki N, Sekizuka T, Seki F, Sakai K, Kubota T, Nakatsu Y, Chen S, Fukuhara H, Maenaka K, Yamaguchi R, Kuroda M, Takeda M. Canine distemper virus with the intact C protein has the potential to replicate in

- p>human epithelial cells by using human nectin4 as a receptor.
- Virology*
- , 2013, 435: 485-492.
81. Panzera Y, Sarute N, Iraola G, Hernández M, Pérez R. Molecular phylogeography of canine distemper virus: Geographic origin and global spreading. *Mol Phylogenet Evol*, 2015, 92: 147-154.
82. Plattet P, Alves L, Herren M, Aguilar HC. Measles Virus Fusion Protein: Structure, Function and Inhibition. *Viruses*, 2016, 8: 112.
83. Pratakpiriya W, Seki F, Otsuki N, Sakai K, Fukuhara H, Katamoto H, Hirai T, Maenaka K, Techangamsuwan S, Lan NT, Takeda M, Yamaguchi R. Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in neurovirulence. *J Virol*, 2012, 86: 10207-10210.
84. Qiu W, Zheng Y, Zhang S, Fan Q, Liu H, Zhang F, Wang W, Liao G, Hu R. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17: 1541-1543.
85. Rahman DA, Saepuloh U, Santosa Y, Darusman HS, Romaria Pinondang IM, Kindangen AS, Pertiwi AP, Sari L, Irawan A, Sultan K, Rianti P. Molecular diagnosis with the corresponding clinical symptoms of canine distemper virus infection in javan leopard (*Panthera pardus ssp. melas*). *Heliyon*, 2022, 8: e11341.
86. Rendon-Marin S, da Fontoura Budaszewski R, Canal CW, Ruiz-Saenz J. Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. *Virol J*, 2019, 16: 30.
87. Rentería-Solís Z, Förster C, Aue A, Wittstatt U, Wibbelt G, König M. Canine distemper outbreak in raccoons suggests pathogen interspecies transmission amongst alien and native carnivores in urban areas from Germany. *Vet Microbiol*, 2014, 174: 50-59.
88. Roelke-Parker ME, Munson L, Packer C, Kock R, Cleaveland S, Carpenter M, O'Brien SJ, Pospischil A, Hofmann-Lehmann R, Lutz H, Mwamengele GL,

- Mgasa MN, Machange GA, Summers BA, Appel MJ. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, 1996, 379: 441-445.
89. Saltık HS. Concomitant virus-induced gastrointestinal infection in dogs. *Pol J Vet Sci*, 2023, 26: 203-209.
90. Sarute N, Calderón MG, Pérez R, La Torre J, Hernández M, Francia L, Panzera Y. The fusion protein signal-peptide-coding region of canine distemper virus: a useful tool for phylogenetic reconstruction and lineage identification. *PLoS One*, 2013, 8: e63595.
91. Sato H, Yoneda M, Honda T, Kai C. Morbillivirus receptors and tropism: multiple pathways for infection. *Front Microbiol*, 2012, 3: 75.
92. Sawatsky B, Wong XX, Hinkelmann S, Cattaneo R, von Messling V. Canine distemper virus epithelial cell infection is required for clinical disease but not for immunosuppression. *J Virol*, 2012, 86: 3658-3666.
93. Scagliarini A, Dal Pozzo F, Gallina L, Vaccari F, Morganti L. TaqMan based real time PCR for the quantification of canine distemper virus. *Vet Res Commun*, 2007, 31 Suppl 1: 261-263.
94. Schmitz KS, Rennick LJ, Tilston-Lunel NL, Comvalius AD, Laksono BM, Geers D, van Run P, de Vries RD, de Swart RL, Duprex WP. Rational attenuation of canine distemper virus (CDV) to develop a morbillivirus animal model that mimics measles in humans. *J Virol*, 2024: e0185023.
95. Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J Virol*, 2003, 77: 9943-9950.
96. Siering O, Sawatsky B, Pfaller CK. C Protein is Essential for Canine Distemper Virus Virulence and Pathogenicity in Ferrets. *J Virol*, 2021, 95.
97. Simon-Martínez J, Ulloa-Arvizu R, Soriano VE, Fajardo R. Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. *Vet J*, 2008, 175: 423-426.

98. Smith EC, Popa A, Chang A, Masante C, Dutch RE. Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. *Febs j*, 2009, 276: 7217-7227.
99. Sparrer KM, Pfaller CK, Conzelmann KK. Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus. *J Virol*, 2012, 86: 796-805.
100. Stettler M, Zurbriggen A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus. *Vet Microbiol*, 1995, 44: 211-217.
101. Takai Y, Ikeda W, Ogita H, Rikitake Y. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2008a, 24: 309-342.
102. Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008b, 9: 603-615.
103. Takenaka A, Sato H, Ikeda F, Yoneda M, Kai C. Infectious Progression of Canine Distemper Virus from Circulating Cerebrospinal Fluid into the Central Nervous System. *J Virol*, 2016, 90: 9285-9292.
104. Tan B, Wen YJ, Wang FX, Zhang SQ, Wang XD, Hu JX, Shi XC, Yang BC, Chen LZ, Cheng SP, Wu H. Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain ZJ7 isolate from domestic dogs in China. *Virol J*, 2011, 8: 520.
105. Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*, 2000, 406: 893-897.
106. Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol*, 2001, 75: 5842-5850.
107. Tatsuo H, Yanagi Y. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol Immunol*, 2002, 46: 135-142.

108. Uhl EW, Kelderhouse C, Buikstra J, Blick JP, Bolon B, Hogan RJ. New world origin of canine distemper: Interdisciplinary insights. *Int J Paleopathol*, 2019, 24: 266-278.
109. von Messling V, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol*, 2001, 75: 6418-6427.
110. von Messling V, Milosevic D, Cattaneo R. Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 14216-14221.
111. von Messling V, Svitek N, Cattaneo R. Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J Virol*, 2006, 80: 6084-6092.
112. Wilkes RP. Canine Distemper Virus in Endangered Species: Species Jump, Clinical Variations, and Vaccination. *Pathogens*, 2022, 12.
113. Williams ES, Thorne ET, Appel MJ, Belitsky DW. Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. *J Wildl Dis*, 1988, 24: 385-398.
114. Wünschmann A, Kremmer E, Baumgärtner W. Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. *Vet Immunol Immunopathol*, 2000, 73: 83-98.
115. Yadav AK, Rajak KK, Bhatt M, Kumar A, Chakravarti S, Sankar M, Muthuchelvan D, Kumar R, Khulape S, Singh RP, Singh RK. Comparative sequence analysis of morbillivirus receptors and its implication in host range expansion. *Can J Microbiol*, 2019, 65: 783-794.
116. Yuan C, Liu W, Wang Y, Hou J, Zhang L, Wang G. Homologous recombination is a force in the evolution of canine distemper virus. *PLoS One*, 2017, 12: e0175416.

117. Zhang X, Lu G, Qi J, Li Y, He Y, Xu X, Shi J, Zhang CW, Yan J, Gao GF. Structure of measles virus hemagglutinin bound to its epithelial receptor nectin-4. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 67-72.
118. Zhao J, Zhang H, Bai X, Martella V, Hu B, Sun Y, Zhu C, Zhang L, Liu H, Xu S, Shao X, Wu W, Yan X. Emergence of canine distemper virus strains with two amino acid substitutions in the haemagglutinin protein, detected from vaccinated carnivores in North-Eastern China in 2012-2013. *Vet J*, 2014, 200: 191-194.
119. Zhao J, Ren Y, Chen J, Zheng J, Sun D. Viral Pathogenesis, Recombinant Vaccines, and Oncolytic Virotherapy: Applications of the Canine Distemper Virus Reverse Genetics System. *Viruses*, 2020, 12.
120. Zhao J, Ren Y. Multiple Receptors Involved in Invasion and Neuropathogenicity of Canine Distemper Virus: A Review. *Viruses*, 2022, 14.
121. Zhao JJ, Yan XJ, Chai XL, Martella V, Luo GL, Zhang HL, Gao H, Liu YX, Bai X, Zhang L, Chen T, Xu L, Zhao CF, Wang FX, Shao XQ, Wu W, Cheng SP. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. *Vet Microbiol*, 2010, 140: 34-42.