

2011—2013 年河南省犬细小病毒 分子流行病学调查与分析

丁 轲^{1,2}, 余祖华², 彭春平¹, 赵战勤², 何 雷², 贾艳艳², 张春杰^{1,2}, 程相朝^{1,2*}, 夏咸柱^{2,3}

(1. 河南科技大学宏翔生物饲料实验室, 洛阳 471003; 2. 河南省动物疫病与公共安全院士工作站, 洛阳 471003;
3. 解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130122)

摘 要: 为了解近年来河南省犬细小病毒病的流行情况及毒株的分子变异特征, 于 2011—2013 年从郑州、洛阳、开封、信阳等 10 个不同的地区采集了 573 份疑似犬细小病毒病病例样品, 首先采用国标法检测犬细小病毒(CPV) VP2 基因 462—1 023 bp 片段, 对扩增的序列进行测序和进化树分析。在分类的基础上分别挑选出代表性毒株, 克隆 VP2 全基因, 测序后进行比较分析。结果表明, 国标法检测样品的阳性率为 88.48%, 阳性毒株分为 7 个分支, 通过对 7 个代表毒株 VP2 基因 426AA 的碱基组成分析, 发现 6 株属于 CPV-2a 型, 1 株属于 CPV-2b 型。与国内外的代表毒株的核苷酸相似性为 98.4%~99.9%, 氨基酸相似性为 97.6%~100.0%。遗传进化树分析表明, 7 个 CPV 分离株分属于 2 个分支, 其中 KJ438801 株与其它分离株亲缘关系较远。氨基酸序列比较发现共有 12 个位点发生变异, 其中突变率较高的位点是 267、297、324、440、555 位氨基酸, 每个毒株均有 2~3 个氨基酸发生突变。以上结果表明, 河南省流行的 CPV 以 CPV-2a 型和 CPV-2b 型并存, 但以 CPV-2a 型为主, 且基因呈多变异现象, 从而为河南省犬细小病毒病的疫苗研发和防治提供了科学的参考依据。

关键词: 河南省; 犬细小病毒; 分子流行病学调查; VP2 基因

中图分类号: S852.659.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)10-1671-08

Molecular Epidemiological Investigation of Canine Parvovirus Isolates from Henan Province during 2011-2013

DING Ke^{1,2}, YU Zu-hua², PENG Chun-ping¹, ZHAO Zhan-qin², HE Lei², JIA Yan-yan²,
ZHANG Chun-jie^{1,2}, CHENG Xiang-chao^{1,2*}, XIA Xian-zhu^{2,3}

- (1. *Hongxiang Biological Feed Laboratory, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;*
- (2. *Animal Disease and Public Security Academician Workstation of Henan Province, Luoyang 471003, China;*
- (3. *Military Veterinary Institute, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, China)*

Abstract: In order to investigate the prevalence and the molecular evolutionary characteristics of canine parvovirus (CPV) infection in Henan province during 2011-2013, 573 suspected CPV samples were collected from 10 different areas, such as Zhengzhou, Luoyang, Kaifeng, Xinyang, etc. Partial of the VP2 fragments (462-1 023 bp) of CPV were amplified by national standard method (NSM). Based on the sequenced results and phylogenetic tree analysis, the representative strains were selected and complete VP2 genes were cloned, sequenced and analyzed. The results showed that the positive rate was 88.48% by NSM, and the positive strains were divided into 7 branches. According to the VP2 gene characteristics, 6 branches were CPV-2a type, and 1 branch of CPV

收稿日期: 2014-02-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101744); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(13B230987); 河南科技大学创新培育基金(2013ZCX017)

作者简介: 丁 轲(1977-), 男, 河南永城人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物微生态与动物传染病研究, E-mail: keding19@163.com,

Fax: 0379-64895698

* 通信作者: 程相朝(1966-), E-mail: chengxch@126.com

was CPV-2b type. Sequence analysis for VP2 gene between CPV isolates and 30 CPV representative strains accessed in GenBank showed that the homology of nucleotides and amino acids were 98.4%–99.9% and 97.6%–100.0%, respectively. Phylogenetic analysis indicated that the 7 CPV isolations were divided into two groups, only one strain (No. KJ438801) was far from the other 6 isolates. The comparison of amino acid sequence showed that 12 mutated sites were found, of which, the 267, 297, 324, 440, 555 amino acid sites were easiest to mutate, and there were at least 2–3 sites of amino acid mutated in each strain. These results indicated that the CPV-2a and CPV-2b were coexisted and the CPV-2a was the primary pathogen in Henan province. More importantly, the VP2 gene showed multiple variations in different strains. The results of this study provide a scientific basis for improving the vaccine design and the control of CPV.

Key words: Henan province; canine parvovirus; molecular epidemiological investigations; VP2 gene

犬细小病毒病是一种由犬细小病毒 (canine parvovirus, CPV) 感染引起的犬的急性高度接触性烈性传染病, 临床上主要以呕吐、急性出血性肠炎、非化脓性心肌炎为特征。该病毒对环境的耐受性很强, 传播迅速, 尤其对幼犬的致病性和致死率都很高, 发病率高达 90%, 病死率 10%~50%^[1]。1967 年 L. N. Binn 等从犬分离到第 1 株犬微小病毒 CPV-1, 1977 年美国人 H. P. Eugster 等首次在病犬的粪便中观察到 CPV, 1978 年澳大利亚人 W. R. Kelly 和加拿大人 R. M. Thomson 等首次从病犬中分离到犬细小病毒, 并命名为 CPV-2, 目前世界上所有养犬的国家均有该病发生, 中国于 1982 年首次发现该病, 并于次年报道了该病的流行^[2-3], CPV 已严重危害世界养犬业的健康发展。

CPV 属于细小病毒科细小病毒属, 是一种无囊膜、线状、单股负链 DNA 病毒, 呈圆形或六边形, 二十面体对称。基因组全长 5 323 bp, 有 2 个主要的开放阅读框架 (open reading frames, ORFs), 5' 端编码非结构蛋白 (NS1 和 NS2), 是早期转录调节蛋白^[4]。3' 端编码结构蛋白 (VP1 和 VP2), 是晚期转录调节蛋白, 其中 VP2 蛋白是病毒的主要衣壳蛋白, VP1 包含整个 VP2 序列, 共同终止于同一位点, 仅在 5' 端比 VP2 多 429 bp。另外, 还存在第 3 种结构蛋白 VP3, 是由 VP2 的 5' 端经蛋白酶水解去掉 14~20 aa 形成的, 仅存在于完整病毒粒子中^[5]。犬细小病毒自发现以来, 就在不断发生变异, 从最初的 CPV-2, 到 CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c、CPV-2c(a) 和 CPV-2c(b), 其变异的主要特征是在 VP2 的第 426 位氨基酸由天冬酰胺 (Asn) 转变为天冬氨酸 (Asp), 即变异为 CPV-2b 亚型^[6], 转变为谷氨酸 (Glu), 即

变异为 CPV-2c 亚型^[7]。据报道, 中国流行的 CPV 主要以 CPV-2a 和 CPV-2b 为主, 但 2010 年首次检测到 CPV-2c^[1], 说明犬细小病毒病目前在中国已呈多型感染或混合感染状况。所以临床上免疫时疫苗毒株亚型选择的偏差, 或者不免疫犬细小病毒疫苗, 导致目前犬细小病毒病在中国一年四季均有发生和流行^[8]。近年来, 关于 CPV 流行病学调查的研究并不多, 对河南省的 CPV 的流行情况还没有系统的研究报道。为了弄清河南省 CPV 的流行毒株和变异情况, 近两年来, 本课题组从河南省不同地区门诊采集了大量犬细小病毒病样品, 通过胶体金快速检测纸条检测和 VP2 基因的特异性扩增、测序和同源性比较, 以了解河南省 CPV 的流行情况, 探讨 CPV 基于 VP2 基因的分子流行病学变化和变异规律, 以期为进一步研究 CPV 的有效防控提供理论数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2011 年 3 月—2013 年 12 月采集郑州、洛阳、开封、周口、商丘、信阳、南阳、许昌、新乡、安阳等 10 个地区的不同宠物门诊的患犬粪便、肛门棉拭子或病死犬的肠、心等样品共计 573 份 (样品详情见结果 2.1 部分)。这些病料均来自疑似感染 CPV 患犬, 病死犬均有明显的肠管出血、心肌炎症状, CPV 试纸条检测阳性。

1.2 主要试剂和仪器

Taq 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、dNTPs、DL5000、TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 5.0 购自 TaKaRa 公司。PCR 产物回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。犬细小病毒

胶体金检测卡购自上海丹枫生物科技有限公司。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 收录的 NC_001539、JN033694、

JQ268284 的基因序列,设计合成 2 对引物(表 1),用于 CPV 通用检测和 CPV VP2 基因检测。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primers sequences

扩增片段 Gene	引物名称 Prime	序列(5'-3') Sequence	扩增长度/bp Length
VP ₅₅₉	CPV-LD1	GAATCTGCTACTCAGCCACCAAC	559
	CPV-LD2	GTGCACTATAACCAACCTCAGC	
VP2	CPV-VP2L	AGAGACAATCTTGCACCAAT	1 755
	CPV-VP2R	ATGTTAATATAATTTTCTAGGTGCT	

1.4 病毒 DNA 基因组的提取

首先用犬细小病毒胶体金检测卡检测病料,然后按 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 5.0 说明书从阳性病料、组织或棉拭子中直接提取病毒基因组 DNA,然后于 -20 ℃ 保存备用。

1.5 样品的 PCR 检测

以上述提取的样品总基因组 DNA 为模板,首先用引物 CPV-LD1 和 CPV-LD2 进行 PCR 扩增。反应体系: *Taq* 酶 0.5 μL, 10× *Taq* buffer 5 μL, 10 mmol·L⁻¹ dNTPs 1 μL, 20 pmol·L⁻¹ 上下游引物各 1 μL, 模板 DNA 0.5 μL, 加去离子水至 50 μL。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 50 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。取 6 μL PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳观察。

1.6 序列测定及分析

将 PCR 产物按照 PCR 产物回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司)说明书进行纯化后,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

利用 DNASTar6.0 软件包中的 MegAlign 对所测序列进行同源性和系统进化树分析,根据各毒株所处亚支进行归类。

1.7 各亚类毒株 VP2 全基因的扩增

以 1.4 步骤所提取的样品总基因组 DNA 为模板,用引物 CPV-VP2L 和 CPV-VP2R 进行 PCR 扩增。反应体系同 1.5 步骤。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 48 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 110 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。取 6 μL PCR 产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳观察。并将各序列克隆后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.8 基于 VP2 全基因的同源性比较和变异分析

利用 DNASTar6.0 软件包中的 MegAlign 将所测定的 CPV VP2 基因及其推导的氨基酸序列与国内、外已发表的相应片段进行同源性和变异分析,用 MEGA4.0 软件包中的 Kimura2-parameter 法计算遗传距离,用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,同时利用 DNAMAN7.0 软件对其突变位点进行统计和亚型分型。

2 结果

2.1 VP2 部分片段的 PCR 扩增

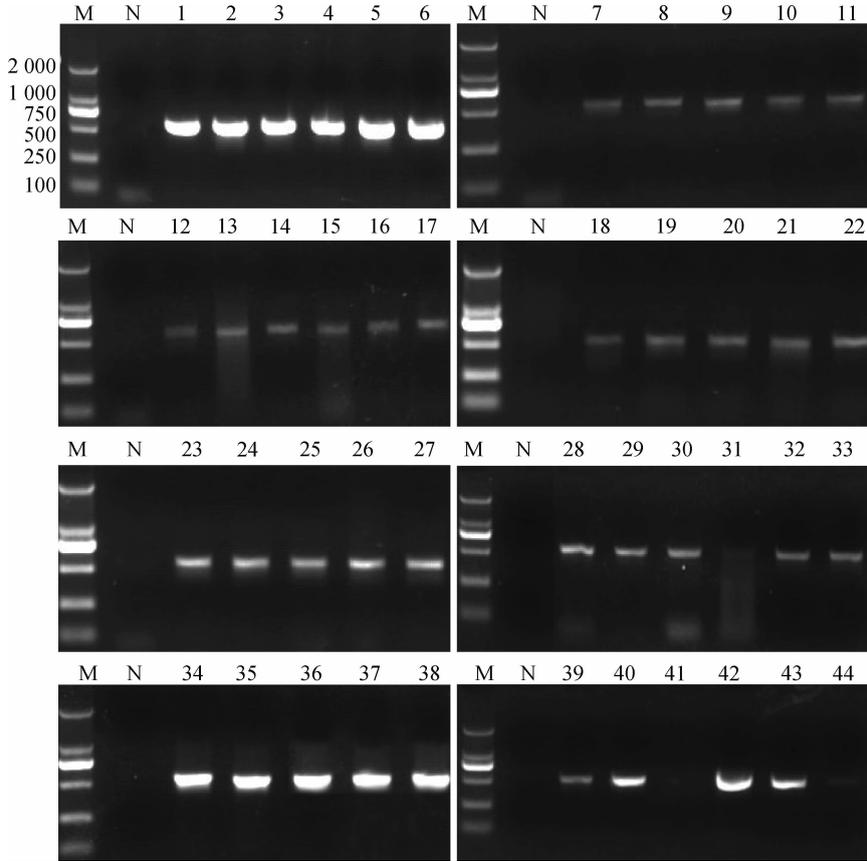
采用引物 CPV-LD1 和 CPV-LD2 对从河南省不同地市采集的患犬样品提取基因组 DNA 后进行 PCR 扩增,反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,均得到大小约 560 bp 的特异性条带,与预期相符(部分 PCR 结果见图 1)。573 份样品中有 507 个样品能够扩增出特异性条带,检出率为 88.48%(表 2)。

2.2 基于 VP₅₅₉ 的进化树分析

将序列进行同源性和系统进化树分析,构建基于 VP₅₆₂ 的遗传进化树(图略),根据进化树的分支将各序列进行归类,共分为 7 支,将部分测序结果提交到 GenBank(序列号: KF772192~KF772224)。

2.3 CPV VP2 全基因的 PCR 扩增及测序

将上述每支中的序列再进行支内同源性和碱基比较,从同源性最近且聚类最多的序列中挑取 1 个毒株,分别是 Henan11、Henan12、Henan13、Henan22、Henan23、Henan36 和 Henan38。采用引物 CPV-VP2L 和 CPV-VP2R 进行 PCR 扩增,反应产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,由图 2 可以看出均能得到大小约为 1 750 bp 的特异性条带,与预期大



M, DL2000 DNA 相对分子质量标准; N, 阴性对照; 1~44. 样品
 M, DL2000 NDA marker; N, Negative control; 1-44. Samples

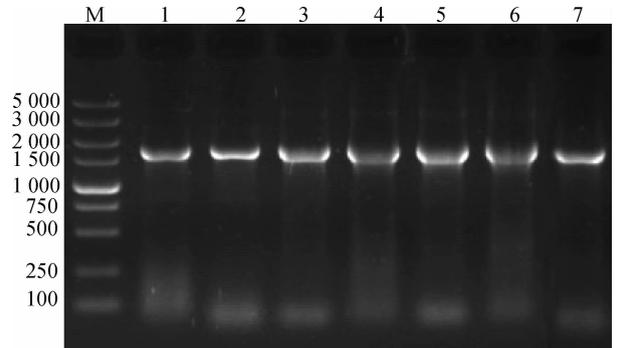
图 1 部分病料中 CPV 的 PCR 检测

Fig. 1 Specific fragment of CPV amplified from partial collected samples

表 2 样品的来源背景及 PCR 检测结果

Table 2 Background of clinic samples and the CPV detection by PCR

样品来源 Origin of samples	样品数量 Number of samples	检测样品阳性数量 Number of positive samples
郑州 Zhengzhou	86	81
洛阳 Luoyang	125	109
开封 Kaifeng	31	25
周口 Zhoukou	29	21
商丘 Shangqiu	44	42
信阳 Xinyang	26	26
南阳 Nanyang	47	38
许昌 Xuchang	92	80
新乡 Xinxiang	55	50
安阳 Anyang	38	35
总计 Total	573	507
阳性率/% Positive rate	—	88.48



M, DL5000 DNA 相对分子质量标准; 1~7. 代表毒株样品
 M, DL5000 DNA marker; 1-7. Samples of representative strains

图 2 CPV 分离株中代表毒株 VP2 全基因的 PCR 扩增

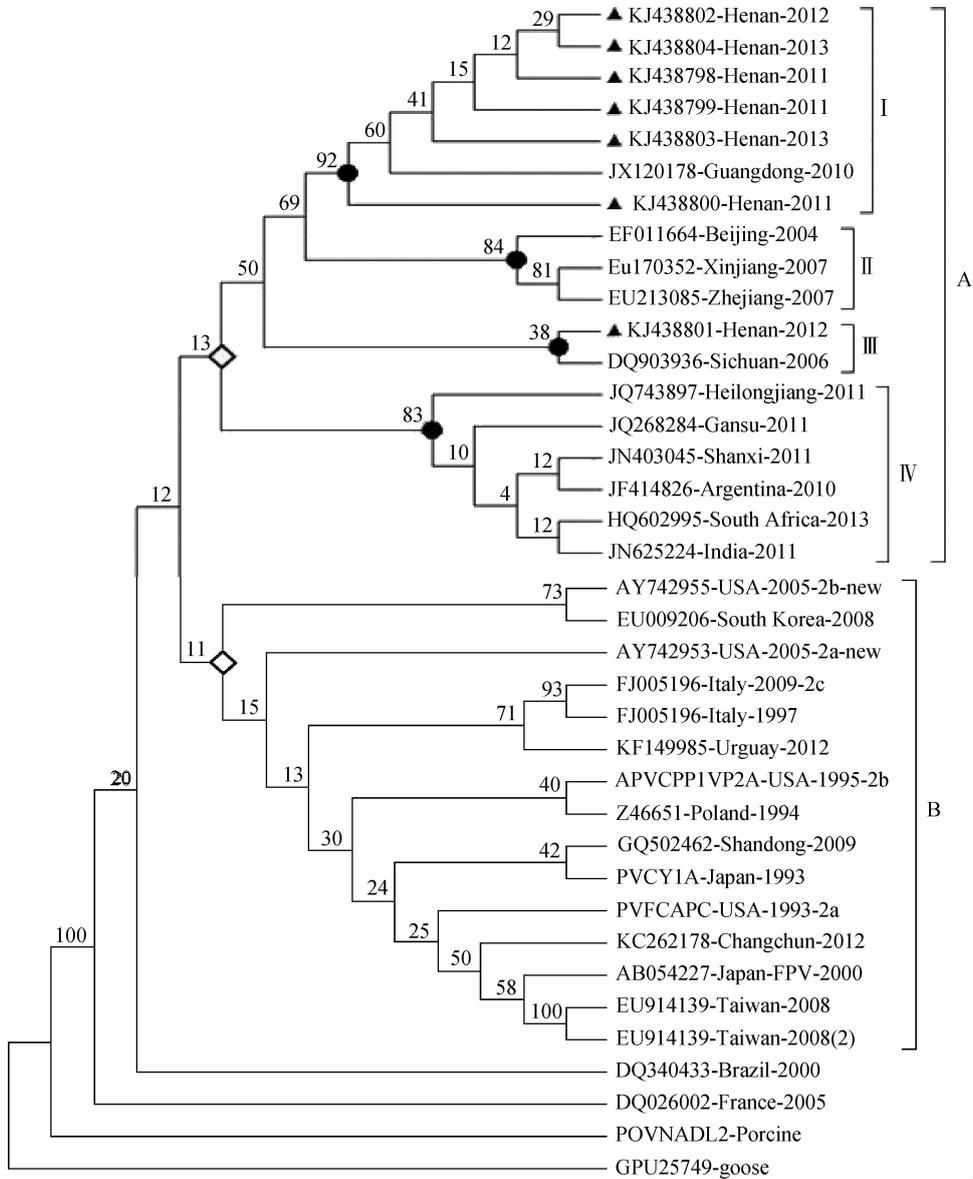
Fig. 2 PCR amplification of VP2 of CPV representative strains from the isolates

小相符。测序结果也表明所选择的 7 个毒株的 VP2 基因大小均为 1 755 bp, 并将其注册到 GenBank, 登陆号为 KJ438798~KJ438804。

2.4 基于 CPV VP2 基因推导氨基酸序列的相似性及遗传进化树分析

采用 DNASTar6.0 软件中的 Megalign 将所测定的 7 株 CPV 的 VP2 基因及其推导的氨基酸序列与 GenBank 中国内外已登陆的 CPV 及其他种属的细小病毒的 VP2 基因及其氨基酸序列进行同源性比较,结果表明这 7 株 CPV 之间的核苷酸相似性为 99.4%~99.9%,氨基酸相似性为 99.1%~99.8%。与国内其他省份分离的 CPV 的核苷酸相似性为 98.4%~99.9%,氨基酸相似性为 97.6%~

100.0%。与国外分离的 CPV 的核苷酸相似性为 98.8%~99.8%,氨基酸相似性为 98.1%~100.0%。与猫泛白细胞减少症病毒(FPV)的核苷酸和氨基酸的相似性分别为 98.0%~98.3%和 96.8%~98.0%,而与猪细小病毒的核苷酸和氨基酸的相似性均低于 60%,与鹅细小病毒的核苷酸和氨基酸的相似性均低于 25%。采用 MEGA4.0 构建基于 VP2 基因的遗传进化树,由图 3 可见,7 个毒株分属于 2 个分支,其中 KJ438798-Henan-2011、KJ438799-Henan-2011、KJ438800-Henan-2011、KJ438802-Henan-



▲. CPV 分离株;◇. 一级分支;●. 二级分支
 ▲. The seven CPV isolates from Henan province;◇. The primary branch;●. The secondary branch

图 3 基于 Neighbor-Joining 法构建 CPV VP2 基因核苷酸序列遗传进化树
 Fig. 3 Phylogenetic tree analysis based on VP2 gene sequence from CPV isolates (▲) and other 30 reference CPV strains by Neighbor-Joining method

2012、KJ438803-Henan-2013 和 KJ438804-Henan-2013 株属于 I 亚分支,且与广东分离株(JX120178)的亲缘关系最近;KJ438801-Henan-2012 株毒株属于 III 亚分支,与四川分离株(DQ903936)的亲缘关系最近。

2.5 CPV 分离株 VP2 氨基酸序列分析

将这 7 个毒株的 VP2 基因推导氨基酸序列与 GenBank 中典型的亚型 CPV 的氨基酸序列进行比

较,发现有 12 个位点发生变异(表 3),其中,从代表 CPV 基因亚型的 426 氨基酸来看,仅 KJ438800-Henan-2011 毒株是 426D,与 CPV-2b 型标准毒株 PVCVP1VP2A 相同,其他 6 个毒株均与 CPV-2a 型标准毒株一致,均为 426N。与 CPV-2a 型相比较,突变率较高的位点是 267、297、324、440、555 位氨基酸,其余毒株均有 2~3 个氨基酸发生突变。

表 3 7 株 CPV 河南分离株 VP2 氨基酸突变位点

Table 3 Amino acid mutations sites of VP2 of seven CPV isolates from Henan province

CPV	氨基酸位点 Amino acid sites												
	164	267	297	300	322	324	333	334	341	348	426	440	555
PVCVPC-2	V	F	S	A	T	Y	P	A	P	S	N	T	V
PVFCAPC-2a	V	F	S	G	T	Y	P	A	P	S	N	T	I
PVCVP1VP2A-2b	V	F	S	G	T	Y	P	A	P	S	D	T	V
FJ005196-2c	V	F	A	G	T	Y	P	A	P	S	E	T	V
AY742953-2a-new *	V	F	A	G	T	Y	P	A	P	S	N	T	V
AY742955-2b-new *	V	F	A	G	T	Y	P	A	P	S	D	T	V
KJ438798	V	Y	A	G	T	I	P	G	S	S	N	A	V
KJ438799	V	Y	A	G	S	I	P	A	S	S	N	A	V
KJ438800	L	Y	A	G	T	I	P	A	P	S	D	A	V
KJ438801	V	F	A	G	S	I	A	G	P	C	N	T	V
KJ438802	V	Y	A	G	T	I	P	A	S	S	N	A	V
KJ438803	V	Y	A	G	T	I	P	A	S	S	N	A	V
KJ438804	L	Y	A	G	T	I	P	A	P	S	N	A	V

* 表示新分离的毒株;KJ438798~KJ438804 表示 7 株 CPV 河南分离株

“*” means new isolated virus;KJ438798-KJ438804 mean nucleotide sequence accession numbers of the seven CPV isolates from Henan province

3 讨论

CPV 自 20 世纪 60 年代发现以来,已在世界范围内发生和流行,给世界养犬业带来了极大的危害。该病毒在近 50 年的时间已经发生了多次变异,由最初的 CPV-2 型变异成 CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c、CPV-2c(a)和 CPV-2c(b)亚型。目前在犬科动物群中主要流行的是 CPV-2a、CPV-2b 和 CPV-2c 亚型,且呈多种亚型同时并存的现象^[9-10]。但在不同的国家和地区呈现有毒株流行差异,在意大利、澳大利亚和英国主要是 CPV-2a 和 CPV-2b 并存,但 CPV-2a 株的流行占主导趋势^[11],与中国的流行情况极为相似^[12]。这也与本研究流行病学调查的结果较为一

致,所检测的 7 株 CPV 中有 6 株是 CPV-2a 型,1 株是 CPV-2b 型。而在巴西和乌拉圭等 CPV-2c 型已占优势地位^[7,13]。CPV-2c 毒株是 21 世纪初新发现的变异型毒株,先后在越南^[14]、意大利^[15]、美国^[16]、英国^[17]等国家分离获得,中国于 2010 年检测到 CPV-2c 毒株^[18]。但是本研究在近两年的样品中没有分离到 CPV-2c 型毒株,说明该型毒株在河南省没有发生或没有形成流行。而 CPV-2c(a)和 CPV-2c(b)是从豹猫体内分离,还没发现能够感染犬。由此可见,CPV 是一种极易发生变异的毒株,这可能也是造成 CPV 广泛发生和流行的原因之一,所以加强 CPV 不同基因型疫苗的研发是防治犬细小病毒病的最有效的途径。

作者采用国标法中的引物对样品基因组进行扩增,扩增的片段位于 VP2 基因的 462—1 023 bp,从检测结果发现阳性检出率比较高,且这一段序列的变异度较高,能够从大量的样品中筛选出同源性差别较大的毒株。但是这段序列仅能够将样品进行分类,不能区分亚型,因为确定亚型的关键位点是 426AA。所以在此基础上,本研究根据同源性和进化树进行分类,从中挑出 7 个毒株,通过克隆 VP2 全基因,从而确定其亚型,并通过同源性比较和进化树分析,可以看出 CPV 分为 A、B 两大分支,本试验分离的 7 个毒株均在 A 分支上,而 A 分支又可分为 4 个亚支,其中 KJ438801 与四川分离株(DQ903936)共同位于第Ⅲ亚支,其余 6 株均与广东株(JX120178)较近,位于第Ⅰ亚支。总体上看,国内分离株亲缘关系相对较近,与国外毒株相比较,不能发现明显的地缘关系,说明在 CPV 几十年的发展过程中世界各地存在相互传播的可能性。

毫无疑问,CPV 的几个亚型之间存在一定的进化关系,从目前的报道来看,主要是根据 CPV VP2 基因中某些特异性位点的变化来进行分型。因为 VP2 蛋白是 CPV 的最主要的结构蛋白,约占衣壳蛋白的 95%,所以 VP2 蛋白关键位点的变异是直接导致产生 CPV 亚型的原因^[5,19]。最典型的 2 个 CPV-2a 毒株是 CPV-IM 和 CPV-15,其中 CPV-IM 与 CPV-2b 只在 426 位氨基酸不同,CPV-15 与 CPV-2b 则在 426 和 555 两个位点不同,而 CPV-2b 与 CPV-2 在 555 位点是相同的,这说明 555 位点在 CPV-2a 中先是突变,而后又发生了回复突变^[20]。除此之外,第 300 位氨基酸也是对 CPV 定型的关键位点,CPV-2c(a)与 CPV-2a 之间和 CPV-2c(b)与 CPV-2b 之间的不同都是仅在该位点由 Asp(D)变异为 Gly(G),但这种突变的毒株目前仅在豹猫体内发现,说明 300 位点的突变会影响毒株的宿主范围^[14]。因此,综合 GenBank 中 CPV VP2 氨基酸序列发现,根据各型毒株出现的时间,作者推导出这几个亚型之间可能存在如图 4 所示的进化关系。本研究分离的 7 个毒株在 300 位均为 Gly(G),426 位点中除 KJ438801 株是 Asp(D),其余毒株均为 Asn(N),555 位点均为 Val(V),其变异趋势与 AY742953 和 AY742955 等近年来报道的毒株很类似。但是除 KJ438801 毒株外,其余 6 个毒株在 267、324、440 三个位点与以往的毒株不同,由表 3 可以看出 267(F)→267(Y)、324(Y)→324(I)、440

(T)→440(A)。其中 267 位氨基酸位于 VP2 蛋白的 loop1 区或 loop2 区,而这两个区域是 CPV 的抗原决定簇 A 的主要组成成分,所以它的变异可能会影响 CPV 的抗原性。323 位氨基酸是影响 CPV 感染宿主范围最关键位点之一^[5,21],而本研究分离的 7 个毒株却是在 324 位均发生了变异 Tyr(Y)→Ile(I),很可能也会影响 323 位点氨基酸的空间构象^[22]。440 位氨基酸变异还未见报道,是否有新的变异动向还有待进一步试验验证。而 297 位点由 Ser(S)变异成 Asn(A)则是 CPV 共同的变异趋势,与近年来 GenBank 中登陆的 CPV 信息一致,该位点是 B 细胞抗原表位附近的抗原位点,因此它的改变会促使 CPV 抗原性的改变^[23-24]。另外,毒株 KJ438801 与其余 5 株不同的是,在 267、440 位点与传统的 CPV-2a 型相同,但在 322、324、333、334、348 位点却发生了变异,这在以往的研究中也未见报道,因此,有必要对这一株毒株做进一步研究。本研究为河南省犬细小病毒病疫苗的研发和防治提供了科学的参考依据。

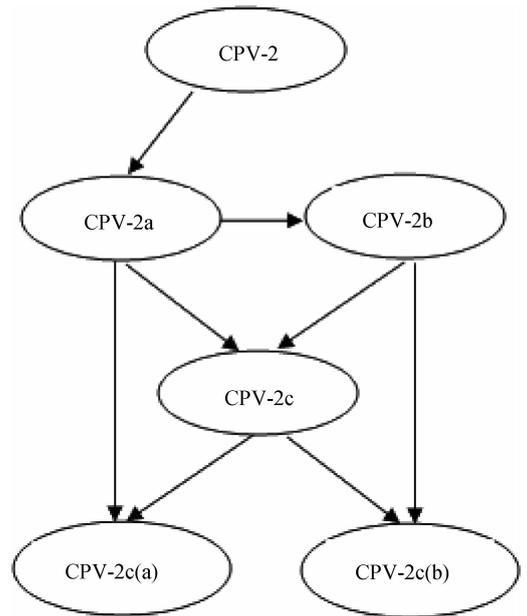


图 4 CPV 不同亚型之间的进化关系

Fig. 4 The relationship of different subtypes CPV

4 结 论

通过国标法对 2011—2013 年间河南省 10 地区的 CPV 疑似病例进行调查,在此基础上挑选 7 个代表株,克隆 VP2 全基因,序列分析表明 6 株属于 CPV-2a 型,1 株属于 CPV-2b 型。提示河南省 CPV

的流行呈现 CPV-2a 型和 CPV-2b 型并存,但以 CPV-2a 型为主。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2006: 368.
- [2] 徐汉坤, 金 淮, 郭宝发, 等. 某犬群暴发犬病毒性肠炎的流行病学和临床病理学观察[J]. 畜牧与兽医, 1983(5): 5-7.
- [3] ZHANG R, YANG S, ZHANG W, et al. Phylogenetic analysis of the vp2 gene of canine parvovirus circulating in China[J]. *Virus Genes*, 2010, 40(3): 397-402.
- [4] WANG D, YUAN W, DAVIS I, et al. Nonstructural protein-2 and replication of canine parvovirus[J]. *Virology*, 1998, 240(2): 273-281.
- [5] REED A P, JONES E V, MILLER T J. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus [J]. *J Virol*, 1988, 62(1): 266-276.
- [6] PARRISH C R, AQUADRO C F, STRASSHEIM M L, et al. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus [J]. *J Virol*, 1991, 65(12): 6544-6552.
- [7] PÉREZ R, BIANCHI P, CALLEROS L, et al. Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 155(2-4): 214-219.
- [8] 王 净, 李英俊, 李 刚, 等. 犬小病毒北京分离株 VP2 基因克隆及变异分析[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(5): 649-653.
- [9] ALDAZ J, GARCIA-DÍAZ J, CALLEROS L, et al. High local genetic diversity of canine parvovirus from Ecuador [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 166(1-2): 214-219.
- [10] MOHAN R J, MUKHOPADHYAY H K, THANISLASS J, et al. Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus [J]. *Infect Genet Evol*, 2010, 10(8): 1237-1241.
- [11] DECARO N, BUONAVOGLIA C. Canine parvovirus: A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 155(1): 1-12.
- [12] 周云朵, 康真玉, 陈月平, 等. 犬细小病毒的分离鉴定与生物学特性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(10): 1402-1408.
- [13] LUCIANE D P, ANDRÉ, F S, KARLA R G, et al. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010 [J]. *Virus Res*, 2012, 165(1): 29-33.
- [14] IKEDA Y, MOCHIZUKI M, NAITO R, et al. Prevalence of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats [J]. *Virology*, 2000, 278(1): 13-19.
- [15] DECARO N, ELIA G, CAMPOLO M, et al. New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains [J]. *J Vet Med*, 2005, 52(7-8): 316-319.
- [16] HONG C, DECARO N, DESARIO C, et al. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2007, 19(5): 535-539.
- [17] DECARO N, DESARIO C, ELIA G, et al. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma [J]. *Vaccine*, 2007, 25(7): 1161-1166.
- [18] 张仁舟, 杨松涛, 冯 昊, 等. 中国国内首次检测到犬细小病毒 CPV-2c [J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(4): 246-249, 275.
- [19] BATTILANI M, BALBONI A, PROSPERI S. Sequence analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolated from domestic dogs in Italy in 1994-2010 [J]. *J Biotech*, 2010, 150(2): 131-132.
- [20] HORIUCHI M, YAMAGUCHI Y, GOJOBORI T, et al. Differences in the evolutionary pattern of feline panleukopenia virus and canine parvovirus [J]. *Virology*, 1998, 249(2): 440-452.
- [21] HORIUCHI M, GOTO H, ISHIGURO N, et al. Mapping of determinants of the host range for canine cells in the genome of canine parvovirus using canine parvovirus/mink enteritis virus chimeric viruses [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75(6): 1319-1328.
- [22] HOELZER K, SHACKELTON L A, PARRISH C R, et al. Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(9): 2280-2289.
- [23] CHINCHKAR S R, MOHANA S B, HANUMANTHA R N, et al. Analysis of VP2 gene sequences of canine parvovirus isolates in India [J]. *Arch Virol*, 2006, 151(9): 1887-1887.
- [24] SCHULTZ R D. Duration of immunity for canine and feline caccines: A review [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 117(1): 75-79.