

犬细小病毒 CPV-YH 毒株的分离鉴定 及其基因组变异分析

孙明¹, 邓小雨¹, 刘巧荣¹, 马永缨¹, 张丽¹, 卢会英¹, 刘伯华¹, 杨欣艳¹, 陈西钊^{1,2*}

(1. 北京世纪元亨动物防疫技术有限公司, 北京 100085; 2. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 100125)

摘要: 为分析当前犬细小病毒(canine parvovirus, CPV)基因组遗传变异情况, 本研究从细小病毒阳性患犬粪便中分离到一株病毒, 经过病毒的形态学观察、血凝试验、动物回归试验以及分子生物学鉴定, 分离的病毒确实为犬细小病毒, 并命名为 CPV-YH。病毒分离结果显示, 病料接种 A-72 细胞能产生典型的细胞病变, 病毒能凝集猪红细胞, 在电子显微镜下呈圆形或六边形, 无囊膜, 直径约为 20 nm。动物回归试验复制出了犬细小病毒病典型症状: 出血性肠炎、肝水肿、肺淤血。全基因组序列测定与分析显示, 其基因组全长为 4 921 nt, 与 2011 年兰州分离的 CPV-LZ2 分离株基因组相似性最高, 为 99%; VP2 氨基酸进化树显示, CPV-YH 分离株与 2013-BJ-P27(中国)分离株和 UY306(乌拉圭)分离株在同一个小的分支上。与 GenBank 上收录的 CPV 代表株的 VP2 基因比对, 核苷酸和氨基酸相似性分别是 98%~99.4% 和 97.1%~99.5%。以上试验结果表明, 成功分离一株 CPV 变异株, 这些数据将为 CPV 的流行情况和防控提供基础。

关键词: 犬细小病毒; 分离鉴定; 序列分析

中图分类号: S852.659.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)09-1724-06

Isolation, Identification and Genomic Variation Analysis of Canine Parvovirus CPV-YH Strain

SUN Ming¹, DENG Xiao-yu¹, LIU Qiao-rong¹, MA Yong-ying¹, ZHANG Li¹,

LU Hui-ying¹, LIU Bo-hua¹, YANG Xin-yan¹, CHEN Xi-zhao^{1,2*}

(1. Beijing Anheal Laboratories Co., Ltd, Beijing 100085, China;

2. China Animal Disease Control Center, Beijing 100125, China)

Abstract: To analyze genetic variation of canine parvovirus (CPV), a new virus strain was isolated from the feces of a dog infected by CPV. The virus strain, named as CPV-YH, was identified by red cell agglutination assay, morphology, artificial infection of Beagle dogs and molecular biology. The results showed that the isolate induced specific CPE in A-72 cells, and it could agglutinate porcine red blood cells. The virus were round or hexagonal by the electron microscope, and there was no capsule, with a diameter of about 20 nm. Animal regression test showed that the infected dogs had typical symptoms of CPV disease such as hemorrhagic enteritis, liver edema, pulmonary hyperaemia. The complete genome of CPV-YH was 4 921 nt and it shared the highest nucleotide identity (99%) with CPV-LZ2 isolates isolated from Lanzhou in 2011. The amino acid phylogenetic tree of VP2 showed that CPV-YH isolate, 2013-BJ-P27 (China) and UY306 (Uruguay) isolates were on the same small branch. Compared with the CPV strains on GenBank, the homology of VP2 gene nucleotide and amino acid showed 98%-99.4% and 97.1%-99.5% identities, respec-

收稿日期: 2017-03-23

基金项目: “十三五”国家重点研究计划(2016YFD0501006)

作者简介: 孙明(1963-), 男, 河北秦皇岛人, 博士, 主要从事病毒诊断技术研究, E-mail: sunming@anheal.com

* 通信作者: 陈西钊, 博士, 研究员, 主要从事动物传染病与预防兽医学研究, E-mail: chenxizhao@anheal.com

tively. In conclusion, one CPV mutant strain was successfully isolated, and these data would provide valuable theoretical basis for the epidemic situation and prevention and control of CPV.

Key words: canine parvovirus; isolation and identification; sequence analysis

犬细小病毒病 (canine parvovirus disease, CPD) 又称犬传染性肠炎或犬病毒性肠炎, 是由犬细小病毒 (canine parvovirus, CPV) 引起的犬的一种急性、接触性、致死性传染病^[1]。临床表现以急性出血性肠炎和非化脓性心肌炎为特征, 该病一年四季均可发生, 不同年龄、性别及品种的犬均易感, 但多发于幼犬, 以发病急、病程短、传染性强、死亡率高为主要特点^[2-4]。CPD 是危害养犬业最为严重的传染病之一。

1977 年美国学者 A. K. Eugster 等从患有出血性肠炎的病犬粪便中首次观察到类似猫细小病毒样颗粒^[5]。次年, 几乎同时在美国、欧洲和澳大利亚分离获得 CPV。为了区别于 1967 年由 L. N. Binn 等从健康犬粪便中分离到的犬极细小病毒 (minute virus of canine, MVC, 习惯上也叫 CPV-1)^[6], 而将后来分离的病毒命名为犬细小病毒 2 型 (CPV-2)。CPV 呈世界性分布, 血清学调查显示, CPV 阳性血清在欧洲最早可以追溯到 1974—1976 年; 在美国、加拿大、日本和澳大利亚可以追溯到 1978 年。在我国, 梁士哲等于 1982 年首次报道了类似犬细小病毒感染性肠炎, 次年, 徐汉坤等正式报道了该病的流行^[2,7]。

CPV 在分类上属细小病毒科 (Parvoviridae), 细小病毒亚科 (Parvovirinae), 细小病毒属 (Parvovirus)^[8]。CPV 只有一个血清型, 但不同毒株间抗原性有所差异, 自发现 CPV 至今, 共出现了 CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c 三个抗原亚型。CPV 的基因组是单股、负链、线性 DNA, 全长 5 300 个核苷酸左右。有 2 个开放阅读框, 5' 端 ORF 编码非结构蛋白 (668 个氨基酸), 即早期转录的调节蛋白 (NS1 和 NS2 蛋白); 3' 端 ORF 编码结构蛋白 (722 个氨基酸), 即晚期转录的病毒衣壳蛋白 (VP1 和 VP2)。整个编码区基因是互相重叠的, 结构基因和非结构基因各有一套早期启动子和晚期启动子。通过选择性剪切 mRNA 前体形成不同的翻译模板, 终止于共同的 Poly(A) 末端。

由于犬细小病毒新变异株的不断出现, 临床上使用的灭活疫苗与弱毒疫苗的免疫效果均有不同程度的下降, 导致免疫失败时有发生。故分离新的毒株, 对其基因组进行分析研究, 了解和掌握目前流行毒株的变异情况, 为更有效地预防、控制犬细小病毒

病的发生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样品 来自北京某比格犬养殖场 1 只雌性经产犬, 年龄约 2 岁, 临床表现为发烧、呕吐、腹泻等症状, 经 PCR 检测为 CPV 阳性, 采集肠组织备用。

1.1.2 培养细胞、载体和菌株 A-72 细胞为本实验室保存, pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司, DH5 α 大肠杆菌购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂 EX-Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA 提取试剂盒均为 Promega 公司产品, 胶回收试剂盒购自 Omega 公司, DMEM 为 Gibco 公司产品。注射用青霉素钠和注射用硫酸链霉素为华北制药股份有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 病毒分离 刮取肠内膜及肠内容物, 用 DMEM (含青、链霉素 2 000 IU \cdot mL⁻¹) 冲洗并稀释, 4 000 r \cdot min⁻¹ 离心 20 min, 取上清, 经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌后, 接入 A-72 细胞, 37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h 后, 加入含 2% 犊牛血清的 DMEM 维持液培养, 逐日观察有无细胞病变 (CPE)。5 d 后收获病毒, 反复冻融 3 次, 连续盲传 5 代仍无病变视为阴性。出现细胞病变达 80% 时收获病毒液, 经 -20 $^{\circ}$ C 冻融 2 次后置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 病毒鉴定

1.2.2.1 血凝试验: 取第 4~7 代细胞培养毒株, 采用微量血凝及血凝抑制试验鉴定分离病毒株的血凝特性。

1.2.2.2 形态学鉴定: 参考文献方法^[9]对细胞培养液进行负染, 电镜观察。

1.2.2.3 病毒滴度测定: 取该分离株反复冻融 3 次的 F4 代细胞培养物, 用维持液将病毒进行 10⁻¹~10⁻⁹ 系列稀释, 分别接种在已长满 A-72 单层细胞的 96 孔细胞培养板中, 每个稀释度接种 6 孔, 每孔 0.1 mL, 37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h 加入维持液, 置 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱培养, 同时设只加维持液的细胞作为对照, 连续 7 d 观察细胞病变并记录结果, 按 Reed-Muench 法计算分离毒株的 TCID₅₀。

1.2.3 动物回归试验 选择 HI 抗体 $<1:20$ 的 60 日龄健康比格犬 10 只, 随机编号, 人工感染组 7 只(1#~7#), 经口灌服 2 mL 病毒液(TCID₅₀ 为 $10^{-8.4} \cdot \text{mL}^{-1}$), 对照组 3 只(8#~10#), 经相同途径灌服 2 mL 细胞培养物, 分别隔离观察饲养, 每天观察临床症状, 并于第 3 天开始收集攻毒犬粪便, 检测病毒排放情况。

表 1 CPV 全基因扩增引物

Table 1 Primers for amplification of CPV genome

引物名称 Primer name	上游引物(5'→3') Sense primer	下游引物(5'→3') Antisense primer
PNS1	ATTCTTTAGAACCAACTGACCA	GCAATTTCTCTGAGCTTAATC
PNS2	CGGTAAACTTAACACCAACTG	AGCTTGTGCTATGGCTTGAG
PNS3	CATGGACCAGCAAGTACAGGA	TATAACCTGGAGGCACAAGTCC
PVP1	ATGGCACCTCCGGCAA	CACTCATTGGTGCAAGATTGTC
PVP2	GCCGGTGCAGGACAAGTA	TAACATATTCTAAGGGCAAACC

1.2.4.3 CPV 全基因组的扩增: 以提取的 DNA 为模板, 用设计的 5 对引物进行扩增。程序: 95 °C 4 min; 95 °C 30 s, 50~58 °C 45 s; 72 °C 2 min, 35 个循环, 72 °C 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收。回收产物与 pMD19-T 载体连接, 转化感受态细胞 DH5 α , PCR 方法鉴定重组质粒。将鉴定正确的阳性菌株送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.4.4 序列分析: 将测序正确的各序列用 DNAMAN 进行拼接, 与 GenBank 上国内外发表的代表性 CPV 基因组序列进行同源性分析比较, 构建系统发育树。

2 结果

2.1 病毒分离和形态学观察

病料接种 A-72 细胞后出现明显细胞病变 (CPE), 感染病毒的细胞表现为细胞膨大, 变圆, 并有“拉网”现象, 继而开始脱落(图略), 将出现 80% 以上病变的培养物收集, -20 °C 反复冻融 3 次, 备用。并将分离的病毒命名为 CPV-YH。电子显微镜观察结果显示, 病毒粒子呈圆形或六边形, 无囊膜, 直径 20~22 nm, 见图 1。

2.2 血凝特性

用新鲜 1% 猪红细胞悬液进行检测, 以每孔中 50% 以上的红细胞出现凝集时判为阳性。结果显示该分离株 4~7 代均能凝集猪红细胞, 其凝集价可达

1.2.4 基因组扩增及分析

1.2.4.1 病毒 DNA 的提取: 按试剂盒操作说明书进行。

1.2.4.2 引物设计: 应用 DNAMAN 软件针对 GenBank 上收录的 CPV 全基因序列设计 5 对引物, 由上海英骏生物技术有限公司合成。

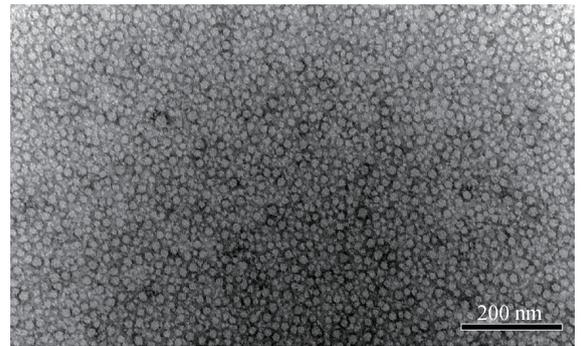


图 1 电子显微镜下的负染病毒粒子

Fig. 1 Negative staining virus particles under electron microscope

2⁸~2⁹。在血凝抑制试验中, 该病毒可被 CPV 阳性血清所抑制。

2.3 病毒滴度测定

按 Reed-Muench 法计算分离毒株 4 代毒的 TCID₅₀ 为 $10^{-8.4} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

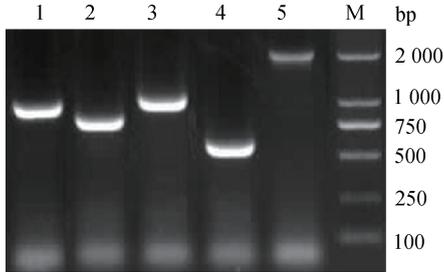
2.4 动物回归试验

攻毒组各犬在感染后第 4 天出现不同程度的精神沉郁、排便异常, 出现软便、黏液便, 并伴有呕吐症状, 随之停止进食; 体温升高, 最高达 40 °C。7 只攻毒犬在接种后 10 d 内死亡, 致死率 100%, 剖检发现攻毒犬呈脱水症状, 小肠充血、淤血、甚至大面积坏死, 肠系膜充血、淤血, 胃内有大量白色或黄色黏液、黏膜有出血点, 肝水肿、出血、坏死, 脾肿大、淤血, 肾盂融合或皮质、髓质区界限不清, 肺淤血、坏死, 心包膜增厚, 胰腺肿大、有出血点等病理变化。感染组犬粪便

CPV 检测结果均为阳性。而对照组健康情况均正常。

2.5 全基因组的扩增、克隆与鉴定

以细胞培养 4 代病毒提取的 DNA 为模板,用 5 对引物进行 PCR 扩增后,得到了与目的基因大小一致的目的片段(图 2),其片段长度分别为 810、762、926、505 和 2 039 nt。与 pMD19-T 克隆载体连接后,取鉴定为阳性的样品测序。



1~5. 扩增的目的片段;M. DL2000 DNA 相对分子质量标准
1-5. PCR product of fragments of CPV genome; M. DNA marker (DL2000)

图 2 CPV 全基因组的克隆
Fig. 2 Clones of CPV genome

表 2 CPV-YH 毒株和 CPV-LZ2 毒株 NS1、VP1 和 VP2 氨基酸序列突变位点

Table 2 The amino acid mutation sites between CPV-YH and CPV-LZ2 strains

毒株名称 Virus strain	氨基酸位点 Amino acid sites							
	NS1			VP1			VP2	
	19 位	544 位	583 位	25 位	549 位	569 位	406 位	426 位
CPV-YH	K	F	K	M	S	N	S	N
CPV-LZ2	R	Y	E	I	T	D	T	D

2.7 VP2 核苷酸和氨基酸序列分析

分离株 CPV-YH 的 VP2 基因包括 1 755 个核苷酸,编码 584 个氨基酸。氨基酸序列进化树显示,CPV-YH 分离株与 2013-BJ-P27(中国)分离株和 UY306(乌拉圭)分离株在同一个小的分支上,见图 3。与 GenBank 上收录的 CPV 代表株的 VP2 基因比对,核苷酸和氨基酸相似性分别是 98%~99.4% 和 97.1%~99.5%。根据第 426 位氨基酸残基的变异情况,该分离株为 CPV-2a 型。

3 讨论

CPV 在我国的流行,以 CPV-2a 亚型为主,CPV-2b 伴随存在,CPV-2c 偶尔存在^[1,10]。目前,我国主要使用 CPV-2 型疫苗,鉴于这种情况以及常出现的免疫失败现象,对国内犬细小病毒抗原变异

2.6 基因组特征

将 5 个片段进行拼接,PCV-YH 基因组全长 4 921 nt(GenBank 登录号为 KY403998)。CPV 基因组有 2 个开放阅读框,分别编码早期转录的调节蛋白(NS1 和 NS2)和晚期转录的病毒衣壳蛋白(VP1 和 VP2)。非结构蛋白 NS1 和 NS2 共长 2 007 nt,位于基因组的 273~2 279 nt 之间。结构蛋白 VP1 和 VP2 编码基因位于基因组的 2 283~4 538 nt 之间,长 2 256 nt,中间有长 72 nt 的间隔序列。5'-端有回文序列形成的发夹结构,3'-端有一个拷贝的长约 60 nt 的重复序列。全基因组序列比对结果显示,CPV-YH 毒株与 2011 年兰州分离的 CPV-LZ2 分离株相似性最高,为 99%。NS1 基因推导的氨基酸序列与 CPV-LZ2 分离株 NS1 相似性为 99.55%,有 3 处发生变异(表 2)。同时,VP1 基因氨基酸序列也出现了 3 处变异(表 2),其中第一处变异存在于 25 位的间隔序列位置,VP2 基因氨基酸有两处发生变异,具体见表 2。

株的分子流行病学检测势在必行。本研究从疑似犬细小病毒感染病例中用 A-72 细胞分离出一株病毒,经病毒形态学鉴定、血凝特性、动物回归试验以及全基因组测定等分子生物学鉴定,成功分离出一株犬细小病毒 CPV-YH,属于 CPV-2a 型。

动物回归试验表明,CPV-YH 分离株为强毒株。可致比格犬出现细小病毒典型临床症状,死亡率 100%,这与王建科等报道结果一致^[11]。可用于建立犬细小病毒病攻毒模型,同时为开发新的疫苗奠定基础。基因组测序结果显示 CPV-YH 基因组全长 4 921 nt。CPV 基因组有 2 个开放阅读框,分别编码早期转录的调节蛋白(NS1 和 NS2)和晚期转录的病毒衣壳蛋白(VP1 和 VP2)。细小病毒具有特征性的末端重复序列^[12],CPV 的第一个末端重复序列起始于终止密码附近的外显子处,长约 60 nt,

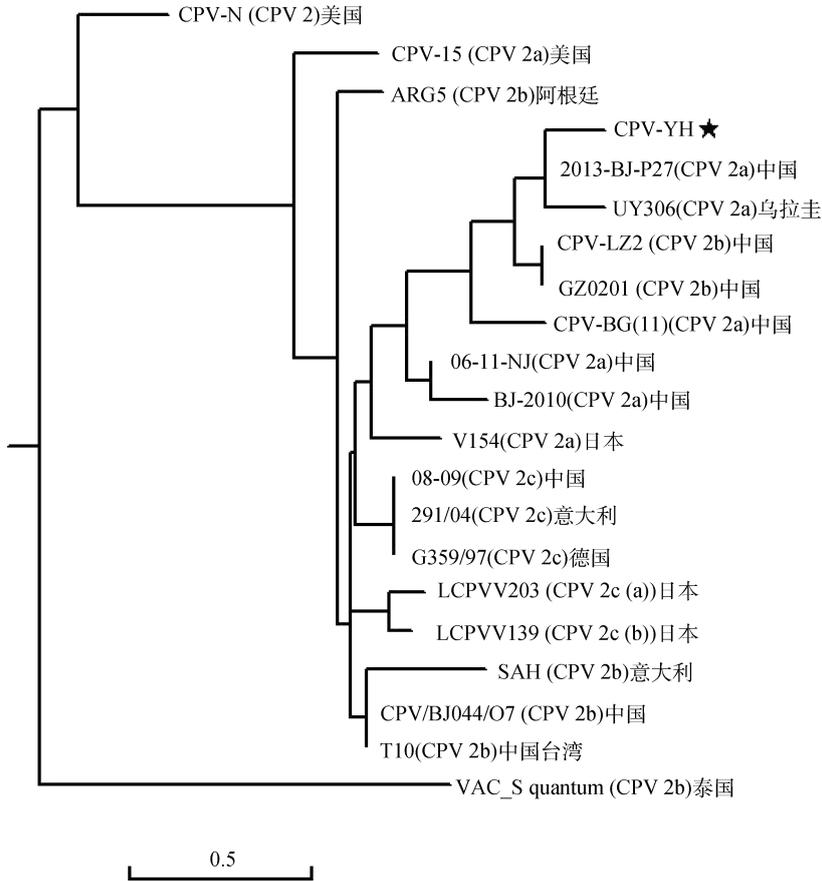


图3 VP2 氨基酸遗传进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of VP2 amino acids of canine parvovirus

另一个 60 nt 的末端重复序列起始于下游的 75 nt 处。CPV-2 和早期 CPV-2a 第一个末端重复序列都是 2 个拷贝，但是目前流行的 CPV-2a 和 CPV-2b 多是 1 个拷贝。第二个末端重复序列的变化较大，1988 年 A. P. Reed 等检测的 CPV-N 是 3 个拷贝^[12]，1985 年 S. L. III Rhode 检测的 CPV-B 是 1 个拷贝^[13]。本研究结果显示，CPV-YH 毒株在 5'-端有回文序列形成的发夹结构，3'-端有 1 个拷贝的长约 60 nt 的重复序列。末端重复序列的具体功能目前尚不清楚。有学者认为末端重复序列的作用是调节 DNA 的长度到最佳，使他们恰好包装在各自的衣壳中^[13]；也有学者认为是调节转录^[14]。S. L. III Rhode 的研究表明，将大鼠 H1 细小病毒在 NB 细胞上传代，其 5' 末端出现重复序列，认为是由于细胞传代造成^[15]。但从细小病毒拥有的重复序列拷贝数，可以推测这两个末端重复序列对 CPV 只有 1 个拷贝就足够。

VP2 氨基酸进化树显示，CPV-YH 分离株与 2013-BJ-P27(中国)分离株和 UY306(乌拉圭)分离

株亲缘关系最为接近。全基因组序列比对结果显示，CPV-YH 毒株与 2011 年兰州分离的 CPV-LZ2 分离株相似性最高(为 99%)，VP2 基因编码氨基酸第 406 位由 T 突变成 S，第 426 位由 D 变成 N，VP1 基因编码氨基酸序列出现了 3 处变异。其中第一处变异出现于 25 位，此位置处于间隔序列位置，目前关于犬细小病毒 VP1 间隔序列的相关研究尚有欠缺，剪切方式和具体位置尚未确定，故本毒株此位置氨基酸的变异是否会直接导致病毒毒力的变化，是否与病毒的进化和致病性有关还有待进一步的研究。

本研究为 CPV 的分子生物学提供了数据，为犬细小病毒病的预防和控制提供了一定的参考依据，也为犬细小病毒流行病学调查、新型疫苗开发以及分析生产实践中免疫失败的原因提供素材。

4 结论

成功分离到一株 CPV-2a 亚型分离株，并命名为 CPV-YH。其基因组全长为 4 921 nt(GenBank 登录号为 KY403998)，与 2011 年兰州分离的 CPV-

LZ2 分离株基因组相似性最高,为 99%;VP2 氨基酸进化树显示,CPV-YH 分离株与 2013-BJ-P27(中国)分离株和 UY306(乌拉圭)分离株在同一小的分支上。

参考文献(References):

- [1] 丁 轲,余祖华,彭春平,等. 2011—2013 年河南省犬细小病毒分子流行病学调查与分析[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(10): 1671-1678.
DING K, YU Z H, PENG C P, et al. Molecular epidemiological investigation of canine parvovirus isolates from Henan province during 2011-2013[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(10): 1671-1678. (in Chinese)
- [2] 梁士哲,魏喜仁,范文光,等. 狗传染性肠炎的研究 1. 腹泻狗粪便中检出的细小病毒样颗粒[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1982, 2(4): 172-175.
LIANG S Z, WEI X R, FAN W G, et al. The study of infectious enteritis in dogs 1, parvovirus like particles detected in feces of diarrh[J]. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 1982, 2(4): 172-175. (in Chinese)
- [3] 赵建军,闫喜军,吴 威. 犬细小病毒:从起源到进化[J]. 微生物学报, 2011, 51(7): 869-875.
ZHAO J J, YAN X J, WU W. Origin and evolution of canine parvovirus—a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(7): 869-875. (in Chinese)
- [4] 孔繁德. 犬细小病毒病原特性的研究概况[J]. 中国兽医科技, 1995, 25(1): 18-19.
KONG F D. A study of pathogen characteristics of Canine parvovirus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1995, 25(1): 18-19. (in Chinese)
- [5] EUGSTER A K, MAIRN C. Diarrhea in Puppies: Parvovirus-like particles demonstrated in their feces [J]. *Southwest Vet*, 1977, 30: 59.
- [6] BINN L N, LAZAR E C, EDDY G A, et al. Recovery and characterization of a minute virus of canines [J]. *Infect Immun*, 1970, 1(5): 503-508.
- [7] 徐汉坤,金 淮,郭宝发,等. 某犬群爆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.
XU H K, JIN H, GUO B F, et al. Epidemiology and clinical pathology of canine viral enteritis in dogs[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 1983(5): 5-7. (in Chinese)
- [8] 易 立,程世鹏. 犬细小病毒分子生物学研究进展[J]. 特产研究, 2008(1): 71-73.
YI L, CHENG S P. Research Progress in the molecular biology of canine parvovirus virus[J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2008(1): 71-73. (in Chinese)
- [9] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 1997: 750-751.
YIN Z, LIU J H. *Animal virology*[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997: 750-751. (in Chinese)
- [10] 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.
ZHOU Y D, KANG Z Y, CHEN Y P, et al. Isolation and biological characterization of canine parvovirus isolates[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(10): 1402-1408. (in Chinese)
- [11] 王建科,刘辉哲,林 鹏,等. 犬细小病毒新 2b 型分离株的分离鉴定[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(5): 734-738.
WANG J K, LIU H Z, LIN P, et al. Isolation and identification of new canine parvovirus type 2b isolate [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(5): 734-738. (in Chinese)
- [12] 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.
- [13] RHODE III S L. Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus[J]. *J Virol*, 1985, 54(2): 630-633.
- [14] MARTYN J C, DAVIDSON B E, STUDDERT M J. Nucleotide sequence of feline panleukopenia virus: Comparison with canine parvovirus identifies host-specific differences[J]. *J Gen Virol*, 1990, 71(11): 2743-2753.
- [15] RHODE III S L. Replication process of the parvovirus, H-1. X. Isolation of a mutant defective in replicative-form DNA replication[J]. *J Virol*, 1978, 25(1): 215-223.

(编辑 白永平)