

从健康狐狸、貉粪中检出犬冠状病毒的两种基因型

马光刚 陆承平*

(南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 取某养殖场健康狐狸(61 份)、貉(24 份)粪样,用套式 PCR(RT-nPCR)方法检测犬冠状病毒(CCV)并进行基因型鉴定。结果显示 狐狸粪样中有 43 份(70.5%)为 CCV II 型阳性,29 份(47.5%)为 CCV I 型阳性,两型混合感染 25 份,占 41.0%,两型总感染率为 77.0%。24 份貉粪样中,22 份为 CCV II 型阳性(91.7%),其中 16 份为 CCV I 型、II 型混合感染(66.7%)。分别取狐狸和貉粪样中 CCV I、II 型阳性 PCR 产物各 2 份(共 8 份)进行测序,均与 CCV 的 M 基因序列相符,证实 PCR 结果非假阳性。序列及系统进化分析表明,CCV I 型与源于意大利腹泻犬的 CCV I 型(AF502583)同源性最高(96.7%~98.1%);CCV I、II 两种基因型同源性为 88.3%~89.7%,在进化树中处于两个大的分支上,同为 CCV II 型,狐狸源与貉源序列也存在多个位点差异。首次在貉粪中检出 CCV,证实在健康狐狸、貉群体中存在 CCV 流行,且 CCV I、II 型并存。

关键词 套式 PCR,犬冠状病毒,CCV I 型,CCV II 型,狐狸,貉

中图分类号 Q812 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2005)02-0305-04

犬冠状病毒(*Canine Coronavirus*, CCV)为冠状病毒科成员,与猫冠状病毒(FCV),猪传染性胃肠炎病毒(TGEV),猪流行性腹泻病毒(PEDV)及人冠状病毒 229E(HCoV-229E)同属第一群。该病毒宿主范围较广,可感染犬、猫、猪、大熊猫、狐狸、狼等^[1-4]。

冠状病毒的基因组庞大,复制时采用独特的套式转录方式,错配率和重组率都很高,极易发生变异。不同动物来源的冠状病毒间也可发生重组,从而导致抗原性及致病性的改变,或产生新的基因型甚至新种,如 FCV II 型就是由 FCV I 型和 CCV 重组的产物^[5],SARS 冠状病毒也怀疑是不同冠状病毒重组的结果^[6]。犬冠状病毒的变异株也较多。Pratelli 等^[7]检测了腹泻犬群 CCV,证实有新的基因型(FCV-like CCV)存在。因其与 FCV I 型同源性最高而建议将其命名为 CCV I 型(CCVC Type I),而目前已知的其他 CCV(Canine-like)则归为 II 型。国内未见关于 CCV 两种基因型的报道。

冠状病毒的健康带毒现象较为普遍,宿主感染后往往成为病毒携带者,可长期慢性排毒,并可引发新一轮感染^[8,9]。健康犬群中 CCV 有很高的感染率,但尚未见其他犬科动物也有此种现象报道。狐狸、貉在我国不少地区作为经济动物养殖,与人类关系密切,对其健康群体进行 CCV 的检测,具有潜在的公共卫生意义。本试验采用 Pratelli 等^[10,11]建立的套式 PCR(RT-n PCR)方法,对某养殖场健康狐狸、貉粪样中的 CCV 进行了检测,以期了解该群体中 CCV 的感染及基因型的分布。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和参考毒株:A72 细胞(犬纤维肉瘤细胞系)及参考株 CCV-1-71 均由德国吉森大学 Baljer 教授惠赠。前者用含 10%新生犊牛血清的 MEM 营养液培养,CCV-1-71 增殖维持液为含 2%新生犊牛血清的 MEM。

1.1.2 主要试剂和仪器:TRIzol(3-ZOL)购自 MDBio 公司, RNasin 购自华美生物公司, M-MLV RT 和 *Taq* DNA 聚合酶(5U/ μ L)购自 Promega 公司, DNA 回收试剂盒购自中科开瑞公司, T 载体购自 TaKaRa, PCR 仪购自 MJ 公司。

1.1.3 引物 参照文献[9,10]发表的 M 基因的套式 PCR 引物序列合成下列引物(由 TaKaRa 合成)。CCV1: 5'-TCCAG ATATGTAATGTTGGG-3' (+); CCV2: 5'-TCTGTTGAGTAATC ACCAGCT-3' (-); CCV3: 5'-GGTGTCACCTAACATTGCTT-3' (+); CCV1a: 5'-GTGCTTCCTGAAGGTACA-3' (+)。

其中,第一轮扩增用引物 CCV1/CCV2,目的片段大小为 409bp,将第一轮产物作 1:100 稀释,用引物 CCV2/CCV3 进行第二轮扩增,目的片段大小为 212bp。第二轮若用引物 CCV2/CCV1a,则可特异性扩增出 CCV I 型 M 基因片段,大小为 239bp。

1.2 粪样的采集及处理

2004 年 4 月从安徽某特种经济动物养殖场采集健康狐狸粪样 61 份,貉粪样 24 份。粪样用 0.01mol/L PBS 作 10 倍稀释,12000r/min 离心 5min,取上清保存于 -20℃待检。

基金项目 上海科技兴农重点公关项目(农科攻字(2003)第 D-1 号)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-84396517; E-mail lucep@njau.edu.cn

作者简介 马光刚(1980-),男,山东人,硕士研究生,研究方向为兽医病毒学。E-mail: yanhai8082@163.com

收稿日期 2004-07-19, 修回日期 2004-11-14

1.3 RNA 提取及 cDNA 合成

将 CCV-1-71 接种 A72 细胞,至 80% 以上细胞出现病变后冻融两次收获病毒,以此病毒液作为检测时的阳性对照。

1.3.1 RNA 提取:取 400μL 粪便上清加 0.8mL TRIzol (3-ZOL)按说明书提取 RNA。

1.3.2 cDNA 合成:提取的 RNA 用 20μL ddH₂O (Rnase-free)溶解,取 5μL 用于 cDNA 合成。RT 反应体系:RNA 模板 5μL,下游引物 CCV2 (30pmol/μL) 1μL,5 × 缓冲液 4μL,10mmol/L dNTPs 1μL,RNasin 15U,M-MLV RT 100U,加 ddH₂O 至终体积 20μL,然后 42℃ 孵育 1h,95℃ 5min。

1.4 套式 PCR 反应体系建立和敏感性检测

用参考株 CCV1-71 对 PCR 反应体系进行优化,最终确立套式 PCR 的反应体系条件如下:参考株 DNA 5μL,10 × PCR 缓冲液 2μL,25mmol/L MgCl₂ 2μL,10mmol/L dNTPs 1μL,上下游引物各 0.5μL(30pmol/μL),Taq DNA 聚合酶 2.5U,补加 ddH₂O 至终体积 20μL。反应条件:94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 1min,35 个循环;72℃ 5min。第二轮与第一轮反应体系和条件均相同。反应结束后,取 5μL 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,观察结果。

用以上的反应体系和条件分别检测含 1000、100、10、1 × TCID₅₀ 的 CCV-1-71 (CCV II 型)细胞培养物,以确定该方法的敏感性,并用于检测处理好的粪样。同时,用引物 CCV2/CCV1a 扩增到的 CCV1-71 的第一轮产物,以确定该引物的特异性。

1.5 基因克隆和测序分析

对 4 份 CCV II 型阳性的样品 (FOX-CCV-3-2,FOX-CCV-4-2,RAC-CCV-2-2,RAC-CCV-8-2) 以及 4 份 CCV I 型阳性样品 (FOX-CCV-3-1,FOX-CCV-18-1,RAC-CCV-2-1,RAC-CCV-14-1) 的 PCR 产物用胶回收试剂盒进行回收,连接 T 载体,转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α,挑取阳性克隆,由上海中科开瑞公司进行测序,测序结果与已知 CCV 序列进行比对,然后用 DNASTAR 和 BLAST 软件进行同源性和系统进化分析。

2 结果

2.1 RT-nPCR 的敏感性

RT-nPCR 方法可检测出 1 × TCID₅₀ 的 CCV1-71,第一轮可扩增出 409bp 的目的片段,用引物 CCV2/CCV3 进行第二轮

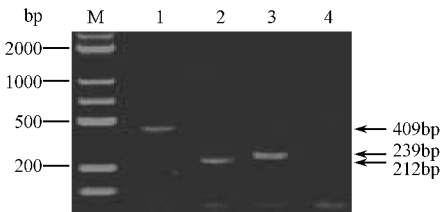


图 1 RT-nPCR 扩增结果

Fig.1 Comparison of the three RT-nPCR products

M. Marker; 1. 409bp; 2. 212bp; 3. The second PCR product of CCV type I in feces (239bp); 4. CCV1-71 can't be amplified by the primers CCV1a/CCV2.

PCR 可扩增出 212bp 的目的片段。用引物 CCV2/CCV1a 未能扩增出目的片段,证明该检测方法敏感性极高,且用于检测 CCV I 型的引物不能扩增出 CCV II 型基因(图 1)。

2.2 粪样中 CCV I 型、II 型的检出

61 份狐狸粪样中,43 份为 CCV II 型阳性,阳性率为 70.5%。24 份貉粪样中,22 份为 CCV II 型阳性,阳性率为 91.7%。部分样品的 RT-nPCR 结果如图 2 所示。对所有样品的第一轮产物经 100 倍稀释后用引物 CCV2/CCV1a 进行 CCV I 型的检测。在狐狸粪样中有 29 份可扩增出 239bp 的目的片段(图 1),阳性率为 47.5%。在这 29 份阳性中,有 25 份同时也是 CCV II 型阳性,两型混合感染率为 41.0%,其余 4 份仅为 CCV I 型阳性。貉粪样中,16 份为 CCV I 型阳性(占 66.7%),同时也是 CCV II 型阳性(表 1)。

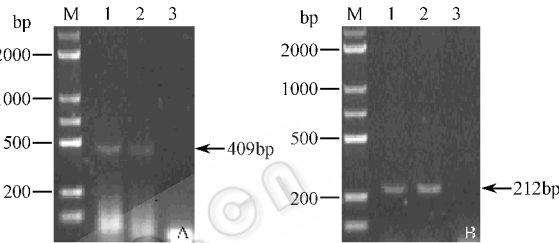


图 2 (A) RT-nPCR 第一轮结果;(B) RT-nPCR 第二轮结果

Fig.2 (A) Results of the first PCR (B) Results of the second PCR

M. Marker; 1~4. Tested feces; 5. CCV1-71; 6. Water.

表 1 健康狐狸、貉粪样 CCV 的检测

Table 1 The detection results of CCV in all the feces

Source of specimens	Amount	CCV typeII positive(%)	CCV typeI positive(%)	Co-infection (%)	Total incidence/%
Foxes	61	43 (70.5)	29 (47.5)	25 (41.0)	77.0
Reccoon dogs	24	22 (91.7)	16 (66.7)	16 (66.7)	91.7

2.3 测序分析

所得序列与已知序列进行比对,均与 CCV 的 M 基因序列相符,证实 PCR 结果非假阳性。其中狐狸源 CCV II 型序列与参考株 CCV1-71 同源性最高(99.5%),与源于中国大熊猫的 M 基因序列(AY436635)同源性 99.1%,与 TGEV 同源性为 97.2%。而貉源 CCV II 型则与犬源南京株 CCV-T14 M 基因序列同源性最高(97.7%~98.1%),与 CCV1-71 同源性为 96.2%~97.2%,与狐狸源 CCV II 型有差异,两者同源性为 95.8%~96.7%。狐狸源与貉源 CCV I 型序列与 Pratelli 等^[12,13]所发现的犬源 CCV I 型(AF502583)同源性最高(96.7%~98.1%),而 CCV II 型与其同源性仅有 88.3%~89.7%。比对序列发现,CCV I 型与 CCV II 型相比存在着多个的碱基差异,变异位点多发生在 5' 端,3' 端相对保守。在系统进化树(图 3)中,以 CCV1-71 及 CCV AY436635 为代表的 CCV II 型与以 CCV I 型(AF502583)为代表的 CCV I 型处于两个大的截然不同的分支上。CCV I 型与 FIPV 关系很近,而 CCV II 型则与 TGEV 处于同一分支上。狐狸源 CCV II 型与貉源 CCV II 型又处于两个小的分支上,两者序列也存在多处

的差异。

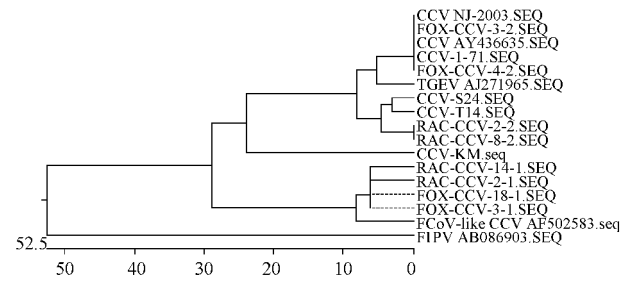


图3 健康狐狸、貉粪样中 CCV I 型、CCV II 型与已知 CCV M 基因片段系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of partial M gene nucleotide sequences (212bp) of two CCV genotypes and several known CCVs

3 讨论

冠状病毒的感染常具有宿主特异性,只感染相应的动物并引起特定的疾病。有些冠状病毒也可感染其他种类的动物,引起或不引起相应的临床症状。近年来对犬冠状病毒的研究发现其宿主范围较广,除犬外,猫、猪、狼、大熊猫、狐狸等均可感染^[1-4]。CCV 在犬群中的感染尤为普遍。Tennant 等血清学调查表明,英国某些犬群 CCV 抗体阳性率在 76%~100% 之间。Pratelli 等^[12]指出,意大利腹污犬粪便中 CCV 阳性率为 42.8%。日本学者^[13]对腹污犬肛拭子的检测结果表明,CCV 感染率为 55.4%。国内也在 CCV 的流行病学方面做过工作,张伯强等^[14]用 ELISA 法检测南京地区的 CCV,证明在南京犬群中有 CCV 的流行,腹污犬中 CCV 的感染有超过犬细小病毒的趋势。但以上研究多集中于对发病群体中 CCV 的检测,对于健康群体中是否也存在有 CCV 的感染则未见报道。

本研究用 Pratelli 等^[10,11]建立的 RT-nPCR 方法对健康的狐狸、貉群体进行了 CCV 的检测,首次发现貉也是 CCV 的宿主,并且在该健康狐狸、貉群体中 CCV 感染率很高(70.5%~91.7%),可能由于狐狸、貉处于同一集约化养殖场,CCV 易在群体内/间相互传播,从而导致了较高的感染率。有研究^[15]表明,CCV 存在致病株与非致病株的差异。这些在健康群体中存在的 CCV 致病意义究竟如何,尚不清楚。

冠状病毒的变异和重组是近些年来研究的热点,不同冠状病毒间的重组往往导致病毒嗜性的改变,并可产生新种^[16,17]。Erles 等^[18]发现冠状病毒也是犬传染性呼吸道综合征(Canine infectious respiratory syndrome)的重要病原,其 S 基因与 HCoV-OC43 和牛冠状病毒(BCoV)同源性最高,可能来源于 OC43 或 BCoV。CCV 的变异株也较多,不断有新的毒株被发现。

Naylor 等^[19]鉴定了分离自澳大利亚肠炎犬的变异株 CCV-UWSMN-1,进化位置处于 FCV 和 CCV 之间,认为可能是 CCV 新的亚型。Pratelli 等^[7]证实,在腹污犬群中有两种 CCV 基因型流行,CCV I 型的检出率为 14.5%,两种基因型共感染率为 76.8%。根据两型保守的 M 基因的序列差异,Pratelli

等^[21]设计了用于鉴定新基因型(CCVCV I 型)的特异引物 CCV1a/CCV2。本研究采用这对引物在健康狐狸、貉粪样中检测到了 CCV I 型,与 CCV II 型的共感染率分别为 41.0%,66.7%。说明目前在狐狸、貉群体中也同时存在着两种 CCV 基因型流行,新发现的基因型(CCVCV I 型)在犬科动物中可能较为普遍。序列及系统进化分析表明,两种基因型在进化树中处于两个大的分支上,序列上存在着多处特异突变,而型内则关系很近,这与以往的研究相符^[20]。有趣的是,即使同为 CCV II 型,狐狸源与貉源序列也存在多处差异,提示 CCV 在适应不同宿主过程中会发生变异。由于在同一宿主体内存在两种基因型共感染,两种基因型理论上存在自然重组的可能。另外,自然条件下 CCV 也能感染其他动物,就为 CCV 与其他动物源的冠状病毒发生异源重组提供了条件,导致新种出现或是宿主范围的改变,其潜在的公共卫生和流行病学意义显而易见。

参 考 文 献

[1] Mainka S A, Qiu X, He T, et al. Serologic survey of giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*), and domestic dogs and cats in the Wolong Reserve, China. *J Wildl Dis*, 1994,30(1): 86-89.

[2] Woods R D, Wesley R D. Seroconversion of pigs in contact with dogs exposed to *Canine coronavirus*. *Can J Vet Res*, 1992,56(1): 78-80.

[3] Woods R D, Wesley R D. Immune response in sows given transmissible gastroenteritis virus or *Canine coronavirus*. *Am J Vet Res*, 1986,47(6): 1239-1242.

[4] Garcelon D K, Wayne R K, Gonzales B J. A serologic survey of the island fox (*Urocyon littoralis*) on the Channel Islands, California. *J Wildl Dis*, 1992, 28(2): 223-229.

[5] Herrevehg A A, I Smeenk I, Horzinek M C, et al. *Feline coronavirus* type II strain 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between *Feline coronavirus* type I and *Canine coronavirus*. *J Virol*, 1998,72(5): 4508-4514.

[6] Michael J S, James R B, Heather A-M. Evidence from the evolutionary analysis of nucleotide sequences for a recombinant history of SARS-CoV. *Infect Genet Evol*, 2004, 4(1): 15-19.

[7] Pratelli A, Martella V, Decaro N, et al. Genetic diversity of a *Canine coronavirus* detected in pups with diarrhea in Italy. *J Virol Meth*, 2003, 110: 9-17.

[8] Marshall J A, Healey D S, Studdert M J, et al. Viruses and virus-like particles in the faeces of dogs with and without diahoea. *J Aust Vet*, 1984,61(2): 33-38.

[9] Hasoksuz M, Hoet A E, Loerch S C, et al. Detection of respiratory and enteric shedding of *Bovine coronaviruses* in cattle in an Ohio feedlot. *J Vet Diagn Invest*, 2002, 14(4): 308-313.

[10] Pratelli A, Tempesta M, Greco G, et al. Development of a nested-PCR for the detection of *Canine coronavirus*. *J Virol Meth*, 1999, 80: 11-15.

[11] Pratelli A, Tinelli A, Decaro N, et al. PCR assay for the detection and the identification of atypical *Canine coronavirus* in dogs. *J Virol Meth*, 2002,106: 209-213.

[12] Pratelli A, Buonavoglia D, Martella V, et al. Diagnosis of *Canine coronavirus* infection using nested-PCR. *J Virol Meth*, 2000, 84: 91-94

- [13] Mochizuki M, Sugiura R, Akuzawa M. Micro-neutralization test with *Canine coronavirus* for detection of *Coronavirus* antibodies in dogs and cats. *Jpn J Vet Sci*, 1987, **49**: 563 – 565.
- [14] 张伯强, 陆承平, 陈怀青. ELISA 法检测犬腹泻粪样中犬冠状病毒. *中国兽医学报*, 1997, **17**(5): 437 – 439.
- [15] Brian C H, Ian B, T Davad K B. Analysis of a 9.6 kb sequence from the 3' end of canine *coronavirus* genomic RNA. *J Gen Virol*, 1992, **73**: 2849 – 2862.
- [16] Lai M M C. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Res*, 1992, **56**: 61 – 79.
- [17] Lai M M C, Cavanagh D. The molecular biology of *coronaviruses*. *Adv Virus Rev*, 1992, **48**: 1 – 100.
- [18] Erles K, Toomey C, Harriet W B, *et al.* Detection of a group 2 *coronavirus* in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology*, 2003, **310**: 16 – 223.
- [19] Naylor M J, Walia C S, McOrist S, *et al.* Molecular characterization confirms the presence of a divergent strain of *Canine coronavirus* (UWSMN-1) in Australia. *J Clin Microbiol*, 2002, **40**(9): 3518 – 3522.
- [20] Pratelli A, Martella V, Pistello M, *et al.* Identification of *coronaviruses* in dogs that segregates separately from the *Canine coronavirus* genotype. *J Virol Meth*, 2003, **107**: 213 – 222.

Two genotypes of *Canine coronavirus* simultaneously detected in the fecal samples of healthy foxes and raccoon dogs

MA Guang-gang LU Cheng-ping*

(Key Lab of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: 61 fecal samples from healthy foxes and 24 from healthy raccoon dogs were examined by RT-nested PCR assays for the presence and genotypic identification of *Canine coronaviruses* (CCVs). 77.0% fox samples were recognized as CCV positive, 43 of which belonged to type II and 29 to type I, as well as both genotypes were simultaneously detected in 25 samples. Out of the total 24 fecal samples from raccoon dogs, 22 were CCV positive for type II and 16 for type I. M gene fragments of 8 samples were sequenced, 4 of which were confirmed as CCV type I and the other 4 as CCV type II. Sequence analysis showed that the M gene of CCV type I had a high similarity of 96.7% ~ 98.1% between the fox- and raccoon dog strains and the reported Italian strain from diarrhea dogs. The two genotypes, with an identity of 88.3% ~ 89.7%, formed two separate branches in phylogenetic tree. Interestingly, the sequence at several nucleic acid sites of CCV type II differed between foxes and raccoon dogs. The co-existence and popularity of the two CCV genotypes in healthy foxes and raccoon dogs were first confirmed in this article.

Key words: nested-PCR, *Canine coronavirus*, CCV type I, CCV type II, Fox, Raccoon dog

Foundation item: Shanghai Key Program Grant(2003-D-1)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-25-84396517; E-mail: lucp@njau.edu.cn

Received 107-19-2004

科技论文中计量单位的标准写法

参照《中国科学院自然科学期刊编排格式规范》、国家标准 GB7713 – 87 和《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》等要求,对本刊经常遇到的一些格式作如下规定。计量单位和单位符号以国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。

1. 时间:日(天)用 d,小时用 h,分钟用 min,秒用 s 等,单位符号均用英文小写正体。
2. 溶液浓度:溶液浓度用 mol/L 表示,而不用 M 或 No. ppm 应写为 mg/L。
3. 旋转速率:单位符号为 r/min,而不用 rpm。
4. 生物大分子的分子量:蛋白质用 kD,核酸用 bp 或 kb。
5. 光密度:光密度符号用斜体表示,如 OD, OD₆₀₀ 等。
6. 体积:升用 L,毫升用 mL,微升用 μ L。
7. 压力/压强:帕斯卡用 Pa,不用 kg/cm²、磅 1.55kg/cm² (8 磅) $\approx 0.55 \times 10^5$ Pa, 1.05kg/cm² (15 磅) $\approx 1 \times 10^5$ Pa。
8. 图表中数值的量和单位:用量与单位的比值表示数值,即物理量符号(斜体)与单位(正体)之间用斜线隔开,如 t/h(时间,单位是小时)。
9. 有些数值带的计量单位不能省略,如 30cm $\times$ 0.5cm 不可写成 30 $\times$ 0.5cm。