



山东地区犬冠状病毒的分子流行病学调查及其基因型多样性分析

张传美[#], 李文凤[#], 张路宾, 刘佳卉, 单虎^{*}, 杨海燕^{*}

青岛农业大学动物医学院, 山东 青岛 266109

张传美, 李文凤, 张路宾, 刘佳卉, 单虎, 杨海燕. 山东地区犬冠状病毒的分子流行病学调查及其基因型多样性分析. 微生物学报, 2022, 62(12): 4981–4991.

Zhang Chuanmei, Li Wenfeng, Zhang Lubin, Liu Jiahui, Shan Hu, Yang Haiyan. Prevalence and genotypic diversity of canine coronavirus in Shandong Province. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4981–4991.

摘要:【目的】了解分析山东地区健康犬及腹泻犬中犬冠状病毒(CCoV)的分子流行病学及其基因型。【方法】采集2017年以来山东省宠物市场、流浪犬中心、犬舍、各地宠物医院等的健康和腹泻犬只的肛拭子样品,采用PCR方法检测CCoV及其CCoV-I和CCoV-II(CCoV-IIa和CCoV-IIb)基因分型情况,并对扩增出的M、S全基因进行测序分析。【结果】199份样品中,共检出CCoV阳性样品79份,健康犬中的检出率为40.2%(33/82),腹泻犬中的检出率为39.3%(46/117)。健康犬中CCoV-I型与CCoV-II型阳性检出率分别为78.8%(26/33)和51.5%(17/33);腹泻犬中CCoV-I型与CCoV-II型阳性检出率分别为39.13%(18/46)和80.4%(37/46)。基因型阳性比率分析表明,健康犬中单独感染CCoV-I型的比率最高,为48.5%(16/33);腹泻犬中单独感染CCoV-IIa比率最高,为47.8%(22/46)。测序分析获得48株M基因序列,遗传进化分析表明,12株CCoV-I型毒株中除1株外,其余均从健康犬中分离。36株CCoV-II型毒株中除7株来自健康犬外,其余均为腹泻犬中获得。获得的3株S全基因均来自腹泻犬且均属于CCoV-IIa亚型。【结论】山东地区犬群中CCoV检出率较高,说明CCoV广泛流行,健康犬和腹泻犬中均存在多重感染情况,健康犬中

基金项目: 在青高校服务青岛重点学科(兽医学)(025/1119002); 2021年山东省专业学位研究生教学案例库(SDYAL21174) Supported by the Key Discipline of Serving Qingdao Industry Development in Qingdao Universities (Veterinary Medicine) (025/1119002) and by the Teaching Case Database of Professional Degree Postgraduates in Shandong Province in 2021 (SDYAL21174)

[#]These authors contributed equally to this work.

***Corresponding authors.** SHAN Hu, Tel: +86-532-58957552, E-mail: shanhu67@163.com; YANG Haiyan, Tel: +86-532-58957734, E-mail: hy386@126.com

Received: 1 April 2022; **Revised:** 19 August 2022; **Published online:** 26 August 2022

主要流行 CCoV 毒株为 CCoV-I 型，腹泻犬中主要流行 CCoV-IIa 型。

关键词：犬冠状病毒；基因型；M 基因；S 基因；序列分析

Prevalence and genotypic diversity of canine coronavirus in Shandong Province

ZHANG Chuanmei[#], LI Wenfeng[#], ZHANG Lubin, LIU Jiahui, SHAN Hu^{*}, YANG Haiyan^{*}

College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

Abstract: [Objective] To learn the prevalence and genotypic diversity of canine coronavirus (CCoV) in healthy and diarrhea dogs in Shandong Province. [Methods] We collected 199 anal swabs from healthy and diarrhea dogs in pet markets, stray dog centers, kennels, and pet hospitals in Shandong Province since 2017. CCoV was detected and genotyped by PCR method, and then the amplified M and S genes were sequenced and analyzed. [Results] Among the 199 anal swabs, 79 were CCoV-positive. The positive rate of CCoV was 40.2% (33/82) in healthy dogs and 39.3% (46/117) in diarrhea dogs. The positive rates of CCoV-I and CCoV-II were 78.8% (26/33) and 51.5% (17/33) in healthy dogs, and 39.13% (18/46) and 80.4% (37/46) in diarrhea dogs, respectively. CCoV-I had the highest single infection rate (48.5%, 16/33) in healthy dogs, while CCoV-II had the highest single infection rate (47.8%, 22/46) in diarrhea dogs. The M gene sequences of 48 strains were determined by sequencing analysis. Phylogenetic analysis showed that 11 out of the 12 CCoV-I strains were isolated from healthy dogs. Among the 36 CCoV-II strains, 7 strains were isolated from healthy dogs and the rest from diarrhea dogs. The 3 strains with whole S gene and obtained from diarrhea dogs all belonged to CCoV-II. [Conclusion] The high positive rate of CCoV in the dogs in Shandong Province indicates that the virus is widely prevalent. Multiple infections exist in both healthy and diarrhea dogs. The main prevalent CCoV type is CCoV-I in healthy dogs and CCoV-IIa in diarrhea dogs.

Keywords: canine coronavirus; genotype; M gene; S gene; sequence analysis

犬冠状病毒(canine coronavirus, CCoV)是一类有囊膜、单股正链 RNA 病毒，属于冠状病毒科(Coronaviridae) α 冠状病毒属(Alphacoronavirus)成员，与猪传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritisvirus, TGEV)、猫冠状病毒(feline coronavirus, FCoV)同属于 α 冠状病毒属中的 α 冠状病毒属-1 种。临床上主要引起犬、貉和狐等犬科动物呕吐、腹泻等胃肠炎症状的犬冠状病毒病，通常只引起温和性腹泻，致死率较低^[1]。

CCoV 包括 4 种结构蛋白：纤突蛋白(spike

protein, S)、膜蛋白(membrane protein, M)、核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, N)和小膜蛋白(small envelope protein, E)，M 蛋白是构成病毒囊膜的主要成分，是病毒颗粒中数量最多的膜蛋白，相对保守，但同样也可发生变异，该变异可能与病毒对宿主的免疫逃避有关^[2]。M 蛋白的基因序列在 CCoV 感染前、后可发生改变，感染前其基因序列与 CCoV 毒株类似，而感染后序列则与猫冠状病毒更相近^[3]。Pratelli 等^[4]根据 M 基因的不同，基于它们与 FCoV-I 型的

同源性,“FCoV 样 CCoV”被命名为 CCoV-I 型,经典 CCoV 参考株则称为 CCoV-II 型^[5]。S 蛋白是决定病毒抗原性和诱导中和抗体的重要蛋白,是病毒组织嗜性和致病性的重要决定因素,与特定的细胞受体结合,在病毒感染过程、细胞间传播和决定组织嗜性方面起重要作用,在分析流行毒株的流行趋势和遗传变异中具有重要的进化意义^[6]。基于 S 蛋白 N 端结构域(N-terminal domain, NTD)的不同,CCoV-II 型又被分为 CCoV-IIa 和 CCoV-IIb 2 种亚型,CCoV-IIa 具有 CCoV 样 NTD,CCoV-IIb 具有 TGEV 样 NTD。CCoV-I 型和 CCoV-II 型都可引起犬肠道冠状病毒病,且 2 种 CCoV 基因型可在同一只犬中共存,从而可能发生同源重组^[7]。2005 年,意大利首次发现了幼犬全身性疾病和高死亡率的致病变种泛嗜性犬冠状病毒(pantropic canine coronavirus, CB/05 毒株),到目前为止鉴定的泛嗜性犬冠状病毒都属于 CCoV-IIa 亚型^[8-11]。因此了解 CCoV 感染的基因型至关重要。

本研究通过采集 2017 年以来山东省宠物市场、流浪犬中心、犬舍、各地宠物医院等的健康和腹泻犬只的肛拭子样品,进行 CCoV 检测、基因分型和 M、S 基因的遗传进化分析,明确本地区 CCoV 流行情况和主要流行的基因型,为犬冠状病毒病的防控及相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

DMEM 培养基(Sigma);病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(杭州博日);HiScript[®] II One Step RT-PCR Kit(南京 Vazyme);MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0 (TaKaRa);Prime Script[™] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit

(TaKaRa);Prime STAR[®] HS DNA Polymerase (TaKaRa)。

1.2 临床样品的采集及处理

2017 年以来采集山东省宠物市场、流浪犬中心、犬舍、各地宠物医院等健康犬和腹泻犬的肛拭子样品共计 199 份。健康犬样品共计 82 份(其中宠物市场 24 份,流浪犬中心 23 份,犬舍 35 份),以精神良好且无腹泻症状为标准;腹泻犬样品共计 117 份(均来自各地宠物医院),为有腹泻症状的患犬。采集的样品用 DMEM 培养基稀释混匀,4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,取上清至 1.5 mL 离心管中,编号,-80 °C 保存待检。

1.3 引物的合成

参照文献发表的引物序列(表 1),利用引物 CCoV-CENP1F/R 扩增犬冠状病毒部分 N 基因,用于临床样品的 PCR 检测;引物 CCoV-IF/R、CCoV-IIF/R、CCoV-IIa F/R、CCoV-IIb F/R 用于犬冠状病毒分型检测;CCoV-M F/R 用于扩增犬冠状病毒 M 全基因;分段引物 CCoV-S1F/R、CCoV-S2F/R、CCoV-S3F/R 用于扩增犬冠状病毒 S1、S2、S3 基因,由青岛擎科梓熙生物技术有限公司合成。

1.4 临床样品的 RT-PCR 检测及分型

使用杭州博日公司的 Simply P 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取样品中病毒 RNA,以提取的样品 RNA 为模板,使用引物 CCoV-CENP1F/R、CCoV-IF/R、CCoV-IIF/R、CCoV-IIa F/R、CCoV-IIb F/R,用 HiScript[®] II One Step RT-PCR Kit 进行一步法 RT-PCR 扩增,扩增结束后,对 PCR 产物进行凝胶电泳,电压 150 V,电泳 20 min,凝胶成像仪观察并记录结果。

1.5 S、M 全基因的扩增、测序及序列分析

按照 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0 试剂盒说明书提取样品中

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of the primers

Primer	Sequence (5'→3')	Length/bp	Reference
CCoV-CENP1F	CTCGTGGYCGGAAGAATAAT	280	[12]
CCoV-CENP1R	GCAACCCAGAMRACTCCATC		
CCoV-IF	CAAGTTGACCGTCTTATTACTGGTAG	346	[4]
CCoV-IR	TCATATACGTACCATTATAGCTGAAGA		
CCoV-IIF	TGCATTTGTGTCTCAGACTT	694	[4]
CCoV-IIR	CCAAGGCCATTTTACATAAG		
CCoV-IIaF	GGCTCTATCACATAACTCAGTCCTAG	758	[13]
CCoV-IIaR	GCTGTAACATAKTCTCATTCCAC		
CCoV-IIbF	GGCTCTATCACATAACTCAGTCCTAG	499	[13]
CCoV-IIbR	CAACATGTAACCTTTGTCTGTGATC		
CCoV-MF	CTCGTGGYCGGAAGAATAAT	835	[14]
CCoV-MR	GCAACCCAGAMRACTCCATC		
CCoV-S1F	ATGATTGTGGTTACATTGTGCC	1 640	[15]
CCoV-S1R	CCTCTACGCTTCATACCAAGAT		
CCoV-S2F	TCTTGGTATGAAGCGTAG	1 581	[15]
CCoV-S2R	TATCTGCTGGTTCTTGTTC		
CCoV-S3F	GAAGTGTAGATCTAACACATTGGA	2 080	[15]
CCoV-S3R	CCGAATTCAGTGAACATGC		

病毒 RNA, 使用 Prime Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录后进行 PCR 扩增 S1、S2、S3 基因和 M 基因, PCR 鉴定为阳性的产物交由青岛擎科梓熙公司测序, 并进行序列拼接。将获得的 S、M 基因序列分别与 GenBank 中参考序列比较(表 2)。利用 DNASTar 软件对获得序列的核苷酸翻译成氨基酸后进行同源性比较。并用 MEGA7 软件采用邻位相邻法(neighbor-joining), bootstrap 设置 1 000 次重复, 绘制系统进化树。

2 结果与分析

2.1 临床样品 PCR 检测结果

RT-PCR 扩增后得到约 280 bp 的 DNA 片段, 与目的基因大小一致且无非特异性扩增(图 1)。结果表明, 199 份样品中, 共检出 79 份阳性样品, 健康犬中 CCoV 的检出阳性样品 33 份, 检出率为 40.2% (33/82), 腹泻犬中 CCoV 阳性样品 46 份, 检出率为 39.3% (46/117)。

2.2 健康犬与腹泻犬中 CCoV 分型结果

CCoV 阳性样品的 RT-PCR 检测, 得到 CCoV-I、CCoV-II、CCoV-IIa 和 CCoV-IIb 目的片段分别为 346、694、758 和 499 bp, 条带大小均与预期一致(图 2)。CCoV 分型结果表明, 健康犬和腹泻犬中均存在多重感染的情况, 健康犬中 CCoV-I 型阳性检出率为 78.8% (26/33), CCoV-II 型阳性检出率为 51.5% (17/33), 其中 CCoV-IIa 阳性检出率为 51.5% (17/33), CCoV-IIb 阳性检出率为 15.2% (5/33); 腹泻犬中 CCoV-I 型阳性检出率为 39.13% (18/46), CCoV-II 型阳性检出率为 80.4% (37/46), 其中 CCoV-IIa 阳性检出率为 80.4% (37/46), CCoV-IIb 阳性检出率为 19.6% (9/46) (图 3)。

CCoV 各基因型的阳性样品数和比率分析结果表明, 健康犬中单独感染 CCoV-I 型的比率最高, 为 48.5% (16/33); 腹泻犬中单独感染 CCoV-IIa 比率最高, 为 47.8% (22/46) (图 3)。本研究中, 在健康犬和腹泻犬中均未发现单独

表 2 引用毒株序列一览表

Table 2 Isolates used in this study

Virus	Accession No.	Country	Year	Host	Genotype
CCoVK378	KC175340	USA	1978	Canine	II
CCoVINSAVC-1	D13096	UK	1992	Canine	II
CCoVBGF10	AY342160	UK	2003	Canine	II
CCoVCB/05	KP981644	Italy	2005	Canine	II
CCoV1-71	JQ404409	Germany	1971	Canine	II
CCoV/TN-449	JQ404410	USA	1980s	Canine	II
CCoV/fc1	AB781790	Japan	2013	Canine	II
CCoV/NTU336	GQ477367	Taiwan, China	2008	Canine	II
CCoV430/07	EU924790	Italy	2007	Canine	II
CCoV174/06	EU856362	Italy	2006	Canine	II
CCoV341/05	ACJ63236	Italy	2008	Canine	II
CCoV68/09	HQ450377	Greece	2010	Canine	II
CCoV/HCM47	LC190907	Viet Nam	2015	Canine	II
CCoV/NJ17	AY704917	China	2004	Canine	II
FCoVUU20	HQ392471	Netherlands	2007	Feline	I
FCoVUU31	HQ012371	USA	2008	Feline	I
FCoVDF-2	JQ408981	USA	1981	Feline	II
CCoV23/03	KP849472	Italy	2003	Canine	I
CCoV259/01	AF502583	Italy	2003	Canine	I
TGE Purdue	DQ811789	USA	1952	Porcine	

感染 CCoV-IIb 和 CCoV-I/CCoV-IIb 混合感染的病例, 但均检测到 CCoV-I/CCoV-IIa/CCoV-IIb 三重感染病例。

2.3 CCoV 的 S、M 全基因同源性分析

通过 RT-PCR 扩增得到 CCoV 的 S1、S2、

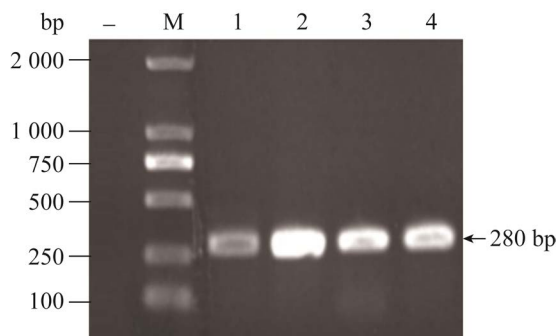


图 1 CCoV RT-PCR 扩增结果

Figure 1 RT-PCR result of CCoV. M: DNA marker DL2000; -: negative control; lanes 1-4: clinical samples.

S3 的目的片段分别为 1 640、1 581 和 2 080 bp, M 全基因扩增目的条带为 835 bp, 条带大小均与预期一致且无非特异性扩增(图 4)。

测序后获得 3 条 4 362 bp 的 S 全基因序列和 48 条全长为 798 bp 的 M 全基因序列, 根据核苷酸序列推导出其相应氨基酸序列。应用 DNASTar 软件对所测序列与国内外 FCoV、CCoV、TGEV 参考毒株进行同源性比较。结果如图 4 所示, 48 株 CCoV 毒株 M 基因之间及与国内外参考株之间氨基酸同源性较高; 3 株 CCoV 毒株 S 基因氨基酸同源性与 CCoV-II 型和 FCoV-II 型参考株之间氨基酸同源性较高(分别为 82.3%–95.8%和 92.4%–93.9%), 与 CCoV-I 型和 FCoV-I 型参考株之间氨基酸同源性较低(47.8%–47.9%和 46.2%–47.3%), 但与 TGEV 参考株(DQ811789)之间氨基酸同源性也较高(81.2%–82.2%) (图 5)。

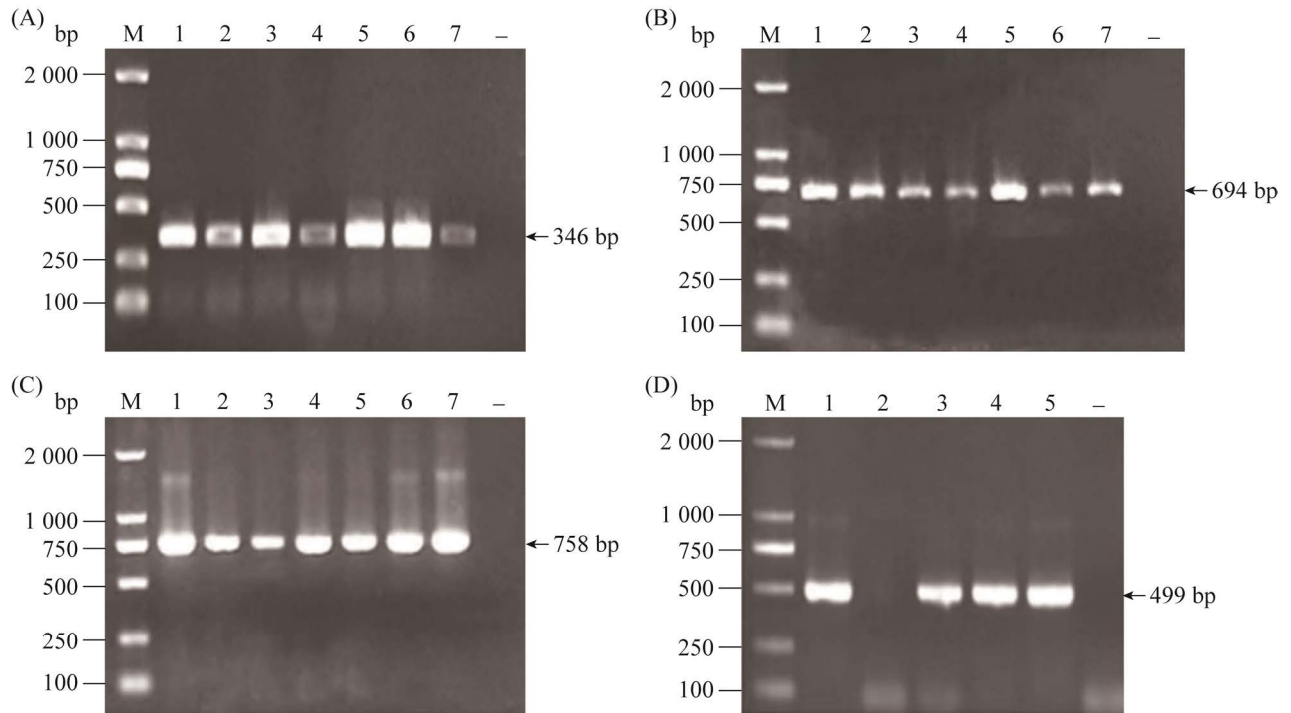


图 2 CCoV-I、CCoV-II、CCoV-IIa 和 CCoV-IIb 基因型 RT-PCR 扩增结果

Figure 2 RT-PCR results of CCoV-I, CCoV-II, CCoV-IIa and CCoV-IIb. M: DNA marker DL2000; lanes 1–7: samples; –: negative control.

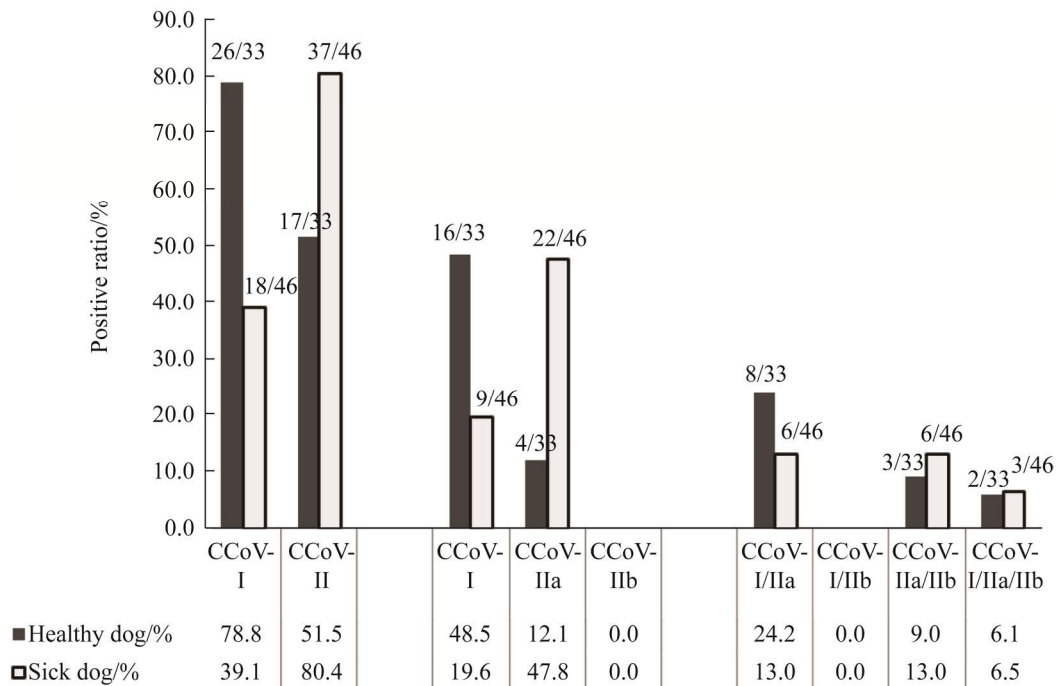


图 3 CCoV 各基因型和亚型的阳性样品数及其比率

Figure 3 Number of positive samples and frequency of CCoV genotypes/subtypes.

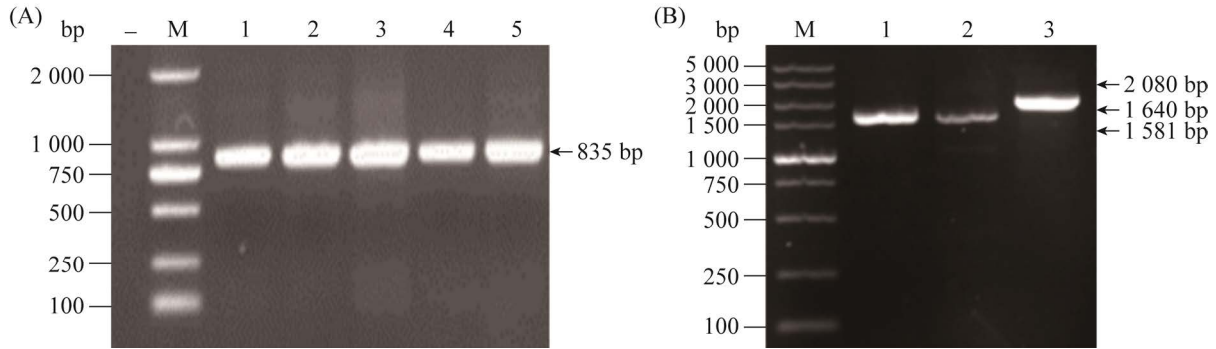


图4 CCoV M 和 S 基因 RT-PCR 扩增结果

Figure 4 RT-PCR results of CCoV M and S gene. A: M: DNA marker DL2000; lanes 1–5: positive samples; –: negative control. B: M: DNA marker DL5000; lane 1: S1 segment 1 640 bp; lane 2: S2 segment 1 581 bp; lane 3: S3 segment 2 080 bp.

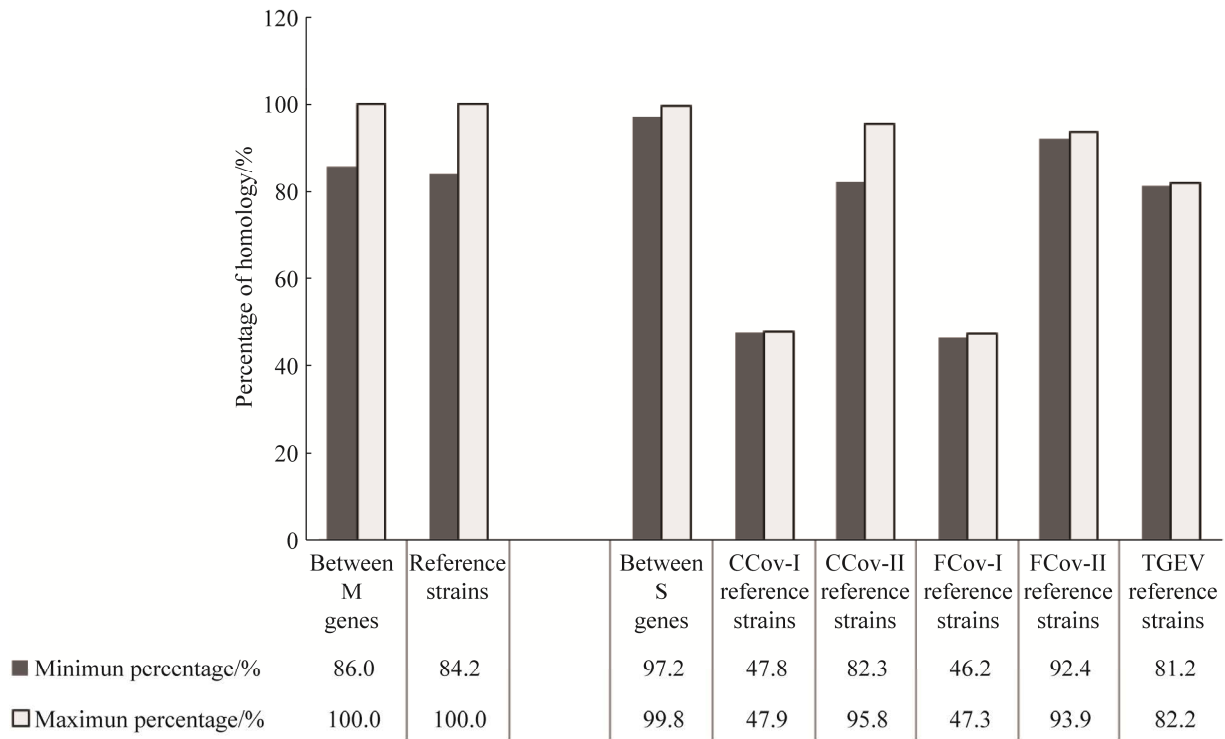


图5 CCoV M、S 全基因同源性分析

Figure 5 Homology analysis of M and S gene.

2.4 CCoV 的 M、S 全基因的遗传进化分析

根据 GenBank 中的参考序列, 利用 MEGA7 软件绘制系统进化树。获得 3 株 S 全基因 (MT166674、MT166675、MT166676), 进化树分析显示, 3 株腹泻犬 CCoV 阳性毒株均属于

CCoV-IIa 亚型, 形成一个相对独立的分支, 与日本流行株 CCoV/fc1 呈现较近亲缘关系(图 6)。

获得 48 株 M 基因(MT136057–MT136104), 遗传进化分析显示, 其中 12 株 CCoV-I 型毒株形成 C1 和 C2 两个独立的亚群, C1 亚群形成

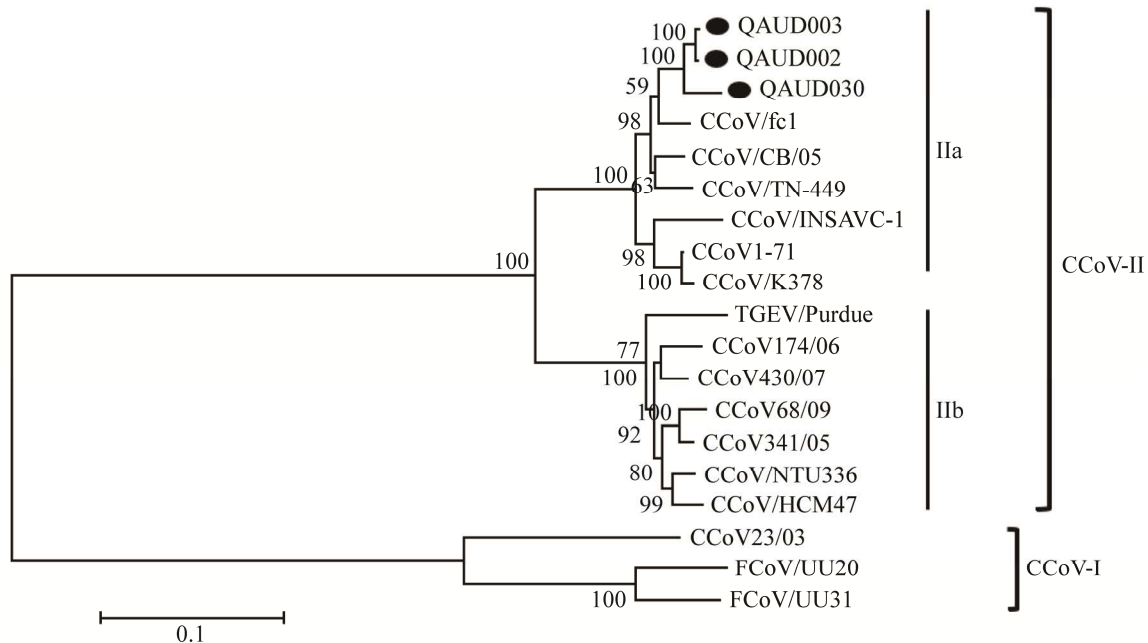


图 6 CCoV S 基因遗传进化分析

Figure 6 Phylogenetic analysis of S gene of CCoV. ● represent the CCoV strains identified from diarrhea in this study; genetic distances were constructed using p-distance model; horizontal bar: genetic distance of 0.1.

一个独立的分支，与当前国内外流行毒株遗传关系较远；C2 亚群与 2 株意大利参考株亲缘关系较近；12 株 CCoV-I 型毒株中除 1 株 (QAUD019) 外，其余均从健康犬中分离。36 株 CCoV-II 型毒株分为 C1、C2 和 C3 三个亚群，C1 亚群中，3 株 QAUD093、QAUD162 和 QAUD075 毒株位于一个相对独立的分支中，QAUD003 等 30 株毒株与中国和越南流行毒株亲缘关系较近；QAUH056、QAUH058 和 QAUH062 位于 C3 亚群，与美国流行毒株 CCoV/TN-449 遗传关系较近；36 株 CCoV-II 型毒株中除 7 株 (QAUH059 等) 来自健康犬外，其余均为腹泻犬中获得(图 7)。

3 讨论

20 世纪 80 年代我国开始有犬冠状病毒性肠炎的报道^[16]，后陆续有警犬、家犬感染 CCoV 的报道，但多数报道并未进行基因分型和混合

感染的研究。王玉燕^[15]报道 2003–2004 年采集的 138 份犬粪便样品中，CCoV-II 在健康犬和腹泻犬的检测阳性率分别为 86.42% (70/81) 和 43.75% (21/48)，未检测到 CCoV-I。王欣宇等^[17]报道，2014–2015 年期间黑龙江地区腹泻犬 CCoV 阳性样品中同时存在 CCoV-I、CCoV-IIa 和 CCoV-IIb 多种基因型，CCoV-I 占 15.79% (9/57)，CCoV-II 占 84.21% (48/57)，其中 CCoV-IIa 型为优势亚型。孙秋艳等^[18]对山东地区的腹泻犬 846 份粪便样品进行 CCoV 的分离鉴定，共鉴定出 CCoV 349 份，检出率为 41.25%，与本研究结果基本符合。本研究中，采自山东地区的 199 份犬肛拭子样品中检出 79 份阳性样品，检出率为 39.7%；检出的 33 份健康犬和 46 份腹泻犬 CCoV 阳性样品基因型分型结果显示，健康犬中主要流行毒株为 CCoV-I 型，单独感染居多；腹泻犬中主要流行毒株为 CCoV-IIa 型，各基因型及其亚型混合感染多。但本研究

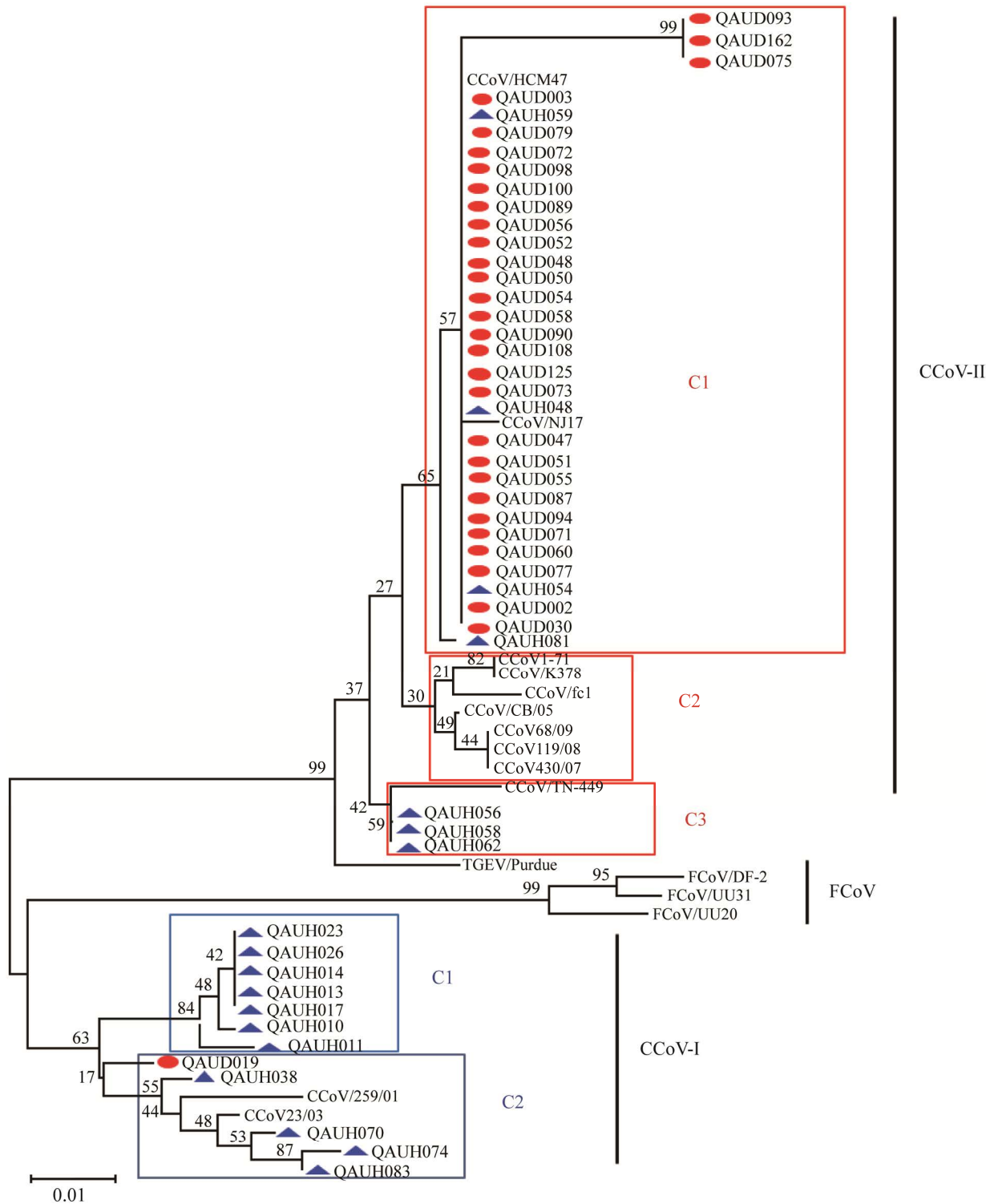


图 7 CCoV M 基因遗传进化分析

Figure 7 Phylogenetic analysis of M gene of CCoV. ● represent the CCoV strains from diarrhea in this study; ▲ represent the CCoV strains from health in this study; genetic distances were constructed using p-distance model; horizontal bar: genetic distance of 0.01.

在健康犬和腹泻犬中均未发现 CCoV-IIb 单独感染和 CCoV-I/CCoV-IIb 混合感染病例,却在健康犬和腹泻犬中都检测到 CCoV-I/CCoV-IIa/CCoV-IIb 三重感染,这一现象有待于进一步研究。

国外多个国家研究也表明,犬中存在 CCoV 多种基因亚型的感染, Ntafis 等^[13]报道,希腊腹泻犬 CCoV 阳性样品中 47%检测到一种以上基因型; Van Nguyen 等^[19]报道,在越南腹泻犬中 CCoV-IIa 和 CCoV-IIb 均有检测到; Moutinho Costa 等^[20]的研究指出,巴西腹泻犬 CCoV 阳性样品中有 7%检测到多种基因型; Cavalli^[21]研究报道,阿尔巴尼亚腹泻犬 CCoV 阳性样品主要流行毒株为 CCoV-IIa; Decaro 等^[22]报道,意大利腹泻犬中有 21.8%混合感染。且近年来发现的泛嗜性犬冠状病毒可引起犬的高致病性和高病死率,其基因型为 CCoV-IIa,在意大利、法国、比利时、巴西等地区均有报道,且有全球流行趋势。以上数据显示,CCoV 虽只引起温和性腹泻,较易痊愈,但随着 CCoV-IIa 亚型的流行和混合感染的加重,CCoV 的感染可能会出现越来越严重的趋势,应引起高度重视^[23]。

本研究对 M 蛋白全基因遗传进化分析显示,健康犬主要携带 CCoV-I型病毒,腹泻犬主要为 CCoV-II型感染; S 基因进一步分析显示,犬腹泻原因可能与 CCoV-IIa 感染有密切的关系。CCoV-I型毒株 7 株和 CCoV-II型毒株 3 株位于一个相对独立的分支中,与其他病毒株遗传关系较远,可能会形成流行毒株群,需要更多的分子流行病学数据来验证。36 株 M 基因 CCoV-II型毒株之间氨基酸同源率为 96.9%–100.0%,该结果表明 CCoV-II型毒株在山东地区具有稳定遗传性,与遗传进化分析结果一致。本研究自腹泻犬中获得的 3 株 CCoV 毒株 S 基因之间氨基酸同源率为 97.2%–99.8%,遗传进化分析表明,与日本参考株 CCoV/fc1 呈现较近亲缘关

系,这与王静等^[24]报道的北京分离株 CCoV BJ02 株与日本该毒株位于一分支,有较近亲缘关系的结论一致。

4 结论

山东地区犬群中 CCoV 检测率较高,说明 CCoV 广泛流行,健康犬中主要流行毒株为 CCoV-I型,腹泻犬中主要流行毒株为 CCoV-IIa型。健康犬和腹泻犬中均存在 CCoV 的多重感染情况,首次发现 CCoV-I/CCoV-IIa/CCoV-IIb 三重感染。遗传进化分析表明,CCoV-I型和 CCoV-II型毒株均存在相对独立分支,预测可能会形成新的流行毒株。

参考文献

- [1] 扈荣良. 现代动物病毒学. 北京: 中国农业出版社, 2014.
- [2] Jeoung SY, Ann SY, Kim HT, Kim D. M gene analysis of canine coronavirus strains detected in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 2014, 15(4): 495–502.
- [3] Pratelli A, Elia G, Martella V, Tinelli A, Decaro N, Marsilio F, Buonavoglia D, Tempesta M, Buonavoglia C. M gene evolution of canine coronavirus in naturally infected dogs. *The Veterinary Record*, 2002, 151(25): 758–761.
- [4] Pratelli A, Decaro N, Tinelli A, Martella V, Elia G, Tempesta M, Cirone F, Buonavoglia C. Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in the fecal samples of dogs with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(4): 1797–1799.
- [5] Pratelli A, Martella V, Decaro N, Tinelli A, Camero M, Cirone F, Elia G, Cavalli A, Corrente M, Greco G, Buonavoglia D, Gentile M, Tempesta M, Buonavoglia C. Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhoea in Italy. *Journal of Virological Methods*, 2003, 110(1): 9–17.
- [6] Pratelli A, Elia G, Decaro N, Tola S, Tinelli A, Martella V, Rocca S, Tempesta M, Buonavoglia C. Cloning and expression of two fragments of the S gene of canine coronavirus type I. *Journal of Virological Methods*, 2004, 117(1): 61–65.
- [7] Terada Y, Matsui N, Noguchi K, Kuwata R, Shimoda H, Soma T, Mochizuki M, Maeda K. Emergence of

- pathogenic coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106534.
- [8] Decaro N, Martella V, Elia G, Campolo M, Desario C, Cirone F, Tempesta M, Buonavoglia C. Molecular characterisation of the virulent canine coronavirus CB/05 strain. *Virus Research*, 2007, 125(1): 54–60.
- [9] Zicola A, Jolly S, Mathijs E, Ziant D, Decaro N, Mari V, Thiry E. Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium. *The Journal of Small Animal Practice*, 2012, 53(5): 297–300.
- [10] Decaro N, Cordonnier N, Demeter Z, Egberink H, Elia G, Grellet A, Le Poder S, Mari V, Martella V, Ntafis V, von Reitzenstein M, Rottier PJ, Rusvai M, Shields S, Xylouri E, Xu Z, Buonavoglia C. European surveillance for pantropic canine coronavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(1): 83–88.
- [11] Pinto LD, Barros IN, Budaszewski RF, Weber MN, Mata H, Antunes JR, Boabaid FM, Wouters ATB, Driemeier D, Brandão PE, Canal CW. Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil. *The Veterinary Journal*, 2014, 202(3): 659–662.
- [12] Erles K, Brownlie J. Sequence analysis of divergent canine coronavirus strains present in a UK dog population. *Virus Research*, 2009, 141(1): 21–25.
- [13] Ntafis V, Mari V, Decaro N, Papanastassopoulou M, Pardali D, Rallis TS, Kanellos T, Buonavoglia C, Xylouri E. Canine coronavirus, Greece. Molecular analysis and genetic diversity characterization. *Infection, Genetics and Evolution*, 2013, 16: 129–136.
- [14] 王玉燕, 陆承平. 犬冠状病毒南京株 M 基因的同源重组分析. *中国病毒学*, 2005, 20(3): 262–267.
Wang YY, Lu CP. Recombination analysis of M protein of a canine coronavirus wild strain isolated from Nanjing city. *Virologica Sinica*, 2005, 20(3): 262–267. (in Chinese)
- [15] 王玉燕. 犬冠状病毒的流行病学调查及地方株的特性研究. 南京农业大学博士学位论文, 2005.
- [16] 徐汉坤, 金淮, 郭宝发. 一起由犬冠状病毒和犬细小病毒引起的犬传染性肠炎. *家畜传染病*, 1985, 7(1): 55, 51.
Xu HK, Jin H, Guo BF. An infectious enteritis caused by canine coronavirus and canine parvovirus. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 1985, 7(1): 55, 51. (in Chinese)
- [17] 王欣宇, 孙东波. 黑龙江地区犬冠状病毒I型和IIa/b亚型的流行及遗传进化分析. 中国畜牧兽医学会生物技术学分会暨中国免疫学会兽医免疫分会第十二次学术研讨会. 昆明, 2016.
Wang XY, Sun DB. Epidemiological and genetic evolution analysis of canine coronavirus typelandIIa/b subtypes in Heilongjiang Province. The 12th Symposium of Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, Biotechnology Branch and Chinese Society of Immunology, Veterinary Immunology Branch. Kunming, 2016. (in Chinese)
- [18] 孙秋艳, 李舫, 蔡国栋. 山东省部分地区宠物犬冠状病毒病的流行病学调查. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(11): 874–878.
Sun QY, Li F, Cai GD. Epidemiological investigation of canine coronavirus disease in some regions of Shandong Province. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(11): 874–878. (in Chinese)
- [19] Van Nguyen D, Terada Y, Minami S, Yonemitsu K, Nagata N, Le TDH, Kuwata R, Shimoda H, Maeda K. Characterization of canine coronavirus spread among domestic dogs in Vietnam. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79(2): 343–349.
- [20] Moutinho Costa E, Xavier De Castro T, De Oliveira Bottino F, De Cássia Nasser Cubel Garcia R. Molecular characterization of canine coronavirus strains circulating in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 2014, 168(1): 8–15.
- [21] Cavalli A, Desario C, Kusi I, Mari V, Lorusso E, Cirone F, Kumbe I, Colaianni ML, Buonavoglia D, Decaro N. Detection and genetic characterization of canine parvovirus and canine coronavirus strains circulating in district of Tirana in Albania. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 2014, 26(4): 563–566
- [22] Decaro N, Martella V, Ricci D, Elia G, Desario C, Campolo M, Cavaliere N, di Trani L, Tempesta M, Buonavoglia C. Genotype-specific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs. *Journal of Virological Methods*, 2005, 130(1/2): 72–78.
- [23] Licitra BN, Whittaker GR, Dubovi EJ, Duhamel GE. Genotypic characterization of canine coronaviruses associated with fatal canine neonatal enteritis in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(12): 4230–4238.
- [24] 王静, 秦彤, 由欣月, 刘畅, 史利军, 梁琳, 李金祥, 崔尚金. 北京地区犬冠状病毒的分离鉴定及遗传进化分析. *中国兽医科学*, 2019, 49(1): 92–98.
Wang J, Qin T, You XY, Liu C, Shi LJ, Liang L, Li JX, Cui SJ. Isolation and identification of canine coronavirus and phylogenetic analysis of the isolate. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(1): 92–98. (in Chinese)