

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.09.04

犬细小病毒 2c 亚型毒株的分离与鉴定

邓 永,孔冬妮,侯力丹,毛娅卿*,王 嘉*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2019-04-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 09-0019-08 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 采集一疑似犬细小病毒(CPV)患犬的粪便,用纳米 PCR 方法对病料进行 CPV 检测,并应用猫肾细胞 F81 进行病毒分离培养,采用免疫过氧化物酶单层细胞染色法(IPMA)检测病毒在 F81 细胞中的增殖动态。利用 PCR 扩增分离病毒的 VP2 基因,测序结果用 DNAMAN 软件对获得的 VP2 基因序列进行拼接,并与 NCBI 上已经公布的犬细小病毒的全基因组序列以及相关蛋白的核酸序列进行比较,确定其所分离的病毒株型并推导氨基酸序列。结果表明,纳米 PCR 检测结果为 CPV 核酸阳性,病料接种到 F81 细胞培养后出现明显细胞病变(CPE),血清学鉴定为 CPV 抗原阳性,序列测定分析表明,该毒株 VP2 基因开放阅读框(ORF)为 1755 bp。进化分析显示,该毒株属于 CPV-2c 型,并命名为 CPV-2c-Guangxi23。

[关键词] 犬细小病毒;分离与鉴定;免疫过氧化物酶单层细胞染色法

Isolation and Identification of Canine Parvovirus 2C Subtype

DENG Yong, KONG Dong-ni, HOU Li-dan, MAO Ya-qing*, WANG Jia*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: The faeces samples which were collected from a dog suspected infected by canine parvovirus (CPV) were detected by nano polymerase chain reaction (PCR). Then the samples were inoculated into F81 cells to isolate CPV. The proliferation of the virus in F81 cells was detected by immunoperoxidase monolayer cell staining (IPMA). The VP2 gene of the virus was amplified by PCR and sequenced by DNAMAN software. Compared with the whole genome sequence and the nucleic acid sequence of related proteins of parvovirus published on NCBI, the strain of the virus was identified and the amino acid sequence of the strain was deduced. The results showed that the virus was positive for CPV nucleic acid. After the virus was inoculated into F81 cells, obvious cytopathic changes (CPE) were observed. Serological identification showed that the virus was positive for CPV antigen. Sequence analysis showed that the open reading frame (ORF) of VP2 gene of the strain was 1755 bp. Evolutionary analysis showed that the strain belonged to CPV-2c type and was named CPV-2c-Guangxi23.

Key words: canine parvovirus; isolation; identification immunoperoxidase monolayer assay

作者简介: 邓 永,助理研究员,从事兽用病毒类生物制品检验与相关研究工作。

通讯作者: 毛娅卿, E-mail: wepmyq@163.com; 王 嘉, E-mail: 44613623@qq.com

犬细小病毒病是由犬细小病毒 (Canineparvo-virus, CPV) 引起的一种高度接触性、烈性传染病^[1]。该病在临床上以剧烈呕吐、出血性肠炎及白细胞显著减少为主要特征,分为出血性胃肠炎和急性心肌炎两种类型^[2]。前者主要侵害犬的肠上皮隐窝细胞,引起犬剧烈呕吐及血样下痢;后者主要侵害犬心肌细胞,引起犬心率紊乱,突然死亡^[3-4]。该病在世界范围内流行,是危害犬健康最严重的疾病之一,给养犬业带来了巨大的经济损失。随着我国经济的发展,养犬的人数越来越多,犬细小病毒对犬的危害非常严重^[5-7]。本实验采集了纳米 PCR 检测为阳性疑似感染犬细小病毒病犬的粪便,并在 F81 细胞上增殖培养,将分离的病毒通过纳米 PCR 试验检测、血凝试验、免疫过氧化物酶单层细胞染色 (IPMA) 试验和基因测序分析,确定其株型^[8-10],为监测 CPV 的变异状况和流行趋势提供依据,对其进行持续监测将是否为是否需要更新当前可用的疫苗和检测方法提供依据。

1 材料

1.1 细胞、病料和载体 猫肾细胞 (F81) 由中国兽医药品监察所病毒制品检测实验室保存;病料采集于广西大学动物医院临床粪便;pMD-18T 克隆载体 (批号 K8201AB) 购自于 TaKaRa 公司。

1.2 主要试剂 DMEM 培养液 (批号 8118126) 购自 GIBCO 公司、MEM 培养液 (批号 AC10447375) 购自 Hyclone 公司、胎牛血清 (批号 ST170802) 购自 PAN SERATECH;注射用青霉素钠 (批号 180508) 购自山东鲁抗公司、注射用硫酸链霉素 (批号 20180201) 购自华北制药公司;DL2000 DNA Marker (批号 746087AH) 购自博迈德公司 and Pluss Marker (批号 AHF1915A) 购自 TaKaRa 公司、Taq DNA 聚合酶 (批号 745661AH) 购自博迈德公司;DNA 提取试剂盒 (批号 03718KC5) 购自 AXYGEn 公司;胶回收试剂盒 (批号 R6620) 购自 AXYGEn 公司;纳米 PCR 试剂盒 (批号 NPK01) 购自山东大正生物有限公司;质粒提取试剂盒 (批号 Q6020) 购自

TIANGEN 公司。

1.3 主要仪器 CO₂ 培养箱 (THERMO 公司)、荧光显微镜 (OLYMPUS 公司)、PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司)、小型高速冷冻离心机 (HIMAC 公司)、高速冷冻离心机 (PROTEINSIPMLE 公司)、紫外凝胶成像系统 (TANON2500) (上海天能科技有限公司)、电子天平 (METTLER TOLEDO PL203-IC)、低温台式高速离心机 (Biofugo primo R) (美国 THERMO 公司)、Milli-Q 纯水仪 (美国 MILLIPORE 公司)、移液枪 (美国 EPPENDORF 公司)、96 孔 V 型血凝板、微型血凝振荡 (上海生物工程公司)、普通光学显微镜 (OLYMPUS 公司) 等。

2 方法

2.1 临床样品处理 采用纳米 PCR 检测为阳性疑似感染犬细小病毒的粪便作为样品,将粪便放入 EP 管中,用 PBS 将其重悬,并加入 1% 青、链霉素。15000 r/min 离心 15 min,将上清用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后作为分离病毒样品,-80 ℃ 保存。

2.2 病毒的分离与增殖 将病料用适量 PBS 重悬,然后 15000 r/min 离心 15 min,用移液器吸取上清,用 0.22 μm 滤器无菌过滤,同步接种于新消化的 F81 细胞中,加入含 5% FBS (胎牛血清) 的 DMEM 细胞培养液,加入 1% 青、链霉素双抗,然后放入 37 ℃,5% CO₂ 细胞培养箱进行培养,同时设正常细胞对照。每天观察细胞生长情况和细胞病变 (CPE) 情况。盲传 3 代无 CPE 则弃去,产生 CPE 的细胞再连续传 3 代,当出现 90% 的 CPE 时,收获病毒。

2.3 样品 PCR 的测定

2.3.1 引物设计及合成 参照 GenBank 中发表的 CPV-2 (登录号:AB054222) 基因组序列的分析,应用 Primer 6.0 软件设计扩增 CPV VP2 基因的全长序列引物,经过 VP2 基因全长序列比对后筛选出保守区域并设计能扩增出 574 bp 目的条带的引物^[11-12]。引物由华大基因公司合成 (表 1)。

表 1 CPV VP2 基因保守序列 PCR 扩增引物

Tab 1 The primers of CPV VP2 gene conservative sequence PCR amplification

引物名称	序列(5' -3')	产物大小
VP2 - F	TGATGGAGCAGTTCACACAGA	574bp
VP2 - R	TCAGATCTCATAGCTGCTGGA	

2.3.2 样品 DNA 提取 样品及病毒分离后细胞培养物 DNA 的提取使用 AXYGEN 公司的 DNA 提取试剂盒进行,具体操作按照使用说明书进行。

2.3.3 PCR 的扩增 以提取的 DNA 为模板,应用引物 VP2 - F 和 VP2 - R 来扩增目的片段,大小为 574 bp,用已经优化好条件的纳米 PCR 进行扩增,将 PCR 产物 5 μ L 与 6 $\times$ Loading buffer 加样缓冲液混匀,在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,电压为 120 V,30 min 后,于凝胶成像系统内观察结果,并照相。

2.3.4 血凝实验 按常规微量 HA 操作方法在 96 孔“V”型微量板上进行。将待检病毒液于 96 孔微量血凝板中倍比稀释后加入等量 1% 猪红细胞悬液,4 $^{\circ}$ C 静置 1 h 后判定结果。

2.3.5 免疫过氧化物酶单层细胞染色法(IPMA) 鉴定 取 1 mL 经过离心的病料上清,经过 0.22 μ L 滤器同步接种于 F81 细胞,加入足量的含 5% 胎牛血清的 MEM,于 5% CO₂,37 $^{\circ}$ C 培养 48 h,用 PBS (200 μ L/孔)洗 3 次,电吹风吹干,直到孔边缘出现白色圈为宜。每孔加入 100 μ L 33% 丙酮 - PBS,室温放置 30 min。弃固定液,用电吹风吹干。进行 IPMA 试验,具体操作步骤如下:每孔加入 200 μ L 洗涤液,置室温漂洗一次,轻轻甩出洗液,吸水纸上轻叩。用样品稀释液将待检样品、阴性血清对照品和阳性血清对照品作 1:100 倍稀释。取上述稀释血清样品分别加入到对应孔,每孔 100 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 1 h。再次洗板后,每孔加入 100 μ L 稀释的 HRP - SPA 辣根过氧化物酶标记的二抗,将反应板放入盒中,于 37 $^{\circ}$ C 温箱中放置 30 min。再次洗板。每孔加入 100 μ L 底物显色液,避光,于

37 $^{\circ}$ C 温箱中反应 15 min。弃去反应液,每孔加入 200 μ L 蒸馏水洗板一次,每孔加入 100 μ L ddH₂O 观察结果。在显微镜下观察各孔显色情况,进行样品结果判定。在 CPV 阳性血清下,若有病毒感染的细胞染色后细胞质内或细胞核周围呈棕红色判定为阳性,若无病毒感染细胞核无着色反应判定为阴性。

2.3.6 VP2 基因 PCR 扩增与序列分析 在 NCBI 网站上下载几个 CPV 的 VP2 序列,使用 DNAMAN 软件进行比对。根据比对结果,选择 CPV 的 VP2 基因的保守区域使用 Primer6.0 软件设计一对覆盖犬细小病毒 VP2 基因全长的引物 P1、P2(表 2),通过 PCR 扩增获得 VP2 全长基因(表 3)。所使用的引物为上海生工生物公司合成,扩增片段长度为 1755 bp。按文献^[13]方法提取待检样品、阴性对照与标准 CPV 的 DNA,进行 PCR 扩增和琼脂糖电泳凝胶观察。用 AXYGEN 公司的凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。将回收的目的基因片段与 pMD18 - T 载体 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化 *E. coli* JM109,经酶切鉴定和质粒 PCR 鉴定后,将阳性克隆送上海生工生物公司测序。

表 2 CPV VP2 全长基因 PCR 扩增引物

Tab 2 The primers of CPV VP2 gene PCR amplification

引物名称	序列(5' -3')	产物大小
VP2 - P1	CGGGATCCATGAGTGATGGAGCAGTTCAA	1755bp
VP2 - P2	GGAATTCTTAGTATAATTTTCTAGGTGCTAGTT	

表 3 PCR 扩增参数

Tab 3 PCR amplification parameters

病原	PCR 反应体系	PCR 反应程序
CPV	Pfu 高保真酶 1 μ L、引物 P1、P2 各 1 μ L、2.5 mmol/L dNTP 5 μ L、5 $\times$ PCR buffer 10 μ L、模板 2 μ L、ddH ₂ O 30 μ L	98 $^{\circ}$ C 5 min;98 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min

2.3.7 序列测定及分析 将鉴定后的阳性菌液送去测序,测序结果用 DNAMAN 软件对获得的 VP2 基

因序列进行拼接,并与 NCBI 上已经公布的犬细小病毒的全基因组序列以及相关蛋白的核酸序列进行比较,确定其所分离的病毒株型并推导氨基酸序列。

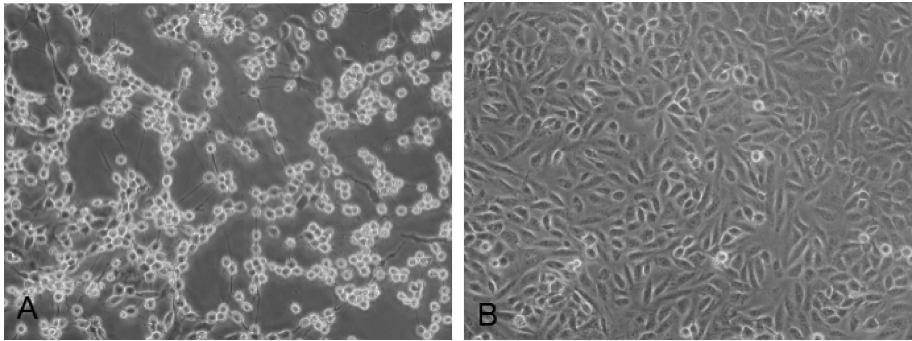
3 结果与分析

3.1 病毒在 F81 细胞上的分离与增殖结果 病料上清接种于 F81 细胞后培养 5 d,接种的细胞明显出现拉长,变圆,脱落状态,呈现明显的 CPE,未接种的细胞状态正常(图 1)。反复冻融并继续传代,仍然出现同样的 CPE,将出现 CPE 的样品命名为

CPV – Guangxi23。

3.2 目的基因的扩增结果 将 PCR 扩增的目的基因以 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示在 574 bp 处可见目的条带,与预期结果相符合,表明成功扩增出 VP2 保守序列(图 2)。

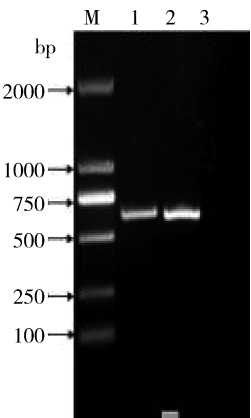
3.3 红细胞血凝检测结果 采用微量血凝试验检测分离上清对猪红细胞的凝集作用,结果显示病毒在 4 ℃ 条件下能够凝集猪红细胞,与已知 CPV 血凝谱相符(图 3)。该上清液血凝效价可达 2¹⁴。



A: CPV 感染的 F81 细胞;B: 正常细胞
A: F81 cells infected with CPV (×100);B: control F81 cells (×100)

图 1 感染 CPV 的 F81 细胞和健康 F81 细胞

Fig 1 Healthy F81 cell and F81 cell infected with CPV



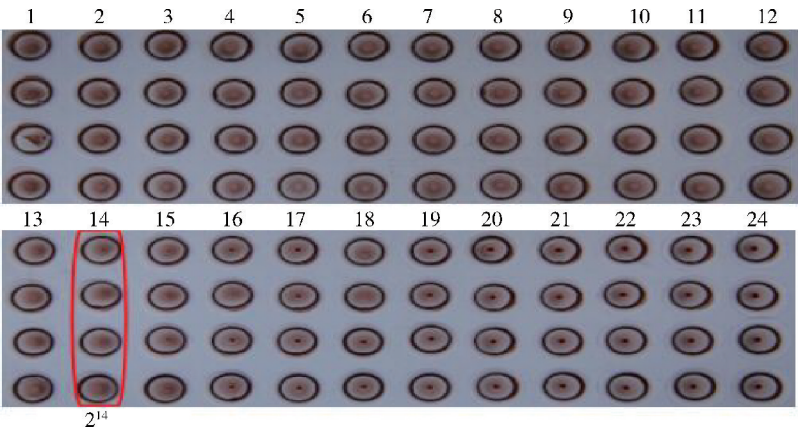
M;DL2000 DNA Marker;1、2:样品 PCR 产物;3:阴性对照
M;DL2000 DNA Marker;1、2:PCR production of sample;
3: Negative control

图 2 CPV – VP2 基因保守序列的 PCR 产物

Fig 2 PCR production of CPV – VP2 gene conservative sequence from samples

3.4 免疫过氧化物酶单层细胞染色法 (IPMA) 鉴定结果 将病毒液同步接种 F81 细胞培养 48 h 后用 33% 丙酮固定,然后用 CPV 阳性血清和阴性血清,按 1:100 稀释,按照 IPMA 操作方法进行,结果显示接种病毒 F81 细胞能与阳性血清反应,细胞核周围呈棕红色染色;接种病毒 F81 细胞不能与阴性血清反应,呈现细胞正常颜色,未接种病毒的 F81 细胞也不能与阳性血清反应,呈现正常细胞颜色,结果与预期相符(图 4)。

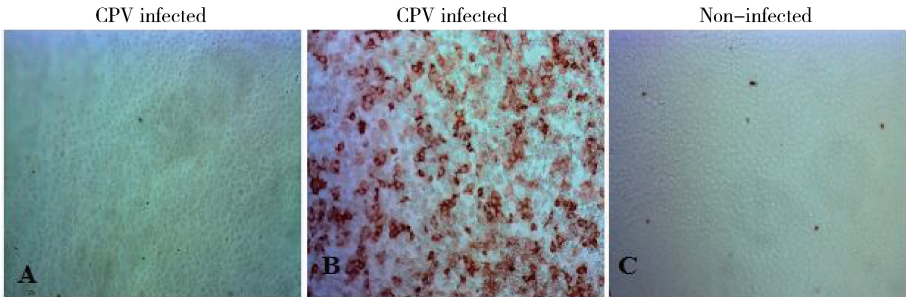
3.5 测序结果 图 5 显示,Guangxi23 样品细小病毒序列中编码 VP2 蛋白 426 位氨基酸的密码子为 GAA,编码 Glu,表明这份样品中的细小病毒为 CPV – 2c 型,命名为 CPV – 2c – Guangxi23。



1 - 23 列:病毒液依次按 2 倍比稀释;24 列:红细胞对照
Line1 - 23: serial two - fold dilutions of the virus; Line24: RBC control

图 3 病毒血凝特性检测结果

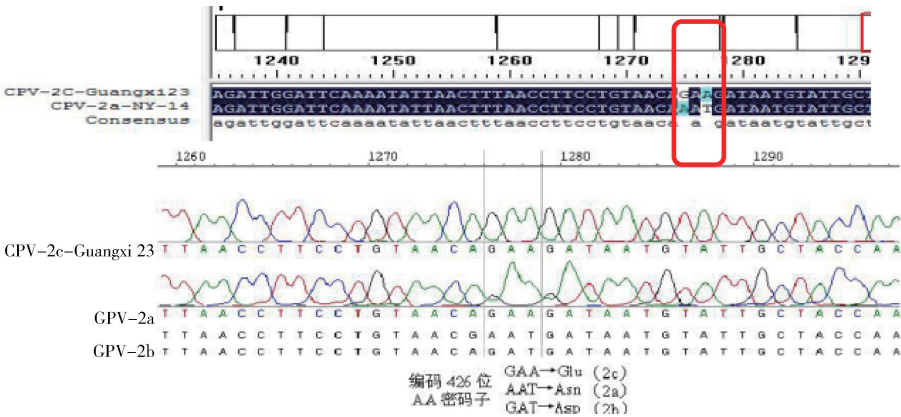
Fig 3 The result of hemagglutination



A: 阴性血清;B: 阳性血清;C: 阳性血清 A: Rabbit negative serum;B: Rabbit positive serum;C: positive serum

图 4 F81 细胞接种 CPV 病毒 48 h 后 IPMA 结果 (× 100)

Fig 4 IPMA results detected 48 h after inoculation of CPV in F81 cells (× 100) using different sera



CPV - Guangxi23 编码 426 位氨基酸的密码子为 GAA,而 CPV - 2a 编码 426 位氨基酸的密码子为 AAT,
CPV - 2b 编码 426 位氨基酸的密码子为 GAT

The codon for AA at position 426 of VP2 of CPV - Guangxi23 is GAA, while AAT for CPV - 2a and GAT for CPV - 2b

图 5 CPV - Guangxi23 样品测序彩图

Fig 5 The sequencing result of CPV - Guangxi23

3.6 序列分析 使用 DNAMAN 软件进行分析对比,结果显示 Guangxi23 样品与 CPV - 2c 型同源性都在 99% 以上。从所测的 VP2 基因氨基酸序列推导序列变异位点,CPV - Guangxi23 在 VP2 蛋白 426

位氨基酸为 Glu,蛋白序列比对结果表明细小病毒为 CPV - 2c 型,并存在 267(F)→267(Y)、324(Y)→324(I) 2 个位点突变,如表 4 所示。

表 4 CPV - Guangxi23 VP2 与参考株 VP2 蛋白序列关键位点氨基酸比较

Tab 4 The comparison of the amino acids at critical sites within VP2 protein of CPV - Guangxi23 and the reference strains. Accession number of reference

毒株	基因型	氨基酸序列中的位置								
		87	101	267	297	300	305	324	375	426
CPV - b	CPV - 2	M	I	F	S	A	D	Y	N	N
CPV - GZ	CPV - 2a	L	T	F	A	G	Y	Y	D	N
CPV - 431	CPV - 2b	L	T	F	A	G	Y	Y	D	D
CPV - M52	CPV - 2c	L	T	F	A	G	Y	Y	D	E
CPV - 2c - Guangxi23		L	T	Y	A	G	Y	I	D	E

* strains: CPV - b (M38245), CPV - GZ(JX120178), CPV - 431(AY742951), CPV - M52 (KC196087)

4 讨论与结论

本研究从疑似犬细小病毒感染的犬粪便中分离出一株病毒,后经细胞培养、病毒形态学鉴定、血凝试验、免疫过氧化物酶单层细胞染色法以及纳米 PCR 扩增试验和 VP2 基因分析等多种方法鉴定^[14],确定分离的病毒为犬细小病毒,该毒株属 CPV - 2c 型,并命名为 CPV - 2c - Guangxi23。

为了区别于 1967 年由 Binn 等人从健康犬粪便中分离到的犬极细小病毒 (Minute virus of canine,MVC) (习惯上被叫做 CPV - 1) 而将后来发现的病毒命名为犬细小病毒 2 型 (CPV - 2)^[16]。迄今为止,CPV 只有一个抗原型,即 CPV - 2,但不同毒株间抗原性有所差异,已出现了多个亚型,即 CPV - 2a、CPV - 2b、CPV - 2c (a) 和 CPV - 2c (b)。CPV - 2 型出现后很快在世界广泛传播,该病毒可能由猫的白血病病毒变异而来,通过野生的犬科动物如貂和狐狸,适应了新的宿主犬,连续传播几年后,CPV 已经发生抗原漂移,在抗原性、宿主

范围和血凝性上都发生了变化,Mara B 等研究证实 CPV - 2 与 RNA 病毒相似,表现有高的遗传异质性。Parrish 等报道,1978 - 1980 年分离的毒株是 CPV - 2 型,1980 年后分离的毒株又是另一个型,Parrish 等提出将新的毒株命名为 CPV - 2a,以表明是 CPV - 2 的亚型,能感染犬和猫。很快,最初的 CPV - 2 被 CPV - 2a 完全替代。较 CPV - 2 而言,CPV - 2a 在 VP2 外膜蛋白上有 5 个氨基酸的改变,已证明这些氨基酸代表了抗原和宿主范围的病毒特性。1984 年,出现了另一种新的抗原变异株,命名为 CPV - 2b,一般和 CPV - 2a 混合感染,两者不同之处在 CPV - 2b 衣壳的主要抗原位点有 1 个氨基酸 (Asn426Asp) 替换。随后应用单克隆抗体发现,Asn/Asp426 Glu 替代引起抗原的改变。因此,有的研究者将 Glu - 426 变异株作为一个新的型,命名为 CPV - 2c^[15]。

研究表明 VP2 基因是 CPV 的特异性基因,为其最主要的毒力基因,也是 CPV 最易变异的集中

区段,尤其是 CPV 基因型分型依据就是位于 VP2 蛋白的第 426aa。为进一步验证该分离株,本实验又对该病毒株的 VP2 基因进行了克隆和分析。结果显示从病料样品和细胞培养物中均能够扩增出大小约为 1755bp 的基因片段,测序后进行同源性比较显示该基因与 CPV VP2 的同源性可达 99% 以上,从分子水平上证明了该分离株为 CPV。进一步对 VP2 基因对应的氨基酸序列分析表明,该病毒株 426aa 为 Glu,符合 CPV-2c 型的特征^[17],而且该病毒株在一些其他位点也发生了变异,在 267 (F)→267 (Y)、324 (Y)→324 (I) 2 个位点发生突变,从而可能会影响该分离株的感染谱或毒力。

犬细小病毒随时在变异,可能再经过几年,又会有新的病毒株型出现。我国主要以 CPV-2a 株流行^[18],在 2010 年之前,国内没有 CPV-2c 出现,最近几年开始陆续报道我国有 CPV-2c 的出现,这说明犬细小病毒的传播速度很快,具有跨区域传播的能力。本研究从犬的粪便中,成功分离到一株 CPV-2c 型病毒,在 VP2 蛋白 426 位氨基酸为 Glu,血凝价为 2^{14} ,病毒的增殖能力较强,病毒液中所含病毒的量较高,氨基酸推导序列分析发现存在 267 (F)→267 (Y)、324 (Y)→324 (I) 2 个位点突变,说明细小病毒在不断进化,应随时监测犬细小病毒变异情况,如若出现新的株型,就可以快速更新疫苗,从而对犬起到保护作用。

参考文献:

- [1] Parker J, Murphy M, Hueffer K, *et al.* Investigation of a canine parvovirus outbreak using next generation sequencing [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1):9633.
- [2] 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]. 2 Edition. Beijing: Science Press, 1997: 750-751.
- [3] 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]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2011, 42 (10): 1402-1408.
- [4] 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.
- [5] 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 a new canine parvovirus type 2b isolate [J]. *China Veterinary Journal*, 2016, 36 (5): 734-738.
- [6] Rhonde 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.
- [7] 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.
- [8] 唐井玉,李传峰,戚伟强,等. 犬细小病毒 SH14 株的分离鉴定及其 VP2 基因的序列分析[J]. 中国兽医科学,2015 (11): 1153-1158.
Tang J Y, Li C F, Qi W Q, *et al.* Isolation and identification of canine parvovirus SH14 strain and sequence analysis of VP2 gene [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015 (11): 1153-1158.
- [9] 张传鹏,张航,高全新,等. 犬细小病毒 SH15 株的分离鉴定与全基因组分析[J]. 中国兽医科学,2017 (2):165-171.
Zhang C P, Zhang H, Gao Q X, *et al.* Isolation and identification of canine parvovirus SH15 strain and genome-wide analysis [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017 (2): 165-171.
- [10] 于永乐,王吉贵,郝冀,等. 犬细小病毒北京分离株的鉴定及其全基因组序列分析[J]. 中国兽医学报,2017 (6): 1023-1029.
Yu Y L, Wang J G, Li J, *et al.* Identification and genome sequencing of canine parvovirus Beijing isolate [J]. *Chinese Veterinary Journal*, 2017 (6): 1023-1029.
- [11] Raj J M, Mukhopadhyay H K, Thanissar J, *et al.* Isolation molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2010, 10 (8): 1237-1241.
- [12] Decaro N, Martella V, Desario C, *et al.* First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain [J]. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases*

- and Veterinary Public Health, 2006, 53(10): 468–472.
- [13] Figueiredo D Miranda C, Souto R, *et al.* Genetic characterization of canine parvovirus type 2 subtypes in Maputo, Mozambique [J]. Archives of Microbiology, 2016, 199(4): 543–549.
- [14] Mira F, Purpari G, Lorusso E, *et al.* Introduction of Asian canine parvovirus in Europe through dog importation [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(1): 16–21.
- [15] 王 俊,舒 龙,郭慧琛,等. 犬细小病毒兰州分离株 VP2 基因的克隆及进化树分析[J]. 中国兽医科学,2012(8): 14–18.
Wang J, Shu L, Guo H C, *et al.* Cloning and phylogenetic tree analysis of VP2 gene of canine parvovirus Lanzhou isolate [J]. Chinese Veterinary Science, 2012(8):14–18.
- [16] 姜燕霞,张淑玲,王金良,等. 犬细小病毒 JN 株的分离鉴定及 VP2 基因序列分析 [J] 动物医学进展,2013(5):83–86.
Jiang Y X, Zhang S L, Wang Jinliang, *et al.* Isolation and identification of canine parvovirus JN strain and analysis of VP2 gene sequence [J]. Progress in animal medicine, 2013(5): 83–86.
- [17] 易 立,程世鹏,闫喜军,等. 犬细小病毒 VP2 基因的遗传变异分析 [J]病毒学报, 2009(6):452–459.
Yi L, Cheng S P, Yan X J, *et al.* Analysis of genetic variation of canine parvovirus VP2 gene [J]. Journal of Virus, 2009(6): 452–459.
- [18] 任谓明,孙 铭,叶 明,等. 犬细小病毒敦化株的分离鉴定 [J] 中国兽医杂志,2017,(9):34–38.
Ren W M, Sun M, Ye M, *et al.* Isolation and identification of canine parvovirus Dunhua strain [J]. Chinese Veterinary Journal, 2017(9):34–38.

(编 辑:李文平)