

# 用套式 PCR 方法检出腹泻及健康犬粪中的犬冠状病毒 \*

王玉燕<sup>1</sup>, 陆承平<sup>1\*\*</sup>, 温 海<sup>1,2</sup>

(1. 南京农业大学 农业部动物疫病诊断及免疫重点实验室, 江苏南京 210095; 2. 公安部南京警犬研究所, 江苏南京 210012)

## Canine Coronavirus Detection in Feces from Diarrhea and Healthy Dogs by Nested-PCR

WANG Yu-yan<sup>1</sup>, LU Cheng-ping<sup>1\*\*</sup>, WEN Hai<sup>1,2</sup>

(1. Key Lab of Animal disease Diagnostic and Immunology Ministry of Agriculture, Nanjing Agric Univ, Nanjing 210095, China; 2. Nanjing Police Dogs Research Institute, Nanjing 210012, China)

**Abstract:** 112 faecal samples of dogs collected from August 2003 ~ January 2004 were tested for the presence of *Canine coronavirus* (CCV) using a nested-PCR with conserved primers for the M gene. 18 out of 43 diarrhea feces from dogs housed singly of Nanjing city were CCV positively, and the CCV detectable rate were positively correlated with seasons, it was higher in winter than that of in summer and autumn. 58 out of 69 feces from healthy dogs trained in groups were positive for CCV, and the positive ratio of samples of dog schools from Shenyang (34/39) was higher than that of from Nanjing (24/30). Sequence analysis of 4 CCV M gene fragments, two from positive diarrhea samples of Nanjing and two from healthy samples of Shenyang, showed the presence of the CCVs with high similarity (94.8% ~ 96.7%) to the CCV of giant panda from China in the GenBank. All the CCVs detected in this survey were type confirmed by a PCR gene typing.

**Key words:** Canine coronavirus; type CCV; nested-PCR.

**摘要:** 自 2003 年夏至 2004 年初的 8 个月内收集犬粪样 112 份, 其中南京地区家庭单养的腹泻犬粪便 43 份, 某养犬场群养健康犬粪便 30 份, 沈阳地区某养犬基地群养健康犬粪便 39 份, 用套式 PCR 方法检测犬冠状病毒 (CCV)。结果显示, 南京家庭单养腹泻犬 CCV 阳性率为 40.9% (18/43), CCV 检出率与季节相关, 冬季的检出率较高。健康犬阳性率为 84.1% (58/69), 其中沈阳某场健康犬 CCV 的感染率 (87.2%) 高于南京某犬场 (80.0%)。取南京腹泻犬和沈阳健康犬阳性样本各 2 份测序, 结果表明, 4 个样本 M 基因 212bp 的序列与 GenBank 登录的中国大熊猫源的 CCV 同源性最高 (94.8 ~ 96.7%), 并且南京和沈阳 CCV 毒株之间存在一定序列差异。所有阳性样本用 CCV 基因型鉴别 PCR 鉴定, 均为 CCV 型。

**关键词:** 犬冠状病毒; 型 CCV; 套式 PCR

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)01-0041-05

犬冠状病毒 (*Canine coronavirus*, CCoV) 是引起犬急性胃肠炎的重要病原, CCoV 与猪传染性胃肠炎病毒 (*Transmissible gastroenteritis Virus*, TGEV)、猫的冠状病毒 (*Feline Coronaviruses*, FCoV)、人冠状病毒 (*Human Coronavirus 229E*, HCoV 229E) 等同属于冠状病毒第 I 群<sup>[1]</sup>。冠状病毒基因组 RNA 在复制时采用独特的套式转录, 基因组的错配率和重组率都很高, 从而导致冠状病毒

的变异株多<sup>[2]</sup>。不同动物来源的冠状病毒之间也可发生同源重组<sup>[3]</sup>。在 2003 年引起世界恐慌的 SARS CoV, 很可能就是不同宿主来源冠状病毒重组的结果<sup>[4]</sup>。CCV 不仅不断有新的变异株发现, 而且有较广的宿主范围<sup>[5-7]</sup>。Erles<sup>[8]</sup> 等最近报道, 证实冠状病毒也是犬传染性呼吸道综合征 (*Canine infectious respiratory syndrome diseases*, CIRDS) 的重要病原, 其 S 基因与 HCoV-OC43 和牛冠状病毒

收稿日期: 2004-07-22, 修回日期: 2004-09-21

\* 基金项目: 上海科技兴农重点攻关项目 (农科攻字 (2003) 第 D-1 号); "江苏省高等学校研究生创新计划" 资助项目。

作者简介: 王玉燕 (1976-), 女, 山东籍, 博士生, 研究方向为兽医病毒学。

\*\* 通讯作者: 陆承平 (1945-), 男, 上海籍, 教授, 兽医微生物学与免疫学。Corresponding author. Tel: 025-84396517, E-mail: lucp@njau.edu.cn

(BCoV)同源性最高,可能来源于 OC43 或 BCoV。因此,对 CCV 的研究有潜在的公共卫生意义。

国内外的犬群中普遍存在 CCV 的感染,也时有检出 CCV 的报道。由于 CCV 没有血凝性,直接检测病毒困难,电镜观察和细胞培养分离病毒,操作繁琐且容易漏检。PCR 方法在病毒检测中具有较好的特异性和敏感性,但是如果样本中病原含量很少,仅仅一次 PCR 可能扩增不出足够检测的目的片段。另外,由于 PCR 的高度灵敏性,有时可能还会有假阳性结果出现。而套式 PCR 方法,先以一对引物扩增极微量的病原目的片段,然后再以一对更特异的引物,以第一次 PCR 的产物为模板,进行第二次扩增,能进一步提高 PCR 的敏感性和准确性,而且排除了第一次结果的非特异性。目前国内一些研究者也建立一些检测 CCV 的方法<sup>[9,10]</sup>,但尚未系统地对国内 CCV 的流行情况进行调查。本试验采用 Pratelli<sup>[11]</sup>等建立的套式 PCR 方法,对采集自南京、沈阳两地的 112 份腹泻和健康犬粪便进行检测和基因型分析,以调查 CCV 的流行情况及病毒的基因型,为研究 CoV 的演化研究提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及参考毒株

CCV-1-71 参考株及 A72 细胞(犬纤维肉瘤细胞系)均由德国吉森大学 Baljer 教授惠赠。细胞用含 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。

### 1.2 引物

参照文献<sup>[11]</sup>发表的 M 基因的套式引物序列合成下列引物(所有引物由上海皓嘉公司合成):

CCV1: 5'-TCC AGA TAT GTA ATG TTG GC-3'

CCV2: 5'-TCT GTT GAG TAA TCA CCA GCT-3'

CCV3: 5'-GGT GTC ACT CTA ACA TTG CTT-3'

CCV1a: 5'-GTG CTT CCT GAA GGT ACA-3'

套式 PCR: 第一轮 PCR 用引物 CCV1 和 CCV2,可扩增 409bp M 基因片段,第二轮 PCR,以 100 倍稀释的第一轮 PCR 产物为模板,用引物 CCV2 和 CCV3 可扩增的到 212bp 的产物。

CCV 分型 PCR: 以 100 倍稀释的第一轮 PCR 产物为模板,如果样本中有 I 型 CCV,用引物 CCV2 和 CCV1a 可扩增的到 239bp 目的片段。

### 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 3 次收获病毒,以此病毒液作为检测时的阳性对照。

待检犬粪便,用 pH7.4 0.01 mol/L 的 PBS 进行 5 倍稀释后,5000r/min 离心 20min,取上清保存于-20℃ 待检。

RNA 提取 取 200μL 粪便上清加 1mL Trizol (3-ZOL) (MDBio 公司产品)按说明书进行操作,提取 RNA。

cDNA 合成 RT 反应体系组成: RNA 模板 5μL, 5 × 反转录缓冲液 4μL, 10 mmol/L dNTPs 2μL, 下游引物 (30pmol/μL) 0.5μL, M-MLV (Promega 公司产品) RT 1μL, RNasin (华美生物公司产品) 0.5μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 20μL, 然后 42℃ 孵育 1h, 95℃ 5min。

### 1.4 PCR 反应体系建立及敏感性检测

用参考株 CCV 1-71 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:模板 DNA 5μL, 10 × PCR 缓冲液 2.5μL, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2μL, 10mM dNTPs 1μL, 引物各 0.5μL (30pmol/μL), TaqDNA 聚合酶 (5U/μL) 0.5μL, 用 ddH<sub>2</sub>O 调整终体积至 25μL。反应条件: 94℃ 30s、55℃ 30s、72℃ 1min, 扩增 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5min。

用以上的反应体系和条件检测含 1 TCID<sub>50</sub> ~ 1000 TCID<sub>50</sub> 的 CCV 1-71 细胞培养物,以确定该方法的敏感性。

### 1.5 犬粪样的采集和检测

2003 年 7 月至 2004 年 1 月在南京宠物门诊采集到腹泻病犬粪样 43 份,南京某养犬场群养健康犬粪样 30 份,沈阳某养犬基地群养健康犬粪样 39 份(参见表 1、表 2)。用以上建立的套式 PCR 方法进行检测。

### 1.6 测序分析

分别选取南京腹泻阳性样本 N14、N17 和沈阳阳性粪样 S1、S24 的第二轮 PCR 产物进行测序,测序结果与 GenBank 上发表的 CCV 序列进行比对,然后用 DNASTAR 进行同源性和系统进化分析。测序由上海中科开瑞公司完成。

## 2 结果

### 2.1 犬粪便中 CCV 的检测

通过敏感性检测,所采用的套式 PCR 方法可检出 1 × TCID<sub>50</sub> 的 CCV 1-71。第一轮 PCR 可得到大小为 409bp 的目的片段,第二轮 PCR 可得到 212bp 的目的片段(图 1)。

43 份腹泻犬的粪样中共检出阳性的 18 份,阳性率为 41.9% (18/43) (表 1, 图 2),不同季节的样

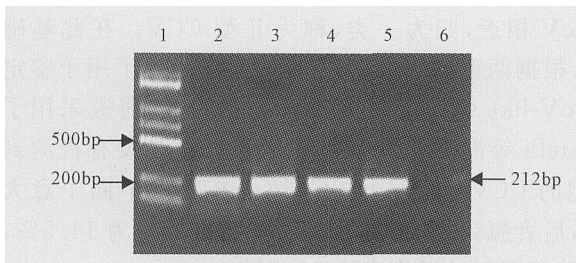


图1 A CCV 1-71 的套式 PCR

Fig. 1 Nested PCR of CCV 1-71

1, Products of the first PCR; 2, Products of the second PCR; 3, Marker.

本 CCV 的检出率之间有显著的差异 ( $P < 0.05$ ); 表明 CCV 的感染与季节相关, 冬季的检出率高于夏秋季; 不同症状之间的差异不显著; 不同年龄段的检出率差别很大, 但由于老龄犬样本较少没有进行统计学比较(表 2)。粪样取自二十几个犬品种(未列出), 每个品种的数量太少, 缺乏统计学意义, 因此未进行品种间的比较。健康犬粪样中, 南京的检出率为 80.0% (24/25); 沈阳为 87.2% (34/39) 地区之间差异不显著, 但与南京腹泻犬粪便中 CCV 检出率相比, 都有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 2 腹泻及健康犬粪样中 CCV 的检测结果

Tab. 2 The presence of CCV in feces of diarrhea and health dogs

Groups	Area	Sampling time	Age(month)	Samples	Positive amples (%)	State
	Nanjing	2003. 7 ~ 2004. 1	2 ~ 96	43	18(41.9)	
	Nanjing	2003. 12 ~ 2004. 1	2 ~ 6	30	24(80.0)	Diarrhea/ housed
	Shenyang	2003. 12 ~ 2004. 1	< 1	13	11(82.3)	Health/ grouped
			3 ~ 7	26	23(88.5)	Health/ grouped
Total				112	76(68.76)	

## 2.2 CCV 的基因型分析

所有粪样第一轮 PCR 产物均用 CCV2、CCV1a 进行检测, 结果全部为阴性, 没有检测到 I 型 CCV。

## 2.3 序列测定与分析

将 4 份第二轮 PCR 扩增的阳性片段测序后得到的序列与 GenBank 的 CCV 序列进行比对, 与之相符, 证明检测到确实是 CCV。采用 DNASTAR 软件, 将所得到的南京 CCV NJ14、CCV NJ17 及沈阳 CCV SY1、CCV SY24 样本 CCV 的序列均与 GenBank 上部分已知的 I 群冠状病毒进行比较分析。结果显示, 本试验得到的序列与来自中国大熊猫中的 CCV (A Y436635) 同源性最高, 在 94.8 ~ 96.7% 之间, 与 TGEV (AJ271965) 的同源性 (93.9 ~ 95.8%) 高于 FCV UCD1 (79.7 ~ 83.5%) 和 FCV 76-1683 (78.3 ~ 82.1) (图 3, 4)。此外, 南京和沈阳检出的 CCV 的 M 基因之间存在着轻度差异, 但在

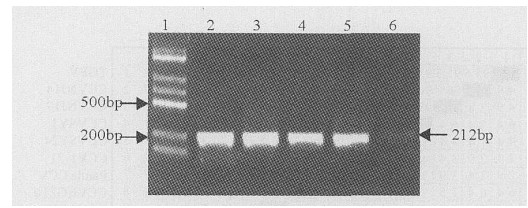


图 2 部分被检粪样的第二轮 PCR 产物

Fig. 2 The second products of the nested PCR for some samples. 1, Marker; 2, CCV 1-71; 3 ~ 6, Tested feces.

表 1 不同症状、年龄和采样时间腹泻犬粪样 CCV 的检测结果

Table 1 The presence of CCV in different symptom, age and sampling time feces

	Total no. of samples tested	No. of samples positive for CCV	Positive rate (%)
Symptom			
Diarrhea	29	12	41.4
Bloody stool	14	6	42.9
Total	43	18	41.9
Age (month)			
2 ~ 12	33	10	30.0
12 ~ 72	6	5	83.3
> 72	4	3	75.0
Total	43	18	41.9
Sampling time			
2003. 7 ~ 2003. 11	21	6	28.5
2003. 12 ~ 2004. 1	22	12	54.5
Total	43	18	41.9

进化树上都位于同一大的分枝上。(本研究得到的 CCV1-71、CCV NJ17、CCV S24 序列已经在 GenBank 上登录, 登录号分别为 A Y702646、A Y704917、A Y702644)

## 3 讨论

国内外的犬群中普遍存在 CCV 的感染。Tenant 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<sup>[12]</sup>。Pratelli 等指出, 意大利腹泻犬粪便中 CCV 阳性率为 42.8%<sup>[13]</sup>。日本学者对腹泻犬肛拭子的检查结果表明, CCV 带毒率为 55.4%<sup>[14]</sup>。国内也在 CCV 的流行病学方面做过工作, 本课题组的张伯强等 (1994)<sup>[15]</sup> 用 ELISA 法检测南京地区 CCV 的流行情况, 证明在南京犬群中有 CCV 的流行, 腹泻犬中 CCV 的感染有超过犬细小病毒的趋势。乔军等建立了基于 S 基因的

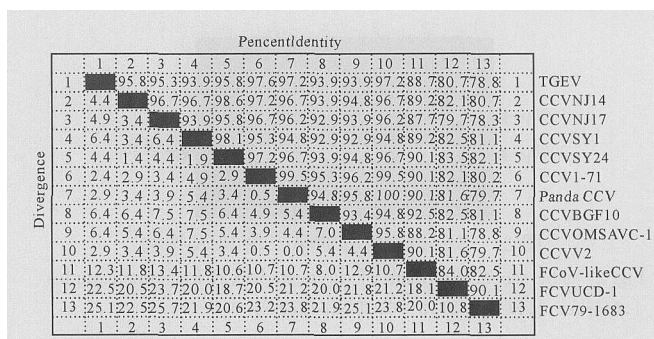


图 3 犬粪样中 CCV M 基因片段与已知 群冠状病毒的同源性比较

Fig. 3 Nucleotide identity and divergence of CCV M gene (212bp) from dog feces with some known group coronaviruses

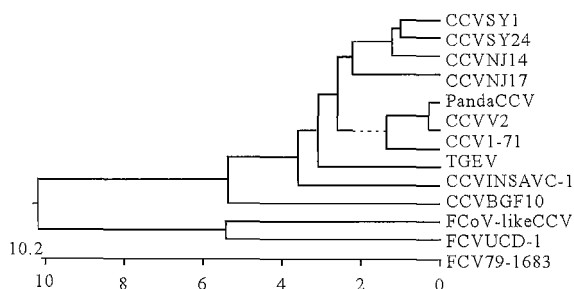


图 4 南京和沈阳犬粪样 CCV M 基因(212bp) 序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of partial CCV M gene nucleotide sequence (212bp) from Nanjing and Shenyang feces.

CCV 套式 PCR 方法<sup>[9]</sup>, 胡桂学等建立了 CCV 的核酸探针检测方法<sup>[10]</sup>。但是迄今为止, 国内尚未有人对犬群内的 CCV 进行系统的分子流行病学调查。本研究采用套式 PCR 方法, 检测了 112 份犬粪便, 其中腹泻和健康犬粪样中 CCV 的检出率分别为 41.9% 和 85.5%。地区之间检出率差异不大, 但腹泻犬粪样中的检出率与季节有相关性, 这与 Randall 等的血清学调查的结果相似<sup>[16]</sup>。在本研究中, 腹泻犬粪中 CCV 的检出率低于健康犬。分析原因, 可能是因为腹泻犬来自兽医门诊, 每个病例都是家庭单独饲养的宠物犬, 而健康犬都是来集中饲养的养殖场, 一旦有 CCV 的感染, 很容易通过接触在整个犬场中传播, 并表现为健康带毒。Naylor 等对澳大利亚犬群 CCV 抗体进行了检测, 证明散养犬和群养犬血清 CCV 抗体阳性率分别为 15.8% 和 40.8%<sup>[17]</sup>, 与本试验的结果不谋而合。

Pratelli 等<sup>[18,19]</sup>证实, 在犬群中有两种 CCV 基因型流行, 新发现的一种与 I 型 FCoV 相近, 为 FCoV-like CCV, 建议参照 FCoV 的分型, 将其称为

I 型 CCV; 而目前已知的所有 CCV 毒株均与 II 型 FCoV 相近, 归为一类, 称为 II 型 CCV。在此基础上, 根据两型的 M 基因序列的差异设计了用于鉴定 FCoV-like CCV 的引物 CCV1a<sup>[18]</sup>。本研究采用了 Pratelli 等设计的 CCV 分型 PCR, 但是没有检测到 I 型的 CCV, 表明国内 CCV 的基因型不同于意大利, 后者腹泻犬粪中 I 型 CCV 的检出率为 14.5%, 两种基因型共感染率为 76.8%<sup>[19]</sup>。

在所检的腹泻粪样中, CCV 感染的占有很大比例 (41.9%), 但是其致病意义尚不清楚。一般认为犬可以健康携带 CCV, 一旦有 CPV、腺病毒 (CAV) 等其它肠道病原感染或应激等引发的胃肠炎, CCV 的存在就会加重病情, 甚至导致死亡。但也有研究表明, CCV 存在致病株与非致病株的差异<sup>[20]</sup>, 本研究未发现严重腹泻与一般腹泻的样本之间 CCV 检出率的差异, 可作为旁证。

本研究得到 CCV 地方株 M 基因的序列与中国大熊猫的 CCV 同源性最高, 达 94.8~96.7%, 说明此种基因型的 CCV 中国普遍存在。CCV 的宿主比较广泛, 业已证实, 实验条件下 CCV 可感染猫和猪<sup>[21,22]</sup>。如果自然条件下 CCV 能感染其他动物, 就为 CCV 与其他动物源的 CoV 发生同源重组提供了条件, 从而具有潜在的流行病学意义, 应予重视。

致谢: 南京农业大学动物医院赵艳兵老师、南京师皇动物医院宋大鲁教授在样本采集上给予了大力帮助, 在此表示感谢!

## 参考文献

- [1] Cavanagh D, Prian D A, Briton P, *et al.* Nidovirales: a new order comprising coronaviridae and arteriviridae [J]. Arch. Virol, 1997, 1452: 629-635.
- [2] Lai S M C, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses[J]. Adv. Virus Res, 1997, 48: 1-100.
- [3] Herrevehg A A, 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]. J Virol, 1998, 72: 4 508-4 514.
- [4] Michael J S, James R B, Heather A-M. Evidence from the evolutionary analysis of nucleotide sequences for a recombinant history of SARS-CoV. Infection, Genetics and Evolution. 2003, Available online at www.sciencedirect.com.
- [5] Pratelli A, Martella V, Pistello M, *et al.* Identification of coronaviruses in dogs that segregate separately from the canine coronavirus genotype [J]. J Virol Meth, 2003, 107: 213-222.
- [6] Wesley R D. The S gene of canine coronavirus, strain UCD-1, is more closely related to S gene of transmissible gastroenteritis virus than to that of feline infectious peritonitis virus [J]. Vi-

- rus Res, 1999, 61: 145-152.
- [7] Matthew J H., Gavan A H, Robert P M, *et al.* Identification of canine coronavirus strains from feses by S gene nested-PCR and molecular characterization of a new Australlia isolatep [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39: 1 036-1 041
- [8] Erles K, Toomey C, Harriet W B, *et al.* Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease [J]. Virology, 2003, 310:16-223.
- [9] 乔 军,孟庆玲,贾桂珍. 用套式 PCR 法检测犬冠状病毒的研究[J]. 新疆农业科学, 2002, 2: 64-67.
- [10] 胡桂学,王龙涛,于守平,等. 核酸探针检测犬冠状病毒方法的建立和初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25:171-174.
- [11] Pratelli A, Tempesta M, Greco G, *et al.* Development of a nested-PCR for the detection of canine coronavirus[J]. J Virol Meth, 1999, 80:11-15.
- [12] Tennant B J, Gaskell R M, Jones R C, *et al.* Studies on the epizootiology of canine coronavirus. [J]. Vet Rec, 1993, 132:7-11.
- [13] Pratelli A, Buonavoglia D, Martella V, *et al.* Diagnosis of canine coronavirus infection using nested-PCR [J]. J Virol Meth, 2000, 84:91-94.
- [14] Mochizuki M, Sugiura R, Akuzawa M. Micro-neutralization test with canine coronavirus for detection of coronavirus antibodies in dogs and cats [J]. Jpn J Vet Sci, 1987, 49:563-565.
- [15] 张伯强,陆承平,陈怀青,ELISA 法检测犬腹泻粪样中犬冠状病毒[J]. 中国兽医学报,1997,17:437-439.
- [16] Zarnke R L, Evermann J, Hoef J M V, *et al.* Serologic surey for canine coronavirus in wolves from Alaska [J]. J Wiildlife Dis, 2001, 37:740-745.
- [17] Naylor M J, Monckton R P, Lehrbach P R, *et al.* Canine coronavirus in Austalian dogs [J]. Australian Veterinary Journal, 2001, 79:116-119.
- [18] Pratelli A, Martella V, Decaro N, *et al.* Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhea in Italy [J]. J. Virol Meth, 2003, 110: 9-17.
- [19] Pratelli A, Elia G, Decaro N, *et al.* Cloning and expression of two fragments of the S gene of canine coronavirus Type I [J]. J Virol Meth 2004, Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [20] 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]. J Gen Virol, 1992:73, 2 849-2 862.
- [21] Woods R D, Wesley R D. Seroconversion of pigs in contact with dogs exposed to canine coronavirus [J]. Can J Vet Res, 1992, 56: 78-80.
- [22] Barlough J E, Stoddart C A, Sorrrwso G P, *et al.* Experimental inoculation of cats with canine coronavirus and subsequent challenge with feline infectious peritonitis virus [J]. Lab Anim Scie, 1984, 34: 529-597.