

李甜甜, 曹文雨, 胡博, 等. 2021—2023年黑龙江与吉林部分地区犬细小病毒 VP2 和 NS1 基因的遗传进化分析 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (5): 71–81.

LI T T, CAO W Y, HU B, et al. Genetic evolution analysis of VP2 and NS1 genes of canine parvovirus in selected regions of Heilongjiang and Jilin Provinces from 2021 to 2023 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (5): 71–81.

## 2021—2023 年黑龙江与吉林部分地区犬细小病毒 VP2 和 NS1 基因的遗传进化分析

李甜甜<sup>#</sup>, 曹文雨<sup>#</sup>, 胡博, 孙亚杰, 张成琪, 刘佳佳, 李双双,  
廉士珍, 邓效禹, 李昀真, 李智杰, 许丽文\*, 白雪\*  
(中国农业科学院特产研究所/农业农村部经济动物疫病重点实验室, 吉林 长春 130112)

**摘要:** 为明确我国东北地区犬细小病毒 (canine parvovirus, CPV) 近年来的流行特征, 于 2021—2023 年采集黑龙江省与吉林省 58 例犬腹泻病例的肛拭子样本, 通过 PCR 扩增 VP2 和 NS1 基因并进行序列的遗传进化分析。结果: 37 份样本检出 CPV 序列, 其中 36 株为亚洲型 CPV-2 (Asia CPV-2), 1 株为猫细小病毒 (FPV)。基因分型表明 CPV-2c 型占主导 (33/36), 另检出 CPV-new 2a 型 1 株和 CPV-new 2b 型 2 株。进化分析揭示 32 株 (89%) 属于 Asia IV 进化簇, 4 株 (11%) 归属 Asia III 进化簇。此外, 本研究发现携带 NS1 (60I/544F/545V/630P) 与 VP2 (267Y/324I/426E) 特征性变异谱的新变异株, 将其定义为 Asia-V 型; 同时检测到国内 FPV 流行株的特征性突变位点 VP2-A91S。研究表明我国东北地区 CPV 流行以 CPV-2c 基因型 (Asia IV 进化簇) 为主, 且存在向 Asia-V 型演化的趋势。

**关键词:** 犬细小病毒; 东北地区; 遗传进化分析

**中图分类号:** S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2026)05-0071-11

## Genetic evolution analysis of VP2 and NS1 genes of canine parvovirus in selected regions of Heilongjiang and Jilin Provinces from 2021 to 2023

LI Tiantian<sup>#</sup>, CAO Wenyu<sup>#</sup>, HU Bo, SUN Yajie, ZHANG Chengqi, LIU Jiajia, LI Shuangshuang,  
LIAN Shizhen, DENG Xiaoyu, LI Yunzhen, LI Zhijie, XU Liwen\*, BAI Xue\*

(Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Special Animal Epidemic Disease, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Changchun 130112, China)

**Abstract:** To elucidate the epidemiological characteristics of canine parvovirus (CPV) in Northeast China in recent years, this study collected 58 anal swabs from diarrheic dogs in Heilongjiang and Jilin Provinces from 2021 to 2023. VP2 and NS1 genes were amplified by PCR and analyzed through genetic and phylogenetic sequencing. Results revealed CPV sequences in 37 samples, including 36 strains of Asian-type CPV-2 (Asia CPV-2) and one feline parvovirus (FPV). Genotyping showed CPV-2c as the predominant subtype (33/36), with one CPV-new 2a and two CPV-new 2b strains. Evolutionary cluster analysis indicated that 32 strains (89%) belonged to the Asia IV cluster, while four (11%) were classified into the Asia III cluster. Additionally, novel variants carrying distinct NS1 (60I/544F/545V/630P) and VP2 (267Y/324I/426E) mutation profiles was identified and designated as the Asia-V type. And, the FPV strain exhibited the characteristic VP2-A91S mutation prevalent in Chinese FPV isolates. The study suggests that CPV-2c (Asia IV cluster) dominates the current CPV epidemiology in northeastern China, with a potential evolutionary shift toward the Asia-V type.

**Keywords:** canine parvovirus; Northeast China; genetic evolution analysis

收稿日期: 2025-03-14; 修回日期: 2025-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32100408); 吉林省科技发展计划项目 (20230202090NC)

第一作者: 李甜甜, 女, 硕士; 曹文雨, 女, 硕士。#共同第一作者

\*通信作者: 许丽文, 博士, 研究方向为动物传染病病原学与流行病学, E-mail: 82101221266@caas.cn; 白雪, 研究员, 研究方向为动物传染病病原学与流行病学, E-mail: baixue01@caas.cn。

犬细小病毒 (canine parvovirus, CPV) 属于细小病毒科、细小病毒属的成员<sup>[1]</sup>, 是一种具有二十面体结构的无囊膜 DNA 病毒<sup>[2]</sup>; 该病毒的直径约为 25 nm, 其基因组是单股负链线性 DNA, 全长约 5 kb。基因主要包含 2 个开放阅读框 (ORFs), ORF1 编码非结构蛋白 NS1 和 NS2, ORF2 编码结构蛋白 VP1 和 VP2<sup>[3]</sup>。VP2 是主要的衣壳蛋白和抗原蛋白, 决定病毒的组织嗜性和宿主范围<sup>[4-5]</sup>。NS1 蛋白在病毒进化过程中相对保守, 是一种具有多种功能的磷酸化蛋白, 在病毒复制中起重要作用, 负责诱导细胞凋亡<sup>[6-7]</sup>。

为了与细小病毒科博卡病毒属成员 CPV-1 (犬微小病毒) 区分, 将犬细小病毒命名为 CPV-2。CPV-2 是由猫泛白细胞减少症病毒 (feline panleukopenia virus, FPV) VP2 蛋白 A300G 氨基酸位点突变而来, 并从 1970 年开始在世界范围内传播<sup>[5]</sup>。随着 VP2 基因的突变, 1979 年报道了具有 VP2 蛋白 (M87L、I101T、A300G、D305Y 和 N375D) 变异特点的新型 CPV-2a 变异株<sup>[8]</sup>, 1984 年出现了 CPV-2b 型 (VP2 N426D) 变异株<sup>[9]</sup>, 2000 年意大利报道了 CPV-2c 型 (N426E) 变异株<sup>[10]</sup>。我国于 1982 年首次发现 CPV-2, 1986 年 CPV-2a 取代 CPV-2 成为主要基因型<sup>[11]</sup>, 随后 CPV-2b 于 1997 年出现, 并与 CPV-2a 同时传播<sup>[12]</sup>。与 CPV-2 仅感染犬科动物不同, CPV-2a、CPV-2b 和 CPV-2c 变体不仅感染犬科动物, 还重新获得感染猫科动物和其他野生食肉动物的能力<sup>[13]</sup>。研究表明 CPV 的频繁变异与疫苗免疫失败有关<sup>[14]</sup>。

CPV-2 的传染性极强, 主要是通过粪-口途径接触污染的粪便或其周围环境传播。病毒主要感染有丝分裂活跃的组织, 如淋巴组织、肠上皮和骨髓以及新生犬的心肌细胞, 因而 CPV 的临床症状主要是出血性肠炎, 临床症状包括厌食、抑郁、呕吐和黏液样或带血粪便, 伴随脱水、发烧和白细胞减少<sup>[15]</sup>。新生幼犬还会引发心肌炎, 主要引起心脏增大伴左心房和心室明显扩张。本研究从东北地区采集的腹泻犬肛拭子中检测到了 37 个 CPV 阳性样本, 对其 VP2 和 NS1 基因序列进行了遗传进化分析, 阐明其氨基酸突变和遗传进化规律, 以期了解东北地区近 3 年 CPV 的流行情况, 为控制该病提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

DNA 提取试剂盒、PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase、6×Loading Buffer 和 DNA Marker 购自北京全式金生物技术股份有限公司。引物由吉林省库美生物科技有限公司合成。

### 1.2 病料收集与处理

分别采集吉林省长春市 (22 份) 和黑龙江省讷河市 (13 份)、齐齐哈尔市 (23 份) 宠物医院有腹泻症状的犬肛拭子, 低温保存下运输。将采集的犬肛拭子置于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 灭菌 PBS (pH=7.2) 浸泡 24 h, 于 80 °C 反复冻融 3 次, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 于 -80 °C 冷冻保存。

### 1.3 引物设计与合成

参考 CPV 基因组 (GenBank 登录号: OP957419.1) 保守区, 应用 Primer Premier 5.0 设计 3 对引物, 分别用于 CPV 的鉴定, VP2 和 NS1 全长的扩增, 扩增的目的片段大小分别为 286、1 755 和 2 007 bp, 由吉林省库美生物科技有限公司合成。

表 1 PCR 引物

名称	序列 (5'→3')	扩增长度/bp
JD-F	AGAGCATTGGGCTTAAATTTTC	286
JD-R	ATCTTGGATCAATCTGCTGCTTG	
VP2-F	GAAGTAGAAAATCATATT	1 755
VP2-R	ACAAGTACAATATTCTATGCTGT	
NS1-F	ACATTCGCTTCTGTCTTTGA	2 007
NS1-R	CACACCCTTACCTCTCCT	

### 1.4 核酸提取

采用西安天隆核酸提取仪器提取处理后病料的 DNA, 保存于 -20 °C。

### 1.5 PCR 鉴定

采用引物 JD-F、JD-R 进行扩增, 反应体系: 2×Rapid Taq Master Mix 12.5 μL、JD-F 1 μL、JD-R 1 μL、DNA 模板 2 μL、ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 15 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 VP2 和 NS1 全基因扩增

对 1.5 步骤中鉴定为阳性的 DNA 样品, 采用 VP2-F 和 VP2-R、NS1-F 和 NS1-R 引物分别对 VP2、NS1 的全基因进行扩增。PCR 反应体系 (50 μL): PrimeSTAR Max Premix (2×) 25 μL, 上游引物 2 μL, 下游引物 2 μL, 模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 19 μL。反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 55 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 7 min。

### 1.7 琼脂糖凝胶电泳检测及测序

取 5 μL 扩增产物混合 Loading Buffer 后加入 1% 琼脂糖凝胶, 在 1×TAE 缓冲液中进行电泳, 电压 180 V, 时间 15 min。在紫外透射仪中观察结果, 以

DNA Marker DL2000 为分子量标准，将阳性扩增产物送至吉林省库美生物科技有限公司进行测序。

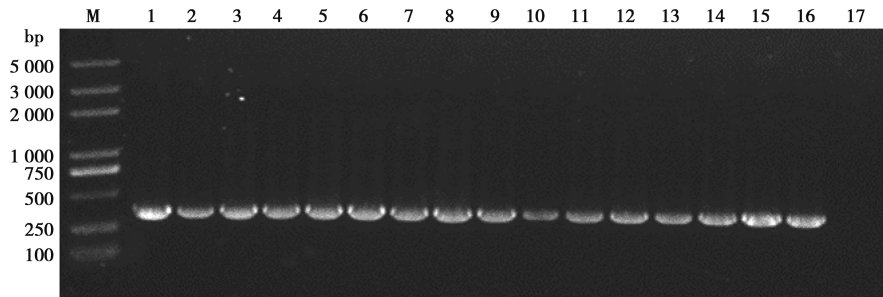
### 1.8 CPV 遗传进化分析

使用 MegAlign 和 MEGA 软件将本研究获得的 37 条 VP2 和 NS1 与 GenBank 下载的 72 条 VP2 和 NS1 参考毒株序列进行比对，MEGA (Clustal W) 软件 Bootstrap Value (1000) 构建核苷酸遗传进化树，MegAlign 进行同源性分析。

## 2 结果与分析

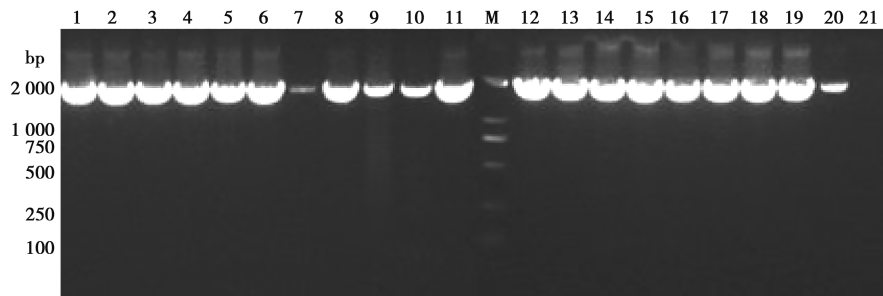
### 2.1 VP2 和 NS1 序列扩增

用 PCR 方法对 58 份样品进行扩增，有 37 份检测为 CPV 阳性，阳性率为 63.79% (37/58)，结果见图 1。对 37 份阳性样品核酸进行 VP2 和 NS1 全长扩增，分别获得了 1 755 和 2 007 bp 的 VP2 和 NS1 基因全长序列，结果见图 2、图 3。



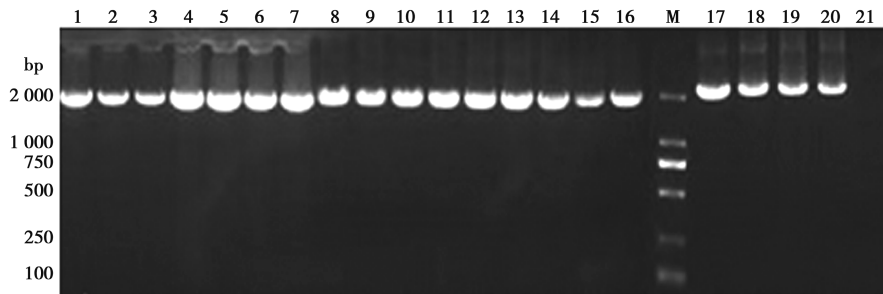
M. DL5000 Marker; 1~15. 样品; 16. 阳性对照; 17. 阴性对照。

图 1 部分样品 PCR 检测结果



M. DL2000 Marker; 1~19. 样品; 20. 阳性对照; 21. 阴性对照。

图 2 部分样品 VP2 特异性扩增结果



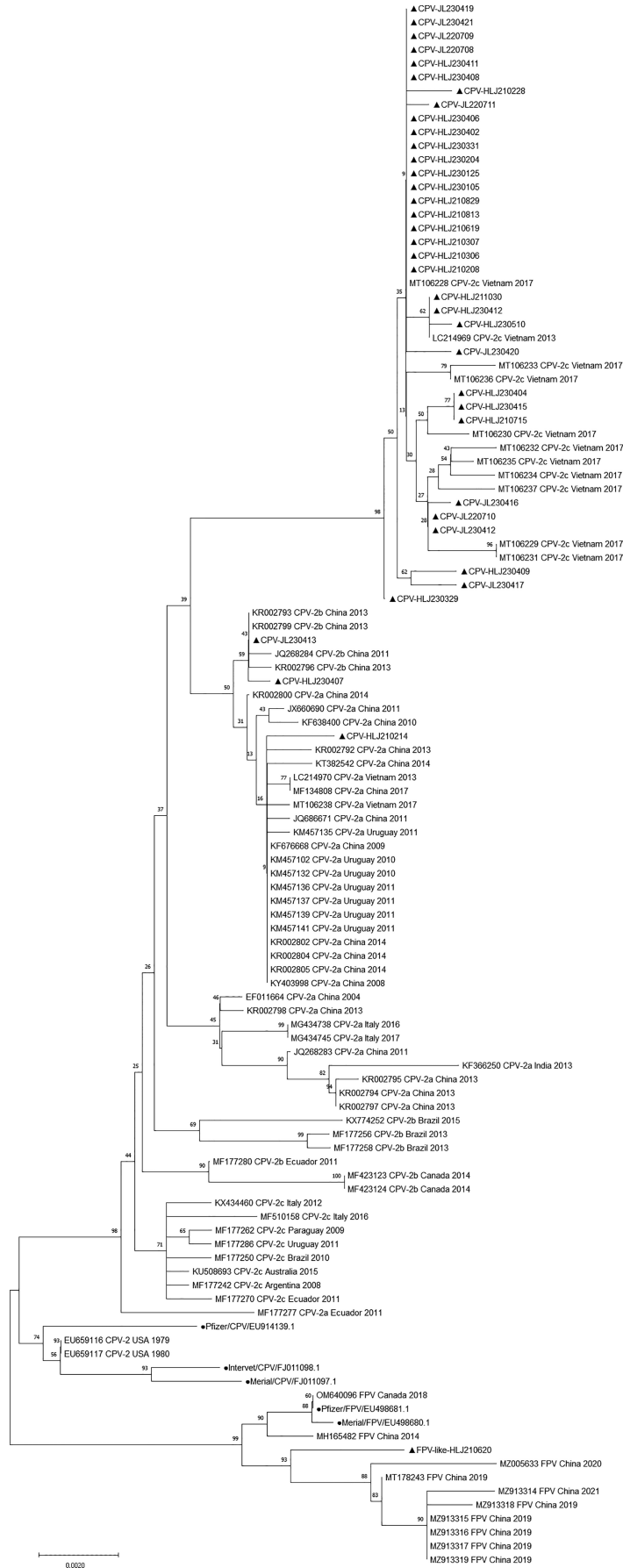
M. DL2000 Marker; 1~19. 样品; 20. 阳性对照; 21. 阴性对照。

图 3 部分样品 NS1 特异性扩增结果

### 2.2 VP2 基因遗传进化分析

将本研究中扩增的 37 株 CPV VP2 基因片段进行测序，并与 GenBank 中 62 条 CPV VP2 和 12 条 FPV VP2 基因参考序列进行比对分析，结果发现，样品序列同源性为 97.8%~100.0%，与参考序列同源性在 97.3%~100.0%，与疫苗株 EU914139.1 和 EU498681.1 同源性在 98.1%~99.4%。在遗传进化

树中，本研究中的 37 条毒株与疫苗株处于不同分支中，亲缘关系较远，36 条 CPV 毒株与 36 株亚洲型分离株的亲缘关系最近，属于亚洲型进化分支，与西方分离株遗传进化关系较远。发现了 1 株 FPV-like 毒株序列，其与 10 条 FPV 参考毒株亲缘关系大于 93%，结果见图 4。



▲. 本试验分离株; ●. 疫苗株; 剩余为参考序列分离株。下同。

图 4 VP2 遗传进化树

### 2.3 VP2 蛋白氨基酸位点分析

将获得的 37 条 VP2 基因氨基酸序列与 GenBank 中 FPV、CPV-2、CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c 以及疫苗株共 18 条 VP2 参考序列的关键氨基酸位点进行对比分析 (表 2)。37 条毒株序列共分为 4 种基因型, 其中 CPV-2c 型为 33 株, CPV-New2b 型为 2 株, CPV-New 2a 型及 FPV-Like 各 1 株。

本研究获得的 CPV-2c、CPV-new 2a 和 CPV-new 2b 型毒株均具有 CPV 的典型氨基酸特征, 其中 33 株 CPV-2c 具有典型的氨基酸位点特征 101T (与 CPV-2 区分) 和 426E (426 位点为 N 代表 2a 型, D 代表 2b 型, E 代表 2c 型), 在此基础上, 根据第 297 位氨基酸发生从 S 到 A 的突变, 确定了 CPV-new 2b 型 2 株, 以及 CPV-new 2a 型 1 株。此外, 发现 1 株具有典型 FPV 氨基酸变异特点的毒株 (80K、93K、103V、323D、564N 和 568A24), 该 FPV-like 株在 91S 的突变是目前主要流行的 FPV 毒株突变位点。

目前, CPV-2c 型分离株的 A5G 突变常与 F267Y、Y324I 突变一起出现, 获得的 33 株 CPV-2c

型毒株 VP2 的变异位点分析发现, 各位点的突变占总毒株的比率分别为 33/37 (89.19%)、33/37 (89.19%)、33/37 (89.19%), 与我国西南部、上海等地发现的 CPV-2c 变异趋势一致, 且本研究中的 CPV-2c 出现 Q370R 和 I447M 变异趋势。CPV 疫苗株 VP2 与获得的 37 条 VP2 序列在第 5、87、101、267、297、300、305、324、426 等氨基酸位点的较大程度突变, 这可能是导致部分疫苗免疫失败的主要原因之一。

### 2.4 NS1 同源性和遗传进化分析

37 条 NS1 序列与 GenBank 中 62 条 CPV 和 10 条 FPV NS1 基因参考序列利用 MegAlign 进行比对分析, 结果发现, 37 条 NS1 序列之间的同源性在 98.6%~100%, 与 23 条来自不同地区参考毒株 CPV NS1 基因序列的同源性为 98.5%~100%。样品中 36 条 CPV 毒株序列属于亚洲型进化分支, 与西方分离株进化关系较远, 另外还发现了一条 FPV-like 毒株序列, 与 10 株 FPV 参考毒株在同一进化分支, 见图 5。

表 2 CPV 分离株与各参考毒株 VP2 关键氨基酸的突变位点

毒株	氨基酸位点																									
	5	13	23	80	87	91	93	101	103	232	262	267	297	300	305	323	324	370	375	426	440	447	564	568		
EU659117 (CPV-2)	A	P	S	R	M	A	N	I	A	I	A	F	S	A	D	N	Y	Q	N	N	T	I	S	G		
MZ913314 (FPV-like)	-	-	-	K	-	-	K	T	V	-	-	-	-	-	-	D	-	-	D	-	-	-	N	A		
MZ005633 (FPV)	-	-	-	K	-	-	K	T	V	V	-	-	-	-	-	D	-	-	D	-	-	-	N	A		
Pfizer/FPV/EU498681. 1	-	-	-	K	-	-	K	T	V	-	-	-	-	-	-	D	-	-	D	-	-	-	N	A		
Pfizer/CPV/EU914139. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-		
KR002794 (CPV-2a)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	-	A	G	Y	-	I	-	D	-	-	-	-	-		
MG434738 (CPV-2a)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	-	A	G	Y	-	L	-	D	-	-	-	-	-		
MF177277 (CPV-2a)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	-	A	G	Y	-	-	-	D	-	S	-	-	-		
KF676668 (CPV-2a)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	-	A	-	-	-		
KF638400 (CPV-2a)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	-	A	G	Y	-	I	-	D	-	A	-	-	-		
KF366250 (CPV-2a)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	-	A	G	Y	-	-	-	D	-	-	-	-	-		
KX774252 (CPV-2b)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	-	A	G	Y	-	L	-	D	D	-	-	-	-		
JQ268284 (CPV-2b)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	D	A	-	-	-		
MF177280 (CPV-2b)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	-	A	G	Y	-	-	-	D	D	-	-	-	-		
MF177258 (CPV-2b)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	-	N	G	Y	-	L	-	D	D	-	-	-	-		
MT106229 (CPV-2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	R	D	E	-	M	-	-		
MF510158CPV-2c)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	-	A	G	Y	-	-	-	D	E	-	-	-	-		
LC214969 (CPV-2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	R	D	E	-	-	-	-		
CPV-HLJ210214 (2a)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	-	A	-	-	-		
CPV-JL230413 (2b)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	D	A	-	-	-		

续表2

毒株	氨基酸位点																								
	5	13	23	80	87	91	93	101	103	232	262	267	297	300	305	323	324	370	375	426	440	447	564	568	
CPV-HLJ230407 (2b)	-	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	D	A	-	-	-	
CPV-JL230416 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	R	D	E	-	M	-	-	
CPV-JL230412 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	R	D	E	-	M	-	-	
CPV-JL220710 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	R	D	E	-	M	-	-	
CPV-JL230417 (2c)	G	S	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230409 (2c)	G	-	F	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ210228 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	T	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-JL230421 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-JL230420 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-JL230419 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-JL220711 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-JL220709 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-JL220708 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230510 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230415 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230412 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230411 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230406 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230404 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230402 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230331 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230329 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230204 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230125 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230105 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ211030 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ210829 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ230408 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ210619 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ210307 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ210306 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ210715 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ210208 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
CPV-HLJ210813 (2c)	G	-	-	-	L	-	-	T	-	-	-	Y	A	G	Y	-	I	-	D	E	-	-	-	-	
FPV-like-HLJ210620	-	-	-	-	K	-	S	K	T	V	V	-	-	-	-	-	D	-	-	D	-	-	-	N	A

注：浅灰色，本研究获得的序列；灰色，突变位点；深灰色，突变趋势。下同。

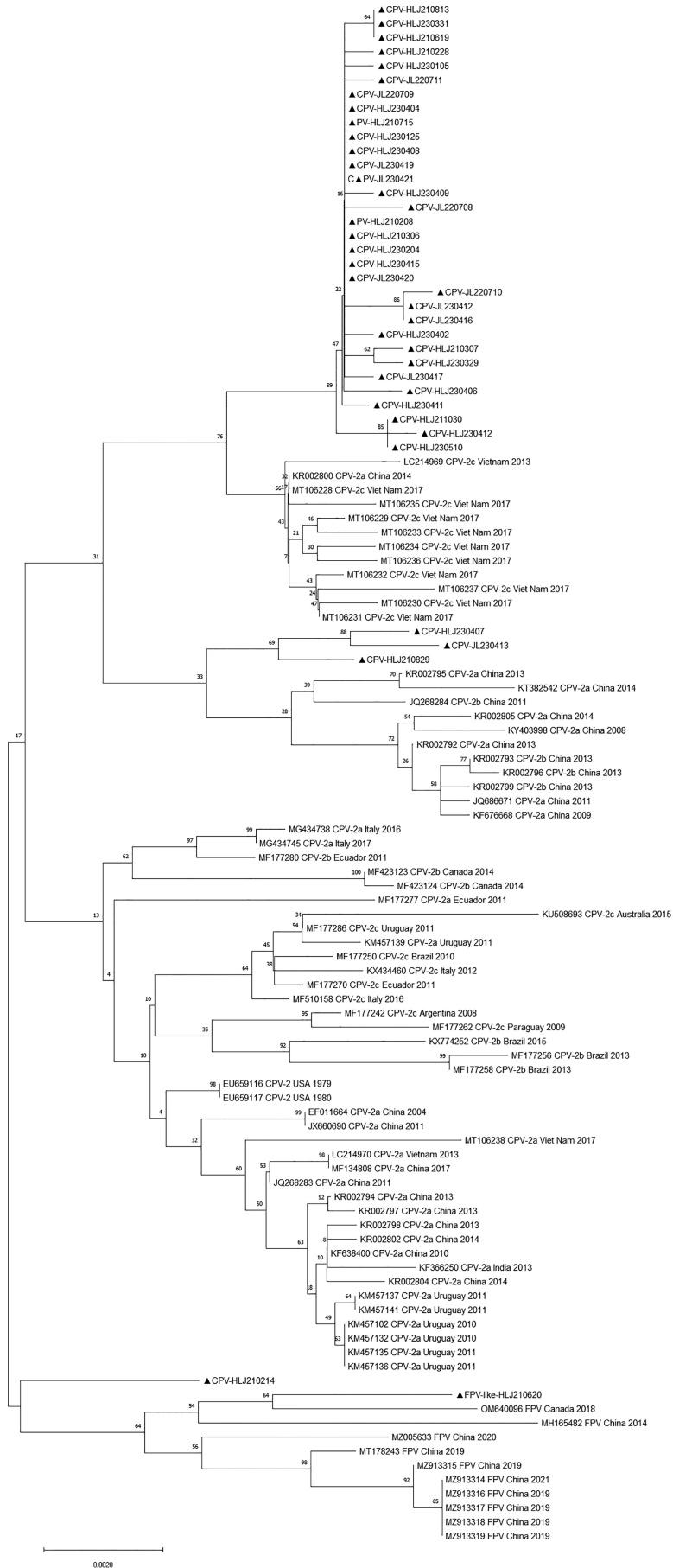


图 5 NS1 遗传进化树



续表3

毒株	氨基酸位点																			
	19	23	60	182	247	248	352	361	443	544	545	572	573	577	583	590	596	624	630	
CPV-HLJ230510 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ230415 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ210619 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ210306 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ210228 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ230402 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ230404 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ210307 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	I	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ230331 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ230329 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ230204 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ230125 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ211030 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ210813 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ210715 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
CPV-HLJ210208 (2c)	-	-	V	-	-	-	-	-	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	P
FPV-like-HLJ210620	-	D	-	-	H	T	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	L	L	-	-

表 4 用于进化分析的 NS1 和 VP2 蛋白的氨基酸位点

亚型	NS1				VP2			类型	子分支	占比 (n=37) /%
	60	544	545	630	267	324	426			
CPV-2	I	Y	E	L	F	Y	N	2a	CPV-2	0
西方	I	Y	E	L	F	L/Y	N/D	2a/2b	WT-I	0
	I	F	E	L	F	L/Y	N/D/E	2a/2b/2c	WT-II	0
	I	Y	E	L	F	Y	E	2c	WT-III	0
	I	Y	E	L	F	L/Y	N	2a	Asia-I	0
亚洲	I	Y	E	L	Y	I	N	2a	Asia-II	0
	I	F/Y	V/E	L	Y	I	N/D	2a/2b	Asia-III	10.81
	V	F/Y	V/E	P	Y	I	E/N	2c/2a	Asia-IV	86.49
	I	F	V	P	Y	I	E	2c	Asia-V	2.70

### 3 讨论

CPV-2 自发现以来已在全世界传播了 50 多年,可引起犬的出血性腹泻和幼犬的心肌炎,是危害犬科动物健康的重要传染病。自 CPV-2 于 1978 年成功被分离,随着基因突变,这种病毒的原始类型被新的基因和抗原变体取代,目前 CPV-2 的多种基因型 CPV-2、CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c、CPV-new 2a、CPV-new 2b 已在亚洲、非洲、大洋洲、欧洲、南北美洲等世界范围内广泛分布<sup>[16]</sup>,其中亚洲特别是中国报道的 CPV 毒株序列最多<sup>[18]</sup>,在中国最早于 2010 年发现了以 D426E 为特征的 CPV-2c 变异位点<sup>[19]</sup>。随着毒株的不断进化,自 2021 年以来,CPV-2c 型

在亚洲、北美和非洲超过 CPV-2a 和 CPV-2b 型并占据了主要优势。截至目前,亚洲已经形成了以 NS1 (60V, 544F, 545V, 630P) 和 VP2 (5G, 267Y, 324I, 370R) 序列变异特点的亚洲型<sup>[20]</sup>。中国 2014 年以来报道的东部地区(江苏、浙江和上海)<sup>[21]</sup>、中部地区(河南、天津和北京)<sup>[22]</sup>、西南地区(四川和重庆)<sup>[23]</sup>、东北地区(吉林省)<sup>[24]</sup>、广东省<sup>[19]</sup>均报道了亚洲型 CPV-2c,其 NS1 和 VP2 序列明显不同于西方 CPV-2c 的序列突变特点。

本研究从东北地区的 58 份腹泻症状犬的肛拭子中成功扩增到 37 个 CPV 阳性样本,对 VP2 和 NS1 基因的遗传进化分析表明亚洲型 CPV-2c 型占比 89.19% (33/37),首次报道了黑龙江省齐齐哈尔市

的 23 株 CPV 属于 CPV-2c 亚洲型, 且以 Asia-IV 为主 (23/33), 并且还在该地区发现了新型亚洲变异型 Asia-V。同时在长春的样品中发现 10 条 CPV-2c 阳性样本序列。有研究对长春、辽源等地的 31 株 CPV 序列分析结果也显示以 CPV-2c 亚洲型为主<sup>[24]</sup>, 进一步说明了东北部分地区流行的病毒流行基因型以 CPV-2c 为主。从 37 个阳性样本 VP2 的遗传进化分析可知, 37 条序列与辉瑞、英特威、梅里亚疫苗株处于不同的分支中, 36 条 CPV 与疫苗株 VP2 序列在 A5G、M87L、I01T、F267Y、S297A、A300G、D305Y、Y324I、N426E 等氨基酸位点的突变所引发的基因突变, 这可能会产生免疫逃逸的现象。免疫逃逸可能是疫苗接种后对动物体的保护率降低, 从而引起犬细小病毒病发生的原因。

跨宿主传播是目前 CPV 传播的主要特征, 特别是目前发现在猪肺部中检测到了 CPV<sup>[25]</sup>。本研究同时从犬腹泻病例中发现了 FPV-like 毒株序列, 该毒株与猫源 FPV 处于同一遗传进化分支, 但 NS1 中的 N23D、P590L、V596L 位点不同于猫源 FPV 分离株与国内其他研究中分离到 FPV-like 毒株变异位点也不同<sup>[26]</sup>。对西南地区猫源 FPV 的序列分析发现, 有 39.37% 的 NS1 A91S 位点突变率<sup>[27]</sup>, 本试验样品中 FPV-like 株 VP2 蛋白出现了目前流行的 A91S 位点变异, 进一步证明了该 FPV-like 病例可能是 FPV 传播而来。有研究发现, 犬腹泻病例中的 FPV-like 毒株已在 4 个亚洲国家报道<sup>[23]</sup>, FPV-like 毒株通过人工攻毒后发现可以引起犬的系统性感染。CPV-2 是由 FPV VP2 蛋白 A300G 氨基酸位点突变而获得了对犬的易感性<sup>[5]</sup>, 但 FPV-like 第 300 位氨基酸为 A, 说明有其他因素导致了其对犬的易感性。

CPV 的 VP2 决定了中和表位、宿主受体结合和致病性密切相关。CPV 的衣壳蛋白表面由 4 个 loop 环和 1 个 GH 环组成: loop 1 (50~100 aa), loop 2 (200~250 aa), loop 3 (295~350 aa), loop 4 (400~450 aa) 和 GH 环 (350~400 aa)。Loop1、loop2、loop4 构成纤突顶部, loop3 构成肩部, 分别形成抗原表位 A 和 B<sup>[28]</sup>, 与 VP2 蛋白 N 端为 CPV 的主要 B 细胞抗原表位, 诱导机体产生体液免疫反应。有研究表明 VP2 残基 loop 1 (N85A, M87A, V92A, N93A) 位点突变可显著增加对猫的转铁蛋白受体 (transferrin, TfR) 的亲合力, 而 loop 3 (S293A, Q296A, S297A, T301A, N302A, D305A) 位点突变显著减少对猫 TfR 的亲合力<sup>[28]</sup>。本研究所发现的亚洲型 CPV VP2 (5G, 267Y, 324I, 370R, 447M) 的变异位点位于多抗原中和表位和环状氨基酸区域, 其中 VP2 第 5 位氨基酸位于 N 端中和表位区 (VP2 1~

23 aa)<sup>[29]</sup>。324 位氨基酸所在的 loop 3 与所在的 300 位氨基酸和相邻的残基 301 位氨基酸是两个主要的中和抗原位点, 是 CPV-2 与宿主发挥作用的表位区域<sup>[29-30]</sup>。VP2 第 370 位氨基酸所在的 GH 环包括特异性 TfR 结合位点<sup>[31]</sup>, 推测这些位点的改变对 TfR 的结合力有影响。

NS1 控制 DNA 包装进入衣壳、细胞凋亡和与宿主蛋白的结合<sup>[32]</sup>, 研究表明 C 末端锌指结构域 (557~668 aa) 控制着 VP2 的转录活性<sup>[33]</sup>。对其中 63 个氨基酸的删除无法激活启动子 P38 和 VP2-5'UTR<sup>[34]</sup>, 此外有研究发现 FPV 的 N588 位氨基酸显著抑制干扰素刺激基因从而促进病毒的复制<sup>[35]</sup>。本研究样品中, CPV 序列 NS1 中 544Y、545E、573S、577L、624K、630L 等多个突变位点可能与病毒的转录复制相关, 未来还需进一步证实。

疫苗接种仍是预防 CPV 感染的主要手段, 但现有疫苗在应对病毒变异和母源抗体干扰方面存在局限。现有疫苗对 CPV-2a、2b 和 2c 型有一定保护效果, 但对基因突变产生的新变种 (如 CPV-new 2c) 则需进一步优化。VP2 作为 CPV 的关键抗原表位, 一直以来都是疫苗和诊断试剂研发过程中重点研究对象, 这就意味着对 CPV 基因监测尤为重要。本研究探讨了东北地区 CPV VP2 的基因突变, 为后续疫苗与诊断试剂的研发所选取有效抗原片段提供了科学的参考依据。未来疫苗研发可基于基因突变的前提, 借助纳米技术、基因改造及新型佐剂 (如 mRNA 疫苗), 高效激活免疫反应, 改进对新毒株的免疫应答, 应对病毒免疫逃避机制<sup>[36]</sup>。

病毒频繁变异是逃避宿主免疫监视的重要因素<sup>[37]</sup>。目前, CPV-2 型疫苗能否保护犬对新变异株的感染尚不清楚, 因此需要持续监测 CPV 的遗传变异情况, 以此为 CPV 防治和疫苗的研发提供科学依据。

## 参考文献:

- [1] KELLY W R. An enteric disease of dogs resembling feline panleucopaenia [J]. Aust Vet J, 1978, 54 (12): 593.
- [2] COTMORE S F, AGBANDJE-MCKENNA M, CANUTI M, et al. ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae [J]. J Gen Virol, 2019, 100 (3): 367-368.
- [3] 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.
- [4] HUEFFER K, PARKER J S L, WEICHERT W S, et al. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor [J]. J Virol, 2003, 77 (3): 1718-1726.

- [5] NELSON C D S, PALERMO L M, HAFENSTEIN S L, et al. Different mechanisms of antibody - mediated neutralization of parvoviruses revealed using the Fab fragments of monoclonal antibodies [J]. *Virology*, 2007, 361 (2): 283-293.
- [6] SAXENA L, KUMAR G R, SAXENA S, et al. Apoptosis induced by NS1 gene of Canine Parvovirus-2 is caspase dependent and p53 independent [J]. *Virus Res*, 2013, 173 (2): 426-430.
- [7] GUPTA S K, SAHOO A P, ROSH N, et al. Canine parvovirus NS1 induced apoptosis involves mitochondria, accumulation of reactive oxygen species and activation of caspases [J]. *Virus Res*, 2016, 213: 46-61.
- [8] PARRISH C R, HAVE P, FOREYT W J, et al. The global spread and replacement of canine parvovirus strains [J]. *J Gen Virol*, 1988, 69 (Pt 5): 1111-1116.
- [9] PARRISH C R, AQUADRO C F, STRASSHEIM M L, et al. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus [J]. *J Virol*, 1991, 65 (12): 6544-6552.
- [10] DECARO N, DESARIO C, ADDIE D D, et al. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13 (8): 1222-1224.
- [11] ZHAO Y, LIN Y, ZENG X, et al. Genotyping and pathobiologic characterization of canine parvovirus circulating in Nanjing, China [J]. *Virol J*, 2013, 10: 272.
- [12] ZHONG Z, LIANG L, ZHAO J, et al. First isolation of new canine parvovirus 2a from Tibetan mastiff and global analysis of the full-length VP2 gene of canine parvoviruses 2 in China [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15 (7): 12166-12187.
- [13] GIRALDO-RAMIREZ S, RENDON-MARIN S, RUIZ-SAENZ J. Phylogenetic, evolutionary and structural analysis of canine parvovirus (CPV-2) antigenic variants circulating in Colombia [J]. *Viruses*, 2020, 12 (5): 500.
- [14] MAGANGA G D, LABOUBA I, MILENDZ IKAPI S Z, et al. Molecular characterization of canine parvovirus variants CPV-2a and CPV-2c, associated with vaccinated dogs at Libreville, Gabon [J]. *Viruses*, 2023, 15 (5): 1169.
- [15] HOELZER K, SHACKELTON L A, HOLMES E C, et al. Within-host genetic diversity of endemic and emerging parvoviruses of dogs and cats [J]. *J Virol*, 2008, 82 (22): 11096-11105.
- [16] MIRA F, CANUTI M, PURPARI G, et al. Molecular characterization and evolutionary analyses of carnivore protoparvovirus 1 NS1 gene [J]. *Viruses*, 2019, 11 (4): 308.
- [17] NGUYEN MANH T, PIEWBANG C, RUNGSIPIPAT A, et al. Molecular and phylogenetic analysis of Vietnamese canine parvovirus 2C originated from dogs reveals a new Asia-IV clade [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68 (3): 1445-1453.
- [18] QI S, ZHAO J, GUO D, et al. A mini-review on the epidemiology of canine parvovirus in China [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 5.
- [19] HAO X, HE Y, WANG C, et al. The increasing prevalence of CPV-2c in domestic dogs in China [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9869.
- [20] MIRA F, PURPARI G, DI BELLA S, et al. Spreading of canine parvovirus type 2c mutants of Asian origin in southern Italy [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66 (6): 2297-2304.
- [21] CHEN Y, WANG J, BI Z, et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of canine parvovirus in East China, during 2018 - 2020 [J]. *Infect Genet Evol*, 2021, 90: 104780.
- [22] CHEN B, ZHANG X, ZHU J, et al. Molecular epidemiological survey of canine parvovirus circulating in China from 2014 to 2019 [J]. *Pathogens*, 2021, 10 (5): 588.
- [23] WANG J, CHEN X, ZHOU Y, et al. Prevalence and characteristics of a feline parvovirus-like virus in dogs in China [J]. *Vet Microbiol*, 2022, 270: 109473.
- [24] JIANG H, YU Y, YANG R, et al. Detection and molecular epidemiology of canine parvovirus type 2 (CPV-2) circulating in Jilin Province, Northeast China [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2021, 74: 101602.
- [25] TEMEYASEN G, SHARAFELDIN T A, LIN C M, et al. Spillover of canine parvovirus type 2 to pigs, south Dakota, USA, 2020 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2022, 28 (2): 471-473.
- [26] ZHANG R, YANG S, ZHANG W, et al. Phylogenetic analysis of the VP2 gene of canine parvoviruses circulating in China [J]. *Virus Genes*, 2010, 40 (3): 397-402.
- [27] CHEN X, WANG J, ZHOU Y, et al. Circulation of heterogeneous *Carnivore protoparvovirus 1* in diarrheal cats and prevalence of an A91S feline panleukopenia virus variant in China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69 (5): e2913-e2925.
- [28] PARKER J S, PARRISH C R. Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid [J]. *J Virol*, 1997, 71 (12): 9214-9222.
- [29] STRASSHEIM M L, GRUENBERG A, VEIJALAINEN P, et al. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid [J]. *Virology*, 1994, 198 (1): 175-184.
- [30] TSAO J, CHAPMAN M S, AGBANDJE M, et al. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications [J]. *Science*, 1991, 251 (5000): 1456-1464.
- [31] CALATAYUD O, ESPERÓN F, CLEAVELAND S, et al. Carnivore parvovirus ecology in the serengeti ecosystem: vaccine strains circulating and new host species identified [J]. *J Virol*, 2019, 93 (13): e02220-18.
- [32] PARRISH C R, KAWAOKA Y. The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2005, 59: 553-586.
- [33] TEWARY S K, ZHAO H, SHEN W, et al. Structure of the NS1 protein N-terminal origin recognition/nickase domain from the emerging human bocavirus [J]. *J Virol*, 2013, 87 (21): 11487-11493.
- [34] XIE Q, WANG J, LIU Y, et al. Transcriptional activation of Mink enteritis virus VP2 by the C-terminal of its NS1 protein [J]. *Virus Genes*, 2023, 59 (1): 100-108.
- [35] LI L, LIU Z, LIANG R, et al. Novel mutation N588 residue in the NS1 protein of feline parvovirus greatly augments viral replication [J]. *J Virol*, 2024, 98 (5): e00093-24.
- [36] DECARO N, BUONAVOGLIA C, BARRS V R. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: are we far from disease eradication [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 247: 108760.
- [37] HORIUCHI M, GOTO H, ISHIGURO N, et al. Mapping of determinants of the host range for canine cells in the genome of canine parvovirus using canine parvovirus/mink enteritis virus chimeric viruses [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75 (Pt 6): 1319-1328.