

基于 H 蛋白基因的犬瘟热病毒遗传变异分析

郭 玲¹, 雷 燕¹, 陈世界², 王成东³, 杨晓龙⁴, 颜其贵^{1,5*}

(1. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014; 2. 四川出入境检验检疫局, 成都 610041; 3. 中国保护大熊猫研究中心, 雅安 625000; 4. 西南民族大学, 成都 610041; 5. 四川农业大学 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014)

摘 要: 犬瘟热是犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)感染犬和其他食肉动物造成的多发性、致死性传染病, 本文从分子水平上探讨 CDV 遗传进化特性、变异情况与流行规律之间的关系。通过收集 2002—2010 年在中国地区分离的 14 株 CDV 野毒株、2006—2007 年在全球各地分离的 12 株 CDV 野毒株以及从不同宿主分离的 12 株 CDV 野毒株和 4 株疫苗株, 将其分为 4 组, 将前 3 组野毒株分别与国内外正在使用的 4 株疫苗株的 H 基因进行遗传变异分析。分析发现, CDV 野毒株与疫苗株间 H 蛋白基因的核苷酸相似性为 86.2%~92.1%, 其氨基酸相似性为 89.1%~91.9%; H 基因的 584 位的天冬酰胺糖基化位点是 Asia-I 型 CDV 所特有的; H 蛋白 3555 区域的非同义氨基酸替换概率较高。作者推测 H 蛋白抗原变异可能造成弱毒疫苗免疫效力降低, 不能为某些 CDV 株的感染提供完全有效的保护。

关键词: 犬瘟热病毒; 遗传变异; 基因型

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)01-0098-07

Genetic Variation Analysis of the Canine Distemper Virus Based on Its H Protein Gene

GUO Ling¹, LEI Yan¹, CHEN Shi-jie², WANG Cheng-dong³, YANG Xiao-long⁴, YAN Qi-gui^{1,5*}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Sichuan Enter-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chengdu 610041, China; 3. China Conservation and Research Center for the Giant Panda, Ya'an 625000, China; 4. Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 5. Sichuan Agricultural University/Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Ya'an 625014, China)

Abstract: Canine distemper disease caused by canine distemper virus (CDV) infection of domestic dogs and many carnivores is a deadly infectious disease. The article discussed the genetic characteristics, evolutionary situations and epidemic regulation of CDV from molecular level. In this paper, we selected H protein gene of CDV as the target gene to evaluate molecular genetics, variation and epidemic regulation by compared the sequence of wild isolates to vaccine strains, the wild isolates included 14 CDV isolates from different geographical areas of China during the years 2002 to 2010, 12 CDV isolates around the world in 2006 to 2007, 12 CDV isolates from different hosts and the attenuated vaccine strains consisted of vCh, vCon, vOnder and vLed. The results showed that the nucleotide similarities of H gene between wild isolates and vaccine strains were from 86.2% to 92.1%, and the similarities of the deduced amino acid of H protein were 89.1% to 91.9%; Only Asia-I had the N-glycosylation sites of H gene at 584 site; There were a higher

收稿日期: 2011-04-27

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0848); 成都大熊猫繁育研究基金项目; 科技部公益性行业科研专项(2009424188); 四川省科技厅科技支撑项目(2010SZ0050)

作者简介: 郭 玲(1988-), 女, 四川南充人, 本科生, 主要从事传染病病原分子生物学研究, E-mail: yaanguoling@163.com

* 通讯作者: 颜其贵, E-mail: yanqigui@126.com

non-synonymous substitution rates in 3555 encoded amino acid sequences. And it indicate that antigenic variation of H protein may result in reduced effectiveness of attenuated vaccine, which couldn't provide complete immune response preservation for some CDV epidemic strains.

Key words: canine distemper virus; genetic and variation; genotype

犬瘟热(Canine distemper, CD)是由犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)感染引起的一种急性、高度接触性传染病,可引起犬、狐、貉和貂等动物发病,是当前养犬业和毛皮动物养殖业危害最大的疫病^[1]。犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)属于副黏病毒科(Paramyxoviridae),副黏病毒亚科(Paramyxovirinae),麻疹病毒属(Morbillivirus),为单股不分节段负链 RNA 病毒。CDV 的基因组呈线性排列,约由 15 690 个核苷酸组成,近年来,虽然在广泛应用疫苗防治 CD,但是随着自然环境的改变、动物及病毒的进化,CDV 自然感染的宿主范围还有不断扩大的趋势^[2-4],大熊猫等多种野生动物也有 CD 自然发病的报道, Mee 等^[5]甚至从人的变形性骨炎(Paget)患者体内也检测到了 CDV 的核酸,使得 CD 有可能成为继狂犬病之后人犬共患的第 2 种疫病,引起了动物病毒学界及医学界的普遍关注^[6]。

到目前为止,CDV 只有一个公认的血清型。但是,一些具有不同毒力和细胞嗜性的 CDV 基因型已经被发现^[7]。根据 H 全基因编码的氨基酸序列构建系统进化树显示可明显分为几个不同的遗传分

支,根据分支上 H 基因编码氨基酸序列相似性高于 95% 的毒株可归于同一基因型的原则^[8-9],到目前为止,CDV 主要可划分为亚洲 I 型(Asia-I)、亚洲 II 型(Asia-II)、欧洲型(Europe)、美国型(USA 或 America)、北极型(Arctic)和疫苗型(Vaccine 或 Old CDVs)6 个基因型^[10-12],前 5 个基因型均为 CDV 野毒株。

随着世贸交流的不断深入,CDV 的流行和传播已经远超出人们的预期,因而对其的监测显得尤为重要。本研究旨在参照 CDV 参考毒株对 CDV H 基因的变异状态进行系统的分析,探索我国 CDV 的流行趋势及分子基础。

1 材料与方法

1.1 病毒株背景

下载 GenBank 中 2002—2010 年在中国地区分离的 14 株 CDV 野毒株、2006—2007 年在全球各地分离的 12 株 CDV 野毒株、从不同宿主分离的 12 株 CDV 野毒株与国内外正在使用的疫苗株的 H 基因序列,其分离背景分别参见表 1~4。

表 1 2002—2010 年在中国地区分离的 14 株 CDV 野毒株

Table 1 14 CDV wild isolates from different geographical areas of China during the years 2002 to 2010

病毒分离株 CDV isolate	分离时间 Time of isolation	宿主动物 Host	序列登录号 GenBank accession number
PS-5	2010	Dog	HQ128601
GS0904-7	2010	Dog	HM623891
GN	2009	Dog	EF445054
HeB(09)1	2009	Dog	HM448830
NM	2009	Dog	EF445053
ZD01	2009	Dog	EF445051
HLJ3-08	2008	Dog	FJ409464
SC01	2008	Dog	EF042818
JL(07)4	2007	Dog	EU564813
MS01	2006	Dog	DQ922630
HLJ2	2005	Dog	EU743935
HLJ1	2004	Dog	EU743934
TN	2003	Dog	AY390347
Kdk-1	2002	Dog	AB025271

1.2 H 基因序列全长的序列分析

用 DNASTar 的 MegAlign 软件对上述 4 组分离野毒株分别进行核苷酸序列的比对和同源性分析;并分析所有毒株氨基酸水平上的分子遗传进化关系;利用 SNA (Synonymous/ Non-synonymous Analysis

Program, <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/SNAP/SNAP.html>) 分析^[13] CDV H 基因的变异情况;用 N-glycoside web utility (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCO_SITE/glycosite.html) 分析潜在的天冬酰胺糖基化位点。

表 2 2006—2007 年在全球各地分离的 12 株 CDV 野毒株

Table 2 12 CDV wild isolates around the world in 2006 to 2007

病毒分离株 CDV isolate	分离地区 Country	宿主动物 Host	序列登录号 GenBank accession number
4L7039	South Africa	Dog	FJ461714
07D111	South Korea	Dog	EU716075
095Cr	Miyazaki, Japan	Dog	AB286952
111-03B	Italy	Dog	DQ494319
H06Ny13	Hungary	Dog	DQ889189
HLJ2-07	Heilongjiang, China	Dog	EU593894
JL(07)4	Jilin, China	Dog	EU564813
SD(06)2	Jilin, China	Dog	EU325726
48-05	Italy	Dog	DQ226088
TW-06-PT17	Taiwan, China	Dog	EU296491
179-94	Italy	Dog	DQ226087
009L	Japan	Dog	AB252718

表 3 不同宿主分离的 12 株 CDV 野毒株

Table 3 12 CDV wild isolates from different hosts

病毒分离株 CDV isolate	宿主动物 Host	序列登录号 GenBank accession number
Giant panda	Giant panda	AF178038
GS0904-8	Domestic dog	HM623893
Lesser panda	Lesser panda	AF178039
LN(07)3	Mink	EU325731
Lynx pardinus	Lynx pardinus	GU001863
Martes foina	Martes foina	GU001864
Monkey-KM-01	Monkey	FJ405224
Pr780-Lu	Meles	AB329581
SD(08)1	China-fox	FJ810215
SNP350-09	Vulpes	HM120874
011C	Dog	AB252717
01-2690	Raccoon	AY465925

表 4 国内外正在使用的疫苗株

Table 4 4 CDV vaccine strains

疫苗株 Vaccine strains	序列登录号 GenBank accession number
Onderstepoort	EU143737
Convac	Z35493
CDV3	DQ778941
Lederle	EF418782

2 结 果

2.1 基于 H 基因序列同源性分析

2.1.1 2002—2010 年间在中国地区分离的 14 株 CDV 野毒株与疫苗株 H 基因序列同源性分析
通过序列比对发现,各野毒株与疫苗株的 H 基因同源性相对较低,核苷酸相似性在 86.2%~91.3%,氨基酸相似性在 89.4%~91.3%;2002—2010 年间中国地区分离到的大部分 CDV 各野毒株间同源率较

高,在 97.1%~99.3%,氨基酸相似性为 96.9%~99.7%;但 2004—2005 年分离 2 株野毒株与其他 12 株野毒株间同源性较低,核苷酸相似性在 86.2%~88.8%,氨基酸相似性为 81.8%~86.3%。

根据 14 株 CDV 分离毒株与疫苗株的 H 基因核苷酸序列建立了系统进化树(图 1)。从绘制的 CDV 进化树可以看出,在 2002—2010 年内,中国地区主要流行的 CDV 进化关系比较接近,但在 2004、2005 年黑龙江地区的 CDV 可能是出现了变异,而使得其处于另一个大的分支上;在国内地区距离较近的省份分离毒株同源性更近,如黑龙江分离株 HLJ3-08 与吉林分离株 JL(07)4,甘肃分离株 GN 与河北分离株 HeB(09)1 均是各自又组成一个单独的小分支;从进化树上不能看出病毒的进化与分离的时间存在着较明显的相关性。

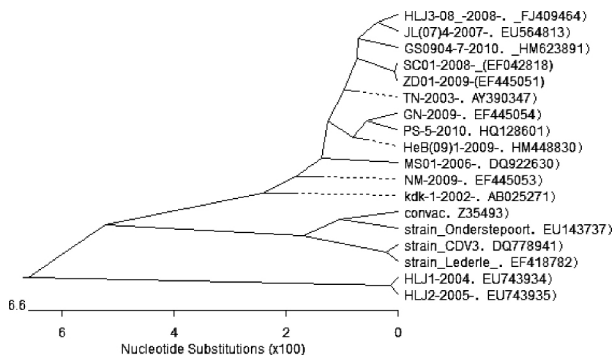


图 1 2002—2010 年在中国地区分离的 14 株 CDV 毒株与疫苗株的 H 基因系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree for part H gene sequences of the 14 CDV wild isolates from different geographical areas of China during the years 2002 to 2010 and the vaccine strains

2.1.2 2006—2007 年在全球各地分离的 12 株 CDV 毒株与疫苗株 H 基因序列同源性分析 通过序列比对发现,2006—2007 年在全球各地分离的 12 株 CDV 野毒株与 4 株疫苗株 H 基因序列相似性均较低,在 89.4%~92.1%,编码的氨基酸相似性在 89.1%~93.1%,但日本分离野毒株 MD77 与疫苗株相似性为 95.0%~97.6%,氨基酸相似性为 93.1%~95.7%,相似性较其他毒株高;各毒株之间由于地理位置的差异而变化较大,同一地区的基因相似性高于非同一地区,如 HLJ2-07 与 JL(07)4 株基因相似性为 99.1%,氨基酸相似性为 98.8%(均为中国株),而其与 07D111(分离于 South Korea)基因相似性为 92.3%,氨基酸相似性为 92.9%。

对 2006—2007 年在全球各地分离的 12 株 CDV 野毒株与疫苗株 H 基因核苷酸序列建立了系统进化树(图 2)。从图中可以看出 MD77 野毒株与疫苗株进化关系较近,在同一个大分支上;从 Japan 分离野毒株 009L 和 South Korea 分离野毒株 07D111 组成了一个分支;Italy 分离的 3 株野毒株:48-05、179-94 和 111-03B 株则分别分布在两个小分支上,表明进化关系较近的毒株也可能分布在不同的地区,而在一个地区可能分布着进化关系较远的毒株,这使得病毒发生基因重组的概率增大,从而发生变异的概率也可能增加。

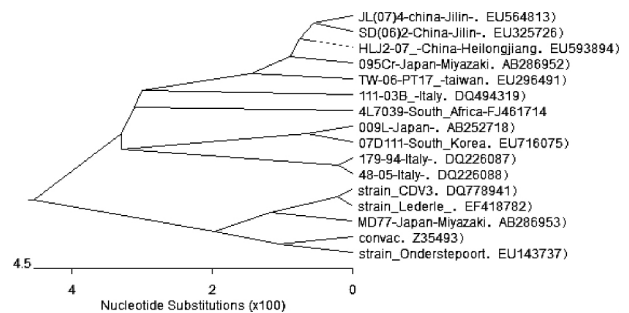


图 2 2006—2007 年在全球各地分离的 12 株 CDV 野毒株与疫苗株 CDV H 基因系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree for part H gene sequences of the 12 CDV wild isolates around the world in 2006 to 2007 and the vaccine strains

2.1.3 不同宿主分离的 12 株 CDV 野毒株与疫苗株 H 基因序列同源性分析 通过序列比对发现,从不同宿主分离的 12 株 CDV 野毒株与 4 株疫苗株 H 基因序列相似性均较低,在 89.8%~91.8%,氨基酸相似性为 89.3%~91.9%;各野毒株之间的氨基酸相似性大小也与地理因素有一定关系,大多数在同一地区的病毒分离株的相似性要高于不在同一地区的病毒分离株,如 Lynx pardinus 株与 Martes foina 株(均为 Spain 分离株)间相似性为 99.3%,其与 GS0904-8 株(中国株)相似性为 92.8%。

对从不同宿主分离的 12 株 CDV 野毒株与疫苗株 H 基因核苷酸序列构建系统进化树(图 3)。从系统进化树看,野毒株的基因型与动物的种属(家养犬和圈养毛皮动物、野生动物)、时间没有明显的相关性,但总体上表现出一定的地理位置相关性,如 Spain 分离株 Martes foina 和 Lynx Pardinus 就构成了自己的小分支。

2.2 基于 H 基因序列遗传进化分析

对所有毒株进行氨基酸水平上的分子进化关系

分析,结果见图 4。从图 4 可看出基因型分布大体呈现地区性分布的特点,与宿主或时间进化之间的相关性不明显;其中 Asia-I 和 Asia-II 型全为亚洲的毒株,其中 2004 年和 2005 年在中国黑龙江所分离到的 2 株野毒株由传统的 Asia-I 型突变为 Asia-II 型;Europe、Artic 和 Africa 型为主要是欧洲和美洲的毒株;America-I 型主要为疫苗型毒株,但从日本分离到的 MD77 野毒株与其进化关系也较近,同处于一个大的分支上。

2.3 基于 *H* 基因序列变异分析

如表 5 所示,不同基因型之间预测的天冬酰胺糖基化位点存在一定差异,其中第 19、149、422 和 587 四处潜在糖基化位点 6 种基因型均含有;从 Asia-I 型所随机抽取的 2 株野毒株有 9 个潜在糖基化位点,其中 584 位的糖基化位点是他们所特有;其他基因型的野毒株都含有 7~8 个潜在糖基化位点,其中 391 和 603 位是缺失位点多发区;疫苗株中除 Onderstepoort 有 4 个潜在糖基化位点外,Convac、CDV3 和 Lederle 株均含有 7 个糖基化位点。

对所选择的毒株 *H* 基因所编码的氨基酸的同义置换与非同义置换比例(ds/dn)结果(表 6)进行分析,可以看出,整个 *H* 基因编码的氨基酸发生同义置换的概率远大于发生非同义置换的概率,为 6.513 4;但是在 3555 区,其同义置换和非同义置换的比例为 0.530 9,其氨基酸发生同义置换的概率和非同义置换的概率相差不大。

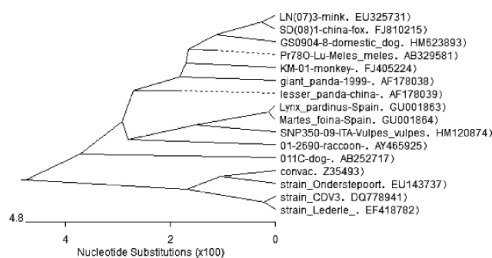


图 3 不同宿主分离的 12 株 CDV 野毒株与疫苗株 *H* 基因系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree for part *H* gene sequences of the 12 CDV wild isolates from different hosts and the vaccine strains

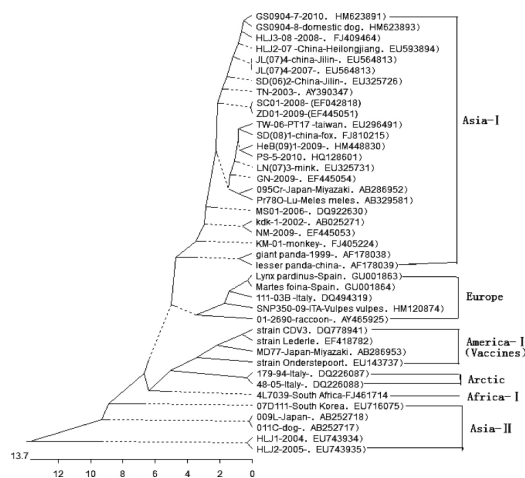


图 4 所有分离野毒株与疫苗株 *H* 基因的遗传进化分析

Fig. 4 Phylogenetic tree for part *H* gene sequences of wild isolates and the vaccine strains

表 5 不同基因型的 CDV 毒株 *H* 基因的潜在天冬酰胺糖基化位点分布情况

Table 5 Distribution status of N-glycosylation sites of *H* gene in different genotypes of CDV

基因型 Genotype	分离株 CDV isolate	潜在天冬酰胺糖基化位点 N-glycosylation sites in each sequence								
		19	149	309	391	421	456	584	587	603
Asia-I	Giant panda	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	HLJ3-08	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Europe	Martes foina	N	N	N	N	N	N	—	N	—
	111-03B	N	N	N	N	N	N	—	N	N
	Onderstepoort	N	N	—	—	N	—	—	N	—
Vaccines	Convac	N	N	—	N	N	N	—	N	N
	CDV3	N	N	—	N	N	N	—	N	N
	Lederle	N	N	—	N	N	N	—	N	N
Arctic	179-94	N	N	N	N	N	N	—	N	N
Africa-I	48-05	N	N	N	N	N	N	—	N	N
	4L7039	N	N	N	N	N	N	—	N	N
Asia-II	HLJ1	N	N	N	—	N	N	—	N	N
	011c	N	N	N	N	N	N	—	N	N

“N”: 潜在天冬酰胺糖基化位点; “—”. 阴性 “N”. N-glycosylation Sites; “—”. Negative

表 6 H 蛋白氨基酸序列的遗传差异

Table 6 Genetic diversity of amino acid sequences of H protein

H 蛋白区域 Region of H	氨基酸位点 aa position	SNAP 分析 SNAP analysis		
		ds	dn	ds/dn
H	1-608	0.182 0	0.030 2	6.513 4
3555	35-55	1.519 9	2.878 0	0.530 9

3 讨 论

3.1 H 蛋白是 CDV 囊膜表面的糖蛋白之一,为典型的 II 型糖蛋白,相对分子质量为 76 000。H 蛋白编码基因由 1 947 个核糖核苷酸组成,位于病毒基因组 7 053—8 999 位,编码氨基酸残基的数目也因毒株不同而异,Onderstepoort 疫苗株编码 604 个氨基酸残基,而 Convac 株和野毒株编码 607 个氨基酸残基^[8]。鉴于 CDV H 蛋白是诱导机体产生中和抗体的主要蛋白之一,是抗 CDV 免疫中很重要的抗原,同时 H 蛋白决定着病毒感染的宿主特异性,在免疫压力作用下,CDV 抗原表位可能发生漂移,尤其是较大的 H 蛋白极易发生变异,从而引起 CDV 毒力的变化;在麻疹病毒属所有结构蛋白中,H 蛋白变异大^[14-15],抗原变化最高^[9],Iwatsuki 等^[16]报道,H 蛋白抗原性的变化可能是近来日本免疫过的犬暴发 CD 的重要原因,因此 H 基因是研究 CDV 抗原变异的首选,故本试验选择 CDV H 基因进行研究。

3.2 在麻疹病毒中 H 蛋白的天冬酰胺糖基化位点在激发中和抗体过程中起着关键作用^[17],并可能会影响病毒的抗原性^[8, 16]。分析野毒株与疫苗株之间的 N-糖基化位点的位置及数目时发现 309 位的 N-糖基化位点为 CDV 野毒株所特有,野毒株都含有 7~8 个潜在糖基化位点,疫苗株中除 Onderstepoort 有 4 个潜在糖基化位点外,Convac、CDV3 和 Lederle 株均含有 7 个糖基化位点,第 584 位的天冬酰胺糖基化位点只在 Asia-I 型中发现,经分析认为可能是由于疫苗株与分离野毒株存在碱基和编码氨基酸上的差异而引起抗原决定簇发生变化,这些差异可为接种弱毒苗后仍有 CD 暴发这一问题的解决提供一种研究思路,但 N-糖基化位点在抗 CDV 中所起的作用还有待于进一步的研究。

H 蛋白 N 端的 35—55 位氨基酸残基即 3555 区域存在着 H 蛋白的一个疏水性区域,Curran

等^[18]认为它具有两方面的作用,一方面为穿膜的信号序列,另一方面为 H 蛋白的锚定区。笔者分析这段序列发现变异的趋势较大,其同义替换速率和非同义替换速率氨基酸的比例为 0.530 9,大多数基因受到进化选择压力,其非同义替换速率比同义替换速率低很多;也有少数基因的非同义替换速率与同义替换速率相差不大或高,这是因为该基因的功能正在发生或者已经发生了大的变化^[19],但目前这一区域的变异对 H 蛋白功能的影响还未见报道。

3.3 本研究对从 2002—2010 年在中国地区内分离的 CDV 野毒株、2006—2007 年在全球各地分离的 CDV 野毒株、从不同宿主分离的 CDV 野毒株的 H 基因进行核苷酸序列的比对和同源性分析,结果表明 CDV 野毒株与疫苗株间相似性在核苷酸水平为 86.2%~92.1%,在氨基酸水平为 89.1%~91.9%,同源性均偏低,因此推测 H 蛋白抗原变异可能造成了弱毒疫苗免疫效力的降低,不能为某些 CDV 流行株的感染提供完全有效的保护,因此,对 CDV 进行全面深入的分子流行病学研究,弄清 CDV 主要流行株的种类和分布,对分析生产实践中免疫失败的原因,有针对性地采取相应的防治措施,最终有效控制该病有着重大的实际应用意义。

分析所有毒株氨基酸水平上的分子遗传进化关系发现,CDV 基因型的分布大体上依然遵循地理性分布原则,与宿主或时间进化之间的相关性不明显。在一些国家或地区也存在着 2 种或 2 种以上 CDV 基因型的流行,如在中国黑龙江地区出现 Asia-I 和 Asia-II 型 2 种基因型的 CDV,因此明确引起毒株变异的因素是由于外界传入新基因型还是毒株自身基因发生进化这一问题具有重要意义。作者推测可能是由于贸易传入外来基因型,不同基因型间发生基因重组而导致基因出现变异。目前随着人们生活水平的提高,宠物犬的数量也越来越多,特别是一些国外犬的引入,可能会引入新的基因型的病毒,因此加强对跨国引入动物的检疫也是犬瘟热防控体系中的一个重要环节。

参考文献:

- [1] ZHAO J J, YAN X J, CHAI X L, et al. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China[J]. *Vet Microbiol*, 2009, 140(1-2): 34-42.

- [2] CARPENTER M A, APPEL M J, ROELKE-PARKER M E, et al. Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, 65(2-4): 193-205.
- [3] APPEL M J, YATES R A, FOLEY G L, et al. Canine distemper epizootic in lions, tigers and leopards in North America[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1994, 6(3): 277-288.
- [4] YOSHIKAWA Y, OCHIKUBO F, MATSUBARA Y, et al. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*) [J]. *Vet Microbiol*, 1989, 20(3): 193-205.
- [5] MEE A P, DIXON J A, HOYLAND J A, et al. Detection of canine distemper virus in 100% of Paget's disease samples by in situ-reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. *Bone*, 1998, 23(2): 171-175.
- [6] 许莎琼,朱建国,傅志强. 犬瘟热病毒当前研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006(1): 6-7.
- [7] LAN N T, YAMAGUCHI R, HIRAI T, et al. Relationship between growth behavior in vero cells and the molecular characteristics of recent isolated classified in the Asia 1 and 2 groups of canine distemper virus [J]. *J Vet Med Sci*, 2009, 71(4): 457-461.
- [8] BOLT G, JENSEN T D, GOTTSCHALCK E, et al. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78(2): 367-372.
- [9] MOCHIZUKI M, HASHIMOTO M, HAGIWARA S, et al. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(9): 2935-2942.
- [10] MARTELLA V, PRATELLI A, CIRONE F, et al. Detection and genetic characterization of canine distemper virus(CDV) from free-ranging red foxes in Italy[J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(1): 77-83.
- [11] LAN N T, YAMAGUCHI R, FURUYA Y, et al. Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs[J]. *Vet Microbiol*, 2005, 110(3-4): 197-207.
- [12] LAN N T, YAMAGUCHI R, KAWABATA A, et al. Comparison of molecular and growth properties for two different canine distemper virus clusters, Asia 1 and 2, in Japan[J]. *J Vet Med Sci*, 2007, 69(7): 739-744.
- [13] CHEN N, HU H, ZHANG Z. Genetic diversity of the envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus: recent isolates branched away from historical and vaccine strains[J]. *Vet Micro Biol*, 2008, 127(3-4): 286-299.
- [14] IWATSUKI K, TOKIYOSHI S, HIRAYAMA N, et al. Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses[J]. *Vet Microbiol*, 2000, 71(3-4): 281-286.
- [15] HIRAMA K, TOGASHI K, WAKASA C, et al. Cytotoxic T-lymphocyte activity specific for hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus in dogs [J]. *Vet Med Sci*, 2003, 65(1): 109-112.
- [16] IWATSUKI K, MIYASHITA N, YOSHIDA E, et al. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78(2): 373-380.
- [17] IWATSUKI K, MIYASHITA N, YOSHIDA E, et al. The nucleotide and predicted amino acid sequence of the fusion Protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan[J]. *J Vet Med Sci*, 1998, 60: 381-385.
- [18] CURRAN M D, CLARKE D K, RIMA B K. The nucleotide sequence of the gene encoding the attachment protein H of canine distemper virus[J]. *J Gen Virol*, 1991, 72(2): 443-447.
- [19] 李 易. 基因进化的同义与非同义替代计算及统计检验的比较分析[J]. 曲靖师范学院学报, 2006, 25(6): 1-8.

(编辑 白永平)