

犬冠状病毒的进化和致病性研究进展

刘玉秀, 黄柏成, 习向锋, 田克恭
(国家兽用药品工程技术研究中心, 河南 洛阳 471000)

中图分类号: S858.292

文献标志码: A

文章编号: 0529-6005(2020)02-0059-04

长期以来, 人冠状病毒(Human Coronavirus, HCoV) 因仅在健康人群中引起轻度症状而一直未被重视。直到 2003 年严重急性呼吸综合征(Severe acute respiratory syndrome, SARS) 疫情的暴发^[1], 其病原 SARS 冠状病毒(SARS-CoV) 高传播力和高致死率, 才引起人类对动物冠状病毒作为直接和间接人兽共患病潜在病原的兴趣。2019 年底, 由 SARS-CoV-2 感染暴发的新冠肺炎(COVID-19)^[2] 在全球广泛流行并造成巨大损失。由于冠状病毒基因组的易突变性, 所形成的新型病毒可能在增强病毒致病力和强流行性中起到重要作用。冠状病毒基因组的易突变性也造成犬冠状病毒(Canine coronavirus, CCoV) 新毒株的出现。近年来, 犬群中出现与经典犬冠状病毒(CCoV) 具有不同生物学和遗传学特性的毒株, 对犬类疾病鉴别诊断及防控造成了极大挑战。本文对近年来 CCoV 在基因演变、组织嗜性变化上的发展进行了综述, 并对 CCoV 疫苗保护效果不足的临床应用现状进行了讨论, 以期对新型冠状病毒防控及疫苗开发提供一些借鉴。

1 冠状病毒分类与基因组组成

冠状病毒(Coronaviruses, CoV) 属于单股正链 RNA 病毒, 可在哺乳动物和鸟类中引起支气管炎、胃肠炎、肝炎、传染性腹膜炎和脑炎等多种疾病。冠状病毒科(Coronaviridae) 分为 α 、 β 、 γ 和 δ 四个属^[3]。 α 属包括 8 个种, 即 α 冠状病毒 1、人冠状病毒 229E、人冠状病毒 NL63、长翼蝠冠状病毒 HKU1、菊头蝠冠状病毒 HKU2 和猪流行性腹泻病毒等。其中犬冠状病毒(Canine coronavirus, CCoV)、猫冠状病毒(Feline coronavirus, FCoV) 和猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 是 α 冠状病毒 1 的成员; β 属包括 7 个种, 即 β 冠状病毒

1、人冠状病毒 HKU1、小鼠肝炎病毒(Mouse hepatitis virus, MHV)、家蝠冠状病毒 HKU5、果蝠冠状病毒 HKU9、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 等。其中犬呼吸道冠状病毒(Canine respiratory coronavirus, CRCoV) 和牛冠状病毒(Bovine coronavirus, BCov)、人冠状病毒 OC43、马冠状病毒(ECoV) 和猪血凝性脑脊髓炎病毒(Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, PHEV) 同属于 β 冠状病毒 1 成员; δ 属包括 7 个种, 多为鸟类和禽类冠状病毒如赤颈鸭冠状病毒 HKU20, γ 属包括白鲸冠状病毒和鸡传染性支气管炎(Avian infectious bronchitis virus, IBV) 等^[3]。2019 年底, 引起全球流行新冠肺炎(2019-nCoV) 的 SARS-CoV-2 为 β 冠状病毒属, S 基因同源性进化结果显示, 其与 α 冠状病毒属的 CCoV 和 FCoV 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 44.2% ~ 46.4% 和 22.5% ~ 24%; 与同是 β 冠状病毒属的犬呼吸道冠状病毒 CRCoV 的核苷酸和氨基酸同源性为 45.3% 和 28.8%。SARS-CoV-2 与先前描述的任何动物冠状病毒都没有密切关系, 如图 1 所示。

CoV 的基因组约 27 ~ 32 kb, 含 7 ~ 11 个开放阅读框(ORF) 编码结构蛋白和非结构蛋白。基因 1 由 2 个部分重叠的 *ORF1a* 和 *ORF1b* 组成, 翻译病毒复制酶(Rep) 前体蛋白。复制酶基因下游的 4 ~ 5 种基因 *ORF*(5'-Rep-S-E-M-N-3') 或(5'-Rep-HE-S-E-M-N-3') 编码结构蛋白^[5], 分别是棘突蛋白 S(Spike protein)、核衣壳蛋白 N(Nucleocapsid protein)、膜蛋白 M(Membrane protein)、小膜蛋白 E(Small membrane protein) 和血凝素酯酶 HE(Hemagglutinin esterase)。

成熟的 S 蛋白具有多种生物学功能, 包括与宿主受体结合、诱导病毒包膜与细胞膜融合、诱导机体产生中和抗体、与病毒毒力强弱密切相关, 其还影响某些冠状病毒的血凝性, 如 PHEV 和 IBV 等具有血凝特性^[5]。M 蛋白是横跨于病毒囊膜上的糖蛋白, 主要负责病毒颗粒的组装^[5]。M 蛋白糖基化序列高度保守, 其糖链主要由 N-(主要是 α -和 γ -CoV) 或 O-(主要是 β -CoV) 方式连接到膜蛋白上^[2, 5],

收稿日期: 2020-02-01

基金项目: 国家重点研发计划(2020YFC0846500)

作者简介: 刘玉秀(1985-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为犬猫病毒和疫苗研究, E-mail: qingqingyuxiu1@163.com

通讯作者: 田克恭, E-mail: vetvac@126.com

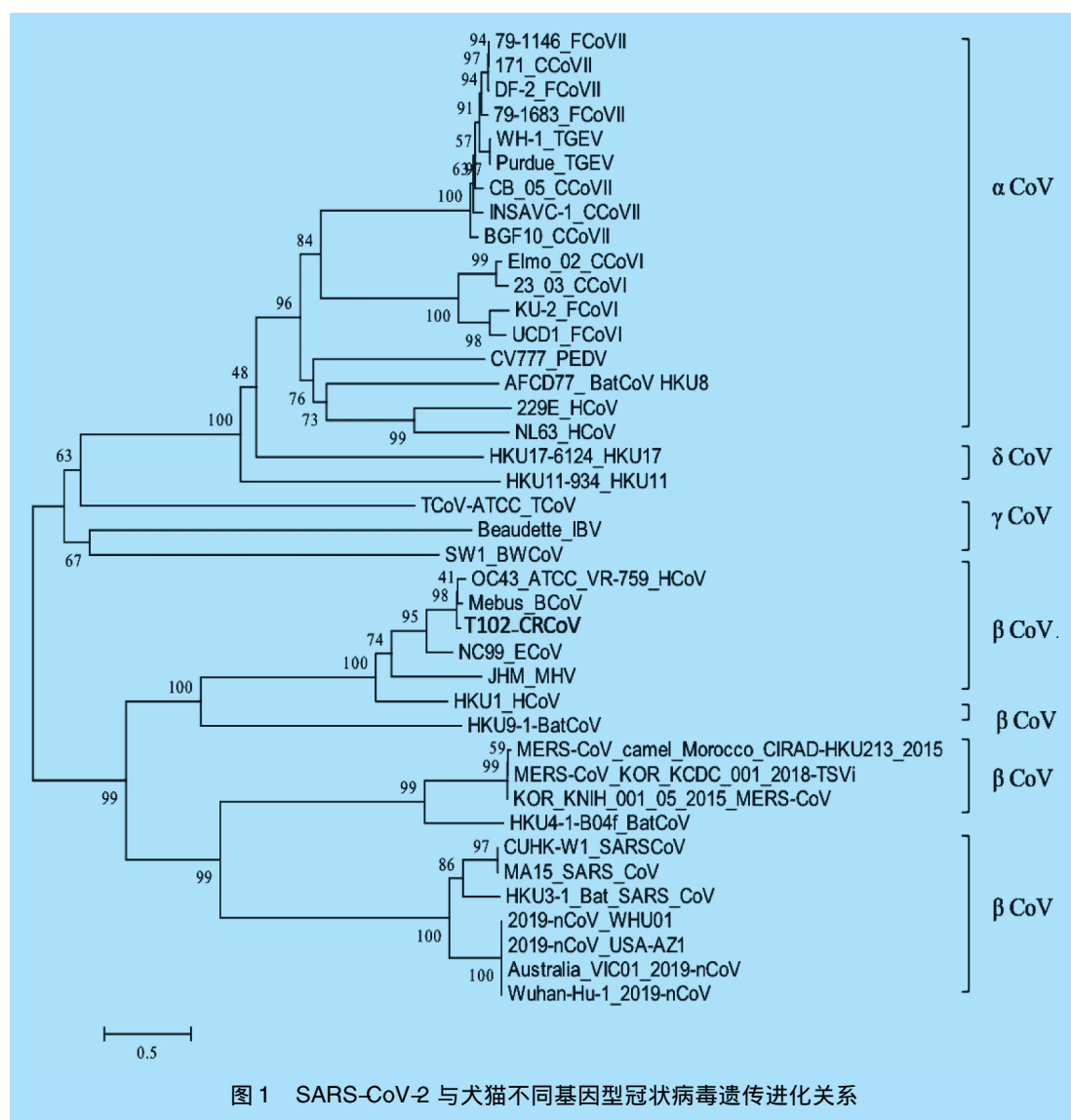


图1 SARS-CoV-2 与犬猫不同基因型冠状病毒遗传进化关系

M 蛋白能诱导机体产生干扰素^[6]。E 蛋白是一种在 CoV 中含量很少的小包膜蛋白,与 M 蛋白共表达形成 E-M 蛋白复合体,产生病毒样粒子,E 蛋白缺失可导致病毒粒子的复制量大大减少,病毒最终形态的形成与 E 蛋白密切相关^[6]。HE 蛋白主要存在于 β 冠状病毒(如 PHEV、CRCoV 和 MHV),也见于 γ 冠状病毒禽冠状病毒中,而 SARS-CoV 是 β 冠状病毒典型的非 HE 病毒^[7]。HE 蛋白介导病毒与细胞膜最初的吸附。HE 蛋白具有乙胺脂酶活性,能在乙胺化的神经氨酸上切割乙胺基团,防止或逆转 S 蛋白或 HE 引起的凝血或血细胞吸附效应^[8]。HE 蛋白对于病毒复制非必需,在 β 冠状病毒中高度变异,在连续病毒传代过程中频繁发生突变和缺失,它的存在与否可改变病毒在动物体内的致病性^[8]。

2 犬肠道型冠状病毒

1971 年 Binn 等首次在急性肠炎犬中分离到

CCoV^[9]。CCoV 感染常局限于消化道,引起轻度或重度胃肠炎,以高发病率和低死亡率为特征。CCoV 有 2 种基因型: CCoV-I 和 CCoV-II 2 种基因型 S 基因相似率 54%^[10],通过扩增基因组 *ORF2* 和 *ORF5* 片段即可鉴别^[11]。此外,CCoV-I 型基因组含有独特的 *ORF3*(624 nt),该基因片段在 CCoV-II 和与其相关的 FCoV-I 和 TGEV 的基因组中仅有少量残留^[12]。CCoV-II 存在 2 种亚型,CCoV IIa 和 CCoV IIb,前者为经典的 CCoVs 毒株,后者是 CCoV II 和 TGEV 重组的 TGEV 样毒株,在犬群中广泛存在^[13]。与其他 CoV 类似,CCoV 基因很容易突变,过去十几年出现多株具有潜在强毒力和基因差异的新 CCoV 毒株;澳大利亚流行的可导致急性致死性胃肠炎的 CCoV II 型毒株(UWSMN-1 株)的 *ORF1b*、S 基因和 5'端与经典 CCoV II 毒株相似率分别为 96.1%、86.1%和 93.0%;系统进化显示,UWSMN-1 株有别于经典 CCoV 和 FCoV,单独形成一个分支,表明突

变是在其整个病毒基因组中逐渐积累而成,不是 CCoV 和 FCoV 之间的重组产物^[14]。2004 年英国暴发了由 CCoV II 型高致病性毒株引起的疫情,流行株的基因组存在一个超长的编码非结构蛋白基因 3b(250aa)和高度分化 M 基因^[15];在意大利腹泻犬中检测到几种 CCoV 在 M 基因出现点突变,有向 FCoV I 型的遗传漂移的趋势,其 S 蛋白序列与 FCoV 相似性达 81%^[16]。

3 泛嗜性犬冠状病毒

2005 年,意大利病死犬的脑组织中分离的 CCoV II 型变种(CB/05 株)可引起感染犬严重系统性疾病^[17],包括发热(39.5~40.8℃)、嗜睡、消化道症状(呕吐、腹泻)、严重白细胞减少和神经症状(共济失调和惊厥),发病后 2 d 内死亡。肺、肝、肾和脾有严重病变,在肺、脾、肝、肾和脑组织中均检测到 CCoV II 型 RNA;此后 2008–2009 年在法国、比利时和希腊均有泛嗜性 CCoV 引起严重致死性疾病流行。研究显示,CB/05 株与肠道型 CCoV-II 在 ORF2 氨基酸序列高度相似,S 蛋白与 FCoV II 毒株 79-1683 株相似性最高,但 CB/05 株在 ORF3b 有 1 个 38 nt 基因缺失标记,是泛嗜性 CCoV 遗传标记^[18],目前该病毒泛嗜性相关遗传变化尚待确定。脑组织中分离的 CB/05 株有力地表明,CCoV 可改变原有的组织感染嗜性,获得了从肠道传播至其他内脏的能力^[19]。泛嗜性 CCoV 是否因基因的变化变成可识别其他受体还未知,期望可建立反向遗传系统来研究病毒毒力和组织感染嗜性变化等相关研究。

4 犬呼吸道冠状病毒

2003 年出现人 SARS-CoV 后,加强了犬群中冠状病毒流行病学调研。同年,英国从患地方性呼吸道疾病犬中分离 1 株 CoV^[18],轻度上呼吸道症状犬中该毒株感染率较高,被称为犬呼吸道冠状病毒(CRCoV)。CRCoV 的复制酶基因和 S 基因与 BCoV 遗传关系密切。T101 株 CRCoV 的 S 基因与 BCoV 和 HCoV-OC43 株 S 基因相似率分别为 97.3% 和 96.9%,提示 3 种病毒有相近的共同祖先,并在不同宿主生物中重复转移^[20-21]。BCoV 经典毒株可感染幼犬,这为 CRCoV 来源于牛源病毒提供了佐证^[22]。基因水平显示 CRCoV 与 CCoV 无关,其 S 基因与肠道 CCoV 同源性仅 21.2%^[18]。

CRCoV 在主要结构蛋白和非结构蛋白中与 BCoV 亚群遗传关系密切。BCoV 基因组 S 基因和 E

基因中间有 3 个不同的 ORF,分别编码 4.9、4.8 kDa 和 12.7 kDa 的非结构蛋白,而 CRCoV 基因组在该区域由于 2 nt 的缺失引起对应 BCoV 基因组编码 4.9 kDa 非结构蛋白的终止密码子缺失而导致形成 8.8 kDa 联合蛋白的翻译,导致只含有 2 个 ORF 分别编码 8.8 kDa 和 12.8 kDa 的非结构蛋白^[23]。与肠道 CCoV I 和 CCoV II 型不同,单纯的 CRCoV 仅引起犬轻微呼吸道症状,但 CRCoV 在呼吸道上皮细胞中的复制可能损害黏液纤毛系统,导致由其他呼吸道病原体感染引起更严重的临床过程。

5 犬冠状病毒感染的防控

CCoV 具有高传染性,一旦暴发传播就难以控制,感染犬可连续排毒 6 个月^[17]。CCoV 灭活疫苗(Duramune P C, Fort Dodge)是 CoV 中为数不多获得生产许可的疫苗。该 CCoV 灭活疫苗皮下免疫后免疫保护欠佳,虽能诱导机体产生较高水平抗体,攻毒后没有明显保护作用^[24-25],不能有效减少感染后排毒,不能有效阻断病毒传播。经口鼻免疫减毒活疫苗也不能对疾病和感染产生完全保护^[26];在血清水平,CCoV I 型和 CCoV II 型之间交叉反应性较差^[27],即使是减毒活疫苗也不能预防 CCoV I 型攻毒后的感染。

此外,新型肠道 CCoV 基因型和泛嗜性 CCoV 病理类型的出现,对肠道 CCoV 疫苗的保护效力提出新的挑战。泛嗜性 CCoV 的 CB/05 毒株具有明显淋巴嗜性,犬感染 1 周后 T 淋巴细胞大量消耗,CD8⁺ 细胞和 B 淋巴细胞在感染后第 7 天恢复至正常水平,外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞长期消耗可能影响体液免疫和细胞免疫,从而损害有效免疫应答的产生和维持能力^[28],严重损害犬对并发病原或疫苗抗原的免疫反应。犬舍和动物收容所的幼犬暴露于多种病原中,同时感染泛嗜性 CCoV 可能会加剧其他病毒的临床进程,从而导致幼犬迅速死亡。其次,CCoV 灭活疫苗推荐的首免时间是 40~60 日龄,也是 CCoV 感染几率最高的时机。

目前,所有商品化肠道 CCoV 灭活疫苗不能保护幼犬来自泛嗜性 CCoV 的攻毒,免疫犬感染泛嗜性 CCoV 会出现亚临床症状,导致淋巴细胞减少,这可能是机会性病原体 and 由“真”病原体(CDV、CAV 和 CPV 等)诱发更严重疾病的一个易感因素,且犬在康复后 6 个月还能检测到排毒^[18]。至于能否抵抗 CRCoV 感染尚不明确。CCoV 灭活疫苗产生的免疫效力和持续时间尚未得到证实。减毒活疫苗接

种后有较高频率的副反应,人们对 CCoV 疫苗在田间试验提供的免疫保护力存在较大争议。

6 展望

基因组点突变积累及插入或缺失都是导致 RNA 病毒微进化的主导力量,导致病毒株、血清型和基因亚型的增多^[4]。几十年来,CCoV 通过某些区域基因的点突变和积累而不是基因重组经历了一次次遗传进化。*ORFs 2* 群体特异基因的变化被认为是 CCoV II 型毒力增强的原因^[16]。*S* 基因点突变也被认为与泛嗜性 CCoV 的发生有关^[18]。CRCoV 可能是 1 株 BCoV 的宿主从牛到犬的变种^[18,20]。因此,在 HCoV(如 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2)的研究中,我们要研究 CoV 的非人类宿主来源,更需要关注的是哪些基因的突变累积或插入或缺失使新型 CoV 的致病力和传染性增强?

CCoV 在长期的毒株进化演变过程中,突变出致病力更强,对宿主组织嗜性更广泛的犬泛嗜性 CCoV,引起感染犬短时间淋巴细胞大量消耗,增加了感染其他致死性病原的风险,造成不可逆转全身性疾病;泛嗜性 CCoV 的出现,对 CCoV 感染的防控提出新的挑战,也是对 HCoV 进化的重要提示, HCoV 由原来仅引起人普通感冒的毒株,进化演变成严重下呼吸道、肺炎的严重疾病,是否也存在人冠状病毒某些突变导致可识别新的受体引起?

犬冠状病毒疫苗田间试验免疫接种的益处未达预期,CCoV I 型和 CCoV II 型交叉保护性低。新基因型 CCoV、泛嗜性 CCoV 及呼吸道 CRCoV 的出现,使肠道 CCoV 灭活疫苗接种后不能有效抵抗野毒感染。此外,CCoV 疫苗不能有效降低感染后排毒和阻断病毒传播。期望人新型 CoV 疫苗的研发过程中,要规避犬冠状病毒疫苗的缺陷,真正起到预防控制疾病作用。

我们还需要进一步研究来揭示导致 CoV 病理生物学改变的分子机制,为理解 CoV 致病性和免疫机理提供新的见解。同时,持续的流行病学监测将有助于发现具有不同遗传生物学特性的毒株,为深入了解动物 CoV 的致病机制提供科学依据。

参考文献:

- [1] Zhong N S, Zheng B J, Li Y M, *et al.* Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, China, in February, 2003 [J]. *Lancet*, 2003, 362(9393): 1353-1358.
- [2] Zhu N, Zhang D, Wang W, *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 [J]. *New England Journal*

of Medicine, 2020, 382(8): 727-733.

- [3] Woo P C Y, Huang Y, Lau S K P, *et al.* Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis [J]. *Viruses*, 2010, 2(8): 1804-1820.
- [4] Jarvis T, Kirkegaard K. The polymerase in its labyrinth: mechanisms and implications of RNA recombination [J]. *Trends in Genetics*, 1991, 7(6): 186-191.
- [5] Lai M C, Holmes K V. *Fields Virology* [M]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 1163-1185.
- [6] Vennema H, Godeke G J, Rossen J W, *et al.* Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by coexpression of viral envelope protein genes [J]. *EMBO Journal*, 1996, 15(8): 2020-2028.
- [7] Jackwood M W. The relationship of severe acute respiratory syndrome coronavirus with avian and other coronaviruses [J]. *Avian Diseases*, 2006, 50(3): 315-320.
- [8] Enjuanes L, Brian D, Cavanagh D, *et al.* Family Coronaviridae. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses* [C]// *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York: Academic Press, 2000: 835-849.
- [9] Binn L N, Lazar E C, Keenan K P, *et al.* Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea [J]. *Proceedings Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, 1974(78): 359-366.
- [10] Pratelli A, Martella V, Decaro N, *et al.* Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhoea in Italy [J]. *Journal of Virological Methods*, 2003, 110(1): 9-17.
- [11] Pratelli A, Decaro N, Tinelli A, *et al.* Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in the fecal samples of dogs with diarrhea [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(4): 1797-1799.
- [12] Lorusso A, Decaro N, Schellen P, *et al.* Gain, preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein [J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(20): 10312-10317.
- [13] Decaro N, Mari V, Campolo M, *et al.* Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of Swine are circulating in dogs [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(3): 1532-1537.
- [14] Naylor M J, Harrison G A, Monckton R P, *et al.* Identification of canine coronavirus strains from feces by S gene nested PCR and molecular characterization of a new Australian isolate [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(3): 1036-1041.
- [15] Sanchez-Morgado J M, Poynter S, Morris T H. Molecular characterization of a virulent canine coronavirus BGF strain [J]. *Virus Research*, 2004, 104(1): 27-31.
- [16] Pratelli A, Martella V, Elia G, *et al.* Variation of the sequence in the gene encoding for transmembrane protein M of canine coronavirus [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2001, 15(4): 229-233.
- [17] Buonavoglia C, Decaro N, Martella V, *et al.* Canine coronavirus highly pathogenic for dogs [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(3): 492-494.

抗菌肽 LL37 抵抗病原微生物感染研究进展

张 凯¹, 王 杰², 李梦莹¹, 马小静¹, 董 馨¹, 孙鑫鹏¹, 赵德明², 周向梅², 许立华¹

(1. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021;

2. 中国农业大学动物医学院 国家动物传染性海绵状脑病实验室, 北京 海淀 100193)

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

文章编号: 0529-6005(2020)02-0063-04

宿主防御肽又名抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs), 最早是由瑞典科学家 Boman H G 于 1980 年在天蚕蛹中发现的一类阳离子小肽类物质, 因其具有杀灭病原菌的作用, 便被命名为抗菌肽^[1]。抗菌肽广泛存在于动植物和少量微生物体内, 是脊椎动物先天免疫的重要组成部分。作为一种分泌性蛋白, 抗菌肽在机体抵抗病原微生物、新血管生成、创伤修复和杀灭肿瘤细胞等方面扮演重要角色^[2]。哺乳动物的 AMPs 有 2 个主要类别: 防御素家族和 Cathelicidin 家族。防御素家族的大部分成员在 C

末端包含 6 个保守的半胱氨酸残基, 根据其半胱氨酸的间距模式分类为 α 、 β 或 θ 防御素^[3]。Cathelicidin 家族成员是在巨噬细胞和中性粒细胞的溶酶体和角质细胞中发现的多肽家族, 其特征是保守的 N 端 Cathelin 结构域和高度可变的 C 端抗微生物结构域, 通常为 α 螺旋或扩张性的结构。Cathelicidin 家族成员存在于从鱼类到哺乳动物类的脊椎动物中, 许多哺乳动物都含有 Cathelicidin 基因。

人源抗菌肽 LL37 是目前人体内发现的唯一一种 Cathelicidin 家族抗菌肽, 于 1995 年被发现, 由位于 3 号染色体上的 CAMP 基因编码, 主要由巨噬细胞、单核细胞和各种上皮细胞的活性结构域释放^[4]。LL37 的前体是 19.3 ku 含信号肽的前原肽, C 末端包含 37 个氨基酸残基, 无活性。去掉信号肽后为 18 ku(hCAP-18), 经细胞释放后, C 端结构域在细胞外丝氨酸蛋白酶角质层胰蛋白酶(SCTE)和角质层胰凝乳蛋白酶(SCCE)的作用下产生有活

收稿日期: 2018-07-23

基金项目: 宁夏科技厅育种专项(2013NYYZ0501); 国家自然科学基金(31560687, 31760722)

作者简介: 张凯(1993-), 男, 硕士生, 研究方向为兽医微生物学与免疫学, E-mail: 942737905@qq.com

通讯作者: 许立华, E-mail: littlezhe99@163.com; 周向梅, E-mail: zhouxm@cau.edu.cn

- [18] Erles K, Toomey C, Brooks H W, *et al.* Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease[J]. *Virology*, 2003, 310(2): 216-223.
- [19] Decaro N, Martella V, Elia G, *et al.* Molecular characterisation of the virulent canine coronavirus CB/05 strain[J]. *Virus Research*, 2007, 125(1): 54-60.
- [20] Vijgen L, Keyaerts E, Moes E, *et al.* Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(3): 1595-1604.
- [21] Vijgen L, Keyaerts E, Lemey P, *et al.* Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(14): 7270-7274.
- [22] Kaneshima T, Hohdatsu T, Hagino R, *et al.* The infectivity and pathogenicity of a group 2 bovine coronavirus in pups[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2007, 69(3): 301-303.
- [23] Erles K, Shiu K B, Brownlie J. Isolation and sequence analysis

- of canine respiratory coronavirus[J]. *Virus Research*, 2007, 124(1-2): 78-87.
- [24] Kaneshima T, Hohdatsu T, Satoh K, *et al.* The prevalence of a group 2 coronavirus in dogs in Japan[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2006, 68(1): 21-25.
- [25] Pratelli A, Tinelli A, Decaro N, *et al.* Efficacy of an inactivated canine coronavirus vaccine in pups[J]. *New Microbiologica*, 2003, 26(2): 151-155.
- [26] Pratelli A, Tinelli A, Decaro N, *et al.* Safety and efficacy of a modified-live canine coronavirus vaccine in dogs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 99(1): 43-49.
- [27] Pratelli A, Elia G, Decaro N, *et al.* Cloning and expression of two fragments of the S gene of canine coronavirus type I[J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 117(1): 61-65.
- [28] Marinaro M, Mari V, Bellacicco A L, *et al.* Prolonged depletion of circulating CD4⁺ T lymphocytes and acute monocytosis after pantropic canine coronavirus infection in dogs[J]. *Virus Research*, 2010, 152(1-2): 73-78.