

动物园大型猫科动物犬瘟热的免疫监测*

李梅荣¹, 唐泰山², 张常印², 王凯民², 李明杰¹, 程家求¹, 陆承平^{3**}

(1 南京市红山森林动物园, 江苏南京 210028; 2 江苏出入境检验检疫局, 江苏南京 210001; 3 南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室, 江苏南京 210095)

Immunological Survey of Canine Distemper in Large Felids in Zoos

LI Mei-rong¹, TANG Tai-shan², ZHANG Chang-yin², WANG Kai-min²,
LI Ming-jie¹, CHEN Jia-qiu¹, LU Cheng-ping^{3**}

(1. Nanjing Forest Zoo, Nanjing 210028, China; 2. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China; 3. Key Lab of Animal Disease Diagnostic & Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Large felids, such as tigers, lions and leopards are often infected with Canine Distemper (CD). Blood samples from pre-immune Amur tiger, African lion and lynx were collected and the antibody against CDV was measured by neutralization tests. The results showed that their CDV antibody level were all below 1:5. After inoculated with attenuated CD vaccine, the young animals produced antibody in 14 days but the antibody levels of the adults increased rapidly within two months and maintained at titer of 1:64, then gradually dropped after 9 to 11 months. After booster immunizing, antibody level went up rapidly to $\geq 1:112$. The vaccination was safe to the animals. Achroia Indian tiger, however, could not produce CDV neutralizing antibody after vaccination.

Key words: Canine Distemper; Attenuated Vaccine; Felids; Immune Surveillance; Neutralization Test

摘要: 虎、狮、豹等大型猫科动物可发生犬瘟热 (CD), 有必要进行预防。采取某动物园未免疫的东北虎、非洲狮、猞猁血样, 用中和试验检测, 结果显示这些动物的犬瘟热病毒 (CDV) 抗体水平均小于 1:5。用 CD 弱毒疫苗接种以上动物, 幼龄动物免疫 14d 逐步产生抗体; 成年动物体内抗体水平在两月内迅速升高, 并维持在 1:64 以上, 9~11 个月后逐步下降, 加强免疫后抗体又迅速升高至 $\geq 1:112$ 。该疫苗对所有接种的动物均安全可靠。白化的孟加拉虎接种疫苗后不能产生 CDV 中和抗体。

关键词: 犬瘟热; 弱毒疫苗; 猫科动物; 免疫; 中和试验

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0368-03

犬瘟热由犬瘟热病毒 (*Canine distemper virus*, CDV) 引起, 是犬的最重要的病毒病, 遍及全世界。CDV 具有高度传染性。宿主范围包括犬科的所有动物、浣熊科、鼬科及猫科的大部分成员 (狮、豹、猎豹、虎)^[1]。我国 1980 年分离到该病毒, 目前各地时有发生。非疫区首次爆发犬瘟热时, 动物易感性极高, 死亡率可达 90% 以上。临床病例大多为 3~6 月龄的幼犬, 冬季发病率最高, 常每隔 2~3 年大爆发一次。

CDV 的易感动物群体在不断扩大^[2]。特别是还能引起虎、狮、豹等猫科动物发病。2003 年 3 月, 北京市某动物园的一只虎发病死亡, 经过病毒分离

鉴定为 CDV^[3]。Appel 等报道, 美国加利福尼亚州野生动物园于 1991~1992 年有 17 只大型猫科动物死于犬瘟热, 包括豹、虎、狮等; 另外, 伊利诺动物园和加利福尼亚某保护区分别死亡 2 只豹和 2 只虎。先后从死亡或濒临死亡的 3 只豹、3 只虎和 3 只狮体内分离出 CDV^[4]。

以上事实表明, 犬瘟热已经威胁到动物园饲养的猫科动物。接种疫苗建立安全可靠的免疫程序, 已是当务之急。本试验之前, 作者所在动物园给猫科动物接种犬瘟热弱毒疫苗 200 余只次, 没有一只发生不良反应, 可见该疫苗是安全的。但接种的剂

收稿日期: 2005-01-06, 修回日期: 2006-02-20

* 基金项目: 南京建设系统科研项目 (93A2005Y1059)

作者简介: 李梅荣 (1971-), 男, 福建上杭籍, 兽医师, 研究方向为动物园动物疾病防治。

** 通讯作者. Corresponding author. E.mail: lucp@njau.edu.cn.

量是否足够, 一年接种一次的间隔期是否合理, 以及不同动物接种同样剂量疫苗以后的免疫应答如何, 均不清楚。本试验采用进口犬瘟热弱毒多联疫苗, 免疫某动物园内的大型猫科动物, 定期采血检测 CDV 抗体水平, 研究抗体消长规律, 为制定有效免疫程序提供依据。

1 材料与方法

1.1 未免疫动物

3 月龄左右未接种疫苗的东北虎 (*Panthera tigris altaica*) 13 只、白虎 (*Panthera tigris tigris*, 孟加拉虎的白色变种) 4 只、非洲狮 (*Panthera leo*) 4 只、猞猁 (*Lynx lynx*) 3 只。

1.2 幼龄动物的免疫

对 3 月龄左右的东北虎 9 只、白虎 2 只、非洲狮 4 只、猞猁 3 只接种犬瘟热弱毒疫苗 (INTERVET INTERNATIONAL B.V 生产的犬瘟热、传染性肝炎、细小病毒病、副流感四联活疫苗, 批号: 003327B, 04255003A), 每只动物免疫 1 头份犬的免疫剂量, 14~20d 加强免疫, 加强免疫前和免疫 80d 各采血一次, 分离血清 -20℃ 冻存备用。

1.3 成年动物

对 4 只东北虎、3 只猞猁和 2 只白虎, 每只接种 2 头份犬的免疫剂量。2003 年 12 月第一次免疫, 2004 年 12 月第二次免疫。从 2004 年 2 月开始每月采集血样一次, 分离血清 -20℃ 冻存备用, 至 2005 年 2 月结束。

1.4 CDV 中和试验

1.4.1 病毒培养: Vero 细胞按常规方法传代^[5]。细胞培养液为含 10% 犊牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司生产, 购自南京生兴生物技术有限公司) 的 MEM (GIBCO 公司), 细胞维持液为含 2~3% 犊牛血清的 MEM。长满单层的 Vero 细胞接种 CDV Onderstepoort 株 (由南京农业大学兽医微生物实验室提供), 每瓶接种 1mL。37℃ 孵育 1h, 倾去培养液, 加入维持液, 37℃ 培养 24h, 观察细胞病变 (CPE), 当绝大多数细胞出现 CPE 时, 冻融 2~3 次, 分装, -60℃ 保存备用。

1.4.2 病毒感染力滴度 (TCID₅₀) 测定: 参照文献^[5]的方法进行, 在 24 孔细胞培养板 (Costar 公司) 进行。每个稀释度接种一列 (8 个孔), 剩余几列加不含血清的 MEM 作为细胞对照。放 37℃ 培养, 逐日观察, 3~5d 判定结果。

1.4.3 中和试验: 参照文献^[1]的固定病毒稀释血清法进行。取保存的试验动物血清, 56℃ 灭活 30min,

15000rpm 离心 5min。血清稀释度从 1:20 开始。每孔加病毒液 250μL, 微型震荡器上混匀, 37℃ 感作 1h。取长满单层 Vero 细胞的 96 孔细胞培养板, 倾去营养液, 每孔加入血清病毒混合物 100μL, 每个滴度加 4 个孔, 37℃、5% CO₂ 培养箱培养, 逐日观察, 记录 CPE。设另加维持液的空白对照、病毒阴性对照、标准阴性血清对照和标准阳性血清对照。

2 结果

2.1 未免疫动物的 CDV 抗体水平

所检 9 只东北虎、4 只白虎、4 只非洲狮及 3 只猞猁的 CDV 中和抗体水平均在 1:5 以下 (表 1、表 3, 部分数据未显示)。

2.2 幼龄动物 CDV 抗体水平

免疫 14d 东北虎的 CDV 中和抗体水平达 1:10~1:28, 平均值为 1:19, 免疫 80d CDV 抗体水平上升到 1:40~1:200, 平均值为 1:80 (表 1)。

表 1 幼龄东北虎的 CDV 抗体水平 (log₂)
Table 1 CDV antibody level of young Amur tiger (log₂)

Animal number	Pre-immune	After Vaccination	
		14d	80d
1	<2.32	3.32	5.81
2	<2.32	4.32	6.31
3	<2.32	3.82	7.64
4	<2.32	4.32	5.32
5	<2.32	4.82	5.32
6	<2.32	4.65	6.32
7	<2.32	3.32	6.65
8	<2.32	4.65	6.98
9	<2.32	4.82	6.65
Average(\bar{X})		4.32±0.60	6.33±0.76

免疫 20d 非洲狮的 CDV 抗体水平分别为 1:40、1:14、1:5、小于 1:5; 免疫 80d, 因其中 2 只非洲狮被迁出, 测得余下 2 只非洲狮的 CDV 抗体水平为 1:79 和 1:112。

免疫 20d 猞猁的 CDV 抗体水平分别为 1:56、1:40、1:160, 平均值为 1:71。

2.3 成年动物 CDV 抗体水平

4 只成年东北虎接种疫苗后 CDV 抗体水平在两月内迅速升高至 1:64~1:1000, 并维持 7~8 个月, 第 9 个月后开始下降, 到 11 月时已下降到 1:20~1:56。第 12 个月加强免疫后, CDV 抗体在 1~2 个月内又迅速上升至原来水平 (表 2)。

3 只猞猁接种疫苗后 CDV 抗体水平在两月内迅速升高至 1:2048 左右, 并维持 7~8 个月, 第 10 个月后开始下降, 11 个月时下降到 1:100~1:399, 第 12 个月加强免疫后, CDV 抗体又迅速上升至原来水平 (表 2)。

表 2 成年猫科动物的 CDV 抗体水平 (\log_2)
Table 2 CDV antibody level of adult large felids (\log_2)

Animal		Time after vaccination (month)												
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Amur tiger	1	6.65	7.81	6.81	7.81	7.42	8.81	7.64	8.81	6.65	5.32	7.81	8.81	-
	2	-	9.30	9.97	9.80	8.97	9.80	9.80	4.32	4.82	4.32	9.64	9.64	-
	3	-	6.81	6.65	5.65	5.98	6.65	6.32	6.32	5.32	4.82	6.81	6.98	-
	4	-	8.81	8.77	8.81	7.64	7.36	8.81	7.36	6.98	5.81	8.64	8.31	-
Lynx	1	9.64	9.30	10.30	9.80	9.30	9.64	8.31	8.81	7.81	6.65	8.97	9.64	9.64
	2	11.30	11.30	12.79	10.77	11.30	10.30	10.77	9.97	8.64	7.36	9.97	11.30	11.30
	3	-	--	12.76	11.30	10.30	11.30	11.30	10.97	9.64	8.64	11.30	11.30	-

“-” means not tested. All animals were boosted after 11 months.

2.4 白虎的 CDV 抗体水平

4 只幼龄白虎免疫前 CDV 抗体均低于检出水平, 其中 2 只免疫 30d 和 60d, 其 CDV 抗体水平有轻微上升, 但均不超过 1: 10, 免疫 90d 后又下降至 1: 5 以下 (表 3)。另外 2 只迁至其它动物园后死亡。2 只成年白虎免疫后 CDV 抗体水平一直在 1:20 以下 (数据未显示)。

表 3 幼龄白虎的 CDV 抗体水平 (\log_2)

Table 3 CDV antibody level of young Achroia Indian tiger (\log_2)

Animal number	Pre-immune	After Vaccination		
		30d	60d	90d
1	<2.32	<2.32	3.32	<2.32
2	<2.32	3.32	2.82	<2.32

3 讨论

动物园猫科动物是否存在 CDV 的天然抗体, 是进行犬瘟热免疫接种的前提。本试验发现所有未免疫动物抗体水平均小于 1:5, 表明这些动物体内不存在天然的 CDV 抗体, 有进行免疫接种的必要。

除白虎以外的试验动物接种疫苗后, 抗体水平不同程度地逐步升高, 表明免疫的大型猫科动物都能产生特异性抗体, 疫苗是有效的。28 只试验动物接种疫苗后, 健康状态良好。部分动物的血常规、肝功能、肾功能检测均未见异常。本试验成果在 2 家动物园和 1 家动物表演团推广应用, 接种的动物园大型猫科动物达 7 种 330 余只, 所有接种动物未见不良反应。表明猫科动物接种 CDV 弱毒疫苗是安全的。

至于猫科动物接种犬瘟热疫苗后, 抗体水平达到多少才能保护, 未见报道。动物园大型猫科动物都属于国家一、二级保护动物, 无法进行攻毒试验。参照犬体的试验结果推测, 按照本试验接种剂量可以达到保护。

成年东北虎和成年猞猁接种 9 个月后 CDV 抗

体均开始下降。虽然猞猁接种 11 个月时抗体仍然维持在可保护范围。如果要确保安全, 免疫 9 个月需要再次加强。

本试验发现, 无论是幼龄白虎还是成年白虎免疫后均检测不到抗体。作者在工作中也发现, 动物园的白孔雀 (蓝孔雀 *Pavo cristatus* 的白色变种) 接种新城疫和禽流感疫苗后, 基本上都不产生特异性抗体 (结果待发表)。临床经验表明, 白孔雀的死亡率明显高于蓝孔雀; 白虎一旦患病, 容易恶化, 治疗比东北虎困难。提示白虎作为基因缺失的变种, 不利于健康, 即使接种了疫苗, 也不能产生有效的免疫应答, 所以检测不到抗体。

致谢: 感谢南京警犬研究所张汇东副所长和缪勤博士惠赠的必需试验材料, 感谢南京农业大学张春燕硕士在检测中和抗体方面所做的大量工作, 感谢动物园协助过该实验的所有饲养员和驯兽师, 所有动物免疫和采血过程离不开他们的密切配合和大力支持。

References

- [1] Lu C P (陆承平). *Veterinary Microbiology*. (兽医微生物学) [M]. 3rd ed Beijing: Chinese Agricultural Press, 2001, 525-526.
- [2] He H B, Xia X Z (何洪彬, 夏咸柱). The development of Diagnosis and Active Immunization of Canine Distemper [J]. *Progress in Veterinary Medicine* (动物医学进展), 2001, 22 (1): 12-14.
- [3] Han L, Guo F (韩磊, 郭枫). Isolation and identification of CDV in tiger [J]. *Chin J Veter Med* (中国兽医杂志), 2004, 40 (2): 16-17.
- [4] 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.
- [5] Xu W Y (徐为燕). *Veterinary Virology* (兽医病毒学) [M]. Beijing: Agricultural Press, 1998, 226-22.