

# 虎血清犬腺病毒抗体调查

贺文琦<sup>1,2</sup> 夏咸柱<sup>1\*</sup> 高玉伟<sup>1</sup> 孙贺廷<sup>1</sup> 王立刚<sup>3</sup> 刘丹<sup>3</sup> 薛琳<sup>1</sup> 黄耕<sup>1</sup>

(1 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春, 130062) (2 吉林大学畜牧兽医学院, 长春, 130062) (3 黑龙江省东北虎林园, 哈尔滨, 150027)

关键词: 虎; 犬腺病毒; 血凝抑制抗体

中图分类号: S858.9

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2005) 03 - 0310 - 04

## Serologic Investigation of Canine Adenovirus Infection in Tigers

HE Wenqi<sup>1,2</sup> XIA Xianzhu<sup>1\*</sup> GAO Yuwei<sup>1</sup> SUN Heting<sup>1</sup> WANG Ligang<sup>3</sup> LIU Dan<sup>3</sup> XUE Lin<sup>1</sup> HUANG Geng<sup>1</sup>

(1 The Military Veterinary Institute, Academy of Military Medical Sciences, Changchun, 130062, China)

(2 The husbandry and Veterinary Institute of Jilin University, Changchun, 130062, China)

(3 Heilongjiang Siberia Tiger Park, Harbin, 150027, China)

**Abstract:** In order to investigate the incidence of canine adenovirus (CAV) infection, sera from a total of 109 unvaccinated tigers from 6 districts of China were examined for antibodies to canine adenovirus type (CAV-1) and canine adenovirus type (CAV-2) by hemagglutination inhibition (HI) test. Antibodies to CAV-1 and CAV-2 were prevalent with positivity rates of 28.4% and 10.1%, respectively. The results suggested that tigers can be infected by CAV.

**Key words:** Tiger; Canine adenovirus; Hemagglutination inhibition test

犬腺病毒 (Canine adenovirus, CAV) 属于腺病毒科哺乳动物腺病毒属成员, 分为犬腺病毒型 (CAV-1) 和犬腺病毒型 (CAV-2), 其中 CAV-1 主要引起狐狸 (*Vulpes vulpes*) 脑炎和犬 (*Canis familiaris*) 传染性肝炎 (殷震和刘景华, 1997; 胡体拉, 1963)。在国内, 夏咸柱等 (1984) 首次分离到 CAV-1, 随后, 多个地区的不同动物中又有相继分离到该病毒报道 (钟志宏等, 1990; 范泉水和袁国庆, 1992; 夏咸柱等, 1984)。CAV-2 主要引起犬的喉气管炎和幼犬咳嗽, 在我国的感染也比较普遍 (范泉水和夏咸柱, 1999)。

大量的血清学调查资料证实, 除犬和狐狸外, CAV-1 还可感染多种野生动物 (Trainer and Knowlton, 1968; Alexander *et al.*, 1972; Foreyt *et al.*, 1986; Zarnke and Ballard, 1987; Zarnke and Evans, 1989), 同样在野外生存的虎 (*Panthera tigris*) 也具有潜在的危险, 但国内外未见有虎感染 CAV 的报道。为保证现有虎群的不断扩大和虎的健康成活, 进一步实现“放虎归山”以维持生态平衡的目

标, 加强虎的疾病防治工作势在必行。为此, 我们对分布于不同地区的未曾使用过疫苗免疫的虎进行 CAV 血凝抑制 (HI) 抗体调查, 以了解虎是否能感染 CAV, 并为今后研制腺病毒疫苗或以腺病毒为载体的重组疫苗、预防虎因 CAV 感染致死等提供流行病学资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 血清样品

哈尔滨、桂林、宜昌、上海、唐山、郑州 6 个地区的人工圈养东北虎, 无菌采取临床表现健康虎的静脉血, 分离血清, 共获得 109 份, -70 保存。

1.2 稀释液 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS。

### 1.3 病毒抗原

本实验室分离保存的 CAV-1 和 CAV-2, 经 MD-CK 细胞系传代培养。将病毒原液测定 HA 滴度后用稀释液配制成 4 单位抗原备用。

### 1.4 血细胞

作者简介: 贺文琦 (1977 -), 男, 硕士, 主要从事动物病毒学研究。

收稿日期: 2004 - 09 - 08; 修回日期: 2004 - 10 - 21

\* 通讯作者, correspondence author, E-mail: xia\_xzh@yahoo.com.cn

由解放军 208 医院提供的健康人“O”型抗凝血, 经稀释液洗涤、离心 3 次, 取红细胞沉积按体积比用稀释液稀释, 配制成 0.75% 的红细胞悬液。

#### 4 保存备用。

#### 1.5 血清处理

血清样品经 56 30 min 灭活后, 按 1 ml 血清中加入 10  $\mu$ l 红细胞沉积的比例将洗涤后的红细胞沉积加入血清样品中, 混匀, 于 37  $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 离心去红细胞沉积, 以除去血清中的非特异性凝集素。

#### 1.6 血凝抑制 (HI) 试验

按常规方法 (殷震和刘景华, 1997) 于 96 孔“V”型板上用 8 孔道微量取样器进行 HI 试验。同

时设稀释液 PBS 对照和 4 单位病毒抗原血凝试验对照。

## 2 结果

### 2.1 抗 CAV-1 HI 抗体滴度

本实验以血清抗体滴度 < 2 (即血清小于 2 倍稀释) 为界判定阴性,  $\geq$  2 为阳性。被检的虎血清样品稀释液对照组全部为阴性。所检测的 4 个地区的 88 份虎血清中 25 份呈抗 CAV-1 抗体阳性反应, 阳性率高达 28.4%, 几何平均滴度为 26。其中, 郑州地区为 203, 血清几何平均滴度最高; 其次为唐山 128; 桂林地区呈现最低的血清几何平均滴度, 为 8。结果见表 1。

表 1 虎血清中抗 CAV-1 HI 抗体滴度

Table 1 The results of tigers serum HI antibody to CAV-1

采样地区 (血清数量) District (no. of sera)	不同 HI 抗体滴度的血清数 Number of sera with HI titer									阳性数/试验总数 (%) Positive/tested (%)	几何平均滴度 GMT
	<2	2	4	8	16	32	64	128	256		
哈尔滨 Harbin (76)	56	3	2	2	3	5	0	5	0	20/76 (26.3)	19
桂林 Guilin (6)	5	0	0	1	0	0	0	0	0	1/6 (16.7)	8
唐山 Tangshan (3)	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1/3 (33.3)	128
郑州 Zhengzhou (3)	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3/3 (100)	203
总数 Total	63	3	2	3	3	5	0	7	2	25/88 (28.4)	26

### 2.2 抗 CAV-2 HI 抗体滴度

检测的 6 个地区的 109 份虎血清中, 除哈尔滨和上海外, 其他地区的血清抗 CAV-2 抗体均为阴

性。血清总体阳性率为 10.1%。上海地区的虎血清 CAV-2 抗体几何平均滴度最高, 为 23 (表 2)。

表 2 虎血清中抗 CAV-2 HI 抗体滴度

Table 2 The results of tigers serum HI antibody to CAV-2

采样地区 (血清数量) District (no. of sera)	不同 HI 抗体滴度的血清数 Number of sera with HI titer									阳性数/试验总数 (%) Positive/tested (%)	几何平均滴度 GMT
	<2	2	4	8	16	32	64	128	256		
哈尔滨 Harbin (76)	71	1	1	1	1	0	1	0	0	5/76 (6.6)	9
桂林 Guilin (6)	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6 (0)	0
宜昌 Yichang (8)	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0/8 (0)	0
上海 Shanghai (13)	7	0	0	3	1	0	0	2	0	6/13 (46.2)	23
唐山 Tangshan (3)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3 (0)	0
郑州 Zhengzhou (3)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3 (0)	0
总数 Total (109)	98	1	1	4	2	0	1	2	0	11/109 (10.1)	15

## 3 讨论

虎属于猫科 (Felidae) 巨猫属 (*Panthera*) 的

虎种 (*P. tigris*) (郑作新, 1982), 它在世界上几乎全部分布在亚洲大陆, 在我国的分布更为普遍。国际自然保护和自然资源联盟 (IUCN) 规定的 8

个亚种, 已有 3 个灭绝。原始森林的砍伐, 虎的生存环境的破坏, 以及偷猎行为都是导致虎数量减少的决定性原因。近些年来, 又不断有虎感染疾病死亡的报道。除一些常见的细菌和寄生虫性疾病外, 病毒对虎的生存也造成极大的威胁。已报道的常见病毒主要有犬瘟热病毒、细小病毒、杯状病毒、流感病毒等可自然感染虎并导致其死亡 (李同义等, 1997; 乔军等, 2001; 邵俊峰, 2002; 夏咸柱等, 2003)。可见, 疾病的流行也给虎造成巨大的威胁。

腺病毒可感染人和多种家畜家禽, 麋鹿 (*Elaphurus davidianus*)、叉角羚 (*Antilocapra americana*) 等野生动物也有自然感染并死亡的报道 (Stauber *et al.*, 1980; Lehmkuhl *et al.*, 2001; Shilton *et al.*, 2002)。其中, CAV 是在已发现的哺乳动物腺病毒属中致病性最强、感染动物最广的病毒 (殷震和刘景华, 1997)。在野生动物中 CAV-1 的感染率较高, 赤狐 (*Vulpes vulpes*)、狼 (*Canis lupus*)、貉 (*Nyctereutes procyonoides*)、臭鼬 (*Mephitis mephitis*)、浣熊 (*Procyon*)、水貂 (*Mustela (luteola) vison*)、黑熊 (*Ursus thibetanus*) 等野生动物均可感染 (Trainer and Knowlton, 1968; Alexander *et al.*, 1972; Foreyt *et al.*, 1986; Zarnke and Evans, 1989)。作者对我国部分地区大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 血清学调查发现, 抗 CAV-1 和 CAV-2 抗体的阳性率分别为 39.3% 和 19.7%, 说明大熊猫也存在一定的 CAV 感染 (贺文琦等, 2004)。可见在自然界中广泛存在有 CAV 的污染源, 尤其是 CAV-1 的感染。我国的一级保护动物——虎是否也存在着被感染的可能性。为此, 本实验对我国不同地区送检的虎血清进行了 CAV 抗体调查, 以了解犬腺病毒是否也能感染虎, 为虎疾病的诊断和预防提供依据。

由于腺病毒的血凝抑制抗体比补体结合抗体和沉淀抗体更接近中和抗体 (Appel *et al.*, 1975), 所以本实验用简便快速的血凝抑制试验方法对采集于我国不同地区的虎血清进行了 CAV-1 和 CAV-2 的抗体检测。被检测的 6 个地区的 109 份虎血清中, 共有 35 份呈 CAV-1 或 CAV-2 抗体阳性, 除宜昌的样品外, 其他地区的样品均检测到 CAV 抗体, 且 CAV-1 的抗体阳性率高于 CAV-2。对 CAV-1, 所检的 88 份虎血清 (因宜昌和上海地区血清样品量太少而未检测) 以郑州地区的血清几何平均滴度最高, 3 份血清均呈强阳性; 桂林地区呈现最低的血清几何平均滴度 (表 1)。对 CAV-2, 除哈尔滨和上海, 其他地区的血清抗体均为阴性, 上海地区的

虎血清抗体阳性率高达 46.2%, 抗体几何平均滴度为 23; 来自哈尔滨的血清样品中有 1 份同时检测到抗 CAV-1 和 CAV-2 的抗体, 这可能是机体同时感染这两种病毒所致, 或者是轻微的交叉反应。可见, 型和型犬腺病毒在这些地区都有不同程度的传播。本实验的调查研究为腺病毒感染提供诊断和防治依据。

在实验过程中我们发现, 虎血清在做血凝抑制试验时其自身对红细胞有轻微的凝集作用, 即对对照组的前 1~2 个孔有轻微的凝集现象。为消除上述影响, 实验中用洗涤好的红细胞沉积首先与待检血清作用, 吸附去除血清中的非特异性凝集素, 结果较为理想。

本实验对虎血清 CAV 抗体调查结果表明 CAV 的确能感染虎, 且能在虎体内复制而诱导机体产生抗体。这一结论为以腺病毒为载体的重组疫苗研究提供了依据。同时, CAV 的强毒株或变异株在感染虎后可能导致发病, 因此动物园的工作人员或游客应该重视 CAV 具有的潜在威胁, 采取必要而有效的防治措施, 以尽可能减少 CAV 所造成的损失。

#### 参考文献:

- Alexander A D, Flyger V, Herman Y F, McConnell S J, Rothstein N, Yager R H. 1972. Survey of wild mammals in a Chesapeake Bay area for selected zoonoses. *Journal of Wildlife Diseases*, **8**: 119 - 126.
- Appel M, Carmichael L E, Robson D S. 1975. Canine adenovirus type 2-induced immunity to two canine adenoviruses in pups with maternal antibody. *Am J Vet Res.* **36** (8): 1199 - 1202.
- Foreyt W J, Evermann J F, Hickman J. 1986. Serologic survey for adenovirus infection in wild bears in Washington. *Journal of Wildlife Management*, **50**: 273 - 274.
- Lehmkuhl H D, Hobbs L A, Woods L W. 2001. Characterization of a new adenovirus isolated from black-tailed deer in California. *Arch Virol*, **146** (6): 1187 - 1196.
- Shilton C M, Smith D A, Woods L W, Crawshaw G J, Lehmkuhl H D. 2002. Adenoviral infection in captive moose (*Alces alces*) in Canada. *J Zoo Wildl Med*, **33** (1): 73 - 79.
- Stauber E H, Autenrieth R, Markham O D, Whitbeck V. 1980. A seroepidemiologic survey of three pronghorn (*Antilocapra americana*) populations in southeastern Idaho, 1975 - 1977. *J Wildl Dis.* 1980 Jan; **16** (1): 109 - 115.
- Trainer D O, Knowlton F F. 1968. Serologic evidence of diseases in Texas coyotes. *Journal of Wildlife Management*, **32**: 981 - 983.
- Zarnke R L, Evans M B. 1989. Serologic survey for infectious canine hepatitis virus in grizzly bears (*Ursus arctos*) from Alaska, 1973 to 1987. *Journal of Wildlife Diseases*, **25**: 568 - 573.
- Zarnke R L, Ballard W B. 1987. Serologic survey for selected microbial pathogens of wolves in Alaska, 1975 - 1982. *Journal of Wildlife Diseases*, **23**: 77 - 85.

(下转第 296 页)

- Science*, **190**: 947 - 954.
- Dewsbury D A, Pierce J D. 1989. Copulatory patterns of primates as viewed in broad mammalian perspective. *Am J Primatol*, **17**: 51 - 72.
- Li B G, Zhao D P. 2005. Female multiple copulations among wild Sichuan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) in Qinling, China. *Chinese Science Bulletin*, **50** (9): 942 - 944.
- Ren B P, Zhang S Y, Xia S Z, Li Q F, Liang B, Lu M Q. 2003. Annual reproductive behavior of *Rhinopithecus roxellana*. *Int J Primatol*, **24** (3): 575 - 589.
- Ren R M, Yan K H, Su Y J, Qi H J, Liang B, Bao W Y. 1995. The reproductive behavior of golden monkeys in captivity (*Rhinopithecus roxellana*). *Primates*, **36** (1): 135 - 143.
- Zhang S Y, Liang B, Wang L X. 2000. Seasonality of matings and births in captive Sichuan golden monkeys (*Rhinopithecus roxellana*). *Amer J Primatol*, **51**: 265 - 269.
- Zhao D P, Li B G, Li Y H, Kazuo W. 2005. Extra-unit sexual behavior among wild Sichuan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellana*) in Qinling Mountains of China. *Folia Primatologica*, **76** (3): 172 - 176.
- 任仁眉, 严康慧, 苏彦捷, 李进军, 周茵. 2000. 金丝猴的社会. 北京: 北京大学出版社, 133 - 147.
- 任宝平, 夏述忠, 李庆芬, 张树义, 梁冰, 邱军华. 2002. 圈养雄性川金丝猴的交配模式. *动物学报*, **48** (5): 577 - 584.
- 杨晓军. 1998a. 笼养川金丝猴雌性性行为的研究. *甘肃农业大学学报*, **33** (3): 228 - 233.
- 杨晓军. 1998b. 笼养川金丝猴雄性性行为观察. *甘肃农业大学学报*, **33** (4): 345 - 349.
- 梁冰, 戚汉君, 张树义, 任宝平. 2001. 笼养川金丝猴不同年龄阶段的发育特征. *动物学报*, **47** (4): 381 - 387.
- 阎彩娥, 蒋志刚, 李春旺, 曾言, 谭妮妮, 夏述忠. 2003. 雌性川金丝猴的邀配行为与尿液雌二醇水平的关系. *动物学报*, **49** (6): 736 - 741.

(上接第 312 页)

- 乔军, 孟庆龄, 夏咸柱, 何宏彬. 2001. 用 PCR 法检测东北虎感染猫细小病毒的研究. *畜牧与兽医*, **33** (5): 14 - 16.
- 李同义, 杨光诚, 牛雪萍. 1997. 幼东北虎病毒性脑炎诊治一例. *郑州牧专学报*, **17** (3): 61 - 62.
- 邵俊峰. 2002. 东北虎疑似犬瘟热的初步诊断治疗. *动物医学进展*, **23** (3): 116.
- 夏咸柱, 武银莲, 钟志宏, 林庆年, 袁书智. 1990. 犬传染性肝炎病原、诊断与实验免疫研究. *中国畜禽传染病*, **6**: 38 - 40.
- 夏咸柱, 高玉伟, 扈荣良, 王立刚, 刘丹, 邹啸环, 黄耕, 贺文琦, 王玮, 苏伟林, 刘文良. 2003. 通过病毒分离鉴定和基因检测首次发现虎流感. *中国兽医学报*, **23** (2): 107 - 110.
- 夏咸柱, 王永贤, 赵吉成, 孙永祥, 陈跃明, 杨盛华, 武银莲, 殷震, 刘作臣. 1984. 犬传染性肝炎病毒的分离与鉴定. *兽医大学学报*, **4**: 228 - 233.
- 钟志宏, 夏咸柱, 赵奕, 涂长春, 武银莲. 1990. 狐狸脑炎病毒的分离鉴定和流行病学调查. *兽医大学学报*, **10** (2): 111 - 116.
- 范泉水, 袁国庆. 1992. 熊脑炎病毒的分离鉴定. *中国畜禽传染病*, **5**: 1 - 2, 55.
- 范泉水, 夏咸柱. 1999. 犬喉气管炎病毒的分离鉴定. *中国兽医科技*, **11**: 28 - 30.
- 郑作新. 1982. 脊椎动物分类. 北京: 农业出版社.
- 胡体拉. 1963. 家畜传染病学. 北京: 科学出版社, 1963.
- 殷震, 刘景华. 1997. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1104 - 1130.
- 贺文琦, 夏咸柱, 高玉伟, 李德生, 王鹏彦, 黄耕, 武银莲. 2004. 大熊猫血清犬腺病毒抗体调查. *中国兽医杂志*, **40** (4): 24 - 26.