

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.06.11

犬细小病毒病防控技术研究进展

王诗研¹, 印春生^{1*}, 曹众达^{1,2}, 张石豪^{1,3}, 张嘉雯¹

(1. 中国兽药药品监察所(农业农村部兽药评审中心), 北京 100081; 2. 山西农业大学, 山西太谷 030801;

3. 中国农业科学院特产研究所, 长春 130112)

[收稿日期] 2023-11-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 06-0086-09 [中图分类号] S852.65

[摘要] 犬细小病毒(canine parvovirus, CPV)感染会导致典型的急性胃肠炎, 出现呕吐、发热、白细胞显著减少和出血性腹泻等症状, 常与犬瘟热病毒、犬冠状病毒等其他病毒混合感染。尽管进行了广泛的疫苗接种, 但 CPV 仍然是导致犬死亡的主要原因, 幼犬死亡率常大于 70%。通过对比不同类型 CPV 疫苗的不同特点及实际使用情况, 同时分析免疫失败的原因, 介绍目前诊断犬细小病毒病的主要方法及近年来取得的技术进步, 对犬细小病毒病防控技术研究进展进行了综述, 为犬细小病毒病的免疫、诊断及防控提供参考。

[关键词] 犬细小病毒; 防控; 诊断; 疫苗

Advances in Prevention and Control Techniques for Canine Parvovirus Disease

WANG Shi-yan¹, YIN Chun-sheng^{1*}, CAO Zhong-da^{1,2}, ZHANG Shi-hao^{1,3}, ZHANG Jia-wen¹

(1. Chinese Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China;

3. Institute of Special Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

Corresponding author: YIN Chun-sheng, E-mail: zjs62158844@sohu.com

Abstract: Canine parvovirus infection can cause typical acute gastroenteritis symptoms, including vomiting, fever, significant leukopenia and bloody diarrhea. It is often co-infected with canine distemper and canine coronavirus. Despite widespread vaccination, it remains a leading cause of death in dogs, with mortality rates often greater than 70% in young dogs. In this paper, the research progress of prevention and control technology for canine parvovirus disease were reviewed, including the characteristics of various CPV vaccines, their practical use, and the the reasons for the failure of immunization. Meanwhile, main diagnostic methods and technical progress made in recent years were also introduced to provide reference for the immunization, diagnosis, prevention and control of canine parvovirus disease.

Key words: canine parvovirus; prevention and control; diagnosis; vaccines; treatment

基金项目: “十四五”国家重点研发计划项目(2022YFD1800603)

作者简介: 王诗研, 硕士研究生, 从事犬细小病毒生物制品研究。

通讯作者: 印春生。E-mail: zjs62158844@sohu.com

犬细小病毒 (canine parvovirus, CPV) 为细小病毒科、细小病毒亚科, 是威胁犬科动物最常见且最严重的病毒之一^[1]。预防 CPV 感染主要依赖于使用弱毒活疫苗, 此外还有亚单位疫苗、灭活疫苗等, 均能够诱导保护力。但并非所有的疫苗都能提供完全保护力, 因免疫失败导致的犬死亡对养犬业造成沉重打击。CPV 早期诊断对该疾病的及时治疗至关重要, 血凝抑制试验等传统的检测方法常常导致误诊、从而耽误犬的治疗。近年来, 随着对于该病的深入研究, 多种新型诊断技术和更先进的疫苗不断被开发出来, 并取得了一定程度上的进展。基于此背景, 本文根据国内外关于 CPV 疫苗及诊断的研究, 对目前防控技术进展进行了梳理和总结。

1 病原学

CPV 是一种无囊膜病毒, 其球形衣壳 (25 nm) 包裹着线性单链负义 DNA, 病毒粒子呈二十面体对称结构。CPV 基因组全长 5323 bp, 其两个开放阅读框分别编码非结构蛋白和结构蛋白, 两种结构蛋白 VP1 (5~6 个拷贝) 和 VP2 (54~55 个拷贝) 由 mRNA 选择性剪接产生^[2], 具有良好的抗原性, 与宿主范围、病毒趋向性和病毒与宿主相互作用有关。其中, VP2 包含主要的抗原决定簇, 含有决定宿主范围的关键位点及与宿主细胞膜上细胞转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TfR) 结合的位点^[3], 是衣壳蛋白的主要组成部分, 常作为基因工程亚单位疫苗的重要成分。CPV 克服了跨物种传播障碍, 可在犬科、猫科及鼬科之间传播, 美洲狮、浣熊、灰狼、灰狐、条纹臭鼬和貉等多种野生动物均可被其感染, 还可以感染恒河猴, 具有传播至灵长类的潜在危险。大量研究表明, 其宿主范围由 CPV 与宿主细胞 TfR 的亲合能力决定, 但其明确的传播机制还有待进一步研究^[4]。

CPV 有 CPV-1 和 CPV-2 两种亚型, CPV-1 较罕见、致病力较弱, 又称犬微小病毒。CPV-2 为 CPV 的主要致病亚型, 有 a、b、c 三种亚型。由于 CPV 基因组与 FPV 有高达 99% 的序列同源性^[5], CPV-2 被认为源于 FPV, 且经 FPV 疫苗免疫的猫

能够对 CPV-2b 产生抵抗力。CPV-2 对某些快速分裂的细胞具有趋向性, 在咽部淋巴细胞内复制后被释放到血液中, 进入骨髓、感染白细胞, 引起白细胞减少。由受感染的白细胞播散的病毒会进入小肠隐窝内的生发上皮, 影响营养物质的吸收, 继而引发腹泻等特征性病变^[6]。

2 流行现状

CPV-2 于 1978 年被首次发现, 并迅速在全球范围内传播^[1]。在随后的几年内出现能够由单克隆抗体识别的抗原变异株 CPV-2a 和 CPV-2b, 在 VP2 衣壳蛋白上与原始毒株存在 5/6 个氨基酸残基差异, 但二者之间仅有两个残基差异。首个 CPV-2c 型在 2000 年于意大利发现, 随后于 2005-2006 年在美国检测到, 2c 型在 VP2 第 426 个氨基酸残基处发生变化。三种亚型均会随着时间推移发生新的突变。

1983 年, 徐汉坤等在我国首次正式报道了该病的流行情况, 随后在我国多个地区都有陆续发生和蔓延。对 2014 年在黑龙江、吉林、辽宁、山东和河北 5 个地区分离的 64 个 CPV 毒株的 VP2 基因序列进行测序分析显示^[7], 河北省以 CPV-2b 为主, 其余 4 个省份以 CPV-2a 为主。2020 年郝祥祺等^[8]对 CPV-2 在中国患病率分析表明, CPV-2 在中国仍然很常见, 且 CPV-2c 的患病率逐渐增加, 并且在 2014-2020 年间 CPV-2c 已取代 CPV-2a/b 成为我国的主要流行毒株。关于全球 CPV-2 流行情况的最新结果亦显示^[9], CPV-2c 的比例一直在逐渐增加, 自 2020 年以来, 它已取代 CPV-2a 成为新的显性变体。同时, CPV-2c 已成为亚洲、南美、北美和非洲的主要毒株, 而欧洲和大洋洲地区不同的变异株共同流行。自发现 CPV 以来, 总体发病率降低, 抗体水平保持稳定, 但动物死亡率却显著增加。这表明该病毒的毒性和对动物的破坏性已显著增加, 这很可能是由于新出现的 CPV 发生了抗原变异^[10]。

该病的主要传染源包括病犬及其排泄物, 主要经过粪口传播, 未严格消毒用具、受到污染的饲料等都可能携带病毒, 成为传播媒介。无症状的犬猫

也可能携带 CPV,其隐性感染是防控本病的主要障碍之一。CPV-2 全年均可引发感染,但不同地区的发病率存在季节差异,其中春季、深秋和初冬感染较为严重。接种 CPV 疫苗在世界范围内是最常规的、最重要的和最有效的疾病控制方法,接种疫苗后长期存在抗 CPV 抗体。新生幼犬受母源抗体保护不易感染,最易感群体为 6 周至 6 月龄幼犬。未绝育的雄性犬患 CPV 肠炎的可能性是未绝育雌性犬的两倍。罗威纳犬、杜宾犬、美国比特斗牛犬、拉布拉多猎犬和德国牧羊犬等品种犬有更高的患严重 CPV 肠炎的风险,但其具体原因尚不明确^[11]。

3 疫苗研发进展

接种疫苗是预防 CPV 病临床感染和犬内传播的最有效措施。CPV 疫苗被世界小动物兽医协会和美国动物医院协会等具有国际影响力的专业协会视为核心疫苗,无论环境及地理位置,所有犬都应该接种疫苗以应对全球范围内的的高危传染病威胁^[12]。然而,尽管在世界范围内采取了密集的疫苗接种计划,CPV 感染仍然是最常见的传染性疾病之一,甚至在发达国家也会导致幼犬死亡^[13]。许多学者指出,接种疫苗的犬发生 CPV 感染主要与不正确的疫苗接种方案有关^[14]。如果在 8 周龄之前过早接种疫苗,免疫效果可能会大大减弱,因为来自母犬的抗体可能会干扰疫苗、阻止病毒复制,从而降低产生保护性免疫的能力^[10]。

CPV 发现至今 40 余年,期间不断有新的基因型和变异位点出现。CPV-2a/2b/2c 变异株已经取代了最初的 CPV-2 型毒株,其中 CPV-2c 已成为一些国家的主要株系^[15]。然而,目前市场上的大部分疫苗仍然使用已不在野外流行的原始型 CPV-2,少部分使用 CPV-2b 型,迄今为止还没有获得许可的含有最新变种的疫苗。这一度引发了人们关于 CPV-2 和 CPV-2b 疫苗对最新亚型 CPV-2c 是否具有交叉保护的担忧。2011 年 Elisabeth 等^[16]证实了用已商业化的 CPV-2 NL-35-D 毒株免疫犬后,能够对 CPV-2b/2c 产生抵抗力。但 2015 年 Beatriz 等^[17]研究表明 CPV-2 和 CPV-2b 疫苗可以减轻临床症状、减少血清学检测阳性率和病毒

排泄量,但受样本量较小、随访时间较短、方法学等限制,目前还无法确定是否能够对 CPV-2c 亚型产生有效的保护。现将对 CPV 疫苗的研究成果以及各类疫苗的优缺点进行描述,以期为防控疫苗的选用提供参考。

3.1 弱毒活疫苗 CPV 弱毒活疫苗(live attenuated vaccine, MLV)目前被广泛使用,被国际犬类疫苗接种指南推荐为预防病毒感染的核心疫苗。它们通过在宿主内复制从而诱导强大、持久(通常为终身)的免疫力,其特点是免疫早发和免疫时间长,在接种 13~15 天后几乎能诱导所有犬产生抗 CPV 的保护性抗体。虽然有研究表明口服 MLV 能够克服母源抗体诱导全身免疫,但由于可能存在的不良反应,该疫苗不建议用于野生犬科动物、4~6 周以下的幼犬或妊娠期间的犬。

对幼犬接种的病毒学研究结果显示^[12],CPV-2 和 CPV-2b 两种疫苗株的病毒血症和排毒持续时间较长。接种的犬均会在接种后的第 3 天出现病毒血症,前者平均持续 19 天,后者平均持续 22 天。此外,接种后前者的平均排毒时间为 19 天,后者平均排毒时间为 12 天。MLV CPV-2b 疫苗相比 MLV-CPV2 排毒时间短,但病毒载量及滴度较高、病毒血症的发生时间较长^[18]。CPV-2 和 CPV-2b 疫苗分别在接种后 7 天和 14 天出现血清阳转。

接种疫苗后的犬只排泄的病毒量较低,常规的诊断检测如 ELISA 和 HA 对接种疫苗的犬的粪便样本的检测结果不太敏感,一般只能通过实时 PCR 检测到病毒^[19-20]。且接种犬往往难以与野生型毒株区分、出现假阳性结果。尽管携带 CPV,但其胃肠症状可能由犬的其他肠道病原体引起,如犬冠状病毒、犬瘟热病毒、呼肠病毒、轮状病毒、沙门菌属和寄生虫^[18]等,因此在进行诊断时,需格外谨慎,以防误诊。

3.2 灭活疫苗 市场上很少有 CPV 灭活疫苗,因为在灭活过程中病毒的免疫原性降低,因此需要在初级疗程和每年加强针期间重复接种,只建议在外来动物和怀孕的母犬中使用。与 MLV 疫苗相比,灭活疫苗更容易免疫失败,这可能是由于 MLV 的

复制能力更强,能够覆盖残留的母源抗体。但灭活疫苗的相比于 MLV 疫苗安全性更高,不存在毒力返强等问题,且制作工艺统一、简单、成本较低。其产生的抗体能够在体内低水平持续 20 周,对全身感染显示出保护作用,将病毒复制限制于肠道和肠道相关淋巴组织^[21]。

灭活疫苗在制作多联疫苗方面具有优势,因其具有减少单一疫苗多次免疫造成的应激反应、降低免疫成本、经济价值高、免疫保护覆盖^[22] 面广等优点。龚成燕等^[23] 使用狂犬病毒、犬瘟热病毒和犬细小病毒经过 β -丙内酯灭活制备的三联疫苗。经过验证,使用 ADJ-801(W) 佐剂的三联灭活疫苗对三种病毒攻毒保护率均为 100%,但使用 $Al(OH)_3$ 作为佐剂的疫苗在该试验中效果不佳。因此灭活疫苗佐剂的选择是影响其免疫效果的重要因素之一。

3.3 核酸疫苗 核酸疫苗主要分为 DNA 疫苗和 RNA 疫苗两大类。相较于 RNA 疫苗,DNA 疫苗易于制备、稳定性好、无需低温保存,能长期存在于接种者的细胞内持续表达抗原。经过许多试验,绰号为“免疫银弹”的 DNA 疫苗已经在犬科动物中开发,显著降低了传染病的发病率^[24]。2011 年 Dahiya 等将 CPV VP2 基因克隆到复制体 DNA 疫苗载体 (pAlpha)^[22] 及辛德毕斯病毒复制子 DNA^[25] 内,均成功诱导了特异性体液免疫及细胞免疫。不同的是,前者直接进行皮内注射,后者则以大肠杆菌 DH5 α 为载体口服免疫。但该疫苗尚未通过第二阶段试验,主要是由于其需进入细胞核内发挥作用,无法在高等哺乳动物中诱导更有效的免疫反应。研究人员尝试了多种方式增强其免疫反应,如细胞因子^[26]、共刺激分子^[27] 和电穿孔^[28] 等。其中,电穿孔介导的递送极大提升了体内免疫反应幅度和反应率,比单独使用裸 DNA 递送增加了 1000 倍,是目前最成熟的 DNA 递送技术。这些方法的探索为开发出有效、安全且经济上可行的核酸疫苗带来了巨大希望。

此外,为弥补裸 DNA 在体内易降解、不易递送等缺点,可使用载体病毒通过携带基因片段至有丝分裂后期或缓慢分裂的体细胞中,缓慢释放目

的基因达到治疗目的。目前常用的载体病毒包括腺病毒、慢病毒、溶瘤病毒和逆转录病毒等。2019 年赵万波等^[29] 用外源性 CPV2-VP2 基因取代了牛痘病毒的主要毒力基因血凝素。结果发现,VP2 基因可在体外高效稳定表达,同时诱导强大、持久的全身免疫反应。尽管 DNA 疫苗具有极大潜力,但现实情况并不理想。相比于已在欧美被批准用于防治 COVID-19 的 RNA 疫苗(如 Spikevax 和 Comirnaty)^[30],DNA 疫苗(ZyCoV-D)仅在印度获批,且仍然面临着保护力不足、审批缺乏透明度等问题,更多 DNA 疫苗仍然处于临床阶段。

3.4 合成肽疫苗 CPV 主要衣壳蛋白 VP2 的 N 末端结构域被证实是开发合成肽疫苗的绝佳靶标^[31],使用 VP2 氨基端的合成肽疫苗可以有效诱导中和抗体的产生,中和抗体与 VP2 N 端 DGGQPAV 序列的氨基酸结合最强烈^[32]。与使用活病毒或灭活病毒疫苗相比,合成肽疫苗不包含活病毒,因此不存在病毒复制或感染的风险,同时还可以避免在病毒抗原体外培养中固有的微生物污染和抗原漂移的问题。鉴于细小病毒群的宿主范围变体之间的密切相似性及序列的高度同源性,这种疫苗同样适用于诱导狗、猫、水貂和浣熊等的保护。Langeveld 等^[33] 研究证实了 CPV 合成肽疫苗对水貂肠炎病毒具有完全保护力,且只需一次、微量注射即可获得。且肽疫苗所使用的表位并不是免疫优势位点,因此可以在母体免疫存在的情况下诱导抗体产生,为解决幼年动物疫苗接种中的母体免疫问题提供了新的策略。此外,由于 VP2 的 N 末端结构域不参与血凝,HI 活性不完全等同于中和活性,抗肽抗体的 HI 试验和 ELISA 可以作为区分接种和感染动物的工具。然而,肽类疫苗通常价格昂贵,免疫原性相对较弱,因此,被认为不适合在现场广泛使用,只有少数疫苗进入了商业市场。

3.5 免疫失败分析 尽管进行了广泛的疫苗接种,然而 CPV-2c 突破性感染却时有发生。疫苗免疫失败可能有几个原因。其中,母源抗体的干扰是重要因素,其次可能与其他病毒合并感染导致犬的免疫抑制,但是病毒抗原性的变化是主要原因。当

前我国常用的疫苗株为 CPV-2 或 CPV-2b,很大程度上与保护力不足有关。针对 CPV 疫苗的开发,需要对目前在犬类种群中流行的主要变异株进行调查。混合了不同变异株的疫苗是一种可行的选择,但这种疫苗能否提供针对突变株的完全保护有待研究,需要对这些突变体进行进一步的功能研究^[9]。疫苗接种效果还可能受到其他内在因素(如体重、年龄、生殖和营养状况、疾病)或外在因素(如压力、身体紧张、药物治疗)的影响,如疫苗毒力返强、疫苗的制作、储存、应用等^[32]。免疫接种方案不合理也是导致免疫失败的重要因素之一。2014 年 Davis^[34]更新了幼犬接种方案,推荐 6~9 周龄时开始接种减毒活疫苗,每 3~4 周重复一次,直到幼犬 14~16 周龄。同时,在完成最初的幼犬免疫后一年再进行后续免疫接种的做法也被普遍推荐。Altman 等在研究中发现^[35],幼犬在发病前接种的最后一剂疫苗的年龄是一个重要的风险因素,二者呈负相关,即越晚接种最后一次疫苗、疫苗失败的风险越低。该研究中推荐最后一剂疫苗应在第 16 周完成接种。但疫苗接种应考虑到一系列个体因素,包括年龄、品种、犬的生活方式、特定地理区域的疾病患病率等,因此,没有标准的疫苗接种政策会涵盖所有可能的情况。总而言之,改变疫苗使用模式、改进疫苗接种方案可能有助于显著降低观察到的失败率。

4 诊断方法研究进展

CPV-2 的初步诊断通常基于综合临床症状以及疫苗接种史来。除此之外,还需进行血糖水平、电解质评估、白细胞计数、血气分析、血清生化和尿液分析等其他检测。但常不易与其他胃肠疾病鉴别诊断,因此需要结合免疫学、分子生物学方法进行确诊。目前常规的方法有酶联免疫吸附试验、聚合酶链式反应、免疫层析试纸条试验和荧光抗体检测等,新兴的检测方法有环介导等温扩增、聚合酶螺旋反应、肽核酸测定和荧光熔解曲线分析等。大多数检测方法都能够从患犬粪便和血液样本中检测到 CPV-2,具有较高灵敏度,特异性范围在 66%~100% 之间。但这些方法一般都需要昂贵的器材、优化的反应条件、专业人员和复杂仪器,并且

耗时长,限制了其在常规实验室的应用。因此开发一种快速、灵敏、简单、准确的检测方法,对于检测和控制 CPV 感染的传播和流行至关重要。临床常用、市面销售的为胶体金试纸具有操作简便、快捷、成本低等优点,但其灵敏度相对于分子检测方法较低。因此,在使用抗原检测方法进行诊断时,应谨慎对待阴性结果,结合 PCR 检测进行确认。生物标志物的各项指标可指导疾病中期的治疗,对患犬的状态进行评估。

4.1 胶体金免疫层析技术 胶体金免疫层析技术是一种将金标记、免疫检测和液相层析等技术合为一体的固相标记免疫检测技术,目前已在病毒性及细菌性疾病监测、食品药物残留检测、铬等重金属离子检测等方面广泛应用。胶体金免疫层析技术能够对 CPV 进行快速、简便的诊断,因此常用于基层临床检测。刘洁等^[36]在 2013 年首次在我国申请了 CPV 胶体金免疫层析检测试纸条的专利。此后其他层析检测试剂盒专利陆续获批,在原本抗原抗体结合的基础上,结合了快速半定量层析、免疫荧光、IgG 抗体、时间分辨荧光等^[37]技术,一定程度上弥补了原本敏感度低的问题。例如吴红玲等^[38]在制备了双抗体夹心法胶体金免疫层析检测试纸条的基础上应用了生物素-链霉亲和素系统信号放大作用,显著提升了检测敏感度达 10^2 TCID₅₀/mL,与 CPV-2 单克隆抗体 ELISA 法的灵敏度相当。然而其信号放大作用应用到试纸条上还需进一步的试验。目前市面上有犬细小病毒和犬冠状病毒二联检测卡,还研发出了犬细小-犬冠状-贾第鞭毛虫抗原三合一胶体金检测卡、犬瘟热-犬细小病毒胶体金二联检测卡,经证实与荧光定量 PCR 阳性符合率均在 95% 以上^[39-40]。多联检测卡能够联合检测其他常见的犬科胃肠疾病,对比单卡具有检测速度快、节省时间和精力等优点。此外,马永缨等^[41]建立了胶体金试纸条检测 CPV 血凝抑制效价的方法,这对评价疫苗免疫效果和确定最佳免疫时机具有重要意义(一般认为 HI 效价达到 1:80 时,可耐受 CPV 的攻击)。

免疫胶体金层析检测法灵敏性会受到抗体的影响,应使用单克隆抗体作为捕获和检测抗体,对于大

规模的 CPV 感染诊断可使用更经济的多克隆抗体。尽管该试纸条制作工艺简单,其准确性、重复性、稳定性、敏感性、特异性会极大地受到制备过程的影响,因此需要对胶体金溶液烧制方法、抗体包被浓度、NC 膜的选择及其封闭条件等进行优化,否则易出现假阳性或假阴性。且由于其检测需要大量病毒抗原产生明亮条带,因此常受到灵敏性限制产生假阴性^[42]。此外,还有不能区分野生型和疫苗株、易受样本中非特异性血凝素的影响产生假阳性等缺点。

4.2 聚合酶链式反应 (PCR) VP2 是病毒衣壳的重要组成部分,包含主要的抗原决定簇,同时含有决定宿主范围的关键位点及与宿主细胞膜上转铁蛋白受体结合的位点。因此在 PCR 检测试验中,对于 VP2 基因的检测是判定 CPV 是否存在的关键。

PCR 方法由于灵敏度高、特异性强和操作简便等原因,是检测 CPV - 2 的金标准,目前已发展出多种 PCR 方法。2005 年 Nicola 等^[43]开发了实时荧光定量 PCR 检测方法,2015 年 Rebecca 等^[44]使用绝缘等温 PCR 检测 CPV - 2,二者都能够检测到低至 10 个拷贝的 CPV - 2 DNA,这利于监测受感染的犬或疫苗试验期间 CPV 脱落的实际时间范围和数量。后者不需要热循环仪,更适合现场检测和即时诊断,但均无法区分其抗原类型。2016 年 Kaur 等^[45]建立的多重实时荧光 PCR 方法可用于 CPV 的快速检测及三种抗原分型,此后三年内孙亚茹、明黄等^[46-47]陆续使用多重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测和分化我国四种抗原类型 CPV。2021 年 Dema 等^[48]使用扩增阻滞突变系统 PCR (ARMS - PCR),针对 CPV - 2 VP2 突变位点 426 个氨基酸进行抗原分型。该技术是第一个用于 CPV - 2 抗原变异分型的一步、快速、不依赖测序的方法。邓晓宇、刘大飞等^[49-50]建立了多重 PCR 方法,可用于同时检测犬瘟热病毒、犬冠状病毒、犬库布病毒等其他病毒。

PCR 技术高度敏感,能够检测出极低水平的病毒排毒,但很难区分疫苗株与野生亚型。在 Maira 等的多重串联 PCR (MT - PCR) 组合检测中发现,某些情况下,用于区分疫苗株与 CPV - 2 野生型病毒的拷贝数或 Ct 值的标准方法可能具有误导性。同时,也

会有假阳性及非特异性扩增情况出现,且该技术需要熟练的专业人员、昂贵的化学品、基质辅助抑制和复杂的仪器,因此通常不适合在临床诊断中应用^[51]。

4.3 生物标志物 生物标志物是用做客观测量和评估生物状态的生理或病理指标。感染 CPV - 2 的主要标志包括血液学的变化、凝血异常、血清生化变化和内分泌变化等^[52]。CPV - 2 肠炎的最佳预后时间是入院后 24 小时,早期的生物标志物水平检测有助于制定适宜的治疗方案、提高患犬存活率,后期生物标志物水平监测可用于疾病的进程及预后判断。

CPV - 2 肠炎期间最一致的发现是短暂性淋巴细胞减少,白细胞总数、中性粒细胞、中性粒细胞带、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞计数显著低的患犬往往存活率极低,而预后良好幼犬往往在入院后 24 小时内淋巴细胞计数出现反弹性增加。因此,淋巴细胞计数有助于监测感染阶段和判断患犬何时真正处于恢复期。犬细小病毒性肠炎的另一典型特征为凝血功能障碍。患犬抗凝血酶通过胃肠道丢失,内毒素介导的凝血激活而消耗抗凝血酶和高纤维蛋白原血症可导致 CPV 肠炎的高凝状态。该凝血功能障碍可通过测定标准凝血参数来检测,该参数包括凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间、纤维蛋白原浓度、纤维蛋白降解产物、d - 二聚体和抗凝血酶 III 活性等^[53]。

此外还有许多非特异性特征,如厌食、呕吐和腹泻引起的严重低钾血症、总血钙浓度降低和血浆瓜氨酸浓度降低等。但作为细小病毒性肠炎潜在标志物的血液学和生物化学变化也可能在幼犬接种细小病毒活疫苗后短暂出现。

5 治疗

细小病毒性肠炎的治疗主要是支持性治疗至呕吐和腹泻等临床体征消退,采取如补充电解质、抗生素治疗、止吐、抗病毒、抗脂多糖辅助治疗、服用口服液改善肠道黏膜健康等措施。虽然奥司他韦被视为潜在的抗病毒治疗候选药物,但目前无特异性抗病毒治疗被批准,因此 CPV - 2 抗病毒治疗很少实施。CPV - 2 会严重破坏胃肠上皮细胞,导致细菌不断转位,引起内毒素血症和败血症。针对这种情况,通常使用 β - 内酰胺类抗生素 (如氨苄西

林或头孢唑林),以及氨基糖苷类抗生素(如庆大霉素)。此外,氟喹诺酮类抗生素(如恩诺沙星)和甲硝唑也可用于缓解厌食和呕吐等症状。特异性抗 CPV-2 疗法常用重组猫干扰素- ω ,因其结构与犬干扰素相似,可以与犬细胞表面的干扰素受体结合^[54]。

支持性治疗作为主要治疗手段,恢复时间较长、死亡率较高,因此需要辅助手段增强疗效、提高治愈率。改善肠道菌群作为多种肠道疾病的辅助治疗方法,在人类和兽医医学中均具有广阔的应用前景。2018 年 Giorgio 等^[55]研究表明,进行粪菌移植的患犬腹泻消退更快,而在 2019 年朴俊锡等^[56]证实了肠道微生物群落的紊乱与犬细小肠炎的发生有关。因此可服用益生菌或粪菌移植治疗,但从临床反应的角度来看,二者效果没有明显的差异^[57]。此外,灌服白头翁散等清热解毒的中草药^[58]、针灸疏通胃肠脉络和注射臭氧化乳酸林格氏溶液^[59]等均在临床试验中证明能够在缩短犬住院治疗时间。

6 结 语

CPV-2 碱基突变率相当高^[60],抗原漂移持续发生,尽管研究显示目前的疫苗仍然适用,且没有突变导致的显著抗原性变化,但不能保证未来的突变株不产生显著抗原性变化,爆发流行新型变异毒株。为了更好地监测、防控及治疗犬细小病毒病,未来应更多地关注结构生物学和分子发病机制方面,研发快捷、灵敏、高特异性的诊断技术,以便与其他犬腹泻病毒鉴别诊断、及时提供针对性治疗。暴露后住院治疗将是治愈患病犬的直接选择,但大部分患犬主人往往因经济原因放弃住院。因此,开发应用新型辅助性疗法及研究基于抗体/适配子的治疗分子来缩短住院时间、减少医疗成本对增加患犬存活率至关重要。

参 考 文 献:

[1] 陈阳阳. 犬细小病毒 VP2 基因在杆状病毒表达系统中的表达及免疫原性鉴定 [D]. 2018.
Chen Y Y. Expression and immunogenicity identification of canine parvovirus VP2 gene in baculovirus expression system [D]. 2018.

[2] Callaway H M, Feng K H, Lee D W, *et al.* Parvovirus capsid structures required for infection; Mutations controlling receptor

recognition and protease cleavages [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(2):23-26.

- [3] Govindasamy L, Hueffer K, Parrish R, *et al.* Structures of host range - controlling regions of the capsids of canine and feline parvoviruses and mutants [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(22): 11-21.
- [4] Lu R G, LIU W Q, YAN X J. Research on the interaction between canine parvovirus and host and the mechanism of cross - species transmission [J]. *Progress in Animal Medicine* 2020, 41(11): 3-6.
- [5] Ahmed N, Riaz A, Zubair Z, *et al.* Molecular analysis of partial VP-2 gene amplified from rectal swab samples of diarrheic dogs in Pakistan confirms the circulation of canine parvovirus genetic variant CPV-2a and detects sequences of feline panleukopenia virus (FPV) [J]. *Virology Journal*, 2018, 15(1): 45-50.
- [6] Tuteja D, Banu K, Mondal B. Canine parvovirology - A brief updated review on structural biology, occurrence, pathogenesis, clinical diagnosis, treatment and prevention [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2022, 82: 101765.
- [7] Zhao H, Wang J, Jiang Y, *et al.* Typing of canine parvovirus strains circulating in North - East China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(2): 495-503.
- [8] Hao X, He Y, Wang C, *et al.* The increasing prevalence of CPV-2c in domestic dogs in China [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9869.
- [9] Hao X, Li Y, Xiao X, *et al.* The changes in canine parvovirus variants over the years [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 18-23.
- [10] Qi S, Zhao J, Guo D, *et al.* A Mini - Review on the Epidemiology of Canine Parvovirus in China [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 5.
- [11] Goddard A, Leisewitz A L. Canine parvovirus [J]. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 2010, 40(6): 41-53.
- [12] Decaro N, Buonavoglia C, Barrs V R. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? [J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 247: 108760.
- [13] Kelman M, Ward M P, Barrs V R, *et al.* The geographic distribution and financial impact of canine parvovirus in Australia [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(1): 299-311.
- [14] 徐刚. 犬感染 CPV 的诊断治疗方法与预防措施 [J] 现代商贸工业, 2010, 22(09): 356.
Xu G. Diagnosis, treatment and prevention of CPV infection in dogs [J]. *Modern Commerce&Trade Industry*, 2010, 22(09): 356-266.
- [15] 耿雨菲, 王恩雨, 滕井胜, 等. 2014—2015 年黑龙江省牡丹江地区犬细小病毒 2 型分子流行病学调查 [J]. *畜牧与饲料*

- 科学, 2015, 36(10): 10-37.
- Geng Y F, Wang Y Y, Teng J S, *et al.* Molecular epidemiology of canine parvovirus type 2 in Mudanjiang area of Heilongjiang province from 2014 to 2015 [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2015, 36(10): 10-37.
- [16] Siedek E M, Schmid H, Sture G H, *et al.* Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c [J]. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2011, 124(1/2): 58-64.
- [17] Hrenández - blanco B, Catala - Lópezf. Are licensed canine parvovirus (CPV2 and CPV2b) vaccines able to elicit protection against CPV2c subtype in puppies?: A systematic review of controlled clinical trials [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 180(1/2): 1-9.
- [18] Decaro N, Crescenzo G, Desario C, *et al.* Long - term viremia and fecal shedding in pups after modified - live canine parvovirus vaccination [J]. *Vaccine*, 2014, 32(30): 38-41.
- [19] Decaro N, Desario C, Billi M, *et al.* Evaluation of an in - clinic assay for the diagnosis of canine parvovirus [J]. *Veterinary Journal (London, England; 1997)*, 2013, 198(2): 4-7.
- [20] Desario C, Decaro N, Campolo M, *et al.* Canine parvovirus infection; which diagnostic test for virus? [J]. *Journal of Virological Methods*, 2005, 126(1/2): 79-85.
- [21] Pollock R V, Carmichael L E. Dog response to inactivated canine parvovirus and feline panleukopenia virus vaccines [J]. *The Cornell Veterinarian*, 1982, 72(1): 16-35.
- [22] Dahiya S S, Saini M, Kumar P, *et al.* Immunogenicity of a DNA - launched replicon - based canine parvovirus DNA vaccine expressing VP2 antigen in dogs [J]. *Research in Veterinary Science*, 2012, 93(2): 89-97.
- [23] 龚成燕, 陈杰, 潘虹军, 等. 狂犬病、犬瘟热和犬细小病毒病三联灭活疫苗免疫效果评价 [J] *中国动物传染病学报*, 2023, 31(03): 82-90.
- Gong C Y, Chen J, Pan H J, *et al.* Evaluation of the immune effect of triple inactivated vaccine against rabies, canine distemper and canine parvovirus disease [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2023, 31(03): 82-90.
- [24] Dhama K, Mahendran M, Gupta P K, *et al.* DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives [J]. *Veterinary Research Communications*, 2008, 32(5): 34-56.
- [25] Dahiya S S, Saini M, Kumar P, *et al.* An oral Sindbis virus replicon - based DNA vaccine containing VP2 gene of canine parvovirus delivered by *Escherichia coli* elicits immune responses in dogs [J]. *Acta Virologica*, 2011, 55(4): 89-94.
- [26] Scheerlinck J P, Casey G, Mcwaters P, *et al.* The immune response to a DNA vaccine can be modulated by co - delivery of cytokine genes using a DNA prime - protein boost strategy [J]. *Vaccine*, 2001, 19(28/29): 40-60.
- [27] Li L, Petrovsky N. Molecular Adjuvants for DNA Vaccines [J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2017, 22: 17-40.
- [28] Flingai S, Czerwonko M, Goodman J, *et al.* Synthetic DNA vaccines; improved vaccine potency by electroporation and co - delivered genetic adjuvants [J]. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4: 354-356.
- [29] Zhao W, Wang X, Li Y, *et al.* Administration with vaccinia virus encoding canine parvovirus 2 VP2 elicits systemic immune responses in mice and dogs [J]. *Viral Immunology*, 2020, 33(6): 434-438.
- [30] Bloom D E, Fan V Y, Sevilla J P. The broad socioeconomic benefits of vaccination [J]. *Science Translational Medicine*, 2018, 10(441): 22-24.
- [31] Casal J I, Langeveld J P, Cortés E, *et al.* Peptide vaccine against canine parvovirus: Identification of two neutralization subsites in the N terminus of VP2 and optimization of the amino acid sequence [J]. *Journal of Virology*, 1995, 69(11): 72-74.
- [32] Langeveld J P, Casal J I, Cortés E, *et al.* Effective induction of neutralizing antibodies with the amino terminus of VP2 of canine parvovirus as a synthetic peptide [J]. *Vaccine*, 1994, 12(15): 80-88.
- [33] Langeveld J P, Kamstrup S, Uttenthal A, *et al.* Full protection in mink against mink enteritis virus with new generation canine parvovirus vaccines based on synthetic peptide or recombinant protein [J]. *Vaccine*, 1995, 13(11): 10-33.
- [34] Davis - wurzler G M. 2013 update on current vaccination strategies in puppies and kittens [J]. *The Veterinary clinics of North America Small Animal Practice*, 2014, 44(2): 235-263.
- [35] Altman K D, Kelman M, Ward M P. Are vaccine strain, type or administration protocol risk factors for canine parvovirus vaccine failure? [J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 210: 8-16.
- [36] 刘洁, 牟林琳, 廖园园, 等. 犬细小病毒胶体金免疫层析检测试纸条及制备方法, CN103604924A [P/OL].
- Liu J, Mu L L, Liao Y Y, *et al.* Colloidal gold immunochromatographic test strip for detection of canine parvovirus and its preparation method, CN103604924A [P/OL].
- [37] Meggiolaro M N, LY A, Rysnik - steck B, *et al.* MT - PCR panel detection of canine parvovirus (CPV - 2): Vaccine and wild - type CPV - 2 can be difficult to differentiate in canine diagnostic fecal samples [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2017, 33: 20-27.
- [38] 吴红玲. 犬细小病毒胶体金免疫层析检测法的建立 [D]. 2016.
- Wu H L. Establishment of colloidal gold immunochromatographic assay for detection of canine parvovirus [D]. 2016.
- [39] 余春明, 郑雪莹, 范君文, 等. 犬瘟热、犬细小病毒胶体金二联检测卡研制 [J]. *中国动物检疫*, 2023, 40

- (01): 128 - 133.
- Yu C M, Zheng X Y, Fan J W, *et al.* Development of colloidal gold kit for detection of canine distemper and canine parvovirus [J]. *China Animal Quarantine*, 2023, 40(01): 128 - 133.
- [40] 庄昕哲, 孙晓笛. 犬细小 + 犬冠状病毒 + 贾第鞭毛虫抗原三合一胶体金检测卡的制备与评价[J]. *现代畜牧兽医*, 2022(01): 52 - 60.
- Zhuang X Z, Sun X D. Preparation and evaluation of three in one colloidal gold detection card for canine paragon + canine corona + Giardia antigen [J]. *Modern Animal Science and Veterinary Medicine*, 2022(01): 52 - 60.
- [41] 马永纓, 孙明, 申屠芬琴, 等. 犬细小病毒血凝抑制抗体效价胶体金免疫层析检测方法的建立及应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(08): 19 - 24.
- Ma Y Y, Sun M, Seng T F, *et al.* Establishment and application of colloidal gold immunochromatographic assay for detection of hemagglutination inhibition antibody titer of canine parvovirus [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2016, 43(08): 19 - 24.
- [42] 杨凯越. 犬细小病毒胶体金试纸条的研制及初步应用[D]. 2020.
- Yang K Y. Development and preliminary application of canine parvovirus colloidal gold strip [D]. 2020.
- [43] Decaro N, Elia G, Martella V, *et al.* A real - time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs [J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 105(1): 19 - 28.
- [44] Wilkes R P, Lee P Y, Tsai Y L, *et al.* An insulated isothermal PCR method on a field - deployable device for rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 at points of need [J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, 220: 35 - 38.
- [45] Kaur G, Chandra M, Dwivedi P N, *et al.* Multiplex real - time PCR for identification of canine parvovirus antigenic types [J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, 233: 1 - 5.
- [46] Sun Y, Cheng Y, Lin P, *et al.* A multiplex TaqMan real - time PCR for detection and differentiation of four antigenic types of canine parvovirus in China [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2018, 38: 7 - 12.
- [47] Hoang M, Wu H Y, Lien Y X, *et al.* A SimpleProbe[®] real - time PCR assay for differentiating the canine parvovirus type 2 genotype [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2019, 33(1): e22654.
- [48] Dema A, Ganji V K, Yella N R, *et al.* A novel one - step amplification refractory mutation system PCR (ARMS - PCR) for differentiation of canine parvovirus - 2 variants [J]. *Virus Genes*, 2021, 57(5): 426 - 433.
- [49] Deng X, Zhang J, Su J, *et al.* A multiplex PCR method for the simultaneous detection of three viruses associated with canine viral enteric infections [J]. *Archives of Virology*, 2018, 163(8): 21 - 28.
- [50] Liu D, Liu F, Guo D, *et al.* One - step triplex PCR/RT - PCR to detect canine distemper virus, canine parvovirus and canine kobuvirus [J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2019, 81(7): 10 - 15.
- [51] 孙亚茹, 王建科, 林鹏, 等. 犬细小病毒病实验室诊断方法研究进展[J]. *经济动物学报*, 2018, 22(01): 57 - 62.
- Sun Y R, Wang J K, Lin P, *et al.* Advances in laboratory diagnosis of canine parvovirus disease [J]. *Journal of Economic Zoology*, 2018, 22(01): 57 - 62.
- [52] Schoeman J P, Goddard A, Leisewitz A L. Biomarkers in canine parvovirus enteritis [J]. *New Zealand Veterinary Journal*, 2013, 61(4): 17 - 22.
- [53] Corda F, Ballocco I, Corda A, *et al.* Coagulation abnormalities in dogs with parvoviral enteritis [J]. *Veterinary Sciences*, 2023, 10(1): 11 - 17.
- [54] Kuwabara M, Nariai Y, Horiuchi Y, *et al.* Immunological effects of recombinant feline interferon - omega (KT - 80) administration in the dog [J]. *Microbiology and Immunology*, 2006, 50(8): 37 - 41.
- [55] Pereira G Q, Gomes L A, Santos I S, *et al.* Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection [J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2018, 32(2): 7 - 11.
- [56] Park J S, Guevarra R B, Kim B R, *et al.* Intestinal microbial dysbiosis in beagles naturally infected with canine parvovirus [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(9): 391 - 400.
- [57] Jugan M C, Kukanich K, Freilich L. Clinical response in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome following randomized probiotic treatment or fecal microbiota transplant [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10: 105 - 110.
- [58] 陈明君, 博永刚. 中西医诊治犬细小病毒病(CPV)[J]. *当代畜牧*, 2022, (02): 56 - 59.
- Chen M J, Bo Y G. Diagnosis and treatment of canine parvovirus disease (CPV) with traditional Chinese and western medicine [J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2022, (02): 56 - 59.
- [59] Dos Santos T G, Orlandin J R, De Almeida M F, *et al.* Ozone therapy: Protocol for treating canine parvovirus infection [J]. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 2023, 45: e004622.
- [60] 伊淑帅. 东北地区宠物猫肠道病毒组学分析及腹泻相关病毒的分子检测与进化研究[D]. 2019.
- Yi S S. Analysis of enterovirus and molecular detection and evolution of diarrhea - related viruses in pet cats in Northeast China [D]. 2019.
- [61] Zhou P, Zeng W, Zhang X, *et al.* The genetic evolution of canine parvovirus - A new perspective [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): 17 - 13.