

2019年某实验猴养殖场食蟹猴犬瘟热暴发的诊断

王晨娟¹, 杨玲焰², 王立鹏¹, 孙雪萍¹, 李静文¹, 郭连香¹, 荣 荣², 时长军¹

(1. 苏州西山生物技术有限公司, 苏州 215123; 2. 西交利物浦大学理学院生物科学系, 苏州 215123)

[摘要] **目的** 报告2019年某实验猴养殖场中食蟹猴群暴发犬瘟热病毒的诊断情况。**方法** 针对2019年底中国华南地区某实验猴养殖场送检的21只患病食蟹猴(出现面部红疹、皮屑、流鼻涕和腹泻等症状)的血清、皮肤红疹拭子和1只病死猴的抗凝全血、肝、肺、皮肤组织,共46份样品,采用实时荧光定量PCR法检测犬瘟热病毒基因片段,采用免疫组织化学染色法检测肺组织中犬瘟热病毒核蛋白表达。将病死猴的皮肤组织研磨过筛,取滤液接种于单层MDCK细胞系中培养分离病毒,将分离的病毒进行全基因组测序鉴定,采用Clustal Omega工具对亚洲不同犬瘟热病毒分离株进行比对和同源性分析,构建遗传发育树,并对其进行遗传进化分析。**结果** 经临床追溯,患病的食蟹猴出现了与麻疹病毒感染食蟹猴类似的临床症状,剖检病死猴可见肺部有红色病变,大肠黏膜有明显出血。实时荧光定量PCR检测患病猴血清、皮肤红疹拭子及病死猴各组织样本中的犬瘟热病毒核酸结果均呈阳性,由标准曲线公式计算出皮肤组织中的病毒载量最高;免疫组织化学染色病死猴的肺组织显示犬瘟热病毒核蛋白聚集在肺泡上皮细胞、肺支气管和细支气管处;从病死猴皮肤组织中分离出1株犬瘟热病毒株,遗传进化分析表明其与越南犬中发现的亚洲1型CDV/dog/HCM/33/140816株亲缘关系最近,基因相似度达到98.86%。**结论** 综合临床症状、核酸检测、病毒蛋白免疫组织化学法及全基因组测序分析结果,诊断该猴场的食蟹猴感染了犬瘟热病毒,建议将犬瘟热病毒纳为饲养猴群的监测项目之一。本研究还为进一步分析犬瘟热病毒的分子生物学特性提供了基础。

[关键词] 犬瘟热病毒; 食蟹猴; 非人灵长类; 遗传进化

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0360-08



Diagnosis of an Outbreak of Canine Distemper in Cynomolgus Monkeys in an Experimental Monkey Farm in 2019

WANG Chenjuan¹, YANG Lingyan², WANG Lipeng¹, SUN Xueping¹, LI Jingwen¹, GUO Lianxiang¹, RONG Rong², SHI Changjun¹

(1. Suzhou Xishan Biotechnology Inc., Suzhou 215123, China; 2. Department of Biological Sciences, School of Science, Xi'an Jiaotong-Liverpool University, Suzhou 215123, China)

Correspondence to: RONG Rong (ORCID: 0000-0002-7641-7684), E-mail: Rong.Rong@xjtlu.edu.cn;

SHI Changjun (ORCID: 0009-0000-9970-9930), E-mail: changjun.shi@vrl.net

[ABSTRACT] **Objective** To report the diagnosis of a canine distemper virus outbreak among a colony of cynomolgus monkeys at an experimental monkey farm in 2019. **Methods** A total of 46 samples were collected from 21 diseased cynomolgus monkeys (exhibiting symptoms such as facial rash, skin scurf, runny nose, and diarrhea) and from one deceased monkey at an experimental monkey breeding farm in South China in late 2019, including serum, skin rash swabs, and anticoagulated whole blood, liver, lung, and skin tissues were submitted for testing. All submitted samples were tested for canine distemper virus gene fragments using real-time quantitative PCR, while immunohistochemical staining was performed to detect canine distemper virus nucleoprotein in lung tissues. The skin tissue of the deceased monkey was ground and sieved. The filtrate was inoculated into a monolayer MDCK cell line for virus isolation. Then, whole-

[基金项目] 国家重点研发计划项目“灵长类实验动物育种、繁育、SPF猴培育及资源保护研究”子课题“猴病原检测新方法建立和高品质种群培育”(2022YFF0710903);2021年江苏省重点研发计划(社会发展)项目“灵长类实验动物重大疫病监测技术应用研发”(BE2021668)

[第一作者] 王晨娟(1987—),女,硕士,助理研究员,研究方向:实验动物质量检测。E-mail: chenjuan.wang@vrlasia.cn

[通信作者] 荣 荣(1967—),女,博士,副教授,研究方向:病毒感染性疾病的机制及控制。E-mail: Rong.Rong@xjtlu.edu.cn。ORCID: 0000-0002-7641-7684;

时长军(1962—),男,博士,高级工程师,研究方向:实验动物疫病学。E-mail: changjun.shi@vrl.net。ORCID: 0009-0000-9970-9930

genome sequencing was performed to identify the isolated virus. The Clustal Omega tool was used to align and analyze the homology of different Asian canine distemper virus isolates. A phylogenetic tree was constructed, followed by genetic evolutionary analysis. **Results** Clinical retrospective analysis revealed that the diseased cynomolgus monkeys exhibited symptoms similar to those observed in cynomolgus monkeys infected with measles virus. Necropsy findings showed red lesions in the lungs and significant hemorrhage in the colonic mucosa. Real-time quantitative PCR detected canine distemper virus nucleic acid in the serum, skin rash swabs of the infected monkeys, and various tissue samples of the deceased monkey, all of which tested positive. Calculation based on the standard curve formula indicated the viral load was highest in the skin tissue. Immunohistochemical staining of the deceased monkey's lung tissue demonstrated aggregation of CDV nucleoprotein in alveolar epithelial cells, bronchi, and bronchioles. A CDV strain was isolated from the skin tissue of the deceased monkey. Phylogenetic analysis indicated that this strain shares the closest relationship (98.86%) with the Asian-1 type canine distemper virus strain CDV/dog/HCM/33/140816, previously identified in dogs in Vietnam. **Conclusion** Based on comprehensive analysis of clinical symptoms, nucleic acid detection, viral protein immunohistochemistry, and whole-genome sequencing results, the diagnosis confirms that the cynomolgus monkeys in this facility are infected with canine distemper virus. It is recommended to include canine distemper virus as a routine surveillance target in captive monkey populations. Additionally, this study provides a foundation for further research on the molecular biological characteristics of canine distemper virus.

[Key words] Canine distemper virus; Cynomolgus monkey; Nonhuman primates; Phylogenetic analysis

犬瘟热 (canine distemper, CD) 是一种危害幼犬, 具有高度传染性的病毒性疾病; 其发病率高且致死速度快, 可通过直接接触或飞沫传播, 是一种在世界范围内分布广泛的疾病。该病是由犬瘟热病毒 (canine distemper virus, CDV) 感染导致。CDV 属于副黏病毒科 (paramyxoviridae) 麻疹病毒属 (morbillivirus), 为 RNA 病毒。副黏病毒科还包含一系列高致病性的病毒, 如麻疹病毒 (measles virus, MeV) 和牛瘟病毒 (rinderpest virus, RPV)。与具有宿主特异性的 MeV 和 RPV 相比, CDV 具有更显著的遗传多样性, 其宿主范围很广, 近些年更是突破了物种屏障^[1-3]。有研究显示, CDV 可以感染至少 6 个目、20 多个科的哺乳动物, 包括家畜种群, 以及自由或圈养的野生动物界的多个物种^[4-9]。CDV 的主要宿主是犬和水貂, 患病及带病毒的动物为主要传染源, 主要通过动物的体液 (鼻涕、唾液、尿液等) 和粪便向外排毒。该病毒的组织侵蚀性非常广泛, 有报道在患病动物的肝、肺、肾、淋巴结、脾、脑等器官组织中均可检测到病毒^[10-11]。

除犬科、浣熊科、熊科、鼬科、猫科外, 非人灵长类动物对 CDV 也敏感^[12-15]。最早感染非人灵长类动物的病例是 1989 年由 Yoshikawa 等^[13] 在自然感染犬瘟热病毒的日本猕猴中发现。近年来, CDV 在非人灵长类动物中的感染时有报道, 且非人灵长类动物感染后有 2%~60% 的致死率^[10]。2006 年, 在我国广西发生过

恒河猴的感染^[11]。笔者所在单位苏州西山生物技术有限公司 (下文简称本单位) 在 2019 年底接收了一批来自华南一猴场疑似 CDV 感染的食蟹猴样本。本研究通过对患病动物临床表现症状追溯、分子生物学检测及所分离病毒的亲缘关系分析, 确诊该猴场的食蟹猴感染了 CDV; 同时结合本单位多年来针对非人灵长类动物 CDV 的检测数据以及该猴场的隔离检测数据, 探讨了 CDV 的诊断及控制措施, 以期开展 CDV 研究工作的同行提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 临床送检样本

来自华南地区某实验猴养殖场的 21 只患病食蟹猴的血清、皮肤红疹拭子样本, 以及 1 只病死食蟹猴的 EDTA 抗凝全血、破溃皮肤、肺和肝脏组织, 共 46 份样本, 通过冷链运输, 于 2019 年底送至本单位。随后本单位在 2019 年底及次年 1 月对送检样本进行鉴定诊断。

1.2 主要试剂及仪器

DNA/RNA 共提取试剂盒 (DP422) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 随机引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成; 逆转录酶 (2641A) 购自日本 TaKaRa 公司; 小鼠抗 CDV 单抗 (MA1-82327) 购自美国 Thermo Fisher 公司; 免疫显色试剂 (IHC-BD03-1)

和DAB染色液(1904001)均购自广州安必平医药科技股份有限公司;病毒研究用MDCK细胞系购自北京北纳创联生物技术研究院;DMEM维持培养基(SH30243.01)购自美国HyClone公司。PCR仪(ABI 7500)购自美国Thermo Fisher公司;显微镜(BX43F)购自日本Olympus公司。

1.3 RNA提取及实时荧光定量PCR反应

取21只患病猴血清、红疹拭子及1只病死猴的全血、皮肤、肺和肝脏组织,用DNA/RNA共提取试剂盒提取RNA,严格按照试剂盒说明书进行操作。提取的RNA用60 μ L无RNA酶水洗脱,并用随机引物和逆转录酶逆转录为cDNA。逆转录反应体系共20 μ L,含RNA模板9 μ L、100 μ mol/L随机引物1 μ L、5 $\times$ M-MLV Buffer 4 μ L、200 U/ μ L逆转录酶0.5 μ L、40 U/ μ L逆转录酶抑制剂0.5 μ L、2.5 mmol/L dNTP 4 μ L和RNase-Free ddH₂O 1 μ L。逆转录反应程序:42 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 2 min。实时荧光定量PCR采用针对CDV核蛋白基因设计的引物^[16]:CDV-83F(5'-AGCTA-GTTTCATCTTAAGTATCAAATT-3')和CDV-83R(5'-TTAACTCTCCAGAAACTCATGC-3')。引物由苏州金唯智生物技术有限公司合成。实时荧光定量PCR反应体系共20 μ L,其中含5 μ L样本cDNA模板(同时设置空白对照和阳性质粒对照)、10 μ mol/L上下游引物各0.2 μ L、2 $\times$ SYBR Premix 10 μ L和ROX(50 $\times$) 0.4 μ L。在PCR仪中95 $^{\circ}$ C预变性30 s, 95 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火延伸31 s(采集信号),进行40个循环,绘制溶解曲线。测得各样本循环阈值(cycle threshold, Ct),根据标准曲线公式计算样本中的病毒载量(拷贝数/ μ L)。

1.4 免疫组织化学法检测

病死猴的肺组织制成冰冻切片,并于室温干燥约40 min,然后浸泡在冷丙酮中20 min,取出后室温干燥40 min,用PBS洗涤3次,每次1 min。实验组和空白对照组分别滴加体积稀释比例为1:50的抗CDV单抗和PBS,两组同时进行以下操作:室温孵育60 min,然后用PBS洗涤3次,每次1 min;再滴加体积比3%的过氧化氢,室温孵育10 min,而后再次PBS洗涤3次,每次1 min;滴加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗,室温孵育20 min,然后用PBS洗涤3次,每次1 min;滴加DAB显色剂染色3~10 min,流水冲洗10 min,去除切片上多余的水分,将切片依次浸入95%乙醇溶液、无水乙醇、环保透明剂中各2次,每次1 min,最后封固,镜检。

1.5 皮肤组织中病毒分离

将病死猴皮肤置于适量无菌生理盐水中,用无菌剪刀剪碎后研磨。研磨后的样本过筛,收集滤液并用PBS稀释至2 mL。随后以4 000 $\times$ g离心5 min,获得上清液,通过0.22 μ m滤膜过滤。取500 μ L组织滤液接种于培养的单层MDCK细胞系中作为实验组,未接种组织滤液的单层MDCK细胞系作为空白对照组,两组同时进行以下操作:37 $^{\circ}$ C吸附1 h后,用PBS清洗细胞1次,再加入含2%胎牛血清的DMEM维持培养基,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养。此后每天观察细胞,直到出现细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。实验组在第8天时收集分离到的病毒,进行CDV特异性PCR验证,方法同1.3节。

1.6 病毒分离株的测序及遗传进化分析

取表现有细胞病变效应的MDCK细胞培养液,3 000 $\times$ g离心5 min,取上清液20 μ L加入5 mL聚乙二醇6000混匀,4 $^{\circ}$ C存放24 h,10 000 $\times$ g离心20 min,取沉淀用DPBS重悬。重悬液送上海探普生物科技有限公司进行全基因组测序。用NovaSeq 6000(Illumina)测序仪测序,用SPAdes v3.13.0工具对病毒基因组进行组装,并将整个开放阅读框序列放入美国国家生物技术信息中心管理的GenBank中。采用Clustal Omega工具对不同CDV分离株进行多序列比对和核苷酸百分比同源性计算,用Seaview 5.02^[17]和PhyML v3.1^[18]算法构建遗传发育树,并对其进行遗传进化分析。

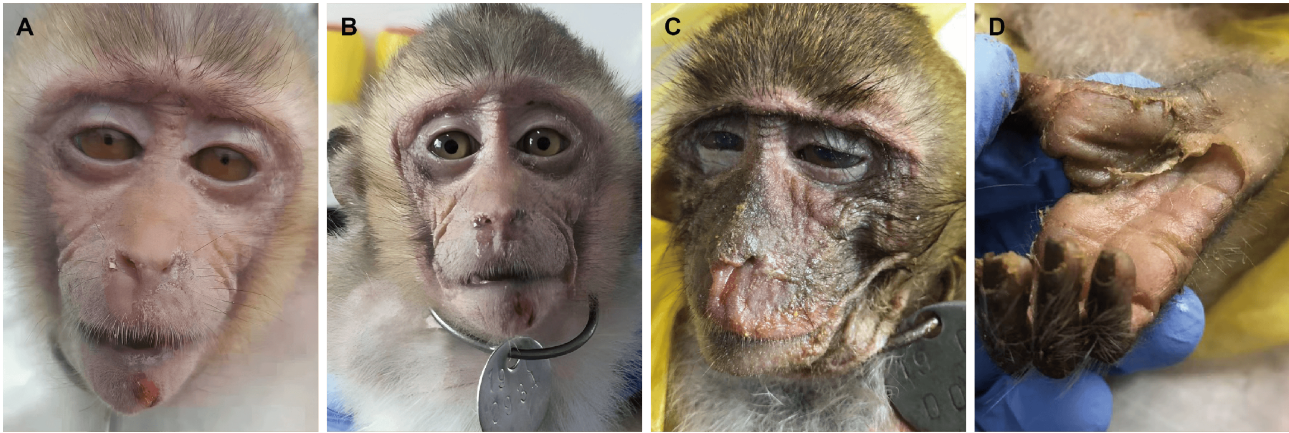
2 结果

2.1 病毒感染食蟹猴的临床症状及剖检情况

经临床追溯,该批食蟹猴在2019年6月由越南购入猴场约半年后,部分动物开始出现面部皮疹(图1A)、红疹,随后出现流鼻涕(图1B),部分动物伴有腹泻。这些症状与同属于副黏病毒科麻疹病毒属的麻疹病毒感染食蟹猴的症状相似。部分病猴后期出现脓皮症(图1C),足部皮肤增厚并破溃(图1D),这一症状也是CDV感染食蟹猴的典型临床特征之一。解剖病死猴后,发现其肺部呈红色病变,大肠黏膜有明显出血,推测严重的肺炎可能是该病猴死亡的主要原因。另外,该实验猴养殖场同期共有26只食蟹猴出现上述症状,其中8只死亡;本次送检样本正是来自其中的21只患病猴和1只病死猴。

2.2 患病猴与病死猴送检样本中均检测出CDV核蛋白基因片段

使用CDV特异性引物对21只患病猴和1只病死猴

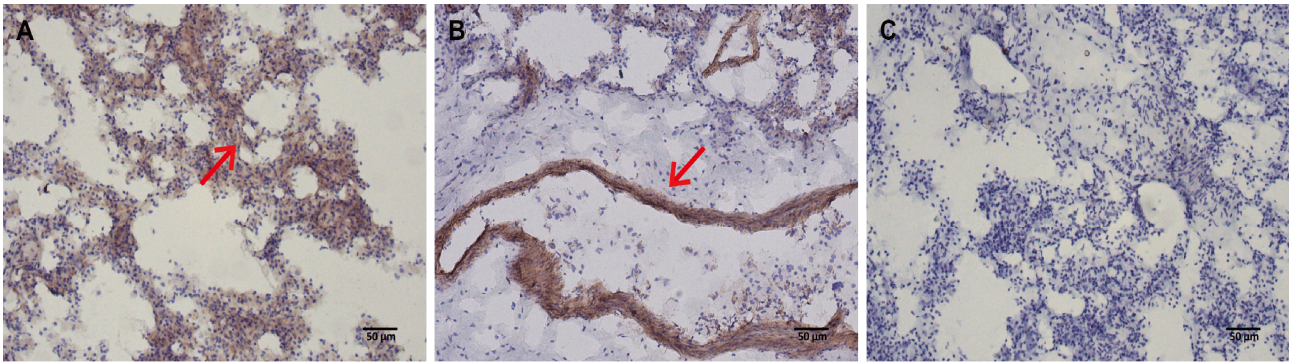


注：A，面部有皮屑；B，流鼻涕；C，脓皮症；D，足部皮肤增厚并破溃。
Note: A, Facial skin scurf; B, Runny nose; C, Pyoderma; D, Thickening and ulceration of foot skin.

图1 患病食蟹猴的临床体征
Figure 1 Clinical symptoms of the infected cynomolgus monkeys

的送检样本进行实时荧光定量PCR检测，结果显示，在21只患病猴血清、红疹拭子样本及1只病死猴的全血、皮肤、肺和肝脏组织中均成功扩增出CDV的核蛋白基因片段，即PCR结果全为阳性，其中1只病死猴全血、皮肤、肺和肝脏组织的Ct值分别为36.4、16.1、17.7和24.9，病毒载量分别为1.4拷贝/ μL 、 4.8×10^5 拷贝/ μL 、 1.7×10^5 拷贝/ μL 和 2.0×10^3 拷贝/ μL ，说明病死

猴皮肤中的病毒载量最高。
2.3 病死猴肺组织中检测出CDV核蛋白
使用针对CDV核蛋白的抗体对病死猴的肺组织进行免疫组织化学染色，结果显示在肺泡上皮细胞、支气管和细支气管处均出现棕褐色的特异性染色反应（图2），提示病死猴的肺组织中有明显的CDV感染。



注：大量CDV核蛋白抗原聚集于肺泡上皮细胞（A）、支气管和细支气管（B），红色箭头指示CDV核蛋白抗原的特异性染色（棕褐色）。空白对照组肺组织未见阳性表达（C）。
Note: A large amount of CDV nucleoprotein antigen aggregated in the alveolar epithelial cells (A), bronchi and bronchioles (B). The red arrow indicates the specific staining (brown color) of the CDV nucleoprotein antigen. No positive expression in lung tissue of blank control group (C).

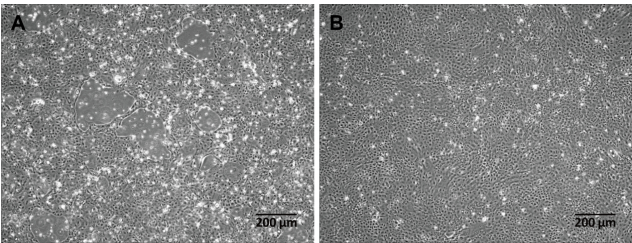
图2 免疫组织化学染色法检测病死猴肺组织切片中病毒蛋白表达(DAB染色, ×100)
Figure 2 Detection of viral protein expression in lung tissue sections of the deceased monkey by immunohistochemical staining (DAB staining, ×100)

2.4 病死猴皮肤组织中分离出CDV

病死猴的皮肤组织经研磨、过滤等处理后接种于培养的单层MDCK细胞，在接种后第4天出现疑似病毒感染后的细胞病变效应，第8天出现明显的细胞病

变效应（图3A），表现为细胞重叠，部分细胞形态变为圆形，细胞质内颗粒增多，部分细胞坏死脱落。经CDV特异性PCR验证为阳性后，收集分离到的病毒，并命名为CDV/CYN/SUZ/2020株。未接种的MDCK细胞

没有出现细胞病变效应（图3B）。



注：A，接种 MDCK 细胞后第 8 天出现细胞病变效应（×40）；B，正常 MDCK 细胞第 8 天未出现细胞病变效应（×40）。
Note: A, Cytopathic effect observed in MDCK cells on the 8th day after inoculation (×40); B, Normal MDCK cells without cytopathic effect on the 8th day (×40).

图3 病死猴皮肤组织滤液接种 MDCK 细胞后的病毒感染细胞病变效应表现

Figure 3 Observation of cytopathic effect after inoculation of MDCK cells with skin tissue filtrate from the deceased monkey

2.5 CDV 分离株测序及遗传进化分析显示其是野生型病毒株

病毒株 CDV/CYN/SUZ/2020 分离自病死猴的皮肤

组织，全基因组长度为 15.67 kb。其完整核苷酸序列存入 GenBank 中，登录号为 MT325867。该分离株的全长开放阅读框核苷酸序列是亚洲地区具有代表性的 CDV 株之一。将其核苷酸序列与亚洲地区常见的病毒株进行比对，结果（表 1）显示：新分离的 CDV/CYN/SUZ/2020 株与在越南发现的 CDV/dog/HCM/33/140816 株^[19]的同源性最高，为 98.86%；与中国发现的水貂 ZC1310M 株也有 98.44% 的一致性，但与水貂 CDV 3 株（疫苗株）的匹配度较低（92.14%），表明此次新发现的食蟹猴 CDV 株并非来源于疫苗株，而是野生型病毒株。另外，与其他实验猴中分离的 CDV 病毒株相比，CDV/CYN/SUZ/2020 株与 BJ-01 株^[2]和 CYN07-dV 株^[10]有 97.05% 的相似性，与 MKY-KM08 株^[2]的相似度为 96.93%。

在系统发育分析中，虽然新鉴定的 CDV/CYN/SUZ/2020 株属于亚洲 1 型遗传谱系（图 4），但它与 2006 年广西犬瘟热恒河猴中分离的 CDV 株以及 2008 年北京犬瘟热恒河猴病例中发现的病毒株均不相同，与 2008 年日本食蟹猴感染病例中的病毒株也不相同。

表1 病死猴皮肤组织中分离的 CDV 株全长开放阅读框核苷酸序列与亚洲常见 CDV 株的一致性(相似度)比对
Table 1 Sequence identity (similarity) comparison between the full-length open reading frame nucleotide sequence of the CDV strain isolated from the skin tissue of the deceased monkey and prevalent Asian CDV strains

病毒株 Strains	CDV/CYN/ SUZ/2020	CDV/dog/ HCM/33/ 140816	ZC1310M	CYN07-dV	BJ-01	MKY- KM08	CDV1_TH/ 2014	MCL-18- Li-1/1	007Lm	CDV3
CDV/CYN/SUZ/2020	100.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDV/dog/HCM/33/140816	98.86	100.00	-	-	-	-	-	-	-	-
ZC1310M	98.44	98.73	100.00	-	-	-	-	-	-	-
CYN07-dV	97.05	97.31	97.70	100.00	-	-	-	-	-	-
BJ-01	97.05	97.30	97.69	99.92	100.00	-	-	-	-	-
MKY-KM08	96.93	97.18	97.56	99.64	99.64	100.00	-	-	-	-
CDV1_TH/2014	94.28	94.54	94.84	94.62	94.61	94.57	100.00	-	-	-
MCL-18-Li-1/1	93.54	93.78	94.11	93.87	93.87	93.82	94.06	100.00	-	-
007Lm	93.93	94.25	94.57	94.53	94.51	94.46	94.57	93.95	100.00	-
CDV3	92.14	92.37	92.68	92.43	92.42	92.43	92.34	91.96	92.76	100.00

3 讨论

有历史文献记载表明，CDV 在 1760 年通过犬类传入欧洲某地，并引发了广泛流行，感染后的动物死亡率很高，最终传播到欧洲的其他地区^[20-21]。CDV 和 MeV 均属于麻疹病毒属，具有相同的基因组结构，并有高度相似的核苷酸和氨基酸序列。有研究表明，

CDV 可能曾感染过人类，与一种人类神经性疾病——多发性硬化症（multiple sclerosis, MS）存在某种关联^[3]。基于 CDV 和 MeV 在分子层面的相关性，科学家们可以用 CDV 来研究麻疹的发病机制，并且开发疫苗和抗病毒疗法。尽管 CDV 具有宿主特异性，主要感染犬科动物，但它仍对包括非人灵长类在内的多种动物构成威胁。目前，国内外已有多起 CDV 感染非人灵

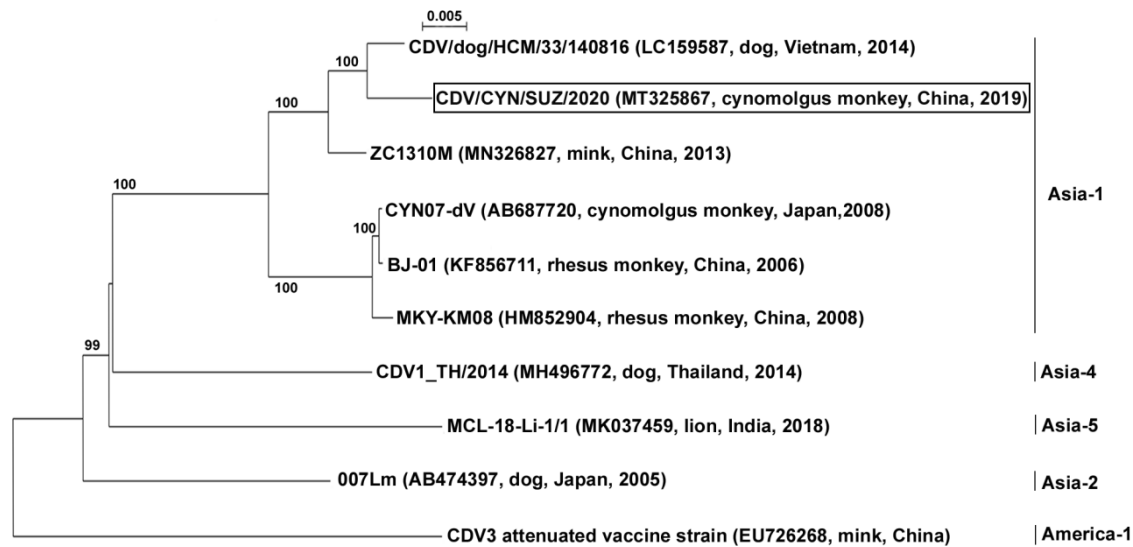


图4 基于不同CDV株全开放阅读框序列的系统发育分析(黑框标记的为本研究从病死猴皮肤组织中新分离的CDV株)

Figure 4 Phylogenetic analysis based on full-length open reading frame sequences of different CDV strains (the CDV strain newly isolated from the skin tissue of the deceased monkey in this study is marked with a black box)

长类动物的报道，且一旦感染，没有疫苗的保护，其发病率较高。接种MeV疫苗的动物通常也会对CDV产生免疫反应，所产生的抗体能够识别MeV和CDV之间保守的表位，从而为宿主提供一定程度的保护^[22-23]。因此推测，MeV免疫可能保护人类免受CDV感染，或至少使感染者未表现出临床症状。在感染CDV并接种MeV疫苗的非人灵长类动物模型中，动物产生的抗体可对CDV产生部分交叉反应，提供了一定的交叉保护^[24]。此外有文献报道，抗CDV血清治疗有助于促进CDV感染动物的康复^[11]。目前，已有CDV肽作为候选疫苗的研制报道，未来将有更为成熟的CDV疫苗产生^[25]。

本研究中，对患病猴和病死猴的临床标本进行实验室调查符合科赫法则^[10]，本实验室的检测结果显示，患病猴血清中的CDV和MeV抗体检测均为阳性，而SVV核酸、抗体以及MeV的核酸检测均为阴性，进一步说明了CDV与MeV抗体之间的交叉反应。

本单位为实验动物第三方检测机构。回溯本单位在2020年6月至2024年6月针对CDV的全部检测数据显示：3 414份实验猴血清样本中CDV抗体的总检出率

为44.11% (1 506/3 414)，其中食蟹猴的CDV抗体检出率为53.88% (903/1 676)，恒河猴为37.14% (361/972)，豚尾猴为31.54% (241/764)；11 333份全血、口腔/鼻拭子、粪便、肺组织等样本中CDV核酸的检出率为1.92% (218/11 333)，其中食蟹猴为1.05% (76/7 268)，恒河猴为3.49% (142/4 073)。可以看出，CDV抗体的阳性率远高于核酸阳性率。这可能是由于近年来随着各单位对CDV感染非人灵长类动物的认识和了解，加强了预防与监测工作，部分动物接种了犬瘟热疫苗，另外部分猴群接种了麻疹疫苗，而这都会使动物产生与CDV抗原的交叉反应。因此，与抗体检测结果相比，核酸检测的阳性率更能反映猴群的实际感染情况。在本案例中，共有26只食蟹猴发病，其中8只死亡；在得知检测结果后，该猴场迅速对患病动物及与其有接触的可疑动物进行了隔离（总计约200只），并对隔离动物接种了CDV疫苗。此后，该猴场出现类似CDV感染症状的实验猴大幅减少，未发现新病例，也无新增死亡动物。鉴于此，笔者建议将CDV纳入猴群的日常监测计划中。

据报道，从中国不同地区的狐狸、浣熊和水貂等动物中分离出来的CDV与来自国外不同地区的CDV一起构成了6个主要的遗传谱系，包括美国1型（大多数疫苗株）、美国2型、亚洲1型、亚洲2型等^[26-27]。亚洲1型CDV于1991年首次由日本报道^[28]，随后蔓延至多个亚洲国家，包括韩国、泰国和中国^[19]。近年，

河南省的一个果子狸农场也暴发了CDV疫情,经全基因组测序发现,该病毒与1997年导致小熊猫死亡的CDV相似度高达98.7%~99.72%,而与美国1型的一致性很低;这株CDV不仅导致圈养动物的免疫衰竭,还可能增加人畜共患风险^[29]。

本研究对华南地区某养殖猴场发现CDV感染症状的21只患病猴的血清、皮肤红疹拭子以及1只病死猴的全血、皮肤、肺、肝脏样本进行CDV核蛋白基因特异性实时荧光定量PCR扩增,结果均为CDV阳性。随后,采用免疫组织化学染色技术检测肺组织中的CDV抗原,发现肺泡上皮细胞、支气管和细支气管处聚集了大量的CDV核蛋白抗原。最后,成功从CDV阳性病死猴的皮肤组织中分离出CDV株并进行了全基因组测序,构建了遗传发育树。遗传进化分析发现,新分离的CDV/CYN/SUZ/2020病毒株与其他已知的亚洲1型、亚洲2型和CDV疫苗株存在差异,但与2014年越南发现的CDV/dog/HCM/33/140816病毒株相似度最高;而越南发现的CDV株与中国河北发现的KC427278.1株亲缘关系最接近^[19],这提示CDV的跨境传播可能发生在中国和越南之间。随后该猴场证实,此批食蟹猴确实是在CDV暴发感染的同年从越南引进。笔者认为,广泛研究来自中国不同地区及不同动物种属的CDV分离株,将有助于更好地了解中国CDV感染情况,特别是非人灵长类动物CDV的起源和演变,同时为CDV的诊断、疫苗研发和疾病防控提供重要支持。

[作者贡献 Author Contribution]

王晨娟负责临床样本收集、检测和结果分析,以及文献检索与论文撰写;

杨玲焰负责病毒分离培养和论文修改;

王立鹏负责PCR检测及数据整理;

孙雪萍负责免疫组织化学染色实验及分析;

李静文负责血清学检测;

郭连香、荣荣指导论文修改,参与论文审核;

时长军指导实验设计,负责论文审核。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] TROGU T, CASTELLI A, CANZIANI S, et al. Detection and molecular characterization of canine distemper virus in wildlife from northern Italy[J]. Pathogens, 2022, 11(12): 1557. DOI:10.3390/pathogens11121557.
- [2] SUN Z Z, LI A X, YE H H, et al. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China[J]. Vet Microbiol, 2010, 141(3-4): 374-378. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.09.024.
- [3] DUQUE-VALENCIA J, SARUTE N, OLARTE-CASTILLO X A, et al. Evolution and interspecies transmission of canine distemper virus-an outlook of the diverse evolutionary landscapes of a multi-host virus[J]. Viruses, 2019, 11(7): 582. DOI:10.3390/v11070582.
- [4] OLEAGA Á, VÁZQUEZ C B, ROYO L J, et al. Canine distemper virus in wildlife in south-western Europe[J]. Transbound Emerg Dis, 2022, 69(4): e473-e485. DOI:10.1111/tbed.14323.
- [5] LIANG J, WANG T T, WANG Q, et al. Prevalence of canine distemper in minks, foxes and raccoon dogs from 1983 to 2023 in Asia, North America, South America and Europe[J]. Front Vet Sci, 2024, 11: 1394631. DOI: 10.3389/fvets.2024.1394631.
- [6] CHENG Y N, WANG J K, ZHANG M, et al. Isolation and sequence analysis of a canine distemper virus from a raccoon dog in Jilin Province, China[J]. Virus Genes, 2015, 51(2):298-301. DOI:10.1007/s11262-015-1236-3.
- [7] WILKES R P. Canine distemper virus in endangered species: species jump, clinical variations, and vaccination[J]. Pathogens, 2022, 12(1):57. DOI:10.3390/pathogens12010057.
- [8] DI FRANCESCO C E, SMOGLICA C, DI PIRRO V, et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of canine distemper virus in marsican brown bear (*Ursus arctos marsicanus*) [J]. Animals, 2022, 12(14): 1826. DOI: 10.3390/ani12141826.
- [9] FRANZO G, DE VILLIERS L, COETZEE L M, et al. Unveiling the molecular epidemiology of canine distemper virus in Namibia: an expected pathogen showing an unexpected origin[J]. Heliyon, 2024, 10(15): e34805. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e34805.
- [10] SAKAI K J, NAGATA N, AMI Y, et al. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008[J]. J Virol, 2013, 87(2):1105-1114. DOI:10.1128/JVI.02419-12.
- [11] QIU W, ZHENG Y, ZHANG S F, et al. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(8):1541-1543. DOI:10.3201/eid1708.101153.
- [12] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 525-526.
- [13] LU C P. Veterinary microbiology[M]. 3rd ed. Beijing: China Agricultural Press, 2001:525-526.
- [14] 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. DOI: 10.1016/0378-1135(89)90043-6.
- [15] 麦博, 王弘义, 盘宝进, 等. 灵长类动物感染犬瘟热[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(6):72-76. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2012.06.016.
- [16] MAI B, WANG H Y, PAN B J, et al. Natural infection with canine distemper virus in Primates[J]. Chin J Comp Med, 2012, 22(6):72-76. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2012.06.016.
- [17] 李慧敏. 犬瘟热病毒的分离鉴定及其抗原蛋白的研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2006.
- [18] LI H M. Isolation and identification of canine distemper virus and study on its antigenic protein[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2006.
- [19] 黄国君, 岳华, 杨发龙, 等. SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测犬瘟热病毒方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(6):450-454. DOI: 10.3724/SP.J.1011.2008.00534.
- [20] HUANG G J, YUE H, YANG F L, et al. Development of a SYBR Green I real-time RT-PCR assay for detection of canine

- distemper virus[J]. Chin J Prev Vet Med, 2008, 30(6):450-454. DOI: 10.3724/SP.J.1011.2008.00534.
- [17] GOUY M, GUINDON S, GASCUEL O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building[J]. Mol Biol Evol, 2010, 27(2):221-224. DOI:10.1093/molbev/msp259.
- [18] GUINDON S, GASCUEL O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood[J]. Syst Biol, 2003, 52(5): 696-704. DOI: 10.1080/10635150390235520.
- [19] NGUYEN D V, SUZUKI J, MINAMI S, et al. Isolation and phylogenetic analysis of canine distemper virus among domestic dogs in Vietnam[J]. J Vet Med Sci, 2017, 79(1):123-127. DOI:10.1292/jvms.16-0394.
- [20] QUINTERO-GIL C, RENDON-MARIN S, MARTINEZ-GUTIERREZ M, et al. Origin of canine distemper virus: consolidating evidence to understand potential zoonoses[J]. Front Microbiol, 2019, 10:1982. DOI:10.3389/fmicb.2019.01982.
- [21] RIVERA-MARTÍNEZ A, RODRÍGUEZ-ALARCÓN C A, ADAME-GALLEGOS J R, et al. Canine distemper virus: origins, mutations, diagnosis, and epidemiology in Mexico[J]. Life, 2024, 14(8):1002. DOI:10.3390/life14081002.
- [22] SHESHERADARAN H, NORRBY E, MCCULLOUGH K C, et al. The antigenic relationship between measles, canine distemper and rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies[J]. J Gen Virol, 1986, 67 (Pt 7): 1381-1392. DOI: 10.1099/0022-1317-67-7-1381.
- [23] ROUXEL R N, SVITEK N, VON MESSLING V. A chimeric measles virus with canine distemper envelope protects ferrets from lethal distemper challenge[J]. Vaccine, 2009, 27 (36):4961-4966. DOI:10.1016/j.vaccine.2009.05.096.
- [24] OTSUKI N, SEKIZUKA T, SEKI F, et al. Canine distemper virus with the intact C protein has the potential to replicate in human epithelial cells by using human nectin4 as a receptor [J]. Virology, 2013, 435(2): 485-492. DOI: 10.1016/j.virol.2012.10.033.
- [25] RENDON-MARIN S, RUÍZ-SAENZ J. Universal peptide-based potential vaccine design against canine distemper virus (CDV) using a vaccinomic approach[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 16605. DOI:10.1038/s41598-024-67781-5.
- [26] SWATI, DEKA D, UPPAL S K, et al. Isolation and phylogenetic characterization of Canine distemper virus from India[J]. Virusdisease, 2015, 26(3): 133-140. DOI: 10.1007/s13337-015-0256-x.
- [27] GUERCIO A, MIRA F, DI BELLA S, et al. Biomolecular analysis of canine distemper virus strains in two domestic ferrets (*Mustela putorius furo*) [J]. Vet Sci, 2023, 10(6): 375. DOI: 10.3390/vetsci10060375.
- [28] 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):2936-2942. DOI:10.1128/JCM.37.9.2936-2942.1999.
- [29] SHI N, ZHANG L, YU X H, et al. Insight into an outbreak of canine distemper virus infection in masked palm civets in China[J]. Front Vet Sci, 2021, 8: 728238. DOI: 10.3389/fvets.2021.728238.

(收稿日期: 2024-11-04 修回日期: 2024-12-30)
(本文责任编辑: 张俊彦)

【引用本文】

王晨娟, 杨玲焰, 王立鹏, 等. 2019年某实验猴养殖场食蟹猴犬瘟热暴发的诊断[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(3): 360-367. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.160.

WANG C J, YANG L Y, WANG L P, et al. Diagnosis of an outbreak of canine distemper in cynomolgus monkeys in an experimental monkey farm in 2019[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(3): 360-367. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.160.

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明

本刊是我国实验动物科学与比较医学领域的一本专业学术期刊, 严格遵守国家实验动物相关法律、法规和标准, 包括但不限于《实验动物管理条例》(2017年3月1日修订版)和《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)等, 同时参考借鉴国际生物医学期刊关于动物实验研究报告的相关指南共识(如ARRIVE 2.0、IGP 2012、IAVE Guidelines 2010等)。因此, 本刊对所有涉及动物实验的来稿均需审查实验动物福利与伦理相关内容。现将一些具体要求说明如下:

1. 涉及动物实验的来稿, 需提供实验动物生产许可证和质量合格证, 以及动物实验场所的实验动物使用许可证。以上证明须与使用动物种类及动物实验单位名称相匹配, 并在正文中列出其对应的许可证编号。

2. 涉及动物实验的来稿, 需在考虑3R(替代、减少和优化)原则的基础上设计动物实验, 并提供作者单位实验动物福利伦理委员会(或相关机构)出具的实验动物福利伦理审查批件。批件中所列内容须与投稿文章相吻合, 并在正文中列出对应的批准编号。

3. 实验动物的用药, 尤其是麻醉镇痛药物必须优先使用药用级麻醉剂, 特别是当涉及存活手术的动物实验时。鉴于无法确定非药用级麻醉剂(如三溴乙醇、水合氯醛等)的相关性状及对实验动物的影响, 从而不能保障实验动物福利及研究结果的可靠性, 而且目前已有更优的市售麻醉药剂可供选择, 因此本刊不建议使用上述试剂。如确需使用, 请提供充足理由说明及相应的批准文件。

4. 涉及肿瘤动物模型的研究, 本刊参考国内及国际通用准则, 建议单个肿瘤体直径不超过20 mm(小鼠)或40 mm(大鼠)且不出出现明显的肿瘤溃疡。如投稿文章中有超出上述标准的研究内容, 需提交作者单位相关肿瘤动物模型研究的指导原则文件, 以及从科学角度判断肿瘤体积合理性的依据性材料。

《实验动物与比较医学》编辑部