



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper

# Antikroppsstatus mot valpsjukevirus och parvovirus hos afrikansk vildhund och dhole på Kolmårdens djurpark

Lotta Wahldén

*Uppsala*

2013

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

ISSN 1652-8697  
*Examensarbete 2013:12*



# Serum antibody levels in African wild dog and dhole at Kolmården zoo to canine distemper virus and parvovirus

Lotta Wahldén

*Handledare: Jonas Johansson Wensman, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examinator: Stefan Alenius, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper  
Kurskod: EX0736, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: afrikansk vildhund, Lycaon pictus, dhole, Cuon alpinus, valpsjuka, parvo, vaccinering  
Key words: African wild dog, Lycaon pictus, dhole, Cuon alpinus, canine distemper, parvovirus, vaccination*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>  
ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2013:12*



## **SAMMANFATTNING**

Afrikansk vildhund och dhole (asiatisk vildhund) på Kolmårdens djurpark vaccineras mot valpsjukevirus och parvovirus med levande tamhundsvaccin (Nobivac DHP live vet). Djuren vaccineras när de är sövda av annan anledning och inga direkta vaccinationsrutiner finns.

Denna studie visar att valpsjukevaccinet är mycket effektivt, båda arterna får skyddande titrar efter vaccination. En vaccination vid tidigast 77 dagar på afrikansk vildhund och vid tidigast 44 dagar på dhole räcker för att uppnå en skyddande titer. Upprepade vaccinationer ger hos merparten av individerna inte en ökad titer pga. steril immunitet och är därför inte motiverade. Durationen av skyddande antikroppar är minst 3,9 år på afrikansk vildhund och 3,4 år på dhole. Inga fall av vaccininducerad valpsjuka har rapporterats i Kolmårdens djurpark.

Avseende parvovirus har merparten av båda arterna antikroppar redan innan vaccination. Vaccinering ger hos majoriteten av individerna inte en ökad titer. För att fastslå att parvovirusvaccinering av denna anledning inte är motiverat krävs dock fler studier. Oavsett vaccinationsstatus sågs hos afrikansk vildhund en sänkning av titer med ökad ålder, vilket inte sågs hos dhole. Då vaccinet som för närvarande används är ett kombinationsvaccin bör man vaccinera efter valpsjukerekommendationen tills vidare studier utförts.

## **SUMMARY**

African wild dog and dhole (Asiatic wild dog) at Kolmården zoo are vaccinated against canine distemper virus and parvovirus with live attenuated commercially available domestic dog vaccine (Nobivac DHP live vet). The animals are vaccinated when sedated for other reasons and no immunization schedules are in place.

This study shows that canine distemper vaccine is very efficient; both species obtain protective immunity after vaccination. One vaccination at the earliest of 77 days of age for African wild dog and 44 days of age for dhole results in protective titers. Revaccination does not, due to sterile immunity, result in higher titers and is therefore not motivated. Duration of protective immunity is at least 3,9 years for African wild dog and 3,4 years for dhole. No cases of vaccine-induced distemper have been reported at Kolmårdens zoo.

Most of the animals have high titers against parvovirus before vaccination. Vaccination did not result in an increase in titers. More studies are required before the conclusion is drawn that vaccinations against parvovirus do not need to be recommended. A decline in titer with increasing age could regardless of immunization status be seen in the African wild dog. This pattern could not be seen in the dhole. Since the vaccine that is currently used is a combination vaccine the immunization schedule recommended for canine distemper should be followed until further studies have been carried out.



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Inledning.....	1
Syfte och frågeställningar.....	1
Bakgrund .....	1
Djuren.....	1
Afrikansk vildhund.....	2
Dhole .....	2
Agens.....	3
Valpsjukevirus.....	3
Parvovirus.....	5
Vaccinering .....	5
Levande, attenuerade vaccin .....	5
Avdödade, inaktiverade vaccin .....	7
Anledningar till att en vaccinering inte fungerar .....	7
Har vaccineringen fungerat? .....	8
Material .....	9
Djuren på Kolmården .....	9
Vaccinationsrutiner på Kolmårdens djurpark .....	9
Blodprov.....	10
Metod/genomförande .....	10
Provrval .....	10
Analysbeskrivning.....	11
Serumneutralisationstest (SN) avseende CDV.....	11
ELISA avseende CPV .....	12
Resultat.....	13
Valpsjukevirus.....	13
Afrikansk vildhund.....	13
Dhole .....	18
Parvovirus.....	22
Afrikansk vildhund.....	22
Dhole .....	24
Diskussion .....	26
Valpsjukevirus.....	26
Utvecklande av skyddande antikroppar .....	26
Revaccinering och duration.....	27
Vaccininducerad sjukdom .....	28
Vaccinationsfailure.....	28
Skillnad mellan arterna.....	29
Parvovirus.....	29
Steril immunitet.....	29
Vaccinets effektivitet.....	31
Fel på analysen eller tolkningen? .....	31
Slutsats.....	31
Referenser.....	32





## **INLEDNING**

En viktig del av djurparkers arbete är att vara delaktiga i skyddandet av utrotningshotade arter. Detta kan göras genom att exempelvis delta i avelsarbete, med målet att etablera och hålla sunda populationer i fångenskap, och bevarandeprojekt, där kunskap om djurhållning och vilthälsovård erhållen från djuren i fångenskap används för att hjälpa djuren i det vilda. Två arter som löper mycket stor risk att utrotas är afrikanska vildhund och dhole. En del av hotet mot dem är infektiösa sjukdomar som valpsjuka och parvovirusinfektion.

Valpsjukevirus och parvovirus är två av de agens som man vill skydda såväl tamhundar, vilda hunddjur samt djur i djurparker ifrån. Ett effektivt sätt att skydda djur mot dessa infektioner är att vaccinera, vilket görs rutinmässigt på tamhundar. Dock är inget vaccin utprovat och inga vaccinationsrekommendationer finns för exotiska hunddjur. Kolmårdens djurpark har sedan år 2001 haft vildhund och sedan år 2007 haft dhole. I dagsläget vaccineras hunddjuren på Kolmården mot bl.a. valpsjuka och parvovirus med tamhundsvaccin men ingen kontroll har tidigare gjorts avseende om djuren efter vaccination har utvecklat ett tillfredsställande skydd mot de infektiösa sjukdomarna.

Mer kunskap om vaccinetts effekt på vildhund och dhole kan leda till en bättre djurhållning av dessa arter på djurparker och kan därmed hjälpa arten att överleva i det vilda.

## **SYFTE OCH FRÅGESTÄLLNINGAR**

Syftet med detta examensarbete är att få fram ett underlag till ett vaccinationsprogram avseende parvovirus och valpsjukevirus för vildhund och dhole i djurparksmiljö.

Studiens frågeställningar är:

- Får djuren antikroppar efter vaccinering?
- Vid vilken ålder kan man börja vaccinera?
- Om djuren är vaccinerade under 6 månader, krävs då ny vaccinering vid 1 års ålder?
- Blir det ökad titer efter flera vaccineringar?
- Vad är durationen av skyddande antikroppar?

## **BAKGRUND**

### **Djuren**

Hunddjuren vars vaccinationsstatus ska undersökas är afrikansk vildhund och dhole. Tamhundar, afrikansk vildhund och dhole tillhör alla familjen hunddjur inom ordningen rovdjur. Både afrikansk vildhund och dhole är i mycket stor risk att utrotas i det vilda och är listade av IUCN (International Union for Conservation of Nature) som utrotningshotade med en population som minskar (IUCN, 2012).

### **Afrikansk vildhund**

Afrikansk vildhund (*Lycaon pictus pictus*; figur 1) är ett rovdjur som lever i familjeflockar i träsavann och halvökner i Afrika (McNutt et al., 2012). Huvudsaklig föda är antiloper.

I det vilda finns endast 3000-5500 afrikanska vildhundar kvar (McNutt et al., 2012). Det finns över 500 vildhundar i djurparker.

De största hoten mot vildhunden är konflikt med människor och smittsamma sjukdomar (McNutt et al., 2012). Problemen görs större av att vildhundens naturliga miljö förstörs och kontakten mellan vildhunden, människor och tamhundar ökar. Många av vildhundarna lever idag i relativt små områden med relativt få individer. Dessa mindre populationer med nära kontakt med tamhundar är mer utstatta för infektiösa sjukdomar och vid ev. utbrott är det en ökad risk för utrotning i det området jämfört med populationer med fler individer som lever i större områden som har bättre chans för överlevnad.

Vildhunden är fredad i stora delar av Afrika men lagarna upprätthålls sällan (McNutt et al., 2012). För att rädda den afrikanska vildhunden behöver man bevara och utöka deras naturliga habitat, arbeta med lokalbefolkning och minska dödandet av vildhundarna samt etablera effektiva metoder som skyddar vildhundarna mot infektioner som rabies och valpsjuka. Man har i vissa områden framgångsrikt släppt ut vildhundar från fångenskap i det vilda men det anses inte vara en prioritet när det gäller vildhundens bevarande (McNutt et al., 2012). En av kunskapsluckorna som finns när det gäller vildhundens bevarande är om vaccinering mot rabies och valpsjuka är säkert och effektivt.



Figur 1. Afrikans vildhund. Foto: Eero Hannukainen/Kolmården.

### **Dhole**

Dhole (*Cuon alpinus*; figur 2), även kallad asiatisk vildhund, är ett flockdjur som lever i torra och fuktiga lövskogar, regnskog, barrskog, törn- och buskskogar samt grässlätter och höglänta

stäppområden i Asien (Durbin et al., 2012). Den äter skalbaggar, gnagare, fåglar och mellanstora hovdjur.

Det finns färre än 2500 dhole kvar i det vilda (Durbin et al., 2012). I slutet på 2008 var 299 djur i fångenskap registrerade i avelsboken för rasen och 197 av dessa djur fanns i europeiska djurparker (Maisch, 2010). Dhole är i dagsläget starkt hotad, bl.a. på grund av skogsavverkning som förstör deras naturliga habitat och minskar tillgången till föda, förföljelse av människor, konkurrens med andra arter och infektiösa sjukdomar som sprids från tamhundar och förvildade hundar (Durbin et al., 2012). De viktigaste infektiösa sjukdomarna är skabb, valpsjuka, parvo och rabies och dessa sjukdomar är framförallt ett stort hot i Sydasiens och troligtvis även i delar av Indonesien.

Dholen är fredad i Kambodja, Indien, Ryssland, Vietnam och Kina (Durbin et al., 2012). I de flesta länder där dholen lever finns inga speciella konserveringsprogram för dholen rapporterade, men program utvecklade för att skydda tigern och dess habitat skyddar även dholen. Kolmården är 2012 involverade i ett forskningsprojekt i Laos där målet är att ta reda på populationsstorlek, hur djuren rör sig i området, vilka byten de tar och hur samspelet med andra rovdjur ser ut (Kolmårdens insamlingsstiftelse, 2012). Även utbildning av lokalbefolkning är en viktig del av projektet.



Figur 2. Dhole på Kolmårdens djurpark. Foto: Lotta Wahldén.

## **Agens**

I denna studie undersöktes förekomst av antikroppar mot valpsjuka (canine distemper virus) och parvovirus efter vaccination med ett levande attenuerat vaccin avsett för tamhund.

## **Valpsjukevirus**

Valpsjuka orsakas av canine distemper virus (CDV) som är ett höljeförsett RNA-virus i genus *Morbillivirus* och familjen *Paramyxoviridae* (Greene & Appel, 2006).

Arter känsliga för CDV-infektion är *Ailuridae* (röd panda), *Canidae* (ex tamhund, räv, varg, coyote), *Hyaenidae* (hyena, ardwolf), *Mustelidae* (ex vessla, mink, skunk, grävling, iller), *Procyonidae* (ex kinkajou, coati, tvättbjörn), *Felidae* (ex tamkatt, lejon, leopard, tiger), *Ursidae* (björn), *Pinnipedia* (sälldjur) och *Viverridae* (ex civet, ganet, binturong) (Appel & Summers, 1995; Philippa, 2010). Hunddjur är huvudvärdjur och anses fungera som en reservoar för smitta bland vilda djur (Cleaveland et al., 2000). Viruset kan smitta mellan arter (Harder & Osterhaus, 1997).

CDV är känsligt för värme och torka; det dör i temperaturer över 50 grader på 30 minuter. Det tål kyla bra; mellan 0-4 grader kan det överleva flera veckor i miljön och under 0 grader kan det överleva i minst 7 år (Greene & Appel, 2006). Viruset är känsligt för de flesta desinfektionsmedel.

Viruset finns huvudsakligen i exsudat i respirationsvägarna men även i urin och annan vävnad (Greene & Appel, 2006). Det sprids mellan djuren framförallt via aerosol. I tamhundspopulationer där de flesta är vaccinerade ser man sjukdom framförallt hos valpar mellan 3-6 månader vilket sammanfaller med åldern de maternella antikropparna har lämnat valpen. I icke-vaccinerade populationer drabbas alla åldrar lika hårt.

Många av tamhundarna blir endast subkliniskt infekterade. De flesta av dessa gör sig av med viruset fullständigt men det finns fall med djur med intermediärt antikroppsskydd som blir kroniskt infekterade med virus som lever kvar i lungor, uvea, hud (trampdynor) och/eller i neuron (Greene & Appel, 2006). Hundar utan skyddande antikroppar får oftast allvarlig generaliserad valpsjuka. De första symtomen är vanligtvis näsflöde och hosta som övergår i lunginflammation. Hundarna får även diarré, feber och nedsatt aptit, ofta pga. sekundär bakteriell infektion. Djuren kan dö hastigt pga. den systemiska sjukdomen. Påverkan på centrala nervsystemet (CNS), såsom demens, desorientering, anfall, tetrapares och ataxi, beror på både djurets antikroppstatus, immunförsvar och vilket virusisolat det är och ses oftast senare i sjukdomen. Hos äldre hundar (över 6 år) har man sett CNS-symtom som kan härledas till en tidigare lindrig infektion med CDV, så kallad "old dog encephalitis".

Symtomen hos exotiska hunddjur liknar de på tamhundar: hyperemi runt ansiktet, röda slemhinnor, trötthet, purulent ögon och näsflöde, förkylningssymtom, minskad rädsla för människor, periodiska kramper, respirationssjukdom och diarré (Wallach & Boever, 1983). Symtomen misstas lätt för rabies då de har ett påverkat beteende, är desorienterade och kan vara aggressiva (Kapil & Yeary, 2011). Unga individer kan få kutana vesiklar och pustler (Wallach & Boever, 1983). Flera utbrott finns dokumenterade på afrikanska vildhundar. Ett av de senaste var 2007 då 23 av ungefär 38 afrikanska vildhundar i en flock i Serengeti i Tanzania dog (Goller et al., 2010). Djuren visade tecken på ataxi, svaghet, dehydrering och diarré. Vid obduktion sågs patologiska förändringar i framförallt lungorna. Andra djurarter som anses känsliga för CDV-infektion och andra afrikanska vildhundflockar i parken visade vid samma tidpunkt inga kliniska symtom eller ökad dödlighet. Serologiska undersökningar har visat att djuren i Serengeti har antikroppar mot CDV vilket tyder på att infektion kan vara subklinisk även hos exotiska hunddjur.

## **Parvovirus**

Parvovirusinfektion orsakas av hundens parvovirus (canine parvovirus typ 2, CPV-2) (McCaw & Hoskins, 2006). Parvovirus är ett icke-hölje försett DNA-virus i familjen *Parvoviridae*.

Naturlig infektion med hundens CPV-2 har setts hos tamhund, bush dog, coyote, crab-eating fox och maned wolf, men troligtvis är alla raser inom *Canidae*-familjen känsliga (McCaw & Hoskins, 2006). Även *Mustelidae*, *Viverridae* och *Procyonidae* är känsliga (Philippa, 2010). CPV-2 har genomgått genetisk förändring och i Europa är det nu CPV-2a och CPV-2b som är vanligast (Greenwood et al., 1996). CPV-2a och CPV-2b kan, till skillnad från CPV-2, infektera även *Felidae* och stora kattdjur är känsligare än tamkatter (Steinel et al., 2001).

Viruset är extremt tåligt och kan överleva länge i miljön och på ex skor, golv eller mattor. Det tål de flesta desinfektionsmedel (McCaw & Hoskins, 2006). Viruset är extremt smittsamt och överförs framförallt vid oronasal kontakt med smittat feces men även människor, instrument, insekter eller gnagare kan sprida viruset. En hund kan även bära virus på sin päls under lång tid.

Viruset behöver snabbt replikerande celler, som exempelvis tarmepitelceller, för att föröka sig (McCaw & Hoskins, 2006). Sjukdom drabbar unga växande djur värst, framförallt valpar yngre än 12 veckor då de saknar skyddande immunitet och har en större mängd växande, delande celler.

Symtomen på tamhundar varierar från subkliniska till mer akuta med diarré, kräkningar, blödningar och sekundära bakteriella infektioner (McCaw & Hoskins, 2006). I de mest allvarliga fallen kan djuret utveckla en septisk chock och dö. Vid infektion då djuret har låga halter av antikroppar ses en mildare infektion, utan viremi och systemiska symtom.

Sjukdom hos exotiska hunddjur liknar tamhundens med akuta dödsfall, hemorragisk gastroenterit, dehydrering, anorexi och kräkningar (Wallach & Boever, 1983). Troligtvis är parvovirusinfektion en av anledningarna till valpdödlighet hos afrikanska vildhundar. Man har i exempelvis Selous Game Reserve i Tanzania sett förekomst av antikroppar (68 % seroprevalens) hos afrikanska vildhundar (Creel et al., 1997). I samma studie såg man en korrelation mellan mindre flockstorlekar och ökade antikroppstitrar, troligtvis beroende på en ökad valpdödlighet under tiden valparna fortfarande var kvar i lyan, vilket resulterar i ett mindre antal individer i flocken.

## **Vaccinering**

När det gäller vaccinering mot valpsjuka och parvovirus är det i dagsläget framförallt levande och avdödade vaccin som finns på marknaden.

### **Levande, attenuerade vaccin**

Eftersom levande vaccin replikerar i värdens celler liknar det en naturlig infektion (Tizard, 2004). Det blir ett CD8+ respons från Th1-celler och därmed stimuleras både antikroppsproduktion och ett cellmedierat försvar. Vid första exponeringen för antigenet bildas

framförallt IgA och vid andra exponeringen är det framförallt IgG som bildas (Greene & Schultz, 2006).

Levande vaccin är känsligare för maternella antikroppar än avdödade vaccin, eftersom det är så lite antigen i vaccinet (man förlitar sig på att det ska replikera) (Tizard & Ni, 1998). Om valparna inte har diat kan de vaccineras tidigare, dock tidigast vid fyra veckors ålder om man använder levande vaccin, innan dess är immunförsvaret för omoget och det finns en risk att snabbt replikerande celler skadas (Greene & Schultz, 2006).

Levande vaccin modifieras (försvagas/attenueras), så att de inte ska orsaka sjukdom hos individen som vaccineras (Greene & Schultz, 2006). Försvagningen görs genom t.ex. anpassning till andra värdjur, en längre tids förvaring eller genom växt i celler eller vävnad som viruset inte är adapterat till (Tizard, 2004).

Levande attenuerade tamhundsvaccin har använts vid vaccinering av afrikanska vildhundar och uppgavs ge en ökning av antikroppstitern för både parvo- och valpsjukevirus (Spencer & Burroughs, 1992; van Heerden et al., 2002).

#### *Vaccininducerad sjukdom*

##### *Valpsjukevirus*

Hos såväl tamhundar som exotiska hundraser har man efter vaccinering med levande vaccin mot valpsjuka sett vaccininducerad sjukdom (Greene & Appel, 2006).

CDV-vaccininducerad sjukdom hos tamhundar är oftast polioencefalit, som kan likna "old dog encephalitis", men om djuret är immunosupprimerat, neonatalt eller prenatalt infekterat kan de få systemiska symtom (Greene & Appel, 2006). Neurologiska symtom börjar oftast 3-20 dagar efter vaccinering. Man har hos unga, växande tamhundar sett förekomst av juvenil cellulit och hypertrofisk osteodystrofi efter vaccination även om sambandet mellan vaccination och symtom inte är helt fastställt (Harrus et al., 2002). Detta har dock inte beskrivits på exotiska hunddjur.

I en djurpark i USA dog 1981 sju afrikanska vildhundvalpar ca tre veckor efter vaccinering med ett levande vaccin (McCormick, 1983). I Sydafrika insjuknade och dog afrikanska vildhundvalpar tretton dagar efter vaccination med levande vaccin i en CDV-liknande infektion där symtomen liknade "vanlig" valpsjuka hos afrikanska vildhundar (van Heerden et al., 1989). Dock gjordes ingen virusisolering i något av fallen, vilket gör att man inte helt säkert kan säga att infektionen var pga. vaccinering och inte att djuren var i inkubationsperioden för "vanlig" CDV-infektion när de vaccinerades.

Hur CDV har attenuerats och vilken vaccinstam som används spelar stor roll vid vaccinering. Rockborn-stammen, som försvagats genom växt i hundnjurceller, ger höga titrar av neutraliserande antikroppar och längre immunitetsduration, men ger samtidigt en högre risk för vaccininducerad neurologisk sjukdom hos exotiska karnivor (Appel & Summers, 1995). Detsamma ska gälla för Snyder Hill-stammen (Greene & Appel, 2006). Denna stam användes dock utan tecken på vaccininducerad sjukdom vid vaccinering av åtta vilda afrikanska

vildhundar 2002 (van Heerden et al., 2002). Onderstepoort-stammen, som inaktiverats genom adaptation till kycklingembryo eller kycklingceller, är ofta mindre virulent än övriga stammar och anses därför vara en av de säkrare stammarna vid vaccinering mot valpsjuka (Appel & Summers, 1995). I fallet med vaccininducerad sjukdom på vildhundar i Sydafrika uppgavs det inte av vilken stam det levande vaccinet var, men man skriver att ”det var en annan stam än den som brukar användas utan problem” (van Heerden et al., 1989).

#### *Parvovirus*

Efter vaccinering med vissa levande försvagade parvovirusvaccin har man hos tamhund sett en kort period med övergående lymfopeni och virusreplikation i magtarmkanalen med efterföljande parvovirusutsöndring i feces (McCaw & Hoskins, 2006). Det är dock en betydligt mindre mängd virus som utsöndras jämfört med vid en naturlig infektion och påverkar inte djuret kliniskt. Vaccininducerad parvovirusinfektion där två av djuren dog har dock setts hos sibirisk tiger och lejon efter vaccination mot felint parvovirus (Philippa, 2010).

#### ***Avdödade, inaktiverade vaccin***

Avdödade vaccin fungerar som ett exogent antigen eftersom ingen replikation sker i värdens celler. Det blir en CD4+ respons från Th2-celler (Tizard, 2004). Avdödade (inaktiverade) vaccin kräver ett adjuvans för att det ska stimulera ett svar hos individen som vaccinerats (Greene & Schultz, 2006). Adjuvans ökar bl.a. risken för hypersensitivitet (Tizard, 2004). Avdödade vaccin anses säkrare eftersom de inte kan orsaka sjukdom men triggar också ett sämre cellulärt immunförsvar, vilket gör att individen kräver flera vaccineringar och durationen av skyddet blir kortare (Greene & Schultz, 2006).

Avdödade vaccin avsedda för tamhundar har använts vid vaccinering av vilda hunddjur men har inte gett ett tillfredsställande skydd (van Heerden et al., 2002; van de Bildt et al., 2002). För att avdödade vaccin ska fungera på vilda hunddjur krävs ett förbättrat adjuvans (Greene & Appel, 2006). I försök på afrikanska vildhundar med CPV-vaccin med olje-emulsion som adjuvans fick man skyddande titer men med vävnadsreaktion på injektionsplatsen (Cirone et al., 2004).

#### ***Anledningar till att en vaccinering inte fungerar***

Anledningar till att ett vaccinerat djur inte utvecklar ett skydd kan bero på själva vaccinet eller på individen som vaccinerats (Greene & Schultz, 2006). Vid vaccinproblem kan det vara pga. hanteringen, problem vid injektionstillfället eller t ex fel vid tillverkningen. CDV-komponenten i kombinationsvaccin, där även parvo- och adenovirus ingår, är den komponent som är mest känslig för förvaring och värme (Chappuis, 1995). När det gäller individen som vaccinerats kan det t ex bero på att djuret fortfarande har maternella antikroppar som stör (Greene & Schultz, 2006).

#### *Maternella antikroppar och immunförsvarets mognad*

Maternella antikroppar (IgG, IgM och IgA) tas upp från modersmjölken över tarmslemhinnan och en mindre del tas även upp över placentan (Greene & Schultz, 2006). IgG tas huvudsakligen upp från råmjölken de första levnadsdygnen medan IgA tas upp under hela



diperioden. Avkomman brukar få mellan 50-75% av mammans titer bl a beroende på kullstorlek (Pollock & Carmichael, 1982).

Hur tidigt man kan börja vaccinera valpar beror på om de fått maternella antikroppar eller inte eftersom moderns antikroppar hindrar djuret från att bilda egna IgG (Day, 2007). När det gäller levande vaccin hindrar de maternella antikropparna virusreplikationen som krävs för att trigga immunförsvaret (Tizard & Ni, 1998). Man tror även att de maternella antikropparna gömmer vaccinets antigen vilket gör att individens B-celler inte kan reagera på vaccinet (Tizard, 2004). Det förklarar hur maternella antikroppar även hindrar effektiv vaccinering med avdödade vaccin. Först när mängden maternella antikroppar sjunkit under en viss nivå triggas avkommans egna immunförsvaret.

Vid 12 veckors ålder anses valpsjukevaccinet fungera på tamhund utan risk för störning från maternella antikroppar (Greene & Schultz, 2006), men med nyare levande vaccin (t ex DHP) kan man vaccinera redan vid 10 veckors ålder utan störning från maternella antikroppar (Bergman et al., 2006).

Enligt vissa författare bör tamhundar vaccineras ytterligare en gång vid ca 1 års ålder eftersom immunförsvaret inte är moget förrän vid 6 månaders ålder (Greene & Schultz, 2006). Detta står dock inte med i vaccinationsrekommendationerna för Nobivac DHP (FASS 2012), vaccinet som används på Kolmårdens djurpark.

### ***Har vaccineringen fungerat?***

Att ett vaccin fungerar, vaccinets effektivitet, kontrolleras genom att vaccinerade och icke-vaccinerade djur utsätts för samma smitta och incidensen sjuka mäts i de olika grupperna i en s.k. challenge-studie (Greene & Schultz, 2006). Ofta är detta inte möjligt, t ex på exotiska djur som är utrottningshotade. Istället mäter man då mängden antikroppar i blodet. En nackdel med denna metod är att endast det humoral försvar mäts och inte det cellulära. Vissa av djuren kan ha ett bättre försvar än vad antikroppstiter ger sken av.

Avseende parvovirus och valpsjukevirus så sprider de sig extracellulärt i kroppvätskor vid en infektion (Greene & Schultz, 2006). När antigenet befinner sig extracellulärt är det som mest utsatt för cirkulerande antikroppar och det cellulära svaret blir inte en lika viktig del av immunförsvaret (Tizard & Ni, 1998). Därför kan en skyddande antikroppstiter mot valpsjukevirus och parvovirus korreleras väl till en skyddande immunitet.

### ***Skyddande titer***

En svårighet med att mäta antikroppar är att veta när antikroppstiter kan räknas som skyddande (Tizard & Ni, 1998). Det finns olika metoder för att hitta den skyddande titern. Vid challenge-exposure-studier vaccineras djuren med olika doser och sedan mäts deras titrar. Därefter exponeras djuren för agens och man ser vid vilken titer djuren är skyddade mot infektion. Minsta titer som hindrar infektion är den skyddande titern. Vid disease incidens övervakar man antal sjukdomsfall i en specificerad population i relation till antikroppstitrar. Detta kräver längre tids övervakning. Även metoden och laboratoriet man använder påverkar vad som räknas som en skyddande titer (Greene & Schultz, 2006).



Att garantera att en viss titer är skyddande blir ännu svårare i och med att det även påverkas av mängden virus; en titer kan skydda mot en låg dos men inte mot oväntat hög exponering (Tizard & Ni, 1998). Det är skillnad på skydd från sjukdom (blir infekterade men inte särskilt dåliga) och skydd från infektion (steril immunitet). En ”halvbra” titer kan skydda från sjukdom men inte nödvändigtvis från infektion. Även om titern sjunker till under skyddande kvarstår minnesceller vilket gör att vid ev. ny challenge kan immunförsvaret reagera snabbare och mer effektivt, vilket kan räcka för att förhindra en infektion.

## **MATERIAL**

### **Djuren på Kolmården**

Kolmården har haft dhole sedan 2007 då sju dhole flyttade till Kolmården från olika djurparker i Europa. Djuren lever i flock med ca 20-25 individer. Ett alfapar har fått ungar en gång om året varje år sedan 2008 (undantag 2008 då två tikar i flocken fick ungar). Kullarna har varit på mellan 5-11 valpar. Det har inte varit några sjukdomsutbrott eller direkta tecken på infektiösa sjukdomar i flocken.

Kolmården har haft afrikansk vildhund sedan 2001. De första djuren var inte en avelsflock, utan först 2003 flyttade avelsdjur till Kolmården från olika djurparker i Europa. Djuren lever i flock med ca 12 individer. Ett alfapar har fått ungar varje år sedan 2005 och kullarna har varit på mellan 8-12 valpar. Senaste valpkullen där alla vaccinerades var 2009. Det har inte varit några sjukdomsutbrott eller direkta tecken på infektiösa sjukdomar i flocken, dock fick flera ungar i valpkullen 2006 avlivas då de hade frakturer pga. problem med mineralutfodringen.

Journaler förs regelbundet över djuren på Kolmården. I journalerna finns information om t ex födelsedatum, släktskap, vaccinationsdatum och sjukdomsstatus. På djur som har flyttat till Kolmården från annan djurpark finns endast i vissa fall information om vaccinationsstatus.

### ***Vaccinationsrutiner på Kolmårdens djurpark***

På Kolmårdens djurpark vaccineras hunddjuren när de är sövda av annan anledning och inga direkta rutiner finns för revaccinering. Tidigaste ålder man börjat vaccinera är vid 6 veckor, men det är inget som görs på alla valpar. Vissa djur vaccineras aldrig. Om man vaccinerar använder man tamhundsvaccin (se nedan) och man ger samma mängd som rekommenderas för tamhund.

De flesta djur som kommer till Kolmården från annan djurpark är inte vaccinerade då större rädsla för vaccininducerad sjukdom råder utomlands. Det vaccin som används i de få fall djuren vaccinerats varierar mellan djurparker.

### ***Nobivac DHP live vet***

Det vaccin som används på Kolmårdens hunddjur är Nobivac DHP live vet som tillverkas av Intervet. Vaccinet är endast utprovat på tamhund. Det är ett kombinationsvaccin och innehåller frystorkade, levande, avirulenta stammar av valpsjukevirus (CDV), parvovirus (CPV) och adenovirus (CAV2) (FASS, 2012). Valpsjukevirusstammen är Onderstepoort

(minst 104 TCID50 per dos) och parvovirusstammen CPV 154 (minst 107 TCID50 per dos), vilka framställts genom odling på cellinjekultur. Vaccinet ska enligt tillverkaren ge upphov till ett tillfredsställande immunförsvar på tamhundar över 10 veckors ålder, som inte befinner sig i inkubationsstadium för endera sjukdomen. Efter en vaccination utförd vid 13 veckors ålder har skyddande antikroppstitrar demonstrerats efter 32 månader avseende sjukdom orsakad av hundens parvovirus. Vaccinet ges subkutant efter upplösning i spädningsvätska och det är samma mängd (1 ml) oavsett ålder och storlek. Färdigställt vaccin skall användas inom en timme. Vaccinet ska förvaras vid 2 °C-8 °C.

Vaccintillverkarna rekommenderar att valpar till tamhundar vaccineras från 13 veckors ålder för att undvika att maternella antikroppar stör vaccinationen (FASS, 2012). Då tidigare vaccinationsskydd eftersträvas ges en första vaccination från 6 veckors ålder, följt av en andra vaccination vid tidigast 10 veckors ålder. Revaccination rekommenderas med 2-3 års mellanrum.

### **Blodprov**

Kolmården har vid olika tillfällen under flera år tillbaka tagit blodprov på sina hunddjur. Detta görs när djuren ändå är sederade av andra anledningar (figur 3). Blodproverna är därför tagna vid olika åldrar, vid olika lång tid från senaste vaccineringen och endast på vissa av djuren finns prover som är tagna innan djuren vaccinerats (så kallade 0-prov). Proverna centrifugeras snarast möjligt efter provtagningen och serum förvaras vid -20°C.



*Figur 3. Dhole vid vaccinering och provtagning på Kolmårdens djurpark. Foto: Lotta Wahldén.*

## **METOD/GENOMFÖRANDE**

### **Provurval**

Serumprover där det fanns tillräcklig mängd samt tillhör en individ med en fullständig journal (se ovan under rubriken Djuren på Kolmården), med undantag från hälften av proverna från 2006 års kull av dholevalpar (sjuk kull, se ovan under rubriken Djuren på Kolmården), har analyserats med avseende på antikroppstitrar. På dhole fanns 78 blodprover från 37 individer.

På vildhund fanns 146 blodprover från 47 individer. Exakta urvalskriterier för varje frågeställning finns specificerat i Resultat.

## **Analysbeskrivning**

### ***Serumneutralisationstest (SN) avseende CDV***

#### *Principen*

När det gäller valpsjukevirus är den gyllene standarden för att mäta mängden antikroppar serumneutralisationstest (SN) (Greene & Schultz, 2006). Principen för SN är att man titrerar testserum och inkuberar det med virus och celler. Om neutraliserande antikroppar finns i testserumet kommer de att blockera virusets möjlighet att infektera celler. Om neutraliserande antikroppar inte finns i testserumet infekteras cellerna och man får en cytopatogen effekt (cpe), dvs celldöd. Detta kontrolleras i mikroskop efter inkubering.

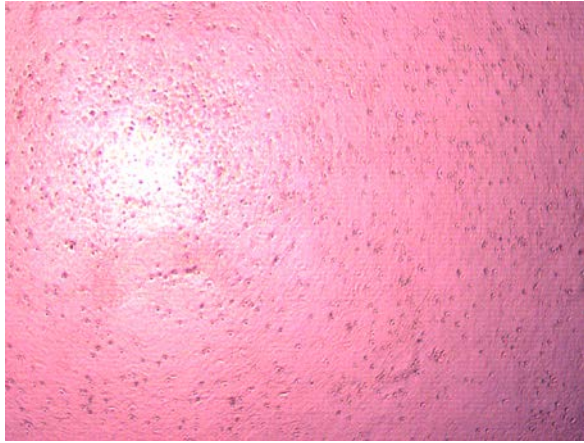
#### *Utförande*

Mikrotitreringsplattor med 96 brunnar användes. Inaktiverat testserum titrerades till spädningarna 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 och 1:256 i cellodlingsmedium. Varje testserumtitrering utfördes i duplikat. Till det titrerade testserumet tillsattes virus (ca 100 TCID<sub>50</sub>/50µl). Efter en inkubering på ca 60 minuter i +37° i CO<sub>2</sub>-miljö tillsattes celler (Vero valp) med cellodlingsmedium till brunnarna. Plattan inkuberades sedan i ca 4 dagar i +37° i CO<sub>2</sub>-miljö.

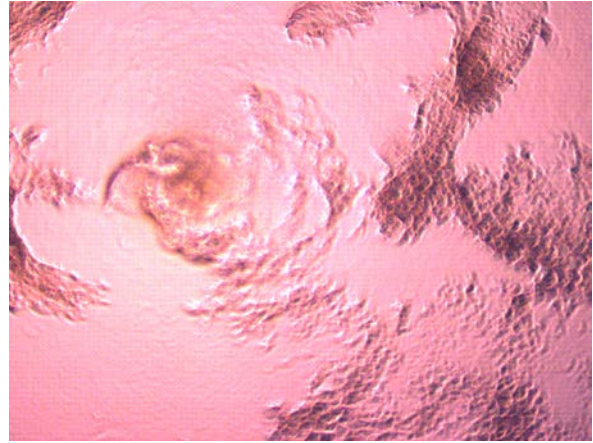
Varje testserum hade en kontrollbrunn utan virus för att kontrollera att serumet i sig inte orsakar cpe. På en separat kontrollplatta gjordes en kontrolltitrering av virusspädningen (spädning 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>) samt cellkontroller och en positiv kontroll. Denna platta inkuberades på samma sätt som övriga plattor.

#### *Avläsning*

Plattorna lästes av varje dag av undertecknad. Alla brunnar med tydlig cpe räknades som virusangripna (figur 4 och 5). Efter i genomsnitt fyra dagar kunde slutavläsning göras. Slutavläsningstidpunkt avgjordes av att virustitreringen var 100 TCID<sub>50</sub>/volymenhet (alla brunnar med virusspädning 10<sup>-1</sup> hade cpe). Plattorna kontrollerades minst en dag efter slutavläsning för att kontrollera att ingen ytterligare cpe hade skett.



*Figur 4. Celler utan cytopatogen effekt.  
Foto: Jonas Johansson Wensman & Lotta Wahldén*



*Figur 5. Celler med cytopatogen effekt.*

Eftersom varje spädning utfördes i duplikat blev möjliga titrar <1:4, 1:4, 1:6, 1:8, 1:11, 1:16, 1:22, 1:32, 1:45, 1:64, 1:90, 1:128, 1:178, 1:256 och  $\geq$ 1:256. Om alla titreringar av testserumet hade cpe var titern <1:4, vilket betyder att det inte fanns några neutraliserande antikroppar i testserumet. Om ingen av titreringarna i båda raderna av testserumet hade cpe var titern  $\geq$ 1:256 och högre titer än detta mättes inte. Därför benämns  $\geq$ 1:256 som maxtiter i Resultat och Diskussion.

#### *Tolkning*

I ett flertal studier på tamhundar anses en titer på 1:20 vara skyddande men det varierar mellan olika artiklar (Greene & Schultz, 2006; Veterinary healthcare communications, 2002). I de studier som finns på afrikansk vildhund anses titern 1:20 skyddande (van Heerden et al., 2002; van de Bildt et al., 2002). Inga uppgifter om skyddande titer på dhole har hittats. En titer på >1:20 anses i denna studie som skyddande på både afrikansk vildhund och dhole.

#### **ELISA avseende CPV**

##### *Principen*

När det gäller parvovirus är den gyllene standarden för att mäta mängden antikroppar hemagglutinationsinhibitionstest (HI) (Greene & Schultz, 2006). Det blir dock allt vanligare att man vill använda snabbare och mindre arbetskrävande test som inte kräver erfaren laboratoriepersonal. Immunoblot snabbtest ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) och ELISA med immunoscanning har jämförts med HI och validerats (Waner et al., 1996). ELISA har även bevisats fungera bra när det gäller att detektera IgG- och IgM-antikroppar efter naturlig infektion på tamhund (Waner et al., 2004). Capture ELISA har verifierats fungera lika bra på red wolf som på tamhund (Harrenstien et al., 1997).

Metoden som användes i denna studie är IgG-ELISA. Principen för testet är att eventuella IgG i testserumet reagerar med CPV-antigen. Antigen binds först till brunnarna med hjälp av monoklonala antikroppar. Efter bindning av antigenet kan testserum med antikroppar binda till antigenet. En polyklonal sekundärantikropp (riktad mot hund-IgG) konjugerad med peroxidas tillsattes och på så sätt kan antikropparna detekteras.

### Utförande

Proverna analyserades av European Veterinary Laboratory (EVL) i Nederländerna. Testserumet späds till 1:50, 1:150, 1:450 och 1:1350. Ett konjugat riktat mot tamhunds-IgG användes. Tjugotre prover testades med både tamhundskonjugat och dingokonjugat.

### Tolkning

EVL anser att gällande tamhundar är titrar under 1:400 icke skyddande (van Herwijnen, 2012). Titrar över 1:450 anses skyddande men beroende på mängd agens eller immunosuppression hos den exponerade individen kan det krävas högre titer för att skydda från infektion. I denna studie anses titrar över 1:450 vara skyddande.

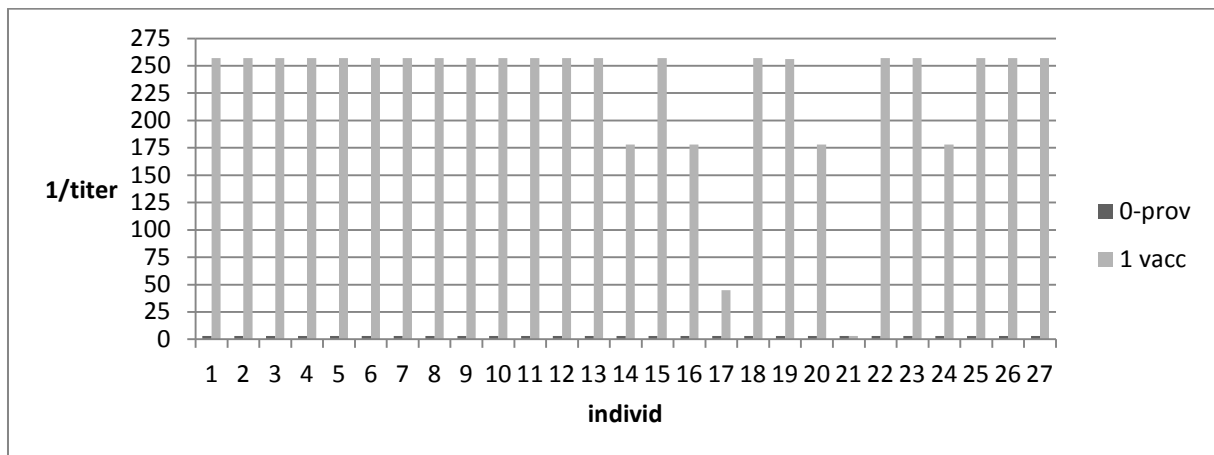
## RESULTAT

### Valpsjukevirus

#### Afrikansk vildhund

##### Får djuren antikroppar efter vaccinering?

Urval: Alla djur med både 0-prov (prov tagna innan vaccination) och prov efter en vaccination. 0-proverna var tagna vid varierande ålder (mellan 77 dagar-2754 dagar). Om flera 0-prov fanns är resultatet från det blodprov taget vid äldst ålder representerat i figur 6 (för att undvika störningar från eventuella maternella antikroppar). Blodproverna efter första vaccineringen var tagna mellan 23 dagar-1066 dagar efter vaccination. Om flera prov fanns på samma individ, är resultaten från det första blodprovet taget sedan vaccination det som är representerat i diagrammet.



Figur 6. Titrar vid 0-prov och efter vaccinering. Titer <1:4 är noterat som 3 och titer  $\geq$ 1:256 som 257 för att undvika datortekniska problem.

Vid jämförelse mellan titrar före och efter vaccination med DHP syns en kraftig ökning av neutraliserande antikroppar, se figur 6.

### Vid vilken ålder kan man börja vaccinera?

#### Individer med maternella antikroppar

Urval: De yngsta vaccinerade individerna med 0-prov med en mamma som var vaccinerad och hade en skyddande titer vid valpning.

Vid 77 dagars (11 veckors) ålder tog man blodprov och vaccinerade 2009 års kull. Mamman till kullen hade vid valpning med hög sannolikhet höga antikroppstitrar då hon vaccinerades ca 1 år innan valpning och vid titerkontroll 2011 hade tiken den högsta uppmätbara titern. Kullens titrar syns i tabell 1.

Tabell 1. Individer med maternella antikroppar. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga figurer

Individ	Födelsedatum	Datum vid 0-prov och vaccination	Ålder vid 0-prov och vaccination (dagar)	CDV titer, 0-prov	CDV titer, efter vaccinering
1	2009-12-31	2010-03-18	77	< 1:4	≥ 1:256
2	2009-12-31	2010-03-18	77	< 1:4	≥ 1:256
3	2009-12-31	2010-03-18	77	< 1:4	≥ 1:256
4	2009-12-31	2010-03-18	77	< 1:4	≥ 1:256

Vid dag 77 är antikropstiteren låg och valparna kunde framgångsrikt vaccineras. Även kullen född 2008 (som hade en annan mamma än kullen 2009), som det togs 0-prov på och vaccinerades vid 80 dagars ålder utvecklade skyddande antikropstitrar. Då det inte fanns prover från yngre individer med vaccinerade mamma kan det inte uteslutas att afrikanska vildhundar med maternella antikroppar kan vaccineras ännu tidigare än 77 dagar.

#### Utan maternella antikroppar

Urval: De yngsta vaccinerade individerna med en mamma som inte var vaccinerad och inte hade en skyddande titer vid valpning.

De yngsta valparna som vaccinerats och har efterföljande blodprov i denna studie var 73 dagar (10,4 veckor) gamla vid vaccineringen. Kullen med föddes 2007 och deras mamma hade vid tillfället inga skyddande antikroppar. Blodprov togs 80 dagar efter vaccination och visar att alla valparna (åtta individer) hade titrar på  $\geq 1:256$ .

Inga sjukdomstecken eller symtom som skulle kunna härledas till för tidiga vaccinering och skada på snabbt replikerande celler har noterats i djurens journaler. Då det inte fanns prover från yngre individer kan det inte uteslutas att afrikanska vildhundar utan maternella antikroppar kan vaccineras ännu tidigare än 73 dagar.

*Om vaccinerad under 6 månader, krävs ny vaccinering vid 1 års ålder?*

Urval: Engångsvaccinerade som var yngre än 6 månader vid vaccination. Blodprov taget vid minst 365 dagar ålder. Om flera blodproverer fanns på individen är det blodprov som var tagit närmast 365 dagars ålder representerat i tabellen.

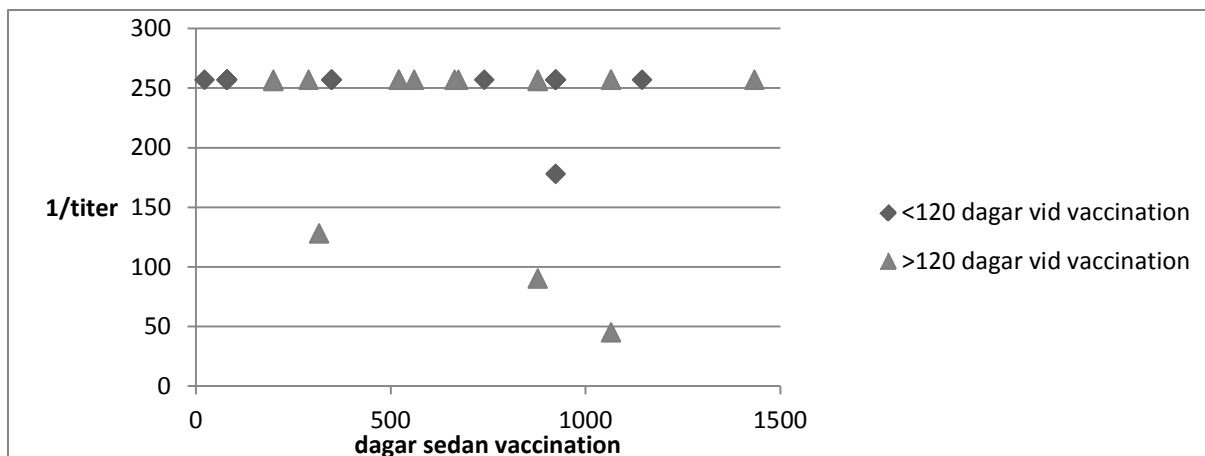
*Tabell 2. Titrar vid över 1 års ålder efter en vaccination vid under 3 månaders ålder. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga figurer*

<b>Individ</b>	<b>Ålder vid vaccination (dagar)</b>	<b>Ålder vid blodprov (dagar)</b>	<b>Ålder vid blodprov (år)</b>	<b>CDV titer</b>
<b>1</b>	77	426	1,2	$\geq 1:256$
<b>2</b>	77	426	1,2	$\geq 1:256$
<b>3</b>	78	426	1,2	$\geq 1:256$
<b>4</b>	77	426	1,2	$\geq 1:256$
<b>5</b>	80	487	1,3	$\geq 1:256$
<b>7</b>	80	1004	2,8	$\geq 1:256$
<b>8</b>	80	1004	2,8	$\geq 1:256$
<b>9</b>	80	1004	2,8	$\geq 1:256$
<b>10</b>	80	1004	2,8	$\geq 1:256$
<b>11</b>	73	1219	3,3	$\geq 1:256$
<b>12</b>	80	1004	2,8	1:178
<b>13</b>	80	1004	2,8	$\geq 1:256$
<b>14</b>	80	487	1,3	$< 1:4$

Om revaccination behövs borde djuren vaccinerade vid under 6 månaders ålder ha låga titrar runt ett års ålder. Det hade inte vildhundarna, se tabell 2. Revaccination vid ett års ålder är alltså inte nödvändigt. Undantag är individ 14 som inte bildade antikroppar efter vaccination vid dag 80 (se Diskussion, vaccinationsfailure).

*Skillnad i duration beroende på ålder vid vaccinering?*

Urval: Två grupper av djur, ena gruppen vaccinerades när de var under 120 dagar gamla och andra gruppen vaccinerades när de var äldre än 120 dagar gamla. Alla blodproverna är tagna efter en vaccinering. Om flera blodprov fanns tagna på individen, är det prov som är tagit längst tid sedan vaccinationen representerad i digrammet (figur 7).

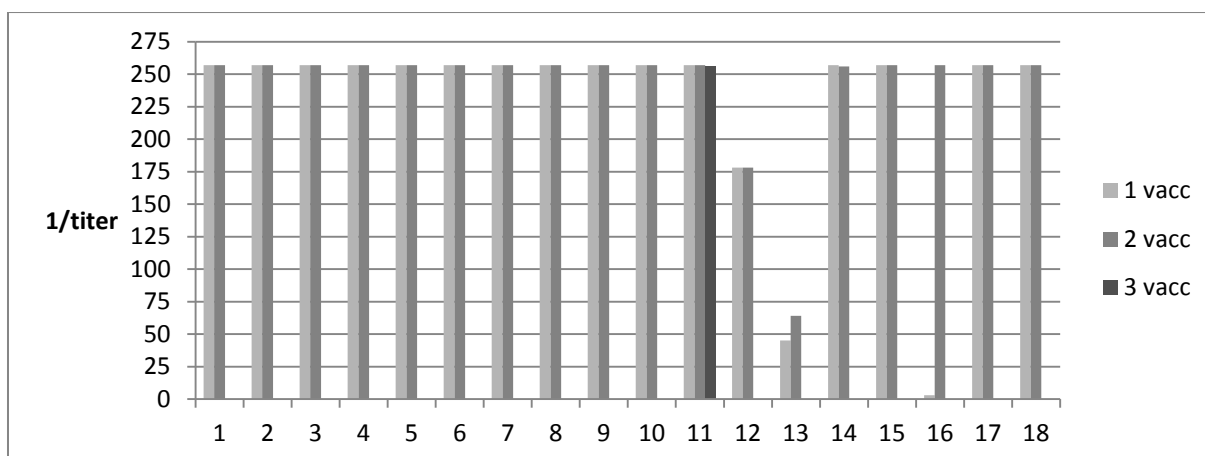


Figur 7. Duration av titer beroende på ålder vid vaccinering. Titer  $<1:4$  är noterat som 3 och titer  $\geq 1:256$  som 257 för att undvika datortekniska problem.

Individer som vaccinerats en gång vid en relativt ung ålder (under 120 dagars ålder) visar inte kortare duration än individerna som vaccinerats en gång vid en äldre ålder. Durationen på antikroppar varierar inte med ålder vid vaccinering, se figur 7.

#### Blir det ökad titer efter flera vaccineringar?

Urval: Individer med blodprov tagna efter en vaccinering och efter en andra vaccinering. 1-proven var tagna mellan 348-1066 dagar sedan vaccinering. 2-prov var tagna mellan 20-420 dagar sedan vaccinering. Om flera 1- och 2-prov fanns på samma individ är det prov som var tagit närmast vaccineringstillfället representerat i figur 8. En individ hade blodprov taget efter en tredje vaccinering.



Figur 8. Titrar efter flera vaccineringar. Titer  $<1:4$  är noterat som 3 och titer  $\geq 1:256$  som 257 för att undvika datortekniska problem. Observera att individ numreringen inte är den samma som i övriga tabeller och figurer.

Om den första vaccineringen triggat en skyddande titer blir det ingen ökad titer efter en andra vaccination (figur 8). Däremot om den första vaccinationen av någon anledning inte fungerade (individ 16) så kan en revaccinering ge en ökad titer.



### Vad är durationen av skyddande antikroppstiter?

Urval: De djuren med blodprov tagit längst tid sen senaste vaccinering. 1434 dagar är den längsta tid som gått mellan vaccinering och blodprov.

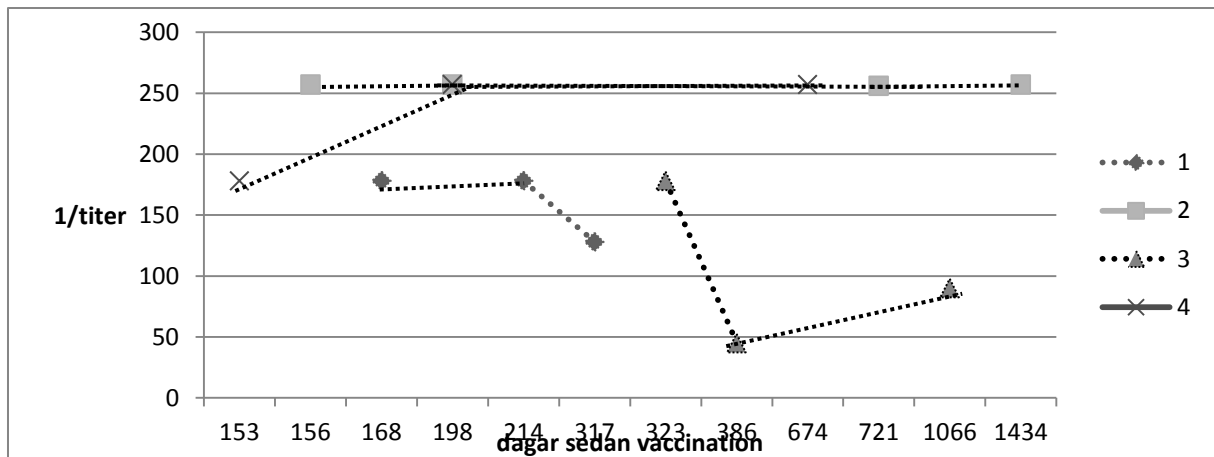
Tabell 3. Duration av titrar. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga tabeller och figurer

Individ	Tid sedan vaccination (dagar)	Tid sedan vaccination (år)	CDV titer
1	1066	2,9	$\geq 1:256$
2	1066	2,9	$\geq 1:256$
3	1066	2,9	$\geq 1:256$
4	1066	2,9	$\geq 1:256$
5	1066	2,9	$\geq 1:256$
6	1066	2,9	$\geq 1:256$
7	1066	2,9	1:45
8	1066	2,9	1:90
9	1066	2,9	$\geq 1:256$
10	1146	3,1	$\geq 1:256$
11	1434	3,9	$\geq 1:256$

Blodprovet från 1434 dagar visar en skyddande titer, se tabell 3. Titern är den högsta titern som är mätbar i laborationsmetoden (SN-test) som använts i studien. Det fanns inga blodprover tagna längre tid än 1434 dagar och kan därför inte utesluta att durationen av skyddet är ännu längre.

### Sjunkande titrar

Urval: De individerna med minst tre blodprover tagna utan att ytterligare vaccination skett mellan blodprovstagningarna. Fyra individer hade minst tre prover, individ 1 har tre 1-prov, individ 2 har fyra 1-prov, individ 3 har tre 3-prov och individ 4 har tre 1-prov.



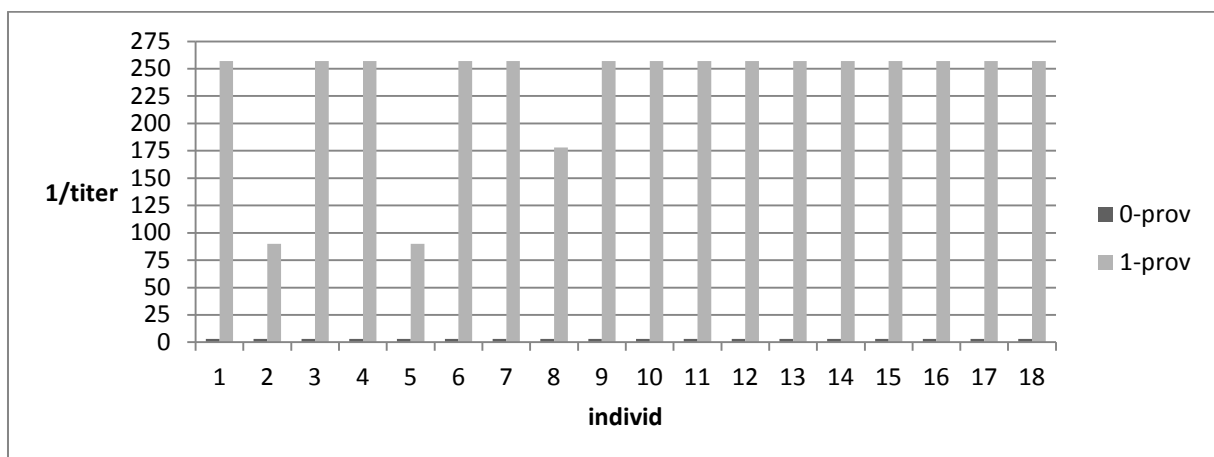
Figur9. Förändringar i titer över tiden. Titer  $<1:4$  är noterat som 3 och titer  $\geq 1:256$  som 257 för att undvika datortekniska problem. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga tabeller och figurer.

Hos ingen av individerna så har titern sjunkit till under skyddande nivå, se figur 9.

### Dhole

#### Får djuren antikroppar efter vaccinering?

Urval: Alla djur med 0-prov (prov tagna innan vaccination) och prov efter en vaccination. 0-proverna var tagna vid ålder varierande mellan 178 dagar-759 dagar. Om flera 0-prov fanns är resultatet från det blodprov taget vid äldst ålder representerat i figur 10 (för att undvika eventuella maternella antikroppar). Blodproverna efter första vaccineringen var tagna mellan 41 dagar-389 dagar efter vaccination. Om flera prov fanns på samma individ, är resultaten från det första blodprovet som är mer än 14 dagar sedan vaccination det som är representerat i figur 10.



Figur 10. Titrar vid 0-prov och efter vaccinering. Titer  $<1:4$  är noterat som 3 och titer  $\geq 1:256$  som 257 för att undvika datortekniska problem. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga tabeller och figurer.

Vid jämförelse mellan titrar före och efter vaccination med DHP syns en kraftig ökning av neutraliserande antikroppar (figur 10).

### *Vid vilken ålder kan man börja vaccinera?*

#### Individer med maternella antikroppar

Urval: De yngsta individer som vaccinerats med en mamma som var vaccinerad och hade en skyddande titer vid valpning. Proverna togs mellan 308-702 dagar efter vaccination.

Individerna i tabell 4 hade inte samma mamma. Kullen född 080409 och kullen född 110404 hade samma mamma och hon hade vid båda valpningstillfällena skyddande antikroppar, dock var titern endast 1:45 sex månader innan 2011 års kull föddes. Även kullen född 080331 hade en mamma med skyddande antikroppar.

*Tabell 4. Individer med maternella antikroppar. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga tabeller eller figurer*

Individ	Födelsedatum	Ålder vid vaccination (dagar)	Titer CDV titer
1	2011-04-04	44	1:128
2	2011-04-04	44	1:178
3	2011-04-04	44	1:178
4	2008-04-09	48	1:64
5	2008-04-09	48	≥ 1:256
6	2008-04-09	48	1:128
7	2008-03-31	57	1:178
8	2008-03-31	57	1:45
9	2008-03-31	57	1:178
10	2008-03-31	57	1:178
11	2008-03-31	57	1:178

Individer så unga som 44 dagar (6,2 veckor) vid vaccinering har fått antikroppar, se tabell 4. Det fanns inte blodprov tagna på yngre individer så det kan inte uteslutas att man kan vaccinera ännu yngre än 44 dagar.

#### *Om vaccinerad under 6 månader, krävs ny vaccinering vid 1 års ålder?*

Urval: Engångsvaccinerade som var yngre än 6 månader vid vaccination. Blodprov taget vid minst 365 dagar ålder.

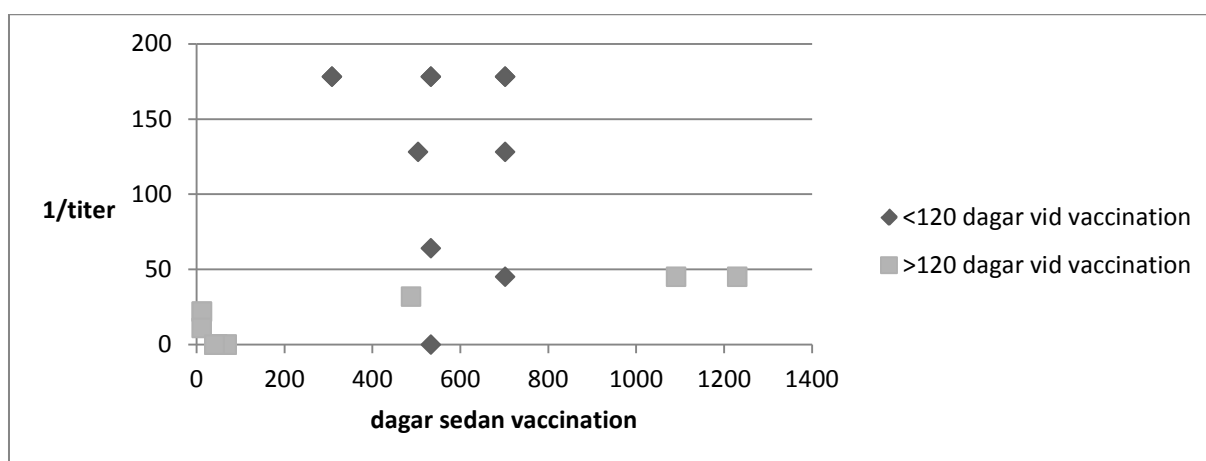
Tabell 5. Titrar vid över 1 års ålder efter en vaccination vid under 3 månaders ålder. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga figurer

Individ	Ålder vid vaccination (dagar)	Ålder vid blodprov (dagar)	Ålder vid blodprov (år)	CDV titer
1	44	548	1,5	1:128
2	48	581	1,6	1:64
3	48	581	1,6	≥ 1:256
4	48	750	2,1	1:128
5	57	590	1,6	1:178
6	57	590	1,6	1:178
7	57	759	2,1	1:45
8	57	759	2,1	1:178
9	57	759	2,1	1:178

Om revaccination behövs borde djuren vaccinerade vid under 6 månaders ålder ha låga titrar runt ett års ålder. Ingen av djuren har titer under skyddande nivå, se tabell 5. Revaccination vid ett års ålder är alltså inte nödvändigt.

#### Skillnad i duration beroende på ålder vid vaccinering?

Urval: Två grupper av djur, ena gruppen vaccinerades när de var under 120 dagar gamla och andra gruppen vaccinerades när de var äldre än 120 dagar gamla. Alla blodproverna är tagna efter en vaccinering. Om flera blodprov fanns tagna på individen, är det prov som är tagit längst tid sedan vaccinationen representerad i digrammet (figur 11).

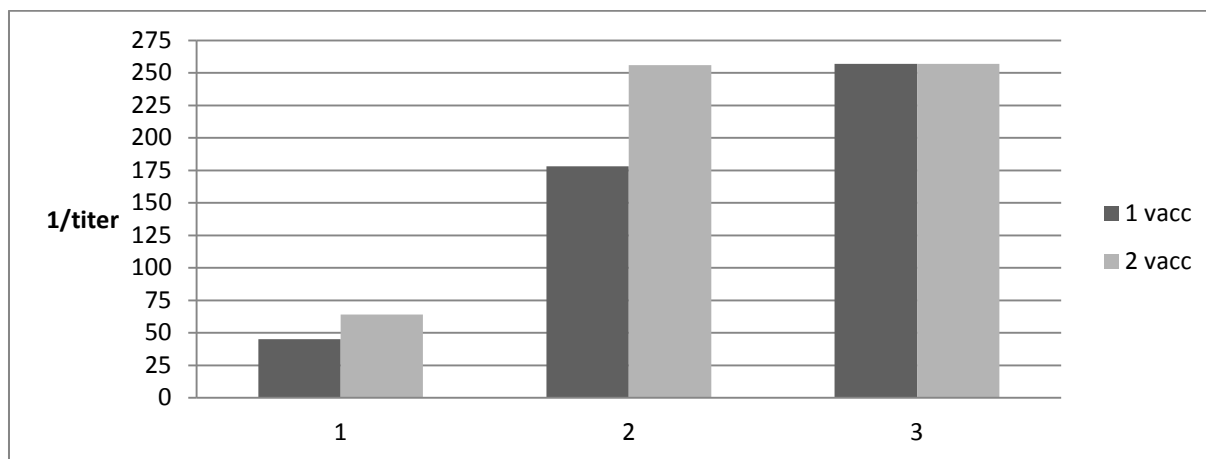


Figur 11. Duration av titer beroende på ålder vid vaccinering. Titer <1:4 är noterat som 1:3 och titer ≥ 1:256 som 257 för att undvika datortekniska problem.

Individer som vaccinerats en gång vid en relativt ung ålder (under 120 dagars ålder) visar inte kortare duration än individerna som vaccinerats en gång vid en äldre ålder, se figur 11, dock behövs fler prover tagna vid längre tid sedan vaccination undersökas, framförallt avseende individer som vaccinerats vid under 120 dagar.

### Blir det ökad titer efter flera vaccineringar?

Urval: Individer med blodprov tagna efter en vaccinering och efter en andra vaccinering. 1-proven var tagna mellan 41-702 dagar sedan vaccinering. 2-prov var tagna mellan 76-113 dagar sedan vaccinering. Om flera 1- och 2-prov fanns från samma individ är det prov som var tagit närmast vaccineringstillfället representerat i figur 12.



Figur 12. Titrar efter flera vaccineringar. Titer  $<1:4$  är noterat som 3 och titer  $\geq 1:256$  som 257 för att undvika dator tekniska problem. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga tabeller och figurer.

Alla djuren har skyddande titer redan efter första vaccinationen, se figur 12. Hos två av individerna blev det ökning av titer motsvarande ett titersteg vilket kan anses som en mycket marginell ökning.

### Vad är durationen av skyddande antikroppar?

Urval: De djuren med blodprov taget längst tid sen senaste vaccinering. Den längsta tid som gått mellan vaccinering och blodprov var 1409 dagar (3,8 år) men denna individ vaccinerades utomlands, och det är osäkert med vilket vaccin och är därför inte representerad i nedan tabell.

Tabell 6. Duration av titrar. Observera att individ numreringen är den samma som i figur 13

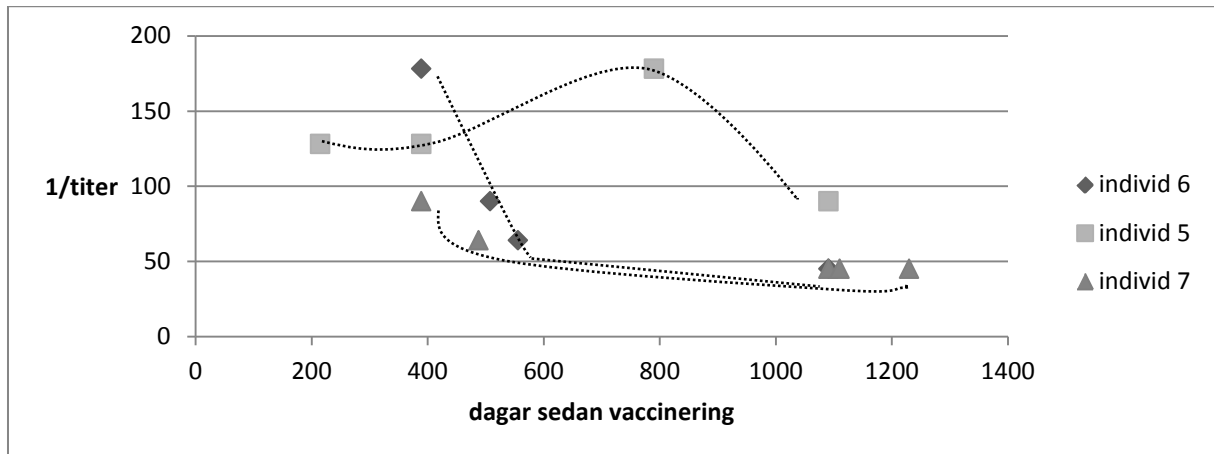
Individ	Tid sedan vaccination (dagar)	Tid sedan vaccination (år)	CDV titer
1	702	1,9	1:45
2	702	1,9	1:178
3	702	1,9	1:128
4	702	1,9	1:178
5	1091	3,0	1:90
6	1091	3,0	1:45
7	1230	3,4	1:45

Blodprovet från 1230 dagar (individ 7) visar en skyddande titer, se tabell 6. Titern är i nedre gränsen men övriga blodprover från denna individ visar att individ 7 max haft en titer på 1:90

(se även figur 13). Det fanns inga blodprover tagna längre tid än 1230 dagar (1409 dagar) och kan därför inte utesluta att durationen av skyddet är ännu längre.

### Sjunkande titrar

Urval: De individerna med minst tre blodprover tagna utan att ytterligare vaccination skett mellan blodprovstagningarna. Tre individer hade minst tre prover, individ 7 har fem 1-prov, individ 5 har fyra 2-prov och individ 6 har fyra 1-prov.



Figur 13. Förändringar i titer över tiden. Titer  $<1:4$  är noterat som 3 och titer  $\geq 1:256$  som 257 för att undvika datortekniska problem. Observera att individnumreringen är den samma som i tabell 6.

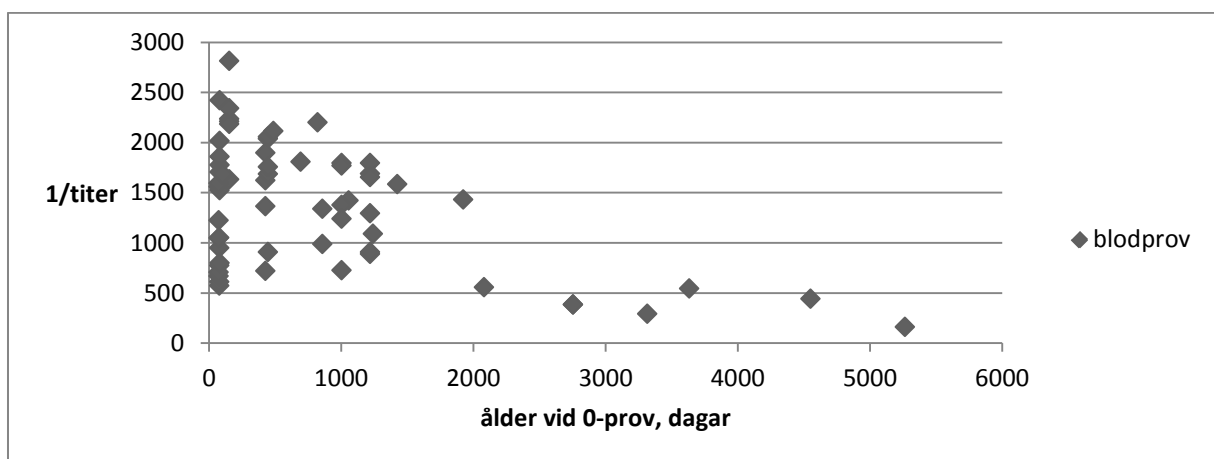
Hos ingen av individ så har titern sjunkit till under skyddande nivå ( $<1:20$ ) (figur 13).

## Parvovirus

### Afrikansk vildhund

Får djuren antikroppar efter vaccinering?

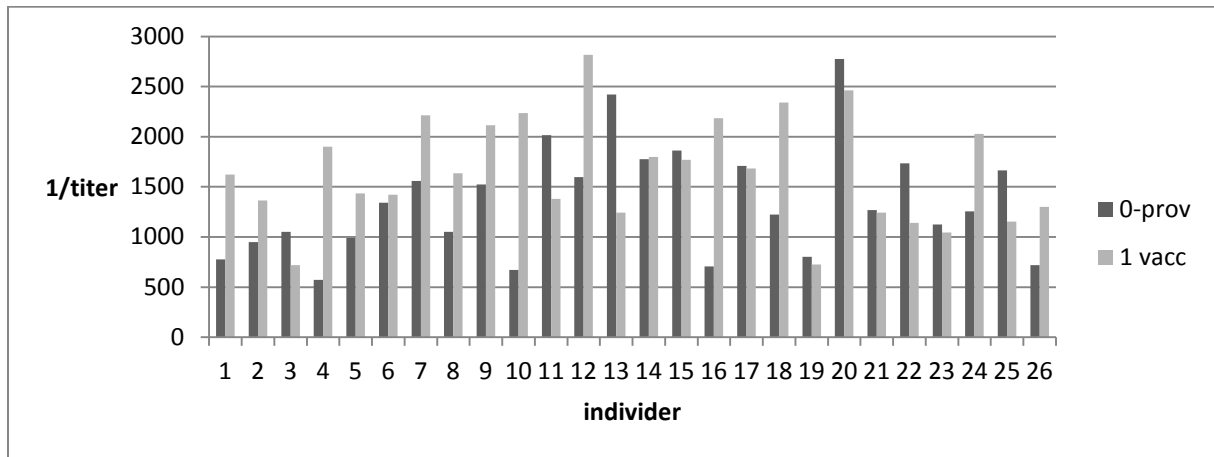
Urval: Alla blodprover tagna innan vaccinering (0-prover).



Figur 14. Titrar vid 0-prov. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga tabeller och figurer.

Majoriteten av djuren har redan innan första vaccination skyddande antikroppstitrar (figur 14). Yngre individer (under 1500 dagar) har generellt högre titer än äldre individer.

Urval: Alla djur med både 0-prov (prov tagna innan vaccinering) och prov efter en vaccination. Om flera 0-prov fanns är det representerat som är tagit vid äldst ålder. Om flera prov fanns från samma individ är resultatet från det första blodprovet taget sedan vaccination det som är representerat i figur 15. Endast individer födda på Kolmårdens djurpark är representerade i figuren.



Figur 15. Titrar vid 0-prov och efter vaccinering. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga tabeller och figurer.

Vid jämförelse mellan titrar före och efter vaccination med DHP syns ingen tydlig ökning av IgG titer (figur 15). Inte heller vid jämförelse mellan första och andra vaccinationen syns en tydlig ökning av titer (sex individer visade ökad titer, elva individer visade minskad titer). Inget djur har en fyrfaldig ökning av titer.

Medelvärdet på titer vid 0-prov (prov taget innan vaccinering) var 1:1371, standardavvikelse 746. Medelvärde på titer efter en vaccinering var 1:1449, standardavvikelse 586. Dessa medelvärde är baserade på alla blodprover från alla individer.

Då titer inte ökar vid vaccination analyserades om skillnad i titer berodde på individens ålder oavsett vaccinationsstatus.

Urval: Alla blodprover, oavsett vaccinationsstatus.



Figur 16. Titrar vid olika åldrar. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga tabeller och figurer.

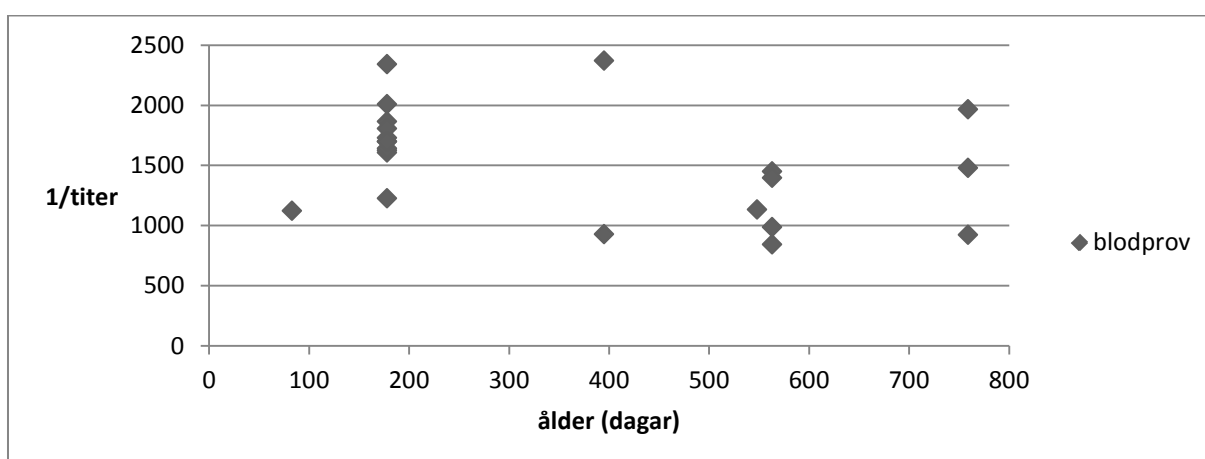
Titernivån minskar med stigande ålder, se figur 16. En regressionsanalys av alla prover, både födda i parken och inflyttade, visar att regressionskoefficienten är  $-0,2391$  med ett skattningsfel på  $\pm 0,04956$  ( $p$ -värdet är  $< 0,0001$ ). Det är alltså ett starkt samband mellan sjunkande titer och ökande ålder, med en sänkning på  $0,2391$  titer enheter per dag. Det var ingen statistisk skillnad mellan individer födda i parken och inflyttade individer.

Individerna med lägst titer var valpar från kullen född i slutet på 2006 (efter en mamma med skyddande titer). De hade vid 39 dagars ålder (0-prov) titrar på i genomsnitt 1:88. Fyra av valparna från samma kull provtogs vid 69 dagars ålder (0-prov), titrarna var då i genomsnitt 1:1543. En fyrfaldig ökning av titer hade skett vilket tyder på en serokonvertering.

### Dhole

Får djuren antikroppar efter vaccinering?

Urval: Alla blodprover tagna innan vaccinering (0-prover).

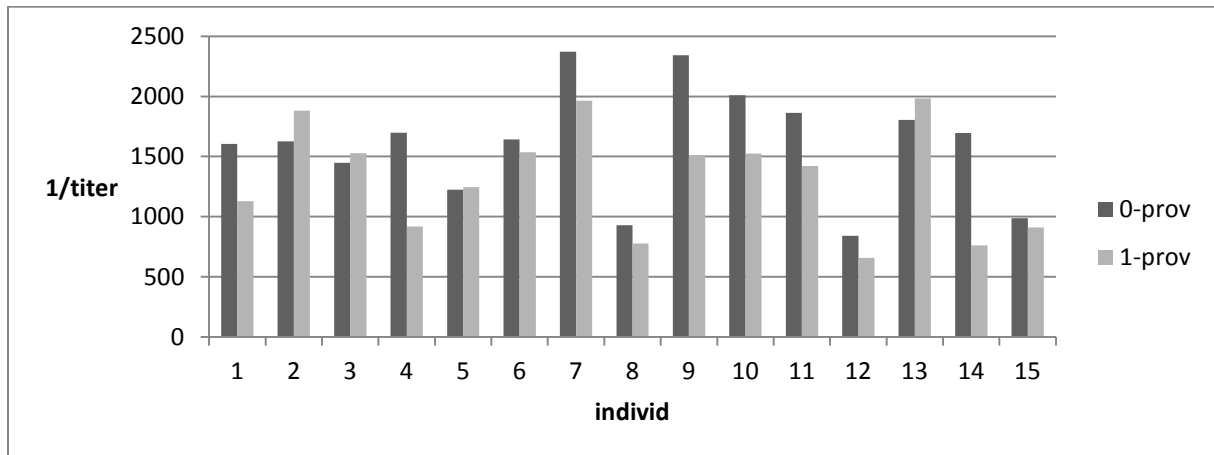


Figur 17. Titrar vid 0-prov. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga tabeller och figurer.



Alla djuren har redan innan vaccination skyddande antikroppstitrar (figur 17). Det är ingen variation i titer beroende på ålder vid blodprov, dock finns inga 0-prover på individer äldre än 759 dagar.

Urval: Alla djur med både 0-prov (prov tagna innan vaccinering) och prov efter en vaccination. Om flera 0-prov fanns är det representerat som är tagit vid äldst ålder. Om flera prov fanns från samma individ är resultatet från det första blodprovet som är mer än fyra veckor (28 dagar) sedan vaccination det som är representerat i figur 18. Endast individer födda på Kolmårdens djurpark är representerade i figuren.



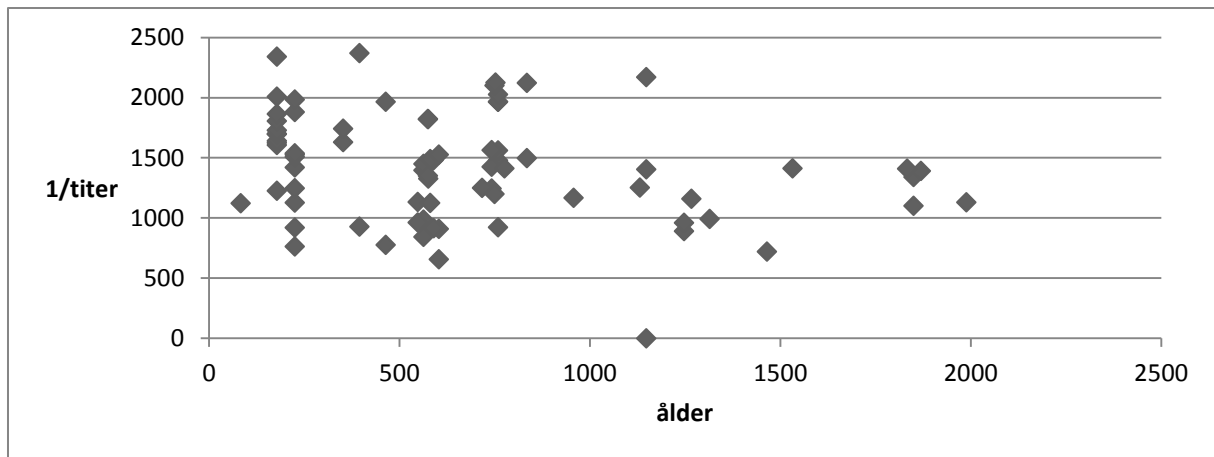
Figur 18. Titrar vid 0-prov och efter vaccinering. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga tabeller och figurer.

Vid jämförelse mellan titrar före och efter vaccination med DHP ses ingen tydlig ökning av IgG titer (figur 18).

Medelvärdet på titer vid 0-prov (prov taget innan vaccinering) var 1:1538, standardavvikelse 438. Medelvärde på titer efter en vaccinering var 1:1377, standardavvikelse 406. Medelvärdet på titer efter två vaccinationer var 1:1485, standardavvikelse 353. Dessa medelvärden är baserade på samtliga blodprover från alla individer.

Då titer inte ökar vid vaccination analyserades om skillnad i titer berodde på individens ålder, oavsett vaccineringsstatus.

Urval: Alla blodprover, oavsett vaccinationsstatus.



Figur 19. Titrar vid olika åldrar. Observera att individnumreringen inte är den samma som i övriga tabeller och figurer.

Man ser inga tendenser till att titern skulle minska med åldern (figur 19) eller att väldigt unga individer har en sämre titer, dock var yngsta provtagna individen relativt gammal (83 dagars ålder).

## DISKUSSION

### Valpsjukevirus

#### *Utvecklande av skyddande antikroppar*

Båda afrikansk vildhund (figur 6) och dhole (asiatisk vildhund) (figur 10) utvecklar antikroppar mot valpsjukevirus efter vaccinering med vaccin utvecklat för tamhundar (DHP Nobivac vaccin). Innan vaccinering har merparten av individerna inga eller väldigt låga halter av antikroppar och det är i merparten av fallen mer än en fyrfaldig ökning av titer efter första vaccinationen. Fyrfaldig ökning i titer räknas som indikation av serokonversion (Waner et al., 1996).

Lägsta uppmätta titer i SN-testet är  $<1:4$ . Detta resultat har majoriteten av de ovaccinerade djuren (både vildhund och dhole) oavsett ålder, alltså förefaller djuren inte utveckla en naturlig immunitet pga. smitta i miljön. Flera andra arter i djurparken är känsliga för CDV men någon naturlig immunitet pga. överföring av virus mellan djurarter eller inom arterna verkar inte ske. Då CDV inte överlever länge i miljön är detta en förväntad slutsats (Greene & Apple, 2006). Hos en afrikansk vildhund fann vi dock en titer på 1:11 vid 39 dagars ålder trots att individen inte var vaccinerad och individens mamma inte var vaccinerad. Vid titrar  $\geq 1:8$  anses det som troligt att djuret varit exponerat för valpsjukevirus tidigare (Woodroffe et al., 2012), så möjligheten att viss naturlig boostring av immunsystemet sker kan inte helt uteslutas.

Både afrikansk vildhund (tabell 1) och dhole (tabell 4), vilka kan antas ha fått maternella antikroppar, förefaller kunna bli effektivt vaccinerade vid ung ålder; vildhund vid 77 dagar och dhole vid 44 dagar. Tyvärr fanns inte prover från yngre individer än så och det kan inte

uteslutas att man framgångsrikt kan vaccinera vid ännu yngre ålder. Immunförsvaret är i sig kapabelt att reagera på vaccinering redan vid två veckors ålder (Toman et al., 2002), även om vissa författare anser att det dock bör ske tidigast vid fyra veckor om man använder levande vaccin. Innan dess är immunförsvaret för omoget och det finns en risk att snabbt replikerande celler skadas (Greene & Schultz, 2006). Det största hindret mot tidig vaccinering är maternella antikroppar som stör vaccineringen. På tamhund rekommenderas vaccinering först vid 10-12 veckors ålder om man säkert vill undvika störning från maternella antikroppar (FASS, 2012). Att indikation på att maternella antikroppar försvinner vid en yngre ålder på afrikansk vildhund eller dhole finns inga tidigare studier på. Dock har man hos andra djurarter sett att maternella antikropps-nivån minskar i förhållande till tillväxt (viktökning) och hos tamhund har man sett att snabbt växande raser eliminerar maternella antikroppar snabbare än långsamt växande raser (Chappuis, 1998). Dhole är snabbväxande raser jämfört med andra hunddjur (Creel & Creel, 1991). Dholevalpen kan under sina första levnadsveckor öka sin kroppsmassa med upp till 25 % per dag (Creel & Creel, 1991), medan en tamhundvalp fördubblar sin vikt på 10-12 dagar (Casal, 2010). Kanske är detta en anledning till att maternella antikroppar eventuellt försvinner snabbare än hos tamhundar.

Framförallt på dhole skulle möjligheten att vaccinera vid 4-5 veckors ålder göra en stor praktisk skillnad på djurparker då valparna vid den åldern fortfarande befinner sig i lyan och kan hanteras utan sedering. På vildhund är detta inte en möjlighet då flocken inte kan hanteras utan fara för de som utför vaccineringen. Fler prover skulle behöva undersökas på dhole för att bekräfta att vaccinering vid 4-5 veckors ålder trots en mamma med konstaterad hög antikropptiter vid tidpunkten för valpning är framgångsrik.

### ***Revaccinering och duration***

Enligt denna studie räcker det att grundvaccinera afrikansk vildhund (tabell 2) och dhole (tabell 5) en gång. Revaccinering ger inte djuren högre titer (vildhund figur 8, dhole figur 12). Ingen ökad titer efter revaccinering stämmer bra med studier på tamhund där man inte ser någon större skillnad på titer efter revaccination (Veterinary health communications, 2002). Anledningen till detta är att vid vaccination mot CPV och CDV uppnås en steril immunitet. Om mängden antikroppar hos djuret är tillräcklig stor neutraliserar antikropparna antigenet snabbt och så effektivt att det inte blir någon ytterligare uppförökning av antigenet, vilket resulterar i ingen ytterligare stimulering av immunförsvaret eller ökad titer (Tizard & Ni, 1998). Hos ett fåtal individer i studien syns en ökning på ett titersteg vid andra eller tredje vaccinationen. Dock krävs en fyrfaldig ökning av titer efter vaccinering för att man ska misstänka att det inte var en steril immunitet innan vaccinationen (Greene & Schultz, 2006). Vissa individer förefaller aldrig bilda de högsta titrarna trots flera vaccineringar. Troligtvis beror detta på en oförmåga hos den individuella individens immunsystem och ytterligare vaccinering kommer sannolikt därmed inte ge högre titrar.

De blodprov som var tagna längst tid sedan senaste vaccinationen var på afrikansk vildhund 3,9 år (tabell 3) och på dhole 3,4 år (tabell 6). Den afrikanska vildhunden hade högsta titern som gick att mäta med metoden som användes i studien (SN-test). I en annan studie på afrikansk vildhund har man sett att antikroppar mot valpsjuka varade i minst 451 dagar (1,2

år) (van Heerden et al., 2002), men det förefaller alltså som att skyddet är betydligt längre. Dholen hade en lägre titer (1:45), dock fortfarande en skyddande titer. Individen var vaccinerad endast en gång och utvecklade inte en hög titer efter vaccination (1:90 som mest) (figur 13). Den relativt låga titern vid 3,4 års ålder är alltså inte pga. att titern har sjunkit mycket och ska inte tolkas som att maxduration av vaccinet är uppnått.

Den långa durationen stämmer bra med studier på tamhund där man sett att CDV-immunitet höll i minst 7 år vid en challenge-studie och baserad på antikroppstiter var durationen ännu längre (Veterinary health communications, 2002). Eftersom det inte fanns blodprov tagna vid längre tid sedan vaccination än 3,9 respektive 3,4 år kan det inte uteslutas att durationen hos vildhund och dhole är lika långa som hos tamhund.

Ålder vid första vaccinationen påverkar inte durationen av den skyddande titern. Även om vaccineringen skett vid en ung ålder (under tre månader) har både afrikansk vildhund (figur 7) och dhole (figur 11) höga titrar senare i livet.

### ***Vaccininducerad sjukdom***

Kolmårdens djurpark har inte haft något fall av vaccininducerad sjukdom, varken på afrikansk vildhund eller på dhole. I flertalet artiklar som beskriver vaccininducerad sjukdom på afrikansk vildhund är individerna som vaccinerats svaga eller på något sätt påverkade av annan sjukdom (McCormick, 1983; van Heerden et al., 1989). Att Kolmården inte haft några fall kan bero på vaccinet man använder (Onderstepoort-stammen) samt att de endast vaccinerar friska individer.

### ***Vaccinationsfailure***

En av de afrikanska vildhundarna som vaccinerades vid 80 dagar utvecklade inte antikroppar (individ 14 i tabell 2). Tiken vaccinerades även vid ett senare tillfälle och utvecklade antikroppar efter den vaccineringen så hennes immunförsvar var kapabelt att bilda antikroppar. De andra individerna som vaccinerades vid samma tillfälle utvecklade alla skyddande antikroppar. Individen provtogs vid två tillfällen efter första vaccineringen och hon hade en titer på <1:4 båda gångerna. Andra individer som analyserades på samma serumneutralisationsplatta (SN) visade höga titrar. Alltså var det inte fel vid blodprovstagningen eller SN-analysen utan vid själva vaccineringen, med antingen vaccinet, vaccinören eller en tillfällig oförmåga hos tiken att bilda antikroppar. Att anledningen skulle vara störande maternella antikroppar förefaller mycket osannolikt då individen vid ett 0-prov taget samma dag som vaccineringen hade titer på <1:4.

Att endast en individ inte har bildat antikroppar efter vaccinering tyder på att rutinerna på Kolmården fungerar bra. Vaccin är känsliga för förvaring men detta förefaller inte vara ett problem på djurparken. Inte heller problem med själva injektionerna vid vaccinationstillfället förefaller vara ett stort problem, trots en ofta stressig situation för personalen med många djur sövda samtidigt.

Enligt medföljande journal hade en inflyttad afrikansk vildhund vaccinerats på annan djurpark med iscoms distemper vaccin. Iscoms (immune-stimulating complexes) är ett avdödat vaccin

med fosfolipid, saponin, kolesterol och antigen (Tizard, 2012). Fosfolipiderna ska göra att det blir en effektivare leverering av antigen till antigenpresenterade celler som dendritceller, saponin ska göra att aktiveringen av dendritcellerna blir bättre samt förbättrar cytokinproduktion och uttrycket av ko-stimulatoriska molekyler. Den afrikanska vildhunden hade enligt journalkopian, som medföljde vid flytten till Kolmården, vaccinerats två gånger med iscom-vaccinet; första gången vid 108 dagar (ca 15 veckors ålder) och andra gången vid 129 dagar (ca 18 veckors ålder). Blodprovet som togs lite över ett år (391 dagar) efter den sista vaccinationen analyserades i denna studie och visade inga skyddande antikroppar (titer <1:4). Individens vaccinerades senare med DHP Nobivac vaccin på Kolmården och utvecklade då skyddande titrar. Om detta ska tolkas som att iscom-vaccinet inte är effektivt på afrikanska vildhundar, att durationen är kortare än 391 dagar eller om något annat fel uppstod vid vaccineringen är svårt att uttala sig om då det endast är ett resultat från en individ som analyserats.

### ***Skillnad mellan arterna***

Båda arterna hade efter vaccinering skyddande titrar i nästan alla fall men den afrikanska vildhunden hade generellt en högre titer än dhole. Dholens titer kunde också variera mer mellan provtagningsgångerna än vad vildhundens gjorde. Anledningen till detta är okänt. Inga studier på vaccination av dhole har gjorts tidigare och mer studier behövs.

### **Parvovirus**

Varken resultaten på afrikansk vildhund (figur 15) eller dhole (figur 18) visar en ökning av titer efter vaccinering med vaccin utvecklat för tamhund (DHP Nobivac vaccin). Detta kan bero på tre saker: djuren hade steril immunitet redan innan vaccinering, vaccinet är ineffektivt på dessa exotiska hundraser eller att metoden använd för att analysera IgG inte har fungerat.

### ***Steril immunitet***

Merparten av individerna har höga antikroppstitrar redan innan vaccination och ingen fyrfaldig ökning av titer sker efter vaccination (vildhund figur 14, dhole figur 17). Detta kan bero på att djuren har en steril immunitet redan innan vaccination. Den skyddande immuniteten borde sannolikt bero på naturlig immunitet pga. agens i miljön. Parvovirus överlever länge i miljön och vid analyser av antikroppshalter från djur i djurparker kan titrar ofta ses hos alla djur (van Herwijnen, 2012; van Heerden et al., 2002).

De första vildhundarna på Kolmårdens djurpark var mellan 6-12 år vid inflyttning. Merparten av djuren hade låga titrar vid ankomst till parken. Två år efter inflyttningen hade de fortfarande låga titrar. Detta skulle kunna bero på att det fanns mindre agens i miljön under den perioden och ingen naturlig boostning skedde eller att dessa äldre individers immunsystem inte reagerat starkt på eventuellt agens i miljön. Vid studier på tamhundar angående åldrandets effekt på immunförsvaret såg man ingen skillnad på vaccinationssvar vid revaccinering mellan yngre och äldre hundar men misstanke kvarstår att vid grundvaccinering på äldre hundar får djuren ett sämre svar (HogenEsch & Thompson, 2010). Om samma skulle gälla vid naturlig immunitet pga. agens i miljön, som i fallet med de första inflyttade vildhundarna på Kolmården, så skulle man inte se skyddande antikroppar efter exponeringen

av agens i miljön då immunförsvaret reagerat sämre pga. djurens höga ålder. Dock borde djurens immunförsvaret då inte heller kunna stå emot infektion och även om äldre hunddjur har ett mindre antal delande celler och därmed mindre känslighet för parvovirus, borde några sjukdomstecken observerats, vilket det inte gjorde. Det förefaller troligare att den låga halten antikroppar beror på att djuren inte exponerats för agens.

Den afrikanska vildhundskullen som föddes 2006 hade inga skyddande titrar vid 39 dagars ålder men hade serokonverterat vid 69 dagars ålder. Att inga skyddande antikroppar fanns vid 39 dagars ålder skulle kunna bero på att valparna inte fått i sig råmjölk och därmed mindre mängd maternella antikroppar eller att de maternella antikropparna redan försvunnit. Inga problem med diande eller dylikt har noterats på individernas journalkort. Att de maternella antikropparna kan ha minskat redan vid 39 dagars ålder styrks av andra resultat i denna studie där dholevalpar föreföll ha sjunkande maternella antikroppstitrar mot valpsjuka redan vid dag 44. Att valparna vid 69 dagars ålder utvecklar skyddande titrar kan bero på att de vid den åldern har börjat lämna lyan och därmed utsätts för smitta i miljön.

Oavsett vaccinationsstatus syns hos den afrikanska vildhunden (figur 16) en minskning av titer med ökande ålder. Detta gäller både individer födda i parken och inflyttade djur. Inget samband mellan ökande ålder och minskande titer sågs hos dhole (figur 19). Äldre djurs immunsystem genomgår förändringar när djuret blir äldre så kallad immunosenescence, bl.a. minskar det cellmedierade försvaret medan det humoral är oförändrat (HogenEsch & Thompson, 2010). Man har sett att äldre hundar kan behålla skyddande titrar mot ex parvovirus. I vissa studier (Taguchi et al., 2011) ser man dock att en större andel yngre individer hade höga titrar, medan en större andel äldre individer inte hade skyddande titrar. Om vaccinering av äldre afrikanska vildhundar med låga titrar på Kolmårdens djurpark skulle ge ökad titer är okänt.

Med så pass höga mängder antigen i miljön att djuren utvecklar skyddande titrar, varför drabbas då djuren inte av klinisk sjukdom? Inga sjukdomsfall har rapporterats hos varken afrikansk vildhund eller dhole i parken. I litteraturen beskrivs alla medlemmar i familjen *Canidae* vara känsliga för parvovirus (McCaw & Hoskins, 2006), men få bekräftade fall med virusisolering eller annan direkt påvisning av virus finns beskrivna. Förekomst av antikroppar finns beskrivet på afrikansk vildhund, både frilevande (Woodroffe et al., 2011) och i djurpark (van Heerden et al., 2002), men ingen fallbeskrivning har hittats på dhole. Hos tamhund ser man både akuta förlopp med dödsfall, men även subkliniska fall med inga eller mycket milda symtom (Steinel et al., 2001). Hos vilda afrikanska vildhundar finns en misstanke om att parvovirus framförallt är skyldig till valpdödighet (Creel et al., 1997). Då valparna dör innan de lämnat lyan upptäcks ofta inte dödsfallen och kroppen går inte att hämta för patologisk undersökning eller virusisolering (Creel et al., 1997). Hos dhole finns det rapporterade fall i djurparker där valpar som dött äts upp av flocken vilket gör att konstaterande av dödsorsak är svår (Maisch, 2010). Maisch kunde i samma studie konstatera att valparna inte dödades av flocken utan dog av annan anledning men sedan, troligtvis av hygienskäl, äts upp av flocken. Endast vid 1-2 tillfällen har man på Kolmårdens djurpark haft kameraövervakning i

vildhundarnas lya. Enstaka dödsfall hos afrikansk vildhund eller dhole innan valparna lämnat lyan skulle därför med största sannolikhet inte upptäckas.

### ***Vaccinets effektivitet***

Vaccinets effektivitet kunde inte bevisas i denna studie. För att utvärdera det krävs antingen en challenge-studie, vilket inte är möjligt på dessa utrotningsshotade djur, eller kontroll av titer hos djur som vaccinerats utan tidigare exponering för virus/smitta i miljön. I denna studie var det för få prover från individer med låga titrar (utan steril immunitet) för att kunna bekräfta eller utesluta att vaccinering gjorde någon skillnad. I andra studier hävdas att vaccinering av vildhund är framgångsrik (van Heerden et al., 2002), men ofta är det baserat på få individer och titern har ofta inte ökat fyrfaldigt. En lika stor titervariation hos icke-vaccinerade individer kan ses mellan blodprovstagningarna som man ser mellan 0-prov och prov efter en vaccination.

### ***Fel på analysen eller tolkningen?***

Indirekt ELISA har jämförts med HI i tamhundstudier och man har sett att det korrelerar väl (Waner et al, 1996), men det har inte verifierats på afrikansk vildhund eller dhole. En capture ELISA har fungerat bra på red wolf (Harrenstien et al., 1997), men det kan inte uteslutas att någon typ av korsreaktion har skett vilket lett till felaktiga resultat.

För att utesluta att något problem förelåg med konjugatet testades tjugotvå av blodproverna från dhole även med ett dingokonjugat. Detta påverkade de enskilda individernas titrar, men gjorde ingen skillnad i den slutgiltiga tolkningen för hela djurgruppen då skillnaden mellan före och efter vaccinering fortfarande inte var signifikant.

Skyddande titer i denna studie har extrapolerats från tamhund där  $>1:450$  anses skyddande (van Herwijnen, 2012). Även om det som ansetts som skyddande titer ( $>1:450$ ) i denna studie skulle visa sig inte stämma på dessa exotiska hundarter borde icke-serokonverterade djur öka sin titer fyrfaldigt vid vaccinering. Det fanns mycket få prover från djur med låga antikroppstitrar, men hos en afrikansk vildhund med en titer på 1:386 sågs ingen fyrfaldig ökning vid vaccinering, medan hos en individ med en titer på 1:312 skedde en fyrfaldig ökning. Detta kan tolkas som att gränsen för skyddande titer är mellan 1:300–1:400 och att vaccineringen fungerade i fallet med den lägre titern, men då så få prover finns tillgängliga samt att det finns individuella skillnader är det ingen statistisk signifikans i detta påstående.

### **Slutsats**

Tamhundvaccin fungerar bra på både afrikansk vildhund och dhole avseende valpsjuka. Man bör vaccinera friska valpar med levande vaccin med Onderstepoort-stammen en gång vid sex veckors ålder. Vaccineringen bör upprepas efter fyra år. Övervaccinering bör undvikas. Många fördelar finns med detta: man besparar djuren stressen, övriga risker med sedering och vaccinationskomplikationer. Om möjlighet finns, kontrollera dholevalparnas titrar vid fyra till fem veckors ålder för att bekräfta att framgångsrik vaccinering kan ske redan vid denna unga ålder.

Avseende parvovirus-vaccinering krävs fler studier för att kunna rekommendera eventuella vaccinationsrutiner. Då vaccinet som används är ett kombinationsvaccin bör man vaccinera enligt ovan valpsjukerekommendationer tills vidare studier utförts.

*Tack til Eva Liljekvist och Lena Renström på SVA, Torsten Möller på Kolmårdens djurpark oh Ulf Emanuelsson på SLU.*

*Stort tack även till Elsa Paulssons minnesfond.*

## REFERENSER

- Appel, M.J.G. & Summers, B.A. (1995). Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary microbiology*, 44, 187-191.
- Bergman, J.G.H.E., Muniz, M., Sutton, D., Fensome, R., Ling, F. & Paul, G. (2006). Comparative trial of the canine parvovirus, canine distemper virus and canine adenovirus type 2 fractions of two commercially available modified live vaccines. *The veterinary record*, 159, 733-736.
- Casal, M. (2010). Management and critical care of neonates. I: England, G.C.W. & von Heimendahl, A. eds. *BSAVA Manuel of canine and feline reproduction and neonatology*. Second edition. Gloucester. BSAVA. Kap. 15.
- Chappuis, G. (1995). Control of canine distemper. *Veterinary microbiology*, 44, 351-358.
- Chappuis, G. (1998). Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. *Vaccine*, 16, 1468-1472.
- Cirone, F., Elia, G., Campolo, M., Friedrich, K., Martella, V., Pratelli, A. & Buonavoglia, C. (2004). Immunogenicity of an inactivated oil-emulsion canine distemper vaccine in african wild dogs. *Journal of wildlife diseases*, 40, 343-346.
- Cleaveland, S., Appel, M.G.J., Chalmers, W.S.K., Chillingworth, C., Kaare, M. & Dye, C. (2000). Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. *Veterinary microbiology*, 72, 217-227.
- Creel, S.R. & Creel, N.M. (1991). Energetics, reproductive suppression and obligate communal breeding in carnivores. *Behavioral ecology and sociobiology*, 28, 263-270.
- Creel, S., Maruscha Creel, N., Munson, L., Sanderlin, D. & Appel, M.J.G. (1997). Serosurvey for selected viral diseases and demography of african wild dogs in Tanzania. *Journal of wildlife diseases*, 33, 823-832.
- Day, M.J. (2007). Immune system development in the dog and cat. *Journal of comparative pathology*, 137, 10-15.
- Durbin, L.S., Hedges, S., Duckworth, J.W., Tyson, M., Lyenga, A. & Venkataraman, A. (IUCN SSC Canid Specialist Group - Dhole Working Group). *Cuon alpinus*. [online](2012) Tillgänglig: <http://www.iucnredlist.org/details/5953/0> [2012-10-07].
- FASS vet. (2012). Stockholm. Läkemedelsindustriföreningen. Sid 624-625.
- Goller, K.V., Fyumagwa, R.D., Nikolin, V., East, M.L., Kilewo, M., Speck, S., Müller, T., Matzke, M. & Wibbelt, G. (2010). Fatal canine distemper infection in a pack of African wild dogs in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Veterinary microbiology*, 146, 245-252.



- Greene, C.E. & Appel, M.J. (2006). Canine distemper. I: Greene, C.E. ed. *Infectious diseases*. Missouri. Saunders Elsevier. Kap. 3
- Greene, C.E. & Schultz, R.D. (2006). Immunoprophylaxis. I: Greene, C.E. ed. *Infectious diseases*. Missouri. Saunders Elsevier. Kap. 100.
- Greenwood, N.M., Chalmers, W.S.K., Baxendale, W. & Thompson, H. (1996). Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme analysis. *Veterinary Record*, 138, 495-496.
- Harder, T.C. & Osterhaus, A.D.M.E. (1997). Canine distemper virus – a morbillivirus in search of new hosts? *Trends in microbiology*, 5, 120-124
- Harrenstien, L.A., Munson, L., Ramsay, E.C., Lucash, C.F., Kania, S.A. & Potgieter, L.N.D. (1997). Antibody response of red wolves to canine distemper virus and canine parvovirus vaccination. *Journal of wildlife diseases*, 33, 600-605.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Safra, N., Mosenco, A., Radoshitzky, M. & Bark, H. (2002). Development of hypertrophic osteodystrophy and antibody response in a litter of vaccinated Weimaraner puppies. *Journal of small animal practice*, 43, 27-31.
- HogenEsch, H. & Thompson, S. (2010). Effect of ageing on the immune response of dogs to vaccines. *Journal of comparative pathology*, 142, 74-77.
- IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. [online](2012) Tillgänglig: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) [2012-10-07].
- Kapil, S. & Yeary, T.J. (2011). Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. *Veterinary clinics of North America: small animal practice*, 41, 1069-1086
- Kolmårdens insamlingsstiftelse. Hemsida. [online] (2012) Tillgänglig: <http://www.stiftelsenkolmarden.se/> [2012-11-21].
- Maisch, H. (2010). The influence of husbandry and pack management on Dhole Cuon Alpinus reproduction. *International zoo yearbook*, 44, 149-164.
- McCaw, D.L. & Hoskins, J.D. (2006). Canine viral enteritis. I: Greene, C.E. ed. *Infectious diseases*. Missouri. Saunders Elsevier. Kap. 8.
- McCormick, A.E. (1983). Canine distemper in African cape hunting dogs (*Lycaon pictus*) - possible vaccine induced. *The journal of zoo animal medicine*, 14, 66-71.
- McNutt, J.W., Mills, M.G.L., McCreery, K., Rasmussen, G., Robbins, R. & Woodroffe, R. (IUCN SSC Canid Specialist Group - African Wild Dog Working Group). *Lycaon pictus*. [online] (2012) Tillgänglig: <http://www.iucnredlist.org/details/12436/0> [2012-10-07].
- Philippa, J. Vaccination of non-domestic carnivores. [online] (2010). Tillgänglig: <http://www.eaza.net/activities/Pages/Transmissible%20Diseases%20Handbook.aspx> . [2012-10-21].
- Pollock, R.V.H. & Carmichael, L.E. (1982). Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *Journal of the american veterinary medical association*, 180, 37-42.
- Spencer, J. & Burroughs, R. (1992). Antibody responses to canine distemper vaccine in african wild dog. *Journal of wildlife diseases*, 28, 443-444.
- Steinel, A., Parrish, C.R., Bloom, M.E. & Truyen, U. (2001). Parvovirus infections in wild carnivores. *Journal of wildlife diseases*, 37, 594-607.
- Taguchi, M., Namikawa, K., Maruo, T., Orito, K., Lynch, J. & Sahara, H. (2011). Antibody titers for canine parvovirus type-2, canine distemper virus, and canine adenovirus type-1 in adult household dogs. *Canadian veterinary journal*, 52, 983-986.

- Tizard, I.R. (2004). *Veterinary immunology: an introduction*. Seventh edition. Philadelphia. Saunders. Kap 21.
- Tizard, I.R. (2012). *Veterinary immunology*. Ninth edition. Missouri. Elsevier Saunders. Kap. 23.
- Tizard, I. & Ni, Y. (1998). Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. *Journal of the american veterinary medical association*, 213, 54-60.
- Toman, M., Faldyna, M., Knotigova, P., Pokorova, D. & Sinkora, J. (2002). Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 87, 321-326.
- van de Bildt, M.W.G., Kuiken, T., Visee, A.M., Lema, S., Fitzjohn, T.R. & Osterhaus, A.D.M.E. (2002). Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. *Emerging infectious diseases*, 8, 211-213
- van Heerden, J., Bainbridge, N., Burroughs, R.E.J. & Kriek, P.J. (1989). Distemper-like disease and encephalitozoonosis in wild dogs (*Lycaon Pictus*). *Journal of wildlife disease*, 25, 70-75.
- van Heerden, J., Bingham, J., van Vuuren, M., Burroughs, R.E.J. & Stylianides, E. (2002). Clinical and serological response of wild dogs (*Lycaon pictus*) to vaccination against canine distemper, canine parvovirus infection and rabies. *Journal of the South african veterinary association*, 73, 8-12.
- van Herwijnen, J.R. ([info@EVLOnline.nl](mailto:info@EVLOnline.nl)) 2012-11-27. CPV interpretation. E-post till Lotta Wahldén ([chwa0001@stud.slu.se](mailto:chwa0001@stud.slu.se))
- Veterinary healthcare communications. (2002). Titer testing and vaccination: A new look at traditional practices. [online] Tillgänglig: <http://www.synbiotics.com/Products/CompanionAnimals/Canine/TiterCHEK-CDV-CPV-TiterTesting/96-0460-RoundTableDiscussion.pdf> [2012-10-05].
- Wallach, J.D. & Boever, W.J. (1983). *Diseases of exotic animals*. Philadelphia. W. B. Saunders Company.
- Waner, T., Keren-Kornblatt, E., Shemesh, O. & Mazar, S. (2004). Diagnosis of acute canine parvovirus infection (CPV-2) in naturally infected dogs using serum IgM and IgG rapid dot ELISA. *Israel journal of veterinary medicine*, 59, 1-2.
- Waner, T., Naveh, A., Wudovsky, I. & Carmichael, L.E. (1996). Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 8, 427-432.
- Woodroffe, R., Prager, K.C., Munson, L., Conrad, P.A., Dubovi, E.J. & Mazet, J.A.K. (2012). Contact with domestic dogs increases pathogen exposure in endangered african wild dogs (*Lycaon pictus*). *PloS ONE*, 7, 1-9.