

# 大熊猫布鲁氏菌病、弓形虫病以及心丝虫病的血清学调查研究

钟志军<sup>1#</sup>, 黄祥明<sup>2#</sup>, 杨洋<sup>1#</sup>, 吴孔菊<sup>2</sup>, 徐晓阳<sup>1</sup>, 曹雪峰<sup>1</sup>, 兰景超<sup>2</sup>, 彭广能<sup>1\*</sup>

(1. 四川农业大学动物医学院, 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川雅安 625014;

2. 成都大熊猫繁育研究基地, 四川省濒危野生动物保护生物学部共建实验室, 成都 610081)

**摘要:**为摸清大熊猫布鲁氏菌病、弓形虫病以及心丝虫病的血清学感染资料, 采用虎红平板凝集试验、试管凝集试验以及外膜蛋白 BCSP3 基因 PCR 扩增检测布鲁氏菌病; 同时采用弓形虫间接血凝试验和犬心丝虫抗原快速诊断对样品进行检测。结果表明, 6 只大熊猫 RBPT 检测为阳性, 进一步采用 SAT 和血液细菌 BCSP31 基因 PCR 扩增结果均为阴性, 排除了布鲁氏菌感染; 大熊猫蜀兰弓形虫抗体检测呈阳性, 复查也为阳性, 表明存在弓形虫感染; 所有大熊猫心丝虫抗原检测结果均为阴性, 表明无心丝虫感染。本次检测的 3 种疾病中, 仅发现 1 只熊猫(蜀兰)存在弓形虫感染, 布鲁氏菌病和心丝虫病均为阴性, 表明目前成都大熊猫繁育研究基地内大熊猫疾病的预防工作成果显著。

**关键词:** 大熊猫; 布鲁氏菌病; 弓形虫病; 心丝虫病

**中图分类号:** Q959.8; S85 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7083(2014)06-0836-04

## Serology Analysis of Brucellosis, Toxoplasmosis and Heartworm in Giant Pandas

ZHONG Zhijun<sup>1#</sup>, HUANG Xiangming<sup>2#</sup>, YANG Yang<sup>1#</sup>, WU Kongju<sup>2</sup>,

XU Xiaoyang<sup>1</sup>, CAO Xuefeng<sup>1</sup>, LAN Jingchao<sup>2</sup>, PENG Guangneng<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan Province 625014, China; 2. Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology for Endangered Wildlife, Chengdu 610081, China)

**Abstract:** In this study, the serological data of brucellosis, toxoplasmosis and heartworm in giant pandas were collected. Rose bengal plate agglutination test, tube agglutination test and outer membrane protein amplification BCSP3 were used to detect brucellosis. And indirect hemagglutination test and canine heartworm antigen rapid diagnostic test were used to detect toxoplasmosis and heartworm infection. The results showed that 6 pandas were positive for RBPT, but negative for SAT and BCSP31 gene amplification, therefore excluded brucella infection. One giant panda (Shulan) was positive for toxoplasma antibodies, indicating the potential infection of toxoplasmosis. All pandas were negative for heartworm antigen test. It suggested that the effective disease prevention in Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding were adopted in recent years.

**Key words:** giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*); brucellosis; toxoplasmosis; heartworm

大熊猫 *Ailuropoda melanoleuca* 是我国特有的珍稀野生动物, 被列为国家 I 级保护动物。经过多年努力, 大熊猫种群数量稳定增加。第三次大熊猫普查结果显示, 全国野生大熊猫数量 1596 只, 圈养大熊猫种群数量由 2012 年的 341 只增加到 2013 年的 376 只, 表明大熊猫已形成较为稳定的种群(张志和, 2013)。

过去的研究主要集中在大熊猫的繁殖上, 近年来随着大熊猫数量的增加, 大熊猫疾病的研究受到关注。大熊猫在圈养条件下, 由于食物结构, 环境因

素以及自身免疫力低下等因素, 致病微生物容易侵入机体, 引起疾病。近年来病毒性疾病、细菌性疾病以及寄生虫病等在大熊猫中陆续发生。其中病毒性疾病如犬瘟热病毒、轮状病毒、冠状病毒、细小病毒等(李金中等, 1999; 胡桂学等, 2004; 王成东等, 2008; Qin *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2013); 细菌性疾病如出血性大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、铜绿假单胞菌、魏氏梭菌、 $\beta$ -溶血性链球菌等引起大熊猫肠道以及呼吸道疾病(王强等, 1998; 孙飞龙等, 2002)。大

收稿日期: 2014-06-02 接受日期: 2014-08-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31272620); 四川省教育厅重点资助项目(13ZA0263); 成都大熊猫繁育研究基金会项目(CPF 研 2012-6); 教育部“长江学者和创新团队发展规划”创新团队项目(IRT0848); 四川农业大学双支计划项目(00270713, 03570362)

作者简介: 钟志军(1980~), 男, 副教授, 博士, 研究方向为兽医临床病理学与分子诊断学, E-mail: zhongzhijun488@126.com #并列第一作者

\*通讯作者 Corresponding author, 男(土家族), 博士, 教授, 从事兽医临床疾病诊断与治疗, E-mail: pgn.sicau@163.com

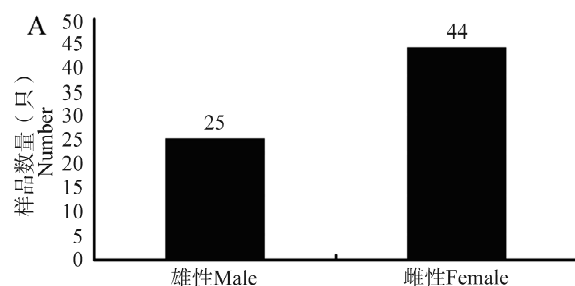
熊猫死亡的原因比较多,但多数为疾病导致。疾病致死是近年来大熊猫死亡的主要原因,同时也是大熊猫趋于濒危的主要原因之一。一些烈性传染病如犬瘟热、轮状病毒、出血性大肠杆菌等严重威胁大熊猫种群安全(李金中等,1999;孙飞龙等,2002;王成东等,2008)。

我们虽然对大熊猫疾病有了较多的认识,但对大熊猫布鲁氏菌病、弓形虫病以及心丝虫病的检测却是空白。野生动物有很多关于布鲁氏菌病、弓形虫病和心丝虫病的报道(张述义等,2001;崔丽瑾等,2010;Lan *et al.*, 2012)。同时少量野生大熊猫由于多种原因受伤被抢救到圈养条件下短暂或长期饲养,野生大熊猫是否携带传染源而影响圈养熊猫仍未知。同时,近年来少数圈养雌性大熊猫存在原因不明的不孕,是否与布鲁氏菌病、弓形虫病这类引起繁殖障碍的疾病有关,也需要进一步调查。此外,成都大熊猫繁育研究基地内小熊猫曾发生心丝虫感染造成大量小熊猫死亡(Lan *et al.*, 2012)。小熊猫与大熊猫同为熊猫基地内饲养的濒危野生动物,小熊猫感染的疾病也严重威胁着基地内大熊猫的健康。为此我们开展了大熊猫布鲁氏菌病、弓形虫病以及心丝虫病的检测,以摸清大熊猫中这 3 种疾病的血清学感染资料,为大熊猫以及其他珍稀野生动物是否需要免疫接种提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

69 只大熊猫血液样品于 2012 年 3 月~2014 年



4 月采集于成都大熊猫繁育研究基地(收集于大熊猫健康体检)。

### 1.2 主要试剂

布鲁氏菌病虎红凝集抗原及试管凝集抗原、布鲁菌阴性血清、布鲁菌阳性血清均购自中国兽医药品监察所;弓形虫间接血凝试验试剂购自中国农业科学院兰州兽医研究所;犬心丝虫抗原快速诊断试纸购自韩国安捷公司;QIAamp UCP Pathogen Mini Kit(50)购自 Qiagen 公司。

### 1.3 方法

布鲁氏菌病虎红平板凝集试验(RBPT)及试管凝集试验(SAT)参考文献进行(黄祥明等,2014)。血液细菌 DNA 提取采用 QIAamp UCP Pathogen Mini Kit(50)进行,然后 PCR 扩增布鲁氏菌属特异性蛋白基因 BCSP31(黄祥明等,2014)。弓形虫抗体检测采用间接血凝试验,按照说明书进行操作和判定。犬心丝虫抗原快速诊断按照说明书进行判定。

## 2 结果

### 2.1 采样大熊猫性别以及年龄分布

我们对采样的 69 只大熊猫性别进行分类,其中雄性 25 只,雌性 44 只,雌雄比为 1.76(图 1,A)。检测的 69 只熊猫中,0~1.5 岁幼龄大熊猫 14 只,1.5~5.5 岁亚成体大熊猫 15 只,5.5~20 岁成体大熊猫 35 只,20 岁以上老龄大熊猫 5 只(图 1,B)。此外,69 只大熊猫中包含北川、小平平、龙龙和乔乔 4 只野生大熊猫。

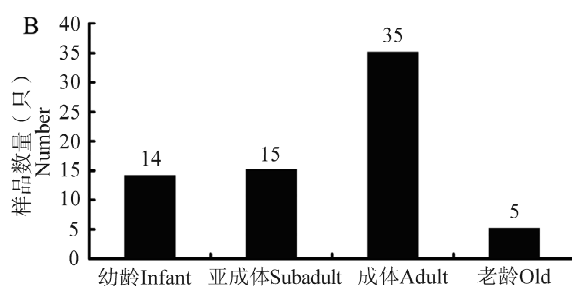


图 1 采样大熊猫雌雄(A)以及年龄(B)分布情况  
Fig. 1 Gender (A) and age (B) distribution of sampling giant pandas

### 2.2 大熊猫布鲁氏菌病、弓形虫病以及心丝虫病检测结果

对 69 只大熊猫 3 种疾病抗体/抗原的检测结果显示如表 1。6 只大熊猫(永滨、五一、芝芝、娅星、琪琪、功仔)布鲁氏菌病 RBPT 阳性,2 次 RBPT 复查也为阳性。对 6 只阳性熊猫进一步采用 SAT 和血液细菌

DNA 的 BCSP31 基因 PCR 扩增(图 2)进行确认,结果均为阴性,表明 6 例虎红平板凝集试验阳性的大熊猫无布鲁氏菌感染。

弓形虫抗体检测仅发现大熊猫蜀兰的结果为阳性,复查也显示为阳性,表明其存在弓形虫感染。其余 68 只大熊猫弓形虫抗体检测结果均为阴性。心

丝虫抗原检测结果表明,所有大熊猫检测结果均为阴性,表明检测的大熊猫种群内无心丝虫感染。

表 1 大熊猫布鲁氏菌病抗体、弓形虫病抗体以及心丝虫病抗原检测结果

Table 1 Results of brucellosis antibodies, toxoplasmosis antibodies and heartworm antigen test for 69 giant pandas

熊猫别名	布鲁氏菌病			弓形虫病	心丝虫病
	RBPT	SAT	PCR		
娅双	-	-	/	-	-
晶晶	-	-	/	-	-
园园	-	-	/	-	-
娅仔	-	-	/	-	-
成功	-	-	/	-	-
娇子	-	-	/	-	-
莉莉	-	-	/	-	-
大娇	-	-	/	-	-
星雅	-	-	/	-	-
小丫头	-	-	/	-	-
蜀庆	-	-	/	-	-
成绩	-	-	/	-	-
蜀兰	-	-	/	+	-
北川	-	-	/	-	-
永浜	+	-	-	-	-
萌萌	-	-	/	-	-
秋浜	-	-	/	-	-
小平平	-	-	/	-	-
思缘	-	-	/	-	-
幸浜	-	-	/	-	-
福福	-	-	/	-	-
五一	+	-	-	-	-
科比	-	-	/	-	-
香冰	-	-	/	-	-
蜀蓉	-	-	/	-	-
娇小	-	-	/	-	-
美兰	-	-	/	-	-
阳阳	-	-	/	-	-
龙龙	-	-	/	-	-
冰点	-	-	/	-	-
绩丽	-	-	/	-	-
乔乔	-	-	/	-	-
庆贺	-	-	/	-	-
二丫头	-	-	/	-	-
雄浜	-	-	/	-	-
贝贝	-	-	/	-	-
双喜	-	-	/	-	-
君君	-	-	/	-	-
双欣	-	-	/	-	-
成对	-	-	/	-	-
福娃	-	-	/	-	-
大双	-	-	/	-	-
奇缘	-	-	/	-	-
成双	-	-	/	-	-
真真	-	-	/	-	-

雄浜	-	-	/	-	-
芝芝	+	-	-	-	-
爱浜	-	-	/	-	-
隆浜	-	-	/	-	-
勇勇	-	-	/	-	-
和琪	-	-	/	-	-
科琳	-	-	/	-	-
和美	-	-	/	-	-
园润	-	-	/	-	-
狮狮	-	-	/	-	-
蜀云	-	-	/	-	-
星蓉	-	-	/	-	-
思一	-	-	/	-	-
奥莉奥	-	-	/	-	-
小乔	-	-	/	-	-
娅星	+	-	-	-	-
二巧	-	-	/	-	-
森森	-	-	/	-	-
琪琪	+	-	-	-	-
迎迎	-	-	/	-	-
冰冰	-	-	/	-	-
娅林	-	-	/	-	-
奇珍	-	-	/	-	-
功仔	+	-	-	-	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性，“/”表示未作检测

Note: “+” indicates positive, “-” indicates negative, “/” indicates not detected

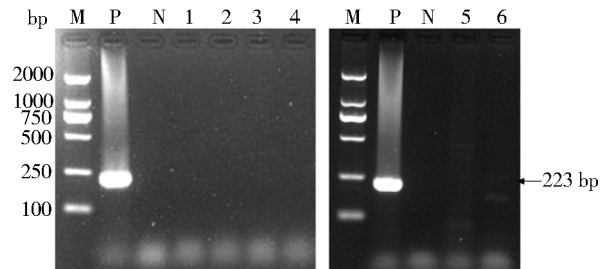


图 2 RBPT 阳性熊猫 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR test of RBPT positive samples

M. Marker, 1~6. 永浜、五一、芝芝、娅星、琪琪、功仔, P. 阳性对照, N. 阴性对照

M. Marker, 1~6. Yongbang, Wuyi, Zhizhi, Yaxing, Qiqi, Gongzai, P. positive control, N. negative control

### 3 讨论

成都大熊猫研究基地是目前饲养圈养熊猫最多的基地之一,也是对濒危大熊猫进行繁殖的重要单位。大熊猫属季节性发情动物,一般春季发情,少数秋季发情,怀孕期差异较大,一般 89~186 d 不等。大熊猫繁殖率低,近年来基地内陆续出现母猫不孕,为了排查一些与繁殖障碍有关的疾病,我们对 69 只大熊猫开展了布鲁氏菌病、弓形虫病抗体的检测。同时对大熊猫也开展了引起小熊猫大量死亡的心丝

虫病血清学调查。结果表明,永滨、五一、芝芝、娅星、琪琪、功仔等 6 只熊猫 RBPT 检测为阳性,进一步采用 SAT 和 BCSP31 基因 PCR 扩增进行确认,结果均为阴性,排除了布鲁氏菌感染。弓形虫抗体检测发现大熊猫蜀兰抗体检测呈阳性,复查也为阳性,表明存在弓形虫感染。弓形虫病是严重的人兽共患传染病,感染动物及其肉制品,往往是其他动物以及人类感染的重要传染源(Cook *et al.*, 2000)。本次检测发现 1 例弓形虫抗体阳性,应引起高度重视,积极采取治疗和预防。心丝虫抗原检测结果表明,所有大熊猫检测结果均为阴性,表明检测的大熊猫种群内无心丝虫感染。本次检测的 3 种疾病中,仅发现 1 只大熊猫存在弓形虫感染,表明目前成都大熊猫繁育研究基地内大熊猫疾病预防工作成果显著。

本次调查弥补了大熊猫布鲁氏菌病、弓形虫病、心丝虫病的检测空白。虽然本次检测中无布鲁氏菌病阳性病例,但对于这类人兽共患传染病要特别关注。因为近年来关于野生动物布鲁氏菌病的报道很多(崔丽瑾等,2010),而且国外也对野生动物采用疫苗进行该病的防控和根除(Davis & Elzer,2002)。目前我们的检测结果表明,大熊猫是否进行布鲁氏菌疫苗免疫还值得商榷。本研究为今后野外捕捉或抢救的大熊猫应检测这类疾病,是否采取疫苗免疫提供更多依据。此外,本次普查仅仅针对了 3 种疾病,今后将开展更多相关疾病的检测工作,保证大熊猫种群的健康、安全。本实验室正对西南地区一些动物园野生动物进行布鲁氏菌病、弓形虫病和心丝虫病的血清学排查,进一步摸清西南地区野生动物中这 3 种疾病的血清学感染资料,为今后野生动物疾病的防控提供依据。

## 4 参考文献

- 崔丽瑾,王兴龙,王英超,等. 2010. 野生动物布鲁氏菌病[J]. 中国人兽共患病学报, 26(3): 283-288.
- 胡桂学,高凤山,高玉伟,等. 2004. 大熊猫犬冠状病毒的分离与鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 35(2): 202-207.
- 黄祥明,杨洋,吴孔菊,等. 2014. 两例小熊猫疑似布鲁菌感染的鉴别诊断[J]. 黑龙江畜牧兽医, 4: 100-102.
- 李金中,夏咸柱,胡桂学,等. 1999. 我国犬瘟热病毒的生态学调查研究[J]. 畜牧兽医学报, 30(4): 375-379.
- 孙飞龙,刘敬贤,席丹,等. 2002. 大熊猫肠道疾病致病菌[J]. 经济动物学报, 6(2): 20-23.
- 王成东,颜其贵,张志和,等. 2008. 大熊猫幼兽腹泻粪便分离出的轮状病毒鉴定[J]. 兽类学报, 28(1): 87-91.
- 王强,江华,中尾建子,等. 1998. 大熊猫肺炎克雷伯氏杆菌出血性肠炎病例报告[J]. 四川动物, 17(1): 29.
- 张述义,魏梅雄,周忠勇,等. 2001. 动物园珍稀野生动物弓形虫感染的血清学调查[J]. 中国兽医学报, 21(1): 68-71.
- 张志和. 2013. 大熊猫迁地保护回顾与展望[C]// 大熊猫保护国际研讨会论文集. 成都: 1-14.
- Cook AJ, Gilbert RE, Buffalano W, *et al.* 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis[J]. BMJ, 321(7254): 142-147.
- Davis DS, Elzer PH. 2002. Brucella vaccines in wildlife[J]. Vet Microbiol, 90(1-4): 533-544.
- Guo L, Yang S, Chen S, *et al.* 2013. Identification of canine parvovirus with the Q370R point mutation in the VP2 gene from a giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. Virol J, 10: 163.
- Lan J, Fu Y, Yang Z, *et al.* 2012. Treatment and prevention of natural heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in red pandas (*Ailurus fulgens*) with selamectin and ivermectin[J]. Parasitol Int, 61(2): 372-374.
- Qin Q, Li D, Zhang H, *et al.* 2010. Serosurvey of selected viruses in captive giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) in China[J]. Vet Microbiol, 142: 199-204.