

圈养华南虎钩端螺旋体感染情况调查

朱向蕾 虞坚颐 周立晨*

(上海动物园, 上海 200335)

关键词: 华南虎; 钩端螺旋体; PCR; 酶联免疫吸附试验

中图分类号: Q864.7

文献标识码: A

文章编号: 1000–1050 (2022) 02–0223–04

Investigation on *Leptospira* infection of captive South China Tiger

ZHU Xianglei, YU Jianyi, ZHOU Lichen*

(Shanghai Zoo, Shanghai 200335, China)

Abstract: *Leptospira*, which is susceptible to cats, poses a threat to the health of the South China tiger. In this study, we performed PCR and Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the pathogen and antibody of 119 tiger blood samples from 11 zoos. The results showed that no *Leptospira*-positive samples were detected in 119 whole blood samples, and 50 positive samples were detected in serum samples. The positive rate of antibody was 42.0%. In different zoos, the positive rate of antibody ranged from 0 to 100%, and the median was 22.2%. There was a significant difference in the infection among different zoos ($\chi^2 = 19.851, P = 0.002$). We also detected a significant difference in the infection between adults and juveniles ($\chi^2 = 9.233, P = 0.006$). The positive rate was 26.1% in infancy and 45.8% in adults. On the other hand, we detected no significant difference in the positive rate of *Leptospira* between different genders ($\chi^2 = 0.006, P = 0.941$). The positive rate of *Leptospira* was 41.4% in males and 42.6% in females. Therefore, the infection of *Leptospira* in South China tigers was affected by age and zoo (different locations). This survey found that leptospirosis antibodies were prevalent in zoo-housed South China tigers, which provided background epidemiological data for the prevention and control of leptospirosis in South China tiger population.

Key words: South China Tiger; *Leptospira*; PCR; Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

钩端螺旋体病 (*Leptospirosis*) 为致病性钩端螺旋体引起的人畜共患传染病, 在世界范围内分布 (Levett, 2001), 可感染鼠科、猴科和犬科等多种动物 (Desvars *et al.*, 2012)。人或动物通过接触带菌动物的粪便、尿液污染的水和土壤而感染 (娄银莹等, 2019), 可造成黄疸、急性肾功能衰竭、出血性素质和严重肺部疾病等, 因血清型或地域不同, 呈现不同的临床表现 (McBride *et al.*, 2005; Goldstein *et al.*, 2006)。

华南虎 (*Panthera tigris amoyensis*) 是国家一级重点保护野生动物, 中国特有虎物种, 仅 249 只圈养于各地动物园 (2020 年华南虎谱系), 种群保护与繁育工作迫在眉睫。目前已有猫感染钩端螺旋体的报道 (Arbour *et al.*, 2012; Murillo *et al.*, 2020),

动物园作为流浪猫、啮齿类动物的常见地, 具备形成钩端螺旋体传播途径的条件, 圈养华南虎也暴露于传播链的风险之下。除人类外, 绝大多数研究集中于宠物犬猫, 关于大型猫科动物如华南虎感染情况的研究较少, 但钩端螺旋体对华南虎造成的潜在威胁不容忽视, 因此对于其感染情况的研究非常必要。

本文采集 11 家动物园华南虎血液 119 份, 通过分子生物学及血清学手段, 开展钩端螺旋体的感染情况调查, 旨在摸清动物园圈养华南虎中钩端螺旋体的感染情况及潜在危险, 为华南虎的疾病防控提供一定的基础资料, 以促进其种群的保育工作。

基金项目: 上海市绿化和市容管理局科研专项 (G200404, G210407); 上海动物园科技攻关项目 (SZ170202)

作者简介: 朱向蕾 (1985–), 女, 硕士, 工程师, 主要从事野生动物科学研究工作. E-mail: zxlnejau@163.com

收稿日期: 2021-04-01; 接受日期: 2022-01-05

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: petitella@163.com

1 研究方法

1.1 样本采集

2018年9月至2019年4月,采集来源于上海、杭州、南京、南昌等11家动物园的119只华南虎血液样本,采集样本数量占全国华南虎饲养种群的47.8%。将华南虎经化学麻醉后静脉采集血液,分别装入含EDTA和促凝剂的血液储存管中,3 000 r/min离心10 min,分离血清,全血及血清均-80℃保存备用。

1.2 检测方法

分别采用PCR(聚合酶链式反应)和酶联免疫吸附试验(Eenzyme linked immunosorbent assay, ELISA)对119份华南虎样本进行病原学和血清学检测。

1.2.1 PCR检测

全血样本按照钩端螺旋体PCR检测试剂盒(世纪元亨)要求进行DNA提取,PCR反应体系为20 μ L,其中PCR反应液16 μ L, Taq DNA聚合酶2 μ L,模板DNA 2 μ L,反应在PCR仪(Jena Biometra TRIO)上进行,参考以下程序:94℃, 3 min; 94℃, 30 s, 60℃, 30 s, 72℃, 30 s,共35个循环;72℃延伸7 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,每个样本上样10 μ L,凝胶成像系统(Tanon 1600)观察记录检测结果。

1.2.2 ELISA检测

检测前将钩端螺旋体通用型检测试剂盒(荷兰EVL)及待测样本放置室温平衡,阴性对照和阳性对照经蒸馏水溶解后,用稀释液进行30倍稀释,样本用稀释液进行150倍稀释。将稀释好的样本和阴阳性对照分别加100 μ L至反应板上,均设置两个平行对照,轻轻震荡,封板膜封板,37℃温箱中孵育60 min;将浓缩洗涤液进行200倍稀释,每孔加入300 μ L进行洗涤,共洗5次;每孔加HRPO单克隆抗体100 μ L,封板,37℃孵育60 min;按照上述要求每孔洗涤5次,等量混匀缓冲液A和B,每孔加入A液和B液的混合液100 μ L,室温放置10~15 min;每孔加入50 μ L终止液,10 min内在酶标仪(迈瑞)上应用450 nm进行读数,记录OD值。阳性对照平均值 ≥ 0.7 ,阴性对照平均值 ≤ 0.35 ,实验成立。结果参照试剂盒说明书中的判定标准,用S/P值(样本与阳性对照的比值)表示,S/P=(样本

平均OD值-阴性对照平均OD值)/(阳性对照平均OD值-阴性对照平均OD值),样本S/P值 ≥ 0.33 判为阳性,S/P值 < 0.33 则为阴性。

1.3 数据分析

采用非参数统计检验(Chi-square Test)对不同动物园以及不同性别、年龄华南虎钩端螺旋体的ELISA检测数据进行分析,其中不同动物园的数据应用Kruskal-Wallis检验,不同性别和年龄的抗体数据应用Mann-Whitney U检验,对其在性别、年龄和不同动物园之间感染的差异进行比较。使用SPSS 23.0对抗体检测数据进行分析,显著性水平设定为0.05。

2 结果

2.1 PCR检测结果

119份华南虎血液样本PCR扩增,经琼脂糖凝胶电泳,结果显示均为阴性。

2.2 ELISA检测结果

2.2.1 不同动物园华南虎血清样本钩端螺旋体抗体

11家动物园的119份华南虎血清样本钩端螺旋体抗体检测结果显示,阳性样本50份,阳性率为42.0%,其中苏州动物园钩端螺旋体抗体阳性率为72.7%,杭州野生动物园61.5%,广州动物园阳性率较低为11.1%,不同动物园华南虎血清抗体差异显著(Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 19.851$, $P = 0.002$),郑州及临沂动物园采样量较少,不参与分析。不同动物园钩端螺旋体抗体阳性率及S/P值见表1。

2.2.2 不同年龄段和不同性别华南虎血清中钩端螺旋体抗体

不同年龄段华南虎血清钩端螺旋体抗体检测结果,23份幼虎,阳性6份,阳性率为26.1%;96份成年虎,阳性44份,阳性率为45.8%,成年及幼年华南虎对钩端螺旋体的感染差异显著(Mann-Whitney U, $\chi^2 = 9.233$, $P = 0.006$)。不同年龄华南虎钩端螺旋体抗体阳性率及S/P值见表2。

不同性别的华南虎血清钩端螺旋体抗体检测结果,58份雄性,阳性24份,阳性率为41.4%;61份雌性,阳性26份,阳性率为42.6%,雌、雄个体感染程度差异不显著(Mann-Whitney U, $\chi^2 = 0.006$, $P = 0.941$)。不同性别华南虎钩端螺旋体抗体阳性率及S/P值见表2。

表1 不同动物园华南虎血清样本钩端螺旋体抗体检测结果
Table 1 Seroprevalences of antibody to leptospirosis in South China Tiger from different zoos

动物园 Zoo	采样时间 Time	样本数 Number	阳性率 Positive rate (%)	S/P 均值 (CI 95%) Average S/P value (CI 95%)(%)
南昌动物园 Nanchang Zoo	2018. 09. 11	35	42. 9	31. 20 (24. 5 ~ 37. 8)
上海动物园 Shanghai Zoo	2018. 10. 12	22	54. 6	36. 64 (29. 5 ~ 43. 7)
杭州野生动物园 Hangzhou Wild Zoo	2018. 11. 15	13	61. 5	46. 28 (12. 8 ~ 79. 8)
苏州动物园 Suzhou Zoo	2018. 10. 09	11	72. 7	59. 81 (31. 3 ~ 88. 3)
洛阳动物园 Luoyang Zoo	2018. 09. 26	9	22. 2	27. 11 (18. 4 ~ 35. 8)
广州动物园 Guangzhou Zoo	2019. 04. 30	9	11. 1	24. 12 (12. 7 ~ 35. 5)
重庆动物园 Chongqing Zoo	2018. 12. 18	6	16. 7	30. 39 (22. 7 ~ 38. 1)
梅花山自然保护区 Meihua Mountain Nature Reserve	2019. 01. 15	6	16. 7	15. 16 (2. 5 ~ 32. 8)
成都动物园 Chengdu Zoo	2018. 12. 18	4	0. 0	28. 43 (21. 1 ~ 35. 8)
郑州动物园 Zhengzhou Zoo	2018. 09. 26	2	100. 0	—
临沂动物园 Linyi Zoo	2019. 02. 17	2	0. 0	—

表2 不同年龄段和不同性别华南虎血清中钩端螺旋体抗体检测结果
Table 2 Seroprevalences of antibody to leptospirosis in South China Tiger at different ages and genders

年龄与性别 Age and gender	被检样本数 Number	阳性样本数 Positive number	阳性率 Positive rate (%)	S/P 均值 (CI 95%) Average S/P value (CI 95%) (%)
幼年 Infant	23	6	26. 1	29. 0 (9. 2 ~ 48. 8)
成年 Adult	96	44	45. 8	36. 0 (31. 6 ~ 40. 4)
雄性 Male	58	24	41. 4	31. 8 (27. 3 ~ 36. 3)
雌性 Female	61	26	42. 6	37. 3 (28. 3 ~ 46. 3)

3 讨论

钩端螺旋体作为人畜共患传染病，可感染家养犬猫、啮齿类、流浪猫、圈养华南虎、人类等 (Lapointe *et al.* , 2013)，其中鼠类带菌率可达 5% ~ 7% (张振兴和沈永林，2009)，排菌时间长达 3 个月乃至终生，我国已发现多种动物能携带不同血清型的钩端螺旋体，包括赤狐 (*Vulpes vulpes*)、浣熊 (*Procyon lotor*) 等，其宿主范围广泛 (张振兴和沈永林，2009)。华南虎作为我国特有珍稀物种，目前已野外灭绝。在迁地保护过程中，华南虎的活动、繁殖和食物等都受到影响，与野生状态差异较大，更易受疾病困扰。在钩端螺旋体病的多发地区及季节，应定期开展监测和调查，为华南虎种群的疾病防控工作提供科学依据。

本文对 11 家动物园的 119 份华南虎血液样本开展钩端螺旋体病原及血清抗体调查。结果未检出钩端螺旋体的病原核酸，这可能与华南虎的个体差异有关，有可能在一定时期内华南虎感染钩端

螺旋体，并很快自愈，因此未检测到病原，但这并不代表华南虎不是钩端螺旋体的易感动物，环境污染或者免疫力低下以及与带菌动物接触等，仍存在感染和暴发的风险。血清学检测发现阳性样本 50 份，抗体阳性率为 42. 02%，由于使用的试剂盒为通用型，未对血清型进行分型，其致病型、致病力等情况还有待进一步研究，但圈养华南虎种群中钩端螺旋体感染普遍存在，还应引起充分重视。

不同地区动物园的华南虎感染钩端螺旋体差异显著 ($P < 0. 05$)，与以往研究中猫感染钩端螺旋体的情况相似 (Mylonakis *et al.* , 2005; Gamage *et al.* , 2011)，可能是饲养条件以及饲养环境的差异。有报道称钩端螺旋体在温、湿度较高的亚热带发病率较高 (Gomard *et al.* , 2019)，表明钩端螺旋体可能更适应温暖湿润的环境。本研究中，成年和幼年华南虎均存在感染钩端螺旋体的情况，且 S/P 差异显著 ($P < 0. 05$)，成年华南虎抗体阳性率更高，S/P 值也更高，推测成年虎的活动范围更大，

进食量和食物种类更多,更容易接触到被钩端螺旋体污染的环境、水或食物,且成年个体暴露于传播链的时间更长。不同性别华南虎感染钩端螺旋体, S/P 值差异未达到显著水平 ($P > 0.05$),说明华南虎雌、雄个体对钩端螺旋体易感性无统计学差异。

钩端螺旋体病的防控关键在于切断传染源。环境、食物、水源以及其他易感动物都可能成为传染源,除了华南虎饲养管理中的日常清洁、病兽隔离和及时治疗外,还应对种群以及周边易感犬猫动物开展流行病学调查,及时掌握并切断潜在传播链与传染源。此外,国内动物园针对犬科、猫科动物多进行犬二联、猫三联等疫苗的免疫预防,有条件的情况下可以增加钩端螺旋体多价疫苗的免疫接种,以降低钩端螺旋体在圈养野生动物中的感染传播。

致谢: 本研究在采样过程中得到南昌动物园、杭州野生动物园、苏州动物园、洛阳动物园、广州动物园、重庆动物园、梅花山虎园、成都动物园、郑州动物园和临沂动物园等的大力支持,在此表示感谢!

参考文献:

- Arbour J, Blais M C, Carioto L, Sylvestre D. 2012. Clinical leptospirosis in three cats (2001–2009). *American Animal Hospital Association*, **48** (4): 256–260.
- Desvars A, Naze F, Vourc'h G, Cardinale E, Picardeau M, Michault A, Bourhy P. 2012. Similarities in leptospira serogroup and species distribution in animals and humans in the Indian Ocean Island of Mayotte. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **87** (1): 134–140.
- Gamage C D, Yasuda S P, Nishio S, Kularatne S A, Weerakoon K, Rajapakse J, Lee R B, Obayashi Y, Yoshimatsu K, Arikawa J, Tamashiro H. 2011. Serological evidence of Thailand virus-related hantavirus infection among suspected leptospirosis patients in Kandy, Sri Lanka. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **64**: 72–75.
- Goldstein R E, Lin R C, Langston C E, Langston C E, Scrivani P V, Erb H N, Barr S C. 2006. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **20** (3): 489–494.
- Gomard Y, Lagadec E, Humeau L, Pinet P, Bureau S, Silva D D, Turpin M, Mattoir T S, Georger S, Mavingui P, Tortosa P. 2019. Feral cats do not play a major role in leptospirosis epidemiology on Reunion Island. *Epidemiology and Infection*, **147** (97): 1–3.
- Lapointe C, Plamondon I, Dunn M. 2013. Feline leptospirosis serosurvey from a Quebec referral hospital. *Canadian Veterinary Journal*, **54**: 497–499.
- Levett P N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**: 296–326.
- Lou Y Y, Zhou M J, Zhang Y X, Zheng W X, Yu Y L. 2020. Epidemiological investigation of canine leptospirosis in Beijing, 2017–2019. *Chinese Journal of Zoonoses*, **36** (1): 1–6. (in Chinese)
- McBride A J, Athanazio D A, Reis M G, Ko A I. 2005. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **18**: 376–386.
- Murillo A, Cuenca R, Serrano M, Marga G, Ahmed A, Cervantes S, Caparrós C, Vieitez V, Ladina A, Pastor J. 2020. Leptospira detection in cats in Spain by serology and molecular techniques. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **17** (1600): 1–11.
- Mylonakis M E, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas A F, Petridou E, Saridomichelakis M N, Leontides L, Siochu A. 2005. Leptospiral seroepidemiology in a feline hospital population in Greece. *Veterinary Record*, **156**: 615–616.
- Zhang Z X, Shen Y L. 2009. *Zoological Disease*. Beijing: China Agricultural Press. (in Chinese)
- 张振兴, 沈永林. 2009. 动物园动物疾病. 北京: 中国农业出版社.
- 娄银莹, 周梦洁, 张颖欣, 郑文潇, 于咏兰. 2020. 2017–2019北京地区犬钩端螺旋体病流行病学调查. 中国人畜共患病学报, **36** (1): 1–6.