

林麝应激生理状态与消化道球虫感染程度关系

丁建红¹, 熊小倩², 吴家慧¹, 胡德夫¹, 李 凯^{1*}

(1. 北京林业大学生态与自然保护学院, 北京 100083; 2. 中国野生动物保护协会保护繁育与利用委员会, 北京 100013)

摘要: 为探索慢性应激与圈养林麝球虫感染之间的相关性, 采用饱和盐水漂浮法对四川九药林麝繁育中心采集的粪便样本中的寄生虫卵进行检测, 用麦克马斯特计数法对虫卵进行计数, 应用酶联免疫吸附法测定粪便皮质醇代谢水平, 并基于广义线性模型分析年龄、参配对粪便皮质醇代谢水平的影响, 以及年龄、参配及粪便皮质醇代谢水平与球虫感染强度之间的关系。结果表明: 年龄和参配的交互作用对粪便皮质醇代谢水平影响显著, 3岁龄参配个体粪便皮质醇代谢水平显著低于6岁龄参配个体, 其余3组间差异不显著。宿主年龄和参配对球虫感染强度无影响, 但粪便皮质醇代谢水平对球虫感染强度影响极显著 (GLMs, $P < 0.01$)。粪便皮质醇代谢水平和球虫感染强度呈极显著负相关 ($R = -0.502, P < 0.01$), 3个浓度组之间球虫感染强度差异极显著 ($P < 0.01$)。慢性应激会增加林麝寄生虫易感性, 应激强度与寄生虫感染强度呈显著正相关关系。建议麝场不要选取3岁龄个体作为种麝, 并减少人为刺激或扩大每个林麝个体的活动空间来降低林麝的应激反应, 加强林麝的健康管护。

关键词: 应激; 寄生虫; 免疫; 相互作用

中图分类号: S858.94; S852.71

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)01-0081-06

Relationship between stress state and infection intensity of coccidian in musk deer (*Moschus berezovskii*)

DING Jianhong¹, XIONG Xiaoqian², WU Jiahui¹, HU Defu¹, LI Kai¹

(1. College of Ecology and Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083;

2. China Wildlife Conservation Association Scientific Breeding and Utilization Committee, Beijing 100013)

Abstract: To study the effect of chronic stress on the infection intensity of coccidia in the intestinal tract of musk deer, the parasite eggs in fecal samples collected from Sichuan Jiuyao musk deer breeding center were detected by saturated saline floating method. The parasite eggs were counted by McMaster Counting method, and the fecal cortisol concentration was determined by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. The Generalized Linear model was used to analyze the influence of age and mating on fecal cortisol concentration and coccidian infection intensity. The results showed that: the interaction of age and mating had a significant effect on fecal cortisol level. The fecal cortisol level of 3-year-old individuals was significantly lower than that of 6-year-old individuals, and there was no significant difference among the other three groups. The age and mating had no effect on the coccidian infection intensity, while the fecal cortisol level had significant effect on the coccidian infection intensity (GLMs, $P < 0.01$). There was a significant negative correlation between fecal cortisol level and coccidian infection intensity ($R = -0.502, P < 0.01$), and there was a significant difference among the three groups ($P < 0.01$). The results suggested that: the chronic stress can increase the parasite susceptibility of musk deer, and there is a significant positive correlation between stress level and parasite infection intensity; 3-year-old individuals are suggested not to be selected as stud musk deer by the musk deer breeding centers and avoid human stimulation or expanding the activity space of each individual, so as to relieve the stress of musk deer, and more attention should be paid to the health management of musk deer.

Key words: stress; parasite; immunity; interaction

收稿日期: 2021-05-11

基金项目: 国家自然科学基金 (31670538) 资助。

作者简介: 丁建红, 硕士研究生。E-mail: 1733817310@qq.com

* 通信作者: 李 凯, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: likai_sino@sina.com

应激是动物机体受到内部和外界各种因子刺激所产生的非特异性生理反应,是机体应对各种生存胁迫因子产生的一种生理适应,过高或过低的应激都不利于动物的生存适应^[1]。生理学研究表明,皮质醇参与且能够指示动物机体的应激生理状态^[2-3]。应激分为急性应激和慢性应激,急性应激在短时间内引起糖皮质激素分泌增加,这调动了机体的能量生成并增加了糖异生,同时抑制了其他生理过程^[4]。当个体长期处于适应超负荷状态时,便发展成为慢性应激,可能对动物健康产生直接的、负面的影响^[5-6],如效应细胞功能减弱,体液免疫和细胞免疫受到抑制,疾病的易感性增加,严重时个体行为会发生改变^[7]。圈养动物普遍存在慢性应激^[8],高强度或长时间的应激直接导致动物的生理异常^[9],圈养条件下林麝(*Moschus berezovskii*)的压力主要是由活动空间减小、食物改变、人工饲养等引发^[10]。理解动物在面临挑战和不断变化的环境时的压力反应对它们的保护至关重要。

应激反应持续的时间不同,对动物的生存和健康造成的不良影响程度就不同。由于寄生虫侵染与宿主免疫力相关,使得研究者在应激反应与寄生虫感染相关性方面兴趣大增。然而,在寄生虫感染和高强度应激之间的研究中却得出不一致的结果^[11-12]。事实上,皮质醇水平和寄生虫感染之间的相互作用不是简单的联系,这取决于寄生虫的毒性、宿主的易感性和多种挑战性刺激的协同作用。

皮质醇通常在血浆样品中作为肾上腺活动和受干扰的参数被测量。然而,采集血液样本对动物来说本身就是一种干扰。因此,非损伤检测糖皮质激素及其代谢物的方法越来越受欢迎。皮质醇激素进入血液后,经肝脏代谢,一部分会以共轭物的形式通过胆汁进入十二指肠,最终可以在粪便中检测到^[13]。Corlatti^[14]验证了粪便皮质醇作为评估动物对不同应激源的生理反应的可靠性。Graham等^[15]研究表明粪便皮质醇浓度和血浆皮质醇浓度具有高度相关性。使用粪便样本评估皮质醇有以下优点:粪便样本易收集,不会对动物造成压力^[16]。且粪便样本代表了一段时间内激素的综合水平,与从血液样本中获得的点估计值相比,粪便激素代表了激素的累积分泌量,他们较少受到短期波动或激素分泌的脉冲性质的影响^[17-18]。因此,粪便皮质醇被广泛应用来监测动物应激生理状态,尤其用于野生动物保护上。

林麝为东亚地区的特产经济动物,雄麝所产的麝香是珍贵的中药材原料^[19]。球虫病是圈养林麝常见疾病之一,林麝感染球虫后会出现消化不良、拉

稀、黄染、消瘦、最终因虚脱或其他继发感染而死亡^[20-21]。球虫是一种肠道原生动物,寄生在宿主肠胃道或相关结构的上皮或内皮细胞内,感染几种脊椎动物宿主,包括鱼类、爬行动物、鸟类和哺乳动物。动物通过摄入被卵囊污染的食物或通过口腔与粪便接触直接传播^[22]。

目前,有关林麝寄生虫方面的研究主要集中在单一物种的鉴定^[23]、驱虫药效的评估^[24-25]、区域寄生虫感染情况等^[26],而对寄生虫关联性影响因素的研究报道较少,尤其应激水平对肠道寄生虫感染影响的研究尚鲜见报道。本研究通过探索胃肠道球虫感染与粪便皮质醇代谢物水平之间的关系,分析慢性应激是否会增加球虫侵染林麝的几率,旨在促进圈养濒危物种的健康管护,并探索宿主对胃肠道寄生虫感染的适应策略。

1 材料与方法

1.1 采样地点和实验动物

本研究区域位于四川省广元市九药林麝养殖繁育中心(32°43' N, 104°81' E),海拔为1 496 m,该麝场由38个饲养区组成,每个饲养区由6个圈舍(3 m × 2 m)和一个露天活动场(18 m × 6 m)组成。参与配种的雄麝在配种期由圈舍转移至露天活动场进行配种,其余雄麝在独立的小舍内。

本研究选取雄性成麝(3~6岁)75头作为研究对象,其中参与配种的雄麝40头,未参与配种的雄麝35头。所有麝均有出生记录,用耳标来区分个体年龄。采样时间为2019年10—11月,麝场统一饲喂时间为07:00及16:00点,该季节林麝主要摄食干树叶,并辅以少量精饲料(主要为麦麸、玉米、豆粕和一些时令蔬菜),所有麝均投喂充足食物,饮水充分。在喂食1 h前统一打扫圈舍。采样期间,实验个体无疾病和异常行为。

1.2 粪样采集

收集75个个体的新鲜粪样,用于粪便皮质醇代谢物水平测定的粪样每隔1 d采集1次,共采集5次,采集的粪样保存在-20℃冰箱中。用于粪便寄生虫卵的检测的粪样连续采集3 d,保存在4℃冰箱中。采样时间为每天04:00—06:00,选取新排未接触地面的粪便颗粒(10~15 g)放入自封袋内,标注好编号、采样日期等关键信息。

1.3 粪便寄生虫卵检测

采用饱和盐水漂浮法对粪便中球虫卵囊进行检测。采用麦克马斯特计数法^[27]进行虫卵的定量测定,步骤如下:称取2 g粪便于100 mL烧杯中,充

分研磨, 加入 60 mL 饱和氯化钠, 用玻璃棒搅拌到粪便混匀为止。过 60 目标准筛到新烧杯中, 吸取滤液注入麦克马斯特计数板的两个计数室中, 静置 5 min 后镜检。

公式如下: $OPG = (n/0.15) \times V/m$, 公式中 n 是指麦克马斯特计数板两个计数室中虫卵或卵囊数的平均值, 0.15 为虫卵计数室的体积。 V 为粪便溶液体积, 60 mL; m 为粪便重量, 2 g。

1.4 粪便皮质醇激素的提取及含量测定

参照 He 等^[10]的提取方法并略做修改, 具体操作方法如下: 称取 0.3 g 粪便于 4 mL 离心管中, 放入 2 颗研磨球, 使用连续加样器加入 3 mL 90% 低温乙醇, 使用震荡研磨仪 25 Hz·min⁻¹ 研磨 3 min。再将研磨好的样品 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取 1 mL 上清液, 60 °C 水浴蒸干, 加入 1 mL 乙醇摇匀分装回收, 并于 -20 °C 保存待测。

采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定提取物中皮质醇的含量。使用皮质醇试剂盒(北京冬歌有限公司)定量皮质醇浓度。皮质醇试剂盒的主要测定参数: 灵敏度 < 5 ng·mL⁻¹; 变异系数: 板内板间均小于 15%; 特异性: 无交叉反应。

1.5 统计方法与数据分析

皮质醇水平表示为每克干粪中激素的含量, 表示为 ng·g⁻¹。所得数据经迭代法去除极值后, 计算每个个体的平均值作为每个个体的粪便皮质醇基值水平。迭代法的具体步骤为: 去除每个个体粪便皮质醇处于 Mean ± 1.5 SD 之外的值^[27]。采用 K-S 检验和 Levene 检验验证各组数据的正态性和方差齐性。以球虫卵囊量作为因变量, 粪便皮质醇代谢物水平、年龄和个体参配状况为预测变量做广义线性模型(GLMs), 这种统计方法的优点包括可以处理非

正态分布和引入连接函数。本研究利用负二项分布和对数连接函数拟合了一组球虫丰度模型, 年龄和参配状况作为分类预测因子, 而皮质醇代谢物水平作为连续预测因子被纳入模型中。用 Spearman 相关性分析检验皮质醇代谢物水平和球虫卵囊数之间的相关性, 3 个皮质醇水平组球虫卵囊数差异比较采用单因素方差分析。

还使用线性的 GLMs 拟合了一系列模型来测试个体年龄、参配对粪便皮质醇代谢物水平的影响。模型以粪便皮质醇代谢物水平为因变量, 个体年龄和参配状态为预测变量。所有统计分析均使用 Excel 2013 和 SPSS 20.0 软件完成, 画图使用 Auto CAD 2018 完成。

2 结果与分析

2.1 最优模型选择

运用广义线性模型检验年龄和参配对粪便皮质醇代谢物水平的影响, 以及年龄、参配和粪便皮质醇代谢物水平对球虫感染强度的影响, 筛选最优模型进行分析。结果(表 1)表明, 粪便皮质醇代谢物水平在个体间差异很大, 范围为 420.236~1 229.312 ng·g⁻¹ ($SE=19.442$)。每个个体的平均皮质醇浓度为 746.469 ng·g⁻¹; 年龄和参配的交互作用对个体粪便皮质醇代谢物水平有影响。3 岁龄和 6 岁龄个体粪便皮质醇代谢物水平差异不显著(GLMs, $P = 0.074$), 参配和未参配个体粪便皮质醇代谢物水平差异不显著(GLMs, $P = 0.534$)。3 岁龄参配个体粪便皮质醇代谢物水平最低(671.99 ± 27.64), 6 岁龄参配个体粪便皮质醇代谢物水平最高(805.18 ± 38.94), 3 岁龄参配个体和 6 岁龄参配个体粪便皮质醇代谢物水平差异极显著(GLMs, $P < 0.01$), 其余 3 组间粪便皮质醇代谢物水平差异不显著。

表 1 基于 AICc 值的模型筛选
Table 1 Model selection based on AICc value

因变量	源	卡方 χ^2	自由度	P 值	ATCc 值
Cortisol	Age	3.199	1	0.074	983.965
	Mating	0.387	1	0.534	986.711
	Age×Mating	984.169	1	0.035	984.169
	Age	1.057	1	0.304	1 305.768
	Mating	0.348	1	0.555	1 306.497
	Cortisol		40.139	1	< 0.01
Parasite egg shedding	Age×Mating	5.884	2	0.053	1 270.977
	Age×Cortisol	0.237	1	0.626	1 273.398
	Mating×Cortisol	0.148	1	0.7	1 273.485
	Mating×Cortisol×Age	6.208	3	0.102	1 273.041

个体球虫感染率为 97.33%, 平均每克粪便中球虫卵囊数为 2 182.347, 个体间感染差异显著, 检测

范围为 0~16 450 g⁻¹。年龄、参配均对个体球虫感染强度无影响, 3 岁龄个体与 6 岁龄个体球虫感染

强度差异不显著(GLMs, $P = 0.304$), 参配个体与未参配个体球虫感染强度差异不显著(GLMs, $P = 0.555$)。粪便皮质醇代谢物水平对球虫感染强度影响极显著(GLMs, $P < 0.01$)。

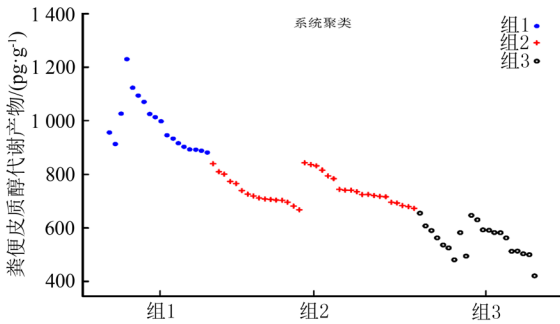


图 1 林麝粪便皮质醇含量分组

Figure 1 Composition of cortisol content in feces of musk deer

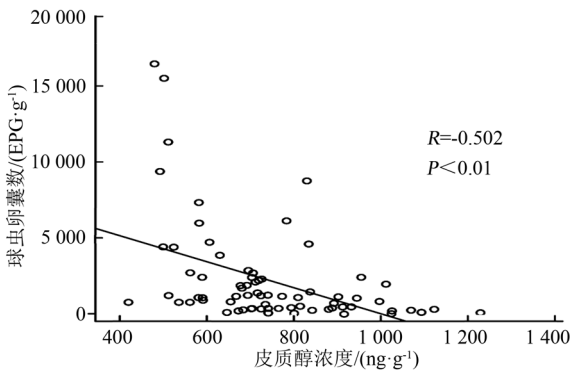


图 2 皮质醇水平和球虫感染强度相关性

Figure 2 Correlation between cortisol concentration and coccidial infection intensity

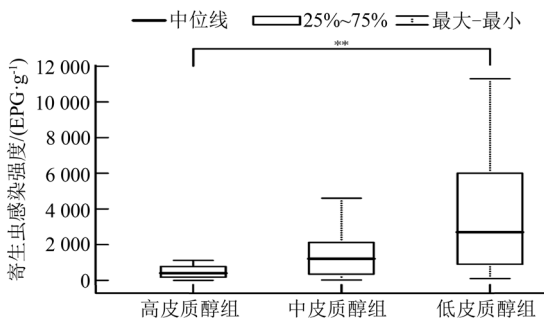


图 3 高中低 3 个皮质醇组球虫感染强度差异

Figure 3 Comparison of coccidial infection intensity among three cortisol groups

2.2 粪便皮质醇浓度聚类

运用系统聚类方法, 根据粪便皮质醇代谢物水平对林麝进行分组, 根据聚类结果将林麝个体分为 3 组, 低浓度组共 21 个个体, 范围为 420.24~654.70 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均值为 $(555.44 \pm 59.62) \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$; 中浓度组共 36 个个体, 范围为 668.41~842.37 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均值为 $(739.81 \pm 51.47) \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$; 高浓度组共 18 个

个体, 范围为 880.46~1 229.31 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均值为 $(982.67 \pm 97.57) \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (图 1)。

2.3 粪便皮质醇代谢物水平与球虫感染强度关系

Spearman 相关性分析表明粪便皮质醇代谢物水平和球虫感染强度呈极显著负相关($R = -0.502, P < 0.01$) (图 2)。

高中低 3 个浓度组球虫感染强度经非参数检验, 差异极显著($P < 0.01$) (图 3)。低浓度组球虫感染强度显著高于中、高浓度组。低浓度组呈现最高的球虫卵囊数, 为 $(4 561.905 \pm 1 063.708) \text{EPG}\cdot\text{g}^{-1}$, 高浓度组呈现最低的球虫卵囊数, 为 $(603.667 \pm 155.997) \text{EPG}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

本研究中, 3 岁龄参配个体粪便皮质醇水平最低, 根据早期研究推测这组动物应激最严重。在 He 等^[10]的研究中, 高拥挤组林麝粪便皮质醇代谢水平低于低拥挤组, 并证实圈养环境给林麝造成了一种慢性压力。林麝是一种野生动物, 圈养后, 由于面临多种应激源如活动空间减小、食物改变、人工饲养等, 造成了巨大的压力。况且, 林麝善于奔跑和跳跃, 圈养后, 由于活动空间减小, 加上人为干扰, 当林麝受刺激后, 会反复在圈舍中行走或上下跳跃, 直到气喘吁吁, 长期以往, 给林麝造成了一种慢性应激。Mason^[28]研究表明, 即使动物在圈养条件下饲养多代, 应激效应也依旧存在。

在欧洲棕鸟^[29]、豚鼠^[30]的研究中证实, 个体长期处于慢性压力条件下, 其基础皮质醇水平降低。Rich 等^[29]研究显示, 个体长期处于慢性应激条件下, 下丘脑精氨酸催产素(AVT, 鸟类)(在哺乳动物中为精氨酸加压素)释放减少, 调节皮质醇浓度降低。当机体面临某种压力时, 下丘脑室旁核神经元分泌促肾上腺皮质激素释放激素(CRH), 再作用于垂体前叶, 分泌促肾上腺皮质激素(ACTH), 又通过外周循环作用于肾上腺, 释放皮质醇。当个体长期处于某种慢性压力状态下, 由于负反馈作用, 肾上腺对促肾上腺皮质激素的反应降低, 使得皮质醇分泌量减少^[31-32]。本研究中, 3 岁龄参配个体粪便皮质醇水平最低, 可能和 3 岁龄个体初为种麝有关。雄麝 1.5 岁性成熟, 2.5 岁达到体成熟^[33-34]。近年来, 麝场为增加优质种源, 常选取刚体成熟的雄麝作为种麝。本研究选取 3 岁和 6 岁林麝作为研究对象, 正是想比较初为种麝的群体和成熟种麝应激生理差异。初次参与配种, 雄麝和雌麝活动领域重合, 且配种期间, 雄麝追逐雌麝或频繁交配(麝场配种机制为“一雄多雌”制)^[35], 这对于雄麝本身就是一

种应激, 对于初次成为种麝的 3 岁个体来说, 应激更为严重。但并非所有参配个体粪便皮质醇代谢水平均低于未参配个体, 在 6 岁龄组中, 参配个体粪便皮质醇代谢水平反而高于未参配个体, 说明参配不是造成林麝应激的唯一应激源, 林麝不同的应激水平是由圈养环境中多种应激源综合作用的结果。

本研究显示, 低浓度组个体球虫卵囊数远高于高浓度组个体, 即个体应激程度越高, 对球虫的易感性越大。研究表明个体长期处于慢性压力下, 会造成机体免疫抑制^[36-39], 长期的慢性压力会使机体平衡紊乱, 白细胞重新分布缓慢, 效应细胞功能降低, 细胞免疫或体液免疫下降, 从而使得机体抗感染能力降低^[7,40]。当其应对寄生虫感染时, 压力大的个体易感性增加, 且压力大的个体可能缺乏足够的能量来对寄生虫进行有效的防御^[41]。该结果与许多针对不同动物的研究结果一致, 如黑猩猩^[42]、大耳负鼠^[43]、草原袋鼠^[44]、负鼠^[45]和胎生蜥蜴^[46]。

研究结果显示 3 岁龄个体和 6 岁龄个体球虫感染强度差异不显著, 可能是由于他们都是成年个体所致。在 Pelletier 等^[47]的研究中也显示, 不同年龄羚羊肺线虫感染无差异。王宇等^[26]研究表明, 林麝各类寄生虫感染率无年龄差异。

本研究发现林麝参配对球虫感染强度无影响, 这与以往几项研究结果不符, 如索艾羊^[48]和大耳负鼠^[49]。可能有以下几点原因: (1)早期研究大多选取的实验对象是处于哺乳期的雌性动物, 本实验对象为交配初期雄性, 在小型哺乳动物中, 妊娠和哺乳的代价是十分昂贵的^[50], 通常雌性在繁殖阶段寄生虫感染达到高峰^[51]。可能雌性更易于解释繁殖与抗寄生虫侵染之间的能量分配。(2)本研究开展时, 林麝正处于交配初期, 由于采样没有涉及整个交配期, 故交配对球虫感染的影响不显著。Strona 等^[45]研究表明, 处于交配后期的负鼠寄生虫感染量显著多于非交配期及交配前期, 提示交配后期个体能量分配更偏重于繁殖而弱化了抗寄生虫感染。(3)推测与他人结果不符主要是研究的寄生虫种类不同, 他人研究的多为肠道蠕虫, 而本研究中林麝感染的球虫为原生动物。由于其传播力强、侵入能力强、更易在体内定殖、世代周期短等特性^[22], 使得球虫能在林麝种群中大量传播, 故配种对其影响不显著。在本研究中, 应激是与球虫感染相关的唯一变量, 这表明应激对林麝抵抗力降低影响最为显著。

参考文献:

- [1] REHBINDER C, HAU J. Quantification of cortisol, cortisol immunoreactive metabolites, and immunoglobulin A in serum, saliva, urine, and feces for noninvasive assessment of stress in reindeer[J]. *Revue Can De Recherche Veterinaire*, 2006, 70(2): 151-154.
- [2] HARPER J M, AUSTAD S N. Fecal glucocorticoids: a noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents[J]. *Physiol Biochem Zool*, 2000, 73(1): 12-22.
- [3] LUNDBERG U. Stress hormones in health and illness: the roles of work and gender[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2005, 30(10): 1017-1021.
- [4] SAPOLSKY R M, ROMERO L M, MUNCK A U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions[J]. *Endocr Rev*, 2000, 21(1): 55-89.
- [5] SAPOLSKY R M, DONNELLY T M. Vulnerability to stress-induced tumor growth increases with age in rats: role of glucocorticoids[J]. *Endocrinology*, 1985, 117(2): 662-666.
- [6] MOORE I T, GREENE M J, LERNER D T, et al. Physiological evidence for reproductive suppression in the introduced population of brown tree snakes (*Boiga irregularis*) on Guam[J]. *Biol Conserv*, 2005, 121(1): 91-98.
- [7] NARDOCCI G, NAVARRO C, CORTÉS P P, et al. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 40(2): 531-538.
- [8] MANNING A, DAWKINS M S. An introduction to animal behaviour [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2012.
- [9] BERGA S L. Stress and reproduction: a tale of false dichotomy? [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(3): 867-868.
- [10] HE L, WANG W X, LI L H, et al. Effects of crowding and sex on fecal cortisol levels of captive forest musk deer[J]. *Biol Res*, 2014, 47: 48.
- [11] PEDERSEN A B, GREIVES T J. The interaction of parasites and resources cause crashes in a wild mouse population[J]. *J Anim Ecol*, 2008, 77(2): 370-377.
- [12] LAFFERTY K D, HOLT R D. How should environmental stress affect the population dynamics of disease? [J]. *Ecol Lett*, 2003, 6(7): 654-664.
- [13] CLARK J D, RAGER D R, CALPIN J P. Animal well-being. II. Stress and distress[J]. *Lab Anim Sci*, 1997, 47(6): 571-579.
- [14] CORLATTI L. Fecal cortisol metabolites under anonymized sampling: robust estimates despite significant individual heterogeneity[J]. *Ecol Indic*, 2018, 95: 775-780.
- [15] GRAHAM L H, BROWN J L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids[J]. *Zoo Biol*, 1996, 15(1): 71-82.
- [16] MÖHLE U, HEISTERMANN M, PALME R, et al. Characterization of urinary and fecal metabolites of testosterone and their measurement for assessing gonadal endocrine function in male nonhuman Primates[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 129(3): 135-145.
- [17] PALME R. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1046: 75-80.
- [18] TOUMA C D, PALME R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1046: 54-74.
- [19] 杨吉生. 牛黄、蟾酥、麝香、五灵脂、鹿茸——解读几种

- 名贵中药材的来源[J]. 家庭中医药, 2014, 21(3):56-57.
- [20] 刘肇邦, 程建国, 代晓阳. 圈养林麝球虫病的地域分布及对策[J]. 中国草食动物, 2002, 22(3): 46.
- [21] 赵贵军, 封孝兰, 陈强, 等. 重庆市圈养林麝球虫感染情况调查[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013, 29(11): 112, 110.
- [22] JOLLEY W R, BARDSLEY K D. Ruminant coccidiosis[J]. Vet Clin N Am Food Animal Pract, 2006, 22(3): 613-621.
- [23] 林海, 程建国, 蔡永华, 等. 林麝捻转血矛线虫的分子鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(7): 597-599.
- [24] 李瑞香, 韩力康. 林麝前后盘吸虫病与细颈囊尾蚴病混合感染的防控[J]. 养殖与饲料, 2017(12): 90-91.
- [25] 陈冬, 程建国, 蔡永华, 等. 多拉菌素和芬苯咪唑对林麝毛首线虫(鞭虫)的驱虫试验[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(1): 101-103.
- [26] 王宇, 程建国, 付文龙, 等. 四川省某养麝场林麝内寄生虫感染情况调查[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(5): 379-382.
- [27] HU X L, WEI Y T, HUANG S L, et al. Effects of breeding center, age and parasite burden on fecal triiodothyronine levels in forest musk deer[J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0205080.
- [28] MASON G J. Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method[J]. Trends Ecol Evol, 2010, 25(12): 713-721.
- [29] RICH E L, ROMERO L M. Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 288(6): R1628-R1636.
- [30] KÜNZL C, KAISER S, MEIER E, et al. Is a wild mammal kept and reared in captivity still a wild animal? [J]. Horm Behav, 2003, 43(1): 187-196.
- [31] MILLER G E, CHEN E, ZHOU E S. If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans[J]. Psychol Bull, 2007, 133(1): 25-45.
- [32] DESTREZ A, BOISSY A, GUILLOTEAU L, et al. Effects of a chronic stress treatment on vaccinal response in lambs[J]. Animal, 2017, 11(5): 872-880.
- [33] 赵玲爱, 李亚红, 王保星. 林麝人工繁殖技术[J]. 陕西林业, 2009(5): 45.
- [34] 韩增胜, 杨长锁, 李青旺, 等. 林麝生殖生理和繁殖性能观察研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(6): 103-106.
- [35] 王洪永, 蔡永华, 程建国. 圈养林麝繁殖参数研究[J]. 中国草食动物, 2009, 29(5): 63-65.
- [36] BORYSENKO M, BORYSENKO J. Stress, behavior, and immunity: animal models and mediating mechanisms[J]. Gen Hosp Psychiatry, 1982, 4(1): 59-67.
- [37] MARTIN L B. Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything[J]. Gen Comp Endocrinol, 2009, 163(1/2): 70-76.
- [38] HUO H H, YIN S T, JIA R, et al. Effect of crowding stress on the immune response in turbot (*Scophthalmus maximus*) vaccinated with attenuated *Edwardsiella tarda*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 67: 353-358.
- [39] OWEN-ASHLEY N T, HASSELQUIST D, WINGFIELD J C. Androgens and the immunocompetence handicap hypothesis: unraveling direct and indirect pathways of immunosuppression in song sparrows[J]. Am Nat, 2004, 164(4): 490-505.
- [40] DHABHAR F S, MCEWEN B S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking[J]. Brain Behav Immun, 1997, 11(4): 286-306.
- [41] RIGBY M, MORET Y. Life-history trade-offs with immune defenses[M]. Amsterdam: Evolutionary Biology of Host-Parasite Relationships: Theory Meets Reality Elsevier, 2000: 129-143.
- [42] MUEHLENBEIN M P, WATTS D P. The costs of dominance: testosterone, cortisol and intestinal parasites in wild male chimpanzees[J]. Biopsychosoc Med, 2010, 4: 21.
- [43] HERNANDEZ S E, STRONA A L S, LEINER N O, et al. Seasonal changes of faecal cortisol metabolite levels in *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae) and its association to life histories variables and parasite loads[J]. Conserv Physiol, 2018, 6(1): coy021.
- [44] HING S, NORTHOVER A S, NARAYAN E J, et al. Evaluating stress physiology and parasite infection parameters in the translocation of critically endangered woylies (*Bettongia penicillata*)[J]. EcoHealth, 2017, 14(Suppl 1): 128-138.
- [45] STRONA A L S, LEVENHAGEM M, LEINER N O. Reproductive effort and seasonality associated with male-biased parasitism in *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae) infected by *Eimeria* spp. (Api Complexa: Eimeriidae) in the Brazilian cerrado[J]. Parasitology, 2015, 142(8): 1086-1094.
- [46] OPPLIGER, CLOBERT, LECOMTE, et al. Environmental stress increases the prevalence and intensity of blood parasite infection in the common lizard *Lacerta vivipara*[J]. Ecol Lett, 1998, 1(2): 129-138.
- [47] PELLETTIER F, PAGE K A, OSTIGUY T, et al. Fecal counts of lungworm larvae and reproductive effort in Bighorn sheep, *Ovis canadensis*[J]. Oikos, 2005, 110(3): 473-480.
- [48] LEIVESLEY J A, BUSSIÈRE L F, PEMBERTON J M, et al. Survival costs of reproduction are mediated by parasite infection in wild Soay sheep[J]. Ecol Lett, 2019, 22(8): 1203-1213.
- [49] LORETTO D, VIEIRA M V. The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphis aurita* wied-neuwied, 1826)[J]. J Mammal, 2005, 86(2): 287-293.
- [50] SPEAKMAN J R. The physiological costs of reproduction in small mammals[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008, 363(1490): 375-398.
- [51] SANCHEZ A, DEVEVEY G, BIZE P. Female-biased infection and transmission of the gastrointestinal nematode *Trichuris arvicolae* infecting the common vole, *Microtus arvalis*[J]. Int J Parasitol, 2011, 41(13/14): 1397-1402.