

新疆和静县黑头羊犬新孢子虫的检测及分子鉴定

吾力江·卡马力¹, 马伟², 贾舒安², 艾日登才次克^{2,*}

(1. 新疆畜牧科学院兽医研究所, 新疆 乌鲁木齐 830010; 2. 新疆维吾尔自治区动物卫生监督所)

摘要:犬新孢子虫是一种细胞内原生动植物寄生虫, 可导致包括绵羊和山羊在内的多种哺乳动物流产和新生胎儿死亡。本研究为了预估巴音郭楞蒙古自治州和静县黑头羊中犬新孢子虫的流行情况, 采集了 8 个乡镇的 165 份血样, 运用聚合酶链式反应(PCR)扩增犬新孢子虫 Nc5 基因片段, 并对部分阳性产物进行基因测序。结果显示, 在 165 只黑头羊中有 13 只(7.9%)检测到犬新孢子虫阳性; 年龄、流产史、饲养犬只与感染率有统计学差异($P < 0.05$); 2 岁以上的母羊感染率最高, 有流产史的母羊, 新孢子虫感染率较高。饲养场地周边犬的存在对感染率也有所影响, 有饲养犬的羊群感染率 11.4%, 高于未饲养犬的羊群。将 Nc5 基因的部分序列与 GenBank 上传的基因序列进行比对, 结果显示同源率为 92%~100%。本研究是首次对和静县黑头羊犬新孢子虫进行系统进化分析, 为犬新孢子虫病防控方案的制订提供参考, 对减少畜牧业的经济损失具有实际意义。

关键词:黑头羊; 犬新孢子虫; 分子鉴定

[中图分类号] S852.72⁺3 [文献标识码] A [文章编号] 1004-6704(2023)03-0005-04

Detection and Molecular Identification of *Neospora Caninum* in Scapegoat in Hejing County

WULJIANG Ka-mali¹, MA Wei², JIA Shu-an², AIRIDENG Cai-cike^{2,*}

(1. Xinjiang Academy of animal husbandry Sciences Veterinary Research Institute Urumqi, Xinjiang 830010, China;

2. Animal Health Supervision Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region)

Abstract: *Neospora caninum* is an intracellular protozoan parasite that can cause abortion and neonatal fetal death in a variety of mammals, including sheep and goats. The purpose of this study was to estimate the prevalence of neosporosis in scapegoat in Hejing County, Bayingolin Mongolian Autonomous Prefecture. PCR was used to amplify the NC5 gene fragment of neosporosis canine, and some positive products were sequenced. Results Showed that 13 of 165 scapegoat (7.9%) were positive for canine *N. caninum*. Age, abortion history, dog ownership and infection rate were significantly different ($P < 0.05$). The infection rate of ewes over 2 years old was the highest. In addition, the infection rate of neosporosis was higher in ewes with a history of abortion, and the presence of dogs around the breeding site also affected the infection rate, and the infection rate of sheep with dogs 11.4%, was higher than that of sheep without dogs. The partial sequence of NC5 gene was compared with that of NC5 gene stored in GenBank, and the homology of NC5 gene was 92%~100%. To our knowledge, this is the first phylogenetic analysis of *N. caninum* in scapegoat from Hejing county. This information is important for designing control schemes to reduce the economic losses of animal husbandry.

Key words: scapegoat; *Neospora caninum*; molecular identification

犬新孢子虫是原生动植物门的一种原生动植物寄生

虫, 该寄生虫被认为是导致家畜流产的主要原因之一。犬科动物是犬新孢子虫的中间宿主和终末宿主, 它能感染多种动物, 包括牛、羊、山羊、马、驴和鸟类等, 家畜感染新孢子虫病造成的经济损失不容小觑。据统计, 欧洲(荷兰、爱尔兰、瑞典、瑞士、德国、西班牙、丹麦、匈牙利、英国、芬兰、挪威)、北美洲(美国、加拿大、墨西哥)、南美(乌拉圭)、亚洲(日本、朝鲜、中国、以色列)、大洋洲(新西兰)、北非(洲)等多个国家报道有此病的流行, 流行情况不等; 尤其在畜

[收稿日期] 2022-10-11

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金计划特培项目(项目编号: 2019D03013)

[作者简介] 吾力江·卡马力(1994-), 女, 哈萨克族, 新疆霍城县人, 硕士, 实习研究员, 主要从事兽医寄生虫分子免疫学、流行病学调查等工作。E-mail: 1427514974@qq.com

*[通讯作者] 艾日登才次克(1984-), 女, 蒙古族, 新疆和静人, 硕士, 高级兽医师, 主要从事兽医实验室管理、流行病学调查等工作。E-mail: 309597977@qq.com

牧业发展国家感染率很高,如新西兰、美国、墨西哥等国普遍流行。全球每年由新孢子虫引起的经济损失,约三分之二发生在美洲。

目前,新孢子虫被认为是奶牛流产的主要原因之一,但近几年有调查报道,犬新孢子虫感染绵羊和山羊在世界范围内存在不同程度的流行率。犬新孢子虫对绵羊群体造成繁殖问题和经济损失,虽没有直接证据证明犬新孢子虫是导致绵羊与山羊发生流产的主要原因,但流产的羊群血清阳性率显著升高。

近年来,有大量研究对牛羊感染犬新孢子虫病的流行率进行了估算,但绝大部分都是以血清学诊断为主,对其进行分子诊断的研究较少。聚合酶链式反应(PCR)具有比血清学检测技术更高灵敏度和特异性,因此,是检测动物组织与血液中犬新孢子虫的最佳方法之一。

巴音布鲁克黑头羊作为新疆肉脂兼用地方优良绵羊品种之一,系巴州和静独有,黑头羊饲养对于提高广大农牧民收入、提升和静县有机畜产品的知名度和美誉度,将起到巨大的推动作用,实现社会效益和经济效益共赢。本试验旨在预估和静县部分区域分布的黑头羊中犬新孢子虫的分子流行情况,对新孢子虫病的防治具有重要作用,利于畜牧业生产中新孢子虫病的防治。

1 材料与方法

1.1 样本采集

2019年11月~2020年1月,课题组成员与和静县兽医站的村级防疫员采用静脉采血的方式,从巴音郭楞蒙古自治州和静县(干燥少雨气候)的八个地区(奥伦布鲁克村、巴西力克村、赛热木村、赛罕托海村、藏德哈德村、伊克扎克村、二乡哈尔萨拉村、二乡乌村)采集黑头羊母羊血液样本,共计165份,并记录了母羊的年龄、胎次与饲养环境是否有饲养犬等信息,采集的样品在4℃下冷藏。

1.2 主要试剂与仪器

试剂:琼脂糖、2 × Taq PCR Green Mix、ddH₂O、DL2000 Marker、pMD18-T载体、E. coli DH5α感受态细胞等购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司,犬新孢子虫基因组DNA均保存于新疆农业大学动物医学学院寄生虫实验室。

试剂盒:赛百盛树脂型TM基因组DNA提纯试剂盒(鼎国昌盛生物技术有限公司),胶回收试剂盒(美国OMEGA公司)。

仪器:RA-DIAL20台式高速离心机(西班牙ORTOALRESA公司),DK-600A型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司),摇床、振荡器、

37℃培养箱、pH计、低速瞬时离心机(鼎国昌盛生物技术有限公司),PCR仪(美国Bio-Rad公司),DYY-II型电泳仪(北京六一公司),YXQ-LS-50A立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司),BSS-SDC型BIOBASE超净工作台(鼎国昌盛生物技术有限公司)。

1.3 血液样本DNA提取、扩增

血液样本进行基因组DNA提取按商品化试剂盒厂家指导方法进行,所得DNA在-20℃冷藏进行PCR分析。本次试验运用新孢子虫Nc5基因特异性引物进行PCR分子检测。采用犬新孢子虫特异性引物,即SN/T 3499 F(5'-GGGTGAAC-CGAGGGAAT-3')和SN/T 3499 R(5'-TCGC-CAGTCAACCTACG-3')。以提取的DNA为模板进行目的基因扩增,每个扩增均使用50 μL: 2xEsTaq Master Mix 25 μL,上、下游引物各2 μL,模板DNA 2 μL,ddH₂O 19 μL。扩增:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,35个循环,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,最后72℃延伸10 min。每一个反应都是设有阴性和阳性对照(分别包括双蒸水和新疆农业大学动物医学学院寄生虫实验室保存的犬新孢子虫Nc5菌株DNA)的情况下进行的。扩增产物取5 μL产物进行1%琼脂糖凝胶电泳分析。用DNA产物纯化试剂盒对PCR产物进行纯化,将其连在pMD18-T载体上,转至E. coli DH5α大肠杆菌感受态细胞中,将成功后的菌体沉淀均匀涂布在含氨苄青霉素(100 mg/L)的LB培养基进行培养,12~17 h后进行单菌落挑取,进行PCR验证,成功获取的产物委托上海生工生物工程服务有限公司用正向和反向引物进行测序。

1.4 DNA测序和系统发育分析

测序结果用BLAST分析(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)与GenBank中的可用序列进行比对。由于本研究测序的扩增引物的相似性为99.2%,因此,比对出了NCBI GenBank中上传的11组序列,用MEGA 6.0软件分析测序结果。

1.5 统计分析

采用SPSS 19.0软件中Fisher's分类变量精确检验对新孢子虫病感染相关潜在危险因素的结果进行分析,当P < 0.05时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分子检测

所有样品均使用犬新孢子虫Nc5基因检测,对样品DNA进行目的基因扩增,检测结果显示:犬新孢子虫总感染率为7.9%(13/165)。受感染的羊群

中,大多数感染发生在 2 岁及以上的母羊中(12.2±6.8%, $P<0.05$),2 岁以下的母羊感染率最低(2.7±3.6%);此外,与无流产史羊群(6.5±3.8%)相比,有流产史羊群犬新孢子虫感染率较高(27.2±28.0%, $P<0.01$);饲养场地周边犬的存在对感染

率也有所影响,有饲养犬的羊群感染率(11.4±6.1%, $P<0.01$)高于未饲养犬的羊群(1.7±3.3%)。在考虑分层优势比后,犬新孢子虫感染的易感性与不同年龄之间没有关联,与羊群是否有流产史和有无犬的饲养存在一定的关联性。

表 1 基于 PCR 的犬新孢子虫感染率结果

岁,%

参数	阳性率(%±SEa)	Stratified ORb[95% CI]c	P 值
年龄	< 2	2/75(2.7±3.6)	0.12[0.02;0.74]
	≥2	11/90(12.2±6.8)	
流产史	有	3/11(27.2±28.0)	5.4[20.4;1.42]
	无	10/154(6.5±3.8)	
有无饲养犬	有	12/105(11.4±6.1)	7.61[4.3;13.4]
	无	1/60(1.7±3.3)	

注:aSE:标准误差;bOR:比值比;c95% CI:95% 置信区间;P 值:差异性

2.2 系统进化分析

所有测序的扩增产物都是 100% 相同的,基于所得犬新孢子虫 Nc5 序列,构建系统发育树,经测序和 BLAST 搜索比对分析发现,获得的犬新孢子虫序列与在 GenBank 中公开的犬新孢子虫序列同源率为 92%~100%。根据物种的犬新孢子虫序列比对,系统发育树显示三个簇(图 1)。第一簇序列包括来自亚洲(伊朗)、大洋洲(澳大利亚)、非洲(埃塞俄比亚);在第二簇中,序列与来自南美洲(阿根廷)、大洋洲(新西兰)、欧洲(瑞士和英国)、亚洲(蒙古国)序列接近。本试验所得到的犬新孢子虫序列(N. caninum HTY)与 N. caninum 分离物(GenBank 登录号: X84238、AY459289、EU686398、MN972456)的同源性为 100%,根据我们扩增的 NC5 基因序列和 GenBank 中的序列,构建了犬新孢子虫的系统发育树;系统发育分析显示,获得的新孢子虫序列与 N. caninum 聚为一支(图 1)。

也是巴音布鲁克区高寒草原的主体畜种之一。因此,查清影响和静县一带黑头羊发生流产的病因对当地养羊业的发展尤为重要。

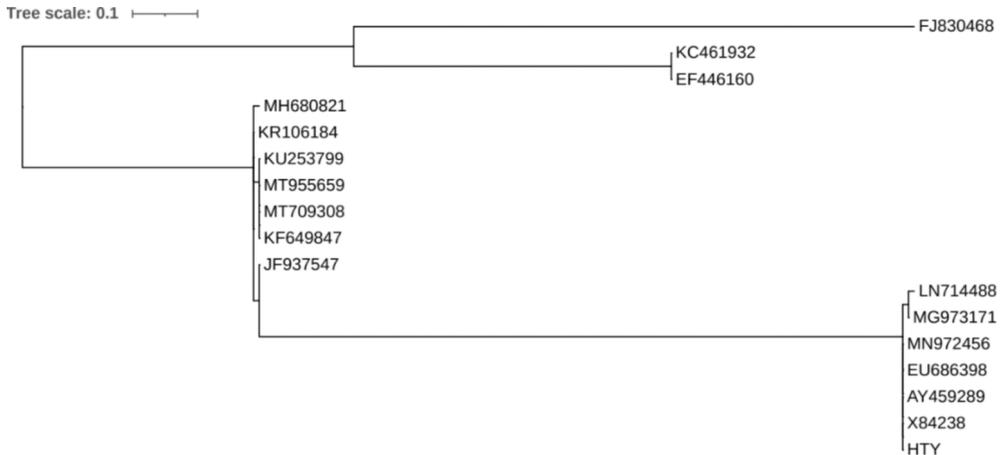


图 1 本研究根据 GenBank 中新孢子虫特异性 Nc5 位点的部分序列,对巴州和静县部分区域犬新孢子虫分离株与其他分离株进行系统发育分析

注:采用基于 Tamura-Ne 模型的极大似然法推断进化历史。采用 Bootstrap1000(1000 次重复)的 ML 法绘制系统发育树。

3 讨论

巴音布鲁克黑头羊称巴音布鲁克羊,产于和静县,是巴州的优良地方羊品种;具有早熟、耐粗饲、适应性强等优点,以产肉量高而著称,是新疆三个大尾羊品种之一。黑头羊既是巴州的当家肉用羊品种,

犬新孢子虫是一种胞内原生动物寄生虫,主要与家畜流产有关,其主要经济效应是影响包括牛和小反刍动物在内的中间宿主的繁殖能力。近年来,随着新

疆地方特色产业的不断发展,地方优良品种羊群养殖量的急剧上升,妊娠母羊发生流产的原因成为畜牧养殖业发展的瓶颈。为了帮助养殖户解决眼前的难题,课题组从和静县随机采集羊血液样品,进行布鲁氏杆菌病血清学检测,并未发现阳性病例;当地有关犬新孢子虫病的报道较少,巴音查汗等曾对和静县黑头羊进行了系统的抗原检测,犬新孢子虫的平均感染率为16.94%。缺乏犬新孢子虫的分子检测研究;因此,补充有关黑头羊新孢子虫病分子流行情况的数据尤为重要。采用PCR检测方法,检测结果更为准确;新孢子虫NC5基因对检测血液、脑组织内虫体敏感性较好,故作为本试验的诊断引物。

本次PCR检测得到的犬新孢子虫感染率(7.9%)低于先前巴音查汗等的报道(16.94%),低于近期报道的云南省乌骨羊新孢子虫血清阳性率(8.55%),高于中国中部河南一带的阳性率(7.32%)。本研究中犬新孢子虫病的感染率与流产史、有无犬的饲养有关,这与先前中国中部、北非的突尼斯报道的一致。统计分析显示,不同年龄段、有无流产史、有无犬饲养与感染率之间存在显著差异,但分层优势比显示,年龄段与感染率无关联,这与先前的报道不同,原因可能是本次选取的样本年龄段不均衡或者其他原因所致,需进一步研究证实。

对13份黑头羊新孢子虫阳性样本进行扩增、测序,确认了犬新孢子虫的感染。犬新孢子虫Nc5基因与NCBI上传的序列同源性较高(92%~100%),它们与蒙古、英国、阿根廷、新西兰等地报道的序列具有较高的同源性。本研究对巴州黑头羊犬新孢子虫的感染进行了PCR检测,初步估计了巴州黑头羊中犬新孢子虫的分子流行率。羊群饲养模式、牧羊犬的饲养,都可能是犬新孢子虫感染的风险因素;而不同年龄段与感染率无明显关联,需要进一步证实。因此,提高农牧民的疾病防范意识,可大大降低此病的感染率。

参考文献:

- [1] 姚雷,杨娜,张维,等.巢式PCR检测奶牛流产胎儿体内的新孢子虫[C].中国畜牧兽医学学会学术年会暨全国畜牧兽医青年科技工作者学术研讨会,2008.
- [2] DUBEY J P, SCHARLES G, ORTEGA-MORA L M. Epidemiology and Control of Neosporosis and Neospora caninum [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2007, 20(2): 323.
- [3] 丁德,贾立军,田万年,等.吉林株犬新孢子虫的分离与鉴定[J].中国兽医学报,2009,29(4):423-425.
- [4] DUBEY J P, CARPENTER J L, SPEER C A, et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs [J].

Journal of the American Veterinary Medical Association, 1988, 192(9): 1269-1285.

- [5] GHALMI F, CHINA B, KAIDI R, LOSSON B, et al. Neospora caninum is associated with abortion in Algerian cattle [J]. J Parasitology, 2011, 97: 1121-1124.
- [6] OSHIRO L M, MOTTA-CASTRO A R C, FREITAS S Z, et al. Neospora caninum and Toxoplasma gondii serodiagnosis in human immunodeficiency virus carriers [J]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2015, 48(5): 568-572.
- [7] TIROSH-LEVY S, STEINMAN A, MINDERIGIU A, et al. High Exposure to Toxoplasma gondii and Neospora Spp. in Donkeys in Israel: Serological Survey and Case Reports[J]. Animals, 2020, 10(10).
- [8] SEYEDEH S R, FARNAZ M, MOUSA T. Neospora caninum, a cause of abortion in donkeys (Equus asinus) in Iran [J]. Parasitology Research, 2022, 121: 367-372.
- [9] SOARES H S, AHID S, BEZERRA A, et al. Prevalence of anti-Toxoplasma gondii and anti-Neospora caninum antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil [J]. Veterinary Parasitology, 2009, 160(3-4): 211-214.
- [10] GHATTOF H H, FARAJ A A. Seroprevalence of Neospora caninum in goats in Wasit province, Iraq [J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 2015, 4: 182-191.
- [11] RAVINDRA N S. Seroprevalence of Neospora caninum in Sheep and Goats from Grenada, West Indies [J]. Journal of Veterinary Medicine, 2015, (11): 219-223.
- [12] REICHEL M P, MA A, GONDIM L, et al. What is the global economic impact of Neospora caninum in cattle the billions dollar question [J]. International journal for parasitology, 2012, 43(2).
- [13] 艾力江·排力丁,吉尔格力,库尔班·艾山,等.巴州部分地区黑头羊新孢子虫病的循环抗体检测[J].新疆畜牧业,2014(9):30-31.
- [14] 吾力江,道尔加拉,郝蕴伟,等.蒙古国科布多省牛新孢子虫病PCR诊断初报[J].畜牧与兽医,2020,52(7):4.
- [15] 孙黎秀.云南省乌骨羊弓形虫、新孢子虫、衣原体及蓝舌病病毒血清流行病学调查[D].北京:中国农业科学院,2020.
- [16] WANG S, LI L, LU Y. Seroprevalence and risk factors of Neospora caninum infection among domestic sheep in Henan province, central China[J]. Parasite, 2018, 25, 15.