

# The Report of *Anaplasma marginale* and *Babesia bovis* Mixed Infection in Cattle in Part of Area Yili

Yuan Meng<sup>1</sup>, Chunyang Yi<sup>2</sup>, Min Wu<sup>1</sup>, Wuerna Ming<sup>2</sup>, Yang Zhang<sup>2</sup>, Ba Yinchahan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi Xinjiang

Email: \*644359734@qq.com

Received: Nov. 2<sup>nd</sup>, 2015; accepted: Nov. 28<sup>th</sup>, 2015; published: Dec. 2<sup>nd</sup>, 2015

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

To explore the situation of *Anaplasma marginale* and *Babesia bovis* mixed infection in part of area Yili, Xinjiang, this experiment collected suspected bovine blood in Xinyuan and Tekes county of Yili and designed and synthesized primer based on 16S rRNA gene conserved sequence, DNA extraction for PCR detection. Results showed that: *Anaplasma marginale* infection rate was 20% (40/200) and *Babesia bovis* infection rate was 40% (80/200); mixed infection rate was 30% (60/200) in cattle in Xinyuan county; *Anaplasma marginale* infection rate was 30% (120/400) and *Babesia bovis* infection rate was 40% (160/400), and mixed infection rate was as high as 45% (180/400) in Tekes county. These results provide the data base for *Anaplasmosis and Babesiosis* prevention in cattle Xnjiang.

## Keywords

Yili, *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, Infection Rate

# 伊犁部分牛边缘无浆体与牛巴贝斯虫混合感染情况报告

孟元<sup>1</sup>, 伊春阳<sup>2</sup>, 吴敏<sup>1</sup>, 明·乌尔娜<sup>2</sup>, 张杨<sup>2</sup>, 巴音查汗<sup>2\*</sup>

\*通讯作者。

<sup>1</sup>浙江大学生科院, 浙江 杭州

<sup>2</sup>新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐

Email: \*644359734@qq.com

收稿日期: 2015年11月2日; 录用日期: 2015年11月28日; 发布日期: 2015年12月2日

## 摘 要

为探究新疆伊犁部分地区牛边缘无浆体与牛巴贝斯虫病的感染情况。本试验通过采集伊犁新源和特克斯县疑似牛全血, 并根据16S rRNA基因保守序列, 设计并合成引物, 提取病原DNA, 进行PCR检测。结果显示, 新源县牛边缘无浆体的感染率为20% (40/200)而牛巴贝斯虫的感染率为40% (80/200), 其混合感染率为30% (60/200); 特克斯县牛边缘无浆体的感染率为30% (120/400)而牛巴贝斯虫的感染率为40% (160/400), 混合感染率高达45% (180/400)。为我区牛边缘无浆体与牛巴贝斯虫病的防治提供数据基础。

## 关键词

伊犁, 边缘无浆体, 巴贝斯虫, 感染率

## 1. 引言

边缘无浆体病是由边缘无浆体(*Anaplasma marginale*)寄生于牛红细胞边缘, 经蜱传播而引起以发热、贫血、黄疸、食欲不振、消瘦等为主要症状的一种传染性无浆体病[1]-[4]巴贝斯虫病是由牛巴贝斯虫(*Babesia bovis*)寄生于牛红细胞胞浆内, 经蜱传播的血液原虫病, 该病与牛边缘无浆体病相似, 亦可引起黄疸、发热等症状。这两种病原均寄生于牛类动的红细胞往往导致混合感染, 其病原血液涂片检查诊断时不易区分, 会造成漏检或者误检。因此, 经鉴别诊断方法来调查了解这两种病的感染情况是对新疆牛类动物蜱传病的综合防治具有重大意义。

## 2. 试验材料与方

### 2.1. 血液样品来源

分别从伊犁新源县及特克斯县采集疑似牛耳尖或尾根部血液 200 份及 400 样品, 先制血膜片后, 分别加入到含有抗凝剂 EDTA 溶液的抗凝管(用于核酸提取)中, -20℃ 保存待检。

### 2.2. 血液涂片染色及镜检

用了改良血液涂片法, 即姬姆萨和瑞氏复合染料染色法进行染色。复合染料 I 的制备: 取瑞氏粉 2 g, 姬姆萨色素 1.7 g, 置研钵中, 加 50 ml 甘油研磨调成均匀糊状后缓慢加入少量甲醇, 研磨片刻将上层液体移入棕色试剂瓶内, 再加少量甲醇, 继续研磨, 再吸出上层染液, 如此连续几次, 共用甲醇 1000 ml。复合染料 II 的制备: 取磷酸二氢钾(无水) 0.3 g, 磷酸氢二钠(无水) 0.23 g 置于烧杯中, 加入少量蒸馏水溶解, 用磷酸盐缓冲液调 PH 至(6.5~6.8)后加水至 1000 ml。

复合染料染法的步骤: 将制作好的血液涂片放入甲醇中固定 5~10 min, 自然晾干; 将其放入复合染料 I 中 1.5 min, 取出; 迅速侵入复合染料 II 中 1~2 min, 取出; 将其冲洗(血涂片区域以外没有染料残留), 自然晾干; 在显微镜下(10×100 的油镜)进行观察。

**Table 1.** *Anaplasma marginale* and *Babesia bovis* in cattle mixed infection in Xinyuan and Tekes county, Yili  
**表 1.** 伊犁新源县/特克斯县牛边缘无浆体与牛巴贝斯虫混合感染情况

采样地区	<i>B. bovis</i> 阳性率	<i>A. marginale</i> 阳性率	混合感染率
新源县	40% (80/200)	20% (40/200)	30% (60/200)
特克斯县	30% (120/400)	40% (160/400)	45% (180/400)

### 2.3. 血样核酸提取及 PCR 检测

采用全血、组织 DNA 提取试剂盒说明书的方法提取 DNA。首先根据 GenBank 中牛边缘无浆体和牛梨形虫的 16S rRNA 基因保守序列, 设计引物。以提取的蜱虫基因组 DNA 为模板, 进行目的片段的扩增。

血样核酸的提取:

1) 离心管内加入吸 200  $\mu$ L 全血、20  $\mu$ L 蛋白酶 K 和 200  $\mu$ L Buffer AL, 振荡混匀 15 s, 56 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。加入 200  $\mu$ L 无水乙醇, 振荡混匀。

2) 将 QIAamp spin column 和 collection tube 组合, 上一步骤中制备的液体移入 QIAamp spin column 中, 6 000 g 离心 1 min, 小心弃去滤液。

3) 将 QIAamp spin column 与新的 collection tube 组合, 加 500  $\mu$ L Buffer AW1, 6000 g 离心 1 min, 小心弃去滤液。

4) 将 QIAamp spin column 与新的 collection tube 组合, 加 500  $\mu$ L Buffer AW2, 18,000 g 离心 3 min, 小心弃去滤液。12,000 g 离心 1 min 去除残留溶液。

5) 将 QIAamp spin column 与新的 1.5 mL 离心管组合, 小心加 200  $\mu$ L Buffer AE 于膜中央, 室温放置 1 min, 6000 g 离心 1 min 洗脱 DNA。

反应体系为 25  $\mu$ L, 2  $\times$  Es Taq MasterMix 体积为 12.5  $\mu$ L; 上、下游引物各 1  $\mu$ L; DNA 模板 1.5  $\mu$ L; 灭菌去离子水加 8.5  $\mu$ L。然后运用建立好的 PCR 方法来检测样品, PCR 反应参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火时间为 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存; 设计阳性对照(牛巴贝斯虫 DNA 和牛边虫 DNA)、阴性对照(健康牛全血 DNA)和空白对照(无菌双蒸水)。

### 3. 实验结果

对来自伊犁新源县的 200 样品及特克斯县的 400 样品进行了检测和鉴别诊断。结果显示: 新源县牛边缘无浆体的感染率是 20% (40/200)而牛巴贝斯虫的感染率是 40% (80/200), 其混合感染率是达 30% (60/200); 特克斯县牛边缘无浆体的感染率是 30% (120/400)而牛巴贝斯虫的感染率是 40% (160/400), 混合感染率是达 45% (180/400), 详见表 1。

### 4. 讨论

本次试验结果表明牛边缘无浆体病和牛巴贝斯虫病在新疆存在混合感染的情况, 牛边缘无浆体在特克斯县感染强度较高, 而牛巴贝斯虫病在新源县较高, 其它疫区需要进一步调查研究。目前, 周作勇等 [5]从分子水平上证实了重庆市牛无浆体的存在; 我区对于牛无浆体的流行病学资料稀少, 相关报道甚少。但新疆媒介蜱虫数量多, 每年有 80% 的草食家畜被蜱虫叮咬, 故牛边缘无浆体和巴贝斯虫的感染呈上升趋势, 应该加强这方面的检测监控及尽防治对策。

### 基金项目

自治区科技支疆项目计划(项目编号: 2013911061)资助。

### 参考文献 (References)

- [1] 杜凯. 边缘无浆体病分子诊断 ELISA 和温氏附红细胞体 PCR 检测方法的建立[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [2] 党志胜, 蒋锡仕, 黄孝纷. 我国牛羊边虫及边虫病的研究现状[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2003, 4(33): 39-41.
- [3] 吴鉴三. 牛边缘无浆体病的研究进展[J]. 动物检疫, 1992, 2(9): 23-25.
- [4] 倪宏波, 姜海芳. 牛无浆体病的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 2010(9): 42-43.
- [5] 周作勇, 聂奎, 唐成, 等. 牛无浆体 16S rRNA 基因的克隆测序及分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(10): 1359-1363.