

The Detection and First Reports of Neospora Infections in Horses in around Hejing Town

Hua Zhong¹, Tumengkai Ba¹, Yilite Da², Bayincaicike Que², Qianlin Chen³, Yinchahan Ba^{3*}

¹Hejing Town Veterinary Station, Hejing Xinjiang

²Bayinbuluk Veterinary Station, Bayinbuluk Xinjiang

³Xinjiang Agricultural University, Urumqi Xinjiang

Email: *2100298748@qq.com

Received: Jun. 19th, 2015; accepted: Jul. 3rd, 2015; published: Jul. 6th, 2015

Copyright © 2015 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

In order to investigate the infections of Neospora in horses in around Hejing, DNA was extracted from 56 bloods of horses and they were amplified using specific primer to diagnose and inspect the positive samples of Neospora. The result showed that the positive rates of Neospora were 8.93% (5/56). Combining the analysis rearing environment of horses, we found that horses and dogs were contacted and that they were infected with Neospora. The experimental parameters provide the town's backyard horses of Neospora infection for future long-term studies and provide a reliable basis of healthy aquaculture awareness for farmers.

Keywords

Horses, Neospora, Blood DNA, PCR Detection

和静镇周围散养马感染新孢子虫的检查初报

钟 华¹, 巴图孟开¹, 达伊力特², 缺巴音才茨克², 陈千林³, 巴音查汗^{3*}

¹和静镇兽医站, 新疆 和静

²巴音布鲁克兽医站, 新疆 巴音布鲁克

³新疆农业大学, 新疆 乌鲁木齐

Email: *2100298748@qq.com

*通讯作者。

收稿日期：2015年6月19日；录用日期：2015年7月3日；发布日期：2015年7月6日

摘要

为了解静镇周围农户散养马感染新孢子虫的情况，笔者应用PCR方法，对随机采集的56匹马全血样品进行了DNA提取、经PCR检测，诊断是否有阳性样品。实验结果：所提取的56份全血DNA中，新孢子虫的阳性率为8.93% (5/56)；结合该马饲养环境分析、了解到被检马匹均与犬接触过，导致了新孢子虫的感染。该实验参数可为以后预防该镇散养马新孢子虫的感染及提高农户健康养殖意识等提供可靠的依据。

关键词

马，新孢子虫，全血DNA，PCR检查

1. 引言

新孢子虫病(*Neosporosis*)是由犬新孢子虫(*Neospora caninum*)引起的一种主要寄生于宿主细胞内的原虫病，1984年首次在挪威的幼犬内发现，1988年Dubey博士将其命名为犬新孢子虫[1]。牛、羊、马等多种野生哺乳动物都可以作为它的中间宿主，犬是该寄生虫的终末宿主兼中间宿主[2]，可通过垂直传播和水平传播[3]。主要造成母牛流产、产死胎以及新生儿的运动神经系统疾病，且临床症状因地区的不同存在着不同的差异。流产特征呈散发性或地方性流行，一年四季均可发生[3]。新孢子虫病呈世界性分布，广泛存在于欧洲、美国和新西兰等30个国家。近年来，在我国北京、新疆、青海、吉林和上海等地区均发现有该病的存在[4]。

随着马产业的发展和农户养马数量的提高，该病的流行在我国马群中也呈上升趋势，给养殖业也造成了严重的经济损失，如今马匹质量、赛马规模、马术水平也是体现国力的标志[5]。然而，患病马常会影响肉、奶等产品的质量，以及马的生育率[6]，损害牧民收入，甚者影响马养殖业的健康发展。和静镇的经济支柱产业主要是农业和畜牧业，再者，当地蒙古族(马背民族)较多且都喜欢养殖马匹，这也直接或间接的影响着这里的农户。故对和静镇周围散养马感染新孢子虫情况调查对今后马产业健康稳定的发展具有一定的现实意义。

2. 材料与方法

2.1. 试剂与主要仪器材料

试剂：树脂型基因组DNA提取试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司；DL2000Marker、2 × Es Taq MasterMix 购自北京康为世纪生物科技有限公司。

主要仪器材料：RADIAL20台式高速离心机(西班牙ORTO ALRESA公司)；DK-600A型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)；DYY-III-5型电泳仪(北京六一公司)；PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

2.2. 引物的合成

参照文献[7]合成一对检测新孢子虫病的特异性引物，目的基因全长约635 bp，由上海生物工程有限公司合成。

上游引物 TOX4: 5'-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3'

下游引物 TOX5: 5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3'

2.3. 样品采集及全血 DNA 的提取

2.3.1. 样品采集

样品随机采集于巴音布鲁克镇周边的散养马(N = 56), 包括牧民散养的珍贵走马和赛马、使役马等(无任何临床症状)。

2.3.2. 全血 DNA 的提取

取 200 μL 新鲜, 冷冻或加入各种抗凝剂的血液, 放入 1.5 mL 离心管。加入 20 μL Proteinase K 溶液涡旋震荡混匀, 而后, 按照血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作, 将提取的全血 DNA 放置于 -4°C 保存, 以备备用。

2.4. 操作方法

PCR 是一种诊断新孢子虫病的有效工具[8], 以提取的马全血 DNA 为模板, 进行目的片段的扩增, 反应体系为 25 μL , 具体反应体系如下:

10X PCR Buffer	2.5 μL
dNTPs	2 μL (浓度0.2 $\mu\text{mol/L}$)
引物TOX4:	1 μL (浓度0.3 $\mu\text{mol/L}$)
引物TOX5:	1 μL (浓度0.3 $\mu\text{mol/L}$)
Taq DNA聚合酶	0.2 μL (浓度0.625 U)
模板DNA:	2 μL
灭菌双蒸水	16.3 μL

采用的PCR反应程序如下: 94°C 5min 55°C 17min 72°C 2min 72°C 10min; 4 保存, 35个循环。

PCR 产物的检测: 取适量 PCR 产物和 $6 \times$ Loading Buffer 上样缓冲液充分混匀, 配制 1%琼脂糖凝胶电泳检测。拍照后判断结果。

3. 试验结果

3.1. 全血基因组 DNA 提取结果

严格按照组织基因组快速提取试剂盒的操作步骤, 采用蛋白激酶 K 裂解法提取模板 DNA, 并取适量对其进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 得到清晰且亮度高的电泳条带(见图 1), 由此证明模板 DNA 提取成功。

3.2. 马新孢子虫病 PCR 检测结果

对 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 阳性对照扩增出预期大小的目的条带, 阴性对照无条带, 检测的 56 份血样中, 其中 5 份为阳性, 因此新孢子虫病感染率为 8.93% (5/56), 见图 2。

4. 讨论与小结

和静地形呈东西长, 南北宽, 西北高, 东南低, 分为山间盆地、山地峡谷和山前平原三部分, 总面积 39,686 平方公里。境内多山、多河, 水源丰沛。和静气候属中温带大陆性气候, 可利用草场 3077 万亩, 是新疆发展畜牧业生产的一个主要基地。近年来由于新疆马产业的发展, 马匹的健康问题日益受到关注, 尤其是马作为一种经济动物, 它的生产问题就显得尤为重要。流产对于马产业的危害甚重, 分析其病因, 主要是传染病和寄生虫病引起。众所周知, 布病对于家畜危害严重, 但在一些调查中发现, 部分家畜流产并不是由布病引起。

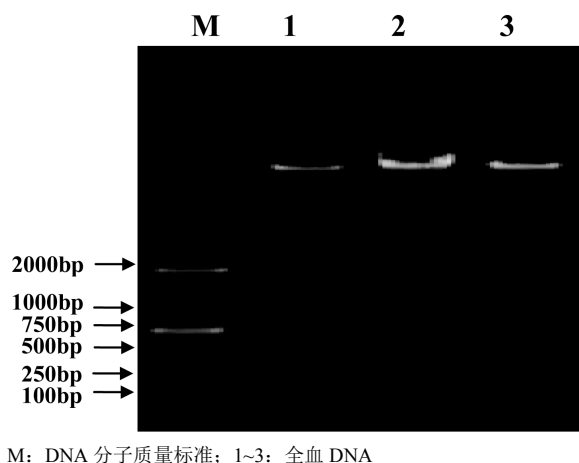


Figure 1. Whole blood genomic dna of horse

图 1. 马全血部分基因组 DNA

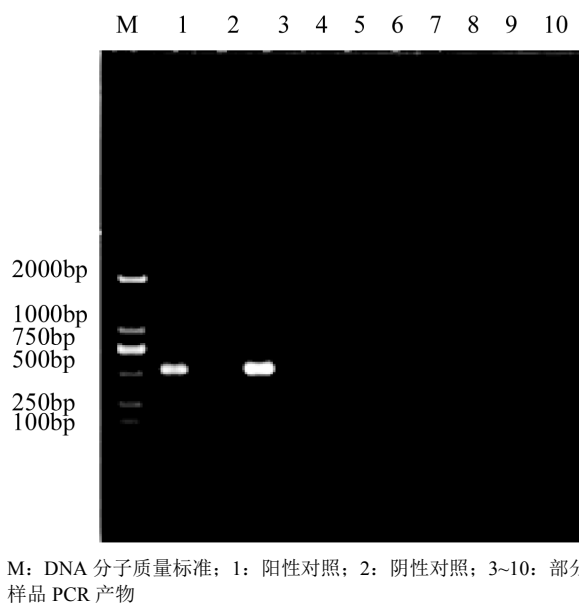


Figure 2. PCR examination of equine Neospora

图 2. 马新孢子虫 PCR 检查

新孢子虫病是近几年被世界各国学者和畜牧业工作人员广泛关注和认识的疾病，该病可引起妊娠母畜流产，进而造成巨大的经济损失。由于新孢子虫感染马的报道甚少。因此本研究对和静镇周围散养马感染新孢子虫病情况进行了调查，结果表明，所检样品新孢子虫阳性率为 8.93% (5/56)，说明该县马匹存在新孢子虫病感染。该结果为和静镇乃至新疆马匹新孢子虫病流行病学提供了数据资料。

由于新孢子虫病常用检测方法为 ELISA 检测法，因此后续会对采集的相应血清进行新孢子虫抗体检测。

犬作为新孢子虫病的中间宿主及终末宿主，对其它动物(包括马)感染此病起到了至关重要的影响[9]。因此，笔者进行马感染新孢子虫情况检查的同时，调查发现在采样点所有畜主家均有养犬现象，且有流浪犬在此周围活动，经犬粪传播了病原，造成了马感染新孢子虫，这与闫双[10]等报到结果一致。建议迎来新孢子虫疫苗[11]以前，各个饲养马的畜主改善饲养环境，犬畜分离，并定期进行预防性驱虫。

项目基金

自治区科技厅成果处, 科技成果转化专项资金项目(项目编号: 201454129)资助。

参考文献 (References)

- [1] Lindsay, D.S., Dubey, J.P. and Duncan, R.B. (1999) Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, **4**, 327-333. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00054-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00054-0)
- [2] 王常汉, 巴音查汗, 王振宝, 等 (2008) 新孢子虫病研究进展. *草食家畜*, **2**, 1-6.
- [3] 张宁, 赵博伟, 胡晓悦, 等 (2013) 牛新孢子虫病最新研究进展. *上海畜牧兽医通讯*, **1**, 10-13.
- [4] 徐晓芳, 邢沈阳, 李建华, 等 (2011) 新孢子虫病检测方法研究进展. *中国病原生物学杂志*, **6**, 311-314.
- [5] 姚新奎, 欧阳文, 谭晓海 (2007) 新疆特色马产业探析. *新疆农业科学*, **2**, 199-205.
- [6] 聂明达 (2012) 我国竞技马产业发展的探讨. *黑龙江畜牧兽医*, **12**, 19-20.
- [7] 郭庆勇, 唐志玲, 陈亮, 等 (2010) 奶牛流产病因探究及新孢子虫病 PCR 检测方法的建立. *新疆农业科学*, **11**, 2324-2328.
- [8] Gottstein, B., Hentrich, B., Wyss, R., et al. (1998) Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *International Journal for Parasitology*, **28**, 679-691. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00006-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00006-X)
- [9] 马少丽, 马利青 (2006) 绒山羊犬新孢子虫病的血清学调查. *中国兽医杂志*, **9**, 25-26.
- [10] 闫双, 陈亮, 巴音查汗, 等 (2012) 牛新孢子虫病在新疆地区流行情况调查. *黑龙江畜牧兽医*, **10**, 98-100.
- [11] 武晓燕, 黄晓红, 等 (2010) 新孢子虫侵入宿主细胞的研究进展. *生命科学*, **9**, 873-877.