

# Serological Investigation of Neosporosis in Habahe County

Jiazi Guli<sup>1,2</sup>, Lijiang Wu<sup>2</sup>, Lamu Saidi<sup>2</sup>, Chahan Bayin<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Aletai Habahe Animal Husbandry Bureau, Habahe Xinjiang

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

Email: \*1427514974@qq.com

Received: Jul. 4<sup>th</sup>, 2018; accepted: Jul. 17<sup>th</sup>, 2018; published: Jul. 24<sup>th</sup>, 2018

---

## Abstract

In order to further investigate the infection of Neosporosis in Habahe County, the recombinant protein NcSRS2 was used as coating antigen and 118 bovine serum samples from 3 townships in Habahe County were randomly selected for detection of Neosporosis by rELISA assay. The test results showed that the positive rate of neosporosis was 4.23% (5/118). Through this experiment, we basically understood and mastered the infection of Neosporosis in Habahe County and monitored the infection of Neosporosis in the future. And preventive measures provide reference data.

## Keywords

Cattle, Neosporosis, rELISA, Detection

---

# 哈巴河县牛新孢子虫病的血清学调查

古丽加孜<sup>1,2</sup>, 吾力江<sup>2</sup>, 赛迪拉木<sup>2</sup>, 巴音查汗<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>阿勒泰地区哈巴河县畜牧局, 新疆 哈巴河

<sup>2</sup>新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐

Email: \*1427514974@qq.com

收稿日期: 2018年7月4日; 录用日期: 2018年7月17日; 发布日期: 2018年7月24日

---

## 摘要

为进一步调查哈巴河县牛新孢子虫病的感染情况, 本次运用重组蛋白NcSRS2作为包被抗原, 随机采自哈

\*通讯作者。

巴河县三个乡镇的118份牛血清样品并进行了新孢子虫病rELISA方法检测。检测结果显示：牛新孢子虫病的阳性率4.23% (5/118)；通过本次检测，基本了解和掌握了哈巴河县牛新孢子虫病的感染情况，为今后新孢子虫病的监控和防范提供了参考数据。

## 关键词

牛, 新孢子虫病, rELISA, 检测

Copyright © 2018 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

## 1. 引言

新孢子虫病(Neosporiasis)是一种由犬新孢子虫(*Neospora caninum*)引起的全球性寄生虫病[1]。属原生动物门, 顶复亚门, 孢子虫纲, 球虫亚纲, 真球虫目, 肉孢子虫科, 新孢子虫属[2]。新孢子虫可感染牛等多种动物, 造成母畜流产、产出木乃伊胎、死胎、繁殖障碍等经济损失[3] [4] [5] [6]。还能使患病动物体重减轻、营养不良, 造成产奶量下降和饲养费用的浪费, 以及产生对奶牛的扑杀、更换、对环境造成污染所带来间接的费用和损失。在国内, 刘群等[7]第一次检出奶牛血清中新孢子虫阳性抗体, 证实了新孢子虫在我国牛场中是有的, 之后在新疆、甘肃等地方的羊群里也相继报道了新孢子虫病的存在[8] [9]。巴音查汗等[10]首先使用了重组抗原进行 rELISA 检测方法, 对南疆部分地区进行新孢子虫病流行病学研究, 关于阿勒泰地区新孢子虫感染数据也在不断的更新中。用透射电镜观察新孢子虫病原体的超微结构, 速殖子的结构和弓形虫相似, 但新孢子虫速殖子的棒状形电子密集度很高, 而弓形虫的棒状体呈蜂窝形。目前还没有能够预防新孢子虫病的疫苗投入市场的有关报道。试验运用新疆农业大学动物医学学院寄生虫实验室前期建立的 rELISA 检测方法及其研发的试剂盒[11], 首次对阿勒泰哈巴河县 3 个乡镇的 118 份牛血清样品进行了 rELISA 检测、诊断, 获得了哈巴河县有关牛新孢子虫病的实际数据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 样品来源

于 2017 年 11 月份采自阿勒泰哈巴河县随机抽取 3 个乡镇的牛血清共计 118 份(库勒拜乡 30 份, 萨尔布拉克乡 30 份, 加依勒玛乡 58 份)。经颈静脉采血, 低温保存送回实验室, 摆成斜面, 室温下自然析出血清后收集血清,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存待检。

### 2.2. 实验材料

辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 购自北京中杉金桥试剂公司, 新孢子虫 rELISA 试剂盒、CBS (碳酸盐缓冲液, PH9.6)、吐温(Tween)-20、PBS 由实验室自制, 显色液购自北京鼎国生物公司; PBST 配制的 5%脱脂奶粉、终止液是  $2\text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$ 。

### 2.3. 主要仪器

酶标板(96 孔平底微量板)、移液枪、枪头购自上海生物工程有限公司, KHBST-36 型全自动酶标仪、温箱购自中仪国科(北京)科技有限公司。

## 2.4. 实验方法

### 2.4.1. 抗原包被

将抗原 NcSRS2 取 5~7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  加入到包被缓冲液内充分混匀后, 在 96 孔酶标板每孔加 100  $\mu\text{L}$  缓冲液, 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下过夜培养。

### 2.4.2. 封闭

PBST 洗涤液洗涤三次后, 残留粘附物用封闭液(0.5%的脱脂乳)每孔 200  $\mu\text{L}$  来封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$  生化箱里培养 1 h。

### 2.4.3. 加入待检血清

酶标板用 PBST 洗涤液冲洗三次后, 100  $\mu\text{L}$  每孔吸入按 1:100 滴度稀释的被检血清(设两个阳性、两个阴性、两个空白), 做好加样记录, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$  生化培养箱里孵育 1 h。

### 2.4.4. 加二抗

PBST 洗涤液洗涤三次后, 每孔吸入 1:8000 滴度稀释后的辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 抗体或者是辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 抗体 100  $\mu\text{L}$ , 并在 37 $^{\circ}\text{C}$  生化培养箱中温育 1 h。

### 2.4.5. TMB 显色液

PBST 洗涤液洗涤三次后, 每孔吸入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液, 酶标板覆膜后置于 37 $^{\circ}\text{C}$  生化培养箱中温育 25 min。

### 2.4.6. 终止显色

生化培养箱里拿出酶标板, 每孔打入 2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止液 50  $\mu\text{L}$ , 立即放入酶标仪读数。

### 2.4.7. 酶标仪读数

预热酶标仪 30 min 后, 将终止液吸入板上, 并在 OD450/630 nm 的波长处测量吸光度。

### 2.4.8. 判定标准

再经酶标仪检测后, 将被检血清值高于标准阳性血清平均值判定为阳性结果; 将低于阴性血清值判定为阴性结果, 没有出现结果的为空白对照。

## 3. 实验结果

### 3.1. 抗体检测结果

运用 rELISA 方法对和静县两个村的牛和羊血清样品进行了新孢子虫病的抗体检测。检测结果为: 在 118 份牛血清样品中, NcSRS2 抗原检出 5 份阳性血清, 平均阳性率为 4.23%; 详见表 1。

### 3.2. 各乡镇感染情况

对采自哈巴河县各乡镇的 118 份牛血清样品进行新孢子虫病抗体水平检测, 新孢子虫感染率最高为萨尔布拉克乡, 结果详见表 2。

## 4. 分析讨论

rELISA 方法是最简单、方便、迅速, 并且特异性和敏感性都挺高, 新孢子虫抗体检测现已广泛应用 [12]。之前的研究表明, 使用新疆农业大学动物医学院寄生虫实验室构建、保存的菌种诱导表达新孢子虫虫体表面 NcSRS2 蛋白, 筛选 rELISA 条件, 建立的新孢子虫病的 rELISA 检查方法特异性极强, 不

**Table 1.** Neosporidium positive antibody inspection situation  
**表 1.** 新孢子虫阳性抗体检出情况

畜种	检测数	NcSRS2 抗原	
		阳性数	阳性率
牛	118	5	4.23%

**Table 2.** Infection of new sporidia in cattle in different towns  
**表 2.** 各乡镇牛新孢子虫感染情况

地名	检测数	阳性数	阳性率
库勒拜乡	30	1	1.70%
萨尔布拉克乡	30	3	10.00%
加依勒玛乡	58	1	1.70%
总值	118	5	4.23%

和弓形虫病以及布氏杆菌病发生交叉反应, 本实验采用 NcSRS2 蛋白对新孢子虫病进行实验室诊断, 从而运用 ELISA 检测方法对 118 头牛进行血清样品的诊断; 共检出牛 5 头, 平均阳性率为 4.23%; 出现这样的结果, 原因是很多的, 有可能是因为此地区的卫生条件之间存在差异, 也可能是每个地区对牛、羊的饲养情况之间的差异, 每个地区和犬科动物相处的密切情况等, 一系列因素都会造成新孢子虫的感染情况不同。由于新孢子虫的终末宿主是犬, 建议在饲养牛只的地方不要饲养狗, 或者犬和牛放养的地方不要交叉, 将犬的粪便清理到牛场距离远的地方, 对该病的控制有帮助。还有一方面是外地引进的牛只, 一定要先进行严格的检疫、隔离, 进行新孢子虫病、弓形虫病及布鲁氏菌病的检测, 一经发现, 马上严格处理。目前, 没有很有效的方法进行治疗, 预防是较好的控制方法; 严禁犬科动物与牛、羊接触, 达到切断传染源的目的, 更好地预防新孢子虫病的传播。

## 参考文献

- [1] Hemphill, A. and Gottstein, B.A. (2000) European Perspective on *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, **30**, 877-924. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00072-2)
- [2] 罗洪林, 黄维义, 夏萌. 新孢子虫病研究概况[J]. 中国动物检疫, 2004, 21(12): 42-44.
- [3] Zhang, W., Deng, C., Liu, Q., et al. (2007) First Identification of *Neospora caninum*, Infection in Aborted Bovine Foetuses in China. *Veterinary Parasitology*, **149**, 72-76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.013>
- [4] Sinnott, F.A., Monte, L.G., Collares, T.F., et al. (2015) Blocking ELISA Using Recombinant Nc SRS2 Protein for Diagnosing Bovine Neosporosis. *Current Microbiology*, **70**, 429-432. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0737-y>
- [5] 余劲术. 新孢子虫 Nc SRS2 和 Nc SAG1 基因及重组蛋白免疫原性的研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [6] Ocal, N., Atmaca, H.T., Albay, M.K., et al. (2014) A New Approach to *Neospora caninum* Infection Epidemiology: Neosporosis in Integrated and Rural Dairy Farms in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **38**, 161-168. <https://doi.org/10.3906/vet-1307-11>
- [7] 刘群, 李博, 齐长明, 等. 奶牛新孢子虫病血清学检测初报[J]. 中兽医杂志, 2003(2): 8-9.
- [8] 徐雪平, 陈志蓉, 薄新文, 等. 新疆部分地区牛新孢子虫病的血清学调查[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(5): 25-26.
- [9] 晁万鼎, 马利青, 李文昌, 等. 青海省格尔木市乳牛新孢子虫病的血清学调查[J]. 中国兽医科学, 2005, 35(12): 1012-1014.
- [10] 巴音查汗, 郝建伟, 王常汉. 应用基因重组 NcSRS1 抗原对新疆部分地区牛(牦牛)新孢子虫病的血清学调查[J]. 中国兽医寄生虫病, 2008, 16(2): 10-12.
- [11] 刘梦丽, 陈千林, 吉尔格勒, 许正茂, 巴音查汗. 北疆部分地区马新孢子虫病血清学调查初报[J]. 黑龙江畜牧兽

医, 2016(2): 91-93.

- [12] 王春仁, 李志莲, 翟延庆, 等. 奶牛新孢子虫重组蛋白 NcSRS2t 间接 ELISA 方法的建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2009(2): 145-149.

**知网检索的两种方式:**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2169-8880, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [acrpvm@hanspub.org](mailto:acrpvm@hanspub.org)