

Serological Investigation of Brucellosis and Neosporiasis in Zhaosu County

Fangxin Li¹, Lijiang Wu¹, Chanhhan Bayin^{1*}, Zhenbao Wang²,
Baole Yeer², Hai Li³, Yingying Sun³

¹College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi Xinjiang

²Integrated Technical Service Center of Yili Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yining Xinjiang

³Zhaosu Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Yili Xinjiang

Email: 1343348571@qq.com, *2514062881@qq.com

Received: Apr. 11st, 2019; accepted: Apr. 23rd, 2019; published: Apr. 30th, 2019

Abstract

Objective: The main pathogens of cow abortion in Zhaosu area, Brucellosis and Neosporiasis, were studied by literature review, statistical analysis and textual research. **Method:** This experiment selected Zhaosu area as the investigation site. From September 2017 to October 2018, 11,538 cattle were serologically tested at 6 test sites in Zhaosu area. **Result:** 396 cases of Brucella serologically positive were detected; the positive rate was 3.43%. Among them, area C and F had the highest positive rate, reaching 6.32% (174/2752), 5.23% (93/1778), and area E was relatively low, reaching 1.32% (26/1956). 66 cases of neosporiasis were positive; the positive rate was 0.57%; the positive rate of area A was 0.59%, and the highest positive rate was 1.18% in area F. **Conclusion:** This study will provide epidemiological data for the comprehensive prevention and control of Brucellosis and Neosporiasis in Zhaosu County in the future.

Keywords

Brucellosis, Neosporiasis, Serology

昭苏县布鲁氏杆菌病及新孢子虫病的血清学调查

李仿鑫¹, 吾力江¹, 巴音查汗^{1*}, 王振宝², 叶尔保勒², 李海³, 孙瑛瑛³

¹新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐

²伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心, 新疆 伊宁

³昭苏县畜牧兽医局, 新疆 伊犁

*通讯作者。

文章引用: 李仿鑫, 吾力江, 巴音查汗, 王振宝, 叶尔保勒, 李海, 孙瑛瑛. 昭苏县布鲁氏杆菌病及新孢子虫病的血清学调查[J]. 亚洲兽医病例研究, 2019, 8(1): 9-15. DOI: 10.12677/acrpvm.2019.81002

摘要

目的: 本文查阅文献、统计分析、考证了昭苏地区导致母牛流产的主要病原——布氏杆菌病及新孢子虫病; 方法: 本试验选择昭苏地区作为调查点, 在2017年9月至2018年10月在昭苏范围6个试验点(区), 对11,538头牛进行血清学检测。结果: 布鲁氏杆菌血清学检测呈阳性的有396份, 阳性率3.43%; 其中, C区、F区阳性率最高, 可达到6.32% (174/2752)、5.23% (93/1778); E区相对较低, 为1.32% (26/1956)。新孢子虫病呈阳性的有66份, 阳性率0.57%, A区阳性率0.59%、F区阳性率1.18%为最高。结论: 为今后昭苏县开展布鲁氏杆菌病、新孢子虫病的综合防控及研究工作提供相关流行病学数据支撑。

关键词

布鲁氏杆菌病, 新孢子虫病, 血清学

Copyright © 2019 by author(s) 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

布鲁氏杆菌病(Brucellosis)又称马耳他热, 地中海热[1], 是由布鲁氏杆菌(*Brucella*)引起的一种人畜共患病, 以母畜流产、不孕和公畜睾丸炎为特征。新孢子虫病(Neosporosis)是由犬新孢子虫(*Neospora caninum*)寄生在犬、牛等动物体细胞内的寄生性原生寄生虫病, 其对牛造成的危害最为严重[2] [3]。迄今为止, 已发现犬新孢子虫可进行垂直、水平传播, 母牛会持续性垂直传染几代[4]。昭苏县位于伊犁地区西南角, 土地肥沃、水源先足、高山草原, 是良好的天然牧场, 现计有牛羊牲畜 40 万余只(头) [5] [6] [7]。畜牧业经济是该地区的支柱型产业之一, 也是农牧民经济收入的主要来源。近几十年来, 昭苏地区流产呈不断上升趋势, 其流产率可达 3.5% [8], 昭苏县除了马产业之外, 主要以养牛业为主, 是以畜牧业为经济支柱的农业大县, 布氏杆菌、新孢子虫病的流行蔓延, 不仅给养殖业造成重大经济损失, 还会威胁人们身体健康[9]。因此, 进行该地区的流产病因分析, 做好病原诊断与防控工作就尤为重要。

2. 试验材料

2.1. 血液采集

采集血清以颈静脉采血的方式。首先将牛赶至保定栏内保定好后, 借助 3 米长的保定绳, 将牛头双角根部同保定栏以稍高于牛体的方位紧紧固定, 以避免牛头晃动而影响采血操作。采血人在牛体左侧, 先用 75% 的酒精棉球对牛颈静脉沟进行螺旋擦拭, 进行消毒并刺激血管扩张。擦拭后, 左手压迫近心端颈静脉沟, 使颈静脉因血液回流受阻而充分怒张。右手持一次性采血针, 在颈静脉怒张最高处, 倾斜 45° 角平稳进针, 针头刺入血管出现血液回流时快速将 5 mL 采血管同采血针链接。

采血完毕后, 将采血后的采血管放在采血架上, 以避免阳光直射和来回晃动, 造成溶血或影响血清质量。将用过的一次性橡胶手套、口罩、医疗防护服、酒精棉球、一次性采血针等统一处理至生物垃圾

箱内进行无害化处理，以避免扎伤牲畜、传播疾病。

2.2. 血清制备

无菌颈静脉采取昭苏县 6 个试验点(A 区, 萨尔阔步乡; B 区, 夏特乡; C 区, 阿克达拉镇; D 区, 昭苏镇; E 区, 洪纳海乡; F 区, 天山乡; 以下统一以字母表示)的牛血液样本 3 mL, 将其置于 20℃ 的生化培养箱中 3~5 h, 待血清自然析出; 或将血清置于医用离心机中 2000 r/min 离心 2 分钟取血清, 合格的牛血清应呈现微黄透明状。将血清分装于 2 mL 离心管中, 同时记录检测牛的编号、年龄、胎龄, 是否有流产史, 放入-20℃ 保存备检。

2.3. 检测材料

布氏菌病试管凝集试验诊断用抗原、布氏菌病虎红平板凝集试验诊断用抗原、虎红平板凝集试验标准血清均购自哈尔滨生物制品有限责任公司; 新孢子虫标准阳性、阴性血清由日本国际原虫病研究中心馈赠, 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, 新孢子虫病 ELISA 检测试剂盒、PBS 等由新疆农业大学寄生虫实验室组装, 显色液购自北京鼎国生物公司。

2.4. 试验仪器

DIGICEN20-R 高速离心机购自西班牙 ORTOALRESA 公司, YXQ-LS-50A 立式压力蒸汽灭菌器购自上海博迅实业有限公司, 微量移液器、可调连续加样器、全自动酶标仪购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, 试验用超纯水系统购自美国 Millipore 原厂。

3. 试验方法

3.1. 虎红平板试验

依据中华人民共和国卫生行业标准(WS269-2007)进行试验, 在阴阳性对照成立的前提下进行结果判定[10]。

结果判定: 受检血清在 4 min 内出现肉眼可见凝集现象者定为阳性(+), 呈均匀粉红色并无凝集反应者定为阴性(-)。

3.2. 试管凝集试验

试管凝集试验的操作步骤及其比浊管的配制, 依照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1090-2002 规定的检测方法进行[10]。

结果判定, 确定每份被检血清的效价, 结合比浊管进行判读。当阴性血清对照和抗原对照不出现凝集(-), 阳性血清的凝集价达到其标准效价至少 1 个滴度时, 则证明试验成立, 可以进行判定。否则, 试验应重做; 于 1:100 血清稀释度, 出现(+++)以上的凝集现象时, 被检血清判定为阳性反应。

3.3. 新孢子虫 ELISA 检测

犬新孢子虫病血清抗体的检测借助新疆农业大学寄生虫实验室建立的牛新孢子虫血清抗体 ELISA 试剂盒, 具体检测步骤依照杨帆所建立的新孢子虫病 rELISA 检测方法进行[11]。

1) 包被抗原: 用包被液将犬新孢子虫标准抗原稀释到 6 $\mu\text{g/mL}$ 的剂量后, 以每孔 50 μL 的量加入到酶标板内, 4℃ 包被过夜。

2) 洗涤: 将酶标板内包被液弃去, 以每孔 300 μL 的洗涤缓冲液静置 3 min 进行洗涤, 后迅速弃去(减少板子干燥时间), 如此反复 3 次。

3) 封闭: 以含 3% 脱脂乳的 PBS 作为封闭液, 37℃ 孵育 1 h, 后同步骤 2) 进行洗涤。

4) 加被检血清: 以 1:100 的滴度用稀释液将待检血清稀释后, 每孔 50 μL 的量加入酶标板内, 同时做空白、阴性、阳性对照, 37℃ 孵育 1 h 后, 同步骤 2) 进行洗涤。

5) 加酶标二抗: 以 1:2000 的稀释滴度用封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 抗体, 每孔 50 μL 的量加入酶标板内, 37℃ 孵育 1 h 后, 同步骤 2) 进行洗涤。

6) 加底物缓冲液: 每孔 100 μL 的量将底物缓冲液加入酶标板内, 37℃ 孵育 10~15 min 后, 以每孔 50 μL 的量加终止液终止反应, 在 OD 值为 430/450 的波长下读数。

判定标准严格依据试剂盒所携带的说明书判定, 对疑似阳性牛进行复检, 复检仍为疑似阳性者判为阳性。

4. 结果

4.1. 统计学分析方法

将检测数据输入计算机, 借助 SPSS Statistics 应用软件进行数据的分析处理, 以 $P < 0.05$ 判定为差异较大, $P > 0.05$ 判定差异不大。

4.2. 昭苏县布鲁氏杆菌病及新孢子虫病血清学检测结果

在昭苏县六个试验区进行的大范围母牛流产流行病学普查中, 于 2017 年 9 月至 2018 年 10 月期间, 共检测牛 11,538 头。布病阳性数 396, 阳性率 3.43%, 其中 C 区、F 区阳性率最高, 可达到 6.32% (174/2752)、5.23% (93/1778), E 区相对较低 1.32% (26/1959); 新孢子虫阳性数 66, 阳性率 0.57%, A 区阳性率 0.59%、F 区阳性率 1.18% 最高。该地区不同试验点牛布病及新孢子虫病阳性率差异显著 ($P < 0.05$)。详见表 1:

Table 1. Serological detection results of Brucellosis and Neosporiasis

表 1. 布病及新孢子虫病血清学检测结果

检测区	布鲁氏杆菌病			新孢子虫病		
	检测数	阳性数	阳性率	检测数	阳性数	阳性率
A 区	1850	36	1.94%	1850	11	0.59%
B 区	915	19	2.07%	915	3	0.32%
C 区	2752	174	6.32%	2752	16	0.58%
D 区	2284	48	2.10%	2284	9	0.39%
E 区	1959	26	1.32%	1959	6	0.30%
F 区	1778	93	5.23%	1778	21	1.18%
合计	11,538	396	3.43%	11,538	66	0.57%

4.3. 昭苏县农牧区牛血清样本布病检测结果

本次试验布病检测以虎红平板凝集试验初检, 试管凝集试验复检为准, 新孢子虫病检测以 rELISA 的方式对牧区及农区两大区域的牛血清样本进行检测, 发现牧区牛布氏杆菌病阳性率 4.62%、新孢子虫病昭苏县阳性率 0.70%, 农区牛布氏杆菌病阳性率 1.71%、新孢子虫病阳性率 0.38%, 牧区显著高于农区。该地区农牧区牛布病及新孢子虫病阳性率差异显著 ($P < 0.05$)。详见表 2:

4.4. 昭苏县不同养殖方式牛布病、新孢子虫病检测结果

结合疫病监测血清学采样登记表对养殖方式进行细化分析,发现舍饲牛阳性率最低,为2.69%、0.36%,该地区不同养殖方式牛布病及新孢子虫病阳性率差异显著($P < 0.05$)。这次细化分析结果跟不同区域阳性率数据统计相一致,进一步证明了日常管理对牛疾病防控的重要性。详见表3:

Table 2. Detection results of *Bovine brucellosis* and Neosporiasis in different areas

表 2. 不同区域牛布病及新孢子虫病检测结果

检测区	布鲁氏杆菌病			新孢子虫病		
	检测数	阳性数	阳性率	检测数	阳性数	阳性率
农区	4724	81	1.71%	4724	18	0.38%
牧区	6814	315	4.62%	6814	48	0.70%
总计	11,538	396	3.43%	11,538	66	0.57%

Table 3. Detection results of *Bovine brucellosis* and Neosporiasis in different culture methods

表 3. 不同养殖方式牛布病及新孢子虫病检测结果

养殖方式	布鲁氏杆菌病			新孢子虫病		
	检测数	阳性数	阳性率	检测数	阳性数	阳性率
舍饲	2483	67	2.69%	2483	9	0.36%
放牧	4347	188	4.32%	4347	31	0.71%
混合	4708	141	2.99%	4708	26	0.55%
总计	11,538	396	3.43%	11,538	66	0.57%

4.5. 昭苏地区不同年龄段牛血清样本布病检测结果

本次检测将被检牛分2~4岁、5~8岁、9~12岁三个年龄阶段进行布鲁氏菌病的检测数据汇总,结果发现,5~8岁为牛布病爆发的高发期,阳性率可达5.12%,该地区不同年龄段牛布病阳性率差异显著($P < 0.05$)。详见表4:

Table 4. Detection results of *Bovine brucellosis* in different age groups

表 4. 不同年龄段牛布病检测结果

年龄段(岁)	检测数	阳性数	阳性率
2~4	2038	6	0.29%
5~8	4179	214	5.12%
9~12	5321	176	3.31%
总计	11,538	396	3.43%

5. 结果讨论

昭苏地区2017~2018年牛布鲁氏杆菌及新孢子虫流行病学调查结果表明其布氏杆菌、新孢子虫病阳性率低于2016年以前的相关文献记载[12][13][14]。分析原因一是昭苏县牲畜品种改良冷链体系建设,减少了种公牛通过生殖器官传播疾病的可能性;二是昭苏县相关负责单位加大重视力度,积极组织乡兽

医站进行采血送检,对确认感染牛迅速隔离扑杀;三是昭苏县在自外地调入家畜过程中,各相关部门密切配合,经布病检查阴性、出具相关阴性诊断报告才能通过。引进动物时进行产地检疫,隔离观察两个月,并两次血清学为阴性者,方可引进[15]。四是对牛场附近犬、猫等新孢子虫宿主严格驱离,禁止其接触草料场、饮水处,减少其同牛只接触的机会,以达到消灭传染源、切断传播途径,进而降低感染率的目的。

在将昭苏县阳性牛依养殖方式、流调地区进行细化分析中发现,牧区明显高于农区,混合饲养明显高于单纯舍饲或放牧。分析其主要原因在于一是混合饲养流动性大,昭苏县多是春夏季节在夏草场,秋季在秋草场,冬季舍饲。在转群过程中大群牛混在一起,很少有牧民主动对粪便、饮水等进行消毒,为疾病的传播创造条件。二是牧区牛只多在深山中放牧,难以进行有效的同期发情、人工授精计划,所以牛大多自然交配,造成一头种公牛感染一群的现象。

6. 结论

目前我国对布氏杆菌病的防控多以预防为主方针,通过对非疫区家畜的严格监管、科学免疫,对疫区家畜采取免疫与阳性畜扑杀结合的方式控制布氏杆菌病的发生及流行[16][17]。对于跨省市动物的布病检测,应在初检无阳性后,于30天后再进行复检,复检无阳性后方可混群。现在各省市开展动物布病检测工作大多以虎红平板凝集试验为初检,初检阳性再进行试管复检确认[18][19]。目前经实践检验,行之有效的猪二号布病菌苗,对于牛只用法包括喂服、饮服和注射,免疫周期为1年;而对于牛新孢子虫病的感染特效药、疫苗仍在研制阶段。

动物检疫、疫苗接种、阳性畜的淘汰及扑杀等综合防治措施的落实力度不够,进而导致布病的发病率呈上升趋势。昭苏县家畜主要以放牧饲养为主,同时阳性畜同牧民长期接触,导致人畜共患病的发生。本次流调结果:放牧饲养的牛阳性率高于舍饲饲养的牛,证实病原同饲养管理条件,日常防疫防控制度,兽医从业人员的水平是密切相关。另外,可通过公共媒体及宣传册等方式宣传布病及新孢子虫病防控知识,增强牧民对该病的防范意识和自我保护意识。同时,上级相关部门应加强对牧民及技术人员的技术培训,以提高从业人员的专业能力和业务水平。

基金项目

自治区国际科技合作计划项目——上海合作组织科技伙伴计划(项目编号:2017E0120)。

参考文献

- [1] 尚德秋. 布鲁氏菌病研究进展[J]. 中国地方病防治杂志, 2004, 19(4): 204-212.
- [2] Lindsay, D.S. and Dubey, J.P. (1999) Confirmation that the Dog Is a Definitive Host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, **82**, 327-333. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00054-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00054-0)
- [3] Hemphill, A., Felleisen, R., et al. (1997) Characterization of a cDNA-Clone Encoding Nc-p43, a Major *Nesopora caninum* Tachyzoite, Surface Protein. *Parasitology*, **115**, 581-590. <https://doi.org/10.1017/s0031182097001650>
- [4] 马利青. 柴达木地区黄牛新孢子虫病的ELISA检测[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(4): 46-47.
- [5] 白文彬, 于康震. 动物传染病诊断学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 621-627.
- [6] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. (第五版). 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [7] 高永辉, 王希良. 布鲁氏菌病的感染免疫研究进展[J]. 国外医学流行病学传染病学分册, 2005, 32(1): 23-25+29.
- [8] 刘秉阳, 孙玺, 尚德秋, 等. 布鲁氏菌病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 1.
- [9] 张雪峰. 阿尔梅里亚省布氏菌病1988-1990年的回顾性研究[J]. 地方病丛, 1994, 15(6): 58.
- [10] 格根通力嘎. 布鲁氏菌病诊断标准[J]. 疾病监测, 2009(10): 781-781.

- [11] 杨帆, 王莲芳, 陈亮, 等. 新孢子虫病 P43 蛋白质(包涵体)的纯化及 rELISA 方法的建立[J]. 新疆农业大学学报, 2010, 33(4): 294-298.
- [12] 加娜尔·阿布扎里汗, 杨帆, 巴音查汗. 北疆部分地区流产奶牛新孢子虫病 ELISA 调查[J]. 草食家畜, 2010(1): 16-18.
- [13] 关琴, 米吉提·莫合他汗, 李勇, 施远翔, 张志诚. 新疆布鲁菌病发生情况及变化趋势[J]. 畜牧与饲料科学, 2013, 34(6): 85-88.
- [14] 马晓菁, 库尔班·居麦, 舒展, 赵卫东, 常青, 施远翔, 刘丽娅, 陈荣贵, 吴智年, 闫双, 钟旗, 王力俭. 2012-2014 年新疆动物布鲁氏菌病流行病学调查与分析[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(5): 111-114.
- [15] Shang, D.-Q., Xiao, D.-L. and Yin, J.-M. (2002) Epidemiology and Control of Brucellosis in China. *Veterinary Microbiology*, **90**, 165-182. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00252-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00252-3)
- [16] 张萍, 杨国林, 陈大健. 奶牛布鲁氏菌病研究进展[J]. 中国牛业科学, 2008, 34(5): 50-52.
- [17] 师志海, 王文佳, 兰亚莉. 布氏杆菌检测方法的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011(8): 44-46.
- [18] 李敏, 任艳玲, 等. 羊布鲁氏杆菌病流行现状及其诊治研究进展[C]. 《2011 中国羊业进展》论文集. 2011.
- [19] 任洪林, 等. 布鲁氏菌病的研究与防控进展[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(9): 139-143.

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