

A Preliminary Survey of *Theileria annulata* in Some Areas of Altay

Huihui Zhao, Xiaowan Xie, Lanlan Du, Zihan Guo, Caishan Li, Qingyong Guo*

College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi Xinjiang
Email: 277522040@qq.com, 110738733@qq.com, *83949588@qq.com

Received: Oct. 10th, 2017; accepted: Oct. 19th, 2017; published: Oct. 26th, 2017

Abstract

In order to understand *Theileria annulata* cases in the Altay cows area and using PCR and blood smears. A total of 228 cows were randomly selected from Alety, Conduct epidemiological investigations of *Theileria annulata*. The total positive blood smear rate was 13.16 (30/228). The total infection rate confirmed by PCR was 25% (57/228). The prevalence of 4 species of adult ticks using Morphological identification during different tick groups has been identified and determined. Through infection investigation, the survey results provided preliminary information on piroplasmosis infections in *Theileria annulata* population in Alety and scientific evidence.

Keywords

Theileria annulata, *Hyalomma anatolicum*, Epidemiology, PCR

阿勒泰部分地区牛环形泰勒虫病检测初报

赵慧慧, 谢小婉, 杜兰兰, 郭子涵, 李才善, 郭庆勇*

新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐
Email: 277522040@qq.com, 110738733@qq.com, *83949588@qq.com

收稿日期: 2017年10月10日; 录用日期: 2017年10月19日; 发布日期: 2017年10月26日

摘要

为了解阿勒泰牛环形泰勒虫病感染情况, 本文采用聚合酶链式反应试验(PCR)与血涂片镜检法相结合的试验法, 对阿勒泰牛只随机抽样(N = 228), 进行牛环形泰勒流行病学调查。经血液涂片检查极少部分全

*通讯作者。

血中发现虫体,牛环形泰勒虫病阳性率为13.16% (30/228);经PCR调查发现,牛环形泰勒虫病感染率为25% (57/228)。婢分组进行形态学鉴定,发现了四种婢和确定成年婢流行情况。通过本次牛感染情况调查,对阿勒泰部分地区牛环形泰勒虫病感染情况有了初步了解,为该地区养牛业的健康发展提供了科学依据。

关键词

牛环形泰勒, 璃眼婢, 流行病学, PCR

Copyright © 2017 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

牛环形泰勒虫病是由环形泰勒虫科(*Theileriidae*)泰勒属(*Theileria*)的原虫所引起的一种以体表淋巴结肿胀、发热、贫血等症状为特征的梨形虫病。该病在全世界流行较广,中东、南欧、中亚等地区均有该病的报道[1] [2],在我国西北、东北、华北等地区也有相关的报道。据报道,新疆维吾尔自治区吐鲁番地区的发病率可高达40% [3]。虽然有关部门每年会定期对该病进行疫苗接种,但该病的感染率仍然未见下降,严重影响了经济的健康发展。

璃眼婢(*Hyalomma detritum*)属于硬蜱科(Ixodidae)璃眼婢属(*Hyalomma*),多寄生于草原牧场、家畜圈舍及牛体表,经证实,*Hyalomma*是牛环形泰勒虫病的主要传播媒介[4],全世界已记载27个种和亚种,我国已记载9个种和亚种,新疆维吾尔自治区就有7个种和亚种,已被证实为仅次于革蜱的地方优势种群。世界粮农组织(FAO)曾报道,全世界每年由婢类引起的泰勒虫病造成的经济损失达70亿美元。虽然近年来我国在婢及婢传疾病的研究方面取得了一定成果,但由于新疆维吾尔自治区地域广阔,自然环境和气候复杂多样,婢及婢传病原体的种类繁多,自然疫源地分布广[5],宿主动物携带病原和媒介婢携带病原的问题尚未进行综合分析,还需要更深入的研究。本研究在进行媒介婢形态学鉴定的同时对其携带的牛环形泰勒虫DNA进行了检测,对了解优势分布媒介婢和开展地方性婢类与婢传疾病的综合防控工作具有重要意义。

2. 材料与方法

1) 调查时间和对象调查时间为2017年7~8月,阿勒泰(N = 228)进行了调查,并采集样品进行牛环形泰勒感染情况检测。

2) 样品来源对所有被检牛只(N = 228)进行颈静脉采血,现场进行血液涂片、经甲醇固定后带回实验室进行涂片染色,镜检。血液-20°C保存备用。

3) 检测仪器和试剂显微镜、平衡离心机、恒温水浴锅、凝胶成像分析系统、稳压稳流电泳仪及电泳槽、PCR仪等。全血DNA提取试剂盒,DNA聚合酶、DNA Marker等试剂均购自上海生物工程有限公司。

4) 显微镜检查方法应用采集样品时制作的血液涂片,放置到新配制的10%姬姆萨染色液里染色,取出后,使用自来水冲洗,在油镜下观察。

5) 采集和形态鉴定从被感染蜱的牛只身上采集了 53 只蜱, 根据盾板颜色、性别、饱血程度、是否死亡等条件进行分类; 饥饿蜱放入 100°C 沸水中停留 5 s, 使其肢体伸展, 去除硬蜱假头基内残留的宿主组织, 用 PBS 缓冲液(pH = 7.2)清洗蜱体表, 在光学显微镜下参照邓国藩《中国经济昆虫志》中的“中国蜱类分属检索表” [4], 于心等《新疆蜱类志》中“新疆蜱类分属、分种检索表” [6]以及《中国重要医学动物鉴定手册》 [7]对璃眼蜱种进行形态鉴定, 并拍照记录观察结果。

6) DNA 提取使用全血基因组 DNA 快速抽提试剂盒, 按照说明提 DNA, -20°C 保存备用。

7) PCR 扩增

a) 引物序列应用本实验室已建立的一对特异性引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。

上游引物为 5'-GTAACCTTTAAAACGT-3', 下游引物为 5'-GTTACGAACATGGGTTT-3', 扩增特异性片段长为 721 bp。

b) PCR 检测牛环形泰勒 PCR 扩增反应体系(25 μ L): 2 \times EcoTaq PCR SuperMix 12.5 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, 灭菌去离子水 8.5 μ L。PCR 扩增程序: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 终延伸 10 min。

8) PCR 扩增产物的检测取 5 μ L 扩增产物, 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 在电泳凝胶成像系统仪中拍照。

9) 阳性率计算方法血液源性牛环形泰勒虫阳性率 = 血涂片阳性牛头数(PCR 阳性牛头数)/被测牛总数; 蜱源性牛环形泰勒虫阳性率 = 某种蜱的阳性数/蜱总数

3. 试验结果

1) 显微镜检查结果血液涂片经油镜观察发现, 228 份样品中, 牛环形泰勒虫阳性率为 13.16% (30/228)。

2) 蜱形态学鉴定在调查过程中检查了每一头牛, 发现 42 (18.42%) 头牛被蜱感染, 采集了 53 只(雄虫 23, 雌虫 30)。结果显示, 小亚璃眼蜱感染率为 7.6% (6/78), 残缘璃眼蜱感染率为 10.2% (8/78), 嗜驼璃眼蜱感染率为 6.4% (5/78), 亚洲璃眼蜱(*Dermacentor marginatus*)感染率为 7.6% (6/78), 详见表 1。

3) 牛环形泰勒虫病 PCR 检测结果对 228 份血样提取 DNA, 以其作为模板进行牛环形泰勒 PCR。环形泰勒虫条带大小为 721 bp, 电泳结果(见图 1)。

a) 阿勒泰部分地区牛环形泰勒虫病感染情况采自于阿勒泰 228 份全血样品进行 PCR 试验, 结果显示牛环形泰勒虫阳性率为 25.00% (57/228)。本实验结果表明牛环形泰勒虫在阿勒泰感染较为严重, 详见表 2。

b) 不同年龄牛环形泰勒虫病感染本次调查中, 将不同年龄的牛分为 1~4 年龄、5~9 年龄和 10 岁以上三个组进行分析, 从结果来看, 5~9 年龄段感染率最高, 1~4 年龄和 10 岁以上年龄段无太大差别, 但是随年龄的增长, 感染率降低, 不同年龄段感染率见表 3。

Table 1. Result of ticks identification and infection

表 1. 蜱虫鉴定结果和感染率

种类 Species	蜱数(只) Ticks number	感染数(头) Infections Numbers	感染率(%) Infections rate
小亚璃眼蜱	9	6	7.6%
残缘璃眼蜱	17	8	10.2%
嗜驼璃眼蜱	14	5	6.4%
亚洲璃眼蜱	13	6	7.6%
总共	53	25	32%

Table 2. *Theileria annulata* infection situation in different areas
表 2. 牛环形泰勒虫病感染情况

	样品数 Numbers of samples	阳性 positive	感染率(%) Infections rate
富蕴	105	28	26.67 (28/105)
福海	91	21	23.08 (21/91)
哈巴河	32	8	25.00 (8/32)

Table 3. *Theileria annulata* infection situation at different age periods
表 3. 不同年龄段牛环形泰勒感染情况

年龄	被检数	阳性率(%)
1~4	40	17.50 (7/40)
5~9	150	30.00 (45/150)
>10	38	13.15 (5/38)

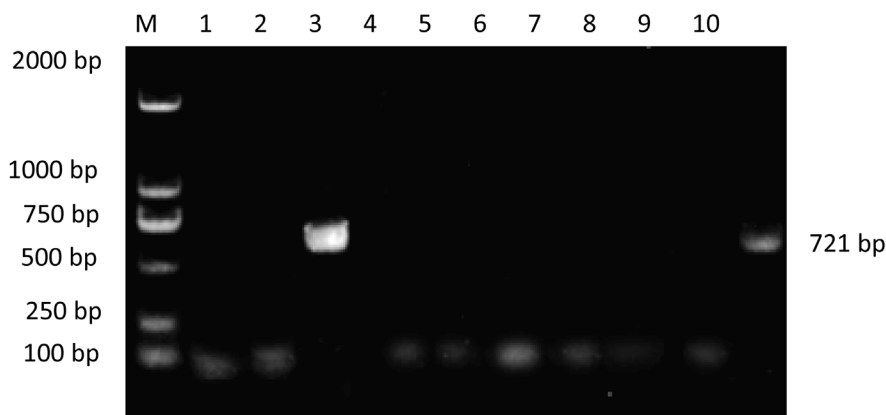


Figure 1. PCR detection for *Theileria annulata*. M: DNA Marker (DL2000); 1 - 10: Samples
图 1. 牛环形泰勒虫 PCR 检测结果。M: DL-2000 Marker; 1~10: 待检样品

4. 讨论与小结

牛环形泰勒虫病一种传播快、危害严重的蜱传播性血液原虫病，严重影响养牛业的发展。新疆是我国主要的牛产业区，阿勒泰全疆前列。为阿勒泰养牛业的蓬勃发展，对牛只调查牛环形泰勒虫病流行情况重中之重。

镜检检查是最简单和方便的诊断方法，为减少诊断误差，本实验结合了镜检和 PCR 检测方法[8]。此次实验调查结果发现，血液涂片的检测结果中牛环形泰勒虫阳性率为 13.16 (30/228)。通过 PCR 检测牛环形泰勒虫感染率为 25 (57/228)%。经血液涂片得到的阳性样品，均在 PCR 检测中被发现且感染虫种一致。上述两种检测方法的果显示出，牛环形泰勒虫的感染率较严重。按不同年龄分组分别进行比较，5~9 岁牛只感染率较高，同时发现各种年龄段的牛均可感染该病。造成这种现象的原因可能是成年牛可能曾经感染过牛环形泰勒虫病，因此对环形泰勒虫具有带虫免疫。

牛环形泰勒虫病的发生和流行规律主要与各种蜱的地区性分布有关，由于梨形虫在蜱体内可继代传递，病牛，带虫牛和带虫蜱均为传染源[8]。阿勒泰的自然地理位置独特，植被类型多样，高山，草场，平原，沙漠均适合各种蜱的孳生。本次调查过程中采了一定数量的蜱，发现了可以传播牛环形泰勒虫病

的, 残缘璃眼蜱, 嗜驼璃眼蜱, 亚洲璃眼蜱, 小亚璃眼蜱, 故梨形虫病致病率较高, 进一步确定本地区存在牛环形泰勒虫病的可能性。

根据本次调查得出的结论是牛环形泰勒虫病在阿勒泰普遍存在, 确定了牛环形泰勒虫病流行的自然因素。上述的实验数据为当地建立适当的防治措施提供一定科学奠定。

5. 结论

蜱类对疾病的传播仅次于蚊类, 可传播病毒、立克次体、细菌、螺旋体、原虫等; 同时是家畜和野生动物虫媒传染病最重要的媒介生物。应提高对蜱及蜱传疾病的重视, 进一步加强对蜱类的监测和防治对保护人畜健康极为重要。

基金项目

国家自然科学基金——新疆联合基金(U1503188)。

参考文献 (References)

- [1] de KoK, J.B., d'Oliveira, C. and Jongejan, F. (1993) Detection of the Protozoan Parasite *Theileria annulata* in *Hyalomma* Ticks by the Polymerase Chain Reaction. *Experimental & Applied Acarology*, **17**, 839-846. <https://doi.org/10.1007/BF00225857>
- [2] Al-Saeed, A.T.M., Omer, L.T., Jabdo, J., *et al.* (2010) Epidemiological Studies on Tropical Theileriosis (*Theileria annulata* Infection of Cattle) in Kurdistan Region, Iraq. *Parasitology Research*, **106**, 403-407. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1675-7>
- [3] Sigal, L.H. (1997) Lyme Disease: A Review of Aspects of its Immunology and Immunopathogenesis. *Annual Review of Immunology*, **15**, 63-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.63>
- [4] 邓国藩, 姜在阶. 中国经济昆虫志第三十九册蜱螨亚纲硬蜱科[M]. 北京: 科学出版, 1991: 1-100.
- [5] Sun, J., Liu, Q., Lu, L., *et al.* (2008) Coinfection with Four Genera of Bacteria (*Borrelia*, *Bartonella*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia*) in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes sinensis* Ticks from China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **8**, 791-795. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0005>
- [6] 于心, 叶瑞玉, 龚正达. 新疆蜱类志[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1997: 1-85.
- [7] 陈宝麟. 中国重要医学动物鉴定手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 725-838.
- [8] Farnaz, M., Mousa, T., Mohammad, Y., *et al.* (2014) Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* Using Microscopic and Molecular Methods in Horses in Suburb of Urmia, Iran. *Veterinary Research Forum*, **5**, 129-133.

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