

Preliminary Report on PCR Diagnosis of Yak *Theileria annulata* in Taskuergan County, Xinjiang

Caishan Li¹, Min Dao², Saidiram¹, Xiangfeng Wang², Abu Duwupul Amibek², Nadirxia Gawaxia², Rey Hanguli Tulson², Nurbia Tulson², Ruiqi Song¹, Qingyong Guo¹, Bayin Chahan^{1*}

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

²Tashkurgan Tajik Autonomous County Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Tashkurgan Tajik Autonomous County Xinjiang

Email: 670270868@qq.com, *2514062881@qq.com

Received: May 3rd, 2019; accepted: May 15th, 2019; published: May 22nd, 2019

Abstract

Bovine ring typhus is a rumorous blood protozoosis caused by the erythrocytes and reticuloendothelial system of Bovine larvae (*Theileria annulata*). The clinical manifestations are severe symptoms such as high fever and anemia. If the diagnosis and treatment are not timely, the mortality rate is extremely high and the economic loss is huge. In this paper, 30 yak blood samples collected from Tashkurgan County were tested by PCR for the detection of *Theileria annulata*. The results showed that the overall positive rate of PCR was 13.3% (4/30), the positive rate of female yak was 13.0%, and the positive rate of male yak was 14.0%. The variance of the disease was found to be insignificant between the sex of yak ($P = 0.935 > 0.05$), indicating that the plateau yak in the county is infected with *Theileria annulata* to varying degrees, which is potentially harmful and should be strengthened.

Keywords

Theileria annulata, PCR, Yak

新疆塔什库尔干县牦牛环形泰勒虫病PCR诊断初报

李才善¹, 道敏², 赛迪拉木¹, 王向峰², 阿布都吾甫尔·亚米别克², 那地尔夏·加完夏², 热依汉古丽·图尔荪², 努尔比亚·图尔荪², 宋瑞其¹, 郭庆勇¹, 巴音查汗^{1*}

¹新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐

*通讯作者。

文章引用: 李才善, 道敏, 赛迪拉木, 王向峰, 阿布都吾甫尔·亚米别克, 那地尔夏·加完夏, 热依汉古丽·图尔荪, 努尔比亚·图尔荪, 宋瑞其, 郭庆勇, 巴音查汗. 新疆塔什库尔干县牦牛环形泰勒虫病 PCR 诊断初报[J]. 亚洲兽医病例研究, 2019, 8(2): 17-21. DOI: 10.12677/acrpvm.2019.82003

²塔什库尔干塔吉克自治县畜牧兽医局, 新疆 塔什库尔干塔吉克自治县
Email: 670270868@qq.com, 2514062881@qq.com

收稿日期: 2019年5月3日; 录用日期: 2019年5月15日; 发布日期: 2019年5月22日

摘要

牛环形泰勒虫病是由牛环形泰勒虫(*Theileria annulata*)寄生于牛类动物的红细胞和网状内皮系统内所引起的婢传性血液原虫病。临床表现为高热、贫血等重剧症状,若诊治不及时死亡率极高经济损失巨大。本文采用PCR诊断方法对采集于塔什库尔干县的30份牦牛血样进行牛环形泰勒虫病检测。结果显示,PCR检测总体阳性率为13.3% (4/30),母牦牛阳性率为13.0%,公牦牛阳性率为14.0%,经方差分析发现该病在牦牛性别之间感染率不显著($P = 0.935 > 0.05$),说明该县高原牦牛在不同程度地感染牛环形泰勒虫病,具有潜在危害,应该加强防范。

关键词

牛环形泰勒虫, PCR, 牦牛

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

牛环形泰勒虫病是经婢传播血液原虫病,其主要症状为消瘦,体温升高呈稽留热,全身淋巴肿大,肾脏、肝脏肿大质地变软,胆囊扩充等病理变化[2]。新疆的牦牛养殖是早年从西藏地区引入开始,据2008年统计目前牦牛在新疆地区的数量约为9.4万头[1]。相比较于普通牛,牦牛对生存环境要求较为严格一般生存在海拔较高的地区,主要以农牧民自养为主,未形成大规模集约化的养殖形式。有关牦牛环形泰勒虫病的研究报道相比之下甚少,如刘道鑫等人对青海省天峻地区牦牛泰勒虫病进行过血清学调查[2]和阿力米江·沙克等对新疆部分地区牦牛环形泰勒虫病调查[3],尤其对塔什库尔干的高原牦牛尚未详细地报道过。本文通过对采集于新疆塔什库尔干县的30份牦牛血样进行血液涂片和PCR方法进行检测、诊断牛环形泰勒虫病,以便为当地牛环形泰勒虫病的综合防治提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 样品来源

通过颈部采血法从新疆塔什库尔干县地区采集30份牦牛血液样品,其中23为雌性、7份为雄性牦牛,具体采样信息详见表1。采集的血样收集于EDTA-K2抗凝管,并将采集好的血液样品放置于有冰袋的采样箱内带回实验室待检。

2.2. 主要试剂及仪器设备

试剂: DNA聚合酶、DNA提取试剂盒、DNA Marker等PCR实验所需的相关试剂购自北京鼎国生物公司;仪器: PCR仪、平衡离心机、恒温水浴锅、BIO-RAD凝胶成像分析系统、恒压恒流电泳仪、电泳槽等。

Table 1. The geographic conditions in the research areas**表 1.** 采样地区地理气候条件

地点	海拔(m)	气压(hPa)	气候类型
库孜更村	3265.6	687.1	均为高原高寒干旱 - 半干旱气候
萨尔库塔什村	3355.9	665.5	
库仑木勒克村	3390.5	664.3	

2.3. 试验方法

2.3.1. PCR 检测法

将采集好的牦牛全血样品轻微颠倒混匀后抽取 200 μL 通过 DNA 提取试剂盒进行血液 DNA 提取, 将提取好的 DNA 作为模板, 应用特异性强的通用引物[4], 上游引物: 5'-ACT TTG GCC GTA ATG TTA AAC-3', 下游引物: 5'-CTC TGG ACC AAC TGT TTG G-3', 目的片段大小为 312bp, 进行 PCR 扩增、诊断。其 PCR 扩增反应体系为 13 μL , 具体如下: $2 \times \text{Es Taq Master Mix}$ 6.5 μL 上游、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 模板 2 μL , 灭菌去离子水 2.5 μL 。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 30 个循环; 65 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min, PCR 扩增结束后取 5 μL PCR 产物经行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定分析。

2.3.2. 血涂片检测

将收集于 EDTA-K2 抗凝管中的血液样品在实验室制作成血液涂片进甲醇固定后放置到新配制的 10% 姬姆萨染色液里进行染色, 随后使用自来水冲洗, 在油镜下观察。

2.3.3. 数据分析

通过 Excel 软件对库孜更村、萨尔库塔什村感染率为、库仑木勒克村三个采样点的牛环形泰勒虫病感染率进行了比较分析, 通过 SPSS 数据分析软件, 对本实验样本进行了差异水平分析。

3. 试验结果

3.1. 高原牦牛环形泰勒虫 PCR 检测结果

本次实验对 30 份牦牛全血样提取 DNA, 以提取的 DNA 作为模板进行牛环形泰勒虫 PCR 检测。环形泰勒虫形泰勒虫条带大小为 312 bp, 结果(见图 1)。

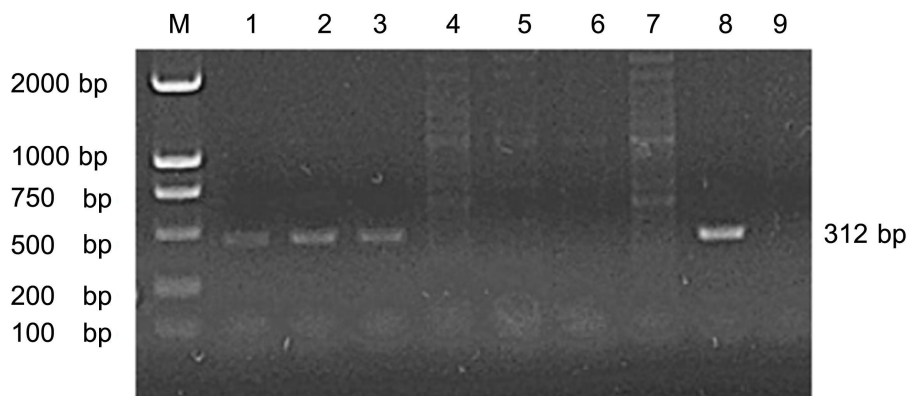


Figure 1. PCR detection for *Theileria annulata*. M: DNA Marker (DL2000); 1 - 9: Samples

图 1. 牛环形泰勒虫 PCR 检测结果。M: DL-2000 Marker; 1~9: 本文测定样品

3.2. 高原牦牛不同采样点牛环形泰勒虫感染情况

在样品采集点采集的样本中，牛只感染牛环形泰勒虫的感染率分别为：库孜更村中感染率为 11.1%(1/9)，萨尔库塔什村感染率为 0%(0/8)，库仑木勒克村感染率为 23.1%(3/13)，详情见图 2。

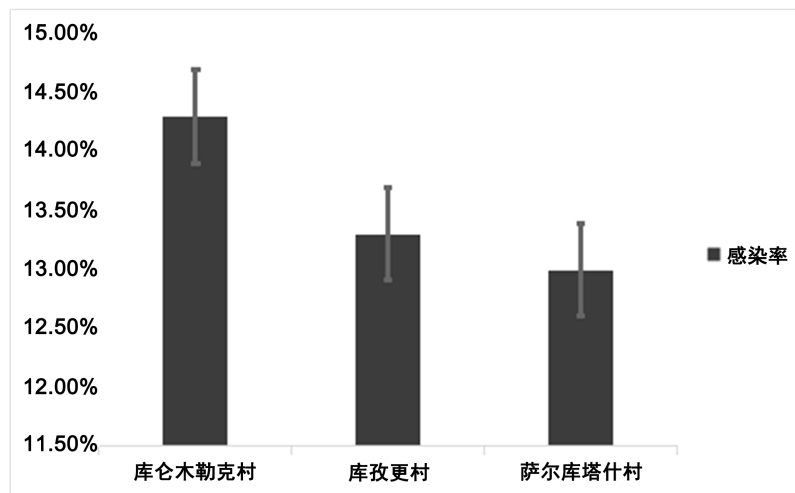


Figure 2. Infection rate of *Theileria annulata* in yaks which from different areas in the research
图 2. 不同地区的牦牛牛环形泰勒虫感染率

3.3. 高原地区牦牛不同性别感染情况

本次检测的高原牦牛中，牛环形泰勒虫总体阳性率为 13.3% (4/30)，母畜中检出率为 13.0% (3/23)，公畜中检出率为 14.3% (1/7)，使用 SPSS17 软件进行分析后发现 $P = 0.935 > 0.05$ 表明在本次牦牛感染牛环形泰勒虫中，性别与感染率之间不存在差异性。

4. 结论

牛环形泰勒虫病从世界范围内来看是一种常出现在热带和亚热带地区影响畜牧经济的疾病[5]。但是塔什库尔干县属于高原高寒干旱 - 半干旱气候，该地区由于海拔均在 3000 米以上从而导致气压极低，这种气候是适合牦牛生存的自然环境，但本结果验证了这种高原牦牛仍然感染了牛环形泰勒虫病流行病，这与中国环形泰勒虫病一般出现在西北半干旱地区[6]很大程度上对西北地区的畜牧业，尤其是牛类养殖方面产生了很大的负面影响，根据大量的文献研究表明该类疾病可以表现出不同且明显的临床症状[7]的文献描述基本一致。

常见的诊断方法主要有血清学检测 ELISA 方法，该方法操作简单，价格不是很昂贵适合大量样品的检测。但是也有文献指出 ELISA 检测其灵敏度和特异性较低[8]。本文选用了血涂片法和 PCR 检测[9]，以更提高了检测、诊断的准确度。结果显示，阳性率为 13.3% (4/30)。由于该季节操场遥远、牦牛散养等因素本文只调查了少部分(30 头份)牦牛的牛环形泰勒虫病感染情况，为后期工作打基础。这次报道，阿勒泰地区有患有牛环形泰勒虫病的报道[10]之后又一个非热带和亚热带地区(塔什库尔干县)的报道，这次季节的原因未采集到媒介蜱，故对于塔什库尔干县牛环形泰勒虫病的传播情况以及流行情况还需要进行进一步的研究。

基金项目

自治区法人科技特派员定点承包技术服务项目(编号：2016D09F011)。

参考文献

- [1] 乌兰, 姜晓东. 新疆牦牛现状及发展前景[J]. 新疆畜牧业, 2016(8): 24-25.
- [2] 孔繁瑶. 家畜寄生虫学[M]. 第二版. 北京: 中国农业出版社, 2008: 339-340.
- [3] 阿力米江·沙克, 巴音查汗. 阿合奇县色乡牦牛环形泰勒虫病流行病学调查报告[J]. 当代畜牧, 2012(4): 25-27.
- [4] Bilgic, H.B., Karagenc, T., Shiels, B., Tait, A., Eren, H. and Weir, W. (2010) Evaluation of Cytochrome b as a Sensitive Target for PCR Based Detection of *T. annulata* Carrier Animals. *Veterinary Parasitology*, **174**, 341-347. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.025>
- [5] Sivakumar, T., Hayashida, K., Sugimoto, C. and Yokoyama, N. (2014) Evolution and Genetic Diversity of *Theileria*. *Infection, Genetics and Evolution*, **27**, 250-263. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.013>
- [6] Guo, H.P., Yin, C.S., Galon, E.M., Du, J.G., Gao, Y., Moumouni, P.F.A., Liu, M.M., Efstratiou, A., Lee, S.-H., Li, J.X., Ringo, A.E., Wang, G.B., Li, Y.C., Tumwebaze, M.A. and Xuan, X.N. (2018) Molecular Survey and Characterization of *Theileria annulata* and *Ehrlichia ruminantium* in Cattle from Northwest China. *Parasitology International*.
- [7] Xu, Y.T., Zhang, S.F., Li, S.Y. and Jin, M.H. (1997) Progress in Diagnosis and Prevention Research of Bovine Theileriosis. *Journal of Agricultural Science Yanbian University*, **19**, 271-275. (In Chinese)
- [8] Gubbels, J.M., d'Oliveira, C. and Jongejan, F. (2000) Development of an Indirect Tams1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *T. annulata* Infection in Cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **3**, 404-411. <https://doi.org/10.1128/CDLI.7.3.404-411.2000>
- [9] 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.
- [10] 赵慧慧, 谢小婉, 杜兰兰, 郭子涵, 李才善, 郭庆勇. 阿勒泰部分地区牛环形泰勒虫病检测初报[J]. 亚洲兽医病例研究, 2017, 6(4): 41-45.

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: acrpvpm@hanspub.org