

奶牛新孢子虫病的巢式 PCR 诊断及 ELISA 检测

段保擎,王天奇*,钱伟锋,闫文朝,彭曦冉
(河南科技大学 动物科技学院,河南 洛阳 471003)

摘要: 为确定焦作某奶牛场奶牛流产是否与新孢子虫感染有关,对采自该奶牛场流产奶牛的胎牛组织进行新孢子虫 *Nc5* 基因巢式 PCR 检测诊断,并用 ELISA 方法对该奶牛场不同年龄阶段奶牛血清样品进行新孢子虫抗体检测。结果显示,在 4 例流产胎牛样本中有 3 例检出新孢子虫 DNA;新孢子虫血清抗体阳性率达 44.80% (112/250),其中,经产奶牛阳性率为 55.40% (77/139),未经产奶牛或犊牛阳性率为 31.53% (35/111);经产奶牛中有流产史的阳性率为 73.17% (30/41),其余未发生过流产的阳性率为 47.96% (47/98)。综上推断,新孢子虫是导致该奶牛场奶牛流产的主要病原。

关键词: 奶牛;新孢子虫;巢式 PCR;流产;抗体

中图分类号: S855.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2017)02-0124-03

Diagnosis of *Neospora caninum* Infection in Cattle Using Nested PCR and Its Detection by ELISA

DUAN Baoqing, WANG Tianqi*, QIAN Weifeng, YAN Wenchao, PENG Xiran
(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: In order to determine the prevalence of *Neospora caninum* in cattle from a dairy farm in Jiaozuo, aborted fetuses samples were tested by nested PCR, and serum samples of cattle with different ages were tested for antibodies to *N. caninum* by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that *N. caninum* DNA was detected in three of the four fetuses. *N. caninum* seroprevalence was 44.80% (112/250) in dairy cows. The seroprevalence was 55.40% (77/139) for dairy cows with pregnancy, 31.53% (35/111) for dairy cows with no pregnancy or calf. The seroprevalence of dairy cows with an aborting history was 73.17% (30/41), 47.96% (47/98) for dairy cows without abortion. Combined with the clinical manifestations of aborting dams and management in this dairy farm, *N. caninum* was thought to be the most potential cause of abortions.

Key words: dairy cow; *Neospora caninum*; nested PCR; abortion; antibody

新孢子虫病 (neosporosis) 是引起牛尤其是奶牛流产的重要原因之一,已有 70 多个国家和地区报道奶牛感染新孢子虫^[1-2]。目前,我国多个省(市)报道了新孢子虫病^[2-4]。河南省焦作市某奶牛场现存栏奶牛 350 多头,自 2006 年 5 月—2015 年 9 月共发生流产 80 多胎次,期间进行了实验室诊断,排除了弓形虫、布氏杆菌、牛病毒性腹泻病毒等致流产病原的存在。2015 年 10 月,该奶牛场出现暴发性流产,

10 d 内发生流产 10 例,占妊娠奶牛数量的 20%。考虑到该奶牛场散养有犬(新孢子虫终末宿主),推测流产与新孢子虫感染有关,因此,用巢式 PCR 方法对该奶牛场流产胎牛组织进行新孢子虫 *Nc5* 基因检测,同时用 ELISA 方法对不同年龄阶段奶牛血清样品进行新孢子虫抗体检测,以确定该奶牛场新孢子虫病的存在,旨在为该奶牛场预防新孢子虫病提供参考。

收稿日期:2016-10-12
基金项目:河南科技大学博士科研启动基金项目(09001675)
作者简介:段保擎(1989-),女,河南泌阳人,在读硕士研究生,研究方向:动物原虫病。E-mail: babyduan89@163.com
* 通讯作者:王天奇(1965-),男,河南新安人,教授,硕士,主要从事动物原虫病致病机理研究。E-mail: wtq@haust.edu.cn

1 材料和方法

1.1 病料采集

于 2015 年 10 月采集河南省焦作市某奶牛场 4 头新鲜流产胎牛,胎龄为 4 ~ 7 个月,其母牛均未见其他明显的临床症状。将流产胎牛放入冰盒内迅速送至实验室,取脑、心脏、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏, -20 ℃ 保存。采用颈静脉采血的方法,用一次性注射器采集不同年龄母奶牛血样 250 份,每份不少于 4 mL,分别编号,并收集对应奶牛的年龄、流产情况(流产时胎龄及母牛表现)等信息。

1.2 胎牛组织基因组 DNA 提取

先用洁净玻璃研磨器分别研磨脑、心、肺、肝、脾、肾等胎牛组织,再按组织/血液/细胞基因组 DNA 提取试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司产品)的操作说明,提取对应样品中基因组 DNA。

1.3 巢式 PCR 检测

参考 Yao 等^[5]报道的针对新孢子虫 *Nc5* 基因的巢式 PCR 引物进行扩增,外引物:Np6 序列为 5' - CTCGCAGTCAACCTACGTCTTCT - 3', Np21 序列为 5' - CCCAGTGCCTCCAATCCTGTAAC - 3';内引物:Np9 序列为 5' - GTTGCTCTGCTGACGTGTCGTTG - 3', Np10 序列为 5' - CTCAACACAGAACACT-GAACTCTCG - 3'。内引物扩增产物大小是 225 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR 扩增采用 25 μL 反应体系:去离子水 9.5 μL, 2 × Easy Taq PCR Super Mix 12.5 μL,上、下游引物(20 pmol/μL)各 0.5 μL,模板 2 μL。内引物扩增时取外引物扩增产物 1 μL 为模板。

内、外引物扩增条件相同,均为 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s,63 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。分别以新孢子虫 *Nc* - 1 分离株基因组 DNA 和去离子水为阳性对照和阴性对照。

通过 2% 琼脂糖凝胶电泳,检测巢式 PCR 扩增结果。每头新孢子虫阳性胎牛各选取 1 个阳性扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,通过 NCBI 网站上的 BLAST 工具对测序结果进行比对分析。

1.4 血清分离及抗体检测

采集到的血液样品首先水平放入 37 ℃ 恒温培养箱 2 h,然后置于 4 ℃ 冰箱过夜,待析出血清后,将其离心转移到洁净离心管中(凡溶血者弃去),贴上标签,保存于 -20 ℃ 冰箱中,备用。检测牛血清中新孢子虫抗体的 ELISA 试剂盒由中国农业大学

国家重点原虫实验室刘群教授赠送,按说明要求进行血清抗体检测。

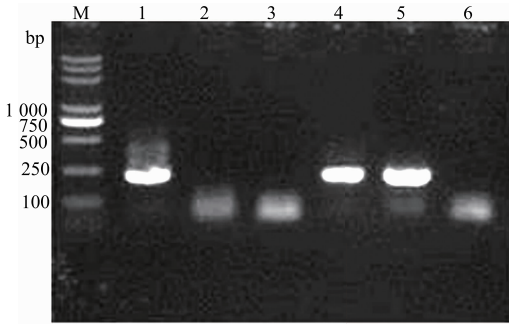
1.5 数据处理

统计不同阶段奶牛新孢子虫血清抗体阳性率,用 *u* 检验方法检验差异显著性^[6]。

2 结果与分析

2.1 流产胎牛组织新孢子虫 *Nc5* 基因巢式 PCR 检测结果

从图 1 可以看出,在 4 例流产胎牛组织中,通过巢式 PCR 检测出新孢子虫 *Nc5* 基因片段阳性 3 例。3 例阳性样品,均在新孢子虫重要寄生部位脑组织中检出,有 2 例在心肌中也检出(表 1)。3 个阳性病例中各选 1 个阳性反应产物进行测序,经 BLAST 比对结果显示,测得的 3 株新孢子虫 *Nc5* 基因序列之间有 3 个碱基存在差异,相似性为 99%。与 GenBank 中新孢子虫北京株(JN106449)和国外报道的新孢子虫序列(EF463099、AY665722、AY911515)的相似性为 98% ~ 99%。



M. DL 2000 plus DNA Marker; 1—4 分别是脑、肝脏、脾脏、心脏组织; 5. 阳性对照; 6. 阴性对照

图 1 流产胎牛组织新孢子虫 *Nc5* 基因的巢式 PCR 扩增结果

表 1 流产胎牛组织新孢子虫 *Nc5* 基因的巢式 PCR 检测结果

胎牛组织编号	脑	心	肝	肺	肾	脾
1	+	+	-	-	-	-
2	+	+	-	+	-	-
3	+	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	-

注: + 为阳性; - 为阴性; 1—4 分别为流产时间在妊娠 152、183、211、135 d 的胎牛组织。

2.2 不同年龄阶段新孢子虫血清样品检测结果

由表 2 可知,本试验检测的 250 份新孢子虫血清样品中,阳抗体阳性样品 112 份,阳性率为 44.80%。3 岁以上的经产奶牛血清样品共 139 份,其中,77 份为阳性,阳性率为 55.40%;2 岁以下的未经产奶牛或犍牛 111 份,阳性样品 35 份,阳性率为 31.53%,

经 u 检验,二者差异显著($P < 0.05$)。3~6 岁阶段的新孢子虫血清抗体阳性率 53.17% (67/126) 与 7~9 岁阶段的阳性率 76.92% (10/13) 之间差异不显著($P > 0.05$)。经产奶牛中曾发生流产奶牛数量为 41 份,阳性率为 73.17% (30/41),其余未发生过流产的阳性率为 47.96% (47/98),经 u 检验,二者差异极显著($P < 0.01$)。

表 2 不同年龄阶段新孢子虫血清抗体阳性率情况

奶牛年龄	样品数/份	阳性数/份	阳性率/%
9 岁	2	2	100.00
8 岁	5	4	80.00
7 岁	6	4	66.67
6 岁	16	9	56.25
5 岁	29	16	55.17
4 岁	31	16	51.61
3 岁	50	26	52.00
2 岁	58	22	37.93
1 岁	32	10	31.25
4~7 个月	21	3	14.29
合计	250	112	44.80

3 结论与讨论

新孢子虫感染是造成牛尤其是奶牛流产的重要原因之一,呈世界性分布,美国、英国、澳大利亚、新西兰、日本等 70 多个国家都有报道,严重危害养牛业的健康发展^[1-2]。我国多个省份和地区已报道该病的发生和流行。本次检测随机抽取 4 例新鲜流产胎牛组织,进行了新孢子虫病 PCR 诊断,并对不同年龄阶段奶牛进行血清抗体检测,结果发现,4 例流产胎牛组织中 3 例阳性,且被检血清抗体阳性率达 44.80%,有流产史者阳性率极显著高于无流产史的其他经产奶牛。现场调查发现,该奶牛场长年散养 4~6 条犬,可自由进入牛舍、活动场,夜晚则多宿于饲草存放区。场内胎盘和流产的胎牛被犬食用(该奶牛场现存的 4 条犬中有 2 条犬的粪便中检出新孢子虫卵囊,数据未发表)。根据 Dubey 等^[7]提出的奶牛感染新孢子虫的风险因素,如牛场内犬的存在、饲草饮水污染和缺乏管理等,结合该奶牛场奶牛流产的流行病学特征以及本次实验室检测结果,可以推断新孢子虫感染是造成该奶牛场奶牛流产的重要原因。

本次所检测到的血清抗体阳性率明显高于石冬梅等^[8]所报道的该地区的阳性率,与王常汉等^[4]在新疆地区调查某奶牛场的阳性率相当。不同奶牛场阳性率的差异,除与检测方法、抽样对象有关外,还与气候条件、牛群结构、终末宿主的存在、饲草及饮

水污染状况、饲养管理水平等有关,其中,终末宿主的存在是奶牛感染本病的重要风险因素。本次检测结果还发现,随供检测奶牛年龄增加,血清抗体阳性率有增大的趋势,说明该奶牛场奶牛新孢子虫的感染可能主要来源于病原的水平传播,即随着奶牛日龄的增大,其食入犬新孢子虫卵囊的机会大大增加,从而发生感染且血清抗体转阳。至于场内垂直传播情况如何,需根据场内奶牛系谱进行跟踪检测与分析^[9-10]。

鉴于奶牛感染新孢子虫病所造成的严重损失,奶牛场应重视本病的预防控制工作。首先,解决本病的水平传播问题,将犬从场内清除,禁止流浪犬进入场内;场内员工不许与犬接触;流产胎儿及胎衣要深埋,不能让犬食入;饲草和饮水不能被犬粪便污染。其次,逐步解决垂直传播问题,采用免疫学、PCR 等技术,检出和隔离阳性牛,并逐步将其淘汰,同时禁止阳性牛入场,最终建立无新孢子虫病牛群。

参考文献:

[1] 丁德,贾立军,其木格,等.犬新孢子虫 *NeSRS2* 基因片段的克隆及原核表达[J]. 河南农业科学,2008(5): 111-113.

[2] 刘群.新孢子虫病[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2013:92-116.

[3] 邹世颖,何倩妮,王小蕾,等.我国北方六省市牛新孢子虫病血清学调查[J]. 中国兽医杂志,2012,48(2): 54-55.

[4] 王常汉,季新城,杨帆,等.新疆地区流产奶牛新孢子虫病和布氏杆菌病的流行病学调查[J]. 新疆农业科学,2009,46(3):657-660.

[5] Yao L, Yang N, Liu Q, et al. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China[J]. Parasitology, 2009,136(11):1251-1256.

[6] 明道绪.生物统计附试验设计[M]. 北京:中国农业出版社,2002:86.

[7] Dubey J P, Schares G, Ortega-Mora L M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(2):323-367.

[8] 石冬梅,陈益,皇甫和平,等.河南省奶牛犬新孢子虫病流行病学调查[J].中国兽医杂志,2011,47(4): 48-50.

[9] Koiwai M, Hamaoka T, Haritani M, et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle with reproductive disorders in Japan[J]. Vet Parasitol, 2005, 130(1/2):15-18.

[10] 张维,刘晶,刘群.牛群中新孢子虫病传播途径的初步研究[C]//中国畜牧兽医学学会家畜寄生虫学分会.中国畜牧兽医学学会家畜寄生虫学分会第六次代表大会暨第十次学术研讨会论文集. 兰州:[出版者不详],2009:29-33.