

四川省甘孜州丹巴地区牦牛芽囊原虫分子流行病学调查

邹其睿 肖启程 王晨妮

四川民族学院

DOI:10.32629/as.v8i12.3530

[摘要] 为研究四川省甘孜州丹巴地区牦牛芽囊原虫的感染情况,采集了当地7个养殖场的50份粪便样本,经染色、DNA提取、PCR及测序分析,检出阳性样本5份,总感染率为10%(5/50)。共鉴定出ST10和ST14两种基因亚型,感染率分别为8%(4/50)和2%(1/50),ST10为优势亚型(占阳性样本80%)。结果表明该地区牦牛存在芽囊原虫感染,需针对性加强防控与养殖场卫生管理。

[关键词] 芽囊原虫; 牦牛; 感染率; 基因型

中图分类号: S823.8+5 **文献标识码:** A

Molecular Epidemiological Investigation of Blastocystis in Yaks in the Danba Region of Ganzi Prefecture, Sichuan Province

Qirui Zou Qicheng Xiao Chenni Wang

Sichuan Minzu University

[Abstract] A study in Danba, Sichuan, detected Blastocystis in yaks from 50 fecal samples. The infection rate was 10% (5/50), with subtypes ST10 (8%) and ST14 (2%) identified. ST10 was dominant (80% of positives). The results confirm local infection and underscore the need for targeted control and improved farm hygiene.

[Key words] Blastocystis; Yak; Infection rate; Genotype

牦牛(*Bos grunniens*)被列为世界三大耐寒物种之一,其种群中超过95%分布在中国^[1]。我国牦牛主要分布于青海、西藏、四川等地,其肉、乳可供食用,亦常作为运输工具。目前已在其体内检出隐孢子虫、弓形虫等多种寄生虫,这些病原不仅影响牦牛生产性能,造成经济损失,也可能因密切接触带来公共卫生风险^[2-4]。

芽囊原虫病(Blastocystis disease)是由芽囊原虫(Blastocystis)感染引起的人兽共患肠道寄生虫病,主要经粪-口途径传播,可引起腹泻、恶心、呕吐及肠道炎症等症状。根据SSU rRNA基因序列,目前至少已鉴定出44种亚型,其中ST1-ST17、ST21及ST23-ST44为有效亚型^[5],目前已有多项研究表明芽囊原虫对各种牛(奶牛、肉牛、牦牛)均存在感染现象^[6-8],因此,芽囊原虫感染牦牛会产生的公共卫生风险及经济损失风险不可忽视。

1 材料

1.1 样本采集

本试验于四川省甘孜州丹巴地区的7个规模化牦牛养殖场,共采集50份新鲜粪便样本,每份15-25g。样本装入标记采样时间、地点及编号的无菌采样管,冰袋保温运送至实验室。

1.2 试剂及仪器

台式高速离心机(型号: TG16G, 天津广丰科技有限公司), Wheathley三色染色液(上海源叶生物科技有限公司), PCR仪(型

号: G25+, LongGene[®]), 水平电泳仪(JY600D型, 北京君意东方公司), 凝胶成像分析系统(型号: JY04S-3C), PCR预混液(北京全式金公司), Trans2K[®] DNA Marker(北京全式金公司), 粪便DNA提取试剂盒(全式金EasyPure[®] Stool Genomic DNA Kit), 2.5%重铬酸钾溶液。

2 方法

2.1 处理粪便样本

实验室处理牦牛粪样时,取部分样品与2.5%重铬酸钾溶液移入25ml离心管中,于4℃保存用于DNA提取,其余样品保存于-20℃。

2.2 染色

按照Wheatley染色步骤完成操作后进行镜检。

2.3 DNA提取

将粪便样本经20目筛网过滤,加入超纯水混匀除杂,滤液离心后弃上清,取沉淀。随后使用EasyPure[®]StoolGenomic DNA Kit试剂盒完成基因组DNA提取。

2.4 PCR扩增

本实验采用的引物见表2,最终目的片段大小为1780bp,退火温度为65℃,PCR扩增的反应体系见表3,总反应体系体积为25 μL,PCR扩增的反应程序如下:

2.5 琼脂糖凝胶电泳

表1 PCR扩增反应条件

预变性	95°C, 4min	} 35cycles
变性	95°C, 30s	
退火	65°C, 30s	
延伸	72°C, 90s	
总延伸	72°C, 5min	
保存	4°C	

表2 芽囊原虫PCR引物

基因位点	引物名称	引物序列	退火温度(°C)	目的片段(bp)	参考文献
SSUrRNA	RD3	GGGATCTGTGATCCTCCGAGGTTACCTAC	65	1780	[9]
	RD5	GGAAGCTTATCTGGTGTCTGCGCAGTA			

表3 PCR扩增反应体系

试剂组成	体积大小(μL)
Template	2
上游引物(10 μM)	1
下游引物(10 μM)	1
2×EasyTaq PCR Super Mix(+dye)	16
Nuclease-free water	5
总反应体系	25

PCR扩增结束后,按比例取琼脂糖和TAE制备琼脂糖凝胶,加入绿色核酸染料,取5 μL PCR产物加入琼脂糖凝胶孔中,120V电压电泳30min。将琼脂糖凝胶取出放入紫外凝胶成像系统仪中观察结果并拍照保存。

2.6 序列分析

将阳性样本DNA送至成都擎科梓熙生物技术公司测序,测序结果通过美国NCBI数据库[Genome List-Genome-NCBI (nih.gov)]进行比对分析,确定牦牛感染芽囊原虫的基因亚型。

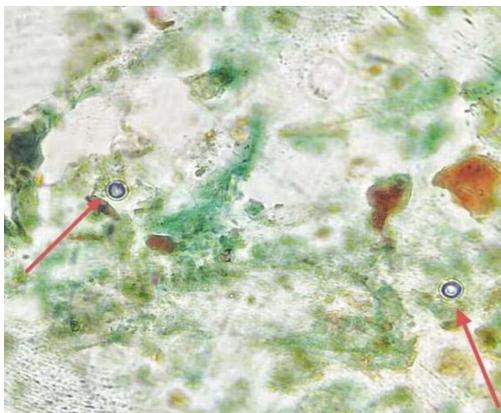


图1 粪便中芽囊原虫滋养体的染色结果

3 结果分析

3.1 Wheatley三色染色结果

Wheatley三色染色液通过与寄生虫细胞内特定生物大分子的选择性结合,把芽囊原虫不同类型的滋养体染色为带紫色调的蓝色或蓝绿色,同时与纯绿色的背景形成鲜明对比,具体结果见图1。

3.2 PCR扩增结果

为调查丹巴牦牛芽囊原虫种类,基于SSU rRNA基因位点,对当地7个养殖场的50份牦牛粪便DNA进行PCR扩增,并通过琼脂糖凝胶电泳分析产物。结果显示,5份样本扩增出与预期大小相符的1780bp目标条带,初步判定为芽囊原虫阳性,见图2。

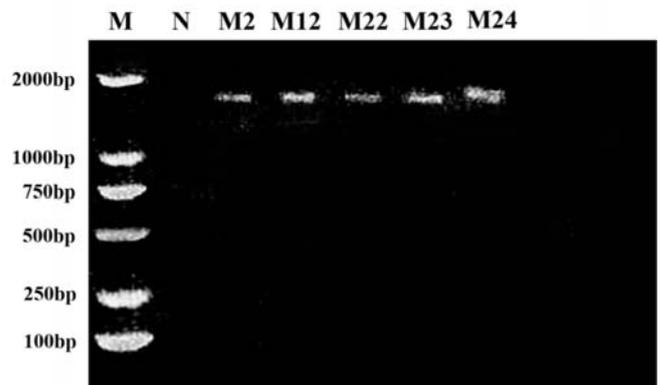


图2 琼脂糖凝胶电泳结果

3.3 测序结果

为确认阳性样本中芽囊原虫的基因亚型,委托成都擎科梓熙生物技术有限公司对DNA样本进行测序,获得5条完整序列。经与美国NCBI数据库比对,这些序列与参考序列ST10、ST14高度同源,同源性均达100%。测序结果证实共有5份阳性样本,感染率为10%,其中ST10亚型4份,ST14亚型1份。

4 讨论

本试验中测得的芽囊原虫感染率为10%,一定程度上反映了四川省甘孜州丹巴地区的芽囊原虫感染情况。我国多地均有芽囊原虫感染的报道,感染率在1.88%(广东)至54.86%(江西)之间^[9-10]。相比之下,甘孜州丹巴县的感染率相对较低,可能与样本量较少有关。此外,感染受多种因素影响:研究表明,24月龄以上牛的感染率更高,且奶牛感染率高于肉牛和水牛,提示品种与感染相关,M等人^[1]研究表明,海拔与卫生条件(如卫生差时感染率可达100%)均可能影响牦牛芽囊原虫感染率。甘孜州丹巴地区已发现感染现象,为控制其公共卫生风险与经济影响,需针对不同年龄段与海拔的牦牛采取相应防控措施,加强分群管理与饲养卫生。

我国多地牛群感染的芽囊原虫基因型存在地域差异:陕西检出ST4、ST5、ST10、ST14;云南与江西均为ST1、ST5、ST10、ST14;海南检出六种,新疆多达十种。综合显示,ST10为最主要流行型,ST14次之。本次试验虽未检出人畜共患基因型,但因样本量有限,不排除丹巴地区仍存在该风险,需持续重视防控。

研究表明,牛羊芽囊原虫是影响反刍动物健康的重要寄生虫,其感染率与品种、年龄、地域及饲养条件相关。然而,其生活史、致病机制及临床症状尚不明确。为预防潜在的人畜共患传播,需加强对ST10等流行亚型的深入研究。目前虽已有快速检测方法,但系统性的治疗方案仍未建立,未来需进一步探索有效治疗手段。

5 结论

本试验针对四川省甘孜州丹巴地区的牦牛芽囊原虫感染情况及感染基因型开展了调查研究,研究发现,在采集的样本中有5份为阳性样本,感染率为10%(5/50),经PCR扩增后测序分析,在5份阳性样本中,4份样本被确定感染了ST10基因属的芽囊原虫,1份样本被确定感染了ST14基因属的芽囊原虫。丹巴地区牦牛体内存在芽囊原虫感染,需要及时制定防控措施,防止芽囊原虫对当地经济以及公共卫生带来风险。

[基金项目]

国家大学生创新创业项目(202411661028)。

[参考文献]

[1]Ren M,Song J,Yang F,et al.First genotyping of Blastocystis in yaks from Qinghai Province, northwestern China[J].Parasites & Vectors,2019,12(1):171.

[2]张群英,赵文俊,王卫,等.牦牛肉品质特性及其影响因素研究进展[J].中国畜牧杂志,2025,61(06):110-119.

[3]韩梦妮,马丽,周璐露,等.隐孢子虫病及其在牦牛中的流

行现状[J].动物医学进展,2020,41(01):108-112.

[4]陈亚明,李勇生,高生智,等.甘南牦牛三种血液原虫多重PCR检测方法建立及流行病学调查[J].核农学报,2023,37(04):699-706.

[5]Santin M,Figueiredo A,Molokin A,et al.Division of Blastocystis ST10 into three new subtypes: ST42-ST44[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology,2024,71(1):e12998.

[6]马丁允,陈九思,马金秀,等.青海省共和县牦牛芽囊原虫分子流行病学调查[J].畜牧与饲料科学,2024,45(04):115-120.

[7]Liang Y,Liu Y Y,Mei J J,et al.Molecular Identification and Genotyping of Cryptosporidium spp.And Blastocystis ssp.in Cattle in Representative Areas of Shanxi Province, North China [J].Animals,2023,13(18).

[8]Hublin S J,Maloney G J,Santin M.Blastocystis in domesticated and wild mammals and birds[J].Research in Veterinary Science,2020,135(prepublish).

[9]王璐阳,曹乐天,王艳歌,等.广东省部分奶牛场芽囊原虫感染情况及亚型分析[J].中国兽医学报,2020,40(02):345-348.

[10]李佳琦.海南猪、牛、羊芽囊原虫分子流行病学研究[D].海南医学院,2023.

作者简介:

邹其睿(2004--),男,四川井研人,本科生,研究方向:兽医寄生虫病学。