

皖浙两省宠物犬海氏哈曼德(*Hammondia heydorni*) 球虫的分子鉴定

陈苗¹, 韩枫², 张衡¹, 阚珍珍¹, 唐莉¹, 李慧¹, 刘欣超¹, 李文超¹, 顾有方^{1*}

(1. 安徽科技学院动物科学学院, 凤阳 233100; 2. 太和县发展和改革委员会, 阜阳 236600)

摘要: 确定皖浙两省宠物犬海氏哈曼德(*Hammondia heydorni*)球虫的感染情况。从安徽多地和浙江杭州共采集 315 份新鲜宠物犬粪样, 提取粪便样本基因组 DNA, 所有样品先采用基于海氏哈曼德球虫/犬神经孢子虫(*H. heydorni/N. caninum*) ITS1 基因的通用引物进行 PCR 检测, 对获得的阳性扩增产物进行测序和分析, 随后对阳性样品用海氏哈曼德球虫的特异性 PCR 引物进行扩增验证。PCR 检测及序列分析发现 315 份粪便样本中有 2 个海氏哈曼德球虫阳性样本, 其自然感染率为 0.63%。皖浙两省宠物犬有海氏哈曼德球虫感染, 但感染率低。

关键词: 海氏哈曼德球虫; 犬; 分子鉴定; 安徽; 浙江

中图分类号: S855.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2019)03-0401-04

Molecular identification of *Hammondia heydorni* in dogs in selected areas of Anhui and Zhejiang Provinces

CHEN Miao¹, HAN Feng², ZHANG Heng¹, KAN Zhenzhen¹, TANG Li¹,
LI Hui¹, LIU Xinchao¹, LI Wenchao¹, GU Youfang¹

(1. College of Animal Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100;

2. Taihe County Development and Reform Commission, Fuyang 236600)

Abstract: To determine the prevalence of *H. heydorni* infection in pet dogs, a total of 315 fresh fecal samples were collected from pet dogs in Anhui and Zhejiang Province. All specimens were screened firstly by nested-PCR targeting *H. heydorni/N. caninum* ITS1 gene, and the positive amplified products obtained were sequenced and analyzed. Subsequently, the *H. heydorni/N. caninum*-positive samples were confirmed by *H. heydorni* ITS1 PCR. PCR and sequence analysis showed that 2 positive samples were found in 315 fresh fecal sample, and the prevalence for *H. heydorni* was 0.63%. The present study showed that the prevalence of *H. heydorni* was not high in the pet dogs from Anhui and Zhejiang Provinces.

Key words: *Hammondia heydorni*; dog; molecular identification; Anhui; Zhejiang

球虫是犬最常见的肠道原虫之一, 可导致犬, 尤其是幼犬或免疫低下的犬消瘦、贫血、呕吐、腹泻脱水及生长发育受阻, 严重时可导致死亡^[1]。寄生于犬的球虫种类较多, 按其卵囊大小可以分为大、中和小型等孢球虫 3 类, 其中隶属于哈曼德属(*Hammondia*)的海氏哈曼德球虫(*H. heydorni*)的卵囊属于小型似等孢球虫, 其和同样以犬为终末

宿主的神经孢子虫属(*Neospora*)的犬新孢子虫(*N. caninum*)的卵囊形态相似、大小重叠, 光镜下难以区分, 因此借助分子方法如 PCR 技术是目前区分它们的主要方法^[2], 间隔区序列(ITS)和 α -微管蛋白是区分这 2 种虫种的有效靶标^[3-9]。

犬自然感染海氏哈曼德球虫/犬神经孢子虫球虫在欧洲已有报道, 国内仅云南省有相关报

收稿日期: 2018-11-05

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1808085MC84), 安徽省科技重大专项(16030701066), 安徽省教育厅项目(KJ2014ZD09), 安徽科技学院重点学科项目(AKZDXK2015A04)和安徽科技学院校级稳定人才项目(dkwd201702)共同资助。

作者简介: 陈苗, 硕士研究生。E-mail: 1611503329@qq.com

* 通信作者: 顾有方, 博士, 教授。E-mail: youfanggu@163.com

道^[2,10]。华东地区是我国经济较为发达的地区,近年来宠物犬的保有量快速上升,为了解该地区宠物犬海氏哈曼德球虫的感染情况,本研究从安徽省和浙江省部分地区采集了宠物犬的粪便样品,采用PCR法对海氏哈曼德球虫的感染情况进行了调查。

1 材料与方法

1.1 样品采集

犬粪便样品的采集与保存等参照文献^[11]的方法。

1.2 主要试剂

粪便DNA提取试剂盒(Stool DNA Kit)购自天根生化科技(北京)有限公司;*rTaq* DNA聚合酶和DL2000均购自TaKaRa公司。

1.3 粪便基因组DNA的提取

参照粪便DNA提取试剂盒说明书进行,所得的基因组DNA溶于50 μL洗脱缓冲液中,-20℃备用。

1.4 PCR检测

1.4.1 粪便样品的ITS1基因套式PCR检测 参照Silva等^[12]的引物和方法对所有粪便样品进行巢式PCR检测。根据*H. heydorni*和*N. caninum* ITS1基因保守序列设计的套式PCR外侧引物为JS4: 5'-CGAAATGGGAAGTTTTGTGAAC-3', CT2b: 5'-TTGC GCGAGCCAAGACAT-3', 内侧引物序列为CT1: 5'-TGAATCCCAAGCAAAACA-3', CT2: 5'-GCGCG AGCCAAGACATCCAT-3'。预计扩增内套产物为400 bp。两轮PCR反应体系均为25 μL,含dNTP 2 μL, Buffer(含Mg²⁺) 2.5 μL,上游引物0.25 μL,下游引物0.25 μL,酶0.15 μL,双蒸水17.85 μL,其中首轮PCR用2 μL犬粪便基因组DNA作模板,第2轮PCR用2 μL首轮PCR产物作模板。反应条件为94℃, 1 min; 94℃, 1 min, 60℃(首轮PCR)或55℃(第2轮PCR), 1 min, 72℃ 1 min, 40个循环; 72℃ 10 min。

1.4.2 *H. heydorni*的鉴定 参照Slapeta等^[5]的引物对所获得的ITS1基因样本进行*H. heydorni*特异的PCR扩增。*H. heydorni*特异的引物序列为JS4: CGAAATGGGAAGTTTTGTGAAC, JS5: CAGCA GCTACATACGTAGA,预计扩增产物为267 bp。PCR反应体系同套式PCR,反应条件为95℃ 5 min; 95℃ 60 s, 65℃ 60 s, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 1.5 min。

上述引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。上述PCR产物经2.0%琼脂糖凝胶电泳

后置于凝胶成像系统下观察,拍照。

1.5 测序与分析

阳性PCR扩增产物经切胶后,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序,所得序列在GenBank中经BLAST分析以验证其是否为*H. heydorni* ITS1。

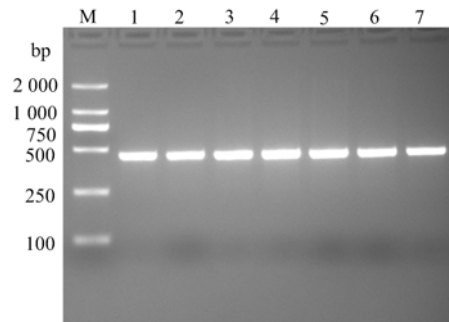
1.6 数据处理

利用SPSS11.5软件对数据进行统计分析,不同采样地区、年龄组感染率比较采用Fisher's exact test分析,当P<0.05时差异显著,P<0.01时差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *H. heydorni*的PCR扩增与鉴定

315份粪便样品,用套式PCR共扩增出7个ITS1基因阳性样品,产物大小均为400 bp,与预期的内套产物相符(见图1)。序列分析及BLAST比对显示其中2个样品的ITS1序列的一致性为99.49%,与GenBank中其他*H. heydorni* ITS1基因的一致性为97%~100%,显示该2个序列均为*H. heydorni* ITS1基因,另5个样品的序列经比对均为新孢子虫ITS1基因(见图2)。7个ITS1基因阳性样品经*H. heydorni*特异PCR扩增后也显示仅2份*H. heydorni*阳性样品扩增出相应条带,而5份新孢子虫阳性样品均未扩增出目的条带(图3),随后的测序及序列分析进一步验证了2份样品为*H. heydorni*感染。



M: DNA标志物; 1-7: ITS1基因阳性样本

M: DNA marker; 1-7: *H. heydorni*/*N. caninum*-positive specimens

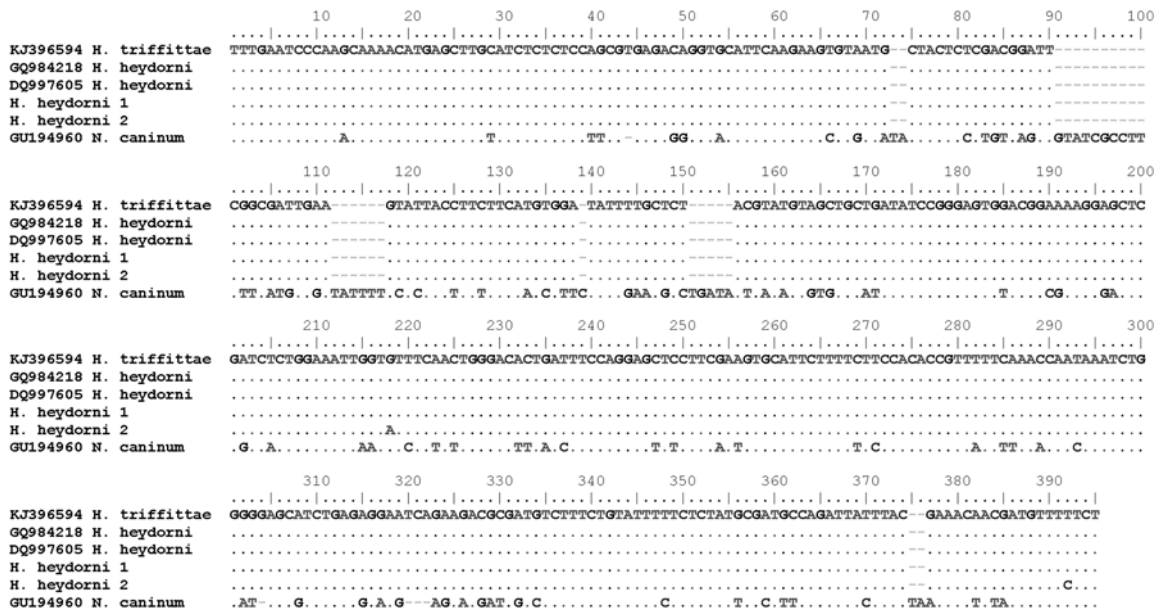
图1 *H. heydorni*/*N. caninum* ITS1基因PCR扩增结果
Figure 1 PCR amplification of *H. heydorni*/*N. caninum* ITS1 gene

2.2 *H. heydorni*流行情况

本研究中,套式PCR显示皖浙两省犬*H. heydorni*/*N. caninum*样球虫的感染率为2.22%(7/315)随后的测序及分析显示仅2份*H. heydorni*/*N. caninum*样球虫阳性样本为*H. heydorni*感染。*H. heydorni*特异的单轮PCR结果也显示仅2

份样品为 *H. heydorni* 感染, 因此本研究中皖浙两省犬 *H. heydorni* 的阳性感染率为 0.63% (2/315)。 *H. heydorni* 阳性样品分布在宣城和蚌埠, 两地区 *H.*

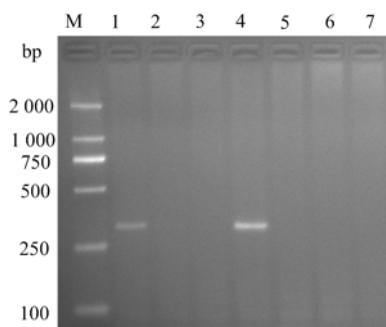
heydorni 阳性率分别为 4.00% (1/25) 和 3.23% (1/31), 其余地区犬未见到有 *H. heydorni* 感染(见表 1)。



H. heydorni 1 和 *H. heydorni* 2 为本研究中得到的 *H. heydorni* 分离株
H. heydorni 1 and *H. heydorni* 2 indicate *H. heydorni* isolates in this study

图 2 *H. heydorni*, *N. caninum* 和 *H. truffittae* ITS1 序列比对

Figure 2 Alignment of the ITS1 sequences of the *H. heydorni*, *N. caninum* and *H. truffittae*



M: DNA marker; 1-7: *H. heydorni*/*N. caninum* ITS1 基因阳性样本

M: DNA marker; 1-7: *H. heydorni*/*N. caninum* -positive specimens

图 3 *H. heydorni* ITS1 基因 PCR 扩增结果

Figure 3 PCR amplification of *H. heydorni* ITS1 gene

3 讨论

H. heydorni 和 *N. caninum* 两者的终末宿主都是犬, 2 种球虫卵囊结构相似, 从形态上无法做出区分。尽管两者在生活史上存在差异, 但通过生活史来进行虫种鉴定不仅费时费力, 且需要大量的实验动物, 而且该方法也不能区分 *H. heydorni* 和 *N. caninum* 混合感染^[10]。PCR 技术, 尤其是套式 PCR, 灵敏度和特异性较高, 尤其适用于卵囊十分微小, 含杂质多

且目的基因又很少的粪便样本检测。本研究首先采用 *H. heydorni*/*N. caninum* 样球虫通用的套式 PCR 方法对所有粪便样本进行检测, 在获得的 *H. heydorni*/*N. caninum* 样球虫阳性样本的基础上, 用 Slapeta 等^[5]设计的 *H. heydorni* 的特异性引物 JS4/JS5 对阳性样本进行 *H. heydorni* 的鉴定, 获得了较好的效果。

因 *H. heydorni* 和 *N. caninum* 的卵囊在形态上很难区分, 因此早期用传统粪检方法所做的犬肠道寄生虫流行病学调查研究中, 一般都是把 *H. heydorni* 和 *N. caninum* 样球虫混合在一起进行结果分析, 无法精确定种。本研究中, 皖浙两省犬 *H. heydorni*/*N. caninum* 样球虫的感染率为 2.22% (7/315), 这一结果低于罗马尼亚 (9.6%), 伊朗 (4.4%) 等的相关报道, 但高于澳大利亚 (1.7%), 德国 (0.3%), 瑞士 (0.7%) 和捷克 (0.22%) 等国的相关报道, 也高于我国昆明市的报道 (0.5%, 0.8%)^[1,5,13-17]。本研究中, 犬 *H. heydorni* 的感染率为 0.63%, 这一结果与用 PCR 方法对美国野生犬科动物调查所得的 *H. heydorni* 感染率(1.1%)类似^[18]。分析不同地区犬 *H. heydorni*/*N. caninum* 样球虫或 *H. heydorni* 感染存在差异的原因, 可能与调查的地域、是否驱虫以及犬只的卫生状况等因素有关。

表 1 本研究中宠物犬海氏哈曼德球虫感染情况

Table 1 Prevalence of *H. heydorni* infection in pet dogs in this study

采样地点 Sampling site	样本数 Number of samples	阳性样本数 Number of positive samples	感染率/% Positive rate
合肥 Hefei	29	0	0.00
宣城 Xuancheng	25	1	4.00
滁州 Chuzhou	89	0	0.00
蚌埠 Bengbu	31	1	3.23
宿州 Suzhou	41	0	0.00
杭州 Hangzhou	100	0	0.00
总计 Total	315	2	0.63

尽管迄今研究显示 *H. heydorni* 对犬无明显的致病性, 而且其在犬群中感染率较低, 但是, 加强对犬 *H. heydorni* 感染情况的研究, 对于了解 *H. heydorni* 对其他肠道寄生虫感染的潜在影响和传播的竞争等具有重要的意义^[18]。

参考文献:

- [1] 孟余, 胡俊杰. 昆明市犬球虫种类及流行病学调查[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(11): 34-36.
- [2] DUBEY J P. The evolution of the knowledge of cat and dog coccidia[J]. Parasitology, 2009, 136(12): 1469-1475.
- [3] ELLIS J T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*[J]. Int J Parasitol, 1998, 28(7): 1053-1060.
- [4] ELLIS J T, MORRISON D A, LIDDELL S, et al. The genus *Hammondia* is paraphyletic[J]. Parasitology, 1999, 118(4): 357-362.
- [5] SLAPETA J R, KOUDELA B, VOTÝPKA J, et al. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*[J]. Vet J, 2002, 163(2): 147-154.
- [6] SREEKUMAR C, HILL D E, FOURNET V M, et al. Detection of *Hammondia heydorni*-like organisms and their differentiation from *Neospora caninum* using random-amplified polymorphic DNA-Polymerase chain reaction[J]. J Parasitol, 2003, 89(5): 1082-1085.
- [7] MONTEIRO R M, DE JESUS PENA H F, GENNARI S M, et al. Differential diagnosis of oocysts of *Hammondia*-like organisms of dogs and cats by PCR- RFLP analysis of 70-kilodalton heat shock protein (HSP₇₀) gene[J]. Parasitol Res, 2008, 103(1): 235-238.
- [8] SIVERAJAH S, RYCE C, MORRISON D A, et al. Characterization of an alpha tubulin gene sequence from *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni*, and their comparison to homologous genes from Apicomplexa[J]. Parasitology, 2003, 126(6): 561-569.
- [9] ABEL J, SCHARES G, ORZESZKO K, et al. *Hammondia* isolated from dogs and foxes are genetically distinct[J]. Parasitology, 2006, 132(2): 187.
- [10] JIE H J, YU M, FEN Y Y, et al. First isolation of *Hammondia heydorni* from dogs in China[J]. Vet Parasitol, 2013, 197(1/2): 43-49.
- [11] 周永, 周力, 陈程, 等. 皖浙两省宠物犬肠道寄生虫病感染情况调查[J]. 安徽科技学院学报, 2014, 28(1): 15-18.
- [12] SILVA M S A, UZÊDA R S, COSTA K S, et al. Detection of *Hammondia heydorni* and related coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil[J]. Vet Parasitol, 2009, 162(1/2): 156-159.
- [13] MIRCEAN V, GYÖRKE A, COZMA V. Prevalence and risk factors of *Giardia duodenalis* in dogs from Romania[J]. Vet Parasitol, 2012, 184(2/3/4): 325-329.
- [14] RAZMI G R. Survey of dogs' parasites in Khorasan Razavi Province, Iran[J]. Iran J Parasitol, 2009, 4(4): 48-54.
- [15] BUGG R J, ROBERTSON I D, ELLIOT A D, et al. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia[J]. Vet J, 1999, 157(3): 295-301.
- [16] BARUTZKI D, SCHAPER R. Results of parasitological examinations of faecal samples from cats and dogs in Germany between 2003 and 2010[J]. Parasitol Res, 2011, 109 (S1): 45-60.
- [17] SAGER H, MORET C S, MÜLLER N, et al. Incidence of *Neospora caninum*, and other intestinal protozoan parasites in populations of Swiss dogs[J]. Vet Parasitol, 2006, 139(1/2/3): 84-92.
- [18] SINNOTT D, MORENO TORRES K, WOLFE B, et al. Detection of *Hammondia heydorni* DNA in feces collected in and around an Ohio Wildlife Conservation Center[J]. Vet Parasitol Reg Stud Reports, 2016, 6: 31-34.