

张颖, 瓦热斯·吐尔松, 辛连喜, 等. 新疆部分地区绵羊捻转血矛线虫苯并咪唑抗性相关分子 I 型 β -微管蛋白基因的多态性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (10): 49-56.

ZHANG Y, TUERSONG W, XIN L X, et al. Polymorphism analysis of benzimidazole resistance-associated I- β -tubulin gene of *Haemonchus contortus* populations in the sheep in some regions of Southern Xinjiang [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (10): 49-56.

新疆部分地区绵羊捻转血矛线虫苯并咪唑抗性相关分子 I 型 β -微管蛋白基因的多态性分析

张颖^{1#}, 瓦热斯·吐尔松^{1#}, 辛连喜¹, 热依兰木·吐尔洪¹, 卡力比夏提·艾木拉江²,
阿得力江·吾斯曼¹, 胡敏³, 巴音查汗·盖力克¹, 郭庆勇¹, 赛福丁·阿不拉^{1*}

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

2. 新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011;

3. 华中农业大学动物医学院农业微生物发掘与利用全国重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为了解新疆地区绵羊捻转血矛线虫对苯并咪唑类药物的抗性相关分子 β -微管蛋白基因的多态性, 本研究对克州及喀什的 183 条捻转血矛线虫成虫进行 ITS-2 基因特异性 PCR 鉴定后, 对抗药相关的 I 型 β -微管蛋白基因进行了扩增和测序, 并对该抗药基因的单核苷酸多态性 (SNP) 167、198 和 200 位点进行了分析。结果: 在 2 个地区种群中, 198 位点及 200 位点均发生不同程度突变, 且以 198 位点突变为, 暂未在 167 位点发生突变; 两地共发现了 5 种基因型, 其中 198 位点纯合敏感型及 200 位点纯合抗药型 (喀什 12 条占 12.37%, 克州 2 条占 2.33%), 198 位点纯合抗药型及 200 位点纯合敏感型 (喀什 23 条占 23.71%, 克州 7 条占 8.14%) 两地均存在, 提示这 2 个种群都存在抗药性。本研究首次报道了新疆部分地区捻转血矛线虫种群 I 型 β -微管蛋白基因存在苯并咪唑类药物抗药性突变, 为新疆地区捻转血矛线虫病的有效防控及抗药性研究提供理论依据。

关键词: 抗药性; 苯并咪唑; 捻转血矛线虫; I 型 β 微管蛋白基因; 单核苷酸多态性; 新疆南疆

中图分类号: S855.9 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)10-0049-08

Polymorphism analysis of benzimidazole resistance-associated I- β -tubulin gene of *Haemonchus contortus* populations in the sheep in some regions of Southern Xinjiang

ZHANG Ying^{1#}, TUERSONG Waresi^{1#}, XIN Lianxi¹, TUERHONG Reyilanmu¹, AIMULAJIANG Kalibixiati²,
WUSIMAN Adelijiang¹, HU Min³, GAILIKE Bayinchahan¹, GUO Qingyong¹, ABULA Saifuding^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. State Key Laboratory on Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Clinical Medicine Institute, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

3. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology Discovery and Utilization, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The study aimed to evaluate the prevalence of resistance to benzimidazoles of *Haemonchus contortus* of sheep in some regions of Southern Xinjiang, as well as the phylogenetic relationship of resistance haplotypes. A total of 183 *H. contortus* adult worms from sheep in the two regions of Kizilsu Kirgiz Autonomous Prefecture and Kashgar Prefecture in southern Xinjiang were isolated and identified by morphological evaluation and PCR with *H. contortus*-specific primers targeting the second internal transcribed spacer (ITS-2). Then, the I- β -tubulin gene associated with benzimidazole resistance was also amplified. The PCR products were then sent for sequencing, and the benzimidazole resistance-related single nucleotide polymorphisms (SNPs) at locus 167, 198, and 200 were analyzed, respectively. The results showed that

收稿日期: 2023-10-09; 修回日期: 2024-08-12

基金项目: 2022 自治区高校科研计划 (L) (XJEDU2022P051)

第一作者: 张颖, 女, 硕士研究生; 瓦热斯·吐尔松, 男, 维吾尔族, 讲师。[#]共同第一作者

* 通信作者: 赛福丁·阿不拉, 维吾尔族, 教授, 主要研究方向为中兽医学与中兽药学, E-mail: 1348793799@qq.com。

E198A and F200Y mutations were detected in the investigated *H. contortus* population. E198A had a higher frequency. In total, five genotypes were detected, HR-198 and Hs-200 (Kizilsu Kirgiz Autonomous: 12, 12.37%; Kashgar Prefecture: 2, 2.33%), HS-198 and HR-200 (Kizilsu Kirgiz Autonomous: 23, 23.71%; Kashgar Prefecture: 7, 8.14%), indicating the presence of drug resistance. In addition, the phylogenetic analysis based on the I- β -tubulin gene sequence revealed that the sequences obtained from this study were grouped with those from other strains in GenBank. In summary, we reported, for the first time, the existence of benzimidazole resistance-associated SNPs in the I- β -tubulin gene of *H. contortus* populations in some regions of Southern Xinjiang, which offered a theoretical basis for research on effective prevention and control of this parasite in the Xinjiang area.

Keywords: anthelmintic resistance; benzimidazole; *H. contortus*; I- β -tubulin gene; single nucleotide polymorphism; Southern Xinjiang

羊养殖业是新疆最具优势的传统产业,在南疆地区畜群结构中处于突出地位^[1],但南疆地区羊群中寄生性线虫病的流行较为普遍^[2],其中危害较为严重的是捻转血矛线虫。该虫起源于非洲撒哈拉沙漠以南地区,经过数千年的宿主动物迁徙和人为因素影响,现已遍布全球^[3]。捻转血矛线虫主要寄生在小反刍动物皱胃内,吸食宿主血液,致宿主消瘦、贫血,严重感染时致死,幼畜死亡率高达30%~50%^[4-5],给羊养殖业造成巨大的经济损失。

目前,捻转血矛线虫的防控主要依赖于三大类化学驱虫药,其中,广谱驱虫药苯并咪唑类(benzimidazoles, BZs)被广泛应用于捻转血矛线虫病的防治^[6-7],但由于长期用药和滥用药物导致抗药性问题日益严重。目前,BZs抗性在许多国家都存在,报道较多的地区有北美的美国、加拿大,南美的巴西、阿根廷、乌拉圭,澳洲的新西兰、澳大利亚,欧洲的比利时、英国、法国、丹麦、荷兰、德国、瑞士和瑞典,非洲的坦桑尼亚、南非及肯尼亚,亚洲的巴基斯坦、印度,还有我国的河北、云南、广西、新疆、内蒙、辽宁等地^[8-10]。总之,捻转血矛线虫BZs抗性在不断扩大和蔓延,已成为该线虫防治中的主要问题。

国内已有大量关于捻转血矛线虫BZs抗性相关研究,证实其抗性的产生与虫体内的I型 β -微管蛋白(I- β -tubulin)基因密切相关。长期使用化学药物会导致I- β -tubulin基因的3个位点发生突变,分别为167位点(TTC-TAC),198位点(GAA-GCA),200位点(TTC-TAC),导致与药物结合位点的结构发生改变,从而产生抗性^[11-12]。目前全球范围内BZs抗性中出现频率最高的突变位点是200位点,但我国主要以198位点突变为主,200位点发生突变频率次之^[14],暂未发现167位点发生突变^[13-14]。目前,南疆各地绵羊捻转血矛线虫BZs抗药性相关研究相对匮乏,是否存在抗药性仍未知。因此,本研究对喀什和克州地区捻转血矛线虫BZs抗性相关基因I- β -tubulin的单核苷酸多态性(SNP)进行调查,为后续该地区羊养殖业捻转血矛线虫防治工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源

疑似捻转血矛线虫成虫样本采自新疆南疆克州和喀什地区屠宰场。从克州、喀什屠宰场各采集皱胃20个,从中分别采集成虫2000、1500余条。将获得的新鲜成虫用生理盐水反复冲洗数次,置于70%酒精中,-20℃保存备用。

1.1.2 主要试剂

血液/组织/细胞基因组DNA提取试剂盒(DP-304),购自天根生化科技有限公司;酶(2×TransStart FastPfu Fly PCR SuperMix),购自北京全式金生物技术股份有限公司;DEPC水、6×DNA上样缓冲液(6×DNA Loading Buffer),购自生工生物工程(上海)股份有限公司;BioGold 2000 DNA Marker、核酸染料,均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DNA Clean-up Kit试剂盒,购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

显微镜BK1201,购自重庆重光实业有限公司;HM-W420数显三用恒温水浴锅,购自金坛市医疗仪器厂;DYY-6C型电泳仪,购自北京六一仪器厂;旋涡混合器MX-S,购自大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;QIAamplifier 96通道PCR仪,购自德国QIAGEN GmbH公司;H1650型台式高速离心机,购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;BIORAD凝胶成像系统(MODEL: Universal Hood II),购自北京海洋蓝天发展有限公司。

1.2 提取DNA

按照血液/组织/细胞基因组DNA提取试剂盒说明书对随机选取来自不同皱胃的183条成虫进行基因组DNA的提取,用NanoDrop 2000分光光度计测定浓度及纯度,在-20℃条件下保存。

1.3 引物合成

针对捻转血矛线虫核糖体第二内转录间隔区(ITS-2)引物序列,ITS-2 F: 5'-CAAATGGCATT-

GTCTTTAG-3', ITS-2 R: 5'-TTAGTTTCTTTTCCTC-CGCT-3', 扩增片段为 265 bp^[15]; I- β -tubulin 基因编码基因特异性引物序列, β -tubulin F: 5'-GACG-CATTCATTGGAGGAG-3', β -tubulin R: 5'-CATAG-GTTGGATTGTGAGTT-3', 扩增片段 385 bp^[16], 在上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 虫体 ITS-2 序列的 PCR 扩增

PCR 扩增反应体系为 25 μ L: DNA 2.0 μ L, 上下游引物各 1.0 μ L (10 mmol/L), 2 \times TransStart FastPfu Fly PCR SuperMix 12.5 μ L, DEPC H₂O 8.5 μ L。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 经紫外透射仪观察结果。

1.5 虫体 I- β -tubulin 基因序列的 PCR 扩增

PCR 扩增反应体系为 25 μ L: 上、下游引物各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, 2 \times TransStart FsatPfu Fly PCR SuperMix 12.5 μ L, DEPC H₂O 8.5 μ L。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 35 个循环; 最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增完成后取 5 μ L PCR 产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上检测目的带。

1.6 虫体 I- β -tubulin 基因 SNP 的检测

对捻转血矛线虫成虫样品进行 I- β -tubulin 基因扩增后, 按照康为世纪 DNA Clean-up Kit 试剂盒说明书, 对未出现非特异性扩增的 PCR 产物进行纯化后送武汉擎科生物工程技术有限公司进行测序, 并对序列峰图进行 SNP 分析, 若出现双峰, 则为杂合型; 若为单峰, 则为纯合敏感型或纯合抗药型。

1.7 虫体 BZs 抗药性与等位基因频率分析

对采集的 183 条捻转血矛线虫样品进行 BZs 抗药性相关的 I- β -tubulin 基因分析, 统计两地区捻转血矛线虫种群基因突变情况及抗药基因型频率。

1.8 序列比较分析

随机取喀什和克州地区各 5 个阳性样品 (编号为 Kashi2、Kashi6、Kashi9、Kashi 21、Kashi24、Kezhou4、Kezhou14、Kezhou17、Kezhou20、Kezhou48) 的测序结果在 NCBI 上进行 Blast, 选择与其相似度高的不同地区捻转血矛线虫 I- β -tubulin 基因相关序列, 以及对 BZs 敏感的序列, 采用序列分析软件 ESPript 进行多序列比对分析。

2 结果

2.1 捻转血矛线虫的采集情况

2023 年 3—4 月, 前往克州和喀什地区屠宰场采集绵羊新鲜皱胃, 剖检时发现皱胃壁上附着有线虫 (图 1A)。将采集的成虫进行形态学鉴定 (图 1B), 发现雄虫较小, 在显微镜下能观察到雄虫典型特有的“Y”字型的交合伞 (图 1C), 雌虫较大, 肉眼及镜下均可见到红白相间的“麻花状”特征 (图 1D)。通过形态学鉴定初步确定所采集的成虫为捻转血矛线虫。

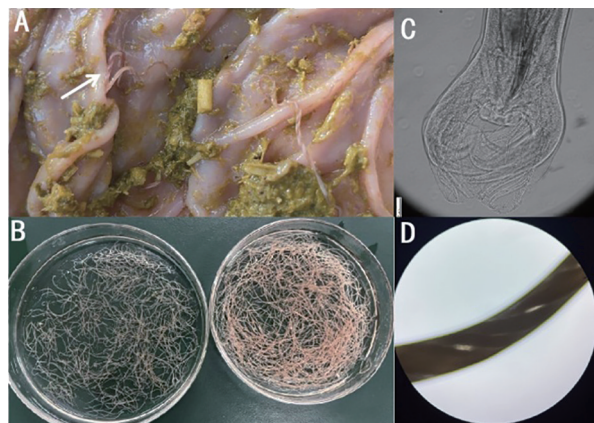


图 1 捻转血矛线虫形态学鉴定
A. 皱胃壁附着的捻转血矛线虫; B. 捻转血矛线虫成虫; C. 捻转血矛线虫雄虫交合伞 (20 \times); D. 捻转血矛线虫雌虫 (10 \times)。

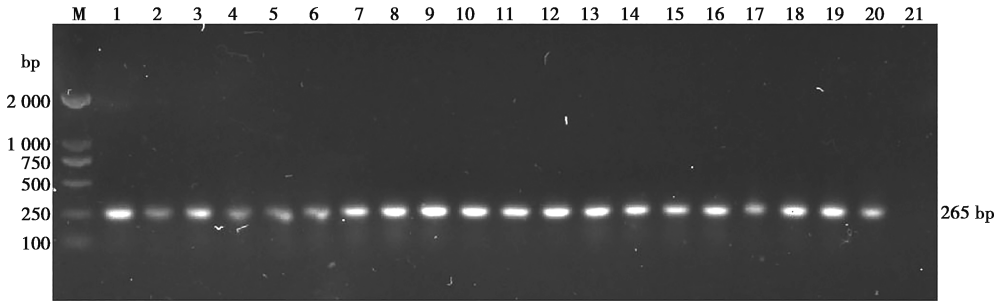
图 1 捻转血矛线虫形态学鉴定

2.2 捻转血矛线虫 ITS-2 序列 PCR 扩增鉴定

为了进一步确定所采集成虫是否为捻转血矛线虫, 使用捻转血矛线虫 ITS-2 基因特异性引物对随机选择的 183 条成虫 DNA 样品进行 PCR 扩增, 结果显示, 均出现片段长度大约为 265 bp 的特异性条带 (图 2), 与预期结果相符, 证明所选的成虫样本均为捻转血矛线虫, 可用于后续试验。

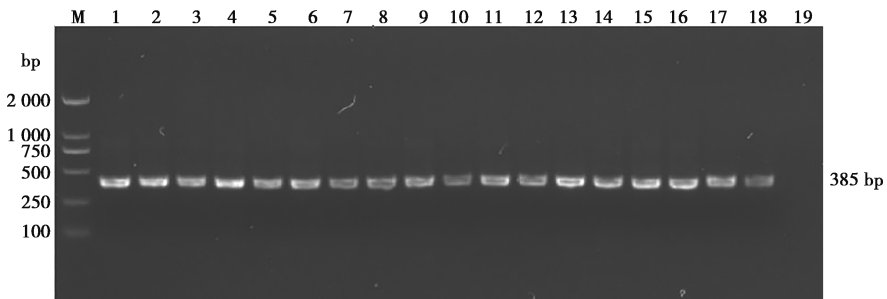
2.3 虫体 I- β -tubulin 基因的 PCR 扩增鉴定

使用捻转血矛线虫 I- β -tubulin 基因的扩增引物, 对所提取的 183 条成虫样本的 I- β -tubulin 基因进行扩增, 发现目的片段长度为 385 bp (图 3), 说明成功扩增出目的基因, 可用于后续的抗药性基因 SNP 位点分析。



M. DNA 分子量标准; 1~20. 样品 ITS-2 扩增产物; 21. 阴性对照。

图 2 ITS-2 基因扩增产物的琼脂糖凝胶电泳



M. DL2000 Marker; 1~18. 样品 I-β-tubulin 扩增产物; 19. 阴性对照。

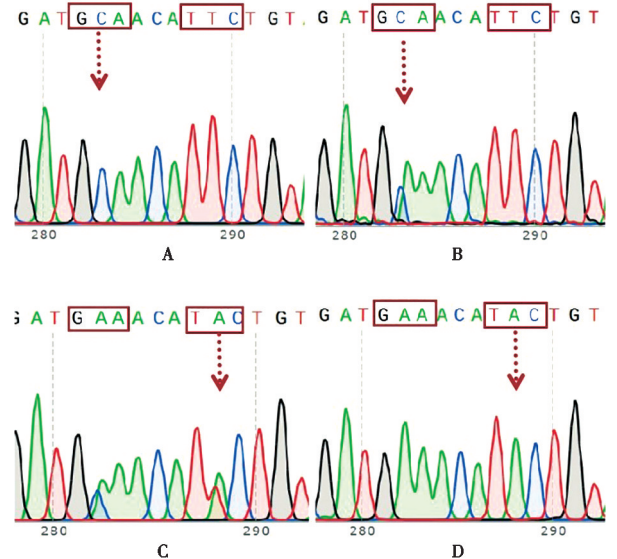
图 3 I-β-tubulin 基因扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

2.4 虫体 I-β-tubulin 基因 SNP 位点的检测

图 4 结果显示，两地种群中 I-β-tubulin 基因 SNP 167 位点都是纯合敏感型，而 198 和 200 位点都出现了不同程度的杂合抗药型和纯合抗药型。

2.5 虫体 BZs 抗药性相关基因 SNP 位点等位基因频率

对捻转血矛线虫的 I-β-tubulin 基因序列的 3 个 BZs 药物抗药性相关基因 SNP 位点进行分析（表 1），发现 183 条捻转血矛线虫在 167 位点均为纯合敏感型。在 198 位点，克州地区 74 条虫体为纯合敏感型（86.04%），5 条虫体为杂合抗药（5.81%），7 条虫体为纯合抗药型（8.14%）；喀什地区 63 条虫体为纯合敏感型（64.95%），11 条虫体为杂合抗药型（11.34%），23 条虫体为纯合抗药型（23.71%）。在 200 位点，克州地区 78 条虫体为纯合敏感型（90.70%），6 条虫体为杂合抗药型（6.98%），2 条为纯合抗药型（2.33%）；喀什地区 80 条虫体为纯合敏感型（82.47%），5 条虫体为杂合抗药型（5.15%），12 条为纯合抗药型（12.37%）。



A. 198 位点纯合抗药型及 200 位点纯合敏感型；
B. 198 位点杂合抗药型及 200 位点纯合敏感型；
C. 198 位点纯合敏感型及 200 杂合抗药型；
D. 198 位点纯合敏感型及 200 位点纯合抗药型。

图 4 3 个 SNP 位点的基因型峰图

表1 克州、喀什地区捻转血矛线虫种群 I-β-tubulin 基因 167、198 和 200 位点的多态性

地区	位点	纯合敏感型			杂合抗药型			纯合抗药型		
		条数	频率/%	序列	条数	频率/%	序列	条数	频率/%	序列
克州	167	86	100	TTC	0	0	TAC/TTC	0	0	TAC
	198	74	86.04	GAA	5	5.81	GCA/GAA	7	8.14	GCA
	200	78	90.70	TTC	6	6.98	TAC/TTC	2	2.33	TAC
喀什	167	97	100	TTC	0	0	TAC/TTC	0	0	TAC
	198	63	64.95	GAA	11	11.34	GCA/GAA	23	23.71	GCA
	200	80	82.47	TTC	5	5.15	TAC/TTC	12	12.37	TAC

此外，根据 198 和 200 位点的突变情况，用 Hs (homozygous sensitive) 表示纯合敏感型，HR (homozygous resistance) 表示纯合抗药型，Het (heterozygosis resistance) 表示杂合抗药型。在 183 条检测样品中共有 5 种基因型 (表 2)，分别为：Hs-198+Hs-200, Het-198+Hs-200, Hs-198+Het-200, Hs-

198+HR-200 以及 HR-198+Hs-200。其中 Hs-198+Hs-200 在 2 个种群的频率最高，分别为 47.42%、76.74%。此外，HR-198+Hs-200 在 2 个种群的频率分别为 23.71%、8.14%，Hs-198+HR-200 在 2 个种群的频率分别为 12.37%、8.14%。

表2 克州及喀什地区捻转血矛线虫种群 I-β-tubulin 的基因型及频率

地区	不同基因型虫体条数 (频率%)					
	Hs-198+Hs-200	Het-198+Hs-200	Hs-198+Het-200	Het-198+Het-200	Hs-198+HR-200	HR-198+Hs-200
喀什	46 (47.42)	11 (11.34)	5 (5.15)	0 (0)	12 (12.37)	23 (23.71)
克州	66 (76.74)	5 (5.81)	6 (6.98)	0 (0)	2 (2.33)	7 (8.14)

2.6 序列比较分析

将 GenBank 上下载的捻转血矛线虫 I-β-tubulin 基因序列与本研究测定的序列进行排序比对，有 57 个变异位点 (图 7)。从 32 个捻转血矛线虫 I-β-

tubulin 基因序列碱基分布可看出 (表 3)，G 碱基分布平均在 17%左右，A 在 28%左右，T 在 33%左右，C 在 21%左右，说明碱基在长期进化过程中出现了颠倒转换、缺失、突变等变化。

	1	10	20	30	40	50	60	70	80																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
BZ	C	T	T	T	G	T	T	A	A	T	T	C	A	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C	C	A	A	A	T	C	C	G	T	T	G	T	T	C	C	A	C	C	C	A	A	A	G	G	T	G	A	G	A	T	C	C	T

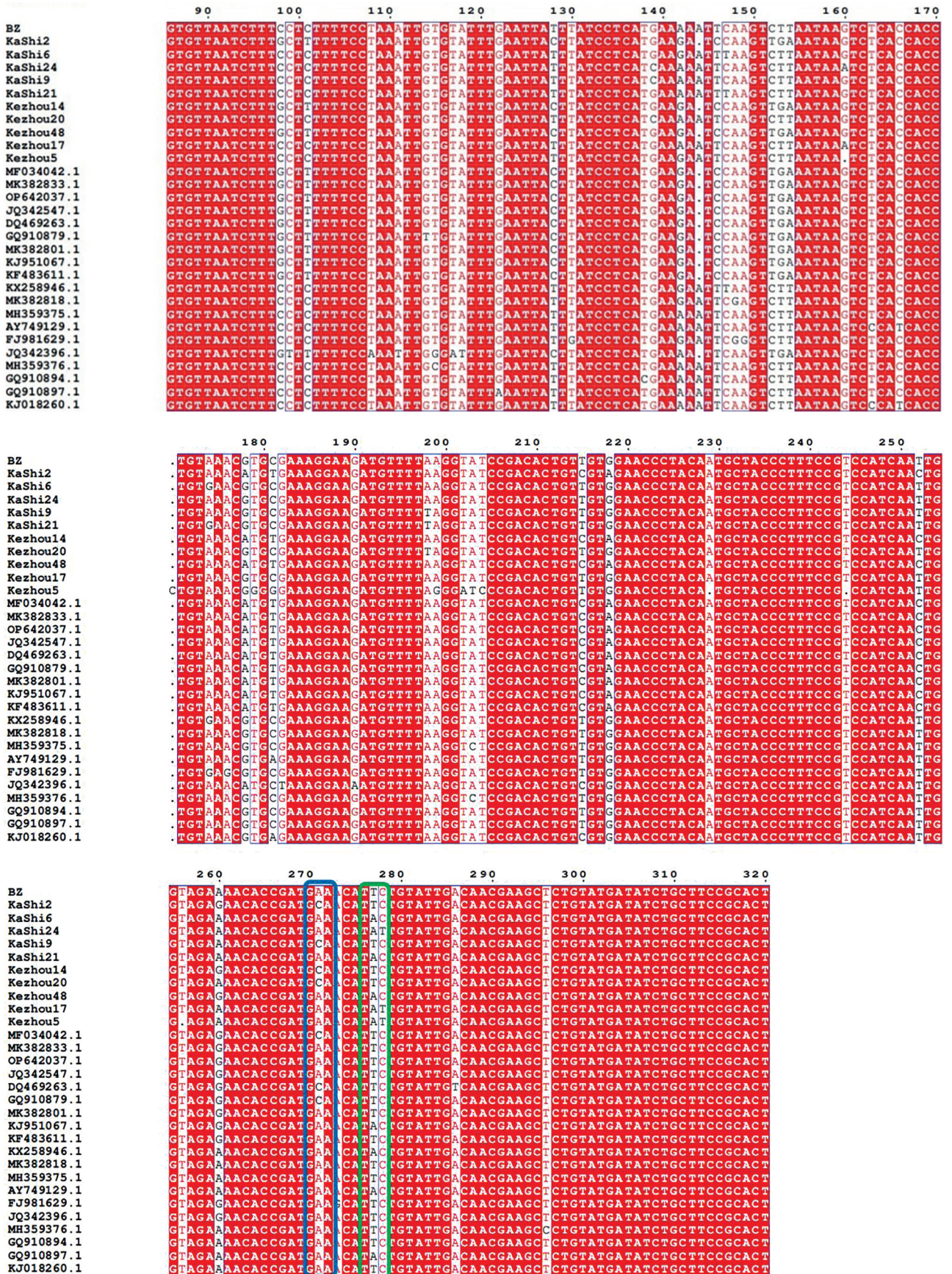


图5 捻转血矛线虫 I- β -tubulin 基因序列比对结果

表3 捻转血矛线虫 I- β -tubulin 基因序列碱基分布

%

项目	T	C	A	G	G+C	A+T	
样品编号	Kashi2	32.8	22.1	27.4	17.7	39.7	60.3
	Kashi6	33.6	21.7	27.0	17.6	39.3	60.7
	Kashi24	33.6	21.7	28.3	16.4	38.1	61.9
	Kashi9	34.0	22.3	27.0	16.7	39.0	61.0
	Kashi21	34.0	21.7	27.0	17.3	39.0	61.0
	Kezhou14	32.8	22.1	27.4	17.7	39.7	60.3
	Kezhou20	34.0	22.3	27.0	16.7	39.0	61.0
	Kezhou48	32.5	21.8	28.1	17.7	39.4	60.6
	Kezhou17	33.3	21.4	28.3	17.0	38.4	61.6
GenBank 登录号	Kezhou5	33.0	21.9	27.0	18.1	40.0	60.0
	MF034042.1	32.6	21.9	27.9	17.6	39.5	60.5
	MK382833.1	32.6	21.6	28.2	17.6	39.2	60.8
	OP642037.1	32.6	21.6	28.2	17.6	39.2	60.8
	JQ342547.1	32.6	21.6	28.2	17.6	39.2	60.8
	DQ469263.1	32.9	21.9	27.6	17.6	39.5	60.5
	GQ910879.1	32.9	21.9	27.9	17.2	39.2	60.8
	MK382801.1	32.6	21.6	28.2	17.6	39.2	60.8
	KJ951067.1	32.3	21.6	28.5	17.6	39.2	60.8
	KF483611.1	32.6	21.6	28.2	17.6	39.2	60.8
	KX258946.1	33.4	21.6	27.5	17.5	39.1	60.9
	MK382818.1	33.4	21.9	27.2	17.5	39.4	60.6
	MH359375.1	33.4	22.2	27.5	16.9	39.1	60.9
	AY749129.1	33.1	21.3	28.8	16.9	38.1	61.9
	FJ981629.1	33.4	21.6	25.6	19.4	40.9	59.1
JQ342396.1	32.9	21.0	28.8	17.2	38.2	61.8	
MH359376.1	32.8	22.5	27.8	16.9	39.4	60.6	

3 讨论

捻转血矛线虫病具有致病性强、危害严重的特性，严重感染时导致动物群发性死亡。自20世纪60年代初针对该线虫病的危害，陆续研发并使用了一系列广谱的BZs药物，为该病的防控起了重要的作用。然而，由于BZs药物长期滥用及该线虫拥有强大的抗药性能，导致捻转血矛线虫BZs抗药性在全球范围内广泛流行^[17]，严重影响养羊业健康发展。尽管国内已有很多关于BZs抗药性的报道，但没有确切数据反映南疆地区捻转血矛线虫BZs抗药性程度。

本试验首次对南疆克州及喀什地区捻转血矛线虫BZs抗药相关基因I- β -tubulin进行SNP检测，结果显示在克州和喀什地区的捻转血矛线虫种群中198位点和200位点均出现突变，但未在167位点发现突变。前期研究表明，我国不同地区种群的捻转血矛线

虫BZs抗药性相关SNP中198位点的突变在中国不同地区更为广泛^[11]。本研究发现克州和喀什地区捻转血矛线虫种群的198位点抗药基因型频率均大于200位点抗药基因型频率，与我国之前调查指出的中国捻转血矛线虫苯并咪唑抗药性突变以198位点突变为相符^[11, 14]。这一结果进一步证实198位点的突变在中国地区更为流行。另外，喀什地区198及200位点纯合抗药频率均大于10%。有研究表明，当198和200位点的纯合抗药基因型(Hs-198+HR-200和HR-198+Hs-200)总和频率超过10%时，可以认为该种群存在BZs抗药性^[14]。因此，可以确定喀什及克州地区都出现了不同程度的BZs抗药性，且喀什地区的抗药性更严重。本试验抗药型基因频率已经超过前人研究中提到的新疆伊犁地区的抗药型基因频率^[13]，与之相比，南疆地区捻转血矛线虫BZs抗药性流行可能更为普遍，迫切需要进一步研究并采取科

学的驱虫方案来控制该线虫的流行。

本研究在检测 BZs 抗药性 SNP 的同时, 对碱基序列分布进行分析, 发现 A+T 含量均在 60% 左右, G+C 含量在 40% 左右, A+T 含量显著大于 G+C 含量, 这种情况可能是由于毛圆科线虫本身具有 A+T 含量丰富这一特征^[18], 也可能是由于在捻转血矛线虫长期进化过程中发生了碱基偏移。

在养羊业迅速发展的今天, 捻转血矛线虫病仍然是制约羊养殖业发展的主要因素, 加上其 BZs 抗药性问题, 该线虫病的危害越来越突出。本研究首次报道了新疆克州及喀什两地区绵羊体内捻转血矛线虫种群 BZs 抗药性基因突变的存在及进化关系, 表明两地可能均存在较为严重的 BZs 抗药性。因此各地养殖场应坚持定期检测寄生线虫的感染情况及抗药性, 制定合理、科学的驱虫方案, 不断提高饲养管理水平, 从而保障羊养殖产业的健康发展。

参考文献:

[1] 王增强. 新疆养羊业的现状与分析 [J]. 畜牧兽医学 (电子版), 2017 (9): 39.

[2] 楚高洁. 新疆半舍饲绵羊消化道寄生虫感染情况的调查及驱虫试验 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2020.

[3] SALLE G, DOYLE S R, CORTET J, et al. The global diversity of *Haemonchus contortus* is shaped by human intervention and climate [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 4811.

[4] 卡力比夏提·艾木拉江. 捻转血矛线虫 5 种排泄分泌蛋白生物学特性及其在早期诊断中的潜在价值 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.

[5] 薄震宇, 刘欣超, 周金星, 等. 羊捻转血矛线虫感染及诊断方法研究现状 [J]. 畜牧与兽医, 2021, 53 (7): 132-135.

[6] 白财福. 云南省西双版纳美洲钩虫耐药 β -tubulin 基因多态性研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2021.

[7] 李晓婷, 周绪正, 李冰, 等. 广谱抗蠕虫药阿苯达唑研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38 (3): 26-29.

[8] ARUNACHALAM K, HARIKRISHNAN T J, ANNA T, et al. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats [J]. *The Indian Veterinary Journal*, 2013, 90 (9): 69-70.

[9] FALZON L C, MENZIES P I, SHAKYA K P, et al. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada [J]. *Veterinary Parasitology*, 2013, 193 (1/2/3): 150-162.

[10] HOWELL S B, BURKE J M, MILLER J E, et al. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2008, 233 (12): 1913-1919.

[11] 李泽华. 我国部分地区捻转血矛线虫对苯并咪唑和左旋咪唑类药物抗性的检测 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.

[12] 张宗泽. 中国地区捻转血矛线虫苯并咪唑类抗药性相关基因 I 型 β 微管蛋白编码基因多样性的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.

[13] 肖培培, 绮丽格尔, 李泽华, 等. 新疆部分地区羊捻转血矛线虫系统进化与抗药性分析 [J]. 中国动物检疫, 2020, 37 (4): 84-89.

[14] 杨新, 雷卫强, 邸文达, 等. 新疆伊犁地区捻转血矛线虫种群 I 型 β 微管蛋白基因苯并咪唑抗药性相关单核苷酸多态性调查 [J]. 中国兽医杂志, 2018, 54 (9): 8-11.

[15] BOTT N J, CAMPBELL B E, BEVERIDGE I, et al. A combined microscopic - molecular method for the diagnosis of strongylid infections in sheep [J]. *Int J Parasitol*, 2009, 39 (11): 1277-1287.

[16] VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G, WALSH T K, DONNAN A A, et al. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing [J]. *Parasitology*, 2009, 136 (3): 349-358.

[17] SPRINGER A, KLOENE P, STRUBE C. Benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* in a wildlife park [J]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 2022, 164 (1): 51-59.

[18] 殷方媛. 中国地区捻转血矛线虫遗传多样性的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.