

学 位 論 文 題 名

Molecular epidemiological studies of protozoan diseases in domestic animals in the Sudan

(スーダンにおける家畜の原虫感染症に関する分子疫学的研究)

学位論文内容の要旨

This work involved the molecular epidemiological aspects of two common and economically important protozoan diseases in Sudan; trypanosomiasis and equine piroplasmosis.

In the first part, characterization of Sudanese isolates of *Theileria equi*, and *Babesia caballi*, the causative agents of equine piroplasmosis was carried out. A number of 127 and 509 blood samples were collected in 2007 and 2010, respectively, and the small subunit rRNA gene was amplified, sequenced and analyzed to reveal possible strain differences and the presence of novel genotypes. Eleven Sudanese isolates of *T. equi* were found to be genetically distinct from all previously known isolates and were considered novel genotypes. The analysis also revealed that three Sudanese isolates shared some similarities with *T. equi* found in other countries including Spain and South Africa. On the other hand the prevalence of both *T. equi* and *B. caballi* was estimated to be 36% in the samples collected in 2010.

The second part reported an outbreak of bovine trypanosomiasis in the Blue Nile State, Sudan that involved the infection with four *Trypanosoma* species in cattle. The outbreak occurred in 2010 in indigenous Kenana and Fulani cattle breeds. A total of 210 blood samples from cattle and a few from other domestic animals were collected and examined by using conventional parasitological techniques such as the hematocrit centrifugation techniques and microscopic examination of Giemsa-stained thin blood films. They were also tested by polymerase chain reaction (PCR) targeting the internal transcribed spacer region 1 (ITS1) which provides a multi-species-specific diagnosis. Parasitological examinations revealed that 33.3% of the animals were infected with *T. vivax* and 10% with *T. congolense*. ITS1-PCR, however, detected the presence of four *Trypanosoma* species namely *T. vivax*, *T. congolense*, *T. simiae* and *T. brucei* in 56.7% of the investigated animals. None of the samples was shown positive for *T. brucei rhodesiense*. The identification of *T. simiae* was further confirmed by sequencing and phylogenetic analysis. It was hypothesized that variant parasite genotype(s) have been introduced to Sudanese cattle from Ethiopia, a tsetse belt region.

The third part represented a cross-sectional investigation carried out in 2009 on 687 samples from camels representing geographically distinct zones in the Sudan to detect all possible trypanosoma species infective to camels.

The prevalence rate varied by region ranging from 7.1 to 57.1 %. Using generic ITS1-PCR, it was shown that all positive camels were infected with a single parasite species; *T. evansi*. Additionally, the absence of RoTat 1.2 gene that is reported to be *T. evansi* specific was demonstrated in thirteen out of thirty *T. evansi*-positive samples. Different prevalence rates of camel trypanosomiasis were shown for different geographical locations. It was concluded that camel trypanosomiasis is highly prevalent, which strengthens the need solid control measures.

The fourth part investigated genetic variation at 15 microsatellite loci of *T. evansi* isolated from camels in Sudan and Kenya to evaluate the genetic information partitioned within and between individuals and between sites. A strong signal of isolation by distance was detected across the area sampled. The results also indicated that *T. evansi* is, most likely, purely clonal and structured in small units at very local scales. In addition there are numerous allelic drop out in the data. This may be explained if the parasite often sexually recombines without the need of tsetse fly as the definitive host, or the recurrent immigration from sexually recombined *T. b. brucei* had occurred.

In conclusion, the present studies based on advanced molecular technologies may clue in to novel approaches to control protozoan diseases which constrain animal production in Sudan.

学位論文審査の要旨

主査	教授	杉本千尋
副査	教授	片倉賢
副査	教授	大橋和彦
副査	教授	鈴木定彦

学位論文題名

Molecular epidemiological studies of protozoan diseases in domestic animals in the Sudan

(スーダンにおける家畜の原虫感染症に関する分子疫学的研究)

本研究はスーダンにおいて家畜衛生上重要な原虫感染症、トリパノソーマ症ならびに馬ピロプラズマ症の分子疫学的解析を目的として行った。

第一章では2007年および2010年にスーダン各地で収集した馬血液由来DNAを用いて、2種の馬ピロプラズマ原虫、*Theileria equi*、*Babesia caballi*のsmall subunit rRNA遺伝子 (SSU r DNA) を標的としたPolymerase Chain reaction (PCR) により原虫遺伝子を検出し、両原虫の感染状況を明らかにした。さらに*T. equi*については増幅産物の塩基配列を決定し、従来世界各地で報告されている同原虫の遺伝子配列と比較し系統解析を行った。その結果、スーダンにおいては、従来知られていなかったSSU r DNA配列を持つ*T. equi*が見出された。

第二章では、スーダン各地で収集した牛血液由来DNA試料210検体を用いて*Trypanosoma*属原虫をInternal Transcribed Spacer (ITS) 領域を標的にしたPCRにより検索し、その増幅産物のサイズにより種鑑別 (*T. congolense*、*T. vivax*、*T. brucei*/*T. evansi*、*T. simiae*) を行った。その顕微鏡検査の結果では、それぞれ、10、33.3%の個体が*T. congolense*、*T. vivax*に感染していることが分かったが、PCRでは56.7%の個体がこれらのトリパノソーマ種に単独もしくは混合感染していることが明らかとなった。さらにITS領域に変異を持つ*T. simiae*が検出された。

第三章では、ラクダの血液DNA試料687検体から、前章と同様ITS領域を標的にしたPCRにより*Trypanosoma*属原虫を検索した。その結果、陽性率は地域ごとに差が認められ、その範囲は7.1-57.1%であった。また、陽性検体のすべては*T. evansi*の単独感染例であることが明らかにされた。陽性30検体について、本種に特異的とされるRoTat1.2遺伝子を標的とするPCRをさらに実施ところ、13検体では本遺伝子陰性であり、*T. evansi*の特異的診断には他の標的領域を探しだす必要があると考えられた。

第四章では、前章で得られた*T. evansi*陽性検体について、15のマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型別を実施し、遺伝子型に基づき原虫集団解析を行った。その結果、地域により検出される遺伝子型に偏りがあることや、スーダンにおける*T. evansi*はクローナルな原虫集団で構成されていることが判明した。また、

原虫間の交雑による組換えの可能性を示唆する結果も得られた。

以上の一連の研究は最新の分子疫学的研究手法を駆使してスーダンでの家畜の原虫感染症に関して行われたものであり、同国での家畜の原虫感染症制圧に寄与するものと考えられる。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者Bashir Osman Mohammed SALIM君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。