

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.01.031

成都动物园野生动物源贾第虫的多位点基因分型鉴定

李威¹, 屈羽², 钟志军¹, 杨平³, 李云娇¹,
王吴优¹, 刘学涵¹, 谢娜¹, 邓家波², 彭广能¹

(1. 四川农业大学动物医学院 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 温江 611130;

2. 成都动物园 成都野生动物研究所 四川成都 610081; 3. 四川省雅安市名山区农业局 四川名山 625100)

摘要: 为了解四川省成都市动物园野生动物贾第虫的流行及基因型,本研究采集了146份不同野生动物的新鲜粪便并提取基因组DNA. 通过巢式PCR扩增 β -giardin、tpi和gdh基因,扩增产物测序后进行种系发育分析. 结果表明,CDZOO1 黠鹿源和CDZOO3 龟源贾第虫通过多位点基因分型(MLG)鉴定为AI-1亚型;CDZOO2 鹿源贾第虫为E型(β -giardin基因位点);CDZOO4 黠鹿源贾第虫为A型(β -giardin和tpi基因位点);CDZOO5 浣熊源和CDZOO6 细尾獾源贾第虫在 β -giardin位点为D型而在tpi位点为A型.

关键词: 贾第虫; β -giardin基因; tpi基因; gdh基因; MLG; 种系发育; 人畜共患

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)01-0185-06

Multilocus genotype (MLG) analysis of *Giardia* from captive wildlife in Chengdu zoo

LI Wei¹, QU Yu², ZHONG Zhi-Jun¹, YANG Ping³, LI Yur-Jiao¹, WANG Wu-You¹,
LIU Xue-Han¹, XIE Na¹, DENG Jia-Bo², PENG Guang-Neng¹

(1. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province /College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 610081, China;

2. Chengdu Zoo, Institute of Wild Animals in Sichuan Province, Chengdu 610081, China;

3. Mingshan Agricultural Department of Ya'an City in Sichuan Province, Mingshan 625100, China)

Abstract: In order to investigate the infection and genotypes of *Giardia* from different wildlife in Chengdu zoo, a total of 146 fresh fecal samples were collected and their genome DNA extracted. The β -giardin, tpi and gdh genes were amplified by nested-PCR and the product were sequenced followed by phylogenetic analysis. As a result, two persian fallows (CDZOO1 and CDZOO4), a deer (CDZOO2), a tortoise (CDZOO3), a raccoon (CDZOO5), a meerkat (CDZOO6) were infected with *Giardia*. Multilocus genotypes (MLGs) identified assemblages AI-1 in CDZOO1 and CDZOO3; CDZOO2 was infected with assemblage A in both β -giardin and tpi loci; CDZOO4 was confirmed as assemblage A at the tpi locus; CDZOO5 and CDZOO6 were identified as assemblage D at the β -giardin locus while assemblage A based on the tpi locus.

Keywords: *Giardia*; β -giardin; tpi; gdh; MLG; Phylogenetic analysis; Zoonotic

收稿日期: 2015-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272620);成都动物园项目(2014-04)

作者简介: 李威(1993-),女,四川彭山人,硕士研究生,主要研究方向为寄生虫分子流行病学调查. E-mail: castalli@163.com.

通讯作者: 彭广能. E-mail: pgn.sicau@163.com

1 引言

贾第虫(*Giardia spp.*),一种人畜共患的寄生虫,于 1681 年被列文虎克发现.人和动物感染贾第虫后可以引起腹痛、腹泻等不良症状,甚至导致死亡^[1];贾第虫不仅具有广泛的宿主,而且呈世界性分布,在发展中国家和发达国家均有不同程度流行,在旅行者中发病率较高,又称“旅行者腹泻”,已经引起世界各国广泛的关注.迄今为止,已被广泛认可的贾第虫有 6 个种,其中蓝氏贾第虫是唯一可以感染哺乳动物的种.当前,蓝氏贾第虫有 8 个基因型或聚集体(A-H),A、B 基因型为人畜共患型,具有广泛的宿主范围;基因型 C-H 具有宿主特异性,其中 C、D 基因型主要感染犬科动物;基因型 E、F、G 分别主要感染偶蹄动物、猫科动物、啮齿类动物;H 基因型当前主要在海豹上发现. A 基因型又分为 AI、AII、AIII 3 个亚型,多基因位点分型法(MLG)又将 AI 细分为 AI-1 和 AI-2, AII 又分为 AII-1 至 AII-7 7 个亚型, AIII 目前只有 AIII-1^[2].

近年来有关野生动物感染贾第虫的报道越来越多,包括非人灵长类动物、反刍类动物、肉食类动物、海洋动物等. Karim 等^[3]报道了动物园内非人灵长类感染贾第虫 A、B 型. Beck 等^[4]发现克罗地亚一个动物园中偶蹄类动物感染 A、C 基因型,灵长类感染 B 基因型,啮齿类和蹄兔目属于基因型 A、B、C、D 混合感染,肉食动物可感染微小贾第虫. Hamnes 等^[5]收集了鹿科野生动物(驼鹿、马鹿、狍、驯鹿)的粪便,结果驼鹿、马鹿、狍、驯鹿的感染率分别为 12.3%、1.7%、15.5%、7.1%. Traub 等^[6]研究证明了马可以感染类聚体 A、B. 在狩猎季节, Hamnes 等^[7]对捕捉的 269 只赤狐的粪便进行了流行病学调查与分析,发现存在贾第虫包裹的有 13 份(4.8%),主要基因型集中在聚集体 A、B. 杨荣昌等^[8]于澳大利亚野生淡水鱼和野生海水鱼上发现贾第虫,基于 tpi、18SrRNA、bg、gdh 基因,鉴定出 4 种集聚体,分别是 A、B、E、G.

当前,检测贾第虫的方法有多种,其中 PCR 检测法既能提高检测准确性和灵敏度,又能精确鉴定基因型与亚型,弥补了仅仅依据形态学来分类的不足.目前,国内外学者对贾第虫的基因及基因型研究主要有 β -贾第素基因(β -giardin gene),磷酸丙糖异构酶基因(tpi gene)和谷氨酸脱氢酶基因(gdh gene).根据 PCR 法研究贾第虫基因型与基因亚型分类可以通过一个、两个或者多个基因位点^[9-12],

然而基于多个基因位点(β -giardin, tpi, gdh)的 MLG 法减少了贾第虫基因亚型分类的混乱,也提高了分型的准确性,因此运用也越来越多^[2].本研究旨在采用 PCR 法检测成都动物园野生动物贾第虫流行情况,并用 MLG 法对该动物园贾第虫进行基因亚型分类,为保护野生动物贾第虫病提供分子流行病学资料.

2 材料与方法

2.1 材料

于 2014 年 10 月在成都市成都动物园采集了 146 只不同野生动物的新鲜粪便,粪便分别用洁净封口袋装好.样品包括了绿猴、大白臂长尾猴、环尾狐猴等非人灵长类动物,长颈鹿、矮种马、角马、羚牛、麋鹿等反刍类动物,美洲豹、金钱豹、华南虎等肉食类动物,丹顶鹤、白鹤等鸟类,龟等爬行类动物.样品通过饱和蔗糖溶液漂浮法获得卵囊.

2.2 方法

2.2.1 分子鉴定 用粪便 DNA 提取试剂盒(购自 omega 公司)提取粪便卵囊 DNA,通过巢式 PCR 扩增 β -giardin、tpi 和 gdh 位点基因. β -giardin 扩增引物参照 Caccio^[13]等和 Lalle 等^[14]的文献设计; tpi 扩增引物参照 Sulaiman^[15]等文献; gdh 引物参照 Ye 等^[16]设计的引物(参见表 1). PCR 反应体系均为 25 μ L,包括 12.5 μ L 2 \times Taq PCR Master Mix(购自北京天根生化科技有限公司)、7.5 μ L Deionized Water、1 μ L 0.1%BSA、1 μ L 上游和下游引物(由上海英潍捷基贸易有限公司合成)、2 μ L 模板 DNA.取 5 μ L PCR 扩增产物点入 1%琼脂糖凝胶孔内,于 100V 电压下电泳 1h 后在凝胶成像系统仪中拍照,将出现与目的条带一致的扩增产物送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序.

2.2.2 序列分析 测序结果在 GenBank 中经 BLAST 比对校正后提交至 NCBI,获得登录号.从 NCBI 下载三个基因位点的相关序列,用 Clustal X (1.83)按照默认设置进行比对,然后用 MEGA6.06 软件中 NJ 法构建系统发育进化树.

3 结果

3.1 PCR 扩增及测序结果

通过 PCR 扩增,发现 6 只圈养野生动物感染贾第虫,各编号、宿主、 β -giardin、tpi、gdh 基因位点扩增情况和登录号见表 2.

表 1 巢式 PCR 引物、退火温度及预计产物长度

Tab. 1 Primers, annealing temperature and expected product length for the identification of *Giardia*

基因位点	引物序列	退火温度	预计产物长度
β -giardin	F1:AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	65°C ;55°C	511bp
	R1:GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC		
	F2:GAACGAGATCGAGGTCCG		
	R2:CTCGACGAGCTTCGTGTT		
tpi	F1:AAATIATGCCTGCTCGTCCG	50°C ;50°C	530bp
	R1:CAAACCTTITCCGAAACC		
	F2:CCCTTCATCGGIGGTAACCTT		
	R2:GTGGCCACCACICCCGTGCC		
gdh	F1:GAGGTCATGCGCTTCTGCCA	58°C ;58°C	530bp
	R1:CGTCCACTGGAGCCTCACGGA		
	F2:ATGACCGAGCTCCAGAGGCACGT		
	R2:CCCTCGGCCACGAACTTGAG		

注:F1 表示第一套上游引物 R1 表示第一套下游引物; F2 表示第二套上游引物 R2 表示第二套下游引物

表 2 成都动物园圈养野生动物贾第虫研究结果

Tab. 2 List of wildlife positive for *Giardia* in the present study

编号	宿主	分型结果				登录号		
		β -giardin	tpi	gdh	MLG	β -giardin	tpi	gdh
CDZOO1	麝鹿	A1	A1	A1	AI-1	KR051222	KR051228	KR051233
CDZOO2	鹿	E	NS	NS	ND	KR051223	NG	NG
CDZOO3	龟	A1	A1	A1	AI-1	KR051224	KR051229	KR051234
CDZOO4	麝鹿	A	A	NS	ND	KR051225	KR051230	NG
CDZOO5	浣熊	D	A	NS	ND	KR051226	KR051231	NG
CDZOO6	细尾獾	D	A	NS	ND	KR051227	KR051232	NG

注:NS 表示未成功测序或成功扩增; ND 表示无法分型 NG 表示无登录号

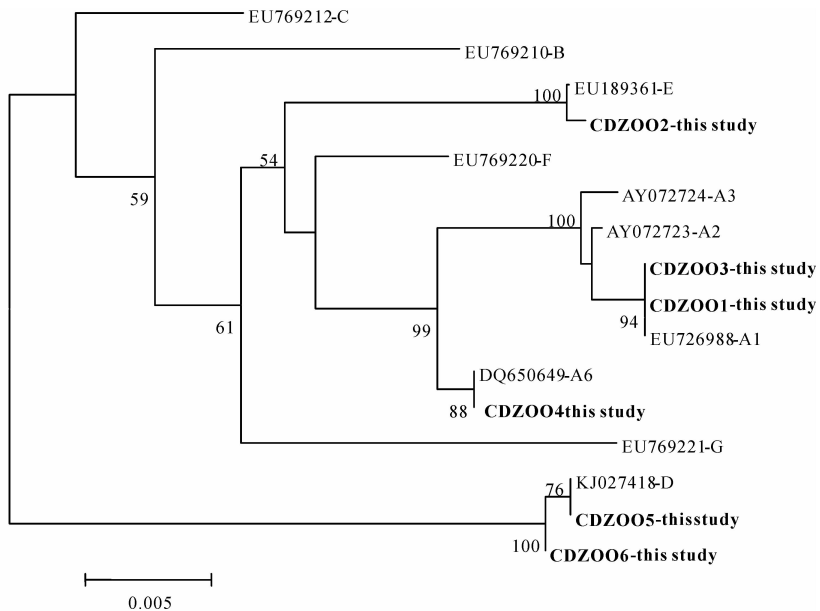


图 1 贾第虫 β -giardin 基因的系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree based on β -giardin gene of the *Giardia*

3.2 种系发育分析

根据 β -giardin 基因构建的分子系统树(见图 1)可知, CDZOO1、CDZOO3 与参考序列 EU726988 处于同一发育枝,为 A1 亚型. CDZOO2 与 E 型在一个分支上,可判断其为 E 型. CDZOO4 与 A6 位于同一个进化枝,节点支持值为 88,因此为 A6 亚型. CDZOO5 和 CDZOO6 与基因型 D 处

于同一个大分支上,为基因型 D; tpi 位点(参见图 2)建树结果显示:分离株 CDZOO1、CDZOO3 与参考序列 JX845440 在一个发育枝,为 A1 亚型. CDZOO4、CDZOO5、CDZOO6 与聚集体 A 处于一个大分枝,可判为基因型 A 型;由 gdh 构建的分子系统树(参见图 3)结果表明 CDZOO1 和 CDZOO3 与 A1 型处于同一分支,为 A1 亚型.

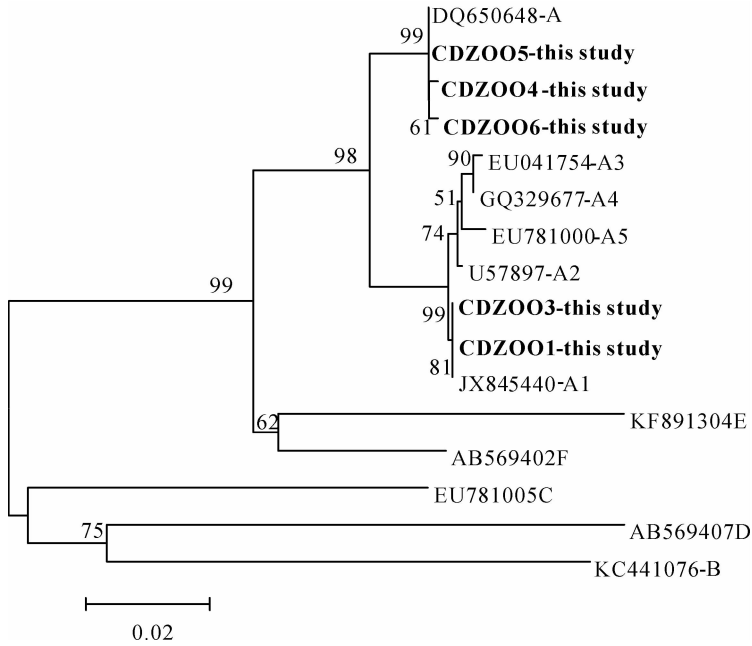


图 2 贾第虫 tpi 基因的系统进化树
Fig. 2 The phylogenetic tree based on tpi gene of the *Giardia*

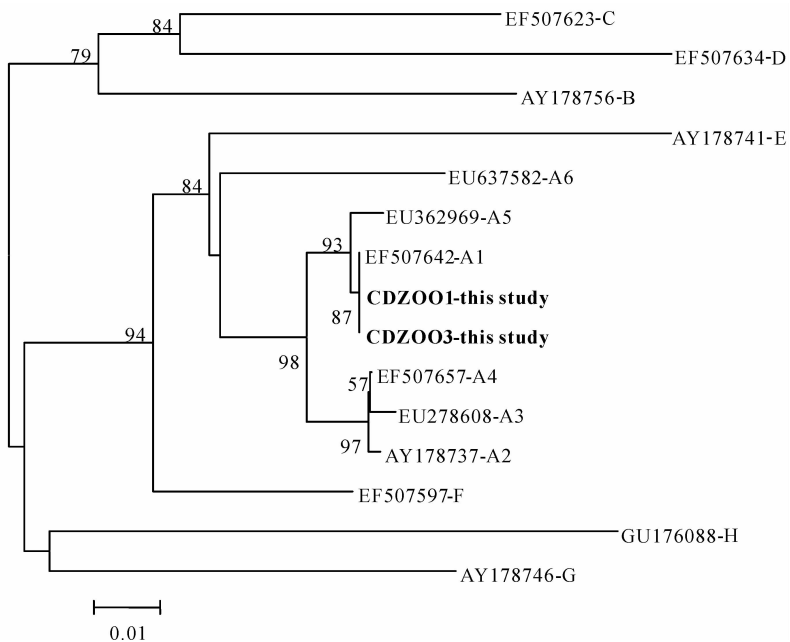


图 3 贾第虫 gdh 基因的系统进化树
Fig. 3 The phylogenetic tree based on gdh gene of the *Giardia*

综合基于 β -giardin、tpi、gdh 构建的系统进化树可知, CDZOO1 和 CDZOO3 以 MLG 分型法鉴定为 AI-1 亚型, CDZOO2 与 CDZOO4 为 A 型, CDZOO5 和 CDZOO6 在 β -giardin 位点为 D 型而在 tpi 位点为 A 型。

4 讨 论

本研究对 146 份样品(包括 76 种动物)进行了贾第虫检测, 结果显示阳性样品 6 份(感染率 4.11%), 发现 A、D、E 三种贾第虫基因型。我们对阳性样品在 3 个基因位点分别进行了 PCR 扩增, 结果发现 CDZOO5(浣熊)和 CDZOO6(细尾獾)在 β -giardin 位点分型为 D 型, 在 tpi 位点鉴定为 A 型, 分型结果在不同基因位点不一致。先前, 不管是人畜共患且有着广泛宿主的 A、B 型还是非人畜共患却有宿主特异性的 C、D 型, 在不同基因位点分型结果呈现不一致的情况也有报道。Caccio 等^[17]曾利用 PCR 法扩增 β -giardin、tpi、gdh、rDNA 基因, 鉴定 28 株人源贾第虫分离株的分型情况, 结果发现 5 株分离株在 β -giardin 位点分型结果和其他三个位点分型结果不相同; Traub 等^[18]报道了几株人源贾第虫分离株在 SSU-rDNA 为 D 型或 C 型, 而 ef1-a 位点却为 B 型, 另外一株人源贾第虫分离株 H165 基于 SSU-rDNA 分型为 D 型, 以 ef1-a 基因分型为 A 型, 犬源贾第虫分离株在 tpi 和 ef1-a 位点分别为 A1 和 B 型, 结果也不一致。在本实验结果中, CDZOO5(浣熊)和 CDZOO6(细尾獾)分离株在 β -giardin 和 tpi 基因位点分型结果也不一样, 可能是由混合感染引起, 造成此结果的原因可能是浣熊和细尾獾进食了受贾第虫卵囊所污染的食物或水, 而卵囊来自于感染了贾第虫的犬或其他肉食动物, 另外, 这两种动物可能本身就是聚集体 D 的天然宿主。然而, 等位基因的杂合性(ASH)也可以造成分型差异性^[19, 20]。此实验结果也提示我们用单个基因研究贾第虫基因型和亚型分类可能会造成结果的不准确性。

本研究中采用的 MLG 法结果表明 CDZOO1 麝鹿源贾第虫为 AI-1 亚型, 这与 Caccio 等^[17]的报道一致。Trout 等^[21]报道了一只白尾鹿感染贾第虫 A 型, 与研究结果无差异。本研究发现龟感染贾第虫, 并且发现其 MLG 基因亚型与 CDZOO3 麝鹿源贾第虫完全相同, 这有可能是这两种动物相互传染引起。感染贾第虫的龟或者麝鹿粪便排于水中引起水源的污染, 而水又未经处理, 从而动物在接触

到受污染的水源, 或者受水源污染的植物、动物等后就可能摄食贾第虫卵囊而引起感染。通过本研究结果可以看出蓝氏贾第虫 A 聚集体是成都动物园野生动物主要感染的基因型, 由于其具有人畜共患性, 而且饲养员又与圈养野生动物关系密切, 因此对饲养员乃至游客等的健康有着潜在威胁。目前已经报道了多种圈养野生动物感染 A 基因型^[3-4, 22]。成都动物园饲养着多种野生动物, 而且圈养野生动物相对于野外的野生动物在高密度、高压环境下生长, 显著地增加了其感染贾第虫的几率, 如果园内感染贾第虫的动物粪便不进行适当处理, 很可能会引起水源性贾第虫病即引起成都动物园内更多的野生动物甚至人类感染贾第虫, 引起贾第虫病的爆发。因此相关管理人一方面应加强对圈养野生动物的饲养管理和粪便管理, 另一方面也要做好驱虫工作, 最后还应加强对水源贾第虫的检测。

本研究在西南区域首次通过巢氏 PCR 技术检测了成都动物园野生动物贾第虫分子流行病学情况, 同时采用了亚型鉴定更为精准的 MLG 法鉴定了龟和麝鹿源贾第虫的基因型, 为该动物园中野生动物感染贾第虫情况提供了精确的分子流行病学资料。更重要的是, 野生动物感染蓝氏贾第虫人畜共患基因型 A 型, 具有重大公共卫生意义。

参考文献:

- [1] Thompson R C A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis [J]. *Veterinary parasitology*, 2004, 126(1): 15.
- [2] Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, 24(1): 110.
- [3] Karim M R, Wang R, Yu F, *et al.* Multi-locus analysis of Giardia duodenalis from nonhuman primates kept in zoos in China: Geographical segregation and host-adaptation of assemblage B isolates [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015, 30: 82.
- [4] Beck R, Sprong H, Bata I, *et al.* Prevalence and molecular typing of Giardia spp. in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia [J]. *Veterinary Parasitology*, 2011, 175(1): 40.
- [5] Hamnes I S, Gjerde B, Robertson L, *et al.* Prevalence of Cryptosporidium and Giardia in free-ranging wild cervids in Norway [J]. *Veterinary Parasitology*, 2006, 141(1): 30.
- [6] Traub R, Wade S, Read C, *et al.* Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of Giardia

- duodenalis in horses [J]. *Veterinary Parasitology*, 2005, 130(3): 317.
- [7] Hamnes I S, Gjerde B K, Forberg T, *et al.* Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*) [J]. *Veterinary Parasitology*, 2007, 143(3): 347.
- [8] Yang R, Reid A, Lymbery A, *et al.* Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in fish [J]. *International Journal for Parasitology*, 2010, 40(7): 779.
- [9] Nolan M J, Jex A R, Pangasa A, *et al.* Analysis of nucleotide variation within the triose-phosphate isomerase gene of *Giardia duodenalis* from sheep and its zoonotic implications [J]. *Electrophoresis*, 2010, 31(2): 287.
- [10] Fernandez-Alvarez A, Martin-Alonso A, Abreu-Acosta N, *et al.* Identification of a novel assemblage G subgenotype and a zoonotic assemblage B in rodent isolates of *Giardia duodenalis* in the Canary Islands, Spain [J]. *Parasitology*, 2014, 141(02): 206.
- [11] Castro-Hermida J A, Almeida A, González-Warleta M, *et al.* Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants [J]. *Parasitology Research*, 2007, 101(5): 1443.
- [12] Geurden T, Thomas P, Casaert S, *et al.* Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium [J]. *Veterinary Parasitology*, 2008, 155(1): 142.
- [13] Cacciò S M, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardiaduodenalis* cysts from human faecal samples [J]. *International journal for parasitology*, 2002, 32(8): 1023.
- [14] Lalle M, Pozio E, Capelli G, *et al.* Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardiaduodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes [J]. *International Journal for Parasitology*, 2005, 35(2): 207.
- [15] Sulaiman I M, Fayer R, Bern C, *et al.* Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9(11): 1444.
- [16] Ye J, Xiao L, Li J, *et al.* Occurrence of human-pathogenic *Enterocytozoon bienersi*, *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* genotypes in laboratory macaques in Guangxi, China [J]. *Parasitology International*, 2014, 63(1): 132.
- [17] Caccio S M, Beck R, Lalle M, *et al.* Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B [J]. *International journal for parasitology*, 2008, 38(13): 1523.
- [18] Traub R J, Monis P T, Robertson I, *et al.* Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community [J]. *Parasitology*, 2004, 128(03): 253.
- [19] Sprong H, Cacciò S M, Van der Giessen J W. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis* [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009, 3(12): e558.
- [20] Lebbad M, Mattsson J G, Christensson B, *et al.* From mouse to moose; multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species [J]. *Veterinary Parasitology*, 2010, 168(3): 231.
- [21] Trout J M, Santin M, Fayer R. Identification of assemblage A *Giardia* in white-tailed deer [J]. *Journal of Parasitology*, 2003, 89(6): 1254.
- [22] Soares R M, de Souza S L P, Silveira L H, *et al.* Genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* from exotic and wild animals kept in captivity in Brazil [J]. *Veterinary Parasitology*, 2011, 180(3): 344.