

中国南海周边犬类贾第虫感染情况调查与基因序列分型

王哲侃, 周浩澜, 李丹蕾, 赵阿勇*

(浙江农林大学 动物科技学院 浙江 杭州 311300)

摘要: 贾第虫是一种人兽共患肠道寄生原虫, 在全世界范围内传播, 其感染率与地区和环境有非常大的关系。为了解中国南海周边国家和地区犬类贾第虫感染情况, 判断海洋隔离是否是影响贾第虫传播的重要因素, 自2018年6月至2019年7月, 从中国广州、越南胡志明市、马来西亚吉隆坡、新加坡和菲律宾马尼拉分别采集犬类粪便样本616份。提取每个地区犬类粪便样本的DNA, 以贾第虫磷酸丙糖异构酶(triose phosphate isomerase)基因 *TPI* 和 *BG* (genotyping at the beta giardin) 基因制作巢式PCR引物。提取的犬粪基因组DNA为模板进行巢式PCR扩增, 确定其阳性感染率, PCR阳性产物经测序并将结果与GenBank中的贾第虫序列比对, 判断其分型。结果发现616份样品中, 有48份样品检验结果为贾第虫感染阳性, 阳性率为7.79% (48/616)。不同地区感染率分别是: 中国广州4.81%、越南胡志明市6.90%、马来西亚吉隆坡9.09%、新加坡2.86%和菲律宾马尼拉11.52%。其中48份样品在 *TPI* 和 *BG* 位点分别检测到条带, 阳性率分别为7.63%和5.19%。阳性样品再经过对于 *BG* 及 *TPI* 基因位点的测序比对, 得知 *BG* 位点有集聚体B型(3.33%)、集聚体C型(86.67%)、集聚体D型(10%), *TPI* 位点有集聚体B型(2.12%)、集聚体C型(85.1%)和集聚体D型(12.76%)。综上, 中国南海周边地区存在贾第虫感染, 公共卫生相对较好地区感染率较低, 犬源贾第虫基因分型分布未明显受到海洋地域隔离影响。

关键词: 贾第虫; 基因型; 感染率

中图分类号: S852.723

文献标志码: A

文章编号: 1004-1524(2020)08-1363-06

Investigation and genotyping of *Giardia duodenalis* infection in South China Sea

WANG Zhekan, ZHOU Haolan, LI Danlei, ZHAO Ayong*

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China)

Abstract: *Giardia duodenalis*, a parasitic intestinal parasite that is zoonotic, was spread all over the world. Moreover, its infection rate had a great relationship with the region and the environment. To understand the infection situation of canine duodenal *Giardia duodenalis* in the neighboring countries and regions of the South China Sea, and determine whether marine isolation is an important factor affecting *Giardia duodenalis* transmission. From June 2018 to July 2019, 616 canine fecal samples were collected from Guangzhou, China, Ho Chi Minh City, Vietnam, Kuala Lumpur, Malaysia, Singapore, and Manila, Philippines. DNA of canine fecal samples from each region were extracted, and a nested PCR was prepared by using the *TPI* gene and *BG* gene of *Giardia duodenalis*. The extracted canine fecal genomic DNA was used as a template for nested PCR amplification to determine its positive infection rate. PCR-

收稿日期: 2020-03-26

基金项目: 学校科研发展基金

作者简介: 王哲侃(1991—)男, 浙江杭州人, 硕士研究生, 主要从事寄生虫流行病学研究。E-mail: 815368656@qq.com

* 通信作者, 赵阿勇, E-mail: zay503@zafu.edu.cn

positive products were sequenced and the results were compared with *Giardia duodenalis* sequences in GenBank to determine their typing. Among the 616 samples, tested results of 48 samples were positive for *Giardia duodenalis* infection, with a positive rate of 7.79% (48/616). The infection rates in different regions were 4.81% in Guangzhou, China, 6.90% in Ho Chi Minh City, Vietnam, 9.09% in Kuala Lumpur, Malaysia, 2.86% in Singapore, and 11.52% in Manila, Philippines. Among them, 48 samples were detected at *TPI* and *BG* sites, and the positive rates were 7.63% and 5.19%, respectively. The positive samples were then sequenced and compared for the *BG* and *TPI* gene sites, and it was learned that the *BG* site had conglomerate B type (3.33%), conglomerate C type (86.67%), and conglomerate D type (10%). *TPI* site had conglomerate B type (2.12%), conglomerate C type (85.1%), and conglomerate D type (12.76%). After statistical analysis and comparison, the difference between *Giardia duodenalis* genotypes in various regions was not significant. *Giardia duodenalis* infection existed in the surrounding areas of the South China Sea, and the infection rate was relatively low in areas with relatively good public health. The genotyping distribution of canine *Giardia duodenalis* was not significantly affected by the isolation of marine areas.

Key words: *Giardia duodenalis*; genotype; infection rate

贾第鞭毛虫 (*Giardia duodenalis*) 又称贾第虫, 是一种单鞭毛寄生虫, 主要寄生于人和哺乳动物的小肠, 是人类最常见的肠道寄生虫^[1-3], 被列为十大严重危害人类健康的寄生虫之一^[4]。根据遗传学和表型的不同, 可将贾第虫分为 8 个不同的基因型(集聚体) A ~ H^[5-6], 其中 A、B 型为人兽共患型, C、D 型主要感染犬类动物, E 型感染有蹄动物, F 型一般在猫科动物中出现, G 型感染啮齿动物, H 型主要感染海洋哺乳动物^[6-10]。犬类主要感染犬特异性 C、D 型贾第虫, 但也可感染 A、B 型贾第虫^[11-13]。野生犬感染贾第虫的概率较大^[14-15], 由于贾第虫具有人犬互传的可能性, 犬是否成为人贾第虫病感染的重要来源已是世界性话题。

对家犬的调查显示, 不同地理区域家犬感染贾第虫的情况存在差异^[16-17], 造成这种差异的原因尚不清楚, 需要在不同的地理区域进行研究探讨。目前, 针对中国南海及周边地区犬类感染贾第虫的调查较少, 且鲜有针对海洋隔离对贾第

虫地区基因分型进行的调查鉴定。因此, 本研究旨在应用分子生物学方法对中国南海周边国家及地区寄生于犬类的贾第虫进行鉴定。本研究从中国广州、越南胡志明市、马来西亚吉隆坡、新加坡和菲律宾马尼拉共收集到 616 份犬类粪便样本, 通过巢式 PCR 扩增 *TPI* 基因和 *BG* 基因, 并通过序列比对分析, 确定阳性样本中贾第虫的基因型, 旨在研究海洋地域隔离是否对贾第虫分型产生影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验样品

从中国广州、越南胡志明市、马来西亚吉隆坡、新加坡和菲律宾马尼拉宠物诊所和收容所共采集犬粪便样品 616 份, 其中流浪犬粪便样本 239 份, 家犬粪便样本 377 份(表 1)。粪便样品分别装入干净的自封袋, 做好详细的信息记录并

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

地区 Origin	样本数 Number	家犬 Domestic dog		流浪犬 Stray dog	
		样本数 Number	比例 Percentage/%	样本数 Number	比例 Percentage/%
广州 Guangzhou	104	46	44.23	58	55.77
胡志明 Ho Chi Minh	145	52	35.86	93	64.14
吉隆坡 Kuala Lumpur	132	49	37.12	83	62.88
新加坡 Singapore	70	29	41.43	41	58.57
菲律宾 Philippines	165	63	38.18	102	61.82
合计 Total	616	239	38.80	377	61.20

编号,放入4℃冰箱保存或-20℃冷冻直到分析。

1.1.2 主要试剂

Stool Genomic DNA Kit、蛋白酶 K、2 × Taq Master Mix 购自北京康为世纪生物科技有限公司; DNA Green、平衡酚、核酸提取液 I(酚、氯仿、异戊醇体积比 25:24:1)、核酸提取液 II(氯仿、异戊醇体积比 24:1) 购自北京索莱宝科技有限公司; 无水乙醇、氯仿、异丙醇、乙二酰胺四乙酸(EDTA) 购自国药集团化学试剂有限公司; DL2000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR 清洁回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 贾第虫 DNA 提取

粪样用无菌水冲洗 3 次,按照粪样 DNA 提取试剂盒说明书,采用酚抽提法提取粪便中的贾第虫 DNA,采集并编号(广州 1~104 号,马尼拉 105~269 号,胡志明市 270~414 号,吉隆坡 415~547 号,新加坡 548~616 号)。检测 DNA 浓度和纯度,并将 DNA 样品置于-20℃保存备用。

1.2.2 引物设计

参考文献[18]方法合成巢式 PCR 引物,引物序列及信息见表 2,由北京擎科新业生物技术有限公司进行合成。

1.2.3 巢式 PCR 扩增

对贾第虫基因位点进行多位点序列排序,选择 Beta giardin(BG)和磷酸三脂异构酶(triose-phosphate isomerase, TPI)这 2 个单拷贝蛋白编码基因靶点,这 2 种基因多态性程度较高,利于分型。第 1 轮 PCR 反应体系为: 2 × Taq Mix 8.5 μL,上(F1)、下(R1) 游引物各 1 μL,模板 DNA 1

μL,加灭菌水至 25 μL; 反应条件为: 94℃ 2 min; 94℃ 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环; 72℃ 5 min。第 2 轮 PCR 体系为: 2 × Taq Mix 7.5 μL,上(F2)、下(R2) 游引物各 1 μL,第 1 轮 PCR 产物 1 μL,加灭菌水至 25 μL; 反应条件为: 94℃ 2 min; 94℃ 45 s, 53℃ 45 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环; 72℃ 5 min。

1.2.4 犬贾第虫基因型判定

将纯化的 PCR 产物送至北京擎科新业生物技术有限公司测序。将获得的核酸序列与 GenBank 中犬贾第虫不同基因型 TPI 基因(KP258395~KP258398)和 BG 基因(KP258342~KP258345) 序列进行对比,根据结果判断其分型。

1.2.5 统计分析

将分型结果进行整理,并进行统计分析,利用卡方检验评价差异性。

2 结果与分析

2.1 粪样阳性率

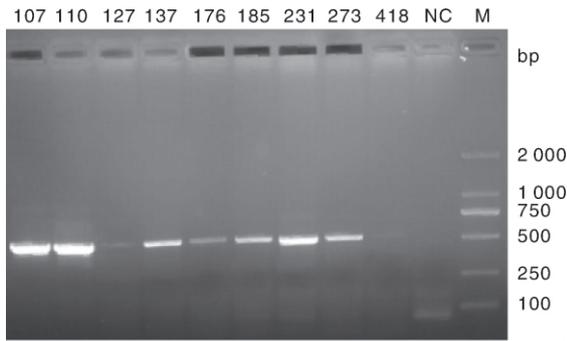
PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,约 500bp 处可见明显目的基因条带,大小与预期相符(图 1、图 2)。

616 份样品中,有 48 份样品见该目的条带。根据结果再次对阳性产物进行二次检验,阳性率为 7.79%(48/616)。中国广州、越南胡志明市、马来西亚吉隆坡、新加坡和菲律宾马尼拉犬贾第虫感染率分别为 4.81%、6.90%、9.09%、2.86% 和 11.52%。家犬和流浪犬贾第虫感染率分别为 5.86% 和 9.02%(表 3)。中国广州、越南胡志明市、马来西亚吉隆坡、新加坡和菲律宾马尼拉阳性

表 2 引物信息

Table 2 Primer information

基因	引物序列	长度	退火温度	退火时间
Gene	Primer sequences(5'→3')	Length/bp	Annealing temperature/℃	Annealing time/s
TPI	F1: AAATYATGCCTGCTCGTGC;	605	53	45
	R1: CAAACCTTYTCCGCAAACC			
	F2: CCCTTCATCGGNGGTAAGT;	563	53	45
	R2: GTGGCCACCACVCCCGTGCC			
BG	F1: AAGCCCGACGACCTCACCCGAGTGC;	753	60	45
	R1: GAGCCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC			
	F2: GAACGAACGAGATCGAGGTCCG;	515	53	45
	R2: CTCGACGAGCTTCGTGT			



M: DNA marker; 107、110、127、137、176、185、231、273、418 为贾第虫感染粪样; NC: 阴性对照。
M: DL 2000 DNA marker; 107, 110, 127, 137, 176, 185, 231, 273, 418: *Giardia duodenalis* positive samples; NC: Negative samples.

图 1 粪样 BG 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 BG PCR products amplified from fecal samples

样品中 BG 位点阳性率分别为 40% (2/5)、30% (3/10)、75% (9/12)、0% (0/2) 和 84.2% (16/19), TPI 位点阳性率分别为 100% (5/5)、100% (10/10)、100% (12/12)、100% (2/2) 和 94.7% (18/19), 2 个位点均呈阳性的比例是 62.5% (30/48)。

表 3 贾第虫感染情况

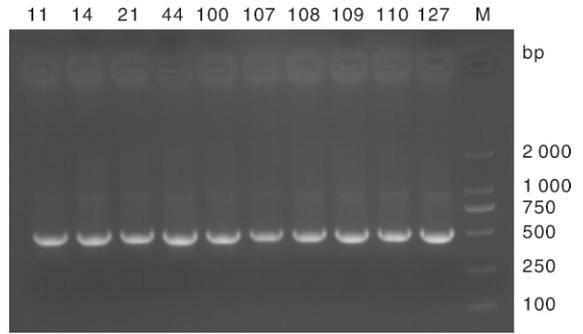
Table 3 Infection status of *Giardia duodenalis*

地区 Origin	家犬 Domestic dog			流浪犬 The stray dog			合计 Total	
	样本数 Number	阳性数 Positive number	阳性率 Positive rate/%	样本数 Number	阳性数 Positive number	阳性率 Positive rate/%	阳性数 Positive number	阳性率 Positive rate/%
广州 Guangzhou	46	2	4.35	58	3	5.17	5	4.81
胡志明 Ho Chi Minh	52	3	5.77	93	7	7.53	10	6.90
吉隆坡 Kuala Lumpur	49	3	6.12	83	9	10.84	12	9.09
新加坡 Singapore	29	0	0	41	2	4.88	2	2.86
菲律宾 Philippines	63	6	9.52	102	13	12.75	19	11.52
合计 Total	239	14	5.86	377	34	9.02	48	7.79

表 4 基于不同基因位点的阳性样品分型结果

Table 4 Positive sample typing results based on different gene loci

地区 Origin	BG					TPI				
	阳性数 Positive number	A 型 A type	B 型 B type	C 型 C type	D 型 D type	阳性数 Positive number	A 型 A type	B 型 B type	C 型 C type	D 型 D type
广州 Guangzhou	2	0	0	2	0	5	0	0	4	1
胡志明 Ho Chi Minh	3	0	0	3	0	10	0	0	7	3
吉隆坡 Kuala Lumpur	9	0	1	7	1	12	0	1	10	1
新加坡 Singapore	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0
菲律宾 Philippines	16	0	0	14	2	18	0	0	17	1
合计 Total	30	0	1	26	3	47	0	1	40	6



M: DNA marker; 11、14、21、44、100、107、108、109、110、127 为贾第虫感染粪样。
M: DL 2000 DNA marker; 11, 14, 21, 44, 100, 107, 108, 109, 110, 127: *Giardia duodenalis* positive samples.

图 2 粪样 TPI 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 TPI PCR products amplified from fecal samples

2.2 基于不同基因位点的阳性样品分型结果

如表 4 所示 基于 BG 基因位点 阳性样本中鉴定为集聚体 B 型 1 例(3.33%) 集聚体 C 型 26 例(86.67%) 集聚体 D 型 3 例(10%) ; 基于 TPI 基因位点 阳性样本中鉴定为 B 型 1 例(2.12%) 集聚体 C 型 40 例(85.1%) 集聚体 D 型 6 例(12.76%) 所有地区均没有出现 A 型。

3 讨论

贾第虫分布广泛,在欧洲、北美洲、南美洲、大洋洲和亚洲等地区均有感染的报道,尤其多见于温带和热带地区,且与当地的经济条件和卫生环境密切相关^[19]。据 WHO 估计,全世界范围内贾第虫感染率为 1%~30%,在经济水平较低、卫生条件较差的地区,感染率达到 10%~20%,基因型及其分布分析对贾第虫感染的公共卫生评价具有重要的意义。

本研究所选择国家和地区处于中国南海周边,具有明显的海洋隔离特性。所有被调查国家和地区犬都证实了有贾第虫的存在。根据目前的研究结果,贾第虫应该被认为是中国南海周边地区的一种犬类常见寄生虫。本研究对比了地区内犬群不同集聚体类型的分布,发现分布以少量集聚体 B 型和 D 型和大量集聚体 C 型为主,家犬与其主人的密切接触可能是导致引发人畜共患疾病的贾第虫集聚体 B 感染的原因,而集聚体 C 和集聚体 D 类的传播则更可能发生在生活于拥挤环境中的野生犬群中。社会和环境条件的差异也可能导致了集聚体分型的变化。然而由于弃养或偶然接触,被贾第虫集聚体 C 和集聚体 D 感染的犬类中,也偶有集聚体 A 和集聚体 B 的存在^[20]。然而,在过去几年的其他的研究中,在不同国家的收容所犬身上发现了潜在的人畜共患病集聚体 A 和集聚体 B,在比利时的研究中从 BG 位点上分析得到的有 37.0%^[21]。在西班牙的研究中从 BG 位点上分析则有 81.4%,但集聚体 A 及集聚体 B 的感染率始终低于集聚体 C 和集聚体 D^[22]。由于不同地区环境的影响,在未来集聚体 C 和集聚体 D 感染率是否仍然会超过集聚体 A 和集聚体 B 仍然是个未知数,这也可能与不同地区的公共生活卫生水平有关^[23]。从结果看,南海周边地区贾第虫基因位点 C、D 分型占比达到 98%,并且各个地区间的分型差异并不显著,这证明海洋并没有成为阻挡贾第虫基因型分布的因素,贾第虫在该地区仍以犬类感染的占比较高,随着伴侣动物的逐渐发展,越来越多的宠物犬进入家庭与人共处,在福利机构也出现野生犬类与家养犬类混居的情况,而犬类可以携带和

传播贾第虫病,并通过多种途径传播给人,所以对人类健康仍然是一个潜在威胁,对于该类疾病并没有特效治疗方法,所以针对该类疾病的预防大于治疗,加强对粪便的管理和处理,保护公用水源和环境,避免污染,对于阳性结果的犬类进行隔离,避免扩大传播范围是普遍的预防手段,并且需要有数据对中国南海周边地区贾第虫病的流行病学、感染源、宿主和传播进一步了解。有必要在分型水平上使用分子工具进行监测研究和暴发调查。此外,为了使数据更具可比性,还需要在各地区之间达成共识并采用协调一致的有效方法。减少人畜生态系统中的人畜共患病和其他威胁的公共健康风险时,必须考虑人类、动物和它们所生活的各种环境之间相互作用的复杂性。这需要负责人类健康、动物健康和环境的部门之间以一种健康的方式进行沟通和合作,并且针对不同地理环境及不同公共卫生状况的地区,进行区域性调查,尽管提出的结果对于公共卫生专家、流行病学家、兽医、农民和一般公众可能更为重要,但是进一步解决数据的缺口,将大大有助于了解贾第鞭毛虫病的复杂情况,从而为今后制定适当的控制和预防计划奠定基础。

参考文献(References):

- [1] O'HANDLEY R M, OLSON M E. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants [J]. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2006, 22(3): 623-643.
- [2] CACCIÒ S M, LALLE M, SVÄRD S G. Host specificity in the *Giardiaduodenalis* species complex [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2018, 66: 335-345.
- [3] RYAN U, HIJJAWI N, FENG Y Y, et al. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite [J]. *International Journal for Parasitology*, 2019, 49(1): 1-11.
- [4] LECOVÁ L, WEISZ F, TŮMOVÁ P, et al. The first multilocus genotype analysis of *Giardiaintestinalis* in humans in the Czech Republic [J]. *Parasitology*, 2018, 145(12): 1577-1587.
- [5] CACCIÒ S M, THOMPSON R C, MCLAUCHLIN J, et al. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology [J]. *Trends in Parasitology*, 2005, 21(9): 430-437.
- [6] RYAN U M, BATH C, ROBERTSON I, et al. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 4992-4997.
- [7] RYAN U, CACCIÒ S M. Zoonotic potential of *Giardia* [J].

- International Journal for Parasitology* , 2013 , 43 (12/13) : 943 – 956.
- [8] LASEK-NESSLEQUIST E , WELCH D M , SOGIN M L . The identification of a new *Giardiaduodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems [J]. *International Journal for Parasitology* , 2010 , 40(9) : 1063 – 1074.
- [9] DELPORT T C , ASHER A J , BEAUMONT L J , et al. *Giardiaduodenalis* and *Cryptosporidium* occurrence in Australian Sea lions (*Neophocacineae*) exposed to varied levels of human interaction [J]. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* , 2014 , 3(3) : 269 – 275.
- [10] CACCIÒ S M , LALLE M , SVÄRD S G . Host specificity in the *Giardiaduodenalis* species complex [J]. *Infection , Genetics and Evolution* , 2018 , 66 : 335 – 345.
- [11] COVACIN C , AUCOIN D P , ELLIOT A , et al. Genotypic characterisation of *Giardia* from domestic dogs in the USA [J]. *Veterinary Parasitology* , 2011 , 177(1/2) : 28 – 32.
- [12] ELIGIO-GARCÍA L , CORTES-CAMPOS A , COTA-GUARDADO S , et al. Frequency of *Giardaintestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan , Sinaloa , Mexico using β -giardin restriction gene [J]. *Veterinary Parasitology* , 2008 , 156(3/4) : 205 – 209.
- [13] 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(3) : 253 – 262.
- [14] TRAUB R J , INPANKAEW T , REID S A , et al. Transmission cycles of *Giardiaduodenalis* in dogs and humans in Temple communities in Bangkok: a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard [J]. *Acta Tropica* , 2009 , 111(2) : 125 – 132.
- [15] PALMER C S , TRAUB R J , ROBERTSON I D , et al. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats [J]. *Veterinary Parasitology* , 2008 , 154(1/2) : 142 – 147.
- [16] LEONHARD S , PFISTER K , BEELITZ P , et al. The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany [J]. *Veterinary Parasitology* , 2007 , 150(1/2) : 33 – 38.
- [17] BALLWEBER L R , XIAO L H , BOWMAN D D , et al. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance [J]. *Trends in Parasitology* , 2010 , 26(4) : 180 – 189.
- [18] SOMMER M F , BECK R , IONITA M , et al. Multilocus sequence typing of canine *Giardiaduodenalis* from South Eastern European countries [J]. *Parasitology Research* , 2015 , 114(6) : 2165 – 2174.
- [19] 王中全 , 崔晶 . 贾第虫病流行病学研究进展 [J]. 国外医学(寄生虫病分册) , 2005(3) : 99 – 105.
WANG Z Q , CUI J . Advances in epidemiological studies of Giardiasis [J]. *Parasitic Diseases Foreign Medical Sciences* , 2005(3) : 99 – 105. (in Chinese)
- [20] MARK-CAREW M P , ADESIYUN A A , BASU A , et al. Characterization of *Giardia duodenalis* infections in dogs in Trinidad and Tobago [J]. *Veterinary Parasitology* , 2013 , 196(1/2) : 199 – 202.
- [21] CLAEREBOUW E , CASAERT S , DALEMANS A C , et al. *Giardia* and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium [J]. *Veterinary Parasitology* , 2009 , 161(1/2) : 41 – 46.
- [22] DADO D , MONTOYA A , BLANCO M A , et al. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* from dogs in Spain: possible zoonotic transmission and public health importance [J]. *Parasitology Research* , 2012 , 111(6) : 2419 – 2422.
- [23] COOPER M A , STERLING C R , GILMAN R H , et al. Molecular analysis of household transmission of *Giardia lamblia* in a region of high endemicity in Peru [J]. *The Journal of Infectious Diseases* , 2010 , 202(11) : 1713 – 1721.

(责任编辑 万晶)