

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2024.04.004

## 河北省多地圈养貉子十二指肠贾第虫的分子鉴定及分析

王建秋<sup>a,b</sup>, 陈东前<sup>a,b</sup>, 陈思源<sup>a,b</sup>, 周欣雨<sup>a,b</sup>, 高宇<sup>a,b</sup>, 刘欣超<sup>a,b</sup>, 李文超<sup>a,b\*</sup>

(安徽科技学院 a. 动物科学学院; b. 动物营养调控与健康安徽省重点实验室, 安徽 凤阳 233100)

**摘要:** 为了解河北省圈养貉子十二指肠贾第虫感染及基因型分布情况, 从河北省多地共采集 389 份新鲜貉子粪便样品, 采用基于十二指肠贾第虫 *SSU rRNA* 基因巢式 PCR 检测所有样本, 对获得的阳性样本分别扩增十二指肠贾第虫 *TPI* 和 *GDH* 基因并测序分析。结果显示, 河北省圈养貉子十二指肠贾第虫感染率为 3.3% (13/389), 不同地区貉子十二指肠贾第虫感染率差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 同时, 不同年龄和粪便类型的貉子十二指肠贾第虫感染率差异也均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。序列分析表明, 研究获得的十二指肠贾第虫基因型均为具人畜共患的聚集体 B。研究结果扩大了对十二指肠贾第虫聚集体 B 感染宿主范围的认识。

**关键词:** 十二指肠贾第虫; 流行; 貉子; 河北

中图分类号: S858.92; R382 文献标志码: A 文章编号: 1673-1891(2024)04-0026-06

## Molecular Identification and Analysis of *Giardia duodenalis* in Captive Raccoon Dogs in Different Areas of Hebei Province

WANG Jianqiu<sup>a,b</sup>, CHEN Dongqian<sup>a,b</sup>, CHEN Siyuan<sup>a,b</sup>, ZHOU Xinyu<sup>a,b</sup>, GAO Yu<sup>a,b</sup>,  
LIU Xinchao<sup>a,b</sup>, LI Wenchao<sup>a,b\*</sup>

(a. College of Animal Science; b. Anhui Provincial Key Laboratory of Animal Nutritional Regulation and Health, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, Anhui, China)

**Abstract:** To understand the infection situation and genotype distribution of *Giardia duodenalis* in captive raccoon dogs in Hebei province, 389 fresh fecal samples of raccoon dogs were collected from different regions in Hebei province. All samples were detected by the nested PCR based on *SSU rRNA* gene of *G. duodenalis*. Then, the *TPI* and *GDH* genes of *G. duodenalis*-positive samples were amplified and sequenced for analysis. The results showed that the infection rate of *G. duodenalis* in captive raccoon dogs in Hebei province was 3.3% (13/389), and there was no significant difference in the infection rate of *G. duodenalis* in raccoon dogs in different regions ( $P>0.05$ ). Meanwhile, the infection rate of *G. duodenalis* in raccoon dogs of different ages or with different fecal types showed no significant difference ( $P>0.05$ ). Sequence analysis showed that all the *G. duodenalis* genotypes obtained in this study were zoonotic assemblage B. The results in the present study have expanded our understanding of the infection host range infected by *G. duodenalis* assemblage B.

**Keywords:** *Giardia duodenalis*; epidemic; raccoon dogs; Hebei province

收稿日期: 2024-06-05

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1808085MC84); 安徽科技学院校级稳定人才项目(dkwd201702); 大学生创新创业项目(202310879038, S202310879065)。

作者简介: 王建秋(2002—), 男, 安徽天长人, 本科生, 研究方向: 人畜共患原虫流行病学调查, e-mail: 2267943973@qq.com。

\*通信作者: 李文超(1979—), 男, 河南南阳人, 教授, 博士, 研究方向: 人畜共患原虫流行病学调查, e-mail: liwen303@126.com。

## 0 引言

十二指肠贾第虫(*Giardia duodenalis*, 也称蓝氏贾第虫, 以下简称贾第虫)是一类在医学和兽医学上具有重要研究意义的原虫, 可寄生于人、家畜和野生动物的肠道中, 通常可导致感染的人出现腹泻、腹部绞痛、腹胀、体重减轻、消化不良等临床症状, 据估计, 全球约有2.8亿人感染<sup>[1-2]</sup>。根据宿主特异性和遗传差异, 贾第虫可被划分为8个不同的基因型, 即集聚体A~H, 其中集聚体A和B是感染人的最主要的集聚体, 同时也可感染广泛的动物宿主, 而集聚体C~H似乎是宿主特异性的<sup>[3]</sup>。越来越多的分子证据显示, 犬科动物不仅可感染宿主特异性的集聚体C和D, 也可感染人畜共患的集聚体A和B, 因此犬科动物可作为人和其他动物贾第虫感染的潜在来源<sup>[2,4-5]</sup>。

貉子是非常古老的一个犬科物种, 被认为是犬科动物的祖先。貉子作为一种毛皮动物, 具有重要的经济价值, 在我国北方地区如东北三省、河北省、山东省等有大量饲养。动物健康状况是反映人工饲养动物福利信息的重要指标之一。虽然目前国内已有一些貉子肠道蠕虫感染的相关报道, 但有关貉子原虫, 尤其是贾第虫感染方面的研究较少<sup>[4]</sup>。貉子等犬科动物感染贾第虫后通常无临床症状, 但其可不断向环境中散播贾第虫包囊, 可成为人和其他动物的感染来源, 具有重要的公共卫生意义<sup>[1-4]</sup>。河北省作为我国貉子养殖大省之一, 目前仅见Zhang等<sup>[4]</sup>报道河北省貉子感染贾第虫, 但该研究存在采样地点较为局限(仅从1个貉子场采样), 且样本数偏少(仅54份样本)等缺陷, 不足以全面反映河北省人工养殖貉子贾第虫感染的真实状况。本研究用分子方法对河北省多个地区圈养貉子的粪便样本进行贾第虫检测和分子鉴定, 以探明河北省圈养貉子中贾第虫的流行情况及虫株的分子特性, 为貉子贾第虫病的相关研究以及明确其公共卫生意

义提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样本来源

参照陈东前等<sup>[6]</sup>的方法, 在2022年6—12月, 分别从河北省中部的石家庄市、南部的邯郸市、东部的秦皇岛市和北部的张家口市的5家貉子场采集389份新鲜圈养貉子粪便样本。

#### 1.1.2 主要试剂

粪便基因组DNA提取试剂盒, 购于天根生化科技(北京)有限公司; 重组Taq DNA聚合酶、dNTPs、DL 2000 DNA marker, 均购于宝生物工程(大连)有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器

PCR仪(ETC811, 苏州东胜兴业科学仪器有限公司); 电泳仪(Bio-rad公司); 凝胶成像系统(Tanon 2500R, 上海天能科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PCR扩增

依照粪便基因组DNA提取试剂盒说明书提取粪便基因组DNA, 置-20℃保存。参照Appelbee等<sup>[7]</sup>的引物和方法, 扩增贾第虫SSU rRNA基因, 对所有样本进行检测以筛选贾第虫阳性样本; 分别参照Sulaiman等<sup>[8]</sup>和Read等<sup>[9]</sup>的引物和方法, 扩增获得的贾第虫SSU rRNA基因阳性样本的TPI和GDH基因(表1)。3个基因位点的PCR反应体系均为25 μL, 含重组Taq DNA聚合酶0.15 μL, 上下游引物(10 mm)各0.25 μL, 10×PCR缓冲液(15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 2.5 μL, dNTP(1.25 mmol/L) 2 μL, 灭菌双蒸水17.85 μL, 模板DNA 2 μL。引物序列及PCR扩增参数如表1所示。所有PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 拍照, 符合预期的TPI和GDH基因阳性样本经切胶后直接送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。

表 1 本研究所用引物

基因	引物	引物序列(5'~3')	片段大小/bp	扩增参数
SSU rRNA	Gia2029	AAGTGTGGTGCAGACGGACTC	292	94 °C 预变性 4 min; 96 °C 45 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 4 min
	Gia2150c	CTGCTGCCGTCCTTGGATGT		
	RH11	CATCCGGTGCATCCTGCC		
	RH4	AGTGAACCCCTGATTCTCGCCAGG		
TPI	eP1	AAATATGCCTGCTCGTCC	530	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min
	eP2	CAAACCTTTTCGGCAAACC		
	iP1	CCCTTCATCGGIGGTAACCTT		
	iP2	GTGGCCACCACICCCGTGCC		
GDH	GDHeF	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	450	94 °C 预变性 2 min; 94 °C 30 s, 56 °C 20 s, 72 °C 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 7 min
	GDHiF	CAGTACAACCTCYGCTCTCGG		
	GDHiR	GTTRTCCTTGCACATCTC		

### 1.2.2 测序及分析

测序所得基因序列经 Dnaman v6.0.3.99 软件校对,剔除相同序列,将得到的代表性序列提交 GenBank 用 Blast 征询验证,分别下载部分序列作参考序列,经 Clustal X 1.81 进行序列对比后,用 Mega 5.05 软件以最大似然法(maximum-likelihood method)构建进化树,采用可逆取代模型计算替代率,自展值(Bootstrap)设为 1 000。分别用巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的 TPI 基因(基因 ID: M87648)和盐沼盐杆菌(*Halobacterium salinarum*)的 GDH 基因(基因 ID: X63837)作为基于 TPI 和 GDH 基因的进化树外群。

### 1.2.3 统计分析

应用 SPSS 20.0 软件对本研究中不同日龄和不同粪便类型貉子贾第虫感染率进行  $\chi^2$  分析,  $P < 0.05$  时表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 河北省貉子贾第虫感染情况

基于贾第虫 SSU rRNA 基因的巢式 PCR 方法,共从 389 份貉子样本中成功扩增出 13 个贾第虫阳性样本,河北省圈养貉子贾第虫感染率为 3.3% (13/

389),其中石家庄感染率为 5.0% (5/100),邯郸感染率为 4.9% (5/103),秦皇岛感染率为 3.0% (3/100),张家口未检出阳性感染;不同地区貉子贾第虫感染率差异无统计学意义( $\chi^2=4.590, P=0.204$ )(表 2)。>6 月龄貉子贾第虫感染率为 3.5%, <6 月龄貉子贾第虫感染率为 4.9%,两者差异无统计学意义( $\chi^2=0.012, P=0.568$ )。粪便正常和非正常貉子贾第虫感染率分别为 3.0% 和 5.6%,差异无统计学意义( $\chi^2=0.602, P=0.343$ )(表 3)。

### 2.2 贾第虫基因型鉴定情况

随后对 13 个贾第虫 SSU rRNA 基因阳性样本进行扩增,共有 7 个阳性样本扩增出贾第虫 TPI 基因,6 个阳性样本扩增出贾第虫 GDH 基因。上述阳性样本经双向测序,均测序成功,序列经加工后,GenBank 中经 Blast 显示所获得的序列均为十二指肠贾第虫 TPI 或 GDH 基因序列,所获得的 7 条 TPI 基因序列和 6 条 GDH 基因序列经比对其同源性均为 100%。基于 TPI 和 GDH 基因的进化树显示,本次获得的基因分别与同属于聚集体 B 的其他贾第虫虫株的 TPI 和 GDH 基因聚在一枝,尤其是 GDH 基因与已报道的多个聚集体为 BIV 的贾第虫 GDH 基因紧密聚在一起,显示本研究所获得的贾第虫其基因型均为聚集

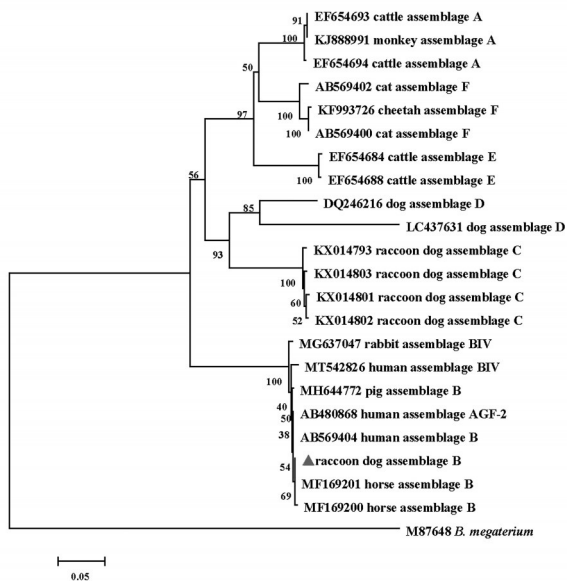
表 2 河北省圈养貉子贾第虫感染情况

采样地点(采样样本数/份)	阳性样本数/份	感染率/(95%CI)	P 值	贾第虫基因型(样本数/份)
石家庄市(100)	5	5.0(0.7,9.3)	0.204	B(5)
邯郸市(103)	5	4.9(0.6,8.7)		B(5)
秦皇岛市(100)	3	3.0(0.4,6.4)		B(3)
张家口市(86)	0	0.0		—
总计(389)	13	3.3(1.5,5.1)		B(13)

表 3 不同年龄和粪便类型圈养貉子贾第虫流行情况

因素	类型	样本数/份	感染数/份	感染率/(95% CI)	P 值
年龄	>6 月	85	3	3.5(0,7.5)	0.568
	<6 月	304	10	3.3(1.3,5.3)	
粪便类型	正常	353	11	3.1(1.3,4.9)	0.343
	非正常(糊状或液体)	36	2	5.6(0,13.4)	

体 B,且属于聚集体 B 的基因亚型聚集体 BIV(图 1、图 2)。



注:▲为本研究所获貉子贾第虫 TPI 基因序列。

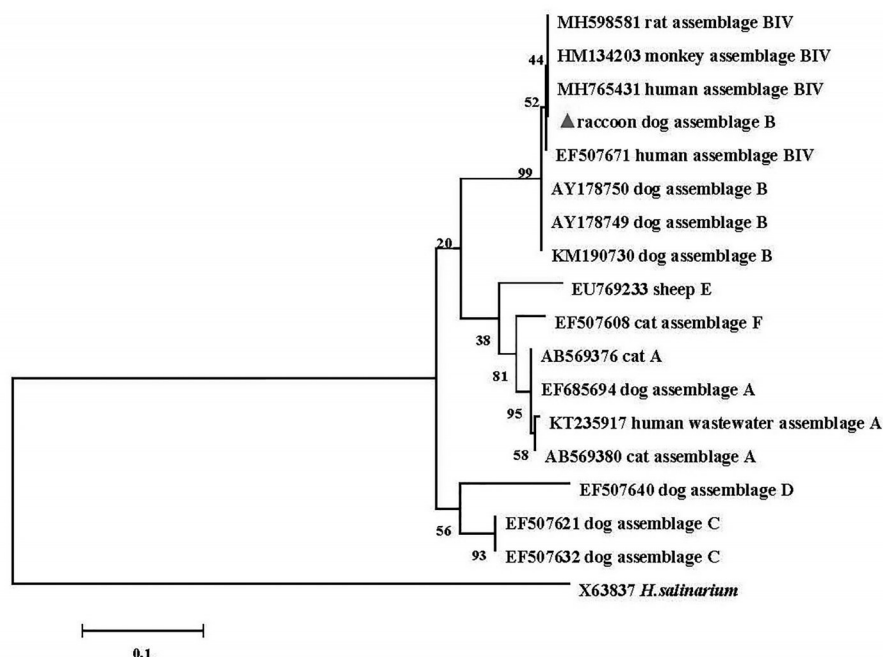
图 1 贾第虫 TPI 基因种系发育关系(最大似然法)

### 3 结论与讨论

虽然贾第虫是全球范围内家养和野生犬科动物最常见的肠道原虫之一,但迄今仅见罗马尼亚、波兰、中国及韩国有貉子贾第虫感染的报道,相关资料非常有限,分析其原因可能与犬科动物感染贾

第虫后大多数无临床症状有关<sup>[4-5,10-12]</sup>。本研究中,河北省多个地区圈养貉子贾第虫感染率为 3.3%(13/389),这一结果低于波兰<sup>[5]</sup>(11.1%,2/18)、韩国<sup>[11]</sup>(9.1%,1/11)以及国内黑龙江省<sup>[4]</sup>(7.5%,3/40),吉林省<sup>[4,12]</sup>(6.4%,7/110)和辽宁省<sup>[4]</sup>(15.3%,11/72),分析其感染率较低的原因可能与本次采样的貉子粪便均来自规模较大的貉子养殖场,饲养管理和卫生条件较好有关。但本研究结果高于河北省<sup>[4]</sup>(1.9%,1/54)以及山东省<sup>[4]</sup>(0%,0/29)的报道,分析其原因可能与 Zhang 等<sup>[4]</sup>的研究从上述 2 省采集的样本量较少有关。本研究中,不同地区间貉子贾第虫感染率间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),这一结果与 Zhang 等<sup>[4]</sup>对国内多地貉子贾第虫的相关报道不一致。同时,本研究结果显示年龄和粪便类型均不是影响貉子贾第虫感染的主要风险因素,这一结果与 Zhang 等<sup>[4]</sup>的结果一致,提示贾第虫感染不是造成貉子粪便不正常的主因,这些貉子可能还存在其他可致粪便不正常的病原体共感染的情况,尚需做进一步研究。考虑到肠道寄生虫的感染率会受到诸如采样地点、采样时机、样本量,检测方法、饲养管理、卫生状况等多种因素影响,因此很难解释清楚不同研究中感染率差异的真正原因。





注:▲为本研究所获貉子贾第虫 *GDH* 基因序列。

图2 贾第虫 *GDH* 基因种系发育关系(最大似然法)

目前,全球已报道犬科动物可感染的贾第虫基因型有聚集体 A、B、C、D、E 和 F,但貉子可感染的贾第虫基因型目前仅见聚集体 C 和 D,且存在少量的两者混合感染<sup>[4-5,10-12]</sup>。本研究中,基于贾第虫 *TPI* 和 *GDH* 基因序列分析显示,河北省圈养貉子中感染的贾第虫基因型均为聚集体 B,且基因亚型为聚集体 BIV,这一结果与波兰<sup>[5]</sup>(聚集体 D)、罗马尼亚<sup>[9]</sup>(聚集体 D)、国内北方五省<sup>[4]</sup>(聚集体 C 和聚集体 D)、长春市<sup>[12]</sup>(聚集体 D)等的报道不同。研究显示,贾第虫聚集体 B 在 *BG*, *TPI* 和 *GDH* 等基因位点上具有广泛的遗传多态性,可产生许多亚型如聚集体 BIII 和 BIV<sup>[13-14]</sup>。贾第虫聚集体 B 目前已在人、非

人灵长类动物、马、兔子、有袋类动物、栗鼠和河狸中发现,该基因型似乎是少数动物群体(如河狸、麝鼠、南美栗鼠、兔子、马和非人类灵长类动物)中的优势基因型,并且相对于聚集体 A,人聚集体 B 感染似乎更为常见<sup>[13-14]</sup>。本研究首次发现圈养貉子可感染人畜共患的贾第虫聚集体 B,扩展了对贾第虫聚集体 B 感染宿主范围的认知,未来尚需开发出更高分辨率的贾第虫基因分型工具,更精确地对人和动物尤其是生活在同一家庭或社区的人和动物贾第虫分离株的遗传特征进行解析,以提升对贾第虫在不同动物中的分布和人畜共患传播潜力的理解。

#### 参考文献:

- [1] BERRY A S F, JOHNSON K, MARTINS R, et al. Natural infection with *Giardia* is associated with altered community structure of the human and canine gut microbiome[J]. *mSphere*, 2020, 5(4): e00670-20.
- [2] ZHAO Z Y, LI M H, LYU C, et al. Prevalence of *Giardia duodenalis* among dogs in China from 2001 to 2021: a systematic review and meta-analysis[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2022, 19(3): 179-191.
- [3] RYAN U, CACCIÒ S M. Zoonotic potential of *Giardia*[J]. *International Journal for Parasitology*, 2013, 43: 943-956.
- [4] ZHANG X X, ZHENG W B, MA J G, et al. Occurrence and multilocus genotyping of *Giardia intestinalis* assemblage C and D in

- farmed raccoon dogs, *Nyctereutes procyonoides*, in China[J]. *Parasit Vectors*, 2016, 9(1):471.
- [5] SOLARCZYK P, MAJEWSKA A C, JĘDRZEJEWSKI S, et al. First record of *Giardia* assemblage D infection in farmed raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) [J]. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2016, 23(4):696-698.
- [6] 陈东前,张玉瑾,王建秋,等.河北省圈养貉子隐孢子虫流行现状调查[J]. *安徽科技学院学报*, 2024, 38(1):7-12.
- [7] APPELBEE A J, FREDERICK L M, HEITMAN T L, et al. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada[J]. *Veterinary Parasitology*, 2003, 112(4):289-294.
- [8] 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):1444-1452.
- [9] READ C M, MONIS P T, THOMPSON R C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at dehydrogenase locus using PCR-RFLP[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2004, 4(5):125-130.
- [10] ADRIANA G, ZSUZSA K, MIRABELA OANA D, et al. *Giardia duodenalis* genotypes in domestic and wild animals from Romania identified by PCR-RFLP targeting the *gdh* gene[J]. *Veterinary Parasitology*, 2016, 217:71-75.
- [11] KUMARI P, EO KY, LEE WS, et al. DNA-based detection of *Leptospira wolffii*, *Giardia intestinalis* and *Toxoplasma gondii* in environmental feces of wild animals in Korea[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2021, 83(5):850-854.
- [12] 于利利,李显赫,李建华,等.长春狐狸、貉和家兔养殖场十二指肠贾第虫基因型分析[J]. *动物医学进展*, 2019, 40(2):84-86.
- [13] XIAO L H, FENG Y Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* [J]. *Food Waterborne Parasitology*, 2017, 8-9:14-32.
- [14] CAI W, RYAN U, XIAO L, et al. Zoonotic giardiasis: an update[J]. *Parasitology Research*, 2021, 120(12):4199-4218.

---

(上接第25页)

- [19] 闫瑞阳. 外源褪黑素和水杨酸对干旱胁迫下木槿生长及光合生理特性的调控作用[D]. 泰安:山东农业大学, 2023.
- [20] 徐亚军,赵龙飞,邢鸿福,等. 内生细菌对盐胁迫下小麦幼苗脯氨酸和丙二醛的影响[J]. *生态学报*, 2020, 40(11):3726-3737.
- [21] 朱秀红,樊博,杨会焱,等. 生物炭配施氮素对Cd胁迫下泡桐幼苗生理生态的影响[J]. *西南农业学报*, 2024, 37(2):302-312.
- [22] 项阳,刘延波,赵德刚,等. 转 *TPSI* 基因促进干旱胁迫条件下的花青素积累提高玉米植株抗旱性[J]. *植物生理学报*, 2015, 51(11):2054-2062.
- [23] KLÁRA K, PAVEL V, ILJA T P, et al. Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response[J]. *Journal of Proteomics*, 2011, 74(8):1301-1322.
- [24] 王宇超,王得祥,彭少兵,等. 干旱胁迫对木本滨藜生理特性的影响[J]. *林业科学*, 2010, 46(1):61-67.
- [25] 魏桦. 不同猕猴桃种质资源抗旱性及抗寒性综合评价[D]. 咸阳:西北农林科技大学, 2021.
- [26] 冯芳芳. 两种柑橘砧木对干旱胁迫的生理响应及水通道蛋白基因表达分析[D]. 南昌:江西农业大学, 2017.
- [27] 王丹. 水杨酸对水分胁迫下草莓叶片生理生化特性的影响[D]. 徐州:江苏师范大学, 2013.