

多位点基因分型用于蓝氏贾第鞭毛虫遗传多样性的研究进展

王斌¹ 沈玉娟² 刘华² 刘晖^{1*}

【摘要】蓝氏贾第鞭毛虫（简称贾第虫）是一种重要的人兽共患肠道原虫，宿主广泛。目前，种内有 8 个有效聚集体型。随着分子生物学技术的发展，多位点基因分型（multi-locus genotyping, MLG）技术被广泛用于贾第虫的研究。该文就 MLG 技术在阐述贾第虫遗传多样性、评估人兽共患传播的可能性及分类学上的应用研究作一综述。

【关键词】蓝氏贾第鞭毛虫；基因型；多位点基因分型；聚集体

Research progress on multilocus genotyping for genetic diversity of *Giardia lamblia* Wang Bin¹, Shen Yujuan², Liu Hua², Liu Hui^{1*}. ¹Department of Parasitology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China ²National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China

*Corresponding author: Liu Hui, Email: liuhui6032@sina.com

Supported by the Chinese Special Program for Scientific Research of Public Health (201302004), Shanghai Public Health Outstanding Academic Leader (GWDTR201214) and the National Science and Technology Major Program (2012ZX10004-201; 2013ZX10004805)

【Abstract】 *Giardia lamblia* is an important zoonotic intestinal parasite with a wide range of hosts. Eight valid assemblages (A-H) have been identified within this parasite. With the development of molecular biological techniques, multi-locus genotyping (MLG) tools have been used increasingly to characterize *G. lamblia* isolates. This paper focused on reviewing the application of MLG in understanding genetic diversity and zoonotic potential of *G. lamblia* as well as its taxonomy.

【Key words】 *Giardia duodenalis*; Genotype; Multi-locus genotyping; Assemblage

贾第鞭毛虫病（giardiasis）简称贾第虫病，是由蓝氏贾第鞭毛虫（*G. lamblia*）或称十二指肠贾第鞭毛虫（*Giardia duodenalis*）或称肠贾第虫（*G. intestinalis*）引起的以腹泻为主要临床症状的人兽共患肠道寄生虫病。因 1976 年首次在旅游者中发生集体感染，故有“旅游者腹泻”之称。人的感染主要是由于摄入被包囊污染的水和食物。贾第虫病主要经水传播，其包囊污染饮用水是造成贾第虫病流行和暴发的主要原因。自 1954 年以来，至少有 132 起

水源性暴发的案例^[1]。贾第鞭毛虫为美国疾病预防控制中心 Foodnet 网络监测的重要寄生虫之一，也是我国《生活饮用水卫生标准》水质必检指标之一。研究证明，贾第虫的集聚体型（基因型）复杂，且有宿主特异性。目前已经分子鉴定出 8 个有效的集聚体（A-H）。近年来，多位点基因分型（multi-locus genotyping, MLG）技术被广泛应用于贾第虫集聚体的研究。本文就 MLG 技术在阐述贾第虫遗传多样性、评估人兽共患传播的可能性及分类学上的应用研究作一综述。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2015.01.011

基金项目：国家卫生行业科研专项（201302004）；上海市公共卫生优秀学科带头人培养项目（GWDTR201214）和国家科技重大专项（2012ZX10004-201；2013ZX10004805）

作者单位：¹563003 遵义，遵义医学院寄生虫学教研室；²200025 上海，中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所，卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室，世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心

*通信作者：刘晖，Email: liuhui6032@sina.com

1 贾第虫病原学特征

贾第虫生活史包括滋养体和包囊两个阶段。滋养体为营养繁殖阶段，呈倒置梨形，长约 9~21 μm，宽 5~15 μm，厚 2~4 μm，前段宽钝，后端尖细，两侧对称，有 4 对鞭毛，依靠鞭毛运动。1 对轴柱将虫体均分两半，在轴柱的中部可见 2 个半月形的中体。

腹面前半部向内凹陷成吸盘状陷窝,靠其吸附在宿主肠黏膜上,以渗透方式从体表吸收营养物质。包囊为感染阶段,呈椭圆形,囊壁较厚,长为8~14 μm ,宽为7~10 μm 。未成熟的包囊有2个核,成熟的包囊具4个核,多偏于一端,囊内可见鞭毛和中体的早期结构。人或动物吞食被包囊污染的饮水或食物而感染,包囊在十二指肠内脱囊形成滋养体,滋养体寄生于小肠黏膜引起黏膜层充血和水肿并导致上皮损伤、脱落,形成溃疡,引起肠黏膜吸收和分泌功能紊乱,出现腹痛、腹泻和吸收不良等症状,免疫功能低下者易发生严重感染甚至死亡^[2]。

2 贾第虫检测

贾第虫的实验室诊断普遍以形态学检测为主,但检出率低、易漏检,且依赖于专业人员。由于不同集聚体之间的形态学差异微小,该方法不能鉴定集聚体型和亚型。粪抗原的免疫学检测虽然快速敏感,但易发生交叉反应,基于它的局限性,仅可作为辅助诊断。目前,以PCR为基础的分子生物学技术已经用于贾第虫病的流行病学调查及实验室诊断,该技术不仅提高了贾第虫的检出率,避免了某些异种抗原和成分间交叉反应的发生,最重要的是能够鉴定贾第虫种和集聚体型。贾第虫核酸检测方法主要有:PCR、限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time PCR, qPCR)、反转录聚合酶链反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)、多重实时聚合酶链反应(multiplex real-time PCR, mPCR)、和环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术等。目前,常用于贾第虫分类的标记基因有核糖体小亚单位rRNA(small-subunit ribosomal RNA, SSU-rRNA)基因、磷酸丙糖异构酶(triosephosphate isomerase, *tpi*)基因、谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, *gdh*)基因、 β 贾第素(β -triosephosphate isomerase, *bg*)基因和 α -延伸因子1(elongation factor 1 alpha, *ef1 α*)基因等。然而,贾第虫集聚体型复杂,基于单一分子标志难以对集聚体进行有效鉴定,且不能区分混合感染。

3 贾第虫遗传多样性

贾第虫具有广泛的宿主范围,能够感染包括人在内的多种哺乳动物,其所表现出来的遗传多样性

与该种内的基因异质性密切相关。目前研究证实,该种内至少有8个不同的集聚体类型(A-H)^[4],每个集聚体有不同的宿主特异性。

集聚体A和B拥有最广泛的宿主特异性,主要感染人类和多种哺乳动物(表1);根据种系发育分析显示,集聚A又可以分为亚集聚体(基因亚型)A I、A II和A III^[4]。最近,Zhang等^[5]基于*tpi*基因对羊贾第虫的流行病学研究中发现一个集聚体A分离株,它与集聚体A I、A II和A III有4~5个碱基的差异,将其命名为集聚体A IV。分子流行病学研究表明:A I常见于动物,偶见于人体;相反,A II常见于人体,偶见于动物;A III主要见于野生动物,人体仅有几个病例^[6-8]。集聚体C、D、E、F和G有很强的宿主特异性,宿主范围较窄。集聚体C和D主要感染犬科及猫科动物,如犬和猫;集聚体E常见于偶蹄类哺乳类动物,如牛、绵羊、山羊、鹿和骆驼等;集聚体F和G主要分别感染猫和啮齿类动物;但也有集聚体C、D、E和F感染人的病例报道^[9-10]。最近,Liu等^[11]对中国上海浦东地区的临床腹泻患者的研究发现:集聚体C是优势的集聚体型。集聚体H到目前为止仅被鉴定于海洋动物海豹中^[12]。

借助分子生物学技术测定贾第虫特定的基因片段和序列,分析比较其目的基因片段的序列差异可确定集聚体型和亚型。然而,各标记基因在遗传特性上存在很大的不同。其中,SSU rRNA基因是多拷贝基因,序列最为保守,普遍用于鉴定贾第虫种及区分种内集聚体类型;*tpi*基因主要用于亚型分析;而*gdh*, *bg*和*ef1 α* 介于上述二者基因间,有广泛的扩增谱^[13]。由于不同基因对同一分离株的敏感性不同,导致PCR扩增效率不同。

尽管集聚体有宿主特异性,但绝大多数的宿主可感染2种以上的集聚体;研究也发现同一宿主,包括人和动物,时有发生不同类型集聚体混合感染的报道。然而,单一基因不能很好地阐述贾第虫病的流行情况、遗传多样性和传播动力学特征^[14]。Cacciò等^[6]提出采用MLG技术对贾第虫进行虫种鉴定和集聚体分型。

4 MLG检测贾第虫

4.1 MLG

MLG是指对同一样本采用不同的基因进行PCR扩增而进行分型的技术。由于不同贾第虫种及种内集聚体间遗传多态性的广泛发生,在进行贾第虫流

表1 贾第虫不同集聚体及其宿主

集聚体	宿主
A	人类、非人类灵长动物、家畜和野生动物、反刍动物、马、袋鼠、犬、猫、雪貂、啮齿类及其它哺乳动物
B	人类、非人类灵长动物、牛、犬、马、兔、海狸及麝鼠
C	家畜和野生犬科动物
D	家畜和野生犬科动物
E	反刍动物和猪
F	猫
G	小鼠和大鼠
H	海豹

行病学调查和实验室诊断时，单一基因的PCR扩增可能存在贾第虫的漏检现象。同时，由于PCR的优势扩增的特性，很难诊断混合感染的病例，更无法解释“集聚体转换”（*assemblage-swapping*）这一现象（同一份样本在不同的基因位点被鉴定为不同的集聚体类型）。然而，应用MLG技术，能够获得每条核苷酸序列上的碱基变异情况，对不同来源的等位基因进行多态性分析，达到基因分型的目的，并能更为有效地追溯传染源或污染源，评估人兽共患的传播机制^[4]。因此，目前MLG分析被越来越多地用于人和动物的贾第虫检测^[6]。

4.2 MLG检测贾第虫

目前，贾第虫的MLG分析中常用的标志基因有 *tpi*、*gdh* 和 *bg*。

首先，该技术能够提高贾第虫的检出率。贾第虫在上述3个基因位点的扩增效率的确存在不同。Liu等^[15]对动物源性的贾第虫分离株进行遗传特性分析时发现，在 *gdh* 和 *bg* 基因位点的PCR扩增率分别为85.2%和73.8%。Scorza等^[16]在对包囊阳性的哺乳动物粪便样本进行基因分型时发现，在 *gdh* 基因位点PCR扩增率最高，为91.0%，其次是 *bg* 位点（84.8%）和 *tpi* 位点（19.8%）。Bertrand等^[17]在一项对人源贾第虫分离株的MLG研究中发现，在 *tpi* 和 *gdh* 基因位点，PCR扩增率分别为96.2%和81.0%。

其次，能够发现更多的混合感染的案例。Liu等^[15]对牛体内贾第虫进行分子流行病学调查时发现，8份包囊阳性的样本，基于 *tpi* 基因位点被鉴定为集聚体B，在 *gdh* 和 *bg* 位点却被鉴定为集聚体E。Scorza等^[16]报道了一个犬源的贾第虫株在 *tpi* 位点鉴定为集聚体A，在 *gdh* 和 *bg* 基因位点为集聚体D。Huey等^[18]对马来西亚84例镜检包囊阳性的儿童贾第虫粪便样品进行分子鉴定时发现，71个样本至少在一个基因扩增成功。30例为集聚体A感染，32例为集聚体B感染，9例在不同基因位点鉴定的集聚

体类型不一致^[18]。有人也把这种现象称为“集聚体转换”。当然，这一“集聚体转换”现象也可能与集聚体间的基因重组有关。

5 结语

目前，分子生物学技术已成为贾第虫检测、鉴定和基因型分析的重要方法，极大地提高了检出率。尽管MLG分型技术既可以提高贾第虫的检测率，又可在一定程度上鉴定混合感染的样本，但因贾第虫种内的集聚体间及同一集聚体内的等位基因异质性，对其传播动力学和人兽共患的传播机制尚不十分清楚。分子生物学新技术在贾第虫研究中的应用将大大推动对贾第虫分类学、传播动力学及遗传多样性和致病机制的研究。

参 考 文 献

- [1] Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt[J]. J Water Health, 2007, 5(1): 1-38.
- [2] 胡纓, 李艳文. 常见人体肠道原虫感染的临床概述[J]. 蛇志, 2013, (1): 54-57.
- [3] 朱海波, 李国清. 蓝氏贾第鞭毛虫检测方法的研究进展[J]. 国际医学寄生虫病学杂志, 2010, 37(5): 284-288.
- [4] Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis[J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24(1): 110-140.
- [5] Zhang W, Zhang X, Wang R, et al. Genetic characterizations of *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Heilongjiang Province, China and possibility of zoonotic transmission[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(9): e1826.
- [6] Caccio S M, Beck R, Lalle M, et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B[J]. Int J Parasitol, 2008, 38(13): 1523-1531.
- [7] Robertson L J, Forberg T, Hermansen L, et al. *Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic characterization by PCR-rflp and sequence analysis at two genes[J]. J Wildl Dis, 2007, 43(4): 576-585.
- [8] van der Giessen JW, de Vries A, Roos M, et al. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates[J]. Int J Parasitol, 2006, 36(7): 849-858.
- [9] Foronda P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, et al. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt [J]. Parasitol Res, 2008, 103(5): 1177-1181.
- [10] Gelanew T, Lalle M, Hailu A, et al. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia [J]. Acta Trop, 2007, 102(2): 92-99.
- [11] Liu H, Shen Y, Yin J, et al. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in di-

- arrheal outpatients in China[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(1): 25-.
- [12] Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems[J]. Int J Parasitol, 2010, 40(9): 1063-1074.
- [13] Wielinga CM, Thompson RC. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data[J]. Parasitology, 2007, 134(12): 1795-1821.
- [14] Caccio SM, Thompson RC, Mclauchlin J, et al. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology[J]. Trends Parasitol, 2005, 21(9): 430-437.
- [15] Liu A, Yang F, Shen Y, et al. Genetic analysis of the Gdh and Bg genes of animal-derived *Giardia duodenalis* isolates in Northeastern China and evaluation of zoonotic transmission potential [J]. PloS One, 2014, 9(4): e95291.
- [16] Scorza AV, Ballweber LR, Tangtrongsup S, et al. Comparisons of mammalian *Giardia duodenalis* assemblages based on the β -giardin, glutamate dehydrogenase and triose phosphate isomerase genes[J]. Vet Parasitol, 2012, 189(2): 182-188.
- [17] Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43: 5940-5944.
- [18] Huey CS, Mahdy MAK, Al-Mekhlafi HM, et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Malaysia[J]. Infect Genet Evol, 2013, 17: 269-276.

(收稿日期: 2014-12-11)

(本文编辑: 孙雅雯, 陈勤)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊可直接用缩写的常用词汇

磷酸盐缓冲液(PBS)	聚合酶链反应(PCR)
十二烷基磺酸钠(SDS)	逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)
聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)	酶联免疫吸附试验(ELISA)
邻苯二胺(OPD)	蛋白质印迹(Western blot)
辣根过氧化物酶(HRP)	一氧化氮(NO)
树突状细胞(DC)	辅助性 T 淋巴细胞(Th)
主要组织相容性复合体(MHC)	艾滋病(AIDS)
异硫氰酸荧光素(FITC)	人类免疫缺陷病毒(HIV)
二氨基联苯胺(DAB)	干扰素(IFN)
改良加藤法(Kato Katz)	白细胞介素(IL)
间接血凝试验(IHA)	肿瘤坏死因子(TNF)
异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)	自然杀伤细胞(NK 细胞)
计算机 X 线断层照相术(CT)	随机对照研究(RCT)
磁共振成像(MRI)	美国食品药品监督管理局(FDA)
核因子- κ B(NF- κ B)	世界卫生组织(WHO)