



蓝氏贾第鞭毛虫诊断

高正琴, 贺争鸣, 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 蓝氏贾第鞭毛虫作为一种重要的人兽共患寄生虫病贾第虫病的病原, 其对 SPF 实验动物质量造成的潜在威胁不容忽视。本研究的目的是建立蓝氏贾第鞭毛虫快速诊断方法, 并对 17 个生产厂家 516 批 2562 只 SPF 实验动物检查结果进行分析。**方法** 用直接镜检法、快速姬姆萨染色法和多重 PCR 方法, 对蓝氏贾第鞭毛虫进行检测。**结果** 在 SPF 实验动物中检出数量众多的蓝氏贾第鞭毛虫滋养体和包囊, 鉴定出蓝氏贾第鞭毛虫 18S rDNA、 β -giardin、TPI 和 GDH 基因。直接镜检法、快速姬姆萨染色法和多重 PCR 方法均能检出蓝氏贾第鞭毛虫。17 个生产厂家 516 批 2562 只 SPF 实验动物蓝氏贾第鞭毛虫阳性检出率 22.9% (586/2562)。**结论** 直接镜检法、快速姬姆萨染色法和多重 PCR 方法具有高度的敏感性和特异性, 可用于蓝氏贾第鞭毛虫的快速诊断。17 个生产厂家 516 批 SPF 实验动物蓝氏贾第鞭毛虫检查结果未能全部符合规定。

【关键词】 蓝氏贾第鞭毛虫; 直接镜检; 快速姬姆萨染色; 多重 PCR; SPF 实验动物; 质量分析

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 01-0076-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.001.014

Diagnoses of *Giardia lamblia*

GAO Zheng-qin, HE Zheng-ming, YUE Bing-fei

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 10050, China)

【Abstract】 Objective *Giardia lamblia* is an important pathogen of zoonosis giardiasis, it poses a potential threat to the quality of SPF (specific pathogen-free) laboratory animals cannot be ignored. The aim of this study is to establish the method of rapid diagnosis of *Giardia lamblia*, and analyze the test results of 516 batches form 17 manufactures. **Methods** Direct microscopy, Giemsa-fast staining and multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) were applied to detect *Giardia lamblia*. **Results** Numerous of *Giardia lamblia* trophozoites and cysts were detected in SPF laboratory animals by using direct microscopy and Giemsa-fast staining, and multiplex PCR were performed to identify 18S rDNA, β -giardin, TPI and GDH genes of DNA extracted from these trophozoites and cysts identified *Giardia lamblia*. Direct microscopy, Giemsa-fast staining, and multiplex PCR methods can be used to detect *Giardia lamblia*. Of the 2562 SPF laboratory animals studied, 22.9% (586/2562) were positive for *Giardia lamblia*. **Conclusions** Direct microscopy, Giemsa-fast staining, and multiplex PCR were effective techniques with high sensitivity and specificity for rapid diagnosis of *Giardia lamblia*. It is not satisfactory that the results of *Giardia lamblia* examination in 516 batches form 17 manufactures failed to meet the requirements 100%.

【Key words】 *Giardia lamblia*; Direct microscopy; Giemsa-fast staining; Multiplex polymerase chain reaction; Specific pathogen-free laboratory animal; Quality analysis

蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)是一种呈全球性分布的寄生性肠道原虫,引起以腹泻、吸收障碍和

消化不良为主的蓝氏贾第鞭毛虫病(giardiasis,简称贾第虫病),也是 HIV/AIDS 合并感染机会原虫。蓝

[基金项目] 国家科技支撑课题(2013BAK11B01)。

[作者简介] 高正琴(1976-),女,副研究员,研究方向:病原生物学和快检新技术研究。

[通讯作者] 贺争鸣(1957-),男,研究员,研究方向:实验动物微生物学。

氏贾第鞭毛虫感染在旅游者中流行引起的腹泻,也称“旅游者腹泻”。目前,贾第虫病已被列为全世界危害人类健康的十种主要寄生虫病之一^[1-5]。

近年来,无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)实验动物已广泛应用于食品药品生物制品医疗器械的检定和研究。中华人民共和国国家标准(GB/T 14922.1—2001)规定:鞭毛虫(flagellates)是 SPF 实验小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬、猴均应排除的寄生虫项目之一,但国家标准中未列出蓝氏贾第鞭毛虫的检测方法^[6-7]。因此,快速准确检测蓝氏贾第鞭毛虫是一个重要问题。目前,尚未见不同方法检测 SPF 实验动物蓝氏贾第鞭毛虫的报道和有效数据。本研究建立了蓝氏贾第鞭毛虫直接镜检法、快速姬姆萨染色法和多重 PCR 检测方法,对 17 个生产厂家 516 批 2562 只 SPF 实验动物蓝氏贾第鞭毛虫进行检测,对检测的准确性进行评估,并对检验结果进行分析讨论,希望对 SPF 实验动物生产厂家及检验单位有参考作用,从而共同提高 SPF 实验动物的质量,防止蓝氏贾第鞭毛虫污染。

1 材料和方法

1.1 仪器设备

生物安全柜(Thermo Fisher Scientific,美国);LEICA DM2500 生物显微镜(Leica Microsystems,德国);倒置显微镜及成像系统(Nikon,日本);二氧化碳培养箱(北京五洲东方科技发展有限公司);基因扩增仪(Applied Biosystem,美国);凝胶成像分析系统(东乐自然基因生命科学公司)。

1.2 样品来源

本试验所用样品来自 17 个生产厂家 516 个批次 2562 只 SPF 实验动物。对于猴、犬活体采集新鲜粪便,对于兔、豚鼠、地鼠、大鼠、小鼠则安乐死后采集肠样本。

1.3 直接镜检

取待测样本,放入洁净离心管中,加入生理盐水,轻轻吹打混匀,室温静置 5 min,吸取中上层液体滴片,直接镜检,采用实时动态显微视频摄录结果。

1.4 快速姬姆萨染色

取待测样本,放入洁净离心管中,加入磷酸盐缓冲液稀释,轻轻吹打混匀,室温静置 5 min,吸取中上层液体滴片,用新鲜配制的姬姆萨快速染色,采用实时动态显微视频摄录结果。

1.5 虫体离体生存能力试验

取待测样本,放入洁净离心管中,加入磷酸盐缓冲液,轻轻吹打混匀,室温静置 5 min,1000 × g 离心 5 min,弃上清,沉淀重新以磷酸盐缓冲液吹打悬浮,小心收集数条鲜活虫体,放置于新鲜配制的含 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素的 DMEM 培养液中,37℃ 5% CO₂ 实验条件下放置,倒置显微镜下观察虫体存活状态,实时拍摄记录结果。

1.6 多重 PCR

针对蓝氏贾第鞭毛虫 18S r DNA、β-giardin(β-贾第毒素)、磷酸丙糖异构酶(triose phosphate isomerase, TPI)和谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)基因设计四对引物。多重 PCR 引物名称、序列和产物大小见表 1。同上收集 SPF 实验动物样本中的数条鲜活虫体,放置于洁净离心管中,用德国 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒,按说明书操作快速提取样品基因组 DNA。以抽提的 DNA 为模板,同时用刚地弓形虫、结肠小袋纤毛虫、四翼无翅线虫 DNA 作为蓝氏贾第鞭毛虫多重 PCR 扩增时的阴性对照。PCR 总反应体系为 50 μL,包括 10 × Buffer (Mg²⁺ Plus) 5.0 μL、dNTP Mixture 4.0 μL、正反向引物(1.0 μmol/μL)各 0.5 μL、EX Taq(5 U/μL)0.25 μL、模板 DNA 2.0 μL、nuclease-free water 37.75 μL。循环参数:94℃ 5 min 1 循环;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min,35 循环;72℃ 10 min 1 循环。琼脂糖凝胶电泳检测多重 PCR 扩增产物。

表 1 多重 PCR 引物
Tab.1 Sequences of multiplex PCR primers used in our study

Name	Sequence 5'→3'	Product
GZQGL-18SF	GGTTGCACCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCG	190 bp
GZQGL-18SR	CCTGATTCTCCGCCAGGCGTCGGGCCCTCGGCGCGCCGCG	
GZQGL-NF	CAACAACGTTGAGACAAATCTCCAGAACCAGATCGCCATC	231 bp
GZQGL-NR	CTAACGGCCCTCTCGCGGGCGATCGTCTCCTTCTCGATCG	
GZQGL-TF	ACGGTGCATGGACCGGCGAGACAAGCGTCGAGATGCTGCT	290 bp
GZQGL-TR	AGCAATTACAACGTTCTCCCATAACTTCTTTGATTCTCCA	
GZQGL-GF	TCTGCTCTCGGCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCACC	356 bp
GZQGL-GR	GACCCGCCCACTTGACGTTCTTGCTGTGAGGACGCCTG	

2 结果

2.1 直接镜检结果

吸取 SPF 实验动物肠样本中鲜活虫体,快速滴片,实时动态显微视频摄录记载虫体形态特征及运动方式:高倍镜下观察,可见数量众多的鞭毛虫滋养体(trophozoite)和包囊(cyst)。外观略显无色透明的鲜活的鞭毛虫滋养体借助鞭毛摆动快速翻滚运动,鞭毛虫包囊移行速度较慢。鞭毛虫滋养体呈纵切为半的倒置梨形,大小为(8~16) μm $\times$ (5~12) μm ,前端宽钝,后端尖细,腹面扁平,背部隆起,两侧对称,有前、后侧、腹侧和尾鞭毛共四对。鞭毛虫包囊为椭圆形,大小为(8~12) μm $\times$ (7~10) μm (彩插 8 图 1)。依据鞭毛虫滋养体和包囊大小形态特征及运动方式,鉴定为蓝氏贾第鞭毛虫^[8]。

2.2 快速姬姆萨染色结果

用新鲜配制的姬姆萨液,对 SPF 实验动物肠样本中鲜活虫体进行快速染色,实时动态显微视频摄录记载虫体形态特征及运动方式:高倍镜下观察,可见大量蓝色半透明鞭毛虫滋养体和包囊。滋养体呈典型的“笑脸样”特征,一对细胞核位于虫体前端 1/2 的吸盘部位。一对前鞭毛由此向前伸出体外,其余三对发出后在两核间沿轴柱分别向体两侧、腹侧和尾部伸出体外。未成熟包囊内含 2 个细胞核,成熟包囊内含 4 个细胞核(彩插 8 图 2)。依据鞭毛虫滋养体和包囊大小形态特征及运动方式,鉴定为蓝氏贾第鞭毛虫。

2.3 虫体离体生存能力试验结果

将从 SPF 实验动物肠样本中收集到的蓝氏贾第鞭毛虫鲜活虫体,37℃ 5% CO_2 实验条件下放置,结果发现:在 37℃ 蓝氏贾第鞭毛虫滋养体能够存活一周。第 4 天时,虫体四对鞭毛齐全,结构完整,运动自如(彩插 8 图 3)。第 8 天后,虫体部分鞭毛脱落,结构松散,无自主运动能力,出现死亡(封 3 图 4)。

2.4 多重 PCR 结果

在上述收集到的 SPF 实验动物数条鲜活虫体样品中均检出蓝氏贾第鞭毛虫 18S rDNA、 β -giardin、TPI 和 GDH 基因特异性 DNA 片段(大小分别为 190 bp、231 bp、290 bp 和 356 bp),而作为阴性对照的刚地弓形虫、结肠小袋纤毛虫、四翼无翅线虫样本却未观察到目的基因片段扩增。SPF 实验动物蓝氏贾第鞭毛虫多重 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

(封 3 图 5)。蓝氏贾第鞭毛虫多重 PCR 扩增获得了清晰特异的 18S rDNA、 β -giardin、TPI 和 GDH 基因目的条带,分子鉴定结果证明 SPF 实验动物自然感染的确实是蓝氏贾第鞭毛虫。

结果显示,直接镜检法、快速姬姆萨染色法和多重 PCR 方法均能检出蓝氏贾第鞭毛虫。在 SPF 实验动物中检出数量众多的蓝氏贾第鞭毛虫滋养体和包囊,鉴定出蓝氏贾第鞭毛虫 18S rDNA、 β -giardin、TPI 和 GDH 基因。17 个生产厂家 516 批 2562 只 SPF 实验动物蓝氏贾第鞭毛虫阳性检出率 22.9% (586/2562)。

3 讨论

蓝氏贾第鞭毛虫同种异名肠贾第虫(*Giardia intestinalis*)或十二指肠贾第虫(*Giardia duodenalis*),简称贾第虫,隶属于双滴虫目(Diplomonadida),六鞭毛科(Hexamitidae),贾第鞭毛虫属(*Giardia*)。蓝氏贾第鞭毛虫滋养体最先由荷兰学者 Antonivan Leeuwenhoek(1632-1723)于 1681 年在自己腹泻的粪便内发现。蓝氏贾第鞭毛虫包囊由 Grassi 于 1879 年发现。1888 年 Blanchard^[9]将该虫命名为 *Lamblia intestinalis*。1915 年 Kofoid^[10]提出改为 *Giardia lamblia*。

蓝氏贾第鞭毛虫是典型的真核生物,厌氧,缺乏线粒体氧化磷酸化的或任何组件。本文作者在 37℃ 5% CO_2 实验条件下研究发现,SPF 实验动物鲜活蓝氏贾第鞭毛虫虫体离体能存活一周。蓝氏贾第鞭毛虫生活史简单,包括滋养体和包囊两个阶段。滋养体为营养繁殖阶段,包囊为传播阶段。滋养体主要寄生于十二指肠、小肠、大肠,虫体借助吸盘吸附于肠绒毛表面,以二分裂方式进行繁殖,在肠道内环境不利情况下,分泌囊壁形成包囊并随粪便排出体外。Bingham 等^[11]研究了物理因素参与的蓝氏贾第鞭毛虫脱囊和生存能力,在实验室条件下包囊 8℃ 存活 77 d,21℃ 存活 5~24 d,37℃ 存活不超过 4 d。包囊在水中和凉爽环境中可存活数天甚至数月之久。人和动物摄入被包囊污染的饮水或食物而被感染。成熟的 4 核包囊被宿主吞食后,在十二指肠内脱囊形成 2 个滋养体。Rendtorff^[12]研究发现人类被蓝氏贾第鞭毛虫感染的剂量仅为 10 个包囊。

18S rDNA 为 rDNA 基因中进化相对保守的部分,含有大量物种间进化的信息。 β -giardin 是蓝氏

贾第鞭毛虫的一种结构蛋白,为滋养体腹吸盘的一部分,TPI、GDH 基因属于基因组中进化较快的部分。本研究应用多重 PCR 技术获得了 SPF 实验动物蓝氏贾第鞭毛虫 18S rDNA、 β -giardin、TPI 和 GDH 基因的片段,多位点测序和基因分型工作正在进行,为进一步开展蓝氏贾第鞭毛虫遗传多样性研究奠定了基础。

本研究对 SPF 实验动物自然感染的蓝氏贾第鞭毛虫进行了病原学和分子诊断。在 SPF 实验动物样本中发现了蓝氏贾第鞭毛虫的滋养体和包囊,虫体鲜活数量众多。应用实时动态显微视频摄录技术跟踪监测寄生虫,获得了蓝氏贾第鞭毛虫滋养体和包囊典型特征形态及独特运动方式的宝贵视频资料。应用多重 PCR 技术,从分子水平上对 SPF 实验动物自然感染的蓝氏贾第鞭毛虫进行多基因特征确认,为快速准确鉴别诊断蓝氏贾第鞭毛虫感染提供了有效方法。

综上所述,直接镜检法、快速姬姆萨染色法和多重 PCR 方法具有高度的敏感性和特异性,可用于蓝氏贾第鞭毛虫的快速诊断。17 个生产厂家 516 批 SPF 实验动物蓝氏贾第鞭毛虫检查结果未能全部符合规定。蓝氏贾第鞭毛虫作为一种重要的人兽共患寄生虫病贾第虫病的病原,其对 SPF 实验动物质量造成的潜在威胁不容忽视。SPF 实验动物已广泛应用于食品药品生物制品医疗器械的检定和研究,人兽共患寄生虫感染会造成严重不良后果。

参考文献:

- [1] Pestechian N, Rasekh H, Rostami-Nejad M, *et al.* Molecular identification of *Giardia lamblia*; is there any correlation between diarrhea and genotyping in Iranian population [J]? *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2014; 7(3):168–172.
- [2] Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin M. 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.
- [3] Bartelt LA, Roche J, Kolling G, *et al.* Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model [J]. *J Clin Invest.* 2013; 123(6):2672–2684.
- [4] Teklemariam Z, Abate D, Mitiku H, *et al.* Prevalence of intestinal parasitic infection among HIV positive persons who are naive and on antiretroviral treatment in Hiwot Fana Specialized University Hospital, Eastern Ethiopia [J]. *ISRN AIDS.* 2013; 324–329.
- [5] Caccio SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis [J]. *Mol Biochem Parasitol.* 2008; 160:75–80.
- [6] 中华人民共和国国家标准 GB/T 18448.10—2001 实验动物 寄生虫学检测方法 [S]. 2001:28
- [7] 中华人民共和国国家标准 GB/T 14922.1—2001 实验动物 寄生虫学等级及监测 [S]. 2001:2
- [8] Dobell C. The discovery of the intestinal protozoa of man [J]. *Proc R Soc Med.* 1920; 13:1–15.
- [9] Blanchard R. Remarques sur le megastome intestinal [J]. *Bull Soc Zool Fr.* 1888; 13:18.
- [10] Rodney D. Adam. Biology of *Giardia lamblia* [J]. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(3):447–475.
- [11] Bingham AK, Jarroll EL Jr, Meyer EA, Radulescu S; *Giardia* sp.: physical factors of excystation in vitro, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability [J]. *Exp Parasitol* 1979, 47:284–291.
- [12] Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules [J]. *Am J Hyg.* 1954; 59:209–220.

[修回日期]2014-12-08