

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(6):828-834; 4 June 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>

基于 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的猪源结肠小袋纤毛虫种群特征分析

王天奇¹, 窦刚², 闫文朝^{1,3*}, 张龙现³, 韩利方¹, 丁轲¹, 贾川川¹, 张梦¹, 于杜鹃¹

¹河南科技大学动物科技学院, 洛阳 471003

²生物芯片北京国家工程研究中心, 北京 102206

³河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002

摘要:【目的】为了揭示结肠小袋纤毛虫病在环境中的分子传播机制, 研究了猪源结肠小袋纤毛虫的种群特征。【方法】用粪便涂片镜检和改进型 DMEM 培养基从病猪结肠内容物分离结肠小袋纤毛虫滋养体, 然后用显微观察、吖啶橙荧光染色法和基于 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的分子标记技术分析豫西地区猪群中结肠小袋纤毛虫的种群特征。【结果】结果显示, 来自豫西地区 8 个县市的病猪中共分离了 15 株小袋纤毛虫, 5.8S rRNA 序列相似性高达 99.4% 以上, 同属于结肠小袋纤毛虫, 根据 ITS1/2 序列分析结果, MJ-2 和 SX-1 株属于结肠小袋纤毛虫基因型 A, 其余 13 株均属于结肠小袋纤毛虫基因型 B。MJ-2 和 SX-1 株滋养体形态特征明显区别其他 13 株, 绝大多数呈球形, 运动缓慢, 粪便中和体外培养的虫体密度较低; 而其他 13 株的滋养体均呈多形性, 运动快速活跃, 虫体密度较大。吖啶橙荧光染色显示, 2 种基因型滋养体的核结构无明显差别。【结论】首次报道中国猪源结肠小袋纤毛虫存在 2 个基因型, 其中基因型 B 为优势种群, 为防控人和动物结肠小袋纤毛虫病提供重要参考。

关键词: 猪, 结肠小袋纤毛虫, 滋养体, 基因型分析

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 06-0828-07

小袋纤毛虫病 (*Balantidiosis*) 是一种水源性人兽共患原虫病, 呈世界性分布, 主要引起宿主腹泻, 结肠溃疡和穿孔^[1-2]。目前已知包括人在内的 33 种脊椎动物均可感染该病, 其中猪是结肠小袋纤毛虫最重要的自然宿主, 猪群感染率高达 20% - 100%, 特别是患断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS) 和蓝耳病 (PRRS) 等疫病的病猪更易继发感染高密度的结肠小袋纤毛虫, 并且表现明显的腹泻症状^[2-4]。感染结肠小袋纤毛虫的病猪也是人和

其他动物感染或爆发结肠小袋纤毛虫病的重要传染源。1973 年西太平洋地区加罗林群岛由于台风侵袭导致粪便污染饮水引发了人结肠小袋纤毛虫病的爆发, 使 110 人被感染。本病主要流行于热带和亚热带地区, 随着全球气候变暖, 有向温带扩大趋势, 成为爆发性疫病的重要潜在病因^[3-5]。因此, 揭示结肠小袋纤毛虫病分子传播机制具有重要的公共卫生意义。

有文献报道^[6-7], 猪源、鸵鸟源小袋属纤毛虫的

基金项目: 河南科技大学科研创新能力培育基金项目 (2010CZ0012); 河南省教育厅自然科学研究计划项目 (2009B23003)

* 通信作者。Tel: +86-379-64282341; E-mail: ywchao11@126.com

作者简介: 王天奇 (1965 -), 男, 河南新安县人, 副教授, 研究方向为动物寄生虫病诊断与防治。E-mail: wtq@mail.haust.edu.cn

收稿日期: 2010-11-23; **修回日期:** 2011-03-12

18S、5.8S rRNA 基因序列与人源和大猩猩源结肠小袋纤毛虫相似性高达 99% 以上, 超微结构特征上也无显著差异, 同属于结肠小袋纤毛虫 (*Balantidium coli*)。但是对人源、大猩猩源、猪源和鸵鸟源结肠小袋纤毛虫的 ITS1/2 序列进行比对分析发现, 结肠小袋纤毛虫分为 A、B、C 三个基因型, 不同基因型在致病性上可能存在差异^[6]。目前国内对不同宿主源小袋属纤毛虫的分子流行病学研究尚未见报道, 本研究利用高度保守的 5.8S rRNA 和高度变异的 ITS1/2 序列分子标记技术和显微结构观察, 对猪源结肠小袋纤毛虫种群特征进行分析, 为防控人和动物结肠小袋纤毛虫病提供重要参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司, 可溶性淀粉购自北京海淀区微生物培养基厂, 小牛血清和吖啶橙染料 (Fluka 进口分装) 购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 和 2 × Taq Master mix 扩增试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; PCR 仪 (Biometra, Germany), 凝胶成像系统 (AlphaImager™ 2200, USA), ABI 3730XL DNA 测序仪 (中美泰和生物技术 (北京) 有限公司), 倒置荧光显微镜及数码摄像系统 (Olympus IX71, Tokyo, Japan), 台式高速离心机 (TGL-16B, 上海安亭科学仪器厂), 显微测微尺 (BMC1-7, 上海彼爱姆光学仪器制造有限公司)。

1.1.2 材料来源: 15 株猪源结肠小袋纤毛虫分别来自于孟津、偃师、洛宁、汝阳、新安、嵩县、伊川和孟州等豫西地区 15 家猪场病猪结肠内容物, 每一株来自单头病猪。

1.2 滋养体的分离与体外培养

2010 年 6-12 月, 陆续用一次性塑料袋从河南科技大学猪病门诊收集病猪剖检后新鲜的结肠内容物, 标记 (包括来源地区、畜主和日期等信息) 后带回实验室, 粪便直接涂片后在显微镜下进行小袋属纤毛虫滋养体检查。发现小袋属纤毛虫滋养体为阳性的样品, 取其少量接种于改进型 DMEM 培养基^[8], 在 28℃ 条件下培养 48 h 后镜检, 发现较多活

动滋养体后计数。其计数方法: 摇匀后取 100 μL 原培养物用 DMEM 培养液 10 倍稀释混匀后, 取 20 μL 稀释液盖片, 在显微镜下计完盖片内所有滋养体数 N, 然后由公式 $M = 10 \times 50 \times N$ 计算每毫升原培养物中滋养体数量。

为了掌握感染结肠小袋纤毛虫病猪发生其它重大疫病 (如猪瘟、蓝耳病和圆环病毒 II 感染) 情况, 我们记录了病猪的临床症状、病理变化等数据, 根据典型临床症状、特征性剖检病变和实验室检测 (如用间接 ELISA 检测圆环病毒 II 型特异抗体阳性, 用 RT-PCR 检测 PRRSV) 结果, 综合作出诊断。

1.3 形态学观察

在光镜下, 观察并记录新鲜粪便中和体外培养的滋养体的形态结构、颜色和运动状态, 并用 MiE 显微图像处理系统对其进行显微拍照。每个分离株随机挑取 50 个滋养体用显微测微尺测量其大小。

参考有关方法^[9], 用吖啶橙对猪源结肠小袋纤毛虫滋养体进行荧光染色, 然后在倒置荧光显微镜激发光 470 nm - 490 nm 波段下观察滋养体的内部结构特征。

1.4 基因组 DNA 提取与 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的克隆

阳性粪便接种改进型 DMEM 培养基培养扩增后, 取 10⁵ 以上滋养体悬液加入 1.5 mL 离心管, 用 598 × g 离心 5 min, 用 PBS 进行水洗和浓集滋养体, 浓集后的滋养体加入 400 μL PCL 细胞裂解液 (植物基因组 DNA 提取试剂盒所带溶液), 用移液器反复吹打混匀后, 再在漩涡振荡器充分混匀, 然后密封好离心管盖, 放入 65℃ 水浴锅内消化裂解 1 h, 期间上下颠倒混匀 3-4 次。然后按照试剂盒操作说明进行操作, 提取的基因组 DNA 于 -20℃ 保存备用。

根据 GenBank 上已发表的小袋属纤毛虫 ITS1-5.8S-ITS2 序列, 用引物设计软件 Oligo6.0 设计属特异性引物 (上游引物 BCITSF: 5'-CGGAAGGATCATTAACA-3', 下游引物 BCITSR: 5'-TAAGTTCAGCGGTCATC-3'), 以各分离株基因组 DNA 为模板, 用优化的 PCR 扩增条件进行 PCR 扩增 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将阳性 PCR 产物进行测序。

1.5 种系发育分析

用生物软件 DNASTar5.01 和 MEGA 4 对所获得

15 株小袋纤毛虫的 ITS1、ITS2 和 5.8S rRNA 序列与 GenBank 上已发表的相关序列(猪源 AM982724 与 AM982725; 大猩猩源 AF045030、EU680315 和 EU680316; 鸵鸟源 AM982726 与 AM982727) 进行比对分析, 构建系统发育树, 选择进化距离较远的寡毛目纤毛虫—具沟急游虫 (*Strombidium sulcatum*) 相关序列 (DQ811089) 作为外群^[10]。另外, 对克隆获得的 ITS1-5.8S rRNA -ITS2 序列在 GenBank 上进行 BLAST 搜索, 根据所得结果, 综合分析豫西地区猪群中小袋属纤毛虫的分子种群特征。

2 结果

2.1 显微结构特征分析

本研究用粪便直接涂片法检测了来自豫西地区不同猪场的 55 例病猪结肠内容物, 最终从 15 家猪场成功分离到 15 株结肠小袋纤毛虫滋养体(每一株来自单头病猪), 其中从孟津 4 家猪场分离到 4 株, 命名为 MJ-1、MJ-2、MJ-3 和 MJ-4; 偃师 4 家猪场分离到 4 株, 命名为 YS-1、YS-2、YS-3 和 YS-4; 洛宁、汝阳、新安、嵩县和伊川各分离到一株, 分别命名为 LN-1、RY-1、XA-1、SX-1 和 YC-1; 孟州 2 家猪场分离到 2 株, 命名为 MZ-1 和 MZ-2。根据临床症状、剖检病变和实验室诊断结果, 其中有 8 株(MJ-3、MJ-4、

YS-1、YS-2、YS-3、RY-1、XA-1 和 MZ-1) 结肠小袋纤毛虫感染的病猪同时感染圆环病毒 II 型, 肠内容物呈水样或变稀, 生前均有不同程度的腹泻症状; 4 株(MJ-1、MJ-2、YS-4 和 LN-1) 感染的病猪患有猪瘟, 其中 3 例(MJ-1、YS-4 和 LN-1) 肠内容物呈水样, 生前明显腹泻, 另外一例(MJ-2) 内容物和粪便正常; 3 株(SX-1、YC-1 和 MZ-2) 感染的病猪患有蓝耳病, 其中仅一例(YC-1) 有明显腹泻症状。对病猪猪瘟、蓝耳病和圆环病毒 II 型感染的典型临床症状、特征性病变和实验室检测的数据另待发表。

在光镜下, 发现 MJ-2 和 SX-1 分离株滋养体形态比较均一, 绝大多数呈球形, 颜色呈深褐色, 在光镜下, 滋养体内部仅能看到大量呈圆形的食物泡, 大核与伸缩泡均不能辨别, 滋养体较大, 大小为 $(82 - 164) \mu\text{m} \times (71 - 143) \mu\text{m}$, 平均为 $105 \mu\text{m} \times 99 \mu\text{m}$, 表面也布满纤毛, 但运动缓慢, 病猪感染虫体密度较低(如图 1-C、D 所示)。而其余 13 株的滋养体形态特征与 MJ-2、SX-1 差别十分明显, 呈椭圆形、卵圆形、叶状或三角形, 其中以椭圆形为主, 颜色呈浅黄色, 能观察到呈腊肠样大核、球形的伸缩泡和大小不一的食物泡, 滋养体大小为 $(34 - 130) \mu\text{m} \times (20 - 98) \mu\text{m}$, 平均为 $92 \mu\text{m} \times 68 \mu\text{m}$, 大小差别较大, 滋养体表面布满纤毛, 运动快速活跃, 病猪感染虫体密度较高(如图 1-A、B 所示)。

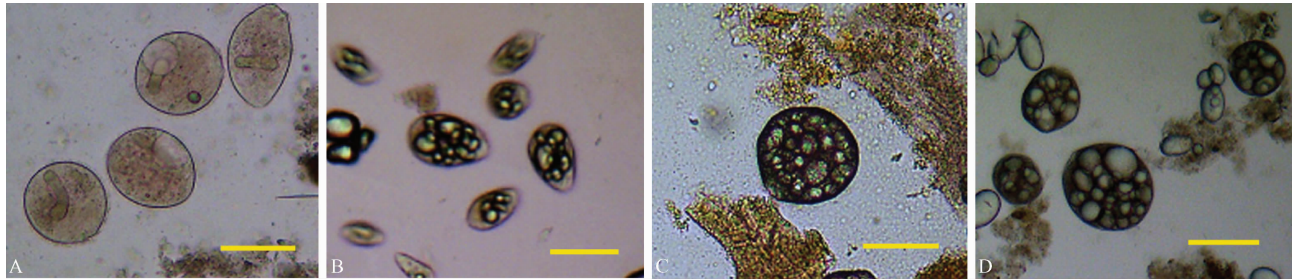


图 1 猪源结肠小袋纤毛虫 2 类滋养体的形态结构显微镜

Fig. 1 Morphological features of two genotypes of porcine-borne *Balantidium coli* under light microscope. A, B: polymorphic, moving faster and higher density trophozoites of MJ-1 isolate in feces and *in vitro*; C, D: round, moving slowly and lower density trophozoites of MJ-2 isolate. (bar = 50 μm).

经吖啶橙荧光染色的滋养体, 核被染成黄色, 包膜和细胞质被染成红色或无色, 对比明显, 轮廓清晰(如图 2 所示)。两类滋养体在内部结构上没明显区别, 大核呈圆形或长卵圆形, 小核呈圆形, 部分滋养体内只观察到大核, 不能看到小核, 处于分裂中的滋养体内可以观察到两个明显的大核(如图 2 所示)。

2.2 ITS1-5.8S rRNA -ITS2 片段 PCR 扩增结果

以从各分离株滋养体提取的基因组 DNA 为模板, 进行了 PCR 扩增退火温度等条件的优化, 最后得到最佳扩增条件: 94°C 预变性 5 min, 然后 94°C 变性 30 s, 53°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 扩增 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min; 反应体系中最佳引物浓度为 $0.4 \mu\text{mol/L}$ 。各分离株的 ITS1-5.8S rRNA -ITS2 扩增

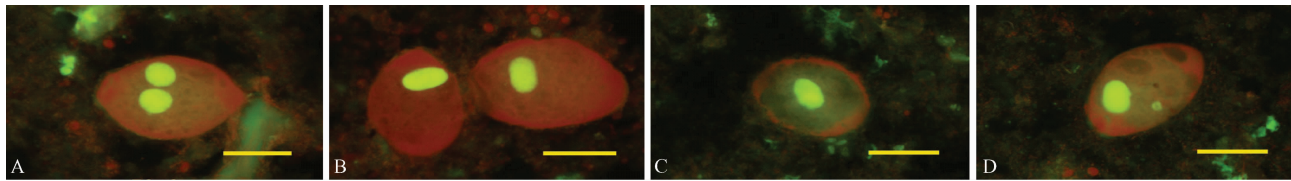


图2 吖啶橙染色的猪源结肠小袋纤毛虫滋养体(MJ-1株)形态特征

Fig.2 Visualization of *Balantidium coli* trophozoites from porcine (MJ-1 isolate) stained with Acridine Orange. Two distinct nuclei in a transverse fission form of trophozoite (A), single ovoid nucleus in the mature trophozoites (B and C), and both big and small nuclei in a trophozoite (D).

(bar = 50 μ m).

片段在 410 bp 左右(如图 3 所示),符合预期结果。

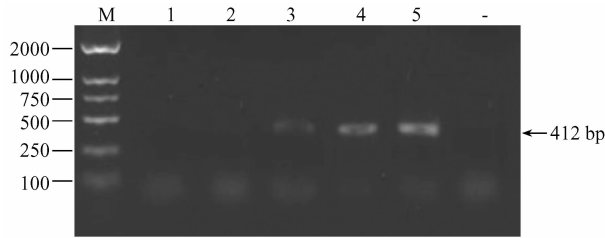


图3 结肠小袋纤毛虫(MJ-1株)ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的PCR扩增退火温度的优化结果

Fig.3 Optimized anneal temperature of PCR amplification for ITS1-5.8S rRNA-ITS2 fragment of *Balantidium coli*(MJ-1 isolate). Lane1 - 5: 60.2 $^{\circ}$ C, 58.8 $^{\circ}$ C, 56.8 $^{\circ}$ C, 53 $^{\circ}$ C, 49.8 $^{\circ}$ C, “-”: negative control, and the optimal anneal temperature is 53 $^{\circ}$ C. The size of target amplicon is 412 bp; M:DL2000 250 bp Ladder-II.

2.3 分子种群特征分析

用 DNASTar5.01 软件包中的子程序 MegAlign 的 Clustal W 方法对 5.8S rRNA 序列进行多重序列比对分析发现,豫西地区 15 株结肠小袋纤毛虫 5.8S rRNA 序列之间高度一致,并且与 GenBank 上猪源(AM982724)、鸵鸟源(AM982726)和大猩猩源(EU680315、EU680316)结肠小袋纤毛虫的序列相似性为 100%。与另一发表的大猩猩源(AF045030)的也高度相似,整个序列仅有一个碱基的差异(在 119 位由 G 替换为 C)^[6]。说明豫西地区猪群中流行的小袋属纤毛虫为同一个种,即结肠小袋纤毛虫。

基于 ITS1/2 序列构建的系统发育树和序列相似性分析结果显示,豫西地区 13 株(MJ-1、MJ-3、MJ-4、MZ-1、MZ-2、YS-1、YS-2、YS-3、YS-4、XA-1、LN-1、RY-1 和 YC-1)与结肠小袋纤毛虫基因型 B(包括猪源和鸵鸟源结肠小袋纤毛虫基因型 B)在同一分支上,该 13 株之间 ITS1 序列相似性在 97.5% - 100%, ITS2 序列相似性在 96.3% - 100%;另外 2

株(MJ-2 和 SX-1)与结肠小袋纤毛虫基因型 A(包括猪源、鸵鸟源结肠小袋纤毛虫基因型 A 和大猩猩源分离株)处在同一分支上,MJ-2 和 SX-1 株之间 ITS1 和 ITS2 序列相似性分别在 98.7% 和 95.7% (如图 4、5 所示)。MJ-2、SX-1 株与豫西地区其他 13 株的 ITS1/2 序列差异明显,其中 ITS1 序列相似性为 85.2% - 88.9%, ITS2 序列相似性在 85.6% - 90.6%,远远低于与结肠小袋纤毛虫基因型 A(AM982724、AM982726、AF045030、EU680315 和 EU680316)之间的相似性。根据聚类分析结果和在 GenBank 上进行 BLAST 搜索结果,说明豫西地区猪群中存在 2 个结肠小袋纤毛虫种群,按照 Ponce-Gordo 等(2008)的基因分型标准^[6],MJ-2 和 SX-1 株属于结肠小袋纤毛虫基因型 A,豫西地区其他 13 株属于基因型 B。

3 讨论

猪群是人类感染结肠小袋纤毛虫的重要传染源^[11],因此,研究猪群中结肠小袋纤毛虫种群特征对当地防控人和动物结肠小袋纤毛虫病具有重要的指导意义。Ponce-Gordo 等(2008)报道^[6],西班牙猪群中流行 2 个结肠小袋纤毛虫基因型:A 型和 B 型,其中基因型 A 为优势种群。本研究发现,孟津、偃师、洛宁、汝阳、新安、嵩县、伊川和孟州等豫西地区猪群中结肠小袋纤毛虫有 A、B 两个基因型,与有关报道一致,但是 B 基因型为豫西地区的优势种群,与西班牙猪场结肠小袋纤毛虫的优势种群类别存在明显差异^[6]。在临床门诊中发现,结肠小袋纤毛虫是一种机会性消化道病原,多与猪圆环病毒 II 型感染、猪瘟和蓝耳病等疫病相继发生,这可能与患上上述疫病的猪机体免疫抵抗力下降有密切关系。结肠小袋纤毛虫滋养体依靠基于纤毛的机械运动和分泌透

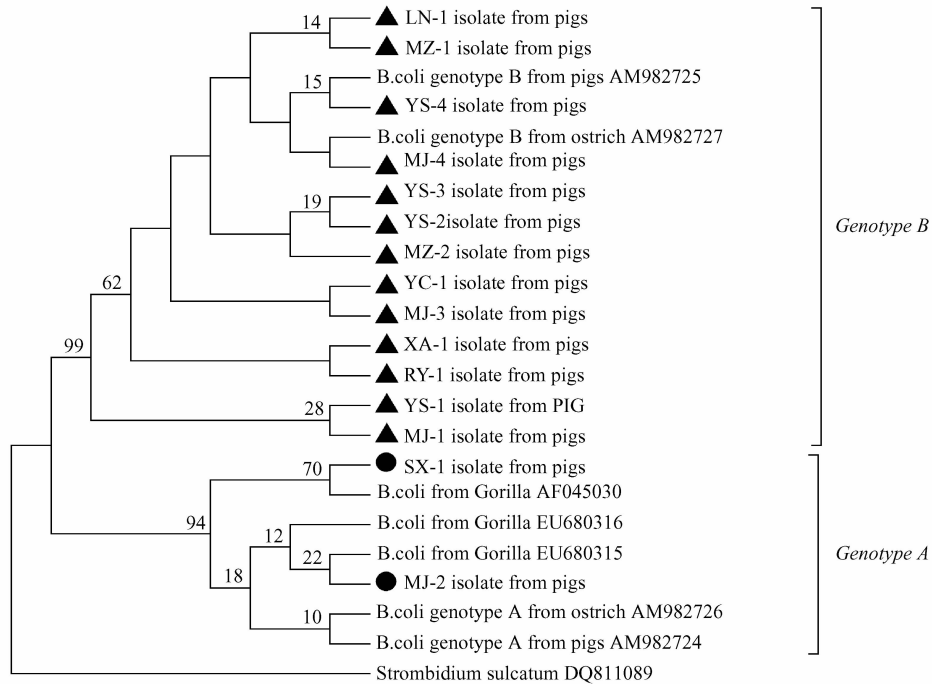


图 4 基于 ITS1 序列用 MEGA4 软件邻近相邻法 (NJ) 构建的猪源结肠小袋纤毛虫系统发育树

Fig. 4 The ITS1-based phylogenetic tree of *Balantidium coli* from pigs using neighbour-joining (NJ) method of MEGA4. MJ-2 and SX-1 isolates belong to genotype A, and the remaining 13 isolates do genotype A.

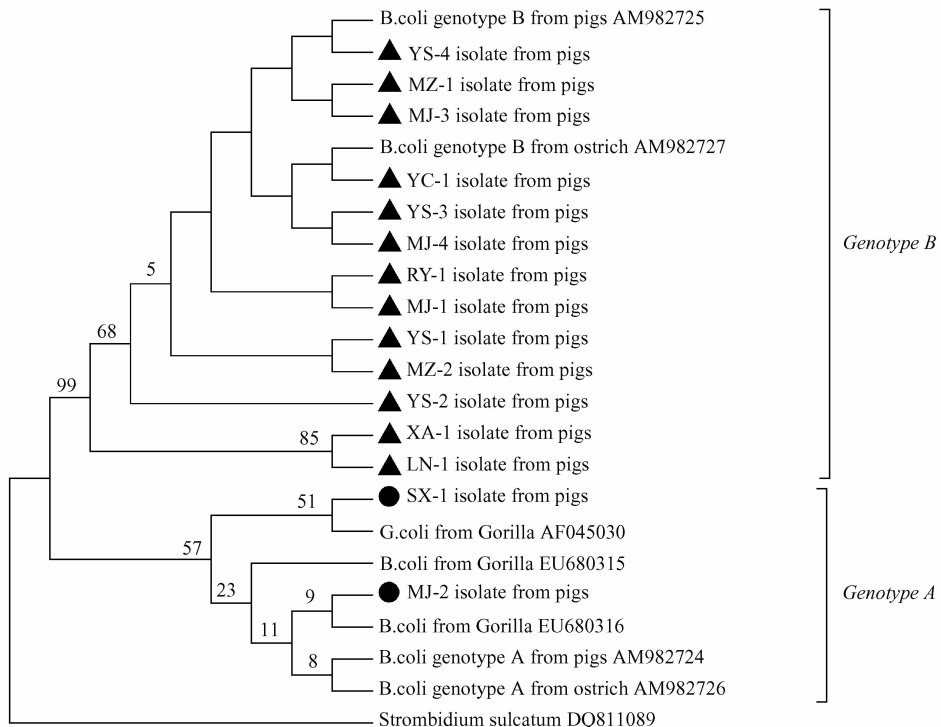


图 5 基于 ITS2 序列用 MEGA4.0 软件邻近相邻法 (NJ) 构建的猪源结肠小袋纤毛虫系统发育树

Fig. 5 The ITS2-based phylogenetic tree of *Balantidium coli* from pigs using neighbour-joining (NJ) method of MEGA4. MJ-2 and SX-1 isolates belong to genotype A, and the remaining 13 isolates do genotype A.

明质酸酶侵害肠组织, 会加重病猪腹泻等病情^[1,3]。感染基因型 B 的病猪大肠内容物内滋养体密度大, 运动活跃, 病猪表现明显腹泻或饲料消化不良 (粪便或大肠内容物含有大量未消化的饲料粗纤维); 相对于基因型 B, 基因型 A 感染的病猪大肠内容物内滋养体密度较低, 运动缓慢, 且病猪无明显的腹泻症状。结肠小袋纤毛虫两种基因型的确切致病性需要用动物感染试验进一步验证。

人和动物是食入包裹而感染的, 但粪便中的包裹产量很低, 也没有找到使滋养体在体外变成包裹的方法, 这成为结肠小袋纤毛虫动物感染试验和致病性研究的瓶颈, 并且不同基因型滋养体和包裹形态结构非常相似, 仅靠显微镜观察很难辨别, 因此, 准确检测宿主体内和环境水样中结肠小袋纤毛虫的基因型或强致病虫株, 科学进行风险性评估, 必须依靠分子标记技术^[6,12]。用于真核生物种类鉴定的标记分子主要有核糖体小亚基基因 18S rRNA、5.8 rRNA 和内转录间隔序列 ITS1/2 等序列, 其中 18S rRNA、5.8 rRNA 高度保守, 适用于种属间分类, 而 ITS1/2 序列变异大, 适用于种内种群特征或基因型的鉴定^[13-15]。Nilles-Bije 等 (2009)^[7] 基于 18S rRNA 作为标记基因分析发现, 菲律宾猪群只感染一个种——结肠小袋纤毛虫, 与本研究基于 5.8 rRNA 序列研究的结果一致。根据 ITS1/2 序列分析发现, 豫西地区 15 株猪源结肠小袋纤毛虫中有 13 株为基因型 B, 另外 2 株 (MJ-2 和 SX-1) 为基因型 A, 结合显微结构观察结果, 两种基因型的滋养体在大小、形态和运动性等方面差别明显。目前尚未见人源结肠小袋纤毛虫 ITS1/2 序列报道, 仅在与人类亲缘关系最近的大猩猩中分离出结肠小袋纤毛虫基因型 A, 而在猪和鸵鸟体内也分离到基因型 A^[6,16], 表明基因型 A 可以在不同宿主间相互传播, 基因型 A 对人和其它宿主致病性如何, 有待进一步研究。基因型 B 为豫西地区猪群中结肠小袋纤毛虫的优势种群, 该基因型对人和灵长类的感染性需要进一步的分子流行病学研究。

结肠小袋纤毛虫病是一种重要的水源性人兽共患寄生虫病, 能感染人、猪、奶牛、灵长类、豚鼠等 33 种脊椎动物^[17-18]。利用分子标记技术对不同宿主特别是人、猪和奶牛进行结肠小袋纤毛虫分子流行病学调查, 揭示该病分子传播机制, 对防控人和动物结肠小袋纤毛虫病爆发具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] 宋铭忻, 张龙现. 兽医寄生虫学. 北京: 科学出版社, 2009.
- [2] Slifko TR, Smith HV, and Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, 2000. 30(12-13): 1379-93.
- [3] Frederick LS, Lynn RA. Current World Status of *Balantidium coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(4):626-638.
- [4] 王天奇, 董发明, 杨光忠, 郭巍, 宋岳飞, 韩丽敏. 洛阳地区规模化猪场结肠小袋纤毛虫感染情况调查及分析. *中国动物检疫 (Chinese Journal of Animal Health Inspection)*, 2007, 24(8):34-36.
- [5] Walzer PD, Judson FN, Murphy KB, Healy GR, English DK, Schultz MG. Balantidiasis outbreak in Truk. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1973, 22:33-41.
- [6] Ponce-Gordo F, Jimenez-Ruiz E, Mart? nez-D? az RA. Tentative identification of the species of *Balantidium* from ostriches (*Struthio camelus*) as *Balantidium coli*-like by analysis of polymorphic DNA. *Veterinary Parasitology*, 2008, 157:41-49.
- [7] Nilles-Bije ML, Rivera WL. Ultrastructural and molecular characterization of *Balantidium coli* isolated in the Philippines. *Parasitology Research*, 2010, 106(6): 387-394.
- [8] 闫文朝, 王天奇, 丁轲, 张玲, 韩利方, 王新彩. DMEM 培养结肠小袋虫的正交试验. *动物医学进展 (Progress in Veterinary Medicine)*, 2010, 31(8):34-37.
- [9] 沈韞芬. 原生动物学. 北京: 科学出版社, 1999.
- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8):1596-1599.
- [11] Solaymani MS, Petri WA. Zoonotic implications of the swine-transmitted protozoal infection. *Veterinary Parasitology*, 2006, 140: 189-203.
- [12] 张文静, 余育和, 沈韞芬. 五株纤毛虫遗传关系的 ISSR 分析. *水生生物学报 (Acta Hydrobiologica Sinica)*, 2005, 29(6): 633-638.
- [13] Lewin B. 基因 VIII. 余龙, 江松敏, 赵寿元译. 北京: 科学出版社, 2005.
- [14] 王进产, 菅复春, 张龙现, 宁长申, 闫文朝, 孙铭飞, 仇书兴, 卢庆斌. 基于 18S rRNA 和 HSP70 基因序列的隐孢子虫种系发育分析. *畜牧兽医学报 (Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences)*, 2007, 38(9):947-953.

- [15] Xiao LH, Alderisio K, Limor J. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000,62;5492-5498.
- [16] Yang Y, Zeng L, Zhou J. Diarrhoea in piglets and monkeys experimentally infected with *Balantidium coli* isolated from human feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995,98;69-72.
- [17] Modry D, Petrzalkova KJ, Pomajbikova K, Tokiwa T, Wrizek J, Imai S, Vallo P. The occurrence and ape-to-ape transmission of the entodiniomorphid ciliate *Trogloodytella abressarti* in captive gorillas. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2009,56(1): 83-87.
- [18] Nakauchi, K. The prevalence of *Balantidium coli* infection in fifty-six mammalian species. *Journal of Veterinary Medicine Sciences*. 1999,61;63-65.

Population characterization of *Balantidium coli* from pigs using ITS1-5.8S rRNA-ITS2 sequence

Tianqi Wang¹, Gang Dou², Wenchao Yan^{1,3,*}, Longxian Zhang³, Lifang Han¹, Ke Ding¹, Chuanchuan Jia¹, Meng Zhang¹, Dujuan Yu¹

¹College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

²The State Engineering Research Center for Biochip Technology, Beijing 102206, China

³College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: [**Objective**] To determine the species and genotypes of *Balantidium* isolated from pigs in Henan province, China. [**Methods**] Scatocopy and the modified DMEM media were used to isolate trophozoites of *Balantidium* from pig feces. The ITS1-5.8S rRNA-ITS2-based molecular marker method, Acridine orange staining (AO) and microscopic observation were used to determine the population characteristics among different isolates of *B. coli* from various pigs farms. [**Results**] We isolated 15 isolates from the pigs at diagnosis in the Animal Hospital of Henan University of Science and Technology from the pig farms of the 8 counties or cities of the west of Henan province in total, and all of them belong to the same species *B. coli*. MJ-2 and SX-1 isolates were genotype A of *B. coli*, and the remaining 13 isolates were genotype B. Trophozoites of MJ-2 and SX-1 were bigger, moved more slowly and lower density in feces and *in vitro* culture than other 13 isolates, while structures of their nuclei were not different. [**Conclusion**] Both genotype A and B of *B. coli* are present in the pig farms of the west of Henan province, China, and genotype B is the determinant population in pigs farms. These findings could provide an important implication for the effective control of balantidiosis of human and other hosts.

Keywords: swine, *Balantidium coli*, trophozoites, genotype analysis

(本文责编:张晓丽)