

涂蕊, 但佳明, 严光文, 等. 四川省部分地区成年山羊十二指肠贾第虫感染调查与基因分型研究[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(5): 59-64.

四川省部分地区成年山羊十二指肠贾第虫感染调查与基因分型研究

涂蕊^{1†}, 但佳明^{1†}, 严光文², 郑静³, 田一男¹, 肖启程¹, 魏斌¹,
周紫峒¹, 刘海峰¹, 杨亭玉¹, 彭广能¹, 钟志军¹

(1 四川农业大学 动物医学院/动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130;

2 西昌学院 动物科技学院, 四川 西昌 615000; 3 南充市顺庆区农牧业局, 四川 南充 637000)

摘要:【目的】了解四川省部分地区成年山羊贾第虫 *Giardia duodenalis* 感染情况以及感染虫种基因型。【方法】在四川省 12 个养殖场采集了 342 份成年山羊的新鲜粪便, 采用多位点基因分型技术, 通过巢式 PCR 扩增 *bg*、*tpi* 和 *gdh* 基因位点, 对阳性样品的 PCR 产物进行了测序分析。【结果】342 份成年山羊粪样中贾第虫的总感染率为 14.91%(51/342)。所有阳性样品感染的虫种基因型均为集聚体 E。51 份阳性样品在 *bg*、*tpi* 和 *gdh* 这 3 个基因位点分别成功鉴定出 4(E5、E8、E17、E18)、2(E2、E4) 和 2(E3、E4) 种基因亚型, 并且在 *bg* 位点发现了 2 种新的基因亚型 (E17、E18)。【结论】四川省部分地区成年山羊存在较为严重的贾第虫感染, 虫种类型主要为集聚体 E, 且具有一定的遗传多样性。

关键词: 成年山羊; 贾第虫; 多位点基因分型技术; 集聚体 E

中图分类号: S855.99

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2018)05-0059-06

Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* in adult goats in Sichuan partial areas

TU Rui^{1†}, DAN Jiaming^{1†}, YAN Guangwen², ZHENG Jing³, TIAN Yinan¹, XIAO Qicheng¹, WEI Bin¹, ZHOU Ziyao¹,
LIU Haifeng¹, YANG Tingyu¹, PENG Guangneng¹, ZHONG Zhijun¹

(1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University/Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, China; 2 College of Animal Science and Technology, Xichang College, Xichang 615000, China; 3 Farming and Animal Husbandry Bureau in Shunqing District of Nanchong City, Nanchong 637000, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the infection states of *Giardia duodenalis* and the infected *G. duodenalis* genotype in adult goats in Sichuan partial areas. 【Method】The fecal samples of 342 adult goats were collected from 12 different farms of Sichuan, and subjected to nested PCR to amplify *bg*, *tpi* and *gdh* gene loci through multilocus genotyping technique. PCR products of positive samples were sequenced and further analyzed.

【Result】The infection rate of *G. duodenalis* in 342 adult goat fecal samples was 14.91% (51/342) and the infected *G. duodenalis* genotype in all positive samples was assemblage E. Fifty-one positive samples were respectively identified four (assemblage E5, E8, E17 and E18), two (assemblage E2 and E4), and two (assemblage E3 and E4) subtypes in *bg*, *tpi* and *gdh* gene loci. Two novel genotypes (assemblage E17 and E18) were detected

收稿日期: 2018-01-28 网络首发时间: 2018-07-09 17:49:52

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180707.1635.024.html>

作者简介: 涂蕊 (1992—), 女, 硕士研究生, E-mail: 756774509@qq.com; 但佳明 (1995—), 女, 硕士研究生, E-mail: 542378229@qq.com; †对本文贡献相同; 通信作者: 钟志军 (1980—), 男, 副教授, 博士, E-mail: zhongzhijun488@126.com

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD0501009); 国家自然科学基金 (31000548); 成都大熊猫繁育研究基金 (CPF2015-4, CPF2017-05); 四川农业大学本科生科研兴趣培养项目 (ky2016076)

at *bg* locus. 【Conclusion】 There are serious *G. duodenalis* infection in adult goats in Sichuan partial areas. The infected *G. duodenalis* genotype is mainly assemblage E which has the genetic diversity at a certain level.

Key words: adult goat; *Giardia duodenalis*; multilocus genotyping technique; assemble E

十二指肠贾第虫 *Giardia duodenalis*, 又名贾第虫、蓝氏贾第鞭毛虫 *G. lamblia*、肠贾第虫 *G. intestinalis*, 是一种人兽共患肠道致病寄生虫, 其宿主广泛, 可感染哺乳动物(包括人)、鸟类及两栖动物等^[1-2]。贾第虫主要通过粪口途径传播, 动物可通过食入被污染的食物和水而感染^[3], 感染后主要表现为消化系统症状: 胃胀、呕吐、消化不良及急性或慢性腹泻。此外, 其危害程度对不同动物也有所不同, 主要取决于宿主的免疫、营养状况及有无同时感染其他寄生虫等^[4-5]。

目前, 根据基因型和宿主特异性, 将贾第虫划分为 8 个集聚体: 集聚体 A~H^[6-7]。山羊是贾第虫感染的常见宿主之一, 其感染的基因型包括集聚体 A、B 和 E, 其中集聚体 E 是优势集聚体^[8-10]。集聚体 A 和 B 对人也具有感染性, 是常见的人兽共患集聚体^[10-11]。近年来有研究表明, 人也能感染集聚体 E^[12-14], 因此山羊感染贾第虫具有人兽共患传播的风险。

近年来, 国内报道多种动物已感染贾第虫, 如牛感染集聚体 A、B 和 E, 山羊感染集聚体 A 和 E, 绵羊感染集聚体 A、B 和 E, 狗感染集聚体 A、C、和 D, 猫感染集聚体 F, 猪感染集聚体 A、B、D、E 和 F, 兔子感染集聚体 B 和 E, 啮齿类感染集聚体 A、B 和 G, 非人灵长类感染集聚体 A、B 和 E, 以及有些野生动物也被贾第虫感染^[15]。对于山羊的贾第虫感染, 已有多个国家进行了相关报道, 如西班牙^[13]、印度^[14]和马来西亚^[16]等, 不同国家和地区的感染率存在较大差异。然而国内对山羊贾第虫感染的研究甚少, 截至 2017 年 12 月, 仅黑龙江^[17]、安徽^[18]、陕西和河南^[12]等省份有研究, 平均感染率为 6.07%, 只检测到集聚体 A 和 E, 以集聚体 E 为主^[15]。国外研究发现, 山羊还可感染集聚体 B^[14, 16]。目前, 四川地区鲜见山羊感染贾第虫的相关报道。本研究采用多位点序列分型技术调查四川省部分地区成年山羊贾第虫感染情况, 并对阳性样品进行基因型和亚型分析, 为研究四川地区成年山羊贾第虫流行情况以及感染的集聚体类型研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 粪便采集

2017 年 6—8 月, 在四川省的 12 个养殖场(名山、经久、纳溪、邻水、水口、大林、松坪、北川、简阳、

富顺、青川和双流) 采样, 采样养殖场地理分布如图 1 所示, 样本量按山羊总数的 20% 采集, 直肠采粪, 共收集成年山羊(年龄均为 1~2 周岁) 粪便 342 份, 逐份标记, 置于冰箱 4 °C 条件下保存。

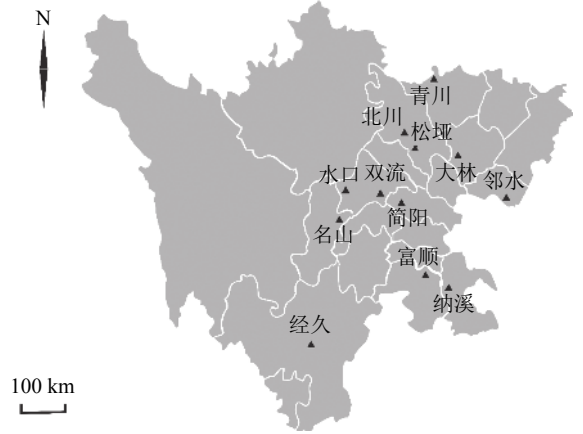


图 1 采样点的地理分布图

Fig. 1 Geographic distributions of sampling sites in Sichuan

1.2 主要试剂

粪便 DNA 提取试剂盒 (E.Z.N.A.[®] Stool DNA Kit) 购自美国 MOBIO Bio-tek 公司。2×Taq PCR Master Mix 购自天根生化科技(北京)有限公司。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.3 粪便 DNA 提取

粪便样品于采样后 24 h 内经改良饱和蔗糖溶液漂浮处理, 然后按粪便 DNA 提取试剂盒说明书操作, 提取的 DNA 于 -20 °C 条件下保存待检^[19]。

1.4 巢式 PCR 扩增

基于 β -贾第素 (*bg*) 基因位点对所有 DNA 进行巢式 PCR 扩增, 引物合成与扩增条件参照文献^[19-20]。对 *bg* 位点扩增所得的阳性样品再进一步扩增其磷酸丙糖异构酶基因位点 *tpi* 和谷氨酸脱氢酶基因位点 *gdh*, 鉴定基因亚型^[20-21]。采用 25 μ L 的反应体系: 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L。第 2 轮的 PCR 产物经 10 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 将阳性样品产物保存并送检测序。

1.5 测序及分析

阳性 PCR 产物送北京六合华大基因科技有限公司双向测序。所得序列进行 NCBI 的 Blast 比对, <http://xuebao.scau.edu.cn>

并采用 Clustal X 与 NCBI 中的参考序列进行比对和校正, 把序列上传至 GenBank, 得到相关序列的登录号为 MG602956、57、58、59、60、61、62、63。采用 Mega 6 软件通过邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统发育树。

1.6 数据分析

利用 SPSS 17.0 进行卡方检验, $P < 0.05$ 说明处理间具有差异显著性。

2 结果与分析

2.1 成年山羊贾第虫感染情况

采集的 342 份粪样中, 51 份检测为贾第虫阳性, 总感染率为 14.91%(51/342)。除了松垭和大林 2 个养殖场以外, 其他 10 个养殖场均检测出贾第虫感染, 感染率在 5.00%~37.50%, 其中, 青川养殖场感染率最高, 阳性率为 37.50%; 4 个养殖场感染率较高, 均高于 20%, 分别是富顺、邻水、名山和双流养殖场, 感染率分别为 35.00%、28.57%、21.95% 和 20.00%(表 1)。统计学分析结果表明, 12 个养殖场的感染率间无显著差异 ($\chi^2=1.333, df=9, P=0.998$)。

2.2 基因序列分析

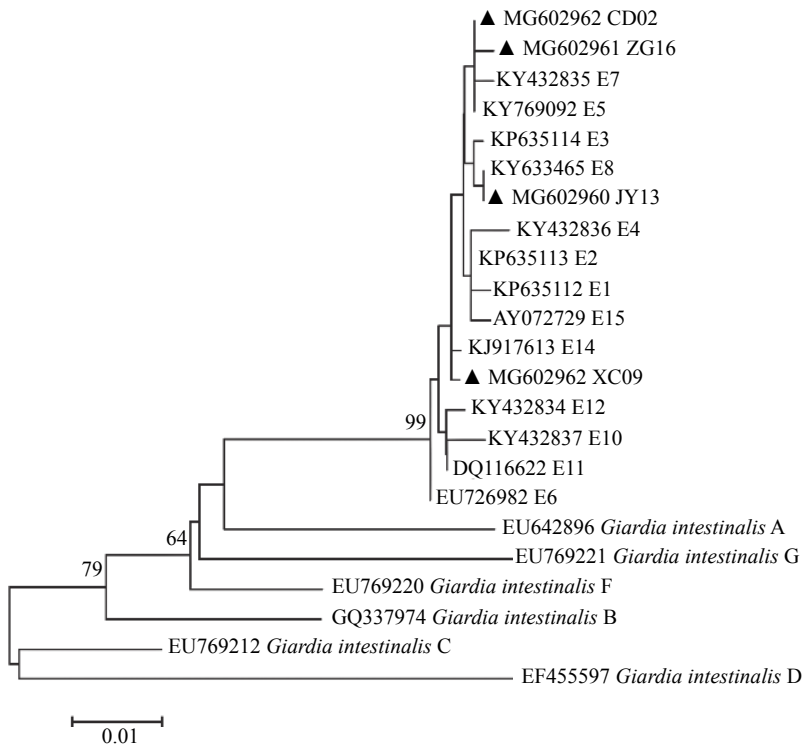
3 个基因位点 (*bg*、*tpi* 和 *gdh*) 扩增后分别得到 50、43 和 33 条序列。序列分析显示, 本次调查的成年山羊感染的贾第虫类型均为集聚体 E。对 *bg* 位

点扩增出的 51 份阳性样品序列鉴定的 4 个亚型构建进化树 (图 2)。JY13(MG602960) 和 CD02

表 1 四川 12 个养殖场成年山羊贾第虫感染情况
Table 1 Infection states of *Giardia duodenalis* in adult goats from 12 different farms in Sichuan

养殖场	样品数	阳性样品数	感染率/%	阳性样品编号 ¹⁾
名山	41	9	21.95	YA15、18、21、26、29、33、37、38、39
经久	36	3	8.33	XC09、21、23
纳溪	26	2	7.69	LZ012、015
邻水	21	6	28.57	GA03、05、06、17、18、19
水口	40	2	5.00	QL27、28
大林	26	0	0	...
松垭	24	0	0	...
北川	23	1	4.35	BC07
简阳	20	1	5.00	JY13
富顺	20	7	35.00	ZG01、03、06、12、14、16、17
青川	40	15	37.50	GY05、08、17、18、20、23、25、26、27、28、29、32、35、37、40
双流	25	5	20.00	CD01、02、06、08、22
总计	342	51	14.91	

1)“...”表示在该养殖场未检出阳性样品



“▲”: 本试验所得序列; CD02、ZG16、JY13 和 XC09 分别表示双流、富顺、简阳和经久养殖场阳性样品的编号

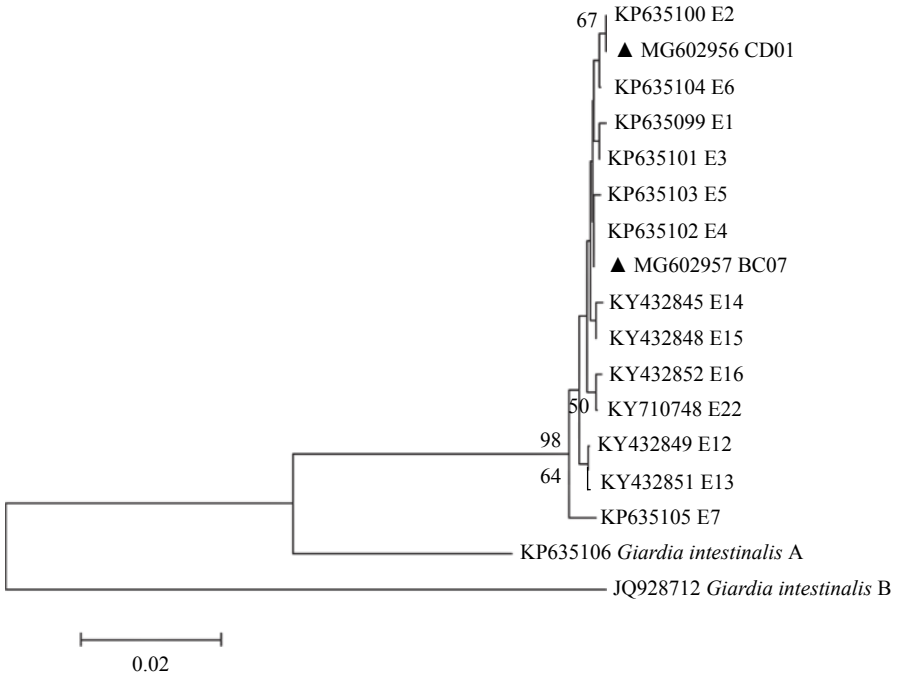
图 2 *bg* 基因位点序列系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis based on *bg* gene sequence of *Giardia duodenalis*

(MG602962) 分别与已知的基因亚型 E8(KY633465) 和 E5(KY769092) 聚在一起, 而 ZG16(MG602961) 和 XC09(MG602962) 形成独立的分支, 为 2 个新的基因亚型; ZG16 与 E5、E8 亲缘关系较近, 而 XC09 与基因亚型 E14(KJ917613) 聚得更近。 *tpi* 位点进化树 (图 3) 显示, BC07(MG602957) 和 CD01(MG602956) 分别与已知的基因亚型 E4(KP635102) 和 E2(KP635100) 聚在一起。 *gdh* 基

因位点构建的进化树 (图 4) 显示, JY13(MG602959) 与已知的基因亚型 E3(KF843925) 聚在一起, 为同一基因亚型, 而 GY17(MG602958) 则与基因亚型 E4(KF843926) 聚为一支。 3 个基因位点 (*bg*、*tpi* 和 *gdh*) 的进化树都支持本试验鉴定的成年山羊感染的贾第虫类型均为集聚体 E 的结论。

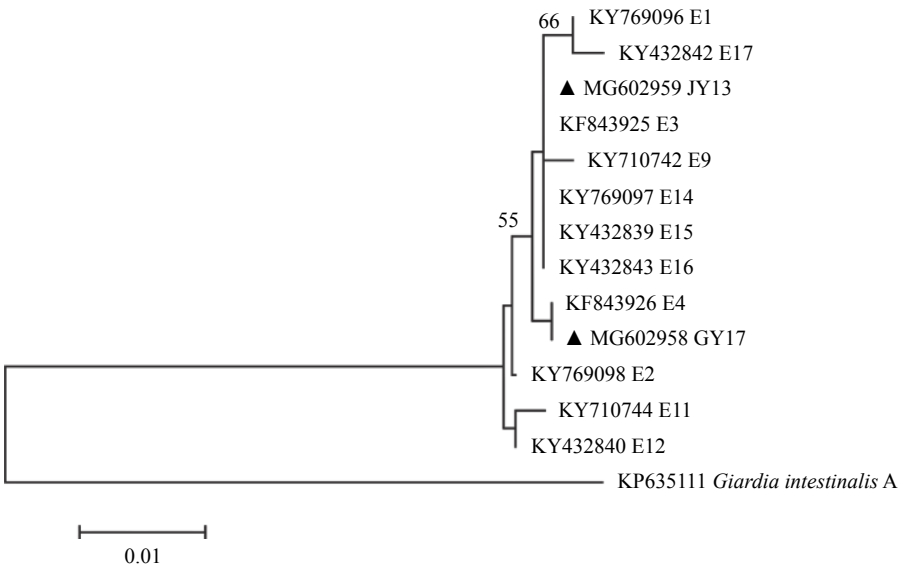
本研究中 51 份贾第虫阳性样品在 3 个基因位点 (*bg*、*tpi* 和 *gdh*) 分别检测到 4、2 和 2 种基因亚型



“▲”: 本试验所得序列; CD01 和 BC07 分别表示双流和北川养殖场阳性样品的编号

图 3 *tpi* 基因位点序列系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis based on *tpi* gene sequence of *Giardia duodenalis*



“▲”: 本试验所得序列; JY13 和 GY17 分别表示简阳和青川养殖场阳性样品的编号

图 4 *gdh* 基因位点序列系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis based on *gdh* gene sequence of *Giardia duodenalis*

(表2)。在 *bg* 位点, 50 条序列分为 4 种基因亚型: 2 个已知的基因亚型 E5、E8, 2 个新的基因亚型 E17、E18, 共有 47 条序列是 E5 亚型, 占比 94.00%, 因此 E5 是 *bg* 位点主要的基因亚型。*tpi* 位点的 43 条序列中检测到 2 种基因亚型, 分别为 E2 和 E4, 都是已知的基因亚型, 共有 41 条序列是 E2 亚型, 占比 95.35%, 因此 E2 是 *tpi* 位点主要的基因亚型。*gdh* 位点的 33 条序列鉴定出 2 种基因亚型, 分别是 E4 和 E3, 均为已知基因亚型, 共有 32 条序列是 E4 亚型, 占比 96.97%, E4 是 *gdh* 位点主要的基因亚型。

表2 在 *bg*、*tpi* 和 *gdh* 基因位点对 51 株贾第虫分离株的基因亚型分析

Table 2 Subtype analyses of 51 *Giardia duodenalis* isolates based on *bg*, *tpi* and *gdh* gene loci

养殖场	阳性样品编号	基因亚型 ¹⁾		
		<i>bg</i>	<i>tpi</i>	<i>gdh</i>
北川	BC07	...	E4	...
双流	CD02、06、08、22	E5	E2	E4
	CD01	E5	E2	...
邻水	GA03、17、19	E5	E2	E4
	GA06、18	E5	...	E4
	GA05	E5
青川	GY17、18、20、26、27、29、35、37	E5	E2	E4
	GY05、08、23、28、40	E5	E2	...
	GY25、32	E5
简阳	JY13	E8	E4	E3
纳溪	LZ012、015	E5	E2	E4
水口	QL27	E5	E2	E4
	QL08	E5	E2	...
经久	XC09	E17 [#]	E2	E4
	XC21	E5	E2	...
	XC23	E5
名山	YA15、26、29、37、38、39	E5	E2	E4
	YA21	E5
	YA18、33	E5	E2	...
富顺	ZG01、03、06、12、17	E5	E2	E4
	ZG14	E5
	ZG16	E18 [#]	E2	...

1) “#”表示本试验得到的新亚型;“...”表示在该位点未检出贾第虫基因亚型;*bg*位点参考序列: E5上海奶牛分离株(KY769092), E8青海藏羊分离株(KY633465);*tpi*位点参考序列: E2河南绵羊分离株(KP635100), E4河南绵羊分离株(KP635102);*gdh*位点参考序列: E3河南奶牛分离株(KF843925), E4河南奶牛分离株(KF843926)

3 讨论与结论

本研究采用多位点基因分型法对四川省部分地区成年山羊贾第虫感染情况及感染的贾第虫聚集类型进行研究。结果显示, 试验调查地区成年山羊贾第虫总感染率为 14.91%, 高于陕西^[12]、安徽^[18]和黑龙江^[17]省部分地区, 但低于河南^[12]省部分地区, 表明我国成年山羊贾第虫感染情况存在明显的地区差异, 这种差异可能与不同地区的地理条件和管理因素有关。

近年来, 贾第虫基因型分类鉴定常采用的基因包括: 小亚单位 rRNA(SSU rRNA) 基因、*tpi*、*gdh* 和 *bg* 等。对不同的基因位点, 检测出的基因型可能不同^[22]。此外, 以往大多研究^[23-25]都是基于某一、两个位点进行测序分析, 比多位点序列分型敏感度低且易漏检。多位点基因分型技术检测贾第虫感染具有较好的敏感度, 同时可用于贾第虫虫种的鉴定、亚型鉴定以及遗传进化分析, 还有助于追溯病原^[26]。本研究采用多位点 (*bg*、*tpi*、*gdh*) 基因分型法对 51 份阳性样品进行分析, 感染的贾第虫均为集聚体 E, 这与安徽省部分地区报道的贾第虫感染基因型一致^[18]。黑龙江省部分地区感染的贾第虫基因型主要为集聚体 A、B、E, 以集聚体 E 为主^[17], 河南和陕西省部分地区感染的基因型为集聚体 A、E, 以及集聚体 A、E 的混合感染^[12]。四川省部分地区成年山羊感染的贾第虫基因型与我国其他地区存在差异, 具体原因需进一步研究。

bg、*tpi* 和 *gdh* 这 3 个基因位点分别以 E5、E2 和 E4 基因亚型为主。在 *bg* 位点检测到的基因亚型 E5 与我国上海奶牛分离株 (KY769092)^[27]、加纳的山羊分离株 (KY711415)^[9]、韩国的犊牛分离株 (KU86884)^[28] 以及埃塞俄比亚的牦牛和羔羊分离株 (KP334150 和 KT92250)^[29] 完全一致, 该亚型的宿主范围和地域分布比较广泛, 可能是反刍动物的常见亚型之一。在 *tpi* 位点检测到的主要基因亚型 E2, 仅在我国绵羊分离株 (KP635100)^[26] 和西班牙的山羊分离株 (EU189326)^[13] 中有报道, 提示该亚型可能只感染羊, 具有宿主特异性。在 *gdh* 位点检测到的基因亚型 E4 与我国河南的奶牛分离株 (KF843926) 序列完全一致^[30], 目前未在其他宿主中检测到。另外在 *bg* 位点还检测到 2 个新的基因型 E17 和 E18, 表明四川地区贾第虫虫种可能具有一定的遗传多样性。

参考文献:

[1] RYAN U, CACCIÒ S M. Zoonotic potential of *Giardia*[J]. Int J Parasitol, 2013, 43(12/13): 943-956.
 [2] FAYER R. *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic

- parasite[J]. *Vet Parasitol*, 2004, 126(1/2): 37-56.
- [3] XIAO L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update[J]. *Exp Parasitol*, 2010, 124(1): 80-89.
- [4] ROBERTSON L J, GJERDE B K, HANSEN E F. The zoonotic potential of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian sheep: A longitudinal investigation of 6 flocks of lambs[J]. *Vet Parasitol*, 2010, 171(1/2): 140-145.
- [5] ROBERTSON I D, IRWIN P J, LYMBERY A J, et al. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses[J]. *Int J Parasitol*, 2000, 30(12/13): 1369-1377.
- [6] MONIS P T, CACCIO S M, THOMPSON R C A. Variation in *Giardia*: Towards a taxonomic revision of the genus[J]. *Trends Parasitol*, 2009, 25(2): 93-100.
- [7] LASEK-NESSELQUIST E, WELCH D M, SOGIN M L. 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.
- [8] ABDEL-MOEIN K A, SAEED H. The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings[J]. *Parasitol Res*, 2016, 115(8): 3197-3202.
- [9] SQUIRE S A, YANG R, ROBERTSON I, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in farmers and their ruminant livestock from the Coastal Savannah zone of Ghana[J]. *Int J Parasitol*, 2017, 55: 236-243.
- [10] TZANIDAKIS N, SOTIRAKI S, CLAEREBOU E, et al. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats reared under dairy husbandry systems in Greece[J]. *Parasite*, 2014, 21(3): 412-418.
- [11] DI CRISTANZIANO V, SANTORO M, PARISI F, et al. Genetic characterization of *Giardia duodenalis* by sequence analysis in humans and animals in Pemba Island, Tanzania[J]. *Parasitol Int*, 2014, 63(2): 438-441.
- [12] PENG X Q, TIAN G R, REN G J, et al. Infection rate of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in cashmere, dairy and meat goats in China[J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 41: 26-31.
- [13] RUIZ A, FORONDA P, GONZÁLEZ J F, et al. Occurrence and genotype characterization of *Giardia duodenalis* in goat kids from the Canary Islands, Spain[J]. *Vet Parasitol*, 2008, 154(1/2): 137-141.
- [14] UTAAKER K S, MYHR N, BAJWA R S, et al. Goats in the city: Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in extensively reared goats in northern India[J]. *Acta Vet Scand*, 2017, 59(1): 86. doi: [10.1186/s13028-017-0354-4](https://doi.org/10.1186/s13028-017-0354-4).
- [15] LI J, WANG H, WANG R, et al. *Giardia duodenalis* infections in humans and other animals in China[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2004. doi: [10.3389/fmicb.2017.02004](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02004).
- [16] LIM Y A L, MAHDY M A K, TAN T K, et al. First molecular characterization of *Giardia duodenalis* from goats in Malaysia[J]. *Mol Cell Probes*, 2013, 27(1): 28-31.
- [17] 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. doi: [10.1371/journal.pntd.0001826](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001826).
- [18] 顾有方, 王立克, 李阳, 等. 安徽省部分地区山羊蓝氏贾第鞭毛虫流行病学调查及基因型分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2014, 32(5): 401-403.
- [19] ZHONG Z, TIAN Y, LI W, et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates in Sichuan and Guizhou provinces, Southwestern China[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184913. doi: [10.1371/journal.pone.0184913](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184913).
- [20] APPELBE E A J, FREDERICK L M, HEITMAN T L, et al. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada[J]. *Vet Parasitol*, 2003, 112(4): 289-294.
- [21] 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.
- [22] FENG Y, ORTEGA Y, CAMA V, et al. High intragenotypic diversity of *Giardia duodenalis* in dairy cattle on three farms[J]. *Parasitol Res*, 2008, 103(1): 87-92.
- [23] SANTÍN M, TROUT J M, FAYER R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland[J]. *Vet Parasitol*, 2007, 146(1/2): 17-24.
- [24] GEURDEN T, THOMAS P, CASAERT S, et al. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium[J]. *Vet Parasitol*, 2008, 155(1/2): 142-145.
- [25] YANG R, JACOBSON C, GORDON C, et al. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia[J]. *Vet Parasitol*, 2009, 161(1/2): 19-24.
- [26] WANG H, QI M, ZHANG K, et al. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* isolated from sheep in Henan Province, central China[J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 39: 330-335.
- [27] WANG X, CAI M, JIANG W, et al. High genetic diversity of *Giardia duodenalis* assemblage E in pre-weaned dairy calves in Shanghai, China, revealed by multilocus genotyping[J]. *Parasitol Res*, 2017, 116(8): 2101-2110.
- [28] LEE S H, VANBIK D, KIM H Y, et al. Prevalence and molecular characterisation of *Giardia duodenalis* in calves with diarrhoea[J]. *Vet Rec*, 2016, 178(25): 633.
- [29] WEGAYEHU T, KARIM M R, LI J, et al. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* species and *Giardia duodenalis* in lambs in Oromia Special Zone, Central Ethiopia[J]. *BMC Vet Res*, 2016, 13(1): 22. doi: [10.1186/s12917-016-0916-0](https://doi.org/10.1186/s12917-016-0916-0).
- [30] WANG H, ZHAO G, CHEN G, et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Henan, China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100453. doi: [10.1371/journal.pone.0100453](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100453).