

陕西部分地区山羊毕氏肠微孢子虫 多位点基因分型研究

刘婷丽¹, 彭先启³, 宋军科¹, 胡瑞思¹, 王莎莎¹, 潘广林^{2*}, 赵光辉^{1*}

(1. 西北农林科技大学 动物医学院, 杨凌 712100; 2. 陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心, 周至 710402;
3. 河南牧翔动物药业有限公司, 郑州 450000)

摘要: 为了阐明山羊毕氏肠微孢子虫的遗传多样性, 笔者采用基于微卫星 (MS1、MS3、MS7) 和小卫星 (MS4) 位点的多位点序列分型技术首次对不同用途山羊的 122 个毕氏肠微孢子虫分离株进行了多位点序列分型研究。结果发现, 在 MS1、MS4 和 MS7 位点的扩增效率依次为 27.9% (34/122)、18.0% (22/122)、50.8% (62/122), 而在 MS3 位点所有样品均未获得有效扩增。核苷酸序列分析表明, 所有样品的 MS1、MS4 和 MS7 位点分别具有 16、9 和 18 个基因型, 共形成了 14 个 MLGs。其中, 50 份绒山羊阳性样品 3 个位点扩增效率分别为 10.0% (5/50)、14.0% (7/50) 和 90.0% (45/50), 分别具有 3、3 和 10 个基因型, 共形成了 5 个 MLGs; 56 份奶山羊阳性样品 3 个位点的扩增效率依次为 28.6% (16/56)、19.6% (11/56) 和 8.9% (5/56), 分别组成 4、4、1 个基因型, 共组成 7 个不同的 MLGs; 16 份黑山羊阳性样品在 3 个位点的扩增效率依次为 81.3% (13/16)、25.0% (4/16)、75.0% (12/16), 分别具有 9、2、7 个基因型, 构成 2 个 MLGs。

关键词: 山羊; 毕氏肠微孢子虫; 多位点序列分型; 陕西

中图分类号: S852.723

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)09-1730-07

Multi-locus Sequence Genotyping Study of *Enterocytozoon bieneusi* in Goats from Partial Areas of Shaanxi Province

LIU Ting-li¹, PENG Xian-qi³, SONG Jun-ke¹, HU Rui-si¹, WANG Sha-sha¹,
PAN Guang-lin^{2*}, ZHAO Guang-hui^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;
2. Shaanxi Rare and Wildlife Rescuing and Breeding Center, Zhouzhi 710402, China;
3. Henan Muxiang Veterinary Pharmaceutical Co., Ltd, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: To indicate the genetic variability of *Enterocytozoon bieneusi* in goats, the multi-locus sequence genotypes (MLGs) of 122 *E. bieneusi* isolates from different production categories were studied using the multi-locus sequence genotyping (MLST) technique based on micro- (MS1, MS3, MS7) and mini-satellite (MS4) loci. The results showed that, the respective amplification efficiencies in loci MS1, MS4 and MS7 were 27.9% (34/122), 18.0% (22/122), 50.8% (62/122), while no amplifications were detected in the locus MS3. The nucleotide sequences analysis indicated that, 16, 9 and 18 genotypes were found in all positive samples for loci MS1, MS4 and MS7, respectively, forming fourteen MLGs. Among them, the amplification efficiencies of three loci among 50 positive samples of cashmere goats were 10.0% (5/50), 14.0% (7/50) and 90.0% (45/50), respectively, belonging to three, three and ten genotypes, and five MLGs. The ampli-

收稿日期: 2017-03-23

作者简介: 刘婷丽 (1993-), 女, 山西吕梁人, 硕士, 主要从事动物寄生虫学与寄生虫病学的研究, E-mail: 1229695951@qq.com; 彭先启 (1991-), 男, 河南周口人, 硕士, 主要从事兽医技术服务工作, E-mail: xianqi001@163.com。二人均为共同第一作者

* 通信作者: 潘广林, E-mail: dongzi_1021@163.com; 赵光辉, E-mail: zgh083@nwsuaf.edu.cn

fication efficiencies of 56 positive samples of dairy goats in three loci were 28.6% (16/56), 19.6% (11/56) and 8.9% (5/56), grouping into four, four, one genotypes, and seven different MLGs. The amplification efficiencies of three loci of 16 positive samples of black goats were 81.3% (13/16) and 25.0% (4/16), 75.0% (12/16), clustering into 9, 2, 7 genotypes, and two MLGs.

Key words: goat; *Enterocytozoon bieneusi*; MLST; Shaanxi

羊是重要的经济动物,在各国畜牧业发展中占据重要位置。目前,中国已成为世界上羊肉生产、消费与贸易的第一大国,具有多个优质山羊品种,尤其是陕西省的陕北白绒山羊、萨能奶山羊、陕北黑山羊^[1]。然而,随着羊产业规模的不断扩大,有关羊群疾病的研究和报道也越来越多,羊群疾病已成为阻碍羊产业发展的重要因素。毕氏肠微孢子虫(*Enterocytozoon bieneusi*)是一种具有重要公共卫生学意义的人畜共患病原,宿主范围广泛,致病力强^[2-4]。据报道,无论是发达国家还是发展中国家均有越来越多的人和动物感染 *E. bieneusi*, 如猪(瑞士, 28/109)、奶牛(美国, 70/413)、山羊(西班牙, 1/7)、马(哥伦比亚, 21/195)、狗(日本, 2/79)等^[5-8]。虫体侵入宿主小肠上皮细胞和胆道上皮细胞后,可引发宿主肠炎、胆道炎、胆管炎等,尤其对艾滋病人等免疫力缺陷病人造成严重的危害^[9-13]。

准确分析病原的遗传多样性是进行感染性疾病有效防控的基础和核心。虽然 *E. bieneusi* 种系相对单一,但仅根据孢子的大小、形态等数据仍无法将毕氏肠微孢子虫与其他种的微孢子虫准确区分,且基于核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)的分子生物学分析发现毕氏肠微孢子虫存在遗传多样性,包括多种人兽共患基因型和动物特异性基因型^[8,14-16]。基于毕氏肠微孢子虫 ITS 基因检测的结果虽准确,但却无法明确 *E. bieneusi* 各基因型的来源、传播途径等,且同一 ITS 基因是否存在多样性仍无法阐明。为了能更加精确地分析毕氏肠微孢子虫的基因型和遗传特征, Y. Y. Feng 等^[17]根据 *E. bieneusi* 基因组序列选取 3 个微卫星(MS1、MS3、MS7)和 1 个小卫星(MS4)位点开发了用于 *E. bieneusi* 的多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)技术,该方法具有较高的灵敏度,能展示同一 ITS 基因型的多态性^[18]。

笔者课题组利用基于 ITS 的分子生物学技术对陕西省部分地区的奶山羊、黑山羊和绒山羊的毕氏肠微孢子虫检测发现,这些羊中广泛存在毕氏肠微孢子虫的感染,并存在多种基因型^[1]。为了进一

步明确毕氏肠微孢子虫的遗传多样性,笔者利用 MLST 技术对这些羊的毕氏肠微孢子虫进行了多位点基因分型研究。

1 材料与方法

1.1 样品

经基于 ITS 的分子生物学方法鉴定为毕氏肠微孢子虫阳性^[1]的陕西不同地区山羊的 122 份粪便样品保存于 2.5% 的重铬酸钾溶液中,置 4 °C 保存备用。

1.2 主要试剂

粪便基因组 E. Z. N. A.® DNA 提取试剂盒购自 OMEGA; 10 × Ex Taq buffer、Ex Taq DNA 聚合酶、2.5 mmol · L⁻¹ dNTP、25 mmol · L⁻¹ MgCl₂、6 × Loading Buffer、DL2000 DNA marker、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)购自大连宝生物工程有限公司;琼脂糖购自上海英潍捷基贸易有限公司。

1.3 粪便样品基因组 DNA 的提取

每份粪便样品分别取 200 mg 置于 1.5 mL 离心管中,加入蒸馏水,混匀,12 000 g 离心 1 min,弃上清,重复以上步骤直至洗净重铬酸钾溶液;然后严格按照粪便基因组 E. Z. N. A.® DNA 提取试剂盒说明书提取粪样基因组 DNA,并置于 -20 °C 保存备用。

1.4 PCR 扩增及电泳

参照 Y. Y. Feng 等^[17]建立的基于 3 个微卫星位点(MS1、MS3、MS7)和 1 个小卫星位点(MS4)的 MLST 技术引物进行序列分型分析(表 1)。针对 4 个扩增位点,均采用巢式 PCR 扩增。两轮 PCR 反应体系基本相同,除第一轮 PCR 所使用的模板为样品中提取的基因组 DNA,第二轮 PCR 所使用的模板为第一轮扩增产物外,其他试验均按如下反应体系进行: 10 × Ex PCR buffer 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol · L⁻¹) 2 μL, MgCl₂(25 mmol · L⁻¹) 2 μL, Ex Taq 酶 0.5 U, 上、下游引物(50 μmol · L⁻¹) 各 1 μL, 模板 1 μL, 加双蒸水至 25 μL。扩增条件除退火温度不同以外,其他反应程序按照以下条件进行: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 退火(温度见表 1) 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 进行 35 个循环; 72 °C 再延

伸 7 min。取 3 μL PCR 扩增产物与 0.5 μL 6 \times Loading Buffer 混合均匀,按照顺序加入含 1% EB

的琼脂糖凝胶平板加样孔中,110 V 电压下电泳 30 min,借助紫外凝胶成像仪进行观察、鉴定。

表 1 毕氏肠微孢子虫多位点基因分型引物

Table 1 Primers used for MLST of *E. bienersi*

基因位点 Locus	引物及序列(5'→3')	退火温度/°C Annealing temperature	产物大小/bp Product length
MS1	F1 CAAGTTGCAAGTTCAGTGTGTTGAA	58	843
	R1 GATGAATATGCATCCATTGATGTT		
	F2 TTGTAAATCGACCAAATGTGCTAT	58	
	R2 GGACATAAACCCTAATTAATGTAAC		
MS3	F1 CAAGCACTGTGGTTACTGTT	55	702
	R1 AAGTTAGGGCATTAAATAAAAATTA		
	F2 GTTCAAGTAATTGATACCAGTCT	55	
	R2 CTCATTGAATCTAAATGTGTATAA		
MS4	F1 GCATATCGTCTCATAGGAACA	55	965
	R1 GTTCATGGTTATTAATTCCAGAA		
	F2 CGAAGTGTAATGATGCTCTCT	55	
	R2 GGACTTTAATAAGTTACCTATAGT		
MS7	F1 GTTGATCGTCCAGATGGAATT	55	684
	R1 GACTATCAGTATTACTGATTATAT		
	F2 CAATAGTAAAGGAAGATGGTCA	55	
	R2 CGTCGCCTTGTTCATAATCTT		

1.5 测序及序列分析

将所有位点的第二轮阳性 PCR 产物样品编号记录,送往上海生工生物工程有限公司,使用 ABI 3730 XL DNA 自动分析仪(Applied Biosystems, USA)结合第二轮 PCR 的上游引物和下游引物进行双向测序。利用 Clustal X 1.83 软件,将测序获得的两条正反互补核苷酸序列进行比对校正,将校准序列使用 BLAST 进行相似性分析,基于每个位点的核心重复序列的变异进行基因分型分析,最终根据所有位点的基因型进行多位点基因分型研究。

2 结果

2.1 基于小卫星、微卫星位点巢式 PCR 扩增

在对 122 份毕氏肠微孢子虫阳性样品进行小卫星、微卫星位点巢式 PCR 扩增后发现,在 MS1 位点共检出有 34 个阳性样品,MS4 位点共检出 22 个阳性样品,MS7 位点共检出 62 个阳性样品(表 2),但

所有样品在 MS3 位点均没有得到有效扩增,未获得目的条带。在 MS1、MS4、MS7 三个位点同时得到扩增的样品共有 9 份。对比笔者所在课题组基于 ITS 位点鉴定的基因型^[1]发现,在 56 份新鉴定出的基因型 SX1 样品中,75%(42 份)在 MS7 位点成功扩增,在 MS4 位点检出 9 份,在 MS1 位点检出 5 份,同时在以上三个位点成功扩增的有 2 份样品。在基因型 BEB6 样品中,仅有 1 份在三个位点均成功扩增。在基因型为 CHG1 的样品中,有 2 份在三个位点均成功扩增。在基因型为 CHG2 的样品中,有 4 份在三个位点均成功扩增。

2.2 MLST 分析结果

本研究共获得的 122 份 ITS 位点阳性毕氏肠微孢子虫分离株分别在 MS1、MS4 和 MS7 位点的扩增效率依次为 27.9%(34/122)、18.0%(22/122)、50.8%(62/122)。核苷酸序列分析表明,分别在 MS1、MS4 和 MS7 位点出现了 16、9 和 18 个核

表 2 基于 MS1、MS3、MS4 和 MS7 位点的多位点基因分型结果

Table 2 MLST results based on loci MS1, MS3, MS4 和 MS7

基因型* Genotype*	宿主 Host	分离株数量 Number of isolate	各位点基因型数量 Number of each gene locus			
			MS1	MS3	MS4	MS7
BEB6	奶山羊 Dairy goats	6	3	0	2	1
CHG1	绒山羊 Cashmere goats	7	5	0	0	5
	奶山羊 Dairy goats	35	8	0	5	2
CHG2	奶山羊 Dairy goats	2	0	0	2	0
	黑山羊 Black goats	16	13	0	4	12
SX1	绒山羊 Cashmere goats	43	0	0	7	40
	奶山羊 Dairy goats	13	5	0	2	2
总计 Total		122	34	0	22	62

* . 基于 *ITS* 位点鉴定的基因型* . Genotype based on *ITS* site

昔酸变异单倍型,形成了 16、9 和 18 个基因型,共形成了 14 个 MLGs(表 3)。其中,50 份绒山羊阳性样品在三个位点的扩增效率分别为 10.0%(5/50)、14.0%(7/50)和 90.0%(45/50),分别具有 3、3 和 10 个基因型,共形成了 5 个 MLGs;56 份奶山羊阳

性样品的扩增效率依次为 28.6%(16/56)、19.6%(11/56)和 8.9%(5/56),分别组成 4、4、1 个基因型,共组成 7 个不同的 MLGs;黑山羊阳性样品的扩增效率依次为 81.3%(13/16)、25.0%(4/16)、75.0%(12/16),分别具有 9、2、7 个基因型,构成 2 个 MLGs。

表 3 毕氏肠微孢子虫分离株 MLST 分型

Table 3 MLST types of *E. bieneusi* isolates

分离株 Isolate	宿主 Host	<i>ITS</i> 基因型 <i>ITS</i> genotype	MS1	MS4	MS7	MLGs
A16	绒山羊 Cashmere goats	CHG1	Type I	Type I	Type I	MLG1
A55	绒山羊 Cashmere goats	CHG1	Type III	Type II	Type III	MLG2
A28	绒山羊 Cashmere goats	SX1	Type II	Type IV	Type II	MLG3
B47	绒山羊 Cashmere goats	SX1	Type I	Type I	Type I	MLG1
D3	绒山羊 Cashmere goats	SX1	Type IV	Type II	Type V	MLG4
G10	绒山羊 Cashmere goats	SX1	Type III	Type I	Type II	MLG5
F1	奶山羊 Dairy goats	BEB6	Type V	Type I	Type III	MLG6
F5	奶山羊 Dairy goats	BEB6	Type I	Type I	Type I	MLG1
F17	奶山羊 Dairy goats	BEB6	Type VI	Type II	Type I	MLG7
P22	奶山羊 Dairy goats	CHG1	Type IV	Type I	Type II	MLG8
F49	奶山羊 Dairy goats	CHG2	Type III	Type I	Type II	MLG5
F58	奶山羊 Dairy goats	CHG2	Type I	Type I	Type II	MLG9
P52	奶山羊 Dairy goats	SX1	Type I	Type V	Type I	MLG10
P54	奶山羊 Dairy goats	SX1	Type III	Type II	Type II	MLG11
P63	奶山羊 Dairy goats	SX1	Type II	Type II	Type II	MLG12
R2	黑山羊 Black goats	CHG2	Type II	Type II	Type III	MLG13
R9	黑山羊 Black goats	CHG2	Type I	Type II	Type III	MLG14

3 讨论

毕氏肠微孢子虫作为一种重要的人兽共患病原,具有复杂的遗传多样性。早期检测毕氏肠微孢子虫的方法有吉姆萨染色法、革兰染色法、韦伯 Chromotrope 染色法、电子显微镜观察、免疫学方法等^[8,18-19]。染色法虽操作简单,但要求检查人员有较丰富的经验,且无法鉴定微孢子虫的具体基因型;利用电子显微镜检查成本高,操作繁琐,应用于水样或粪样的研究时具有一定局限性;而免疫学方法虽特异性高、灵敏度高,但在应用于水样中微孢子虫的检查时表现出一定的局限性^[20]。近年来,基于 *ITS* 位点的分子生物学方法以其高特异性、高敏感性的特点,不仅作为毕氏肠微孢子虫的检测标记,还可准确鉴定毕氏肠微孢子虫的基因型^[21]。目前鉴定的毕氏肠微孢子虫 *ITS* 基因型已超过 200 个,其中一些具有宿主特异性,只存在于单一宿主,有些基因型可感染包括人在内的两种或多种宿主^[15,22-23],但由于以前对基因型的命名方法和规则不够规范,具有相同的 *ITS* 序列的基因型在不同的研究中被不同作者赋予了不同名称(如基因型 Type IV 也被命名为 K、BEB5、BEB-var、MITS1、PtEBIII、peru2)。为了规范基因型名称, M. Santin 等^[16] 列述了当时的所有已报道的毕氏肠微孢子虫基因型,并讨论和统一规定了今后对毕氏微孢子虫的命名规则,为鉴定毕氏肠微孢子虫基因型提供了标准。

然而,*ITS* 无法明确 *E. bienersi* 各基因型的来源、传播途径等,新发现的基因型多数情况下只能证明对此宿主易感,其基因型分布、感染力强弱是否存在地域性特点、是否存在亚群体遗传等方面仍难以明确,故仅依靠 *ITS* 单一位点判定某基因型是否具有人兽共患性仍只能靠搜集同一基因型在不同宿主之间的感染病例数据来确认。为了能更加精确地分析毕氏肠微孢子虫的基因型和遗传特征,2011 年, Y. Y. Feng 等^[17] 根据 *E. bienersi* 基因组序列选取 3 个微卫星(MS1、MS3、MS7)和 1 个小卫星(MS4)位点开发了用于 *E. bienersi* 的 MLST 技术。MLST 最初被开发并应用于测定细菌的分型,通过应用巢式 PCR 扩增的手段来获取全基因组中多个位点的管家基因序列,以多个生物学标签的方式来更好地展示病原体的某些特性^[24]。通过应用 MLST 技术,可以发现不同来源的 *E. bienersi* 基因型存在明显的亚型分布和群体遗传规律^[25-27],并可

配合多种生物技术更准确地鉴定及研究毕氏肠微孢子虫的生物学特性。

本研究首次将 MLST 技术用于山羊的毕氏肠微孢子虫的多位点基因分型研究,所使用的 MLST 分型工具的各位点是通过分析毕氏肠微孢子虫人分离株 H348 全基因组测序结果筛选而确立的^[17], *ITS* 基因型鉴定显示其具有宿主适应特性,因而所建立的 MLST 位点在部分宿主特异性进化群体中可能不存在对应位点或表达量过低,这可能是本研究中出现的某些位点(如 MS3)即使多次扩增也未得到目的条带的原因,尽管 MS1、MS4 和 MS7 也因此不能得到 100% 扩增,但本研究中 MS1 和 MS7 位点的扩增效率较高,与前人研究报道相符^[2,28]。此外,本研究中 MS1、MS4、MS7 位点具有明显的核苷酸多态性(SNPs、碱基缺失和插入),可依次形成 16、9、18 个基因型。在 122 份阳性样品中,共有 9 份阳性分离株均在 MS1、MS4、MS7 位点 PCR 扩增成功,且同一 *ITS* 基因型出现多种 MLGs,表明山羊毕氏肠微孢子虫同一 *ITS* 基因型存在遗传多样性,MLST 能更详尽地反映陕西部分地区山羊感染 *E. bienersi* 基因型的复杂性,为山羊乃至其他动物及人微孢子虫病研究提供了基础资料。

4 结论

采用基于微卫星(MS1、MS3、MS7)和小卫星(MS4)位点的多位点序列分型技术首次对陕西省部分地区的不同用途山羊的 122 个毕氏肠微孢子虫分离株进行了多位点序列分型研究。结果显示,在 MS1、MS4 和 MS7 位点的扩增效率依次为 27.9%、18.0% 和 50.8%,而在 MS3 位点所有样品均未获得有效扩增。序列分析表明,所有样品的 MS1、MS4 和 MS7 位点分别具有 16、9 和 18 个基因型,共形成了 14 个 MLGs。其中,50 份绒山羊阳性样品三个位点扩增效率分别为 10.0%、14.0% 和 90.0%,分别具有 3、3 和 10 个基因型,共形成了 5 个 MLGs;56 份奶山羊阳性样品三个位点的扩增效率依次为 28.6%、19.6% 和 8.9%,分别组成 4、4、1 个基因型,共组成 7 个不同的 MLGs;16 份黑山羊阳性样品在三个位点的扩增效率依次为 81.3%、25.0% 和 75.0%,分别具有 9、2、7 个基因型,构成 2 个 MLGs。

参考文献(References):

[1] 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.
- [2] DENG L, LI W, ZHONG Z J, et al. Multi-locus genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in captive Asiatic black bears in southwestern China: high genetic diversity, broad host range, and zoonotic potential[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171772.
- [3] PRASERTBUN R, MORI H, PINTONG A R, et al. Zoonotic potential of *Enterocytozoon* genotypes in humans and pigs in Thailand [J]. *Vet Parasitol*, 2017, 233: 73-79.
- [4] YUE D M, MA J G, LI F C, et al. Occurrence of *Enterocytozoon bieneusi* in donkeys (*Equus asinus*) in China: a public health concern[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 565.
- [5] TEN HOVE R J, VAN LIESHOUT L, BEADSWORTH M B J, et al. Characterization of genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in immunosuppressed and immunocompetent patient groups[J]. *J Eukaryot Microbiol*, 2009, 56(4): 388-393.
- [6] LIGUORY O, SARFATI C, DEROUIN F, et al. Evidence of different *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in patients with and without human immunodeficiency virus infection[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(7): 2672-2674.
- [7] SADLER F, PEAKE N, BORROW R, et al. Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in AIDS patients from the north west of England[J]. *J Infect*, 2002, 44(1): 39-42.
- [8] SANTÍN M, FAYER R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals [J]. *Res Vet Sci*, 2011, 90(3): 363-371.
- [9] AKINBO F O, OKAKA C E, OMOREGIE R, et al. Molecular epidemiologic characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in HIV-infected persons in Benin City, Nigeria[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2012, 86(3): 441-445.
- [10] METGE S, VAN NHIEU J T, DAHMANE D, et al. A case of *Enterocytozoon bieneusi* infection in an HIV-negative renal transplant recipient [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000, 19(3): 221-223.
- [11] NKININ S W, ASONGANYI T, DIDIER E S, et al. Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(9): 2841-2846.
- [12] ZHANG X, WANG Z X, SU Y, et al. Identification and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in China [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(5): 2006-2008.
- [13] SAK B, BRADY D, PELIKÁNOVÁ M, et al. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(3): 1064-1070.
- [14] WIDMER G, AKIYOSHI D E. Host-specific segregation of ribosomal nucleotide sequence diversity in the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* [J]. *Infect Genet Evol*, 2010, 10(1): 122-128.
- [15] SHI K, LI M J, WANG X X, et al. Molecular survey of *Enterocytozoon bieneusi* in sheep and goats in China[J]. *Parasit Vectors*, 2016, 9: 23.
- [16] SANTÍN M, FAYER R. *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: A consensus [J]. *J Eukaryot Microbiol*, 2009, 56(1): 34-38.
- [17] FENG Y Y, LI N, DEAREN T, et al. Development of a multilocus sequence typing tool for high-resolution genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(14): 4822-4828.
- [18] NAGPAL A, PRITT B S, LORENZ E C, et al. Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient: Case report and review of the literature [J]. *Transpl Infect Dis*, 2013, 15(5): 526-532.
- [19] DENGJEL B, ZAHLER M, HERMANN S W, et al. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi* [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(12): 4495-4499.
- [20] LEE J H. Prevalence and molecular characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle in Korea[J]. *Parasitol Res*, 2007, 101(2): 391-396.
- [21] GHOSH K, WEISS L M. Molecular diagnostic tests for microsporidia [J]. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009, 2009: 926521.
- [22] BREITENMOSER A C, MATHIS A, BÜRGI E, et al. High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans[J]. *Parasitology*, 1999, 118(Pt 5): 447-453.
- [23] FAYER R, SANTIN-DURAN M. Epidemiology of microsporidia in human infections[M]//WEISS L M, BECNEL J J. Microsporidia: Pathogens of Opportunity. UK: John Wiley & Sons, Inc. Press, 2014: 135-164.
- [24] PÉREZ-LOSADA M, CABEZAS P, CASTRO-NALLAR E, et al. Pathogen typing in the genomics era;

- MLST and the future of molecular epidemiology[J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 16: 38-53.
- [25] KARIM M R, DONG H J, YU F C, et al. Genetic diversity in *Enterocytozoon bieneusi* isolates from dogs and cats in china: Host specificity and public health implications[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(9): 3297-3302.
- [26] KARIM M R, WANG R J, DONG H J, et al. Genetic polymorphism and zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi* from nonhuman primates in China [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(6): 1893-1898.
- [27] LI N, XIAO L H, WANG L, et al. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* by genotyping and subtyping parasites in wastewater[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6(9): e1809.
- [28] LI W, DENG L, YU X M, et al. Multilocus genotypes and broad host-range of *Enterocytozoon bieneusi* in captive wildlife at zoological gardens in China[J]. *Parasit Vectors*, 2016, 9: 395.

(编辑 白永平)