

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2026.01.001

## 实验用比格犬毕氏肠微孢子虫流行及分子特性分析

廖晓龙<sup>a,b</sup>, 桂立钦<sup>a,b</sup>, 巩容均<sup>a,b</sup>, 葛雪莉<sup>a,b</sup>, 李曼婷<sup>a,b</sup>, 马佳敏<sup>a,b</sup>, 李文超<sup>a\*</sup>

(安徽科技学院 a. 动物科学学院; b. 动物营养调控与健康安徽省重点实验室, 安徽 凤阳 233100)

**摘要:** [目的] 了解我国实验用比格犬毕氏肠微孢子虫流行及基因型分布情况。[方法] 2025年3—5月, 从北京、南通和连云港3地采集452份新鲜实验用比格犬粪便样本, 提取样本基因组DNA, 利用靶向毕氏肠微孢子虫核糖体内部转录间隔区(internal transcribed spacer, *ITS*)的巢式PCR对所有样品进行检测, 对阳性样本进行测序和分析。[结果] (1) 北京、南通和连云港3地实验用比格犬毕氏肠微孢子虫感染率分别为9.3% (14/150)、4.8% (4/84)、6.9% (15/218), 平均感染率为7.3% (33/452)。(2) 序列分析共鉴定出4种毕氏肠微孢子虫基因型, 包括1个已知基因型PtEb IX和3个新基因型(BGD-1、BGD-2、BGD-3), 其中PtEb IX是本研究中的优势基因型。(3) 进化树构建显示, 本研究所获序列均与犬特异基因型PtEb IX聚为一枝, 显示本研究所获基因型均属犬特异基因型。[结论] 我国实验用比格犬存在毕氏肠微孢子虫感染, 为保障实验动物的健康和科学研究的可靠性, 应高度重视实验用比格犬毕氏肠微孢子虫的防控。

**关键词:** 毕氏肠微孢子虫; 比格犬; *ITS*; 流行

中图分类号: S858.292 文献标志码: A 文章编号: 1673-1891(2026)01-0001-07

## Research on the Prevalence and Molecular Characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in Experimental Beagle Dogs

LIAO Xiaolong<sup>a,b</sup>, GUI Liqin<sup>a,b</sup>, GONG Rongjun<sup>a,b</sup>, GE Xueli<sup>a,b</sup>, LI Manting<sup>a,b</sup>,  
MA Jiamin<sup>a,b</sup>, LI Wenchao<sup>a\*</sup>

(a. College of Animal Science; b. Key Laboratory of Animal Nutritional Regulation and Health of Anhui Province, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, Anhui, China)

**Abstract:** [Objective] It is aimed to investigate the prevalence and genotype distribution of *Enterocytozoon bieneusi* in experimental Beagle dogs in China. [Method] A total of 452 fresh fecal samples of experimental Beagle dogs were collected from Beijing, Nantong and Lianyungang during March to May 2025. Genomic DNA was extracted from the samples, and all samples were detected by nested PCR targeting the internal transcribed spacer (*ITS*) of *E. bieneusi*. Positive samples were further sequenced and analyzed. [Result] (1) The infection rates of *E. bieneusi* in experimental Beagle dogs in Beijing, Nantong and Lianyungang were 9.3% (14/150), 4.8% (4/84) and 6.9% (15/218), respectively, with an average infection rate of 7.3% (33/452). (2) Sequence analysis identified four genotypes of *E. bieneusi*, including one known genotype PtEb IX and three novel genotypes (BGD-1, BGD-2, BGD-3), among which PtEb IX was the dominant genotype

收稿日期: 2025-07-22

基金项目: 安徽科技学院兽医学校级高峰学科项目(XK-XJGF002); 安徽科技学院校级稳定人才项目(dkwd201702)。

第一作者简介: 廖晓龙(1998—), 男, 安徽蒙城人, 硕士研究生, 主要研究方向为人畜共患原虫流行病学调查。E-mail: 2250855140@qq.com。

\*通信作者简介: 李文超(1979—), 男, 河南南阳人, 教授, 博士, 主要研究方向为人畜共患原虫流行病学调查。E-mail: liwen303@126.com。

in this study. (3) Phylogenetic tree analysis showed that all sequences obtained in this study were clustered with the dog-specific genotype PtEb IX, indicating that all genotypes identified in this study belonged to dog-specific genotypes. [Conclusion] *E. bieneusi* infection is confirmed in experimental Beagle dogs in China. To ensure the health of experimental animals and the reliability of scientific research, high attention should be paid to the prevention and control of *E. cytozoon bieneusi* in experimental Beagle dogs.

**Keywords:** *Enterocytozoon bieneusi*; Beagle dogs; ITS; prevalence

## 0 引言

微孢子虫是一类机会性的专性胞内真菌,能够感染包括人在内的哺乳动物、鸟类、两栖动物、爬行动物等宿主<sup>[1-2]</sup>。迄今,已鉴别了 200 多个微孢子虫属和近 1 500 个物种,其中至少 17 个微孢子虫虫种能感染人,尤其以毕氏肠微孢子虫(*Enterocytozoon bieneusi*)感染人最为常见,其感染症状多为急性或慢性腹泻、吸收不良和/或消瘦<sup>[3-4]</sup>。

传统上对毕氏肠微孢子虫的鉴定主要依据其孢子大小、孢子核特征等形态学特征,存在难以区分毕氏肠微孢子虫和其他微孢子虫虫种等缺陷,因此,目前聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)是诊断和鉴定毕氏肠微孢子虫最可靠的方法<sup>[5]</sup>。当前,基于核糖体内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)的扩增和测序技术已被广泛用于毕氏肠微孢子虫的鉴定和基因分型<sup>[6]</sup>。目前基于该方法已鉴定了 800 多个毕氏肠微孢子虫 ITS 基因型,这些基因型共形成了 13 个不同的群组(群组 1~群组 13),不同群组宿主特异性和人畜共患潜力存在显著差异<sup>[1,5,7-9]</sup>。其中,群组 1 和群组 2 包含大多数的人畜共患基因型,其余群组则显示出较强的宿主特异性特征<sup>[1]</sup>。

比格犬是国际公认的标准实验用犬,广泛应用于医学、生物学、病理学、肿瘤学等生命科学领域。随着我国生物医药产业的快速发展,对实验用比格犬的需求量明显增加,国内相关养殖发展迅速。在比格犬饲养过程中,寄生虫感染会导致其达不到各类实验动物标准的要求,进而不能销售或使用后影响科学研究结果的准确性,从而造成不必要的

损失。

自 1999 年瑞士首次报道犬可感染毕氏肠微孢子虫以来,目前全球已有至少 10 个国家有犬感染该虫的报道,但相关研究多集中在宠物犬、家养犬、农场犬、流浪犬等方面,迄今尚未见有实验动物用犬毕氏肠微孢子虫流行情况的相关报道<sup>[3-4,10]</sup>。此外,尽管我国国家标准《实验动物微生物、寄生虫学等级及监测》(GB 14922—2022)中对不同等级实验犬寄生虫检测项目做了强制规定,但此标准中没有涉及毕氏肠微孢子虫的检测<sup>[11]</sup>。鉴于此,本文拟对我国多地实验用比格犬开展毕氏肠微孢子虫调查和检测,以期为比格犬毕氏肠微孢子虫的防控、实验动物质量控制等提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、主要试剂及仪器

材料:比格犬粪便。2025 年 3—5 月,分别从北京、连云港和南通 3 地的实验用比格犬养殖场采集 452 份普通清洁级比格犬新鲜粪便样品,每份约 50 g,分别装入密封袋,标注采集地、年龄和编号后,置于 4 °C 冰箱待检。

主要试剂:E.Z.N.A®. Mag-Bind® Stool DNA Kit(Omega 公司), 2×EasyTaq® PCR SuperMix(北京全式金生物技术股份有限公司), DL 2000 DNA marker(TaKaRa 公司)。

主要仪器:T100 型梯度 PCR 仪(伯乐生命医学产品(上海)有限公司), Tanon 1600 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 粪便基因组DNA提取

比格犬粪便基因组DNA提取参照粪便DNA提取试剂盒说明书进行操作。

### 1.2.2 PCR扩增

基于毕氏肠微孢子虫 *ITS* 序列的巢式PCR参照 Sulaiman 等<sup>[12]</sup> 的方法进行, 引物(表1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR反应体系为25  $\mu$ L, 含12.5  $\mu$ L 2 $\times$ EasyTaq<sup>®</sup> PCR SuperMix, 上

下游引物(10  $\mu$ mol/L)各1  $\mu$ L, DNA模板1  $\mu$ L, 超纯水9.5  $\mu$ L, 其中第1轮PCR用提取的粪便基因组DNA做模板, 第2轮PCR用第1轮PCR产物做模板。2轮PCR扩增程序相同, 均为预变性94  $^{\circ}$ C, 5 min; 94  $^{\circ}$ C变性, 30 s; 57  $^{\circ}$ C退火, 30 s; 72  $^{\circ}$ C延伸, 40 s; 共35个循环; 72  $^{\circ}$ C, 10 min。同时用经鉴定含毕氏肠微孢子虫的宠物犬粪便基因组DNA提取物作为阳性对照, 用不含毕氏肠微孢子虫的宠物犬粪便基因组DNA提取物作为阴性对照。

表1 毕氏肠微孢子虫引物

序列	引物名称	引物序列 5'~3'	产物长度/bp
<i>ITS</i>	AL4037	GATGGTCATAGGGATGAAGAGCTT	410
	AL4039	AATACAGGATCACTTGGATCCGT	
	AL4038	AGGGATGAAGAGCTTCGGCTCTG	392
	AL4040	AATATCCCTAATACAGGATCACT	

### 1.2.3 测序与分析

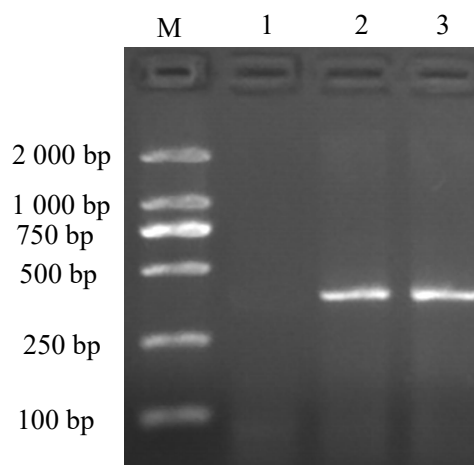
第2轮PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后, 切下符合预期大小的DNA条带, 送生工生物工程(上海)股份有限公司南京分公司进行双向测序, 所获序列经Dnaman v6.0.3.99编辑后, 在GenBank中经Blast搜索确定其是否是毕氏肠微孢子虫 *ITS* 序列并确定其基因型。下载部分匹配度较高的序列作参考序列, 利用Clustal X 1.81进行序列比对, 在Mega 5.05中, 以邻接法(Neighbor-Joining)构建进化树, 自展值(bootstrap)设为1 000, 用柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)的 *ITS* 序列(基因ID: AF026388)作进化树外群。

## 2 结果与分析

### 2.1 毕氏肠微孢子虫PCR扩增及序列分析

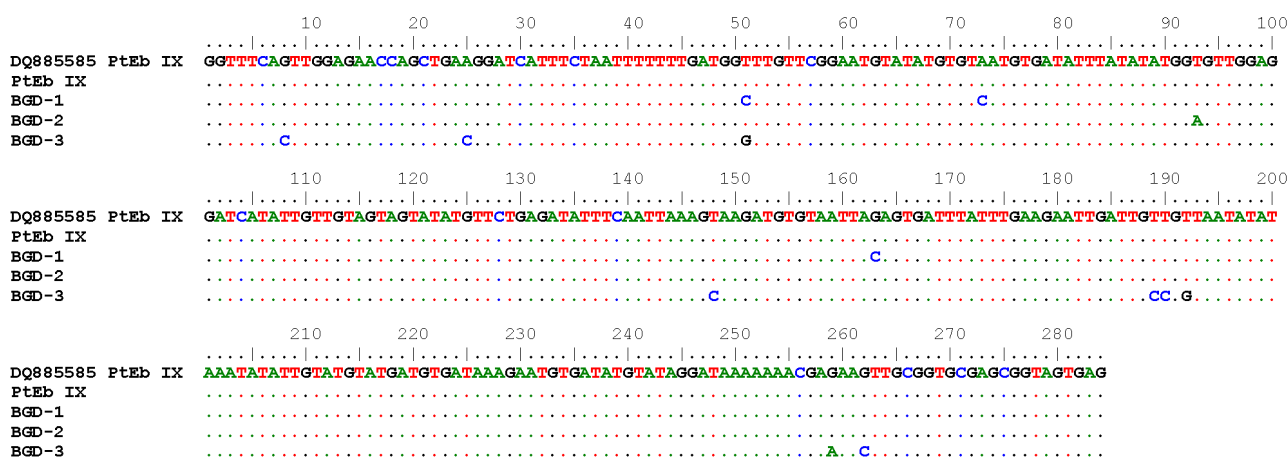
452份实验用比格犬粪便样品共扩增出33份毕氏肠微孢子虫阳性结果, 扩增产物大小约为390 bp(图1), 符合预期。共30个阳性样品测序成功, 序列经比对和Blast检索, 共鉴定出4种基因型, 包括1种已知基因型PtEb IX和3个新基因型(命名为BGD-

1、BGD-2、BGD-3), 本研究获得的已知基因型PtEb IX与已报道的犬特异基因型PtEb IX(基因ID: DQ885585)的参考序列同源性为100%, 3个新基因型与该参考序列分别有1~9个核苷酸的差异, 与其同源性分别为98.9%、99.7%和96.8%(图2)。将本研究获序列与参考序列构建进化树, 本研究获序列均与犬特异基因型PtEb IX聚为一枝, 显示本研究获基因型可能均属犬特异的基因型(图3)。



注: M为DNA标志物; 1为阴性对照, 2为阳性对照, 3为毕氏肠微孢子虫阳性样本。

图1 毕氏肠微孢子虫 *ITS* 序列PCR扩增



注:仅列出本研究所获基因型与参考基因型(基因型PtEb IX,基因ID为DQ885585)中不同的核苷酸;圆点表示不同序列中的相同核苷酸。

图2 毕氏肠微孢子虫 ITS 序列比对

### 2.2 实验用比格犬毕氏肠微孢子虫感染及基因型分布

本次调查北京、连云港和南通3地实验用比格犬毕氏肠微孢子虫感染率分别为9.3%(14/150), 4.8%(4/84)和6.9%(15/218),平均感染率为7.3%(33/452)(表2)。PtEb IX占测序成功样品的60.0%(18/30),是本研究中的优势基因型。从基因型分布看,PtEb IX基因型在3个地区均有分布,且均为3地的优势基因型;BGD-1仅分布于北京;BGD-2和BGD-3仅分布于南通。从基因型分布多样性看,南通检出3个基因型,北京检出2个基因型,连云港仅检出1个基因型。

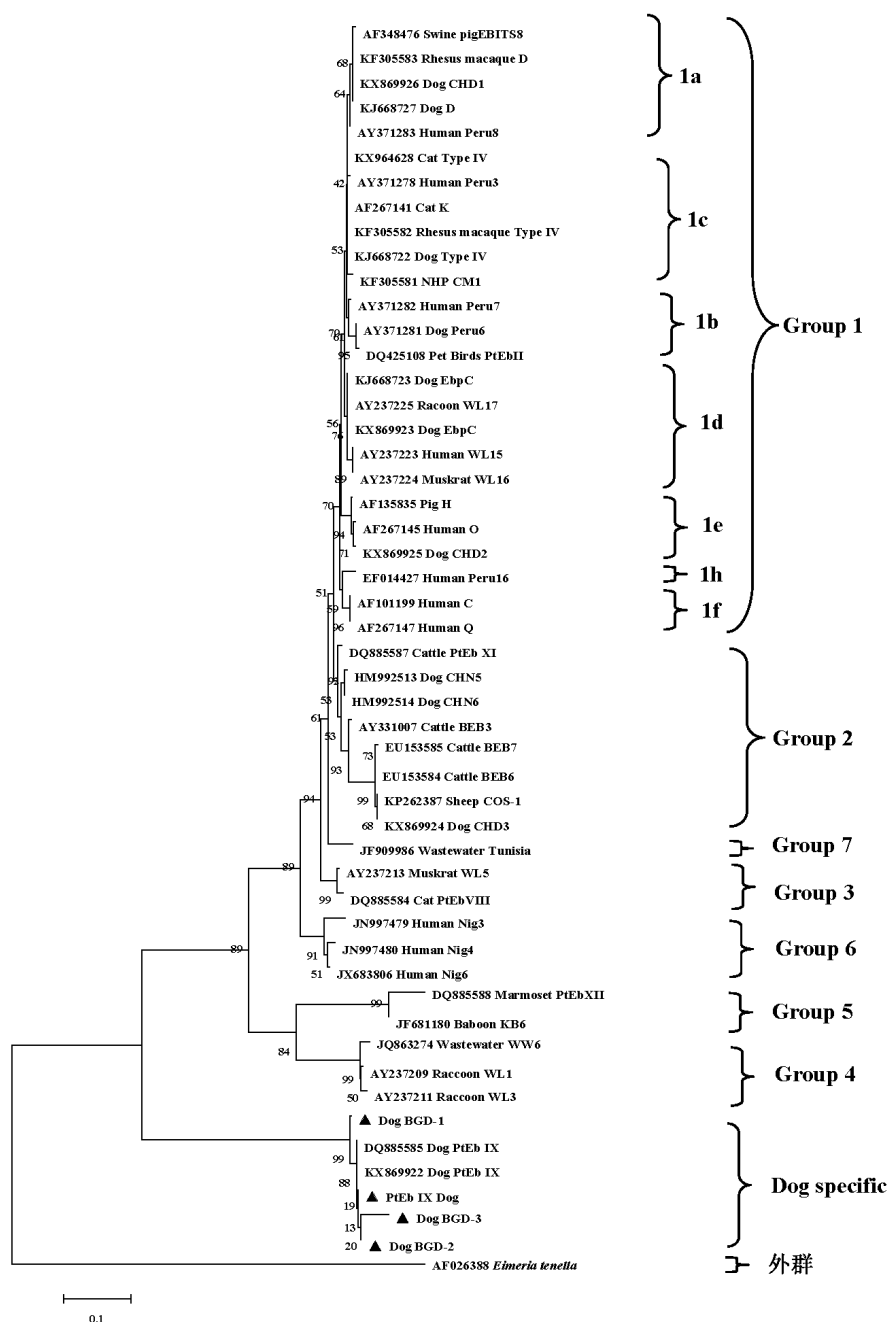
### 3 结论与讨论

目前有关犬感染毕氏肠微孢子虫的研究<sup>[10]</sup>显示,全球犬毕氏肠微孢子虫平均感染率为10.9%(585/5 363),其中流浪犬为3.2%~17.9%,宠物犬为

0.8%~9.6%,家养犬为3.3%~8.6%,农场犬为8.3%。本研究中,实验用比格犬毕氏肠微孢子虫平均感染率为7.3%(33/452),这一结果低于全球犬毕氏肠微孢子虫平均感染率(10.9%)<sup>[10]</sup>。与宠物犬相比,这一结果低于国内广州(17.9%,90/502)<sup>[13]</sup>、黑龙江(7.7%,2/26)<sup>[14]</sup>、云南(8.0%,21/262)<sup>[15]</sup>等地宠物犬毕氏肠微孢子虫感染率,高于日本(5.0%,1/20;4.4%,26/597)<sup>[16-17]</sup>及国内黑龙江(7.2%,18/249)<sup>[18]</sup>、上海(5.9%,19/322)<sup>[19]</sup>、新疆(6.3%,38/604)<sup>[4]</sup>、云南(4.9%,29/589)<sup>[10]</sup>等地宠物犬毕氏肠微孢子虫感染率。与流浪犬相比,本研究结果仅高于日本(1.7%,1/59)<sup>[16]</sup>和伊朗(5.3%,4/75)<sup>[20]</sup>流浪犬毕氏肠微孢子虫感染率,低于哥伦比亚(15.0%,18/120)<sup>[21]</sup>和国内广州(39.6%,59/149)<sup>[13]</sup>、上海(8.8%,24/272)<sup>[22]</sup>和四川(18.8%,136/724)<sup>[23]</sup>等地流浪犬毕氏肠微孢子虫感染率。与家养犬相比,本研究结果高于澳大利亚(4.4%,15/342)<sup>[24]</sup>、波兰(4.9%,4/82)<sup>[25]</sup>、西班牙

表2 比格犬毕氏肠微孢子虫感染情况

采样地点	样品数	阳性数	阳性率/%	基因型(数量)
北京	150	14	9.3	BGD-1(4), PtEb IX(7)
连云港	84	4	4.8	PtEb IX(4)
南通	218	15	6.9	PtEb IX(7), BGD-2(5), BGD-3(3)
总计	452	33		



注: ▲为本研究所获毕氏肠微孢子虫 ITS 序列。

图 3 基于毕氏肠微孢子虫 ITS 序列构建的进化树(NJ 法)

(0.8%, 2/237)<sup>[26]</sup>家养犬毕氏肠微孢子虫感染率,但低于西班牙(9.6%, 7/73)<sup>[27]</sup>、上海(7.8%, 8/102)<sup>[19]</sup>等地家养犬毕氏肠微孢子虫感染率。同时,本研究结果也高于国内上海门诊犬(3.3%, 2/61)<sup>[19]</sup>,但低于华东地区门诊犬(8.6%, 27/315)<sup>[28]</sup>及瑞典农场犬(8.3%, 3/36)<sup>[29]</sup>毕氏肠微孢子虫感染率。不同研究中犬毕氏肠微孢子虫感染率的差异可能与采样动物来源地区、

采食地点、饲养方式、年龄分布、样本量、动物健康状况、饲养管理、种群密度和其他未确定的因素有关<sup>[4]</sup>。

目前,已有文献<sup>[10]</sup>显示,犬可感染 50 多种毕氏肠微孢子虫 ITS 基因型,其中大多数属人畜共患的群组 1,部分属群组 2,也有一些属犬特异性的群组 11。上述犬群中鉴定的 50 多个基因型中,14 个基因型已在人群中发现,因此在犬和人之间可能存在毕

氏肠微孢子虫的人兽共患传播<sup>[10]</sup>。本研究中,在测序成功的 30 个阳性样本中,共鉴定出 4 种 *ITS* 基因型,包括 1 种已知基因型 PtEb IX 和 3 个新基因型。基因型 PtEb IX 是本研究中的优势基因型,这一结果与目前的大多数报道结果一致<sup>[4,10]</sup>。该基因型呈全球分布,主要见于犬,在中国和澳大利亚的猫及西班牙的野生獾类动物也有发现<sup>[7,14,30]</sup>,该基因型被认为是一种适应犬类宿主的基因型<sup>[1]</sup>。本研究中发现的 3 个新基因型,其与 PtEb IX 间有 1~9 个核苷酸的

差异,但进化树构建显示,这些基因型与 PtEb IX 均聚在一起,表明这些基因型可能与 PtEb IX 一样,属于犬特异的基因型,其人畜共患潜力可能有限。

综上,本研究结果显示,我国多地实验用比格犬群中存在毕氏肠微孢子虫流行,尽管所鉴定出的基因型均为犬特异的基因型,其人畜共患潜力有限,但为提高实验用比格犬的质量和保证科研结果的准确,需高度重视实验用比格犬群中毕氏肠微孢子虫的防控问题。

#### 参考文献:

- [1] LI W, FENG Y, SANTIN M. Host specificity of *Enterocytozoon bieneusi* and public health implications[J]. Trends in Parasitology, 2019, 35(6):436-451.
- [2] STENTIFORD G D, BECNEL J J, WEISS L M, et al. Microsporidia-emergent pathogens in the global food chain[J]. Trends in Parasitology, 2016, 32(8):657.
- [3] LIU H, XU J, SHEN Y J, et al. Genotyping and zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi* in stray dogs sheltered from Shanghai, China[J]. Animals (Basel), 2021, 11(12):3571.
- [4] CAO Y W N, TONG Q L, ZHAO C H, et al. Molecular detection and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in pet dogs in Xinjiang, Northwestern China[J]. Parasite, 2021, 28:57.
- [5] LI W, FENG Y, XIAO L H. Diagnosis and molecular typing of *Enterocytozoon bieneusi*: the significant role of domestic animals in transmission of human microsporidiosis[J]. Research in Veterinary Science, 2020, 133:251-261.
- [6] SANTÍN M, FAYER R. *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2009, 56(1):34-38.
- [7] 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]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(9):3297-3302.
- [8] CHEN M H, WANG H D, LI X M, et al. Molecular epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* from foxes and raccoon dogs in the Henan and Hebei provinces in China[J]. BMC Veterinary Research, 2024, 20(1):53.
- [9] KOEHLER A V, ZHANG Y, GASSER R B. A perspective on the molecular identification, classification, and epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* of animals[J]. Experientia Supplementum, 2022, 114:389-415.
- [10] JIAN J H, ZI J R, WANG Y X, et al. Occurrence and genetic characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in pet dogs in Yunnan Province, China[J]. Parasite, 2024, 31:27.
- [11] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测: GB 14922—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [12] SULAIMAN I M, FAYER R, LAL A A, et al. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8):4495-4501.
- [13] WANG H Y, LIN X H, SUN Y H, et al. Occurrence, risk factors and genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in dogs and cats in Guangzhou, southern China: high genotype diversity and zoonotic concern[J]. BMC Veterinary Research, 2020, 16(1):201.

- [14] ZHANG X, WANG Z X, SU Y, et al. Identification and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in China[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(5):2006–2008.
- [15] WANG Y G, ZOU Y, YU Z Z, et al. Molecular investigation of zoonotic intestinal protozoa in pet dogs and cats in Yunnan Province, Southwestern China[J]. Pathogens, 2021, 10(9):1107.
- [16] ABE N, KIMATA I, ISEKI M. Molecular evidence of *Enterocytozoon bieneusi* in Japan[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2009, 71(2):217–219.
- [17] PHROMPRAPHAI T, ITOH N, IJIMA Y, et al. Molecular detection and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in family pet dogs obtained from different routes in Japan[J]. Parasitology International, 2019, 70:86–88.
- [18] LI W, LI Y J, SONG M X, et al. Prevalence and genetic characteristics of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in cats and dogs in Heilongjiang province, China[J]. Veterinary Parasitology, 2015, 208(3–4):125–134.
- [19] XU H L, JIN Y, WU W X, et al. Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China[J]. Parasites & Vectors, 2016, 9:121.
- [20] DELROBAEI M, JAMSHIDI S, SHAYAN P. Molecular detection and genotyping of intestinal microsporidia from stray dogs in Iran[J]. Iranian Journal of Parasitology, 2019, 14(1):159–166.
- [21] SANTÍN M, VECINO J A C, FAYER R. *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in dogs in Bogota, Colombia[J]. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2008, 79(2):215–217.
- [22] LIU H, XU J, SHEN Y J, et al. Genotyping and zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi* in stray dogs sheltered from Shanghai, China[J]. Animals, 2021, 11(12):3571.
- [23] ZHONG Y L, ZHOU Z Y, DENG L, et al. Prevalence and new genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in sheltered dogs and cats in Sichuan province, southwestern China[J]. Parasite, 2021, 28:31.
- [24] ZHANG Y, KOEHLER A V, WANG T, et al. *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in cats and dogs in Victoria, Australia[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1):183.
- [25] PIEKARSKA J, KICIA M, WESOŁOWSKA M, et al. Zoonotic microsporidia in dogs and cats in Poland[J]. Veterinary Parasitology, 2017, 246:108–111.
- [26] DASHTI A, SANTÍN M, CANO L, et al. Occurrence and genetic diversity of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) in owned and sheltered dogs and cats in Northern Spain[J]. Parasitology Research, 2019, 118(10):2979–2987.
- [27] GALVÁN-DÍAZ A L, MAGNET A, FENOY S, et al. Microsporidia detection and genotyping study of human pathogenic *E. bieneusi* in animals from Spain[J]. PLoS One, 2014, 9(3):e92289.
- [28] LI W C, QIN J, WANG K, et al. Genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in dogs and cats in Eastern China[J]. Iranian Journal of Parasitology, 2018, 13(3):457–465.
- [29] MATHIS A, BREITENMOSER A C, DEPLAZES P. Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat[J]. Parasite, 1999, 6(2):189–193.
- [30] SANTÍN M, CALERO-BERNAL R, CARMENA D, et al. Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in wild carnivores in Spain[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2018, 65(4):468–474.