Original Article

Molecular characterization of zoonotic isolates of *Enterocytozoon bieneusi* in Iran

Pirestani M[1], Sadraei J[1*], Forouzandeh M[2]

1- Deptartment of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, I. R. Iran.
2- Deptartment of Biotechnology, Faculty of Medicine Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, I. R. Iran.

Received September 5, 2011; Accepted November 13, 2011

Abstract:

Background: Microsporidia infections occur in all invertebrate and vertebrate hosts. The most common microsporidia infecting humans and animals are *Enterocytozoon bieneusi*. This study aimed to characterize the zoonotic isolates of *E. bieneusi* using a molecular method among the slaughtered cattle in Tehran.

Materials and Methods: In this descriptive study, 126 fecal samples from slaughtered cattle in Tehran were analyzed for *Enterocytozoon bieneusi*. A transcribed spacer region (500 bp) for rRNA gene of *E. bieneusi* was amplified using a nested PCR technique. For genotyping, positive samples were sequenced and the phylogenetic tree was reconstructed to determine the relationship between the isolates from human, animal and zoonotic isolates.

Results: Nineteen out of 126 *E. bieneusi* PCR-positive samples were sequenced. A high degree of genetic polymorphism, represented by four genotypes (IREb4, IREb5, D, M), was found among the *E. bieneusi* isolated from cattle. In this study, the most common genotypes were D (38.6%), M and IREb4 (26.3%), respectively followed by IREb5 (10.5%) in the next stage. In phylogenetic analysis, 89.5 percent of the isolates (D ،IREb4 و IREB5) formed a distinct cluster consisting of genotypes from humans and other domestic animals, but one genotype clustered as E. bieneusi genotypes taken from cattle and pig.

Conclusion: Only some *E. bieneusi* isolates taken from cattle may be of public health importance. However, further studies should be conducted on cattle and other hosts to determine the role of animals in the transmission of infection to human.

Keywords: *Enterocytozoon bieneusi*, Ribosomal RNA, Genotype, Zoonoses, Phylogenetic tree

*** Corresponding Author.**
Email: sadraeij@modares.ac.ir
Tel: 0098 912 501 6254
Fax: 0098 21 828 83841

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences March, 2012; Vol. 16, No 1, Pages 51-57

Please cite this article as: Pirestani M, Sadraei J, Forouzandeh M. Molecular characterization of zoonotic isolates of *Enterocytozoon bieneusi* in Iran. ***Feyz*** 2012; 16(1): 51-7.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

شناسایی مولکولی ایزوله‌های زئونوز *انتروسایتوزون بیئوسی* در ایران

مجید پیرستانی [۱]، جاوید صدرایی [۲*]، مهدی فروزنده [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: عفونت‌های میکروسپوریدیایی در تمام میزبانان مهره‌دار و بی‌مهره رخ می‌دهد. شایع‌ترین میکروسپوریدیای آلوده کننده انسان و حیوانات *انتروسایتوزون بیئوسی* است. هدف از این مطالعه شناسایی ایزوله‌های زئونوز *انتروسایتوزون بیئوسی* در گاوهای کشتار شده تهران به‌روش مولکولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی ۱۲۶ نمونه مدفوع از گاوهای کشتار شده تهران جهت وجود *انتروسایتوزون بیئوسی* بررسی شدند. یک قطعه ۵۰۰ جفت بازی ژن RNA ریبوزومی شامل ناحیه ITS *انتروسایتوزون بیئوسی* با استفاده از تکنیک nested-PCR تکثیر یافت. جهت تعیین ژنوتیپ، نمونه‌ها تعیین توالی شده و برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی ایزوله‌های این مطالعه با ایزوله‌های انسانی، حیوانی و زئونوتیک، درخت فیلوژنی رسم شد.

نتایج: از ۱۲۶ نمونه، ۱۹ نمونه (۱۵/۱ درصد) از نظر PCR مثبت و تعیین توالی شد. توالی‌ها دارای درجه بالایی از پلی‌مورفیسم ژنتیکی بوده و در ٤ ژنوتیپ IREb4، IREb5، D و M قرار داشتند. ژنوتیپ D با ۳۶/۸ درصد شایع‌ترین ژنوتیپ، M و IREb4 هریک با ۲۶/۳ درصد و IREb5 با ۱۰/۵ درصد در جایگاه بعدی قرار گرفتند. در آنالیز فیلوژنتیک، ۸۹/۵ درصد ژنوتیپ‌های شناسایی شده (D، IREb4 و IREB5) تشکیل شاخه‌ای مجزا را داده و در زمره ژنوتیپ‌های جدا شده از انسان و حیوانات اهلی قرار گرفته، ولیکن یک ژنوتیپ (M) در زمره ژنوتیپ‌های جدا شده از گاو و خوک در یک شاخه قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: تنها برخی از ایزوله‌های گاوی (ژنوتیپ D) *انتروسایتوزون بیئوسی* زئونوز بوده و دارای اهمیت بهداشتی هستند. با این-وجود بایستی بررسی‌های بیش‌تری روی گاو و میزبانان دیگر صورت پذیرفته تا نقش حیوانات در انتقال این عفونت به انسان مشخص شود.

واژگان کلیدی: *انتروسایتوزون بیئوسی*، RNA ریبوزومی، ژنوتیپ، زئونوز، درخت فیلوژنتیک

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۱، صفحات ۵۷-۵۱

مقدمه

میکروسپوریدیا عوامل بیماری‌زای نوظهور حیوانات و انسان‌ها هستند. تا به‌حال ١٤ گونه میکروسپوریدیایی آلوده کننده انسان شناسایی شده است. برای اولین بار در سال ۱۹۸۵، *انتروسایتوزون بیئوسی* در یک بیمار HIV مثبت به‌عنوان یک عامل شایع اسهال مزمن توصیف شد. در سال‌های اخیر این عامل در افراد HIV منفی، حیوانات اهلی و وحشی نیز جدا شده است [۱]. شیوع این عفونت در افراد دارای نقص ایمنی اکتسابی بین ۵۰-۲۰ درصد از کشورهای مختلف گزارش شده است.

[۱] دکترای انگل شناسی، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۲] دانشیار، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۳] دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

***نشانی نویسنده مسئول:**

دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی و حشره شناسی

تلفن: ۰۹۱۲ ۵۰۱۶۲۵۴ **دورنویس:** ۰۲۱ ۸۲۸۸۳۸۴۱

پست الکترونیک: sadraeij@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱۴ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۰/۸/۲۲

هم‌چنین، میزان شیوع در حیوانات نیز متفاوت بوده و از ۷۵-۳۰ درصد گزارش وجود دارد [۲]. در ایران به‌علت در دسترس نبودن اطلاعات، میزان شیوع این انگل در انسان و حیوانات مشخص نمی‌باشد. این عفونت به‌علت نبودن درمان مناسب در بیماران دارای نقص ایمنی می‌تواند عواقب مرگباری داشته باشد [۲]. باوجود اینکه منابع عفونت انسانی به این ارگانیسم و روش انتقال آنها به‌طور مستقیم مشخص نشده است، لیکن شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد انتقال از طریق منابع حیوانی به انسان امکان پذیر است [٤،۳]. براساس قابلیت دسترسی به توالی‌ها و وجود مناطق محافظت شده در ژن‌های RNA ریبوزومی روش‌های تشخیصی بر پایه PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده از این ژن به‌کار رفته است. با استفاده از پرایمرهای محافظت شده به لحاظ فیلوژنتیکی در تکثیر زیر واحد کوچک (SSU) و بزرگ (LSU) RNA ریبوزومی و ناحیه جدا کننده بین ژنی (IGS یا ITS)، امکان تعیین توالی قسمتی از RNA ریبوزومی میکروسپوریدیاهای ناشناخته در نمونه‌های بالینی فراهم می‌آید. براساس ناحیه ITS ژن RNA ریبوزومی، بیش از ۹۰ ژنوتیپ از این ارگانیسم گزارش شده است. براساس جدا شدن این ژنوتیپ‌ها از میزبانان مختلف، ۳

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

گروه مختلف برای این ارگانیسم تعریف شده است: ۱- گروه جدا شده از انسان؛ ۲- گروه جدا شده از حیوانات و ۳- گروه زئونوز [۵]. توالی ITS یک ژنوتیپ انسانی (ژنوتیپ D)، با برخی از ایزوله‌های *انتروسایتوزون بیئوسی* میمون، خوک (ژنوتیپ PigEBITS9) و برخی از حیوانات وحشی نظیر خرس، موسکارت، راکون و روباه یکسان می‌باشد [۳]. به‌طور مشابه، ژنوتیپ دیگری از انسان (ژنوتیپ IV) توالی یکسانی با ژنوتیپ جدا شده از گربه دارد (ژنوتیپ K) [٦]. تمام ایزوله‌های *انتروسایتوزون بیئوسی* یافت شده در خوک به‌طور ژنتیکی وابسته به ژنوتیپ‌های انسانی هستند [٤]. در آلمان از ۸۸ گاو بررسی شده تنها ۸ ایزوله *انتروسایتوزون بیئوسی* شناسایی شد که این ایزوله‌ها در میان ۵ ژنوتیپ قرار می‌گرفتند که از نظر فیلوژنتیکی به ژنوتیپ‌های جدا شده از انسان و حیوانات اهلی وابسته می‌باشد. این تحقیق نشان داد که *انتروسایتوزون بیئوسی* جدا شده از گاو می‌تواند عامل بیماری‌زای زئونوز باشد [۷]. مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اهمیت بهداشتی *انتروسایتوزون بیئوسی* گاوی با شناسایی توالی ITS ژن RNA ریبوزومی می‌پردازد. در ایران هیچ مطالعه‌ای بر روی شناسایی *انتروسایتوزون بیئوسی* در گاو انجام نشده است تا بتوان نقش این میزبان را در انتقال عفونت به انسان و اهمیت بهداشتی ایزوله‌های گاوی این ارگانیسم در ایران مشخص نمود. از این‌رو با توجه به اهمیت این ارگانیسم در بروز عوارض بالینی در میزبانان خود و تفاوت‌های ژنتیکی این ارگانیسم، برای اولین بار اقدام به شناسایی مولکولی *انتروسایتوزون بیئوسی* و ایزوله‌های قابل انتقال به انسان در مدفوع گاوهای کشتار شده تهران طی سال ۱۳۸۹ نمودیم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه توصیفی ۱۲٦ نمونه مدفوع از گاوهای کشتار شده در کشتارگاه میثم رباط کریم به‌طور تصادفی جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری، نمونه‌ها در محلول تثبیت کننده دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد قرار گرفت و به آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافت. در مرحله بعد نمونه‌ها با ۲ لایه گاز صاف شده و تا زمان استخراج DNA در محلول دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج DNA: در این مطالعه از ترکیب دو روش هضم قلیایی و کیت استخراج DNA از مدفوع شرکت QIAGEN استفاده شد. بدین منظور ۲۰۰ µl از نمونه مدفوع را برداشته و به‌منظور حذف دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد سه مرتبه با PBS در دور ۱٤۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه شستشو و حجم محلول با PBS به ۲۰۰ µl رسانده شد. برای هضم قلیایی ۱۸/٦µl DDT (۱M) و ٦٦/٦µl KOH (۱M) اضافه شده و در دمای ٥٦ درجه به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. محلول هضم شده با ۸/٦ µl HCl (۲۵ درصد) خنثی گردیده و بلافاصله با ۱٦۰ µl Tris-HCl (PH=۸/۳، ۲M) بافری شد. ۵۰۰ µl فنل-کلروفرم- ایزو آمیل الکل به نسبت (۲۵:۲٤:۱) اضافه شده و در دور ۵۰۰ g به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گشته و مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل گردید. از این مرحله به بعد طبق دستورالعمل کیت (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA) عمل شده و DNA استخراج شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

شناسایی مولکولی: در این مرحله از پرایمر اختصاصی طراحی شده توسط Katzwinkel-Wladarsch و همکارانش استفاده شد [۸]. این پرایمر برای ناحیه خاصی از ژن ریبوزومی شامل زیر واحد کوچک ریبوزومی (SSU)، ناحیه ITS و زیرواحد بزرگ ریبوزومی (LSU) طراحی شده که در شناسایی و تعیین ژنوتیپ *انتروسایتوزون بیئوسی* قابل استفاده می‌باشد. تکنیک مولکولی استفاده شده در این مطالعه nested-PCR می‌باشد. پرایمرهای واکنش اول عبارتند از: MSP-1: TGA ATG KGT CCC TGT و MSP-2B: GTT CAT TCG CAC TAC T و واکنش دوم MSP-3: GGA ATT CAC ACC GCC CGT CRY TAT، و MSP-4B: CCA AGC TTA TGC TTA AGT CCA GGG AG. با استفاده از پرایمرهای فوق یک قطعه حدود ۵۰۰ bp تکثیر می‌یابد. در این مطالعه از AccuPowerTM PCR PreMix شرکت BioNEER به‌عنوان مواد تشکیل دهنده واکنش PCR استفاده شد که آنزیم موجود در آن از نوع hot-start می‌باشد. در PCR اول به مواد تشکیل دهنده PCR تنها DNA استخراج شده از مدفوع، پرایمرهای MSP-1 و MSP-2B به‌میزان ۲ نانومول اضافه شده و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. در مرحله PCR دوم از محصول PCR اول به‌میزان ۲ میکرولیتر و پرایمرهای MSP-3 و MSP-4B به‌میزان ۲ نانومول استفاده و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه انجام واکنش اول و دوم بدین صورت بود که: مرحله واسرشت ابتدایی ۹۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت ۹۵ درجه به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها ۵۵ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن زنجیره ۷۲ درجه به‌مدت ٤۵ ثانیه، که این ۳ مرحله به تعداد ٤۵ سیکل و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه انجام گرفت. محصول PCR دوم بر روی ژل ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

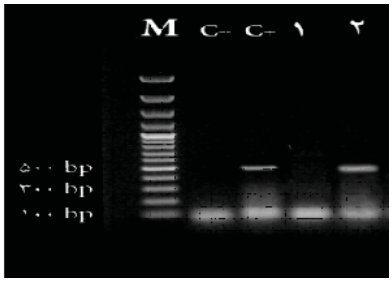
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

تعیین ژنوتیپ: تعیین ژنوتیپ *انتروسایتوزون بیئوسی* براساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS ژن RNA ریبوزومی صورت گرفت [۵]. برای این منظور تمامی نمونه‌های مثبت از لحاظ مولکولی به‌صورت دو طرفه تعیین توالی شده و با استفاده از نرم افزارهای Sequencher توالی‌ها بررسی شده و با توالی‌های استاندارد ثبت شده در بانک ژن مقایسه و ژنوتیپ آنها مشخص گردید.

ترسیم درخت فیلوژنی: در ابتدا برای هم‌ترازی چندگانه توالی‌های مورد نظر با استفاده از نرم افزار MEGA4 مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از ایزوله‌های *انتروسایتوزون بیئوسی* حیوانی، انسانی و زئونوز ثبت شده در بانک ژن درخت فیلوژنی ترسیم گردید. الگوریتم مورد استفاده در رسم این درخت neighbour-joining است که برای اطمینان بخشیدن به این درخت از ۲۰۰۰ بار تکرار استفاده شد.

نتایج

از تعداد ۱۲۶ نمونه، محصول PCR ۱۹ نمونه (۱۵/۱ درصد) در حدود ۵۰۰ جفت باز بوده و از لحاظ *انتروسایتوزون بیئوسی* مثبت بود (شکل شماره ۱). توالی نوکلئوتیدی بخشی از زیر واحد کوچک ریبوزومی (SSU) و بزرگ ریبوزومی (LSU) و تمام ناحیه ITS تمام ایزوله‌های گاوی تعیین شد. وجود تنوع ژنتیکی در ایزوله‌های گاوی *انتروسایتوزون بیئوسی* توسط هم‌ترازی چندگانه ناحیه ITS بررسی شد (شکل شماره ۲). این آنالیز نشان داد که ایزوله‌های گاوی *انتروسایتوزون بیئوسی* در ٤ ژنوتیپ مجزا (IREb4، IREb5، D و M) طبقه‌بندی می‌شوند. در میان ژنوتیپ‌های شناسایی شده در ناحیه ITS هتروژنیسیتی مشاهده شد. اکثر ژنوتیپ‌ها با یکدیگر بین ٦ تا ۱۰ نوکلئوتید در ناحیه ITS پلی‌مورفیسم نشان می‌دادند. از بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده IREb5 با ۸ تغییر، بیش‌ترین پلی‌مورفیسم نوکلئوتیدی مجزا single nucleotide polymorphisms (SNPs) را نشان می‌داد. از ۱۹ ایزوله گاوی *انتروسایتوزون بیئوسی*، شایع‌ترین ژنوتیپ مربوط به ژنوتیپ D با ۷ ایزوله (۳٦/۸ درصد) (شماره دستیابی بانک ژن AF101200)، ۵ ایزوله مربوط به ژنوتیپ M (۲٦/۳ درصد) (شماره دست‌یابی بانک ژن AF267143)، ۵ ایزوله مربوط به ژنوتیپ IREb4 (۲٦/۳ درصد) و ۲ ایزوله مربوط به ژنوتیپ IREb5 (۱۰/۵ درصد) بود. از بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده IREb4 و IREb5 برای اولین بار از گاو جدا شد.



شکل شماره ۱- تصویر باند مربوط به PCR دوم ستون C- نمونه منفی، ستون C+ نمونه مثبت، ستون ۱ نمونه منفی، ستون ۲ نمونه مثبت می‌باشد. ستون M مارکر ۱۰۰ جفت بازی را نشان می‌دهد.

```
AF101200    TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGA 60
D           ............................................................ 60
IREb4       ................T..G.....................................A. 60
IREb5       ................T..G.....................................A. 60
M           ...............................A............................ 60
            ***************** ** ********* ************************** *

AF101200    TGCCGAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGCAGGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGTGTG 120
D           ............................................................ 120
IREb4       .....C...................................................... 120
IREb5       .....C...................................................... 120
M           ...................T...........T.T.................T...G... 120
            ***** ************** *********** * ***************** *** ***

AF101200    AGGGATGTGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTG 180
D           ............................................................ 180
IREb4       .......G.................................................... 180
IREb5       .......G.................................................... 180
M           ...............AT.....G..................................... 180
            ******** ********  ***** ***************************************

AF101200    ATGGTTGGATGGGGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAG 240
D           ............................................................ 240
IREb4       ...........................................T................ 240
IREb5       ............................G..T.........T.................. 240
M           ..............G............................................. 240
            *************** *********** ** ********* ******************

AF101200    CGG 243
D           ... 243
IREb4       ... 243
IREb5       ... 243
M           ... 243
            ***
```

شکل شماره ۲- اختلاف در ناحیه ITS ژن RNA ریبوزومی ایزوله‌های گاوی انتروسایتوزون بیئوسی.

چهار ژنوتیپ براساس این توالی‌ها مشاهده می‌شود (D، M، IREb4، IREb5). نقاط نشان‌دهنده یکسان بودن توالی با AF101200 (ژنوتیپ D) می‌باشد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

به‌منظور درک روابط ژنتیکی ایزوله‌های *انتروسایتوزون بینئوسی* از منابع مختلف، درخت فیلوژنی براساس ناحیه ITS ایزوله‌های گاوی *انتروسایتوزون بینئوسی* و برخی از ژنوتیپ‌های شناسایی شده از این ارگانیسم با استفاده از الگوریتم neighbor-joining رسم گردید. تمام ایزوله‌های جدا شده در این مطالعه در شاخه اصلی قرار می‌گیرند که در آن ژنوتیپ‌های گزارش شده از انسان (میمون و حیوانات اهلی (شامل گاو، خوک، پرندگان، سگ، لاما، اسب، گربه) و حیوانات وحشی (نظیر موش آبی، سمور، خرس، راکون و روباه) دیده می‌شود. دومین و سومین شاخه اصلی نیز به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های جدا شده از موش آبی و راکون می‌باشد. در درون اولین شاخه اصلی، ۳ ژنوتیپ جدا شده (D، IREb4 و IREb5) در این مطالعه به همراه ٦ ژنوتیپ جدا شده از انسان، حیوانات اهلی و وحشی در یک گروه قرار می‌گیرند. ژنوتیپ M نیز در گروهی قرار می‌گیرد که اعضای آن از خوک و گاو جدا شده‌اند (شکل شماره ۳).

شکل شماره ۳- درخت فیلوژنی ایزوله‌های گاوی *انتروسایتوزون بینئوسی* بر اساس ناحیه ITS ژن RNA ریبوزومی با استفاده از الگوریتم neighbour-joining و ۲۰۰۰ بار تکرار.

▲) ایزوله‌های انسانی، △) ایزوله‌های حیوانی، ■) ایزوله‌های زئونوز. مقیاس نشان داده شده برابر با فاصله ژنتیکی به ازای هر جانشینی نوکلئوتید است. اعداد نشان داده شده در سمت چپ شاخه‌ها برابر با درصدی از درخت‌های تکرار شده که توپولوژی یکسانی را نشان می‌دهد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

بحث

در این بررسی مشخص شد که ژنوتیپ D شناسایی شده در ایزوله‌های *انتروسایتوزون بیئوسی* گاوی شهر تهران ژئونوز می‌باشد. ژنوتیپ D بی‌شک شایع‌ترین ژنوتیپ زئونوز در میان میزبانان مختلف بوده [۲] که در این مطالعه بالاترین میزان (۳۶/۸ درصد) را در بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده به‌خود اختصاص داد. همولوژی ۱۰۰ درصد ژنوتیپ D جدا شده از گاو با ژنوتیپ‌های جدا شده از انسان، حیوانات اهلی و وحشی حاکی از وجود چرخه زئونوز بین این میزبانان بوده و می‌توان گفت این ژنوتیپ توان آلوده کردن انسان را دارا می‌باشد [۵]. این ژنوتیپ پیش از این در انسان از کشورهای گابون، کامرون [۹]، پرو [۱۰]، انگلیس [۱۱]، نیجریه، ویتنام [۱۲]، مالاوی، هلند [۱۳] و تایلند [۱٤]، در خوک از کشورهای ایالات متحده [٤]، ژاپن [۱۵] و جمهوری چک [۱٦]، در گاو از ایالات متحده [۱۷] و کره [۱۹،۱۸]، در خرس، موش آبی، روباه، راکون از ایالات متحده [۳]، در شاهین از امارات متحده [۲۰]، در اسب از کلمبیا [۲۱]، در سگ از پرتغال [۲۲] و در میمون از ایالات متحده [۲۳] جدا شده است. اسامی مترادف این ژنوتیپ عبارتند از: WL8، Peru9، PgEBITS9، PtEb VI، CEbC [۵]. تاکنون حدود ۹۳ ژنوتیپ از انتروسایتوزون بیئوسی در میزبانان مختلف شناسایی شده است. این ژنوتیپ‌ها به سه دسته اصلی تقسیم می‌شوند: ۱) ژنوتیپ‌هایی که فقط انسان را آلوده می‌کنند (۳٤ ژنوتیپ)؛ ۲) ژنوتیپ‌هایی که فقط حیوانات را آلوده می‌کنند (٤۸ ژنوتیپ) و ۳) ژنوتیپ‌هایی که بین انسان و حیوانات مشترک بوده و زئونوز می‌باشند (۱۱ ژنوتیپ) (جدول شماره ۱).

برخی از ژنوتیپ‌ها اختصاصیت میزبانی وسیعی داشته و قابلیت انتقال از حیوانات به انسان در آنها وجود دارد. از طرفی ژنوتیپ‌های مختص میزبان نیز در مورد این ارگانیسم وجود دارد؛ به‌طوری‌که ژنوتیپ‌های WL1-6 تنها در میزبانان خاص یافت شده است. ژنوتیپ‌های مختص گاو نیز وجود دارد که در این مطالعه ژنوتیپ M از این دسته می‌باشد [۵]. این ژنوتیپ با ژنوتیپ‌های PigITS1 ،G و F1 تشکیل زیر شاخه‌ای را می‌دهد که تنها از حیوانات جدا شده‌اند. به‌علت اینکه آنها یک گره اصلی را ایجاد نموده و دارای اختلافات زیادی در توالی شان نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر می‌باشند، احتمالا برای انسان بیماری‌زا نمی‌باشند. دانشمندان دلیل تنوع ژنتیکی در ژنوم میکروسپوریدیاها، به‌خصوص *انتروسایتوزون بیئوسی* را تولیدمثل جنسی و انتقال افقی ژن از سایر انگل‌های اجباری داخل سلولی نظیر کلامیدیاها می‌دانند. از این‌رو با گسترده‌تر شدن مطالعات مولکولی و بررسی شاخص‌های مولکولی متفاوت جنبه‌های مختلف این تنوع ژنتیکی مشخص شده است [۲٤]. در نهایت این مطالعه نشان داد که میکروسپوریدیوزیس در میان گاوهای شهر تهران شایع بوده و اختلاف ژنتیکی وسیعی در ایزوله‌های گاوی *انتروسایتوزون بیئوسی* وجود دارد. باوجود اینکه ژنوتیپ‌های IREb4 و IREb5 تاکنون از انسان جدا نشده است، ولی قرار گرفتن آنها در گروه ژنوتیپ‌های جدا شده از انسان و حیوانات احتمال بیماری‌زا بودن این ژنوتیپ‌ها برای انسان را مطرح می‌سازد. بنابراین اطلاعات این مطالعه نشان می‌دهد که هر دو نوع ژنوتیپ مختص میزبان و بیماری‌زا برای انسان در گاوهای شهر تهران وجود دارد.

جدول شماره ۱- ژنوتیپ‌های شناسایی شده به تفکیک میزبان براساس ناحیه ITS ژن RNA ریبوزومی

میزبان	ژنوتیپ‌های شناسایی شده
انسان	A، B، C، Q، R، S، T، U، V، W، Peru3، Peru7-8، Peru11، Peru13، Peru15، CAF2-4، Type III، Type V، NIA 1، HAN 1، S1-9، Peru17، UG2145
حیوان	I، BEB3-7، PtEB XI، CEbA، CEbD، CEbF، M، N، J، EbpA، G، H، PigITS1-6، PigITS8، E1، F1، L، EbfelA، PtEb IV، P، PtEb XII، PtEb V، WL12، WL9، WL7، WL14، WL10، WL6، WL1-4، Horse1-2، PtEb IX، D-like، PtEb VIII، PtEb II و Peru6-var
مشترک بین انسان و حیوان	D، CAF1، EbpC، Peru16، Peru10، Type IV، WL11، O، PigEBITS7، Peru6، WL15

تشکر و قدردانی

این پروژه در قالب رساله دوره دکتری تخصصی انگل‌شناسی پزشکی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از جناب آقای دکتر دلیمی، سرکار خانم دکتر غفاری فر، آقای سروی و همچنین کارکنان محترم گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس اعلام می‌دارند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

References:

[1] Lores B, Lopez-Miragaya I, Arias C, Fenoy S, Torres J, del Aguila C. Intestinal microsporidiosis due to Enterocytozoon bieneusi in elderly human immunodeficiency virus--negative patients from Vigo, Spain. ***Clin Infect Dis*** 2002; 34(7): 918-21.

[2] Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic Potential of the Microsporidia. ***Clin Microbiol Rev*** 2005; 18(3): 423-45.

[3] Sulaiman IM, Fayer R, Lal AA, Trout JM, Schaefer FW 3rd, Xiao L. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted Enterocytozoon spp. as well as human-pathogenic Enterocytozoon bieneusi. ***Appl Environ Microbiol*** 2003; 69(8): 4495-501.

[4] Buckholt MA, Lee JH, Tzipori S. Prevalence of Enterocytozoon bieneusi in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. ***Appl Environ Microbiol*** 2002; 68(5): 2595-9.

[5] Santin M, Fayer R. Microsporidiosis: Enterocytozoon bieneusi in domesticated and wild animals. ***Res Vet Sci*** 2011; 90(3): 363-71.

[6] Dengjel B, Zahler M, Hermanns W, Heinritzi K, Spillmann T, Thomschke A, et al. Zoonotic potential of Enterocytozoon bieneusi. ***J Clin Microbiol*** 2001; 39(12): 4495-9.

[7] Rinder H, Thomschke A, Dengjel B, Gothe R, Loscher T, Zahler M. Close genotypic relationship between Enterocytozoon bieneusi from humans and pigs and first detection in cattle. ***J Parasitol*** 2000; 86(1): 185-8.

[8] Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Heise W, Loscher T, Rinder H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. ***Trop Med Int Health*** 1996; 1(3): 373-8.

[9] Breton J, Bart-Delabesse E, Biligui S, Carbone A, Seiller X, Okome-Nkoumou M, et al. New highly divergent rRNA sequence among biodiverse genotypes of Enterocytozoon bieneusi strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. ***J Clin Microbiol*** 2007; 45(8): 2580-9.

[10] Cama VA, Pearson J, Cabrera L, Pacheco L, Gilman R, Meyer S, et al. Transmission of Enterocytozoon bieneusi between a child and guinea pigs. ***J Clin Microbiol*** 2007; 45(8): 2708-10.

[11] Sadler F, Peake N, Borrow R, Rowl PL, Wilkins EG, Curry A. Genotyping of Enterocytozoon bieneusi in AIDS patients from the north west of England. ***J Infect*** 2002; 44(1): 39-42.

[12] Espern A, Morio F, Miegeville M, Illa H, Abdoulaye M, Meyssonnier V, et al. Molecular study of microsporidiosis due to Enterocytozoon bieneusi and Encephalitozoon intestinalis among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. ***J Clin Microbiol*** 2007; 45(9): 2999-3002.

[13] Ten Hove RJ, Van Lieshout L, Beadsworth MB, Perez MA, Spee K, Claas EC, et al. Characterization of genotypes of Enterocytozoon bieneusi in immunosuppressed and immunocompetent patient groups. ***J Eukaryot Microbiol*** 2009; 56(4): 388-93.

[14] Leelayoova S, Subrungruang I, Suputtamongkol Y, Worapong J, Petmitr PC, Mungthin M. Identification of genotypes of Enterocytozoon bieneusi from stool samples from human immunodeficiency virus-infected patients in Thailand. ***J Clin Microbiol*** 2006; 44(8): 3001-4.

[15] Abe N, Kimata I. Molecular survey of Enterocytozoon bieneusi in a Japanese porcine population. ***Vector Borne Zoonotic Dis*** 2010; 10(4): 425-7.

[16] Sak B, Kvac M, Hanzlikova D, Cama V. First report of Enterocytozoon bieneusi infection on a pig farm in the Czech Republic. ***Vet Parasitol*** 2008; 153(3-4): 220-4.

[17] Santin M, Trout JM, Fayer R. Enterocytozoon bieneusi genotypes in dairy cattle in the eastern United States. ***Parasitol Res*** 2005; 97(6): 535-8.

[18] Lee JH. Molecular detection of Enterocytozoon bieneusi and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. ***Appl Environ Microbiol*** 2008; 74(5): 1664-6.

[19] Lee JH. Prevalence and molecular characteristics of Enterocytozoon bieneusi in cattle in Korea. ***Parasitol Res*** 2007; 101(2): 391-6.

[20] Muller MG, Kinne J, Schuster RK, Walochnik J. Outbreak of microsporidiosis caused by Enterocytozoon bieneusi in falcons. ***Vet Parasitol*** 2008; 152(1-2): 67-78.

[21] Santín M, Cortés Vecino JA, Fayer R. A zoonotic genotype of Enterocytozoon bieneusi in horses. ***J for Parasitolology*** 2010; 96: 157-61.

[22] Lobo ML, Xiao L, Cama V, Stevens T, Antunes F, Matos O. Genotypes of Enterocytozoon bieneusi in mammals in Portugal. ***J Eukaryot Microbiol*** 2006; 53 Suppl 1: S61-4.

[23] Chalifoux LV, Carville A, Pauley D, Thompson B, Lackner AA, Mansfield KG. Enterocytozoon bieneusi as a cause of proliferative serositis in simian immunodeficiency virus-infected immunodeficient macaques (Macaca mulatta). ***Arch Pathol Lab Med*** 2000; 124(10): 1480-4.

[24] Lee SC, Weiss LM, Heitman J. Generation of genetic diversity in microsporidia via sexual reproduction and horizontal gene transfer. ***Communi & Integrat Biology*** 2009; 2(5): 414-7.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]