

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

Pirestani M¹, Sadraei J^{1*}, Forouzandeh M²

1- Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, I. R. Iran.

2- Department 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 + 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: sadraej@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

شناسایی مولکولی ایزوله‌های زئونوز انتروسایتیوزون بینتوسی در ایران

مجید پیرستانی^۱، جاوید صدرایی^۲، مهدی فروزنده^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: عفونت‌های میکروسپوریدیایی در تمام میزانان مهره‌دار و بی‌مهره رخ می‌دهد. شایع‌ترین میکروسپوریدیای آلوود کننده انسان و حیوانات/انتروسایتیوزون بینتوسی است. هدف از این مطالعه شناسایی ایزوله‌های زئونوز انتروسایتیوزون بینتوسی در گاوهای کشتار شده تهران به روش مولکولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی ۱۲۶ نمونه مدفوع از گاوهای کشتار شده تهران جهت وجود انتروسایتیوزون بینتوسی بررسی شدند. یک قطعه ۵۰۰ جفت بازی ژن RNA ریبوزومی شامل ناحیه ITS انتروسایتیوزون بینتوسی با استفاده از تکنیک nested-PCR تکثیر یافت. جهت تعیین ژنتیک، نمونه‌ها تعیین توالی شده و برای تعیین رابطه فیلوژنیکی ایزوله‌های این مطالعه با ایزوله‌های انسانی، حیوانی و زئونوتیک، درخت فیلوجنی 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 ۴ ژنتیپ IREb4، D و M قرار داشتند. ژنتیپ D با ۳۶/۸ درصد شایع‌ترین ژنتیپ، M و IREb4 هریک با ۲۶/۳ درصد و IREb5 با ۱۰/۵ درصد در جایگاه بعدی قرار گرفتند. در آنالیز فیلوجنیک، ۸۹/۵ درصد ژنتیهای شناسایی شده (D, IREb4 و IREb5) تشکیل شاخه‌ای مجزا را داده و در زمرة ژنتیپ‌های جدا شده از انسان و حیوانات اهلی قرار گرفته، ولیکن یک ژنتیپ (M) در زمرة ژنتیپ‌های جدا شده از گاو و خوک در یک شاخه قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: تنها برخی از ایزوله‌های گاوی (ژنتیپ D) انتروسایتیوزون بینتوسی زئونوز بوده و دارای اهمیت بهداشتی هستند. با این وجود بایستی بررسی‌های بیشتری روی گاو و میزانان دیگر صورت پذیرفته تا نقش حیوانات در انتقال این عفونت به انسان مشخص شود.

واژگان کلیدی: انتروسایتیوزون بینتوسی، RNA ریبوزومی، ژنتیپ، زئونوز، درخت فیلوجنیک

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

همچنین، میزان شیوع در حیوانات نیز متفاوت بوده و از ۷۵-۳۰%

درصد گزارش وجود دارد [۲]. در ایران به علت در دسترس نبودن اطلاعات، میزان شیوع این انگل در انسان و حیوانات مشخص نمی‌باشد. این عفونت به علت نبودن درمان مناسب در بیماران دارای نفس ایمنی می‌تواند عاقب مرگباری داشته باشد [۲]. باوجود اینکه منابع عفونت انسانی به این ارگانیسم و روش انتقال آنها به طور مستقیم مشخص نشده است، لیکن شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد انتقال از طریق منابع حیوانی به انسان امکان پذیر است [۴،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 به کار رفته است. با استفاده از پرایمرهای محافظت شده به لحاظ فیلوجنیکی در تکثیر زیر واحد کوچک (SSU) و بزرگ (LSU)، RNA ریبوزومی و ناجیه جدا کننده بین ژنی (ITS یا IGS)، امکان تعیین توالی قسمتی از RNA ریبوزومی میکروسپوریدیاهای ناشناخته در نمونه‌های بالینی فراهم می‌آید. براساس ناحیه ITS ژن RNA ریبوزومی، بیش از ۹۰ ژنتیپ از این ارگانیسم گزارش شده است. براساس جدا شدن این ژنتیپ‌ها از میزانان مختلف، ۳

مقدمه

میکروسپوریدیا عوامل بیماری‌زای نوظهور حیوانات و انسان‌ها هستند. تا به حال ۱۴ گونه میکروسپوریدیایی آلوود کننده انسان شناسایی شده است. برای اولین بار در سال ۱۹۸۵، انتروسایتیوزون بینتوسی در یک بیمار HIV مثبت به عنوان 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

*لشان نمی‌شود مسئله:

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

تلفن: ۰۹۱۲ ۵۰۱۶۲۵۴، ۰۹۱۲ ۸۲۸۸۳۸۴؛ دوctor@modares.ac.ir

پست الکترونیک: sadraejij@modares.ac.ir

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

دور g ۱۴۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه شستشو و حجم محلول با PBS به ۱۳ ۲۰۰ رسانده شد. برای هضم قلیایی ۱۸/۶می ۱M (DDT) و ۱M KOH ۶۶/۶می (۱M) اضافه شده و در دمای ۵۶ درجه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. محلول هضم شده با ۱M ۸/۶ HCl در صدر خشی گردیده و بلا فاصله با ۱M ۱۶۰ Tris-HCl PH=۸/۳ (۲M) بافری شد. ۱M ۵۰۰ فنل-کلروفرم-ایزو آمیل الكل به نسبت (۲۵:۲۴:۱) اضافه شده و در دور g ۵۰۰ به مدت 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 سانتی گراد 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 زیر واحد بزرگ ریبوزومی (LSU) طراحی شده که در شناسایی و تعیین ژنوتیپ انتروسا-یتوزون بیئنوسی قابل استفاده می‌باشد. تکنیک مولکولی استفاده شده در این مطالعه nested-PCR می‌باشد. پرایمرهای واکنش اول عبارتند از: MSP-1: TGA ATG KGT MSP-2B: GTT CAT TCG CAC TAC T CCC TGT MSP-3: GGA ATT CAC ACC GCC و واکنش دوم MSP-4B: CCA AGC TTA TGC، CCGT CRY TAT TTA AGT CCA GGG AG یک قطعه حدود ۵۰۰ bp تکثیر می‌یابد. در این مطالعه از شرکت BioNEER AccuPowerTM PCR PreMix مواد تشکیل دهنده واکنش PCR استفاده شد که آنژیم موجود در آن از نوع hot-start می‌باشد. در PCR اول به مواد تشکیل دهنده PCR تنها DNA استخراج شده از مدفعه، پرایمرهای ۱- MSP-2B به میزان ۲ نانومول اضافه شده و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. در مرحله PCR دوم از محصول PCR اول به میزان ۲ میکرولیتر و پرایمرهای ۳- MSP-4B به میزان 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 واسرت است ابتدا ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرت است ابتدا ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن زنجیره ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، که این ۳ مرحله به تعداد ۴۵ سیکل و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه انجام گرفت. محصول PCR دوم بر روی ژل ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

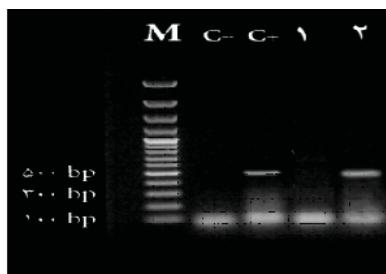
گروه مختلف برای این ارگانیسم تعریف شده است: ۱- گروه جدا شده از انسان؛ ۲- گروه جدا شده از حیوانات و ۳- گروه زئونوز [۵]. توالی ITS یک ژنوتیپ انسانی (ژنوتیپ D)، با برخی از ایزوله‌های انتروسا-یتوزون بیئنوسی می‌باشد، خوک (ژنوتیپ PigEBITS9) و برخی از حیوانات وحشی نظری خرس، موسکارت، راکون و روباء یکسان می‌باشد [۳]. به طور مشابه، ژنوتیپ دیگری از انسان (ژنوتیپ IV) توالی یکسانی با ژنوتیپ جدا شده از گربه دارد (ژنوتیپ K) [۶]. تمام ایزوله‌های انتروسا-یتوزون بیئنوسی یافت شده در خوک به طور ژنتیکی وابسته به ژنوتیپ‌های انسانی هستند [۴]. در آلمان از ۸۸ گاو بررسی شده تنها ۸ ایزوله انتروسا-یتوزون بیئنوسی شناسایی شد که این ایزوله‌ها در میان ۵ ژنوتیپ قرار می‌گرفند که از نظر فیلوسوژنیکی به ژنوتیپ‌های جدا شده از انسان و حیوانات اهلی وابسته می‌باشد. این تحقیق نشان داد که انتروسا-یتوزون بیئنوسی جدا شده از گاو می‌تواند عامل بیماری‌زای زئونوز باشد [۷]. مطالعه حاضر به منظور بررسی اهمیت بهداشتی انتروسا-یتوزون بیئنوسی گاوی با شناسایی توالی ITS ژن RNA ریبوزومی می‌پردازد. در ایران هیچ مطالعه‌ای بر روی شناسایی انتروسا-یتوزون بیئنوسی در گاو انجام نشده است تا توان 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 انتروسا-یتوزون بیئنوسی و ایزوله‌های قابل انتقال به انسان در مدفعه گاوهای کشتار شده تهران طی سال ۱۳۸۹ نمودیم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه توصیفی ۱۲۶ نمونه مدفعه از گاوهای کشتار شده در کشتارگاه میشم رباط کریم به طور تصادفی جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری، نمونه‌ها در محلول ثبیت کننده دی‌کرومات پتابسیم ۲/۵ در صدر 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 در محلول دی‌کرومات پتابسیم ۲/۵ در صدر در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

استخراج DNA: در این مطالعه از ترکیب دو روش هضم قلیایی و کیت استخراج DNA از مدفعه شرکت QIAGEN استفاده شد. بدین منظور ۱M ۲۰۰ از نمونه مدفعه را برداشته و به منظور حذف دی‌کرومات پتابسیم ۲/۵ در صدر سه مرتبه با PBS در

ژنوتیپ مجزا (D, IREb5, IREb4) طبقه‌بندی می‌شوند. در میان ژنوتیپ‌های شناسایی شده در ناحیه ITS هتروژنیتی مشاهده شد. اکثر ژنوتیپ‌ها با یکدیگر بین ۶ 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 بیشتری، شایع‌ترین ژنوتیپ مربوط به ژنوتیپ D با ۷ ایزوله (۴۶/۸) درصد (شماره دستیابی بانک ژن AF101200)، ۵ ایزوله مربوط به ژنوتیپ M (۲۶/۳ درصد) (شماره دستیابی بانک ژن AF267143)، ۵ ایزوله مربوط به ژنوتیپ IREb4 (۲۶/۳ 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.

تعیین ژنوتیپ: تعیین ژنوتیپ انتروسایتوزون بیشتری براساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS زن RNA ریبوزومی صورت گرفت [۵]. برای این منظور تمامی نمونه‌های مثبت از لحاظ مولکولی به صورت 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 فیلوزنی: در ابتدا برای هم‌ترازی چندگانه توالی‌های مورد نظر با استفاده از نرم افزار MEGA4 مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از ایزوله‌های انتروسایتوزون بیشتری حیوانی، انسانی و زئونوز ثبت شده در بانک ژن درخت فیلوزنی ترسیم گردید. الگوریتم مورد استفاده در رسم این درخت neighbour-joining درخت از ۲۰۰۰ بار تکرار استفاده شد.

نتایج

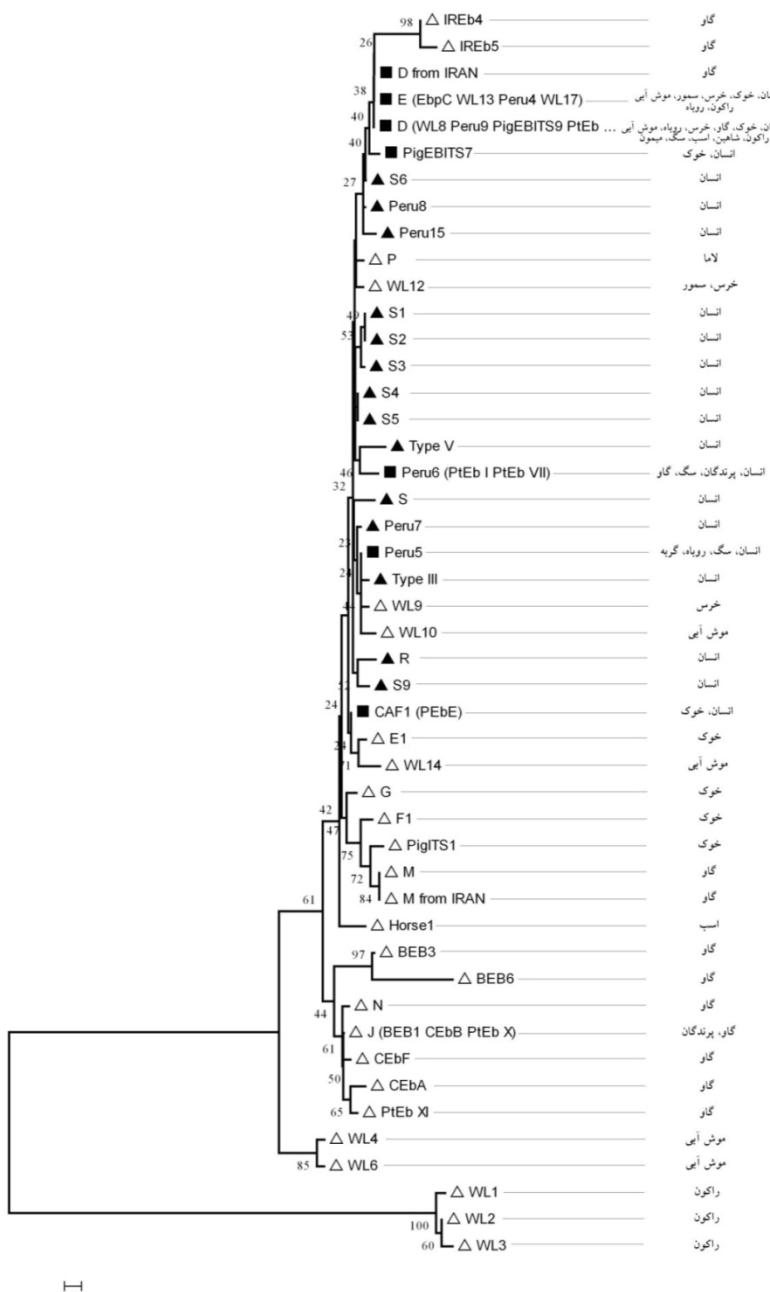
از تعداد ۱۲۶ نمونه، محصول ۱۹ نمونه (۱۵/۱ درصد) در حدود ۵۰۰ جفت باز بوده و از لحاظ انتروسایتوزون بیشتری ثبت بود (شکل شماره ۱). توالی نوکلئوتیدی بخشی از زیر واحد کوچک ریبوزومی (SSU) و بزرگ ریبوزومی (LSU) و تمام ناحیه ITS تمام ایزوله‌های گاوی تعیین شد. وجود تنوع ژنتیکی در ایزوله‌های گاوی انتروسایتوزون بیشتری توسط هم‌ترازی چندگانه ناحیه ITS بررسی شد (شکل شماره ۲). این آنالیز نشان داد که ایزوله‌های گاوی انتروسایتوزون بیشتری در ۴

AF101200	TCAGTTTTGGGTGTTGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTATGGGGGA	60
D	60
IREb4T..G.....	60
IREb5T..G.....	60
MA.....	60
AF101200	TGCCGAGGGGACCRGCGGTGCGGTGGTGTGTGCRRGGCGTGRGRTGTATCTCCRAAGTGTG	120
DC.....	120
IREb4C.....	120
IREb5T.....T.T.....T.....G....	120
M	120
AF101200	AGGGATGTGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTG	180
DG.....	180
IREb4G.....	180
IREb5AT.....G.....	180
M	180
AF101200	ATGGTTGGATGGGGAAATGATGTGTATGGGTGAGGAAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAG	240
D	240
IREb4T.....	240
IREb5G..T.....T.....	240
MG.....	240
AF101200	CGG 243	
D	... 243	
IREb4	... 243	
IREb5	... 243	
M	... 243	

شکل شماره ۲- اختلاف در ناحیه ITS ریبوزومی ایزوله‌های گاوی انتروسایتوزون بیشتری. چهار ژنوتیپ براساس این توالی‌ها مشاهده می‌شود (IREb5, IREb4, M, D). نقاط نشان‌دهنده یکسان بودن توالی با AF101200 (ژنوتیپ D) می‌باشد.

راکون و روباه) دیده می‌شود. دومین و سومین شاخه اصلی نیز به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های جدا شده از موش آبی و راکون می‌باشد. در درون اولین شاخه اصلی، ۳ ژنوتیپ جدا شده (D, IREb5 و IREb4) در این مطالعه به همراه ۶ 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 کاو جدا شده‌اند (شکل شماره ۳).

بهمنظور درک روابط زنگنهای ایزوله‌های انتروساپیوزون بینتوسی از منابع مختلف، درخت فیلوزنی براساس ناحیه ITS ایزوله‌های گاوی انتروساپیوزون بینتوسی 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، گریه) و حیوانات وحشی (نظیر موش آبی، سمور، خرس،



شکل شماره ۳- درخت فیلوجنی ایزولهای گاوی/انتروساپیوزون بینوسری بر اساس ناحیه ITS RNA ریبوزومی با استفاده از الگوریتم neighbour-joining و ۲۰۰۰ بار تکرار.

▲) ایزوله‌های انسانی، △) ایزوله‌های حیوانی، ■) ایزوله‌های زنونوز. مقایس نشان داده شده برابر با فاصله ژنتیکی به ازای هر جانشینی نوکلتویید است. اعداد نشان داده شده در سمت جب شاخه‌ها برابر با درصدی از درخت‌های تکمیل شده که توبولوژی بگسانند، را نشان می‌دهد.

بحث

برخی از ژنوتیپ‌ها اختصاصیت میزانی وسیعی داشته و قابلیت انتقال از حیوانات به انسان در آنها وجود دارد. از طرفی ژنوتیپ‌های مختص میزان نیز در مورد این ارگانیسم وجود دارد؛ به طوری که ژنوتیپ‌های WL1-6 تنها در میزان 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 F1, PigITS1, G, T تشکیل زیرشاخه‌ای را می‌دهد که تنها از حیوانات جدا شده‌اند. به علت اینکه آنها یک گره اصلی را ایجاد نموده و دارای اختلافات زیادی در توالی شان نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر می‌باشند، احتمالاً برای انسان بیماری‌زا نمی‌باشند. دانشمندان دلیل تنوع ژنتیکی در ژنوم میکروسپوریدیاهای، به خصوص انتروسایتوزون بیشترین تولید مثل جنسی و انتقال افقی ژن از سایر انگل‌های اجاری داخل سلولی نظیر کلامیدیاهای می‌دانند. از این‌رو با گستردگی شدن مطالعات مولکولی و بررسی شاخص‌های مولکولی متفاوت جنبه‌های مختلف این تنوع ژنتیکی مشخص شده است [۲۴]. در نهایت این مطالعه نشان داد که میکروسپوریدیوزیس در میان گاوهای شهر تهران شایع بوده و اختلاف ژنتیکی وسیعی در ایزوله‌های گاوی انتروسایتوزون IREb4 و بیشتری وجود دارد. با وجود اینکه ژنوتیپ‌های 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 میزان و بیماری‌زا برای انسان در گاوهای شهر تهران وجود دارد.

در این بررسی مشخص شد که ژنوتیپ D شناسایی شده در ایزوله‌های انتروسایتوزون بیشتری گاوی شهر تهران زئونوز می‌باشد. ژنوتیپ D بیشتر شایع ترین ژنوتیپ زئونوز در میان میزان مختلف بوده [۲] که در این مطالعه بالاترین میزان ۳۷/۸ درصد را در بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده به خود 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 میزانان 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 [۱۴]، در خوک از کشورهای ایالات متحده [۴]، ژاین [۱۵] و جمهوری چک [۱۶]، در گاو از ایالات متحده [۱۷] و کره [۱۹، ۱۸]، در خرس، موش آبی، روباء، راکون از ایالات متحده [۲۳]، 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 CEBc, PtEb VI, PgEBITS9, Peru9, WL8, Tاکنون حدود ۹۳ ژنوتیپ از انتروسایتوزون بیشتری در میزان مختلف شناسایی شده است. این ژنوتیپ‌ها به سه دسته اصلی تقسیم می‌شوند: ۱) ژنوتیپ‌هایی که فقط انسان را آلوده می‌کنند (۴ ژنوتیپ)؛ ۲) ژنوتیپ‌هایی که فقط حیوانات را آلوده می‌کنند (۴۸ ژنوتیپ) و ۳) ژنوتیپ‌هایی که بین انسان و حیوانات مشترک بوده و زئونوز می‌باشند (۱۱ ژنوتیپ) (جدول شماره ۱).

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

میزان	ژنوتیپ‌های شناسایی شده
انسان	.HAN 1, NIA 1, Type V, Type III, CAF2-4, Peru15, Peru13, Peru7-8, Peru3, W, V, U, T, S, R, Q, C, B, A S1-9, Peru17, UG2145
حیوان	.PtEb IV, EbfeIA, L, F1, E1, PigITS8, PigITS1-6, H, G, Ebpa J, N, M, CEBf, CEBd, CEbA, PtEB XI, BEB3-7, I .PtEb XII, PtEb V, WL12, WL9, WL7, WL14, WL10, WL6, WL1-4, Horse1-2, PtEb IX, D-like, PtEb VIII Peru6-var و PtEb II
مشترک بین انسان و حیوان	WL15, Peru6, PgEBITS7, O, WL11, Type IV, Peru10, Peru16, Ebpc, CAF1, D

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.

تشکر و قدردانی

این پژوهه در قالب رساله دوره دکتری تخصصی انگل-شناسی پژوهشی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسنده‌گان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود

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, Suputtmongkol 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 Parasitology* 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.