

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

Pirestani M<sup>1</sup>, Sadraei J<sup>1\*</sup>, Forouzandeh M<sup>2</sup>

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*

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.

# شناسایی مولکولی ایزوله‌های زئونوز/انتروسایتوزون بینوسی در ایران

مجید پیرستانی<sup>۱</sup>، جاوید صدراپی<sup>\*۲</sup>، مهدی فروزنده<sup>۳</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: عفونت‌های میکروسپوریدیایی در تمام میزبانان مهره‌دار و بی‌مهره رخ می‌دهد. شایع‌ترین میکروسپوریدیای آلوده‌کننده انسان و حیوانات *انتروسایتوزون بینوسی* است. هدف از این مطالعه شناسایی ایزوله‌های زئونوز/انتروسایتوزون بینوسی 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 *انتروسایتوزون بینوسی* بررسی شدند. یک قطعه ۵۰۰ جفت بازی ژن RNA ریبوزومی شامل ناحیه ITS *انتروسایتوزون بینوسی* 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 ۴ ژنوتیپ IREb4، IREb5، D و M قرار داشتند. ژنوتیپ D با ۳۷/۸ درصد شایع‌ترین ژنوتیپ، M و IREb4 هر یک 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 بینوسی* 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 بینوسی*، 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 به حال ۱۴ گونه میکروسپوریدیایی آلوده‌کننده انسان شناسایی شده است. برای اولین بار در سال ۱۹۸۵، *انتروسایتوزون بینوسی* 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 ۲۰-۵۰ درصد از کشورهای مختلف گزارش شده است.

<sup>۱</sup> دکترای انگل‌شناسی، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۳</sup> دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

## \*نشانی نویسنده مسئول:

دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی

تلفن: ۰۹۱۲۵۰۱۶۲۵۴ | دونهیسی: ۰۲۱ ۸۲۸۸۳۸۴۱

پست الکترونیک: sadraei@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 ارگانیزم و روش انتقال آنها به‌طور مستقیم مشخص نشده است، لیکن شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد انتقال از طریق منابع حیوانی به انسان امکان‌پذیر است [۳، ۴]. 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 جداکننده بین ژنی (IGS یا ITS)، امکان تعیین توالی قسمتی از RNA ریبوزومی میکروسپوریدیاها شناخته در نمونه‌های بالینی فراهم می‌آید. براساس ناحیه ITS ژن RNA ریبوزومی، بیش از ۹۰ ژنوتیپ از این ارگانیزم گزارش شده است. براساس جدا شدن این ژنوتیپ‌ها از میزبانان مختلف، ۳

دور ۱۴۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه شستشو و حجم محلول با PBS به ۲۰۰ µl رسانده شد. برای هضم قلیایی ۱۸/۶µl DDT (۱M) و ۶۶/۶µl KOH (۱M) اضافه شده و در دمای ۵۶ درجه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. محلول هضم شده با ۸/۶ µl HCl (۲۵ درصد) خنثی گردیده و بلافاصله با ۱۶۰ µl Tris-HCl (۲M, PH=۸/۳) بافری شد. ۵۰۰ µl فنل-کلروفرم-ایزو آمیل الکل به نسبت (۲۵:۲۴:۱) اضافه شده و در دور ۵۰۰ g 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 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 ریپوزومی شامل زیر واحد کوچک ریپوزومی (SSU)، ناحیه ITS و زیر واحد بزرگ ریپوزومی (LSU) طراحی شده که در شناسایی و تعیین ژنوتیپ *انتروسایتوزون بینوسوس* قابل استفاده می‌باشد. تکنیک مولکولی استفاده شده در این مطالعه nested-PCR می‌باشد. پرایمرهای واکنش اول عبارتند از: MSP-1: TGA ATG KGT و واکنش دوم MSP-2B: GTT CAT TCG CAC TAC T و CCC TGT و واکنش دوم MSP-3: GGA ATT CAC ACC GCC و واکنش دوم MSP-4B: CGT CRY TAT و TTA AGT CCA GGG AG با استفاده از پرایمرهای فوق یک قطعه حدود ۵۰۰ bp تکثیر می‌یابد. در این مطالعه از BioNEER شرکت AccuPower™ PCR PreMix به عنوان 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 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 MSP-3 و 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 واسرشت ابتدایی ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت ۹۵ درجه به مدت 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 ارگانسیم 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 بینوسوس* 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) [۶]. تمام ایزوله‌های *انتروسایتوزون بینوسوس* یافت شده در خوک به‌طور ژنتیکی وابسته به ژنوتیپ‌های انسانی هستند [۴]. در آلمان از ۸۸ گاو بررسی شده تنها ۸ ایزوله *انتروسایتوزون بینوسوس* 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 بینوسوس* جدا شده از گاو می‌تواند عامل بیماری‌زای زئونوز باشد [۷]. مطالعه حاضر به منظور بررسی اهمیت بهداشتی *انتروسایتوزون بینوسوس* گاوی با شناسایی توالی ITS ژن RNA ریپوزومی می‌پردازد. در ایران هیچ مطالعه‌ای بر روی شناسایی *انتروسایتوزون بینوسوس* در گاو انجام نشده است تا بتوان نقش این میزبان را در انتقال عفونت به انسان و اهمیت بهداشتی ایزوله‌های گاوی این ارگانسیم در ایران مشخص نمود. از این رو با توجه به اهمیت این ارگانسیم در بروز عوارض بالینی در میزبانان خود و تفاوت‌های ژنتیکی این ارگانسیم، برای اولین بار اقدام به شناسایی مولکولی *انتروسایتوزون بینوسوس* و ایزوله‌های قابل انتقال به انسان در مدفوع گاوهای کشتار شده تهران طی سال ۱۳۸۹ نمودیم.

#### مواد و روش‌ها

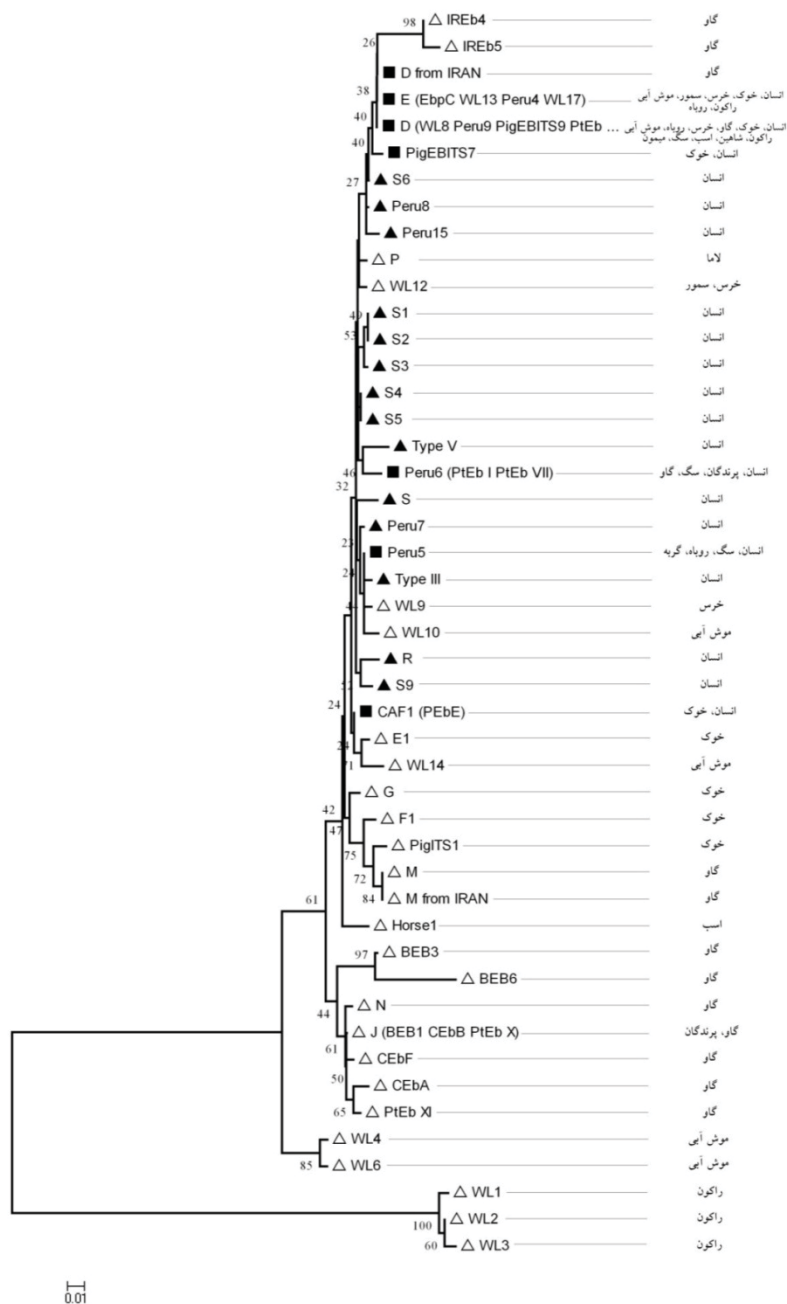
جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه توصیفی ۱۲۶ نمونه مدفوع از گاوهای کشتار شده در کشتارگاه میثم رباط کریم به‌طور تصادفی جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری، نمونه‌ها در محلول تثبیت کننده دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد قرار گرفت و به آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافت. در مرحله بعد نمونه‌ها با ۲ لایه گاز صاف شده و تا زمان استخراج DNA در محلول دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد در ۴ 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 به منظور حذف دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد سه مرتبه با PBS در



راکون و روباه) دیده می‌شود. دومین و سومین شاخه اصلی نیز به- ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های جدا شده از موش آبی و راکون می- باشد. در درون اولین شاخه اصلی، ۳ ژنوتیپ جدا شده (D, IREb4 و IREb5) 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 گاو جدا شده‌اند (شکل شماره ۳).

به‌منظور درک روابط ژنتیکی ایزوله‌های *انتروسایتوزون بینوسی* از منابع مختلف، درخت فیلوژنی براساس ناحیه ITS ایزوله‌های گاوی *انتروسایتوزون بینوسی* و برخی از ژنوتیپ‌های شناسایی شده از این ارگانیزم 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،



شکل شماره ۳- درخت فیلوژنی ایزوله‌های گاوی *انتروسایتوزون بینوسی* 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.

## بحث

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 ارگانیزم وجود دارد؛ به طوری که 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 [5]. این ژنوتیپ با ژنوتیپ‌های PigITS1، G و F1 تشکیل زیر شاخه‌ای 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 میکروسپوریدیایا، به خصوص *انتروسایتوزون بینوسوس* را تولیدمثل جنسی و انتقال افقی ژن از سایر انگل‌های اجباری داخل سلولی نظیر کلامیدیایا می‌دانند. از این رو با گسترده‌تر شدن مطالعات مولکولی و بررسی شاخص‌های مولکولی متفاوت جنبه‌های مختلف این تنوع ژنتیکی مشخص شده است [24]. در نهایت این مطالعه نشان داد که میکروسپوریدیوزیس در میان گاوهای شهر تهران شایع بوده و اختلاف ژنتیکی وسیعی در ایزوله‌های گاوی *انتروسایتوزون بینوسوس* وجود دارد. با وجود 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.

در این بررسی مشخص شد که ژنوتیپ D شناسایی شده در ایزوله‌های *انتروسایتوزون بینوسوس* گاوی شهر تهران ژنوتیپ می‌باشد. ژنوتیپ D بی‌شک شایع‌ترین ژنوتیپ ژنوتیپ در میان میزبانان مختلف بوده [2] که در این مطالعه بالاترین میزان (36/8 درصد) را در بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده به خود اختصاص داد. همولوژی 100 درصد ژنوتیپ D جدا شده از گاو با ژنوتیپ‌های جدا شده از انسان، حیوانات اهلی و وحشی حاکی از وجود چرخه ژنوتیپ بین این میزبانان بوده و می‌توان گفت این ژنوتیپ توان آلوده کردن انسان را دارا می‌باشد [5]. این ژنوتیپ پیش از این در انسان از کشورهای گابون، کامرون [9]، پرو [10]، انگلیس [11]، نیجریه، ویتنام [12]، مالای، هلند [13] و تایلند [14]، در خوک از کشورهای ایالات متحده [4]، ژاپن [15] و جمهوری چک [16]، در گاو از ایالات متحده [17] و کره [18، 19]، در خرس، موش آبی، روباه، راکون از ایالات متحده [3]، در شاهین از امارات متحده [20]، در اسب از کلمبیا [21]، در سگ از پرتغال [22] و در میمون از ایالات متحده [23] جدا شده است. اسامی مترادف این ژنوتیپ عبارتند از: CEbC، PtEb VI، PgEBITS9، Peru9، WL8 [5]. تاکنون حدود 93 ژنوتیپ از *انتروسایتوزون بینوسوس* در میزبانان مختلف شناسایی شده است. این ژنوتیپ‌ها به سه دسته اصلی تقسیم می‌شوند: 1) ژنوتیپ‌هایی که فقط انسان را آلوده می‌کنند (34 ژنوتیپ)؛ 2) ژنوتیپ‌هایی که فقط حیوانات را آلوده می‌کنند (48 ژنوتیپ) و 3) ژنوتیپ‌هایی که بین انسان و حیوانات مشترک بوده و ژنوتیپ می‌باشند (11 ژنوتیپ) (جدول شماره 1).

جدول شماره 1- ژنوتیپ‌های شناسایی شده به تفکیک میزبان براساس ناحیه ITS ژن RNA ریپوزومی

میزبان	ژنوتیپ‌های شناسایی شده
انسان	HAN 1, NIA 1, Type V, Type III, CAF2-4, Peru15, Peru13, Peru11, Peru7-8, Peru3, W, V, U, T, S, R, Q, C, B, A S1-9, Peru17, UG2145
حیوان	PtEb IV, EbfelA, L, F1, E1, PigITS8, PigITS1-6, H, G, EbpA, J, N, M, CEbF, CEbD, CEbA, PtEb XI, BEB3-7, I, P, 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, PigEBITS7, O, WL11, Type IV, Peru10, Peru16, EbpC, CAF1, D

## تشکر و قدردانی

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.

این پروژه در قالب رساله دوره دکتری تخصصی انگل-شناسی پزشکی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان 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 bienersi* 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 bienersi*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(8): 4495-501.
- [4] Buckholt MA, Lee JH, Tzipori S. Prevalence of *Enterocytozoon bienersi* 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 bienersi* 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 bienersi*. *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 bienersi* 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 bienersi* 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 bienersi* 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 bienersi* in AIDS patients from the north west of England. *J Infect* 2002; 44(1): 39-42.
- [12] Espern A, Morio F, Miegerville M, Illa H, Abdoulaye M, Meyssonier V, et al. Molecular study of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienersi* 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 bienersi* 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 bienersi* 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 bienersi* 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 bienersi* 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 bienersi* genotypes in dairy cattle in the eastern United States. *Parasitol Res* 2005; 97(6): 535-8.
- [18] Lee JH. Molecular detection of *Enterocytozoon bienersi* 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 bienersi* 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 bienersi* in falcons. *Vet Parasitol* 2008; 152(1-2): 67-78.
- [21] Santin M, Cortés Vecino JA, Fayer R. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bienersi* 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 bienersi* 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 bienersi* 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.