

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI HASTA GRUPLARINDA *ENTEROCYTOZON  
BIENEUSI*'NİN (PROTOZOA, MICROSPORIDIA)  
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan  
Berna HAMAMCI**

**Danışman  
Prof. Dr. İzzet ŞAHİN**

**Doktora Tezi**

**Aralık 2013  
KAYSERİ**

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI HASTA GRUPLARINDA *ENTEROCYTOZOOM  
BIENEUSI*'NİN (PROTOZOA, MICROSPORIDIA)  
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan  
Berna HAMAMCI**

**Danışman  
Prof. Dr. İzzet ŞAHİN**

**Doktora Tezi**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından TSD-10-3271kodlu proje ile desteklenmiştir.**

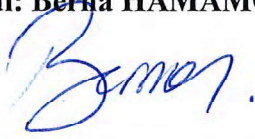
**Aralık 2013  
KAYSERİ**

**BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

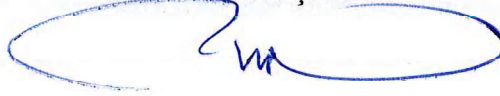
**Adı-Soyadı: Berna HAMAMCI**

**İmza :**



**YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

**“Farklı Hasta Gruplarında *Enterocytozoon bienersi*’nin (Protozoa, Microsporidia) Araştırılması” Adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne Uygun Olarak Hazırlanmıştır.**

**Hazırlayan****Berna HAMAMCI****Danışman****Prof.Dr.İzzet ŞAHİN****Anabilim Dalı Başkanı****Prof.Dr.İzzet ŞAHİN**

**Prof.Dr.İzzet ŞAHİN** danışmanlığında **Berna HAMAMCI** tarafından hazırlanan “**Farklı Hasta Gruplarında *Enterocytozoon bieneusi*’nin (Protozoa, Microsporidia) Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Parazitoloji** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

26/12/ 2013

**JÜRİ**

Danışman : Prof. Dr. İzzet ŞAHİN

Üye : Prof. Dr. Süleyman YAZAR

Üye : Prof. Dr. Salih KUK

Üye : Doç. Dr. Zübeyde AKIN POLAT

Üye : Doç Dr. Alparslan YILDIRIM

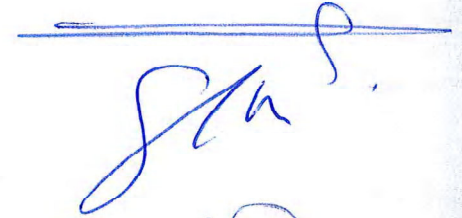
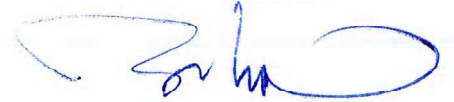
**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR**  
Enstitü Müdürü

İmza



## TEŞEKKÜR

Tıbbi parazitoloji Anabilim Dalında lisansüstü eğitimim boyunca, desteğini her zaman yanımda hissettiğim çalışmalarına büyük bir özveri ile katkıda bulunan tez danışmanım aynı zamanda Anabilim Dalı başkanımız değerli hocam Prof. Dr. İzzet ŞAHİN'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, akademik bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına büyük bir özveri ile gerek manevi gerekse bilimsel desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Süleyman YAZAR 'a,

Çalışmalarında akademik bilgi ve tecrübeleriyle yardımlarını esirgemeyerek katkıda bulunan değerli hocam Prof. Dr. Salih KUK'a,

Akademik bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına önemli katkıları bulunan Zürih Üniversitesinden Prof. Dr. Rainer WEBER ve Prof. Dr. Herbert KUSTER'e

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan bana yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen bir ekip ruhu ile birlikte çalıştığım arkadaşım Arş. Gör. Ülfet ÇETİNKAYA'ya,

Laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan arkadaşlarım; Arş. Gör. Merve YÜRÜK, Biyolog Hanife TEMEL, Niğmet GÖZKENÇ, Serpil ATEŞ'e ayrıca yüksek lisan öğrencilerimizden Tuğba KAYA, Muhittin KAYA, Esra GÜRBÜZ, Eda SİVCAN, Sahra ŞİRİN'e ve sekreterimiz Özge ATEŞ'e

Çalışmalarına katkıları bulunan ve desteğini esirgemeyen Mustafa Kemal Üniversitesinden değerli hocam Doç. Dr. M. Özlem KAYA'ya

Çalışmalarına devam edebilmem için sağladıkları kolaylıklardan dolayı Mustafa Kemal Üniversitesinden hocalarım ve müdürlerim Doç. Dr. Cumali GÖKÇE, Doç. Dr. Zafer YÖNDEN'e ve müdür yardımcımız Doç. Dr. Cem ZEREN'e,

Büyük bir fedakârlık ve anlayışla her konuda olduğu gibi doktora eğitimim boyunca da beni destekleyen ve her an yanımda olan yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

İstatistiksel çalışmalar da yardımcı olan hocam Yrd. Doç. Dr. Ferhan ELMA'ya,

Ayrıca Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkür ederim.

**Berna HAMAMCI**  
**Antakya/HATAY 2013**

**FARKLI HASTA GRUPLARINDA *ENTEROCYTOZOOM BIENEUSI*'NİN  
(PROTOZOA, MICROSPORIDIA) ARAŞTIRILMASI**

**Berna HAMAMCI**

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Parazitoloji Anabilim Dalı**

**Doktora Tezi, Aralık 2013**

**Danışman: Prof.Dr. İzzet ŞAHİN**

**ÖZET**

*Enterocytozoon bieneusi*; insanlarda mikrosporidialar arasında HIV/AIDS hastalarında klinik olarak kronik diyare, zayıflık ve kolonjite sebep olan çok önemli türlerden birisidir. İntestinal mikrosporidiosis'e yol açan etkenlerin tanısında ışık mikroskobu, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve floresan mikroskobu yaygın olarak kullanılmaktadır. Calcofluor, Modifiye Trichrome ve Asit-Fast Trichrome boyaları mikrosporidiosis için standart tanı testleridir fakat bu testlerle tür tayini yapılamamaktadır. Araştırma laboratuvarlarında *E. bieneusi* tanısında monoklonal antikorlar ve türe spesifik PCR yöntemleri kullanılmaktadır.

Bu çalışmada farklı hasta grubundan (kansere tanısı almış, kemik iliği transplantlı, gelişme geriliği, kaşıntı, dermatit, ürtiker ve ülseratif kolit şikayeti olan hastalar) toplanan 140 örnek ile 2 farklı kontrol grubundan (kronik rahatsızlığı olmayan fakat gastrointestinal şikayeti olan hastalar, sağlıklı gönüllüler) toplanan 40 örnek çalışmaya alınmıştır. Hasta ve kontrol gruplarından alınan toplam 180 dışkı örneği; immunofloresans, konvansiyonel ve moleküler tanı yöntemleriyle incelenmiştir.

Çalışmada, 140 hastanın %40.7'sinde *Microsporidia* spp, %12.1'inde *E. bieneusi*; sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda %35'inde *Microsporidia* spp, %5'inde *E. bieneusi* ve sadece gastrointestinal şikayeti olan kontrol grubunda ise %60'ında *Microsporidia* spp, %15'inde *E. bieneusi* pozitifliği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, kontrol ve hasta grupları arasında *Microsporidia* spp. veya *E. bieneusi* görülmesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Mikrosporidia, *Enterocytozoon bieneusi*, Tanı

**INVESTIGATION OF *ENTEROCYTOZOOM BIENEUSI* (PROTOZOA,  
MICROSPORADIA) IN DIFFERENT PATIENT GROUPS.**

**Berna HAMAMCI**

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences**

**Department of Parasitology**

**Doctora Thesis, December 2013**

**Supervisor: Prof.Dr. İzzet ŞAHİN**

**SUMMARY**

*Enterocytozoon bieneusi* is clinically the most significant among the microsporidia causing chronic diarrhea, wasting and cholangitis in human with immunodeficiency virus/AIDS. In diagnosis of intestinal microsporidiosis; light microscopy, electron microscopy (TEM) and fluorescent microscope are used extensively. Microscopy with Calcofluor, Modified Trichrome and Acid-Fast Trichrome are standard diagnostic tests for microsporidiosis but doesn't allow species identification. In research laboratories, species specific tests such as monoclonal antibody test and PCR are used for detection of *E. bieneusi*.

In this investigation totally 140 samples from different patient groups (have received a diagnosis of cancer, bone marrow transplant, patients suffering from growth retardation, itching, dermatitis, urticarial and ulcerative colitis) and together with 40 samples from two different control groups (patient have gastrointestinal symptoms without chronic disease and healthy volunteers) were examined. Consequently 180 stool samples taken from patients and control groups were investigated with immunofluorescent, conventional and molecular diagnostic methods.

In this study; 40.7% *Microsporidia* spp. and 12.1% *E. bieneusi* were found positive in patient groups; 35% *Microsporidia* spp. and 5% *E. bieneusi* were found positive in healthy control group; 60% *Microsporidia* spp. and 15% *E. bieneusi* were found positive in control group with only gastrointestinal complaints. According to these results; there is no statistically important difference between patient and control groups ( $p>0.05$ ).

**Key Words:** Microsporidia, *Enterocytozoon bieneusi*, Diagnosis



## İÇİNDEKİLER

|                                                                           | <u>Sayfa no</u> |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| İÇ KAPAK .....                                                            | i               |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI .....                                     | ii              |
| YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....                                           | iii             |
| KABUL VE ONAY SAYFASI .....                                               | iv              |
| TEŞEKKÜR .....                                                            | v               |
| ÖZET .....                                                                | vi              |
| ABSTRACT .....                                                            | vii             |
| İÇİNDEKİLER.....                                                          | viii            |
| TABLO ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ.....                                        | xi              |
| KISALTMALAR .....                                                         | xii             |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                      | 1               |
| 2.GENEL BİLGİLER .....                                                    | 3               |
| 2.1. TARİHÇE.....                                                         | 3               |
| 2.2. SINIFLANDIRMA .....                                                  | 4               |
| 2.3. MORFOLOJİ .....                                                      | 6               |
| 2.3.1. Spor Morfolojisi.....                                              | 6               |
| 2.3.1.1. Spor Duvarı .....                                                | 6               |
| 2.3.1.2. Sporoplasma .....                                                | 7               |
| 2.3.1.3. Ekstrüzyon Aparatı .....                                         | 7               |
| 2.3.1.4. <i>Entorocytozoon bieneusi</i> 'nin Morfolojik Özellikleri ..... | 7               |
| 2.4. HAYAT DÖNGÜSÜ .....                                                  | 8               |
| 2.4.1. Faz I- Enfektif /Çevresel Faz.....                                 | 8               |
| 2.4.2. Faz II- Proliferatif Faz/ Üreme Fazı.....                          | 8               |
| 2.4.3. Faz III- Sporogonik Faz .....                                      | 9               |
| 2.4.4. <i>Enterocytozoon bieneusi</i> 'nin Hayat Döngüsü.....             | 9               |
| 2.5. MİKROSPORODİALARIN HÜCREYE GİRİŞ MEKANİZMALARI.....                  | 11              |
| 2.5.1. Aktif İnvazyon.....                                                | 12              |
| 2.5.2. Endositosiz .....                                                  | 12              |
| 2.6. EPİDEMİYOLOJİ .....                                                  | 13              |
| 2.7. CİNS VE TÜRLERİN TAKSONOMİK ÖZELLİKLERİ .....                        | 15              |

|                                                   | <b><u>Sayfa no</u></b> |
|---------------------------------------------------|------------------------|
| 2.8. BULAŞMA .....                                | 18                     |
| 2.8.1. Zoonotik Bulaşma.....                      | 19                     |
| 2.8.2. İnsandan İnsana Bulaşma .....              | 20                     |
| 2.8.3. Su Yoluyla Bulaşma.....                    | 20                     |
| 2.8.4. Besinler Yoluyla Bulaşma.....              | 20                     |
| 2.8.5. Transplasental Bulaşma.....                | 21                     |
| 2.8.6. Seksüel Transmisyon .....                  | 21                     |
| 2.8.7. Vektorial Transmisyon.....                 | 21                     |
| 2.9. TANI.....                                    | 22                     |
| 2.9.1. KONVANSİYONEL TANI YÖNTEMLERİ.....         | 23                     |
| 2.9.1.1. Modifiye Trichrome Boyaları .....        | 23                     |
| 2.9.1.2. Giemsa Boyama.....                       | 24                     |
| 2.9.1.3. Floresan Boyalar .....                   | 25                     |
| 2.9.1.4. Acridine Orange Boyama .....             | 25                     |
| 2.9.1.5. Histolojik Boyalar .....                 | 26                     |
| 2.9.2. İmmüno Floresan İşaretleme .....           | 27                     |
| 2.9.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu.....       | 27                     |
| 2.9.4. Seroloji .....                             | 28                     |
| 2.9.5. Hücre Kültürü .....                        | 29                     |
| 2.9.6. Moleküler Yöntemler .....                  | 31                     |
| 2.10. KLİNİK.....                                 | 32                     |
| 2.11. TEDAVİ.....                                 | 34                     |
| 2.12. İMMÜNİTE.....                               | 36                     |
| 2.13. KORUNMA VE KONTROL.....                     | 37                     |
| 3.GEREÇ ve YÖNTEM.....                            | 39                     |
| 3.1. IFA YÖNTEMİ (IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY) ..... | 40                     |
| 3.2. SU-ETER KONSANTRASYON YÖNTEMİ .....          | 41                     |
| 3.3. BOYAMA YÖNTEMLERİ.....                       | 42                     |
| 3.3.1. Calcofluor Boyama .....                    | 42                     |
| 3.3.2. Modifiye Trichrome Boyama (MTS) .....      | 43                     |
| 3.3.3. Asit Fast-Trichrome Boyama .....           | 44                     |
| 3.3.4. Acridin Orange Boyama .....                | 46                     |

**Sayfa no**

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4. MOLEKÜLER ANALİZLER .....                                           | 46 |
| 3.4.1. DNA Ekstraksiyonu .....                                           | 46 |
| 3.4.2. Polymerase Chain Reaction .....                                   | 48 |
| 3.4.2.1. İnsanda patojen olan mikrosporidia türleri için ortak PCR ..... | 48 |
| 3.4.2.2. Nested-Polymerase Chain Reaction .....                          | 49 |
| 3.5. VERİLERİN ANALİZİ .....                                             | 51 |
| 4.BULGULAR .....                                                         | 52 |
| 5.TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                | 66 |
| 6.KAYNAKLAR .....                                                        | 78 |
| EKLER                                                                    |    |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                 |    |

## TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                                                                                                           | <u>Sayfa No</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Şekil 2.1.</b> İnsandan izole edilen Mikrosporidia türlerinin sınıflandırılması.....                                                                                   | 5               |
| <b>Şekil 2.2.</b> Sporum İnce Yapısı.....                                                                                                                                 | 6               |
| <b>Şekil 2.3.</b> <i>Enterocytozoon bienewsi</i> 'nin Hayat Döngüsü.....                                                                                                  | 10              |
| <b>Şekil 2.4.</b> <i>Enterocytozoon bienewsi</i> 'nin Hayat Döngüsü.....                                                                                                  | 11              |
| <b>Şekil 2.5.</b> Mikrosporidia ve insan enfeksiyonları arasındaki su-besin ilişkisi .....                                                                                | 19              |
| <b>Şekil 2.6.</b> Horizontal ve Vertikal bulaşma yolları.....                                                                                                             | 22              |
| <b>Şekil 4.1.</b> Modifiye Trichrome boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları.....                                                                         | 54              |
| <b>Şekil 4.2.</b> Asit-Fast Trichrome boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları .....                                                                       | 55              |
| <b>Şekil 4.3.</b> Calcofluor boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları.....                                                                                 | 56              |
| <b>Şekil 4.4.</b> Acridin oranj boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları.....                                                                              | 57              |
| <b>Şekil 4.5.</b> Mikrosporidia pozitif örneklerin Micro F, 300 R primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel elektroforezde görüntüsü. ....              | 58              |
| <b>Şekil 4.6.</b> IFA yöntemi ile tespit edilen <i>Enterocytozoon bienewsi</i> sporları(x1000).....                                                                       | 61              |
| <b>Şekil 4.7.</b> <i>Enterocytozoon bienewsi</i> pozitif örneklerin MSP primeri ile yapılan Nested-PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel elektroforezde görüntüsü. .... | 62              |
| <b>Tablo 2.1.</b> İnsanı enfekte eden mikrosporidia türlerinin morfolojik özellikleri. ....                                                                               | 16              |
| <b>Tablo 2.2.</b> İnsanı enfekte eden mikrosporidia türlerinin klinik özellikleri. ....                                                                                   | 17              |
| <b>Tablo 2.3.</b> Floresan Boyalarla Mikroskopta Sporların Görünüm Karakterizasyonu.....                                                                                  | 25              |
| <b>Tablo 2.4.</b> Boyama teknikleri ve özellikleri .....                                                                                                                  | 30              |
| <b>Tablo 3.1.</b> PCR'da kullanılan primerler ve dizilimleri.....                                                                                                         | 48              |
| <b>Tablo 3.2.</b> PCR reaksiyonu için kullanılan bileşen ve miktarları.....                                                                                               | 48              |
| <b>Tablo 3.3.</b> Nested-PCR'da kullanılan primerler ve dizilimleri.....                                                                                                  | 49              |
| <b>Tablo 3.4.</b> Nested-PCR reaksiyonu için kullanılan bileşen ve miktarları.....                                                                                        | 50              |
| <b>Tablo 3.5.</b> Amplifikasyon için gerekli PCR şartları.....                                                                                                            | 50              |
| <b>Tablo 4.1.</b> Cinsiyete göre moleküler analizlerle tespit edilen pozitiflik oranları .....                                                                            | 52              |
| <b>Tablo 4.2.</b> Farklı hasta gruplarının farklı boyama yöntemlerine göre mikrosporidia pozitiflik oranları .....                                                        | 58              |
| <b>Tablo 4.3.</b> Farklı tanı yöntemlerinin cins spesifik-PCR'a göre sensitivite ve spesifite değeri.....                                                                 | 59              |
| <b>Tablo 4.4.</b> Farklı hasta gruplarında IFA ve Nested-PCR'a göre pozitiflik oranları .....                                                                             | 60              |
| <b>Tablo 4.5.</b> IFA'nın Nested-PCR'a göre sensitivite ve spesifite değeri.....                                                                                          | 62              |
| <b>Tablo 4.6.</b> Farklı hasta gruplarının farklı tanı yöntemlerine göre sonuçları .....                                                                                  | 64              |
| <b>Tablo 4.7.</b> İshal olma durumuna göre moleküler analizlerle tespit edilen pozitiflik oranları. ....                                                                  | 65              |

## KISALTMALAR

***E. bieneusi***: Enterocytozoon *bieneusi*

**HIV**: Human Immunodeficiency Virus

**AIDS**: Acquired Immüno Deficieny Syndrom

***E. intestinalis***: Encephalitozoon *intestinalis*

***N. bombycis***: Nosema *bombycis*

***E. cuniculi***: Encephalitozoon *cuniculi*

***N. corneum***: Nosema *corneum*

***T. hominis***: Trachipleistophora *hominis*

***C. parvum***: Cryptosporidium *parvum*

***E. hellem***: Encephalitozoon *hellem*

***V. cornea***: Vittaforma *corneae*

**BAL**: Bronkoalveolar Lavaj

**BOS**: Beyin Omirilik Sıvısı

**PCR**: Polimeraz Chain Reaksiyonu

**TEM**: Transmission Elektron Mikroskobu

**MTS**: Weber'in Trichrome Boyası, Modifiye Trichrome Boyama

**AFT**: Asit-Fast Tricrome

**ELISA**: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**IFAT**: Indirekt Floresan Antikor Testi

**IFA**: Immunofluorescence assay

**PBS**: Phosphate Buffered Saline

**PAS**: Periodic Acid Schiff boyası

**INF-  $\gamma$** : Interferon gama

**TNF**: Tümör nekrozis faktör

**IL**: Interlökin

**IgG**: Immunoglobulin G

**IgM**: Immunoglobulin M

**bp**: Baz pair

**sn**: Saniye

**SEM**: Taramalı-Scanning elektron mikroskobisi

**nm**: Nanometre

**NaOH**: Sodyum hidroksit

**KOH**: Potasyum hidroksit

**GAA**: Glacial Asetik Asit

**HCl**: Hidroklorik asit

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikrosporidialar; her yerde bulunabilen, omurgalı ve omurgasız konaklarda enfeksiyona neden olabilen, 144 cins altında 1200 türü tanımlanmış zorunlu intrasellüler ökaryotik parazitlerdir. İnsanlarda patojen olarak tanımlanan 14 mikrosporidia türünden *Enterocytozoon bienewi* ve *Encephalitazoon* sp. en sık görülen türler olup gastrointestinal sistemde enfeksiyona yol açmaktadır. Bu türler özellikle HIV pozitif hastalarda kronik diyare sebebi olarak bilinmektedir.

Mikrosporidialar da olduğu gibi *E. bienewi*'nin de en çok bilinen evresi, oldukça küçük ve dirençli olan sporlarıdır. Boyutları 1-1.6 µm arasındadır. Biyolojileri 3 fazda incelenmektedir; enfektif veya çevresel faz, proliferatif veya üreme fazı ve sporogonik faz. *E. bienewi* sadece intrasellüler olarak, konak sitoplazmasından serbest olarak gelişir ve konak hücre dışında hiçbir aktif döneme sahip değildir (1). Proliferatif merogonik bir dönemi sporogonik bir dönem izleyerek sonuçta farklı ve dirençli enfektif sporların oluştuğu benzersiz bir hayat döngüsüne sahiplerdir. Olgun sporlar konak hücre içerisine enfektif spor içeriğini enjekte etmek için tübüler ekstriksiyon aparatı içerirler. *Enterocytozoon* cinsinin karakteristik bir özelliği sporogonial plasmodium içerisinde polar tüpün tamamen farklılaşmış olmasıdır. Sporoblastların bölünmesi, sporlar içerisinde bunun olgunlaşması konak sitoplazması içerisinde dağılmış şekilde oluşmaktadır. İnsanda bu cinse ait sadece tek bir tür tanımlanmıştır. *E.*

*bieneusi* insanda hastalık yapan tek türdür. İnsan ve diğer memelilerdeki epitel hücrelerinin sitoplazmasını enfekte etmektedir (2).

Rutinde daha çok seroloji ve konvansiyonel tanı yöntemlerinin tercih edildiği mikrosporidia enfeksiyonlarında farklı tanı yöntemleri de kullanılmaktadır. Bazı mikrosporidial türlerin gelişimi spesifik bir konak hücresinde tek bir organla sınırlıyken, diğer türler farklı organ sistemlerini içeren sistemik enfeksiyonlara sebep olabilirler. Mikrosporidial enfeksiyonların belirtileri; enfeksiyona neden olan türlere, enfeksiyon tipine, konağın yaşına ve konağın immun sistemine bağlıdır. Parazit-konak etkileşiminin dengesizliği parazitlerin proliferasyon ve yayılmasıyla sonuçlanır.

Epidemiyolojik çalışmalara göre *E. bineusi* kişiden kişiye sindirim ve solunum yoluyla veya kontamine su ve besinlerle bulaşabilmektedir. İntestinal hücreleri enfekte eden *E. bineusi* genellikle kronik veya akut ishal, karın ağrısı ve bulantıya neden olmaktadır. AIDS'lilerde karın ağrısı sık şikayetlerdendir ve bu hastalarda malabsorbsiyon ve çinko eksikliği görülmektedir. Diğer mikrosporidium türlerinin aksine *E. bineusi* HIV pozitif hastalarda sistemik enfeksiyonlara yol açmaktadır. Hepatobiliyer yerleşimde papiller stenoza, iç ve dış hepatik safra kanalı, sklerozan kolanjit ve akalküloz kolanjit görülmektedir.

Mikrosporidiaların epidemiyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalarında genellikle HIV pozitif, immünsüpresif ve homoseksüel hastalar araştırma grubunu oluşturmuştur. Ülkemizde ise insanlarda görülme sıklığı üzerine yapılan çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Bütün dünyada yaygın olarak bulunan ve önemi gittikçe artan *E. bineusi* üzerinde ülkemizde yeterli araştırma yapılmamıştır. Mikrosporidia ile ilgili yapılan çalışmalarda ise tür ayırımına gidilmemiştir.

Bu çalışmada; farklı hasta gruplarında fırsatçı bir parazit olan *E. bineusi*'nin yaygınlığının farklı tanı yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. TARİHÇE

İlk olarak 1857 yılında Nageli tarafından *Nosema bombycis* olarak adlandırılan mikrosporidialar, Schizomycetes'ler arasına dahil edilmiştir. Mikrosporidia şubesi ise 1882 yılında Balbiani tarafından tanımlanmıştır. 1977'de yapısal özellikleri, spor ve gelişme safhalarındaki çekirdeğin şekli, konak-parazit ilişkisi ve polar tüpteki sarmal sayılarına göre sınıflandırılmıştır (3,4). Mikrosporidia cinsi 1980'de Protista alemi ve protozoa altalemi altında yer almıştır (3,5,6). 1986 yılında parazit, diplokaryon olup olmaması, mayoz bölünmesi ve sporofaz organeline göre sınıflandırılmıştır. Ancak bu durum filogenetik analizi açısından yararlı görülmemiş ve sporun morfolojisine ve gelişme safhalarına göre 1986 yılında yeniden sınıflandırılmıştır. 2000'li yıllarda ise alfa ve beta tubilin genlerinin dizi analizi yapılmış ve bu parazitlerin protozoonlardan çok mantarlarla daha yakın ilişkide olduklarını bildirilmiştir.

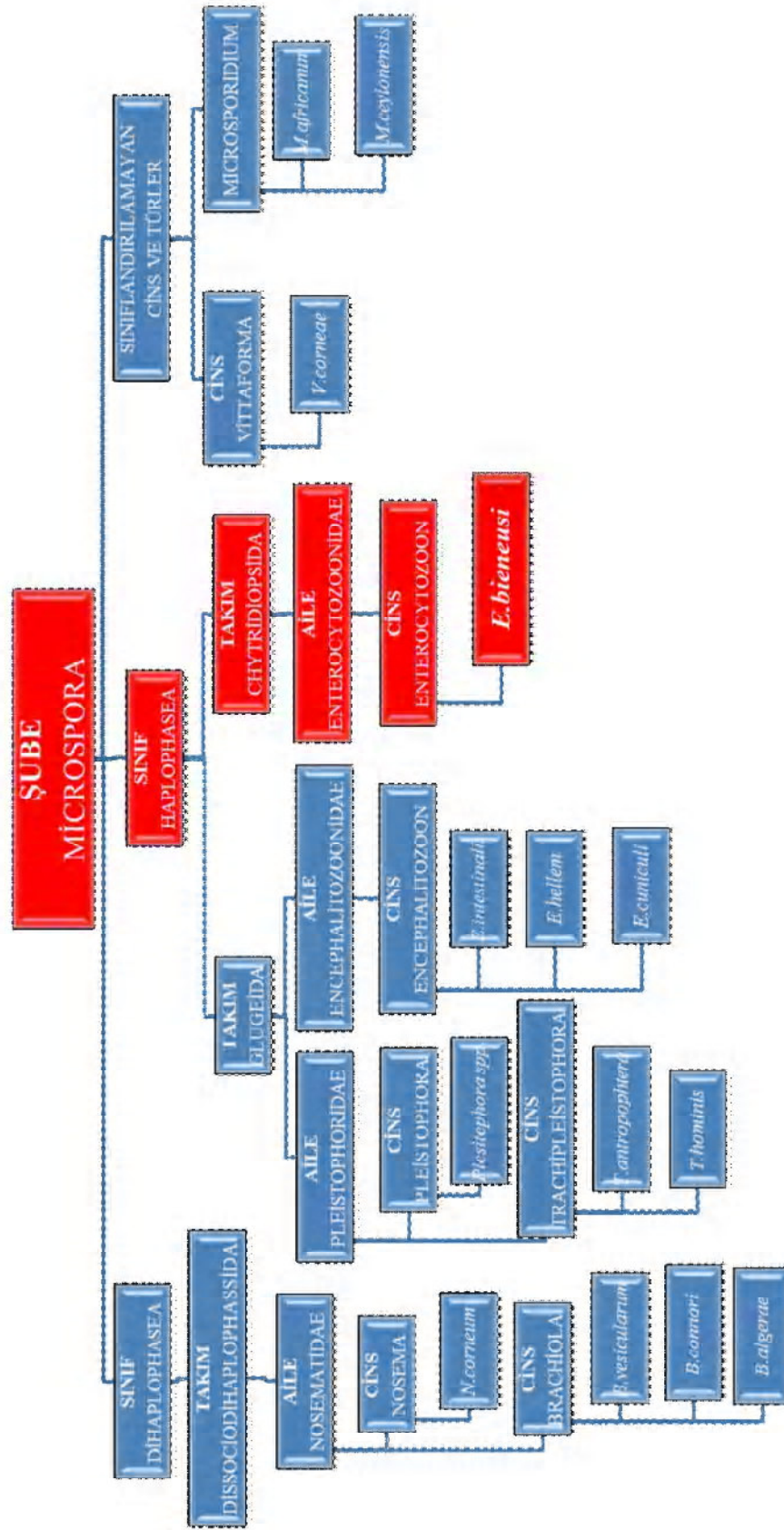
*Enterocytozoon bieneusi* ilk olarak 1985 yılında Desportes-Livage tarafından kronik diyaresi olan AIDS'li bir hastanın dışkıсында ve ince bağırsaklarında gösterilmiştir. Daha sonra akciğer enfeksiyonu ve bağırsak tutulumlarına sebep olduğu, safra sistemi, safra kesesi, mesane, pankreas kanalı ve karaciğerde yerleştiği de saptanmıştır (5).



## 2.2. SINIFLANDIRMA

Mikrosporidiaların, insanlarda enfeksiyon oluşturan 7 cinse bağlı 14 türü tanımlanmıştır.

Mikrosporidiaların sınıflandırılmasındaki esas kriterler arasında; doğal konak ilişkileri, spor veya diğer gelişme dönemlerinin büyüklüğü, tek veya iki nükleusa sahip olması, spor içindeki polar filament helozon sayısı ve organizmanın konak hücre sitoplazması ile ilişkisi yer almaktadır (7,8). İnsandan izole edilen Mikrosporidia türleri ve *E. bienewisi*'nin sınıflandırılması şekil' de gösterildiği gibidir (9,10).



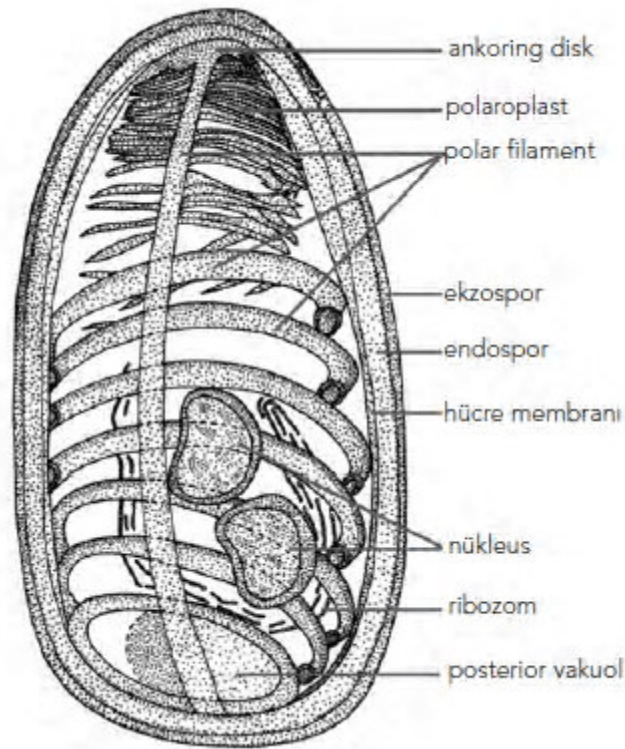
Şekil 2.1: İnsandan izole edilen Mikrosporidia türlerinin sınıflandırılması.

## 2.3. MORFOLOJİ

### 2.3.1. Spor Morfolojisi

Mikrosporidiaların en tipik gelişimsel evresi, polar filament taşıyan spor dönemidir. Spor, muhtevasını konak hücre içine enjekte edebilme mekanizmasına sahip olan enfektif dönemdir ve konak hücre dışında uzun zaman yaşayabilen tek evrim dönemidir. Boyutları 1-10  $\mu\text{m}$ 'dir. Memelileri enfekte eden sporlar daha küçük boyutlardadır (1-3  $\mu\text{m}$ ). Oval, küresel, çubuk veya armut şeklinde olabilirler (7,9).

*Enterocytozoon bieneusi*'nin erişkin sporları oval 1-1.6  $\mu\text{m}$  uzunluğunda, 0.7-1  $\mu\text{m}$  genişliğinde olup iki sıra halinde 5-7 kıvrımlı polar tüp içermektedir. Spor üç genel yapıya sahiptir (11). Bunlar; spor duvarı, sporoplazma ve ekstrüzyon aygıtıdır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Sporun İnce Yapısı (12)

#### 2.3.1.1. Spor Duvarı

Çevresel direnç sağlayan spor duvarı, elektron mikroskopisi ile gözlenebilen üç tabakadan oluşmuştur. Bunlar; **Ekzospore**: Elektron-yoğun olan en dıştaki, glikoprotein yapısındaki tabakadır. **Endospore**: Elektron-fakir ve temel birleşeni kitin olan tabakadır.

Ekzospora bir köprü ile bağlanmıştır. Endospor tabakasının ön (anterior) ucu sporun en ince kısmıdır ve polar tüpün dışarı çıkması esnasında parçalanır. **Hücre membranı:** Yaklaşık 7 nm kalınlığında olan ve sitoplazmayı kuşatan en içteki tabakadır (9,11,13).

### 2.3.1.2. Sporoplazma

Spor sitoplazması; bir veya iki çekirdekli nükleus, prokaryotik boyda ribozomlar, karakteristik bir şekilde konumlanmış endoplazmik retikulum içerir. Çekirdek ökaryotik tiptedir. Mitokondri, peroksizom ve tipik bir golgi aygıtına da sahip değildir (7,11,13)

### 2.3.1.3. Ekstrüzyon Aparatı

Ekstrüzyon aparatı; sporun anterior ucundaki ankoring (çapa şeklinde) diske mantar şeklinde bağlanan uzun polar filament, polaroplast adı verilen atipik bir golgi cisimciği ve arka (posterior) vaküolden oluşmaktadır. Ankoring diske bağlandığı düz (manubroid) kısım ve türüne bağlı olarak sporaplasma etrafında 4-30 sarmal oluşturan posterior kısım olmak üzere iki bölgeye ayrılmaktadır. Polar filamentin manubroid kısmı ve ön uca en yakın olan sarmalı distaldeki sarmallardan daha geniş çapa sahiptir. Polaroplast, atipik bir golgi cisimciğidir. Lamellar ve vesiculer olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Lamellar polaroplast membranları çoğunlukla anteriorda lokalize olmuştur. Vesiculer polaroplast ise tubuler şekildedir ve sporun merkezine doğru lokalize olmuştur. Posterior vaküol, ekstrüzyon aparatının üçünü komponentidir. Büyüklükleri ve şekilleri oldukça farklı olan posterior vakuol, sporun arka kısmında lokalize olmuştur ve içeriği tipik bir unit membran ile sınırlandırılmıştır. Polar filamentin bu yapı tarafından meydana getirildiği düşünülmektedir (11,13,2)

### 2.3.1.4. *Enterocytozoon bienersi*'nin Morfolojik Özellikleri

*Enterocytozoon bienersi*, insanlarda en sık enfeksiyon oluşturan ve HIV pozitif hastalarda kronik ishal etkeni olan mikrosporidia türlerdendir. Tüm gelişim evrelerinde konak hücre sitoplazması ile direkt temas halinde olup, sporofor kese veya pansporoblastik zar oluşmamaktadır. Türe özgü olan gelişmenin erken dönemlerinde uzunlamasına çekirdek bulunmakta olup, bölünme ve sporogoni evrelerinde yuvarlak şekil almakta ve sonra 6 µm çapında çok sayıda çekirdek oluşmaktadır. Bu türe özgü sitoplazma içinde polar tüp ve elektron yoğun diskler bulunmaktadır. Erişkin sporlar oval, 1-1.6 µm uzunlukta, 0.7-1 µm genişlikte olup iki sıra halinde 5-7 kıvrımlı polar tüp içermektedir (10,11).

## 2.4. HAYAT DÖNGÜSÜ

Mikrosporidia türleri, omurgalı ve omurgasız konakları enfekte edebilen zorunlu hücre içi parazitidir. Hatta bu protozoonlar başka parazitlerle aynı hücreyi enfekte edebilmektedirler. Bilinen bir vektör veya ara konakları ve hücre dışında herhangi bir metabolik aktivasyonları yoktur (10,14). Uygun şartlar altında ve uygun konakta bulaşma yoluna bağlı olarak sporların konak hücreye girişiyle enfeksiyon başlamaktadır. Mikrosporidiaların hayatı 3 fazda gerçekleşmektedir.

### 2.4.1. Faz I- Enfektif /Çevresel Faz

Hayatın ekstrasellüler fazıdır. Çevre şartlarına dirençli olan ve uzun süre enfekte kalabilen sporlar direkt temas veya ağız yoluyla alınmaktadır. Sporlar, çeşitli fiziksel ve kimyasal değişiklikler (uygun pH, sıcaklık, nem, iyon konsantrasyonları, sindirim enzimleri, basınç gibi) ve diğer bazı uyarıların etkisiyle konak enterositlerine girer ve burada sporun çimlenmesi aktifleşir. Primer enfeksiyonun lokalizasyonunun bulaş yoluna bağlı olduğu, tipik olarak gastrointestinal ve solunum sistemi epitel hücrelerinde olduğu bildirilmektedir. Uygun şartlar altında (uygun  $K^+$  ve  $Ca^{++}$  iyon konsantrasyonunda) spor uygun konak tarafından alındıktan sonra helezon şeklindeki polar tüp düzleşir ve iç içe katlanmış gibi duran bu yapı dışarı doğru uzanır ve konak hücresi içerisine sporoplazma boşaltılması ile hücre enfekte olur. Konak hücre içerisinde, sporlardan serbest kalan sporoplazmalar dış yüzeyleriyle yoğun görünüşü ile tanımlanan sporontları geliştirmek için merontları oluşturmaktadır (6,10,11).

### 2.4.2. Faz II- Proliferatif Faz/ Üreme Fazı

Mikrosporadiaların hayat döngüsünün bir parçası olan ve intrasellüler gelişmenin gerçekleştiği ilk fazdır. Bu faz, spor şekillenmesine bağlı olarak parazit sporoplazmasının büyüüp geliştiği ve bölünerek çoğaldığı fazdır. Proliferatif faz, merogoni ve sporogoni olmak üzere iki önemli aşamada gerçekleşir. Bu iki aşamada, nükleer kılıfın bozulmadan parazit nükleusunun bölünmesidir (15). Sporoplazmanın uygun bir konağa girmesiyle oluşan merontlar, yapısal olarak basit ve tek katlı hücre zarına sahip hücrelerdir. Bunlar defalarca ikiye (*Encephalitozoon*, *Nosema*, *Vittaforma* cinsleri) veya çoğa (*Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora* cinsleri) bölünerek çoğalırlar (6,15). Bölünme sırasında ilk olarak nükleer kılıf bozulmadan parazitin nükleusu bölünmektedir (Karyokinesiz). Karyokinesiz sonucunda yuvarlaklaşmış çok çekirdekli hücreler oluşur. Hücre bölünmesinde karyokinesizi

sitokinezis takip eder ve bu çoğalma sonucunda tek bir hücre içerisinde yaklaşık 50-100 meront oluşur. Bu merontlar; enterosit, makrofaj, mezenkim hücreleri gibi farklı hücrelerde ve besinleri bu konak hücrelerden absorbe ederek gelişimlerine devam ederler (15).

Merontlar, konak hücre sitoplazmasıyla direk temas halinde (*Nosema*, *Enterocytozoon* cinsleri), konak orjinli oluşan parazitoforus vakuol içinde (*Encephalitozoon* cinsi), parazit tarafından salgılanan sporoforoz vakuol içinde (*Pleistophora*, *Trachipleistophora* cinsleri) veya konağın endoplazmik retikulumuyla (*Endoreticularis*, *Vittaforma* cinsleri) çevrilerek gelişir ve sonuçta sporontları oluştururlar(11).

#### **2.4.3. Faz III- Sporogonik Faz**

Sporontların oluşması ile sporogonik faz başlamaktadır. Sporontlar ikiye bölünme ya da çoklu füzyon ile çoğalıp, sporoblastları oluşturur. Oval şekilli sporoblastların olgunlaşmasıyla sonuç olarak olgun sporlar meydana gelir (10). Sporogoni, konağın oluşturduğu membran ile sınırlandırılmış parazitoforus vakuolde (*Encephalitozoon* spp.), konak hücre sitoplazmasından serbest olarak (*E. bienersi*) ya da sporoforoz vakuol (*Pleistophora*, *Trachipleistophora* cinsleri) içinde gelişir. Sporlar konak hücrelerini tamamen doldurduğu zaman plazma membran patlar ve sporlar çevreye dağılır. Bu sporlar ya konak içerisinde yeni bölgelere taşınarak çevredeki diğer hücreleri enfekte edebilir ya da yeni konakları enfekte edebilmek için idrarla veya dışkı ile dışarı atılabilirler (6,14,15).

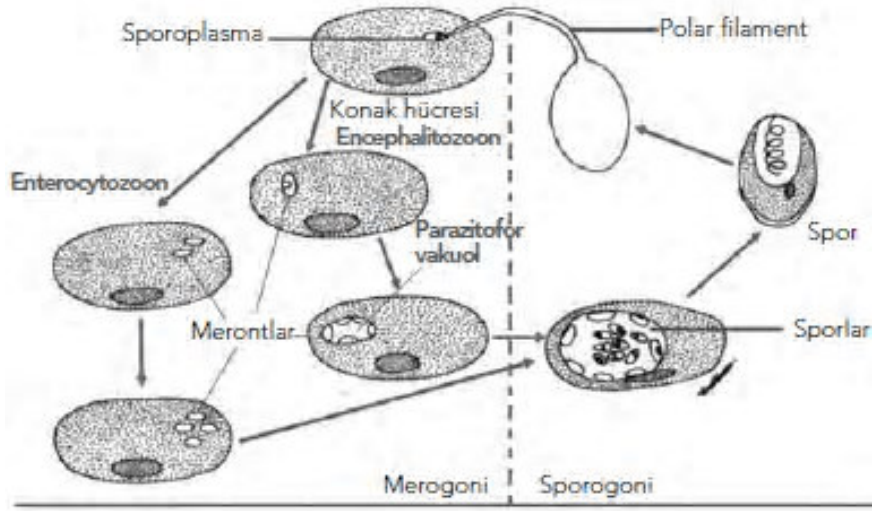
#### **2.4.4. *Enterocytozoon bienersi*'nin Hayat Döngüsü**

*Enterocytozoon bienersi*'nin hayat döngüsü basit veya kompleks olabileceği gibi seksüel veya aseksüel çoğalmalarından her ikisini birden de gerçekleştirebilir. Bu kompleks hayat döngüsüne sahip olanlar birden fazla zorunlu konağa ve 3 farklı spor tipine sahip olabilmektedir. Bu formlar, spesifik konak ve dokulara özelleşme eğilimdedirler. Basit hayat döngüsü ve aseksüel üreme özelliğine sahip olanlar hemen hemen her çeşit ökaryotik hücreyi (laboratuvar şartları altında) enfekte etme bakımından geniş bir tolerans göstermektedir (16).

Enfekte spor, polar tüpü ile konağın intestinal enterosit hücre sitoplazması içerisine sporoplazmasını enjekte ederek boşaltmaktadır. Gelişmeleri intrasellüler olarak gerçekleşmektedir. Proliferatif hücre tek bir nükleus bölünmesi gerçekleştirir. Yan yana

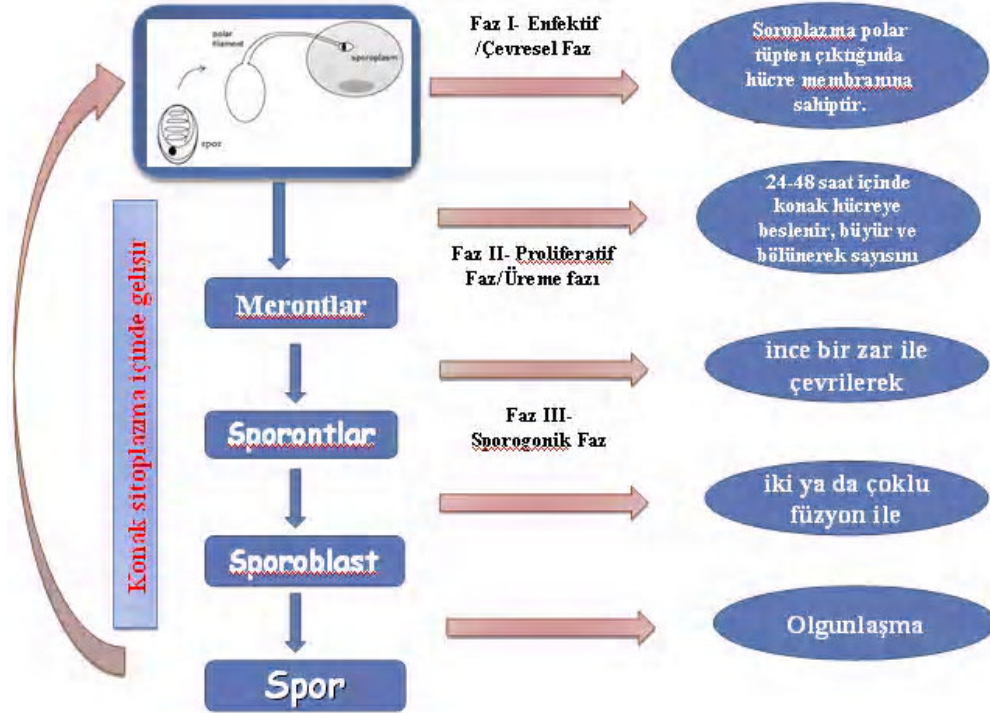
bulunan proliferatif hücreler son sitoplazma bölünmesinden sonra hücre sitoplazmasıyla ilgisi kalmamaktadır.

Sporoplazma, çekirdekten ve sitoplazmadan meydana gelmektedir. Sporoplazmanın büyük bir parçası ribozomlardan oluşmaktadır. Sporoplazma polar tüpten çıktığı zaman bir hücre membranına sahiptir. 24-48 saat içinde konak hücreye ulaşır ve bölünerek sayısını artırır. Sporogoni ile merontlar ince bir zarla çevrilerek sporontlar oluşmaktadır (11). Sporontlar ikiye bölünme ya da çoklu füzyon ile çoğalıp, sporoblastları oluşturur. Oval şekilli sporoblastların olgunlaşmasıyla olgun sporlar meydana gelir. Sporlar konak hücrelerini tamamen doldurduğu zaman plazma membran patlar ve sporlar çevreye dağılır (16,17).



Şekil 2.3. *E.bieneusi* Hayat Döngüsü (12)





Şekil 2.4. *E. bienersi* Hayat Döngüsü

## 2.5. MİKROSPORODİALARIN HÜCREYE GİRİŞ MEKANİZMALARI

Mikrosporadiaların yeni konak hücre içerisine giriş mekanizması oldukça karmaşıktır. Polar tüpün nasıl boşaltıldığının keşfedilmesine rağmen konak hücre membranına nasıl penetre olduğu hala açıklık kazanmamıştır. Sporların enfektif sporoplazmasının hassas bir konağa transferi bir seri kompleks aktiviteler sonucu oluşurken, spor çimlenmesinin aktivasyonu için de çevre şartlarının uygun olması gerekmektedir. Sporun geçirgenliğinde ve polar filamentin ters dönüşünde etkili olan bu çevresel değişiklikler fiziksel veya kimyasal olabilmektedir (11,18).

Birçok çalışma ilk spor aktivasyonunun değişken olduğunu ve organizmaya bağlı olduğunu göstermiştir. Bazı çalışmalarda enfektif sporların dışarıda aktive olduğu, yüksek basınç ve nem gibi çeşitli fiziksel değişikliklerin spor üzerine fazla bir etkisinin bulunmadığı belirtilmiştir. Mikrosporidia enfeksiyonlarının çoğu konağın sindirim sisteminde sporların kimyasal uyarılarına (pH, sindirim enzimleri, iyon konsantrasyonları vb.) bağlı olarak başlamaktadır (11).

Aktive olan spor, sporoplazmanın kısa zamanda bölünerek yıkılmasına neden olmaktadır. Spor içinde ozmotik basıncın anormal artması posterior vakuolu genişletir



ve bu değişim polar tüpün ters dönüşünü tetikler. Spordan çıkan polar t p tipine göre  $100 \mu\text{ms}^{-1}$ 'i aşıan bir hızla hareket edebilir. Sporoplazma 15-500 ms hızında polar tüpe doğru yönelerek tüple birleşir ve birkaç saniye sonra tüpten ayrılmasıyla hücre invazyonu gerçekleşir. Ayrıca enfektif spor konak hücre içerisine fagositoz yoluyla da alınabilmektedir. Bu olayların sporoplazma içerisindeki karbonhidrat oranına ve özellikle de trehaloz enziminin aracılık ettiği trehalozun glikoz ve diğer metabolitlere dönüşümüne bağlı olduğu düşünülmektedir (2,6).

Mikrosporidialar hücre içerisine deneysel olarak gösterilmiş iki yol ile giriş yapmaktadır;

1. Aktif invazyon
2. Endositozis

### **2.5.1. Aktif İnvazyon**

Başlangıçta polar t p konak hücre plazma membranına penetre olmaktadır ve hipodermik iğne şeklinde konak hücre sitoplazmasına sporoplazmalarını enjekte etmektedir. Sporoplazmanın polar tüpten lümene doğru ge işı 5-30 sn'de gerçekleşmektedir. *E. bienewisi*, polar t p yardımıyla konak hücre plazma membranını delerek sitoplazma kaybı olmadan hücre içerisine penetre olmaktadır (15). İnvazyon süreci sonunda mikrosporidia sporu direkt konak hücrenin sitoplazmasında veya bir vakuol içinde gelişimine devam etmektedir.

### **2.5.2. Endositosiz**

Mikrosporidia sporlarının çoğu, polar t p açılması olmadan internalizasyonla sitoplazmaya girer. Aktin-bağımlı fagositozun aracılık ettiği sporların hücre içersine girişı sitokalazin-D tarafından inhibe edilebilir. Konak hücre tarafından spor endositoz yolu ile hücre içine alınır ve spor fagozomla çevrilir. İçersinde mikrosporidia sporlarını içeren fagozomlar önce endozomal daha sonra lizozomal kompartmanlara dönüşür. Franzen'ın yaptığı çalışmada (18) lizozomal kompartmanlar içersinde sporların hızlıca yıkıldığı fakat bazı sporoplazmaların olgunlaşan lizozomlardan kaçtığı ve polar t p salınması yoluyla konak hücre sitoplazmasını enfekte ettiği gösterilmiştir. Endositozda bir reseptörün görev aldığına dair bir kanıt yoktur fakat polar tüpün uzantısı hareketsiz sporun uzak hedef hücrelerle az ya da çok etkileşiminin bir adaptasyonu şeklinde olabileceği düşünülmektedir.

## 2.6. EPİDEMİYOLOJİ

Doğada yaygın olarak bulunan Mikrosporidialar tüm dünyada görülmektedir fakat prevalansı büyük ölçüde değişiklik göstermektedir. Fırsatçı patojenlerden biri olması nedeniyle immun yetmezlikli bireylerde prevalansın daha yüksek olduğu bildirilmektedir (19). Tür çeşitliliğinin olması, farklı doku ve organlara yerleşmesi ve bundan dolayı çeşitli mikrosporidia enfeksiyonlarının görülmesi güvenli bir prevalansın elde edilmesini zorlaştırmaktadır. 1990 yılından bu zamana kadar AIDS hastalarında mikrosporidia prevalansının coğrafik bölgelere ve yapılan tanı testlerine göre %1,5-50 arasında değiştiği belirtilmektedir (4,7,13,20). Mikrosporidiosis vakalarının çoğunluğunun özellikle; Güneydoğu Asya (Hindistan, Tayland), Orta-Doğu (Türkiye), Avrupa, Afrika (Senegal, Tunus, Mali, Ouganda, Zimbabve) ve Latin Amerika (Brezilya, Peru) da HIV enfeksiyonlu hastalarda görüldüğü bildirilmektedir (9,13,21-33). Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve Avustralya da bulunan HIV ile enfekte hastalarda prevalansı %2-50 arasında veya daha yüksek oranda görülmektedir (3,19,34).

Başlıca AIDS'li hastalar olmak üzere enfeksiyon akut diyareden çok kronik diyare şeklinde görülmektedir. Birçok araştırmalar sonucu çocuklara göre HIV ile enfekte yetişkin kişilerde prevalansın daha yüksek olduğu bildirilmektedir (19). Fırsatçı patojen olan mikrosporidia'nın ishali olan AIDS'li hastalarda görülme oranının %39 olduğu belirtilmektedir. Görülme oranı, parazitin türüne ve konağın immün durumuna göre değişebilmektedir (3,22,35,36). Mikrosporidiosis, AIDS hastalarının yanı sıra; kalp, akciğer ve kemik iliği transplantasyonu olan diğer immünokompramize hastalarda da görülmektedir (37). HIV negatif kişilerde mikrosporidiosis prevalansı ile ilgili bilgiler sınırlıdır. İntestinal mikrosporidial enfeksiyonlarda diyareli HIV negatif hasta sayısı nadirdir ve seyahat edenlerde geçici diyare ile ilişkili vaka sayısı az olarak bildirilmiştir. (38-41).

Bağışıklık sistemi baskılanmış HIV ile enfekte hastalarda etkin bir şekilde antiretroviral tedavi uygulanmasıyla gelişmiş ülkelerde mikrosporidia enfeksiyon vaka sayısının azaldığı tespit edilmiştir (20). Fakat HIV ile enfekte olan Alt sahra Afrika da tedavilerin tam uygulanmaması sonucu burada mikrosporidiosis yüksek morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır (22-24).

Son yıllarda daha kompleks serolojik testlerle; kan donöleri, köpek yetiştiricileri, hamile bayanlar, mezbaha ve orman işçileri gibi HIV(-) kişilerde mikrosporidia-spesifik

antikorları tespit edilmiş ve oranın %1,3-8 arasında değiştiği bildirilmiştir (42-44). HIV(-) olan kişilerde mikroskopik bakı ve PCR teknikleri kullanılarak benzer prevalans çalışmaları sonucunda endemik bölgelerde %3.3-10, diyaresi olan veya olmayan çocuklarda %1.7-17.4 ve yaşlılarda %17 oranında görüldüğü saptanmıştır (4,7, 26,45).

İnsanlarda en sık hastalığa yola açan mikrosporidia türlerinden *E. bieneusi* ilk kez 1985 yılında Haitili AIDS'li bir hastanın enterositlerinde tespit edilmiştir (46). *E. bieneusi* enfeksiyonunun HIV(+) hastalarda %50'ye kadar ulaştığı bildirilmektedir (36). İsviçre'de homoseksüel erkeklerde ve diğer parazit enfeksiyonu olan kişilerde seroprevalans sonuçlarının en yüksek oranları %0-42 arasında değişmektedir (47-49). Geçmişten bugüne bakıldığında serolojik verilerin yorumlanması yeni mikrosporidia türlerin tanımlanmasıyla sınırlı kalmaktadır. Örneğin *E. bieneusi*'nin serolojik testler için yeterli miktarda antijen elde edilmesi gerekli olan kültürü hala yapılamamaktadır. Buna ek olarak diğer paraziter enfeksiyonlar ve çapraz reaksiyonların olması yanlış pozitiflikler verebilmektedir. *E. bieneusi* çoğunlukla immünokompromize ve CD4 hücre sayısı 100 hücre/ml'nin altındaki hastalarda yaygın olarak görülmektedir (9,50-52).

İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri, Arjantin, Zambia, Uganda, Almanya, Fransa, Congo, Avustralya ve Hollanda gibi dünyanın birçok yerinde AIDS'li hastalarda rapor edilmiştir (19). Bu hastalarda gözlenen en önemli bulgular, kronik ishal ve kilo kaybıdır. Kronik ishallerli AIDS hastalarında yapılan endoskopik çalışmalar sonucunda, *E. bieneusi* prevalansı %7-50 olarak saptanmıştır. Bununla beraber koprodiagnostik tekniklerin kullanıldığı çalışmalarda, HIV (+) kronik ishallerli hastalarda prevalans %9-16 bulunmuştur (10). Kongo da 2006-2007 yılları arasında AIDS hastalarında çeşitli yöntemlerle fırsatçı intestinal parazitlerin dağılımının araştırıldığı bir çalışmada *E. bieneusi* oranı %5.1 olarak tespit edilmiştir (53).

Uganda'da 72 saat ve üzerinde ishal şikayeti olan çocuklardan alınan örnekler de PCR yöntemi kullanılarak %17,4 oranında *E. bieneusi*'ye rastlanmıştır. Aynı zamanda yağmurlu mevsimlerde parazitin görülme sıklığında bir artış olduğu bildirilmiştir (54). Çek Cumhuriyetinde *Enterocytozoon* ve *Encephalitozoon* prevalansının koprodiagnostik ve moleküler yöntemlerle 9 kişide *E. bieneusi* olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak sağlıklı bireylerde de yaygın olabileceği bildirilmiştir (55).

Son zamanlarda Mikrosporidia organ transplantasyonu olan hastalarda hayati tehdit eden patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir. İspanya da HIV(-) olan ve böbrek

nakli yapılmış 2 kişide ilk vakalarında *E. bieneusi* genotip D saptanmış ve sonuçta dirençli ishal ve etiyolojisi bilinmeyen kronik ateş gibi farklı semptomların bulunduğu durumlarda sistemik olarak bu parazitin araştırılması gerektiği belirtilmiştir (56).

## 2.7. CİNS VE TÜRLERİN TAKSONOMİK ÖZELLİKLERİ

Mikrosporidiaların taksonomik özellikleri; parazit-konak ilişkileri, spor veya diğer gelişme dönemlerinin büyüklüğü, tek veya iki nükleusa sahip olması, spor içindeki polar filamentin helozon sayısı ve organizmanın konak hücre sitoplazması ile ilişkisine göre ışık ve elektron mikroskobu incelemelerine dayanarak belirlenmektedir.

Bu güne kadar tanımlanmış 144 cins ve bu cinslere bağlı 1200'den fazla türü bulunmasına rağmen 7 cinse bağlı 14 mikrosporidia türü insanda patojen olarak tanımlanmıştır. İnsanda enfeksiyon oluşturan *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma* ve *Brachiola* olmak üzere bu 7 cinse bağlı olan türlerin, bu gün için tespit edilebilmiş farklı taksonomik özellikleri bilinmektedir. Bu türlerin morfolojik özellikleri ve kliniği tablo 1ve 2'de özetlendiği gibidir. (7,8).

**Tablo 2.1.** İnsanı enfekte eden mikrosporidia türlerinin morfolojik özellikleri.

| <b>Tür</b>                       | <b>Çekirdek Yapısı</b> | <b>Gelişim Yeri</b>                                | <b>Spor Boyutu (µm)</b>             | <b>Polar Tüp Sarmal Sayısı</b> |
|----------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| <b><i>Enterocytozoon</i></b>     |                        |                                                    |                                     |                                |
| <i>E.bieneusi</i>                | Tek parçalı            | Konak hücre sitoplazması ile direkt temas halinde  | 1.5 x 0.5                           | 5-7                            |
| <b><i>Encephalitozoon</i></b>    |                        |                                                    |                                     |                                |
| <i>E.cuniculi</i>                | Tek parçalı            | Parazitoforus vakuol içinde                        | 2.5-3.2 x 1.2-1.6                   | 4-7                            |
| <i>E.hellem</i>                  | Tek parçalı            | Parazitoforus vakuol içinde                        | 2-2.5 x 1-1.5                       | 6-8                            |
| <i>E.intestinalis</i>            | Tek parçalı            | Parazitoforus vakuol içinde                        | 2.2 x 1.2                           | 5-7                            |
| <b><i>Pleistophora</i></b>       | Tek parçalı            | Sporofor vezikül                                   | 2.8 x 3.4                           | 9-12                           |
| <b><i>Trachipleistophora</i></b> |                        |                                                    |                                     |                                |
| <i>T.hominis</i>                 | Tek parçalı            | Sporofor vezikül                                   | 5.2 x 2.4                           | 11                             |
| <i>T. anthropophthera</i>        | Tek parçalı            | Sporofor vezikül                                   | Tip I: 3.7 x 2<br>Tip II: 2.5 x 1.4 | 4-5                            |
| <b><i>Vittaforma</i></b>         |                        |                                                    |                                     |                                |
| <i>V.corneae</i>                 | İki parçalı            | Konak hücre endoplazmik retikulumu ile çevrelenmiş | 3.8 x 1.2                           | 5-7                            |
| <b><i>Nosema</i></b>             |                        |                                                    |                                     |                                |
| <i>N. ocularum</i>               | İki parçalı            | Konak hücre sitoplazması ile direkt temas halinde  | 5 x 3                               | 9-12                           |
| <b><i>Brachiola sp.</i></b>      | İki parçalı            | Konak hücre sitoplazması ile direkt temas halinde  | 2.5-2.9 x 1.9-2                     | 7-10                           |

**Tablo 2.2.** İnsanı enfekte eden mikrosporidia türlerinin klinik özellikleri.

| <b>Tür</b>                | <b>Klinik Tablo</b>                                                                                                                  |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Enterocytozoon</b>     |                                                                                                                                      |
| <i>E.bieneusi</i>         | Kronik Diyare, Kolesistit, Kolanjit, Sinüzit, Bronşit, Pnömoni.                                                                      |
| <b>Encephalitozoon</b>    |                                                                                                                                      |
| <i>E.cuniculi</i>         | Ensefalit, Hepatit, Kolesistit, Kronik Diyare Nefrit Rinit Sinüzit Dissemine Enfeksiyonlar Keratokonjiktivit,                        |
| <i>E.hellem</i>           | Keratokonjiktivit, Sinüzit, Bronşit, Pnömoni, Peritonit, Nefrit, Rinit, Üretrit, Sistit, Prostatik Apse, Üriner Sistem Enfeksiyonu,  |
| <i>E.intestinalis</i>     | Kronik Diyare, Kolesistit, Kolanjit, Sinüzit, Bronşit, Pnömoni, Peritonit, Nefrit, Rinit, Keratokonjiktivit, Dissemine Enfeksiyonlar |
| <b>Pleistophora</b>       |                                                                                                                                      |
| <i>P. ronneafiei</i>      | Miyozit                                                                                                                              |
| <b>Trachipleistophora</b> |                                                                                                                                      |
| <i>T.hominis</i>          | Miyozit, Keratokonjiktivit, Rinit, Sinüzit                                                                                           |
| <i>T. anthropophthera</i> | Keratit, Miyozit, Ensefalit, Dissemine Enfeksiyonlar                                                                                 |
| <b>Vittaforma</b>         |                                                                                                                                      |
| <i>V.corneae</i>          | Keratit, Nefrit                                                                                                                      |
| <b>Nosema</b>             |                                                                                                                                      |
| <i>N. ocularum</i>        | Keratokonjiktivit,                                                                                                                   |
| <b>Brachiola</b>          |                                                                                                                                      |
| <i>B.connori</i>          | Dissemine Enfeksiyonlar                                                                                                              |
| <i>B. vesicularum</i>     | Miyozit                                                                                                                              |
| <i>B. algerae</i>         | Keratokonjiktivit, Keratit, Deri Ülserleri, Miyozit                                                                                  |
| <b>Microsporidia</b>      |                                                                                                                                      |
| <i>M. africanum</i>       | Kornea ülseri                                                                                                                        |
| <i>M. ceylonensis</i>     | Kornea ülseri                                                                                                                        |

## 2.8. BULAŞMA

AIDS salgınlarnn başlangıcıyla insanlarda mikrosporidia enfeksiyonları görölmeye başlamıştır. Mikrosporidialar geniş yelpazede çok sayıda omurgalı ve omurgasız konaklar içerisinde ökaryotik hücreleri enfekte edebilen parazitlerin son derece farklı bir grubudur.

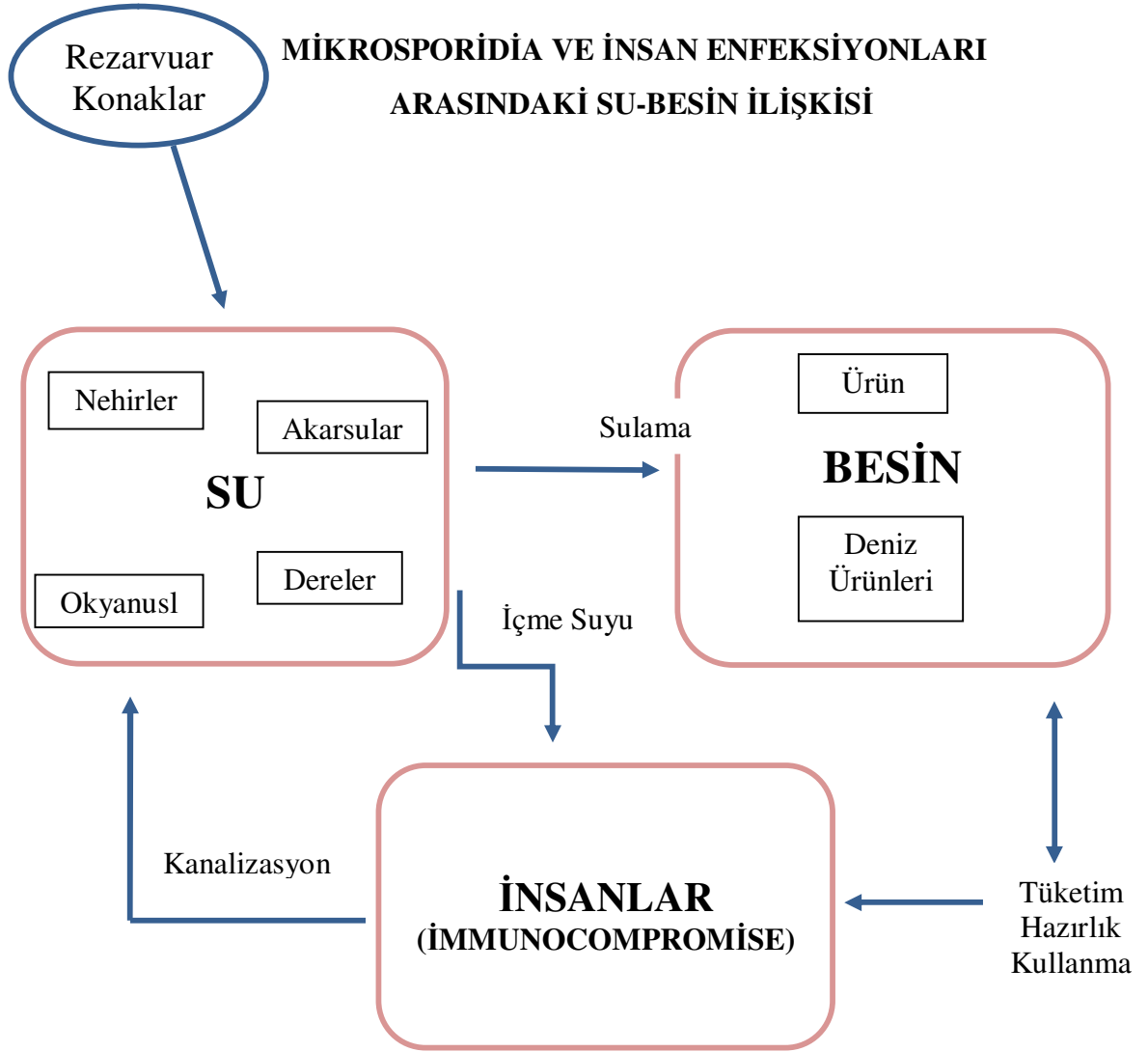
Mikrosporidiaların enfekte formu sporlardır. Sporlar, protein ve kitinden oluşmuş koruyucu bir duvara sahip olduğundan dolayı oldukça dirençlidir. Mikrosporidia sporları çok özel bir içeriğe sahiptir. Mikrosporidiaların, kontaminasyon kaynakları ve bulaşma şekilleri tam olarak anlaşılmamasına rağmen, dışkı, idrar ve solunum yolu sekresyonlarında serbest olarak bulunan bu organizma için enfekte insan veya hayvanlar enfeksiyon kaynağı rolü oynamaktadır. Transmisyon kişiden kişiye direk olduğu gibi su, süt, yiyecek, homoseksüel ilişki, yüzme havuzlarındaki sular, saunalar, hayvan ve vektör aracılığı ile gerçekleşmektedir. İnsan mikrosporidiosis'in klinik belirtileri göz önüne alındığında iletim şeklinin; göz, ağız veya solunum yoluyla gerçekleştiği in-vivo çalışmalarla doğrulanmıştır (7,22,57).

Gastrointestinal hastalıklara neden olan ve en yaygın bulunan *E. bienewsi* patojen olarak tanımlanan, insanda görölen 14 mikrosporidia türünden biridir. Geçen 15 yıl içerisinde *E. bienewsi* özellikle; su, vahşi, evcil ve çiftlik hayvanları gibi bulaşma kaynakları tespit edilmiştir.

*Enterocytozoon bienewsi*'nin, hem AIDS'li yetişkinlerde hem de çocuklarda diyarenin en yaygın nedenlerinden biri olduğu belirtilmektedir (58). Enfeksiyon kaynakları ve bulaşma hakkında belirsizlikler bulunmaktadır. Ancak son zamanlarda yüksek hassasiyete sahip ve organizmanın tür ve genotiplerinin tespitinde PCR yöntemlerinin kullanılmasıyla bu enfeksiyon hakkında bilgiler artmıştır. *E. bienewsi* genotiplendirilmesi rRNA geni ITS bölgesinin polimorfik sekans analizine göre belirlenmiştir (59). Son epidemiyolojik çalışmalarda *E. bienewsi*'nin kişiden kişiye direk, zoonotik, kontamine su ve besinlerle bulaşabileceği gösterilmektedir (58,60-62).

*Enterocytozoon bienewsi* enfeksiyonu olan hastalarda bağırsak tutulumunun sık, solunum yolu tutulumunun ise nadir olması; fekal-oral, oral-oral, aerosol inhalasyonu ya da kontamine yiyecek ve içeceklerin alınması gibi farklı geçiş yolları olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca oküler enfeksiyonların kaynağı da tam olarak bilinmemektedir.

Direkt inokülasyon yolu ile ya da sistemik infeksiyon sonucu göz tutulumu olabileceği düşünülmektedir (36).



Şekil 2.5. Mikrosporidia ve insan enfeksiyonları arasındaki su-besin ilişkisi (63).

### 2.8.1. Zoonotik Bulaşma

Bugüne kadar mikrosporidiosis hayvan-insan iletiminin resmi bir kanıtı yoktur. Yapılan araştırmalara göre köpek, kedi, domuz, keçi, eşek, sığır, tavşan gibi evcil ve çiftlik hayvanlarında *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon intestinalis* sporları tanımlanmıştır. Vahşi memeliler (tilki, su samuru, rakun, domuz, sığır, kedi) ve endüstriyel kümes hayvanları, kentsel güvercinler gibi kuşların dışkılarında *E. bieneusi* bulunmuştur (21,60).



Gen sekans analizlerine göre insan ve hayvanlarda aynı suşların olduğunun tespit edilmesi zoonotik bulaşmanın bir kanıtı olarak gösterilmektedir (4,7,21). Özellikle zoonotik bulaşmada köpeklerin dışkılarında bulunan sporların solunum yolu veya oral olarak alınmasıyla enfeksiyonun bulaşabileceği belirtilmektedir. Sporlar, sudan sonra kuraklığa karşı dirençlidirler. Bu nedenle, sporlarla kontamine olmuş su, besin veya solunum yolu ile indirekt zoonotik bulaşmanın olabileceği düşünülmüştür (4,7,64).

### **2.8.2. İnsandan İnsana Bulaşma**

İnsanlar arası bulaşmanın olabileceği göz ardı edilemez. Laboratuvar hayvanları arasında mikrosporidiaların bulaşması üzerine yapılan deneysel araştırmalar, hayvanlarda olduğu gibi insanlar arasında da benzer yollarla bulaşmanın gerçekleşebileceği düşünülmektedir (7,65). Bilindiği gibi mikrosporidia sporları dışkı, idrar ve solunum sekresyonları ile çevreye yayılmaktadır (7,3,66). Bu insanlar arası bulaşmanın muhtemelen oral-fekal yolla, kontamine aerosol inhalasyonu ile gerçekleşebileceği düşünülmektedir.

### **2.8.3. Su Yoluyla Bulaşma**

Bağırsağa yerleşen mikrosporidia türlerinin sporları, su kaynaklarının yüzey sularında ve atıklarında tespit edilmiştir (3,4,7,21,66). Mikrosporidia sporlarında olduğu gibi *E. bieneusi* sporları dış ortama oldukça dayanıklıdır ve suda uzun süre canlı kalabilir. Ayrıca çok küçük oldukları için su filtrelerinden de geçebilirler. Enfekte hayvanın idrarı ve dışkısıyla atılan parazit, suları kontamine edebilir. Bu durum mikroorganizmaların sudan bulaş özelliği ile ilgili varsayımları desteklemektedir (3,4,7,36). Buna ek olarak yüzey suları ile temas eden kara hayvanların dışkılarında da tespit edilmiştir (67). Su ile bulaşmada yüzme havuzları da risk faktörleri arasında yer almaktadır.

### **2.8.4. Besinler Yoluyla Bulaşma**

Yapılan bir epidemiyolojik çalışmada ayda en az bir kere iyi pişmemiş sığır eti yemenin HIV (+) hastalarda mikrosporidiosis açısından bir risk oluşturduğu belirtilmektedir. Besinler yoluyla bulaşmada kontamine suların sulamada kullanılması sonucunda gerçekleşebilir. Mikrosporidia sporlar yalnızca sulama suyu ile değil aynı zamanda bazı bitkilerde de (marul, maydanoz, çilek) saptanmıştır (4,7,13).

### 2.8.5. Transplasental Bulaşma

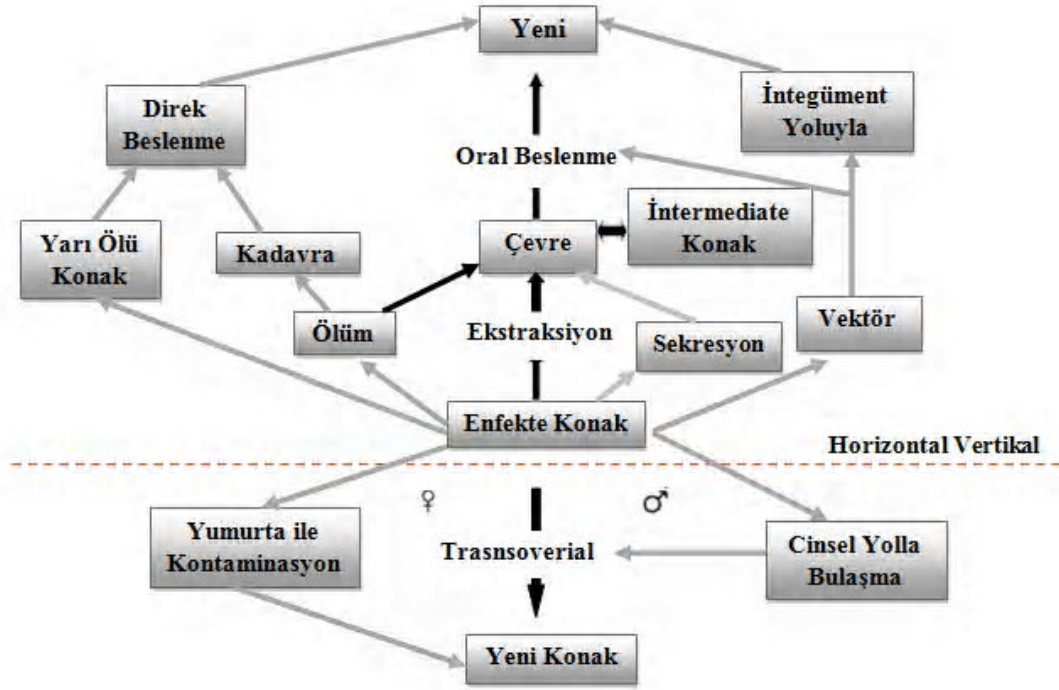
Hayvanlardaki deneysel ve epidemiyolojik alışmalar *Encephalitozoon* türlerinin transplasental olarak anneden bebeğe geçebildiği gösterilmiştir. Ayrıca transplasental geçiş kemirgenler, tavşanlar, etobur ve primatlarda anneden bebeğe vertikal bulaşmanın olduğu bildirilmektedir. Konjenital olarak kazanılmış insan infeksiyonu ise henüz bildirilmemiştir (3,4,7).

### 2.8.6. Seksüel Bulaşma

Mikrosporidia enfeksiyonlarında homoseksüellik risk faktörleri arasında yer almaktadır. İsveç’de yapılan bir çalışmada homoseksüellerin %33’ünde anti-*Encephalitozoon cuniculi* antikorları tespit edilmiş ve transmisyonu katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (68). Üretra veya prostat apsesi olan AIDS hastalarının idrar ve prostat salgılarında mikrosporidia sporları tanımlanmış, bu durumun seksüel geçiş olasılığını artırabileceğini belirtmişlerdir (69-71).

### 2.8.7. Vektoral Bulaşma

Mikrosporidiosisin vektör kaynaklı bulaştığına dair kanıtlar bulunmaktadır. *Brachiola algerae*’nın sivrisinekler için doğal bir patojen olduğu gösterilmiştir (7). Epidemiyolojik çalışmalarda mikrosporidium ile enfekte HIV hastalarının bal arısı veya yaban arısı ile sokulmasının vektör yolu ile bulaşta etkili olabilecek risk faktörlerinden biri olarak belirtilmektedir (72).



Şekil 2.6. Horizontal ve Vertikal bulaşma yolları (73)

## 2.9. TANI

Mikrosporidia'nın tanımlanmasından itibaren dünyanın çeşitli bölgelerinden, farklı türlerin sebep olduğu enfeksiyonlar bildirilmektedir. HIV pozitif hastalarda fırsatçı patojen olmasıyla birlikte son yıllarda immun sistemi sağlıklı kişilerde, özellikle seyahat edenler, çocuklar, yaşlılar, ve organ transplantasyon alıcılarında görülebilmektedir (15,74-77). Mikrosporidian sporların tanımlanması ve mikrosporidiosis'in doğrulanması için kullanılabilir çok sayıda yöntem bulunmaktadır. *E. bienewisi* sporları içinde bu geçerlidir. Bu yöntemlerin çoğu immünokompromize kişilerde enfeksiyonların tanımlanması için geliştirilmiştir. İmmünokompetent hastalardaki mikrosporidial enfeksiyonların semptomları hafif seyirli olmasıyla birlikte kendi kendini sınırlayabilmektedir. Günümüzde doğru tanı için mikrosporidiosis tanısında tek bir tanı yöntemi yerine birden fazla tanı yönteminin kullanılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Tanı için dışkı ya da duodenal drenaj örnekleri taze materyal şeklinde veya %5–10 formolde laboratuvara gönderilebilir. Parazit sporları, çevre koşullarına dirençli ve %10'luk formol ile tespit sonrasında dahi canlılıklarını korumaktadır. Fakat hücre kültürü ya da moleküler yöntemler için taze materyalle çalışmak gerekmektedir. Dışkı

örneklerinin ve diğer vücut sıvılarından boyalı preparatların hazırlanmasında önce 500xg'de 10 dk santrifüj edilmesinin spor saptama olasılığını artırmasından dolayı oldukça önemli olduğu belirtilmektedir. Trichrome boyamadan önce dışkıya mukolitik ajan olarak 1:1 oranında %10 'luk KOH ile muamele edilmesinin daha kaliteli smearlerin sağlandığını, chromotrope 2R boyamanın duyarlılığını artırdığı bildirilmektedir (75).

Rutinde daha çok immunofloresan işaretleme ve konvansiyonel tanı yöntemlerinin tercih edildiği *E. bienersi* enfeksiyonlarında farklı tanı yöntemleri de kullanılmaktadır. Sporlar insanda 1.8x1 µm kadar boyutlarda olup, dışkı ve vücut sıvılarında Calcofluor, Giemsa, Asit-Fast Trichrome, Weber'in Trichrome Boyası (MTS) gibi boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Kullanılan boyama yöntemlerinde sporların benzer boyutlarındaki bakteri, maya ve küf sporlarından ayrıca coccidian ookistlerinden ayırt edilmesi önemlidir.

Tanıda genellikle transmisyon elektron mikroskobu (TEM) geleneksel altın standart olarak kabul edilse de örneklerin çok sayıda kullanılacağı durumlarda bir dezavantaj olarak görülmektedir.

Küçük olmaları, hücre içi yerleşimleri ve zor boyanma özellikleri nedeniyle, geleneksel yöntemlerle saptanması güç olan bu fırsatçı patojenlerin neden oldukları enfeksiyonların tanısında günümüzde konvansiyonel tanı yöntemleri, transmisyon elektron mikroskopisi ve araştırma laboratuvarlarında PCR gibi nükleik asit amplifikasyon teknikler mikrosporidiaların türe spesifik ve belirli bir genotipin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Parazitin immunolojik tanısında ise kullanılan yöntemler olarak, serolojik testler (CIA: Karbon Immun Assay, IFA: monoklonal immunofloresan antikor testleri, ELISA, kompleman fiksasyon, Western blot), moleküler tabanlı yöntemler olarak gruplandırılabilir.

### **2.9.1. Konvansiyonel Tanı Yöntemleri**

#### **2.9.1.1. Modifiye Trichrome Boyaları**

Dışkı incelemesinde standart olarak kullanılan bir boyama yöntemidir. Boyanın farklı modifikasyonları bulunmaktadır. Modifiye trichrome boyama yöntemi mikrosporidia sporlarının boyayı içerisine alması oldukça zordur. Bu nedenle Chromotrope 2R kullanılmakta ve boyama süresi (90 dk.) çok daha uzun tutulmaktadır (75). Modifiye trichrome boyama tanıda daha duyarlıdır. Bu boyama yöntemi ile 0.8-1.4 µm

büyükluğündeki sporlar; yeşil (Weber modifikasyonu) veya mavi (Ryan Modifikasyonu) zemin üzerinde parlak pembemsi-kırmızı renkte görülmektedir. Modifiye trichrome boyanın duyarlılık ve özgüllüğü kesin olarak belirlenememiştir. Fakat bu boyama yönteminde bakterilerden ayırt etmeyi sağlayan diyagonal ve ekvatorial çizgiler içerdiğinden diğer boyama tekniklerine oranla daha yararlı olduğu bildirilmiştir (3,23). 50°C de 10 dk, 37°C de 30 dk boyanarak sporların daha belirgin görülmesinin sağlayacağı bildirilmektedir (78-80).

Ignitus ve ark. Asit-Fast Trichrome boyanın, kinyon asit-fast boyama yöntemine benzediğini fakat karbol fuksin solüsyonunun hazırlanışındaki farklılıkların bulunuşuyla birbirinden ayrıldığını bildirmektedirler. Bu yöntemle boyanmış preparatlarda *Cryptosporidium* ve *Isospora* ookistleri mor veya parlak pembe boyanırken, mikrosporidia sporları pembe boyanmakta ve soluk diyagonal ve ekvatoryal çizgilenmeler göstermektedir (81). Asit-Fast Trichrome boyası hem *Cryptosporodim parvum* ookistlerini hem de mikrosporidium sporlarının tanısında kullanılan yöntemlerden biridir.

Gram-Chromotrope boyama yönteminde sürüntü örnekleri ısıya tespit edildikten sonra Gram boyasıyla boyanmaktadır. Daha sonra Chromotrop boyayla boyanarak preparat asit alkolle çalkalanır ve dehidrasyon yapılır. Sıcak uygulanan Gram Chromotrope boyama ile boyama süresi beş dakikaya indirilmiştir. Bu yöntemle soluk yeşil bir zemin üzerinde koyu mor boyanan mikrosporidial sporların kuşak şeklinde görülen çizgilenmeler tanı koydurucudur (75, 82).

### **2.9.1.2. Giemsa Boyama**

Mikrosporidia tanısında dışkı örnekleri Giemsa ile boyanabilir ve sporlar açık mavi renkte görülmektedir. Sporların artık maddelerden ayırt edilmesi oldukça zordur. Bu nedenle vücut sıvısı, sitolojik preparatlar veya çok az artefaktın bulunabileceği intestinal biyopsi örneklerinde Giemsa boyama yöntemi kullanılabilir. Sporların ayrımı dışkı preparatlarındakinden daha kolay olmaktadır. Dışkı, çok fazla mikroorganizma içeren bir materyal olduğundan dolayı mikrosporidia sporlarının ayırt edilmesinde yeterli olmadıkları için, tanıda tercih edilmemektedir (75).

### 2.9.1.3. Floresan Boyalar

Floresan mikroskobunun kullanılmasını gerektiren kitin boyalardır (75,83). Başlıca Calcofluor White M2R, Fungi Fluor ve Uvitex 2B olup, bunlar spor duvarının endospor tabakasında bulunan kitin yapısını boyamaktadırlar. Uvitex 2B ve Calcofluor spor duvarının endospor tabakasındaki kitine bağlanarak mavi–beyaz floresan vererek tanı konulmaktadır. Dışkıda bulunan mantar, kitin içeren diğer mikroorganizmalar ve bazı artefaktlarda floresan verebilir. Bu durumda mikrosporidium sporlarının boyutları özellikle ayırıcı tanı olarak kullanılabilir. Mikrosporidiaların canlı olup olmadığını anlamak için Calcofluor M2R ve Sytox green boyaları kullanılabilir. Canlı sporlar Calcofluor M2R ile 390-420 nm dalga boyunda mavimsi beyaz veya turkuaz oval haleler şeklinde, ölü sporlar beyaz-sarı renkte görülmektedir. Sytox green ile boyamada ise canlı sporlar görüntü vermezken ölü sporların içerisine boya rahatlıkla girebilir ve 470-490 nm dalga boyunda parlak sarı-yeşil renkte floresan verir (75,84).

Araştırmacılar floresan boyaların hızlı ve kolay olduğunu, ayrıca MTS ile paralel boyanmasının da tanıda duyarlılığı artırdığını bildirmişlerdir (75,85-87).

**Tablo 2.3.** Floresan Boyalarla Mikroskopta Sporların Görünüm Karakterizasyonu

| Spor Tipi | Floresan Mikroskobunda Sporların Görünüm Karakterizasyonu |                                      |
|-----------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------|
|           | 390-420 nm<br>(Calcofluor White M2R)                      | 470-490 nm<br>(Sytox green)          |
| Canlı     | Turkuaz-Mavi, Oval                                        | Görüntü yok veya nadiren yeşil, Oval |
| Ölü       | Beyaz-Yeşil, Oval                                         | Sarı-Yeşil, Oval                     |

### 2.9.1.4. Acridine Orange Boyama

Oval görünümlü olan sporlar turuncu floresan vermektedirler. Sporları arka zeminden ayırmak kolay değildir. Mayalarla karıştırılabilmektedir fakat tomurcuklanma göstermemesi ile ayırt edilmektedir. Sporlar ya dağınıktır ya da nadiren epitel hücrelerin sitoplazmasıyla çok fazla kümelenmiş olarak görünmektedir (75,84). Araştırmacılar floresan boyaların hızlı ve pratik olduğunu ayrıca MTS ile paralel boyanmasının tanıda duyarlılığı artırdığını bildirmişlerdir (88).

### 2.9.1.5. Histolojik Boyalar

Mikrosporidianın dokularda belirlenmesi ve tanımlanması için çok sayıda teknik bulunmaktadır. Mikrosporidiaların tanımlanmasında hematoksilen ve eozin boyaları ile boyanmış doku kesitlerinin yalnızca deneyimli patologlar tarafından incelenmesi gerektiği bildirilmektedir. Ancak, çeşitli özel boyama yöntemleri ile sporlar, formalin ile fixe edilmiş ve parafin bloklu dokularda kolayca gösterilebilmektedir. Parafin doku kesitlerinde endospor tabakasında kitin görülebilmektedir. Özellikle, Gram ve modifiye Warthin-Starry boyama yöntemleri ile boyanan kesitlerde de sporlar rahatlıkla görülebilir ve sporlar; lizozomlar, intrasitoplazmik nöroendokrin granüller, karyorrhexic parçaları ve müsin damlacıklarından ayırt edilebildiği için en iyi histolojik boyalar arasında kullanılmaktadır.

Mikrosporidialar da doku Gram boyamaları rutin parafin kesitlerinde kullanılmış ve bütün türlerin sporların tespitinde güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. Bu boyama yöntemi genellikle doku örneklerinde tercih edilmektedir. Olgun sporlar Gram pozitif boyanmakta (mor menekşe), olgunlaşmamış sporlar ise kırmızı renkte boyanmaya meyillidir. Bu sporlar koyu boyanabilir ve polar tüpü temsil eden yatay çizgilenmeler bazı sporlarda görülebilmektedir.

Sporlar periyodik asit-Schiff (PAS), gümüş boyaları (Warthin-Starry), asit-fast boyaları, chromotrope-based boyası ya da chemofluorescent ajanlar kullanarak çok iyi görülebilmektedir. Boyama sonucunda sporlar küçük, asit-Schiff (PAS) pozitif, spor yüzey duvarı gümüş ile ve sporlar asit-fast değişken olarak boyanmaktadır. Warthin-Starry boyama yöntemi intestinal dokulardaki hem gelişmekte olan hem de olgun sporların boyanmasında etkili yöntemlerden biridir. Warthin-Starry boyama ayrıca sporların gerçek boyutundan daha büyük görünmesini sağlamaktadır. Warthin-Starry boyama yöntemi ile boyanan sporlar kahverengimsi siyah renkte görünür ve doku parçalarının boyanmasında kullanılan en iyi yöntemdir. Bu boyama yönteminin bir dezavantajı sporun içyapısının, polar tüpünün, Gram boyama ile hazırlanan preparatlardan çok daha zor görülmesidir. *E. bienersi* ile *Encephalitozoon* türlerinin tanısında duyarlılığı oldukça yüksektir. Bu yöntem sonuçlarının elektron mikroskobu sonuçlarıyla %100 uyumlu olduğu tespit edilmiştir (10,46).

### 2.9.2. İmmünofloresan İşaretleme

Bazı mikrosporidia türlerine karşı monoklonal ve poliklonal antikorlar geliştirilmiştir. Türe özgü yüzey molekülleri veya polar tübül yapısını tanıyan floresan işaretli monoklonal antikorlarla tanıma duyarlılık oldukça yüksektir. Poliklonal antikorlar kullanıldığında ise arka planın veya ortamda bulunan bazı bakteri ve maya mantarlarının da boyanması nedeniyle özgüllük düşüktür (74,75).

*Enterocytozoon bieneusi* enfeksiyonların tanısı oldukça zordur çünkü organizmanın dışkı içerisindeki maya ve mantarların boyutlarıyla ayırt edilmemektedir. Bugüne kadar mikrosporidia tanısında fluorochrome Uvitex 2B, Modifiye Trichrome boyama veya Calcofluor boyama kullanılmaktadır. Bu yöntemler nonspesifik olup sensitivite ve spesifitesi daha yüksek olan PCR yöntemleri tercih edilmektedir ancak rutin klinik tanıma kullanılmamaktadır. *E. bieneusi* karşı spesifik monoklonal antikor (MAb) kiti ile yeni ve daha basitleştirilmiş tanı testleri geliştirilmiştir.

### 2.9.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)

Mikrosporidialar sınıflandırılması için çeşitli doku örneklerinde, vücut sıvılarında ve dışkıda sporların boyutu ve morfolojisi, polar tübül sarmal sıra sayısı, gelişimsel hayat siklusu ve konak parazit ilişkileri TEM ile gösterilebilmektedir (77,89). Parazitin polar filamentinin özelliklerine göre ayrıca tür tayini yapılabilmektedir (3-5,78). Sporların yapılarını detaylı inceleyebilmek ve yeni türlerin taksonomik sınıflandırılmaları için TEM'e ihtiyaç duyulmaktadır (90). Doku örneklerinde parazitin tüm evreleri, dışkı ve vücut sıvılarında ise sadece sporlar görülmektedir (5). Dışkı ya da idrar örneklerin incelenmesinde TEM'nun sensitivitesi diğer yöntemleriyle aynı olmayabilir. Elektron mikroskobu, doku örneklerinin görüntülenmesinde hala en iyi yaklaşım olarak kabul edilmekte fakat her laboratuarlarda kullanılmamaktadır. Moleküler yöntemlerin uygulanmadığı laboratuarlarda tür tayininde bu yöntemden faydalanılmaktadır.

Doğrulama ve tür tayini için altın standart kabul edilen TEM'in özellikle biyopsi örneklerinde mikrosporidia tanısı için özgüllüğü yüksek olmakla beraber, çalışılan örneklerin küçüklüğü nedeniyle duyarlılık düşük olabilmektedir. Tür seviyesinde insanda patojen mikrosporidiaların tanımlanması için TEM'in tek başına yeterli olmadığı ve örnek hazırlama aşamasının uzun ve pahalı olması yöntemin dezavantajları arasındadır (74). Antijenik veya moleküler testlerle desteklenmesi gerektiği belirtilmektedir.



#### 2.9.4. Seroloji

Mikroskopik tanı yöntemlerinin duyarlılık ve güvenilirliği; inceleyen kişinin bilgi ve tecrübesine dayanmaktadır. Bu nedenle Mikrosporidium'lara karşı spesifik antikorları saptamaya yarayan ELISA, IFA ve Western Blot (WB) gibi çeşitli serolojik testler kullanılmaktadır. Poliklonal ve monoklonal antikor ile hazırlanan testler *E. bienersi* ve *Encephalitozoon* spp. tür ayrımında başarılı olarak değerlendirilmiştir (7,19,91). Deneysel çalışmalar polar tüp proteinlerinin yüksek oranda immunojenik olduğunu göstermekte ve polar tüp proteini ile türe özgü yüzey proteinlerine karşı geliştirilen monoklonal antikorlarla parazit tanımlanmakta ve IFA testleri ile tür ayrımı yapılabilmektedir. *E. cuniculi*, *E. intestinalis* ve *E. hellem* türleri monoklonal antikorlar ile birbirinden ayırt edilebilmektedir (9, 92). Monoklonal antikorların kullanıldığı immunofluoresan antikor testleri ile dışkıda *E.intestinalis* ve *E. bienersi*'e ait sporlar belirlenebilmektedir. Bu yöntemin duyarlılığı yaklaşık %100, özgüllüğü ise bilinen diğer yöntemlerden daha yüksektir. Monoklonal antikorlar örnekte bulunan sporların spor duvarındaki proteinlere bağlanmakta ve floresan mikroskopunda sporlar parlak yeşil rölle vermektedir.

Hayvanlarda en sık saptanan mikrosporidia türlerinden *E. cuniculi*'nin kültürü yapılarak serolojik testlerde antijen olarak kullanılmaktadır. İnsanlarda mikrosporidiosis etkeni türler çeşitli olduğundan sadece *E. cuniculi* antijenlerinin kullanıldığı serolojik testlerin güvenilirliği düşüktür (15,89).

*Enterocytozoon bienersi* dışındaki pek çok mikrosporidia türünün kültürünün yapılabilmesinden sonra insanda mikrosporidiosis tanısında daha özgül ve güvenilir serolojik testler geliştirilmiştir. Ancak, insan mikrosporidia enfeksiyonları, genellikle güçlü ya da belirgin antikor yanıtı oluşturmayan immun sistemi baskılanmış kişilerde görüldüğünde, bu hasta grubunda serolojik testlerin kullanımı uygun değildir, buna karşılık; ELISA, immun peroksidaz, WB gibi serolojik testler bağışıklık sistemi sağlam kişilerde ki mikrosporidiosis tanısında da kullanılabilir (15,75).

İnsan *E. bienersi* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi yeterince anlaşılamamıştır ve organizmanın bulaşmasında rol oynayan çevresel faktörler tam olarak aydınlatılamamıştır. Mikrosporidiosis'in prevalans çalışmaları ele alındığında çoğu raporların koproloji ve PCR tabanlı yöntemlere dayanmaktadır. Mikrosporidia için

insan enfeksiyonlarında serolojik çalışmalar yalnızca kültürü yapılabilen türler içerisinde sınırlı kalmıştır (42-44).

Serolojik testler klinik bulgu olmadan da enfeksiyonu gösterebilmekte fakat akut veya kronik ayırımı yapılamamaktadır. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda immunolojik yanıtın zayıflaması nedeniyle kanda bulunan antikor miktarının azalması, türe özgü antijenlerin kolay üretilmemesi ve çapraz reaksiyonların oluşması nedeniyle mikrosporidium tanısında serolojik testlerin çok yararlı olmadığı, insan enfeksiyonlarındaki özgüllüğü tam olarak tespit edilememiş olduğundan saptanan antikorların gerçek enfeksiyonu yansıtmayı yansıtmadığı tartışmalı olduğu belirtilmektedir (7,8).

### 2.9.5. Hücre Kültürü

İnsanlarda enfeksiyona yol açan mikrosporidia türlerinin aksenik kültürü yapılmamasına rağmen; idrar, nasal polipler, nazofarenks aspiratları, dışkı ve kas biyopsi örneklerinin tavşan ve maymun böbrek hücreleri, insan fetal fibroblast hücreleri gibi çeşitli memeli hücre serilerinde kültürü yapılabilmektedir; ancak hasta örneklerinden yapılan hücre kültürlerinden sonuç alınabilmesi için 3-6 haftalık bir süre gerekmektedir (74,89,93).

İnsanları enfekte eden türlerin hepsi olmasa da *Nosema corneum* (*N. corneum*), *E. hellem*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *Trachipleistophora hominis* (*T. hominis*) ve *V. corneae* türlerinin üretilmesinde hücre kültürleri yapılmaktadır.

İshalli AIDS hastalarında en sık görülen mikrosporidia türlerinden *E. bienewisi*'nin uzun süreli hücre kültürü henüz yapılamamaktadır. Bu parazitin biyopsi materyallerinde tanısı konulmuş çeşitli hastaların dışkı örneklerinden hücre kültürü yapma çalışmalarında *E. bienewisi* yerine *E. intestinalis* kullanılmıştır (94). Bu gibi durumlarda, *E. bienewisi*'nin kültürde büyümesi başarısızken, *E. intestinalis*'in kültürü nispeten kolaydır ve hızla septal parasitophorous vakuol içerisinde çoğalabilmektedir. Halbuki *E. bienewisi*'nin tüm aşamaları parazitoforuz vakuoller arasında herhangi bir septasyon olmaksızın konak hücre sitoplazma içinde çoğalmaktadır. *E. bienewisi*'nin çeşitli izolatlarında, E6 ve HLF monolayer içerisine duodenal aspirat ve biyopsi örnekleri aşılansak kısa süreli kültürü yapılmıştır. Kısa süreli kültürleri herhangi bir yerde 6 hafta ile 6 ay sürmektedir. Aynı hastadan alınan biyopsi ve duodenal aspirat örnekleri santrifüj edilerek aynı kültür flaksları içerisine ekilmiştir. Ekimden birkaç hafta sonra 1-

1.2 µm uzunluğunda gram-pozitif sporlarına benzer yapılar gözlemlendiği belirtilmiştir (95). Prolifer dönemleri açık alanlarda karakterize edilmiş ve elektron mikroskopunda gözlenmiştir. Proliferatif aşamaları konak endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri ile yakın ilişkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Çift sarmallı polar tüp olgun sporlar ve sporoblastlarda görüldüğü; ancak, kültürlerin yavaş yavaş bozulduğu ve hücrelerin sonunda kaybolduğu belirtilmiştir (94).

Hücre kültüründe uygun miktarda elde edilen mikroorganizmalarla antijen hazırlanabilmekte ve bu antijenleri; serolojik testlerde, monoklonal, poliklonal antikor hazırlanmasında ön basamak olarak kullanılabilir. Ayrıca kültürde çoğaltılan mikrosporidia sporları daha sonra tür tayini için SDS-PAGE veya PCR çalışmalarında kullanılabilir (93,95). Mikrosporidia'ların hücre kültüründe üretilmesi ve izole edilmesi uzun sürmesi nedeniyle rutin tanıda tercih edilmemektedir.

**Tablo 2.4.** Boyama teknikleri ve özellikleri (74)

| Boyama Teknikleri                   | Örnekler                                | Özellikleri                                                       | Açıklamalar                                                                                                                   |
|-------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Floresan                            | Dışkı, Vücut sıvıları, Doku biyopsileri | Kitin spor duvarı parlak Floresan verir.                          | Hızlı ve hassas bir teknik gerekmektedir. Biyopsi örneklerini boyamada kullanışlıdır. Hassas, fakat spesifik değildir.        |
| Chromotrope ve Modifiye Chromotrope | Dışkı, Vücut sıvıları, Doku biyopsileri | Spor duvarı pembe-kırmızı boyanır, zemin mavi veya yeşil boyanır. | Zaman alıcı bir boyama yöntemidir. Modifiye boyalar kullanılarak boya süresi kısaltılabilir. Güvenilir ve yapılması kolaydır. |
| Giemsa                              | Vücut sıvıları, Doku biyopsileri        | Açık mavi boyanır.                                                | Yorumu zordur çünkü diğer fekal elementlerle karıştırılabilir.                                                                |
| Gram                                | Vücut sıvıları                          | Gram variable                                                     | Yorumu zordur çünkü diğer fekal elementlerle karıştırılabilir.                                                                |
| Modifiye Gram                       | Doku biyopsileri                        | Mavi veya soluk kırmızı, zemin kahverengi yeşil                   | Hassas olup, standarde edilmemiştir. Deneyimli patologlar gereklidir.                                                         |
| Warthin Starry                      | Doku biyopsileri                        |                                                                   | Zaman alıcıdır ve yorumlanması zordur.                                                                                        |
| IFA                                 | Dışkı                                   | Sporlar Yeşil röfle                                               | Duyarlılığı %100'e yakın, özgüllüğü ise bilinen diğer yöntemlerden daha yüksektir.                                            |

### 2.9.6. Moleküler Yöntemler

Rutin klinik laboratuvarlarda mikrosporidiaların tanısında mikroskopik yöntemler uygulanmasına rağmen son on yıldır araştırma laboratuvarlarında teşhis amacıyla moleküler yöntemler kullanılmaktadır (96).

Mikrosporidiaların moleküler tanısında doku biyopsileri, duodenal aspiratlar, korneal kazıntı, idrar ve in-vitro kültür örnekleri kullanılabilir (9). Bu örneklerden nükleik asit ekstraksiyonu için ticari kitler kullanılabildiği gibi klasik ekstraksiyon yöntemi olan fenol-kloroform ve etil alkol presipitasyon yöntemi de uygulanabilir. Ayrıca formalinle fiske edilmiş parafine gömülmüş biyopsi örneklerinden DNA ekstraksiyonu için ticari kitler bulunmaktadır.

Genellikle dışkıdan DNA izolasyonu oldukça zordur ve değişkenlik göstermektedir. Bunun için klasik DNA ekstraksiyon yolları yanında çeşitli DNA izolasyon kitleri kullanılmakta, son yıllarda bazı araştırmacılar tarafından cam boncuklar ile oluşturulan mekanik parçalamanın veya kaynatmanın izolasyonda daha etkili olduğu mekanik olarak sporların parçalanmasına ve daha zor bir ekstraksiyon şartlarına gerek duyulmaktadır. Ayrıca dışkının moleküler yöntemler içerisinde kullanımının diğer bir zorluğu da sıklıkla polimeraz enzim inhibitörleri içermesi ve bu maddelerinde PCR da inhibitör etki göstermesidir. İnhibitörlerin uzaklaştırılması için basit olarak örneklerin dilüsyonu veya guanidin tiosiyanat ile muamele edilmesi önerilmektedir (97-99).

Değişken alanlı jel elektroforezi (Pulsed-field gel electrophoresis) çalışmaları haploid genom boyutlarının ortalama 5.3-19.5 Mb arasında olduğu belirtilmektedir. Mikrosporidia rRNA gen bölgesi, genler arası transkripsiyonu yapılmayan ara bölge ile ayrılan 16S SSU rRNA ve 23S LSU rRNA genlerinden oluşmaktadır. Mikrosporidiaların PCR temelli tanısında bu gen bölgelerinden (SSU rRNA, LSU rRNA),  $\alpha$  ve  $\beta$ -tubulin, polar tüp protein, polar tüp protein 55 prekürsör, ribozomal protein L27a, dihydrofolat redüktaz, serine hidroksimetiltransferaz, aminopeptidaz, timidilate sentaz, internal transkribe olan boşluklar hazırlanmış primerler kullanılmaktadır (9). İnsanlarda sıklıkla enfeksiyon oluşturan beş mikrosporidia türünün (*E. bienersi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem* ve *V. cornea*) ve diğer mikrosporidiaların tanısında SSU rRNA hedef gen bölgesinden hazırlanmış türe spesifik ve jenerik primer çiftleri kullanılmaktadır (7,89).

*Enterocytozoon bienersi* ve *Encephalitozoon spp.* tanısı amacıyla rRNA bölgesinden hazırlanan primer ve problemlerin kullanıldığı multipleks real-time PCR yönteminin %100

sensitivite ve spesifiteye sahip olduğuna dair yayınlar bulunmaktadır. Bu yöntemin dışkıda  $10^2$  spor/ml saptayabilme duyarlılığına sahip olduğu bildirilmektedir (100-103).

Son yıllarda multiplex Real-time PCR ile aynı anda birden fazla mikrosporida'nın eş zamanlı tanısı yapılmaya başlanmıştır, taze ve formalinli dışkı örneklerinde *E. bienersi* için ITS, *Encephalitozoon* türleri için SSU rRNA gen bölgesi hedef alınarak *E. bienersi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, ve *E. hellem* saptanılmıştır (103). Geliştirilen multiplex Real-time PCR teknikleri ile dışkı örneklerinde *E. bienersi* ve *Encephalitozoon* spp.'un tanısında %100 özgüllük ve duyarlılık saptanmıştır (102). Özellikle mikrosporidiosis'in epidemiyolojik çalışmalarında, su kaynaklı salgınlarda ve immun sistemi baskılanmış hastaların erken tanısında Real-time PCR'ın hızlı ve güvenilir bir moleküler yöntem olduğu bildirilmiştir (101,102,104).

Moleküler yöntemler; duyarlılığının, özgüllüğünün yüksek olması, hızlı ve doğru sonuç verme ve tedavi açısından önemli olan aynı anda birden fazla türün tespitine olanak sağlama açısından mikrosporidiaların tanısında oldukça önemlidir.

## 2.10. KLİNİK

Mikrosporidiosis genellikle HIV pozitif, organ transplant alıcıları, kanserli hastalar gibi immünokompromize bireyler ile çocuklar, turistler, kontakt lens kullananlar ve yaşlılarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (9,105,106). İnsana yerleşen mikrosporidia türleri ve bunlara bağlı olarak oluşan klinik bulgular enfeksiyonun lokalizasyonu ve konağın immün durumu ile yakından ilişkilidir (74,15).

Mikrosporidiaların bazı türlerinin bireysel hücre tiplerine uyum göstermesine rağmen herhangi bir dokuyu da enfekte edebilmektedirler. Sindirim sistemi enfeksiyonlarında en sık izole edilen türler *E. bienersi*, *E. intestinalis* ve *E. cuniculi* olarak bildirilmektedir (5). Mikrosporidiosis gastrointestinal enfeksiyonları özellikle HIV pozitif kişilerde sık görülmektedir. *E. bienersi*, % 90 AIDS hastalarını enfekte eden ve kronik diyarenin yaygın sebeplerinden biridir. *E. bienersi* ve *E. intestinalis* türleri gastrointestinal sistem içerisinde bir tropizma ile ince bağırsak epitellerine kolonize olmaktadır. *E. bienersi* villusların apikal kısmını tercih ederken, *E. intestinalis* hem villusları hem de endotel hücreleri enfekte etmektedir. Bağırsak mukozasında meydana gelen değişikliği sonucunda yağ ve deskuamasyon birikimi ile epitel doku düz olarak görülebilmektedir. Ayrıca *E. bienersi* enfeksiyonlarında bunu takiben ince bağırsak enterosit villus enfeksiyonu, villus duyarsızlığı, villus yüzey alanının %40 azalmasıyla kript

hiperplazisi, enfekte villus hücrelerinin nekrozu ve intraepitelyal lenfositlerin artışı, ödem ve vezikülasyon gözlenebilmektedir. *E. bienewisi* enfeksiyonlarında en belirgin semptomlar kronik ishal, anoreksi ve kilo kaybı şeklinde gözlenmektedir (74). *Encephalitozoon* türlerinin klinik belirtileri *E. bienewisi*'ye benzer şekilde ishal, kilo kaybı ve malabsorbsiyondur (7). Immünocompetant bireylerde semptomlarda genellikle ishal kendiliğinden gerileyerek sınırlamaktadır.

Safra kesesi mikrosporidiosis olguları nadiren görülmekte ve olguların çoğunun *E. bienewisi* ve *E. intestinalis* kaynaklı olduğu bildirilmektedir. Enfeksiyon parankim dışı karaciğer hücrelerinde, safra kanalı epitelinde, nadiren safra kesesinde saptanmakta ve kolanjit, safra kanalları genişlemesi, papiller stenoz ve taşsız kolosistite yol açmaktadır. Bu iki tür HIV pozitif kişilerden izole edilmiştir. Klinik belirtiler kronik diyareye ek olarak sarılıkla birlikte seyreden ya da seyretmeyen sağ hipokondriumdaki baskın karın ağrısıdır. Abdominal utrasound, endoskopik utrasound ya da endoskopik retrograd kolanjiopankreatikografi ile safra çamuru, distansiyon, duvar kalınlaşması gibi safra kesesi anormallikleri, intra hepatik safra yolları düzensizlikleri, koledok dilatasyonları açığa çıkabilmektedir. Papiller stenoz görülebilir. Serum alkali fosfataz genellikle yüksek; total bilirubin, aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz ise genellikle normal sınırlar içerisindedir.

Günümüzde oküler mikrosporidiosis insanlarda gastrointestinal enfeksiyonlar sonrası en sık görülen ikinci lokalizasyonlardır. Mikrosporidia türlerinin ayrıca serebral tutulumu, pulmoner enfeksiyonlara, üriner enfeksiyonlara, sinüzit, miyozit, peritonit, pankreatit, prostatit, dil ülserleri, kemik ve deri tutulumuna da neden olduğu bildirilmiştir (107).

Mikrosporidiosis'in dissemine formları nadirdir ancak birden fazla organ yetmezliği olan immünokompromize hastalarda şüphe edilmelidir. İnsanda enfeksiyon oluşturan üç *Encephalitozoon* türü, *Trachipleistophora*, *Pleistophora* ve *Brachiola* cinslerin bazı türlerinde sistemik enfeksiyonlara yol açabildiği bildirilmektedir. *E. bienewisi* tarafından oluşturulan enfeksiyonlar ise genellikle hepatobiliyer sisteme veya akciğerlere yayılabilmektedir.

*E. bienewisi* enfeksiyonları yaşlılığa ek olarak immun cevabın azalmış olması önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. İspanya'da yapılan bir çalışmada; *E. bienewisi* enfeksiyonunun kronik diyare ve non- kronik diyare ile birlikte yaş ortalaması 85 olan yaşlı kişilerde önemli oranda görüldüğü bildirilmektedir.

Mikrosporidia enfeksiyonları özellikle organ transplantasyonu yapılan hastalarda ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır (108). Bunun en önemli sebebi immunsupresif tedavidir. Yapılan bir çalışmada kalp veya akciğer nakli yapılan kişilerde diyare etkeni olarak *E. bienewsi* gösterilmiştir (15). Diğer çalışmalarda ise allogenik ilik nakli (15) ve karaciğer nakli (108) yapılan kişilerde tür bazında tanımlama yapılamamışna rağmen *E. bienewsi* sporlarına benzer 1 µm lik sporlar tespit edildiği bildirilmiştir.

*E. bienewsi* ve *E. intestinalis* sıklıkla turist diyaresine sebep olduğu ve bu sebepten dolayı mikrosporidia türlerinin HIV ile enfekte olmayan kişilerin dışında da sıklığının giderek arttığı bildirilmektedir (15). Turist diyaresi olan hastalarda altta yatan bir immun yetmezlik bulunmadığı sürece enfeksiyon kendini sınırlayan bir görünüm sergilemektedir. Zimbabwe de yapılan bir çalışmada diyare görülen enfeksiyonlarda *E. bienewsi*'nin diğer ajanlara göre daha sık görüldüğü ve bu konuda immünokompetent bireylerde enfeksiyonun insidansını gösteren daha fazla prospektif çalışmaya ihtiyaç bulunduğu bildirilmektedir.

## 2.11. TEDAVİ

Mikrosporidial enfeksiyonların tedavisi intrasellüler olmaları ve sporlarının doğal direnci nedeniyle oldukça zordur. İntestinal mikrosporidialar için önerilen çeşitli tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Etkinlikleri türlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. İnsanda görülen mikrosporidia enfeksiyonlarının çoğu enteriktir. *Enterocytozoon bienewsi*'nin *Encephalitozoon intestinalis*'ten daha yaygın olduğu fakat *E. intestinalis*'in tedaviye daha fazla duyarlı olduğu belirtilmektedir. Mikrosporidia tedavisinde genel olarak, Albendazol, Fumagillin, Metronidazol, Itrakonazol, Trimetoprim-sulfamethoxazol (TMP-SMX), Atovaquone, Furazolidon, Nitazoxanid gibi ilaçlar kullanılmaktadır.

HIV ile enfekte hastalarda, özellikle *E. intestinalis* ve *E. bienewsi*'nin etken olduğu gastrointestinal tutulumlarda hastalığın progresif, sıklıkla fatal ve tedavisinin imkansız olduğu düşünülürken albendazol kullanımı ile mikrosporidiosis insidansında belirgin bir azalmanın olduğu belirtilmektedir.

Albendazole antihelmintik aktiviteleri geniş bir Benzimidazol türevi olan ve tubulinlere bağlanıp hücresel bölünmeyi durdurarak etki göstermektedir (7). Parazit yükünde bir azalma ve sporlarda dejeneratif değişiklikler gibi *E. bienewsi* karşı ise çok az bir etkinliğe sahiptir. Klinik olarak ise vücut ağırlığını dengeleyecek şekilde enfekte hastalarda

dışkılama sıklığını ve dışkı hacmini azaltarak etki göstermektedir. Ancak tedavinin kesilmesinden sonra relapslar çok sık gözlenmektedir (109,110). Sonuç olarak, dışkı ve duodenal biyopsi örnekleri pozitif görülmektedir yalnız albendazol'un *E. bieneusi*'nin çoğalmasında eksik inhibisyonu ile bir parasitostatik etkisi bulunduğu belirtilmektedir (4,20,109,111).

Bugüne kadar *E. bieneusi* enfeksiyonları için iyileştirici bir tedavinin bulunmadığı; metronidazol'un bazen mikrosporidiosis olgularında geçici bir iyileşmeye neden olduğu bildirilmektedir. Albendazol'un *E. bieneusi* dışında diğer mikrosporidia türlerine karşı daha etkili olduğu ancak *E. bieneusi* enfeksiyonlarında ishal belirtilerini hafiflettiği ve spor çoğalmasının belirgin bir şekilde azalttığı belirtilmektedir (56). *E. bieneusi* konak hücre sitoplazmasında direkt olarak çoğalmasına rağmen, bir parazitoforus vakuol içerisinde farklılaşan mikrosporidian türlerinin albendazole karşı çok fazla hassas olabileceği düşünülmektedir (17).

Fumagillin (3x20 mg/gün) veya TNP-470'in *E. bieneusi* enfeksiyonlarındaki hastaların tedavisinde daha etkili olduğu belirtilmektedir (112). Fumagillin, 1951 yılında bulunmuş ve başta *E. histolytica* olmak üzere in-vitro amebisidal etkinliğinin olduğu belirtilirken son zamanlarda ilacın anti-mikrosporidial etkinliğinin de olduğu saptanmış ve tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Etki mekanizmasının; paraziti destrukte ve konak hücrede bölünmeyi bloke etmek olduğu düşünülmektedir. Fumagillin'nin hedefi metiyonin aminopeptidase 2 olan bir hücresel metalloproteazdır. Bu enzim mikrosporidiaların metabolizma ve yaşamları için vazgeçilmezdir. Post-translasyonel ve fonksiyonel değişiklikler için gerekli olan proteinlerin terminal ucunun üzerindeki metioni'nin ortadan kaldırmak için çok önemlidir (112).

Nitazoxanid; protozoa, nematod, sestod trematod ve amiplere karşı geniş spektrumlu etkili anti-parazit ajanlardan biridir (109). Ayrıca cryptosporidiosis tedavisinde de kullanılmaktadır. Elektron taşıma sisteminde, pirüvat ferrodoksin oxiredüktaz enzimini inhibe ederek etkinliğini göstermektedir. *E. bieneusi* ile enfekte AIDS hastaların tedavisinde etkili olduğu bildirilmektedir (113).

Antiretroviral tedavi, HIV enfeksiyonlu hastalarda daha düşük bir viral yüke sahiptirler ve onların bağışıklık savunmaları rekonstitüsyon ile CD4 miktarı açısından iyileştirilmektedir. Sonuç olarak, anti-retroviral tedavi, mikrosporidiosis dahil oportunistik enfeksiyonların yaygınlığını düşürmektedir ve HIV enfeksiyonu ile ilişkili



morbidite ve mortaliteyi azaltmaktadır. Aynı zamanda spesifik bir tedavi kullanımını olmadan, mikrosporidia enfeksiyonlarının eradikasyonunu sağlamaktadırlar. Ciddi immün yetmezliği olan kişilerde tedavi kesildikten sonra tekrarlayan mikrosporidiosis riskini önemli ölçüde azaltmaktadır (20,114).

## 2.12. İMMUNİTE

Mikrosporidiosis'e bağlı immün yanıt, konak ve parazitin türüne göre oluşmaktadır (88). İmmunocompetent bireylerde mikrosporidia'ya karşı IgM ve IgG antikorları gelişmekte ve yaşam boyu devam etmektedir. İmmunsupresif bireylerde ise antikor yanıtı değişkendir (2).

HIV/AIDS (+) hastalarda *E. bieneusi* enfeksiyonları kronik ishal vakalarının %30-50'sinden sorumludur. Enfeksiyonlara karşı ilaç tedavisi kısmen etkilidir. *E. bieneusi*'nin immün yanıtının anlaşılması için *Encephalitozoon* spp. özellikle *E. cuniculi*'nin immün yanıtına bağlı gözlemlere dayanarak yorumlanmaya çalışılmıştır. Hücrel immünite hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak *E. cuniculi* enfeksiyonlarında CD8<sup>+</sup> T lenfositlerinin konağın korunmasında ve uzun süreli bir immün yanıtın oluşmasında önemli rol oynadığı bildirilmektedir (115).

Feng ve arkadaşları (116) fare modelleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada; *E. bieneusi* enfeksiyonlarında ilk dirençte IFN $\gamma$ 'nın görev aldığını ve bunun önemini vurgulamışlardır.

Antijen Sunan Hücreler (APC) gibi Dendritik Hücreler (DC) de çeşitli patojenlere karşı konak savunmasını başlatarak önemli bir etki göstermektedir. Parazit kaynaklı enfeksiyonlarda DC'lerinin aktivasyonu konağın doğal ve kazanılmış bağışıklığı için önemlidir. Dendritik hücreler, PRR (Pattern Recognition Receptor; Patojen kalıplarını tanıyan reseptörler.) aracılığıyla çeşitli mikrobik uyaranları tanımakta ve cevaplamaktadır. PRR'ler konak hücreleri tarafından sürekli olarak sunulurlar. İmmünolojik hafızadan bağımsızdırlar. PRR'lerin en önemli çeşitlerinden biri olan Toll-like reseptörleri mikroorganizmaları tanıyan ve doğal immün yanıtın oluşmasında kritik rol oynayan, evrimsel olarak korunmuş, sinyal ileten transmembran reseptörlerdir. Miyofibroblast, mide, ince ve kalın bağırsak matur ve immatur epitel hücrelerinde ve bağırsak mukozasının endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Aynı zamanda TLR'ler TH1/TH2 dengesini sağlayarak kanser, alerji, otoimmünite gibi çeşitli immün bozuklukların düzenlenmesinde görev almaktadırlar.

Genel sinyal yollarında IL1R1 ve adaptör bir molekül olan Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88)'in sinyal alımı, TLR'in birçoğu tarafından kullanılmaktadır. Patojen türevli molekülerin uyarılmasında T hücrelerinin çalışması için kritik olan kostimülatör'ün upregülasyonuna neden olabilmektedir. *E. bieneusi* enfeksiyonlarında MyD88/TLR'in sinyal yolunda herhangi bir rol alıp almadığı bilinmemektedir. Zhang ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, *E. bieneusi* sporlarının, kostimülatör ve sitokin üretimini artırarak DC'lerini aktive etme yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir. DC aktivasyonunun MyD88 sinyalizasyonuna bağımlı, TLR4'e bağımsız olduğu gösterilmiştir (117).

MyD88, IL-1 ve IL-18 sinyalizasyonu gibi çoğu TLR'lerin önemli bir adaptör molekülüdür ve doğal bağışıklıkta kritik rol oynamaktadır (118) In-vitro deneylerde, MyD88'e bağlı mouse bone marrow-derived DCs (BMDCs) farelerde *E. bieneusi* sporlarına maruz kaldıktan sonra pro-inflamatuvar sitokin cevabında bozukluk olduğunu, ayrıca, yaş ve genetiğin aksine MyD88 nakavt farelerin *E. bieneusi* enfeksiyonlarına duyarlı olduğunu bildirmektedirler. TLR'lerine ek olarak; IL-1R ve IL18R sitokin reseptörleri ayrıca MyD88 adaptör molekülün sinyalizasyonu ile *E. bieneusi* için potansiyel olarak MyD88'e bağlı konak direnci oluşmaktadır. Ancak bu reseptörlerin *E. bieneusi*'e maruz kaldıktan sonra DC'ler IL-1 üretiminin eksikliği gibi önemli bir rol oynayan reseptörleri olmadığı muhtemeldir. Dolayısıyla söz konusu ilave reseptörlerin TLR'lerin olma ihtimali bulunduğu bildirilmektedir. TLR'lerin mikrosporidiosis enfeksiyonlarında konak savunmasında rol alıp almadığı henüz tam olarak netleşmemiştir. Buna ek olarak, hem ısı ile öldürülmüş hem de canlı sporların aynı ölçüde sitokin üretimi olduğu ve bu sporlar vasıtasıyla uyarılan DC'lerden sitokin üretiminin sporların DC'lerin yüzey ya da endozomal bileşen etkileşimi ile tetiklenmektedir; fakat bu DC'ler sitozik reseptörler üzerinden gerçekleşmemektedir. Yapılan çalışmaların verilerine göre *E. bieneusi* tarafından DC'lerin aktivasyonu MyD88 sinyalizasyonuna bağlıdır ki bu mikrosporidial enfeksiyonlara karşı dirençte oldukça önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (117).

### 2.13. KORUNMA VE KONTROL

İnsanı enfekte eden en yaygın mikrosporidia türlerinden biri olan *E. bieneusi*, AIDS'li yetişkinlerde hem de çocuklarda diyarenin en yaygın nedenlerinden biridir aynı zamanda immünokompetent bireylerde de görülebilmektedir. Enfeksiyon kaynakları ve

transmisyonu hakkında belirsizlikler bulunmaktadır. Ancak son zamanlarda yüksek hassasiyete sahip ve organizmanın tür ve genotiplerinin tespitinde PCR yöntemlerinin kullanılmasıyla bu enfeksiyon hakkında bilgiler artmıştır. *E. bienensi* kişiden kişiye direk, zoonotik, kontamine su ve besinlerle bulaşmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, *E. bienensi*'nin yer altı ve içme sularıyla bulaşabileceği doğrulanmıştır.

Mikrosporidiaların sporları ve *E. bienensi*; dış ortama oldukça dayanıklı ve suda uzun süre canlı kalabilmektedirler. Ayrıca çok küçük oldukları için su filtrelerinden de geçebilmektedirler (15,78).

İmmünoşüpresif ve immünokompetent bireyler mikrosporidiosis açısından risk altındadır. Yaşam standartların gelişmişliğine bağlı olarak mikrosporidiosis tehlikesine karşı; kişisel hijyene, özellikle el temizliğine önem vermek, kaynamış veya şişe suyu içmek özellikle risk altındaki AIDS ve organ transplantasyonu olan kişiler için önerilmektedir. Diğer önleyici stratejiler; et, balık ve deniz ürünlerinin iyi pişirilmesi ve sebze ve meyvelerin iyi yıkanmasıdır. Hayvanların mikrosporidiosis türleriyle enfekte olduğunun bilinmesinden beri; mikrosporidiosisle enfekte olduğundan şüphelenilen hayvanların karantinaya alınması hastalığın sınırlandırılması için önemlidir (7).

Çevrede bulunan potansiyel mikrosporidia sporlarının canlılık ve enfektif özelliklerini azaltmak için genellikle geniş yelpazeli stratejiler uygulanmaktadır. Yeterli konsantrasyonda; dezenfektanlarla 30 dakikada, kaynatılarak 5 dakikada, 120 °C'de otoklavda sporlar canlılığını yitirmektedir. Suyun en az 5 dakika kaynatılması, Sporların bulunabileceği yerlere en az 8 °C de 30 dakika; %70 Etanol, %0.3-1 Formaldehit, %1 Hidrojen Peroksit, % 1 NaOH, amfoterik surfaktan, cloramin ve quater amonyum içeren dezenfektanların uygulanması önerilmektedir (7).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya başlamadan önce Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurul onayı alınmıştır (Ek: 1).

Çalışmada kullanılacak olan dışkı örnekleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe ve Mustafa Kemal Dedeman Onkoloji Hastanesi'nden Parazitoloji Anabilim Dalı'na gönderilen; kanser tanısı almış hastalar, kemik iliği transplantları, gelişme geriliği, kaşıntı, dermatit, ürtiker ve ülseratif kolit şikayetleri bulunan hastalar, kontrol grubu olarak herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat gastrointestinal şikayeti olan hastalar ile sağlıklı gönüllülerden alınmıştır. Bu hastalar Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu ile bilgilendirilip yazılı onayları alındıktan sonra çalışmaya alınmıştır (Ek: 2).

Çalışmaya, yaşları 3-16 (ort:  $8.75 \pm 3.2$ ) arasında değişen gelişme geriliği bulunan 20 çocuk ile yaşları 18-79 (ort:  $41.69 \pm 14.1$ ) arasında değişen kanser tanısı almış hastalar, kemik iliği transplantlı, kaşıntı, dermatit, ürtiker ve ülseratif kolit şikayetleri bulunan 120 hasta, herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat gastrointestinal şikayeti olan hastalar ile sağlıklı gönüllülerden oluşan 40 kişi dahil edilmiştir. Çalışma ve kontrol grubunun, 106 (%58.9)'sı kadın, 74 (%41.1)'ü erkek bireyden oluşmaktadır. Hasta ve kontrol gruplarından alınan toplam 180 dışkı örneği; immunofloresans, konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle incelenmiştir.

Örnekler nativ-lugol yöntemi ile incelendikten immunofluorescence assay (IFA), boyama ve moleküler analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

*Anti-Enterocytozoon bieneusi* monoklonal antikor kiti (Bordier Affinity Products Switzerland) ile *E. bieneusi* pozitifliği belirlenmiştir. Kit prosedürü üretici firma önerisine göre uygulanmış ve floresans mikroskopunda 450-490 dalga boylu filtrede ve 1000X büyütmede değerlendirilmiştir. Dışkı örneklerinin her birine su-eter konsantrasyon yöntemi uygulandıktan sonra, Modifiye Trichrome boyası (MTS), Asit-Fast Trichrome (AFT), Acridin orange ve Calcofluor boyama yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Modifiye Trichrome boyası (MTS) ve Asit-Fast Trichrome ile boyanan preparatlar ışık mikroskopunda x1000 büyütmede, Calcofluor ile boyanan preparatlar ise floresans mikroskopunda 380-420 dalga boylu filitrede ve x1000 büyütmede incelenmiştir. Su-eter konsantrasyon yöntemi uygulanarak elde edilen çökelti daha sonra QIAamp mini kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA ekstraktları, S. Katzwinkel-Wladarsch ve arkadaşları (119). tarafından bildirilen *Enterocytozoon bieneusi* türlerine spesifik primerler kullanılarak nested-PCR ile analiz edildi.

İsviçre Zürich Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü öğretim üyeleri, Prof. Dr. Rainer Weber ve Herbert Kuster ile iletişim kurularak incelemede kolaylık sağlamak için boyanmış pozitif preparatlar istenmiştir.

### 3.1. IFA YÖNTEMİ (IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY)

Monoclonal antibodies: anti-*Enterocytozoon bieneusi* (Bordier Affinity Products, Switzerland) kit prosedürü üretici firma önerisine göre çalışıldı.

#### Yöntem

1. Dışkılar 0.250 gr tartıldı ve 500 µl PBS içerisinde vortexlenerek çözdürüldü.
2. Ependorf içerisindeki çözdürülmüş dışkılar plastik çay süzgeçleri kullanılarak süzdürüldü.
3. Sulandırılmış ve süzdürülmüş dışkı örnekleri teflon tabanlı slaytlar üzerine 2 µl yerleştirildi ve 1 saat 37 °C de kurutuldu.
4. Slaytlar metanol ile fikse edildi ve kurutuldu.

5. Fikse edilen slaytlar aseton içerisinde -20 °C de 10 dk. bekletildi ve aseton içerinden çıkartılan slaytlar havada kurutuldu.
6. Bir damla PBS ile rehidrat edildi ve slaytlar 5 dk. oda ısısında bırakıldı. Daha sonra kuyucuklardaki PBS bir taraftan aspire edildi.
7. Monoklonal antibodies anti-*Enterecytozoon bieneusi* den kuyucuklara 20 µl eklendi ve 30 dk. oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi.

**Nemli ortam:** metal küvet içine kurutma kağıtları serildi ve ıslatıldı. Slaytlar bu kabın içerisinde uygun şekilde yerleştirildi ve küvetin ağzı tamamen kapatıldı.

8. İnkübasyon sonrasında monoklonal antibodies 3 kez PBS ile yıkandı.

**Yıkama İşlemi:** monoklonal antibodies bulunan kuyucuklardan tek tek pastör pipeti yardımıyla aspire edildi. Her kuyucuğa 1 damla PBS eklendi ve kenardan pastör pipeti ile geri çekildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

9. Her kuyucuğa 20 µl kullanıma hazır konjuge eklendi. 30 dk. oda ısısında, nemli ortamda karanlıkta inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonunda konjuge aspire edildi ve 1 damla PBS ile yıkandı. Daha sonra 3 farklı PBS bulunan şaleler içine daldırıp çıkartılarak yıkandı.
11. Slaytlar dik bir şekilde konularak kurutuldu.
12. 1 damla gliserol eklendi ve 24X60 mm'lik lamslar slaytlar üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı.
13. Floresans mikroskopunda 450-490 nm dalga boylu filtrede ve x1000 büyütmede incelendi. Parlak yeşil röfle floresan veren spor görünümlü yapılar etkenin kendisi olarak tanımlandı.

### 3.2. SU-ETER KONSANTRASYON YÖNTEMİ

1. 15 ml'lik falkon tüpüne yaklaşık 5 gram dışkı konuldu.
2. Üzerine 8 ml distile su eklendi ve tamamen homojen olana kadar vortekslendi.
3. Tam çözünme için 30 dakika oda ısısında bekletildi.
4. Dışkı-su karışımı plastik çay süzgeçleri kullanılarak süzdürüldü.

5. Dışkı-su karışımı tekrar 150 µm porluk filtreden süzüldü.
6. Süzülen kısım 15 ml'lik falkon tüpüne alındı ve üzerine 6 ml eter eklendi.
7. Dışkı-su-eter karışımı 1 dk. vortekslendi.
8. Vorteks sonrası 4 dk. 3000 g'de santrifüj edildi.
9. Dipteki kısım alındı ve 2 kez distile su ile yıkandı.
10. Her yıkama işleminde 14000 g'de 2 dk. santrifüj edildi.
11. Yıkama işlemi sonrasında ise 200 µl PBS ile sulandırıldı.

Son yıkama işleminden sonra süpernatant dökülerek pelet PBS ile sulandırıldı. Daha sonra hem boyama da hemde DNA izolasyonunda kullanıldı.

### **3.3. BOYAMA YÖNTEMLERİ**

#### **3.3.1. Calcofluor Boyama (Fluorescent Brightener 28, Sigma Chemical) (220)**

Bu boyama yöntemi iki farklı şekilde hazırlandı. Calcofluor (Fluorescent Brightener 28) boyası KOH ve PBS içerisinde çözündürüldü. Boyamada PBS içerisinde çözündürülmüş Calcofluor (Fluorescent Brightener 28) boyası kullanıldı.

#### **Fosfat Buffer Saline (PBS)**

- |                                                      |         |
|------------------------------------------------------|---------|
| • NaCl                                               | 8 gr    |
| • NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | 1.15 gr |
| • KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | 0.2 gr  |
| • KOH                                                | 0.2 gr  |
| • Distile su                                         | 1000 ml |

Karışımın pH'sı 1M'lık NaOH ile 7,2'ye ayarlanmıştır.

- Evan's blue PBS ile %5'lik hazırlandı.
- Fluorescent Brightener 28 PBS ile %0,5'lik hazırlandı ve oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.
- Boya kullanılmadan önce boyadaki tortuyu çöktürmek için 4000 g'de 3 dk. santrifüj edildi.

### **Yöntem**

1. Hazırlanan yaymalar havada kurutuldu.
2. Metil alkol (% 99.9) ile tespit edildi.
3. Havada kurutuldu.
4. Fluorescent Brightener 28                      2-3 dk.
5. Distile su ile yıkama                              1-2 sn
6. Evan's blue                                          30 sn
7. Musluk suyu ile yıkama

Karanlık bir ortamda lamalar kurutulduktan sonra immersiyon yağı kullanılarak floresans mikroskopunda 380-420 nm dalga boylu filtrede ve x1000 büyütmede incelendi. Mavi-beyaz floresan veren spor görünümlü yapılar etkenin kendisi olarak tanımlandı.

### **3.3.2. Modifiye Trichrome Boyama (MTS) (Weber'in Trichrome Boyası, Cromotrop 2R boyası) (10)**

#### **Cromotrop Boya Solüsyonu**

- Cromotrop 2R                                          6.0 gr
- Fast green                                              0.15 gr
- Fosfotungustik Asit Hidrat                      0.7 gr

Karışıma 3 ml glasiyal asetik asit (GAA) eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra 30 dk. bekletildi. Karışım 100 ml'ye tamamlanacak şekilde üzerine distile su eklendi ve homojen bir karışım elde edildi.

Karışımın pH'sı 2 N'lik HCl ile 2.5'a ayarlandı.

#### **Asit Alkol**

#### **%90 Etil Alkol**

- Etanol absolut %99,8                              900 ml
- Distile su                                                  100 ml

Kimyasallar karıştırılarak hazır hale getirildi.



Yukarıda hazırlanan solüsyondan 995.5 ml alındı ve 4.5 ml glasiyal asetik asit (GAA) eklendi.

### **Yöntem**

1. Hazırlanan yaymalar havada kurutuldu.
2. Metil alkol (% 99.9) ile tespit edildi.
3. Havada kurutuldu
4. Cromotrop 2R boyama 90 dk.
5. Asit alkol 8 sn. veya daha az
6. %95'lik etanol 8 sn.
7. %95'lik etanol 10 dk.
8. %100'lük etanol 10 dk.
9. %100'lük etanol 10 dk.
10. Ksilen 10 dk.

Bekletildi ve son şaleden de çıkardıktan sonra lamaların üzeri kapatıldı. İmmersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskopunda x1000 büyütmede incelendi. Yeşil zemin üzerinde 0.8-1.4 µm büyüklüğündeki parlak pembemsi-kırmızı renkte görülen sporlar etkenin kendisi olarak tanımlandı.

### **3.3.3. Asit Fast-Trichrome Boyama (10)**

#### **Cromotrop Boya Solüsyonu**

- Cromotrop 2R 6.0 gr
- Fast green 0.15 gr
- Fosfotungustik Asit Hidrat 0.7 gr

Karışıma 3 ml glasiyal asetik asit eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra 30 dk. bekletildi. Üzerine 100 ml distile su eklendi ve iyice karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi.

Karışımın pH'sı 2 N'lik HCl ile 2.5'a ayarlandı.

### **Asit Alkol**

#### **%90 Etil Alkol**

- Etanol absolut %99,8 900 ml
- Distile su 100 ml

Kimyasallar karıştırılarak hazır hale getirildi.

Yukarıda hazırlanan solüsyondan 995.5 ml alındı ve 4.5 ml glasiyal asetik asit (GAA) eklendi.

### **Karbol Fuksin Boya Solüsyonu**

- Bazik fuksin 4 gr
- %95 Etanol 25 ml

Fuksin havan ile ezilerek yavaş yavaş etil alkol eklendi ve karışıma 56°C'de eritilmiş Fenol'den 8 ml konuldu.

Üzerine 100 ml distile su eklendi ve 24 saat bekletildi. Daha sonra süzülüp kullanım için hazır hale getirildi.

### **Yöntem**

1. Hazırlanan yaymalar havada kurutuldu
2. Metil alkol (% 99.9) ile tespit edildi.
3. Havada kurutuldu.
4. Kinyon Karbol Fuksin 10 dk.
5. Musluk suyu ile yıkama
6. %0.5lik HCl (etil alkol ile hazırlanmış) 5 dk.
7. Musluk suyu ile yıkama
8. Cromotrop 2R 37°C'de 30 dk.
9. Asit alkol 8 sn.
10. %95'lik etanol 8 sn.
11. %95'lik etanol 8 sn.

- |                     |        |
|---------------------|--------|
| 12. %100'lük etanol | 10 dk. |
| 13. %100'lük etanol | 10 dk. |
| 14. Ksilen          | 10 dk. |

Bekletildi ve son şaleden de çıkardıktan sonra lamaların üzeri kapatıldı. İmmersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskopunda x1000 büyütmede incelendi. Mavi zemin üzerinde 0.8-1.4  $\mu\text{m}$  büyüklüğündeki pembe renkte ve soluk diyagonal ve ekvatoryal çizgilenmeler gösteren sporlar etkenin kendisi olarak tanımlandı.

### 3.3.4. Acridin Orange Boyama (121)

- Acridin Orange 1 gr
- PBS 99 ml

Bu karışımdan %1'lik stok solüsyon elde edilmiştir ve +4 °C'de saklanmıştır.

- %1'lik stok solüsyon 0,5 ml
- PBS 4,5 ml

Karışım boyamadan önce hazırlandı.

### Yöntem

1. Hazırlanan yaymalar havada kurutuldu.
2. Metil alkol (% 99.9) ile tespit edildi.
3. Havada kurutuldu.
4. Aynı gün stok solüsyondan hazırlanan Acridin Orange boyası ile 1 dk. boyandı.
5. Musluk suyu ile yıkandı.

Karanlık bir ortamda lamalar kurutulduktan sonra immersiyon yağı kullanılarak floresans mikroskopunda 380-420 nm dalga boylu filtrede ve x1000 büyütmede incelendi. Turuncu renkte floresan veren spor görünümlü yapılar etkenin kendisi olarak tanımlandı.

## 3.4. MOLEKÜLER ANALİZLER

### 3.4.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA izolasyonu için QIAamp mini kit (QIAGEN, ABD) kullanıldı. Dowd ve arkadaşları (122) tarafından bildirilen prosedür modifiye edilerek uygulanmıştır.

## **Yöntem**

1. PBS ile sulandırılmış dışkı içerisine spor duvarının daha kolay parçalanması için 20 µl (1.5 U/µl) lyticase eklendi ve 30 dk. 37 °C’de inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrası 360 µl ATL buffer (kit içerisinden), 40 µl proteinaz K (kit içerisinden) ve 250 µl cam boncuk eklendi.
3. 4 saat 57 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresince her 20 dk’da bir örnekler 1 dk. vortekslendi.
4. İnkübasyon sonrasında 400 µl AL buffer (kit içerisinden) eklendi.
5. Örnekler 10 dk. 70 °C’de inkübe edildi ve daha sonra 10 dk. kaynatıldı.
6. Kaynatma işlemi sonunda 14000 g’de 2 dk. santrifüj edildi.
7. Süpernatant yeni bir ependorfa aktarıldı ve üzerine 350 µl etanol eklenerek vortekslendi.
8. Vorteksleme işlemi sonrasında elde edilen karışım spin koluma (kit içerisinden) aktarıldı ve 8000 g’de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
9. QIAamp spin kolumu yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra üzerine 500 µl Buffer AW1 eklendi ve 8000 g’de 1 dk. santrifüj edildi.
10. QIAamp spin kolumu yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra üzerine 500 µl Buffer AW2 eklenerek 14000 g’de 3 dk. santrifüj edildi.
11. QIAamp spin kolumu yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra 14000 g’de 1 dk. boş santrifüj edildi.
12. QIAamp spin kolumu yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi ve kolum membranının direkt üzerine 100 µl Buffer AE eklendi.
13. Kolum oda ısısında 5 dk. inkübe edildikten sonra 8000 g’de 1 dk santrifüj yapılarak elüsyon sağlanmıştır.
14. Elde edilen DNA kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

### 3.4.2. Polymerase Chain Reaction

#### 3.4.2.1. İnsanda patojen olan mikrosporidia türleri için ortak PCR

PCR reaksiyonunda öncelikle, insanda patojen olan beş mikrosporidia türü için (*E.bieneusi*, *E.intestinalis*, *E.cuniculi*, *E.hellem*, *V.corneae*) ortak olan, small subunit ribosomal DNA gen bölgesini hedef alan ve 250-279 bp'lık alanı amplifiye eden Micro F, 300R primerleri kullanılmıştır. PCR'da kullanılan primerler ve dizilimleri Tablo 3.1'de verilmiştir (123).

**Tablo 3.1.** PCR'da kullanılan primerler ve dizilimleri

| Primerler                | Primer Dizilimi (5'---3')          | TM*(°C) |
|--------------------------|------------------------------------|---------|
| Micro-F                  | 5'-CAC CAG GTT GAT TCT GCC TGA-3'  | 61      |
| 300-R                    | 5'-CCT CTC CGG AAC CAA ACC CTG -3' | 65      |
| *TM: Melting Temperature |                                    |         |

Reaksiyon için 25 µl'lik bir karışım hazırlanmıştır. Bu reaksiyon karışımında kullanılan bileşen ve miktarları Tablo 3.2'de bildirilmektedir.

**Tablo 3.2.** PCR reaksiyonu için kullanılan bileşen ve miktarları

| Bileşen                    | Miktar (µl) |
|----------------------------|-------------|
| 10X Tampon                 | 2.5         |
| 25mM MgCl <sub>2</sub>     | 3           |
| 10mM dNTP miks             | 0.5         |
| 20 pmol/ µl Micro F Primer | 1           |
| 20 pmol/ µl 300 R Primer   | 1           |
| Taq DNA polimeraz (5u/ µl) | 0.5         |
| BSA (10 mg/ml)             | 1           |
| DNA                        | 5           |
| Distile su                 | 10.5        |
| <b>Toplam</b>              | <b>25</b>   |

PCR reaksiyonu için karışım 0,5 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisine hazırlanmıştır. Tüpler thermal cyclers (SENSEQUEST, Germany) cihazına yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur. Thermalcyclarda protokol ön denatürasyon: 95 °C'de 5 dk; 45 döngüyü takiben denatürasyon: 94 °C'de 45 saniye, bağlanma: 58 °C'de 45 saniye, uzama: 72 °C'de 45 saniye; son uzama: 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde programlanmıştır.

Bu protokolle elde edilen PCR ürünü etidyum bromidle boyanmış % 1.5 agaroz jelde marker eşliğinde elektroforeze tabi tutuldu ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla (Carestream, ABD) görüntülendi.

### 3.4.2.2. Nested-Polymerase Chain Reaction

Elde edilen genomik DNA ekstraktları, *Enterocytozoon bieneusi* türüne spesifik S. Katzwinkel-Wladarsch ve arkadaşları (119) tarafından bildirilen SSU rRNA geninin 3' ucundaki 122 bp'lik, ITS geninin 243 bp'lik, LSU rRNA geninin 5' ucundaki 143 bp'lik kısımlarını içeren 508 bp'lik DNA parçasını çoğaltan MSP primerleri kullanılarak nested-PCR analizine tabi tutuldu. Nested-PCR'da kullanılan primerler ve dizilimleri Tablo3.3'de verilmiştir.

**Tablo 3.3.** Nested-PCR'da kullanılan primerler ve dizilimleri

|             | Primerler | Primer Dizilimi (5'---3')                     | TM*(°C) |
|-------------|-----------|-----------------------------------------------|---------|
| 1.Reaksiyon | MSP-I     | 5'-TGA ATG (G,T)GT CCC TGT-3'                 | 45      |
|             | MSP-2B    | 5'-GTT CAT TCG CAC TAC T-3'                   | 46      |
| 2.Reaksiyon | MSP-3     | 5'-GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G)(C,T) TAT-3' | 67      |
|             | MSP-4B    | 5'-CCA AGC TTA TGC TTA AGT CCA GGG AG-3'      | 68      |

\*TM: Melting Temperature

1 ve 2. reaksiyonda kullanılan reaksiyon karışım içeriği Tablo 3.4'te verildiği gibidir. Toplamda 25 µl olmak üzere PCR karışımı hazırlanmış bu reaksiyondan alınan ürün 2. reaksiyonda kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

**Tablo 3.4.** Nested-PCR reaksiyonu için kullanılan bileşen ve miktarları

| Bileşen                                                       | 1.reaksiyon (µl) | 2.reaksiyon (µl) |
|---------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| 10X Tampon                                                    | 2.5              | 2.5              |
| 25mM MgCl <sub>2</sub>                                        | 3                | 3                |
| 10mM dNTP miks                                                | 0.5              | 0.5              |
| 20 pmol/ µl F Primer *                                        | 1                | 1                |
| 20 pmol/ µl R Primer **                                       | 1                | 1                |
| Taq DNA polimeraz (5u/ µl)                                    | 0.5              | 0.5              |
| BSA (10 mg/ml)                                                | 1                | -                |
| DNA                                                           | 5                | 1                |
| Distile su                                                    | 10.5             | 15.5             |
| Toplam                                                        | 25               | 25               |
| * F primer: 1.reaksiyon için MSP 1, 2.reaksiyon için MSP 3    |                  |                  |
| ** R primer: 1.reaksiyon için MSP 2B, 2.reaksiyon için MSP 4B |                  |                  |

**Termal cykler:** *Enterocytozoon bieneusi* için belirlenen MSP-I, MSP-2B, MSP-3, MSP-4B primerleri kullanılarak PCR programı optimize edildi. Amplifikasyon için gerekli PCR şartları Tablo 3.5’te verilmiştir.

**Tablo 3.5.** Amplifikasyon için gerekli PCR şartları

| 1.reaksiyon                   | 2.reaksiyon                   |
|-------------------------------|-------------------------------|
| <u>95°C 15 dk</u>             | <u>95°C 15 dk</u>             |
| 95°C - 30 sn                  | 95°C - 30 sn                  |
| 49°C - 60 sn                  | 58°C - 60 sn                  |
| <u>72°C - 120 sn 36 döngü</u> | <u>72°C - 120 sn 36 döngü</u> |
| 72°C -10 dk                   | 72°C -10 dk                   |

Thermal cycler'a (SENSEQUEST, Germany) yerleştirilen örnekler uygun PCR şartları süresince beklendi. 2. reaksiyon sonrasında elde edilen PCR ürünleri etidyum bromidle boyanmış % 1.5'luk agaroz jel de elektroforeze tabi tutuldu ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla görüntülendi.

### **3.5.Verilerin Analizi**

İstatistiksel analizlerde için; iki oran ve ki-kare testi kullanılmıştır.  $p<0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

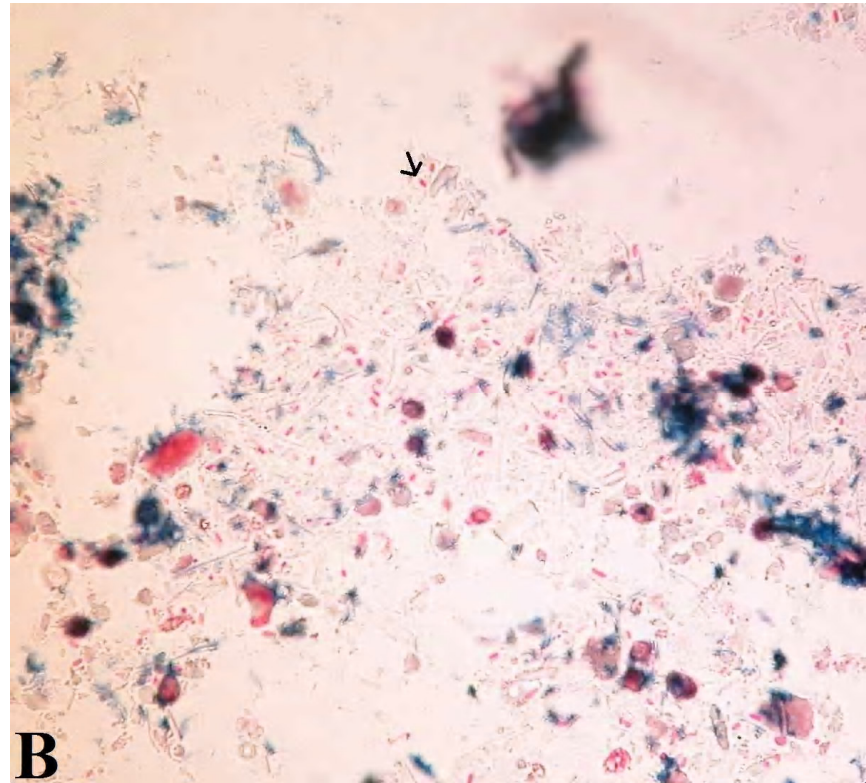
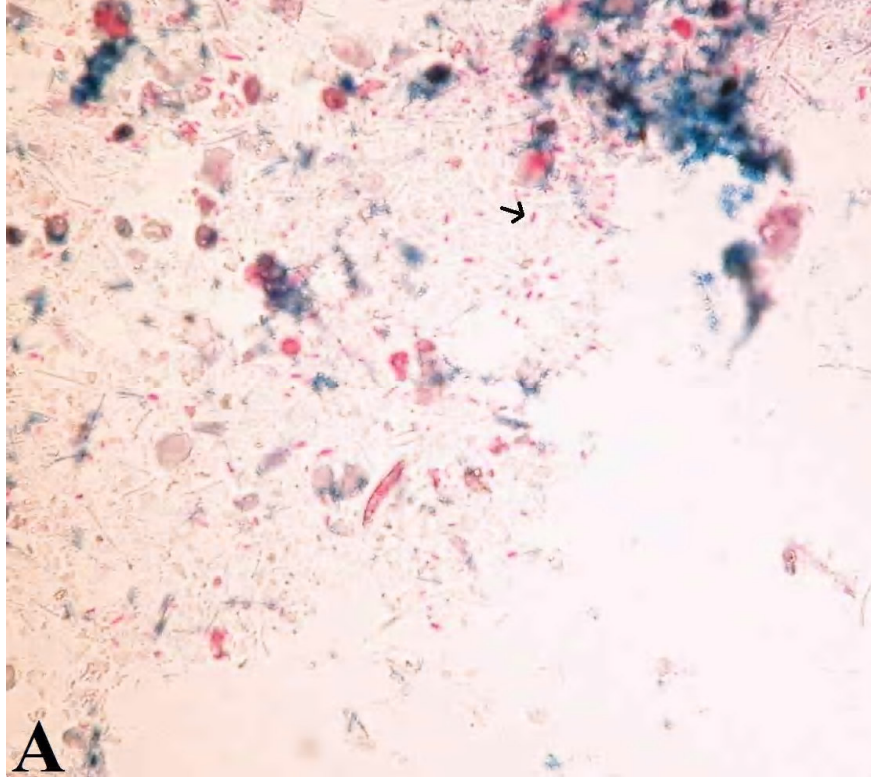
Hasta ve kontrol gruplarından alınan toplam 180 dışkı örneği; immunofloresans, konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle incelenmiştir. Mikrosporidia pozitifliğinde Cins spesifik-PCR, *E. bieneusi* pozitifliği için ise nested-PCR refere alınmıştır.

Araştırmaya dahil edilen 106 kadın hastanın %41.5'i, 74 erkek hastanın %43.2'si cins spesifik primerlerle *Microsporidia* spp. pozitif olarak değerlendirilmiştir. Aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ( $p=0.878$ ). *E. bieneusi* görülme sıklığı açısından değerlendirildiğinde ise kadın hastaların %13.2'sinde, erkek hastaların ise %9.5'inde pozitiflik tespit edilmiş aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ( $p=0.488$ ) (Tablo 4.1).

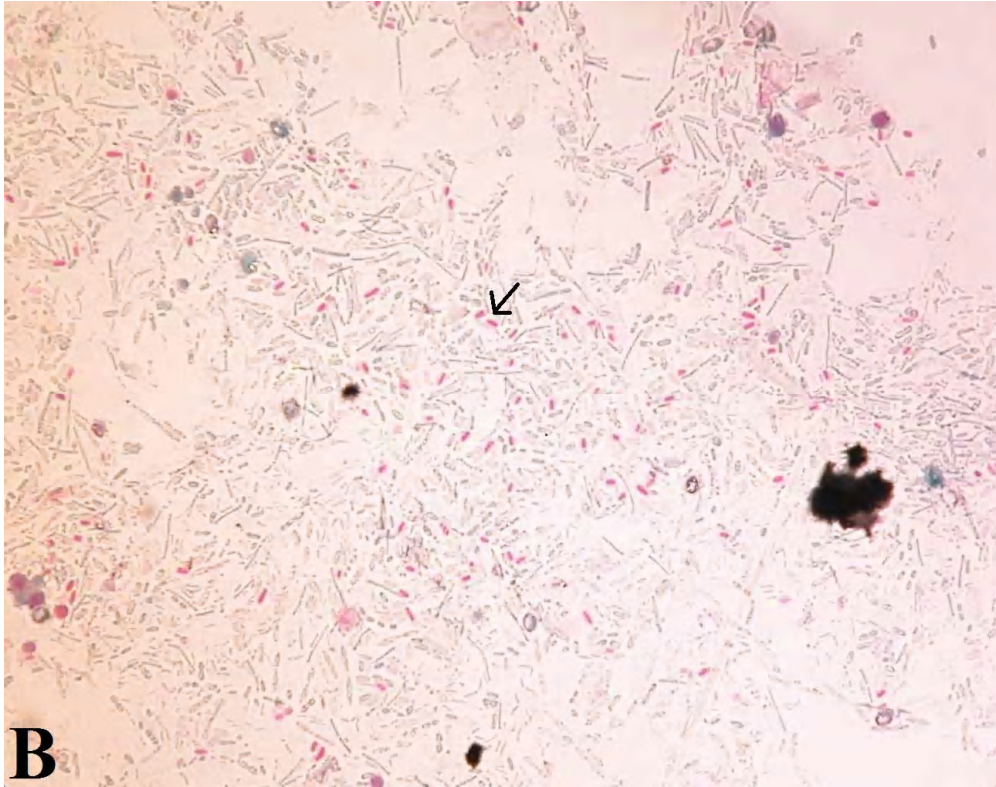
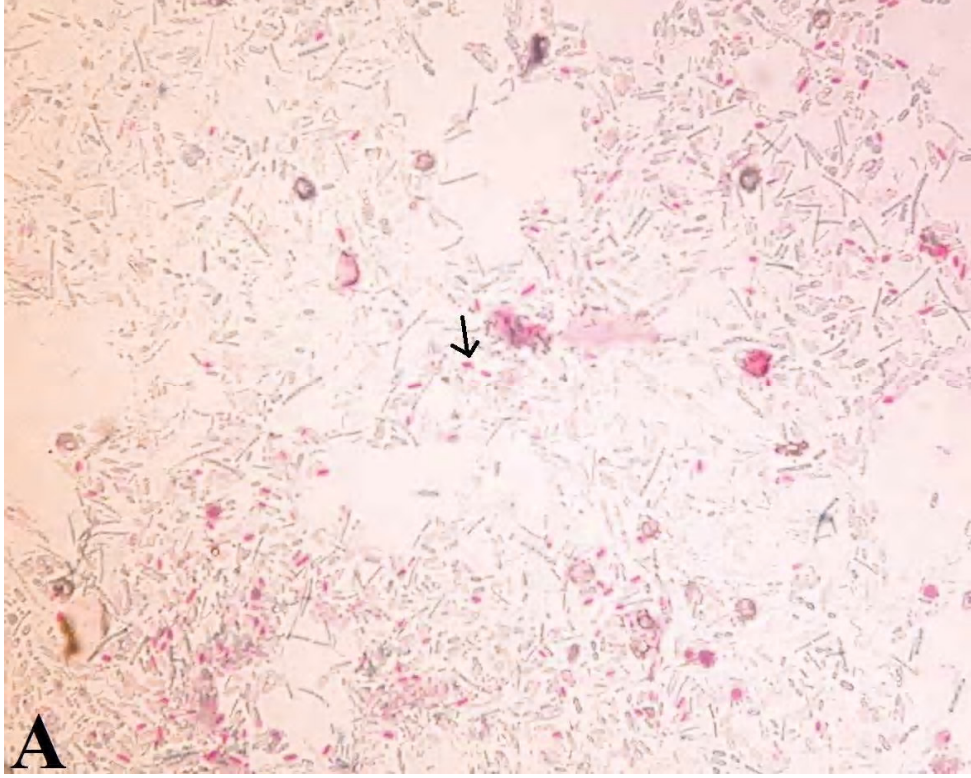
**Tablo 4.1.** Cinsiyete göre moleküler analizlerle tespit edilen pozitiflik oranları.

|                   |         | Erkek |      | Kadın |      |
|-------------------|---------|-------|------|-------|------|
|                   |         | n     | %    | n     | %    |
| Mikrosporidia     | Pozitif | 32    | 43.2 | 44    | 41.5 |
|                   | Negatif | 42    | 56.8 | 62    | 58.5 |
| <i>E.bieneusi</i> | Pozitif | 7     | 9.5  | 14    | 13.2 |
|                   | Negatif | 67    | 90.5 | 92    | 86.8 |

İncelemesi yapılan 180 dışkı örneğinden %49.4'ü Modifiye Trichrome (Şekil 4.1A, 4.1B), %59.4'ü Asit-Fast Trichrome (Şekil 4.2A, 4.2B), %61.1'i Calcofluor (Şekil 4.3A, 4.3B), %63.9'u Acridin orange (Şekil 4.4A, 4B) ve %42.2'si ise insanda patojen olan beş mikrosporidia türü için (*E. bienersi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *V. corneae*) ortak olan primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda (Şekil 4.5) mikrosporidia pozitif olarak değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının uygulanan tanı yöntemine göre pozitiflik oranları Tablo 4.2'de verilmiştir.

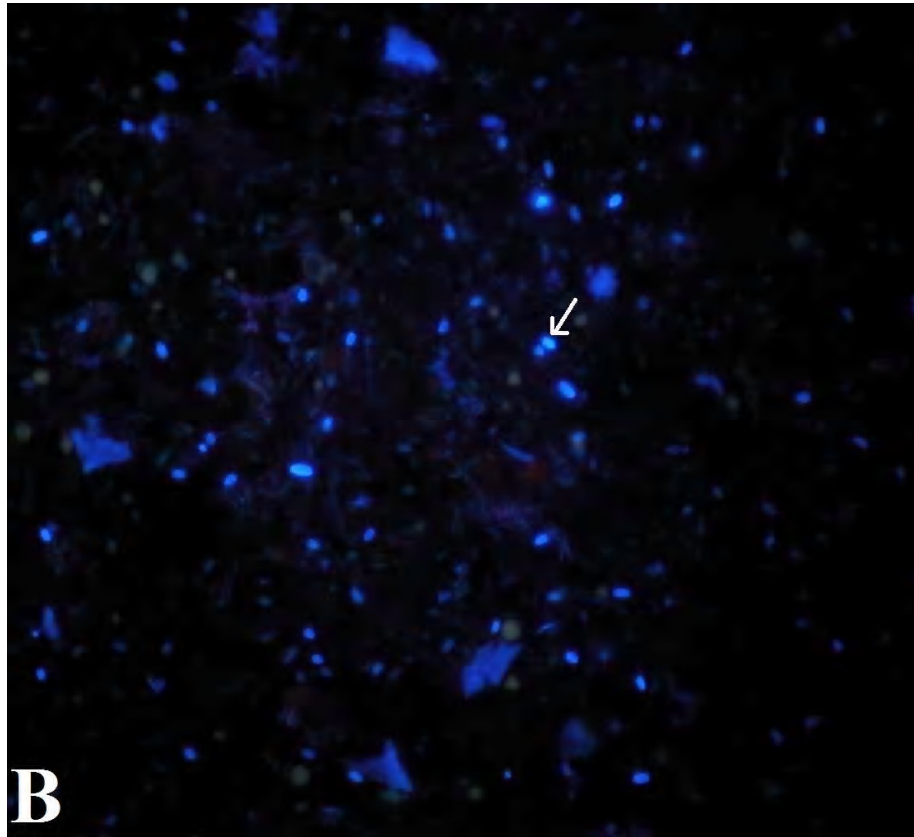
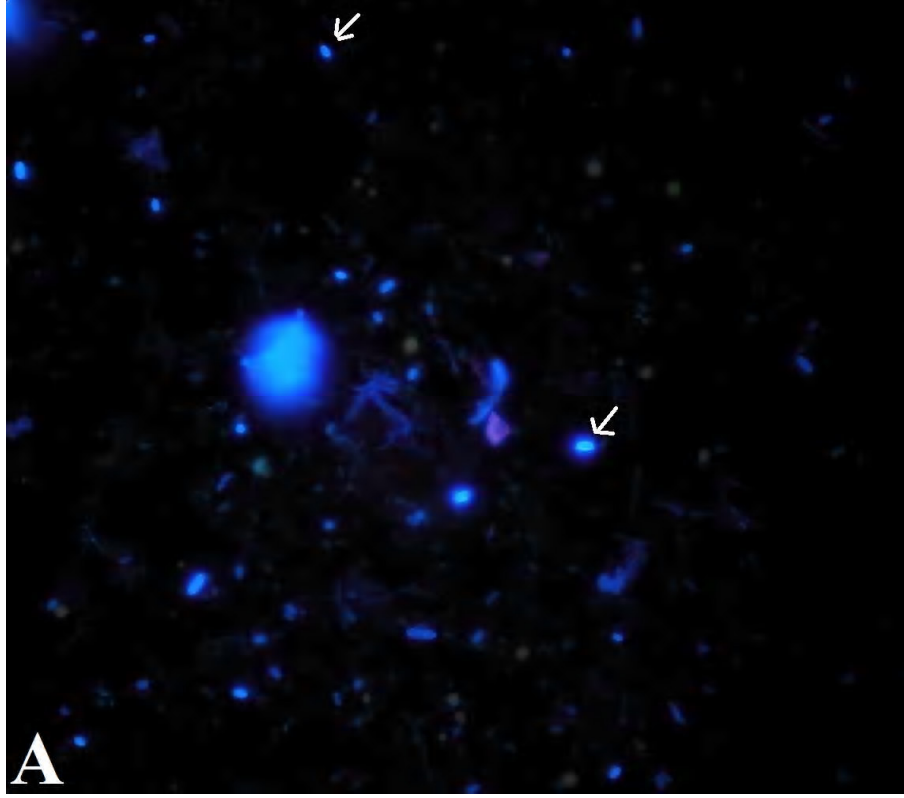


Şekil 4.1A, 4.1B. Modifiye Trichrome boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları (x1000)

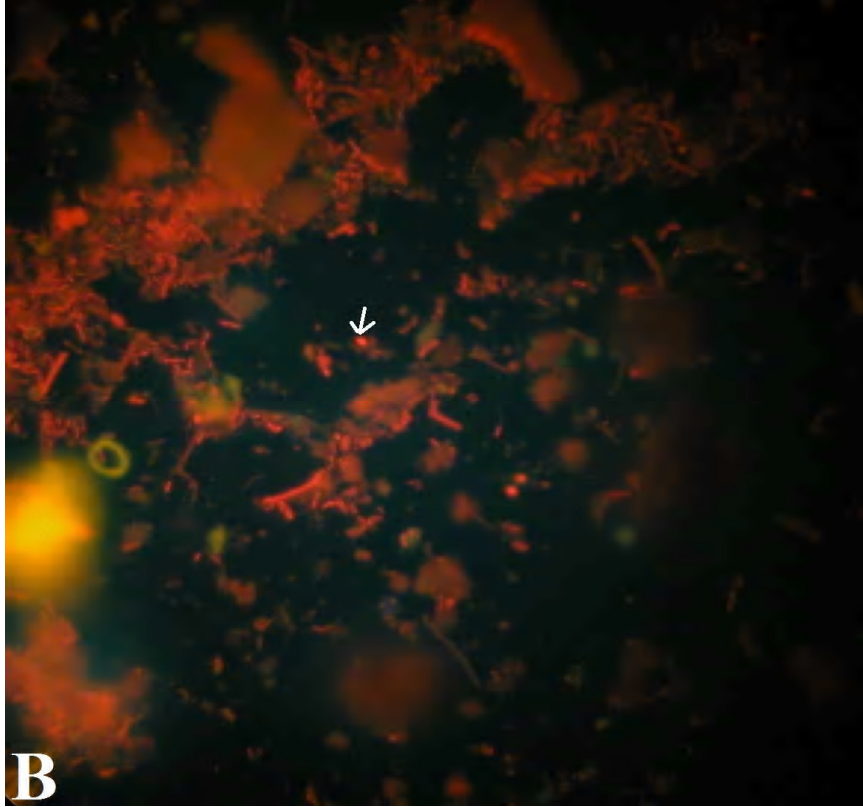
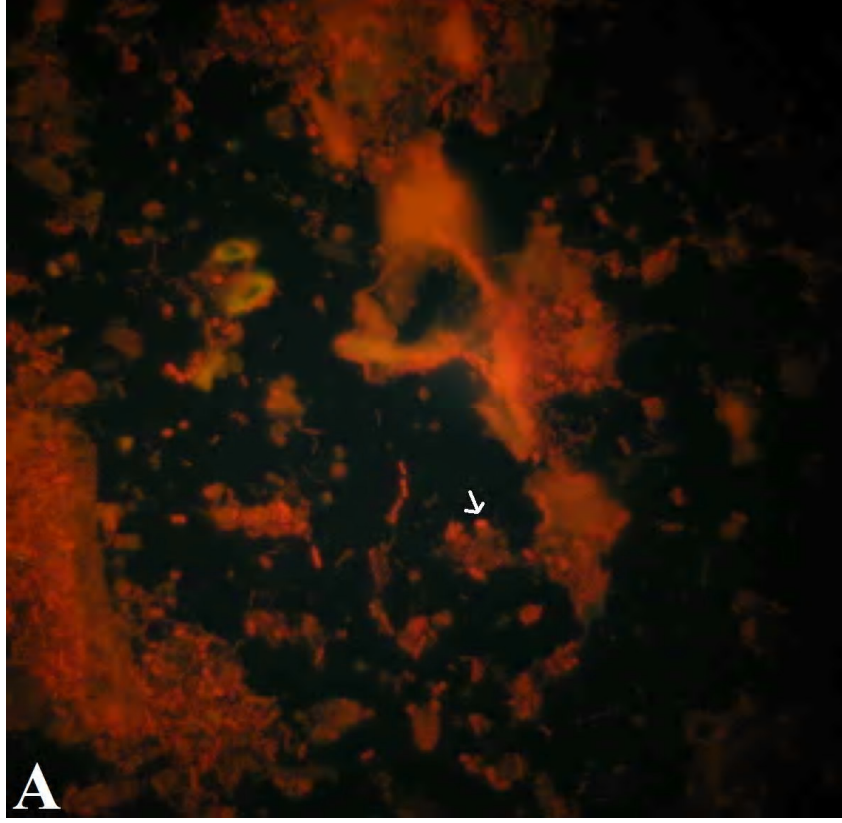


Şekil 4.2A, 4.2B. Asit-Fast Trichrome boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları (x1000)

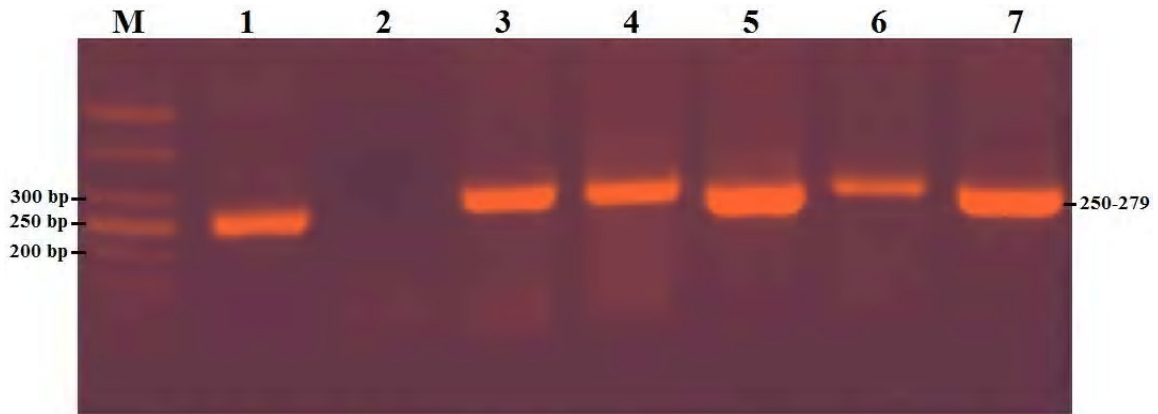




Şekil 4.3A, 4.3B. Calcofluor boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları (x1000)



Şekil 4.4A, 4B. Acridin orange boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları(x1000)



**Şekil 4.5A.** Mikrosporidia pozitif örneklerin Micro F, 300 R primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel elektroforezde görüntüsü. M: 50 bp marker (BIOMATİK, M7507), 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3-7: Pozitif örnekler.

**Tablo 4.2.**Farklı hasta gruplarının farklı boyama yöntemlerine göre mikrosporidia pozitiflik oranları.

| Hasta Grupları          | Tam Yöntemleri |             |           |             |            |             |                |             |                   |             |
|-------------------------|----------------|-------------|-----------|-------------|------------|-------------|----------------|-------------|-------------------|-------------|
|                         | AFT            |             | MTS       |             | Calcofluor |             | Acridin Orange |             | Cins spesifik-PCR |             |
|                         | n              | %           | n         | %           | n          | %           | n              | %           | n                 | %           |
| Onkoloji (n=20)         | 8              | 40          | 6         | 30          | 6          | 30          | 11             | 55          | 9                 | 45          |
| KIT (n=20)              | 6              | 30          | 7         | 35          | 10         | 50          | 8              | 40          | 7                 | 35          |
| Dermatit (n=20)         | 11             | 55          | 15        | 75          | 15         | 75          | 14             | 70          | 10                | 50          |
| Ürtiker (n= 20)         | 12             | 60          | 7         | 35          | 13         | 65          | 15             | 75          | 7                 | 35          |
| Gelişme Geriliği (n=20) | 16             | 80          | 6         | 30          | 16         | 80          | 15             | 75          | 7                 | 35          |
| Ülseratif Kolit (n=20)  | 16             | 80          | 12        | 60          | 12         | 60          | 16             | 80          | 8                 | 40          |
| Kaşıntı (n=20)          | 12             | 60          | 13        | 65          | 17         | 85          | 16             | 80          | 9                 | 45          |
| Kontrol 1 (n=20)        | 11             | 55          | 10        | 50          | 6          | 30          | 9              | 45          | 7                 | 35          |
| Kontrol 2 (n=20)        | 15             | 75          | 13        | 65          | 15         | 75          | 11             | 55          | 12                | 60          |
| <b>TOPLAM (n=180)</b>   | <b>107</b>     | <b>59.4</b> | <b>89</b> | <b>49.4</b> | <b>110</b> | <b>61.1</b> | <b>115</b>     | <b>63.9</b> | <b>76</b>         | <b>42.2</b> |

MicroF ve 300R primerleri kullanılarak yapılan cins spesifik-PCR'ı referans aldığımızda MTS'nin sensitivite %61.8, spesifitesi %59.6; AFT'nin sensitivite %71.1, spesifitesi %48.5; Calcofluor'un sensitivite %72.4, spesifitesi %47.1; Acridin orange'nin sensitivite %77.6, spesifitesi %45.1 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** Farklı tanı yöntemlerinin cins spesifik-PCR'a göre sensitivite ve spesifite değeri.

| Boyama Yöntemleri     | Cins spesifik-PCR |         | Sensitivite | Spesifite             |
|-----------------------|-------------------|---------|-------------|-----------------------|
|                       | Pozitif           | Negatif |             |                       |
| <b>AFT</b>            | Pozitif           | 54      | 53          | %71.1<br><b>%48.5</b> |
|                       | Negatif           | 22      | 50          |                       |
| <b>MTS</b>            | Pozitif           | 47      | 42          | %61.8<br><b>%59.6</b> |
|                       | Negatif           | 29      | 62          |                       |
| <b>Calcofluor</b>     | Pozitif           | 55      | 55          | %72.4<br><b>%47.1</b> |
|                       | Negatif           | 21      | 49          |                       |
| <b>Acridin Orange</b> | Pozitif           | 59      | 56          | %77.6<br><b>%45.1</b> |
|                       | Negatif           | 17      | 46          |                       |

Çalışmada IFA yöntemi ile %27.2'si (Şekil 4.6A, Şekil 4.6B) ve nested-PCR ile %11.7'sinde (Şekil 4.7) *E. bieneusi* pozitif olarak saptanmıştır.

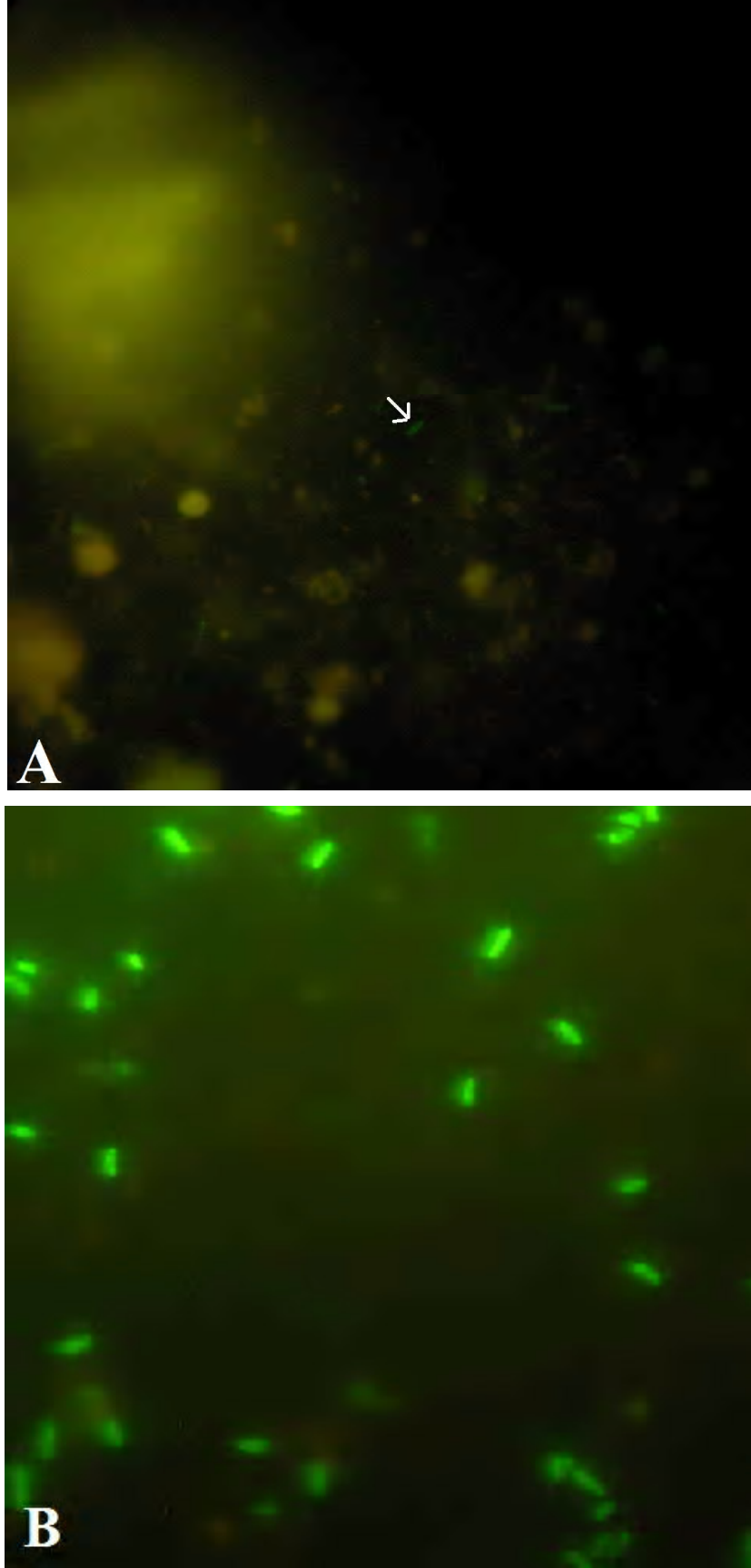
Çalışmaya dahil edilen kanser tanısı almış hastalar, kemik iliği transplantlı, gelişme geriliği, kaşıntı, dermatit, ürtiker ve ülseratif kolit şikayetleri bulunan toplam 140 hastanın %30'unda IFA ile %12.14'ü ise nested-PCR ile *E. bieneusi* pozitif olarak tespit edilmiştir.

Kontrol grubu olarak herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat gastrointestinal şikayeti olan hastaların %20'si IFA, %15'i ise nested-PCR ile sağlıklı gönüllülerin ise %15'i IFA, %5'i ise nested-PCR ile pozitiflik saptanmıştır (Tablo 4.4).

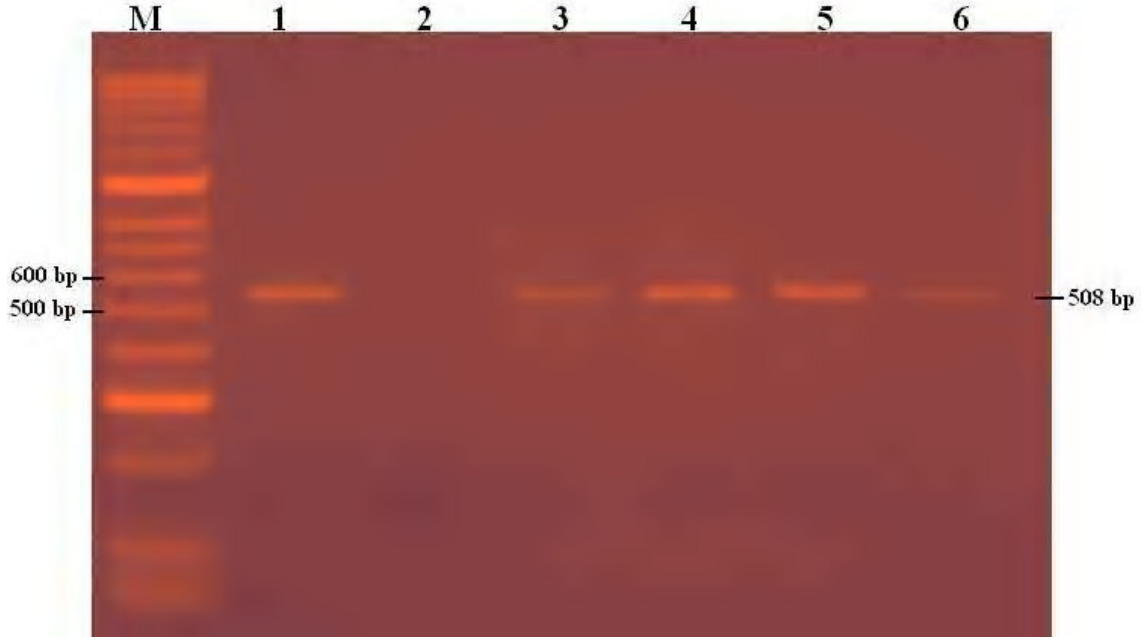


**Tablo 4.4.** Farklı hasta gruplarında IFA ve Nested-PCR'a göre pozitiflik oranları.

| Hasta Grupları         | YÖNTEMLER |             |            |             |
|------------------------|-----------|-------------|------------|-------------|
|                        | IFA       |             | Nested-PCR |             |
|                        | n         | %           | n          | %           |
| Onkoloji (n=20)        | 7         | 35          | 2          | 10          |
| KIT(n=20)              | 10        | 50          | 5          | 25          |
| Dermatit(n=20)         | 5         | 25          | 2          | 10          |
| Ürtiker(n=20)          | 6         | 35          | 4          | 20          |
| Gelişme Geriliği(n=20) | 8         | 40          | 1          | 5           |
| Ülseratif Kolit(n=20)  | 1         | 5           | 1          | 5           |
| Kaşıntı(n=20)          | 5         | 25          | 2          | 10          |
| Kontrol 1(n=20)        | 3         | 15          | 1          | 5           |
| Kontrol 2(n=20)        | 4         | 20          | 3          | 15          |
| <b>TOPLAM</b>          | <b>49</b> | <b>27.2</b> | <b>21</b>  | <b>11.7</b> |



Şekil 4.6A,4.6B. IFA yöntemi ile tespit edilen *Enterocytozoon bienersi* sporları (x1000)



**Şekil 4.7.** *E. bienewsi* pozitif örneklerin MSP primeri ile yapılan nested-PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel elektroforezde görüntüsü. M: 100 bp marker (BIOLINE,HyperLadder II), 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3-6: Pozitif örnekler.

MSP primerleri kullanılarak yapılan *E. bienewsi*'ye spesifik nested-PCR'ı referans aldığımızda IFA'nın sensitivite %38, spesifitesi %74 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** IFA'nın Nested-PCR'a göre sensitivite ve spesifite değeri.

|            |         | Nested-PCR |         | Sensitivite | Spesifite |
|------------|---------|------------|---------|-------------|-----------|
|            |         | Pozitif    | Negatif |             |           |
| <b>IFA</b> | Pozitif | 8          | 41      | %38         | %74       |
|            | Negatif | 13         | 118     |             |           |

Kronik rahatsızlığı olup gastrointestinal şikayetlerle laboratuvarımıza başvuran kanser tanısı almış, kemik iliği transplantlı ve ülseratif kolit'li hastalar, herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat sadece gastrointestinal şikayeti olan hastalardan oluşan kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Cins spesifik-PCR sonucunda elde edilen verilere göre kontrol grubu ile bu hasta grupları arasında mikrosporidia görülmesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Nested-PCR sonuçlarına göre *E. bienewsi* görülme oranı bakımından karşılaştırıldığında ise yine aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür ( $p>0.05$ ).

Herhangi bir gastrointestinal şikayeti olmayan fakat parazitlerin de sebep olabildiği kaşıntı, dermatit, ürtiker ve gelişme geriliği gibi klinik tablolar ile laboratuvarımıza başvuran hastalarla hiçbir şikayeti olmayan sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Cins spesifik-PCR sonucunda elde edilen verilere göre kontrol grubu ile bu hasta grupları arasında mikrosporidia görülmesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Nested-PCR sonuçlarına göre *E. bienersi* görülme oranı bakımından karşılaştırıldığında ise yine aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür ( $p>0.05$ ).

Kontrol grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında Cins spesifik-PCR ve nested-PCR sonuçlarına göre aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=205$ ,  $p=605$ ).

Bu farklı hasta gruplarının immunofloresans, konvansiyonel ve moleküler yöntemlere göre sonuçları Tablo 4.6’da verildiği gibidir.

**Tablo 4.6.** Farklı hasta gruplarının farklı tanı yöntemlerine göre sonuçları

| Hasta Grupları   | YÖNTEMLER     |      |            |      |                |      |     |      |     |      |                   |      |            |      |
|------------------|---------------|------|------------|------|----------------|------|-----|------|-----|------|-------------------|------|------------|------|
|                  |               |      |            |      |                |      |     |      |     |      |                   |      |            |      |
|                  | Konvansiyonel |      |            |      |                |      |     |      |     |      |                   |      | Moleküler  |      |
|                  | IFA           |      | Calcofluor |      | Acridin Orange |      | MTS |      | AFT |      | Cins spesifik-PCR |      | Nested-PCR |      |
|                  | n             | %    | n          | %    | n              | %    | n   | %    | n   | %    | n                 | %    | n          | %    |
| Onkoloji         | 7             | 35   | 6          | 30   | 11             | 55   | 6   | 30   | 8   | 40   | 9                 | 45   | 2          | 10   |
| KIT              | 10            | 50   | 10         | 50   | 8              | 40   | 7   | 35   | 6   | 30   | 7                 | 35   | 5          | 25   |
| Dermait          | 5             | 25   | 15         | 75   | 14             | 70   | 15  | 75   | 11  | 55   | 10                | 50   | 2          | 10   |
| Ürtiker          | 6             | 35   | 13         | 65   | 15             | 75   | 7   | 35   | 12  | 60   | 7                 | 35   | 4          | 20   |
| Gelişme Geriliği | 8             | 40   | 16         | 80   | 15             | 75   | 6   | 30   | 16  | 80   | 7                 | 35   | 1          | 5    |
| Ülseratif Kolit  | 1             | 5    | 12         | 60   | 16             | 80   | 12  | 60   | 16  | 80   | 8                 | 40   | 1          | 5    |
| Kaşıntı          | 5             | 25   | 17         | 85   | 16             | 80   | 13  | 65   | 12  | 60   | 9                 | 45   | 2          | 10   |
| Kontrol 1        | 3             | 15   | 6          | 30   | 9              | 45   | 10  | 50   | 11  | 55   | 7                 | 35   | 1          | 5    |
| Kontrol 2        | 4             | 20   | 15         | 75   | 11             | 55   | 13  | 65   | 15  | 75   | 12                | 60   | 3          | 15   |
| TOPLAM           | 49            | 27.2 | 110        | 61.1 | 115            | 63.9 | 89  | 49.4 | 107 | 59.4 | 76                | 42.2 | 21         | 11.7 |

Araştırmaya dahil edilen 124 ishali olmayan hastanın %41.1'i cins spesifik primerlerle mikrosporidia pozitif olarak değerlendirilirken 56 ishali olan hastanın %44.6'sı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Aradaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p=0.745$ ). *E. bieneusi* görülme açısından değerlendirildiğinde ise ishali olmayan hastaların %10.5'inde, ishali olan hastaların ise %14.3'ünde pozitiflik tespit edilmiştir. Aradaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p=0.461$ ). (Tablo 4.7)

**Tablo 4.7.** İshal olma durumuna göre moleküler analizlerle tespit edilen pozitiflik oranları.

|                           |         | İshalli   |      | İshalsiz   |      |
|---------------------------|---------|-----------|------|------------|------|
|                           |         | n         | %    | n          | %    |
| <b>Mikrosporidia</b>      | Pozitif | <b>25</b> | 44.6 | <b>51</b>  | 41.1 |
|                           | Negatif | <b>31</b> | 55.4 | <b>73</b>  | 58.9 |
| <b><i>E. bieneusi</i></b> | Pozitif | <b>8</b>  | 14.3 | <b>13</b>  | 10.5 |
|                           | Negatif | <b>48</b> | 85.7 | <b>111</b> | 89.5 |

Çalışmaya alına 180 kişiden; 28'inde *B. hominis*, 5'inde *E. coli*, 2'sinde *G. intestinalis*, 2'sinde *E. nana* ve 1'inde *I. bütschlii* tespit edilmiştir. Ayrıca 32 kişide ise lökosit saptanmıştır. AFT boyama sonucunda ise hiçbir hastada intestinal coccidianlara rastlanmamıştır. *B. hominis* belirlenen 3 hasta ile lökosit belirlenen 5 hasta aynı zamanda *E. bieneusi* açısından da pozitif olarak değerlendirilmiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Daha önce hayvan paraziti olarak bilinen mikrosporidian parazitlerin aslında zoonoz etkenler olduğu, son yıllarda AIDS ve diğer nedenlere bağlı olarak immun sistemi baskılanmış hastaların artmasıyla öneminin giderek arttığı görülmektedir. İmmunokompetant hastalarda kendini sınırlayan, HIV pozitif ve diğer nedenlerle ortaya çıkan immun sistemi baskılanmış hastalarda ise ağır ve öldürücü ishale sebep olan *E. bieneusi*'ye insanlarda oldukça sık olarak rastlanmaktadır. *E. bieneusi* enfeksiyonunun HIV pozitif hastalarda %50'ye kadar ulaştığı, HIV negatif kişilerde ise %1.3-8 arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir (36). Hastaların yarısında; karın ağrısı, ateş, mide bulantısı, kusma, dışkıda kan ve lökosit bulunmaktadır. Enfeksiyon genellikle ince bağırsakta ve safra yollarında sınırlı kalmakta ve sporlar dışkı ile dışarı atılmaktadır.

Bu çalışmada; farklı hasta gruplarında fırsatçı bir parazit olan *E. bieneusi*'nin yaygınlığının farklı tanı yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

*Enterocytozoon bieneusi* enfeksiyonları; İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri, Arjantin, Zambia, Uganda, Almanya, Fransa, Kongo, Avustralya ve Hollanda gibi dünyanın birçok yerinde AIDS'li hastalarda ki raporlar bulunmaktadır (19). Bu hastalarda gözlenen en önemli bulgular, kronik ishal ve kilo kaybıdır. Kronik ishalleri AIDS hastalarında yapılan endoskopik çalışmalar sonucunda, *E. bieneusi* prevalansı %7-50 olarak saptandığı bildirilmektedir. Bununla beraber; koprodiagnostik tekniklerin

kullanıldığı çalışmalarda, HIV pozitif kronik ishalli hastalarda prevalans %9-16 arasında bulunduğu belirtilmektedir (10). 1990 yılından bu zamana kadar yapılan çalışmalara göre AIDS hastalarında mikrosporidia prevalansının coğrafik bölgelere ve uygulanan tanı testlerine göre %1.5-50 arasında değiştiği bildirilmektedir (4,7,13,20). Ülkemizde ise mikrosporidia prevalansı ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır. Yapılan çalışmalarda genel olarak mikrosporidia yaygınlığı %5.6- %10.9 arasında değişmektedir (10,88,124,125).

Yapmış olduğumuz çalışmada ise 106 kadının %41.5'i, 74 erkeğin ise %43.2'si *Microsporidia* spp. pozitif olarak bulunmuştur. *E. bienewisi* görülme sıklığı açısından değerlendirildiğinde ise kadınların %13.2'sinde, erkeklerin ise %9.5'inde pozitiflik tespit edilmiştir. Dünyadaki belirtilen prevalans aralığına göre benzer sonuçlar elde edilmiştir. Fakat mikrosporidia parazitleri için tür sayısındaki fazlalık, farklı doku ve organlara yerleşmesi ve tanıdaki bazı zorluklardan dolayı güvenli bir prevalansın elde edilmesini zorlaştırmaktadır.

1985'den buyana *E. bienewisi* enfeksiyonları, devamlı ishali ve kilo kaybı bulunan AIDS hastalarında oportunistik enfeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır. Tanı metotlarının gelişmesi ve farkındalığın artmasıyla mikrosporidia enfeksiyonları; organ transplantasyonu olan hastalarda, yaşlılar, çocuklar, kontak lens kullananlar, turistler ve risk faktörü oluşturmeyen immunokompetant bireyler de dahil olmak üzere geniş bir yelpazede araştırılmaktadır. *E. bienewisi* enfeksiyonlarının primer olarak immun sistemi baskılanmış kişilerde görülmesine rağmen, günümüzde sağlıklı bireylerde de enfeksiyon sıklığının giderek arttığı bildirilmektedir (126).

AIDS'li hastalarda *E. bienewisi* ve *E. intestinalis* enfeksiyonları başlıca kronik ishale neden olmaktadır (127). Bu konuda yapılan çalışmalar arasında; Kotler et al (128) mikrosporidia prevalansını 141 ishalli AIDS hastasında %83, 53 ishali olmayan AIDS hastasında %2'sinde ve 56 AIDS hastası olmayan hasta grubunda ise %3 oranında tespit etmişlerdir. Mikrosporidiosisin AIDS hastalarında kronik ishal, aşırı kilo verme ve malabsorbsiyona neden olduğu bildirilmektedir. Afrika ülkelerinde çocuklar üzerinde yapılan prevalans çalışmaları oldukça sınırlı olup HIV(+) kronik diyaresi bulunan hastalarda Zimbabwe'de %18 (37), Guinea Bissau'da %11 (29) oranında pozitiflik saptanmıştır.



Araştırmamızda; cins spesifik primerlerle 56 ishali olan hastanın %44.6'sı mikrosporidia pozitif olarak değerlendirilirken, *E. bieneusi* görülme açısından değerlendirildiğinde ishali olmayan hastaların %10.5'inde, ishali olan hastaların ise %14.3'ünde pozitiflik tespit edildi. İstatistiksel olarak aralarında fark olmasa da immün sistemi sağlam veya baskın olsun ishallerde *E. bieneusi*'nin araştırılmasının faydalı olacağı kanısındayız.

Çalışmalarda microsporidiumların tedavi olmadan geçebilen ishalleri neden olabileceği ve 2-3 gün süren turist ishallerinin görülebileceği bildirilmektedir. Ayrıca, kronik ishali olan ve daha önceden enterik patojen saptanmayan hastalarda *E. bieneusi* oranını %7 - 50 arasında bulunduğu belirtilmektedir (3,9).

Kongo da AIDS hastalarının %5.1'i (53), Anane et al (20) HIV ile enfekte hastaların %3.6'sında, Anane et al Tunus'da (25) HIV (+) hastaların %20'sinde, HIV(-) hastaların ise %5.35'inde, İspanya'da HIV(-) olan ve böbrek nakli yapılmış 2 kişide (56), Lanternier et al (104) biri böbrek diğeri karaciğer olmak üzere solit organ transplantasyonu olan ishallerde *E. bieneusi* saptadıklarını bildirmişlerdir.

Ülkemizde; Atambay ve arkadaşları (124) immün sistemi sağlam ve sindirim sistemi şikayetleri bulunan hastaların %6.5'inde, Karaman ve arkadaşları (125) kanser tanısı almış hastaların %10.9'unda, ülseratif kolitli hastaların %17.6'sında, Yazar ve arkadaşları (129) kanserli bir hastada BAL örneğinde Giemsa boyama ile mikrosporidia tespit edildiğini ve bu olgunun akciğer enfeksiyonlu immün yetersiz bireylerde mikrosporidiaların patojen olduğunu belirtmişlerdir, Büget ve arkadaşları (130) ise bir AIDS hastasında *Microsporidia* spp. saptadıklarını bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmada, kronik rahatsızlığı olup aynı zamanda gastrointestinal şikayetlerle laboratuvarımıza başvuran kanser tanısı almış hastaların %10'unda, kemik iliği transplantlı hastaların %25'inde, ülseratif kolit'li hastaların %5'inde, herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat sadece gastrointestinal şikayeti olan kontrol grubu hastaların %15'inde *E. bieneusi* tespit edildi. Hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0.05$ ).

Aynı hasta grupları mikrosporidia açısından değerlendirildiğinde ise kanser tanısı almış hastaların %45'inde, kemik iliği transplantlı hastaların %35'inde, ülseratif kolit'li hastaların %40'ında, herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat sadece gastrointestinal şikayeti olan kontrol grubu hastaların %60'ında pozitiflik belirlendi.

Hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0.05$ ).

Sonuçlara göre, *E. bieneusi* ve mikrosporidiaların yalnızca HIV(+) hastalarda değil, diğer kronik rahatsızlığı bulunan hastalarda da enfeksiyona neden olabileceği düşünülmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada herhangi bir gastrointestinal şikayeti olmayan fakat kaşıntı, dermatit, ürtiker ve gelişme geriliği gibi klinik tablolar ile laboratuvarımıza başvuran hastalarla hiçbir şikayeti olmayan sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Uganda da (131) malnutrisyon ve diyare sebebiyle hastaneye yatırılarak tedavi edilen çocuklarda %17.4'ünde *E. bieneusi*, Karaman, (10) büyüme ve gelişme geriliği bulunan çocukların %12.1'inde, alerji ve kaşıntı şikayeti ile gelen hastaların %13.2'sinde mikrosporidia pozitifliği tespit etmişlerdir. Ayrıca Karaman ve ark, ürtikeri olan 132 hastanın 26 (%19.7)'sında mikrosporidia saptamıştır ve nedeni bilinmeyen ürtikerli ve genel vücut kaşıntısı olan hastalarda araştırılması gerektiğini vurgulamıştır (132).

Çalışmamızda gelişme geriliği bulunan çocukların %5'inde *E. bieneusi*, %35'inde ise mikrosporidia pozitifliği saptandı. İntestinal mikrosporidiaların genel bilgilerinde de vitamin, karbonhidrat, yağ ve protein emilimi bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. Gelişme geriliği görülen çocuklarda bu parazit açısından da değerlendirilmesi kanısındayız.

Kaşıntı ve dermatit hastalarının %10'unda, ürtiker hastaların ise %20'sinde *E. bieneusi* pozitif bulundu. Mikrosporidia görülme açısından değerlendirdiğimizde kaşıntı hastalarının %45'inde dermatit hastaların %50'sinde, ürtiker hastalarının ise %35'inde pozitiflik saptandı. Fakat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Karaman alerji ve kaşıntısı bulunan hastalarda genel vücut kaşıntısı ve alerji ile *Microsporidium* spp. (%13.2) görülme durumu arasında anlamlı ilişki tespit etmişlerdir (10). Çalışmamızla görülme oranı bakımından uyumludur. Aynı zamanda parazitin kliniğine göre alerjik bilgiler göstermektedir bu nedenle bu tip şikayetleri bulunan hastalarda rutinde de incelenmesi ve ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

Rabeneck et al (133) 55'i kronik ishalli toplam 106 HIV(+) erkek hastadan alınan deudonum biyopsi örneğini elektron mikroskobu ile mikrosporidia açısından araştırmışlardır. 106 biyopsi örneğinin 31'inde *E. bienensi*, 24'ünde ise diğer enterik patojenlerin saptandığı bildirilmektedir. Kronik ishali olan ve olmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı saptanmıştır. Gastrointestinal sistem şikayetleri bulunmayan HIV (+) hastalarda da *E. bienensi*'nin görülebileceğini ve bunun ilk vaka olduğu bildirilmektedir (133).

Yapılan çalışmada, sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunda %5'inde, herhangi bir kronik rahatsızlığı bulunmayan fakat gastrointestinalis şikayeti bulunan kontrol hasta grubunun %15'inde *E. bienensi* pozitif olarak bulundu. İstatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark saptanmadı. Sindirim sistemi enfeksiyonlarında en sık izole edilen türler arasında bulunan *E. bienensi*, %90 AIDS hastalarını enfekte eden ve kronik ishalin yaygın sebeplerinden biridir. *E. bienensi* gastrointestinal sistem içerisinde ince bağırsak epitellerine kolonize olmakta, enterit ve ülsera yol açmaktadır. Sindirim sistemine yerleşmesi ve diğer sindirim sistemi rahatsızlıklarında olduğu gibi *E. bienensi* ve *Microsporidium* spp.'nin de gastrointestinal şikayeti bulunan hastalarda çalışılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Rutin klinik laboratuvarlarda mikrosporidiaların tanısında mikroskopik yöntemler uygulanmasına rağmen son on yıldır araştırma laboratuvarlarında teşhis ve tür tespiti amacıyla moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

Moleküler tanı yöntemleri; duyarlılığı, özgüllüğü yüksek olan hızlı ve doğru sonuç veren yöntemlerdir. Tedavi açısından önemli olan birden fazla türün aynı anda tespitine olanak sağlayan mikrosporidiaların tanısında oldukça önemlidir. Son yıllarda önemi giderek artmış bir yöntem olan Real Time PCR (RT-PCR) ile yapılan çalışmalarda, sensivitesi ve spesifitesi %100 olduğu bildirilmektedir.

Verweij et al, (134) multipleks RT-PCR ile ITS gen bölgesindeki 103 bp'lik fragmanı amplifiye eden EbITS-89F ve EbITS-191R primerleri ve EbITS-114RT *E. bienensi* spesifik çift etiketlenmiş prob kullanmışlardır. Sonuç olarak, 33 DNA örneğinden 30'unu *E. bienensi* pozitif olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Espen et al (135) tarafından iki farklı coğrafik bölgede, HIV (+) hastalarda *E. bienensi* pozitifliği RT-PCR ile araştırılmıştır. Mikroskopi incelemelerinde, toplam 228 dışkı örneğinin 62

(%27)'sinde mikrosporidia ve bu örneklerin 24 (%38.7)'ünde RT-PCR'da *E. bieneusi* pozitifliği bildirmişlerdir.

Yapmış olduğumuz çalışmada türe spesifik MSP primerleri kullanılarak nested-PCR ile *E. bieneusi* görülme sıklığını ve IFA yöntemi ile olan ilişkisi araştırıldı. Aynı zamanda insanda patojen olan beş mikrosporidia türü için (*E. bieneusi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *V. corneae*) ortak olan MicroF ve 300R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda mikrosporidia pozitifliği değerlendirildi.

Uganda da nested-PCR ile yapılan çalışmada; 1779 çocuğun %17.4'ünde, kontrol grubunda ise %16.8'inde *E. bieneusi* saptandığı bildirilmektedir (131). Rusya'nın SP Botkin Memorial Klinik Hastanesi'ne başvuran 159 HIV (+) hastada MSP primerleri kullanılarak nested-PCR'ları yapılmış ve 30 (%18.9)'unda *E. bieneusi* tespit etmişlerdir (136). Sak et al (55) 9 kişide, Ayinmode et al (137) Nijerya'da, %9.3'ünde, Akinbo et al (138) HIV (+) hastaların 77'sinde, Lopez et al (139) 40 hastanın 4'ünde *E. bieneusi* saptadıklarını bildirmişlerdir.

Ülkemizde ise ilk tür çalışması Oğuz ve ark tarafından yapılmıştır. Boyama ile pozitif olarak saptadıkları 77 ishali dışkı örneğini MSP primeri ile kullanılarak yaptıkları multiplex nested-PCR sonucunda 7'sini *E. bieneusi*, 70'ini ise *Encephalitozoon* spp. bulduklarını bildirmişlerdir (140).

Çalışmamızda ise MSP primeri ile yapılan nested-PCR sonucunda toplam 140 hastanın %12.1'inde *E. bieneusi* tespit edildi. Yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Genellikle dışkıdan DNA izolasyonu oldukça zordur ve değişkenlik göstermektedir. Bunun için klasik DNA ekstraksiyon yolları yanında cam boncuklar ile oluşturulan mekanik parçalama veya kaynatma ile izolasyonda daha etkili olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle bizde çalışmamızda daha fazla spor elde edebilmek için konsantrasyon yöntemlerinden faydalandığımız gibi DNA izolasyonu sırasında da cam boncuklardan faydalandı ve kaynatma işlemleri yapıldı. Ayrıca çalışmalarda dışkının moleküler yöntemler içerisinde kullanımının diğer bir zorluğunun da sıklıkla polimeraz enzim inhibitörleri içermesi ve bu maddelerinde PCR da inhibitör etki göstermesi olduğu belirtilmektedir (57).

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda konvensiyonel tanı yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda mikrosporidiosis prevalansına göre; Lono et al Malezya'da (141) %21.2, Anane et al Tunus'da (25) HIV (+) 118 hastanın 4'ünde, Garcia et al (83) %42'sinde, Salleh et al (82) %18.3'ünde, Chabchoub et al (142) %6.7'sinde, Abaza et al (143) %2.3 oranında mikrosporidia pozitifliği saptamışlardır.

Anane et al (20) 1995-2007 yıllarını kapsayan retrospektif çalışmalarında 279'u HIV(+) ve 293'ü HIV(-) olan, Modifiye (Weber'in) Trichrome boyama ile HIV (+) hastaların %3.6'sında, HIV(-) hastaların % 1.4'ünü pozitif olarak saptamışlardır. Çek Cumhuriyetinde *Enterocytozoon* ve *Encephalitozoon* prevalansının araştırıldığı bir çalışmada; 382 kişiden alınan dışkı örneği Calcofluor M2R boyası ile boyanarak 58 (%15)'i pozitif bulmuşlardır (55). HIV(-) 60 yaş üzeri ishali bulunan 47 hastada yapılan çalışmada Modifiye Trichrome boyama ile 8 (%17.02) hastada mikrosporidia pozitif olarak belirtilmiştir (26). Didier et al, MTS ve Calcofluor yöntemiyle toplam 74 dışkının 49'unu pozitif olarak saptamıştır (79).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise farklı boyama yöntemleri ile Karaman (10) değişik hasta gruplarından oluşan 2665 kişinin %8.5'inde ve sağlıklı bireylerden oluşan 320 kişilik kontrol grubunun %5.6'sında, Türk (88) ishal şikayeti olan 225 hastanın farklı boyama yöntemleri ile %9.8'inde; mikrosporidia pozitif olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Oğuz ve ark, formol-eter çoklaştırma yöntemi uyguladıkları 200 ishali dışkı örneğini Calcofluor ve Uvitex 2B ile boyamışlardır ve 77 (%38.5)'sini mikrosporidia pozitif olarak tespit etmişlerdir (140).

Franzen et al (9) Uvitex 2B boyasının, Degirolami et al (86) ise hem Uvitex 2B boyasının hem de MTS yönteminin tanıda daha hızlı ve hassas bir yöntem olduğunu bildirilmektedir. Calcofluor M2R ve Sytox gren boyalarının kullanılmasının mikrosporidia sporlarının canlılıklarının belirlenmesinde önemli olduğu belirtilmektedir. Canlı sporların Calcufluor M2R ile 395-415nm dalga boyunda turkuaz-mavi oval şekilde görülmesine karşın, ölü sporların beyaz-sarı renkte gözlenir (84). Tanıda genellikle transmisyon elektron mikroskobu (TEM) geleneksel altın standart olarak kabul edilse de örneklerin çok sayıda kullanılacağı durumlarda bir dezavantaj yaratacağı görülmektedir. Araştırma laboratuvarlarında PCR gibi nükleik asit amplifikasyon teknikler mikrosporidiaların türe spesifik ve belirli bir genotipin belirlenmesi için kullanılmaktadır.

Saigal et al (144) yapmış oldukları çalışmada 125 HIV (+) ishali hasta, 158 HIV (+) ishali olmayan hasta, 55 HIV (-) ishali hasta ile 57 sağlıklı kontrol gurubu olmak üzere toplam 395 kişide Modifiye Trichrome ve Calcofluor boyama yöntemleri ile mikrosporidia sporları araştırılmıştır. 22 (5.6)'sini MTS, 98 (%24.8)'ni calcofluor ve 57 (%14.4)'sini ise PCR ile *Microsporidia* spp. pozitif olarak saptamışlardır. Calcofluor boyamada 60'ını pozitif fakat PCR da ve MTS'de negatif, 13'ünü MTS ve PCR'da, 29'unu Calcofluor ve PCR da, 9'unu ise her üç yöntemle pozitif saptadıklarını bildirmişlerdir. Trichrome boyamanın özgüllüğünü %100, duyarlılığını %97.9, Calcofluor boyamanın özgüllüğünün %82.2, duyarlılığının ise %79.7 olarak belirlemişlerdir.

Gastrointestinal mikrosporidiosis'in genel olarak tanımlanmasında boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanlar dışkı örneklerinin Calcofluor veya Modifiye Trichrome boyaları ile boyanarak ışık ve floresan mikroskobun da incelenmesidir. Fakat bu yöntemlerle de örnekler sadece mikrosporidia pozitif olarak değerlendirilmekte, tür tayini ise yapılamamaktadır (36). Boyama yöntemlerinde chemofluorescent boyaların chromotrope boyamalarına göre duyarlılığı daha yüksek olduğu ancak chemofluorescent boyaların özgüllüğünün daha düşük olduğu belirtilmektedir (79).

Yapmış olduğumuz çalışmada 180 dışkı örneğinden %49.4'ü MTS, %59.4'ü AFT, %61.1'i Calcofluor'da, Acridin orange'da %63.9'u mikrosporidia pozitif olarak değerlendirildi. Ayrıca cins spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda 180 örneğin 76 (%42.2)'sında *Microsporidia* spp. pozitif saptandı. Yapılan çalışmalara göre pozitiflik oranımız daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebinin de görülme oranı yüksek olabilecek hasta gruplarını seçmiş olmamızdan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ayrıca Calcofluor boyamada boyama süresinin kısa olması bir avantaj oluşturmaktadır. Fakat bu boyalar mikrosporida türlerinin endospor tabakasında bulunan kitin tabakasını boyamaktadır. Spor duvarının floresan mikroskobunda parlak görünmesiyle tanı konulmaktadır ancak, maya ve küf mantarı sporlarında da kitin tabakası bulunduğundan dolayı ayırım zordur bu nedenle mantar ve mayalarla karıştırılabileceği ve yanlış pozitiflik verebileceği düşüncesiyle mutlaka cinse spesifik-primerler kullanılarak PCR'ı yapılmasının iyi olabileceğini düşünmekteyiz. Didier et al, Calcofluor White 2MR, MTS ve indirect immuno fluorescent antibody (IFA) yöntemleri karşılaştırdıklarında

sensitivitesi en yüksek olarak Calcofluor White 2MR olduğu belirtilmektedir. MTS ve Calcofluor yöntemiyle 74 örnekten 49'unu pozitif olarak saptadıklarını belirtmişlerdir. Fakat Calcofluor yöntemiyle mikrosporidiaların mayalarla karıştırılabileceği, MTS ile mikrosporidiaların mayalardan kolayca ayrılabilceği bildirilmektedir. TEM ile bu 49 örneği pozitif olarak doğruladıklarını, IFA ile pozitif bulunan 49 örnekten 10'unu doğrulayamadıkları bildirilmiştir. Sonuç olarak, MTS ve Calcofluor boyama yöntemleriyle düşük yoğunluktaki sporları tespit ettikleri belirtilmiştir (79).

Graczyk et al Chromotrope 2R ve Calcofluor White M2R ile 110 hastanın 80'inde, fluorescence in situ hybridization (FISH) ile 94'ünde mikrosporidia saptandığını bildirmiştir. FISH yönteminin duyarlılığını %85.5, Chromotrope 2R yöntemini ise %72.7, Calcofluor yöntemininkini ise %70.9 tespit etmiştir (64).

Luna et al MTS ve Calcofluor boyama yöntemleriyle yaptıkları çalışmada Calcofluor boyama yönteminin ucuz ve hızlı olmasının yanında MTS kadar duyarlı olduğunu belirtmişlerdir (145).

Türk 225 dışkı örneğini MTS, Calcofluor boyama ve Acridine orange yöntemleriyle boyadıkları çalışmada. Weber'in trikrom boyası ile incelenen dışkı örneklerin %9.8 oranında pozitiflik saptadıklarını belirtmiştir. Acridine orange ile %59'unu pozitif bulduklarını ve bu yüksek pozitifliğin yanlış olabileceğini vurgulamışlardır. Bütün preparatın turuncu renge boyanması tanıyı zorlaştırdığı ve deneyim gerektiği kanısına vardıkları bildirilmiştir (88).

Yapmış olduğumuz çalışmada ise; MicroF ve 300R primerleri kullanılarak yapılan cins spesifik-PCR'ı referans aldığımızda MTS'nin sensitivitesi %61.8, spesifitesi %59.6; AFT'nin sensitivitesi %71.1, spesifitesi %48.5; Calcofluor'un sensitivitesi %72.4 spesifitesi %47.1; Acridin orange ise sensitivitesi %77.6, spesifitesi %45.1 olarak belirlendi.

Sonuç olarak; Acridine orange boyamada sporların ayırt edilmesinin güç olmasından dolayı ayırıcı tanıda iyi bir boyama yöntemi olmadığı yanlış pozitiflik verebileceği sonucuna varıldı. Aynı zamanda, intestinal mikrosporidiaların tanımlanmasında diğer boyama yöntemlerinin de yeterli olmadığını, spor sayısının az olduğu durumlarda, spor boyutlarının küçük olmasından dolayı bakteri, küf ve mantarlarla karıştırılabileceğinden dolayı tür identifikasyonu için PCR yönteminin de ayrıca kullanılmasının önemli olduğu düşüncesindeyiz. Moleküler alt yapısı olmayan laboratuvarlarda Calcofluor'un

boyama süresinin kısa olması nedeniyle tercih edilebilir. Fakat MTS boyası ile sporların mayalardan kolayca ayırt edilmesi, AFT boyasında da sporların daha güzel boyanması ve görüntünün net olması nedeniyle bu konvansiyonel tanı yöntemleri kullanılarak doğrulanması önerilebilir.

Bazı mikrosporidia türlerine karşı monoklonal ve poliklonal antikorlar geliştirilmiştir. Türe özgü yüzey molekülleri veya polar tübül yapısını tanıyan floresan işaretli monoklonal antikorlarla tanıda duyarlılık oldukça yüksektir. Monoklonal antikorlar örnekte bulunan sporların spor duvarındaki proteinlere bağlanmakta ve floresan mikroskobunda sporlar parlak yeşil röfle vermektedir. *E. bienewsi* enfeksiyonların tanısı oldukça zordur çünkü organizmanın dışkı içerisindeki maya ve mantarların boyutlarıyla ayırt edilmemektedir.

Rusya’da 46 HIV/AIDS hastanın serumları, oportunistik parazitlerden *C. parvum* ve mikrosporidiaların (*E.cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem*, *E. bienewsi*) seroprevalansını belirlemek için ELISA ve IFA yöntemleri kullanılarak çalışmışlardır. ELISA ile %10.9’unda *E. cuniculi*, %41.3’ünde *C. parvum* seropozitifliği saptamışlardır. IFAT ile %13.6’sında *E. bienewsi*, %7.8’inde *E. intestinalis*, %19.6’sında ise *E. hellem* olduğu tespit etmişlerdir. Bu çalışma; HIV/AIDS hastalar arasında cryptosporidiosis ve mikrosporidiosis prevalansının belirlemek amacıyla yapılan ilk çalışma olduğu bildirilmektedir (146).

Al-Mekhlafi et al (147); MTS boyama yöntemi ile mikrosporidia açısından 50 pozitif, 50 negatif toplam 100 dışkı örneği IFA yöntemi ile Monoclonal antibodies: anti-*E. bienewsi* ve anti-*E. intestinalis* açısından değerlendirmişlerdir. İncelenen 100 örneğin 42’sinde *E. bienewsi*, 7’sinde *E. intestinalis* ve 7’sinde ise mix enfeksiyonun olduğunu tespit etmişlerdir. Yapmış oldukları çalışma sonucunda, MTS boyama tekniği ve IFA-MAbs arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunduğu bildirilmiştir. Mikrosporidial sporların tanımlanmasında IFA-MAbs yönteminin sensitivitesinin %98, spesifitesinin %86 olduğu belirtilmektedir. Ayrıca *E. bienewsi*’nin en sık görülen mikrosporidia türlerinden biri olduğu, konvansiyonel tanı yöntemlerinin yanında IFA-MAbs yöntemi ile birlikte araştırılmasının gerekliliği vurgulanmıştır (147).

Sing et al (148) SIV (simian Immunodeficiency virüs) ile enfekte maymunların dışkısında *E. bienewsi* sporlarının belirlenmesi için monoklonal antikor kullanılarak yapılan immunofloresan testinin sensitivitesi ve spesifitesini araştırmışlardır. İnfekte



maymunlardan rastgele toplanan 232 dışkıda *E. bieneusi* sonuçlarını primer ve nested-PCR ile IFA'nın hassasiyeti ile karşılaştırıldığında primer PCR ile pozitif bulunan 89 örnek IFA yöntemi ile de pozitif olarak tespit etmişlerdir. Fakat nested-PCR ile pozitif olarak saptanan 62 örneğin 42'sini IFA yöntemi ile pozitif bulmuşlardır. Sonuç olarak, nested-PCR ile karşılaştırıldığında IFA'nın sensitivitesi %87, spesifitesi %100 olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Buna rağmen, PCR yöntemiyle *E. bieneusi* enfeksiyonunun belirlenmesinde referans laboratuvarlarının kısıtlılığı nedeniyle standart tanı testi olarak kullanılmadığı bildirilmiştir.

Suda insanda patojen olan mikrosporidiaların belirlenmesi için PCR ve IFA yöntemlerinin değerlendirildiği bir çalışmada *E. bieneusi*'nin insanda patojen olmayan fakat böceklerde patojen olan *Nosema* sp. ve *Varimorpha* sp. ile çapraz reaksiyon verdiği bildirilmektedir. Buna ek olarak IFA da *E. bieneusi* için etkili bir reaksiyon olmadığı belirtilmektedir (149).

Yapmış olduğumuz çalışmada, kanser tanısı almış hastalar, kemik iliği transplantlı, gelişme geriliği, kaşıntı, dermatit, ürtiker ve ülseratif kolit şikayetleri bulunan toplam 140 hastanın %30'unda IFA ile %12.14'ü ise nested-PCR ile *E. bieneusi* pozitif olarak tespit edildi. Kontrol grubu olarak herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat gastrointestinal şikayeti olan hastaların %20'si IFA, %15'i ise nested-PCR ile sağlıklı gönüllülerin ise %15'i IFA, %5'i ise nested-PCR ile pozitiflik saptandı. Bu bulgulara göre biz de IFA yönteminin farklı patojen veya nonpatojenlerle çapraz reaksiyon verebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca bir hastada bütün tanı yöntemleri negatif olmasına rağmen nested PCR ile *E. bieneusi* saptandı. Yapılan diğer araştırmalarda ise yüksek sensitivite (%100) ve spesifiteye (%97) sahip olduğu belirtilmektedir (144). Fakat bu çalışmamızda yüksek sensitivite, spesifiteye sahip değildir ve diğer metotlardan biri ile doğrulanması gerektiğini düşünmekteyiz.

MSP primerleri kullanılarak yapılan *E. bieneusi*'ye spesifik nested-PCR'ı referans aldığımızda IFA'nın sensitivitesi %38, spesifitesi %74 olarak belirlendi. Çalışmamızı değerlendirdiğimizde rutin tanıda IFA'nın kullanılabileceği fakat tanıda şüpheye düşüldüğünde veya yetersiz kalındığı durumlarda nested-PCR çalışılması gerektiği sonucuna varıldı.

Sonuç olarak; mikrosporidiaların tanısında konvansiyonel tanı yöntemlerinin yetersiz kaldığı anlaşılmaktadır. Düşük sensitivite ve spesifiteye sahip olduğundan yanlış

pozitiflik veya negatiflik verme olasılığı yüksektir. Bu nedenle mikrosporidiosis tanısında mümkünse moleküler tanı yöntemlerinin uygulanmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Mikrosporidiaların epidemiyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalarda araştırma grubu genellikle HIV pozitif, immünsüpresif ve homoseksüel hastalar oluşturmaktadır. Ülkemizde insanlarda görülme sıklığı üzerine yapılan çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Bu nedenle bütün dünyada yaygın olarak bulunan ve önemi gittikçe artan *E. bieneusi*'nin daha farklı ve daha geniş tabanlı hasta gruplarında yaygınlığının belirlenmesinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

## 6. KAYNAKLAR

1. Canning EU. Microsporidia. In *Parasitic protozoa*. Kreier JP & Baker JR (Edt), Academic Press: New York. 1993;6:299-385.
2. Aksoy Ü, Usluca S. Microsporidiosis ve immünolojisi. Özcel MA, İnci A, Tugay N, Köroğlu E (ed), Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. Meta Basım, İzmir. 2007;102-120.
3. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. Clin. Microbiol. 1994;7:426-461.
4. Didier ES. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta tropica. 2005;94:61-76.
5. Ok ÜZ, Limoncu ME. Microsporidiosis. Özcel MA, (edt). Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını. 2007;397-409.
6. Franzen C, Muller A, Hartmann P, Salzberger B. Quantitation of microsporidia in cultured cells by flow cytometry. Cytometry A. 2004;60:107-114.
7. Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Veterinary parasitology. 2004; 126:145-166.
8. Joseph J, Vemuganti GK, Sharma S. Microsporidia: emerging ocular pathogens. Indian J Med Microbiol. 2005;23:80-91.
9. Franzen C, Müller A. Molecular Techniques for Detection, Species Differentiation and Analysis of Microsporidia. Clin Microbiol. 1999;12:243-285.
10. Karaman Ü. İnsanlarda microsporidia'ların epidemiyolojisi (malatya ili örneği), doktora tezi, Malatya. 2007.
11. Keoghane EM, Weiss LM. The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds.), The Microsporidia and Microsporidiosis. AMS Press, Washington, D.C. 1999;196-224.

12. Yazar S, Koru O, Hamamcı B, Cetinkaya U, Karaman U, Kuk S. Microsporidia and microsporidiosis. *Turkiye Parazitol Derg.* 2013;37:123-134.
13. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19:485-492.
14. Cheng L. Parasite and pestilence: infectious public health challenges. *Microsporidiosis* 2006.  
([www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/Microsporidiosis/microsporidia1.html](http://www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/Microsporidiosis/microsporidia1.html)).
15. Curry A. Microsporidiosis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD (eds). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections; Parasitology*. 10 nd edn. Washington, ASM pres, 2005;529-555.
16. <http://www.palaeos.com/Eukarya/Units/Stem>
17. Grob U. Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitol. Res.* 2003;90:14-18.
18. Franzen C. How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol (Praha)*. 2005;52:36-40.
19. Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shadduck JA: Microsporidiosis in mammals. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000;709-720.
20. Anane S, Attouchi H. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010;34:450-464.
21. Desportes-Livage I, Darty A. Infections à microsporidies, Isospora et Sarcocystis. EMC (Elsevier SAS, Paris), Maladies infectieuses. 2005;8:503-510.
22. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. microbiol.* 2005;18:423-445.
23. Sarfati C, Bourgeois A, Menotti J, Liegeois F, Moyou-Somo R, Delaporte E, Derouin F, Ngole EM, Molina JM. Prevalence of intestinal parasites including microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon: a cross-sectional study. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:162-164.
24. Raccurt CP, Agnamey P, Sarfati C, Chouaki T, Totet A. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienersi* in a patient infected with HIV-1: first reported case in Chad. *Med Trop (Mars)*. 2008;68:307-308.
25. Anane S, Kaouech E, Belhadj S, Abdelmalek R, Ammari L, Ben Othman T, Bejaoui M, Ben Chaabane T, Kallel K, Chaker E. Identification of *Enterocytozoon bienersi* by PCR in stools of Tunisian immunocompromised patients. *Pathologie-biologie*. 2011;59:234-239.
26. 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; 34:918-921.

27. Espern A, Morio F, Miegerville M, Illa H, Abdoulaye M, Meyssonier V, Adehossi E, Lejeune A, Cam PD, Besse B, Gay-Andrieu F. 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;45:2999-3002.
28. Liguory O, David F, Sarfati C, Schuitema AR, Hartskeerl RA, Derouin F, Modai J, Molina JM. Diagnosis of infections caused by *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* using polymerase chain reaction in stool specimens. *AIDS.* 1997;11:723-726.
29. Lebbad M, Norrgren H, Naucler A, Dias F, Andersson S, Linder E. Intestinal parasites in HIV-2 associated AIDS cases with chronic diarrhoea in Guinea-Bissau. *Acta tropica.* 2001;80:45-49.
30. Ferreira FM, Bezerra L, Santos MB, Bernardes RM, Avelino I, Silva ML. Intestinal microsporidiosis: a current infection in HIV-seropositive patients in Portugal. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2001;3:1015-1019.
31. Konate A, Minta D, Diarra M, Dolo A, Dembele M, Diarra B, Maiga MY, Traore HA, Doumbo O. Intestinal parasitosis during AIDS diarrhoea. *Bull Soc Pathol Exot.* 2005; 98:33-35.
32. Dworkin MS, Buskin SE, Davidson AJ, Cohn DL, Morse A, Inungu J, Adams MR, McCombs SB, Jones JL, Moura H, Visvesvara G, Pieniazek NJ, Navin TR. Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with diarrhea in major United States cities. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49:339-342.
33. Samie A, Obi CL, Tzipori S, Weiss LM, Guerrant RL. Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101:547-554.
34. Kotler DP, Orenstein JM. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Adv Parasitol.* 1998;40:321-349.
35. John DT, Petri WA. Jr. Markell and Voge's Medical Parasitology. 9th ed Elsevier Philadelphia. 2006.
36. Sancak B, Ayhan M, Karaduman A, Arıkan S. In vitro activity of ketoconazole, itraconazole and terbinafine against *Malassezia* strains isolated from neonates. *Mikrobiyoloji bülteni.* 2005;39:301-308.
37. Gumbo T, Hobbs RE, Carlyn C, Hall G, Isada CM. Microsporidia infection in transplant patients. *Transplantation.* 1999;67:482-484.

38. Hautvast JL, Tolboom JJ, Derks TJ, Beckers P, Sauerwein RW. Asymptomatic intestinal microsporidiosis in a human immunodeficiency virus-seronegative, immunocompetent Zambian child. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16:415-416.
39. Desportes-Livage I, Doumbo O, Pichard E, Hilmarsdottir I, Traore HA, Maiga, II, el Fakhry Y, Dolo A. Microsporidiosis in HIV-seronegative patients in Mali. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998;92:423-424.
40. Bryan RT, Weber R, Schwartz DA. Microsporidiosis in patients who are not infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 1997;24:534-5.
41. Bryan RT, Schwartz DA. Epidemiology of microsporidiosis," in *The Microsporidia and Microsporidiosis*, M. Wittner, (Eds) ASM Press, Washington, DC, USA. 1999;502-516.
42. van Gool T, Vetter JC, Weinmayr B, Van Dam A, Derouin F, Dankert J. High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *J Infect Dis*. 1997;175:1020-4.
43. del Aguila C, Rueda C, De la Camara C, Fenoy S. Seroprevalence of anti-*Encephalitozoon* antibodies in Spanish immunocompetent subjects. *J Eukaryot Microbiol*. 2001;75-78.
44. Kucerova-Pospisilova Z, Ditrich O. The serological surveillance of several groups of patients using antigens of *Encephalitozoon hellem* and *E. cuniculi* antibodies to microsporidia in patients. *Folia parasitologica*. 1998; 45:108-112.
45. Aoun K, Barbouche R, Bouratbine A, Bejaoui M, Dellagi K, Ben Ismail R: Intestinal microsporidia infections in children with primary immunologic deficiencies. *Parasite*. 1997;4:386-387.
46. Canning EU. Microsporidia. In *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. Edited by Gillespie SH PR. Virginia: Wiley. 2001;171-191.
47. Canning EU, Hollister WS. In vitro and in vivo investigations of human microsporidia. *J Protozool*. 1991; 38:631-5.
48. Hollister WS, Canning EU. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infections in man. *Parasitology*. 1987;94:209-19.
49. Hollister WS, Canning EU, Willcox A. Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological tests. *Parasitology*. 1991;102:33-43.
50. Franzen C, Hartmann P, Salzberger B. Cytokine and nitric oxide responses of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. *Exp Parasitol*. 2005;109:1-6.
51. McDougall RJ, Tandy MW, Boreham RE, Stenzel DJ, O'Donoghue PJ. Incidental finding of a microsporidian parasite from an AIDS patient. *J Clin Microbiol*. 1993;31:436-439.

52. Ronny Larsson. [Ronny.Larsson@cob.lu.se](mailto:Ronny.Larsson@cob.lu.se). 2004.  
<http://www.biol.lu.se/cellorgbiol/microsporidia/index.html>
53. Wumba R, Longo-Mbenza B, Mandina M, Odio WT, Biligui S, Sala J, Breton J, Thellier M. Intestinal parasites infections in hospitalized AIDS patients in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Parasite*. 2010;17:321-328.
54. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Buckholt MA, Tzipori S. Enterocytozoon bienewi among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67:299-303.
55. Sak B, Brady D, Pelikanova M, Kvetonova D, Rost M, Kostka M, Tolarova V, Huzova Z, Kvac M. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1064-1070.
56. Galvan AL, Sanchez AM, Valentin MA, Henriques-Gil N, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C. First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1301-1306.
57. Güngör Ç, Kuru Ö. Microsporidiasis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını. İzmir: 2011;23.
58. Pagornrat W, Leelayoova S, Rangsin R, Tan-Ariya P, Naaglor T, Mungthin M. Carriage rate of Enterocytozoon bienewi in an orphanage in Bangkok, Thailand *J Clin Microbiol*. 2009;47:3739-41.
59. Santin M, Fayer R. Enterocytozoon bienewi genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. *J Eukaryot Microbiol*. 2009;56:34-38.
60. Dengjel B, Zahler M, Hermanns W, Heinritzi K, Spillmann T, Thomschke A, Loscher T, Gothe R, Rinder H. Zoonotic potential of Enterocytozoon bienewi. *J Clin Microbiol*. 2001;39:4495-4499.
61. Fournier S, Liguory O, Santillana-Hayat M, Guillot E, Sarfati C, Dumoutier N, Molina J, Derouin F. Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;29:95-100.
62. Leelayoova S, Subrungruang I, Rangsin R, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Worapong J, Naaglor T, Mungthin M. Transmission of Enterocytozoon bienewi genotype a in a Thai orphanage. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(1):104-107.
63. Cali A, Weiss LM, Takvorian PM. A review of the development of two types of human skeletal muscle infections from microsporidia associated with pathology in invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Folia parasitologica*. 2005; 52:51-61.

64. Graczyk TK, Sunderland D, Rule AM, da Silva AJ, Moura IN, Tamang L, Girouard AS, Schwab KJ, Breyse PN. Urban feral pigeons (*Columba livia*) as a source for air- and waterborne contamination with *Enterocytozoon bieneusi* spores. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:4357-4358.
65. Bern C, Kawai V, Vargas D, Rabke-Verani J, Williamson J, Chavez-Valdez R, Xiao L, Sulaiman I, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Cama V, Moura H, Secor WE, Visvesvara G, Gilman RH. The epidemiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima, Peru. *J Infect Dis*. 2005;191:1658-1664.
66. Sarfati C, Liguory O, Derouin F. Microsporidiosis. *Presse Med*. 2001; 27:30:143-7.
67. Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, Gelas P, Persat F, Piens MA, Trepo C. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. 1999;180:2003-2008.
68. Bergquist R, Morfeldt-Mansson L, Pehrson PO, Petrini B, Wasserman J. Antibody against *Encephalitozoon cuniculi* in Swedish homosexual men. *Scand J Infect Dis*. 1984;16:389-391.
69. Birthistle K, Moore P, Hay P. Microsporidia: a new sexually transmissible cause of urethritis. *Genitourinary medicine*. 1996;72:445.
70. Corcoran GD, Isaacson JR, Daniels C, Chiodini P.L. Urethritis associated with disseminated microsporidiosis: clinical response to albendazole, *Clin. Infect. Dis*. 1996; 22:592–593.
71. Schwartz DA, Visvesvara G, Weber R, Bryan RT. Male genital tract microsporidiosis and AIDS: prostatic abscess due to *Encephalitozoon hellem*. *J Eukaryot Microbiol*. 1994;41:61.
72. Dascomb K, Frazer T, Clark RA, Kissinger P, Didier E. Microsporidiosis and HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000;24:290-292.
73. Abe N, Kimata I, Iseki M. Molecular evidence of *Enterocytozoon bieneusi* in Japan. *J Vet Med Sci*. 2009;71:217-219.
74. Franzen C, Muller A. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect*. 2001;3:389-400.
75. Garcia LS. Laboratory identification of the microsporidia. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1892-901.
76. Franzen C, Salzberger B. Analysis of the beta-tubulin gene from *Vittaforma corneae* suggests benzimidazole resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52:790-793.
77. Sharma S, Das S, Joseph J, Vemuganti GK, Murthy S. Microsporidial keratitis: need for increased awareness. *Surv Ophthalmol*. 2011;56:1-22.



78. Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. Fifth Edition. ASM Press, Washington, USA. 2007;33-46.
79. Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol.* 1995;33:3138-45.
80. Kokoskin E, Gyorkos TW, Camus A, Cedilotte L, Purtill T, Ward B. Modified technique for efficient detection of microsporidia. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1074-1075.
81. Ignatius R, Lehmann M, Miksits K, Regnath T, Arvand M, Engelmann E, Futh U, Hahn H, Wagner J. A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1997;35:446-449.
82. Salleh FM, Al-Mekhlafi AM, Nordin A, Yasin 'M, Al-Mekhlafi HM, Moktar N. Evaluation of gram-chromotrope kinyoun staining technique: its effectiveness in detecting microsporidial spores in fecal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;69:82-85.
83. Garcia LS, Shimizu RY, Bruckner DA. Detection of microsporidial spores in fecal specimens from patients diagnosed with cryptosporidiosis. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1739-1741.
84. Green LC, LeBlanc PJ, Didier ES. Discrimination between viable and dead *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidian) spores by dual staining with sytox green and calcofluor white M2R. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3811-3814.
85. Müller A, Stellermann K, Hartmann P, Schrappe M, Fätkenheuer G, Salzberger B, Diehl V, Franzen C. A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6:243-246.
86. DeGirolami PC, Ezratty CR, Desai G, McCullough A, Asmuth D, Wanke C, Federman M. Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with Weber's modified trichrome and Uvitex 2B strains. *J Clin Microbiol.* 1995;33:805-810.
87. Joseph J, Murthy S, Garg P, Sharma S. Use of different stains for microscopic evaluation of corneal scrapings for diagnosis of microsporidial keratitis. *J Clin Microbiol.* 2006;44:583-585.
88. Türk S. İshalli Olgularda Microsporidia Sıklığının Farklı Boyama Yöntemleriyle Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara. 2010.
89. Weiss LM, Vossbrinck CR. Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects. *Adv Parasitol.* 1998;40:351-395.

90. Takvorian PM, Buttle KF, Mannella CA, Weiss LM, Cali A. High-voltage electron microscopy and computerized tomography: new approaches to study microsporidian spore internal organization. *J Eukaryot Microbiol.* 2006;53:55-57.
91. Mungthin M, Subrungruang I, Naaglor T, Aimpun P, Areekul W, Leelayoova S. Spore shedding pattern of *Enterocytozoon bienersi* in asymptomatic children. *J Med Microbiol.* 2005;54:473-476.
92. Jordan CN, Zajac AM, Snowden KS, Lindsay DS. Direct agglutination test for *Encephalitozoon cuniculi*. *Vet Parasitol.* 2006; 18,135:235-240.
93. Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. *N Engl J Med.* 1992;16:161-166.
94. Visvesvara GS. In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. *Clinical microbiology reviews.* 2002; 15:401-413.
95. Visvesvara GS, Leitch GJ, Moura H, Wallace S, Weber R, Bryan RT. Culture, electron microscopy, and immunoblot studies on a microsporidian parasite isolated from the urine of a patient with AIDS. *J Protozool.* 1991;38:105-111.
96. Procop GW. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. *Clin Infect Dis.* 2007;45:99-111.
97. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990;28:495-503.
98. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol.* 1997;35:995-998.
99. Ombrouck C, Ciceron L, Biligui S, Brown S, Marechal P, van Gool T, Datry A, Danis M, Desportes-Livage I. Specific PCR assay for direct detection of intestinal microsporidia *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal specimens from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:652-655.
100. Hester JD, Varma M, Bobst AM, Ware MW, Lindquist HD, Schaefer FW 3rd. Species-specific detection of three human-pathogenic microsporidial species from the genus *Encephalitozoon* via fluorogenic 5' nuclease PCR assays. *Mol Cell Probes.* 2002;16:435-444.
101. Menotti J, Cassinat B, Sarfati C, Liguory O, Derouin F, Molina JM. Development of a real-time PCR assay for quantitative detection of *Encephalitozoon intestinalis* DNA. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1410-1413.

102. Verweij JJ, Ten Hove R, Brien EA, van Lieshout L. Multiplex detection of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. in fecal samples using real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57:163-167.
103. Wolk DM, Schneider SK, Wengenack NL, Sloan LM, Rosenblatt JE. Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3922-3928.
104. Lanternier F, Boutboul D, Menotti J, Chandesris MO, Sarfati C, Mamzer Bruneel MF, Calmus Y, Mechai F, Viard JP, Lecuit M, Bournoux ME, Lortholary O. Microsporidiosis in solid organ transplant recipients: two *Enterocytozoon bieneusi* cases and review. *Transpl Infect Dis*. 2009;11:83-88.
105. Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A, Bernard F, Cochand-Priollet B, Lavergne A, Ravis P, Modigliani R. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool*. 1985;32:250-254.
106. Orenstein JM. Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Protozool*. 1991;77:843-864.
107. Orenstein JM, Dieterich DT, Kotler DP. Systemic dissemination by a newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS. *AIDS*. 1992;6:1143-1150.
108. Sax PE, Rich JD, Pieciak WS, Trnka YM. Intestinal microsporidiosis occurring in a liver transplant recipient. *Transplantation*. 1995;60:617-618.
109. Costa SF, Weiss LM. Drug treatment of microsporidiosis. *Drug Resist Updat*. 2000;3:384-399.
110. Blanshard C, Ellis DS, Dowell SP, Tovey G, Gazzard BG. Electron microscopic changes in *Enterocytozoon bieneusi* following treatment with albendazole. *J Clin Pathol*. 1993;46:898-902.
111. Contreas CN, Berlin OG, Ash LR, Pruthi JS. Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;63:121-7.
112. Didier PJ, Phillips JN, Kuebler DJ, Nasr M, Brindley PJ, Stovall ME, Bowers LC, Didier ES. Antimicrosporidial activities of fumagillin, TNP-470, ovalicin, and ovalicin derivatives in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:2146-55.
113. Bicart-See A, Massip P, Linas MD, Datry A. Successful Treatment with Nitazoxanide of *Enterocytozoon bieneusi* Microsporidiosis in a Patient with AIDS. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;167-168.
114. Martins SAR, Muccioli C, Belfort R, Castelo A. Resolution of microsporidial keratoconjunctivitis in an AIDS patient treated with highly active antiretroviral therapy. *Am J Ophthalmol*. 2001;131:378-379.

115. Valencakova A, Revajova V, Balent P, Lesnik F, Levkut M. Immunosuppressive effect of *Encephalitozoon cuniculi*. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2003;47:113-120.
116. Feng X, Akiyoshi DE, Sheoran A, Singh I, Hanawalt J, Zhang Q, Widmer G, Tzipori S. Serial Propagation of the Microsporidian *Enterocytozoon bienersi* of Human Origin in Immunocompromised Rodents. *Infect Immun*. 2006;74:4424–4429.
117. Zhang Q, Feng X, Nie W, Golenbock DT, Mayanja-Kizza H, Tzipori S, Feng H. MyD88-dependent pathway is essential for the innate immunity to *Enterocytozoon bienersi*. *Parasite Immunol*. 2011;33:217-225.
118. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335–376.
119. Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Helse W, Löscher T, Rinder H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop Med Int Health*. 1996;1:373-8.
120. Leitch GJ, Ceballos C. Effects of host temperature and gastric and duodenal environments on microsporidia spore germination and infectivity of intestinal epithelial cells. *Parasitol Res*. 2008;104:35-42.
121. Çetinkaya Ü. Vajinal Akıntılı Kadınlarda *Trichomonas vaginalis*'in Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kayseri. 2008.
122. Dowd SE, Gerba CP, Pepper IL. Confirmation of the Human-Pathogenic Microsporidia *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in Water. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64: 3332-5.
123. Thurston-Enriquez JA, Watt P, Dowd SE, Enriquez R, Pepper IL, Gerba CP. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J Food Prot*. 2002;65:378-82.
124. Atambay M, Karaman Ü, Daldal N, Çolak C. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Parazitoloji Laboratuvarına Gelen Erişkin Hastalarda *Microsporidium* Görülme Sıklığı. *T Parazitol Derg* 2008;32:113-115.
125. Karaman Ü, Atambay M, Daldal N, Çolak C. Kanseri Tanısı Almış Hastalarda *Microsporidium* Görülme Sıklığı. *T Parazitol Derg* 2008;32:109-112.
126. Matos O, Lobo ML, Xiao L. Epidemiology of *Enterocytozoon bienersi* Infection in Humans. *J Parasitol Res*. 2012;2012:981424.
127. Endeshaw T, Kebede A, Verweij JJ, Zewide A, Tsige K, Abraham Y, Wolday D, Woldemichael T, Messele T, Polderman AM, Petros B. Intestinal microsporidiosis in diarrheal patients infected with human immunodeficiency virus-1 in Addis Ababa, Ethiopia. *Jpn J Infect Dis*. 2006;59:306-59310

128. Kotler DP, Orenstein JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. *Am J Gastroenterol.* 1994;89:1998-2002.
129. Yazar S, Eser B, Yalçın Ş, Şahin İ and Koç N, A case of Pulmonary Microsporidiasis in an Acute Myeloblastic Leukemia (AML)- M3 Patient. *Yonsei Med J.* 2003;44:146-149.
130. Büğet E, Büyükbaba-Boral Ö, Kırkoyun-Uysal H, Nazlıcan Ö, Ögüt T, Şengür G, Türkiye'de bir AIDS hastasında ilk mikrosporidiaz ve solunum sistemini tutan ilk kriptosporidiaz olgusu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2000;30:166-170.
131. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Buckholt MA, Tzipori S. Enterocytozoon bienersi among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67:299-303.
132. Karaman U, Sener S, Calık S, Şaşmaz S. Investigation of microsporidia in patients with acute and chronic urticaria. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45:168-173.
133. Rabeneck L, Gyorky F, Genta RM, Gyorky P, Foote LW, Risser JM. The role of Microsporidia in the pathogenesis of HIV-related chronic diarrhea. *Ann Intern Med.* 1993;19:895-899.
134. Verweij JJ, Ten Hove R, Brienens EA, van Lieshout L. Multiplex detection of Enterocytozoon bienersi and Encephalitozoon spp. in fecal samples using real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57:163-167.
135. Espersen A, Morio F, Miegerville M, Illa H, Abdoulaye M, Meyssonier V, Adehossi E, Lejeune A, Cam PD, Besse B, Gay-Andrieu F. 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;45:2999-3002.
136. Sokolova OI, Demyanov AV, Bowers LC, Didier ES, Yakovlev AV, Skarlato SO, Sokolova YY. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2102-2108.
137. Ayinmode AB, Ojuromi OT, Xiao L. Molecular Identification of Enterocytozoon bienersi Isolates from Nigerian Children. *J Parasitol Res.* 2011;129542.
138. Akinbo FO, Okaka CE, Omeregbe R, Dearen T, Leon ET, Xiao L. Molecular epidemiologic characterization of Enterocytozoon bienersi in HIV-infected persons in Benin City, Nigeria. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86:441-445.
139. López-Vélez R, Turrientes MC, Garrón C, Montilla P, Navajas R, Fenoy S, del Aguila C. Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *J Travel Med.* 1999;6:223-227.

140. Oğuz İ, Doğruman Al F, Mumcuoğlu İ. İshalli Olgularda Microsporidia Sıklığının Calcofluor Beyazı ve Uvitex 2B Kemilüminesans Boyama Yöntemleriyle Araştırılması ve Tiplendirilmesi. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, SB02-8. 28 Eylül-4 Ekim 2013, Denizli.
141. Lono A, Kumar GS, Chye TT. Prevalence of microsporidia in an indigenous Orang Asli community in Pahang, Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104:214-218.
142. Chabchoub N, Abdelmalek R, Issa S, Kanoun F, Ben Chaabene T, Bouratbine A, Aoun K. Contribution of PCR for detection and identification of intestinal microsporidia in HIV-infected patients. *Pathol Biol (Paris).* 2012;60:91-94.
143. Abaza SM, Makhlof LM, el-Shewy KA, el-Moamly AA. Intestinal opportunistic parasites among different groups of immunocompromised hosts. *J Egypt Soc Parasitol.* 1995;25:713-727.
144. Saigal K, Khurana S, Sharma A, Sehgal R, Malla N. Comparison of staining techniques and multiplex nested PCR for diagnosis of intestinal microsporidiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77:248-249.
145. Luna VA, Stewart BK, Bergeron DL, Clausen CR, Plorde JJ, Fritsche TR. Use of the Fluorochrome Calcofluor White in the Screening of Stool Specimens for Spores of Microsporidia. *Am J Clin Pathol.* 1995;103:656-659.
146. Kucerova Z, Sokolova OI, Demyanov AV, Kvac M, Sak B, Kvetonova D, Secor WE. Microsporidiosis and Cryptosporidiosis in HIV/AIDS Patients in St. Petersburg, Russia: Serological identification of microsporidia and *Cryptosporidium parvum* in sera samples from HIV/AIDS patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011;27:13-15.
147. Al-Mekhlafi MA, Fatmah MS, Anisah N, Azlin M, Al-Mekhlafi HM, Norhayati M. Species identification of intestinal microsporidia using immunofluorescence antibody assays. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2011;42:19-24.
148. Singh I, Sheoran AS, Zhang Q, Carville A, Tzipori S. Sensitivity and specificity of a monoclonal antibody-based fluorescence assay for detecting *Enterocytozoon bienersi* spores in feces of simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12:1141-1144.
149. Dowd SE, Gerba CP, Kamper M, Pepper IL. Evaluation of methodologies including immunofluorescent assay (IFA) and the polymerase chain reaction (PCR) for detection of human pathogenic microsporidia in water. *J Microbiol Methods.* 1999;35:43-52.

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                           |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| KARAR BİLGİLERİ | Karar No : 2010/30                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Karar Tarihi : 06.05.2010 |
|                 | <p>Fakültemiz Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. İzzet Şahin'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurumumuz kararının başvuru sahibine ve dekanlık makamına arzına toplantıya katılan etik değerlendirme komisyonu üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.</p> |                           |

**ETİK KURUL BİLGİLERİ**

|               |  |
|---------------|--|
| ÇALIŞMA ESASI |  |
|---------------|--|

ETİK DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

**ETİK DEĞERLENDİRME KOMİSYONU ÜYELERİ**

| Ünvanı / Adı Soyadı<br>Ek Üyeligi | Uzmanlık<br>Dalı              | Kurumu        | Cinsiyeti                                                                                   | İlişki (*)                                                         | Katılım (**)                                                                                  | İmza                  |
|-----------------------------------|-------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Prof. Dr. Kader KÖSE              | Biyokimya                     | E.Ü. Tıp Fak. | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X                          | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>   | <i>Kader Köse</i>     |
| Prof. Dr. Halit MADENOĞLU         | Anest. ve Rean.               | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X | E <input type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X |                       |
| Prof. Dr. Olgun KONTAŞ            | Patoloji                      | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>   | <i>Olgun KONTAŞ</i>   |
| Prof.Dr. Duran ARSLAN             | Çocuk Sağ. ve Hast.           | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>   | <i>Duran ARSLAN</i>   |
| Doç. Dr. İrfan ÖZYAZGAN           | Plastik ve Rek. Cer.          | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>   | <i>İrfan ÖZYAZGAN</i> |
| Doç. Dr. H.Basri ULUSOY           | Farmakoloji                   | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>   |                       |
| Doç. Dr. Mehmet Güngör KAYA       | Kardiyoloji                   | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X | E <input type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X |                       |
| Öğr. Gör. Dr. Ferhan ELMALI       | Tıp Bilgisi ve Biyoistatistik | E.Ü. Tıp Fak. | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X                          | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>   | <i>Ferhan ELMALI</i>  |
| Av. Zübeyde ÇELEBİ                | Avukat                        | E.Ü. Tıp Fak. | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X                          | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>   |                       |
| Ecz. Nuran YOZGAT                 | Eczacı                        | E.Ü. Tıp Fak. | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X                          | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>   |                       |
| Sevtap KOÇER                      | Sivil Toplum Tems.            |               | E <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>                                       | E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>              | E <input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>   |                       |

### **BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)**

Bu çalışmada; Farklı Hasta Gruplarında *Enterocytozoon bieneusi*'nin (Protozoa, Microsporidia) Araştırılması.

Alınan dışkı örnekleri çeşitli yöntemlerle incelenecektir.

Alternatif tedavi veya girişimler olmayacak; aynı zamanda araştırma sırasında karşılaşılabileceğiniz riskler yoktur.

Araştırmaya katılmak isteğinize bağlı olup, bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmayacak ve hiçbir hakkınızı kaybetmeyeceksiniz. Araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan istediğiniz zaman çekilebilirsiniz;

Kimliğiniz gizli tutulacak; kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde bile kimliğiniz gizli kalacaktır.

Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabileceğiniz Kişi: **Berna Hamamcı, Tel: 05055825059**

#### **GÖNÜLLÜ OLURU**

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama, aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

**Adı Soyadı**

**İmza**

**Tarih**

**Gönüllünün:**

**Açıklamaları Yapan Kişi:**

**Gerekliyorsa Tanık Olan Kişi:**

**Gerekliyorsa Yasal Temsilcinin:**



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: **Berna HAMAMCI**

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: **16 Mayıs 1976, Kayseri**

Medeni Durumu: **Bekâr**

Tel: **+90 505 582 50 59**

e-mail: [uzmberna@hotmail.com](mailto:uzmberna@hotmail.com)

[bhamamci@mku.edu.tr](mailto:bhamamci@mku.edu.tr)

### EĞİTİM

| Derece        | Kurum                                              | Mezuniyet Tarihi |
|---------------|----------------------------------------------------|------------------|
| Doktora       | EÜ Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Parazitoloji AD |                  |
| Yüksek Lisans | EÜ Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Parazitoloji AD | 2003             |
| Lisans        | EÜFEF Biyoloji Bölümü                              | 1999             |
| Lise          | Fevzi Çakmak Lisesi                                | 1993             |

### İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl       | Kurum                                                                     | Görev                    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 1999-2002 | Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri | Biyolog ve Yüksek Lisans |
| 2002-2003 | Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri | Arş. Gör.                |
| 2003-2004 | Birikim 2000 Dershanesi, Kayseri                                          | Biyoloji Öğret           |
| 2004-2007 | Rota Dershanesi, Kayseri                                                  | Biyoloji Öğret           |
| 2007      | Hüma Kadın Doğum Hastanesi                                                | Biyolog                  |
| 2011      | Mustafa Kemal Üniversitesi Hatay<br>SHMYO, Antakya                        | Öğr. Gör.                |

### YABANCI DİL

İngilizce

### BÖLÜMDE VE FAKÜLTEDE ALDIĞI GÖREVLER:

1. Müdür Yardımcısı
2. Yönetim Kurulu Üyesi
3. Yüksekokul Kurul Üyesi
4. Erasmus Koordinatörü
5. Bologna Koordinatörü
6. Farabi Koordinatörü
7. Yüksekokul Sekreter Vekili
8. Muayene Kabul Komisyon Başkanı
9. Staj Değerlendirme Komisyonu Üyesi
10. Disiplin Kurulu Üyesi
11. Burs Komisyonu Üyesi
12. Yemek Yardımı Komisyonu Üyesi
13. Stratejik Plan Hazırlama Komisyon Üyesi
14. Kamu İç Kontrol Standartları Birim Risk Koordinatörü
15. Kamu İç Kontrol Standartları Birim İç Kontrol İzleme ve Değerlendirme Kurulu Üyesi
16. ISO 2008 Kalite-Kontrol Yönetim Koordinatörü

#### **GİRDİĞİ DERSLER**

1. Tıbbi Parazitoloji ve Entomoloji (Uygulama ve Teorik)
2. Genel Biyoloji
3. Fizyoloji
4. Temel Sağlık
5. Laboratuvar Kimyası
6. Laboratuvar Alet Kullanım ve Bakımı
7. Tıbbi Sekreterlik ve Teknikleri
8. Dosyalama ve Arşivleme
9. Tıp Kütüphaneciliği

#### **YAYINLAR**

**A. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:**

**A1.** Çetinkaya Ü, Yazar S, Serin S, **Hamamcı B**, Kuk S. Vajinal Akıntılı Kadınlarda Akıntı Türüne Göre *Trichomonas vaginalis* Pozitifliği. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31(5):1094-1099.

**A2.** Çetinkaya Ç, Yazar S, Kuk S, Ateş S, **Hamamcı B**, Gedikbaş T, Şahin İ. The Distribution of Intestinal Parasites Determined Between 2009-2010 in Erciyes University, Medical Faculty, Parasitology Laboratory. Kafakas Univ. Vet Fak Derg. 2012; 18:A93-A96.

**A3.** Zeren C, Eren A, Çelikel A, Motor VK, Yengil E, **Hamamcı B**. Investigation of Fasciola hepatica Seropositivity in Forensic Autopsies in the Çukurova Region. Accepted: 07.09.2012 DOI: 10.5336/medsci.2012-30826 SCI-EXP

**B. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler:**

**B1.** Alkan A, Esen Ç, Kolay M, Yazar S, Şişman Y, **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, “The investigation of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in the subgingival bacterial plaque of periodontitis patients: a preliminary study”. **Eoroperio 6, 4-6 June-2009, Stockholm, Sweden.**

**B2.** Yazar S, **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, Şahin İ. ‘Anti-*Toxoplasma gondii* IgG Seropozitif Gebelerde IgG-Avidite Değerleri.’Yüzyıllık Tecrübe; *Toxoplasma gondii* Uluslar Arası Katılım Sempozyum ve Workshop, 17-20 Mart 2010, İzmir.

**B3.** Çetinkaya U, **Hamamcı B**, Delice S, Ercal EB, Gucuyetmez S, Yazar S, Şahin İ. ‘The Prevalence of *Pediculus humanus capitis* in two primary school of Hacılar, Kayseri, Turkey. **Fourth International Conference On Phthiraptera**, June 13-18, 2010. Urgup, Cappodicia/TURKEY

**B4.** Yazar S, Çetinkaya U, **Hamamcı B**, Alkan A, Şişman Y, Esen Ç, Kolay M. Investigation of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in the subgingival microbial plaques of periodontitis and gingivitis patients. **XII. International Congress of Parasitology (ICOPA)**, 15-20 August 2010. Melbourne/Australia.

**B5.** Yazar S, Kuk S, Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Kurnaz F, Şahin İ. ‘Intestinal Microsporidiosis in Immunocompromised Patiends from Kayseri-Turkey. **Fourth Eurasia Congress of Infectious Diseases**, June 01-05, 2011. Sarajevo-Bosna & herzegovina

**B6.** Ayca Kaya ÖM, Polat S, Yula E, Tunçdemir AR, **Hamamcı B**, Damlar İ, Dalkız M. Gingivit ve Periodontal Hastalığı Bulunan Kişilerin Diş Taşlarında *Entamoeba gingivalis* ve *Trichomonas tenax* Araştırılması -Pilot Çalışma. **İnönü University International Dentistry Congress**. April 26-28, 2012 Malatya – TURKEY.

**B7.** Ayca Kaya O, **Hamamcı B**, Inci M, Yula E, Köksaldı Motor V, Karakus A, Kaya S, Kılinc C. The Frequency of *Pediculus humanus capitis* In Elderly Individuals Living in an Aged Care Facility and Rehabilitation Center. European Society for Emergency Medicine (EuSEM), EuSEM 2012 7.European Congress on Emergency Medicine, 8. Emergency Physicians Association of Turkey (EPAT), National Emergency Medicine Congress Antalya, Turkey, 3-6 October 2012.

**C. Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler :**

**C1.** Yazar S, **Hamamcı B**, Birhan M, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı koproloji laboratuvarına başvuran hastalarda intestinal parazitlerin dağılımı. *T Parazitol Derg*, **25**(1): 53-55 (2001).

**C2.** Yazar S, Birhan M, **Hamamcı B**, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi mutfak personeline bağırsak parazitlerinin görülme sıklığı. *T Parazitol Derg*, **25**(4):359-361 (2001).

**C3.** Yazar S, Akman MAA, **Hamamcı B**, Birhan M, Şahin İ. Kayseri’de ilköğretim okulu öğrencilerinde barsak parazitlerinin araştırılması. *T Parazitol Derg*, **25**(4):362-366 (2001).

**C4.** Yazar S, Altunoluk B, Aslan Akman MA, Birhan M, **Hamamcı B**, Şahin İ. Kayseri’de İlköğretim Okullarında *Pediculus humanus capitis* yaygınlığının araştırılması ve permethrin (Kwellada) ile tedavis. *T Tıp Dergisi*, **8**(4):172-178 (2001).

**C5.** Yazar S, Akman MAA, **Hamamcı B**, Birhan M, Şener S, Şahin İ. Kayseri Sosyal Hizmetler Çocuk Esirgeme Kurumu (SHÇEK) Çocuk Yuvasındaki 0-7 Yaş Çocuklarda bağırsak parazitlerinin araştırılması. *T Parazitol Derg*, **26**(1):48-51 (2002).

**C6.** Yazar S, **Hamamcı B**, Ünver AC, Şahin İ 2002. Ratlarda Bağırsak Parazitlerinin Yaygınlığının Araştırılması. *T Parazitol Derg*, **26**(2):212-213

**C7.** Yazar S, Aslan Akman MA, Yay M, **Hamamcı B**, Yalçın Ş. Ayakkabı Tamircilerinde Anti-*Echinococ* Antikorlarının Araştırılması *İnönü Üniv Tıp Fak Derg*, **10** (1): 21-23 (2003).

**C8.** **Hamamcı B**, Yazar S, Şahin İ 2004. *Blastocystis hominis*’in In vitro Kültürü ve Antiprotozoal İlaçların In vitro Etkilerinin Araştırılması. *EÜ Sağlık Bil Derg*, **13**(1): 7-15

**C9.** Yazar S, Yaman O, Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Şahin İ 2010. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalına Müracaat Edenlerde Anti-*Toxocara canis* IgG Antikorlarının Araştırılması. *T Parazitol Derg*, **34** (1): 24 –26

**C10.** Kaya M, **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, Yaman O, Yazar S 2010. Bir Lisede Öğrenim Gören Yabancı Uyruklu Erkek Öğrencilerde Selofan-bant Yöntemi ile *Demodex* sp. Araştırılması. *Türk Hij Den Biyol Derg*; **67** (2): 73-77.

**C11.** Yaman O, Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Yazar S, Şahin İ, 2010. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalına Müracaat Edenlerde Anti-*Toxoplasma gondii* Antikorlarının Araştırılması. *Sağlık Bilim Dergisi*. **19**(2): 119-123

**C12.** Yaman O, **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, Kaya M, Ateş S, Gözkenç N, Özcan H, Yazar L, Yazar S 2010 Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde İntestinal Parazitlerin Araştırılması. *T Parazitol Derg*,34(3): 176-178

**C13.** **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, Yaman O, Kaya M, Yazar S 2010. Kayseri’deki Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde *Fasciola hepatica* Antikorlarının Araştırılması. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 67 (3): 121-126

**C14.** Yazar S, Yaman O, Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Kaya M 2010. Bir Süredir Türkiye’de Yaşayan Nijeryalı Bir Öğrencide *Schistosoma haematobium* Enfeksiyonu. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 67 (4): 185-188

**C15.** Şahin İ, Yaman O, **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, 2010. Apicomplexan Protozoonlara Model Olarak *Plasmodium* spp.’nin Eritrosit İnvazyonunun Moleküler Temelleri. *T Parazitol Derg* 34: 203-6.

**C16.** **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, Delice S, Erçal B D, Gücüyetmez S, Yazar S. Kayseri-Hacılar’da İlköğretim Okulu Öğrencilerinde Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması *T Parazitol Derg*; 2011;35: 96-9

**C17.** Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Kaya M, Yaman O, Yazar S. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde Anti-Toxoplasma gondii Antikorlarının Araştırılması. *T Parazitol Derg*, 2011; 35 (3): 129-132.

**C18.** Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Delice S, Erçal BD, Gücüyetmez S, Yazar S, Şahin İ.. The Prevalence of Pediculus humanus capitis in Two Primary Schools of Hacılar, Kayseri. *T Parazitol Derg*, 2011; 35 (3):151-153.

**C19.** Çetinkaya U, **Hamamcı B**, Kaya M, Gücüyetmez S, Kuk S, Yazar S ve Şahin İ. Kistik Ekinokokkozis Ön Tanılı Hastalarda Anti-Echinococcus granulosus Antikorlarının Araştırılması *T Parazitol Derg*, 2012;36(2):57-60.

**C20.** Kaya OA, **Hamamcı B**, Yula E, İnci M, Motor VK, Karakuş A, Kılınç Ç. The Frequency of *Pediculus humanus capitis* In Elderly Individuals Living In An Aged Care Facility And Rehabilitation Center. *Mustafa Kemal Üniv. Tıp Derg*. 2012. 3(9):1-7.

**C21.** Özgür T, Aycan Kaya Ö, Hakverdi S, Akın MM, **Hamamcı B**, Yıldız M. Retrospective evaluation of the echinococcus cases. *Dicle Med J* 2013. Basımda.

**C.22.** Yazar S, Kuru O, **Hamamcı B**, Çetinkaya U, Karaman U, Kuk S. Microsporidia and microsporidiosis. *T Parazitol Derg*. 2013;37(2):123-34. doi: 10.5152/tpd.2013.28.

**D. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:**

**D1.** Yazar S, Altunoluk B, Akman MAA, Birhan M, **Hamamcı B**, Şahin İ. “Kayseri’de ilköğretim okullarında Pediculus humanus capitis yaygınlığının araştırılması ve Permethrin

(KWEELLADA) ile tedavisi". (Poster) *II. Ulusal Tropikal Hastalıklar Kongresi*, 25-29 Eylül, Şanlıurfa, 2000.

**D2.** Yazar S, Altunoluk B, Akman MAA, **Hamamcı B**, Birhan M, Şahin İ. Kayseri'de ilköğretim okulu öğrencilerinde barsak parazitlerinin araştırılması. (Poster) *II. Ulusal Tropikal Hastalıklar Kongresi*, 25-29 Eylül 2000, Şanlıurfa, 2000.

**D3.** Yazar S, Birhan M, **Hamamcı B**, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Mutfak Personelinde barsak parazitlerinin görülme sıklığı. (Poster) *II. Ulusal Tropikal Hastalıklar Kongresi*, 25-29 Eylül 2000, Şanlıurfa, 2000.

**C4.** Yazar S, **Hamamcı B**, Birhan M, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı koproloji laboratuvarına başvuran hastalarda intestinal parazitlerin dağılımı. (Poster) *II. Ulusal Tropikal Hastalıklar Kongresi*, 25-29 Eylül 2000, Şanlıurfa, 2000.

**D5.** Yazar S, Akman MAA, Yay M, **Hamamcı B**. Ayakkabı tamircilerinde anti-Echinococ antikorlarının araştırılması. (Poster) *XII. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 24-28 Eylül 2001, Elazığ, 2001.

**D6.** **Hamamcı B**, Yazar S, Saraymen R, Tunçbilek A. Un güvesi (*ephestia kuehniella* zell) larvalarında eser elementlerin (Zn, Mg, Cu) konsantrasyon düzeylerine gamma radyasyonunun etkisinin araştırılması. (Poster) *XII. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 24-28 Eylül 2001, Elazığ, 2001.

**D7.** Yazar S, Akman Aslan MA, **Hamamcı B**, Birhan M, Şener S, Şahin İ. Kayseri SHÇEK Çocuk Yuvasındaki 0-7 yaş çocuklarda bağırsak parazitlerinin araştırılması. (Poster) *XII. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 24-28 Eylül 2001, Elazığ, 2001.

**D8.** Yazar S, **Hamamcı B**, Ünver AC, Şahin İ. Ratlarda intestinal parazitlerin araştırılması. (Poster) *XII. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 24-28 Eylül 2001, Elazığ, 2001.

**D9.** **Hamamcı B**, Yazar S, Şahin İ. *Blastocystis hominis*'in invitro kültürü ve antiprotozoal ilaçların invitro etkilerinin araştırılması. (Poster) *XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 8-12 Eylül, 2003, Konya.

**D10.** Yazar S. Mikrosporidia ve Mikrosporidiosis (**Yuvarlak Masa Oturumu**). **Hamamcı B**. Mikrosporidiaların Hayat Döngüsü ve Hücre İnvazyonu.

**D11.** Kaya M, **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, Yaman O, Yazar S. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde Selofan-bant Yöntemi ile *Demodex sp.* Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

**D12.** Yaman O, Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Yazar S, Şahin İ. Erciyes Üniv. Tıp Fak. Parazitoloji AD'na Müracaat Edenlerde *Anti-Toxoplasma gondii* Antikorlarının Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

- D13.** Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Kaya M, Yaman O, Yazar S. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde Anti-*Toxoplasma gondii* Antikorlarının Araştırılması (**Poster**). XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, 2009, Adana.
- D14.** Yazar S, Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Alkan A, Şişman Y, Esen Ç, Kolay M. Periodontitis veya Gingivitisli Hastalarda *Trichomonas tenax* ve *Entamoeba gingivalis* Araştırılması (**Poster**). XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, 2009, Adana.
- D15.** Yazar S, Yaman O, Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Kaya M. Bir Süredir Türkiye’de Yaşayan Nijeryalı Bir Öğrencide *Schistosoma hematobium* Enfeksiyonu (**Poster**). XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, 2009, Adana.
- D16.** Yazar S, Yaman O, Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Şahin İ. Gastrointestinal Şikayeti Olan hastalarda ELISA ile *Entamoeba histolytica* Spesifik Antijen Araştırılması (**Poster**). XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, 2009, Adana.
- D17.** Yazar S, **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, Yaman O, Şahin İ. Gastrointestinal Şikayeti Olan hastalarda ELISA ile *Giardia intestinalis* Spesifik Antijen Araştırılması (**Poster**). XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, 2009, Adana.
- D18.** **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, Yazar S, Şahin İ. Bazı Antimikrobiyal İlaçların *Blastocystis hominis* Üzerine İn-Vitro Etkilerinin Araştırılması (**Poster**). XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, 2009, Adana. **2.lık ödülü**
- D19.** Yaman O, **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, Kaya M, Ateş S, Gözkenç N, Özcan H, yazar L, Yazar S. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde İntestinal Parazitlerin Araştırılması (**Poster**). XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, 2009, Adana.
- D20.** **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, Yaman O, Kaya M, Yazar S. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde *Fasciola hepatica* Antikorlarının Araştırılması (**Poster**). XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, 2009, Adana.
- D21.** Yazar S, Yaman O, Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Şahin İ. Erciyes Üniv. Tıp Fak. Parazitoloji AD’na Müracaat Edenlerde Anti-*Toxocara canis* IgG Antikorlarının Araştırılması (**Poster**). XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, 2009, Adana.
- D22.** Çetinkaya Ü, **Hamamcı B**, Kaya M, Gücüyetmez S, Kuk S, Yazar S, Şahin İ. Kistik Ekinokokkozis Ön Tanılı Hastalarda Anti-*Echinococcus granulosus* Antikorlarının Araştırılması (**Poster**). V. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 22-25 Eylül, 2010, Antakya
- D23.** Çetinkaya Ç, Yazar S, Kuk S, Ateş S, **Hamamcı B**, Gedikbaş T, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji AD. Laboratuvarında 2009-2010 Yılları Arasında Saptanan Barsak Parazitlerini dağılımı (Poster). XVII. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Parazitler Hastalıklar Sempozyumu, 4-10 Eylül 2011, Kars

**D24.** Çulha G, Aycan Kaya Ö, **Hamamcı B**, Gülkan B, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na Başvuran Kistik Ekinokokkozis Ön Tanılı Hastaların Serumlarında İndirekt Hemaglutinasyon (IHA) Yöntemi İle Antikor Varlığının Araştırılması. Uluslararası Katılımlı *VI. Ulusal Hidatidoloji Kongresi*, 12-15 Eylül, 2012, Gaziantep.

**D25.** Özgür T, Aycan Kaya Ö, Akın M, **Hamamcı B**, Yıldız M. Unilokuler Kistik Ekinokokkozis Olguları (17 Olgu). Uluslararası Katılımlı *VI. Ulusal Hidatidoloji Kongresi*, 12-15 Eylül, 2012, Gaziantep.

**D26.** **Hamamcı B**, Kokoçya M. H, Aycan Kaya Ö, Şahpolat M, Özkan B Şizofreni Hastalarında *Demodex* sp. Görülme Sıklığı. *XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 28 Eylül - 4 Ekim 2013, Denizli

**D27.** Çetinkayaü, **Hamamcı B**, Kaynar L, Kuk S, Şahin İ, Yazar S. Kemik İliği Transplant Hastalarında *Encephalitozoon intestinalis* ve *Enterocytozoon bieneusi* Yaygınlığı. *XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 28 Eylül - 4 Ekim 2013, Denizli

**D28.** **Hamamcı B**, Çetinkaya Ü, Berk V, Kaynar L, Kuk S, Yazar S. Onkolojik Tedavi Alan Hastalarda *Encephalitozoon intestinalis* ve *Enterocytozoon bieneusi*. *XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 28 Eylül - 4 Ekim 2013, Denizli

**D29.** Aycan-Kaya Ö, Benk-Şilfeler D, Özgür T, **Hamamcı B**, Keskin-Kurt R, Gülerokyay A, Yengil E Bir Üniversite Hastanesi Jinekoloji Polikliniğine Başvuran Kadınlarda Parazitolojik ve Sitolojik Yöntemlerle *Trichomonas vaginalis* Araştırılması. *XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 28 Eylül - 4 Ekim 2013, Denizli

**D30.** Okuyan HM, Karaboğa İ, **Hamamcı B**, Çalışkan Y, Nacar A, Yönden Z. Rat Böbrek Dokusu Üzerine Ceviz ve Boğma Rakı Tüketiminin Etkisi. *XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*. 26-30 Ekim 2013, Aydın.

**E. Kongre, Toplantı ve Kurs Katılımları**

**E1.** II. Ulusal Tropikal Hastalıklar Kongresi, 20–22 Eylül, 2000, Şanlıurfa.

**E2.** II. Ulusal Deneysel Hayvanlar Kongresi ve Workshop, 16–20 Mayıs, 2000, Kayseri

**E3.** XII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 24–28 Eylül, 2002, Elazığ.

**E4.** XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 18–23 Kasım, 2007, Kayseri ve Ürgüp.

**E5.** XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1–7 Kasım, 2009, Adana.

**E6.** XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, 2009, Adana. **Poster 2.lik ödülü**

**E7.** Leonardo Da Vinci Avrupa Birliği Projesi, 29 Haziran–21 Temmuz, Frankfurt/Almanya

**E8.** Fourth International Conference On Phthiraptera, June 13–18, 2010. Urgup, Cappodicia/TURKEY

**E9.** Leonardo Da Vinci Avrupa Birliği Projesi, 2 Ağustos –16 Ağustos, Brüksel/Belçika

**E10.** V. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 22-25 Eylül, 2010, Antakya



**E11.** XVII. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu, 4-10 Eylül 2011, Kars

**E12.** Tübitak tarafından düzenlenen Bilgilendirme ve eğitim Semineri, 17.01.2012, Antakya

**E13.** Proje Ön teklifi Hazırlama Eğitim Programı, 19-20 Haziran, 2012, Antakya

**E14.** Uluslararası Katılımlı VI. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 12-15 Eylül, 2012, Gaziantep

**E15.** XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 28 Eylül - 4 Ekim 2013, Denizli.

#### **F. PROJELER**

**F1.** NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ (NAP), TSA-10-3334, Araştırmacı, *Fasciola hepatica*'ya karşı aşı adayı olabilecek rekombinant cathepsin L proteininin elde edilmesi.

**F2.** NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ (NAP), TSA-10-3340, Araştırmacı, Su kaynaklarında insan için patojen olan serbest yaşayan amiplerin araştırılması.

**F3.** TEZ PROJESİ, DOKTORA, TSD-10-3271, Araştırmacı, Farklı Hasta Gruplarında *Enterocytozoon bienersi*'nin (Protozoa, Microsporidia) Araştırılması.

**F4.** NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ (BAP) Rat Hipokampal NMDA Reseptörleri Üzerine Ceviz ve Boğma Rakı Tüketiminin Etkisi 2013 Mayıs, MKU Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi, Yardımcı Araştırmacı.

**F5.** NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ (BAP) Şizofreni ve *Toxoplasma gondii* Arasındaki Olası İlişkinin Araştırılması 2013 Haziran. MKU Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi, Yardımcı Araştırmacı.

**F6.** NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ (BAP) İntihar otopsilerinde *Toxoplasma gondii* prevalansı. 11.02.2013. MKU Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi, Yardımcı Araştırmacı.

**F7.** İlk Yardım Acildir-AB projesi