

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



DÜZCE VE BOLU İLLERİNDE İNSANLARDAKİ
MİKROSPORİDİA'LARIN MİKROSKOBİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

MÜCAHİT ÇAKMAK

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Erol AYAZ

BOLU, AĞUSTOS - 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Mücahit ÇAKMAK tarafından hazırlanan “**Düzce ve Bolu İllerinde İnsanlardaki Mikrosporidia’ların Mikroskopik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak oy birliği kabul edilmiştir. 28/07/2023

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Erol AYAZ
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Muhammet Güzel KURTOĞLU
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Şükrü ÖKSÜZ
Düzce Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Kerem YAMAN
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin 07/08/2023 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 9 olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışma için Düzce Üniversitesi Girişimsel Olmayan Sağlık Araştırmaları Etik Kurulundan 2019/241 sayısı ile etik izin alınmıştır.

.....
MÜCAHİT ÇAKMAK

ÖZET

**DÜZCE VE BOLU İLLERİNDE İNSANLARDAKİ
MİKROSPORİDİA'LARIN MİKROSKOBİK VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI
DOKTORA TEZİ
MÜCAHİT ÇAKMAK
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. EROL AYAZ)**

**BOLU, AĞUSTOS - 2023
XIV + 88**

Mikrosporidia üyeleri spor oluşturan tek hücreli ökaryotlar olup, konak hücre dışında metabolik aktivasyon göstermeyen, zorunlu hücre içi parazitlerdir. Geniş bir konak seçiciliği gösteren bu patojenlerin, insanlardaki ilk vakası 1959 yılında rapor edilmiş, sonraki yıllarda özellikle AIDS'li hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara yol açtığına ortaya çıkmasıyla ilgi odağı olmaya başlamışlardır.

Dünya'nın farklı ülkelerinde, bölgelere göre kronik ishalleri AIDS hastalarındaki *Enterocytozoon bieneusi* prevalansının %7-50 arasında, Ülkemizde ise %7'lerden %69'a kadar değiştiği bilinmektedir. Dünya ve özellikle ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında çoğunluğunun enfeksiyon varlığı ile sınırlı kaldığı, türlerin dağılımı ve bu türlerin taksonomik durumuna ilişkin çalışmaların çok az olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada Düzce Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi ve BAİBÜ Eğitim ve Araştırma Hastanesine gelen gaita numunelerinin, mikroskopik ve moleküler yöntemler ile incelenerek Mikrosporidia türlerinin varlığı ve yaygınlığının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Mikroskopik ve moleküler incelemeler sonucunda pozitiflik oranının sırasıyla Düzce örnekleri için %6,6 (14/212) ve %11,3 (24/212), Bolu örnekleri için %5,8 (11/188) ve 13,3 (25/188) olduğu görülmüştür. Tür olarak yalnızca *Enterocytozoon bieneusi* tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: mikrosporidia, epidemiyoloji, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MICROSPORIDIA SPECIES IN HUMANS BY MICROSCOPIC AND MOLECULAR METHODS IN DUZCE AND BOLU PROVINCES

PHD THESIS

MÜCAHİT ÇAKMAK

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT

(SUPERVISOR: PROF. DR. EROL AYAZ

BOLU, AUGUST 2023

XIV + 88

Microsporidia are obligatory intracellular parasites that do not show metabolic activation outside the host cell. It was firstly isolated from silkworm in 1857 and thought to be fungus. These pathogens that show broad host selectivity, firstly reported in humans in 1959. They have become the focus of attention with the emergence of opportunistic infections, especially in AIDS patients.

Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* changes between %7-50 in different regions and countries and changes between %7-69 in our country. It is clear that studies in the world and especially in our country are limited about presence or absence of infection. It is also seen that there are few studies about active species and their taxonomic status. For this reason, the determination of frequency and taxonomic status of human pathogen microsporidia are very important for us.

In this study, it was aimed to reveal the presence and prevalence of Microsporidia species by examining stool samples from Düzce University Health Practice and Research Center and BAIBU Training and Research Hospital with microscopic and molecular methods.

As a result of microscopic examinations, it was seen that the positivity rate was 6.6% (14/212) for Düzce samples and 5.8% (11/188) for Bolu samples. As a result of molecular analysis, number of positive 24 (11.3%) for Düzce and 25 (13,3%) for Bolu. Only *Enterocytozoon bieneusi* has been identified as a species.

KEYWORDS: microsporidia, epidemiology, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ	x
FOTOĞRAF LİSTESİ	xi
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xii
TEŞEKKÜR	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tarihçe	3
2.2 Morfolojik Özellikleri.....	4
2.2.1 Spor Morfolojisi	4
2.2.2 Genom Yapısı	8
2.3 Yaşam Döngüsü.....	9
2.3.1 Enfektif Evre.....	9
2.3.2 Proliferatif ve Vejetatif Evre	12
2.4 İnsanlarda Enfeksiyona Sebep Olan Mikrosporidia Türleri	13
2.4.1 Encephalitozoon Cinsi.....	13
2.4.2 <i>Enterocytozoon</i> Cinsi.....	15
2.4.3 Diğer Mikrosporidia Türleri	16
2.5 Epidemiyoloji	17
2.6 Bulaşma	22
2.7 Bağışık Yanıt	22
2.8 Tanı ve Araştırma Yöntemleri	24
2.8.1 Mikroskopik Yöntemler	24
2.8.2 Antijen ve Antikor Tabanlı Yöntemler.....	28
2.8.3 Nükleik Asit Tabanlı Yöntemler	30
2.8.4 Hücre Kültürü	31
2.8.5 Akış Sitometri (Flow Cytometry).....	31
2.8.6 Hayvan Modelleri	32
2.8.7 Kütle Spektrometresi (MALDI TOF MS).....	32
2.9 Tedavi	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1 Mikroskopik Yöntemler.....	36
3.1.1 Formol-Eter Çöktürme Yöntemi	37

3.1.2 Modifiye Weber Trikrom Boyama	38
3.2 Moleküler Yöntemler.....	39
3.2.1 DNA izolasyonu	39
3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	43
3.2.3 Jel Elektroforez.....	44
3.3 İstatistiksel Yöntemler	45
4. BULGULAR	46
4.1 Mikroskopik Bulgular.....	46
4.2 Moleküler Bulgular.....	47
4.3 İstatistiksel Bulgular	49
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
7. KAYNAKLAR.....	72
8. EKLER.....	87



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Mikrosporidia Spor Morfolojisi (Orjinal).....	5
Şekil 2.2. Mikrosporidiaların Konak Hücre Dışındayken Polar Tüpün Hücreye Girişi (Orjinal).....	10
Şekil 2.3. Mikrosporidiaların Konak Hücre Dışındayken Sporoplazmanın Hücreye Aktarılması (Orjinal).....	10
Şekil 2.4. Fagositoz ile Konak Hücre İçerisine Alınan Mikrosporidia Polar Tüpünün Spordan Çıkışı (Orjinal).....	11
Şekil 2.5. Fagositoz Sonrası Mikrosporidia Sporoplazmasının Konak Hücre İçine Aktarılması (Orjinal).....	11
Şekil 2.6. Mikrosporidialarda Merogoni Evresi; A) Konak Hücre Sitoplazmasında B)Vakuol İçerisinde (Orjinal)	12
Şekil 2.7. Mikrosporidialarda Sporogonik Evre (Orjinal)	13
Şekil 2.8. Dünya’da Mikrosporidia Epidemiyolojisine ilişkin Çalışmaların Yapıldığı Ülkeler.....	22
Şekil 3.1. İş Akış Şeması	36
Şekil 3.2. Formol- Eter Konsantrasyon Yöntemi	38
Şekil 3.3. Modifiye Weber Trikróm Boyama Basamakları	39
Şekil 3.4. DNA izolasyon Basamakları	42
Şekil 4.1. İllere Göre Mikroskobik İnceleme Sonuçları	46
Şekil 4.2. Jel Elektroforez Sonucunda Tespit Edilen Mikrosporidia Türlerinin İl Bazında Sayısı.....	48
Şekil 4.3. Mikrosporidia Varlığının Cinsiyete Göre Dağılım	50
Şekil 4.4. İshal Durumuna Göre Mikrosporidia Varlığı	51
Şekil 4.5. Mikrosporidia Varlığının Yaş Gruplarına Göre Dağılımı	53

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Ülkemizde Gerçekleştirilen Mikrosporidia Çalışmaları	18
Tablo 2.2. Avrupa Ülkelerinde Gerçekleştirilen Mikrosporidia Çalışmaları ...	20
Tablo 2.3. Afrika Ülkelerindeki Gerçekleştirilen Mikrosporidia Çalışmaları .	20
Tablo 2.4. Asya Ülkelerindeki Gerçekleştirilen Mikrosporidia Çalışmaları....	21
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Primerler	43
Tablo 3.2. Reaksiyon Çözeltileri	43
Tablo 4.1. MTS Yöntemi ile Mikroskobik Mikrosporidia Bulguları.....	46
Tablo 4.2. Elektroforez’de Mikrosporidia Türleri için Bant Görülen/Görülmeyen Örnek Sayıları	48
Tablo 4.3. Mikrosporidia varlığı ile Cinsiyet Çapraz Tablosu.....	49
Tablo 4.4. Bolu İli Mikrosporidia-Cinsiyet Çapraz Tablosu.....	50
Tablo 4.5. Düzce İli Mikrosporidia-Cinsiyet Çapraz Tablosu	51
Tablo 4.6. Mikrosporidia Varlığı ile İshal Durumu Çapraz Tablosu	51
Tablo 4.7. Bolu İli Mikrosporidia Varlığı ile İshal Durumu Çapraz Tablosu..	52
Tablo 4.8. Düzce İli Mikrosporidia Varlığı ile İshal Durumu Çapraz Tablosu	52
Tablo 4.9. Mikrosporidia Varlığı ile Yaş Grupları Çapraz Tablosu.....	53
Tablo 4.10. Bolu İli Mikrosporidia Varlığı ile Yaş Grupları Çapraz Tablosu .	54
Tablo 4.11. Düzce İli Mikrosporidia Varlığı ile Yaş Grupları Çapraz Tablosu	54
Tablo 4.12. Mikrosporidia Teşhisinde Moleküler ve Mikroskobik İncelemelerin Karşılaştırılması	54

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 2.1. Mikrosprodia Duvar Yapısının TEM ile Görünümü, bar:250 nm (2)	6
Fotoğraf 2.2. Mikrosprodia Polar Filamentinin Enine Kesiti, bar: 250 nm (2) .7	7
Fotoğraf 2.3. Giemsa ile boyanmış Sporont bar: 10µm (Sitoplazmaya fazla boya girememiş)(2)	26
Fotoğraf 2.4. MTS ile boyanmış Encephalitozoon spp. 100X.....	27
Fotoğraf 2.5. Kalkaflor (1,2,3) ve MTS (4) ile Boyanan Mikrosprodia sporları (17)	28
Fotoğraf 4.1. MTS ile Boyanmış Mikrosporidia Sporları (100x)	47
Fotoğraf 4.2. Jel Elektroforezde Bantların Görüntüsü	49

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
AO	: Akridin Turuncusu Boyama
ATP	: Adenozintrifosfat
BOS	: Beyin-Omurilik Sıvısı
CD4⁺	: Yardımcı T Lenfosit
CD8⁺	: Sitotoksik T Lenfosit
CF	: Kalkaflor Boyama
Cys	: Sistein
DDBJ	: Japon DNA Veri Bankası
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzim Bağlı Immünosorbent Deneyi
EMBL	: Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı
ER	: Endoplazmik Retikulum
g	: yerçekimi kuvveti
GCK	: Gram-Kromotogrof Kinyon Boyama
gr	: Gram
HAART	: Yüksek Aktif Antiretroviral Terapiler
HFF	: İnsan Deri Fibroblast Hücreleri
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
IFA	: İmmü floresan Yöntemleri
IFN-γ	: İnterferon Gama
ITS	: Internal Transcribed Spacer
LSU rDNA	: Büyük Alt Ünite Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
MAbs	: Monoklonal antikorlar
MALDI-TOF	: Matris İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi
Mb	: Baz çifti
MetAP1	: Metiyonin Aminopeptidazı Tip 1
MetAP2	: Metiyonin Aminopeptidazı Tip 2
mg	: Miligram
ML	: Maksimum Likelihood-En Yüksek İhtimal
ml	: Mililitre

MP	: Maksimum Parsimoni-Tutumluluk
MP	: Maksimum Parsimoni-Tutumluluk
MTS	: Modifiye Trikróm Boyama
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NJ	: Komşu Birleştirme Metodu
nm	: Nanometre
NTTs	: Nükleotit Taşıma Proteinleri
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PV	: Parazitofor Vakuol
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SCID	: Şiddetli Kombine Bağışıklık Yetmezliği
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
SSU rRNA	: Küçük Alt Ünite Ribozomal Ribonükleik Asit
SSU rDNA	: Küçük Alt Ünite Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
TIM	: Triosefosfat İzomeraz
TLR9	: Toll Benzeri Reseptör 9
TNF-a	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
UV	: Morötesi ışık
WS	: Warthin-Starry Boyama
µm	: Mikrometre

TEŞEKKÜR

Bu çalışma için konu seçiminde ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde her türlü yardım ve desteğini benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Erol AYAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında yer alan mikroskopik inceleme basamaklarında laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü ve çalışanlarına, moleküler yöntemlerin gerçekleştirilmesinde laboratuvar imkanlarını sağlayan Prof. Dr. Göksel Özer ve Prof. Dr. Mehmet Öztürk hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışması süresince bilgi birikimi ve tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Şükrü ÖKSÜZ, Prof. Dr. Mustafa YAMAN, Prof. Dr. Mutlu GÜLTEPE, Dr. Öğr. Üyesi Cansu ÖNAL ve Öğr.Gör. İslam YILDIZ hocalarıma, pozitif kontrolün temini konusunda Doç. Dr. Ülfet ÇETİNKAYA hocama, yöntemlerin uygulanmasında her türlü yardım ve destekleri için arkadaşlarım Seda TANRIVERDİ, Vet. Hekim Enes EĞİLMEZ, Phd. Zekiye KILIÇSAYMAZ'a gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve her türlü fedakarlığı gösteren çok değerli Babam Macit ÇAKMAK ve Annem Nurten ÇAKMAK'a sonsuz teşekkür ederim.

Doktora eğitiminin her aşamasında yanımda olan, yöntemlerin iyileştirilmesinde ve tezin düzenlenmesinde eşsiz emeği olan değerli eşim Dr. Elif ÇAKMAK'a ve hayatımızın neşesi kızım Hüsna ÇAKMAK'a teşekkür ederim.

Bu araştırma Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2020.04.01.1106 numarası ile ve TUBİTAK tarafından 1002-B Hızlı Destek 222S708 numarası ile desteklenmiştir.

1. GİRİŞ

Mikrosporidia üyeleri spor oluşturan tek hücreli ökaryotlar olup, konak hücre dışında metabolik aktivasyon göstermeyen, zorunlu hücre içi parazitlerdir (1,2). İhtiva ettikleri ribozom (70S) ve ribozomal alt ünite (30S ve 50S), rRNA bölge (16S ve 23S) özellikleri, mitokondri, peroksizom ve golgi aygıtı ile prokaryotik organizma özelliği göstermelerinin yanında, zarla çevrili bir çekirdek, sitoplazmik membran sistemi ve kromozomal bölünme özellikleriyle de ökaryotik organizma olarak değerlendirilmektedirler (3-5).

Türlerine göre farklılıklar gösteren ve genellikle 1-10 µm boyutlarındaki Mikrosporidiaların sporları enfektif olup, uygun koşullarda bir yıldan uzun süre yaşayabilirler. Memelileri enfekte eden Mikrosporidiaların sporları ise, ortalama 1-3 µm boyutlarında küçük ve oval şekildedir (6,7).

Bugüne kadar 200 cinse bağlı 1200'den fazla türü tanımlanan Mikrosporidialar, diğer protozoonlar da dahil olmak üzere hem omurgalı hem de omurgasız canlılarda enfeksiyon oluşturmaktadır (8). Geniş bir konak seçiciliği gösteren Mikrosporidialar, farklı canlı gruplarında sebep oldukları enfeksiyonlardan dolayı bilim insanlarının ilgisini çekmektedirler (2).

Tanımlanmasından yaklaşık 100 yıl sonra ilk insan mikrosporidiyoz olgusu 1959 yılında bildirilmiş ve 1985 yılına kadar ise sadece on olgu ile karşılaşmıştır. Sonraki yıllarda bağışıklık sistemi baskılanmış insanlarda meydana getirdikleri fırsatçı enfeksiyonlar sebebiyle ilgi odağı olmuşlar ve dünyanın dört bir yanından Mikrosporidia türleri ile ilişkili enfeksiyon bildirimleri artmaya başlamıştır. Günümüze kadar insanlara yerleşebilen türlerin yer aldığı cinsler *Brachiola* (*Anncaliia*), *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Microsporidium*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora* ve *Vittoforma* olarak saptanmıştır (8-10). Bu cinsler arasında en yaygın olan türler *Enterocytozoon bienersi* ve *Encephalitozoon intestinalis*'tir. *Enterocytozoon bienersi* AIDS hastalarında rastlanılan ilk Mikrosporidia türü olmasıyla birlikte insanlarda enfeksiyona sebep olan türlerin başında gelmektedir (11).

Mikrosporidialar özellikle organ transplant, kanser ve HIV pozitif gibi bağışıklık sistemi yetersiz veya baskılanmış insanlarda ileri düzeyde enfeksiyon oluşturmaktadır. Bununla birlikte çocuklar, ileri yaştaki insanlar ve kontakt lens

kullanıcılarında da gastrointestinal sorunlara yol açtıkları bilinmektedir (12). Bağışıklık sistemi yetersiz veya baskılanmış hastalarda genellikle ağır gastrointestinal belirtiler göstermekle birlikte; göz, beyin, solunum yolları, karaciğer, safra yolları ve böbrek gibi farklı doku ve organ tutulumları da raporlanmıştır (11,13–15). İnsanlarda bulaşın fekal-oral, oral-oral olmasının yanı sıra solunum yoluyla olduğu da düşünülmektedir (16).

Mikrosporidiaların tanısında türün yerleşim yerine göre farklılık gösteren dışkı, idrar, sinus aspiratları, nazal akıntı, bronkoalveolar lavaj veya doku biyopsileri gibi numuneler kullanılmaktadır (15,17). Rutin tanıda çoğunlukla geleneksel yöntemler (Modifiye trikrom, Giemsa, Floresan boyalar vb.) kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerle sadece örneklerde Mikrosporidia varlığı/yokluğu olarak değerlendirilmekte, tür tayini morfolojik benzerlik gösterdiklerinden dolayı yapılamamaktadır (18). Araştırma laboratuvarlarında türlerin belirlenmesi için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) gibi ileri teknikler de sıklıkla kullanılmaktadır. TEM yöntemi özellikle moleküler tekniklerin olmadığı laboratuvarlarda tanıda altın standart olarak kabul edilmektedir (2). Yakın zamanlarda ise birçok araştırmacı tarafından yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bilinen, bazı Mikrosporidia türlerine özgü yüzey molekülleri veya polar tübül yapısını tanıyan floresan işaretli monoklonal antikorlar geliştirilmiş ve tanıda kullanılmaya başlanmıştır (7,19,20).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

Mikrosporidia ilk olarak Güney Avrupa'daki ipek böceği yetiştiriciliğine büyük zarar veren biber hastalığının etkeni olarak bulunmuş ve 1857'de Nageli isimli bir araştırmacı tarafından, *Nosema bobbycis* olarak adlandırılmıştır (2,21). İlk önceleri Nageli, *Nosema*'nın şizomiçet mantarı olduğunu düşünmüş fakat inceleme sonrasında birçok yönden mantarlardan farklı olduğunu görmüştür. Balbiani isimli araştırmacı 1882 yılında bu paraziti *Cnidosporidia* altşubesinde yer alan *Miksospora* (*Myxospora*) adı altında ayrı bir grup olarak sınıflandırmıştır (8). İlerleyen yıllarda Honigberk ve ark. (1964) yaptığı Protozoa revizyon çalışmasında bu grubu Takım'dan Sınıf'a yükseltmiştir (22). İlk zamanlarda bu patojenler hakkında bilinenlerin az olması sebebiyle basit bir gruplandırma yapılmış, fakat ilerleyen yıllarda araştırmacılar farklı sınıflandırma metotları geliştirilmişlerdir (9,23–25).

Sprague 1976 yılında bu grubu *Microspora* şubesi adı altında toplamış ve 1977'de yapısal özellikleri, spor ve gelişme safhalarındaki çekirdeğin şekli, konak-parazit ilişkisi ve polar tübüldeki sarmal sayılarına göre sınıflandırmıştır (15,17). Yine Sprague, derlediği açıklamalı bir listede 44 cins tanımlamış ve belirsiz formların yer aldığı *Microsporidium* taksonunu tanıtmıştır (8). Sonraki yıllarda, tek çekirdeklielerin *Pleistophorida*, iki çekirdeklieleri *Nosematidida* olarak sınıflandırılması uygun görülmüştür. Levine ise bu patojenleri, 1980 yılında, *Protista* alemi ve *Protozoa* altalemi altında sınıflandırılmıştır (26).

1986 yılında ise parazitin çekirdeğinin diplokaryon olup olmasına, mayoz bölünme özelliğine göre sınıflandırma yapılmış ancak bu durum filogenetik analizlerin sonuçları ile uyumlu olmadığı görülmüştür (26). Aynı yıl sporun morfolojisine ve gelişme safhalarına göre de sınıflandırma yapılmıştır. Kromozom döngülerindeki farkların gözden geçirilerek değerlendirilmesi ise 1992 yılında temel taksonomik kriter olarak önerilmiştir (17).

Edling ve ark. 2000'li yılların hemen öncesinde alfa ve beta tubilin genlerinin dizi analizi sonucunda Mikrosporidiaların protozoalardan ziyade mantarlarla daha yakın ilişkide olduklarını bildirmişlerdir (27). Tranlasyonda görevli olan RNA polimeraz II, uzama faktörü 1 ve 2 (EF-1 ve EF-2) gen dizilerinin kıyaslanması Mikrosporidia-mantar ilişkisini destekler sonuçları ortaya çıkarmıştır

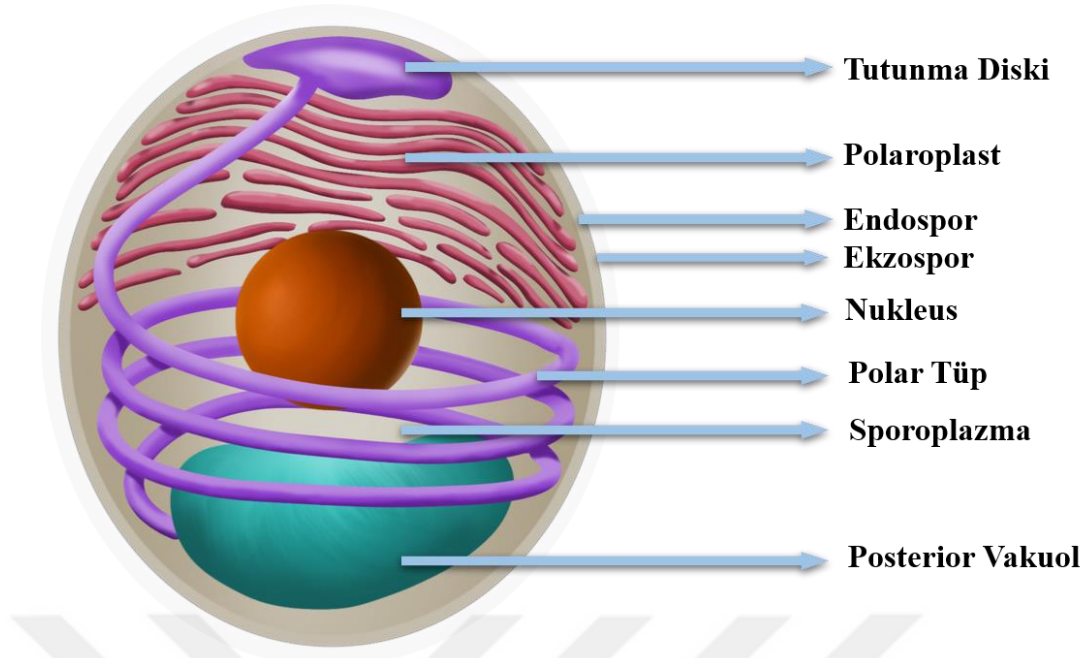
(28). Bununla birlikte tanımlanmış olan *Varimorpha necatrix* ve *Nosema locustae* türlerinin ısı şok protein (Heat Shock Protein- HSP70) gen dizi analizleri de bu ilişkiyi desteklemiştir. (12). İlerleyen zamanlarda yapılan çalışmalarda önerilen birçok yeni gen ağacının da Mikrosporidiaların mantarlarla daha yakın ilişkide olduğunu desteklemiştir (29–32).

Son yıllarda Mikrosporidiaların ilkel amitokondriyalardan olmadığını, aksine mitokondriyal genlere ve kalıntılara sahip olduğu bildirilmiştir (29,33). Dean ve ark. (34) yatay gen transferinin Mikrosporidialara, nükleotit taşıma proteinleri (NTTs) aracılığıyla, konak ATP'sini kullanma yetisi kazandırdığını ve serbest yaşayan ökaryotlardaki enerji üretme yollarının ve nükleotit biyosentez mekanizmalarının kaybına yol açtığı fikrini destekler kanıtlar sunmuşlardır. Filogenetik durumu hakkında tam olarak bir fikir birliği sağlanmamış olsa da gerçekleştirilmiş genomik araştırmalar Mikrosporidiaların ilkel bir canlı grubu olmadığını, karmaşık evrimsel süreçler neticesinde bir enerji paraziti formunu kazandığını açıkça göstermektedir (8).

2.2 Morfolojik Özellikleri

2.2.1 Spor Morfolojisi

Spor, içeriğini konak hücreye enjekte edebilme yeteneğindeki enfektif dönemdir. En dışta, konak hücrenin dışarısında uzun zaman yaşayabilmesine olanak sağlayan oldukça dirençli bir hücre duvarına sahiptirler. Spor duvarının hemen altında ise bütün hücre içeriğini çevreleyen bir plazma zarı mevcuttur. Boyutları 1-10 µm arasında değişen spor içerisinde bir membran sistemi, ön kısımda yer alan bir tutunma (anchoring disk) diski ve bu tutunma diskine bağlanan, polar tüp ve tübüler polaroplast ile lamellar polaroplast bulunur. Polar tüp, tutunma diski, polaroplast ve posterior vakuolün oluşturduğu sistem boşaltım aygıtı olarak isimlendirilir (Şekil 2-1). Çoğunluğunun tek çekirdekli olmasının yanında *Vittaforma* cinsi içerisindeki bazı türlerin iki çekirdekli olduğu bilinmektedir (35,36).

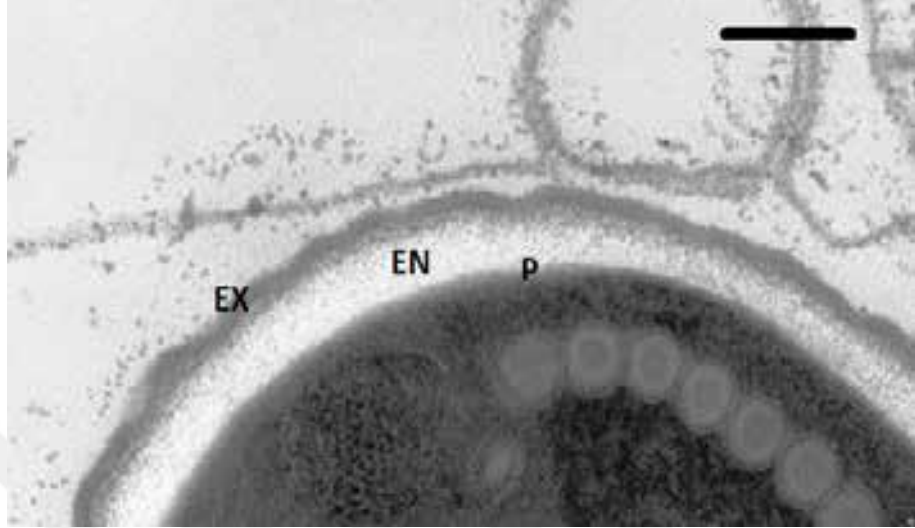


Şekil 2.1. Mikrosporidia Spor Morfolojisi (Orjinal)

2.2.1.1 Spor Duvarı

Mikrosporidiaları olumsuz dış koşullardan koruyan spor duvarı eksospor, endospor ve plazma membranı olmak üzere 3 tabakadan oluşur. Sporun dış kısmında elektronca yoğun, glikoprotein ve kitin yapısında olan ekzospor bulunmakta ve üç tabakadan oluşmaktadır. En dış kısmında dikenli bir tabaka, ortada lamina ve içte ise fibröz tabaka bulunmaktadır. Ekzosporun kimyasal bileşeni protein yapıda olduğu için son zamanlarda çeşitli Mikrosporidia türlerine özel hücre duvarı proteinleri karakterize edilmiştir (37). Bununla birlikte fiziksel (ultrastrüktürel) yapısının da tür yakınlıkları için bir belirteç olduğu bilinmektedir. Spor duvarının orta kısmında, temel bileşeni kitin olan endospor bulunmakta ve ekzospora bir köprü ile bağlandığı bilinmektedir. Yapısındaki kitin, Mikrosporidiaların tespit edilmesinde floresandan faydalanmayı sağlamaktadır. Endospor elektronca yoğun olmadığı için ekzosporun altında yapısal olmayan bir tabaka gibi gözükmemektedir. Plazma membranı ise sitoplazmayı çevreleyen ve spor duvarı ile hücre içeriğini birbirinden ayıran, spor duvarı katmanının en iç tabakasıdır. Bu membran, sporoplazmanın (Spor sitoplazması) konak hücre içine aktarılması sırasında spor duvarına bağlı olarak kalması sebebiyle duvarın bir parçası olarak görülmektedir. (Fotoğraf 2-1)(38–40).

Spor duvarı sadece hücre içeriğinin mekanik korunmasında görevli değil aynı zamanda spor içeriğinin konak hücreye boşaltılmasında ve aktif dönemde spor duvarının modifikasyonunda görevlidir (17).



Fotoğraf 2.1. Mikrospordia Duvar Yapısının TEM ile Görünümü, bar:250 nm (2)

2.2.1.2 Çekirdek

Boyutları yaşam döngüsü sırasında farklılık gösteren Mikrosporidia çekirdek genellikle yuvarlak veya ovaldir. Merontlarda, genellikle çapı birkaç mikrometredir; sporülasyon sırasında boyutu azalır ve olgun sporlarda genellikle çok küçüktür. Ökaryotik özellikte olan çekirdek, bir boşlukla ayrılmış çift katlı membran (perinükleer) ile çevrelenmiştir ve çekirdek plasması (nükleoplazma) genellikle homojendir. Türlerine ve yaşam döngüsüne göre çekirdek bir veya iki tane olabilir (40).

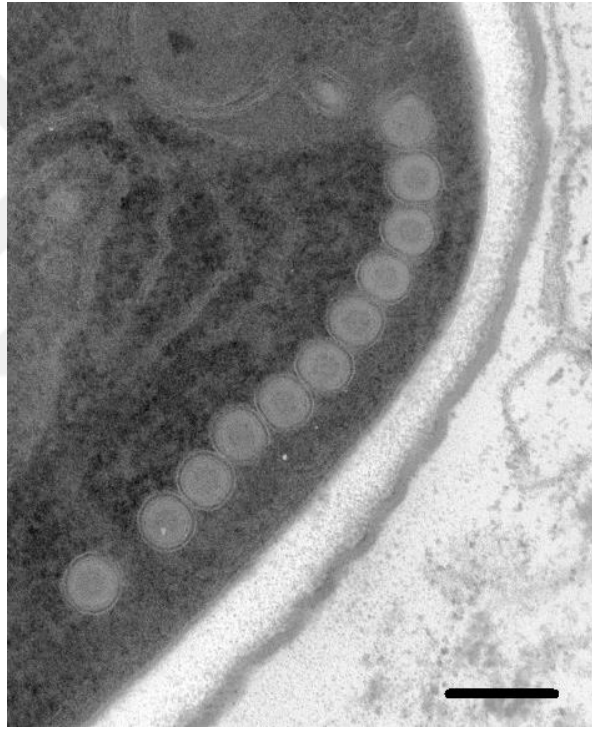
2.2.1.3 Polar Filament (Tüp)

Keşiflerinin ilk dönemlerinde Mikrosporidialarla ilgili yapılan en önemli gözlemlerden biri, polar filamentin sporoplazmanın sporun dışına geçişi için bir tüp görevi görmesiydi (41). Oshima'nın gözlemi yıllar sonra Kudo ve Daniels (42) gibi araştırmacılar tarafından boyalı preparatların ve elektron mikrograflarında incelenmesi ile doğrulanmıştır (8).

Polar filamentin yapısı spor içindeki kıvrım sayısı, kıvrımın açısı ve çapı taksonomik açıdan önemlidir. Polar tüpteki kıvrım sayısı 6-10 arasındaki çift

sıralılar *Enterocytozoon* ve *Brachiola* cinslerinde, 5-11 arası tek sıralılar ise *Encephalitazoon*, *Trachipleistophara* ve *Vittaforma* cinslerinde görülür.

Elektron mikroskobu görüntülerinde, sporun enine kesitlerinde polar filament farklı tabakalardan oluşmuş enine halkalar şeklinde görülmektedir. Halkaların çapı birbiri ile aynı (izofilar) ya da son halkaların çapı önceki halkalardan daha küçük de (anizofilar) olabilmektedir. Türe ait polar filament halka sayısı, sporun bir tarafındaki başlangıç halkası hariç polar filament halkaları sayılarak tespit edilir. Polar filament, sporun anterior kısmında şemsiyeyi andıran “tutunma diskine”(anchoring) bağlanır. Tüpün ön kısmındaki bölüm ise polaroplast adı verilen membran bölgesi tarafından çevrelenmiştir (Fotoğraf 2-2) (2).



Fotoğraf 2.2. Mikrosporidia Polar Filamentinin Enine Kesiti, bar: 250 nm
(2)

2.2.1.4 Polaroplast

Sporun ön kısmında yer alan, polar filamentin düz kısmını çevreleyen ve polar filamentin kıvrım kısmına ulaşmadan sonlanan bu alan birbirine yakın ya da dağınık olarak paketlenmiş membran bölgeleriyle tipik lamelli bir yapıdır. Çoğu cinsten genelde iki bölümden oluşan (anterior bölgesi ve posterior bölgesi) ve üst üste sıralanmış lameller şeklinde görünen polaroplastlar mevcuttur. Spor oluşumu

olayında en son gelişen organel polaroplasttır. Bundan dolayı olgunlaşmamış sporlarda, gelişmekte olan polaroplast düzensiz bir dokuya sahipken, olgun sporların polaroplastı bölmeleri olan belirgin bir şekilde organize edilmiş bir yapıdır (2,40).

2.2.1.5 Diğer Sitoplazmik Organeller

Prokaryotik karakterli ribozomlar (70S, alt üniteleri 50S ve 30S) Mikrosporidia sitoplazmanın baskın bir bileşenidir. Erken gelişim aşamalarında, ribozomlar çoğunlukla sitoplazmada serbestçe dağıtılırken, geç merogoniyal ve sporogoniyal aşamalarda, ER'nin lamellerine bağlı ribozomlar belirginleşir. Ribozomlar sporoblastlarda ve genç sporlarda, örgüsel düzenlenmiş poliribozomlar halinde gözlenir (37).

Endoplasmik retikulum, genç sporlarda sıklıkla çekirdeğin etrafında belirgin olan poliribozom iplikçikleri (zincirleri) olarak görülür. Poliribozomlar ya zarlar arasına sıkıştırılmış çift sıra ribozom gibi görünür ya da hiç zar görülmez. İndirgenmiş mitokondriyal kalıntılar olarak bilinen mitozomlar ise çoğunlukla gruplar halinde polar veziküllerin yakınlarında bulunur, bazen de sitoplazmaya dağılmış halde görülebilirler (8,40).

Posterior vakuol sporun arka kısmında, süngerimsi bir içeriğe sahip zarla kaplı bir alandır. Boşaltım aygıtının diğer parçaları gibi, vakuol de golgi veziküllerinin bir ürünüdür (40).

2.2.2 Genom Yapısı

Mikrosporidia türlerinin genomları evrimsel süreçte aşırı indirgemeye uğramıştır, ancak bu grup içerisinde türler genom büyüklüğü ve yapısı açısından farklılıklara sahiptirler. *E. intestinalis* 2,25 megabaz (Mb) genom büyüklüğü ile şimdiye kadar tanımlanmış en küçük endoparazit genomuna sahip canlı olarak bilinmektedir. Bununla birlikte sivrisinek patojeni olan *Edhazardia aedis* ise 51,3 Mb genom büyüklüğü ile Mikrosporidia taksonu içerisinde en büyük genoma sahip mikroorganizmadır. Karşılaştırmalı analizler, genom boyutundaki bu farklılıkların protein kodlama dizisinden ziyade intergenik sekans miktarındaki varyasyonla açıklanabileceğini göstermektedir (43).

Çok sayıda telomerli lineer kromozomlardan oluşması gibi özellikleri bakımından, Mikrosporidia genomu standart bir ökaryotik genom özelliğini

yansıtmaktadır. Bununla birlikte intron ve transpozonların azlığı nedeniyle yüksek gen yoğunluğuna sahip olması, genellikle kısa intergenik bölgeler içermesi ve az sayıda çoğaltılmış gen bölgeleri bakımından ise bakteri genomuyla oldukça yakındır (40).

2.3 Yaşam Döngüsü

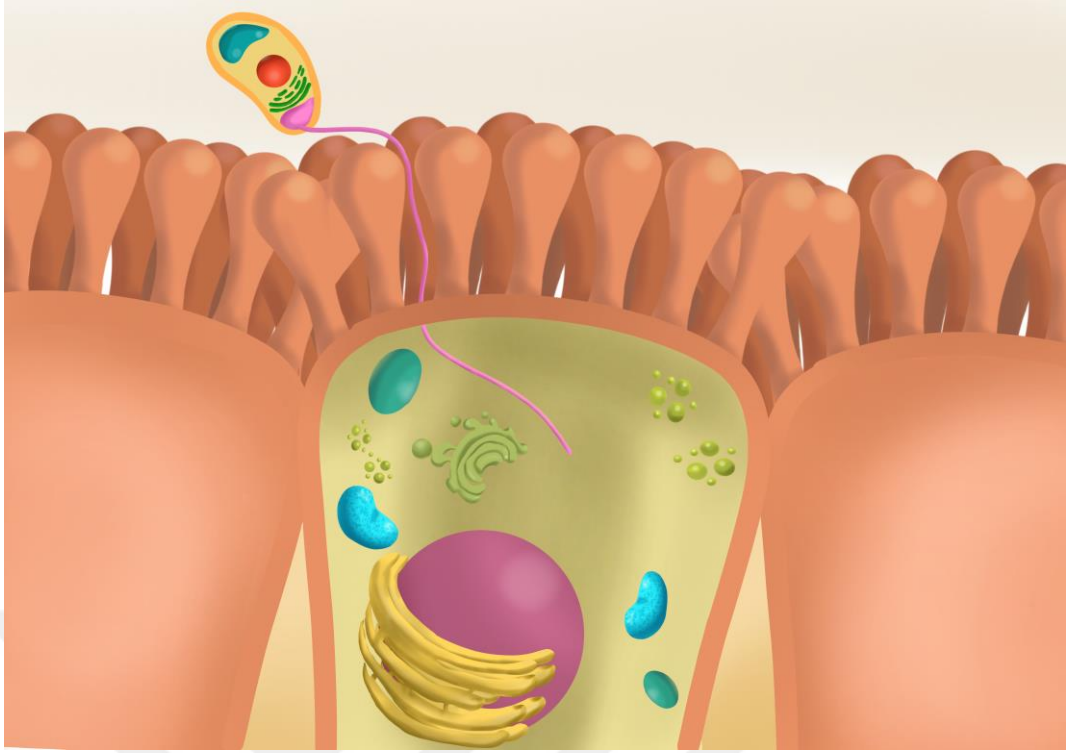
Mikrosporidiaların yaşam evrelerinin tümü konak hücre içerisinde geçer. Yaşam döngülerini tek bir konakta (monoksen) tamamlamakta, herhangi bir ara konak veya vektör ile ilişkileri olmadığı bilinmektedir (33). Uygun konak ve şartlar altında polar tüp ters dönerek sporun ön kısmına doğru gelir ve zayıf olan kısımdan dışarı çıkarak konak hücreye sitoplazmasını boşaltır ve böylece hücre enfekte olur (33).

Mikrosporida evriminde üç evre vardır. Bunlar; enfektif, proliferatif-vegetatif ve hücre içi sporogonik evrelerdir (1,12).

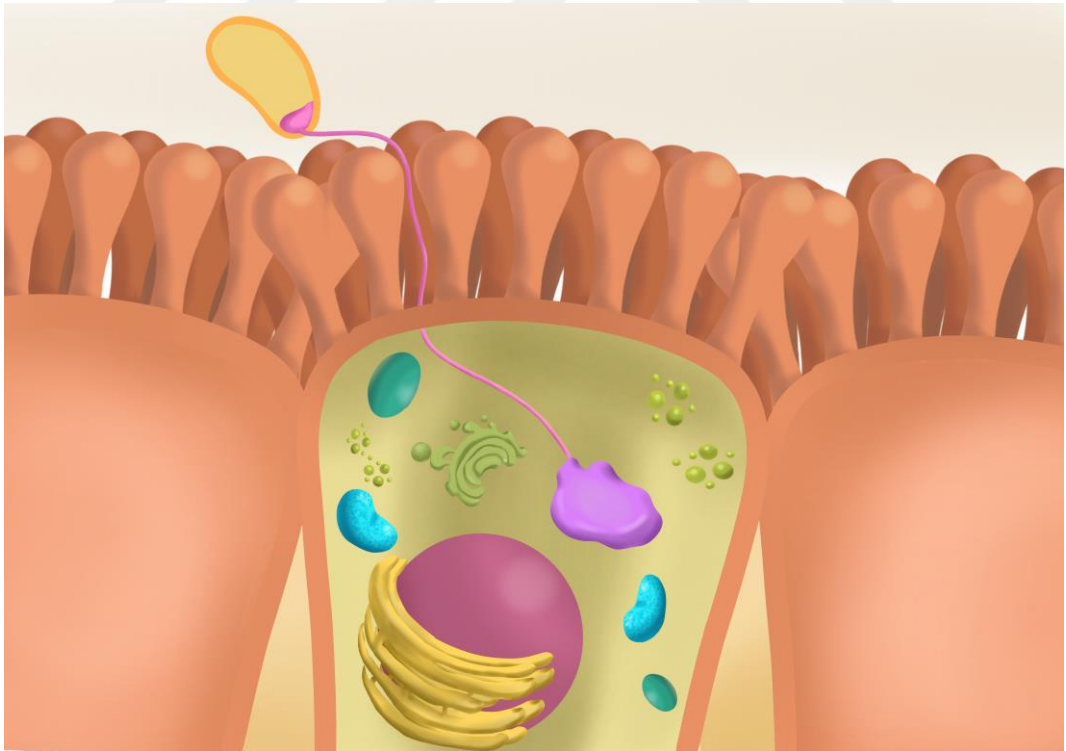
2.3.1 Enfektif Evre

Ağız ya da solunum yoluyla konak tarafından alınan spor, türden türe farklılık gösteren birkaç uyarana aktif olur ve sporoplazma bölmelere ayrılarak çöker. Bu durum spor içindeki osmotik basıncın anormal şekilde artmasına sebep olur ve posterior vakuolu genişleterek polar tüpün ters dönüşünü tetikler. Polar tüpün iç kısmı dış kısmının içinden radyo anteni gibi kayarak ilerler. Spor duvarının anterior kısmında çıkıntı oluşur ve sporun en zayıf bölgesi olan üst (apeks) kısmı polar tüp tarafından delinir. Spordan çıkmış polar tüpün uzunluğu sporun 100 katı kadar uzunlukta olabilir (50 µm-500 µm). Üst bölgesi aynı zamanda polar tüpün ters dönüşünün başladığı yerdir. Polar tüp aracılığıyla sporoplazma konak hücre içine enjekte edilerek bu evre sonlanır (Şekil 2-2 ve Şekil 2-3) (8,33,35,44).

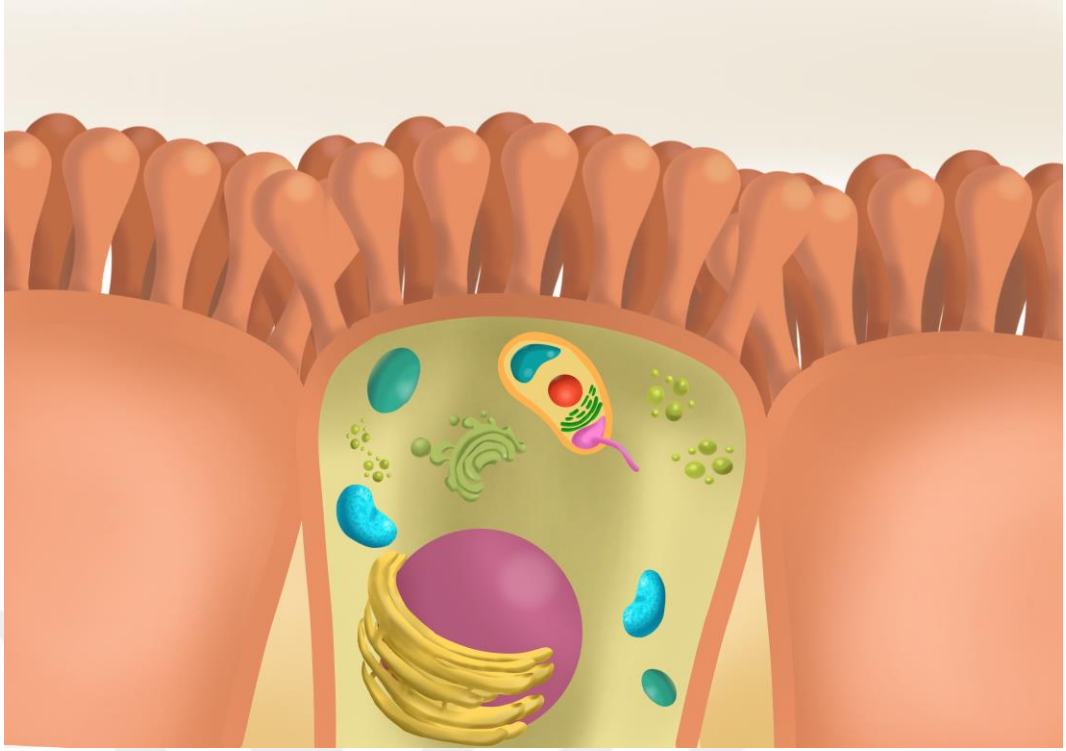
İlk zamanlarda polar tüpün konak hücre membranını yalnızca bir enjeksiyon iğnesi gibi delerek girdiği düşünülmüştür, fakat sonralarda yapılan çalışmalarda fagositoz yardımı ile de konak hücreye girdiği bildirilmiştir (Şekil 2-4 ve Şekil 2-5) (33,44,45).



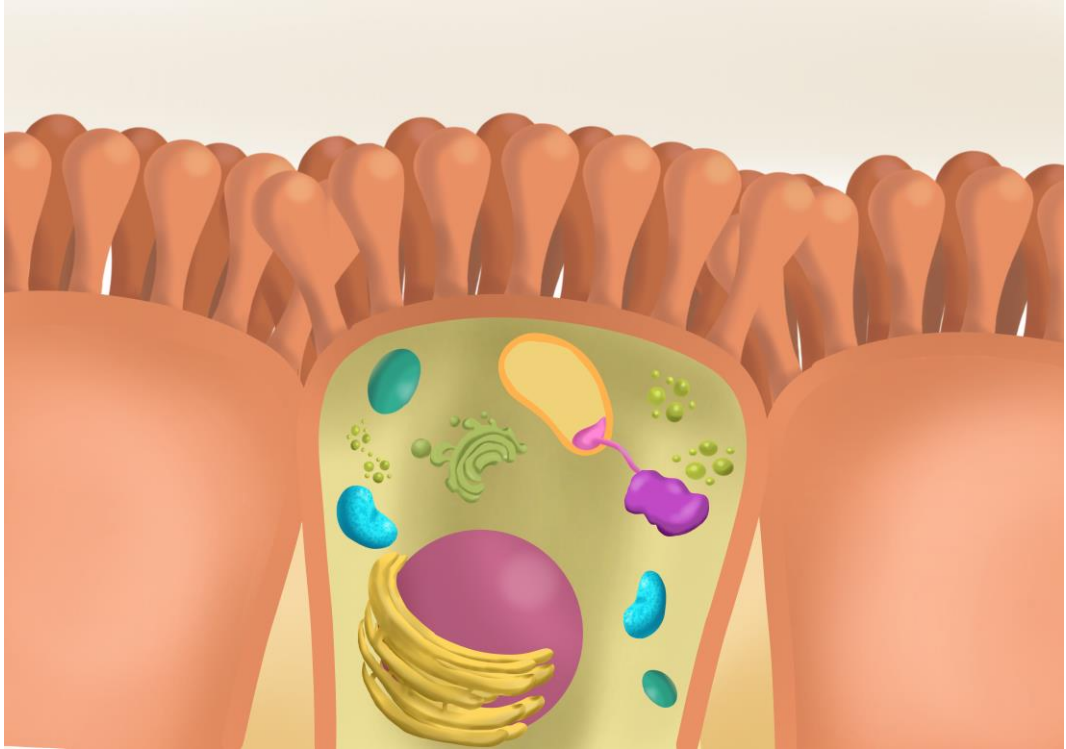
Şekil 2.2. Mikrosporidiaların Konak Hücre Dışındayken Polar Tüpün Hücreye Girişi (Orjinal)



Şekil 2.3. Mikrosporidiaların Konak Hücre Dışındayken Sporoplazmanın Hücreye Aktarılması (Orjinal)



Şekil 2.4. Fagositoz ile Konak Hücre İçerisine Alınan Mikrosporidia Polar Tüpünün Spordan Çıkışı (Orjinal)

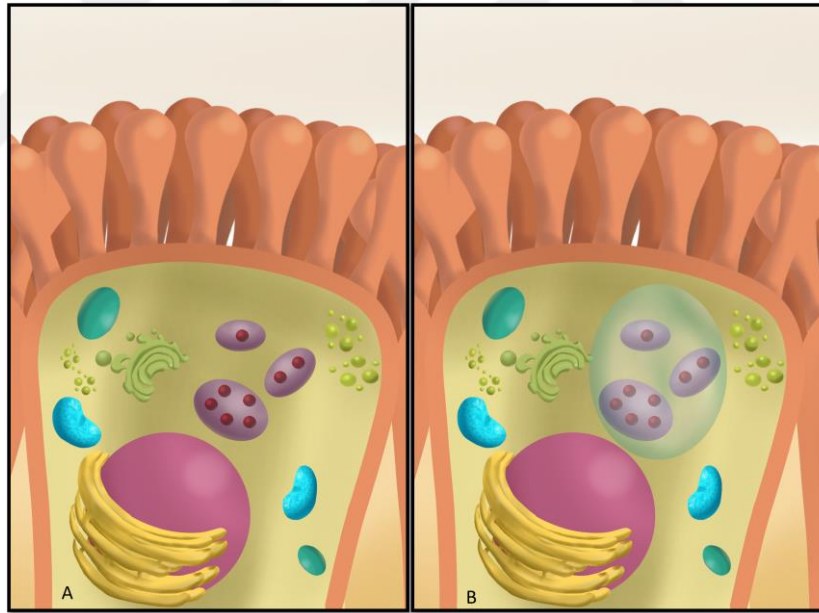


Şekil 2.5. Fagositoz Sonrası Mikrosporidia Sporoplazmasının Konak Hücre İçine Aktarılması (Orjinal)

2.3.2 Proliferatif ve Vejetatif Evre

2.3.2.1 Merogoni/Şizogoni Evresi

Bu evre sporoplazmanın uygun bir konağa enjekte edilmesini müteakiben sporoblastların meront olarak adlandırılan hücreler aracılığı ile bölünerek çoğalmasını kapsar. Yapısal olarak basit ve tek katlı hücre zarına sahip olan merontlar, konak hücrenin sitoplazmasında (*Nosema*, *Enterocytozoon*), parazitofor vakuol içinde (*Encephlitozoon*, *Septata*), parazitin salgıladığı şekilsiz bir kabuk içinde (*Pleistophora*, *Trachipleistophora*) veya konağın endoplazmik retikulumuyla (*Endoreticularis*, *Vittaforma*) çevrilerek gelişir (46). Bu hücreler defalarca ikiye veya daha fazla sayıya ortadan bölünerek çoğalırlar (40,46). Bu bölünmeler sonucunda yuvarlaklaşmış çok çekirdekli plasmodial (*E. bieneusi*) veya kurdele benzeri (*Septata*) hücreler oluşur (Karyokinezis). Sitoplazma bölünmesinden (sitokinez) önce karyokinezis defalarca meydana gelebilir ve vakuol periferine bitişik çok çekirdekli hücreler gözlemlenebilir (Şekil 2-6)(8).



Şekil 2.6. Mikrosprodialarda Merogoni Evresi; A) Konak Hücre Sitoplazmasında B)Vakuol İçerisinde (Orjinal)

2.3.2.2 Sporogonik Evre

Bu evre merontların sporontlara dönüştüğü zaman başlar. Proliferatif gelişimleri sırasında basit bir plazma zarına sahip olan Mikrosporidialarda, sporogony fazına giriş ile ilişkili bazı değişiklikler gözlenir. Plasmalemma salgıları

2.4.1.1 *Encephalitozoon cuniculi*

İlk olarak 1927’de tanımlanmış, fakat 1960’ların sonuna kadar *Nosema* cinsi altında yer almıştır. Cali isimli araştırmacı 1970’de yaptığı incelemeler sonucunda ultrastrüktürel olarak *Nosema* cinsinden farklı olduğu göstermiş ve *Encephalitozoon* cinsine dahil edilmesini önermiştir (8). Bilinen Mikrosporidialar arasında en küçük genoma sahip olan bu türün insanların yanında kemirgen, kuş ve primatlarda da parazitlendikleri bilinmektedir (47,48). Ribozomal RNA (rRNA) dahili kopyalanmış aralayıcılar (Internal Transcribed Spacer/ITS) bölgelerine göre 3 genotipi (ECI, ECII ve ECIII) tanımlanmıştır (49). Birçok doku ve organda bulunabilmesine rağmen genellikle beyin ve böbreği tuttukları bilinmektedir. Yaygınlığı bölgelere göre değişmektedir fakat ılıman tropik bölgelerde oranın daha fazla olduğu bilinmektedir (17).

Encephalitozoon cuniculi mikrosporidiaların DNA onarım mekanizması, ATP sağlama mekanizması ve tedavi edici ajanların araştırılması, bağışık yanıt gibi konuları anlama açısından önemli çalışmalarda model olarak kullanılmıştır (50–55).

2.4.1.2 *Encephalitozoon hellem*

İlk olarak 1991 yılında tanımlanan bu türün benzer bir tür olan *Encephalitozoon cuniculi*’den ayrımı birçok yönden (SDS-PAGE, Western Blot ve SSU rRNA) yapılmıştır (9). Boyutları 2-2,5 ile 1-1,5 µm arasında, polar tübül sarmalı ise 5-7 arasında tek sıralıdır. Türün makrofajlara, burna, korneaya, üriner sistem epiteline ve böbreklere yerleştiği tespit edilmiştir (17).

2.4.1.3 *Encephalitozoon intestinalis*

İlk olarak 1993’te HIV’li hastadan izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Önceleri *Septata intestinalis* olarak isimlendirilen tür moleküler analizler sonucunda *Encephalitozoon* cinsine dahil edilmiştir. Spor boyutları 1,2-2 µm’dir ve tek sıralı 4-7 halkalı polar tüp içerirler. İmmün sistemi baskılanmış kişilerin lamina propia makrofajlarında ve enterositlerinde saptanmıştır. *Enterocytozoon bieneusi*’den sonra insanlarda en sık enfeksiyon oluşturan Mikrosporidia türüdür (31,56,57).

2.4.2 *Enterocytozoon Cinsi*

Gelişimlerini konak hücre sitoplazmasında gerçekleştiren bu cins üyelerinin tek ve çok çekirdekli formları mevcuttur. Işık mikroskobu ile meront ve sporontların ayrımı zordur, fakat elektron mikroskobu ile merontların düzensiz bir çekirdeğe ve sitoplazmasında enine (transvers) yarıklara sahip olduğu görülür (21).

Özellikle ince bağırsak ile safra yollarında enfeksiyon oluşturur ve buralarda kalırlar. Olgunlaşmış sporlar buralardan dışkı yoluyla atılır böylece parazitin döngüsü tamamlanmış olur (17).

2.4.2.1 *Enterocytozoon bienewsi*

İlk olarak 1985 yılında AIDS'li bir hastadan izole edilerek tanımlanan bu tür genellikle insan bağırsaklarında enterositleri tutar ve immün yetmez kişilerde ağır ishallere sebep olur. Ayrıca birçok organda da yerleştiği bildirilmiştir (5,12,58,59).

Gelişim evrelerinin konak sitoplazmasında herhangi bir zar oluşturmadan geçirirler. Gelişim evrelerinde her zaman tek çekirdekli dir. Yaklaşık boyu 0.7-1 µm-1.1- 1,6 µm civarında olan bu tür en küçük Mikrosporidia türüdür. Polar filamenti 5-7 kez kıvrılmıştır. Küçüklüğünün yanında kitin yapısındaki ince endospor tabakası ile diğer türlerden ayrılır (9,17,57).

İnsanlarda en çok enfeksiyon oluşturan *Enterocytozoon bienewsi*, özellikle 2010 yılından sonra Ribozomal ITS polimorfizmleri baz alınarak genotiplere ayrılmıştır. ITS bölgeleri “Küçük Altünite (SSU) rDNA” ve Büyük Altünite (LSU) rDNA” bölgeleri arasında yer alan, Mikrosporidiaların genotip karakterizasyonunda kullanılan yaklaşık 243 baz uzunluğunda bir dizi setidir. (60). Bu dizilerin karşılaştırılması sayesinde *Enterocytozoon bienewsi*'nin evrimi ve geçiş yolları hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Fakat genotiplendirmede standart bir isimlendirme olmadığı için zaman zaman karışıklıklara sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca bazı araştırmacılar, çoğalma evresinde (proliferatif/vejetatif) genetik rekombinasyonların meydana gelebilme olasılığı sebebiyle tek bir ITS bölgesini çalışmanın genotiplendirme için yetersiz kalabileceğini düşünmektedirler. Bu sebeple multilokus genotiplendirmenin popülasyon genetiğini ve konak özgüllüğünü anlamada faydalı olacağını bildirmişlerdir (61). Her ne kadar isimlendirmede karışıklıkları olsa da ITS genotiplendirmesi için bilim

camiasında kabul edilmiş 474 genotipi Genbank'ta yer almaktadır. Genotipler belirli standartlara göre toplam 11 grup içerisine yerleştirilmiştir. En çok genotipin yer aldığı (314) ve konak seçiciliği en geniş olan Grup 1'dir. İnsanlarla birlikte birçok canlıyı enfekte eden genotipler bu grupta yer almaktadır. Grup 1'de en çok karşılaşılan genotipler Genotip D, EbpC ve tip IV'tür. Grup 2'de ise genellikle ruminatları enfekte eden ve konak seçiciliği biraz daha dar olan genotiplerin olduğu gruptur. Tabi son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda Grup 2 genotiplerinin de insanlarda yerleştiği bildirilmiştir. 3-11 Grupları ise konak seçiciliği dar olan ve nadir rastlanılan genotiplerin olduğu gruplardır (62,63). Ayrıca antroponotik tiplerin gelişmiş ülkelerde, antroponotik ve zoonotik tiplerin ise gelişmekte olan ülkelerde birlikte görüldüğü dikkat çekmektedir (64).

Dünya genelinde yapılan çalışmalara bakıldığında, Grup 1'deki genotiplerin birçok ülkede insan ve hayvanları enfekte ettiği, bununla birlikte içme ve sulama kaynaklarından da izole edildiği raporlanmıştır (62,65-72).

2.4.3 Diğer Mikrosporidia Türleri

Nosema cinsine ait türler, insanlarda nadir enfeksiyon yapmasının yanında genellikle arı, ipek böceği gibi omurgasızlarda yaygındır. Merogoni ve sporogoni evrelerinde ikiye bölünerek çoğalan *Nosema* türlerinin çekirdekleri yaşam evrelerinin her döneminde iki parçalıdır. Sporların boyutları 4-4.5 µm-2-2.5 µm kadar olup, polar tüpünde 10-12 burğu bulunmaktadır (2,9,17).

Pleistophora türleri genellikle balıklarda görülmesine rağmen, farklı böcek ve omurgalı türlerinde de raporlanmıştır. İnsanlarda, özellikle immün yetmezliği olan hastalara ilişkin olgular bildirilmiştir. Parazit konak sitoplazmasında oluşturduğu sporoforöz vezikül içinde gelişir. Sporların boyutları 2-2.8 µm-3-4 µm kadar olup oval şekillidir. Polar tüpündeki burğu sayısı ise 10-12 arasındadır (8,17).

Gelişim dönemlerinde çekirdek tek parçalı olmasına rağmen meront oluşumunda çekirdekler çoğalır. Sonrasında merontlar içlerinde birden fazla çekirdek bulunan parçalara ayrılır. Spogoni evresinde ise sporoforöz vezikül içerisinde farklı sayılarda spor oluşur (17).

İn vitro kültürü yapılabilen *Trachipleistophora* cinsi ilk olarak miyoziti olan AIDS'li bir hastadan izole edilmiştir. Bu cinse ait türlerin hayat evrelerinde çekirdekleri çok parçalı olabilmektedir (8,9,26,33).

Vittaforma sporların boyutları 3.7-1 µm kadar olup, polar tübüldeki burgu sayısı 6'dır. Kültüre edilebilir olduklarından bütün evreleri incelenebilir. Hücreleri çift çekirdekli. İlk olarak ketatitli bir hastadan izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Lokal ve yaygın enfeksiyonlara yol açabilirler (9,12,17).

İlk olarak bir hastanın korneasından izole edilen *Brachiola* sporları 5-2.9x1.9-2µm boyutlarındadır ve polar tübülünde 7-10 kıvrım bulunmaktadır (9,17,26).

2.5 Epidemiyoloji

Fırsatçı patojen olarak bilinen Mikrosporidiaların sebep olduğu enfeksiyonlar dünyanın birçok farklı ülkesinden bildirilmiştir. HIV ile enfekte hastalar başta olmak üzere bağışık sistemi yetersiz hastalarda kronik ve akut ishallere sebep olmaktadır. En sık enfeksiyon oluşturan türleri ise *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon intestinalis*'dir. Bu iki türün yanında *Vittaforma corneae*, *Trachipleistophora* ve *Brachiola* türlerinin sebep olduğu enfeksiyonlar bildirilmiştir (12,24,58,73).

İnsanlarda enfeksiyon oluşturan Mikrosporidia varlığı ilk olarak 1959 yılında bildirilmiştir. Ateş, kasılma (konvülsiyon) ve baş ağrısı şikayetleri ile hastaneye getirilen hastanın beyin omurilik sıvısı incelenmiş ve *Encephalitozoon* cinsi sporlar görülmüştür. Daha sonra 1985 yılına kadar bağışıklık sistemi baskılanmış 10 kişide Mikrosporidia vakaları bildirilmiştir. (9,18). 1985 yılında ise bir hastanın enterositlerinde *E. bieneusi* ilk olarak tespit edilmiş ve bu yıldan sonra İngiltere, Avusturalya, Amerika gibi birçok ülkeden insanlarda patojenin varlığı raporlanmıştır. Klinik bulguların belirgin olmaması veya belirtisiz seyretmesi ve Mikrosporidiaların ayırıcı tanılarda dikkate alınmaması sistemik mikrosporidiyoz prevalansını tahmin etmeyi zorlaştırmıştır (10). Fakat yapılan çalışmalarda bölgelere göre kronik ishallerli AIDS hastalarında ve organ transplant hastalarında Mikrosporidia prevalansının % 7-50 arasında değiştiği ayrıca immün yetmezlik durumu olmayan hastalarda da parazite rastlanıldığı bildirilmiştir (11,13,17,18,65,74-87). Gelişmiş ülkelerde intestinal mikrosporidiyoz prevalansı yüksek aktif antiretroviral terapiler (HAART-highly active antiretroviral therapy) sayesinde azalmaktadır, fakat gelişmekte olan ülkelerde bu tip tedavilerin yetersizliği sebebiyle prevalans normal seyretmektedir. Bununla birlikte dünyadaki çalışmalara bakıldığında antroponotik genotiplerin gelişmiş ülkelerde, antroponotik

ve zoonotik genotiplerin ise gelişmekte olan ülkelerde birlikte görüldüğü anlaşılmaktadır (64).

Ülkemizde Mikrosporidialarla ilgili yapılan çalışmalar fazla olmamasına rağmen, mikrosporidiyoz vakalarının azımsanmayacak derecede olduğu dikkat çekmektedir. Çetinkaya ve ark. (88) farklı hasta gruplarında (büyüme geriliği olan çocuklarda %40, kemoterapi alan hastalarda %40, kemik iliği transferi olan hastalarında %24 ve ürtikerli hastalarda %20), Hamamcı ve ark.(11) Kayseri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde kemoterapi alan kanser hastalarında (%69,9), Çetinkaya ve ark. (7) kemik iliği transferi hastalarında (%39), Özkoç ve ark. (89) İyatrojenik bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda (%14,2), Çalık ve ark. (90) Malatya'daki çocuklarda (%7,8), Karaman (17) Malatya'daki değişik hasta gruplarında (%8,5), Atambay ve ark. (91) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezine, bağışıklık sistemi sağlam olup sindirim sistemi yakınması ile gelen kişilerde (%6,5), Karaman ve ark. (6) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde kanser tanısı almış hastalarda (%10,9), Karaman ve ark. (92) akut ve kronik ürtikerli hastalarda (%19,7), Türk ve ark. (93) ishal şikayeti olan hastalarda, Şıvgın ve ark. (94) onkolojik tedavi gören hastada, Mumcuoğlu ve ark.(95) sağlıklı ve bağışıklık sistemi bozuk insanlarda (gruplara göre %27 ile %45,5 arasında) Büget ve ark. (96) ise bir AIDS hastasında farklı oranlarda Mikrosporidia türlerinin varlığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalarda pozitiflik oranının yüksek olmasını örnek alınan hasta grupları ile ilgili olduğunu açıklamışlardır. Çetinkaya ve Caner'in (97) de belirttiği gibi ülkemizdeki Mikrosporidia dağılımı hakkında daha doğru bilgi edinmek için güvenilir tanı yöntemleri kullanılarak, farklı şehirlerden insan, hayvan ve çevre örnekleri incelenmesi gerekmektedir.

Tablo 2.1. Ülkemizde Gerçekleştirilen Mikrosporidia Çalışmaları

Araştırmacı	Yılı	Kategori	Yöntem		
			Mikroskobik	Moleküler	İFA
Büget ve ark.	2000	Vaka (AIDS)	1 kişi (MTS)		
Atambay ve ark.	2008	Gastrointestinal şikâyet	%6,5 (51/781)		

Araştırmacı	Yılı	Kategori	Yöntem		
			Mikroskopik	Moleküler	İFA
Karaman ve ark.	2008	Kanser tanısı almış kişiler	Kanser: %10,9 (35/320) Kontrol: %5,6 (18/320)		
Karaman ve ark.	2009	Epidemiyolojik	%8,5 (226/2665)		
Usluca ve Aksoy	2010	Vaka (Miyotonik Distrofi)	1 Kişi		1 Kişi
Karaman ve ark.	2011	Akut ve Kronik Ürtikerli kişiler	Hasta: %19,7 (26/132) Kontrol: %2,8 (1/36)		
Çalık ve ark.	2011	Epidemiyolojik (Çocuklarda)	%7,8 (1181/92)		
Şıvgın ve ark.	2012	Vaka (Kök hücre nakli)			1 Kişi
Türk ve ark.	2012	Gastrointestinal Şikâyet	%9,8 (225/22)		
Hamamcı	2013	Farklı Hasta Grupları	Kontrol: %57,5 Hasta %36,6	Kontrol: %40,7 Hasta: %35	
Çetinkaya	2014	Farklı Hasta Grupları	Kontrol: %20 (10/50) Hasta: %33 (33/100)	Kontrol: %24 (10/50) Hasta: %40 (40/100)	Kontrol: %12 (6/50) Hasta: %31 (31/100)
Hamamcı ve ark.	2015	Kemoterapi alan Kanser Hastaları	Hasta %34 (17/50)		Hasta: %69,9 (65/93) Kontrol:%16 (5/30)
Çetinkaya ve ark.	2015	Kemik İliği Nakil Hastaları			Hasta: %39 (78/200) Kontrol:%11,3 (9/80)
Mumcuoğlu ve ark.	2016	Gastrointestinal şikâyet	Kontrol: %45,5 Akut İshalli: % 27 Kronik İshalli: %34,1		

Araştırmacı	Yılı	Kategori	Yöntem		
			Mikroskopik	Moleküler	İFA
Özkoç ve ark.	2016	İyatrojenik Bağışıklığı Baskılanmış		%14,2 (9/63)	
Çetinkaya ve ark.	2016	Farklı Hasta Grupları			Kontrol: %12 (6/50) Hasta: %31 (31/100)

Tablo 2.2. Avrupa Ülkelerinde Gerçekleştirilen Mikrosporidia Çalışmaları

Araştırmacı	Yılı	Şehir/Ülke	Kategori	Yöntem	
				Mikroskopik	Moleküler
Cotte ve ark.	1999	Lyon/Fransa	Epidemiyolojik	MTS: %15- %23	
Müller ve ark.	1999	Köln/Almanya	HIV+	%7,4	
Lores ve ark.	2002	Vigo/İspanya	Yaşlı bireyler	%13,3	%13,3
Sak ve ark.	2011	Prag/Çekya	HIV-	%15	
Lobo ve ark.	2012	Lizbon/Portekiz	HIV+ ve HIV-		HIV+: %13,9 HIV-: %8,5
Greigert ve ark.	2018	Strazburg/Fransa	Epidemiyolojik	%1,1	
Kicia ve ark. (Polonya)	2019	Wroclaw/Polonya	Böbrek Nakil Hastaları		%8,3

Tablo 2.3. Afrika Ülkelerindeki Gerçekleştirilen Mikrosporidia Çalışmaları

Araştırmacı	Yılı	Şehir/Ülke	Kategori	Yöntem	
				Mikroskopik	Moleküler
Tumwine ve ark.	2002	Mulago (Uganda)	Çocuklar		Kontrol : %16,8 İshal: %17,4
Nkinin ve ark.	2007	Younde (Kamerun)	Kontrol ve Hasta Grubu	HIV+ TB+: %35,7 HIV+ TB- : %35,7 Kontrol: %67,5	
Breton ve ark.	2007	Gabon	HIV+		%3

Araştırmacı	Yılı	Şehir/Ülke	Kategori	Yöntem	
				Mikroskopik	Moleküler
Breton ve ark.	2007	Kamerun	HIV-		%2,9
Ayinmode	2011	Oyo (Nijerya)	Çocuklar		%9,3
Ojuromi ve ark.	2016	Nijerya	HIV+		%5,5

Tablo 2.4. Asya Ülkelerindeki Gerçekleştirilen Mikrosporidia Çalışmaları

Araştırmacı	Yılı	Şehir/Ülke	Kategori	Yöntem	
				Mikroskopik	Moleküler
Leelayoova ve ark.	2005	Bangkok/Tayland	Çocuklar (Yetimhane)	%4,1	
Lono ve ark.	2011	Kajang/Malezya	HIV+	HIV+: %8,5 Kontrol: %2,9	HIV+: %8,5 Kontrol: %2,9
Mori ve ark.	2013	Kuzey ve Batı Tayland	Çocuklar		Batı: %3,8 Kuzey: %2,9
Anuar ve ark.	2016	Pahang (Malezya)	Çocuklar (Aborijin)	%27	
Kaushik ve ark.	2018	Delhi (Hindistan)	HIV+	HIV+: %23,3 Kontrol: %10,83	HIV+: %23,3 Kontrol: %10,83
Gyouchi ve ark.	2019	İran (Kuzeybatı)	Kemoterapi alan çocuklar	%12,8	%10,6
Esteghamati ve ark.	2019	Tahran (İran)	Kanser ve Organ Nakil		%0,5
Karimi ve ark.	2020	Tahran (İran)	Bağıışıklığı yetersiz		%5,9
Shen ve ark.	2020	Burma (Myanmar)	Epidemiyolojik		%8,72
Zang ve ark.	2021	Çongçin, Şantung ve Hubei (Çin)	Epidemiyolojik	%9,6	%10,2

önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (104–106). Yapılan immünolojik çalışmaların çoğu, laboratuvarında kolayca kültürlenebilen, insan sağlığı açısından da önemi olan bir Mikrosporidia türü *Encephalitozoon cuniculi* ile gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, farelerde yapılan deneyler, büyük ölçüde insan bağışıklık sistemi cevabını taklit eder niteliktedir (107,108).

Mikrosporidia enfeksiyona karşı edinilmiş (adaptif) bağışıklığın önemi, atimik ve SCID farelerin (T hücresi olmayan) bağışıklık sistemi sağlam olan farelerin aksine enfeksiyonu kontrol edemediklerini gösteren çalışmalar ile çok erken dönemlerde bildirilmiştir (109,110). Sonraki yıllarda CD8⁺ alt kümesinin enfeksiyona karşı birincil tepki topluluğu olduğu bildirilmiştir (104,111). Ayrıca aynı dönemde, viral olmayan bir patojene karşı konağın korunması konusunda sıra dışı bir durum olan, güçlü sitotoksik T lenfosit (CTL) cevabının üretilmesi çok önemli bir buluştur (112). Deneysel olarak oluşturulan nakavt (knock out) bir farede, sitotoksik bir granül olan perforinin eksikliğinde, mikrospridya enfeksiyonun durdurulmasının başarısız olduğu bildirilmiştir (113).

CD4⁺ T hücrelerinin enfeksiyon yoluna bağlı olan ikili rolü de ilginç gözlemler arasında yer almaktadır (107). Periton içi enfeksiyon durumunda, konakçı koruması veya CD8⁺ T hücresi bağışıklığının geliştirilmesi için CD4⁺ çok gerekli olmayabilirken, oral enfeksiyon durumunda CD4⁺ ve CD8⁺'in ortak (sinerjik) rolü olduğu öne sürülmüştür (112,114,115). CD4⁺T hücrelerinden yoksun farelerin normal periton içi enfeksiyon sonrasında normal bir CD8⁺ yanıtı oluşturması ise yukarıda bahsedilen durumun kanıtı niteliğini taşımaktadır (114).

Bağışıklığı yeterli (İmmünokompetan) farelerde, *E. cuniculi* enfeksiyonun, kısa ömürlü efektör CD8⁺ T hücreleri (SLEC) olarak adlandırılan antijene özgü güçlü bir CD8⁺ T hücreleri efektör tepkisini indüklediği bildirilmiştir (107). Bhadra ve ark. (116) SLEC popülasyonunun, akut *E. cuniculi* enfeksiyonu sırasında çok işlevli özellikler sergilediğini ve bu durumun da enfeksiyonun kontrol edilmesinde önemli olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, kritik sitolitik özelliklerinin yanı sıra, IFN γ ve TNF α salgılanması gibi diğer fonsiyonlarının da, CD8⁺ T hücrelerinin patojenin yayılmasını kontrol etmede sinerjistik bir rol oynayabileceği görülmektedir (107). Yapılan bir başka çalışmada *Enterocytozoon bieneusi* sporlarının sitokin ve kostimülatör üretimini arttırması ve böylece dentritik hücrelerin faaliyetini sağladığı gösterilmiştir (117).

Yukarıda bahsedilen *E. cuniculi* enfeksiyonuna karşı koruyucu bağışıklık ile ilgili çalışmaların çoğu intraperitoneal bir enfeksiyon yolu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Patojen oral yoldan elde edildiğinden, bağırsak bağışıklığını değerlendiren çalışmalar patojene karşı bağışık tepkiyi anlamak için önemlidir. Yapılan birkaç çalışma bağırsak CD4⁺ T lenfositlerinin CD8⁺ ile sinerjik etki göstererek enfeksiyonu temizlediğini göstermiştir (111,115). Hall ve ark. (2008) bağırsak florasının, TLR9'un (TLR9) katılımı ile *E. cuniculi*'ye karşı güçlü bir bağırsak bağışıklık tepkisinin oluşmasında ve sağlıklı bir bağırsak homeostazında önemli bir rol oynadığı gösterilmişlerdir. Ayrıca TLR9 gen eksikliği olan farelerde Mikrosporidia enfeksiyonuna karşı zayıflamış bir cevap görülmüştür (118). Moretto ve ark. (106) Latent enfeksiyon durumunda yaş arttıkça enfeksiyon riskinin, yetersiz mukozal CD8⁺ T hücre cevabı sebebiyle, arttığı deneysel olarak gösterilmişlerdir.

2.8 Tanı ve Araştırma Yöntemleri

Mikrosporidiaların birçok farklı canlı grubunda sebep olduğu enfeksiyonlar, bu canlıların teşhis ve tanımlamalarının çok titiz bir şekilde yapılmasını gerektirmiştir. Farklı hayat evreleri, küçük boyutları ve fazla cins/tür sayısına sahip olmaları Mikrosporidiaların karakterizasyonunu zorlaştıran etmenler arasındadır. Bu sebeple geçmiş yıllarda özellikle sadece ışık mikroskopu ile yapılan çalışmalarda birçok yanlış tür tanımlaması yapılmıştır. Günümüzde duyarlı ve özgüllüğü yüksek farklı tanı yöntemleri mevcuttur, fakat araştırmacılar birkaç farklı yöntemin birlikte kullanılarak doğrulama yapılmasını önermişlerdir (2).

Mikrosporidia sporları çok dayanıklı olduğundan dışkı ya da duodenal drenaj örnekleri %5-10'luk formol içinde de laboratuvara gönderilebilir ya da taze olarak incelenebilir. Fakat moleküler çalışmalar için kesinlikle taze materyal gereklidir. Dışkı ve duodenal drenaj haricinde balgam, nazal akıntı ve BOS vücut sıvıları, konjunktiva sürüntüsü ve doku örnekleri de incelenebilir (12).

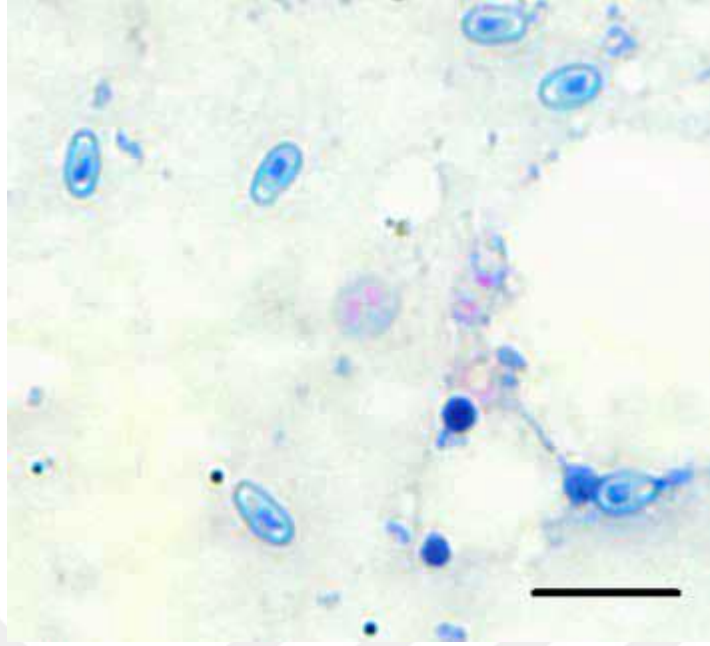
2.8.1 Mikroskobik Yöntemler

Belirtilen zorluklar sebebiyle geçmişte ışık mikroskobu yapılan çalışmalarda bazen yanlış tür teşhislerine bazen de bilinen türlerinin sinonimlerinin

oluşmasına yol açmıştır. Sonraki yıllarda özellikle elektron mikroskopunun gelişmesi ve yaygınlaşması ile teşhis ve tanımlamada daha doğru sonuçlara ulaşılmıştır. Fakat hızlı tespit ve inceleme imkanı sunduğu için günümüzde ışık mikroskobu hala yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (2,11).

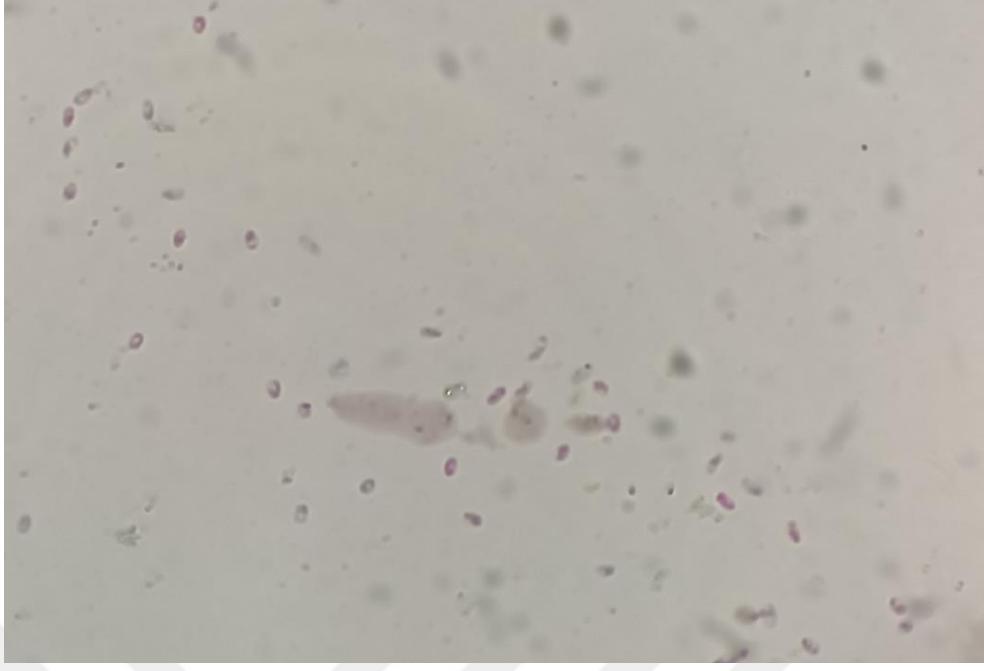
2.8.1.1 Işık ve Floresan Mikroskop

Işık mikroskobu cins ve tür düzeyinde ayırım yapılmasını sağlayamamasına rağmen tanıda etkin olarak kullanılan bir yöntemdir (17). Hayat evreleri ışık mikroskopunda pek fazla ayırt edilememekte fakat giemsa gibi temel boyama teknikleriyle bazı hayat formları ayırt edilebilmektedir (Fotoğraf 2-4) (119). Gram boyama yapılan örneklerde gram pozitif boyanan sporlar maya hücresi görünümünde olmalarına rağmen pembesi renk ve tomurcuklanma göstermemesi ile mayalardan ayrılırlar (17). Hayat evrelerinde sahip oldukları çekirdek sayıları parazitin teşhisinde önemli bir rol oynamaktadır. Işık mikroskopunda meront, sporont ve sporoblast evrelerine ait taze örneklerde çekirdek sayıları tespit edilebilirken, spor evresinde boyanması gerekmektedir. Sporun kalın duvara sahip olması boyama öncesi bazı kimyasallarla müdahaleyi gerektirmektedir (120). Çekirdek sayılarının yanında sporların şekilleri ve boyutları da teşhiste önem arz eden özelliklerdendir. Bir cinse ait türlerin spor yapılarının birbirine benzer yapıda olması buna örnek olarak verilebilir (2).



Fotoğraf 2.3. Giemsa ile boyanmış Sporont bar: 10µm (Sitoplazmaya fazla boya girememiş)(2)

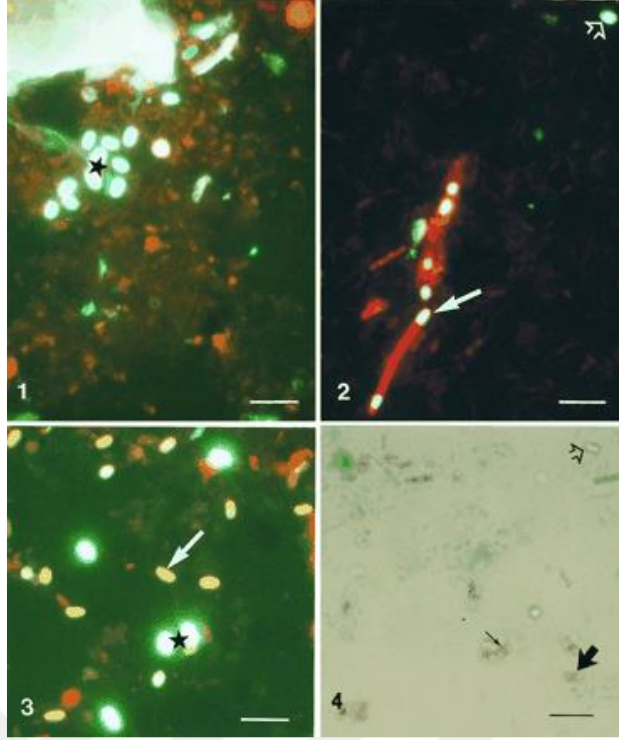
Yapılan çalışmalarda, diğer boyalarla müdahale edilen örneklerin Weber'in Modifiye Trikróm Boyası (MTS) ile doğrulanması gerektiği bildirilmiştir. Özellikle dışkı örneklerinin boyandığı MTS rutin tanıda da kullanılabilen güvenilir bir tekniktir (76,121,122). Bu yöntem ile spor duvarı parlak pembe renge boyanmaktadır (Resim 7) (15,17). Türk ve ark. (93) gerçekleştirdiği MTS'nin referans olarak kabul edildiği çalışmada, Kalkaflor (CF) ve Akridin turuncusu (AO) boyamalarının özgüllük ve duyarlılığını değerlendirmiş ve çok yakın sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir. Salleh ve ark. (123) 290 dışkı örneğini Gram-Kromotograf Kinyon (GCK) ile incelemiş ve Weber'in Modifiye Trikróm Boyası ile karşılaştırdığında uyumluluğun %98 civarında olduğunu rapor etmişlerdir. Böylelikle GCK tekniğinin rutin tanıda kullanılabileceğini önermişlerdir.



Fotoğraf 2.4. MTS ile boyanmış *Encephalitozoon* spp. 100X

Işık mikroskobu tanımlarında floresan boyalar da kullanılmaktadır. Uvitex 2B, Kalkaflor Beyaz ve Fungi Flour en çok kullanılan boyalardandır. Bu boyalar endospor tabakasındaki kitine bağlanarak floresan renk verir. Kitin içeren mantar sporları da bu boyalar ile boyandıklarında boyut burada ayırt edici özellik olmaktadır. Sporlar canlı ise Calcoflour M2R ile 395-415nm dalga boyunda tüküaz-mavi bir görüntü, ölü ise beyaz-sarı renkte gözlenir (Resim 7). Floresan boyaların hızlı ve kolay olmasının yanında MTS ile de uyumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir (9,121,124).

Doku örneklerinde mikrospridya incelemeleri için %1'li asit fast ve gram kromotogrof boyalarının uygulama kolaylığı, etkinliği ve maliyeti yönünden ideal olduğu bildirilmiştir (125).



Fotoğraf 2.5. Kalkaflor (1,2,3) ve MTS (4) ile Boyanan Mikrosporidia sporları (17)

Warthin-Starry (WS) yöntemi ise elektron mikroskobu ile %100 uyumlu sonuç veren, özellikle *Encephalitozoon* türlerinin tanısında kullanılan bir boyamadır (126). Ayrıca Reisner ve ark. (127) Asit-Fast-Trichrome Boyasının da Mikrosporidia tanısında kullanılabileceğini belirtmiştir.

2.8.1.2 Geçirimli (Transmisyon) Elektron Mikroskobu

Mikrosporidiaların incelenmesinde daha çok geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılmaktadır. TEM ile Mikrosporidiaların bütün hayat döngüleri ve organelleri (Polar filament vb.) kolaylıkla incelenip karakteristik özellikleri belirlenebilir ve parazitin cinsi hatta türü düzeyinde teşhis yapılabilir (2,17).

Bu yöntemin özgüllüğü yüksek olup duyarlılığı düşüktür ve bunun yanında yorucu ve uzun zaman gerektirmektedir. Özellikle moleküler yöntemlerin uygulanmadığı laboratuvarlarda altın standart olarak kabul edilen bir yöntemdir (12,17,128–130).

2.8.2 Antijen ve Antikor Tabanlı Yöntemler

ELISA ve İmmunblot gibi antikor tabanlı (Serolojik) testler, yakın türler için olası çapraz reaksiyon ve enfeksiyonun yeni mi yoksa geçmiş dönemlere mi ait

olduğunun ayrımını vermemesi sebebiyle önerilmemektedir. Ayrıca bağışık sistemi yetersiz insanlardaki farklı antikor sevipleri ve sağlıklı insanlardaki yüksek Mikrosporidia antikorlarının bulunması, tanı için serolojik yöntemlerden kaçınmayı gerektirmiştir (46,128,129,131,132).

Immunfloresan Teknikleri (IFAs) ve ELISA gibi antijen tabanlı tanı yöntemlerinde deneysel olarak bağışıklanmış deney hayvanlarından elde edilen antikorlar kullanılmaktadır. Bu antikorlar, monoklonal (tek epitopa karşı) ya da poliklonal (çeşitli epitoplara karşı) olarak üretilir ve patojene özel antijenleri tanıma yeteneğine sahiptirler (46). Klinik tanıda diğer patojenlerin sebep olabileceği çapraz reaksiyonlar, türe özel monoklonal antikor tekniğinde endişe edilmesi gereken konu olmaktan çıkmıştır (133).

Enterocytozoon bienersi ve *Encephalitozoon intestinalis* gibi insanda enfeksiyon oluşturan Mikrosporidia türleri için birçok özel antikor geliştirilmiştir ve bunların büyük bir kısmı spor duvarı proteinleri hedefli çalışmaktadır (7,94,134–139). Antikor tabanlı tanı yöntemlerin aksine antijen tabanlı yöntemlerin, özellikle monoklonal antikorların (MAbs), yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip oldukları raporlanmıştır. Ghosh ve ark. (133) tarafından yapılan çalışmada, PZR ile Monoklonal Antikor (IFA-MAbs) yöntemiyle 200 kişiden alınan örnekler *Enterocytozoon bienersi* ve *Encephalitozoon intestinalis* açısından taranmıştır. PZR'nin altın standart olarak kabul edildiği bu çalışmada IFA-MAbs yönteminin duyarlılığının %95,2, özgüllüğünün ise %100 olduğunu raporlamışlardır. Benzer şekilde Alfa Cisse ve ark. (134) IFA-MAbs tekniğinin duyarlılık ve özgüllüğünü %100 olarak raporlamışlardır. Bazı çalışmalar böylesi yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermemesine rağmen (%80-%100 arasında değişen oranlar mevcut), IFA-MAbs tanı yönteminin insan patojeni Mikrosporidialar için güvenilir bir teknik olduğu bildirilmiştir (135,138). Yüksek duyarlılık ve özgüllüğüne ek olarak, PZR gibi uzman gerektiren tekniklerden daha kısa sürede sonuç vermesi ve sadece bir kit ve floresan mikroskop gerektirmesiyle de araştırmacıların dikkatini çekmektedir (133).

Ülkemizde Şıvgın ve ark. (94) yaptığı çalışmada Türkiye'de ilk olarak IFA-MAbs yöntemi ile *Encephalitozoon intestinalis* saptanmıştır. Hamamcı ve ark. (11) kanser tanısı ile takip edilen ve kemoterapi uygulanan hastalardan aldığı örnekleri *Encephalitozoon intestinalis* ve *Enterocytozoon bienersi*'ye özgül monoklonal antikor kiti (IFA-MAbs) ile değerlendirmişlerdir. Aynı çalışmada MTS, AFT ve

Kalkoflor boyalar ile de müdahale edilmiş ve pozitiflik oranları birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Çetinkaya ve ark. (7) ise kemik iliği transplant hastalarında aynı yöntemden faydalanarak epidemiyolojik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar monoklonal antikor yönteminin konvansiyonel yöntemlerle birlikte kullanılmasının tanıdaki duyarlılığı arttıracığı vurgulamışlardır.

Birçok araştırmacı PZR'nin IFA-MAbs yönteminden daha duyarlı olduğu konusunda hemfikirdir, fakat gerek ülkemizde, gerekse dünyada gerçekleştirilen çalışmalar IFA-MAbs'ın diğer yöntemlerle birlikte klinik tanıda güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir (11,46,140).

2.8.3 Nükleik Asit Tabanlı Yöntemler

Klinikte de yaygın olarak kullanılabilen nükleik asit tabanlı yöntemler özellikle taksonomik ve filogenetik çalışmalarda tür tespiti ve ayrımı için önem taşımaktadır. Genom büyüklüğü 2,3-51,3 Mb arasında değişen bu canlılarda, rRNA, α - ve β - Tübülün genleri'nin yanında birçok özel gen bölgeleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda tür ayrımlarının doğru bir şekilde yapıldığı bildirilmiştir. Ayrıca Genbank'ta 3000 civarında kısmi ve tam SSU RNA dizilimleri erişilebilir durumdadır (4,9,17,46,98,141–143). Nükleik asit tabanlı yöntemlerin etkinliği formalin içinde kalmış örneklerde dahi görülmüştür (144). EBIEF1, EBIER1 gibi türe özgü primelerin yanında özellikle taksonomik çalışmalarda birçok türün (*Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon hellem*, *E.intestinalis*, *E.cuniculi*) rRNA bölgesini çoğaltmakta kullanılan V1 ve Micro-F gibi birçok primer tasarlanmıştır (145,146).

Nükleik asit tabanlı araştırmalar çok farklı amaçlara hizmet etmektedir. Patojenin dağılımı, klinik tanımı, taksonomik durumu, genom kaybı, protein sentez mekanizmalarına ilişkin birçok çalışma mevcuttur. Vossbrinck ve Debrunner Vossbrinck'in (147) 125 farklı mikrosporida türüne ait dizinin filogenetik analizini gerçekleştirmesi ve habitatlarına göre yorumlanması; Gill ve Fast'ın (50) *Encephalitozoon cuniculi*'de genom kaybının (azaltımı) DNA onarım mekanizmasının üzerine etkisinin araştırılması; Ashikin ve ark.'ın (58) Malezya'da belirli bir bölgede yaşayan yerlilerde parazitlenmiş olan Mikrosporidia türlerini PCR ile tanımlaması ve sıklığını raporlaması, bu farklı çalışmalara örnek olarak verilebilir.

Ülkemizde ise Özkoç ve ark. (89) iyatrojenik olarak immün sistemi baskılanmış hastalarda Mikrosporidia prevalansını araştırmak için PCR yöntemini kullanmışlardır. Usluca ve Aksoy (148) bağışıklık sistemi baskılanmış bir çocukta, mikroskop ile tanı koyulan Mikrosporidia türünü PZR ile belirlemişlerdir. Çetinkaya ve ark. (149) farklı DNA izolasyon süreçleri ile elde edilen örnekleri PCR ile karşılaştırmış ve moleküler yöntemlerin uygulanmasında izolasyon yöntemlerinin çok önemli olduğunu vurgulamıştır.

2.8.4 Hücre Kültürü

Mikrobiyolojik araştırmalarda 1930'lu yıllarda başlanan ve şimdiye kadar geliştirilmiş olan in vitro hücre kültürü metotları, hücre içi patojenlerin izolasyonunda, saflaştırılmasında ve üretilmesinde çok kullanışlıdır (150,151). Hücre kültürü ilk zamanlarda tedavi edici bileşiklerin etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmış olsa da sonradan, özellikle bu organizmaların enfeksiyon mekanizmalarını anlamada bilim camiasına önemli bilgiler sunmuştur (39,152–154).

Mikrosporidialar söz konusu olduğunda, kültürde kullanılacak hücre hatlarının Mikrosporidiaların bulunduğu doğal konak canlılarından elde edilmesine gerek yoktur (8). İnsanlarda enfeksiyon oluşturan Mikrosporidiaların bir kısmının kültürü yapılabilmektedir (*N. corneum*, *Encephalitozoon hellem*, *E.cuniculi*, *E.intestinalis*, *T. hominis* ve *V. corneae*). Fakat insan Mikrosporidia enfeksiyonlarının en önemli türlerinden olan *Enterocytozoon bienersi*'nin uzun süreli kültürü yapılamamaktadır. Özellikle *Encephalitozoon* türlerinin kültürleri için insan deri fibroblastları (HFF) ve tavşan böbreği (RK13) hücreleri çokça kullanılmaktadır (155). Hücre kültürü uygulamaları özellikle Mikrosporidiaların enfeksiyon mekanizmalarını ve gelişim evrelerini incelemek için önem arz etmektedir. (4,12,151,156). Han ve ark. (4) hücre kültürü kullanılarak Mikrosporidiaların polar tüpünün konak hücreyi enfekte etmedeki rolünü aydınlatmaları bu çalışmalara verilecek en iyi örneklerdendir.

2.8.5 Akış Sitometri (Flow Cytometry)

Bakteriyolojide geniş kullanım alanı olan Akış Sitometri Tekniği, *Plazmodium*, *Toxoplazma*, *Eimeria*, *Leishmania*, serbest yaşayan amipler, *Cryptosporidium*, *Giardia* ve *Mikrosporidia* gibi canlıları tanımlamada ve patojen

yükünü ölçmede kullanılmıştır. Tanıdan ziyade anti mikrobiyal ajanların etkisini değerlendirme amaçlı patojen yükünün ölçüldüğü çalışmalar mevcuttur (157–162).

Mikrosporidialar söz konusu olduğunda akış sitometri tekniği çalışmalarının çok az olduğu görülmektedir. Literatüre bakıldığında, *Encephalitozoon cuniculi*'nin canlılık ve yükünü belirlemek, dışkı örneklerinden *Enterocytozoon bieneusi* izole etmek, bir balıktan izole edilen Mikrosporidia sporlarının nükleik asitlerini karşılaştırmak ve 3 *Encephalitozoon* türünün ayrımını yapmak için Akış Sitometri Tekniğini kullanıldığı çalışmalar görülmektedir (158,163,164).

2.8.6 Hayvan Modelleri

Hayvan modelleri genellikle temel immün yanıt çalışmalarının yanında tanı metotlarını, aşıları ve terapötik stratejileri değerlendirmede yarar sağlamaktadır. Bunlarla birlikte mono ve poliklonal antikorların üretiminde de kullanılmaktadır. Farklı Mikrosporidia türleriyle (*Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem*, veya *Vittaforma corneae*) gerek periton içi gerekse oral yol ile enfekte edilen farklı deney hayvanlarında (fare, rat, tavşan, maymun, nematod) farklı modeller oluşturulmuştur (4,9,39,117,165–169). Bununla birlikte hayvan modellemesi olmayıp sadece Mikrosporidiaları üretmekte farklı hayvan türleri kullanılmaktadır (8,170).

Hernandez ve ark. (171) Mikrosporidia enfeksiyonlarının konak hücre döngüsüne ve hücre apoptozisine etkisini araştırmak için arılar üzerinde çalışma yapmışlardır. Moretto ve ark.(106) deneysel olarak *E. cunuculi* ile enfekte ettiği farelerde yaşa bağlı olarak mukozal dentritik hücre cevabının düştüğünü rapor etmişlerdir. Kotkova ve ark.(172) latent mikrosporidiyoz oluşturdukları farelerde, tedaviden sonra bağışıklık sisteminin baskılanması sonucunda yeniden reaktif olabileceğini bildirmişlerdir. Bağışık yanıtların anlaşılması konusunda dünya genelinde farklı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (108,109,112,115,167,173).

2.8.7 Kütle Spektrometresi (MALDI TOF MS)

Kütle spektrometresi, kimyasal bileşiklerin kütle yük oranlarını belirlemek için geliştirilmiş analitik bir tekniktir. Kütle spektrometrelerinden biri olan “Matriks İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi” *Leishmania*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Entamoeba histolytica* gibi protozoonların yanında kene ve pire gibi dış parazitlerin teşhisinde kullanılmış

ve biyolojik moleküllerin analizinde çok uygun bir metot olduğu görülmüş, hem uygulama hem de maliyeti açısından diğer yöntemlerden avantajlı olduğu bildirilmiştir (174–179).

İnsan patojeni Mikrosporidia teşhisi için MALDI-TOF yöntemi günümüzde pek kullanılmıyor olsa da, Moura ve ark. (180) bu teknik ile *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon intestinalis* ve *Brachiola algerae* türlerini birbirinden ayırt etmeyi başarmışlardır. Bu çalışmada bütün sporu, spor duvarını ve çözülebilir maddelerini (fraksiyonlar) herhangi bir saflaştırma basamağı olmadan doğrudan MALDI plakasının üzerine uygulamışlardır. İşlem sonucunda ise bütün spor ve çözülebilir madde analizlerinin bahsi geçen 4 türü birbirinden ayırdığı raporlanmıştır. Sonucunda, bütün bir organizma için MALDI-TOF analizinin hızlı, duyarlı ve güvenilir olduğunun ve bununla birlikte farklı parazitoloji uygulamalarında kullanılma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.

2.9 Tedavi

Mikrosporidiaların hücre içi parazit olması hastanın etkenden temizlenmesini güçleştirmektedir. Tübülini (β -tubulin) inhibe eden albendazol ve metiyonin aminopeptidazı tip 2'yi (MetAP2) inhibe eden fumagilin mikrosporidiyoz tedavisindeki en temel 2 ilaçlar olmakla birlikte sitotoksik etkisi en az olan bileşiklerdir. Albendazolun, *Encephalitozoon* türleri için etkili olduğu bilinmektedir, ancak *Enterocytozoon bienersi*'ye karşı etkinliği yoktur. Fumagilin ise *Enterocytozoon bienersi* ve *Encephalitozoon* türlerine karşı etkisi olduğu raporlanmıştır fakat toksik etkisi fazla ve birçok ülkede ticari olarak bulunmamaktadır (153,181–184). İnsan sağlığını tehdit etmesinin yanında, Mikrosporidiaların ekonomik değeri olan böceklerde ve sucul canlılarda da ciddi enfeksiyonlara sebep olmuş ve dünya genelinde ekonomik kayıplara neden olmuştur. Bundan dolayı yıllar içerisinde, Mikrosporidiyoz tedavisi için çeşitli deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir (9,54,182,185,186).

Mikrosporidialarda metionin aminopeptidaz tip 1 (MetAP1) yoktur ve bu nedenle MetAP2'ye bağımlıdır, ancak memeli hücrelerinin her iki enzimi de vardır (48). MetAP2'ler yeni oluşmuş proteinlerden N-terminal metiyonin artıklarının hidrolitik olarak uzaklaştırılmasını katalize eden bir sitosolik metaloenzimdir. Bu nedenle Mikrosporidialarda tek olarak bulunan MetAP2 hayati bir enzimdir ve bu yolun yeni inhibitörlerinin, terapötik ajanlar olarak kullanılması ilgi çekmektedir

(187,188). *Encephalitozoon cuniculi*'nin glikoliz reaksiyonunda önemli rol oynayan triosefosfat izomeraz (TIM), yakın zamanda anti-Mikrosporidia ilaç tasarımı için kullanılmaya başlayan yeni bir hedeftir. TIM sistein (Cys) kalıntıların üç farklı sülfhidril reaktifi ile modifikasyonu Mikrosporidian TIM'i inaktive edebileceği fakat insanlara ya hiç ya da biraz olumsuz etki gösterebileceği raporlanmıştır (53).

Memeli hücrelerinde bulunmayan kitin, Mikrosporidiaların spor duvarının yapısını korumak için önemlidir. Bu durum, kitin sentazın mikrosporidyoz için terapötik ajanların geliştirilmesinde dikkat çeken bir hedef olarak göze çarpmaktadır. Nikkomisin, polioksinler ve lufenuron gibi kitin sentaz inhibitörlerinin spor replikasyonunu inhibe ettiği ve spor morfolojisini bozduğu in vitro olarak gösterilmiştir (189–191).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Düzce Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine gelen gaita örnekleri Mikrosporidia türleri açısından araştırılmış ve değerlendirilmiştir. Düzce'den 212, Bolu'dan 188 olmak üzere toplamda 400 örnek çalışılmıştır. Çalışmaya dahil edilen örnekler toplum içindeki gerçek prevelansı yansıtmaması için özellikli hasta gözetmeksizin farklı polikliniklerden temin edilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce Düzce Üniversitesi Girişimsel Olmayan Sağlık Araştırmaları Etik Kurulu'na başvuru yapılmış ve 2019/41 nolu 16.12.2019 tarihli kararda onay alınmıştır. Çalışma için gerekli olan bütçe Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından sağlanmıştır (2020.04.01.1106 nolu proje). Ayrıca DNA dizi analizi için TUBİTAK 1002-B Hızlı Destek Modülüne sunulan 222S708 Nolu proje önerisi ile desteklenmiştir.

Temin edilen örnekler ilk olarak mikroskopik ve moleküler incelemelerde kullanılmak üzere ikiye ayrılmıştır. Mikroskobik yöntemler için ayrılan her bir örneğe çöktürme yöntemi uygulanmış, modifiye trikrom boyama yapılmış ve incelenmiştir. Moleküler yöntemler için ayrılmış örneklerde ilk olarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrasında örneklerde PZR gerçekleştirilmiş ve pozitifliği tespit etmek amacıyla jel elektroforez yapılmıştır. (Şekil 3-1). Ayrıca Kayseri Erciyes Üniversitesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ülfet ÇETİNKAYA pozitif Kontrol konusunda yardımcı olmuştur.

Epidemiyolojik bir çalışma olan bu araştırma için örneklem sayısı, örnek uzayındaki birey sayısının bilinmesi sebebiyle aşağıdaki formül ve değerler kullanılarak hesaplanmıştır. Araştırılan durumun görülme sıklığının 0,5 olarak alınmasının sebebi, ülkemiz genelinde yapılan çalışmalarda insan patojeni Mikrosporidia yaygınlığının belirgin olmamasıdır.

$$n = \frac{N * t^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + (t^2 * p * q)}$$

n: Örneklem sayısı.

N: Örnek uzayındaki birey sayısı

p: Araştırılan durumun görülme sıklığı (0,5 olarak kabul edilmiştir).

q: (1-p), araştırılan durumun görülmemesi sıklığı (0,5 olarak hesaplanmıştır).

t: Belirli bir anlamlılık düzeyinde, t tablosuna göre bulunan teorik değer (%95 güven seviyesinde 1,96'dır).

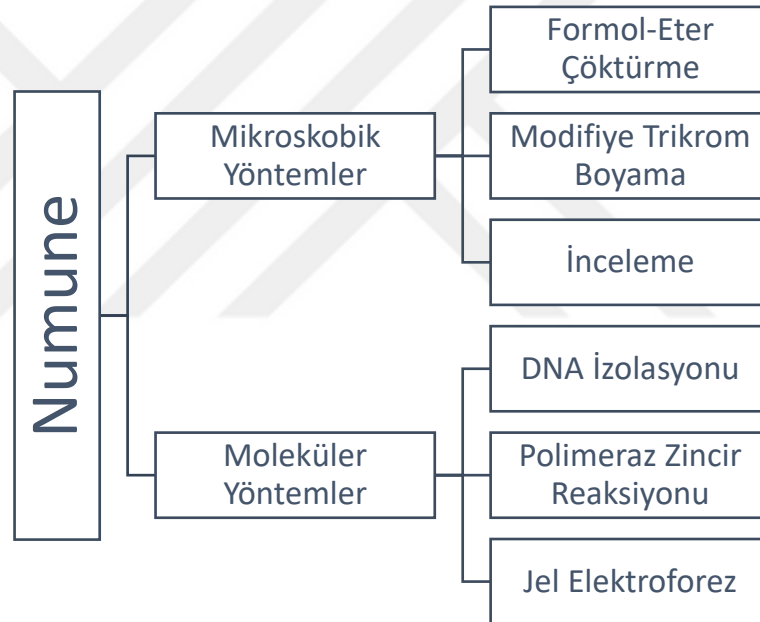
d: Olayın görülüş sıklığına göre kabul edilen örnekleme hatasıdır (0,05 olarak kabul edilmiştir).

Bolu ve Düzce illeri popülasyonu toplam yaklaşık 700 000 olarak ele alındığında, %5 yanılma payı ve %95 güven düzeyinde çalışmaya dahil edilmesi gereken örnek sayısı 384 olarak hesaplanmıştır.

Bolu'dan alınacak örnek sayısı: $384 \times 311810 / 700000 = 172$

Düzce'den alınacak örnek sayısı: $384 \times 387844 / 700000 = 212$

Temin edilen DNA izolasyon kiti 400 örneklik olması sayesinde oransal olarak örnek alımı yeninde hesaplanmış ve Bolu için 188, Düzce için 212 örnek dahil edilmiştir.



Şekil 3.1. İş Akış Şeması

3.1 Mikroskopik Yöntemler

Doğrudan yayma ile incelendiğinde gözden kaçabilen seyrek miktardaki helmint yumurtaları ve protozoon kist ve ookistleri dışkının yoğunlaştırılmasıyla daha kolay saptanabilmektedir. Yoğunlaştırma yöntemlerini başlıca çöktürme ve yüzdürme olarak ikiye ayırabiliriz. Çöktürme santrifüj yada suyun kaldırma kuvveti etkisiyle sağlanabilmektedir. Çökeltinin dışkıda yer alan parazitlere ait tüm yapıları içermesi açısından çöktürme yöntemi yüzdürme yöntemlerine göre avantajlı gözükmetedir. Tabi çökeltide fazlaca dışkı artığının bulunması ise en

önemli dezavantajdır. Bu sebeple çöktürme yöntemlerinde dışkıdaki yağın çözünmesini ve artıkların azaltılmasını sağlamak için eter, etil asetat ve ksilen gibi kimyasallar kullanılmaktadır.

3.1.1 Formol-Eter Çöktürme Yöntemi

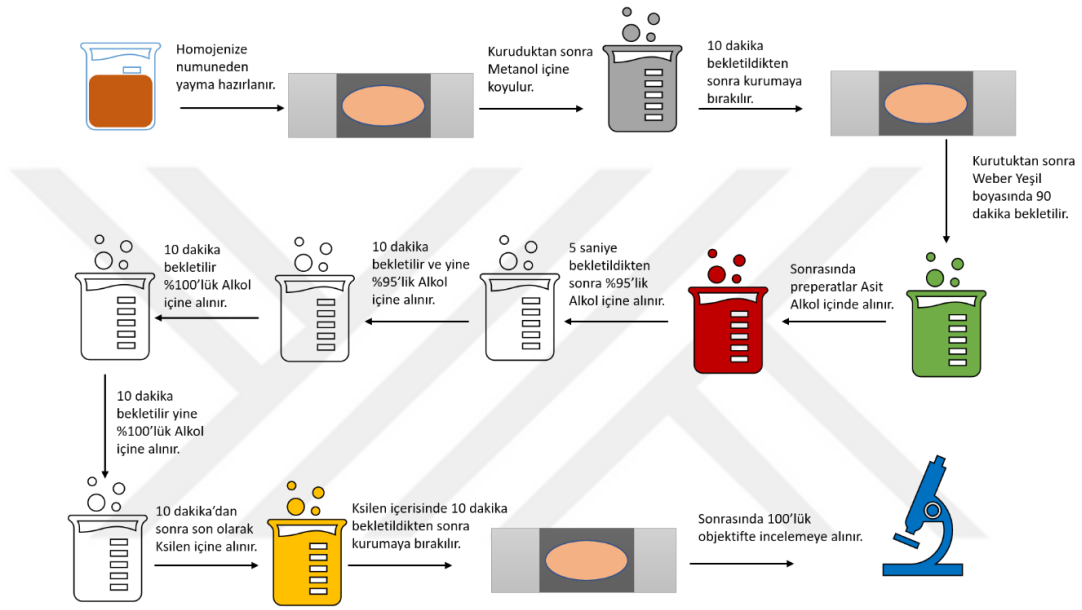
Mikrosporidia gibi teşhis edilmesi zor olan patojenlerin mikroskopik incelemeler öncesinde yoğunlaştırma yöntemlerine tabi tutulması görülme oranları arttırmaktadır. Bu çalışmada yoğunlaştırma yöntemlerinden biri olan formol-eter yöntemi uygulanmıştır (Şekil 3-2).

Formol-eter çöktürme yönteminin basamakları;

- 1-1,5 gram taze dışkıya 10 ml %10'luk formol eklenir, karıştırılır ve 30 dakika bekletilir. Eğer dışkı sıvı ise 5-6 ml dışkı koymak yeterlidir.
- Süspansiyon 2 katlı gazlı bezden geçirilerek 15 ml'lik konik santrifüj tüpüne aktarılır.
- Süzölmüş olan çözelti içerisine serum fizyolojik ekledi ve 15 ml'ye tamamlanır.
- Çözelti 400-500X g'de 2 dakika kadar santrifüj edilir. Uygulama sonrasında üsteki sıvı kısım bulanık ise bu sıvı döküler, çökeltinin üzerine serum fizyolojik eklenir, karıştırılır ve yeniden santrifüj edilir.
- Berraklaşan su dökülür ve dipte kalan çökeltiye birkaç ml %10'luk formol eklenir ve tüp çalkalanır. Sonrasında toplam hacim 10 ml olana kadar formol eklenir.
- Çözeltiye 3 ml etil asetat ya da eter eklenir. Tüpün ağzı kapatılarak çalkalanır. Hava yapabileceği için tıpa patlayabilir o yüzden çalkalarken birkaç kez hava alması sağlanır.
- Oluşan çözelti 400-500X g'de 2-3 dakika santrifüj edilir. Üstte oluşan dışkı tıkaçı olarak isimlendirilen sıvı tabakalar dökülür. Kenarda kalan bir miktar sıvı çökelti içine akar. Çökelti ile bu az miktardaki sıvı karıştırılır.
- Çökelti hala katı ise az miktarda serum fizyolojik eklenerek karıştırılır ve vortekslenerek çalkalanır.
- İncelemek ya da boyamak için preparat hazırlanır.

sonrasında yaklaşık 5 saniye kadar Asit Alkol çözeltisi içerisinde bekletilmiştir.

- Sonrasında %95'lik etanolde iki kez 10'ar dakika bekletildi ve ardından iki kez %100'lük etanolde 10'ar dakika bekletilmiştir.
- Son basamak olarak da Ksilende 10 dakika bekletilen örnekler kurumaya bırakılmıştır.
- Kuruyan örnekler immersiyeon yağı ile ışık mikroskopunda 100'lük objektifte inceleme yapılmıştır.



Şekil 3.3. Modifiye Weber Trikróm Boyama Basamakları

3.2 Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler DNA izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Jel Elektroforezi olmak üzere 3 basamaktan oluşmaktadır.

3.2.1 DNA izolasyonu

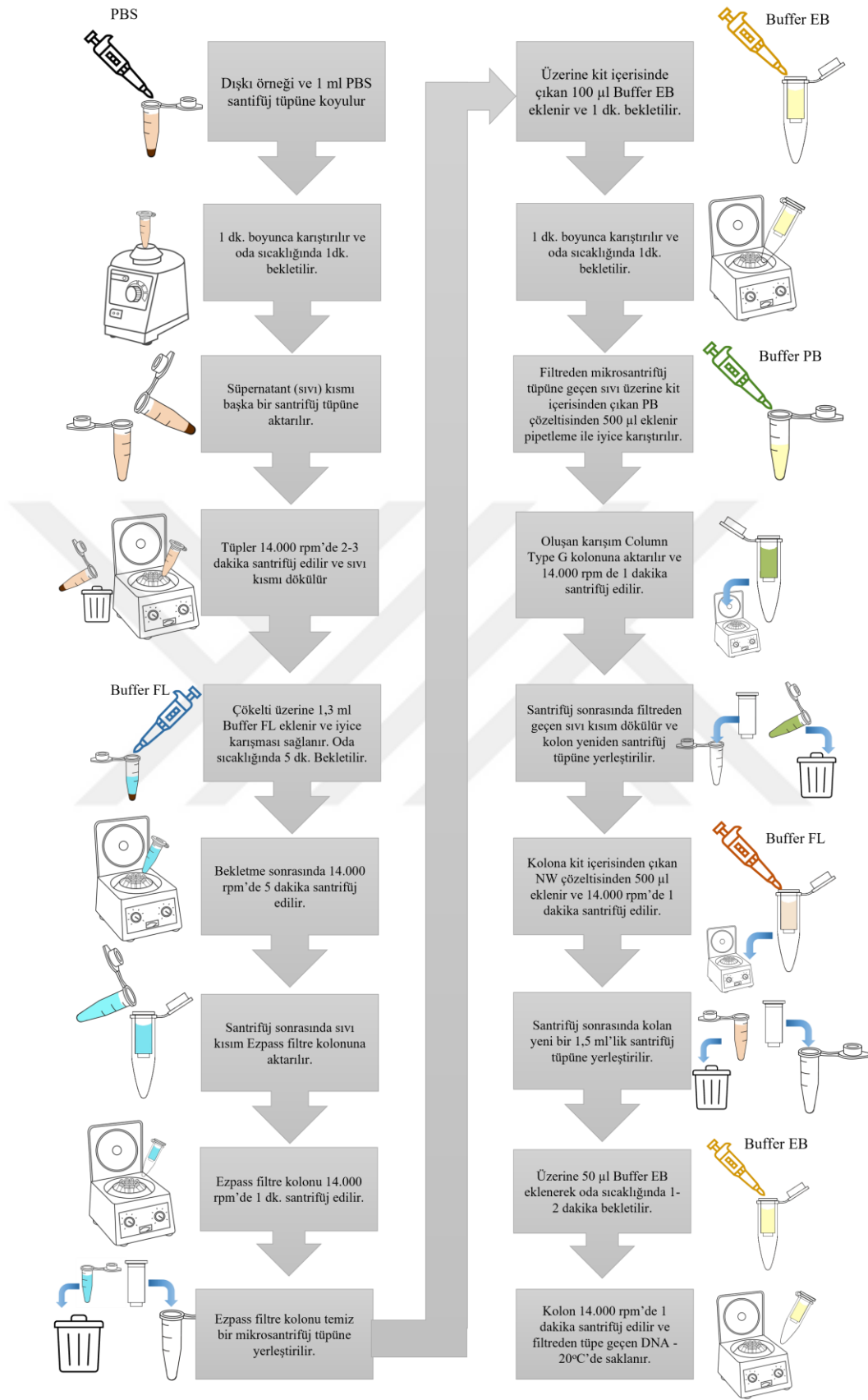
DNA izolasyonu GeneAll üretici firmanın “Stool DNA minikit” isimli kiti ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen toplam DNA örnekleri PZR gerçekleştirilene kadar – 20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Örneklerden DNA izole etmeden önce Doç. Dr. Ülfet ÇETİNKAYA’dan temin edilen *Encephalitozoon intestinalis* örneğinde (pozitif kontrol) DNA izolasyonu kiti denenmiştir.

DNA izolasyonu basamakları;

- Kit içerisinde mevcut olan 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 200 mg dışkı örneği koyulur.
- Üzerine 1 ml PBS çözeltisi eklenir ve 1 dakika boyunca vorteklenerek homojen olarak karışması sağlanır.
- Tüpler oda sıcaklığında 1 dakika kadar bekletilir.
- Süpernatant kısmı 2 ml'lik başka bir santrifüj tüpüne aktarılır.
- Bu yeni tüpler 14.000 rpm'de 2-3 dakika santrifüj edilir ve sonrasında süpernatant kısmı dökülür.
- Tüpün dibindeki çökelti üzerine kit içerisinde çıkan Buffer FL çözeltisinden 0,65 ml eklenir ve karışması için 1 dakika kadar vorteklenir.
- Karışımın üzerine yeniden 0,65 ml Buffer FL eklenir ve yeniden vorteklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Bekleme süresi sonunda tüpler 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrasında supernatant kısmı, kitin içerisinde çıkan "Ezpass Filter (Beyaz)" olarak isimlendirilen kolona dökülür.
- Ezpass kolonu 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Toplam hacim (1,3 ml) Ezpass kolonuna sığmadığı için bu işlem her bir örnek için iki kere tekrarlanır.
- Ezpass Filter kolonu 1,5 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirilir.
- Üzerine kit içerisinde çıkan Buffer EB çözeltisinden 100 µl eklenir ve 1 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilir.
- Bekletilen tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Ezpass Filter kolonu 1,5 ml'lik santrifüj tüpünden çıkartılır ve santrifüj neticesinde filtreden geçen tüpün içerisinde olan sıvıya kit içerisinde çıkan Buffer PB çözeltisinden 500 µl eklenir ve pipetleme ile karışması sağlanır.
- Oluşan karışım kitin içerisinde çıkan "Column Type G (Yeşil)" kolonuna nakledilir.
- Yeşil kolon 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrasında filtreden geçen süpernatant kısmı dökülür ve kolon yeniden tüpe yerleştirilir.

- Yeşil kolona kit içerisinde çıkan Buffer NW isimli çözeltiden 500 µl eklenir ve 14.000 rpm’de santrifüj edilir.
- Yine filtreden geçen supernatant dökülür ve kolon tüpe yeniden yerleştirilir.
- Kalan yıkama çözeltisinden tamamen arınması için kolon yeniden en yüksek hızda santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrasında kolon yeni bir 1,5 ml’lik santrifüj tüpüne yerleştirilir ve üzerine kit içerisinde çıkan Buffer EB’den 50 µl eklenir. 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
- Kolonlar 14.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir ve filtreden santrifüj tüpüne geçen saflaştırılmış DNA, PZR için -20’de bekletilir.



Şekil 3.4. DNA izolasyon Basamakları

3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonunda insanlarda en sık enfeksiyon oluşturan 4 türün (*Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *E.cuniculi* ve *E. hellem*) küçük alt ünite (SSU) rRNA bölgesini hedef alan C1 ve C2 isimli primerler kullanılmıştır (Tablo 3.1). Seçilen gen bölgesinin evrensel olması sebebiyle, çoklu reaksiyonların bertarafı ve türlerin ayrımı için ayrıca türlere özgü primerler tasarlanmış ve reaksiyonlarda kullanılmıştır. EBIEF1 ve EBIER primerleri *Enterocytozoon bieneusi* türü için EIMCF ve EIMCR primerleri *Encephalitozoon* türleri için kullanılmıştır. Örneklerden izole edilen DNA'lar çalışılmadan önce pozitif kontrol olarak elimizde bulunan *Encephalitozoon intestinalis* DNA'sı PZR ile çalışılmış ve jel elektroforezinde 1200-1300 baz çiftlik bantlar görülmüştür. Son hacim 50µl olacak biçimde hesaplanmış ve reaksiyon çözeltileri Tablo 3.2.'deki gibi eklenmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Primerler

Primerler	Baz Dizilişi
C1 (Forward)	5'-CACCAGGTTGATTCTGCC-3'
C2 (Reverse)	5'-GTGACGGGCGGTGTGTAC-3'
EBIEF1 (Forward)	5'-GAAACTTGTCCACTCCTTACG-3'
EBIER1 (Reverse)	5'-CCATGCACCACTCCTGCCATT-3'
EIMCF(Forward)	5'-GTCTATGGTGAATGCTGCAGTT-3'
EIMCR (Reverse)	5'-ATTCGATCCTCTAGCCTTCGT-3'

Tablo 3.2. Reaksiyon Çözeltileri

Çözelti İsimleri	Miktar
PZR Master Mix (Taq Polimeraz, MgCl ₂ , dNTP)	25 µl
Forward primer	5 µl
Reverse primer	5 µl
RNase'dan arındırılmış su	12,5 µl
İzole edilmiş taslak DNA	2,5 µl

Polimeraz zincir reaksiyonu için "BİO-RAD T100 Thermal Cycler" cihazı kullanılmıştır. PZR Isı-Döngü Cihazı ile DNA'nın 94°C'de 5 dakika denatürasyonu ile başlatılmıştır ve 35 döngü olacak şekilde programlanmıştır. Her döngüde 94°C'de 1 dakika çift DNA zincirin ayrılması (denatürasyon), 56°C'de 1 dakika primerin taslak DNA ile birleşmesi (annealing) ve 72°C'de 1 dakika dizinin uzaması (elongasyon) işlemleri gerçekleştirilmiş ve 30 döngüden sonra 72°C'de 5 dakika

son uzatma ile reaksiyon sonlandırılmıştır (192). Amplifiye edilen ürünler, agaroz jel üzerinde elektroforetik olarak analiz edildi ve Gelred nükleik asit boyası ile boyandı ve bantların varlığı UV ışık altında saptandı.

3.2.3 Jel Elektroforez

DNA gibi yüklü molekülleri elektrik akımı yardımıyla boyutlarına göre ayırmamızı sağlayan bu yöntemin basamakları aşağıdaki gibi yapılmıştır.

%1'lik jelin hazırlanması;

- 0,3 gram toz agaroz tartılır.
- 30 ml Tris EDTA Tampon (TAE) çözeltisi ile karıştırılır.
- Agarozun erimesi için mikrodalgada yeterince ısıtılır.
- Erimiş çözelti bir döküm tepsisine dökülür ve PZR ürününün içerisine pipetlenmesini sağlayacak kuyuların oluşması için tarak yerleştirilir.
- Jel katılaştıktan sonra (opak bir görünüm alacaktır) tarak çıkarılır.
- Katılaşmış jel bir elektroforez tankına yerleştirilir ve tank jelin yüzeyi tamponla kaplanana kadar TAE ile doldurulur.

PZR ürününün jel kuyularına yüklenmesi;

- Numunelerin kuyucuklardan çıkmasını önlemek ve jel içerisindeki hareketini görebilmek için, PZR ürünleri yüklenmeden önce özel boya ile karıştırılır.
- Yüklemeden önce jelin pozitif ve negative elektrotlarının yönü kontrol edilir. Ürünlerin negative uçtan pozitif uca göç etmesi gerekmektedir.
- İlk kuyucuğa bir DNA merdiveni (marker) ya da pozitif kontrol, diğer kuyucuklara ise PZR ürünleri mikropipet yardımıyla yüklenir.

Elektroforezin başlatılması ve jelin görüntülenmesi;

- Bu işlemler sonrasında elektroforez tankının kapağı kapatılır ve 100 voltta 30 dakika yürütme işlemi başlatılır.
- Yürütme işlemi bittikten sonra 100 ml TAE tampon bulunan bir kaba 2,5 µl etidyum bromid eklenir ve jel bu çözeltinin içerisinde otomatik çalkalayıcı yardımıyla 10 dakika kadar bekletilir. Etidyum bromid nükleik asit yapılarına bağlanarak jelde saptanmasını sağlayan floresan bir boyadır.

- Jel UV ışık altında incelenir.

3.3 İstatistiksel Yöntemler

Verilerin istatistiksel analizleri için SPSS programından faydalanılmıştır. Mikrosporidia dağılımının yaş, cinsiyet ve şikayet ile ilişkisi Ki-Kare analiziyle gerçekleştirildi. Duyarlılık ve özgüllük analizi için Kappa testi kullanılmıştır. “p” değeri 0,05’ten küçük olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.



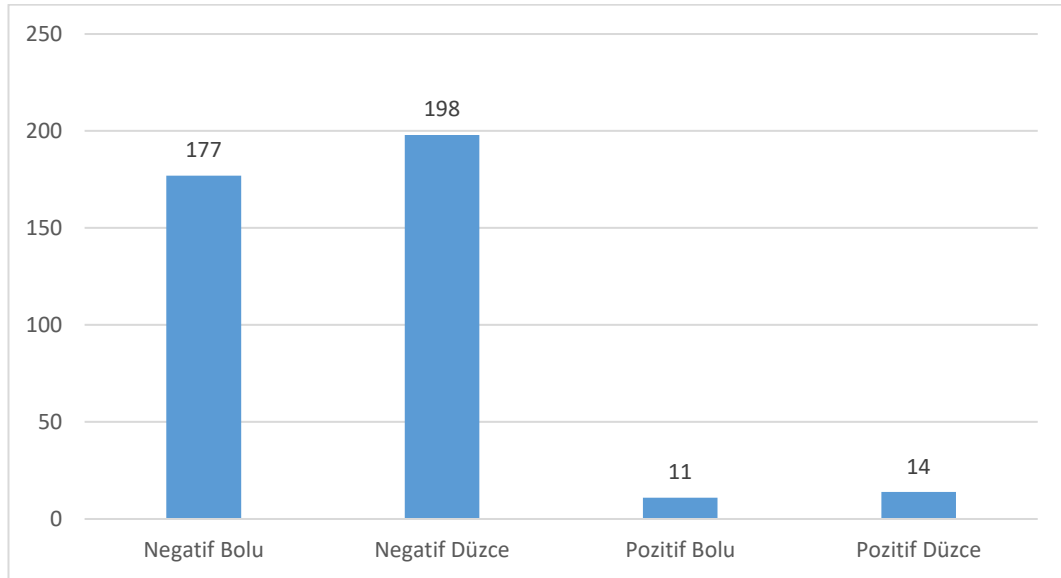
4. BULGULAR

4.1 Mikroskopik Bulgular

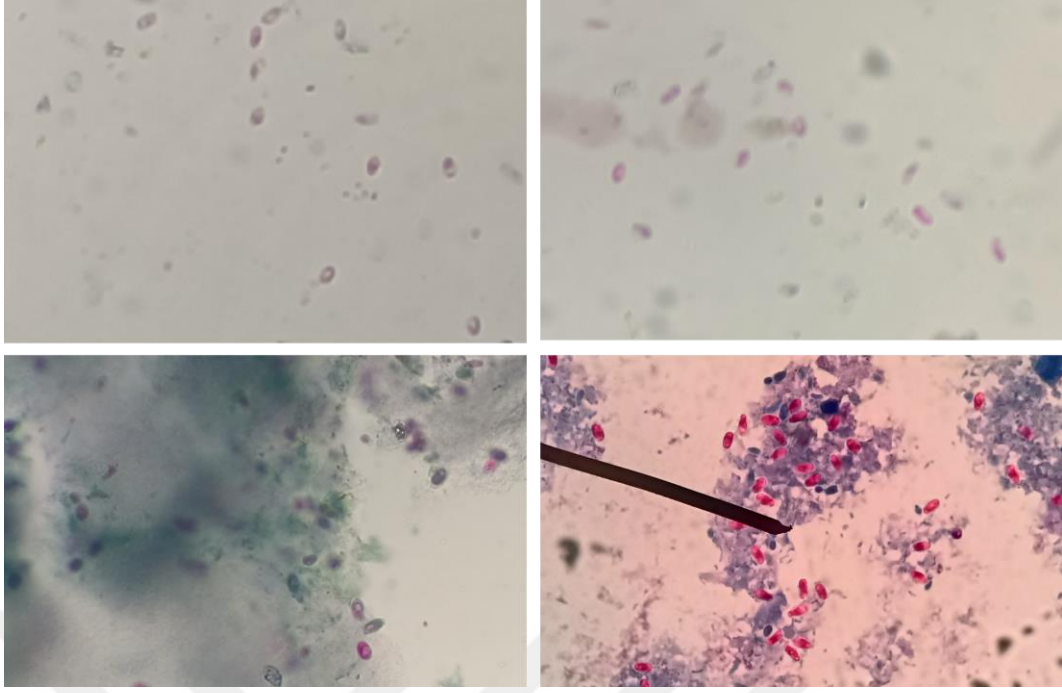
Bu çalışmada Bolu ve Düzce'den toplanan çöktürme (yoğunlaştırma) yöntemi uygulanmış ve boyamada altın standart olarak kullanılan Modifiye Trikróm Boya (MTS) ile boyanmıştır. Boyama sonrasında incelenen 400 örnekten 25'inde (%6,25) Mikropsoridia türlerine ait sporlar tespit edilmiştir. İl bazında değerlendirildiğinde oranların birbirinden pek farklı olmadığı görülmüştür. Düzce'den toplanan 212 adet gaita örneğinden 14'ünde (%6,6), Bolu'dan toplanan 188 adet gaita örneğinden 11'inde (%5,8) Mikropsoridia türlerine ait sporlar gözlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. MTS Yöntemi ile Mikroskopik Mikropsoridia Bulguları

Mikropsoridia	Bolu		Düzce		Toplam	
	N	%	N	%	N	%
Pozitif	11	%5,8	14	%6,6	25	%6,25
Negatif	177	%94,2	198	%93,4	375	%93,75
Toplam	188	%100	212	%100	400	%100



Şekil 4.1. İllere Göre Mikroskopik İnceleme Sonuçları



Fotoğraf 4.1. MTS ile Boyanmış Mikrosporidia Sporları (100x)

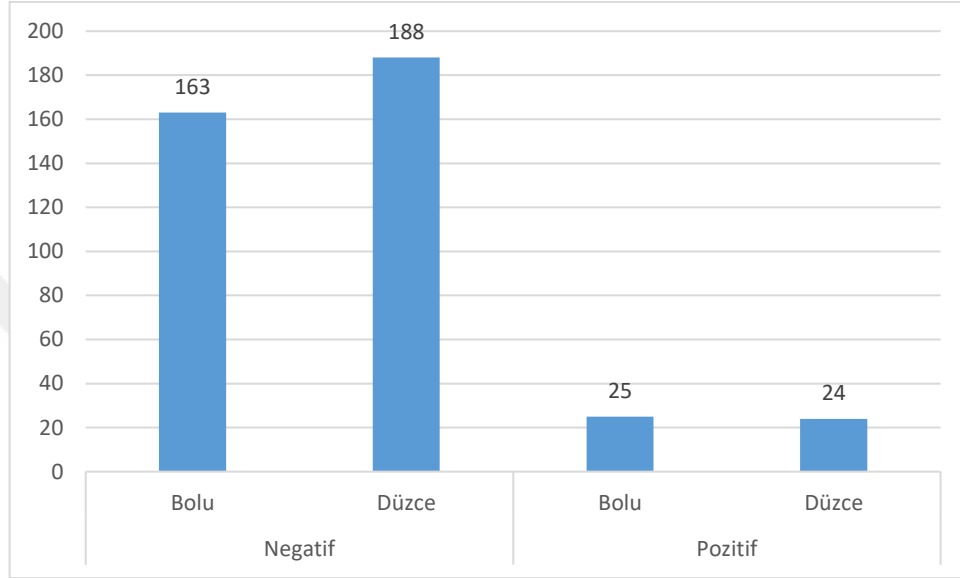
4.2 Moleküler Bulgular

Mikroskobik inceleme yapılan bütün örnekler moleküler yönden de değerlendirilmiştir. Temin edilen gaita örneklerinden kit yardımıyla toplam DNA izole edilmiştir. Bu metodun akabinde insanlarda enfeksiyon oluşturan türlerin SSU rRNA bölgesinin hedef alan primerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca türlerin ayrımının sağlanması için tür özel primerleri ile yeniden PZR yapılmıştır. PZR sonucunda Mikrosporidia türlerinin varlığı jel elektroforez ile bantların varlığına bakılarak tespit edilmiştir.

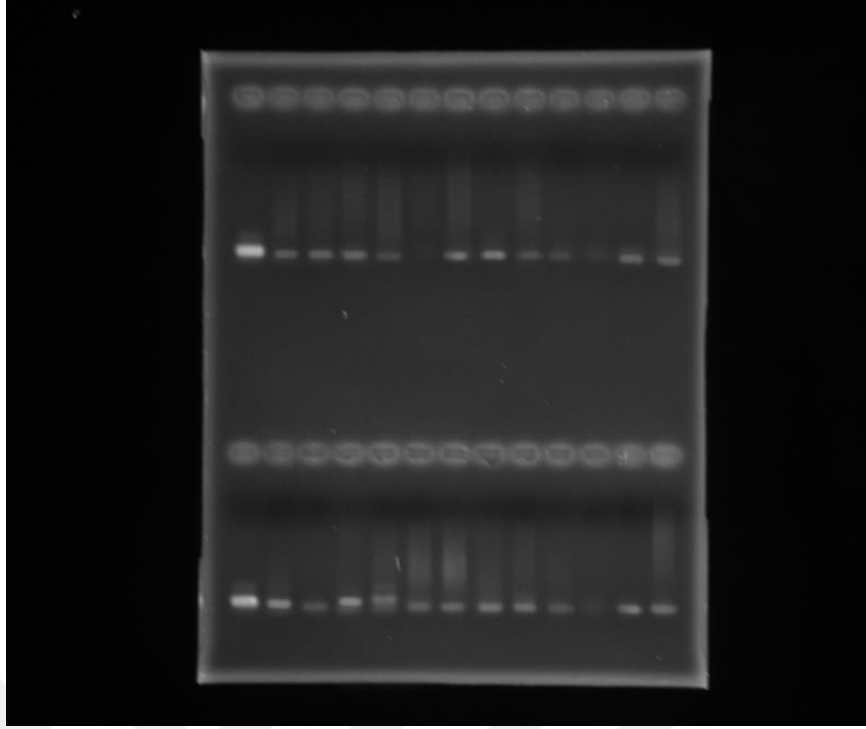
Jel elektroforez sonucunda bant görülen örnek sayısı 49 olarak tespit edilmiştir. Toplam olarak değerlendirildiğinde %12,25 olduğu görülmektedir. İl bazında bakıldığında yine benzer oranların tespit edildiği görülmüştür. Düzce'den toplanan 212 gaita örneğinden 24 tanesinde (%11,3), Bolu'dan toplanan 188 gaita örneğinden 25 tanesinde (%13,3) bant görülmüş ve pozitif olarak yorumlanmıştır (Tablo 4.2). Tür özel primerlerle gerçekleştirilen PZR analizi ve jel elektroforez sonucunda yalnızca *Enterocytozoon bieneusi* türü için seçilmiş primerlerde bantlar görülmüştür. Bu sebeple, bütün pozitif örneklerdeki patojen türü *E.bieneusi* olarak yorumlanmıştır.

Tablo 4.2. Elektroforez’de Mikrosporidia Türleri için Bant Görülen/Görülmeyen Örnek Sayıları

Mikrosporidia	Bolu		Düzce		Toplam	
	N	%	N	%	N	%
Görüldü	25	%13,3	24	%11,3	49	%12,5
Görülmedi	163	%86,7	188	%88,7	351	%87,5
Toplam	188	%100	212	%100	400	%100



Şekil 4.2. Jel Elektroforez Sonucunda Tespit Edilen Mikrosporidia Türlerinin İl Bazında Sayısı



Fotoğraf 4.2. Jel Elektroforezde Bantların Görüntüsü

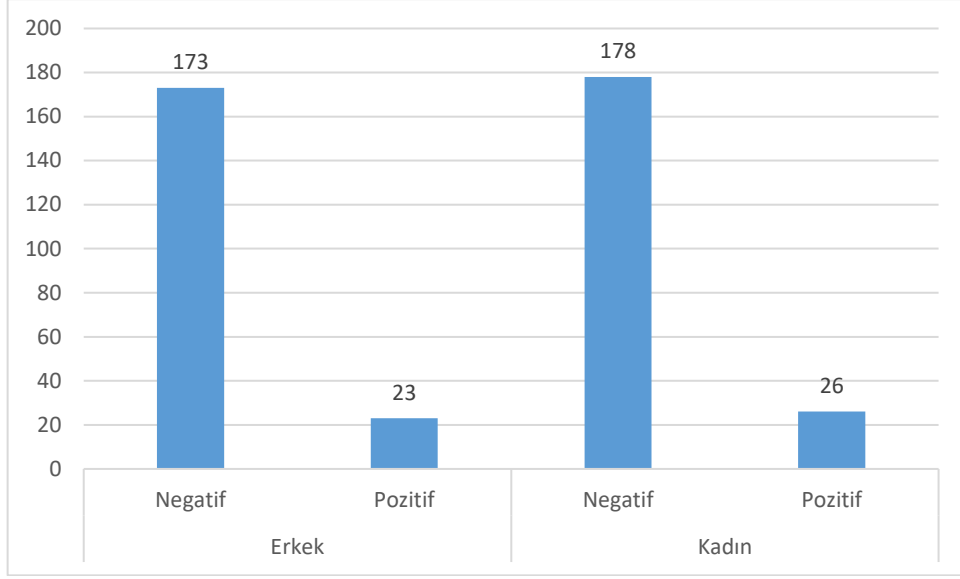
4.3 İstatistiksel Bulgular

Bu çalışmada Bolu ve Düzce İllerinden alınan ve incelenen 400 adet örnek için Mikrosporidia dağılımının cinsiyet, yaş ve ishal durumu ile ilişkileri incelenmiştir. Bu ilişkiler incelenirken moleküler analizlerin daha güvenilir sonuç vermesi sebebiyle PZR sonucunda elde edilen veriler kullanılmıştır.

Kadınlardan temin edilen 204 örnekten 26 (%12,7) tanesinin Mikrosporidia pozitif olduğu görülürken, erkeklerde 196 örnekten 23 (%11,7) tanesi pozitif olarak tespit edilmiştir. Yapılan Ki Kare analizi sonucunda kadınlar ve erkekler arasında Mikrosporidia sıklığı açısından istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p=0,439$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Mikrosporidia varlığı ile Cinsiyet Çapraz Tablosu

		Mikrosporidia					
		Negatif		Pozitif		Toplam	
		N	%	N	%	N	%
Cinsiyet	Kadın	178	%87,3	26	%12,7	204	%100
	Erkek	173	%88,3	23	%11,7	196	%100
Toplam		351	%87,8	49	%12,3	400	%100



Şekil 4.3. Mikrosporidia Varlığının Cinsiyete Göre Dağılım

Ayrıca Cinsiyet-Mikrosporidia ilişkisi her iki il için değerlendirilmiştir. Bolu ilinde kadınlardan temin edilen 86 örneğin 10'unda (%11,6), erkeklerden elde edilen 102 örneğin 15'inde (%14,7) Mikrosporidia tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Düzce ilinde kadınlardan alınan 118 örneğin 15'inde (%11,6), erkeklerden alınan 94 örneğin 9'unda (%14,7) Mikrosporidia tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Oranlara bakıldığında erkeklerde Mikrosporidia varlığının yüksek olduğu görülmekle birlikte, analiz sonucunda Bolu ve Düzce illerindeki kadın ve erkekler arasında Mikrosporidia sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p=0,345$ ve $p=0,311$).

Tablo 4.4. Bolu İli Mikrosporidia-Cinsiyet Çapraz Tablosu

		Mikrosporidia					
		Negatif		Pozitif		Toplam	
		N	%	N	%	N	%
Cinsiyet	Kadın	76	%88,4	10	%11,6	86	%100
	Erkek	87	%85,3	15	%14,7	102	%100
Toplam		163	%86,7	25	%13,3	188	%100

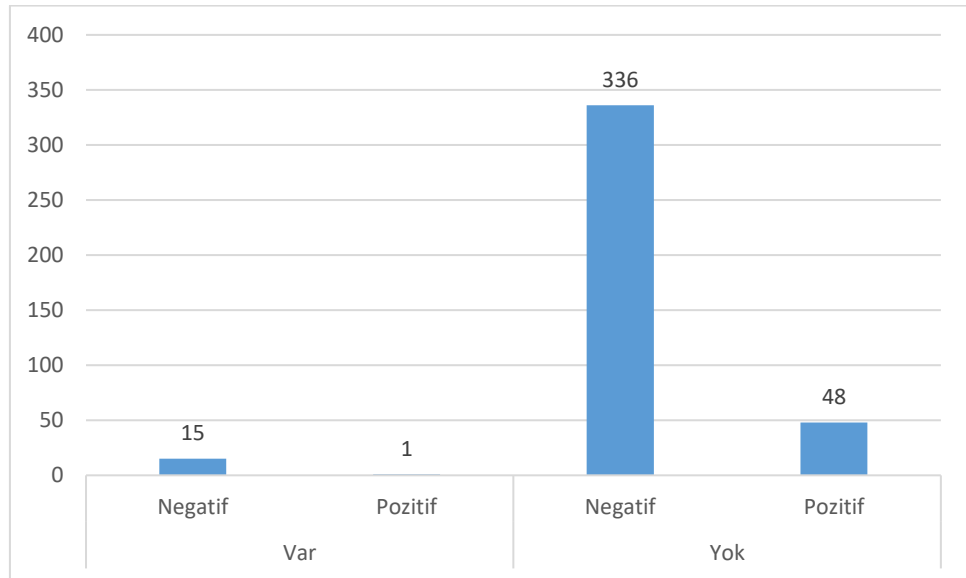
Tablo 4.5. Düzce İli Mikrosporidia-Cinsiyet Çapraz Tablosu

		Mikrosporidia					
		Negatif		Pozitif		Toplam	
		N	%	N	%	N	%
Cinsiyet	Kadın	103	%88,4	15	%11,6	118	%100
	Erkek	85	%85,3	9	%14,7	94	%100
Toplam		188	%86,7	24	%13,3	212	%100

İncelenen 400 örnekten 16'sında ishal durumu gözlenmiştir. İshalli 16 örnekten 1 tanesinde (%6,3) Mikrosporidia tespit edilirken, ishali olmayan 384 örnekten 48 tanesinde (%12,5) Mikrosporidia tespit edilmiştir. İshalli olmayan örneklerde Mikrosporidia oranının daha fazla olduğu görülmüştür. Yapılan Ki Kare analizi sonucunda ishali olan ve olmayan kişiler arasındaki Mikrosporidia oran farklılıklarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=0,705$) (Tablo4.6).

Tablo 4.6. Mikrosporidia Varlığı ile İshal Durumu Çapraz Tablosu

		Mikrosporidia					
		Negatif		Pozitif			
		N	%	N	%	N	%
İshal	Yok	336	%87,5	48	%12,5	384	%100
	Var	15	%93,8	1	%6,3	16	%100
Toplam		351	%87,8	49	%12,3	400	%100

**Şekil 4.4.** İshal Durumuna Göre Mikrosporidia Varlığı

Bolu ilindeki ishalleri 7 örneğin 1'inde (%14,3), ishalleri olmayan 181 örneğin ise 24 'ünde (%13,3) Mikrosporidia tespit edilmiştir (Tablo 4.7). Düzce ilindeki 9 ishalleri örnekten hiç birinde Mikrosporidia tespit edilmezken, ishalleri olmayan 203 örnekten 24 tanesinde (%11,8) Mikrosporidia tespit edilmiştir (Tablo 4.8). Yapılan Ki Kare analizi sonucunda iki ildeki ishalleri ve ishalleri olmayan örneklerdeki Mikrosporidia görülme oranları arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Bolu $p=0,638$ ve Düzce $p=0,332$).

Tablo 4.7. Bolu İli Mikrosporidia Varlığı ile İshal Durumu Çapraz Tablosu

		Mikrosporidia				Toplam	
		Negatif		Pozitif			
		N	%	N	%	N	%
İshal	Yok	157	%86,7	24	%13,3	181	%100
	Var	6	%87,5	1	%14,3	7	%100
Toplam		163	%86,7	25	%13,3	188	%100

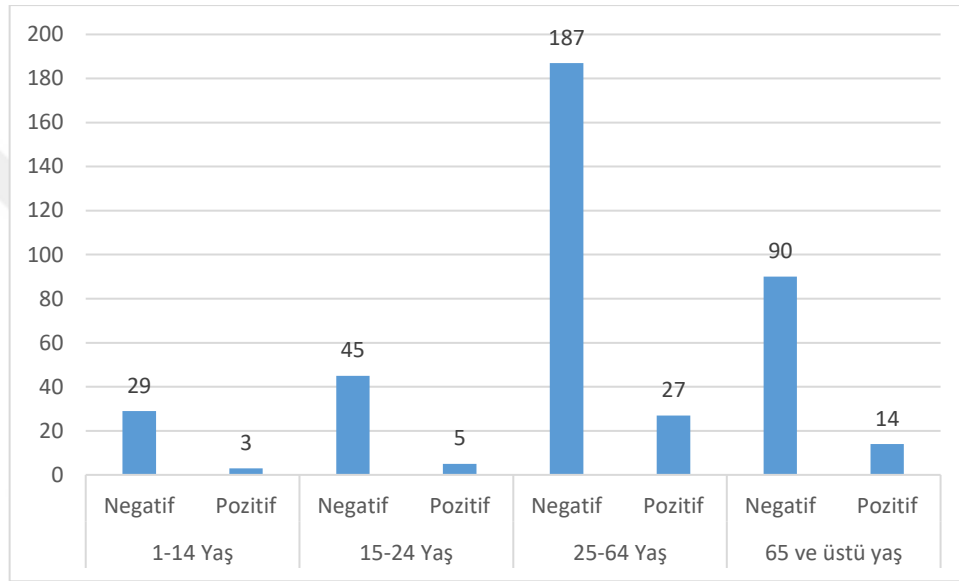
Tablo 4.8. Düzce İli Mikrosporidia Varlığı ile İshal Durumu Çapraz Tablosu

		Mikrosporidia					
		Negatif		Pozitif		Toplam	
		N	%	N	%	N	%
İshal	Yok	179	%88,2	24	%11,8	203	%100
	Var	9	%100	0	%0	9	%100
Toplam		188	%88,7	24	%11,3	212	%100

Yaş grupları açısından bakıldığında “1-14 Yaş” grubu 32 örnekten 3'ünde (%9,4), “15-24 Yaş” grubu 50 örnekten 5'inde (%10), “25-64 Yaş” grubu 214 örnekten 27'sinde (%12,6) ve “65 Yaş Üstü” grubu 104 örnekten 14'ünde (%13,5) Mikrosporidia varlığı tespit edilmiştir. Verilerden görüleceği üzere Mikrosporidia sıklığı en fazla “65 Yaş Üstü” grubunda gözlenmiş ve yaş gruplarındaki azalmayla birlikte görülme oranı da azalmıştır (Tablo 4.9). Gerçekleştirilen Ki Kare analizi sonucunda yaş grupları aralarındaki Mikrosporidia görülme oranlarının farklılığının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. ($p=0,885$)

Tablo 4.9. Mikrosporidia Varlığı ile Yaş Grupları Çapraz Tablosu

		Mikrosporidia					
		Negatif		Pozitif		Toplam	
		N	%	N	%	N	%
Yaş Grupları	1-14 Yaş	29	%90,6	3	%9,4	32	%100
	15-24 Yaş	45	%90	5	%10	50	%100
	25-64 Yaş	187	%87,4	27	%12,6	214	%100
	65 Yaş Üstü	90	%86,5	14	%13,5	104	%100
Toplam		351	%87,75	49	%12,25	400	%100



Şekil 4.5. Mikrosporidia Varlığının Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

Bolu ilinde “1-14 Yaş” grubu 21 örnekten 2’sinde (%9,5), “15-24 Yaş” grubu 25 örnekten 2’sinde (%8), “25-64 Yaş” grubu 96 örnekten 16’sında (%16,7) ve “65 Yaş Üstü” grubun 46 örnekten 5’inde (%10,9) Mikrosporidia tespit edilmiştir. Bolu ilinde Mikrosporidia oranının en yüksek olduğu grup “25-64 Yaş” ve en düşük olduğu grup ise “15-24 Yaş” grubu olduğu görülmüştür (Tablo 4.10). Düzce ilinde “1-14 Yaş” grubu 11 örnekten 1’inde (%9,1), “15-24 Yaş” grubu 25 örnekten 3’ünde (%12), “25-64 Yaş” grubu 118 örnekten 11’inde (%9,3) ve “65 Yaş Üstü” grubun 58 örnekten 9’ünde (%15,5) Mikrosporidia tespit edilmiştir. Düzce ilinde Mikrosporidia oranının en yüksek olduğu grup “65 Yaş Üstü” grubu olurken, en düşük oranın görüldüğü grup ise “1-14 Yaş” grubu olarak kaydedilmiştir (Tablo 4.11). Yapılan Ki Kare analizi sonucunda iki ilde

gözlemlenen yaş grupları arasındaki Mikrosporidia oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Bolu, $p=0,562$ ve Düzce $p=0,670$).

Tablo 4.10. Bolu İli Mikrosporidia Varlığı ile Yaş Grupları Çapraz Tablosu

		Mikrosporidia					
		Negatif		Pozitif		Toplam	
		N	%	N	%	N	%
Yaş Grupları	1-14 Yaş	19	%90,5	2	%9,5	21	%100
	15-24 Yaş	23	%92	2	%8	25	%100
	25-64 Yaş	80	%83,3	16	%16,7	96	%100
	65 Yaş Üstü	41	%89,1	5	%10,9	46	%100
Toplam		351	%86,7	49	%13,3	400	%100

Tablo 4.11. Düzce İli Mikrosporidia Varlığı ile Yaş Grupları Çapraz Tablosu

		Mikrosporidia					
		Negatif		Pozitif		Toplam	
		N	%	N	%	N	%
Yaş Grupları	1-14 Yaş	10	%90,9	1	%9,1	11	%100
	25-24 Yaş	22	%88	3	%12	25	%100
	25-64 Yaş	107	%90,7	11	%9,3	118	%100
	65 Yaş Üstü	49	%84,5	9	%15,5	58	%100
Toplam		351	%88,7	49	%11,3	400	%100

Moleküler yöntem (PZR) referans olarak kabul edilmiş ve mikroskobik incelemeler için gerçekleştirilen duyarlılık ve özgüllük analizinde MTS duyarlılığı %49, özgüllüğü ise %100 olarak bulunmuştur (Tablo 4.12). Gerçekleştirilen Kappa analizi ile yöntemlerin birbiriyle uyumluluk skoru 0,646 olarak hesaplanmıştır ($p<0,01$). Bu sonuç yöntemler arası uyumluluğun orta derecede olduğu göstermektedir.

Tablo 4.12. Mikrosporidia Teşhisinde Moleküler ve Mikroskobik İncelemelerin Karşılaştırılması

		Moleküler				Toplam	
		Negatif		Pozitif			
		N	%	N	%	N	%
Mikroskobik	Negatif	351	%100	24	%49	375	%93,8
	Pozitif	0	%0	25	%51	25	%6,3
Toplam		351	%100	49	%100	400	%100

5. TARTIŞMA

Mikrosporidia türleri yaklaşık 150 yıldır canlılarda sebep olduğu istenen ve istenmeyen enfeksiyonlardan dolayı bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. Tarım zararlıları için biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılması istenen enfeksiyonlara örnek olurken arı ve ipek böceği gibi diğer omurgasız türleri ve insanlarda oluşturdukları ciddi sorunlar ise istenmeyen enfeksiyon örneklerindendir. 1959 yılında ilk insan Mikrosporidia vakası bildirilmiş ve günümüze kadar dünyanın farklı bölgelerinden özellikle bağışıklık sistemi yetersiz/baskılanmış kişilerde ciddi sağlık sorunlarına yol açtığı raporlanmıştır. Sağlıklı insanlarda belirtisiz ve ciddi olmayan enfeksiyon seyri sebebiyle, dünya çapında gerçekleştirilen çalışmaların büyük bir çoğunluğu bağışık sistemi yetersiz/baskılanmış kişileri içermektedir (2,13,14,193).

Literatürdeki çalışmalara çoğunlukla risk altındaki ve özel hasta gruplarındaki kişilerin dahil edilmesi, toplumdaki Mikrosporidia epidemiyolojisinin tam olarak tespit edilmediğini düşündürmektedir. Herhangi bir sebepten ya da hastalıktan dolayı bağışıklığı yetersiz/baskılanmış insanların korunması için ilk önce patojenin toplumda ve çevrede ne kadar yaygın olduğunu saptamak çok önemlidir. Hastalık grubu gözlemeksizin yapılan çalışmalarla toplumdaki Mikrosporidia sıklığının belirlenmesi, özelde bağışıklık sistemi yetersiz insanların genelde ise toplumun bu patojenlerden korunmasında doğru adımların atılmasına yardımcı olacağını düşünmekteyiz. Bu sebeple çalışmamızda Düzce ve Bolu illerindeki insanlardan özellikli durum gözetmeksizin gaita örnekleri temin edilmiş, mikroskopik ve moleküler yöntemlerle Mikrosporidia türlerinin epidemiyolojisinin belirlenmesi ve filgenetik analizlerle taksonomik durumunun ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

İnsanlardaki ilk mikrosporidiyoz vakası 1959 yılında bildirilmiştir. 1985 yılına kadar ateş, kasılma, diyare gibi şikayetleri olan on olgu ile karşılaşılmıştır. İlerleyen zamanlarda dünyanın farklı ülkelerinden AIDS, kanser ve organ nakil hastalarında farklı nadir vakalar raporlanmıştır(13,101,128,194). Örnek olarak, Brown ve ark. (13) HIV ile enfekte olmayan böbrek nakil hastası 50 yaşındaki bir kadında *Encephalitozoon cuniculi* raporlamışlardır. Ülkemizde bir AIDS hastasından ilk mikrosporidiyoz vakası Büget ve ark.(96) tarafından raporlanmıştır.

İnatçı diyare şikâyeti ile başvuran hastadan alınan gaita örneği MTS ile boyanmış ve inceleme sonucunda Mikrosporidia sporlarına rastlanmıştır. İlerleyen yıllarda Usluca ve Aksoy (148) miyotonik distrofi tanısıyla izlenen hasta bir çocukta gastrointestinal şikayetlerin artması sebebiyle inceleme yapılmıştır. Mikroskopik olarak tespit edilen Mikrosporidia türünün PZR ile *Encephalitozoon intestinalis* olduğu belirtilmiştir. Şıvgın ve ark. (94) allojenik hematopoetik kök hücre nakli yapılan bir kişide bulantı ve ishal şikayetlerine binaen yaptığı inceleme sonucunda *Encephalitozoon intestinalis*'e rastlamışlardır. Bu çalışma ülkemizde IFA MAb's yöntemiyle bildirilen ilk vaka olma özelliğindedir. Bahsi geçen vakalara baktığımızda bağışıklık sistemi yetersiz/baskılanmış kişilerde bu patojenlerin belirli aralıklarla taramasının faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Yukarıda bahsedilen vakaların haricinde ülkemizdeki literatür incelendiğinde, farklı bölgelerden, farklı yöntem ve hasta gruplarını ihtiva eden Mikrosporidialarla ilgili tez ve araştırmalardan 13 adet mevcuttur. Atambay ve ark. (91) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Sağlık Merkezine gelen immün süpresif rahatsızlığı olmayan fakat, gastrointestinal şikâyeti olan kişilerde Mikrosporidia oranının %6,5 (51/781 kişi) olduğunu bildirmişlerdir. Karaman ve ark. (6) kanser tanısı almış hastalarda (320 kişide) MTS ile %10,9 oranında Mikrosporidia sporlarına rastlamışlardır. Aynı sayıdaki kontrol grubunda ise bu oran %5,6 olarak saptanmıştır. Karaman ve ark.'ın (195) gerçekleştirdiği çalışma ülkemizdeki insan patojeni Mikrosporidiaların epidemiyolojisine ilişkin önemli araştırmalardan biridir. MTS ile incelenen 2665 gaita örneğinden 226'sinin (%8,5) pozitif olduğu tespit edilmiştir. Karaman ve ark. (92) akut ve kronik ürtikerli hastalarda Mikrosporidia pozitifliğini MTS ile araştırmışlar, hasta gruplarındaki Mikrosporidia pozitifliği %19,7 (132/26'sı), kontrol grubunda %2,8 (36/1) olarak raporlanmışlardır. Çalık ve ark. (196) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Hastanesine gelen 1181 çocuktan alınmış örneklerin %7,8'inde (1181/92) Mikrosporidia sporları tanımlamışlardır. Türk ve ark. (197) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesine başvuran 225 ishalli hastada Mikrosporidia sıklığının %9,8 (225/22) olduğunu bildirilmiştir. Hamamcı'nın gerçekleştirdiği doktora tezinde (18) Kayseri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesine gelen farklı hasta gruplarının örneklerinden MTS boyama sonucunda kontrol gruplarında %57,5, hasta gruplarında ise %36,6 Mikrosporidia pozitiflik saptanmıştır. Moleküler tanı sonucunda oranının hasta gruplarında %40,7, gastrointestinal şikâyeti olmayan

kontrol grubunda %35, gastrointestinal şikâyeti olan kontrol gurubunda ise %60 olarak raporlanmıştır. *Enterocytozoon bieneusi* özel primeri ile yapılan PZR sonucunda pozitiflik hasta gruplarında %12,1, kontrol grubunda %5,5 ve gastrointestinal şikâyeti olan sağlıklı kişilerde %15 olarak bildirilmiştir. Çetinkaya'nın hazırladığı doktora çalışmasında (198) MTS ile incelenen örneklerin %28'inde, kalkaflor beyazı ile incelenen örneklerin %47,3'ünde, moleküler yöntem ile (PZR) incelediği örneklerin %34'ünde Mikrosporidia varlığını bildirmiştir. Multiplex Real Time PZR sonucunda ise pozitif örneklerin %32,7'si *Encephalitozoon* türleri, %2'si *Enterocytozoon bieneusi* olarak değerlendirilmiştir. Hamamcı ve ark. (11) kemoterapi alan kanserli hastalarda IFA-MAb (Monoklonal antikor) yöntemiyle Mikrosporidia prevelansını araştırmış ve %69,9 gibi yüksek bir oran raporlamışlardır. Hastaların %46,2'inde *Encephalitozoon intestinalis*, %9,7'sinde *Enterocytozoon bieneusi* ve %14'ünde karışık enfeksiyon tespit edilmiştir. Kontrol gurubunda ise *E. intestinalis* oranı %6,7, *E.bieneusi* oranı %3,3 ve karışık enfeksiyon oranı %6,7 olarak belirtilmiştir. Çetinkaya ve ark. (7) kemik iliği transfer hastalarında (200 hasta) IFA-Mabs yöntemi ile *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon intestinalis* varlığını araştırdığı çalışmada %25,5 *E.intestinalis*, %4 *E.bieneusi* saptamışlardır. Toplam Mikrosporidia pozitiflik ise %39 olarak raporlanmıştır. Mumcuoğlu ve ark. (95) Ankara Numune Hastanesine gelen insanlarda Mikrosporidia prevelansı araştırdığı çalışmada akut ishalli hastalarda %27 pozitif, kronik ishalli hastalarda ise %34,1 olarak raporlamıştır. MTS, Kalkaflor Beyaz ve Uvitex 2B boyalarının kullanıldığı bu çalışmada yöntemler birbirine çok yakın sonuçlar vermiştir. Özkoç ve ark. (199) iyatrojenik bağışık sistemi baskılanmış 63 hastanın BAL örneklerinde PZR ile ülkemizde ilk defa pulmoner Mikrosporidiyoz araştırmışlardır ve 9 kişide (%14,2) Mikrosporidia varlığı görülmüştür. PZR yönteminde kullanılan primer 4 türün (*Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *E. cuniculi* ve *E. hellem*) SSU rDNA bölgesi için koplayalamak için tasarlanmıştır fakat tür ayrımı yapılmamıştır. Mikroskobik incelemeler sonucunda ise yalnızca 1 kişide Mikrosporidia türü sporları görülmüştür.

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada Mikrosporidia görülme sıklığı açısından bakıldığında, MTS ile boyanmış örneklerin incelenmesi sonucunda 400 örnekten 25'inde (%6,25) Mikropsoridia türlerine ait sporlar tespit edilmiştir. İl bazında bakıldığında Düzce'deki pozitiflik oranının %6,6 ve Bolu'daki pozitiflik oranının

%5,8 olduğu görülmüştür. Yukarıda bahsedilen Malatya, Kayseri ve Ankara’da gerçekleştirilen çalışmalara bakıldığında özellikle bağışıklık sistemi yeterli/baskılanmamış (çalışmalarda genelde kontrol grubu olarak kullanılmış) kişilerdeki oranların çalışmamızdakiler ile yakın olduğu görülmektedir. Bağışıklığı yetersiz kişilerde ise enfeksiyon oranların daha fazla olduğu görülmekle birlikte, enfeksiyon seyirlerinin de daha ciddi olduğu bildirilmiştir. Kanseri tanısı almış, kemoterapi alan, kemik iliği nakli olan, ürtikerli, büyüme geriliği olan çocuk hastalardaki oranların kronik hastalığı olmayan kişilere göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir (6,7,11,88,92). İshal, hazımsızlık ve halsizliğin Mikrosporidia varlığı ile ilişkili görüldüğü çalışmalar mevcutken (7,195,200), bazı çalışmalarda patojenin varlığı ile bu şikayetlerin ilişkisinin olmadığı raporlanmıştır (6,197). Bununla birlikte ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalarda Mikrosporidia sıklığının yaş ve cinsiyet değişkenleriyle istatistiksel olarak bir ilişkisi olmadığı raporlanmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz moleküler bulgular ishal şikâyeti olan ve olmayan kişilerde Mikrosporidia oranının sırasıyla %6,3 ve %12,5 olduğunu göstermiş ve yapılan istatistiksel analiz sonucunda ishal ve ishal olmayan kişilerdeki Mikrosporidia farkının anlamlı olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte kadınlardaki pozitiflik oranının %11,6 ve erkeklerde 14,7 olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Çalışmamızın bulgularına bakıldığında yaş arttıkça Mikrosporidia oranının arttığı görülmektedir fakat yaş grupları arasındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Özellikle bağışıklık sistemi açısından kronik bir rahatsızlığı olmayan kişilerde Mikrosporidia türleri kendini sınırlayan, klinik belirti göstermeyen enfeksiyonlar oluşturması sebebiyle bazı çalışmalarda şikayetlerle Mikrosporidia ilişkisinin olmadığı raporlanması normal bir durumdur. Mikrosporidialara fırsatçı patojen kimliğini kazandıran özelliği, bağışıklık sistemi yetersiz/baskılanmış kişilerde klinik belirtiler eşliğinde enfeksiyon oluşturmasıdır. Bundan dolayı özellikle hasta örneklerinin araştırıldığı çalışmalarda doğal olarak Mikrosporidia varlığında şikayetlerin arttığını ortaya koyan sonuçlar alınmaktadır.

Mikrosporidia gibi küçük yapıdaki canlıların özellikle gaita örneklerinden tespit edilmesi oldukça zordur. Küçük boyutta olmalarının yanında, gaita içerisinde yabancı parçaların varlığı, Mikrosporidia türleri ile karıştırılabilecek boyutlardaki mikroorganizmaların varlığı, enfeksiyon şiddeti, araştırmacının tecrübesi gibi etkenler de bu zorluğu arttırmaktadır. Bununla birlikte zorluklara rağmen özel

yoğunlaştırma ve boyama yöntemleri mikroskopik tanıda istenilen patojenin ayrımını sağlayarak araştırmacılarının işini kolaylaştırmaktadır. Birçok çalışmada, Mikrosporidiaların mikroskopik tanısında MTS gibi boyama yöntemlerinin iyi sonuçlar verdiği raporlanmıştır. Moleküler yöntemler araştırmacılara patojenlerin tür düzeyinde tanımlanması imkânını sağlamasının yanında patojenin dağılımı konusunda daha doğru sonuçların elde edilmesini sağlamıştır. Bu yöntemler için yüksek güvenilirlik çok güçlü bir özelliktir fakat, DNA izolasyon aşamaları ve istenilen gen bölgesinin çoğaltılması için gereken primerlerin seçimi çok dikkat gerektiren basamaklardır. Mikroskopik ve moleküler yöntemlerin kısıtlılıklarının/sorunlarının büyük bir kısmı, yukarıdaki belirtilen bu yöntemlerin birlikte kullanıldığı çalışmalarda bertaraf edilmektedir. Böylece Mikrosporidia dağılışına ilişkin elde edilen verilerin güvenilirliği de artmaktadır.

Ülkemizdeki gerçekleştirilen çalışmalarda MTS'nin yanında akridin oranj, kalkaflor beyaz, uvitex 2B, wheatley trikrom gibi boyama yöntemlerinin kullanılmış ve bu yöntemlerin birbirleriyle uyumuna dikkat çekilmiştir (95,197,201). Bu boyalardan akridin oranjın hızlı sonuç vermesi olumlu bir yan olarak gözükürken tüm zeminin turuncu renge boyanması tanıda büyük bir güçlüğü sebep olduğu bildirilmiştir. Kalkaflor ve uvitex 2B yöntemlerinin MTS ile uyum oranı yüksek olsada floresan mikroskop gerektirmesi ve mantar sporlarının renklenmelerinin yanlış pozitifliğe yol açması sebebiyle, araştırmacılar bu yöntemlerin farklı güvenilir yöntemlerle birlikte karşılaştırılmalı olarak kullanılmasını önermişlerdir. Kır ve ark. (201) gerçekleştirdiği çalışmada modifiye trikrom boyamada görülen Mikrosporidiaların wheatley trikrom boyama yöntemiyle gözden kaçırıldığı görülmüş ve söz konusu Mikrosporidia türleri olduğunda MTS'nin daha güvenilir bir yöntem olduğu raporlamışlardır. Araştırmalar sonucunda literatürdeki olumlu ve olumsuz yönler dikkate alınarak çalışmamızda MTS boyama yöntemi seçilmiştir. Nitekim çalışmamızda yapılan Kappa analizi sonucunda MTS ve PZR arasındaki uyumluluk skoru orta derecede çıkmış ve özgüllüğü %100 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, MTS yönteminin araştırmacıyı yanlış pozitif sonuçlara yönelmekten koruduğunu göstermektedir. Mikrosporidia için mikroskopik yöntemler etken türün teşhisinde kullanışlı olarak gözükmesede, patojenin varlığı ve yayılışı konusunda önemli ve yararlı bir bilgi edinme yöntemi olarak kabul edilmektedir. Özellikle yoğunlaştırma ve boyama yöntemlerinin uygulanmasıyla rutin tanıda çok yardımcı olmaktadır. Ayrıca

enfeksiyon yoğunluğuna bağlı olarak gözden kaçabilmesi sebebiyle, Sak ve ark. (75) değindiği gibi mikroskopik Mikrosporidia araştırmaları için bir kişiden çoklu örnek alınması Mikrosporidia tanısında çok faydalı bir yöntem olarak gözükmektedir.

Ülkemizdeki Moleküler tabanlı yöntemlerin yer aldığı çalışmalara bakıldığında mikroskopik tanıda raporlanan pozitiflik oranlarının, moleküler yöntemlerden daha az olduğu görülmektedir (11,198,199). Bu durum genellikle moleküler yöntemlerin daha güvenilir olduğuyla ilişkilendirilmiştir. Bilindiği üzere moleküler yöntemlerde DNA izolasyon aşamaları, primerlerin seçimi ve PZR'de belirlenen sıcaklık döngüleri uygun ayarlandığı takdirde, patojen yüküne bakılmaksızın tanı imkânı sağlamaktadır. Çalışmamızdaki mikroskopik ve moleküler incelemeler sonucunda elde edilen pozitif vakalar sırasıyla 25 (%6,25) ve 49'dur (%12,25). Aradaki farka bakıldığında moleküler yöntemlerin kullanışlılığı göze çarpmaktadır. Bununla birlikte bazı çalışmalarda mikroskopik yöntemlerle teşhis edilen örneklerin PZR sonucunda tespit edilmediği belirtilmiştir (202). Benzer şekilde çalışmamızda da mikroskopik olarak pozitif raporlanan bir örnekte PZR sonucunun negatif olduğu görülmüştür. Bu durum bir yöntemin ne kadar güvenilir olursa olsun, dikkatli bir şekilde uygulanabildiğinde doğru sonuç verebileceğini göstermektedir. Nitekim çalışmamızdaki sorunun örnekten elde edilen DNA taslağının PZR tüpüne aktarılırken olduğu kanısındayız. Çünkü bahsi geçen DNA örneği ile tekrar PZR yapıldığında elektroforez sonucunda bant görülmüş ve pozitif olarak kaydedilmiştir. Ayrıca çalışmamızda karşılaştığımız üzere, türe özgü değil de sadece evrensel primerlerin kullanılması özel olmayan bağlanmalara yol açmaktadır. Bu sebepten ötürü jel elektroforezinde birden fazla bant görülmektedir. Nitekim çalışmamızda evrensel primer (*Entercytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *E.cuniculi* ve *E.hellem* türleri için) ile gerçekleştirilen PZR analizi ve jel elektroforez sonucunda farklı bantlar görülmüş 10 adet örnekte türe özgü primerlerin kullanımı sonrasında herhangi bir bant görülmemiştir. Bu örneklerin mikroskopik incelemesinde de Mikrosporidia sporlarına rastlanılmadığı için negatif olarak değerlendirilmiştir. Görüldüğü üzere, özellikle Mikrosporidialar için mümkünse moleküler ve mikroskopik yöntemlerin bir arada kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelenmesinin çok önemli olduğu düşünmekteyiz.

Ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalara bakıldığında çoğunlukla risk altındaki ve özel hasta gruplarındaki kişilerin dahil edildiği görülmektedir. Bilinmelidir ki, bağışıklığı baskılanmış ve kanser gibi hastalıkları olan insanların korunması için ilk önce patojenin toplumda ve çevrede ne kadar yaygın olduğu saptamak çok önemlidir. Hastalık grubu gözlemeksizin yapılan çalışmalarla toplumdaki Mikrosporidia sıklığının belirlenmesi, özelde bağışıklık sistemi yetersiz insanların genelde ise toplumun bu patojenlerden korunmasında doğru adımların atılmasına yardımcı olacağını düşünmekteyiz. Nitekim Çetinkaya ve Caner (97) Ülkemizde gerçekleştirilen çalışmaların meta analizini yaptığı çalışmada Mikrosporidia sıklığının insanlarda ortalama %13,4 ve diğer omurgalı konaklarda %15,2 olarak bildirmişlerdir. Özellikle bağışıklığı yetersiz hastalarda oranların fazla olduğu görülmüştür. Bu derleme ülkemizdeki Mikrosporidiaların sıklığı açısından güzel bir çevre çizmiştir. Bununla birlikte çalışmalardaki örnek alımlarının 4 şehir (insanların yer aldığı çalışmalarda 3 daha önce bahsi geçen 3 şehir) sınırları içerisinde olması, diğer omurgalılarıdaki dağılımını gösteren çalışmaların az olması, çalışmalardaki metotların farklı olması, özellikle karakter ayrımının yapılabileceği moleküler çalışmaların az olmasından dolayı doğru bir yayılım/sıklık haritası çıkarılması açısından eksikleri ortaya çıkarmıştır.

Dünya üzerinde yapılan çalışmalara bakıldığında pozitiflik oranlarının bölgelere, altta yatan hastalıklara, sosyoekonomik duruma göre değiştiği görülmektedir. Literatüre bakıldığında gelişmiş ülkelerde fırsatçı patojenlerin tanısına ilişkin gerçekleştirilen çalışmaların gelişmekte olan ülkelere nazaran daha önceki tarihlerde başladığı görülmektedir.

Avrupa ülkelerinde 90'lerde genellikle mikroskopik yöntemler ile Mikrosporidia sıklığı araştırılmış ilerleyen zamanlarda moleküler çalışmalarda artmaya başlamıştır. Cotte ve ark. (203) 1993-1996 yılları arasında Lyon'da (Fransa) 1454 kişiden alınan 5692 gaita örneğini MTS ve Uvitex 2B ile incelemişler ve MTS ile incelenen örneklerin (565/3849) %15'i, Uvitex 2B ile incelenen örneklerin (710/3075) %23 Mikrosporidia şüpheli olarak raporlanmıştır. Sonuç olarak 338 pozitif örneğin 261 tanesi HIV ile enfekte, 16 tanesi organ nakil hastası ve 61 tanesi ise kronik rahatsızlığı olmayan kişiler olduğu belirtilmiştir. Müller ve ark. (204) mikroskopik yöntem ile (Uvitex 2B boyama) Köln'de (Almanya) HIV ile enfekte ve ishal şikâyeti olan kişilerin %7,4'ünde (8/104) Mikrosporidia varlığını göstermişlerdir. Lores ve ark. (194) Vigo şehrinde (İspanya) 60 (ortalama

yaş 73,5) yaşlı bireyde Mikrosporidia taraması (MTS ve PZR yöntemleri ile) gerçekleştirmişler ve 8 (%13,3) kişi pozitif olarak raporlanmıştır. Pozitif örneklerin %75'i kırsal alanda yaşayan kişilerden alındığı belirtilmiştir. Sak ve ark. (70) Prag Bölgesel Halk Sağlığı Enstitüsünde (Çek Cumhuriyeti) 382 kişinin örneğini mikroskopik (Kalkaflor boyama) olarak incelenmesi sonucunda 58'inde (%15) Mikrosporidia tespit etmişlerdir. Lobo ve ark. (205) Lizbon'da (Portekiz) 10 yıllık süreçte HIV pozitif ve HIV negatif kişilerde 1989 gaita örneği Mikrosporidia açısından PZR ile incelemişleridir. Dışkı örneklerinde %12 pozitiflik saptanmıştır (HIV+: %13,9 ve HIV-: %8,5). Çocuklardaki Mikrosporidia sıklığı %18,8 iken, erişkinlerde bu oran %10,2 olarak saptanmıştır. Greigert ve ark.(78) 2014-2016 yılları arasında Strazburg Üniversite Hastanesine (Fransa) başvuran kişilerde MTS ile Mikrosporidia sıklığını araştırmışlardır. Yedi kişinin (%1,1) pozitif olarak raporlandığı bu çalışmada, 2 kişinin AIDS 5 kişinin ise organ nakli sebebiyle bağışıklık sistemini baskılayıcı ajan kullandıkları bildirilmiştir. Kicia ve ark. (14) Wroclaw Sağlık Üniversitesinde (Polonya) böbrek nakli olan 72 hastanın 6 tanesinin solunum yollarında (%8,3) Mikrosporidia raporlamışlar ve moleküler analiz sonrasında türün *Encephalitozoon cuniculi* olduğu saptanmıştır.

Yukarıda bahsi geçen Avrupa ülkelerinde gerçekleştirilen çalışmalardaki oranlar, insanların Mikrosporidia türleriyle karşılaşmalarının düşünüldüğünden daha sık olduğunu göstermektedir. Nitekim Sak ve ark. (75) latent Mikrosporidiyoz varlığını incelemek ve belirlemek için Çek Cumhuriyeti'nde gerçekleştirdiği çalışmada, sağlıklı 15 kişiden 3 aylık takip süresince serum, idrar ve dışkı örnekleri olarak inceleme yapmışlardır. Alınan örneklerin 14'ünde mikrosporidyal antikorlar tespit edilmiş, 13 örnekte *Encephalitozoon* türlerinin sebep olduğu enfeksiyon, 7 kişide ise *Enterocytozoon bienersi* kaynaklı enfeksiyon gözlenmiştir. Bu sonuçlar, Mikrosporidia türlerine maruz kalmanın çok normal ve yaygın olduğunu ve sağlıklı bireylerde herhangi klinik belirti göstermeden enfeksiyonun toplumda sürekli devam ettiğini göstermiştir. Nitekim çalışmamız sonucunda elde edilen pozitiflik oranları (Bolu için %13,3 ve Düzce için %11,3) Ülkemiz sınırları içerisinde de Mikrosporidia türlerine sürekli bir maruziyetin olduğunu göstermektedir. Yukarıda bahsedilen çalışmalarda, Avrupa ülkelerinde de HIV+ ve organ nakil hastalarındaki pozitifliğin daha fazla olduğu göze çarpmaktadır. Bununla birlikte kırsal alanlarda yaşayanların da mikropsoridia türlerine daha fazla maruz kaldığı görülmüştür. Ayrıca Mikrosporidia tanısıyla düşük CD4 sayısı, ishal ve

eşcinselliğin de ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına da benzer şekilde, söz konusu bağışıklığı yeterli olan kişiler olduğunda ishal şikâyeti, cinsiyet ve yaş gibi değişkenlerin Mikrosporidia dağılımına çoğunlukla etki etmediği görülmektedir. İlk dönemlerde gerçekleştirilen mikroskopik çalışmalarda oranların yüksekliği bir salgın durumuyla ilişkilendirilmekle birlikte, Mikrosporidialar yönünden farkındalığın az olması da bir etken olarak görülmüştür. İlerleyen yıllardaki moleküler çalışmalarda bağışıklık sistemi yetersiz ya da baskılanmış kişilerde dahi oranların azalması hem farkındalığın artması hemde yüksek derecede aktif antiretroviral tedavi (HAART) yöntemlerinin kullanılması sayesinde olduğu belirtilmiştir (194,203,205).

Avrupa ülkeleri çalışmalarındaki mikroskopik incelemelere dikkat edilecek olunursa, Uvitex 2B ya da Kalkaflor gibi boyama yöntemlerindeki pozitiflik oranlarının MTS'den daha yüksek olduğu görülmektedir (70,203). Bu durum farklı değişkenlerin etksi sebebiyle de olabilir fakat duyarlılığı yüksek başka yöntemlerle karşılaştırılmadığı için ve daha önce belirtilen sebeplerden dolayı yanlış pozitifliği de akla getirmektedir. Çalışmamızdaki bulgulardan bakıldığında, PZR yöntemi ile kıyaslandığında özgüllüğü %100 olarak saptanan MTS yöntemi, önemli derecede yanlış pozitif sonuçların bertarafını sağlarken duyarlılığı orta düzeyde olması sebebiyle yalnızca MTS yöntemiyle Mikrosporidia araştırması yapılmasından kaçınılması gerektiği anlaşılmaktadır. Moleküler yöntemlerin kullanıldığı bahsi geçen çalışmalarda baskın türün *Enterocytozoon bienersi* olduğu görülmekte ve *Encephalitozoon* türleri ile *Vittaforma* benzeri organizların da varlığına dikkat çekilmiştir (14,194,205). Çalışmamızdaki moleküler bulgular sonucunda yalnız *Enterocytozoon bienersi* özel primelerinin kullanıldığı PZR ürünlerinde bant görülmüş ve farklı bir Mikrosporidia türüne rastlanılmamıştır.

Asya ülkelerinde Mikrosporidia çalışmaları 2000'lerin başlarında görülmeye başlansa da özellikle moleküler yöntemlerin yaygınlaştığı 2010 yılından sonra artmaya başlamıştır. Gerçekleştirilen çalışmalarda daha önce de bahsedildiği gibi özellikli hastalardan/gruplardan örnekler alınmıştır ve farklı pozitif oranları bildirilmiştir. Leelayoova ve ark. (206) Bangkok'ta (Tayland) bir yetimhanede çocuklarda mikroskopik olarak yapılan Mikrosporidia taraması sonucunda %4,1 oranında pozitiflik saptamış ve moleküler araştırma sonucunda türün *Enterocytozoon bienersi* olduğunu raporlamışlardır. Lono ve ark. (82) Kajang (Malezya) bölgesinde HIV pozitif kişilerde Mikrosporidia oranının %8 (12/247)

olduğunu bildirmişlerdir. Kontrol grubu olan sağlıklı kişilerde oranın %2,9 olduğu görülmüştür. MTS ile PZR sonuçlarının %100 uyumlu bulunduğunu bildirmişlerdir. Özellikle HIV+ kişilerdeki akut ishal ile Mikrosporidia varlığı arasında güçlü bir korelasyon olduğuna dikkat çekmişlerdir. Mori ve ark. (64) Taylan'da *Enterocytozoon bienersi* prevalansını araştırmak amacıyla Ülkenin batı ve kuzey bölgelerinde yaşayan çocuklardan örnek temin edip incelemişlerdir. Batı ve Kuzey Tayland'da sırasıyla %3,8 ve %2,9 oranında pozitiflik bildirmişlerdir. Kırsal alanlarda zootonik geçişin de etkisiyle oranların artabileceğine ilişkin yorumda bulunmuşlardır. Anuar ve ark. (207) Malezya'nın doğusunda bulunan (Pahang Kenti) Kuala Krau bölgesinde yaşayan okul çağındaki aborijin çocuklarda, mikroskopik (Gram Kromotrof Kinyon Boyası) olarak %27,1 (225/69) Mikrosporidia pozitiflik raporlamışlardır. Özellikle 10 yaşının üstündeki çocuklardaki oranın daha yüksek olduğu, bu durum bu yaş grubunun daha faal ve özgür olmalarıyla ilişkilendirilmiştir. Kaushik ve ark. (208) Delhi'de (Hindistan) gerçekleştirdiği araştırmada *Enterocytozoon bienersi* oranının %10,83 olarak raporlamışlardır. İshali belirtisi olan HIV+ kişilerde pozitiflik oranının %23,3 olduğu görülmüştür. Farklı boyama yöntemlerinin de kullanıldığı bu çalışmada mikroskopide en çok pozitiflik raporlanan boyamanın kalkaflor (%8,3) olduğu belirtilmiş fakat PZR sonuçlarıyla en uyumlu sonucun ise MTS (%6,6) boyama sonucunda olduğu belirtilmiştir. Ghoyouchi ve ark. (65) Kuzeybatı İran'da kemoterapi alan 132 çocukta Mikrosporidia sıklığını araştırdığı çalışmada mikroskopide örneklerin 17'sinde (%12,8), PZR sonucunda ise 14'ünde (%10,6) pozitiflik raporlamışlardır. Bu farklılığın sebepleri, mikroskopide mantar sporlarının Mikrosporidia olarak değerlendirilmesi ya da PZR için kullanılan primerlerin *Enterocytozoon bienersi* ve *Encephalitozoon intestinalis* için seçildiğinden farklı bir Mikrosporidia türlerinde çalışmadığı olarak yorumlanmıştır. Esteghamati ve ark. (79) gerçekleştirdiği Tahran'da (İran) kanser ve organ nakli olan kişilerde bağırsak parazitlerini araştırdığı çalışmada 1 (1/190) kişide Mikrosporidia (PZR sonucunda) raporlamışlardır. Karimi ve ark. (81) Tahran'da (İran) 252'ü bağışıklık sistemi sorunları olan 600 kişide moleküler olarak Mikrosporidia sıklığını araştırmışlardır. 10 kişide (%1,67) *Enterocytozoon bienersi*, 26 kişide (%4,33) ise *Encephalitozoon intestinalis* tanımlanmıştır (ortalama %5,9). Shen ve ark. (72) Burma'da (Myanmar) kırsal alandaki insanlardan 172 dışkı örneğinde moleküler olarak *Enterocytozoon bienersi*

taraması yapmışlardır. Prevelansın %8,72 (15 kişi) olduğu çalışmada, örnek sayısı ülke bazında bir yoruma ulaşma bakımında az olsa da Burma'da gerçekleştirilen ilk *Enterocytozoon bieneusi* prevelans çalışması olması sebebiyle önem kazanmaktadır. Ayrıca Çin sınırları içerisinde yer alan, benzer iklim ve sosyoekonomik durumdaki Yunnan şehrinde de oranın benzer şekilde %8,30 olduğunu belirtmişlerdir. Zang ve ark. (86) Çin'in Çongçin, Şantung ve Hubei (Chongqing, Shandong ve Hubei) şehirlerinde yaşayan 196 kişide MTS ile 19 tanesinde (%9,6) sporları görülmüş ve PZR ile 20 kişide Mikrosporidia (*Enterocytozoon bieneusi*) tespit etmişlerdir.

Asya ülkelerinde gerçekleştirilen çalışmaların oranlarında daha önce bahsedilen sebeplerden kaynaklı farklılıkların yanında, araştırılan türlerin de etkisi olduğu görülmektedir. Özellikle moleküler temelli çalışmalarda yalnızca *Enterocytozoon bieneusi* ya da *Encephalitozoon intestinalis* türlerinin birine özgü primerlerinin kullanılması diğer enfeksiyon etkeni Mikrosporidiaların saptanmamasına ve oranların diğer çalışmalara nazaran daha düşük olarak raporlanmasına sebep olmaktadır. Bu durum mikroskobide görülen sporların, farklı türlere özgü primerler olmaması sebebiyle, PZR sonucunda saptanamadığı da düşündürmektedir (65). Ayrıca bazı çalışmalarda yalnızca mikroskobik olarak pozitifliği saptanan örneklerde moleküler analizler gerçekleştirildiği için raporlanan oranlar konusunda bir eksiklik olabileğini düşündürmektedir (82,206). Çalışmamızda da görüldüğü üzere, sadece mikroskobik olarak pozitifliği saptananlara PZR yapılmış olsaydı gerçeğinden daha düşük oranların raporlanmasına sebep olacaktı. Bununla birlikte daha önce de belirtildiği gibi DNA izolasyon aşamalarındaki değişkenler de oranların farklılığına etki etmektedir (209–211).

Her ne kadar enfeksiyonların büyük bir çoğunluğunda etken *Enterocytozoon bieneusi* olsa da bölgelere ve numunelere (balgam, dışkı) göre değişen durumlarda *Encephalitozoon intestinalis* gibi türlerin de ilk sırayı aldığı görülmüştür (81). Bu yüzden tek tür ele alınarak yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler ile genel Mikrosporidia sıklığını yorumlamak yetersiz kalmaktadır. Nitekim çalışmamızda farklı türlere özgü primerler kullanarak PZR analizi gerçekleştirilmesinin amacı tür dağılımı ve oranları doğruya en yakın şekilde yansıtmaktır. Mikroskobik incelemelerde farklı boyama yöntemleri kullanılmış fakat genellikle MTS tercih edilmiştir. Benzer ve hatta fazla pozitiflik veren kalkaflor ve gram kromotograf

kinyon gibi boyama yöntemleri maddi olarak ve zaman açısından avantaj sağlasa da PZR ile yüksek uyum gösteren MTS daha güvenli bir yöntem olarak kabul edilmektedir (65,82,208,212). Çalışmamızda görüldüğü üzere, MTS yönteminin PZR yöntemi ile karşılaştırıldığında özgüllüğün yüksek çıkması yanlış pozitif sonuçların alınmasına engel olmaktadır.

Asya ülkelerinde özellikle HIV+ pozitif gibi bağışıklığı baskılanmış kişilerde ishal şikâyeti ile Mikrosporidia varlığının korelasyon gösterdiği belirtilmiştir(82,208). Bağışıklığı yeterli kişilerde ise oranların genelde %10'un altında seyrettiği görülmektedir (64,81,206). Benzer şekilde gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada hastalık grubu gözetmeksizin moleküler olarak incelenen örneklerin %12,25'inde Mikrosporidia pozitiflik saptanmıştır. Asya bölgesinde insanların çok farklı coğrafik koşullarda yaşamaları da Mikrosporidia sıklığının farklı oranlarda bildirilmesine katkı sağlamaktadır (207). Böyle bölgelerde zoonotik geçişin de etkisiyle oranların dönemsel olarak artabileceği düşünülmektedir. Asya literatürüne genel olarak bakıldığında yaptığımız bu çalışmada olduğu gibi, cinsiyet ve yaş gruplarının Mikrosporidia dağılımına etki etmediği görülmektedir fakat yaşın artmasıyla birlikte bağışıklık sistemindeki gerilemelerin ve çocuk yaşta kişisel bakımın iyi olmaması (hijyen yönetimin iyi olmadığı yerleşim bölgelerinde) kimi zaman oranların bu yaş gruplarında artmasına sebep olabilmektedir. Aynı şekilde çalışmamızda bildirilen oranların da özellikle hastalık gözetmeksizin yapılan epidemiyolojik araştırmalarla yakın olduğu görülmektedir. Yaş grupları arasında farklılıklar olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Asya ülkelerinde insanlardaki Mikrosporidia sıklığına bakıldığında, türlerinin varlığı dikkate alınacak ölçüde olduğu göze çarpmaktadır. Nitekim Qui ve ark. (2019) Çin'de Mikrosporidia varlığının araştırıldığı 84 çalışmayı içeren meta analizinde rastgele etki metodu analizi sonucunda canlılardaki (insan, sığır, köpek vb. memeliler) pozitiflik oranının %20, su örneklerindeki oranın ise %64,5 olduğunu raporlamışlardır. Özellikle hayvanlardaki oranların yüksek olduğu yerleşim alanlarında, insanlardaki mikrosporidia oranlarının da arttığını belirtmişlerdir (84).

Avusturalya kıtasında Mikrosporidia konusunda yapılan çalışmalar az olsa da 90'lı yıllardan 2000'li yıllara doğru Mikrosporidia pozitifliğin azaldığı görülmektedir. Sidney'de (Avusturalya) Field ve ark. (126) HIV ile enfekte 240 kişinin duodenal biyopsi örneklerden, mikroskopik incelemeler sonucunda 43

kişide (%17,9) Mikrosporidia sporları raporlamışlardır. Stark ve ark. (213) Sidney (Avustralya) CD4+ T hücre sayısı 100'den az olan HIV ile enfekte kişilerde Mikrosporidia taraması gerçekleştirmişlerdir. 1995-2007 seneleri arasındaki vakalar değerlendirildiğinde, özellikle yüksek aktif antiretroviral tedavinin (HAART) yaygınlaşmaya başladığı 1998'den sonra Mikrosporidia insidansının düştüğü görülmektedir. Bununla birlikte 2004 senesinden sonra hiç Mikrosporidia vakasına rastlanılmamıştır.

Afrika kıtası söz konusu olduğunda Mikrosporidia çalışmalarının büyük çoğunluğu orta Afrika ülkelerinde gerçekleştirilmiştir. Tumwine ve ark. (214) Mulago Hastanesine (Uganda) ishal şikâyeti ile başvuran 0-60 aylık çocuklarda *Enterocytozoon bienewi* araştırmışlardır. Herhangi bir şikayeti bulunmayan kontrol grubu üyeleride %16,8 oranında, ishalleri çocuklarda ise %17,4 oranında *E.bienewi* pozitifliği görülmüştür. Nkinin ve ark. (83) Yaounde'de (Kamerun) 28'i HIV pozitif olan, 191 kişide mikroskopik (Kalkaflor Boyama) olarak Mikrosporidia incelemesi gerçekleştirmişlerdir. HIV pozitif ve tüberkülozlu kişilerin pozitiflik oranını %35,7, HIV pozitif tüberküloz olmayanların pozitiflik oranını %24 ve sağlıklı kişilerin pozitiflik oranını %67,5 olarak raporlamışlardır. Sağlıklı insanlarda pozitifliğin bu denli yüksek olması, sahra altı afrika ülkelerinde yaşayan insanların bu parazitlerle kronik olarak enfekte olduklarını ve Mikrosporidialara karşı tolerans geliştirdiğini düşündürmüştür. Farklı bölgelerde gerçekleştirilen çalışmalarda, kalkaflor yönteminin MTS ve PZR'den daha fazla pozitiflik vermesi mantarların Mikrosporidia sporları gibi floreasan vererek yanlış pozitifliğe sebep olma potansiyelini unutmamak gerekmektedir (198,208). Breton ve ark. (215) Gabon'da HIV pozitif ve Kamerun'da HIV negatif kişilerde gerçekleştirdiği çalışmada *Enterocytozoon bienewi* yüksek rRNA sekans değişkenliğine sahip genotipine rastlamışlardır. PZR ve IFA yöntemlerinin kullanıldığı bu çalışmada Gabon'da 822 kişiden 22 (%3) ve Kamerun'da 758 kişiden 22 (%2,9) kişide pozitifliğe rastlanmıştır. Ayinmode ve ark. (216) Nijerya'nın güneybatısındaki Oyo kentinde 43 çocukta moleküler olarak *Enterocytozoon bienewi* araştırmışlar ve 4 (%9,3) çocukta patojenin varlığı raporlanmıştır. Ojuromi ve ark. (217) Lagos'ta (Nijerya) Antiretroviral terapi alan HIV ile enfekte 90 hastadan 5'inde *Entereocytozoon bienewi*'yi tanımlamışlardır. Araştırmacılar Nijeryada HIV pozitif insanlar üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında oranların %3,6-16,6 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Nijerya'da çocuk bakımı ve ev işleri

kadınların sorumluluğunda olması sebebiyle, Mikrosporidia sıklığının görece daha fazla görülmesiyle ilişkilendirilmektedir (218–221).

Afrika ülkelerinde Mikrosporidia çalışmalarının Asya ve Avrupa ülkelerinden daha geç dönemlerde başladığı ve genelde orta Afrika ülkelerinden Mikrosporidia varlığına ilişkin çalışmalar yapıldığı görülmektedir. Literatürdeki çalışmaların büyük bir çoğunluğu moleküler yöntemlerin yaygınlaşmaya başladığı yıllarda gerçekleştirildiği için mikroskopik taramaların az olduğu görülmektedir. Daha önce de değinildiği gibi yalnızca mikroskopik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda bu küçük patojenlerin gözden kaçtığı bilinmektedir. Aynı şekilde moleküler yöntemler için gerekli süreçlerdeki (DNA izolasyonu, seçilen primerler ve PZR döngüleri) aksilikler tanıda yanlış sonuçlara yol açmaktadır. Bununla birlikte kalkaflor gibi güvenilir kabul edilen boyama yöntemlerinde mantar gibi mikroorganizmaların Mikrosporidia sporları ile çok benzer renklenmesi yanlış pozitifliğe yol açarak patojenlerin sıklığını olduğundan fazla göstermektedir (83). Çalışmamızda kullanılan MTS yönteminin PZR yöntemine göre duyarlılığı orta düzeyde olsa da özgüllüğünün çok yüksek olması yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmayı sağlamaktadır. Yine de güvenilir yöntemlerin ufak da olsa dezavantajlarını göz önüne alarak çalışmaların planlanması ve yöntemlerin birlikte yapılması daha doğru ve güvenilir sonuçların alınmasını sağlayacaktır. Moleküler çalışmalarda ise Asya ülkelerinde olduğu gibi tek türe özgü primerlerin seçilmesi göze çarpmaktadır. İnsanlardaki Mikrosporidia enfeksiyonlarının çok büyük bir kısmından *Enterocytozoon bieneusi* sorumlu olsa da tek tür hedefli araştırmalar Mikrosporidia türlerinin sıklığını tam olarak temsil edememektedir. Bu sebeple çalışmaların farklı Mikrosporidia türlerini de kapsamasını sağlayacak şekilde planlanması önem arz etmektedir.

Afrika çalışmalarına genel olarak bakıldığında, yaptığımız bu çalışmadaki sonuçlarla benzer şekilde ishal gibi gastrointestinal şikayetlerin, cinsiyetin ve yaşın Mikrosporidia oranlarına bir etkisi olmadığı raporlanmakla birlikte kimi zaman çocuklardaki oranların daha fazla olduğu bildirilmiştir (214). Yağış mevsimlerinde oranların artması da dikkat edilmesi gereken hususlardan biridir, çünkü sosyoekonomik durumun Mikrosporidia açısından önemi Afrika ülkelerinde daha fazla etkili olmaktadır (214). Afrika ülkelerinde HIV+ gibi bağışıklığı yetersiz/baskılanmış kişilerdeki pozitiflik ile sağlıklı kişilerdeki pozitiflik dereceleri anlamlı şekilde farklılık göstermemektedir. Kontrol grubu olarak seçilen

sağlıklı kişilerde oranların HIV+ kişilere göre daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar mevcutken, benzer oranların da raporlandığı çalışmalar da görülmektedir. (83,215,217). Bu durum çevresel ve kişisel etkilerden kaynaklanmakla birlikte, Avrupa ülkelerinde olduğu gibi Afrika'da da HAART yöntemlerinin kullanılması HIV+ kişilerdeki oranların etkili şekilde azaldığını göstermiştir (217).

Yukarıda bahsi geçen farklı coğrafyalarda gerçekleştirilen çalışmalara bakıldığında, insanların devamlı olarak Mikrosporidia türlerine maruz kaldığını, çevresel, ekonomik vb. etkenlerle birlikte tanı yöntemlerindeki farklılıkların da etkisiyle birbirinden farklı oranların bildirildiği görülmektedir. Ayrıca tek bir tanı yönteminin kullanıldığı çalışmaların da belirtilen oranların değişkenliğine katkıda bulunduğu göz ardı edilmemelidir. Gerek dünya genelinde gerekse ülkemizdeki çalışmalar değerlendirildiğinde Mikrosporidiaların yaygınlığının azımsanmayacak ölçüde olduğu aşikardır. Bu sebeple epidemiyolojik çalışmalar planlanırken örneklemin hastalık gözetmeksizin yapılması, güvenilir olan en az iki yöntemin kullanılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bolu ve Düzce ilindeki insanlarda Mikrosporidia türlerinin varlığı ve yaygınlığını araştırmayı amaçladığımız bu çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda aşağıdaki sonuçlar ortaya konmuştur.

1. Mikroskobik incelemeler sonucunda 400 örnekten 25 (%6,25) tanesinde Mikrosporidia sporları tespit edilmiştir. Bolu'dan temin edilen 188 örnekten 11'inde (%5,8), Düzce'den temin edilen 212 adet örnekten 14'ünde (6,6) Mikrosporidia türleri tespit edilmiştir.
2. Moleküler analizler sonucunda 400 örnekten 49 tanesinde (%12,25) pozitiflik saptanmıştır. Bolu örnekleride %13,3 (25/188), Düzce örneklerinde %11,3 (24/212) Mikrosporidia pozitiflik görülmüştür.
3. Yapılan istatistik analizler sonucunda Mikrosporidiaların dağılımının yaş, cinsiyet ve ishal durumu ile bir anlamlı ilişkisi olmadığı görülmüştür.
4. Tür özel primerler kullanıldığından yalnızca *Enterocytozoon bieneusi* türü için yapılan PZR sonucunda bantlar görülmüş ve bu sebeple tespit edilen türün *Enterocytozoon bieneusi* olduğu anlaşılmıştır.

Yukarıdaki sonuçlar ve literatür karşılaştırmaları neticesinde aşağıdaki öneriler sunulmuştur.

1. Çalışmamızda, Mikrosporidia araştırmalarında tek yöntemin kullanılmasının eksik ve yanlış sonuçlara götürebileceğinden bahsedilmiştir. Bu sebeple yöntem ne kadar güvenilir olursa olsun, gerçekleştirilecek çalışmaların en az iki yöntem ile planlanmasını önermekteyiz.
2. Çalışmamızdaki verilerle birlikte Ülkemizde ve Dünya'da gerçekleştirilen çalışmalara bakıldığında, sağlıklı ve bağışıklığı baskılanmış insanlardaki Mikrosporidia'ların varlığı azımsanmayacak ölçüdedir. Bu sebeple, yapılacak çalışmaların hastalık grubu gözlemeksizin planlanması toplumdaki Mikrosporidia sıklığının belirlenmesi, özelde bağışıklık sistemi yetersiz insanların genelde ise

toplumun bu patojenlerden korunmasında doğru adımların atılmasına yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

3. Literatürde de bahsedildiği gibi bağışıklık sistemi yetersiz/baskılanmış kişilerde bu patojenlerin belirli aralıklarla taramasının faydalı olabileceği düşünülmektedir. Bu tarz taramaların hali hazırda araştırma çalışmalarında kullanılmakta olan multipleks PZR yönteminin rutin tanıda yer almasının yararlı olacağını düşünmekteyiz.
4. Yapılacak sonraki çalışmalarda, örnekleme çeşitliliğinin artırılarak bu patojenlerin yayılış haritasını daha iyi ortaya koymamızı sağlayacaktır. Su kaynakları, evcil-sokak hayvanları gibi farklı canlı ve ortamlardan örnekler alınarak geçiş yollarına ilişkin önemli bilgiler edilebilir.
5. Gerek bu çalışmada elde edilen gerekse farklı konak ve kaynaklardan alınan örneklerde sekans analizi gerçekleştirilerek, Ülkemizdeki Mikrosporidia türlerinin filogenetiğine ilişkin ve türlere özgü ITS genotiplendirmesiyle geçiş yollarına ilişkin önemli bilgilere ulaşılabileceğini düşünmekteyiz.
6. Bununla birlikte yapılacak araştırmalarda genotipte görülebilecek olası farklılıkların fenotipik olarak incelenmesi için elektron mikroskobu yönteminin de eklenmesinin faydalı olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır.)

1. Dunn AM, Smith JE. Microsporidian life cycles and diversity: The relationship between virulence and transmission. *Microbes Infect.* 2001;3(5):381–8.
2. Yaman M, Algi G, Guner BG. Microsporidia Karakterizasyonunda Morfolojik ve Ultrastrüktürel Özellikler. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2015;39(1):52–9.
3. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: Current Status. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19(5):485–92.
4. Han B, Weiss LM. Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiol Spectr.* 2017;5(2):1–17.
5. Yazar S, Kuru O, Hamamci B, Cetinkaya U, Karaman U, Kuk S. Mikrosporidialar ve Mikrosporidiosis. *Türkiye Prazitol Derg.* 2013;37(2):123–34.
6. Karaman Ü, Atambay M, Daldal N, Çolak C. Kanseri Tanısı Almış Hastalarda Mikrosporidium Görülme Sıklığı. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2008;32(2):109–12.
7. Çetinkaya Ü, Hamamci B, Kaynar L, Kuk S, Şahin İ, Yazar S. Kemik İliği Transplant Hastalarında Encephalitozoon intestinalis ve Enterocytozoon bienewsi Varlığının IFA-MAbs Yöntemiyle Araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(3):432–8.
8. Cali A, Becnel JJ, Takvorian PM. Microsporidia. In: *Handbook of the Protists.* 2017. p. 1–60.
9. Franzen C, Müller A. Molecular Techniques for Detection, Species Differentiation, and Phylogenetic Analysis of Microsporidia. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(2):243–85.
10. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: Not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24(5):490–5.
11. Hamamci B, Çetinkaya Ü, Berk V, Kaynar L, Kuk S, Yazar S. Kemoterapi Alan Kanseri Hastalarda Encephalitozoon intestinalis ve Enterocytozoon bienewsi Prevalansı. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(1):105–13.
12. Sancak B, Akyön Y. Microsporidia Genel Özellikleri, Enfeksiyonları ve Laboratuvar Tanısı. *Mikrobiyol Bült.* 2005;39:513–22.
13. Brown M, Longano A, Dendle C, Polkinghorne KR, Kanellis J. Confirmed microsporidian graft infection in a HIV-negative renal transplant recipient: A case report and review of the literature. *Transplant Infectious Disease.* 2018;20(3):1–10.
14. Kicia M, Szydlowicz M, Cebulski K, Jakuszko K, Piesiak P, Kowal A, et al. Symptomatic respiratory Encephalitozoon cuniculi infection in renal transplant recipients. *Int J Infect Dis.* 2019;79(5):21–5.
15. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human Microsporidian Infections. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(4):426–61.

16. Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. Epidemiology of Microsporidiosis: Sources and Modes of Transmission. *Vet Parasitol.* 2004;126:145–66.
17. Karaman Ü. İnsanlarda Microsporidia'ların Epidemiyolojisi (Malatya İli Örneği). [Malatya]: İnönü Üniversitesi; 2007.
18. Hamamcı B. Farklı Hasta Gruplarında Enterocytozoon bienersi'nin (Protozoa, Microsporidia) Araştırılması. [Kayseri]: Erciyes Üniversitesi; 2013.
19. Alfa Cisse O, Ouattara A, Thellier M, Accoceberry I, Biligui S, Minta D, et al. Evaluation of an Immunofluorescent-Antibody Test Using Monoclonal Antibodies Directed against Enterocytozoon bienersi and Encephalitozoon intestinalis for Diagnosis of Intestinal Microsporidiosis in Bamako (Mali). *J Clin Mikrobiol.* 2002;40(5):1715–8.
20. 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 of Trop Med Public Health.* 2011;42(1):19–24.
21. Türk S. Microsporidia: Genel Özellikleri ve Güncel Laboratuvar Tanısı. *İnfeksiyon Dergisi.* 2009;23(2):89–95.
22. Honigberg BM, Balamuth W, Bovee EC, Corliss JO, Gojdics M, Hall RP, et al. A Revised Classification of the Phylum Protozoa. *J Protozool.* 1964;11(1):7–20.
23. Yaman M, Yarılgac ES, Guner BG, Erturk O. Presence of Nosemosis in Honeybees (*Apis mellifera*) in Ordu Province. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2015;39(1):47–51.
24. Keeling PJ, McFadden GI. Origins of microsporidia. *Trends Microbiol.* 1998;6(1):19–23.
25. Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:93–116.
26. Didier ES. Microsporidiosis: An Emerging and Opportunistic Infection in Humans and Animals. *Acta Trop.* 2005;94(1):61–76.
27. Edlind TD, Li J, Visvesvara GS, Vodkin MH, McLaughlin GL, Katiyar SK. Phylogenetic analysis of β -tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol Phylogenet Evol.* 1996;5(2):359–67.
28. Hirt RP, Logsdon JM, Healy B, Dorey MW, Doolittle WF, Embley TM. Microsporidia are related to fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(2):580–5.
29. Keeling PJ, Fast NM, Corradi N. Microsporidian genome structure and function. In: Weiss LM, Becnel JJ, editors. *Microsporidia-Pathogens of Opportunity*. Ames Wiley-Blackwell Press; 2014. p. 221–30.
30. Corradi N. Microsporidia : Eukaryotic Intracellular Parasites Shaped by Gene Loss and Horizontal Gene Transfers. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69(1):167–83.
31. Fischer WM, Palmer JD. Evidence From Small-Subunit Ribosomal RNA Sequences for a Fungal Origin of Microsporidia. *Mol Phylogenet Evol.* 2005;36(3):606–22.
32. Tanabe Y, Watanabe MM, Sugiyama J. Are Microsporidia really related to Fungi?: A Reappraisal Based on Additional Gene Sequences from Basal Fungi. *Mycol Res.* 2002;106(12):1380–91.

33. Franzen C. Microsporidia: How can they invade other cells? *Trends Parasitol.* 2004;20(6):275–9.
34. Dean P, Sendra KM, Williams TA, Watson AK, Major P, Nakjang S, et al. Transporter Gene Acquisition and Innovation in the Evolution of Microsporidia Intracellular Parasites. *Nat Commun.* 2018;9(1):1–12.
35. Franzen C, Müller A. Molecular Techniques for Detection, Species Differentiation, and Phylogenetic Analysis of Microsporidia. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(2):243–85.
36. Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:93–116.
37. Vávra J, Lukeš J. Microsporidia and “The Art of Living Together.” In: Rollison D, editor. *Advances in Parasitology*. First Edition. Academic Press; 2013. p. 253–319.
38. Bohne W, Ferguson DJP, Kohler K, Gross U. Developmental Expression of a Tandemly Repeated, Glycine- and Serine- Rich Spore Wall Protein in the Microsporidian Pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect Immun.* 2000;68(4):2268–75.
39. Hayman JR, Hayes SF, Amon J, Nash TE. Developmental Expression of Two Spore Wall Proteins During Maturation of the Microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Infect Immun.* 2001;69(11):7057–66.
40. Vávra J, Larsson RJI. Structure of Microsporidia. In: Weiss ML, Becnel JJ, editors. *Pathogens of Opportunity*. First Edition. USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 1–71.
41. Ohshima K. On the Function of the Polar Filament of *Nosema Bombycis*. *Parasitology.* 1937;29(2):220–4.
42. Kudo RR, Daniels EW. An Electron Microscope Study of the Spore of a Microsporidian, *Thelohania californica*. *J Protozool.* 1963;10(1):112–20.
43. Williams TA, Nakjang S, Campbell SE, Freeman MA, Moore K, Hirt RP, et al. A Recent Whole-Genome Duplication Divides Populations of a Globally Distributed Microsporidian. 2016;33(8):2002–15.
44. Bigliardi E, Sacchi L. Cell Biology and Invasion of the Microsporidia. *Microbes Infect.* 2001;3(5):373–9.
45. Magaud A, Achbarou A, Desportes-Livage I. Cell Invasion by the Microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. *J Eukaryot Microbiol.* 1997;44(s6):81s–81s.
46. Ghosh K, Weiss LM. Molecular Diagnostic Tests for Microsporidia. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009;1–13.
47. Keeling PJ. Parasites Go the Full Monty. *Nature.* 2001;414(6862):401–2.
48. Katinka MD, Duprat S, Cornillott E, Méténler G, Thomarat F, Prensier G, et al. Genome Sequence and Gene Compaction of the Eukaryote Parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature.* 2001;414(6862):450–3.
49. Pombert JF, Xu J, Smith DR, Heiman D, Young S, Cuomo CA, et al. Complete Genome Sequences from Three Genetically Distinct Strains Reveal High Intraspecies Genetic Diversity in the Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Eukaryot Cell.* 2013;12(4):503–11.

50. Gill EE, Fast NM. Stripped-Down DNA Repair in a Highly Reduced Parasite. *BMC Mol Biol.* 2007;8(1):24.
51. Hacker C, Howell M, Bhella D, Lucocq J. Strategies for Maximizing ATP Supply in the Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*: Direct Binding of Mitochondria to the Parasitophorous Vacuole and Clustering of the Mitochondrial Porin VDAC. *Cellular Microbiol.* 2014;16(4):565–79.
52. Scanlon M, Leitch GJ, Visvesvara GS, Shaw AP. Relationship between the Host Cell Mitochondria and the Parasitophorous Vacuole in Cells Infected with *Encephalitozoon Microsporidia*. *J Eukaryot Microbiol.* 2004;51(1):81–7.
53. García-Torres I, De La Mora-De La Mora I, Hernández-Alcántara G, Molina-Ortiz D, Caballero-Salazar S, Olivios-García A, et al. First Characterization of a Microsporidian Triosephosphate Isomerase and the Biochemical Mechanisms of its Inactivation to Propose a New Druggable Target. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–12.
54. Lallo MA, Da Costa LFV, De Castro JM. Effect of Three Drugs against *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Immunosuppressed Mice. *Antimicro Agents Chemother.* 2013;57(7):3067–71.
55. Moretto MM, Khan IA, Weiss LM. Gastrointestinal cell mediated immunity and the microsporidia. *PLoS Pathog.* 2012;8(7):4.
56. Sobottka I, Albrecht H, Schafer H, Schottelius J, Visvesvara GS, Laufs R, et al. Disseminated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in a patient with AIDS: Novel diagnostic approaches and autopsy-confirmed parasitological cure following treatment with albendazole. *J Clin Microbiol.* 1995;33(11):2948–52.
57. Visvesvara GS. In Vitro Cultivation of Microsporidia of Clinical Importance In Vitro Cultivation of Microsporidia of Clinical Importance. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(3):401–13.
58. Ashikin A, Al-Mekhlafi HM, Moktar N, Anuar TS. Molecular Detection and Species Identification of *Enterocytozoon bienersi* Isolated from Immunocompetent Orang Asli in Malaysia. *Parasitol Int.* 2017;66:163–5.
59. Mathis A, Weber R, Deplazes P, Villamor E, Fawzi WW, Aguero-rosenfeld ME, et al. Zoonotic Potential of the Microsporidia. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(3):423–45.
60. Henriques-Gil N, Haro M, Izquierdo F, Fenoy S, Águilat C Del. Phylogenetic Approach to the Variability of the Microsporidian *Enterocytozoon bienersi* and its Implications for Inter- and Intrahost Transmission. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(10):3333–42.
61. Li W, Cama V, Feng Y, Gilman RH, Bern C, Zhang X, et al. Population Genetic Analysis of *Enterocytozoon bienersi* in Humans. *Int J Parasitol.* 2012 Mar;42(3):287–93.
62. Li W, Feng Y, Santin M. Host Specificity of *Enterocytozoon bienersi* and Public Health Implications. *Trends Parasitol.* 2019;35(6):436–51.
63. Li W, Feng Y, Zhang L, Xiao L. Potential Impacts of Host Specificity on Zoonotic or Interspecies Transmission of *Enterocytozoon bienersi*. *Infect Genet Evol.* 2019;75:104033.
64. Mori H, Mahittikorn A, Watthanakulpanich D, Komalamisra C, Sukthana Y. Zoonotic Potential of *Enterocytozoon bienersi* Among Children in Rural Communities in Thailand. *Parasite.* 2013;20(14):1–6.

65. Ghoyouchi R, Mahami-Oskoue M, Rezamand A, Spotin A, Aminisani N, Nami S, et al. Molecular Phylodiagnosis of *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* in Children with Cancer: Microsporidia in Malignancies as an Emerging Opportunistic Infection. *Acta Parasitol.* 2019;64(1):103–11.
66. Da Silva Fiuza VR, Lopes CWG, de Oliveira FCR, Fayer R, Santin M. New findings of *Enterocytozoon bienersi* in Beef and Dairy Cattle in Brazil. *Vet Parasitol.* 2016;216:46–51.
67. Li W, Li Y, Song M, Lu Y, Yang J, Tao W, et al. Prevalence and genetic characteristics of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon bienersi* and *Giardia duodenalis* in cats and dogs in Heilongjiang province, China. *Vet Parasitol.* 2015;208(3–4):125–34.
68. Guo Y, Alderisio KA, Yang W, Cama V, Feng Y, Xiao L. Host Specificity and Source of *Enterocytozoon bienersi* Genotypes in a Drinking Source Watershed. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(1):218–25.
69. Chabchoub N, Abdelmalek R, Breton J, Kanoun F, Thellier M, Bouratbine A, et al. Genotype Identification of *Enterocytozoon bienersi* Isolates From Stool Samples of HIV-Infected Tunisian Patients. *Parasite.* 2012;19:147–51.
70. Sak B, Brady D, Pelikánová M, Květoňová D, Rost M, Kostka M, et al. Unapparent Microsporidial Infection Among Immunocompetent Humans in the Czech Republic. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):1064–70.
71. Yang H, Lin Y, Li Y, Song M, Lu Y, Li W. Molecular Characterization of *Enterocytozoon bienersi* Isolates in Laboratory Macaques in north China: Zoonotic Concerns. *Parasitol Res.* 2017;116(10):2877–82.
72. Shen Y, Gong B, Liu X, Wu Y, Yang F, Xu J, et al. First Identification and Genotyping of *Enterocytozoon bienersi* in Humans in Myanmar. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):1–9.
73. Xiang L, Guo F, Yu Y, Parson LS, Lacoste L, Gibson A, et al. Multiyear Survey of Coccidia, Cryptosporidia, Microsporidia, Histomona, and Hematozoa in Wild Quail in the Rolling Plains Ecoregion of Texas and Oklahoma, USA. *J Eukaryot Microbiol.* 2016;0:1–14.
74. Weber R, Bryan RT. Microsporidial Infections in Immunodeficient and Immunocompetent Patients. *Clin Infect Dis.* 1994;19:517–21.
75. Sak B, Kvac M, Kucerova Z, Kvetonova D, Saková K. Latent Microsporidial Infection in Immunocompetent Individuals – A Longitudinal Study. *Plos Negl Trop Dis.* 2011;5(5):1–5.
76. Anuar TS, Bakar NH, Al-Mekhlafi HM, Moktar N, Osman E. Prevalence and Risk Factors for Asymptomatic Intestinal Microsporidiosis Among Aboriginal School Children in Pahang, Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2016;47(3):441–9.
77. Bryan RT, David A. Epidemiology of Microsporidiosis. In: Weiss LM, editor. *The Microsporidia and Microsporidiosis*. First Edition. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1999. p. 502–16.
78. Greigert V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Candolfi E, Brunet J. Intestinal Microsporidiosis in Strasbourg from 2014 to 2016: Emergence of an *Enterocytozoon bienersi* Genotype of Asian Origin. *Emerg Microbes Infect.* 2018;97(7):1–7.

79. Esteghamati A, Khanaliha K, Bokharaei-Salim F, Sayyahfar S, Ghaderipour M. Prevalence of Intestinal Parasitic Infection in Cancer, Organ Transplant and Primary Immunodeficiency Patients in Tehran, Iran. *Asian Pac Journal Cancer Prev.* 2019;20(2):495–501.
80. Hocevar SN, Paddock CD, Spak CW, Diaz-luna H, Castillo I, Luna S, et al. HHS Public Access Acquired Through Solid Organ Transplantatiton: A Public Health Investigation. *Ann Intern Med.* 2015;160(4):213–20.
81. Karimi K, Mirjalali H, Niyyati M, Haghighi A, Pourhoseingholi MA, Sharifdini M, et al. Molecular Epidemiology of *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon sp.*, Among Immunocompromised and Immunocompetent Subjects in Iran. *MicrobPathog.* 2020;141:103988.
82. Lono A, Kumar S, Chye TT. Detection of microsporidia in local HIV-positive population in Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(7):409–13.
83. Nkinin SW, Asonganyi T, Didier ES, Kaneshiro ES. Microsporidian Infection Is Prevalent in Healthy People in Cameroon. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2841–6.
84. Qiu L, Xia W, Li W, Ping J, Ding S, Liu H. The Prevalence of Microsporidia in China : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–9.
85. Hern OX, Alvarez-torres O, Uribe-uribe NO. Case Report Microsporidia Infection in a Mexican Kidney Transplant Recipient. *Case Rep. Nephrol.* 2012.
86. Zang M, Li J, Tang C, Ding S, Huang W, Qin Q, et al. Prevalence and Phylogenetic Analysis of *Microsporidium Enterocytozoon bienersi* in Diarrheal Patients. *Pathogens.* 2021;10(2):1–10.
87. Sadler F, Peake N, Borrow R, Rowl PL, Wilkins EGL, Curry A. Genotyping of *Enterocytozoon bienersi* in AIDS patients from the north west of England. *Journal of Infection.* 2002;44(1):39–42.
88. Çetinkaya Ü, Yazar S, Kuk S, Sivcan E, Kaynar L, Arslan D, et al. The High Prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* in Patients Receiving Chemotherapy and Children with Growth Retardation and the Validity of Real-Time PCR in its Diagnosis. *Turk J Med Sci.* 2016;46(4):1050–8.
89. Özkoç S, Bayram Delibaş S, Akısü Ç. Evaluation of Pulmonary Microsporidiosis in Iatrogenically Immunosuppressed Patients. *Tuberk Toraks.* 2016;61(1):9–16.
90. Calik S, Karaman U, Colak C. Prevalence of *Microsporidium* and Other Intestinal Parasites in Children from Malatya, Turkey. *Indian J Microbiol.* 2011;51(3):345–9.
91. Atambay M, Karaman Ü, Daldal N, Çolak C. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Parazitoloji Laboratuvarına Gelen Erişkin Hastalarda *Microsporidium* Görülme Sıklığı. *Türkiye Parazitol Derg.* 2008;32(2):113–5.
92. Karaman Ü, Şener S, Çalik S, Şaşmaz S. Akut ve Kronik Ürtikerli Hastalarda Microsporidia Pozitiflik Oranı. *Mikrobiyol Bül.* 2011;45(1):168–73.
93. Türk S, Doğruman Al F, Karaman Ü, Kuştımur S. Investigation of Microsporidia Prevalence by Different Staining Methods in Cases of Diarrhea. *Mikrobiyol Bul.* 2012;46(1):85–92.
94. Şıvgın S, Eser B, Kaynar L, Kurnaz F, Şıvgın H, Yazar S, et al. *Encephalitozoon intestinalis* : A Rare Cause of Diarrhea in an Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (

- HSCT) Recipient Complicated by Albendazole-Related Hepatotoxicity. *Türk J Hematol.* 2013;30(2):204–8.
95. Mumcuoglu I, Cetin F, Dogruman Al F, Oguz I, Aksu N. Prevalence of Microsporidia in Healthy Individuals and Immunocompetent Patients with Acute and Chronic Diarrhea. *Infect Dis.* 2016;48(2):133–7.
 96. Büget E, Büyükbaba-boral Ö, Kirkoyun-uysal H, Nazlıcan Ö, Ögüt T, Şengür G. Türkiye’de Bir AIDS Hastasında İlk Mikrosporidiaz ve Solunum Sistemini Tutan İlk Kriptosporidiaz Olgusu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2000;30:166–70.
 97. Çetinkaya Ü, Caner A. Prevalence of Microsporidiosis in Different Hosts in Turkey: A Meta-analysis. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2020;44(4):232–8.
 98. Javanmard E, Mirjalali H, Niyyati M, Jalilzadeh E, Seyed Tabaei SJ, Asadzadeh Aghdaei H, et al. Molecular and Phylogenetic Evidences of Dispersion of Human-Infecting Microsporidia to Vegetable Farms via Irrigation with Treated Wastewater: One-Year Follow Up. *Int J Hyg Environ Health.* 2018 May;221(4):642–51.
 99. Moss JA, Snyder RA. Surveillance of Microsporidia and Protozoan Pathogens in Pensacola Florida: A One-year Study. *J Eukaryot Microbiol.* 2019;66(4):617–24.
 100. Karaman Ü, Koloren Z, Demirel E, Ayaz E, Seferoğlu O. Giresun İli’ndeki Sularda Parazitlerin Varlığı. *Dicle Medical Journal.* 2016;43(4):521–6.
 101. Cama VA, Pearson J, Cabrera L, Pacheco L, Gilman R, Meyer S, et al. Transmission of *Enterocytozoon bienersi* Between a Child and Guinea Pigs. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8):2708–10.
 102. Zhao W, Zhou H, Jin H, Sun L, Li P, Liu M, et al. Genotyping of *Enterocytozoon bienersi* Among Captive Long-Tailed Macaques (*Macaca fascicularis*) in Hainan Province: High Genetic Diversity and Zoonotic Potential. *Acta Trop.* 2020;201:1–7.
 103. Li W, Xiao L. Ecological and Public Health Significance of *Enterocytozoon bienersi*. *One Health.* 2021;12:1–8.
 104. Khan IA, Moretto M. Role of Gamma Interferon in Cellular Immune Response Against Murine *Encephalitozoon cuniculi* Infection. *Infect Immun.* 1999;67(4):1887–93.
 105. Valenčáková A, Revajová V, Bálent P, Lešník F, Levkut M. Immunosuppressive Effect of *Encephalitozoon cuniculi*. *Bull Vet Inst.* 2003;47(1):113–20.
 106. Moretto MM, Lawlor EM, Khan IA. Aging Mice Exhibit a Functional Defect in Mucosal Dendritic Cell Response Against an Intracellular Pathogen. *Journal of immunology.* 2008;181(11):7977–84.
 107. Moretto MM, Harrow DI, Khan IA. Effector CD8 T Cell Immunity in Microsporidial Infection: A Lone Defense Mechanism. *Semin Immunopathol.* 2015;37(3):281–7.
 108. Sak B, Salát J, Horká H, Saková K, Ditrich O. Antibodies Enhance the Protective Effect of CD4+ T Lymphocytes in SCID Mice Perorally Infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasite Immunol.* 2006;28(3):95–9.
 109. Hermanek J, Koudela B, Kucerova Z, Ditrich O, Travnicek J. Prophylactic and Therapeutic Immune Reconstitution of SCID Mice Infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol (Praha).* 1993;40:287–91.

110. Didier ES, Varner PW, Didier PJ, Aldras AM, Millichamp NJ, Murphey-Corb M, et al. Experimental Microsporidiosis in Immunocompetent and Immunodeficient Mice and Monkeys. *Folia Parasitol.* 1994;41(1):1–11.
111. Braunfuchsova P, Salát J, Kopecký J. CD8 + T Lymphocytes Protect SCID Mice against *Encephalitozoon cuniculi* Infection. *Int J Parasitol.* 2001;31(7):681–6.
112. Khan I, Schwartzman JD, Kasper LH, Moretto M. CD8+ CTLs are Essential for Protective Immunity against *Encephalitozoon cuniculi* Infection. *Journal of immunology.* 1999;162(10):6086–91.
113. Moretto MM, Weiss LM, Combe CL, Khan IA. IFN- γ -Producing Dendritic Cells Are Important for Priming of Gut Intraepithelial Lymphocyte Response Against Intracellular Parasitic Infection. *J Immunol.* 2007;179(4):2485–92.
114. Moretto M, Casciotti L, Durell B, Khan IA. Lack of CD4+ T Cells Does Not Affect Induction of CD8+ T-cell Immunity against *Encephalitozoon cuniculi* Infection. *Infect Immun.* 2000;68(11):6223–32.
115. Moretto M, Weiss LM, Khan IA. Induction of a Rapid and Strong Antigen-Specific Intraepithelial Lymphocyte Response During Oral *Encephalitozoon cuniculi* Infection. *J Immunol.* 2004;172(7):4402–9.
116. Bhadra R, Moretto MM, Castillo JC, Petrovas C, Ferrando-Martinez S, Shokal U, et al. Intrinsic TGF- β Signaling Promotes Age-Dependent CD8+ T cell Polyfunctionality Attrition. *Journal of Clinical Investigation.* 2014;124(6):2441–55.
117. Feng X, Akiyoshi DE, Sheoran A, Singh I, Hanawalt J, Zhang Q, et al. Serial Propagation of the Microsporidian *Enterocytozoon bienersi* of Human Origin in Immunocompromised Rodents. *Infect Immun.* 2006;74(8):4424–9.
118. Hall JA, Bouladoux N, Sun CM, Wohlfert EA, Blank RB, Zhu Q, et al. Commensal DNA Limits Regulatory T Cell Conversion and Is a Natural Adjuvant of Intestinal Immune Responses. *Immunity.* 2008;29(4):637–49.
119. Conteas CN, Sowerby T, Berlin GW, Dahlan F, Porchen Robert, Donovan J, et al. Fluorescence Techniques for Diagnosing Intestinal Microsporidiosis in Stool, Enteric Fluid and Biopsy Specimens from AIDS Patients with Chronic Diarrhea. *Arch Pathol Lab Med.* 1996;120:847–53.
120. Larsson JIR. Identification of Microsporidian Genera (Protozoa, Microspora) a Guide with Comments on the Taxonomy. *Arch Protistenkd.* 1988;136:1–37.
121. Ignatius R, Henschel S, Liesenfeld O, Mansmann U, Schneider T, Heise W, et al. Comparative Evaluation of Modified Trichrome and Uvitex 2B Stains for Detection of Low Numbers of Microsporidian Spores in Stool Specimens. *J Clin Microbiol.* 1997;35(9):2266–9.
122. Carter PL, Pherson DWMAC. Modified Technique To Recover Microsporidian Spores in Sodium Acetate-Acetic Acid-Formalin-Fixed Fecal Samples by Light Microscopy and Correlation with Transmission Electron Microscopy. *J Clin Microbiol.* 1996;34(11):2670–3.
123. Salleh FM, Al-mekhlafi AM, Nordin A, Yasin AM, Al-mekhlafi HM, Mokhtar N. Evaluation of Gram-Chromotrope Kinyoun Staining Technique: Its Effectiveness in Detecting Microsporidian Spores in Fecal Specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;69(1):82–5.

124. Didier ES. Discrimination Between Viable and Dead *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidian) Spores by Dual Staining with Sytox Green and Calcofluor White M2R. *J Clin Mikrobiol.* 2000;38(10):3811–4.
125. Joseph J, Vemuganti GK, Garg P, Sharma S. Histopathological Evaluation of Ocular Microsporidiosis by Different Stains. *BMC Clin Pathol.* 2006;8:1–8.
126. Field AS, Marriot DJ, Hing MC. The Warthin-Starry Stain in the Diagnosis of Small Intestinal Microsporidiosis in HIV-Infected Patients. *Folia Parasitol.* 1993;40: 261–6.
127. Reisner BS, Spring J, Ascp MT. Evaluation of a Combined Acid-Fast – Trichrome Stain for Detection of Microsporidia and *Cryptosporidium parvum*. *ArchPatholLabMed.* 2000;124:777–9.
128. Franzen C, Müller A. Microsporidiosis : Human Diseases and Diagnosis. *Microbes Infect.* 2001;3(5):389–400.
129. Garcia LS. Laboratory Identification of the Microsporidia. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):1892–901.
130. Gool T Van, Snijders F, Reiss P, Schattenkerk JKME, Weerman MAVDB. Papers Diagnosis of Intestinal and Disseminated Microsporidial Infections in Patients with HIV by A New Rapid Fluorescence Technique. *J Clin Pathol.* 1993;46:694–9.
131. Jordan CN, Zajac AM, Snowden KS, Lindsay DS. Direct agglutination Test for *Encephalitozoon cuniculi*. *Vet Parasitol.* 2006;135(3–4):235–40.
132. Sheoran AS, Feng X, Singh I, Chapman-Bonofiglio S, Kitaka S, Hanawalt J, et al. Monoclonal Antibodies against *Enterocytozoon bienersi* of Human Origin. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(9):1109–13.
133. Ghoshal U, Khanduja S, Pant P, Ghoshal UC. Evaluation of Immunofluorescence Antibody Assay for the Detection of *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitol Res.* 2016;115(10):3709–13.
134. Alfa Cisse O, Ouattara A, Thellier M, Accoceberry I, Biligui S, Minta D, et al. Evaluation of an Immunofluorescent-Antibody Test Using Monoclonal Antibodies Directed against *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* for Diagnosis of Intestinal Microsporidiosis in Bamako (Mali). *J Clin Mikrobiol.* 2002;40(5):1715–8.
135. Singh I, Sheoran AS, Zhang Q, Carville A, Tzipori S. Sensitivity and Specificity of a Monoclonal Antibody-Based Fluorescence Assay for d, Detecting *Enterocytozoon bienersi* Spores in Feces of Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(10):1141–4.
136. Furuya K, Miwa S, Omura M, Asakura T, Yamano K, Takatori K, et al. Mouse Monoclonal Immunoglobulin E Antibodies Specific for the Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* Polar Tube Protein 1. *Hybridoma.* 2008;27(3):153–7.
137. Polonais V, Mazet M, Wawrzyniak I, Texier C, Blot N, El Alaoui H, et al. The Human Microsporidian *Encephalitozoon hellem* Synthesizes Two Spore Wall Polymorphic Proteins Useful for Epidemiological Studies. *Infect Immun.* 2010;78(5):2221–30.
138. 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 of Trop Med Public Health.* 2011;42(1):19–24.

139. Izquierdo F, Moura H, Bornay-Llinares FJ, Sriram R, Hurtado C, Magnet Á, et al. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against *Encephalitozoon intestinalis* and *Encephalitozoon* sp. Spores and Their Developmental Stages. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):1–12.
140. Accoceberry I, Thellier M, Desportes-livage I, Achbarou A, Biligui S, Danis M, et al. Production of Monoclonal Antibodies Directed against the *Microsporidium Enterocytozoon bienewisi*. 1999;37(12):4107–12.
141. Chabchoub N, Abdelmalek R, Issa S, Kanoun F, Ben Chaabene T, Bouratbine A, et al. Contribution of PCR for Detection and Identification of Intestinal Microsporidia in HIV-Infected Patients. *Pathol Biol*. 2012;60(2):91–4.
142. He Q, Vossbrinck CR, Yang Q, Meng XZ, Luo J, Pan GQ, et al. Evolutionary and Functional Studies on Microsporidian ATP-Binding Cassettes: Insights into the Adaptation of Microsporidia to Obligated Intracellular Parasitism. *Infect Genet Evol*. 2019;68:136–44.
143. Mohammadpour I, Bozorg-Ghalati F, Motazedian MH. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Microsporidia and *Cryptosporidium* spp. in Patients with Multiple Bowel Biopsies from Fars Province, Iran. *Ann Parasitol*. 2016;62(4):321–30.
144. Dowd SE, Gerba CP, Enriquez FJ, Pepper IANL. PCR Amplification and Species Determination of Microsporidia in Formalin-Fixed Feces after Immunomagnetic Separation. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(1):333–6.
145. Da Silva AJ, Schwartz DA, Visvesvara GS, De Moura H, Slemenda SB, Pieniazek NJ. Sensitive PCR Diagnosis of Infections by *Enterocytozoon bienewisi* (microsporidia) Using Primers based on the Region Coding for Small-Subunit rRNA. *J Clin Microbiol*. 1996;34(4):986–7.
146. Valenčáková A, Sučík M. Alternatives in Molecular Diagnostics of *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* Infections. *J Fungi*. 2020;6(3):114.
147. Vossbrinck CR, Debrunner-Vossbrinck BA. Molecular Phylogeny of the Microsporidia: Ecological, Ultrastructural and Taxonomic Considerations. *Folia Parasitol (Praha)*. 2005;52(1–2):131–42.
148. Usluca S, Aksoy Ü. İmmün Sistemi Baskılanmış bir Çocukta *Microsporidium* spp. Enfeksiyonunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanımlanması. *Mikrobiyol Bül*. 2010;44:679–83.
149. Çetinkaya Ü, Charyyeva A, Sivcan E, Gürbüz E. Evaluation of Four Commercial DNA Extraction Kits for the Detection of Microsporidia and the Importance of Pretreatments in DNA Isolation. *Acta Parasitol*. 2018;63(2):386–92.
150. Han B, Polonais V, Sugi T, Yakubu R, Takvorian PM, Cali A, et al. The Role of Microsporidian Polar Tube Protein 4 (PTP4) in Host Cell Infection. *PLoS Pathog*. 2017;13(4):1–28.
151. Han B, Moretto M, Weiss L. *Encephalitozoon*: Tissue Culture, Cryopreservation, and Murine Infection. *Curr Protoc Microbiol*. 2019;52(1):1–19.
152. MacLeod MJ, Vo NTK, Mikhaeil MS, Monaghan SR, Alexander JAN, Saran MK, et al. Development of a Continuous Cell Line from Larval Atlantic Cod (*Gadus morhua*) and Its Use in the Study of the Microsporidian, *Loma morhua*. *J Fish Dis*. 2018;41:1359–72.

153. Beauvais B, Sarfati C, Challier S, Derouin F. In Vitro Model to Assess Effect of Antimicrobial Agents on *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(10):2440–8.
154. Waller T. Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to Various Temperatures, Disinfectants and Drugs. *Lab Anim*. 1979;13(3):227–30.
155. Han B, Moretto M, Weiss L. *Encephalitozoon*: Tissue Culture, Cryopreservation, and Murine Infection. *Curr Protoc Microbiol*. 2018;72:1–19.
156. Visvesvara GS. In Vitro Cultivation of Microsporidia of Clinical Importance In Vitro Cultivation of Microsporidia of Clinical Importance. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(3):401–13.
157. Moss DM, Arrowood MJ. Quantification of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Mouse Fecal Specimens Using Immunomagnetic Particles and Two-Color Flow Cytometry. *J Parasitol*. 2001;87(2):406.
158. Moss DM, Croppo GP, Wallace S, Visvesvara GS. Flow cytometric analysis of microsporidia belonging to the genus *Encephalitozoon*. *J Clin Microbiol*. 1999;37(2):371–5.
159. Muldrow LL, Tyndall RL, Fliermans CB. Application of flow cytometry to studies of pathogenic free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol*. 1982;44(6):1258–69.
160. Saito-Ito A, Akai Y, He S, Kimura M, Kawabata M. A rapid, simple and sensitive flow cytometric system for detection of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int*. 2001;50(4):249–57.
161. Gay-Andrieu F, Cozon GJN, Ferrandiz J, Kahi S, Peyron F. Flow Cytometric Quantification of *Toxoplasma gondii* Cellular Infection and Replication. *J Parasitol*. 1999;85(3):545–9.
162. Fuller AL, McDougald LR. Analysis of Coccidian Oocyst Populations by Means of Flow Cytometry. *J Protozool*. 1989;36(2):143–6.
163. Santillana-Hayat M, Sarfati C, Fournier S, Chau F, Porcher R, Molina JM, et al. Effects of Chemical and Physical Agents on Viability and Infectivity of *Encephalitozoon intestinalis* Determined by Cell Culture and Flow Cytometry. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):2049–51.
164. Franzen C, Mu A, Hartmann P, Salzberger B. Quantitation of Microsporidia in Cultured Cells by Flow Cytometry. *The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2004;60(1):107–14.
165. Neurophilia P, West K, Miles R, Kent ML, Frazer JK, Al WET. Unusual Fluorescent Granulomas and Myonecrosis in *Danio Rerio* Infected by Microsporidian Pathogen *Pseudoloma neurophilia*. *Fish Haus*. 2014;11(3):283–90.
166. Abou-El-naga IF, Said DE, Gaafar MR, Ahmed SM, El-Deeb SA. A New Scope for Orlistat: Effect of Approved Anti-Obesity Drug against Experimental Microsporidiosis. *Med Mycol*. 2019;57(2):181–95.
167. Balla KM, Troemel ER. Microreview *Caenorhabditis elegans* as a Model for Intracellular Pathogen Infection. *Cell Microbiol*. 2013;15:1313–22.

168. Reinke AW, Balla KM, Bennett EJ, Troemel ER. Identification of Microsporidia Host-Exposed Proteins Reveals a Repertoire of Rapidly Evolving Proteins. *Nat Commun.* 2017;8:1–11.
169. Abou-El-Naga IF, Gaafar MR, Gomaa MM, Khedr SI, Achy SN El. Encephalitozoon intestinalis: A New Target for Auranofin in a Mice Model. *Med Mycol.* 2019;58:810–9.
170. Li Y, Tao M, Ma F, Pan G, Zhou Z, Wu Z. A Monoclonal Antibody that Tracks Endospore Formation in the Microsporidium *Nosema bombycis*. *PLoS One.* 2015;10(3):1–13.
171. Martín-Hernández R, Higes M, Sagastume S, Juarranz Á, Dias-Almeida J, Budge GE, et al. Microsporidia Infection Impacts the Host Cell's Cycle and Reduces Host Cell Apoptosis. *PLoS One.* 2017;12(2):e0170183.
172. Kotkova M, Sak B, Kvetonova D, Kvac M. Latent Microsporidiosis Caused by *Encephalitozoon cuniculi* in Immunocompetent Hosts: A Murine Model Demonstrating the Ineffectiveness of the Immune System and Treatment with Albendazole. *PLoS One.* 2013;8(4):1–7.
173. Schmidt EC, Shadduck JA. Mechanisms of Resistance to the Intracellular Protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in Mice. *J Immunol.* 1984;133(5):2712–9.
174. Calderaro A, Piergianni M, Buttrini M, Montecchini S, Piccolo G, Gorrini C, et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *PLoS One.* 2015;10(4):1–16.
175. Cassagne C, Pratlong F, Jeddi F, Benikhlef R, Aoun K, Normand AC, et al. Identification of *Leishmania* at the Species Level with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(6):551–7.
176. Glassmeyer ST, Ware MW, Schaefer FW, Shoemaker JA, Kryak DD. An Improved Method for the Analysis of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. *J Eukaryot Microbiol.* 2007;54(6):479–81.
177. Karger A, Kampen H, Bettin B, Dautel H, Ziller M, Hoffmann B, et al. Species Determination and Characterization of Developmental Stages of Ticks by Whole-Animal Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3(2):78–89.
178. Murugaiyan J, Roesler U. MALDI-TOF MS Profiling-Advances in Species Identification of Pests, Parasites, and Vectors. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7.
179. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* 2010;5(11):1733–54.
180. Moura H, Ospina M, Woolfitt AR, Barr JR, Visvesvara GS. Analysis of four human microsporidian isolates by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Eukaryot Microbiol.* 2003;50(3):156–63.
181. He Q, Leitch GJ, Visvesvara GS, Wallace S. Effects of Nifedipine, Metronidazole, and Nitric Oxide Donors on Spore Germination and Cell Culture Infection of the Microsporidia *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon intestinalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(1):179–85.

182. Han B, Weiss LM. Therapeutic Targets for the Treatment of Microsporidiosis in Humans. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(11):903–15.
183. Menotti J, Cassinat B, Porcher R, Sarfati C, Derouin F, Molina J. Development of a Real-Time Polymerase-Chain-Reaction Assay for Quantitative Detection of *Enterocytozoon bienersi* DNA in Stool Specimens from Immunocompromised Patients with Intestinal Microsporidiosis. *J Infect Dis*. 2003;187(9):1469–74.
184. 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(4):1410–3.
185. Snowden KF, Didier ES, Orenstein JM, Shadduck JA. Animal Models of Human Microsporidial Infections. *LanAnim*. 1998;48(6):589–92.
186. Santiana M, Pau C, Takvorian PM, Cali A. Analysis of the Beta-Tubulin Gene and Morphological Changes of the *Microsporidium Annaliia algerae* both Suggest Albendazole Sensitivity. *J Eukaryot Microbiol*. 2015;62(1):60–8.
187. Zhang H, Huang H, Cali A, Takvorian PM, Feng X, Zhou G, et al. Investigations into Microsporidian Methionine Aminopeptidase Type 2: A Therapeutic Target for Microsporidiosis. *Folia Parasitol (Praha)*. 2005;52(1–2):182–92.
188. Weiss LM, Zhou GC, Zhang H. Characterization of Recombinant Microsporidian Methionine Aminopeptidase Type 2. *J Eukaryot Microbiol*. 2003;50:597–9.
189. Bigliardi E, Bernuzzi AM, Corona S, Gatti S, Scaglia M, Sacchi L. In Vitro Efficacy of Nikkomycin Z against the Human Isolate of the Microsporidian Species *Encephalitozoon hellem*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(11):3012–6.
190. Sobottka I, Bartscht K, Schäfer P, Weitzel T, Schottelius J, Kock N, et al. In Vitro Activity of Polyoxin D and Nikkomycin Z against *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol Res*. 2002;88(5):451–3.
191. Didier ES, Maddry JA, Kwong CD, Green LC, Snowden KF, Shadduck JA. Screening of Compounds for Antimicrosporidial Activity In Vitro. *Folia Parasitol (Praha)*. 1998;45(2):129–39.
192. Raynaud L, Delbac F, Broussolle V, Rabodonirina M, Girault V, Wallon M, et al. Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in Travelers with Chronic Diarrhea by Specific PCR Amplification. *J Clin Microbiol*. 1998;36(1):37–40.
193. Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. Epidemiology of Microsporidiosis: Sources and Modes of Transmission. *Vet Parasitol*. 2004;126:145–66.
194. Lores B, Ló Pez-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. *ClinInfectDis*. 2002;24:918–21.
195. Karaman Ü, Daldal N, Atambay M, Çolak C. The Epidemiology of Microsporidias in Humans (Malatya sample). *Turk J Med Sci*. 2009;39(2):281–8.
196. Calik S, Karaman U, Colak C. Prevalence of *Microsporidium* and Other Intestinal Parasites in Children from Malatya, Turkey. *Indian J Microbiol*. 2011;51(3):345–9.

197. Türk S, Doğruman Al F, Karaman U, Kuştimur S. Investigation of Microsporidia prevalence by different staining methods in cases of diarrhea. *Mikrobiyol Bül.* 2012;46(1):85–92.
198. Çetinkaya Ü. Farklı Hasta Gruplarında Encephalitozoon intestinalis'in Araştırılması [2014]. [Kayseri]: Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2014.
199. Özkoç S, Bayram Delibaş S, Akisü Ç. İyatrojenik Immün Baskılanmış Hastalarda Pulmoner Mikrosporidiosis Değerlendirilmesi. *Tuberk Toraks.* 2016;64(1):9–16.
200. Atambay M, Karaman Ü, Daldal N, Çolak C. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Parazitoloji Laboratuvarına Gelen Erişkin Hastalarda Microsporidium Görülme Sıklığı. *Türkiye Parazit Derg.* 2008;32(2):113–5.
201. Kır B, Kaçmaz G, Direkel Ş, Akdemir C, Baldemir A, Ildız Güçlüer N. Comparison of The Modified Trichrome Stain Method With Wheatley's Trichrome Stain Methods. *Türk Aile Hek Derg.* 2018;10(2):15–8.
202. Hamamcı B. Farklı Hasta Gruplarında Enterocytozoon bienersi'nin (Protozoa, Microsporidia) Araştırılması. [Kayseri]: Erciyes Üniversitesi; 2013.
203. Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, et al. Waterborne Outbreak of Intestinal Microsporidiosis in Persons with and without Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Infect Dis.* 1999;180(6):2003–8.
204. Müller A, Stellermann K, Hartmann P, Schrappe M, Fatkenheuer G, Salzberger B, et al. A Powerful DNA Extraction Method and PCR for Detection of Microsporidia in Clinical Stool Specimens. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6(2):243–6.
205. Lobo ML, Xiao L, Antunes F, Matos O. Microsporidia as Emerging Pathogens and the Implication for Public Health: A 10-year Study on HIV-Positive and -Negative Patients. *Int J Parasitol.* 2012;42(2):197–205.
206. Leelayoova S, Subrungruang I, Rangsin R, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Worapong J, Naaglor T, et al. Transmission of Enterocytozoon bienersi Genotype A in a Thai Orphanage. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(1):104–7.
207. Anuar TS, Bakar NH, Al-Mekhlafi HM, Moktar N, Osman E. Prevalence and Risk Factors for Asymptomatic Intestinal Microsporidiosis Among Aboriginal School Children in Pahang, Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2016;47(3):441–9.
208. Kaushik S, Saha R, Das S, Ramachandran VG, Goel A. Pragmatic Combination of Available Diagnostic Tools for Optimal Detection of Intestinal Microsporidia. In: *AdvExpMedBiol.* Springer New York LLC; 2018. p. 85–94.
209. Mirjalali H, Mohebbi M, Mirhendi H, Gholami R, Keshavarz H, Meamar AR, et al. Emerging Intestinal Microsporidia Infection in HIV + /AIDS Patients in Iran: Microscopic and Molecular Detection. *Iranian J Parasitol.* 2014;9(2):149–54.
210. Nooshadokht M, Sharifi I, Mohammadi MA, Pirestani M, Afgar A, Mahootchi A, et al. Intestinal Microsporidiosis in Iran (Kerman): Comparison in Immune-Compromised Patients and Immune Competent People with Diarrhea. *Curr Med Mycol.* 2017;3(1):30–6.
211. Liu H, Jiang Z, Yuan Z, Yin J, Wang Z, Yu B, et al. Infection by and Genotype Characteristics of Enterocytozoon bienersi in HIV/AIDS Patients from Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. *BMC Infect Dis.* 2017 Oct 13;17(1).

212. Salleh FM, Al-Mekhlafi AM, Nordin A, Yasin 'Azlin 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(1):82–5.
213. Stark D, Van Hal S, Barratt J, Ellis J, Marriott D, Harkness J. Limited Genetic Diversity among Genotypes of *Enterocytozoon bienersi* Strains Isolated from HIV-Infected Patients from Sydney, Australia. *J Med Microbiol*. 2009;58(3):355–7.
214. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Buckholt MA, Tzipori S. *Enterocytozoon bienersi* among Children with Diarrhea attending Mugalo Hospital in Uganda. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67(3):299–303.
215. Breton J, Bart-Delabesse E, Biligui S, Carbone A, Seiller X, Okome-Nkoumou M, et al. New Highly Divergent rRNA Sequence among Biodiverse Genotypes of *Enterocytozoon bienersi* Strains Isolated from Humans in Gabon and Cameroon. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2580–9.
216. Ayinmode AB, Ojuromi OT, Xiao L. Molecular Identification of *Enterocytozoon bienersi* Isolates from Nigerian Children. *J Parasitol Res*. 2011;2011:1–2.
217. Ojuromi OT, Duan L, Izquierdo F, Fenoy SM, Oyibo WA, del Aguila C, et al. Genotypes of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bienersi* in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in Lagos, Nigeria. *J Eukaryot Microbiol*. 2016;63(4):414–8.
218. Akinbo FO, Okaka CE, Omoregie R, Adamu H, Xiao L. Unusual *enterocytozoon bienersi* genotypes and *cryptosporidium hominis* subtypes in hiv-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(1):157–61.
219. Akinbo FO, Okaka CE, Omoregie 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(3):441–5.
220. Maikai B V., Umoh JU, Lawal IA, Kudi AC, Ejembi CL, Xiao L. Molecular characterizations of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* in humans in Kaduna State, Nigeria. *Exp Parasitol*. 2012;131(4):452–6.
221. Ojuromi OT, Izquierdo F, Fenoy S, Fagbenro-Beyioku A, Oyibo W, Akanmu A, et al. Identification and Characterization of Microsporidia from Fecal Samples of HIV-Positive Patients from Lagos, Nigeria. *PLoS One*. 2012;7(4).

8. EKLER

EK 1 Etik Kurul Belgesi

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
#GİRİŞİMSSEL OLMAYAN SAĞLIK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Düzce ve Bolu illerinde insanlarda Mikrosporida ların Epidemiyolojisi ve Moleküler Filogenetiği	
TITLE OF STUDY		Epidemiology and Molecular Phylogeny of Microsporida Species in Humans in Düzce and Bolu Province	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	Belge Adı			Açıklama
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	ILAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GUVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	Diğer:	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2019/241			
	Tarih: 16.12.2019			
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerektirdiği amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU				
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI				
İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: Doç.Dr.Gülbin SEZEN				

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Hüseyin YÜCE	Tıbbi Genetik	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Ege GÜLEÇ BALBAY	Göğüs Hastalıkları	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Muhammet Ali KAYIKÇI	Üroloji	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Birgül ÖNEÇ	İç Hastalıkları	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mehmet GAMSIZKAN	Patoloji	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr Öğr. Üyesi Nuri Cenk COŞKUN	Farmakoloji	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr Öğr. Üyesi Filiz SUZER ÖZKAN	Hemşirelik Bölümü	Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr Öğr. Üyesi Önder KILIÇASLAN	Çocuk Sağlığı	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr Öğr. Üyesi Abdullah BELADA	KBB	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr Öğr. Üyesi Zerrin GAMSIZKAN	Tıp Eğitimi ve Bilişimi	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr Öğr. Üyesi Mehmet Ali SUNGUR	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Mustafa Salih EROL	Biyomedikal Uzmanı	Düzce Üniversitesi Sağlık Uyg. ve Araş. Merkezi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Kenan VAROL	Sivil Üye	Varoller Demir Çelik Ürünleri San. ve Tic. Ltd. Şti.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Metin POLAT	Avukat	Düzce Üniversitesi Hukuk Müşavirliği	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurulu Başkanı
Unvanı: Doç.Dr.Gülbin SEZEN
İmza:

: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Scanned with CamScanner

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN SAĞLIK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Düzce ve Bolu illerinde İnsanlarda Mikrosporidia'nın Epidemiyolojisi ve Moleküler Filogenetiği
TITLE OF STUDY	Epidemiology and Molecular Phylogeny of Microsporidia Species in Humans in Düzce and Bolu Province

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Düzce Üniversitesi Girişimsel Olmayan Sağlık Araştırmaları Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Düzce Üniversitesi Tıp Fak. Morfoloji Binası 4. Kat Konuralp-Düzce
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ

KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Şükrü ÖKSÜZ			
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Erol AYAZ, Öğr.Gör.Mücahit ÇAKMAK, Arş.Gör.Betül DÖNMEZ, Arş.Gör.Nagihan TELİS			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Mikrobiyoloji			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
DESTEKLEYİCİ				
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
	Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
	In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
	İlaç dışı klinik araştırma	☐		
Diğer ise belirtiniz ****				
	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

Dr. Öğr. Dr. Gülbin SEZEN

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Scanned with CamScanner