T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Parazitoloji Anabilim Dalı

FARKLI HASTA GRUPLARINDA *ENCEPHALITOZOON INTESTINALIS'*İN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Ülfet ÇETİNKAYA

Danışman
Prof. Dr. Süleyman YAZAR

Doktora Tezi

Eylül 2014
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Parazitoloji Anabilim Dalı

FARKLI HASTA GRUPLARINDA *ENCEPHALITOZOON INTESTINALIS'*İN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Ülfet ÇETİNKAYA

Danışman
Prof. Dr. Süleyman YAZAR

Doktora Tezi

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2013-4511 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Eylül 2014
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Ülfet ÇETİNKAYA

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Farklı Hasta Gruplarında *Encephalitozoon intestinalis*'in Araştırılması" Adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne Uygun Olarak Hazırlanmıştır.

Hazırlayan
Ülfet ÇETİNKAYA

Danışman
Prof.Dr.Süleyman YAZAR

Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr.Süleyman YAZAR

Prof.Dr.Süleyman YAZAR danışmanlığında **Ülfet ÇETİNKAYA** tarafından hazırlanan **"Farklı Hasta Gruplarında *Encephalitozoon intestinalis*'in (Protozoa, Microsporidia) Araştırılması"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Parazitoloji** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

12/09/2014

JÜRİ		**İmza**
Danışman	: Prof. Dr. Süleyman YAZAR	
Üye	: Prof. Dr. İzzet ŞAHİN	
Üye	: Prof. Dr. Salih KUK	
Üye	: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM	
Üye	: Prof. Dr. Nazmiye ALTINTAŞ	

ONAY

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

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

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tıbbi parazitoloji Anabilim Dalında lisansüstü eğitimim boyunca, desteğini her zaman yanımda hissettiğim çalışmalarıma büyük bir özveri ile katkıda bulunan tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Süleyman YAZAR'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, akademik bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarıma büyük bir özveri ile gerek manevi gerekse bilimsel desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. İzzet ŞAHİN ve Prof. Dr. Salih KUK'a,

Tezimin laboratuar çalışmalarında beni yalnız bırakmayan bana yardımcı olan ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Eda SİVCAN, Esra GÜRBÜZ ve diğer Parazitoloji AD çalışanlarına,

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

Çalışma süresince TDK-2013-4511 kodlu proje ile maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne

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

Ülfet ÇETİNKAYA

FARKLI HASTA GRUPLARINDA *ENCEPHALITOZOON INTESTINALIS'*İN ARAŞTIRILMASI

Ülfet ÇETİNKAYA
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Eylül 2014
Danışman: Prof. Dr. Süleyman YAZAR

ÖZET

Bu çalışmada; immun sistemi baskılanmış ve immun sağlıklı kişilerden oluşan değişik hasta gruplarında fırsatçı bir parazit olan *Encephalitozoon intestinalis'*in farklı tanı yöntemleri ile yaygınlığının araştırılması, tanıda kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya; 25'i onkolojik tedavi gören ve akut gastrointestinal şikayeti olan, 25'i kemik iliği transplantasyonu yapılmış ve akut gastrointestinal şikayeti olan, 25'i ürtikerli ve 25'i gelişme geriliği olan toplam 100 hasta ile kontrol grubu olarak herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat akut gastrointestinal şikayeti olan 25 hasta ve 25 sağlıklı gönüllüden oluşan toplam 50 kişi dahil edilmiştir. Dışkı örneklerinin mikrosporidian parazitler açısından değerlendirilmesinde modifiye trikrom ve calcofluor white 2MR boyama yöntemleri ile Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR), Monoklonal antikorların kullanıldığı Immun Floresan Antikor (IFA-MAbs), Nested PCR ve prob bazlı Real Time PCR olmak üzere toplam altı farklı yöntem kullanılmıştır. Modifiye trikrom boyama, calcofluor white 2MR ve Multiplex Real Time PCR yöntemleri ile intestinal sisteme yerleşen mikrosporidian parazitlerin varlığı tür ayrımı yapılmaksızın araştırılmıştır. Bu üç yöntemden Multiplex Real Time PCR ile elde edilen sonuçlar esas alınarak cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal varlığına göre mikrosporidian parazitlerin pozitiflik oranları belirlenmiştir. Aynı zamanda bu yöntem ile elde edilen sonuçlara göre modifiye trikrom ve calcofluor white 2MR boyama yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri belirlenmiştir. Onkolojik tedavi gören ve akut gastrointestinal rahatsızlığı olan hastalarda %52, kemik iliği transplantasyonu yapılmış ve akut gastrointestinal şikayetleri olan hastalarda %28, ürtiker şikayeti bulunan hastalarda %36, gelişme geriliği olan çocuklarda %44 ve kronik rahatsızlığı olmayan fakat akut gastrointestinal rahatsızlığı bulunan hastalarda ise %36 oranında pozitiflik

tespit edilmiştir. Multiplex Real Time PCR'ı referans test olarak aldığımızda modifiye trikrom boyama yönteminin sensitivitesi %65.4, spesifitesi %90.8; calcofluor white 2MR boyama yönteminin sensitivitesi %71.2, spesifitesi %65.3 olarak belirlenmiştir.

IFA-MAbs, Nested PCR ve prob bazlı Real Time PCR yöntemleri ile ise *E.intestinalis* araştırılmıştır. Bu yöntemlerden prob bazlı Real Time PCR ile elde edilen sonuçlar esas alınarak, cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal varlığına göre *E.intestinalis* pozitiflik oranları belirlenmiştir. Aynı zamanda bu veriler kullanılarak IFA-MAbs ve Nested PCR yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri de hesaplanmıştır. Onkolojik tedavi gören ve akut gastrointestinal rahatsızlığı olan hastalarda %40, kemik iliği transplantasyonu yapılmış ve akut gastrointestinal şikâyetleri olan hastalarda %24, ürtiker şikâyeti bulunan hastalarda%20, gelişme geriliği tespit edilen çocuklarda %40 ve kronik rahatsızlığı olmayan fakat akut gastrointestinal şikayeti bulunan hastalarda %28 oranında pozitiflik tespit edilmiştir. Prob bazlı Real Time PCR referans test olarak alındığında; IFA-MAbs'ın sensitivitesi %56.4, spesifitesi %93.7; Nested PCR'ın sensitivite %30.8, spesifitesi %100 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak; *E.intestinalis* ve diğer mikrosporidian parazitler sadece immun sistemi baskılanmış hastalarda değil gelişme geriliği olan çocuklar, ürtikerli ve akut gastrointestinal şikayeti olan hastalarda da yaygın şekilde bulunmuştur. Mikrosporidian parazitler ile ilgili çalışmaların başka hastalık gruplarında da çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz. Diğer taraftan; konvansiyonel yöntemlerin düşük sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu, yalancı pozitiflik veya yanlış negatiflik verme olasılığının yüksek olduğu gözlemlenmiş ve bu nedenle de mikrosporidian parazitlerin tanısında real-time PCR yönteminin kullanılmasının gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Microsporidia, *Encephalitozoon intestinalis*, Tanı, Kayseri

INVESTIGATION OF *ENCEPHALITOZOON INTESTINALIS* IN DIFFERENT PATIENT GROUPS.

Ülfet ÇETİNKAYA

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Parasitology

Doctora Thesis, September 2014

Supervisor: Prof. Dr. Süleyman YAZAR

SUMMARY

In this study; it was aimed to investigated the prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* in different patients group consisting of immunocompromised and immunocompotent individuals with different diagnostic methods and to determine sensitivity and specificity of diagnostic methods used in study.

100 patient's samples, consist of 25 of oncological treated and acute gastrointestinal complaints, 25 of bone marrow transplant and acute gastrointestinal complaints, 25 of urticaria and 25 of growth retardation, were included to study. As a control group; 25 of without any chronic disease but acute gastrointestinal complaints and 25 of healthy volunteers with a total of 50 people were including in. Total of six different methods, including modified trichrome and calcofluor white 2MR staining methods, Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR), immunofluorescence assay using monoclonal antibodies (IFA-MAbs), Nested PCR and probe based Real Time PCR, for the evaluation of microsporidia parasites of stool samples were used. Presence of microsporidian parasites who settled in the intestinal tract was researched by modified trichrome and calcofluor white 2MR staining methods, Multiplex Real Time were investigated without distinction of species. Positive rate of microsporidian parasites on the basis of the results obtained with Multiplex Real Time PCR were compared by sex, age, research groups and presence of diarrhea. According to the results obtained with this method modified trichrome and calcofluor white 2MR staining the sensitivity and specificity values were determined.

52% of oncological treated and acute gastrointestinal complaint patients, 28% of bone marrow transplant and acute gastrointestinal complaints patients, 36% of urticaria patiens, 44% of growth retardation patients, 36% of without any chronic disease but acute gastrointestinal complaints patients were determined as positive. When Multiplex Real Time PCR is accepted as reference test, it has been found modified trichrome

method's sensitivity 65.4%, specificity 90.8%; calcofluor white 2MR staining method's sensitivity 71.2%, specificity 65.3%.

Presence of *E.intestinalis* was investigated by IFA-MAbs, Nested PCR and prob based Real Time PCR. Positive rate of *E.intestinalis* on the basis of the results obtained with prob based Real Time PCR were identified by sex, age, research groups and presence of diarrhea. According to the results obtained with this method, IFA-MAbs and Nested PCR the sensitivity and specificity values were determined.

40% of oncological treated and acute gastrointestinal complaint patients, 24% of bone marrow transplant and acute gastrointestinal complaints patients, 20% of urticaria patiens, 40% of growth retardation patients, 28% of without any chronic disease but acute gastrointestinal complaints patients were determined as positive. When probe based Real Time PCR test is accepted as reference, it has been found that IFA-MAbs's sensitivity 56.4%, specificity 93.7%; Nested PCR's sensitivity 30.8%, specificity 100%.

As a result; *E.intestinalis* and other microsporidian parasites were found to be common not only in patients with immunocompromised but also of children with growth failure, urticaria and patients with acute gastrointestinal complaints. We think that microsporidian parasites in other disease groups need to be studied. On the other hand, conventional methods that have low sensitivity and specificity, false positive or false negative result have high possibility, therefore using of real-time PCR method on the diagnosis of microsporian parasites was needed to be necessary.

Key Words: Microsporidia, *Encephalitozoon intestinalis*, Diagnosis, Kayseri

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

İÇ KAPAK i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI iii
KABUL VE ONAY SAYFASI iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT viii
İÇİNDEKİLER x
KISALTMALAR xiii
TABLO ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ xv

1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 3
2.1. TARİHÇE 3
2.2. SINIFLANDIRMA 4
2.3. MORFOLOJİ 6
2.3.1. Merontların Morfolojisi 6
2.3.2. Sporontların Morfolojisi 6
2.3.3. Sporobalstların Morfolojisi 6
2.3.4. Spor Morfolojisi 6
2.3.4.1. Spor Duvarı 7
2.3.4.2. Sporoplasma 8
2.3.4.3. Ekstrüzyon Aparatı 8
2.4. HAYAT DÖNGÜSÜ 10
2.4.1. Faz I-Enfektif (Çevresel) Faz 10
2.4.4.1. Mikrosporidian Parazitlerin Hücreye Giriş Mekanizmaları 11
2.4.2. Faz II- Proliferatif (Üreme) Faz 12
2.4.3. Faz III- Sporogonik Faz 13
2.4.4. *Encephalitozoon intestinalis*'in morfolojik özellikleri ve hayat döngüsü 13
2.5. EPİDEMİYOLOJİ 15
2.5.1. Bulaş Yolları 15
2.5.2. Dünya'daki Dağılımı 15
2.5.3. Türkiye'deki Dağılımı 16

Sayfa no

2.6. İMMUM YANIT 16
2.7. PATOGENEZ ve KLİNİK BELİRTİLER....17
2.7.1. Gastrointestinal Tutulum....18
2.7.2. Hepatobiliyer Tutulum 18
2.7.3. Oküler Tutulum 18
2.7.4. Serebral Tutulum 19
2.7.5. Üriner Enfeksiyonlar....19
2.7.6. Pulmoner Enfeksiyonlar 19
2.7.7. Sistemik Mikrosporidia Enfeksiyonları....19
2.8. TANI....21
2.8.1. Tanıda Kullanılan Klinik Örnekler....21
2.8.2. Işık ve Floresan Mikroskobisi Yöntemleri 21
2.8.2.1. Modifiye Trikrom boyaları....22
2.8.2.2. Floresan boyaları 23
2.8.2.3. Giemsa boyası 24
2.8.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) 24
2.8.4. Serolojik Yöntemler....25
2.8.5. Monoklonal antikorların kullanıldığı Immun Floresan Antikor (IFA-MAbs) Yöntemi 25
2.8.6. Moleküler Yöntemler....25
2.8.7. Histolojik Yöntemler....28
2.8.8. Hücre Kültürü....28
2.8.9. Flow Sitometrisi....28
2.8. TEDAVİ....29
2.9. KORUNMA VE KONTROL 29
3.GEREÇ ve YÖNTEM....31
3.1. Örneklerin Toplanması ve Hasta Gruplarının Oluşturulması....31
3.2. Örneklerin Konvansiyonel Yöntemlerle İncelenmesi....32
3.2.1. Su-Eter Konsantrasyon Yöntemi 33
3.2.2. Boyama Yöntemleri....34
3.2.2.1. Calcofluor White 2MR 34
3.2.2.2. Modifiye Trikrom Boyama....35
3.3. IFA-MAbs 36
3.4. Moleküler Yöntemler....37
3.4.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu 37
3.4.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) 38

Sayfa no

3.5. DNA Dizi Analizi 43
3.5.1. Jelden Ekstraksiyon İslemi 43
3.5.2. Sekans Analizleri 44
3.6. VERİLERİN ANALİZİ.....44
4.BULGULAR 45
4.1. Dışkı Örneklerinin Konvansiyonel Yöntemlerle Değerlendirilmesi 45
4.2. Dışkı Örneklerinin Mikrosporidian Parazitler Açısından Değerlendirilmesi 48
4.2.1. Multiplex Real Time PCR Sonuçlarına Göre Dışkı Örneklerinde Mikrosporidian Parazitlerin Pozitiflik Oranları 48
4.2.1.1. Multiplex Real Time PCR Sonuçlarına Göre Dışkıda Mikrosporidian Parazit Yükü 51
4.2.1.2. Multiplex Real Time PCR Sonuçlarına Göre Modifiye Trikrom ve Calcofluor White 2MR Boyama Yöntemlerinin Sensitivite ve Spesifite Değerleri 53
4.2.2. Prob Bazlı Real Time PCR Sonuçlarına Göre Dışkı Örneklerindeki *Encephalitozoon intestinalis* Pozitiflik Oranları.....57
4.2.2.1. Prob Bazlı Real Time PCR Sonuçlarına Göre Dışkıdaki *Encephalitozoon intestinalis* Yükü 60
4.2.2.2. Prob Bazlı Real Time PCR Göre IFA-MAbs ve Nested PCR Yöntemlerinin Sensitivite ve Spesifite Değerleri 62
4.3. 16S SSU rRNA Gen Bölgesinin Sekans Analizleri Sonucu 65
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....67
6.KAYNAKLAR 81
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR

E. intestinalis: *Encephalitozoon intestinalis*
E. bieneusi: *E*nterocytozoon *bieneusi*
N. bombycis: *Nosema bombycis*
E. cuniculi: *Encephalitozoon cuniculi*
N. corneum: *Nosema corneum*
T. hominis: *Trachipleistophora hominis*
C. parvum**:** *Cryptosporidium parvum*
E. hellem: *Encephalitozoon hellem*
V. cornea: *Vittaforma corneae*
M.ceylonensis: *Microsporidium ceylonensis*
M.africanum: *Microsporidium africanum*
HIV: Human Immunodeficiency Virus
AIDS: Acquired Immüno Deficieny Syndrom
BAL: Bronkoalveolar Lavaj
BOS: Beyin Omirilik Sıvısı
PCR: Polimeraz Chance Reaksiyonu
TEM: Transmission Elektron Mikroskobu
MTS: Modifiye Trichrome Boyama
WTS: Weber'in Trichrome Boyası,
AFT: Asit-Fast Tricrome
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IFAT: Indirekt Floresan Antikor Testi
PBS: Phosphate Buffered Saline
PAS: Periodic Acid Schiff boyası
INF- γ: Interferon gama
TNF: Tümör nekrozis faktör
IL: Interlökin
IgG: Immunoglobulin G
IgM: Immunoglobulin M
bp: Baz pair
SSU rRNA: Small subunit ribosomal ribonucleic acid
LSU rRNA: Large subunit ribosomal ribonucleic acid
sn: Saniye
nm: Nanometre
µm: Mikrometre
NaOH: Sodyum hidroksit
KOH: Potasyum hidroksit
$MgCl_2$: Magnezyum klorür
GAA: Glasial Asetik Asit

HCl: Hidroklorik asit
PTP: Polar tüp proteini
TEM: Transmisyon Elektron Mikroskobu
IFA-MAbs: Monoklonal antikorların kullanıldığı Immun Floresan Antikor
FISH: In situ hibridizasyon
ITS: Internal Transcribed Spacer
FCM: Flow sitometre
TMP-SMX: trimetoprim-sulfamethoxazol
Tm: Mmelting temparature
UPL: Universal Probe Library
Cp: Crossing point

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. İnsanlarda enfeksiyon oluşturan türlerin morfolojik özellikleri 9
Tablo 2.2. İnsana yerleşen mikrosporidia türleri, yerleştikleri dokular ve oluşan klinik bulgular 20
Tablo 2.3. Mikrosporidian parazitlerin tanısında kullanılan boyama yöntemleri ve özellikleri.....22
Tablo 2.4. *Encephalitozoon intestinalis* tanısında kullanılan tür-spesifik primer çiftleri 27
Tablo 2.5. *Encephalitozon intestinalis*'in real-time PCR ile tanısında kullanılan bazı primer ve problar 27
Tablo 3.1. Dört türü belirlemek için Real-Time PCR'da kullanılan primerler 39
Tablo 3.2. Nested PCR'da kullanılan primerler..... 41
Tablo 3.3. PCR reaksiyonu için kullanılan bileşen ve miktarları..... 42
Tablo 3.4. Amplifikasyon için gerekli PCR şartları..... 42
Tablo 4.1. İncelenen dışkı örneklerinde nativ-lugol ve asit-fast boyama yöntemleri ile belirlenen parazitlerin cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı 46
Tablo 4.2. Farklı tanı yöntemleri ile elde edilen mikrosporidian parazit pozitifliğinin cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı 50
Tablo 4.3. Multiplex Real Time PCR ile pozitif saptanan örneklerin Cp değerlerinin cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi 52
Tablo 4.4. Multiplex Real Time PCR'da elde edilen sonuçlara göre modifiye trikrom ve calcofluor white 2MR boyama yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri..... 56
Tablo 4.5. Analizlerde kullanılan dilüsyonlar, Cp değerleri ve DNA düzeyleri 58
Tablo 4.6. Farklı yöntemlerle elde edilen *Encephalitozoon intestinalis* pozitiflik oranlarının cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı 59
Tablo 4.7. Prob Bazlı Real Time PCR ile *E.intestinalis* açısından pozitif saptanan örneklerin Cp değerlerinin cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi 61
Tablo 4.8. Prob bazlı Real Time PCR sonuçlarına göre IFA-MAbs ve Nested PCR yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri 64
Tablo 4.9. Pozitif belirlenen hastaların 16S SSU rRNA gen bölgesine ait DNA dizi analizi sonuçları 65
Tablo 4.10. Elde edilen dizileme sonucunun GenBank'a kayıtlı izolatlarla nükleotid dizilimleri açısından benzerlikleri..... 65
Şekil 2.1. İnsandan izole edilen mikrosporidian parazitlerin sınıflandırılması 5
Şekil 2.2. Spor morfolojisi 7
Şekil 2.3. Mikrosporidiaların genel hayat döngüsü 10
Şekil 2.4. Spor germinasyonu sırasında polar filamentin ters dönmesi..... 11
Şekil 2.5. *E.intestinalis*'in hayat döngüsü 14
Şekil 3.1. *Encephalitozoon intestinalis* tanısında kullanılan primer ve prob..... 40
Şekil 4.1. Multiplex Real Time PCR analizleri sonucu..... 49
Şekil 4.2. Modifiye trichrome boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları 54
Şekil 4.3. Calcofluor white 2MR boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları..... 55

Şekil 4.4 *Encephalitozoon intestinalis* 16S SSu rRNA gen bölgesini içeren plasmit DNA'sından hazırlanmış seri dilüsyonların prob bazlı Real Time PCR analiz sonuçları 57

Şekil 4.5. IFA-MAbs ile pozitif tespit edilen *E.intestinalis* sporları. 63

Şekil 4.6. Nested PCR analizinin ikinci PCR basamağında *E.intestinalis* pozitif belirlenen bazı örneklerin agaroz jel üzerindeki görünümü. 64

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Mikrosporidian parazitler spor oluşturan, hem omurgalı hem de omurgasız birçok konağı enfekte eden, küçük, zorunlu hücre içi parazitleridir. 19. yüzyılın ortalarına doğru ipek böceği yetiştiriciliğine büyük zarar veren biber hastalığının etkeni olarak bulunmuştur. Aynı zamanda bazı mikrosporidia türleri de bal arılarında oldukça yıkıcı ve yaygın enfeksiyonlara sebep olabilmekte ve arıcılık sektöründe ciddi maddi sorunlar oluşturabilmektedir. Kabuklular ve balıklarda da görülen en yaygın enfeksiyonlardan biri olup balıkçılık sektöründe de önemli kayıplara sebep olmaktadır. Aynı zamanda mikrosporidian parazitler çekirge gibi böceklerin biyolojik kontrolünde de yararlı olabilmektedir (1,2).

Mikrosporidian parazitlerin bugüne kadar tanımlanmış 144 cinsi ve bu cinslere bağlı 1200'den fazla türü bulunmaktadır. 7 cinse bağlı 14 mikrosporidia türü ise insanlarda patojen olarak tanımlanmıştır. Bu türler içerisinden *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon intestinalis* en sık görülen türler olup gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına yol açmaktadırlar. Bu türler özellikle HIV pozitif hastalarda kronik diyare sebebi olarak bilinmektedir (1-3).

Encephalitozoon intestinalis insanda sıkılıkla enfeksiyon oluşturan mikrosporidia türlerinden ikinci sırada gelmektedir. İnsan dışında köpek, maymun, domuz, sığır, keçi ve goril gibi hayvanları da enfekte etmekte ve bu hayvanlarla yakın temas sonucunda insanlara geçiş olabilmektedir. *E. intestinalis* immun sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu hastalarda sıklıkla inatçı, hayatı tehdit eden diyarenin yanı sıra; enterit, ince bağırsak perforasyonu, kolanjit, kolesistit, nefrit,

bronşit, sinüzit, rinit, keratokonjonktivit ve dissemine enfeksiyonlara sebep olmaktadır (1-3).

Encephalitozoon intestinalis ve diğer mikrosporidia türlerinin laboratuar tanısı oldukça zordur. Dışkıda bulanan sporların boyutlarının oldukça küçük olması nedeniyle rutin dışkı incelemelerinde gözden kaçmakta ve bu nedenle de mikrosporidian parazitlerin tanısında farklı tanı yöntemleri kullanılmaktadır (1-3).

Mikrosporidian parazitlerin epidemiyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar genellikle HIV pozitifliği veya diğer sebeplerle immun sistemi baskılanmış hastalar üzerinde yapılmıştır(1-3). Ülkemizde ise insanlarda görülme sıklığı üzerine yapılan çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Bütün dünyada yaygın olarak bulunan ve önemi gittikçe artan *Encephalitozoon intestinalis* ile ilgili ülkemizde yeterli sayıda araştırma yapılmamıştır. Ayrıca yapılan çalışmaların birçoğunda tür ayrımına gidilmemiştir.

Bu çalışmada; immun sistemi baskılanmış ve immun sağlıklı hastalardan oluşan değişik gruplarda fırsatçı parazit *Encephalitozoon intestinalis'*in farklı tanı yöntemleri ile yaygınlığının araştırılması, tanıda kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda bu çalışmada; Türkiye'de ilk kez filogenetik özelliklerin ortaya konması amacı ile parazitin 16S SSU rRNA gen bölgesi yönünden moleküler karakterizasyonu yapılarak GenBank'a kayıtlı tüm izolatlarla nükleotid dizilimleri açısından benzerlik oranları tespit edilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

İlk olarak 1857 yılında Nageli tarafından, *Nosema bombycis* olarak adlandırılan mikrosporidian parazitler Schizomycetes'ler içerisine dahil edilmiştir. Mikrospora şubesi ise 1882 yılında Balbiani tarafından tanımlanmıştır. 1977'de mikrosporidian parazitler yapısal özellikleri, spor ve gelişme safhalarındaki çekirdeğin şekli, konak-parazit ilişkisi ve polar tüpteki sarmal sayılarına göz önünde bulundurularak sınıflandırılmıştır (3,4).

Mikrospora şubesi 1980'de Protista alemi ve protozoa altalemi altında yer almıştır. 1986 yılında mikrosporidian parazitler, diplokaryon olup olmaması, mayoz bölünmesi ve sporofaz organeline göre sınıflandırılmıştır. Ancak bu durum filogenetik analiz açısından uygun bulunmamış ve sporun morfolojisine ve gelişme safhalarına göre 1986 yılında yeniden sınıflandırılmıştır (2).

Encephalitozoon intestinalis başlangıçta Orestein ve ark. (5) tarafından *Encephalitozoon cuniculi*'ye benzer olarak tanımlanmıştır. Cali ve ark. (6,7) ise 1993 yılında bu paraziti yeni bir cins olarak tanımlamış ve vakuol içerisinde parazitler septa ile ayrıldığı için *Septata intestinalis* olarak isimlendirmişlerdir. Hartskeerl ve ark. (8) ise antijenik özellikleri ve moleküler düzeylerindeki benzerlik nedeniyle Encephalitozoon cinsine dahil etmiş ve *E. intestinalis* olarak isimlendirmişlerdir.

2.2. SINIFLANDIRMA

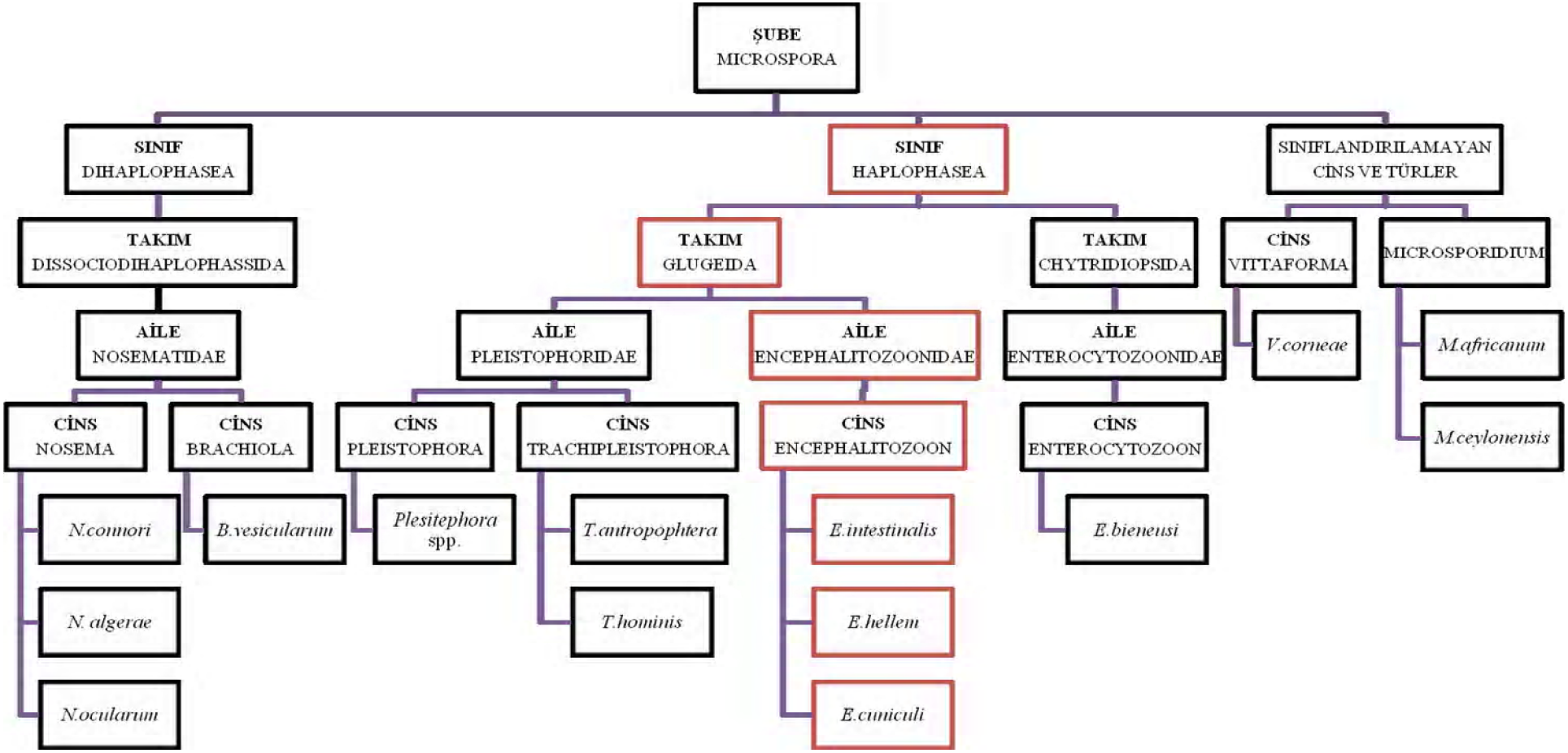
Mikrosporidian parazitlerin sınıflandırılmasında esas olan kriterler aşağıdaki gibidir (9,10);

- Doğal konak ile olan ilişkileri
- Spor veya diğer gelişme dönemlerinin büyüklüğü.
- Tek veya iki nükleusa sahip olmaları
- Spor içindeki polar filament helezon sayısı
- Organizmanın konak hücre sitoplazması ile ilişkisi

Bu kriterler ışığında *E.intestinalis*; Microspora şubesi, Haplopasea sınıfı, Glugeida takımı, Encephalitozoonidae ailesi ve Encephalitozoon cinsi içerisinde yer almaktadır.

Microspora şubesi içerisinde bugüne kadar tanımlanmış 144 cins ve bu cinslere bağlı 1200'den fazla tür bulunmaktadır. 7 cinse bağlı 14 mikrosporidia türü ise insanda patojen olarak tanımlanmıştır. *E.intestinalis* ve insanda enfeksiyon oluşturan diğer türlerin sınıflandırılması Şekil 2.1'de verilmiştir (11-13).

Microsporidium, tam belirgin olmayan mikrosporidia türleri için kullanılan ortak bir terimdir. Bu grup içerisinde insanı enfekte eden iki tür bulunmaktadır; *M.ceylonensis* ve *M.africanum* (11,12).



Şekil 2.1. İnsandan izole edilen mikrosporidian parazitlerin sınıflandırılması

2.3. MORFOLOJİ

Encephalitozoon intestinalis diğer mikrosporidian parazitler gibi konak hücre dışında aktif formu bulunmayan, tek hücreli, spor oluşturan zorunlu hücre içi parazitidir. Ökaryotik hücre olarak tanımlanmalarıyla birlikte bazı tipik ökaryotik özelliklerden yoksundurlar. Ribozom (70S), ribozomal alt ünite (30S ve 50S) ve rRNA bölge (16S ve 23S) özellikleri; mitokondri, peroksizom ve tipik bir golgi aygıtına sahip olmamaları ile prokaryotik organizmalara benzerlerken, zarla çevrili bir çekirdek, intrasitoplazmik membran sistemi ve mitotik iplikçiklerle gerçekleşen kromozomal bölünme özellikleriyle de ökaryotik organizma olarak değerlendirilmektedirler (14,15).

Meront, sporont, sporoblast ve spor parazitin hayat döngüsünde görülen dönemlerdir (11,16,17).

2.3.1.Merontların Morfolojisi

Büyük merkezi çekirdekli, yuvarlaklaşmış veya hafif oval şekilli ve bir plazma membranı ile kuşatılmış olan hücrelerdir. Sitoplazma homojen olarak granüllüdür ayrıca çok sayıda serbest ribozoma ve az gelişmiş endoplazmik retikuluma sahiptir. Merontlar ikili veya daha fazla füzyonla çoğalmaktadır (11,16,17).

2.3.2.Sporontların Morfolojisi

Merozoitten sporonta dönüşüm esnasında iki önemli değişiklik meydana gelmektedir. İlk olarak granüllü endoplazmik retikulum artar, sonrasında ise plazma zarının kalınlığı ve karmaşıklığı dışarıdan elektronca yoğun materyal eklenmesi ile birlikte artar (11,16,17).

2.3.3.Sporoblastların Morfolojisi

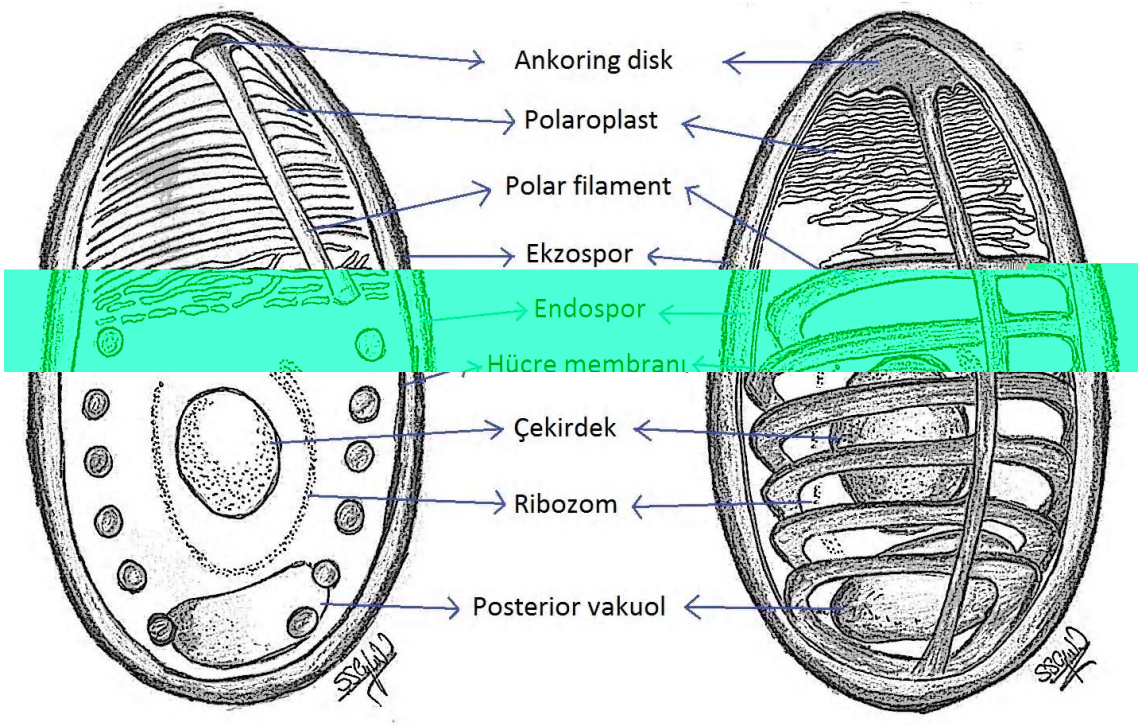
Sporonttan sonra oluşan dönemdir. Oval şekilli hücrelerdir ve bunların olgunlaşmasıyla olgun sporlar meydana gelir (11,16,17).

2.3.4.Spor Morfolojisi

Mikrosporidian parazitlerin en tipik gelişimsel evresi spordur. Spor, içeriğini konak hücre içine enjekte edebilme mekanizmasına sahip olan enfektif ve diagnostik dönemdir. Ayrıca konak hücre dışında uzun süre yaşayabilen tek evrim dönemidir.

Boyutları 1-20 µm'dir. Fakat memelileri enfekte eden türleri daha küçüktür (1-3 µm). Oval, küresel, çubuk veya armut şeklinde olabilirler (9,12).

Sporlar üç genel yapıya sahiptir (16). Bunlar; spor duvarı, sporoplasma ve ekstrüksiyon aygıtıdır (**Şekil 2.2**).



Şekil 2.2. Spor morfolojisi (Orijinal)

2.3.4.1. Spor Duvarı

Çevresel direnç sağlayan spor duvarı, elektron mikroskobisi ile gözlenebilen üç tabakadan oluşmuştur. Bunlar; ekzospor, endospor ve hücre membranıdır (12,15,16).

Ekzospor: Elektronca yoğun olan en dışta, glikoprotein yapısındaki tabakadır. Ekzospor kompleks bir yapıda olup üç tabakalıdır. Bunlar; dış kısımda dikenli bir tabaka, ortada lamina ve içte fibröz tabakadır (12,15,16).

Endospor: Elektronca fakir ve temel birleşeni kitin olan tabakadır. Ekzospora bir köprü ile bağlanmıştır. Endospor tabakasının anterior ucu sporun en ince kısmıdır ve polar tüpün dışarı çıkması esnasında parçalanmaktadır (12,15,16).

Hücre membranı: En içte, sitoplazmayı kuşatan yaklaşık 7 nm kalınlığındaki tabakadır (12,15,16).

2.3.4.2. Sporoplazma

Spor sitoplazması, monokaryon ya da diplokaryon nükleus, prokaryotik boyda ribozomlar, karakteristik bir şekilde konumlanmış endoplazmik retikulum içerir. Çekirdek ökaryotik tiptedir. Mitokondri, peroksizom ve tipik bir golgi aygıtına sahip değillerdir (9,15,16).

2.3.4.3. Ekstrüksiyon Aparatı

Ekstrüksiyon aparatı üç kısımdan oluşmaktadır. Bunlar; polar filament, polaroplast ve posterior vakuoldür (9,15,16).

Polar filament: Sporun anterior ucundaki ankoring diske mantar şeklinde bağlanmaktadır. Polar filament, ankoring diske bağlandığı düz (manubroid) kısım ve türüne bağlı olarak sporoplasma etrafında 4-30 sarmal oluşturan posterior kısım olmak üzere iki bölgeye ayrılmaktadır. Polar filamentin, manubroid kısmı ve anterior uca en yakın olan sarmalı distaldeki sarmallardan daha geniş çapa sahiptir (9,15,16).

Polaroplast: Atipik bir golgi cisimciğidir. Lamellar ve veziküler olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Lamellar polaroplast membranları çoğunlukla anteriorda lokalize olmuştur. Veziküler polaroplast ise tubuler şekildedir ve sporun merkezine doğru lokalize olmuştur (9,15,16).

Posterior vakuol: Ekstrüksiyon aparatının üçüncü komponenti posterior vakuoldür. Büyüklük ve şekli oldukça farklı olan posterior vakuol, sporun arka kısmında lokalize olmuştur ve içeriği tipik bir unit membran ile sınırlandırılmıştır. Polar filamentin bu yapı tarafından meydana getirildiği düşünülmektedir (2,15,16).

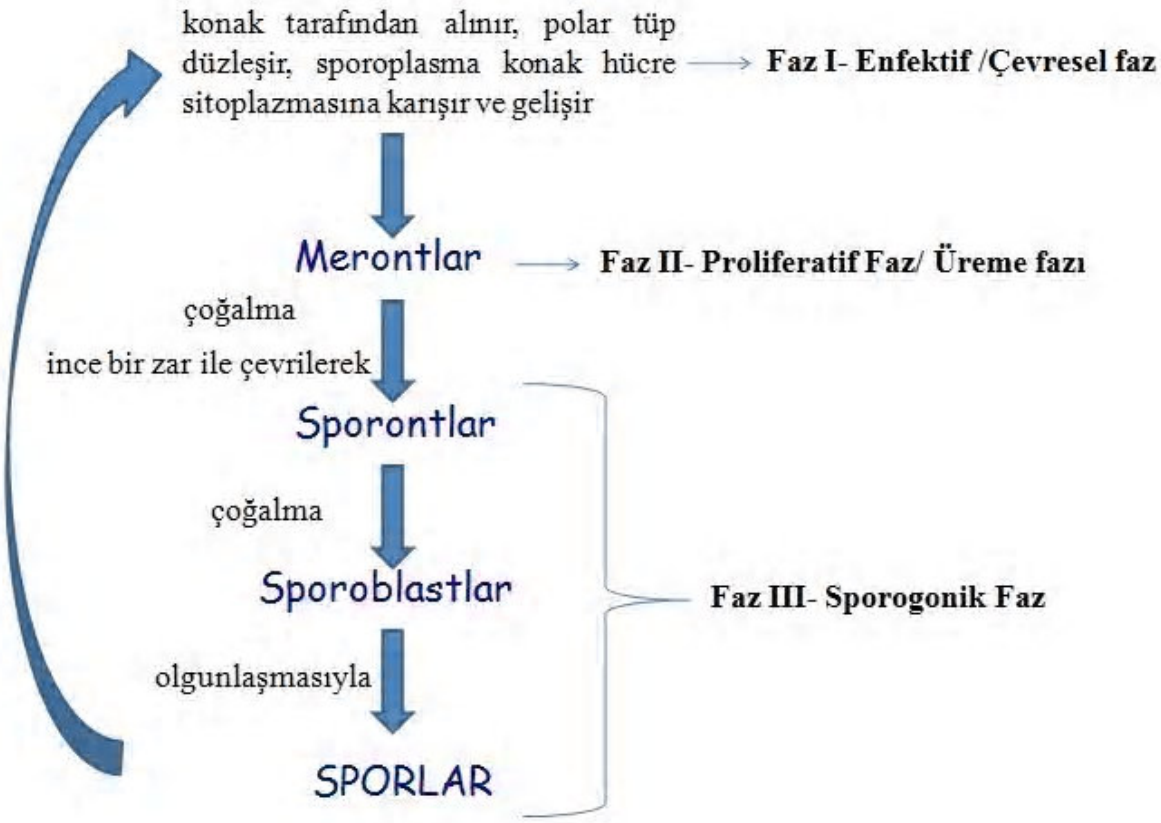
İnsanlarda enfeksiyon oluşturan türlerin morfolojik özellikleri Tablo 2.1'de verilmiştir (9,10-12).

Tablo 2.1. İnsanlarda enfeksiyon oluşturan türlerin morfolojik özellikleri

Tür	**Çekirdek yapısı**	**Gelişim yeri**	**Spor boyutu (µm)**	**Polar tüp sarmal sayısı**
Encephalitozoon cuniculi	Tek parçalı	Parazitoforoz vakuol içinde	2.5-3.2 x 1.2-1.6	4-7
Encephalitozoon hellem	Tek parçalı	Parazitoforoz vakuol içinde	2-2.5 x 1-1.5	6-8
Encephalitozoon intestinalis	Tek parçalı	Parazitoforoz vakuol içinde	2.2 x 1.2	5-7
Enterocytozoon bieneusi	Tek parçalı	Konak hücre sitoplazması ile direkt temas halinde	1.5 x 0.5	4-6
Pleistophora sp.	Tek parçalı	Sporofor vezikül	2.8 x 3.4	9-12
Trachipleistophora hominis	Tek parçalı	Sporofor vezikül	5.2 x 2.4	11
Trachipleistophora anthropophthera	Tek parçalı	Sporofor vezikül	Tip I sporofor vezikül içimdeki sporlar; 3.7 x 2 Tip II sporofor vezikül içindeki sporlar 2.5 x 1.4	4-5
Vittaforma corneae	İki parçalı	Konak hücre endoplazmik retikulum ile çevrelenmiş	3.8 x 1.2	5-7
Nosema ocularum	İki parçalı	Konak hücre sitoplazması ile direkt temas halinde	5 x 3	9-12
Brachiola sp.	İki parçalı	Konak hücre sitoplazması ile direkt temas halinde	2.5-2.9 x 1.9-2	7-10
Microsporidium ceylonensis			3.5 x 1.5	9
Microsporidium africanum			4.5-5 x 2.5-3	11-13

2.4. HAYAT DÖNGÜSÜ

Mikrosporidian parazitlerin hayat döngüsü 3 fazdan oluşmaktadır (**Şekil 2.3**). Bunlar; Enfektif (Çevresel) faz, Proliferatif (Üreme) faz ve Sporogonik faz.



Şekil 2.3. Mikrosporidiaların genel hayat döngüsü.

2.4.1. Faz I-Enfektif (Çevresel) Faz

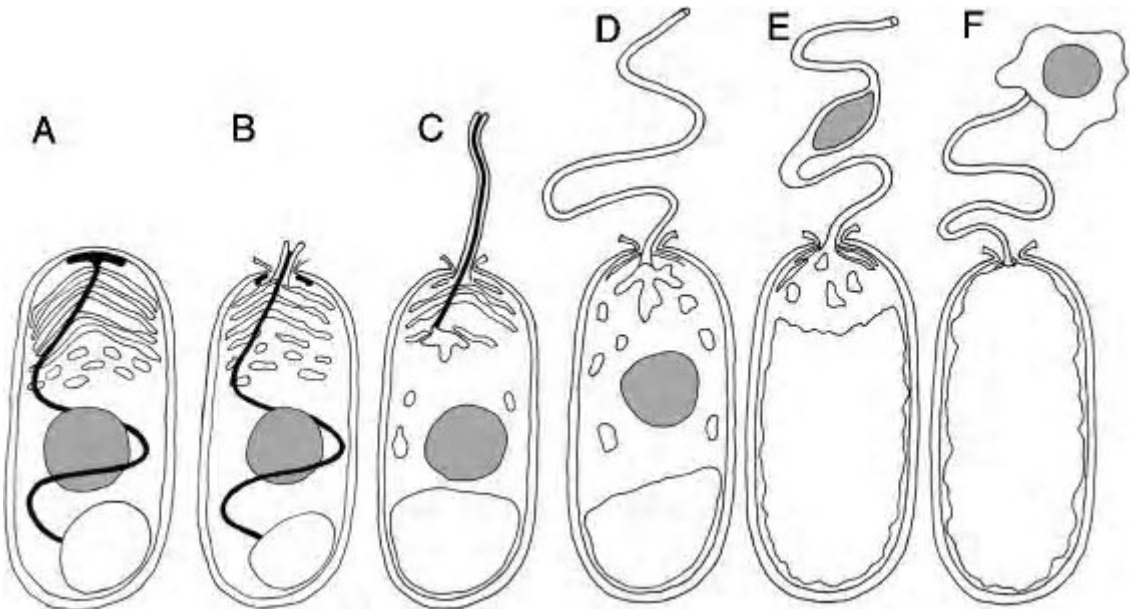
Parazitin hayat döngüsündeki ekstrasellüler fazdır. Çevresel şartlara dirençli olan ve uzun süre enfekte kalabilen sporlar solunum veya ağız yoluyla alınmaktadır. Konak vücuduna giren spor, konak hücre sitoplazmasına sporoplazmasını boşaltmaktadır (9,11,15,16).

2.4.1.1. Mikrosporidian Parazitlerin Hücreye Giriş Mekanizmaları

Mikrosporidian parazitler hücre içerisine deneysel olarak gösterilmiş iki yol ile giriş yapmaktadır. Bunlar; Aktif invazyon ve Endositozis (9,11,15,16).

Aktif invazyon

Sporlar, çeşitli fiziksel ve kimyasal değişiklikler (uygun pH, sıcaklık, nem, iyon konsantrasyonları, sindirim enzimleri, basınç gibi) ve diğer bazı uyaranlara maruz kaldığı zaman, spor içerisindeki ozmotik basınç anormal derecede artmakta, posterior vakuol genişlemekte ve bu değişim polar tüpün ters dönüşünü tetiklemektedir. Polar tüpün iç kısmı dış kısmının içinden kayarak ilerlemekte ve konak hücre plazma membranına penetre olarak hipodermik iğne şeklinde konak hücre sitoplazmasına sporoplazmasını enjekte etmektedir. Sporoplazma tüpün içinden geçerek konak hücre sitoplazmasına geçmekte ve böylece konak hücre enfekte olmaktadır (Şekil 2.4). Sporoplazmanın polar tüpten lümene doğru geçişi 5-30 sn'de gerçekleşmektedir (9,11,15,16).



Şekil 2.4. Spor germinasyonu sırasında polar filamentin ters dönmesi.

A-Olgun spor.
B-Ankoring disk parçalanır ve polar filament ters dönmeye başlar.
C-Polar filament ters dönmeye devam eder.
D-Polar filament tamamen ters döner ve sporoplasma polar filament içine doğru zorlanır.
E-Sporoplasma polar filament içine geçer.
F-Sporoplasma konak hücre sitoplazmasına geçer (14).

Endositozis

Mikrosporidia sporlarının çoğu, polar tüp açılması olmadan internalizasyonla sitoplazmaya girer. Konak hücre tarafından spor endositoz yolu ile hücre içine alınır ve spor fagozomla çevrilir. İçersinde mikrosporidia sporlarını içeren fagozomlar önce endozomal daha sonra lizozomal kompartmanlara dönüşür. Lizozomal kompartmanlar içersinde sporların hızlıca yıkıldığı fakat bazı sporoplazmaların lizozomlardan kaçtığı ve polar tüp salınması yoluyla konak hücre sitoplazmasını enfekte ettiği gösterilmiştir (9,11,15,16).

2.4.2. Faz II- Proliferatif (Üreme) Faz

Bu faz hayat döngüsünde çoğalmanın olduğu fazdır. Sporoplazmanın konak hücre sitoplazmasına girmesi ve merontlara dönüşmesi ile başlamaktadır. Merontlar yapısal olarak basit, tek katlı zarla çevrilmiş hücrelerdir. Parazit, enterosit, makrofaj, mezenkim hücreleri gibi farklı hücrelere yerleşebilmektedirler. Besinlerini de bu konak hücrelerden absorbe ederek gelişimlerine devam etmektedirler. Merontlar konak hücre içerisinde parazitin türüne göre aşağıdaki gibi farklı şekillerde gelişimini sürdürebilirler;

1-Direkt konak hücrenin sitoplazmasında. Nosema, Brachiola ve Enterocytozoon cinslerine ait parazitler bu şekilde gelişimlerini sürdürmektedirler.

2-Parasitoforoz vakuol içinde. Encephalitozoon cinsine ait parazitler bu şekilde gelişimlerini sürdürmektedirler.

3-Parazitin salgıladığı şekilsiz bir kabuk içinde (Sporofor vezikül). Pleistophora ve Trachipleistophora cinslerine ait parazitler bu şekilde gelişimlerini sürdürmektedirler.

4-Konağın endoplazmik retikulumuyla çevrilerek. Vittaforma cinsine ait parazitler bu şekilde gelişimlerini sürdürmektedirler.

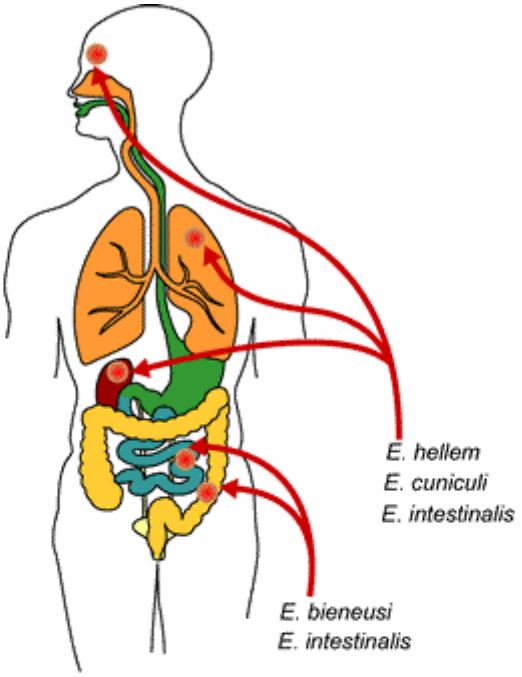
Merontlar ikiye (*Encephalitozoon, Nosema, Vittaforma* cinsleri) veya daha fazla sayıya (*Enterocytozoon, Pleistophora, Trachipleistophora* cinsleri) bölünerek çoğalma gösteren hücrelerdir. Bölünme sırasında ilk olarak nükleer kılıf bozulmadan parazitin nükleusu bölünmektedir (karyokinezis). Karyokinezis sonucunda, yuvarlaklaşmış çok çekirdekli hücreler oluşur. Hücre bölünmesinde karyokinezisi sitokinezis takip eder ve bu çoğalma sonucunda tek bir hücre içerisinde yaklaşık 50-100 meront oluşur. Merontlar gelişmeye devem eder ve sonuçta sporontları oluştururlar (9,11,15,16).

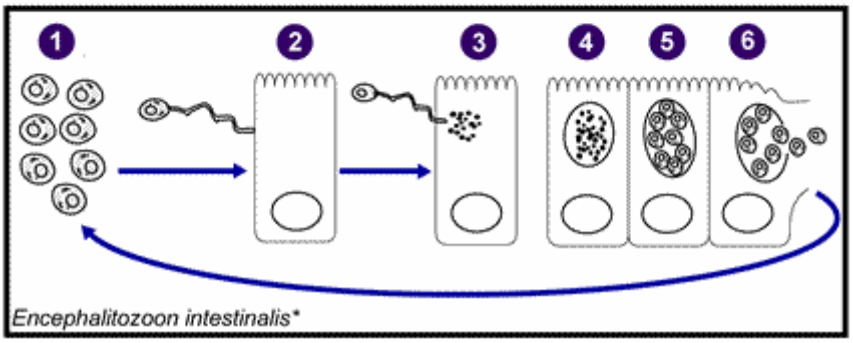
2.4.3. Faz III-Sporogonik Faz

Bu faz çevresel şartlara dirençli olan ve uzun süre enfekte kalabilen sporların oluşturulduğu fazdır. Sporontların oluşması ile sporogonik faz başlamaktadır. Sporontlar, ikiye bölünme ya da çoklu füzyon ile çoğalıp, sporoblastları oluşturur. Oval şekilli sporoblastların olgunlaşmasıyla olgun sporlar meydana gelir. Sporogoni de yine parazitin türüne göre parazitoforoz vakuolde, konak hücre sitoplazmasından serbest olarak ya da sporoforoz vakuol içerisinde meydana gelir. Sporlar konak hücresini tamamen doldurduğu zaman plazma membranı patlar ve sporlar çevreye dağılır. Bu sporlar ya konak içerisinde yeni bölgelere taşınarak çevredeki diğer hücreleri enfekte edebilir ya da yeni konakları enfekte edebilmek için idrar, dışkı gibi vücut çıkartıları ile dışarı atılabilirler (9,11,15,16).

2.4.4. *Encephalitozoon intestinalis*'in morfolojik özellikleri ve hayat döngüsü

*Encephalitozoon intestinalis'*in tüm evrim dönemlerinde çekirdek tek parçalıdır. Parazit konak hücre sitoplazması içinde bulunan ve konak tarafından oluşturulan parazitoforoz vakuolde gelişmektedir. Enfekte olan hücreler, gelişen organizma çevresinde parazitin salgıladığı fibriler ağ yapısı göstermektedir. Böylece parazitoforoz vakuol septalı gözlenir. Parazit ikiye bölünerek çoğalır ve çoğaldıkça vakuolü büyütür. Merontlar vakuol membranına yapışık olarak; sporontlar ise serbest olarak vakuol içinde bulunur. Sporları elipsoid, yaklaşık olarak 2.2 x 1.2 µm boyutlarında olup, polar tüpteki sarmal sayısı 5-7'dir (9,11,15,16). *E.intestinalis*'in hayat döngüsü Şekil 2.5'te gösterilmiştir.





Şekil 2.5. *E.intestinalis*'in hayat döngüsü.

1-*E.intestinalis*'in enfektif dönemi olan sporlar.
2-Spor polar tüpü aracılığı ile konak hücreye tutunur.
3-Spor enfektif dönemi olan sporoplasmayı polar tüpü aracılığı ile konak hücre sitoplazmasına enjekte eder.
4-Hücre içinde sporoplasma merogoni ile çoğalır. Bu çoğalma konak tarafından oluşturulan parazitoforoz vakuol içerisinde gerçekleşir.
5-Olgun sporlar oluşur.
6-Hücrenin parçalanması sonucunda sporlar ya konak içerisinde yeni bölgelere taşınarak çevredeki diğer hücreleri enfekte edebilir ya da yeni konakları enfekte edebilmek için idrar, dışkı gibi vücut çıkartıları ile dışarı atılabilirler.

2.5.EPİDEMİYOLOJİ

AIDS pandemisinden önce microsporidiosis olgu sayısı oldukça sınırlıyken, bugün başta hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkeler olmak üzere tüm dünyada giderek artış göstermektedir. Tanıda kullanılan metot farklılıklarından dolayı prevalans verileri oldukça değişkenlik göstermektedir. Mikrosporidian parazitler ilk olarak 1857 yılında tanımlanmasına rağmen ilk insan olgusu 1959 yılında çiftlik hayvanlarıyla temas öyküsü olan Japon bir çocukta bildirilmiştir ve etkenin Encephalitozoon cinsi mikrosporidian parazitler olduğu rapor edilmiştir. 1973 yılında ise immun sistemi baskılanmış bir çocuğun tüm organlarından *Nosema connori* izole edilmiştir. 1985 yılına kadar sadece 10 olgu bildirilmiştir. *E.intestinalis* ilk olarak 1992 yılında diyaresi olan bir AIDS hastasında gösterilmiştir. *E.intestinalis* insanda ikinci sıkılıkla enfeksiyon oluşturan mikrosporidia türüdür (9,11,15,16).

2.5.1. Bulaşma Yolları

Encephalitozoon intestinalis'in bulaşma yolu tam kesinlik kazanmamıştır. Enfeksiyonun bağırsak, solunum sistemi, göz gibi farklı bölgelerdeki lokalizasyonu göz önüne alındığında, bulaşmanın fekal-oral yol, inhalasyon ve kontamine parmaklarla mümkün olabileceği düşünülmektedir (9,11,15,16).

E.intestinalis insan dışında köpek, maymun, domuz, sığır, keçi ve goril gibi hayvanları da enfekte etmektedir. Bu nedenle zoonotik geçiş düşünülmesine rağmen ne evcil hayvanlar arasındaki yaygınlığı ne de hayvan enfeksiyonları ile insan enfeksiyonu arasında herhangi bir bağlantı bildirilmemiştir (9,11,15,16).

Parazitin birçok özelliği sudan geçişi desteklemektedir. Enfekte hayvanın idrarı ve dışkısıyla atılan sporlar, suları kontamine etmekte ve özellikle de su içerisinde uzun süre canlı kalabilmektedirler. Sporlar küçük oldukları için filtrelerden geçebilirler (9,11,15,16).

2.5.2. Dünya'daki Dağılımı

Mikrosporidian parazitler bütün dünyada fırsatçı patojenler olarak kabul görmeye başlanmış ve Arjantin, Avustralya, Botswana, Brezilya, Kanada, Çek Cumhuriyeti, Fransa, Almanya, Hindistan, İtalya, Japonya, Hollanda, Yeni Zelanda, İspanya, Sri Lanka, İsveç, İsviçre, Uganda, Tayland, Birleşik Krallık, Amerika Birleşik Devletleri ve

Zambiya gibi birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde microsporidiosis vakaları bildirilmiştir(18).

Encephalitozoon intestinalis prevalansı ise yapılan çeşitli çalışmalarda; Pakistan'da %4 (19), Rusya'da %1,2 (20), Malezya'da %12,5 (21), Venezüella'da %24 (22) olarak bildirilmiştir.

2.5.3. Türkiye'deki Dağılımı

Ülkemizde insanlarda görülme sıklığı üzerine yapılan çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Yapılan sınırlı sayıdaki araştırmada Karaman (13) değişik hasta gruplarından oluşan 2665 kişinin %8,5'inde; Atambay ve ark. (23) immun sistemi sağlam ve sindirim sistemi yakınmaları nedeni ile hastaneye başvuran 781 kişinin %6,5'inde; Karaman ve ark. (24), kanser tanısı almış 320 kişinin %10,9'ında ve sağlıklı bireylerden oluşan 320 kişilik kontrol grubunun ise %5,6'sında; Türk (25) ishal şikayeti olan 225 hastanın %9,8'inde; Yazar ve ark. (26) Akut Myeloblastik Lösemili (AML)-M3 bir hastada, Büget ve arkadaşları (27) ise bir AIDS hastasında *Microsporidia* spp. bildirmişlerdir. Fakat bu çalışmaların hiçbirinde tür ayrımı yapılmamıştır. Usluca ve Aksoy (28) immun sistemi baskılanmış bir çocukta PCR ile; Şıvgın ve ark (29) ise onkolojik tedavi gören bir hastada IFA-MAbs ile *E.intestinalis* belirlediklerini bildirmişlerdir. Ülkemizde tür ayrımı yapılan tek epidemiyolojik çalışmada ise Oğuz ve ark. (30) ishal şikayeti bulunana hastaların %22'sinde nested-PCR ile *E.intestinalis* bildirmişlerdir. Çalışma sayısının oldukça az olması nedeniyle *E.intestinalis*'in ülkemizdeki durumu tam olarak bilinmemektedir.

2.6. İMMUM YANIT

Mikrosporidia enfeksiyonlarında immun yanıt ve oluşan hasarlar, konağın immun sistemi ve parazitin türüne bağlı olarak değişmektedir. İmmun sistemi sağlam olan bireylerde IgM ve IgG antikorları gelişmekte ve ömür boyu devam etmektedir. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda ise antikor cevap değişkendir. İmmun yetmezlikli insanlarda CD4+ T hücre sayısı 100/µl'nin altında olan AIDS hastaları *E.intestinalis* enfeksiyonuna açıktır (31).

Dendritik hücreler tarafından IFN-γ üretimi intestinal mikrosporodia enfeksiyonlarında koruyucu cevabın oluşmasında önemli bir role sahiptir. *E.cuniculi* ile enfekte yaşlı

farelerden dendritik hücrelerden T hücre primingi normal şekilde olmaz iken daha genç farelerde dendritik hücrelerin yeniden yapılandırıldığı bir immun cevabın varlığı gösterilmiştir. Son yıllardaki çalışmalar farelerle sınırlı olup yaşlı farelerin mikrosporadial enfeksiyonlara daha yatkın olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden birçok araştırıcı Encephalitozoonlara karşı kazanılmış immun cevabın priminginde dendritik hücrelerin rolüne yoğunlaşma ihtiyacı duymuştur. *E.intestinalis* ile enfekte edilen IFN-γ knockout farelerle yapılan çalışmalarda *E.intestinalis* enfeksiyonlarının kontrolünde IFN-γ'nın önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. *E.intestinalis* ile enfekte edilen farelerde 10. günde spor atılımının başladığı, 16. günde ise belirgin miktarda azaldığı, IFN-γ knockout farelerde ise 6 ay boyunca spor atılımının devam ettiği ve belirli periyotlarda pikler oluşturduğu rapor edilmiştir (31-33).

Encephalitozoon türlerine karşı koruyucu hücresel immuniteyi oluşturan antijenler çok fazla bilinmemektedir. Bununla birlikte saflaştırılmış PTP1 proteini ile farelerin immunizasyonunun mikrosporidian sporlara karşı güçlü T hücre cevabını uyardığı gösterilmiştir. İlaveten saflaştırılmış PTP1 proteini ile uyarılmış fare dalak dendritik hücrelerinin CD8+ T hücrelerini üreten IFN-γ'ları aktive edebildiği fakat CD4+ T hücrelerini üreten IFN-γ'ların aktive edemediği bildirilmiştir (34).

2.7. PATOGENEZ ve KLİNİK BELİRTİLER

Encephalitozoon intestinalis immun sistemi sağlam bireylerde de bulunabilen bir parazit olmasına rağmen genellikle HIV pozitif, organ transplant alıcıları, kanserli hastalar gibi immun sistemi baskılanmış hastalar ile çocuklar, turistler, kontakt lens kullananlar ve yaşlılarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (11,16).

Encephalitozoon intestinalis öncelikle ince barsak enterositlerini enfekte etmektedir. Parazit epitelyal hücreler ile sınırlı kalmayıp, aynı zamanda lamina propria makrofajları, fibroblastlar ve endotelyal hücrelerde de bulunabilmektedir (11).

Encephalitozoon intestinalis ince barsak enterositleri, safra sistemi epiteli, böbrek ve solunum sistemi dokularına yerleşmektedir. Bunlara ek olarak AIDS'li bir hastanın konjonktivasında da saptanmıştır (11).

2.7.1. Gastrointestinal Tutulum

Sindirim sistemi enfeksiyonlarında en sık izole edilen türler *E.bieneusi*, *E.intestinalis* ve *E.cuniculi* olarak bildirilmektedir. *E. intestinalis* gastrointestinal sistem içerisinde ince bağırsak epitellerine kolonize olmaktadır. Kolonizasyon sonucunda bağırsak mukozasında bir takım değişiklikler olmakta ve epitel doku düz olarak görülebilmektedir. İmmun sistemi baskılanmış bireylerde *E.intestinalis* enfeksiyonlarında en yaygın olarak gözlenen klinik belirtiler kronik ishal, anoreksi ve kilo kaybıdır. İmmun sistemi sağlam bireylerde klinik semptomlar ise genellikle kendini sınırlayan ishal şeklindedir (12,35).

2.7.2. Hepatobiliyer Tutulum

Genellikle Encephalitozoon türlerinin neden olduğu hepatobiliyer tutulum ilk olarak, hepatit gelişen iki AIDS'li hastanın otopsisi sonrasında bildirilmiştir. Bunun yanında birçok HIV pozitif hastanın non-parankimal karaciğer hücrelerinde, *E.bieneusi* ve *E.intestinalis* tespit edilmiş fakat hastalarda tipik hepatit klinik bulgularının oluşmadığı gözlenmiştir (13,17,36).

E.intestinalis, safra sistemi ve safra kesesine ulaşarak kolanjit ve kolesistite neden olabilmektedir. AIDS'li hastalarda kolanjite neden olan etkenler arasında nadir olarak görüldüğü düşünülürken mikrosporidialar için yeni tanı yöntemlerinin gelişmesi ile bu kanı son zamanlarda değişmeye başlamıştır. Bu hastaların yaklaşık %90'ında sağ üst kadran veya epigastrik bölgede ağrı vardır ve bu ağrı, sıklıkla narkotik analjeziklere ihtiyaç duyulacak kadar şiddetli olmaktadır. Hastaların yarısında bulantı, kusma ve ateş görülürken, 2/3'ünde ishal, 3/4'ünde de belirgin kilo kaybı bulunmaktadır (36).

2.7.3. Oküler Tutulum

Son zamanlarda immun yetmezlikli hastalarda oküler microsporidiosis vaka sayısı dikkat çekici bir şekilde artmaktadır. Oküler microsporidiosis keratokonjonktivit ve stromal keratit olmak üzere iki klinik tablo şeklinde görülmektedir (10,11). Encephalitozoon türleri bu klinik tablolardan sadece keratokonjonktivit formun sebepleri arasında yer almaktadır. Bu klinik tablo genellikle immun yetmezlikli hastalarda ve kontakt lens kullanıcılarında görülmektedir. Enfeksiyon gözde; yabancı cisim hissi, aşırı gözyaşı, göz ağrısı, görme keskinliğinde azalma ve fotofobi gibi klinik

belirtiler oluşturmaktadır. Göz muayenelerinde diffüz yüzeyel punctate keratopati gözlenmektedir (10,11).

2.7.4. Serebral Tutulum

Serebral microsporidiosise en sık sebep olan tür *E.cuniculi*'dir. Serebral tutulumlu dissemine Encephalitozoon enfeksiyonu iki ve dokuz yaşlarındaki iki çocukta rapor edilmiştir. Her iki vakada da baş ağrısı, bulantı, kusma, spastik konvülsiyon ve serebral semptomlar olduğu, her ikisinin idrarında ve birinin beyin omurilik sıvısında (BOS) Encephalitozoon benzeri organizmaların tespit edildiği bildirilmiştir (12). Weber ve arkadaşları (37) 29 yaşında HIV pozitif, CD4+ sayısı 0 hücre/µl olan ve aynı zamanda **b**aş ağrısı, görsel ve bilişsel bozukluk, mide bulantısı ve kusma şikâyetleri olan bir hastada *E. cuniculi* kaynaklı serebral microsporidiosis tespit etmişlerdir. Hastanın BOS, balgam, idrar ve dışkı örneklerinde mikrosporidia sporları gösterilmiştir.

2.7.5.Üriner Enfeksiyonlar

Encephalitozoon türlerinin neden olduğu üriner enfeksiyonlara dissemine tutulumu olan AIDS'li hastalarda sıklıkla rastlanmaktadır. Mikrosporidia kaynaklı üriner enfeksiyonlar asemptomatik olabileceği gibi hematüri, sistit, granülomatöz interstisyel nefrit ve renal rahatsızlıklar tabloya hakim olabilir. *E.intestinalis* tarafından oluşturulan üriner enfeksiyonlarda böbrek çoğunlukla etkilenmekte ve böbrek fonksiyonları önemli ölçüde bozulmaktadır (38,39).

2.7.6.Pulmoner Enfeksiyonlar

Pulmoner microsporidiosis enfeksiyonları diğer mikrosporidia enfeksiyonlarına göre daha az sıklıkta görülmektedir. Bütün Encephalitozoon türleri HIV pozitif hastaların bronşiyal epitel hücrelerinde tespit edilmiştir (3,11,40).

2.7.7.Sistemik Mikrosporidia Enfeksiyonları

İnsanda enfeksiyon oluşturan üç Encephalitozoon türü sistemik enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Trachipleistophora, Pleistephora ve Brachiola genusunda bazı türlerin de sistemik enfeksiyonlara yol açabildiği bildirilmiştir. *E.bieneusi* tarafından oluşturulan enfeksiyonlar ise genellikle bağırsak epitel hücrelerinde ve hepatobiliyer bölgede sınırlanmıştır. Encephalitozoon türlerinin oluşturduğu enfeksiyonlar özellikle CD4+ hücre sayısı <50 hücre/µl olan şiddetli immun yetmezlikli hastalarda sistemik

enfeksiyonlara dönüşme eğilimindedir. Hastalığın klinik spektrumu etken olan Encephalitozoon türünün yayılım özelliklerine göre değişiklik gösterir. Bu türler arasında *E.hellem* genellikle keratokonjunktival, üriner, nazal sinüsler ve bronşial sistemde enfeksiyon oluştururken, *E.intestinalis* gastrointestinal sistem ve safra yollarında, nadirde olsa böbrek, göz, nazal sinüs ve respiratuar sistemde, *E.cuniculi* ise tüm organları tutan sistemik enfeksiyonlara yol açabilmektedir (12,35). İnsana yerleşen mikrosporidian parazitlerin oluşturdukları enfeksiyon Tablo 2.2'de verilmiştir (3,11).

Tablo 2.2. İnsana yerleşen mikrosporidia türleri, yerleştikleri dokular ve oluşan klinik bulgular

Türler	**Yerleştiği dokular**	**Klinik Tablo**
Encephalitozoon cuniculi	Böbrek, karaciğer	Hepatit, rinosinüzit, peritonit
Encephalitozoon hellem	Burun, trakea, solunum sistemi epiteli, böbrek, göz	Kronik rinosinüzit, rinit, keratokonjonktivit, dissemine enfeksiyon, nefrit, üretrit, prostatit, üreterit, sistit, pnömoni
Encephalitozoon intestinalis	İnce barsak enterositleri, safra sistemi epiteli, böbrek, solunum sistemi	Enterit, diyare, ince bağırsak perforasyonu, kolanjit, kolesistit, nefrit, bronşit, sinüzit, rinit, keratokonjonktivit, dissemine enfeksiyon
Enterocytozoon bieneusi	İnce bağırsak, hepatobiliyer sistem, solunum sistemi	Enterit, diyare, kolanjit, kolesistit, pnömoni, bronşit, sinüzit, rinit
T. hominis	Kas dokusu	Miyozit, sinüzit, rinit, keratokonjonktivit
T. anthropophthera	Kas dokusu	Ensefalit, miyozit, dissemine enfeksiyon
Nosema türleri	Göz dokuları, nadiren başka dokularda	Keratit
Pleistophora türleri	Kas dokusu	Miyozit
Vittaforma	Göz dokuları	Keratit
Brachiola	Kas dokusu	Miyozit
M. africanum	Göz dokuları	Korneal ülser
M. ceylonensis	Göz dokuları	Korneal ülser

2.8. TANI

Mikrosporidiaların tanısı, vücut çıkartılarında parazite ait sporları görerek konmaktadır. Fakat spor boyutlarının oldukça küçük olması nedeniyle rutin dışkı incelemelerinde genellikle gözden kaçmaktadır. Bu nedenle de mikrosporidia sporlarının tanımlanması ve enfeksiyonun doğrulanması için farklı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemler içerisinde farklı boyama yöntemleri ile boyanan preparatların ışık veya floresan mikroskobunda incelenmesi, transmisyon elektron mikroskobisi, serolojik testler, moleküler testler, histolojik incelemeler, hücre kültürü ve akım sitometrisi yer almaktadır (12,41-43).

2.8.1. Tanıda Kullanılan Klinik Örnekler

Encephalitozoon intestinalis'in tanısı genel olarak klinik örneklerde parazite ait sporları görerek olmaktadır. Tanıda kullanılan klinik örneklerin başında dışkı gelmektedir ki özellikle enfeksiyonun erken döneminde tanının konabilmesi için dışkının incelemesi önemlidir. Dışkı dışında diğer inceleme materyalleri ise idrar, duodenal aspirasyon materyali, balgam, bronkoalveoler lavaj sıvısı, beyin omurilik sıvısı, konjonktival süründüdür (3,11,43).

2.8.2. Işık ve Floresan Mikroskobisi Yöntemleri

Mikrosporidian parazitlerin tanısı birçok laboratuarda, klinik örneklerin farklı boyama yöntemleri ile boyanarak ışık veya floresan mikroskobunda değerlendirilmesiyle gerçekleşmektedir. Bu konvansiyonel tanı yöntemleri ile cins ve tür düzeyinde ayrım yapılamamaktadır. Ayrıca içyapı incelemesinde pratik olmayan bu yöntemlerde sporların tanınabilmesi için de deneyimli personele ihtiyaç vardır (3,11,42).

Konvansiyonel tanı yöntemlerinde, floresan boyaları (Calcofluor White 2MR, acridine orange ve Uvitex 2B), Giemsa boyası, Acid Fast-Trikrom boyası ve Weber'in Trikrom Boyası (WTS) en çok tercih edilen boyalar arasında yer almaktadır. Mikrosporidian parazitlerin tanısında kullanılan boyama yöntemleri ve özellikleri Tablo 2.3'te verilmiştir (3,11,42).

Tablo 2.3. Mikrosporidian parazitlerin tanısında kullanılan boyama yöntemleri ve özellikleri

Boyama Teknikleri	**Örnekler**	**Özellikleri**	**Açıklamalar**
Floresan	Dışkı, Vücut sıvıları, Doku biyopsileri	Kitin spor duvarı parlak Floresan verir.	Hızlı ve hassas bir teknik gerekmektedir. Biyopsi örneklerini boyamada kullanışlıdır. Hassas, fakat spesifik değildir.
Chromotrope ve Modifiye Chromotrope	Dışkı, Vücut sıvıları, Doku biyopsileri	Spor duvarı pembe-kırmızı boyanır, zemin mavi veya yeşil boyanır.	Zaman alıcı bir boyama yöntemidir. Modifiye boyalar kullanılarak boya süresi kısaltılabilir. Güvenilir ve yapılması kolaydır.
Giemsa	Vücut sıvıları, Doku biyopsileri	Açık mavi boyanır.	Yorumu zordur çünkü diğer fekal elementlerle karıştırılabilir.
Gram	Vücut sıvıları	Gram variable	Yorumu zordur çünkü diğer fekal elementlerle karıştırılabilir.
Modifiye Gram	Doku biyopsileri	Mavi veya soluk kırmızı, zemin kahverengi yeşil	Hassas olup, standardize edilmemiştir. Deneyimli patologlar gereklidir.
Warthin Starry	Doku biyopsileri		Zaman alıcıdır ve yorumlanması zordur.

2.8.2.1. Modifiye Trikrom boyaları

Acid Fast-Trikrom boyası

Mikrosporidian parazitler gibi intestinal coccidialar da immun sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Fakat bu iki grup parazitin tanısı için farklı boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Reisner ve ark. (44) ise bu boyama yöntemini *Cryptosporidium parvum* ve mikrosporidian parazitlerin tanısında kullanılabilecek başarılı bir yöntem olarak tarif etmişlerdir. Bu yöntemle mavimsi bir zemin üzerinde koyu kırmızı boyanan mikrosporidial sporların, bir kutbunda kuşak şeklinde görülen çizgilenmeler tanı koydurucudur.

Weber'in Trichrome Boyası

Bu boyama yöntemi ile sporun duvarı parlak pembe renge boyanırken sporun içi şeffaf ya da yatay köşegen çizgi şeklinde görülmektedir. Zemin ise yeşil ya da mavi görülmektedir. Modifiye trichrome boyanın duyarlılık ve özgüllüğü kesin olarak belirlenememiştir. Fakat bu boyama yönteminde bakterilerden ayırt etmeyi sağlayan diyagonal ve ekvatorial çizgiler içerdiğinden diğer boyama tekniklerine oranla daha yararlı olduğu bildirilmiştir (43,45).

2.8.2.2. Floresan boyaları

Mikrosporidia sporlarının tanısı için kullanılan floresan boyaları, Calcofluor White 2MR, acridine orange ve Uvitex 2B'dir. Diğer boyama yöntemlerine göre floresan boyaları hızlı ve pratiktir, fakat özgüllüğü yüksek değildir. Özgüllüğü arttırmak için diğer boyama yöntemleri, özellikle de MTS ile paralel olarak örneklerin boyanması ve değerlendirilmesi gerekmektedir (43,46).

Calcofluor White 2MR

Bu boyama yönteminde, Calcofluor ile boyanan örnekler floresan mikroskobunda 395-415 nm dalga boylu filtrede incelenmektedir. Boya, spor duvarının endospor tabakasındaki kitine bağlanmakta ve sporun, mavi–beyaz floresan vermesini sağlamaktadır. Yöntemin duyarlılığı yüksek ancak kitin içeren diğer mikroorganizmaları özellikle de mantar sporlarını da boyadığı için özgüllüğü düşüktür. Fakat mikrosporidia sporları mantarlardan boyutlarının daha küçük olması ve tomurcuklanma olmaması ile ayırt edilebilmektedir. Bu boyama ile spor morfolojisi anlaşılmasına rağmen içyapısının görülmemesi de yine boyanın dezavantajlarından biridir (43,46,47).

Calcofluor boyası aynı zamanda sporların canlılık testi içinde kullanılan bir boyadır. Canlı sporlar Calcofluor ile 395-415 nm dalga boyunda tukuaz-mavi, ölü sporlar ise beyaz-sarı renkte gözlenmektedirler.

Uvitex 2B

Uvitex 2B yönteminde de Calcofluor boyama yönteminde olduğu gibi boya spor duvarının endospor tabakasındaki kitine bağlanarak mavi–beyaz floresan vermektedir. Bu yöntemde de kitin içeren diğer mikroorganizmalar özellikle de mantar sporları da boyanmaktadır (48).

Acridine Orange

Acridine orange ile boyanmış preparatlarda sporlar turuncu floresan vermektedir. Fakat zeminde turuncu renk verdiği için, sporları zeminden ve diğer dışkı artıklarından ayırt etmek zordur. Bu boyama yönteminde de sporlar mantarlarla karışmaktadır (49).

2.8.2.3. Giemsa boyası

Giemsa boyası mikrosporidian parazitlerin tanısında başlangıç testi olarak kullanılabilecek kolay bir yöntemdir. Bu boyama yönteminde sporlar açık mavi renkte görülmektedir. Dışkı, vücut sıvıları, sitolojik örnekler ve intestinal biyopsi örnekleri Giemsa boyası ile boyanarak incelenebilir. Fakat bu örneklerden dışkıda, artık madde miktarı fazla olduğu için sporların ayırt edilmesi oldukça zordur. Dışkıların filtrelerden süzüldükten veya artık maddelerin uzaklaşmasını sağlayan çoklaştırma yöntemlerinden sonra boyanması tanıyı daha duyarlı hale getirmektedir. Dışkı dışındaki örneklerde ise artık madde miktarı fazla olmadığı için sporların ayrımı dışkı preparatlarınkinden daha kolay olmaktadır (43,49).

2.8.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)

Günümüzde TEM, moleküler yöntemlerin uygulanmadığı laboratuarlarda halen tanımlamada kullanılan ve tür tayininde altın standart kabul edilen bir yöntemdir (41,50). TEM ile vücut sıvılarında ve dışkıda sporların boyutu ve morfolojisi, polar tübül sarmal sayısı ve konak parazit ilişkileri gösterilebilmektedir. Parazitin polar filamentinin özelliklerine göre ayrıca tür tayini yapılabilmektedir. Sporların yapılarını detaylı inceleyebilmek ve yeni türlerin taksonomik sınıflandırılmaları için TEM'den yararlanılmaktadır (11,46).

Mikrosporidiaların tanısında TEM yönteminin özgüllüğü yüksek olup duyarlılığı düşüktür. Örnek hazırlama aşamasının uzun ve pahalı olması yöntemin dezavantajları arasındadır (11,46).

2.8.4. Serolojik Yöntemler

Mikrosporidian parazitlerin tanısında Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Western blot, Indirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) ve immun floresan gibi serolojik testler kullanılmaktadır. Seroepidemiyolojik çalışmalarda kullanılan bu testler ile mikrosporidialara karşı tespit edilen antikorların, yeni enfeksiyon, latent enfeksiyon, çapraz reaksiyon veya poliklonal B hücre aktivasyonu olup olmadığının gösterilmesinde zorluklar yaşandığı belirtilmiştir (51).

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda, ilerleyen immun yetmezlik ve sonraki evrelerde yetersiz antikor üretimi bulunmaktadır. Microsporidiosisli HIV pozitif hastaların sadece %50'sinde yüksek seviyede antikor bulunduğu ve ayrıca serolojik testlerin türler arasında ve hatta diğer parazitlerle çapraz reaksiyon verme olasılığının da bulunduğu bilinmektedir (36).

2.8.5. Monoklonal antikorların kullanıldığı Immun Floresan Antikor (IFA-MAbs) Yöntemi

Bazı mikrosporidia türlerine karşı monoklonal ve poliklonal antikorlar geliştirilmiştir. Türe özgü yüzey molekülleri veya polar tübül yapısını tanıyan floresan işaretli monoklonal antikorlar tanıda kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar örnekte bulunan sporların spor duvarındaki proteinlere bağlanmakta ve floresan mikroskobunda sporlar parlak yeşil röfle vermektedir. Fakat bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri ile ilgili bazı çelişkiler bulunmaktadır (21,52).

2.8.6. Moleküler Yöntemler

Birçok laboratuarda rutin olarak mikrosporidian parazitlerin tanısında hala mikroskobi temelli yöntemler kullanılmasına rağmen son yıllarda özellikle de araştırma laboratuarlarında teşhis amacıyla moleküler yöntemlerin kullanılması hız kazanmıştır**.** Moleküler yöntemlerin başarısı, hasta örneklerinden genomik DNA'nın ekstraksiyonu için kullanılan yöntemlerle yakından ilişkilidir (53,54). Mikrosporidian parazitlerin moleküler tanısında dışkı, doku biyopsi materyali, korneal kazıntı örnekleri, duodenal aspirasyon sıvıları, idrar örnekleri ve in-vitro kültür örnekleri kullanılabilir (3). Bu örnekler içerisinde dışkıdan DNA izolasyonu oldukça zordur ve değişkenlik göstermektedir. Normal kit prosedürlerinin yetersiz kaldığı dışkı örneklerinde, mekanik veya kimyasallarla sporların parçalanmasını sağlayacak ön işlemlere ve dolaysıyla da

daha zor bir ekstraksiyon şartlarına gerek duyulmaktadır. Başarılı bir ekstraksiyon için %0.5 sodyum hipoklorit, kitinaz, litikaz, guanidin tiyosiyanat, %10 formaldehit veya 1 M potasyum hidroksit, dithiotreitol, hekzadeksiltrimetilamonyum bromit kullanımı veya örneklerin kaynatılması ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Dışkının moleküler yöntemler için kullanımının diğer bir dezavantajı ise sıklıkla polimeraz enzim inhibitörleri içermesidir. İnhibitörlerin uzaklaştırılması için basit olarak örneklerin dilüsyonu veya guanidin tiyosiyanat ile muamele edilmesi çeşitli araştırıcılar tarafından tavsiye edilmektedir (55-58). Bunlardan başka denatürantların, şelat yapıcı ajanların ve serbest radikal bağlayıcıların emdirilmiş olduğu FTA filtre metodunun da mikrosporidia sporlarının ekstraksiyonu için oldukça etkili olduğu belirtilmektedir (59).

Ökaryotik organizmalarla karşılaştırıldığında mikrosporidian parazitler oldukça küçük genoma sahiptir. Haploid genom boyutlarının ortalama 5.3 ila 19.5 Mb arasında olduğu gösterilmiştir. Mikrosporidian parazitlerde rRNA gen bölgesi genler arası transkripsiyonu yapılmayan ara bölge ile ayrılan 16S SSU rRNA ve 23S LSU rRNA genlerinden oluşmaktadır. Gerçek ökaryotik organizmalardan farklı olarak 5.8S rRNA geninden ve ikinci bir genler arası ara bölgeden yoksundur (60). Aynı zamanda mikrosporidian parazitlerin içerisinde *E.cuniculi*'nin haploid genomu 2.9 Mb'dır ve tüm genomu sekanslanan tek mikrosporidia türüdür (61). *E.intestinalis* ise en küçük genoma sahip ökaryotik hücredir.

Mikrosporidian parazitlerin PCR temelli teşhisinde SSU rRNA, LSU rRNA, α ve β-tubulin, polar tube protein, polar tube protein 55 precursor, ribosomal protein L27a, dihydrofolate reductase, serine hydrxymethyltransferase, aminopeptidase, thymidylate synthase, internal transcribed spacer ve actin gen bölgelerinden hazırlanmış primerler kullanılmaktadır (3). İnsanlarda sıklıkla enfeksiyon oluşturan beş mikrosporidia türünün (*E. bieneusi*, *E. intestinalis, E. cuniculi*, *E. hellem* ve *V. cornea*) ve diğer mikrosporidian parazitlerin tanısında SSU rRNA hedef gen bölgesinden hazırlanmış tür spesifik ve jenerik primer çiftleri başarıyla kullanılmaktadır (3,53). *E.intestinalis* tanısında kullanılan tür-spesifik primer çiftlerinden bazıları Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4. *Encephalitozoon intestinalis* tanısında kullanılan tür-spesifik primer çiftleri

Primer çifti sekansı (5'-3')	Primer	Kaynak
CAC CAG GTT GAT TCT GCC TGA C	V1	62
CTC GCT CCT TTA CAC TCG AA	SI500	
TTT CGA GTG TAA AGG AGT CGA	SINTF1	63
CCG TCC TCG TTC TCC TGC	SINTR	
GGG GGT AGG AGT GTT TTT G	3	64
CAG CAG GCT CCC TCG CCA TC	3	
TGA ATG (G/T)GT CCC TGT	MSP1	65
TCA CTC GCC GCT ACT	MSP2A	
GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A/G)(C/T) TAT	MSP3	
CCA GCT TAT GCT TAA GT(C/T) (A/C)AA (A/G)GG GT	MSP4A	

Enterocytozoon bieneusi ve *Encephalitozoon* spp. tanısı amacıyla rRNA bölgesinden hazırlanan primer ve probların kullanıldığı multipleks real-time PCR yönteminin %100 sensitivite ve spesifiteye sahip olduğuna dair yayınlar bulunmaktadır. Bu yöntemin dışkıda 10^2 spor/ml saptayabilme duyarlılığına sahip olduğu bildirilmektedir (66-69). Ayrıca mikrosporidia türlerinin tanısında 16S rRNA gen bölgesi hedef alınarak tasarlanmış fluoresan işaretli probların örnek içersindeki uygun nükleik asit dizisine bağlanması esasına dayalı in situ hibridizasyon (FISH) temelli tekniklerde moleküler tanıda kullanılmaktadır (66,70,71). Mikrosporidiaların dört türüne (*E.bieneusi*, *E.intestinalis, E.cuniculi* ve *E.hellem*) özgü hazırlanmış oligonükleotit problarla yapılan bir multipleks fluoresan in situ hibridizasyon çalışmasında, sporları boyamaya yönelik kromotrop-2R ve Calcofluor White 2MR boyalarının kullanıldığı mikroskobik tanıya göre daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (72). *E.intestinalis*'in real-time PCR ile tanısında kullanılan bazı primer ve problar Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.5. *Encephalitozon intestinalis*'in real-time PCR ile tanısında kullanılan bazı primer ve problar

Primer çifti sekansı (5'-3')	Primer/Prob	Kaynak
CCC TGT CCT TTG TAC ACA CCG CCC	EncephP1	
AAT TCC TAG TAA TAA CGA TTG AAC AAG TTG	EintF1	**66**
ACG AAG GAC TCA GAC CTT CCA A	EintR2	
GCA AGG GAG GAA TGG AAC AGA ACA G	FEI1	
TTC AGA AGC CCA TTA CAC AGC	REI1	**67**
CGG GCG GCA CGC GCA CTA CGA TA	Prob	

Mikrosporidian parazitlerin filogenetik analizinde ve zoonotik geçişin gösterilmesinde önemli olan genotiplendirmede, korunmuş fakat türe göre farklılıklar gösteren ITS (Internal Transcribed Spacer) gen bölgesine göre hazırlanmış primerlere dayalı DNA sekans analizleri sıklıkla kullanılmaktadır (73,74).

2.8.7. Histolojik Yöntemler

Özel boyama yöntemleri ile mikrosporidian parazitlere ait sporlar, formalin ile fikse edilmiş ve parafin bloklara gömülmüş dokularda kolayca gösterilebilmektedir. Özellikle, Gram ve modifiye Warthin-Starry boyama yöntemleri ile boyanan kesitlerde sporların rahatlıkla tespit edildiği bildirilmektedir (13,42).

Dokuların Gram boyanması ile olgun sporların Gram pozitif boyandığı (mor menekşe), olgunlaşmamış sporların ise kırmızı renkte boyandığı bildirilmektedir. Warthin-Starry boyama yöntemi intestinal dokulardaki hem gelişmekte hem de olgun sporların boyanmasında etkili yöntemlerden biridir. Warthin-Starry boyama ayrıca sporların gerçek boyutundan daha büyük görünmesini sağlamaktadır. Bu boyama yöntemi ile boyanan sporlar kahverengimsi siyah renkte görülür. Bu boyama yönteminin bir dezavantajı sporun içyapısının Gram boyama ile hazırlanan preparatlara göre çok daha zor ayırt edilmesidir. *E.bieneusi* ile *Encephalitozoon* türlerinin tanısında duyarlılığı oldukça yüksektir. Bu yöntem sonuçlarının elektron mikroskobu sonuçlarıyla %100 uyumlu olduğu bildirilmiştir (13,42).

2.8.8. Hücre Kültürü

İnsanı enfekte eden mikrosporidian parazitlerin hepsinin olmasa da bir kısmının hücre kültürü yapılabilmektedir. Bu türlerden biri de *E.intestinalis'*tir. *E.intestinalis* sporlarını taşıyan dışkı, idrar, BAL, balgam, nazal mukoza, duodenal aspirasyon sıvısı ve biyopsi örneklerinden hücre kültürü yapılabildiği bildirilmiştir. E6, HLF, human embryonic lung (HEL), monocytes (MDM), MRC-5, RK-13, MDCK, intestinal (I 047), HT-29 ve Caco-2 gibi hücreler *E.intestinalis'*in hücre kültürü için kullanılmaktadır (75).

2.8.9. Flow Sitometrisi

Encephalitozoon intestinalis tanısında flow sitometre (FCM) kullanılmaktadır. Barbosa ve arkadaşları (76) *E.intestinalis* tanısında FCM kullanılmasının duyarlı, spesifik bir yöntem olduğunu ve aynı zamanda değerlendirmede uzmana ihtiyaç olmamasının

yöntemin bir avantajı olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda FCM ile ölü ve canlı hücrelerin de ayırt edilebileceğini belirtmişlerdir.

2.8. TEDAVİ

Mikrosporidial enfeksiyonların tedavisi intrasellüler olmaları ve sporlarının doğal direnci nedeniyle oldukça zordur. İnsanda görülen mikrosporidia enfeksiyonlarının çoğu enteriktir. *E. intestinalis* ikinci sıklıkla enfeksiyona yol açan türüdür, aynı zamanda tedaviye diğer türlerden daha duyarlıdır. Mikrosporidian parazitlerin tedavisinde genel olarak, albendazol, fumagillin, metronidazol, itrakonazol, trimetoprim-sulfamethoxazol (TMP-SMX), atovaquone, furazolidon ve nitazoxanid gibi ilaçlar kullanılmaktadır (11,17).

HIV ile enfekte hastalarda, özellikle *E.intestinalis* ve *E.bieneusi*'nin etken olduğu gastrointestinal tutulumlarda hastalığın progresif, sıklıkla fatal ve tedavisinin imkânsız olduğu düşünülürken albendazol kullanımı ile microsporidiosis insidansında belirgin bir azalmanın olduğu belirtilmektedir. Benzimidazol türevi olan ve tubulinlere bağlanıp hücre bölünmesini durdurarak etki gösteren albendazol, günümüzde tedavide en çok ümit veren anti-mikrosporidial ajan olarak kabul edilmektedir (11,17). *E.intestinalis*'e bağlı intestinal microsporidiosisde albendozol tek başına 400mg dozunda yeterli olmaktadır. Gunnarson ve arkadaşları (77) *E. intestinalis* ile multi organ enfeksiyonu kanıtlanmış beş hastaya albendazol tedavisi uygulamış ve tedavi sonrası semptomların azaldığı, dışkı örneklerinde ise mikrosporidian sporların görülmediğini bildirmişlerdir.

2.9. KORUNMA VE KONTROL

Encephalitozoon intestinalis'in bulaş yolu tam kesinlik kazanmamıştır. Enfeksiyonun bağırsak, solunum sistemi, göz gibi farklı bölgelerdeki lokalizasyonu göz önüne alındığında; bulaşmanın fekal-oral yol, inhalasyon ve kontamine parmaklarla mümkün olabileceği düşünülmektedir. *E.intestinalis* insan dışında birçok yabani ve evcil hayvanları da enfekte etmektedir. Hayvanlar arasındaki yaygınlığı ve hayvan enfeksiyonları ile insan enfeksiyonu arasındaki herhangi bir bağlantı bildirilmemiş olsa da bu durum zoonotik geçişi düşündürmektedir. Parazitin spor özellikleri düşünüldüğünde; bunlar dış ortama oldukça dayanıklı ve suda uzun süre canlı kalabilmektedirler. Ayrıca çok küçük oldukları için su filtrelerinden de geçebilmektedirler (11,43). Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, *E.intestinalis*'in içme

sularında tespit edildiği ve içme suyu yoluyla insana bulaşabileceği bildirilmiştir. Aynı zamanda sporlar çevrede nem ve sıcaklığa bağlı; aylarca hatta yıllarca canlı kalabilmekte, 22 ^{0}C'de ise en az bir ay canlılıklarını devam ettirebilmektedir. Dezenfektanlarla (%70 Etanol, %0.3-1 Formaldehit, %1 Hidrojen Peroksit, % 1 NaOH) 30 dakikada, kaynatılarak 5 dakikada, 120 ^{0}C'de otoklavda sporlar canlılığını yitirmektedir. Bu bilgiler ışığında korunma ve kontrol yöntemlerini şu şekilde sıralayabiliriz (17,13,25,43);

- ✓ Fekal-oral yolla bulaşma söz konusu olabileceğinden kişisel hijyene, özellikle de el temizliğine önem verilmelidir.
- ✓ Kaynamış veya ambalajlı su içmek özellikle risk altındaki AIDS ve organ transplantasyonu olan kişiler için önerilmektedir.
- ✓ Sebze ve meyvelerin iyi yıkanması bulaşın önlenmesi için önemlidir.
- ✓ Çeşitli vücut sıvılarında enfektif sporlar bulanabileceğinden özellikle hastanelerde bu duruma dikkat edilmelidir.
- ✓ Solunum yolu ile de geçiş olabileceğinden balgamında spor tespit edilen hastalara özel önlemler alınmalıdır.
- ✓ Konjonktivit ve diğer göz enfeksiyonları açısından kirli ellerle gözlere dokunulmamalıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması ve Hasta Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır (Ek: 1). Çalışmada kullanılacak olan dışkı örnekleri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi'nin çeşitli polikliniklerine başvuran ve tetkik için Parazitoloji Anabilim Dalı'na gelen hastalar ile sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubundan alınmıştır. Dışkı örneği alınan hastalar ile sağlıklı gönüllüler "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" (Ek: 2) ile bilgilendirilip yazılı onayları alındıktan sonra çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grupları aşağıdaki şekildedir.

Hasta Grupları (HG)

HG-1: Kanser tanısı almış, kemoterapi gören ve akut gastrointestinal şikayetleri olan hastalarından oluşmaktadır. Yaş ortalaması 62,52 (±11,36) olan toplam 25 kişinin, 13 (%52)'ü erkek, 12 (%48)'si kadındır. Bu grubun 20 (%80)'sinde ishal mevcut idi.

HG-2: Kemik iliği transplantasyonu yapılmış ve akut gastrointestinal şikayetleri olan hastalardan oluşmaktadır. Yaş ortalaması 42,4 (±13,42) olan toplam 25 kişinin, 18'i erkek, 7'si kadındır. Bu grubun da 20 (%80)'sinde ishal mevcut idi.

HG-3: Ürtiker şikayeti bulunan hastalardan oluşmaktadır. Bu gruba dahil edilen hastaların hiçbirinin herhangi bir gastrointestinal şikayet mevcut değildi. Yaş ortalaması 34.66 (±14.56) olan toplam 25 kişinin, 11 (%44)'i erkek, 14(%56)'ü kadındır.

HG-4: Fizyolojik gelişimleri normal olmayıp gelişme geriliği tespit edilen çocuklardan oluşmaktadır. Bu gruptaki hastaların 3 (%12)'ünde aynı zamanda ishal de mevcuttu. Yaş ortalaması 8,16 (±3,42) olan toplam 25 kişinin, 10 (%40)'u erkek, 15 (%60)'i kadındır.

Kontrol Grupları (KG)

KG-1: Herhangi bir kronik rahatsızlığı bulunmayan fakat akut gastrointestinal şikayetleri mevcut olan hastalardan oluşmaktadır. Yaş ortalaması 46,88 (±16,08) olan toplam 25 kişinin, 12 (%48)'si erkek, 13 (%52)'ü kadındır. Bu gruptaki kişilerin 12(%48)'sinde ishal mevcut idi.

KG-2: Herhangi bir kronik rahatsızlığı ve gastrointestinal şikayeti olmayan sağlıklı gönüllülerden oluşmaktadır. Yaş ortalaması 29,77 (±9,9) olan toplam 25 kişinin, 15 (%60)'i erkek, 10 (%40)'u kadındır. Bu gruptaki kişilerin hiçbirinde ishal yoktu.

3.2. Örneklerin Konvansiyonel Yöntemlerle İncelenmesi

Toplanan dışkı örnekleri ilk olarak nativ-lugol yöntemi ile incelenmiştir. İmmun sistemi baskılanmış hastaların dışkı örnekleri aynı zamanda asit-fast boyama yöntemi ile boyanarak intestinal coccidialar açısından değerlendirilmiştir. Kalan dışkı örnekleri IFA-MAbs yöntemi, konvansiyonel boyama yöntemleri ve moleküler testler için kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Boyamalar ve DNA izolasyonundan önce dışkı örneklerine su-eter konsantrasyon yöntemi uygulanarak parazitlerin yoğunlaşması ve dışkı artıklarından arındırılması sağlanmıştır.

3.2.1. Su-Eter Konsantrasyon Yöntemi (13,25)

Fosfat Buffer Saline (PBS)' nin Hazırlanışı

- NaCl 8 gr
- NaH_2PO_47H2O 1,15 gr
- KH_2PO_4 0,2 gr
- KOH 0,2 gr
- Distile su 1000 ml

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

Yöntem

1. 15 ml'lik falkon tüpüne 1-1,5 gram dışkı konmuştur.
2. Dışkı üzerine 8 ml distile su eklenip tamamen homojen olana kadar vortekslenmiştir.
3. Tam çözünmenin olması için 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir.
4. Dışkı-su karışımı 150 µm porluk filtreden süzülmüştür.
5. Süzülen kısım 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılmış ve üzerine 3 ml eter eklenmiştir.
6. Dışkı-su-eter karışımı 1 dk vortekslenmiştir.
7. Vorteksleme sonrası 4 dk 5000 *x g*'de santrifüj edilmiştir.
8. Dipteki kısım alınmış ve 2 kez distile su ile yıkanmıştır.

Yıkama işlemi: dipteki kısım üzerine 2 ml distile su eklenmiş ve 20000 *x g*'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Üsteki sıvı kısım atılarak işlem tekrarlanmıştır.

9. Yıkama işlemi sonrasında 200 µl PBS ile sulandırılmıştır.

Sulandırılan örnekten 15 µl alınarak lamın bir kenarına yayılmıştır. Bu şekilde her boyama yöntemi için bir ve bir tane de yedek olmak üzere toplam 3 preparat hazırlanmıştır. Kalan kısım ise DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

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

3.2.2. Boyama Yöntemleri

3.2.2.1. Calcofluor White 2MR (78)

%5 Evan's Blue'nun Hazırlanışı

- 100 ml PBS içerisinde 5 gr Evan's blue çözdürülmüştür.

%0.5'lik Fluorescent Brightener 28'in Hazırlanışı

- 100 ml PBS içerisinde 0,5 gr Fluorescent Brightener 28 çözdürülmüştür.
- Solüsyon oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.
- Boya kullanılmadan önce boyadaki tortuyu çöktürmek için 4000 g de 3 dk santrifüj edilmiştir.

Yöntem

1. Hazırlanan yaymalar havada kurutulmuştur.
2. Kuruyan preparat üzerine saf metil alkol dökülmüş ve oda ısısında 3 dk inkübe edilmiştir.
3. Örneklerden fazla alkol uzaklaştırılmış ve preparat havada kurutulmuştur.
4. %0.5'lik Fluorescent Brightener 28 preparat üzerine dökülmüş ve 3 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonrasında preparatlar PBS ile yıkanmıştır.
6. %5'lik Evan's blue preparat üzerine dökülmüş ve 30 sn oda ısısında inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyon sonrasında preparatlar musluk suyu ile yıkanmıştır.
8. Lamlar karanlık ortamda kurutularak derhal floresans mikroskobunda 380-420 nm dalga boylu filtre ve 1000X büyütmede incelenmiştir.

3.2.2.2. Modifiye Trikrom Boyama (Weber'in Trikrom Boyası, Chromotrope 2R boyası) (79,80)

Chromotrope 2R Boya Solüsyonun Hazırlanışı

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

Karışıma 3 ml glasiyal asetik asit eklenerek havan içerisinde ezilerek karıştırılmış ve 30 dk oda ısısında bekletilmiştir. Karışım üzerine 100 ml'ye tamamlanacak şekilde distile su eklenmiş ve homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır.

- Karışımın pH'sı 2 N'lik HCl ile 2.5'a ayarlanmıştır.
- Solüsyon oda sıcaklığında saklanmıştır.

Asit Alkol'ün Hazırlanışı

- 900 ml saf etanol ve 100 ml distile su karıştırılarak %90'lık etil alkol hazırlanmıştır.
- 995.5 ml % 90'lık etil alkolden alınmış ve 4.5 ml glasiyal asetik asit (GAA) ile karıştırılarak asit alkol hazırlanmıştır.
- Solüsyon oda sıcaklığında saklanmıştır.

Yöntem

1. Hazırlanan yaymalar havada kurutulmuştur.
2. Kuruyan preparat üzerine saf metil alkol dökülmüş ve oda ısısında 10 dk inkübe edilmiştir.
3. Örneklerden fazla alkol uzaklaştırılmış ve preparat havada kurutulmuştur.
4. Preparatlar chromotrope 2R boyası içerisinde 90 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.
5. Preparatlar asit alkol içerisinde 8 sn bekletilmiştir.
6. Preparatlar %95'lik etanol içerisinde 8 sn bekletilmiştir.

7. Preparatlar %95'lik etanol içerisinde 10 dk bekletilmiştir.
8. Preparatlar %100'lük etanol içerisinde 10 dk bekletilmiştir.
9. Preparatlar %100'lük etanol içerisinde 10 dk bekletilmiştir.
10. Preparatlar ksilen içerisinde 10 dk bekletilmiştir.

Ksilen içerisinden çıkardıktan lamlar kurutulmuş ve immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskobunda X1000'lik büyütmede incelenmiştir.

3.3. IFA-MAbs

Monoclonal antibodies anti-*Encephalitozoon intestinalis* kiti (Bordier Affinity Products, Switzerland) prosedürüne göre aşağıdaki şekilde çalışılmıştır.

Yöntem

1. Dışkılar 0.250 gr tartılmış ve 500 µl PBS içerisinde vortexlenerek çözdürülmüştür.
2. Ependorf içerisindeki çözdürülmüş dışkılar plastik çay süzgeçleri kullanılarak süzdürülmüştür.
3. Sulandırılmış ve süzdürülmüş dışkı örneklerinin 4 µl'si teflon tabanlı slaytlar üzerine yayılmış ve 1 saat 37 ºC de kurutulmuştur.
4. Slaytlar metanol ile fikse edilmiş ve kurutulmuştur.
5. Fikse edilen slaytlar aseton içerisinde -20 ºC de 20 dk bekletilmiş ve aseton içerisinden çıkartılan slaytlar havada kurutulmuştur.
6. Bir damla PBS örnekler üzerine damlatılmış ve slaytlar 5 dk oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra ise örnekler üzerindeki PBS bir taraftan pipet ile aspire edilmiştir.
7. Monoklonal antibodies anti- *Encephalitozoon intestinalis'*den kuyucuklara 20 µl eklenmiş ve 30 dk oda ısısında nemli ortamda inkübe edilmiştir.
8. İnkübasyon sonrasında preparatlar PBS içeren 3 farklı şaleye batırılmıştır.
9. Her kuyucuğa 20 µl kullanıma hazır konjuge eklenmiştir.
10. Preparatlar 30 dk oda ısısında, nemli ortamda karanlıkta inkübe edilmiştir.
11. İnkübasyon sonunda konjuge aspire edilerek preparatlar PBS ile yıkanmıştır.

12. Slaytlar dik bir şekilde konularak kurutulmuştur.
13. Her bir örneğin üzerine 1 damla gliserol eklenmiş ve 24X60 mm'lik lamlarla slaytlar kapatılmıştır.
14. Floresan mikroskobunda 1000X büyütmede 450-490 nm dalga boylu filtrede incelenmiştir.

3.4. Moleküler Yöntemler

3.4.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Dışkı örneklerinden DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji Laboratuarı'nda yapılmıştır. -20 ^{0}C'de muhafaza edilen örnekler ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Su eter yöntemi ile çoklaştırılan örneklerden DNA ekstraksiyonu, QIamp stool mini kiti (QIAGEN, Germany) ile aşağıdaki gibi yapılmıştır.

1. Çoklaştırma yöntemi ile elde edilen pellet üzerine 1.4 ml ASL buffer ve 250 mg asitle yıkanmış cam boncuk (Sigma-Aldrich, Germany) eklenmiştir. Mini bead beater (Biospec, Tayvan) cihazına yerleştirilen örnekler 2 dk vortekslenmiştir.
2. Vortekslenen örnekler sporların daha iyi parçalanması için önce sıvı azotta dondurulmuş ve hemen ardına tüpler kaynayan su içerisine konularak 5 dk kaynatılmıştır.
3. Kaynama işlemi sonunda örnekler tekrar mini-bead beater cihazına yerleştirilerek 20 sn vortekslenmiştir.
4. Vorteksleme işlemi sonunda 20000 *x g*'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
5. Üst sıvı yeni bir ependorfa aktarılmış ve üzerine kit içerisinde yer alan İnhibitEX tablet eklenmiştir. Tablet tamamen homojen olana kadar vortekslenen örnekler sonrasında 1 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon sonrasında örnekler 20000 *x g*'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
7. Üst sıvı yeni bir ependorfa alınarak yeniden 20000 *x g*'de 3 dk santrifüj edilmiştir

8. 1,5 ml'lik ependorf tüpüne 15 µl proteinaz K ve üzerine 200 µl santrifüj edilen örneklerin üst sıvısından konmuştur.
9. Proteinaz K+Örnek karışımı üzerine 200 µl AL buffer eklenerek 15 sn vortekslenmiştir.
10. Tüpler 70 ºC'de 10 dk inkübe edilmiştir.
11. İnkübasyon sonrası örnek üzerine 200 µl etanol eklenerek vortekslenmiştir.
12. Vorteksleme işlemi sonrasında elde edilen karışım spin koluma (kit içerisinden) aktarılmış ve 20000 *x g*'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
13. QIAamp spin kolumu yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra üzerine 500 µl Buffer AW1 eklenmiş ve 20000 *x g*'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
14. QIAamp spin kolumu yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra üzerine 500 µl Buffer AW2 eklenerek 20000 *x g*'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
15. QIAamp spin kolumu yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra 20000 *x g*'de 1 dk boş santrifüj edilmiştir.
16. QIAamp spin kolumu yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiş ve kolum membranının direkt üzerine 100 µl AE buffer eklenmiştir.
17. Kolum oda ısısında 5 dk inkübe edildikten sonra 20000 *x g*'de 1 dk santrifüj edilerek elüsyon sağlanmıştır.
18. Elde edilen DNA kullanılana kadar - 20°C'de saklanmıştır.

3.4.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Multiplex Real Time PCR

Bu çalışmada intestinal sisteme yerleşen dört mikrosporidia türünü (*E.intestinalis, E.cuniculi, E.hellem, E. bieneusi*) belirleyebilen Real Time PCR geliştirilmiştir. Primer dizaynında, *E.intestinalis* için Visvesvarav ve arkadaşları tarafından (81) karakterize edilen ve U09929.1 GenBank aksesyon numarası ile bildirilen; *E.cuniculi* için Baker ve arkadaşları tarafından (82) karakterize edilen ve L39107.1 GenBank aksesyon numarası ile bildirilen; *E.hellem* için Baker ve arkadaşları tarafından (82) karakterize edilen ve

L39108.1 GenBank aksesyon numarası ile bildirilen; *E. bieneusi* için Hartskeerl ve arkadaşları tarafından (83) karakterize edilen ve L16868.1 GenBank aksesyon numarası ile bildirilen 16S SSU rRNA gen bölgeleri kullanılmıştır. Aksesyon numaraları girilerek **"**Roche Diagnostics Universal Probe Library (UPL) Assay Design Center**"** programı kullanılarak dört türün tanısında kullanılabilecek en uygun primerler dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primer ve özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Dört türü belirlemek için Real-Time PCR'da kullanılan primerler

Primer	Uzunluk	Tm	%GC	Sekans
Mic-F	20	60	60	AGA GGG AGC CTG AGA GAT GG
Mic-R1*	20	60	60	CCC CAA AGG ATT AGG CAA GT
Mic-R2**	20	60	50	CTG TCT CCC CCG TAA GGA GT

*Encephalitozoon türleri için
**Enterocytozoon bieneusi için

Bu primerleden Mic-F ve Mic-R1 üç Encephalitozoon türünde yaklaşık 72 bp lik alanı amplifiye ederken, Mic-F ve Mic-R2 *E.bieneusi*'de yaklaşık 94 bp'lik alanı amplifiye etmekteydi.

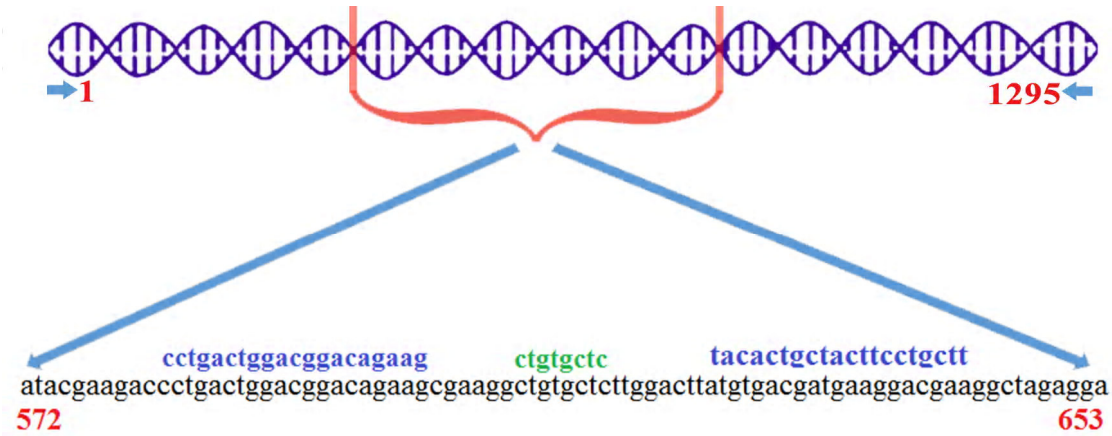
Multiplex Real Time PCR analizlerinde LightCycler 480 SYBR-Green master kiti (Roche Diagnostic, Almanya) ve primerler kullanılarak PCR karışımı hazırlanmıştır. Amplifikasyonlar 20 µl toplam tepkime hacmi içerisinde; 5 µl genomik DNA, 10 µl 2x SYBR-Green Master, 1'er Mic-F, Mic-R1 ve Mic-R2 primerlerinden ve 2 µl distile su kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Multiplex Real Time PCR amplifikasyonu için termal profil 95 ºC'de 5 dk 1 siklus; 95 ºC'de 10 sn, 60 ºC'de 10 sn ve 72 ºC'de 10 sn den oluşan 45 siklus; 95 ºC'de 5 sn ve 65 ºC'de 1 dk 1 siklus ve 40 ºC'de 30 sn 1 siklus olarak belirlenmiştir. Real Time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, amplifikasyon egrileri ve crossing point (Cp) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

***Encephalitozoon intestinalis* için Real Time PCR**

Elde edilen genomik DNA ekstraktları *E.intestinalis*'in 16S rRNA gen bölgelerini hedef alan spesifik primerler ve UPL prob kullanılarak Light Cycler 480 (Roche Diagnostic,

Almanya) cihazında Real Time PCR ile analiz edilmiştir. Bu amaç için kullanılan primer ve UPL prob dizaynında Visvesvarav ve arkadaşları tarafından (81) karakterize edilen ve U09929.1 GenBank aksesyon numarası ile bildirilen SSU rRNA gen bölgesi kullanılmıştır. Aksesyon numarası girilerek "Roche diagnostics UPL Assay Design Center" programı kullanılarak real-time PCR için en uygun primer ve problar belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan primer ve prob Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *Encephalitozoon intestinalis* tanısında kullanılan primer ve prob.

Real Time PCR analizlerinde LightCycler 480 probes master kiti, primerler ve UPL probu kullanılarak PCR karışımı hazırlanmıştır. Amplifikasyonlar 20 µl toplam tepkime hacmi içerisinde; 5 µl genomik DNA, 0.4 µl UPL probu, 1'er µl F ve R primerlerinden, 10 µl 2x probes Master ve 2,6 µl distile su kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Real Time PCR amplifikasyonu için termal profil 95 ºC'de 10 dk 1 siklus; 95 ºC'de 10 sn, 60 ºC'de 30 sn ve 72 ºC'de 1 sn 45 siklus ve 40 ºC'de 30 sn 1 siklus olarak belirlenmiştir. Real Time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, amplifikasyon ergileri, Cp verilerine ve kopya sayısına göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

Real Time PCR analizlerinde pozitif kontrol olarak; Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde görev yapmakta olan Doç. Dr. Özgür KORU'dan temin edilen *E.intestinalis* 16S SSU rRNA gen bölgesini içeren plazmit DNA'sından hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardaki seri dilisyonlar ve daha önce Nested-PCR ile pozitif bulunarak DNA dizi analizi ile *E.intestinalis* olduğu doğrulanmış olan hasta dışkısından elde

edilen genomik DNA kullanılmıştır. Çalışma esnasında pozitif kontrol olarak *E.intestinalis'*e ait 16S rRNA gen bölgesini içeren plazmit DNA'sından hazırlanmış seri dilüsyonlar kullanılmıştır. Ana sulandırımın kopya sayısı $5,3x10^8$ olarak hesaplanmıştır. Daha sonra ana stoktan 10'ar kat sulandırılarak 8 dilüsyon hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlar hazırlanırken 900 µl distile su içerisine bir önceki dilüsyondan 100 µl eklenerek dilüe edilmiş ve seri dilüsyonlardan elde edilen kopya sayıları standart eğrinin oluşturulmasında kullanılmıştır.

Negatif kontrol olarak ise; yine Doç. Dr. Özgür KORU'dan temin edilen *Encephalitozoon cuniculi, Encephalitozoon hellem* ve *Enterocytozoon bieneusi*'ye ait 16S SSU rRNA gen bölgesini içeren plazmit DNA'ları ve *Giardia intestinalis, Cryptosporidium parvum, Blastocystis hominis, Toxoplasma gondii, Leishmania* spp. pozitif olarak tespit edilmiş genomik DNA örnekleri ve steril distile su kullanılmıştır.

Nested PCR

PCR solüsyonlarının hazırlanması esnasında steril pipetler, pipet uçları ve distile su kullanılmıştır. Birinci PCR reaksiyonunda Wang ve arkadaşları (84) tarafından bildirilen 16S SSU rRNA gen bölgesinde yaklaşık 1300 bp'lik bölgeyi amplifiye eden primer, ikinci PCR reaksiyonunda Da Silva ve arkadaşları (63) tarafından bildirilen 16S SSU rRNA gen bölgesinde yaklaşık 530 bp'lik bir parçayı amplifiye eden *E.intestinalis* spesifik primerler (Tablo 3.2) kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Nested PCR'da kullanılan primerler

	Adı	Dizilimi (5'---3')	Büyüklük
1. Reaksiyon	Micro F	CACCAGGTTGATTCTGCCTGA	□1300 bp
	Micro R	TAATGATCCTGCTAATGGTTCTCCAAC	
2. Reaksiyon	Sınt F1	TTTCGAGTGTAAAGGAGTCGA	□530 bp
	Sınt R	CCGTCCTCGTTCTCCTGCCCG	

Reaksiyon için 25 µl'lik bir karışım hazırlanmıştır. Bu reaksiyon karışımında kullanılan bileşen ve miktarları Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. PCR reaksiyonu için kullanılan bileşen ve miktarları

Bileşen	**1.reaksiyon (µl)**	**2.reaksiyon (µl)**
10X Tampon	2,5	2,5
25mM $MgCl_2$	2	2
10mM dNTP miks	0,5	0,5
20 pmol/ µl F Primer *	1	1
20 pmol/ µl R Primer**	1	1
Taq DNA polimeraz (5u/ µl)	1	1
DNA	5	1
Distile su	12	16
Toplam	25	25

*F primer: 1.reaksiyon için Micro F, 2.reaksiyon için Sınt F1
**R primer: 1.reaksiyon için Micro R, 2.reaksiyon için Sınt R

PCR reaksiyonu için karışım 0,5 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisine hazırlanmıştır. Tüpler thermal cycler (SENSEQUEST, Almanya) cihazına yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur. Amplifikasyon için gerekli PCR şartlar Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4: Amplifikasyon için gerekli PCR şartları

1.reaksiyon		**2.reaksiyon**	
95°C 15 dk	1 döngü	95°C 15 dk	1 döngü
94°C - 30 sn		95°C - 30 sn	
54°C - 90 sn		52°C - 60 sn	
72°C - 90 sn	45 döngü	72°C - 60 sn	35 döngü
72°C -10 dk		72°C -7 dk	

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

3.5. DNA Dizi Analizi

3.5.1. Jelden Ekstraksiyon İslemi

Pozitif olarak belirlenen örneklerden toplamda 100 µl olacak şekilde PCR ürünü elde edilmiştir. Elde edilen ürünler birleştirilen iki kuyucuğa yüklenmiştir. Ürünler UV ışın altında görüntülenmiş ve yaklaşık 530 bp'lik bantlar steril bisturi ile kesilerek Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ABD) ile üretici firma önerisine göre aşağıdaki gibi saflaştırılmıştır.

1. Doğru büyüklükteki bant steril bir bisturi yardımı ile kesilerek steril ependorf içerisine alınmıştır.
2. Jel üzerine Membran Binding solüsyon her 10 mg jele 10 µl olacak şekilde eklenmiştir.
3. 60 °C'de jel tamamen çözünene kadar inkübe edilmiştir.
4. Jel tamamen çözününce örnek SV minikoluma aktarılmıştır.
5. Oda ısısında 2 dk inkübe edilmiş ve sonrasında 16000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
6. Minikolum yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve üzerine 700 µl Membran Wash Solution eklenerek 16000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
7. Minikolum yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve üzerine 500 µl Membran Wash Solution eklenerek 16000 x g'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
8. Minikolum yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve 16000 x g'de 3 dk boş santrifüj edilmiştir.
9. Minikolum steril bir ependorfa aktarılarak, üzerine 30 µl distile su eklenmiştir. 2 dk oda ısısında inkübe edildikten sonra 16000 x g'de 1 dk santrifüj edilerek DNA elüe edilmişti.

3.5.2. Sekans Analizleri

Jelden pürifiye edilen örnekler 30 µl hacimde, 20 pmol/ µl'lik primerden ise her bir örnek için en az 5 µl hacimde olacak şekilde firmaya iletilmiştir. Örneklerin sekans analizleri tek yönlü olarak yaptırılmıştır. Dizilime sonuçları, BioEdit Sequence Alignment programı ile incelenerek örneklerin sekans dizilimleri ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sekans dizilimlerinin internet ortamında Genbank'ta BLAST analizleri yapılarak Dünya'daki diğer bildirilen izolatlarla karşılaştırılmış ve filogenetik analizler yapılmıştır.

3.6.Verilerin Analizi

Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ki-kare testinin exact yöntemi uygulanmıştır. Ki-kare testinin çoklu karşılaştırmaları Bonferroni düzeltmeli Z testi ile yapılmıştır. Sayısal değişkenlerin normal dağılımına Shapiro-Wilk normallik testi ile bakılmıştır. İki grup karşılaştırmaları bağımsız örneklerde T testi ile, ikiden fazla grup karşılaştırmaları tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey HSD testi kullanılmış olup $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Dışkı Örneklerinin Konvansiyonel Yöntemlerle Değerlendirilmesi

Çalışmaya; 25'i onkolojik tedavi gören ve akut gastrointestinal şikayetleri olan, 25'i Kemik iliği transplantlı ve akut gastrointestinal şikayetleri olan, 25'i ürtikerli ve 25'i gelişme geriliği olan toplam 100 hasta dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat akut gastrointestinal şikayetleri olan 25 hasta ile 25 sağlıklı gönüllüden oluşan toplam 50 kişi alınmıştır.

Hasta ve kontrol gruplarından alınan toplam 150 dışkı örneği ilk olarak nativ-lugol yöntemi ile incelenmiştir. Aynı zamanda immun sistemi baskılanmış hastaların (onkolojik tedavi gören ve kemik iliği transplantasyonu yapılmış) dışkı örnekleri asit-fast boyama yöntemi ile boyanarak intestinal coccidialar açısından da değerlendirilmiştir. İncelenen dışkı örneklerinde nativ-lugol ve asit-fast boyama yöntemleri ile belirlenen parazitlerin cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Söz konusu rutin koproparazitolojik yöntemler ile mikrosporidian parazitlerin tanısı mümkün olmadığından tabloda mikrosporidian parazitler yer almamıştır.

Tablo 4.1. İncelenen dışkı örneklerinde nativ-lugol ve asit-fast boyama yöntemleri ile belirlenen parazitlerin cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı

	GRUP	Parazit Türü								TOPLAM
		Blastocystis hominis	*Giardia intestinalis*	*Entamoeba coli*	*Entamoeba histolytica*	*Entamoeba hartmanni*	*Endolimax nana*	*Isospora belli* ve *Cryptosporidium parvum*	*Blastocystis hominis* ve *Endolimax nana*	
		n (%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
Cinsiyet	Erkek (n:79)	11(13.9)	1(1.3)	-	-	-	1(1.3)	1(1.3)	-	14(17.2)
	Kadın (n:71)	7(11.3)	-	2(2.8)	1(1.4)	1(1.4)	1(2.8)	-	1(1.4)	13(18.3)
	TOPLAM	18 (12)	1(0.7)	2(1.4)	1(0.7)	1(0.7)	2(1.4)	1(0.7)	1(0.7)	27(18)
Yaş grupları	0-17 (n:25)	3(12.0)	1(4.0)	-	-	-	-	-	1(4.0)	5(24)
	18-30 (n:37)	7(18.9)	-	-	1(2.7)	-	-	-	-	8(21.6)
	31-40 (n:23)	-	-	1(4.3)	-	-	1(4.3)	-	-	2(8.7)
	41-50(n:22)	3(13.6)	-	-	-	-	-	1(4.5)	-	4(18.2)
	51-60 (n:21)	2(9.5)	-	-	-	-	1(4.8)	-	-	3(14.3)
	>61 (n:22)	3(13.6)	-	1(4.5)	-	1(4.5)	-	-	-	5(22.7)
	TOPLAM	18 (12)	1(0.7)	2(1.4)	1(0.7)	1(0.7)	2(1.4)	1(0.7)	1(0.7)	27(18)
Araştırma grupları	Onkoloji (n:25)	1 (4.0)	-	1(4.0)	-	-	-	-	-	2 (8)
	KİT (n:25)	1(4.0)	-	-	-	-	-	1(4.0)	-	2(8)
	Ürtiker (n:25)	8(32.0)	-	1(4.0)	-	-	1(4.0)	-	-	10(40)
	Gelişme Geriliği (n:25)	3(12.0)	1(4.0)	-	-	-	-	-	1(4.0)	5(24)
	Kontrol Grubu 1 (n:25)	4(16.0)	-	-	1(4.0)	1(4.0)	1(4.0)	-	-	7(28)
	Kontrol Grubu 2 (n:25)	1(4.0)	-	-	-	-	-	-	-	1(4)
	TOPLAM	18 (12)	1(0.7)	2(1.4)	1(0.7)	1(0.7)	2(1.4)	1(0.7)	1(0.7)	27(18)
İshal durumu	Pozitif (n:54)	4(7.4)	-	1(1.9)	-	1(1.9)	-	1(1.9)	1(1.9)	8(14.8)
	Negatif (n:96)	14(14.6)	1(1.0)	1(1.0)	1(1.0)	-	2(2.1)	-	-	19(19.8)
	TOPLAM	18 (12)	1(0.7)	2(1.4)	1(0.7)	1(0.7)	2(1.4)	1(0.7)	1(0.7)	27(18)

Hastaların 27 (%18)'sinde bir veya birden fazla parazit türü tespit edilirken, bunların 18 (%12)'inde *Blastocystis hominis,* 2 (%1,3)'sinde *Entamoeba coli,* 2 (%1,3)'sinde *Endolimax nana,* 1 (%0,7)'inde *Giardia intestinalis*, 1 (%0,7)'inde *Entamoeba histolytica,* 1 (%0,7)'inde *Entamoeba hartmanni,* 1 (%0,7)'inde *Isospora belli* ve *Cryptosporidium parvum* birlikte, 1 (%0,7)'inde ise *Endolimax nana* ve *Blastocystis hominis* birlikte olduğu görülmüştür.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda; belirlenen parazitlerin cinsiyet (p=0,446), yaş (p=0,554) ve ishal durumuna (p=0,273) göre dağılımında anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. Tespit edilen parazitlerin araştırma gruplarına göre dağılımına bakıldığında ise sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunda diğer gruplara göre anlamlı negatiflik tespit edilmiştir (p=0,047).

4.2. Dışkı Örneklerinin Mikrosporidian Parazitler Açısından Değerlendirilmesi

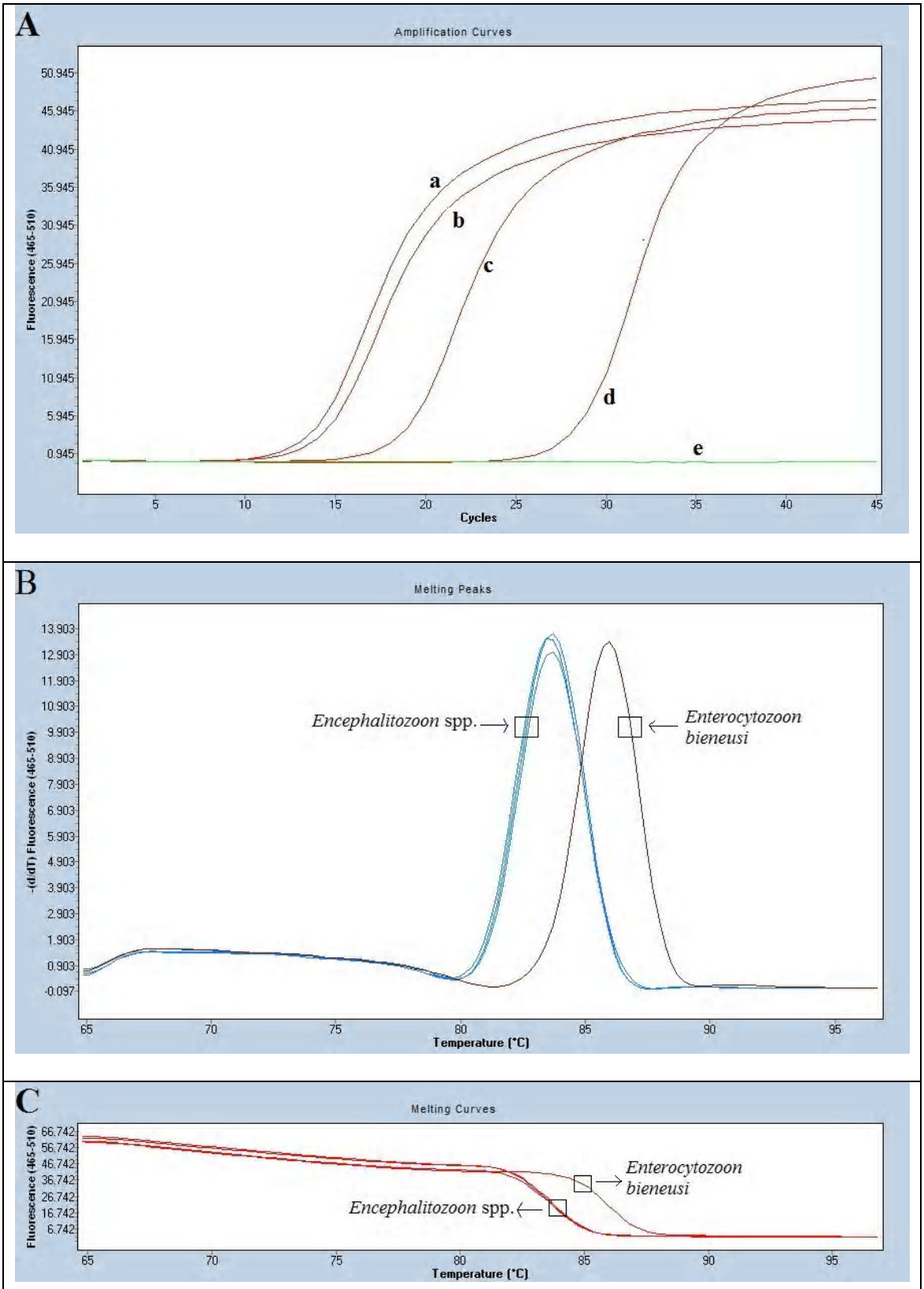
Dışkı örneklerinin mikrosporidian parazitler açısından değerlendirilmesinde altı farklı yöntem (modifiye trikrom boyama, calcofluor white 2MR, Multiplex Real Time PCR, IFA-MAbs, Nested PCR ve prob bazlı Real Time PCR) kullanılmıştır.

Modifiye trikrom boyama, calcofluor white 2MR ve Multiplex Real Time PCR yöntemleri ile intestinal sisteme yerleşen mikrosporidian parazitlerin varlığı tür ayrımı yapılmaksızın araştırılmıştır. Bu üç yöntemden Multiplex Real Time PCR ile elde edilen sonuçlar esas alınarak cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre mikrosporidian parazitlerin pozitiflik oranları karşılaştırılmış ve ayrıca Multiplex Real Time PCR ile dışkıdaki parazit yükü belirlenmiştir. Aynı zamanda bu yöntem ile elde edilen sonuçlara göre modifiye trikrom boyama ve calcofluor white 2MR boyama yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri belirlenmiştir.

IFA-MAbs, Nested PCR ve prob bazlı Real Time PCR yöntemleri ile ise *E.intestinalis* pozitifliği belirlenmiştir. Bu yöntemlerden prob bazlı Real Time PCR ile elde edilen sonuçlar esas alınarak, cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre *E.intestinalis* pozitiflik oranları karşılaştırılmış ve yine prob bazlı Real Time PCR ile dışkıdaki parazit yükü belirlenmiştir. Aynı zamanda bu veriler kullanılarak IFA-MAbs ve Nested PCR yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri de belirlenmiştir.

4.2.1. Multiplex Real Time PCR Sonuçlarına Göre Dışkı Örneklerinde Mikrosporidian Parazitlerin Pozitiflik Oranları

İntestinal sisteme yerleşen mikrosporidian parazitlerin belirlenmesinde Multiplex Real Time PCR referans test olarak alınmıştır. Analizler esnasında pozitif kontrol olarak *E.intestinalis, E.hellem, E.cuniculi* ve *E.bieneusi*'ye ait 16S SSU rRNA gen bölgesini içeren plazmit DNA'ları kullanılmıştır. Pozitif kontrollerden üç Encephalitozoon türünün erime sıcaklığı (melting temparature, Tm) 83.6 (±0.3°C), *E.bieneusi*'nin ise 86 (±0.2°C) olarak tespit edilmiştir. Pozitif kontrollerin amplifikasyon grafikleri, erime pikleri (melting peaks) ve erime eğrileri (melting curve) Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Multiplex Real Time PCR analizleri sonucu.
A-Amplifikasyon grafikleri. a-*E.intestinalis*, b-*E.cuniculi*, c- *E.bieneusi*, d-*E.hellem,* e- Negatif kontrol.
B-Pozitif kontrollerin erime pikleri (melting peaks).
C- Pozitif kontrollerin erime eğrileri (melting curve).

Mikrosporidian parazitlerin tanısında kullanılan yöntemlerle elde edilen pozitiflik oranlarının cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Farklı tanı yöntemleri ile elde edilen mikrosporidian parazit pozitifliğinin cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı

	Grup	**Modifiye Trikrom Boyama**	**Calcofluor White 2MR Boyama**	**Multiplex Real Time PCR**
		n(%)	n(%)	n(%)
Cinsiyet	Erkek (n:79)	25(31.6)	32(40.5)	29(36.7)
	Kadın (n:71)	18(25.4)	39(54.9)	23(32.4)
	TOPLAM	43(28,7)	71 (47.3)	52(%34.7)
Yaş grupları	0-17 (n:25)	10(48)	15(60)	11(44)
	18-30 (n:37)	10(27)	14(37.8)	10(27)
	31-40 (n:23)	2(8.7)	11(47.8)	3(139
	41-50 (n:22)	7(31.8)	10(45.5)	8(36.4)
	51-60 (n:21)	6(28.7)	9(42.9)	12(57.1)
	>61 (n:22)	8(36.4)	12(54.5)	8(36.4)
	TOPLAM	43(28,7)	71 (47.3)	52(%34.7)
Araştırma grupları	Onkoloji (n:25)	9(36)	12(48)	13(52)
	KİT (n:25)	7(28)	10(40)	7(28)
	Ürtiker (n:25)	7(28)	12(48)	9(36)
	Gelişme Geriliği (n:25)	10(40)	15(60)	11(44)
	Kontrol Grubu 1 (n:25)	6(24)	13(52)	9(36)
	Kontrol Grubu 2 (n:25)	4(16)	9(36)	3(12)
	TOPLAM	43(28,7)	71 (47.3)	52(%34.7)
İshal durumu	Pozitif (n:54)	20(37.0)	27(50.0)	23(42.6)
	Negatif (n:96)	23(24.0)	44(45.8)	29(30.2)
	TOPLAM	43(28,7)	71 (47.3)	52(%34.7)

İncelemesi yapılan 150 dışkı örneğinden 52 (34,7)'si Multiplex Real Time PCR ile intestinal sisteme yerleşen mikrosporidian parazitler açısından pozitif olarak tespit edilmiştir. Pozitif tespit edilen örneklerden 49 (%32,7)'unun erime sıcaklığı 83,3 (±0,2°C) olarak belirlenmiş olup *Encephalitozoon* spp. olarak değerlendirilmiştir. 3 (%2)'ünün erime sıcaklığı ise 86,1 (±0,1°C) olarak tespit edilmiş olup bu örnekler *E.bieneusi* olarak değerlendirilmiştir.

Pozitif tespit edilen 52 hastanın 29 (%55,8)'u erkek, 23 (%44,2)'ü ise kadındı. Erkek ve kadın hastalardaki pozitiflik oranları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür (p=0,610).

Yaş gruplarındaki pozitiflik oranları incelendiğinde; mikrosporidia pozitifliğinin 51-60 yaş arasında en yüksek (%51,7), 31-40 yaş arasında ise en düşük (%13) oranlarda olduğu saptanmış olup istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p=0,042).

Onkolojik tedavi gören ve akut gastrointestinal rahatsızlığı olan hastaların oluşturduğu grupta %52, kemik iliği transplantasyonu yapılmış ve akut gastrointestinal şikayetleri olan hasta grubunda %28, ürtikerli hastalarda %36, gelişme geriliği olan çocuklarda %44, kronik rahatsızlığı olmayan fakat akut gastrointestinal rahatsızlığı bulunan hastalarda %36, sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunda ise %12 oranında mikrosporidia pozitifliği tespit edilmiştir. Sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubundaki pozitifliğin diğer gruplara göre anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüştür (p=0.046).

Bütün hasta grupları içerisinde ishal şikâyeti olan 54 hastanın 23 (%42,6)'ü, ishal şikâyeti olmayan 96 hastanın ise 29 (%30,2)'u Multiplex Real Time PCR ile intestinal mikrosporidian parazitler açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ancak yapılan istatistiksel değerlendirmede; aradaki farkın anlamlı olmadığı görülmüştür (p=0,153).

4.2.1.1. Multiplex Real Time PCR Sonuçlarına Göre Dışkıda Mikrosporidian Parazit Yükü

Multiplex Real Time PCR ile mikrosporidian parazitler açısından pozitif belirlenen örneklerde saptanan Cp değerlerinin cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı Tablo 4.3'te verilmiştir.

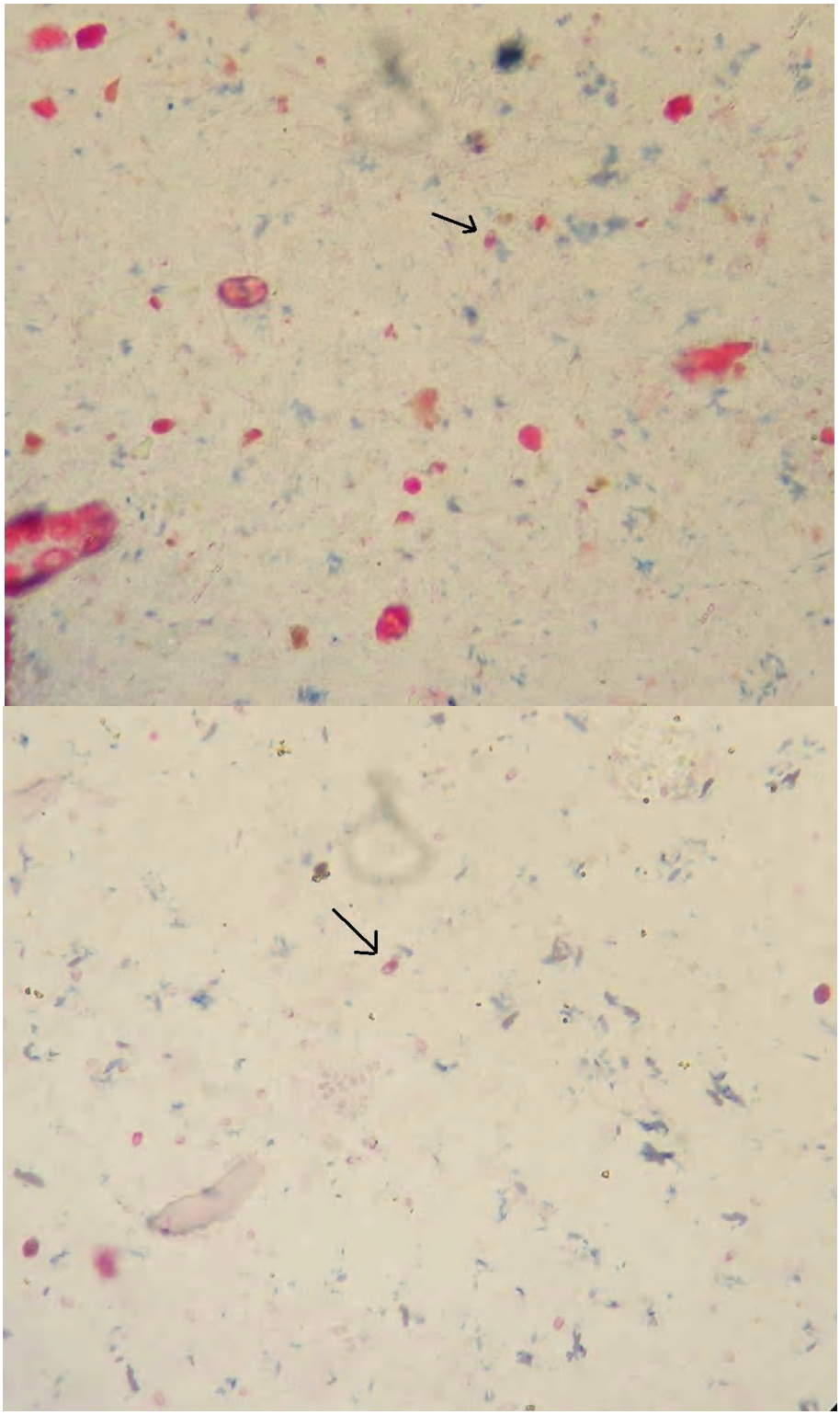
Tablo 4.3. Multiplex Real Time PCR ile pozitif saptanan örneklerin Cp değerlerinin cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi

	Grup	Pozitif Hasta Sayısı	Cp değerleri				
			Min-Max	Ortalama	Standart sapma	F	P
Cinsiyet	Erkek (n:79)	29	31.18-37.1	35.17	1.54	50	0.818
	Kadın (n:71)	23	32.21-38.01	35.27	1.35		
Yaş grupları	0-17 (n:25)	11	32.21-36.83	35.33	1.29	0.507	0.770
	18-30 (n:37)	10	32.14-36.84	34.94	1.51		
	31-40 (n:23)	3	35.96-37.14	36.37	0.67		
	41-50 (n:22)	8	31.18-38.01	34.93	2.43		
	51-60 (n:21)	12	33.43-37.1	35.23	1.02		
	>61 (n:22)	8	33.56-36.85	35.24	1.20		
Araştırma grupları	Onkoloji (n:25)	13	33.43-37.10	35.27	1.06	3,345	0.012
	KİT (n:25)	7	31.18-36.01	33.41	1.75		
	Ürtiker (n:25)	9	33.38-37.14	35.78	1.34		
	Gelişme Geriliği (n:25)	11	32.21-36.83	35.33	1.29		
	Kontrol Grubu 1 (n:25)	9	33.56-38.01	35.67	1.37		
	Kontrol Grubu 2 (n:25)	3	35.27-35.98	35.74	0.4		
İshal durumu	Pozitif (n:54)	23	31.18-37.1	35.15	1.21	50	0,024
	Negatif (n:96)	29	32.21-38.01	35.61	1.18		

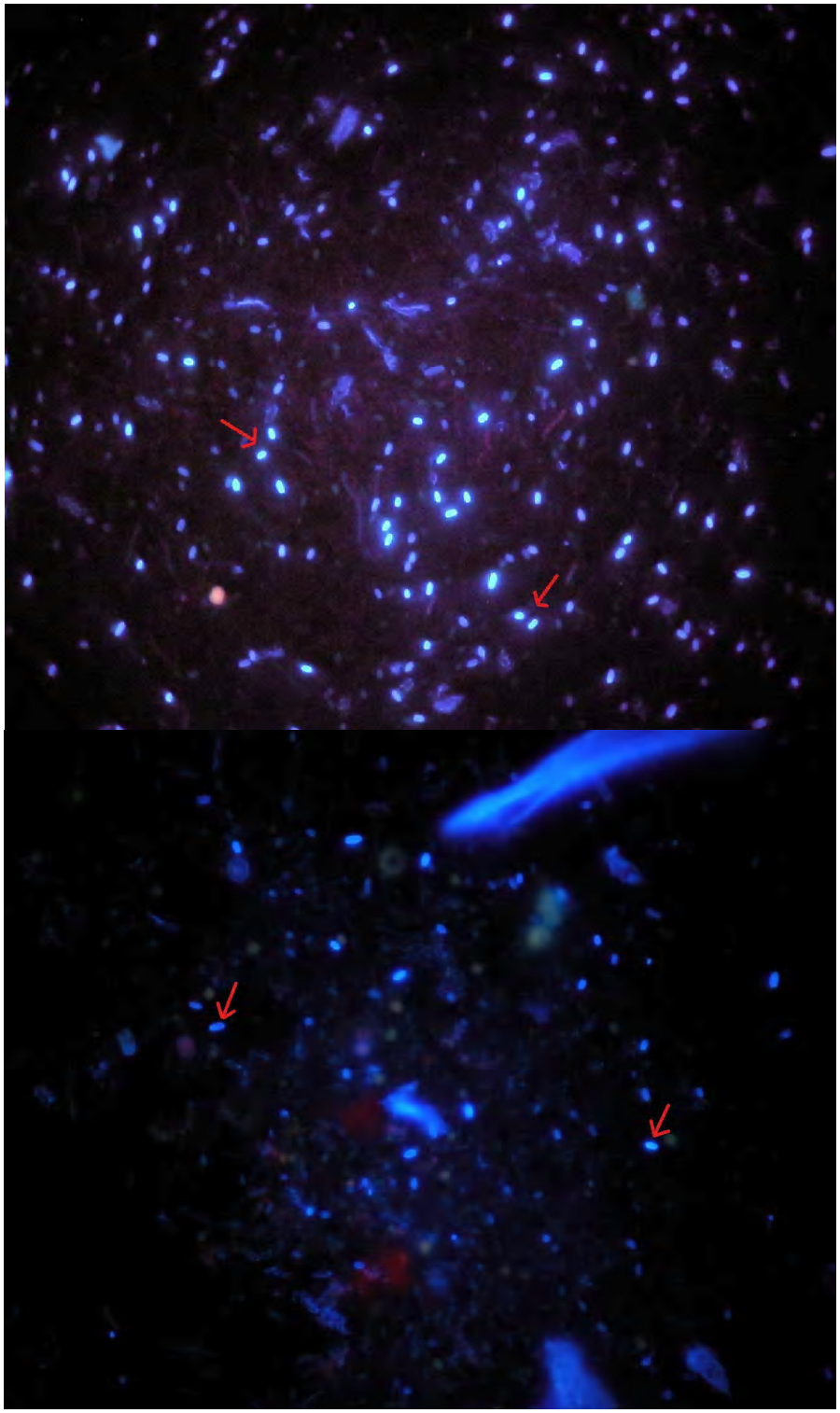
Yapılan istatistiksel analizde; parazit yükü ile cinsiyet (p=0.818) ve yaş (p=0.770) arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı görülmüştür. Araştırma gruplarında parazit yüküne bakıldığında ise KİT hastalarındaki parazit yükünün onkolojik tedavi gören ve gelişme geriliği olan hastalardan farklı olmadığı fakat diğer gruplardan farklı olduğu ve bu farkında anlamlı olduğu görülmüştür (p=0.012).

4.2.1.2. Multiplex Real Time PCR Sonuçlarına Göre Modifiye Trikrom ve Calcofluor White 2MR Boyama Yöntemlerinin Sensitivite ve Spesifite Değerleri

İncelemesi yapılan 150 dışkı örneğinden 43 (%28,7)'ü modifiye trikrom (Şekil 4.2A ve B), 71 (%47,3)'i ise calcofluor white 2MR (Şekil 4.3A ve B) boyama yöntemi ile pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.2).



Şekil 4.2. Modifiye trichrome boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları (x1000)



Şekil 4.3. Calcofluor white 2MR boyama yöntemi ile tespit edilen mikrosporidia sporları (x1000)

Multiplex Real Time PCR'da elde edilen sonuçlara göre modifiye trikrom boyama ve calcofluor white 2MR boyama yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Multiplex Real Time PCR'da elde edilen sonuçlara göre modifiye trikrom ve calcofluor white 2MR boyama yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri

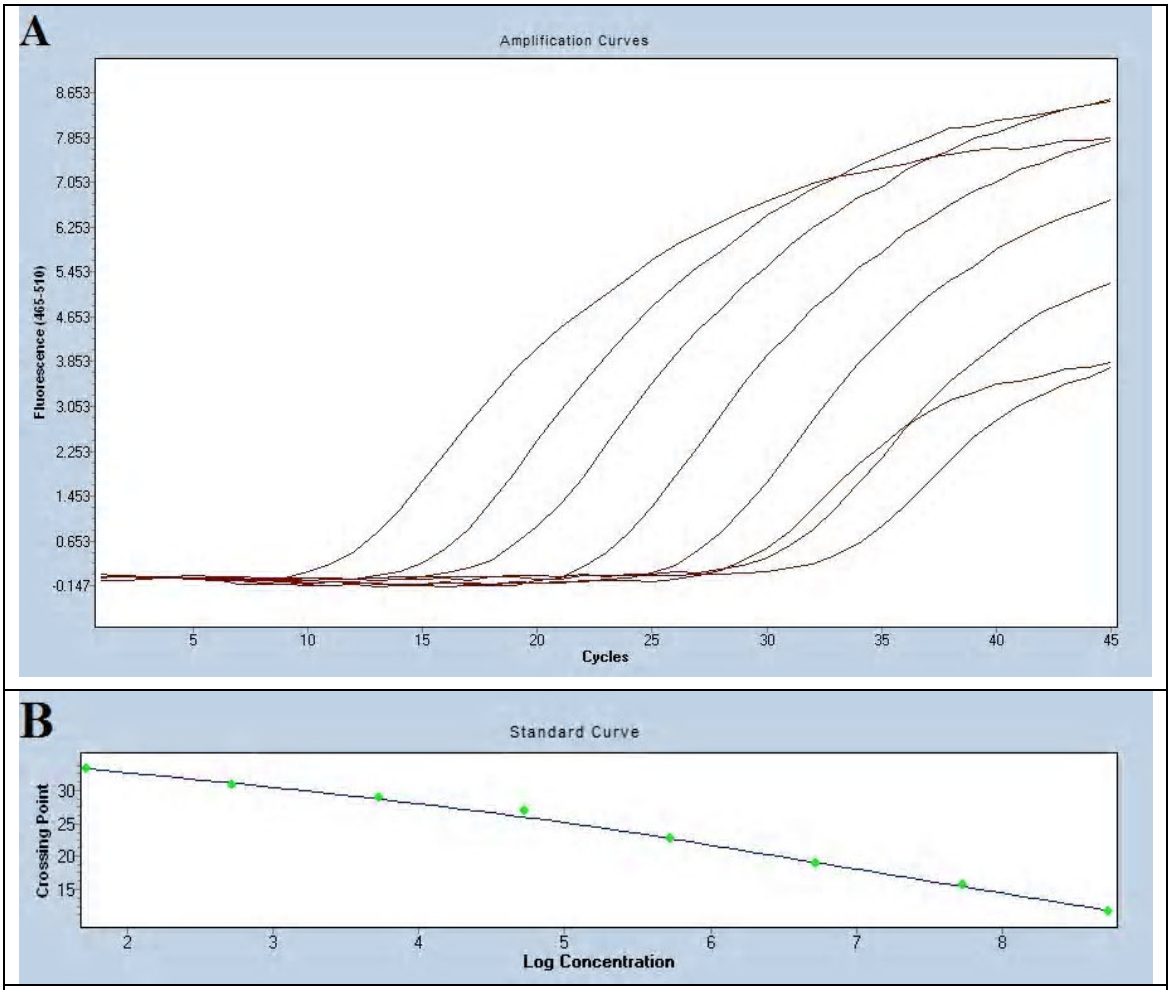
Boyama Yöntemleri		**Mutiplex Real Time PCR**		**Sensitivite**	**Spesifite**
		Pozitif	Negatif		
Modifiye Trikrom	Pozitif	34	9	%65.4	%90.8
	Negatif	18	89		
Calcofluor White 2MR	Pozitif	37	34	%71.2	%65.3
	Negatif	15	64		

İncelemesi yapılan 150 dışkı örneğinden 34 (%22,7)'ü hem modifiye trikrom boyama hem de Multiplex Real Time PCR'da pozitif belirlenirken, 18 (%12)'i Multiplex Real Time PCR'da pozitif iken modifiye trikrom boyama ile negatif olarak değerlendirilmiştir. Hastaların 37 (%24,7)'si hem calcofluor white 2MR hem de Multiplex Real Time PCR'da pozitif belirlenirken, 15 (%10)'i Multiplex Real Time PCR'da pozitif iken calcofluor white 2MR ile negatif olarak değerlendirilmiştir.

Multiplex Real Time PCR'ı referans test olarak aldığımızda modifiye trikrom boyama yönteminin pozitif prediktif değeri %79.1, negatif prediktif değeri %83.2, sensitivitesi %65.4, spesifitesi %90.8; calcofluor white 2MR boyama yönteminin pozitif prediktif değeri %52.1, negatif prediktif değeri %81, sensitivitesi %71.2, spesifitesi %65.3 olarak belirlenmiştir.

4.2.2. Prob Bazlı Real Time PCR Sonuçlarına Göre Dışkı Örneklerindeki *Encephalitozoon intestinalis* Pozitiflik Oranları

Encephalitozoon intestinalis'in belirlenmesinde prob bazlı Real Time PCR referans test olarak alınmıştır. Çalışma esnasında pozitif kontrol olarak *E.intestinalis'*e ait 16S SSU rRNA gen bölgesini içeren plasmit DNA'sından hazırlanmış seri dilüsyonlar kullanılmıştır. Ana sulandırımın kopya sayısı $5{,}3x10^8$ olarak hesaplanmıştır. Daha sonra ana stoktan 10'ar kat sulandırılarak 8 dilüsyon hazırlanmıştır. Seri dilüsyonlardan elde edilen DNA düzeyleri (Kopya/ml) standart eğrinin oluşturulmasında kullanılmıştır (Şekil 4.4A ve 4B).



Şekil 4.4. *Encephalitozoon intestinalis* 16S SSu rRNA gen bölgesini içeren plasmit DNA'sından hazırlanmış seri dilüsyonların prob bazlı Real Time PCR analiz sonuçları.

A- Amplifikasyon eğrileri.
B- Standart eğri

Söz konusu analizde kullanılan dilüsyonlar, Cp değerleri ve DNA düzeyleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. Analizlerde kullanılan dilüsyonlar, Cp değerleri ve DNA düzeyleri

Dilüsyon	**Cp değeri**	**DNA Düzeyleri (Kopya/ml)**
1 (ana sulandırım)	11.75	$5,57x10^8$
2 (1/10)	15.63	$4,77\ x10^7$
3 (1/100)	19.01	$5,59\ x10^6$
4 (1/1000)	22.73	$5,31\ x10^5$
5 (1/10000)	26.95	$2,56\ x10^4$
6 (1/100000)	28.89	$4,99\ x10^3$
7 (1/1000000)	30.94	$6,44\ x10^2$
8 (1/10000000)	33.26	$7,17\ x10^1$

Uygulanan yöntemlere göre *E.intestinalis* pozitiflik oranlarının cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı araştırılmış ve Tablo 4.6'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Farklı yöntemlerle elde edilen *E. intestinalis* pozitiflik oranlarının cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı

Grup		IFA-MAbs	Nested PCR	Real Time PCR
		n(%)	n(%)	n(%)
Cinsiyet	Erkek (n:79)	10(12.7)	5(6.3)	18(22.8)
	Kadın (n:71)	17(22.5)	7(9.9)	21(29.6)
	TOPLAM	27(18)	12(8)	39 (26)
Yaş Grupları	0-17 (n:25)	6(24)	5(20)	10(40)
	18-30 (n:37)	5(13.5)	2(5.4)	7(18.9)
	31-40 (n:23)	2(8.7)	-	-
	41-50 (n:22)	6(27.3)	3(13.6)	7(31.8)
	51-60 (n:21)	5(23.8)	2(9.5)	10(47.6)
	>61 (n:22)	3(13.6)	-	5(22.7)
	TOPLAM	27(18)	12(8)	39 (26)
Araştırma grupları	Onkoloji (n:25)	7(24)	3(12)	10(40)
	KİT (n:25)	4(16)	4(16)	6(24)
	Ürtiker (n:25)	4(16)	-	5(20)
	Gelişme Geriliği (n:25)	6(24)	5(20)	10(40)
	Kontrol Grubu 1 (n:25)	5(20)	-	7(28)
	Kontrol Grubu 2 (n:25)	1(4)	-	1(4)
	TOPLAM	27(18)	12(8)	39 (26)
İshal durumu	Pozitif (n:54)	13(24.1)	7(13.0)	18(33.3)
	Negatif (n:96)	14(14.6)	5(5.2)	21(21.9)
	TOPLAM	27(18)	12(8)	39 (26)

İncelenen 150 dışkı örneğinden 39 (%26)'u prob bazlı Real Time PCR ile *E.intestinalis* açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif olarak değerlendirilen bu hastaların 18 (%46,2)'i erkek, 21 (%53,8)'i ise kadındı. Pozitiflik cinsiyete göre karşılaştırıldığında; erkek ve kadın hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.459).

Yaş gruplarındaki *E.intestinalis* pozitiflik oranları incelendiğinde; 0-17, 41-50, 51-60 yaş gruplarında diğer gruplara göre yüksek pozitiflik belirlenirken, 31-40 yaş arasındaki

hiçbir hastada pozitiflik tespit edilmemiştir. Yapılan istatistiksel analizde aradaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür(p=0,007).

Onkolojik tedavi gören ve akut gastrointestinal rahatsızlığı olan hasta grubunda %40 kemik iliği transplantasyonu yapılmış ve akut gastrointestinal şikâyetleri olan hasta grubunda %24, ürtiker şikâyeti bulunan hasta grubunda %20, gelişme geriliği bulunan çocuklarda %40, kronik rahatsızlığı olmayan fakat akut gastrointestinal rahatsızlığı bulunan hastalarda %28, sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunda ise %4 oranında *E.intestinalis* pozitifliği tespit edilmiştir. Sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubundaki pozitifliğin diğer gruplara göre anlamlı şekilde düşük, onkolojik tedavi gören ve gelişme geriliği olan çocuklarda ise en yüksek pozitifliğin olduğu ve diğer gruplara göre anlamlı olduğu görülmüştür (p=0.043).

İshal şikayeti olan 54 hastanın 18 (%33,3)'i, ishal şikayeti olmayan 96 hastanın ise 21 (%21,9)'i Real Time PCR ile *E.intestinalis* açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan analizde; aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (p=0,241).

4.2.2.1. Prob Bazlı Real Time PCR Sonuçlara Göre Dışkıdaki *Encephalitozoon intestinalis* Yükü

Prob Bazlı Real Time PCR ile *E.intestinalis* açısından pozitif saptanan örneklerin Cp değerleri belirlenerek parazit yükü hesaplanmıştır. Elde edilen Cp değerlerinin cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi Tablo 4.7'de verilmiştir.

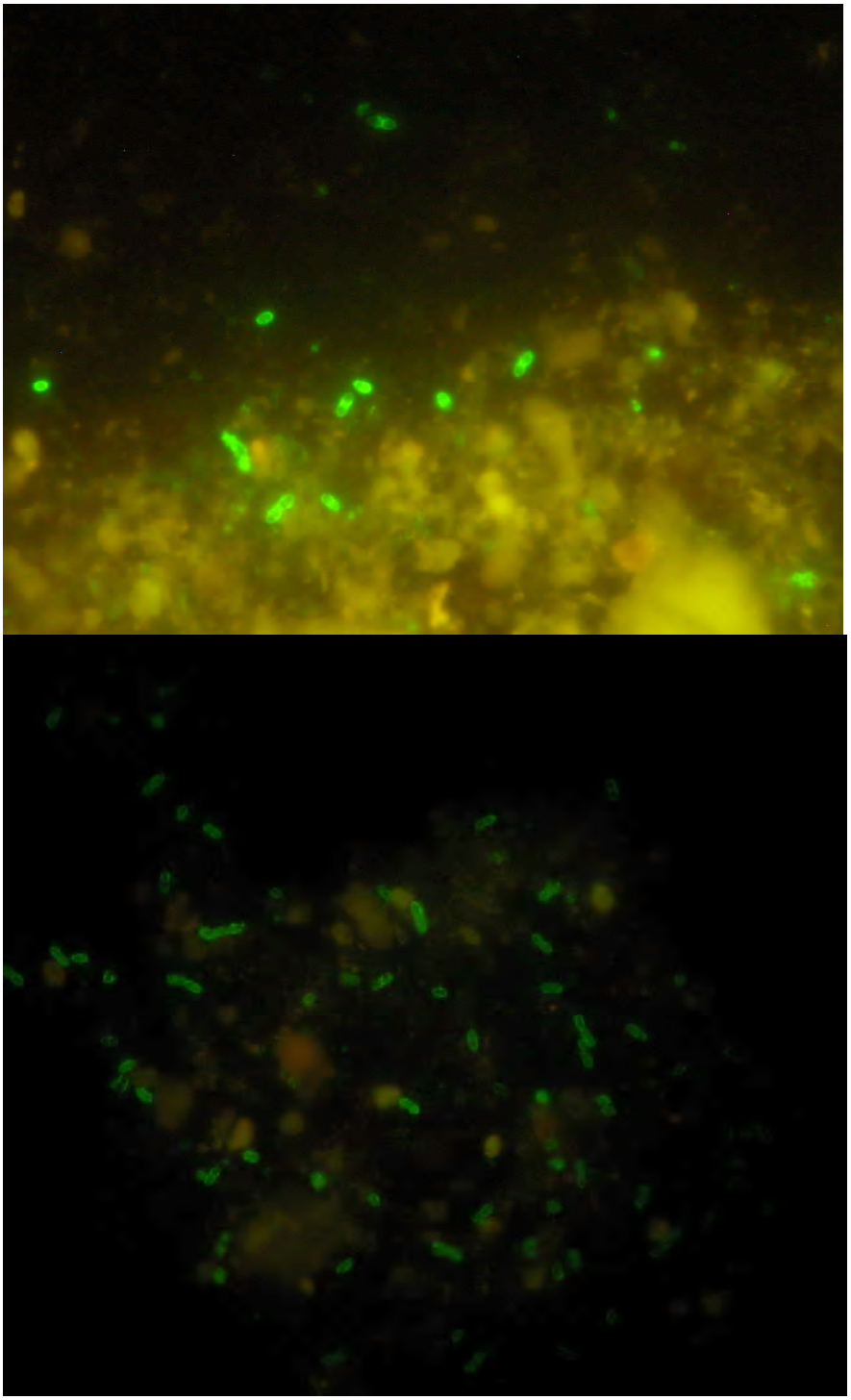
Tablo 4.7. Prob Bazlı Real Time PCR ile *E.intestinalis* açısından pozitif saptanan örneklerin Cp değerlerinin cinsiyet, yaş, araştırma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi

	Grup	Pozitif Hasta Sayısı	Cp değerleri				
			Min-Max	Ortalama	Standart sapma	F	P
Cinsiyet	Erkek (n:79)	18	29.78-38.29	33.88	1.78	33.818	0.346
	Kadın (n:71)	21	27.63-36.86	33.21	2.82		
Yaş grupları	0-17 (n:25)	10	29.27-36.31	34.35	2.07	0.667	0.619
	18-30 (n:37)	7	30.54-36.86	33.79	2.21		
	31-40 (n:23)	-	-	-	-		
	41-50 (n:22)	7	29.78-38.29	33.14	2.87		
	51-60 (n:21)	10	28.65-36.22	33.40	2.37		
	>61 (n:22)	5	27.63-34.98	32.25	3.39		
Araştırma grupları	Onkoloji (n:25)	10	33.55-34.95	34.55	0.9	13.501	0.000
	KİT (n:25)	6	31.77-34.8	33.25	1.21		
	Ürtiker (n:25)	5	32.51-38.29	35.23	2.42		
	Gelişme Geriliği (n:25)	10	29.27-36.31	34.35	2.07		
	Kontrol Grubu 1 (n:25)	7	27.63-30.94	29.56	1.12		
	Kontrol Grubu 2 (n:25)	1	-	-	-		
İshal durumu	Pozitif (n:54)	18	27.63-34.95	32.9	2,45	36	0,163
	Negatif (n:96)	21	28.65-38.29	34	2.45		

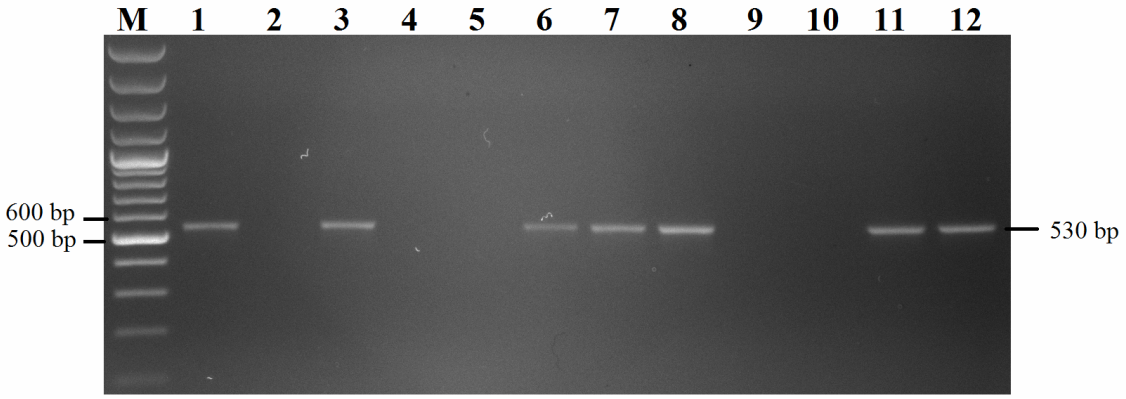
Yapılan istatistiksel analizde; parazit yükü ile cinsiyet (p=0.346), yaş (p=0.619) ve ishal durumu (p=0,163) arasında anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. Araştırma gruplarında ise akut gastrointestinal şikayeti olan hastalarda diğer gruplara göre parazit yükünün fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p=0.000).

4.2.2.2. Prob Bazlı Real Time PCR Göre IFA-MAbs ve Nested PCR Yöntemlerinin Sensitivite ve Spesifite Değerleri

İncelemesi yapılan 150 dışkı örneğinden 27 (%18)'si IFA-MAbs ile (Şekil 4.5), 12 (%8)'si Nested PCR (Şekil 4.6) ile pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.6).



Şekil 4.5. IFA-MAbs ile pozitif tespit edilen *E.intestinalis* sporları (x1000)



Şekil 4.6. Nested PCR analizinin ikinci PCR basamağında *E.intestinalis* pozitif belirlenen bazı örneklerin agaroz jel üzerindeki görünümü. M- Marker (100bp), 1-pozitif kontrol, 2-negatif kontrol, 3,6-8,11,12-Pozitif örnekler, 4,5,9,10- negatif örnekler.

Prob bazlı Real Time PCR'da elde edilen sonuçlara göre IFA-MAbs ve Nested PCR yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Prob bazlı Real Time PCR sonuçlarına göre IFA-MAbs ve Nested PCR yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri

Yöntem		**Real Time PCR**		**Sensitivite**	**Spesifite**
		Pozitif	Negatif		
IFA-MAbs	Pozitif	22	7	%56.4	%93.7
	Negatif	17	104		
Nested PCR	Pozitif	12	-	%30.8	%100
	Negatif	27	111		

İncelemesi yapılan 150 dışkı örneğinden 22 (%14,7)'si hem IFA-MAbs hem de Real Time PCR'da pozitif belirlenirken, 17 (%11.3)'si Real Time PCR'da pozitif, IFA-MAbs ile negatif olarak değerlendirilmiştir. Hastaların 12 (%8)'si hem Nested PCR hem de Real Time PCR'da pozitif belirlenirken, 27 (%10)'si Real Time PCR'da pozitif, Nested PCR ile negatif olarak değerlendirilmiştir.

Prob bazlı Real Time PCR'ı referans test olarak aldığımızda: IFA-MAbs'ın pozitif prediktif değeri %75.9, negatif prediktif değeri %86, sensitivitesi %56.4, spesifitesi %93.7; Nested PCR yönteminin pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %80.4, sensitivitesi %30.8, spesifitesi %100 olarak belirlenmiştir.

4.3. 16S SSU rRNA Gen Bölgesinin Sekans Analizleri Sonucu

Çalışmamızda Nested PCR ile pozitif bulunan 12 hastanın yaklaşık 470 bp'lık kısmının DNA dizi analizi yaptırılmıştır. Tamamının aynı DNA dizisine sahip olduğu görülen örneklerin dizileme sonucu Tablo 4.9'de verilmiştir.

Tablo 4.9. Pozitif belirlenen hastaların 16S SSU rRNA gen bölgesine ait DNA dizi analizi sonuçları

```
1    cagcagccgc ggtaatacct gctccaatag tgtctatggt gaatgttgca gttaaaaagt
61   ccgtagtctt ttgtatgtct ttgtttgggg gattatgtcc tgatgtggat gtaagaggtt
121  tggcagagga cgaggggcac cggatagttg ggcgaggggt gaaatacgaa gaccctgact
181  ggacggacag aagcgaaggc tgtgctcttg gacttatgtg acgatgaagg acgaaggcta
241  gaggatcgaa atcgattaga taccgtttta gttctagcag taaacgatgc cgactggacg
301  ggactatata gtgttgtgca tgagaaatct tgagtatgtg ggttctgggg atagtatgct
361  cgcaagagtg aaacttgaag agattgacgg aaggacacca caaggagtgg agtgtgcggc
421  ttaatttgac tcaacgcggg gcaacttacc ggttctgaag cgggcaggag  a
```

Elde edilen dizileme sonucunun GenBank'a kayıtlı izolatlarla nükleotid dizilimleri açısından benzerlik ve farklılıkları Tablo 4.10'de verilmiştir.

Tablo 4.10. Elde edilen dizileme sonucunun GenBank'a kayıtlı izolatlarla nükleotid dizilimleri açısından benzerlikleri.

	Pozitif Örnek	**46**	**69**	**195-196**	**256**	**296**	**361**	**383**	**395**	**413**	**Benzerlik (%)**
		T	**T**	**-**	**T**	**G**	**C**	**G**	**G**	**G**	
GenBank'ta kayıtlı izolatlar	CP001951.1	C	T	-	T	G	C	G	G	G	99
	CP001946.1	C	T	-	T	G	C	G	G	G	99
	CP001945.1	C	T	-	T	G	C	G	G	G	99
	CP001942.1	C	T	-	T	G	C	G	G	G	99
	U09929.1	C	T	-	T	G	C	G	G	G	99
	L16867.1	C	T	-	T	G	C	G	G	G	99
	L39113.1	C	T	-	T	G	C	G	G	G	99
	L16866.1	C	T	-	T	G	C	G	G	G	99
	DQ453122.1	C	T	-	T	G	C	G	G	G	99
	L19567.1	C	-	A	-	-	T	A	A	T	98

Elde edilen dizileme sonucu GenBank'a kayıtlı izolatlarla nükleotid dizilimleri açısından karşılaştırılarak benzerlik oranları tespit edilmiştir. Karşılaştırılması yapılan dokuz izolat ile %99, bir izolat ile ise %98 benzerlik tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Birçok omurgalı ve omurgasız canlıda enfeksiyona sebep olan mikrosporidian parazitler, ipek böcekçiliği ve balıkçılıkta sorunlara neden olmakla birlikte, çekirge gibi böceklerin biyolojik kontrolünde ise yarar sağlamaktadır. Uzun süredir bilinen bu parazitin HIV enfeksiyonu ile ilişkisinin ortaya konulmasıyla birlikte bu parazite karşı son yıllarda artan bir ilgi oluşmuştur. Bu nedenle yapılan epidemiyolojik çalışmaların büyük çoğunluğu immun sistemi baskılanmış kişilerden oluşmaktadır ki bu da parazitin fırsatçı patojen özelliğini yansıtmaktadır. Parazitin laboratuvar tanısındaki zorluklar ve tanı yöntemlerindeki farklılıklardan dolayı prevalans verileri oldukça değişkenlik göstermektedir (11,13,16,17).

Bu çalışmada; *E.intestinalis*'in immun sistemi baskılanmış ve immun sağlıklı hasta gruplarında yaygınlığının araştırılması, tanıda kullanılan farklı yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin araştırılması, parazitin 16S SSU rRNA gen bölgeleri yönünden moleküler karakterizasyonunun araştırılarak GenBank'a kayıtlı izolatlarla nükleotid dizilimleri açısından benzerlik oranlarının tespiti amaçlanmıştır.

Çalışmamızda beş farklı hasta grubu oluşturularak elde edilen epidemiyolojik veriler tartışılmıştır. Bu çalışmada DNA izolasyonu için orijinal bir yöntem de geliştirilmiş ve avantajları tartışılmıştır. Çalışmamızda örneklerin incelenmesinde mikrosporidian parazitlerin tanısında kullanılan altı farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerden Real Time PCR ile elde edilen sonuçlar referans alınarak diğer yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri belirlenerek tartışılmıştır.

Araştırma gruplarımızdan onkolojik tedavi görenler ile kemik iliği transplant hastaları, immunsupresif olarak değerlendirilmiş ve bu iki grup birlikte tartışılmıştır.

Mikrosporidialar fırsatçı patojenlerdir ve enfeksiyonlarında klinik seyir, hastanın bağışıklık sisteminin durumuna ve enfeksiyon bölgesine göre farklılık göstermektedir (11,16,17). Bu parazitler özellikle HIV ile enfekte immun sistemi baskılanmış hastalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Kanser tedavisi alan ve organ transplant hastaları da immunsupresif olarak değerlendirilebilmekte ve mikrosporidian parazitler bu hastalarda ciddi enfeksiyon oluşturabilmektedir. Aynı zamanda, önemli komplikasyonlara da neden olup tedavi sürecini olumsuz etkileyebilmektedir (24,85).

Lono ve ark. (85) kemoterapi gören 311 kanser hastasının 68(%21,9)'inde, 173 sağlıklı bireylerin ise 5(%2,9)'inde modifiye trikrom boyama yöntemi ile mikrosporidian parazitleri belirlediklerini bildirmişlerdir. Spesifik primer kullandıkları PCR amplifikasyonu sonucunda ise bu hastaların 2'sinde *E. intestinalis*, 1'inde ise *E. hellem* tespit etmişlerdir. Karaman ve ark. (24) kanser tanısı almış 320 hastada %10.9, kontrol grubunda ise %5.6 oranında farklı boyama yöntemleri ile mikrosporidian parazitleri saptadıklarını ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu bildirmişlerdir. Yazar ve ark. (26) kanserli bir hastanın BAL örneğinde Giemsa boyama ile mikrosporidian sporlarını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Şıvgın ve ark (29) onkolojik tedavi gören bir hastada *E.intestinalis* belirlediklerini ve bu vakanın Türkiye'de IFA-MAbs ile belirlenen ilk *E.intestinalis* vakası olduğunu bildirmişlerdir. Hamamcı ve ark. (86) kanser tanısı almış ve akut gastrointestinal sistem şikayetleri olan toplam 93 hastanın %78,5'inde, bir veya birden fazla yöntemle pozitiflik belirlediklerini bildirmişlerdir. IFA-MAbs yöntemi ile yaptıkları tür ayrımında ise hastaların 9 (%9.7)'unda *E. bieneusi*, 43 (%46.2)'ünde *E. intestinalis* ve 13 (%14)'ünde ise hem *E. bieneusi* hem de *E. intestinalis* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Hamamcı (87) kanser

tanısı almış hastaların %45'inde mikrosporidian parazitleri, %10'unda ise *E.bieneusi* tespit ettiğini bildirmiştir.

Organ transplant hastalarında vakalar şeklinde mikrosporidian parazitler bildirilmektedir. 1993 yılından günümüze kadar kemik iliği ve solid organ transplant hastalarında 60'tan fazla mikrosporidia vakası rapor edilmiştir (88). Çetinkaya ve ark. (89) 200 kemik iliği transplant hastasının 51 (%25,5)'inde *E.intestinalis*, 8(%4)'inde *E.bieneusi*, 19(%9,5)'unda ise mix enfeksiyon olmak üzere toplam 78 (%39)'inde pozitiflik bildirmişlerdir. Hamamcı (87) kemik iliği transplantlı hastaların %35'inde mikrosporidian parazitleri, %25'inde ise *E.bieneusi* tespit ettiğini bildirmiştir.

Akut gastrointestinal sistem şikayetleri olan kanserli hastalar ve kemik iliği transplant hastaları ile gastrointestinal sistem şikayetleri olan kişilerden oluşan kontrol grubu arasında mikrosporidian parazitlerin görülmesi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fakat sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubu ile aralarında anlamlı bir fark mevcuttu. İmmun sistemi baskılanmış hastalardan oluşan her iki grupta da yüksek oranda pozitiflik tespit edilmiştir. Bu hastalarda mikrosporidian parazitlerin özellikle de Encephalitozoon türlerinin, önemli gastrointestinal rahatsızlıkların yanı sıra dissemine enfeksiyonlara da neden olabileceği unutulmamalıdır. Bu durum hastanın hem yaşam kalitesini hem de tedavi sürecini olumsuz etkileyebilmektedir. Kanser hastaları ile kemik iliği transplant hastalarının yaşam kalitesini yükseltmek ve tedavi esnasında hastanın paraziter enfeksiyonlardan korunması amacı ile bu hastaların özellikle de gastrointestinal sistem şikayetleri olanların düzenli aralıklarla mikrosporidian parazitler açısından değerlendirilmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Araştırma gruplarımızdan bir diğerini de ürtiker şikayeti olan hastalar oluşturmaktadır. Ürtiker, basınca solabilen, kırmızı ve deriden kabarık, sıklıkla kaşıntılı ve 1-2 mm'den bir kaç cm'ye kadar değişebilen büyüklükte, kenarları düzensiz kabartılardan oluşan bir çeşit deri hastalığıdır. Kabartılar, vücudun herhangi bir yerinde oluşma ve genellikle 48 saatten daha kısa bir zamanda kaybolma eğilimindedir. Ürtiker, insanlarda günlük aktiviteyi ve yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Ürtiker ataklarının altı haftadan kısa sürmesi akut ürtiker, altı haftadan uzun sürmesi ise kronik ürtiker olarak adlandırılır. Akut ürtikerin sebeplerini saptamak genellikle daha kolaydır. İlaçlar, enfeksiyonlar, gıda ve gıda katkı maddeleri, psikojenik faktörler, otoimmun hastalıklar, bazı endokrin hastalıklar ve malign hastalıklar gibi birçok faktör ürtiker sebebi olarak

görülebilmektedir. Buna karşılık kronik ürtiker vakalarının %70'inde herhangi bir tetikleyici faktör bulunamamaktadır. Bulunabilen sebepler arasında da besinlere hassasiyet ilk sırayı almaktadır. Özellikle gıda katkı maddelerini içeren yiyecek ve içecekler (boyalı sakızlar, şekerler, patates cipsi vb.), baharatlı ve konserve edilmiş yiyecekler, kabuklu kuru yemişler en sık sorumlu tutulan maddelerdir (90-93). Paraziter açıdan bakıldığında ise *Blastocystis hominis* ve *Giardia intestinalis* ürtikerle ilişkisi olduğu bildirilen protozoonların başında gelmektedir (94-96).

Mikrosporidian parazitler ile ürtiker arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların sayısı oldukça azdır. Karaman (13), genel vücut kaşıntısı ve alerji şikayeti olan hastaların %13.2'sinde; Karaman ve ark., (97) ürtiker şikayeti olan hastaların %19.7'sinde mikrosporidian parazitlerin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Her iki çalışmada da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olduğu vurgulanmıştır. Hamamcı (87) ise ürtikerli hastaların %35'inde mikrosporidian parazitlerin, %20'sinde ise *E.bieneusi* tespit ettiğini fakat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda ürtikerli hastalarda elde ettiğimiz pozitiflik oranları sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farkın olduğu görülmüştür. Birçok çalışmada *Blastocystis hominis* ürtiker sebebi olan parazitler içerisinde ilk sırada yer almaktadır (94-96). Çalışmamızda da ürtiker şikayeti olan hastaların %32'sinde *B.hominis* tespit edilmiştir. Ürtikerli hastalarda mikrosporidian parazitlerin görülme oranının ise %36 olduğu düşünüldüğünde ürtiker ile ilişkilendirilmesi gereken önemli bir parazit grubunun da mikrosporidian parazitler olabileceği görülür.

Hastaların günlük aktivitelerini ve yaşam kalitelerini olumsuz yönde etkileyen ürtikerin, sebebini tam olarak belirleyebilmek doğru tedavinin verilmesi açısından oldukça önemlidir. Bağırsak parazitleri, gastrointestinal sistem şikayetlerinin yanı sıra, sinir sistemi, ürogenital sistem ve deride de çeşitli semptomlara neden olmaktadır. Aynı şekilde mikrosporidian parazitlerinde immun sistemi sağlam olan bireylerde de enfeksiyon oluşturabildiği göz önüne alınarak, özellikle sebebi bilinmeyen ürtikerli hastaların dışkı örneklerinde rutin olarak bu parazitin aranmasının uygun olacağını düşünmekteyiz.

Araştırma gruplarımızdan bir diğerini de gelişme geriliği olan hastalar oluşturmakta idi. Büyüme ve gelişme geriliği, beslenme bozuklukları, malabsorbsiyon, bağırsak parazitleri, hormonal nedenler, ailevi nedenler, kronik hastalıklar gibi değişik sebeplere

bağlı olarak ortaya çıkabilir. Bağırsak parazitleri kusma, ishal, iştah değişiklikleri gibi gastrointestinal sistem rahatsızlıklarına neden olabileceği gibi malnütrisyona da neden olarak çocuğun bedensel ve zihinsel gelişiminde yetersizliklere yol açabilir (98).

Mikrosporidian parazitlerin çocuklardaki yaygınlığı ile ilgili araştırmalarda genellikle akut veya kronik diyaresi olan çocuklar üzerinde yoğunlaşılmıştır. Wanachiwanawin ve ark. (99) diyaresi olan HIV ile enfekte çocukların %25.3'ünde, HIV ile enfekte olmayıp akut diyaresi olan çocukların ise %14.9'unda konvansiyonel yöntemlerle mikrosporidian parazitleri tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda, HIV ile enfekte olmayan çocuklarda da mikrosporidian parazitlerin önemli olduğu vurgulanmıştır.

Botero ve ark. (100) gastrointestinal şikayetleri olmayan immun sistemi baskılanmamış çocukların %1.8'inde; Termmathurapoj ve ark. (101) Tayland'da çocukların %1,3'ünde; Calik ve ark. (102), gastrointestinal şikayetleri olan 1181 çocuğun %7.8'inde; Türk (25), ishal şikayeti olan çocukların %9,5'inde konvansiyonel yöntemlerle mikrosporidian parazitleri bildirmişlerdir.

Tumwine ve ark. (103) malnutrisyon ve diyare sebebiyle hastaneye yatırılarak tedavi edilen çocuklarda %17.4'ünde *E. bieneusi* bildirmiştir. Karaman, (13) büyüme ve gelişme geriliği bulunan çocukların %12.1'inde mikrosporidian parazitleri belirlediğini ve istatistiksel olarak büyüme ve gelişme geriliği ile *Microsporidium* spp. görülme durumu arasında anlamlı ilişki tespit ettiğini bildirmiştir. Hamamcı (87) gelişme geriliği bulunan çocukların %35'inde mikrosporidian parazitleri, %5'inde ise *E. bieneusi* tespit ettiğini bildirmiştir.

Çalışmamızda gelişme geriliği olan hastalarda elde ettiğimiz pozitiflik oranları sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farkın olduğu görülmüştür. İncelenen hastalardan sadece üçünde ishal mevcutken diğer 22 hastada gastrointestinal şikâyetler mevcut değildi. Mikrosporidian parazitler açısından pozitif bulunan 11 hastanın 9 (%81.8)'unda ishal şikayeti mevcut değildi. Ayrıca gelişme geriliği olan çocukların %20'sinde nativ-lugol yöntemi ile diğer intestinal protozoonlar tespit edilmiştir. Gelişme geriliği olan çocuklarda gastrointestinal şikâyetlerin varlığına bakılmaksızın dışkının parazitolojik ve özellikle de mikrosporidian parazitler açısından değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Araştırma gruplarımızdan bir diğerini de akut gastrointestinal şikayetleri bulunan fakat kronik herhangi bir rahatsızlığı bulunmayan hastalar oluşturmaktadır. İntestinal microsporidiosiste en tipik belirtiler ishal, iştahsızlık ve kilo kaybıdır. İshal kan ve lökosit olmaksızın sulu dışkılama ile karakterizedir. HIV pozitif hastalarda ilk microsporidiosis olgusu 1985 yılın da rapor edilmiş ve 1985'ten günümüze kadar mikrosporidian parazitler uzamış ishali ve kilo kaybı bulunan AIDS hastalarının büyük bir kısmında bu tablonun oluşmasından sorumlu tutulmuştur. Tanı metotlarının gelişmesi ve farkındalığın artmasıyla mikrosporidia enfeksiyonlarının sadece immunsupresif kişilerde görülmediği aynı zamanda immun sağlıklı kişilerde de akut ve kendini sınırlayan ishallere neden olabileceği gösterilmiştir (104).

İshal şikâyeti olan hastalarda yapılan çalışmalarda**;** Kotler ve Orenstein (105), mikrosporidia prevalansını ishalli AIDS hastalarında %83, ishali olmayan AIDS hastalarında ise %2 olarak bildirmişlerdir. Kumar ve ark. (106), 105 HIV pozitif kronik ishalli hastanın 10'unda MTS yöntemiyle mikrosporidian parazitleri tespit ettiklerini, ishali olmayan 48 hastanın ise hiçbirinde mikrosporidian parazitleri görmediklerini bildirmişlerdir. Field ve ark. (107), 109'u ishalli olan 180 hastanın 36'sında mikrosporidian parazitleri saptadıklarını bildirmişlerdir. Rabeneck ve ark. (108) ishal şikayeti olan 55 hastanın 18 (%33)'inde, ishal şikayeti olmayan 51 hastanın 13 (%25)'ünde mikrosporidian parazitleri belirlemişlerdir.

Karaman ve ark.(109) %7,3, Türk ve ark.(110) %9,8, Atambay ve ark. (23) %6,5 oranında konvansiyonel yöntemlerle mikrosporidian parazitleri rapor etmişlerdir. Oğuz ve ark. (30) ishal şikayeti olan hastaların %38,5'inde mikrosporidian parazitleri tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada Nested-PCR ile DNA dizi analizi yaptırmaksızın, %1,5'luk agaroz jeldeki büyüklüğü 300-320 bp arasında değişen bantları yorumlayarak yaptıkları tiplendirmede; hastaların %62,9'unun *E.intestinalis*, %31,4'ünün *E.cuniculi*, %5,7'sinin *E.hellem* olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca hastaların %9,1'inde *E.bieneusi* olduğunu bildirilmiştir. Hamamcı (87) herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat akut gastrointestinal şikâyetleri bulunan hastaların %60'ında mikrosporidian parazitleri, %15'inde ise *E.bieneusi* tespit ettiğini bildirmiştir.

Çalışmamızda herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat akut gastrointestinal şikâyetleri olan hastalarda elde ettiğimiz pozitiflik oranları sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farkın olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda ishal şikâyeti olan ve olmayan hastalarda parazit görülmesi açısından ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hastalardaki parazit yüküne bakıldığında ise ishalli hastalarda anlamlı bir şekilde parazit yükünün fazla olduğu görülmüştür. Bu durum parazit yükü ile ishal durumu arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir.

İshal insanların günlük aktivitesini olumsuz etkileyebilen ve yüksek miktarda sıvı ve elektrolit kaybına sebep olan bir klinik tablodur. İshal etkeninin doğru belirlenmesi, doğru tedavinin verilmesi açısından önemlidir. Mikrosporidian parazitlerin de tedavi olmadan geçebilen ishallere neden olabileceği ve 2-3 gün süren turist ishallerinin görülebileceği bildirilmektedir. Ayrıca, kronik ishali olan ve daha önceden enterik patojen saptanmayan hastalarda mikrosporidian parazitlerin varlığı da bildirilmektedir. Bütün bunların ışığında herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan fakat akut veya kronik gastrointestinal şikayetleri olan hastalarda mutlaka mikrosporidian parazitlerin de araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda; mikrosporidian parazitlerin tanısında sıklıkla tercih edilen yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin hesaplanması da amaçlanmıştır. Mikrosporidiaların spor boyutlarının oldukça küçük olması nedeniyle rutin dışkı incelemelerinde genellikle gözden kaçmaktadır. Bu nedenle de mikrosporidia sporlarının tanımlanması ve enfeksiyonun doğrulanması için farklı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Farklı boyalarla boyanan preparatların ışık veya floresan mikroskobunda incelenmesi, transmisyon elektron mikroskobisi, serolojik testler, moleküler testler, histolojik incelemeler, hücre kültürü ve akım sitometrisi tanıda kullanılan bazı yöntemlerdir (3,11,42).

Bu yöntemler içerisinden moleküler tabanlı tanı yöntemleri birçok paraziter enfeksiyonun tanısında kullanılmaktadır. Mikrosporidian parazitlerin tanısında birçok laboratuvarda mikroskobi temeline dayalı yöntemler kullanılsa da son yıllarda tanıda, moleküler yöntemlerin kullanılması artmıştır**.** Moleküler tanı yöntemleri; duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan hızlı ve doğru sonuç veren yöntemlerdir (53,54).

Moleküler yöntemlerin başarısı, hasta örneklerinden genomik DNA'nın ekstraksiyonu için kullanılan yöntemlerle yakından ilişkilidir. Çalışmamızda dışkı örneklerinden DNA

izolasyonu yapılmıştır. Dışkıdan DNA izolasyonu oldukça zordur ve değişkenlik göstermektedir. Aynı zamanda dışkı, polimeraz enzim inhibitörlerini içerebilmektedir. Dışkı örneklerinde mikrosporidian parazitlerin DNA'sının elde edilmesinde, birçok araştırmacı normal kit prosedürlerinin yetersiz kaldığını ve bu nedenle de mekanik veya kimyasallarla sporların parçalanmasını sağlayacak ön işlemlerin tanının duyarlılığını arttırdığını bildirmektedir (55-59). Çalışmamızda dışkı örneklerinde DNA izolasyonuna başlamadan önce dışkıya çeşitli ön işlemler uygulanmıştır. Böylece dışkıdan mikrosporidia DNA izolasyonu için orijinal bir metod geliştirilmiştir. DNA izolasyonundan önce dışkı örneklerine su-eter konsantrasyon yöntemi uygulanarak parazitler dışkı artıklarından arındırılmış ve yoğun bir şekilde elde edilmesi sağlanmıştır. Bu konsantrasyon yönteminde PCR analizlerini olumsuz etkilediği bilinen formol yerine su kullanılmıştır. Çoklaştırma işleminden sonra cam boncuklar ile mekanik parçalama gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlere ilaveten örnekler sıvı azotta dondurulmuş ve hemen sonrasında kaynatılmıştır. Bu şekilde spor duvarının daha etkili bir şekilde parçalanması ve daha yüksek konsantrasyonlarda DNA elde edilmesi sağlanmıştır. Dışkıda bulunan polimeraz enzim inhibitörlerini uzaklaştırmak için ise çeşitli araştırmacılar tarafından örneklerin dilüsyonu veya guanidin tiyosiyanat ile muamele edilmesi tavsiye edilmektedir (55-59). Çalışmamızda DNA izolasyonu için kullanılan kit, dışkı örnekleri için üretilmiş olup içerisindeki bazı solüsyonlar sayesinde bu dezavantaj da ortadan kaldırılmış ve PCR reaksiyonları için uygun kalitede DNA elde edilmiştir. Yapılan denemelerde ön işlemler uygulanarak pozitif belirlenen 6 hastadan 3(%50)'ünün normal kit prosedürü ile negatif belirlendiği, diğer 3 hastanın pozitif belirlendiği fakat hastalardaki parazit yükünün oldukça düşük olduğu görülmüştür.

Real Time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkmaktadır. Ayrıca söz konusu teknik ile mutasyon analizleri ve gen ekspresyonları da hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Son yıllarda önemi giderek artmış bir yöntem olan Real Time PCR ile yapılan çalışmalarda, sensitivitesi ve spesifitesi %100 olduğu bildirilmektedir (66-69).

Çalışmamızda örnekler, moleküler olarak Nested-PCR, prob bazlı Real Time PCR ve Multiplex Real Time PCR ile incelenmiştir.

Mikrosporidian parazitlerin tanısı amacıyla rRNA bölgesinden hazırlanan primer ve probların kullanıldığı gerek multipleks Real Time PCR gerekse prob bazlı Real Time PCR yöntemlerinin %100 sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir. Bu yöntemin dışkıda 10^2 spor/ml saptayabilme duyarlılığına sahip olduğu bildirilmiştir (66-69). Çalışmalarımızda 16S SSU rRNA gen bölgesinde dizayn edilen orijinal primerler kullanılmıştır. Seri dilüsyonlardan oluşan pozitif kontroller ve farklı parazitlerden oluşan negatif kontrollerle primerlerin güvenilirliği değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda da Multiplex Real Time PCR ile tür ayrımı yapmaksızın mikrosporidian parazitler araştırılmıştır. Bu yöntem ile elde edilen sonuçlara göre modifiye trikrom boyama ve calcofluor white 2MR boyama yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri belirlenmiştir.

Gastrointestinal microsporidiosisin tanısı, birçok laboratuvarda örneklerinin Calcofluor veya Modifiye Trikrom boyaları ile boyanarak ışık ve floresan mikroskobunda incelenmesiyle yapılmaktadır. Fakat bu yöntemlerle örnekler sadece mikrosporidia pozitif olarak değerlendirilmekte, tür tayini yapılamamaktadır. Aynı zamanda bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri de oldukça düşüktür. Calcofluor boyası hızlı ve zahmetsiz bir boyama yöntemidir. Spor duvarındaki kitine bağlanarak sporun floresan vermesini sağlamaktadır. Mikrosporidian sporları dışında yapısında kitin içeren diğer bütün organizmalara da bağlanarak tanıyı zorlaştırmakta veya yanlış pozitifliklere sebep olmaktadır. Modifiye Trikrom boyama yöntemi ise calcofluor boyasına göre oldukça zahmetli ve uzun süren bir prosedüre sahiptir. Duyarlılığı daha yüksektir, fakat sporlar dışkıdaki bazı artefaktlarla karışarak yanlış pozitifliklere sebep vermektedir. Bazı durumlarda bu boyama yönteminde sporun polar tüp kısmında horizontal veya diagonal çizgiler görülmektedir. Fakat sporların her zaman bu şekilde görülmemesi yanıltıcı olabilmektedir. Aynı zamanda sporların boyutlarının oldukça küçük olması, sayısının az olması veya dışkıda bulunan fazla miktardaki artık maddeden dolayı gözden kaçabilmesi ve ayrıca değerlendirmede deneyimli personele ihtiyaç duyulması konvansiyonel yöntemlerin dezavantajları içerisinde yer almaktadır. Bu dezavantajlara rağmen araştırmacıların bir kısmı konvansiyonel yöntemlerin tanıda kullanılabilecek

hassas ve hızlı yöntemler olduğunu savunmaktadır. Franzen ve ark. (12) Uvitex 2B boyasının, Degirolami ve ark. (48) ise hem Uvitex 2B boyasının hem de MTS yönteminin tanıda kullanılabilecek hızlı ve hassas bir yöntem olduğunu bildirmektedir. Ayrıca Uvitex 2B boyasının mikrosporidia sporlarının canlılıklarının belirlenmesinde önemli olduğu belirtilmektedir. Didier ve ark. (111) dışkıda mikrosporidian parazitlerin tanısında Calcofluor White 2MR, MTS ve IFA yöntemlerinin duyarlılığını araştırmak için yaptıkları çalışmada *E.intestinalis* sporları ile hazırladığı üç farklı dışkı örneğinden 10 seri hazırlayarak üç farklı yöntemle preparatları değerlendirmişlerdir. Hazırladıkları bütün dilüsyonları TEM, Calcofluor White 2MR ve MTS ile pozitif bulduklarını, 10 örneğin ise IFA ile negatif olduğunu bildirmişlerdir.

Bir grup araştırmacı ise bu verilerin aksine konvansiyonel yöntemlerin düşük sensitivite ve spesifiteye sahip olduğunu savunmaktadır. Saigal et al (112) Trikrom boyamanın özgüllüğünü %100, duyarlılığını %97.9, Calcofluor boyamanın özgüllüğünün %82.2, duyarlılığının ise %79.7 olarak belirlemişlerdir. Hamamcı (87) MicroF ve 300R primerleri kullanılarak yapılan cins spesifik-PCR'ı referans alarak MTS'nin sensitivitesini %61.8, spesifitesini %59.6; Calcofluor'un sensitivitesini %72.4 spesifitesini %47.1 olarak belirlediğini bildirmiştir.

Çalışmamızda Multiplex Real Time PCR referans test olarak alındığında modifiye trikrom boyama yönteminin sensitivitesi %65.4, spesifitesi %90.8; calcofluor white 2MR boyama yönteminin sensitivitesi %71.2, spesifitesi %65.3 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında intestinal mikrosporidiaların tanısında boyama yöntemlerinin yetersiz kalabileceği aşikardır.

Prob bazlı Real Time PCR ile dışkı örneklerindeki *E.intestinalis* pozitifliği araştırılmıştır. Prob bazlı Real Time PCR referans test olarak alınmış ve *E.intestinalis*'in tanısında kullanılan IFA-MAbs ve Nested PCR'ın sensitivite ve spesifite değerleri belirlenmiştir. Söz konusu durumda; Nested PCR'ın sensitivitesi %30.8, spesifitesi %100 olarak belirlenmiştir. Dışkı gibi kompleks yapıya sahip olan örneklerde klasik PCR yöntemleri bazı durumlarda yetersiz kalmaktadır. Bu örneklerde bazen amplifikasyon mümkün olmamakta, bazen de oluşan non-spesifik fragmentlerin amplifikasyonu sonucu yanlış pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Nested PCR yönteminde standart PCR'dan farklı olarak, ilk amplifikasyonda elde ettiğimiz PCR ürününün kalıp olarak kullanılması ve bu bölgeye spesifik ikinci bir primer çiftinin yer

aldığı ikinci bir amplifikasyon uygulandığından yanlış pozitiflikler ortadan kaldırılmakta, aynı zamanda düşük DNA'ya sahip örneklerde ikinci kez PCR uygulaması ile teşhisteki sensitivite artırılabilmektedir. Çalışmamızda Nested-PCR ile yanlış pozitiflik durumunun söz konusu olmadığı görülmüştür. Fakat Real Time PCR ile karşılaştırıldığında sensitivitesinin oldukça düşük olduğu görülmüştür. Real Time PCR çalışılamadığı durumlarda bu yöntem ile pozitif belirlenen hasta örneklerinde sorun olmadığı fakat hasta örneklerinin negatif belirlenmesi durumunda tek başına yetersiz olduğu, mutlaka ikinci bir tanı yönteminin uygulanması gerektiği düşünülmektedir.

Prob bazlı Real Time PCR referans test olarak alındığında IFA-MAbs'ın, sensitivitesi %56,4, spesifitesi %93,7 olarak belirlenmiştir. Ayrıca örneklerin incelenmesi esnasında yeşil floresan veren fakat morfolojik olarak uyumsuz görüldüğü için pozitif olarak değerlendirilemeyen 9 (%6) hasta preparatı mevcuttur.

Monoklonal antikorlar örnekte bulunan sporların spor duvarındaki proteinlere bağlanmakta ve floresan mikroskobunda sporlar parlak yeşil röfle vermektedir. Bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri ile ilgili bazı çelişkiler bulunmaktadır. Alfa Cisse ve ark. (52) PCR ile karşılaştırıldığında IFA-MAbs'ın spesifite ve sensitivitesinin %100 olduğunu bildirmişlerdir. Tür ayrımında PCR'dan daha hızlı ve daha ucuz olduğu için "altın standart" olarak kabul edilebileceğini vurgulamışlardır. Enriquez ve arkadaşları (113) Encephalitozoon türlerinde ekzospor ile reaksiyona giren 3B6 monoklonal antikorunu kullanarak yaptıkları çalışmada, bu monoklonal antikorun 3 Encephalitozoon türünün tanımlanmasında etkili olduğu, ayrıca diğer protozoonlar, mikrosporidian parazitler ve mantarlarla çapraz reaksiyona girmediğini rapor etmişlerdir. Tek dez avantajının üç türü ayırt edememesi olduğunu da vurgulamışlardır.

Monoklonal antikorların kullanıldığı IFA testinin yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip olduğunu düşünen bu araştırmacıların aksine bir grup araştırmacı ise IFA-MAbs ile tespit edilen mikrosporidial sporların diğer bir yöntemle mutlaka teyit edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Beckers ve ark. (114) *E.intestinalis*'e spesifik monoklonal antikorların *E.hellem* ile çapraz reaksiyon vermediği, fakat dışkıda bulunan bazı bakteri ve mayalarla çapraz reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Morfolojik olarak bu yapılardan ayrılarak tanıya gidilebileceğini rapor etmişlerse de diğer klinik örneklerde daha güvenilir sonuç alınabileceğini vurgulamışlardır.

Al-Mekhlafi ve ark.(21) MTS boyama yöntemi ile mikrosporidia açısından 50 pozitif, 50 negatif toplam 100 dışkı örneğini IFA yöntemi ile monoklonal antikor kullanarak (anti-*E. bieneusi* ve anti-*E. intestinalis*) değerlendirmişlerdir. İncelenen 100 örneğin 42'sinde *E. bieneusi*, 7'sinde *E. intestinalis* ve 7'sinde ise mix enfeksiyonun olduğunu ve çalışma sonucunda, MTS boyama tekniği ve IFA-MAbs arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Mikrosporidial sporların tanımlanmasında IFA-MAbs yönteminin sensitivitesinin %98, spesifitesinin %86 olduğunu belirterek konvansiyonel tanı yöntemlerinin yanında IFA-MAbs yöntemi ile örneklerin değerlendirilmesinin duyarlılığı arttıracağını vurgulamışlardır.

Garcia ve ark. (115) IFA-MAbs'ın mikrosporidian parazitlerin tanısı için spesifik olmadığını bildirmişlerdir. Bazı sporların polar tüp kısmında horizontal veya digonal çizgilenmeler görülebileceğini, bu durumda tanının oldukça kolay olduğu fakat her zaman bu yapıların ayırt edilemeyeceği veya sporların çok soluk floresan verebileceği vurgulanmıştır. Didier ve ark.(111) IFA yöntemi ile pozitif olduğu bilinen 40 örnekten 10'unu doğrulayamadıklarını vurgulamışlardır.

Elde ettiğimiz veriler ışığında moleküler yöntemlerin uygulanmadığı laboratuvarlarda IFA-MAbs yönteminin kullanılabileceği fakat değerlendirme esnasında boyut ve morfolojik yapı gibi kriterlerin de göz önüne alınarak değerlendirilmesi gerektiği ve MTS gibi boyama yöntemleri ile birlikte uygulanmasının duyarlılığı arttırabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda parazitin 16S SSU rRNA gen bölgeleri yönünden moleküler karakterizasyonu araştırılarak GenBank'a kayıtlı tüm izolatlarla nükleotid dizilimleri açısından benzerlik oranlarının tespit edilmesi de amaçlanmıştır. Bu nedenle Nested PCR ile pozitif olarak belirlenen izolatların nükleotid sekansları belirlenmiştir. 12 izolatın tamamının 16S SSU rRNA gen bölgesine göre identik oldukları görülmüştür. Aynı zamanda çalışmamızda elde edilen izolatların Kanada (CP001951, CP001946, CP001945, CP001942), Amerika (U09929.1), Hollanda (L16866.1) ve İrlanda (DQ453122.1)'dan bildirilen izolatlarla %99 identik bulunurken Amerika (L19567)'dan bildirilen bir izolatla %98 identik bulunmuştur.

Mikrosporidian parazitlerin yayılışına etki eden birçok faktör bulunmakla birlikte sosyo-demografik faktörlerin epidemiyolojiye etkisi hakkında kısıtlı bilgi

bulunmaktadır. Çalışmamızda cinsiyet ve yaş ile parazit görülmesi arasındaki ilişki de araştırılmıştır.

Çeşitli çalışmalarda cinsiyet ile mikrosporidian parazitlerin görülmesi arasında anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür (13,24,97). Çalışmamızda da erkek ve kadın hastalardaki pozitiflik oranları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür.

Diğer taraftan yaş ile parazit görülme oranının karşılaştırıldığı sınırlı sayıda çalışmada anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Çalışmamızda ise 41 yaş üstü ile 18 yaş altındaki hastalarda pozitifliğin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu farkın; çocukların hijyen kurallarına fazla dikkat etmemesi ve yaşlıların immun sisteminin zayıflamış olabileceğinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak;

Bu çalışmada immun sistemi baskılanmış ve immun sağlıklı bireylerden oluşan farklı hasta gruplarında mikrosporidian parazitlerin ve *E.intestinalis*'in yaygınlığı araştırılmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bütün hasta gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitifliğin olduğu görülmüştür. Diğer taraftan; mikrosporidian parazitlerin tanısında kullanılan konvansiyonel tanı yöntemlerinin yetersiz kaldığı, bu yöntemlerin düşük sensitivite ve spesifiteye sahip olduğundan yanlış pozitiflik veya negatiflik verme olasılığının yüksek olduğu, bu nedenle mikrosporidian parazitlerin tanısında Real Time PCR'ın kullanılmasının isabetli olacağı, Real Time PCR imkanının olmadığı durumlarda IFA-MAbs'ın MTS ile birlikte çalışılmasının gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez mikrosporidian parazitlerin DNA dizilimleri belirlenmiştir.

Çalışmamızda araştırma gruplarının sadece 25'er hastadan oluşması bu çalışmanın en büyük kısıtlılıklarından biridir. Aynı zamanda sosyo-demografik faktörler ve hastaların sahip olduğu semptomlar ile mikrosporidian parazitlerin görülmesi ve parazit yükü arasındaki ilişki de ayrıntılı bir şekilde ortaya konamamıştır. İleri çalışmalarda; bu faktörlerle mikrosporidian parazitler arasındaki ilişkinin araştırılabileceği gibi, Türkiye'den elde edilen izolatlarla farklı gen bölgelerini içeren daha ayrıntılı filogenetik analizler yapılabilir. Bunun yanında çok merkezli çalışmaların planlanarak Türkiye

genelinde epidemiyolojik verilerin ortaya konulmasının bilime katkı sağlayacağı mutlaktır. Mikrosporidian parazitlerin başka hastalık gruplarında hatta sebebi bilinmeyen hastalıklarda da araştırılması gerektiği kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Canning EU. Microsporidia. In *Parasitic protozoa.* Kreier JP & Baker JR (Edt), Academic Press: New York. 1993;6:299-385.
2. Aksoy Ü, Usluca S. Microsporidiosis ve immünolojisi. Özcel MA, İnci A, Tugay N, Köroğlu E (ed), Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. Meta Basım, İzmir. 2007;102-120.
3. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. Clin Microbiol. 1994;7:426-461.
4. Didier ES. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta tropica. 2005;94:61-76.
5. Orenstein JM. Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. J Protozool. 1991;77:843-864.
6. Cali A, Kotler DP, Orenstein JM. *Septata intestinalis*, n. g., n. Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. J Eukaryot Microbiol. 1993;40:101-112.
7. Cali A. Cytological and taxonomical comparison of two intestinal disseminating microsporidioses. AIDS. 1993;7:12-16.
8. Hartskeerl R, Van Gool T, Schuitema AR, Didier ES, Terpstra WJ. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali,

Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. Parasitology. 1995;110:277-285.

9. Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Veterinary parasitology. 2004;126:145-166.

10. Joseph J, Vemuganti GK, Sharma S. Microsporidia: emerging ocular pathogens. Indian J Med Microbiol. 2005;23:80-91.

11. Curry A. Microsporidiosis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD (eds). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections; Parasitology. 10 nd edn. ASM pres, Washington, D.C. 2005;529-555.

12. Franzen C, Müller A. Molecular Techniques for Detection, Species Differentiation and Analysis of Microsporidia. Clin Microbiol. 1999;12:243-285.

13. Karaman Ü. İnsanlarda microsporidia'ların epidemiyolojisi (malatya ili örneği), doktora tezi, Malatya. 2007.

14. Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Ann Rev Microbiol. 2002;56: 93–116.

15. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. Curr Opin Infect Dis. 2006;19:485-492.

16. Keohane EM, Weiss LM. The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds.), The Microsporidia and Microsporidiosis. AMS Press, Washington, D.C. 1999;196–224.

17. Ok ÜZ, Limoncu ME. Microsporidiosis. Özcel MA, (edt). Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, İzmir. 2007:397-409.

18. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/microsporidiosis.htm

19. Yakoob J, Abbas Z, Beg MA, Jafri W, Naz S, Khalid A, Khan R. Microsporidial infections due to Encephalitozoon intestinalis in non-HIV-infected patients with chronic diarrhoea. Epidemiol Infect. 2012;140:1773-1779.

20. Sokolova OI, Demyanov AV, Bowers LC, Didier ES, Yakovlev AV, Skarlato SO, Sokolova YY. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. J Clin Microbiol. 2011;49:2102-2108.

21. Al-Mekhlafi MA, Fatmah MS, Anisah N, Azlin M, Al-Mekhlafi HM, Norhayati M. Species identification of intestinal microsporidia using immunofluorescence antibody assays. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2011;42:19-24.

22. Rivero-Rodríguez Z, Hernández Sierra A, Arráiz N, Bracho Mora A, Villalobos Perozo R. Prevalence of Encephalitozoon intestinalis and Enterocytozoon bieneusi in HIV positive patients to Maracaibo, Venezuela. Invest Clin. 2013;54:58-67.

23. 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;32:113-115.

24. Karaman Ü, Atambay M, Daldal N, Çolak C. Kanser Tanısı Almış Hastalarda Microsporidium Görülme Sıklığı. Türkiye Parazitol Derg. 2008;32:109-112.

25. Türk S. İshalli Olgularda Mıcrosporıdıa Sıklığının Farklı Boyama Yöntemleriyle Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara. 2010.

26. Yazar S, Eser B, Yalçın Ş, Şahin İ, Koç N. Acase of Pulmonary Microsporidiasis in an Acute Myeloblastic Leukemia (AML)- M3 Patient. Yosei Med J. 2003;44:146-149.

27. Büget E, Büyükbaba-Boral Ö, Kırkoyun-Uysal H, Nazlıcan Ö, Öğüt T, Şengür G, Türkiye'de bir AIDS hastasında ilk mikrosporidiyaz ve solunum sistemini tutan ilk kriptosporidiyaz olgusu. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2000;30:166-170.

28. Usluca S, Aksoy Ü. İmmün sistemi baskılanmış bir çocukta *Microsporidium* spp. enfeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu ile tanımlanması. Microbiol Bült. 2010;44:679-683.

29. Sıvgın S, Eser B, Kaynar L, Kurnaz F, Sıvgın H, Yazar S, Cetin M, Unal A. Encephalitozoon intestinalis: A Rare Cause of Diarrhea in an Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) Recipient Complicated by Albendazole-Related Hepatotoxicity. Turk J Haematol. 2013;30:204-208.

30. Oğuz İ, Doğruman Al F, Mumcuoğlu İ. İshalli Olgularda Microsporidia Sıklığının Calcofluor Beyazı ve Uvitex 2B Kemilüminesans Boyama Yöntemleriyle Araştırılması ve Tiplendirilmesi. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, SB02-8. 28 Eylül-4 Ekim 2013, Denizli.

31. Valencakova A, Halanova M. Immune response to Encephalitozoon infection review. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2012;35:1-7.

32. Achbarou A, Ombrouck C, Gneragbe T, Charlotte F, Rénia L, Desportes-Livage I, Mazier D. Experimental model for human intestinal microsporidiosis in interferon gamma receptor knockout mice infected by *Encephalitozoon intestinalis*. Parasite Immunol. 1996;18:387-392.

33. El Fakhry Y, Achbarou A, Franetich JF, Desportes-Livage I, Mazier D. Dissemination of *Encephalitozoon intestinalis*, a causative agent of human microsporidiosis, in IFN-gamma receptor knockout mice. Parasite Immunol. 2001;23:19-25.

34. Peuvel I, Delbac F, Metenier G, Peyret P, Vivares CP. Polymorphism of the gene encoding a major polar tube protein PTP1 in two microsporidia of the genus Encephalitozoon. Parasitology. 2000;121:581-587.

35. Willson R, Harrington R, Stewart B, Fritsche T. Human immunodeficiency virus 1-associated necrotizing cholangitis caused by infection with Septata intestinalis. Gastroenterology. 1995;108:247–251.

36. Sheıkh RA, Yasmeen S, Prındıvılle T. Gastroıntestınal and hepatobılıary microsporidiosis. JK-Practitioner. 2003;10:91-97.

37. Weber R. Deplazes P, Flepp M, Mathis A, Baumann R, Sauer B, Kuster H, and Luthy R. Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficient virus infection. N Engl J Med. 1997;336:474–478.

38. Orenstein, JM, Dieterich DT and Kotler DP. Systemic dissemination by a newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS. AIDS. 1992;6:1143–1150.

39. Mertens RB, Didier ES, Fishbein MC, Bertucci DC, Rogers LB and Orenstein JM. *Encepahlitozoon cuniculi* microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys,

trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. Mod Pathol. 1997;10:68–77.

40. Sodqu M, Brazille P, Gonzalez-Canali G, Cornet M, Piketty C and Weiss L. Unusual pulmonary Enterocytozoon bieneusi microsporidiosis in an AIDS patient: case report and review. Scand J Infect Dis. 2004;36:230-231.

41. Sancak B, Akyön Y. Microsporidia: Genel özellikleri, infeksiyonları ve laboratuvar tanısı. Microbiol Bült. 2005;39:513-522.

42. Franzen C, Muller A. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. Microbes Infect. 2001;3:389-400.

43. Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. Fifth Edition. ASM Press, Washington, USA. 2007;33-46.

44. Reisner BS, Spring J. Evalution of combined Acid-Fast-trichrome stain for detection of microsporidiaa and *Crptosporidium parvum*. Arch Pathol Lab Med. 2000;124:777-779.

45. Kokoskin E, Gyorkos TW, Camus A, Cedilotte L, Purtill T, Ward B. Modified technique for efficient detection of microsporidia. J Clin Microbiol. 1994;32:1074-1075.

46. Karaca Ö, Rota S. İnsan microsporidial infeksiyonları. Türk Microbiyol Cem Derg. 1996;26:142-150.

47. Green LC, LeBlanc PJ, Didier ES. Discrimination brween viable and dead Encephalitozoon cuniculi (microsporidian) spores by dual staining with sytox gren and calcofluor white M2R. J Clin Microbiol. 2000;38:3811-3814.

48. DeGirolami PC, Ezratty CR, Desai G, McCullough A, Asmuth D, Wanke C, Federman M. Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with Weber's modified trichrome and Uvitex 2B strains. J Clin Microbiol. 1995;33:805-810.

49. Joseph J, Vemuganti GK, Garg P, Sharma S. Histopathological Evalution of Ocular Microsporidiosis by Different Stains. BMC Clin Pathol. 2006;6:1-8.

50. Sateeshkumar S, Ananthan S. Electron microscopy identification of microsporidia (*Enterocytozoon bieneus*) and *Cylospora cayetanensis* from stool samples of HIV infected patients. Indian J Med Microbiol. 2004;22:119-122.

51. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. Clin microbiol. 2005;18:423-445.

52. Alfa Cisse O, Ouattara A, Thellier M, Accoceberry I, Biligui S, Minta D, Doumbo O, Desportes-Livage I, Thera MA, Danis M, Datry A. Evaluation of an immunofluorescent-antibody test using monoclonal antibodies directed against Enterocytozoon bieneusi and Encephalitozoon intestinalis for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali). J Clin Microbiol. 2002;40:1715-1718.

53. Weiss LM, Vossbrinck CR. Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects. Adv Parasitol. 1998;40:351-395.

54. Procop GW. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. Clin Infect Dis. 2007;45:99-111.

55. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 1990;28:495-503.

56. Ghosh K, Weiss LM. Molecular diagnostic tests for Microsporidia. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009; 2009:926521.

57. Monteiro L, Bonnemaison D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model. J Clin Microbiol. 1997;35:995-998.

58. Ombrouck C, Ciceron L, Biligui S, Brown S, Marechal P, van Gool T, Datry A, Danis M, Desportes-Livage I. Specific PCR assay for direct detection of intestinal microsporidia Enterocytozoon bieneusi and Encephalitozoon intestinalis in fecal specimens from human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol. 1997;35:652-655.

59. Subrungruan I, Mungthi M, Chavalitshewinkoon-Petmit P, Rangsi R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of DNA extraction and PCR methods for detection of

Enterocytozoon bienuesi in stool specimens. J Clin Microbiol. 2004;42:3490–3494.

60. Vossbrinck CR, Woese CR. Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. Nature. 1986;320:287–288.

61. Biderre C, Page`s M, Me´te´nier G, Canning EU, Vivare`s CP. Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. Mol Biochem Parasitol. 1995;74:229–231.

62. Weiss LM, Zhu X, Cali A, Tanowitz HB, Wittner M. Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny:a review. Folia Parasitol. 1994;41:81–90.

63. Da Silva AJ, Slemenda SB, Visvesvara GS, Schwartz DA, Wilcox CM, Wallace S, Pieniazek NJ. Detection of *Septata intestinalis* (microsporidia) cali et al. 1993 using polymerase chain reaction primers targeting the small subunitribosomal RNA coding region. Mol Diagn. 1997;2:47–52.

64. Schuitema ARJ, Hartskeerl RA, van Gool T, Laxminarayan R, Terpstra WJ. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of microsporidiosis. AIDS. 1993;7:62–63.

65. Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Helse W, Löscher T, Rinder H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. Trop Med Int Health. 1996;1:373-378.

66. Hester JD, Varma M, Bobst AM, Ware MW, Lindquist HD, Schaefer FW 3rd. Species-specific detection of three human-pathogenic microsporidial species from the genus Encephalitozoon via fluorogenic 5' nuclease PCR assays. Mol Cell Probes. 2002;16:435-444.

67. Menotti J, Cassinat B, Sarfati C, Liguory O, Derouin F, Molina JM. Development of a real-time PCR assay for quantitative detection of Encephalitozoon intestinalis DNA. J Clin Microbiol. 2003;41:1410-1413.

68. Verweij JJ, Ten Hove R, Brienen EA, van Lieshout L. Multiplex detection of Enterocytozoon bieneusi and Encephalitozoon spp. in fecal samples using real-time PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57:163-167.

69. Wolk DM, Schneider SK, Wengenack NL, Sloan LM, Rosenblatt JE. Real-time PCR method for detection of Encephalitozoon intestinalis from stool specimens. J Clin Microbiol. 2002;40:3922-3928.

70. Carville A, Mansfield K, Widmer G, Lackner A, Kotler D, Wiest P, Gumbo T, Sarbah S, Tzipori S. 1997. Development and application of genetic probes for detection of *Enterocytozoon bieneusi* in formalin-fixed stools and in intestinal biopsyspecimens from infected patients. Clin Diagn Lab Immunol. 1997;4:405–408.

71. Velasquez JN, Carnevale S, Labb´e JH, Chertco A, Cabrera MG, Oelemann W. In situ hybridization: a molecular approach for the diagnosis of the microsporidian parasite *Enterocytozoon bieneusi*. Hum Patho. 1999;30:54–58.

72. Graczyk TK, Sunderland D, Rule AM, da Silva AJ, Moura IN, Tamang L, Girouard AS, Schwab KJ, Breysse PN. Urban feral pigeons (Columba livia) as a source for air- and waterborne contamination with Enterocytozoon bieneusi spores. Appl Environ Microbiol. 2007;73:4357-4358.

73. Jacques B, Bart-Delabese E, Biligui S, Carbone A, Seiller X, Okome-Nkoumou M, Nzamba C, Kombilla M, Accoceberry I, Thellier M. New highly divergent rRNA sequence among biodiverse genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. J Clin Microbiol. 2007;45:2580-2589.

74. Monica S, Vecino JAC, Fayer R. *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in dogs in Bogota, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2008;79:215-217.

75. Visvesvara GS. In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. Clinical microbiology reviews. 2002;15:401-413.

76. Barbosa J, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. Cytometric approach for detection of *Encephalitozoon intestinalis*, an emergent agent. Clin Vaccine Immunol. 2009;16:1021-1024.

77. Gunnerson G, Hurlbut D, DeGirolami P. C, Federman M, ve Wanke C. Multiorgan microsporidiosis: report of five cases and review. Clin Infect Dis. 1995;21:37–44.

78. Leitch Ceballos C. Effects of host temperature and gastric and duodenal environments on microsporidia spore germination and infectivity of intestinal epithelial cells. Parasitol Res. 2008;104:35-42.

79. Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. N Engl J Med. 1992;16:161-166.

80. Weber R, Deplazes P, Schwartz D. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. Contrib Microbiol. 2000;6:166-192.

81. Visvesvara GS, da Silva AJ, Croppo GP, Pieniazek NJ, Leitch GJ, Ferguson D, de Moura H, Wallace S, Slemenda SB, Tyrrell I. In vitro culture and serologic and molecular identification of Septata intestinalis isolated from urine of a patient with AIDS. J Clin Microbiol. 1995;33:930-936.

82. Baker MD, Vossbrinck CR, Didier ES, Maddox JV, Shadduck JA. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of various microsporidia with emphasis on AIDS related forms. J Eukaryot Microbiol. 1995;42:564-570.

83. Hartskeerl RA, Schuitema AR, van Gool T, Terpstra WJ. Genetic evidence for the occurrence of extra-intestinal Enterocytozoon bieneusi infections. Nucleic Acids Res. 1993;21:4150.

84. Wang Z, Orlandi PA, Stenger DA. Simultaneous detection of four human pathogenic microsporidian species from clinical samples by oligonucleotide microarray. J Clin Microbiol. 2005;43:4121-4128.

85. Lono AR, Kumar S, Chye TT. Incidence of microsporidia in cancer patients. J Gastrointest Cancer. 2008;39:124-9.

86. Hamamcı B, Cetinkaya U, Berk V, l Kaynar L, Kuk S, Yazar S. Onkolojik Tedavi Alan Hastalarda *Encephalitozoon intestinalis* ve *Enterocytozoon bieneusi* XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, PBO72. 28 Eylül-4 Ekim 2013, Denizli.

87. Hamamcı B. Farklı Hasta Gruplarında *Enterocytozoon bieneusı*'nin (Protozoa, Mıcrosporıdıa) Araştırılması. Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2013.

88. Hernández-Rodríguez OX, Alvarez-Torres O, Ofelia Uribe-Uribe N. Microsporidia infection in a mexican kidney transplant recipient. Case Rep Nephrol. 2012;2012:928083.

89. Cetinkaya U, Hamamcı B, Kaynar L, Kuk S, Şahin İ, Yazar S. Kemik İliği Transplant Hastalarında *Encephalitozoon intestinalis* ve *Enterocytozoon bieneusi* Yaygınlığı. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, PBO71. 28 Eylül-4 Ekim 2013, Denizli.

90. Wai YC, Sussman GL. Evaluating chronic urticaria patients for allergies, infections, or autoimmune disorders. Clin Rev Allergy Immunol. 2002;23:185-193.

91. Kozel MM, Bossuyt PM, Mekkes JR, Bos JD. Laboratory tests and identified diagnoses in patients with physical and chronic urticaria and angioedema: a systematic review. J Am Acad Dermatol. 2003;48:409-416.

92. Kozel MM, Sabroe RA. Chronic urticaria: aetiology, management and current and future treatment options. Drugs. 2004;64:2515-2536.

93. Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects. J Allergy Clin Immunol. 2006;118:170-177.

94. Verma R, Delfanian K. Blastocystis hominis associated acute urticaria. Am J Med Sci. 2013;346:80-81.

95. Chirila M, Panaitescu D, Capraru T. Frequency of *Giardia lamblia* in certain allergic syndromes. Med Interne.1981;19: 367-72.

96. Doğruman Al F, Adişen E, Kuştimur S, Gürer MA. The role of protozoan parasites in etiology of urticaria. Turkiye Parazitol Derg. 2009;33:136-139.

97. Karaman U, Sener S, Calık S, Saşmaz S. Investigation of microsporidia in patients with acute and chronic urticaria. Mikrobiyol Bul. 2011;45:168-173.

98. Bhandari N, Kausaph V, Neupane GP. Intestinal parasitic infection among school age children. J Nepal Health Res Counc. 2011;9:30-32.

99. Wanachiwanawin D, Chokephaibulkit K, Lertlaituan P, Ongrotchanakun J, Chinabut P, Thakerngpol K. Intestinal microsporidiosis in HIV-infected children with diarrhea. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2002;33:241-245.

100. Botero JH, Castaño A, Montoya MN, Ocampo NE, Hurtado MI, Lopera MM. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:197-200.

101. Termmathurapoj S, Engkanun K, Naaglor T, Taamsri P, Wirote A, Leelayoova S, Mungthin M. Cross-sectional study of intestinal protozoan infections in orphans and childcare workers at the Phayathai babies' home, Bangkok Thailand. J Trop Med Parasitol. 2000; 51:345–349.

102. Calik S, Karaman U, Colak C. Prevalence of microsporidium and other intestinal parasites in children from malatya, Turkey. Indian J Microbiol. 2011;51:345-349.

103. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Buckholt MA, Tzipori S. Enterocytozoon bieneusi among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. Am J Trop Med Hyg. 2002;67:299-303.

104. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. Curr Opin Infect Dis. 2011;24:490-495.

105. Kotler DP, Orenstein JM. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. Adv Parasitol. 1998;40:321-349.

106. Kumar SS, Ananthan S, Joyee AG. Detection of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) by Polymerase Chain Reaction (PCR) Using Species-Specific Primer in Stool Samples of HIV Patients. Indian J Med Res. 2005;121:215-219.

107. Field AS, Hing MC, Milliken ST, Marriott DJ. Microsporidia in The Small Intestine of HIV-Infected Patients. A New Diagnostic Technique and A New Species. Med J Aust 1993; 158: 390-394.

108. Rabeneck L, Gyorkey F, Genta RM, Gyorkey P, Foote LW, Risser JM. The role of Microsporidia in the pathogenesis of HIV-related chronic diarrhea. Ann Intern Med. 1993;19:895-899.

109. Karaman U, Daldal N, Atambay M, Çolak C. The Epidemiology of Microsporidias in Humans (Malatya sample). Turk J Med Sci. 2009;39:281-288.

110. Türk S, Doğruman Al F, Karaman U, Kuştimur S. Investigation of Microsporidia prevalence by different staining methods in cases of diarrhea. Mikrobiyol Bul. 2012 Jan;46:85-92.

111. Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. J Clin Microbiol. 1995;33:3138-3145.

112. Saigal K, Khurana S, Sharma A, Sehgal R, Malla N. Comparison of staining techniques and multiplex nested PCR for diagnosis of intestinal microsporidiosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77:248-249.

113. Enriquez FJ, Ditrich O, Palting JD, Smith K. Simple diagnosis of Encephalitozoon sp. microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. J Clin Microbiol. 1997;35:724-729.

114. Beckers PJ, Derks GJ, Gool T, Rietveld FJ, Sauerwein RW.Encephalocytozoon intestinalis-specific monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of microsporidiosis. J Clin Microbiol. 1996;34:282-285.

115. Garcia LS, Shimizu RY, Bruckner DA. Detection of microsporidial spores in fecal specimens from patients diagnosed with cryptosporidiosis. J Clin Microbiol. 1994;32:1739-1741.

KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	: ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 85
E-POSTA	: byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Farklı Hasta Gruplarında Encephalitazoon intestinalis'in (Protozoa, Microsporidia) araştırılması
ARIŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	
EUDRACT NUMARASI	
SORUMLU ARAŞTIRMACININ ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Süleyman Yazar
SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Parazitoloji
KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	
KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	
ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı
ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı
BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu
DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	
UZMANLIK TEZİ/ AKADEMİK AMAÇLI	UZM. TEZİ [ ] AKADEMİK AMAÇLI [ ] DR. TEZİ [X] Y.LİSANS TEZİ [ ]
ARAŞTIRMA FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1 [ ]
	FAZ 2 [ ]
	FAZ 3 [ ]
	FAZ 4 [ ]
	BE/BY [ ]
	DİĞER [ ] Diğer ise belirtiniz
	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA [ ] Belirtiniz
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ [X] ÇOKMERKEZ [ ] ULUSAL [ ] ULUSLARARASI [ ]

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER

BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER

BELGE ADI		Açıklama
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	[ ]	
SİGORTA	[ ]	
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	[ ]	
İLAN	[ ]	
YILLIK BİLDİRİM	[ ]	
SONUÇ RAPORU	[ ]	
GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	[ ]	
DİĞER	[ ]	

ASLI GİBİDİR.

T.C. ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2011/196	Karar Tarihi : 05.04.2011

Fakültemiz Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Süleyman Yazar'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibine ve dekanlık makamına arzına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Erciyes Üniversitesi Senatosunun 08.12.2010 tarih ve 16 nolu toplantı kararı

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

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E [ ] K [X]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Prof. Dr. Halit MADENOĞLU	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Prof. Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Prof.Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Doç. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rek. Cer.	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Doç.Dr. Polat DURUKAN	Acil Tıp	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [ ] H [X]	
Doç.Dr. Hasan Basri ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Doç.Dr. Fatih TANRIVERDİ	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [ ] H [x]	
Doç.Dr. Leyla HASDIRAZ	Göğüs Cerrahisi	E.Ü. Tıp Fak.	E [ ] K [X]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Doç.Dr. Mehmet Güngör KAYA	Kardiyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [ ] H [x]	
Doç.Dr. Ertuğrul MAVİLİ	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Öğr. Gör. Dr. Ferhan ELMALI	Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	Rektörlük	E [ ] K [X]	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Ecz. Nuran YOZGAT	Eczacı	E.Ü. Tıp Fak.	E [ ] K [X]	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Yusuf Oğuz ALTUNTAŞ	Sivil Üye	E.Ü. Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	

Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

Bu çalışmada; Farklı hasta gruplarında ve farklı tanı yöntemleriyle fırsatçı bir parazit olan *Encephalitozoon intestinalis*'ın yaygınlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Alınan dışkı örnekleri, direkt mikroskobik inceleme, boyama yöntemleri, DFA ve moleküler yöntemlerle incelenecektir.

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

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

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

Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabileceğiniz Kişi:

Prof. Dr. Süleyman YAZAR, Tel: 4374937/23401

GÖNÜLLÜ OLURU

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

	Adı Soyadı	İmza	Tarih
Gönüllünün:			
Açıklamaları Yapan Kişi:			
Gerekiyorsa Tanık Olan Kişi:			
Gerekiyorsa Yasal Temsilcinin:			

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Ülfet ÇETİNKAYA

Uyruğu : T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri : 29 Kasım 1983, Kayseri

Medeni Durumu : Evli

Tel :+90 533 4213393

Email :ucetinkaya@erciyes.edu.tr

Yazışma Adresi : Erciyes üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Melikgazi/KAYSERİ

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen Edebiyat Fakültesi/Biyoloji	Erciyes Üniversitesi	1999-2003
Yüksek Lisans	Tıbbi Parazitoloji AD	Erciyes Üniversitesi	2005-2008
Doktora	Tıbbi Parazitoloji AD	Erciyes Üniversitesi	2008-Devam ediyor

Yüksek Lisans Tezi Başlığı (özeti ekte) ve Danışmanı: Vajinal Akıntılı Kadınlarda *Trichomonas vaginalis*'in Araştırılması

Tez danışmanı: Prof. Dr. Süleyman YAZAR

Doktora Tezi Başlığı (özeti ekte) ve Danışmanı: Farklı Hasta Gruplarında *Encephalıtozoon intestınalıs'*in (Protozoa, Microsporidia) Araştırılması

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Süleyman YAZAR

Yabancı Dil: İngilizce (ÜDS:65)

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Araş. Gör.	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri	12.09.2006-Devam ediyor
Öğrenci Temsilciliği	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	24.11.2009-22.11.2011

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. TEZ PROJESİ, YÜKSEK LİSANS, SBT-07-13, Araştırmacı, Kayseri'de Vaginal Akıntılı Kadınlarda *Trichomonas vaginalis*'in Araştırılması. 2007.
2. NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ (NAP), TSA-10-3334, Araştırmacı, *Fasciola hepatica'*ya karşı aşı adayı olabilecek rekombinant cathepsin L proteininin elde edilmesi. 2012
3. NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ (NAP), TSA-10-3340, Araştırmacı, Su kaynaklarında insan için patojen olan serbest yaşayan amiplerin araştırılması. 2012
4. TEZ PROJESİ, DOKTORA, TDK-2013-4511, Araştırmacı, Farklı Hasta Gruplarında *Encephalıtozoon intestınalıs'*in (Protozoa, Microsporidia) Araştırılması. DEVAM EDİYOR.

<u>Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:</u>

Türkiye Parazitoloji Derneği

ESERLER

A. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

A1. Yazar S**,** Kilic E, Saraymen R, **Mercan U**, Ayyildiz N. Essential elements in *Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendtriticum*. Indian Vet J. 2006;83:1322-1323.

A2. Çetinkaya U, Yazar S, Serin S, Hamamcı B, Kuk S. Vajinal Akıntılı Kadınlarda Akıntı Türüne Göre *Trichomonas vaginalis* Pozitifliği. Turkiye Klinikleri J Med Sci. 2011;31(5):1094-1099.

A3. Yazar S, Kuk S, **Çetinkaya U**, Gözkenç N, Şahin İ. Investigation of *Sarcoptes scabiei* in Scabies Suspected Patients Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2012;18(Suppl-A): 85-87.

A4. Yazar S, Kuk S, **Çetinkaya U,** Kaya M, Şahin İ. The Distribution of Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Patients Presenting to Erciyes University Medical Faculty Parasitology Laboratory. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2012;18(Suppl-A):89-92.

A5. Cetinkaya U, Yazar S, Kuk S, Ateş S, Hamamcı B, Gedikbaş T, Şahin İ. The Distribution of Intestinal Parasites Determined Between 2009-2010 in Erciyes University, Medical Faculty, Parasitology Laboratory. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2012; 18(Suppl-A):93-96.

A6. Kuk S, Yazar S, **Cetinkaya U**. Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(8): 965-968.

A7. Kuk S, Yazar S, Doğan S, **Cetinkaya U**, Şakalar Ç. Molecular characterization of Acanthamoeba isolated from Kayseri well water. Turk J Med Sci. 2013;43(1):12-17.

A8. Yazar S, Kuk S, **Cetinkaya U**, Şahin İ. Leishmania sp. in Cutaneous Leishmaniasis suspected patients is Kayseri. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2013; 60:177-178.

A9. Yazar S, Kuk S, **Cetinkaya U**, Uyar Y, Şahin İ. *Leishmania* sp. in Visceral Leishmaniasis suspected patients in Kayseri. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2013;60:185-187.

A10. Sakalar C, Kuk S, Erensoy A, Dağlı AF, Özercan İH, **Cetinkaya U**, Yazar S. Molecular discrimination of Echinococcus granulosus and Echinococcus multilocularis by sequencing and a new PCR- RFLP method with the potential use for other Echinococcus species. Turk J Med Sci. 2014;44(5):741-748.

B. <u>Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler:</u>

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

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

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

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

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

B6. Kuk S, Yazar S, **Cetinkaya U,** Gücüyetmez S. Molecular detection of Acanthamoeba spp. in Brackish Wather sediments of Kayseri, Turkey (A Preliminary Study). Fourth Eurasia Congress of Infectious Diseases, June 01-05, 2011. Sarajevo-Bosna & Herzegovina

B7. Yazar S, **Cetinkaya U,** Doğan S, Artis T, Kuk S. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Turkey by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. Advances on Epidemiology, Diagnosis and Management of Echinococcosis. 11.11.2011, Iasi-Romania.

B8. Yazar S, **Cetinkaya U**, Doğan S, Artis T, Kuk S. Molecular characterization of Echinococcus granulosus in Turkey. ASTMH 60th Annual Meeting, 4-8 December 2011 Phledelphia, USA.

B9. Kuk S, **Cetinkaya U**, Yazar S. Storage condition for DNA isolation in *Giardia intestinalis.* ASTMH 60th Annual Meeting, 4-8 December 2011 Phledelphia, US.

B10. Yazar S, Kuk S, **Cetinkaya U**, Şahin İ. Leishmania sp. in Cutaneous Leishmaniasis suspected patients is Kayseri.1 st National Symposium on vectors and Vector-Borne Diseases with International Participation, 9-10 September 2012 Nevsehir, TURKEY.

B11. Yazar S, Kuk S, **Cetinkaya U**, Uyar Y, Şahin İ. *Leishmania* sp. in Visceral Leishmaniasis suspected patients in Kayseri. 1 st National Symposium on vectors and Vector-Borne Diseases with International Participation, 9-10 September 2012 Nevsehir, TURKEY.

B12. Kuk S, **Cetinkaya U**, Yuruk M, Yazar S. Molecular Dıscrımınation of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* by sequencing and a new PCR-RFLP Method with the Potential Use for Other Echinococcus species. The 88 th Annual Meeting of the American Society of Parasilogists and the 13 th Annual Quebec Molecular Parasitology Meeting, 26-29 June 2013, CANADA.

B13. Yazar S, Kuk S, **Cetinkaya U**, Yuruk M. Devloping of ELISA based on recombinanat Cathepsin L1 Protein for Diagnosis of *Fasciola hepatica.* The 88 th Annual Meeting of the American Society of Parasilogists and the 13 th Annual Quebec Molecular Parasitology Meeting, 26-29 June 2013, CANADA.

C. <u>Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:</u>

C1. Yazar S, Özcan H, **Çetinkaya Ü**. Üniversite Öğrencilerinde Selofan-Bant Yöntemi İle *Demodex* sp. Araştırılması. Türkiye Parazitol Derg. 2008;32(3):238-240.

C2. Yaman O, Yazar S, Özcan H, **Çetinkaya Ü**, Gözkenç N, Ateş S, Şahin İ. 2005-2008 Yılları Arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitol Derg. 2008;32(3):266-270.

C3. Yaman O, Yazar S, **Çetinkaya Ü**, Temel HÖ, Balcı E, Pehlivan İ, Şahin İ. Kayseri Kapalı Cezaevi Mahkumlarında *Toxoplasma gondii* Seroprevalansı. Türkiye Parazitol Derg. 2009;33(1):15-19.

C4. Yazar S, Yaman O, **Çetinkaya Ü**, Hamamcı B, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalına Müracaat Edenlerde Anti-*Toxocara canis* IgG Antikorlarının Araştırılması. Türkiye Parazitol Derg. 2010;34(1):24 –26.

C5. Kaya M, Hamamcı B, **Çetinkaya Ü**, Yaman O, Yazar S. Bir Lisede Öğrenim Gören Yabancı Uyruklu Erkek Öğrencilerde Selofan-bant Yöntemi ile *Demodex* sp. Araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg. 2010;67(2):73-77.

C6. Yaman O, **Çetinkaya Ü,** Hamamcı B, Yazar S, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalına Müracaat Edenlerde Anti-Toxoplasma gondii Antikorlarının Araştırılması. Sağlık Bilimleri Dergisi. 2010;19(2):119-123.

C7. Yaman O,Hamamcı B, **Çetınkaya Ü**, Kaya M, Ateş S, Gözkenç N, Özcan H, Yazar L, Yazar S. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde İntestinal Parazitlerin Araştırılması. Türkiye Parazitol Derg. 2010;34(3):176-178.

C8. Hamamcı B, **Çetınkaya Ü**, Yaman O, Kaya M, Yazar S. Kayseri'deki Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde *Fascıola Hepatıca* Antikorlarının Araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg. 2010; 67(3): 121-126.

C9. Yazar S, Yaman O, **Çetınkaya Ü**, Hamamcı B, Kaya M. Bir Süredir Türkiye'de Yaşayan Nijeryalı Bir Öğrencide *Schıstosoma Haematobıum* Enfeksiyonu. Turk Hij Den Biyol Derg. 2010;67(4):185-188

C10. Şahin İ, Yaman O, Hamamcı B, **Çetınkaya Ü**. Apicomplexan Protozoonlara Model Olarak Plasmodıum spp.'nin Eritrosit İnvazyonunun Moleküler Temelleri. Türkiye Parazitol Derg. 2010;34(4):183-185.

C11. Hamamcı B, **Çetinkaya Ü**, Delice S, Erçal BD, Gücüyetmez S, Yazar S. Kayseri-Hacılar'da İlköğretim Okulu Öğrencilerinde Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması. Türkiye Parazitol Derg. 2011;35(2): 96-99.

C12. Çetınkaya Ü, Hamamcı B, Kaya M, Yaman O, Yazar S. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde Anti-Toxoplasma gondii Antikorlarının Araştırılması. Türkiye Parazitol Derg. 2011;35(3): 129-132.

C13. Çetinkaya Ü, Hamamcı B Delice S, Erçal BD, Gücüyetmez S, Yazar S, Şahin İ.The Prevalence of Pediculus humanus capitis in Two Primary Schools of Hacılar, Kayseri. Türkiye Parazitol Derg. 2011;35(3):151-153.

C14. **Çetınkaya Ü,** Hamamcı B, Kaya M, Gücüyetmez S, Kuk S, Yazar S, Şahin İ. Kistik Ekinokokkozis Ön Tanılı Hastalarda Anti-Echinococcus granulosus Antikorlarının Araştırılması. Türkiye Parazitol Derg. 2012;36(2):57-60.

C15. Polat M, Kılıç E, Yazar S, **Çetinkaya Ü.** *Toxoplasma gondıı* Pozitif Bireylerde İleri Protein Oksidasyon Ürünü Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Dergisi. 2012;21(3):200-204.

C16. Yazar S, Koru O, Hamamcı B, **Çetinkaya Ü,** Karaman Ü, Kuk S. Mikrosporidialar ve Mikrosporidiyozis**.** Türkiye Parazitol Derg. 2013;37(2):123-134.

D. <u>Ulusal ve Uluslar Arası Katılımlı Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:</u>

D1. Yazar S, Özcan H, **Çetinkaya Ü**. Üniversite Öğrencilerinde Selofan-bant Yöntemi İle *Demodex folliculorum* Araştırılması (**Poster**). *XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 18-23 Kasım, 2007, Kayseri ve Ürgüp.

D2. Yazar S. Mikrosporidia ve Mikrosporidiosis (**Yuvarlak Masa Oturumu**). **Çetinkaya Ü.** Mikrosporidiaların Sınıflandırılması ve morfolojisi. *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D3. Kaya M, Hamamcı B, **Çetinkaya Ü**, Yaman O, Yazar S. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde Selofan-bant Yöntemi ile *Demodex sp*. Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D4. Yaman O, **Çetinkaya Ü**, Hamamcı B, Yazar S, Şahin İ. Erciyes Üniv. Tıp Fak. Parazitoloji AD'na Müracaat Edenlerde Anti-*Toxoplasma gondii* Antikorlarının Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D5. Çetinkaya Ü, Hamamcı B, Kaya M, Yaman O, Yazar S. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde Anti-*Toxoplasma gondii* Antikorlarının Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D6. Yazar S, **Çetinkaya Ü,** Hamamcı B, Alkan A, Şişman Y, Esen Ç, Kolay M. Periodontitis veya Gingivitisli Hastalarda Trichomonas tenax ve Entamoeba gingivalis Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D7. Yazar S, Yaman O, **Çetinkaya Ü**, Hamamcı B, Kaya M. Bir Süredir Türkiye'de Yaşayan Nijeryalı Bir Öğrencide *Schistosoma haematobium* Enfeksiyonu (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D8. Yazar S, Yaman O, **Çetinkaya Ü**, Hamamcı B, Şahin İ. Gastrointestinal Şikayeti Olan hastalarda ELISA ile *Entamoeba Histolytica* Spesifik Antijen Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D9. Yazar S, Hamamcı B, **Çetinkaya Ü**, Yaman O, Şahin İ. Gastrointestinal Şikayeti Olan hastalarda ELISA ile *Giardia İntestinalis* Spesifik Antijen Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D10. Hamamcı B, **Çetinkaya Ü**, Yazar S, Şahin İ. Bazı Antimikrobiyal İlaçların B*lastocystis hominis* Üzerine İn-Vitro Etkilerinin Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D11. Yaman O, Hamamcı B, **Çetinkaya Ü**, Kaya M, Ateş S, Gözkenç N, Özcan H, yazar L, Yazar S. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde İntestinal Parazitlerin Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D12. Hamamcı B, **Çetinkaya Ü**, Yaman O, Kaya M, Yazar S. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde *Fasciola hepatica* Antikorlarının Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D13. Yazar S, Yaman O, **Çetinkaya Ü**, Hamamcı B, Şahin İ. Erciyes Üniv. Tıp Fak. Parazitoloji AD'na Müracaat Edenlerde Anti-*Toxocara canis* IgG Antikorlarının Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D14. Çetinkaya Ü, Yazar S, Serin S. Vajinal Akıntılı Kadınlarda *Trichomonas vaginalis* Araştırılması (**Poster**). *XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

D15. Çetinkaya Ü, Hamamcı B, Kaya M, Gücüyetmez S, Kuk S, Yazar S, Şahin İ. Kistik Ekinokokkozis Ön Tanılı Hastalarda Anti-*Echinococcus garanulosus* Antikorlarının Araştırılması(**Poster**). V. *Ulusal Hidatidoloji Kongresi*, 22-25 Eylül, 2010, Antakya.

D16. Çakır I, Kılıç E, Çetinkaya Ü, Söylemez S, Başkol G, Kuk S, Çeliköz A, Yazar S. Taenia Saginata İle Enfekte Çocuklarda Protein Oksidasyonunun Değerlendirilmesi. (**Poster**) *XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi,* 27-30 Ekim 2010, Eskişehir.

D17. Yazar S, Kuk S, Doğan S, **Çetinkaya Ç**. Kayseri kuyu sularında serbest yaşayan Amiplerin izolasyonu ve Genotiplendirilmesi (**Poster**). XVII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu,* 4-10 Eylül 2011, Kars

D18. Kuk S, **Çetinkaya Ç**, Yazar S. Farklı Şekilde Saklanmış Dışkı Örneklerinden Giardia intestinalis DNA'sının izolasyonu (**Poster**). XVII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu,* 4-10 Eylül 2011, Kars

D19. Yazar S, Kuk S, **Çetinkaya Ç**, Kaya M, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuarına Müracaat Eden Hastalarda Anti-*Toxoplasma gondii* Antikorlarının Dağılımı (**Poster**). XVII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu,* 4-10 Eylül 2011, Kars.

D20. Yazar S, Kuk S, **Çetinkaya Ç**, Gözkenç N, Şahin İ. 2004-2011 Yılları Arasında Erciyes Üniv. Tıp Fak. Parazitoloji AD'na Bşvuran Hastalarda *Sarcoptes scabiei* Araştırılması (**Poster**).

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

D21. Çetinkaya Ç, Yazar S, Kuk S, Ateş S, Hamamcı B, Gedikbaş T, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji AD. Laboratuarında 2009-2010 Yılları Arasında Saptanan Barsak Parazitlerini dağılımı (**Poster**). XVII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu,* 4-10 Eylül 2011, Kars.

D22. Yazar S. Mikrosporidialar: Konak parazit Etkileşimi (**Yuvarlak Masa Oturumu**). **Çetinkaya Ü.** Mikrosporidialar ve Toll-like Reseptörler. XVII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu,* 4-10 Eylül 2011, Kars.

D23. Kuk S, Cetinkaya U, Uyar Y, Erdoğan E,Yazar S. Farklı tür konaklardan elde edilen Echinococcus granulosus izolatlarının Mitokondriyal ATPase Subunit 6 ile moleküler karakterizasyonu. 6. Ulusal hidatidoloji kongresi 12-15 Eylül 2012, Gaziantep.

D24. Sakalar Ç, Kuk S, Erensoy A, Dağlı AF, Özercan İH, **Çetinkaya Ü**, Yazar S. Diğer Echinococcus Türleri İçinde Kullanılabilme Potansiyeli Olan Yeni Bir PCR-RFLP Yöntemi ile *Echinococcus granulosus* ve *Echinococcus multilocularis*'in Ayrımı **(Poster)**. 6. Ulusal hidatidoloji kongresi 12-15 Eylül 2012, Gaziantep.

D25. Yürük M, **Çetinkaya Ü,** Kuk Ü, Şahin İ, Yazar S. Kistik Ekinokokkozis Ön Tanılı Hastaların Serolojik Değerlendirilmesi **(Poster)**. XVIII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi,* 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli.

D26. Yürük M, **Çetinkaya Ü,** Özkan B, Kuk S, Yazar S. *Fasciola hepatica* Tanısı İçin Rekombinant Cathepsin L1 Tabanlı ELISA Geliştirilmesi **(Poster)**. XVIII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi,* 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli.

D27. Çetinkaya Ü, Dursun İ, Kuk S, Şahin İ, Yazar S. Renal Transplantlı Bir Hastada *Cryptosporidium parvum* Gastroenteriti **(Poster)**. XVIII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi,* 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli.

D28. Ceylan ŞS, **Çetinkaya Ü,** Kuk S, Yazar S. Dışkı Örneklerinde *Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp. Kopro-Antijenlerinin Araştırılması **(Poster)**. XVIII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi,* 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli.

D29. Çetinkaya Ü, Hamamcı B, Kaynar L, Kuk S, Şahin İ, Yazar S. Kemik İliği Transplant Hastalarında *Encephalitozoon intestinalis* ve *Enterocytozoon bieneusi* Yaygınlığı **(Poster)**. XVIII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi,* 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli.

D30. Hamamcı B, **Çetinkaya Ü,** Berk V, Kaynar L, Kuk S, Yazar S. Onkolojik Tedavi Alan Hastalarda *Encephalitozoon intestinalis* ve *Enterocytozoon bieneusi* **(Poster)**. XVIII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi,* 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli.

D31. Yürük M, **Çetinkaya Ü,** Kuk Ü, Şahin İ, Yazar S. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Son İki Yılda Müracaat Eden Hastalarda Anti-*Toxoplasma gondii* Antikorlarının Dağılımı **(Poster)**. XVIII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi,* 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli.

D32. Yazgan S, **Çetinkaya Ü**, Şahin İ. İlköğretim Çağı Çocuklarında *Enterobius vermicularis* (L.1758) Yaygınlığı ve Çeşitli Semptomlar İle İlişkisinin Araştırılması **(Poster)**. XVIII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi,* 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli.

D33. Yazar S. Parazitlerde Gen Susturma (Gene Silencing) ve miRNA (mikro RNA) (**Yuvarlak Masa Oturumu**). **Çetinkaya Ü.** Helmintlerde Gen Susturma ve miRNA. XVIII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi,* 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli.

E. <u>Aldığı Kurslar ve Katıldığı Eğitim Programları:</u>

E1. "Tıbbi ve Veteriner Önem Taşıyan Bitler, Uyuz Etkenleri ve Keneler" konulu kurs, 1-5 Eylül 2008, Sivas.

E2. Araştırıcılar İçin Deney Hayvanları Kullanım Sertifika Programı, 18-28 Mayıs, 2009, Kayseri.

F. <u>Katıldığı Bilimsel Toplantılar:</u>

F1. XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 18-23 Kasım, 2007, Kayseri ve Ürgüp.

F2. IV. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 25-28 Haziran, 2008, Malatya.

F3. XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, 2009, Adana.

F4. Fourth International Conference On Phthiraptera, June 13–18, 2010. Urgup, Cappodicia/TURKEY

F5. V. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 22-25 Eylül, 2010, Antakya

F6. XVII. Ulusal Parazitoloji Kongresi *ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu,* 4-10 Eylül 2011, Kars.

F7. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi*,* XVIII. *Ulusal Parazitoloji Kongresi,* 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli.

F8. VII. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 04-07 Eylül, 2014, Ordu