T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

KÖPEKLERDE *ENCEPHALITOZOON CUNICULI*'NİN MOLEKÜLER PREVALANSI VE GENETİK KARAKTERİZASYONU

Proje No: TSA-2015-5742

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Abdullah İNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Zuhal ÖNDER
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı
Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Ekim 2016
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırıcılar bu çalışmaya TSA-2015-5742 kodlu proje ile finansman desteği veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederler.

İÇİNDEKİLER

KAPAK ..... **i**

TEŞEKKÜR **2**

İÇİNDEKİLER **3**

TABLO LİSTESİ **5**

ŞEKİL LİSTESİ **6**

ÖZET **7**

ABSTRACT **8**

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM **9**

2. LİTERATÜR BİLGİ **10**

2.1 Tarihçe ve Sınıflandırma 10

2.2 Morfoloji 13

2.2.1 Merontların Morfolojisi 13

2.2.2 Sporontların Morfolojisi 13

2.2.3 Sporoblastların Morfolojisi 13

2.2.4 Spor Morfolojisi 13

2.3 Hayat Döngüsü 16

2.3.1 Faz I-Enfektif (Çevresel) Faz 17

2.3.2 Faz II- Proliferatif (Üreme) Faz 18

2.3.3 Faz III-Sporogonik Faz 19

2.4 Epidemiyoloji, Patogenez ve Klinik 20

2.5 Tanı 22

2.5.1 Tanıda Kullanılan Klinik Örnekler 22

2.5.2 Işık ve Floresan Mikroskobisi Yöntemleri 22

2.5.3 Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) 23

2.5.4 Serolojik Yöntemler 23

2.5.5 Monoklonal antikorların kullanıldığı Immun Floresan Antikor (IFA-MAbs) Yöntemi 23

2.5.6 Moleküler Tanı Yöntemleri 24

3. GEREÇ VE YÖNTEM 26

3.1 Hayvan Materyali, Kan ve Dışkı Örnekleri 26

3.2 LABORATUAR ÇALIŞMALARI 27

3.2.1 Kan Örneklerinden Genomik DNA Ekstraksiyonu 27

3.2.2 Dışkı Örneklerinden Genomik DNA Ekstraksiyonu 29

3.2.3 Tür Spesifik Primerlerle Small Subunit (SSU) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu 30

3.2.4 Small Subunit (SSU)-Intergenic Spacer- Large Subunit (LSU) rRNA Geninin Amplifikasyonu 31

3.2.5 Klonlanlama ve Plazmid DNA İzolasyonu 32

3.2.6 Sekans ve Filogenetik Analizler 34

3.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ 35

4. BULGULAR 36

4.1 MİCROSPORİDİA ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE PREVALANSI 36

4.2 GENOTİPLENDİRME, SEKANS VE FİLOGENETİK ANALİZLER 39

4.2.1 SSU-Intergenic Spacer-LSU rRNA Geninin Amplifikasyon Sonuçları 39

4.2.2 Sekans Analizi ve Genotiplendirme Sonuçları 39

4.2.3 Filogenetik Analiz Sonuçları 41

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 44

6. KAYNAKLAR 50

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Zoonotik karakterli ve insanlarda enfeksiyona yol açan microsporidia türlerinin morfolojik özellikleri 15

Tablo 4.1 Microsporidia türlerinin köpeklerin çeşitli faktörlerine bağlı olarak dağılımları ve istatistik analiz sonuçları.....38

Tablo 4.2 Çoklu hizalama analizleriyle filogenetik analizlere dahil edilen microsporidia izolatları arasındaki identiklik oranları.....42

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Mikrosporidian parazitlerin sınıflandırılması 12

Şekil 2.2 Spor morfolojisi 14

Şekil 2.3 Mikrosporidiaların genel hayat döngüsü 17

Şekil 2.4 Spor germinasyonu sırasında polar filamentin ters dönmesi. 18

Şekil 2.5 *E. cuniculi*'nin hayat döngüsü 20

Şekil 3.1 pJET1.2/blunt cloning vector haritası 32

Şekil 3.2 LB katı besi yerinde üreyen koloniler 33

Şekil 3.3 Kolonilerin LB sıvı besi yerinde üretilmesi 34

Şekil 4.1 *E. cuniculi* pozitif belirlenen izolatlara ait SSU rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü 36

Şekil 4.2 *E. intestinalis* pozitif belirlenen izolatlara ait SSU rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü 37

Şekil 4.3 *E. hellem* SSU rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu jel elektroforezde görünüm 37

Şekil 4.4 *E. beunesi* SSU rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu jel elektroforezde görünüm 38

Şekil 4.5 İzolatların SSU-Intergenic Spacer-LSU rRNA geninin amplifikasyonu sonucu agaroz jel üzerinde görünümleri. 39

Şekil 4.6 Haplotip ve genotip bazında karakterize edilen microsporidia türlerine ait izolatların SSU-Intergenic Spacer-LSU rRNA gen bölgesi nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları 40

Şekil 4.7 ERU-Ecuni1 izolatına ait internal transcribed spacer gen bölgesinde *E. cuniculi* Genotip III'e özgü sıralı nükletid tekrarları 40

Şekil 4.8 Microsporidia türlerine ait izolatlarının SSU-Intergenic Spacer-LSU rRNA gen bölgesi BI ve ML analizlerine göre filogenetik ilişkileri. 43

ÖZET

Bu çalışma, köpeklerde *Encephalitozoon cuniculi* ve diğer zoonotik karakterli microsporidia türlerinin moleküler olarak araştırılması ve belirlenen izolatların haplotip ve genotip bazında karakterizasyonlarının yapılarak filogenetik yapılanmalarının ortaya konması amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada toplam 282 köpek dışkı örneğinin yanında 400 adet kan örneği incelenmiştir. Dışkı ve kan örneklerinden genomik DNA (gDNA) izolasyonlarını takiben elde edilen gDNA izolatlarının SSU rRNA gen bölgesinin amplifiye eden tür spesifik primerlerle PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. İncelenen dışkı örneklerinin 41'i (%14,5) microsporidia türleri ile enfekte bulunurken kan örneklerinde pozitiflik saptanmamıştır. Microsporidia pozitif örneklerin 35'inde *E. intestinalis*, altısında ise *E. cuniculi* identifiye edilmiş, *E. hellem* ve *Enterocytozoon beunesi* pozitifliğine rastlanmamıştır. Pozitif örneklerin tek türle enfekte oldukları belirlenmiş miks enfeksiyonlara rastlanmamıştır. Genotiplendirme ve filogenetik analizler için pozitif gDNA izolatlarının Small Subunit (SSU)-Intergenic Spacer- Large Subunit (LSU) rRNA gen bölgesi amplifiye edilmiştir. Sonraki basamakta amplifikasyon ürünlerinin klonlama, plazmid pürifikasyonu ve sekans analizleri gerçekleştirilerek genotiplendirmeleri sağlanmıştır. GenBank aksesyonları sağlanan izolatların Dünyadaki homolog izolatlarla filogenetik yapılanmaları belirlenmiştir. *E. intestinalis* izolatları arasında birbirine yüksek düzeyde identik (ort %99,4) üç haplotip saptanmış ve bu haplotiplerin dünyadan çeşitli memeli ve kanatlı konaklardan izole edilmiş homolog izolatlarla ortalama %1,0±0,4 genetik farklılık gösterdiği belirlenmiştir. *E. cuniculi* izolatlarına ait sekanslar arasında polimorfik bölge bulunmamış ve neticesinde bir haplotip belirlenmiştir. Karakterize edilen bu haplotipin *E. cuniculi* Genotip III'e (Köpek genotipi) ait olduğu saptanmış ve aynı genotipte belirlenen izolatlara filogenetik olarak yakın bulunmuşlardır.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de köpeklerde enfeksiyona yol açan zoonotik karakterli microsporida türleri ilk kez moleküler olarak saptanmıştır. Elde edilen verilerle Türkiye'de *E. cuniculi* ve *E. intestinalis* genotipleri ilk kez karakterize edilmiş ve filogenetik yapılanmaları ortaya konmuştur. Ayrıca bu çalışmayla köpeklerin insan microsporidia enfeksiyonları için rezervuar olarak risk potansiyeli taşıdığı da belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Encephalitozoon cuniculi,* microporidia, köpek, PCR, moleküler karakterizasyon

GENETIC CHARACTERIZATION AND MOLECULAR PREVALENCE OF *ENCEPHALITOZOON CUNICULI* IN DOGS

ABSTRACT

This study was conducted to investigate *Encephalitozoon cuniculi* and other zoonotic microsporidia species molecularly and to determine phylogenetic construction of the isolates by characterizing the isolates on the base of haplotypes and genotypes. Totally 282 dog stool samples along with 400 blood samples were examined. Following the genomic DNA (gDNA) isolation from stool and blood samples, SSU rRNA gene region of the gDNA isolates was amplified by species specific primers in PCR. A total of 41 (14.5%) out of the examined stool samples were found to be infected with microsporidia species. Whereas there was no positivity in the examined blood samples. Thirty-five and six of the microsporidia positive samples were identified as *E. intestinalis* and *E. cuniculi,* respectively. Neither *E. hellem* nor *Enterocytozoon beunesi* positivity was identified. Positive samples were infected with single species and there were no mix infections. SSU-Intergenic Spacer- LSU rRNA gene region of the positive gDNA isolates was amplified in order to genotyping and phylogenetic analyses. In the next step genotyping of amplification products were provided by utilizing cloning, plasmid purification and sequence analyzes. Phylogenetic constructions of the isolates that recorded into GenBank along with the homologous isolates from the World were provided were determined. Three haplotypes of *E. intestinalis* that were highly identical to each other (mean 99.4%) were determined among the isolates and these haplotypes showed a mean of %1.0±0.4 genetic distance to the homologous isolates isolated from several mammalian and avian hosts in the World. No polymorphic region was found among the sequences of *E. cuniculi* isolates, thus only one haplotype was determined. This haplotype was characterized as Genotip III (dog genotype) and found as phylogenetically close to the isolates in the same genotype.

In conclusion, the zoonotic microsporidia species that infect dogs was firstly determined molecularly in Turkey. *E. cuniculi* and *E. intestinalis* genotypes and their phylogenetic constructions were firstly characterized in Turkey by the obtained data. Furthermore, the risk potential of the dogs as a reservoir for the human microsporidia infections were also determined.

Key words: *Encephalitozoon cuniculi,* microporidia, dog, PCR, molecular characterization

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Mikrosporidialar önceleri protozoa olarak klasifiye edilmesine karşın günümüzde yapılan taksonomi çalışmalarında Mantarlar âleminde yer aldığı bildirilmiştir (1). Mikrosporidia filumunda yaklaşık 100 cinse bağlı 1200'den fazla tür bulunmaktadır. Ökaryotik, zorunlu hücre içi mikrosporidian parazitler hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda özellikle insektlerde, balık ve memelilerde tanımlanmıştır (2). Mikrosporidian parazitlerin 8 cinse ait 14 türünün insanları enfekte ettiği bildirilmiştir (3, 4). Bunlardan *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon* spp. (*Encephalitozoon intestinalis, Encephalitozoon hellem* ve *Encephalitozoon cuniculi*) özellikle HIV pozitif hastalarda ve doku nakillerinde fırsatçı patojenler olarak tanımlanmışlardır (5, 6). Bu türler ile hayvan enfeksiyonları bu patojenlerin zoonotik potansiyelini göstermektedir (3, 4, 7-9). Mikrosporidial sporlar enfekte konakların solunum sistemi, dışkı ve idrarı ile çevreyi kontamine etmekte ve su, toprak ve besinlerde uzun bir zaman canlı kalabilmektedir (10). Bu projede, Kayseri yöresindeki sahipli ve sokak köpeklerinden daha önce ERU Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından desteklenen "Kayseri ve Yöresi Köpeklerinde Filaria Enfeksiyonlarının ELISA ve Membran Filtrasyon Asit Fosfataz Histo Kimyasal Boyama Yöntemleri ile Araştırılması" başlıklı ve VA-05-04 kodlu ve TÜBİTAK tarafından desteklenen "Kayseri ve Civarında Köpeklerde Leishmaniosis'in Nested-PCR ile Moleküler Biyolojik Tanısı" başlıklı ve 104O302 kodlu araştırma projeleri kapsamında Kayseri'nin çeşitli bölgelerindeki köpeklerden toplanmış ve Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Cryo-Bankında (-20°C) muhafaza edilen toplam 400 adet EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) kan örneği ile "Kayseri Yöresi Koyun, Sığır ve Köpeklerinde Echinococcosis'in Prevalansı ve Cystic Echinococcosis'e Bağlı Ekonomik Kayıpların Araştırılması" başlıklı ve VA-06-07 kodlu araştırma projesi kapsamında Kayseri'nin çeşitli bölgelerindeki köpeklerden toplanmış ve Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Cryo-Bankında (-80°C) muhafaza edilen toplam 300 adet dışkı örneğinde *E. cuniculi* ve diğer zoonotik microsporidia etkenleri moleküler olarak araştırılmış ve saptanan izolatların moleküler karakterizasyonları yapılarak genotipleri ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar ile yörede köpeklerde microsporidia enfeksiyonlarının varlığı ve epidemiyolojisi üzerine moleküler zeminde verilere ulaşılmıştır. Bununla birlikte moleküler epidemiyolojik veriler ışığında halk sağlığı açısından köpeklerdeki *E. cuniculi* ve diğer microsporidia enfeksiyonlarının oluşturduğu zoonotik risk potansiyelleri de ortaya konmuştur.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1 Tarihçe ve Sınıflandırma

İlk olarak 1857 yılında Nageli tarafından, *Nosema bombycis* olarak adlandırılan mikrosporidian parazitler Schizomycetes'ler içerisine dâhil edilmiştir. Mikrospora şubesi ise 1882 yılında Balbiani tarafından tanımlanmış, 1977'de mikrosporidian parazitler yapısal özellikleri, spor ve gelişme safhalarındaki çekirdeğin şekli, konak-parazit ilişkisi ve polar tüpteki sarmal sayılarına göz önünde bulundurularak sınıflandırılmıştır (8).

Mikrospora şubesi 1980'de Protista âlemi ve protozoa altalemi altında gösterilmiştir. Takiben 1986 yılında mikrosporidian parazitler, diplokaryon olup olmaması, mayoz bölünmesi ve sporofaz organeline göre tekrar klasifiye edilmişler ise de bu sınıflandırma, filogenetik analiz açısından uygun bulunmamış ve sporun morfolojisine ve gelişme safhalarına göre 1986 yılında yeniden sınıflandırılmışlardır (2).

Encephalitozoon intestinalis başlangıçta Orestein ve ark. (11) tarafından *Encephalitozoon cuniculi*'ye benzer olarak tanımlanmıştır. Cali ve ark. (12) 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. (13) ise antijenik özellikleri ve moleküler düzeylerindeki benzerlik nedeniyle *Encephalitozoon* cinsine dahil etmiş ve *E. intestinalis* olarak isimlendirmişlerdir.

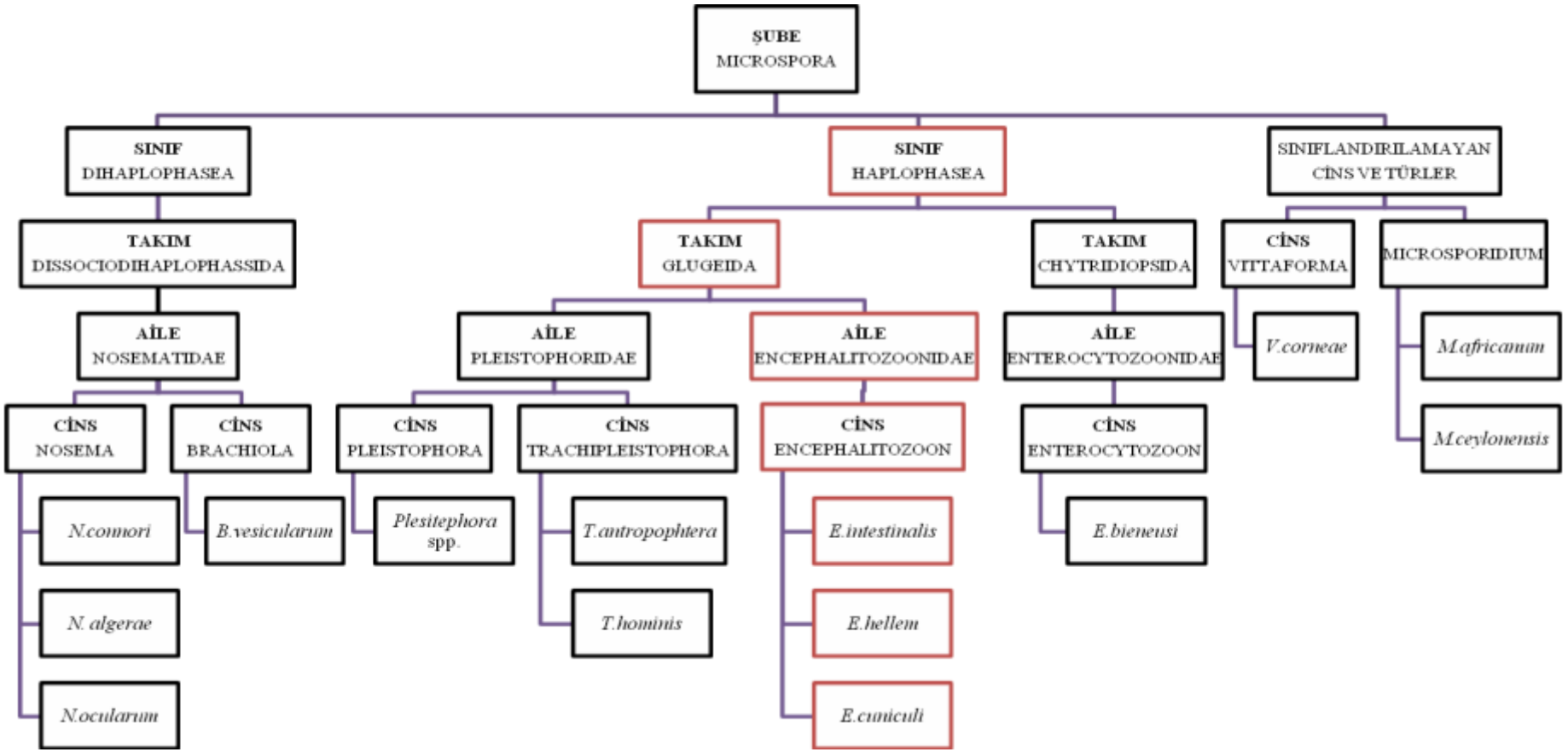
Mikrosporidian parazitlerin sınıflandırılmasında esas olan kriterler aşağıdaki gibidir (9,10);

- 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 bulunmakta olup bunlardan 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 (14).

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* (14).



Şekil 2.1 Mikrosporidian parazitlerin sınıflandırılması

2.2 Morfoloji

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 organizm olarak değerlendirilmektedirler (4, 15).

Meront, sporont, sporoblast ve spor parazitin hayat döngüsünde görülen dönemlerdir (3).

2.2.1 Merontların Morfolojisi

Büyük merkezi çekirdekli, yuvarlaklaşmış veya hafif oval şekilli ve bir plazma membranı ile kuşatılmış olan hücrelerdir. Sitoplazma homojen olarak granüllü ve ayrıca çok sayıda serbest ribozoma ve az gelişmiş endoplazmik retikuluma sahiptir. Merontlar ikili veya daha fazla füzyonla çoğalmaktadır (3).

2.2.2 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 (3).

2.2.3 Sporoblastların Morfolojisi

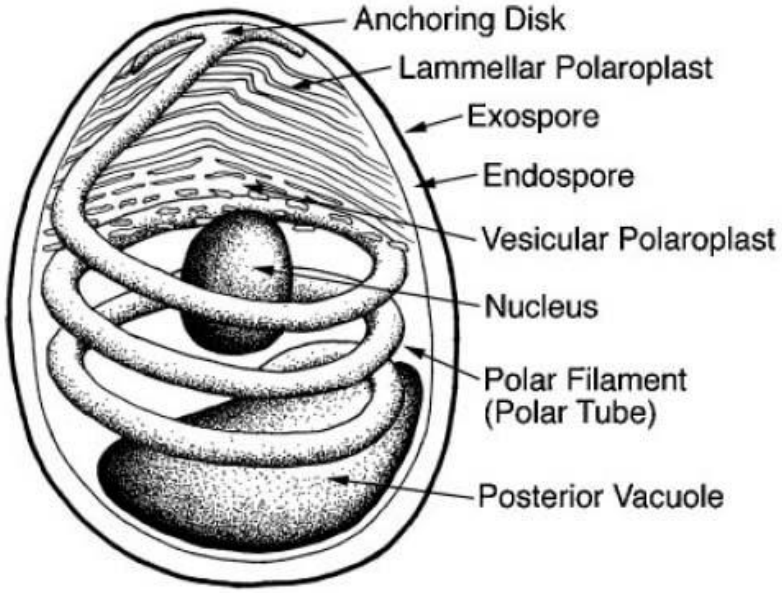
Sporonttan sonra oluşan dönemdir. Oval şekilli hücrelerdir ve bunların olgunlaşmasıyla olgun sporlar meydana gelir (3).

2.2.4 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 (3, 14).

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



Şekil 2.2 Spor morfolojisi (https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Microcell.jpg_copy.jpg)

2.2.4.1 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 (4, 14).

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 (4, 14).

Hücre membranı: En içte, sitoplazmayı kuşatan yaklaşık 7 nm kalınlığındaki tabakadır (4, 14).

2.2.4.2 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 (3, 4).

2.2.4.3 Ekstrüksiyon Aparatı

Ekstrüksiyon aparatı üç kısımdan oluşmaktadır. Bunlar; polar filament, polaroplast ve posterior vakuoldür (3, 4).

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 (3, 4).

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 (3, 4).

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 (4).

Zoonotik ve insanlarda enfeksiyon oluşturan türlerin morfolojik özellikleri Tablo 2.1'de verilmiştir (3, 14, 16).

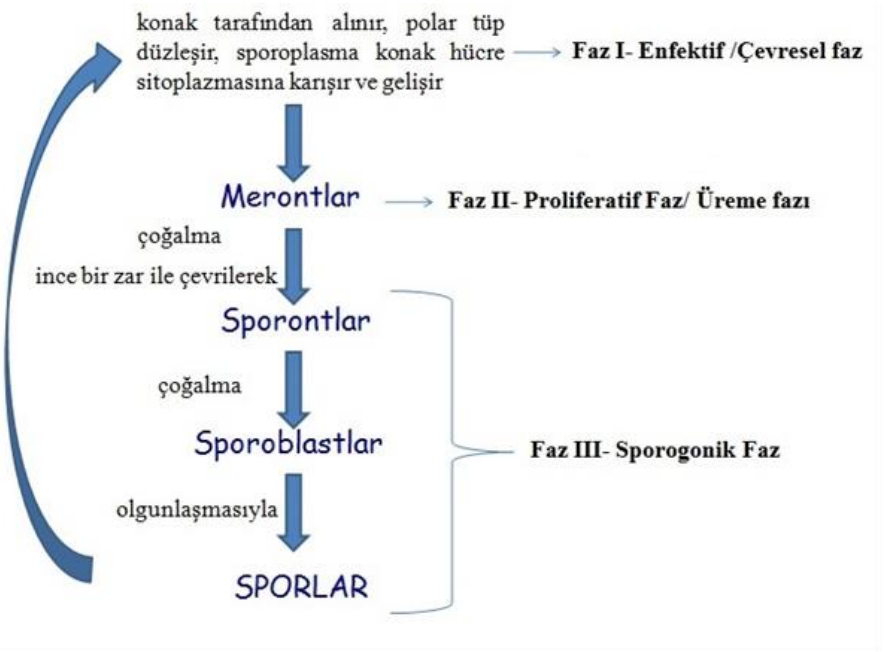
Tablo 2.1 Zoonotik karakterli ve insanlarda enfeksiyona yol açan microsporidia türlerinin morfolojik özellikleri

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

2.3 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.

2.3.1 Faz I-Enfektif (Çevresel) Faz

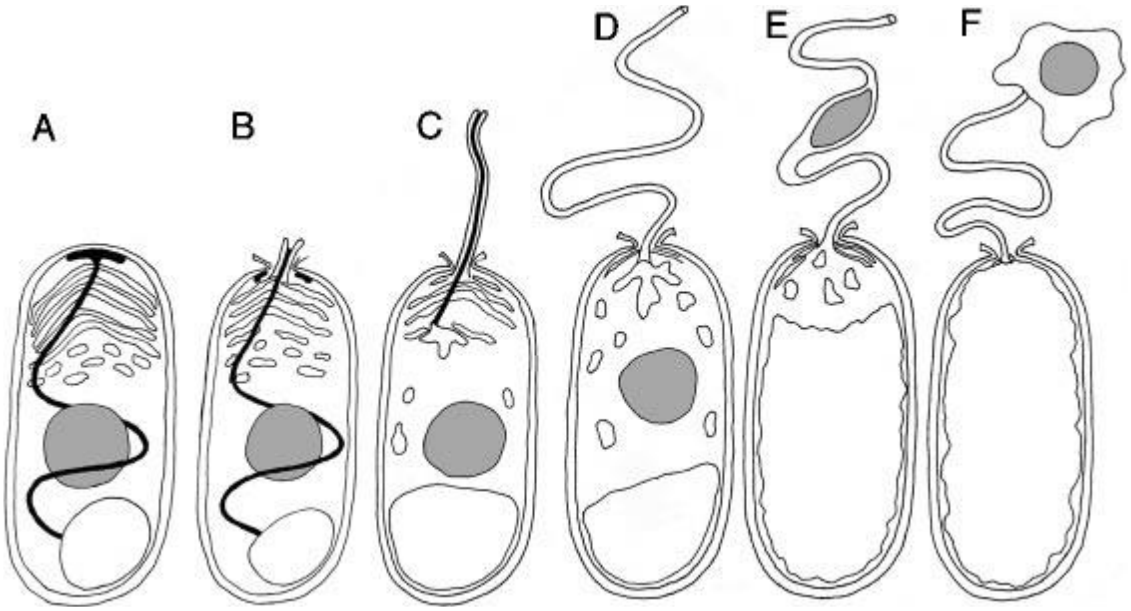
Parazitin hayat döngüsündeki ekstrasellüler fazdır. Çevresel şartlara dirençli olan ve uzun süre enfekte kalabilen sporlar solunum veya ağız yoluyla alınmaktadır. Konak vücuduna giren spor, konak hücre sitoplazmasına sporoplazmasını boşaltmaktadır (3, 4).

2.3.1.1 Mikrosporidian Parazitlerin Hücreye Giriş Mekanizmaları

Mikrosporidian parazitler hücre içerisine deneysel olarak gösterilmiş iki yol ile giriş yapmaktadır. Bunlar; Aktif invazyon ve Endositozis (3, 4).

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 (3, 4).



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 (15).

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 (3, 4).

2.3.2 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.

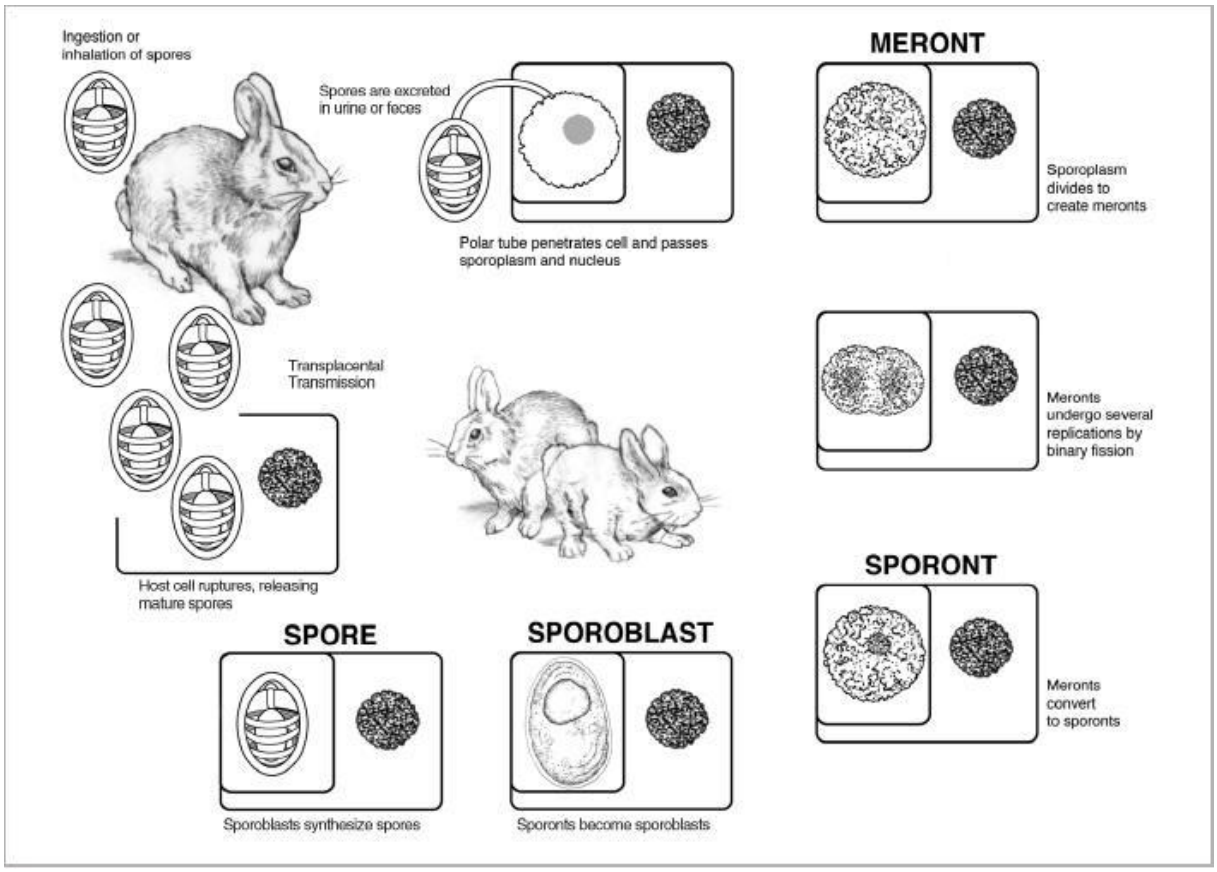
4-Konağın endoplazmik retikulumuyla çevrilerek. Vittaforma cinsine ait parazitler bu şekilde gelişimlerini sürdürmektedirler.

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 (3, 4).

2.3.3 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 (3, 4).

E. cuniculi'nin hayat döngüsü Şekil 2.5'de verilmiştir.



Şekil 2.5 *E. cuniculi*'nin hayat döngüsü (http://www.vetfolio.com/parasitology/encephalitozoon-cuniculi-infection-in-rabbits).

2.4 Epidemiyoloji, Patogenez ve Klinik

Encephatlitozoonosis'in ilk defa 1922'de Wright ve Craighead tarafından felçli laboratuvar farelerinden rapor edildiği bildirilmiştir (17, 18). O tarihten bu yana, tavşanlarda ve insanlarda *E. cuniculi* enfeksiyonları üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Parazitin insanlarda AIDS'li HIV hastalarında ve/veya immun sistemi baskılanmış (immunocompromised) diğer kişilerde opportunistik infeksiyonlara neden olduğu (7, 19-21), laboratuvar farelerinde planlanmış deneysel çalışmaları interfere ederek sık sık problemlere yol açtığı rapor edilmiştir (22). Parazit, tavşanlarda tercihen merkezi sinir sistemi, böbrekler ve gözlere yerleşir. Histolojik olarak lezyonlar beyin, böbreklerde gözlemlenmiştir (23). Bu yüzden laboratuvar hayvanları üzerinde bir deneysel çalışmayı başlatmadan önce hayvan materyalinin *E. cuniculi* infeksiyonu yönünden rutin bir serolojik test ile monitorize edilmiş olması gerekliliği genel bir laboratuvar prosedürü haline getirilmiştir (24).

Kendi cinsi içerisinde 1920'li yılların başlarında memelilerde tarif edilen ilk microsporidian *E. cuniculi*, çok geniş bir konak spektrumuna sahip olup kemiriciler ve tavşanlar, köpek, kedi, tilki ve egzotik karnivorlar, sığır, at, primatlar, insan (17) ve kanatlılarda (25) enfeksiyon meydana getirir. *E. cuniculi* enfeksiyonu primer olarak çiftlik ve laboratuvar tavşanlarında görülmektedir. Hasta tavşanlarda *E. cuniculi*, gözleri, böbrekleri ve beyini enfekte eder ve klinik olarak katarakt, baş dönmesi ve felç gibi klinik semptomlar ve ölüm görülebilir. Ayrıca veteriner hekimlikte, encephalitozoonosis evlerde yetiştirilen (pet) tavşanlarda yaygın olarak görülen nörolojik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte hasta hayvanların tedavisinde, seçenekleri değerlendirebilecek geliştirilmiş üniform bir "tedavi protokolü" de henüz bulunmamaktadır (24, 26). Öte yandan klinik olarak sağlıklı görünen tavşanların kanında %52 oranında spesifik antikor pozitifliği saptandığı rapor edilmiştir (27). Tavşanların dışında *E. cuniculi*, tavuklardan ve diğer kanatlılardan da izole edilmiştir. Yumurta yoluyla vertikal olarak nakledilen parazitin yol açtığı enfeksiyon embriyo ölümüyle seyretmektedir. Enfekte tavuklarda topallık ve buna bağlı hareketsizlik, orta dereceli ishal ve ağırlık kaybı meydana gelmektedir. Nekropsisi yapılan tavukların sindirim ve ürogenital kanallarından ve kaslarından parazit izole edilmiştir. Ayrıca embriyonların beyin ve kalpleri de te *E. cuniculi* ile enfekte bulunmuştur (28, 29).

Köpek ve kedilerde *E. cuniculi* enfeksiyonunun görüldüğü (30), deneysel enfekte köpeklerde histopatolojik lezyonlarin gösterildiği ancak hastalığın yetişkinlerde klinik semptomlara yol açmadığı, enfeksiyonun, transplasental yolla nakledildiği ve köpek yavrularının encephalitis-nefritisden ızdırap duydukları rapor edilmiştir. Enfekte köpek yavrularında klinik olarak körlük, ataksi ve kriz nöbetlerinden oluşan sinirsel bulgular gözlenmektedir (31). Köpeklerde encephalitozoonosis seropozitifliği üzeri yapılan çeşitli seroepidemiyolojik çalışmalarda değişik pozitiflik oranları rapor edilmiştir (18, 32-35).

Encephalitozoon cuniculi, mikrosporidian parazitler içerisinde, tek zoonotik karakterli tür olarak tarif edilmiş (7, 30) olmasına karşın *E. intestinalis* ve *E. hellem*'in farklı genotiplerinin ve *E. bieunesi*'nin de zoonotik potansiyeli olduğu son yıllardaki araştırmalarla ortaya çıkarılmıştır. Hali hazırda *E. cuniculi*'nin dört suşu karakterize edilmiş bulunmaktadır. Bunlardan Tip 1 tavşan, Tip 2 fare, Tip 3 köpek ve Tip 4 de insan genotipleri olarak karakterize edilmiştir (30, 31, 36) izole edilmiştir. Köpeklerin de bulunduğu ortak habitatlarda yaygın

görülen Tip 1 suşu insanlarda primer enfeksiyona yol açan suş olarak bilinmesine karşın Tip 3 suşunun da insanlar için yakın düzeyde enfektif olduğu kaydedilmiştir (30, 31, 37).

2.5 Tanı

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 (14, 38).

2.5.1 Tanıda Kullanılan Klinik Örnekler

Encephalitozoon türlerinin 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 sürüntü ve nadiren perifer kan örneğidir (39).

2.5.2 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 (38, 39).

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.

2.5.3 Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)

Günümüzde TEM, moleküler yöntemlerin uygulanmadığı laboratuarlarda halen tanımlamada kullanılan ve tür tayininde altın standart kabul edilen bir yöntemdir (40). 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 (40).

Mikrosporidiaların tanısında TEM yönteminin özgüllüğü yüksek olup duyarlılığı düşüktür. Örnek hazırlama aşamasının uzun ve pahalı olması yöntemin dezavantajları arasındadır (40).

2.5.4 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 (41).

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.

2.5.5 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 (42).

2.5.6 Moleküler Tanı Yöntemleri

Son yıllarda *E. cuniculi* üzerine bazı PCR tabanlı moleküler çalışmalar yapılmıştır. *E. cuniculi*'nin zoonotik bir tür olduğu anlaşıldıktan sonra, insan örneklerinin PCR-tabanlı teşhisi ve diğer mikrosporidialardan diferensiye edilmeleri, DNA sekansı yapılması ve genotpinin tayini ve zoonotik orijinin saptanması zorunlu hale gelmiştir (7). Elektron mikroskobik inceleme, çoğunun diferensiye edilmesine imkân sağlasa da bunun için mikrosporidia türlerinin tamamının hücre kültüründe üretilmesi gereklidir (7, 43, 44). Klinik uygulamalar için, ya tür spesifik (44) primerler veya geleneksel primerler kullanarak direkt PCR amplifikasyonları yapıldıktan sonra sekans analizi veya restrüksiyon fragment length-polimorfizm analizi gibi teknikler uygulanmaktadır (45). Alternatif olarak, teşhiste sensiviteyi artırmak için Nested PCR kullanılmıştır (46, 47). Tavşanlarda Nested PCR ile teşhis çok yaygın değildir. Ancak sensitiviteyi artırmak için uygulanabilir. *E. cuniculi* DNA'sı dokularda (48, 49) ve nested PCR ile enfekte tavşanların idrarlarında (50) tespit edilmiştir. Bununla beraber klinik olarak hasta hayvanların vücut sıvılarında PCR ile *E. cuniculi* DNA'sı araştırılmış ancak sonuç negatif olmuştur (49, 50). Doku örneklerinde, konvansiyonel veya nested PCR ile amplifikasyon, spesifik boyamadan sonra sporların histopatolojik tespitinden daha sensitif olarak rapor edilmiştir (49, 50). Öte yandan, phacoclastic uveitisli tavşanlarda phacoemilsifikasyondan sonra hazırlanmış lens materyalinde *E. cuniculi*'nin saptanması için PCR'ın çok daha uygun olduğu bildirilmiştir (26, 49).

Encephalitozoonosis'in monitorize edilmesinde serolojik testler yaygın kullanılan yöntemlerdir. Ancak, kronik *E. cuniculi* enfeksiyonuna karşı oluşmuş antikorların varlığının serolojik olarak gösterilmesi hastalığı yapan patojeni doğrulamaz (18). Hastalığın kesin teşhisi canlı hayvanlarda zordur. Genellikle kesin teşhis, örneğin tavşanlarda veya köpek yavrularında klinik-nörolojik/oftalmolojik muayene bulguları, serolojik pozitiflik ve ayrıcı teşhis sonuçlarının bir araya gelmesi ve moleküler analizlerin konfirmasyonuyla olabilmektedir.

Vücut sekresyonlarında ve sıvılarında *E. cuniculi* DNA'sının PCR ile saptanması, patojenin varlığının doğrulanmasında oldukça sensitif ve spesifiktir. Ancak henüz dünyada köpeklerde encephalitozoonosis üzerine yapılan moleküler çalışmalar sınırlıdır. İran'da sağlıklı ve asemptomatik sokak köpekleri ve kedilerde PCR ile yapılan bir çalışmada, 100 köpeğin 31'inde (%31) mikrosporida türleri, 18'inde (%18) *E. cuniculi*, 8'inde (%8) *E. bieneusi*, 5'inde (%5) *E.*

intestinalis; 40 kedinin 3'ünde (%7.5) *E. bieneusi* saptanmıştır (51). Öte yandan Türkiye'de bu güne kadar mikrosporialar üzerine yapılmış çalışmaların (52-58) oldukça sınırlı olduğu ve insan enfeksiyonları üzerine yapıldığı görülmekte olup köpeklerde microsporidia enfeksiyonları üzerine ise yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hayvan Materyali, Kan ve Dışkı Örnekleri

Çalışmanın materyalini, Kayseri yöresindeki farklı yaş, ırk ve cinsiyetteki sahipli ve sokak köpeklerinden daha önce ERU Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından desteklenen "Kayseri ve Yöresi Köpeklerinde Filaria Enfeksiyonlarının ELISA ve Membran Filtrasyon Asit Fosfataz Histo Kimyasal Boyama Yöntemleri ile Araştırılması" başlıklı ve VA-05-04 kodlu ve TÜBİTAK tarafından desteklenen "Kayseri ve Civarında Köpeklerde Leishmaniosis'in Nested-PCR ile Moleküler Biyolojik Tanısı" başlıklı ve 104O302 kodlu araştırma projeleri kapsamında Kayseri'nin çeşitli bölgelerindeki köpeklerden toplanmış ve Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Cryo-Bankında (-20°C) muhafaza edilen toplam 400 adet EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) kan örneği ile "Kayseri Yöresi Koyun, Sığır ve Köpeklerinde Echinococcosis'in Prevalansı ve Cystic Echinococcosis'e Bağlı Ekonomik Kayıpların Araştırılması" başlıklı ve VA-06-07 kodlu araştırma projesi kapsamında Kayseri'nin çeşitli bölgelerindeki köpeklerden toplanmış ve Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Cryo-Bankında (-80°C) muhafaza edilen toplam 282 adet dışkı örneği oluşturmuştur.

Araştırmaya dâhil edilen örneklerin örnek toplama merkezi, yaş, cinsiyet, ırk, ve sahipli/sokak köpeği olma durumuna göre dağılımları Tablo 3.1-3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kan örneklerinin toplama merkezi, yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma durumuna göre dağılımları

Araştırma Merkezi	Köpek sayısı									
	Yaş (yıl)			Cinsiyet		Irk		Sahipli/Sokak		TOPLAM
	0,5-3	4-6	7-10	Erkek	Dişi	Küçük	Büyük	Sahipli	Sokak	
Kayseri Merkez	152	37	11	63	137	79	121	151	49	**200**
İncesu	31	12	6	20	29	22	27	26	23	**49**
Pınarbaşı	16	6	4	7	19	9	17	19	7	**26**
Felahiye	15	7	3	9	16	9	16	14	11	**25**
Talas	30	13	3	15	31	17	29	34	12	**46**
Tomarza	14	9	1	7	17	10	14	14	10	**24**
Yahyalı	12	16	2	8	22	10	20	19	11	**30**
TOPLAM	**270**	**100**	**30**	**129**	**271**	**156**	**244**	**277**	**123**	**400**

Tablo 3.2. Dışkı örneklerinin toplama merkezi, yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma durumuna göre dağılımları

Araştırma Merkezi	Köpek sayısı									
	Yaş (yıl)			Cinsiyet		Irk		Sahipli/Sokak		TOPLAM
	1-3	4-6	7-10	Erkek	Dişi	Küçük	Büyük	Sahipli	Sokak	
Kayseri Merkez	101	34	5	87	53	62	78	74	66	**140**
İncesu	22	9	3	20	14	12	22	20	14	**34**
Pınarbaşı	10	5	3	10	8	6	12	10	8	**18**
Felahiye	11	6	2	13	6	5	14	11	8	**19**
Talas	21	8	3	25	7	11	21	19	13	**32**
Tomarza	9	6	3	11	7	5	13	9	9	**18**
Yahyalı	14	4	3	12	9	10	11	12	9	**21**
TOPLAM	**188**	**72**	**22**	**178**	**104**	**111**	**171**	**155**	**127**	**282**

3.2 LABORATUAR ÇALIŞMALARI

3.2.1 Kan Örneklerinden Genomik DNA Ekstraksiyonu

Köpek kanlarından DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. Analize tabi tutulana kadar -20˚C'de muhafaza edilen EDTA'lı kan örnekleri ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen örneklerden DNA ekstraksiyonu, Axygen Firmasına ait AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit'inin prosedürüne göre yapılmıştır. Final elüsyon 50µl olacak şekilde ayarlanmış ve elde edilen DNA miktarları Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir.

Ekstraksiyon işlemine başlamadan önce ticari kitin prosedürüne göre Buffer W1A ve Buffer W2A solusyonları üzerine %100'lük ethanol eklenmiştir. Kit, kullanılana kadar oda ısısında muhafaza edilmiştir.

Ticari kitin önerileri doğrultusunda DNA ekstraksiyon işlemi şu şekilde yapılmıştır:

1. İşleme başlamadan önce, kan örnekleri vorteksle homojenize edildi. İşlenecek numune sayısına göre, örneklerin karışmaması amacıyla ependorf tüplerinin üzerine hayvanlara ait protokol numaraları yazıldı. Kit içerisinde bulunan Buffer TE, önceden ısısı 65 ºC'ye ayarlanmış su banyosu içerisine konuldu.

2. 1.5 ml'lik ependorflara 500 µl Buffer AP1 eklendi.

3. Herbiri farklı sığıra ait kan örneklerinden 200 µl kan, pipetle alınarak protokol numaralarına göre ependorflara ilave edildi. Tüplerin ağızları kapatılarak 10 saniye vortekslendi.

4. İyice vortekslenen örneklerin üzerine 100 µl Buffer AP2 ilave edilerek ependorf tüpleri tekrar vortekslendi.

5. Örnekler oda ısısında 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücresel kısımların dibe çökmesi sağlandı.

6. Her bir örnek için 2 ml'lik ependorf tüplerine miniprep kolon yerleştirildi. Santrifüj işlemi sonucu üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla alınarak miniprep kolonlar içerisine konularak 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

7. Santrifügasyon sonucu, süpernatant içerisinde parazite ait genomik DNA varsa, bunlar DNA'yı tutma özelliğinde olan miniprep column'da kaldı ve geri kalan süpernatant da 2 ml'lik ependorfların dip kısımlarına süzüldü. Dibe çöken süpernatantlar döküldü ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. Miniprep kolonlar içerisine ilk yıkama solusyonu olan 700 µl Buffer W1A ilave edilerek oda ısısında 2 dakika bekletildi. Sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

8. Miniprep kolondan süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı uzaklaştırıldı. Miniprep kolonlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. İçerisine ikinci yıkama solusyonu olan Buffer W2A'dan 800 µl ilave edildi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

9. Süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılarak miniprep kolonlar bu tüplere geri yerleştirildi. Bu basamakta ikinci yıkama solusyonu Buffer W2A'dan 500 µl eklenip 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek tekrar yıkama işlemi yapıldı. Bu son yıkama opsiyonel olarak yapılan bir işlem olup sekanslama işlemlerinde problem teşkil edebilecek tuz ve enzimlerin tamamen elimine edilmesi amacıyla yapılmıştır.

10. Yıkama işlemi sonucu dibe süzülen sıvı kısım uzaklaştırılarak miniprep columnlar boş ependorflar içerisine yerleştirildi. Herhangi bir solusyon eklenmeden boş tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solusyonları içerisindeki ethanolün tamamen uçması sağlandı.

11. Herbir örneğe ait miniprep kolonlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine, önceden 65 ^{o}C'lik su banyosuna konulmuş olan Buffer TE'den 80 µl ilave edilerek oda ısısında 1 dakika bekletildi. Daha sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edildi. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20 ^{o}C) muhafaza edildi.

3.2.2 Dışkı Örneklerinden Genomik DNA Ekstraksiyonu

Dışkı örneklerinden genomik DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. -20 ^{0}C'de muhafaza edilen örnekler ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Su eter yöntemi ile çoklaştırılan örneklerden DNA ekstraksiyonu QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Germany) ile aşağıdaki gibi yapılmıştır.

1- Çoklaştırma yöntemi ile elde edilen pellet üzerine 1.4 ml ASL buffer ve 5mm glass bead (Sigma-Aldrich, Germany) eklenmiştir. Homojenizatöre (Tissue Lyser LT; Qiagen) yerleştirilen örnekler 2 dk vortekslenmiştir.

2. Vortekslenen örnekler sporların daha iyi parçalanması için 5 siklus önce sıvı azotta dondurulmuş ve hemen ardına tüpler kaynayan su içerisine konularak 5 dk kaynatılmıştır.

3. Kaynama işlemi sonunda örnekler tekrar homojenizatöre yerleştirilerek 20 sn vortekslenmiştir.

4. Vortekslеme işlemi sonunda örnekler 15300 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

5. Üst sıvı 2 ml'lik yeni bir ependorfa aktarılmış ve üzerine kit içerisinde yer alan InhibitEX tablet eklenmiştir. Tablet tamamen homojen olana kadar vortekslenen örnekler sonrasında 1 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.

6. İnkübasyon sonrasında örnekler 15300 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir.

7. Üst sıvı 2.5 ml'lik yeni bir ependorfa alınarak yeniden 15300 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir.

8- Yeni 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. Vortekslemeişlemi sonrasında elde edilen karışım spin koluma (kit içerisinden) aktarılmış ve 15300 rpm'de 1 dk santrifüj edilmistir.

13. QIAamp spin kolumu yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra üzerine 500 µl Buffer AW1 eklenmiş ve 15300 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

14. QIAamp spin kolumu yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra üzerine 500 µl Buffer AW2 eklenerek 15300 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir.

15. QIAamp spin kolumu yeni 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra 15300 rpm'de 1 dk boş santrifüj edilmiştir.

16. QIAamp spin kolumu yeni 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiş ve kolum membranının direkt üzerine 100 µl AE buffer eklenmiştir.

17. Kolum oda ısısında 1 dk inkübe edildikten sonra 15300 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek genomik DNA elde edilmiştir.

18. Elde edilen DNA kullanılana kadar - 20°C'de saklanmıştır.

Elde edilen genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir.

3.2.3 Tür Spesifik Primerlerle Small Subunit (SSU) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Genomik DNA ekstraktları *Encephalitozoon cuniculi, E. intestinalis, E. hellem ve Enterocytozoon bieneusi* için SSU rRNA geninin sırasıyla 549 bp, 527 bp, 547 bp ve 607 bp kısmını parsiyel olarak amplifiye eden yine sırasıyla tür spesifik ECUNF (5' -ATGAGAAGTGATGTGTGTGCG-3') / ECUNR (5' -TGCCATGCACTCACAGGCATC-3') (59); SINTF (5' -TTTCGAGTGTAAGGAGTCGA-3') / SINTR 5' – CCGTCCTCGTTCTCCTGCCCG-3') (60); EHELF (5'-TGAGAAGTAAGATGITTTAGCA-3') / EHELR (5'-GTAAAAACACTCTCACACTCA-3') (60) ve EBIEF1 (5'-GAAACTTGTCCAC TCCTTACG-3') / EBIER1 (5'-CCATGCACCACTCCTGCCATT-3') primerleri ile ayrı ayrı PCR analizlerine tabii tutulmuştur (59). Mater mix tüm reaksiyonlar için

25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımları; 10X PCR buffer, [6 mM MgCl2 1. PCR; 3mM MgCl2 2. PCR], 100 nM her bir primer, 200 mM dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase olarak ayarlanmış ve 50ng/µl template DNA kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 94 ℃'de 5 dk; 35 siklus, denaturation: 94℃'de 30 s, annealing: 55℃'de 30 sn (*E. intestinalis* için 45℃), extension: 72℃'de 1,5 dk; final extension: 72℃'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (61). PCR geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen referans microsporidia izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

3.2.4 Small Subunit (SSU)-Intergenic Spacer- Large Subunit (LSU) rRNA Geninin Amplifikasyonu

Tür spesifik SSU rRNA analizleri ile pozitif belirlenen örneklere ait genomik DNA izolatları Microsporidia Small Subunit (SSU)-Intergenic Spacer- Large Subunit (LSU) rRNA gen bölgesininin *E. cuniculli* için 290-311 bp, *E. intestinalis* için 288 bp ve *E. hellem* için de 310 bp kısmını parsiyel olarak amplifiye eden primerlerle Nested PCR analizlerine tabii tutulmuştur. Nested PCR'ın birinci basamağında MSP-1 (5'-TGA ATG(G/T) GTC CCT GT-3') ve MSP-2A (5'-TCA CTC GCC GCTACT-3') primerleri, ikinci basamağında ise MSP-3 (5'-GGA ATTCAC ACC GCC CGT C(A/G) (C/T)TA T-3') and MSP-4A (5'-CCAAGC TTA TGC TTA AGT(C/T) (A/C) AA(A/G)G GGT-3') iç primerleri kullanılmıştır (14, 46). Reaksiyon karışımları 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımları; 10X PCR buffer, [6 mM MgCl2 1. PCR; 3mM MgCl2 2. PCR], 100 nM her bir primer, 200 mM dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase olarak ayarlanmıştır. İlk PCR reaksiyonunda 50ng/µl template DNA, ikici PCR raksiyonunda ise ilk PCR ürününden 1 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda her iki PCR için de protokol initial denaturation: 94 ℃'de 5 dk; 40 siklus, denaturation: 94℃'de 1 dk, annealing: 55℃'de 30 s, extension: 72℃'de 1 dk; final extension: 72℃'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (62). PCR geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen referans microsporidia izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

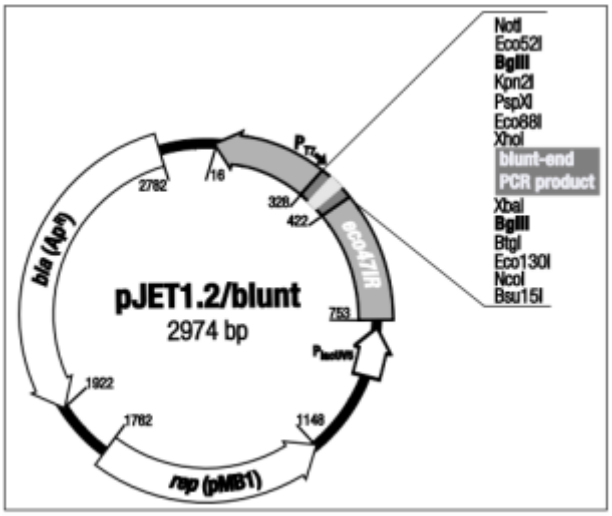
3.2.5 Klonlanlama ve Plazmid DNA İzolasyonu

PCR analizleri sonucu elde edilen amplikonlar jel pürifikasyon işlemleri sonrası sekans ve filogenetik analizler amacıyla klonlama ve plazmid pürifikasyon işlemlerine tabii tutulmuştur.

Klonlama prosedürlerinin ligasyon basamağında ilgili gen bölgesine ait amplikonlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Jel pürifiye örneklerin klonlanmasında CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonu üreticinin açıklamaları doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

2X Reaction Buffer	10 µl
PCR product	1-5 µl (~10ng/µl)
Nuclease free water	17 µl'ye kadar
DNA Blunting Enzyme	1 µl
Toplam	18 µl

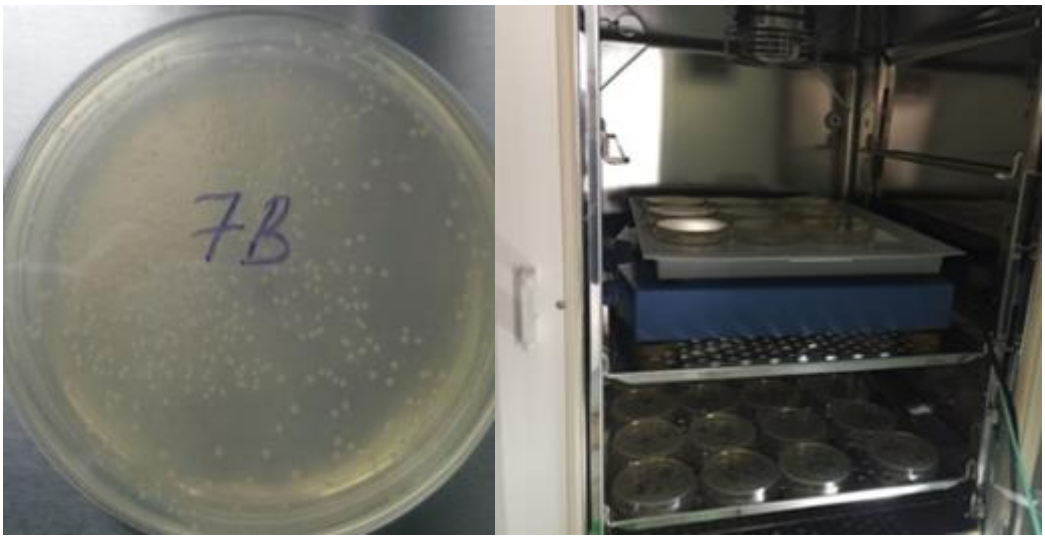
Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70°C'de su banyosunda 5 dk inkübe edilerek hemen buz üstüne alınmıştır. Karışım üzerine daha sonra 1 µl pJET1.2/blunt CloningVector (50 ng/ µl) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenerek son hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 25 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt Cloning Vector haritası Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 pJET1.2/blunt cloning vector haritası

Klonlama prosedürünün transformasyon basamağında 5 µL'lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan *E. coli* TOP 10 hücreleri üzerine eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk inkübasyona

bırakılmıştır. Sonra hücreler önce 42°C'de 2 dk daha sonra buz üzerinde 4 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL SOC Medium eklenmiştir. 37°C'de çalkalayıcı üzerinde 1,5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı uygun konsantrasyonda ampicilin ihtiva eden LB (Lurie-Bertani) katı besi yerine ekilerek kolonilerin gelişimi için bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. LB katı besi yerinde üreyen kolonilerden (Şekil 3.2) izolat başına 2 koloni seçilmiş ve steril pipet uçları ile bu koloniler alınarak işaretlenmiş LB katı besi yeri içeren pleytler üzerine (her pleyt dörde bölünerek her bölmeye bir koloni geçilmiştir) tekrar ekilerek 37°C'de 1 gece daha inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.2 LB katı besi yerinde üreyen koloniler

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plasmidi içerip içermediğini anlamak için aynı koloniye ait her bir işaretlenmiş bölgeden tek bir koloni seçilerek koloni secreening PCR yapılmıştır. Koloni PCR'da vektör spesifik pJET1.2 forward ve pJET1.2 reverse primerleri (Thermo Scientific) kullanılmıştır. PCR sonucu oluşan amplikonlar %1.5'luk agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiş ve vektör+insert varlığı yönünden konfirmasyonu sağlanmıştır.

Vektör+insert varlığı yönünden konfirme edilen kolonilerden (İşaretlenmiş pleytlerde aynı bölmede bulunan koloniler) en az iki adedi seçilerek steril özeler ile alınmış ve uygun konsantrasyonda ampicilin ihtiva eden 5 ml hacimde LB sıvı besi yerlerine ekimleri yapılarak 37°C'de çalkalayıcı üzerinde bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Kolonilerin LB sıvı besi yerinde üretilmesi

Sıvı besi yerinde üretilen hücrelerden 2 ml alınarak 8000 rpm'de 2 dk santrifüj işlemine tabii tutulmuş ve hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp hücresel pelet GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ile plazmid pürifikasyonuna alınmış, aynı örneklere ait diğer bir kısım hücresel pelletler ihtiyaç halinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza altına alınmıştır. Elde edilen plazmidler insertlerin varlığı yönünden vektör spesifik pJET1.2 forward ve pJET1.2 reverse primerleri ile prosedürüne uygun olarak PCR'da analize tabi tutulmuştur.

3.2.6 Sekans ve Filogenetik Analizler

İlgili gen bölgesi için elde edilmiş olan plazmid DNA'lar pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 9.1.3 (63) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin pairwise alignmentları yapılarak, vektör DNA'sı ile kıyaslanmış, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlemiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'ta mevcut homolog izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla Geneious 9.1.3 (63) yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid farklılıkları belirlenmiştir. Filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Bayesian (BA) ve Maximum Likelihood (ML) analizleri uygulanmıştır. BA ve ML analizlerinde sekans evrimi için en uygun modelin belirlenmesinde jModeltest v.0.1.1 (64) kullanılmış ve en düşük Akaike Bilgi Kriteri (AIC) değerine sahip TIM3 + Gamma distributed modeli filogenetik ağaçların

oluşturulmasında kullanılmıştır. Bayesian analizleri Geneious 8.1.8 (63) yazılımı üzerinden MrBayes (65) ve PHYML (66)pluginler kullanılarak gerçekleştirilmiş, Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100,000 jenerasyon için 4 zincirle ve ağaç örneklemesi her 200 jenerasyonda bir (ilk 100,000 ağaç "burn in" olarak çıkarılmıştır). Karakterizasyonu sağlanan tüm izolatların GenBank kayıtları sağlanmıştır.

3.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

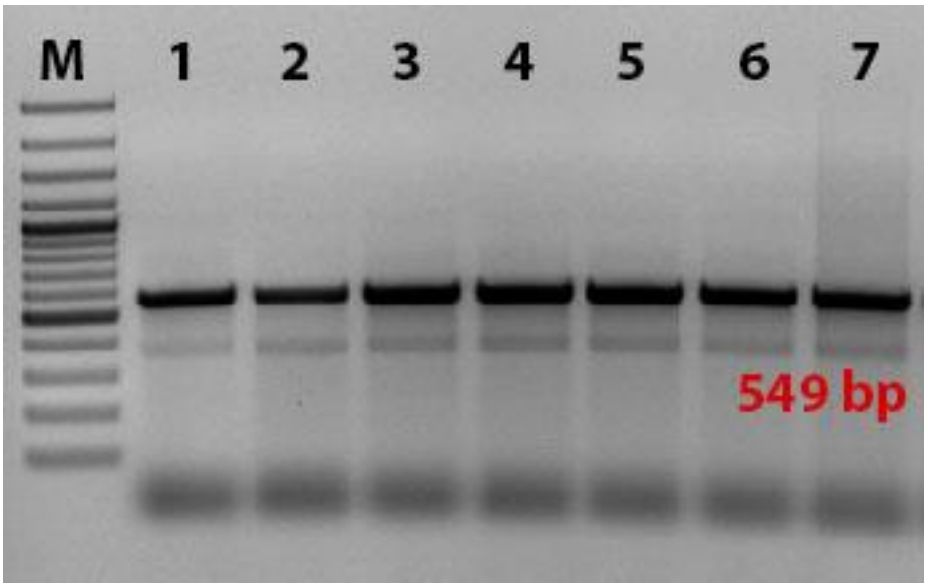
İstatistik analizler IBM SPSS Statistics 20 yazılımında gerçekleştirilmiştir. İncelenen köpeklerde microsporidiosis prevalansı ile yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği faktörlerinin ilişkisi Pearson's Chi Square testi ile araştırılmıştır.

4. BULGULAR

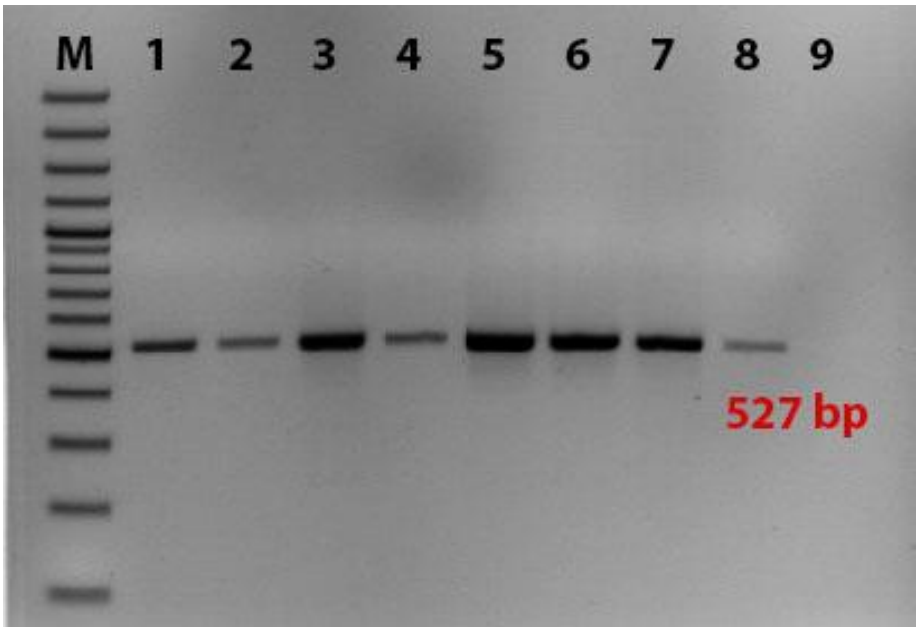
4.1 MİCROSPORİDİA ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE PREVALANSI

SSU rRNA gen bölgesi tür spesifik PCR analizleri sonucunda, incelemesi yapılan toplam 282 köpeğe ait dışkı örneğinin 41'i (%14,5) microsporidia etkenleri yönünden pozitif bulunurken incelenen 400 adet kan örneğinde pozitiflik belirlenmemiştir. Microsporidia pozitif belirlenen 41 dışkı örneğinin 35'inde *E. intestinalis*, altısında ise *E. cuniculi* identifiye edilmiş, *E. hellem* ve *E. beunesi* pozitifliğine rastlanmamıştır. Ayrıca enfeksiyonların tek türle olduğu belirlenmiş, identifiye edilen iki türle miks enfeksiyonlara rastlanmamıştır.

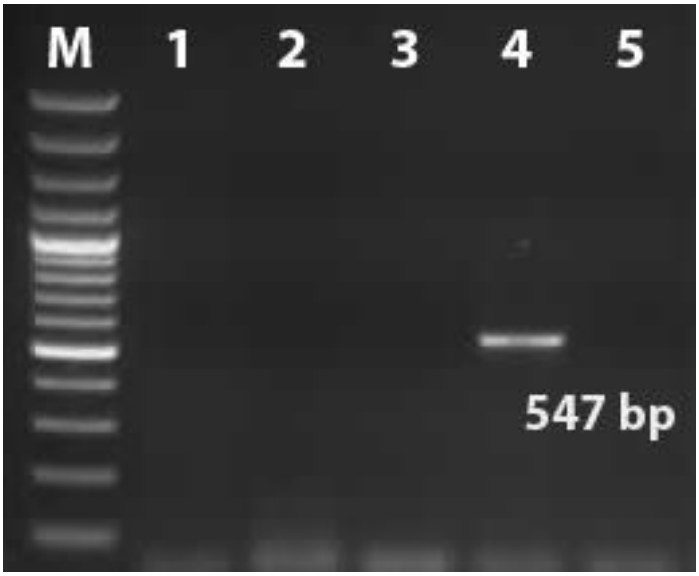
Dışkı örneklerine ait genomik DNA izolatlarının *E. cuniculi* ve *E. intestinalis* tür spesifik primerleriyle SSU rRNA gen bölgesi amplifikasyonları sonucu pozitif izolatlarda hedef büyüklükte amplikonlar saptanmış olup bazı örnekler için belirlenen amplikonların agaroz jel üzerinde görünümleri sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. Yapılan analizlerde *E. hellem* ve *E. beunesi* için tür spesifik primerlerle pozitiflik saptanmamış ancak referans izolatların hedef büyüklükte amplikonlar (Şekil 4.3, Şekil 4.4) verdiği belirlenerek PCR metodolojisinin etkinliği ortaya konmuştur.



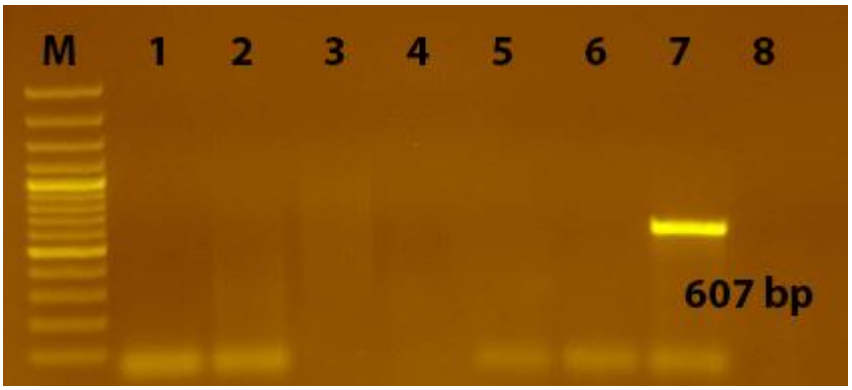
Şekil 4.1 *E. cuniculi* pozitif belirlenen izolatlara ait SSU rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1-6: Pozitif örnekler; 7: Referans DNA izolatı



Şekil 4.2 *E. intestinalis* pozitif belirlenen izolatlara ait SSU rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1-4, 6-8: Pozitif örnekler; 5: Referans DNA izolatı; 9: No DNA



Şekil 4.3 *E. hellem* SSU rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu jel elektroforezde görünüm M: Marker (100bp); 1-3: Negatif örnekler; 4: Referans DNA izolatı; 5: No DNA



Şekil 4.4 *E. beunesi* SSU rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu jel elektroforezde görünüm M: Marker (100bp); 1-6: Negatif örnekler; 7: Referans DNA izolatı; 8: No DNA

Microsporidia etkenleri ile pozitif belirlenen örneklerin köpeklerin çeşitli faktörlerine göre dağılımları Tablo 4.1'de verilmiştir. Tablo 4.1'de görüleceği üzere microsporidia enfeksiyonları en yüksek 1-3 yaş grubunda belirlenmiş bunu 7-10 ve 4-6 yaş grupları takip etmiştir. Erkek ve dişi köpeklerde enfeksiyon oranları yakın olmakla birlikte erkeklerde yüksek bulunmuştur. Büyük ırk köpeklerde küçük ırklara oranla ve sokak köpeklerinde sahipli köpeklere oranla prevalansın daha yüksek olduğu saptanmıştır. Köpeklerin sahipli veya sokak köpeği olma faktöründeki farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p>0,05$) bulunurken diğer tüm kategorilerdeki farklılıklar önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Microsporidia türlerinin köpeklerin çeşitli faktörlerine bağlı olarak dağılımları ve istatistik analiz sonuçları

Faktör	**İncelenen Hayvan Sayısı**	**Microsporidia türü**						**Paerson Chi-Square**	
		E. intestinalis		***E. cuniculi***		**TOPLAM**			
		PH	**%**	**PH**	**%**	**PH**	**%**	**χ^2**	**p**
Yaş (yıl)									
1-3	188	29	15,4	4	2,1	33	17,6	4,132	0,127
4-6	72	5	6,9	1	1,4	6	8,3		
7-10	22	1	4,5	1	4,5	2	9,1		
Cinsiyet									
Erkek	178	23	12,9	4	2,2	27	15,2	0,695	0,730
Dişi	104	12	11,5	2	1,9	14	13,5		
Irk									
Küçük	111	10	9,0	2	1,8	12	10,8	0,152	0,170
Büyük	171	25	14,6	4	2,3	29	17,0		
Sahipli/Sokak									
Sahipli	155	14	9,0	1	0,6	15	9,7[a]	0,011	0,017
Sokak	127	21	16,5	5	3,9	26	20,5[b]		
TOPLAM	**282**	**35**	**12,4**	**6**	**2,1**	**41**	**14,5**		

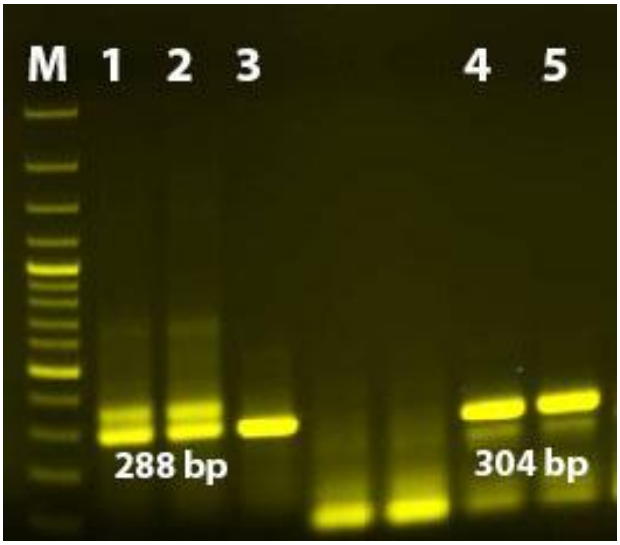
PH: Pozitif hayvan sayısı

[a,b]: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki farklılık önemlidir ($p<0,05$)

4.2 GENOTİPLENDİRME, SEKANS VE FİLOGENETİK ANALİZLER

4.2.1 SSU-Intergenic Spacer-LSU rRNA Geninin Amplifikasyon Sonuçları

Tür spesifik SSU rRNA analizleri ile *E. cuniculli* ve *E. intestinalis* yönünden pozitif belirlenen genomik DNA izolatları microsporidia small subunit (SSU)-intergenic spacer- large subunit (LSU) rRNA gen bölgesine göre genotiplendirme ve sekans analizleri için ilgili primer çiftleri ile nested PCR'da amplifiye edilmiş ve her iki tür için agaroz jel üzerinde hedef büyüklükte DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 4.5).

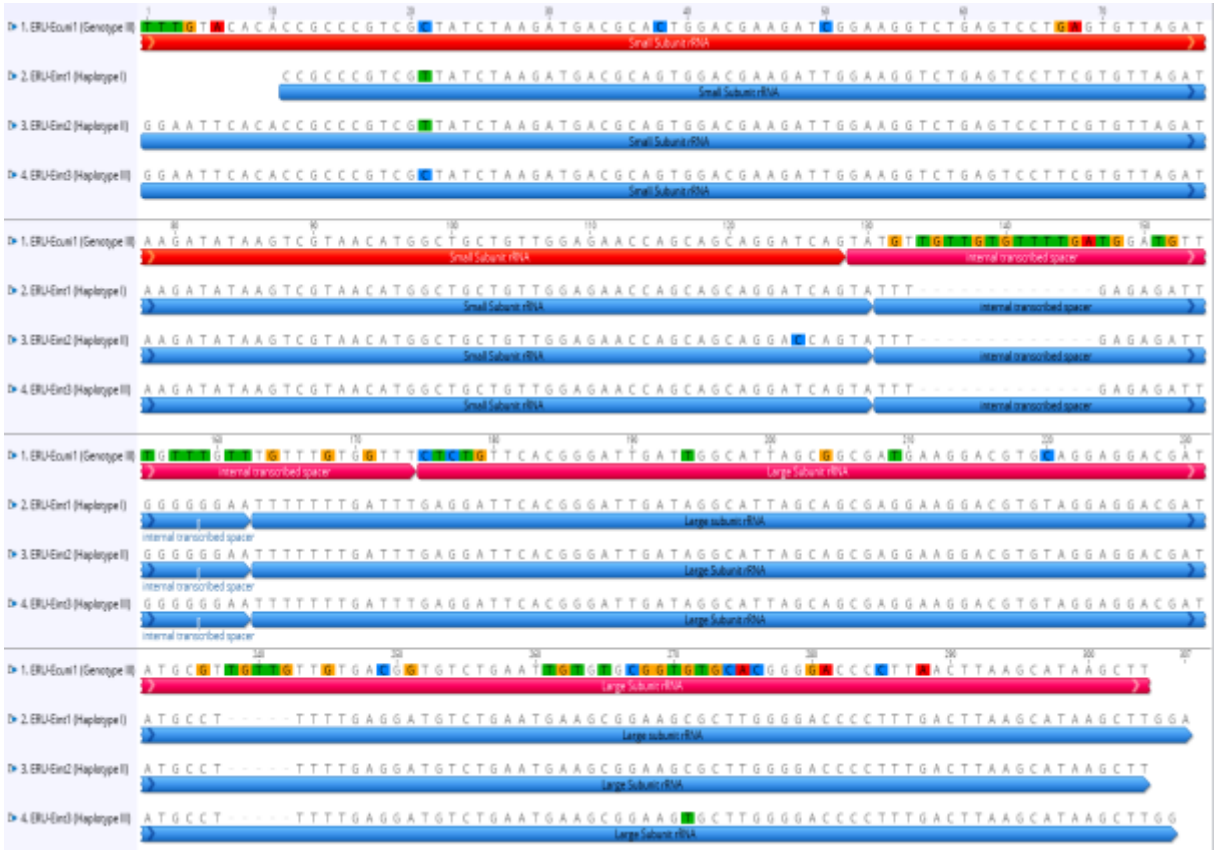


Şekil 4.5 İzolatların SSU-Intergenic Spacer-LSU rRNA geninin amplifikasyonu sonucu agaroz jel üzerinde görünümleri. 1-3: *E. intestinalis*; *4,5: E. cuniculi*

4.2.2 Sekans Analizi ve Genotiplendirme Sonuçları

Çalışmada *E. intestinalis* için 10 izolat ve *E. cuniculi* için de tüm izolatların (6 izolat) SSU-Intergenic Spacer-LSU rRNA gen bölgesi nükleotid dizileri klonlama ve sonrasında elde edilen plazmidlerin sekanslanmasıyla elde edilmiştir. *E. intestinalis* sekansları arasında 285 (%99,0) identik bölge belirlenirken 3 farklı haplotipi ortaya koyan toplam 3 polimorfik bölge saptanmıştır. *E. intestinalis* izolatları için ortalama nükleotid diversitesi %0,44±0,18 belirlenmiştir. *E. cuniculi* sekansları arasında polimorfik bölge bulunmamış ve buna bağlı olarak da bir haplotip belirlenmiştir. Karakterizasyonları yapılan haplotip bazında izolatlarının nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Karakterizasyonları yapılan *E. cuniculi* izolatlarının tümünün Genotip III (Köpek genotipi) oldukları saptanmıştır. *E. cuniculi* Genotip III'e özgü "internal transcibed spacer" gen bölgesinde "GTTT" üçlü sıralı tekrarı ilgili haplotipe ait nükleotid sekansı üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.7). Haplotip ve

genotip bazında karakterize edilen izolatlar KX925857-KX925860 aksesyon numaraları ile GenBank veri tabanına kayıt edilmiştir.



Şekil 4.6 Haplotip ve genotip bazında karakterize edilen microsporidia türlerine ait izolatların SSU-Intergenic Spacer-LSU rRNA gen bölgesi nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları



Şekil 4.7 ERU-Ecuni1 izolatına ait internal transcribed spacer gen bölgesinde *E. cuniculi* Genotip III'e özgü sıralı nükletid tekrarları

4.2.3 Filogenetik Analiz Sonuçları

Moleküler olarak karakterize edilen microsporidia türlerine ait izolatların Dünyada çeşitli bölgelerden izole edilmiş homolog izolatlarla birlikte çoklu hizalama identiklik oranları Tablo 4.2'de, filogenetik yapılanmaları da Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Bayesian ve Maksimum likelihood analizleri benzer topoloji göstermiş ve Bayesian filogenetik ağacı üzerinde posterior olasılıklar ve bootstrap değerleri (1000 replikasyon) birlikte gösterilmiştir. Analize dahil edilen izolatların tür ve genotip bazında kümelenme gösterdikleri belirlenmiş olup bu filogenetik yapılanma ayrıca yüksek posterior olasılık ve bootstap değerleriyle desteklenmiştir. Çalışmada karakterize *E. intestinalis* haplotiplerinin kendi aralarında genetik farklılığı %0,6±0,4 belirlenirken dünyadan çeşitli konaklardan izole edilmiş homolog izolatlarla (Şekil 4.8) bu farklılık %1±0,4 olarak saptanmıştır. ERU-Eint1-3 olarak isimlendirilen *E. intestinalis* haplotipleri en yüksek identikliği ortalama %99,7 (%99,6-%100) ile Almanya'dan rapor edilmiş izolatla (GenBank aksesyon: Y11611) göstermiştir. Yine aynı izolatlar İran'da bir güvercinden izole edilmiş izolatla da (GenBank aksesyon: JF792394) %99,6 oranında yüksek identik bulunmuştur. Genotip III'de yer aldığı belirlenen *E. cuniculi* ERU-Ecunil izolatı filogenetik olarak aynı genotipte belirlenen izolatlara yakın yerleşim göstermiştir (Şekil 4.8). İlgili izolat genotip III'de yer alan diğer izolatlarla (Şekil 4.8) ortalama %1,98±0,6 genetik farklılık gösterirken genotip I, II ve IV'de yer alan izolatlarla (Şekil 4.8) sırasıyla %2,13±1,0, %3,77±0,6 ve %3,85±0,5 farklı bulunmuştur. *E. cuniculi* ERU-Ecunil izolatı en yüksek identikliği %98,9 ile Polonya'dan bir sırtı çizgili orman faresinin (*Apodemus agrarius*) dalağından izole edilmiş bir izolatla (GenBank aksesyon: KX189630) göstermiştir. Ayrıca ilgili izolat Amerika Birleşik Devletlerinden çeşitli köpek ırklarından izole edilmiş genotip III'de yer alan izolatlarla da (Şekil 4.8) %98,0 identik bulunmuştur.

Tablo 4.2 Çoklu hizalama analizleriyle filogenetik analizlere dahil edilen microsporidia izolatları arasındaki identiklik oranları

	AB7131...	GU1989...	JF79239...	ERU-Ecu...	KX18963...	EU0012...	EU0012...	EU0012...	KX57758...	GU7354...	JQ3400...	GQ4221...	JF79235...	KJ46997...	AB8975...	AF1103...	JF79228...	AF1103...	KM4595...	AB8975...	GQ4089...	ERU-Ent1	Y11611...	GQ4089...	JF79239...	ERU-Ent3	ERU-Ent2	KP73519...	KP73519...	EU8491...	EU8491...	EU8837...
AB713183 Oryctolagus cun...		100%	100%	96.7%	97.5%	98.7%	98.7%	98.7%	96.2%	92.9%	93.3%	97.8%	98.4%	97.9%	76.1%	77.9%	76.8%	75.3%	79.3%	73.6%	73.9%	75.2%	74.2%	73.9%	73.9%	74.9%	74.4%	73.2%	73.6%	48.0%	48.5%	48.9%
GU198946 Homo sapiens C...	100%		100%	96.5%	98.5%	98.5%	98.5%	98.5%	98.5%	97.0%	97.0%	97.8%	98.4%	98.4%	76.1%	77.4%	76.8%	74.8%	78.7%	74.0%	74.3%	74.7%	74.0%	74.3%	73.7%	75.1%	74.3%	73.6%	74.0%	50.2%	50.6%	51.0%
JF792397 Pigeon Iran GI	100%	100%		96.4%	98.4%	98.4%	98.4%	98.4%	98.4%	96.9%	96.9%	97.8%	98.4%	98.4%	75.9%	77.3%	76.7%	74.6%	78.1%	73.3%	73.6%	74.0%	73.3%	73.6%	73.0%	74.4%	73.6%	72.9%	73.3%	50.2%	50.6%	51.0%
ERU-Ecun1	96.7%	96.5%	96.4%		98.9%	98.0%	98.0%	98.0%	97.2%	95.8%	96.5%	95.7%	96.9%	96.1%	77.2%	78.9%	78.0%	76.3%	79.6%	75.8%	76.1%	77.3%	75.0%	76.1%	74.7%	77.0%	76.1%	75.5%	75.8%	49.8%	50.2%	50.6%
KX189630 Apodemus agrar...	97.5%	96.5%	96.4%	96.9%		98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	97.6%	97.9%	95.7%	96.9%	96.5%	77.2%	78.6%	78.0%	75.9%	79.8%	76.0%	76.4%	76.2%	75.0%	76.4%	74.7%	77.4%	76.4%	75.7%	76.0%	50.7%	51.0%	51.4%
EU001235, Yorkshire terrie...	98.7%	98.5%	98.4%	98.0%	98.9%		100%	100%	97.6%	94.2%	94.6%	95.7%	96.9%	96.5%	77.2%	78.9%	78.0%	76.3%	80.0%	74.2%	74.5%	75.8%	75.0%	74.5%	74.7%	75.6%	75.1%	73.9%	74.2%	48.4%	48.9%	49.2%
EU001236 Miniature poodl...	98.7%	98.5%	98.4%	98.0%	98.9%	100%		100%	97.6%	94.2%	94.6%	95.7%	96.9%	96.5%	77.2%	78.9%	78.0%	76.3%	80.0%	74.2%	74.5%	75.8%	75.0%	74.5%	74.7%	75.6%	75.1%	73.9%	74.2%	48.4%	48.9%	49.2%
EU001237 dachshund USA ...	98.7%	98.5%	98.4%	98.0%	98.9%	100%	100%		97.6%	94.2%	94.6%	95.7%	96.9%	96.5%	77.2%	78.9%	78.0%	76.3%	80.0%	74.2%	74.5%	75.8%	75.0%	74.5%	74.7%	75.6%	75.1%	73.9%	74.2%	48.4%	48.9%	49.2%
KJ577583 Lagurus lagurus ...	96.2%	96.5%	96.4%	97.2%	96.9%	97.6%	97.6%	97.6%		98.6%	98.0%	95.7%	96.9%	96.8%	77.2%	78.3%	78.0%	75.6%	79.7%	76.5%	76.8%	76.6%	75.0%	76.8%	74.7%	77.1%	76.7%	76.1%	76.5%	50.4%	50.8%	51.2%
GU735480 Cat Austria GIV	92.9%	97.0%	96.9%	95.8%	97.6%	94.2%	94.2%	94.2%	98.6%		99.4%	93.8%	95.5%	95.5%	78.4%	80.0%	79.2%	77.7%	80.7%	77.8%	78.1%	77.9%	75.1%	78.1%	74.8%	78.2%	77.7%	77.5%	77.8%	50.8%	51.1%	51.5%
JQ340013 Dog Austria GIV	93.3%	97.0%	96.9%	96.5%	97.9%	94.6%	94.6%	94.6%	98.0%	99.4%		93.8%	95.5%	95.6%	78.4%	80.1%	79.2%	77.8%	80.6%	78.0%	78.4%	78.0%	75.1%	78.4%	74.8%	78.5%	78.1%	77.7%	78.0%	50.9%	51.2%	51.6%
GQ422153 Mus musculus C...	97.8%	97.8%	97.8%	95.7%	95.7%	95.7%	95.7%	95.7%	95.7%	93.8%	93.8%		100%	100%	75.6%	76.1%	76.1%	72.7%	78.1%	69.3%	69.8%	70.3%	70.3%	69.8%	69.8%	70.3%	69.8%	68.8%	69.3%	50.5%	51.0%	51.5%
JF792398 Pigeon Iran GII	98.4%	98.4%	98.4%	96.9%	96.9%	96.9%	96.9%	96.9%	96.9%	95.5%	95.5%	100%		100%	75.7%	76.9%	76.4%	74.3%	78.5%	73.5%	73.9%	74.2%	73.7%	73.9%	73.5%	74.6%	73.9%	73.1%	73.5%	50.2%	50.6%	51.0%
KJ469978 Gorilla beringei b...	97.9%	98.4%	98.4%	96.1%	96.5%	96.5%	96.5%	96.5%	96.8%	95.5%	95.6%	100%	100%		75.7%	76.8%	76.4%	74.2%	78.9%	75.4%	75.6%	75.5%	73.8%	75.8%	73.6%	76.0%	75.7%	75.1%	75.4%	49.6%	50.0%	50.4%
AB897503 exotic bird Iran	76.1%	76.1%	75.9%	77.2%	77.2%	77.2%	77.2%	77.2%	77.2%	78.4%	78.4%	75.6%	75.7%	75.7%		99.2%	99.2%	94.8%	93.2%	73.0%	73.4%	73.8%	73.0%	72.6%	72.6%	72.6%	72.6%	72.2%	72.6%	52.0%	51.9%	52.3%
AF110328 Switzerland	77.9%	77.4%	77.3%	78.9%	78.6%	78.9%	78.9%	78.9%	78.3%	80.0%	80.1%	76.1%	76.9%	76.8%	99.2%		100%	95.6%	93.7%	74.7%	75.1%	75.8%	73.4%	74.4%	73.1%	74.6%	74.6%	74.0%	74.4%	49.1%	49.1%	49.5%
JF792396 Pigeon Iran	76.8%	76.8%	76.7%	78.0%	78.0%	78.0%	78.0%	78.0%	78.8%	79.2%	79.2%	76.1%	76.4%	76.4%	99.2%	100%		95.5%	94.0%	73.4%	73.7%	73.4%	73.4%	73.0%	73.0%	73.0%	73.0%	72.6%	73.0%	52.0%	51.9%	52.3%
AF110327 Switzerland	75.3%	74.8%	74.6%	76.3%	75.9%	76.3%	76.3%	76.3%	75.6%	77.7%	77.8%	72.7%	74.3%	74.2%	94.8%	95.6%	95.5%		90.1%	73.7%	74.0%	73.9%	72.2%	73.3%	72.0%	73.5%	73.5%	73.0%	73.3%	48.2%	48.3%	48.7%
KM459505 Pan troglodytes...	79.3%	78.7%	78.1%	79.6%	79.8%	80.0%	80.0%	80.0%	79.7%	80.7%	80.6%	78.1%	78.5%	78.9%	93.2%	93.7%	94.0%	90.1%		74.8%	75.2%	75.8%	73.9%	74.5%	73.6%	74.6%	74.6%	74.1%	74.5%	49.8%	49.8%	50.2%
AB897502 exotic bird Iran	73.6%	74.0%	73.3%	75.8%	76.0%	74.2%	74.2%	74.2%	76.5%	77.8%	78.0%	69.3%	73.5%	75.4%	73.0%	74.7%	73.4%	73.7%	74.8%		99.1%	98.7%	99.2%	98.4%	98.7%	98.1%	98.4%	98.1%	98.4%	47.9%	47.1%	47.7%
GQ408911 Homo sapiens R...	73.9%	74.3%	73.6%	76.1%	76.4%	74.5%	74.5%	74.5%	76.8%	78.1%	78.4%	69.8%	73.9%	75.8%	73.4%	75.1%	73.7%	74.0%	75.2%	99.1%		99.1%	99.6%	98.8%	99.2%	98.4%	98.8%	98.4%	98.8%	47.9%	47.1%	47.7%
ERU-Ent1	75.2%	74.7%	74.0%	77.3%	76.2%	75.8%	75.8%	75.8%	76.6%	77.9%	78.0%	70.3%	74.2%	75.5%	73.0%	75.0%	73.4%	73.9%	75.0%	98.7%	99.1%		100%	99.1%	99.6%	99.3%	99.6%	98.0%	98.4%	47.7%	46.9%	47.5%
Y11611 Germany	74.2%	74.0%	73.3%	75.0%	75.0%	75.0%	75.0%	75.0%	75.0%	75.1%	75.1%	70.3%	73.7%	73.8%	73.0%	73.4%	73.4%	72.2%	73.9%	99.2%	99.6%	100%		99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	98.3%	98.7%	50.2%	49.1%	49.8%
GQ408912 Homo sapiens R...	73.9%	74.3%	73.6%	76.1%	76.4%	74.5%	74.5%	74.5%	76.8%	78.1%	78.4%	69.8%	73.9%	75.8%	72.6%	74.4%	73.0%	73.3%	74.5%	98.4%	98.8%	99.1%	99.6%		100%	98.4%	98.8%	97.8%	98.1%	47.5%	46.7%	47.3%
JF792394 Pigeon Iran	73.9%	73.7%	73.0%	74.7%	74.7%	74.7%	74.7%	74.7%	74.7%	74.8%	74.8%	69.8%	73.5%	73.6%	72.6%	73.1%	73.0%	72.0%	73.6%	98.7%	99.2%	99.6%	99.6%	100%		99.2%	99.2%	97.9%	98.3%	49.5%	48.5%	49.1%
ERU-Ent3	74.9%	75.1%	74.4%	77.0%	77.4%	75.6%	75.6%	75.6%	77.1%	78.2%	78.5%	70.3%	74.6%	76.0%	72.6%	74.6%	73.0%	73.5%	74.6%	98.1%	98.4%	99.3%	99.6%	98.4%	99.2%		99.0%	97.4%	97.7%	47.9%	47.1%	47.7%
ERU-Ent2	74.4%	74.3%	73.6%	76.1%	76.4%	75.1%	75.1%	75.1%	76.7%	77.7%	78.1%	69.8%	73.9%	75.7%	72.6%	74.6%	73.0%	73.5%	74.6%	98.4%	98.8%	99.6%	99.6%	98.8%	99.2%	99.0%		97.7%	98.1%	47.0%	46.3%	46.9%
KP735193 Homo sapiens Iran	73.2%	73.6%	72.9%	75.5%	75.7%	73.9%	73.9%	73.9%	76.1%	77.5%	77.7%	68.8%	73.1%	75.1%	72.2%	74.0%	72.6%	73.0%	74.1%	98.1%	98.4%	98.8%	98.3%	97.8%	97.9%	97.4%	97.7%		99.1%	47.9%	47.1%	47.7%
KP735194 Homo sapiens Iran	73.6%	74.0%	73.3%	75.8%	76.0%	74.2%	74.2%	74.2%	76.5%	77.8%	78.0%	69.3%	73.5%	75.4%	72.6%	74.4%	73.0%	73.3%	74.5%	98.4%	98.8%	98.4%	98.7%	98.1%	98.3%	97.7%	98.1%	99.1%		48.3%	47.5%	48.1%
EU849128 Sus scrofa Germ...	48.0%	50.2%	50.2%	49.8%	50.7%	48.4%	48.4%	48.4%	50.4%	50.8%	50.9%	50.5%	50.2%	49.6%	52.0%	49.1%	52.0%	48.2%	49.8%	47.9%	47.9%	47.7%	50.2%	47.5%	49.5%	47.9%	47.0%	47.9%	48.3%		99.1%	98.3%
EU849130 Sus scrofa Germ...	48.5%	50.6%	50.6%	50.2%	51.0%	48.9%	48.9%	48.9%	50.8%	51.1%	51.2%	51.0%	50.6%	50.0%	51.9%	49.1%	51.9%	48.3%	49.8%	47.1%	47.1%	46.9%	49.1%	46.7%	48.5%	47.1%	46.3%	47.1%	47.5%	99.1%		98.4%
EU883763 Sus scrofa Germ...	48.9%	51.0%	51.0%	50.6%	51.4%	49.2%	49.2%	49.2%	51.2%	51.5%	51.6%	51.5%	51.0%	50.4%	52.3%	49.5%	52.3%	48.7%	50.2%	47.7%	47.7%	47.5%	49.8%	47.3%	49.1%	47.7%	46.9%	47.7%	48.1%	98.3%	98.4%	



Şekil 4.8 Microsporidia türlerine ait izolatlarının SSU-Intergenic Spacer-LSU rRNA gen bölgesi BI ve ML analizlerine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kırmızı ve kalın karakterde gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar sırasıyla ML bootstrap desteği ve Bayesian posterior olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Microsporidia filumu en az 150 cins içerisinde 1200'ün üzerinde türü kapsamaktadır (9, 67). 1980 yılının ortalarından bu yana bu organizmalar insan hastalık etkenleri olarak artan bir şekilde ortaya çıktığı belirtilmekte olup özellikle HIV hastaları (9, 68) ve organ transplantasyonu veya kemoterapi alanlar gibi immun sistemi baskılanmış bireylerde (38) fırsatçı patojen olarak ciddi komplikasyonlara yol açtıkları bilinmektedir. Günümüze kadar sekiz soyda 14 türün insanlarda enfeksiyona yol açtığı ortaya konmuştur (8). Serolojik çalışmalar (69, 70) microsporidiaların yaygın olduğunu fakat genel popülasyon içerisinde kendini sınırlayan veya asemptomatik karakterde olduğunu öne çıkarmıştır. Bulaşma yolları epidmiyolojik çalışmalarda henüz net olarak ortaya konulamamış olmasına karşın, enfeksiyonların su-kaynaklı, respiratör, seksüel, kongenital, zoonotik buluşma ve oküler infeksiyon gibi çeşitli yollarla ortaya çıkabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (9). Tüm microsporidialar çevresel etmenlere dirençli sporlar üretirler ve bu sporlar sarmal tarzında iç polar filamentlerini çıkarma yeteneğinde olup bu şekilde içeriğini yakın konak hücresine inoküle ederler. Yapı ve fonksinel açıdan özgün olmak üzere, polar filamentin identifikasyonu bu filum için temel tanı kriteridir. Çok küçük çapta mikroorganizmalar olmaları (örn, insanları enfekte eden bir çok tür 1-2 μm (38) ölçüsündedir) sebebiyle, microsporidiaların teşhisi geleneksel olarak transmisyon elektron mikroskop (TEM) ile polar filament ultra yapısal karakterlerin identifikasyonuna dayanmıştır. Halen gold standart nitelenen bu teknik, yoğun emek gerektirmesi ve zaman alıcı olması, pahalı araçlara ihtiyaç olması, önemli derecede uzamlık gerektirmesi gibi çeşitli handikapları bulunmaktadır. Teşhiste TEM'e göre daha hızlı ve daha dutarlı ışık mikroskobu tabanlı metodlar da geliştirilmiş olmasına karşın, bu teknikler de henüz başarılı bir değerlendirme için uzman patolojistlere gereksinim göstermektedir. Bu metodlar modifiye trichrome boyama ve ya bu boyanın Gram veya Warthin-Starry silver ile kombine kullanımı gibi rutin histolojik boyaları kapsamaktadır (67). Bu teknikler microsporidiaların vücut sıvıları ve dokularda saptanmasında TEM'e göre daha uygun olmalarına karşın internal polar filament bu tekniklerle her zaman kolay bir şekilde identifiye edilemez. Bunun yanında teşhis daha çok çift katmanlı ve modifiye trichrome boyama için seçici boyama karakteristikleri sağlayan kalın spor duvarının saptanmasına göre yapılmaktadır. Kemofloreson parlayıcılar (Örn., Calcofluor White, Uvitex 2B, Fungifluor) spor duvarı içerisindeki kitin hedef almak için kullanılmaktadır. Bu teknikler de duyarlı olmakla birlikte, açeşitli mantarlar ve dışkı örnekleri içerisindeki kalıntı materyalleri ile kros reaksiyon

gösterebilmektedir. Dolayısıyla özellikle dışkı örneklerinin incelenmesinde daha yüksek duyarlılık ve özgünlük için kemofloresan parlayıcıların geleneksel histolojik boyamalarla kombine kullanılmaları gerektiği kaydedilmiştir. Ancak her nekadar en uygun doku preperasyonu ve boyama yapılmış olsa da ışık mikroskobu nadiren microsporidiaların tür spesifik teşhisine olanak sağlar. Bu da insanları enfekte eden çeşitli microsporidian türlerinin farklı tedavileri için önemli bir eksiklik olarak ortaya çıkmaktadır (4).

Bu filuma özgü polar filamentin veya diğer ultrayapısal özelliklerin TEM ile ortaya konması microsporidiosis'in konfirmasyonu için tartışılmaz olmasına karşın yalnızca morfoloji tabanlı daha özgün teşhis her zaman mümkün olmamaktadır. Özellikle birbirine yakın türlerde ayırt edici karakterler yalnızca belirli gelişim evrelerinde ortaya çıkmakta olup bu evrelerin tümü belirli klinik örneklerde aynı zamanda bulunmamaktadır. İnsanlada enfeksiyona yol açan türlerin teşhisinde in vitro kültür yardımcı bir araç olarak düşünülebilir olsa da, bu teknikler zahmetli, kontaminasyona açık ve genellikle pratik değildir. Bunun birlikte insanlarda en yaygın görülen microsporidia türü olan *E. bieneusi* için henüz bir in-vitro kültür sistemi bulunmamaktadır (71). Neticede hem klinik örneklerde hem de çevresel örneklerde daha hızlı, spesifik ve kolay uygulanabilir taşhis için yaklaşımlara ihtiyaç çıkmıştır. Son on yıl içerisinde moleküler biyoloji tabanlı teknikler klinik anlamda mikrobial patojenlerin teşhisi ve karakterizasyonu için artan bir şekilde kullanılmaktadır. Bu teknikler nükleik asit sekanslarını ve/veya patojene spesifik antijenleri belirleme amacıyla dizayn edilmektedir. Geleneksel mikroskopi veya kültür tabanlı tekniklerle kıyaslandığında moleküler tekniklerin potansiyel avantajlarıyla öne çıktığı görülmektedir. Bu avantajların başında sinyal amplifikasyonunun etkinliği ile artan sensitivite, özellikle uyugun saptama problarının uygulanması ile daha yüksek özgünlük, sonuça daha hızlı ulaşma ve uzman olmayanlar tarafından dahi kolay uygulanabililik gibi faktörler gelmektedir (72). İnsanları enfekte eden microsporidialar "emerging" patojenlerin farklı bir grubudur ve bu organizmalar üzerine mevcut genetik bilgi sınırlı olmakla birlikte gün geçtikçe artmaktadır. GenBank microsporidia sekans verilerinin büyük kısmı rRNA genlerine ait verilerdir. Sekanks bilgisinin bulunabilir olması ile birlikte korunmuş ve değişken bölgeleri içermesiyle PCR tabanlı tekniklerde genel olarak rRNA gen bölgesi hedef alınmış ve microsporidiaların karakterizasyonları yapılmıştır. Bu gen içerisinde korunmuş bölgeleri hedef alan primerler insanlarda enfeksiyona yol açan *Enc. cuniculi, Enc. hellem, Enc. intestinalis, Ent. bieneusi* ve *Vittaforma corneae* çeşitli türlerin rRNA geninin amplifiye ve takiben sekanslarının elde edilmesinde kullanılmıştır (73, 74). Bu rRNA genleri Katinka ve ark. (75)

tarafindan *Enc. cuniculi* genomunda 20 kopyadan fazla olarak bulunmuş olup bu durum da teşhis amaçlı PCR testlerinde sensitivitenin artmasını (tek kopya genlerine oranla) sağlamaktadır. Çalışmamızda da köpeklerde microsporidia enfeksiyonlarına yol açan türlerin araştırılmasında söz konusu avantajları ile SSU rRNA gen bölgesinin tür spesifik amplifikasyonu temelinde moleküler analizler gerçekleştirilmiştir. Nitekim pozitif izolatlar üzerinde yapılan sekans analizlerinde ilgili teknik ve kullanılan primerlerin yüksek özgünlükte olduğu görülmüştür.

Türkiye'de microsporidia enfeksiyonları üzerine araştırmaların daha çok insanlarda yapıldığı buna karşın hayvanlarda çalışmaların çok sınırlı olduğu görülmektedir. İnsanlarda yapılan morfolojik identifikasyon çalışmalarında (52, 56-58) klasik morfoloji ve boyama yöntemiyle farklı hasta gruplarında değişik oranlarda microsporidia enfeksiyonları rapor edilmiştir. Yine monoklonal antikor tabanlı kitlerle yürütülen serolojik çalışmalarda (53-55, 76) insanlarda *E. intestinalis* ve *E. bieneusi* seropozitiflikleri rapor edilmiştir. Buna karşın insanlarda microsporidia türlerinin moleküler zeminde araştırıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalardan Oğuz ve ark. (77), ishalli hastalarda tespit ettikleri microsporidia etkenlerinin nested PCR ile identifikasyonunu gerçekleştirmişler ve sekans konfirmasyonu yapmaksızın amplifikasyon büyüklüklerine göre farklı oranlarda *E. intestinalis, E. cuniculi* ve *E. hellem* pozitiflikleri rapor etmişlerdir. Özkoç ve ark., (78), yine farklı hasta gruplarında genus spesifik SSU rRNA PCR anaizleriyle microsporidia pozitifliğini %14,2 olarak kaydetmişlerdir. Çetinkaya ve ark. (54), Kayseri yöresinde farklı hasta gruplarında *E. intestinalis* yaygınlığını IFA-MAbs ve Real Time PCR teknikleri ile araştırmışlar ve pozitif belirledikleri izolatları SSU rRNA gen bölgesi sekans analizleriyle *E. intestinalis* olarak kaydetmişlerdir. Türkiye'de evcil hayvanlarda microsporidia enfeksiyonları üzerine günümüze kadar her hangi bir çalışma yapılmamıştır. Buna karşın tavşanlarda Ankara ve Elazığ yörelerinde yürütülen iki çalışmada (79, 80) nekropsi, konvansiyonel morfolojik boyama ve serolojik yöntemlerle *E. cuniculi* pozitifliği ve yaygınlığı rapor edilmiştir. Erol ve ark. (81), İzmir yöresinden örnekledikleri midyelerde genus spesifik SSU rRNA PCR analizleriyle microsporidia etkenlerine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Mevcut çalışma ile Türkiye'de ilk olarak köpeklerde microsporidia türlerinin varlığı ve yaygınlığı moleküler olarak ortaya konmuştur.

Hem *Encephalitozoon* spp. hem de *Enterocytozoon bieneusi* insanlarda enfeksiyona yol açmasına ve özellikle immun sistemi baskılanmış bireylerde potansiyel öldürücü bir hastalık

oluşturmasına karşın, bulaşma yolları ve zoonotik potansiyelleri henüz yeterli düzeyde anlaşılamamıştır (3, 41, 82). Buna karşın güncel çalışmalarla insan ve diğer bazı omurgalı hayvanlarda görülen çeşitli microsporidia türlerinin benzer genotipte nesilleri taşıdığı ortaya konmasının (7, 51, 61, 83, 84) ardından zoonotik bulaşmanın önemli bir yol olduğu görüşü yaygınlaşmıştır. *Encephalitozoon* soyunda insanlarda en yaygın görülen tür *E. intestinalis* olarak bilinmesine karşın çeşitli hayvan türlerinde bu türün daha az yaygın olduğu kaydedilmiştir (85-87). Ancak çalışmamızda köpeklerde *E. intestinalis* en yaygın tür belirlenmiş ve insan sağlığı açısından köpeklerin rezervuar olarak potansiyel risk oluşturduğu görülmüştür. *Encephalitozoon cuniculi* microsporidia etkenleri arasında tavşan, rodent, köpek ve insan dahil en geniş konak spekturumuna sahip tür olarak bilinmektedir (41). *E. cuniculi* köpek genotipi olarak bilinen suş III; Brezilya, Kolombiya, İngiltere, Norveç, Slovakya ve Amerika Birleşik Devletleri gibi bir çok ülkede köpeklerden izole edilmiş ve insanlarda da bu genotipin enfeksiyona yol açabildiği belirlenmiştir (31, 32, 34, 88, 89). Köpeklerde klinik semptomlar genellikle genç veya immun yetmezliği olan hayvanlarda görülmekte olup depresyon ve kasılma nöbetleri tarzında ortaya çıkmaktadır (90). Ayrıca ağır nefritis, encephalitis ve yüksek mortalitenin köpeklerde *E. cuniculi*'nin transplasental nakli ile ilişkili olduğu kaydedilmekte ancak doğum sonrası alınan enfeksiyonların genellikle subklinik seyrettiği belirtilmektedir (89, 91). Çalışmamızda *E. cuniculi* pozitifliği belirlenen köpekler daha çok 1-3 yaş grubu genç hayvanlar olmasına karşın hiçbirinde klinik tablo görülmemiş ve yukarıdaki araştırıcıların bulguları zemininde enfeksiyonların transplasental nakilden ziyade muhtemelen doğum sonrası alındığı düşünülmüştür. Daha önce insan spesifik bir parazit olarak düşünülen ve daha çok AIDS hastalarında ortaya çıkan *E. bieneusi*, sonraki çalışmalarla kanatlı ve memeli sınıflarına dahil geniş spekturumda evcil, vahşi ve pet hayvanlardan da izole edilmiş ve zoonotik potansiyeli üzerine veriler elde edilmiştir (92). En yaygın microsporidia türlerinden biri olan *E. bieneusi* genotiplerinin zoonotik karakteri, evcil ve vahşi hayvanlarda ITS sekans benzerlikleri temelinde konfirme edilmiştir (93-96). *E. hellem* özellikle HIV hastaları gibi immun suprese bireylerde başta keratokonjuktivitis olmak üzere enfeksiyona yol açan diğer bir microsporidia türü olup genellikle kanatlılardan izole edilmiş ve kanatlıların insan ve diğer hayvanlara enfeksiyonun naklinde ana rezervuar olduğu kaydedilmiştir (84, 97-99). Ancak çalışmamızda incelenen köpeklerde *E. bieneusi* ve E. hellem pozitiflikleri belirlenmemiştir. Bu iki yaygın türün insanlara bulaşma dinamiklerinde zoonotik potansiyelin ve risk faktörlerinin ortaya konması için Türkiye'de geniş çaplı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Mevcut çalışmada microsporidia etkenlerinin prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet ve ırklarına bağlı olarak istatistiksel bir farklılık göstermediği belirlenmiş olup elde edilen bu sonuçların bazı araştırıcıların (35, 51, 82) bulguları ile paralel seyrettiği görülmüştür. Buna karşın enfeksiyonların sokak köpeklerinde sahipli köpeklere oranla daha yüksek görüldüğü ve bu farklılığında istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenmiştir. Bu açıdan özellikle sokak köpeklerinin microsporidia enfeksiyonlarının yayılmasında rezervuar olarak önemli zoonotik potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Tüm bu sonuçlar temelinde, diğer zoonotik enfeksiyonlar da göz önüne alındığında sokak köpeklerinin kontrolü ve hastalıklarla mücadele için etkin strateji ve programların ivedilikle oluşturulması ve hayata geçirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Microsporidia türlerinde ribosomal RNA'nın ITS gen bölgesindeki yüksek düzeydeki çeşitlilik, bu gen bölgesinin insan ve hayvanlardaki izolatların genotiplerinin araştırılmasında ve zoonotik karakterleri üzerine veriler elde edilmesinde yoğun olarak kulanılmasına yol açmıştır (100-104). ITS geninin sekans analizi ve databanklardaki referans sekanslarla kıyaslanmaları *E. bieneusi, E. hellem* ve *E. cuniculi* genotiplendirmesi için standart bir teknik olmuştur (92, 100, 102). Moleküler epidemiyolojik çalışmalar farklı konaklardan bu üç türe ait yüksek sayıda genotiplerin varlığını ortaya koymuştur (100, 102, 103). Buna karşın insan ve hayvanlardan şimdiye kadar izole edilen *E. intestinalis* sekanslarında polimorfik bölgeler bulunmadığı ve neticesinde genetik farklılığın bulunmayışıyla konak olarak identifiye edilen türler arasında bir bulaşma bariyerinin olmadığı rapor edilmiştir (Pirestani et al., 2013, Kim et al., 2015). Paralel olarak mevcut çalışmada da *E. intestinalis* izolatları için nükleotid diversitesi düşük belirlenmiş (ort., %0,44±0,18), yalnızca üç polimorfik bölge ve buna bağlı üç haplotipin varlığı saptanmıştır. Çalışmada belirlenen bu üç haplotipe ait izolatların ayrıca kendi aralarında ve dünyadan çeşitli konaklardan izole edilmiş homolog izolatlarla genetik farklılıklarının da düşük olduğu (<%1) belirlenmiştir. Çalışmada karakterize edilen *E. intestinalis* haplotiplerinin en yüksek identikliği Almanya'dan ve İran'da bir güvercinden izole edilmiş izolatlarla gösterdiği belirlenmiştir. Yine ilgili haplotiplere bağlı izolatlar insanlardan karakterize edilen çeşitli izolatlarla da genetik olarak yakın bulunmuş ve neticesinde zoonotik potansiyelleri açısından risk oluşturdukları ortaya konmuştur. *E. cuniculi* için ITS gen bölgesindeki kısa tandem tekrarlar bazında günümüze kadar dört farklı fakat tam anlamıyla konak spesifik olmayan genotip (I = "tavşan", II = "fare", III = "köpek", IV = "insan") bulunmuştur (36, 105). Günümüze kadar bu genotipler arasında genotip I ve genotip III'ün insanlarda da enfeksiyona

yol açtığı belirlenmiş ve zoonotik potansiyelleri ortaya konmuştur (7, 30, 37, 95, 106). Çalışmamızda genotiplendirmesi yapılan *E. cuniculi* izolatlarının tümünün ITS gen bölgesinde "GTTT" üçlü tandem tekrarı gösterdiği ve buna bağlı olarak Genotip III'de yer aldıkları ve izolatlar arasında polimorfik bölge bulunmamasıyla bir haplotipe ait oldukları saptanmıştır. Karakterize edilen *E. cuniculi* izolatlarının filogenetik olarak aynı genotipte bulunan izolatlara (%1,98±0,6 genetik farklılık) yakın oldukları görülmüş, genotip I, II ve IV'de yer alan izolatlarla ise sırasıyla %2,13±1,0, %3,77±0,6 ve %3,85±0,5 genetik farklılık gösterdikleri saptanmıştır. İlgili haplotipe ait izolatlar ayrıca en yüksek identikliği Polonya'dan bir sırtı çizgili orman faresinin (*Apodemus agrarius*) dalağından izole edilmiş genotip III'de yer alan bir izolatla göstermiş, yine Amerika Birleşik Devletlerinden çeşitli köpek ırklarından izole edilmiş genotip III'de yer alan izolatlarla da yüksek identik (%98,0) identik bulunmuşlardır. Elde edilen bu sonuçlar genotip III'ün zoonotik potansiyeli de göz önüne alındığında araştırma yöresinde *E. cuniculi*'nin insan ve diğer konaklara bulaşmasında köpeklerin rezervuar olarak önemli bir rol üstlendiğini ve risk oluşturduklarını ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de evcil hayvanlarda ilk olmak üzere microsporidia enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi üzerine veriler ortaya konmuştur. Köpeklerde *E. intestinalis* enfeksiyonlarının yaygın olduğu, yine zoonotik karakterli *E. cuniculi* köpek genotipi olarak bilinen genotip III'ün sporadik olarak seyir gösterdiği ve her iki türün de insan sağlığı açısında risk oluşturdukları görülmüştür. Bu açıdan microsporidia enfeksiyonlarıyla mücadele için etkin kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve özellikle sokak köpeklerinin denetim altına alınarak oluşturdukları risk faktörlerinin monitorize edilmesi ve gerekli yaklaşımların hayata geçirilmesi geremektedir. Bu çalışma aynı zamanda microsporidia enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi üzerine yapılacak ileriki çalışmalara da model oluşturmuştur. Nitekim microsporidia enfeksiyonlarının bulaşma dinamikleri, konak spekturumları ve bu konaklardaki nesillerin genotiplendirilmesi ile zoonotik potansiyellerinin ortaya çıkarılması üzerine Türkiye'de geniş çaplı moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç olduğu da ortaya çıkmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res. 2007; 111 (Pt 5): 509-547.
2. Wittner M. The Microsporidia and Microsporidiosis. Washington, D.C.: ASM Press; 1999.
3. Didier ES, Stovall ME, Green LC, et al. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Vet. Parasitol. 2004; 126 (1-2): 145-166.
4. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. Curr. Opin. Infect. Dis. 2006; 19 (5): 485-492.
5. Carlson JR, Li L, Helton CL, et al. Disseminated microsporidiosis in a pancreas/kidney transplant recipient. Arch. Pathol. Lab. Med. 2004; 128 (3): e41-43.
6. Horvath M, Leng L, Stefkovic M, et al. Lethal encephalitozoonosis in cyclophosphamide-treated rabbits. Acta Vet. Hung. 1999; 47 (1): 85-93.
7. Deplazes P, Mathis A, Muller C, et al. Molecular epidemiology of Encephalitozoon cuniculi and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. J. Eukaryot. Microbiol. 1996; 43 (5): 93S.
8. Didier ES. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta Trop. 2005; 94 (1): 61-76.
9. Weiss LM. Microsporidia: emerging pathogenic protists. Acta Trop. 2001;78(2):89-102.
10. Sinski E. Environmental contamination with protozoan parasite infective stages: biology and risk assessment. Acta Microbiol. Pol. 2003; 52 Suppl: 97-107.
11. Orenstein JM. Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. J. Parasitol. 1991; 77 (6): 843-864.
12. 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 (1): 101-112.

13. Hartskeerl RA, Van Gool T, Schuitema AR, et al. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. Parasitology. 1995; 110 (Pt 3): 277-285.

14. Franzen C, Muller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. Clin. Microbiol. Rev. 1999; 12 (2): 243-285.

15. Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Annu. Rev. Microbiol. 2002; 56: 93-116.

16. Joseph J, Vemuganti GK, Sharma S. Microsporidia: emerging ocular pathogens. Indian J. Med. Microbiol. 2005; 23 (2): 80-91.

17. Canning EU, Lom Jr, Dyková I. The microsporidia of vertebrates. London ; New York: Academic Press; 1986. x, 289 p. p.

18. Furuya K. Spore-forming microsporidian encephalitozoon: current understanding of infection and prevention in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 2009; 62 (6): 413-422.

19. Mertens RB, Didier ES, Fishbein MC, et al. *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. Mod. Pathol. 1997; 10 (1): 68-77.

20. Wasson K, Peper RL. Mammalian microsporidiosis. Vet. Pathol. 2000; 37 (2): 113-128.

21. Zender HO, Arrigoni E, Eckert J, et al. A case of *Encephalitozoon cuniculi* peritonitis in a patient with AIDS. Am. J. Clin. Pathol. 1989; 92 (3): 352-356.

22. Shadduck JA, Pakes SP. Encephalitozoonosis (nosematosis) and toxoplasmosis. Am. J. Pathol. 1971; 64 (3): 657-672.

23. Cox JC, Gallichio HA. Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. Res. Vet. Sci. 1978; 24 (2): 260-261.

24. Kunzel F, Joachim A. Encephalitozoonosis in rabbits. Parasitol. Res. 2010; 106 (2): 299-309.

25. Poonacha KB, William PD, Stamper RD. Encephalitozoonosis in a parrot. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1985; 186 (7): 700-702.

26. Kunzel F, Gruber A, Tichy A, et al. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. Vet. Parasitol. 2008; 151 (2-4): 115-124.

27. Keeble EJ, Shaw DJ. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. Vet. Rec. 2006; 158 (16): 539-544.

28. Reetz J. Naturally-acquired microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) infections in hens. Tierarztl. Prax. 1993; 21 (5): 429-435.

29. Reetz J. [Natural transmission of microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) by way of the chicken egg]. Tierarztl. Prax. 1994; 22 (2): 147-150.

30. Didier ES, Rogers LB, Orenstein JM, et al. Characterization of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. J. Eukaryot. Microbiol. 1996; 43 (1): 34-43.

31. Snowden KF, Lewis BC, Hoffman J, et al. *Encephalitozoon cuniculi* infections in dogs: a case series. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 2009; 45 (5): 225-231.

32. Akerstedt J. Serological investigation of canine encephalitozoonosis in Norway. Parasitol. Res. 2003; 89 (1): 49-52.

33. Cray C, Rivas Y. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in dogs in the United States. J. Parasitol. 2013; 99 (1): 153-154.

34. Lindsay DS, Goodwin DG, Zajac AM, et al. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in ownerless dogs from urban areas of Brazil and Colombia. J. Parasitol. 2009; 95 (3): 760-763.

35. Sasaki M, Yamazaki A, Haraguchi A, et al. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in Japanese dogs. J. Parasitol. 2011; 97(1) : 167-169.

36. Talabani H, Sarfati C, Pillebout E, et al. Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. J. Clin. Microbiol. 2010; 48 (7): 2651-2653.

37. Snowden K, Logan K, Didier ES. *Encephalitozoon cuniculi* strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. J. Infect. Dis. 1999; 180 (6): 2086-2088.

38. Franzen C, Muller A. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. Microbes Infect. 2001; 3 (5): 389-400.

39. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, et al. Human microsporidial infections. Clin. Microbiol. Rev. 1994; 7 (4): 426-461.

40. Satheeshkumar S, Ananthan S. Electron microscopy identification of microsporidia (*Enterocytozoon bieneusi*) and *Cyclospora cayetanensis* from stool samples of HIV infected patients. Indian J. Med. Microbiol. 2004; 22 (2): 119-122.

41. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18 (3): 423-445.

42. Al-Mekhlafi MA, Fatmah MS, Anisah N, et al. Species identification of intestinal microsporidia using immunofluorescence antibody assays. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2011; 42 (1): 19-24.

43. De Groote MA, Visvesvara G, Wilson ML, et al. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. J. Infect. Dis. 1995; 171 (5): 1375-1378.

44. Weber R, Schwartz DA, Deplazes P. Laboratory Diagnosis of Microsporidiosis. In: Wittner M, Weiss LM, editors. The Microsporidia and Microsporidiosis. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1999. p. 315–362.

45. Katzwinkel-Wladarsch S, Deplazes P, Weber R, et al. Comparison of polymerase chain reaction with light microscopy for detection of microsporidia in clinical specimens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1997; 16 (1): 7-10.

46. Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Helse W, et al. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. Trop. Med. Int. Health. 1996; 1 (3): 373-378.

47. Kock NP, Petersen H, Fenner T, et al. Species-specific identification of microsporidia in stool and intestinal biopsy specimens by the polymerase chain reaction. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1997; 16 (5): 369-376.

48. Baneux PJ, Pognan F. In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. Lab. Anim. 2003; 37 (2): 132-138.

49. Csokai J, Joachim A, Gruber A, et al. Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. Vet. Parasitol. 2009; 163 (1-2): 18-26.

50. Jass A, Matiasek K, Hartmann K, et al. Evaluation of liquor analysis and PCR for diagnosis of encephalitozoonosis in the rabbit. Praktische Tierarzt. 2006; 87 (7): 518-524.

51. Jamshidi S, Tabrizi AS, Bahrami M, et al. Microsporidia in household dogs and cats in Iran; a zoonotic concern. Vet. Parasitol. 2012; 185 (2-4): 121-123.

52. Atambay M, Karaman U, Daldal N, et al. The prevalence of Microsporidium among adult patients admitted to the parasitology laboratory at the Inonu University Turgut Ozal Medical Center. Turkiye Parazitol Derg. 2008; 32 (2): 113-115.

53. Cetinkaya U, Hamamci B, Kaynar L, et al. Investigation of the presence of *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in bone marrow transplant patients by IFA-MAbs method. Mikrobiyol. Bul. 2015; 49 (3): 432-438.

54. Cetinkaya U, Yazar S, Kuk S, et al. The high prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* in patients receiving chemotherapy and children with growth retardation and the validity of real-time PCR in its diagnosis. Turk J Med Sci. 2016; 46 (4): 1050-1058.

55. Hamamci B, Cetinkaya U, Berk V, et al. Prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in cancer patients under chemotherapy. Mikrobiyol. Bul. 2015; 49 (1): 105-113.

56. Karaman Ü. İnsanlarda microsporidiaların epidemiyolojisi (Malatya ili örneği) [Doktora tezi]. Malatya: İnönü Üniversitesi; 2007.

57. Karaman U, Atambay M, Daldal N, et al. The prevalence of Microsporidium among patients given a diagnosis of cancer. Turkiye Parazitol Derg. 2008; 32 (2): 109-112.

58. Turk S. İshalli olgularda microsporidia sıklığının farklı boyama yöntemleriyle araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2010.

59. da Silva AJ, Schwartz DA, Visvesvara GS, et al. Sensitive PCR diagnosis of Infections by *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. J. Clin. Microbiol. 1996; 34 (4): 986-987.

60. Visvesvara GS, Leitch GJ, da Silva AJ, et al. Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. J. Clin. Microbiol. 1994; 32 (11): 2760-2768.

61. Lores B, del Aguila C, Arias C. *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002; 97 (7): 941-945.

62. Tsukada R, Tsuchiyama A, Sasaki M, et al. *Encephalitozoon* infections in Rodentia and Soricomorpha in Japan. Vet. Parasitol. 2013; 198 (1-2): 193-196.

63. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics. 2012; 28 (12): 1647-1649.

64. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol. Biol. Evol. 2008; 25 (7): 1253-1256.

65. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics. 2001; 17 (8): 754-755.

66. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 2003; 52 (5): 696-704.

67. Garcia LS. Laboratory identification of the microsporidia. J. Clin. Microbiol. 2002; 40 (6): 1892-1901.

68. Cali A. General microsporidian features and recent findings on AIDS isolates. J. Protozool. 1991; 38 (6): 625-630.

69. Bergquist NR, Stintzing G, Smedman L, et al. Diagnosis of encephalitozoonosis in man by serological tests. Br. Med. J. (Clin. Res. Ed). 1984; 288 (6421): 902.

70. van Gool T, Vetter JC, Weinmayr B, et al. High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. J. Infect. Dis. 1997; 175 (4): 1020-1024.

71. Visvesvara GS. In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15 (3): 401-413.

72. Procop GW. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. Clin. Infect. Dis. 2007;45 Suppl 2: S99-S111.

73. Menotti J, Cassinat B, Porcher R, et al. Development of a real-time polymerase-chain-reaction assay for quantitative detection of *Enterocytozoon bieneusi* DNA in stool

specimens from immunocompromised patients with intestinal microsporidiosis. J. Infect. Dis. 2003; 187 (9): 1469-1474.

74. Menotti J, Cassinat B, Sarfati C, et al. Development of a real-time PCR assay for quantitative detection of *Encephalitozoon intestinalis* DNA. J. Clin. Microbiol. 2003; 41 (4): 1410-1413.

75. Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, et al. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. Nature. 2001; 414 (6862): 450-453.

76. Şıvgın S, Eser B, Kaynar L, et al. *Encephalitozoon intestinalis*: A Rare Cause of Diarrhea in an Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) Recipient Complicated by Albendazole-Related Hepatotoxicity. Turk J Hematol. 2013; 30: 204-208.

77. Oğuz İ, Doğruman AF, Mumcuoğlu İ. İshalli olgularda microsporidia sıklığının Calcofluor Beyazı ve Uvitex 2B Kemolüminesans Boyama Yöntemleriyle Araştırılması ve Tiplendirilmesi. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Denizli; 28 Eylül-4 Ekim2013. p. SB02-08.

78. Özkoç S, Delİbaş SB, Akısü Ç. Evaluation of pulmonary microsporidiosis in iatrogenically immunosuppressed patients. Tüberküloz ve Toraks. 2016; 64 (1): 9-16.

79. Berkin S, Kahraman MM. *Encephalitozoon cuniculi* infection of rabbits in Turkey. Veteriner Fakultesi Dergisi Ankara Universitesi. 1983; 30 (3): 397-406.

80. Eröksüz Y, Eröksüz H, Özer H, et al. A survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbit colonies in Elaziğ, Turkey: pathomorphologic and serologic (carbonimmunoassay test) studies. Israel Journal of Veterinary Medicine. 1999; 54 (3): 73-77.

81. Erol N, Delİbaş SB, Özkoç S, et al. Investigation of parasitic and viral pathogens in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Gulf of Izmir, Turkey. Saudi Med. J. 2016; 37 (6): 703-706.

82. Askari Z, Mirjalali H, Mohebali M, et al. Molecular detection and identification of zoonotic microsporidia spore in fecal samples of some animals with close-contact to human. Iran J Parasitol. 2015; 10 (3): 381-388.

83. Fayer R, Santin M, Trout JM. First detection of microsporidia in dairy calves in North America. Parasitol. Res. 2003; 90 (5): 383-386.

84. Haro M, Izquierdo F, Henriques-Gil N, et al. First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71 (6): 3153-3157.

85. Bornay-Llinares FJ, da Silva AJ, Moura H, et al. Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. J. Infect. Dis. 1998; 178 (3): 820-826.

86. Malcekova B, Halanova M, Sulinova Z, et al. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon intestinalis* in humans and animals. Res. Vet. Sci. 2010; 89 (3): 358-361.

87. Valencakova A, Balent P, Huska M, et al. First report on *Encephalitozoon intestinalis* infection of swine in Europe. Acta Vet. Hung. 2006; 54 (3): 407-411.

88. Halanova M, Cislakova L, Valencakova A, et al. Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. Ann. Agric. Environ. Med. 2003; 10 (1): 117-120.

89. Hollister WS, Canning EU, Viney M. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in stray dogs as determined by an ELISA. Vet. Rec. 1989; 124 (13): 332-336.

90. Jordan CN, Zajac AM, Snowden KS, et al. Direct agglutination test for *Encephalitozoon cuniculi*. Vet. Parasitol. 2006; 135 (3-4): 235-240.

91. Szabo JR, Shadduck JA. Immunologic and clinicopathologic evaluation of adult dogs inoculated with *Encephalitozoon cuniculi*. J. Clin. Microbiol. 1988; 26 (3): 557-563.

92. Santin M, Fayer R. *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. J. Eukaryot. Microbiol. 2009; 56 (1): 34-38.

93. Deplazes P, Mathis A, Weber R. Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. Contrib. Microbiol. 2000; 6: 236-260.

94. Mathis A, Breitenmoser AC, Deplazes P. Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat. Parasite. 1999; 6 (2): 189-193.

95. Rinder H, Thomschke A, Dengjel B, et al. Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. J. Parasitol. 2000; 86 (1): 185-188.

96. Sulaiman IM, Fayer R, Lal AA, et al. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69 (8): 4495-4501.

97. Black SS, Steinohrt LA, Bertucci DC, et al. *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (Melopsittacus undulatus). Vet. Pathol. 1997; 34 (3): 189-198.

98. Snowden KF, Logan K, Phalen DN. Isolation and characterization of an avian isolate of *Encephalitozoon hellem*. Parasitology. 2000; 121 (Pt 1): 9-14.

99. Suter C, Mathis A, Hoop R, et al. *Encephalitozoon hellem* infection in a yellow-streaked lory (*Chalcopsitta scintillata*) imported from Indonesia. Vet. Rec. 1998; 143 (25): 694-695.

100. Hofmannova L, Sak B, Jekl V, et al. Lethal *Encephalitozoon cuniculi* genotype III infection in Steppe lemmings (Lagurus lagurus). Vet. Parasitol. 2014; 205 (1-2): 357-360.

101. Matos O, Lobo ML, Xiao L. Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* Infection in Humans. J Parasitol Res. 2012; 2012: 981424.

102. Pirestani M, Sadraei J, Forouzandeh M. Molecular characterization and genotyping of human related microsporidia in free-ranging and captive pigeons of Tehran, Iran. Infect. Genet. Evol. 2013;20:495-499.

103. Santin M, Fayer R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. Res. Vet. Sci. 2011; 90 (3): 363-371.

104. Zhao W, Zhang W, Wang R, et al. *Enterocytozoon bieneusi* in sika deer (*Cervus nippon*) and red deer (Cervus elaphus): deer specificity and zoonotic potential of ITS genotypes. Parasitol. Res. 2014; 113 (11): 4243-4250.

105. Didier ES, Vossbrinck CR, Baker MD, et al. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology. 1995; 111 (Pt 4): 411-421.

106. Rossi P, La Rosa G, Ludovisi A, et al. Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. Int. J. Parasitol. 1998; 28 (9): 1361-1366.