

İshalli Olgularda *Microsporidia* Sıklığının Calcofluor Beyazı ve Uvitex 2B Kemiluminesans Boyama Yöntemleriyle Araştırılması ve Türlerinin Moleküler Yöntemle Tiplendirilmesi*

Investigation of *Microsporidia* Prevalence with Calcofluor White and Uvitex 2B Chemiluminescence Staining Methods and Molecular Analysis of Species in Diarrheal Patients

İlkiz OĞUZ KAYA¹, Funda DOĞRUMAN AL¹, İpek MUMCUOĞLU²

¹ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

² University of Health Sciences, Ankara Numune Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, ilk isim yazarın yüksek lisans tez çalışmasını içermekte olup (Proje no: 01/2011-38) Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

* Bu çalışma, 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi (29 Eylül-5 Ekim 2013)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 19.06.2018 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 10.09.2018

ÖZ

Zorunlu hücre içi paraziti olan *Microsporidia*, ilk kez 1857 yılında Nageli tarafından tanımlanmıştır. *Microsporidia* filumunda 200 cins ve 1500 tür bulunmaktadır. *Microsporidia* türlerinin böcekler, balıklar ve memeliler gibi geniş bir konak çeşitliliği bulunmaktadır. Hayvanlar dışında insanları da enfekte edebildiği ve insanlarda hem semptomatik hem de asemptomatik olarak bulunabildiği gösterilmiştir. İnsanı enfekte eden sekiz cins bulunmaktadır. Bu cinsler; *Anncaliia* (*Brachiola*, *Nosema*), *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Microsporidium*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora* ve *Vittaforma*'dır. İnsanlarda en sık enfeksiyon oluşturan türler *Encephalitozoon intestinalis* ve *Enterocytozoon bienersi*'dir. Bu çalışmada iki farklı kemiluminesans boya olan uvitex 2B ve calcofluor ile *Microsporidia* sıklığının belirlenmesi ve etken türlerinin moleküler olarak tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 2012-2013 yılları arasında Gazi Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ile Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen ishalleri 200 hastanın dışkı örnekleri incelenmiştir. Dışkı örnekleri kemiluminesans boya olan uvitex 2B ve calcofluor yöntemleriyle boyanmış ve floresan mikroskopu ile değerlendirme sonucunda *Microsporidia* sıklığı %38.5 (77/200) olarak saptanmıştır. Kemiluminesans boya olan uvitex 2B ve calcofluor arasında *Microsporidia* saptama açısından istatistiksel olarak mükemmel bir uyum olduğu belirlenmiştir (Cohen's kappa= 0.881). Uvitex 2B ile calcofluor'un mikroskop sahasındaki *Microsporidia* sporlarının sayısal yoğunluğuna (az, çok) ve sporların parlaklıklarına (soluk, parlak) göre uyumlulukları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, iki boya arasında sporların sayısal yo-

ğunluğunun saptanması açısından orta düzeyde uyum belirlenirken (Cohen's $\kappa=0.354$), sporların parlaklıklarının belirlenmesi açısından herhangi bir uyum saptanmamıştır (Cohen's $\kappa=0.001$). Çalışmada *Microsporidia* sıklığının yaş grupları ve kliniklere göre dağılımında anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0.05$). Cinsiyete göre ise *Microsporidia* sıklığının kadınlarda (%50) erkeklere (%30.8) göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Uvitex 2B ve calcofluor boyaları ile *Microsporidia* pozitif saptanan 77 örnekte multipleks nested polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle cins ve tür düzeyinde tanımlama yapılmıştır. Kemilüminesans boyalarla *Microsporidia* tespit edilen 77 izolatın multipleks nested PCR ile yedisi (%9.1) *E.bieneusi*, 70 (%90.9)'i ise *Encephalitozoon* spp. olarak belirlenmiştir. *Microsporidia* cinsleri göz önüne alındığında yaş, cinsiyet ve gönderilen kliniklere göre *Microsporidia* sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu çalışmada 70 adet *Encephalitozoon* spp.'nin 44'ü (%62.9) *E.intestinalis*, 22'si (%31.4) *E.cuniculi* ve dördü ise (%5.7) *E.hellem* olarak belirlenmiştir. *Encephalitozoon* türlerinin yaş, cinsiyet ve kliniklerine göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). *Microsporidia* tanısında ilk aşamada dışkı örneklerinin kemilüminesans boya olan uvitex 2B ve/veya calcofluor boyama yöntemleriyle incelenmesinin yararlı olacağı sonucuna varılmış ve multipleks nested PCR yönteminin cins ve tür belirlenmesinde kullanılmasının yararlı olduğu gözlenmiştir. Ülkemizde dışkı örneklerinde *Microsporidia* prevalansının moleküler analizi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. İshalli olgularda tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi ve *Microsporidia* epidemiyolojisinin saptanması için moleküler yöntemler daha sık kullanılmalıdır.

Anahtar sözcükler: *Microsporidia*; *Enterocytozoon bieneusi*; *Encephalitozoon* spp.; ishal.

ABSTRACT

Microsporidia, obligate intracellular parasites, were first defined by Nageli in 1857. *Microsporidia* phylum consists of 200 genus and 1500 species. They have a wide host spectrum including insects, fish, and mammals. It has been shown that they may also infect humans and may be existed both in symptomatic and asymptomatic forms. There are eight species infecting humans, which include *Anncaliia* (*Brachiola*, *Nosema*), *Encephalitozoon*, *Entrocytozoon*, *Microsporidium*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, and *Vittiforma*. The species most commonly infect humans are *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi*. The aim of this study was to determine the prevalence of *Microsporidia* by using two different chemiluminescence stains, namely uvitex 2B and calcofluor and detect species by molecular analysis in diarrheal patients. For this purpose, we studied stool samples of 200 patients with diarrhea sent to Gazi University Health Practice and Research Hospital, Microbiology Laboratory and Ankara Numune Training and Research Hospital Microbiology Laboratory between 2012-2013. The stool samples were stained with chemiluminescent stains uvitex 2B and calcofluor methods; the *Microsporidia* prevalence was found to be 38% (77/200) by fluorescent microscopic examination. Statistically an excellent consistency was found between the chemiluminescent stains uvitex 2B and calcofluor (Cohen's $\kappa=0.881$). A statistical analysis for the consistency of uvitex 2B and calcofluor in terms of numerical density (low, high) and luminescence of spores (dim, bright) showed a moderate consistency between the two stains with respect to determining numerical density of spores (Cohen's $\kappa=0.354$), while there was no consistency in terms of luminescence of spores (Cohen's $\kappa=0.001$). No significant difference was found between the *Microsporidia* prevalence with respect to age group or clinics ($p>0.05$). A sex-based analysis showed that *Microsporidia* prevalence was more common in women (50%) than men (30.8%) ($p<0.05$). In 77 samples that were detected positive for *Microsporidia* with uvitex 2B and calcofluor stains determination of genus and species level were done by using multiplex nested polymerase chain reaction (PCR) method. With this technique, seven (9.1%) of 77 isolates were detected as *E.bieneusi*, and 70 (90.9%) as *Encephalitozoon* spp. When the *Microsporidia* genus was considered, the *Microsporidia* prevalence did not show differences with respect to age, sex, and referring clinics ($p>0.05$). In our study 44 (62.9%) of 70 *Encephalitozoon* spp. were *E.intestinalis*, 22 (31.4%) were *E.cuniculi*, and 4 (5.7%) were *E. hellem*. No statistical difference was found in the distribution of *Encephalitozoon* spp. with age, sex, and referring clinic ($p>0.05$). We concluded that examination of stool samples with the chemiluminescent stain uvitex 2B and/or calcofluor would be useful for the initial stage of *Microsporidia* diagnosis; furthermore, the multiplex nested PCR method was considered useful for determination of genus and species. In our country, there is a small number of molecular reports about *Microsporidia*

prevalence in stool samples. Molecular methods should be used more commonly for the evaluation of treatment options in diarrheal patients and detection of *Microsporidia* epidemiology.

Keywords: *Microsporidia*; *Enterocytozoon bieneusi*; *Encephalitozoon* spp.; diarrhea.

GİRİŞ

İlk defa ipek böceği ve bal arılarının patojeni olarak yaklaşık 150 yıl kadar önce tanımlanan *Microsporidia* lar, doğada yaygın olarak bulunmakta ve hemen hemen tüm vertebrali ve vertebrasız konakları enfekte edebilmektedirler. *Microsporidia* filumu önceden "ilkel protozoonlar" olarak tanımlanırken moleküler filogenetik analizlerde mantarlarla ilişkili olduğu saptanmıştır^{1,2}. Tek hücreli, sporlu, hücre içi paraziti olan *Microsporidia* türleri 1.0-3.0 µm x 1.5-4.0 µm boyutlarında küçük canlılardır³. Günümüze kadar *Microsporidia* filumunun 200'den fazla cinsi ve 1500'den fazla türü tanımlanmıştır. İnsanlarda sekiz cinse ait 14 türün çeşitli enfeksiyonlara neden olduğu belirtilmektedir⁴. En sık görülen klinik tablo ishal olup etken olarak *Encephalitozoon* türleri (*Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon cuniculi*) ve *Enterocytozoon bieneusi* izole edilmektedir³.

Microsporidia genellikle insan immünyetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte olgularda, transplantasyon hastalarında, kemoterapi alanlarda, kronik otoimmün hastalıklarla ilişkili immünyetmezlik olgularında olduğu gibi immün sistemi yetersiz bireylerde fırsatçı enfeksiyonlara neden olmakla birlikte, immün yeterli bireylerde de kendini sınırlayan veya asemptomatik olarak seyreden enfeksiyonlar olarak görülmektedir⁴.

Microsporidia enfeksiyonlarının kaynağı tam olarak belirlenememiş olsa da insanları enfekte eden türlerin genotipleriyle evcil, çiftlik ve doğadaki hayvanlardan izole edilenlerle benzer olması, *Microsporidia* enfeksiyonunun zoonotik hastalık olarak düşünülmesini desteklemektedir^{5,6}. Bununla birlikte sporlarla kontamine besin ve suların tüketilmesinin bulaşta başlıca rol oynadığı da ileri sürülmektedir⁷⁻¹⁰.

Microsporidia tanısında elektron mikroskobu, modifiye trikrom boyama, kitinli spor duvarını hedefleyen floresan boyalar (calcoflour white, uvitex 2B), histokimyasal incelemeler, immünyofloresan antikor yöntemi ve son yıllarda yaygınlaşan moleküler yöntemler kullanılmaktadır³.

Bu çalışmada, gastrointestinal şikayetleri nedeniyle dışkı incelemesi için gönderilen toplam 200 ishali dışkı örneğinde *Microsporidia* sıklığının saptanması ve türlerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 26.08.2010 ve Karar No: 14).

Gazi Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ve Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Aralık 2011-Ocak 2013 tarihleri arasında gastrointestinal şikayetleri ne-

deniyle dışkı incelemesi için gönderilen toplam 200 ishalli dışkı örneği çalışmaya dahil edildi. Her örnek için formol-eter çoklaştırma yöntemi uygulandı¹¹. Çoklaştırma yapılan örnekler + 4°C'de uvitex 2B ve calcofluor boyama yöntemi yapılıncaya kadar saklandı. Uvitex 2B ve calcofluor boyama yöntemi için lama yayılan örnekler kurutulduktan sonra metil alkol ile 10 dakika süreyle tespit edildi.

Calcofluor boyama için "Fluorescent Brightener 28" (Sigma, Almanya), %0.1'lik olarak "phosphate buffered saline (PBS)" tablet (Oxoid, İsviçre) ile sulandırılarak hazırlandı. Evan's mavisi (Sigma, Almanya) ise %5'lik olarak PBS ile sulandırılarak hazırlandı. Calcofluor boyama, sırasıyla 3 dakika calcofluor ile boyama, 1-2 sn distile su ile yıkama, 30 sn Evan's mavisi ile boyama ve 1-2 sn distile su ile yıkama basamakları şeklinde uygulandı^{12,13}. Uvitex 2B boyama için ise; uvitex 2B (Polysciences Inc., İngiltere), %1'lik Evan's mavisi ise %0.5'lik olarak PBS ile sulandırılarak hazırlandı. Uvitex 2B boyama, sırasıyla 10 dakika uvitex 2B ile boyama, 1-2 sn PBS ile yıkama, 1 dakika Evan's mavisi ile boyama ve 1-2 sn PBS ile yıkama basamakları şeklinde uygulandı. Preparatlar kuruduktan sonra immersiyon yağı ile floresan mikroskopta 395-415 nm dalga boyunda x100'lük objektifle incelendi^{12,13}. Tür tayini yapabilmek için boyama yöntemleri ile *Microsporidia* spp. saptanan örneklerin -20°C'de saklanan alikotlanmış dışkılarından ticari kit kullanılarak (Qiagen Mini Stool Kit, Almanya) DNA izolasyonu yapıldı. Bu amaçla 2 ml'lik ependorflara 180-220 mg dışkı konularak, üzerine 200 µl PBS eklendi ve 20 µl (1.5 U/µl) zymolase (Seikagaku Bio Busines, Japonya) eklendikten sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bu işlem sonrasında üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı.

Elde edilen DNA örneklerinden *E.bieneusii* ve *Encephalitozoon* türlerinin belirlenmesi multipleks nested PCR yöntemiyle yapıldı. Bu amaçla kullanılan oligonükleotit primer dizileri Tablo I'de sunuldu^{14,15}.

Multipleks nested PCR yönteminde ilk döngüde MSP-1, MSP-2A, MSP-2B primerleri kullanılırken, ikinci döngüde ise MSP-3, MSP-4A, MSP-4B primerleri kullanıldı ve Katzwinkel-Wladarsch ve arkadaşlarının tanımladığı ısı döngü programlarıyla ve karışım içeriğiyle DNA çoğaltıldı¹⁴.

Tablo I. *Enterocytozoon bieneusii* ve *Encephalitozoon* Türlerinin Belirlenmesi için Multipleks Nested PCR Yönteminde Kullanılan Oligonükleotit Primer Dizileri

Primer adı	Primer dizileri
MSP-1	5'-TGAATGKGTCCCTGT-3'
MSP-2A	5'-TCACTCGCCGCTACT-3'
MSP-2B	5'-GTTCAATCGCACTACT-3'
MSP-3	5'-GGAATTCACACCGCCCGTCRYTAT-3'
MSP-4A	5'-CCAAGCTTATGCTTAAGTYMAARGGGT-3'
MSP-4B	5'-CCAAGCTTATGCTTAAGTCCAGGGAG-3'

Multipleks nested PCR sonrasında çoğaltılan ürünler, yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra %1.5'lik agaroz jele yüklendi. Etidyum bromür (2 µl/ml) içeren 1 x Tris-Borik asit-EDTA tamponunda 15 dakika bekletildikten sonra amplikon büyüklüklerine göre *E.bieneusi* için 500 bp, *E.intestinalis* için 300 bp, *E.cuniculi* için 310 bp, *E.hellem* için ise 320 bp uzunlukta gözlenen bantlar görüntülendi.

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. İki farklı kemiluminesans boya uyumluluğu Cohen's Kappa testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 200 olgunun 80(%40)'i kadın, 120(%60)'si erkek hastalardan oluşmuştur. Hastaların 0-87 yaş aralığında olduğu saptanmıştır. Örnekler 35 farklı klinikten gönderilmiştir ancak istatistiksel analiz yöntemlerinin uygulanabilmesi için 35 klinik; dahili bilimler (n= 130, %65), cerrahi bilimler (n= 15, %7.5) ve pediatri polikliniği (n= 55, %27.5) olmak üzere üç bölümde gruplandırılmıştır. Bu gerekçe ile olgular üç farklı yaş grubuna ayrılmış ve yaş grupları; 0-18, 19-45 ve 45 yaş üzeri olarak belirlenmiştir. Buna göre, 0-18 yaş aralığında 64 (%32), 19-45 yaş aralığında 64 (%32), 45 yaş üzerinde 72 (%36) olgu yer almıştır.

Kadınların %50'sinde erkeklerin %30.8'sinde *Microsporidia* pozitifliği belirlenmiş ve kadınlardaki *Microsporidia* sıklığının yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Yate's düzeltilmeli ki-kare testi, $p < 0.05$).

Yaş gruplarına göre *Microsporidia* sıklığı değerlendirildiğinde; 0-18 yaş aralığında %39.7, 19-45 yaş aralığında %38.5, 45 yaş ve üzerinde %37.5 olarak belirlenmiş ve yaş gruplarına göre *Microsporidia* pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Pearson ki-kare testi, $p > 0.05$).

Klinik servislere göre *Microsporidia* saptanma sıklığı değerlendirildiğinde; dahili bilimlerden gönderilen 130 hastanın %36.2'sinde, cerrahi bilimlerden gönderilen 15 hastanın 7 (%46.7)'sinde ve pediatri polikliniğinden gönderilen 55 hastanın %41.8'inde pozitiflik saptanmış, klinik gruplara göre *Microsporidia* pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir (Pearson ki-kare testi, $p > 0.05$).

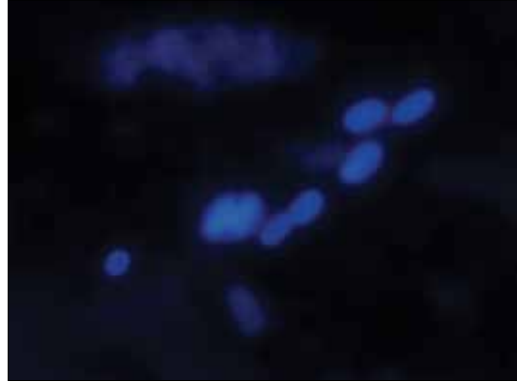
Çalışmamızda cinsiyet, yaş ve klinik gruplara göre *E.bieneusi* ve *Encephalitozoon* spp. saptanması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Pearson ki-kare testi, $p > 0.05$). Bununla birlikte, *E.bieneusi* saptanan örnek sayısı çok az olduğu için bu konuda genelleme yapılması da mümkün olmamıştır.

Dışkı örneklerinin uvitex 2B ve calcoflour boylarıyla hazırlanan preparatlarının floresan mikroskopuyla incelenmesinde, *Microsporidia* sporları parlak turkuaz renkli sporlar şeklinde görülmüştür (Resim 1,2). Bazı preparatlarda sporun bir ucunda polar filamentten dolayı daha koyu boyanma olduğu tespit edilmiştir (Resim 3).

İki farklı kemiluminesans boyama ile toplam 200 preparat değerlendirilmiş ve uvitex 2B ile incelen örneklerin 76 (%38)'sında, calcoflour beyazı ile 67 (%33.5)'sinde *Micros-*



Resim 1. Uvitex 2B ile boyanan Microsporidia'ların görüntüsü.



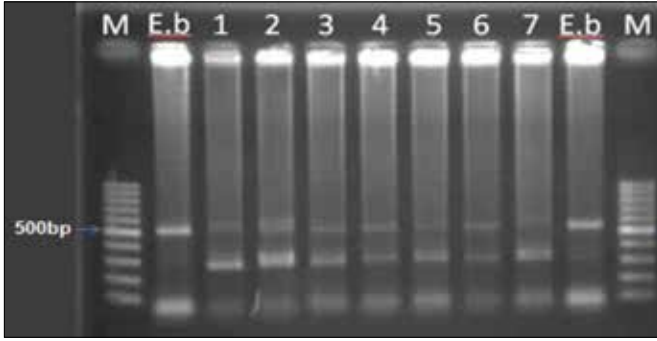
Resim 2. Calcofluor beyazı ile boyanan Microsporidia'ların görüntüsü.



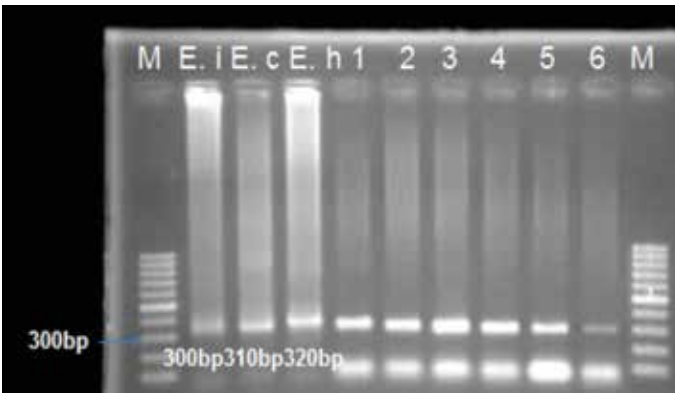
Resim 3. Uvitex 2B ile polar tüpü belirgin boyanan Microsporidia görüntüsü.

poridia saptanmıştır. Uvitex 2B boyama yönteminin saptayıp, calcoflour boyama yönteminin saptayamadığı 10 örnek, calcoflour boyama yönteminin saptayıp, uvitex 2B boyama yönteminin saptayamadığı bir örnek belirlenmiştir. Her iki boya ile 66 örnekte pozitiflik bulunmuştur. İki kemiluminesans boyanın uyumuna bakıldığında calcoflour ile uvitex 2B boyama yöntemleri arasında mükemmel bir uyum olduğu saptanmıştır (Cohen's kappa= 0.881). *Microsporidia* yoğunluğunu belirleme açısından her iki boyama yöntemi arasındaki uyum düşük-orta düzeyde (Cohen's kappa= 0.354) saptanırken, parlaklıkları değerlendirildiğinde aralarında herhangi bir uyum olmadığı belirlenmiştir (Cohen's kappa= 0.000). Uvitex 2B ile calcoflour boyasına göre daha parlak görüntü elde edildiği saptanmıştır ($p < 0.05$).

Her iki boyama yöntemiyle incelenen 200 örneğin 77 (%38.5)'inde *Microsporidia* tespit edilmiştir. Tür ayırımı yapabilmek amacıyla multipleks nested PCR yöntemi kullanılmış ve 77 örneğin tümü multipleks nested PCR ile tanımlanmıştır. Buna göre 77 örneğin 7 (%9.1)'si *E.bieneusi*, 70 (%90.9)'i *Encephalitozoon* spp. olarak belirlenmiştir. *Encepha-*



Resim 4. Multipleks nested PCR ile *E.bieneusi* olarak tanımlanan yedi örneğin agaroz jel görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirteci, E.b: *E.bieneusi* pozitif kontrol).



Resim 5. *Encephalitozoon* spp.'nin tür dağılımında; pozitif kontroller ile örneklerin agaroz jel görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirteci, pozitif kontroller; E.i: *E.intestinalis*, E.c: *E.cuniculi*, E.h: *E.hellem*, örnekler; 1= 320 bp (*E.hellem*), 2= 310 bp (*E.cuniculi*), 3, 4, 5, 6= 300 bp (*E.intestinalis*)).

litozoon spp. olarak tanımlanan örneklerin 44 (%62.9)'ü *E.intestinalis*, 22 (%31.4)'si *E. cuniculi*, 4 (%5.7)'ü *E.hellem* olarak tanımlanmıştır (Resim 4,5).

TARTIŞMA

Microsporidia enfeksiyonları AIDS hastalığından önce insanlarda nadiren tanımlanırken, özellikle son 20 yılda tanı yöntemlerinin gelişmesiyle yalnız bağırsaklarda değil aynı zamanda farklı organ ve dokularında tutabilen ve sistemik yayılımla seyreden enfeksiyonları dikkat çekmeye başlamıştır¹⁶. Gerek HIV ile enfekte immünyetmezliği olan olgularda gerekse HIV ile enfekte olmayan ancak immünyetmezliği olan olgularda (organ transplant alıcıları, diğer malign hastalığı olanlar, diyabetli olgular), çocuklarda, yaşlılarda, bağışıklığı yeterli olan hastalarda enfeksiyonlara neden olmaktadır^{4,16}.

İshal olgularının yaklaşık yarısında etyolojik etken tanımlanamamaktadır. *Microsporidia* türlerinde mevcut tanı güçlükleri ve rutin laboratuvarlarda uygun testlerin olmaması bu durumda önemli rol oynamaktadır⁴.

Bağışıklığı yeterli olan olgularda *Microsporidia* enfeksiyonlarının asemptomatik seyreden ve kendini sınırlayan enfeksiyonlar olduğu düşünülmekle birlikte, AIDS olgularının %30-70'inde ishal ataklarına neden olabildiği bildirilmektedir⁴.

İran'da AIDS, hematolojik malignansi, hemodiyaliz ve böbrek nakil olgularının toplam 310 dışkı örneğinde modifiye trikrom (Weber) yöntemi ve multipleks nested PCR yöntemi ile sırasıyla %30 ve %28.4 sıklığında *Microsporidia* pozitifliği saptanmıştır. *Microsporidia*'ların %70.4'ü *E.bieneusi*, %29.6'sı ise *Encephalitozoon* türleri olarak belirlenmiştir. *Encephalitozoon* türlerinin 19'u *E.intestinalis*, dördü *E.hellem*, üçü *E.cuniculi* olarak tanımlanmıştır¹⁷.

Diğer bir çalışmada ise HIV pozitif olgularda %11.6 *E.bieneusi* pozitifliği saptanırken, HIV negatif olgularda pozitiflik saptanamamıştır¹⁸. Başka bir çalışmada ise HIV pozitif olgularda *Microsporidia* prevalansı %36 olarak belirlenmiş, *E.intestinalis* türü baskın tür olarak saptanmıştır¹⁹.

Hindistan'da multipleks nested PCR, modifiye trikrom boyama ve calcofluor boyama yöntemleriyle ishaller ve ishalsiz HIV pozitif olgular ile ishalleri HIV negatif olgular ve sağlıklı olgularda *Microsporidia* sıklığı araştırıldığında, 395 olgunun dışkı örneğinde modifiye trikrom boyama yöntemiyle %5.6, calcofluor beyazı boyama yöntemiyle %24.8, PCR ile %14.4 *Microsporidia* pozitifliği (*E.intestinalis* n= 40, *E.bieneusi* n= 17) saptanmıştır. *Microsporidia* varlığı PCR yöntemiyle HIV pozitif ishalleri olgularda %30.4, HIV pozitif ishalsiz olgularda %7.6, HIV negatif ishalleri olgularda ise %12.7 olarak saptanmış, sağlıklı kişilerin hiçbirinde parazit belirlenememiştir²⁰. Kahnduja ve arkadaşları²¹ ise HIV pozitif olgularda *Microsporidia* pozitifliğini sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde yüksek olarak belirlemişler ve sadece *E.bieneusi* saptadıklarını (%1.8), *Encephalitozoon* spp. belirlemediklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar *Microsporidia* pozitifliğinin ishalleri HIV pozitif olgularda daha yaygın olduğunu belirlemişlerdir.

Weber modifiye trikrom boyama, calcoflour ve akridin oranj boyama yöntemleriyle ishali olgularda %9.8 sıklığında *Microsporidia* pozitifliği belirlediğimiz daha önceki çalışmamızda, *Microsporidia* sıklığında erişkin ve çocuk yaş grubu ile cinsiyet farklılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Bununla birlikte, pratik bir yöntem olan calcoflour boyama yönteminin modifiye trikrom ile çok güçlü seviyede tutarlılık gösterdiği, duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğu belirlenmiştir¹². Diğer bir çalışmamızda ise, modifiye trikrom, calcoflour ve uvitex 2B boyama yöntemleriyle *Microsporidia* akut ishali olgularda %27, kronik ishali olgularda %34.1 ve ilginç olarak sağlıklı gönüllülerde %45.5 sıklığında saptanmış, yine şaşırtıcı olarak yaş ilerledikçe ve katı dışkılarda pozitifliğin arttığı gözlenmiştir¹³. Bu çalışmamızda ise kadınlarda *Microsporidia* pozitifliği daha yüksek olarak saptanırken ($p < 0.05$) yaş grupları arasında bir fark belirlenmemiştir.

Bağıışıklığı yeterli, gastrointestinal şikayeti olan erişkinlerde modifiye trikrom ve calcoflour yöntemleriyle %6.5 sıklığında *Microsporidia* saptanan bir çalışmada, yaş ve cinsiyetle ilişkisi gösterilememiş, klinik olarak dispepsi ile ilişkisi olduğu belirlenmiştir²². Aynı çalışmada gastrointestinal şikayeti olan bağıışıklığı yeterli çocuklarda aynı boyalara kullanılarak %7.8 *Microsporidia* pozitifliği saptanmıştır²³.

Başka bir çalışmada gastrointestinal şikayetleri olan kanserli olgular ile kanserli olmayan olgularda modifiye trikrom ve calcoflour boyama yöntemleriyle *Microsporidia* pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.01$)²⁴.

Microsporidia tanısında yaygın olarak kullanılan boyama tekniklerinin PCR yöntemine göre duyarlılığının, özgüllüğünün ve tanı etkinliğinin daha düşük olduğu, boyama yöntemleriyle PCR uyumunun da orta düzeyde olduğu belirtilmektedir. Aynı zamanda PCR yöntemiyle *Microsporidia* türlerinin tanımlanması mümkün olmaktadır²⁰. Dışkıda artefaktların ve hücre duvarında bulunan kitin yapısı nedeniyle mayaların calcoflour ile boyanma özelliklerinin olması yanlış pozitifliğin ve negatifliğin sebebi olabilmektedir²⁵.

Boyama yöntemlerinin düşük duyarlılık ve özgüllükte olması ve tecrübe gerektirmesi nedeniyle daha pratik olan immünfloresan antikor (IFA) yönteminin RFLP-PCR ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, IFA yönteminin *Microsporidia* tanısını %95.2 duyarlılık ve %100 özgüllükle gerçekleştirdiği saptanmıştır. Bu yöntem pratik olması ve yoğun tecrübe gerektirmemesine rağmen, düşük bütçeli ve floresan mikroskobu olmayan laboratuvarlarda kullanım şansı bulması mümkün olmamaktadır²⁶. Diğer bir çalışmada IFA yöntemiyle kemik iliği transplant alıcılarının %25.5'inde *E.intestinalis*, %4'ünde *E.bieneusi* ve %9.5'inde iki tür birden olmak üzere, toplam %39'unda *Microsporidia* pozitifliği saptanmıştır. Bu oranlar sağlıklı kontrol grubu için sırasıyla %5, %2.5, %3.8 ve %11.3 olarak tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında saptanan pozitiflik oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aynı çalışmada hasta grubunda pozitif bulunan 78 hastanın 67 (%85.9)'sinin ishali olduğu izlenmiş; ishal varlığı ile parazit pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olduğu görülmüştür²⁷. Bizim çalışmamızda da tüm olgular ishali olup *Microsporidia* pozitifliğimiz %38.5 gibi yüksek bir oran olarak belirlenmiştir. Bu sonuç diğer çalışmalarda olduğu gibi ishalle *Microsporidia* ilişkisini ortaya koymaktadır.

Kemoterapi alan kanserli olgularda da IFA-MAb yöntemi ile hastaların 43 (%46.2)'ünde. *E.intestinalis*, 9 (%9.7)'ünde *E.bieneusi* ve 13 (%14)'ünde karışık enfeksiyon olmak üzere toplam 65 (%69.9) olguda pozitiflik saptanmış; kontrol grubunda ise 2 (%6.7) *E.intestinalis*, 1 (%3.3) *E.bieneusi* ve 2 (%6.7) karışık enfeksiyon olmak üzere toplam 5 (%16.7) pozitif sonuç alınmıştır. Hasta ve kontrol grubunun pozitiflik oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). İshalli hastalardan %68.6 (35/51)'sının *Microsporidia* ile enfekte olduğu izlenmiş; *Microsporidia* pozitiflik oranı ishali olan ve olmayan olgular arasında anlamlı fark gösterilmiştir ($p < 0.05$). Tüm yöntemlerin birlikte uygulandığı 50 örnek değerlendirildiğinde; *Microsporidia* pozitiflik oranları IFA-MAb yöntemi ile %66 (n=33), modifiye trikrom boyama ile %34 (n=17), aside dirençli trikrom boyama ile %24 (n=12) ve calcofluor boyama ile %42 (n=21) olarak belirlenmiştir²⁸.

Çalışmamızda calcofluor ve uvitex 2B'nin kullanıldığı her iki boyama yöntemiyle incelenen 200 örneğin 77 (%38.5)'inde *Microsporidia* tespit edilmiştir. Tür ayrımını yapabilmek amacıyla multipleks nested PCR yöntemi kullanılmış ve 77 örneğin tümü multipleks nested PCR ile tanımlanmıştır. Buna göre 77 örneğin 7 (%9.1)'si *E.bieneusi*, 70 (%90.9)'i *Encephalitozoon* spp. olarak belirlenmiştir. *Encephalitozoon* spp. olarak tanımlanan örneklerin 44 (%62.9)'ü *E.intestinalis*, 22 (%31.4)'si *E.cuniculi*, 4 (%5.7)'ü *E.hellem* olarak tanımlanmıştır.

Pakistan'da tür spesifik primerlerle yapılan PCR ve sonrasında DNA dizi analizi ile kronik ishalli olgularda %5, hepatoselüler karsinomlularda %17 ve sağlıklı olgularda %1.4 sıklığında *E.intestinalis* belirlenmiş, olguların hiçbirinde *E.bieneusi* tespit edilmemiştir²⁹. Bu sonuç bizim de *Microsporidia* türleri içinde *E.bieneusi*'nin az sayıda saptanması bulgusuyla uyumluluk göstermektedir. İlginç olarak bu durumla çelişecek şekilde Malezya'da sosyoekonomik düzeyi düşük, sanitasyon koşulları yetersiz bölgede yaşayan bağışıklığı yeterli bireylerde PCR ile *E.bieneusi* %3.8 sıklığında saptanmış, örneklerin hiçbirinde *E.intestinalis* belirlenememiştir³⁰.

Cinsiyetler arasında *Microsporidia* pozitifliğinin saptanması açısından istatistiksel olarak fark saptanmayan çalışmalar bulunmasına rağmen çalışmamızda *Microsporidia* pozitifliği kadınlarda erkeklerden anlamlı olarak daha yüksek belirlenmiştir ($p < 0.05$)^{27,28}. Ashikin ve arkadaşları³⁰ ise *E.bieneusi* pozitifliğini erkeklerde (%5.12), kadınlardan (%2.66) daha yüksek olarak belirlerken, çalışmada yalnızca *E.bieneusi* türü araştırılmış ve katı dışkılarda pozitifliğin daha sık olduğunu saptanmıştır.

Dışkı örneklerinden DNA izolasyonunda özellikle *Microsporidia* spor duvarının etkili bir şekilde parçalanması DNA eldesinde önemli bir aşamayı oluşturmaktadır. Bu konuda standart bir yöntem bulunmaması çalışmaların karşılaştırılmasında zorluk yaratmaktadır³¹. Farklı prevalans sonuçlarının alınması ve tür dağılımındaki değişkenlik; farklı coğrafik bölgelerde yapılan çalışmalar, kullanılan yöntemler, seçilen primerler, bazı çalışmalarda yalnız *E.bieneusi* ve *E.intestinalis*'in araştırılması, çalışmaya alınan dışkı örneklerinin ishalli olup olmaması, çalışmaya dahil edilen olguların klinik özellikleri nedeniyle farklılık göstermek-

tedir. Çalışmalar immünyetmezlikli olguların yanında bağışık olgularda da *Microsporidia* türlerinin ishal etkeni olabileceğini göstermektedir^{12,13,30}.

Sonuç olarak, bu çalışmada ishali dışkı örneklerinde *Microsporidia* tanısında kemiluminensans boya olan uvitex 2B ve/veya calcoflour boyama yöntemlerinin pratik ve hızlı olması nedeniyle ilk tarama testi olarak kullanılmasının faydalı olacağı ve multipleks nested PCR yönteminin cins ve tür belirlenmesinde yararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Ülkemizde insanlarda *Microsporidia* sıklığı ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda genellikle mikroskopik yöntemler kullanılmıştır^{12,13,22,23,27,28}. Bu çalışma, ülkemizde ishali olgularda multipleks nested PCR ile *Microsporidia* tür tayininin yapıldığı ilk çalışmadır. Tanı ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesi ve *Microsporidia* epidemiyolojisi açısından türlerin tespiti için moleküler yöntemlerin yaygınlaşması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Pozitif kontrol olarak kullanılan *E.bieneusi* ve *Encephalotizoon* spp. türlerini sağladıkları için Elizabeth Didier ve Lisa Bowers'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Weiss LM, Edlind TD, Vossbrinck CR, et al. Microsporidian molecular phylogeny: the fungal connection. J Eukaryot Microbiol 1999; 46(5): 175-185.
2. James TY, Kauff F, Schoch CL, et al. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. Nature 2006; 443(7113): 818-22.
3. Didier ES, Weiss LM. Intestinal microsporidiosis. Curr Opin Infect Dis 2006; 19(5): 485-92.
4. Field AS, Milner DA Jr. Intestinal microsporidiosis. Clin Lab Med 2015; 35(2): 445-59.
5. Lešniarška K, Perec-Matysiak A. Wildlife as an environmental reservoir of *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia)-analyses of data based on molecular methods. Ann Parasitol 2017; 63(4): 265-81.
6. Javanmard E, Mirjalali H, Niyati M, et al. Molecular and phylogenetic evidences of dispersion of human-infecting microsporidia to vegetable farms via irrigation with treated wastewater: one-year follow up. Int J Hyg Environ Health 2018; 221(4): 642-51.
7. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the *Microsporidia*. Clin Microbiol Rev 2005; 18(3): 423-45.
8. Mehlhorn H. Microsporidia, pp: 123-128 In: Human Parasites, Diagnosis, Treatment, Prevention. 2016, Springer, Switzerland.
9. Karaman Ü, Kolören Z, Seferoğlu O, et al. Presence of parasites in environmental waters in Samsun and its districts. Türkiye Parazitol Derg 2017; 41(1): 19-21.
10. Chen JS, Hsu BM, Tsai HC, et al. Molecular surveillance of *Vittaforma*-like *Microsporidia* by a small-volume procedure in drinking water source in Taiwan: evidence for diverse and emergent pathogens. Environ Sci Pollut Res Int 2018; 25(19): 18823-37.
11. Garcia LS. Macroscopic and Microscopic examination of fecal specimens, pp:32-41, In: Diagnostic Medical Parasitology. 2016, 6th ed. ASM Press, USA.
12. Türk S, Doğruman Al F, Karaman U, et al. Investigation of *Microsporidia* prevalence by different staining methods in cases of diarrhea. Mikrobiyol Bul 2012; 46(1): 85-92.
13. Mumcuoglu I, Cetin F, Dogruman Al F, et al. Prevalence of *Microsporidia* in healthy individuals and immunocompetent patients with acute and chronic diarrhea. Infect Dis (Lond) 2016; 48(2): 133-7.

14. 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.
15. Franzen C, Müller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of *Microsporidia*. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 243-85.
16. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24(5): 490-5.
17. Tavalla M, Mardani-Kateki M, Abdizadeh R, et al. Molecular identification of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. in immunodeficient patients in Ahvaz, Southwest of Iran. *Acta Trop* 2017; 172: 107-12.
18. Liu H, Jiang Z, Yuan Z et al. Infection by and genotype characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in HIV/AIDS patients from Guangxi Zhuang autonomous region, China. *BMC Infect Dis* 2017; 17(1): 684.
19. Rivero-Rodríguez Z, Hernández Sierra A, Arráiz N, et al. Prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in HIV positive patients to Maracaibo, Venezuela. *Invest Clin* 2013; 54(1): 58-67.
20. Saigal K, Khurana S, Sharma A, et al. Comparison of staining techniques and multiplex nested PCR for diagnosis of intestinal microsporidiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77(3): 248-9.
21. Khanduja S, Ghoshal U, Agarwal V, et al. Identification and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* among human immunodeficiency virus infected patients. *J Infect Public Health* 2017; 10(1): 31-40.
22. 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): 113-5.
23. Calik S, Karaman U, Colak C. Prevalence of microsporidium and other intestinal parasites in children from Malatya, Turkey. *Indian J Microbiol* 2011; 51(3): 345-9.
24. 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): 109-12.
25. Garcia LS. Intestinal Protozoa (Coccidia), *Microsporidia*, Algae, pp: 648-662. In: *Diagnostic Medical Parasitology*. 2016, 6th ed. ASM Press, USA.
26. Ghoshal U, Khanduja S, Pant P, et al. Evaluation of immunofluorescence antibody assay for the detection of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitol Res* 2016; 115(10): 3709-13.
27. Çetinkaya Ü, Hamamcı 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): 432-8.
28. Hamamcı B, Çetinkaya Ü, Berk V, et al. Prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in cancer patients under chemotherapy. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(1): 105-13.
29. Yakoob J, Abbas Z, Beg MA, et al. Microsporidial infections due to *Encephalitozoon intestinalis* in non-HIV-infected patients with chronic diarrhoea. *Epidemiol Infect* 2012; 140(10): 1773-9.
30. Ashikin A, Al-Mekhlafi HM, Moktar N, et al. Molecular detection and species identification of *Enterocytozoon bieneusi* isolated from immunocompetent Orang Asli in Malaysia. *Parasitol Int* 2017; 66(2): 163-5.
31. Çetinkaya Ü, Charyyeva A, Sivcan E, et al. Evaluation of four commercial DNA extraction kits for the detection of *Microsporidia* and the importance of pretreatments in DNA isolation. *Acta Parasitol* 2018; 63(2): 386-92.