

Kemik İliği Transplant Hastalarında *Encephalitozoon intestinalis* ve *Enterocytozoon bieneusi* Varlığının IFA-MAbs Yöntemiyle Araştırılması

Investigation of the Presence of *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in Bone Marrow Transplant Patients by IFA-MAbs Method

Ülfet ÇETİNKAYA¹, Berna HAMAMCI², Leylagül KAYNAR³, Salih KUK¹, İzzet ŞAHİN¹, Süleyman YAZAR¹

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Kayseri, Turkey.

² Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Antakya.

² Mustafa Kemal University, Hatay Vocational School of Health, Antakya, Turkey.

³ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri.

³ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Kayseri, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 13.08.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 10.06.2015

ÖZ

Mikrosporidian patojenler her yerde bulunabilen, omurgalı ve omurgasız konaklarda enfeksiyona neden olabilen, 144 cins altında 1200'den fazla türü tanımlanmış zorunlu hücre içi ökaryotik parazitlerdir. İnsanlarda patojen olarak tanımlanan 14 microsporidia türü arasında en sık saptananlar *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon intestinalis* olup gastrointestinal sistemde enfeksiyona yol açmaktadırlar. Bu etkenler, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda kronik ishallerin yanı sıra, yaygın enfeksiyonlara neden olarak hayatı tehdit eden ağır klinik tablolar oluşturmaktadır. Microsporidia sporları çok küçük olduklarından, rutin dışı incelemelerinde genellikle gözden kaçmaktadır. Bu nedenle tanıda moleküler yöntemler ve mümkünse transmisyon elektron mikroskopi altın standart olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin uygulanmadığı laboratuvarlarda ise, monoklonal antikorların kullanıldığı immüno floresan antikor (IFA-MAbs) yöntemi, konvansiyonel yöntemlere üstünlüğü nedeniyle tercih edilebilir. Bu çalışmada, kemik iliği transplant (KİT) hastalarında *E.intestinalis* ve *E.bieneusi* varlığının IFA-MAbs yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 147'sinde ishal şikayeti olan 200 KİT hastası (134'ü erkek, 66'sı kadın; yaş ortalaması: 43.2 ± 15.01 yıl) ile kontrol olarak 80 sağlıklı birey (43'ü erkek, 37'si kadın; yaş ortalaması: 31.9 ± 11.76 yıl) dahil edilmiştir. Tüm olguların dışkı örnekleri, konvansiyonel yöntemlerin (nativ-lugol ve modifiye aside dirençli boyama) yanı sıra, ticari bir IFA-MAbs (Bordier Affinity Products,

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Süleyman Yazar, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, 38039 Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 352 6666/2340, **E-posta (E-mail):** syazar@erciyes.edu.tr

İsviçre) yöntemiyle de değerlendirilmiştir. Hastaların %25.5 (51/200)'ünde *E.intestinalis*, %4 (8/200)'ünde *E.bieneusi* ve %9.5 (19/200)'ünde her ikisi birden olmak üzere, toplam %39 (78/200)'unda pozitiflik saptanmıştır. Bu oranlar kontrol grubu için sırasıyla, %5 (4/80), %2.5 (2/80), %3.8 (3/80) ve %11.3 (9/80) olarak tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında saptanan pozitiflik oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (%39'a karşı %11.3, $p < 0.05$). Hasta grubunda pozitif bulunan 78 hastanın 67 (%85.9)'ünün ishalleri olduğu izlenmiş; ishal varlığı ile parazit pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Sonuç olarak, KİT hastalarının yaşam kalitesini yükseltmek ve tedavi sürecindeki olumsuzlukları azaltmak için, bu hastaların, özellikle de gastrointestinal yakınması olanların düzenli aralıklarla *E.intestinalis* ve *E.bieneusi* açısından değerlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Encephalitozoon intestinalis*; *Enterocytozoon bieneusi*; kemik iliği transplantlı hasta; IFA-MAbs.

ABSTRACT

Microsporidian pathogens are obligatory intracellular eukaryotic parasites which can be found worldwide. They have been represented in 144 genera and more than 1200 species that may cause infections in both vertebrate and invertebrate hosts. *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* are the most common species among 14 species of microsporidia identified as human pathogens and they cause infections in the gastrointestinal tract. These species may also cause chronic diarrhea particularly in immunocompromised patients, as well as disseminated infections with severe clinical conditions which can be life-threatening. Since the spores of microsporidia are quite small-sized structures, they frequently may be overlooked in routine stool examinations. Therefore, molecular methods and transmission electron microscopy, if possible, are used as the gold standard methods in laboratory diagnosis. In laboratories in which those methods could not be applied, immunofluorescence assay using monoclonal antibodies (IFA-MAbs) may be advantageous compared to conventional methods. The aim of this study was to investigate the presence of *E.intestinalis* and *E.bieneusi* in bone marrow transplant (BMT) patients by using IFA-MAbs method. A total of 200 BMT patients (134 male, 66 female; mean age: 43.2 ± 15.01 years), of them 147 with diarrhea and 80 healthy subjects (43 male, 37 female; mean age: 31.9 ± 11.76 years) as control group were included in the study. All of the stool samples were examined by a commercial IFA-MAbs (Bordier Affinity Products, Switzerland) method as well as conventional (native-lugol and modified acid-fast staining) methods. Of the patients 25.5% (51/200) were positive for *E.intestinalis*, 4% (8/200) for *E.bieneusi* and 9.5% (19/200) for both of them, giving a total positivity rate of 39% (78/200). Those rates were 5% (4/80), 2.5% (2/80), 3.8% (3/80) and 11.3% (9/80), respectively for control group. The difference between the patient and control groups in terms of positivity was found statistically significant (39% vs 11.3%, $p < 0.05$). Among 78 positive BMT patients, 67 (85.9%) were suffering from diarrhea. The correlation between the presence of diarrhea and the presence of microsporidia was statistically significant ($p < 0.05$). It was concluded that, BMT patients particularly those with gastrointestinal complaints, have to be evaluated for microsporidian pathogens regularly to improve quality of life and to decrease the problems during the treatment period.

Keywords: *Encephalitozoon intestinalis*; *Enterocytozoon bieneusi* bone marrow transplant patient; IFA-MAbs.

GİRİŞ

Microsporidian patojenler omurgalı ve omurgasız geniş bir konak seçiciliği gösteren, 1-20 μm ebatlarında spor oluşturan zorunlu hücre içi patojenlerdir. 19. yüzyılın ortalarına doğru ipek böceği yetiştiriciliğine büyük zarar veren biber hastalığının etkeni olarak bu-

lunmuştur. Aynı zamanda bazı microsporidia türleri, bal arılarında, kabuklularda ve balıklarda yaygın enfeksiyonlara sebep olarak arıcılık ve balıkçılık sektöründe önemli kayıplara sebep olmaktadır. Diğer taraftan microsporidia türleri, çekirge gibi böceklerin biyolojik kontrolünde yararlı olabilmektedir^{1,2}. Bugüne kadar tanımlanmış 144 cins ve 1200'den fazla türü bulunmasına rağmen, 14 microsporidia türü insan için patojen olarak bilinmektedir. İnsan microsporidia enfeksiyonlarının %90'ından fazlasına ise *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon intestinalis* türleri neden olmaktadır¹⁻⁴. Microsporidia genellikle, organ transplant alıcıları, kanserli veya HIV pozitif hastalar gibi immün yetmezlikli bireyler ile çocuklar, turistler, kontakt lens kullananlar ve yaşlılarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu hastalarda, sıklıkla inatçı, hayatı tehdit eden gastrointestinal semptomların yanı sıra; göz, beyin, solunum yolları, karaciğer ve safra yolları tutulumu da olabilmektedir¹⁻⁴.

Bu patojenlerin laboratuvar tanısında; dışkı, idrar, bronkoalveolar lavaj ve biyopsi materyalleri kullanılmaktadır. Rutin dışkı incelemelerinde, dışkıda bulunan sporların boyutlarının oldukça küçük olması nedeniyle gözden kaçmaktadır. Bu nedenle farklı tanı yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanları dışkı örneklerinin kalkoflor veya modifiye trikrom boyaları ile boyanarak floresan ve ışık mikroskopunda incelenmesidir. Ancak bu yöntemlerle de, örnekler sadece microsporidia pozitif olarak değerlendirilmekte, tür tayini yapılamamaktadır. Transmisyon elektron mikroskopi (TEM) yöntemi tanıda altın standart olarak kabul edilmektedir^{3,5,6}. Ancak zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir. Bazı microsporidian türlerine karşı monoklonal antikorlar geliştirilmiştir. Türe özgü yüzey molekülleri veya polar tübül yapısını tanıyan floresan işaretli bu monoklonal antikorlar, hasta örneğinde bulunan sporların duvarındaki proteinlere bağlanmakta ve floresan mikroskopunda sporlar parlak yeşil röfle vermektedir. Birçok araştırmacı tarafından, bu yöntemlerin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmektedir⁷⁻¹⁰. Bu çalışmada, kemik iliği transplant hastalarında *Encephalitozoon intestinalis* ve *Enterocytozoon bieneusi* prevalansının, monoklonal antikorların kullanıldığı immünofloresan antikor (IFA-MAbs) yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Erciyes Üniversitesi Hematoloji-Onkoloji Hastanesi, Kemik İliği ve Kök Hücre Nakli Ünitesi'nde yatan, 200 kemik iliği transplant (KİT) hastası ile kontrol grubu olarak immün sistemi normal, sağlıklı 80 gönüllü dahil edildi. Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı (05.08.2010 tarih ve 2010/81 karar no) ile gerçekleştirildi. Çalışmaya alınan tüm katılımcılar bilgilendirilip yazılı onayları alındı.

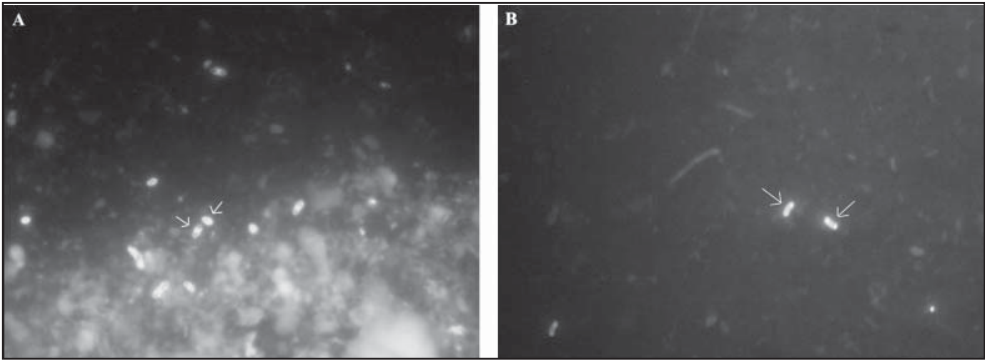
Dışkı örnekleri öncelikle nativ-lugol yöntemi ve modifiye aside dirençli boyama yöntemiyle incelendi. Sonrasında ise, *E.bieneusi* ve *E.intestinalis*'e özgül monoklonal antikorların kullanıldığı ticari IFA-MAbs yöntemiyle (Bordier Affinity Products, İsviçre) değerlendirildi. Kit prosedürü üretici firma önerisine göre uygulandı ve floresan mikroskopunda 450-490 dalga boylu filtrede incelendi.

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS for Windows V.11.0 paket programı kullanılarak Fisher's Exact Ki-kare testi uygulandı ve $p < 0.05$ değer i anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan KİT hastalarının 134'ü erkek, 66'sı kadın olup, yaş ortalaması 43.2 ± 15.01 yıldır. Sağlıklı kontrol grubu ise, yaş ortalaması 31.9 ± 11.76 yıl olan, 43'ü erkek, 37'si kadın bireyden oluşmaktadır. KİT hastalarının 147'sinde ishal şikayeti mevcuttur.

İncelenen toplam 280 dışkı örneğinden 87 (%31.1)'si IFA-MAbs ile microsporidia açısından pozitif bulunmuştur (Resim 1). Pozitifliğin saptandığı hastaların 52 (%59.8)'si erkek, 35 (%40.2)'i kadın olup, cinsiyetler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p= 0.232$). Hasta grubunda pozitif bulunan toplam 78 olgudan 67 (%85.9)'si ishalleridir. İshal varlığı ile parazit pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). KİT hastalarında saptanan pozitiflik oranı (%39.0), kontrol grubu (%11.3) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p < 0.05$). Çalışmada elde edilen pozitiflik oranlarının cinsiyet, çalışma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.



Resim 1. IFA-MAbs ile tespit edilen *Encephalitozoon intestinalis* (A) ve *Enterocytozoon bienewisi* (B) sporları (1000x).

Tablo 1. IFA-MAbs yöntemi ile elde edilen pozitiflik oranlarının cinsiyet, çalışma grupları ve ishal durumuna göre dağılımı

		<i>E.intestinalis</i>	<i>E.bieneusi</i>	<i>E.intestinalis</i> + <i>E.bieneusi</i>	Toplam
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Cinsiyet	Erkek (n= 177)	33 (19.8)	7 (4)	10 (5.6)	52 (29.4)
	Kadın (n= 103)	20 (19.4)	3 (3)	12 (11.7)	35 (34)
	Toplam (n= 280)	55 (19.6)	10 (3.6)	22 (7.9)	87 (31.1)
Çalışma Grupları	Hasta (n= 200)	51 (25.5)	8 (4)	19 (9.5)	78 (39.0)
	Kontrol (n= 80)	4 (5.5)	2 (2.5)	3 (3.8)	9 (11.3)
	Toplam (n= 280)	55 (19.6)	10 (3.6)	22 (7.9)	87 (31.1)
İshal durumu	Var (n= 147)	44 (29.9)	7 (4.8)	16 (10.9)	67 (45.6)
	Yok (n= 53)	11 (20.8)	3 (5.7)	6 (11.3)	20 (37.7)
	Toplam (n= 200)	55 (27.5)	10 (5)	22 (11)	87 (43.5)

TARTIŞMA

Mikrosporidiyoz, başta HIV pozitif hastalar olmak üzere immün sistemi baskılanmış hastalarda kronik ishallerle ve bazen de hayatı tehdit eden ağır klinik tablolarla seyreden önemli bir halk sağlığı problemidir. Bu nedenle, microsporidian patojenler ile ilgili çalışmalar genellikle immün yetmezliği olan hastalar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Dünyanın farklı bölgelerinde, immün sistemi baskılanmış hastalarda yapılan çalışmalarda, %2.3 ile %42 arasında değişen geniş bir aralıkta pozitiflik oranları bildirilmiştir¹¹⁻¹⁹. Ülkemizde microsporidia prevalansı ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı sınırlı olup, bu çalışmalarda genel olarak %5.6-10.9 arasında değişen oranlar bildirilmektedir²⁰⁻²⁵. Karaman ve arkadaşları²² kanserli 320 hastanın %10.9'unda; Türk²³ yedi KİT ve üç onkoloji hastasında; Karaman²⁰ 63 onkoloji hastasının %4'ünde; Yazar ve arkadaşları²⁴ ise kanserli bir hastada microsporidia olgusu bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda tanı amaçlı konvansiyonel yöntemler kullanılmış olup, hastalar sadece microsporidia pozitif olarak değerlendirilmiş, tür tayini ise yapılmamıştır. Hamamcı²⁶ KİT'li hastaların %35'inde microsporidian türleri, %25'inde ise *E.bieneusi* tespit ettiğini bildirmiştir.

Çalışmamızda, birçok araştırmacı⁷⁻¹⁰ tarafından yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olduğu bildirilen IFA-MAbs yöntemi kullanılmıştır. Cisse ve arkadaşları⁷, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile karşılaştırıldığında, IFA-MAbs'in duyarlılık ve özgüllüğünün %100 olduğunu bildirmişler; tür ayırımında PCR'dan daha hızlı ve daha ucuz olduğu için "altın standart" olarak kabul edilebileceğini vurgulamışlardır. Enriquez ve arkadaşları⁸ *Encephalitozoon* türlerinde ekzospore ile reaksiyona giren 3B6 monoklonal antikorunu kullanarak yaptıkları çalışmada, bu monoklonal antikorun 3 *Encephalitozoon* türünün tanımlanmasında etkili olduğunu, ayrıca bazı protozoonlar, microsporidian patojenler ve mantarlarla çapraz reaksiyon vermediğini rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar, yöntemin tek dezavantajının üç türü ayırt edememesi olduğunu da vurgulamışlardır⁸. Beckers ve arkadaşları⁹, *E.intestinalis*'e özgül monoklonal antikorların *E.hellem* ile çapraz reaksiyon vermediğini, ancak dışkıda bulunan bazı bakteri ve mayalarla çapraz reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Morfolojik olarak bu yapılardan ayrılarak tanıya gidilebileceğini rapor etmişlerse de, diğer klinik örneklerde daha güvenilir sonuç alınabileceğini vurgulamışlardır. Al-Mekhlafi ve arkadaşları¹⁰, modifiye trikrom boyama (MTS) yöntemiyle microsporidia açısından 50'si pozitif, 50'si negatif bulunan toplam 100 dışkı örneğini, IFA yöntemi ile monoklonal antikorlar (anti-*E.bieneusi* ve anti-*E.intestinalis*) kullanarak değerlendirmişlerdir. İncelenen örneklerin 42'sinde *E.bieneusi*, yedisinde *E.intestinalis* ve yedisinde de her ikisi için pozitiflik saptanmış; çalışma sonucunda, MTS yöntemi ve IFA-MAbs arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir¹⁰. Bu araştırmacılar, Microsporidial sporların tanımlanmasında IFA-MAbs yönteminin duyarlılığını %98, özgüllüğünü ise %86 olarak vermişler; bu yöntemin, konvansiyonel tanı yöntemleri ile birlikte kullanılmasının duyarlılığı artıracağını vurgulamışlardır¹⁰.

Bizim çalışmamızda, ticari bir IFA-MAbs kiti kullanılarak 200 KİT hastasının %25.5'inde *E.intestinalis*, %4'ünde *E.bieneusi* ve %9.5'inde her ikisi için olmak üzere, toplam %39'unda pozitiflik saptanmış (Tablo I) ve bu oranlar kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p> 0.05). Bu hastalarda microsporidian türlerin özellikle de *Encephalitozoon*

türlerinin, önemli gastrointestinal rahatsızlıkların yanı sıra, vücutta yaygın enfeksiyonlara da neden olabileceği unutulmamalıdır. Bu durum, hastanın hem yaşam kalitesini hem de tedavi sürecini olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenle KİT hastalarının, özellikle de gastrointestinal yakınmaları olanların düzenli aralıklarla microsporidian patojenler açısından değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Çalışmamız ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile kıyaslandığında; tespit edilen pozitiflik oranının diğer çalışmalarda elde edilenden farklı olduğu görülmüştür. Yüksek pozitiflik içeren bu farkın sebeplerinden birisinin hasta popülasyonu ile ilgili olduğu düşünülmüştür. KİT hastaları ile ilgili yapılan sadece bir tez çalışmasına ulaşılabılmış; 20 hasta üzerinde PCR ile yapılan bu çalışmada %35 oranında pozitiflik bildirilmiştir²⁶. Söz konusu çalışmanın sonuçlarının bizim çalışmamızla paralellik gösterdiği görülmüştür. Hastalarımızda gastrointestinal yakınmaların bulunmasının da pozitiflik oranını artırdığı düşünülmektedir. Literatürde KİT hastaları ile ilgili diğer çalışmalar ise, genellikle dünyanın değişik bölgelerinde olgu sunumları şeklindedir. Microsporidia tanısında her zaman bir takım sıkıntılar mevcuttur. Bu nedenle rRNA bölgesinden hazırlanan primer ve probların kullanıldığı gerek multipleks gerçek zamanlı PCR, gerekse prob bazlı gerçek zamanlı PCR yöntemlerinin %100 duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir. Aynı zamanda TEM yöntemi de birçok laboratuvarında altın standart olarak kullanılmaktadır. Bu iki yöntemin uygulanamadığı laboratuvarlarda, IFA-MAbs yönteminin güvenle kullanılabilmesi düşünülmüştür. Sonuç olarak, microsporidia türleri immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi klinik tablolara sebep olduğundan, bu hastaların özellikle de ishalin eşlik ettiği durumlarda microsporidia açısından değerlendirilmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Yazar S, Kuru O, Hamamcı B, Çetinkaya U, Karaman U, Kuk S. Microsporidia and microsporidiosis. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2013; 37(2): 123-34.
2. Ok ÜZ, Limoncu ME. Microsporidiosis, s: 397-409. Özcel MA (ed), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007, Meta Basım, İzmir.
3. Garcia LS. Intestinal protozoa (coccidia and microsporidia), pp: 57-101. In: *Diagnostic Medical Parasitology*. 2007, 5th ed. ASM Press, Washington, DC.
4. Didier ES. Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19(5): 485-92.
5. Türk S, Doğruman AI F, Karaman Ü, Kuştimur S. İshalli olgularda microsporidia sıklığının farklı boyama yöntemleriyle araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(1): 85-92.
6. Sancak B, Akyön Y. Microsporidia: Genel özellikleri, enfeksiyonları ve laboratuvar tanısı. *Mikrobiyol Bul* 2005; 39(4): 513-22.
7. Alfa Cisse O, Ouattara A, Thellier M, et al. Evaluation of an immunofluorescent-antibody test using monoclonal antibodies directed against *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali). *J Clin Microbiol* 2002; 40(5): 1715-8.
8. Enriquez FJ, Ditrich O, Palting JD, Smith K. Simple diagnosis of *Encephalitozoon* sp. microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1997; 35(3): 724-9.
9. Beckers PJ, Derks GJ, Gool T, Rietveld FJ, Sauerwein RW. *Encephalocytozoon intestinalis*-specific monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of microsporidiosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34(2): 282-5.

10. Al-Mekhlafi MA, Fatmah MS, Anisah N, Azlin M, Al-Mekhlafi HM, Norhayati M. Species identification of intestinal microsporidia using immunofluorescence antibody assays. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011; 42(1): 19-24.
11. Lono AR, Kumar S, Chye TT. Incidence of microsporidia in cancer patients. *J Gastrointest Cancer* 2008; 39(1-4): 124-9.
12. Anane S, Kaouech E, Belhadj S, et al. Identification of *Enterocytozoon bieneusi* by PCR in stools of Tunisian immunocompromised patients. *Pathol Biol (Paris)* 2011; 59(4): 234-9.
13. Garcia LS, Shimizu RY, Bruckner DA. Detection of microsporidial spores in fecal specimens from patients diagnosed with cryptosporidiosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32(7): 1739-41.
14. Salleh FM, Al-Mekhlafi AM, Nordin A, Yasin 'M, Al-Mekhlafi HM, Moktar N. Evaluation of gram-chromotrope kinyoun staining technique: its effectiveness in detecting microsporidial spores in fecal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69(1): 82-5.
15. Chabchoub N, Abdelmalek R, Issa S, et al. Contribution of PCR for detection and identification of intestinal microsporidia in HIV-infected patients. *Pathol Biol (Paris)* 2012; 60(2): 91-4.
16. Abaza SM, Makhlof LM, el-Shewy KA, el-Moamly AA. Intestinal opportunistic parasites among different groups of immunocompromised hosts. *J Egypt Soc Parasitol* 1995; 25(3): 713-27.
17. Müller A, Stellerman K, Hartmann PIA. A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(2): 243-6.
18. Bretagne S, Foulet F, Alkassoum W, Fleury-Feith J, Develoux M. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* spores in the stool of AIDS patients and African children not infected by HIV. *Bull Soc Pathol Exot* 1993; 86(5): 351-7.
19. Field AS, Hing MC, Milliken ST, Marriott DJ. Microsporidia in the small intestine of HIV-infected patients. A new diagnostic technique and a new species. *Med J Aust* 1993; 158(6): 390-4.
20. Karaman U. İnsanlarda microsporidia'ların epidemiyolojisi (Malatya ili örneği). Doktora Tezi, 2007. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
21. Atambay M, Karaman Ü, Daldal N, Çolak C. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Parazitoloji Laboratuvarına gelen erişkin hastalarda *Microsporidium* görülme sıklığı. *Türkiye Parazit Derg* 2008; 32(2): 113-5.
22. Karaman Ü, Atambay M, Daldal N, Çolak C. Kanser tanısı almış hastalarda *Microsporidium* görülme sıklığı. *Türkiye Parazit Derg* 2008; 32(2): 109-12.
23. Turk S. İshalli olgularda microsporidia sıklığının farklı boyama yöntemleriyle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, 2010. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
24. Yazar S, Eser B, Yalcin S, Sahin I, Koc AN. A case of pulmonary microsporidiasis in an acute myeloblastic leukemia (AML) - M3 patient. *Yonsei Med J* 2003; 44(1): 146-9.
25. Hamamcı B, Çetinkaya Ü, Berk V, Kaynar L, Kuk S, Yazar S. Prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in cancer patients under chemotherapy. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(1): 105-13.
26. Hamamcı B. Farklı hasta gruplarında *Enterocytozoon bieneusi*'nin (Protozoa, Microsporidia) araştırılması. Doktora Tezi, 2013. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.