

# İshalli Olgularda *Microsporidia* Sıklığının Farklı Boyama Yöntemleriyle Araştırılması\*

## Investigation of *Microsporidia* Prevalence by Different Staining Methods in Cases of Diarrhea

Songül TÜRK<sup>1</sup>, Funda DOĞRUMAN AL<sup>2</sup>, Ülkü KARAMAN<sup>3</sup>, Semra KUŞTİMUR<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

<sup>1</sup> Gazi University Institute of Health Sciences, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup> Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup> Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

<sup>3</sup> Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ordu.

<sup>3</sup> Ordu University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ordu, Turkey.

\* Bu çalışma ilk isim olan yazarın yüksek lisans tezi olup, 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (7-11 Kasım 2010, Kıbrıs)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 07.08.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 02.11.2011

### ÖZET

*Microsporidia*, türüne bağlı olarak, genellikle kendiliğinden iyileşen ishal, kornea ülseri ve miyozit gibi semptomlarla karakterize sporadik olgulara neden olmaktadır. İnsan immünyetmezlik virusu ile enfekte hastalarda fırsatçı patojen olarak değerlendirilmekle birlikte, *Microsporidia* türleri son yıllarda immün sistemi normal bireylerde de ishal etkenleri arasında yer almaya başlamıştır. *Microsporidia* enfeksiyonlarının tanısı, dışkı, idrar, sinüs aspiratları, nazal akıntı, bronkoalveoler lavaj veya doku biyopsilerinde, parazit sporlarının veya evrim dönemlerinin görülmesiyle konulur. Tanıda boya yöntemleri, serolojik yöntemler, polimeraz zincir reaksiyonu ve elektron mikroskobu kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Mart 2009-Haziran 2009 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran ishalleri hastalardan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen dışkı örneklerinde üç farklı boyama yöntemi kullanılarak *Microsporidia* sıklığının araştırılması ve bu yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, 225 ishalleri hastaya (84'ü çocuk, 141'i erişkin; 103'ü kadın, 122'si erkek) ait dışkı örneği Weber'in modifiye trikrom (MTS) boyaması, kalkoflor (calcofluor; CF) boyama ve akridin turuncusu (Acridine orange; AO) boyama yöntemleriyle boyanarak *Microsporidia* açısından incelenmiştir. Araştırmada, ishalleri hastaların %9.8 (22/225)'inde *Microsporidia* varlığı saptanmış; bu oranın çocuk yaş grubunda %9.5 (8/84), erişkinlerde %9.9 (14/141) olduğu belirlenmiştir. Erişkin-çocuk yaş grupları ve kadın-erkek cinsiyetleri arasında *Microsporidia* görülmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Boyama

**İletişim (Correspondence):** Prof. Dr. Semra Kuştımur, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara, Türkiye. Tel (Phone): +90 312 202 6979, E-posta (E-mail): kustimur@gazi.edu.tr

yöntemlerinin karşılaştırmasında MTS yöntemi referans alındığında, AO yönteminin duyarlılık, özgüllük ve tutarlılık oranları sırasıyla %100, %91.6 ve %92 olarak saptanmış; bu değerler CF yöntemi için sırasıyla %95.4, %99.5 ve %99.1 olarak belirlenmiştir. CF boyama ile MTS arasında çok güçlü ve anlamlı bir korelasyon ( $r=0.950$ ,  $p<0.001$ ) saptanırken, AO ile korelasyon güçlü ve anlamlı ( $r=0.719$ ,  $p<0.001$ ) olarak izlenmiştir. AO yönteminde boyalı preparatın zemininin de turuncu renge boyanması ve boya artıklarının ortamda yoğun bulunması yorumlamada güçlük oluşturmuş, hızlı ve pratik bir yöntem olmasına rağmen pozitif prediktif değeri düşük (%56.4) olarak saptanmıştır. Sonuç olarak çalışmamızda, ishallerin dışı örneklerinin *Microsporidia* açısından da araştırılması gerektiği kanısına varılmış ve rutin laboratuvarlarda MTS yöntemiyle birlikte CF boyama yönteminin kullanılmasının, *Microsporidia* tanısında duyarlılığı ve güvenilirliği artıracığı sonucuna ulaşılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Microsporidia*; tanı; ishal; boyama yöntemi.

## ABSTRACT

*Microsporidia*, depending on their different species, generally lead to self-limited, sporadic and mild infections such as diarrhea, corneal ulcer and myositis. They are considered as opportunistic pathogens in HIV-positive patients however in recent years *Microsporidia* have been detected also in immunocompetent individuals as a cause of diarrhea. Diagnosis of *Microsporidia* depends on the detection of spores or different developmental stages of protozoon in stool, urine, sinus aspirates, nasal discharge, bronchoalveolar lavage or tissue biopsies. Diagnosis of *Microsporidia* infections is usually achieved by the use of different staining methods, serological tests, polymerase chain reaction, and electron microscopic methods. The aims of this study were to detect the incidence of microsporidia in patients with diarrhea by using three different staining methods and to compare the performance of these methods. A total of 225 stool samples from diarrheal patients (84 were children, 141 were adults; 103 were female, 122 were male) admitted to Gazi University Medical Faculty Hospital between March-June 2009, have been evaluated in the laboratory of Medical Microbiology Department. Stool samples were examined in terms of the presence of *Microsporidia* spores by Weber's modified trichrom staining (MTS), calcofluor (CF) and acridine orange (AO) staining methods. *Microsporidia* positivity rate was 9.8% (22/225) in the diarrheal patients, the rate being 9.5% (8/84) in children and 9.9% (14/141) in adults. There was no statistically significant difference between age and gender groups ( $p>0.05$ ) regarding *Microsporidia* detection. When MTS was considered as the reference method, sensitivity, specificity and consistency of AO staining were estimated as 100%, 91.6% and 92%, respectively, while those rates for CF staining were 95.4%, 99.5% and 99%, respectively. There was very strong and significant correlation ( $r=0.950$ ,  $p<0.001$ ) between CF staining and MTS, while there was strong and significant ( $r=0.719$ ,  $p<0.001$ ) correlation between AO staining and MTS. Although AO staining is rapid and convenient, the positive predictive value was measured very low (56.4%) and the interpretation of stained slides was very difficult since background of the slides was stained orange and there were a lot of dye artefacts. In conclusion, screening *Microsporidia* in all diarrheal stool samples is of diagnostic value. To increase sensitivity and reliability in the detection of *Microsporidia* spores in diarrheal samples, initial application of calcofluor staining should be followed by the confirmatory MTS method.

**Key words:** *Microsporidia*; diagnosis; diarrhea; staining methods.

## GİRİŞ

*Microsporidia*, tek hücreli zorunlu hücre içi paraziti olup, 160 cins ve 1200'den fazla tür içeren *Microspora* şubesinde sınıflandırılmaktadır. Boyutları türlere göre farklılık göstermekle birlikte genellikle 1-10  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir<sup>1</sup>. Hem omurgalı hemde

omurgasız konakları enfekte edebilen *Microsporidia* türleri konak hücre dışında sporlarıyla enfeksiyon oluşturmaktadır. İnsanları enfekte eden cinsler arasında *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Trachipleistophora* (*Pleistophora*), *Nosema*, *Brachiola* ve *Vittaforma* yer alır<sup>1,2</sup>. Bunlar arasında da dışkı örneklerinden en sık izole edilen enfeksiyon etkenleri *Enterocytozoon bienersi* ve *Encephalitozoon intestinalis* olup, dünyada yaygın olarak bulunmaktadır<sup>1-3</sup>. *Microsporidia* sporları çevre koşullarına oldukça dayanıklıdır ve organizmadan atıldıktan sonra uzun süre efektif olarak kalabilir<sup>3,4</sup>.

İlk memeli enfeksiyonu 1922 yılında ilk insan enfeksiyonu 1927 yılında bildirilmiş; insan immünyetmezlik virusu (HIV) pozitif hastalarda ilk *Microsporidia* olgusu 1985 yılında rapor edilmiş ve AIDS hastalarında görülen kronik ishal olgularının yarısında etken olduğu belirtilmiştir<sup>1,5</sup>. *Microsporidia* türlerinin doğada yaygın halde bulunması ve enfeksiyonun tüm dünyada görülmesi nedeniyle çeşitli bulaş yolu ve kaynağının olduğu; sporların sindirim ya da solunum yoluyla alınmasıyla enfeksiyonun oluşabileceği düşünülmektedir<sup>1,6,7</sup>.

*Microsporidia* enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında; mikroskopik inceleme (ışık, floresan veya elektron mikroskobu ile), histolojik inceleme, serolojik testler, hücre kültürü, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve akım sitometrisi gibi yöntemler yer almaktadır<sup>6,8</sup>. Boyama yöntemleri olarak ise kalkoflor, Giemsa, aside dirençli-trikrom ve Weber'in trikrom boyama yöntemleri kullanılmaktadır<sup>8,9</sup>. Bu çalışmada ishal yakınması olan hastalardan laboratuvarımıza gönderilen dışkı örneklerinde üç farklı boyama yöntemi kullanılarak *Microsporidia* sıklığının araştırılması ve bu boyama yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Mart 2009-Haziran 2009 tarihleri arasında çeşitli poliklinik ve kliniklerden rutin inceleme için laboratuvarımıza gönderilen 225 ishali olguya ait dışkı örneği değerlendirildi. Tüm örnekler boyama öncesinde formol-etil-asetat sedimentasyon yöntemiyle yoğunlaştırıldı.

Akridin turuncusu (Acridine orange; AO) boyama yöntemi için, fosfat tamponlu solüsyon (PBS, pH: 7.4) içinde hazırlanan %1 stok solüsyonu 10 kat sulandırılarak kullanıldı. Sedimentasyondan sonra örnekler lama yayılıp metil alkolle 10 dakika tesbit edildi. Daha sonra AO ile iki dakika boyanıp çeşme suyuyla yıkandı. Lamlar kuruduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak floresan mikroskobunda x100 objektifle, 490 nm dalga boyunda incelendi.

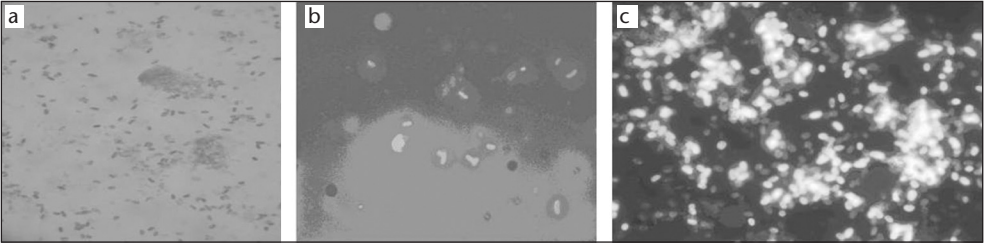
Kalkoflor (Calcofluor; CF) boyama için, %10'luk KOH içinde %0.5 oranında hazırlanan "fluorescent brightener 28" (MP Biomedicals no: 158067) ve PBS ile %0.5 olarak hazırlanan evans mavisi kullanıldı. Boyamada, AO boyama yönteminde olduğu gibi hazırlanan ve tesbit edilen lamlar CF boyası ile üç dakika boyanıp distile su ile yıkandı. Lamlar evans mavisi ile 30 saniye boyandıktan sonra tekrar distile su ile yıkanıp kurutuldu ve immersiyon yağı damlatılarak floresan mikroskobunda x100 objektifle, 365 nm dalga boyunda incelendi.

Weber'in modifiye trikrom boyama (MTS) yöntemi ise daha önce tanımlanan<sup>4</sup> şekilde yapılarak lamalar ışık mikroskopunda x100 objektifle incelendi. Çalışmamızda, Prof. E. Didier'den (Tropical Medicine and Research Scientist; Division of Microbiology, Tulane National Primate Research Center, Louisiana, USA) sağlanan, *E.intestinalis* türü pozitif kontrol olarak kullanıldı ve tüm boyama yöntemleriyle boyanıp test edildi.

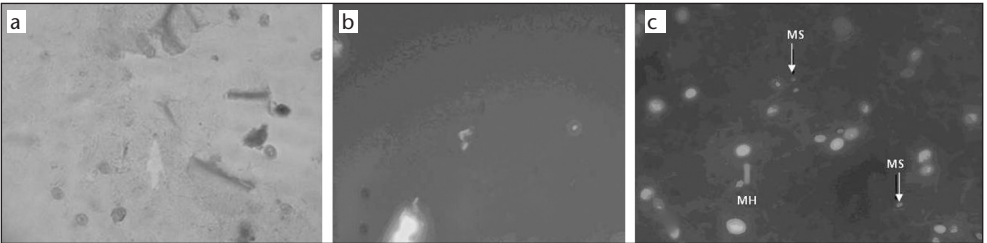
MTS yöntemi referans yöntem olarak kabul edilerek istatistiksel analizler bilgisayar ortamında SPSS programının 16.0 versiyonu ile yapıldı. Analizlerde bağımlı gruplarda ki-kare (Mc Nemar testi) ve korelasyon testleri kullanılarak  $p < 0.05$  değerleri anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmamızda değerlendirilen 225 olgunun 84 (%37)'ü çocuk (0-18 yaş), 141 (%63)'i erişkin (> 18 yaş) olup, 103 (%46)'ü kadın ve 122 (%54)'si erkektir. Olgulardan alınan dışkı örneklerinin tümü ve pozitif kontrol olarak kullanılan *E.intestinalis* suşu AO, CF ve MTS boyama yöntemleriyle incelenmiştir (Resim 1,2). Referans yöntem olarak kabul edilen MTS yöntemiyle toplam *Microsporidia* pozitiflik oranı %9.8 (22/225) olarak bulunmuş; bu oranın çocuklar için %9.5 (8/84), erişkinler için %9.9 (14/141) olduğu izlenmiştir. MTS yöntemiyle *Microsporidia* türlerinin saptanmasında kadın ve erkek cinsiyetleriyle erişkin ve çocuk yaş grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).



**Resim 1.** Pozitif kontrol olarak kullanılan *Encephalitozoon intestinalis* sporlarının: a) MTS ile boyanması (ışık mikroskopu, x100); b) AO ile boyanması (floresan mikroskop, x100); c) CF ile boyanması (floresan mikroskop, x100).



**Resim 2.** Bir hasta örneğinde *Microsporidia* sporlarının: a) MTS ile boyanması (ışık mikroskopu, x100); b) AO ile boyanması (floresan mikroskop, x100); c) CF ile boyanması (floresan mikroskop, x100) (MS: *Microsporidia* sporu; MH: Maya hücresi).

MTS yöntemi referans yöntem olarak kabul edildiğinde, *Microsporidia* türlerinin saptanması açısından AO yöntemi ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ( $p < 0.01$ ). AO yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü %91.6, tutarlılığı %92, negatif prediktif değeri %100 ve pozitif prediktif değeri %56.4 olarak tespit edilmiştir. AO yönteminde arka zeminin de kuvvetli boyanması ve boya artıklarının ortamda yoğun olarak bulunması nedeniyle *Microsporidia* türlerinin ayırımında zorluk yaşanmıştır.

CF boyama yöntemiyle MTS arasında *Microsporidia* türlerini saptama açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ( $p > 0.05$ ). CF yönteminin duyarlılığı %95.4, özgüllüğü %99.5, tutarlılığı %99.1, negatif prediktif değeri %99.5 ve pozitif prediktif değeri %99.5 olarak belirlenmiştir. CF boyama ile MTS yöntemi arasında pozitif, çok güçlü ve anlamlı bir korelasyon ( $r = 0.950$ ,  $p < 0.001$ ) olduğu saptanırken, AO boyama ile MTS yöntemi arasındaki korelasyon pozitif, güçlü ve anlamlı ( $r = 0.719$ ,  $p < 0.001$ ) olarak izlenmiştir.

## TARTIŞMA

*Microsporidia* türleri, gerek immün sistemi normal gerekse baskılanmış bireyleri enfekte edebilmekte ve özellikle immünyetmezliği olan hastalarda bağırsak, göz, sinüs, akciğer, kas ve böbrek enfeksiyonları yanında çoklu organ tutulumuna da neden olmaktadır<sup>3,5,7</sup>. Çeşitli ülkelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *Microsporidia* saptama oranları; Avustralya'da<sup>10</sup> ishali HIV pozitif hastalarda %33, ishalsiz olgularda %1.4; Nijerya'da<sup>11</sup> HIV pozitif erişkin olgularda %7, HIV negatif çocuklarda %0.8; Uganda'da<sup>12</sup> ishali çocuklarda %17.4 ve Amerika Birleşik Devletleri'nde<sup>13</sup> HIV pozitif hastalarda %0.16 olarak bildirilmektedir. Bu çalışmalarda ayrıca, HIV pozitif ishali olgularda fırsatçı patojen olarak görülen *Microsporidia* türlerinin HIV negatif olgularda da göz ardı edilmemesi gerektiği ve parazitin prevalansının HIV enfeksiyonundan bağımsız olarak farklı bölgelerde farklı oranlarda saptanabileceği vurgulanmaktadır<sup>10-13</sup>. Nitekim Espern ve arkadaşları<sup>14</sup>, iki ayrı coğrafi bölge olan Nijerya ve Vietnam'da HIV pozitif hastalarda *Microsporidia* sıklığını sırasıyla %10.5 ve %9.5 olarak saptamışlar; bu bölgelerde sadece *E. bieneusi* saptadıkları halde farklı genotipler tespit ettiklerini bildirmişler ve buna bağlı olarak bulaşın Nijerya'da insandan insana, Vietnam'da ise zoonotik kaynaklı olduğunu rapor etmişlerdir. Sak ve arkadaşları<sup>15</sup> da indirekt immünfloresan yöntemiyle HIV pozitif hastaların serum örneklerinde %20, mesleki olarak hayvanlarla temas olanlarda %33 ve sağlıklı bireylerde %10 oranında *Microsporidia* seropozitifliği tespit etmişlerdir.

Ülkemizde *Microsporidia* ile ilk epidemiyolojik çalışma Karaman ve arkadaşları<sup>16</sup> tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada 2665 dışkı örneği MTS, kalkoflor (CF), asit-fast trikrom ve Giemsa boyama yöntemleriyle incelenmiş ve örneklerin %8.5'inde pozitiflik saptanmıştır<sup>16</sup>. Araştırmacılar, bulantı-kusma, iştahsızlık, nefes darlığı, ürtiker-allerji ve ülseratif kolit ile *Microsporidia* görülme sıklığı arasında anlamlı ilişki olduğunu ifade etmişlerdir<sup>16</sup>. Atambay ve arkadaşları<sup>17</sup> da, 781 erişkinde %6.5 oranında *Microsporidia* varlığı tespit etmişler ve parazitlerin saptanmasıyla hazımsızlık arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Karaman ve arkadaşları<sup>18,19</sup> akut ve kronik ürtikerli 132 hastanın %19.7'sinde ve kanserli hastaların %5.6'sında; Çalık ve arkadaşları<sup>20</sup> ise çocuklarda %7.8 oranında *Microspori-*

*dia* sporlarına rastladıklarını bildirmişlerdir. Yazar ve arkadaşlarının<sup>21</sup> çalışmasında, kanserli bir hastanın bronkoalveoler lavaj örneğinde Giemsa boyama ile *Microsporidia* pozitifliği saptanmış; bu durum immün sistemi baskılanmış bireylerde akciğer tutulumundan sorumlu patojenler arasında *Microsporidia* türlerinin de düşünülmesi gerektiğini desteklemiştir. Usluca ve Aksoy<sup>22</sup> da immün sistemi baskılanmış bir çocukta PCR ile *E.intestinalis* varlığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda, ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak, 225 ishalleri hastanın %9.8'inde *Microsporidia* pozitifliği belirlenmiş; yaş grubu ve cinsiyetler arasında *Microsporidia* sıklığı açısından anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

*Microsporidia* tanısı için farklı boyama yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarda; Tuli ve arkadaşları<sup>23</sup> DAPI (4',6'-diamidine-2-phenylindole) ile kombine edildiğinde CF boyama yönteminin duyarlılığını %97, özgüllüğünü ise %98 olarak saptamışlardır. Bir diğer çalışmada, CF yönteminin hızlı ve ucuz olmasının yanı sıra MTS kadar duyarlı olduğu bildirilmiştir<sup>24</sup>. Didier ve arkadaşları<sup>25</sup> da, kalkoflor beyazı (CFW) 2MR, MTS ve immünofloresan antikor yöntemlerini karşılaştırmışlar ve en yüksek duyarlılığı CFW 2MR yönteminde, en düşük duyarlılığı IFA yönteminde bulmuşlardır. MTS ve Giemsa boyama yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise, Giemsa yönteminin *Microsporidia* tanısında yetersiz kaldığı rapor edilmiştir<sup>26</sup>. MTS yöntemiyle pozitif bulunan altı hastanın beşinde elektron mikroskopu ile pozitiflik saptayan Notermans ve arkadaşları<sup>27</sup>, bu yöntemin dışkı örneklerinde intestinal *Microsporidia* türlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da, dışkı örnekleri MTS, CF ve AO boyama yöntemleriyle değerlendirilmiş ve bu yöntemlerle *Microsporidia* tanısının konulabilmesi için deneyimin gerektiği gözlenmiştir. Çalışmamızın bulguları diğer çalışmaların sonuçlarıyla paralel olup, CF yönteminin MTS ile uyumu %99.1, duyarlılığı %95.4, özgüllüğü ise %99.5 oranında belirlenmiştir. Kullandığımız AO boyama yönteminde preparatın arka zemininin turuncu renge boyanması tanıda zorluk yaratmıştır. Bu yöntemin pozitif prediktif değerinin düşük (%56.4) saptanması, testin güvenilirliğinin sorgulanmasına neden olmuş, ucuz ve pratik bir yöntem olmasına rağmen *Microsporidia* tanısında yetersiz kalacağı gözlenmiştir. CF boyamanın ise pozitif prediktif değeri (%99.5) yüksek olarak saptanmıştır. Bu yöntemde ayrıca boyama süresinin çok kısa olması da, rutin kullanım amacıyla uygulanmasında bir avantaj oluşturmaktadır. Zira MTS boyama yönteminde boyama işlemi uzun süre almaktadır. Dışkıda sık görülen türlerin boyutlarının küçük olması da MTS yönteminde zorluk yaratmaktadır. Bununla birlikte dışkıda *Microsporidia* tanısında MTS yöntemi referans yöntem olarak gösterilmekte, ancak CF ve uvitex 2B gibi floresan boyaların kullanımının da yüksek duyarlılığa sahip olduğu vurgulanmaktadır<sup>24,25,28</sup>.

Sonuç olarak bu çalışmada, diğer çalışmalarda olduğu gibi, ishalleri olgularda dışkı örneklerinin *Microsporidia* açısından da değerlendirilmesi gerektiği kanısına varılmıştır. Rutin laboratuvarlarda ilk aşamada CF boyama yönteminin kullanılması ve *Microsporidia* şüpheli örneklerin MTS ile doğrulanması, tanıda duyarlılık ve güvenilirliği artıracaktır.

**KAYNAKLAR**

1. Ok ÜZ, Limoncu ME. Microsporidiosis, s: 397-409. Özcel MA (ed), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007. Meta Basım, İzmir.
2. Garcia LS. Intestinal protozoa (coccidia and microsporidia), pp: 57-101. In: Diagnostic Medical Parasitology. 2007, 5<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, DC.
3. Didier ES. Microsporidiosis: current status. Curr Opin Infect Dis 2006; 19(5): 485-92.
4. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev 1994; 7(4): 426-61.
5. Joseph J, Vemuganti GK, Sharma S. *Microsporidia*: emerging ocular pathogens. Indian J Med Microbiol 2005; 23(2): 80-91.
6. Sancak B, Akyön Y. *Microsporidia*: genel özellikleri, enfeksiyonları ve laboratuvar tanısı. Mikrobiyol Bul 2005; 39(4): 513-22.
7. Aksoy Ü, Usluca S. Microsporidiosis ve immunolojisi, s: 102-20. Özcel MA, İnci A, Tugay N, Köroğlu E (ed), Tıbbi ve Veteriner Immunoparazitoloji. 2007. Meta Basım, İzmir.
8. Franzen C, Müller A. Molecular techniques for detection, species differentiation and analysis of *Microsporidia*. Clin Microbiol Rev 1999; 12(2): 243-85.
9. Joseph J, Vemuganti GK, Garg P, Sharma S. Histopathological evaluation of ocular microsporidiosis by different stains. BMC Clin Pathol 2006; 6: 6.
10. 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.
11. 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.
12. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Buckholt MA, Tzipori S. *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. Am J Trop Med Hyg 2002; 67(3): 299-303.
13. Dworkin MS, Buskin SE, Davidson AJ, et al. Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with diarrhea in major United States cities. Rev Inst Med Trop S Paulo 2007; 49(6): 339-42.
14. Espern A, Morio F, Miegerville M, et al. Molecular study of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol 2007; 45(9): 2999-3002.
15. Sak B, Kucerova Z, Kvac M, Kvetonova D, Rost M, Secor EW. Seropositivity for *Enterocytozoon bieneusi*, Czech Republic. Emerg Infect Dis 2010; 16(2): 335-7.
16. Karaman Ü, Daldal N, Atambay M, Çolak C. The epidemiology of microsporidiasis in humans (Malatya sample). Turk J Med Sci 2009; 39(2): 281-8.
17. Atambay M, Karaman U, Daldal N, Çolak C. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Parazitoloji Laboratuvarına gelen erişkin hastalarda microsporidium görülme sıklığı. Türkiye Parazitol Derg 2008; 32(2): 113-5.
18. Karaman U, Atambay M, Daldal N, Çolak C. Kanseri tanısı almış hastalarda *Microsporidium* görülme sıklığı. Türkiye Parazitol Derg 2008; 32(2): 109-12.
19. Karaman Ü, Şener S, Çalık S, Şaşmaz S. Akut ve kronik ürtikerli hastalarda *Microsporidia* pozitiflik oranı. Mikrobiyol Bul 2011; 45(1): 168-73.
20. Çalık S, Karaman U, Çolak C. Prevalence of *Microsporidium* and other intestinal parasites in children from Malatya, Turkey. Indian J Microbiol 2011; 51(3): 345-9.
21. Yazar S, Eser B, Yalçın Ş, Şahin İ, Koç AN. A case of pulmonary microsporidiasis in an acute myeloblastic leukemia (AML)-M3 patient. Yonsei Med J 2003; 44(1): 146-9.
22. Usluca S, Aksoy Ü. İmmün sistemi baskılanmış bir çocukta *Microsporidium* spp. enfeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu ile tanımlanması. Mikrobiyol Bul 2010; 44(4): 679-83.



23. Tuli L, Singh DK, Gulati AK, Sundar S, Mohapatra TM. A multiattribute utility evaluation of different methods for the detection of enteric protozoa causing diarrhea in AIDS patients. BMC Microbiol 2010; 10: 11.
24. Luna VA, Stewart BK, Bergeron DL, Clausen CR, Plorde JJ, Fritsche TR. Use of the fluorochrome calcofluor white in the screening of stool specimens for spores of microsporidia. Am J Clin Pathol 1995; 103(5): 656-9.
25. Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. J Clin Microbiol 1995; 33(12): 3138-45.
26. Carter PL, Macpherson DW, Mckenzie RA. Modified technique to recover microsporidian spores in sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed fecal samples by light microscopy and correlation with transmission electron microscopy. J Clin Microbiol 1996; 34(11): 2670-3.
27. Notermans DW, Peek R, de Jong MD, Wentink-Bonnema EM, Boom R, van Gool T. Detection and identification of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* species in stool and urine specimens by PCR and differential hybridization. J Clin Microbiol 2005; 43(2): 610-4.
28. Green LC, LeBlanc PJ, Didier ES. Discrimination between viable and dead *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidian) spores by dual staining with sytox green and calco\_uor white M2R. J Clin Microbiol 2000; 38(10): 3811-4.