

## **MICROSPORIDIA: GENEL ÖZELLİKLERİ VE GÜNCEL LABORATUVAR TANISI**

### **MICROSPORIDIA: GENERAL CHARACTERISTICS AND LABORATORY DIAGNOSIS**

Songül TÜRK ve Funda DOĞRUMAN-AL

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

**Anahtar Sözcükler:** *Microsporidia*, genel özellikler, tanı yöntemleri

**Keywords:** *Microsporidia*, general features, diagnosis

Geliş: 02 Şubat 2009

Kabul: 13 Şubat 2009

## **ÖZET**

*Microsporidia*, microspora filumu altında toplanmış ve 100'den fazla cinsi 1200'ün üzerinde türü tanımlanan zorunlu hücre içi parazitidir. Hem omurgalı hem omurgasız konakları infekte eden *Microsporidia*'lar konak hücre dışında sporlarıyla infeksiyon oluşturmaktadır. Boyutları türlere göre farklılık göstermekle birlikte genellikle 1-10 µm arasında değişmektedir. Ancak memelileri infekte eden *Microsporidia*'ların boyutları 1.5-3 µm arasında değişmektedir. *Microsporidia* infeksiyonuyla ilgili ilk insan olgusu 1959'da bildirilmiş ve son yıllarda gerek immün yetmezlikli gerekse immün yeterli olgularda neden olduğu hastalık tablolarının anlaşılması üzerine bu parazite ilgi artmıştır. Günümüzde insanlarda infeksiyon yapan *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma* ve *Brachiola* olmak üzere yedi tür tanımlanmıştır. İshal, keratit, myozit, bronşit, bronşiyolit gibi infeksiyonlardan etken olarak izole edilmiştir. Tanınması için özel boyama yöntemlerine ihtiyaç duyulması, bakteri boyutlarında olması nedeniyle gözden kaçabilmesi, tanı amacıyla geliştirilmiş serolojik yöntemlerin olmaması, tanısında yaşanan zorlukların yanısıra, gerçek epidemiyolojisinin tam olarak bilinmemesine de neden olmaktadır. Bu derlemede *Microsporidia*'ların genel özellikleri, tanı yöntemleri ve tanı zorlukları literatürlerle birlikte tartışılmıştır.

## **SUMMARY**

*Microsporidia* is an obligate intracellular parasite that has been classified under Microspora Phylum, with more than 100 genera and over 1200 species. *Microsporidia* spp. infecting both vertebrate and invertebrate hosts, cause extracellular infection with their spores. Their size differs according to the species and is often of 1-10 µm. However, the size of *Microsporidia* spp. infecting mammals is 1.5-3 µm. The first human case due to *Microsporidia* was reported in 1959. In the last decade interest for the parasite has increased considerably upon observing that it causes infection in immunocompromised as well as in immunocompetent individuals. For today seven species of *Microsporidia* are known to infect man: *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma*, and *Brachiola*. *Microsporidia* can cause infections such as diarrhoea, keratitis, myositis, bronchitis, and bronchiolitis. Besides difficulties occurring diagnosis, The need for special staining methods to detect the parasite, missing the presence of the parasite due to its bacterium-like small size, lack of diagnostic serological methods render the diagnosis of the parasite leading to incomplete epidemiologic data. In this paper; the general characteristics, diagnostic methods and difficulties in the diagnosis of *Microsporidia* spp. are reviewed.

### **Genel özellikler**

*Microsporidia* ilk 1857'de Nageli tarafından *Nosema bombycis* olarak adlandırılmış, Balbiani ise 1882 yılında *Microspora* filumunu tanımlamıştır (1, 2). *Microspora* filumu 144 cins ve 1200'den fazla türü içermektedir. İnsanda hastalık etkeni olarak *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*,

*Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma* ve *Brachiola* olmak üzere yedi tür tanımlanmıştır. *Microsporidia* sınıflandırılması yapılırken spor boyutları, sporların nükleusta düzenlenmesi ve gelişim formları, infekte edilen hücre ve organizma arasındaki ilişki dikkate alınmaktadır (2-5).

Spor oluşturan, tek hücreli ve zorunlu hücre içi protozoonu olan *Microsporidia*'lar omurgasız hayvanlarda da parazitik yaşam sürmektedir. Mitokondri, Golgi membranları ve diğer tipik ökaryotik organellerinin yokluğu nedeniyle, ilkel ökaryot organizma olarak kabul edilmektedirler. Ayrıca bazı *Microsporidia*'ların prokaryot ribozomlarına benzer ribozomlara sahip olduğu da bildirilmiştir. Boyutları 1,5-5 µm x 2-7 µm olup insanı infekte eden *Microsporidia*'ların ise daha küçük olduğu (1,5-3 µm) gözlenmektedir (2, 3, 6).

İlk insan olgusu 1959'da bildirilmiş, 1985'e kadar sadece 10 olgu bildirilmiştir. Bu tarihten sonra HIV infeksiyonu ile ilişkili olarak görülmesi nedeniyle parazite olan ilginin son yıllarda arttığı dikkat çekmektedir (7, 8). Günümüze kadar insanlarda bildirilen olgu sayısı 400'den fazla olup hemen hemen büyük çoğunluğunun immün sistemi baskılanmış kişilerden oluşması, *Microsporidia* türlerinin fırsatçı patojen özelliğini yansıtmaktadır (2, 3). İnsanların yanısıra böcekler, balıklar, kemirgenler ve memelilerde infeksiyona neden olan *Microsporidia* türleri ipek böcekçiliği ve balıkçılıkta sorunlara neden olmakla birlikte, çekirge gibi böceklerin biyolojik kontrolünde de yarar sağlamaktadır. Hayvanlarda vertikal bulaş olmasına rağmen henüz insanlarda bildirilmiş bir vertikal bulaş yoktur. Horizontal bulaş sağlayan risk faktörleri arasında eşcinsel ilişki, intravenöz ilaç kullanımı, yüzme havuzlarındaki sular, saunalar ve kontamine su kaynakları sayılmaktadır. Zoonotik geçiş ise şüpheli birkaç olguyla sınırlı kalmış, tam olarak belirlenememiştir (7, 8).

### Morfolojik özellikler

**Spor:** *Microsporidia*'lar zorunlu hücre içi paraziti olmalarından dolayı konak hücresi dışında metabolik aktivasyon gösterememektedir (7). Ayrıca infekte sporoplazmasını konak hücresine enjekte edebilen, tek bir sarmal polar filament içeren, küçük, oval sporları ile özelleşmektedir (3). Sporların boyutları 1.5-5x2-7 µm olmasına rağmen insanı infekte eden türlerde ise genellikle 1.5-3 µm'dir. Sporlar dışta oldukça dirençli olan bir hücre duvarına sahiptirler. İnfektif formlar tek ya da çift çekirdekli olarak bulunabilmektedir (9). Spor çevre koşullarına oldukça dayanıklı olup atıldıktan sonra uzun süre infektif olarak kalabilmektedir. Hayvanlardan atılan sporlar genellikle yiyeceklerle bazen de solunumla alınmaktadır (6).

**Hücre duvarı:** Dışta oldukça dirençli glikoprotein ve kitin yapısındaki ekzospore, içte kitin yapısındaki endospore ve sitoplazmayı çevreleyen plazma membranı olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Hücre duvarı sporun dış çevreye olan direncini artırmakta ve içeriğinin infekte

edilen hücre içine boşalması için hidrostatik basıncın artmasını sağlamaktadır (1).

**Polar tüp:** *Microsporidia*'lar polar filamentleriyle karakterizedirler. Polar tübün helezon sayısı ve düzenlenmesi tür ve cinslere göre değişmekte olup, bu nedenle tür ayrımında kullanılmaktadır. Polar tüp, düz bir kısım ile direkt olarak diske (anchoring disc) bağlanır. Polar tübün kesitsel analizinde 3-20 tabaka açıklanmıştır. Boşaltım sırasında ve sonrasında farklı tabakalara rastlanılmıştır. Polar tüp proteinleri, insan için infektif olan türler arasında sadece *Encephalitozoon* türlerinde moleküler yöntemlerle karakterize edilmiş olmakla birlikte fonksiyonları tam olarak saptanamamıştır (1, 10, 11).

### Evrım

*Microsporidia* türlerinin konak hücresi dışında infektif evreleri bulunmamaktadır. Yaşam döngüsünü tek bir konakta tamamlamakta olduğu ileri sürülmüş, ara konak veya vektör için henüz bir kanıt bulunamamıştır. Uygun konakta ve uygun koşullarda konak hücreye penetre olan parazitin polar tübü, sporun ön kısmına doğru gelerek konak hücre içerisine sporoplazma boşaltılması ile infeksiyon oluşturmaktadır (1). Polar tübün konak hücreye nasıl penetre olduğu henüz bilinmemekle birlikte bunun için iki görüş ileri sürülmüştür; ilki, konak hücre membranını delerek, diğeri ise fagositozla içeri girdiği şeklindedir (7).

*Microsporidia* türlerinin yaşam döngüsü üç evreden oluşmaktadır:

**1) Merogoni evresi:** Proliferatif dönem olup, merontlar ikili veya daha fazla füzyonla çoğalmakta, hücreden diğere yayılmakta ve sonuçta sporontlara dönüşmektedir.

**2) Sporogoni evresi:** Sporontlar gelişmekte ve bazı konak hücrelerinde sporoblastlara dönüşmektedir.

**3) İnfektif evre:** Bu fazı oluşturan sporlar konak hücrelerin içinde yer almakta ve çevreye yayılarak yeni konaklara geçişi sağlamaktadırlar (3).

### İmmün yanıt

Microsporidiosis'e bağlı immün yanıt ve lezyonlar konak ve parazitin türüne bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. *Encephalitozoon* türleri başlangıçta ince bağırsaklarda infeksiyon yapmakta, inflamasyon ve bağırsak hücre hasarına neden olmaktadır. Fokal ve rastlantısal dağılımlı granümatöz lezyonlar meydana gelmektedir. Bu lezyonlar inflamatuvar makrofaj hücreleri, lenfositler,

nötrofiller ve plazma hücrelerini içermektedir. Microsporidiosisli HIV pozitif hastaların dışkılarında inflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$  miktarının arttığı saptanmıştır. İnsanlarda bu protozoona karşı antikor gelişiminin oldukça değişken olduğu belirlenmiştir. İmmün yeterli konakta *Microsporidia* türlerine karşı IgM ve IgG antikorları gelişmekte ve yaşam boyu devam etmekte iken immün yetmezlikli konakda ise antikor yanıtının böylesi şekillenmediği saptanmıştır. Bununla birlikte, infekte olguların dışkılarında hem IgA hem de IgG antikorlarının aynı zamanda görülmeye başlandığı ve IL-12 ve IFN- $\gamma$ 'nın immün yanıtının oluşmasında önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Hücresele bağışıklık, özellikle de Th1 yanıtı, microsporidiosisin öldürücü hastalığından korunmada etkili olmaktadır (7).

### İnsanda infeksiyon yapan *Microsporidia* türleri (Tablo1)

***Enterocytozoon spp.***: İlk olarak 1985 yılında kronik diyaresi olan AIDS'li bir hastanın dışkısı ve ince bağırsağından alınan biyopsi örneklerinde gösterilmiştir. Diğer *Microsporidia* türlerinin aksine *Enterocytozoon bienewsi* HIV pozitif hastalarda sistemik infeksiyonlara yol açabilmektedir. *Enterocytozoon bienewsi* infeksiyonları ayrıca HIV negatif ancak başka bir hastalığa veya organ transplantasyonuna bağlı immünsupresyon alan hastalarda da saptanmıştır. HIV negatif ve immün sistemi sağlam kişilerde de kendini sınırlayan birkaç ishal olgusunda da gösterilmiştir. İnce bağırsağın enterositlerini ve safra yollarının epitel hücrelerini tutmaktadır. Hastaların yarı-

sında karın ağrısı, ateş, mide bulantısı ve kusma, dışkıda kan ve lökosit bulunmaktadır. Erişkin sporlar oval, 1-1.6  $\mu$ m boyutlarında olup iki sıra halinde 5-7 kıvrımlı polar tüp içermektedirler. Solunum sistemi tutulursa öksürük, dispne ve hırıltı bulunmaktadır ve bronkoalveoler lavaj sıvısında veya biyopside sporlar gösterilebilmektedir. Bir olguda bu infeksiyon rinosinüzit ile birlikte bulunmuştur (3, 4, 7). Gelişimlerini konak hücre sitoplazması içinde gerçekleştirirler. Parazitin tüm evreleri hücre sitoplazmasında gerçekleşir. İnfeksiyon genellikle ince bağırsakta ve safra yollarında sınırlı kalmakta ve olgunlaşmış sporlar dışkı yoluyla atılmaktadır (3).

Lanternier ve ark. (12); solit organ nakli alıcısı olan ishali iki hastanın dışkı örneğinde *E. bienewsi* tanısında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yönteminden yararlanmışlardır. *Microsporidia* türlerinin yalnızca HIV pozitif hastalarda değil, diğer immün sistemi baskılanmış hastalarda da infeksiyonlara neden olduğu belirlenmiştir. López ve ark. (13); tropikal ülkelere seyahat etmiş 40 Avrupalı ishali hastadan aldıkları dışkı örneklerini Weber's trikrom boyama yöntemi ve PZR yöntemi ile incelemişler ve dört hastada *E. bienewsi* saptamışlardır. Lee (14); 180 mandıra ineğinden alınan süt örneklerinde PZR yöntemi kullanarak 15 örnekte pozitiflik saptamışlar ve bunlardan üçünde insan infeksiyonlarına neden olan *E. bienewsi* türünü saptamışlardır. İnek sütlerinin insanlara *E. bienewsi* bulaşmasında kaynak oluşturabileceği düşünülmektedir (14).

**Tablo 1.** İnsanda infeksiyon yapan *Microsporidia* türleri ve özellikleri

Türler	Spor boyutları	Klinik tablo	Yerleştiği dokular
<i>Enterocytozoon sp.</i>			
<i>E. bienewsi</i>	1.1-1.6x0.7-1.0 $\mu$ m	Enterit, ishal, kolesistit, bronşit, sinüzit, kolanjit, pnömoni	Bağırsağın enterositleri, safra yollarının epitelyum hücreleri, solunum sistemi, parankim dışı karaciğer hücreleri
<i>Encephalitozoon sp.</i>			
<i>E. intestinalis</i>	2-2.5x1-1.5 $\mu$ m	Kronik ishal, kolesistit, üriner infeksiyon, bronşit, sinüzit	İncebağırsak enterositleri, safra sistemi epiteli, böbrek, solunum sistemi
<i>E. cuniculi</i>	2-2.5x1.0-1.5 $\mu$ m	Ensefalit, bağırsak infeksiyonu, üriner sistem infeksiyonu, keratokonjunktivit, sinüzit, sistemik infeksiyonlar	Böbrek, karaciğer
<i>E. hellem</i>	2-2.5x1.0-1.5 $\mu$ m	Keratokonjunktivit, sinüzit, pnömoni, nefrit, üretrit, sistemik infeksiyon	Burun, trakea, solunum sistemi epiteli, böbrek, göz dokuları
<i>Nosema sp.</i>	2.5-5x2.0-2.5 $\mu$ m	Keratokonjunktivit, sistemik infeksiyon	Göz dokuları
<i>Vittaforma sp.</i>	3.7x1 $\mu$ m	Keratit, üriner sistem infeksiyonu	Göz dokuları
<i>Trachipleistophora sp.</i>	4x2.4 $\mu$ m	Miyozit, keratokonjunktivit, sistemik infeksiyon	Kas dokusu, göz dokusu
<i>Pleistophora sp.</i>	1.2-3.4x2.8 $\mu$ m	Myozit	Kas dokusu
<i>Brachiola sp.</i>	2.5-2.9x1.9-2.0 $\mu$ m	Miyozit, keratokonjunktivit	Kas dokusu, göz dokusu

**Encephalitozoon spp.** Bu cins içinde *E. cuniculi*, *E. hellem* ve *E. intestinalis* türleri yer almaktadır. *Encephalitozoon intestinalis* ilk olarak ishali bir AIDS olgusunda gösterilmiştir. *Encephalitozoon intestinalis* gelişme döneminde ince bağırsakta bulunmakta ve sporlar fibroblastlar, makrofajlar, lamina propria endotel hücreleri içinde ve enterositlerin sitoplazmasında görülmektedir. Kronik seyri malabsorbsiyonla birlikte seyreden şiddetli kronik diyaredir. *Encephalitozoon intestinalis* konak kaynaklı bir parazitofor vakuol içinde sitoplazmada bulunmaktadır. Erişkin sporları  $2 \times 1.2 \mu\text{m}$  boyutlarında ve tek sıralı 4-5 kıvrımlı polar tüpe sahiptir (3). *Encephalitozoon cuniculi* bir memeli paraziti olmakla birlikte nadir görülmektedir. Konak hücresi kaynaklı bir zarla çevrili olan parazitofor vakuol içinde gelişmektedir. Bulaş yolu su kaynaklı olarak düşünülmektedir. Erişkin sporları  $2-2.5 \times 1-1.5 \mu\text{m}$  boyutlarında olup, içlerinde tek sıra üzerinde 5-6 kıvrımlı polar tüp bulunmaktadır (3, 7).

Aguila ve ark. (15); 35 yaşındaki İspanyol bir hastadan ateş, kilo kaybı, halsizlik, epigastrik karın ağrıları ve ishal şikayetleriyle balgam ve idrar örneklerinin modifiye trikrom boyama yöntemiyle *Microsporidia* sporları görülmüş, PZR ve elektron mikroskopuyla ise sporlar *E. cuniculi* olarak tanımlanmıştır.

*Encephalitozoon hellem* daha çok insan infeksiyonlarına neden olan ve nadir görülen tür olarak karşımıza çıkmaktadır. Akciğer, böbrek, mesane, sinüs, kornea, konjunktiva, karaciğer gibi organ ve dokularda infeksiyon yaptıkları bildirilmiştir (3).

*Encephalitozoon cuniculi* ve *E. hellem*'i TEM mikroskopisi ile ayırt etmek mümkün değildir. Tür ayrımının yapılabilmesi için Western blot veya PZR tekniklerinin de kullanılması gerekmektedir (16). *Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis* ve *E. hellem* AIDS hastalarından izole edilmiştir, ciddi nötropenili olgularda daha sık infeksiyona neden olduğu belirlenmiştir (4).

Jedrzejewski ve ark. (17); *E. bieneusi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi*'nin gıda kaynaklı infeksiyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada meyveler ile lahana ve yeşil yapraklı sebzelerde *Microsporidia* sporlarının yaşayabileceği kanıtlanmıştır (17).

**Nosema spp.:** Genellikle omurgasızlarda görülen *Nosema* spp. insanda çok nadir infeksiyona neden olmaktadır. Sporlar parçalı  $4.5-2.5 \mu\text{m}$  büyüklüğünde ve içlerinde 11 kıvrımlı polar tübülü bulunmaktadır (3).

**Pleistophora spp.:** *Pleistophora* böceklerin ve balıkların paraziti olarak belirtilmiştir ve insanlarda henüz birkaç

olgu bildirilmiştir. Genellikle iskelet kas hücresine yerleşerek miyozite neden oldukları belirlenmiştir. Sporlar  $2.8-3.4 \mu\text{m}$  boyutlarında ve 9-12 kıvrımlı polar tübülü bulunmaktadır (3).

**Trachipleistophora spp.:** Bu cins ilk olarak myoziti olan AIDS'li bir hastada saptanmıştır. Myozit ve keratit olgularından izole edilmiş, AIDS'li bir hastada birçok organ tutulumuna rastlanmıştır (16). Pariyakanok ve Jongwutiwes (11); Tayland'da 42 yaşında keratitli HIV+ bir hastanın korneal biyopsi örneğinde TEM kullanılarak *T. anthropoptera*'nın varlığını göstermişlerdir.

**Vittaforma spp.:** Sporları  $3.8 \times 1 \mu\text{m}$  boyutlarında olan ve altı kıvrımlı polar filamenti bulunan *Vittaforma* türleri daha çok keratitli olgulardan izole edilmektedir. *Vittaforma corneae invitro* kültürde üretilmiş ilk *Microsporidia* izolatıdır. Bugüne kadar üçü göz tutulumu, biri üriner infeksiyonu olan dört olgu bildirilmiştir (3, 7).

**Brachiola spp.:** İlk kez myoziti olan bir AIDS hastasından izole edilmiştir. Kas ve korneadan yerleşebilmektedir. Gözdeki başlangıç infeksiyonun ardından parazitin memeli konak koşullarına adapte olduğu ve muhtemelen makrofajlar aracılığıyla iç organlara yayıldığı düşünülmektedir. Sporlar  $2.5-2.9 \times 1.9-2 \mu\text{m}$  boyutlarında olup polar tübülünde 7-10 kıvrım bulunmaktadır (1, 3, 7).

#### Laboratuvar tanısı

*Microsporidia*'ların laboratuvar tanısında biyopsi materyalleri, dışkı, idrar, safra, bronko-alveoler lavaj ya da nazal sıvılar kullanılabilir. Sporların boyutları bakteri boyutunda olduğu için rutin laboratuvar testlerinde kolaylıkla gözden kaçmaktadır (4). *Microsporidia* tanısı için ışık ve floresans mikroskopu, histopatolojik incelemeler, serolojik yöntemler, hücre kültürü, elektron mikroskopu, PZR, akım sitometrisi kullanılmaktadır. Işık mikroskopu tanıda etkili olmasına karşın cins ve tür düzeyinde ayırım yapılmasını sağlamamaktadır. Kullanılmakta olan boyama yöntemleri ile sporların idrar, dışkı ya da doku örneklerinde tanınması mümkün olmaktadır.

**Warthin-Starry boyama:** Bu boya ile boyanan sporlar kahverengimsi siyah renkte görünür ve doku parçalarının boyanmasında kullanılan en iyi yöntemdir. *Encephalitozoon bieneusi* ile *Encephalitozoon* benzeri protozoonların tanısında kullanılmakta ve duyarlılığı oldukça yüksek bir tanı yöntemi özelliği taşımaktadır. Bu boyama yöntemi ile elektron mikroskopu yöntemi arasındaki uyumun yüksek olduğu belirlenmiştir (1, 9).

**Gram kromotrop boyama:** Bu boyama yönteminde Gram pozitif boyanan sporlar, maya hücrelerine benzer

bir görünüm sergilemekle birlikte *Microsporidia* sporları, pembe-kırmızı renkte boyanmaları ve tomurcuklanma göstermemeleri ile mayalardan ayrılmaktadırlar. Kesin ayırım için %1'lik aside dirençli boyama ya da Weber'in Modifiye Trikrom Boyama (MTS) yöntemiyle tanının doğrulanması gerekmektedir (10, 11, 18).

Kronik ishal, bulantı, ateş, halsizlik ve kilo kaybı şikayetleri olan HIV+ bir hastanın dışkı örneğinde Gram-kromotrop boyama yöntemiyle *Microsporidia* sporları belirlenmiştir (19). Norhayati ve ark. (20); 893 dışkı örneğinde Gram-kromotrop boyama yöntemi kullanılarak 116 (%13) olgunun dışkı örneğinde *Microsporidia* sporlarını belirlemişlerdir. Örneklerin %72.4'ünde düşük yoğunlukta, %23.3'ünde orta yoğunlukta ve %4.3'ünde yüksek yoğunlukta *Microsporidia* sporları belirlenmişler, aynı zamanda sporların bulunma oranı 0-6 yaş arasında %26.4, 31 yaş üzerindekielerde ise %57.2 olarak saptamışlardır (20).

**Giemsa boyama:** Bu boyama yöntemi sporların belirlenmesi açısından yeterli duyarlılığı sağlamamakla birlikte gelişme evrelerini gösterebilmektedir (3). Giemsa boyama ile sporlar açık mavi renkte görünmektedir (21).

**Hematoksilen-Eozin boyama:** Bu yöntem ile yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilememiştir (1).

**Weber'in modifiye trikrom boyama yöntemi:** Özellikle dışkı örneklerinin boyanmasında kullanılan bir yöntemdir. Sporun duvarı parlak pembe renkte boyanmakta ve sporun içi şeffaf ya da polar tübülün olduğu bölümde daha koyu boyanan yatay veya eğik çizgi bulunmaktadır. Boya hazırlanırken fast green kullanılmışsa zemin yeşil, anilin blue kullanılmışsa zemin mavi olarak gözlenir (1, 2, 21). Bu yöntemle *Microsporidia* sporlarını tanımlamak daha kolay olduğu için rutin tanıda özellikle idrar, dışkı örneklerinde ve vücut sıvılarında bu yöntem önerilmektedir. Örnekler taze veya fiksatif (%5 ya da %10 formalin, sodyum asetat-asetik asit-formalin) içinde olmalıdır (1, 21).

**Floresan mikroskopunda inceleme:** Calcofluor White 2MR ve Uvitex 2B boyama kullanılmakta ve 395-415 nm dalga boyunda floresans mikroskopunda incelenerek canlı sporların mavimsi-turkuaz renkte, ölü sporların ise beyaz sarı renkte olduğu görülmektedir (2, 21). Uvitex 2B ve kalkoflor spor duvarının endospor tabakasındaki kitine bağlanarak mavi-beyaz floresan vermektedirler. Kitin içeren diğer mikro-organizmalar, özellikle mantar sporları da bu boyalarla boyandıklarından, ayırıcı tanının önemli olduğu ve *Microsporidia* sporlarının 5 µm'den

küçük olduklarının unutulmaması gerekmektedir. *Microsporidia*'lar ile mantarların farklı şekilde boyanmasına yönelik yeni boyaların geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar sürmektedir (11). Modifiye trikrom boyama ve Uvitex 2B boyaları kullanılarak düşük sayıdaki *Microsporidia* sporlarının tanımlanmasında bu yöntemlerin özgüllüğü ve duyarlılığı karşılaştırıldığı çalışmada (22); *Microsporidia* sporlarının 1:1 ile 1:1000 oranında seri dilüsyonları hazırlanarak Uvitex 2B ve MTS yöntemleriyle incelenmiştir. Her iki yöntemin özgüllüğü ve duyarlılığı benzer bulunmuş, birlikte kullanıldıklarında duyarlılığın artacağı bildirilmiştir (22). Sridhar ve ark; sol gözünde kızarıklık, gözyaşı ve bulanıklık şikayetleri ile gelen keratitli bir olgudan korneal kazıntı ve kalkoflor boyama ile *Microsporidia* sporları saptamışlardır (23). Floresan boyalar uygulanmalarının kolay olması ve kısa sürede sonuç verebilmesi nedeniyle *Microsporidia* cinsinin tanısında kullanım alanı bulmuştur (1).

**Serolojik tanı:** Serolojik tanıda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western Blot, İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT), immün floresans ve immün peroksidaz yöntemleri kullanılmaktadır. Serolojik testlerde IgG ve IgM antikorları aranmaktadır. *Encephalitozoon cuniculi* ve *E. intestinalis* karşı oluşmuş antikorlar infekte olgularda saptanmıştır. Uzun süreli kültürü yapılamamasından ve elde edilebilir antijenleri bulunmamasından dolayı *E. bieneusi* için henüz rutin tanı için geliştirilmiş serolojik test bulunmamaktadır (17). Bağışıklığı baskılanmış kişilerde antijene karşı zayıf antikor yanıtının gelişmesi, hem patojen hem patojen olmayan *Microsporidia*'larda çarpaz reaksiyona neden olan antijenlerin olması, *E. bieneusi*'nin sürekli kültürü yapılamaması nedeniyle türe özgü antijenlerinin güç elde edilebilmesi serolojik yöntemlerin geliştirilmesinde sorunlara neden olmaktadır (3).

**Flow (akım) Sitometre (FCM):** *Microsporidia*'ların tanısında FCM'nin de yeri olabileceği gösterilmiştir. Franzen ve ark. (24) kültürü yapılmış olan parazitlerin tanımlanmasında FCM yöntemini kullanmışlar ve sonuçları floresans mikroskopuyla karşılaştırmışlardır. Her iki yöntemin sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu gösterilmiş ve FCM yönteminin kullanım kolaylığı ve duyarlılığına dikkat çekilmiştir.

**Polimeraz zincir reaksiyonu:** Moleküler yöntemler, taksonomik sınıflama, filogenetik çalışmalar ve özellikle klinik örneklerde *Microsporidia* saptama ve tür ayırımı için önem taşımaktadır (9). Türlerin ayırımı türe özgül primerlerin kullanımıyla yapılmakta olup primerler, parazitlerin

rRNA genlerini hedef almaktadır. *Brachiola algerae*, *E. bieneusi*, *E. intestinalis*, *E. hellem*, ve *E. cuniculi*'nin PZR ile ayrımı yapılmıştır (5, 11). Müller ve ark. (18) floresans mikroskobu (Uvitex 2B) ve PZR ile ishali 148 yolcuyla yapıları çalışmada; mikroskopik yöntemle beş, PZR ile dokuz hastada *E. bieneusi* saptamışlardır. Wolk ve ark. (16); dışkı örneklerinde gerçek zamanlı PZR ile *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem* türlerini saptamışlardır. Dışkı örnekleri taze, 4<sup>0</sup> C'de 72 saat, -70<sup>0</sup> C'de yedi gün ve ticari bir fiksatifte oda ısısında yedi gün saklanmış olarak gruplandırılarak gerçek zamanlı PZR ve trikrom boyama yöntemiyle çalışılmıştır. Dışkılara 10<sup>2</sup>-10<sup>7</sup> spor/ml eklenmiştir. Sadece taze ve 4<sup>0</sup> C'de 72 saat saklanan örneklerin hepsinde sırasıyla 10<sup>4</sup>spor/ml ve 10<sup>3</sup>spor/ml yoğunluğunda PZR pozitifliği belirlenirken, bu oran dondurulmuş ve fiksatifte saklanmış örneklerde 10<sup>5</sup> spor/ml olarak saptanmıştır. Trikrom boyama yönteminde ise ancak ≥10<sup>6</sup> spor/ml yoğunluğundaki örneklerin hepsinde pozitiflik gösterdiği bulunmuştur (16).

**Elektron mikroskobu:** Bu yöntemin özgüllüğü yüksek, duyarlılığı düşük olup emek yoğun bir uygulama süreci içermektedir. Biyopsi ve otopsi ile alınan dokular Transmisyon Elektron Mikroskobisi (TEM) ile incelendiğinde parazitin tüm evreleri görülebilmekte, vücut sıvılarında ve dışkıda ise yalnızca sporlar saptanabilmektedir. Bu yöntem ile parazitin polar filamentinin ince yapısı ortaya konulabilmektedir (2, 3). Günümüzde TEM, moleküler yöntemlerin uygulanmadığı laboratuvarlarda tür saptamasında altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem ile sporların yapısal özellikleri incelenerek, parazitin cins ve tür düzeyinde ayrımı yapılabilmekle birlikte *E. cuniculi* ve *E. hellem*'in ince yapısı birbirlerine çok benzediğinden ayırt edilmesi zor olmaktadır (1). Yöntemin maliyetinin yüksek oluşu aynı zamanda, vücut sıvılarında ve dışkıda kullanıldığında duyarsız olabilmesi, biyopsi örnekleri için invazif yöntemlere gereksinim duyulması, örneklerin hazırlanması, incelemenin emek yoğun olması ve deneyim gerektirmesi kullanımını kısıtlayan faktörleri oluşturmaktadır (3). Rajesh ve ark. (25)

82 yaşındaki Hintli bir hastada microsporidia keratiti tanısında elektron ve ışık mikroskobu kullanmışlar, etkenin *Nosema* cinsi olduğunu ve kesin tanı için kornea biyopsisinin gerekli olduğu belirtmişlerdir.

**Hücre Kültürü:** İn vitro kültür özellikle tanı yöntemlerinin doğrulanması amacıyla kullanılmaktadır. Maymun böbrek hücreleri ve insan akciğer fibroblast kültürlerinde insanları enfekte eden türlerin bir kısmının (*N. corneum*, *E. hellem*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *T. hominis* ve *V. corneae*) kültürleri yapılabilmektedir. Ancak *E. bieneusi*'nin 6 ay gibi kısa süreli kültürü yapılabilmektedir (1-3). Hücre kültürü *E. cuniculi*, *E. hellem* ve *E. intestinalis*'in antimikrobiyal ajanların etkilerini değerlendirmek için de kullanılmaktadır. Bununla birlikte hücre kültüründe enfekte hücrelerde *Microsporidia*'ları gösterilebilmesi için 3-10 haftalık süreye ihtiyaç duyulmakta ayrıca kontaminasyon nedeniyle de bu yöntemin rutin tanıda uygulanması pratik olmamaktadır. (2,3).

Türkiye'de ilk kez Büğet ve ark. (26) bir AIDS hastasında *Cryptosporidium* oostitleri ile birlikte *Microsporidia* sporları saptamışlardır. Kahraman ve ark. (1) 2665 dışkı örneğinin % 8.5'inde çeşitli boyama yöntemleri kullanarak *Microsporidia* spp. saptamışlar; iştahsızlık, kaşıntı, immün yetmezlik, ülseratif kolitle *Microsporidia* cinsi bulunması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptadıklarını bildirmişlerdir.

*Microsporidia* türlerine yönelik henüz geliştirilmiş bir aşı bulunmamakla birlikte *E. hellem*, *E. cuniculi* ve *E. intestinalis* türlerine yönelik aşı çalışmaları devam etmektedir. *Microsporidium*'un tam olarak nasıl bulaştığı bilinmediği için etkili bir kontrol programı oluşturulması gerçekleştirilememiştir. Ancak sporların yeraltı ve yerüstü su kaynaklarında saptanması nedeniyle özellikle immün sistemi baskılanmış olguların kaynağı belirsiz su tüketiminden kaçınması ve tüketilecek suların kaynatılması önem taşımaktadır. Bu nedenle korunmak için genel hijyen kurallarına uyulması vurgulanmaktadır (3, 7).

#### KAYNAKLAR

1. Kahraman Ü, Daldal N, Atambay M, Çolak C. The epidemiology of microsporidiosis in humans (Malatya sample). *Turk J Med Sci* 2009; 39: 281-8.
2. Garcia LS. *Intestinal Protozoa (Coccidia and Microsporidia) and Algae*. Washington, DC: ASM Pres, 2001: 60-97.
3. Ok ÜZ, Limoncu ME. Microsporidiosis. Özcel MA, ed. *Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları*'nda. İzmir: Basımevi ?????, 2007: 397-409.
4. John DT, Petri WA. Lumen-dwelling protozoa. In: Editör?? Markell and Vogg's *Medical Parasitology*. Ninth ed. Basım Şehri?: Saunders, 2006: 73-8.
5. Ok ÜZ. Immün sistemi baskılananlardaki barsak parazitolojileri. *ANKEM Derg* 2006; 20 (Ek 2): 177-81.
6. Elizabeth S, Didier, Louis MW. Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 485-92.

7. **Aksoy Ü, Usluca S.** Microsporidiosis ve immunolojisi. Özcel MA, İnci A, Tugay N, Köroğlu E, ed. *Tıbbi ve Veteriner İmmonoparazitolojisi*nde. 2007; p.102-120 Basım şehri, basımevi???
8. **Visvesvara GS.** *In vitro* cultivation of *Microsporidia* of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* **2002**; 15: 401-13.
9. **Canning EU.** *Microsporidia*. In: Gillespie SH, Pearson RD, eds. Principles and Practice of Clinical Parasitology. Wiley, **2001**: 171-91. Basım şehri??
10. **Ryan NJ, Sutherland G, Coughlan K, et al.** A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol* **1993**; 31: 3264-9.
11. **Pariyakonok L, Jongwutiwes S.** Keratitis caused by *Trachipleistophora anthropoptera*. *J Infect* **2005**; 51: 325-8.
12. **Lanternier F, Boutboul D, Menotti J, et al.** Microsporidiosis in solid organ transplant recipients: two *Enterocytozoon bieneusi* cases and review. *Transpl Infect Dis* **2008**; 1398-2273.
13. **López-Ve'lez R, Turrientes MC, Garrón C, et al.** Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *J Travel Med* **1999**; 6: 223-7.
14. **Lee JH.** Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. *Appl Environ Microbiol* **2008**; 74: 1664-6.
15. **Aguila C, Moura H, Fenoy S, et al.** *In vitro* culture, ultrastructure, antigenic, and molecular characterization of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from urine and sputum samples from a Spanish patient with AIDS. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 1105-8.
16. **Wolk DM, Schneider SK, Wengenack NL, Sloan LM, Rosenblatt JE.** *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 3922-8. Makale adı???
17. **Jedrzewski S, Graczyk TK, Slodkowiez-Kowalska A, Tamang L, Majewska AC.** Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Appl Environ Microbiol* **2007**; 73: 4071-3.
18. **Müller A, Bialek R, Kamper A, Fatkenheuer G, Salzberger B, Franzen C.** Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 1630-2.
19. **Gonçalves EMN, Uemura IH, Orban M, Castilho VLP, Corbett CEB.** Microsporidiosis in a Brazilian University Hospital. Case report. *Rev Inst Med Trop S Paulo* **2006**; 48: 351-2.
20. **Norhayati M, Azlin M, Hesham Al-Mekhlafi M, et al.** A preliminary study on the prevalence of intestinal microsporidiosis in patients with and without gastrointestinal symptoms in Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2008**; 102: 1274-8.
21. **Garcia LS.** Laboratory identification of the microsporidia. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 1892-901.
22. **Ignatus R, Henschel S, Liesenfeld O, et al.** Comparative evaluation of modified trichrome and uvitex 2B stains for detection of low numbers of microsporidian spores in stool specimens. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 2266-9.
23. **Sridhar MS, Sharma S.** Microsporidial keratoconjunctivitis in a HIV-seronegative patient treated with debridement and oral itraconazole. *Am J Ophthalmol* **2003**; 136: 745-6.
24. **Franzen C, Müller A, Hartmann P, Salzberger B.** Quantation of microsporidia in cultured cells by flow cytometry. *Cytometry A* **2004**; 60: 107-14.
25. **Fogla R, Prema P, Lily TK, Jyotirmay B, Madhavan HN, Nethralaya S.** Chronic microsporidial stromal keratitis in an immunocompetent, non-contact lens wearer. *Indian J Ophthalmol* **2005**; 53: 123-5.
26. **Büget E, Büyükbaba-Boral Ö, Kırkkoyun-Uysal H, Nazlıcan Ö, Ögüt T, Şengür G.** Türkiye'de bir AIDS hastasında ilk mikrosporidiaz ve solunum sistemini tutan kriptosporidiaz olgusu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **2000**; 30: 166-70.

## İLETİŞİM

Bio. Songül TÜRK  
 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
 Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
 06500 Beşevler, ANKARA  
 e-posta: songulturk07@hotmail.com