

MICROSPORIDIA: GENEL ÖZELLİKLERİ, ENFEKSİYONLARI VE LABORATUVAR TANISI

MICROSPORIDIA: GENERAL CHARACTERISTICS, INFECTIONS AND LABORATORY DIAGNOSIS

Banu SANCAK*, Yakut AKYÖN*

ÖZET: Microsporidia, tek hücreli zorunlu bir hücre içi parazitidir. Spor oluşturan bu mikroorganizma, ilk kez 1959 yılında insanda hastalık oluşturan bir etken olarak tanımlanmıştır. Omurgalı ve omurgasız olmak üzere çeşitli konakları enfekte edebilmektedir. Sayısız Microsporidia cinsi içinde *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma* ve *Brachiola* olmak üzere insanda hastalık oluşturabilen yedi cins tanımlanmıştır. Bunlar arasında en sık insanda hastalık oluşturan cins *Enterocytozoon bienewsi*'dir. Mikroorganizmanın tanımlama kriterleri arasında spor büyüklüğü, sporun çekirdek konfigürasyonu, polar tübüldeki kıvrım sayısı ve konak-parazit arası etkileşim şekli yer almaktadır. Microsporidia gelişim sürecinde proliferatif faz ve sporogenik faz olmak üzere iki farklı faz bulunmaktadır. Konak dışında bulunan tek formu enfektif sporlardır. Microsporidia sporu, çevre koşullarına oldukça dirençlidir ve türe bağlı olarak büyüklüğü ve şekli değişkenlik gösterir. Hem immünokompetan hem de AIDS gibi immünoşüpresif hasta gruplarında enfeksiyonlara yol açabilir. İmmünokompetan hasta gruplarında kendi kendini sınırlayan enfeksiyonlara yol açarken, özellikle AIDS hastalarında olmak üzere yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Bu derlemede, Microsporidia'nın temel biyolojisi, epidemiolojik özellikleri ve immünopatogenezi ile oluşturduğu hastalıkların tanı ve tedavisi tartışılmaktadır.

Anahtar sözcükler: *Microsporidia*, *Enterocytozoon bienewsi*, *Microsporidia enfeksiyonları*.

ABSTRACT: Microsporidia are single celled, obligate intracellular, spore forming microorganisms which were first described as a cause of human disease in 1959. They are capable of infecting a wide variety of vertebrate and invertebrate hosts. Among the numerous microsporidial genera, seven have been described in human diseases such as *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma*, *Brachiola*. Among these, *Enterocytozoon bienewsi* is the most frequently identified microsporidian in the patients. Features used in identification include spore size, nuclear configuration of spores, the number of polar tubule coils and the parasite-host interaction. In the

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

development of Microsporidia, there are two different phases, called as proliferative phase and sporogonic phase. The only stage of Microsporidia outside the host is infective spores. The microsporidial spore is highly specialized, environmentally resistant structure that varies in size and shape according to species. They can cause infections both in immunocompetent subjects and immunocompromised patients such as AIDS. Although it can cause self-limiting infections in immunocompetent patients, it can cause severe life threatening infections especially AIDS patients. In this review, the basic biology, epidemiologic characteristics and immunopathogenesis of Microsporidia, together with the diagnosis and treatment of the infections have been discussed.

Key words: Microsporidia, Enterocytozoon bienersi, microsporidial infections.

G İ R İ Ş

Microsporidia, spor oluşturan, küçük, tek hücreli, zorunlu hücre içi parazittir. Konak hücre dışında metabolik aktivasyon gösteren bir evresi yoktur. Membrana bağlı çekirdeği ve intrasitoplazmik membran sistemine sahip olması gibi bir takım özellikleri nedeniyle ökaryot olarak kabul edilmekle birlikte, 70S ribozomu olması, mitokondri veya peroksizomunun olmaması ve golgi cisimciğinin basit yapıda olması gibi ökaryotlara benzemeyen tarafları da vardır¹.

Omurgalı ve omurgasızlar olmak üzere geniş bir konak yelpazesine sahiptir. Bugüne kadar yaklaşık olarak 100 cins ve 1200 tür Microsporidia tanımlanmıştır². İnsanları enfekte eden tür sayısı ise 14 olarak bilinmektedir.

Yaklaşık olarak 100 yıl önce tanımlanmış olmasına karşın ilk insan mikrosporidyozis olgusu 1959 yılında bildirilmiştir³. 1959'dan 1985 yılına kadar ise tanımlanmış sadece on olgu vardır. Bunu takip eden yıllarda AIDS'li hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara yol açtığına ortaya çıkmasıyla dünyanın her yanından Microsporidia'ya bağlı enfeksiyonlar bildirilmeye başlamıştır^{4,5}.

Tanımlama yöntemlerindeki gelişmeler sonucu Microsporidia ile oluşan enfeksiyonların organ transplant hastaları, kontakt lens kullanıcıları, çocuklar ve yaşlılar olmak üzere değişik hasta ve yaş gruplarında görülebildiği ortaya çıkmıştır. Bugün Microsporidia ailesinin hem immünokompetan hem de immünoşüpresif hastalarda intestinal, oküler, sinüs, pulmoner ve renal hastalıklara yol açabildiği bilinmektedir^{6,7}. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyona yol açan en önemli fırsatçı patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir.

Microsporidia ismi aslında jenerik bir isimdir. Bugüne kadar insanlarda enfeksiyon yapan 7 cins Microsporidia tanımlanmıştır. *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma*, *Brachiola* ve henüz sınıflandırılmamış olan diğer Microsporidia'lar özellikle immünoşüpresif hastalarda olmak üzere değişik klinik tablolara yol açabilmektedir¹.

TAKSONOMİ ve SINIFLAMA

Microsporidia doğal konağına ve yapısal farklılıklarına (mikroorganizmanın boyutu, monokaryon/dikaryon çekirdek yapısı, polar filament kıvrım sayısı, vb) göre gruplandırılır ve sınıflandırılır. Microsporidia ilk kez 1857 yılında Nageli adlı

araştırmacı tarafından *Nosema bombycis* olarak adlandırılmıştır. 1882 yılında Balbiani bu mikroorganizmaları Microsporidia olarak ayrı bir grup olarak sınıflandırmıştır⁴. Bunu takip eden yıllarda Microsporidia taksonomisi birçok kez değişikliğe uğramıştır. 1976 yılında Sprague'nın Microspora filumu altında topladığı bu mikroorganizmalar, daha sonra 1980 yılında Levine tarafından Protista "kingdom"unda protozoa "subkingdom"unda sınıflandırılmıştır⁸. Daha sonra 1998 yılında Sprague filum adını Microsporidia Balbiani olarak değiştirmiştir.

2000'li yıllara gelindiğinde değişik genlerin dizi analizinin yapılması sonucunda Microsporidia sınıflandırılmasında yeni gelişmeler elde edilmiştir. Edlind ve arkadaşları⁹, alfa ve beta tubulin genlerinin dizi analizini yapmışlar ve Microsporidia'nın protozoolardan çok mantarlarla daha yakın ilişkide olduklarını bildirmişlerdir. Translasyonda görev alan "elongation factor" EF-1 ve EF-2 ve RNA polimeraz II gen dizisinin kıyaslanması sonucunda Microsporidia ve mantarlar arasındaki yakın ilişkiyi destekler sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca *Varimorpha necatrix* and *Nosema locustae*, HSP70 (Heat Shock Protein) gen dizi analizleri tanımlanmış ve protozoadan çok mantar HSP70 gen dizisiyle daha yakın ilişkili olduğu bulunmuştur⁸⁻¹⁰.

YAPISAL ÖZELLİKLER

Microsporidia tek hücreli, hücre içi yerleşim gösteren ökaryotik mikroorganizmalardır. Hayat döngüsü, proliferatif merogonik dönemi ve onu takip eden sporogoni dönemini içermektedir. Sporogoni sonucunda dış ortam koşullarına oldukça dayanıklı ve enfeksiyöz olan sporlar oluşur.

Memelileri enfekte eden Microsporidia'ların sporları, ortalama 1-3 µm boyutlarında küçük ve oval/yuvarlak şekildedir. Spor duvarı üç tabakadan meydana gelir. Dış tarafı glikoprotein yapısında ekzospore ile çevrilidir. Bunun altında yer alan endospore kitin yapısındadır. En altta ise sitoplazmayı çeviren plazma membranı yer alır. Microsporidia çekirdeği, monokaryon ya da diplokaryon şeklinde bulunur¹¹. İçerdiği uzun ve kıvrık polar filament, Microsporidia'yı diğer mikroorganizmalardan ayırt etmeyi sağlamaktadır. Polar filamentte yer alan kıvrım sayısı ve oluşumu cins ve türler arasında farklılık göstermektedir. Polar filamentin konak invazyonunda önemli bir rolü vardır. Uygun koşullarda polar filament, sporun ucundan dışarı atıldıktan sonra enfektif sporoplazmayı konak hücresine enjekte eder^{1,4}.

İnsanlarda en sık enfeksiyon oluşturan türler *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon intestinalis*'dir. Her iki tür de dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. Başlıca HIV ile enfekte hastalarda kronik diyare etkeni olmakla birlikte, immünokompetan kişilerde de akut ve kendini sınırlayan diyarelere neden olabilmektedir. Bunların dışında *Vittaforma corneae*, *Trachipleistophora spp.* ve *Brachiola spp.* olmak üzere diğer Microsporidia türlerine de nadiren rastlanılmaktadır¹².

Microsporidia türleri yaşam döngülerine ve konak-parazit ilişkisine göre birbirinden ayırt edilebilmektedir.

Enterocytozoon: Bu cins içinde sadece *Enterocytozoon bieneusi* yer alır. İlk kez 1985 yılında AIDS'li bir hastadan izole edilen *E.bieneusi* insanlarda en sık enfeksiyona yol açan Microsporidia cinsidir¹³. HIV ile enfekte hastalarda *E.bieneusi*

enfeksiyonu oranı %50'nin üzerindedir¹². Enfeksiyon genellikle ince barsakta ve safra yollarında lokalize kalır ve olgunlaşmış sporlar gaita yoluyla dış ortama atılır⁵. Parazitin tüm evreleri hücre sitoplazmasında gerçekleşir. Erken gelişim evrelerinde dikaryotik çekirdek bulunabilir. Yaklaşık olarak 5-7 kez kıvrılmış polar filamenti mevcuttur. 0.7-1 μm x 1.1-1.6 μm çapında olan *E.bieneusi*, en küçük Microsporidia'dır ve kitin yapısındaki ince bir endospor tabakasının olmasıyla diğer Microsporidia'lardan farklılık gösterir^{13,14}.

Encephalitozoon: Bu cins içinde *Encephalitozoon cuniculi*, *E.hellem* ve *E.intestinalis* türleri yer almaktadır. *E.cuniculi* en geniş konak yelpazesine sahip olan türdür. Bütün *Encephalitozoon* türleri konak hücresi içinde membrana bağlı olarak bulunan bir vakuolde (parazitoforus vakuolü; PV) gelişimini tamamlar. PV içinde ikiye bölünme yolu ile çoğalırlar. PV membranı ve konak hücre plazma membranının patlamasıyla sporlar serbest kalır. *Encephalitozoon* sporları elipsoid şeklinde olup, yaklaşık olarak 2-2.5 μm x 1-1.5 μm boyutlarındadır ve 4-8 kez kıvrılmış polar bir filament içerirler. Sporların kıvrıntılı bir ekzospor yüzeyi, kalın bir endosporu, 4-7 bükümüne olan polar tübülü ve genellikle bir polar vakuolü bulunmaktadır^{13,14}. *Encephalitozoon* sporları barsak enfeksiyonunun erken dönemlerinde dışkıda görülebilir, ancak bu cins içinde yer alan türler genellikle böbrek ve solunum sistemine yayılım gösterirler ve geç dönemde idrar ve solunum yolu sekresyonlarında bulunurlar^{5,13,14}.

Nosema: Çoğu *Nosema* türü omurgasızlarda görülmektedir. *Nosema* türleri doğada yaygın olarak bulunmasına karşın insanlarda nadiren enfeksiyona yol açmaktadır. Bazıları sitoplazmaya bağlı bir kist içinde bulunabilir ancak genellikle sitoplazmayla direk temas halindedirler. Sporlar oval ve 4-4.5 x 2-2.5 μm boyutlarındadır. Polar tübülde 10-12 burğu bulunmaktadır^{13,14}.

Pleistophora: *Pleistophora* türleri balıklarda görülen parazitlerdir. İnsanlarda nadiren enfeksiyona yol açarlar. Parazit bir vezikül içinde gelişir. Sporlar, oval ve yaklaşık 2-2.8 x 3-4 μm boyutlarındadır ve polar tübülde 10-12 burğu bulunmaktadır. Spor duvar yapısı tipik Microsporidia yapısına benzer¹³⁻¹⁵.

Trachipleistophora: *Trachipleistophora* cinsi, ilk kez miyoziti olan AIDS'li bir hastadan izole edilmiştir. *Pleistophora* cinsinden, hiçbir evresinde çok çekirdekli sporogonial plasmodium olmaması ile ayrılır^{2,4,8}.

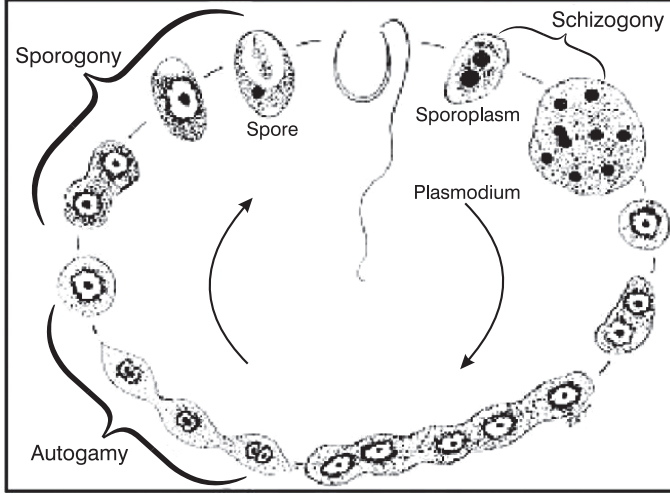
Vittaforma: Sporları 3.7 x 1 μm boyutlarındadır. Polar tübülde 6 burğu bulunur. Keratit gibi lokal enfeksiyona ya da yaygın enfeksiyonlara yol açabilir.

Brachiola: İlk kez immünokompetan bir hastanın korneasından izole edilmiştir. Sporlar 2.5-2.9 x 1.9-2 μm boyutlarındadır. Polar tübülde 7-10 kıvrım bulunmaktadır^{2,4,8}.

YAŞAM DÖNGÜSÜ

Enfeksiyonun ilk başladığı yer parazitin konağa geçiş yoluna göre farklılık göstermektedir. En sık gastrointestinal ya da solunum sisteminin epitel hücresinde başlar. Microsporidia'nın konak hücre dışında görülen formu enfeksiyöz olan sporlardır. Enfeksiyon, sporun konak hücrenin sitoplazması içine polar filamenti aracılığıyla enfektif sporoplazmasını enjekte etmesi sonucunda meydana gelmektedir^{11,13}.

Germinasyondan ve konak hücresinin enfeksiyonundan sonra Microsporidia'nın hücre içinde beslenme (şizogenik faz) ve sporulasyon (sporogenik faz) olmak üzere iki gelişim fazı vardır (Şekil 1).



Şekil 1: Microsporidia yaşam döngüsü.

1. *Merogoni/Sizogoni Fazı*: Sporoplazmanın uygun bir konağa girmesiyle başlar. Sporoblastlar, merontlara dönüşür. Meront olarak adlandırılan çoğalma gösteren hücreler konak hücresinin sitoplazmasında (*Nosema*, *Enterocytozoon*), PV içinde (*Encephalitizoon*) ya da parazitin salgıladığı şekilsiz bir kabuk içinde (*Pleistophora*, *Trachipleistophora*) gelişir, veya konağın endoplazmik retikulumuyla (*Endoreticulatus*, *Vittaforma*) çevrilir^{4,16}.

2. *Sporogonik Faz*: Sporogoni, merontların sporontlara dönüşümü olayına verilen isimdir. Sporontlar, ikiye bölünme ya da çoklu füzyon ile çoğalıp, sporoblastları oluşturan hücrelerdir. Daha sonra oval şekilli sporoblastlardan olgun sporlar meydana gelir. Hücre membranının parçalanmasıyla olgun sporlar serbest kalırlar¹⁶.

ENFEKSİYON VE HASTALIK GELİŞİMİ

Enfeksiyon genellikle HIV enfeksiyonuna bağlı olarak immün yetmezliği olan erişkinlerde görülmesine karşın, HIV negatif olan bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda da görülebilmektedir. Ayrıca immünokompetan hasta gruplarında da rastlanmaktadır^{1,2,17} (Tablo I).

Microsporidiosis'in klinik seyri, hastanın bağışıklık sisteminin durumuna ve enfeksiyon bölgesine göre farklılık gösterir. En sık gastrointestinal ve safra yolları tutulumu görülmektedir. Microsporidia'ya bağlı intestinal enfeksiyonlar genellikle HIV enfekte hastalarda görülür ve bu enfeksiyonların çoğunda etken *E.bieneusi*'dir. *E.bieneusi* enfeksiyonlarında mukozal yüzey alanında azalma ve olgunlaşmamış villusların diyareye yol açtığı düşünülmektedir^{5,6}.

Tablo I: İnsanda Mikrosporidial Enfeksiyonlarının Klinik Manifestasyonları

Türler	Klinik manifestasyonlar
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Enterit, diyare, kolanjit, kolesistit, pnömoni, bronşit, sinüzit, rinit
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	Enterit, diyare, kolanjit, kolesistit, nefrit, bronşit, sinüzit, rinit, keratokonjunktivit, yaygın enfeksiyon
<i>E.hellem</i>	Sinüzit, rinit, keratokonjunktivit, yaygın enfeksiyon, nefrit, üretrit, prostatit, sistit, üretrit, pnömoni
<i>E.cuniculi</i>	Sinüzit, rinit, keratokonjunktivit, yaygın enfeksiyon, hepatit, peritonit, ensefalit, barsak enfeksiyonu
<i>Encephalitozoon spp.</i>	Kütanöz enfeksiyonlar, karaciğer yetmezliği, kemik enfeksiyonu
<i>Trachipleistophora hominis</i>	Miyozit, keratokonjunktivit, sinüzit, rinit
<i>T.anthropophthera</i>	Ensefalit, miyozit, yaygın enfeksiyon
<i>Pleistophora spp</i>	Miyozit
<i>Vittaforma corneae</i>	Keratit, üriner sistem enfeksiyonu
<i>Nosema ocularum</i>	Keratokonjunktivit
<i>Nosema connori</i>	Yaygın enfeksiyon
<i>Brachiola vesicularum</i>	Miyozit

E.bieneusi ve *E.intestinalis* ile enfekte AIDS hastalarında ateş, iştahsızlık, kilo kaybı ile giden persistan diyare meydana gelmektedir. Günde 10 ve üzerinde dışkılama görülebilir. Hastalarda görülen diyare kan ve mukus içermez.

Encephalitozoon, *Trachipleistophora* ve *Pleistophora* türleri, immünokompromize hastalarda genellikle yayılmaya eğilimlidir ve sinüzit, keratokonjunktivit, hepatit, miyozit, peritonit, nefrit, ensefalit veya pnömoniye yol açabilirler⁸.

İmmünokompetan hastalarda klinik genelde kronik seyreder. Bazı olgularda ise enfeksiyonun erken döneminde hafif klinik bulgular ortaya çıkabilir. Bazı bireylerde turist diyaresi meydana gelebilir. Diyare genellikle 2-3 hafta sürer ve kendiliğinden düzelir¹⁸. Tropikal bölgelerde yaşayan, *E.bieneusi* ile enfekte olan çocuklarda persistan diyare tablosu meydana gelebilir ve malnütrisyona bağlı olarak alevlenmeler görülebilir. Ayrıca yaşlıların, yaşla birlikte bağışıklık sistemlerinin zayıflamasından dolayı bu enfeksiyonlara daha duyarlı hale geldiği bildirilmektedir^{2,12}.

EPİDEMİYOLOJİ

Prevalans: İnsanlarda Microsporidia olgusu ilk kez 1959 yılında çiftlik hayvanlarıyla temas öyküsü olan Japon bir çocukta tanımlanmıştır. Ateş, konvülsiyon ve baş ağrısı şikayetleri ile gelen hastanın beyin omurilik sıvısının (BOS) incelenmesi sonucunda etken olan *Encephalitozoon* cinsi Microsporidia tanımlanmıştır. Bunu

takiben 1973 yılında iki olgu daha bildirilmiştir. Bunlardan atipik aplazi tanısı olan immünokompromize olan çocukta tüm organlardan *Nosema connori* izole edilmiştir. Diğer olgu ise kornea tutulumu olan 11 yaşında bir çocuktur⁴.

AIDS pandemisinden önce tanımlanmış olan Microsporidia olgu sayısı oldukça sınırlı sayıdayken, bugün hem gelişmiş ve hem de gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere tüm dünyada giderek artış göstermektedir. Tanımlamada kullanılan metot farklılıklardan dolayı prevalans verileri oldukça değişkenlik göstermektedir⁶. En fazla veri Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve Avusturalya'da bulunan HIV ile enfekte hastalara aittir. Bu hastalarda en sık görülen etken *E.bieneusi*'dir ve görülme oranı %5-50 arasında değişmektedir. HIV negatif popülasyonda ise seroprevalans oranları %1.3-8 arasında değişkenlik göstermektedir⁶.

Bulaş Yolları: Microsporidiosis, insanlarda yeni tanımlanmış bir enfeksiyondur. Mikroorganizmanın bulaş yolu ve enfeksiyon kaynakları ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı oldukça sınırlı sayıdadır. Microsporidia'nın doğada yaygın olarak bulunması ve enfeksiyonun tüm dünyada görülmesi nedeniyle birçok geçiş yolu ve kaynağı olduğu düşünülmektedir⁴.

Yaygın *E.bieneusi* enfeksiyonu olan hastalarda barsak tutulumunun sık, solunum yolu tutulumun ise nadir olması; fekal-oral, oral-oral, aerosol inhalasyonu ya da kontamine yiyeceklerin alınması gibi farklı geçiş yolları olabileceğini düşündürmektedir. Oküler enfeksiyonların kaynağı tam olarak bilinmemektedir. Direk inokülasyon yolu ile ya da sistemik enfeksiyon sonucu göz tutulumu olabileceği düşünülmektedir⁵.

Hayvanlarda vertikal geçiş tanımlanmış olmasına rağmen insanlarda gösterilememiştir. Microsporidia'nın solunum ve intestinal sistemde bulunması ve idrar ve gaita ile sporların atılması nedeniyle horizontal geçişin olabileceği düşünülmektedir. Risk faktörleri arasında intravenöz ilaç kullanımı, homoseksüellik, yüzme havuzları ve meslek icabı su ile temas yer almaktadır. İnsanları enfekte eden birçok Microsporidia türünün hayvanları da enfekte edebilmesi zoonotik geçiş olasılığını desteklemektedir^{4,12}.

Microsporidia'nın birçok özelliği sudan geçişi desteklemektedir. Enfekte hayvanın idrarı ve dışkısıyla atılan mikroorganizma, suları kontamine etmektedir. Sporları dış ortama oldukça dayanıklıdır ve suda uzun süre canlı kalabilir. Sporlar küçük oldukları için filtrelerden geçebilirler. Epidemiyolojik çalışmalarda risk faktörleri arasında arıtılmış su, mesleki sular ve içme sularına maruz kalma da yer almaktadır.

LABORATUVAR TANISI

Microsporidia sporları, çevre koşullarına oldukça dirençlidir ve %10'luk formalin ile fiksasyon sonrasında da canlılığını korur. Bu nedenle dışkı ya da duodenal drenaj örnekleri taze materyal şeklinde ya da %5-10 formalin içinde gönderilebilir. Taze dokular serum fizyolojik içinde ya da antibiyotikli besiyeri içinde saklanabilir. Hücre kültürü ya da moleküler inceleme için taze materyalin gönderilmesi gerekmektedir.

Sistemik enfeksiyonlarda örnek olarak idrar önerilmektedir. Diğer vücut sıvıları (balgam, bronkoalveolar lavaj, nazal akıntı veya BOS), konjunktiva sürüntüsü, kornea kazıntısı veya doku örneği de mikrobiyolojik inceleme için gönderilebilir.

Son yıllarda Microsporidia tanısında kullanılan yöntemlerde oldukça ilerlemeler kaydedilmiştir. Microsporidia tanımlanmasında mikroskopik inceleme, elektron mikroskopik değerlendirme, serolojik testler ve moleküler yöntemler olmak üzere değişik yöntemler kullanılmaktadır.

Işık ve Floresan Mikroskopisi: Işık mikroskopisi, Microsporidia enfeksiyonların tanısında yardımcı olan bir yöntemdir ancak cins ve tür düzeyinde ayırımı sağlayamamaktadır. Parazit hücre içinde ya da dışında oval, refraktil cisimcikler olarak gözükürler. Gram ile boyanan örneklerde Gram pozitif boyanan sporlar, maya hücrelerine benzer bir görünüm sergilerler. Sporlar, pembemsi-kırmızı renkte boyanması ve tomurcuklanma göstermemesi ile mayalardan ayrılırlar. Kesin ayırım için %1'lik aside dirençli boyama ya da Weber modifiye trikrom boyama ile tanının doğrulanması gerekir^{1,2}.

Microsporidia tanısında kalkoflor beyazı gibi bir çok kemilüminesan boya da kullanılmaktadır. Bu boyalar parazitin endospor tabakasına bağlanmakta ve böylece floresan mikroskopu ile örneklerde bulunan sporlar kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Ancak floresanlı boyalar küçük maya hücrelerini de boyayabilecekleri için yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmektedir.

Histopatoloji: Mikroorganizmanın histopatolojik incelemesinde değişik boyama teknikleri kullanılmaktadır. Hematoksilen-eozin (HE) boyasının tanımlamadaki yeri tartışmalıdır. Sporlar HE ile pozitif boyanırlar ancak küçük boyutları nedeniyle deneyimli bir patoloğun bile gözünden rahatlıkla kaçabilir. Gomori metanamin gümüşleme yöntemiyle boyama ise değişik sonuçlar verir^{1,2}.

Transmisyon Elektron Mikroskopi (TEM): Bu yöntemin özgüllüğü yüksek olmasına karşın duyarlılığı düşüktür. Ayrıca örneğin hazırlanması oldukça zahmetli ve zaman alıcıdır^{1,2}. TEM ile parazitin polar filamentleri tespit edilmektedir. Günümüzde TEM, moleküler yöntemlerin uygulanamadığı laboratuvarlarda hala tanımlamada kullanılan ve tür tayininde altın standart kabul edilen bir yöntemdir. TEM ile sporların yapısal özellikleri incelenerek, Microsporidia'lar cins hatta tür düzeyine kadar tanımlanabilir. Ancak *E.cuniculi* ve *E.hellem*'in ince yapısı EM altında bile birbirine çok benzerdir ve ayırt edilmesi mümkün değildir.

Hücre Kültürü: Microsporidia zorunlu hücre içi parazittir ve maymun (Vero) ve tavşan böbrek hücrelerinde (RK13), insan fetal akciğer fibroblast hücrelerinde (MRC-5), MDCK hücrelerinde ve diğer hücre kültürlerinde üretilmektedir^{2,4}. İnsanı enfekte eden birçok Microsporidia türünün (*Encephalitozoon hellem*, *E.cuniculi*, *E.intestinalis*, *Trachipleistophora hominis*, *Vittaforma corneae*) üretilmesinde bu hücre kültürleri kullanılır. En sık etken olarak karşımıza çıkan *Enterocytozoon bieneusi*'nin ise uzun süreli kültürü yapılamamakta ancak insan akciğer fibroblastında ve Vero hücrelerinde kısa süreli üretilmektedir^{2,4}.

İn vitro kültürünün yapılması, mikroorganizma ile konak arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılması, tür tayininin yapılması ve tanıda kullanılacak yeni immünolojik araçların geliştirilmesi gibi birçok fayda sağlamaktadır. Bunun yanı sıra klinikte

kullanılmakta olan ilaçların etkinliğinin araştırılmasında uygulanmaktadır. Metodun uygulanmasının oldukça zaman alıcı olması ve sadece özel laboratuvarlarda yapılabilmesi nedeniyle klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin kullanımı mümkün değildir.

Hayvan Modelleri: Gerek Microsporidia enfeksiyonlarının patogenezinin araştırılması gerekse poliklonal ve monoklonal antikorların üretilmesi için birçok değişik hayvan modelleri denenmiştir. BALB/c ve C57B1/6 atimik fareler kullanılmış ve bu hayvanlara intraperitoneal olarak *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* veya *Vittaforma corneae* enjekte edilmiştir^{1,2,12}.

Antijen Tespiti: Microsporidium tanısında ve tür ayırımında immün floresan (IF) testlerde özgül antikorlar kullanılmıştır. Bu antikorlar, sporların türe özgül yüzey yapılarını veya polar tüp proteinlerini tanırlar. Yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda rutin boyama yöntemlerinin IF metodundan daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla henüz yaygın olarak kullanılmayan IF yöntemi, sadece tanının doğrulanmasında ve tür ayırımında önerilmektedir^{1,2,12}.

Seroloji: İmmün floresan, immünoperoksidaz, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ve "Western blotting" olmak üzere birçok serolojik yöntem, insan serumunda Microsporidia'ya karşı oluşan IgG ve IgM tipi antikorların tespitinde kullanılmaktadır^{1,2,12}. Bu testlerde kullanılan Microsporidia antijenleri, sadece doku kültürlerinde üretilebilen türlerden hazırlanabilmekte ve ancak bu türlere karşı antikor varlığının araştırılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca HIV ile enfekte hastalar immün yetmezlikten dolayı antikor oluşturamadığından ve *E.bieneusi* kültürde üretilemediğinden dolayı, Microsporidia serolojik tanısı sadece HIV enfekte olmayan hastalarda ve kültürde üretilebilen türler için geçerli olmaktadır^{1,2}.

Seroepidemiyolojik çalışmalar için uygun olan bu testlerde Microsporidia'ya karşı tespit edilen antikorların yeni bir enfeksiyonu mu, latent bir enfeksiyonu mu, çapraz reaksiyonu mu yoksa poliklonal B hücre aktivasyonunu mu gösterdiği ayırt edilememektedir^{1,12}.

Moleküler Çalışmalar: Microsporidia ile ilgili moleküler çalışmalar henüz başlangıç dönemindedir. Moleküler yöntemler, taksonomik sınıflama, filogenetik çalışmalar ve özellikle klinik örneklerden Microsporidia tespiti ve tür ayırımı için önem taşımaktadır.

Ribozomal RNA'nın LSU (large subunit) ve SSU (small subunit) gen bölgeleri ya da "intergenik spacer" bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle amplifiye edilerek Microsporidia tanımlaması ve tür tayini yapılabilmektedir. PCR dışında RFLP (Restricted fragment length polymorphism), heterodubleks analizi ve DNA dizi analizi olmak üzere diğer moleküler yöntemler de tanımlamada kullanılmaktadır⁴.

Son yıllarda insanları enfekte eden Microsporidia'ların bir çok geninin dizi analizi yapılmıştır. Fransa'da bir grup araştırmacı *E.cuniculi*'nin tüm genomik yapısının dizi analizini tamamlamıştır¹².

TEDAVİ

Günümüzde invaziv Microsporidia için özellikle *Encephalitozoonidae* enfeksiyonlarının tedavisinde albendazol kullanılmaktadır. *E.bieneusi* enfeksiyonlarında ise en etkin ilaç fumagillin gibi görünmektedir. Dolayısıyla Microsporidia'nın tür düzeyinde tanımlanması hastaların tedavisi açısından büyük önem taşımaktadır¹².

KAYNAKLAR

1. Garcia LS: Laboratory identification of the microsporidia. J Clin Microbiol 2002, 40: 1892-1901.
2. Franzen C, Müller A: Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. Microbes Infect 2001, 3: 389-400.
3. Matsubayashi H, Koike T, Mikata T, Hagiwara S: A case of *Encephalitozoon* like body infection in man. Arch Pathol 1959, 67: 181-187.
4. Franzen C, Muller A: Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. Clin Microbiol Rev 1999, 12: 243-285.
5. Kotler DP, Orenstein JM: Clinical syndromes associated with microsporidiosis. Adv Parasitol 1998, 40: 321-349.
6. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL: Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev 1994, 7: 426-461.
7. Bryan RT, Weber R, Schwartz DA: Microsporidiosis in patients who are not infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1997, 24: 534-535.
8. Didier ES: Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta Trop 2005, 94: 61-76.
9. Edlind TD, Li J, Visvesvara GS, Vodkin MH, Mc Laughlin GL, Katiyar SK: Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. Mol Phylogenet Evol 1996, 96: 359-367.
10. Hirt RP, Logsdon JM Jr, Healy B, Dorey MW, Doolittle WF, Embley TM: Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. Proc Natl Acad Sci (USA) 1999, 46: 580-585.
11. Bigliardi E, Sacchi L: Cell biology and invasion of the microsporidia. Microbes Infect 2001, 3: 373-379.
12. Mathis A, Weber R, Deplazes P: Zoonotic potential of the microsporidia. Clin Microbiol Rev 2005, 18: 423-445.
13. Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A, et al: Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. J Protozool 1985, 32: 250-254.
14. Franzen C, Muller A: Molecular techniques for detection, species differentiation and phylogenetic analysis of Microsporidia. Clin Microbiol Rev 1999, 12: 243-285.
15. Didier ES, Didier PJ, Friedberg DN, et al: Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. J Infect Dis 1991, 163: 617-621.
16. Bigliardi E, Sacchi L: Cell biology and invasion of the microsporidia. Microbes Infect 2001, 3: 373-379.
17. Goetz M, Eichenlaub S, Pape GR, Hoffman RM: Chronic diarrhea as a result of intestinal microsporidiosis in a liver transplant recipient. Transplantation 2001, 71: 334-337.
18. Muller A, Bialek R, Kamper A, Fatkenheuer G, Salzberger B, Franzen C: Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. J Clin Microbiol 2001, 39: 1630-1632.