

İMMÜN SİSTEMİ BASKILANMIŞ BİR ÇOCUKTA MICROSPORIDIUM SPP. ENFEKSİYONUNUN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE TANIMLANMASI

MICROSPORIDIUM SPP. INFECTION IN AN IMMUNOCOMPROMISED CHILD DIAGNOSED BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Selma USLUCA¹, Ümit AKSOY¹

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir. (selmausluca@yahoo.com)

ÖZET

Microsporidium türleri, immünyetmezliği olan hastalarda sinüzit, keratokonjonktivit, hepatit, miyozit, peritonit, nefrit, ensefalit ve pnömoni gibi çeşitli klinik tablolara neden olmaktadır. Bu raporda miyotonic distrofi tanısıyla izlenen, *Microsporidium* spp.'ye bağlı ishali olan bir olgu sunulmaktadır. Dört yaşındaki erkek hasta solunum sıkıntısı ve ateş yakınmasıyla hastaneye başvurmıştır. Tekrarlayan enfeksiyonları nedeniyle immünolojik açıdan değerlendirilen hastanın IgA düzeyinin 14 mg/dl (normal değer 18-160), IgM düzeyinin 30 mg/dl (normal değer 45-200) olduğu tespit edilmiştir. Akciğer değişikliklerinin nedenini ortaya çıkarmak için yapılan bronkoskopi sonrası hastada yüksek ateş ve 20-25 kez sulu dışkılama ile seyreden ishal bulgularının ön plana çıktığı belirlenmiştir. Dışkının bakteriyolojik incelemesi sonucunda shigellosis tanısı konularak tedaviye siprofloksasin; parazitolojik inceleme sonucunda *Microsporidium* spp. tanısı konularak albendazol eklenmiştir. Weber'in modifiye trikrom boyası ile mikroskopik inceleme sonucu elde edilen pozitiflik, *Microsporidium* spp. için özgül olan C1 ve C2 primerleri (Metabion, Almanya) ile yapılan polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile doğrulanmış ve *Encephalitozoon intestinalis*'e özgü 270 baz çiftlik bant elde edilmiştir. Sonuç olarak, ishali olgular ile immün sistemi baskılanmış hastalara ait dışkı örneklerinin, rutin parazitolojik incelemelere ek olarak *Microsporidium* spp. açısından da değerlendirilmeleri gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Microsporidium* spp., ishal, immünyetmezlik.

ABSTRACT

Microsporidium spp. may lead to a variety of clinical pictures like sinusitis, keratoconjunctivitis, hepatitis, myositis, peritonitis, nephritis, encephalitis and pneumonia in case of immune deficiencies. In this report, a case of diarrhea due to *Microsporidium* spp. has been presented. A four years old male patient who was followed with the diagnosis of myotonic dystrophobia, was admitted to the hospital with the complaints of respiratory distress and fever. Due to the history of recurrent infections, further investiga-

tions was carried out to clarify the immunological status of the patient, and the total IgA and IgM levels were found as 14 mg/dl and 30 mg/dl, respectively (normal values were; 18-160 and 45-200 mg/dl, respectively). Following bronchoscopy done to enlighten respiratory distress, the patient developed high fever and watery diarrhea. Since bacteriological cultures of the stool yielded *Shigella* spp., antimicrobial therapy with ciprofloxacin was initiated. Parasitological examination of the stool done by Weber's modified trichrome dye, yielded *Microsporidium* spp. microscopically and albendazole was added to the treatment. Presence of *Microsporidium* spp. was confirmed by polymerase chain reaction with the use of C1 and C2 primers (Metabion, Germany) targeted to *Microsporidium* spp. and besides a 270 bp band specific for *Encephalitozoon intestinalis* was also obtained. This case emphasized that in case of diarrhea the stool samples of the immunocompromised patients should be evaluated in terms of *Microsporidium* spp. in addition to the routine parasitologic examinations.

Key words: *Microsporidium* spp., diarrhea, immune deficiency.

GİRİŞ

Microsporidium türleri, küçük, spor oluşturan, hem omurgalı hem de omurgasız konakları enfekte edebilen, zorunlu hücre içi ökaryotik parazitlerdir. Mikrosporidiyozisin klinik seyri, etkenin lokalizasyonuna ve konağın immün durumuna bağlıdır. CD4+ T hücre sayısı 100/mm³'ün altında olan immünyetmezlikli hastalarda *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon intestinalis*'in neden olduğu enfeksiyonlar, klinik tabloyu ağırlaştırmakta ve enfeksiyon, kronik ishal, ateş, iştahsızlık ve kilo kaybı ile yaşamı tehdit edebilmektedir¹. Etkenin farklı sistemleri tuttuğu düşünüldüğünde (bağırsaklar, solunum sistemi ve göz) fekal-oral yol, inhalasyon ve direkt kontaminasyon ile bulaşma mümkün olabilmektedir².

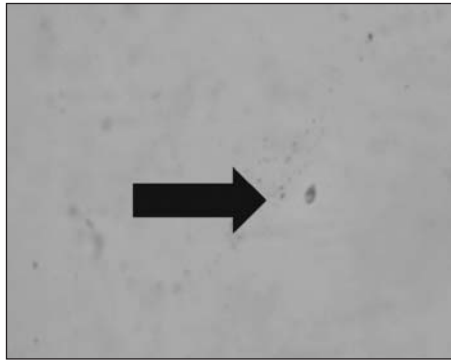
OLGU SUNUMU

Miyotonik distrofi tanısıyla izlenen 4 yaşındaki erkek çocuk, solunum sıkıntısı ve ateş yakınması ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEUTF) Çocuk Hastalıkları Servisine yatırıldı. Hematolojik sayımlarda beyaz küre 20.1 µL [normal değer (ND): 4.0-10.3], hemoglobin 11.7 g/dl (ND: 13.5-17.5), hematokrit %34.1 (ND: 41-53), MCV 80.6 fL (ND: 80.7-95.5), trombosit 535 µl (ND: 156-373) olarak saptandı. Biyokimyasal analizlerinde; kreatinin 0.4 mg/dl (ND: 0.8-1.4), aspartat aminotransferaz 263 U/L (ND: 1-38) ve alanin aminotransferaz 327 U/L (ND: 1-41) idi. Akciğer grafisinde bilateral bazallerde havalanma azlığı, konsolidasyon alanları ile, toraks ultrasonografisinde plevral efüzyon saptandı. Solunum güçlüğü nedeniyle entübe edilen hasta, anestezi yoğun bakıma nakledildi. Tekrarlayan enfeksiyonları açısından pediatrik immünoloji tarafından değerlendirilen hastanın IgA düzeyinin 14 mg/dl (ND: 18-160), IgG düzeyinin 60 IU/L (normal değer 0-150), IgM düzeyinin ise 30 mg/dl (ND: 45-200) olduğu tespit edildi. Akciğer değişikliklerinin nedenini ortaya çıkarmak için yapılan bronkoskopi mukus tıkaçı tespit edildi. Bronkoskopi sonrası hastada yüksek ateş ve 20-25 kez sulu dışkılama ile seyreden ishal bulgularının ön plana çıktığı belirtildi. Bakterioloji ve parazitoloji laboratuvarlarına ishal nedenini araştırmaya yönelik dışkı örnekleri gönderildi. Çalışma için gerekli etik onay DEUTF Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alındı.

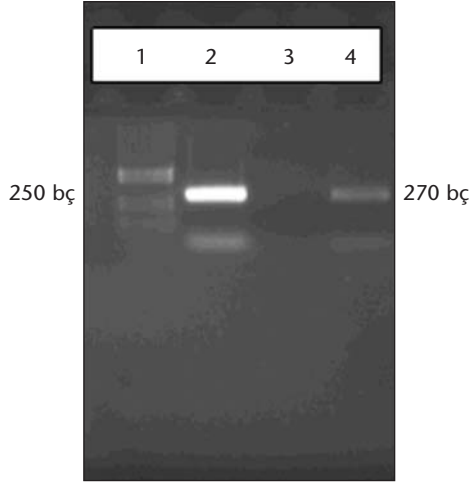
McConkey, EMB (eosine methylene blue) ve SS (Salmonella-Shigella) besiyerlerine ekim sonucunda shigellosis tanısı koyularak tedaviye siprofloksazin eklendi. Nativ-lugol ve çoklaştırma yöntemleri ile parazit saptanmayan dışkı örneğinin Weber'in modifiye trikrom boyası ile incelenmesi sonucu, *Microsporidium* sporları saptandı. Bu yöntem ile *Microsporidium* spp. sporlarının parlak pembe renkte boyandığı görüldü. Bağırsak florasında yer alan bakteriler ve artefaktların ise açık mavi-mor renkte boyanarak etken ile iyi bir kontrast oluşturduğu ve kolayca ayırt edilebilmesine imkan verdiği belirlendi. Diğer parazitler için uygulanan rutin boyalı preparat incelemeleri negatif olarak değerlendirildi. *Microsporidium* spp. yoğunluğu Menotti ve arkadaşlarının³ geliştirdiği yöntem ile belirlendi. Buna göre her 10 sahada 1'den az sayıda spor saptandı ve parazit yoğunluğu +1 olarak değerlendirildi (Resim 1).

Mikroskopik inceleme sonrası dışkı örneğine polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi uygulandı. Direkt olarak -80°C'de dondurularak saklanmış dışkı örneklerinden, NucleoSpin Tissue Genomic DNA Tissue Kit (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA elde edildi. *Microsporidium* spp. için ticari olarak temin edilen C1 ve C2 primerleri (Metabion, Almanya) kullanıldı. PCR karışımı; 10x tampondan 5 µl, MgCl₂'den 4 µl, dNTP'den 1 µl, C1 ve C2 primerlerinin her birinden 1.25'er µl, "hot start" Taq polimeraz'dan (Fermentas) 0.2 µl, DNA ekstraktından 10 µl olmak üzere total hacim 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon, 95°C'de 7 dakikalık ön denatürasyonun ardından 35 döngü 94°C'de 1 dakika, 62°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika ve son uzama basamağı için 72°C'de 5 dakika olacak şekilde düzenlendi. Elde edilen DNA, DNA saflaştırma kiti (GeneMARK, Technology Co., Ltd, Tayvan) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırıldı ve %1.5 agaroz jelde görüntülendi. *E.intestinalis*'e özgü 270 baz çift (bc)'lik bant gözlemlendi (Resim 2). Hastaya 7 gün *E.intestinalis*'e etkili olduğu bildirilen albendazol tedavisi önerildi. Tedavinin ardından ishal yakınmasının sona erdiği saptandı. Tekrarlayan dışkı incelemelerinde parazite rastlanmadı.

Sol akciğerde solunum seslerinin azalması üzerine hastaya tekrar bronkoskopi yapıldı. Alınan örnekte ARB (++) saptandı, ancak tüberküloz PCR negatif olarak değerlendirildi. Hastanın öyküsünde tüberküloz geçiren ve temas halinde bulunduğu dede ve hala olduğundan, hasta tüberküloz olarak değerlendirildi ve üçlü tedavi (izoniazid, rifampisin, pirazinamid) başlandı. Hastanın genel durumunun iki hafta süreyle iyi seyretmesi üzerine taburcu edildi.



Resim 1. Modifiye trikrom boyası ile *Microsporidium* spp. görüntüsü.



Resim 2. Agaroz jelde *E.intestinalis* saptanan olguya ait PCR görüntüsü. 1. hat: Moleküler ağırlık belirteci (250 bç ladder); 2. hat: *E.intestinalis* pozitif kontrol; 3. hat: Negatif kontrol; 4. hat: *E.intestinalis* saptanan olgu (*E.intestinalis*'e özgü 270 bç'lik bant).

TARTIŞMA

Microsporidium türleri immün sistemi sağlam kişilerde subklinik veya klinik enfeksiyona neden olurken, immün sistemi baskılanmış hastalarda kronik ishal, emilim bozukluğu ve şiddetli kilo kaybına yol açmakta, hatta ölüme neden olabilmektedir⁴. Ülkemizde Yazar ve arkadaşları⁵ tarafından, akut miyeloblastik lösemili bir olgunun bronkoalveoler lavaj (BAL) örneğinin Giemsa ile boyalı preparatının değerlendirilmesi sırasında *Microsporidium* spp. saptandığı rapor edilmiştir. Antineoplastik ilaçların ve steroid tedavisinin, bu hastada pre-dispozan faktör olarak rol oynadığı düşünülmüştür⁵. Enfeksiyonun özellikle immün sistemin baskılandığı durumlarda önemli bir ishal etkeni olduğu göz ardı edilmemelidir.

Günümüzde bağırsak mikrosporidiosis enfeksiyonlarının tanısında, dışkının ışık mikroskopisi ile değerlendirilmesine olanak veren basit ve hızlı sonuç veren boya yöntemleri geliştirilmiştir⁴. Bunlardan en sık uygulananı, Weber'in modifiye trikrom boya yöntemidir⁶. Bu boya ile *Candida albicans* gibi küçük mayalar da parlak pembe renkte boyanmakta, ancak koyu renkte homojen bir görünüm sergilediklerinden iç yapıları görülememektedir. Ayrıca bu boya yöntemi, çoklaştırmaya yöntemi uygulanmadan formolle sulandırılan dışkıdan direkt hazırlandığı için çoklaştırmaya sırasında sporların kaybı söz konusu olmamaktadır. Olgumuzun dışkı örneğinin boya yöntemi ile mikroskopik değerlendirmesi sonucunda çok az sayıda spor içerdiği görülmüştür. Bu nedenle birden fazla preparat hazırlanmış, farklı zamanlarda tekrar değerlendirilerek etkenin gözden kaçırılmamasına çalışılmıştır. Ayrıca preparatların çok ince olarak hazırlanmasının, etkenin saptanmasını kolaylaştırdığı belirlenmiştir.

Günümüzde moleküler yöntemlerin, konvansiyonel yöntemlerin kısıtlılıklarını ortadan kaldıracığı düşünülmektedir. Modifiye trikrom boya yöntemi ile tanıda, PCR'nin doğru-

lama ve tür ayrımında kullanılması tavsiye edilmektedir⁴. Ancak PCR'nin, dışkıdan DNA ekstraksiyonu yapılırken sporun parçalanmasındaki güçlükler, dışkıda bulunan inhibitörlerin yeterince uzaklaştırılamaması veya DNA ekstraksiyonunun zayıf olması gibi bazı kısıtlılıkları da mevcuttur⁷. Çalışmamızda, olgumuzun -80°C'de dondurularak saklanan dışkı örneğinde PCR ile pozitif sonuç alınmış, ancak formalinle saklanan dışkı örneğine uygulanan DNA ekstraksiyonunun başarılı olmadığı belirlenmiştir. Formalinin PCR üzerine güçlü inhibitör etki gösterdiği ve ekstraksiyondan önce tamamıyla uzaklaştırılması gerektiği düşünülmüştür. PCR yöntemi ile pozitifliğin saptanabilmesi için, dışkı örneklerindeki spor konsantrasyonunun 1 g dışkıda en az 10² spor olması gerektiği 10³ spor ve üzeri olduğu koşulda daha güvenilir sonuçların elde edildiği bildirilmektedir⁸.

Sonuç olarak, ishalleri olgular ile immün sistemi baskılanmış hastalara ait dışkı örneklerinin, rutin parazitolojik incelemelere ek olarak *Microsporidium* spp. açısından da değerlendirilmeleri gerektiği kanısına varılmıştır. *Microsporidium* türlerinin tanısında Weber'in modifiye trikrom boya yönteminin güvenle başvurulacak bir yöntem olduğu ve etkenin rutin tanısında kullanılabileceği düşünülmüştür. Ancak epidemiyolojinin ortaya konulması, uygun tedavinin yapılması ve etkenin tür ayrımının yapılması için PCR protokolünün oluşturulması gerekmektedir. Edindiğimiz deneyimler doğrultusunda, spor duvarının parçalanması aşamasında karşılaşılan güçlüklerin, yöntemin DNA ekstraksiyonu basamağındaki en önemli kısıtlılık olduğu belirlenmiştir. *Microsporidium* tanısına yönelik ülkemizde oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamız PCR yöntemi ile insan *Microsporidium* türlerinin saptandığı ilk çalışma olması açısından önemlidir. Çalışmamızın bu konuda planlanacak çalışmalara yol gösterici nitelikte olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Didier ES, Stovall ME, Green L, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 2004; 126: 145-66.
2. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 423-45.
3. Menotti, J, Cassinat B, Porcher R, Sarfati C, Derouin F, Molina JM. Development of a real-time polymerase-chain- reaction assay for quantitative detection of *Enterocytozoon bienersi* DNA in stool specimens from immunocompromised patients with intestinal microsporidiosis. *J Infect Dis* 2003; 187: 1469-74.
4. Fedorko DP, Hijazi YM. Application of molecular techniques to the diagnosis of microsporidial infection. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 183-91.
5. 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: 146-9.
6. 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: 3138-45.
7. Subrungruang I, Mungthin M, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of DNA extraction and PCR methods for detection of *Enterocytozoon bienersi* in stool specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3490-4.
8. Müller A, Stellermann K, Hartmann P, et al. A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 243-6.