

İmmün Sistemi Sağlam Bir Çocukta *Cryptosporidium parvum* Enfeksiyonu

Cryptosporidium parvum Infection in an Immunocompetent Child: Case Report

Dr. Selma USLUCA,^a
Dr. Ümit AKSOY^a

^aParazitoloji AD,
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
İzmir

Geliş Tarihi/Received: 20.02.2010
Kabul Tarihi/Accepted: 21.06.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Selma USLUCA
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Parazitoloji AD, İzmir,
TÜRKİYE/TURKEY
selmausluca@yahoo.com

ÖZET *Cryptosporidium* cinsi, memeliler, kuşlar, sürüngenler ve balıklar gibi birçok konağı enfekte eden koksidian parazittir. İnsanı enfekte eden türleri antropotik geçiş göstermekle birlikte, bazı türleri zoonotik enfeksiyona da neden olabilmektedir. Bu makalede dispepsi yakınması etiyojisi araştırılan, *Cryptosporidium parvum*'a bağlı ishali olan bir olgu sunulmaktadır. Olgu, immün sistemi sağlam kişilerde görülen cryptosporidiosis kliniğinin, immün yetmezlikli hastalardaki tabloyu taklit edebildiğine dikkat çekebilmek için rapor edildi. Sekiz yaşındaki kız çocuğu, kronik karın ağrısı nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Hastalıkları polikliniğine başvurdu. Son iki ay içinde 3 kilogram kilo kaybı öyküsü olan hastanın 23 kilogram olduğu tespit edildi. Hastanın o sırada 5 gündür devam eden ishal yakınması olması nedeniyle dışkıının mikrobiyolojik ve parazitolojik incelenmesi istendi. Parazitolojik inceleme sonucunda Kinyoun acid-fast boya yöntemi ile çok sayıda *Cryptosporidium spp.* oocisti saptandı. Hastanın dışkı örneğine uygulanan PCR-RFLP yöntemi ile, *Cryptosporidium parvum*'a spesifik bantlar olan 34, 106, 413 bp bantlar gözlemlendi. Parazitin sadece boya yöntemi ile saptanmasının yeterli olmadığı, PCR yöntemi ile doğrulanması ve tür ayrımı yapılarak ile muhtemel bulaş kaynağının belirlenmesi ile enfeksiyondan etkin bir şekilde korunmanın mümkün olabileceği düşünülmektedir. Parazitin epidemiyolojisinin ortaya konulması, uygun tedavi protokolünün oluşturulması ve ülkemizde mevcut türlerin belirlenmesi için bu alanda yapılacak çalışmalara ağırlık verilmesi gerektiği kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: Kriptosporidyum parvum; polimeraz zincir reaksiyonu; polimorfizm, kesilmiş parça uzunluğu

ABSTRACT *Cryptosporidium* species are coccidian parasites infecting mammals, birds, reptiles and fish. Those that infect humans show an antropotoc transmission, but certain types may cause zoonotic infections. This report presents a case, whose etiology of dyspepsia has been studied and who has diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*. Case was reported to notify that symptoms of cryptosporidiosis in immunocompetent patients may resemble that of immunocompromised patients. An eight-year-old girl applied to the Department of Pediatrics of the of Dokuz Eylül University due to a chronic colic. It has been observed that the patient weighs 23 kg and has lost 3 kg in the last two months. Microbiological and parasitological examination of the patient's stool was requested as she had had the diarrhea for five days then. As a result of the parasitological examination using Kinyoun acid-fast dye method, a lot of *Cryptosporidium spp.* oocyst was found. Using the PCR-RFLP method on the stool sample of the patient, *Cryptosporidium*-specific bands 34, 106, 413 bp were seen. It has been concluded that determining the parasite using dye method only is not enough and that PCR method should be used. It is thought that discriminating the type will help the possible causes of the infection to be discovered and thus making effective protection from the infection possible. Further investigations are needed to obtain correct data about the epidemiology, species in our country and management protocols of the parasite.

Key Words: *Cryptosporidium parvum*; polymerase chain reaction; polymorphism, restriction fragment length

Cryptosporidium cinsi, memeliler, kuşlar, sürüngenler ve balıklar gibi birçok konağı enfekte eden koksidian parazittir. *Cryptosporidium spp.*'nin insanda barsak enfeksiyonu yapan en azından 6 türü bilinmektedir. Bunlar *Cryptosporidium hominis* (*C. hominis*), *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*), *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium muris*'dir. En sık görülen iki türden biri olan *C. hominis* antropotik geçiş gösterirken, *C. parvum* ise zoonotik geçiş gösterir.¹ Enfeksiyon ishal, kusma, karın ağrısı ve ateş ile karakterize olup sağlıklı kişilerde tedavi edilmeksizin kendiliğinden iyileşir.²

İmmün sistemi baskılanmış kişilerde enfeksiyonun seyri, kısa süreli ve hızlı iyileşme gösteren ishalden, kronik, yaşamı tehdit eden kolera benzeri tabloya kadar değişebilmektedir. Özellikle AIDS, kızamık gibi viral hastalıklarda, lösemi, gamaglobulinemiler, insüline bağımlı diyabet, böbrek yetmezliği, karaciğer transplantasyonu ve kanser tedavisi gören hastalarda semptomlar şiddetlidir. Bu hastalarda ishal 2 aydan uzun sürer, tüm enfeksiyon süresince dışkı ile ookist atılımı, şiddetli dehidratasyon, kilo kaybı ve malnutrisyon görülür. AIDS hastalarında CD4 sayısı 180 hücre/mm³ üzerinde ise enfeksiyonun daha hafif seyrettiği, bu sayının altında olması durumunda enfeksiyonun daha şiddetli olduğu ve süresinin uzadığı bildirilmektedir. Günlük sıvı kaybı ortalama 3-6 litre olmakla birlikte bazen 17 litreye kadar çıkabilmektedir. *Cryptosporidium*'un başlıca yerleştiği yer barsaklar olmasına karşın, immün sistemi baskılanmış hastalarda barsak dışı (safra kanalları, pankreas, mide, solunum sistemi, böbrek) tutulum da görülür. Bu hastalarda barsak kanalından hematogen yolla yayılımın gerçekleştiği düşünülmektedir.³

Cryptosporidiosis tanısı genellikle dışkı, daha az sıklıkla da safra ve balgamdaki ookistlerin çeşitli boyalarla boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelenmesi ile konur.⁴ *Cryptosporidium spp.*'nin saptanması ve tür ayrımında PCR ve RFLP giderek daha çok kullanılan yöntemler olmuştur.⁵

OLGU SUNUMU

8 yaşındaki kız çocuğu, kronik karın ağrısı nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi'ne başvurdu. Son iki ay içinde 3 kilogram kilo kaybı öyküsü olan hastanın 23 kilogram olduğu tespit edildi. Hastaya dispepsi şikayeti nedeniyle endoskopi uygulandı. Endoskopi sonucu özofagus ve korpus mukozasının normal, antrumun hafif hiperemik (bu bölgeden biyopsi alındı) olduğu rapor edildi. Hızlı üreaz testi negatifti. Hastanın hastanemize ilk kez başvurması nedeniyle önceki laboratuvar bilgilerine ulaşılamadı.

Hastanemizde yapılan hematolojik analiz sonuçları; hemoglobin, beyaz küre (WBC), nötrofil, lenfosit ve elektrolit değerleri (Na, K, Cl) normal olarak belirlendi. Sedimentasyon 25 mm/sa (referans aralığı 0-20 mm/sa) idi. Trombosit 394 UL (referans aralığı 156-373 UL) idi. Karaciğer fonksiyon testlerinden ALT normal değerlerde iken, AST 43 U/L (referans aralığı 1-32 U/L), ALP 383 U/L (referans aralığı 34-240 U/L) idi. LDH, GGT, total protein, albümin, total bilirubin, direkt bilirubin, kalsiyum, fosfor değerleri normal olarak tespit edildi. Böbrek fonksiyon testlerinden kreatinin 0.70 mg/dl (referans aralığı 0.8-1.4 mg/dl), BUN normal olarak değerlendirildi. İdrar analizi sonuçları; idrar dansitesi 1.020 (referans aralığı 1.010-1.030), idrar pH 5.5 (referans aralığı 5.0-7.5), lökosit 500 Leu/UL (referans aralığı 0-25 UL), nitrit, protein, bilirubin, hemoglobin negatif, glukoz, ürobilinojen normal, keton 4 mmol/L (referans aralığı 0-1 mmol/L) olarak belirlendi. Çocuk Hastalıkları polikliniğine başvuran hastanın o sırada 5 gündür devam eden ishal yakınması olması nedeniyle dışkının mikrobiyolojik ve parazitolojik incelenmesi istendi. Hastanın ailesinden alınan ayrıntılı öyküsünde 4-5 aydır zaman zaman ishal yakınmalarının olduğu, ancak herhangi bir tetkik ve tedavi uygulanmadan kendiliğinden düzeldiği, hastanın iştahsızlık problemi de olduğu için ancak kilo kaybının belirgin olması üzerine hastaneye başvurdukları öğrenildi. Parazitoloji laboratuvarında ishal yakınması olan hastaların dışkı örneklerine rutin olarak uygulanan Kinyoun acid-fast boya yöntemi ile çok sayıda *Cryptosporidium spp.* ookisti saptandı. Boyalı preparattaki parazit yo-

ğunluğu, McLauchlin ve ark.nın geliştirdiği yöntem ile belirlendi.⁶ Buna göre, her alanda 11-100 parazit saptandı ve parazit yoğunluğu +2 olarak değerlendirildi (Resim 1). Mikrobiyolojik inceleme sonucu negatif geldi.

Hastanın ishal yakınmasının devam etmesi durumunda kontrol amacıyla aralıklı olarak dışkı incelemesi önerildi. 14 gün boyunca yapılan takibinde ookist atılımının azalarak sonlandığı görüldü. Hastanın diğer aile bireylerinin dışkı incelemeleri negatif olarak değerlendirildi.

Ailenin şebeke suyu kullandıkları, hastanın günde 4-5 kez dışkılamayla karakterize ishalinin olduğu ancak (dışkısının) kan ve mukus içermediği öğrenildi. Ayrıca karın ağrısı, bulantı, kusma, ateş, gaz şikayetlerinin de tabloya eşlik ettiği rapor edildi. Ailenin hayvan beslemediği, ancak hayvancılıkla uğraşan yakınlarının bulunduğu Mardin'e seyahat öykülerinin olduğu dikkati çekti.

Çalışma için gerekli etik onay Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alındı (Onay tarihi 03.05.05). Hastadan "aydınlatılmış onam" alındı.

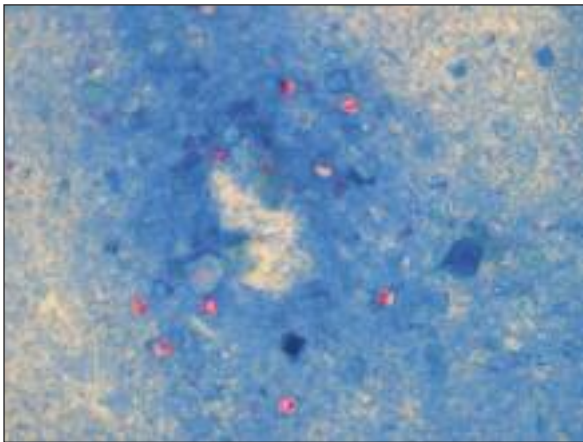
Olguya ait materyale boyalı preparat inceleme sonrası PCR-RFLP yöntemleri uygulandı. Direkt olarak -80 °C'de dondurularak saklanmış dışkı örneklerinden QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Ltd., Crawley, West Sussex, UK) üretici firmanın önerdiği prosedür doğrultusunda DNA elde edildi. Spano ve ark.nın önerdiği *Cryptospori-*

dium spp. duvar proteinine yönelik Cry9 ve Cry15 primerleri kullanıldı⁷. Miks oranları 10x buffer'dan 5 µl, dNTP'den 1 µl, Cry9 ve Cry 15 primerlerinin herbirinden 3'er µl, Taq polimeraz'dan (Roche) 0.5 µl, DNA ekstraktından 10 µl olmak üzere total hacim 50 µl olacak şekilde hesaplandı. Amplifikasyon, 94 °C'de 5 dakikalık ön denatürasyonun ardından 35 siklus 94 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve final ekstansiyon basamağı için 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde düzenlendi. Elde edilen DNA, DNA pürifikasyon kiti (GeneMARK, Technology Co., Ltd, Tayvan) kullanılarak üretici firmanın önerdiği prosedür doğrultusunda pürifiye edildi. 30 µl total volüm içinde 2 µl RsaI kesici enzimi (Fermentas), 10 µl PCR ürünü, 2 µl 10x Buffer tango olacak şekilde RFLP yöntemi uygulandı. %1.5 agaroz jelde görüntülendi. *Cryptosporidium parvum*'a spesifik bantlar olan 34, 106, 413 bp bantlar gözlemlendi (Resim 2).

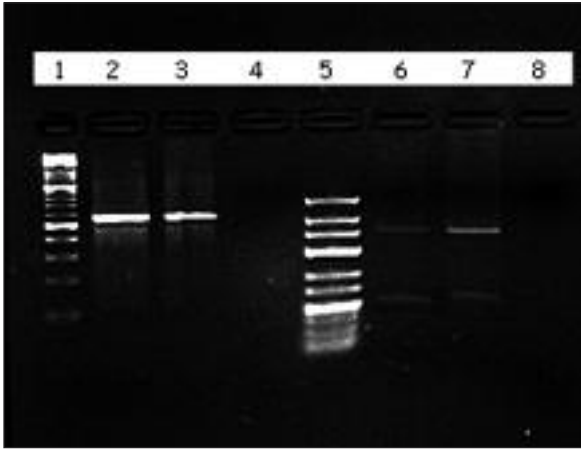
İnsan ve hayvan dışkılarından elde edilen gübrelere, sulamada kullanılan kontamine suların, çiftlik çalışanlarının toprakla bulaşmış ellerinin, sebzeilerin paketlenmesi, depolandığı, satıldığı veya hazırlandığı yerlerdeki kontamine yüzeylerin bu parazitin bulaşında rol alabileceği belirtilmiştir.⁸ Olgumuzda muhtemel bulaşın, *C. parvum*'un bulaş yollarını içeren benzer yollardan biri ile gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

Kinyoun acid-fast boya yöntemi ile tanı için dışkıda parçalanmamış ookistlerin varlığı gerekir. PCR yöntemi ise muhtemel bulaş kaynağını ve bunun insan sağlığı için oluşturduğu riski belirlemede yardımcı olur.⁹ Çalışmamızda dışkıda ookist yoğunluğunun fazla olması nedeniyle Kinyoun boya ve PCR yöntemleri arasında bir fark görülemedi, her iki yöntem de paraziti saptamada başarılı bulunmuştur.

Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve İsrail'de sığırlarda *C. parvum*'un genotiplendirilmesi ile ilgili bir çalışmada, her iki toplumun parazit popülasyonunda sığırların etkileri karşılaştırılmıştır. Sığırdan sığıra geçişi kolaylaştıran klasik ahırların *C. parvum*'un toplumdaki dağılımını kolaylaştırdığı düşünülmüştür.¹⁰ Çalışmamızda enfeksiyon kaynağının hayvanlar ile ilişkili olabileceği düşünülmüş, ancak hayvanlar üzerinde araştırma yapılamamıştır.



RESİM 1: Kinyoun acid-fast boya yöntemi ile *Cryptosporidium spp.* ookistleri.



RESİM 2: %1.5 agaroz jelde PCR-RFLP görüntüsü. 1. sütun: 100 bp DNA ladder. 2. sütun: *Cryptosporidium spp.* saptanan hasta örneği. 3. sütun: *Cryptosporidium spp.* pozitif kontrol. 4. sütun: Negatif kontrol. 5. sütun: 25 bp DNA ladder. 6. sütun: Hasta örneğinin RFLP ürünü. 7. sütun: *C. parvum* pozitif kontrol. 8. sütun: Negatif kontrol.

Son yıllarda ülkemizde *Cryptosporidium spp.*'nin moleküler yöntemlerle saptanmasına ilişkin çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Dirim ve ark.nın çalışmasında ishal şikayeti ile başvuran bir hastada Kinyoun acid-fast boya yöntemi ile *Cryptosporidium spp.* oookistleri saptandığı, PCR yöntemi ile *C. parvum*'a spesifik bant elde edildiği bildirilmiştir.¹¹ Olgumuza tanı koymak için mikroskop ve PCR birlikte kullanıldı ve bu yöntemlerin hastanın oookist atılımının takibinde oldukça yol gösterici olduğu kanısına varıldı. Hastanın takibinde 1., 3., 5., 8., 12., 14. günlerde olmak üzere 6 kez mikroskop ve PCR incelemesi yapıldı. Tümünde mikroskop ve PCR ile aynı sonuç elde edildi.

Tanriverdi ve ark.nın gastrointestinal şikayeti olan insanların dışkı örneklerinde çeşitli real-time PCR prosedürleri ile *C. parvum*'un saptanması ve genotiplendirmesi ile ilgili çalışmalarında, *C. hominis* (genotip 1), *C. parvum* (genotip 2)'un başarı ile saptandığı bildirilmiştir.¹² Çalışmamızda konvansiyonel PCR prosedürü uygulanmış, olguda *C. parvum* saptanmıştır.

Ülçay ve ark.nın çalışmasında ishal yakınması olan immün sistemi sağlam ve immün sistemi baskılanmış hastaların dışkıları farklı yöntemlerle parazitolojik açıdan değerlendirilmiş, ishal yakınması

olanlardan immün sistemi baskılanmış 1 olguda modifiye acid-fast boya yöntemi ile, 3 olguda DFA yöntemi ile *Cryptosporidium spp.* saptandığı, PCR yöntemi ile *Cryptosporidium spp.* tespit edilmediği bildirilmiştir.¹³

Tamer ve ark.nın çalışmasında okul çocuklarının dışkı örnekleri modifiye acid-fast boya yöntemi ve PCR-RFLP yöntemi ile değerlendirilmiş, 4 olguda *Cryptosporidium parvum* saptandığı bildirilmiştir.¹⁴

Erdoğan ve ark.nın çalışmasında taze ve formaldehitte saklanan dışkı örnekleri modifiye acid-fast boya yöntemi ve nested PCR yöntemi ile *Cryptosporidium spp.* açısından değerlendirilmiş, taze dışkılarda nested PCR yönteminin sensitivitesinin %100, formaldehitte saklanan dışkı örneklerinde ise %50 olduğu bildirilmiştir.¹⁵

Bu olgu sunumunda, *Cryptosporidium spp.*'nin ishale yol açan enfeksiyöz etkenler arasında mutlaka düşünülmesi gerektiği vurgulanmıştır. Cryptosporidiosis yalnızca immün yetmezliği olan hastalarda değil, immün sistemi sağlam olanlarda da görülebildiği akla gelmelidir. İshale bağlı sıvı-elektrolit dengesizliği sonucu ağır klinik tabloların oluşabildiği göz önüne alındığında, çocukluk yaş grubunda ishal yapan etkenlerin araştırılması öncelikli önem taşımaktadır.

Cryptosporidium spp. tanısında sadece boya yöntemi ile saptanmasının yeterli olmadığı, dışkının rutin parazitolojik incelemesinde moleküler yöntemlerin kullanımı ile parazite yönelik primer bulaş kaynaklarının ortaya konulması gerektiğini düşünmekteyiz. Olgumuzda zoonotik geçiş gösteren *Cryptosporidium parvum* saptanmıştır. Bulaş kaynağı kesin olarak ortaya konulamasa bile, söz konusu türün hayvancılıkla ilgilenenlerde ve onların yakın çevrelerinde görüldüğü bilinmektedir.

İnsan yaşamını tehdit edebilen bu parazitin epidemiyolojisinin ortaya konulması, uygun tedavi protokolünün oluşturulması ve ülkemizde mevcut türlerin belirlenmesi için bu alanda yapılacak çalışmalara ağırlık verilmesi gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Gonçalves EM, da Silva AJ, Eduardo MB, Uemura IH, Moura IN, Castilho VL, et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. *Clinics (Sao Paulo)* 2006;61(2):119-26.
2. Koturoğlu G, Bayram S, Kurugöl Z, Turgay N, Mutlubaş F. [Cryptosporidium incidence in children with acute diarrhea and risk factors]. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2004;13(1):16-9.
3. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4(3):325-58.
4. McLauchlin J, Amar CF, Pedraza-Díaz S, Mieli-Vergani G, Hadzic N, Davies EG. Polymerase chain reaction-based diagnosis of infection with *Cryptosporidium* in children with primary immunodeficiencies. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(4):329-35.
5. Trotz-Williams LA, Martin SW, Martin D, Duffield T, Leslie KE, Nydam DV, et al. Multi-attribute evaluation of two simple tests for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf faeces. *Vet Parasitol* 2005;134(1-2):15-23.
6. McLauchlin J, Pedraza-Díaz S, Amar-Hoet-zeneder C, Nichols GL. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3153-8.
7. Spano F, Putignani L, McLauchlin J, Casemore DP, Crisanti A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol Lett* 1997;150(2):209-17.
8. Çetinkaya F. [The role of water and foods in the transmission of *Cryptosporidium parvum*]. *Uludag Univ J Fac Vet Med* 2004;23 (1-2-3):103-9.
9. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect* 2002;4(10):1047-58.
10. Tanriverdi S, Markovics A, Arslan MO, Itik A, Shkap V, Widmer G. Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(4):2507-13.
11. Dirim D, Turgay N, Alkan MZ. [The role of kinyoun acid fast staining and polymerase chain reaction (PCR) in following up a cryptosporidiosis case]. *Türkiye Parazit Derg* 2003;27(4):237-9.
12. Tanriverdi S, Tanyeli A, Başlamışlı F, Köksal F, Kiliç Y, Feng X, et al. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3237-44.
13. Ülçay A, Görenek L, Coşkun Ö, Araz E, Acar A, Eyigün CA. [Diagnosis of intestinal protozoa in patients with immune deficiency]. *Türkiye Parazit Derg* 2008;32(4):328-33.
14. Tamer GS, Turk M, Dagci H, Pektas B, Guy EC, Guruz AY, et al. The prevalence of cryptosporidiosis in Turkish children, and genotyping of isolates by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Saudi Med J* 2007;28(8):1243-6.
15. Dirim Erdoğan D, Dağcı H, Turgay N, Akarca US, Alkan MZ. [The molecular diagnosis of cryptosporidiosis in fresh and formalin preserved fecal samples]. *Türkiye Parazit Derg* 2009;33(2):120-4.