

Dışkı Örneklerinde *Blastocystis* spp. Varlığının Mikroskopik, Kültür ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması*

Investigation of the Presence of *Blastocystis* spp. in Stool Samples with Microscopic, Culture and Molecular Methods

Gülcan ADIYAMAN KORKMAZ¹, Funda DOĞRUMAN AL², İpek MUMCUOĞLU³

¹ Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

² Gazi University Vocational School of Health, Ankara.

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

³ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

³ Ankara Numune Educational and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, ilk yazarın yüksek lisans tez çalışması olup, 1. KLİMUD Günleri (13-14 Haziran 2013, Şanlıurfa)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 19.07.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 27.10.2014

ÖZ

Blastocystis türleri, insan ve hayvanlarda yaygın olarak görülen enterik protozoonlardır. Günümüzde 17 alt tipi saptanmış olup bunlardan dokuzu insandan izole edilmiştir. *Blastocystis* türlerinin pleomorfik yapısı, genetik çeşitliliği ve standardize edilmiş tanımlama yöntemlerinin bulunmaması, verilerin yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Rutin tanıda çoğunlukla nativ-lugol ve trikrom boyama gibi mikroskopik yöntemler kullanılmakta olup, kültür ve moleküler yöntemler daha ziyade araştırma amacıyla tercih edilmektedir. Bu çalışmada, gastrointestinal şikayetleri olan hastaların dışkı örneklerinde *Blastocystis* spp. varlığının mikroskopik ve kültür yöntemleri ile araştırılması ve izole edilen suşların polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile alt tip tayininin yapılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, ishali olan (n= 157) ve olmayan (n= 193) hastalara ait toplam 350 dışkı örneği dahil edilmiştir. Örneklerde *Blastocystis* spp. varlığı, nativ-lugol inceleme, trikrom boyama ve direkt floresan antikor (DFA) yöntemleri ile araştırılmış; kültür için %10 at serumu ve %0.05 asparajin içeren Ringer's solüsyonu kullanılmıştır. Kültürler 37°C'de 3-4 günlük inkübasyon sonrasında mikroskopik inceleme ile değerlendirilmiştir. Kültürden elde edilen *Blastocystis* spp. izolatlarının alt tip tayini STS (sequenced-tagged site) primerleri kullanılarak PCR ile yapılmıştır. Çalışmada, ishali hastaların 26 (%16.6)'sı ve ishali olmayanların 40 (%21)'i olmak üzere toplam 66 (%19) dışkı örneğinin kültüründen *Blastocystis* sp. izolasyonu yapılmıştır. Örneklerin %12 (42/350)'si nativ-lugol inceleme, %17'si (58/350) trikrom boyama ve %19 (66/350)'ü DFA yöntemi ile pozitif sonuç vermiştir. Yapılan

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Funda Doğruman Al, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06500 Beşevler, Ankara, Türkiye. Tel (Phone): +90 312 202 4625, E-posta (E-mail): alfunda@yahoo.com

değerlendirmede, nativ-lugol yönteminin kültür yöntemi ile uyumu güçlü ($\kappa= 0.752$), trikrom boyama ve DFA yöntemlerinin kültür yöntemi ile uyumları ise çok güçlü (sırasıyla $\kappa= 0.922$ ve $\kappa= 1.00$) bulunmuştur. Kültür yöntemi referans olarak alındığında, nativ-lugol, trikrom boyama ve DFA yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %65 ve %100, %88 ve %100, %100 ve %100 olarak hesaplanmıştır. *Blastocystis* spp. pozitif saptanan örneklerin 43 (%65)'ünde PCR ile alt tip (ST) tayini yapılmış, 23 suş tiplendirilememiştir. Buna göre en sık tespit edilen alt tip ST3 (12/43; %28) olmuş; bunu ST1 (6/43; %13.9), ST4 (5/43; %11.6) ve ST7 (5/43; %11.6), ST2 (3/43; %7) ve ST6 (1/43; %2.3) izlemiştir. Örneklerin hiçbirinde ST5 tespit edilmemiş; 11 (%25.6) örnekte alt tiplerin karışık olarak bulunduğu görülmüştür. İshali olan ve olmayan olgu grupları arasında *Blastocystis* spp. pozitifliği ve alt tip dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p> 0.05$). Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da en sık ST3 tespit edilirken, ST6 ve ST7 ilk kez tanımlanmıştır. Sonuç olarak, kültür yönteminin zaman alıcı ve zahmetli olması, nativ-lugol yönteminin duyarlılığının düşük olması, PCR yönteminin ise maliyetinin yüksek ve standardize edilmemiş olması gibi nedenlerle, rutin tanı laboratuvarlarında *Blastocystis* spp. saptanmasında hızlı, pratik ve yüksek duyarlılığı olan DFA yönteminin kullanılabileceği görüşüne varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Blastocystis*; alt tip; tanı; moleküler epidemiyoloji.

ABSTRACT

Blastocystis species are enteric protozoa frequently detected in human and animals. Seventeen subtypes (STs) have now been identified, nine of them isolating from humans. The pleomorphic structure and genetic diversity of *Blastocystis* spp. and the absence of standardized diagnostic methods complicate the evaluation of current data. Microscopic methods such as native-lugol and trichrome staining are most frequently used methods in routine diagnosis, while culture and molecular methods are preferred for research purposes. The aims of this study were to investigate the presence of *Blastocystis* spp. in the stool samples of patients with gastrointestinal complaints by microscopic and culture methods, and to detect the subtypes of isolates by polymerase chain reaction (PCR). A total of 350 stool samples collected from patients with diarrhea (n= 157) and without diarrhea (n= 193) were included in the study. Presence of *Blastocystis* spp. in the samples were investigated by native-lugol examination, trichrome staining and direct fluorescent antibody (DFA) methods. Ringer's solution containing 10% horse serum and 0.05% asparagine was used for cultivation. The cultures were evaluated after 3-4 days of incubation at 37°C by microscopic examination. The subtypes of *Blastocystis* spp. strains isolated from the cultures have been identified by PCR using sequence-tagged site primers. A total of 66 (19%) stool samples, of them 26 (16.6%) were from diarrheal and 40 (21%) from non-diarrheal cases, yielded *Blastocystis* sp. growth in culture. Among the evaluated samples, 12% (42/350) were found positive with native-lugol examination, 17% (58/350) with trichrome staining, and 19% (66/350) with DFA method. The agreement of culture and native-lugol method was estimated as strong ($\kappa= 0.752$), while it was very strong between culture with trichrome staining and DFA methods ($\kappa= 0.922$ and $\kappa= 1.00$, respectively). When the culture was accepted as reference method, the sensitivity and specificity rates of native-lugol method were 65% and 100%, trichrome staining method were 88% and 100%, and DFA method were 100% and 100%, respectively. Forty-three (65%) of *Blastocystis* spp. positive samples were subtyped by PCR, while 23 isolates could not be subtyped. The most frequent detected subtype was ST3 (12/43; 28%), followed by ST1 (6/43; 13.9%), ST4 (5/43; 11.6%) and ST7 (5/43; 11.6%), ST2 (3/43; 7%) and ST6 (1/43; 2.3%). ST5 was not detected in this study and 11 (25.6%) samples have been identified to have mixed subtypes. The differences of *Blastocystis* spp. positivity rates and the distribution of the subtypes between the patients with or without diarrhea were not found statistically significant ($p> 0.05$). In our study, ST3 was the most frequently identified *Blastocystis* spp. subtype, similar to the previous national studies, however ST6 and ST7 have been identified for the first time. In conclusion, as the sensitivity of native-lugol examination is low, culture is time-consuming and laborious and PCR methods are costly and non-standardized, rapid, practical and high sensitive DFA is considered as the favourable method in the diagnosis of *Blastocystis* spp. in routine laboratories.

Keywords: *Blastocystis*; subtype; diagnosis; molecular epidemiology.

GİRİŞ

Blastocystis türleri, günümüzde en yaygın görülen gastrointestinal sistem protozoonudur. Tanımlanmasının üzerinden 100 yıl geçmesine rağmen patojenitesi, genetik çeşitliliği, konak spektrumu ve tedavi seçenekleri hakkında kısıtlı bilginin olması şaşırtıcıdır¹. Bu bilinmezlikler birçok araştırmacının ilgisini çekmekte ve *Blastocystis* spp. konusundaki araştırma sayısı giderek artmaktadır. *Blastocystis* türlerinin gelişmiş ülkelerdeki prevalansı %1.5-10 oranında saptanırken, gelişmekte olan ülkelerde %30-50 oranındadır^{1,2}. Ülkemizde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda da gastrointestinal sistem protozoonları içinde ilk sırada yer aldığı bildirilmektedir^{3,4}.

Polimorfik bir parazit olan *Blastocystis* cinsi içinde 17 alt tip (Subtype; ST) tanımlanmış olup, bunların dokuzu insanlardan izole edilmiştir⁵. ST1 insan ve diğer memelilerden, ST2 primat ve domuzlardan, ST4 kemiricilerden, ST5 sığır ve domuzlardan, ST6 ve ST7 kuşlardan izole edilmekte, epidemiyolojik çalışmalarda en sık izole edilen ST3 ise, belki de insan kaynaklı tek alt tip olarak bildirilmektedir. Daha az bilinen ST8 maymun, insan ve sülünden, ST9 ise nadir olarak insandan izole edilmiştir. Alt tiplerin tespitinde, STS (sequenced-tagged site) primerleri ile yapılan konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi tercih edilmekle birlikte, son yıllarda DNA dizi analizi ve pirosekanslama yöntemleri de kullanılmaktadır⁶⁻⁸. Yapılan çalışmaların çoğunda en sık ST3 (%30-60) saptanmakta, ancak alt tip dağılımında coğrafi bölgeler arasında farklılıklar olduğu ifade edilmektedir^{2,8,9}.

Blastocystis spp. tanısında rutin laboratuvarlarda nativ-lugol ve trikrom boyama gibi mikroskopik yöntemler yaygın olarak kullanılmakla birlikte, bu yöntemlerin duyarlılığının düşük (%48) olduğu belirtilmektedir^{1,9}. Duyarlılığı yüksek olan kültür ve moleküler yöntemler ise daha ziyade araştırma amacıyla tercih edilmektedir¹. Bu çalışmada, gastrointestinal sistem şikayetleri olan hastaların dışkı örneklerinde *Blastocystis* spp. varlığının mikroskopik ve kültür yöntemleri ile araştırılması ve izole edilen suşların PCR yöntemi ile alt tip tayininin yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurul Komisyonu onayı (28.08.2010-14) ile gerçekleştirildi. Çalışmaya, Haziran-Ağustos 2011 tarihinde çeşitli kliniklerden gastrointestinal sistem şikayetleri olan toplam 350 hastanın rutin inceleme için gönderilen dışkı örnekleri dahil edildi. Alınan örnekler, ishal ve ishal olmayan şeklinde iki grup olarak değerlendirildi.

Mikroskopik İnceleme

Örneklerden ilk aşamada nativ-lugol preparatlar hazırlanarak 10x ve 40x objektifle, sonrasında da trikrom boyalı preparatlar 100x objektifle ışık mikroskopunda incelendi. Ayrıca tüm örnekler direkt immüno Floresan antikor (DFA) yöntemi ile değerlendirildi¹⁰. Bu amaçla, *Blastocystis* spp. alt tip 1 ve 3 antijenlerine karşı tavşandan elde edilmiş ve floresan izotiyosyanat (FITC) ile işaretlenmiş poliklonal antikorları içeren ticari kit (Blasto-FL, Antibodies Inc, ABD) kullanıldı.

Kültür

Çalışmaya dahil edilen tüm örneklerin %10 at serumlu %0.05 asparajin içeren Ringer's solüsyonunda kültürleri yapıldı. Kültürler 37°C'de 3-4 gün inkübasyon sonrasında üreme yönünden mikroskopik inceleme ile kontrol edildi¹¹.

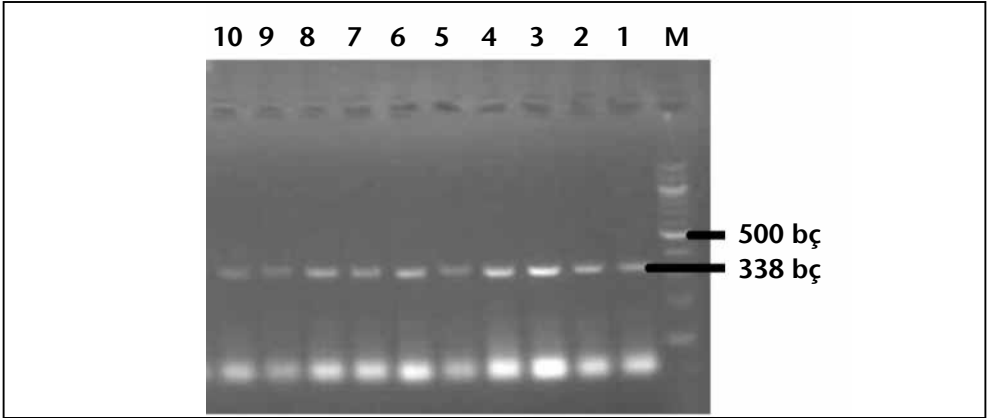
Moleküler Testler

DNA eldesi için tüm dışkı örneklerinden çift ependorfa ayrılarak çalışılincaya kadar -80°C'de saklandı. Kültürde üreme saptanan dışkıardan DNA eldesi Qiagen Mini Stool Kit (Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Dışkıda *Blastocystis* spp. varlığı F: 5' GGAGGTAGTGACAATAAATC ve R: 5' ACTAGGAATTCCTCGTTCATG primerleri ile araştırıldı. Bu primerler ile *Blastocystis* türlerine ait 1800 baz çift (bç)'lik rDNA bölgesinin 1100 bç'lik gen bölgesi konvansiyonel PCR ile çoğaltıldı¹². Isı döngü cihazı programı 94°C'de 5 dk denatürasyonun ardından, 35 döngü 94°C'de 1 dk, 54°C'de 1 dk ve 72°C'de 1.5 dk ile bağlanma ve 72°C'de 10 dk uzama basamakları şeklinde düzenlenerek, Hemo Klen Taq polimeraz (NEB, ABD) ile çoğaltma işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem sonrasında alt tip tayini, STS primerleri kullanılarak PCR ile yapıldı (Tablo I)¹¹.

Alt tiplendirme için kullanılan primerlerin bağlanma dereceleri, gradient PCR yapıldıktan sonra %1.5 agaroz jelde DNA bantlarının parlaklıklarına göre belirlendi (Resim 1). Bu işlem sonrasında ısı döngü cihazı programı; 94°C'de 3 dk denatürasyonun ardından, 30 döngü 94°C'de 30 sn, 61/62°C'de 45 sn ve 72°C'de 1 dk ile bağlanma ve 72°C'de 7 dk uzama basamakları şeklinde düzenlenerek Hemo Klen Taq polimeraz (NEB, ABD) ile çoğaltma işlemi gerçekleştirildi. *Blastocystis* ST1, ST3 ve ST5 için bağlanma derecesi 62°C; ST2, ST4, ST6 ve ST7'nin bağlanma ısısı 61°C olarak saptandı. Çoğaltma sonrasında DNA bantları %1.5 agaroz jelde görüntülendi.

Tablo I. *Blastocystis* spp. Alt Tiplerinin Saptanmasında Kullanılan Primerler¹¹

STS primer çifti	Alt tip (ST)	Amplikon büyüklüğü (bç)	Primer dizisi	Primer kaynağı	Genbank no
B83	ST1	351	F: GAAGAACTCTCTGACGATGA R: GTCCAAATGAAAGGCAGC	Nand II	AF166086
B155	ST7	650	F: ATCAGCCTACAATCTCCTC R: ATCGCCACTTCTCCAAT	B	AF166087
B227	ST3	526	F: TAGGATTTGGTGTGGAGA R: TTAGAAGTGAAGGAGATGGAAAG	HV93-13	AF166088
B332	ST6	338	F: GCATCCAGACTACTATCAACATT R: CCATTTTCAGACAACCACTTA	HJ96AS-I	AF166091
B340	ST2	704	F: TGTTCTTGTCTTCTCAGCTC R: TTCTTTCACACTCCCGTAT	HJ96-I	AY048752
B336	ST5	317	F: GTGGGTAGAGGAAGGAAAACA R: AGAACAAGTAGATGAAGTGAGAT	SY94-3	AY048751
B337	ST4	487	F: GTCTTCCCTGTCTATTCTGCA R: AATTCGGTCTGCTTCTCTG	Nand II	AF166086



Resim 1. STS primerleri ile yapılan gradient PCR ile ST6 suşunun jel elektroforez görüntüsü.

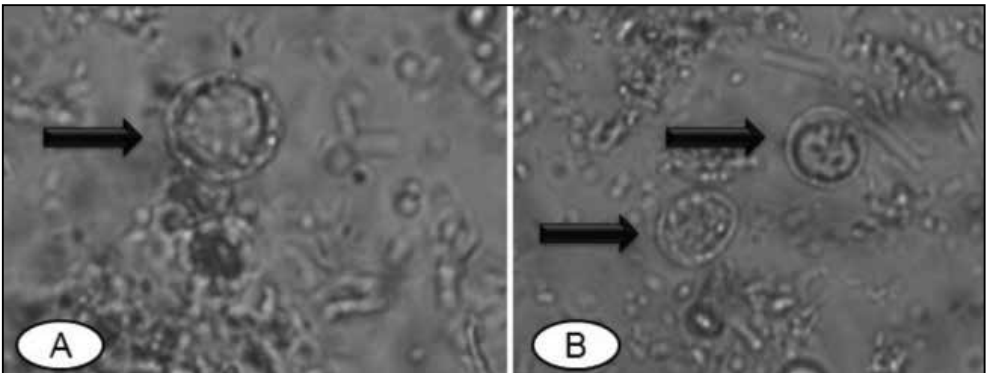
İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analizi için SPSS 15.0 istatistik programı kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizlerde uygun veriler, tanımlayıcı istatistikler (sayı, yüzde olarak) olarak sunuldu. Gruplar arasındaki farkın saptanmasında Mc Nemar ki-kare testi kullanıldı. Testlerin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplandı. Testler arasındaki tutarlılık Kappa testi ile değerlendirildi ve $\kappa = 0.40-0.59$ ise orta derecede, $\kappa = 0.60-0.79$ ise güçlü/yüksek derecede, $\kappa \geq 0.80$ ise çok güçlü/çok yüksek derecede tutarlı kabul edildi.

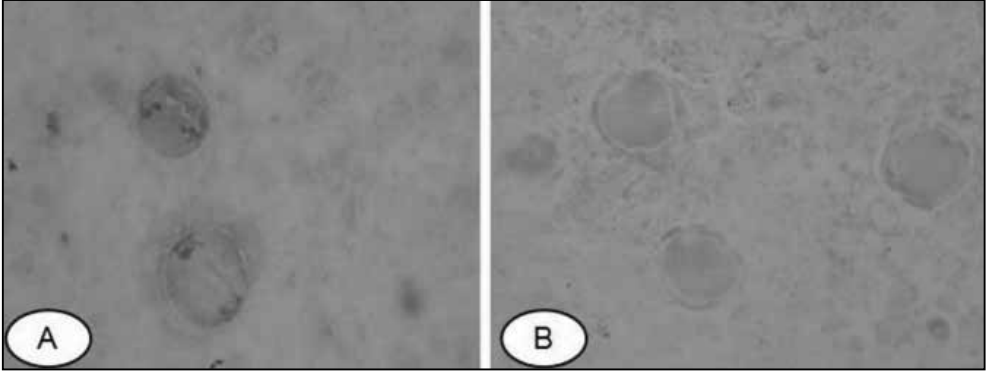
BULGULAR

Çalışmaya alınan dışkı örneklerinin %12 (42/350)'si nativ-lugol incelemesi, %17 (58/350)'si trikrom boyama ve %19 (66/350)'ü DFA yöntemi ile pozitif sonuç vermiş; 66 (%19) örneğin kültüründe ise *Blastocystis* spp. üremesi saptanmıştır (Resim 2-6).

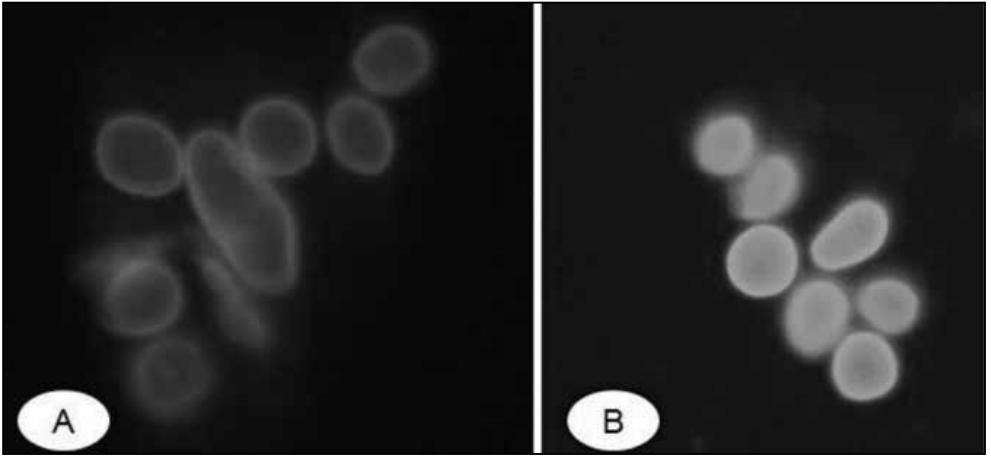
Blastocystis spp. saptanmasında kullanılan boyama yöntemlerinin kültür ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo II'de; kültür yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, yöntemlerin duyarlılık, özgüllük ve tutarlılık değerleri ise Tablo III'te verilmiştir.



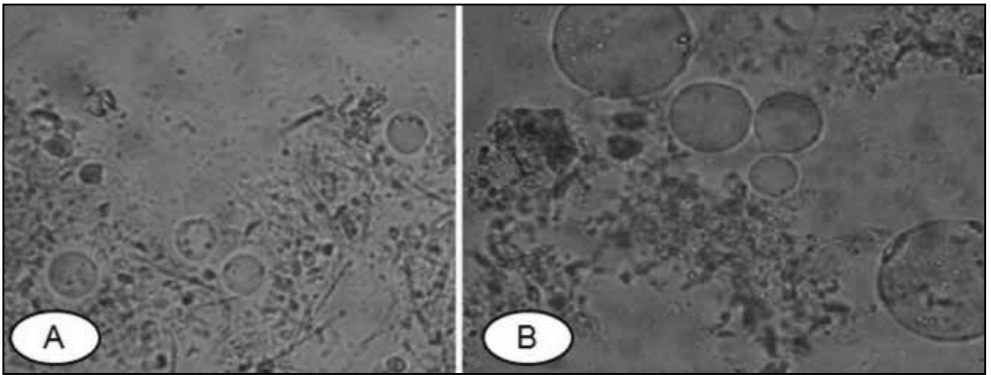
Resim 2. A, B: Nativ-lugol ile *Blastocystis* spp. kistleri (Işık mikroskobu, 40x).



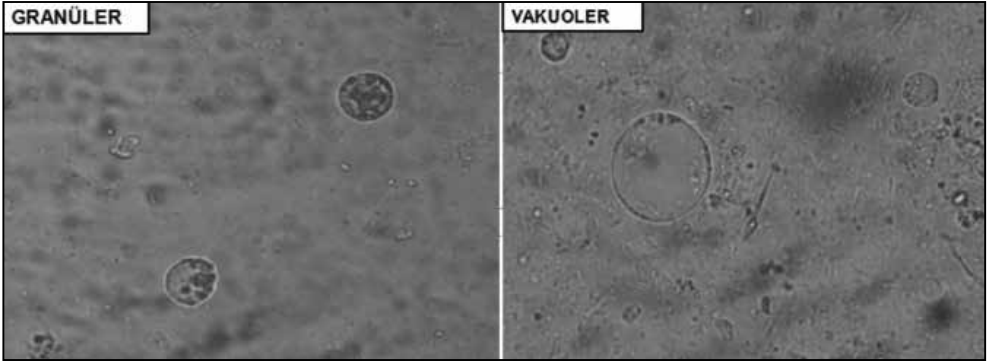
Resim 3. Trikom boyama ile *Blastocystis* spp. A: Granüler form, B: Vakuoler form (Işık mikroskobu, 100x).



Resim 4. DFA yöntemiyle *Blastocystis* spp. görünümü (Floresan mikroskop, 40x).



Resim 5. Farklı izolatların kültürlerinde farklı boyutlardaki *Blastocystis* spp. görünümleri (40x).



Resim 6. Kültürde *Blastocystis* türlerinin farklı formları (40x).

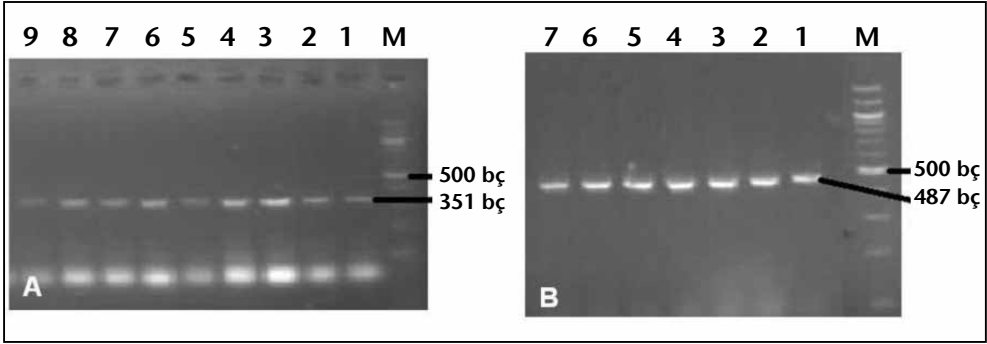
Tablo II. *Blastocystis* spp. Saptanmasında Nativ-Lugol, Trikróm Boyama, DFA Testlerinin Kültür Yöntemiyle Karşılaştırılması

Yöntem		Kültür		Toplam
		Negatif	Pozitif	
Nativ-lugol	Pozitif	42	0	42
	Negatif	24	284	308
Trikróm	Pozitif	58	0	58
	Negatif	8	284	292
DFA	Pozitif	66	0	66
	Negatif	0	284	284

Tablo III. Kültür Yöntemi Referans Alındığında *Blastocystis* spp. Saptanmasında Kullanılan Yöntemlerin İstatistiksel Analiz Bulguları

Boyama yöntemi	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	κ değeri (tutarlılık)	McNemar χ^2
Nativ-lugol	65	100	0.752 (güçlü)	p= 0.0001
Trikróm	88	100	0.922 (çok güçlü)	p= 0.008
DFA	100	100	1.00 (çok güçlü)	p> 0.05

Nativ-lugol (NL) incelemesinde negatif bulunan örneklerin %7.8 (24/308)'inde, pozitif bulunan örneklerin ise %100 (42/42)'ünde kültür yöntemi ile *Blastocystis* spp. saptanmış; bu iki yöntem arasındaki tutarlılık güçlü bulunmuştur (Tablo II, III). Trikróm boyama (TkB) ile negatif bulunan örneklerin %2.7 (8/292)'inde, pozitif bulunan örneklerin %100 (58/58)'ünde kültür yöntemi ile *Blastocystis* spp. saptanmış; bu iki yöntem arasındaki tutarlılık çok güçlü bulunmuştur (Tablo II, III). DFA ile negatif (n= 284) ve pozitif (n= 66) bulunan örneklerin tümünde, kültür yöntemi ile de aynı



Resim 7. ST1 (A) ve ST3 (B) alt tiplerinin jel elektroforezi görüntüsü.

sonuçlar alınmış ve bu yöntemler arasındaki tutarlılık çok güçlü düzeyde saptanmıştır (Tablo II, III).

Blastocystis spp. saptanmasında NL ile TkB ve DFA yöntemlerinin karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.05$). NL ile negatif bulunan örneklerin %5.2 (16/308)'sinde, pozitif bulunan örneklerin %100'ünde TkB yöntemi ile *Blastocystis* spp. belirlenmiştir (Tablo II). Buna göre NL yönteminin TkB yöntemine göre duyarlılığı %74, özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. NL ile negatif bulunan örneklerin %7.8 (24/308)'inde, pozitif bulunan örneklerin %100'ünde DFA yöntemi ile *Blastocystis* spp. tespit edilmiş (Tablo II); NL yönteminin DFA yöntemine göre duyarlılığı %65, özgüllüğü %100 olarak hesaplanmıştır.

Blastocystis spp. saptanmasında TkB ve DFA yöntemlerinin karşılaştırılmasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). TkB ile negatif bulunan örneklerin %2.7'sinde (8/292), pozitif bulunan örneklerin %100'ünde DFA yöntemi ile *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir (Tablo II). TkB yönteminin DFA yöntemine göre duyarlılığı %88, özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir.

Blastocystis spp. pozitifliği (66/350; %19) saptanan örneklerin 43'ünde alt tip (ST) tayini yapılmış, 23 suş tiplendirilememiştir. Buna göre en sık tespit edilen alt tip ST3 (12/43; %28) olmuş; bunu ST1 (6/43; %13.9), ST4 (5/43; %11.6) ve ST7 (5/43; %11.6), ST2 (3/43; %7) ve ST6 (1/43; %2.3) izlemiştir (Resim 1 ve 7). Örneklerin hiçbirinde ST5 tespit edilememiş; 11 (%25.6) örnekte alt tiplerin karışık olarak bulunduğu izlenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 350 örneğin 157 (%45)'si ishalleri, 193 (%55)'ü ishalleri olmayan örneklerdir. İshalleri olanların %16.6 ($n = 26$)'sı, olmayanların ise %21 ($n = 40$)'inde *Blastocystis* spp. pozitif olarak saptanmış olup, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.3$) (Tablo IV).

Tablo IV. Blastocystis Alt Tiplerinin İshalli Olan ve Olmayan Örneklerle Göre Dağılımı

Alt tip	Dışkı örneği (n)		Toplam
	İshalli	İshalli olmayan	
ST1	4	2	6
ST2	2	1	3
ST3	5	7	12
ST4	1	4	5
ST5	-	-	-
ST6	-	1	1
ST7	4	1	5
Karışık	4	7	11
Tiplendirilemeyen	6	17	23
Toplam	26	40	66

TARTIŞMA

Gastrointestinal şikayetleri olan hastaların dışkı örneklerinde *Blastocystis* spp. varlığının farklı yöntemlerle araştırıldığı bu çalışmada, örneklerin %12'sinde nativ-lugol (NL), %17'sinde trikrom boyama (TkB), %19'unda ise DFA ve kültür yöntemleriyle pozitiflik tespit edilmiştir. Kültür yöntemi altın standart olarak alındığında, NL, TkB ve DFA yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla; %65 ve %100, %88 ve %100, %100 ve %100 olarak belirlenmiştir (Tablo III). Kültür yöntemiyle elde edilen izolatların alt tiplendirmesi, protozoonun 18S rDNA bölgesine özgül STS primerleri kullanılarak PCR ile yapılmış ve en yaygın alt tipin ST3 olduğu (%28), örneklerin %25.6'sının ise karışık alt tip içerdiği görülmüştür (Tablo IV).

Direkt mikroskopik incelemede; *Blastocystis* türlerinin farklı boyutlarda olması, farklı morfolojik tiplerinin bulunması, deneyimsiz kişilerce yapılan incelemede maya ve lökositlerle karıştırılabilmesi gibi nedenlerle tanıda zorluk yaşanmaktadır^{10,13,14}. TkB yöntemi ile parazitin saptanma oranı NL incelemesine göre daha yüksek olmakla birlikte, bu yöntem de zaman alıcı ve zahmetli olup, deneyim gerektirmektedir⁹. Çalışmamızda, bu iki yöntem arasında *Blastocystis* spp. saptama açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Stensvold ve arkadaşlarının¹³ çalışmasında, *Blastocystis* spp. tanısı için PCR yöntemi referans alındığında, kültür, TkB ve formol-etil asetat yoğunlaştırma yöntemlerinin duyarlılığı sırasıyla %89, %82 ve %82 olarak bildirilmiştir. Bu araştırmacılar, DNA dizi analizi ile en sık rastlanan alt tipin ST3 (%46) olduğunu, bunu ST2 (%28), ST1 (%14) ve ST4 (%3.5)'ün izlediğini rapor etmişlerdir¹³. Roberts ve arkadaşları¹⁴, 513 dışkı örneğinde *Blastocystis* spp. pozitifliğini %19 olarak belirlemişler; PCR yönteminin duyarlılığını %94, demirli hematoksilen boyama yönteminin duyarlılığını %48 olarak saptamışlar ve dizi analizi ile ST3 oranını %43, ST1'i %29, ST4'ü %12, ST2'yi %6 olarak tespit etmişlerdir. Bart ve arkadaşları¹⁵, üçlü fekal test (TFT) ve PCR kullanarak yaptıkları

çalışmada, dışkı örneklerinde *Blastocystis* spp. oranını %24.2 (107/442) olarak bulmuşlar; bu yöntemlerin duyarlılıklarını sırasıyla %99.1 ve %96.3 olarak bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar da, alt tip olarak en sık ST3'ü (%42) tespit etmişler; ST1 ve ST2 için %22, ST4 için %12 ve ST1 için %1'lik pozitiflik vermişlerdir¹⁵.

Direkt floresan antikor (DFA) yönteminin kullanıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır. NL, TkB ve DFA yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, bu yöntemlerin duyarlılıkları sırasıyla; %36.7, %50 ve %86.7 olarak belirlenmiştir¹⁰. Türk ve arkadaşları¹⁶, 105 hastanın dışkı örneğini *Blastocystis* pozitifliği açısından NL, TkB, kültür ve DFA yöntemleri ile incelemişler ve pozitiflik oranlarını sırasıyla; %10.5, %15.2, %28.6 ve %24.8 olarak bildirmişlerdir. DFA yönteminin kültür yöntemine göre duyarlılığı %83.3, özgüllüğü ise %93.7 olarak saptanmış; TkB ve NL yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri ise (sırasıyla %43.3, %78.7 ve %30, %77.6) daha düşük olarak tespit edilmiştir¹⁶. Bu araştırmacılar, DFA yönteminin preparat incelemesinin kısa sürmesi, az sayıda protozoon içeren örneklerde ve morfolojisi ve boyutları sebebiyle tanımlanamayan parazitlerin tanısını kolaylaştırması nedeniyle kültür yöntemine alternatif bir yöntem olabileceğini ifade etmişlerdir¹⁶. Bizim çalışmamızda da, *Blastocystis* spp. saptanmasında NL yönteminin tek başına tanı için yetersiz kalması; kültür yönteminin ise uzun (3-4 gün) zaman alması, hazırlanması ve değerlendirilmesinin deneyim gerektirmesi nedeniyle, hızlı ve pratik olan DFA yönteminin tanıda kullanılabileceği düşünülmüştür.

Son yıllarda moleküler yöntemler parazitoloji alanında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde daha ziyade konvansiyonel PCR yöntemi kullanılırken, gelişmiş ülkelerde gerçek zamanlı PCR, DNA dizi analizi, pirosekanslama ve DNA barkodlama yöntemlerinin tercih edildiği görülmektedir^{6,17-19}. Moleküler yöntemlerin kültüre göre daha duyarlı olduğunu bildiren çalışmaların yanında karşıt bulguların elde edildiği araştırmalar da mevcuttur²⁰. *Blastocystis* alt tiplerinin tespitinde dizi analizi ve PCR en sık kullanılan yöntemlerdir^{7,13,14}. Dünyanın çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalarda, klinik örneklerde ST3'ün en sık saptanan alt tip olduğu bildirilmekte, ancak alt tip dağılımının coğrafi farklılıklar gösterdiği vurgulanmaktadır^{2,8,18}. Yoshikawa ve arkadaşları⁸, farklı ülkelerdeki (Almanya, Tayland, Bangladeş, Japonya, Pakistan) olgulardan alınan 102 dışkı örneğinde, en yaygın alt tipin ST3 (%41.7-92.3) olduğunu, bunu ST1 (%7.7-25) ve ST4 (%10-22.9)'ün izlediğini rapor etmişlerdir. ST2, ST5 ve ST7 sadece Almanya ve Japonya örneklerinde nadir olarak görülürken, ST6 tipine hiç rastlanmamıştır⁸. Bizim çalışmamızda da tiplendirilebilen örneklerin %28 (12/43)'i ST3 olarak saptanmış; bunu sırasıyla ST1 (%13.9), ST4 ve ST7 (%11.6), ST2 (%7) ve ST6 (%2.3) izlemiştir. Buna karşın İspanya²¹ ve Danimarka'da²² sırasıyla 51 ve 25 hasta örneğinde yapılan araştırmalarda baskın alt tip ST4 olarak saptanırken, Çin'de yapılan bir çalışmada²³ 35 hasta örneğinde en sık ST1 tespit edilmiştir. Coğrafi farklılıkların, alt tip dağılımındaki değişkenlikte etkili olduğu görülmekle birlikte, alt tip belirlemede farklı yöntemlerin kullanıldığı da dikkat çekmektedir.

Blastocystis spp. alt tip dağılımı, insan ve hayvan suşları arasında da farklılık göstermektedir. İnsan ve hayvanlardan elde edilen izolatlar morfolojik olarak benzer olmakla birlikte geniş genetik varyasyonlar saptanmıştır^{5,8}. Yoshikawa ve arkadaşlarının²⁴

bir çalışmada, hayvanlardan (maymun, sığır, domuz, tavuk, bildircin, sülün) elde edilen alt tipler (n= 92) ile insan izolatlarının (n= 102) alt tip çeşitlilikleri karşılaştırılmış; memeli ve kuşlardan elde edilen izolatların %67.4'ünün insanlarındaki ile aynı olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla daha önce insandan elde edilen izolatlar *B.hominis* olarak adlandırılırken, hem hayvan hem de insanlardan benzer suşların izole edilmesiyle isimlendirme *Blastocystis* spp. olarak güncellenmiştir⁹. Nepal bölgesinde çocuklar ve maymunlar arasında *Blastocystis* spp. alt tiplerinin moleküler olarak araştırıldığı bir çalışmada da; çocuklarda ST1, ST2 ve ST3'ün sırasıyla %20, %20 ve %60 oranında gözleendiği, buna karşın maymunlarda ST1 (%50) ve ST2 (%70)'nin baskın olduğu ancak ST3'ün hiç bulunmadığı saptanmıştır²⁵.

Blastocystis alt tiplerinin semptomatoloji ve patojenitelerinin farklılık gösterdiği çeşitli çalışmalarda vurgulanmaktadır^{15,21,22,26,27}. Dominguez-Marquez ve arkadaşları²¹ ile Stensvold ve arkadaşları²², akut ishali olgularda ST4'ün en sık rastlanılan alt tip olduğunu bildirirken, Doğruman AI ve arkadaşları^{26,27} ST1'in semptomatik, ST2'nin ise asemptomatik enfeksiyonla ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer olarak Moosavi ve arkadaşları²⁸ gastrointestinal semptomları olan hastalarda ST1'in daha sık görüldüğünü bildirmiş, ancak Vogelberg ve arkadaşları²⁹ ST2'nin semptomatik enfeksiyonla ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Ülkemizde, 69 semptomatik ve 18 asemptomatik olgudan elde edilen 84 izolatın değerlendirildiği bir çalışmada ise, ST3 en sık rastlanılan alt tip olmuş (%75.9), ancak alt tipler ile gerek semptomatik hastalık gerekse hastalık şiddeti arasında bir ilişki bulunamamıştır³⁰. Bizim çalışmamızda da, bu verilere paralel olarak en sık görülen alt tip ST3 (%28) olmuş ve alt tip dağılımları ishali olan ve olmayan örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir ($p > 0.05$).

Bu çalışmada, *Blastocystis* alt tip dağılımı ile ilgili elde edilen veriler, laboratuvarımızda daha önce yapılan diğer çalışmaların^{10,26,27} verileriyle benzerlik göstermekle birlikte, ST6 ve ST7 ilk defa bu çalışmada belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, kültürden elde edilen 66 izolattan 43 (%65)'ünün alt tip tayini yapılabilmektedir. Bu durumu; dışkıdan DNA izolasyonunda, dışkının kompleks bir yapı olması ve çeşitli inhibitörler içermesine ek olarak, yeni alt tiplerin varlığı durumunda STS primerlerinin yetersiz kalmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür²⁴. Yeni alt tiplerin belirlenmesinde DNA dizi analizi daha yararlı bir yöntemdir; ancak çalışmamızda DNA dizi analizi yapılamamıştır. Sonuç olarak, kültürle tam uyum göstermesi ve yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması nedeniyle DFA yönteminin, dışkı örneklerinde *Blastocystis* spp. saptanmasında rutin tanı laboratuvarlarında kullanılabileceği görüşüne varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. Gut Pathog 2014; 6: 17.
2. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Trop 2013; 126(1): 11-8.
3. Ozçakir O, Güreser S, Ergüven S, Yılmaz YA, Topaloğlu R, Haşçelik G. Characteristics of *Blastocystis hominis* infection in a Turkish university hospital. Turkiye Parazitoloj Derg 2007; 31(4): 277-82.

4. İnceboz T, Usluca S, Över L, Yalçın G, Tuncay S, Özkoç S. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesine 2005-2009 yılları arasında başvuran olgularda *Blastocystis hominis* epidemiyolojisinin araştırılması. Türkiye Parazit Derg 2011; 35(2): 72-6.
5. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, et al. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. Protist 2013; 164(4): 497-509.
6. Stensvold CR, Traub RJ, von Samson-Himmelstjerna G, et al. *Blastocystis*: subtyping isolates using pyrosequencing technology. Exp Parasitol 2007; 116(2): 111-9.
7. Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. Clin Microbiol Rev 2014; 27(2): 371-418.
8. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. Adv Parasitol 2013; 82: 1-32.
9. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev 2008; 21(4): 639-65.
10. Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorum K, et al. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. PLoS One 2010; 5(11): e15484.
11. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. Parasitol Res 2004; 92(1): 22-9.
12. Wong KH, Ng GC, Lin RT, Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KS. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. Parasitol Res 2008; 102(4): 663-70.
13. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59(3): 303-7.
14. Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. Am J Trop Med Hyg 2011; 84(2): 308-12.
15. Bart A, Wentink-Bonnema EM, Gilis H, et al. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. BMC Infect Dis 2013; 13: 389.
16. Türk S, Doğruman Al F, Kuştimur S. *Blastocystis* türlerinin tanısında yeni bir yaklaşım: Direk floresan antikor yöntemi. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012; 18 (Suppl A): A171-4.
17. Stensvold CR, Ahmed UN, Andersen LO, Nielsen HV. Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. J Clin Microbiol 2012; 50(6): 1847-51.
18. Stensvold CR, *Blastocystis*: genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. Trop Parasitol 2013; 3(1): 26-34.
19. Ramírez JD, Sánchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Flórez AC, Stensvold CR. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. Infect Genet Evol 2014; 22: 223-8.
20. Santos HJ, Rivera WL. Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp. in human stool samples. Asian Pac J Trop Med 2013; 6(10): 780-4.
21. Dominguez-Marquez MV, Guna R, Munoz C, Gomez-Munoz T, Borrás R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). Parasitol Res 2009; 105(4): 949-55.
22. Stensvold CR, Christiansen DC, Olsen KE, Nielsen HV. *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. Am J Trop Med Hyg 2011; 84(6): 883-5.
23. Yan Y, Su S, Lai R, et al. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. Parasitol Res 2006; 99(5): 597-601.
24. Yoshikawa H, Abe N, Wu Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. Microbiology 2004; 150(Pt 5): 1147-51.

25. Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet Parasitol* 2009; 160(3-4): 295-300.
26. Doğruman-Al F, Dağcı H, Yoshikawa H, Kurt O, Demirel M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2008; 103(3): 685-9.
27. Dogruman-Al F, Yoshikawa H, Kustimur S, Balaban N. PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in a major hospital in Ankara, Turkey. *Parasitol Res* 2009; 106(1): 263-8.
28. Moosavi A, Haghighi A, Mojarad EN, et al. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. *Parasitol Res* 2012; 111(6): 2311-5.
29. Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, et al. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitol Int* 2010; 59(3): 469-71.
30. Ozyurt M, Kurt O, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int* 2008; 57(3): 300-6.