

# DNA Barkotlama Yöntemiyle *Blastocystis* Alt Tiplerinin Belirlenmesi ve Tanı Yöntemlerinin Değerlendirilmesi

## Subtype Distribution of *Blastocystis* spp. with DNA Barcoding and Evaluation of Diagnostic Methods

Erdoğan MALATYALI<sup>1</sup>, Hatice ERTABAKLAR<sup>1</sup>, Sema ERTUĞ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

<sup>1</sup> Aydın Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Aydın, Turkey.

**Makale Atfı:** Malatyali E, Ertabaklar H, Ertuğ S. DNA barkotlama yöntemiyle *Blastocystis* alt tiplerinin belirlenmesi ve tanı yöntemlerinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2019;53(3):308-318.

### ÖZ

Ülkemizde ve dünya genelinde en yaygın görülen protozoonlardan biri olan *Blastocystis* spp.'in laboratuvar tanısı, genetik çeşitliliği ve klinik özellikleri parazitle ilgili tartışmalı konular arasında yer almaktadır. Bu çalışmada, Aydın ilinde gözlenen *Blastocystis* spp. izolatlarının alt tip dağılımını, tanıda kullanılan bazı yöntemlerin değerlendirilmesi ve ayrıca, *Blastocystis* spp. enfeksiyonu ile klinik bulgular ve demografik faktörler arasındaki ilişkinin retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Direkt mikroskopik inceleme sonucunda *Blastocystis* spp. saptanan ve saptanmayan yüzere dışkı örneği basit rastgele örnekleme yöntemiyle seçilerek çalışma kapsamına dahil edilmiştir. Tüm dışkı örneklerinden hem direkt DNA izolasyonu yapılmış hem de Jones besiyerine ekim yapılmıştır. Üreme gözlenen kültürlerden de farklı bir kit ile DNA izolasyonu yapılmıştır. *Blastocystis* spp. ribozomal RNA küçük alt ünite (SSU rRNA) genini hedef alan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile genomik DNA örnekleri çalışılmış olup alt tipler (ST) sekanslara göre belirlenmiştir. Bu şekilde alt tipi belirlenemeyen örnekler sequence tagged site-PCR (STS-PCR) ile tekrar çalışılmıştır. Ayrıca herhangi bir tanı yöntemi ile *Blastocystis* spp. saptanan ve saptanmayan olgular demografik özellikler (cinsiyet, yaş, yerleşim yeri) ve klinik bulgular (kaşıntı, ishal, karın ağrısı, dispepsi, bulantı-kusma, konstipasyon ve kilo kaybı) yönünden istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda direkt mikroskopi yöntemiyle *Blastocystis* spp. pozitifliği bildirilen 100 dışkı örneğinin kültür yöntemiyle 81'inde, PCR yöntemiyle ise 86'sında pozitiflik saptanmıştır. Aynı yöntemle *Blastocystis* spp. saptanmayan 100 dışkı örneği kültür ve PCR ile çalışıldığında sırasıyla beş ve yedi örnekte pozitif sonuç elde edilmiştir. *Blastocystis* SSU rRNA gen sekanslarının analizi ve STS-PCR yöntemi ile 95 *Blastocystis* spp. izolatının alt tip dağılımı: ST3 (n= 50, %52.6), ST2 (n= 21, %22.1), ST1 (n= 17, %17.9), ST7 (n= 4, %4.2), ST2 + ST3 (n= 2, %2.1) ve ST1 + ST3 (n= 1, %1.1) şeklinde belirlenmiştir. Ayrıca, kültürde çoğalan izolatlardan rastgele seçilen 35'inin alt tip dağılımı ile aynı örneklerin direkt dışkıdan DNA izolasyonu sonuçları karşılaştırıldığında sonuçlar arasında tam bir uyum gözlenmiştir. Çalışmamızda herhangi bir yöntem ile *Blastocystis* spp. saptanan 107 ve saptanmayan olgular 93 olgu semptomların görülme sıklığı ve demografik özellikler açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Benzer şekilde, semptomlar ile alt tipler arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Sonuç olarak, *Blastocystis*

**İletişim (Correspondence):** Dr. Öğr. Üyesi Erdoğan Malatyali, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Efeler, 09010, Aydın, Türkiye. Tel (Phone): +90 505 380 06 58, E-posta (E-mail): erdogan.malatyali@adu.edu.tr

spp.'nin rutin laboratuvar tanısında direkt mikroskopik incelemeye ek olarak kültür ve PCR gibi yöntemlerin kullanılmasının faydalı olacağı gösterilmiştir. Aydın ilinde *Blastocystis* alt tip dağılımı dünya geneli ile büyük oranda örtüşmektedir. Çalışmamızda *Blastocystis* spp. enfeksiyonu ile semptomlar arasında ilişki bulunmuş olması insanlarda *Blastocystis* spp. enfeksiyonunun büyük oranda asemptomatik seyrettiği ve daha çok sağlıklı mikrobiyota elemanı olarak bulunduğu fikrini desteklemektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Blastocystis* spp.; laboratuvar tanısı; alt tip.

## ABSTRACT

*Blastocystis* spp. is one of the most common protozoa in Turkey and throughout the world; laboratory diagnosis, genetic diversity and clinical features are among the most controversial topics related to the parasite. The aims of the present study were to investigate the subtype distribution of *Blastocystis* spp. isolates from Aydın, Turkey, to evaluate the efficiency of some diagnostic methods and to evaluate the relationship between *Blastocystis* spp. infection with demographic factors and clinical findings. According to the direct microscopy results, 100 stool samples with and without *Blastocystis* spp. were selected by simple random sampling method. All were directly subjected to DNA isolation and cultured in Jones medium. DNA isolation was also carried out in *Blastocystis* spp. positive cultures with a different kit. Genomic DNA samples were analysed by PCR targeting the *Blastocystis* spp. small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene and subtypes (ST) were determined according to the sequence analyses. Moreover, the samples with undetected ST were further studied with sequence tagged site-PCR (STS-PCR). In addition, the patients with and without *Blastocystis* spp. were compared in terms of demographic characteristics (gender, age, residence) and clinical findings (itching, diarrhoea, abdominal pain, dyspepsia, nausea, vomiting, constipation and weight loss). Among 100 stool positive samples diagnosed with direct microscopic examination 81 (81%) and 86 (86%) were found as positive with culture and PCR, retrospectively. Additionally, among 100 *Blastocystis* spp. negative stool samples five (5%) and seven (7%) samples were found positive with the same methods, respectively. The results of the analysis of *Blastocystis* spp. with SSU rRNA gene sequencing and STS-PCR methods revealed the subtype distribution of 95 *Blastocystis* spp. isolates as follows: ST3 (n= 50, 52.6%), ST2 (n= 21, 22.1%), ST1 (n= 17, 17.9%), ST7 (n= 4, 4.2%), ST2 + ST3 (n= 2, 2.1%) and ST1 + ST3 (n= 1, 1.1%). In addition, a complete accordance was observed in subtype distribution between direct DNA isolation from stools and 35 randomly selected isolates from the culture. In our study, the comparison of 107 *Blastocystis* spp. positive (by any of the methods) cases and 93 negative cases showed that there was no correlation in terms of demographic characteristics and clinical findings. Similarly, there was no significant relationship between symptoms and subtypes. In conclusion, it is recommended that in addition to direct microscopic examination, the use of additional methods such as culture and PCR will be useful in routine laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. The distribution of *Blastocystis* subtype in Aydın is mainly in accordance with the global findings. Lack of a relationship between *Blastocystis* spp. infection and symptoms in our study was supported the idea that *Blastocystis* spp. infection is mostly asymptomatic in humans and it may be a member of healthy microbiota.

**Keywords:** *Blastocystis* spp.; laboratory diagnosis; subtype.

## GİRİŞ

*Blastocystis* spp., insanda ve diğer birçok canlı türünde enfeksiyon oluşturabilen, bağırsak yerleşimli, anaerobik bir protozondur. Uzun yıllar süren sınıflandırma çalışmaları sonrasında stramenofiller (Heterokonta) grubu içerisinde yer alan *Blastocystis* spp., insan bağırsağında kolonize olabilmesi ve yaşam döngüsünde kamçılı formunun olmaması ile diğer stramenofillerden ayrılmaktadır<sup>1</sup>. *Blastocystis* spp. küresel bir dağılıma sahip olup birçok epidemiyolojik araştırmada insan dışkı örneklerinde en sık rastlanılan protozoon olarak bildirilmiştir<sup>2</sup>. Gelişmemiş ve/veya az gelişmiş ülkelerde, diğer bağırsak parazitlerinde olduğu gibi, hijyen alışkanlıkları ve sosyo-ekonomik faktörlere bağlı olarak *Blastocystis* spp.'e daha

yüksek oranlarda rastlanmakta olup %100'e varan görülme sıklıkları dahi bildirilmiştir<sup>3</sup>. Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise *Blastocystis* spp. prevalansı %1.4 ila %23.5 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir<sup>4</sup>. Bu çalışmalar kullanılan yöntem ve çalışma popülasyonu açısından birbirinden oldukça farklılık göstermektedir.

*Blastocystis* spp.'nin insanlarda enfeksiyon oluşturduğunun kanıtlanmasından günümüze kadar uzun bir süre geçmesine karşın, başta patogenezi olmak üzere *Blastocystis* spp.'nin genetik çeşitliliği, yaşam döngüsü ve tedavisi tartışmalı konular arasında yer almaktadır<sup>5</sup>. *Blastocystis* spp. için günümüze kadar patojen, fırsatçı patojen veya apatojen mikroorganizma şeklinde farklı tanımlamalar yapılmıştır. Burada karşılaşılan temel sorun *Blastocystis* spp.'ye hem sağlıklı bireylerde hem de semptomlu kişilerde rastlanması olarak gösterilmektedir<sup>1</sup>. Moleküler filogenetik analizler sonucu *Blastocystis* spp.'nin birçok alt tipi (ST) tanımlanmıştır. Ayrıca *Blastocystis* spp.'nin zoonotik karakteri ve alt tiplerle konak özgüllüğü arasındaki ilişki ortaya konulmuştur<sup>6</sup>. Bu amaçla kullanılan iki temel yaklaşım alt tip özgül primerlerin kullanılması ve küçük alt ünite ribozomal RNA kodlayan genin (SSU-rRNA) dizilenmesi olarak bildirilmiştir<sup>7</sup>. Birçok rutin parazitoloji laboratuvarında *Blastocystis* spp. tanısı dışı örneklerinin mikroskopik incelemesiyle yapılmaktadır<sup>8</sup>. Bu amaçla, en sık tercih edilen besiyerinin, düşük maliyeti ve kolay hazırlanması nedeniyle Jones besiyeri olduğu belirtilmektedir. Bunun yanı sıra Robinson ve LYGM (TYSGM modifikasyonu) besiyerlerinde de *Blastocystis* spp.'nin rahatlıkla çoğaltılabildiği bildirilmektedir<sup>2</sup>. Bunlara ek olarak başta polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olmak üzere moleküler yöntemlerin *Blastocystis* spp. tanısında kullanılması, hem geleneksel tanı yöntemlerinin etkinliğini değerlendirilmesi hem de *Blastocystis* spp.'nin moleküler epidemiyolojisinin anlaşılmasında önemli katkılar sağlamıştır<sup>9</sup>.

Bu çalışmada, Aydın ilinde saptanan *Blastocystis* alt tiplerinin belirlenerek *Blastocystis* spp.'in laboratuvar tanısında kullanılan direkt mikroskopi, kültür ve PCR yöntemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, *Blastocystis* spp. saptanan ve saptanmayan olguların demografik özellikler ve klinik bulgular yönünden istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 14.11.2014 ve Karar No: 2014/433).

### Dışkı Örnekleri ve DNA İzolasyonu

Bu çalışmaya Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarında direkt mikroskopi yöntemiyle *Blastocystis* spp. saptanan ve saptanmayan yüzer dışkı örneği dahil edildi. Bu amaçla dışkı örnekleri serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ve Lugol'un iyodin çözeltileri ile ışık mikroskopunda incelendi.

Çalışmada 200 dışkı örneğinin tamamında QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Almanya) ile genomik DNA izolasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. İzole edilen DNA örnekleri çalışılincaya kadar +4°C'de saklandı.

## Kültür ve *Blastocystis* spp. Üreyen Örneklerden DNA İzolasyonu

Dışkı örnekleri bekletilmeden Jones besiyerine ekildi ve 37°C'de etüvde inkübe edildi. *Blastocystis* spp. üremesi 48. saatten itibaren bir haftaya kadar kontrol edildi. *Blastocystis* spp. pozitif kültürler 12000 x g'de bir dakika santrifüj edildi ve DNAzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti ile DNA izolasyonu yapıldı.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonları ve Alt Tiplerin Belirlenmesi

DNA izolasyonları yapılan örnekler [Dışkı örneklerinden (200 örnek) ve kültürde üreyenlerden] *Blastocystis* spp. SSU-rDNA geni (barkot bölgesi) PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Amplifikasyon işlemi, üniversal RD5 (F) (5'-ATC TGG TTG ATC CTG CCA GT-3') ve *Blastocystis* spp.'e özgü BhrDr (R) (5'-GAG CTT TTT AAC TGC AAC AAC G-3') primerleri kullanılarak gerçekleştirildi<sup>10</sup>. Çalışmamızda rutin parazitoloji laboratuvarına gönderilen dışkılarından elde ettiğimiz, hem barkotlama hem de çoklu lokus sekans tiplendirme (MLST) ile doğrulanmış *Blastocystis* suşu (ADUbl172) pozitif kontrol olarak kullanıldı. PCR sonrasında ~600 baz çifti (bp) büyüklükte görülen örnekler pozitif olarak değerlendirildi ve Applied Biosystems 377 DNA Sequencer ile dizi analizi yapıldı.

*Blastocystis* spp. kısmi SSU rDNA dizileri Genbank nükleotit veri tabanı BLAST kullanılarak karşılaştırıldı. Ayrıca, belirlenen tüm diziler *Blastocystis* spp. alt tip veri tabanına "http://pubmlst.org/*Blastocystis* spp." kayıt edildi. Veri tabanına göre tam veya en fazla benzerlik gözlenen alt tipler belirlendi<sup>11</sup>. Bu şekilde alt tipi belirlenemeyen örnekler yedi farklı *Blastocystis* spp. alt tipine (ST1-7) özgü primer çiftlerinin kullanıldığı STS-PCR yöntemiyle tekrar çalışıldı<sup>12</sup>.

### Genetik Uzaklıklarının Belirlenmesi

Sıralanan ve düzenlenen dizi verileriyle MEGA versiyon 7.0 programında Neighbor-Joining yöntemi, ve bootstrap testleri (1000 tekrar) kullanılarak genetik uzaklığa bağlı filogenetik ağaç oluşturuldu. Örneklerin evrimsel uzaklıkları Maximum Composite Likelihood yöntemi ile belirlendi. Bu analizlerde *Proteromonas lacertae* 18S ribozomal RNA geni kısmi dizisi (AY224080) dış grup olarak kullanıldı.

### Demografik Özellikler ve Klinik Bulguların Değerlendirilmesi

Direkt mikroskopi, kültür veya PCR yöntemlerinin herhangi biriyle *Blastocystis* spp. pozitifliği saptanan olgular ile bu yöntemlerden hiçbirisiyle *Blastocystis* spp. pozitiflik saptanmayanlar cinsiyet, yerleşim yerleri, yaş grupları ve klinik bulgular yönünden karşılaştırıldı. Bununla birlikte, *Blastocystis* spp. alt tipleri ve olguların özellikleri ayrıca değerlendirildi.

### İstatistiksel Analiz

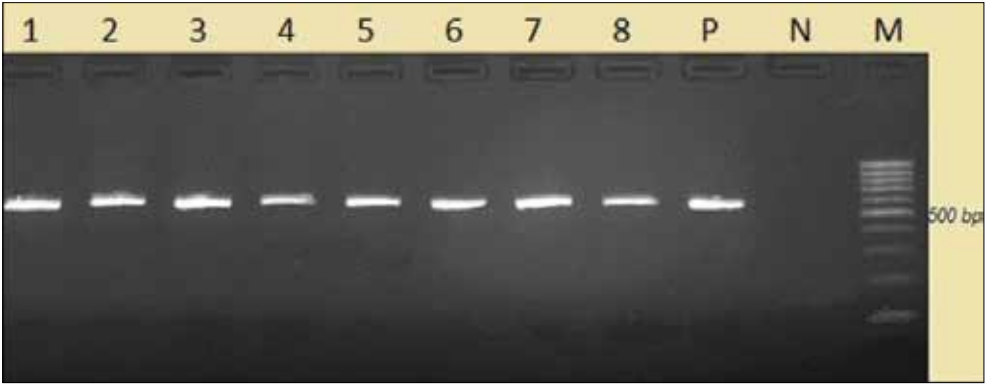
Verilerin istatistiksel analizi SPSS 15.0 paket programı (PASW Inc., Chicago. IL. ABD) kullanılarak yapıldı ve p< 0.05 değerleri anlamlı kabul edildi. Sınıflandırılmış verilerin değerlendirilmesinde ki-kare testi, analitik verilerin değerlendirilmesinde Student's t-testi kullanıldı.

## BULGULAR

Direkt mikroskopi sonucunda *Blastocystis* spp. saptanan 100 dışkı örneği Jones besiyerine ekildiğinde 81 (%81)'inde üreme gözlenmiştir. Aynı örneklerin SSU rDNA-PCR ile 88 (%88)'inde amplifikasyon saptanmıştır. Bu örneklerin bazılarında ait agaroz jel elektroforez görüntüsü Resim 1'de verilmiştir. Çalışmamızda direkt mikroskopi ile pozitif 100 örneğin kültür ve PCR ile değerlendirilmesi Tablo I'de verilmiştir.

Direkt mikroskopi ile *Blastocystis* spp. saptanmayan 100 dışkı örneğinin 5 (%5)'inde üreme gözlenmiştir. Bu örnekler SSU rDNA-PCR yapıldığında 7 (%7)'sinde beklenen boyutta amplifikasyon saptanmıştır. Direkt mikroskopi ile *Blastocystis* spp. saptanmayan 100 dışkı örneğinde aynı yöntemler kullanıldığında gözlenen pozitiflik oranları Tablo II'de verilmiştir.

Tüm dışkı örneklerinden (n= 200) DNA izolasyonu yapılmış olup bunların 95'inde SSU rDNA PCR ile beklenen boyutta amplifikasyon görülmüştür. Dizilerin veri tabanlarına girildiğinde 92 (%96.8)'si herhangi bir ST ile tam uyum göstermiştir. Bu şekilde alt tipi belirlemeyen (herhangi bir ST ile tam uyum göstermeyen) üç örnek (%3.2) STS-PCR ile çalışıldığında birden fazla alt tip belirlenmiştir. Çalışmamızda tespit edilen alt tiplerin dağılımı Tablo III'te verilmiştir.



**Resim 1.** Bazı örneklerin SSU rDNA-PCR sonuçlarına ilişkin agaroz jel görüntüsü, 1-8 pozitif örnekler, P: Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol, M: 100 bp ağırlık belirteci (Fermentas, ABD).

**Tablo I.** Direkt Mikroskopi ile *Blastocystis* spp. Saptanan 100 Dışkı Örneğinde Diğer Yöntemlerle Saptanan Pozitiflik Oranları

Kültür	SSU rDNA-PCR		Toplam
	Pozitif (sayı, %)	Negatif (sayı, %)	
Pozitif	81 (100)	0	81
Negatif	7 (36.9)	12 (63.1)	19
Toplam	88	12	100

**Tablo II.** Direkt Mikroskopi ile *Blastocystis* spp. Saptanmayan 100 Dışkı Örneğinde Diğer Yöntemlerle Saptanan Pozitiflik Oranları

Kültür	SSU rDNA-PCR		Toplam
	Pozitif (sayı, %)	Negatif (sayı, %)	
Pozitif	5 (100)	0	5
Negatif	2 (2.1)	93 (97.9)	95
Toplam	7	93	100

**Tablo III.** Çalışmada Saptanan *Blastocystis* spp. Alt Tiplerinin Dağılımı

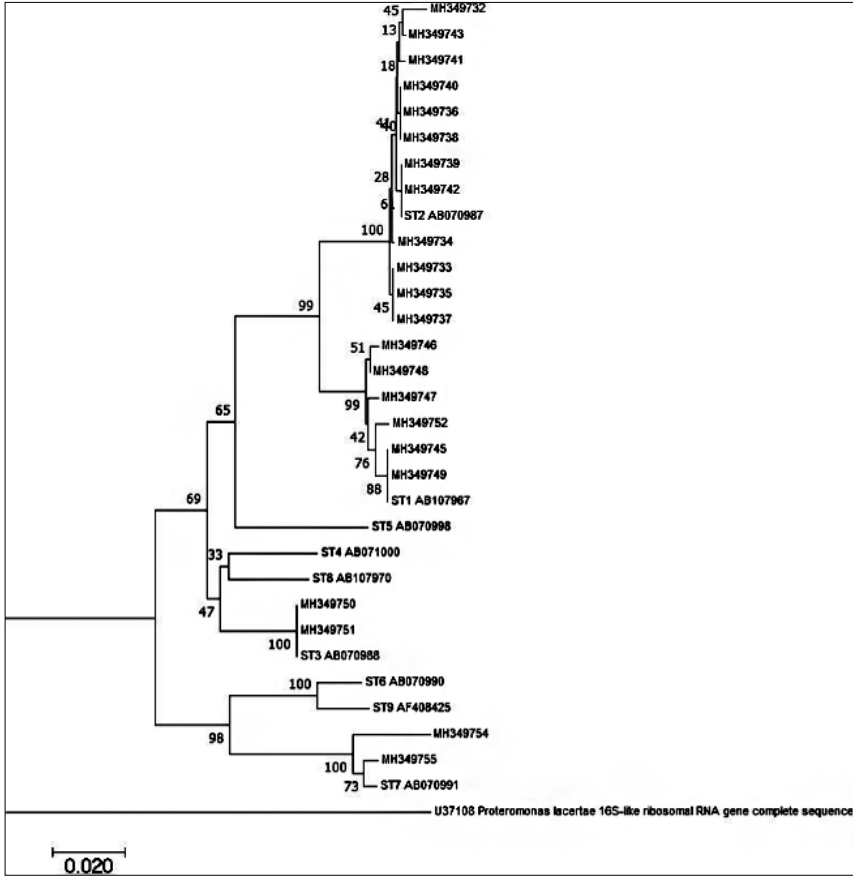
	Sayı	%
ST3	50	52.6
ST2	21	22.1
ST1	17	17.9
ST7	4	4.2
ST2 ve ST3*	2	2.1
ST1 ve ST3*	1	1.1
Toplam	95	100

\* STS-PCR ile alt tipler belirlenmiştir.

Ayrıca, kültürde üreyen 86 (%43) izolatin tamamında SSU rDNA PCR ile amplifikasyon gözlenmiştir. Ancak, PCR ürünlerinden basit rastgele örnekleme yöntemiyle seçilen 35 örnek dizi analizine gönderilmiştir. Bu örneklerin alt tip dağılımı: 19 örnek ST3 (%54.3), sekiz örnek ST2 (%22.8), beş örnek ST1 (%14.2), iki örnek ST2 + ST3 (%5.7) ve bir örnek ST 7 (%2.8) olarak belirlenmiştir. Aynı olguya ait dışkıdan ve kültürden DNA izolasyonu sonrası belirlenen alt tipler karşılaştırıldığında aynı alt tipler saptanarak tam bir uyum gözlenmiştir.

Çalışmada elde edilen *Blastocystis* spp. kısmi SSU rDNA dizileri GenBank veri tabanına MH349732-43, MH349745-52, MH349754, MH349755 numaraları ile kaydedilmiş olup referans diziler ile evrimsel uzaklıkları Şekil 1'de verilmiştir.

Direkt mikroskopi, kültür veya SSU rDNA-PCR yöntemlerinden herhangi biriyle *Blastocystis* spp. pozitifliği saptanan 107 olgu ile saptanmayan 93 olgu cinsiyet, yaş, yerleşim yeri açısından karşılaştırıldığında herhangi biriyle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo IV). Aynı şekilde semptomlar açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo V). Epikriz kayıtları incelendiğinde olguların büyük çoğunluğunda birden fazla semptomun var olduğu görülmüştür. *Blastocystis* spp. alt tipleri ve semptomlar ayrıca değerlendirildiğinde alt tipler ile semptomlar arasında bir ilişki bulunmadığı saptanmıştır.



Şekil 1. Kısmi SSU rDNA dizilerinin evrimsel uzaklıkları (ST1-9: referans dizilere, MH: Bu çalışmada elde edilenlere, U37108: Dış grup olarak kullanılan diziyeye ait GenBank erişim numaraları.)

Tablo IV. *Blastocystis* spp. Saptanan ve Saptanmayan Olgular Cinsiyet, Yaş, Yerleşim Yerleri Açısından Karşılaştırılması

		Pozitif (n= 107)		Negatif (n= 93)		Toplam	X <sup>2</sup>	p
		Sayı	%	Sayı	%			
Cinsiyet	Erkek	49	45.8	43	46.2	92	0.004	0.950
	Kadın	58	54.2	50	53.8	108		
Yerleşim yeri	Şehir M.	69	53.4	60	46.6	129	0.038	0.981
	İlçe	17	15.9	14	15.1	31		
	Köy	21	19.6	19	20.4	40		
Yaş grupları	1-18	38	35.5	28	30.1	66	4.873	0.181
	19-40	33	30.8	20	21.5	53		
	41-60	21	19.6	28	30.1	49		
	61+	15	14.1	17	18.3	32		

**Tablo V.** *Blastocystis* spp. Saptanan ve Saptanmayan Olgularda Semptomların Karşılaştırılması

Semptom	Pozitif (n= 107)		Negatif (n= 93)		Toplam	X <sup>2</sup>	p
	Sayı	%	Sayı	%			
Kaşıntı	35	32.7	28	30.1	53	0.156	0.693
İshal	27	25.2	16	17.2	43	1.901	0.168
Karın ağrısı	21	19.6	14	15.1	35	0.721	0.396
Dispepsi	10	9.3	11	11.8	21	0.326	0.568
Bulantı kusma	9	8.4	6	6.5	15	0.275	0.600
Konstipasyon	6	5.2	3	3.2	14	1.604	0.091
Kilo kaybı	5	4.7	5	5.4	10	0.052	0.820
Diğer*	14	13.1	11	11.8	25	0.072	0.789

\* Diğer: Öksürük, eklem ağrısı, gastrit, anemi, gelişme geriliği.

## TARTIŞMA

*Blastocystis* spp. tanısı birçok rutin laboratuvar için karmaşık bir işlem olarak görülmekte olup bu laboratuvarlarda yaygın olarak mikroskopi kullanılarak tanı konulmaktadır<sup>8</sup>. Bununla birlikte, PCR başta olmak üzere moleküler yöntemler daha çok epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilmektedir<sup>1</sup>. Çalışmamızda direkt mikroskopi ile *Blastocystis* spp. görülen 100 dışkı örneği kültür ve SSU rDNA PCR ile değerlendirildiğinde sırasıyla 81 ve 88'inde pozitiflik saptanmıştır. Bu aşamada direkt mikroskopi ile pozitif rapor edilmesine karşın kültürde üreme gözlenmemesinin (n= 19, %19) bazı faktörlere bağlı olarak açıklanabileceği düşünülmektedir. İlk olarak dışkıdaki makrofaj, mantar, nötrofil, *Cyclospora cayatanensis* ve yağ globülleri gibi etkenler yalancı pozitifliklere neden olabilmektedir<sup>1,5,13</sup>. Bunun yanı sıra ST5 gibi zoonotik karakterli *Blastocystis* spp. izolatlarının rutin kültürlerde çoğalmayabileceği ve negatif sonuçlara neden olabileceği bildirilmiştir<sup>14</sup>. Bizim bulgumuza benzer şekilde bazı çalışmalarda direkt mikroskopi ile tespit edilen pozitif örneklerin bir kısmında da kültür yöntemiyle negatif sonuç elde edildiği bildirilmiştir<sup>15</sup>. Çalışmamızda direkt mikroskopi ile pozitif sonuç saptanmasına karşın PCR ile negatif sonuç alınan örneklerin varlığı (%12) yukarıda sayılan faktörlere ek olarak dışkıdaki PCR inhibitörlerine bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir<sup>3,16</sup>. Ayrıca kullanılan primer çiftleri ve DNA izolasyon yönteminin de PCR sonuçlarını etkilediği ifade edilmektedir<sup>17</sup>.

Araştırmamızda direkt mikroskopi ile *Blastocystis* spp. saptanmayan 100 dışkı örneğine kültür yapıldığında ve SSU rDNA-PCR ile çalışıldığında sırasıyla %5 ve %7 pozitiflik görülmüştür. Bu aşamada direkt mikroskopi ile yalancı negatif sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Bunun nedenleri arasında küçük boyutları (3-5 µm) nedeniyle *Blastocystis* spp. kistlerinin gözden kaçırılması, havayla temas, kullanılan ilaç sonucu morfolojisinin bozulması, kist formunun periyodik olarak atılmaması sayılmaktadır<sup>1,5,18</sup>. Bulgumuzu destekler şekilde literatürdeki tanı çalışmalarında direkt mikroskopi ile negatif örneklerin %7.8 ve %4.7'sinde kültür ile pozitif sonuç elde edildiği bildirilmiştir<sup>19,20</sup>. *Blastocystis* spp.'in rutin laboratuvar tanısında maliyet ve zaman avantajından dolayı direkt mikroskopi gibi duyarlılığı düşük



yöntemlerin kullanılmasının çok sayıda *Blastocystis* spp. ile enfekte olgunun gözden kaçırılmasına neden olduğu bildirilmiştir<sup>2</sup>. Ayrıca epidemiyolojik araştırmalarda bu yöntemlerin kullanılması mevcut literatür verilerinin gerçekliğini tartışmalı hale getirdiği ifade edilmiştir<sup>9</sup>.

*Blastocystis* spp. izolatları arasında yüksek derecede genetik polimorfizm olduğu moleküler filogenetik çalışmalarda gösterilmiştir<sup>21</sup>. Çalışmamızda 95 örnekte *Blastocystis* spp. alt tipi belirlenmiş olup dağılımı: ST3 %52.6; ST2 22.1; ST1 17.9; ST7 4.2; ST2 + ST3 %2.1 ve ST1 + ST3 %1 olarak belirlenmiştir. Hem küresel ölçekte hem de ülkemizde *Blastocystis* spp. alt tiplerinin araştırıldığı çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Dünya genelinde ST1-4'ün insan *Blastocystis* spp. enfeksiyonlarının %90'ını oluşturduğu, ST3'ünde en yaygın rastlanılan alt tip (yaklaşık %60) olduğu bildirilmiştir<sup>6,16</sup>. Bu veriye uygun şekilde çalışmamızda da ST1-3'ün tüm izolatların %95.8'ini (91/95 örnek) oluşturduğu saptanmıştır. Buna ek olarak çalışmamızda da en sık ST3 alt tipine (%55.7) rastlanmıştır. Birçok araştırmada *Blastocystis* spp. ST4'ün Avrupa'da daha yaygın saptandığı bildirilmiş ayrıca ülkemizde diğer bazı illerde bu alt tipe rastlandığı bildirilmiştir<sup>6,22</sup>. Ancak bizim çalışmamızda bu alt tipe rastlanmamıştır. Ülkemizdeki araştırmaların büyük kısmında en sık rastlanan *Blastocystis* spp. alt tipinin ST3 olduğu bildirilmiştir<sup>23</sup>.

Çalışmamızda kültürde üreyen *Blastocystis* spp. izolatlarından 35'inin kısmi SSU rDNA dizileri direkt dışkıdan elde edilen dizilerle karşılaştırıldığında tam bir uyum gözlenmiştir. Diğer bir ifadeyle iki DNA izolasyonu yaklaşımı ile aynı alt tipler saptanmıştır. Benzer şekilde dışkıdan ve kültüründen DNA izolasyonunun *Blastocystis* spp. alt tip dağılımına etkisinin olmadığı veya oldukça sınırlı olduğu rapor edilmiştir<sup>21</sup>. Ancak diğer bazı çalışmalarda kültürden DNA izolasyonunun bazı alt tiplerin hızlı çoğalmasına bağlı olarak sonucu etkileyebileceği bildirilmiştir<sup>14</sup>. Genotip farklılıklarına ek olarak dışkıyla birlikte kültüre aktarılan bakterilerin ve laboratuvar koşullarının da *Blastocystis* spp. üremesini ve dolayısıyla saptanan alt tipi etkileyebileceği rapor edilmiştir<sup>2</sup>. Dışkıdan direkt DNA izolasyonu yapılması zaman açısından daha avantajlı görülmekte olup ayrıca diğer etkenlerin (protozoa veya bakteri) saptanmasına olanak sağlamaktadır. Ancak geniş çaplı moleküler epidemiyolojik çalışmalarda kültür sonrası DNA izolasyonu maliyet açısından tavsiye edilmektedir<sup>21</sup>.

*Blastocystis* spp. enfeksiyonlarının yüksek oranda asemptomatik olduğu ve enfekte bireylerin küçük bir kısmında gastrointestinal semptomların görüldüğü bildirilmiştir<sup>1</sup>. Enfeksiyon semptomatik olduğunda hastalarda ishal, abdominal ağrı ve şişkinlik gibi özgül olmayan gastrointestinal semptomlar ve dermatolojik bulgular görülebilmektedir<sup>5</sup>. Çalışmamızda herhangi bir tanı yöntemiyle *Blastocystis* spp. saptanan ve saptanmayan olgular cinsiyet, ikamet yeri ve yaş açısından değerlendirildiğinde herhangi biriyle anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Birçok çalışmada cinsiyet ile *Blastocystis* spp. pozitifliği arasında bir ilişki saptanmadığı bildirilmiştir<sup>24</sup>. Bazı çalışmalarda ise yaş ve yerleşim yerinin *Blastocystis* spp. pozitifliğini etkilediği yönünde bulgular rapor edilmiştir<sup>3</sup>. Demografik özelliklere ek olarak çalışmamızda olguların semptomları da değerlendirilmiş ve *Blastocystis* spp. pozitifliği ile semptomlar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Literatürdeki çalışmalarda genelde semptomatik hasta grubu ve kontrol gruplarında *Blastocystis* spp. yaygınlığı karşılaştırılmış olup bulgumuzu destekleyen sonuçlar bildirilmiştir<sup>5,25</sup>. Ayrıca elde ettiğimiz bulgu *Blastocys-*

*stis* spp.'in sağlıklı birey mikrobiyotasının üyesi olabileceği fikrini de desteklemektedir<sup>26</sup>. Çalışmamızın aksine özellikle çocuk yaş grubundaki bazı çalışmalarda *Blastocystis* spp.'nin semptomlara neden olduğu bildirilmiştir<sup>27</sup>. Çalışmamızda *Blastocystis* spp. saptanan olgularda en sık kaşıntı (%32.7) olmak üzere sırasıyla ishal (%25.2), karın ağrısı (%19.6) ve dispepsi (%9.3) semptomlarının görüldüğü saptanmıştır. Benzer çalışmalar incelendiğinde en sık görülen semptomların karın ağrısı, kaşıntı, ishal, şişkinlik ve kabızlık olduğu rapor edilmiştir<sup>1</sup>. Çalışmamızda alt tipler ile semptomlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu konuda literatürde birbiriyle çelişen bulgular yer almakta olup bazı araştırmacılar ST3 ve ST1 ile karın ağrısı, ST2 ile ürtiker arasında ilişki olabileceğini rapor etmişlerdir<sup>28,29</sup>. Ancak birçok çalışmada bizim bulgumuzu destekler nitelikte veriler yer almaktadır. *Blastocystis* spp. patojenitesi ve klinik özellikleri uzun süredir *Blastocystis* spp. ile ilgili en tartışmalı konuların başında gelmektedir. Mevcut bulguların yetersizliği ve çelişkili sonuçlar deneysel çalışmaların ve hayvan modellerine olan ihtiyacı ortaya koymaktadır<sup>1,30</sup>. Günümüzde *Blastocystis* spp. patogenezinin, *Blastocystis* spp.'in genetik ve biyolojik özelliklerine bağlı değişen çok etmenli bir fenomen olduğu düşünülmektedir<sup>2</sup>.

Sonuç olarak *Blastocystis* spp. rutin laboratuvar tanısında direkt mikroskopi yöntemi, hem yalancı pozitiflik hem de yalancı negatif sonuçlara neden olması nedeniyle yetersiz görülmekte olup kültür veya PCR gibi ikinci bir yönteminde tanıda kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir. Ancak *Blastocystis* spp.'in sağlıklı birey mikrobiyotasında yer alabileceği ve herhangi bir klinik tablo ile ilişkilendirilememiş olması rutin tanıda ikinci bir yönteminin gerekliliğini tartışmalı hale getirmektedir. Aydın ilinde alt tip dağılımı hem dünya genelindeki hem de ülkemizdeki çalışmalarla örtüşmektedir. *Blastocystis* spp. ve semptomlar arasında ilişki bulunmaması *Blastocystis* spp. kolonizasyonunun daha çok normal mikrobiyota ile ilgili olduğu fikrini desteklemektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev 2008;21(4):639-65.
2. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. Parasitol Int 2016;65(6):763-71.
3. El-Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, et al. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. BMC Inf Dis 2014;14:164.
4. Ertuğ S, Malatyalı E, Ertabaklar H, Ö Çalışkan S, Bozdoğan B. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates and evaluation of clinical symptoms detected in Aydın province Turkey. Mikrobiyol Bul 2015;49(1):98-104.
5. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, et al. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. Ther Adv Infect Dis 2013;1(5):167-78.
6. 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 Tropica 2013;126(1):11-8.
7. Stensvold CR. Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. J Clin Microbiol 2013;51(1):190-4.
8. 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.

9. 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.
10. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 2006;157(1):77-85.
11. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes a consensus. *Trends Parasitol* 2007;23(3):93-6.
12. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IK, Hossain MB. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis* hominis populations isolated from different countries. *Parasitol Res* 2004;92(1):22-9.
13. Parija SC, Jeremiah S. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop Parasitol* 2013;3(1):17-25.
14. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol* 2010;169(1-2):8-17.
15. Das R, Khalil S, Mirdha BR, Makharia GK, Dattagupta S, Chaudhry R. Molecular characterization and subtyping of *Blastocystis* species in irritable bowel syndrome patients from North India. *PLoS One* 2016;11(1): e0147055.
16. Souppart L, Sancier G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res* 2009;105(2):413-21.
17. Yoshikawa H, Dogruman-AI F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol Res* 2011;109(4):1045-50.
18. Vennila GD, Suresh Kumar G, Khairul Anuar A, Rajah S, Saminathan R, Sivanandan S, et al. Irregular shedding of *Blastocystis* hominis. *Parasitol Res* 1999;85(2):162-4.
19. Adiyaman Korkmaz G, Doğruman AI F, Mumcuoğlu I. Investigation of the presence of *Blastocystis* spp. in stool samples with microscopic, culture and molecular methods. *Mikrobiyol Bul* 2015;49(1):85-97.
20. Coşkun A, Malatyalı E, Ertabaklar H, Yaşar MB, Karaoğlu AO, Ertuğ S. *Blastocystis* in ulcerative colitis patients: Genetic diversity and analysis of laboratory findings. *Asian Pac J Trop Med* 2016;9(9):916-9.
21. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Inf Dis* 2007;59(3):303-7.
22. Boral Büyükbaba Ö, Paycu Çelik DG, Akgül A, İşsever H. *Blastocystis* spp. saptanan 50 semptomatik hastada alt tip dağılımın saptanması. *KÜ Sağlık Bil Derg* 2017;3(1):6-10.
23. Sankur F, Ayturan S, Malatyalı E, Ertabaklar H, Ertuğ S. The distribution of *Blastocystis* subtypes among school-aged children in Muğla, Turkey. *Iran J Parasitol* 2017;12(4):580-6.
24. Dağcı H, Kurt O, Demirel M, Mandıracıoğlu A, Aydemir S, Saz U, et al. Epidemiological and diagnostic features of *Blastocystis* infection in symptomatic patients in izmir province, Turkey. *Iranian J Parasitol* 2014;9(4):519-29.
25. Rezaei Riabi T, Mirjalali H, Haghighi A, Nejad MR, Pourhoseingholi MA, Poirier P, et al. Genetic diversity analysis of *Blastocystis* subtypes from both symptomatic and asymptomatic subjects using a barcoding region from the 18S rRNA gene. *Infect Genet Evol* 2018;61:119-26.
26. Audebert C, Even G, Cian A, The Blastocystis Investigation Group, Loywick A, Merlin S, et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep* 2016;6:25255.
27. Nithyamathi K, Chandramathi S, Kumar S. Predominance of *Blastocystis* sp. Infection among school children in Peninsular Malaysia. *PLoS One* 2016;11(2): e0136709.
28. Khademvatan S, Masjedizadeh R, Yousefi-Razin E, Mahbodfar H, Rahim F, Yousefi E. PCR-based molecular characterization of *Blastocystis* hominis subtypes in southwest of Iran. *J Infect Public Health* 2017;341(17):1-6.
29. Sigidaev AS, Kozlov SS, Tarasova EA, Suvorova MA. Investigation of the genetic profile of *Blastocystis* species in Saint Petersburg residents with gastrointestinal tract diseases in different age groups. *Med Parazitol* 2013;4(4):19-23.
30. Ajjampur SS, Png CW, Chia WN, Zhang Y, Tan KS. Ex vivo and in vivo mice models to study *Blastocystis* spp. adhesion, colonization and pathology: closer to proving Koch's postulates. *PLoS One* 2016;11(8): e0160458.