

İshalli Olgularda *Blastocystis*'in Genetik Çeşitliliği: Alt tipler ve Alellerin Belirlenmesi

Genetic Diversity of *Blastocystis* in Diarrheal Cases: Identification of Subtypes and Alleles

Evren TİLEKLİOĞLU(ID), Hatice ERTABAKLAR(ID)

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Aydın Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Aydın, Türkiye.

*Bu çalışma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TPF-19020).

Makale Atfı: Tileklioğlu E, Ertabaklar H. İshalli olgularda *Blastocystis*'in genetik çeşitliliği: Alt tipler ve alellerin belirlenmesi. Mikrobiyol Bul 2024;58(2):196-208.

ÖZ

Blastocystis türleri insan dışkı örneklerinde saptanan en yaygın intestinal protozoan parazittir. Günümüzden çok daha önce tanımlanmış olmasına rağmen patojenitesi tartışmalıdır. Çoğunlukla asemptomatik olmakla birlikte semptomatik olgularda ishal başta olmak üzere çeşitli gastrointestinal semptomlar *Blastocystis* ile ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda olgularda gözlenen semptomlarla *Blastocystis* alt tiplerini [subtype (ST)] ilişkilendiren çalışmalar raporlanmıştır. Bu çalışmada, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Laboratuvarına başvuran ishalli olgularda *Blastocystis*'in saptanması, alt tip ve alel çeşitliliği belirlenerek olgularda görülen klinik semptomlarla ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmaya 200 olgunun ishalli dışkı örneği dahil edilmiş ve demografik özellikleri (yaş, cinsiyet, ikamet) ile klinik bulguları (karın ağrısı, dispepsi, bulantı-kusma, halsizlik, kilo kaybı, anal kaşıntı, döküntü, ürtiker) kayıt altına alınmıştır. Dışkı örneklerinde direkt mikroskop yöntemi (DM) ve polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ile *Blastocystis* araştırılarak moleküler analizler yapılmıştır. Ayrıca, *Blastocystis* ribozomal ribonükleik asit küçük alt ünite (SSU rRNA) genini hedef alan PCR ile alt tip çeşitliliği ve alel farklılıkları DNA dizi analizine göre belirlenmiş, tüm verilerle klinik bulgular istatistiksel açıdan karşılaştırılmıştır. Çalışmada 200 ishalli dışkı örneğinde DM ile 31 (%15.5), *Blastocystis* SSU rRNA genine özgü PCR ile 35 (%17.5) örnekte *Blastocystis* saptanmıştır. *Blastocystis* ile demografik özellikler arasında istatistiksel açıdan bir fark saptanmamıştır. Olgularda dispepsi ve bulantı-kusma semptomlarının *Blastocystis* saptanan olgularda saptanmayanlara göre anlamlı farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p=0.0025$, $p=0.0498$). Çalışmada DNA dizi analiziyle 33 örnekte *Blastocystis* alt tipi saptanmış ve alt tip dağılımı ST1 ($n=10$, %30.3), ST2 ($n=4$, %12.1) ve ST3 ($n=19$, %57.6) olarak belirlenmiştir. Klinik bulgular ile *Blastocystis* alt tiplerinin istatistiksel değerlendirilmesinde dispepsi ile *Blastocystis* ST3, istatistiksel açıdan anlamlı olarak saptanmıştır ($p=0.0039$). *Blastocystis* alt tiplerinin alel çeşitliliği ayrı ayrı belirlenmiş ve ST1'in tamamında alel 4 (10/10), ST2'de alel 11 (2/4) ve alel 12 (2/4), ST3'te alel 34 (14/19), alel 36 (4/19) ve alel 38 (1/19) olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışma ishalli olgularda *Blastocystis* pozitifliğinin, alt tiplerinin ve alellerinin belirlenmesiyle, parazitin moleküler epidemiyolojik özellikleri konusunda önemli veriler sağlamaktadır. Bu nedenle tek sağlık yaklaşımı kapsamında insan, hayvan ve çevresel örneklerde *Blastocystis* varlığı ve genotiplerinin araştırıldığı geniş kapsamlı moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: *Blastocystis*; alt tip; alel; ishal; tanı; moleküler analiz.

İletişim (Correspondence): Araş. Gör. Dr. Evren Tileklioğlu, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, 09010, Aydın, Türkiye. Tel (Phone): +90 0505 587 54 00, E-posta (E-mail): evren.tileklioglu@adu.edu.tr

ABSTRACT

Blastocystis spp. are the most common intestinal protozoan parasites detected in human stool samples. While identified long before today, its pathogenicity remains controversial. It is generally asymptomatic but in symptomatic cases, many gastrointestinal symptoms, especially diarrhea, have been associated with *Blastocystis* infection. In recent years, the relationship between the symptoms observed in cases and *Blastocystis* subtypes (ST) has been reported. The aim of this study was to detect *Blastocystis* in diarrheal cases admitted to the Aydın Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Parasitology Laboratory, to determine subtypes and allele diversity and to investigate its relationship with clinical symptoms. For this purpose, diarrheal stool samples of 200 cases were included in the study and their demographic characteristics (age, gender, residence) and clinical findings (abdominal pain, dyspepsia, nausea-vomiting, weakness, weight loss, anal itching, rash, urticaria) were recorded. *Blastocystis* was detected by direct microscope method (DM) and by molecular analyses which were performed with polymerase chain reaction (PCR). Subtype diversity was determined based on DNA sequence analysis by PCR targeting the *Blastocystis* ribosomal ribonucleic acid small subunit (SSU rRNA) gene. In addition, alleles related to *Blastocystis* subtypes were determined and statistically compared between all data and clinical findings. In the current study, *Blastocystis* was detected in 31 (15.5%) samples by DM and in 35 (17.5%) samples by PCR specific to the *Blastocystis* SSU rRNA gene among 200 diarrheal stool samples. No statistical difference was detected between *Blastocystis* and demographic characteristics. Dyspepsia and nausea-vomiting symptoms differed significantly in cases with *Blastocystis* compared to negative ones ($p=0.0025$, $p=0.0498$). *Blastocystis* subtype was detected in 33 samples by SSU rRNA sequence analysis, and the subtype distribution was ST1 ($n=10$, 30.3%), ST2 ($n=4$, 12.1%) and ST3 ($n=19$, 57.6%). In the statistical evaluation between clinical findings and *Blastocystis* subtypes, a relationship was found between dyspepsia and *Blastocystis* ST3 ($p=0.0039$). The allele diversity of *Blastocystis* subtypes was determined as allele 4 (10/10) in all ST1, allele 11 (2/4) and 12 (2/4) in ST2, allele 34 (14/19), 36 (4/19), and 38 (1/19) in ST3. In conclusion, our study provides important data on the molecular epidemiological characteristics of the *Blastocystis* by determining positivity, subtypes and alleles in diarrheal cases. Therefore, within the scope of the one health approach, comprehensive molecular epidemiological studies are required to determine the presence and genotypes of *Blastocystis* in human, animal and environmental samples.

Keywords: *Blastocystis*; subtype; allele; diarrhea; diagnosis; molecular analysis.

GİRİŞ

Küresel sağlık tahminleri raporuna göre ilk on küresel ölüm nedeni arasında sekizinci sırada ishalin yer aldığı rapor edilmiştir¹. İshal etiyolojisi çok faktörlü olmakla birlikte sıklıkla bakteri, virüs veya parazitlerden kaynaklandığı bilinmektedir. *Blastocystis* türleri hayvanların ve insanların gastrointestinal sisteminde bulunan en yaygın mikro-ökaryotlardan biridir. Epidemiyolojik çalışmalar prevalansın gelişmiş ülkelerde %20 ile 35'e varan oranlarda, gelişmekte olan ülkelerde ise %100'e varan oranlarda saptandığını raporlamıştır^{2,3}. Prevalansı etkileyen faktörler arasında demografik özellikler, sanitasyon, endemik bölgelere seyahat ve hayvanlarla yakın temas yer almaktadır⁴. Enfeksiyon fekal-oral yol, kontamine su ve gıda yoluyla bulaşabilmektedir. Gastrointestinal sistemde kolonize olan *Blastocystis* türleri bireyin bağışıklık durumuna bağlı olarak asemptomatik veya semptomatik olarak kendini göstermektedir⁵. Semptomatik olgularda karın ağrısı, şişkinlik, gaz, kusma, konstipasyon, mide bulantısı, kramplar gibi non-spesifik gastrointestinal bulguların ortaya çıktığı bildirilmiştir. Klinik araştırmalarda parazit ile irritabl bağırsak sendromu (IBS) gibi sindirim sistemi hastalıklarıyla ilişkili olabileceği ifade edilmiştir³.

Ayrıca ürtiker ve palmoplantar pruritus gibi bağırsak dışı belirtilerde de rol oynadığı ifade edilmiştir⁶. *Blastocystis* türlerinin laboratuvar tanısında mikroskopik yöntemler [direkt mikroskopi (DM) ve boyalı preparat inceleme] başta olmak üzere kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] kullanılmaktadır. Özellikle gerçek zamanlı (real-time)-PCR (Rt-PCR), paraziti taramada altın standart olarak kullanılmakta iken barkodlama PCR ve DNA dizilemeyle *Blastocystis* alt tipleri saptanmaktadır^{2,7,8}. Yapılan çalışmalardan bazıları kronik gastrointestinal semptomlar (yorgunluk, depresyon, deri döküntüsü, eklem ağrısı, kabızlık, karın ağrısı ve ishal) ile alt tip 1 ve 3 arasında, karında şişlik ile alt tip 4 arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir^{8,9}. Ancak semptomatik ve asemptomatik olgularla bu olgularda saptanan *Blastocystis* alt tipleri arasında bir ilişkinin olmadığı da raporlanmıştır¹⁰.

Günümüzde küçük alt birim ribozomal RNA (SSU rRNA) nükleotit polimorfizm analizi ile *Blastocystis*'in 42 alt tipi saptanmış ve doğrulanmıştır. Bunların arasında ST1-9 ve ST10, ST12, ST14 ve ST41 insanlarda saptanmıştır. Bildirilen tüm alt tiplerin %90'ından fazlasının ise ST1-ST4 olduğu belirtilmiştir¹¹.

Blastocystis türlerinin hem asemptomatik hem de semptomatik bireylerde saptanması, parazitin kommensal mi yoksa patojen bir mikroorganizma olarak mı değerlendirilmesi gerektiği konusunda net bir fikir birliğine varılamamasına neden olmuştur¹². Patojenitedeki tartışmaların en büyük nedenleri arasında parazitin farklı morfolojik yapıları ve genetik çeşitliliği olabileceği belirtilmiştir⁴. Bu nedenle günümüzde *Blastocystis* türlerinin genetik çeşitliliğini araştıran çalışmaların sıklığı artmıştır. Bu sayede parazitin bulaş yolu, klinik bulgularla ilişkisi, epidemiyolojisi ve patogenezi aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Mevcut çalışmada ilk olarak, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Laboratuvarına gelen ishalli dışkı örneklerinde *Blastocystis*'i saptamak, alt tiplerini ve alel dizilerini belirlemek amaçlanmıştır. İkinci olarak, elde edilen veriler ile olguların klinik bulguları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için öncelikle Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındı (Tarih: 27.06.2022 ve Karar no: 20).

Dışkı Örneklerinin Toplanması ve Direkt Mikroskopi İnceleme Yöntemiyle *Blastocystis* Araştırılması

Çalışma kapsamına Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Parazitoloji Laboratuvarına rutin parazitolojik inceleme için farklı polikliniklerden başvuran ishalli olgular seçildi. Laboratuvarımızda rutin olarak uygulanan nativ-lugol yöntemi (%0.9 NaCl-Lugol'un iyodin çözeltisi), çoklaştırma yöntemi (formol-etil asetat) ve sonrasında trikrom boya yöntemiyle ishalli örneklerde parazitolojik inceleme yapıldı. Çalışmaya sadece *Blastocystis* saptanan dışkı örnekleri dahil edildi.

Bu kapsamda 200 olgu çalışma kapsamına alınarak gönüllü olur formu onayı alındı. Çalışmaya dahil olan olguların demografik özellikleri ve epikriz raporları kayıt altına alınarak geriye dönük olarak incelendi.

DNA İzolasyonu ve PCR Amplifikasyonu

Genomik DNA izolasyonu daha önce -20 °C'de muhafaza edilen dışkı örneklerinden QIAmp Fast DNA Stool Mini Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) ile üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Alt tip analizi ve *Blastocystis* türlerinin PCR amplifikasyonu, küçük alt birim SSU rRNA barkod bölgesi primerleri olan BhRDr R- (5'-GAG CTT TTT AAC TGC AAC AAC G-3') ve RD5 F- (5'-ATC TGG TTG ATC CTG CAG T-3') kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon içeriği tüm örnekler için 30 µL hacimde hazırlandı. Reaksiyon içeriği için 1-2 µL DNA, 1.5 pmol/µL primer (RD5 ve BhRDr), 0.24 U/µL Taq DNA polimeraz (Fermentas, ABD), 1.8 mM dNTP (Fermentas, ABD) ve 1 × (NH₄)₂SO₄ tampon (Fermentas, ABD) kullanıldı. Amplifikasyon sıcaklıkları ve süreleri; 94 °C'de 3 dakika, denatürasyonu takiben 30 döngü olacak şekilde 94 °C'de 1 dakika, 59 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika ve ardından 72 °C'de 5 dakika son uzama şeklinde T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, ABD) cihazında ayarlandı. Elde edilen amplikonlar %1.5 agaroz jel elektroforezde (0.5X tris borik asit- EDTA) yürütülerek Vilber Lourmat sistemiyle 340 nm ultraviyole ışık altında 600 baz çifti [base pair (bp)]'lik bantlar görüntülendi.

DNA Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

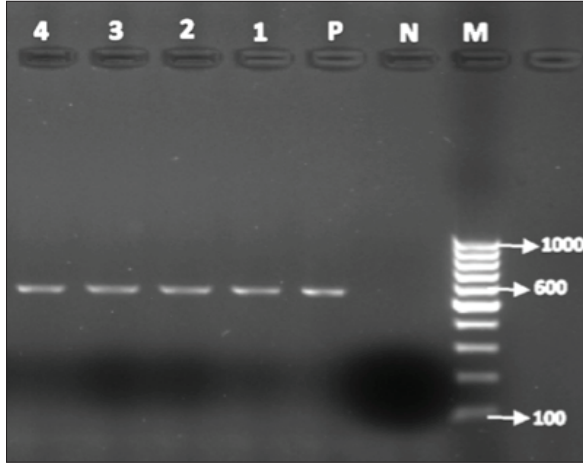
Pozitif saptanan amplikonlar DNA dizilemesi için ticari bir firmaya (MedSantek, İstanbul) gönderildi. Elde edilen diziler Molecular Evolutionary Genetics Analysis versiyon 11 (MEGA-<http://www.megasoftware.net/>) programı kullanılarak sıralandı ve analiz edildi. Bu diziler ile GenBank veri tabanındaki referans diziler Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak karşılaştırılıp alt tipler belirlendi. Kısmi filogenetik analiz MEGA 11 programıyla yapıldı. Evrimsel uzaklık belirlemede dış grup olarak *Proteromonas lacertae* 18S ribozomal RNA geninin kısmi dizisi (GenBank No: U37108) kullanıldı. Alellerin belirlenmesi için düzenlenmiş diziler *Blastocystis* alt tip veri tabanında (<https://pubmlst.org/organisms/Blastocystis-spp/>) karşılaştırma yoluyla belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada sınıflandırılmış veriler Ki-kare testiyle, analitik veriler ise Student-t testiyle değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 22.0 programı (PASW Inc., Chicago. IL. ABD) kullanıldı. Çalışma kapsamında *Blastocystis* varlığı ile olguların demografik özellikleri ve klinik bulguları arasındaki ilişkisi ve ayrıca *Blastocystis* alt tipleri ile klinik bulgular ve cinsiyet arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildi. Analiz sonucunda $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

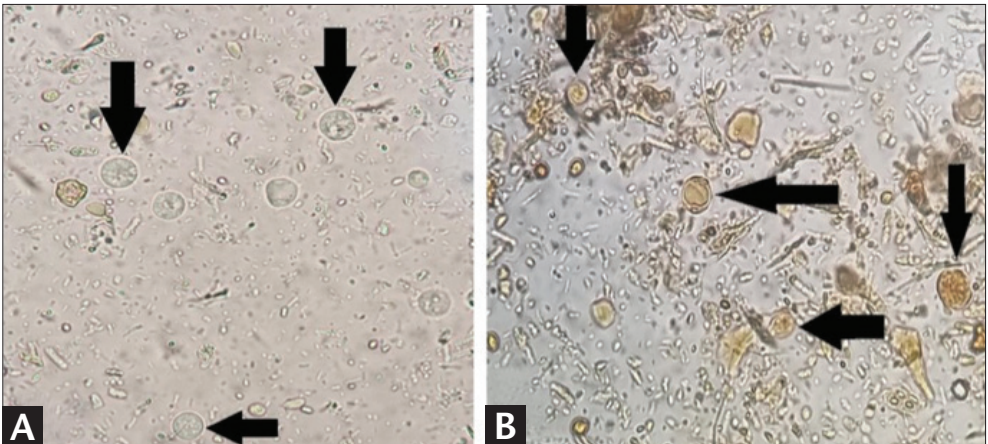
BULGULAR

Çalışmada yaşları iki ile 90 arasında (ort= 43.7 ± 18.7) olan 114 (%57)'ü kadın, 86 (%43)'sı erkek olmak üzere toplam 200 ishali olgu ve bu olgulara ait dışkı örnek-



Şekil 1. PCR ile pozitif saptanan örneklerin (600 bp) jel görüntüsü (M: Marker, P: Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol, 1-4: Örnek numaraları).

leri değerlendirilmiştir. Direkt mikroskopik inceleme yöntemiyle 31 örnekte (%15.5), *Blastocystis* SSU rRNA genine özgü PCR (600 bp'lik bantlar) ile 35 (%17.5) örnekte *Blastocystis* saptanmıştır (Şekil 1,2). Ayrıca üç örnekte *Entamoeba coli* saptanmıştır. *Blastocystis* belirlenen olgular ile saptanmayanlar arasında hem cinsiyet hem de yaş gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo I). Olguların ikametleri şehir, ilçe ve köy olarak alt kategorilere ayrılmıştır. Toplam olguların 95 (%47.5)'inin en sık şehirden başvurduğu belirlenmiş olup *Blastocystis* varlığı ile olguların ikamet yerleri arasında istatistiksel açıdan ilişki saptanmamıştır ($\chi^2 = 3.6199$, $p = 0.1636$). Olguların klinik bulguları geriye dönük olarak incelendiğinde ishal ile bir veya daha fazla semptomun olduğu belirlenmiştir. Çalışma örnekleminde sadece *Blastocystis* saptanan ve saptanmayan ishalli



Şekil 2. Nativ-Lugol inceleme ile saptanan *Blastocystis* türleri. (A). Nativ inceleme (x40), (B). Lugol'ün iyodin çözeltisi (x40).

Tablo I. Blastocystis Pozitifliği Saptanan ve Saptanmayan Olguların Demografik Analizi

		Blastocystis						
		Pozitif (n= 35)		Negatif (n= 165)		Toplam	χ^2	p
		Sayı	%	Sayı	%			
Cinsiyet	Erkek	20	57.1	94	47	114	0.0004	0.985
	Kadın	15	42.9	71	43	86		
Yaş	1-19	5	14.3	16	9.7	21	1.6929	0.6385
	20-39	13	37.1	50	30.3	63		
	40-59	9	25.7	55	33	64		
	60+	8	22.9	44	27	52		
Toplam		35	100	165	100	165		

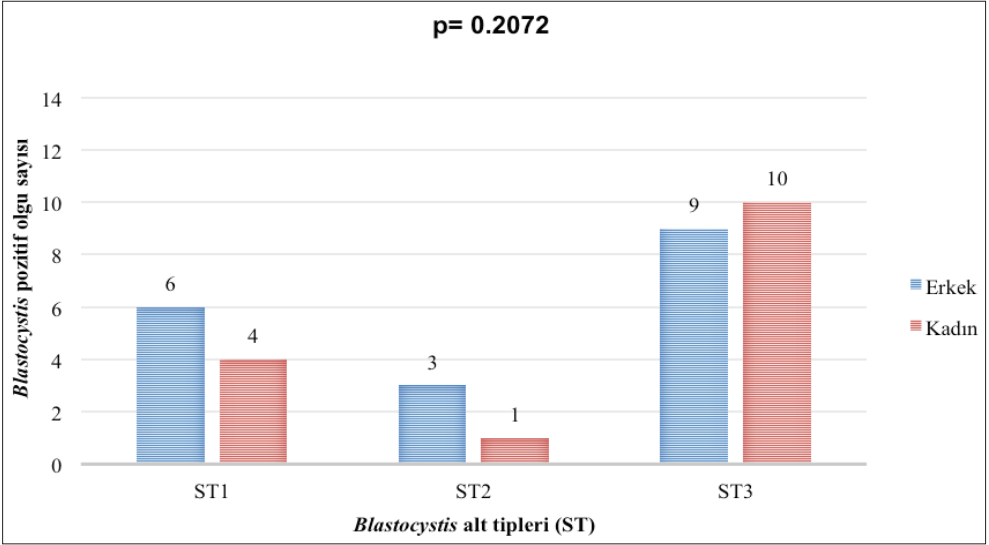
olguların en sık görülen klinik bulguları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre dispepsi ve bulantı-kusma semptomlarının, *Blastocystis* saptanan olgularda saptanmayanlara göre anlamlı farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Tablo II).

Çalışmada toplam 33 *Blastocystis* alt tipi saptanmış olup iki örneğin alt tipi tespit edilememiştir. Elde edilen tüm dizilerin GenBank veri tabanındaki dizilerle tam benzerlik (%100) gösterdiği belirlenmiştir. Buna göre *Blastocystis* ST1 için 10 (%30.3), ST2 için dört (%12.1) ve ST3 için ise 19 (%57.6) örnek saptanmıştır. *Blastocystis* alt tiplerinin cinsiyete göre dağılımı Grafik 1’de gösterilmiştir. Olgulardaki klinik bulgular ile *Blastocystis* alt tiplerinin istatistiksel analizinde dispepsi ile *Blastocystis* ST3 arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmıştır (Tablo III). *Blastocystis* alt tipleri arasındaki baz farklılıklarının değerlendirilmesinde ST3 için üç farklı, ST2 için üç farklı ve ST1 için yedi farklı dizi tespit edilmiş ve bu diziler GenBank veri tabanına girilerek erişim numaraları (OP678985-97) kaydedilmiştir (Şekil 3). *Blastocystis* alt tipleriyle ilişkilendirilen aleller Grafik 2’de sunulmuştur.

Tablo II. İshal ile Birlikte En Sık Görülen Klinik Bulgular

		Blastocystis						
		Pozitif (n= 35)		Negatif (n= 165)		Toplam	χ^2	p
Semptom		Sayı	%	Sayı	%			
Karın ağrısı		31	88.5	157	95.1	188	0.853	0.3557
Dispepsi		25	71.4	149	90.3	174	9.0951	0.0025
Bulantı-kusma		24	68.5	137	83	107	3.8456	0.0498
Halsizlik		4	11.4	20	12.1	24	0.0131	0.9088
Kilo kaybı		3	8.5	17	10.3	20	0.0962	0.7564
Anal kaşıntı		3	8.5	7	4.2	10	1.1392	0.2858
Döküntü		2	5.7	6	3.6	8	0.3247	0.5688
Ürtiker		2	5.7	4	2.4	6	1.074	0.3
Diğer*		3	8.5	9	5.4	12	0.4974	0.4806

*Diğer: Gastrit, anemi, gelişme geriliği, öksürük, eklem ağrısı.



Grafik 1. *Blastocystis* alt tiplerinin cinsiyete göre dağılımı.

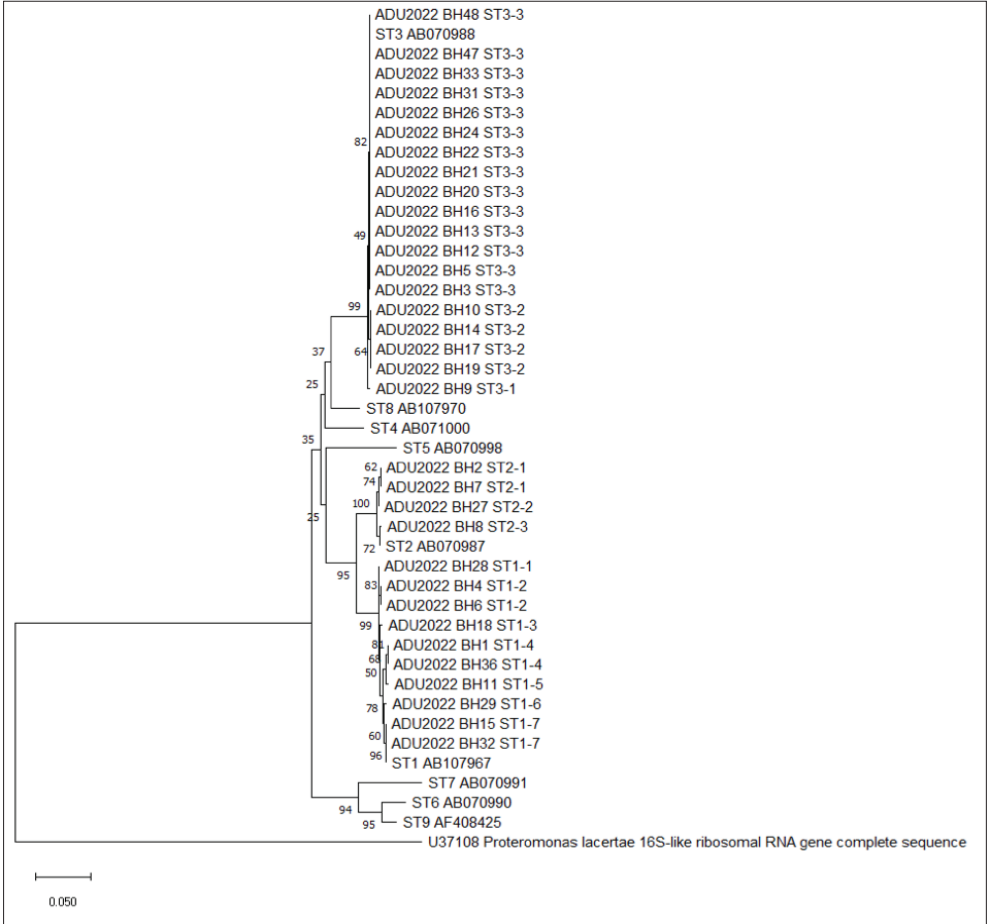
Tablo III. *Blastocystis* Alt Tipleri Saptanan Olgularda İshal ile En Sık Görülen Klinik Bulgular

Semptom*	ST1 (n= 10)		ST2 (n= 4)		ST3 (n= 19)		χ^2	p
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		
Karın ağrısı	8	80	3	100	18	100	2.0445	0.3597
Dispepsi	4	40	2	50	18	94.7	11.082	0.0039
Bulantı-kusma	7	70	2	50	14	73.6	0.8782	0.6446
Halsizlik	2	20	0	0	2	10.5	0.4945	0.4819
Kilo kaybı	0	0	0	0	3	15.7	0.5367	0.6413

*Toplam 33 *Blastocystis* alt tipi saptandığı için iki örnek dahil edilmemiştir.

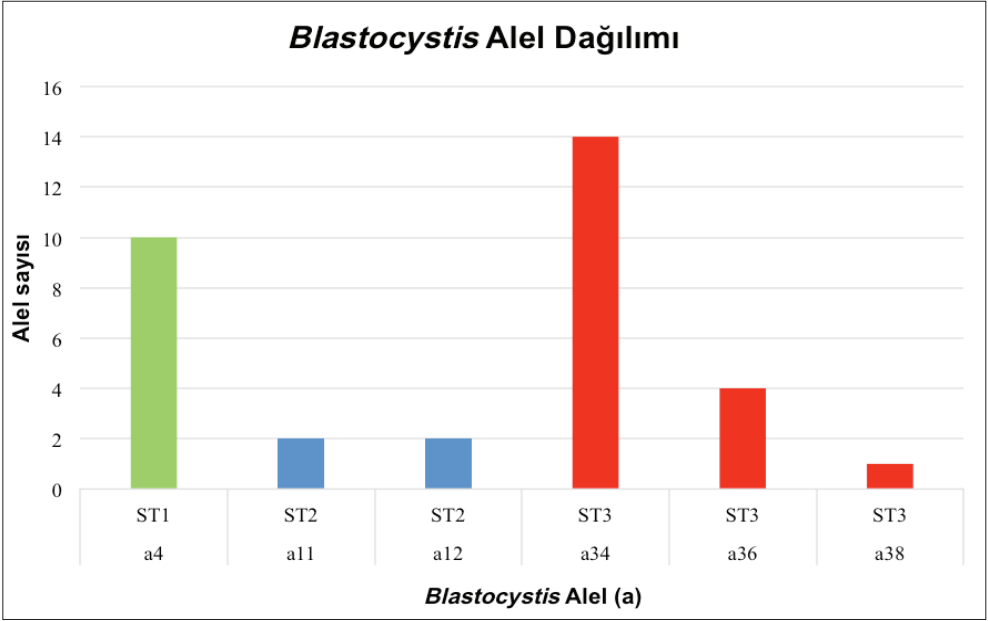
TARTIŞMA

İnsan dışkı örneklerinde sıkça rastlanan *Blastocystis* türleri, son yıllarda bağırsak üzerindeki etkileri araştırılan bir parazit olmuştur. Protozoon parazit saptanan olgularda bağırsak geçirgenliği (BG) değişikliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada BG'nin protozoon enfeksiyonu olan olgularda kontrol grubuna kıyasla arttığı belirlenmiştir ($p= 0.0017$). Bağırsak geçirgenliği, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında *Giardia intestinalis* ve *B.hominis* saptanan olgularda anlamlı derecede yüksek olarak saptanmıştır (sırasıyla $p= 0.0025$, $p= 0.00037$). Ancak *Entamoeba coli* saptanan olgular için bir ilişki saptanmamıştır. Bu nedenle *Blastocystis* türlerinin bağırsak geçirgenliğini arttırdığını ve buna bağlı olarak patojenik bir organizma olabileceği ifade edilmiştir¹³. Bağırsak geçirgenliğindeki değişikliklerin, *Blastocystis* türlerinin neden olduğu enfeksiyon ve özellikle ishal arasında bir ilişki olduğu öne sürülmüştür^{6,14}.



Şekil 3. *Blastocystis* SSU rDNA dizilerinin evrimsel uzaklıkları.

Günümüzde *Blastocystis* prevalansı ülkeden ülkeye değişmekte olup %1 ile %100 arasında değişen oranlarda olduğu belirtilmiştir^{2,3}. Ülkemizde ise prevalansın %1.4 ile 23.5 arasında olduğu bildirilmiştir¹⁵. Bu oranlar arasındaki farklılıkların olgusal yaklaşımlardan daha çok tanısı metodolojilere dayandığı belirtilmiştir⁷. *Blastocystis* tanısında başta nativ-Lugol ve trikrom boyama gibi mikroskopik yöntemler olmak üzere kültür ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu tanı yöntemlerinin avantaj ve/veya dezavantajları nedeniyle bir ve daha fazla yöntemin birlikte kullanılması gerektiği ifade edilmiştir⁵. Bu çalışmada 200 ishali olgu DM yöntemiyle incelendiğinde 31 (%15.5), PCR ile ise 35 (%17.5) örnekte *Blastocystis* saptanmıştır. Bu farkın DM yönteminde ishali olguların dışı örneklerinde saptanan çeşitli yapılarla (lökositler, nötrofiller, makrofajlar, mantarlar, çeşitli hücreler) *Blastocystis*'in ayırt edilemeyerek yalancı negatiflikten kaynaklanabileceği öngörülmüştür. Bu çalışmada *Blastocystis*'i saptamada kullandığımız tanı yöntemlerinden DM ve PCR metoduna benzer olarak yurt dışı kaynaklı yapılan



Grafik 2. *Blastocystis* alt tiplerinde saptanan aleller.

çalışmalarda ishalli olgularda *Blastocystis* prevalansının DM yöntemiyle %3.5 ile %6.42, PCR ile %10.1 ile %44.23 arasında değişen oranlarda saptandığı raporlanmıştır^{3,16-18}. Ülkemizde ise DM yöntemiyle %7.96 ile %38, PCR yöntemiyle ise %6.6 ile %17.7 oranlarında ishalli olgularda *Blastocystis* saptanmıştır¹⁹⁻²².

Literatürde yapılan çalışmalarda *Blastocystis* ST3'ün Amerika hariç Avrupa, Afrika, Asya ve Avustralya'da insanlarda en sık saptanan alt tür olduğu bildirilmiştir^{2,4}. Ülkemizde ise son yapılan bir derlemede en sık görülen alt tipin ST3 (%47.9), diğer alt tiplerin ise sırasıyla ST1 (%17.5), ST2 (%14.7), ST4 (%4) ve ST5-ST7 (%15.9) olduğu rapor edilmiştir¹⁵. Yurt dışı kaynaklı ishalli olgularda yapılan çalışmalarda ise sıklıkla *Blastocystis* ST3 ve ST4 ishalle ilişkilendirilmiştir^{14,23}. Bu çalışmada 35 (%17.5) örnekte *Blastocystis* pozitifliği saptanmış, kısmi SSU rDNA geninin dizilenmesiyle 33 (%16.5) örneğin *Blastocystis* alt tipi belirlenmiştir. İki örneğin ise kromatogram görüntüsü net olmadığı için alt tipi tespit edilememiştir. Bu verilere göre örneklerin %57.6'sında ST3 (19/33), %30.3'ünde ST1 (10/33) ve %12.1'inde ST2 (4/33) saptanmıştır.

Son yıllarda *Blastocystis* alt tiplerinde saptanan alel çeşitliliği parazitin patojenitesini ve konak dinamiklerini anlamada yardımcı olmuştur. Yapılan çalışmalarda ST1 alel 4'ün en yaygın alel olduğu belirtilmiştir²⁴. Ayrıca ST1 alel 4 insan dışkı örneklerinde ve su örneklerinde raporlanmıştır²⁵. *Blastocystis* ST2'de saptanan alel 11 ve 12, ST3'te alel 34, alel 36, farklı olgu gruplarında saptanmıştır^{24,26}. Ayrıca ST3 alel 34 ve alel 38'in nehir suyu örneklerinde saptandığı bildirilmiştir²⁷. İshalli olgularda yapılan bir çalışmada alel 4 (8/12) ve alel 2 (4/12) ST1'de, ST2'de alel 9 (3/5) ve alel 12 (2/5), ST3'te alel 34 (9/14), alel 36

(3/14) ve alel 38 (2/14) ve ST4'te alel 42 (2/2) saptanmıştır²⁸. Gastrointestinal şikayetleri olan olgu grubunda yapılan bir çalışmada ST1 için alel 4, ST2 için alel 9, alel 11 ve alel 12, ST3 için alel 34 ve alel 36 saptanmıştır²². Bu çalışmada ST1'de alel 4 (10/10), ST2'de alel 11 (2/4) ve alel 12 (2/4), ST3'te alel 34 (14/19), alel 36 (4/19) ve alel 38 (1/19) olarak belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada²⁵ yağışlı ve kurak mevsimlerde Aborjinlerin hem su hem de dışkı örneklerinde tanımlanan ST1 alel 4, benzer bir çalışmada²⁷ ise ST3'te alel 34 ve alel 38 saptandığı bildirilmiş olup mevcut çalışmamız ile aynı veriler olduğu görülmüştür. Bu nedenle Noradiah ve arkadaşlarının belirttiği gibi mevcut aleller için bulaş kaynağının su olabileceği düşünülmüştür^{25,27}. *Blastocystis*'in gerçek bulaş kaynaklarının saptanabilmesi için başta su olmak üzere diğer kaynakların incelenmesine ihtiyaç vardır.

Blastocystis görülme sıklığının yaş ve cinsiyet üzerinde bir etkisinin olup olmadığı tartışmalıdır⁴. Bu çalışmada kadın olguların %42.9'unda, erkek olguların %57.1'inde, yaş aralıkları incelendiğinde ise 20-39 yaş aralığındaki olgularda *Blastocystis*'in en yüksek oranda (%37.1) olduğu belirlenmiş olup yaş ve/veya cinsiyet ile *Blastocystis* arasında istatistiksel açıdan bir ilişki saptanmamıştır. Olgularımız yerleşim yerlerine göre gruplandırıldığında, en sık şehirde ikamet edenlerde pozitiflik (%65.7) saptanmıştır. Yapılan çalışmalar-da yerleşim yerine bağlı olarak *Blastocystis* prevalansının değişebileceği ifade edilmiştir².

İshal başta olmak üzere en sık görülen gastrointestinal bulgular (karın ağrısı, bulantı kusma, kabızlık) ile *Blastocystis* ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmalara göre; İspanya'da gerçekleştirilen vaka kontrol çalışmasında *Blastocystis* saptanan olgularda saptanmayanlara göre bulantı, aerofaji, ürtiker, anal kaşıntı ve dispepsi bulgularının önemli ölçüde daha yaygın olduğu bildirilmiştir²⁹. İran'da karın ağrısı, ishal, kusma, bulantı ve kabızlık bulguları olan olgularda *Blastocystis* ile ilişkisi araştırılmış ve karın ağrısı ve *Blastocystis* arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur³⁰. Olgularımızın klinik semptomları geriye dönük olarak incelendiğinde bir veya daha fazla semptomun bir arada görüldüğü belirlenmiş olup en sık görülen semptomlar değerlendirilmiştir. Bu bulgulara göre dispepsi ve bulantı-kusma semptomları ile *Blastocystis* pozitifliği arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0.0025$, $p=0.0498$). Ancak bu çalışmada diğer mikrobiyolojik etkenler değerlendirilemediği için klinik semptomlardan sadece *Blastocystis*'in sorumlu tutulması güçtür. Literatürde *Blastocystis* ile dispepsi ve bulantı-kusma semptomu arasındaki ilişkinin anlamlı olduğunu bildiren benzer çalışmalar³¹ olduğu gibi aksini ifade eden raporlar da mevcuttur³².

Blastocystis alt tipleri ile klinik bulgular arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda kronik gastrointestinal hastalıklar ile ST1-3 arasında istatistiksel açıdan bir korelasyon saptanmıştır⁸. Farklı bir çalışmada ST1 ile karın ağrısı, ST4 ile de şişkinlik arasında bir ilişki saptanmış, gastrointestinal bulgular ile *Blastocystis* arasında daha çok çalışma yapılması gerektiği vurgulanmıştır⁹. Ancak *Blastocystis* alt tipleri ile klinik semptomlar arasında bir ilişkinin olmadığı da bildirilmiştir^{10,22}. Çalışma kapsamına aldığımız ishallerli olgularda saptanan *Blastocystis* alt tipleri ile klinik bulguların istatistiksel değerlendirmesinde *Blastocystis* ST3 ile dispepsi semptomu arasında istatistiksel açıdan bir ilişki saptanmıştır

($p= 0.0039$). Ancak diğer mikrobiyolojik etkenler dışlanamadığından *Blastocystis* ST3 ile dispepsi semptomu arasındaki ilişki net olarak değerlendirilememiştir. Bulgularımıza benzer olarak yapılan bir çalışmada olgularda en sık ST3 saptanmış ve intestinal dispepsiyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir³³. Ülkemizde yapılan bir çalışmada kadın olgularda dispepsi semptomu ile *Blastocystis* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur³⁴. Aksine, *Blastocystis* alt tipleri ile dispepsi bulgusu arasında bir ilişkinin olmadığı da raporlanmıştır³².

Bu araştırmada seçilen olguların mikrobiyolojik tanısız (bakteri, virüs) incelemelerinin yapılamamış olması kısıtlılık oluşturmaktadır. Ayrıca dışkıda saptanabilecek diğer parazit etkenler açısından asit-fast boyama yapılmadığından *Cryptosporidium* ve *Cyclospora* türleri açısından değerlendirilememiştir. İleride yapılacak olan araştırmalarda bu durumun dikkate alınması planlanmıştır.

Günümüzde *Blastocystis* türlerinin patogenezi araştırmacılar arasında süregelen tartışmalara neden olmaktadır. Bu çalışmada ishallerde *Blastocystis* pozitifliği, alt tipler ve aleller saptanmıştır. Özellikle, bu çalışmada *Blastocystis* saptanan olgularda belirlenen semptomlar ile alt tipler arasında bir korelasyonun olması parazitin patojenik potansiyeli üzerinde daha fazla araştırma yapılması gerektirdiğini düşündürmüştür. Ayrıca bu çalışmada *Blastocystis* alt tiplerinde saptadığımız alellerin (ST1 alel 4, ST3 alel 34 ve alel 38) literatür verileri ışığında su kaynaklı olabileceği kanısına varılmıştır^{25,27}. Ancak moleküler yaklaşımlar ile daha ileri epidemiyolojik çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, insan ve hayvan deneyleri içermediğinden etik kurul onayı gerektirmemiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). (2021) Suicide worldwide in 2019: global health estimates. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (Erişim tarihi: 20.04.2024).
2. Popruk S, Adao DEV, Rivera WL. Epidemiology and subtype distribution of *Blastocystis* in humans: A review. *Infect Genet Evol* 2021; 95: 105085. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105085>
3. Rudzińska M, Sikorska K. Epidemiology of *Blastocystis* infection: A review of data from Poland in relation to other reports. *Pathogens* 2023; 12(8): 1050. <https://doi.org/10.3390/pathogens12081050>
4. Kumarasamy V, Rajamanikam A, Anbazhagan D, Atroosh WM, Azzani M, Subramaniyan V, et al. Systematic review and meta-analysis: Epidemiology of human *Blastocystis* spp. infection in Malaysia. *IDTM* 2023; 8(8): 415. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8080415>
5. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(4): 639-65. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-08>
6. Jha S, Gupta P, Bhatia M. *Blastocystis* spp. infection in cases of diarrhea: A pilot study from a tertiary care teaching hospital in Rishikesh, Uttarakhand, with a brief review of literature. *Trop Parasitol* 2021; 11(2): 113.

7. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Mølbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: A comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59(3): 303-7. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003>
8. Jones MS, Whipps CM, Ganac RD, Hudson NR, Boroom K. Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitol Res* 2009; 104: 341-5. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1198-7>
9. Pérez MR, Yáñez CM, Hernández AM, Sustaita JJD, Jiménez EG, Andrade MR, et al. *Blastocystis* infection frequency and subtype distribution in university students. *Heliyon* 2020; 6(12): e05729. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05729>
10. 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: 263-8. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1658-8>
11. Koehler AV, Herath HD, Hall RS, Wilcox S, Gasser RB. Marked genetic diversity within *Blastocystis* in Australian wildlife revealed using a next generation sequencing-phylogenetic approach. *IJP-PAW* 2024; 23: 100902. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.100902>
12. 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. <https://doi.org/10.1177/2049936113504754>
13. Dagci H, Ustun S, Taner MS, Ersoz G, Karacasu F, Budak S. Protozoon infections and intestinal permeability. *Acta Trop* 2002; 81(1): 1-5. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00191-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00191-7)
14. Vega L, Herrera G, Muñoz M, Patarroyo MA, Maloney JG, Santín M, et al. Gut microbiota profiles in diarrheic patients with co-occurrence of *Clostridioides difficile* and *Blastocystis*. *PLoS One* 2021; 16(3): e0248185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248185>
15. Malatyali E, Ertabaklar H, Ertuğ S. Subtype distribution of *Blastocystis* in Türkiye. *Türkiye Parazitol Derg* 2023; 47(3): 184-9. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2023.79188>
16. Elghareeb AS, Younis MS, El Fakahany AF, Nagaty IM, Nagib MM. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* sp. in diarrheic patients. *Trop Parasitol* 2015; 5(1): 36. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.149919>
17. Zulfa F, Sari IP, Kurniawan A. Association of *Blastocystis* subtypes with diarrhea in children. *J Phys Conf Ser* 2017; 884: 12031. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/884/1/012031>
18. Deng L, Tay H, Peng G, Lee JW, Tan KS. Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* in patients with *Clostridium difficile* infection, Singapore. *Parasit Vectors* 2021; 14(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04749-8>
19. Dogan N, Tüzemen NÜ, Dinleyici EÇ. Akut ishali olan ve olmayan çocuklarda farklı tanı yöntemleriyle *Blastocystis* spp. tanımlanması. *Osmangazi Tıp Derg* 2018; 40(2): 13-7. <https://doi.org/10.20515/otd.408450>
20. Pektaş B, Yıldırım A, Gökmen AA, Berrin UZUN, Güngör S, Peker BO. İrritabl barsak sendromlu hastalarda *Blastocystis hominis* sıklığının araştırılması. *JCEI* 2014; 5(2): 242-5. <https://doi.org/10.5799/ahinj-s.01.2014.02.0395>
21. Ertuğ S, Malatyali E, Ertabaklar H, Çalışkan Ö, Bozdoğan B. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates and evaluation of clinical symptoms detected in Aydın province, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(1): 98-104. <https://doi.org/10.5578/mb.8532>
22. Aykur M, Caliskan Kurt, C, Dirim Erdogan D, Biray Avcı C, Vardar R, Aydemir S, et al. Distribution and phylogenetic analysis of subtypes and alleles of *Blastocystis* sp. in the stool samples collected from patients with gastrointestinal complaints in İzmir, Turkey. *Acta Parasitol* 2023; 68(2): 304-16. <https://doi.org/10.1007/s11686-023-00665-2>
23. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KEP, 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. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0005>
24. Jiménez PA, Jaimes JE, Ramírez JD. A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. *Parasit Vectors* 2019; 12(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3641-2>

25. Noradilah SA, Moktar N, Anuar TS, Lee IL, Salleh FM, Manap SNAA, et al. Molecular epidemiology of blastocystosis in Malaysia: Does seasonal variation play an important role in determining the distribution and risk factors of *Blastocystis* subtype infections in the Aboriginal community?. *Parasit Vectors* 2017; 10: 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2294-2>
26. Aykur M, Camyar A, Türk BG, Sin AZ, Dagci H. Evaluation of association with subtypes and alleles of *Blastocystis* with chronic spontaneous urticaria. *Acta Trop* 2022; 231: 106455. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106455>
27. Noradilah SA, Lee IL, Anuar TS, Salleh FM, Manap SNAA, Mohtar NSHM, et al. Occurrence of *Blastocystis* sp. in water catchments at Malay villages and Aboriginal settlement during wet and dry seasons in Peninsular Malaysia. *PeerJ* 2016; 4: e2541. <https://doi.org/10.7717/peerj.2541>
28. Gureser AS, Karasartova D, Sarzhanov F, Kosar N, Taylan-Ozkan A, Dogruman-AI F. Prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* in diarrheal patients in Corum, Türkiye. *Parasitol Res* 2023; 122(12): 2977-87. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07987-0>
29. Matovelle C, Tejedor MT, Monteagudo LV, Beltrán A, Quílez J. Prevalence and associated factors of *Blastocystis* sp. infection in patients with gastrointestinal symptoms in Spain: A case-control study. *IDTM* 2022; 7(9): 226. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7090226>
30. Salehi R, Haghighi A, Stensvold CR, Kheirandish F, Azargashb E, Raeghi S, et al. Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* isolated from humans in Ahvaz, Southwestern Iran. *GHFBB* 2017; 10(3): 235.
31. Robles-Cabrera MX, Maguiña JL, Gonzales-Huerta L, Panduro-Correa V, Dámaso-Mata B, Pecho-Silva S, et al. *Blastocystis* species and gastrointestinal symptoms in Peruvian adults attended in a public hospital. *IC* 2021; 53(2): 374. <https://doi.org/10.3947/ic.2021.0004>
32. Malatyali E, Ertabaklar H, Ertuğ S. Subtype distribution of *Blastocystis* spp. with DNA barcoding and evaluation of diagnostic methods. *Mikrobiyol Bul* 2019; 53(3): 308-18. <https://doi.org/10.5578/mb.68344>
33. 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 (Mosk)* 2013; (4): 19-23.
34. Özyurt M, Kurt Ö, Mølbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int* 2008; 57(3): 300-6. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.01.004>