

İNFLAMATUAR BARSAK HASTALIĞI OLAN HASTALARDA BLASTOCYSTIS SPP.'NİN  
FARKLI TANI YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI  
VE  
GENOTİPLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF BLASTOCYSTIS SPP. AMONG INFLAMMATORY BOWEL DISEASE PATIENTS WITH  
DIFFERENT DIAGNOSTIC METHODS AND SUBTYPE ANALYSES

Özden BÜYÜKBABA BORAL\*, Deniz Gözde ÇELİK\*, Raim İLİAZ\*\*, Akın AKGÜL\*,  
Halim İŞSEVER\*\*\*, Filiz AKYÜZ\*\*

ÖZET

**Amaç:** *Blastocystis spp.*; fekal-oral yolla özellikle kötü hijyen koşullarında bulaşan, tüm dünyada yaygın bir protozoonudur. Enfeksiyon asemptomatik seyredebileceği gibi karın ağrısı, kabızlık, bulantı gibi gastrointestinal semptomlara neden olabilmektedir. *Blastocystis spp.*'nin barsakta çeşitli patolojilere neden olabileceği, inflammatuar yanıtı uyatarak İnflammatuar Barsak Hastalıkları (IBH)'nin gelişmesi ile ilişkisi olabileceği öne sürülmektedir.

**Gereç-Yöntem:** Çalışmamıza İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'nda 30 Crohn hastalığı (CH), 30 ülseratif kolit (UK) tanısı alan hasta ve 40 gastrointestinal system hastalığı bulunmayan sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. Bu hastaların dışkı örnekleri tüm parazitler yönünden incelenmiş, mikroskopi, kültür, ELISA ve PCR ile *Blastocystis spp.* varlığı araştırılmıştır. *Blastocystis spp.* saptanan örneklerde subtip dağılımı sekanslama yöntemi ile araştırılmıştır.

**Bulgular:** IBH grubunda mikroskopi ve kültür yöntemleri ile 6 (%10)'sında, kontrol grubunun 2 (%5)'sinde *Blastocystis spp.* varlığı saptanmıştır. ELISA ile *Blastocystis spp.* antijeni IBH grubunun 12 (%20)'sinde, kontrol grubunun 3 (%7,5)'ünde saptanmıştır. *Blastocystis spp.* DNA'sı PCR ile IBH grubunun 8 (%13,3)'inde, kontrol grubunun 6 (15%)'sında bulunmuştur. Gruplar arasında *Blastocystis spp.* varlığı yönünden anlamlı bir sonuç saptanamamıştır. Suptipler arasında ST3 en sık olarak saptanmış, bunlarda en yaygın klinik semptomun karın ağrısı olduğu gözlenmiştir.

**Sonuç:** İki farklı besiyeri kullanılması tanı duyarlılığını arttırmıştır. En duyarlı tanı yöntemi PCR olarak saptanmış, ELISA yöntemi de oldukça yüksek duyarlılık ve özgüllükte sonuç vermiş, mikroskopi ve kültüre alternatif bir yöntem olabileceği gözlenmiştir. Sonuçlarımız subtipler ile klinik bulgular arasında bir bağlantı olduğunu göstermese de konuyu aydınlatmak için çalışmalara ihtiyaç olduğuna işaret etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Blastocystis spp.*; inflammatuar barsak hastalığı; IBH; subtip; klinik semptomlar.

ABSTRACT

**Objective:** *Blastocystis spp.*; is a protozoon that can be seen worldwide. Fecal-oral transmission is the most accepted pathway for *Blastocystis spp.* infection. Most infected patients show no symptoms of infection, however it can cause abdominal pain, acute or chronic diarrhea, vomiting, flatulence and nausea. It is suggested that *Blastocystis spp.* may cause several pathologies in gut causing an inflammatory response that may lead to Inflammatory Bowel Diseases.

**Materials and Methods:** Our study included 60 IBH patients diagnosed as ulcerative colitis (30) and Crohn's Disease (30) in Division of Gastroenterology and 40 healthy controls with no gastrointestinal disease. Stool samples of all patients were examined for presence of any parasites. Presence of *Blastocystis spp.* was evaluated with microscopy, culture with two different media, ELISA and PCR methods. For subtype analyses sequencing was performed.

**Results:** *Blastocystis spp.* was detected in 6 (10%) IBD patients, 2 (5%) in controls. *Blastocystis spp.* antigen detected in 12 (20%) IBD patients and 3 (7.5%) in controls. *Blastocystis spp.* DNA was detected in 8 (13.3%) IBD patients and 6 (15%) controls. No statistical significance was detected between IBD patients and control group in terms of *Blastocystis spp.* positivity. ST3 was the predominant subtype and abdominal pain was the most common clinical symptom.

**Conclusion:** These results suggested that using two different media increases the sensitivity. PCR was the most sensitive method. ELISA results showed high sensitivity and specificity, suggested that ELISA method could be an

Date received/Dergiye geldiği tarih: 30.10.2016 – Date accepted/Dergiye kabul edildiği tarih: 16.03.2017

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, \*Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, \*\* İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenterohepatoloji BD, \*\*\* Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İstanbul, TÜRKİYE.

(Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: obboral@yahoo.com)

alternative to the microscopy and culture. No significant relationship between IBD and *Blastocystis spp.* was determined. Also, no significance was detected between subtypes and clinical symptoms. Although we could not determine a relationship between subtypes and IBD or clinical symptoms, further investigations are needed to clarify this issue.

**Key words:** *Blastocystis spp.*; inflammatory bowel disease; IBD; subtype; clinical symptoms

## GİRİŞ

*Blastocystis spp.*, insan ve birçok hayvan türünde sıklıkla rastlanan, son zamanlarda önemi artan enterik bir protozoondur. Tüm dünyada en sık rastlanmasına karşın patojenitesi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

*Blastocystis spp.*, fekal-oral yol ile, özellikle kötü hijyen koşullarında bulaşmaktadır. Görülme sıklığı dünyanın farklı yerlerinde değişiklik göstermektedir. Brezilya ve Mısır gibi gelişmekte olan ülkelerde (%30-50) Singapur ve Japonya gibi gelişmiş ülkelere (%1,5-10) oranla daha sık görülmektedir (1). Ülkemizde de prevalansı %0.48 ile %59,7 olarak bildirilmiştir (2). Enfekte ettiği canlı gruplarında 17 farklı subtipinin (ST1-ST17) olduğu bildirilmiştir. Çoğu enfeksiyon asemptomatik seyretmektedir. Ancak son yıllarda *Blastocystis spp.* varlığını semptomatik hastalarda bildiren çok sayıda çalışma yapılmış, irritable barsak sendromu gibi gastrointestinal rahatsızlıklar (blastocystosis) ve çeşitli kutanöz lezyonlar ile ilişkilendirilmiştir (3). En sık ishal, karın ağrısı, kramp, kabızlık, bulantı ve gaz semptomlarına neden olduğu bildirilmektedir. AIDS, lösemi gibi immün yetmezlik durumu olan hastalarda semptomlu veya semptomsuz *Blastocystis spp.* enfeksiyonunu bildiren, yine ürtiker gibi alerjik semptomlarla, kolon kanseri ile ilişkisini öne süren çalışmalar da mevcuttur (4,5,6,7).

Ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn Hastalığı (CH) İnflamatuvar Barsak Hastalıkları (İBH) olup çevresel, genetik, immün mekanizmaların ve barsak mikrobiyotasının karmaşık etkileşimi ile gelişebilen rahatsızlıklardır. *Blastocystis spp.* enfeksiyonun değişik tanı yöntemleri kullanılarak İBH, ÜK ve CH hastalarında %71'e varan oranlarda *Blastocystis spp.* varlığı saptanmış ve İBH gelişimini tetikleyen bir unsur olabileceği ileri sürülmüştür (8,9,10,11). *Blastocystis spp.* ile enfekte edilen guinea piglerin barsaklarının mikroskopik incelemesinde, çekum ve kolonda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödematöz lamina propria, *Blastocystis spp.*'nin barsak epiteline penetrasyonu ve epitel içinde anlamlı sayıda parazitin varlığı gösterilmiştir (12). *Blastocystis spp.* ile enfekte farelerin nekroskopilerinde çekum ve kolonda distansiyon saptanmıştır. Çekum ve kolonun histolojik incelenmesinde yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödematöz lamina propria ve mukozal dökülme saptanmıştır. Gastrointestinal semptomlar ile birlikte lökositlerdeki değişimler ve inflamasyonun başlamasıyla birlikte *Blastocystis spp.*, intestinal epitel hücrelerinden inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını uyarmaktadır. *Blastocystis spp.*'in kolon epitel

hücrelerinden IL-8 ve GM-CSF'nin salgılanmasını uyardığı gözlemlenmiştir. *Blastocystis spp.*'nin, barsak epitel hücrelerinden inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını uyarak akut inflamasyona neden olması, İBH için tetikleyici bir unsur olmaktadır (13).

Bugüne kadar insanlarda *Blastocystis spp.*'in 9 subtipi saptanmıştır. Bu subtipler arasında sıklıkla görülen tipin ST3 olduğu ve bunu sırasıyla ST1, ST2, ST4, ST7, ST6, ST8, ST5, ST9'un izlediği bildirilmiştir<sup>14</sup>. Ayrıca *Blastocystis spp.* subtiplerinin dağılımının incelendiği yayınlarda İBH'nda ST1'in sıklıkla bulunduğu, bunu ST4 ile ST2'nin takip ettiği bildirilmiştir. Sağlıklı bireylerde ise ST5 ve ST3'ün sıklıkla bulunduğu gösterilmiştir (11).

Bu çalışmada İBH tanısı alan hastalarda *Blastocystis spp.* varlığının mikroskopi ve kültür ile, *Blastocystis spp.* antijeni varlığı ELISA yöntemi ile ve *Blastocystis spp.* DNA'sının varlığı ise PCR yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla 30 ÜK ve 30 CH tanısı alan hasta ile 40 gastrointestinal sistem hastalığı olmayan sağlıklı kontrol grubuna ait dışkı örneği toplanmıştır. *Blastocystis spp.* varlığı saptanan örneklerde sekanslama ile subtip dağılımı saptanmış ve bu subtipler ile klinik bulgular arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır.

## GEREÇ - YÖNTEM

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.B.D Gastroenteroloji Bölümü'nde CH ve ÜK tanısı alan hastalardan ve hiçbir şikayeti olmayan sağlıklı bireylerden alınan dışkı örnekleri formol etil asetat çöktürme yöntemi uygulanarak mikroskobik olarak ve ayrıca örneklerden hazırlanan preparatlar trikrom boyama yöntemi ile boyanarak incelenmiştir. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No:43523). Çalışma için gerekli etik kurul onayı İstanbul Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Proje No: 2014/184). Örnekler *Blastocystis spp.* üretilmesi için Jones' Medium ve RPMI-Serum-Antibiyotik (RAS) içerikli besiyeri olmak üzere iki farklı besiyerine ekilmiştir. Ayrıca örneklerden *Blastocystis spp.* antijeni ELISA yöntemi ile ve *Blastocystis spp.* DNA'sı ise PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Jones' besiyeri %1 Maya Özeti fosfat tampon solüsyonu (PBS) içinde çözülerek otoklavlanmıştır. Daha sonra içine standart tarifteki at serumu yerine %20 inaktive newborn calf serum (Sigma-Aldrich Co., St. Louis,USA) eklenmiştir. Besiyeri, Zaman ve arkadaşlarının (20) çalışmalarında parazitin daha iyi ürediğini belirtmelerinden yola çıkılarak nişasta ilavesi olmadan hazırlanmıştır (21). İkinci bir besiyeri olan RAS besiyeri; 100ml RPMI-

1640 (filtrasyon ile steril edilerek) içine tariften farklı olarak Fetal Bovine Serumunu yerine 5ml newborn calf serum (Sigma-Aldrich Co., St. Louis,USA) ve 1ml antibiyotik (Penisilin-Streptomisin karışımı) olacak şekilde eklenmiştir. Her iki besiyeride 4'er ml olacak şekilde kapaklı tüplere dağıtılarak 4 °C'de saklanmıştır (22).

Besiyerleri 37 °C'de anaerob ortamda inkübe edilmiş, 3. gün üremesi mikroskopi ile değerlendirilerek üremeyen örnekler 1 haftaya kadar inkübe edilmeye devam edilmiştir.

Ayrıca bu dışkı örneklerinde *Blastocystis spp.* antijen varlığı ELISA kiti ile (Abnova, GmBh Germany) araştırılmıştır. Deneyler kit test prosedürüne uygun olarak yapılmıştır.

PCR yönteminde ve genotiplerin belirlenmesi amacı ile yapılan dizileme işleminde, daha yoğun üremenin gözlemlendiği besiyeri seçilerek besiyerinden, besiyerinde üreme görülmeyen örneklerden ise dışkıdan direkt DNA izolasyonu yapılmıştır (23). Bu amaçla dışkı DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen,Germany) prosedürüne uygun olarak kullanılmıştır.

PCR işleminde ekstraksiyonlardan DNA'nın çoğaltılması amacı ile BioRad T100 Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. Bu aşamada kullanılan koşullar ve primerler Böhm-Gloning ve arkadaşlarının çalışmaları referans alınarak yapılmıştır (24).

*Blastocystis spp.* tiplendirme çalışması için sekanslama metodu kullanılmıştır. *Blastocystis spp.* primeri olarak adlandırılan ve organizmanın small subunit ribozomal DNA'sındaki (ssu rDNA) ~500 bazlık korunmuş bölgeyi çoğaltan primer çifti ile amplikon PCR ile çoğaltılmıştır Santin ve ark<sup>25</sup>'in çalışmasında belirtilen primerler ticari olarak temin edilmiştir. Bu amplikona öncelikle Exo 1-SAP enzimleri kullanılarak clean-up, ardından ABI BigDye Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit, (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak Genetic Analyzer 3130xl'' (Applied Biosystems, CA,USA) cihazı ile sekanslama işlemi uygulanmıştır. Dizileme işlemi tamamlanan örnekler "Sequencing Analysis 5.3.1" yazılımı ile analiz edilmiştir. Dizi sonuçları "NCBI Blast" veri tabanından Megablast kullanılarak subtipler analiz edilmiştir.

## **BULGULAR**

ÜK ve CH'larından toplanan toplam 60 dışkı örneğinde mikroskopi ile 6 (%10) hastada *Blastocystis spp.* saptanmıştır. 30 adet ÜK hastasından toplanan dışkı örneklerinin 4 tanesinde (%13,3), 30 CH ait örneklerden ise 2 (%6,6) tanesinde *Blastocystis spp.* varlığı gözlemlenmiştir. Pozitif ÜK örneklerinin 2 tanesi her iki besiyerinde de bol miktarda üretilirken, diğer iki hastaya ait örneklerde Jones' besiyerinde RAS besiyerine oranla daha bol miktarda üreme gözlemlenmiştir. CH grubunda ait pozitif iki örnekten ise bir tanesi Jones' mediumunda ürememiş, RAS besiyerinde üremiş, diğer pozitif örnek ise her iki besiyerinde de üremiş ancak Jones' besiyerinde daha seyrek üremiştir. Örneklerde başka parazite rastlanmamıştır.

Sağlıklı kontrol grubu örneklerinde ise 40 örnekten mikroskopi ile 2 örnekte (%5) *Blastocystis spp.*

saptanmış, her iki örnek iki besiyerinde de üremiş fakat biri Jones' besiyerinde daha yoğun olarak üremiştir.

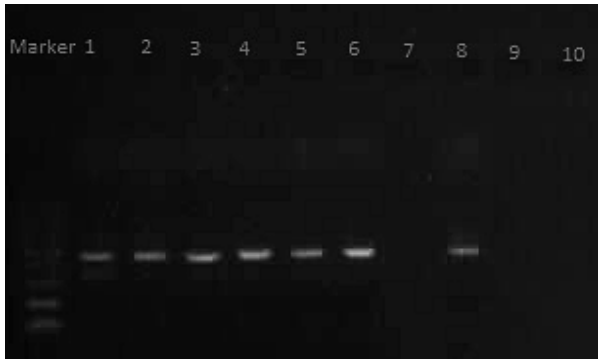
ELISA ile İBH grubunda 12 (20%) hastada *Blastocystis spp.* antijeni saptanmıştır Bunlardan 7 (%23,3)'si ÜK, 5 (% 16,6)'i CH grubuna ait hastalardır. Kontrol grubunda ise 3 (7.5%) hastada *Blastocystis spp.* antijeni pozitif saptanmıştır.

ÜK hastalarının yaş ortalaması 47± 15 ve CD hastalarının ise 43±14 olarak saptanmıştır (p=0.31). Cinsiyet dağılımı ise ÜK için %50 (n=11) erkek, CH için ise %40 (n=12) erkektir (p=0.44). Hastalara ait ortalama CRP, ESR ve albumin değerleri ÜK ve CH grupları için benzer olarak saptanmıştır (sırasıyla p=0.71, p= 0.40 ve p=0.68). ÜK grubunda 9 (%31), CH grubunda ise 10 (%35.7) hasta klinik olarak aktifti (p=0.71). Anti-TNF tedavisi alan ÜK hastaları 7 (%24.1), CH hastaları 3 (%10.7), azathioprin tedavisi alan ÜK hastaları ise CH grubunda daha fazladır (%73.1 vs %34.5, p=0.004). ÜK grubunda hastalığın lokasyonunun dağılımı şu şekilde saptanmıştır; %48.8 (n=12) proktosigmoidit, %31 (n=9) pankolit. CH grubunda ise; %59.3 (n=16) ileokolonik yayılım ve %29.6 (n=8) ileal yayılım gözlemlenmiştir.

Her ne kadar çalışmamızda *Blastocystis spp.* çalışma grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı sıklıkta görülmemiş olsa da ÜK grubunda hiçbir hastada aktif hastalık gözlemlenmemiş olması, CH grubunda ise tek bir hastanın aktif olması, hiçbir hastanın anti-TNF ve azathioprin tedavisi almıyor olması, ÜK grubundaki 4 *Blastocystis spp.* pozitif hastada sol kolon yayılımı, 1 hastada proktit ve 1 hastada genel yayılım, CH grubunda ise iki hastada da ileokolonik yayılım görülmesi dikkat çekicidir.

PCR ile hasta grubu örneklerinden 8 tanesinde (%13,3) *Blastocystis spp.* DNA'sı saptanırken bunlardan 6 (%20)'si ÜK, 2 (%6,6)'si ise CH grubuna ait örneklerdir. ÜK hastalarından pozitif saptanan 2 örnekte diğer yöntemler ile *Blastocystis spp.* varlığı saptanamamıştır. Kontrol grubu örneklerinin ise 6 (%15)'sında *Blastocystis spp.* DNA'sı varlığı gözlemlenmiştir. Two-tailed Fishers' exact test ile *Blastocystis spp.* enfeksiyonu ile İBH arasında CH-ÜK, ÜK-kontrol, CH-kontrol gruplarından hiçbiri arasında anlamlı bir sonuç saptanamamıştır (sırasıyla; p=0.05, p=0.75, p=0.45) Mikroskopi ve kültür ile *Blastocystis spp.* varlığı saptanan örneklerin tümü ELISA ve PCR yöntemleri ile pozitif saptanırken, ELISA veya PCR ile pozitif saptanan örneklerden (Şekil 1) bir kısmı mikroskopi ve kültürle negatif olarak gözlemlenmiştir (Tablo 1,2). \*\*Burada belirtildiği üzere kültür ve mikroskopi ile *Blastocystis* varlığı saptanamayan bazı örneklerde PCR ile parazitin varlığı saptanmıştır. Bu durum PCR'in duyarlılığının yüksek olduğu olarak yorumlanmıştır.

ELISA yönteminin kültür yöntemi altın standart olarak alındığında duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %92,39, PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde ise duyarlılığı %85,7 ve özgüllüğü %93,02 olarak saptanmıştır.



Şekil 1: Çalışma grubuna ait bazı pozitif örneklerin PCR sonuçları

Tablo 1: Mikroskopi ve kültür sonuçlarının ELISA sonuçları ile karşılaştırılması

n=100	Mikroskopi- Kültür (+)	Mikroskopi- Kültür (-)
ELISA (+)	8	7
ELISA (-)	0	85
PCR (+)	8	6
PCR (-)	0	86

Tablo 2: ELISA sonuçlarının PCR sonuçları ile karşılaştırılması

n=100	ELISA (+)	ELISA (-)
PCR (+)	12	2
PCR (-)	6	80

Tablo 3: *Blastocystis spp.* DNA'sı saptanan İBH hast klinik bulguları ve subtip dağılımı.

Hasta no	İBH	Subtip	Klinik bulgular
1	ÜK	ST3	Karın ağrısı, Gaz
2	ÜK	ST3	Karın ağrısı
3	ÜK	ST3	Karın ağrısı
4	ÜK	ST3	Asemptomatik
5	ÜK	ST1	Karın ağrısı
6	ÜK	ST2	Asemptomatik
7	CH	ST3	Karın ağrısı
8	CH	ST3	Asemptomatik

PCR yöntemi ile *Blastocystis spp.* DNA'sı saptanan örnekler dizileme yapılmıştır. Bunun sonucunda ÜK grubuna ait örneklerden 4 tanesi ST3, 1'er tanesi ST1 ve ST2, CH grubuna ait 2 örnek ise ST3 olarak saptanmıştır. Kontrol grubu örneklerinin ise 5 tanesi ST3, 1 tanesi ST1 olarak saptanmıştır. Bu hastalarda en sık görülen şikayet karın ağrısıdır, ancak asemptomatik

hastalarda bulunmaktadır. Hasta grubuna ait örnekler, subtip dağılımı ve klinik bulgular Tablo 3'te gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

*Blastocystis spp.* dünyada oldukça yaygın görülen bir parazittir. Prevalansı değişik ülkelerde değişmekte olup, gelişmekte olan ülkelerde düşük hijyenik koşullar ve hayvanlarla yakın temasa bağlı olarak daha yüksek oranda gözlenmektedir. Ancak görülme sıklığı ülke içinde farklı bölgelerde de değişebilmektedir ve bu değişik oranlar farklı sosyoekonomik koşullara bağlı olabileceği gibi farklı duyarlılığa sahip tanı yöntemlerinin kullanılmasına da bağlanabilmektedir. Rutin incelemede en yaygın olarak mikroskopi yöntemi kullanılmaktadır. Boyalı preparasyon ve kültür metodlarına da sıklıkla başvurulmaktadır. Subunit (ssu) ribozomal RNA genlerinin saptanmasına yönelik PCR metodları da yüksek duyarlılığa sahip olmaları ile son yıllarda özellikle araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (26).

Çalışmamızda toplam 60 ÜK ve CH'ndan oluşan hasta grubunun mikroskopi ile 6 (%10)'sında *Blastocystis spp.* görülürken 40 kontrol grubu örneğinin 2 (%5)'sinde *Blastocystis spp.* görülmüştür. Çalışmamızda, kültür yönteminin mikroskopi yönteminden üstün olduğunu ileri süren Zaman ve arkadaşlarının 1994'te iki akselik kültür sistemi (modifiye Boeck & Drbohlav's medium ve tripton, yeast extract, glukoz, methionine-9 medium) kullandıkları çalışmanın aksine kültür yöntemi ile mikroskopi sonuçları paralellik göstermiştir (27). Kukoschke ve arkadaşları (28) ise besince zengin bir besiyeri kullandıkları çalışmada bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak kültür ve mikroskopi sonuçlarını benzer saptamışlardır (29). Pek çok çalışma *Blastocystis spp.* kültürü için Jones' besiyerini başarılı ve yüksek duyarlılığa sahip olarak önermektedir (30,31). Çalışmamızda bazı örnekler her iki besiyerinde de başarılı şekilde ürerken bir örnek Jones' besiyerinde üremezken, RAS besiyerinde üremiştir. bazı örnekler ise bir besiyerinde diğerine oranla daha yoğun üremiştir. Popruk ve arkadaşları (1) çalışmalarında bir subtipin üremesinin diğer bir subtipin üremesini baskılayabileceğini belirtmişlerse de bizim çalışmamızda birden çok subtipin birlikte olduğu bir örnek saptanamamıştır. Sonuçlarımız aynı subtiplerin farklı üreme yetenekleri olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda ELISA yöntemi ile mikroskopi-kültür yöntemlerine oranla daha yüksek pozitiflik saptanmıştır. ELISA yönteminin kültür yöntemi altın standart olarak alındığında duyarlılığı 100% ve özgüllüğü 92,39%, PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde ise duyarlılığı 85,7% ve özgüllüğü 93,02% olarak saptanmıştır. Başka bir ELISA kitinin (CoproELISATM Blastocystis, Savyon Diagnostics) kullanıldığı, ELISA sonuçlarının kültür veya İndirekt Floresan Antikor test sonuçları ile kıyaslandığı bir çalışmada ELISA'nın duyarlılığının %92, özgüllüğünün ise %87 olduğu bildirilmiştir. Bu oranlar çalışmamızdaki bulgularla paralellik göstermiştir (32).

PCR ile. ÜK hastalarından pozitif saptanan 2 örnekte diğer yöntemler ile *Blastocystis spp* varlığı saptanamamıştır. Kontrol grubu örneklerinin ise 6 (%15)'sında *Blastocystis spp.* DNA'sı varlığı gözlenmiştir. Mikroskopi ve kültür ile *Blastocystis spp* varlığı saptanan örneklerin tümü ELISA ve PCR yöntemleri ile pozitif saptanırken, ELISA veya PCR ile pozitif saptanan örneklerden bir kısmı mikroskopi ve kültürde negatif olarak gözlemlenmiştir. Kültür yönteminin PCR'a göre üstün olduğunu belirten çalışmaların yanı sıra PCR yöntemini üstün bulan çalışmalar da mevcuttur (26,33). Bizim çalışmamız PCR yönteminin kültür ve mikroskopiye oranla daha duyarlı olduğunu göstermiştir.

İnflamatuvar barsak hastalıklarından ÜK ve CH çevresel, genetik ve immun mekanizmaların karmaşık etkileşimi ile gelişebilen rahatsızlıklardır. Altta yatan genetik faktörlerin yanı sıra pek çok çalışma ile kommensal bakterilere karşı mukozal immun yanıtın disfonksiyonunun İBH ve özellikle CH patogeneğinde rolü olabileceği öne sürülmektedir. Bir patojenle enfeksiyon veya defektif mukozal bariyere bağlı olarak gelişen kronik inflamatuvar yanıt tetikleyici olabilmektedir. Karakteristik inflamatuvar yanıt nötrofil veya makrofaj infiltrasyonu ile başlar, sitokin ve kemokin salınımı gerçekleşir (34). *Blastocystis spp.*'nin İBH'ye yol açtığını ileri süren çalışmaların yanı sıra hayvan modellerinde *Blastocystis spp.*'nin oluşturduğu immun yanıt ve parazitin barsak epitel hücrelerine penetrasyonunu gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (12). İnflamatuvar hücre infiltrasyonu ve lökositlerdeki değişiklikler ile *Blastocystis spp.* kolon epitel hücrelerinden interlökin (IL)-8 ve granulosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarır. Bu inflamatuvar süreç İBH'nın oluşumu için tetikleyici olabilmektedir (13). İBH hastalarından kolonik biyopsiler alınarak yapılan bir çalışmada bu hastalardaki gastrointestinal semptomların serin proteaz aktivitesine bağlı olarak oluştuğu bildirilmiştir (35). Serin proteazların yüksek düzeyleri karın ağrılarına, kas kısılmalarına neden olmaktadır ve bu yüksek düzey serin proteaz aktivitesi viral ve bakteriyel enteritlerde görülmemektedir (36). *Blastocystis spp.*'nin 22 adet proteaz salgıladığı tahmin edilmektedir ve bunlar 20 sistein proteaz, 1 serin proteaz, 1 aspartik proteaz olarak karakterize edilmektedir (35). Sistein proteaz aktivitesinin IgA degradasyonuna neden olarak parazitin in vivo yaşamasına olanak sağladığı düşünülmektedir<sup>37</sup>. Enterik anti- *Blastocystis* IgA'nın yüksek düzeyde salgılanmasının tüm semptomatik hastalarda görüldüğü fakat asemptomatik hastalarda saptanmadığı belirtilmiştir (38). Bu durum hastalığın gelişiminde parazitin konağa saldırmasından çok konağın parazite saldırmasının etkili olması ve parazitin savunma mekanizmasının hastalığı oluşturmaya bağlanmıştır (39).

Çalışmamızda *Blastocystis spp.* varlığı yönünden CH-ÜK, ÜK-kontrol, CH-kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Bu bulgular Peterson ve arkadaşlarının (40) 42 CH ve 41 ÜK hastaları ve 96 kontrol içeren çalışmaları ile

benzerdir. Araştırmacılar *Blastocystis spp.*'nin bu hastalarda saptanamamasını bu hastalarda kolonizasyon için uygun ortamın olmamasına bağlamış ve uygun olmayan koşulların mikrobiyotadaki değişimleri yansıtmadığını ve/veya bu durumun konak immunitesi ile ilişkili olup olmadığını anlaması için daha ileri araştırmaların gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Rossen ve arkadaşları (41) *Blastocystis spp.* varlığını triple feces test (TFT) kullanarak sağlıklı bireylerde 40/123 (%32.5), ÜK hastalarında 6/45 (%13.3) oranında saptamıştır. Diğer yandan İBH ile *Blastocystis spp.* arasında anlamlı ilişki saptayan çalışmalar da mevcuttur. Çekin ve arkadaşları (42) İBH grubunda, özellikle ÜK hastalarında kontrollere oranla oldukça anlamlı *Blastocystis spp.* pozitifliği saptamış (sırasıyla; p=0.019, p=0.016), CH grubunda anlamlı sonuç bulamamışlardır. Yamamoto ve arkadaşları (43) Meksikalı CH hastaları arasında *Blastocystis spp.* prevalansını %10 oranında saptamıştır fakat bu çalışmaya kontrol grubu dahil edilmemiştir. Başka bir çalışmada 6 semptomatik ÜK hastasında dışkıının mikroskobik incelemesi sonucu *Blastocystis spp.* varlığı saptanmış ve 14 günlük metronidazol tedavisi sonucu tamamen iyileşme gözlenmiştir (44).

Çalışmamızda PCR yöntemi ile *Blastocystis spp.* DNA'sı saptanan örneklere dizileme yapılmıştır. Bunun sonucunda ÜK grubuna ait örneklerden 4 tanesi ST3, 1'er tanesi ST1 ve ST2, CH grubuna ait 2 örnek ise ST3 olarak saptanmıştır. Kontrol grubu örneklerinin ise 5 tanesi ST3, 1 tanesi ST1 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda subtipler ile klinik semptomlar arasında anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Dogruman ve arkadaşları (45) *Blastocystis spp.* ST3 ve ST2'yi kronik diyare, İBS ve İBH hastalarında yaygın olarak saptamışlardır. Bizim sonuçlarımıza paralel olarak subtipler ile semptomlar arasında bir ilişki saptayamamışlar, bu durumu semptomların ortaya çıkmasında konak faktörlerinin kuvvetli rol oynamasına bağlamışlardır. Bu konuyu açıklamak için daha yüksek sayıda hastalarda *Blastocystis spp.* subtipleri dağılımı konağın immun durumunda araştırıldığı çalışmalara gereklilik vardır.

Sonuç olarak çalışmamızda *Blastocystis spp.* tanısı amacı ile kullanılan değişik tanı yöntemleri kıyaslandığında mikroskobik yöntem ile iki farklı besiyeri ile uygulanan kültür yöntemi sonuçları paralellik göstermiştir. İki farklı besiyerinin kullanılması tanı duyarlılığını arttırmıştır. ELISA yöntemi bu yöntemler ile kıyaslandığında yüksek oranda özgüllük ve duyarlılık göstermiştir. Fakat PCR yöntemi altın standart olarak değerlendirildiğinde ELISA yöntemi duyarlılığı daha düşük olarak saptanmıştır. *Blastocystis spp.* ve barsak patolojileri üzerine yapılan çalışmalar parazitin barsak homeostazını bozarak patolojilere yol açtığını destekler niteliktedir. Her ne kadar çalışmamızda ÜK ve CH gruplarında kontrol grubuna göre *Blastocystis spp.* varlığı yönünden anlamlı bir ilişki saptanamamış olsa da bu konu üzerinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamızda semptomatik ve asemptomatik hastalarda en sık ST3 saptanmış olup ülkemizde yapılan çalışmalar ile bu sonuçlar örtüşmektedir. Bizim sonuçlarımız

subtipler ile klinik bulgular arasında bir bağlantı olduğunu göstermemesine rağmen, konuyu aydınlatmak için *Blastocystis spp.* subtiplerinin klinik ile ilişkisini açıklamaya yönelik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

### TEŞEKKÜR

Desteklerinden dolayı İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No:43523)'ne ve çalışmamızda kullanılan sekanslama metodundaki yardımlarından dolayı Fullgen Biyoteknoloji'ye teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

1. Popruk P, Pintong A, Radomyos P. Diversity of *Blastocystis* subtypes in humans. *J Trop Med Parasitol* 2013; 36:88-97.
2. Dağcı.H: *Blastocystis*: Türkiye'deki Son Gelişmeler. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi Kitapçığı, 29 Eylül - 5 Ekim 2013, Denizli, 2013;30-4.
3. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, El-Alaoui H. *Blastocystis*, an unrecognized parasite:an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis* 2013; 1:167-78.
4. Koltas IS, Özcan K, Tanriverdi S, Paydas S, Paydas S, Baslamisli F. The prevalence of *Blastocystis hominis* in immunosuppressed patients. *Ann Med Sci* 1999; 8:117- 9.
5. Tasova Y., Sahin B., Koltas S., Paydas S.: Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. *Acta Med Okayama* 2000; 54:133-6.
6. Zoglool DAM., Khodari YAW., Frooq MU.: *Blastocystis hominis* and allergic skin diseases; a single center experience. *Journal Of Health Sciences* 2012; 2 : 66
7. Horiki N, Kaneda Y, Maruyama M, Fujita Y, Tachibana H. Intestinal blockage by carcinoma and *Blastocystis hominis* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:400-2.
8. Yakoob J., Jafri W., Jafri N., Khan R., Islam M., Beg MA., Zaman V.: Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70: 383-5.
9. Nagler J.,Brown M., Soave R.: *Blastocystis hominis* in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1992; 16:109-12.
10. Giacometti A., Cirioni O., Fiorentini A., Fortuna M., Scalise G.: Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:436-9.
11. Yakoob J., Jafri W., Beg MA., Abbas Z., Naz S., Islam M., Khan R.: Irritable Bowl Sendrome: It is associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2010; 106:1033-8.
12. Phillips BP, Zierdt CH.: *Blastocystis hominis*: Pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics. *Exp Parasitol* 1976;39: 358-64.
13. Long HY., Handschack A., Konig W., Ambrosch A.: *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitol Res* 2001; 87:1029-30.
14. Alfellani MA, Mulla DT, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* 2013;164:497-509.
15. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho L.C, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 348-55.
16. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis spp.* *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:639-65.
17. Scanlan PD, Marchesi JR. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: quantitative assessment using culture-dependent and independent analysis of faeces. *ISME J* 2008; 2:1183-93
18. Dominguez-Marquez M, Guna R, Munoz C, Gomez-Munoz M, Borrás R. High prevalence of subtip 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of health district of Valencia (Spain). *Parasitol Res* 2009; 105:949-55.
19. Stensvold C, Christiansen D, Olsen K, Nielsen H. *Blastocystis sp.* subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84:883-5.
20. Zaman V, Ng GC, Suresh K, Yap EH, Singh M. Isolation of *Blastocystis* from the cockroach (*Dictyoptera, Blattellidae*). *Parasitol Res* 1993;79:73-4.
21. Jones, WR. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1946; 40: 130-40.
22. Grecu (Mătiut) DS, Neagu AN, Hărmanescu EA, Moglan I, In vitro division modalities developed by *Blastocystis hominis* examined with the acridine orange stain. *Analele Stiintifice ale Universității Alexandru Ioan Cuza" din Iași, s. Biologie animală, Tom LIX* 2013;13-8
23. Stensvold CR. Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *J. Clin. Microbiol* 2013, 51: 190-4.
24. Böhm-Gloning B, Knobloch J, Walderich B. Five subgroups of *Blastocystis hominis* isolates from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Trop Med In Health* 1997;2 (8):771-8.
25. Santín M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis spp.* from humans and animals. *Parasitol Res.* 2011;109(1):205-12.
26. Roberts T, Barrat 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; 84:308-12.

27. Zaman V, Khan KZ. A comparison of direct microscopy with culture for the diagnosis of *Blastocystis hominis*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1994; 25:792-3.
28. Kukoschke KG, Necker A, Muller HE. Detection of *Blastocystis hominis* by direct microscopy and culture. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9:305-7.
29. Boeck, W. C., and J. Drbohlav. The cultivation of *Endamoeba histolytica*. Am. J. Hyg 1925; 5:371-407.
30. Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M. In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. Ann Trop Med Parasitol 2002; 96:803-7.
31. 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;59:303-7.
32. Dogruman-AI F, Turk S, Adiyaman-Korkmaz G, Hananel A, Levi L, Kopelowitz J, et al. A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens. Parasitol Res 2015; 114:495-500.
33. Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, Thathaisong U, Nimmanon T, Taamasri P, Mungthin M. The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. Parasitol Res 2004; 93: 445 - 7.
34. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. Inflamm Bowel Dis 2006;1:3-9.
35. Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnet NW, Sharkey KA, Ferraz JG, Shaffer E, Vergnolle N. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. J Clin Invest 2007; 117: 636-47.
36. Gecse K, Roka R, Ferrier R, Leveque M, Eutamene H, Cartier C, Ait-Belgnaoui A, Rosztoczy A, Izbeki F, Fiamonti J, Wittmann T, Bueno L. Increased fecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity 2008;57:591-9.
37. Puthia M., Vaithilingam A., Lu J., Tan K. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. Parasitol Res 2005;97:386-9.
38. Mahmoud MS, Saleh WA. Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections. J Egypt Soc Parasitol. 2003; 33:13-30.
39. Markell EK, Udkow MP. *Blastocystis hominis*: pathogen or fellow traveler?. Am Trop Med Hyg 1986; 35:1023-26.
40. Petersen AM, Stensvold CR, Mirsepasi H, Engberg J, Friis-Møller A, Porsbo LJ, Hammerum AM, Nordgaard-Lassen I, Nielsen HV, Krogfelt KA. Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. Scand J Gastroenterol 2013; 48:638-9.
41. Rossen NG, Bart A, Verhaar N, van Nood E, Kootte R, de Groot PF, D'Haens GR, Ponsioen CY, van Gool T. Low prevalence of *Blastocystis* sp. in active ulcerative colitis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34:1039-44.
42. Cekin AH, Cekin Y, Adakan Y, Tasdemir E, Koclar FG, Yolcular BO. *Blastocystosis* in patients with gastrointestinal symptoms: a case-control study. BMC Gastroenterol 2012; 12:122.
43. Yamamoto-Furusho JK, Torijano-Carrera E. Intestinal protozoa infections among patients with ulcerative colitis: prevalence and impact on clinical disease course. Digestion 2010;82:18-23.
44. Tai WP, Hu PJ, Wu J, Lin XC: Six ulcerative colitis patients with refractory symptoms co-infective with *Blastocystis hominis* in China. Parasitol Res 2011;108:1207-10.
45. Dogruman-AI F, Kustimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Simsek Z, Tanyuksel M, et al. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2009;104:724-7.