

Akut İshali olan ve Olmayan Çocuklarda Farklı Tanı Yöntemleriyle Blastocystis Spp. Tanımlanması

Detection of Blastocystis Spp. Infection Using Different Investigation Techniques in Children With or Without Acute Diarrhea

¹Nihal Doğan, ¹Nazmiye Ülkü Tüzemen, ²Ener Çağrı Dinleyici

¹Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskisehir, Türkiye
²Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Eskisehir, Türkiye

Özet: Blastocystis türleri, günümüzde gelişmekte olan ülkelerde en yaygın görülen gastrointestinal sistem parazitlerindedir. Tanısında çoğunlukla nativ-lugol ve trikrom boyama gibi mikroskopik yöntemler kullanılmakta olup, kültür ve moleküler yöntemler daha ziyade araştırma amacıyla tercih edilmektedir. Bu çalışmada; Eskisehir ilinde 0-12 yaş arası akut ishali olan ve olmayan çocuklarda Blastocystis spp. varlığı ve tanıda kullanılan yöntemlerin başarısı karşılaştırılmıştır. Akut ishal şikayeti ile iki farklı hastanenin acil servisine başvuran çocuklar ile ishal şikayeti olmayan yedi farklı sosyoekonomik düzeydeki ilköğretim okuluna giden çocuklardan alınan dışkı örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Örnekler Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Araştırma Hastanesi parazitoloji laboratuvarında rutin dışkı inceleme yöntemlerinin yanısıra, trikrom boyama ve Real time PCR yöntemiyle Blastocystis varlığı araştırılmıştır. Çalışma Eskisehir Osmangazi Üniversitesi etik kurulunca onaylanmış olup, Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir. Toplamda 303 dışkı örneği çalışmaya dahil edilmiş olup, bunlardan 84'ü akut ishali olan çocuklardan alınmıştır. Blastocystis spp. görülme oranları kullanılan testlere göre sırasıyla; direkt mikroskopi yöntemiyle %38, Trikrom boyama yöntemiyle %35 ve moleküler yöntemle %38 olarak saptanmıştır. Akut ishal şikayeti ile başvuran 84 olguda bu oranlar sırasıyla; %13, %18 ve %18 olarak saptanmıştır. Akut ishali grupta PCR yöntemi referans alınarak yöntemler karşılaştırıldığında; direkt mikroskopi yönteminin duyarlılığı %65, özgüllüğü %78, trikrom yönteminin duyarlılığı %55, özgüllüğü %77, PCR yönteminin duyarlılığı %80, özgüllüğü %84 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak moleküler yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü ishali olgularda daha güvenilir sonuçlar için tercih edilebilir, ancak çok merkezli ve geniş kapsamlı klinik çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Blastocystis, ishal, çocuk, mikroskopik inceleme, moleküler tanı.

Doğan N, Tüzemen NÜ, Dinleyici EÇ. 2018, Akut İshali Olan ve Olmayan Çocuklarda Farklı Tanı Yöntemleriyle Blastocystis Spp. Tanımlanması, *Osmangazi Journal of Medicine*, 40 (2):13-17 **Doi:** 10.20515/otd.408450

Abstract: Blastocystis species are the most common gastrointestinal system parasites. Microscopic methods such as native-lugol and trichrome staining are mostly used for diagnosis and culture and molecular methods are preferred for research purposes. In this study, we aim to evaluate the prevalence of Blastocystis spp. In 0-12 age's children in Eskisehir, Turkey, with or without acute diarrhoea, using direct microscopy, trichrome stain and real-time polymerase chain reaction (PCR) technique. Children were admitted to the emergency unit with acute diarrhoea and school children without diarrhoea from seven different socioeconomic backgrounds have been enrolled. Stool specimens were investigated by routine faecal examinations in the Parasitology laboratory of Eskisehir Osmangazi University Education and Research Hospital. The study was approved by the Local Ethical Committee of the Eskisehir Osmangazi University and has been founded by Eskisehir Osmangazi University Research Project. The children were included after informed consent was given by their parents. Totally, 303 samples have been evaluated with these three methods, and 84 out of these samples have been obtained from children had acute watery diarrhoea. Blastocystis spp. cysts was seen in 38% of samples with direct microscopic examination while cysts were seen in 35% of samples by the trichrome stain and were 38% by PCR method. In the acute diarrhoea group, Blastocystis spp. cysts have been with these three methods respectively: 13%, 18% and 18%. When methods are compared with reference to PCR method in acute diarrhoea group; for direct microscopic evaluation the sensitivity was 65% and the specificity was 78%, while for trichrome staining 55% and 77%, the specify of PCR was 80.5% and sensitivity 83.8 the respectively. As a result, molecular methods can be preferred for more specific results in diarrheic cases, but there is a need for multicenter and also extensive clinical trials.

Key Words: Blastocystis, diarrhoea, children, microscopic examination, molecular diagnosis.

Dogan N, Tuzemen NU, Dinleyici EC. 2018, Detection of Blastocystis Spp. Infection Using Different Investigation Techniques in Children with or Without Acute Diarrhea, *Osmangazi Tıp Dergisi*, 40 (2):13-17 **Doi:** 10.20515/otd.408450

1. Giriş

İntestinal enfeksiyonlar tüm dünyada yaygın olarak görülmekle birlikte özellikle gelişmekte olan ülkelerde daha sık görülür. Sanitasyon ve hijyen koşullarının iyi olmadığı bölgelerde insan ve/veya hayvan dışkılarıyla kontamine olmuş su ve yiyeceklerle fekal-oral yolla bulaşır¹. *Blastocystis*, tüm dünyada insan ve hayvanlarda bulunabilen kolon yerleşimli anaerobik bir protozoonudur. Dışkı örneklerinde en sık rastlanan protozoon olarak bildirilen *Blastocystis*, kozmopolit bir dağılım göstermektedir². *Blastocystis* spp. prevelansı gelişmiş ülkelerde %1,5-10, gelişmekte olan ülkelerde %30-60 arasında değişmektedir¹⁻³. Zorunlu anaerob olup nötral pH'da 37°C'de üremektedir⁴. Bilinen formları vakuolar, granular, multivakuolar, ameboid ve kistik formlardır³. Hastalar asemptomatik olabileceği gibi abdominal rahatsızlık, ishal, yorgunluk, kusma ve anoreksi gibi semptomlarla da gelebilmektedir. Ürtiker ve şiddetli kaşıntı gibi dermatolojik şikayetlerde sıklıkla bildirilmektedir⁵. Birçok çalışma X40 büyütmede her alanda 5 ya da daha fazla mikroorganizma görüldüğünde raporlanması gerektiğini belirtmekle birlikte, günümüzde farklı patojen suşlar olabileceği ve parazitin günlük atılımında farklılıklar olabileceği düşüncesiyle kabul görmemektedir. Genetik ve moleküler çalışmalarla 17 alt tipi belirlenen protozoonun en az 9 tanesinin insanda patojen olabileceği saptanmıştır. Tanıda; direkt mikroskopi, kültür ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır⁶⁻⁸.

Bu çalışmada; Eskişehir ilinde ishal şikayeti olan ve olmayan çocuklarda *Blastocystis* sp. prevelansını saptamak ve tanıda kullanılan direkt mikroskopi, trikrom boyama ve real time PCR yöntemlerini birbirleriyle karşılaştırarak kolay ve güvenilir bir yöntem tanımlamayı planladık.

2. Gereç ve Yöntem

Çalışmamızın ilk aşamasında; öncelikle gerekli izinler alınarak farklı bölge ilköğretim okulları ve iki farklı hastaneden gelen dışkı örneklerinin toplanması, genel bir bağırsak paraziti taranması planlandı. 01.01.2011-29.03.2013 tarihleri arasında hastanemiz Tıbbi

Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen dışkı örnekleri, Eskişehir Devlet Hastanesi acil servisine ishal şikayetiyle gelen hastalardan mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen dışkı örnekleri ile Valilik ve Milli Eğitim Müdürlüğünden izin alınıp rastgele seçtiğimiz ilköğretim okullarındaki öğrencilerden ailelerinin izni olanlardan topladığımız dışkı örnekleri çalışmaya dahil edildi. Toplanan 303 dışkı örneği; öncelikle moleküler yöntemle çalışılmak üzere koruyucu ilavesiz olarak ayrılarak -70°C derecede saklandı. Kalan örneklere rutin tanı için hazırlandı ve direkt mikroskobik inceleme (nativ-lugol ve serum fizyolojikle) yapıldı. Hazırlanan preparatlar X10 ve X40 büyütmede incelendi. Örnekler trikrom boyası ile boyandı ve X100 büyütmede incelendi. Moleküler yöntem için örnekler -70°C dereceden oda ısısına çıkarıldı. Oda ısısına gelen örneklerden önce QIAamp DNA Stool Mini Kit ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA ekstraksiyonu yapıldı, ekstrakte edilen örneklere real-time PCR yöntemi uygulandı. Kit (PrimerDesign Ltd. standart kit) *Blastocystis* sp. örneklerinde G elongation factor-1 alpha genini saptamaktadır. Çalışılacak her örnek için PCR tüplerine 10 µl oasig™ 2 x qPCR MasterMiks, 1µl *Blastocystis* spp. spesifik primer/prob miks, 4 µl RNase/DNase free su, 5 µl örnek eklendi. Pozitif kontrol için 5 µl *Blastocystis* spp. pozitif kontrol, negatif kontrol için 5 µl su eklendi. Örnekler Rotor-Gene Q cihazına yerleştirilip 10 saniye 95°C derecede, 60 saniye 60°C derecede 50 siklus ayarlanıp çalışıldı. Çalışma sonunda lineer değer belirlendi ve sonuçlar değerlendirildi.

3. Bulgular

84'ü ishali (44 kız 40 erkek) kalanı rastgele seçilen toplam 303 dışkı örneğinde (149 kız ve 154 erkek) *Blastocystis* spp. varlığı direkt mikroskopi, trikrom ve Real Time PCR yöntemleriyle araştırıldı. Direkt mikroskopi yöntemiyle *Blastocystis* spp. görülme oranı %38 (116 örnek), trikrom boyama ile %35 (107 örnek) ve Real-time PCR yöntemiyle %38 (115 örnek) olarak saptanmıştır. Akut ishal şikayeti ile gelen 84 çocuğa ait örneğin

inceleme sonuçları sırasıyla; %13 (11 örnek), %18 (15 örnek) ve %18 (15 örnek) olarak saptanmıştır.

Real-time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde çalışma grubunda direkt mikroskopi yönteminin duyarlılık oranı %65, özgüllük oranı %78, trikrom boyama yönteminin sırasıyla %55, %77 olarak

saptanmış olup akut ishalleri grupta direkt mikroskopi yönteminin duyarlılığı %80, özgüllüğü %84, trikrom boyama yönteminin sırasıyla %27, %84 olarak saptanmıştır. Akut ishalleri grupta direkt mikroskopi yönteminin negatif prediktif değeri %80, trikrom boyama yönteminin %84 olarak bulunmuştur (Tablo 1).

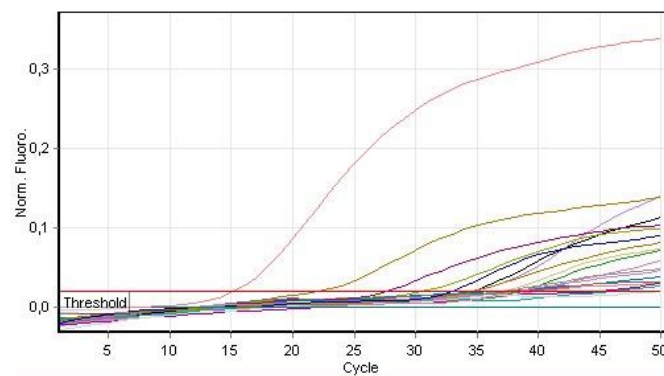
Tablo 1.

Real-time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde direkt mikroskopi yönteminin ve trikrom boyama yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

		Duyarlılık	Özgüllük	Pozitif Prediktif Değer	Negatif Prediktif Değer
Çalışma Grubu	Direkt mikroskopi	%65	%78	%65	%79
	Trikrom boyama	%55	%77	%59	%73
Akut İshalleri Grup	Direkt mikroskopi	%47	%85	%9	%80
	Trikrom boyama	%27	%84	%27	%84

Blastocystis spp. Real-time PCR yöntemi (PrimerDesign Ltd) ile çalışılan bir PCR çalışmasının ekran sonuç görüntüsü şekil 1'de verilmiştir. İlk yükselen değer pozitif

kontrolün değeridir. Threshold değerinin üzerindeki diğer eğriler ise pozitif çıkan örnekler için eğrilerdir.



Şekil 1. *Blastocystis* spp. Real-time PCR yöntemi (PrimerDesign Ltd) ekran sonuç görüntüsü

4. Tartışma

Blastocystis spp. enfeksiyonu özellikle gelişmekte olan ülkeler başta olmakla birlikte tüm dünyada tropik ve subtropikal bölgelerde en yaygın halk sağlığı problemi⁸

Ülkemizde yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda *Blastocystis* spp. tanısında farklı yöntem karşılaştırmalarında seropozitiflik oranları %12-35 arasında değişmektedir.^{6,7,9,10}

Amany ve arkadaşları hassas barsak sendromlu 83 hastaya ait dışkı örneğinde *B. hominis* varlığını yöntemlere göre sırasıyla; 25(%30.1) direkt mikroskopi, 34(%41) kültür yöntemiyle, 37 (%44.6) PCR yöntemiyle pozitif olarak saptamışlar¹¹. Bizim çalışmamızda çalışma grubunda direkt mikroskopi yöntemiyle *Blastocystis* spp. görülme oranı %38 (116 örnek), trikrom boyama ile %35 (107 örnek) ve real-time PCR yöntemiyle %38 (115 örnek) olarak saptanmıştır. Akut ishal şikayetiyle gelen çocuklarda ise görülme oranları sırasıyla %13 (11 örnek), %18 (15 örnek) ve %18 (15 örnek) olarak saptanmıştır. Brezilyada okul çocuklarında yapılan bir çalışmada %34.6 oranında *Blastocystis spp* tanımlanmış, tanımlanan olguların %41.3'ünde karın ağrısı, inatçı diyare gibi bağırsak semptomları bildirilmiştir¹².

Poirier ve arkadaşları ise 94 immün düşkün ve 92 immün düşkün olmayan toplam 186 hastadan dışkı örnekleri toplayarak direkt mikroskobik inceleme, ksenik invitro dışkı kültürü yaparak ve PCR yöntemiyle *Blastocystis*spp. varlığını araştırmışlar. PCR yöntemiyle karşılaştırdıklarında direkt mikroskobik incelemenin duyarlılığını %29, ksenik invitro kültürünün duyarlılığını %52 olarak saptamışlar¹³. Bizim çalışmamızda ise çalışma grubundaki 303 örnekten %38'inde PCR yöntemiyle *Blastocystis* spp. varlığı saptanmıştır. PCR yöntemiyle karşılaştırdığımızda direkt mikroskobik incelemin duyarlılığını %65 olarak bulunmuştur.

Doğurman al ve arkadaşları Gazi Üniversitesinde yaptıkları bir çalışmada 94 gastrointestinal semptomu olan hasta ve 109 asemptomatik hastadan topladıkları dışkı örneklerinde nativ-lugol-iyodin, trikrom boyama yöntemi ve Kinyoun asid-fast boyama yöntemleri ve invitro kültür yöntemlerini kullanarak *Blastocystis* spp. varlığını araştırmışlar. Toplam 203 örnekten 12 (%5.9) tanesinde nativ-lugol-iyodin ve 20 (%9.9) tanesinde trikrom boyama yöntemi ile

Blastocystis spp. saptamışlar. Kültür metodu ile 66 (%32.5) oranında *Blastocystis* spp. saptamış olup diğer mikroskobik inceleme yöntemlerine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek duyarlılığa sahip olduğunu bildirmişlerdir(p< 0.001). PCR yöntemiyle *Blastocystis* sp. subtiplerini araştırdıklarında ise subtip 3'ün diğer tiplere göre semptomatik ve asemptomatik grupta daha fazla oranda bulunmuşlar¹². Bizim çalışmamızda ise 303 örnekten 84 tanesi gastrointestinal semptomlu çocuklara ait olup 116 (%38) tanesinde direkt mikroskobik inceleme ve 107 (%35) tanesinde trikrom boyama yöntemi ile *Blastocystis* sp. saptanmıştır.

Jakarta'da İlkokul çocuklarında *Blastocystis* ve alt türlerinin belirlendiği bir çalışmada toplam 141 dışkı örneği; mikroskopi kültür ve PZR yöntemiyle karşılaştırılmış, sonuçlar PZR testine göre sırasıyla; % 89,% 78,% 80 ve% 88 duyarlılık, özgüllük te tanımlanmıştır¹⁴.

5. Sonuç

Çalışmamızda 303 örnekte (84 tanesi akut ishali) Real-time PCR yöntemi çalışılmış olup 115 örnekte *Blastocystis* spp. saptanmıştır. Real-time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde; çalışma grubunda direkt mikroskopi yönteminin duyarlılık oranı %65, özgüllük oranı %78, trikrom boyama yönteminin sırasıyla %55, %77 olarak saptanmıştır. Akut ishali grupta ise, direkt mikroskopi yönteminin duyarlılık oranı %77, özgüllük oranı %85 olarak saptanmıştır. Trikrom boyama yönteminde bu oranlar sırasıyla; %27, %84 olarak saptanmıştır. Akut ishali grupta direkt mikroskopi yönteminin negatif prediktif değeri %80, trikrom boyama yönteminin %84 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak moleküler testler zahmetli ve pahalı yöntemler olmakla birlikte, özel durumlar ve akut ishali olgularda daha yararlı olabileceği düşünülmüştür, ancak bu konuda çok merkezli, geniş kapsamlı klinik çalışmalara gereksinim vardır.

* Bu makale poster bildirisi olarak 1st International *Blastocystis* Symposium, Ankara'da sunulmuştur

KAYNAKLAR

1. Cabrine-Santos M, Nascimento Cintra E, Carmo RA, Nascentes GAN, Pedrosa AL, Correia D, Oliveira-Silva MB. Occurrence Of *Blastocystis* sp. In Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*; 2015; 57(3):211-215.
2. Ertug S, Malatyali E, Ertabaklar H, Çalışkan SÖ, Bozdoğan B. Subtype Distribution of *Blastocystis* Isolates and Evaluation of Clinical Symptoms Detected in Aydın Province, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(1): 98-104.
3. Elghareeb A, Younis MS, Fakahany AFE, Nagaty IM, Nagib MM. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* sp. in diarrheic patients *Trop Parasitol*. 2015 Jan-Jun; 5(1): 36–41.
4. 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): p. 780-4.
5. Vassalos CM, Spanakos G, Vassalou E, Papadopoulou C, Vakalis N. Differences in clinical significance and morphologic features of *Blastocystis* sp subtype 3. *Am J Clin Pathol*. 2010; 133(2): p. 251-8.
6. Dağcı H, Kurt Ö, Demirel M, Mandıracıoğlu A, Aydemir S, Saz U, Bart A, Van Gool T. Epidemiological And Diagnostic Features Of *Blastocystis* Infection In Symptomatic Patients In İzmir Province, Turkey. *Iranian J Parasitol*: Vol. 9, No. 4, Oct–Dec 2014, p.519-529.
7. Adıyaman Korkmaz G, Doğruman Al F, Mumcuoğlu İ. Dışkı örneklerinde *Blastocystis* spp. varlığının Mikroskopik, kültür ve moleküler yöntemlerle araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2015; 49 (1): 85-97.
8. Belleza MLB, Cadacio JLC, Borja MP, Solon JAA, Padilla MA, Tongol-Rivera PN, Rivera AL. Epidemiologic Study of *Blastocystis* Infection in an Urban Community in the Philippines. *Journal of Environmental and Public Health*. Volume 2015, Article ID 894297.
9. Doğruman-Al F, Yoshikawa H, Kustimur S, Balaban N. PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in a major hospital in Ankara, Turkey. *Parasitol Res*, 2009; 106(1): p. 263-8.
10. Özcakir O, Güreşer S, Ergüven S, Yılmaz YA, Topaloğlu R, Hascelik G. Characteristics of *Blastocystis hominis*. *Acta Parasitologica Turcica*. 2007; 31:277-82.
11. Amany M Eida, Mohamed M Eida. Identification of *Blastocystis hominis* in Patients with Irritable Bowel Syndrome using Microscopy and Culture Compared to PCR. *Parasitologists United Journal*. 2008. 1(2): p. 87-92.
12. Seguí R, Klisiowicz D, Oishi CY, Toledo R, Esteban JG, Muñoz-Antoli C. Intestinal symptoms and *Blastocystis* load in schoolchildren of Paranaguá Bay, Paraná, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017 Dec 21;59:e86. doi: 10.1590/S1678-9946201759086.
13. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(3): p. 975-83.
14. Sari IP, Benung MR, Wahdini, Kurniawan A. Diagnosis and Identification of *Blastocystis* Subtypes in Primary School Children in Jakarta. *J Trop Pediatr*. 2017: 31.