

Formol ile Tespit Edilmiş Dışkı Örneklerinde Moleküler Yöntemler Kullanılarak Blastocystis spp.'nin ve Giardia Intestinalis Pozitifliğinin Araştırılması

Investigation of Blastocystis spp. and Giardia Intestinalis in formol-fixed Stool Samples by Molecular Methods

Ülkü Karaman¹, Zeynep Kolören², Berivan Başak Gülabi³

¹ Yrd.Doç.Dr., Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

² Doç.Dr., Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

³ Uzm.Bio., Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

Özet

Amaç: İnsanlarda gastrointestinal sisteme yerleşen ve hastalıklara yol açan protozoonlar arasında yer alan. Blastocystis spp. ve Giardia intestinalis'in çocuklarda görülme oranı yüksektir. Parazitlerin ishal, karın ağrısı, şişkinlik, kusma, kilo kaybı ve uykusuzluk gibi semptomlarla seyredebilir. Sosyoekonomik durumu düşük olan ülkelerde ise yaygınlığı daha fazladır. Bu çalışmada, direk bakı incelemelerinde parazite rastlanılan tespit edilmiş dışkı örneklerinde Blastocystis spp.'nin ve G. intestinalis'in varlığının moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Dışkı örnekleri nativ-lugol ve trikrom boyama yöntemleri ile ışık mikroskopunda incelenmiştir. Mikroskopik bakı sonucunda 45 Blastocystis spp., 11 G. intestinalis saptanan dışkı örnekleri %10'luk formolde tespit edilmiştir. Örnekler incelenene kadar +4 °C de saklanmıştır. İki hafta sonra tespit edilmiş örnekler pozitif ve negatif kontroller kullanılarak gradient yöntemi ile saflaştırılmış ve DNA izolasyonları yapılmıştır. Blastocystis spp. polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile, G. intestinalis de semi-nested PZR yöntemi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Mikroskopik bakı ile pozitifliği tespit edilen dışkı örneklerinde PZR ve semi-nested PZR yöntemleriyle pozitiflik tespit edilememiştir. Hem Giardia hemde Blastocystis pozitif DNA'ları sırasıyla Semi-nested PZR ve PZR yöntemleriyle agaroz jelde oldukça kaliteli bant verirken, dışkı örneklerinden pozitiflik tespit edilememiştir.

Sonuç: Çalışma sonucu gözlenen bu durum formolle tespit edilmiş dışkı örneklerinden kaliteli bir DNA elde edilememesinden veya parazit kültürünün yapılmamasından kaynaklanmış olabilir.

Anahtar Kelimeler: Blastocystis spp, Giardia intestinalis, PCR, Semi-nested PCR

Summary

Objective: The incidence of Blastocystis spp. and Giardia intestinalis that are located in the gastrointestinal system is quite high in children. This disease caused by the parasites can be accompanied by symptoms such as diarrhea, abdominal pain, bloating, vomiting, weight loss and insomnia. The prevalence of these parasites are higher in countries with low socioeconomic status. This study is aimed to investigate the presence of Blastocystis spp. and G. intestinalis by molecular methods in formol-fixed stool specimens that detected parasites in direct smear microscopic examination.

Material and Methods: Stool specimens with native-lugol and trichrome staining methods were examined by light microscopy. The stool samples, by direct smear microscopic examination, which were detected 45 Blastocystis spp. and 11 G. Intestinalis, preserved in %10 formalin. The samples were stored at +4 °C until examined. These samples were purified by the sucrose gradient method and they were used for DNA extraction after two weeks later. Blastocystis spp. and G. intestinalis were investigated by polimerase chain reaction (PCR) and semi- nested PCR, respectively.

Results: PCR and semi- nested PCR methods in positive stool specimens which were detected by direct smear microscopic examination showed no positive results. Both Giardia and Blastocystis positive DNAs gave very good quality band on agarose gel by semi-nested PCR and PCR methods respectively, but no positivity was detected in stool specimens preserved in formalin.

Conclusion: Situation at the end of the study, may be due to the inability to obtain a quality DNA from the formol-fixed stool specimens or the absence of parasitic cultures

Key words: Blastocystis spp, Giardia intestinalis, PCR, Semi-nested PCR

Kabul Tarihi: 30.10.2017

Giriş

Ülkemizde bağırsak parazitleri önemli halk sağlığı sorunlarından birini teşkil etmektedir. Sosyo-ekonomik ve eğitim düzeyinin düşük olması, iklim ve çevre koşullarının uygunluğu ve beslenme alışkanlıkları, bağırsak parazitlerinin yayılmasında rol oynayan önemli faktörlerdir.

Dünyada yaygın olarak bulunan bağırsak parazitlerinden Blastocystis spp. ilk kez Alexeieff tarafından maya mantarı olarak tanımlanmıştır. Fekal oral yolla bulaşan ve insanlarda gastrointestinal sisteme yerleşen Blastocystis spp. erişkinlere kıyasla çocuklarda daha sık görülür. Oluşturduğu hastalığa blastocystosis denir (1,2).

Özellikle çocuklarda yüksek oranda görülen ve uzun süreli diyarelere bağlı malnutrisyon ve gelişme geriliğine neden olan diğer bir parazit Giardia intestinalis olup tüm dünyada ve özellikle de gelişmekte olan ülkelerde en sık rastlanan protozoon hastalığı olarak bildirilmektedir. Endüstriyel ülkelerde %2-5 arasında, gelişmekte olan ülkelerde %20-30'a varan oranlarda yayılım gösterdiği belirtilmektedir (3,4). Hem Blastocystis spp hem de G. intestinalis'in fekal-oral yolla kontamine olmuş yiyecek ve içeceklerin tüketilmesi sonucunda yayılmaktadır. Özellikle lağım sularının içme sularına karışması ile salgınların ortaya çıktığı bildirilmektedir (4,5).

Çalışmada direk bakı incelemelerinde parazite rastlanılan tespit edilmiş dışkı örneklerinde Blastocystis spp.'nin ve G. intestinalis'in varlığının moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

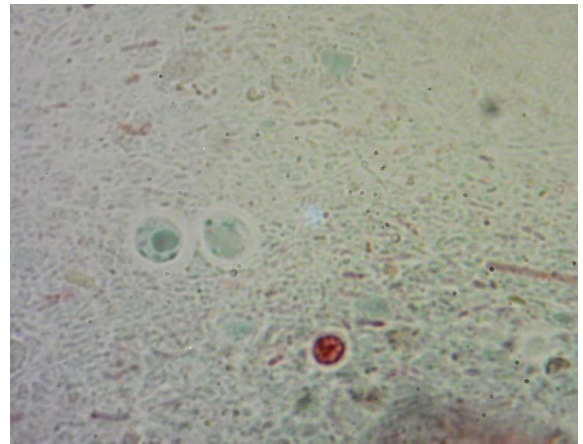
Nativ-lugol ve trikrom boyama yöntemleri ile 45 Blastocystis spp., 11 G. intestinalis saptanan dışkı örnekleri %10'luk formolde tespit edilmiştir. Örnekler incelenene kadar +4 °C de saklanmıştır. Daha sonra moleküler işlemlere başlamadan dışkı

örneklerini formolden arındırmak için seri santrifüj işlemi uygulanmıştır. İki hafta sonra tespit edilmiş örnekler pozitif ve negatif kontroller kullanılarak pelletlerine Kourenti ve Karanis'in (6) uyguladığı sükröz gradient yöntemi uygulanarak saflaştırılmış ve DNA (Qiagen) izolasyonları yapılmıştır. Blastocystis spp. polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile, G. intestinalis de semi-nested PZR yöntemi ile araştırılmıştır.

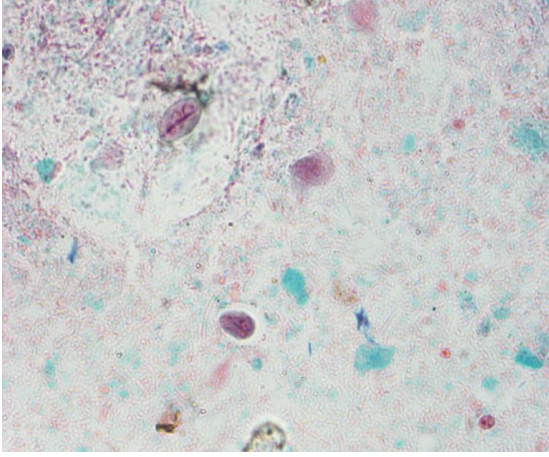
Bulgular

Çalışmada direk bakı ve trichrome boyası ile pozitif olarak saptanan 45 Blastocystis spp. (şekil 1) ve 11 G. intestinalis (şekil 2), %10'luk formolle tespit edilmiştir. İki hafta bekletilen örnekler saflaştırılmış ve DNA izolasyonu yapılmıştır. Blastocystis spp. (şekil 3). PZR yöntemi ile G. intestinalis (şekil 4) de semi-nested PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Mikroskopik yöntemle pozitifliği belirlenen dışkı örneklerinde kullanılan moleküler yöntemlerle pozitiflik tespit edilememiştir.

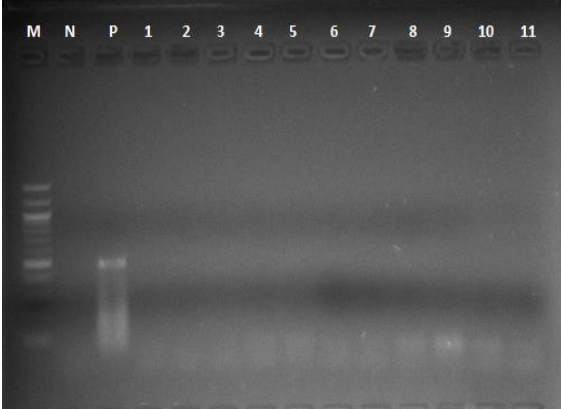
Şekil 1. Alınan dışkı örneklerinde Trichrom boyama yöntemiyle Blastocystis spp.'nin ve G. intestinalis'in tespiti



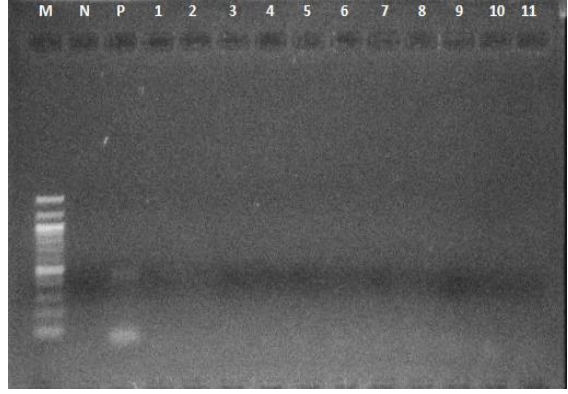
Şekil 2. Alınan dışkı örneklerinde Trichrom boyama yöntemiyle *Blastocystis spp.* 'nin ve *G. intestinalis* 'in tespiti.



Şekil 3. İlköğretim okulu çocuklarından alınan dışkı örneklerine ait PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. M: 100 bp DNA marker; N: Distile su (negatif); P: *Blastocystis spp.* DNA'sı (pozitif); 1-11 çalışılan dışkı örnekleri



Şekil 4. İlköğretim okulu çocuklarından alınan dışkı örneklerine ait PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. M: 100 bp DNA marker; N: Distile su (negatif); P: *Giardia H3* DNA'sı (pozitif); 1-11 çalışılan dışkı örnekleri



Tartışma

Yapılan araştırmalarda, bağırsak parazitlerinin görülme sıklığında farklılıklara; toplumun sosyo ekonomik durumu, eğitim düzeyleri ve çevre koşullarının neden olabildiği belirtilmiştir (7). Türkiye'de bağırsak parazitlerinin dağılımı ile ilgili çalışmalarda; Kaya ve ark. (8) Isparta il merkezinde 6 sağlık ocağı bölgesindeki 800 kişiden alınan örnekte 77 (%9,6) parazit tespit etmiştir. Bunlar; *E. coli* 26 (%34,2), *G. intestinalis* 20 (%26,3), *E. vermicularis* 14 (%19,2), *B. hominis* 8 (%10,4), *Iodamoeba bütschlii* 4 (%5,2) dir. Yine Çulha ve arkadaşları (9) 142 dışkı ve 136 selofanlı lam örneği incelemişlerdir. Dışkı örneklerinin 65 tanesinde (%45,77) bir veya birden fazla parazit saptanmıştır. Tespit edilen parazitlerin görülme oranlarını 63 örnekte (%96,92) *Blastocystis hominis*, 2 (%3,08) *G. intestinalis* 'dir.

Kuk ve ark. da (10) Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalardaki bağırsak parazitlerinin dağılımını retrospektif olarak araştırmışlardır. İncelenen 1218 örneğin 210'unda (%17,24) parazit saptanmış olup en sık saptanan parazitlerin sırasıyla *B. hominis* %26,66, *G. intestinalis* %24,76 ve *E. coli* %20,95 olduğunu tespit etmişlerdir.

Görgün (11) çalışmasında da, Manisa'da insanlarda ve hayvanlarda bulunan *G. intestinalis*

genotiplerini, moleküler epidemiyolojilerini ve enfeksiyon karakterlerini araştırmıştır. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran ve G. intestinalis yönünden pozitif 45 hastaya ait dışkı örneği DNA izole edildikten sonra Nested PZR çalışmış ve 45 izolatinın 33'ü (%73,3) A genotipi, 5'i (%11,1) B genotipi ve 7'si (15,5) A+B karışık genotip bulmuştur. Hastaların çoğunda 43/45 (%95,5) Giardia enfeksiyonu ile ilişkili bir ya da birden fazla semptoma rastlanırken sadece 2 hastada herhangi bir semptom bildirilmemiştir. Çalışmada rutin mikroskopik incelemeler ile pozitif bulunan tüm örnekler gerçek zamanlı PZR ile de pozitif bulunmuş olup işlemin %100 duyarlılık ve özgünlüğe sahip olduğu görülmüştür.

Çalışmada dışkıyla atılan kistlerin çeşitli boyama yöntemleriyle boyanması sağlanarak örneklerde pozitiflik belirlenmiştir. Mikroskopik bakı ile pozitif olarak belirlenen örneklerden DNA elde edilememiştir. Bunun nedeni ise formolle tespit edilmiş dışkı örneklerinden kaliteli bir DNA elde edilememesinden veya parazit kültürünün yapılmamasından kaynaklanmış olabilir.

Kaynaklar

1. Al FD, Hökelek M. Blastocystis hominis Fırsatçı Bir Patojen mi? Türkiye Parazitoloji Dergisi 2007;31:28-36.
2. Ok ÜZ. Blastocystosis: Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Özcel, MA, Özbel Y, Ak M. (eds.) İzmir, Meta matbaa. 2007;383-6.
3. Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svard SG. Giardia mmunity-an update. Trends in Parasitology 2006;1:26-31.
4. Ak M, Türk M, Güneş K. Giardiasis. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M. (Eds). Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın no:22; İzmir. 2007;323-44.
5. Leber AL, Novak-Weekley S. Çev: Tanyüksel M, Koro Ö. İntestinal ve ürogenital yerleşimli amipler, kamçılılar ve silialılar. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (Eds) Çev. Başustaoglu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M. Manuel of Clinical Microbiology Ankara. cilt:2, 2009;2092-112.
6. Karanis P, Kimura A. Evaluation of three flocculation methods for the purification of Cryptosporidium parvum oocysts from water samples. Lett Appl Microbiol 2002;34:444-9.

7. Direkel Ş, Özerol İH, Bayraktar MR. Malatya merkezinde bağırsak parazitlerin dağılımı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2002;1:52-5.
8. Kaya S, Demirci M, Demirel R, Arıdoğan BC, Öztürk M, Şirin C. Isparta Şehir Merkezinde Bağırsak Parazitleri Prevalansı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2004;28:103-5.
9. Çulha G, Duran GG, Duran N, Canpolat A, Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Öğrencilerinde Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı, Türkiye Parazitoloji Dergisi 2005;29(4):258-60.
10. Kuk S, Erensoy A, Keleştemur N. Son Bir yıl İçinde Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi Parazitoloji Laboratuvarında Koproparazitolojik İnceleme Sonuçları. Fırat Tıp Merkezi 2006;11(2):113-5.
11. Görgün S. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde (Manisa) giardiasis tanısı konulan olgularda Giardia intestinalis genotiplerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, 2011.

İletişim:

Yrd.Doç.Dr. Ülkü Karaman

Ordu Üniversitesi

Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

Tel: 0.553.6185245

E-mail: ulkukaraman44@hotmail.com