

# *Blastocystis* spp.'nin İnsandan İzolasyonu ve Besiyerinde Farklı Evrim Şekillerinin İzlenmesi

Isolation of *Blastocystis* spp. from Human Hosts and *In vitro* Determination of Different Morphological Forms

Erdoğan Malatyalı, Semra Özçelik

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

## ÖZET

**Amaç:** *Blastocystis* spp. birçok canlının gastrointestinal sisteminde yerleşebilmekte ve yaygın olarak gözlenebilmektedir. Parazitin sınıflandırılması ve morfolojisi birçok bilinmeyen içerermekte ve moleküler biyolojik çalışmalarla bu sorunlar aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Bu çalışma bölgemizde *Blastocystis* spp.'nin insanlar arasındaki yaygınlığının belirlenmesi ve etkenin klinik materyalden izolasyonu amacıyla yapılmıştır.

**Yöntemler:** Çalışmada incelenen dışkı örneklerinin %0.48'inde parazite rastlanmış ve pozitif saptanan örnekler difazik Locke-Egg Serum (LES) besiyerinde çoğaltılmıştır. Pasaj sırasında alınan örnekler hem direkt inceleme hem de Trichrome ve Demirli Hematoksilen ile boyanarak morfolojik formların varlığı izlenmiştir.

**Bulgular:** Besiyerlerinde en sık gözlenen vakuoler ve granüler formlar olurken ameboid formlara da rastlanmıştır.

**Sonuç:** *Blastocystis* spp.'nin üzerine yapılan çalışmalarda LES besiyeri uygun bir tercih olabilir ve rutinde tanı amaçlı kullanılabilir. (Türkiye Parazitol Derg 2011; 35: 19-22)

**Anahtar Sözcükler:** *Blastocystis* spp., besiyeri, ameboid, vakuoler, kist, granüler

**Geliş Tarihi:** 08.06.2009

**Kabul Tarihi:** 01.03.2010

## ABSTRACT

**Objective:** *Blastocystis* is a highly common parasite that infects the gastrointestinal tract of many different organisms. Morphology and the appropriate classification of *Blastocystis* spp. has only recently been resolved with molecular biological studies. This study was performed to determine the prevalence of *Blastocystis* spp. among humans and to isolate the parasite from clinical specimens.

**Methods:** *Blastocystis* spp. was detected in 0.48% of the stool samples and the positive samples were cultivated in Locke-Egg Serum (LES). During passages inoculums were investigated by direct microscopy and stained with Trichrome and Iron Hematoxyline.

**Results:** Vacuolar and granular forms were the most common in cultures and also the amoeboid form was observed.

**Conclusion:** LES medium may be a suitable selection for studies aiming to determine the frequency of *Blastocystis* spp. and for the diagnosis in routine laboratories. (Türkiye Parazitol Derg 2011; 35: 19-22)

**Key Words:** *Blastocystis* spp., medium, amoeboid, vacuolar, cyst, granular

**Received:** 08.06.2009

**Accepted:** 01.03.2010

## GİRİŞ

*Blastocystis* spp., Heteroökontophyta filumunda yer alan tek hücreli parazit grubudur. İnsanları, çiftlik hayvanlarını, kuşları, kemirgenleri, sürüngenleri, amfibileri, balıkları hatta hamamböceklerini infekte edebilen birçok *Blastocystis* türü bulunmaktadır (1). Parazitin neden olduğu hastalık *Blastocystosis* olarak adlandırılır ve karın ağrısı, konstipasyon ve diyare en sık gözlenen klinik belirtilerdir.

*Blastocystis*'in sınıflandırmasındaki sorunlar yakın zamanda çözülmüştür. Önceleri *Blastocystis*, yalancı ayaklarının olmaması ve hareketsiz olmasının yanı sıra direkt mikroskopide mantar gibi parlak görünümü ve şekli nedeniyle mantar olarak kabul edilmekteydi. Zierdt tarafından bu bilginin doğru olmadığı fikri ortaya atıldı, araştırmacı *Blastocystis* hücrelerinde çekirdek, düz ve kaba ER, golgi kompleksi, mitokondri benzeri organellerin bulunmasına dayanarak etkeni sporo-

**Yazışma Adresi/Address for Correspondence:** Dr. Erdoğan Malatyalı, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye  
Tel: +90 346 219 10 10-1044 E-posta: emalatyalı@cumhuriyet.edu.tr

doi:10.5152/tpd.2011.05

zoa alt filumuna yerleştirdi. Antiprotozoal ilaçlara duyarlılık göstermesi ve mantar besiyerlerinde çoğalmaması protozoon olduğunu ortaya koyan diğer özelliklerdir. Bunun yanı sıra sınıflandırmasında da büyük revizyonlar yapılmış ve 1996'da gen sekanslarının analizi sonucu Stramenopiles grubuna dahil edilmiştir (2, 3). Stramenopiles grubu kahverengi algleri, küfleri, diatomları, "Irish potato famine" ve "Sudden oak death" hastalıklarının etkenlerini içermektedir. Bununla birlikte, *Blastocystis*'in stramenofiller içindeki pozisyonu halen anlaşılammıştır (4).

Uzun yıllar tek *Blastocystis* türünün insanları ve diğer türlerinde hayvanları infekte ettiğine ve diğerlerinin hayvanları infekte ettiği görüşü yaygındı. Bu nedenle insandan izole edilen tür *B. hominis* olarak adlandırılmış ve diğer hayvanlardan izole edilenlere de aynı tür isimleri verilmiştir. Örneğin sıçanlardan izole edilene *B. ratti* adı verildi. Ancak yakın zamanda yapılan genetik analizler insanları infekte eden tek bir tür olmadığını göstermiştir (5). Gerçekte, dokuz farklı *Blastocystis* türünün (genetik farklılıklara dayalı) insanları infekte edebildiği ve *B. ratti* olarak adlandırılan türün de bu gruba dahil olduğu ortaya konmuştur (6). Bu nedenle 2007 yılında araştırmacılar *B. hominis* teriminin kullanılmamasını yerine insanlardan ve hayvanlardan izole edilen türler için "*Blastocystis* sp. subtype nn" şeklinde bir kullanım önermektedir. Bu tanımlamada "nn" genetik olarak tanımlanmış 9 türe ait numarayı bildirmekte ve infekte organizmaya göre yapılan adlandırmadan daha doğru sonuçların elde edileceği ortaya konmaktadır (7). Aynı yıl içerisinde Çin'de 10'cu tür bildirilmiştir. Ancak, bu türün genetik analizi tam olarak yapılmadığı için yeni bir tür mü yoksa tanımlanmış türlerden biri mi olduğu henüz anlaşılammıştır (8). Farklı olduğu kanıtlanmış onuncu tür primatlar da dahil olmak üzere diğer hayvanlardan izole edilmiş ancak henüz insanlarda gösterilememiştir (9).

*Blastocystis* spp.'in çok sayıda morfolojik formu bulunmaktadır. Vakuoler (merkezi cisim), granular, amoeboid ve kist formu en sık gözlenen formlardır. Organizmanın görünümü çevresel koşullardan etkilenmekte olup oksijene çok duyarlıdır. Bu formların tamamının bağırsakta gözlenebildiği tartışmalı bir konudur. Vakuoler form kültürlerde görülen tipik şekildir. Vakuoller 2 µm ile 200 µm arasında değişen boyutlarda olabilir. Vakuoler form merkezi cisim olarak da bilinir çünkü merkezi büyük bir vakuol içerir. Bu yapının etrafı organelleri içeren ince bir stoplazma ile çevrilidir. Vakuolün görevi tam olarak bilinmemekle birlikte ökaryotik canlılarda olduğu gibi besin depolanmasında rol aldığı sanılmaktadır. Granular form morfolojik olarak vakuoler forma benzemekle birlikte merkezinde grannülerin bulunmasıyla vakuoler formdan ayrılır. Merkezi cisimde bulunan granüller metabolik, lipid, ve üreme granülleri olmak üzere üç çeşittir. Amoeboid formu hareketsiz ve güçlü adezivdir. Yakın zamandaki bir çalışmada amoeboid formun yalnızca semptomlu kişilerden alınan dışkı örneklerinin kültüründe ortaya çıktığı asemptomatik olanların kültüründe daha çok vakuoler formun çoğaldığı rapor edilmiştir. Ayrıca semptomların amoeboid formun bağırsak yüzeyinde çoğalması ve yüksek adezyon karakteristiğinin bir sonucu olduğu ortaya atılmıştır. 2007 yılında amoeboid formların detaylı üç boyutlu yapısı yayınlanmıştır (10). Kist formu diğer formlara kıyasla daha küçük ve kalındır ve çok katmanlı kist duvarıyla çevrilidir. Merkezi cisim yoktur, çok sayıda vakuol ve besin deposu içerir. Kist formu çevre koşullarına en dayanıklı formdur, mide suyuna dayanıklıdır.

Distile suda lizis olmaz ve oda sıcaklığında 19 güne kadar canlılığını korur (11, 12). Ayrıca, kültür ortamına anti-protozoal ilaçlar eklendiğinde bile canlılığını koruduğu gözlenmiştir.

Bu çalışma ile klinik materyalden *Blastocystis* spp.'nin izolasyonu, LES besiyerinde çoğaltılması ve *in-vitro* koşullarda farklı evrim şekillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda öncelikle ilköğretim çağındaki çocuklardan toplanan dışkı örneklerinde *Blastocystis* spp. varlığı direkt mikroskopi ile araştırılmıştır. Sivas bölgesinde il merkezi, ilçeler ve köylerden basit rastgele örnekleme ile seçilen okullardan toplanan dışkı örnekleri aynı gün içerisinde bekletilmeden C.Ü. Parazitoloji Laboratuvarında incelenmiştir. Bir iki damla serum fizyolojik içerisine pirinç tanesi büyüklüğünde dışkı örneği alınarak 10 ve 40'lık objektiflerle *Blastocystis* spp. araştırılmıştır. Çalışmada toplam 1449 dışkı örneği incelenmiştir.

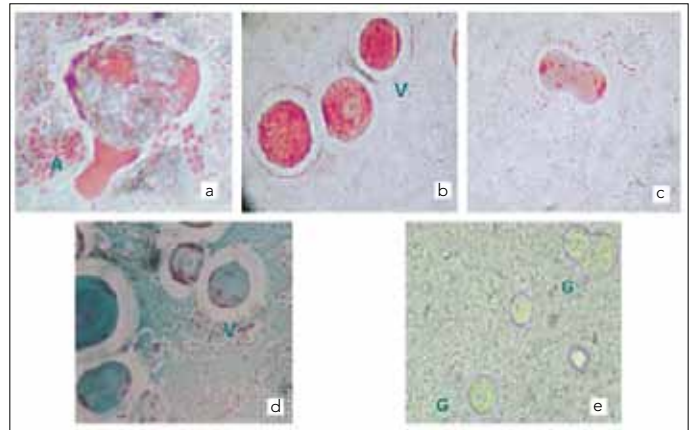
Pozitif olan örnekler hiçbir işlem yapılmadan doğrudan LES besiyerine ekilmiştir. 35.5 °C de tutulan besiyerlerine az miktarda dışkı eklenerek inokülasyon yapılmıştır. Besiyerinin pasajı iki günde bir katı ve sıvı kısmının birleştiği yerden 0.5 ml örnek alınarak yapıldı. Pasaj sırasında alınan örnekler direkt mikroskopi ve Gomori'nin Trikrome ve Demirli Hematoksilen boyaları ile boyanarak izlendi.

## BULGULAR

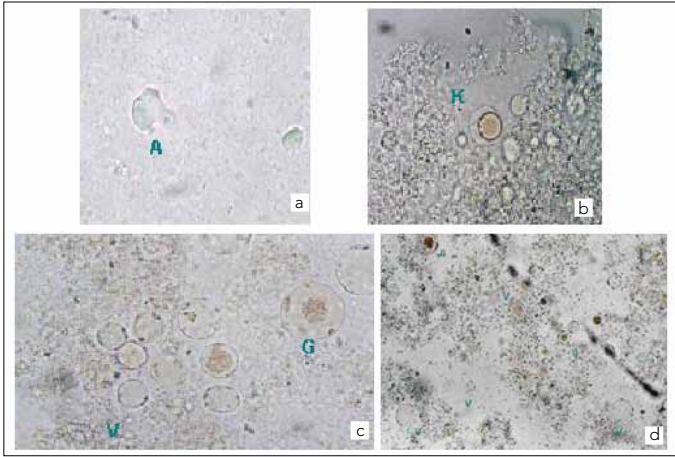
İncelenen 1449 dışkı örneğinin 7'sinde (%0.48) *Blastocystis* spp.'ye rastlanmıştır. Pozitif örnekler LES besiyerine alındığında farklı formlar gözlenebilmiştir (Şekil 1 a-e, Şekil 2 a-d). Ayrıca, granüllerle dolu bazı şekillerin zamanla parçalandığı ve sonraki gün vakuoler formun olağanüstü çoğaldığı gözlenmiştir.

## TARTIŞMA

*Blastocystis* türleri dünya genelinde yaygın görülmesine karşın sınıflandırılması ve patojenitesi üzerine tartışmalar devam etmektedir (13-15). Ribozomal RNA sekanslarının filogenetik analizi *B. hominis*'in stramenopiles grubuna ait olduğunu göstermiştir (2). Parazit dışkı ve kültürlerde farklı birçok morfolojik formda bulunabilir. Vakuoler, granüler, ve kist dışkıda gözlenen formlardır ayrıca dışkı örneklerinde ameboid forma nadiren rastlanır.



Şekil 1 a-e. Trikrom ile boyanan *Blastocystis* spp.'nin değişik formları (x100)



**Şekil 2 a-d.** Direkt mikroskopik incelemede gözlenen formlar (x40).  
A. Ameboid; G. Granüler; K. Kist; V. Vakuoler form.

Çalışmamızda olduğu gibi kültürde ise vakuoler ve granüler formun baskın olduğu bildirilmiştir (14, 16).

*Blastocystis* spp. ve *E. histolytica*'nın doğrudan aksenik kültürde çoğaltılması halen başarısız olmuştur. Ayrıca, *Blastocystis* spp., *Entamoeba* türleri ve *D. fragilis*'in dışkıdan izolasyonunda kullanılan besiyerlerinde yoğun bir şekilde çoğalabildiği ve araştırılan amip türünün gözlenmesini zorlaştırabildiği bildirilmiştir. Çalışmamızda *Blastocystis* spp. ve *E. histolytica/dispar*' in saptandığı dışkı örnekleri besiyerine alındığında *Blastocystis* spp.'nin baskın hale geldiği gözlenmiştir. Parazitin aksenik kültürünü ilk kez Baret serum-saline besiyerinde yapmıştır (17). Ayrıca, Iscove'nun Dulbecco's besiyeri (IMDM) gibi aksenik kültürler de günümüzde kullanılmaktadır (18, 19). Aksenik kültür ortamlarının geliştirilmesi *Blastocystis*' in tür tayini çalışmalarını da kolaylaştırmıştır (13).

Ülkemizde *B. hominis* yaygınlığı %0.8–37 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (20-24). Bu değerler klinik tablo dikkate alınmadan gerçekleştirilen çalışmaları içermektedir. Bu nedenle *B. hominis* ve klinik ilişkisini açıklamaya yardımcı olmamaktadır. Bunun yanı sıra, gastrointestinal yakınmaları olan kişilerde *B. hominis* yaygınlığının daha yüksek olduğu söylenebilir. Bu grupta *B. hominis* yaygınlığı yapılan çalışmalarda %4-%23.32, Kayseri'de %17.1, Bursa'da %15.6, İzmir'de % 0.25-4.96 ve Ankara'daki çalışmada %56.1 olarak bildirilmiştir (25-31). Sivas' da yapılan benzer çalışmalarda *Blastocystis* spp. yaygınlığı 2008 yılında %2.2, 2006 yılında 1.1 ve 2004 yılında hastaneye başvuranlarda %0.4 olarak bildirilmiştir (32-34). Önceki yıllara ait veriler değerlendirildiğinde *Blastocystis* spp. yaygınlığının yıllar içinde fazla değişmediği söylenebilir. Ancak parazite diğer illere göre daha düşük oranda rastlanmıştır.

*B. hominis* patojenitesi tartışmalı ve sınıflandırması moleküler genetik çalışmalarla yeni aydınlatılmış ve son zamanlarda birçok araştırmacının ilgi odağında bulunan bir parazittir. Parazit LES ve Robinson besiyerlerinde hızlı ve kolay çoğaldığı için gerçek yaygınlığının belirlenmesinde ve tanısına yönelik rutin uygulamalarda besiyerleri kullanılabilir.

#### Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

#### KAYNAKLAR

1. Yoshikawa H, Wu Z, Howe J, Hashimoto T, Geok-Choo N, Tan KS. Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *J Eukaryot Microbiol* 2007; 54: 33-7. [CrossRef]
2. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 1996; 380: 398. [CrossRef]
3. Stechmann A, Hamblin K, Pérez-Brocá V, Gaston D, Richmond GS, Van Der Giezen M, et al. Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current biology* 2008; 18: 580-5. [CrossRef]
4. Baldauf SL. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *Journal of Systematics and Evolution* 2008; 46: 263-73.
5. Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, et al. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 348-55. [CrossRef]
6. Puthia MK, Sio SW, Lu J, Tan KS. *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infect Immun* 2006; 74: 4114-22. [CrossRef]
7. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes--a consensus. *Trends Parasitol* 2007; 23: 93-6. [CrossRef]
8. Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, et al. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res* 2007; 102: 83. [CrossRef]
9. Stensvold CR, Alfellani MA, Norkov-Lauritsen S. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new *Blastocystis* sp. subtype. *Int J Parasitol* 2009; 39: 473-9. [CrossRef]
10. Tan TC, Suresh KG. Amoeboid form of *Blastocystis hominis* - a detailed ultrastructural insight. *Parasitol Res* 2006; 99: 737-42. [CrossRef]
11. Moe KT, Singh M, Howe J. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol Res* 1996; 82: 439-44. [CrossRef]
12. Zaman V, Howe J, Ng M. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitol Res* 1995; 81: 465-9. [CrossRef]
13. Al FD, Hökelek M. *Blastocystis hominis* Fırsatçı Bir Patojen mi? *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2007; 31: 28-36.
14. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 563-84. [CrossRef]
15. Tan KSW. New Insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 639-65. [CrossRef]
16. Tan KSW, Singh M, Yap EH. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *Int J Parasitol* 2002; 32: 789-804. [CrossRef]
17. Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 329-41. [CrossRef]
18. Ho LC, Singh M, Suresh G, Ng GC, Yap EH. Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitol Res* 1993; 79: 614-61. [CrossRef]
19. Lanuza MD, Carbajal JA, Villar J, Borrás R. Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. *Parasitol Res* 1997; 83: 60-3
20. Akdemir C, Helvacı R. Kütahya'da Parazitoloji Laboratuvar sonuçlarının 15 ve üzeri yaş grubunda değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2007; 31: 37-40.
21. Atambay M, Karaman Ü, Aycan Ö, Yoloğlu S, Daldal N. Akşemseddin işitme engelliler okulu öğrencilerinde bağırsak parazitleri ve baş biti görülme sıklığı. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2007; 31: 62-5.
22. Çelik T, Daldal N, Karaman Ü, Aycan MÖ, Atambay M. Malatya ili merkezinde üç ilköğretim okulu çocuklarında bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2006; 30: 35-8.
23. Üner A, Ertuğ S, Yurdagül C, Ertabaklar H, Akısü Ç. İzmir ve çevresinde insanlarda *Blastocystosis* yaygınlığının araştırılması. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 1999; 23: 247-50.

24. Yazıcı V, Sırken F, Ertabaklar H, Ertuğ S. Aydın il merkezindeki hastanelerde çalışan mutfak personelinde bağırsak parazitlerinin araştırılması. Türkiye Parazit Derg 2007; 31: 136-8.
25. Alver O, Özakin C, Yılmaz E, Akçağlar S, Töre O. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesinde farklı yıllarda bağırsak parazitlerinin dağılımlarının değerlendirilmesi. Türkiye Parazit Derg 2005; 29: 193-9.
26. Değirmenci A, Sevil N, Güneş K, Yolasiğmaz A, Turgay N. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji laboratuvarında 2005 yılı boyunca saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2007; 31: 133-5.
27. Özyurt M, Kurt Ö, Yaman O, Ardiç N, Haznedaroğlu T. Bir Eğitim Hastanesi Koproloji Laboratuvarında geçen dört yıllık dönemde saptanan bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. Türkiye Parazit Derg 2007; 31: 306-8.
28. Tamer GS, Çalışkan S, Willke A. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2008; 32: 126-9.
29. Üstün Ş, Aksoy Ü, Üner A. Gastrointestinal yakınmalı hastalarda amoebiosis sıklığının araştırılması. Türkiye Parazit Derg 1999; 23: 367-71.
30. Yaman O, Yazar S, Özcan H, Çetinkaya Ü, Gözgenç N, Ateş S, ve ark. 2005-2008 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2008; 32: 266-70.
31. Yapıcı F, Tamer GS, Arısoy ES. Çocuklarda bağırsak parazitlerinin dağılımı ve bununla ilişkili etmenler. Türkiye Parazit Derg 2008; 32: 346-50.
32. Değerli S, Çeliksöz A, Arslan A, Acıöz M, Özçelik S. Sivas Merkez Alahacı Köyü İlköğretim Okulu öğrencilerinde altı ay arayla yapılan dışkı incelemesi sonuçlarının karşılaştırılması. Türkiye Parazit Derg 2006; 30: 305-7.
33. Değerli S, Özçelik S, Çeliksöz A. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2005; 29: 116-9.
34. Malatyalı E, Özçelik S, Çeliksöz A, Değerli S, Yıldırım D. Sehir, ilçe ve köy ilköğretim okulu öğrencilerinde bağırsak parazitleri görülme sıklığı. Türkiye Parazit Derg 2008; 32: 54-8.