

# ***Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* ve *Giardia intestinalis*'in Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanısı: Optimizasyon Çalışması**

## *Diagnosis of Blastocystis sp., Cryptosporidium sp., and Giardia intestinalis by Multiplex PCR: An Optimization Study*

Ali Ahmet Kilimcioğlu\*<sup>1</sup>, Nogay Girginkardeşler\*<sup>2</sup>, Tuba Oyur\*<sup>3</sup>, Selin Bölük Sabuncu\*<sup>4</sup>,  
Didem Düzyol Azak\*<sup>5</sup>, Serhan Görgün\*\*<sup>6</sup>, Işın Akyar\*\*\*<sup>7</sup>, Özgür Kurt\*\*\*<sup>8</sup>, Tanıl Kocagöz\*\*\*<sup>9</sup>  
Ahmet Özbilgin\*<sup>10</sup>

\* Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

\*\* Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Manisa, Türkiye

\*\*\* Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**Atf/Cite as:** Kilimcioğlu AA, Girginkardeşler N, Oyur T ve ark. *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* ve *Giardia intestinalis*'in multipleks polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı: Optimizasyon çalışması, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):354-62.

### Öz

**Amaç:** Özellikle immun sistemi baskılanmış hastalar ve çocuklarda şiddetli gastrointestinal sistem yakınmalarına yol açabilen *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* ve *Giardia intestinalis*'in tanısı için yerli hastalardan elde edilen izolatlarla yeni bir Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Mikroskopik incelemesinde yoğun miktarlarda *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* ve *Giardia intestinalis* saptanan farklı hastalara ait üç dışkı örneğinden ticari bir kit ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Önce her bir protozoona karşı özel PZR protokolü geliştirilmiştir. Sonrasında bu üç protozoonun birlikte tanı konabildiği multipleks PZR protokolü optimize edilmiştir.

**Bulgular:** DNA izolasyonu sonrası gerçekleştirilen multipleks PZR protokolünde *Cryptosporidium sp.*, *Blastocystis sp.* ve *G. intestinalis* için sırasıyla 95 bp, 227 bp ve 258 bp'lik bantlar elde edilmiştir.

**Sonuç:** Geliştirilen özgün protokolle *Cryptosporidium sp.*, *Blastocystis sp.* ve *G. intestinalis*'in multipleks PZR ile tanısı gerçekleştirilmiştir. Parazitolojik incelemelerde farklı yöntemlerin kullanılmasındaki zorluklar nedeniyle, optimize edilen bu protokole halk sağlığı için önemli olan diğer protozoonların da eklenmesiyle, çok sayıda parazitin tek bir moleküler yöntemle saptanması mümkün hale gelebilecektir.

**Alındığı tarih / Received:**  
12.03.2021 / 12.March.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
22.06.2021 / 22.June.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

A.A. Kilimcioğlu 0000-0002-5736-7319  
N. Girginkardeşler 0000-0002-9680-4294  
T. Oyur 0000-0001-8014-284X  
S. Bölük Sabuncu 0000-0003-4701-287X  
D. Düzyol Azak 0000-0003-1236-3741  
S. Görgün 0000-0002-6150-7353  
I. Akyar 0000-0003-1115-0429  
Ö. Kurt 0000-0001-5575-588X  
T. Kocagöz 0000-0001-7211-2026  
A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

✉ alikilimcioglu@gmail.com

**Anahtar kelimeler:** Multipleks PZR, *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia intestinalis*, tanı

### ABSTRACT

**Objective:** It was aimed to develop a new Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) protocol with isolates obtained from local patients for the diagnosis of *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* and *Giardia intestinalis*, which can cause severe gastrointestinal system complaints especially in immunocompromised patients and children.

**Method:** DNA isolation was performed with a commercial kit from three stool samples of different patients whose microscopic examination showed dense amounts of *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* and *Giardia intestinalis*. First, a special PCR protocol has been developed for each protozoon. Then, the multiplex PCR protocol, in which these three protozoa can be diagnosed together, was optimized.

**Results:** In the multiplex PCR protocol performed after DNA isolation, bands of 95 bp., 227 bp. and 258 bp. were obtained for *Cryptosporidium sp.*, *Blastocystis sp.* and *G. intestinalis*, respectively.

**Conclusion:** *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* and *Giardia intestinalis* were diagnosed by multiplex PCR with the original protocol developed. Due to the difficulties in using different methods in parasitological examination, by adding other protozoa important for public health to this optimized protocol, it will be possible to detect a large number of parasites with a single molecular method.

**Keywords:** Multiplex PCR, *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia intestinalis*, diagnosis

## GİRİŞ

Bağırsak parazitlerine bağlı enfeksiyonlar dünyanın özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerinde her yıl çok sayıda insanın hastalanmasına veya ölüme neden olabilen, erişkinlerde işgücü kaybına, çocuklarda ise büyüme gelişme geriliğine yol açabilen önemli bir halk sağlığı sorunudur<sup>(1,2)</sup>. Gelişmekte olan ülkelerde her iki-üç kişiden birinde bağırsak paraziti olduğu tahmin edilirken, ülkemizde yapılan çalışmalarda bağırsak paraziti görülme sıklığının %2.2 ile %34.1 arasında değiştiği, Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da bu oranın diğer bölgelerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir<sup>(3-6)</sup>. Bağırsak parazitlerinin yol açtığı enfeksiyonlar sıklıkla ishal, kabızlık, karın ağrısı, bulantı, kusma, kaşıntı gibi belirtilerle kendini gösterirken, bazen de belirtisiz seyredebilir. Çocuklar içinse bağırsak parazitlerinin yol açtığı enfeksiyon uzun vadede daha ağır sorunlara yol açabilmekte, çocuklarda büyüme-gelişme geriliği, sık hastalanma tablosu ve okulda öğrenme güçlüğü görülebilmektedir<sup>(7,8)</sup>. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda parazitlere bağlı oluşan ishal bazen hayatı tehdit edecek kadar ciddi olabilmektedir<sup>(9,10)</sup>.

Bağırsak parazitlerine neden olan enfeksiyonların tanısında mikroskopik inceleme düşük duyarlılığına rağmen halen en yaygın kullanılan yöntemdir<sup>(11-14)</sup>. Laboratuvara taze ya da fiksatif solüsyon (%10 formol, sodyum asetat-asetik asit-formaldehit [SAF] fiksatif, vb.) içinde teslim edilen dışkı örneğinin önce %0.9'luk serum fizyolojik ve Lugol ile, daha sonra yoğunlaştırılıp Lugol solüsyonu ile ve kalıcı boya preparatları (trikrom, demir hematoksilen, Kinyoun asid-fast, vb.) ile hazırlanan yaymaların incelenmesi ideal mikroskopik inceleme yöntemleridir. Tüm bu işlemlerin en az üç ayrı gün alınacak dışkı örnekleriyle tekrarlanmasıyla dışkıda var olan parazitlerin saptanma olasılıklarının çok yüksek olacağı ifade edilmektedir<sup>(12-14)</sup>.

Son yıllarda moleküler biyolojik yöntemlerle parazitolojik hastalıkların tanısı tüm dünyada yaygınlaşan bir uygulamadır. Bu yöntemlerden en sık kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yüksek özgünlük ve duyarlılık değerleriyle bazı bağırsak

parazitlerinin tanısı için altın standart sayılmaktadır<sup>(15,16)</sup>. PZR yöntemi araştırılan enfeksiyon etkeninin tanısına yönelik özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek olduğu için mikrobiyoloji ve parazitoloji laboratuvarlarında, özellikle mikroskopla inceleme veya kültür ile kolayca saptanamayan enfeksiyon etkenlerinin tanısı için son derece yararlıdır. Bununla birlikte, PZR'nin de bazı dezavantajları vardır; bunların başında diğer tanı seçeneklerine göre daha pahalı olması, özel bir laboratuvar, ekipman ve eğitilmiş personel gerektirmesi sayılabilir. Aynı zamanda, araştırılan patojene uygun test koşullarının oluşturulma süreci olarak tanımlanan optimizasyonun bazen uzun zaman alması, test koşullarındaki ufak sapmalar ya da kontaminasyonların testin çalışmasını engellemesi de dezavantaj sayılmaktadır<sup>(17, 18)</sup>.

PZR'nin farklı uygulamaları arasında yer alan gerçek zamanlı (real time) PZR ve multipleks (çoklu) PZR günümüzde parazitolojik enfeksiyonların rutin tanısında gitgide daha sık kullanılmaktadır<sup>(19,20)</sup>. İki veya daha çok mikroorganizmaya ait PZR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda eş zamanlı olarak gerçekleştirilmesine dayanan multipleks PZR yöntemi, optimizasyonu daha da güç olabileceği de son yıllarda paraziter hastalıklar için daha sık kullanılmakta olup bu yönde geliştirilmiş ticari test kitleri ve bunlarla yapılan araştırmalar bulunmaktadır<sup>(20-22)</sup>. Ülkemizden elde edilecek parazit örnekleriyle yapılacak çalışmalar sonucunda geliştirilecek multipleks PZR protokolünün duyarlı, özgün ve daha düşük maliyetli olacağı için rutin tanıda kullanılabileceği ve konvansiyonel yöntemlere göre fark yaratabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında mikroskopik inceleme ile *Blastocystis* sp., *Cryptosporidium* sp. ve *Giardia intestinalis* içerdiği saptanan üç farklı dışkı örneği kullanılarak özgün multipleks PZR protokolünün optimizasyonu amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

TIP 2010-121 nolu bu proje Manisa Celal Bayar

**Tablo 1. *Cryptosporidium* sp. PZR protokolünün içeriği.**

	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PZR Tamponu	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM
dNTP karışımı	20 mM	0.2 mM
İleri Primer (FP)	20 µM	0.2 µM
Geri Primer (RP)	20 µM	0.2 µM
"Hot Start Taq polimeraz"	5 U/µl	2 U/µl
DNA		2 µl

PZR'ye uygun su (PZR-grade H<sub>2</sub>O) ile karışım 25 µl'ye tamamlanmıştır.

Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiş, Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 18.08.2011 tarih 275 sayılı izin alınmıştır. Ayrıca Manisa Celal Bayar Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'nin 12.06.2013 tarih 7661 sayılı yazısı ile proje başlığı değiştirilmesi talebi uygun görülmüştür. Araştırmamızda önce bağırsak parazitleri saptanmış, sonrasında DNA izolasyonu ve PZR yöntemi optimizasyonu aşamaları gerçekleştirilmiştir.

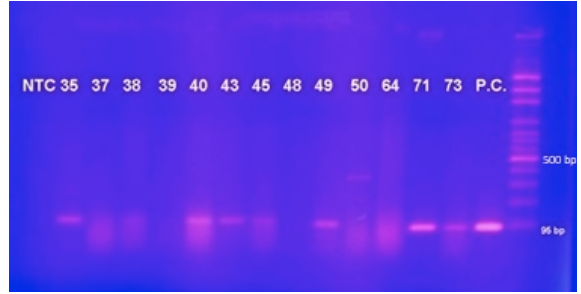
**Bağırsak Parazitlerinin Saptanması:** Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji A.D. laboratuvarlarında uygulanan direkt bakı (serum fizyolojik ve Lugol solüsyonları ile inceleme), yoğunlaştırma ve trikrom boyama yöntemleri ile *Blastocystis* sp. ve *G. intestinalis* içerdiği saptanan iki dışkı örneği ile bunlara ek olarak Kinyoun asit-fast yöntemiyle boyanan ve *Cryptosporidium* sp. içerdiği saptanan bir olmak üzere toplam üç dışkı örneği proje kapsamında kullanılmıştır. Dışkı örnekleri çalışmaların yapılacağı tarihe kadar -20°C'de saklanmıştır.

**DNA İzolasyonu:** Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu ticari kit ("QIAamp DNA Stool Mini Kit", Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri çalışma zamanına kadar -20°C'de saklanmıştır.

**PZR Yöntemlerinin Optimizasyonu:** Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD'nın işbirliğiyle özgün bir multipleks PZR yöntemi geliştirilebilmesi amacıyla öncelikle her bir parazite ait ayrı ayrı PZR protokolleri oluşturulmuş, sonrasında ikili ve üçlü PZR optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 2. *Cryptosporidium* sp. için optimize edilen test koşulları.**

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	15 dk	1
95	30 sn	40
58	30 sn	
72	30 sn	
72	7 dk	1

**Resim 1. *Cryptosporidium* sp.'nin UV ışığında jel görüntüsü.**

***Cryptosporidium* sp. için PZR yönteminin optimizasyonu:** *Cryptosporidium* cinsine özgün bir gen bölgesi BLAST analizleri ve Gen bankası verileri kullanılarak araştırılmış ve "*Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP)" geninin (Acce. no. HQ332161.1) korunmuş ve özgün bir bölgesi belirlenmiştir. Buna uygun olarak "Primer3" programıyla uygun primerler tasarlanmıştır. Daha sonra ise COWP geninin 95 baz çiftlik (bp) bir bölgesi çoğaltılmıştır<sup>(23)</sup> (Tablo 1, 2). *Cryptosporidium* sp. için PZR ile çoğaltılan ürünler elektroforez ile ayrıştırılmıştır. Bunun için %1.8'lik agaroz jele aktarılan PZR ürünleri 100 volt akımda toplam 100 dakika yürütülmüş ve sonrasında etidyum bromid ile boyanarak UV ışığında görüntülenmiştir (Resim 1).

***Giardia* sp. için PZR yönteminin optimizasyonu:** *Giardia* sp.'nin PZR ile saptanabilmesi için önceki bir çalışmamızda geliştirdiğimiz primerler ile protokol kullanılmıştır<sup>(24)</sup>. Sert kist duvarı nedeniyle *G. intestinalis* örneklerinin DNA izolasyonunda zorluk çıkabildiğinden, izolasyon öncesi dışkı örnekleri kistlerin parçalanması amacıyla Roche MagnaLyser® ile muamele edilmiştir. Bu amaçla, içinde 1.4 mm çapında seramik boncuk bulunan (MagnaLyser® Green Beads) 2 ml'lik özel plastik tüplere 500 µl tamponlu bir tuz çözeltisi olan soğutulmuş 1 M fosfat tampon solüsyonu (PBS) eklenmiştir. Daha sonra bu çözeltinin üzerine de yak-

laşık 1.5 mg dışkı örneği eklenmiş ve karışım vorteks yardımıyla yüksek hızda 30 sn kadar karıştırılmıştır. Son aşamada örnekler MagnaLyser® cihazında 6500 devirde 1 dk karıştırma işlemi uygulanmış ve işlem sonunda tüp içerisindeki süspansiyondan 200 µl alınıp 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konulmuştur. DNA izolasyon işlemi bu aşamadan itibaren Qiagen® dışkı izolasyon kitiyle (QIAmp DNA Stool Mini Kit, Cat. No. 51504) kitin protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Elde edilen izolatlar PZR işlemi yapıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

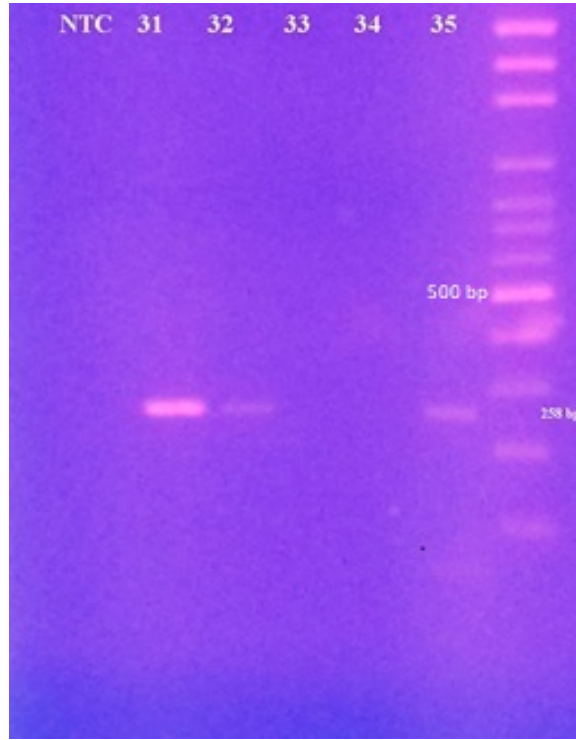
PZR için; *G. intestinalis* *tpi* geninin çoğaltılması için "Forward" 5'-TGGACTGGCGAGACAAG-3' ve "Reverse" 5'-TCCGGCTTGAGGGAAGC-3' primer seti kullanılmıştır. Reaksiyonun son konsantrasyonları ve ısı döngü cihazı programı Tablo 3 ve 4'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır<sup>(25)</sup>. *Giardia* sp. için PZR ile çoğaltılmış olan ürünler %1'lik agaroz jelde yürütülmüş, etidyum bromid ile boyandıktan sonra oluşmuş spesifik bantlar UV ışığında görüntülenmiştir (Resim 2).

**Blastocystis sp. için PZR yönteminin optimizasyonu:** *Blastocystis*'e ait özgün bir gen bölgesi BLAST analizleri ve Gen bankası verileri kullanılarak araştırılmış ve "*Blastocystis* sp. small subunit (SSU) ribosomal RNA" (Acce. no. JN587548.1) üzerinde korunmuş özgün bir gen bölgesi belirlenmiştir. Daha sonra Primer3 programı kullanılarak hazırlanan primerler ile (BLF: 5'-CGAATGGCTCATTATATCAGTT-3' ve BLR: 5'-TCTTCGTTACCGTTACTGC-3') rRNA geninin küçük alt ünitesinden (SSU) 227 bp'lik bir bölge çoğaltılmıştır<sup>(26)</sup> (Tablo 5, 6). PZR ile çoğaltılan ürünler daha sonra elektroforez ile ayrıştırılmıştır. Bunun için 1xTBE tampon ile hazırlanan %1.5'lik agaroz jele aktarılan PZR ürünleri 100 volt akımda toplam 90

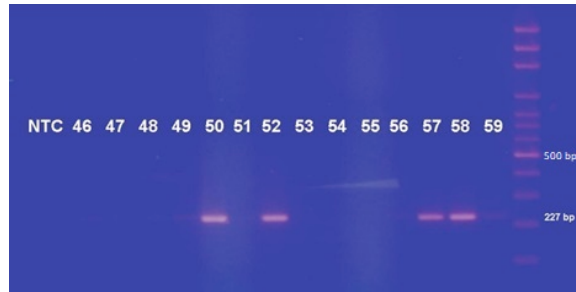
**Tablo 3. *Giardia intestinalis* PZR protokolünün içeriği.**

Reaksiyon Konsantrasyonu	
PZR Tamponu (10X)	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2.0 mM
dNTP karışımı	100 mM
İleri Primer (FP)	1 µl
Geri Primer (RP)	1 µl
"Hot Start Taq polimeraz"	2.5 U/µl
DNA	3 µl

PZR'ye uygun su (PZR-grade H<sub>2</sub>O) ile karışım 50 µl'ye tamamlanmıştır.



**Resim 2. *Giardia intestinalis*'in UV ışığında jel görüntüsü.**



**Resim 3. *Blastocystis* sp.'nin UV ışığındaki jel görüntüsü.**

dakika yürütülmüş ve sonrasında etidyum bromid ile boyanarak UV ışığında görüntülenmiştir (Resim 3).

**Cryptosporidium sp. ve *G. intestinalis*'in ikili PZR optimizasyonu:** Sonraki aşamada *Cryptosporidium* sp. ile

**Tablo 4. *Giardia intestinalis* için optimize edilen test koşulları.**

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	3 dk	1
95	15 sn	35
58	30 sn	
72	30 sn	
72	3 dk	1

PZR'ye uygun su (PZR-grade H<sub>2</sub>O) ile karışım 50 µl'ye tamamlanmıştır.

Tablo 5. *Blastocystis* sp. PZR protokolünün içeriği.

	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PZR Tamponu	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM
dNTP karışımı	20 µM	0.2 µM
İleri Primer (FP)	20 µM	0.2 µM
Geri Primer (RP)	20 µM	0.2 µM
"Hot Start Taq polimeraz"	5 U/µl	3 U/µl
DNA		2 µl

PZR'ye uygun su (PZR-grade H<sub>2</sub>O) ile karışım 25 µl'ye tamamlanmıştır.

Tablo 7. Üçlü PZR için protokol içeriği.

	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PZR Tamponu	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM
dNTP mix	20 mM	0.2 mM
Blastocystis Forward	20 µM	0.2 µM
Blastocystis Reverse	20 µM	0.2 µM
<i>Cryptosporidium</i> sp. Forward	20 µM	0.8 µM
<i>Cryptosporidium</i> sp. Reverse	20 µM	1 µM
<i>Giardia</i> Forward	20 µM	0.6 µM
<i>Giardia</i> Reverse	20 µM	0.8 µM
Hot Start Taq polymerase	5 U/µl	2 U/µl
DNA		2 µl

PZR'ye uygun su (PZR-grade H<sub>2</sub>O) ile karışım 25 µl'ye tamamlanmıştır.

*Giardia* sp.'nin ikili PZR ile çoğaltılabilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. *Giardia* sp. tek başına çoğaltıldığında 258 bp'lik bir bant edilmiş, ancak *Cryptosporidium* sp. ile birlikte çoğaltıldığında aynı sonuç alınamamıştır. Bunun üzerine *Giardia* sp. tpi gen bölgesi üzerinden başka bir baz dizisi primer olarak kullanılmış ve *Giardia* sp. için 113 bp'lik bir bant elde edildiği tespit edilmiştir.

*Cryptosporidium* sp., *G. intestinalis* ve *Blastocystis* sp.'nin üçlü PZR optimizasyonu: Projenin son aşamasında ise, geliştirilmiş olan ikili PZR protokolüne *Blastocystis* sp.'nin eklenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonunda, Tablo 7'de gösterilen test koşullarında üçlü PZR'nin optimize olduğu ve üç protozoona ait DNA'ların bir arada başarıyla çoğaltılabildiği saptanmıştır (Tablo 7, 8). PZR ile çoğaltılan ürünler elektroforez ile ayrıştırılmış, 1xTBE tampon ile hazırlanan %1.5'lik agaroz jele aktarılan PZR ürünleri 100 volt akımda toplam 90 dakika yürütülmüş ve sonrasında etidyum bromid ile boyanarak UV ışığında görüntülenmiştir.

Tablo 6. *Blastocystis* sp. için optimize edilen test koşulları.

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	5 dk.	1
95	30 s	40
58	30 s	
72	45 s	
72	5 dk.	1

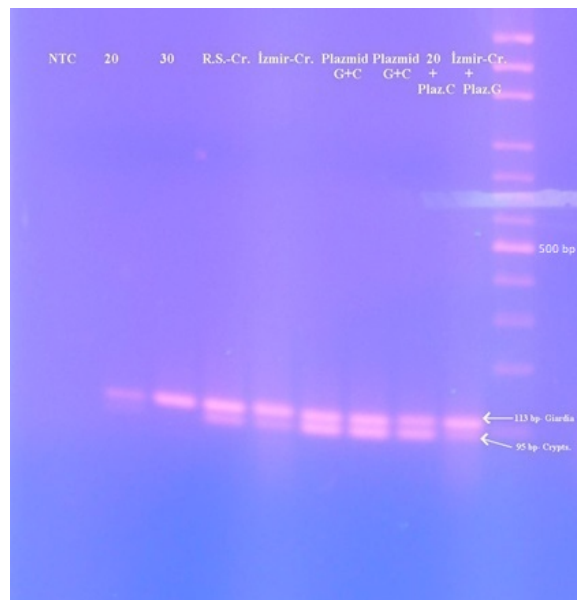
Tablo 8. Üçlü PZR için optimize edilen test koşulları.

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	15 dk.	1
95	30 s	40
58	30 s	
72	45 s	
72	7 dk.	1

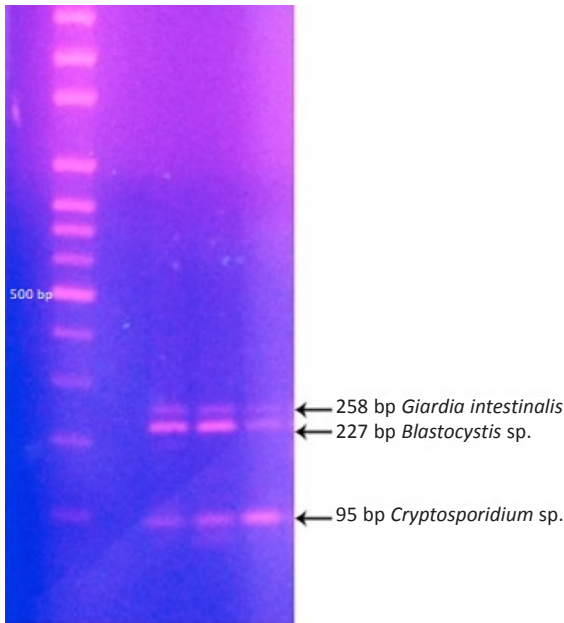
## BULGULAR

*Cryptosporidium* sp., *Blastocystis* sp. ve *G. intestinalis* için sırasıyla 95, 227 ve 258 bp'lik bantlar elde edilmiş, agaroz jele aktarılan PZR ürünleri UV ışığında görüntülenmiştir (Resim 1,2,3).

*Cryptosporidium* sp. ve *G. intestinalis*'in ikili PZR ürünleri görüntülediğinde aynı jelde sırasıyla 95 ve 113 bp'lik bantlar elde edilmiştir (Resim 4).



Resim 4. Optimize edilen ikili PZR sonrası *Cryptosporidium* sp. ile *Giardia intestinalis*'in ikili PZR jel görüntüsü.



Resim 5. *Blastocystis* sp., *Cryptosporidium* sp. ve *Giardia intestinalis*'in üçlü PZR jel görüntüsü.

Projenin son aşamasında *Cryptosporidium* sp., *Blastocystis* sp. ve *G. intestinalis*'in bir arada gerçekleştirilen multipleks PZR optimizasyonu sonucunda aynı jelde sırasıyla oluşan 95, 227 ve 258 bp'lik bantlar Resim 5'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

Bağırsak parazitlerinin tanısında dışkı örneklerinin mikroskopik bakışı halen tüm dünyada en yaygın yöntemdir. Kısa sürede sonuç verebilmesi, serum fizyolojik ile inceleme yapıldığında var olan parazitleri canlı saptayabilmesi ve maliyetinin nispeten düşük olması nedeniyle hemen hemen tüm laboratuvarlarda tercih edilmektedir<sup>(1)</sup>. Bununla birlikte, bağırsak parazitlerinin her gün dışkıyla atılmıyor oldukları bilirse de<sup>(12)</sup> çoğunlukla hastaya ait tek bir dışkı örneği ile tanı konulmaya çalışıldığından yöntemin duyarlılığı düşük kalmakta, incelemeyi yapan uzmanın tecrübesi de belirleyici olmaktadır. Bağırsak parazitlerinin güvenilir mikroskopik tanısında dışkı örneklerine direkt mikroskopi, yoğunlaştırma ve kalıcı boyalı yayma yöntemlerinin bir arada ve üç kez farklı günlerde uygulanması gerektiği bilinmektedir<sup>(12,27)</sup>. Ancak zaman ve tecrübe gerektiren bu yöntemlerin tümünün dünyada ve ülkemizde üç farklı günde tam olarak

uygulanabildiğini söylemek güçtür. Buna bağlı olarak dünyada bağırsak parazitlerine ait insidansın gerçekte çok daha yüksek olduğu, birçok olgunun tanı sürecinde atıldığı tahmin edilmektedir<sup>(1,11)</sup>. Bu nedenlerle çok sayıda paraziti bir arada saptayabilen hızlı ve güvenilir moleküler yöntemlere gereksinim olduğu düşünülmektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonunun bağırsak parazitleri için rutin tanıda kullanımı her geçen gün ucuzlamakta ve yaygınlaşmaktadır. Bugün çalışan personelin maliyetleri ile kıyaslandığında rutin parazitolojik tanı için çok sayıda örneğe PZR ile tanı konulmasının daha düşük maliyetli olduğu hesaplanmaktadır<sup>(28)</sup>. Ayrıca, bağırsak parazitlerinin tanısında moleküler tanı yöntemlerinin geleneksel tanı yöntemlerine kıyasla çok daha duyarlı ve özgün olduğunu, tek bir dışkı incelemesiyle dahi hastaya tanı konulabildiğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur<sup>(15,29-33)</sup>. Son yıllarda yapılan bu çalışmalar sonrasında, gerçek zamanlı PZR'nin bağırsak parazitlerinin tanısında "altın standart" olarak alınabileceği ileri sürülmüştür<sup>(15,32)</sup>.

Multipleks PZR ile tek bir test süresinde daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden son yıllarda mikrobiyolojinin çoğu alanında yaygın kullanılmaya başlanılmıştır<sup>(17,22)</sup>. Testin başarıyla sonuçlandırılabilmesi için test içindeki tüm mikroorganizmaların çoğaltılabileceği uygun sıcaklık ve test sürelerinin tespit edilebilmesi esastır; bu nedenle de optimizasyonu uzun ve zorlu olabilmektedir. Son birkaç yıldır en sık enfeksiyona yol açan *Entamoeba histolytica*, *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* sp., *Blastocystis* sp. ve *Dientamoeba fragilis* gibi bağırsak parazitlerinden birkaçını saptayabilen multipleks PZR panelleri geliştirildiğini bildiren çalışmalar yayınlanmaktadır<sup>(20,32-34)</sup>. Ayrıca ishal etkeni patojenlerini saptamaya yönelik geliştirilmiş ticari kitler de bulunmaktadır; bu kitlerin yüksek maliyetleri göz önüne alındığında araştırma laboratuvarlarının yerli halkta enfeksiyon yapan etkenleri kullanarak, kendi olanaklarıyla yüksek etkinliğe sahip özgün multipleks PZR protokolleri oluşturmaları halen cazibesini korumaktadır. Biz de bu amaçla, laboratuvar olanaklarımızı kullanarak hastalarımızda sık enfeksiyona yol açtığını önceden bildiğimiz *G. intestinalis*, *Blastocystis*

sp., ve *Cryptosporidium* sp. için bir multipleks PZR protokolü oluşturmayı hedefledik. Çalışmalar sonucunda üç parazitin aynı anda optimize edilmiş olarak saptanabildiği özgün bir multipleks PZR protokolü geliştirilmiştir. Bu şekilde tasarlanan primerlerle elde edilen ampikonların *G. intestinalis* için 258 bp, *Blastocystis* sp. için 227 bp ve *Cryptosporidium* sp. için ise 95 bp uzunluğunda olduğu görülmüştür. Testin başındaki denemelerde, *Giardia* sp. tek başına çoğaltıldığında 258 bp uzunluğunda bir bant oluşurken, *Cryptosporidium* sp. ile ikili çoğaltıldığında kullanılan primer dizisiyle değil, *tpi* geninin farklı bir bölgesinden hazırlanan diziyle çoğaltılabildiği ve bu defa 113 bp uzunluğunda bant oluşturabilmiştir. Çalışmanın esas hedefi olan üç parazitin bir arada çoğaltılabilmesi ise ilk başta kullanılan ve çalışmanın "Gereç ve Yöntem" bölümünde dizisi verilen primerlerle gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, sonradan sentezlettilen ve sadece *Giardia* sp. ile *Cryptosporidium* sp.'nin birlikte çoğaltılmasına yarayan primer dizisine karışıklığa yol açmamak için yer verilmemiştir. Sonuç olarak, çalışmada hedeflendiği şekilde üç parazitin optimal koşullarda PZR ile çoğaltılması, "Gereç ve Yöntem" bölümünde açıklanan gen bölgeleri ve primer dizileri ile gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırmanın kısıtlılığı üçlü parazit tanısında multipleks PZR yönteminin optimizasyonunu hedefleyen bir ön çalışma olması nedeniyle sağlıklı ve hasta gruplarıyla duyarlılık ve özgüllük hesaplamalarının yapılamamış olmasıdır. Takip eden araştırmalarda bu durumun dikkate alınarak optimize edilen yeni protokolün konvansiyonel PZR ve mikroskopiye göre duyarlılık ve özgüllüğünün saptanması planlanmaktadır.

Bu yöntemin rutin dışkı incelemeleri için kullanıma girmesiyle mikroskobik bakıda gözden kaçabilen söz konusu parazitlerin saptanabilmesi mümkün olacak ve bu sayede hastalara etkin tanı ve tedavi verilmesi sağlandığı gibi, toplum sağlığına da katkı sağlanmış olacaktır. Gelecekte bu üç parazite ek olarak *E. histolytica*, *D. fragilis* ve *Cyclospora cayatanensis*'in de optimize edilip bu protokole dahil edilmesi planlanmaktadır. Bu gerçekleştiğinde, başta immun yetmezlikli hastalar olmak üzere gastrointestinal sistem

yakınmaları olan tüm hastalara özel bir "Bağırsak Parazitleri Paneli" geliştirilmiş olacak ve bu sayede laboratuvarlarda parazitolojik incelemede dışkı örneklerine farklı yöntemlerin kullanılmasındaki zorluklar nedeniyle çok sayıda parazitin tek bir moleküler yöntemle saptanması mümkün hale gelebilecektir.

**Etik Kurulu Onayı:** Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul tarafından (18.08.2011 tarih ve 275 kayıt numarası) onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansal Destek:** Bu araştırma Celal Bayar Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TIP 2010-121 no.lu proje olarak desteklenmiştir.

**Ethics Committee Approval:** This study was conducted with the approval of Celal Bayar University, Research Ethics Committee (08.18.2011/275).

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Funding:** Celal Bayar University, Scientific Research Committee (Project No: TIP 2010-121)

## KAYNAKLAR

1. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. In: Intestinal Protozoa Amebae. Third Edition American Society for Microbiology, Washington DC Press, 1997:25-30.
2. Korpe PS, Ravdin JI, Petri WA. Introduction to Protozoal Diseases. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Eds: Bennett, JE, Dolin R, Blaser MJ. Ninth Edition. Philadelphia, PA. Elsevier. 2020:3270-2.e1.
3. Gürbüz CE, Gülmez A, Özkoç S, ve ark. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2011-2018 yılları arasında saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg. 2020;44(2):83-7. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2020.6662>
4. Çiçek AC, Direkel Ş, Ulsan Gündoğdu DZ, Ertürk A, Sarı A. Rize İlinde Üniversite ve Devlet Hastanelerine başvuran hastalarda görülen bağırsak parazitlerinin dağılımı. Int J Basic Clin Med. 2013;1(2):78-82.
5. Taş Cengiz Z, Yılmaz H, Beyhan YE, Çiçek M. Geniş kapsamlı bir retrospektif çalışma: Van yöresinde insanlarda intestinal parazitler. Türkiye Parazit Derg.

- 2019;43(2):70-3.  
<https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.5997>
6. Polat E, Özdemir S, Sirekbasan S. İstanbul'da Bir Üniversite Hastanesine başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı: Yedi yıllık retrospektif analiz. *Türkiye Parazit Derg.* 2020;44(3):139-42.  
<https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2020.6653>
  7. Ogbera AO, Anaba E. Protozoa and endocrine dysfunction. 2021 Mar 14. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al. editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–.
  8. Sürmeli A, Tolunay T, Yasin Y, et al. Child health, parasites and lower socioeconomic status: Outcomes of a long-term screening, intervention and training study by health volunteers in rural Nepal. *Acta Trop.* 2020;202:105263.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105263>
  9. Ok ÜZ, Üner A, Korkmaz M. *İmmün yetmezlikte önemi olan parazitler hastalıkları kitabında*. *Blastocystosis*, Özcel MA ed. *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 12*, Bornova, İzmir, 1995:43-9.
  10. Caner A, Zorbozan O, Tunali V, et al. Intestinal protozoan parasitic infections in immunocompromised child patients with diarrhea. *Jpn J Infect Dis.* 2020;73(3):187-92.  
<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2019.054>
  11. Özyurt M, Kurt Ö, Yaman O, Ardic N, Haznedaroğlu T. Bir eğitim hastanesi koproloji laboratuvarında geçen dört yıllık dönemde saptanan bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. *Türkiye Parazit Derg.* 2007;31(4):306-8.
  12. Limoncu ME, Ok ÜZ. Taze dışkı örneğinin toplanması, tespit edilmesi ve nakli. *Parazitolojide Laboratuvar kitabında*. (ed) Korkmaz M, Ok ÜZ. Meta basım, İzmir, 2011:9-16.
  13. Kilimcioğlu AA, Ok ÜZ. Makroskopik inceleme ve taze dışkı incelemeleri. *Parazitolojide Laboratuvar kitabında*. (ed) Korkmaz M, Ok ÜZ. Meta basım, İzmir, 2011:17-22.
  14. Girginkardeşler N, Ok ÜZ. Kalıcı boyalı yaymalar. *Parazitolojide Laboratuvar kitabında*. (ed) Korkmaz M, Ok ÜZ. Meta basım, İzmir, 2011:29-36.
  15. Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Evaluation of three diagnostic methods, including real-time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2006;44(1):232-5.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.232-235.2006>
  16. Emisiko J, Shaviya N, Shiluli C, et al. Comparison of microscopy and PCR for detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in human stool specimens in a resource limited setting in Western Kenya. *Ethiop J Health Sci.* 2020;30(6):891-6.  
<https://doi.org/10.4314/ejhs.v30i6.6>
  17. Li W, Zhang N, Gong P, et al. A novel multiplex PCR coupled with Luminex assay for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp., *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis*. *Vet Parasitol.* 2010;11;173(1-2):11-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.05.024>
  18. Bişkin Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö. Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2011;8(1):43-51.
  19. Tilmanne A, Martiny D, Quach C, et al. Enteropathogens in paediatric gastroenteritis: comparison of routine diagnostic and molecular methods. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(12):1519-24.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.07.021>
  20. Paulos S, Saugar JM, de Lucio A, Fuentes I, Mateo M, Carmena D. Comparative performance evaluation of four commercial multiplex real-time PCR assays for the detection of the diarrhoea-causing protozoa *Cryptosporidium hominis/parvum*, *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica*. *PLoS One.* 2019;14(4):e0215068.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215068>
  21. Usluca S, Eken Berberoğlu AE, Çelebi B, Kılıç S. *Cryptosporidium* spp.'nin realtime PCR yöntemi ile saptanması için metot verifikasyon çalışması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg.* 2019;49(3):162-8.  
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2019.162>
  22. Autier B, Gangneux JP, Robert-Gangneux F. Evaluation of the Allplex™ GI-Helminth(I) Assay, the first marketed multiplex PCR for helminth diagnosis. *Parasite.* 2021;28:33.  
<https://doi.org/10.1051/parasite/2021034>
  23. Coklin T, Farber JM, Parrington LJ, Bin Kingombe CI, Ross WH, Dixon BR. Immunomagnetic separation significantly improves the sensitivity of polymerase chain reaction in detecting *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2011;23(2):260-7.  
<https://doi.org/10.1177/104063871102300210>
  24. 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 uzmanlık tezi]. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa 2011.
  25. Balcıoğlu C, Kurt O, Sevil N, ve ark. Genotyping of *Giardia lamblia* in a cohort of Turkish patients: A search for a relationship between symptoms and genotypes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012;18(Suppl-A):125-31.  
<https://doi.org/10.9775/kvfd.2012.5968>
  26. Menounos PG, Spanakos G, Tegos N, Vassalos CM, Papadopoulou C, Vakalis NC. Direct detection of



- Blastocystis* sp. in human faecal samples and subtype assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing. *Mol Cell Probes*. 2008;22(1):24-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.06.007>
27. Autier B, Gangneux JP, Robert-Gangneux F. Evaluation of the Allplex<sup>TM</sup> gastrointestinal panel-parasite assay for protozoa detection in stool samples: A retrospective and prospective study. *Microorganisms*. 2020;8(4): 569.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8040569>
28. Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, et al. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: Clinical Trial. *J Clin Microbiol*. 1998;36(4):995-8.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.36.4.995-998.1998>
29. Roberts T, Barratt 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(2): 308-12.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0447>
30. Roser D, Simonsen J, Nielsen HV, Stensvold CR, Molbak K. *Dientamoeba fragilis* in Denmark: epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(10):1303-10.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-013-1880-2>
31. Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JL, et al. Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J Clin Microbiol*. 2011;49(1):257-62.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01796-10>
32. Nazeer JT, El Sayed Khalifa K, von Thien H, et al. Use of multiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt. *Parasitol Res*. 2013;112(2):595-601.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-012-3171-8>
33. Zhang H, Morrison S, Tang YW. Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis. *Clin Lab Med*. 2015;35(2): 461-86.  
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.006>
34. Jerez Puebla LE, Núñez-Fernández FA, Fraga Nodarse J, et al. Diagnosis of intestinal protozoan infections in patients in Cuba by microscopy and molecular methods: advantages and disadvantages. *J Microbiol Methods*. 2020;179:106102.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106102>