

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN VE HAYVANLARDA RASTLANAN
BLASTOCYSTİS SP.'NİN GENOTİPLENDİRİLMESİ VE
SUBTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatih ÇAKIR
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Mutalip ÇİÇEK

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ A.D.
Diyarbakır-2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN VE HAYVANLARDA RASTLANAN
BLASTOCYSTİS SP.'NİN GENOTİPLENDİRİLMESİ VE
SUBTİPLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Fatih ÇAKIR
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Mutalip ÇİÇEK**

**TEZ DANIŞMAN YARDIMCISI
Yrd. Doç. Dr. Halil İbrahim YILDIRIM**

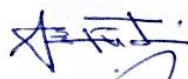




**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ A.D.
Diyarbakır-2017**

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ

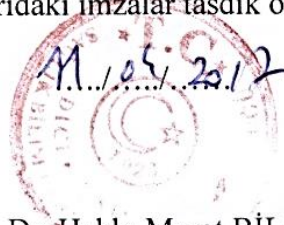
“İnsan ve Hayvanlarda Rastlanan Blastocystis sp’nin Genotiplendirilmesi ve Subtiplerinin Belirlenmesi” isimli Doktora Tezi 05/04/2017 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Mutalip ÇİÇEK
Tezi Teslim Eden : Fatih ÇAKIR

Jüri Üyesinin

	Ünvanı	Adı Soyadı
Başkan	: Prof. Dr. Kadri GÜL	
Üye	: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ	
Üye	: Prof. Dr. Hasan YILMAZ	
Üye	: Prof. Dr. Selahattin ATMACA	
Üye	: Doç. Dr. Mutalip ÇİÇEK	

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.



Doç.Dr. Hakkı Murat BİLGİN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin ve tez hazırlama sürecimin her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek bilimsel alanda ve insani ilişkilerde ciddi katkısını hissettiğim danışman hocam Doç. Dr. Muttalip ÇİÇEK'e,

Tecrübelerini bizlerle paylaşarak eksikliklerimizi tamamlama noktasında gösterdiği sabır, gayreti ve bitmeyen bilim öğrenme merakı ile hem insani hem de akademik yönünden çok istifade ettiğim Anabilim dalı Başkanı'mız Prof. Dr. Kadri GÜL hocama,

Eğitimim süresince her konuda bana destek olan ve problemlerimi sabırla dinleyip yol gösteren hocalarım Prof. Dr. Adnan SUAY'a, Prof. Dr. Mahmut METE'ye, Prof. Dr. Selahattin ATMACA'ya, Prof. Dr. Nezahat AKPOLAT'a ve Prof. Dr. Tuncer ÖZEKİNCİ'ye,

Çalışmalarım süresince laboratuvarını bana açan, her konuda yardımcı olan ve yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Halil İbrahim YILDIRIM hocama,

Çalışmamın istatistiksel analizi ve elde ettiğimiz verilerin değerlendirilmesinde katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. İsmail YILDIZ'a,

Doktora süresince bilgilerinden istifade ettiğim Uzm. Dr. Nida ÖZCAN'a ve diğer asistan arkadaşlara,

Tez hazırlama süresince her türlü ihtiyacıma koşan değerli arkadaşım Alican BİLDEN'e,

Çalışmalarımda bana yardımcı olan laboratuvarın emektarları Mehmet DAĞ ve diğer personel arkadaşlara,

Bu zorlu ve sıkıntılı süreçte bana manevi yönden destek olan anneme, babama ve evin yükünü tek başına çeken eşime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLOLAR DİZİNİ.....	VI
RESİMLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TARİHÇE VE SINIFLANDIRMA.....	3
2.2. MORFOLOJİ.....	5
2.2.1. Vakuoler form (santral form).....	6
2.2.2. Granüler form.....	7
2.2.3. Ameboid form.....	7
2.2.4. Kist formu.....	8
2.2.5. Avakuoler ve Multivakuoler Form.....	9
2.3. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	9
2.4. YAŞAM DÖNGÜSÜ.....	11
2.5. GENETİK ÇEŞİTLİLİK.....	14
2.6. PATOGENEZ VE İMMUNİTE.....	17
2.6.1. İn vitro Çalışmalar.....	17
2.6.2. Blastocystis sp.'nin İmmunomodülatör Etkileri.....	19
2.6.3. İnvivo Çalışmalar.....	21
2.6.4. Blastocystis sp.'nin intestinal dokuya etkileri.....	21
2.7. EPİDEMİYOLOJİ.....	21
2.7.1. Dünyadaki Çalışmalar.....	23
2.8. KLİNİK BELİRTİLER.....	24
2.8.1. GİS ile ilişkili hastalıklar.....	24
2.8.2. GİS Dışı Hastalıklar.....	25

2.9.	TANI YÖNTEMLERİ.....	26
2.9.1.	Mikroskobik Tanı.....	26
2.9.2.	Kültür Yöntemi.....	26
2.9.3.	İmmünolojik Tanı Yöntemleri.....	27
2.9.4.	Moleküler Tanı Yöntemleri.....	28
2.10.	TEDAVİ.....	32
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1.	GEREÇ.....	33
3.1.1.	Cihazlar.....	33
3.1.2.	Kimyasallar.....	33
3.2.	YÖNTEM.....	34
3.2.1.	Örneklerin Toplanması.....	34
3.2.2.	Direk Mikroskobi.....	35
3.2.3.	Kültür Yöntemi.....	37
3.2.4.	PCR Yöntemi.....	38
4.	BULGULAR.....	44
5.	TARTIŞMA.....	53
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
7.	KAYNAKLAR.....	65

Şekiller Dizini

Şekil. 1. *Blastocystis* sp.'nin yaşam döngüsü

Şekil. 2. *Blastocystis* sp.'nin bağırsak epitel hücreleri üzerindeki patojen etkileri



Tablolar Dizini

Tablo. 1. *Blastocystis* sp.'nin Filogenetik Analiz Sonucu Tespit Edilmiş Subtip 1-17'nin Genbank SSU rDNA Dizileri

Tablo. 2. *B. hominis*'in Sınıflandırılmasında ve Subtiplerin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Metotlar

Tablo. 3. *Blastocystis hominis* Genel Primeri

Tablo. 4. *Blastocystis hominis* Subtip Tespitinde Kullanılan Primerler

Tablo. 5. *B. hominis*'in Farklı Yaş Gruplarındaki Dağılımı

Tablo. 6. *B. hominis*'in Cinsiyete Göre Dağılımı

Tablo. 7. *B. hominis* ST1'in Hasta Gruplarına Göre Görülme Oranları

Tablo. 8. *B. hominis* ST2'nin Hasta Gruplarına Göre Görülme Oranları

Tablo. 9. *B. hominis* ST3'ün Hasta Gruplarına Göre Görülme Oranları

Resimler Dizini

Resim. 1. *Blastocystis* sp.'nin Binary Fision İle Üremesi

Resim. 2. *Blastocystis* sp.'nin Tomurcuklanma İle Üremesi

Resim. 3. Kùltürde Üremiş *Blastocystis* sp. Vakuoler Form Direk Bakı Görünümü

Resim. 4. Kùltürde *Blastocystis* sp. Granüler Form Görünümü

Resim. 5. *Blastocystis* sp. Lugol Boyama Görünümü

Resim. 6. *Blastocystis* sp. Vakuoler Form Trikròm Boyama Yöntemiyle Görünümü

Resim. 7. Direk Gaitadan ve Kùltürden Çalışılan PCR Sonucu Elde Edilen Bantlar

Resim. 8. Çalışmada Tespit Edilen Bütün Subtipler



Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

Sp.	: Specie
µm	: Mikrometre
TEM	: Transmission Electron Microscope
MLO	: Mitokondri Like Organel
STS	: Sequence-Tagged Site
PCR	: Polymerase Chain Reaction
ssrRNA	: small-subunit Ribozomal RNA
SSU	: Smal Subunit
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RAPD	: Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
RT-PCR	: Real Time PCR
ST	: Subtip
İBS	: İrrite Bağırsak Sendromu
INOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentezi
NFκB	: Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells
MAP	: Mitogen Activated Protein
GM-CSF	: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
LPS	: Lipopolisakkarit
GİS	: Gastrointestinal Sistem

ÖZET

Blastocystis sp. insan ve hayvanlardan izole edilen patojen bir etken olup günümüze kadar tespit edilebilmiş 17 subtipi bulunmaktadır. Bu subtiplerden 9 tanesi insanda görülmekte ve *Blastocystis hominis* olarak isimlendirilmektedir.

Blastocystis hominis'in bulaş kaynakları ve patojenliği üzerinde en fazla tartışılan konulardan biriydi. Son yapılan çalışmalar sonucu *Blastocystis hominis*'in patojen bir etken olduğu kabul edilmektedir. Özellikle gastrointestinal (GİS) şikâyetleri ve ürtiker gibi hastalıklarla ilişkili olduğu yönünde fikir birliği sağlanmış ise de bu etkenin patojen ve apatojenliğini etkileyen faktörlerin ayırımında tartışmalar devam etmektedir. Günümüzde subtiplerin ve morfolojik formların *Blastocystis hominis*'in patojenliğini etkileyen faktörler olabileceği ifade edilmektedir.

Çalışmaya, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji, Dermatoloji ve Onkoloji polikliniklerinden toplanmış *Blastocystis hominis* yönünden pozitif 51 hasta dışkı örneği, kontrol grubu olarak herhangi bir şikayeti olmayan sağlıklı bireylerden toplanmış 18 dışkı örneği; sığır, koyun, at ve tavuklardan toplanan *Blastocystis hominis* yönünden pozitif 27 hayvan dışkı örneği dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen örnekler nativ-Lugol ve trikrom boyama yöntemi ile değerlendirildi. Pozitif bulunan örnekler kültür yöntemi ile çalışıldı. Kültürde pozitif çıkan örneklerin subtip tespiti PCR yöntemi ile yapıldı. PCR işleminde insanda enfeksiyon yapabilen 9 subtipin tayini için Sequence-Tagged Site (STS) primerleri kullanıldı.

Bu çalışmada direk bakıda pozitif bulunan bütün örnekler Jones medium kültür yöntemiyle de pozitif olarak tespit edildi. Kültür yöntemi, içerisinde çok sayıda hücreli yapı ve artefakt bulunduran hayvan dışkı örneklerinin tanımlanmasında daha güvenilir bir yöntem olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda, ST3 en yaygın subtip olarak belirlendi. ST3'ten sonra en sık görülen subtipler sırasıyla ST1, ST2, ST7, ST6 ve ST5 olarak tespit edildi. Bu çalışmada, ülkemizde ilk defa koyunlarda ST5 ve ST6 tespit edildi. Çalışmamızda insanlarda *Blastocystis* sp. genel primerleri pozitif olarak tespit edilen 12 hastada hiçbir subtip belirlenemedi. Bu durum bizlere, insanda enfeksiyon yapan subtiplerin 9'dan daha fazla olduğu ve ileride yapılan moleküler dizi analiz çalışmalarıyla başka subtiplerin de tespit edilebileceği fikrini verdi.

Anahtar kelimeler: *Blastocystis hominis*, Subtip, Jones Medium Kültür Yöntemi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu,

ABSTRACT

Blastocystis sp., isolated from human beings and animals, has 17 subspecies that can be detected up to day. Nine of these subspecies can be seen in humans and they are called *Blastocystis hominis*.

Infection sources and pathogenesis of *Blastocystis hominis* was one of the most debated topics. As a result of the conducted studies, *Blastocystis hominis* is considered to be a pathogenic factor. Although there is consensus on the fact that it is associated with diseases such as gastrointestinal (GI) complaints and urticaria, there are still debates on the differentiation of factors that affect the pathogenesis and apoptosis. It is stated today that subtypes and morphological forms may be factors affecting the pathogenicity of *Blastocystis hominis*.

The study included 51 positive stool samples collected from patients admitted to the Gastroenterology, Dermatology, Oncology polyclinics of the Dicle University Faculty of Medicine and from control groups, 18 stool samples from healthy individuals with no complaints, and 27 positive animal specimens in regards to *Blastocystis hominis* consisting of double-claw, single-claw and poultry groups.

The samples included in the study were evaluated by Native-Lugol and trichrome staining method. Positive samples were evaluated by the culture method. The subtypes of the samples which were positive in culture were determined by the PCR method. Sequence-Tagged Site (STS) primers were used for the detection of 9 subtypes capable of infecting in-house during PCR.

All specimens positive for direct microscopic examination were also detected as positive by the Jones medium culture method too. The culture method was evaluated as a more reliable method of identifying animal stool specimens with numerous cellular structures and artefacts.

ST3 was identified as the most common subtype in our research. The frequency of sighting following ST3 was determined as ST1, ST2, ST7, ST6 and ST5 respectively. In this study, ST5 and ST6 were detected in sheep for the first time in our country. In our study, no subtypes could be detected in 12 patients with PCR positive *Blastocystis hominis* general primers. This provided us the idea that subtypes infecting humans are more than 9 and we could detect other subspecies in the future studies conducted with molecular sequence analysis.

Key words: *Blastocystis hominis*, Subtype, Jones Medium Culture Method, Polimerase Chain Reaction

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yaşadığımız zaman, baş döndürücü bir şekilde bilgiyi yenilemektedir. Özellikle tıp ve sağlık bilimlerindeki literatürün sürekli artması ve buna bağlı olarak, teknolojik gelişmeler ile bilginin yarı ömrünün 2-3 yıl gibi kısa bir süreye inmesi söz konusudur (1). Bu sebepten şartlar doğru bildiğimiz her şeyi yeniden gözden geçirmemizi zorunlu kılmaktadır.

Blastocystis sp. bunun en çarpıcı örneklerinden biridir. İlk olarak 1911 yılında tespit edilmiş ve bir mantar olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra Zierdt ve arkadaşları morfolojik ve fizyolojik özelliklerini inceleyerek *B. hominis*'in protozoon olduğunu bildirmişlerdir (2). Taksonomik olarak 1996 yılında sınıflandırılabilmiş ve son yıllarda patojenliği üzerinde durulmaya başlanmıştır. Günümüzde ise *Blastocystis* sp.'nin her gün yeni bir yönü ortaya konulmakta ve üzerinde yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Blastocystis sp. hakkında literatüre girmiş bilgileri şu şekilde sıralayabiliriz.

Taksonomik sınıflandırması ancak son yıllarda yapılabilmemiş ve 18s rRNA'nın araştırılması gibi modern filogenetik tekniklerin uygulanması sonucu Stramenopile alevinin içine yerleştirilmiştir (3).

İnsanın ve birçok hayvan türünün doğal konak olarak bu paraziti taşıdıkları ve hayvanların belli subtipleri insanlara bulaştırdıkları belirlenmiştir. Şu ana kadar 17 subtip tespit edilmiş ve bu subtiplerden dokuzunun insanda bulunduğu belirlenmiştir (4).

Blastocystis sp. morfolojik yönden çok değişiklik göstermektedir. Altı farklı morfolojik formu vardır. Bunlar, vakuoler, avakuoler, multivakuoler, granüler, ameboid ve kist formudur. Bu formların patojenite ile olan ilişkisi kesinlik kazanmamıştır (5).

Yapılan çalışmalar sonucu *Blastocystis hominis*'in patojen bir etken olduğu yönünde fikir birliği sağlanmıştır. Fakat parazitin patojen ve apatojenliğini etkileyen faktörlerin ayrımı noktasında tartışmalar devam etmektedir.

Blastocystis sp. hakkında üzerinde fikir birliği sağlanmış noktaları belirttikten sonra günümüzde hala çözüme kavuşturulamamış noktaları şu şekilde sıralayabiliriz:

Blastocystis hominis neden enfekte ettiği bütün bireylerde aynı etkiyi yapmıyor? Patojen suşlarla subtiplerin bir ilişkisi var mı? Belli subtiplerin belli

konaklarla ve belli hastalıklarla ilişkisi var mı? Bu etkenin patojenitesinin belli formlarla (Ameboid form) ilişkisi var mı? *Blastocystis* sp.'nin virulansını etkileyen etmenler nelerdir (Enzimler, Hücre yüzey yapısı)?

Bu çalışmada; *B. hominis*'in insan ve hayvanlarda ortak olan 9 subtipi çalışılarak özellikle ürtikerli, GİS şikâyetleri olan ve immün suprese hastalar gibi belli hasta gruplarında hangi subtiplerin baskın olduğunun belirlenmesi ve insanlarla yakın ilişkili olan sığırlarda, koyunlarda, atlarda, köpeklerde ve kanatlılarda hangi subtiplerin baskın olduğunun saptanması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE VE SINIFLANDIRMA

Blastocystis sp. Parazitolojinin en tartışmalı konularından biridir. Bu etkenin literatürde yerini alması ve tanımlanması yaklaşık yüz yıl önceye dayanmaktadır. İlk olarak 1899'da Perroncito *B. hominis*'e benzeyen bir organizma tespit etmiş fakat tam olarak isimlendirememiştir (6). Ucke'nin 1907 de, Bohne'nin 1908 de yaptığı çalışmalarda bu paraziti *Trichomonas intestinalis* olarak isimlendirilmiştir (7, 8).

Bundan sonra 1911 yılında Alexeieff bu etkenin hücre yapısı ve üreme şekli itibariyle farklı bir cins olduğunu belirtmiş ve *Blastocystis enterocola* olarak isimlendirmiştir. *Blastocystis* sp. bu çalışmada, boyutlarındaki değişiklikler, morfolojik olarak maya mantarına benzer şekillerinin olması ve en önemlisi de tomurcuklanma ile üremesi gibi özellikleri sebebiyle maya mantarı olarak sınıflandırılmıştır (9).

Alexeieff'ten bir yıl sonra Brumpt insan dışkı örneklerinden izole ettiği bu etkene günümüzde de geçerliliğini koruyan *Blastocystis hominis* adını önermiştir. Bu çalışma *B. hominis*'in *Entomeoba* ile karıştırılabileceğini ve zararsız bir etken olduğunu belirten ilk ciddi bilgileri içermektedir (10).

Bu çalışmadan sonra apatojen bir etken olarak kabul edilen *Blastocystis hominis* üzerinde çok durulmamış ve hakkında çok fazla çalışma yayınlanmamıştır. 1967 yılında Zierdt'in *B. hominis*'in fizyolojik ve morfolojik yapısının protozoon bir karakter gösterdiğini ifade etmesi, patojen bir etken olabileceği ve farklı formlarının olduğunu belirtmesinden sonra bu etken hakkında yapılan çalışmalar ve yayınlar artmaya başlamıştır (11).

Özellikle Zierdt ve arkadaşları 1974, 1976 ve 1981 yıllarında yaptığı çalışmalarda bu etkenin aksenik kültürünü yapmış, hücre duvar yapılarını incelemiş ve bir protozoon olduğunu belirtmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda *B. hominis* yeni bir sınıflandırmaya tabi tutulmuş ve bir protozoon olarak tanımlanmış ve Sarcodina subfilumunda sınıflandırılmıştır (12-15).

1980 yılında Levine ve arkadaşları tarafından bu etkenin sınıflandırması ayrıntılı şekilde yapılmış ve 1985 yılında bu sınıflandırma şeması kabul edilmiştir (16). Özellikle 1985 yılından sonra moleküler yöntemlerinin gelişmesiyle *Blastocystis*

sp. daha fazla önem kazanmaya başlamış ve bu alanda yapılan çalışmalar artmıştır (3, 17, 18). 1990 yılından sonraki çalışmalarda ve yayınlarda protista içinde olduğu belirtilmiş ve protista özellikleri gösterdiği ifade edilmiştir. *Blastocystis* sp'nin mantar besiyerlerinde ürememesi ve antifungal ilaçlara dirençli olmasına karşın metranidazol ve emetin gibi antiprotozoal ilaçlara karşı duyarlı olması protistalar içine alınmasında etkili olmuştur (19, 20).

Fakat 18s rRNA, Elangasyon Faktör (EF) 1α ve 2 sekans analizleri, Sitolitik-Type 70kDa Heat Shock proteini gibi korunmuş bölgeler ile yapılan moleküler çalışmalar, taksonomik ve filogenetik olarak çok farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Bu çalışmalar, *Blastocystis* sp'nin fungus, maya, sarcodines veya sporozoa sınıfı ile filogenetik olarak uyumlu olmadığı ve bu etkenin Stramenopile alemi içine yerleştirilmesi gerektiğini göstermiştir (17, 18, 21).

Stramenopile alemi, heterekonta ile eş anlamlı olarak kullanılmakta ve çok farklı türleri barındırmaktadır. Bu grupta kamçı veya küçük kıl benzeri çıkıntılar içeren, besinlerini organik bileşikleri parçalayarak veya güneş enerjisinden sağlayan Oomycetes, Diatomae, Sarı Algler ve Kahverengi Algler gibi organizmalar bulunur (22).

Moleküler filogenetik çalışmalar *Blastocystis* sp.'nin flagellasız ve hareketsiz bir etken olmasına rağmen, bazı kertenkele ve kurbağaların kalın bağırsağında yaşayan flagelleli bir etken olan *Protoremonas lacetae* ile yakın akraba olduğu göstermektedir. Bunun için *Blastocystis* sp.'nin filogenetik sınıflandırması yeniden düzenlenmiş ve günümüzde de geçerliliğini koruyan son şeklini almıştır (17, 18, 23, 24). Cavalier-Smith'in 1998 yılında yaptığı sınıflandırma aşağıdaki şekildedir ve güncelliğini korumaktadır (23).

Kingdom	: <i>Chromista</i>
Subkingdom	: <i>Chromobiota</i>
İnfrakingdom	: <i>Stramenopile (Heterokonta)</i>
Subphylum	: <i>Opalinata</i>
Class	: <i>Blastocystea</i>

Son yapılan moleküler çalışmalar *Blastocystis* sp.'nin insan ve hayvanda 17 farklı subtipinin bulunduğunu ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalar bu etkenin hayvanlar aleminde yaygın şekilde bulunduğunu göstermiştir (25).

Geçmiş zamanlarda *Blastocystis* sp.'ye izole edildiği etkene göre farklı isimler verilmiştir (tavuklarda *Blastocystis gali*, ördekte *Blastocystis anatis*, kazda *Blastocystis anseri* ve yılan da *Blastocystis lapemi*). Fakat günümüzde insandan izole edilebilen subtiplere *Blastocystis hominis*, sadece hayvanlardan izole edilen türlere de *Blastocystis* sp. denilmesi tavsiye edilmektedir (26).

2.2. MORFOLOJİ

Blastocystis hominis boyutları 4 ile 50 µm arasında değişen (Besiyerlerinde 200µm'ye kadar çıkabilmektedir) yuvarlak görünümlü bir parazittir (27).

Blastocystis sp.'nin hücre yüzeyi fibriler, filamentöz veya kapsüler tabaka olarak isimlendirilen kalın bir tabaka ile kaplanmıştır. Taze dışkıdan elde edilen izolatlarda bu tabaka 1 µm kalınlığa ulaşabilirken eski kültürlerde gittikçe incelmektedir. Hücre zarı düzgün ve parlak bir görünüm sergiler. Taze dışkıda sitoplazma ve vakuol parlak röfle verir şekilde görülür (28).

Anaerob bir etken olduğu için beklemiş dışkıda oksijenin etkisiyle hücre çeperi daha pürüklü bir yapı arz edebilir. Bazı yayınlarda hücre yüzeyinin karbonhidrat bir tabaka ile kaplı olduğu ve bu tabakanın savunma sisteminden kaçmak ve beslenme amaçlı bakterileri yakalamak için kullanıldığı ifade edilmiştir (29).

B. hominis'in sitoplazması normal bir anaerobik ökaryotik organizmadaki, endoplasmik retikulum, mitokondri like organel (MLO), golgi aygıtı vb. temel organelleri içerir ve organeller periferik dağılmıştır. Işık mikroskobu ile bakıldığında nükleus sayısı iki ile dört arasında değişmekte ve mikro vidayla oynandığında parlak bir görünüm arz etmektedir. Mitokondri like organel (MLO) yuvarlak şekilde görülmektedir (27).

Blastocystis sp.'nin dört temel, iki tane de ara formu vardır. Bu dört temel form: Vakuoler form, granüler form, ameboid form ve kist formudur. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar, taze dışkıda iki ara form olan avakuoler form ve multivakuoler formların bulunabileceğini göstermiştir. Bundan başka taze dışkıda ve kültürde çok sayıda farklı form ve şekiller görülebilmektedir. Bu şekillerin her birine morfolojik görünümüne göre bir isim vermek zor ve gereksizdir (27).

2.2.1. Vakuoler form (santral form)

Bu form tanıda en çok karşılaşılan formdur. Boyutları taze dışkıda veya kültürden hazırlanan preparatlarda bakılmasına göre çok ciddi farklılıklar gösterir. Vakuoler formun boyutları taze dışkıda 4 µm - 50 µm arasında değişebilmekte, kültür ortamında ise 200µm ye ulaşabilen çok büyük boyutlarda görülebilmektedir (30, 31).

Bu formun ışık mikroskopunda çok rahat tanımlanabilen bir şekli vardır. Vakuoler formun en dış tabakası, taze dışkıda kalın, kültür ortamında daha ince görülebilen bir hücre duvarı ile çevrilmiştir. Daha iç kısımda bir şerit halinde, parlak görümlü ve mikroskopun mikro vidasıyla oynandığında yeşil röfle veren sitoplazma görülmektedir. *B. hominis*'in çekirdeği bir veya daha fazla sayıda bulunabilir ve sitoplazma boyunca yerleşmiştir. Hücrenin merkezinde tipik, geniş bir vakuol bulunmaktadır. Bu vakuol hücrenin yaklaşık % 90'ını oluşturmaktadır. Merkezi vakuol boş görülebilir veya bazen ince flokülant maddeler içerebilir (27).

Bu vakuollerin, periyodik asit - Schiff ve Alcian blue boyaları ile boyanan karbonhidrat yapılar ve Sudan black boyası ile boyanan lipidler içerdiği gösterilmiştir (32, 33). Bu yönleriyle vakuolün organeller açısından bir depo özelliği olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir araştırmada, hücre zarından besinlerin küçük veziküller aracılığı veya klatrine dayalı endositoz ile merkezi vakuole alındığı gösterilmiştir (34). Vakuollerin progeninin üremesi için uygun bir ortam sağlayarak şizogoni benzeri üremede rol oynadığı düşünülmektedir (35).

Vakuoler formun sitoplazması, normal bir ökaryotik canlının organel yapılarını içermektedir. Vakuoler formun sitoplazma içeriğinde; birçok farklı organel bulunmaktadır. TEM (Transmission Electron Microscope) Elektron mikroskobu ile yapılan incelemede sitoplazmanın; bir veya daha fazla sayıda nükleus, Golgi aygıtı, endosom benzeri vakuoller, tübüller, mitokondri benzeri yapılar ve hücre zarının içe katlanması sonucu oluşan filament ve veziküller içerdiği tespit edilmiştir (36).

Vakuoler formun dış yüzeyi bazen fibriler şekilde bazen de kapsül şeklinde görülen bir tabaka ile kaplıdır. Parazit taze dışkıdan izole edildiğinde yüzey tabakası daha kalındır. Bu tabakanın uzun süreli kültür ortamında incelediği ve bazı invitro kültür ortamında belli yüzey katmanlarını kaybettiği gösterilmiştir (31). Bu yüzey tabakasının neden incelendiği tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan yorumlarda parazit taze dışkıda yapışkan yüzey tabakası ile beslenme amaçlı bakterileri yakaladığı veya

immün sistemden kaçtığı ve bu durumun da daha kalın bir tabaka oluşturabileceği iddia edilmiştir (29). *Blastocystis* sp.'nin yüzey fibrillerindeki bu değişimin sebebi, aksenik kültürde başka bir mikroorganizma ile beslenmenin mümkün olmaması ve ksenik kültürlerde de beslenmek için yeterli imkân bulunması olabilir (28).

Bu yüzey tabaka çeşitli karbonhidratlar içermektedir. Karbonhidrat tabakanın, beslenme amaçlı bakterileri yakalama ve onların yapılarını bozmak, osmotik basınca karşı hücreyi korumak ve immün sistemin hayati organellere zarar vermesini engellemek için koruyucu bir tabaka oluşturmak gibi görevleri vardır (37).

2.2.2. Granüler form

Bu form ışık mikroskopunda incelendiğinde vakuoler forma çok benzemektedir. Fakat merkezi vakuollerin ve bazen de sitoplazmanın çeşitli derecelerde granül içermesi ile vakuoler formdan ayrılır (27). Granüler formun boyutları vakuoler formdan daha büyüktür ve 6,5-80 µm arasında değişmektedir ve ortalama çapı 10 µm'dir (38).

Bu form geçmiş yayınlarda, tedavi görmüş hastaların eski, ksenize kültürlerinde görülen ve granül içeren vakuoler form olarak tarif edilmiştir. Fakat sonraki çalışmalar granüler formun belirgin bir form aşaması olduğunu ortaya koymuştur (27, 39).

Hücre içi granüller heterojen bir dağılım göstermektedir. Bu heterojen yapılar içinde, miyelin benzeri inklizyonlar, küçük veziküller, kristalize granüller ve lipit damlacıklar bulunmaktadır (31).

Parazitin bir bölünme şekli olan şizogoni benzeri bölünme döneminde granüllerin daha sık görüldüğü ifade edilmiştir (19, 35, 40). Bazı araştırmacılar bu durumu kabul etmemekte ve granüllerin parazitin yaşayabilmesi ve gelişebilmesi için gerekli olduğunu ifade etmektedir (41, 42).

2.2.3. Ameboid form

Bu form ilk olarak ishallerde dışkıda amip benzeri yapıların görülmesi ile bildirilmiştir (13). Ameboid formun *Blastocystis* sp.'nin farklı bir genetik varyasyonu olabileceği belirtilmiştir. Bu form hakkında yapılan çalışmalar kısıtlıdır ve yapılan çalışmalarda bir biriyle çelişen durumlar vardır (43).

Yapılan çalışmaların ortak noktalarını şu şekilde sıralayabiliriz. İnvitro kültürde yapılan bir çalışmada; bu formun 10 - 15 µm boyutunda olduğu ve düzensiz yüzey yapısı gösterdiği ifade edilmiştir Ameboid form, bir veya iki büyük pseudopoda sahip olmasına karşın hareketsizdir (31).

Bu form TEM ile incelendiğinde, merkezi bir vakuolü, golgi aygıtı, mitokondri benzeri yapıları, bir yüzey tabakası ve sitoplazmasının içine aktığı pseudopodları görülebilir. Yine içinde bakterilerin bulunduğu lizozom benzeri yapılar vardır. Hücre sitoplazmasında görülen bakterilerin, beslenme amaçlı olduğunu anlaşılmıştır (44, 45).

Ameboid form daha çok semptomatik belirtileri olan hastaların invitro kültürlerinde görülmektedir (46). Yine ameboid formun patojenite ile ilişkili olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda ameboid formun tıpkı *E. histolytica* benzeri enzim yapısında maddeler saldığı ve böylece hücre yüzey hasarına sebep olduğu bununla beraber hümmoral ve hüccresel immün yanıtı tetikleyerek ikinci bir hücre hasarına sebep olduğu gösterilmiştir (47-49).

Günümüzde ameboid formun popülaritesi gittikçe artmaktadır. Bu sebeple artarak devam eden elektron mikroskobu ile görüntüleme ve moleküler temelli çalışmaların yapılması ile bu formların tür düzeyinde ayrımı yapılacak ve morfolojik farklılıklara dayalı tahminler ortadan kalkacaktır (27).

2.2.4. Kist formu

Kist formu genellikle taze dışkı örneklerinde görülür. Kist formunun tanımlanmasında ışık mikroskobu yetersiz olduğu için çalışmalar daha çok elektron mikroskobu üzerine yoğunlaşmıştır (50-53)

Diğer formlarla karşılaştırıldığında daha küçüktür (2-5 µm). Şekil olarak çeşitlilik gösterir fakat genellikle oval veya yuvarlak şekillidir. Dış yüzeyi çok tabakalı kalın bir kist duvardan oluştuğı için bulanık görünür (54-56).

Kist formunun sitoplazması; birden dörde kadar değışebilen nükleus, mitokondri benzeri yapılar, glikojen depoları ve küçük vakuoller içerir (55, 57, 58).

Bu form bulaştan sorumludur. Yapılan bir çalışmada kist formunun, sulu bir ortamda yüksek ısılarda uzun süre yaşayamadığı fakat 25°C 1 ay, 4°C de 2 ay canlı kalabildiğı gösterilmiştir (54, 59).

2.2.5. Avakuoler ve Multivakuoler Form

Yukarıda tarif edilen dört formdan başka iki form daha, farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Bunlar, avakuoler ve multivakuoler formlardır.

Avakuoler form tipik merkezi vakuolünü kaybetmiştir. Multivakuoler formda ise küçük küçük birçok vakuol görülmektedir. Bu formları ışık mikroskobu ile tespit etmek çok zordur. Bu sebepten bu formların morfolojik yapıları elektron mikroskobu (TEM) ile yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Taze dışkıda büyüklükleri 3-8 µm arasında değişmektedir. Bu formların sadece in vivo koşullarda oluşabildiği ileri sürülmüştür (60, 61)

Avakuoler formlarda organel matrisine uzanan sayısız krista bulunmaktadır. Kültür ortamında bu yapılar oldukça az sayıdadır ve kısa tübüler veya kesecik şeklindedirler. Yapılan çalışmalarda, avakuoler formlarda mitokondri benzeri organelin elektriksel yükünün diğer formlara göre daha az olduğu gözlemlenmiştir (62).

Bu formlar kist oluşturma veya kistten çıkma aşamalarında ara formlar olabilirler. Elektron mikroskobu (TEM) ile yapılan çalışmalarda, *Blastocystis* sp. hücrelerinin kistten çıkma aşamasında bu formlara benzer çeşitli morfolojik yapılar gösterdiği belirtilmiştir. Bu formların boyutlarının küçük olması ve vakuollerini ya kaybetmeleri veya birçok vakuol içermeleri bu iddiayı desteklemektedir (53, 58).

2.3. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Blastocystis sp. ksenik ve aksenik invitro ortamlarda üretilen mutlak anaerop bir canlıdır. *Blastocystis* sp. en rahat 37°C ısıda ve nötral veya hafif alkali pH'da üremektedir.

B. hominis'in sitoplazma zarı iki tabakadan oluşmaktadır. Sitoplazma zarı elektron mikroskobu ile incelendiğinde, dış katmanın elektron yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmektedir. Yine dış tabakadan fibriler yapıda uzantılar çıkmaktadır. Bu yapıların bakterileri yakalama gibi bir görevinin olup olmadığı halen tartışılmaktadır (27).

Sitoplazma zarının içeriğine bakıldığında ise ökaryotik bir hücre zarına ek olarak yoğun bir şekilde karbonhidrat içerdiği görülmektedir. Lanuza ve ark'ının. yaptıkları bir çalışmada lektin içeriği görülmüştür (62). Yine başka bir çalışmasında

alpha-d-mannose, alpha-d-glucose, N-acetyl-d-glucosamine, alpha-L-fucose, kitin ve sialic asit içeriği tespit edilmiştir (63, 64).

Hücre zarındaki bu karbonhidrat tabakanın beslenme amaçlı bakterileri yakalamak ve onların yapılarını bozmak, hücreyi osmotik basınca karşı korumak ve immün sistemin hayati organellere zarar vermesini önlemek için koruyucu bir tabaka oluşturmak gibi görevleri vardır (64, 65).

B. hominis'in sitoplazması normal ökaryotik bir canlıdaki bütün organelleri içermektedir. Fakat anaerop bir etken olduğu için morfolojik olarak mitokondriye benzer fakat biyolojik olarak mitokondrinin işlevlerini yerine getirmeyen bir yapıya sahiptir. Bu yapı hidrogenezom veya Mitokondri like organel (MLO) olarak isimlendirilmektedir (60).

Hidrogenezom veya MLO olarak isimlendirilen bu yapılar 0.5-1.0 µm kalınlığında çift zar ile kaplıdır. Bu yapı enerji üretebilmektedir. Mitokondriden en temel farkları ise; sitokrom enzimlerinin olmayışı, trikarboksilik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon gibi işlevlerin eksikliği olarak belirtilmiştir (66).

Blastocystis sp.'nin vakuoler ve granüler formlarında merkezi geniş bir vakuol bulunmaktadır. Bu vakuolün görevleri hakkında birçok çalışma yapılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Fakat günümüzde dahi bu vakuolün hücrede nasıl bir rol oynadığı kesin olarak açıklanamamıştır (67).

Özellikle vakuoler formda, merkezi vakuol boş görülebilir veya ince bir flokülant içerebilir. Granüler formda ise bu flokülantlar daha kaba bir görünüm arz eder. Bu vakuollerin karbonhidrat içerdiği ve periyodik asit - shiff ve alcian blue boyaları ile boyandığı gösterilmiştir (65). Bununla beraber sudan black boyası ile boyanabildiği ve triaçil gliseroller, diaçil gliseroller ve fosfolipidler gibi farklı tarzda lipit yapılar içerdiği de gösterilmiştir. Yine farklı çalışmalarda temel bazı proteinlerinde bu vakuol içinde bulunduğu gösterilmiştir (34, 65, 68, 69).

Bu yönleriyle vakuolün, organeller açısından bir depo özelliği olduğu ve bazı metabolik olaylarda rol aldığı düşünülmektedir (68). Vakuollerin, progeninin üremesi için bir ortam sağlayarak şizogoni benzeri üremede rol oynadığı düşünülmektedir (70).

Kist formunda merkezi vakuol yoktur fakat bir sürüngen izolatında yapılan çalışmada, sitoplazmada büyük oranda glikojen granülleri bulunduğu rapor edilmiştir (59). Kist formunun dış yüzeyinde kitinden oluşmuş kalın bir kist duvarı vardır. Bu

tabakanın üstünde ise muhtemelen karbonhidratlardan oluşmuş ince bir tabaka mevcuttur. Çünkü kistlerin kitin boyaları ile boyanmadığı ışık mikroskobu ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (27).

2.4. YAŞAM DÖNGÜSÜ

Blastocystis sp.'nin üreme döngüsü hakkında çok farklı modeller ileri sürülmüştür. Bunun en temel sebebi ise, *Blastocystis* sp.'nin üreme döngüsü içinde birçok farklı form ve süreçlerin bulunmasıdır (39, 50, 70-73).

Bu sebepten burada, literatürlerde en çok kabul gören yaşam döngüsü modeli açıklandı.

Bu konuda yapılan araştırmalara baktığımızda, bulaştan sorumlu formun kontamine gıdalar ve suyla alınan kist formu olduğu genel kabul görmüştür. Fakat etkenin bulaştırıcı forma geçmek için dış ortamda geçireceği bir evre yoktur. Bu sebepten vakuoler formun da direk temas gibi durumlarda bulaştırıcı olabileceği bazı yayınlarda belirtilmiştir (39, 74).

Burada kist formunun daha ön plana çıkmasının sebepleri şöyle sayılabilir; *Blastocystis* sp. ısı değişikliklerine çok duyarlı bir etkidir ve bu sebepten belli bir ısı derecesinin altında çok kısa zamanda ölebilmektedir. *Blastocystis* sp. mutlak anaerob bir etkidir ve oksijene maruziyet durumunda kısa sürede ölmektedir (27).

Diğer bir sebep ise, *Blastocystis* sp. pH değişikliklerine çok duyarlı bir etkidir ve mide asiditesinde canlılığını kaybetmektedir. Saydığımız bu sebeplerden dolayı bulaştan asıl sorumlu form kist formu olarak kabul edilmektedir. Fakat diğer formların da teknik olarak enfeksiyona neden olabileceği farklı yayınlarda vurgulanmıştır (58, 73).

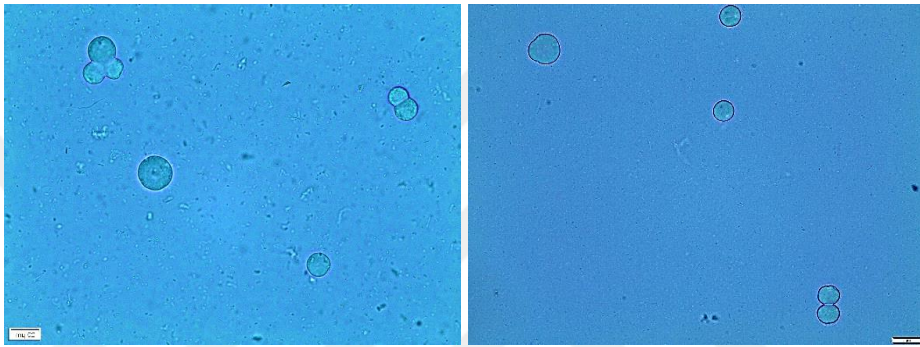
Elektron mikroskobisi (TEM) ile yapılan çalışmalarda, oral yol ile alınan kistler kalın bağırsakta açıldığı ve vakuoler formun geliştiği hatta bir çalışmada kist duvarı daha parçalanmadan içinde vakuoler formun olduğu gösterilmiştir (73, 75).

Enfekte olan bireylerde gastrointestinal sistem içinde belli bölgelerde baskın morfolojik formlar vardır. Çekumda baskın form vakuoler ve granüler form iken kolonda daha çok kist formu gözükmektedir. Fayer ve ark. domuzlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada; *Blastocystis* sp.'nin jejunumda aktif üreyen formlarının olduğunu ve bunun sonucu olarak ta bu etkenin potansiyel olarak bağırsağın daha büyük bölümlerini kolonize edebildiğini rapor etmişlerdir (76).

Blastocystis sp.'nin üreme şekilleri ve morfolojik formların oluşma şekilleri üzerinde tartışmalar devam etmektedir. Yine genel kabul gören noktaları şöyle sıralayabiliriz.

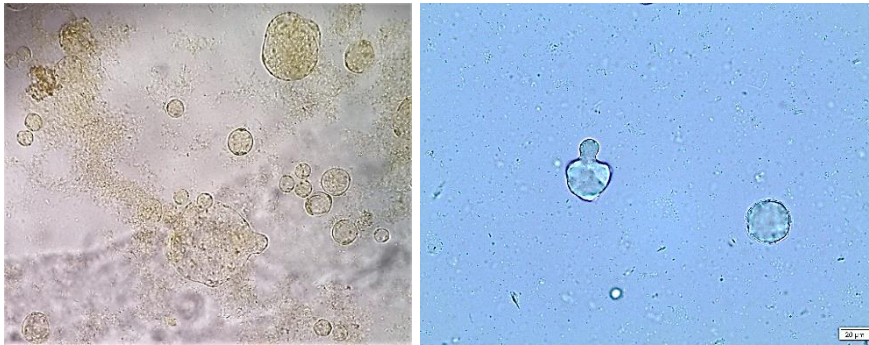
Araştırmacılar *Blastocystis* sp.'nin üremesinde, Binary fission, tomurcuklanma, plasmotomi, multiple fission, endodyogeny ve schizogony gibi birçok üreme modeli olabileceğini belirtmiştir (77, 78).

Binary fission vakuoler ve granüler formun bölünmesinde en çok görülen üreme şeklidir. Günümüzde de en fazla kabul gören üreme şekli de budur (58, 73).



Resim. 1. *Blastocystis* sp.'nin Binary Fision İle Üremesi (Orjinal)

Zhang ve ark. tarafından yapılan bir çalışma ile, tomurcuklanma ve plasmotomi üreme modelleri *Blastocystis* sp.'nin diğer üreme modelleri olarak literatüre girmiştir (77).

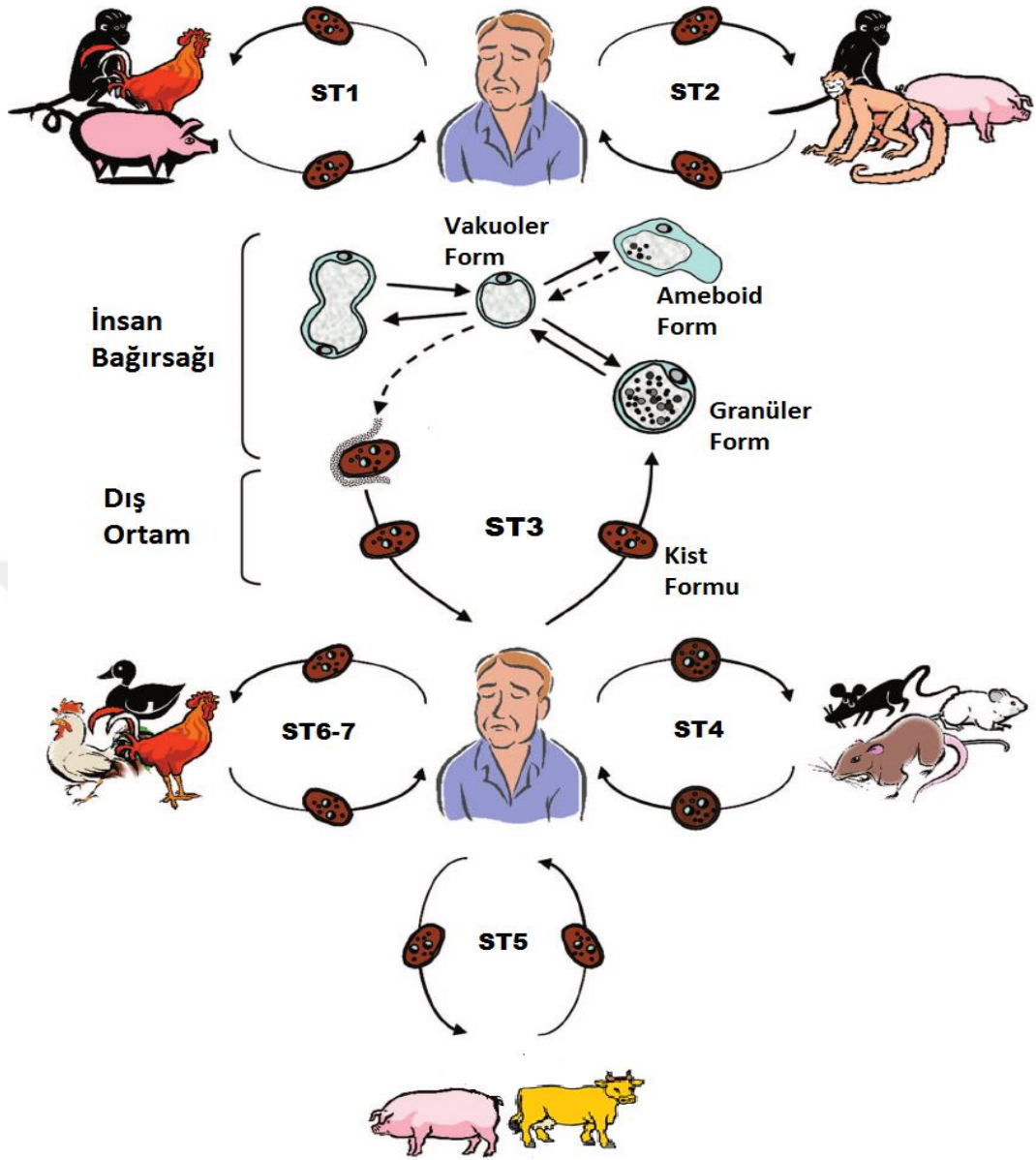


Resim. 2. *Blastocystis* sp.'nin Tomurcuklanma İle Üremesi (Orjinal)

Şizogoni, endodiyogeni üreme modelleri ise özellikle vakuoler formdan granüler forma geçişte kullanılan üreme modeli olduğu iddia edilmiştir. Fakat bu durumun daha çok çalışmayla desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır (27).

Yine ameboid form, multivakuoler ve avakuoler form gibi formların vakuoler formdan kaynak aldığı gösterilmiştir. Burada dikkat çeken bir nokta ise, ameboid formun genelde ishalli ve semptomlu dışkılarda görüldüğüdür (43).

Etken kalın bağırsak boyunca ilerlerken ortamın yaşam şartlarının bozulması sonucu kistler oluşur ve bu kistler dışkıyla atılır. Bazı makalelerde iki farklı kist formunun olduğu iddia edilmektedir. Bu makalelerde, ince duvarlı kistlerin otoenfeksiyondan sorumlu olduğu, kalın duvarlı kistlerin ise dış bulaştan sorumlu olduğu belirtilmektedir. Fakat bu iddia bilimsel olarak ispatlanamamıştır (27).



Şekil 1. *Blastocystis* sp.'nin Yaşam Döngüsü (27).

2.5. GENETİK ÇEŞİTLİLİK

Blastocystis sp. insan ve hayvan türleri arasında morfolojik olarak farklılık göstermemektedir. Bazı çalışmalarda farklı türler arasında morfolojik olarak çeşitli farklılıklar olduğu gösterilmiş fakat bu farklılıkların normal ışık mikroskobu ile ayırt edilebilecek düzeyde olmadığı ifade edilmiştir (79-81).

Blastocystis sp.'nin morfolojik olarak birbirinden ayırt edilemese de genetik olarak birbirinden çok farklı subtipleri bulunmaktadır. Günümüzde araştırmacıların en

fazla dikkatini çeken konuların başında da *Blastocystis* sp.'nin göstermiş olduğu bu genetik çeşitlilik gelmektedir (27).

Bu amaç ile ilk olarak Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemi ile subtip ayrımı yapılmıştır (82-86). Daha sonra dideoxy sequence analizleri ile nükleotid sıralamasının tespiti yapılmıştır (87-89). En son olarak ta, STS (sequence-tagged site) primerleri ile PCR yöntemi kullanılarak bu subtiplerin tespiti yoluna gidilmiştir (90-92).

Günümüzde en çok kullanılan yöntem ise small-subunit rRNA (ssrRNA) üzerindeki gen bölgelerinin STS (Sequence-Tagged Site) primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile tespit edilmesi ve böylece insan ve hayvan türleri arasındaki subtip farklılıklarının belirlenmesidir (93).

Blastocystis sp.'nin insanda ve hayvanda bulunan farklı subtiplerinin tespit edilmesi üzerine artık günümüzde insandan izole edilen subtiplere *Blastocystis hominis*, hayvandan izole edilen subtiplere ise *Blastocystis* sp. denilmesi yönünde görüş birliği sağlanmıştır (26).

Blastocystis sp. birçok yönüyle gelişmeye açık bir alan olduğu için her gün yeni bilgiler ortaya çıkmaktadır. Özellikle subtip düzeyindeki farklılıklar çok hızlı değişmektedir. Bu sebepten 2017 yılına kadar elde edilen en güncel bilgiler burada belirtilmeye çalışılacaktır.

Blastocystis sp. insanda ve çeşitli hayvanlarda bulunan 17 farklı subtipten oluşmaktadır (25). Bu subtiplerden 9 tanesi farklı türdeki hayvanlarda ve insanlarda görülebilmektedir (25, 91). İnsanlarda görülen *Blastocystis hominis* enfeksiyonlarının %90'ından fazlasını ST1, ST2, ST3 ve ST4 oluşturmaktadır (94). Bu subtipler arasında ST1, ST2 ve ST4 düşük konak spesifitesine sahip olup muhtemelen zoonotik enfeksiyonlardır (95). Yapılan çalışmalarda, ST3'ün daha antropotik bir etken olduğu ve insan dışında primatlarda, sığır ve domuzda bulunduğu belirtilmiştir. ST3'ün filogenetik analizinde, insan izolatlarının hayvan izolatlarından ayrı olduğu gösterilmiş ve insandan elde edilen ST3'ün hayvandan farklı olarak ayrı bir alt grup içinde değerlendirilmesi gerektiği ifade edilmiştir (96).

Subtip10-17 ise insanlarda görülmemekte olup, primatlarda, tek tırnaklılarda, çift tırnaklılarda, etçil hayvanlarda, kuşlarda ve kemirgenlerde bulunmaktadır (26, 85).

Tablo. 1. *Blastocystis* sp.'nin filogenetik analiz sonucu tespit edilmiş subtip 1-17'nin GenBank SSU rDNA dizileri (93)

ST	Konakçı	Suş	Baz çifti Uzunluğu	GenBank Erişim Kodu
ST1	İnsan	Nand II	1770	U51151
	İnsan	HA	1770	KF002532
	Tavuk	CK86-1	1769	AB070993
ST2	İnsan	HJ96-1	1768	AB070987
	İnsan	HD17	1768	KF002542
	Maymun	M24	1721	EU445491
ST3	İnsan	HT98-1	1770	AB070992
	Kolobus maymunu	DMP/08-1043	1733	HQ909981
	Siğır	CJ99-363	1769	AB107965
ST4	İnsan	HG00-10	1778	AY244619
	Rat	WR1	1730	AY590113
	Kobay	NIH:1295:1	1778	U51152
ST5	İnsan	HC06-28	1782	EF468654
	Domuz	SY94-7	1784	AB070999
	Siğır	CJ99-284	1784	AB107966
ST6	İnsan	HJ96AS-1	1741	AB070990
	Hindi	C1	1741	EU445485
	Tavuk	Bt1	1693	AY135411
ST7	İnsan	B	1805	AF408427
	İnsan	HJ97-2	1803	AB070991
	Bıldırcım	QQ98-4	1807	AB070996
ST8	Lemur	MJ99-132	1779	AB107970
	Keseli Şıçan	Dm15	1779	KF002524
	Sülün	BJ99-319	1779	AB107971
ST9	İnsan	HJ00-4	1736	AF408425
	İnsan	HJ00-5	1737	AF408426
	İnsan	NA	1688	KC138681
ST10	Deve	CA6	1728	KC148207
ST11	Fil	Bg1	995	GU256922
	Fil	b29	989	GU256929
	Fil	b1	943	GU256907
ST12	Zürafa	970471	1023	GU256905
	Zürafa	910152	993	GU256906
	Zürafa	A50284	992	GU256899
ST13	Cüce Geyik	Mouse deer	1765	KC148209
	Kısa Kuyruklu Kanguru	49	1015	GU256934
ST14	Siğır	Cow1	1772	KC148205
	Bufalo	Mouflon	1708	KC148206
ST15	Gibbon (Primat)	MA7	1898	KC148211
	Deve	CA25	1907	KC148210
ST16	Kanguru	MKJ04-10	1748	EU427512
	Kanguru	MKJ04-30	1748	EU427514
ST17	Gundi (Kemirici)	Gundi	1983	KC148208

2.6. PATOGENEZ VE İMMUNİTE

B. hominis gastrointestinal sistemde yaşayan, hücre dışı yerleşimi olan ve toplumda çok sık görülen bir etkidir. Bu etken günümüzde birçok yönüyle tartışılmaktadır. En çok tartışılan konuların başında *B. hominis*'in patojen bir etken olup olmadığı gelmektedir. *B. hominis* enfekte ettiği bireylerde hiçbir belirti vermeden bulunabildiği gibi basit enterik şikayetlere yol açan nonspesifik enfeksiyonlara da neden olabilir. Ayrıca irrite bağırsak sendromu (İBS) ve ürtiker gibi daha spesifik hastalıklarda da rol oynayabilir (5).

B. hominis'in klinik önemi tartışmalıdır (97, 98). Fakat multidisipliner çalışmalardan elde edilen veriler, in vitro ve in vivo çalışmalardaki bulgular sonucunda, *B. hominis*'in patojen bir etken olduğu görüşü daha fazla kabul görmektedir (99, 100).

B. hominis'in patojenite potansiyeli ve virulans faktörlerini belirlemek ve sebep olduğu hastalıkları tespit etmek için yapılan invitro ve invivo çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Rodentler ve doğal olarak enfekte olmuş domuzlar üzerinde yapılan çalışmalarda, parazitin çoğunlukla çekum ve kolonda bulunduğu ve kalın bağırsağın lümenine ve mukozal yüzeyine yerleştiği gösterilmiştir (75, 101, 102).

Blastocystis sp.'nin Elektron Mikroskobu ile araştırıldığı bir çalışmada, bu etkenin yüzeyinde ağırlıklı olarak karbonhidratlardan oluşmuş iki tabakalı bir yüzey örtüsü bulunduğu gösterilmiştir. Bu yüzey tabakasına bakterilerin yapıştığı ve bu bakterilerin yüzey dansitesini kaybettiği gösterilmiştir. Çalışmanın sonucunda, bu tabakanın *Blastocystis* sp.'nin beslenmesinde önemli rol oynadığı vurgulanmıştır. Yine aynı çalışmada, bu yüzey tabakasının parazitin adezyonunda da rol oynayabileceği belirtilmiştir (29).

Başka bir çalışmada ise, bu tabakanın vücudun immün sistemine karşı koruyucu bir tabaka olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmaların neticesinde araştırmacılar, yüzey tabakasının virulansta ve patogeneizde önemli bir rol oynadığı sonucuna ulaşmıştır (27).

2.6.1. İn vitro Çalışmalar

Blastocystis sp.'nin hücre kültürlerinden elde edilen lizat ve salgı ürünlerinden yapılan araştırmalar birkaç farklı patojenite mekanizmasını ortaya koymuştur. Bu mekanizmalar, İntestinal hücrelerin apoptozu, tigh Junction proteinlerinin bozulması

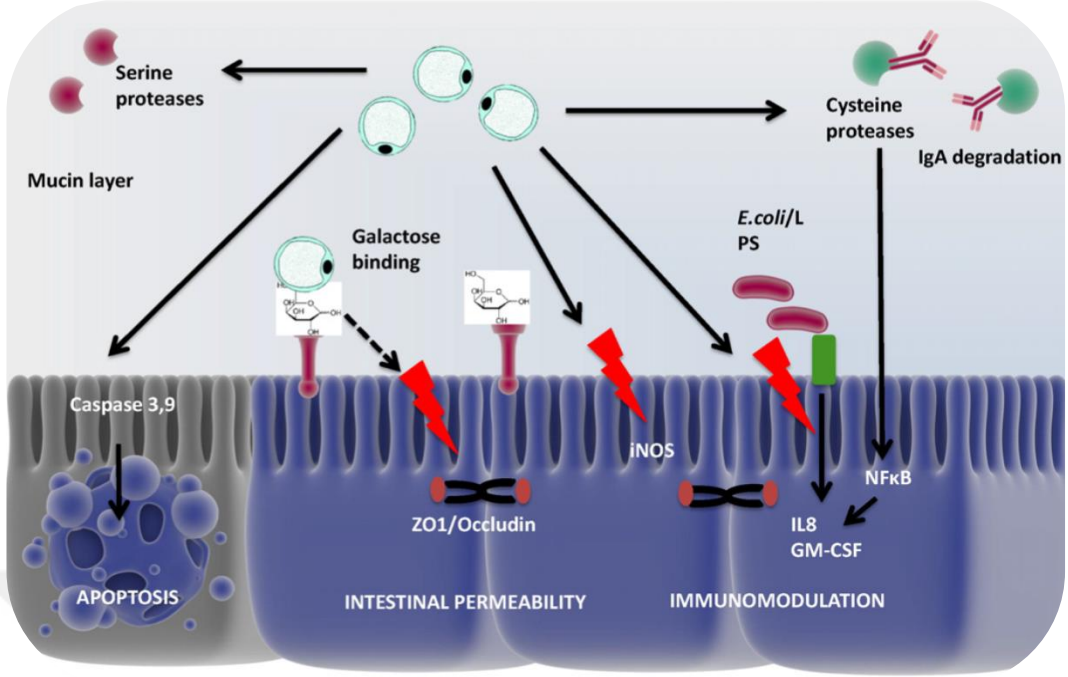
ve buna bağlı bağırsak permabilitesinin artması, proinflatuar sitokinlerin indüksiyonu, ve uyarılabilir nitrik oksit sentezi (INOS) mekanizmasının engellenmesidir (103-106).

İn vitro çalışmalar, parazitin ve parazit lizatlarının bağırsak epitel hücreleri üzerinde apoptoza neden olan zararlı etkilere sahip olduğunu ve tight junction proteinlerinden olan occludin ve ZO1'in harabiyeti sonucu bağırsak permeabilitesinin arttırdığını göstermiştir (107).

Etkenin bağırsak epiteline yapışması ve sistein proteazları salması patogeneizde en temel mekanizmalardan biri gibi gözükmektedir. İki de sistein proteaz olan legumain ve Katepsin B'nin patogeneizde etkili olduğu tespit edilmiştir (108).

Birbirinden bağımsız 2 grup tarafından yapılan çalışmada, *Blastocystis* sp. virulansında sistein proteinazların merkezi rolü olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, 31 kDa'luk aspargin sistein proteaz olan Legumain'in hücre yüzeyinde bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu yapıların monoklonal antikorların tutunduğu alanlar olduğu da aynı çalışmalarda ortaya konulmuştur (109, 110).

Yine başka bir çalışmada, Katepsin B'nin virulansta ciddi rol oynadığı belirtilmiştir. ST4 izolatu üzerinde yapılan bir çalışmada, Sistein Proteazlarının merkezi vakuolde lokalize olduğu gösterilmiştir. Böylece çeşitli tartışmalara neden olan, *B. hominis*'ten elde edilen lizatın canlı parazitlerden daha şiddetli etkilerinin olduğu, konusu da kısmen anlaşılmıştır (104, 105).



Şekil. 2. *Blastocystis* sp.'nin Bağırsak Epitel Hücreleri Üzerindeki Patojen Etkileri (107)

2.6.2. *Blastocystis* sp.'nin İmmünomodülatör Etkileri

Blastocystis sp. konak bağırsak epitelini üzerinde doğrudan etkilere ek olarak, immünomodülatör özelliklere de sahiptir. Yapılan çalışmalarda *Blastocystis* sp. lizatlarında tesbit edilen sistein proteazların IgA üzerindeki direk yıkıcı etkileri gösterilmiştir. Buna ek olarak *Blastocystis* sp.'nin boşaltım ve salınım ürünleri hem ortamın pH'sını değiştirerek hem de zamanlanmış apoptoz mekanizmasını uyararak IgA'nın çalışmasını engellemektedir (111). Bu protezlar, kültüre ekimden 24-48 saat sonra en yüksek düzeyde bulunmuş ve en çok ST7'de tespit edilmiştir (112).

B. hominis, bağırsak epitel hücrelerinde proinflatuvar sitokinler varlığında dahi Nitrik oksit mekanizmasının (INOS) ekspresyonunu aşağı regüle ederek ve arginin alımını arttırarak immün mekanizmaların zararlı etkilerinden kaçınmayı başarmıştır (106).

Bir ST4 izolatında tespit edilen sistein proteazların, insan bağırsak epitel hücrelerinde NFκB aracılı IL8'in yukarı regülasyonunu indüklediği gösterilmiştir. IL8'in artması da vasküler endotel aktivasyonu sonucu geçirgenliğinin artmasına, lökositlerin ortama çağırılmasına ve sonuç olarak doku harabiyeti ve bağırsak

permeabilitesinin artmasına sebep olmaktadır. Ayrıca kalın bağırsakta mukoza dökülmesine ve Goblet hücresinden salınan mükünde artışa neden olmaktadır (105).

Sıçan üzerinde yapılan bir çalışmada; canlı parazitlerin ve parazit lizatlarının, makrofajlarda IL1 β , IL6 ve TNF α 'nın düzenlenmesinde aracı olan MAP (Mitogen-activated protein) kinazları indüklediği gösterilmiştir (104).

Sistein proteazların, bu proinflatuar sitokinleri MAP kinaz yolağından bağımsız bir şekilde indükleyebildikleri de gösterilmiştir. Buna karşın ST7 lizatındaki serin proteazların ERK ve JNK yolakları aracılığı ile bu etkiyi yaptığı gösterilmiştir (113).

Blastocystis sp.'nin immünomodülatör etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, ST1'in hücre kültürüne ekildikten 24 saat sonra T84 ve HT-29 epitel hücrelerinden IL8 ve GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) üretimini indüklediği gösterilmiştir. Yine aynı yayında, *Blastocystis* sp.'nin ilk 6 saatte, sitokinler üzerinde hiçbir etki göstermediği fakat parazitten elde edilen kültür lizatlarının *E. coli* lipopolisakkartilerinin (LPS) bağırsak epitel hücreleri üzerindeki olumsuz etkisini azalttığı anlaşılmıştır (114).

Başka bir çalışmada *Blastocystis* sp.'nin THP1-Blue Monositik hücre kültürü yapıldığında, ST-7'nin ve ST-4'ün, NF κ B'yi aktive ederek LPS'nin etkisini azalttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu sonuçların bütün subtipler için geçerli olmadığı ve *Blastocystis* sp. için yapılacak genellemelerde daha ihtiyatlı olunması gerektiği belirtilmiştir. Yine bu çalışmanın sonuç bölümünde, NF κ B'nin IL8 ile etkileşiminin daha ayrıntılı araştırılmasının bu konuyu daha iyi anlamamıza yardımcı olacağı ifade edilmiştir (115).

Yine farklı çalışmalarda, *B. hominis*'in immünomodülatör etkisinin bağırsak florasıyla da ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (115). *Blastocystis hominis* yönünden pozitif İBS hastalarıyla yapılan bir çalışmada, bu bireylerde *Bifidobacterium* sp. ve *Faecalibacterium prausnitzii* gibi bağırsak florasında diğer sağlıklı bireylere kıyasla ciddi azalma olduğu görülmüştür (116). Bağırsak florası üzerine yapılan çalışmalar, *Bifidobacterium* sp. ve *Faecalibacterium prausnitzii*'nin bağırsakta diğer patojenlere karşı koruyucu olduğunu ve antiinflatuar etkilere sahip olduğunu göstermiştir (116-118).

2.6.3. İnvivo Çalışmalar

Blastocystis sp. ile yapılan invivo çalışmalarda patojeniteye dair ciddi kanıtlar bulunmuştur. Fakat bu çalışmalar içinde Koch postulatının tam olarak uygulandığı bir araştırma mevcut değildir (107).

2.6.4. *Blastocystis* sp.'nin intestinal dokuya etkileri

Blastocystis sp. ile yapılan hayvan çalışmalarında, submukozada lenfositik ve eozinofilik inflamatuvar infiltratların varlığı gösterilmiştir. Yine bu çalışmalarda mukoza dökülmesi ve ödemli lamina propria varlığı da gözlemlenmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda enflamasyonun şiddeti, alınan parazitin miktarı ve subtip ile ilişkili bulunmuştur (75, 119-121).

Hussein ve ark. tarafından subtip ile bağırsak inflamasyonu arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada; ST2 ve ST4'ün hafif ila orta şiddette enfeksiyonlara neden olurken, ST3 ve ST1'in, bağırsak poliplerinin varlığı da dahil olmak üzere daha şiddetli patolojilere sebep olduğu gösterilmiştir (122).

Hayvan modellerinde *Blastocystis* sp'ye karşı serolojik yanıt üzerine yapılan araştırmalar çok sınırlıdır. Bu alanda serumda anti IgM ve IgG ve bağırsak sekresyonlarında anti IgA'nın yükselişini gösteren çalışmalar çok kısıtlıdır (107, 123).

Sonuç olarak; invitro çalışmalarda bu etkenin enfeksiyonla ilişkili çeşitli virulans faktörler taşıdığı ispatlanmıştır. Fakat bu çalışmaların hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarla desteklenmeye ihtiyacı vardır. Bu parazitin patojenitesi ile ilgili çelişkili raporları önlemek için, *Blastocystis* sp.'nin aksenik kültürünün yapılarak daha iyi standardize edilmiş hayvan modelleri ve teknikler kullanılarak çalışılması gerekmektedir (107).

2.7. EPİDEMİYOLOJİ

Blastocystis hominis toplumda en yaygın görülen bağırsak parazitlerinden biridir. Fakat epidemiyolojik veriler incelendiğinde mevcut durumu tam yansıtmadığı görülmektedir. Bunun en temel sebebi, hala birçok mikrobiyoloji laboratuvarında bu parazitin patojen bir etken olarak değerlendirilmemesi ve kliniğe bildirim yapılmamasıdır. Geçmişte bu durum çok daha yaygın olmakla beraber gün geçtikçe azalmaktadır (27).

B. hominis oral-fekal yolla bulaşan bir etkidir. Hastalığın bulaşında en önemli sebep hijyen koşullarına yeterince dikkat edilmemesidir. Bununla beraber hayvanlarla yakın temas halinde olma, coğrafik bölge, iklim şartları da hastalığın bulaşını ve yaygınlığını etkilemektedir. Hastalığın epidemiyolojisine baktığımızda gelişmekte olan ülkelerde %30 ile %50 arasında değişen yüksek oranlarda gözükmektedir. Gelişmiş ülkelerde ise bu oran %1.5 ile %10 seviyelerindedir (27).

Ülkemizdeki veriler incelendiğinde, bölgeler arasında ciddi farklılıklar gözükmektedir.

Gülmez ve ark. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji laboratuvarında 2003-2012 yılları arasındaki sonuçları retrospektif olarak incelediği bir çalışmada, *Blastocystis* sp. oranını %22 saptadıklarını bildirmişlerdir (124).

Köksal ve ark. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde 1999 ve 2009 yılları arasındaki Mikrobiyoloji Laboratuvarına başvuran hastalara yönelik yaptığı bir çalışmada *Blastocystis* sp. oranını % 2.1 bulduklarını bildirmişlerdir (125).

Kayseri ili Karpuzkesen Havzasında Şahin ve ark. ve Hacılar İlköğretim okulunda Hamamcı ve ark. yaptığı iki farklı çalışmada *Blastocystis* sp. oranı sırasıyla %34,16 - %23.5 bulunmuştur (126, 127).

Eskişehir Osmangazi Üniversitesinde Doğan ve ark. tarafından 2003 – 2007 yılları arasındaki beş yıllık verilerin incelendiği bir çalışmada *Blastocystis* sp. oranı % 7 bulunmuştur (128).

Cengiz ve ark. Van'da Süphan İlköğretim Okulu öğrencilerinin bağırsak parazitlerinin dağılımını araştırdığı bir çalışmada *B. hominis*. oranı %3,3 olarak bulunmuştur (129).

Değirmenci ve ark. tarafından yapılan ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarında 2005 yılı boyunca saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımının araştırıldığı bir çalışmada *Blastocystis* sp. oranı %4.9 bulunmuştur (130).

Yaman ve ark. tarafından 2005-2008 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımının araştırıldığı bir çalışmada *Blastocystis hominis* %19.7 bulunmuştur (131).

Yaman ve ark. tarafından 2009 yılında Kayseri’de yabancı uyruklu lise öğrencilerinde intestinal parazitlerin araştırıldığı bir çalışmada *Blastocystis hominis* oranı %32.8 bulunmuştur (132).

Bu sonuçları değerlendirdiğimizde; gelişmişlik düzeyi daha düşük olan illerimizde *B. hominis* görülme oranı artmaktadır. Bir ilin kırsal kesimi ile merkezi arasında *B. hominis* görülme yönünden fark bulunmaktadır. Yine çalışmanın yapıldığı laboratuvarda *Blastocystis* sp’nin patojen bir etken olarak değerlendirilip değerlendirilmemesi ve tanıda kullanılan yöntemlerin farklı oluşu sebebiyle retrospektif parazit taramalarında farklı sonuçlar çıkmaktadır (5).

Blastocystis sp.’nin epidemiyolojik verilerinin değerlendirilmesinde asıl önemli nokta subtip düzeyindeki dağılımın belirlenmesidir. Çünkü *Blastocystis* sp. içinde apatojen ve patojen olarak değerlendirilen belli subtipler mevcuttur. Bu subtiplerin yaygınlığının araştırılması o bölgenin risklerini belirlemede daha anlamlı olmaktadır. Bu sebepten yapılan araştırmalar daha çok subtiplerin tanısı ve dağılımı üzerine yoğunlaşmaktadır (27).

Ülkemizde görülen subtiplerin epidemiyolojik olarak dağılımını şu şekildedir; Ülkemizde yapılan çalışmalarda en yaygın subtip olarak ST3 görülmektedir Bu çalışmalarda ST3’ü sırasıyla ST1, ST2 ve ST4 takip etmektedir (133-138). Sadece 2016 yılında Koltaş ve ark. kırsal kesimde yaşayan insanlar üzerine yaptığı bir çalışmada ST1, ST3’ten daha fazla görülmüştür (139).

Dağcı ve ark. tarafından semptomatik hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, ST6 ve ST7 semptomatik hastalarla ilişkili bulunmuştur (137).

Ülkemizde ST5, 2016 yılında Koltaş ve ark. tarafından yapılan çalışmada bir tane tespit edilmiştir (139).

2.7.1. Dünyadaki Çalışmalar

Dünyada yapılan epidemiyolojik çalışmalarda farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalarda *Blastocystis hominis* en sık görülen bağırsak parazitlerinden biridir. Yine ülkeler bazında değerlendirildiğinde, *B. hominis* gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha düşük oranda görülmektedir (27).

Farklı ülkelerde *Blastocystis hominis* görülme oranlarını şu şekilde sıralayabiliriz.

En düşük oran Japonya % 0,5-1 ve Singapur'da % 3.3 görülmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde farklı oranlar görülmektedir. Arjantin % 27.2, Brezilya % 40.9, Endonezya % 60, Mısır % 33.3. Bazı ülkelerde ise farklı çalışmalarda birbirinde farklı oranlar rapor edilmiştir. Çin % 1.9-32.6, Tayland % 0.19-45.2.

Dünyada subtip düzeyinde dağılım şu şekildedir.

ST3 dünya genelinde birçok ülkede en baskın Subtip olarak görülmektedir; Tayland % 41.7 - 92.3, Mısır % 54.6, Singapur % 78, Almanya %21, Fransa % 53 (140).

Bunun harici kısıtlı sayıdaki çalışmalarda farklı subtipler daha fazla oranda görülmüştür. Subtip 4 İspanya'da % 94.1, Fransa'da % 63 ve Nepal'de % 84 oranında görülmüştür. Subtip 1 ise; Çin'de % 51.4 Brezilya'da % 41 oranlarında diğer subtiplere oranla daha fazla tespit edilmiştir (141).

2.8. KLİNİK BELİRTİLER

Blastocystis hominis'in yaptığı hastalıklar ve bu hastalıklar sonucu oluşan klinik belirtiler uzun yıllardır tartışılan bir konudur. Araştırmacılar arasında *B. hominis*'in patojen bir etken olup olmadığı konusunda farklı görüşler mevcuttur. Fakat bu alanda artan moleküler çalışmalar ve hayvan deneyleri, *B. hominis*'in belirli spesifik hastalıklarla ilişkisi olan patojen bir etken olduğunu ortaya koymaktadır (5).

Her ne kadar patojenlik yönünde ciddi bir kanı söz konusuysa da hiçbir çalışma bu etkenin patojenitesini Koch postulatına uygun şekilde göstermemiştir (107).

Blastocystis hominis'in ilişkili olduğu hastalıkları, Gastrointestinal Sistem (GİS) ile ilişkili hastalıklar ve GİS dışı hastalıklar olmak üzere iki ana başlık altında toplayabiliriz (5).

2.8.1. GİS ile ilişkili hastalıklar

Nonspesifik Şikâyetler

B. hominis enfeksiyonlarında daha çok, karın ağrısı, karında şişlik hissi, gaz, bulantı ve kramp gibi belli bir hastalığa özgü olmayan şikâyetler görülmektedir (27). Bu belirtiler akut ve kronik seyir gösterebilmektedir. Bunlara ek olarak rektal kanama, hepatomegali ve splenomegali gibi belirtilerde görülebilmektedir. Fakat genelde bu şikâyetler çok ağır seyirli ve ölümcül olmamaktadır (5).

İrrite Bağırsak Sendromu (İBS)

İrrite bağırsak sendromu (İBS) kronik karın ağrısı, şişkinlik, gaz, bağırsak alışkanlıklarında değişiklik (ishal ve/veya kabızlık) gibi semptomlarla seyreden fonksiyonel bir bağırsak hastalığıdır. Hastaların bir kısmında karın ağrısına diyare eşlik ederken, bir kısmında ise kabızlık eşlik etmektedir. Bazılarında ise diyare ve kabızlık dönüşümlü olarak görülebilmektedir (142).

İBS'li hastalarda semptomların kaynağını bulma noktasında birçok araştırma yapılmıştır fakat bu hastalarda semptomları açıklayabilecek patolojik bir hastalık bulunamamıştır. Bu sebepten araştırmacılar, İBS' nin ortaya çıkmasında rol oynayabilecek birçok faktör tespit etmiştir (142).

B. hominis'te bu faktörlerden biri olarak gösterilmektedir. Doğruman ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, İBS ile *B. hominis*'in belli subtiplerinin yakın ilişkili olduğu görülmüştür (135). Yakoop ve ark. yaptığı bir çalışma, İBS'li hastalarda *B. hominis* kolon taşıyıcılığının diğer kontrol gruplarına göre 7 kat daha fazla olduğunu ortaya koymuştur (143)

Gün geçtikçe bu alanda çalışmalar artmakta ve ilginç bir şekilde *B. hominis* ile İBS'nin yakın ilişkili olduğu görülmektedir.

2.8.2. GIS Dışı Hastalıklar:

Ürtiker

Ürtiker halk arasında kurdeşen olarak bilinen cilt yüzeyinde aşırı kaşıntıyla seyreden ve bastırmayla solabilen 1-2 mm çapında kırmızı kabarıklıklar şeklinde gözükten bir hastalıktır. Yine İBS'de olduğu gibi bu hastalığında altında yatan sebepler tam olarak aydınlatılamamıştır (144).

Birçok helmint ve protozoonun akut ve kronik ürtikere neden olduğu bilinmektedir. Bu parazitlerin lümeninde TH2 den salgılanan IL-3, IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi belli immünolojik mediatörlerin salgılanmasını uyararak IgE yanıtına sebep olduğu görülmüştür. Bu immün sistem mediatörlerinin de bazofillerden ve mast hücrelerinden histamin salınımını indüklediği ve böylece ciltte immün mekanizma sonucu oluşan kaşıntılı lezyonlara sebep olduğu gösterilmiştir (145).

Birçok çalışmada *B. hominis* pozitifliği ile ürtiker arasında yakın bir korelasyon olduğu görülmüştür. *B. hominis*'in belirli immün mediatörleri aktive ederek ürtiker oluşturabileceği bu çalışmalarda belirtilmiştir (146-148).

2.9. TANI YÖNTEMLERİ

2.9.1. Mikroskopik Tanı

Mikroskopi, *Blastocystis hominis*'in tanısında kullanılan rutin tanı yöntemidir. *B. hominis* direk bakıda nativ-Lugol ile mikroskobun X40'lık merceği ile büyütmede veya boyalı preparatlarda mikroskobun X100'lük merceği ile teşhis edilebilmektedir (5).

B. hominis'in tanısında kalıcı boyalar kullanılabilir. Bu yöntemler içinde en sık trikrom boyama yöntemi kullanılmaktadır. Bundan başka kalıcı boyalardan, demirli hematoksilen, Giemsa ve Wright boyalarının da tanıda kullanılabileceğini belirten yayınlar mevcuttur (149).

Direk bakıda pozitiflik oranını arttırmak için konsantrasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler içinde en sağlıklı sonuç veren ise Formol Etil Asetat konsantrasyon yöntemidir (27).

B. hominis'in tanısında direk bakı yöntemleri; ucuz olması, kısa sürede sonuç vermesi ve diğer yöntemlere göre daha kolay olması gibi avantajlara sahiptir (27).

Buna karşın direk bakı yöntemleri, yanlış pozitiflik ve negatiflik oranları yüksek olan yöntemlerdir. Bu yöntemde, *C. cayetanensis*, mantar hücreleri ve yağ globülleri *B. hominis* ile karıştırılabilmektedir. Ayrıca kist formu, çok küçük olması ve belirgin bir morfolojik şeklinin olmaması sebebi ile direk bakı ile tespit edilememektedir (27).

2.9.2. Kültür Yöntemi

Blastocystis hominis'in tanısında birçok farklı besiyeri kullanılmaktadır. *B. hominis* hassas bir etkindir ve kültür ortamında üreyebilmek için anaerob koşullara, 37°C sıcaklığa ve 7,0-7,5 arası pH'ya ihtiyaç göstermektedir (27).

B. hominis özellikle aerop koşullara, düşük ısıya ve asit ortama karşı çok hassastır. Bu sebepten araştırılması istenen dışkı mümkün olduğu kadar kısa sürede besiyerine ekilmelidir. Ekimi yapılan besiyeri en az 72 saat süreyle pozitiflik yönünden takip edilmelidir (150).

B. hominis'in ksenize ve aksenize kültürü yapılmaktadır;

Ksenize Kültürler

Bu yöntem laboratuvar ortamında özellikle direk bakının yetersiz kaldığı durumlarda rutin tanı için kullanılmaktadır. Temel olarak; tampon görevi gören çeşitli kimyasallar, maya özütü, at serumu ve yumurta gibi zenginleştirici maddeler içerir. Bu grup birçok farklı besiyerini içermektedir. *B. hominis*'i üretmek için bu besiyerlerinden en çok; %10 at serumlu ve maya özütü jones medium, %10 at serumlu ve asparjinli ringer serumu, Boeck ve Drbohlav'ın yoğunlaştırılmış yumurtalı besiyeri, Dobell and Laidlaw besiyeri (ringer solüsyonu + %20 insan serumu + streptomisin sülfat), Diamond's triptikaz serum monofazik besiyeri, %10 at serumlu Minimal essential medium, %10 at serumlu Iscove's modified Dulbecco's medium kullanılmaktadır (38, 151).

Aksenize Kültürler

Aksenize kültürler için en sık Modifiye Dulbecco besiyeri veya Locke solüsyonlu bifazik yumurtalı besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerleri daha çok moleküler çalışmalar, ilaç deneyleri ve hayvan deneyleri ile patojenite ve virülans faktörlerinin araştırılması için kullanılmaktadır (27).

Bu yöntemle *B. hominis* üretebilmek ksenize kültürlerine göre çok daha zordur. Çünkü *B. hominis* beslenmek ve üremek için ortamda bulunan bakterilerden yararlanır. Aksenize besiyerinde, hem bakterilerin olmaması hem de bu bakteri ve mantarları ortamdaki uzaklaştırmak için kullanılan ilaçların bulunması *B. hominis*'in yaşama şansını düşürür. Bu sebeplerden dolayı aksenize kültürler rutin tanı için değil özel çalışmalar için kullanılmaktadır (27, 152).

2.9.3. İmmünolojik Tanı Yöntemleri

Bu alanda yapılan çalışmalar çok kısıtlı olmakla beraber *B. hominis*'in tanısına yönelik umut veren sonuçlar elde edilmiştir. Bu zamana kadar *B. hominis*'in tanısında, serolojik tanı yöntemlerinden, DFA, IFA ve ELISA yöntemleri başarıyla kullanılmıştır (153).

B. hominis yüzey antijenine karşı tavşanlardan monoklonal antikolar elde edilebilmiş ve bu antikolar DFA ve ELISA testlerinde kullanılmıştır (27).

Yine insan serum IgA ve IgG ve sekretuar IgA düzeyleri semptomatik ve asemptomatik hastalarda ELISA ve IFA testleriyle araştırılmış. Semptomatik hastalar asemptomatik hastalara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (154).

Ülkemizde 2014 yılında yapılan bir çalışmada, *B. hominis*'in dışkıdan direk tespiti için IFA ve ELISA yöntemleri ile çalışılmış. Bu yöntemlerin başarısı direk bakıya göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (153).

Yine farklı bir çalışmada, *B. hominis* yüzey antijenine karşı elde edilmiş IgM antikorları farklı subtipler üzerinde ELISA yöntemi ile çalışılmış ve sınırlı sayıda çapraz reaksiyon verdiği görülmüştür (155).

Blastocystis hominis'in tanısında immünolojik yöntemler gün geçtikçe daha fazla kullanılmaktadır. Çalışmalarda, ELISA ve IFA gibi testlerin duyarlılık ve özgüllükleri direk bakıya göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Özellikle dışkıda direk antijen aramak suretiyle yapılan çalışmalar *B. hominis* tanısında ciddi kolaylık sağlamaktadır. Yapılacak çalışmalar sonunda subtipe özgü spesifik epitoplara bulunabilir ve bunlara karşı monoklonal antikorlar üretilebilirse hem moleküler yöntemlere karşı ciddi bir alternatif olabilir hem de *B. hominis*'in tanısında ciddi kolaylık ve geniş bir kullanım alanı sağlayabilir (153).

Fakat bu yöntemlerle subtip düzeyinde görülen farklılıkları tespit etmek şu an için çok zor gözükmemektedir. Dışkıda birçok farklı etken olduğu için *B. hominis*'e spesifik antijen epitoplara bulmak zor olmaktadır. *B. hominis* invaziv enfeksiyon yapmadığı için serum antikor düzeyine bakmak da çok faydalı gözükmemektedir (156).

2.9.4. Moleküler Tanı Yöntemleri

B. hominis'in sınıflandırılmasında ve subtiplerin tespiti ve tanısında kullanılan en temel yöntem moleküler tekniklerdir. Bu alanda moleküler yöntemlerin birçok üstünlüğü vardır. Bunları şu şekilde sıralayabiliriz: *B. hominis*'in birçok morfolojik formu olduğu ve mantara benzer yapıları bulunduğu için filogenetik analizler ve sınıflandırma ancak 18s rRNA'lara göre yapılabilmektedir. Birçok çalışmaya göre moleküler tanı yöntemlerinin özgüllüğü ve duyarlılığı direk bakı ve kültüre göre daha yüksektir. Moleküler yöntemler subtiplerin belirlenebilmesinde kullanılabilecek tek tanı yöntemidir (157).

Moleküler teknikler iki basamakta ele alınabilir; birinci basamakta, sekans analizleri ile türe ve subtiplere özgü gen bölgelerinin belirlenmesi, İkinci basamakta ise, tespit edilen spesifik gen bölgelerinin farklı moleküler yöntemler kullanılarak gösterilmesi bulunmaktadır.

Dizi analizi için, Sanger-Coulson Zincir Sonlanma Yöntemi (Dideoxy sequece yöntemi) ve Maxam ve Gilbert Yöntemi kullanılmaktadır.

B. hominis izolatları arasındaki farklılıklar izoenzim analizleriyle, kromozom karyotip ve rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA analiz yöntemleri ile de belirlenmiştir.

B. hominis'in sekans analizi yöntemleriyle elde edilen DNA dizilerinin tespiti için ise birçok farklı yöntem geliştirilmiştir.

B. hominis'in filogenetik ve polimorfik analizi, diğer gen bölgelerine göre daha korunaklı olan 18S smal subunit (SSU) rDNA bölgesine göre yapılmaktadır. İzolatların genotiplenmesinde farklı moleküler yöntemler birleştirilerek kullanılmıştır. Bu yöntemlerde ribozomal DNA'ya ait 1800 bp'lik gen bölgesi hedeflenerek çalışmalar yapılmıştır (26, 158).

Günümüzde en sık kullanılan yöntem, STS (Sequence-Tagged Sites) primerleri kullanılarak 18s rDNA bölgesinin PCR tekniği ile çoğaltılması işlemidir. STS primerleri, *B. hominis* türlerinin polimorfik DNA'sının randomize amplifikasyonundan geliştirilmiştir (89). Günümüzde bu yöntem kullanılarak *Blastocystis* sp.'nin insanda ve hayvanda 17 subtipi tespit edilmiştir (91).

Bundan başka SSU rDNA'nın PCR – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) yöntemleri ile belirlenmesi de *B. hominis* tanısında kullanılmaktadır (26).

Tablo. 2. *B. hominis*'in Sınıflandırılmasında ve Subtiplerin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Metotlar (26)

Yöntem	Hedef Bölge	Çalışma Prensipleri
PCR – RFLP	SSU-rDNA (riboprinting) Elongation factor-1a (elfaprinting)	Endonükleaz restriksiyon enzimleri ile elde edilen DNA parçalarının PCR ile çoğaltılarak jel elektroforezde yürütülmesi ile belli bantların elde edilmesi
PCR ve Dideoksi dizileme	SSU-rDNA	Elimizdeki DNA parçasının Dideoxy sequence yöntemi ile dizi analizinin yapılması ve PCR yöntemiyle bu dizinin çoğaltılması
PCR–STS	Belli bir bölge yok	Belli subtiplere özgü bölgeleri çoğaltmak için, o bölgeye spesifik primerler ile genetik bölgeyi tesbit etme işlemi
AP-PCR	Belli bir bölge yok	Spesifik DNA profilleri elde etmek için rasgele primerler ile PCR amplifikasyonu yöntemi
Multilocus sequence typing	Elongation factor 1a Sitozolik 70-kDa heat shock proteinleri SSU rDNA Vakuoler ATPaz'ların katalitik 'B' altbirimi	PCR ve dideoksi dizileme yöntemi ile birden fazla genin incelenmesi

STS PCR işlemi; STS; genomun başka hiçbir bölgesinde bulunmayan 200-300 baz uzunluğundaki kısa bölgelerdir. STS sekansı DNA'nın başka bölgelerinde de görülebilen tekrarlı elementler içerebilir fakat iki ucunun sekansının eşi yoktur ve DNA primerleri bu uçlardaki 15-20 bazlık dizilere göre sentezlenerek PCR ile amplifiye edilir. STS-PCR günümüzde en yaygın kullanılan moleküler tanı yöntemidir (159).

PCR işlemi; ilk olarak eldeki materyalden DNA'nın izolasyonu (pürifikasyonu) ile başlar. Bu bütün materyaller için çok hassas bir işlemdir. En ufak bir bulaş ve kontaminasyon bütün işlemi başarısız kılar. Eğer çalıştığımız örnek bir dışkı ise bu işlem çok daha zor ve uzun sürmektedir. Çünkü dışkı, çok sayıda farklı organizma ve araştırılan genetik bölgeye zarar verebilecek enzimler içerir. Bu sebepten dışkıdan DNA izolasyon işleminde birçok basamak kullanılır.

B. hominis için iki farklı izolasyon yöntemi vardır (160). Birincisi direkt dışkıdan izolasyon işlemidir. Bu işlem daha önce de ifade ettiğimiz gibi çok uzun

basamaklar gerektiren zor bir işlemdir. İkinci olarak, besiyerinde üretilmiş *Blastocystis* sp. etkeninin izolasyonudur. Kültürden DNA izolasyon işleminde, *Blastocystis* sp. nispeten daha saf olduğu ve DNA'yı parçalayan enzimler daha az bulunduğu için başarı şansı daha yüksektir. Fakat bu işlemde *Blastocystis* sp. üretilirken dışkıda bulunabilecek farklı subtiplerin birbirini baskılaması gibi bir risk söz konusudur (160).

İzolasyon ile elde ettiğimiz DNA'yı farklı yöntemler kullanarak çoğaltabiliriz. Günümüzde en sık PCR yöntemi kullanılmaktadır. PCR işlemi iki önemli basamaktan oluşmaktadır. Bu basamaklardan birincisi, DNA'yı çoğaltmak için MİX hazırlamak, ikincisi ise çoğaltma işleminin yapılacağı Termal Cyclus ısı derecelerini belirlemektir (161).

PCR işleminde MİX hazırlama basamağı birçok değişkeni içinde barındırır. Bunları şöyle sıralayabiliriz; izole ettiğimiz ve tanımlamada kullanacağımız DNA, DNA'nın spesifik bölgelerine bağlanacak primerler, primerleri tanıyarak bağlanan ve nükleotidleri DNA kalıbına takan tag polimeraz enzimi, enzimlerin çalışmasını sağlayacak kofaktörler ve tampon solüsyonu (91).

İkinci basamak ise Termal Cyclus ısı derecelerinin belirlenmesidir. Termal Cyclus ısı döngüsünde ki değişkenler, DNA'nın izole edildiği materyale, İzolasyon işleminde kullanılan kitin özelliklerine ve MİX'in oranlarına göre değişmektedir (162).

Son basamak ise, çoğalttığımız DNA zincirini tanımlayabilmek için kullanılacak yöntemdir.

Bu yöntemlerden laboratuvarlarda en sık kullanılan, agaroz jel elektroforez yöntemidir. Agaroz Jel elektroforez işleminde hazırlanan jel içine elde ettiğimiz çift zincirli DNA'ları görünür kılmak için etidhyum bromür katılır. Sonra PCR yöntemi ile çoğalttığımız DNA jel üzerindeki kuyucuklara bırakılır. Elektriksel akım yardımı ile DNA Agaroz Jel'de yürütülür ve baz çiftleri moleküler ağırlıklarına göre jel üzerinde bant oluşturur. Etidhyum bromür buradaki çift zincirli DNA'ların arasına girer ve bu kompleks UV ışığı yardımı ile görüntülenir (163).

Günümüzde birçok farklı PCR metodu geliştirilmiştir. Bunlardan *Blastocystis* sp. subtiplerinin tanısı için en kullanışlı olanları Nested PCR ve RT (Real Time) PCR yöntemleridir. Nested PCR Yönteminde; tekbir çalışma içinde birden fazla subtip incelemek mümkündür. Bu da genel primer ve 9 farklı subtip için on farklı PCR işlemini bir basamakta yapmayı mümkün kılar. RT-PCR yöntemi ise, otomatize

sistemler sayesinde DNA'nın çoğaltılmasını bilgisayar ekranından gerçek zamanlı olarak takip edebilmeyi olanaklı kılar. *Blastocystis hominis*'in 9 subtipinin tanısında RT-PCR yöntemi başarıyla kullanılmıştır ve bu durum ileride RT-PCR yönteminin çok daha yaygın şekilde kullanılacağını göstermektedir (164).

2.10. TEDAVİ

B. hominis ile enfekte kişilerin tedavisi, parazitin kesinleşmemiş patogenezi ve hastalığın kendini sınırlayıcı özelliği nedeniyle tartışmalıdır. Tedavi; enfeksiyonun kronik bir seyir izlemesi ve başka bir etken tespit edilememesi durumunda önerilmektedir (165).

Tedavide birinci seçenek metranidazoldür. Eğer tedaviye direnç görülürse paramomisin ve kotrimaksazolle kombine tedavi önerilmektedir (27). Bu ilaçların *B. hominis*'e direk etkisi olmadığı halde beslenme kaynağı olan bakterileri öldürerek parazite dolaylı yoldan etkili olduğu düşünülmektedir. Farklı çalışma gruplarıyla yapılan araştırmalarda nitazoxanide ile tedavi edilen vakalar bildirilmektedir (166). AIDS hastalarında furazolidonun etkili olduğu gösterilmiştir (5).

B. hominis tedavisi için yapılan çalışmalarda hiçbir ilaç grubu ile %100 başarı sağlanamamıştır. Özellikle bölgesel olarak değişebilen dirençli türler görülmektedir. Kist formu tedaviye daha dirençlidir (167).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Çalışmanın yürütülmesi sırasında, materyallerin toplanması, saklanması ve laboratuvar aşamasında aşağıdaki cihazlar ve kimyasallar kullanılmıştır.

3.1.1. Cihazlar

- Santrifüj: Mikro 22 R, Almanya
- Vortex: Stuart SA8, Almanya
- Hassas Terazî: Mettler Toledo, İsviçre
- Gradient PCR Cihazı: Applied Biosystem 2022, Singapur
- Elektroforez: Syngene SYTC/1287
- Jel Yürütme Cihazı: Consort EV231, Belçika
- Etüv: Thermo Heratherm IGS60, Almanya
- Mikroskop: Olympus CX 31, Japonya
- Mikropipet: Thermo Scientific, Almanya
- Soğutucu Dolaplar: Uğur Derin Dondurucu
- Otoklav: Thermo Scientific OG180, Japonya
- Kabin: Metisafe
- Heater: Biosan
- Mikrodalga: Arçelik MD 565S
- Steril pipet uçları
- Mezür
- Grainer (15ml)
- Ependorf, Lam ve lamel

3.1.2. Kimyasallar

- At serumu (56 °C' de 30 dk inaktive edilmiş)
- L-Asparagin: Merck, Almanya
- Sodyum klorür: Sigma, Almanya
- Potasyum klorür: Sigma, Almanya
- Kalsiyum klorür: Sigma, Almanya
- Serum fizyolojik: İzotonik 1000cc, Polifarma-Türkiye

- İyot kristalleri: Kimetsan, Türkiye
- Chromotrope 2R: Himedia, India
- Light gren SF: Himedia, India
- Fosfotungustik asit: Sigma, Almanya
- Glasiyel asetik asit (%100): Merck, Almanya
- Ksilen: Kimetsan, İngiltere
- Civa kloür: Fluka, USA
- Potasyum iyodür: Kimetsan, Türkiye
- İmmersiyon
- Etil alkol (etanol) ve metil alkol (metanol): Riedel-de Haën
- Agar: Agarose Low EEO, AppliChem BioChemica
- MgCl₂: Enzymes 50 mM
- Buffer: Hemo KlenTaq Reaction Buffer Pack BO332S, Biolab
- Etidyum bromür: SIGMA tablet
- Gliserol: Ambresco
- Orange G: AppliChem
- Tris: Ambresco
- EDTA: Scharlau
- SDS: Aplichem
- Fenol: Riedel de Haen
- Kloroform: Kimetsan
- İzoamil alkol: Aplichem
- Borik asit: Riedel de Haen

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmaya, 01 Ocak 2015 - 30 Eylül 2016 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji, Dermatoloji, Onkoloji polikliniğine başvuran hastalar ve kontrol grubu olarak da herhangi bir gastroenterit ve ürtiker şikâyeti olmayan immün sistemi sağlam kişiler dâhil edildi. Bu çalışmaya, GİS şikâyetleri olan 21, ürtiker tanısı alan 18, onkoloji kliniğinde radyoterapi gören 12 hasta ve kontrol grubundan 18 kişi olmak üzere, toplam 69 kişi dahil edildi. Hayvan örnekleri için

hayvan pazarından 110 sığır ve koyun dışkı örneği, farklı besicilerden 80 kanatlı dışkı örneği, hipodromdan ve at çiftliklerinden 80 tek tırnaklı dışkı örneği ve köpek barınağından 73 köpek dışkı örneği toplandı. Örnekleri toplamak için geniş ağızlı, plastik kapaklı toplama kapları kullanıldı. Toplanan örneklerden nativ-Lugol ve trikrom boyama yapıldı. Hasta gruplarından toplanan dışkı örneklerinin pozitif olarak kabul edilmesi için, direk bakıda her alanda (40X objektif) 5 ve üzeri *B. hominis* görülmesi şartı arandı. Direk bakıda pozitif bulunan dışkı örnekleri %10 at serumlu Modifiye Jones Mediumda kültüre alındı. Hayvan gruplarından elde edilen dışkılarda ise, etken sayısına bakılmaksızın *Blastocystis* sp. görülen bütün dışkı örneklerinin kültürü yapıldı. Bütün pozitif dışkı örnekleri ve kültürde üreyen örnekler ependorfa aktarılarak DNA eldesi için -20 °C' de saklandı.

3.2.2. Direk Mikroskopi

Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Serum Fizyolojik: Üretici firmadan hazır olarak direk kullanıldı.

Lugol'un İyot Solüsyonu

- Potasyum iyodür : 10 g
- İyot krisalleri : 5 g
- Distile su : 100 ml

Direk mikroskobik inceleme: Direk mikroskobik incelemede her örnek için serum fizyolojik ve Lugol' un iyot solüsyonu ile preparatlar hazırlanarak ışık mikroskobunda (40X objektif) incelendi. Dışkıda parazitin olup olmaması eğer parazit varsa parazitin morfolojisi, saha sayımı ve hücre boyutu yönünden durumu değerlendirildi. İnsan dışkı örneklerinden her alanda 5 ve üzeri *B. hominis* görülen numuneler pozitif kabul edilerek ayrıldı.

Trikrom boyama yöntemi Kullanılan solüsyonların hazırlanması

Trikrom boyası

- Chromotrope 2R : 3 g
- Light gren SF : 1.5 g
- Fosfotungustik asit : 3.5 g
- Glasiyel asetik asit : 5 ml
- Distile su : 500 ml

Karışım renkli cam şişede saklandı.

D'antoni iyot solüsyonu

Potasyum iyodür	: 1 g
İyot kristalleri	: 1.5 g
Distile su	: 100 ml

Solüsyon kırmızı-kahverengi olana kadar karıştırılıp filtre kâğıdından süzüldü ve oluşan bu stok çözelti ışık almayan koyu renkli şişede muhafaza edildi.

%90' lık asit alkol

Etil alkol (%90)	: 995.5 ml
Glasiyel asetik asit	: 4.5 ml

Schaudinn fiksatif (Bakır sülfat modifikasyonu)

Doymuş bakır sülfat solüsyonu:	600 ml
Etil alkol (%95'lik)	: 300 ml
Gliserin	: 15 ml
Glasiyal asetik asit	: 5 ml

Doymuş bakır sülfat solüsyonu, etil alkol ve gliserin ile karıştırıldı (Burada gliserinin tam olarak karışabilmesi için mekanik karıştırıcı kullanıldı). Kullanıncaya kadar saklandı. Kullanmadan hemen önce, kullanılacak her 95 ml stok solüsyona 5 ml glasiyal asetik asit eklendi.

Diğerleri

%70'lik metanol: 70 ml %100'lük metanol üzerine 30 ml distile su eklenerek hazırlandı. Ksilen ve %100'lük metanol direk kullanıldı.

Trikrom Boyama Yöntemi

1. Dışkı örnekleri lam üzerine resim fırçası yardımı ile yayıldı.
2. Dışkı yayması yanlarından kurumaya başlayınca Schaudin fiksatif içine alındı. Fiksatif içinde 30 dk bekletildi.
3. Fiksatif içinden alınan lam direk D'antoni iyot solüsyonu içerisine alınarak 1 dk bekletildi.
4. %70'lik metanol içerisinde 1 dk bekletildi.
5. %70'lik metanol içerisinde 1 dk bekletildi.
6. Trikrom boyası içinde 8-10 dk bekletildi.

7. %90' lık asit alkolde 8-10 sn bekletildi.

8. %100' lük metanolde çalkalandı.

9. %100' lük metanolde 30 sn bekletildi.

Trikrom boyamanın mikroskopik incelemesi: Tüm örnekler boyama sonrası immersiyon damlatılarak incelendi.

3.2.3. Kültür Yöntemi

Modifiye Jones Medium

Stok Solüsyon

1 Lt distile suya 9,46 g Na_2HPO_4 (Sodyum Fosfat Dibazik)

1 Lt distile suya 9,08 g KH_2PO_4 (Potasyum Fosfat Monobazik)

1 Lt distile suya 9,00 g NaCl

Hazırlanışı

Mix hazırlanır

Stok solüsyonlarından 93,8 ml. Na_2HPO_4 - 31,3 ml. KH_2PO_4 - 562,5 ml NaCl alınarak tamponlu solüsyon hazırlandı. Tamponlu solüsyona, % 0,1 Maya özütü eklendi ve pH 7-7,5 olacak şekilde ayarlandı. Maya özütü eklenen solüsyon otoklavda (121°C, 1 atm basınç, 15 dk) steril edildi. Steril edilen solüsyona % 10 At serumu (56°C 30 dk. İnaktive edilmiş) eklendi ve hazırlanan besiyeri 2 ml'lik santrifüj tüplerine (Vidalı Kapaklı) aktararak -20°C'de muhafaza edildi.

Kültürün yapılması

Jones Medium içeren 2 ml'lik tüplere dışkıdan 30mg eklendi.

Daha sonra besiyeri 37°C'de 3-4 gün inkübe edildi.

Etüvde Üreme görüldüğünde 100 ml taze besiyerine pasaj yapıldı.

Kültür yönteminin mikroskopik incelemesi

Kültürün dip kısmındaki dışkı atıklarına dokunmadan, bu tabakanın üzerindeki bölgeden pastör pipeti yardımıyla alınan örnekten preparat hazırlanarak ışık mikroskopunda (40X objektif) incelendi. Parazitin olup olmaması, parazit varsa parazitin morfolojisi, saha sayımı ve hücre boyutu yönünden değerlendirildi.

3.2.4. PCR Yöntemi

DNA eldesi için, dışkıdan DNA izolasyon kiti (GeneMATRIX Stool DNA Purification Kiti, **Polonya**) kullanıldı. Bu amaçla nativ-Lugol ve trikrom boyama ile *Blastocystis* sp. olduğu belirlenen altı örnek seçildi. DNA eldesinin kontrolü amacıyla *B. hominis* genel primerleri ile amplifikasyon yapıp DNA varlığı kontrol edildi. Uygun DNA eldesi yöntemi belirlenerek dışkıdan izole edilen DNA'lar subtip tayini için kullanıldı.

GeneMatrix Dışkı İzolasyon Kiti Çalışma Prosedürü

1. 40 µl Aktivasyon Buffer ST DNA bağlayıcı spin column'a eklendi ve spin – column üzerine lizat ekleninceye kadar oda ısısında muhafaza edildi.

a. Buffer ST'yi spin - column içindeki zarın merkezine eklendi. Bu hem zarın tam ıslanmasını hem de DNA bağlanmasının maksimum düzeye çıkmasını sağlar

B. Membran aktivasyonu izolasyon işlemine başlanmadan önce yapılmalıdır.

2. Bead Tüpe 200 mg gaita örneği eklendi.

3. Gaita tüp duvarından ayrılarak tam bir süspansiyon haline gelinceye kadar kuvvetlice vortekslendi.

4. 60 µl Lyse ST buffer eklendi.

a. Lyse ST buffer bileşenleri 20°C altındaki sıcaklıklarda çökelti oluşturabilir. Bu sebepten çözeltiyi çözmek için 37°C de sıcak su banyosunda çözelti şeffaflaşınca kadar karıştırılır.

5. 1 dakika boyunca vortekslendi.

6. 70°C de **5 dakika** inkübe edildi.

7. Bead tüpler bir vortex adaptör kullanılarak **10 dk yatay olarak vortekslendi.**

8. Bead Tube **14000 rpm'de 2 dk.** santrifüj edildi. Sonra **400µl** süpernatant kısmı 2ml lik santrifüj tüplerine aktarıldı.

9. 400µl PR buffer eklenir ve **5 saniye** vortekslendi, sonra **5 dk** boyunca **buz** üzerinde inkübe edildi.

10. 14000 rpm de 2 dk santrifüj edildi.

11. Sonra süpernatantın **550µl**'lik kısmı yeni 2ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı.

12. 650 µl SOL st buffer 400 µl % 96 etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.

13. Tüp kapağının iç kısmına yapışan sıvıyı ayırmak için kısa süreli santrifüj edildi.

14. Lizatın **600 µl**'si içine spin – column yerleştirilmiş toplama tüpüne aktarıldı.

15. **12000 rpm de 1 dk** santrifüj edildi.

16. Spin – column kısmı çıkartılır ve süzölmüş sıvı atılır ve spin – column toplama tüpüne yerleştirildi.

17. 15 – 17. Basamaklar tekrarlandı.

18. Sıvının süpernatant kısmı alınır ve spin – column yerleştirilmiş tüpe aktarıldı. Filtrenin içinde kalan lizat kalıntılarını süzmek için 12000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.

a. Lizatın spin – column'dan tam geçmediği durumlarda tüpler 14000 devirde tekrar santrifüj edildi.

19. Spin – column kısmı çıkartıldı ve flow throug (süzölmüş sıvı) atıldı ve spin – column toplama tüpüne yerleştirildi.

20. **500 µl Wash STX buffer** spin columna eklendi ve **12000 rpm de 1 dk** santrifüj edildi.

21. Spin – column kısmı çıkartıldı ve flow throug (süzölmüş sıvıyı) atıldı ve spin – column toplama tüpüne yerleştirildi

22. **500 µl Wash STX buffer** spin - columna eklendi ve **12000 rpm de 2 dk** santrifüj edildi.

23. Spin - column çıkartıldı ve yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. **100-200 µl 70°C**'ye kadar ısıtılmış **Elution buffer** eklendi ve DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması sağlandı.

a. Filtrenin merkezi üzerine Elution buffer'ın DNA verimi artırmak için doğrudan eklendi.

B. Spin-column yüzündeki DNA artıklarının aktarılmasını önlemek için mikro pipet spin - column duvarına dokundurmadan aktarma yapıldı.

24. Spin - column / toplama tüpü düzeneği oda sıcaklığında **2 dk** inkübe edildi.

25. Spin - column **12000 rpm de yarım dk** santrifüj edildi.

26. Spin - column çıkartıldı ve saklama kabının kapağı kapatıldı.

Elde edilen DNA'lar PCR için kullanılıncaya kadar **-20°C**'de muhafaza edildi.

PCR Optimizasyonu:

B. hominis'in subtip tayini için direk bakı ve kültürde pozitif bulunup -20°C'de muhafaza edilen dışkı örnekleri kullanıldı. Subtip tespiti için kullanılan *B. hominis* genel primerleri (Tablo 3) ve STS primerleri (Tablo 4) ilk önce 100 pmol/μl olacak şekilde sulandırıldı.

B. hominis genel primerleri ile *B. hominis*'in 1800 bç'lik rDNA bölgesinin 1100 bç'lik gen bölgesi çoğaltıldı. PCR koşulları, Yoshikawa ve ark. STS primerleriyle dokuz subtipin belirlenmesinde uyguladığı PCR koşullarına uygun olarak ayarlandı.

Tablo. 3. *Blastocystis hominis* Genel Primeri

	Amplikon büyüklüğü (bç)	Primerler (Forward/Reverse)
Genel Primer	1100 bç	F: 5'-GGAGGTAGTGACAATAAATC-3' R: 5'-ACTAGGAATTCCTCGTTCATG-3'

Tablo. 4. *Blastocystis hominis* Subtip Tespitinde Kullanılan Primerler

ST	Amplikon büyüklüğü (bç)	Genbank No	Primerler (Forward/Reverse)
ST 1	1500 bç	AB023499.1	F: 5' CATGAGAAAGTCCTCTGGTGAGG -3' R: 5' CATCCTTTTACAGACAACCAATCTC -3'
ST 2	1500 bç	AB070987.1	F: 5'-CATGAGTAAAGTCCCCTGGGA-3' R: 5'-CCCTTTTACAGTTCATTCGCCTA-3'
ST 3	1200 bç	AB070992.1	F: 5'-CATGCAATTGGTCTTGACTGCA-3' R: 5'-GTCCCTCTAAGAGGATTCCTATAGA-3'
ST 4	1050 bç	AY244621.1	F: 5'-TTGAAGTGAACCTGGGTTGATGTG-3' R: 5'-AATAATCCGCAAAGAATTACTATATCA-3'
ST 5	1200 bç	AB070999.1	F: 5'-GCTAATACATGAATAAATCCTCAACTTC-3' R: 5'-CGTATAGTGCCCTCTAAGAAGTATACA-3'
ST 6	1050 bç	AB070990.1	F: 5'- TGGATGAGTATTTGAATTCAATTTTCG-3' R: 5'-CCCAGATACTCAAACGTATCCG-3'
ST 7	1340 bç	AF408427.1	F: 5'-TGGGCAACCATTAAAGAAGTAC-3' R: 5'-TCCCAAGTCTATCGACTCAGA-3'
ST 8	1480 bç	AB107970.1	F: 5'-GAATGAAAACAGTAGACTTAGTCTATTCG-3' R: 5'-CTCTATTCCTTTTACAGACTAGAAAC-3'
ST 9	1030 bç	AF408426.2	F: 5'- GAGAATGTCAAATCCTTGTAATAATC-3' R: 5'-CCCAGATACAAAACGTATCCG-3'

Genel ve Subtip *B. hominis* primerleri için kullanılan primerin bağlanma derecelerini belirlemek için farklı ısılarda çoğaltıldı ve jelde yürütülen DNA'lar parlaklık derecelerine göre bağlanma dereceleri belirlenerek PCR protokolü oluşturuldu.

PCR MiX

- H₂O : 14.3 µl
- Buffer : 1 µl
- MgCl : 1 µl
- dNTP : 1 µl
- Primer F : 0.25 µl
- Primer R : 0.25 µl
- Taq polimeraz : 0.2 µl
- DNA : 2 µl
- Toplam reaksiyon tamponu: 20 µl

PCR Isı Döngüsü

- 94°C: 5 dk
 - 94°C: 1 dk
 - 55°C: 45 sn
 - 72°C: 1 dk
 - 72°C: 10 dk
- } 38 döngü

Jel Elektroforez Yöntemi

Jel Hazırlama

5X TBE hazırlanışı

- EDTA : 20 ml (0.5 M, pH: 8)
- Tris : 54 g
- Borik Asit : 27.5 g

Yükleme Tamponu (Orange G)

- Orange G : 25 mg
- Gliserol : 3ml
- 5X TBE : 2ml
- Distile su : 5ml

Moleküler ağırlık standardı

- Distile su : 4 µl
- Blue loading dye : 1 µl
- DNA loader : 1µl

Yöntem

1. Jel yürütme tamponu hazırlamak için; 20 ml EDTA ve tartılan kimyasallar 1000 ml'lik şişe içerisine alındı ve üzeri 1000 ml' ye kadar distile su ile tamamlandı. Jel hazırlamak ve tank içerisinde jel yürütürken kullanmak için hazırlanan 5X TBE' den 200 ml 5X TBE'den alınıp üzerine 800 ml distile su eklenerek 1X TBE hazırlanmıştır.

2. Jel için; 100 ml 1X TBE içine 1.5 g agaroz tartıldı ve karışım içerisindeki agaroz kristalleri çözülünceye kadar mikrodalgada ısıtıldı. Daha sonra hazırlanan jel içerisine 5 µl etidyum bromür eklenerek taraklı tanka döküldü ve 45 dk jelin kristalize olması için beklenildi. Donan jel içerisinden taraklar çıkarılarak jel yürütme tankına yerleştirildi.

3. Tankın içi jel yüzeyini kaplayacak kadar 1X TBE tamponu ile dolduruldu.

4. Amplifiye edilen DNA'dan 10 µl ve yükleme tamponundan 2 µl alınarak ayrı bir yerde pipetlenip totalde 12 µl olacak şekilde jel içindeki kuyucuklara yüklendi.

5. DNA'ların ağırlıklarına göre dizilimini belirlemek için 5 µl marker DNA örnekleri gibi ilk kuyuya yüklendi. Yüklenen DNA'lar tank içinde 60 Amper, 110 Volt da 30-35dk yürütüldü.

6. Agaroz jel tanktan çıkarılarak translüminatöre aktarıldı. Translüminatörde, DNA'ların ağırlıklarına göre oluşturduğu bantlar UV ışığı altında incelendi.

Verilerin analizi SPSS 21.0 windows istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen değerlerin $p < 0.05$ altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizlerde uygun veriler, tanımlayıcı istatistikler (sayı, yüzde olarak) olarak sunuldu. Bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için Mc Nemar testi, bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için Chi-Square testi kullanıldı. Bu çalışma metodolojik bir çalışmadır.

Çalışmanın kısıtlılıkları: PCR sonucunda subtip tayini yapılamayan örnekler için yeni subtip olup olmadığının belirlenmesi amacıyla DNA dizi analizi yöntemi kullanılmadı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada 282 insan dışkı örneği, 343 hayvan dışkı örneği Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen *B. hominis* pozitif 96 dışkı örneğinden 69 tanesi insanlardan, 27 tanesi de farklı hayvanlardan toplanmıştır.

Çalışma kapsamında, Gastroenteroloji polikliniğinden GİS şikâyeti ile gelen 130 hastanın dışkı örneği toplandı bunlardan 21 tanesi pozitif bulundu. Dermatoloji polikliniğinden ürtiker tanısı konulmuş 80 hastanın dışkı örneği toplandı bunlardan 18 tanesi pozitif bulundu. Onkoloji kliniğinde radyoterapi gören hastalardan 54 dışkı örneği toplandı bunlardan 12 tanesi pozitif bulundu. Kemoterapi tedavisi gören hastalardan topladığımız örnekler kromotografik yöntemle *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* yönünden değerlendirildi ve bütün örneklerin negatif olduğu belirlendi. Kontrol grubu olarak herhangi bir şikâyeti olmayan bireylerden toplanan ve *B. hominis* yönünden pozitif bulunan 18 dışkı örneği çalışmaya dâhil edildi.

Hayvan örnekleri için, Hayvan pazarından 110 büyükbaş ve küçükbaş hayvan dışkısı toplandı, 32 tanesinde direk bakıda *Blastocystis* sp.'ye benzer yapılar görüldü fakat bunlardan 17 tanesi kültürde pozitif bulundu. Farklı besicilerden 80 kanatlı dışkısı toplandı, 21 tanesinde direk bakıda *Blastocystis* sp.'ye benzer yapılar görüldü fakat 9 tanesi kültürde pozitif bulundu. Hipodromdan ve at çiftliklerinden 80 at dışkısı toplandı, 13 tanesinde direk bakıda *Blastocystis* sp.'ye benzer yapılar görüldü fakat bunlardan 1 tanesi kültürde pozitif bulundu. Köpek barınağından 73 köpek dışkı örneği toplandı 9 tanesinde direk bakıda *Blastocystis* sp.'ye benzer yapılar görüldü ve kültüre ekimi yapıldı. Kültüre ekimi yapılan örneklerden hiçbiri *B. hominis* yönünden pozitif değildi.

Çalışma kapsamında toplanan dışkı örnekleri ilk olarak nativ-Lugol yöntemi ile tarandı. Pozitif olarak tespit edilen örnekler ikinci bir yöntem olarak trikrom boyama yöntemiyle çalışıldı. Ayrıca her bir örnek Modifiye Jones Medium'a ekilerek ikinci bir doğrulama yöntemine gidildi. Direk bakı ve kültür pozitif bulunan örnekler -20°C'de muhafaza edildi ve bu numunelerden DNA eldesi yapıldı. Elde edilen DNA'lardan STS primerleri kullanılarak PCR yöntemiyle subtip tayinleri yapıldı.

Çalışma yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde; *B. hominis*, GİS şikâyeti olan hastalarda, Ürtikerli hastalarda ve kontrol grubunda, 10-50 yaş arasında daha sık tespit edildi. Kemoterapi alan hastalarda ise 50 ve üzeri yaş grubunda daha sıklıkla saptandı (Tablo. 5). Çalışma grupları yaş aralıklarına göre değerlendirildiğinde; 10-50 yaş arası hasta grubunda *B. hominis* görülme oranının daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$).

Tablo. 5. *B. hominis*'in Farklı Yaş Gruplarındaki Dağılımı

	Gastroenteroloji		Kemoterapi		Ürtiker		Kontrol Grubu		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
10 Yaş Altı	4	100	0	0	0	0	0	0	4	100
10-50 Yaş	15	27,8	7	13,0	15	27,8	17	31,5	54	100
50 Yaş Üstü	2	18,2	5	45,5	3	27,3	1	9,1	11	100
Total	21	30,4	12	17,4	18	26,1	18	26,1	69	100

Çalışma cinsiyete göre değerlendirildiğinde: 69 kişiden, 34 erkek ve 35 kadın *B. hominis* yönünden pozitif bulundu (Tablo. 6). Çalışma grupları cinsiyete göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo. 6. *B. hominis*'in Cinsiyete Göre Dağılımı

	Gastroenteroloji		Kemoterapi		Ürtiker		Kontrol Grubu		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Erkek	10	29,4	2	5,9	7	20,6	15	44,1	34	100
Kadın	11	31,4	10	28,6	11	31,4	3	8,6	35	100
Total	21	30,4	12	17,4	18	26,1	18	26,1	69	100

İnsanlardan toplanan dışkı örneklerinin hepsi nativ-Lugol ve trikrom boyama yöntemiyle çalışıldı ve bütün örnekler her iki yöntemde de pozitif olarak belirlendi. Hayvanlarda ise dışkı örnekleri içinde artefaktlar ve olası hücresel yapılar fazla olduğu

için *B. hominis*'in morfolojik ayrımı ve tanımlanmasında zorluklar yaşandı. Bu sebeple direk bakıda şüpheli görülen örnekler kültüre alındı.

Kültür yöntemi ile direk bakı yöntemlerini karşılaştırdığımızda; bütün insan ve hayvan dışkı örnekleri direk bakı yöntemi ile incelendi. Direk bakı ile pozitif bulunan bütün örnekler kültürde de pozitif olarak tespit edildi. Hayvan dışkı örneklerinden 14 tanesi direk bakı yöntemiyle kesin olarak teşhis edilemedi. Bu örnekler kültür yöntemiyle çalışıldığında, *B. hominis* yönünden pozitif olduğu görüldü. İnsan dışkı örnekleri, *B. hominis*'in en sık görülen vakuoler formun kolayca teşhis edilmesi ve insan dışkısında *B. hominis*'e benzer artefaktlar ve farklı hücresel yapılar bulunmaması sebebiyle, direk bakıyla kolayca teşhis edildi. Direk bakıda çok nadir *B. hominis* gördüğümüz bazı dışkı örneklerinin kültürlerinde bol *B. hominis* ürediği saptandı. Bu da bize, dışkının direk bakısında nadir *B. hominis* etkeni görülse bile kültür ortamında üretilbileceğini ve kültürün teşhisten ne kadar önemli olduğunu gösterdi.

Bu çalışmamızda ayrıca, kültür yönteminin DNA izolasyonunda da avantaj sağladığını gördük. Çalışmamızda *B. hominis* DNA'sını izole etmek için dışkıdan DNA izolasyon kiti kullanıldı. Bu izolasyon işleminde karşılaştırmak amacıyla -20°C saklanan 96 dışkı örneğiyle beraber, 12 tane de kültürde çoğaltılan örnekten izolasyon yapıldı. Kontrol amacıyla çalıştığımız 12 örneğin PCR işleminde, direk dışkıdan çalışılan örneklerle kıyasla daha net bantlar elde edildi.

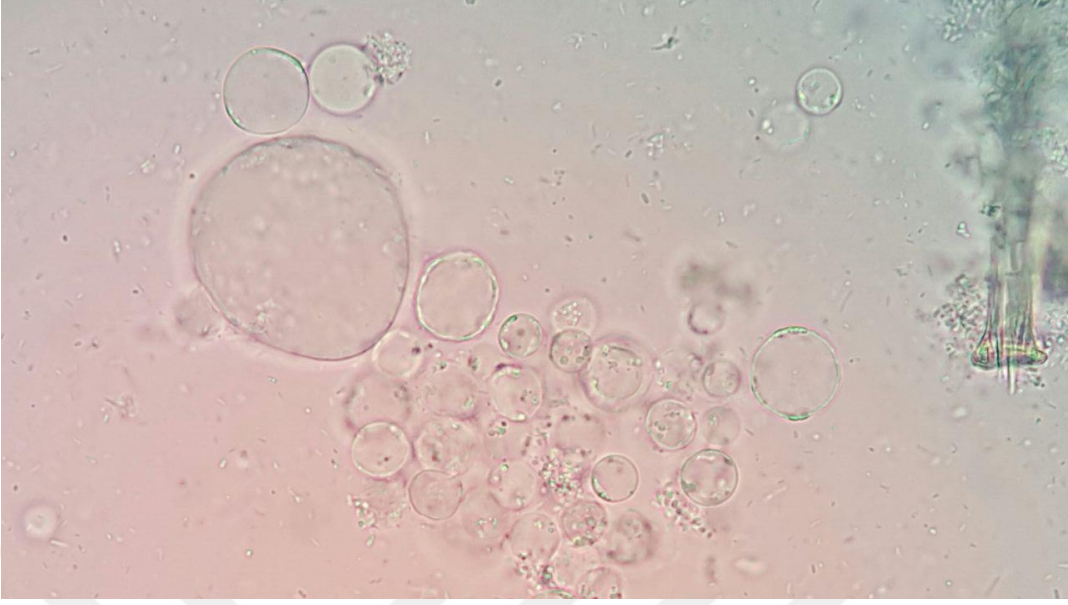
Direk bakıda pozitif bulunan ve kültürde üreyen 96 örnek PCR yöntemiyle çalışıldı. Çalışmada ilk olarak genel primerler kullanıldı ve 96 örneğin hepsi *Blastocystis* sp. pozitif olarak tespit edildi.

İncelenen 96 insan ve hayvan dışkı örneğinde en çok ST3 saptandı. ST3 bütün örneklerin %43,8'de ve insanların %60,9'da tespit edildi. PCR işleminde *Blastocystis* sp. genel primeri pozitif bulunan örneklerin; % 43,8'inde ST3, %12,5'inde ST1, % 12,5'inde ST2, % 6,3'ünde ST7, % 4,2'sinde ST6 ve % 3,1'inde ST5 tespit edildi.

İncelenen 96 örneğin %10,4'ünde miks subtip saptandı. Miks Subtip görülen gruptan kemoterapi tedavisi alan bir hastada ST1, ST2 ve ST3 olmak üzere üç farklı subtip bir arada görüldü. Ayrıca ürtiker teşhisi konulan 4 hastadan bir tanesinde ST1 ve ST2, üç tanesinde ST1 ve ST3, GİS şikâyeti olan hastalardan bir tanesinde ST2 ve ST3 ve Kontrol grubundan bir kişide ST1 ve ST3 görüldü. Hayvan grubundan ise, bir kanatlıda ST6 ve ST7 görüldü.

PCR işleminde *Blastocystis* sp. genel primeri pozitif bulunan 96 örnekten %27,2'sinde ise hiçbir subtip rastlanmadı. Non Subtip gruplar sırasıyla; Büyükbaş 8, küçükbaş 7, ürtikerli 7, GİS şikâyetleri olanlar 3, kontrol grubu ve kanatlı 1 olarak tespit edildi. Kemoterapi alan hastaların ise, tamamının en az bir subtip ile enfekte olduğu görüldü. Bu çalışmada ST4, ST8 ve ST9 tespit edilemedi.

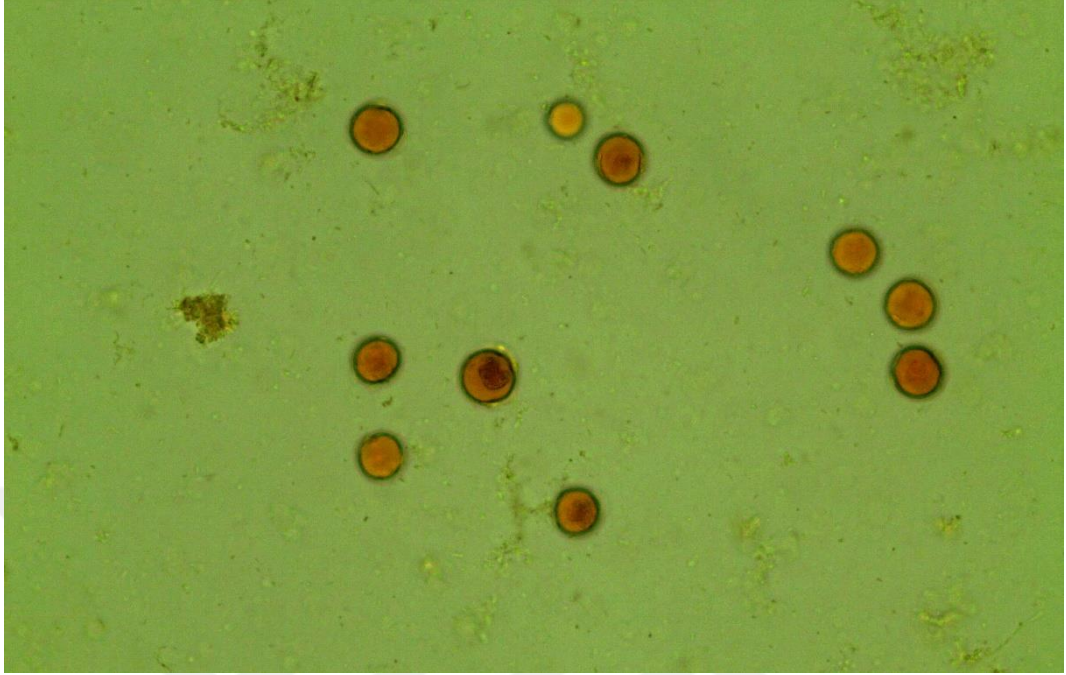




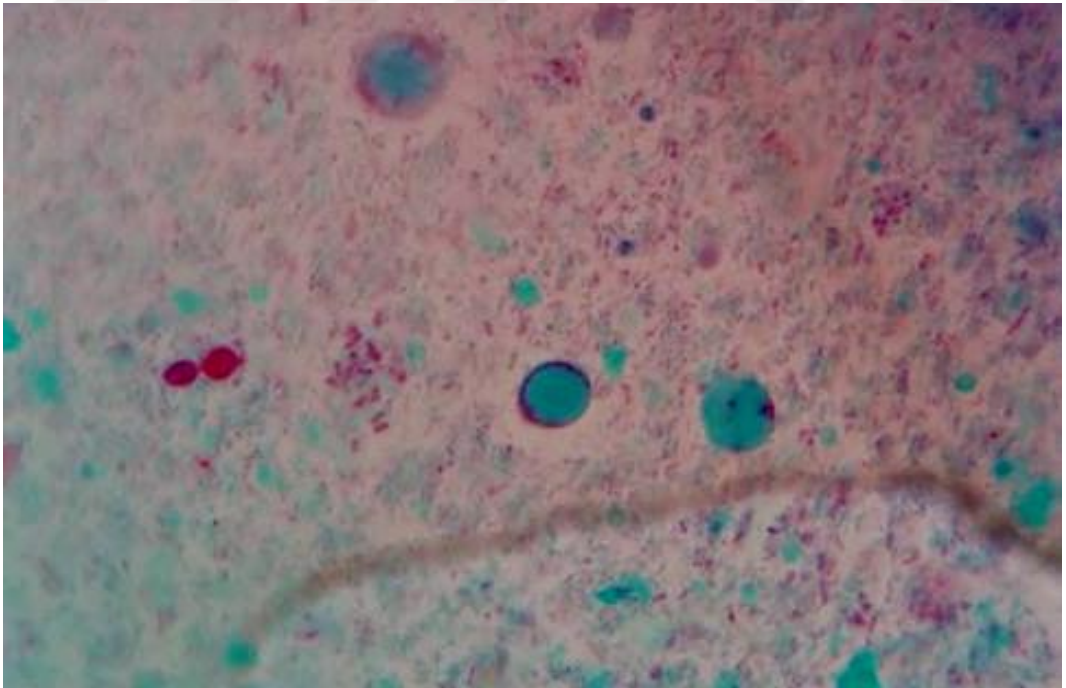
Resim. 3. Kltrde remiş *Blastocystis* sp. Vakuoler Form Direk bakı Görünümü



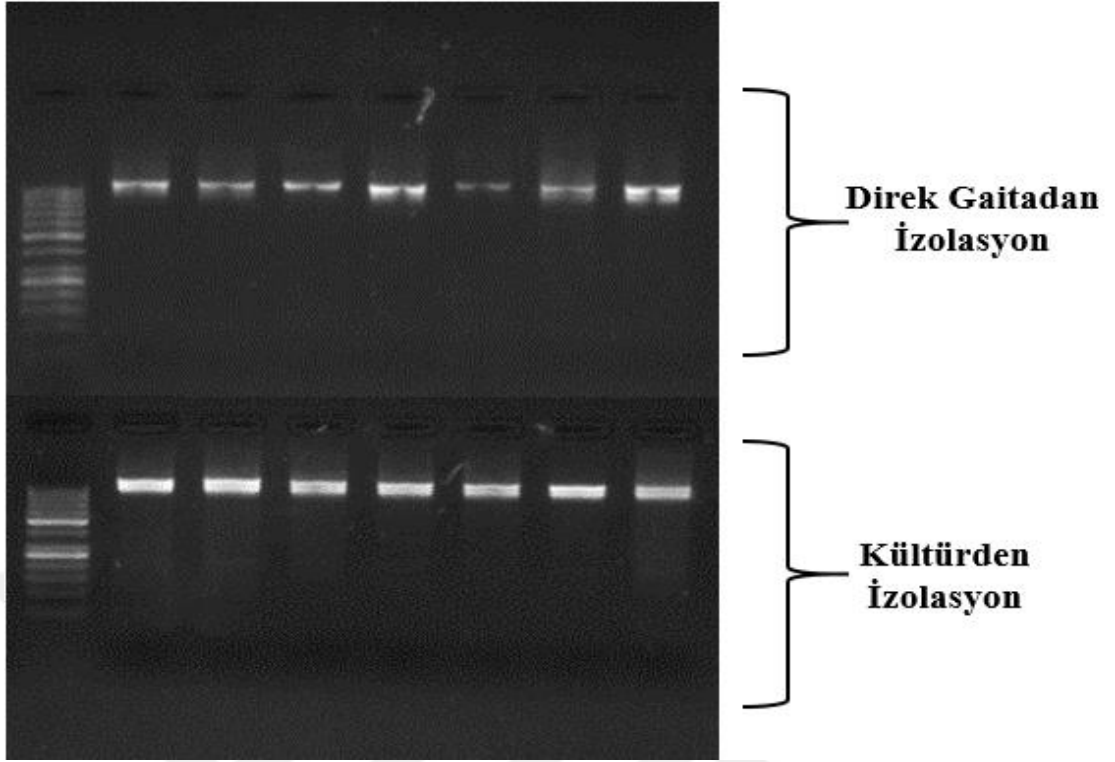
Resim. 4. Kültürde *Blastocystis* sp. Granüler Form Görünümü



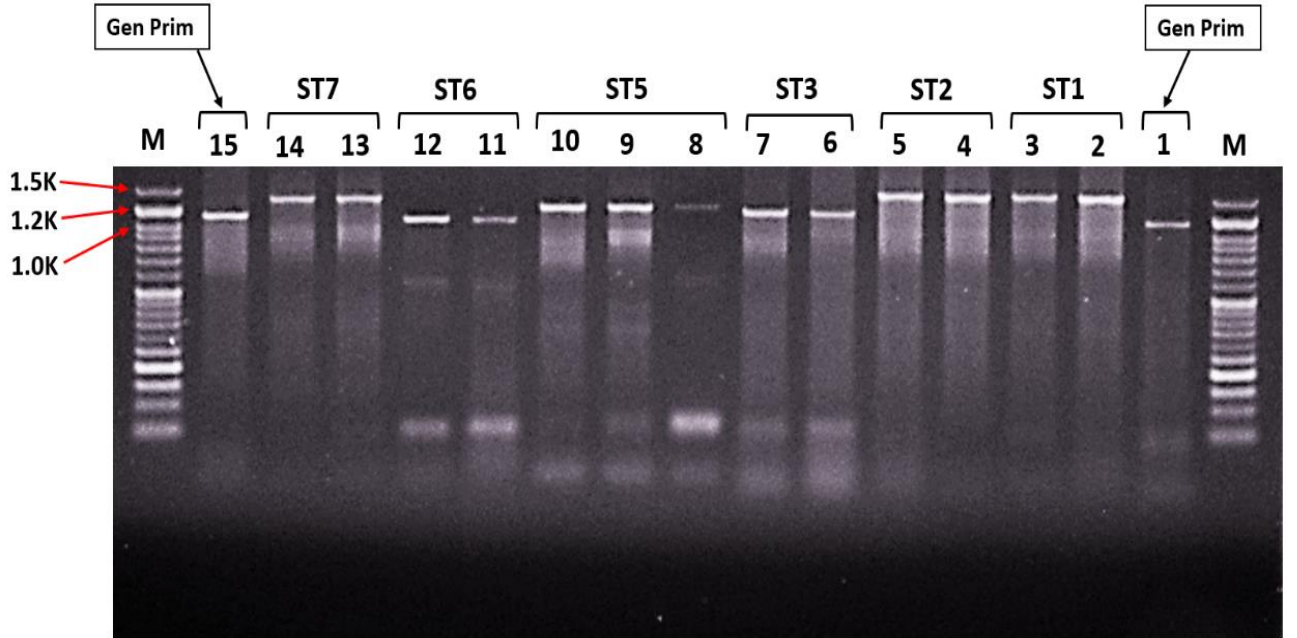
Resim. 5. *Blastocystis* sp. Lugol Boyama Görünümü



Resim. 6. *Blastocystis* sp. Vakuoler Form Trikróm Boyama Yöntemiyle Görünümü



Resim. 7. Direk Gaitadan ve Kültürden Çalışılan PCR Sonucu Elde Edilen Bantlar



Resim. 8. Çalışmada Tespit Edilen Bütün Subtipler

Subtiplerin hasta gruplarına göre dağılımı şu şekilde bulundu:

ST1, %33,3 oranıyla en sık, ürtiker şikayeti olan ve kemoterapi tedavisi alan hasta gruplarında görüldü. En az ise, %8,3 oranıyla kontrol grubunda gözlemlendi. Grupların birbiriyle karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo. 7. *B. hominis* ST1'in Hasta Gruplarına Göre Görülme Oranları

	Gastro		Kemoterapi		Cildiye		Kontrol		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Negatif	18	31,6	8	14,0	14	24,6	17	29,8	57	100
Pozitif	3	25,0	4	33,3	4	33,3	1	8,3	12	100
Toplam	21	30,4	12	17,4	18	26,1	18	26,1	69	100

ST2, %41,7 oranıyla en sık, kemoterapi tedavisi alan hasta grubunda görüldü. En az ise, %8,3 oranıyla kontrol grubunda gözlemlendi. Grupların birbiriyle karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo. 8. *B. hominis* ST2'nin Hasta Gruplarına Göre Görülme Oranları

	Gastro		Kemoterapi		Cildiye		Kontrol		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Negatif	17	29,8	7	12,3	16	28,1	17	29,8	57	100
Pozitif	4	33,3	5	41,7	2	16,7	1	8,3	12	100
Toplam	21	30,4	12	17,4	18	26,1	18	26,1	69	100

ST3, %33,3 oranıyla en sık kontrol grubunda görüldü. En az ise, %11,9 oranıyla kemoterapi tedavisi alan hasta grubunda gözlemlendi. Grupların birbiriyle karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo. 9. *B. hominis* ST3'ün Hasta Gruplarına Göre Görülme Oranları

	Gastro		Kemoterapi		Cildiye		Kontrol		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Negatif	8	29,6	7	25,9	8	29,6	4	14,8	27	100
Pozitif	13	31,0	5	11,9	10	23,8	14	33,3	42	100
Toplam	21	30,4	12	17,4	18	26,1	18	26,1	69	100

ST5 bir tane kontrol grubunda, iki tane de küçükbaş hayvanda olmak üzere toplam üç örnekte görüldü. ST6 sadece bir tane GİS şikâyeti olan hastada ST2 ile beraber, 3 tane de kanatlı grubunda saptandı. ST7 ise insan gruplarında görülmedi fakat 6 tane kanatlı grubunda görüldü.

GİS şikâyetleri olan, Ürtikerli ve Kemoterapi tedavisi alan hasta gruplarıyla kontrol grubunun *B. hominis* subitlerine göre istatistiksel karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlar:

ST 1: GİS şikayeti olan grupta %25 kemoterapi alan grupta % 33,3, ürtikerli grupta %33,3 ve Kontrol grubunda %8,3 görüldü. Grupların kontrol grubuyla Mc.Nemar testine göre karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$).

ST 2: GİS şikayetleri olan grupta % 33,3 (n=4), Kemoterapi alan grupta % 41,7 (n=5), Ürtikerli grupta % 16,7 (n=2) ve kontrol grubunda % 8,3 (n=1) görülmüştür. Grupların kontrol grubuyla Mc.Nemar testine göre karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$)

ST 3: GİS şikayetleri olan grupta % 31,0 (n=13), Kemoterapi alan grupta % 11,9 (n=5), Ürtikerli grupta % 23,8 (n=10) ve kontrol grubunda % 33,3 (n=14) görülmüştür (Tablo 9). Grupların kontrol grubuyla Mc.Nemar testine göre karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p<0,05$)

ST4, ST7, ST8ve ST9 insan gruplarında görülmedi. ST5 bir tane kontrol grubunda, ST6 bir tane GİS şikâyeti olan hasta grubunda tespit edildi. Bu subtiplerin yetersiz sayıda bulunması sebebiyle kontrol grubuyla karşılaştırma yapılamadı.

5. TARTIŞMA

Çalışmaya alınan dışkı örnekleri, ilk olarak nativ-Lugol yöntemiyle ve trikrom boyama yöntemiyle incelendi. Nativ-Lugol yöntemiyle pozitif bulduğumuz bütün örnekler trikrom boyama yönteminde de pozitif olarak tespit edildi. Çalışmaya nativ-Lugol yönteminde pozitif bulunan örnekler dahil edildiği için *B. hominis*'in tespitinde nativ-Lugol yöntemiyle trikrom boyama yönteminin karşılaştırılması yapılmadı. Fakat laboratuvar şartlarında iki yöntemin birbirine olan üstünlükleri değerlendirildi. Nativ-Lugol yöntemi, bütün laboratuvar koşullarında rahatlıkla uygulanabilecek, hızlı sonuç veren ve *B. hominis*'in dışkıda en sık görülen formu olan vakuoler formunu kolayca tanımlayabilecek bir yöntem olarak değerlendirildi. Fakat nativ-Lugol yönteminin, deneyimsiz personel varlığında ve *B. hominis*'in kist formu veya granüler form gibi tespiti daha zor olan formlarının varlığında özgüllüğü ve duyarlılığı azalmaktadır. Ayrıca mantar ve yağ globülleri gibi morfolojik olarak *Blastocystis* sp.'ye benzer yapılar varlığında özgüllüğü azalmakta ve yanlış pozitif sonuçlara sebep olmaktadır. Bu noktalardan araştırmacılar, *Blastocystis* sp. tanısında nativ-Lugol yönteminin yanlış sonuçlara neden olabileceğini ve şüpheli preperatların başka bir yöntemle desteklenmesi gerektiğini ifade etmişlerdir (27, 92).

Tikrom boyama yönteminde organizmanın stoplazma ve organellerinin farklı renklere boyanması ve örneklerin mikroskopun 100X'lük merceğiyle taranması sebebiyle *B. hominis*'in diğer etkenlerle karıştırılma ihtimali azalmaktadır. Ayrıca trikrom boyama işleminde dışkı belli işlemlerden geçirilerek boyanmakta ve artefaktlardan kısmen arındırılmakta bu da *B. hominis*'in tanımlanmasını kolaylaştırmaktadır. Bu yönleri ile trikrom boyama yöntemi nativ-Lugol yöntemine göre daha güvenilir bir yöntem olarak değerlendirildi. Bu alanda yapılan farklı çalışmalar da *Blastocystis* sp. tanısında trikrom boyama yönteminin nativ-Lugol yöntemine göre daha güvenilir bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Özçakır ve ark. *B. hominis*'in tanı yöntemlerini karşılaştırdığı bir çalışmada, trikrom boyama yöntemi ile 78 hasta, Nativ-Lugol yöntemi ile 39 hasta pozitif olarak tespit edilmiş ve trikrom boyama yönteminin direk bakıya göre daha duyarlı bir yöntem olduğu belirtilmiştir (168). Termmathurapoj ve ark. tarafından tanı yöntemlerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, Trikrom boyama yönteminin direk bakıya göre duyarlılığının yüksek özgüllüğünün ise düşük olduğu belirtilmiştir (169). Trikrom boyama yönteminde

özgüllüğün düşmesinin sebebi, boyama esnasında birçok farklı kimyasal kullanılması ve boyama işleminin uzun süren birçok basamak içermesi sebebiyle standardizasyonunun zorlaşması olabilir. Buna karşın Doğruman ve ark. tarafından *B. hominis* tanı yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, trikrom boyama yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü nativ-Lugol yönteminden daha yüksek bulunmuştur (170).

Yapılan çalışmalarda kültür yöntemi, direk bakı ve moleküler yöntemlere göre daha duyarlı bir yöntem olarak belirtilmekte ve *Blastocystis* sp. tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir (27, 169, 171). Çalışmamızda, direk bakıda pozitif bulduğumuz bütün örnekler Jones medium kültür yönteminde pozitif olarak tespit edildi. Kültür yönteminin, direk bakıdan iki noktada üstün olduğu belirlendi. Birincisi; direk bakıda nadir *Blastocystis* sp. görülen bazı dışkı örneklerinin kültürü yapıldığında bol üreme olduğu gözlemlendi. Elghareeb ve ark. yaptığı bir çalışmada bu durumun sebebinin, nativ-Lugol yönteminin *Blastocystis* sp.'nin bazı formlarını tanımlamada yetersiz kalması ve *Blastocystis* sp.'lerin yağ globülleri ve mantar hücreleriyle karıştırıldığı için tanımlanamaması olduğu belirtilmiştir (172). Bu durumda bizlere direk bakı ile birlikte kültür yönteminin kullanılmasının teşhiste avantaj sağlayacağını gösterdi. İkincisi; 14 hayvan dışkı örneğinde alanda gördüğümüz organizmanın *Blastocystis* sp. olup olmadığı noktasında kesin bir hükme varamadık. Bu örnekleri kültüre ektiğimizde bol *Blastocystis* sp. ürediğini gördük. Bu durum bizlere, hayvan dışkı örneklerinde *Blastocystis* sp.'nin tanımlanmasını zorlaştıran çok sayıda hücre yapılarının ve artefaktların bulunduğunu ve bu yapılardan *Blastocystis* sp.'yi ayırmak için kültür yönteminin güvenilir şekilde kullanılabileceğini gösterdi. Abe ve ark. çiftlik hayvanlarında, evcil hayvanlarda ve hayvanat bahçesinde yaşayan hayvanlarda *Blastocystis* sp. görülme sıklığını araştırdığı bir çalışmada direk bakıda negatif bulunan sekiz örneğin kültürde pozitif bulunduğunu belirtmiş ve kültür yönteminin dışkıda *B. hominis* tespit etme oranını arttırdığını ifade etmiştir (173).

Yaptığımız çalışmada kültür yöntemi, standardizasyonu zor bir yöntem olarak değerlendirildi. Çalışmada dışkının klinikten laboratuvara getirilmesi sürecinde ve besiyerine ekiminde oksijene ve düşük ısıya maruz kalmasının üremeyi ciddi olarak baskıladığını gözlemlendi. Bu problemin önüne geçmek için dışkı örneğinin en kısa sürede kültüre ekilmesi gerekmektedir. Besiyeri hazırlama sürecinde pH'nın 7-7,5 arasında ayarlanması için pH metre kullanılması gerekmektedir. Çalışmada modifiye

jones medium hazırlama prensibinde verilen oranlar tam olarak uygulansa da kullanılan kimyasallara bağlı olarak pH oranlarının değiştiğini ve bu değişikliklere bağlı olarak oluşan asidik veya bazik ortamın *Blastocystis* sp.'nin üremesini ciddi oranda engellediğini tespit ettik. Zhang ve ark. üç farklı besiyerini karşılaştırdığı bir çalışmada, sıcaklık ve pH'nın üreme üzerinde hayati öneme sahip olduğu belirtmesi bizim bu bulgumuzu desteklemektedir (174). Yine kültür yönteminin 48 saat gibi uzun bir süre içinde sonuç vermesi hastanın tedavisini geciktirmektedir. Ayrıca kültür yöntemi, günümüzde patojenite ile ilişkilendirilen subtiplerin ayrımını yapamamaktadır.

Moleküler tanı yöntemleri, özel laboratuvar şartları, hassas işlem basamakları, deneyimli personel gerektirmesi ve pahalı olması sebebiyle rutin tanıda kullanılması zor yöntemlerdir (151). Çalışmamızda, direk bakı ve kültürde pozitif bulunan örnekler PCR işleminde de pozitif olarak tespit edildi. Dışkı örnekleri çok partiküllü, kompleks yapılar olması ve birçok farklı inhibitör içermesi sebebiyle moleküler çalışmalarda kullanımı zor materyallerdir. Bu sebepten dışkıdan DNA elde etmek için ticari kitler geliştirilmiştir. Bu ticari kitlerin başarı oranları farklı çalışmalarda değişkenlik göstermektedir (161). Bu çalışmada dışkıdan DNA elde edilmesi işleminde bir problem yaşanmadı. Çalışmamızda, 12 tane kültürde üretilen örnekten, 96 tane de direk dışkıdan DNA izolasyon işlemi yapıldı ve kültürde üretilen örneklerden elde ettiğimiz DNA'ların daha net bantlar verdiği gözlemlendi. Robert ve ark. yaptığı bir çalışmada, direk dışkıdan izolasyonun *B. hominis* DNA'sını besiyerinde üretmeye gerek kalmadan elde etmesi ve dışkıda bulunan bütün subtipleri birbirini baskılamadan tespit etmesi gibi avantajları olduğu ifade edilmiştir (151). Santos ve ark. yaptığı bir çalışmada, kültürden PCR ile direk dışkıdan PCR işlemleri karşılaştırılmış ve kültürden yapılan PCR işleminin daha yüksek oranda pozitiflik verdiği belirtilmiştir (169, 175). Yoshikawa ve ark. tarafından yapılan ve *Blastocystis* sp. izolasyonunda kullanılan ticari kitlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, ticari izolasyon kitlerinin farklı özgüllük ve duyarlılıkta olduğunu belirtmiş ve PCR işleminde pozitiflik ve maliyet yönünden düşünüldüğünde kültürden izolasyon işleminin daha avantajlı olduğu ifade edilmiştir (161). Bu çalışmalar beraber düşünüldüğünde, yapılan çalışmada hızlı sonuç almak ve dışkıda bulunan bütün subtipleri tespit etmek amaçlanıyorsa direk dışkıdan

izolasyon işlemi, yüksek pozitiflik oranı ve jelde daha net bant görüntüsü amaçlanıyorsa kültürden izolasyon işlemi kullanılmalıdır.

Purifikasyon sonucu elde edilen 108 örnekte PCR ile *Blastocystis* pozitifliğini tespit etmek için *Blastocystis* sp. genel primerleri kullanıldı ve çalışılan 108 örneğin hepsi *B. hominis* genel primerleri yönünden pozitif olarak tespit edildi. Pozitif örneklerden jel elektroforez yöntemiyle elde ettiğimiz bantlar çok netti ve non spesifik bantlar çok azdı. Bu da bizlere, dışkıdan izolasyon işleminin bir çok basamak içermesi ve zor olmasına karşın PCR yönteminin *Blastocystis* sp.'nin tanısında kültür kadar güvenilir bir yöntem olduğu sonucunu verdi. Bu alanda yapılan çalışmalar, moleküler testlerin kültür yöntemi kadar güvenilir testler olduğunu göstermektedir. Santos ve ark. tarafından *B. hominis* tanı yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada kültür en güvenilir yöntem olarak tespit edilmiş, kültür yöntemini sırasıyla, kültürde üretilen örneklerle yapılan PCR ve direk dışkıdan yapılan PCR takip etmiştir (175). Roberts ve ark. tarafından *B. hominis* tanı yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada iki farklı kültür yöntemi ile PCR1 ve PCR2 diye isimlendirilen iki farklı primerin kullanıldığı PCR yöntemi karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmanın sonucunda en yüksek pozitiflik oranını, 92 pozitif örnekle PCR2 göstermiş ve PCR2'yi 81 ve 80 pozitif örnekle kültür yöntemleri ve 65 pozitif örnekle PCR1 takip etmiştir (151). Parkar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, moleküler yöntemler kültür yöntemine göre daha üstün bulunmuştur (176). Bu çalışmalardan elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde şu sonuçlara ulaşabiliriz. *B. hominis*'in tanısında kültür yöntemi ve moleküler yöntemler diğer tanı metotlarıyla kıyaslandığında daha güvenilir yöntemlerdir. İki yöntemin birbiriyle karşılaştırıldığı çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar çıkmış fakat gün geçtikçe moleküler yöntemlerin üstünlüğü artmaktadır. Bu çalışmalarda PCR işleminin pozitiflik oranını değiştiren sebepler arasında, dışkıdan DNA izolasyonunun zor olması, MİX'in hazırlanması ve DNA'nın çoğaltılması aşamalarında ortamın PCR işlemine uygunluğu, izolasyon ve PCR işleminin bütün basamaklarında standardizasyonun sağlanması ve kullanılan primerler sayılabilir.

Blastocystis sp.'nin günümüze kadar tespit edilmiş 17 subtipi bulunmaktadır ve bunlardan 9 tanesinin insanlarda enfeksiyon yaptığı belirlenmiştir. Subtip belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılmakla birlikte pek çok araştırmacı STS primerleri ile konvensiyonel PCR yöntemini tercih etmektedir (91, 93, 177). Bizde

çalışmamızda, STS primerlerini kullanarak PCR işlemiyle *B. hominis*'in 9 subtipini araştırdık. İncelenen 96 insan ve hayvan dışkı örneğinde %43,8'lik oranla en fazla ST3 saptandı. Sadece insan dışkı örnekleri baz alındığında, ST3 oranı %60,9 olarak tespit edildi. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgu, ülkemizde ve dünyada yapılan birçok çalışmayla benzerlik göstermektedir (133-138, 140). Ülkemizde ST1 ve ST2'nin ST3'den daha fazla oranda tespit edildiği çalışmalarda bulunmaktadır. Doğruman ve ark. yaptığı bir çalışmada asemptomatik hastalarda en yaygın subtipin ST3 olduğunu tespit etmişlerdir (134). Buna karşın Eroğlu ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada ST2'yi semptomatik hastalarda en yaygın görülen subtip olarak tespit etmişlerdir (178). Yine Koltaş ve ark. kırsalda ve şehirde yaşayan semptomatik hastaları karşılaştırdığı bir çalışmada, ST1'i her iki kesimde de en yaygın subtip olarak tespit etmiştir (139). Bu çalışmalardan, ülkemizde en yaygın subtipin ST3 olmasına karşın çalışılan grubun yaşadığı bölgeye ve semptomatik veya asemptomatik bireylerden oluşmasına göre ST1 ve ST2'nin de en yaygın görülen subtipler olabileceği anlaşılmaktadır.

Yaptığımız çalışmada, ST3 dışında subtip görülme sıklığı sırasıyla ST1, ST2, ST7, ST6 ve ST5 olarak belirlendi. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ST3'den sonra en yaygın görülen subtipler ST1, ST2 ve ST4 dür. Adıyaman ve ark. yaptığı bir çalışmada ST3'ü ST1, ST2 ve ST4 takip etmektedir (179). Özyurt ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, ST3'ten sonra en yaygın subtipin ST1, ST2 ve ST4 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar beraber değerlendirildiğinde ST1, ST2 ve ST3 ülkemizde en yaygın görülen subtiplerdir ve bunları ST4 takip etmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada, ST1 ve ST2 için benzer sonuçlar elde edildi fakat ST4 tespit edilemedi. Bu durumun sebebi, *B. hominis*'in subtiplerinin dağılımının bölgesel olarak farklılık göstermesi olabilir. Bu çalışmada tespit edilen ST5, ST6 ve ST7 için ise ülkemizde çok kısıtlı sayıda çalışma yapılmıştır. Bu sebepten epidemiyolojik olarak değerlendirmek çok sağlıklı gözükmemektedir.

Bu çalışmada ST1, 3 tane GİS şikayeti ile gelen hastada, 4 tane immün suprese hasta grubunda, 4 tane ürtikerli hasta grubunda ve 1 tane kontrol grubunda olmak üzere toplam 12 tane tespit edildi (Tablo 7). ST1 tespit edilen örneklerden 7 tanesinde mix enfeksiyon görüldü. Mix enfeksiyonlardan 1 tanesi ST2 ve ST3 ile beraber bir tanesi ST2 ile beraber ve 5 tanesi ST3 ile beraber görüldü. Yapılan çalışmalarda da ST1, ST2

ve ST3'ün mix enfeksiyonlar yaptığı belirtilmektedir. Yoshikawa ve ark. yaptığı bir çalışmada ST1, ST3 mix enfeksiyonu %26.3 oranında ST1, ST2 mix enfeksiyon sıklığı %5,1 oranında ST1, ST2 ve ST3 mix enfeksiyon sıklığı ise %1,7 oranında tespit edilmiştir. Araştırmacı bu durumun sebebini açıklarken, *B. hominis*'in bulaşında kişisel hijyenin önemli rol oynadığını belirtmiş ve kişilerin kötü hijyen koşulları sebebiyle tekrar tekrar aynı etkene maruz kalması sonucu mix enfeksiyonların oluştuğunu ifade etmiştir (180). Bizim çalışmamızda ST1, ST3 mix enfeksiyon oranı %41,6 gibi yüksek bir oranda tespit edilmiştir. Bu bulgular bölgemizde sanitasyon kurallarına yeterince dikkat edilmediğini göstermektedir.

Bu çalışmada ST1 kontrol grubunda bir tane, ürtikerli ve GİS şikayeti olan grupta 7 tane, kemoterapi tedavisi alan grupta ise 4 tane tespit edildi (Tablo 7). Semptomatik hasta grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, ST1 semptomatik hasta grubunda yüksek oranda görülmüştür ve bu veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 7) ($P<005$). Tan ve ark. tarafından 2010 yılında yayınlanan ve subtiplerin semptomatik vakalarla ilişkisinin araştırıldığı bir derlemede ST1'in semptomatik vakalarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (181). Bizim bulgularımızda bu veriyi desteklemektedir.

Bu çalışmada ST2, 4 tane GİS şikayeti ile gelen hastada, 5 tane immün suprese hasta grubunda, 2 tane ürtikerli hasta grubunda ve 1 tane kontrol grubunda olmak üzere toplam 12 tane tespit edildi (Tablo 8). Semptomatik hasta grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, ST2 semptomatik hasta grubunda yüksek oranda görülmüştür ve bu veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<005$). ST2 ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar tespit edilmiştir. Doğruman ve ark. 286 yetişkin ve çocuk grubu üzerinde yaptığı ve subtiplerin patojeniteyle ilişkisini araştırdığı bir çalışmada, ST2'nin asemptomatik bir subtip olduğunu belirtmiştir (134). Hussein ve ark. tarafından infekte ratlar üzerinde belli subtiplerin patojenitesinin araştırıldığı bir çalışmada, ST2'nin patojenlik potansiyeli göstermediği sonucuna varmıştır (122). Buna karşın Vogelberg ve ark. tarafından, ürtiker ve GİS şikayetleri olan hasta gruplarının ST2 ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ST2'nin ürtiker ve GİS şikayetlerinin oluşmasında rolünün olduğu sonucuna varmıştır. Yine bu hasta grubundan izole ettiği ST2'nin DNA dizi analizlerinin Danimarka gen bankasında bulunan ve aynı hasta grubundan elde edilen ST2'nin DNA dizi analizleriyle benzer

olduğunu belirtmiştir. Vogelberk bu çalışmanın tartışma kısmında, ST2'nin farklı çalışmalarda semptomatik ve asemptomatik vakalarla ilişkilendirilmesinin sebebinin, ST2 içerisindeki genetik ve / veya morfolojik varyasyon farkları olabileceğini ifade etmiştir (182).

Bu çalışmada iki tane koyunlarda bir tane de kontrol grubunda olmak üzere 3 tane ST5 tespit edilmiştir. ST5'in ülkemizde çok kısıtlı sayıda bildirimidir. İlk kez 2016 yılında Koçtaş ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada tespit edilmiş ve bundan başka ST5 bildirimleri yapılmamıştır (139). ST5 genelde semptomatik hastalarla ilişkili görülmüştür (25). Fakat bizim çalışmamızda ST5, kontrol grubunda tespit edildi. ST5 tespit ettiğimiz kişi kırsal kesimde yaşayan ve bu sebeple hayvanlarla sıkı temas halinde olan biriydi. Bu da tespit ettiğimiz ST5'in hayvansal kaynaklı bir bulaş olma ihtimalini güçlendirmektedir. Dünyada yapılan çalışmalarda ST5'in hayvan kaynaklı bir subtip olduğu ve kötü hijyenin bulaşta çok önemli rol oynadığını göstermektedir (180, 183).

Bu çalışmada ülkemizde ilk defa ST5 koyunlarda tespit edildi. Dünyada yapılan çalışmalarda ST5 sığırlarda ve domuzlarda tespit edilmiştir (180, 183). Alfellani ve ark. hazırladığı ve *Blastocystis* sp.'nin çiftlik hayvanları ve hayvanat bahçesinde yaşayan hayvanlar arasındaki dağılımını araştırdığı bir çalışmada ST5'in genel olarak çift tırnaklı hayvanlarda bulunabileceği ifade edilmiştir (25). Bu yönüyle ST5'in koyunlarda bulunması mümkündür. Fakat bu verinin, moleküler dizi analizleri ve bu alanda yapılacak daha fazla örneğin kullanıldığı farklı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

ST6, bir tane GİS şikayeti olan hasta grubunda, üç tane de kanatlı grubunda olmak üzere toplam 4 tane tespit edildi. Ülkemizde ST6, Dağcı ve ark. tarafından semptomatik hastalarda, Adıyaman ve ark. tarafından GİS şikayeti olan hastalarda ve Koltaş ve ark. tarafından semptomatik hastalarda tespit edilmiştir (137, 139, 179). Rene ve ark. dışkıda kist atımı olan hastalar üzerinde yaptığı bir araştırmada ST6 kabızlık şikayeti olan bir hastada tespit edilmiştir (184). Bu çalışmalar bizim çalışmamızla uyum göstermektedir. Bütün bu çalışmalar beraber değerlendirildiğinde ST6'nın özellikle GİS şikayeti olan hasta grubunda görüldüğü ve patojenlik potansiyeli olduğu anlaşılmaktadır.

Kanatlılarda yaygın olarak görülen ST6'nın ülkemizde kanatlılar arasındaki yaygınlığını araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. 2008 yılında Tan tarafından hazırlanan ve *Blastocystis* sp. türlerinin dağılımının araştırıldığı bir derlemede, ST6'nın özellikle kanatlılarda görüldüğü ve insanlara bulaştan da kanatlı grubunun sorumlu olduğu ifade edilmiştir (27). Tarafımızca yapılan bu çalışmada ST6, *Blastocystis* sp. pozitif kanatlılar arasında %33,3 gibi yüksek bir oranda tespit edilmiştir. Bu da ST6'nın insanlara bulaşında kanatlıların potansiyel bir kaynak olduğunu göstermektedir.

ST7, kanatlı grubunda 6 tane tespit edilmiş fakat insan gruplarında tespit edilememiştir. Ülkemizde Adıyaman ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada GİS şikayeti olan hastalarda ve Koltaş ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kırsal kesimde yaşayan semptomatik hasta grubunda tespit edilmiştir (139, 179). Buna karşın dünyada yapılan çalışmalarda bizim çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilmiştir. Tan ve ark. yayınladıkları bir derlemede, ST7'nin tavuklarda görüldüğü ve konak dağılımının çok kısıtlı olduğu belirtilmiş ve bu subtipin proteaz aktivitesi gösterdiği ve ciddi virülans faktörleri içerdiği ifade edilmiştir (181). Hisao ve ark. yaptığı, *Blastocystis* sp.'nin insanlar ve hayvanlar arasındaki dağılımını araştıran bir çalışmada, ST7'yi, sekiz tane tavukta, sekiz tane de domuzda tespit etmişler insanda ise tespit etmediklerini bildirmişlerdir (180). Bizim çalışmamızda ST7, *Blastocystis* sp. pozitif kanatlı grubunda %66,6 gibi yüksek bir oranda tespit edilmiştir. Bu çalışmalar ile bizim çalışmamız beraber değerlendirildiğinde, ST7 insanlarda nadir karşılaşılan bir subtipdir. Pozitif tespit edilen hastalar genelde kırsal kesimde yaşayan ve hayvanlar ile sıkı temas halinde olan bireylerden oluşmaktadır.

Çalışmamızda *B. hominis* genel primerleriyle pozitiflik belirlenmesine rağmen 12 insanda 15 tane de hayvanlarda olmak üzere toplam 27 örnekte hiçbir subtip tespit edilemedi. Nonsubtip 12 kişiden 6 tanesinin ürtikerli hasta grubunda, 4 tanesinin GİS şikayetleri ile gelen hastalarda ve 2 tanesinin de kontrol grubunda olduğu belirlendi. Kemoterapi tedavisi gören gruptaki bütün hastalar ise en az bir subtip ile enfekteydi. Ülkemizde Ertuğ ve ark. yaptıkları ve insanda görülen 7 subtipin araştırıldığı bir çalışmada nonsubtiplerin oranı %27,9 bulunmuştur (185). Lee ve ark. yaptığı bir çalışmada nonsubtip oranını %12,7 olarak tespit etmiştir (141). Tan ve ark. immün suprese hastalar üzerinde yaptığı bir çalışmada 2 tane nonsubtip tespit etmiş ve bu

durumun sebebinin yanlış izolasyon işlemi veya bilinmeyen subtiplerin olabileceğini ifade etmiştir (186). Bu çalışmada günümüzde insanları enfekte ettiği bilinen 9 subtip çalışıldı ve insan grubunda %17,4 gibi yüksek bir oranda subtip tespit edilemedi. Subtip tespit edilemeyen örnekler GİS şikayeti olan hastalarda ve ürtikerli hasta grubunda daha fazla rastlandı. Bu durum bizlere, *B. hominis*'in insanlarda enfeksiyon yapan farklı subtiplerinin olabileceğini ve ileride yapılacak çalışmalarda insanda enfeksiyon yapan subtiplerin sayısının artacağı konusunda fikir vermektedir. Ayrıca bizim çalışmamızda ürtikerli hasta grubunda nonsubtip oranı %50 gibi çok yüksek bir oranda görülmüştür, fakat yapılan araştırmalar içinde belli hasta gruplarında nonsubtip oranını araştıran bir çalışma olmadığı için karşılaştırma yapılamadı.

Hayvan örneklerinde nonsubtip dağılımı şu şekilde gözlemlendi. *Blastocystis* sp. genel primerleri pozitif bulunan, 17 sığır ve koyundan 15 tanesinde hiçbir subtip tespit edilmedi. Bu alanda yapılan çalışmaların çoğunluğunda ST1, ST3 ve ST5'in çift tırnaklılarda sık görülen subtipler olduğu gösterilmiştir (171, 187-189). Bizim elde ettiğimiz bulgular bu çalışmalarla uyumlu değildir. Bu alanda yapılan farklı çalışmalarda ise, çift tırnaklılarda en fazla ST10 ve ST14 bulunduğu belirtilmiştir (190, 191). Bu çalışmalara göre değerlendirdiğimizde, bizim çalışmamızda *B. hominis*'in 9 subtipi araştırıldığı için nonsubtip olan hayvanlarda ST10 ve ST14 gibi bizim çalışmadığımız subtiplerin olma ihtimali vardır. Cian ve ark. 2016 yılında yayınlanan ve dünya genelinde çift tırnaklılardan elde edilen subtiplerin insanda görülen subtiplerle ilişkisini araştırdığı bir çalışmada, çift tırnaklılarda en çok ST10, ST14 ve ST1 görüldüğünü belirtmiş ve ST10 ve ST14'ün insanlarda görülmediğini, ST1'in ise hayvanlardan insanlara bulaşımı gösteren çalışmaların çok kısıtlı olduğunu ifade etmiştir (190). Cian ve ark. yaptığı bu çalışma ve bizim elde ettiğimiz veriler beraber değerlendirildiğinde, büyükbaş, küçükbaş çift tırnaklı hayvanlar *B. hominis*'in insana bulaşında çok etkili gözükmemektedir. Özellikle büyükbaş çift tırnaklılarda hiçbir insan subtipi tespit edilememesi bu iddiayı destekler niteliktedir.

Çalışmamızda *B. hominis* Kemoterapi tedavisi alan hasta grubunda %22,2 oranında görülmektedir. Kemoterapi tedavisi alan hasta grubu kromotograf test ile *E.histolytica*, *G. lamblia* ve *C. parvum* yönünden de tarandı ve bu hasta grubunda taranan parazitler içinde sadece *B. hominis* tespit edildi. Tan ve ark. immün suprese hasta grubunda yapmış oldukları bir çalışmada *B. hominis*'in immün suprese

hastalarda potansiyel bir risk olduğunu belirtmiş ve özellikle patojenlikle ilişkilendirilen subtiplerin varlığında ve hasta şikayetlerinin devam ettiği durumlarda *B. hominis* için tedavi başlanabileceğini belirtmiştir (186). Yersal ve ark. tarafından kanser hastaları ile *B. hominis* ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada, özellikle kemoterapi ve antibiyotik tedavisi gören hasta grubunda *B. hominis*'in baskın tür olarak görüldüğünü ve bu duruma hastanın gördüğü tedavi sonucu bağırsak florasının değişmesinin sebep olabileceğini belirtmiştir (192). Bu çalışmalar ve bizim yaptığımız çalışma beraber değerlendirildiğinde, normal şartlarda apatojen olan etkenlerin de immün sistemi baskılanmış bireylerde ciddi hastalıklara sebep olabileceği ve bu yönüyle *B. hominis*'in potansiyel bir tehlike olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda *B. hominis*, GİS şikâyeti olan hasta grubunda %17,5 ve ürtikerli hasta grubunda %22,5 oranında görülmüştür. Bu hasta grubunda *B. hominis* görülme sıklığını araştıran çalışmalarda *B. hominis*'in GİS şikâyeti olan ve ürtikerli hastalarda daha fazla görüldüğü bildirilmektedir (27, 149). Ülkemizde farklı bölgelerde yapılan ve *B. hominis*'in yaygınlığını araştıran çalışmalarda, toplumda *B. hominis* görülme oranı %10 ile %34 arasında değişmektedir (124, 126, 127, 131). Bizim çalışmamızda bulduğumuz oranlar ile ülkemizde yapılan ve *B. hominis*'in toplumdaki yaygınlığı araştıran çalışmalardaki oranlar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda direk bakıda pozitif çıkan örneklerin tamamı, kültür yöntemi, PCR genel primerleri ile de pozitif olarak tespit edildiği için bu testlerin özgüllük ve duyarlılıkları noktasında bir karşılaştırma yapılmamış, sadece laboratuvar koşullarında uygulanabilirlikleri ve birbirine üstünlükleri değerlendirilmiştir.

Direk bakıda *Blastocystis* sp. pozitifliği noktasında kesin karar verilemeyen 12 hayvan dışkı örneğinin kültür yönteminde ürediği gözlemlendi. Bu durumda bizlere, şüpheli örneklerde kültür yönteminin doğrulama amaçlı kullanılabileceğini gösterdi.

Kültür yöntemiyle pozitif bulunan örnekler PCR yöntemiyle *Blastocystis hominis* genel primerleri ile çalışıldı ve bütün örnekler pozitif olarak tespit edildi. Bu çalışmada, pahalı olması ve hassas birçok basamak içermesi PCR yönteminin dezavantajlı yönleri olarak değerlendirildi. Bu dezavantajları ile beraber, *Blastocystis* sp. tanısında altın standart olarak değerlendirilen kültür yöntemine ciddi bir alternatif olduğu belirlendi. Ayrıca *B. hominis*'in patojenitesiyle ilişkilendirilen subtipleri belirlemesi ve kültür yöntemine kıyasla daha kısa sürede sonuç vermesi PCR yönteminin avantajları olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada günümüzde insanlarda enfeksiyon yaptığı belirlenen 9 subtip çalışıldı. Bu subtipler içinde ST3, bütün örneklerin %43,8'inde ve insan örneklerinin %60,9'unda en baskın subtip olarak tespit edildi. Bütün örneklerde ST3'ten sonra sırasıyla ST1 %12,5, ST2 %12,5, ST7%6,3, ST6 %4,2 ve ST5 %3,1 oranında tespit edildi.

Çalışmada hasta grubuyla kontrol grubu karşılaştırıldığında, hasta grubunda ST1 ve ST2'nin anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. ST3'ün ise gruplar arası dağılımında anlamlı bir fark tespit edilemedi.

Hayvan örneklerinde, koyunlarda iki tane ST5 tespit edildi. *B. hominis* genel primerleri pozitif bulunan sığırlarda ise hiçbir subtip tespit edilemedi. Kanatlı grubunda ise üç tane ST6 ve altı tane ST7 tespit edildi. Bu veriler doğrultusunda, ST6 ve ST7'nin insanlara bulaşında kanatlıların, ST5 bulaşında ise koyunların bir kaynak olabileceği değerlendirildi. Sığırların ise, insan bulaşında ciddi bir kaynak olmadığı gözlemlendi.

Bu çalışmada insanda enfeksiyon yaptığı tespit edilen 9 subtip çalışılmasına rağmen *Blastocystis hominis* genel primerleri pozitif örneklerden %17,3'ünde hiçbir subtip tespit edilemedi. Farklı çalışmalarda nonsubtiplerin sebebi olarak, dışkıdan DNA izolasyon işleminde yaşanabilecek problemler gösterilmektedir. Bizim çalışmamızda bütün örnekler *B. hominis* genel primerleri yönünden pozitif tespit edildiği için izolasyon işleminde bir problem olmadığını düşünüyoruz. Çalışılan örneklerde %17,3 gibi yüksek oranda subtip tespit edilememesinin sebebinin, günümüzde insanda enfeksiyon yapan fakat tespit edilememiş subtipler olabileceği değerlendirildi.

Öneri:

Bu çalışmamızda belli subtiplerin hasta grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi. Bu subtiplerin hastalıklarla olan ilişkisinin ve virülans faktörlerinin hayvan deneyleri ile araştırılması gerekmektedir.

B. hominis'in insanlara bulaşında hayvanların etkisi, hayvan besicilerinden ve hayvanlardan toplanan örneklerin moleküler dizi analizleri ile karşılaştırılmalı olarak ortaya konulması gerekmektedir.

Nonsubtip örnekler dizi analiz yöntemleri ile günümüzde tespit edilememiş farklı bir subtip olup olmadığı yönünden değerlendirilmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Uysal EK, Uçak NÖ. Tıp Akademisyenlerinin Kanıtı Dayalı Bilgi Gereksinimleri ve Bilgi Arama Davranışları. *Bilgi Dünyası*. 2013;14 (1):37-61.
2. Zierdt CH. Studies of *Blastocystis hominis*. *The Journal of protozoology*. 1973;20 (1):114-21.
3. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, et al. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2002;49 (1):42-53.
4. Navarro C, Domínguez-Márquez M, Garijo-Toledo M, Vega-García S, Fernández-Barredo S, Pérez-Gracia M, et al. High prevalence of *Blastocystis* sp. in pigs reared under intensive growing systems: frequency of ribotypes and associated risk factors. *Veterinary parasitology*. 2008;153 (3):347-58.
5. AL Doğruman, Hökelek M. *Blastocystis hominis* Fırsatçı Bir Patojen mi? *Türkiye Parazit Derg*. 2007;31:28-36.
6. Perroncito E. Di un nuovo protozoa dell uomo e di talune specie animali. *G. Acad Med Torino*. 1899;5:36-8.
7. Ucke A. Trichomonaden und Megastomen im Menschendarm. *Centralbl. f. Bakt und Parasitenk I Abt*. 1907;45:231.
8. Bohne A, Prowazek Sv. Zur frage der Flagellatendysenterie. *Arch Protistenkd*. 1908;12:1-8.
9. Alexeieff A. Sur la nature des formations dites kystes de *Trichomonas intestinalis*. *CR Soc Biol*. 1911;71:296-8.
10. Brumpt E. *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. *Bull Soc Pathol Exot*. 1912;5:725-30.
11. Zierdt C, Rude W, Bull B. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *American Journal of Clinical Pathology*. 1967;48 (5):495-501.
12. Zierdt CH, Williams RL. *Blastocystis hominis*: axenic cultivation. *Experimental parasitology*. 1974;36 (2):233-43.
13. Zierdt CH, Tan HK. Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 1976;50 (3):277-83.
14. Zierdt CH, Tan H. Endosymbiosis in *Blastocystis hominis*. *Experimental parasitology*. 1976;39 (3):422-30.
15. Zierdt CH, Swan JC. Generation time and growth rate of the human intestinal parasite *Blastocystis hominis*. *The Journal of protozoology*. 1981;28 (4):483-5.
16. Levine N, Corliss J, Cox F, Deroux G, Grain J, Honigberg B, et al. A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of protozoology*. 1980;27 (1):37-58.
17. Hoever J, Snowden K. Analysis of the ITS region and partial ssu and lsu rRNA genes of *Blastocystis* and *Proteromonas lacertae*. *Parasitology*. 2005;131 (02):187-96.
18. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature*. 1996;380 (6573):398-.

19. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*--past and future. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991;4 (1):61-79.
20. Zierdt C, Donnelly C, Muller J, Constantopoulos G. Biochemical and ultrastructural study of *Blastocystis hominis*. *Journal of clinical microbiology*. 1988;26 (5):965-70.
21. Cavalier-Smith T. Sagenista and Bigyra, two phyla of heterotrophic heterokont chromists. *Archiv für Protistenkunde*. 1997;148 (3):253-67.
22. Derelle R, López-García P, Timpano H, Moreira D. A phylogenomic framework to study the diversity and evolution of stramenopiles (= heterokonts). *Mol Biol Evol*. 2016:msw168.
23. Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*. 1998;73 (3):203-66.
24. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, et al. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of Stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2002;49 (1):42-53.
25. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, et al. Genetic Diversity of *Blastocystis* in Livestock and Zoo Animals. *Protist*. 2013;164 (4):497-509.
26. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RA, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus. *Trends in parasitology*. 2007;23 (3):93-6.
27. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21 (4):639-65.
28. Zaman V, Howe J, Ng M. Observations on the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*. 1997;83 (7):731-3.
29. Zaman V, Howe J, Ng M, Goh T. Scanning electron microscopy of the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitology research*. 1999;85 (12):974-6.
30. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21 (4):639-65.
31. Dunn L, Boreham P, Stenzel D. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *International journal for parasitology*. 1989;19 (1):43-56.
32. YOSHIKAWA H, KUWAYAMA N, ENOSE Y. Histochemical detection of carbohydrates of *Blastocystis hominis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1995;42 (1):70-4.
33. Yoshikawa H, Satoh J, Enose Y. Light and electron microscopic localization of lipids in *Blastocystis hominis*. *J Electron Microsc*. 1995;44 (2):100-3.
34. Stenzel D, Dunn L, Boreham P. Endocytosis in cultures of *Blastocystis hominis*. *International journal for parasitology*. 1989;19 (7):787-91.
35. Suresh K, Howe J, Ng G, Ho L, Ramachandran N, Loh A, et al. A multiple fission-like mode of asexual reproduction in *Blastocystis hominis*. *Parasitology research*. 1994;80 (6):523-7.
36. Moe K, Singh M, Howe J, Ho L, Tan S, Chen X, et al. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitology research*. 1999;85 (2):103-8.

37. Tan S, Singh M, Ho L, Howe J, Moe K, Chen X, et al. Survival of *Blastocystis hominis* clones after exposure to a cytotoxic monoclonal antibody. *International journal for parasitology*. 1997;27 (8):947-54.
38. Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorum K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, et al. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PloS one*. 2010;5 (11):e15484.
39. Boreham PF, Stenzel DJ. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Advances in Parasitology*. 1993;32:1-70.
40. Singh M, Suresh K, Ho L, Ng G, Yap E. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitology research*. 1995;81 (5):446-50.
41. Tan KSW, Stenzel DJ. Multiple reproductive processes in *Blastocystis*: proceed with caution. *Trends in Parasitology*. 2003;19 (7):290-1.
42. Windsor JJ, Stenzel DJ, Macfarlane L. Multiple reproductive processes in *Blastocystis hominis*. *Trends in Parasitology*. 2003;19 (7):289-90.
43. Rajamanikam A, Govind SK. Amoebic forms of *Blastocystis* spp. - evidence for a pathogenic role. *Parasite Vector*. 2013;6.
44. Dunn LA, Boreham PFL, Stenzel DJ. Ultrastructural Variation of *Blastocystis-Hominis* Stocks in Culture. *International Journal for Parasitology*. 1989;19 (1):43-56.
45. Tan KS, Howe J, Yap E, Singh M. Do *Blastocystis hominis* colony forms undergo programmed cell death? *Parasitology research*. 2001;87 (5):362-7.
46. Tan T, Suresh K. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitology research*. 2006;98 (3):189-93.
47. Katsarou-Katsari A, Vassalos CM, Tzanetou K, Spanakos G, Papadopoulou C, Vakalis N. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Derm-Venereol*. 2008;88 (1):80-1.
48. Tan TC, Suresh KG. Amoeboid form of *Blastocystis hominis* - a detailed ultrastructural insight. *Parasitology Research*. 2006;99 (6):737-42.
49. Tan TC, Suresh KG. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitology Research*. 2006;98 (3):189-93.
50. Stenzel DJ, Boreham PFL. A Cyst-Like Stage of *Blastocystis-Hominis*. *International Journal for Parasitology*. 1991;21 (5):613-5.
51. Stenzel DJ, Cassidy MF, Boreham PFL. Morphology of *Blastocystis* Sp Isolated from Circus Animals. *International Journal for Parasitology*. 1993;23 (5):685-7.
52. Stenzel DJ, Lee MG, Boreham PFL. Morphological differences in *Blastocystis* cysts - An indication of different species? *Parasitology Research*. 1997;83 (5):452-7.
53. Chen XQ, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Yap EH. In vitro encystation and excystation of *Blastocystis ratti*. *Parasitology*. 1999;118:151-60.
54. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Ng GC, et al. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitology Research*. 1996;82 (5):439-44.
55. Zaman V, Howe J, Ng M. Ultrastructure of *Blastocystis-Hominis* Cysts. *Parasitology Research*. 1995;81 (6):465-9.
56. Zaman V, Howe J, Ng M. Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*. 1997;83 (3):306-8.

57. Cheng HS, Guo YL, Shin JW. Hematological effects of *Blastocystis hominis* infection in male foreign workers in Taiwan. *Parasitology Research*. 2003;90 (1):48-51.
58. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitology Research*. 1999;85 (2):103-8.
59. Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S, Kimata I. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitology Research*. 2004;94 (6):391-6.
60. Stenzel D, Boreham P. *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996;9 (4):563-84.
61. Stenzel DJ, Boreham PFL, Mcdougall R. Ultrastructure of *Blastocystis-Hominis* in Human Stool Samples. *International Journal for Parasitology*. 1991;21 (7):807-12.
62. İNCEBOZ T, USLUCA ŞENLEN S. *Blastocystis hominis* bağırsak hastalığı için potansiyel bir tehlike olabilir mi? 2009.
63. Lanuza MD, Carbajal JA, Borrás R. Identification of surface coat carbohydrates in *Blastocystis hominis* by lectin probes. *International Journal for Parasitology*. 1996;26 (5):527-32.
64. Lanuza M, Carbajal J, Villar J, Mir A, Borrás R. Soluble-protein and antigenic heterogeneity in axenic *Blastocystis hominis* isolates: pathogenic implications. *Parasitology research*. 1999;85 (2):93-7.
65. Yoshikawa H, Kuwayama N, Enose Y. Histochemical Detection of Carbohydrates of *Blastocystis-Hominis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1995;42 (1):70-4.
66. Palmer JD. Organelle Genomes--Going, Going, Gone. *Science*. 1997;275 (5301):790-.
67. Parija SC, Jeremiah S. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology*. 2013;3 (1):17-25.
68. Yoshikawa H, Satoh J, Enose Y. Light and Electron-Microscopic Localization of Lipids in *Blastocystis-Hominis*. *J Electron Microscop*. 1995;44 (2):100-3.
69. Yoshikawa H, Oishi K. Ultrastructural localization of basic proteins of *Blastocystis hominis*. *Protoplasma*. 1997;200 (1-2):31-4.
70. Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH. Elucidation of the Life-Cycle of the Intestinal Protozoan *Blastocystis-Hominis*. *Parasitology Research*. 1995;81 (5):446-50.
71. Tan KSW. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitology*. 2004;126 (1-2):121-44.
72. Nagel R, Gray C, Bielefeldt-Ohmann H, Traub RJ. Features of *Blastocystis* spp. in xenic culture revealed by deconvolutional microscopy. *Parasitology Research*. 2015;114 (9):3237-45.
73. Zaman V, Zaki M, Manzoor M, Howe J, Ng M. Postcystic development of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*. 1999;85 (6):437-40.
74. Lee LI, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK. *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasite Vector*. 2012;5 (1):1.
75. Moe K, Singh M, Howe J, Ho L, Tan S, Chen X, et al. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology research*. 1997;83 (4):319-25.
76. Fayer R, Elsasser T, Gould R, Solano G, Urban Jr J, Santin M. *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitology research*. 2014;113 (4):1465-72.

77. Zhang X, Zhang SW, Qiao JY, Wu XM, Zhao LM, Liu YS, et al. Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*. 2012;110 (3):1165-72.
78. Zhang X, Qiao J, Zhou X, Yao F, Wei Z. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and in vitro. *Parasitology research*. 2007;101 (1):43-51.
79. Singh M, Ho L, Yap A, Ng G, Tan S, Moe K, et al. Axenic culture of reptilian *Blastocystis* isolates in monophasic medium and speciation by karyotypic typing. *Parasitology research*. 1996;82 (2):165-9.
80. Stenzel D, Lee M, Boreham P. Morphological differences in *Blastocystis* cysts—an indication of different species? *Parasitology research*. 1997;83 (5):452-7.
81. Stenzel D, Cassidy M, Boreham P. Morphology of *Blastocystis* sp. from domestic birds. *Parasitology research*. 1994;80 (2):131-7.
82. Yoshikawa H, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals. *J Parasitol*. 2003;89 (3):585-94.
83. Snowden K, Logan K, Blozinski C, Hoevers J, Holman P. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis* isolates from animal hosts. *Parasitology research*. 2000;86 (1):62-6.
84. Kaneda Y, Horiki N, Cheng X-j, Fujita Y, Maruyama M, Tachibana H. Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;65 (4):393-6.
85. Clark CG. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Mol Biochem Parasit*. 1997;87 (1):79-83.
86. Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from birds by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology research*. 2003;89 (5):393-6.
87. Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Veterinary parasitology*. 2004;120 (3):235-42.
88. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology*. 2003;126 (01):1-9.
89. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IKM, Hossain MB, et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology research*. 2004;92 (1):22-9.
90. Lanuza MD, Carbajal J, Villar J, Borrás R. Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. *Parasitology research*. 1996;83 (1):60-3.
91. Yoshikawa H, Iwamasa A. Human *Blastocystis* subtyping with subtype-specific primers developed from unique sequences of the SSU rRNA gene. *Parasitol Int*. 2016.
92. Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol*. 2006;92 (5):1081-7.
93. Yoshikawa H, Koyama Y, Tsuchiya E, Takami K. *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol Int*. 2016.
94. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ESU, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Tropica*. 2013;126 (1):11-8.

95. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology*. 2010;169 (1-2):8-17.
96. Alfellani MA, Jacob AS, Perea NO, Krecek RC, Taner-Mulla D, Verweij JJ, et al. Diversity and distribution of *Blastocystis* sp subtypes in non-human primates. *Parasitology*. 2013;140 (8):966-71.
97. Leder K, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Wolfe R. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *J Gastroen Hepatol*. 2005;20 (9):1390-4.
98. Scanlan PD. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends in parasitology*. 2012;28 (8):327-34.
99. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares CP, Delbac F, El Alaoui H. New Insights into *Blastocystis* spp.: A Potential Link with Irritable Bowel Syndrome. *Plos Pathog*. 2012;8 (3).
100. Mirza H, Wu Z, Teo JD, Tan KS. Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cell Microbiol*. 2012;14 (9):1474-84.
101. Fayer R, Elsasser T, Gould R, Solano G, Urban J, Santin M. *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitology Research*. 2014;113 (4):1465-72.
102. Wang WQ, Bielefeldt-Ohmann H, Traub RJ, Cuttell L, Owen H. Location and Pathogenic Potential of *Blastocystis* in the Porcine Intestine. *Plos One*. 2014;9 (8).
103. Mirza H, Wu ZN, Teo JDW, Tan KSW. Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cell Microbiol*. 2012;14 (9):1474-84.
104. Puthia MK, Sio SWS, Lu J, Tan KSW. *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infect Immun*. 2006;74 (7):4114-23.
105. Puthia MK, Lu J, Tan KSW. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappa B-dependent manner. *Eukaryot Cell*. 2008;7 (3):435-43.
106. Mirza H, Wu ZN, Kidwai F, Tan KSW. A Metronidazole-Resistant Isolate of *Blastocystis* spp. Is Susceptible to Nitric Oxide and Downregulates Intestinal Epithelial Inducible Nitric Oxide Synthase by a Novel Parasite Survival Mechanism. *Infect Immun*. 2011;79 (12):5019-26.
107. Ajjampur SS, Tan KS. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp.—Interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitol Int*. 2016.
108. Nourrisson C, Wawrzyniak I, Cian A, Livrelli V, Viscogliosi E, Delbac F, et al. On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology*. 2016;143 (13):1713.
109. Tan SW, Ho LC, Moe KT, Chen XQ, Ng GC, Yap EH, et al. Production and characterization of murine monoclonal antibodies to *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology*. 1996;26 (4):375-81.

110. Wu BH, Yin J, Texier C, Roussel M, Tan KSW. *Blastocystis* Legumain Is Localized on the Cell Surface, and Specific Inhibition of Its Activity Implicates a Pro-survival Role for the Enzyme. *J Biol Chem*. 2010;285 (3):1790-8.
111. Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KSW. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitology Research*. 2005;97 (5):386-9.
112. Mirza H, Tan KSW. *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitology Research*. 2009;104 (2):355-61.
113. Lim MX, Png CW, Tay CYB, Teo JDW, Jiao H, Lehming N, et al. Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. *Infect Immun*. 2014;82 (11):4789-801.
114. Long HY, Handschack A, König W, Ambrosch A. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitology Research*. 2001;87 (12):1029-30.
115. Teo JDW, MacAry PA, Tan KSW. Pleiotropic Effects of *Blastocystis* spp. Subtypes 4 and 7 on Ligand-Specific Toll-Like Receptor Signaling and NF-kappa B Activation in a Human Monocyte Cell Line. *Plos One*. 2014;9 (2).
116. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, Cian A, et al. *Blastocystis* Is Associated with Decrease of Fecal Microbiota Protective Bacteria: Comparative Analysis between Patients with Irritable Bowel Syndrome and Control Subjects. *Plos One*. 2014;9 (11).
117. Bennet S, Ohman L, Simrén M. Gut microbiota as potential orchestrators of irritable bowel syndrome. *Gut Liver*. 2015;9 (3):318-31.
118. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105 (43):16731-6.
119. Zhang H, Li W, Yan Q, He L, Su Y. [Impact of *Blastocystis hominis* infection on ultrastructure of intestinal mucosa in mice]. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*. 2006;24 (3):187-91.
120. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology Research*. 1997;83 (4):319-25.
121. Abou ENI, Negm A. Morphology, histochemistry and infectivity of *Blastocystis hominis* cyst. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 2001;31 (2):627-35.
122. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitology Research*. 2008;102 (5):853-60.
123. Santos HJ, Rivera WL. Kinetic analysis of antibody responses to *Blastocystis hominis* in sera and intestinal secretions of orally infected mice. *Parasitology Research*. 2009;105 (5):1303-10.
124. Gülmez D, Sarıbaş Z, Akyön Y, Ergüven S. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı 2003-2012 Yılları Sonuçları: 10 Yıllık Değerlendirme. *Türkiye Parazitol Derg*. 2013;37:97-101.

125. Köksal F, Başlantı I, Samastı M. A retrospective evaluation of the prevalence of intestinal parasites in Istanbul, Turkey. *Türkiye Parazitol Derg.* 2010;34 (3):166-71.
126. Hamamcı B, Çetinkaya Ü, Delice S, Erçal BD, Gücüyetmez S, Yazar S. Kayseri-Hacılar'da ilköğretim okulu öğrencilerinde bağırsak parazitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg.* 2011;35:96-9.
127. Şahin İ, Yazar S, Yaman O, Gözkeç N. Kayseri-Karpuzsekisi Havzasında yaşayanlarda bağırsak parazitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg.* 2006;30:178-80.
128. Doğan N, Demirüstü C, Aybey A. Eskişehir Osmangazi Üniversitesinin beş yıllık bağırsak paraziti prevalansının türlere ve cinsiyetlere göre dağılımı. *Türkiye Parazitol Derg.* 2008;32 (2):120-5.
129. Cengiz ZT, Çiçek M, Akbayram S, Yılmaz H. Van'da Süphan İlköğretim okulu öğrencilerinde saptanan bağırsak parazitleri. *Türkiye Parazitol Derg.* 2009;33:294-7.
130. Değirmenci A, Sevil N, Güneş K, Yolasığmaz A, Turgay N. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji laboratuvarında 2005 yılı boyunca saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitol Derg.* 2007;31 (2):133-5.
131. Yaman O, Yazar S, Özcan H, Çetinkaya Ü, Gözkeç N, Ateş S, et al. 2005-2008 Yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *T Parazitol Derg.* 2008;3:266-70.
132. Yaman O, Hamamcı B, Çetinkaya Ü, Kaya M, Ateş S, Gözkeç N, et al. Yabancı uyruklu lise öğrencilerinde intestinal parazitlerin araştırılması. *Ulusal Parazitoloji Kongresi Adana.* 2010:1-7.
133. Dogruman-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. *Parasitology Research.* 2009;106 (1):263-8.
134. Dogruman-Al F, Dacı H, Yoshikawa H, Kurt O, Demirel M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research.* 2008;103 (3):685-9.
135. Dogruman-Al 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 I Oswaldo Cruz.* 2009;104 (5):724-7.
136. Ozyurt M, Kurt O, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int.* 2008;57 (3):300-6.
137. Dacı H, Kurt O, Demirel M, Mandiracioglu A, Aydemir S, Saz U, et al. Epidemiological and Diagnostic Features of *Blastocystis* Infection in Symptomatic Patients in Izmir Province, Turkey. *Iran J Parasitol.* 2014;9 (4):519-29.
138. 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 (3):133-6.
139. Koltas IS, Eroglu F. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates using SSU rRNA-DNA sequencing in rural and urban population in southern Turkey. *Experimental Parasitology.* 2016;170:247-51.
140. Ragavan ND, Govind SK, Chye TT, Mahadeva S. Phenotypic variation in *Blastocystis* sp ST3. *Parasite Vector.* 2014;7.

141. Lee IL, Tan TC, Tan PC, Nanthiney DR, Biraj MK, Surendra KM, et al. Predominance of *Blastocystis* sp subtype 4 in rural communities, Nepal. *Parasitology Research*. 2012;110 (4):1553-62.
142. Yakoob J, Jafri W, Jafri N, Khan R, Islam M, Beg MA, et al. Irritable bowel syndrome: In search of an etiology: Role of *Blastocystis hominis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70 (4):383-5.
143. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, et al. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*. 2010;106 (5):1033-8.
144. Gupta R, Parsi K. Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis*. *Australas J Dermatol*. 2006;47 (2):117-9.
145. Karaman DH. Atopik Dermatitli Hastalarda Topikal% 1 Pimekrolimus Tedavisinin Skorad Endeks Skoru Ve Serum Eozinofil Katyonik Protein Üzerine Etkisi.
146. Balint A, Doczi I, Bereczki L, Gyulai R, Szucs M, Farkas K, et al. Do not forget the stool examination!-cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp infection. *Parasitology Research*. 2014;113 (4):1585-90.
147. Karabiber E, Ozdemir E, Karakaya G, Kalyoncu AF. The role of *Blastocystis hominis* in acute/chronic urticaria and pruritus. *Allergy*. 2015;70:593-4.
148. Lepczynska M, Chen WC, Dzika E. Mysterious chronic urticaria caused by *Blastocystis* spp.? *Int J Dermatol*. 2016;55 (3):259-66.
149. İceboz T, Usluca Şenlen S. *Blastocystis hominis* bağırsak hastalığı için potansiyel bir tehlike olabilir mi? *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi dergisi*. 2009;23 (1):37 - 45.
150. Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2004;23 (6):509-11.
151. 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.
152. Tan KSW, Singh M, Yap EH. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *International Journal for Parasitology*. 2002;32 (7):789-804.
153. Dogruman-Al 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. *Parasitology Research*. 2015;114 (2):495-500.
154. Mahmoud M, Saleh W. Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 2003;33 (1):13-30.
155. Tan KSW, Ibrahim M, Ng GC, Nasirudeen AMA, Ho LC, Yap EH, et al. Exposure of *Blastocystis* species to a cytotoxic monoclonal antibody. *Parasitology Research*. 2001;87 (7):534-8.
156. Turk S, Dogruman-Al F, Kustimur S. A New Approach to the Diagnosis of Species of *Blastocystis*: Direct Fluorescent Antibody Method. *Kafkas Univ Vet Fak*. 2012;18:A171-A4.
157. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Micr Infec Dis*. 2007;59 (3):303-7.

158. Stensvold CR, Traub RJ, von Samson-Himmelstjerna G, Jespersgaard C, Nielsen HV, Thompson RCA. *Blastocystis*: Subtyping isolates using pyrosequencing (TM) technology. *Experimental Parasitology*. 2007;116 (2):111-9.
159. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent Developments in *Blastocystis* Research. *Adv Parasit*. 2013;82:1-32.
160. Adıyaman-Korkmaz G, Yanıtra TN, Doğruman-AI F. *Blastocystis* Sp. DNA'sının Dışkıdan Eldesine İzolasyon Öncesi Uygulanan İki Farklı Ön İşlemin Etkisi. *Gazi Medical Journal*. 2015;26 (2).
161. Yoshikawa H, Dogruman-Ai F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitology Research*. 2011;109 (4):1045-50.
162. Cobb BD, Clarkson JM. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Research*. 1994;22 (18):3801-5.
163. Kheyrodin H. Introduction of Electrophoresis Process. 2015.
164. Stensvold CR, Ahmed UN, Andersen LO, Nielsen HV. Development and Evaluation of a Genus-Specific, Probe-Based, Internal-Process-Controlled Real-Time PCR Assay for Sensitive and Specific Detection of *Blastocystis* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50 (6):1847-51.
165. <https://www.cdc.gov/dpdx/Blastocystis/tx.html>.
166. Rossignol JF, Kabil SM, Said M, Samir H, Younis AM. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis hominis*. *Clin Gastroenterol H*. 2005;3 (10):987-91.
167. Stensvold CR, Smith HV, Nagel R, Olsen KEP, Traub RJ. Eradication of *Blastocystis* Carriage With Antimicrobials: Reality or Delusion? *J Clin Gastroenterol*. 2010;44 (2):85-90.
168. Ozcakil O, Güreşer S, Ergüven S, Yılmaz YA, Topaloğlu R, Haşçelik G. Characteristics of *Blastocystis hominis* infection in a Turkish university hospital. *Turkiye parazitoloji dergisi/Turkiye Parazitoloji Derneği= Acta parasitologica Turcica/Turkish Society for Parasitology*. 2006;31 (4):277-82.
169. Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, Thathaisong U, Nimmanon T, Taamasri P, et al. The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitology Research*. 2004;93 (6):445-7.
170. Dogruman-AI F, Simsek Z, Boorum K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, et al. Comparison of Methods for Detection of *Blastocystis* Infection in Routinely Submitted Stool Samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *Plos One*. 2010;5 (11).
171. Thathaisong U, Worapong J, Mungthin M, Tan-Ariya P, Viputtigul K, Sudatis A, et al. *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41 (3):967-75.
172. Elghareeb AS, Younis MS, El Fakahany AF, Nagaty IM, Nagib MM. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in diarrheic patients. *Tropical Parasitology*. 2015;5 (1):36.
173. Abe N, Nagoshi M, Takami K, Sawano Y, Yoshikawa H. A survey of *Blastocystis* sp in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Veterinary Parasitology*. 2002;106 (3):203-12.

174. Zhang X, Qiao JY, Wu XM, Da R, Zhao LM, Wei ZC. In vitro culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. *International Journal of Infectious Diseases*. 2012;16 (1):E23-E8.
175. 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):780-4.
176. Parkar U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, et al. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology*. 2007;134:359-67.
177. Stensvold CR. Comparison of Sequencing (Barcode Region) and Sequence-Tagged-Site PCR for *Blastocystis* Subtyping. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51 (1):190-4.
178. Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitology Research*. 2009;105 (6):1589-92.
179. Adiyaman G, Dogruman-Al F. Dışkı Örneklerinde *Blastocystis* spp. Varlığının Mikroskopik, Kültür ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2015;49 (1):85-97.
180. Yoshikawa H, Tokoro M, Nagamoto T, Arayama S, Asih PB, Rozi IE, et al. Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol Int*. 2016;65 (6):780-4.
181. Tan KS, Mirza H, Teo JD, Wu B, MacAry PA. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Current infectious disease reports*. 2010;12 (1):28-35.
182. Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzen A, Stopsack K, Heinrich-Grafe U, et al. *Blastocystis* sp subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitol Int*. 2010;59 (3):469-71.
183. Yan Y, Su SL, Ye JH, Lai XF, Lai RY, Liao H, et al. *Blastocystis* sp subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitology Research*. 2007;101 (6):1527-32.
184. Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV. Subtype Analysis of *Blastocystis* Isolates from *Blastocystis* Cyst Excreting Patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80 (4):588-92.
185. Ertug S, Malatyali E, Ertabaklar H, Caliskan SO, Bozdogan B. Subtype Distribution of *Blastocystis* Isolates and Evaluation of Clinical Symptoms Detected in Aydin Province, Turkey. *Mikrobiyol Bul*. 2015;49 (1):98-104.
186. Tan TC, Ong SC, Suresh KG. Genetic variability of *Blastocystis* sp isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitology Research*. 2009;105 (5):1283-6.
187. Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International Journal for Parasitology*. 2009;39 (4):473-9.
188. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43 (1):348-55.

189. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol.* 2014;22:223-8.
190. Fayer R, Santin M, Macarasin D. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitology Research.* 2012;111 (3):1349-55.
191. Cian A, El Safadi D, Osman M, Moriniere R, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, et al. Molecular Epidemiology of *Blastocystis* sp. in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk. *PloS one.* 2017;12 (1):e0169659.
192. Yersal O, Malatyali E, Ertabaklar H, Oktay E, Barutca S, Ertug S. *Blastocystis* subtypes in cancer patients: Analysis of possible risk factors and clinical characteristics. *Parasitol Int.* 2016;65 (6):792-6.

