

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

**BLASTOCYSTIS SPP.'NİN DIŞKI ÖRNEKLERİNDE PCR İLE
SAPTANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SELİN BÖLÜK SABUNCU

TEZ DANIŐMANI
DOÇ. DR. ALİ AHMET KİLİMCİOĞLU

MANİSA

2014

ÖNSÖZ

Bağırsak parazitlerine bağlı enfeksiyonlar tüm dünyada sağlık problemlerine ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bunlar arasında yer alan *Blastocystis* spp. insanlarda en sık rastlanan ve patojenitesi halen tartışmalı olan parazitlerden biridir. *Blastocystis* spp. insanda gastrointestinal sisteme yerleşen; vakuolar, granüler, amoeboid, kist ve diğer formları bulunan bir protozoondur. Neden olduğu hastalık blastocystosis olarak adlandırılır ve karın ağrısı konstipasyon ve diyare en sık gözlenen semptomlardır.

Bu proje ile morfolojik çeşitliliği nedeniyle mikroskopik bakıda gözden kaçabilen *Blastocystis* spp.'nin PCR yöntemi kullanılarak saptanması amaçlanmıştır.

Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Koproloji Polikliniği'ne farklı polikliniklerden farklı şikayetler ile başvuran hastalara çalışma hakkında bilgi verilmiştir. Gönüllü olmayı kabul eden hastaların dışkı örneklerinin önce serum fizyolojik ve Lugol yöntemleriyle mikroskopik bakısı yapılmış, daha sonra yoğunlaştırma ve kalıcı boyama yöntemleri uygulanarak incelenmiştir. Doğrudan bakı, yoğunlaştırma ve boyama yöntemlerinin en az birinde *Blastocystis* spp. pozitif olan hastalar mikroskopik bakısı pozitif olarak kabul edilmiştir. Mikroskopik bakı ile projeye dahil edilen 60 hastanın hepsine PCR yöntemi uygulanmıştır.

Bu projenin son yıllarda birçok alanda kullanılmaya başlanan PCR yöntemini, parazit hastalıklarının tanısında da kullanılabileceğini göstermesi açısından önem taşıdığı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında bilgi, eleştiri ve yardımlarıyla beni yönlendiren, sabır ve desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım hocam Doç. Dr. Ali A. Kilimcioğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşan, desteklerini esirgemeyen Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı hocalarım; Prof. Dr. Nogay Girginkardeşler, Prof. Dr. Ahmet Özbilgin, Prof. Dr. Ülgen Zeki Ok, Prof. Dr. Kor Yereli ve Prof. Dr. Cüneyt Balcıoğlu'na,

Yüksek lisansa başlamamda beni destekleyerek yol gösteren hocalarım Prof. Dr. Tamer Şanlıdağ ve Doç. Dr. Talat Ecemiş'e,

Tezimin istatistiksel değerlendirme aşamasındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Beyhan Cengiz Özyurt'a,

Laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvar çalışanlarına,

Hayatımın her anında olduğu gibi, tez çalışmalarım boyunca bana sabır gösteren, huzur veren ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen annem, babam, kardeşlerim ve sevgili eşim Fırat Sabuncu'ya, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	III
ŞEKİL DİZİNİ.....	V
TABLolar DİZİNİ.....	VI
KISALTMA VE SEMBOLLER DİZİNİ.....	VII
ÖZET	IX
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Tarihçe	2
2.2 Sınıflandırma	3
2.3 Morfoloji	4
2.4 Formların Tanımlanması.....	5
2.4.1 Vakuoler Form	5
2.4.2 Granüler Form	6
2.4.3 Ameboid Form	6
2.4.4 Kist Formu	7
2.4.5 Diğer Formlar	8
2.5 Fonksiyonları Belirgin Olmayan Yapılar	9
2.5.1 Merkezi Vakuol	9
2.5.2 Mitokondriler.....	10
2.5.3 Hücre Çekirdeği.....	11
2.5.4 Yüzey Kılıfı.....	11
2.6 Hayat Döngüsü	12
2.7 Epidemiyoloji ve Prevalans.....	14
2.8 Klinik ve Patogenez	14
2.9 Tanı	16
2.9.1 Mikroskobi	16
2.9.2 Kültür	17

2.9.3	Seroloji.....	17
2.9.4	Moleküler Yöntemler.....	18
2.10	Tedavi	19
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1	Mikroskopik Tanı Yöntemleri.....	20
3.1.1	Doğrudan Bakı	20
3.2	Yoğunlaştırma Yöntemleri.....	21
3.2.1	Formol-Etil Asetat Çöktürme Yöntemi	21
3.3	Kalıcı Boyama Yöntemleri.....	22
3.4	PCR Yöntemi	24
3.4.1	DNA İzolasyonu	24
3.4.2	PCR Yöntemi	25
3.4.3	Elektroforez.....	26
3.5	İstatistiksel Değerlendirme.....	27
4.	BULGULAR.....	28
5.	TARTIŞMA.....	33
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	36
7.	EKLER	37
7.1	EK-1.....	37
7.2	EK-2.....	40
7.3	EK-3.....	41
8.	KAYNAKLAR	42

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. <i>Blastocystis</i> spp. subtip 4, faz kontrast mikroskopisi	9
Şekil 2. <i>Blastocystis</i> spp. subtip 4 elektron mikrografi.	9
Şekil 3. <i>Blastocystis</i> spp.'nin hayat döngüsü	13
Resim 1: Vakuoler formda <i>Blastocystis</i> spp. (Trikrom boya).	24
Resim 2: 1-14 nolu örneklerden PCR-elektroforez sonucunda elde edilen bantların UV ışığındaki görüntüleri.	29
Resim 3: 15-24 nolu örneklerden PCR-elektroforez sonucunda elde edilen bantların UV ışığındaki görüntüleri.	30
Resim 4: 25-38 nolu örneklerden PCR-elektroforez sonucunda elde edilen bantların UV ışığındaki görüntüleri.	30
Resim 5: 39-52 nolu örneklerden PCR-elektroforez sonucunda elde edilen bantların UV ışığındaki görüntüleri.	31
Resim 6: 53-60 nolu örneklerden PCR-elektroforez sonucunda elde edilen bantların UV ışığındaki görüntüleri.	31

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: <i>Blastocystis</i> spp. 'nin mikroskopik bakı ve PCR sonuçlarının cinsiyete göre dağılımı.	28
Tablo 2: <i>Blastocystis</i> spp. 'nin mikroskopik bakı ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması.	29
Tablo 3: PCR sonuçlarının şikayetler ile birlikte değerlendirilmesi.	32

KISALTMA VE SEMBOLLER DİZİNİ

bp	Base pair (Baz çifti)
dH ₂ O	Deiyonize su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EF-1 α	Elongation factor-1 α
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g	Gram
I ₂	İyot kristalleri
KI	Potasyum İyodür
IFAT	İndirek Floresan Antikor Testi
mAb	Monoklonal antikor
MEM	Minimal essential medium
MgCl ₂	Magnesium klorür
ml	Mililitre
PCR	Polimeraz zincirleme tepkimesi
RFLP	Restriksiyon Fragment Length Polymorphism
RPM	Rotation (Revolutions) Per Minute

RT-PCR	Real-Time Polimeraz zincirleme tepkimesi
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poly-Akrilamid Jel Elektroforez
SF	Serum Fizyolojik
SEM	Tarayıcı elektron mikroskobu
SSU rRNA	Small-Subunit Ribozomal RNA
TAE	Tris-asetik asit-EDTA
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
UV	Ultraviyole
μ	Mikron
μ l	Mikrolitre

ÖZET

Proje adı : *Blastocystis* spp.'nin dışkı örneklerinde PCR ile saptanması.

Özet : *Blastocystis* spp. dünyada yaygın olarak görülen bir bağırsak protozoonudur. Yaygınlık sosyo-kültürel, sosyo-ekonomik ve coğrafik koşullara bağlı olarak değişmektedir. Patojenitesi hala tartışmalı olan bu parazit insanda gastrointestinal sisteme yerleşir. Her yaş insanda rastlanıldığı gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda daha sık görülmektedir. *Blastocystis* spp.'nin başlıca vakuoler, granüler, ameboid ve kist formları bulunmaktadır. *Blastocystis* spp.'nin tanısı en sık mikroskopik bakı ile konulsa da, mikroskopik bakının duyarlılığı ve özgüllüğü incelemeyi yapanın eğitim ve deneyimine bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle PCR'ye dayalı tanı yöntemleri parazitolojide de hızla daha yaygın hale gelmektedir.

Bu çalışmanın amacı morfolojik çeşitliliği ve boyutlarının son derece değişken olması nedeniyle mikroskopik bakıda gözden kaçabilen *Blastocystis* spp.'nin PCR yöntemi kullanılarak saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Koproloji Laboratuvarına çeşitli polikliniklerden farklı şikayetlerle başvuru yapan 60 hastanın dışkı örneği kullanılmıştır. Tüm dışkı örnekleri doğrudan bakı, yoğunlaştırma ve trikrom boyama yöntemleri kullanılarak incelenmiş ve bu yöntemlerin herhangi birinde *Blastocystis* spp.'nin herhangi bir formu saptanan örnekler mikroskopik bakısı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Mikroskopik bakısı pozitif olan 30 ve negatif olan 30 örnek olmak üzere çalışmamıza toplam 60 gönüllü hasta katılmıştır. Ayrıca çalışmamıza katılan tüm hastaların dışkı örnekleri PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS 15 programı kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin analizinde ki-kare testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Çalışmaya katılan hastaların 24'ü (%40) erkek, 36'sı (%60) kadın hastadır ve yaş ortalaması 35,6 olarak saptanmıştır. PCR ile yapılan çalışmalar sonucunda erkeklerin 16'sında (%66,7), kadınların 19'unda (%52,8) *Blastocystis* spp. pozitif saptanmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Mikroskopik bakı ile incelemede hastaların 30'u (%50) pozitif, 30'u (%50) negatif iken PCR ile değerlendirildiğinde 35'i (%58,3) pozitif, 25'i (%41,7) negatif olarak saptanmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde mikroskopik bakı ile PCR arasındaki fark anlamlı olarak tespit edilmiştir ($p=0,00$, $p<0,05$). Şikayetlerin değerlendirilmesinde PCR altın standart kabul edilmiş ve hastaların 27'si (%45) allerji, 15'i (%25) ishal, 13'ü (%21,7) karın ağrısı 4'ü (%6,7) bulantı, 1'i (%1,6) anemi şikayetleri bulunmaktadır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde *Blastocystis* spp. varlığı ile şikayetler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Mikroskopik bakıda *Blastocystis* spp.'nin her sahada görülme sıklığı ve sayısına bakarak rapor edilirken, PCR ile parazitin varlığı saptandığı için sayı ve sıklığı hakkında bize bilgi verememektedir. Bu yüzden semptomatik hastalarda tüm nedenler elimine edilmiş ise PCR ile *Blastocystis* spp. pozitif saptanan hastalara tedavi uygulanması önerilmiştir.

Sonuç olarak, dışkı örneklerinde mikroskopik bakıda gözden kaçabilen *Blastocystis* spp.'nin, PCR ile pozitif olarak saptanabildiği ve PCR'nin mikroskopik bakıdan daha güvenilir ve özgül sonuç verdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Blastocystis* spp., protozoon, mikroskopik bakı, PCR

ABSTRACT

Project Title : Determination of *Blastocystis* spp. in stool samples by PCR method.

Abstract : *Blastocystis* spp. is a common intestinal protozoan in the world. Its prevalence varies depending on the socio-cultural, socio-economic and geographic conditions. The parasite that is settled on the gastrointestinal system of human body still has a controversial pathogenesis. As seen in people of all ages, immune suppressed patients' systems are more frequently infected. Vacuolar, granular, ameboid and cyst forms are major types of *Blastocystis* spp.. Although the most common diagnosis of *Blastocystis* spp. is made by microscopic examination, the sensitivity and specificity of microscopic diagnosis varies depending on the examiner's training and experience. Therefore, PCR based diagnostic methods are becoming more common in parasitology. The aim of this study is to determine *Blastocystis* spp. using the PCR method which can be overlooked in the microscopic examination due to its morphological diversity and highly variable size.

In our study, stool samples of 60 patients who admitted with different complaints from various polyclinics to Celal Bayar University Hafsa Sultan Hospital Coprology Laboratory were used. All stool samples were investigated using direct examination, concentration and trichrome staining methods and in any of these methods microscopic examination of the samples that any forms of *Blastocystis* spp. detected were evaluated as positive. A total of 60 patients, 30 with positive and 30 with negative for microscopic examination were participated in the study voluntarily. In addition, stool samples of all patients in our study were evaluated by PCR method. SPSS 15 software was used in the statistical analysis. Categorical variables were analyzed by chi-square test. Results with $p < 0,05$ were considered statistically significant.

24 (40%) of the patients who participated in the study were male and 36 (60%) were female and the mean age was found to be 35.6. As a result of studies conducted by PCR, *Blastocystis* spp. were positive in 16 (66,7%) male and 9 (52,8%) female. There were no statistically significant differences in the results. As in patients with microscopic examination of 30 (50%) were positive and 30 (50%) were found to be negative, PCR analysis determined 35 (58,3%) positive and 25 (41,7%) negative. The difference between microscopic examination and the PCR results was statistically significant ($p=0,00$, $p<0,05$). When PCR has been considered to be gold standard for evaluation of complaints and patients' symptoms, 27 (45%) allergy, 15 (25%) diarrhea, 13 (21,7%) abdominal pain and 4 (6,7%), nausea, 1 (1,6%) anemia were detected. There was no statistically significant difference between presence of *Blastocystis* spp. and complaints.

Blastocystis spp. is reported based on its number in microscopic examination whereas PCR determines the existence of parasite. Therefore, PCR can't give us information about the number in microscopic field. If all causes have been eliminated in symptomatic patients, treatment should be applied to *Blastocystis* spp. positive patients.

As a result, the *Blastocystis* spp. which can be overlooked in some cases in the microscopic examination were determined to be positive in PCR. It is concluded that the PCR method is more reliable than microscopic examination and give more spesific results.

Keywords: *Blastocystis* spp., protozoon, microscopic examination, PCR

1. GİRİŞ

Bağırsak parazitlerine bağlı enfeksiyonlar tüm dünyada sağlık problemlerine ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bunlar arasında yer alan *Blastocystis* spp. insanlarda en sık rastlanan ve patojenitesi halen tartışmalı olan parazitlerden biridir. *Blastocystis* spp. insanda gastrointestinal sisteme yerleşen; başlıca vakuoler, granüler, ameboid ve kist formları bulunan bir protozondur. Yaygınlık oranı sosyo-kültürel, sosyo-ekonomik ve coğrafik koşullara bağlı olarak değişmektedir.

Blastocystis spp.'ye her yaştaki insanda rastlanıldığı gibi özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda daha sık görülmektedir. Parazitin neden olduğu hastalık "Blastocystosis" olarak adlandırılır ve karın ağrısı, konstipasyon ve diyare en sık gözlenen klinik belirtilerdir.

Polimeraz zincirleme tepkimesi (PZT/PCR), mikroskop veya kültür ile kesin tanısında güçlük yaşanan enfeksiyon etkenlerinin tanısında büyük bir ilerleme sağlamıştır. Bazı virüsler, çeşitli parazitler, yavaş üreyen veya üretilmeyen bakteriler bu grupta yer almaktadır. Sindirim sisteminde yer alan parazitlerin tanısında dışkı örneğinin en az üç farklı günde alınarak doğrudan bakı, konsantrasyon ve kalıcı boyalarla incelenmesi durumunda doğru tanı oranı ancak %90'lara çıkabilmektedir. Bununla birlikte dışkıyla atılan parazitleri kültür yöntemiyle saptamak genelde zaman alıcıdır ve pratik bir uygulama değildir. Birçoğunun tanısı mikroskopik inceleme ile konulsa da bazı organizmalar hastalık etkeni olmayan türler ile karıştırılabilmektedir. Mikroskopik incelemenin duyarlılığı ve özgüllüğü incelemeyi yapanın eğitim ve deneyimine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle PCR'ye dayalı tanı yöntemleri parazitolojide de hızla yaygın hale gelmektedir.

Bu proje ile morfolojik çeşitliliği nedeniyle mikroskopik bakıda gözden kaçabilen *Blastocystis* spp.'nin PCR yöntemi kullanılarak saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

Blastocystis, ilk defa 1911 yılında Alexeieff tarafından maya mantarı olarak tanımlanarak *Blastocystis enterocola* olarak isimlendirilmiştir. Brumpt, 1912 yılında farklı konaklarda *Blastocystis*'in farklı türlerinin olduğunu ve insanlardan izole edilen türe *Blastocystis hominis* (*B. hominis*) denilmesini önermiştir. Taze dışkıda görülen *Blastocystis* spp., nükleuslarının belirlenememesi, mantar görünümünde olması, ısıtılmadan psödopodların görülebilmesi, boyutlarındaki değişkenliğin herhangi bir protozoondan beklenenden çok daha geniş sınırlarda olması, tomurcuklanma ile üremesi nedeniyle önce mantar olarak düşünülmüştür. 1967 yılında Zierdt'in bu patojenin çeşitli formları olduğunu tanımlamasına kadar olan süreçte, oldukça az sayıda araştırma yayınlanmıştır. Bu dönemden sonra hem klinik hem de deneysel çalışmalar bildirilmeye başlamıştır. *Blastocystis* spp. Zierdt tarafından 1988'de protozoon olarak tanımlanmıştır (1, 2).

Blastocystis pek çok hayvan ve insanın enterik protozoon parazitidir. Tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. Parazit 1900'lü yılların başından itibaren bilinmesine rağmen sadece son on yıldır *Blastocystis* biyolojisini açıklayan gelişmeler olmuştur. Bununla birlikte parazitin pleomorfik yapısı ve standardize edilmiş tetkiklerin bulunmaması verilerde yanlış yorumlamalara neden olmaktadır.

Bu durum parazitin laboratuvar tanısında ve çoğalması, yaşam döngüsü, prevalans ve patogenezinin anlaşılmasında aksamalara neden olmaktadır. Artan epidemiyolojik, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar *Blastocystis*'in patojen olduğunu düşündürmektedir. Doğada birçok genotip mevcuttur ve insan çok sayıda zoonotik genotipin konağıdır. Bu genetik çeşitliliğin, patogenezele ilgili akıl karıştırıcı bilgilerden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (3).

2.2 Sınıflandırma

Blastocystis spp., Zierdt tarafından 1988'de protozoon olarak tanımlanmış ve Sarcodina subfilumunda sınıflandırılmıştır. *Blastocystis* spp. mantar ve bakteri besiyerinde üreyememesine karşın bağırsak protozoonları için hazırlanan besiyerlerinde üremektedir. Kültürde ürerken bakterilere gereksinim duyması, aksenik olarak güç üremesi, 33⁰C altında çoğalamaması, 30⁰C altında ölmesi, amfoterisine dirençli, protozoonlara etkili ilaçlara karşı duyarlı olması protozoonlara daha yakın olduğu izlenimi vermektedir. Ayrıca hücre çeperinin protozoonlarınkine benzemesi, endodiyogeni ile çoğalması, yavaş hareket eden psödopodlarının olması, önceden vakuol, bugün ise santral cisim olarak adlandırılan üreme organelinin varlığı nedeniyle protozoonlar içerisinde olması gerektiği ileri sürülmüştür (4, 5).

Bu bağlamda sınıflandırması tartışılan *Blastocystis* spp., yapılan moleküler çalışmalar sonucunda 1996 yılında Silberman ve ark.nın *Blastocystis* spp. SSUrRNA'sının sekanslanmasını gerçekleştirmeleri ile heterojen, tek ve çok hücreli protistaların (kahverengi algler, diatomlar, krizofitler, su küfleri gibi) yer aldığı Stramenopile grubunun içerisinde protozoon olarak tanımlanmıştır. Stramenopile grubunun üyeleri mastigonemli (kamçıya yatay olarak uzanan saç benzeri çıkıntı) bir kamçıya sahip olmalarıyla karakterizedir. Ancak, *Blastocystis* türlerinde kamçı olmaması ve hareketsiz olmaları nedeniyle yeni bir sınıf oluşturulmuştur. Bu yeni sınıfa Blastocystea adı verilmiş ve alt şube Opalinata, infra alem Heterokonta, alt alem Chromobiota, alem Chromista altında yer almıştır (6). Sarcocystis sınıfında, Blastocystea takımında Blastocystidae ailesinde *Blastocystis* cinsi ve *hominis* türü olarak tanımlanmaktadır (6). İmmunolojik yöntemler, SDS-PAGE ve rastgele problemlerle DNA hibridizasyon tekniği ile yapılan izoenzim çalışmalarıyla en az iki zimodemi olduğu saptanmıştır. İnsan dışındaki konaklarda farklı *Blastocystis* türlerinin olduğu gösterilmiştir (*B. galli*-tavuk, *B. anatis*-evcil ördek, *B. anseri*-kaz, *B. lapemi*-deniz yılanı gibi). *Blastocystis*'in tür tayininde farklı kültür ortamlarının kullanılabileceği belirtilmiştir (7).

Uzun zaman tek bir *Blastocystis* türünün insanları enfekte ettiği düşünülmüş ve insandan izole edilen tür *Blastocystis hominis* olarak adlandırılmıştır. Diğer türlerinde hayvanları enfekte ettiği bildirilirken hayvanlardan izole edilen türlere de farklı isimler verilmiştir. Noel ve ark.'nın 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada insanları enfekte eden tek bir *Blastocystis* türü olmadığı bildirilmiştir (8). 2006 yılında Puthia ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada genetik farklılıklara dayalı dokuz farklı türün insanları enfekte edebildiği bildirilmiştir (9). 2007

yılında Stensvold ve ark. *Blastocystis homoinis* terimi yerine insanlardan ve hayvanlardan izole edilen türler için “*Blastocystis* sp. subtype nn” şeklinde bir kullanım önermişlerdir. Bu adlandırmada “nn” genetik olarak tanımlanmış 9 türe ait numarayı bildirmektedir. Bu adlandırmanın organizmaya göre yapılan adlandırmadan daha doğru olduğu bildirilmiştir (10). Çin’de yeni bir 10. tür bildirilmiştir (11). 2009’da Stensvold ve ark.’nın yaptığı çalışmada primatlar da dahil diğer hayvanlardan izole edilen 10. türün farklı olduğunu saptamışlar ancak bu türün henüz insanlardan izole edilemediğini bildirmişlerdir (12).

Sınıflandırma için 16S rRNA bölgesinin SSUrRNA sekanslanması sonucunda *Blastocystis*’in insan ve domuzdan elde edilen suşları arasında %6,4 oranında farklılık saptandığı bildirilmiştir (13). Bu çalışmaya kadar ökaryotik organizmaların bu kadar yüksek derecede intraspesifik varyasyon gösterdiği saptanmamıştır. Karyotiplendirmedeki bu heterojeniteye rağmen izolatlar 3 karyotip grupta toplanmıştır. Biyokimyasal ve immünolojik çalışmalar sonucunda farklı zimodemleri olduğu belirlenen *Blastocystis*’in insanda enfeksiyon yapabileceği tespit edilmiştir. Bu farklılıkların patojenite için önem taşıyabileceği düşünülmektedir (7). Filogenetik analize yönelik yapılan araştırmalarda elongation factor-1 α (EF-1 α) geninin filogenetik analizi, intestinal mukozaya invaze olabilme ve eritrosit fagositozu yapabilme özelliği olan *Entamoeba histolytica* trofozoiti ile *Blastocystis* spp. arasında yakın ilişki olabileceğinin ileri sürülmesine neden olmuştur (14).

2.3 Morfoloji

Polimorfik bir protozoon olan *Blastocystis*’in literatürde, vakuoler, granüler, ameboid, kist ve daha az rastlanılan diğer bazı formları bildirilmiştir. Morfolojisindeki bu farklılıkların, organizmanın genel hücre biyolojisinde ve biyokimyasındaki farklılıkları yansıtmadığı henüz bilinmemektedir.

Blastocystis spp.’nin ışık mikroskopundaki morfolojileri, geniş merkezi bir gövde (merkezi vakuol, iç gövde veya rezerv gövde olarak da adlandırılmaktadır) ve bunu çevreleyen sitoplazmadan oluşan küresel hücrelerdir. Aynı zamanda organizmayı çevreleyen kalın yapışkan bir kılıf ve birden fazla çekirdeğin bulunduğu belirlenmiştir. Hücre çapı genellikle 5-20 μ arasında değişmekle birlikte bazı raporlarda daha küçük formların bulunduğu söz edilmektedir. Bu küçük form kalın bir duvar ile kaplı durumdadır ve bu formun organizmanın dirençli dönemi olduğu düşünülmektedir. Bu formda vakuol yoktur, fakat glikojen ve lipid varlığından söz edilmektedir (15)

Tarayıcı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan araştırmalarda, *Blastocystis* spp.'nin genellikle küresel veya oval bir Őekle sahip olduğu, aynı zamanda organizmanın içine doğru uzayan por ve boşlukların olduğu belirlenmiştir. Kültürden elde edilen organizmalarda ise iki tip dış yüzey fark edilmiştir. Birinci yüzey, kılıf veya kalıntıları Şeklinde çok przli bir yüzey, ikincisi ise sadece oluk ve porlara sahip düzgün bir yüzeydir. Hem przli hem de düzgün yüzeyli yapılara bakterilerin yapıştığı gözlenmiştir (15).

Konvansiyonel transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda organizmanın hem dış zarında hem de merkezi vakuol zarında porların mevcut olduğu bildirilmiştir (16). Ancak daha sonra zar formasyonları ve bileşenlerinin görüntülenmesi ile *Blastocystis* spp.'nin dış hücre zarında porların olduğu fakat merkezi vakuolde rastlanılmadığı belirtilmiştir (15).

2.4 Formların Tanımlanması

2.4.1 Vakuoler Form

Kültür ve dışkılarda en sık gözlenen formdur. Vakuoler forma aynı zamanda “santral vakuoler” form da denilmektedir. Yuvarlak, boyutu büyük farlılıklar gösterecek Şekilde 2-200 μm (ortalama 4-15 μm) arasında değişen, hücre hacminin %90'ını kaplayan büyük bir santral vakuol içeren yapılardır. Periodik asit schiff ile karbonhidrat, Sudan Black B boyası ile lipid varlığının gösterilmesi bu vakuolün depo görevini ortaya koymaktadır (3). Bu vakuolün aynı zamanda Şizogoni benzeri bir çoğalmaya da ortam sağladığı düşünülmektedir (17). Merkezi vakuollar iki katlı zar ile kaplı ve içerisinin morfolojisi açısından önemli farlılıklar göstermektedir. İçerikleri genellikle ince granüller Şeklinde olup dağılmaları düzensizdir (18). Vakuoller, çok sayıda granüler formun oluşumunu sağlamakta; bu nedenle gerçek vakuol olmadığı, ancak granüler forma geçiş esnasında granüllerin gelişmesini sağlayan bir organel olduğu kabul edilmiştir (15).

Organeller genellikle sitoplazmanın kalınlaşmış bölümlerinde toplanmaktadır ve bu bölümler hücrenin genellikle zıt kutuplarında yer almaktadır. Bu bölümlerde santral vakuol ya çıkıntı yapmakta ya da uzamaktadır ve bundan dolayı hücre düzensiz bir görünüm kazanmaktadır (2, 18). Sitoplazma ökaryotlarda tipik olarak izlenen organelleri içermektedir. TEM ile bir veya daha fazla nükleus, golgi cisimciği, endosom benzeri vakuoller, mikrotübüller ve mitokondri benzeri organeller izlenmektedir. Organizma sıklıkla farlı kalınlıkta olan yüzeysel bir kapsülle sarılıdır. Bu kapsül ilk izolasyonda kalın iken uzayan kültürlerde incelmektedir (18). Kapsülün; bakterileri tutmak, osmotik Őoka karşı

hücreyi korumak ve önemli plazma membran proteinlerini immün sistemden korumak için bir bariyer görevi yaptığı düşünülmektedir (3).

2.4.2 Granüler Form

Granüler form, merkezi vakuoler içerikleri dışında, ince yapıları açısından vakuolar forma benzerlik göstermektedirler ve genellikle biraz daha büyüktürler (15). Granüler form vakuoler formdan oluşmaktadır ve bu dönüşüm farklı faktörlerin etkisiyle olmaktadır (4). Granüler form vakuoler formdan farklı olmakla birlikte birçok benzerlikleri paylaşmaktadır, pek çok granüller, periferik sitoplazmada ince bant ve çoğunlukla santral vakuol içermektedir (5). Granüler formun merkezi vakuolünde miyelin benzeri cisimcikler, küçük veziküller, kristal granüller ve lipid damlacıkları bulunmaktadır (18). Lipid damlacıkları sitoplazmada da bulunmaktadır. Granüler hücrelerin sitoplazmasında yer alan küçük vakuoller ve veziküller de merkezi vakuoldeki granüllere benzer granüller içermektedir (15, 18).

Sitokimyasal çalışmalar, granüllerin büyük bir kısmının lipitlerden özellikle fosfolipid ve yağ asitlerden oluştuğunu göstermiştir (18). Bunlar enerji depolama şeklini temsil etmektedirler. Bazı hücrelerde ise protein olarak bilinen küçük granüller bulunmaktadır (15). Granüllerin farklı morfolojiye sahip olmaları farklı bileşenlere sahip olduklarını yansıtmaktadır.

Vakuoler formdan granüler forma dönüşmeyi sağlayan çeşitli koşullar vardır.

Bunlar:

I- Kültür ortamında artan serum konsantrasyonları,

II- MEM (Minimal essential medium) ortamına transferi,

III- Aksenisazyonda bazı antibiyotiklerin kullanılması, özellikle norfloksasin ve amfoterisin B'nin eklenmesi. Bunlar, vakuoler formun granüler forma dönüşümünün farklı koşullar altında gerçekleştiğini göstermektedir (15).

2.4.3 Ameboid Form

Blastocystis spp. 'nin ameboid formuna dışkı ve kültürler içerisinde çok az rastlanılmaktadır ve morfolojik tanımlamalarında birbiriyle uymayan raporlar vardır (2, 15, 18). Hücrenin yaklaşık 1/3'ünde merkezi bir cisim vardır ve etrafı bir hücre duvarı ile çevrili değildir. Ameboid formlar, küçük olmakla birlikte yaklaşık olarak 2,6-7,8 µm çapında, düzensiz ve psödopodlarının bulunmasıyla tanımlanmaktadır (18). Bu form psödopodlarının

olmasına rağmen hareketsizdir (3). Bu formun nükleer yapısı vakuol ve granüler formun aynısıdır ve yoğun bir kromatin şeridi mevcuttur (15). Dunn (18) 1989'da bu formun golgi kompleksi, yüzey kılıfı ve mitokondrileri olmadığını bildirmiştir. Yalnız TEM ile yapılan çalışmalarda, psödopod benzeri uzantıların sitoplazma içerisinde bir santral vakuolün, çok sayıda golgi cisimlerin, endoplazmik retikulumun ve mitokondrilerin olduğu gösterilmiştir (5). Buradaki hücreler yüksek aktivite içermekte ve oluşumları için enerjiye ihtiyaç duymaktadırlar. Aynı zamanda lizozom benzeri organeller içermektedir ve komşu hücreleri dejenere etmektedir. Bu formun, endositozide görev aldığı belirtilmektedir (5). Ameboid formlar vakuoler formlardan meydana gelmekte ve mitoz ile çoğaldığı belirtilmektedir (19).

Ameboid formlardaki farklılıklar veya hayat döngüsü içerisindeki rolleri konusunda bilgiler yetersizdir. Ameboid formların kist ve vakuoler formlar arasında bir yerde olduğu ve kistlenme için beslenmesini alan bakterilerin sağladığı belirtilmektedir (19).

2.4.4 Kist Formu

Vakuoler ve granüler formlar 1900'lü yıllardan beri tanımlanmış olmasına rağmen, kist formunun morfolojik farklılıkları ve hayat döngüsündeki rolleri son zamanlarda keşfedilmiştir (20-22). Bu gecikme kistin çok küçük (3-10 µm) ve dışındaki artefaktlarla kolayca karıştırılmasından kaynaklanmaktadır (5). Dışkıda ve aksenik kültürler içerisinde görülen kistler diğer protozoon kistlerindeki gibi kalın hücre duvarlı olup yoğun sitoplazmaya sahiptirler (20).

Kist formları dışkı örneklerinde daha sık rastlanmakta ve bu durumda organizmanın dış ortamda hayatta kalma şansı artmaktadır. Dışkıda görülen kistler, küresel, oval ve çok kenarlı bir kist duvarıyla korunmaktadır. Kistler, 3-10 µm arasında değişmektedir (20, 21). Hücre içinde bir veya dört nükleus, glikojen ve lipid deposu olarak çok sayıda vakuol bulunmaktadır (21-23). Bu kistler genellikle serbest fibriler bir tabaka ile sarılıdır ve dışarıya olgun kist olarak atılmaktadır (23).

Hayvan dışkı örneklerinden izole edilen *Blastocystis* kistleri, *Blastocystis* spp.'nin dışkıda bulunan kistleri ile karşılaştırıldığında morfolojik farklılıkların olduğu ortaya çıkarılmış ve hayvan kaynaklı kistlerin daha büyük (15 µm) olduğu belirlenmiştir (5).

Blastocystis spp.'nin kist formlarının su içerisinde parçalanmadıkları ve oda sıcaklığında 19 gün yaşayabildikleri belirtilmektedir (5, 24). Fakat aşırı sıcak ve soğuk koşullara ve dezenfektanlara karşı genellikle duyarlı oldukları bildirilmiştir (25).

Blastocystis spp.'nin kist formu, dış ortamda hayatta kalma mekanizmasını temin eden ve aynı zamanda kişiler arasında geçişi sağlayan bir formudur. Hem vakuoler hem de granüler formlar çevre koşullarına duyarlıdır ve sıcaklık değişiminde, hipertonik ve hipotonik ortamlarda veya açık havada kolayca ölmektedirler (2, 26).

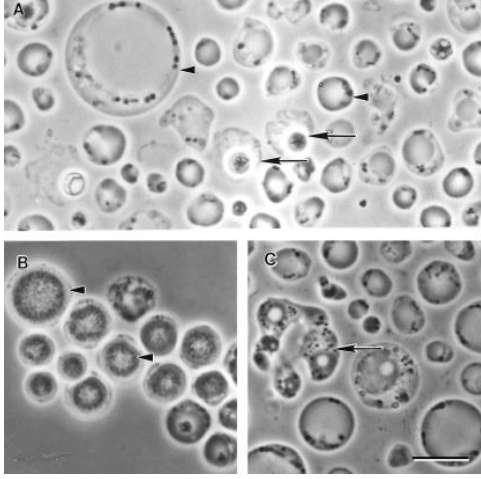
Blastocystis spp.'nin dışkıda görülen kistlerdeki morfolojik ayrılıkları *in vitro* ortamdaki formasyonlarıyla ayrılmakta ve kistler benzer granüler formlardan kalın osmofilik kist duvarının bulunmasıyla ayırt edilmektedir (27).

Blastocystis spp.'nin dışkıda görülen kistlerinin *in vitro* ortamlarda gelişmesi incelendiğinde; 1 saat içerisinde tipik kist formları görülebilmektedir. Bununla birlikte, kistler yavaş yavaş 6 saatte kist duvarlarını kaybetmekte ve ince yüzey tabakası yerine geçmektedir. Bu kist duvarları parçalandığında 5 µm iken 9 saat sonunda 7-9 µm'ye kadar gelişmektedir. Bu hücrelerin gelişmesi yanında kistlerden çok sayıda küçük vakuoler yapılar meydana gelmektedir. Granüler formlar vakuollerin içinde de görülmektedir. Santral vakuollerin birleşmesi ile sonuçta granüler formlar meydana gelmektedir. On iki saatte tipik vakuoler ve granüler formlar ortaya çıkmakta ve ikiye bölünerek çoğalmaktadır. Bölünmeden sonra parazit kist duvarı materyali ile etrafını çevirir ve 4 tane kız hücre bir araya gelerek bir kisti meydana getirmektedir (22).

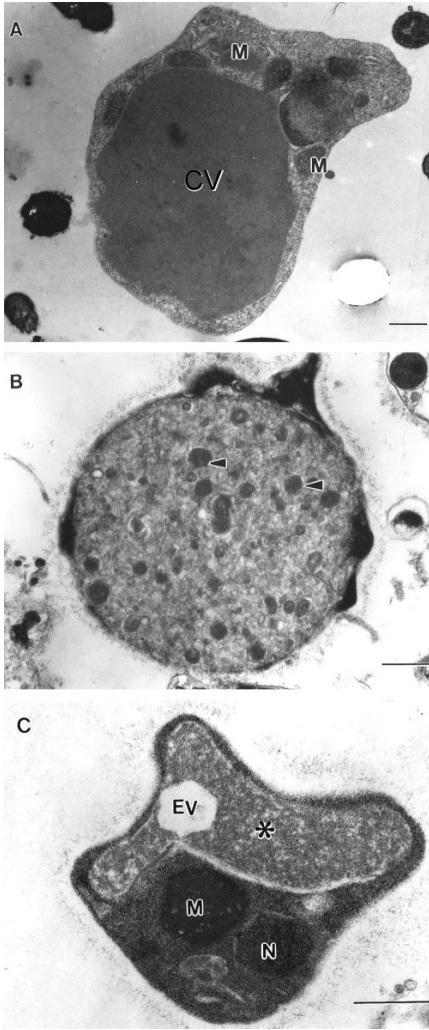
2.4.5 Diğer Formlar

Blastocystis spp.'nin dört formu (vakuoler, granüler, ameboid ve kist) bilinmektedir, fakat bunların dışında intestinal sistemden izole edilen farklı formların olduğu da belirtilmiştir (2, 21, 28). Bu formlardan biri santral vakuollerini olmayan avakuoler formlardır. Kültür formları içerisindeki farklılıkları hücrelerin çok küçük (5µm) ve yüzey tabakalarının olmayışdır. Mitokondrileri de yoktur ve bu da morfolojilerindeki diğer bir farklılıktır (28, 21). Kültürler içerisinde tanımlanamayabilir; çünkü hücrenin dejenere olmasıyla kalıntı halinde bulunan merkezi vakuol diğer hücre kalıntılarıyla karıştırılabilir.

Diğer bir form ise multivakuoler formdur ve dışkı materyalleri içerisinde tek olarak bulunmaz. Multivakuoler formların dışkı kistlerinin gelişmesinde rol aldığı belirtilmektedir. Çok az rastlanılan bu forma şizont formu da denilmektedir. Bu form vakuoler hücrelerden meydana gelmektedir (15). Ayrıca vakuoler formlar değişikliğe uğrayarak, santral vakuolün birleşmesiyle multivakuoler formlar meydana gelmektedir. *In vitro* kültürler içerisinde kaybolmakta ve sonradan vakuoler form olarak ortaya çıkmaktadır. Bu form, *Blastocystis* spp.'nin hayat döngüsü içerisinde kısa süreli bir dönem olarak bilinmektedir(15).



Şekil 1. *Blastocystis* spp. subtip 4, faz kontrast mikroskopisi.
 (A): *In vitro* aksenik kültürde farklı boyutlarda görülen vakuoler formlar ve okla gösterilen fekal kist formları
 (B): Granüler formlar, santral vakuolle birlikte belirgin granüler inklüzyonlar mevcut.
 (C): Kültürde psödopod benzeri sitoplazmik uzantılar gösteren ameboid formlar. Bar, 10 µm. (3)



Şekil 2. *Blastocystis* spp. Subtip 4 elektron mikrografi.
 (A): İnce periferik sitoplazmik bantla çevrili büyük santral vakuol (CV) içeren vakuoler form.
 (B): Tüm santral vakuolü kaplayan granüllerle kaplı granüler form.
 (C): Santral vakuol ve boş vakuol içeren (EV) irregüler (düzensiz) şekilli ameboid form.
 M: Mitokondri benzeri organel. N: Nükleus.
 Bar, 1 µm. (3).

2.5 Fonksiyonları Belirgin Olmayan Yapılar

2.5.1 Merkezi Vakuol

Blastocystis'in merkezi vakuolü 1911 yılında Alexeieff tarafından açıklanmıştır (15). Bu yapıyı zarla kuşatılmış, kimyasal ve fonksiyonel olarak belirlenmiş içeriklere sahip merkezi

vakuol olarak tanımlamışlardır. Bazı yazarlar tarafından merkezi vakuolün metabolizma ve üremede bir rol oynadığı düşünülmüştür, fakat nükleik asit içerikleri gözlenememiştir (15).

Blastocystis spp.'nin merkezi vakuolünün depolamada herhangi bir rolü olmadığı ifade edilse de yapılan çalışmalarda bazı koşullar altında bazı materyallerin vakuolde birikip depolandığını gösterilmiştir (29, 30). Vakuoler formun vakuolünde karbonhidrat ve lipidler bulunmaktadır (31). Lipidler genellikle granüler formda ve eski hücrelerde yer almaktadır. Bunun sonucunda merkezi vakuolün bazı metabolik ürünleri depolamada fonksiyonu olduğunu ortaya koymaktadır (15).

Vakuoler ve granüler formlarda endositoz olayı gerçekleşmektedir (29). Endositoz için elektron opak işaretleyici olan katyon ferritin, dış çevreden materyal alınımını takip etmek için kullanılmış ve bu izleyici ferritin sitoplazma içerisindeki vakuollerde ve küçük veziküllerde gözlendiği ve sonunda merkezi vakuolde depolandığı tespit edilmiştir. Bu sitoplazmik yapıların içerdikleri materyalleri serbest bırakmak için merkezi vakuolde yapıştığı farz edilmiştir ve benzeri bir mekanizmanın merkezi vakuolde granüllerin birikiminde de rol oynadığı ileri sürülmüştür. Bunların doğruluğu tam olarak belirlenmemiştir; çünkü zardaki birleşmenin hızlı ve dinamik bir yapıya sahip olmasından dolayı tek başına elektron mikroskobunda gözlenememiştir (15).

Endositozis esnasında, materyalin dışarıdan içeriye doğru yüzey girintileri vasıtasıyla geçmesi bazı protistlerdeki ve diğer ökaryotik hücrelerininkine de benzemektedir. Antikorlar, *Blastocystis* spp.'nin yüzey girintilerine bağlanmaktadır ve bu durumdaki kompozisyonlarının memeli hücrelerininkine benzer veya aynı olduğu bildirilmiştir (29).

2.5.2 Mitokondriler

Blastocystis spp. bir anaerob organizmadır (4) ve yaşamında mitokondri organelleri de mevcuttur (5). Genellikle profil olarak yuvarlak veya uzamış görünmelerine rağmen, mitokondriler bazı hücrelerde daha uzun, sinüzoidal ve nadiren de düzensiz bir profil olarak görülebilirler. Yaklaşık olarak 0,5-1 µm çapındadır ve küresel sitoplazmanın kenarında bulunmaktadırlar, ayrıca hücre çekirdeğinin yakınında bir yerde konsantre olma eğilimi de vardır(4, 5).

Blastocystis spp.'nin mitokondrileri için TEM ile yapılan çalışmalar, mitokondrinin iki katlı bir zar ile çevrili olduğu ve ayrıca içinde kristanın geliştiği iki katlı bir iç zarın varlığı belirlenmiştir (32). Ribozomlar ve granüllü endoplazmik retikulum, mitokondri ile yakın temas halindedirler (15). Bazı mitokondriler de kristalite ve osmofilik yapılar vardır (15, 26)

ve bu yapılar protein depolamasını, kristalize olmuş enzimleri ve bozulma aşamalarını temsil edebilirler. Hücre başına mitokondri sayısının henüz tam olarak belirlenmemesine rağmen, genç bir hücrede 2-4 adet ile büyük ve yaşlı hücrelerde yüzlerce mitokondri bulunabilmektedir (32).

Biyokimyasal analizler, enerji metabolizması ile ilgili olan birkaç tipik mitokondri enziminin *Blastocystis* spp.'de yer almadığını göstermiştir (32). Sitokrom oksidaz, katalaz, peroksidaz, pürivat dehidrogenaz kompleksi, ketoglutarat dehidrogenaz kompleksi, isositrat dehidrogenaz, glutamat dehidrogenaz ve sitokrom oksidaz enzimleri *Blastocystis* spp.'de bulunmamaktadır (32). Bu enzimler, çoğu diğer organizmalarda yer alan ve mitokondrinin var olduğunu gösteren enzimler olarak düşünülmektedir. Daha ileri çalışmalarla kesin sonuçlar verilebileceği bildirilmektedir (15).

2.5.3 Hücre Çekirdeği

Blastocystis spp.'nin hücre çekirdeğinin yapısı, diğer organellerin yapısından daha az tartışmalıdır. Hem ışık hem de elektron mikroskobunda hücre çekirdeğinin genellikle bir kutbunda yoğun kromatin şeridinin yer aldığı görülebilmektedir. Bu yapı organizmanın tüm formlarında bulunmaktadır ve hücre bölünmesi ile herhangi bir ilişkisi yoktur (15). Nadiren hücre çekirdeği içerisinde ilave bir yoğun materyal noktası (spot) görülmektedir (33). Bu spot'a *Blastocystis* spp.'nin *in vivo* formunda daha çok rastlanılmaktadır ve bunun çekirdek olduğu belirtilmiştir (34). Hücre çekirdeği şekilce küresel ve oval, yaklaşık 1 µm çapındadır, nükleer porlara sahip zar ile çevrelenmiştir ve en dışta nükleer bir kılıfı vardır. Perinükleer boşluk şişkin olabilir, bu uygun olmayan sıcaklıklar veya ortam gibi stres koşulları altında görülmektedir. Perinükleer boşluklar birkaç hücre çekirdeğinde daha sık rastlanılmakta ve bu nükleer bölünmenin o ortam içerisinde yer aldığını göstermektedir (34).

Hücre çekirdeği içerisinde DNA'nın varlığı spesifik boyaların kullanımı ile gösterilmiştir. RNA ise hücre çekirdeğinin etrafına yoğunlaşmaktadır (15).

2.5.4 Yüzey Kılıfı

İnsan dışkısından alınan tüm *Blastocystis* spp.'lere bakıldığında, yaklaşık olarak 0.25-0.5 µm genişliğinde ince bir fibriler tabaka şeklinde bir yüzey kılıfı bulunmaktadır. Bu kılıf genellikle vakuoler ve granüler formlarda görülmektedir. Kist formunun dış yüzeyini çevreleyen yapılarla benzerdir (15, 23). Bununla beraber ameboid formda yüzey kılıfının olup olmadığı tartışmalıdır (5).

Yüzey kılıfı, kalınlık ve yoğunlukça isolatlar arasında farklılık göstermektedir. Kültür içerisinde yer alan hücrelerin sadece küçük bir kısmında yüzey kılıfı yoktur. Hatta kolonoskopi ile elde edilen hücrelerde ve ishallerden alınan örneklerdeki hücrelerin birçoğunda yüzey kılıfı olmadığı belirtilmektedir (15). *In vivo* ortamda yüzey kılıfının rolü bilinmemekte fakat *in vitro* ortamda da yüzey kılıfının kaybolması, bu rolün kültürde organizmanın yaşamasını destekleyici bir faktör olmadığını göstermektedir.

Bakteriler genellikle yüzey kılıfı ile yakın temas halindedirler. SEM ile yapılan çalışmalarda bakterilerin *Blastocystis* spp.'nin yüzeyine tutundukları gözlenmiştir (23). Bir çalışmada ise yüzeye yapışan bakterilerin elektron dansitelerini kaybettikleri görülmüş, bununla beslenme amaçlı tuzak mekanizması olabileceği düşünülmüştür (23). Yüzey kılıfı mekanik ve kimyasal bariyer fonksiyonları ile konak immün cevabına karşı bir koruma sağlamaktadır, bu diğer protozoonlardaki yüzey kılıflarının sahip olduğu fonksiyona benzemektedir (15). *Blastocystis* spp.'nin yüzey kılıfına bağlanan monoklonal antikoların (mAb) büyümeyi inhibe edemedikleri fakat plazma membran proteinine spesifik antikoların bağlanması ile hücreyi öldürdüğü gösterilmiştir (35).

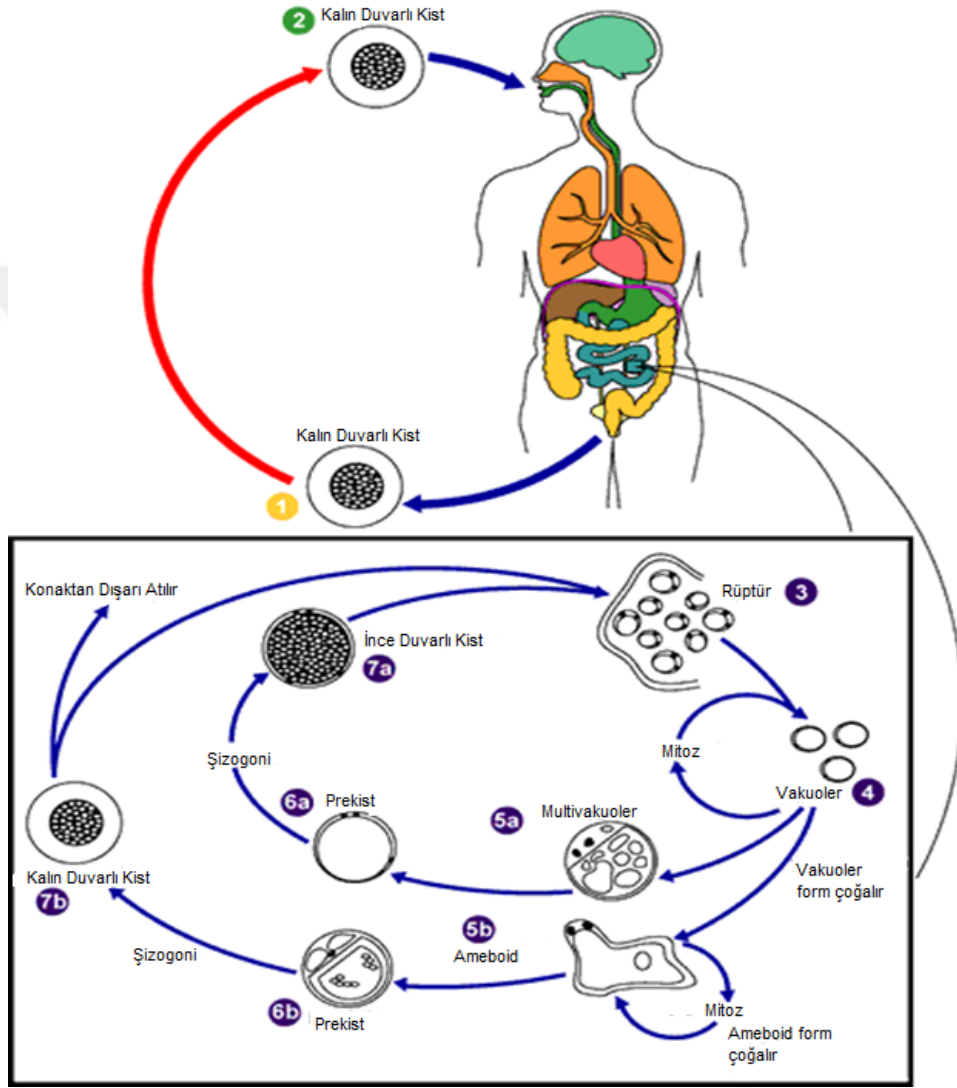
2.6 Hayat Döngüsü

Blastocystis için açıklanmış birbiriyle çelişkili yaşam sikluslarının olma nedeni bu parazitin farklı çoğalma yollarının olmasıdır. Şizogoni, tomurcuklanma, endodiyogeni ile çoğalma hipotezlerinin organizmanın pleomorfik yapısından kaynaklandığı ve bu parazitin gerçek çoğalma yolları olmadığı düşünülmektedir (3).

Blastocystis spp.'nin evriminde ameboid, vakuoler, multivakuoler, kalın ve ince duvarlı kist dönemlerinin bulunduğu kabul edilmektedir (19). Burada vakuoler form mitotik bölünme ile çoğalarak ya ameboid ya da multivakuoler forma dönüşmektedir. Ameboid form mitozla çoğalarak prekistler meydana gelmektedir. Multivakuoler formlardan da prekistler oluşmaktadır. Multivakuoler formlardan meydana gelen prekistler şizogoni ile ince duvarlı kistleri oluşturmaktadır. Bu ince duvarlı kistlerin otoenfeksiyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir (31, 19). Ameboid formdan oluşan prekistler ise şizogonik çoğalma ile kalın duvarlı kistleri meydana getirmektedir. Bu kalın duvarlı kistler konaktan dışarı dışkıyla atılırlar. Dışkıyla atılan kistler su ve besinleri kontamine etmektedir. Singh ve ark. kalın duvarlı kistlerin dış bulaştan ve ince duvarlı kistlerin otoenfeksiyondan sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (19).

Blastocystis spp.'nin kültür ortamları içerisinde bulunan yaşam döngülerin de ise kist formları nadiren görülmektedir. Bunun yerine vakuoler formun kisti oluşturacak şekilde gelişmekte olduğu belirtilmektedir (15).

Canlı hücre görüntüleme teknolojileri uygulandığı takdirde bu organizmanın çoğalması daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir (3).



Şekil 3. *Blastocystis* spp.'nin hayat döngüsü (36) (Türkçeye çevrilmiştir).

(1) Dışkıda bulunan kalın duvarlı kistler, (2) kontamine su ve besinlerle alınarak fekal-oral bulaştan sorumlu olan dönemdir. (3-4) Sindirim kanalının epitel hücrelerini enfekte eder ve aseksüel olarak çoğalır. Vakuolar formdan (5a) multivakuolar ve (5b) ameboid formlar meydana gelir. Multivakuolar formdan prekistler(6a) oluşmakta ve bunlardan da şizogoni ile ince duvarlı kistler (7a) meydana gelir. Ameoid formdan oluşan prekistler(6b) ise şizogoni ile kalın duvarlı kistleri(7b) meydana getirirler.

2.7 Epidemiyoloji ve Prevalans

Blastocystis spp. tüm dünyada yaygın olarak bulunan ve epidemiyolojik çalışmaların bir çoğunda en sık rastlanılan parazittir (3). Prevalansı ülkeden ülkeye veya aynı ülke içinde farklı topluluklar arasında değişebilmektedir. Genel olarak gelişmekte olan ülkelere göre daha sık görülmektedir ve bunun düşük hijyen, hayvanlarla temas ve kontamine su ve yiyeceklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Prevalans Japonya'da %1 iken (37), Brezilya'da %40,9 (38), Mısır'da %33,3 (39) olarak bildirilmiştir. Ülkemizde bu oran % 0,48-44,4 arasında değişmektedir (40-44).

PCR yöntemi eklenerek yapılmış epidemiyolojik çalışmalar insan ve hayvanlarda görülen subtiplerin dağılımını belirlerken aynı zamanda bulaş yolları ve kaynaklarla ilgili bilgi sağlamıştır. Beş ülke verilerini içeren bir çalışmada en sık subtip 3 görülürken, bunu subtip 1 ve 6 izlemiştir (3). Ülkemizde yapılan bir çalışmada da subtip 3 (%75,9) en sık bulunan subtip olmuştur (45). Bu çalışmalar subtip 3'ün insan kaynaklı olduğunu ve coğrafik orjinle subtip arasında herhangi bir ilişki olmadığını göstermektedir (3).

Bazı çalışmaların aksine (47, 48), 2003 ve 2008 yılları arasında yapılan çalışmaların çoğu *Blastocystis*'in patojen olduğunu desteklemektedir (46-51). Tan (2008) bazı popülasyonların *Blastocystis* spp. enfeksiyonlarına daha duyarlı olabileceğini ve risk faktörlerinin; immün yetmezlik, düşük hijyen, tropik bölgelere yolculuk, hayvanlarla temas veya kontamine su ve yiyecekler olduğunu ileri sürmektedir (3).

Blastocystis spp. ile ilgili en önemli sorulardan biri hastalıkla genotip arasında ilişki olup olmadığıdır. Bazı çalışmalar genotip ve hastalık arasında bir ilişki olmadığını bildirmektedir (52, 53). Bir çalışmada kolonoskopi ile inflamasyon bulguları bulunan hastalarda subtip 1, 2 ve 4 bulunurken insanlarda en sık bulunan genotip 3'ün semptomlarla ilişkili olmadığı görülmüştür (54). Bir diğer çalışmada subtip 1'in en patojen tür olduğu ileri sürülürken (55), ülkemizde yapılan bir çalışmada subtip 2'nin semptomatik hastalarda yüksek olduğu bulunmuştur (56).

2.8 Klinik ve Patogenez

Henüz insan ve diğer canlılarda *Blastocystis*'in neden olduğu hastalık tablosu tam olarak tanımlanamamıştır. Gastrointestinal hastalıklarda ancak diğer enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz nedenlerin eliminasyonu yapıldıktan sonra etken olarak sorumlu tutulabileceği belirtilmiştir. Fakat tümüyle diğer etkenlerin araştırılıp belirlenmesinin zor olması nedeniyle bu yaklaşım üzerinde tartışmalar devam etmektedir. Bazı araştırmacılar *Blastocystis* spp.'nin patojen

olmadığını, semptomatik olgularda saptanmasının bu paraziti sorumlu kılmaya yetmediğini, oluşan semptomların eşlik eden patojenlerle ya da nonenfeksiyöz nedenlerle ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Antiprotozoon tedavi uygulandıktan sonra semptomların gerilemesi olası bir ajan veya etken olduğunu gösterebilmektedir. Özellikle kullanılan 5-nitroimidazollerin, Gram negatif ve Gram pozitif birçok mikroorganizmaya da etkili olduklarından, diğer etkenlerden kaynaklanan semptomları da ortadan kaldırmalarının olası olduğu belirtilmektedir (57).

Günümüzde *Blastocystis* spp. ile yapılan araştırmaların büyük bir bölümünde parazitin patojenitesi tartışılmaktadır. Bazı yazarlar bulunan klinik belirtilerden *Blastocystis* spp.'nin sorumlu olmadığını savunurken (58-60), çok sayıda araştırmacı da etkenin en azından potansiyel bir patojen olduğunu düşünmektedir (2, 15, 59, 61-64).

Blastocystis spp.'nin yalnızca ameboid formunun saptandığı nadir olgularda şiddetli ishal görülebildiği, immün sistemi baskılanmış kişilerde, özellikle AIDS hastalarında *Blastocystis* spp.'nin uzun süren ve tekrarlayan ishallerde yol açabildiği bildirilmektedir (5, 15, 65-69). Aynı zamanda *Blastocystis* spp. turist diyaresi etkenleri arasında da gösterilmektedir (66).

Blastocystis enfeksiyonlarıyla ilgili; ishal, karın ağrısı, huzursuzluk, şişkinlik, gaz, anoreksi, kramp, kusma, dehidratasyon, uykusuzluk, bulantı, iştahsızlık, kilo kaybı, yorgunluk, kaşıntı ve tenezmus gibi semptomlar görülmektedir (5, 15, 61, 70). Aynı zamanda en sık karşılaşılan semptomların, karın ağrısı, gaz ve ishal olduğu belirtilmekte ancak ishalin ve diğer semptomların görülmediği olgular da söz konusudur. Hastalarda ateş, döküntü, baş ağrısı, baş dönmesi gibi çeşitli spesifik ve non-spesifik rahatsızlıklar görülebilir.

Hastalar, semptomatik taşıyıcılar, asemptomatik taşıyıcılar, akut enfeksiyonlular (iki haftadan az), kronik enfeksiyonlular (semptomların iki haftadan daha uzun sürdüğü olgular), persistan Blastocystosisliler olarak sınıflandırılabilir (59, 70).

Blastocystis spp. enfeksiyonunda iki sendrom belirtilmiştir. Birincisi irritabil bağırsak rahatsızlığı, diğeri non-inflamatuvar bağırsak rahatsızlıklarıdır (5). İlk çalışmalarda irritabil bağırsak sendromlarında önemli olan *Blastocystis* spp. antijenlerine karşı oluşan IgG₂ antikör seviyelerinin yükseldiği, konak immün yanıtı da her şeyden önce karbonhidrat antijenlerine karşı direkt etki olduğu belirtilmektedir. Yapılan ikinci bir çalışmada, irritabil bağırsak sendromu olan hastalardaki IgG oranının önemli olduğu gösterilmektedir. Non-

irritabil bağırsak sendromu diğer gastrointestinal hastalıklarla birleşince, bu semptomlarda *Blastocystis* spp.'nin rolünün tanımlanması zorlaşmaktadır (5).

Enfeksiyonlarda yaş faktörünün önemli olduğu, yetişkinlere oranla gençlerin enfeksiyonlardan daha fazla etkilendiği bildirilmektedir. Yetişkinlerde parazit çok yüksek oranda alındığı zaman enfeksiyona karşı direnç sekiz haftada oluşabilmektedir. Enfekte olmuş hastalarda, ilgisizlik, duyarsızlık ve kilo kaybı görülmektedir (5). Lümen sıvısından aspire edilen *Blastocystis* spp. incelendiğinde, bunların *Entamoeba histolytica* gibi çekal kolanizasyona eğilimli olduğu, distal, ileum, çekum ve kolona yerleştiği gözlenmektedir (26). Yapılan nekroskopik çalışmalarda *Blastocystis* spp.'nin, çekum ve kolonda ödeme neden olduğu, histolojik çekum ve kolon muayenesinde ise şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonları, ödemli yüzey propria ve mukoza erozyonu görülmüş ve bu durumdaki hastaların parazite karşı akut enfeksiyona yol açtığı belirtilmiştir (5).

Blastocystozisli hastaların dışkılarında mukus, eritrosit ve lökosit görülebilir (60, 70). Hastalarda çok fazla parazitin bulunması gastrointestinal şikayetleri artırmakta ve spesifik semptomlar göstermektedir. *Blastocystis* spp.'nin gastrointestinal sistemde yapmış olduğu patojenik etki ile buna sebep olabilecek diğer ishal etkenleri karşılaştırılmaktadır. İshale sebep olan nedenlerin *Blastocystis* spp.'ye bağlı olabileceği gibi, enterik virüsler, pseudomembranöz kolitler, postenfeksiyon disakkaridaz etkileri, immün sistemin baskılanmış olması gibi nedenlerin de ishale sebep olabileceği düşünülmektedir (59).

2.9 Tanı

2.9.1 Mikroskopi

Blastocystis'in tanısını koymanın, rutin tanı laboratuvarları için pek çok sıkıntısı vardır. Parazitin patogeneziyle ilişkin şüpheler olduğundan bazı laboratuvarlar rapor edilmesinde tereddütler yaşamaktadır. Bir diğer problem, organizmanın polimorfik yapısı nedeniyle, mikroskobide mantarlarla, *Cyclospora* spp. ve yağ globülleri ile karıştırılmasıdır. Ayrıca, klasik vakuoler formlar dışkıda baskın değilse ve daha küçük olan kist formları mevcutsa tanı koymak güç olmaktadır (28, 3).

Direkt tanıda boyalı preparatlar tercih edilmektedir. Parazitin düzensiz atılımı nedeni ile çoklu dışkı incelemeleri yapılmaktadır. Lugol solüsyonu ile hazırlanan taze preparatlar ve asid-fast, Giemsa ve trikrom boyamalar tanıda uygulanmakta, bunlar arasında en sık trikrom kullanılmaktadır (3). *In vitro* kültürler özgülüğü arttırmaktadır (71). Formol-etil-asetat yöntemi bu parazitin tanısında uygun değildir (71). *Blastocystis*'in rapor edilmesinde

önerilen genel kriter doğrudan bakıda (X400) her sahada beş, boyalı preparatlarda (X1000) iki veya daha fazla parazitin görülmesidir (68, 73-77). Bazı çalışmalar parazit yoğunluğu ile semptomlar arasında bir paralellik olduğunu belirtirken (77, 78) bazı çalışmalar ise böyle bir paralelliğin olmadığını göstermektedir (47, 45). Bu farklılığın nedeni açık olmamakla birlikte genotipik farklılıklar ve konak faktörleri olabileceği ileri sürülmektedir (3).

2.9.2 Kültür

Bazı araştırmacılar, kültür yapmadan önce konsantrasyon yöntemlerinin uygulanmasını hücrelerin parçalanmasına neden olduğu için önermemekte, bazı araştırmacılar ise konsantrasyon metodu ile başarılı olduklarını bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda kültürün mikroskopik incelemeye üstünlüğü gösterilmiş olup çok sayıda *Blastocystis* spp. var ise kültürün başarılı olabileceği, bunun da mikroskopik bakıda saptanacağını bildirmiştir (79, 80). Kültürde *Blastocystis* spp. 'nin üreyebilmesi için anaerobik ortam ve 37°C'lik ısı gereklidir.

Jones besiyeri insan örneklerinden izolasyon için en sık kullanılan ksenik besiyeridir (3, 81, 71). Yoshikawa ve ark. (2004) tarafından geliştirilen at serumlu asparjinli Ringer solüsyonu bir diğer besiyeridir (53). Akselik kültürler için Modifiye Dulbecco besiyeri veya Locke solüsyonlu bifazik yumurtalı besiyeri kullanılmaktadır (3). Sodyum tiyoglukonat eklenmiş yumuşak agarda veya solid agarda bakteri kolonilerine benzer koloniler yaparlar ve bu koloniler aksenizasyon işlemi için kullanılır (82). Akselik kültürlerin yapılması moleküler ve biyokimyasal çalışmalar için çok önemlidir. Ancak, bakteri ve mantarların uzaklaştırılması için antibiyotik kokteyllerinin kullanılması birkaç hafta sürebilecek uzun bir işlemdir ve kontaminantların uzaklaştırılması garanti değildir. Ayrıca bazı izolatlar bakteri olmaksızın canlılıklarını sürdürememektedirler (3).

2.9.3 Seroloji

Blastocystis spp.'ye karşı IgG ve IgA yanıtı oluşmaktadır. Bu yanıt, IFAT ve ELISA testleri ile belirlenmektedir. ELISA titreleri 1:50 ve 1:1600 arasında değiştiği ve yüksek titrelerin semptomatik enfeksiyonlarla ilişkili olduğu Zierdt ve ark., (1995) tarafından gösterilmiştir (82). Bazı çalışmalarda ise semptomatik hastaların serum titrelerinde çok az bir artış olduğunu bildirilirken (84), kronik enfeksiyonlarda anlamlı artışın olduğu bildirilmiştir (82). Bu farklılıklar antijen elde edilen suşların antijenik ve genotipik farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Şu anda mevcut olmamasına rağmen, insanları

enfekte eden genotiplerin monoklonal antikorlarının, antijen belirleme çalışmalarında yararlı olabileceği düşünülmektedir (3).

Blastocystis ilişkili semptomlar kendi kendini sınırlayıcıdır ve genellikle 1-14 gün arasında sonlanmaktadır (4). Bununla birlikte bazı enfeksiyonlar tedavi edilmezse aylarca sürebilmektedir. Kronik enfeksiyonda serolojik sonuçlarla ilgili çelişkili raporlar vardır (83, 84). Sonuç olarak *Blastocystis* türlerine karşı konak yanıtı ve antijenik farklılıklarla ilgili bilgiler kısıtlı olduğu için, rutin laboratuvar tanısında seroloji kullanılması önerilmemektedir (3).

2.9.4 Moleküler Yöntemler

PCR, bakteri, virüs, mantar, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer olarak adlandırılan spesifik ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq), komplementer ve oligonükleotitler kullanılarak *in vitro* olarak çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir yöntemdir (85). Bu yöntem, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır (86). Oligonükleotit primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanırlar. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit organik bazın bulunduğu deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PCR döngüsü DNA'nın tek iplikçik haline gelmesi (denatürasyon), primerin bağlanması (annealing) ve uzama (elongasyon) olmak üzere üç aşamadan oluşur (87).

Blastocystis identifikasyonu için PCR temelli diagnostik testler açıklanmıştır. Subtip spesifik tanısal primerler, *Blastocystis* türlerinin polimorfik DNA'sının randomize amplifikasyonundan geliştirilmiştir (53). Böylesi bir yaklaşımın epidemiyolojik çalışmalar için oldukça faydalı olduğu, insan ve hayvanlarda hastalık yapan genotiplerin dağılımı hakkında bilgi sağladığı görülmüştür. Birçok çalışmada direkt dışkıdan yapılan analizlerde boya ve kültür yöntemleri ile karşılaştırıldığında PCR yönteminin üstün olduğu gösterilirken (71) bazı çalışmalarda direkt dışkıdan bakılan PCR'ın kültürden düşük performanslı olduğu gösterilmiştir (71). Stensvold ve ark. (2007) geliştirdiği PCR yöntemi dışkıdan *Blastocystis* spp. tanısında %100 özgüllük göstermiş ve dışkıda az parazit bulunması ve parazitlerin

dejenere olması durumunda bile çalışmıştır (71). *Blastocystis* spp. tanısında kullanılacak RT-PCR yöntemi de açıklanmıştır. Bu yöntemle parazit genomunda 152 bp'lik bir bölge kullanılarak subtip 1, 3 ve 4'e ait türler belirlenebilmektedir (88).

Genotip ve parazit patogenezi arasında bir ilişki olduğu kanıtlanırsa gelecekteki laboratuvar uygulamalarında PCR yöntemleri de yerini almalıdır. Taze dışkıdan PCR analizi mikroskopiye iyi bir alternatiftir ve analiz aynı zamanda genotipin belirlenmesini de mümkün kılmaktadır (3). Real time PCR ise güvenilir, hızlı ve çoklu genotipleri ayırabilecek avantajlı bir tanı yöntemi olarak bildirilmektedir (88).

2.10 Tedavi

Blastocystis spp. ile infekte olmuş hastaların tedavi edilmesinin uygun olup olmadığı konusunda ve eğer tedavi edilecekse hangi ilacın kullanılması gerektiği tam olarak bilinmemektedir. Bunun sebebi hastalığı hekimlerin önemsiz görmesi, enfeksiyonun kendiliğinden geçeceği düşüncesi ve *Blastocystis* spp.'nin bir patojen olduğu ispatlanmamış iken potansiyel toksik ilaçların kullanımına karşı isteksiz olmalarıdır. Fakat çoğunun inancına göre de, eğer semptomlar var ise hastalığın başka bir nedeni olmadığı açıkça belirlenmiş ise tedavi uygulanmalıdır.

Tedavi önerildiğinde en sık tercih edilen ajan metronidazoldür (89; 69). Paramomisin (90) ve kotrimaksazol (49) gibi ajanlarla kombine halde de önerilmektedir. Nitozoxanide ile tedavi edilen vaka grupları da bildirilmektedir (91). Ancak yapılan tüm çalışmalarda %100 tedavi sağlanan grup olmamış hatta aynı ilaç için farklı bölgelerden çok farklı duyarlılıklar bildirilmiştir (76, 77). Bunun nedeninin bölgesel ilaç direnci farklılıkları olduğu düşünülmektedir. Özellikle kist formlarının daha dirençli olduğu görülmüş ve *in vitro* çalışmalarda paramomisin, kotrimaksozol gibi ajanların direkt parazite etkili olmadığı halde beslenme kaynağı olan bakterileri öldürerek parazite dolaylı etkili olduğu düşünülmüştür (92). Bazı tedavi başarısızlıklarına rağmen metronidazol ilk seçenek ilaç olarak bildirilmekte kotrimaksazol ve nitozoxanide ise ikinci seçenek ilaçlar olarak önerilmektedir. Tedavi kronik diyarelerde dışkıda başka bir patojen görülmemesi durumunda önerilmektedir (93).

Sonuç olarak; bu proje ile morfolojik çeşitliliği nedeniyle mikroskopik bakıda gözden kaçabilen *Blastocystis* spp.'nin PCR yöntemi kullanılarak saptanması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Temmuz 2012 - Kasım 2012 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Koproloji Laboratuvarına çeşitli polikliniklerden farklı şikayetlerle başvuru yapan hastalara öncelikle çalışma hakkında kısaca bilgi verilerek çalışmaya katılmayı kabul eden hastalara, hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu doldurtularak hastanın izni alınmıştır ardından hastaya kısa bir anket uygulayarak hastanın anamnezi alınmıştır (Ek-1, Ek-2). Çalışmaya katılmayı kabul eden tüm hastaların dışkı örnekleri alınarak doğrudan bakı, yoğunlaştırma ve trikrom boyama yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Bu yöntemlerin herhangi birinde her mikroskop sahasında görülme sayısına bakılmaksızın *Blastocystis* spp.'nin herhangi bir formu saptanan örnekler “mikroskopik bakısı pozitif” olarak değerlendirilmiştir. Bunun sonunda mikroskopik bakısı pozitif olan 30 ve negatif olan ilk 30 örnek olmak üzere toplam 60 gönüllü hasta çalışmamıza katılmıştır. Çalışmamıza katılan tüm hastaların dışkı örnekleri (60 örnek) PCR yöntemi ile de değerlendirilmiştir.

3.1 Mikroskopik Tanı Yöntemleri

3.1.1 Doğrudan Bakı

Mikroskopik tanı yöntemlerinden doğrudan bakı (serum fizyolojik-Lugol) yöntemine dışkı incelemelerinde en basit ve etkili bir yöntem olması nedeniyle başvurulmuştur.

3.1.1.1 Serum Fizyolojik Yöntemi

Bir lam üzerine serum fizyolojik damlatılarak plastik baget yardımıyla yaklaşık 2 mg. dışkı alınıp karıştırılarak X400 büyütmede mikroskopik bakısı yapılmıştır (94).

3.1.1.2 Lugol Yöntemi

Bu yöntemde parazitlerin iyot ile boyanmalarını sağlamak için boya solüsyonu aşağıdaki gibi hazırlanmıştır (94).

Kullanılan Maddeler

1- Potasyum İyodür (KI)	10 g
2- Toz halindeki İyot kristalleri (I ₂)	5 g
3- Distile su	100 ml

Yöntem:

Potasyum iyodür distile suyun içinde çözündürülmüştür. Solüsyon doyuncaya kadar iyot kristalleri eklenmiştir. Solüsyon ışık geçirmeyen kahverengi bir cam şişenin içine süzölmüştür. Kırmızımsı kahverengi renk solduğu zaman taze solüsyon hazırlanmıştır. Bu solüsyon stok Lugol solüsyonudur ve bu şekliyle taze bakı amacıyla kullanılmamıştır. Kullanılmadan önce bir birim stok Lugol solüsyonu, 5 birim distile suyla sulandırılmıştır. Doğrudan bakıda kullanılan bu solüsyon her hafta yenilenmiştir. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda X400 büyütmede incelenmiştir.

3.2 Yoğunlaştırma Yöntemleri

Yoğunlaştırma yöntemleri çeşitli parazitlere ait gözden kaçabilen az miktardaki kist veya ookistlerin dışkı örneklerinde daha kolay saptanmasını sağlar. Çalışmamızda yoğunlaştırma yöntemlerinden formol-etil asetat çöktürme yöntemi kullanılmıştır (95).

3.2.1 Formol-Etil Asetat Çöktürme Yöntemi

Kullanılan Maddeler

1- %10 Formol	10 ml
2- Etil Asetat	3 ml

Yöntem:

1-1,5 g taze dışkı 10 ml %10'luk formol içinde uygun bir cam veya plastik kaptan tamamen ezilmiştir. Fiksasyonun tam olarak gerçekleşmesi için 30 dakika veya daha fazla beklenilmiştir. Eğer dışkı örneği sulu veya çok yumuşak ise 5-6 ml kullanılmıştır.

Süspansiyon çay süzgeci ile başka bir kap içine süzölmüştür, buradan da 15 ml'lik konik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

Etil asetata dayanıklı bir eldiven giydikten sonra, süspansiyona 3 ml etil asetat eklenmiştir, tüpün ağzı başparmakla sıkıca kapatılarak 30 saniye kuvvetlice çalkalanmıştır. Süspansiyon 1000 RPM'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpü santrifüjden çıkartığımızda 4 tabaka görölmüştür.

- a) En üstte etil-asetat tabakası,
- b) Tüpün duvarlarına yapışan bir dışkı artığı tabakası,
- c) Formol tabakası
- d) Çökelti

Dışkı artığı tıkaçı tüp kenarından bir çubuk yardımı ile ayrılmıştır ve üstteki üç tabaka dökülmüştür. Bundan sonra kenarlarda kalan sıvının az bir miktarı tekrar çökelti üzerine akmıştır.

Tek kullanımlık cam pipet kullanılarak bu sıvı çökelti ile karıştırılmıştır. Çökelti hala katı ise birkaç damla serum fizyolojik eklenerek vorteksle çalkalanmıştır.

İnceleme için iyotlu solüsyonlarla ve serum fizyolojik ile doğrudan bakı preparatları hazırlanmıştır.

3.3 Kalıcı Boyama Yöntemleri

Çalışmamızda, çabuk, kolayca hazırlanabilir olması, yüksek düzeyde stabil olması ve uzun bir raf ömrüne sahip olmasından dolayı, Trikrom Boyama Yöntemi kullanılmıştır (96).

Trikrom Boyama Yöntemi (Wheatley Modifikasyonu)

Kullanılan Maddeler

1- Chromotrope 2R	6 g
2- Light green SF	3 g
3- Fosfotungstik asit	7 g
4- Glasiyal asetik asit	4,5 ml
5- %90'lık etil alkol	995,5 ml
6- D'Antoni'nin iyot solüsyonu	100 ml
7- Ksilen	100 ml
8- Karbol-ksilen	100 ml

Hazırlanan Solüsyonlar

1. Trikrom boyası

Temiz bir cam beher içinde 6 g Chromotrope 2R, 3 g Light green SF ve 7 g fosfotungstik asit eklenip karıştırılmış ve karışım 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 1000 ml distile su ekleyerek iyice karıştırılarak boya hazırlanmıştır.

2. %90 Asit Alkol

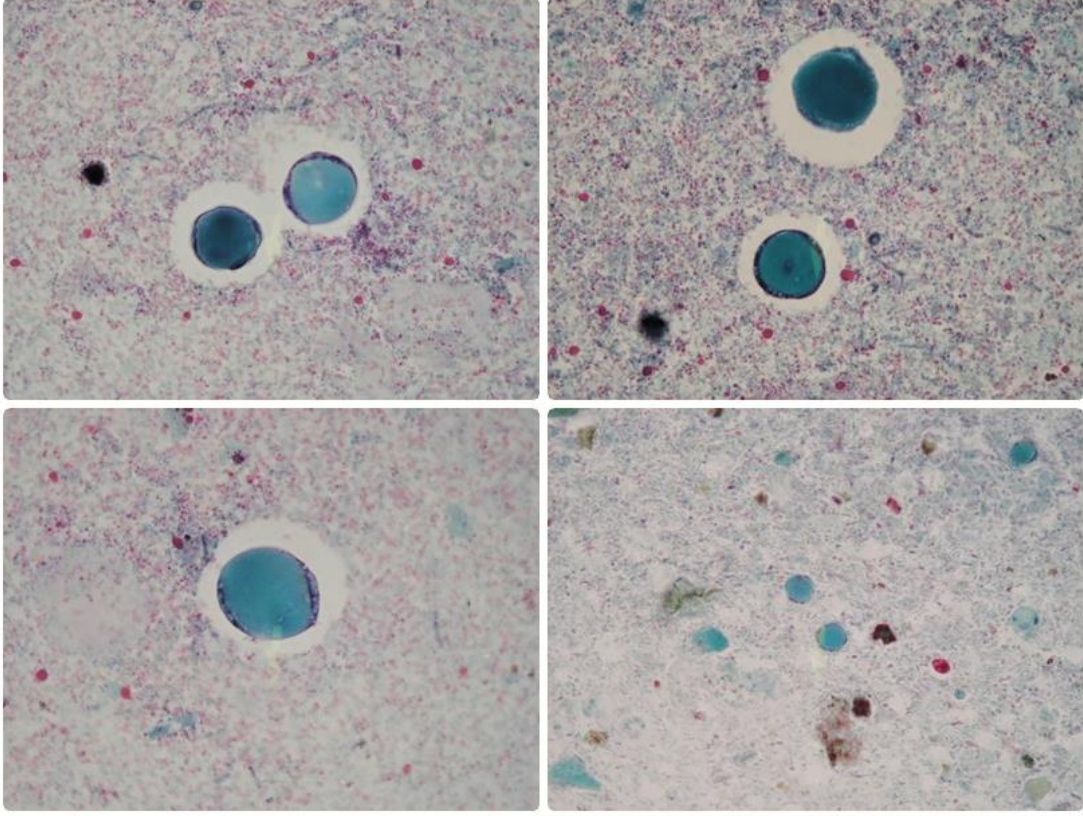
995,5 ml %90 etil alkole 4,5 ml glasiyal asetik asit ekleyerek hazırlanmıştır.

Yöntem:

Bir fırça yardımı ile alınan dışkı örneği temiz bir lam üzerine suluboya fırçası ile ince bir tabaka şeklinde sürülmüştür. Bu lamlar daha sonra Schaudinn fiksatif ile 30 dakika fikse edilmiştir. Trikrom boyama yöntemi için kapaklı, derin, cam şaleler kullanılmıştır. Her şalenin kapağına sıra numarası, solüsyonun içeriği ve yaymanın bu şalede kalma süresi yazılmıştır. Yaymalar bir şaleden diğerine aktarılırken kurutma kağıtlarına değiştirilerek fazla sıvı alınmış ve bu şekilde solüsyonların karışması engellenmiştir.

%70'lik etil alkole demli çay renginde bir solüsyon elde edene kadar D'Antoni'nin iyot solüsyonu eklenmiş ve lamlar bu solüsyonda 3-5 dakika tutulmuştur. Bu işlemden sonra lamlar iki ayrı %70'lik alkol solüsyonunda 2 dakika tutulmuştur. Daha sonra lamaları 10 dakika sulandırılmış trikrom boyasında beklettikten sonra lamaları kağıt havlu üzerine birkaç kez değdirerek fazla boyanın süzülmesi sağlanmıştır. Fazla boyası uzaklaştırılan lamlar %90'luk asit alkolde 2-3 saniye kadar batırıp çıkartılmıştır ve kağıt havluya değdirdikten sonra önce %95 alkolde, sonra karbol-ksilen solüsyonuna aktararak boyadan arındırma işleminin durması sağlanmıştır.

Lamlar ikinci ve üçüncü karbol-ksilen solüsyonunda 2'şer dakika tutulmuştur. Daha sonra lamlar iki ayrı ksilen içeren şalede 2'şer dakika tutulmuş ve kurumaları beklenilmiştir. Son olarak lamlara entallen damlatarak lamelle kapatılmış ve ışık mikroskobunda x100'lük büyütme immersiyon objektifinde incelenmiştir. Resim 1'de vakuoler formda saptadığımız bazı örnekler gösterilmiştir.



Resim 1: Vakuoler formda *Blastocystis* spp. (Trikrom boya).

3.4 PCR Yöntemi

Dışkı örneklerinden DNA elde etmek için Norgen Biotek DNA ekstraksiyon kiti çalışma prosedürüne uygun olarak kullanılmıştır.

3.4.1 DNA İzolasyonu

Kullanılan Maddeler

1-Lysis solüsyonu	1 ml
2- Lysis additive	100 µl
3- Binding solüsyonu	200 µl
4- %70'lik alkol	700 µl
5- Wash solüsyon I	500 µl
6- Wash solüsyon II	500 µl
7- Elution buffer	50 µl

Yöntem:

Boncuklu tüplere 200 mg dışkı örneği ile 1 ml Lizis solüsyonu koyarak vorteksle tamamen homojen bir karışım elde edinceye kadar karıştırılmış ve üzerine 100 µl Lysis additive ekleyerek eppendorf santrifüjünde 14 000 RPM'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra alt ve üst kısımda biriken atık kısmına dokunmadan orta kısımdan 600 µl alınarak eppendorflara aktarılmış ve üzerine 200 µl Binding solüsyonu ekleyip iyice çalkalanmış ve 10 dakika buzda inkube edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra 14 000 RPM'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Orta kısımdan 700 µl alınıp temiz bir eppendorf içine aktarılmış ve üzerine 700 µl %70'lik alkol ekleyip vortexlenmiştir. Vortex işleminden sonra 600 µl alınmış ve Spin Column'a aktarılmış, 1 dakika 14 000 RPM'de santrifüj edilmiştir. Bu son işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.

Spin Column'da bulunan DNA'ları dışkı atığından tamamen uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılmıştır. Spin Column'a 500 µl I. yıkama solüsyonu eklenmiş 1 dakika 14 000 RPM'de santrifüj edilmiştir, sonra da üzerine 500 µl II. yıkama solüsyonu eklenmiş tekrar 1 dakika 14 000 RPM de santrifüj edilmiştir, DNA'lar II. yıkama solüsyonu ile iki kez yıkanmıştır. Yıkanan DNA'ları kurutmak için 2 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak Spin Column'a 50 µl elution buffer eklenmiş DNA saklama eppendorfu içine koyarak 2 000 RPM'de 2 dakika santrifüj ederek DNA'lar DNA saklama tüpü içine alınmıştır. Elde ettiğimiz DNA'lar PCR yönteminde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.4.2 PCR Yöntemi

Kullanılan maddeler

1- dH ₂ O	25 µl
2- 10X buffer	1 µl
3- MgCl ₂	1,5 µl
4- dNTP	0,2 µl
5- Primer Forward	0,2 µl

(5' CGA ATG GCT CAT TAT ATC GC 3')

6-Primer Reverse	0,2 µl
------------------	--------

(5' TCT TCG TTA CCC GTT ACT GC 3')

7-Taq polimeraz 3 U

8-DNA 2 µl

Yöntem:

Steril bir eppendorfa 25 µl dH₂O'dan başlayarak sırasıyla, 1 µl 10X buffer, 1,5 µl MgCl₂, 0,2 µl dNTP, 0,2 µl Primer Forward, 0,2 µl Primer Reverse, son olarak 3 U Taq polimeraz, en son da 2 µl DNA'yı ekleyerek bir master mix elde edilmiştir. Hazırladığımız master mix'i termocycler'a yükleyerek PCR döngüleri gerçekleştirilmiştir. Termal döngümüz aşağıdaki gibidir;

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

Elde edilen PCR ürünü elektroforez işlemi için kullanıma hazırdır.

3.4.3 Elektroforez

Kullanılan maddeler

1-Biyoteknolojik agar	1,5 g
2-10X TAE	100 ml
3-Ethidium Bromid	4 µl
4-Marker (100 bp DNA ladder solis biodyne)	5 µl

Yöntem:

1,5 g biyoteknolojik agar 100 ml 10X TAE içerisinde mikrodalga fırında kaynamasına izin vermeden eritilmiştir. Daha sonra jel kalıba hava kabarcığı oluşmasına izin vermeden dökülmüş ve donması beklenmiştir. 8 µl PCR ile elde ettiğimiz amplifikasyon sonuçları 2 µl 6X yükleme solüsyonu ile birlikte % 1,5'lik agaroz jele yüklenmiştir. Jele 5 µl marker (100

bp DNA ladder solis biodyne) yüklenmiştir. Marker, agaroz jel elektroforezinde DNA göçünün görüntülenmesine olanak sağlayan bromofenol mavisi içerir ve 100 bp ile 3000 bp arasında değişen toplam 12 basamak içermektedir.

Daha sonra jel elektroforez cihazına yerleştirilerek 100 volt akımda 90 dakika yürütülmüştür ve UV ışığında görüntüsü alınmıştır. PCR çalışması sonucunda 227 bp uzunluğunda saptanan bantlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.5 İstatistiksel Değerlendirme

Analizlerde SPSS 15 programı kullanıldı. Kategorik değişkenlerin analizinde ki-kare testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Koproloji Laboratuvarına çeşitli polikliniklerden farklı şikayetlerle başvuran ve çalışmamıza dahil edilen toplam 60 hastanın yaş ortalaması $35,6 \pm 20,75$ (Range: 0,7-77) olarak bulunmuştur. Çalışmaya katılan hastaların 24'ü (%40) erkek, 36'sı (%60) ise kadın hastadır. Mikroskopik bakı ile yapılan incelemeler sonucunda erkeklerin 14'ünde (%58,3), kadınların ise 16'sında (%44,4) *Blastocystis* spp. saptanmıştır (Tablo 1). Her iki cinsiyet arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$). PCR ile yapılan çalışmalar sonucunda erkeklerin 16'sında (%66,7), kadınların 19'unda (%52,8) *Blastocystis* spp. saptanmıştır (Tablo 1). PCR yönteminde de cinsiyetler arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 1: *Blastocystis* spp.'nin mikroskopik bakı ve PCR sonuçlarının cinsiyete göre dağılımı*.

CİNSİYET	YÖNTEM					
	Mikroskopik Bakı			PCR		
	Pozitif (%)	Negatif (%)	Toplam (%)	Pozitif (%)	Negatif (%)	Toplam (%)
Erkek	14 (%58,3)	10 (41,7)	24 (%100)	16 (%66,7)	8 (%33,3)	24 (%100)
Kadın	16 (%44,4)	20 (%55,6)	36 (%100)	19 (%52,8)	17 (%47,2)	36 (%100)
Toplam	30 (%50)	30 (%50)	60 (%100)	35 (%58,3)	25 (%41,7)	60 (%100)

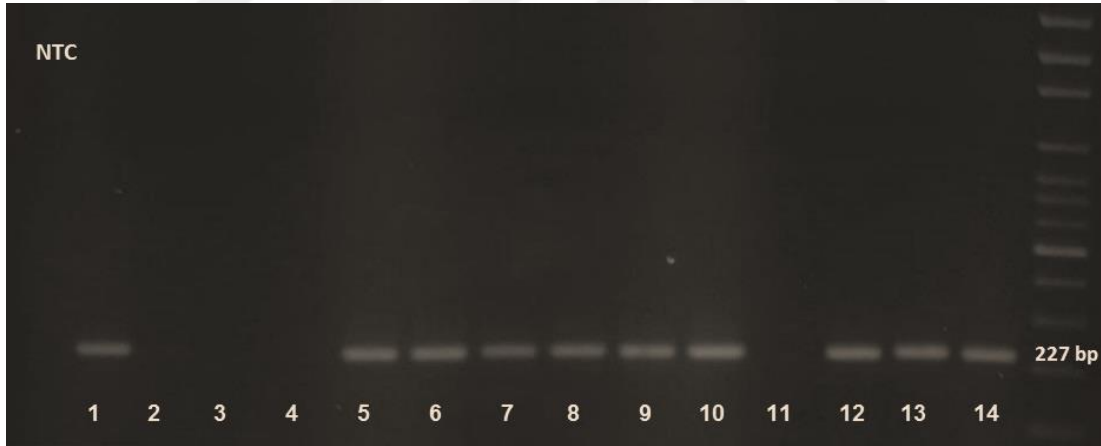
*Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

Yapılan çalışmada mikroskopik bakı ile incelemede hastaların 30'unda (%50) *Blastocystis* spp. pozitif, 30'unda *Blastocystis* spp. negatif olarak saptanmışken, PCR ile değerlendirildiğinde 35'i (%58,3) *Blastocystis* spp. pozitif, 25'i (%41,7) *Blastocystis* spp. negatif olarak bulunmuştur (Tablo 2). Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde mikroskopik bakı ile PCR arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,00$, $p<0,05$).

Tablo 2: *Blastocystis* spp.'nin mikroskopik bakı ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

		PCR		Toplam (%)
		Negatif (%)	Pozitif (%)	
Mikroskopik Bakı	Negatif	25 (%83,3)	5 (%16,7)	30 (%100)
	Pozitif	0 (%0)	30 (%100)	30 (%100)
Toplam		25 (%41,7)	35 (%58,3)	60 (%100)

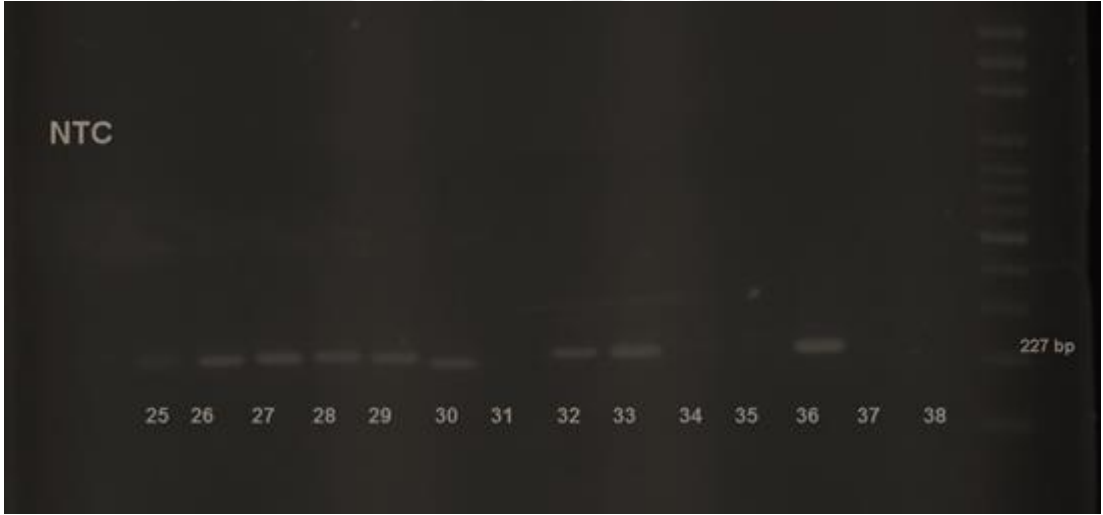
PCR-elektroforez sonucunda elde edilen 227 bp uzunluğunda bantların UV ışığındaki görüntüleri verilmiştir (Resim 2 – 6).



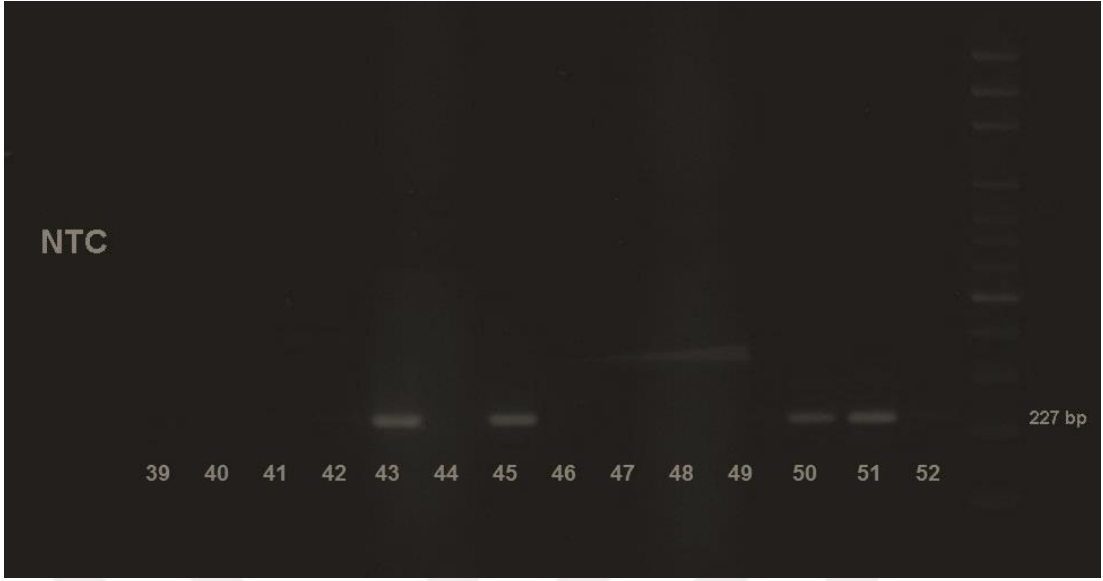
Resim 2: 1-14 nolu örneklerden PCR-elektroforez sonucunda elde edilen bantların UV ışığındaki görüntüleri. 2-4 ve 11 nolu örnekler negatif olarak değerlendirilmiştir. 5 nolu örneğin mikroskopik bakısı negatif iken PCR sonucu pozitifdir. NTC: Negatif kontrol



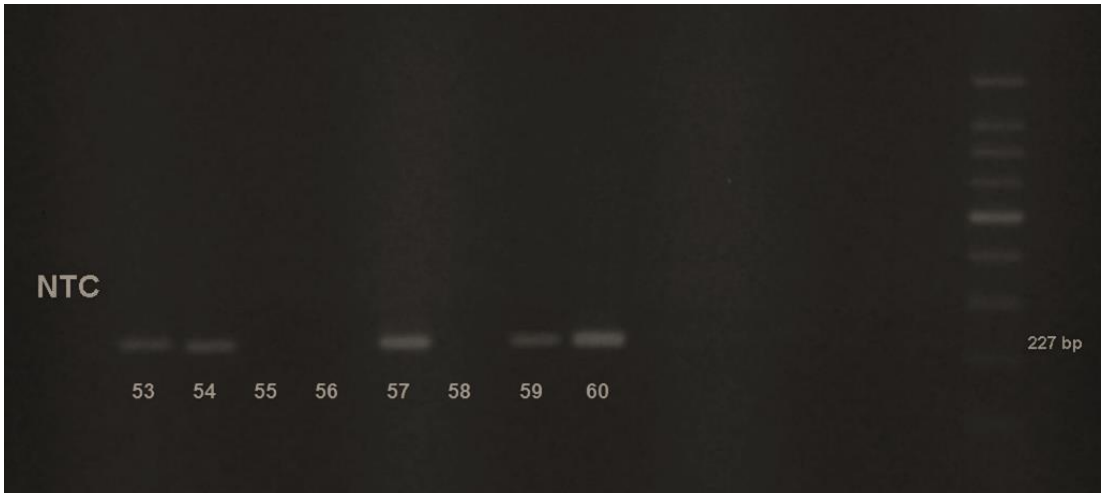
Resim 3: 15-24 nolu örneklerden PCR-elektroforez sonucunda elde edilen bantların UV ışığındaki görüntüleri. 16-18 nolu örnekler negatif olarak değerlendirilmiştir.



Resim 4: 25-38 nolu örneklerden PCR-elektroforez sonucunda elde edilen bantların UV ışığındaki görüntüleri. 31, 34, 35, 37 ve 38 nolu örnekler negatif olarak değerlendirilmiştir. 27 ve 32 nolu örneklerin mikroskopik bakışı negatif iken PCR sonuçları pozitif olarak saptanmıştır. NTC: Negatif kontrol



Resim 5: 39-52 nolu örneklerden PCR-elektroforez sonucunda elde edilen bantların UV ışığındaki görüntüleri. 39-42, 44, 46-49 ve 52 nolu örnekler negatif olarak değerlendirilmiştir. 43 nolu örneğin mikroskopik bakışı negatif iken PCR sonucu pozitif olarak saptanmıştır. NTC: Negatif kontrol



Resim 6: 53-60 nolu örneklerden PCR-elektroforez sonucunda elde edilen bantların UV ışığındaki görüntüleri. 55, 56 ve 58 nolu örnekler negatif olarak değerlendirilmiştir. 60 nolu örneğin mikroskopik bakışı negatif iken PCR sonucu pozitif olarak saptanmıştır. NTC: Negatif kontrol

Şikayetlerin değerlendirilmesinde PCR altın standart kabul edilmiş ve PCR ile pozitif saptanan hastaların 27'si (%45) allerji, 15'i (%25) ishal, 13'ü (% 21,7) karın ağrısı, 4'ü (%6,7) bulantı, 1'i (%1,6) anemi şikayetleri ile polikliniğe başvuru yaptığı tespit edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3: PCR sonuçlarının şikayetler ile birlikte değerlendirilmesi*.

Şikayetler	PCR		Toplam (%)
	Pozitif (%)	Negatif (%)	
Allerji	18 (%66,7)	9 (%33,3)	27 (%100)
İshal	6 (%40)	9 (%60)	15 (%100)
Karın Ağrısı	8 (61,5)	5 (%38,5)	13 (%100)
Bulantı	2 (%50)	2 (%50)	4 (%100)
Anemi	1 (%100)	0 (%0,0)	1 (%100)
Toplam	35 (%58,3)	25 (%41,7)	60 (%100)

*Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Blastocystis spp. rutin tanısında kullanılan yöntemler başlıca doğrudan bakı, yoğunlaştırma ve kalıcı boyama yöntemleridir. Doğrudan bakı, yoğunlaştırma ve trikrom boyama yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda yoğunlaştırma ve trikrom boyama yöntemlerinin, doğrudan bakı yöntemine göre *Blastocystis* spp. pozitifliğini saptama oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (5, 97).

Dünyada *Blastocystis* spp. prevalansı gelişmiş ülkelerde %1,5-10 iken, gelişmekte olan ülkelerde %30-50 arasında değişmektedir (4). Amerika'da yapılan bir çalışmada *Blastocystis* spp. prevalansı %18 olarak saptanırken Nascimento ve ark.'nın Brezilya'da yaptıkları çalışmada ise *Blastocystis* spp. prevalansı %26,5 olarak saptanmıştır (98,99). Tayland'da yapılan bir çalışmada ise *Blastocystis* spp. prevalansı %1,9 olarak bildirilmiştir (100). Cheng ve ark.'nın Vietnamlı gebe kadınlarda yaptıkları çalışmada *Blastocystis* spp. enfeksiyonun oranı %20,4 olduğu bildirilmiştir (101).

Ülkemizde *Blastocystis* spp. yaygınlığı %0,48-44,4 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (40-44). Yapılan çalışmalarda *Blastocystis* spp. yaygınlığı Kütahya'da %0,48 (40), İstanbul'da %2,1 (102), Ankara'da %22 (103), İzmir'de %4,38(104), Eskişehir'de %7, (105), Manisa'da %7,64 (106), Kocaeli'nde %23,2 (107), Hatay'da %18,30 (108), Bursa'da %23,57 (109), olarak bildirilmiştir. Usluca ve ark.'nın İzmir'de yaptığı çalışmada ise *Blastocystis* spp. yaygınlığı %44,04 olarak bildirilmiştir (110).

Bu projede cinsiyete göre *Blastocystis* spp. dağılımı değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu konuda çalışmamızı destekleyen çalışmalar bulunduğu gibi (104, 111), Usluca ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada cinsiyetler arasında istatistiksel olarak fark olduğu da bildirilmiştir. (110).

Blastocystis spp. özellikle bağımsızlık sistemi yetersiz kişilerde çok şiddetli gastrointestinal semptomlarla birlikte görülebildiği gibi gastrointestinal semptomu olmayan sağlıklı kişilerin dışkıında da saptanabilen bir parazittir (4, 5, 46, 112). de Wit MA ve ark.'nın tüm mikrobiyolojik incelemeleri de içeren çalışmalarında *Blastocystis* spp. gastrointestinal yakınmaları olanlarda kontrol grubuna göre daha sık bulunmuştur (113). Kaya ve ark.'nın yaptıkları bir başka çalışmada *Blastocystis* spp. ile birlikte bağırsak semptomlarının sıklıkla görüldüğü, olası diğer etkenlerin elimine edilmesi durumunda *Blastocystis* spp.'nin patojenite açısından değerlendirilmesinin yararlı olacağı bildirilmiştir (114). Özçakır ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise allerjisi olan hastalarda *Blastocystis* spp.'nin daha sık görüldüğü bildirilmiştir (46). Bazı çalışmalarda, reaktif artrit ve kronik ürtiker gibi çeşitli bağırsak dışı bulguların *Blastocystis* spp. enfeksiyonu ile ilişkili olabileceği ve tedavi sonrasında bulguların iyileştiği belirtilmiştir (115). Yakoob ve ark.'nın yaptıkları çalışmada irritable bağırsak sendromu olan hastalarda *Blastocystis* spp. görülme oranı kontrol grubu hastalara göre daha yüksek olarak bildirilmiştir (116). Bizim yaptığımız çalışmada ise hastaların en çok allerji şikayeti ile polikliniğimize başvurduğu tespit edilmiştir. Ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde şikayetler arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Mikroskopik bakı ucuz ve hızlı bir yöntem olmasına karşın bazı dezavantajları da vardır. Bunlar arasında en önemlisi yetişmiş insan gücüne duyulan gereksinimdir. Gerçekten bu yöntemler oldukça basit olarak görünmelerine ve kolay uygulanabilir olmalarına karşın, doğru tanı koyabilecek deneyimli mikroskopistleri yetiştirmek oldukça zor ve maliyetlidir. Diğer bir dezavantajı da elde edilen sonuçların genellikle tekrarlanabilir, izlenebilir ve objektif olmamasıdır (117, 118). Son yıllarda klasik dışkı bakısı önemli ölçüde ihmal edilmektedir. Parija ve ark.'nın yaptıkları çalışmalarında bu ihmali üç önemli nedene bağlamışlardır. Bunlar; dışkının hazırlanması sırasında teknisyenin motivasyon eksikliği, eğitiminin yetersizliği ve dışkı hazırlamaktaki zorluklar ile uzmanların yeterince eğitilememesinden kaynaklanmaktadır (119). PCR ile mikroskopik bakıdan daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. Bundan dolayı da moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (88). Mikroskopik bakı ile her sahada beş ve üzeri *Blastocystis* saptanan hastalar tedavi edilmektedir. PCR ile *Blastocystis* spp. yoğunluğu hakkında bilgi elde edilememektedir. Bundan dolayı PCR pozitif semptomatik hastalarda diğer tüm nedenler elimine edilmiş ise tedavi uygulanmalıdır.

Stensvold ve ark.'nın geliştirdiği PCR yöntemi dışkıda *Blastocystis* spp. tanısında %100 özgülük göstermiş ve parazitlerin dejenere olması durumunda bile çalıştığı bildirilmiştir. Bu çalışmada primer F:5'-GGA GGT AGT GAC AAT AAATC-3' ve primer R 5'-TAA GAC TAC GAG GGT ATC TA-3' gen bölgesi kullanılmış ve 550-585 bp'de bantlar pozitif olarak bildirilmiştir. (72). Menounos ve ark.'nın yaptığı çalışmada primer F 5'-CGA ATG GCT CAT TAT ATC AG TT-3 ve primer R 5'-TCT TCG TTA CCC GTT ACT GC-3' gen dizilimleri kullanılmış ve mikroskopik bakıda pozitif olan tüm sonuçlar PCR'de 260 bp'de bant oluşturarak pozitif sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (120). Bizim yaptığımız çalışmada ise primer F 5' CGA ATG GCT CAT TAT ATC GC 3' ve primer R 5' TCT TCG TTA CCC GTT ACT GC 3' gen bölgeleri kullanılmıştır. Mikroskopik bakıda pozitif olan tüm örnekler ve mikroskopik bakıda negatif saptanan 5 örneğin PCR sonuçları 227 bp'de bant oluşturmuş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada *Blastocystis* spp.'nin RFLP yöntemiyle 12 genotipinin belirlendiği ve coğrafik kökenle genotip arasında ilişki saptanmadığı bildirilmiştir (121). Semptomatik ve asemptomatik olgularda genotip ile patojenite arasında ilişki tespit edilemediği fakat genotip olarak en sık subtip 3, subtip 1 ve subtip 4'ün saptandığı belirtilmiştir (53). Yan ve ark.'nın 2006'da yaptıkları bir çalışmada *Blastocystis* spp.'nin genotiplendirilmesinde subtip 3 ve subtip 1'in, en fazla saptanan genotip olduğu ve subtip 1'in semptomatik hastalarda subtip 3'ten daha fazla bulunduğu bildirilmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş bu bulgular ışığında subtip 1'in patojenite ile ilişkisi olabileceği ileri sürülmüştür (55). Ülkemizde yapılan bir çalışmada subtip 2'nin semptomatik hastalarda yüksek olduğu bildirilmiştir (56).

Stensvold ve ark.'nın 2007'de yaptığı çalışmada, doğrudan dışkıdan yapılan analizlerde boya ve kültür yöntemleri ile karşılaştırıldığında PCR yönteminin üstün olduğu bildirilmişken, Termmathurapoj'un 2004'te yaptığı bir çalışmada ise PCR'nin kültürden düşük performanslı olduğu gösterilmiştir (71, 72).

Mikroskopik bakıda pozitif olan tüm örneklerin PCR ile pozitif saptanması seçilen gen bölgesinin iyi çalıştığını göstermiştir. Bunun yanında mikroskopik bakıda negatif olan 5 örneğin PCR ile pozitif saptanması doğrudan bakıda gözden kaçabilen ve bakan kişinin tecrübesine göre değişebilen sonuçların PCR ile doğru bir şekilde saptanabildiğini göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Blastocystis spp.'nin laboratuvar tanısında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmamızda doğrudan bakı, yoğunlaştırma, boyama ve PCR yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmamızda, doğrudan bakı, yoğunlaştırma ve boyama yöntemleri ile değerlendirildiğinde pozitif olan 30 hasta ve negatif olan 30 hasta, PCR yöntemi ile de çalışılmıştır. Mikroskopik bakıda pozitif olan 30 hastanın PCR sonucu pozitif iken, mikroskopik bakıda negatif olan 30 hastanın 25'i negatif, 5'i pozitif sonuç vermiştir. Sonuç olarak, mikroskopik bakıda gözden kaçabilen *Blastocystis* spp. pozitifliği PCR ile saptanmıştır. PCR-elektroforez sonucunda 227 bp uzunluğunda bantlar elde edilmiştir.

Mikroskopik bakı ucuz ve hızlı bir yöntem olmasına karşın, sonuçlar bakı yapan kişinin tecrübesine bağlı olarak değişebilmektedir. Taze dışkıdan PCR analizi mikroskopik bakıya iyi bir alternatiftir ve analiz aynı zamanda genotipin belirlenebilmesini de mümkün kılmaktadır. PCR mikroskopik bakıya göre daha özgül ve güvenilir bir yöntemdir. Mikroskopik bakıda gözden kaçabilen parazitler PCR ile saptanabilir. Ancak burada dikkat edilmesi gereken konu, mikroskopik bakıda *Blastocystis* spp.'nin her sahada görülme sıklığı ve sayısına bakarak rapor edilirken, konvansiyonel PCR ile parazitin varlığı saptandığı için sayı ve sıklığı hakkında bize bilgi verememektedir. Bu yüzden *Blastocystis* spp. enfeksiyonu semptomları bulunan hastaların mikroskopik bakıda *Blastocystis* spp. yönünden negatif olarak değerlendirildiği ve hastalığa ait başka bir nedenin bulunmadığı durumlarda, dışkı örneğinin PCR ile de değerlendirilmesi önerilir.

7. EKLER

7.1 EK-1



T.C.
CELAL BAYAR UNIVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ

ARASTIRMANIN ADI:

Blastocystis spp.'nin dışkı örneklerinde PCR yöntemi ile saptanması.

CALISMANIN ACIK ADI:

Bir bağırsak paraziti olan *Blastocystis spp.*'nin dışkı örneklerinden moleküler bir yöntem (PCR) ile saptanabilmesi.

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. **Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.**

BU CALISMAYA KATILMAK ZORUNDA MIYIM?:

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirseniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Eğer isterseniz, bu çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir.

CALISMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?:

İnsanlarda ishal ve karın ağrısı gibi şikayetlere yol açabilen ve insanda en sık rastlanan insan bağırsak paraziti *Blastocystis spp.*'nin teşhisi için bugünkünden çok daha etkili ve güvenilir yöntemler araştırılmaktadır. Bu çalışmada amaç, rutinde kullanılan testlerin yanı sıra moleküler bir teknik olan PCR yöntemini kullanarak bu parazitin saptanmasında en duyarlı tanı yöntemini belirlemektir.

CALISMA İSLEMLERİ:

Bu çalışma için parazitoloji laboratuvarına teslim edeceğimiz ve geleneksel yöntemlerle yukarıda adı geçen parazit bulunan dışkı örneğiniz kullanılacaktır. Alınacak dışkı örneğiniz katı kıvamlı ise ceviz büyüklüğü kadar, sıvı kıvamlı bir çorba kaşığı kadar olacaktır. Dolayısıyla hastaya ek bir invazif girişim yapılmayacaktır.



ÇALIŞMAYA KATILMAMIM NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Bu çalışmaya katılıyor olmak sizin için hiçbir ek bir soruna sebep olmayacaktır.

CALISMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Çalışmanın başarıya ulaşması halinde bu parazitin enfekte ettiği insanlara gelecekte çok daha güvenilir bir şekilde tanı konulması mümkün olacaktır.

CALISMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışma amacıyla yapılan normal muayeneler sırasında istenilen tetkikleriniz dışındaki Tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyicisi tarafından karşılanacak; size veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Kişisel bilgiler hiçbir şekilde kullanılmayacaktır.

SORU VE PROBLEMLER İÇİN BASVURULACAK KİŞİLER

Doç. Dr. Ali Ahmet Kilimcioğlu: Araştırma sorumlusu Tel: 532 293 08 77
Biyolog Selin Bölük Yardımcı araştırmacı Tel: 554 373 34 97

Çalışmaya Katılma Onayı

Yukarıdaki bilgileri doktorumla ayrıntılı olarak tartıştım ve kendisi bütün sorularımı cevapladı. Bu bilgilendirilmiş olur belgesini okudum ve anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorum ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışmam sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllü / Hastanın adresi:

Gönüllü / Hastanın telefonu:

Gönüllü / Hastanın Adı Soyadı:

İmzası

Tarih

Veli / Vasinin Adı Soyadı:

İmzası

Tarih

Veli / Vasinin adresi ve telefonu:

Rıza alım işlemine başından



T.C.
CELAL BAYAR UNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sonuna kadar taahhüt eden

Adı Soyadı Görevi

İmzası

Tarih

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı Soyadı

İmzası

Tarih



7.2 EK-2

TIBBİ PARAZİTOLOJİ HASTA ANKET FORMU:

Tarih: / / 2012

Hastanın Adı, Soyadı:

Yaş / Cinsiyet:/.....

Çalışma / Defter Protokol No:/.....

İletişim Telefonu:

1.	Hastanın şikayetleri?	<input type="checkbox"/> 1 Karın ağrısı <input type="checkbox"/> 2 İshal <input type="checkbox"/> 3 Kabızlık <input type="checkbox"/> 4 Gaz, şişkinlik <input type="checkbox"/> 5 Bulantı <input type="checkbox"/> 6 Kusma <input type="checkbox"/> 7 Hazımsızlık <input type="checkbox"/> 8 Ateş <input type="checkbox"/> 9 Deri kaşıntısı <input type="checkbox"/> 10 Deride kızarıklık, döküntü <input type="checkbox"/> 11 Diğer (kilo kaybı, vb.)
2.	Son 15 gün içinde antibiyotik veya bağırsak antiseptiği kullandınız mı? (Cevap evet ise ilacın ismi ve süresi)	<input type="checkbox"/> 1 Evet (.....) <input type="checkbox"/> 2 Hayır
3.	Oturduğunuz yer nerede?	<input type="checkbox"/> 1 Şehir merkezi <input type="checkbox"/> 2 İlçe <input type="checkbox"/> 3 Köy
4.	Tuvalet evin içinde mi, dışında mı?	<input type="checkbox"/> 1 İçinde <input type="checkbox"/> 2 Dışında
5.	İçme suyu olarak ne kullanıyorsunuz?	<input type="checkbox"/> 1 Şebeke (musluk) suyu <input type="checkbox"/> 2 Hazır su (satın aldığınız) <input type="checkbox"/> 3 Kuyu suyu
6.	Hastanın eğitim durumu;	<input type="checkbox"/> 1 Okur yazar değil <input type="checkbox"/> 2 İlkokul <input type="checkbox"/> 3 Ortaokul <input type="checkbox"/> 4 Lise <input type="checkbox"/> 5 Üniversite
7.	Hastada son 2 ay içinde parazit saptandı mı?	<input type="checkbox"/> 1 Evet (.....) <input type="checkbox"/> 2 Hayır
8.	Aile bireylerinin birinde son dönemde parazit saptandı mı?	<input type="checkbox"/> 1 Evet (.....) <input type="checkbox"/> 2 Hayır

NOT : (Aşağıdaki bölüm yetkili kişi tarafından doldurulacaktır)

Dışkı kıvamı: 1 Katı 2 Yarı katı 3 Yumuşak 4 Sulu

Diğer özellikler: 1 Kanlı 2 Mukuslu 3 Kötü kokulu

Sonuç:

Mikroskopi (Direkt bakı / Trikrom) :

PZR :

Anal Bant :

7.3 EK-3



T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Sayı :273
Konu: Araştırma Hakkında

16.11.2012

Sn. Doç. Dr. Ali KİLİMCİOĞLU

“Blastocystis spp.’nin dışkı örneklerinde PCR ile saptanması” isimli araştırmanız ile ilgili dilekçeniz incelenmiş; Etik açıdan uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

1. Söz konusu bilimsel çalışmanız onaylandığı başlangıç tarihten itibaren 6 ay içinde başlamaması durumunda Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığına yazılı rapor vermeniz;
2. Araştırmanın isim ve yazarlarının değiştirilmesi talebi durumunda gerekçesi ile birlikte Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığına bildirilmesi ve onay alınması;
3. Araştırmanız yurtiçi ve yurtdışı bir dergide basıldı ise bir örneğinin gönderilmesi gerekmektedir.

Gereğini rica ederim

Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ
Başkan

8. KAYNAKLAR

- 1- Tan TC, Suresh KG. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol Res*, 2006(3); 98:189-93
- 2- Zierdt CH. *Blastocystis hominis*--past and future. *Clin Microbiol Rev*, 1991;4(1):61-79.
- 3- Tan KSW. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):639-65.
- 4- Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(4):563-84.
- 5- Tan KSW, Singh M, Yap EH. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *Int J Parasitol*. 2002;32(7):789-804.
- 6- Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1998;73:203-266
- 7- Stenzel DJ, Boreham RE. *Blastocystis*. Gillette SH, Pearson RD, eds., *Principles and Practise of Clinical Parasitology*. UK: John Wiley&Sons Ltd. 2001:355-368.
- 8- Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E. Molecular Phylogenies of *Blastocystis* Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity, Identification of Species, and Zoonosis. *J Clin Microbiol* 2005;43:348-55.
- 9- Puthia MK, Sio SW, Lu J, Tan KSW. *Blastocystis ratti* induces contactindependent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infect Immun* 2006;74:4114-22.

- 10- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RCA, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG. Terminology for *Blastocystis* subtypes-a consensus. Trends Parasitol 2007; 23: 93-6.
- 11- Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, Steinmann P, Utzinger J, Tong XM, Chen SH, Zhou XN. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. Parasitol Res 2007;102: 83-90
- 12- Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new *Blastocystis* sp. subtype. Int J Parasitol 2009;39:473-9.
- 13- Clark CG. Riboprinting: a tool for the study of genetic diversity in microorganisms. J Eukaryot Microbiol, 1997;44(4):277-283.
- 14- Ho LC, Armiugam A, Jeyaseelan K, Yap EH, Singh M. *Blastocystis* elongation factor-1alpha: genomic organization, taxonomy and phylogenetic relationships. Parasitology, 2000;121(2): 135-44.
- 15- Boreham PFL, Stenzel DJ. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology and epizootiology. Adv. Parasitol. 1993; 32:1-70.
- 16- Zierdt CH, Swan JC. Generation time and growth rate of the human intestinal parasite *Blastocystis hominis*. J. Protozool. 1981;28:483-5.
- 17- Suresh K, Howe J, Ng GC, Ho LC, Ramachandran NP, Loh AK, Yap EH, Singh M. A multiple fission-like mode of asexual reproduction in *Blastocystis hominis*. Parasitol. Res. 1994;80:523-527.
- 18- Dunn LA, Boreham PFL, Stenzel DJ. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. Int. J. Parasitol. 1989;19:43-56.
- 19- Singh M, Suresh K, Ho L C, Ng GC, Yap EH. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. Parasitol. Res. 1995;81:446-50.
- 20- Mehlhorn H. *Blastocystis hominis*, Brumpt, 1912: are there different stages or species?. Parasitol. Res. 1988;74:393-5.

- 21- Stenzel DJ, Boreham PFL. A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. Int J Parasitol. 1991;21:613-15.
- 22- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan KSW, Chen XQ, Yap EH. Development of *Blastocystis hominis* cysts vakuoler forms in vitro. Parasitol. Res. 1999;85:103-8.
- 23- Zaman V, Howe J, Ng ML. Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. Parasitol. Res. 1997;83:306-308
- 24- Zaman V, Howe J, Ng ML. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cyst. Parasitol. Res. 1995;81:465-469.
- 25- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Ng GC, Chen XQ, Yap EH. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. Parasitol. Res. 1996;82:439-444.
- 26- Matsumoto Y, Yamada M, Yashida Y. Light microscopical appearance and ultrastructure of *Blastocystis hominis*, an intestinal parasite of man. Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. 1987;264:379-385.
- 27- Clark GC. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. Mol. Biochem. Parasitol. 1997;87:79-83.
- 28- Stenzel DJ, Boreham PFL, McDougall R. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. Int. J. Parasitol. 1991; 21: 807-812.
- 29- Stenzel DJ, Dunn LA, Boreham PFL. Endocytosis in cultures of *Blastocystis hominis*. Int. J. Parasitol. 1989;19:787-791
- 30- Yamada M, Yoshikavva H, Tegoshi T, Matsumoto Y, Yoshikawa T, Shiota T, Yoshida Y. Light microscopical study of *Blastocystis* spp. In monkes and fovvlus. Parasitol. Res. 1987;73:527-531.
- 31- Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. In: Intestinal Protozoa Amebae. Thirdt Edition American Society for Microbiolgy, Washington DC Press, 1997: 25-30.
- 32- Zierdt CH, Donnolley CT, Muller J, Constantopoulos G. Biochemical and ultrastructural study of *Blastocystis hominis*. J. Clin. Microbiol. 1988;26:965-970.

- 33- Stenzel DJ, Boreham PFL, McDougall R. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *Int. J. Parasitol.* 1991; 21: 807-812.
- 34- Zierdt CH, Tan H. Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in patient with enteric disease. *Z. parasitenkunde.* 1976;50:277-283.
- 35- Tan KSW, Singh M, Ho LC, Howe J, Moe KT, Chen XQ, Ng GC, Yap EH. Survival of *Blastocystis hominis* clones after exposure to a cytotoxic monoclonal antibody. *Int. J. Parasitol.* 1997;27:947-954.
- 36- <http://www.cdc.gov/dpdx/blastocystis/index.html>
- 37- Hirata T, Nakamura H, Kinjo N, Hokama A, Kinjo F, Yamane N, Fujita J. Prevalence of *Blastocystis hominis* and *Strongyloides stercoralis* infection in Okinawa, Japan. *Parasitol. Res.* 2007;101:1717-19.
- 38- Aguiar JI, Goncalves AQ, Sodre FC, Pereira Sdos, R, Boia MN, De Lemos ER, Daher RR. Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40:631-34.
- 39- Rayan HZ, İsmail OA, El Gayar EK. Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. *J Egypt Soc Parasitol* 2007;37:599-608.
- 40- Malatyalı E, Özçelik S. *Blastocystis* spp.'nin İnsandan İzolasyonu ve Besiyerinde Farklı Evrim Şekillerinin İzlenmesi. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2011;35:19-22
- 41- Akdemir C, Helvacı R. Kütahya'da Parazitoloji Laboratuvar sonuçlarının 15 ve üzeri yaş grubunda değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2007; 31: 37-40.
- 42- Atambay M, Karaman Ü, Aycan Ö, Yoloğlu S, Daldal N. Akşemseddin işitme engelliler okulu öğrencilerinde bağırsak parazitleri ve baş biti görülme sıklığı. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2007;31:62-5.
- 43- Çelik T, Daldal N, Karaman Ü, Aycan MÖ, Atambay M. Malatya ili merkezinde üç ilköğretim okulu çocuklarında bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2006;30:35-8.

- 44- Yazıcı V, Sırıken F, Ertabaklar H, Ertuğ S. Aydın il merkezindeki hastanelerde çalışan mutfak personeline bağırsak parazitlerinin araştırılması. Türkiye Parazitol Derg 2007;31:136-8.
- 45- Özyurt M, Kurt Ö, Mølbak K, Nielsen HV, Haznedaroğlu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. Parasitol. Int. 2008;57:300-6.
- 46- Özçakir O, Güreser S, Ergüven S, Yılmaz YA, Topaloğlu R, Haşçelik G. Characteristics of *Blastocystis hominis* infection in a Turkish university hospital. Turkiye Parazitol. Derg. 2007;31:277-82.
- 47- Leder KM, Hellard E, Sinclair MI, Fairley CK, Wolfe R. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. J. Gastroenterol Hepatol. 2005;20:1390-94.
- 48- Tungtrongchitr A, Manatsathit S, Kositchaiwat C, Ongrotchanakun J, Munkong N, Chinabutr P, Leelakusolvong S, Chaicumpa W. *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel syndrome patients. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2004;35:705-10.
- 49- Andıran N, Açıkgöz ZC, Türkay S, Andıran F. *Blastocystis hominis*, an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. J. Pediatr. Surg. 2006;41:1489-91.
- 50- Yakoob J, Jafri W, Jafri N, Khan R, Islam M, Beg MA, Zaman V. Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2004;70:383-5.
- 51- Yakoob J, Jafri W, Jafri N, Islam M, Asim Beg M. In vitro susceptibility of *Blastocystis hominis* isolated from patients with irritable bowel syndrome. Br. J. Biomed. Sci. 2004;61:75-7.
- 52- Böhm-Glönig B, Knobloch J, Walderich B. Five subgroups of *Blastocystis hominis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. Trop. Med. Int. Health. 1997;2:771-778.
- 53- Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Isekı M, Ali IK, Hossain MB, Zaman V, Haque R, Takahashi Y. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. Parasitol. Res. 2004;92:22-29.

- 54- Kaneda Y, Horikı N, Cheng XJ, Fujita Y, Maruyama M, Tachibana H. Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2001; 65:393-6.
- 55- Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, Luo X, Chen G. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. Parasitol. Res. 2006;99:597-601.
- 56- Doğruman-Al F, Dağcı H, Yoshikawa H, Kurt Ö, Demirel M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. Parasitol. Res. 2008;103: 685-689.
- 57- Markell EK, Udkow MP. *Blastocystis hominis*: pathogen or fellow traveler? Am J Trop Med Hyg, 1986;35(5): 1023-1026.
- 58- Müller RA, Minshevv BH. *Blastocystis hominis*: an organism in search of a disease. Rev. Inf. Dis. 1988;10:930-8.
- 59- Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J. Clin. Microbiol. 1990;28: 116-21.
- 60- Senay H, MacPherson D. *Blastocystis hominis*: epidemiology and natural history. J. Inf. Dis. 1990;162:987-990.
- 61- Koutsaulis AT, Valiquette L, Allard R, Soto J. *Blastocystis hominis*: A new pathogen in day-care centres? Canada Communicable Disease Report. 2001;27(9):76-89.
- 62- Jelinek T, Peyerl G, Loscher T, Von Sonnenburg F, Nothdurft HD. The role of *Blastocystis hominis* as a possible intestinal pathogen in travellers. J. Infect. 1997;35:63-66
- 63- Lee MJ. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J. Clin. Microbiol. 1991;29:2089.
- 64- İnceboz T, Üner A. *Blastocystis hominis*' in Epidemiyolojisinin Araştırılması. Türkiye Parasitol Derg. 2001;25(2):135-138.
- 65- Windsor JJ, Whiteside TM, Chalmers RM, Thomas AL, Joynson DHM. *Blastocystis hominis*: a common yet neglected human parasite. Brit. J. Biomed. Sci. 2001;58:129-30.
- 66- Ok ÜZ, Üner A, Korkmaz M. Immun yetmezlikte önemi olan paraziter hastalıkları. In: Blastocystosis, Özcel MA eds. Türkiye Parazitoloji Yayını No: 12, Bornova-İzmir, 1995:43-49.

- 67- Brites C, Barberino MG, Bastos MA, Sampaio SaM, Silva N. *Blastocystis hominis* as a potential cause of diarrhea in AIDS patients: a report of six cases in Bahia. Brazil, Braz. J. Infect. Dis. 1997;1:91-4.
- 68- Cirioni O, Giacometti A, Drenaggi D, Ancarani F, Scalise G. Prevalance and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. Eur. J. Epidemiol. 1999;15:389-393.
- 69- Taşova Y, Şahin B, Koltas S, Poydas S. *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. Açta. Med. Okoyama. 2000;54:133-36.
- 70- Gödekmerdan A. Sağlık Ocağına Başvuran Hastalarda *Blastocystis hominis*'in Görülme Sıklığı ve Gastro-intestinal Şikayetlerle İlişkisi, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 1995.
- 71- Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, Thathaisong U, Nimmanon T, Taamasri P, Mungthin M. The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. Parasitol. Res.2004;93:445-447.
- 72- Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNABased methods: a comparative study. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2007;59:303-7.
- 73- Giacometti A, Cirioni O, Fiorentini A, Fortuna M, Scalise G. Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1999;18:436-39.
- 74- Kain KC, Noble MA, Freeman HJ, Barteluk RL. Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1987;8:235-44.
- 75- Kaya S, Çetin E, Arıdoğan B, Arıkan S, Demirci M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. Turkiye Parazitol. Derg. 2007;31:184-7.
- 76- Moghaddam DD, Ghadirian E, Azami M. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/ sulfamethoxazole. Parasitol. Res. 2005;96:273-75.

- 77- Ok UZ, Girginkardeşler N, Balcıoğlu C, Ertan P, Pırıldar T, Kilimcioğlu AA. Effect of trimethoprim-sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. Am. J. Gastroenterol. 1999;94:3245-47.
- 78- Sheehan DJ, Raucher BG, Mckitrick JC. Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. J. Clin. Microbiol. 1986;24:548-50.
- 79- Kukoschke KG, Necker A, Muller HE. Detection of *Blastocystis hominis* by direct microscopy and culture. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1990;9(4):305-307.
- 80- Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M. In vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. Ann Trop Med Parasitol, 2002;96(8):803-807.
- 81- Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2004;23:509-11.
- 82- Tan KSW, Ng GC, Quek E, Howe J, Ramachandran NP, Yap EH, Singh M. *Blastocystis hominis*: a simplified, high-efficiency method for clonal growth on solid agar. Exp. Parasitol. 2000;96:9-15.
- 83- Zierdt CH, Zierdt WS, Nagy B. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. J. Parasitol. 1995;81:127-9.
- 84- Kaneda Y, Horiki N, Cheng X, Tachibana H, Tsutsumi DY. Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. Tokai J. Exp. Clin. Med. 2000;25:51-6.
- 85- Persing HD. Polymerase chain reaction: Trends to benches. J Clin Microbiol, 1991;29:1281-85.
- 86- Prichard R, Tait A. The role of molecular biology in veterinary parasitology. Vet Parasitol, 2001;98:169-94.
- 87- McPherson MJ, Moller SG. The Basic of PCR. New York:New York BIOS Scientific publisher Limited. 2000;1-45.
- 88- Jones MS, Ganac RD, Hiser G, Hudson NR, Le A, Whipps CM. Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. Parasitol. Res. 2008;103: 551-557.

- 89- Nigro L, Larocca L, Massarelli L, Patamia I, Minniti S, Palermo F, Cacopardo B. A placebo-controlled treatment trial of *Blastocystis hominis* infection with metronidazole. J. Travel. Med. 2003;10:128-30.
- 90- Pasqui AL, Savini E, Saletti M, Guzzo C, Puccetti L, Auteri A. Chronic urticaria and *Blastocystis hominis* infection: a case report. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2004;8:117-20.
- 91- Rossignol JF, Kabil SM, Said M, Samir H, Younis AM. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis hominis*. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2005;3:987-91.
- 92- Zierdt CH, Swan JC, Hosseini J. In vitro response of *Blastocystis hominis* to antiprotozoal drugs. J. Protozool. 1983;30:332-34.
- 93- CDC. Drugs for parasitic infections. The Medical Letter. 2004;46(1189):e1-12.
- 94- Korkmaz M. Ok Ü.Z. Parazitolojide laboratuvar yöntem, yorum, akreditasyon. Kilimcioğlu A.A. Ok Ü.Z, ed; Makroskobik İnceleme ve Taze Dışkı İncelemeleri. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 23, 2011:17-22.
- 95- Korkmaz M. Ok Ü.Z. Parazitolojide laboratuvar yöntem, yorum, akreditasyon. Kilimcioğlu A.A. Ok Ü.Z, ed; Yoğunlaştırma Yöntemleri. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 23, 2011:23-28.
- 96- Korkmaz M. Ok Ü.Z. Parazitolojide laboratuvar yöntem, yorum, akreditasyon. Girginkardeşler N. Ok Ü.Z, ed; Kalıcı Boyalı Yayımlar. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 23, 2011:29-35.
- 97- Özçakır O, Güreser S, Ergüven S, Akyön Yılmaz Y, Topaloğlu R, Hasçelik G. Türkiye'deki bir üniversite hastanesinde *Blastocystis hominis* enfeksiyonunun karakteristiği. Turkiye Parazitol Derg 2007;31: 277-82.
- 98- Amin OM. The epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. Res J Parasitol 2006;1:1-10.
- 99- Nascimento SA, Moitinho Mda L. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga City, Paraná State, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 2005;47:213-7.

- 100- Rhongbutsri P. Seasonal Prevalence of *Blastocystis hominis* among patients attending Thammasat Chalermprakit Hospital, Pathum Thani Province, Thailand. J Trop Med Parasitol 2005;28:39-42
- 101- Cheng HS, Haung ZF, Lan WH, Kuo TC, Shin JW. Epidemiology of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a Vietnamese female immigrant population in Southern Taiwan. Kaohsiung J Med Sci 2006;22:166-70.
- 102- Köksal F, Başlantı I, Samasti M. A retrospective evaluation of the prevalence of intestinal parasites in Istanbul, Turkey. Türkiye Parazitoloj Derg 2010;34:166-71.
- 103- Gülmez D, Sarıbaş Z, Akyon Y, Erguven S. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı 2003-2012 Yılları Sonuçları: 10 Yıllık Değerlendirme. Türkiye Parazitoloj Derg 2013;37:97-101.
- 104- İnceboz T, Usluca S, Över L, Yalçın G, Tuncay S, Özkoç S. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne 2005-2009 Yılları Arasında Başvuran Olgularda *Blastocystis hominis* Epidemiyolojisinin Araştırılması. Türkiye Parazitoloj Derg 2011;35:72-6.
- 105- Doğan N, Demirüstü C, Aybey A. Eskişehir Osmangazi Üniversitesinin Beş Yıllık Bağırsak Paraziti Prevalansının Türlerine ve Cinsiyetlere Göre Dağılımı. Türkiye Parazitoloj Derg 2008;32(2):120-5.
- 106- Düzyol D, Kilimcioğlu AA, Cengiz Özyurt B, Özkan H, Girginkardeşler N. Celal Bayar Üniversitesi Hastanesi Parazitoloji Polikliniği'nde 2006-2010 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin İnsidansı. Türkiye Parazitoloj Derg 2012;36:147-51.
- 107- Tamer GS, Çalışkan S, Willke A. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazitoloj Derg 2008;32:126-9.
- 108- Çulha G. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazitoloj Derg 2006;30:302-4.
- 109- Alver O, Oral B, Töre O. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine 2005-2008 Yılları Arasında Başvuran Kişilerde Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitoloj Derg 2011;35:194-8

- 110- Usluca S, Yalçın G, Over L, Tuncay S, Sahin S, Inceboz T, Aksoy U. The distribution of intestinal parasites detected in the Dokuz Eylul University Medical Faculty Hospital between 2003 and 2004. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2006;30:308-12.
- 111- Hamamcı B, Çetinkaya Ü, Delice S, Erçal BD, Gücüyetmez S, Yazar S. Kayseri-Hacılar'da İlköğretim Okulu Öğrencilerinde Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2011;35:96-9
- 112- Doğruman-Al F, Hökelek M. *Blastocystis hominis* fırsatçı bir patojen mi? *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2007;31:28-36.
- 113- De Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, van Leeuwen NJ, Vinje J, van Duynhoven YT. Etiology of gastroenteritis in sentinel general practices in the Netherlands. *Clin Infect Dis* 2001;33:280-8.
- 114- Kaya S, Sesli Çetin E, Akçam Z, Kesbiç H, Demirci M. *Entamoeba coli* ve *Blastocystis hominis* saptanan olgularda klinik semptomlar. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2005;29:229-31.
- 115- Cassano N, Scoppio BM, Loviglio MC, Vena GA. Remission of delayed pressure urticaria after eradication of *Blastocystis hominis*. *Acta Derm Venereol* 2005;85:357-8.
- 116- Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M. *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome Criteria. *Parasitol Res* 2010;107:679-84.
- 117- Forton F, Germaux MA, Brasseur T. Demodicosis and rosacea: epidemiology and significance in daily dermatologic practice. *J Am Acad Dermatol* 2005;52:74-87.
- 118- Vidal AMB, Catapani WR. Enzyme Linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *Sao Paulo Med J* 2005;123:282-5.
- 119- Parija SC, Srinivasa H, Viewpoint: The neglect of stool microscopy for intestinal parasites and possible solutions. *Tropical Medicine and International Health* 1999;4:522-4
- 120- Menounosa PG, Spanakos G, Tegosa N, Vassalou CM, Papadopoulou C, Vakalis NC. Direct detection of *Blastocystis* spp. in human faecal samples and subtype assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing. *Molecular and Cellular Probes* 2008;22:24-29

121- Hoevers J, Holman P, Logan K, Hommel M, Ashford R, Snowden K. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis hominis* isolates from geographically diverse human hosts. Parasitol Res, 2000;86(1):57-61.

