

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ (TIP) DOKTORA PROGRAMI**

TPR-2017-0001

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ, TIP FAKÜLTESİ
PARAZİTOLOJİ LABORATUVARINDA İZOLE EDİLEN
BLASTOCYSTIS ALT TIPLERİNİN SEKANSLAMA YÖNTEMİ
İLE BELİRLENMESİ**

ERDOĞAN MALATYALI

DOKTORA TEZİ

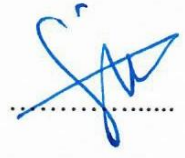

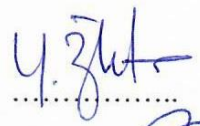
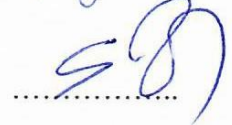

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sema ERTUĞ**

AYDIN-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji (Tıp) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Erdoğan MALATYALI tarafından hazırlanan “Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarında İzole Edilen *Blastocystis* Alt tiplerinin Sekanslama Yöntemi ile Belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14/07/2017

Üye (T.D.)	: Prof. Dr. Sema ERTUĞ	Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi	
Üye	: Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR	Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi	
Üye	: Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL	Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi	
Üye	: Prof. Dr. Seray TÖZ	Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi	
Üye	: Doç. Dr. Bülent ERTUĞRUL	Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi	

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında ve gerçekleŐtirilmesinde emeklerini esirgemeyen, değerli bilgi ve birikimlerinden faydalandığım başta tez danıŐmanım ve Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam Prof. Dr. Sema ERTUęĐ'a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım. Aynı Şekilde, tezin hazırlanmasında değerli bilgilerinden faydalandığım kıymetli hocam Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR'a teşekkür ederim.

Ayrıca Parazitoloji laboratuvarında örneklerin toplanmasındaki değerli katkılarından dolayı Dr. Serçin Özlem ÇALIŞKAN ve laboratuvar teknisyenimiz Kerim ÇOLAK'a teşekkür ederim. Tez yazım sürecinde manevi desteğini esirgemeyen sevgili eŐim Kübra MALATYALI'ya da teŐekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma	3
2.2. Morfoloji	4
2.2.1. Vakuoler Form	5
2.2.2. Granüler Form	6
2.2.3. Amoeboid Form	6
2.2.4. Kist Formu	7
2.2.5. Avakuoler ve Multivakuoler Form	7
2.3. Biyoloji	8
2.4. Yaşam Döngüsü	10
2.5. Genetik Çeşitlilik ve Alt Tipler	11
2.6. Patogenez	13
2.7. Klinik Bulgular	15
2.8. Tanı	17
2.8.1. Direkt Mikroskopik İnceleme	17
2.8.2. Çoklaştırma Yöntemleri	18
2.8.3. Kültür Yöntemleri	18
2.8.4. Seroloji Temelli Yöntemler	19
2.8.5. Moleküler Yöntemler	20
2.9. Epidemiyoloji	21
2.10. Tedavi	23

2.11. Korunma	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Dışkı Örnekleri ve Olguların Seçilmesi	26
3.2. Dışkı Örneklerinin Direkt Mikroskopi Yöntemiyle İncelenmesi	26
3.2.1. Lugol'ün İyodin Çözeltilisi	26
3.3. Kültür Yöntemiyle <i>Blastocystis</i> Araştırılması	27
3.3.1. Jones Besiyeri	27
3.4. DNA İzolasyonu	28
3.4.1. Dışkı Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu	28
3.4.2. Kültürlerden Genomik DNA İzolasyonu	29
3.5. <i>Blastocystis</i> SSU rDNA Geninin PZR ile Kısmi Olarak Çoğaltılması ve Dizilenmesi ...	30
3.6. Direkt Mikroskopi, Kültür ve PZR Yöntemlerinin Karşılaştırılması	30
3.7. <i>Blastocystis</i> Kısmi SSU rRNA Geninin Dizilenmesi ve Alt Tiplerin Belirlenmesi	31
3.8. STS-PZR ve Alt Tiplerin Belirlenmesi	32
3.9. <i>Blastocystis</i> SSU rDNA Dizilerinin Genetik Uzaklıklarının Belirlenmesi	33
3.10. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
4.1. Dışkı Örnekleri ve Olgular	34
4.2. <i>Blastocystis</i> Kültürü	35
4.3. DNA İzolasyonları ve SSU rDNA-PZR	36
4.4. Tanıda Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması	37
4.5. Kısmi SSU rDNA Ürünlerinin Dizilenmesi	39
4.6. Kısmi SSU rDNA Dizilerine göre <i>Blastocystis</i> Alt Tipleri	39
4.7. Sekanslama ile Alt Tipi Belirlenmeyen Örneklerin STS-PZR Sonuçları	41
4.8. Dışkıdan ve Kültürden DNA İzolasyon ve <i>Blastocystis</i> Alt Tipleri	42
4.9. <i>Blastocystis</i> Alt Tiplerinin Toplu Halde Değerlendirilmesi	44
4.10. <i>Blastocystis</i> Kısmi SSU rDNA Dizilerinin Filogenetik Analizi	45
4.11. Demografik Özellikler ve Semptomların Analizi	47
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	85
KAYNAKLAR	87
EKLER	108
ÖZGEÇMİŞ.....	109

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	: Kazanılmış immün yetmezlik sendromu
BLAST	: <i>Basic local alignment search tool</i>
DM	: Direkt mikroskopi
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
dNTP	: Deoksinukleozit tri-fosfat
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent testi
FCS	: Fötal buzağı serumu
FECT	: Formalin eter konsantrasyon tekniği
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
IBS	: İrritabl bağırsak sendromu
IFA	: İndirekt floresan antikor testi
IgA	: Immüoglobulin A
IgG	: Immüoglobulin G
IL	: İnterlökin
INOS	: İndüklenebilir Nitrik oksit sentaz
MLST	: Çoklu lokus sekans tiplendirme
PFGE	: Darbeli alan jel elektroforezi
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Random amplifikasyon polimorfik DNA
RNA	: Ribo Nükleik asit
ROCK	: Rho ilişkili kinaz
RT-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SSU- rRNA	: Küçük-alt ünite ribozomal RNA
ST	: Alt tip
STS-PZR	: <i>Sequence tagged site</i> -PZR
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
ÜK	: Ülseratif kolit
TCA	: Trikarboksilik asit
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
TLR	: Toll benzeri reseptör
XIVC	: Ksenik in vitro kültür

TMP-SMX : Trimethoprim-sulfametoksazol

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Blastocystis</i> yaşam döngüsü	13
--	----

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1. Direkt mikroskopik incelemede görülen <i>Blastocystis</i> 'ler	34
Resim 4.2. Jones besiyerinde üreyen <i>Blastocystis</i> 'lere ait mikroskop görüntüleri	35
Resim 4.3. Bazı örneklerin SSU rDNA-PZR sonuçlarına ilişkin agaroz jel görüntüsü	36
Resim 4.4. <i>Blastocystis</i> SSU rDNA dizilerinin sıralanması	40
Resim 4.5. <i>Blastocystis</i> kısmi SSU rDNA dizilerinden birine ait kromatogram dosyası	40
Resim 4.6. <i>Blastocystis</i> veri tabanında ST3 ile tam uyum gösteren kısmi SSU rDNA	41
Resim 4.7. <i>Blastocystis</i> veri tabanında her hangi bir ST ile tam uyum göstermeyen kısmi SSU rDNA dizisi	41
Resim 4.8. Bazı örneklerin STS-PZR sonuçlarına ilişkin agaroz jel görüntüsü	42
Resim 4.9. Aynı örneğin dışkıdan direkt ve kültür sonrası DNA örneklerinden elde edilen SSU rDNA dizilerinin karşılaştırılması	42
Resim 4.10. Kısmi SSU rDNA dizilerinin evrimsel uzaklıkları	46

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Bazı ülkelerden bildirilen <i>Blastocystis</i> yaygınlıkları	22
Tablo 2.2. <i>Blastocystis</i> tedavisinde karşılaştırmalı çalışmalar	24
Tablo 3.1. <i>Blastocystis</i> SSU rDNA kısmi amplifikasyonu için PZR döngüsü	30
Tablo 3.2. Tanı yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerlerinin hesaplanması	31
Tablo 3.3. STS-PZR için kullanılan primer çiftleri	32
Tablo 3.4. <i>Blastocystis</i> STS-PZR döngüsü	33
Tablo 4.1. DM ve kültür sonuçları	35
Tablo 4.2. DM ve SSU rDNA-PZR sonuçları	37
Tablo 4.3. Kültür ve SSU rDNA-PZR sonuçları	37
Tablo 4.4. Tanı yöntemlerinin bir arada değerlendirilmesi	38
Tablo 4.5. DM yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde kültür ve SSU rDNA-PZR yöntemlerinin değerleri	38
Tablo 4.6. Kültür yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde DM ve SSU rDNA-PZR yöntemlerinin değerleri	38
Tablo 4.7. SSU rDNA-PZR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde DM ve kültür yöntemlerinin değerleri	39
Tablo 4.8. DNA izolasyon yöntemleri ve alt tipler	43
Tablo 4.9. <i>Blastocystis</i> alt tiplerinin dağılımı	44
Tablo 4.10. Alt tipleri belirlenen <i>Blastocystis</i> izolatlarının yöntemlere göre dağılımı	45
Tablo 4.11. <i>Blastocystis</i> saptanan ve saptanmayan olguların cinsiyet, yaş, yaşadıkları idari birim açısından karşılaştırılması	47
Tablo 4.12. <i>Blastocystis</i> saptanan ve saptanmayan olguların karşılaştırılması	48
Tablo 4.13. <i>Blastocystis</i> alt tipleri ve semptomların dağılımı	48
Tablo 5.1. <i>Blastocystis</i> tanısında farklı yöntemlerin değerlendirildiği çalışmalar	57
Tablo 5.2. Farklı ülkelerde <i>Blastocystis</i> alt tiplerinin dağılımı	68
Tablo 5.3. Türkiye’de <i>Blastocystis</i> alt tiplerinin araştırıldığı çalışmalar	74
Tablo 5.4. <i>Blastocystis</i> saptanan olgularda bildirilen semptomlar	81

ÖZET

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ, TIP FAKÜLTESİ PARAZİTOLOJİ LABORATUVARINDA İZOLE EDİLEN *BLASTOCYSTIS* ALT TIPLERİNİN SEKANSLAMA YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Malatyalı E. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Programı Doktora Tezi, Aydın, 2017

Bu çalışmanın başlıca amacı Adnan Menderes Üniversitesi, Eğitim ve Uygulama Hastanesi, Parazitoloji Laboratuvarı'nda saptanan *Blastocystis* izolatlarının alt tip dağılımını belirlemektir. Ayrıca *Blastocystis*'in laboratuvar tanısında direkt mikroskopik inceleme (DM), kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemlerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Son olarak *Blastocystis* enfeksiyonu ve klinik bulgular arasında retrospektif bir analiz yapılması hedeflenmiştir.

Çalışmanın başlangıcında direkt mikroskopik inceleme sonuçlarına göre toplam 200 dışkı örneği (100 pozitif ve 100 negatif) seçilmiştir. Tüm dışkı örnekleri Jones besiyerine ekilmiş ve PZR yöntemiyle çalışılmıştır. Ribozomal RNA küçük alt ünite (SSU rRNA) geni kısmi sekanslarına göre *Blastocystis* alt tipleri (dışkı örneklerinin tamamında ve kültür pozitif izolatların bir kısmında) belirlenmiştir. Bu şekilde alt tipi belirlenemeyen örnekler *sequence tagged site*-PZR (STS-PZR) ile tekrar çalışılmıştır. Son olarak *Blastocystis* saptanan ve saptanmayan olgular arasında demografik özellikler ve klinik bulgular karşılaştırılmıştır. Ayrıca alt tipler ve klinik bulgular değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda DM yöntemiyle pozitif 100 dışkı örneğinin 81'inde (%81) kültür yöntemiyle, 86'sında (%86) ise PZR yöntemiyle pozitiflik saptanmıştır. Aynı yöntemle negatif saptanan 100 dışkı örneğinin beşinde (%5) kültür yöntemiyle, yedisinde (%7) PZR ile pozitif sonuç elde edilmiştir. Sekans analizi ve STS-PZR sonucu toplam 95 örnekte *Blastocystis* alt tipi belirlenmiş olup *Blastocystis* alt tip dağılımı: ST3 (n=50, %52,6), ST2 (n=21, %22,1), ST1 (n=17, %17,9), ST7 (n=4, %4,2), ST2+ST3 (n=2, %2,1) ve ST1+ST3 (n=1, %1,1) şeklinde bulunmuştur. *Blastocystis* saptanan ve saptanmayan olgularda semptomların görülme sıklığı açısından farklılık saptanmamıştır. Benzer şekilde semptomlar ile alt tipler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Blastocystis rutin laboratuvar tanısında direkt mikroskopi yöntemi, hem yalancı pozitiflik hem de yanlış negatif sonuçlara neden olması nedeniyle yetersiz görülmekte olup kültür veya PZR gibi ikinci bir yöntemde tanıda kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir. Aydın'daki alt tip dağılımı hem dünya genelindeki hem de ülkemizdeki çalışmalarla örtüşmektedir. *Blastocystis* ve semptomlar arasında ilişki bulunmaması *Blastocystis* kolonizasyonunun daha çok normal flora ile ilgili olduğu fikrini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: *Blastocystis*, alt tip, tanı yöntemleri, sekanslama, Aydın

ABSTRACT

THE IDENTIFICATION OF *BLASTOCYSTIS* SUBTYPES BY SEQUENCING IN ADNAN MENDERES UNIVERSITY, FACULTY OF MEDICINE PARASITOLOGY LABORATORY

Malatyali E. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Parasitology Programme Thesis of Doctorate, Aydin, 2017

The aim of this study was to determine subtype distribution of *Blastocystis* isolates from Adnan Menderes University, Parasitology Laboratory. Moreover, it was aimed to evaluate direct microscopy (DM), culture and polymerase chain reaction (PCR). Finally, we aimed to analyse clinical findings in relation to *Blastocystis* infection, retrospectively.

A total of 200 faecal samples were selected with DM (100 positive and 100 negative). All were cultured and studied with PCR. Subtypes were determined by sequencing of the partial small sub-unit ribosomal RNA gene of *Blastocystis* (all of faecal samples and some of culture positives). The samples, which were not able to be subtyped by sequencing were further studied with sequence tagged site-PCR (STS-PCR). Finally, the clinical findings between *Blastocystis* infected and non-infected cases as well as subtypes were compared.

Of the 100 DM positive samples 81 (81%) were positive with culture and 86 (86%) were positive with PCR. Additionally, positivity was five (5%) and seven (7%) with culture and PCR in DM negative group, respectively. Subtypes of 95 isolates were determined by sequencing or STS-PCR, the distribution was as follows: ST3 (n=50, 52,6%), ST2 (n=21, 22,1%), ST1 (n=17, 17,9%), ST7 (n=4, 4,2%), ST2+ST3 (n=2, 2,1%) and ST1+ST3 (n=1, 1,1%). There was no statistically significant difference between *Blastocystis* positive and negative groups in terms of any symptoms and also subtypes.

In conclusion, direct microscopy seems to be an ineffective method for *Blastocystis* diagnosis as it causes false negativity and positivity. Thus it would be useful to use additional diagnostic tools such as culture or PCR. The subtype distribution of *Blastocystis* in Aydin was in accordance with the previous data, globally. Finally, our clinical findings support the idea of asymptomatic colonization of *Blastocystis* in human gut and being a flora member.

Key words: *Blastocystis*, subtype, diagnostic methods, sequencing, Aydin

1. GİRİŞ

Blastocystis intestinal yerleşimli, anaerobik bir protozoon olup insanlarda ve diğer birçok canlı türünde görülmektedir. Uzun süren sınıflandırma çalışmaları sonucunda *Blastocystis*'in, fotosentetik alglerin ve heterotrofik protistlerin yer aldığı Stramenopiles (Heterokonta) grubunda yer aldığı bildirilmiştir (Silberman ve ark, 1996). Bu grupta yer alan mikroorganizmalar arasında insanda yerleşebilen tek tür olmasının yanı sıra yaşam döngüsünde kamçılı bir formun bulunmaması *Blastocystis*'i bu gruptaki diğer organizmalardan ayırmaktadır (Tan, 2008).

Blastocystis küresel bir dağılıma sahip olup birçok çalışmada insan dışı örneklerinde en sık rastlanan intestinal protozoon olarak bildirilmiştir (Stensvold ve Clark, 2016). *Blastocystis* prevalansı gelişmemiş ülkelerde gelişmiş ülkeler göre daha yüksek olup bu ülkelerde %100'e varan görülme oranları rapor edilmiştir (El Safadi ve ark, 2014). Türkiye'de yapılan çalışmalarda *Blastocystis* görülme sıklığı %1,4-%23,5 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (Çelik ve ark, 2006; Hamamcı ve ark, 2011; Tüzemen ve Doğan, 2014).

Uzun yıllardır bilinen bir mikroorganizma olmasına karşın *Blastocystis*' in patojenitesi, gastrointestinal semptomlarla ilişkisi, genetik çeşitliliği, yaşam döngüsü, tanısı ve tedavisi ile ilgili çok sayıda bilinmeyen nokta bulunmaktadır (Wawrzyniak ve ark, 2013). *Blastocystis* bazı çalışmalarda patojen, bazılarında fırsatçı patojen ve bazılarında da apatojen bir mikroorganizma olarak tanımlanmıştır. *Blastocystis* enfeksiyonlarının yüksek oranda asemptomatik seyrettiği, enfekte olguların çok küçük bir kısmında gastrointestinal semptomların görüldüğü bildirilmiştir (Mingmongkol ve ark, 2015). Ayrıca *Blastocystis*' in sağlıklı bir bağırsak florasının bir göstergesi olabileceği öne sürülmüştür (Scanlan ve ark, 2014). Semptomatik *Blastocystis* enfeksiyonlarında görülen ishal, karın ağrısı, şişkinlik gibi non-spesifik gastrointestinal semptomların yanı sıra dermatolojik semptomların da görülebildiği birçok araştırmada ifade edilmiştir (Pasqui ve ark, 2004). Günümüzde, *Blastocystis* patojenitesinin konağın yanı sıra *Blastocystis*'in genetik ve biyolojik özelliklerine bağlı olarak değişen çok faktörlü, karmaşık bir fenomen olduğu bu nedenle patojeniteyi tek bir özellik üzerinden açıklamanın mümkün olmadığı düşünülmektedir (Stensvold ve Clark, 2016).

İnsanın yanı sıra birçok canlıda görülebilen *Blastocystis*' in oldukça polimorfik bir genoma sahip olduğu, moleküler filogenetik analizlerle alt tip (ST) olarak adlandırılan çok sayıda genotipinin bulunduğu bilinmektedir. *Blastocystis* alt tiplerinin belirlenmesinde yaygın

tercih edilen iki yaklaşımdan ilki küçük-alt ünite ribozomal RNA kodlayan genin (SSU-rRNA) kısmen sekanslanması olup diğeri de alt tiplere özgü primerlerin kullanıldığı “sequence tagged site polimerase chain reaction” (STS-PZR) yöntemidir (Stensvold, 2013a). Alt tiplerin belirlenmesinde *Blastocystis*’li olgularda izolatların alt tiplerine bağlı olarak farklı klinik tabloların ortaya çıkabileceği bildirilmiş olmakla birlikte literatürde bu konuda tartışmalı sonuçlar bulunmaktadır (Tan, 2008). Alt tiplerin belirlenmesini hedefleyen çalışmalar sonucunda *Blastocystis*’in zoonotik karakterli bir protozoon olduğu ayrıca konak özgülüğünün alt tipler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Parkar ve ark, 2007; Alfellani ve ark, 2013a). Dünya genelinde alt tiplerin dağılımı konusunda yeterince bilgi sahibi olunmamakla birlikte bazı alt tiplerin belirli bölgelerde daha yaygın görüldüğü yönünde bulgular yer almaktadır (Stensvold ve Clark, 2016).

Blastocystis tanısı birçok rutin laboratuvarı için karmaşık bir işlem olarak görülmekte olup yaygın olarak mikroskopi ve kültür yöntemleri kullanılarak yapılmaktadır (Santos ve Rivera, 2013). Ancak kist formların küçük boyutları nedeniyle gözden kaçırılabilmesi, dışkıda *Blastocystis* ile karışabilecek canlı veya cansız elemanların bulunması mikroskobik tanıyı zorlaştırmaktadır (Tan, 2008). Kültür yöntemlerinde karşılaşılan zorlukların başında ise bazı *Blastocystis* izolatlarının kültürde çoğalmaması gösterilmektedir (Parkar ve ark, 2007). Son yıllarda *Blastocystis*’in laboratuvar tanısında başta PZR olmak üzere moleküler yöntemlerin kullanımının yaygınlaşması hem geleneksel tanı yöntemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesine hem de *Blastocystis*’in moleküler epidemiyolojisinin anlaşılmasına önemli katkılar sağlamıştır (Roberts ve ark, 2011).

Bu çalışmanın temel amacı Adnan Menderes Üniversitesi, Eğitim ve Uygulama Hastanesi, Parazitoloji Laboratuvarı’na gönderilen dışkı örneklerinde saptanan *Blastocystis* izolatlarının alt tip dağılımını belirlemektir. Bununla birlikte dışkıdan veya kültürden DNA izolasyonunun alt tiplerin belirlenmesine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. *Blastocystis* enfeksiyonunun tanısında kullanılan üç farklı yöntemin (direkt mikroskobik inceleme, kültür ve PZR) değerlendirilmesi çalışmamızın diğeri bir amacdır. Son olarak *Blastocystis* enfeksiyonu ve klinik bulgular arasındaki ilişkinin retrospektif olarak değerlendirmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Literatürde daha eski dönemlere ait bazı kayıtlar olmakla birlikte *Blastocystis*, bilimsel olarak ilk kez 1911 yılında, patojen olmayan bir maya türü veya dejenere olmuş bir protozoon kisti olarak Alexeieff tarafından tanımlanmış olup *B. enterocola* olarak isimlendirilmiştir. O yıllarda sıçan, kobay, tavuk, sürüngen ve sülüklerden *Blastocystis* izole edilmiştir (Zierdt, 1991). Araştırmacılar *Blastocystis* üzerine ayrıntılı morfolojik gözlemler yapmış, aynı zamanda basit bir yaşam döngüsü de ortaya koymuştur (Stenzel ve Boreham, 1996). Taksonomik olarak Schizosaccharomyces grubuna yerleştirilen *Blastocystis*, izole edildiği konaklara göre farklı şekillerde isimlendirilmiştir. Bu yaklaşımın temelinde, farklı konaklarda yerleşen farklı *Blastocystis* türlerinin bulunduğu fikri yatmakta olup insanlardan elde edilen izolatların *B. hominis* olarak adlandırılması önerilmiştir (Zierdt, 1973). Ancak *Blastocystis*'in izole edildiği konağa (*B. ratti*, *B. anseri* vb.) göre isimlendirilmesinin konak özgüllüğü, hücre biyolojisi ve patojenite gibi konularda karmaşaya neden olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark, 1997). *Blastocystis*'in mantar olarak düşünülmesinin nedeni taze dışkı örneklerinde çekirdeklerinin görülmemesi, mantarlar gibi şeffaf bir görünüme sahip olması, amipler gibi yalancı ayaklarının olmaması, kist formunun gösterilememesi, hareketsiz olması ve protozoonlara göre boyutlarının çok daha fazla değişkenlik göstermesi olarak bildirilmiştir. Aslında basit ikiye bölünme şeklinde olan çoğalması da araştırmacılar tarafından tomurcuklanma olarak algılanmıştır (Zierdt, 1991). *Blastocystis*'in protozoon olarak tanımlanması, Zierdt'in 1967 yılındaki morfolojik ve fizyolojik çalışmaları sonucunda gerçekleşmiştir. Bu gözlemler: bir veya daha fazla çekirdeğinin olması, düz ve granüllü endoplazmik retikuluma, golgiye sahip olması, mantar besiyerlerinde çoğalmaması, anti-fungal ilaçlara duyarsız olmasında karşın anti-protozoal ilaçlara duyarlılık göstermesi olarak bildirilmiştir (Zierdt ve ark, 1967). Elektron mikroskobu ile 1990'lı yıllardaki çalışmalarda ultra-yapısal özellikleri incelenmiş ve hücre duvarının olmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar *Blastocystis*'i önce *Sporozoa* alt-filumuna daha sonra da *Sarcodina* grubuna yerleştirmiştir (Zierdt, 1991). *Blastocystis*'in taksonomik sınıflandırması ilk tanımlandığı yıllarda tartışmalı bir konu olup araştırmacılar arasında bir fikir birliğinin olmadığı görülmektedir. Bunun

temelinde de moleküler yöntemlerin henüz yeterince yaygın olmaması nedeniyle sınıflandırmanın morfolojik ve fizyolojik gözlemlerle sınırlı kalması gösterilmektedir.

Blastocystis'in gerçek taksonomik pozisyonu 1989 yılında başlayan moleküler filogenetik analizler ile mümkün olmuştur. *Blastocystis* küçük-alt ünite ribozomal RNA kodlayan gen (SSU-rRNA) kısmi olarak çoğaltılarak dizilenmiştir. Dizi analizi sonucu *Blastocystis*'in maya, küf, *Sarcodine* veya *Sporozoa* ile aynı grupta yer almadığı bildirilmiştir (Johnson ve ark, 1989). Bu bulguyu destekler nitelikteki sonraki bir çalışmada, Silberman ve ark (1996) SSU-rDNA geninin tamamını dizilemiş ve filogenetik analiz sonucu *Blastocystis*'in Stramenopiles (Heterokonta) grubunda yer alması gerektiği bildirilmiştir. Arisue ve ark (2002) tarafından SSU-rDNA, sitozolik-tip 70-kDa ısı şok proteini, translayon uzama faktörü 2, vakoular ATPaz enziminin non-katalitik B alt ünite kodlayan genleri dizilerek filogenetik analiz yapılmış ve *Blastocystis*'in Stramenopile grubundan *Proteromonas lacerate*' ye yakın olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca uzama faktörü-1 α (EF-1 α) dizileri analiz edildiğinde *Blastocystis*'in *Trypanosoma*, *Euglena*, *Dictyostelium* ve diğer ökaryotlardan daha önce evrimsel olarak ayrıldığı ortaya konulmuştur (Ho ve ark, 2000). Diğer stramenopillerden farklı olarak *Blastocystis*'in herhangi bir formunda kamçı bulunmamakta ve dolayısıyla hareketsiz olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle *Blastocystis* için yeni bir sınıf oluşturulmuş ve bu sınıfa Blastocystea adı verilmiştir. *Blastocystis*'in güncel sınıflandırması aşağıdaki şekilde bildirilmiştir (Cavalier-Smith, 1998; Tan, 2008).

Sınıf	Blastocystea
Subphylum	Opalinata
Infrakingdom	Heterokonta
Subkingdom	Chromobiota
Kingdom	Chromista

2.2. Morfoloji

Blastocystis oldukça polimorfik bir mikroorganizma olup literatürde genel olarak: vakuoler, granüler, ameboid ve kist formları olmak üzere dört farklı morfolojik formu tanımlanmıştır (Tan ve ark, 2002). Işık mikroskopuyla elde edilebilen bulgular *Blastocystis*

morfolojisinin anlaşılmasında oldukça sınırlı kalmış olup araştırmalarda elektron mikroskopunun kullanılması ile *Blastocystis*'in morfolojisi, hücre biyolojisi ve yaşam döngüsü konusunda yeni bilgilerin elde edilmesi mümkün olmuştur. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda ozmotik basınç, ilaçlar ve metabolizma gibi faktörlerin *Blastocystis*'in morfolojisini değiştirdiği gözlenmiştir. *Blastocystis*'de gözlenen morfolojik değişimler tanıyı zorlaştırması nedeniyle ayrıca da bir önem taşımaktadır (Stenzel ve Boreham, 1996). Bunun yanı sıra *Blastocystis* formlarının sadece morfolojik kriterlere göre yapılması yüksek genotipik varyasyonlar düşünöldüğünde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle formlara özgü moleküler belirteçlerin tanımlanmasının faydalı olacağı bildirilmiştir (Yamada ve Yoshikawa, 2012).

2.2.1. Vakuoler Form

Blastocystis'in en yaygın bilinen, tipik formu olan vakuoler form aynı zamanda merkezi vakuol form olarak da bilinmektedir. Akselik besiyerinde, ksenik sıvı besiyerinde ve taze dışkı örneklerinde de en sık karşılaşılan form olduğu bildirilmiştir. Vakuoler formun boyutları 2-200 µm arasında değişmekte olup ortalama 4-15 µm olarak tanımlanmaktadır (Tan, 2008).

Hücrenin sitoplazması merkezi vakuol tarafından kenara itilmiş bir periferde yer almaktadır. Çekirdek, golgi, mitokondri-benzer organelin (MLO) ve mikrotübüllerin hücre sitoplazmasının kalınlaştığı alanda yer aldığı belirtilmektedir (Tan, 2008). Hücre sitoplazması merkezi vakuole doğru evajine olarak vezikül-benzeri veya filament-benzeri yapıları oluşturabilmektedir. Genellikle ovoid şekilli olan MLO (0,5–2 µm) sitoplazmada çekirdeğin yanında yer almakta olup sayısı bazı hücrelerde yüzlere ulaşabilmektedir. Organelde yer alan kristaların şekli tübüler, oval, veziküler veya halka şeklinde olabilmektedir (Yarlett ve Tan, 2008). *Blastocystis* genellikle bir veya iki çekirdek iğerir, ancak çok sayıda çekirdeği olan izolatlar da gözlemlenebilir. Eğer hücre iki çekirdekli ise her bir çekirdeğin hücrenin karşı kenarlarında yer aldığı bildirilmiştir. *Blastocystis* çekirdeği sferik veya ovoidal olup hilal şeklindeki kromatin kütesinin genellikle çekirdeğin sonunda göröldüğü rapor edilmiştir (Tan ve ark, 2001).

Blastocystis'de hücresel elemanlar karbonhidrat içeren bir yüzey tabakası (fibriler tabaka veya kapsül) ile çevrelenmiştir. Cassidy ve ark (1994) insan, maymun, domuz ve tavuktan izole ettikleri *Blastocystis* izolatlarını elektron mikroskobu ile incelediklerinde

protozoonun etrafını çevreleyen fibriler bir yapının bulunduğunu ve kalınlığının izolatlar arasında farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca yeni izole edilmiş *Blastocystis* 'lerde bu tabaka genellikle kalın olmakla birlikte, laboratuvar kültürlerinde giderek incelediği rapor edilmiştir (Tan, 2008). *Blastocystis*'i çevreleyen bu fibriler yapının işlevinin bakterileri yakalamak ve ozmotik şoklardan paraziti korumak olduğu düşünülmektedir (Zaman ve ark, 1995).

Blastocystis'de en sık gözlenen hücresel yapı olan merkezi vakuolün işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte merkezi vakuol içinde kolesterol bulunduğu filipin indikatörü ile gösterilmiştir. Araştırmacılar bu yapının karbonhidrat ve yağ deposu olarak hücre büyümesinde ve bölünmesinde kullanıldığını öne sürmüşlerdir (Yoshikawa ve Hayakawa, 1996). Daha sonra yapılan bir çalışmada ise merkezi vakuolün programlı hücre ölümü sırasında ortaya çıkan apoptotik cisimciklerin depolanmasında ve hücre dışına salınmasında rolü olabileceği bildirilmiştir (Nasirudeen ve ark, 2001).

2.2.2. Granüler Form

Granüler form morfolojik olarak vakuoler forma oldukça benzer bir yapıda olup merkezi vakuolde yer alan çok sayıdaki granüle yapı nedeniyle ayrı bir form olarak tanımlanmıştır. *Blastocystis*' in bu formuna aksenik olmayan besiyerlerinde, uzun süre devam ettirilen kültürlerde ve antibiyotik eklenmiş besiyerlerinde daha sık rastlanmaktadır (Yamada ve Yoshikawa, 2012). Granüler form vakuoler formdan daha büyük olup (ortalama: 15-25 µm), büyüklüğünün de 3-80 µm arasında değiştiği bildirilmiştir. Organeller vakuoler formda olduğu gibi periferal yerleşimli olup merkezi vakuolün içine dağılmış halde granüler materyal bulunmaktadır (Tan, 2004). Miyelin-benzeri inklüzyonların, küçük veziküllerin, kristalin granüllerinin ve yağ damlacıklarının granüllü görünümü oluşturduğu rapor edilmiştir (Dunn ve ark, 1989).

2.2.3. Amoeboid Form

Amoeboid form *Blastocystis*'in nadir görülen formlarından biri olup genellikle antibiyotik eklenmiş veya uzun süre devam ettirilmiş besiyerlerinde gözlenmektedir. Ayrıca nadiren de olsa taze dışkı örneklerinde ameboid formlara rastlanabilmektedir. Bu form 2,6-15

μm boyutlarında olup belirli bir hücre şekline sahip değildir. Psödopod benzeri sitoplazmik çıkıntıları olmasına karşın hareketsizdir (Tan, 2008). Işık mikroskopu ve TEM ile yapılan mikroskopik incelemeler sonucu ameboid formda merkezi vakuolün bulunduğu ayrıca yalancı ayak benzeri sitoplazmik uzantılarda çok sayıda golgi ve MLO'nun yer aldığı bildirilmiştir (Tan ve ark, 2001). Ameboid formda gözlenen bu organeller aktif bir form olduğuna kanıt olarak gösterilmektedir. Ameboid formdaki yalancı ayak benzeri yapıların amiplerde olduğu gibi hareket için kullanılmadığı ancak bakteri fagositozunda rol oynadığı bildirilmiştir (Boreham ve Stenzel, 1993).

2.2.4 Kist Formu

Blastocystis formları arasında en son tanımlanan şekil olan kist formu, diğer formlara göre daha küçük boyutlarda (2-5 μm) olup küresel veya oval bir görünüme sahiptir. Ayrıca diğer formların aksine *in vitro* kültürlerde kist formuna çok daha nadiren rastlanmaktadır (Tan, 2008). Kist formunun çok katlı bir kist duvarına sahip olduğu, buna ek olarak bazı örneklerde kist yüzeyinde ayrıca gevşek ve kırılğan bir tabakanın da bulunabileceği bildirilmiştir (Zaman ve ark, 1995). Kist sitoplazmasının oldukça yoğun bir yapıda olduğu, bir ile dört arasında değişen sayıda çekirdek, çok sayıda MLO ve lipit/glikojen vakuolleri içerdiği gösterilmiştir (Abou ve Negm, 2001; Tan, 2008).

Kist formunun 25°C sıcaklıkta bir aydan, +4°C'de sıcaklıkta iki aydan fazla süreyle canlı kalabildiği ve klorlamaya karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir (Zaki ve ark, 1996). Ayrıca kist formunun *Blastocystis*'in fekal-oral yolla bulaşından sorumlu olduğu hayvan deneyleri ile gösterilmiştir (Yoshikawa ve ark, 2004a).

2.2.5. Avakuoler ve Multivakuoler Form

Blastocystis'in yaygın bilinen dört formunun yanı sıra az sayıdaki araştırmada avakuoler (merkezi vakuolü olmayan) ve multivakuoler (birden fazla küçük vakuol içeren) formlar da tanımlanmıştır. Bu küçük formlar (5-8 μm) taze dışkı örneklerindeki *Blastocystis* izolatlarının transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmesi sonucu ortaya konulmuştur (Yamada ve Yoshikawa, 2012). Bu formların *Blastocystis*'in *in vivo*,

bağırsaktaki şekilleri olduğu iddia edilmiş olsa da bu bilginin tatmin edici olmaktan oldukça uzak olduğu ifade edilmektedir (Stenzel ve Boreham, 1996).

2.3. Biyoloji

Blastocystis; memeliler, kuşlar, sürüngenler, amfibiler ve böcekler de dahil olmak üzere çeşitli canlı türlerinin dışkı örneklerinde saptanmıştır. *Blastocystis*'in düşük konak özgüllüğüne sahip olduğu ve zoonotik bulaşın mümkün olduğu bildirilmiştir (Parkar ve ark, 2007). Alt tiplerin belirlendiği çalışmalarda zoonotik geçişin mümkün olduğu gösterilmiş olup yine alt tiplerle konak özgüllüğü arasında bir ilişkinin varlığı da birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Wawrzyniak ve ark, 2013).

Blastocystis esas olarak bağırsak lümeninde veya mukozal kenarında lokalize olduğu ve bu bölgelerden müsin salınımını artırdığı bildirilmektedir. Bağırsak epiteline yapışmış gibi görünmesine karşın dokulara invaze olmadan besin parçalarını sindirdiği rapor edilmektedir (Fayer ve ark, 2014; Ajampur ve Tan, 2016). *Blastocystis*' in granüler ve vakuoler formları çoğunlukla çekumda bulunmakta iken kistlerin daha çok kolonda gözlemlendiği ifade edilmektedir. Bununla birlikte kemirgen çalışmalarından elde edilen verilere göre ileum, jejunum ve midede de kist dışındaki formların görüldüğü bildirilmiştir (Ajampur ve Tan, 2016). Ameboid formların içinde bakteri ve bakteri kalıntılarının varlığı gösterilmiş olup bu nedenle ameboid formun beslenen ve aktif bir şekil olduğu düşünülmektedir (Tan, 2008). *Blastocystis*'in en bilinen morfolojik yapısı olan merkezi vakuolün beslenme, besin depolama ve apoptozda rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca, sistein proteazlar için bir depo görevi yapıyor olabileceği de ifade edilmektedir (Puthia ve ark, 2008). Geçmişte vakuoler formda üremeyle ilişkili granüllerin varlığını öngören bazı çalışmalar olmasına karşın sonraki dönemlerde bu bulguyu destekler nitelikte yeni veriler elde edilmemiştir. Bu yapıların elektron yoğunluklu inklüzyonlar olduğu ileri sürülmektedir (Tan, 2008).

Blastocystis'de hem genomik hem de organel DNA'sı (MLO'larda) bulunmakta olup günümüze kadar iki farklı *Blastocystis* alt tipinin (ST7 ve ST4) genomu dizilenmiştir (Denoeud ve ark, 2011; Wawrzyniak, 2015). Darbeli alan jel elektroforezi ile *Blastocystis*'in toplam on beş kromozomu tanımlanmıştır. İlk dizilenen *Blastocystis* genomu olan ST7 alt tipinde, genomun büyük kısmının dublike gen bloklarından oluştuğu ve 18,8 Mb büyüklükte bir genoma sahip olduğu (stramenopiller arasında en küçük) bildirilmiştir. *Blastocystis* genomu, kısa intronlar ve intergenik bölgelere sahip, tüm genomun yaklaşık %42'sini

kapsayan yaklaşık 6000 tahmini protein kodlayıcı gen içerdiği belirtilmektedir. *Blastocystis* genomunda proteazlar, proteaz inhibitörleri, immünofilinler ve glikosil-transferazlar da dahil olmak üzere birkaç tahmini salgı proteinini kodlayan genlerin varlığı gösterilmiştir. Bu proteinlerin konağın fizyolojisi üzerine etkili olduğu, virülans faktörü olarak görev aldığı veya *Blastocystis* kolonizasyonu için uygun ortamı oluşturmak gibi görevleri olduğu düşünülmektedir. *Blastocystis*'in ayrıca kendi metabolizmasından veya konak bağışıklık sisteminden kaynaklanan oksidatif hasardan korunmak için bazı enzimatik sistemlere sahip olduğu belirtilmektedir. Buna ek olarak, *Blastocystis*'in konak glikoproteinleri indirgemek için hidroliz enzimleri ürettiği ve bağırsaktaki sindirim ürünlerini besin olarak kullandığı ileri sürülmektedir (Denoeud ve ark, 2011). *Blastocystis* ST4 genomu, *Blastocystis* ST7 genomuyla karşılaştırıldığında daha küçük boyutta olduğu ve daha az gen duplikasyonu içerdiği bildirilmiştir (Wawrzyniak ve ark, 2015).

Zorunlu anaerobik bir protozoan olan *Blastocystis*'in aerobik metabolizmaya sahip özellikler de taşıdığı bildirilmiştir (van der Giezen ve ark, 2005). Örnek olarak, mitokondri benzeri organel (MLO) olarak adlandırılan organellerin varlığı gösterilmektedir. Bu organeller genom, krista ve trans-membran potansiyeli gibi bazı mitokondriyal yapılara sahipken ilginç bir şekilde sitokromlarının bulunduğu bildirilmektedir (Nasirudeen ve Tan, 2004; Yarlett ve Tan, 2008). *Blastocystis*'deki MLO yapısının böceklerde yerleşen bir ökaryot olan *Nyctotherus ovalis*'dekine benzer olduğu bildirilmiştir (Stechmann ve ark, 2008). ST7, ST1 ve ST4 MLO genomları karşılaştırıldığında genlerin büyük ölçüde aynı sırada bulunduğu, iki gen hariç tamamında oldukça korunmuş bir sentez mekanizması gözlemlenmiştir. İşlevsel olarak bu organellerin mitokondri ve hidrojenozomlar (anaerobik ökaryotlarda bulunan mitokondriye benzeri organel) arasında bir spektrumda yer aldığı düşünülmektedir. MLO'lar ATP üretimine katılmakta ancak hidrojen üretiminin olduğu, hidrojenaz proteinlerine rağmen henüz doğrulanmamıştır (Jacob ve ark, 2016). Bu organellerin aminoasit metabolizmasında, demir-sülfür protein biyosentezinde ve trikarboksilik asit döngüsünde (TCA) rol aldıkları bildirilmiştir (Tsaousis ve ark, 2014). Ayrıca, sukinat ve yağ asitlerinin sentezi için asetil CoA üreticileri olarak işlev görebileceği rapor edilmiştir. MLO ile ilişkili apoptotik faktörler henüz belirlenmemesine rağmen, *Blastocystis* MLO'larının apoptoz benzeri programlanmış hücre ölümünde rol aldığı düşünülmektedir (Lantsman ve ark, 2008). Keenan ve Zierdt (1994) aksenik kültürde yaptıkları çalışmada *Blastocystis*'in birçok hücreli lipidi *de novo* sentezleyebildiğini ancak bu işlem için serbest ve intakt kolesterol esterlerine ihtiyaç duyduklarını bildirmiştir.

Blastocystis'de apoptozisin temel morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin bulunduğu bildirilmiştir. Işık, elektron ve flow sitometre ile yapılan gözlemler sonucunda *Blastocystis* apoptozis sırasında DNA'nın yoğunlaşması, fragmentasyonu, sitoplazma hacminin küçülmesi, fosfotidilserin değişimi ve plazma zarının bütünlüğünün bozulması gözlenmiştir. Araştırmacılar sitotoksik monoklonal antikor kullandıkları çalışma sonucunda ayrıca merkezi vakuolün apoptoziste oluşan apoptotik cisimlerin depolanmasında görev aldığını ortaya koymuşlardır (Nasirudeen ve ark, 2001). Dhurga ve ark (2012) *Blastocystis*'in anti-parazitik ilaç varlığı veya aerobik ortam gibi olumsuz koşullarda apoptozise giderek canlı hücre sayısını artırmayı hedefleyen bir mekanizma geliştirdiğini ve bu direnç mekanizmasının alt tiplere göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada da apoptozis sürecindeki kaspaz aktivitesi ile semptomatik enfeksiyonlar arasında bir ilişki olabileceği bildirilmiştir (Balakrishnan ve Kumar, 2014).

2.4. Yaşam döngüsü

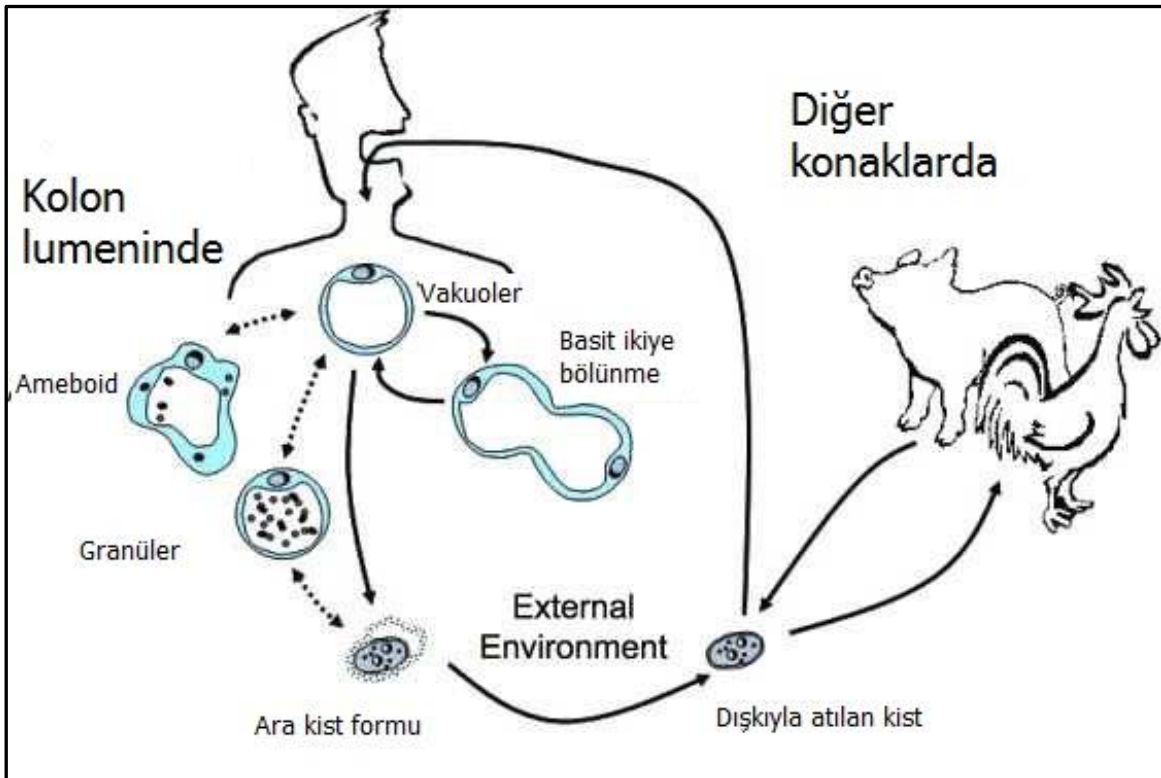
Blastocystis ile ilgili yeterince açıklanamayan konulardan biri yaşam döngüsü olup birçok laboratuvar hayvanından izole edilebilmesine rağmen uygun hayvan modellerinin geliştirilememesi bunun en temel nedeni olarak görülmektedir (Tan, 2004). Yakın tarihte yapılan bir çalışmada hayvan modeli konusunda oldukça umut verici sonuçlar elde edilebilmiştir. Araştırmacılar fareden fareye inokule ederek *Blastocystis* enfeksiyonun sürekliliğini sağlayabilmiş ve benzer histopatolojik bulgular elde ettiklerini bildirmişlerdir (Ajjampur ve ark, 2016).

İlk tanımlandığı yıllarda, *Blastocystis*'in otogami, tomurcuklanma, şizogoni, plazmotomi ve endodiyogeni ile çoğaldığı öngörülmüş olmakla birlikte bu yaklaşımların çoğu kabul görmemiştir (Zierdt, 1991; Tan, 2008). Ayrıca araştırmacılar ışık mikroskobuna dayanan gözlemler ile vakuoler formun granüler veya ameboid forma dönüştüğünü, granüler formun içinde tomurcuklanma ile yeni vakuoler formların ortaya çıktığını öne sürmüşlerdir. Singh ve ark (1995) yılında farklı bir yaşam döngüsünün olabileceği fikrini ortaya atmış olup ince ve kalın duvarlı kistlerden bahsetmişlerdir. Kalın duvarlı kistlerin fekal-oral bulaştan, ince duvarlı kistlerin ise oto-enfeksiyondan sorumlu olduğunu öne sürmüşlerdir.

Günümüzde en yaygın kabul gören yaşam döngüsü Tan ve ark (2004, 2008) tarafından bildirilen, kist formunun enfektif şekil olarak tanımlandığı model olup Şekil 2.1'de verilmiştir. Bu modele göre *Blastocystis*'in bulaşı kist formları ile kontamine yiyecek veya

suların tüketilmesiyle gerçekleşmektedir. Ayrıca direkt olarak insan-hayvan, hayvan-insan ve insan-insan arasında fekal-oral bulaşın da mümkün olduğu kabul edilmektedir (Popruk ve ark, 2013). *Entamoeba histolytica*'nın yaşam döngüsünde olduğu gibi eksistasyon öncesi *Blastocystis* kistlerinde çekirdek bölünmesi gerçekleşmektedir (Chen ve ark, 1999). Eksistasyon sonrası, kistlerden vakuoler formlar ortaya çıkmakta ve basit ikiye bölünme ile çoğalmaktadır. Bu aşamada farklı çoğalma şekillerinin de mümkün olabileceği bildirilmiştir (Yamada ve Yoshikawa, 2012). *Blastocystis*'in trofik şekilleri olarak tanımlanan formların (vakuolar, granüler ve ameboid) birbirlerine dönüşebildikleri kabul edilmektedir. Son olarak, *Blastocystis*'in ensistasyonunun kolonda gerçekleştiği ifade edilmektedir (Tan, 2004; 2008).

Özetle yeterli bilgiye halen sahip olmamakla birlikte, *Blastocystis*'in bulaş yolunun fekal-oral olduğu, bağırsakta basit ikiye bölünme ile çoğaldığı ve kist formunun enfektif şekil olduğu kabul edilmektedir.



Şekil 2.1. *Blastocystis* yaşam döngüsü (Tan, 2004)

2.5. Genetik Çeşitlilik ve Alt tipler

Blastocystis izolatları arasında genetik farklılıkların araştırılması literatürde geniş bir yer tutmaktadır. İlk olarak karyotiplendirme ile sıçanlardan, deniz yılanlarından kaplumbağalardan ve iguanalardan elde edilen *Blastocystis* izolatlarında kromozom farklılıkları darbeli alan jel elektroforezi (PFGE) ile incelenmiştir (Teow ve ark, 1991; Singh ve ark, 1995; Chen ve ark, 1997). Ancak *Blastocystis* izolatları arasında karyotipik varyasyonun çok yüksek olduğu görülmüş olup, kromozom yapısına göre bir tür ayrımının mümkün olmadığı bildirilmiştir (Carbajal ve ark, 1997). Arisue ve ark (2003) insan ve diğer canlılardan elde ettikleri 16 farklı *Blastocystis* izolatında SSU rRNA kodlayan geni PZR ile çoğalttıktan sonra klonlayarak bu genin bir kısmını sekanslamışlardır. Filogenetik analiz sonucu yedi farklı sekans paterni belirlenmiş olup yüksek derecede hetorejenite gösteren SSU rRNA gen bölgesininin hedef alınarak farklı genotiplere özgü primerlerin tasarlanabileceği bildirilmiştir. Ayrıca farklı konaklardan elde edilen izolatlar arasındaki genetik homoloji, *Blastocystis*'in konak spesifitesinin düşük ve zoonotik karakterli bir protozoon olduğunu ortaya koymuştur. Noel ve ark (2005) elongasyon faktörü 1 alfa (EF-1 α) kodlayan genleri daha önceden dizilenmiş toplam 12 tane insan, sıçan ve sürüngen *Blastocystis* izolatında SSU rRNA gen dizilerini elde etmiş ve veri tabanlarındaki benzer diziler ile Bayesian yaklaşımı ile analiz etmiştir. Araştırmacılar insanda kolonize olabilen çok sayıda zoonotik izolatın bulunduğunu ayrıca insandan hayvanlara ve hayvanlardan insana bulaşın da mümkün olduğunu bildirmişlerdir.

Günümüzde SSU-rDNA analizine göre *Blastocystis* cinsinin en az 17 tane alt tip (ST) olarak adlandırılan genotipi tanımlanmıştır. ST1-ST9 alt tipleri insan örneklerinden izole edilebilmiş olup ST10-ST17 alt tipleri insan dışındaki organizmalardan da izole edilmiştir (Stensvold, 2013a; Scanlan ve Stensvold, 2013). Ancak sonraki bir çalışmada ST12'nin de insan örneklerinden izole edildiği bildirilmiştir (Ramirez ve ark, 2016). ST1-ST4 bildirilen tüm alt tiplerin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır ve bu dört alt tip, insanlarda diğer konaklara göre daha yaygın bildirilmiştir. İnsan dışında bu dört alt tip kuşlarda, domuzlarda, sığırlarda, köpeklerde, sıçanlarda ve insan-dışı primatlardan izole edilmiştir (Villanueva-Garcia ve ark, 2017). İnsandan elde edilen *Blastocystis* izolatlarında en sık ST3'e rastlandığı bildirilmiştir (Forsell, 2017). ST5 domuzlarda, ST6 ve ST7 kanatlılarda yaygın görülmekte olup ST8 sadece insan dışındaki primatlardan izole edilmiştir. İlginç bir şekilde günümüze kadar insan dışında bir organizmalardan ST9 izole edilememiştir (Yoshikawa ve ark, 2016). İnsanda görülebilen diğer alt tipler ise ST5-ST9 olup diğer alt tipler ST10-ST17 insan

dışındaki organizmalardan da izole edilmiştir (Stensvold ve ark, 2009a; Stensvold, 2013a). Diğer yaygın alt tipler (ST1, ST2 ve ST4) düşük konak özgüllüğe sahip olup ve *Blastocystis*'in zoonotik alt tipleri olarak düşünülmektedir (Parkar ve ark, 2010). Dünya genelinde alt tiplerin de araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmakta olup genel olarak ST1, 2 ve 3 ün küresel bir dağılım gösterdiği ancak ST4'ün Avrupa ile sınırlı kaldığı bildirilmektedir (Stensvold ve Clark, 2016).

Blastocystis terminolojisini standardize etmek ve araştırmacılara kolaylık sağlamak üzere 2007 yılında bir konsensüs oluşturulmuştur. Bu kapsamda SSU-rDNA dizileri temel alınarak memeli ve kuş izolatlarının bu konsensüs çerçevesinde tanımlanan dokuz alt tipten biriyle adlandırılması fikri benimsenmiştir. Ancak bu sınıflandırma kemirgen, sürüngen, amfibi ve böcekleri kapsamamaktadır (Stensvold ve ark, 2007a).

2.6. Patogenez

Son yıllardaki *in vitro* ve *in vivo* hayvan çalışmaları *Blastocystis* patogenezinin anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır. Bu çalışmaların büyük kısmında bağırsak hücre hatları *Blastocystis* ile birlikte inkübe edilmiş ve *Blastocystis*'in hücelere etkisi araştırılmıştır (Lawrence, 2014). Bazı çalışmalarda da *Blastocystis* salgısal proteinleri veya *Blastocystis* lizatları hücre kültürlerine eklenerek hücelere olan etkileri araştırılmıştır. Genel olarak bu araştırmalar sonucunda programlı hücre ölümü, sıkı bağlantı proteinlerinin bozunumu, geçirgenlikte artış, inflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu ve indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) regülasyonu gözlenmiştir (Puthia ve ark, 2006; Eida ve ark, 2008; Ajjampur ve Tan, 2016).

Blastocystis, sıçan epitel hücrelerinde apoptozu ve epitel bariyer fonksiyonunu kaspaz bağımlı ve temasa bağlı olmayan mekanizma ile indüklediği gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca *Blastocystis*'in F-aktinin yıkımına ve aktin stres liflerinin oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Puthia ve ark, 2006). Başka bir çalışmada, *Blastocystis* ve insan enterositleri birlikte inkübe edilmiş ve *Blastocystis*'in kaspaz-3 ve kaspaz-9 aracılığıyla epitelyal bariyer fonksiyonunu ve ZO-1 organizasyonunu bozduğu saptanmıştır. Bununla birlikte semptomatik bir hastadan izole edilen ST7 izolatu hücrelerin apoptozunu indüklerken, sıçandan izole edilen ST4 izolatu hücrelerinin benzer bir etki göstermediği bildirilmiştir (Wu ve ark, 2014). Ayrıca, *Blastocystis* sistein proteazlarının rho-kinaza (ROCK) bağlı bir mekanizma ile epitelyal bariyer fonksiyonunu bozmaktadır (Mirza ve ark, 2012).

Blastocystis'in bağışıklık sistemi mekanizmaları üzerine etkisinin araştırılması hem *Blastocystis*'in patojenezi hem de konak-parazit etkileşiminin anlaşılmasında değerli bilgiler ortaya koymuştur (Tan ve ark, 2010). *Blastocystis*'de saptanan sistein proteazların salgısal imünoglobulin IgA'yı parçaladığı, konağın nitrik oksit salgısını etkisizleştirdiği ve IL-8 gen ekspresyonunu aktive ederek parazitin lümendeki yaşam süresini uzattığı bildirilmektedir (Puthia ve ark, 2005; 2008). *Blastocystis* enfeksiyonu olan kişilerde sık görülen bir klinik belirti olan ürtiker ile ilgili literatürde çok sayıda olgu sunumu bulunmaktadır. Bağırsakta yerleşen patojenler çeşitli immünolojik reaksiyonlar başlatmaktadır. Bu nedenle *Blastocystis*'in kendisinin veya antijenlerinin bağırsak bağlantılı lenfoid doku homeostazını etkileyebileceği ve alerjik reaksiyonlara neden olabileceği bildirilmektedir (Valsecchi ve ark, 2004). *Blastocystis*, makrofajlar başta olmak üzere konak immün hücrelerinde inflamatuvar yolakları aktive edebilmekte olup bazı sitokinleri(IL-1 β , IL-6,9 ve tümör nekroz faktör alfa) (TNF- α) indükleyebilir (Lim ve ark, 2014). Ayrıca, *Blastocystis*'in insanlarda bir bağışıklık düzenleyici etkisi olabileceği fikrini destekler nitelikteki bir çalışmada *Blastocystis* enfekte irritable bağırsak sendromu (IBS) hastalarında IL-8 düzeyinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Teo ve ark, 2014). Bir diğer çalışmada da özgül ligandlar kullanılarak *Blastocystis* ile enfekte IBS hastalarında interlökin düzeyinde artış ve Toll Benzeri Reseptör (TLR) modülasyonu gösterilmiştir (Ragavan ve ark, 2015).

Blastocystis enfeksiyonlarında mukozal biyopsi örneklerinin patolojik incelemesi sonucu birbirinden oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Semptomatik olguların değerlendirildiği bir çalışmada, *Blastocystis*'in mukozaya invazyonu ve kolonda inflamasyon bulgusu görülmediği rapor edilmiştir (Zuckerman ve ark, 1994). Bazı eski çalışmalarda *Blastocystis*'in lamina propria, sub-mukozaya ve hatta kas tabakasına invaze olduğu rapor edilmiş olsa da bu sonuçların dikkatli olarak ele alınması gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca bu tarz çalışmaların *Blastocystis*'e özgü antikörlerin kullanıldığı seroloji ile desteklenmesi, ksenik kültürdeki mikroflora kontrollerinin gerçekleştirilmesi, immüno-kimya veya immüno-floresans gibi daha ileri yöntemlerin kullanılarak yapılması gerektiği bildirilmiştir (Ajampur ve Tan, 2016).

Blastocystis ST7'nin bütün genomunu sıraladıktan sonra, proteom ve sekrotom analizleri yardımıyla patojenez hakkında daha fazla bilgiye sahip olunabilmiştir. *Blastocystis* ST7 genom analizinde patojenez ile doğrudan ilişkili olabilecek toplam 75 salgısal protein tanımlanmıştır. Bunların arasında proteazlar, heksoz sindirim enzimleri, lektinler, glikosil transferazlar ve proteaz inhibitörleri yer almaktadır (Denoeud ve ark, 2011).

2.7. Klinik Bulgular

Blastocystis enfeksiyonların büyük kısmı asemptomatik seyretmektedir (Boorom ve ark, 2008; El Safadi ve ark, 2016; Stensvold ve Clark, 2016). Semptomatik *Blastocystis* enfeksiyonları çok nadiren görülmekte olup bu hastalarda akut veya kronik diyare, karın ağrısı, şişkinlik, gaz, kusma, konstipasyon, mide bulantısı, kramplar, yorgunluk ve iştahsızlık gibi birçok non-spesifik semptomun görüldüğü bildirilmiştir (El Shazly ve ark, 2005; Graczyk ve ark, 2005; Alfellani ve ark, 2007; Boorom ve ark, 2008; Tan, 2008; Coyle ve ark, 2012; Salvador ve ark, 2016). Semptomatik olgularda en sık bildirilen gastrointestinal semptomlar ishal ve karın ağrısı olup semptomların şiddeti hafif, kronik karın ağrısından şiddetli, akut diyareye kadar değişmektedir (Levy ve ark, 1996; Rossignol ve ark, 2005; Gupta ve Parsi, 2006; Tan, 2008).

Blastocystis patojenitesi ve kliniği birçok faktöre bağlı olarak açıklanmaya çalışılmıştır. Bunların başında alt tipler, ameboid formun varlığı ve parazit yükü gelmektedir. Ancak bu yaklaşımların hiç birinde tatmin edici sonuçlara ulaşıldığını söylemek mümkün olmamaktadır (El Safadi ve ark, 2016; Wawrzyniak ve ark, 2013; Poirier ve ark, 2012). Alt tip ve klinik bulgular arasında çelişkili sonuçlara rağmen genel olarak ST1, ST4 ve ST7 semptomlarla ilişkili olarak rapor edilirken ST2 ve ST3 patojenik olmayan alt tipler olarak rapor edilmiştir (Mirza ve Tan, 2012).

Başta ürtiker olmak üzere bazı alerjik kutanöz lezyonların *Blastocystis* enfeksiyonu ile ilişkilendirildiği çalışmalar bulunmaktadır (Vogelberg ve ark, 2010; Hameed ve ark, 2011). Ayrıca bazı olgu sunumu olarak yayınlanan araştırmalarda, ilaç tedavisi ile *Blastocystis* yok edildikten sonra dermatolojik semptomların ortadan kalktığı bildirilmiştir (Biedermann ve ark, 2002; Valsecchi ve ark, 2004). Bunlara ek olarak *Blastocystis* ile enfekte olgularda çok nadiren de olsa fekal lökosit, eozinofili, hipoalbuminemi, anasarka, toksik megakolon ve anjioödem görüldüğünü bildiren bazı yayınlarda literatürde yer almaktadır (Nassir ve ark, 2004; Micheloud ve ark, 2007; Tan, 2008).

Kronik gastrointestinal ve fonksiyonel bir bağırsak hastalığı olan IBS'de *Blastocystis*'in rolü önemli bir araştırma konusu olmakla birlikte mevcut sonuçlar yeterince açıklayıcı bulunmamaktadır (Yakoob ve ark, 2010; Poirier ve ark, 2012; Scanlan ve ark, 2014). Son araştırmalar intestinal mikrobiyota göz önünde bulundurulmadığında *Blastocystis* ve IBS arasındaki ilişkiyi açıklanmasının imkansız olduğunu ortaya koymaktadır (Poirier ve ark, 2012; Stensvold ve Clark, 2016). Araştırmacılar kronik bağırsak hastalıklarında değişen intestinal flora nedeniyle ortamın *Blastocystis*'in çoğalmasını destekleyen veya desteklemeyen

bir hale gelebileceği öne sürülmüştür (Audebert ve ark, 2016; Nagel ve ark, 2016; Stensvold ve Clark, 2016). Retrospektif bir çalışmada meta-genomik analiz sonucu *Blastocystis*'in ülseratif kolitli (ÜK) hastalarda %20,3 görülmesine karşın Crohn hastalarında saptanmadığı tespit edilmiştir (Andersen ve ark, 2015).

İnsan immünyetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte kişiler, kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS) hastaları, kanser hastaları ve organ nakli olan hastalar gibi immün-sistemi baskılanmış hasta gruplarında *Blastocystis*'in fırsatçı bir patojen olabileceği öne sürülmüştür (Rao ve ark, 2003; Tan, 2010; Roberts ve ark, 2014a). Ayrıca bu hasta gruplarında *Blastocystis* tanısının daha güvenilir yöntemlerle konulması gerektiği bildirilmiştir. Bunlara ek olarak kemoterapi süresi ve *Blastocystis* pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu bildirilmiştir (Chandramathi ve ark, 2012; Yersal ve ark, 2016).

Genel olarak, *Blastocystis*'in klinik özellikleri ve patojenitesi ile ilgili çalışmalarda bazı sınırlamalar olduğu bildirilmiştir. Bu sınırlamalar: dışkı örneklerinin direkt mikroskopi gibi duyarlı yöntemlerle değerlendirilmesi, araştırmalarda olası diğer patojenlerin göz önünde bulundurulmaması ve kontrol gruplarının olmaması olarak sıralanmaktadır (Doyle ve ark, 1990; Tan, 2008; Stensvold ve ark, 2009b; Stensvold ve Clark 2016). Mevcut çalışmalar hakkındaki bir başka kısıtlamanın da semptomatik gruplarda olduğu bildirilmiştir. Bu gruplarda yapılan çalışmalarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması sadece *Blastocystis*'i değil aynı zamanda diğer mikroorganizmaları da etkilemekte veya yok etmektedir. Bu nedenle antibiyotik tedavisi semptomlarda gözlenen gerilemenin yalnızca *Blastocystis* eradikasyonuna bağlanmasının doğru bir yaklaşım olmayacağı düşünülmektedir (Ok ve ark, 1999; Lucia ve ark, 2007; Tan, 2010).

Sonuç olarak, günümüzde *Blastocystis*'in kommensal yaşayan bir mikroorganizma mı yoksa fırsatçı bir patojen mi olduğuna karar vermek henüz mümkün görülmemektedir (Parija ve Jeremiah, 2013; Scanlan ve ark, 2014). *Blastocystis* enfeksiyonlarında ortaya çıkan klinik bulguları ve *Blastocystis*'in patojenitesi çok faktörlü bir fenomen olarak düşünülmesi gerektiği bildirilmektedir (Stensvold ve Clark, 2016). Bu muhtemel faktörler *Blastocystis* alt tipi, *Blastocystis* yoğunluğu, intestinal flora, konağın bağışıklık sistemi, konağı beslenme durumu ve *Blastocystis*'e eşlik edebilecek diğer enfeksiyonlar olarak bildirilmiştir (Tan, 2008; Tan, 2010; Andersen ve ark, 2015; Stensvold ve Clark, 2016).

2.8. Tanı

Blastocystis enfeksiyonlarında bildirilen semptomların spesifik olmaması nedeniyle klinik tanının imkansız görülmektedir. Bu nedenle, *Blastocystis*'in tanısı başta dışkı örneklerinde veya kültürde *Blastocystis*'in saptanmasına yönelik laboratuvar teknikleri ile yapılmaktadır. Ayrıca dışkı örneklerinde *Blastocystis* DNA'sı veya antijenlerinin tespiti de tanıda tercih edilen diğer yöntemler olarak bildirilmektedir. Günümüzde gelişmiş tanı yöntemlerine ulaşmak daha kolay olmasına karşın birçok laboratuvarında *Blastocystis* enfeksiyonunun tanısı direk mikroskopi gibi duyarlılığı düşük yöntemlerle yapılmakta olduğu için yanlış pozitif ve negatif sonuçlar verilmektedir. Ayrıca *Blastocystis* patojenitesinin tartışmalı olması nedeniyle *Blastocystis* tanı veya bildirimünün genellikle göz ardı edildiği bildirilmiştir (Stensvold ve ark, 2007b; Stensvold ve Clark, 2016).

2.8.1. Direkt Mikroskopik İnceleme

Direkt mikroskopi, kolay uygulanabilir ve maliyeti düşük olduğu için rutin laboratuvarında *Blastocystis* tanısı için en yaygın kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir (Stensvold ve ark, 2007b; Tan, 2008). Nativ-lügol inceleme olarak da adlandırılan bu yöntemde temiz bir lamın bir köşesine serum fizyolojik (%0,9 NaCl) diğer köşesine de lügol çözeltisi damlatılmakta ve taze dışkı örneği ile karıştırıldıktan sonra ışık mikroskobu altında *Blastocystis* varlığı araştırılmaktadır. Bu yöntemin başlıca kısıtlılıkları şu şekilde bildirilmiştir: (i) küçük boyutları nedeniyle kist formlarının gözden kaçırılması, (ii) kullanılan ilaçlara bağlı olarak *Blastocystis* morfolojisinin bozulması ve (iii) maya, *Cyclospora sp.*, makrofajlar, nötrofiller ve yağ globülleri ile *Blastocystis*'in karıştırılması (Wawrzyniak ve ark, 2013, Parija ve Jeremiah, 2013). Ayrıca, hangi eşik değerinin üzerinde (> 5 hücre, bir 40X objektif alanında) *Blastocystis*'in raporlandırılacağı konusunda görüş birliğinin bulunmaması da sonuçların güvenilirliğini azaltmaktadır (Stensvol ve Clark, 2016) Diğer bağırsak parazitlerinde olduğu gibi *Blastocystis*'in dışkıyla atılımının düzenli olmadığı bu nedenle ardışık günlerde üç dışkı örneğinin incelenmesi gerektiği bildirilmiştir (Vennila ve ark, 1999; Tan, 2008; Bart ve ark, 2013). Dışkının direkt mikroskopik incelemesinde en sık 5-8 µm arasında değişen boyutlardaki vakuoler forma rastlandığı ancak enfekte olguları yakalamak adına küçük boyutlardaki kist formunun da aranmasının önemli olduğu bildirilmiştir.

Rutin laboratuvarlarında, nativ-lügol incelemenin yanı sıra daha duyarlı bir metod olduğu için trikrom ile kalıcı boyamaların yapılması tavsiye edilmektedir (Tan, 2008). Trikrom boyasının dışında dışkı yaymalarının boyanmasında demir hematoksilen, giemsa, field ve wright boyalarının da başarı ile kullanıldığı bildirilmiştir (Stenzel ve Boreham, 1996). Dışkı örneklerinde direkt mikroskopi (nativ, lügol ve kalıcı boyama) yönteminin çevresel örneklerde, insan dışındaki konaklarda ve gıda kaynaklarında *Blastocystis* aranması için daha uygun bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Londono-Franco ve ark, 2014).

2.8.2. Çoklaştırma Yöntemleri

İntestinal parazitlerin tanısında sıklıkla kullanılan çoklaştırma yöntemleri, *Blastocystis*'in tanısında da kullanılmış ancak santrifüj aşamasında *Blastocystis*'in kırılğan formlarının (vakuoler, multivakuoler ve granüler) parçaladığını bildirilmiştir. Birçok çalışmada çoklaştırma yöntemlerinin *Blastocystis* tanısında yetersiz kaldığını rapor etmiştir (Stensvold ve ark, 2007b). Örneğin bir çalışmada kültür yöntemiyle dışkı örneklerinin %11,5'inde *Blastocystis* saptanmış iken formalin eter konsantrasyon tekniği (FECT) yöntemiyle *Blastocystis* pozitifliği %3,5 olarak bulunmuştur (Rene ve ark, 2009). Genel olarak direkt mikroskopi ve FECT yöntemleri düşük duyarlılıkları nedeniyle *Blastocystis* tanısında güvenilir yöntemler olarak kabul edilmemektedir (Stensvold ve ark, 2007b; Rene ve ark, 2009; Wawrzyniak ve ark, 2013).

2.8.3. Kültür Yöntemleri

Blastocystis tanısında düşük maliyeti ve kolay hazırlanması nedeniyle en çok Jones besiyeri tercih edilmektedir. Bunun yanı sıra Robinson ve LYGM (TYSGM modifikasyonu) besiyerlerinde de *Blastocystis* rahatlıkla çoğaltılabilmektedir (Stensvold ve Clark, 2016). Yapılan çalışmalarda kültür yönteminin FECT ve direkt mikroskobiden daha duyarlı olduğunu bildirmiştir (Leelayoova ve ark, 2002; Ertuğ ve ark, 2015; Coşkun ve ark, 2016). Benzer şekilde Suresh ve Smith (2004) de direkt mikroskobide *Blastocystis* göremedikleri dışkı örneklerinde ksenik *in vitro* kültürde (XIVC) üreme görüldüğünü bildirmiştir. Kültür yöntemi zaman alıcı bir yöntem olup sonuçların değerlendirmesi için en az 2-3 gün beklenmesi gerekmektedir. Ayrıca birden fazla genotiple enfekte olgularda dışkı örnekleri

kültüre edildiğinde bazı genotiplerin kültürde daha hızlı çoğaldığı ve devam eden pasajlarda baskın hale gelebildiği bildirilmiştir (Tan, 2008; Roberts ve ark, 2014a). Benzer bir durum aksenik kültürler içinde geçerli görünmektedir. *Blastocystis* izolatlarının alt tipine göre aksenik kültürde rejenerasyon zamanlarının farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (Parija ve Jeremiah, 2013). Ayrıca *Blastocystis*'in aksenik kültürde jenerasyon zamanının kullanılan besiyerine bağlı olarak 17-22 saat arasında değiştiği ancak aksenik kültürden aksenik kültüre geçiş yapıldığında jenerasyon zamanının kısaldığı (7-12 saat) bildirilmiştir (Irikov ve ark, 2009). Kültür yöntemlerinin moleküler epidemiyolojik araştırmalara ek olarak, geniş popülasyonlarda *Blastocystis* prevalansının araştırıldığı çalışmalarda kullanılmasının faydalı olduğu rapor edilmiştir (Stensvold, 2007b). Genel bir yaklaşım olarak *Blastocystis*'in rutin tanısında kalıcı boyama yöntemleri ve kültür yöntemlerinin birlikte kullanılmasının en doğru yaklaşım olacağı düşünülmektedir.

2.8.4. Seroloji Temelli Yöntemler

Blastocystis enfeksiyonlarında IgG and IgA antikor yanıtının görüldüğü indirekt floresan antikor testi (IFA) ve enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) gösterilmiştir. Ancak günümüzde serolojik yöntemler *Blastocystis*'in rutin tanısında kullanılmaktan oldukça uzaktır. Bunun nedenleri olarak: (i) konak immün yanıtı hakkında yeterince bilgi sahibi olunmaması, (ii) *Blastocystis*'in çok farklı morfolojik formlarının olması, (iii) *Blastocystis*'in çok sayıda alt tipinin olması ve son olarak (iv) yüzey antijenik yapısının izolatlar arasında büyük farklılık göstermesi sayılmaktadır (Tan, 2008). Bu kısıtlamalara rağmen Ag-ELISA ve IFA'nın tanıda kullanılması yönünde çalışmalar devam etmektedir. Günümüzde ticari olarak temin edilebilecek bazı tanı kitleri bulunmaktadır: Blasto-Fluor (Antibodies Inc., Davis, CA, ABD), coproELISA™ *Blastocystis* (Savyon Diagnostics, Ashdod, İsrail) ve ParaFlor B (Boulder Diagnostics, Boulder, CO, ABD). Ancak bu kitlerin tanısal değeri az sayıda örnek üzerinde çalışıldığı için sonuçların henüz yeterli olmadığı bildirilmiştir (Stensvold ve Clark, 2016). Ayrıca *Blastocystis* izolatlarındaki genetik varyasyonun göz önüne alınmadığı serolojik çalışmalar yetersiz olarak görülmektedir (Nagel ve ark, 2015; Stensvold ve Clark, 2016).

2.8.5. Moleküler Yöntemler

Blastocystis tanısında mikroskopi temelli yöntemlerin duyarlılıklarının düşük olması araştırmacıları moleküler yöntemler geliştirmeye ve kullanmaya yöneltmiştir (Leelayoova ve ark, 2002; 2004). Polimeraz zincir reaksiyonu, *Blastocystis* rutin tanısında 2006 yılından bu yana kullanılmaktadır. Bu yöntemin %100 özgüllük gösterdiği, FECT'den daha duyarlı olduğu ve en az kültür yöntemi kadar duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir (Stensvold ve Clark, 2016). Birçok çalışmada da dışkı örneklerinden izole edilen DNA örneklerinin kullanıldığı PZR yönteminin kültürden, direkt mikroskopiden ve FECT'den daha yüksek duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir (Parkar ve ark, 2007; Roberts ve ark, 2011; Stensvold ve Clark, 2016). Saklanmış dışkı örneklerinden çalışabilmesi çoklaştırma, kalıcı boyama ve kültür yönteminde olduğu gibi taze dışkı örneğine ihtiyaç duyulmaması *Blastocystis* tanısında PZR'in avantajlarından biri olarak bildirilmiştir. Ayrıca çoklaştırmada olduğu gibi fazla örneğe ihtiyaç duyulmaması yöntemin bir diğer avantajı olarak görülmektedir. Kültür ile karşılaştırıldığında PZR ile daha kısa sürede sonuç alınmaktadır. Yüksek duyarlılık göstermesine rağmen başta PZR olmak üzere moleküler yöntemler rutin *Blastocystis* tanısından çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Geleneksel tanı yöntemlerine göre maliyetinin yüksek olması ve özel laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duyulması rutin tanıda tercih edilmemesinin nedenleri olarak görülmektedir (Stensvold ve ark, 2007c). Dışkıdan DNA izolasyonunda başarıyla kullanılacak çok sayıda ticari kit olmakla birlikte bunların performanslarının değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Yoshikawa ve ark, 2011). *Blastocystis* tanısında moleküler yöntemlerin kullanılması aynı zamanda mevcut geleneksel yöntemlerin yetersizliklerini de ortaya çıkartmıştır. Gerçek zamanlı veya geleneksel PZR yöntemleri ile karşılaştırıldığında kültürün duyarlılığı %52–%79, direkt mikrobik yöntemlerin duyarlılığı %82 olarak bildirilmiştir (Stensvold ve ark, 2007b; Poirier ve ark, 2011; Stensvold ve ark, 2012; Stensvold ve Clark, 2016). IBS hastalarından alınan kolon aspiratlarında *Blastocystis* varlığının farklı yöntemlerle incelendiği bir çalışmada kültür, direkt mikroskopi ve FECT ile *Blastocystis*'e rastlanmadığı ancak PZR ile örneklerin %9,1'inde pozitiflik tespit edildiği bildirilmiştir (Ragavan ve ark, 2015). Polimeraz zincir reaksiyonunun *Blastocystis* tedavisi sonrası olguların takibine olanak sağladığı rapor edilmiştir (Stensvold ve Clark, 2016). Bununla birlikte yüksek duyarlılık ve seçicilik gösteren gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları (RT-PZR) genellikle alt tiplerin bazılarında özgü olarak tasarlanabilmiştir. Bu nedenle tüm alt tiplerde aynı performansı gösterecek ve PZR inhibitörlerini test etmeye olanak sağlayacak şekilde geliştirilmeleri gerektiği bildirilmiştir (Stensvold ve Clark, 2016).

2.9. Epidemiyoloji

Blastocystis dünya genelinde bir yayılım göstermekte olup hem semptomlu bireylerde hem de sağlıklı bireylerde en sık saptanan protozoon olarak bildirilmektedir (Tan, 2008; Stensvold ve ark, 2009c; Stensvold ve Clark, 2016). Küresel çapta *Blastocystis* yaygınlığının anlaşılması konusunda karşılaşılan zorlukların başında standardize edilmeyen birbirinden farklı yöntemlerin tanıda kullanılması ve buna bağlı olarak oldukça farklı sonuçları elde edilmesi gösterilmektedir. Ayrıca çalışmalarda sınırlı sayıda ve dar bir alandan elde edilen örneklerde *Blastocystis* aranması sonuçları karşılaştırılmaz hale getirmektedir.

Dünya'nın farklı ülkelerinde yapılan çalışmalara bakıldığında genel olarak gelişmekte olan ve gelişmemiş ülkelerde *Blastocystis* görülme sıklığının (%86,6 ve %100'e varan) gelişmiş ülkelere (0,5-%24) göre daha yüksek olduğu görülmektedir (Tan, 2008; Alfellani ve ark, 2013a; El-safadi ve ark, 2014; Rebolla ve ark, 2016). Örnek olarak Malezya'da yapılan çalışmada Noor Azian ve ark (2007) yaşları 0-70 arasında değişen 130 kişiden dışkı örneği toplamış ve 68'inde (%52,3) *Blastocystis*'e rastladığını bildirmiştir. Bu çalışmada *Blastocystis* tanısı kalıcı boyama yöntemlerinden trikrom boyası kullanılarak yapılmıştır. Yine aynı ülkede Suresh ve ark (2001) tarafından yapılan çalışma da ise %14,9 oranında *Blastocystis*'e rastlandığı bildirilmiştir. Bu çalışma da ise trikrom boyasının yanısıra kültür ve çoğaltırma yöntemleri de kullanılmıştır. Yöntemin dışında iki çalışmada değerlendirilen populasyonlar arasındaki sosyo-demografik farkın bu sonuçların elde edilmesine neden olabileceği bildirilmiştir. Genel olarak gelişmekte olan ve gelişmemiş ülkelerdeki yüksek *Blastocystis* görülme sıklıkları işlenmemiş suların tüketilmesi, hayvanlarla yakın temas, aile içinde enfeksiyonun bulaşı ve annenin eğitim durumu ile ilişkili bulunmuştur (Abdulsalam ve ark, 2012; Osman ve ark, 2016; Ajjampur ve Tan, 2016). Tablo 2.1'de farklı ülkelere bildirilen *Blastocystis* görülme sıklıkları ve kullanılan yöntemler verilmektedir. Ancak, bu tablodan da anlaşılacağı üzere birçok prevalans çalışmasının verisi direkt mikroskopi ve FECT gibi düşük duyarlılığa sahip yöntemler ile yapılmıştır (Suresh ve ark, 2004). Bu nedenle *Blastocystis* görülme sıklıkları aynı bölgede farklı zamanlarda yapılan çalışmalarda bile oldukça büyük farklılık göstermektedir (Stensvold ve ark, 2013a).

Yapılan prevalans çalışmalarında çok sayıda çevresel ve kişisel faktörün *Blastocystis* görülme sıklığını etkilediği bildirilmiştir. Aksini bildiren yayınlarda olmakla birlikte yaş, çalışıp çalışmama durumu, uzun süre antibiyotik kullanımı, sosyo-ekonomik düzey, tropikal bölgelere seyahat, hayvanlarla yakın temas, köpek besleme, uygun olmayan su kaynaklarının kullanımı ve kişisel hijyen *Blastocystis* görülme sıklığı ile ilişkili faktörler arasında

sayılmaktadır (Suresh ve ark, 2001; Su ve ark, 2009; Lu ve Sung, 2009; Parkar ve ark, 2010; Abdulsalam ve ark, 2012; 2013; Belleza ve ark, 2015; Khoshnood ve ark, 2015; El safadi ve ark, 2016). Bu faktörlerin dışında birçok çalışmada cinsiyetin *Blastocystis* görülme sıklığı ile ilişkisinin olmadığı bildirilmiştir (Lu ve Sung, 2009; Khoshnood ve ark, 2015). Bazı çalışmalarda da *Blastocystis*'in yaz aylarında kış aylarına göre daha sık görüldüğü bildirilmiştir (Alfellani ve ark, 2007; El safadi ve ark, 2016).

Tablo 2.1. Bazı ülkelerden bildirilen *Blastocystis* yaygınlıkları

Ülke (Kaynak)	İncelenen Örnek sayısı	Yöntem	Yaygınlık (%)
Fransa (El Safadi ve ark, 2016)	788	DM ve PZR	18,1
Hollanda (Bart ve ark, 2013)	442	DM ve PZR	24,2
Danimarka (Stensvold ve ark, 2007b)	93	FECT, DM, PZR ve Kültür	23
İngiltere (Suresh ve ark, 2004)	1000	DM, Kültür ve FECT	3,9
Mozambik (Meurs ve ark, 2017)	302	DM ve FECT	21
Kolombiya (Ramirez ve ark, 2016)	2026	DM	12,6
Türkiye (Doğruman Al ve ark, 2009a)	203	Kültür	32,5
Singapur (Wong ve ark, 2008)	276	Kültür	3
Filipinler (Belleza ve ark, 2015)	1271	Kültür	12,9
Zambiya (Graczyk ve ark, 2005)	93	DM	53,8
Katar (Abu-Madi ve ark, 2015)	608	RT-PZR	71,1
Lübnan (Osman ve ark, 2016)	249	PZR	63

DM: Direkt mikroskopi, FECT: Formol etil asetat çoklaştırma yöntemi, PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu, RT-PZR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

2.10. Tedavi

Blastocystis ile enfekte olgularda tedavinin gerekli olup olmadığı tartışmalı konular arasında yer almaktadır (Tan, 2008). Bu tartışmaların nedeni olarak her hangi bir tedavi edici ajan verilmediği olgularda bile semptomların kendiliğinden düzelmesi veya *Blastocystis*'in kendiliğinden yok olmasıdır. Yapılan çalışmalarda *Blastocystis* enfekte olguların %40-%91,2'sinde *Blastocystis*'in kendiliğinden kaybolduğu bildirilmiştir (Stenzel ve Boreham, 1996; Stensvold ve ark, 2010; Dinleyici ve ark, 2011). Ancak *Blastocystis* enfekte olguların tedavi edilmemesi enfeksiyonun toplumda yayılmasına ve enfekte bireylerde eğer varsa semptomların devam etmesiyle sonuçlanmaktadır (Roberts ve ark, 2014a). *Blastocystis* ile enfekte olguların tedavisi konusundaki genel yaklaşım eğer olgularda gastrointestinal semptomlar varsa ve *Blastocystis* dışında patojen bir etken tanımlanmamışsa tedaviye başlanması şeklinde bildirilmiştir (Roberts 2014a, Sekar ve Shanthi, 2013). Bir diğer yaklaşım da dışkısında az sayıda *Blastocystis* saptanan ve asemptomatik seyreden olgularda tedaviye gerek olmadığı şeklinde ifade edilmektedir (Coyle ve ark, 2012).

Giardia intestinalis, *Entamoeba histolytica* ve *Trichomonas vaginalis* gibi diğer anaerobik protozoon enfeksiyonlarında olduğu gibi *Blastocystis* enfeksiyonlarının tedavisinde de dünya genelinde de ilk tercihin metronidazol olduğu bildirilmiştir (Tan, 2008; Stensvold ve ark, 2010; Roberts ve ark, 2014a). Ancak birçok çalışmada metronidazolün *Blastocystis* enfeksiyonlarının tedavisinde yetersiz kaldığı ve kısıtlılıklarının olduğu bildirilmiştir. Bu kısıtlılıklar: (i) metronidazolün *Blastocystis* tedavisinde etkinliğinin çok değişken olması (%0-%100 etkinlik), (ii) metronidazolün kullanım dozu ve sıklığı konusunda ortak bir yaklaşımın bulunmaması ve (iii) alt tiplere göre değişen veya değişmeyen direnç görülmesi olarak sıralanmıştır (Stensvold ve ark, 2010; Coyle ve ark, 2012; Sekar ve Shanthi, 2013). Burada sıralanan kısıtlılıklardan dolayı metronidazole alternatif ilaçlar ve tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla başta trimethoprim-sulfamethoksazol (TMP/SMX), paramomisin ve nitazoksanid olmak üzere farklı ilaç ve ilaç kombinasyonları: tinidazol, ornidazol, seknidazol, ketokonazol, pentamidin, furazolidon, quinin, iyodoquinol, iyodoklorhidroksiquin *Blastocystis* tedavisinde denenmiştir (Sekar ve Shanthi, 2013). Ancak bu çalışmalarda elde edilen veriler genellikle semptomatik (ishal veya kaşıntı) bir olgunun tedavi edilmesine dayanmaktadır. Ayrıca çalışmaların birçoğunda plasebo grubunun yer almamasının sonuçların güvenilirliğini azalttığı bildirilmiştir (Coyle ve ark, 2012).

Blastocystis enfekte olguların TMP/SMX ile tedavi edildiği iki ayrı çalışmada olguların %22'sinde ve %97,3'ünde tedavi sonrası *Blastocystis* in dışkı örneklerinden

kaybolduğu bildirilmiştir (Ok ve ark, 1999; Moghaddam ve ark, 2005). Plasebo kontrollü yapılan bir çalışmada ise TMP/SMX tedavisi ile plasebo grubu arasında bir farklılık olmadığı gözlenmiştir (Heyland ve ark, 2012). Retrospektif bir çalışmada paromomisin metronidazol ve kliokinolden daha etkili olduğu bildirilmiştir (van Hellemond J ve ark, 2013). *Blastocystis* ile enfekte ishal şikayeti olan IBS hastaları TMP/SMX ve seknidazol (TAB) kombinasyonu ile tedavi edildiğinde olguların %60'ında *Blastocystis*'in ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir (Nagel ve ark, 2014). Dinleyici ve ark (2011) probiyotik olarak kullanılan *Saccharomyces boulardii* 'nin metronidazolden daha yüksek klinik tedavi başarısı (sırasıyla %94,4 ve %73,3) gösterdiğini rapor etmişlerdir. Tablo 2.2'de birden fazla ilacın karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiği çalışmalara yer verilmektedir. İlaçlara ek olarak Tayland medikal bitkileri ve soğan özütleri gibi bazı geleneksel tıp ürünlerinin de *Blastocystis* üzerine değişen oranlarda etkili olduğu *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (Sawangjaroen N ve Sawangjaroen K, 2005; Sekar ve Shanthi, 2013; Abdel-Hafeez ve ark, 2016; Eida ve ark, 2016).

Tablo 2.2. *Blastocystis* tedavisinde karşılaştırmalı çalışmalar

İlaç veya kontrol (% <i>Blastocystis</i> eradikasyonu)				Kaynak
Metronidazol (44)	TMP/SMX (35)	Plasebo (29)		(Heyland ve ark, 2012)
Metronidazol (33)	TMP/SMX (22)			(Moghaddam ve ark, 2005)
Metronidazol (38)	Paromomisin (77)	Plasebo (22)	Klioquinol (38)	(van Hellemond ve ark, 2013)
Metronidazol (72)	<i>S. boulardii</i> (80)	Plasebo (26)		(Dinleyici ve ark, 2011)
	Nitazoksanid (86)	Plasebo (12)		(Rossignol ve ark, 2005)

Yakın zamanda *Blastocystis* tedavisinde yaygın kullanılan ilaçların (metronidazole, iodoquinol, üçlü kombinasyon: nitazoksanid, furazolidon ve seknidazol) değerlendirildiği kapsamlı bir çalışmada ilaçların tamamının etkisiz bulunduğu bildirilmiştir (Roberts ve ark, 2014b). Bazı çalışmalarda ilaçların etkisiz kalmasının nedenleri olarak farklı *Blastocystis* alt tiplerinin ilaçlara olan tepkisinin farklı olabileceği bildirilmiştir (Mirza ve ark, 2011). Ayrıca kist formların ilaçlara diğer formlardan daha dirençli olması nedeniyle ilaçların etkisiz kaldığı düşünülmektedir (Zaman ve ark, 1995; Stensvold ve ark, 2010; Roberts ve ark, 2015). Roberts ve ark (2014b) *Blastocystis* tedavisinde kullanılan toplam 12 ilacın etkisini *In vitro* kültürlerde dört farklı alt tip (ST1, ST3, ST4 ve ST8) kullanarak araştırmıştır. Her bir alt tipin

metronidazole, paromomisin ve üçlü tedaviye (nitazoksanid, furazolidon ve seknidazol) karşı çok düşük duyarlılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Özetle günümüzde *Blastocystis* eradikasyonu için uygun bir stratejiye sahip olmadığımız ve yeni ilaç veya ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesini gerekli olduğu görülmektedir (Coyle ve ark, 2012; Stensvold ve Clark 2016). Geçtiğimiz yıllarda anti-mikrobiyal duyarlılık testlerinde moleküler yöntemlerin kullanılması ilaç direncinin daha iyi anlaşılmasına imkan sağlamıştır. Mirza ve ark (2011) tarafından geliştirilen redoks tepkimeleri ve mikro-kültürün birleştirilmesi esasına dayanan antibiyotik duyarlılık test yöntemi geleneksel seri dilüsyon ve radyoizotop yöntemlerine göre zaman ve maliyet açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Ancak geliştirilen yöntem sadece vakuoler forma özgü olup diğer formlarda etkisiz kalmaktadır. Bu nedenle özellikle kist formlarında antibiyotik duyarlılığını belirleyecek çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Abdel-Hafeez ve ark, 2016).

2.11. Korunma

Patojenitesi tartışmalı bir konu olduğu için *Blastocystis* karşı korunma stratejilerinin ne kadar öncelikli olduğu bilinmemektedir. Benzer nedenle günümüze kadar herhangi bir aşı veya profilaksi çalışmasının olmadığı bildirilmiştir. *Blastocystis* yaşam döngüsünde bazı bilinmeyen noktalar olmakla birlikte, günümüzde en olası bulaş yolunun fekal-oral olduğu kabul edilmektedir (Tan, 2008). Ayrıca *Blastocystis*'in zoonotik karakterli olduğu ve su kaynaklı bulaşın mümkün olduğu hemen hemen kanıtlanmıştır (Parker ve ark, 2007; Anuar ve ark, 2013). Bu nedenlerle *Cryptosporidium sp.* ve *Giardia intestinalis* gibi zoonotik diğer protozoonlara benzer korunma yollarının *Blastocystis* için de geçerli olduğu öngörülmektedir. Kontamine su ve yiyecek kaynaklarından uzak durulması, hayvanlarla temas ve kişisel hijyene dikkat edilmesinin korunmada etkili olabileceği bildirilmektedir (Abdulsalam ve ark, 2012; Lee ve ark, 2012; Palasuwan ve ark, 2016).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Dışkı Örnekleri ve Olguların Seçilmesi

Çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Parazitoloji Laboratuvar'ına değişik polikliniklerden rutin parazitolojik inceleme için gönderilen dışkı örneklerinden iki grup oluşturulmuştur. İlk grup direkt mikroskopi (DM) yöntemiyle *Blastocystis* saptanan 100 dışkı örneğini, ikinci grup (kontrol grubu) ise DM ile *Blastocystis* saptanamayan 100 dışkı örneğini ihtiva etmektedir. Gruplarda yer alan örnekler basit rastgele örneklem yöntemiyle seçilmiştir.

Çalışma kapsamına alınan olguların demografik özellikleri ve epikriz kayıtları hastane bilgi yönetim sistemi (MIA-MED) kullanılarak retrospektif olarak incelenmiştir. Bu kayıtlar arasında olguların cinsiyet, yaş, ikamet adresi, gönderildiği poliklinik ve klinik bulguları yer almaktadır.

Çalışma öncesinde Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 13.11.2014 tarihinde 2014/433 nolu kararı ile çalışma için onay alınmıştır (Ek 1).

3.2. Dışkı Örneklerinin Direkt Mikroskopi (DM) Yöntemiyle İncelenmesi

Çalışma kapsamında, 200 dışkı örneğinde *Blastocystis* formlarının varlığı rutin parazitolojik inceleme kapsamında DM yöntemiyle araştırılmıştır. Dışkı örnekleri laboratuvara fiksatif içermeyen, temiz, kaşıklı, plastik dışkı kaplarıyla ulaştırılmış ve bekletilmeden incelemeye alınmıştır. Dışkı örnekleri lamın iki ucuna damlatılan serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ve Lugol'un iyodin çözeltileri ile süspanse edildikten sonra ışık mikroskopunda (Leika 500) 10X ve 40X büyütmede incelenmiştir.

3.2.1. Lugol'ün İyodin Çözeltisi

- a. 10 g potasyum iyodür tartılmış ve 100 ml suda eritilmiştir.
- b. Bu karışımın üzerine 5 g iyot kristali yavaşça eklenmiştir.

- c. Filtre kağıdından geçirilen karışım (stok) kahverengi ağzı sıkıca kapalı bir şişede bir ay süreye kadar saklanarak kullanılmıştır.
- d. Bir ml stok Lugol'ün iyodin çözeltisine, 5 ml distile su eklenerek kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan çözelti haftada bir değiştirilmiştir.

3.3. Kültür Yöntemiyle *Blastocystis* Araştırılması

İki yüz dışkı örneğinin tamamında taze dışkının farklı yerlerine eküvyon çubuğu değdirilerek alınan yaklaşık pirinç büyüklüğündeki dışkı 3ml'lik Jones besiyerine ekilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri 37°C'de standart bakteriyolojik etüvde inkübe edilmiş, bu besiyerlerinde *Blastocystis* üremesi olup olmadığı 48. saatten itibaren kontrol edilmiştir. Bu amaçla, besiyeri tüplerinin dibinden alınan yaklaşık bir damla örnek lam lamel arası preparat hazırlanarak ışık mikroskobunda incelenmiştir. Kültürlerden 0,5 ml olacak şekilde alınan sıvı taze Jones besiyerlerine aktarılarak alt kültürler yapılmıştır.

3.3.1. Jones Besiyeri

- a. %1,15 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, %0,9 KH_2PO_4 ve %0,9 NaCl çözeltileri ayrı ayrı stok çözelti olarak hazırlanmıştır.
- b. Hazırlanan stok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 93,8 ml, KH_2PO_4 çözeltisinden 31,3 ml ve NaCl çözeltisinden 562,5 ml alınarak karıştırılmıştır.
- c. Karıştırılan bu çözeltilere 0,69 gr maya ekstresi eklenmiş ve pH:7,1'e ayarlanmıştır.
- d. Çözelti 121°C'de 20 dk. otoklavlanarak steril edilmiştir.
- e. Otoklav sonrası oda sıcaklığına soğutulan çözeltilerden her 90 ml için 10 ml fetal buzağı serumu (FCS) olacak şekilde eklenmiş ve çözelti cam, vidalı kapaklı tüplere 3'er ml dağıtılmıştır.
- f. Hazırlanan besiyerleri kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmış ve dışkı örnekleri ekilmeden önce etüvde 37°C'ye kadar ısıtılmıştır.

3.4. DNA İzolasyonu

Çalışmada 200 dışkı örneğinin tamamından ve *Blastocystis* üremesi gözlenen kültürlerden genomik DNA izolasyonları ticari kitler kullanılarak yapılmıştır.

3.4.1. Dışkı Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

Dışkı örneklerinden genomik DNA izolasyonu QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) ile üretici firmanın protokolü çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. En fazla 4 hafta süreyle -20°C'de saklanan dışkı örnekleri çözülmeden aşağıdaki izolasyon aşamalarına alınmıştır.

1. 180-220 mg dışkı (sıvı ise 200 ml), 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konulmuş ve üzerine 1,4 ml tampon ASL eklenerek bir dk. boyunca en yüksek hızda vorteks ile karıştırılmıştır.
2. Süspansiyon 95°C'de 5 dk. su banyosunda veya ısı bloğunda bekletildikten sonra 15 sn. en yüksek hızda vorteks ile karıştırılmıştır.
3. Bu süspansiyon en yüksek hızda bir dk. santrifüj (15000 x g) edilmiştir.
4. Süpernatantın 1,2 ml'si yeni bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve her bir tüpe bir tane InhibitEX tablet eklenerek bekletilmeden en yüksek hızda vorteks ile karıştırılmıştır.
5. Süspansiyon bir dk. oda sıcaklığında inkübe edilip sonrasında üç dk. boyunca tam hızda (15000 x g) santrifüj edilmiştir.
6. Süpernatantın tamamı yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak 3 dk. tam hızda santrifüj edilmiştir.
7. Yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 15 µl proteinaz K konulmuştur.
8. Proteinaz K konulan yeni tüpe altıncı aşamada elde edilen süpernatandan 200 µl eklenmiştir.
9. Karışıma 200 µl Tampon AL eklenmiş ve 15 sn. vorteks ile karıştırılmıştır.
10. Bu karışım 70°C'de 10 dk. ısı bloğunda bekletilmiştir.
11. Üzerine 200 µl etanol (% 96-100) ilave edilerek vorteks ile karıştırılmıştır.
12. İki ml'lik toplama tüpüne yerleştirilen QIAamp kolonlarının kapakları etiketlenmiş ve karışımın tamamı dikkatlice QIAamp kolonun üzerine eklenmiştir.
13. Tüpler bir dk. tam hızda santrifüj edilmiştir.

14. Toplama tüpünden çıkarılan QIAamp kolonlar 2 ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
15. Üzerlerine 500 µl tampon AW1 eklenmiş ve bir dk. tam hızda santrifüj edilmiştir.
16. Toplama tüpünden çıkarılan QIAamp kolonlar 2 ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
17. Üzerine 500 µl Tampon AW2 eklenmiş ve kapağı kapatılarak 3 dk. tam hızda (15000 x g) santrifüj edilmiştir.
18. QIAamp kolonlar, önceden etiketlenen 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir.
19. QIAamp spin kolondaki membranın üzerine 200 µl Tampon AE eklenmiş ve oda sıcaklığında bir dk. bekletilmiştir.
20. Bu tüpler bir dk. tam hızda (15000g) santrifüj edilmiştir.
21. Elde edilen DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.4.2. Kültürlerden Genomik DNA İzolasyonu

Besiyerinde çoğalan *Blastocystis* izolatlarından genomik DNA izolasyonlarında ticari DNAzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific) kiti kullanılmıştır. İkinci pasajdan 48-72 saat sonra *Blastocystis* üremesi saptanan kültürler 12000 x g'de bir dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletlerden genomik DNA izolasyonu üretici firmanın bildirdiği protokole göre yapılmıştır.

1. Pelletin üzerine bir ml DNAzol® Reagent eklenerek karıştırılmıştır.
2. Karışımın üzerine 0,5 ml % 100 etanol eklenmiş ve 4000 x g'de iki dk. santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice atılmıştır. Dipte bırakılan pellet/DNA üzerine %75'lik etanol eklenip 3-5 defa alt-üst yapılmıştır. DNA'nın bu şekilde yıkanması işlemi üç defa tekrarlanmıştır.
4. Yıkama işlemleri sonrası etanolün ortamdan uzaklaştırılması için tüplerin kapağı açılarak 5-15 sn. oda sıcaklığında beklenmiştir.
5. Elde edilen pellet halindeki DNA, 8mM NaOH ile yavaşça pipetlenerek DNA'nın çözülmesi sağlanmıştır.
6. Son aşamada 10000 x g'de 10dk. santrifüj edildikten sonra genomik DNA'yı içeren süpernatant yeni mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.
7. İzole edilen DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.5. *Blastocystis* SSU rDNA Geninin PZR ile Kısmi Olarak oğaltılması ve Dizilenmesi

DNA izolasyonları yapılan tüm örneklerde [Dışkı örneklerinden (200 örnek) ve kültürde üreyenlerden] *Blastocystis* SSU-rDNA geni (barkot bölgesi) PZR ile çoğaltılmıştır. Amplifikasyon işlemi, universal RD5 (forward) (5'-ATCTGGTTGATC CTGCCAGT-3') ve *Blastocystis*'e özgü BhRDr (reverse) (5'-GAGCTTTTTAACTGCAACAACG-3') primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 30 µl hacimde şu şekilde kurulmuştur: 50 ng kalıp DNA, 0,4 pmol RD5 ve BhRDr primerleri, 0,3 U Taq DNA polimeraz (Fermentas), 0,2 mM dNTP (Fermentas) ve 1× (NH₄)₂SO₄ tampon (Fermentas). Polimeraz zincir reaksiyonu için T100™ Thermal Cycler (Biorad) cihazı kullanılmış olup döngüler aşağıdaki şekilde ayarlanmıştır (Tablo 3.1). Amplikonlar %1,5 agaroz jelde Vilber Lourmat görüntüleme sistemi kullanılarak ultraviyole ışık (340 nm) altında fotoğraflanmıştır.

Tablo 3.1. *Blastocystis* SSU rDNA kısmi amplifikasyonu için PZR döngüsü

	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	
Ön denatürasyon	94	3	
Denatürasyon	94	1	
30 döngü	Bağlanma	54	1
	Uzama	72	1
Son uzama	72	5	

3.6. Direkt Mikroskopi, Kültür ve PZR Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Çalışmada kullanılan DM, kültür ve PZR yöntemlerinden her biri ayrı ayrı altın standart olarak kabul edilmiş, seçilen bu yönteme göre diğerlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar Tablo 3.2'de gösterildiği şekilde yapılmıştır.

Tablo 3.2. Tanı yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerlerinin hesaplanması

		Altın standart	
		Pozitif	Negatif
Test	Pozitif	a	c
	Negatif	b	d

a: gerçek pozitif, b: yanlış negatif, c: yanlış pozitif, d: gerçek negatif

Duyarlılık= $a / (a + b)$, **Özgüllük**= $d / (d+c)$,

Pozitif Prediktif Değer= $a / (a + c)$, **Negatif Prediktif Değer**= $d / (d+b)$

3.7. *Blastocystis* Kısmi SSU rDNA Geninin Dizilenmesi ve Alt Tiplerin Belirlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında beklenen boyutta (~600bp) bant görülen dışkı-PZR ürünlerinin tamamı ve basit rastgele örneklem ile seçilen kültür-PZR ürünleri dizileme için ticari bir firmaya (MedSanTek, İstanbul) gönderilmiştir. Örnekler purifikasyon yapıldıktan sonra Applied Biosystems 377 DNA Sequencer cihazı kullanılarak *Blastocystis* kısmi SSU rDNA geni dizilenmiştir.

Blastocystis kısmi SSU rDNA gen dizileri Genbank'dan indirilen referans dizilerle ClustalW algoritması Bioedit for Windows (Tom Hall) programı ile sıralanarak (alignment) dizilerin başlangıcında ve sonundaki muhtemel yanlış okunan bölgeler çıkarılmıştır. Bu amaçla kullanılan referans dizilerin GenBank erişim numaraları şu şekildedir: AB107967, JF792497, EU445488, EU445486, EU445492, KF848573, KF848534 dizileri ST1 için; AB070987, JF792496, EU679345, DQ232794, JN003684 dizileri ST2 için; KF848561, JN587546, AB070988, dizileri ST3 için ve son olarak JN003686, KF447169, AB070991, dizileri ST7 için kullanılmıştır. Ayrıca tüm dizileme dosyalarında amplifikasyon eğrileri gözden geçirilerek olası yanlış okumalar tespit edilmeye çalışılmıştır.

Düzenlenen *Blastocystis* kısmi SSU rDNA dizileri Genbank nükleotit veri tabanındaki “<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>” dizilerle Basic Local Alignment (BLAST) kullanılarak karşılaştırılmıştır (Altschul ve ark, 1990). Ayrıca, tüm diziler *Blastocystis* alt tip veri tabanına “<http://pubmlst.org/Blastocystis>” girilmiştir. Veri tabanına göre tam veya en fazla benzerlik gösterdikleri alt tipler belirlenmiştir (Stensvold ve ark, 2007a; Jolley ve Maiden, 2010).

3.8. STS-PZR ve Alt Tiplerin Belirlenmesi

Kısmi SSU rDNA dizilerine göre alt tipi belirlenemeyen *Blastocystis* DNA örnekleri STS-PZR ile tekrar çalışılmıştır. Bu yöntemde yedi farklı *Blastocystis* alt tipine (ST1-7) özgü primer çiftleri (Tablo 3.3) kullanılmış olup her bir alt tip için ayrı reaksiyon yapılmıştır. Reaksiyonlar 30µl hacimde kurulmuştur: 50ng DNA, 0,4 pmol primer, 0.3U Taq DNA polimeraz (Fermentas), 0,2 mM dNTP (Fermentas)ve 1×(NH₄)₂SO₄ tampon (Fermentas). Polimeraz zincir reaksiyonları T100™ ThermalCycler (Biorad) cihazında yapılmış olup döngüler Tablo 3.4’de verilmiştir.

Reaksiyon sonrası PZR ürünleri %1,5’lik agaroz jelde 90V, 30-45 dk. yürütülmüş ve Vilber Lourmat görüntüleme sistemi kullanılarak ultraviyole ışık altında (340 nm) fotoğraflanmıştır.

Tablo 3.3. STS-PZR için kullanılan primer çiftleri

Alt tip	Primer	Ürün (bp)	Forward Primer (5’-3’)	Reverse Primer (5’-3’)
ST 1	SB ₈₃	351	GAAGGACTCTCTGACGATGA	GTCCAAATGAAAGGCAGC
ST 2	SB ₃₄₀	704	TGTTCTTGTGTCCTTCAGCTC	TTCTTTCACACTCCCGTCAT
ST 3	SB ₂₂₇	526	TAGGATTTGGTGTGGAGA	TTAGAAGTGAAGGAGATGGAAG
ST 4	SB ₃₃₇	487	GTCTTCCCTGTCTATTCTTGCA	AATTCGGTCTGCTTCTTCTG
ST 5	SB ₃₃₆	317	GTGGGTAGAGGAAGGAAAACA	AGAACAAGTCGATGAAGTGAGAT
ST 6	SB ₃₃₂	338	GCATCCAGACTACTATCAACATT	CCATTTTCAGACAACCACTTA
ST 7	SB ₁₅₅	650	ATCAGCCTACAATCTCCTC	ATCGCCACTTCTCCAAT

Tablo 3.4. *Blastocystis* STS-PZR döngüsü

	Sıcaklık (°C)	Süre
Ön denatürasyon	96	2 dk.
35 döngü	Denatürasyon	20 sn.
	Bağlanma	20 sn.
	Uzama	30 sn.
Son uzama	72	7 dk.

3.9. *Blastocystis* Kısmi SSU rDNA Dizilerine Göre Örneklerin Genetik Uzaklıklarının Belirlenmesi

Sıralanan ve düzenlenen dizilerle Molecular Evolutionary Genetics Analysis versiyon7.0 (MEGA) programında Neighbor-Joining metodu, bootstrap testleri (1000 tekrar) kullanılarak genetik uzaklığa bağlı bir ağaç çizilmiştir. Örneklerin evrimsel uzaklıkları Maximum Composite Likelihood metodu ile belirlenmiştir. Bu analizlerde *Proteromonas lacertae* 18S ribozomal RNA geni kısmi dizisi (AY224080) dış grup olarak kullanılmıştır.

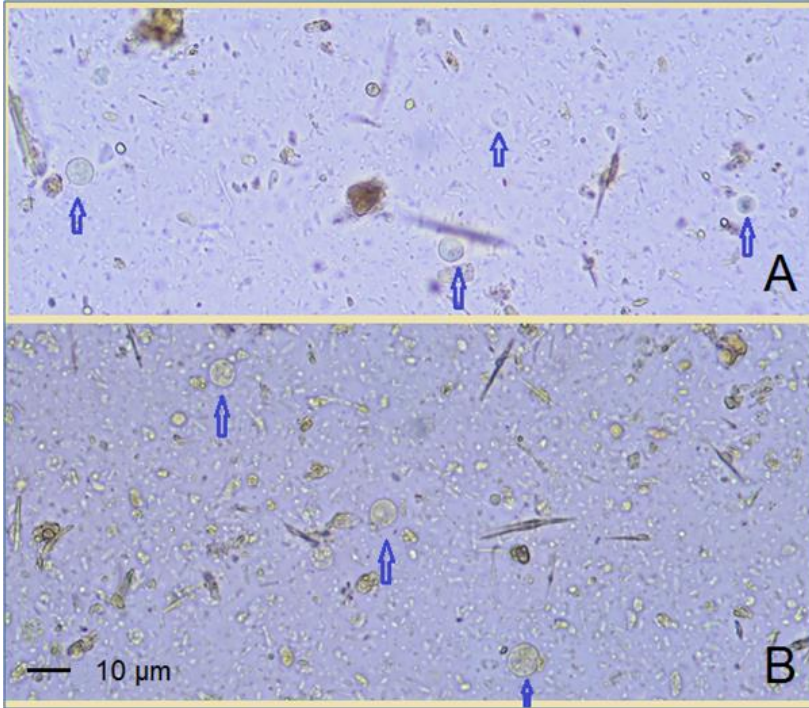
3.10. İstatistiksel Analiz

Direkt mikroskopi, kültür veya PZR yöntemlerinin herhangi biriyle *Blastocystis* pozitifliği saptanan olgular ile bu yöntemlerden hiç biriyle *Blastocystis* pozitiflik saptanmayanlar cinsiyet, yerleşim yerleri, yaş grupları ve klinik bulgular yönünden karşılaştırılmıştır. Bununla birlikte *Blastocystis* alt tipleri ve olguların özellikleri ayrıca değerlendirilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi SPSS 15.0 paket programı (PASW Inc., Chicago. IL. USA) kullanılarak yapılmış ve $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Sınıflandırılmış verilerin değerlendirilmesinde Ki-kare testi, analitik verilerin değerlendirilmesinde Student-T testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Dışkı Örnekleri ve Olgular

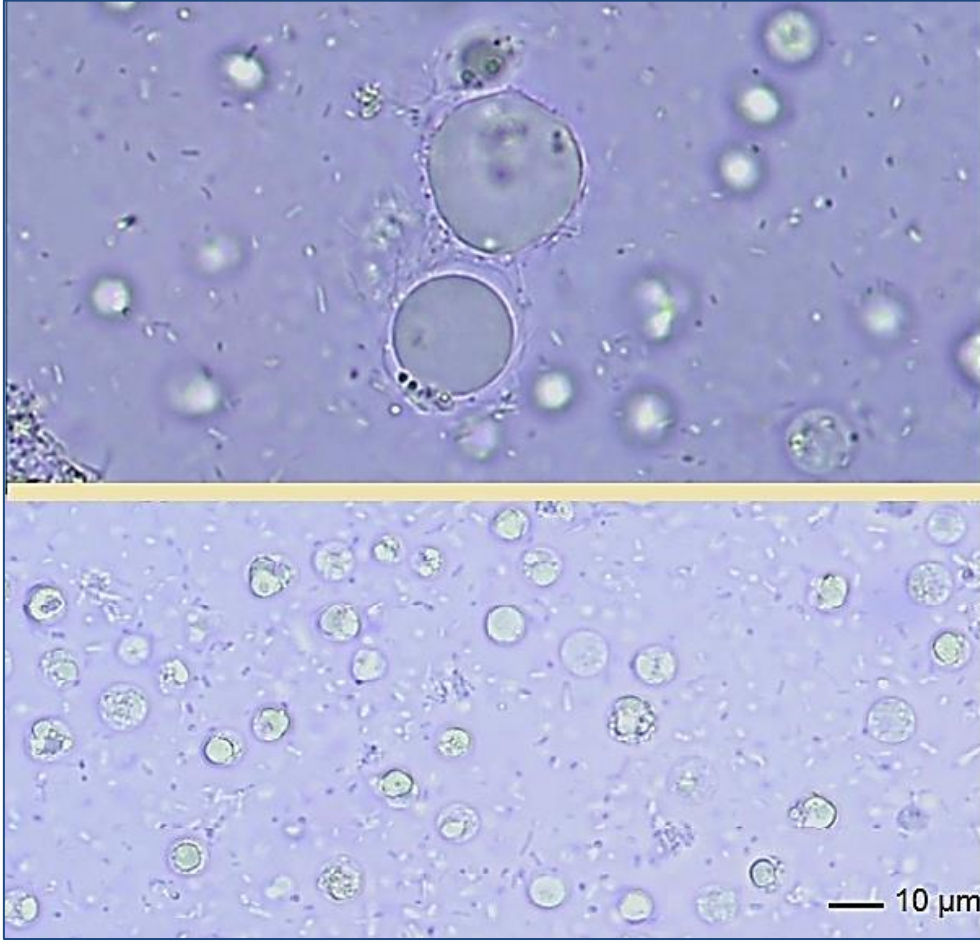
Çalışma kapsamında Adnan Menderes Üniversitesi, Eğitim ve Uygulama Hastanesi, Parazitoloji Laboratuvarı'na değişik polikliniklerden gönderilen toplam 200 farklı olguya ait dışkı örneği değerlendirilmiştir. Bu örneklerin 100'ü DM yöntemiyle *Blastocystis* saptanan (Resim 4.1) diğer 100'ü ise aynı yöntemle *Blastocystis* saptanmayan olgulardan seçilmiştir. Olguların 102'sini (%54) kadınlar, 92'sini (%46) erkekler oluşturmaktadır. Olguların yaşları 1-84 arasında değişmekte olup ortalama \pm standart sapma: $34,6 \pm 23,4$ şeklinde bulunmuştur. Örneklerin gönderildiği poliklinikler incelendiğinde en başta Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları polikliniği gelmekte (62 dışkı örneği, %31) bunu Gastroenteroloji (45 dışkı örneği, %22,5), İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları (44 dışkı örneği, %22), İç Hastalıkları (22 dışkı örneği, %11) ve diğer polikliniklerin (27 dışkı örneği %13,5) takip etmektedir. Çalışmamızdaki olguların büyük kısmı şehir merkezinde ikamet etmekte olup (129 kişi, %64,5), ardından köylerde (40 kişi, %20) ve ilçelerde ikamet edenler (31 kişi, %15,5) gelmektedir.



Resim 4.1. Direkt mikroskopik incelemede görülen *Blastocystis*'ler (A: Serum fizyolojik, B: Lügol'ün iyodin boyası)

4.2. *Blastocystis* Kültürü

Direkt mikroskopik inceleme (DM) ile *Blastocystis* saptanan 100 dışkı örneği Jones besiyerine ekildiğinde, kültürlerin 81'inde (%81) üreme görülmüştür (Resim 4.2). Ayrıca DM ile *Blastocystis* saptanmayan 100 dışkı örneği besiyerine ekildiğinde, kültürlerin beşinde (%5) üreme görülmüştür. Tablo 4.1'de dışkı örneklerinin DM ve kültür sonuçları verilmiştir.



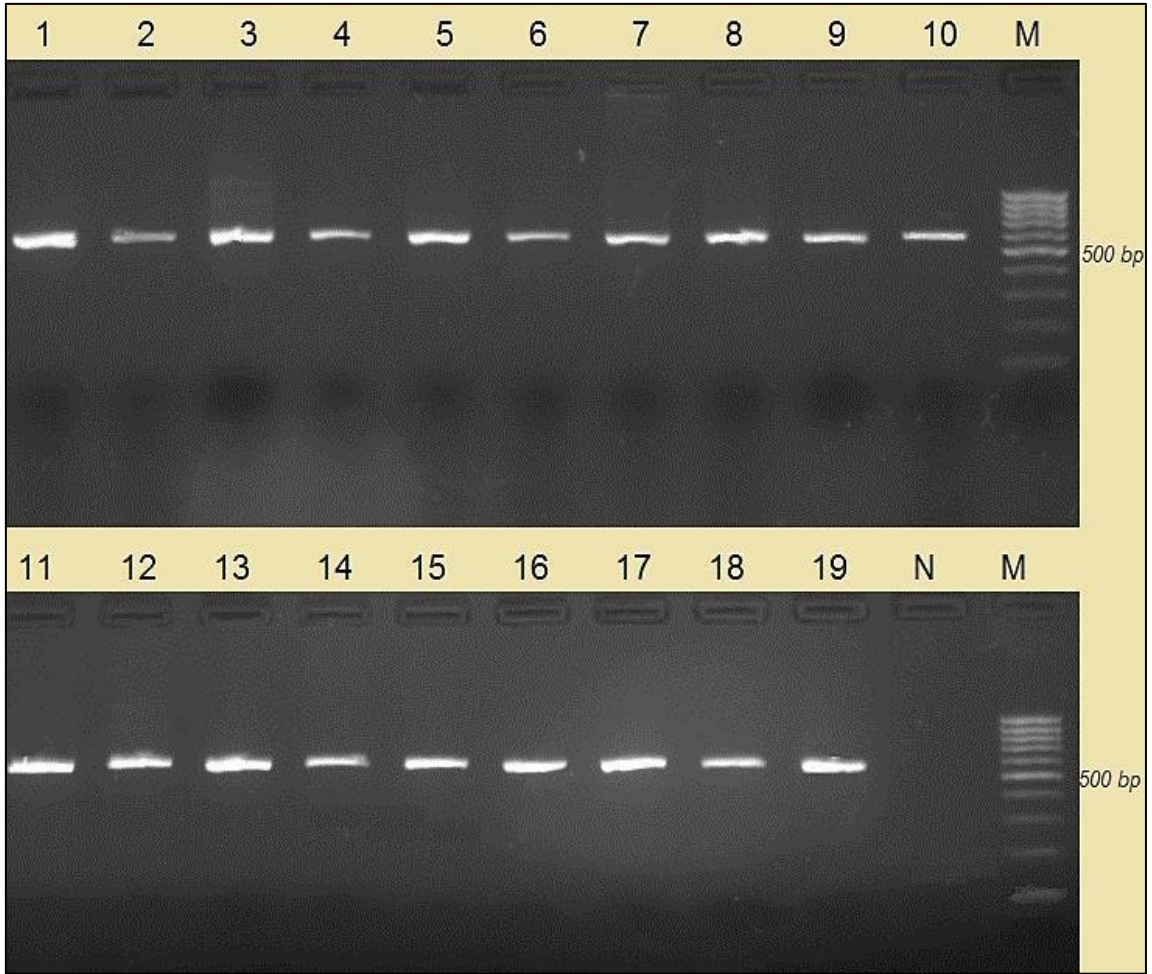
Resim 4.2. Jones besiyerinde üreyen *Blastocystis*'lere ait mikroskop görüntüleri

Tablo 4.1. DM ve kültür sonuçları

		Kültür	
		Pozitif(%)	Negatif(%)
DM	Pozitif (n=100)	81(%81)	19 (%19)
	Negatif (n=100)	5 (%5)	95 (%95)
Toplam	N=200	86 (%43)	114 (%57)

4.3. DNA İzolasyonları ve SSU rDNA-PZR

Direkt mikroskopi (DM) yöntemiyle *Blastocystis* saptanan 100 ve saptanmayan 100 dışkı örneğinden genomik DNA izolasyonu yapılarak *Blastocystis* SSU rRNA genine özgü PZR çalışıldığında sırasıyla 88'inde (%88) ve yedisinde (%7) beklenen boyutta (~600bp) amplifikasyon görülmüştür (Resim 4.3). Tablo 4.2'de DM ve SSU rDNA-PCR sonuçları verilmiştir. Ayrıca kültür ve SSU rDNA-PZR bulguları Tablo 4.3'de verilmiştir.



Resim 4.3. Bazı örneklerin SSU rDNA-PZR sonuçlarına ilişkin agaroz jel görüntüsü, 1- 19 pozitif örnekler, N: Negatif Kontrol, M: 100bp'lik marker (Fermentas).

Tablo 4.2. DM ve SSU rDNA-PZR sonuçları

		SSU rDNA-PZR	
		Pozitif (%)	Negatif (%)
DM	Pozitif (n=100)	88 (%88)	12 (%12)
	Negatif (n=100)	7 (%7)	93 (%93)
Toplam	N=200	95 (%47,5)	105 (%52,5)

Tablo 4.3. Kültür ve SSU rDNA-PZR sonuçları

		SSU rDNA-PZR	
		Pozitif (%)	Negatif (%)
Kültür	Pozitif (n=86)	86 (100)	0 (0)
	Negatif (n=114)	9 (7,9)	105 (92,1)
Toplam	N= 200	95 (47,5)	105 (52,5)

Blastocystis üremesi görülen toplam 86 (n=200, %43) kültürün tamamından DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu örnekler SSU rDNA-PZR ile çalışıldığında tamamında beklenen boyutta amplifikasyon görülmüştür.

4.4. Tanıda Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

Çalışma kapsamında uygulanan DM, kültür ve SSU rDNA-PZR yöntemleri ve sonuçları toplu olarak Tablo 4.4’de verilmiştir. Yöntemler sırasıyla altın standart olarak kabul edilerek duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri hesaplanmıştır. Direkt mikroskopi altın standart olarak kabul edildiğinde, kültür ve SSU rDNA-PZR yöntemlerinin değerleri Tablo 4.5’de verilmiştir. Kültür yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, DM ve SSU rDNA-PZR yöntemlerinin değerleri Tablo 4.6’de verilmiştir. SSU rDNA-PZR altın standart olarak kabul edildiğinde, DM ve kültür yönteminin değerleri Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.4. Tanı yöntemlerinin bir arada değerlendirilmesi

Direkt Mikroskopi	Kültür	SSU rDNA-PZR
Pozitif n=100	Pozitif n=81 (%81)	Pozitif n=81 (%100)
		Negatif n=0 (%0)
	Negatif n=19 (%19)	Pozitif n=7 (%36,9)
		Negatif n=12 (%63,1)
Negatif n=100	Pozitif n=5 (%5)	Pozitif n=5 (%100)
		Negatif n=0 (%0)
	Negatif n=95 (%95)	Pozitif n=2 (%2,1)
		Negatif n=93 (%97,9)

Tablo 4.5. DM yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, kültür ve SSU rDNA-PZR yöntemlerinin değerleri

	Kültür Yöntemi (%)	SSU rDNA-PZR (%)
Duyarlılık	81	88
Özgüllük	95	93
Pozitif Prediktif Değer	94,2	92,6
Negatif Prediktif Değer	83,3	88,6

Tablo 4.6. Kültür yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, DM ve SSU rDNA-PZR yöntemlerinin değerleri

	DM (%)	SSU rDNA-PZR (%)
Duyarlılık	94,2	100
Özgüllük	83,3	92,1
Pozitif Prediktif Değer	81	90,5
Negatif Prediktif Değer	95	100

Tablo 4.7. SSU rDNA-PZR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, DM ve kültür yöntemlerinin değerleri

	DM (%)	Kültür(%)
Duyarlılık	92,6	90,5
Özgüllük	88,6	100
Pozitif Prediktif Değer	88	100
Negatif Prediktif Değer	93	92,1

4.5. Kısmi SSU rDNA Ürünlerinin Dizilenmesi

Dışkı örneklerinden izole edilen DNA örnekleri SSU rDNA PZR ile çalışıldığında 95 örnekte beklenen boyutta amplifikasyon görülmüştür. Bu amplikonların tamamı dizilenmek üzere ticari firmaya gönderilmiştir.

Ayrıca kültürde çoğalan 86 *Blastocystis* izolatından izole edilen DNA örnekleri SSU rDNA PZR ile çalışıldığında tamamında beklenen boyutta amplifikasyon görülmüştür. Bu örneklerden basit rastgele örnekleme metodu ile seçilen 35 tanesi dizilemeye gönderilmiştir. *Blastocystis* negatif kültürlerden DNA izolasyonu ve PZR yapılmamıştır.

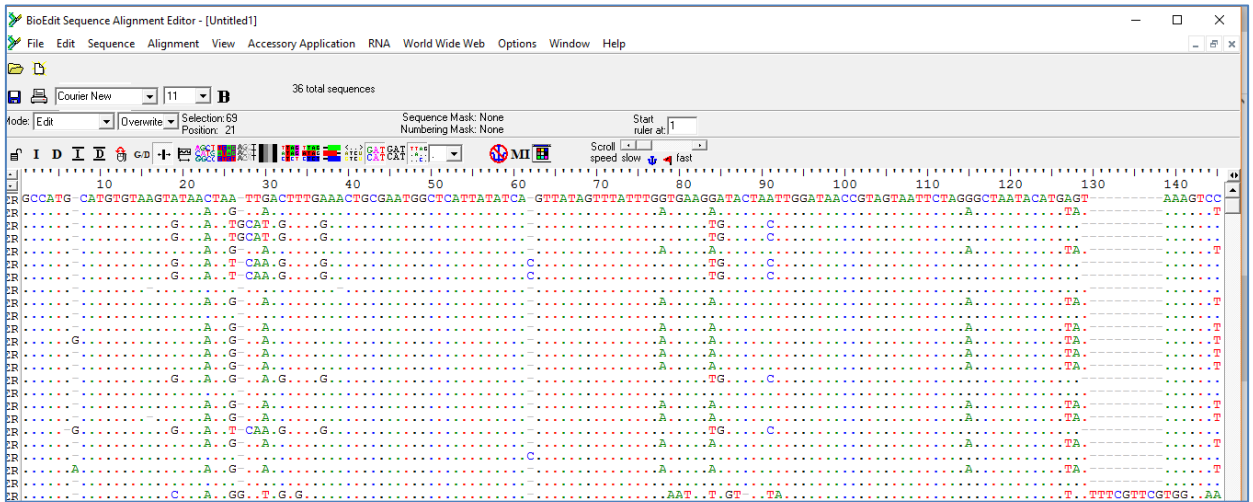
Toplamda 130 SSU rDNA-PCR ürünü (95'i dışkıdan ve 35'i kültürden izole edilen DNA'lardan) dizilenmek üzere ticari firmaya gönderilmiştir.

4.6. Kısmi SSU rDNA Dizilerine Göre *Blastocystis* Alt Tipleri

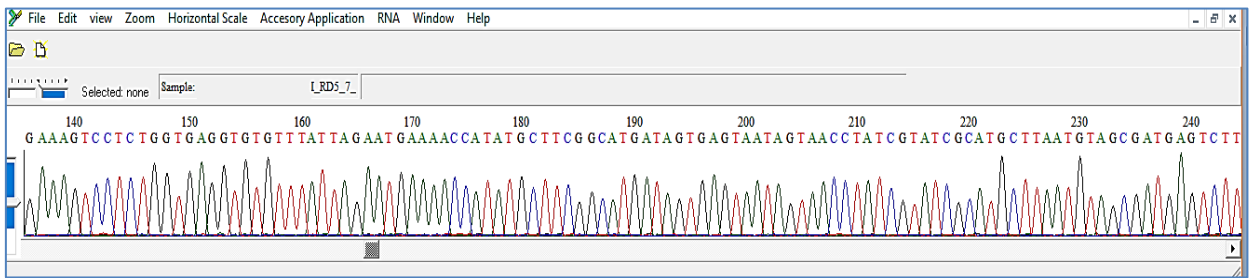
Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu ve SSU rDNA PZR yapılarak elde edilen toplam 95 kısmi SSU rDNA dizisi, referans dizilerle sıralanmıştır (Resim 4.4). Ayrıca kromotogram görüntüleri (.abi uzantılı) gözden geçirilerek olası yanlış nükleotit okumaları düzeltilmiştir (Resim 4.5). Referans dizilerle sıralama sonucu tüm *Blastocystis* SSU rRNA gen dizileri 540 bp boyuta getirilmiştir. Düzenlenen kısmi *Blastocystis* SSU rDNA dizileri, alt tip veri tabanına girildiğinde 92'si (%96,8) mevcut alt tip girdilerinin bir tanesi ile tam uyum

göstermiş ancak üç tanesi (%3,2) değişen oranlarda farklılık göstermiştir. Resim 4.6'de tam uyum gösteren bir izolata ait sonuç, Resim 4.7'de ise tam uyum göstermeyen üç diziden bir tanesine ait sonuç verilmiştir. Bu veri tabanında alt tipler SSU rRNA gen dizisinin ST1 için 351 bp, ST2 için 350 bp, ST3 için 348 bp ve ST7 için 357 bp uzunluktaki kapsayacak şekilde belirlenmiştir.

Kültürden DNA izolasyonu ve SSU rDNA PZR yapılarak elde edilen 35 kısmi SSU rDNA dizisi, referans dizilerle sıralanmıştır. Ayrıca kromotogram görüntüleri gözden geçirilerek olası yanlış nükleotit okumaları düzeltilmiştir. Düzenlenen kısmi *Blastocystis* SSU rDNA dizileri, alt tip veri tabanına girildiğinde 33'ü (%94,2) mevcut alt tip girdilerinin bir tanesi ile tam uyum göstermiş ancak iki tanesi (%5,8) değişen oranlarda farklılık göstermiştir.



Resim 4.4. *Blastocystis* SSU rDNA dizilerinin sıralanması (alignment)



Resim 4.5. *Blastocystis* kısmi SSU rDNA dizilerinden birine ait kromatogram dosyası

Sequence query - *Blastocystis* locus/sequence definitions

Please paste in your sequence to query against the database. Query sequences will be checked first for an exact match against the chosen (or all) loci - they do not need to be trimmed. The nearest partial matches will be identified if an exact match is not found. You can query using either DNA or peptide sequences. [?](#)

— Please select locus/scheme — — Order results by —
 All loci — locus —

— Enter query sequence (single or multiple contigs up to whole genome in size) — — Alternatively upload FASTA file —
 Select FASTA file:
 Choose File | No file chosen
 — or enter Genbank accession —

Action
 Reset Submit

1 exact match found.
 Translate query

Allele	Length	Start position	End position	Attributes
18S rRNA: 12	350	78	427	subtype: ST2

Resim 4.6. *Blastocystis* veri tabanında ST3 ile tam uyum gösteren kısmi SSU rDNA dizisi

Translate query

Closest match: 18S rRNA: 36

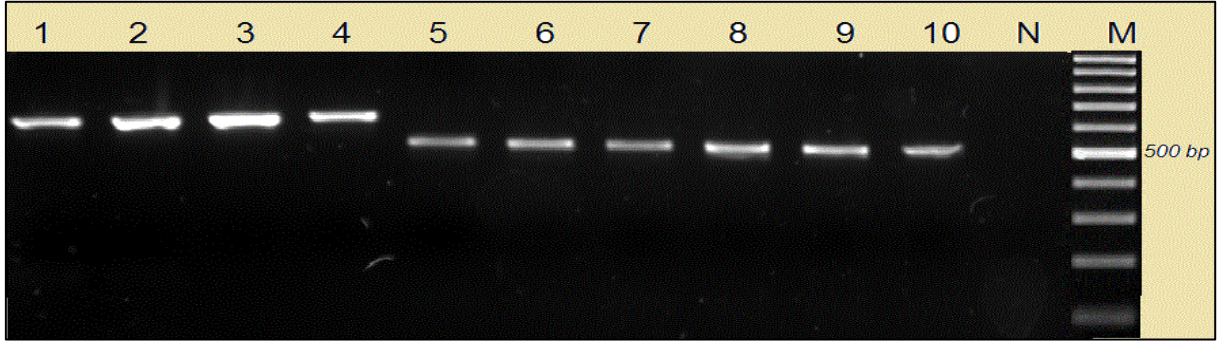
Query	GTGCCCTAGGATTAGCCATGCATGTGTAAGTATAAAATAGTTAACTTTGAAACTGCGAATGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATGAAGAATACTA
Ref
Query	ATTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGTATAAAGTCTGTAGACTGCATTATTAGAAATGAAAACCATAGGTTTCGGCCATTTCGTGAGTA
Ref
Query	ATAATAACTAATCATATCGTATGCTTAAGTAACGATGTGCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCTCCTTTCGATGGGGTGTATTGGACTACCTGGGGTAA
RefAG.....TA.....CA.....
Query	CGGGGAACAAATAATTTGGGTTCTATTTTTCAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACCTATCCAGGAAGGCGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGAC
Ref	...T...G...G...T...G...CG.....A...A...A...
Query	ACAGGGGGTGGTGAACAATAAATCAAAATGCGGAACAATGTTTTCGAATTGGATTGAGAAACAACCTACAAACCTTATTGATAAACAATTGGAGGGCAAGT
RefA...A.....
Query	CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCTGCTCCCATAGCGTATATAAACGTTTGTTCATGAAAAAATCAAAAAAATT
Ref

Resim 4.7. *Blastocystis* veri tabanında her hangi bir ST ile tam uyum göstermeyen (19 nükleotit fark) kısmi SSU rDNA dizisi

4.7. Sekanslama ile Alt Tipi Belirlenmeyen Örneklerin STS-PZR Sonuçları

Dışkıdan DNA izolasyonu yapılan örneklerden alt tipi belirlenemeyen üç örnek STS-PZR ile tekrar çalışıldığında ikisinde ST2 ve ST3 alt tipleri, sonuncusunda ise ST1 ve ST2 alt tipleri birlikte saptanmıştır (Resim 4.8). Aynı şekilde kültürden DNA izolasyonu yapılan

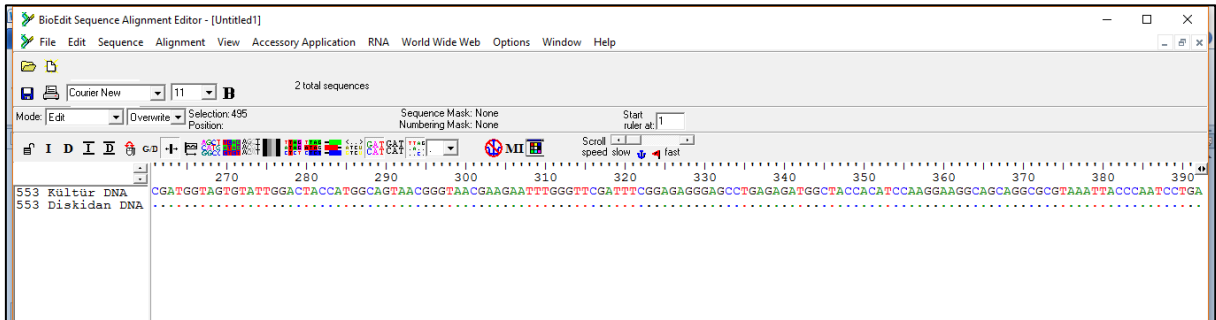
örneklerden alt tipi belirlenemeyen iki örnek STS-PZR ile tekrar çalışıldığında ikisinde de ST2 ve ST3 alt tipleri birlikte saptanmıştır.



Resim 4.8. Bazı örneklerin STS-PZR sonuçlarına ilişkin agaroz jel görüntüsü: 1- 4 arası ST2 (704bp), 5-10 arası ST3 (526 bp), N: Negatif Kontrol, M: 100bp'lik marker (Fermentas).

4.8. Dışkıdan ve Kültürden DNA İzolasyonu Sonucu Belirlenen *Blastocystis* Alt Tiplerinin Karşılaştırılması

Çalışmada dışkıdan direkt ve kültürden DNA izolasyonu yapılan aynı olgulara ait örneklerin kısmi SSU rDNA dizileri birbiriyle karşılaştırıldığında aynı nükleotid dizilerine (diğer ifadeyle alt tipleri) sahip oldukları görülmüştür. Örnek olarak Resim 4.9'da 553 numaralı olgunun kültürden ve dışkıdan direkt DNA izolasyonu ile belirlenen kısmi SSU rDNA dizilerinin karşılaştırılması gösterilmektedir. Her iki DNA izolasyon yöntemiyle değerlendirilen 35 olguda belirlenen *Blastocystis* alt tipleri Tablo 4.8'de verilmiştir.



Resim 4.9. Aynı örneğin dışkıdan direkt ve kültür sonrası DNA örneklerinden elde edilen SSU rDNA dizilerinin karşılaştırılması

Tablo 4.8. DNA izolasyon yöntemleri ve alt tipler

Sıra	Örnek No.	Dışkıdan DNA	Kültürden DNA
1	534	ST1	ST1
2	540	ST1	ST1
3	560	ST1	ST1
4	1003	ST1	ST1
5	1010	ST1	ST1
6	466	ST2	ST2
7	469	ST2	ST2
8	559	ST2	ST2
9	570	ST2	ST2
10	575	ST2	ST2
11	1004	ST2	ST2
12	1008	ST2	ST2
13	1009	ST2	ST2
14	427	ST3	ST3
15	468	ST3	ST3
16	474	ST3	ST3
17	525	ST3	ST3
18	532	ST3	ST3
19	550	ST3	ST3
20	552	ST3	ST3
21	553	ST3	ST3
22	557	ST3	ST3
23	561	ST3	ST3
24	563	ST3	ST3
25	574	ST3	ST3
26	581	ST3	ST3
27	1001	ST3	ST3
28	1002	ST3	ST3
29	1012	ST3	ST3
30	1013	ST3	ST3
31	1014	ST3	ST3
32	1023	ST3	ST3
33	1103	ST7	ST7

(Devam)			
34*	453	ST2 ve ST3	ST2 ve ST3
35*	1095	ST2 ve ST3	ST2 ve ST3

Alt tipler: ST1 beş örnek (%14,2), ST2 sekiz örnek (%22,8), ST3 19 örnek (%54,3) ve ST2+ST3 iki örnek (%5,7), ST 7 bir örnek (%2,8); *STS-PZR ile alt tipi belirlenen örnekler

4.9. *Blastocystis* Alt Tiplerinin Toplu Halde Değerlendirilmesi

Sonuç olarak toplam 95 örneğin *Blastocystis* alt tipi belirlenmiştir (Tablo 4.9). SSU rDNA-PZR ile alt tipi belirlenen örneklerin direkt mikroskopi ve kültür sonuçlarına göre değerlendirilmesi Tablo 4.10'da verilmiştir. Ayrıca besiyerinde üremeyen ancak dışkıdan DNA izolasyonu ve sonrasında PZR yapıldığında pozitif saptanan toplam dokuz örnekte *Blastocystis* alt tip dağılımı: ST3 (altı örnek, %66,6), ST2 (iki örnek, %22,2) ve ST1 (bir örnek, %11,1) şeklinde bulunmuştur.

Tablo 4.9. *Blastocystis* alt tiplerinin dağılımı

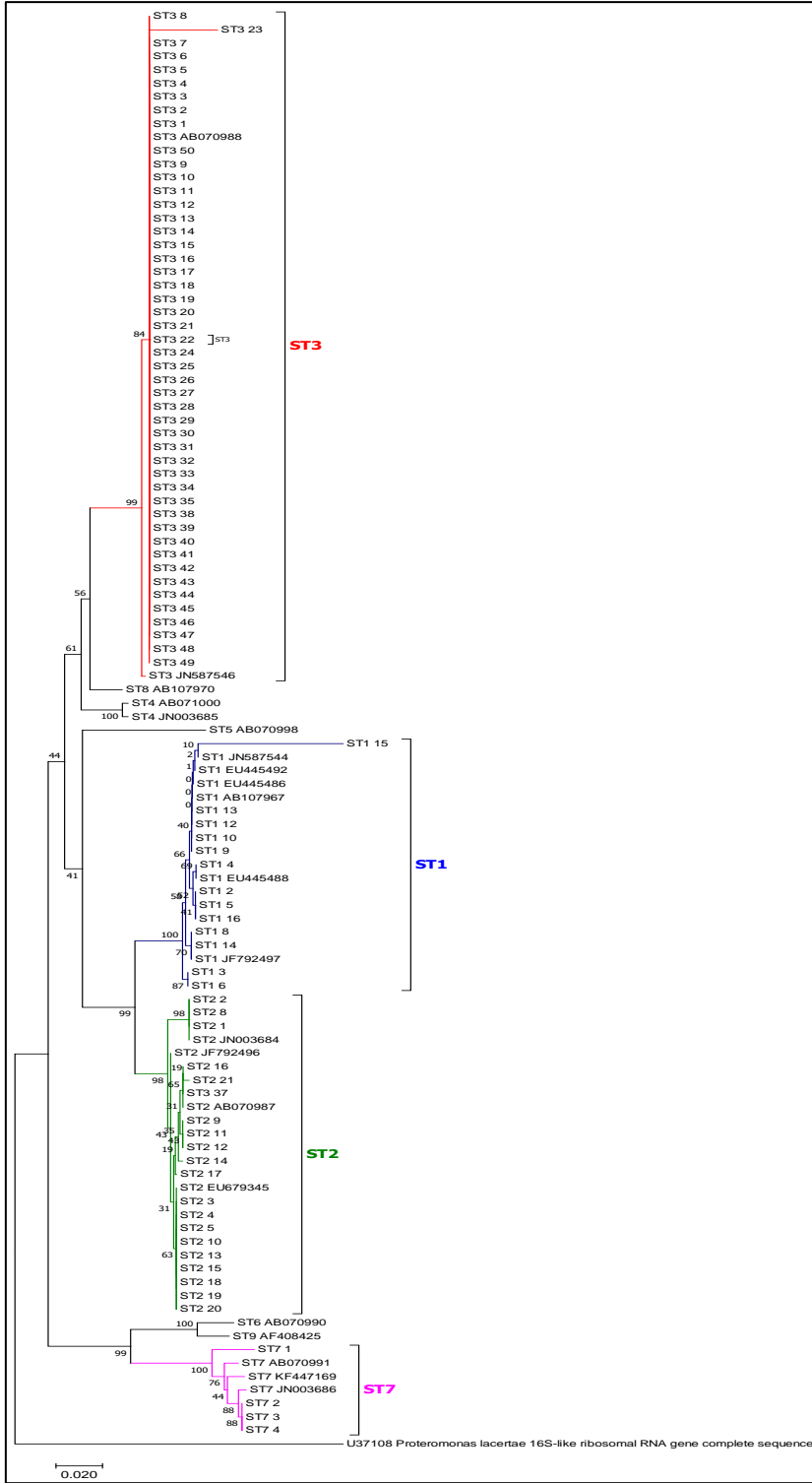
	Sayı	%
ST3	50	52,6
ST2	21	22,1
ST1	17	17,9
ST7	4	4,2
ST2 ve ST3	2	2,1
ST1 ve ST3	1	1,1
Toplam	95	100

Tablo 4.10. Alt tipleri belirlenen *Blastocystis* izolatlarının yöntemlere göre dağılımı

	ST1 (%)	ST2(%)	ST3(%)	ST7 (%)	ST1+ST3 (%)	ST2+ST3 (%)	Toplam
DM+ Kültür+							
n=81	14 (17)	19 (23,5)	41 (50,6)	4 (4,9)	1 (1,2)	2 (%2,4)	81 (100)
DM+ Kültür –							
n=19	1 (5,2)	2 (10,4)	4 (21)	-	-	-	7 (36,8)
DM- Kültür+							
n=5	2 (40)	-	3 (60)	-	-	-	5 (100)
DM- Kültür –							
n=95	-	-	2 (2,1)	-	-	-	2 (2,1)
Toplam	17 (17,9)	21(22,1)	50 (52,6)	4 (4,2)	1 (1,1)	2 (2,1)	95 (100)

4.10. *Blastocystis* Kısmi SSU rDNA Dizilerinin Filogenetik Analizi

Alt tipi belirlenen toplam 95 *Blastocystis* izolatının 92'si (kalan üç tanesi STS primerleri ile belirlendiği için sekans verisi yoktur) “Genbank” dan indirilen referans diziler ile sıralanmış ve evrimsel uzaklıkları belirlenmiştir (Resim 4.10). Kısmi SSU rDNA dizilerinin veri tabanına girilmesi sonucu belirlenen *Blastocystis* alt tipleri ile filogenetik analiz sonuçları bir biriyle tamamen örtüşmektedir. Alt tipi ST3 olarak belirlenen toplam 50 örnek Genbank'dan indirilen ST3 referans SSU rDNA dizileri ile aynı dalda, ST2' olarak belirlenen 21 örnek ST2 referansları ile aynı dalda, ST1 olarak belirlenen 17 örnek ST1 referansları ile aynı dalda ve ST7 olarak belirlenen dört örnekte ST7 referanslarına yakın dallarda yer almıştır.



Resim 4.10. Kısmi SSU rDNA dizilerinin evrimsel uzaklıkları

4.11. Demografik Özellikler ve Semptomların Analizi

Direkt mikroskopi, kültür veya SSU rDNA-PZR yöntemlerinden herhangi biriyle *Blastocystis* pozitifliği saptanan 107 olgu ile saptanmayan 93 olgucinsiyet, yaş, yaşadıkları idari birim açısından karşılaştırıldığında her hangi biriyle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 4.11). Aynı şekilde semptomlar açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 4.12). Epikriz kayıtları incelendiğinde olguların büyük çoğunluğunda birden fazla semptomun var olduğu görülmüştür. *Blastocystis* alt tipleri ve semptomlar ayrıca değerlendirildiğinde alt tipler ile semptomlar arasında bir ilişki bulunmadığı saptanmıştır (Tablo 4.13).

Tablo 4.11. *Blastocystis* saptanan ve saptanmayan olgular cinsiyet, yaş, yaşadıkları idari birim açısından karşılaştırılması

		<i>Blastocystis</i>						
		Pozitif (n=107)		Negatif (n=93)		Toplam	χ^2	P
		Sayı	%	Sayı	%			
Cinsiyet	Erkek	49	45,8	43	46,2	92	0,004	0,950
	Kadın	58	54,2	50	53,8	108		
	Şehir Merkezi	69	53,4	60	46,6	129		
Yerleşim yeri	İlçe	17	15,9	14	15,1	31	0,038	0,981
	Köy	21	19,6	19	20,4	40		
	1-18	38	35,5	28	30,1	66		
Yaş grupları	19-40	33	30,8	20	21,5	53	4,873	0,181
	41-60	21	19,6	28	30,1	49		
	61+	15	14,1	17	18,3	32		

Tablo 4.12. *Blastocystis* saptanan ve saptanmayan olgularda semptomların karşılaştırılması

Semptom	<i>Blastocystis</i>				Toplam	χ^2	p
	Pozitif (n=107)		Negatif (n=93)				
	Sayı	%	Sayı	%			
Kaşıntı	35	32,7	28	30,1	53	0,156	0,693
İshal	27	25,2	16	17,2	43	1,901	0,168
Karın ağrısı	21	19,6	14	15,1	35	0,721	0,396
Dispepsi	10	9,3	11	11,8	21	0,326	0,568
Bulantı kusma	9	8,4	6	6,5	15	0,275	0,600
Konstipasyon	6	5,2	3	3,2	14	1,604	0,091
Kilo kaybı	5	4,7	5	5,4	10	0,052	0,820
Diğer*	14	13,1	11	11,8	25	0,072	0,789

*Diğer: Öksürük, eklem ağrısı, gastrit, anemi, gelişme geriliği

Tablo 4.13. *Blastocystis* alt tipleri ve semptomların dağılımı*

Semptom	ST1		ST2		ST3		χ^2	p
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		
Kaşıntı	5	29,4	4	19	19	38	3,476	0,482
Karın ağrısı	5	29,4	6	28,6	9	18	1,477	0,478
İshal	6	35,3	4	19	41	18	0,447	0,309
Dispepsi	3	17,6	2	9,5	5	10	0,829	0,661

* Sayı az olduğu için diğer semptomlartabloya dahil edilmemiştir. Yine ST7 (dört izolat) ve miks alt tipler (üç izolat) sayı az olduğu için tabloya dahil edilmemiştir.

5. TARTIŞMA

Blastocystis zorunlu anaerobik, intestinal yerleşimli bir protozoon olup dünya genelinde insan dışkı örneklerinde en sık rastlanan ökaryotik mikroorganizmaların başında gelmektedir (Popruk ve ark, 2013). *Blastocystis* prevalansının az gelişmiş ülkelerde hijyen alışkanlıkları ve sosyo-ekonomik faktörlere bağlı olarak daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (El safadi ve ark, 2014). Bunun yanı sıra gelişmiş ülkelerde de %23'e varan görülme sıklıkları bildirilmiştir (Amin, 2002). *Blastocystis*'in ilk kez tanımlanmasından bu yana geçen 100 yıllık süreçte, mikroorganizmanın adı ve taksonomideki yeri fazlaca değiştirilmiştir. Başlangıçta non-patojenik bir maya türü olarak tanımlanan *Blastocystis* son olarak moleküler filogenetik çalışmalarla *Heterokontophyta* şubesinde sıradışı bir Stramenopil olarak tanımlanmıştır (Tan, 2008). Özellikle 1970'li yıllardan itibaren *Blastocystis*' in morfolojisi, biyolojisi ve klinik özellikleri konusunda yapılan çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (Zierdt, 1991). *Blastocystis*'in bu güne kadar dışkı veya kültür örneklerinde vakuoler, granüler, ameboid ve kist olmak üzere dört farklı formu tanımlanmıştır. Ancak uzun yıllardır üzerinde çalışılan bir mikroorganizma olmasına karşın morfolojik formlarının birbirine dönüşümü ve bunu etkileyen faktörlerle ilgili sahip olunan bilgi oldukça sınırlıdır (Dunn ve ark, 1989; Tan ve ark, 2008). Ayrıca yaşam döngüsünde açıklanması gereken çok sayıda nokta bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Blastocystis*'in ince ve kalın duvarlı kistlerinin olduğu; bunlardan ince duvarlı kistlerin enfekte konaklarda oto-infeksiyondan, kalın duvarlı kistlerin ise dışkıyla atılarak fekal-oral bulaştan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Singh ve ark, 1995; Tan ve ark, 2008). *Blastocystis* yalnızca insanlara özgü bir protozoon olmayıp insan dışında birçok omurgalı ve omurgasız canlıda görülmekte olup bu canlıların *Blastocystis* için rezervuar konak olabileceği bildirilmiştir (Yoshikawa ve ark, 2007; Yan ve ark, 2007). Moleküler yöntemlerin kullanıldığı epidemiyolojik çalışmalar sonucunda *Blastocystis*'in zoonotik karakterli bir protozoon olduğu ayrıca insandan insana ve hayvandan insana bulaşın fekal-oral yolla gerçekleştiği açık bir şekilde ortaya konulmuştur (Thathaisong ve ark, 2003; Yoshikawa ve ark, 2004a; Noel ve ark, 2005). Fekal-oral bulaş direkt olarak veya dışkıyla kontamine yiyecek ve içeceklerin tüketilmesiyle gerçekleşebilmektedir (Tan, 2008). Dünya sağlık örgütü 2008 yılında *Blastocystis*'i Su Sanitasyonu ve Sağlık Programları kapsamına almış ve *Blastocystis*' in su kaynaklarında fekal kontaminasyon indikatörü olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (DSÖ, 2011; Wawrzyniak ve ark, 2013).

Blastocystis tanısı birçok rutin tanı laboratuvarı için zahmetli ve karmaşık bir işlem olarak görülmektedir. *Blastocystis* patojenitesi konusunda süregelen tartışmalar dışkı örneklerinin incelenmesinde *Blastocystis*' e gereken önemin verilmemesine yol açmakta ve bu nedenle çok sayıda *Blastocystis* ile enfekte olgu gözden kaçırılmaktadır (Stensvold ve Clark, 2016). Ayrıca rutin parazitolojik dışkı incelemelerinde maliyet ve zaman avantajı gibi nedenlerle DM gibi duyarlılığı düşük yöntemlerin kullanılması literatürdeki prevalans verilerinin gerçekliğini tartışmalı hale getirmektedir (Roberts ve ark, 2011). Son yıllarda epidemiyoloji çalışmalarında moleküler yöntemlerin kullanılması ile birçok bölgede *Blastocystis* prevalansının tahmin edilenin üstünde olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca moleküler tanı yöntemleri sayesinde hastane rutin laboratuvarlarında enfekte bireylerin tanısının daha etkili bir şekilde yapıldığı da bildirilmiştir (Stensvold, 2013a).

Çalışmamızın ilk aşamasında DM yöntemiyle *Blastocystis* saptanan 100 dışkı örneği Jones besiyerine ekildiğinde kültürlerin 81'inde (%81) üreme gözlenmiştir. Bu aşamada DM pozitif olmasına karşın besiyerinde üreme gözlenmeyen 19 dışkı örneğinin (%19) bulunması farklı yönlerden değerlendirilebilmektedir. Öncelikle dışkı örneklerinde bulunabilen mantar, makrofaj, nötrofil ve *Cyclospora sp.* gibi hücreler veya yağ globülleri gibi cansız varlıklar *Blastocystis* ile karıştırılabilmektedir (Tan, 2008; Parija ve Jeremiah, 2013; Wawrzyniak ve ark, 2013). Direkt mikroskopi yönteminden kaynaklanabilecek yalancı pozitifliklerin yanı sıra özellikle zoonotik karakterli *Blastocystis* izolatlarının (örneğin ST5) besiyerinde çoğalmayabileceği bildirilmiştir (Parkar ve ark, 2007; Tan, 2008). Bu faktörlere ek olarak kültür yapılırken *Blastocystis* ile birlikte besiyerine aktarılan dışkıdaki bakteri florasının da kültürü etkileyebileceği düşünülmektedir. Çünkü *Blastocystis* ksenik *in vitro* kültürlerde bilinmeyen bir bakteri florası ile birlikte çoğalmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar ile dışkı florasındaki bakteriler ve *Blastocystis* kolonizasyonu arasındaki ilişki açıkça ortaya konulmaktadır. Örnek olarak *Clostridium* türlerinin baskın, *Enterobacteriaceae* türlerinin az olduğu dışkılarda *Blastocystis*' in daha sık görüldüğü bildirilmektedir (Audebert ve ark, 2016). Bizim bulgumuza benzer şekilde Boral Büyükbaba ve ark (2017) rutin parazitoloji laboratuvarına gönderilen örneklerde *Blastocystis* araştırdıkları çalışmalarında DM ile pozitif saptanan 50 dışkı örneğinin ikisinin (%4) Jones besiyerinde çoğalmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca Das ve ark (2016) IBS hastalarından topladıkları 150 dışkı örneğinin nativ-lügol incelemeyle 48'inde (%32) *Blastocystis* saptamış olup bu pozitif örneklerin 45'inin (%93,7) besiyerinde ürediğini üçünün (%6,3) ise ümediğini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda DM yöntemiyle *Blastocystis* saptanmayan 100 dışkı örneği Jones besiyerine ekildiğinde kültürlerin beşinde (%5) üreme görülmüştür. Bu bulguya göre DM

yöntemiyle *Blastocystis* ile enfekte olguların bir kısmının gözden kaçırıldığı ve yanlış negatif sonuçlar verilebildiği söylenebilmektedir. *Blastocystis* tanısında DM yöntemiyle yanlış negatif sonuç elde edilmesi birçok nedene bağlanabilmektedir. Bunların başında kist formunun küçük boyutlara (3-5 µm) sahip olması nedeniyle gözden kaçırılması gelmektedir (Tan, 2008). Ayrıca dışkı örneklerinin havayla teması sonucu veya olguların kullandıkları ilaçlara bağlı olarak *Blastocystis* morfolojisinin bozulabileceği veya tamamen parçalanabileceği bildirilmektedir (Wawrzyniak ve ark, 2013). Son olarak dışkıyla *Blastocystis* atılmasının her gün düzenli olmaması enfekte olgularda DM yönteminin yetersiz kalmasının bir nedeni olarak gösterilmektedir (Vennila ve ark, 1999; Tan, 2008). Bizim bulgumuza benzer şekilde birçok çalışmada kültür yöntemiyle DM yöntemiyle saptanandan daha fazla sayıda *Blastocystis* saptandığı veya DM negatif dışkı örneklerinin bir kısmında kültür ile pozitiflik saptandığı bildirilmiştir. Adıyaman Korkmaz ve ark (2015) çalışmalarında native-lugol (NL) ile *Blastocystis* saptamadıkları 208 dışkı örneğinin 24'ünde (%7,8) kültürde üreme tespit etmiştir. Ayrıca Coşkun ve ark (2016) 150 ülseratif kolitli hastada yaptıkları çalışmada DM yöntemiyle yedi dışkı örneğinde (%4,7) pozitiflik saptamış olup kültür yöntemini kullandıklarında beş olguda daha (n=12, %8) *Blastocystis* enfeksiyonu saptadıklarını bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada da Yersal ve ark (2016) kanserli hastalardan aldıkları 232 dışkı örneğinin 15'inde (%6,5) DM yöntemiyle *Blastocystis* saptadıklarını dışkı örneklerini kültüre ettiklerinde kültürlerin 25'inde (%10,8) *Blastocystis* üremesi gördüklerini rapor etmişlerdir. Leelayoova ve ark (2002) 900 dışkı örneğinde mikroskopi ve kültür yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada kültür yöntemiyle 334 olguda (%37,1) *Blastocystis* saptarken DM yöntemiyle sadece 142 dışkı örneğinde (%15,7) *Blastocystis* saptayabildiklerini bildirmişlerdir. Diğer bir ifadeyle DM negatif olan 758 dışkı örneğinin 198'i (%25) kültür yöntemiyle pozitif saptanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmalarında kültür yönteminin prevalans çalışmalarında kullanılmasını tavsiye etmektedirler. Doğruman-Al ve ark (2010) rutin parazitoloji laboratuvarına gönderilen 105 dışkı örneğini kültür yöntemiyle incelemiş ve 30'unda (%28,6) *Blastocystis* üremesi saptamışlardır. Kültür pozitif 30 olgunun 11'inde (%36,6) Lügol'ün iyodin boyası, 15'inde (%50) kalıcı boyama ve 26'sında IFA yöntemiyle pozitiflik saptandığı bildirilmiştir. Eida AM ve Eida MM (2008) IBS hastalarında DM ve kültür yöntemleriyle *Blastocystis* yaygınlığını araştırdıkları çalışmalarında DM yöntemiyle 25 (%30), kültür yöntemiyle 34 (%41) hastada *Blastocystis* saptadıklarını bildirmiştir. Benzer şekilde Yakoob ve ark (2004) da kültür yöntemi kullanıldığında DM yönteminden daha fazla sayıda *Blastocystis* saptandığını ifade etmişlerdir (sırasıyla %46 ve %32). Dağcı ve ark (2014) gastrointestinal semptomlu 617 hastada yaptıkları çalışmada DM yöntemiyle sadece 11 dışkı

örneğinde (%1,8) *Blastocystis* saptamış ancak kültür yöntemiyle bu sayı 80'e (%13) yükselmiştir. Elghareeb ve ark (2015) toplam 1200 örnekte dört farklı tanı yöntemini (nativ-lügol, kalıcı boyama, FEA ve kültür) değerlendirdikleri çalışmalarında en fazla pozitifliğin kültür yöntemiyle (n=273, %22,8) elde edildiği bildirmişlerdir. Aynı çalışmada kalıcı boyama ile 148 dışkı örneğinde (%12,3), FEA yöntemiyle 120 dışkı örneğinde (%10) ve nativ-lügol inceleme ile 72 dışkı örneğinde (%6) *Blastocystis* görüldüğü ifade edilmiştir.

Çalışmamızda DM yöntemiyle *Blastocystis* saptanan dışkı örnekleri (n=100) SSU rDNA-PZR ile çalışıldığında 88 örnekte (%88) pozitif, 12 örnekte ise (%12) negatif sonuç elde edilmiştir. Bunun nedeni olarak kültür yönteminin değerlendirmesinde bahsedildiği gibi dışkıdaki bazı canlı veya cansız etmenlerin DM yönteminde yalancı pozitifliğe neden olması gösterilebilir (Parija ve Jeremiah, 2013; Wawrzyniak, 2013). Bazı çalışmalarda dışkıdaki inhibitörlere bağlı olarak PZR ile yanlış negatif sonuçların alınabileceği de bildirilmiştir (Souppart ve ark, 2009; El safadi ve ark, 2013). Dışkı örneklerinde moleküler yöntemlerle patojenlerin araştırılmasının ilk aşaması dışkıdan genomik DNA'nın uygun şekilde elde edilmesi olup bu aşamada kullanılan ticari kitlerin performanslarının farklı olduğu bildirilmiştir. Yoshikawa ve ark (2011) çalışmalarında beş farklı DNA izolasyon kitini (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen; ZR Fecal DNA Kit, Zymo Research; Roche; QuickGene SP Kit DNA, FujiFilm; NucleoSpin Plant II, Macherey-Nagel; MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I) kullanarak DNA izolasyonu yapmış ve PZR sonuçlarını değerlendirmiştir. İlk aşamada FujiFilm ve Macherey-Nagel kitleri ile negatif bulunan örneklerin diğer kitlerle pozitif bulunduğu bildirmişlerdir. İkinci aşamada kültür pozitif 50 olgunun dışkı örneklerinden Roche, Qiagen ve Zymo Research kitleri ile izolasyon yapmış ve PZR ile sırasıyla %10, %48, %94 pozitiflik saptamışlardır. El Safadi ve ark (2014) DM yöntemiyle *Blastocystis* gördükleri 42 dışkı örneğinden DNA izolasyonu yaparak *Blastocystis* alt tiplerini araştırdıkları çalışmalarında örneklerin sadece altısında (%14,2) amplifikasyon gördüklerini bildirmiştir. Araştırmacılar bu farkı yaratan en önemli faktör olarak dışkıdaki PZR inhibitörlerini işaret etmiştir. Çalışmamızda kullandığımız DNA izolasyon kiti, PZR inhibitörlerini absorbe eden tabletler (InhibitEX, Qiagen) içermektedir. Bu nedenle kullandığımız DNA izolasyon kitinin PZR inhibisyonundan kaynaklanan negatif sonuçları azalttığı veya ortadan kaldırdığı düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda DM yöntemiyle pozitif bulunan bazı olguların hem kültür hem de PZR ile negatif bulunmasının dışkıdaki inhibitörlerden çok DM yöntemindeki yalancı pozitifliklere bağlı olduğu düşünülmektedir. *Blastocystis* görülme sıklığının veya alt tiplerinin araştırıldığı moleküler çalışmalarda sonucu etkileyen bir diğer faktörün de kullanılan primer çiftleri olduğu bildirilmiştir. Roberts ve ark

(2013) *Blastocystis* alt tiplerini araştırdıkları çalışmalarında 513 örnekten DNA izolasyonu yapmış ve iki farklı primer çifti kullanarak PZR yapmışlardır. Araştırmacılar F1 ve BHCRseq3 primerlerini kullandıkları PZR yöntemiyle ile 98 pozitif dışkı örneğinin 92'sinde (%93,4) pozitiflik saptadıklarını ancak b11400ForC ve b11710RevC primerleri ile sadece 65'inde (%66,3) pozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca ilk primer çiftiyle negatif sonuç elde edilen dört örneğın diğeri primer çiftiyle pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Bizim bulgumuza benzer şekilde 382 kişiden dışkı örneğinin toplandığı bir diğeri çalışmada da mikroskopi ile rneğlerin 80'inde (%21) *Blastocystis* görülmesine karşın PZR ile bu rneğlerin 66'sında (82,5) beklenen boyutta amplikon elde edilmiştir (Malheiros ve ark, 2011). Bu çalışmada dışkı rneğleri DNA izolasyonu yapılmışa kadar %70 alkolde saklanmış olup QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılmıştır. Ayrıca bu çalışmada kullanılan primer çiftleri çalışmamızdaki ile aynıdır. Son olarak bir çalışmada *Blastocystis* araştırılmasında DNA izolasyonu öncesi yapılan bazı ön işlemlerin PZR başarısını artırmaya yardımcı olduğu rapor edilmiştir. Adıyaman Korkmaz ve ark (2017) *Blastocystis* kültürlerinde DNA izolasyonu ncesi Ringer modifiye yöntem (RMY) ve sükroz gradient yöntemi (SGY) gibi iki farklı ön işlem uyguladıkları çalışmalarında F1 ve RB primerleri ile SSU rDNA gen bölgesinin 1100bp'lik kısmını PZR ile amplifiye etmişlerdir. PZR rnleri agaroz jelde görüntülendiğinde RMY ile 12 örneğın 11'inde (%91,6) ve SGY ile altısında (%50) beklenen boyutta bant gördüklerini bildirmişlerdir. RMY ile saptanan bantların daha parlak ve belirgin olduğu ayrıca RMY uygulanması kolay ve zaman açısından avantajlı olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda DNA izolasyon öncesi herhangi bir ön işlem yapılmadan dışkı rneğleri dondurularak saklanmıştır.

Çalışmamızda DM yöntemiyle *Blastocystis* saptanmayan rneğler (n=100) SSU rDNA-PZR ile çalışıldığında yedisinde (%7) amplifikasyon gözlenmiştir. Bu bulgunun ortaya çıkmasında kültür yönteminde değinilen faktörlere (düzensiz kist atımı, kist formlarının kk boyutu, bozulmuş *Blastocystis* morfolojisi vb.) bağlı olarak direkt mikroskopi ile yalancı negatif sonuç elde edilebileceği bildirilmektedir (Vennila ve ark, 1999; Tan, 2008). Bazı çalışmalarda bizim bulgumuzu destekler nitelikte DM yöntemiyle *Blastocystis* saptanmayan dışkı rneğlerinin bir kısmının PZR ile pozitif sonuç verdiği veya PZR ile DM yöntemine göre daha fazla sayıda pozitiflik saptandığı bildirilmiştir. Ragavan ve ark (2015) IBS'li hastalarda *Blastocystis* araştırdıkları çalışmada DM yöntemiyle *Blastocystis* saptanmayan 35 dışkı örneğinin altısında (%17,6) PZR ile amplifikasyon gördüklerini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada ayrıca kontrol grubunda yine DM ile negatif bulunan 74 dışkı örneğinden dördü (%5,5) PZR ile pozitif saptanmıştır. Bir diğeri çalışmada da DM yöntemiyle

negatif bulunan 100 dışkı örneğinin %19'unda moleküler yöntemlerle pozitiflik saptandığı rapor edilmiştir (Ben Abda ve ark, 2017). Seyer ve ark (2017) 230 dışkı örneğinde *Blastocystis* araştırdıkları çalışmalarında DM ile örneklerin %10,5'inde PZR ile %28,5'inde pozitiflik saptamışlardır. Mohamed RT ve ark (2017) çalışmalarında 1330 dışkı örneğinin PZR ile 133'ünde (%10) amplifikasyon saptadıklarını ancak DM ile 83'ünde (%6,5) pozitiflik saptadıklarını belirtmişlerdir. Sanchez ve ark (2017) tarafından yapılan bir diğer çalışmada da mikroskopi ile örneklerin %35,2'sinde *Blastocystis* saptandığı, moleküler yöntemlerle ise aynı grupta %88,7 amplifikasyon görüldüğü ifade edilmiştir. Das ve ark (2016) direkt mikroskopi ile 48 örnekte (%32), STS PZR ile 50 örnekte (%33) pozitiflik saptamışlardır. Jones ve ark (2008) mikroskopi ve kültür ve hatta geleneksel PZR yöntemiyle negatif sonuç alındığı bildirilen üç örneğin tamamında (%100) RT-PZR yöntemiyle pozitiflik saptamışlardır. Ayrıca diğer bir çalışmada da dışkıda *Blastocystis*'lerin parçalandığı durumlarda DM yöntemiyle *Blastocystis*'lerin görülememesine karşın moleküler yöntemlerle *Blastocystis* DNA'sının tespit edilebileceği bildirilmiştir (Dağcı ve ark, 2014).

Çalışmamızda kültür ve SSU rDNA-PZR yöntemiyle elde edilen bulgular incelendiğinde kültürde *Blastocystis* üremesi görülen 86 örneğin tamamında (%100) amplifikasyon saptanmıştır. Benzer şekilde Mohamed RT ve ark (2017) rutin laboratuvar örneklerinde *Blastocystis* araştırdıkları çalışmalarında kültür yöntemiyle üreme saptadıkları 83 örneğin tamamının PZR yöntemiyle de pozitif bulunduğunu rapor etmiştir. Ayrıca çalışmalarında kültür ile 122 örnekte (%9,6), PZR ile 133 örnekte (%10) pozitiflik belirlediklerini bildirmiştir. Das ve ark (2016) kültür ve STS-PZR yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında sırasıyla 45 örnekte (%30) ve 50 örnekte (%33) pozitiflik saptamışlardır. Bizim çalışmamızın aksine Souppart ve ark (2009) kültür pozitif dışkı örneklerinin %25'inde PZR yöntemiyle negatif sonuç elde edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar bu durumu dışkıdaki PZR inhibitörlerine bağlamıştır. Yine Santos ve Rivera (2013) 110 dışkı örneğinin onunda PZR yöntemiyle, 36'sında (%23,6) kültür yöntemiyle pozitiflik bulduklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda kültürde üremeyen 114 örneğin dokuzunda (%7,9) SSU rDNA-PZR yöntemiyle pozitiflik saptanmıştır. Bu bulgu DM yöntemi ve SSU rDNA PZR yöntemlerinin değerlendirildiği önceki kısımda da bahsedildiği üzere bazı *Blastocystis* suşlarının besiyerinde çoğalmayabileceği fikrini desteklemektedir (Parkar ve ark, 2007). Bizim elde ettiğimiz bulgulara benzer şekilde 433 dışkı örneğiyle yaptıkları çalışmada Roberts ve ark (2011), kalıcı boyama ve kültür yöntemleriyle negatif bulunan sekiz negatif dışkı örneğinin (%1,8) PZR ile pozitif bulunduğunu bildirmiştir. İrritabl bağırsak sendromlu hastalarda *Blastocystis*

araştırıldığı bir çalışmada da DM yöntemiyle negatif olduğu bildirilen 35 dışkı örneğinin altısında (%17,6) PZR ile pozitiflik saptanmıştır (Ragavan ve ark, 2015). Ayrıca, Parkar ve ark (2007) dışkı örneklerini besiyerine ektiklerinde %19'unda üreme gördüklerini, dışkıdan direkt DNA izolasyonu sonrası PZR yapıldığında ise daha yüksek (%35) pozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir. Yine Das ve ark (2016) IBS'li 150 hastada yaptıkları çalışmada Jones besiyerinde 45 (%30) örnekte üreme gözlemlemiş olup bizim çalışmamızdaki primerleri kullandıkları PZR yöntemi ile 50 örnekte (%33,3) amplifikasyon saptamışlardır.

Çalışmamızın başlangıcında DM yöntemine göre pozitif ve negatif örnekler seçildiği için hesapladığımız duyarlılık ve özgüllük değerleri literatürde bildirilenler ile tam olarak karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Bununla birlikte hesaplanan duyarlılık ve özgüllük değerlerinden bazıları tanı yöntemlerinin değerlendirilmesi açısından fikir vermektedir. Çalışmamızda duyarlılık ve özgüllük değerleri yöntemlerden her biri sırasıyla altın standart olarak seçilerek hesaplanmıştır. Çalışmamızda DM yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, kültür ve SSU rDNA-PZR yöntemlerinin duyarlılık/özgüllükleri sırasıyla %81/%95 ve %88/%93 olarak bulunmuştur. Kültür yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde DM yönteminin duyarlılığı %94,2 özgüllüğü ise %83,3 olarak; SSU rDNA PZR yönteminin duyarlılığı %100 özgüllüğü ise %92,1 olarak saptanmıştır. Son olarak SSU rDNA-PZR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, DM ve kültür yöntemlerinin duyarlılık/özgüllük değerleri sırasıyla %92,6/%88,6 ve %90,5/%100 olarak hesaplanmıştır.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında DM yönteminin duyarlılığı bizim çalışmamızda hesaplanandan çok daha düşük olup %19,7-62 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (Termmathurapoj ve ark, 2004; Dogruman Al ve ark, 2010; Roberts ve ark, 2013). Termmathurapoj ve ark (2004) kültür yöntemi altın standart kabul edildiğinde direkt mikroskopi ve kalıcı boyama yöntemlerinin duyarlılık/özgüllükleri sırasıyla %16,7/%94 ve %40,2/%80,4 olarak bulmuşlardır. Dağcı ve ark (2014) DM yönteminin %12 duyarlılık ve %100 özgüllük gösterdiğini rapor edilmiştir. Doğruman Al ve ark (2010) kültür yöntemi altın standart kabul edildiğinde Lügol'un iyodin boyaması, kalıcı boyama ve IFA yöntemlerin duyarlılık/özgüllüklerini sırasıyla %36/%91, %50/%100 ve %86/%97 olarak saptamışlardır. Mohamed RT ve ark (2017) çalışmalarında DM ve kültür yöntemlerinin duyarlılıklarını sırasıyla %62 ve %92 olarak bildirilmiştir. Santos ve ark (2013) kültür altın standart alındığında PZR ve DM yöntemlerinin duyarlılıklarının oldukça düşük %19,4 olduğunu bildirmişlerdir. Elghareeb ve ark (2015) tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerini: kültür (%100 ve %88), FEA (%81 ve %100) ve nativ-lügol (%48 ve %100) olarak rapor etmişlerdir. Roberts ve ark (2013) kültür yönteminin duyarlılığını %82 hesapladıkları çalışmalarında

mikroskopinin duyarlılığını %48 olarak bildirmişlerdir. Poirier ve ark (2011) RT-PZR ile karşılaştırıldığında DM yönteminin duyarlılığını %29, kültür yöntemin duyarlılığını %52 olarak saptadıklarını bildirmiştir. Stensvold ve ark (2007b) parazitolojik yöntemlerle (kültür, kalıcı boyama ve FECT) ile SSU rDNA-PZR yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada parazitolojik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerini sırasıyla %89/%100, %82/%100 ve %50/%100 olarak bildirmişlerdir. Bart ve ark (2013) mikroskopi ve SSU rDNA- PZR yöntemleri ile 442 dışkı örneğinin 107'sinde (%24,2) *Blastocystis* saptadıkları çalışmalarında mikroskopi yönteminin duyarlılığını %99, SSU rDNA-PZR yönteminin duyarlılığını %96 olarak saptanmıştır.

Literatürde *Blastocystis* tanısında farklı yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda elde edilen sonuçlar Tablo 5.1'de özetlenmiştir. Bu çalışmalarda çok sayıda farklı çalışma gruplarında *Blastocystis* tanı yöntemlerinin değerlendirildiği görülmektedir. Ayrıca bu çalışmalarda kullanılan tanı yöntemleri de birbirinden oldukça farklılık göstermektedir.

Tablo 5.1. *Blastocystis* tanısında farklı yöntemlerin değerlendirildiği çalışmalar

Çalışma grubu	Mikroskopi		Kültür		Moleküler		Kaynak
	Yöntem	Sayı (%)	Yöntem	Sayı (%)	Yöntem	Sayı (%)	
IBS hastaları (n=150)	Nativ-lügol Triokrom	48 (32) 42 (28)	Jones	45 (30)	PZR	50 (33,3)	(Das ve ark, 2016)
Rutin laboratuvar örnekleri (n=1262)	Nativ-lügol	83 (6,5)	DMEM	122 (9,6)	PZR	133 (10,5)	(Mohamed RT ve ark, 2017)
Çocuklarda (n=284)	Nativ-lügol	92 (35,2)			RT-PZR	252 (88,7)	(Sanchez ve ark, 2017)
ÜK hastaları (n=150)	Nativ-lügol	7 (4,7)	Jones	12 (8)	STS-PZR*	12 (8)	(Coşkun ve ark, 2016)
Kanser hastaları (n=232)	Nativ-lügol	15 (6,5)	Jones	25 (10,8)	STS-PZR*	22 (9,5)	(Yersal ve ark, 2016)
Rutin laboratuvar örnekleri (n=1200)	Nativ-lügol FEA Triokrom	72 (6) 120 (10) 148 (12,3)	Jones	274 (22,8)			(Elghareeb ve ark, 2015)
Laboratuvar örnekleri, kültür pozitif (n=30)	Nativ-lügol Triokrom IFA	11 (36,6) 15 (50) 26 (86,6)	-	-	-	-	(Doğruman Al ve ark, 2010)

(Tablo 5.1 Devam)

Laboratuvar örnekleri, FEA pozitif (n=50)	-	Jones RPMI	42 (84) 41 (82)	PZR	50 (100)	(Boral Büyükbaba ve ark, 2017)
İşhali grup ve kontrol olguları (n=350)	Nativ-lügol Triokrom DFA	42 (12) 58 (17) 66 (19)				(Adıyaman Korkmaz ve ark, 2015)
Yetişkinlerde, askeri birlikte(n=900)	Nativ-lügol FEA	142 (15,7) 64 (7,1)	Jones	334 (37,1)		(Leelayoova ve ark, 2004)
GIS semptomlu hastalar (n=617)	Native- lügol	11 (1,8)	Jones	80 (13)	RT-PZR	94 (15,2) (Dağcı ve ark, 2014)
Çocuklarda (n=303)	Nativ-lügol Triokrom	116 (38,2) 107 (35,3)			RT-PZR	115 (37,9) (Doğan ve ark, 2017)
Rutin laboratuvar örnekleri, (n=98)	Triokrom	47 (48)	MBD TYGM-9	81 (82,6) 80 (81,6)	PZR	92 (93,8) (Roberts ve ark, 2011)
Rutin laboratuvar örnekleri (n=889)	FECT	19 (2,1)	Jones	64 (7,2)		(Stensvold ve ark,2011)
Saha çalışması (n=110)	Nativ-lügol	9 (8,2)	LES	36 (32,7)	PZR	26 (23,6) 10 (9,1) (Santos ve ark, 2013)
Rutin laboratuvar örnekleri, (n=174)	FECT	24 (13,8)			PZR RT-PZR	85 (48,9) 106 (60,9) (Forsell ve ark, 2016)

(Tablo 5.1 Devam)

IBS'li hastalar ve kontrol (n=127)	Native-lügol	43 (33,8)	Jones	56 (44,1)	PZR	58 (45,6)	(Uobeed ve ark, 2015)
Rutin Laboratuvar örnekleri, mikroskopi pozitif (n=100)			Jones	81 (81)	PZR	89 (89)	Bu çalışma
Rutin Laboratuvar örnekleri, mikroskopi negatif (n=100)			Jones	5 (5)	PZR	7 (7)	Bu çalışma

*Kültür pozitif örneklerden DNA izolasyonu ve STS-PZR sonuçları, MBD = Modifiye Boeck ve Drbohlav's besiyeri; TYGM-9 = tripton, maya özütü, glikoz besiyeri , LES: Locke'nin yumurt-serum besiyeri, DNA izolasyonu , DMEM: Dulbecco modifiye Eagle besiyeri

Çalışmamızda 35 örneğin direkt dışkıdan ve kültüründen elde edilen DNA örnekleri PZR yöntemi ile çalışılmış olup kısmi SSU rDNA dizileri birbiriyle karşılaştırılmıştır. Bu 35 *Blastocystis* izolatının beşi ST1 (%14,2), sekizi ST2 (%22,8), 19'u ST3 (%54,2), ikisi ST2+ST3 (%5,7) ve bir örnek ST7 (%2,8) olarak tanımlanmıştır. İki DNA izolasyon yöntemi arasında alt tip dağılımı yönünden bir fark görülmemiş olup her iki DNA izolasyon yöntemiyle aynı alt tipler belirlenmiştir. Bu nedenle iş yükünü ve maliyeti artırmamak için diğer örneklerde iki DNA izoalsyon yöntemi birlikte değerlendirilmemiştir. Bu bulgumuzu destekler nitelikteki bir çalışmada Stensvold ve ark (2007b) *Blastocystis* pozitif 10 olgunun dışkısından ve kültüründen DNA izolasyonu yaparak SSU rDNA-PZR ile *Blastocystis* alt tiplerini araştırmışlardır. Araştırmacılar bizim çalışmamıza benzer şekilde kültürün alt tip dağılımına etkisinin olmadığı veya çok az olduğu sonucuna varmışlardır. Ancak Yan ve ark (2007) *Blastocystis* ST5 ve ST3 saptadıkları bir dışkı örneğini kültüre ettiklerinde ST3'ün daha hızlı çoğaldığını ve baskın hale geldiğini bildirmiştir. Araştırmacılar bu örneğin kültüründe STS-PZR ile sadece ST3 saptandığını rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada da ST5 ve ST1 alt tiplerinin bulunduğu kültürde ST5'in baskın hale geldiği bildirilmiş olup araştırmacılar dışkı örneklerinden DNA izolasyonu sonrası alt tiplerin belirlenmesinin kültürden DNA izolasyon sonrasına göre daha etkili ve duyarlı olduğunu bildirmiştir (Parkar ve ark, 2007). Çalışmanın bu aşamasında elde edilen bulgulara göre kültürden veya dışkı örneklerinden DNA izolasyonunun alt tip dağılımını etkilemeyeceği sonucu çıkmakla birlikte bu bulgu dikkatle ele alınmalıdır. Çünkü çalışmamızda ST1, ST2, ST3 ve ST7 alt tipleri bulunmuş olup diğer alt tiplerin değerlendirilmesi mümkün olmamıştır. SSU rDNA dizilerine göre alt tipi belirlenemeyen (veri tabanında bulunan alt tiplerin herhangi biriyle tam uyum göstermeyen) iki örnek STS PZR ile çalışıldığında ST2 ve ST3 'ün birlikte olduğu ortaya konulmuştur. Bu noktadan hareketle ST2 ve ST3'ün kültürde birlikte çoğaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte besiyerinde bazı alt tiplerin (örneğin ST5 ve ST1) diğerinden daha hızlı çoğalarak baskın hale geldiği ve birden fazla alt tipin bulunduğu örneklerde hatalı alt tip belirlenmesine neden olabileceği bildirilmiştir (Parkar ve ark, 2007; Tan, 2008). Çalışmamızda ikinci pasajdan sonra kültürlerden DNA izolasyonları yapılmıştır. Kültürün yeni pasajlarla devam ettirilmesi sonucu birden fazla alt tip bulunan kültürlerde sonuçlarının nasıl değişeceği ayrıca ele alınması gereken bir konu olarak düşünülmektedir. Ayrıca besiyerinde *Blastocystis* üremesi genotip dışında dışkıyla birlikte besiyerine aktarılan flora veya laboratuvar koşulları gibi faktörlerden etkilenmesi olası görülmektedir (Stensvold ve Clark, 2016). Çalışmamızda ST2 ve ST3 alt tiplerinin saptandığı iki örneğin hem dışkıdan hem de kültürden DNA izolasyonu alt tiplerinin belirlenmiş olması bu iki alt tipin birlikte

çoğalabildiğini göstermektedir. Ancak oldukça sınırlı sayıdaki bulgu ile böyle bir sonuca varılamayacağı daha fazla sayıda örnekle benzer çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir. Genel olarak kültür yöntemi ve sonrasında DNA izolasyonu yapılarak *Blastocystis* alt tiplerinin araştırılması geniş çaplı moleküler epidemiyoloji çalışmalarında tavsiye edilmektedir. Bunun nedeni olarak kültürün maliyetinin düşük olması ve alt tip dağılımı üzerine etkisinin az olması gösterilmektedir (Stensvold ve ark, 2007b).

Moleküler filogenetik analizlerde *Blastocystis* izolatları arasında genetik polimorfizm oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Stensvold ve ark, 2007a). Birçok organizmada olduğu gibi *Blastocystis* izolatlarının genetik çeşitliliğini araştırılması için kullanılan genetik markırların başında ribozomal RNA geni (SSU rRNA) gelmektedir (Yoshikawa ve ark, 2000). Ribozomal rRNA geni tüm canlılarda bulunmakta olup korunmuş bir işleve sahip olmakla birlikte oldukça değişken bir bölge olarak tanımlanmaktadır (Nelles ve ark, 1984). İnsan dahil diğer memelilerden, kanatlılardan ve amfibilerden elde edilen SSU rRNA gen dizilerinin filogenetik analizi sonucunda 17 farklı *Blastocystis* alt tipi tanımlanmış olup bunlardan ST1-ST9 insan dışı örneklerinden izole edilmiştir (Stensvold ve ark, 2007a; Yoshikawa ve ark, 2004b). *Blastocystis* alt tipleri ile konak özgüllüğü, *Blastocystis* bulaş şekli arasında yakın bir ilişki bulunduğu ortaya konulmuştur. *Blastocystis* izolatları arasındaki genetik farklılıklar PZR-RFLP, SSU rDNA geninin dizilenmesi, alt tipe-özgü primelerle amplifikasyon (STS-PZR), rastgele primer çiftleri ile PZR, karyotipleme, RT-PZR ve MALDI TOF gibi moleküler yöntemlerle belirlenmiştir (Bohm-Gloning ve ark, 1997; Carbajal ve ark, 1997; Arisue ve ark, 2003; Tan, 2008; Stensvold ve ark, 2012; Martiny ve ark, 2014;). *Blastocystis* genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde bu yöntemlerden ikisi ön plana çıkmakta olup literatürde yaygın olarak tercih edilmektedirler. İlki alt tiplere özgü primerlerin kullanıldığı STS-PZR yöntemi diğeri de *Blastocystis* SSU rDNA geninin “barkot bölgesi” kısmen çoğaltılması ve dizilenmesi esasına dayanan SSU rDNA-PZR yöntemidir. İki yöntemin karşılaştırıldığı bir çalışmada SSU rDNA-PZR yönteminin *Blastocystis* alt tiplerinin araştırılmasında öncelikle kullanılması önerilmektedir (Stensvold, 2013b). Öncelikle STS-PZR yönteminin dezavantajı sadece ST1-ST7 alt tiplerinin tanımlanmasının mümkün olmasıdır. Ancak günümüzde *Blastocystis*' in 17 alt tipi tanımlanmış ve bunların dokuzunun insanda görülebildiği bildirilmiştir (Stensvold ve ark, 2007a; Alfellani ve ark, 2013b). Ayrıca, STS primerlerinin yüksek özgüllük göstermelerine rağmen duyarlılıklarının orta düzeyde olduğu ve bu nedenle bazı *Blastocystis* alt tiplerinin belirlenemediği yöntemin bir diğer dezavantajı olarak sayılmaktadır. Bir diğer eksiklik olarak da STS primerlerinin kültürden elde edilen DNA örneklerinde iyi sonuç verdiği ancak dışkıdan direkt izole edilen DNA

örneklerinde barkot yöntemi kadar başarılı olmadığı şeklindedir (Stensvold ve ark, 2013b). Bu nedenlerle çalışmamızda öncelikle dışkıdan DNA izolasyonu yapılan 200 DNA örneği SSU rDNA-PZR ile çalışılarak *Blastocystis* alt tipleri araştırılmıştır. Veri tabanlarındaki benzerlikler doğrultusunda alt tipler belirlenmiş ve uyum göstermeyenlerde STS-PZR ile alt tipler belirlenmiştir. Çalışmamızda örnekler klonlama yapılmadan dizilemeye gönderildiği için birden fazla alt tipin olduğu örnekler STS-PZR ile belirlenmiştir (Abdulsalam ve ark, 2013). Scanlan ve ark (2015) birden fazla *Blastocystis* alt tipi ile enfekte olgularda karşılaşılan sorunları çözmek için alt tip spesifik nested PZR yöntemi geliştirmiştir. Bu reaksiyon için geliştirilen primerler ilk aşamada ST1-ST4 alt tipleri için uygulanmıştır. Geleneksel olarak *Blastocystis* genotiplendirmesinde kullanılan RD5 ve BhRDr primerleri ile tek alt tipin saptandığı örneklerin %22'sinde iki alt tipin bulunduğunu göstermişlerdir. Yoshikawa ve Iwamasa (2016) SSU rRNA gen dizilerini kullanarak insanda görülen dokuz *Blastocystis* alt tipi için yeni primerler geliştirmiştir. Araştırmacılar bu şekilde karışık alt tip görülen *Blastocystis* enfeksiyonlarını ayırt etmeyi de hedeflememiştir. Yeni dizayn ettikleri primerleri tüm alt tiplere ait DNA örnekleriyle (ST1-ST9), diğer protozoon DNA örnekleriyle ve mantar DNA örnekleriyle test etmişlerdir. Alt tip 5 dışında tüm primerlerin diğer protozoon DNA'ları ile negatif sonuç verdiği saptanmıştır. Bununla birlikte yöntemin *Blastocystis* izolatlarında alt tip belirlemede etkili olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda 95 örnekte *Blastocystis* alt tip dağılımı: ST3 (50 örnek %52,6), ST2 (21 örnek %22,1), ST1 (17 örnek %17,9), ST7 (dört örnek %4,2), ST2+ST3 (iki örnek %2,1) ve ST1+ST3 (bir örnek %1,1) şeklinde bulunmuştur. Dünya genelinde yapılan çalışmalar toplu olarak değerlendirildiğinde ST1, ST2, ST3 ve ST4'ün insandaki *Blastocystis* enfeksiyonlarının %90'ını oluşturduğu, en yaygın alt tipin ise ST3 (yaklaşık %60) olduğu bildirilmiştir (Özyurt ve ark, 2008; Souppart ve ark, 2009; Stensvold ve ark, 2009a; Alfellani ve ark, 2013a). Bu dağılıma uygun şekilde bizim çalışmamızda da ST1, ST2 ve ST3 alt tipleri tüm örneklerin %95,8'sini (91/95 örnek) oluşturmaktadır. Ayrıca ülkemiz ve dünya genelindeki araştırmalarda benzer şekilde çalışmamızda en sık *Blastocystis* ST3 alt tipi (n=53, %55,7 tek ve diğer alt tiplerle birlikte) saptanmıştır. *Blastocystis* ST4'ün Avrupa kıtasıyla sınırlı bir yayılıma sahip olduğu diğer bölgelerde genellikle saptanmadığı bildirilmiştir (Alfellani ve ark, 2013a). Ancak Avrupa kıtası dışında *Blastocystis* ST4 alt tipinin saptandığının bildirildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Sanchez ve ark, 2017). Bizim çalışmamızda *Blastocystis* ST4'e rastlanmamıştır. Ancak Türkiye'de diğer illerde yapılan çalışmalarda ST4 alt tipine rastlandığı bildirilmiştir (Adıyaman Korkmaz ve ark, 2015; Boral Büyükbaba ve ark, 2017).

Literatürde özellikle son yıllarda *Blastocystis* alt tiplerinin araştırıldığı çalışma sayısı hızla artmıştır. Bu çalışmalar sayesinde birçok ülkede *Blastocystis* alt tip dağılımı hakkında bilgi sahibi olunmuş ve *Blastocystis*'in moleküler epidemiyolojisi daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Dünya genelinde alt tip çalışmaları incelendiğinde Bangladeş, Brezilya, Kolombiya, Çin, Mısır, Fransa, Almanya, Hollanda, Yunanistan, İtalya, Japonya, Nepal, Pakistan, Singapur, İsveç, Tayland, Hindistan, Filipinler, Rusya, Polonya, Birleşik Arap Emirlikleri, Senegal, Tunus, İran, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda *Blastocystis* ST3 alt tipinin en sık saptandığı bildirilmiştir (Malheiros ve ark, 2011; Bart ve ark, 2013; Sigidaev ve ark, 2013; Popruk ve ark, 2013; El-Safadi ve ark, 2014; Adao ve ark, 2016; Das ve ark, 2016; Salamatin ve ark, 2016; AbuOdeh ve ark, 2016; Khademvatan ve ark, 2017; Sanchez ve ark, 2017; Seyer ve ark, 2017). Bunun yanı sıra Danimarka, Nepal, Fransa ve İspanya'da yapılan araştırmalarda ST4 alt tipine en sık rastlandığı rapor edilmiştir (Poirier ve ark, 2011; Popruk ve ark, 2013). Ayrıca Tayland'da yapılan iki çalışmada, Tanzanya, Laos ve Libya'da ST1; İrlanda ve Suudi Arabistan'da yapılan çalışmalarda da ST2 en yaygın *Blastocystis* alt tipi olarak saptanmıştır (Abdulsalam ve ark, 2013; Popruk ve ark, 2013; Forsell ve ark, 2016; Mohamed RT ve ark, 2017; Sanpool ve ark, 2017). Dünya genelinde *Blastocystis* alt tiplerinin araştırıldığı çalışmalar ayrıntılı olarak ele alındığında farklı moleküler yöntemlerin kullanıldığı ve birçok farklı popülasyonda alt tip dağılımlarının rapor edildiği görülmektedir (Tablo 5.2).

El-Safadi ve ark (2016) Fransa'da *Blastocystis* yaygınlığını ve alt tiplerini SSU rDNA genini hedef alan RT-PZR yöntemiyle araştırdıkları çalışmalarında 788 kişiden dışkı örneği toplamış ve *Blastocystis* prevalansını %18,1 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada en yaygın *Blastocystis* alt tipinin ST3 (%43,3) olduğu çalışmada izolatların %20'si ST1, %20'si ST4, %12,8'i ST2, %2,1'i ST6 ve %2,1'i ST7 olarak tanımlanmıştır.

Bart ve ark (2013) Hollanda'da en yaygın alt tipin ST3 (%43,4) olduğunu bildirdikleri çalışmalarında ST1 ve ST2 alt tiplerine eşit oranda (%23,2) rastlandığını rapor etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada ST4, ST6 ve ST6+ST7 alt tiplerin görülme yüzdeleri sırasıyla %12, %1 ve %1 olarak bildirilmiştir.

Mattiucci ve ark (2015) İtalya'da IBD tanısı konulmuş 186 örnekte *Blastocystis* alt tipini belirledikleri çalışmalarında alt tip dağılımını ST3 (%46), ST1 (%15,3), ST2 (%13,8), ST4 (%21,7), ST6 (%3,2) ve ST8 (%0,5) olarak bildirmişlerdir.

Poirier ve ark (2011) Fransa'da kemoterapi alan hematolojik maligniteli hastalar ve kontrol grubundan oluşan 186 kişide RT-PZR yöntemiyle *Blastocystis* alt tiplerini

araştırdıkları çalışmalarında en sık ST4 (%63) olmak üzere ST1 (%3,7), ST2 (%3,7), ST3 (%14,8), ST6 (%3,7) ve ST7 (%11,1) alt tiplerine rastladıklarını bildirmişlerdir.

Roberts ve ark (2013) Avustralya, Sidney’de 513 kişiden dışkı örneği toplamış ve *Blastocystis* alt tiplerini iki farklı primer seti kullanarak araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 96 *Blastocystis* izolatında alt tip dağılımını: 40’ı (41,6) ST3, 28’i ST1 (%29,1), 12’si ST4 (%12,5) ve beşi ST2 (%5,2), üçü ST6 (%3,1), biri ST7 (%1) ve ikisi (%2) ST8 şeklinde saptamışlardır.

Amerika Birleşik Devletleri, Colorado Eyaleti’nde 139 kişiden alınan dışkı örneğinde *Blastocystis* varlığı ve alt tiplerini araştırılmıştır. Gelişmiş ülkelerle karşılaştırıldığında *Blastocystis* prevalansının daha düşük (%7,2) bulunduğu ancak alt tip dağılımının bu ülkelerde bildirilenlere benzer olduğu bildirilmiştir (Scanlan ve ark, 2016).

Malheiros ve ark (2011) Brezilya’nın Amazon bölgelerinden Mato Grosso’da yaşayan yerlilerde yaptıkları çalışmada 382 dışkı örneğinden direkt DNA izolasyonu yapmış ve SSU rDNA-PZR ile *Blastocystis* alt tiplerini araştırmışlardır. Dizi analizleri ile alt tip dağılımını ST1 (%41), ST2 (%32) ve ST3 (%17) olarak belirlemişlerdir. Ayrıca yedi örnekte (%11) birden fazla alt tipe beraber rastlamışlardır.

Ramirez ve ark (2016) Güney Amerika’da yer alan farklı ülkelere dışkı örnekleri toplamış ve bu örneklerde *Blastocystis* alt tiplerini SSU rDNA gen dizilerini referans olarak araştırmışlardır. Sonuç olarak alt tip dağılımı ST1 (%28,3), ST2 (%22,2), ST3 (%36,7), ST4 (%2), ST5 (%2,3), ST6 (%2), ST7 (%2,3), ST8 (%0,6), ST12 (0,9%) ve daha önce tanımlanmamış bir ST (%2,7) olarak rapor etmişlerdir.

Sanchez ve ark (2017) çalışmalarında Kolombiya’nın Amazon bölgesinde kırsal kesimde yaşayan 15 yaşın altındaki 284 kişiden dışkı örneği toplamıştır. Bu örnekler *Blastocystis* ve diğer intestinal protozoonlarının varlığı yönünden direkt mikroskopi ve RT-PZR ile incelenmiştir. RT-PZR ürünlerinin dizilenmesiyle belirlenen alt tipler sırasıyla: ST3, ST2, ST1, ST6 ve ST4 olarak bildirilmiştir.

Salamatın ve ark (2016) Polonya, Varşova’da hastane rutin laboratuvarına gönderilen örneklerde *Blastocystis* alt tiplerini SSU rDNA PZR ile araştırmıştır. Araştırmacılar DM yöntemiyle *Blastocystis* gördükleri örnekleri Jones besiyerine ekmiş ve pozitif kültürlerden QIAamp DNA Mini Kit ile DNA izolasyonu yapmıştır. Genomik DNA’lar PZR ile çalışıldığında altı örnekte pozitiflik saptanmış ve alt tipler: dört izolat ST3, bir izolat ST2 ve bir izolat ST6 olarak belirlenmiştir.

Sigidaev ve ark (2013) Rusya, St. Petersburg'da çocuklarda yaptıkları çalışmada en yaygın *Blastocystis* alt tipinin ST3 (%62,3) olduğunu ve bunu ST7 (%3,8), ST1 (%29,5), ST2 (%24,3) ve ST4 (%1,3)'ün izlediğini bildirmişlerdir.

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde yapılan çalışmada 230 gönüllüden dışkı örneği toplanmış ve *Blastocystis* alt tipleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda alt tip dağılımı: ST3 (20 örnek, %31,2), ST2 (18 örnek %28,2), ST1 (8 örnek, %12,5), ST4 (7 örnek %11), ST6 (üç örnek %4,7) ve ST7 (iki örnek %3,2) olarak belirlenmiştir. Ayrıca altı örnekte (%9,4) alt tiplerin belirlenemediği bildirilmiştir (Seyer ve ark, 2017).

Mohamed RT ve ark (2017) Suudi Arabistan'da yaptıkları çalışmada 138 kanserli hastada ve 74 kişiden oluşan kontrol grubunda *Blastocystis* alt tiplerini PZR-RFLP ve STS-PZR yöntemlerini kullanarak araştırmışlardır. Araştırmacılar en sık ST2 (%44) olmak üzere ST1 (%38) ve ST5 (%22) alt tiplerine rastladıklarını bildirmişlerdir. Yine aynı ülkede yapılan bir başka çalışmada hastaneye başvuran 1262 kişiden dışkı örneği toplanmış ve direkt dışkı örneğinden yapılan DNA izolasyonu sonrası *Blastocystis* alt tipleri STS-PZR yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışma sonucunda ST3 (%80,5), ST1 (%14,5) ve ST2 (%5) olmak üzere üç farklı *Blastocystis* alt tipinin saptandığı bildirilmiştir (Mohamed RT ve ark, 2017).

Birleşik Arap Emirlikleri, Sharjah'da yapılan bir çalışmada SSU rDNA-PZR ile 133 örnekte *Blastocystis* yaygınlığı ve alt tipler araştırılmıştır. *Blastocystis* yaygınlığının %44,4 bulunduğu çalışmada 59 *Blastocystis* pozitif örneğin 39'unda alt tipler belirlenebilmiştir. Bu çalışmada en yaygın saptanan alt tip ST3 olup (%58,9) bunu sırasıyla ST1 (%28,2), ST2 (%7,6) izlemiştir. Yine bu çalışmada da Avrupa ülkelerinde rastlanan ST4'e rastlanmamıştır (AbuOdeh ve ark, 2016).

Tunus'ta *Blastocystis*'in moleküler epidemiyolojisini belirlemeye yönelik bir çalışmada gönüllülerden 524 dışkı örneği toplanmıştır. Direkt mikroskopi yöntemiyle 68 dışkı örneğinde (%13) *Blastocystis* formlarına rastlanmıştır. Bu örneklerden 61'inde SSU rDNA gen dizisi kullanılarak *Blastocystis* alt tipleri belirlenmiş olup alt tip dağılımı: ST3 (%51), ST1 (%30), ST2 (%16), ST4 (%1,6) ve ST7 (%1,6) olarak rapor edilmiştir (Ben Abda ve ark, 2017).

Abdulsalam ve ark (2013) Libya'daki bir hastaneye başvuran olgularda *Blastocystis* alt tip dağılımını: ST1 (%51,1), ST2 (%24,4), ST3 (%17,8), ST1+ST2 (%3,4) ve ST1+ ST3 (%3,4) olarak bildirmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada SSU rDNA genini önce klonlayıp sonra diziledikleri için karışık alt tipleri (ST1+ST3 ve ST1+ST2) bizim çalışmamızdaki gibi STS-PZR yapmadan belirleyebilmiştir.

El-Safadi ve ark (2014) Senegal’de 93 çocukta *Blastocystis* yaygınlığını ve alt tiplerini araştırdıkları çalışmada SSU rDNA genini hedef alan geleneksel PZR ve RT-PZR yöntemleri kullanmışlardır. Araştırmacılar tüm çocukların *Blastocystis* ile enfekte olduğunu saptamışlardır. Olguların 85’inin (%91,4) tek *Blastocystis* alt tipiyle, sekiz olgunun (%8,6) ise iki veya daha fazla alt tipe enfekte olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada alt tip dağılımı ise ST3 (%49,5), ST1 (%28,2), ST2 (%20,4) ve ST4 (%1,9) olarak rapor edilmiştir.

Forsell ve ark (2016) Tanzania, Zanzibar bölgesinde ishaller hastalarda ve ishalsiz kontrol grubunda RT-PZR ile *Blastocystis* alt tiplerini araştırdıkları çalışmalarında alt tip dağılımını: izolatların %34’ü ST1, %26,4’ü ST2, %25,5’i ST5, %0,9’u ST7 olarak bildirmiştir. Ayrıca bu çalışmada Avrupa’dan bildirilenlerden farklı olarak ST4’e hiç rastlanmamış olması kıtalararası alt tip farkına bir örnek olarak gösterilmektedir.

Laos’da Sanpool ve ark (2017) yaptıkları çalışmada direkt mikroskopi ile *Blastocystis* görülen örnekler besiyerine ekilmiş ve bu örneklerde *Blastocystis* alt tipleri SSU rDNA dizilerini kullanarak araştırmışlardır. Filogenetik ve BLAST analizi sonucu alt tip dağılımı: ST1 (%64), ST2 (%8), ST3 (%24) ve ST7 (%4) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular bizim çalışmamıza oldukça benzemektedir. Her iki çalışmada da aynı alt tipler belirlenmiştir ancak bizim çalışmamızda en sık ST3 saptanırken bu çalışmada en sık ST1 saptanmıştır.

İran’ın Ahvaz bölgesinde yapılan bir çalışmada hastane laboratuvarına gönderilen 481 dışkı örneğinin 69’unda (%14,3) DM yöntemi ile *Blastocystis* saptanmış olup araştırmacılar sadece DM pozitif dışkı örneklerinden DNA izolasyonu yaparak *Blastocystis* alt tiplerini STS-PZR yöntemiyle araştırmıştır (Khademvatan ve ark, 2017). Bu dışkı örneklerinin 50’sinde (%72,4) alt tipler belirlenebilmiş ve dağılım: ST3 (%40), ST1 (%22), ST5 (%8), ST2 (%6), ST4 (%2) ve 11’i (%22) karışık alt tipler şeklinde bildirilmiştir. Karışık alt tiplerin dağılımının ise beş örnek ST3+ST4, üç örnek ST1+ST3 ve üç örnek ST1+ST4 olduğu rapor edilmiştir.

Das ve ark (2016) Hindistan’ın kuzey eyaletlerinde yaptıkları çalışmada 150 IBS hastasında *Blastocystis* alt tiplerini STS-PZR yöntemiyle araştırmışlardır. Toplam 65 izolatin alt tipinin belirlendiği bu çalışmada izolatların tamamına yakının ST3 (n=59, %91) olduğunu diğerlerinin de ST1(n=6, %9) olarak tanımlandığını rapor etmişlerdir.

Zhan ve ark (2014) Çin’de lise öğrencileri arasında yaptıkları çalışmada 53 *Blastocystis* izolatının alt tipini STS-PZR ile araştırmışlardır. Bu çalışmada alt tip dağılımı: ST3 (%32,1, 17 örnek), ST7 (%9,4, beş örnek), ST1 (%7,6, dört örnek) ve ST6 (%1,9, bir

örnek) olarak belirlediklerini bildirmişlerdir. Ayrıca 22 (%41,5) *Blastocystis* izolatının da tipinin belirlenemediği bildirilmiştir.

Tayland'da yapılan bir çalışmada hastaneye başvuran kişilerden toplanan 562 dışkı örneği kültüre alındığında 56'sında (%9,9) üreme gözlenmiştir. Kültürde üreyen izolatların alt tipleri STS-PZR ile araştırılmış olup en yaygın ST3 olmak üzere toplam dört farklı alt tip (ST1, ST6 ve ST7) saptandığı bildirilmiştir. Yine bu ülkede yapılan kesitsel bir çalışmada 220 dışkı örneğinden DNA izolasyonu yapılmış kısmi SSU rDNA dizisine göre alt tipler belirlenmiştir. *Blastocystis* prevalansı %5,9 olarak bildirilmiş olup alt tiplerin dağılımı: ST3 (%84,6), ST2 (%7,7) ve ST6 (%7,7) şeklinde belirlenmiştir (Palasuwan ve ark, 2016). Tayland'da Sanpool ve ark (2016) çalışmalarında Jones besiyerinde çoğalan izolatlardan DNA izolasyonu yapmış ve SSU rDNA dizisine göre *Blastocystis* alt tiplerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar toplam 20 örnekte alt tip dağılımını ST1 (%20), ST3 (%60), ST6 (%10) ve ST7 (%10) olarak belirlemiştir.

Popruk ve ark (2015) Tayland-Myanmar sınırındaki bir bölgede yaptıkları çalışmada 207 kişiden dışkı örneği toplayarak DNA izolasyonu yapmış ve SSU rDNA dizilerine göre *Blastocystis* alt tiplerini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda örneklerin %32,7'sinde amplifikasyon saptadıklarını ve alt tip dağılımını ST3 (%19,8, 41 örnek), ST1 (%11,6, 24 örnek), ST2 (%5,3, 11 örnek) ve ST4 (%0,5, bir örnek) şeklinde bulduklarını rapor etmişlerdir.

Yoshikawa ve ark (2004c) Tayland, Bangladeş, Almanya ve Japonya'dan olgulara ait dışkı örneklerinden kültürde üreyen 102 *Blastocystis* izolatından 99'unu (%97) STS-PZR ile tiplendirebilmişlerdir. Bu izolatlar değerlendirildiğinde en yaygın *Blastocystis* genotipinin ST3 olduğu, ST1 ve ST4 genotiplerinin ikinci sırada yer aldığı bildirilmiştir. Ayrıca ST2, ST5 ve ST7 genotiplerine çok az sayıda olmakla birlikte sadece Almanya ve Japonya'dan elde edilen izolatlarda rastlandığı bildirilmiştir.

Filipinler'in Pateros bölgesinde yapılan bir çalışmada asemptomatik 35 kişiden dışkı örneği toplanmış ve kültürde çoğalan *Blastocystis* izolatlarının alt tipleri SSU rRNA gen sekanslarına göre belirlenmiştir. Dışkı örneklerinin 29'unun (%82,8) kültüründe *Blastocystis* üremesi görülmüş olup üç farklı alt tipin (ST3 %65, ST1 %31 ve ST2 %3) saptandığı bildirilmiştir (Adao ve ark, 2016).

Tablo 5.2. Farklı ülkelerde *Blastocystis* alt tiplerinin dağılımı

Ülke	Çalışma grubu	Yöntem	ST1 sayı (%)	ST2 sayı (%)	ST3 sayı (%)	ST4 sayı (%)	Diğer sayı (%)	Kaynak
Senegal	Çocuklar n=103	SSU rDNA PZR	29 (28,2)	21 (20,4)	50 (49,5)	2(1,9)		(El safadi ve ark, 2014)
Lübnan	Semptomatik ve kontrol grubu n=36	PZR ve RT PZR	11 (30,6)	12 (33,3)	12 (33,3)	1 (2,8)		(El safadi ve ark, 2013)
Japonya	Rutin laboratuvar örnekleri (n=50)	STS-PZR	4 (8)	5 (10)	26 (52)	11 (22)	ST7: 2 (4) Belirlenemeyen 2 (4)	(Yoshikawa ve ark, 2004c)
Bangladeş	Rutin laboratuvar örnekleri (n=50)	STS-PZR	2 (7,7)		24 (92,3)			(Yoshikawa ve ark, 2004c)
Pakistan	Rutin laboratuvar örnekleri (n=10)	STS-PZR	2 (20)		7 (70)	1 (10)		(Yoshikawa ve ark,2004c)
Almanya	Rutin laboratuvar örnekleri (n=12)	STS-PZR	3 (25)		5 (41,7)		ST5: 2 (16,7) ST7: 2 (16,7)	(Yoshikawa ve ark, 2004c)

(Tablo 5.2 Devam)

Çin	Saha çalışması n=192	STS-PZR	47 (24,5)	9 (4,7)	116 (60,4)	1 (0,5)	ST6: 1 (0,5) ST1+ST3: 8 (4,2) ST1+ST2: 1 (0,5) ST2+ST3: 1 (0,5) Belirlenmeyen : 8 (4,2)	(Li ve ark, 2007)
Mısır	Rutin laboratuvar örnekleri(n=21)	SSU rDNA PZR	4 (19)	4 (19)	13 (61,9)			(Souppart ve ark, 2010)
Fransa	Rutin laboratuvar örnekleri(n=40)	SSU rDNA PZR	7 (17,5)	6 (15)	18 (45)	6 (15)	ST1+ST3: 3 (7,5)	(Souppart ve ark, 2009)
Danimarka	Rutin laboratuvar örnekleri(n=25)	SSU rDNA PZR	1 (4)	1 (4)	13 (46,4)	19 (76)		(Stensvold ve ark, 2011)
İngiltere	Rutin laboratuvar örnekleri (n=55)	SSU rDNA PZR	3 (5,4)	9 (16,4)	22 (40)	17 (31)		(Sciicluna ve ark, 2006)

(Tablo 5.2 Devam)

Yunanistan	Rutin laboratuvar örnekleri (n=45)	SSU rDNA PZR	9 (20,0)	6 (13,3)	27 (60,0)	1 (2,2)	ST6: 1 (2,2) ST7: 1 (2,2)	(Menounos ve ark, 2007)
Singapur	Rutin laboratuvar örnekleri (n=9)	PCR-RFLP	2 (22,2)		7 (77,8)			(Wong ve ark, 2008)
İtalya	Rutin laboratuvar örnekleri (n=30)	SSU rDNA PZR	2 (6,6)	4 (13,3)	14 (43,3)	6 (20)	ST2+ST8: 1(3,3) ST1+ST3: 1(3,3) ST3+ST7: 1(3,3) ST2+ST3: 1(3,3)	(Meloni ve ark, 2011)
İspanya	İshalli hastalar (n=51)	PZR-RFLP	1 (2)	2 (3,9)		48 (94,1)		(Domínguez-Márquez ve ark, 2009)
İran	Rutin laboratuvar örnekleri (n=50)	STS-PZR	11 (22)	3 (6)	20 (40)	1 (2)	ST5: 4 (8) ST3+ST4: 5 (10) ST1+ST3: 3 (6)	(Khademvatan ve ark, 2017)

(Tablo 5.2 Devam)

Hollanda	Rutin laboratuvar örnekleri (n=103)	SSU rDNA PZR	23 (22)	23 (22)	43 (41)	12 (12)	ST6: 1(%1) ST7: 1 (%1)	(Bart ve ark, 2013)
Tanzanya	Rutin laboratuvar örnekleri (n=106)	RT-PZR ve SSU rDNA PZR	36 (34)	28 (26,4)	27 (25,5)		ST7 1 (0,9) Belirlenemeyen 14 (13,2).	(Forsell ve ark, 2016)

Türkiye'nin farklı illerinde *Blastocystis* alt tiplerinin araştırıldığı çalışmalar değerlendirildiğinde bizim çalışmamıza alt tip dağılımı yönünden benzerlik gösterdikleri ancak saptanan *Blastocystis* alt tip sayısı yönünden bazı farklılıklar olduğu görülmüştür (Tablo 5.3). Çalışmamızda ST1, ST2, ST3 ve ST7 olmak üzere toplam dört farklı alt tip saptanmıştır. Ülkemizde bu alt tiplere ek olarak ST4, ST5 ve ST6 alt tiplerinin de saptandığı çalışmalar bulunmaktadır. Dağcı ve ark (2014) Manisa ve İzmir'de hayvan besleyen kişilerden topladıkları dışkı örneklerde *Blastocystis* alt tip dağılımını: ST3 (%44,7), ST1 (%13,8), ST2 (%11,7), ST6 (%1,1), ST7 (%1,1) ve ST2+ST3 (%2,1) olarak belirlemişlerdir. Aydın 'da yapılan önceki araştırmalarda çalışmamıza benzer şekilde ST3 en sık olmak üzere ST1, ST2 ve ST7 alt tiplerinin bulunduğu bildirilmiştir (Ertug ve ark, 2015; Yersal ve ark, 2016; Coskun ve ark, 2016). Adıyaman Korkmaz ve ark (2015) Ankara'da gastrointestinal sistem şikayeti olan 350 hastadan topladıkları dışkı örneklerinden besiyerinde çoğalan izolatların alt tiplerini STS-PZR ile belirlemişlerdir. Araştırmacılar *Blastocystis* alt tip dağılımını: ST3 (%28), ST1 (%13,9), ST4 (%11,6), ST7 (%11,6), ST2 (%7) ve ST6 (%2,3) şeklinde bulmuştur. İstanbul'da yapılan bir çalışmada en sık saptanan *Blastocystis* alt tipinin ST3 olduğu ve bunu sırasıyla ST1, ST5, ST2 ve ST4'ün takip ettiği bildirilmiştir (Boral Büyükbaba ve ark, 2017). Ankara'da IBS, IBD, kronik diyareli hastalarda ve asemptomatik kontrol gruplarında yapılan bir çalışmada ST3 görülme sıklığı %62,8 (n=22), ST2 %34,3 (n=12) ve ST1 %8,5 (n=3) olarak rapor edilmiştir (Doğruman Al ve ark, 2009b). Eskişehir'de yaşları 3-13 arasında değişen çocuklarda *Blastocystis* genetik çeşitliliğinin STS-PZR yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada alt tip dağılımı: ST3 (%43,4), ST1 (%26,1), ST4 (%10,9) ve ST2 (%8,7) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca beş örnekte birden fazla alt tip (üç örnek ST1+ST3, bir örnek ST1+ST2, bir örnek ST2+ST3) saptanmıştır (Doğan ve ark, 2017). Koltaş ve Eroğlu (2016) Çukurova bölgesinden elde ettikleri 28 örnekte *Blastocystis* alt tip dağılımını ST1 (10 izolat, %35,7), ST3 (yedi örnek %25), ST2 (beş örnek %17,8) ve ST4 (üç örnek, %10,7), ST5 (bir örnek, %3,6), ST6 (bir örnek, %3,6) ve ST7 (bir örnek %3,6) olarak bildirmiştir. Şakalar ve ark (2013) Kayseri, Erciyes Üniversitesi Hastanesi'nden topladıkları örneklerde direkt mikroskopi ile *Blastocystis* gördükleri örneklerden DNA izolasyonu yapmış ve STS-PZR ile *Blastocystis* alt tiplerini araştırmışlardır. Araştırmacılar en sık ST3 (%55,2), sonra ST1 (%37,9), ST2 (%13,8) ve ST4 (%6,8) saptadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca bir olguda *Blastocystis* ST1 ve ST2 alt tipleri, diğer bir olguda da ST1 ve ST3 alt tipleri son olarak iki olguda ST3 ve ST4 alt tiplerine birlikte rastlandığı bildirilmiştir.

Blastocystis alt tip dağılımları değerlendirildiğinde ST4'ün Avrupa kıtasında, ST6 ve ST7 alt tiplerinin ise daha çok Asya kıtasında görüldüğü bildirilmiştir (Poirier ve ark, 2011;

El-safadi ve ark, 2014). Çalışmamızda ST7'ye %4,2 oranında rastlanmış olmakla birlikte ST4 alt tipi saptanmamıştır. Ülkemizdeki diğer çalışmalarda Aydın, İzmir ve Muğla illerinde ST7'ye rastlandığı bildirilmiştir. Bu çalışmalarda ST7'nin görülme sıklığı Aydın'dan elde edilen *Blastocystis* izolatları arasında %8,3 (n=12, bir izolat), İzmir'de %1,1 (n=94, bir izolat) ve Muğla'da %2,8 (n=35, bir izolat) olarak rapor edilmiştir (Dağcı ve ark, 2014; Sankur ve ark, 2015; Coşkun ve ark, 2016). Ankara ve Eskişehir'deki çalışmalarda ST4'e sırasıyla %1,1 (n=87, bir izolat) ve %10,9 (n=46, beş izolat) rastlandığı bildirilmiştir (Özyurt ve ark, 2008; Doğan ve ark, 2017). Türkiye bulunduğu coğrafi olarak Asya ve Avrupa kıtalarının kesişme noktasında bulunduğu için alt tiplerin dağılımı ayrıca önem taşımaktadır. *Blastocystis* alt tiplerinin araştırıldığı farklı illerdeki çalışmalar sonucunda bu konuda daha ayrıntılı bilgi sahibi olunması gerekli görülmektedir.

Tablo 5.3. Türkiye’de *Blastocystis* alt tiplerinin araştırıldığı çalışmalar*

Şehir	Çalışma grubu	Yöntem	ST1 sayı (%)	ST2 sayı (%)	ST3 sayı (%)	Diğer sayı (%)	Kaynak
Aydın	Rutin lab. örnekleri (n=95)	sekanslama ve STS-PZR	17 (17,9)	21 (22,1)	50 (52,6)	ST7: 4 (4,2) ST2+ST3: 2 (2,1) ST1+ST3: 1 (1,1)	Bu çalışma
Aydın	Ülseratif kolitli hastalar (n=12)	sekanslama	2 (16,7)	1 (8,3)	8 (66,7)	ST7: 1 (8,3)	Coşkun ve ark (2016)
Aydın	Kanser hastaları (n=25)	STS-PZR	5 (23)	4 (18)	13 (59)	Belirlenemeyen 3 (12)	Yersal ve ark (2016)
Aydın	Rutin laboratuvarı (n=61)	STS-PZR	9 (20,5)	13 (29,5)	17 (38,6)	Belirlenemeyen 17 (27,9) ST1+ST3: 4 (9,1) ST2+ST3: 1 (2,3)	Ertuğ ve ark (2015)
İstanbul	Rutin lab. örnekleri (n=87)	sekanslama	8 (9,2)	12 (13,7)	66 (75,8)	ST4: 1 (1,1)	Özyurt ve ark (2008)

(Tablo 5.3 Devam)

İstanbul	Rutin lab. örnekleri (n=50)	Sekanslama	3 (6)	2 (4)	34 (68)	ST1+ST3: 1 (2) ST2+ST3: 1 (2) ST3+ST5: 3 (6) ST4+ST5: 1 (2) ST1+bilinmeyen alt tip: 1 (2) ST3+bilinmeyen alt tip: 4 (8)	Boral Büyükbaba ve ark (2017)
İzmir	GIS semptomlu hastalar (n=94)	RT-PZR	13 (13,8)	11 (11,7)	42 (44,7)	ST6: 1 (1,1) ST7 1 (1,1) ST2 +ST3: 2 (2,1) Belirlenemeyen 24 (25,5)	Dağcı ve ark (2014)
Eskişehir	Çocuklarda (n=46)	RT-PZR	12 (26,1)	4 (8,7)	20 (43,4)	ST4: 5 (10,9) ST1+ST3: 3 (6,5) ST1+ST2: 1 (2,1) ST2+ST3: 1 (2,1)	Doğan ve ark (2017)

(Tablo 5.3 Devam)

Manisa	Rutin lab, örnekleri (n=92)	STS-PZR	17 (18,4)	20 (21,7)	51 (55,4)	ST1+ST3: 2 (2,1) ST2+ST3: 2 (2,1)	Doğruman Al ve ark (2008)
Ankara	IBD, Chron ve ishalli hasta gruplarında (n=35)	STS-PZR	1 (2,8)	10 (28,6)	21 (60)	ST2:+ST1: 2 (5,7) ST2+ST3: 1 (2,8)	Doğruman ve ark, (2009b)
Adana	Semptomatik ve asemptomatik gruplarda (n=32)	STS-PZR	20 (62,5)	3 (9,3)	9 (28,1)		Eroğlu ve ark (2009)
Muğla	Çocuklarda (n=35)	Sekanslama	11 (31,4)	9 (25,7)	12 (34,2)	ST7: 1 (2,8)	Sankur ve ark (2015)

* En sık saptanan alt tipler vurgulanmıştır.

Çalışmamızda besiyerinde üremeyen ancak dışkıdan DNA izolasyonu sonrası PZR ile pozitif saptanan dokuz örneğin alt tipleri: ST3 (altı örnek, %66,6), ST2 (iki örnek, %22,2) ve ST1 (bir örnek, %11,1) şeklinde bulunmuştur. Roberts ve ark (2011) kültür ve DM negatif altı örnekten dördünün ST3, diğer ikisinin ise ST1 ve ST4 birlikte olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise iki örneğin alt tipinin de ST3 olduğu belirlenmiştir. Boral Büyüka ve ark (2017) karşılaştırma yöntemiyle *Blastocystis* pozitif buldukları ancak Jones besiyerinde üreme görmedikleri üç örneği dışkıdan DNA izolasyonu yaparak PZR yöntemiyle tekrar çalışmışlardır. Araştırmacılar bu örneklerin tamamında STS-PZR ile *Blastocystis* alt tiplerini (bir örnek ST3+ST2 ve iki örnek ST3) belirlemişlerdir. Tam olarak bizim çalışmamızdaki verilerle kıyaslamak mümkün olmasa da Stensvold ve ark (2007b) çalışmalarında FECT ve kalıcı boyama ile yanlış negatif sonuç alınan örneklerde PZR yöntemiyle ST3 saptamıştır.

Çalışmamızda 92 *Blastocystis* izolatına ait SSU rDNA dizisi (üç izolat STS-PZR ile belirlenebildiği için dizi verisi bulunmamaktadır) referans dizilerle sıralanıp evrimsel uzaklıkları belirlendiğinde *Blastocystis* alt tip veri tabanı (<https://pubmlst.org/Blastocystis/>) ile tamamen örtüşen şekilde alt tipler belirlenmiştir. Bu sonuç *Blastocystis* alt tiplerinin belirlenmesinde uygulamadaki kolaylığı nedeniyle veri tabanının tercih edilebileceğini göstermektedir. Ancak ikinci bir yöntem olarak filogenetik analizle veya Genbank dizileriyle karşılaştırılarak sonuçların değerlendirilmesi de faydalı görülmektedir. Filogenetik analiz incelendiğinde ST1 ve ST2'nin ortak bir atadan ayrıldığı görülmektedir. Ayrıca ST3 ile ST4 de birbiriyle daha yakın bulunmuştur. Benzer şekilde bir ilişki daha önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Stensvold ve ark, 2007a; Stensvold ve ark, 2009a; Forsell ve ark, 2012). Çalışmamızda saptanan ST7 izolatları ise ST6 ve ST9 alt tiplerine yakın çıkmıştır.

Blastocystis biyolojisi ve patogenezi hakkında birçok bilinmeyen ve tartışmalı konuları içeren bir protozoan olup son yıllarda özellikle moleküler çalışmaların yardımıyla araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır. Bilim adamlarının uzun yıllardır cevap aradığı soruların başında “*Blastocystis* entero-patojen mi yoksa kommensal yaşayan bir mikroorganizma mı?” sorusu gelmektedir (Roberts, 2014a). Tedavi edilmeyen *Blastocystis*'li olguların bir kısmında etkenin kendiliğinden ortadan kaybolması ve gastrointestinal semptomların gerilemesi birçok çalışmada kaydedilen bir bulgu olarak bildirilmiştir (Rossignol ve ark, 2005; Dinleyici ve ark, 2011; Heyland ve ark, 2012; van Hellemond ve ark, 2013). Ayrıca *Blastocystis* enfeksiyonları genellikle asemptomatik veya kendini sınırlayan klinik bulgularla seyretmekte olup bu olgularda tedavi önerilmemektedir (Roberts ve ark, 2014b). Ancak semptomlar süreklilik gösteriyorsa ve hastada *Blastocystis* dışında herhangi bir patojen saptanmadıysa *Blastocystis* tedavisine başlanabileceği bildirilmektedir

(Sekar ve Shanthi, 2013). Bazı çalışmalarda ise *Blastocystis* fırsatçı bir patojen olarak tanımlanmış olup çocuklarda ve immün-sistemi baskılanmış kişilerde *Blastocystis* enfeksiyonlarının daha dikkatli takip edilmesinin gerekli olduğu rapor edilmiştir (Rao ve ark, 2003; Basak ve ark, 2014; Eassa ve ark, 2016). Günümüzde *Blastocystis* enfeksiyonu olan kişilerde klinik bulguların *Blastocystis* genotipi, mikrobiyota, konak immün yanıtı, *Blastocystis* yoğunluğu ve eşlik eden diğer enfeksiyonlar gibi birçok faktöre bağlı olarak geliştiği kabul edilmektedir (Tan, 2008; Tan, 2010; Andersen ve Stensvold, 2016; Stensvold ve Clark, 2016). *Blastocystis* patojen olarak tanımlandığı araştırmalarda çok sayıda gastrointestinal ve bazı dermatolojik semptom (karın ağrısı, ishal, konstipasyon, halsizlik, kusma, baş ağrısı, dermatolojik belirtiler, eklem ağrısı ve psikiyatrik bulgular) *Blastocystis* enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Daryani ve ark, 2006; Boorom ve ark, 2008; Tan, 2008; Hameed ve ark, 2011).

Çalışmamızda tanı yöntemlerinin herhangi biriyle *Blastocystis* pozitifliği saptanan 107 ve *Blastocystis* saptanmayan 93 olgu demografik özellikler (cinsiyet, ikamet yeri ve yaş) açısından karşılaştırıldığında her hangi biriyle anlamlı bir fark bulunmamıştır. Dağcı ve ark (2014) *Blastocystis* görülme sıklığının kadın ve erkeklerde anlamlı farklılık göstermediğini ancak 20-29 yaş aralığında görülme sıklığının daha yüksek olduğunu bildirmiştir. El-Safadi ve ark (2016) *Blastocystis* 'e 15-49 yaş aralığında 50 yaş üstüne göre daha sık rastladıklarını bildirmiştir. Cabrine Santos ve ark (2015) altı yaşından büyüklerde *Blastocystis* görülme sıklığının istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada *Blastocystis* enfeksiyonu saptanan ve saptanmayan bireyler arasında cinsiyet yönünden anlamlı bir farklılık bulunmadığı rapor edilmiştir. AbuOdeh ve ark (2016) cinsiyet ile *Blastocystis* görülmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığını bildirmiştir. El Safadi ve ark (2016) *Blastocystis* görülme sıklığını kadınlarda %19, erkeklerde %16 olarak saptamalarına karşın bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmaların aksine Abdulsalam ve ark (2013) *Blastocystis* görülme sıklığının kadın olgularda ve eğitim düzeyi düşük bireylerde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulduklarını bildirmiştir. Nithyamathi ve ark (2016) *Blastocystis* enfeksiyonu ve risk faktörlerini araştırdıkları çalışmada şehir merkezi ve kırsaldan topladıkları dışkı örneklerinde *Blastocystis* varlığını DM ve kültür yöntemiyle araştırmışlardır. Demografik faktörlerden yaş, ve cinsiyet ile *Blastocystis* enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki bulmadıklarını bildirmişlerdir. Ancak ailenin geliri, yaşadığı yer (kırsalda daha yüksek) ve annenin eğitim durumu risk faktörü olarak tanımlanan parametreler arasında yer almaktadır. Ayrıca çoklu varyans analizi sonucuna göre gelir seviyesi düşük

çocukların diğerlerine göre *Blastocystis* ile enfekte olma ihtimalinin iki kat yüksek olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda hastane kayıtları incelenip retrospektif olarak olguların özellikleri değerlendirildiği için olguların sınırlı sayıda bilgisine ulaşılmıştır.

Çalışmamızda hastane kayıtlarının incelenmesi sonucu *Blastocystis* saptanan olgularda en sık kaşıntı (%32,7) olmak üzere sırasıyla ishal (%25,2), karın ağrısı (%19,6) ve dispepsi (%9,3) semptomlarının görüldüğü saptanmıştır. Çalışmamızda olduğu gibi parazitoloji laboratuvarına gönderilen dışkı örneklerinin değerlendirildiği bir çalışmada *Blastocystis*'li olgularda en sık karın ağrısı, kaşıntı, ishal ve kabızlık semptomları izlendiği bildirilmiştir (Ertuğ ve ark, 2015). Onkoloji servisindeki hastalarda yapılan diğer bir çalışmada ise *Blastocystis* saptanan olgularda en sık şişkinlik, karın ağrısı, melena ve kabızlık görüldüğü rapor edilmiştir (Yersal ve ark, 2016). Dağcı ve ark (2004) *Blastocystis* saptadıkları olgularda en yaygın bildirilen semptomların sırasıyla karın ağrısı, ishal ve bulantı/kusma olarak bildirmiştir. Bir diğer çalışmada ise *Blastocystis* ile enfekte olgularda en sık karın ağrısı ve alerjik semptomların görüldüğü de bildirilmiştir (Boral Büyükbaba ve ark, 2017). Geniş çaplı bir derlemede de *Blastocystis* 'li olgularda en sık bildirilen iki semptomun karın ağrısı ve ishal olduğu rapor edilmiştir (Tan, 2008). Beyhan ve ark (2015) rutin parazitolojik incelemede *Blastocystis* saptadıkları olgularda en sık karın ağrısı ve ishal bulgularına rastladıklarını ifade etmişlerdir. Elghareeb ve ark (2015) *Blastocystis*'li olgularda semptomların görülme sıklıklarını: karın ağrısı (%40), şişkinlik (%36), kusma (%20), bulantı (%14), halsizlik (%11), kaşıntı (%11) ve eklem ağrısı (%6) şeklinde bildirmiştir. Şakalar ve ark (2013) çalışmalarında *Blastocystis* ile enfekte olgularda en sık karın ağrısı, ishal ve dermatit görüldüğü rapor etmiştir. *Blastocystis*'li olgularda görülen semptomların değerlendirildiği çalışmaların bir kısmı Tablo 5.4'de özetlenmiştir.

Çalışmamızda tanı yöntemlerin herhangi biriyle *Blastocystis* pozitifliği saptanan 107 ve saptanmayan 93 olgu klinik bulgular açısından karşılaştırıldığında semptomların herhangi biriyle istatistiksel olarak anlamı bir ilişki bulunmamıştır (tamamında $p>0.05$). *Blastocystis* pozitif grup ve negatif grupta semptomlar ayrı ayrı değerlendirildiğinde: kaşıntı (%32,7 ve %30,1), ishal (%25,2 ve %17,2), karın ağrısı (%19,6 ve %15,1), dispepsi (%9,3 ve %11,3), bulantı kusma (%8,4 ve %6,5), konstipasyon (%5,2 ve %3,2) ve son olarak kilo kaybı (%4,7 ve %5,40) şeklinde bir sonuç ortaya çıkmıştır. Literatürdeki çalışmalar genellikle asemptomatik kontrol ve semptomatik hasta gruplarının karşılaştırılması şeklinde yapılmış olmakla birlikte birçoğu bizim bulgumuzu desteklemektedir. Seyer ve ark (2017) kontrol grubu ve semptomatik olgular arasında *Blastocystis* görülme sıklığı yönünden bir farklılık olmadığı da bildirilmiştir. Forsell ve ark (2016) ishalleri hastalarda ve kontrol grubunda

Blastocystis görülme sıklığı yönünden farklılık olmadığını bildirmiştir. El Safadi ve ark (2016) RT-PZR ile semptomatik hastaların %18,5'inde *Blastocystis* pozitifliği saptadıkları çalışmalarında asemptomatik grupta *Blastocystis* pozitifliğinin %16,2 olduğunu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmiştir. Bu çalışmada karın ağrısı, şişkinlik, ishal, kabızlık ve kusma değerlendirilen semptomlar arasında yer almaktadır. Jantermtor ve ark (2013) *Blastocystis* pozitif olguların 31'inin (%55,4) asemptomatik olduğunu ve 22'sinin gastrointestinal semptomlar gösterdiğini bildirmiştir. Nithyamathi ve ark (2016) çocuklarda yaptıkları çalışmada *Blastocystis* enfeksiyonu ile gastrointestinal semptomlar arasında bir ilişki olduğunu ayrıca gelir seviyesi düşük çocuklarda enfeksiyonun semptomatik olma ihtimalinin beş kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Özçakır ve ark (2007) parazitoloji laboratuvarında gönderilen dışkı örneklerinde *Blastocystis* araştırdıkları çalışmalarında *Blastocystis*'in alerjik hastalığı olanlarda daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir.

Tablo 5.4. *Blastocystis* saptanan olgularda bildirilen semptomlar

Çalışma grubu	Semptom, Sayı (%)										Kaynak
	Diyare	Karın ağrısı	Bulantı/ Kusma	Flatulans	Kabızlık	Şişkinlik	Dispepsi	Halsizlik	Kilo kaybı	Ürtiker /kaşıntı	
Rutin laboratuvar örnekleri (n=107)	27 (25,2)	21 (19,6)	9 (8,4)		6 (5,2)		10 (9,3)		5 (4,7)	35 (32,7)	Bu çalışma
Rutin laboratuvar örnekleri (n=93)	16 (17,2)	21 (22,5)	12 (12,9)		14 (15)	26 (27,9)					El safadi ve ark, 2016
Rutin laboratuvar örnekleri (n=51)	11 (21,5)	39 (76,4)	3 (5,8)	21 (41,1)	2 (3,9)						Abdulsalam ve ark, 2013
Rutin laboratuvar örnekleri (n=92)	61 (66,3)	34 (37)	15 (16,3)	16 (17,4)		13 (14,1)	16 (17,4)			9 (9,8)	Salvador ve ark, 2016
Kanser hastaları (n=25)	2 (8)	5 (20)	3 (12)	10 (40)	8 (32)				4 (16)		Yersal ve ark, 2016
Rutin laboratuvar örnekleri (n=61)	4 (6,5)	24 (39,3)			2 (3,2)					22 (36)	Ertuğ ve ark, 2015

Tablo 5.4 Devam

Rutin laboratuvar örnekleri (n=275)	54 (19,6)	75(27,3)	21 (7,6)		11 (4)		24 (8,7)	9 (3,3)	Beyhan ve ark, 2015
Rutin laboratuvar örnekleri (n=125)	93 (74,4)	72 (57,6)	49 (39,2)	52 (42)			37 (29,6)		Doyle ve ark, 1990
Rutin laboratuvar örnekleri (n=48)	26 (54,1)	15 (31,2)	3 (6,2)	3 (6,2)	2 (4,1)		2 (4,1)	3 (6,2)	El Masry ve ark, 1990
Çocuklar (n=75)	22 (30)	71 (90)	65 (87)		22 (30)	37 (50)	45 (60)	56 (75)	Nimri ve Batchoun, 1994
Hematolojik malignanslı hastalar (n=23)	16 (70)	20 (87)	15 (65)	17 (74)		15 (65)			Taşova ve ark, 2000
Rutin laboratuvar örnekleri (n=52)	26 (50)	40 (76,9)			2 (3,8)	17 (32,6)	2 (3,8)	3 (5,7)	Kaya ve ark, 2007

* Her bir çalışmada en sık bildirilen semptom vurgulanmıştır.

Çalışmamızda alt tip dağılımı ve en yaygın bildirilen dört semptom (kaşıntı, karın ağrısı, ishal ve dispepsi) değerlendirildiğinde herhangi biriyle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Benzer şekilde El-safadi ve ark (2016) alt tipler ve semptomlar arasında da herhangi bir korelasyon olmadığı bildirilmiştir. Doğan ve ark (2017) gastrointestinal semptomlu ve semptomsuz çocuklarda *Blastocystis* alt dağılımı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadıklarını bildirmiştir. Benzer şekilde Adıyaman Korkmaz ve ark (2015) çalışmalarında *Blastocystis* pozitifliği veya alt tip dağılımı ile ishal bulgusu yönünden anlamlı bir fark bulunmadığını rapor etmiştir. Sanpool ve ark (2016) alt tipler ve semptomlar arasında anlamlı bir ilişki olmadığını bildirmiştir. Yoshikawa ve ark (2004a) *Blastocystis* patojenik potansiyeli ve alt tipler arasında bir korelasyon bulmadıklarını bildikleri çalışmalarında hem asemptomatik grupta hem de semptomatik grupta en sık ST1 ve ST3'e rastladıklarını rapor etmişlerdir. Jantermtor ve ark (2013) *Blastocystis* alt tipleri ve klinik tablo arasında bir ilişki bulunmadığı rapor etmiştir. Benzer şekilde Boral Büyükbaba ve ark (2017) klinik semptomlar ile *Blastocystis* arasında ilişki saptamadıklarını bildirmiştir. Seyer ve ark (2017) *Blastocystis* alt tipleri ile olguların demografik özellikleri ve gastrointestinal semptomları arasında bir ilişki bulmadıklarını ifade etmişlerdir.

Bizim bulgularımızın aksine bazı çalışmalarda *Blastocystis* alt tipleri ve klinik bulgular arasında ilişki bulunduğu bildirilmiştir. Khademvatan ve ark (2017) ST3 ile gastrointestinal semptomlar arasında bir ilişki olabileceğini bildirmiştir. Sigidaev ve ark (2013) ST1 alt tipi saptanan çocuklarda gastrointestinal semptomların ST2 saptanan çocuklarda ise alerjik semptomlara daha sık olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda ST1 saptananlarda en sık ishal (%35,3), ST2 saptananlarda en sık karın ağrısı bulgusu (%28,6) görülmüştür. Yan ve ark (2006) Çinde yaptıkları çalışmada 19'u asemptomatik ve 16'sı semptomatik olmak üzere toplam 35 olguda *Blastocystis* genetik çeşitliğini STS-PZR ile araştırmışlardır. Semptomatik grupta saptanan *Blastocystis* izolatlarının %56'sı ST1, asemptomatik grupta saptananların ise %21'i ST1 olarak tanımlanmıştır. Bu fark anlamlı olduğu için ST1'in diğer alt tiplere göre patojenik olabileceği sonucuna varılmıştır. Diğer bir çalışmada çalışmada ST3'ün istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ishal ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Abdulsalam ve ark, 2013). Roberts ve ark (2013) *Blastocystis* ST3 ile enfekte olguların yaklaşık %40'ında gastrointestinal semptomların görüldüğünü ve en güçlü ilişkinin ishal ile olduğunu bildirmiştir. Ayrıca *Blastocystis* ST4 alt tipi ile enfekte olgularda %50'sinde ishal dışındaki semptomlar görüldüğü saptanmıştır. Bu bulguya dayanarak patojenite ve alt tipler arasında bir ilişki olabileceği savunulmuştur. Bizim çalışmamızda da ST3 alt tipi saptanan olgularda en sık bildirilen semptom ishal olarak not edilmiştir. Mohamed AM ve ark (2017) asemptomatik

olgularda ST3'e istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksek oranda rastlandığını bildirmiştir. Çalışmamızda ST4 alt tipine ait izolat bulunmadığı için diğer bulguyu karşılaştırma olanağımız olmamıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz ve literatürde yer alan bulgular *Blastocystis* alt tipleri ve patojenite arasındaki ilişkiyi anlamamız için mevcut moleküler epidemiyolojik verilerin yetersiz kaldığını göstermektedir. Bu nedenle *Blastocystis* patojenitesi ve klinik özellikleri uzun yıllardır olduğu gibi *Blastocystis* ile ilgili en tartışmalı konuların başında gelmektedir. Deneysel çalışmaların ve hayvan modelleri *Blastocystis* patojenitesi konusunda çok daha açıklayıcı olacağı açıkça görülmektedir (Tan, 2008; Ajjampur ve Tan, 2016). Ancak günümüzde *Blastocystis* ile enfekte bireylerin büyük kısmının asemptomatik olduğu birçok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir. Ayrıca son çalışmalarda *Blastocystis*'in sağlıklı bir intestinal floranın belirteci olabileceği dahi iddia edilmektedir (Stensvold ve Clark, 2016; Audebert ve ark, 2016).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Direkt mikroskopi yöntemiyle *Blastocystis* saptanan 100 dışkı örneğinin 81'inde (%81) kültür ile 88'inde (%88) PZR ile pozitiflik saptanmıştır.
2. Direkt mikroskopi yöntemiyle *Blastocystis* saptanmayan 100 dışkı örneğinin beşinde (%5) kültür yöntemiyle ile yedisinde (%7) PZR ile pozitiflik saptanmıştır.
3. Kültürde üreme gözlenen 86 örneğin tamamında PZR ile beklenen boyutta amplifikasyon görülmüştür.
4. Kültürde üreme gözlenmeyen 114 örneğin dokuzunda (%7,8) PZR ile beklenen boyutta amplifikasyon görülmüştür.
5. DM yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, kültür ve PZR yöntemlerinin duyarlılık/özgüllükleri sırasıyla %81/%95 ve %88/%93 olarak bulunmuştur.
6. Kültür yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde DM yönteminin duyarlılığı %94,2 özgüllüğü %83,3 olarak; PZR yönteminin duyarlılığı %100 özgüllüğü ise %92,1 olarak bulunmuştur.
7. PZR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, DM ve kültür yöntemlerinin duyarlılık/özgüllük değerleri sırasıyla %92,6/%88,6 ve %90,5/%100 olarak bulunmuştur.
8. Çalışmamızda toplam 95 izolatan alt tipi belirlenmiş olup alt tip dağılımı: ST3 (50 örnek %52,6), ST2 (21 örnek %22,1), ST1 (17 örnek %17,9), ST7 (dört örnek %4,2), ST2+ST3 (iki örnek %2,1) ve ST1+ST3 (bir örnek %1,1) şeklinde bulunmuştur.
9. Toplam 35 örneğin kültürde çoğaltılan izolatlardan ve dışkıdan direkt DNA izolasyonu ile belirlenen alt tipleri karşılaştırıldığında herhangi bir fark saptanmamıştır.
10. *Blastocystis* enfeksiyonu saptanan ve saptanmayan olgular arasında klinik bulgular yönünden herhangi biri fark bulunmamıştır.
11. *Blastocystis* alt tipleri ve klinik bulguların dağılımı arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.
12. *Blastocystis* SSU rRNA dizilerinin evrimsel uzaklıkları incelendiğinde ST1 ve ST2'nin ortak bir atadan ayrıldığı görülmüştür. Ayrıca ST3 ile ST4 de birbiriyle daha yakın bulunmuştur.
13. *Blastocystis* rutin tanısında direkt mikroskopi yöntemi hem yalancı pozitiflik hem de yanlış negatif sonuçlar verdiği için yetersiz bulunmakta olup ikinci bir yöntemin daha kullanılması faydalı görülmektedir.

14. Aydın ilinde saptanan *Blastocystis* alt tip dağılımı dünya ve ülkemizdekinden farklılık göstermemektedir. Diğer birçok çalışmada bildirildiği gibi ST3 baskın genotip olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda ST4'e rastlanmasına karşın bizim çalışmamızda ST4'e rastlanmamıştır.
15. Kültürden veya dışkıdan DNA izolasyonunun alt tip dağılımı üzerine etkisinin olmadığı veya sınırlı olduğu saptanmıştır. Dışkıdan direkt DNA izolasyonu zaman ve uygulanabilirlik açısından avantajlı ancak maliyet yönünden dezavantajlı olduğu görülmektedir.
16. *Blastocystis* enfeksiyonu ile herhangi bir gastrointestinal semptom arasında ilişki bulunmaması *Blastocystis* enfeksiyonlarının asemptomatik olduğu ve *Blastocystis*'in normal flora elemanı olarak bulunabileceği fikrini desteklemektedir. Ancak retrospektif çalışmalar ile klinik bulguların değerlendirilmesi semptomların kaynağının tam olarak bilinmemesi nedeniyle bazı zorluklar taşımaktadır. Bu nedenle *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ağırlık verilmelidir. Bunlara ek olarak farklı polikliniklerden gönderilen hastalarda semptomların kaynağının tam olarak belirlenmesi mümkün olmamaktadır.
17. Alt tip ile semptomlar arasında ilişki bulunmaması patojenitenin *Blastocystis* alt tipi gibi tek bir özellik üzerinden açıklanamayacağı fikrini desteklemektedir. Patojenite çalışmalarında *Blastocystis* ve konaktan kaynaklanan faktörlerin toplu olarak ele alınmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Hafeez EH, Ahmad AK, Abdelgelil NH, Abdellatif MZ, Kamal AM, Hassanin KM, Abdel-Razik AR, Abdel-Raheem EM.** Immunopathological assessments of human *Blastocystis spp.* in experimentally infected immunocompetent and immunosuppressed mice. *Parasitology Research* 2016, 115, 2061-2071.
- Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Ahmed A, Surin J, Mak JW.** Drinking water is a significant predictor of *Blastocystis* infection among rural Malaysian primary schoolchildren. *Parasitology* 2012, 139, 1014-1020.
- Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Khan AH, Ahmed A, Surin, J, Mak JW.** Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis sp.* in Sebha, Libya. *Parasites & Vectors* 2013, 6, 86.
- Abou ENIF, Negm AY.** Morphology, histochemistry and infectivity of *Blastocystis hominis* cyst. *Journal of Egyptian Society of Parasitology* 2001, 31(2), 627-635.
- Abu-Madi M, Aly M, Behnke JM, Clark CG, Balkhy H.** The distribution of *Blastocystis* subtypes in isolates from Qatar. *Parasites & Vectors* 2015, 8, 465.
- AbuOdeh R, Ezzedine S, Samie A, Stensvold CR, ElBakri A.** Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in healthy individuals in Sharjah, United Arab Emirates. *Infection and Genetic Evolution* 2016, 37, 158-162.
- Adao DE, Dela Serna AO, Belleza ML, Bolo NR, Rivera WL.** Subtype analysis of *Blastocystis sp.* isolates from asymptomatic individuals in an urban community in the Philippines. *Annals of Parasitology* 2016, 62(3), 193-200.
- Adiyaman Korkmaz G, Doğruman Al F, Mumcuoğlu I.** Investigation of the presence of *Blastocystis spp.* in stool samples with microscopic, culture and molecular methods. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2015, 49(1), 85-97.
- Ajjampur SS, Tan KS.** Pathogenic mechanisms in *Blastocystis spp.* - Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitology International* 2016, 65, 772-779.
- Ajjampur SS, Png CW, Chia WN, Zhang Y, Tan KS.** Ex Vivo and *in vivo* mice models to study *Blastocystis spp.* adhesion, colonization and pathology: closer to proving Koch's postulates. *PLoS One* 2016, 11, 458.

- Alfellani MA, Khan AH, Al-Gazoui RM, Zaid MK, Al-Ferjani MA.** Prevalence and clinical features of *Blastocystis hominis* infection among patients in Sebha, Libya. *Sultan Qaboos University Medical Journal* 2007, 7(35), 40.
- Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG.** Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Tropica* 2013a, 126, 11-18.
- Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG.** Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* 2013b, 164(4), 497-509.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 1990, 215(3), 403-410.
- Amin OM.** Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002, 66(6), 799-803.
- Andersen LO, Bonde I, Nielsen HB, Stensvold CR.** A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiology Ecology* 2015, 91(7).
- Andersen LO, Stensvold CR.** *Blastocystis* in health and disease, are we moving from a clinical to a public health perspective? *Journal of Clinical Microbiology* 2016, 54(3), 524-528.
- Anuar TS, Ghani MK, Azreen SN, Salleh FM, Moktar N.** *Blastocystis* infection in Malaysia: evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. *Parasites & Vectors* 2013, 6, 40.
- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F.** Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *Journal of Eukaryot Microbiology* 2002, 49(1), 42-53.
- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H.** Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology* 2003, 126(1), 1-9.
- Audebert C, Even G, Cian A, The *Blastocystis* Investigation Group, Loywick A, Merlin S, Viscogliosi E, Chabé M.** Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific Reports* 2016, 6, 225-255.
- Balakrishnan DD, Kumar SG.** Higher Caspase-like activity in symptomatic isolates of *Blastocystis* spp. *Parasites & Vectors* 2014, 7, 219.

- Bart A, Wentink-Bonnema EM, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJ, van Vugt M, Goorhuis A, van Gool T.** Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13, 389.
- Basak S, Rajurkar MN, Mallick SK.** Detection of *Blastocystis hominis*: a controversial human pathogen. *Parasitology Research* 2014, 113(1), 261-265.
- Belleza MLB, Cadacio JL, Borja MP, Solon JAA, Padilla MA, Tongol-Rivera PN, Rivera WL.** Epidemiologic study of *Blastocystis* infection in an urban community in the Philippines. *Journal of Environmental Public Health* 2015, 894297.
- Ben Abda I, Maatoug N, Ben Romdhane R, Bouhelmi N, Zallegua N, Aoun K.** Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* sp. in healthy individuals in the Tunis Area, Tunisia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2017, 96(1), 202-204.
- Beyhan YE, Yilmaz H, Cengiz ZT, Ekici A.** Clinical significance and prevalence of *Blastocystis hominis* in Van, Turkey. *Saudi Medical Journal* 2015, 36(9), 1118-1121.
- Biedermann T, Hartmann K, Sing A, Przybilla B.** Hypersensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs and chronic urticaria cured by treatment of *Blastocystis hominis* infection. *British Journal of Dermatology* 2002, 146, 1113-1114.
- Bohm-Gloning 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. *Tropical Medicine International Health* 1997, 2(8), 771-778.
- Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Li LH, Zhou XN, Ok UZ, Leelayoova S, Jones MS.** Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites & Vectors* 2008, 1, 40.
- Boral Büyükbaba Ö, Paycu Çelik DG, Akgül A, İşsever H.** *Blastocystis* spp. saptanan 50 semptomatik hastada alt tip dağılımının saptanması. *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2017, 3(1), 6-10.
- Boreham PF, Stenzel DJ.** *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Advanced Parasitology* 1993, 32, 1-70.
- Cabrine Santos M, Cintra EN, Carmo RA, Nascentes GAN, Pedrosa AL, Correia D, Oliveria-Silva MB.** Occurrence of *Blastocystis* spp. in Uberaba, minas gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2015, 57(3), 211-214.
- Carbajal JA, del Castillo L, Lanuza MD, Villar J, Borrás R.** Karyotypic diversity among *Blastocystis hominis* isolates. *International Journal of Parasitology* 1997, 27(8), 941-945.
- Cassidy MF, Stenzel DJ, Boreham PF.** Electron microscopy of surface structures of *Blastocystis* sp. from different hosts. *Parasitology Research* 1994, 80(6), 505-511.

- Cavalier-Smith T.** A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 1998, 73, 203-266.
- Chandramathi S, Suresh K, Anita ZB, Kuppusamy UR.** Infections of *Blastocystis hominis* and microsporidia in cancer patients: are they opportunistic? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2012, 106, 267-269.
- Chen XQ, Singh M, Ho LC, Moe KT, Tan SW, Yap EH.** A survey of *Blastocystis sp.* in rodents. *Laboratory Animal Science* 1997, 47(1), 91-94.
- Chen XQ, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Yap EH.** *In vitro* encystation and excystation of *Blastocystis ratti*. *Parasitology* 1999, 118 (2), 151-160.
- Coşkun A, Malatyalı E, Ertabaklar H, Yaşar MB, Karaoğlu AO, Ertuğ S.** *Blastocystis* in ulcerative colitis patients: Genetic diversity and analysis of laboratory findings. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2016, 9, 916-919.
- Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB.** *Blastocystis*: to treat or not to treat. *Clinical Infectious Diseases* 2012, 54, 105-10.
- Çelik T, Daldal N, Karaman Ü, Aycan MÖ, Atambay M.** Malatya ili merkezinde üç ilköğretim okulu çocuklarında bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2006, 30(1), 35-38.
- Dağcı H, Kurt O, Demirel M, Mandiracıoğlu A, Aydemir S, Saz U, Bart A, van Gool T.** Epidemiological and diagnostic features of *Blastocystis* infection in symptomatic patients in izmir province, Turkey. *Iranian Journal of Parasitology* 2014, 9(4), 519-529.
- Daryani N, Barmaki GH, Ettehad M, Sharif MH, Dehghan A.** A cross-sectional study of *Blastocystis hominis* in primary school children, Northwest Iran. *International Journal of Tropical Medicine* 2006, 1(2), 53-57.
- Das R, Khalil S, Mirdha BR, Makharia GK, Dattagupta S, Chaudhry R.** Molecular characterization and subtyping of *Blastocystis* species in irritable bowel syndrome patients from North India. *PLoS One* 2016, 11(1), e0147055.
- Denoëud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, Viscogliosi E, Brochier-Armanet C, Couloux A, Poulain J, Segurens B, Anthouard V, Texier C, Blot N, Poirier P, Ng GC, Tan KS, Artiguenave F, Jaillon O, Aury JM, Delbac F, Wincker P, Vivarès CP, El Alaoui H.** Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biology* 2011, 12, 29.
- Dhurga DB, Suresh KG, Tan TC, Chandramathi S.** Apoptosis in *Blastocystis spp.* is related to subtype. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2012, 106(12), 725-730.

- Dinleyici EC, Eren M, Dogan N, Reyhanioglu S, Yargic ZA, Vandenplas Y.** Clinical efficacy of *Saccharomyces boulardii* or metronidazole in symptomatic children with *Blastocystis hominis* infection. *Parasitology Research* 2011, 108, 541-545.
- Doğan N, Aydın M, Tüzemen NU, Dinleyici EC, Oğuz I, Doğruman-Al F.** Subtype distribution of *Blastocystis spp.* isolated from children in Eskisehir, Turkey. *Parasitology International* 2017, 66(1), 948-951.
- Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt O, Demirel M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 2008, 103(3), 685-689.
- Doğruman-Al F, Yoshikawa H, Kustimur S, Balaban N.** PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in a major hospital in Ankara, Turkey. *Parasitology Research* 2009a, 106 (1), 263-268.
- Doğruman-Al F, Kuştimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Şimşek Z, Tanyüksel M, Araz E, Boorum K.** *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009b, 104(5), 724-727.
- Doğruman-Al F, Simsek Z, Boorum K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, Kustimur S, Altinbaş A.** Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS One* 2010, 5(11), e15484.
- Dominguez-Marquez MV, Guna R, Munoz C, Gomez-Munoz MT, Borrás R.** High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitology Research* 2009, 105(4), 949-955.
- Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM.** Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1990, 28, 116-121.
- Dünya Sağlık Örgütü.** Microbial fact sheets. World Health Organization Guidelines for Drinking-Water Quality (WHO GDWQ). Gutenberg, 2011, s 262.
- Dunn LA, Boreham PF, Stenzel DJ.** Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *International Journal of Parasitology* 1989, 19(1), 43-56.
- Eassa SM, Ali HS, El Masry SA, Abd El-Fattah EH.** *Blastocystis hominis* among immunocompromised and immunocompetent children in Alexandria, Egypt. *Annals of Clinical and Laboratory Research* 2016, 4, 2.
- Eida OM, Hussein EM, Eida AM, El-Moamly AA, Salem AM.** Evaluation of the nitric oxide activity against *Blastocystis hominis* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Egypt Society for Parasitology*. 2008, 38(2), 521-536.

- Eida AM, Eida MM.** Identification of *Blastocystis hominis* in patients with Irritable Bowel Syndrome using microscopy and culture compared to PCR. *Parasitologists United Journal* 2008, 1, 87–92.
- Eida OM, El-Shafei HA, Nomeir YA, El Safhi MB.** *In vivo* and *in vitro* efficacy of Nigella Sativa aqueous extract on *Blastocystis hominis*. *J Egypt Soc Parasitol* 2016, 46(1), 27-34.
- Elghareeb AS, Younis MS, El Fakahany AF, Nagaty IM, Nagib MM.** Laboratory diagnosis of *Blastocystis spp.* in diarrheic patients. *Tropical Parasitology* 2015, 5(1), 36-41.
- El Safadi D, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, Wawrzyniak I, Delbac F, El Alaoui H, Delhaes L, Dei-Cas E, Mallat H, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi E.** Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2013, 88(6), 1203-1206.
- El Masry NA, Bassily S, Farid Z, Aziz AG.** Potential clinical significance of *Blastocystis hominis* in Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1990, 84(5), 695.
- El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, Delbac F, Dabboussi F, Delhaes L, Seck M, Hamze M, Riveau G, Viscogliosi E.** Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis sp.* ever observed worldwide. *BMC Infectious Diseases* 2014, 14, 164.
- El Safadi D, Cian A, Nourrisson C, Pereira B, Morelle C, Bastien P, Bellanger AP, Botterel F, Candolfi E, Desoubieux G, Lachaud L, Morio F, Pomares C, Rabodonirina M, Wawrzyniak I, Delbac F, Gantois N, Certad G, Delhaes L, Poirier P, Viscogliosi E.** Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis sp.* from a large-scale multi-centre study in France. *BMC Infectious Diseases* 2016, 16, 451.
- El-Shazly AM, Abdel-Magied AA, El-Beshbishi SN, El-Nahas HA, Fouad MA, Monib MS.** *Blastocystis hominis* among symptomatic and asymptomatic individuals in Talkha Center, Dakahlia Governorate, Egypt. *Journal of Egyptian Society of Parasitology* 2005, 35, 653-666.
- Eroğlu F, Genç A, Elgün G, Koltaş IS.** Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitology Research* 2009, 105(6), 1589-1592.

- Ertuğ S, Malatyali E, Ertabaklar H, Özlem Çalışkan S, Bozdoğan B.** Subtype distribution of *Blastocystis* isolates and evaluation of clinical symptoms detected in Aydın province, Turkey. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2015, 49(1), 98-104.
- Fayer R, Elsasser T, Gould R, Solano G, Urban J, Jr., Santin M.** *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitology Research* 2014, 113, 1465-1472.
- Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark CG, Evengard B.** Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012, 31(7), 1689-1696.
- Forsell J, Granlund M, Samuelsson L, Koskiniemi S, Edebro H, Evengard B.** High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasites & Vectors* 2016, 9(1), 370.
- Forsell J.** Genetic Subtypes in Unicellular Intestinal Parasites with Special Focus on *Blastocystis*. Thesis of Doctorate. Umea University Department of Clinical Microbiology, Umea, 2017. 73.
- Graczyk TK, Shiff CK, Tamang L, Munsaka F, Beitin AM, Moss WJ.** The association of *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* with diarrheal stools in Zambian school-age children. *Parasitology Research* 2005, 98, 38-43.
- Gupta R, Parsi K.** Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis*. *Australasian Journal of Dermatology* 2006, 47, 117-119.
- Hamamcı B, Çetinkaya U, Delice S, Erçal BD, Gücüyetmez S, Yazar S.** Investigation of intestinal parasites among primary school students in Kayseri-Hacılar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2011, 35(2), 96-99.
- Hameed DM, Hassanin OM, Zuel-Fakkar NM.** Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitology Research* 2011, 108, 553-60.
- Heyland K, Friedt M, Buehr P, Braegger CP.** No advantage for antibiotic treatment over placebo in *Blastocystis hominis*-positive children with recurrent abdominal pain. *Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition* 2012, 54, 677-679.
- Ho LC, Armugam A, Jeyaseelan K, Yap EH, Singh M.** *Blastocystis* elongation factor-1 alpha: genomic organization, taxonomy and phylogenetic relationships. *Parasitology* 2000, 121 (2), 135-144.
- Irikov OA, Antokhin AI, Romanov YA.** Study of the dynamics of *Blastocystis hominis* reproduction *in vitro*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2009, 148(1), 99-102.

- Jacob AS, Andersen LO, Bitar PP, Richards VP, Shah S, Stanhope MJ, Stensvold CR, Clark SG.** *Blastocystis* mitochondrial genomes appear to show multiple independent gains and losses of start and stop codons. *Genome Biology and Evolution* 2016, 8, 3340-3350.
- Jantermtor S, Pinlaor P, Sawadpanich K, Pinlaor S, Sangka A, Wilailuckana C.** Subtype identification of *Blastocystis* spp. isolated from patients in a major hospital in northeastern Thailand. *Parasitology Research* 2013, 112(4), 1781-1786.
- Jolley KA, Maiden MCJ.** BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 2010, 11, 595.
- Johnson AM, Thanou A, Boreham PF, Baverstock PR.** *Blastocystis hominis*: phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. *Experimental Parasitology* 1989, 68(3), 283-288.
- Kaya S, Çetin ES, Arıdoğan BC, Arıkan S, Demirci M.** Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2007, 31(3), 184-187.
- Keenan TW, Zierdt CH.** Lipid biosynthesis by axenic strains of *Blastocystis hominis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1994, 107(4), 525-531.
- Khademvatan S, Masjedizadeh R, Yousefi-Razin E, Mahbodfar H, Rahim F, Yousefi E.** PCR-based molecular characterization of *Blastocystis hominis* subtypes in southwest of Iran. *Journal of Infection and Public Health* 2017, 341(17), 1-6.
- Khoshnood S, Rafiei A, Saki J, Alizadeh K.** Prevalence and genotype characterization of *Blastocystis hominis* among the baghmalek people in southwestern Iran in 2013 - 2014. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2015, 8(10), e23930.
- Koltaş İS, Eroğlu F.** Subtype analysis of *Blastocystis* isolates using SSU rRNA-DNA sequencing in rural and urban population in southern Turkey. *Experimental Parasitology* 2016, 170, 247-251
- Lantsman Y, Tan KS, Morada M, Yarlett N.** Biochemical characterization of a mitochondrial-like organelle from *Blastocystis* sp. subtype 7. *Microbiology* 2008, 154(9), 2757-2766.
- Lawrence YA.** The Effect of *Blastocystis* sp. ST1 on the Expression of Serotonin Transporter, Tryptophan Hydroxylase, Toll-like Receptor 2, and Toll-like Receptor 4 in CACO-2 Cell Culture. Master of Science Thesis. Oregon State University Department of Veterinary Science, Oregon, 2014. 45.
- Lee LI, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK.** *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasites & Vectors* 2012, 5, 130.
- Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M.** In-vitro

cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2002, 96(8), 803-807.

Leelayoova S, Rangsin R, Taamasri P, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M. Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004, 70(6), 658-662.

Levy Y, George J, Shoenfeld Y. Severe *Blastocystis hominis* in an elderly man. *The Journal of Infection* 1996, 33, 57-59.

Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitology Research* 2007, 102(1), 83-90.

Lim MX, Png CW, Tay CY, Teo JD, Jiao H, Lehming N, Tan KS, Zhang Y. Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. *Infection and Immunity* 2014, 82(11), 4789-4801.

Lu CT, Sung YJ. Epidemiology of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites among the immigrant population in northeastern Taiwan by routine physical examination for residence approval. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* 2009, 42, 505-509.

Londono-Franco AL, Loaiza-Herrera J, Lora-Suárez FM, Gomez-Marín JE. *Blastocystis* sp. frequency and sources among children from 0 to 5 years of age attending public day care centers in Calarcá, Colombia. *Biomedica* 2014, 34(2), 218-227.

Lucia JF, Aguilar C, Betran A. *Blastocystis hominis* colitis in a haemophilic patient as a cause of lower gastrointestinal bleeding. *Haemophilia* 2007, 13, 224-225.

Malheiros AF, Stensvold CR, Clark CG, Braga GB, Shaw JJ. Short report: Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirape ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011, 85(6), 1050-1053.

Martiny D, Bart A, Vandenberg O, Verhaar N, Wentink-Bonnema E, Moens C. Subtype determination of *Blastocystis* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2014, 33(4), 529-536.

Mattiucci S, Crisafi B, Gabrielli S, Paoletti M, Cancrini G. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiology & Infection* 2016, 144(3), 635-646.

- Meloni D, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, Chabe M, Delhaes L.** Molecular subtyping of *Blastocystis sp.* isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitology Research* 2011, 109(3), 613-619.
- Meurs L, Polderman AM, Vinkeles Melchers NVS, Brienen EAT, Verweij JJ, Groosjohan B, Mendes F, Mechendura, Hepp DH, Langenberg MCC, Edelenbosch R, Polman K, van Lieshout L.** Diagnosing polyparasitism in a high-prevalence setting in Beira, Mozambique: detection of intestinal parasites in fecal samples by microscopy and real-time PCR. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2017, 11(1), 305-310.
- Micheloud D, Jensen J, Fernandez-Cruz E, Carbone J.** Chronic angioedema and *Blastocystis hominis* infection. *Review of Gastroenterology Peru* 2007, 7, 191-193.
- Mingmongkol S, Prasartpan S, Aumkhayan S, Watthanakulpanich D.** Asymptomatic *Blastocystis* infected persons as potential carriers of disease in Thailand. *International Journal of Tropical Disease & Health* 2015, 10(2), 1-10.
- Mirza H, Teo JD, Upcroft J, Tan KS.** A rapid, high-throughput viability assay for *Blastocystis spp.* reveals metronidazole resistance and extensive subtype-dependent variations in drug susceptibilities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011, 55, 637-648.
- Mirza H, Tan KS.** Clinical aspects of *Blastocystis* infections: Advancements amidst controversies. In: Mehlhorn H, Tan KSW, Yoshikawa H (eds), *Blastocystis: Pathogen or Passenger?* Heidelberg, Germany: Springer Press 2012, s 66-68.
- Mirza H, Wu Z, Teo JD, Tan KS.** Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cell Microbiology* 2012, 14, 1474-1484.
- Moghaddam DD, Ghadirian E, Azami M.** *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitology Research* 2005, 96, 273-275.
- Mohamed AM, Ahmed MA, Ahmed SA, Al-Semany SA, Alghamdi SS, Zagloul DA.** Predominance and association risk of *Blastocystis hominis* subtype I in colorectal cancer: a case control study. *Infectious Agents and Cancer* 2017, 12, 21.
- Mohamed RT, El-Bali MA, Mohamed AA, Abdel-Fatah MA, EL-Malky MA, Mowafy NM, Zaghlool DA, Bakri RA, Al-Harhi SA.** Subtyping of *Blastocystis sp.* isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia. *Parasites & Vectors* 2017, 10, 174.
- Menounos PG, Spanakos G, Tegos N, Vassalos CM, Papadopoulou C, Vakalis NC.** Direct detection of *Blastocystis sp.* in human faecal samples and subtype assignment using

single strand conformational polymorphism and sequencing. *Molecular and Cellular Probes* 2008, 22(1), 24-29.

Nagel R, Bielefeldt-Ohmann H, Traub R. Clinical pilot study: efficacy of triple antibiotic therapy in *Blastocystis* positive irritable bowel syndrome patients. *Gut Pathogens* 2014, 6, 34.

Nagel R, Traub RJ, Kwan MMS, Bielefeldt-Ohmann H. *Blastocystis* specific serum immunoglobulin in patients with irritable bowel syndrome (IBS) versus healthy controls. *Parasites & Vectors* 2015, 8, 453.

Nagel R, Traub RJ, Allcock RJ, Kwan MM, Bielefeldt-Ohmann H. Comparison of faecal microbiota in *Blastocystis*-positive and *Blastocystis*-negative irritable bowel syndrome patients. *Microbiome* 2016, 4, 47.

Nasirudeen AM, Singh M, Yap EH, Tan KS. *Blastocystis hominis*: evidence for caspase-3-like activity in cells undergoing programmed cell death. *Parasitology Research* 2001, 87(7), 559-565.

Nasirudeen AM, Tan KS. Isolation and characterization of the mitochondrion-like organelle from *Blastocystis hominis*. *Journal of Microbiological Methods* 2004, 58(1), 101-109.

Nassir E, Awad J, Abel AB, Khoury J, Shay M, Lejbkowitz F. *Blastocystis hominis* as a cause of hypoalbuminemia and anasarca. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2004, 23, 399-402.

Nelles L, Fang BL, Volckaert G, Vandenberghe A, De Wachter R. Nucleotide sequence of a crustacean 18S ribosomal RNA gene and secondary structure of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Research* 1984, 12(23), 8749-8768.

Nimri L, Batchoun R. Intestinal colonization of symptomatic and asymptomatic schoolchildren with *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1994, 32(11), 2865-2866.

Nithyamathi K, Chandramathi S, Kumar S. Predominance of *Blastocystis sp.* Infection among school children in Peninsular Malaysia. *PLoS One* 2016, 11(2), e0136709.

Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43(1), 348-355.

Noor Azian MY, San YM, Gan CC, Yusri MY, Nurulsyamzawaty Y, Zuhaizam AH, Maslawaty MN, Norparina I, Vythilingam I. Prevalence of intestinal protozoa in an aborigine community in Pahang, Malaysia. *Tropical Biomedicine* 2007, 24(1), 55-62.

- Ok UZ, Girinkardesler N, Balcioglu C, Ertan P, Pirildar T, Kilimcioglu AA.** Effect of trimethoprim-sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. *American Journal of Gastroenterology* 1999, 94, 3245-3247.
- Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, Pereira B, Razakandrainibe R, Pinon A, Lambert C, Wawrzyniak I, Dabboussi F, Delbac F, Favennec L, Hamze M, Viscogliosi E, Certad G.** Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2016, 10(3), e0004496.
- Özçakır O, Güreşer S, Ergüven S, Yılmaz YA, Topaloğlu R, Haşçelik G.** Türkiye'deki bir üniversite Hastanesinde *Blastocystis hominis* enfeksiyonunun karakteristiği. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2007, 31(4), 277-282.
- Özyurt M, Kurt O, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroğlu T, Stensvold CR.** Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitology International* 2008, 57(3), 300-306.
- Palasuwan A, Palasuwan D, Mahittikorn A, Chiabchalard R, Combes V, Popruk S.** Subtype distribution of *Blastocystis* in communities along the Chao Phraya River, Thailand. *Korean Journal of Parasitology* 2016, 54, 455-460.
- Parija SC, Jeremiah S.** *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology* 2013, 3, 17-25.
- Parkar U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, Morris K, Thompson RC.** Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology* 2007, 134, 359-367.
- Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RC.** Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology* 2010, 169, 8-17.
- Pasqui AL, Savini E, Saletti M, Guzzo C, Puccetti L, Auteri A.** Chronic urticaria and *Blastocystis hominis* infection: a case report. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2004, 8(3), 117-120.
- Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V.** Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology* 2011, 49, 975-983.

- Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares CP, Delbac F, El Alaoui H.** New insights into *Blastocystis spp.*: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathogens* 2012, 8, e1002545.
- Popruk P, Pintong A, Radomyos P.** Diversity of *Blastocystis* subtypes in humans. *Journal of Tropical Medicine and Parasitology* 2013, 36, 88-97.
- Popruk S, Udonsom R, Koompapong K, Mahittikorn A, Kusolsuk T, Ruangsittichai J.** Subtype distribution of *Blastocystis* in Thai-Myanmar border, Thailand. *Korean Journal of Parasitology* 2015, 53(1), 13-19.
- Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KS.** Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitology Research* 2005, 97, 386-389.
- Puthia MK, Sio SW, Lu J, Tan KS.** *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infection and Immunity* 2006, 74, 4114-23.
- Puthia MK, Lu J, Tan KS.** *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappa B-dependent manner. *Eukaryotic Cell* 2008, 7, 435-43.
- Ragavan ND, Kumar S, Chye TT, Mahadeva S, Shiaw-Hooi H.** *Blastocystis sp.* in irritable bowel syndrome (IBS) detection in stool aspirates during colonoscopy. *PLoS One* 2015, 10, e0121173.
- Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Flórez C, Bernal MC, Giraldo JC, Reyes P, López MC, García L, Cooper PJ, Vicuña Y, Mongi F, Casero RD.** Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infection Genetics and Evolution* 2016, 41, 32-35.
- Rao K, Sekar U, Iraivan KT, Abraham G, Soundararajan P.** *Blastocystis hominis*--an emerging cause of diarrhoea in renal transplant recipients. *The Journal of the Association of Physicians of India* 2003, 51, 719-721.
- Rebolla MF, Silva EM, Gomes JF, Falcao AX, Rebolla MV, Franco RM.** High prevalence of *Blastocystis spp.* infection in children and staff members attending public urban schools in Sao Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 2016, 58, 31.
- Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV.** Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2009, 80(4), 588-592.

- Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D.** Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis sp.* in clinical stool samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011, 84, 308-312.
- Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J.** Subtype distribution of *Blastocystis* isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of *Blastocystis*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2013, 32(3), 335-343.
- Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J.** Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis sp.* *Gut Pathogens* 2014a, 6:17.
- Roberts T, Ellis J, Harkness J, Marriott D, Stark D.** Treatment failure in patients with chronic *Blastocystis* infection. *Journal of Medical Microbiology* 2014b, 63, 252-257.
- Roberts T, Bush S, Ellis J, Harkness J, Stark D.** *In vitro* antimicrobial susceptibility patterns of *Blastocystis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015, 59, 4417-4423.
- Rossignol JF, Kabil SM, Said M, Samir H, Younis AM.** Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis hominis*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2005, 3, 987-991.
- Salamat R, Kaczmarek A, Rozej-Bielicka W, Cielecka D, Janczak D, Lewicki A, Wesolowska M, Mlocicki D, Golab E.** Genotype characterisation of *Blastocystis* isolates from Polish patients - preliminary results. *Annals of Parasitology* 2016, 62, 1.
- Salvador F, Sulleiro E, Sanchez-Montalva A, Alonso C, Santos J, Fuentes I, Molina I.** Epidemiological and clinical profile of adult patients with *Blastocystis sp.* infection in Barcelona, Spain. *Parasites & Vectors* 2016, 9, 548.
- Sanchez A, Munoz M, Gomez N, Tabares J, Segura L, Salazar A.** Molecular Epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among indigenous children from the Colombian Amazon Basin. *Front Microbiology* 2017, 8, 248.
- Sankur F, Malatyali E, Ayturan S, Ertabaklar H, Ertuğ S.** The distribution of *Blastocystis* subtypes among school-aged children in Mugla, Turkey. 1st International Symposium on *Blastocystis*. 28-28 Mayıs 2015, Ankara.
- Sanpool O, Laoraksawong P, Janwan P, Intapan PM, Sawanyawisuth K, Thanchomnang T.** Genetic subtypes of *Blastocystis* isolated from thai hospitalized patients in Northeastern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2015, 46(2), 184-190.
- Sanpool O, Laymanivong S, Thanchomnang T, Rodpai R, Sadaow L, Phosuk I.** Subtype identification of human *Blastocystis spp.* isolated from Lao People's Democratic Republic. *Acta Tropica* 2017, 168, 37-40.

Santos HJ, Rivera WL. Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis sp.* in human stool samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2013, 6(10), 780-784.

Sawangjaroen N, Sawangjaroen K. The effects of extracts from anti-diarrheic Thai medicinal plants on the *in vitro* growth of the intestinal protozoa parasite: *Blastocystis hominis*. *Journal of Ethnopharmacology* 2005, 98(1-2), 67-72.

Scanlan PD, Stensvold CR. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends in Parasitology* 2013, 29: 523–529.

Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilic-Stojanovic M, Heilig HG, De Vos WM, O'Toole PW, Cotter PD. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiology Ecology* 2014, 90, 326-330.

Scanlan PD, Stensvold CR, Cotter PD. Development and application of a *Blastocystis* subtype-specific pcr assay reveals that mixed-subtype infections are common in a healthy human population. *Applied Environmental Microbiology* 2015, 81(12), 4071-4076.

Scanlan PD, Knight R, Song SJ, Ackermann G, Cotter PD. Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* in family units living in the United States. *Infection and Genetic Evolution* 2016, 45, 95-97.

Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 2006, 157(1), 77-85.

Sekar U, Shanthi M. *Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies. *Tropical Parasitology* 2013, 3, 35-39.

Seyer A, Karasartova D, Ruh E, Güreşer AS, Turgal E, Imir T, Taylan-Özkan A. Epidemiology and Prevalence of *Blastocystis spp.* in North Cyprus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2017, 96(5), 1164-1170.

Sigidaev AS, Kozlov SS, Tarasova EA, Suvorova MA. Investigation of the genetic profile of *Blastocystis* species in Saint Petersburg residents with gastrointestinal tract diseases in different age groups. *Meditinskaja Parazitologija* 2013, (4), 19-23.

Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 1996, 380 (6573), 398.

Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 1995, 81(5), 446-450.

Souppart L, Sanci G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, Dei-Cas E, Boorom K, Delhaes L, Viscogliosi E. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitology Research* 2009, 105(2), 413-421.

- Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H.** Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitology Research* 2010, 106(2), 505-511.
- Stechmann A, Hamblin K, Perez-Brocal V, Gaston D, Richmond GS, van der Giezen M, Clark CG, Roger AJ.** Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current Biology* 2008, 18(8), 580-585.
- Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC.** Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology* 2006, 92, 1081-1087.
- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG.** Terminology for *Blastocystis* subtypes a consensus. *Trends Parasitology* 2007a, 23(3), 93-96.
- Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV.** Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic Microbiology Infection Disease* 2007b, 59, 303-307.
- Stensvold CR, Traub RJ, von Samson-Himmelstjerna G, Jespersgaard C, Nielsen HV, Thompson RC.** *Blastocystis*: subtyping isolates using pyrosequencing technology. *Experimental Parasitology* 2007c, 116, 111-119.
- Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG.** Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International Journal of Parasitology* 2009a, 39, 473-479.
- Stensvold CR, Nielsen HV, Molbak K, Smith HV.** Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* diagnostic limitations. *Trends in Parasitology* 2009b, 25, 23-29.
- Stensvold CR, Arendrup MC, Nielsen HV, Molbak K.** *Blastocystis* -an enigmatic parasite. *Ugeskr Laeger* 2009c, 171, 2388-2390.
- Stensvold CR, Smith HV, Nagel R, Olsen KE, Traub RJ.** Eradication of *Blastocystis* carriage with antimicrobials: reality or delusion? *Journal of Clinical Gastroenterology* 2010, 44, 85-90.
- Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KE, Nielsen HV.** *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011, 84(6), 883-885.

- Stensvold CR, Ahmed UN, Andersen LO, Nielsen HV.** Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 2012, 50:1847-51.
- Stensvold CR.** *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Tropical Parasitology* 2013a, 3(1), 26-34.
- Stensvold CR.** Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *Journal of Clinical Microbiology* 2013b, 51(1), 190-194.
- Stensvold CR, Clark CG.** Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitology International* 2016, 65, 763-771.
- Stenzel DJ, Boreham PF.** *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews* 1996, 9(4), 563-584.
- Su FH, Chu FY, Li CY, Tang HF, Lin YS, Peng YJ, Su YM, Lee SD.** *Blastocystis hominis* infection in long-term care facilities in Taiwan: prevalence and associated clinical factors. *Parasitology Research* 2009, 105, 1007-1013.
- Suresh K, Salim HR, Jamaiah I, Anuar AK.** *Blastocystis hominis* in high-rise flat dwellers in Kuala Lumpur, Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2001, 95(4), 377-378.
- Suresh K, Smith H.** Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2004, 23(6), 509-511.
- Şakalar Ç, Uyar Y, Yürürdurmaz MA, Tokar S, Yeşilkaya H, Gürbüz E.** *Blastocystis* sp. Subtip 3 small-subunit ribozomal geninin klonlanması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2013, 37(1), 13-18.
- Tan KS, Howe J, Yap EH, Singh M.** Do *Blastocystis hominis* colony forms undergo programmed cell death? *Parasitology Research* 2001, 87(5), 362-367.
- Tan KS, Singh M, Yap EH.** Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *International Journal of Parasitology* 2002, 32, 789-804.
- Tan KS.** *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitology* 2004, 126(1-2), 121-144.
- Tan KS.** New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 2008, 21(4), 639-665.
- Tan KS, Mirza H, Teo JD, Wu B, Macary PA.** Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Current Infectious Disease Reports* 2010, 12, 28-35.

- Teo JD, Macary PA, Tan KS.** Pleiotropic effects of *Blastocystis spp.* subtypes 4 and 7 on ligand-specific toll-like receptor signaling and NF-kappaB activation in a human monocyte cell line. *PLoS One* 2014, 9, 89036.
- Thathaisong U, Worapong J, Mungthin M, Tan-Ariya P, Viputtigul K, Sudatis A, Noonai A, Leelayoova S.** *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2003, 41(3), 967-975.
- Taşova Y, Sahin B, Koltas S, Paydas S.** Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. *Acta Medica Okayama* 2000, 54(3), 133-136.
- Teow WL, Zaman V, Ng GC, Chan YC, Yap EH, Howe J.** A *Blastocystis* species from the sea-snake, *Lapemis hardwickii* (Serpentes: Hydrophiidae). *International Journal of Parasitology* 1991, 21(6), 723-726.
- Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, Thathaisong U, Nimmanon T, Taamasri P.** The usefulness of short-term *in vitro* cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitology Research* 2004, 93(6), 445-447.
- Tsaousis AD, Gentekaki E, Eme L, Gaston D, Roger AJ.** Evolution of the cytosolic iron-sulfur cluster assembly machinery in *Blastocystis* species and other microbial eukaryotes. *Eukaryotic Cell* 2014, 13(1), 143-153.
- Tüzemen NÜ, Doğan N.** *Entamoeba histolytica*'nın tanısında direkt mikroskopi, kültür, ELISA ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2014, 48(1), 114-122.
- Uobeed AH, Ali GB, Mohammed SK.** Isolation and identification of *Blastocystis hominis* isolated from irritable bowel syndrome patients using phenotypic and genotypic methods. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 2015, 6(11), 1183-1190.
- Valsecchi R, Leghissa P, Greco V.** Cutaneous lesions in *Blastocystis hominis* infection. *Acta Dermato-Venereologica* 2004, 84, 322-323.
- van der Giezen M, Tovar J, Clark CG.** Mitochondria-derived organelles in protists and fungi. *International Review of Cytology* 2005, 244, 175-225.
- van Hellemond JJ, Molhoek N, Koelewijn R, Wismans PJ, van Genderen PJ.** Is paromomycin the drug of choice for eradication of *Blastocystis* in adults? *The Journal of Infection and Chemotherapy* 2013, 19, 545-548.
- Vennila GD, Suresh Kumar G, Khairul Anuar A, Rajah S, Saminathan R, Sivanandan S, Ramakrishnan K.** Irregular shedding of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 1999, 85(2), 162-164.

- Villanueva-Garcia, C., Gordillo-Chavez, E. J., Lopez-Escamilla, E., Rendon-Franco, E., Muñoz-Garcia, C. I., Gama, L., Martinez-Flores WA, Gonzalez-Rodriguez N, Romero-Valdovinos M, Diaz-Lopez H, Galian J, Villalobos G, Maravilla P, Martinez-Hernandez, F.** Clarifying the cryptic host specificity of *Blastocystis* spp. isolates from *Alouatta palliata* and *A. pigra* howler monkeys. *Plos One* 2017, 12(1), 9616-9637.
- Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzen A, Stopsack K, Heinrich-Gräfe U, Pöhlmann C.** *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitology International* 2010, 59, 469-471.
- Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, Alaoui HE.** *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 2013, 1, 167-178.
- Wawrzyniak I, Courtine D, Osman M, Hubans-Pierlot C, Cian A, Nourrisson C, Chabe M, Poirier P, Bart A, Polonais V, Delgado-Viscogliosi P, El Alaoui H, Belkorchia A, van Gool T, Tan KS, Ferreira S, Viscogliosi E, Delbac F.** Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. *Genome Data* 2015, 4, 22-23.
- Wong KH, Ng GC, Lin RT, Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KS.** Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitology Research* 2008, 102, 663-670.
- Wu Z, Mirza H, Teo JD, Tan KS.** Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in a caspase 3- and 9-dependent manner. *BioMed Research International* 2014, 159-163.
- 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*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004, 70(4), 383-385.
- Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R.** Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 2010, 106, 1033-1038.
- Yamada M, Yoshikawa H.** Morphology of human and animal *Blastocystis* isolates with special reference to reproductive modes. In: Mehlhorn H, Tan K, Yoshikawa H (eds), *Blastocystis: Pathogen or Passenger? Parasitology Research Monographs*. Berlin, Heidelberg, Springer, 2012, s 9-35.
- Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, Luo X, Chen G.** Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitology Research* 2006, 99(5), 597-601.

- Yan Y, Su S, Ye J, Lai X, Lai R, Liao H, Chen G, Zhang R, Hou Z, Luo X.** *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitology Research* 2007, 101(6), 1527-1532.
- Yarlett N, Tan KSW.** Mitochondrial remnant in *Blastocystis*. In: Tachezy J (ed), *Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes*. Berlin, Heidelberg, Springer Press, 2008, s 255-262.
- Yersal Ö, Malatyali E, Ertabaklar H, Oktay E, Barutça S, Ertuğ S.** *Blastocystis* subtypes in cancer patients: Analysis of possible risk factors and clinical characteristics. *Parasitology International* 2016, 65, 792-796.
- Yoshikawa H, Hayakawa A.** Freeze-fracture cytochemistry of membrane cholesterol in *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology* 1996, 26(10), 1111-1114.
- Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z.** Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *Journal of Clinical Microbiology* 2000, 38(4), 1324-1330.
- Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S, Kimata I.** Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitology Research* 2004a, 94, 391-396.
- Yoshikawa H, Abe N, Wu Z.** PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology* 2004b, 150(5), 1147-1151.
- Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IK, Hossain MB.** Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology Research* 2004c, 92(1), 22-29.
- Yoshikawa H, Wu Z, Howe J, Hashimoto T, Geok-Choo N, Tan KS.** Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2007, 54(1), 33-37.
- Yoshikawa H, Dogruman-Al F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N.** Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitology Research* 2011, 109, 1045-1050.
- Yoshikawa H, Tokoro M, Nagamoto T.** Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitology International* 2016, 65, 780-784.
- Yoshikawa H, Iwamasa A.** Human *Blastocystis* subtyping with subtype-specific primers developed from unique sequences of the SSU rRNA gene. *Parasitology International* 2016, 65(6), 785-791.

- Zaki M, Zaman V, Sheikh NA.** Resistance of *Blastocystis hominis* cyst to chlorine. *Journal of Pakistan Medical Association* 1996, 46, 178-179.
- Zaman V, Howe J, Ng M.** Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitology Research* 1995, 81, 465-469.
- Zhan TZ, Liu T, Shi HH, He SS, Yan H, Liu DY.** PCR-based genotype classification of *Blastocystis hominis* isolates from college students of Guangxi. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Disease* 2014, 32(3), 209-211.
- Zierdt CH, Rude WS, Bull BS.** Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *American Journal of Clinical Pathology* 1967, 48(5), 495-501.
- Zierdt CH.** Studies of *Blastocystis hominis*. *Journal of Protozoology* 1973, 20(1), 114-121.
- Zierdt CH.** *Blastocystis hominis*-past and future. *Clinical Microbiology Reviews* 1991, 4(1), 61-79.
- Zuckerman MJ, Watts MT, Ho H, Meriano FV.** *Blastocystis hominis* infection and intestinal injury. *American Journal of the Medical Sciences* 1994, 308, 96-101.

Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Sayı : 56989545/050.04-296
Konu : Çalışmanız hk.

16.11./2014
AYDIN

Sayın, Prof.Dr. Sema ERTUĞ
Parazitoloji AD

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 13.11.2014 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmanızla ilgili alınan 11 nolu karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize sunarım.

Prof.Dr. Nefati KIYLIOĞLU
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

KARAR {}

Protokol No : 2014/433
Sorumlu Yürütücü : Prof.Dr. Sema ERTUĞ
Parazitoloji AD

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nca 16.10.2014 tarihinde ADÜBAP bütçe onayının gelmesi şartıyla onay verilen; Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Sema ERTUĞ'un "Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarında izole edilen *Blastocystis* alt tiplerinin sekanslama yöntemiyle belirlenmesi" başlıklı klinik araştırmasının 04.11.2014 tarihli gelen dilekçesi ekinde destekleyici olan YÖK/ÖYP Proje Kabul Raporu (30.10.2014 tarihli) görüşülmüş olup, şartların yerine getirildiği oybirliğiyle kabul edildi.

Yine sorumlu araştırmacıya; Form 2'nin 11.1.'in son bölümünde taahhüt edilen çalışma bittikten sonra nihai raporun, [Sonuç Raporu (web'te), BGOF (Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu-gönüllüler tarafından bizzat kendilerinin kendi adı-soyadını yazması ve imzalamasının sağlanması ile adreslerinin eksiksiz olarak formlara yazılmasına dikkat edilmelidir.) ve ORF (Olgu Rapor Formu/Anket)] lerin gönderilmesi gerektiğinin hatırlatılmasına ve sorumlu yürütücülerinin bu hususa özen göstermesi gerektiğinin bir kez daha vurgulanmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Adres: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü – Kepez Mevkii- AYDIN
Tel: 256- 225 31 66
Faks : 256-212 31 69
Web : <http://www.site.adu.edu.tr/etikkurulu/goek/>
e-posta: goetik@adu.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : MALATYALI, Erdoğan
Uyruk : T. C.
Doğum yeri ve tarihi : Sivas, 20/08/1983
Telefon : 05053800658
E-mail : erdogan.malatyali@adu.edu.tr
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Adnan Menderes Üniversitesi	
Y. Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi	2009
Lisans	İstanbul Teknik Ünivesitesi	2006

BURSLAR ve ÖDÜLLER

1. En iyi poster ödülü, International Association of Echinococcosis, XXVI World Congress on Echinococcosis, Bükreş, Romanya, 2015.
2. Faculty of 1000, Sözlü sunum birincilik ödülü, 1st International *Blastocystis* Symposium, Ankara, Türkiye, 2015.
3. NYDA Poster Award (G. Pohl-Boskamp GmbH & Co.KG), 3.lük ödülü, 4th International Conference on Phthiraptera, Nevşehir, Türkiye, 2010.

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2006-2012	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi
2012-	Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

AKADEMİK YAYINLAR

A. MAKALELER

A.1. SCI veya SCI–Expanded Kapsamındaki Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Ertabaklar H, Yaman Karadam S, **Malatyali E**, Ertuğ S (2016). *Trichomonas vaginalis* klinik izolatlarında in vitro metronidazol direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 50(4): 552-558.
2. Yersal Ö, **Malatyali E**, Ertabaklar H, Oktay E, Barutça S, Ertuğ S (2016). *Blastocystis* subtypes in cancer patients: Analysis of possible risk factors and clinical characteristics. Parasitol Int 65(6): 792-796.
3. Ertuğ S, **Malatyali E**, Ertabaklar H, Bozdoğan B (2016). Multilocus sequence typing of *Blastocystis* isolates in Aydın Turkey. Parasitol Int 65(6): 760-762.
4. Coşkun A, **Malatyali E**, Ertabaklar H, Yaşar MB, Karaoğlu AÖ, Ertuğ S (2016). *Blastocystis* in ulcerative colitis patients: Genetic diversity and analysis of laboratory findings. Asian Pac J Trop Biomed 9(9): 916-919.
5. Ertuğ S, **Malatyali E**, Ertabaklar H, Ö Çalışkan S, Bozdoğan B (2015). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates and evaluation of clinical symptoms detected in Aydın province Turkey. Mikrobiyol Bul 49(1): 98-104.
6. Değerli S, **Malatyali E**, Çeliksöz A, Özçelik S, Mumcuoğlu KY (2012). The prevalence of *Pediculus humanus capitis* and the coexistence of intestinal parasites in young children in boarding schools in Sivas Turkey. Pediatr Dermatol 29(4): 426-429.
7. Değerli S, Berk Ş, Tepe B, **Malatyali E** (2012). Amoebicidal activity of the rhizomes and aerial parts of *Allium sivasicum* on *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res 111(1): 59-64.
8. **Malatyali E**, Tepe B, Değerli S, Berk Ş (2012). In vitro amoebicidal activities of *Satureja cuneifolia* and *Melissa officinalis* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. Parasitol Res 110(6): 2175-2180.
9. Değerli S, Tepe B, Çeliksöz A, Berk Ş, **Malatyali E** (2012). In vitro amoebicidal activity of *Origanum syriacum* and *Origanum laevigatum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. Exp Parasitol 131(1): 20-24.
10. Özçelik S, Poyraz Ö, Kalkan K, **Malatyali E**, Değerli S (2012). The Investigation of *Cryptosporidium spp.* prevalence in cattle and farmers by ELISA. Kafkas Univ Vet Fak Derg 18 (A): 61-64.

11. **Malatyalı E**, Tepe B, Değerli S, Berk Ş, Akpulat HA (2012). In vitro amoebicidal activity of four *Peucedanum* species on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Res* 110(1): 167-174.
12. Tepe B, Değerli S, Arslan S, **Malatyalı E**, Sarıkürkçü C (2011). Determination of chemical profile antioxidant DNA damage protection and antiamoebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia* 82(2): 237-246.

A.2. Diğer Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Sankur F, Ayturan Ş, **Malatyalı E**, Çitil BE, Ertabaklar H, Ertuğ S (2015). The retrospective analysis of *Toxoplasma* serology results from Muğla Sıtkı Koçman University Training and Research Hospital between 2012 and 2013. *Türkiye Parazitol Derg* 39(3): 179-184.
2. Yazıcı V, Kale A, **Malatyalı E**, Ertabaklar H (2014). Kocaeli Derince de *Toxoplasma gondii* serolojisi için gönderilen doğurganlık yaş grubundaki olgulara ait sonuçların retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitol Derg* 38(4): 223-227.
3. Değerli S, **Malatyalı E**, Mumcuoğlu KY(2013). Head lice prevalence and associated factors in two boarding schools in Sivas. *Türkiye Parazitol Derg* 37(1): 32-35.
4. Özçelik S, Açıkalm K, Yünlü Ö, Alim A, **Malatyalı E** (2012). The prevalence isolation and morphotyping of potentially pathogenic free living amoebae from tap water and environmental water sources in Sivas. *Türkiye Parazitol Derg* 36(4): 198-203.
5. Özçelik S, Sümer Z, Değerli S, **Malatyalı E**, Sümer EH (2012). The cytopathic effects of *Trichomonas vaginalis* on fibroblast cell culture alone and with *C. albicans* and *E. coli*. *Türkiye Parazitol Derg* 36: 193-197.
6. **Malatyalı E**, Özçelik S, Çeliksöz A (2011). The Investigation of *Entamoeba histolytica* prevalence in some villages of Sivas by ELISA method. *Türkiye Parazitol Derg* 35(1): 6-9.
7. **Malatyalı E**, Özçelik S (2011). *Blastocystis spp* nin insandan izolasyonu ve besiyerinde farklı evrim şekillerinin izlenmesi. *Türkiye Parazitol Derg* 35: 19-22.
8. Değerli S, Şalk S, **Malatyalı E** (2011). Sivas'da vaginit ön tanılı hastalarda *Trichomonas vaginalis* sıklığı. *Türkiye Parazitol Derg*, 35, 145-147.
9. Özçelik S, Gedik T, Gedik R, **Malatyalı E** (2010). Ağız ve diş sağlığı ile *Entamoeba gingivalis* ve *Trichomonas tenax* varlığı arasındaki ilişkinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 34: 155-159.

10. Kalkan K, Özçelik S, **Malatyalı E** (2010). Sivas ta insanlarda babesiosis seroprevalansının araştırılması. Cumhuriyet Tıp Derg 32(4): 276-280.
11. **Malatyalı E**, Özçelik S (2010). Farklı fiziksel koşullarda *Entamoeba histolytica* kültüründe elde edilen bulgular. Cumhuriyet Tıp Derg 32(3): 283-287.
12. Kalkan K, Özçelik S, **Malatyalı E** (2010). Sivas'da sığırlarda babesiosis seroprevelansı. Türkiye Parazitol Derg, 34(1): 11-16.
13. **Malatyalı E**, Özçelik S, Çeliksöz A, Değerli S (2009). Bağırsak parazitlerinin Sivas ili farklı Yerleşim birimlerindeki ilköğretim okulu öğrencilerinde görülme sıklığı. Cumhuriyet Tıp Derg 31(2): 106-111.
14. **Malatyalı E**, Özçelik S, Gürsoy N (2009). Kekik (*Thymus vulgaris*) Kimyon (*Cuminum cyminum*) ve Mersin (*Myrtus communis*) bitkilerinden elde edilen yağların in vitro antileishmanial etkileri. Türk Hij Den Biyol Derg 66 (1): 7-13.
15. Değerli S, **Malatyalı E**, Özçelik S, Çeliksöz A (2009). Enterobiosis in Sivas Turkey from past to present effects on primary school children and potential risk factors. Türkiye Parazitol Derg 33(1): 95-100.
16. Özçelik S, **Malatyalı E** (2008). Amebiyaz ve virulans faktörlerinin *Entamoeba histolytica* patogenezindeki rolü. Türk Hij Den Biyol Derg 65(3): 139-148.
17. **Malatyalı E**, Özçelik S, Çeliksöz A, Değerli S, Yıldırım D (2008). Şehir ilçe ve köy ilköğretim okulu öğrencilerinde bağırsak parazitleri görülme sıklığı. Türkiye Parazitol Derg 32(1): 54-58.

2. PROJELER

1. Kistik ekinokokkozis tanısında hızlı tanı testinin uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi ve western blotting yöntemi ile karşılaştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı (2016).
2. *Leishmania tropica*'nın green fluorescent protein reporter GFP geni ile transfeksiyonu ve invitro ilaç etkisinin araştırılması modelinde kullanımı, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı,(2016).

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. Ertuğ S, Ertabaklar H, **Malatyalı E**, Özlem Çalışkan S (2016). The diagnostic value of an immunochromatographic test in Cystic Echinococcosis in human. 2nd International Congress on Applied Biological Sciences, Saraybosna, Bosna Hersek.

2. Ertabaklar H, Ertuğ S, Özlem Çalışkan S, **Malatyali E**, Bozdoğan B (2016). ITS Typing a potent genetic tool for discrimination of *Trichomonas vaginalis* isolates. 17th International Congress on Infectious Diseases, Hyderabad, Hindistan.
3. Ertuğ S, **Malatyali E**, Özlem Çalışkan S, Ertabaklar H (2015). The diagnostic value of an immunochromatographic test in Cystic Echinococcosis in human. XXVI World Congress of Echinococcosis, Bükreş, Romanya.
4. Babaoğlu A, Soyder A, **Malatyali E**, Ertuğ S, Ertabaklar H (2015). The genotype distribution of human *E. granulosus* isolates in Aydın, Turkey. XXVI World Congress of Echinococcosis, Bükreş, Romanya.
5. Yersal Ö, **Malatyali E**, Ertabaklar H, Oktay E, Barutça S, Ertuğ S (2015). *Blastocystis* subtypes in cancer patients analysis of possible risk factors and clinical characteristics. 1st International Symposium on *Blastocystis*, Ankara, Türkiye.
6. Coşkun A, **Malatyali E**, Ertabaklar H, Karaoğlu AÖ, Yaşar MB, Ertuğ S (2015). *Blastocystis* in ulcerative colitis patients: Genetic diversity and analysis of laboratory findings. 1st International Symposium on *Blastocystis*, Ankara, Türkiye.
7. **Malatyali E**, Sankur F, Akın MN, Ertabaklar H, Ertuğ S (2015). The frequency and subtype distribution of *Blastocystis* in pregnant women and analysis of possible factors a primarily study. 1st International Symposium on *Blastocystis*. Ankara, Türkiye.
8. Sankur F, Ayturan Ş, **Malatyali E**, Ertabaklar H, Ertuğ S (2015). The frequency of intestinal parasites and subtype distribution of *Blastocystis* in children Mugla Turkey. 1st International Symposium on *Blastocystis*. Ankara, Türkiye.
9. Ertuğ S, **Malatyali E**, Ertabaklar H, Bozdoğan B (2015). Multi locus sequence typing of *Blastocystis* isolates in Aydın Turkey. 1st International Symposium on *Blastocystis*. Ankara, Türkiye.