

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DIŞKI ÖRNEKLERİNDE *BLASTOCYSTIS*'İN MİKROSKOBİK, KÜLTÜR VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİO. GÜLCAN ADIYAMAN KORKMAZ

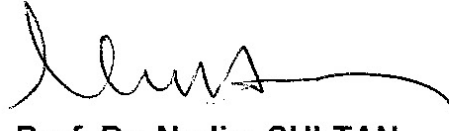
TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. FUNDA DOĞRUMAN-AL

ANKARA
HAZİRAN 2012

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşğıdaki jüri
tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

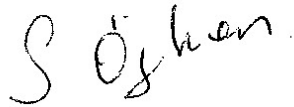
Tez Savunma Tarihi: 15/ 06/ 2012



Prof. Dr. Nedim SULTAN

Gazi Üniversitesi

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Seçil Özkan

Gazi Üniversitesi



Doç. Dr. Funda Doğruman-Al

Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	i
İçindekiler.....	ii
Şekiller.....	iv
Resimler.....	v
Tablolar.....	vi
Semboller, Kısaltmalar.....	vii

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TARİHÇE VE SINIFLANDIRMA.....	3
2.2. MORFOLOJİSi.....	5
2.2.1. Vakuoler Form (Santral Form).....	7
2.2.2. Granüler Form.....	7
2.2.3. Ameboid Form.....	8
2.2.4. Kist Form.....	8
2.2.5. Multivakuoler Form.....	9
2.2.6. Avakuoler Form.....	9
2.3. BİYOKİMYA VE SİTOKİMYA.....	10
2.4. YAŞAM DÖNGÜSÜ.....	11
2.5. GENETİK ÇEŞİTLİLİK.....	14
2.6. PATOGENEZ VE VİRULANS.....	15
2.7. <i>BLASTOCYSTIS</i> TÜRLERİNDE İMMUN YANIT.....	20
2.8. EPİDEMİYOLOJİ.....	22
2.9. KLİNİK BELİRTİLER.....	25
2.10. BULAŞ VE BULAŞ YOLLARI.....	27
2.11. TANI YÖNTEMLERİ.....	28
2.11.1. Mikroskopik Tanı.....	28
2.11.2. Kültür Yöntemi.....	29
2.11.3. İmmunolojik Tanı Yöntemleri.....	30

2.11.4.	Moleküler Çalışmalar.....	30
2.12.	TEDAVİ.....	33
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1.	Gereçler.....	34
3.1.1.	Cihazlar.....	34
3.1.2.	Kimyasallar.....	35
3.2.	Yöntemler.....	37
3.2.1.	Örneklerin Toplanması	37
3.2.2.	Direk Mikroskobi.....	37
3.2.3.	Trikrom Boyama Yöntemi	38
3.2.4.	Direk Floresan Antikor Yöntemi.....	40
3.2.5.	Kültür Yöntemi	41
3.2.6.	PZR Yöntemi.....	42
3.2.6.1.	DNA Eldesi	42
3.2.6.1.1.	Protokol: Qiagen Mini Stool Kit.....	43
3.2.6.1.2.	Protokol: Mobio İzolasyon Kiti.....	45
3.2.6.1.3.	Protokol: DNAzol ile DNA Eldesi.....	46
3.2.6.1.4.	Protokol: Fenol Kloroform İzosamil Alkol ile DNA eldesi....	47
3.2.6.2.	PZR Optimizasyonu.....	48
3.2.6.3.	Jel Elektrophorez Yöntemi.....	53
4.	BULGULAR.....	56
5.	TARTIŞMA.....	73
6.	SONUÇ.....	81
7.	ÖZET.....	83
8.	SUMMARY.....	85
9.	KAYNAKLAR.....	87
10.	EKLER.....	113
	TEŞEKKÜR.....	114
	ÖZGEÇMİŞ.....	115

ŞEKİLLER

Şekil 1: <i>Blastocystis</i> yaşam siklusu.....	13
Şekil 2: <i>Blastocystis</i> sp.' de Alttür 7' nin salgı proteinleri ve virulans faktörlerinin konak hücre ile etkileşimi.....	17

RESİMLER

Resim 1: <i>Blastocystis</i> ' in farklı formları.....	7
Resim 2: Alttür6 gradient PZR jel elektroforez görüntüsü.....	50
Resim 3: <i>Blastocystis</i> genel primerleri jel elektroforez görüntüsü.....	51
Resim 4: <i>Blastocystis</i> nativ-lugol preparat görüntüsü.....	57
Resim 5: <i>Blastocystis</i> trikrom boyama preparat görüntüsü.....	57
Resim 6: <i>Blastocystis</i> floresan boyama preparat görüntüsü.....	58
Resim 7: <i>Blastocystis</i> örneklerinde farklı hastalardan alınan kültürlerin mikroskopik incelemesinde farklı boyutlardaki <i>Blastocystis</i> görüntüleri....	58
Resim 8: Kültür mikroskopisinde farklı formlarda <i>Blastocystis</i> Görüntüsü.....	59
Resim 9: Alttür 1 Jel Elektroforezi görüntüsü.....	70
Resim 10: Alttür 2 Jel Elektroforezi görüntüsü.....	70
Resim 11: Alttür 3 Jel Elektroforezi görüntüsü.....	71
Resim 12: Alttür 4 Jel Elektroforezi görüntüsü.....	71
Resim 13: Alttür 6 Jel Elektroforezi görüntüsü.....	72

TABLÖLAR

Tablo 1: Alttür belirlenmesinde kullanılan primerler ve yeni sınıflandırmaya ait alttür isimlendirmesi.....	49
Tablo 2: <i>Blastocystis</i> genel primerleri.....	49
Tablo 3: Duyarlılık ve özgüllük hesaplama.....	55
Tablo 4: İshalli ve ishalleri olmayan hasta örneklerinin sayısı ve yüzdesi....	56
Tablo 5: <i>Blastocystis</i> saptanmasında direk nativ-lugol ve kültür inceleme yöntemlerinin karşılaştırılması.....	60
Tablo 6: <i>Blastocystis</i> saptanmasında trikrom boyama ve kültür inceleme yöntemlerinin karşılaştırılması.....	62
Tablo 7: <i>Blastocystis</i> saptanmasında floresan boyama ve kültür inceleme yöntemlerinin karşılaştırılması.....	63
Tablo 8: <i>Blastocystis</i> saptanmasında direk nativ-lugol ve trikrom boyama yöntemlerinin karşılaştırılması.....	64
Tablo 9: <i>Blastocystis</i> saptanmasında direk nativ-lugol ve floresan boyama yöntemlerinin karşılaştırılması.....	65
Tablo 10: <i>Blastocystis</i> saptanmasında trikrom boyama ve floresan boyama yöntemlerinin karşılaştırılması.....	66
Tablo 11: Dışkı örneklerinin makroskopilerine göre Alttür 3 saptanmasının değerlendirilmesi.....	67
Tablo 12: Dışkı örneklerinin makroskopilerine göre miks alttür saptanmasının değerlendirilmesi.....	68
Tablo 13: Tiplendirilen örneklerin alttürlere göre dağılımı.....	69

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

B. hominis: *Blastocystis hominis*

DNA: Deoksiribonükleik asit

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

DFA: Direk Floresan Antikor

H. Pylori: *Helicobacter pylori*

HIV: Human Immunodeficiency Virus

IBS: Irritable bağırsak sendromu

IFA: İndirek Floresan Antikor

IL: İnterlökin

İmmunglobulin: Ig

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

ROS: Reactive oxygen species

RT PZR: Real Time PZR

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat poly-acrylamide gel electrophoresis

sIgA: Sekretuar İmmunglobulinA

ST: Alttür

STS: Sequerced tagged site

TB: Trikróm Boyama

TEM: Transmission Electron Microscope

1. GİRİŞ

Blastocystis memeliler, kuşlar, sürüngenler ve artropodlar gibi çok geniş konak popülasyonuna sahiptir. ¹ *Blastocystis* insanlardan izole edildiğinde *Blastocystis hominis* (*B.hominis*) adını alırken diğer türlerden izole edilenler *Blastocystis* spp. adını almaktadır. Fakat konak kökeni ve genetik çeşitlilik değerlendirilmeden morfolojik özelliklerine bakılarak ayırt edilememektedir. ²

Blastocystis' in insan dışkıında veya in vitro kültürde elde edilen beş formu vardır; bunlar, ameboid, granüler, vakuoler, multivakuoler ve kist formlarıdır. Geniş varyasyona sahip bir parazit olduğu için, insan ve hayvandan izole edilen örneklerde morfolojik olarak ayırt edilememesine rağmen moleküler yöntemler kullanılarak bu ayırım yapılabilmektedir. ³ İnsan kolon ve çekumu içerisinde zorunlu anaerob olan bu parazit 5 µm' den 40 µm' ye kadar değişebilen hücre boyutu ve pürüzsüz hücre zarına sahiptir. ⁴

Kontamine su ve gıdalarla fekal oral yol ile bulaştığı bilinmektedir. ⁵ Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalarla parazitin bulaş yolları aydınlatılmıştır. İnsandan insana, hayvandan hayvana, insandan hayvana, hayvandan insana geçişleri moleküler yöntemler kullanılarak gösterilmiştir. ¹ Iguchi ve ark.'nın yaptığı çalışmada bu durumu doğrulamıştır. ⁶

İnsanlardaki patojenitesi hakkında bilim adamları birçok fikir ortaya atmışlardır. Organizmanın semptomatik ve asemptomatik bireylerde hem patojen hem de patojen olmayan suşlarının varlığı tespit edilmesi patojenitesi hakkında tartışmalara yol açmaktadır. ⁷ İrritabl

bağırsak sendromu, ishal veya diğer klinik sendromu olan immun sistemi baskılanmış, hemofilik ya da sağlıklı bireylerde bu parazitin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. ⁸

Hastalığa neden olan diğer intestinal patojenlerin olmadığı durumlarda bu parazitin çok sayıda olduğu bildirilmiştir. İyodokinol ve metronidazol ile tedavi başarılı bulunmuştur. ⁹

Son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalar hayvanlardan ve insanlardan izole edilen *Blastocystis* izolatlarında genetik çeşitliliğe rastlanılmaktadır. ¹⁰ Yapılan moleküler çalışmalar *Blastocystis* küçük alt birim (SSU) rDNA' ya dayalı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) primerleri kullanılarak ya da Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemi kullanılarak alttür tayini yapılmaya başlanmıştır. ^{11,12} Ayrıca pirosekans ve gerçek zamanlı PZR (Real Time –RT- PZR) çoklu nükleotid polimorfizm ve mutasyon saptamasında kullanılmakta ve bu analizler için ideal testler olarak bildirilmektedir. ^{13,14}

Yoshikawa ve ark.'nın geliştirdiği Sequenced-Tagged Site (STS) primerleri ile insan dışkılarından izole edilen *Blastocystis*' ler yedi alttüre kadar tanımlanabilmektedir. ¹⁵ DNA dizi analizi ile yakın zamanda *Blastocystis*' in 13 alttürü olduğu bildirilmiştir. ¹⁶ Bunlardan alttür 1 ve alttür 3 alttür prevelansının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. ¹⁷

Bu çalışmada, 350 hastadan alınan dışkı örneğinde *Blastocystis* protozoonu mikroskopik, kültür yöntemleri ile araştırılıp alttür tayininin STS primerleri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE VE SINIFLANDIRMA

Blastocystis' e özellikle tropikal ve subtropikal ülkelerde daha sık rastlanılmaktadır. *Blastocystis* hakkında 1967 yılında Zierdt' in bu patojenin çeşitli formları olduğunu tanımlamasına kadar olan süreçte, çok az sayıda araştırma yayınlanmıştır. ¹⁸ *Blastocystis* ve benzeri organizmalar, primatlar, domuz, kuş ve amfibiler, nadiren sıçan, sürüngenler ve böcekler gibi birçok canlıda tespit edilmiştir. ¹⁹ 1967 yılında Zierdt ve arkadaşları morfolojik ve fizyolojik özelliklerini inceleyerek *Blastocystis*' in protozoon olduğunu bildirmişlerdir. ²⁰

Blastocystis' in taksonomisi uzun yıllar tartışmalı kalmıştır. Alexeieff 1911 yılında *Blastocystis enterecola* olarak isimlendirmiş ve maya mantarı olarak kabul etmiştir. Ucke (1907), Bohne ve Prowazek (1908) ve Bensen (1910) ise *Trichomonas intestinalis* (*T. intestinalis*) olarak isimlendirmişlerdir fakat Alexeieff *Blastocystis*'in tomurcuklanma şeklinde bölünerek çoğalması, kapsül benzeri bir zar yapısının olması, çimlenme özelliği ve spor varlığından dolayı *T. intestinalis* olmadığını ileri sürmüştür. ²¹ Ayrıca *Blastocystis*' in hücre duvarının olmaması, anaerob olması, bağırsak protozoonları için geliştirilen besiyerinde üremesi, bakterileri ve diğer partikülleri sindirmesi, pseudopodların varlığı, üremek için optimum pH ve 37 °C' ye ihtiyaç duyması, vakuoller, ameboid ve granüler formlarının olması ve bu formların insan dışkı örneklerinde tespit edilmesi, protozoal ilaçlara duyarlı amfoterisine dirençli olması, şizogoni, endogoni, binari füzyon görülmesi, golgi organelinin ve mitokondri gibi organellerinin olması ve kültür ortamında 2-3 gün içinde ancak çoğalması maya olmadığını göstermiştir ve protozoon parazit olarak kabul edilmiştir.

Blastocystis' in çeşitli canlılarda tür ismi; tavuklarda *Blastocystis gali*, yerli ördekte *Blastocystis anatis*, yerli kazda *Blastocystis anseri* ve yılan da *Blastocystis lapemi* adını almaktadır. ²³ İnsanlarda da bu türe rasladıktan sonra Brumpt (1912) *Blastocystis hominis* adını önermiştir ve tür ismi kabul edilip bu şekilde günümüze kadar gelmiştir. ²¹

Blastocystis, 1996 yılında gen analizi yapıldıktan sonra Stramenopiles grubunun içinde yer almaya başlamıştır. ²⁴

Moleküler yöntemlerle rRNA küçük alt birim kullanılarak yapılan, *Saccharomyces* spp., *Neurospora* spp., *Naegleria*, *Acanthamoeba* ve *Dictyostelium* spp., yada *Trypanosoma* ve *Euglena* spp. gibi türlerinde bulunduğu sekanslamada diğer türlerden farklı olduğu ortaya çıkmıştır. Bu veriler *Blastocystis*' in maya, mantar ya da sporozoa olmadığını göstermiştir. ²³ Son olarak da Cavalier-Smith 1998'de Stramenopile'in Chromista aleminin altındaki Heterokonta bölümüyle (infrakingdom) identik olduğunu belirterek *Blastocystis*' in Heterokontid Chromista olduğunu ifade etmiştir. Sarcomastigophora sınıfında, *Blastocystea* takımında *Blastocystidae* ailesinde *Blastocystis* cinsi ve *hominis* türü olarak tanımlanmıştır. ²⁵ 18S rRNA analizi ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucu sınıflandırması son şeklini almıştır. ²⁶

Alem: *Chromista*
Alt alem: *Chromobiota*
Bölüm: *Heterokonta*
Alt şube: *Opalinata*
Sınıf: *Blastocystea*
Takım: *Blastocystida*
Aile: *Blastocystidae*
Cins: *Blastocystis*
Tür: *Blastocystis hominis*

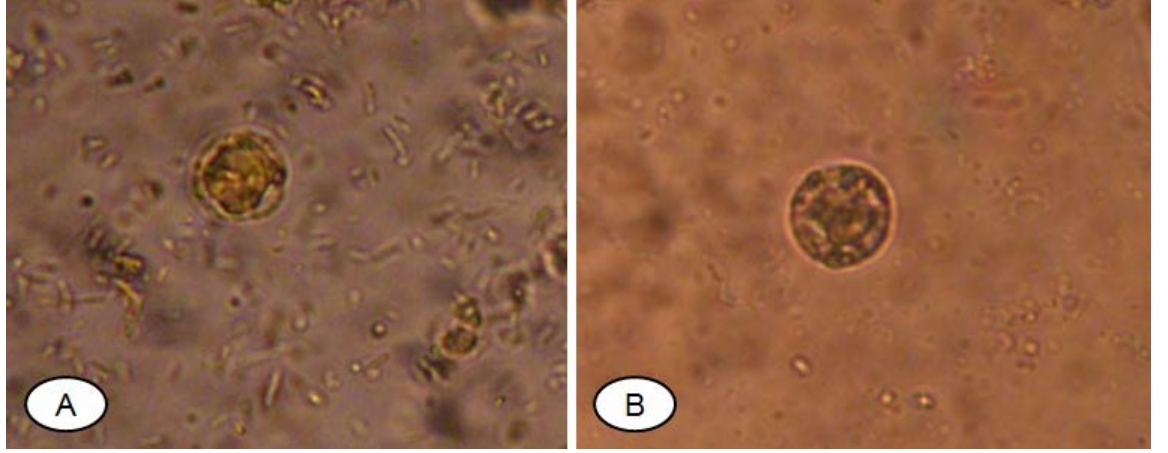
Günümüzde *Blastocystis hominis* türünün sadece insandan değil diğer canlılardan da izole edildiğinin gösterilmesi nedeniyle *Blastocystis* spp. isimlendirmesi kullanılmaktadır.²⁷

2.2. MORFOLOJİSİ

Blastocystis spp. klinik örneklerde, 4-15 µm boyutlarına kadar değişkenlik gösteren hücre boyutuna sahiptir. Rozet formunda çekirdekleri ve küresel mitokondrisi görülmektedir. Organelleri hücrede periferik olarak yerleşmiştir. Hücre zarı parlak ve düzgün çeperlidir. Eritrosit hücreleri gibi boş hücreler gibi görülürler. Anaerob olduğu için oksijenli ortamda hücreleri patlar. Mitokondrileri Janus yeşili ve rodamin floresan boyası ile çok iyi boyanır. Hücrenin genellikle merkezinde bulunan vakuölü bulunmaktadırlar ve boş görünümündedir. Bu vakuol, vakuoler formlarda hücrenin ortalama %90' lik hacmini oluşturabilmektedir. Merkezi cisim gram, feulgen, trikrom ve hemotoksilen-eozin boyası ile yoğun ve amorf görünümde boyanmaktadır. Elektron mikroskopunda ise küre şeklinde ve düzgün çeperli görünüme sahiptir.²²

Elektron mikroskopik incelemelerde, *Blastocystis* spp.'nin tüm formlarında nükleusta elektron opak materyalin, nükleus kenarında kresentrik bant görünümünde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu morfolojik görüntünün hücre döngüsünün evrelerinden veya fizyolojik koşullardan bağımsız olduğu da gözlenmiştir. Sitoplazmada genellikle ökaryotik hücrelerde görülen golgi organeli, endozom benzeri vakuol, mitokondri ve mikrotübül gibi organeller Transmission Electron Microscope (TEM) ile görülebilmektedir. ²⁸ *Blastocystis* spp.'nin sitoplazmasında mitokondri benzeri organellerin farklı sayıda ve morfolojide olduğu da belirtilmiştir. ²⁵

Polimorfik protozoon olan *Blastocystis*' in altı formunun olduğu bildirilmektedir. Bu formlar vakuoler, granüler, multivakuoler, avakuoler, ameboid ve kist formuna rastlanmaktadır. Ameboid form çok nadir görülmektedir. Kültürde ise vakuoler ve granüler forma daha sık rastlanmaktadır. *Blastocystis* spp. kültürde çok farklı formların bir arada üreyebildiği de gözlemlenmektedir. ¹⁸ *Blastocystis* spp.'nin morfolojik formlarının görünümünün çevresel faktörlere bağlı olduğu belirtilmektedir. Fiziksel etkilerin, bazı ilaçların varlığının ve metabolik durumun *Blastocystis*' in morfolojisini etkilediği düşünülmektedir. ²³



Resim 1: *Blastocystis*' in farklı formları, A: Kistik form, B: Granüler form (Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D Laboratuvarı)

2.2.1. Vakuoler form (santral form): Taze dışkıda ve kültürde en sık görülen formdur. Vakuoler formun boyutu 2-200 μm arasında değişmekte ve santral vakuol boş görünmektedir. Karbonhidratları boyayabilen periyodik asit Schiff ve Alcian Blue boyası ile ya da lipid boyası olan Sudan Black B ve Nile Blue boyası ile santral vakuolün boyanması depo görevi gördüğünü düşündürmektedir.²⁸ Aynı zamanda bu vakuolün parazitin gelişimini için uygun ortam sağlayarak şizogoni benzeri üremeyi sağladığı da ileri sürülmüştür.³⁰ Organizma genellikle fibriler katman veya kapsül adı verilen dış katman ile kaplıdır. Direk dışkıdan izole edilen *Blastocystis*' ler de daha kalınken uzun süreli kültür ortamına bırakıldıklarında kapsülün incelendiği görülmektedir.²⁶ Kapsülün; bakterileri tutmak, osmotik şoka karşı hücreyi korumak ve önemli plazma membran proteinlerini immün sistemden korumak için bir bariyer görevi yaptığı düşünülmektedir.²⁸

2.2.2. Granüler form: Granüler form vakuoler forma benzer morfoloji göstermektedir fakat santral vakuol içeriği değişmektedir. Boyutları vakuoler formdan daha büyük ve 6.5-80 μm

arasında değişmektedir. Granüler hücrelerin ortalama çapı 10 µm'dir.^{23,29} İntrasellüler granüller heterojendirler ve miyelin benzeri inklüzyonlar, küçük veziküller, kristal granülleri ve yağ damlaları oldukları açıklanmıştır. Kaba ve düz endoplazmik retikulum sadece sitoplazmanın periferik alanında mevcuttur. Çoklu çekirdekleri ve membrana paralel birçok golgi organeli vardır.²² (Resim 1)

2.2.3. Ameboid form: Çok nadir görülen *Blastocystis*'in ameboid formu tanı için büyük zorluklar oluşturmaktadır. Kültürde kolay tanımlanılabilir fakat sıvı ishallerde dışkı örneklerinde lökosit taklit etmektedir. Gram boyama yapıldığında daha kolay tanınabilmektedir.²² Sitoplazmada lizozom benzeri yapıların içinde hücre tarafından sindirilmiş gibi görünen bakteriler mevcuttur. Santral vakuol yoktur ve hücre merkezine yakın bir veya iki nükleus vardır. Hücreler *Blastocystis*'in diğer formlarında görünen morfolojik özelliklerin çok azını taşımaktadır.³¹ Kültürde, ışık ve elektron mikroskopisi ile incelenmeler sonucunda 10-15 µm boyutunda, tipik vakuoler form morfolojisinde ancak, bir veya iki pseudopod içeren yapılar olduğu gösterilmiştir. Pseudopodların beslenmede ve patogeneizde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu form pseudopod benzeri sitoplazmik çıkıntılar gözlenmesine rağmen hareketsizdir.²⁸ Lizozim, golgi kompleksine sahipken mitokondri ve vakuole sahip olmadığı bildirilmektedir. Hücre bölünmesi henüz kanıtlanmamıştır. Tomurcuklanma ya da sporlanma ile ürediği de düşünülmektedir fakat kesin bir bilgi henüz bulunmamaktadır.²³

2.2.4. Kist form: Dirençli formda denilmektedir. Bu form küçük boyutları nedeniyle geç keşfedilmiş ve tanıda karışıklığa sebep olmuştur. Boyutu 3-5 µm arasında değişmektedir ve ışık mikroskopunda tanımlanması zordur. Fekal örneklerde kistler çok katmanlı kist duvarı

tarafından korunmaktadır.¹⁸ *Blastocystis*' in kist formu kültürdeki vakuoler ve granuler formlardan ve genelde taze dışkı örneklerindeki multivakuoler formlardan küçüktür. Yoğunlaşmış sitoplazma diğer kistlerde olduğu gibi pek çok küçük vakuol içerir. Glikojen ve lipid inklüzyonları sitoplazmada depolanır.³¹ Kistlere kültür ortamında çok rastlanmaz. Morfolojik olarak değişik şekiller göstermektedir fakat genellikle küresel ve oval şekiller görülmektedir. Sitoplazma; çekirdek, mitokondri, glikojen ve küçük vakuoller içerebilir.²⁸ Kist formun multiple fizyon benzeri eşeysiz üreme gösterdiği düşünülmektedir fakat araştırmacılar tarafından teyit edilememiştir.²³ (Resim 1)

2.2.5. Multivakuoler form: Multivakuoler form, tipik vakuoler ve granüler formlardan daha küçük ve 5-8 μm ' dir. Taze dışkı örneklerinde tespit edilmiştir.²³ Vakuoller ışık mikroskopisinde ayırt edilemeyecek kadar küçüktür ve çok sayıdadır.²⁸

2.2.6. Avakuoler form: Oldukça nadir rastlanan bir form olarak bilinmektedir. Boyutu 5 μm civarında olup yüzey örtüsü ve vakuölü yoktur. Sulu dışkı yapan bir hasta ile kolonoskopi yapılan bir hastadan izole edildiği bildirilmiştir.²⁹ Avakuoler formlarda organel matrikse uzanan sayısız krista bulunmaktadır. Kültür formlarda bu yapılar oldukça az sayıdadır ve kısa tübüler veya kesecik şeklindedirler. Avakuoler formlarda mitokondri benzeri organeller diğer formlardakilere göre daha az elektron opaktır.³¹

2.3. BİYOKİMYA VE SİTOKİMYA

Blastocystis spp. görülen insan dışkısının kültür ortamına ekilmesinden sonra üreyebilmesi için 37 °C sıcaklık, nötral ya da hafif alkali ortam gerekmektedir. Ayrıca kültür solüsyonu %10'luk at serumu da içermelidir. ³¹

Morfolojik ve sitokimyasal çalışmalar organizmanın, hem sitoplazma hem de vakuolde lipid depolayabildiğini göstermektedir. Biyokimyasal analizler, fosfolipidler, nötral lipidler ve polar lipidlerle hayvan hücrelerine benzer bir lipid profili olduğunu ortaya koymuş, triaçilgliseroller, diaçilgliseroller ve fosfolipidleri sentezleyebildiğini göstermiştir. Kültür ortamlarında kolesterol ve kolesterol esterleri bulunmaktadır. ²³

Blastocystis' in kist duvarı "kitin" dendir ve bu kitin kist duvarının muhtemelen iç tarafında yer almaktadır. Çünkü ışık mikroskobisinde kistler kitin boyaları ile boyanmamaktadır. ³¹

Yapılan izoenzim çalışmaları; *Blastocystis*' in glukoz fosfat izomeraz, fosfoglukomutaz, malik enzim, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz ve hegzokinaz enzimleri taşıdıklarını göstermiştir. ³²

Blastocystis spp. mitokondri benzeri 1 µm kalınlığında çift zarla çevrili organelle sahiptir fakat bu organelin rolü ve niteliği henüz bilinmemektedir. Klasik mitokondriye sahip değildir fakat hidrogenozom ya da mitozom olarak bilinen anaerobik mitokondrilere sahiptir ve bu

organeller hücre için gerekli enerji üretimini sağlamaktadır.³³ Mitokondri benzeri yapıların içeriği incelendiğinde ise, yapısında mitokondriyal enzimler olan piruvat dehidrogenaz kompleksi, α -ketoglutarat dehidrogenaz kompleksi, izositrat dehidrogenaz ve glutamat dehidrogenaz olmasına rağmen sitokromlardan yoksun olduğu belirlenmiştir.³⁴

Sitokimyasal analizler, santral vakuolde hidrolitik enzim olan asit fosfataz içermediğini göstermiştir. Sitokimyasal boyama yöntemleri ile yapılan çalışmalarda ise vakuolde ve golgi organelinde alkalik fosfataz tespit edilmiştir.²³

Sistein proteazların insan sekretuvar IgA degradasyonuna sebep olduğu ve in vitro olarak kolon epitelyum hücrelerinde IL-8 uyarılmasına neden olduğu bilinmektedir.³⁵ *Blastocystis* alttür 3 saptanan semptomatik ve asemptomatik hastalarda proteaz aktivitesi incelendiğinde, semptomatik hastalarda 32 kDa olarak kabul edilen proteazların daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca bu enzimlerin protein yıkımından sorumlu olduğu, konağın immun yanıtından kaçmada önemli rol oynadığı ve virulans faktörü olarak kabul edilebileceği belirlenmiştir.³⁶

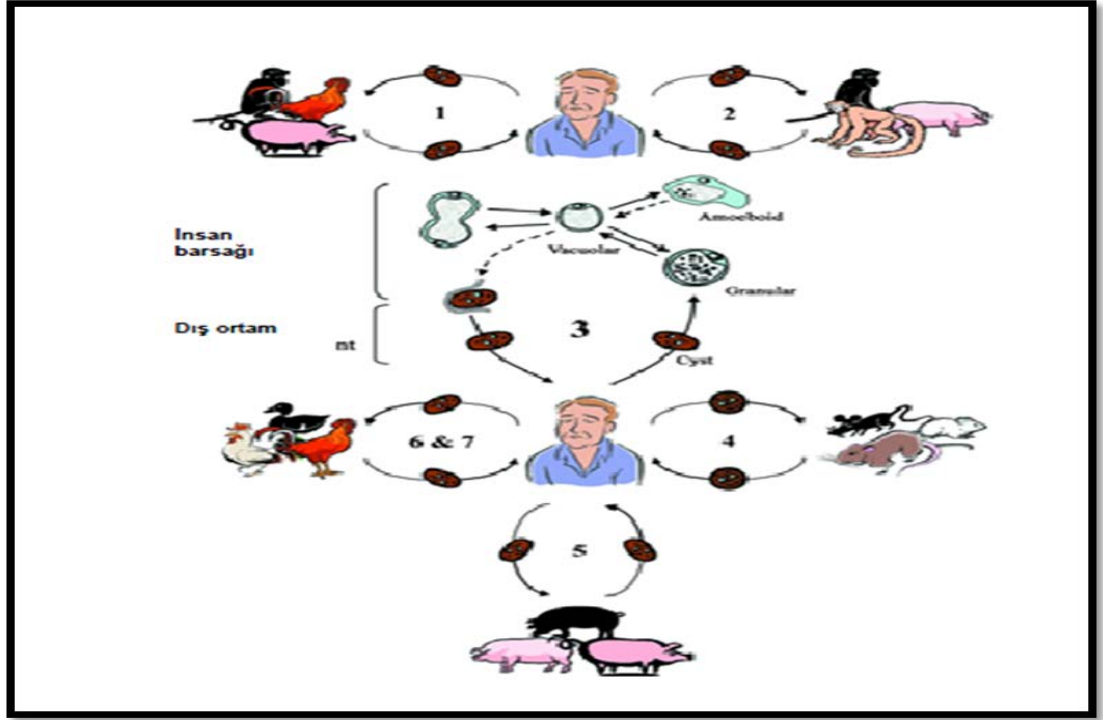
2.4. YAŞAM DÖNGÜSÜ

Blastocystis için açıklanmış birbiriyle çelişkili yaşam siklusları bulunmaktadır. Bunun sebebi ise, parazitin farklı çoğalma yollarının olmasıdır. Şizogoni, tomurcuklanma, endodiogeni ile çoğalma

gibi hipotezler organizmanın polimorfik yapısından kaynaklandığı ve bu parazitin gerçek çoğalma yollarının olmadığı düşünülmektedir.²⁸

Işık mikroskopisi düzeyinde yapılan çalışmalarda vakuoler form, granüler forma dönüşmekte, daha sonra santral vakuolün içinde yavru vakuollü form veya ameboid form oluşmakta ve sonra tomurcuklanma ile vakuollü forma dönüştüğü düşünülmektedir.²³

Bir başka yaşam döngüsü modelinde ise; *Blastocystis spp.*'nin yaşam döngüsünde, insan bağırsağındaki formun yüzeyel katmanı olmayan küçük, avakuoler form olduğu görülmektedir. Bu avakuoler form bağırsakta ilerledikçe sitoplazmada mevcut küçük vakuoller muhtemelen birleşmekte ve multivakuoler form oluşmaktadır. Dışkı materyalinde belirleyici form olan multivakuoler hücreler kalın bir yüzeyel tabaka ile kaplıdır. Bu kalın yapının altında bir kist duvarı oluşmakta ve hücre yapısını değiştirmektedir. Sonuçta oluşan kist formunun, *Blastocystis spp.*'nin enfektif formu olduğunu düşündürmektedir. Kistler taze dışkı materyalinden çok, beklemiş dışkı materyallerinde görülür. Bu bulgu, kist formunun oluşumunun, konaktan çevre koşullarına geçişe verilen bir yanıt olabileceğini göstermektedir.³¹
(Şekil 1)



Şekil 1: *Blastocystis* protozoonunun yaşam siklusu, farklı konakları olan zoonotik genotipler (alttür 1-7) göz önüne alınarak hazırlanmıştır. İnsan ve hayvanlar fekal kistlerle enfekte olur ve kistler kalın barsakta vakuoler forma dönüşür. İnsanlarda vakuoler formlar ikiye bölünerek çoğalır ve bu aşamada ameboid ve granüler formlar gelişebilir. Ameboid formdan vakuoler forma ve vakuoler formdan kist formuna geçişle ilgili yeterince bilgi olmadığından bu hipotetik yollar kesik çizgilerle gösterilmiştir. Alttür 1 memeli ve kuşlar arasında çapraz enfeksiyon yapar. Alttür 2, 3, 4, ve 5 sırasıyla, primat/domuz, insan, kemirgen ve domuzları içerir ve alttür 6 ve 7 kanatlı izolatlarını içerir.³¹

Yaygın olarak kabul gören yaşam döngüsünde iki farklı kist yapısının olduğu, ince duvarlı kist yapısının otoenfeksiyondan, kalın duvarlı kist yapısının ise dışkı ile dışarı atılarak su ve besinlerin kontaminasyonundan sorumlu olduğu belirtilmektedir.^{30,22}

2.5. GENETİK ÇEŞİTLİLİK

Blastocystis' in filogenetik analizi ribozomal RNA (rDNA) gen dizileri kullanılarak oluşturulmuştur. Morfolojik olarak benzer olmasına rağmen genetik olarak çok farklı yedi türün olduğu bildirilmiştir.³⁷

Sodyum dodesil sülfat poly-acrylamide jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve immunblotlama, izoenzim analizi, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve RFLP analizleri, hem *Blastocystis* spp. suşları arasında hem de coğrafi bölgeler arasında antijenik ve genetik heterojeniteye sahi olduğunu göstermiştir.³⁸

Blastocystis türleri insanlarda ve hayvanlarda morfolojik olarak ayırt edilememesine rağmen RFLP ve STS primerleri kullanılarak PZR analizlerinde genetik varyasyon olduğu belirlenebilmektedir.^{28,39} *Blastocystis*' de protein analizi ve DNA hibridizasyon sonucunda iki demes (bölge) varlığı tür içi varyasyonları ortaya koymuştur.⁴⁰

İnsanlar, sıçanlar ve sürüngen izolatlarında uzama faktörü-1 alfa (elongation factor -EF-1 α) incelendiğinde ise, tüm izolatlarda 900 bp olduğu ve akrabalık değerlendirilmelerinde kullanılabileceği belirtilmektedir.⁴¹

Genetik çeşitlilik ribozomal RNA gen analizlerinde primatlar, kuşlar ve insanlarda dahil birçok memelide farklı alttürler

tespit edilmiştir. ³⁹ Belirlenen bu alttürlerden, alttür 3' ün en sık görülen alt tür olduğunu gösterilmiştir. Diğer genotiplerden de alttür 1 ve alttür 6'nın da insanlarda bulunabildiğini fakat düşük sıklıkta olduğu belirtilmiştir. ⁴² Genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla yapılan 20 kanser ve 20 HIV/AIDS hastasının dahil edildiği çalışmada alttür 3'ün baskın olduğu bulunmuştur. ⁴² Özyurt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da en sık görülen alttür 3'ü (%75.9) alttür 1,2 ve 4 izlemektedir. ⁴³ Bir başka çalışmada ise, kolonoskopi ile inflamasyon bulguları bulunan hastalarda alttür 1,2 ve 4 bulunurken insanlarda en sık bulunan alttür 3'ün semptomlarla ilişkili olmadığı görülmüştür. ⁴⁴ Alttür 1'in en patojen tür olduğu ileri sürülürken, ülkemizde yapılan bir çalışmada alttür 2'nin asemptomatik hastalarda yüksek olduğu bulunmuştur. ^{45,46} Bu çalışmalar, genotip 3'ün insan kaynaklı olduğunu ve coğrafik orjinle genotip arasında herhangi bir ilişki olmadığı sonucunu göstermektedir.²⁸

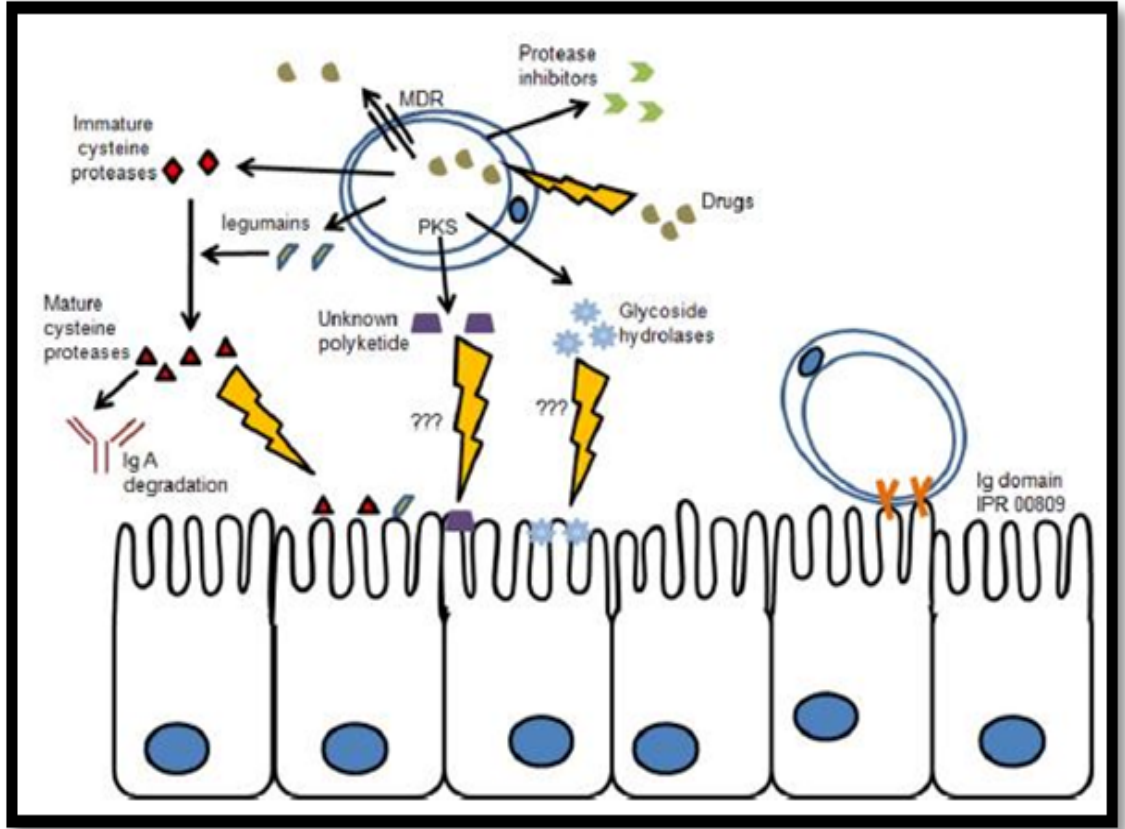
2.6. PATOGENEZ VE VİRULANS

Blastocystis' in yüzey tabakasının fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen TEM ile yapılan bazı çalışmalarda, bakterilerin protozoonun yüzey tabakasına yapıştığı gözlenmiştir. ⁴⁷ Endoskopi ve biyopsi raporları *Blastocystis*' in kolon mukozasını invaze etmediği ancak ödem ve inflamasyon oluşturduğu görülmüştür. *Blastocystis* enfeksiyonu olan hastalarda inflamasyon ve bağırsak geçirgenliği artmaktadır. ⁴⁸ Gnotobiotik kobaylarda yapılan çalışmada parazitin epitelyum hücrelerinde inflamasyona neden olduğu gösterilmiştir. Bağırsak mukozasına toksik-alerjik reaksiyonlara sebep olduğu ileri sürülmesine rağmen kanıtlanmamıştır. ^{49,50}

Blastocystis tarafından salgılanan proteazların epitel hücrelerdeki immunolojik reaksiyonlarına odaklanılan çalışmalar sonucunda, kültür çalışmaları yapılmış ve *Blastocystis*' in epitel hücrelerinden salınan inflamatuvar sitokin IL-8 regülasyonunun üretimini başlangıçta azalttığını daha sonra üretimini arttırdığı saptanmıştır. ⁵¹ Ratlarda oluşturulan *Blastocystis* enfeksiyon modelinde kolonik epitel hücrelerinden salınan inflamatuvar sitokin IL-8 regülasyonunun üretimini arttırdığı ve bu artışın *Blastocystis* spp.' nin invaziv etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. ⁵²

Blastocystis' in sistein proteaz aktivitesinin insan sekretuar IgA degradasyonuna sebep olduğu ve epitel hücrelerinde IL-8 yanıtının uyarılmasından sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca zamana bağlı proteaz aktivitesinde, hücre boyutu ve proteaz aktivitesinin ilişkili olduğu gözlenmiştir. ³⁵

Blastocystis' in sistein proteazlar salgıladığı ve bu salgıların immun sistem üzerinde etkileri bulunduğu tahmin edilmektedir. Çoklu ilaç direncinin bulunmasının MDR proteinlere bağlı olduğu bildirilirken, sekonder metabolitlerden poliketid sentazın semptomlarla ilişkili olup olmadığı henüz belirlenememiştir. Aynı zamanda *Blastocystis*' in epitel hücreye yapışmasını sağlayan proteinlerde salgıladığı bulunmuştur. ¹⁷ (Şekil 2)



Şekil 2: *Blastocystis* sp.' de alttür 7' nin salgı proteinleri ve virulans faktörlerinin konak hücre ile etkileşimi (yıldırım işaretleri: toksik etkiyi, MDR: çoklu ilaç direnci, PKS: poliketid sentaz).¹⁷

Blastocystis' in immün sistemi baskılanmış ve sağlıklı insanlarda ishale neden olduğu bilinmektedir.⁵³ İlk zamanlarda immün sistemi baskılanmış insanlarda fırsatçı patojen olduğu düşünülmüş olsa da daha sonra yapılan çalışmalarda asemptomatik ve sağlıklı bireylerde de bu parazite rastlanılmıştır. Kukoschke ve Muller'in yaptığı çalışmada semptomatik ve sağlıklı bireyleri karşılaştırdığında semptomatik kişilerde *Blastocystis* spp. insidansında artış bulunmuştur.⁵⁴ Aynı zamanda Taşova ve ark. immün yetmezliği olmayan, ishalleri kontrol grubuyla karşılaştırmalı çalışmalarında, hematolojik malignite nedeniyle kemoterapi alan nötropenik ishalleri hastalarda *Blastocystis* insidansında anlamlı artış

olduğunu bildirmişlerdir.⁵⁵ Yapılan çalışmalar ve izole edilen olgulara dayanılarak birçok araştırmacı *Blastocystis* spp.'nin patojen olduğunu düşünmektedir.⁵⁶

Blastocystis ile intestinal hastalık arasında bağlantı olmadığını hakkında yapılan çalışmalar ise; semptomatik ve asemptomatik hastalar arasında prevalans farklılıkları olmadığını, sadece dışkıda tek başına *Blastocystis* spp. bulunduğu durumlarda bu iki grup arasında fark olduğunu öne sürmüşlerdir.^{57,58} Bazı araştırmacılar ise klinik bulguları saptanamayan bir patojenite veya fonksiyonel bağırsak bozukluklarına bağlamaktadırlar.⁹ Ancak *Blastocystis* spp.'den başka patojenin bulunmadığı ishal vakalarıyla yapılan ve parazitin eradikasyonu ile şikayetlerin geçtiğini bildiren plasebo kontrollü çalışmalar bu parazitin patojenik potansiyeli olduğunu desteklemektedir.^{59,60} Ayrıca asemptomatik seyirli *Giardia* ve *Entamoeba histolytica* enfeksiyonlarının daha sonra semptomatik hale geçebilmesi durumu *Blastocystis* türleri için de geçerli olabileceği düşünülmektedir.²⁸ Morfolojik formlar arasında yapılan çalışmalarda semptomatik hastalarda ameboid forma rastlanıldığından bu formun patojenitede önemli olduğu düşünülmektedir.³⁸

IBS hastalarında ishal ve *Blastocystis* arasında kesin olmamakla birlikte bir ilişki olduğu düşünülmektedir.⁶¹ IBS hastalığı olan kişilerde, lamina propria artmış T hücre aktivasyonu olduğu T hücre sitokinlerinin fazlalaştığı, buna bağlı olarak da T hücre fonksiyonları arttığı gözlenmiştir. İltihabi bağırsak hastalıklarında da artmış T hücre aktivasyonu olduğu dikkati çekmektedir.⁶²

Blastocystis'in patogenezi ile ilgili önerilen mekanizmalar;

1. Toksik ve alerjik reaksiyonlar ortaya çıkarma
2. İnsan sekretuar IgA' larını proteazları ile parçalama
3. Epitelyum hücrelerin bariyer fonksiyonlarını bozma ve permeabilite değişikliği
4. Kolon epitelyum hücrelerinden sitokin salınımı ve bağışık yanıtın modülasyonu olarak bildirilmektedir. ^{63,64,65}

Gastrointestinal hastalıklarda ancak diğer infeksiyöz ve noninfeksiyöz nedenlerin eliminasyonu yapıldıktan sonra etken olarak sorumlu tutulabileceği belirtilmiştir. Fakat tümüyle diğer etkenlerin araştırılıp belirlenmesinin güç olması nedeniyle bu yaklaşım üzerinde tartışmalar sürmektedir. ²⁹

Blastocystis 'in bir kommensal olduğu gösterilmiş olsa da immün yetmezlik, beslenme bozukluğu gibi bazı konak koşullarında bir patojene dönüşebilmesinin mümkün olduğu ve *Blastocystis* ' in potansiyel bir patojen olarak değerlendirilmesi gerektiği ileri sürülmüştür. ³¹

Semptomatik ve asemptomatik hastalarda alttür bağımlı patojenite çalışmaları sınırlı sayıdadır ve yapılan çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmiştir. ^{44,47,66,67} Alttür 3 insanlardan en çok izole edilen alttürdür fakat hastalıklarda bütün türlerin ilişkili olduğu görülmektedir. Klinik durum ele alınırken fenotip ile birlikte genotip analizinin faydalı olacağı belirtilmektedir. ⁶⁵ Eroğlu ve ark.'nın yaptıkları semptomatik ve asemptomatik hastalarda *Blastocystis* spp.'nin tür tipleri ile ilgili çalışmada asemptomatik hastalarda alttür3 ve alttür2 saptanırken semptomatik hastalarda ise alttür1'in baskın olduğu saptanmıştır. ⁵³ 28 semptomatik 16 asemptomatik hastanın STS primerleri ile alttür tayini belirlendiğinde alttür3 en sık görülen alttür iken semptomatik hastalarda sırasıyla alttür 1,

3, 4 görülürken asemptomatik hastalarda ise alttür 2, 3, 4 en sık görülen alttür olarak belirlenmiştir. Aynı hastalardan izole edilen *Blastocystis* enfeksiyonu oluşturulmuş farelerde semptomatik alttür 1' in alttür 3 ve 4' e kıyasla intestinal hücre geçirgenliğini daha çok arttırdığı ayrıca alttür 1' in patojenite ile yakından ilgisi olduğu belirlenmiştir. Alttür 2' nin ise patojeniteden sorumlu olmadığı bildirilmiştir. ⁶⁸

Yoshikawa ve arkadaşlarının 15 semptomatik ve 11 asemptomatik hastada alttür karşılaştırması için yaptıkları çalışmada, her iki grupta da sadece alttür 1 ve alttür 3 değerlendirilmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ve genotip ve patojenik potansiyel arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir. ⁶⁹

Gastrointestinal şikayetleri ve akut ürtiker lezyoları olan bir hastada *Blastocystis*' in alttür 3 olarak tespit edildiği ve morfolojik olarak ameboid formunun mevcut olduğu bildirilmiştir. ⁷⁰

2.7. BLASTOCYSTIS TÜRLERİNDE İMMUN YANIT

Blastocystis enfeksiyonunda konağın immun sisteminin, gastrointestinal sistemde önemli olduğu bilinmektedir. *Blastocystis* immun sistemi baskılanmış hastaların bağırsak mukozasında önemli patolojik değişikliklere sebep olmaktadır. ^{71,72} *Blastocystis*' in bağırsak mukozasını işgal edip etmediği henüz kanıtlanmamış olsada, mukoza, submukoza ve kas tabakasını işgal ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. ^{73,74}

Konağın bağışıklık sistemi parazit enfeksiyonu tarafından tetiklendiğinde Reaktif Oksijen Radikalleri (ROS) veya oksidatif patlamanın

aktive olmasıyla makrofajlar ile birlikte inflamatuvar sistem aktive olur. Makrofaj veya fagositoz aktivasyonu, reaktif metabolitlerin salınımına lipid peroksidasyonu, protein hasarı ve DNA kırılmalarına sebep olmaktadır. ⁷⁵

Blastocystis için SDS-PAGE, immunblotlama, immundifüzyon ve immunfloresan gibi teknikler kullanıldığında parazitin antijenik heterojeniteye sahip olduğu görülmektedir. Çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiş olsa dahi antijenik heterojenite olması insanlarda farklı türlerinin olduğunu kanıtlamaktadır. ³⁸

Sitopatik etkilerini araştırmak için memeli hücre kültürlerinden elde edilen *Blastocystis* spp. ile Çin hamsterlerinden elde edilen HT-29 ve T-84 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, HT-29 hücreleri üzerinde sitopatik etkide eksiklik olduğu, T-84 hücrelerinde ise etki görülmediği saptanmıştır. Ancak 24 saat inkübasyonda bekletildiğinde proinflamatuvar sitokinler IL-8 ve granülosit-makrofaj kolon uyarıcı faktör üretimine neden olduğu gözlenmiştir. Inkübasyon süresi altı saat olduğunda ise IL-8 üretimine neden olmadığı gözlenmiştir. ²⁸ Bir başka çalışmada ise, zoonotik izolat olan *Blastocystis ratti* VR1'in sistein proteazlarının insan kolon epitelyum hücrelerinde IL-8 gen ekspresyonunu etkinleştirebildiği aynı zamanda IL-8 üretiminin de NFκB aktivasyonuna katkısı olduğunu da göstermektedir. ^{76,77} Bu NFκB aktivasyonunun da parazitin yaşama, çoğalma ve yaygınlaşmasına katkı sağladığı düşünülmektedir. ⁷⁸

Humoral immünite konusunda alttür 4 ve 7'nin hücre lizatları ve salgısal ürünlerinin IgA' yı parçaladığı ve parazitin canlı kalmak için proteaz salgıladığı bildirilmiştir. ⁶³

Dışkı ve serum örneklerinde ELISA yöntemi ile IgG ve IgA antikor yanıtını değerlendirilen bir başka çalışmada da semptomatik bireylerin asemptomatik bireylere göre daha güçlü antikor yanıtı oluşturduğu belirlenmiştir. ⁷⁹ IBS' li hastalarda ise humoral yanıt açısından *Blastocystis* incelendiğinde IgG antikorları ile arasında bir paralellik olduğu ve IgG düzeyinin büyük oranda yükseldiği bildirilmiştir. ^{62,80}

Yapılan çalışmalarda mAb ID5'in, *Blastocystis* izolatında bulunan 29-30 kDa ağırlığındaki protein için spesifik olup özellikle insan ve insan dışı *Blastocystis* kökenlerinin ayrılmasında ve tanı amacıyla geliştirilecek ELISA gibi yöntemlerde kullanılacak bir hedef olduğu belirtilmiştir. ²⁹

2.8. EPİDEMİYOLOJİ

Geçmişte *Blastocystis* ile ilgili veri eksiklikleri, epidemiyolojisi hakkında da bilgi sahibi olunmasını engellemiştir. Fakat son zamanlarda coğrafik yayılımı ile ilgili çalışmalar artmaya başlamıştır. ^{28,41}

Blastocystis enfeksiyonlarının halk sağlığı açısından önemi konusunda yeterli bilgi bulunmamasına rağmen en sık görülen gastrointestinal sistem protozoonu olduğu ve gelişmekte olan ülkelerde prevalansının %60'a kadar ulaştığı tahmin edilmektedir^{43,81}. Gelişmiş ülkelerde ise bu oran daha azdır (%1,5 -10). ^{31,37}

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; *Blastocystis*'in en çok görülen parazitler arasında yer aldığı görülmektedir. Aynı zamanda hem çocuklarda hem de erişkin hastalarda prevalansının yüksek olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmalar incelendiğinde yabancı uyruklu lise öğrencileri üzerinde yapılan çalışmada %32.8 oranında en yüksek rastlanan protozoan parazit olarak saptanmıştır.⁸² Yaman ve ark. nın Erciyes Üniversitesi'nde yaptığı bir diğer çalışmada %19.72 ile en yüksek görülen parazit olarak bildirilmiştir.⁸³ Çocuklarda parazit sıklığı ile ilgili yapılan bir çalışmada %5.8 oranında en çok görülen üçüncü parazit olarak belirlenmiştir.⁸⁴ Ege Üniversitesi'nde 2005 yılında %4.96 oranında, 2007 yılında gastrointestinal rahatsızlıklarla hastaneye başvuran çocuk hastalarda %6.5', Denizli' de ki çocuklarda %29.6, Kütahya' da 15 yaş ve üzeri yaş grubunda %1.4 oranında, Van da ilköğretim öğrencilerinde %3.3 oranında en sık görülen dördüncü parazit, Malatya da ilkokul çağındaki çocuklarda %1.4, Hatay da 0-14 yaş grubunda %0.17, Eskişehir de 2003-2007 yılları arasında %7 oranı ile en çok görülen üçüncü parazit, Hakkari de bir ilköğretim okulunda %23.6 ile *G. intestinalis*' ten dan sonra en sık görülen, Van da bir ilköğretim okulunda %14.4 oranında saptandığı ve Kayseri'de bir ilköğretim okulunda %23.5 ile en çok görülen parazit olduğu belirlenmiştir.⁸⁵⁻⁹⁶

Erişkin hastalarda yapılan çalışmalarda; Kayseride Karpuzsekisi havzasında %34.16 ile en yüksek, İzmir de 2003-2004 yılları arasında %44.04 ile en yüksek, İzmir de 2005-2008 yılları arasında yapılan bir başka çalışmada %4.83 ile en yüksek, Köksal ve ark.'nın İstanbul' da 1999-2009 yılları arasında parazitlerin prevalansı ile ilgili araştırmalarında *Blastocystis* spp. %2.1 olarak belirlenmiştir ve Ankara'da bir üniversite hastanesinde %12.2 oranında bulunmuştur.⁹⁶⁻¹⁰¹

Yurt dışından bildirilen yayınlarda çocuklarda; Venezuela' da 5 yaş ve altında olan çocuklarda %47, Filipinler'de %40.7 ile en yaygın parazit enfeksiyonu olduğu, Guetamala da okul çağındaki 5-15 yaş arasındaki çocuklarda %2.8, Peru okul çağındaki çocuklarda %53.3 ile en fazla, Brezilya' da çocuklardan alınan dışkı örneklerinde %34.7 (Gumaries-1993) oranında görülen parazit olarak bildirilmiştir. ¹⁰²⁻¹⁰⁶

İran' da 2004-2006 yılları arasında gastrointestinal şikayetleri olan hastalarda %2.2 , İran da 2006-2008 yılları arasında %0.08 , Tayvan' da yabancı işçiler üzerinde yapılan çalışmada %2.54 ile en yüksek parazit , Arjantin de 2002-2003 yılları arasında %27.2 ile en yüksek , Taylan da %5.6 , İranda 2009-2010 yıları arasında yapılan bir çalışmada %25.53 ile en yüksek , Malezya da %52.3 ile en sık görülen parazit, Afrika, Ortadoğu, Güneydoğu Asya, Doğu Avrupa ve Latin Amerika' dan ABD' ye gelen mültecilerin %20-40 arasında en sık saptanan parazit , Güney Taiwan' da göçmen kadın nüfusunda *Blastocystis* spp. ve parazitlerin 1998-2001 yılları arasında *Blastocystis* spp. %20.4, Brezilya'da 2004 yılında yapılan bir başka çalışmada %26.5 olarak bildirilmiştir. ¹⁰⁷⁻¹¹⁵

HIV pozitif hastalarla yapılan çalışmalarda ise; Kuzey Hindistan da kronik diyaresi olan HIV pozitif hastalarda %8, İran da HIV pozitif hastalarda %4.4 ile *G.intestinalis*' den sonra en sık saptanan parazit, İran' da yapılan bir çalışmada, HIV pozitif hastalarda %22.6 ile *Giardia intestinalis* ile en çok saptanan parazit olarak belirlenmiştir. ¹¹⁶⁻¹¹⁸ İtalyada da HIV pozitif ishali ve ishali olmayan hastalarda %10.77 oranında, Peru da 18 yaş üstünde ki HIV pozitif hem de HIV negatif hastalarda en çok saptanan parazit olarak saptanmıştır. ^{119,120} Bu çalışmaların aksine Brezilya' da yapılan bir çalışmada ise edinilmiş

bağışıklık yetmezliği olan hastalarda %0.5 oranında en az görülen parazit olarak bildirilmiştir. ¹²¹

Kronik ishali olan hastaların %6.52 *Blastocystis* enfeksiyonu belirlenmiştir. ¹²²

IBS' li hastalarda etiyolojik olarak rolü olduğu düşünölmekle birlikte çalışmaların çelişkili sonuçları nedeniyle henüz tartışmalıdır. ⁷³ Yakoob ve ark. IBS' li hastaların % 46, kontrol grubunun ise %7' sinde *Blastocystis* saptamıştır. ¹²³

Ürtikerli hastalarda yapılan çalışmada %11.6 oranında *Blastocystis* saptanmıştır ve ürtikerli olgularda etiyolojik olarak protozooların düşünölmesi gerektiği belirtilmiştir. ¹²⁴

Colombiya' da *Blastocystis*, semptomlu hastaların %69, semptomsuz hastaların %31'in de rastlanılmıştır ve aynı zamanda dönemsel sıklık değeriendirildiğinde ise en sık görölen aydan itibaren sırasıyla Eylül, Kasım, Ağustos, Temmuz, Aralık, Haziran, Ekim ayları olarak gösterilmiştir. ¹²⁵

2.9. KLİNİK BELİRTİLER

Bir çok çalışma gastrointestinal şikayetlerle birlikte X400 büyütmede her sahada beşten fazla *Blastocystis* spp. görölmelerini enfeksiyon olarak kabul etmektedir. ^{59,126} Bazı çalışmalar ise saha

sayımının semptomlarla ilişkili olmadığını bildirmişlerdir.⁵¹ Son zamanlarda gelişen moleküler yöntemler ile birlikte alttür ile semptomatoloji arasındaki ilişkiyi değerlendirmeye yoğunlaşmıştır.⁴² Bununla birlikte dışkı incelemelerinde *Blastocystis* saptanmış pek çok kimsede hiçbir yakınma yokken bazı hastalarda ishal, karın ağrısı, şişkinlik, kusma, iştahsızlık ve bazen de konstipasyon saptanmıştır.⁵¹

Blastocystis spp. saptanan 239 hastada klinik belirtiler sırasıyla karın ağrısı, kabızlık, ishal, ishal ve kabızlık, kusma, yorgunluk, anoreksi, bulantı, baş ağrısı, gıda intoleransı, depresyon ve gazı gibi şikayetler gözlenmiştir.¹²⁸ Hameed ve ark. çalışmasında ise, hastalarda görülen semptomlar ishal, karın ağrısı ve kabızlık olarak tespit edilmiştir.¹²⁹ Gastrointestinal şikayetleri ile birlikte eklem ağrısı ve artriti olan bir olguda dışkı ve sinoviyal sıvısında *Blastocystis* izole edildiği bildirilmiştir.¹³⁰ Son zamanlarda *Blastocystis*' in deri döküntülerine sebep olduğunu gösteren yayınlar bildirilmeye başlamıştır. Alttür 3 ile enfekte bir olguda deri döküntü şikayetleri *Blastocystis* ile ilişkilendirilmiştir.⁵¹

21 yaşında allojenik kemik iliği transplantasyonu yapılan bir hastada dört hafta sonra karın ağrısı, kan ile karışık mukoid dışkı daha ilerleyen zamanlarda da sulu dışkı gözlenmiştir. Hastanın dışkısı mikroskopik olarak incelendiğinde de bol sayıda *Blastocystis* spp.'ye rastlanılmıştır.¹³¹

Blastocystis spp. enfeksiyonu ile ilgili diğer belirtiler fekal lökosit varlığı, eozinofili, deri döküntüleri ve ürtikerdir. Bazı helmintler ve *G. intestinalis*' in yanı sıra *Blastocystis* türlerinin de ürtikere neden olduğuna

dair yayınlar bulunmaktadır ve parazitin tedavisiyle deri semptomları gerilemektedir.²⁸

2.10. BULAŞ VE BULAŞ YOLLARI

Blastocystis' in insan hastalıklarında rolü tartışmalı olmasına rağmen bağırsak ve ekstra-intestinal bozukluklara sebep olan patojen bir parazit olarak kabul edilmektedir.¹³²

Gelişmekte olan ülkelerde ve kötü hijyen koşulları olan yerlerde kist formlarının oral-fekal yol ile bulaştığı düşünülmektedir.^{17,65,133} Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar içme suları, kontamine yiyecek ve hayvanlarla yakın temas ile bulaştığı belirlenmiştir. Kist formlarının da suya dayanıklı olması kist formlarının bulaşta önemli rolü olduğunu düşündürmektedir.¹³⁴⁻¹³⁶ Kontamine yiyecek ve sularla bulaşın olduğunu Nimri ve ark. nın yaptığı çalışmalarda desteklemektedir.^{137,138} Bir çalışmada farelere oral yoldan verilen kist formu takip edilmiş ve sonra çekumda bol miktarda kalın bağırsakta ise az miktarda parazite rastlanılmıştır. Bu da kist formunun enfektif ve bulaşıcı form olduğunu göstermektedir.¹³⁹

Blastocystis' e birçok hayvan türlerinde de rastlanması türleşmesi için yeterli bir kriter olduğu düşündürmektedir. Bununla birlikte yılan, iguana ve kaplumbağadan izole edilen türlere insanlarda da rastlanılmıştır. Hayvanlardan izole edilen türlerin moleküler çalışmalarda insanlar ile aynı olduğu belirlenmiştir ve parazitin bulaşmasında hayvanların rol aldığı görüşünü birçok çalışmada desteklemektedir.

Böylece zoonotik bir etken olduğu belirlenmiştir. ¹³³ Ayrıca bulaşın insandan insana olabildiğide bildirilmiştir. ¹¹

Kathmandu bölgesindeki insanların gıdalarına ve içtikleri sulara maymun dışkısının karışma ihtimalinin yüksek olması, sağlık alt yapısının iyi olmaması, ve yerel halkın olduğu bölgede birçok maymunun yaşaması nedeniyle, Kathmandu çevresinde çocuklar ve maymunlar arasında *Blastocystis* enfeksiyonu bulaşını değerlendirmek için yapılan çalışmada, maymunlarda bulunan türler ile çocuklarda belirlenen türlerin aynı olduğu ve alttür 2' nin enfeksiyonunun maymun kaynaklı olduğu belirlenmiştir. ¹⁴⁰

Bulaşın aile arasında ve yakın temasla olabileceği gibi seksüel ilişkiyle de bulacağı da düşünülmektedir. ¹²⁷

2.11. TANI YÖNTEMLERİ

2.11.1. Mikroskopik tanı;

Blastocystis tanısının rutin laboratuvar için birçok sıkıntısı vardır. Klinisyenlerin parazitin hastalık etkeni olabileceğini düşünmemesinin yanı sıra *Blastocystis* ' in polimorfik yapısı nedeniyle mantarlarla, *Cyclospora* spp. ve yağ globülleri ile karıştırılmasıdır. Aynı zamanda kistik formlarının çok küçük olması tanıda zorluklara yol açmaktadır. ²⁸ Ayrıca *Blastocystis* türlerinin farklı morfolojik şekillerinin ve boyutlarının bulunması tanısında zorluklara neden olmakta, özellikle deneyimsiz kişilerce yapılan mikroskopik incelemede dışkıda lökosit ve mayalarla karıştırılabilmektedir. ¹⁴

Blastocystis tanısında giemsa, hemotoksilen, gram ve Wright' in boyası başarılı olmasına rağmen rutin kullanımda trikrom boyama yöntemi *Blastocystis* tanısında önerilmektedir. ^{23,28}

Blastocystis' in rapor edilmesinde önerilen genel yaklaşım nativ-lugol ile (X400) veya boyalı preparatlarda (X1000) her sahada beş veya daha fazla parazitin görülmesidir. ^{126,142} Fakat son zamanlarda sayı ve semptomlar arasında ilişki olmadığı da düşünülmektedir. ⁴²

2.11.2. Kültür yöntemi:

Blastocystis anaerobik ortamda üreme gösteren bir parazittir⁶¹. Kültürde *Blastocystis*' in üremesi için anaerobik ve 37 °C sıcaklıkta ortam gerekmektedir. Kültür için; Boeck ve Drbohlav'ın yoğunlaştırılmış yumurtalı besiyeri, Dobell and Laidlaw besiyeri (ringer solüsyonu +%20 insan serumu+streptomisin sülfat), Diamond's triptikaz serum monofazik besiyeri, Minimal essential medium (MEM)+%10 at serumlu, Iscove's modified Dulbecco's medium +%10 at serumu kullanılan kültürler arasında belirtilmektedir. ²⁹ % 10 at serumlu % 0,05 asparjinli Ringer solüsyonu kullanılan bir diğer besiyeridir. ¹⁴⁰

Aksenize kültürler için Modifiye Dulbecco besiyeri veya Locke solüsyonlu bifazik yumurtalı besiyeri kullanılmaktadır. Aksenik kültürlerin yapılması moleküler ve biyokimyasal çalışmalar için önem taşımaktadır. Ancak, bakteri ve mantarların uzaklaştırılması için antibiyotik karışımlarının kullanılması uzun süren bir işlemdir. Ayrıca bazı izolatların bakteri olmaksızın canlılıklarını sürdüremediği de bildirilmektedir. ^{18,28}

İn vitro kültür yönteminin dışkıda kistlerin sayıca az olması ve tespit edilmesinin zor olduğu durumlarda tanı için yararlı olacağı

bildirilmektedir. ²⁸ Ayrıca in vitro kültür ve hücre kültür çalışmaları antiparaziter ilaçların değerlendirilmesinde, *Blastocystis*' in sitopatik etkileri, sitokin aktivasyonu, patogeneze, parazitin ilaç direnci ve alttüre göre ilaç tedavisinin araştırılması gibi birçok çalışmada da kullanılmaktadır. ¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

2.11.3. İmmunolojik tanı yöntemleri;

Serolojik yöntemler genellikle araştırma amacıyla kullanılmıştır ve çok sınırlı başarı göstermiştir. ²³

Zierdt ve ark. IFA yönteminde kullanılmak üzere hazırladıkları tavşan antiserumları ile santral cisim, amoeboid ve granüler formların immunfloresan boyamaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda fluoresan boyanın başarı ile kullanılabileceği belirtilmiştir. ²²

İmmunglobülin G (IgG) ve IgA düzeylerini tespit etmekte kullanılan IFA ve ELISA çalışmalarında *Blastocystis* enfeksiyonu geçiren hastalarda IgG titreleri yükseldiği gösterilmiştir. Şu anda mevcut olmamasına rağmen, insanları enfekte eden alttürler kullanılarak elde edilecek monoklonal antikorların, antijen belirleme çalışmalarında yararlı olabileceği düşünülmektedir. ²⁸

2.11.4. Moleküler çalışmalar;

PZR için çeşitli vücut sıvı (serum, vb.) ve sekresyonları, dokular gibi her türlü örnek kullanılabilesine rağmen inhibitörlerden mümkün olduğu kadar kaçınılmalıdır. PZR için en uygun örnekler; etkenin yoğun bulunduğu, elde edilmesi kolay, en az kompleks ve yeterli miktarda

elde edilebilen örneklerdir. Bir örneğin PZR işleminde kullanılabilmesi için DNA veya RNA'nın izole edilmesi yani diğer maddelerden ayrılarak saflaştırılması (pürifikasyon) gerekmektedir.¹⁴⁸ Dışkı örneklerinde de birçok inhibitör bulunduğu ve PZR için bu inhibitörlerin zorluk oluşturduğu ve başarılı birçok PZR' da ise rutin olarak uygulaması zor olan birçok aşama sonrası PZR yapıldığı bildirilmektedir.^{149,150} Dışkıdan *Helicobacter pylori* DNA' sının taranması esasına dayalı çalışmalarda başarı % 25-100 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir. Bu başarı aralığının geniş olması dışkıdaki muhtemel inhibitörlerin varlığına bağlı olduğu düşünülmektedir.¹⁵¹

Blastocystis izolatları arasında genetik çeşitlilik olduğu bilinmektedir ve PZR tabanlı metodların alttür tayini, sınıflandırılma ve filogenetik analizler için etkin bir araç olarak önemli olduğu bildirilmektedir.¹⁵²

Blastocystis' in moleküler yöntemler kullanılarak araştırılması ile ilgili yapılan birçok çalışmada farklı DNA eldesi yöntemleri kullanılmaktadır. Yoshikawa ve ark. birçok çalışmada asparajin içeren Ringer's solüsyonunda üremesini sağladığı parazitlerin DNAzol (MRC, Ohio) ile DNA eldesini kullanırken, birçok araştırmacı ise direk dışkıdan Qiagen Mini Stool Kit' i (Germany) kullanmaktadır.^{140,143,153-155} Ayrıca PZR için kullanılan farklı primerler ve ısı döngü programları yapılan çalışmalarda değişiklik gösterebilmektedir. Yoshikawa ve ark. ile Yan ve ark. alttür belirlemede kullandıkları primerler aynı olmasına rağmen kullanılan ısı döngü programları farklılık göstermektedir.^{45,69}

*Blastocystis'*in tanısında moleküler epidemiyoloji çalışmaları için son derece hassas tarama yöntemleri gerekmektedir.¹⁵⁶ *Blastocystis* için kullanılan moleküler yöntemler RFLP, DNA dizi analizi,

pirosekanslama, subtiplere özgü STS primerleri ile PZR ve SSU rDNA ve SSU rRNA analizleridir. ^{11,13,53,157} *Blastocystis* izolatları arasındaki heterojenite ultrastrüktürel, serolojik, izoenzim, kromozom karyotip ve rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA analiz yöntemleri ile de belirlenmiştir.¹⁵⁸

Blastocystis' in filogenetik ve polimorfik analizi 18S küçük alt birim SSU rRNA genine göre tarif edilmektedir. İzolatların genotiplenmesinde farklı moleküler yöntemler birleştirilerek değerlendirilmiştir. bu yöntemlerde ribozomal DNA'ya ait 1800 bp gen bölgesini hedeflenerek çalışmalar yapılmıştır. ¹³

SDS-PAGE, immunoblotting izoenzim analizleri, RAPD ve RFLP analizleri ile *Blastocystis* suşları arasındaki farklılıklar ve genetik heterojeniteye sahip olduğu belirlenebilmektedir. ¹⁸ Son zamanlarda yapılan gen analizlerinde *Blastocystis*' in dokuz alttürü olduğu belirlenmişken daha yakın yapılan çalışmalarda da primatlar ve toynaklıların her ikisinde de 10. alttürün bulunduğu bildirilmiştir. ¹⁵⁹ Yoshikawa ve ark tarafından geliştirilen yedi alttüre kadar tanımlayabilen STS primerlerinin epidemiyolojik çalışmalar için uygun olduğu kanıtlanmıştır. Aynı zamanda epidemiyolojik çalışmalarda SSUrRNA geninin hızlı taraması için pirosekans tekniğinin yüksek verimlilik gösterdiği fakat bu tekniğin miks enfeksiyonları belirlemede başarılı olmadığı belirlenmiştir. Fakat salgın gibi durumlarda geniş çaplı epidemiyolojik çalışmalar için ve genotiplerin hızlı tespiti için yararlı olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda hızlı tarama ve miks enfeksiyonların tespiti açısından RT-PZR' ın geliştirilmesinin epidemiyolojik çalışmalar açısından avantajlı olacağı bildirilmektedir. ¹⁴⁴

İnsan, tavuk, maymun ve domuzdan elde edilen 12 izolat, sekans tekniği kullanılarak filogenetik analiz yapıldığında; alttür 1' i insan, maymun ve domuzlardan, alttür 2' yi domuz ve maymunlardan, alttür 3' ü maymun ve insanlardan, alttür 6' yı ise tavuktan izole etmişlerdir. ¹⁰ Bazı çalışmalarda insan dışındaki diğer canlılar değerlendirildiğinde; alttür 1 primat, domuz, sığır ve kuşlardan, alttür 2 temelde primatlar olmak üzere bazen domuz ve kuşlardan, alttür 3 primat, domuz ve sığırlardan, alttür 4 kemirgenlerden, alttür 5 domuzlardan, alttür 6 ve 7 ise kuşlardan izole edildiği bildirilmiştir. ²⁷

Genotip ve parazit patogenezi arasında bir ilişki olduğu kanıtlanırsa, gelecekte bir örnek içinde birden fazla genotip varlığının tespitinde ve epidemiyolojik çalışmalar için laboratuvar uygulamalarında PZR yöntemlerinin geniş kullanım bulacağı düşünülmektedir. Aynı zamanda taze dışkıdan PZR analizinin de mikroskopik incelemeye iyi bir alternatif olduğu bildirilmektedir. ²⁸

2.12. TEDAVİ

Blastocystis enfeksiyonlarının tedavisinde iyodokinol ve metronidazol parazitin eradikasyonu için başarılı bulunmuş ve semptomları hafiflettiği belirlenmiştir.⁹ Metranidazolün iyi bir tedavi seçeneği olduğu bilinmektedir. ¹⁶⁰⁻¹⁶³

Tedavide çok etkili veya orta düzeyde etkili furazolidon, kinakrin, ornidazol, tinidazol, trimetoprim-sulfametoksazol, kotrimoksazol ve ketokonazol gibi ilaçlar da bildirilmiştir. ³¹

Refrakter ülseratif koliti olan 122 hastadan *Blastocystis* enfeksiyonu belirlenen altı hastaya 10-14 gün boyunca metronidazol tedavisi uygulandığında hastaların tedaviye yanıt verdiği görülmüştür.¹⁵⁷

Al ve ark. nın anti-paraziter etkili ilaçların *Blastocystis* izolatlarının canlılıkları üzerine etkilerini MTT Testi ile değerlendirdikleri çalışmalarında, farklı izolatların farklı duyarlılık profilleri olduğu belirlenmiştir. Blastosistozda etkin tedavi uygulayabilmek için geliştirilecek standart bir anti-paraziter ilaç duyarlılık testine gereksinim duyulduğu sonucuna varılmıştır.¹⁵⁸

Ülkemizde *Blastocystis*'e karşı antiprotozoal ilaçların etkisinin araştırıldığı çalışmada en etkili ilaçlar sırasıyla ornidazol, metronidazol, azitromisin, itrakonazol, trimetoprim-sülfametoksazol olarak saptanmıştır.⁹²

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1 Cihazlar:

- Santrifüj: Boeco U-32, Almanya
- Vortex: Boeco U-32, Almanya
- Hassas Terazisi: Shimadzu, Libror AEG-220, Almanya
- Ependorf Kurutma Cihazı: LABCONCO CentriVap DNA Concentrater
- Amplifikasyon Cihazı: Gene Amp PZR System 9700
- Gradient PZR Cihazı: Eppendorf Mastercycler Gradient
- Elektroforez: Syngene SYTC/1287
- Jel Yürütme Cihazı: Wealtec ELITE 300

- Jel Yürütme Tankı: Cosmo BioCo. LTD
- Spin: Combi-Spin BIOSAN
- Etüv: Elektro-mag M5040BÇ, Türkiye
- Mikroskop: Olympus CX 31, Japonya
- Mikropipet: Biohit, Finlandiya- Beta Pette
- Soğutucu Dolaplar: Uğur Derin Dondurucu
- Otoklav: Sanyo MLS-3020-U, Japonya
- Mikroskop: Leica CTR DM4000
- Kabin: Metisafe
- Heater: Biosan
- Elektroforez: Cihaz: Uvitec, Bilgisayar: LG
- Mikrodalga: Arçelik MD 565S
- Steril pipet uçları
- Mezür
- Grainer (15ml)
- Şale
- Ependorf, Lam ve lamel

3.1.2. Kimyasallar

- At serumu (56 °C' de 30 dk inaktive edilmiş): Gibco
- L-Asparagin: Merck, Almanya
- Sodyum klorür: Sigma, Almanya
- Potasyum klorür: Sigma, Almanya
- Kalsiyum klorür: Sigma, Almanya
- Serum fizyolojik: İzotonik 1000cc, Polifarma-Türkiye
- İyot kristalleri: Kimetsan, Türkiye
- DNA zol: MRC
- Chromotrope 2R: Himedia, India
- Light gren SF: Himedia, India
- Fosfotungustik asit: Himedia, India
- Glasiyel asetik asit(%100): Merck, Almanya

- Ksilen: Kimetsan, İngiltere
- Civa kloür: Fluka, USA
- Potasyum iyodür: Kimetsan, Türkiye
- Floresan boya (FITC): Rbt anti-*Blastocystis hominis* FITC (Blast-FL)
- İmmersiyon
- Etil alkol (etanol) ve metil alkol (metanol): Riedel-de Haën
- Steril distile su
- Agar: Agarose Low EEO, AppliChem BioChemica
- $MgCl_2$: Finnzymes 50 mM
- Buffer: Hemo KlenTaq Reaction Buffer Pack BO332S, Biolabs
- Taq polimerase: Hemo KlenTaq MO332S, Biolabs
- Ultra saf su: Dr. Zeydanlı
- dNTP: 10 mM, Finnzymes
- Moleküler ağırlık standardı: Biolabs
- Subtip Primerleri: Thermo Electron
- *Blastocystis* Genel Primerleri: Alpha DNA
- Etidyum bromür: SIGMA tablet
- Gliserol: Ambresco
- Orange G: AppliChem
- Tris: Ambresco
- EDTA: Scharlau
- SDS: AppliChem
- Fenol: Riedel de Haen
- Kloroform: Kimetsan
- İzoamil alkol: AppliChem
- Borik asit: Riedel de Haen

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin toplanması:

Çalışmaya Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına 01 Haziran- 30 Ağustos 2011 yılında ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli kliniklerden gastrointestinal sistem şikayetleri olan toplam 350 hastadan rutin inceleme için gönderilen dışkı örnekleri dahil edildi. Örneklerden geniş ağızlı, kuru, temiz ve plastik kapaklı steril toplama kaplarına alındı. Alınan dışkı örnekleri makroskobik yönden ishal ve ishal olmayan olmak üzere iki grup altında değerlendirilerek kayıt edildi. Daha sonra örneklerden nativ-lugol, trikrom boyama, floresan boyama yapıldı, %10 at serumlu %0.05 asparajin içeren ringer solüsyonunda kültüre alındı ve DNA eldesi için -80 °C’ de saklanmak üzere çift ependorfa her dışkı örneğinden ayrıldı.

3.2.2. Direkt mikroskopi

Kullanılan solüsyonların hazırlanması:

Serum Fizyolojik: Üretici firmadan hazır olarak direkt kullanıldı.

Lugol’ un İyot Solüsyonu:

- Potasyum iyodür: 1 gr
- İyot krisalleri: 1.5 gr
- Distile su: 100 ml

Direk mikroskobik inceleme: Direkt mikroskobik incelemede her örnek için serum fizyolojik ve Lugol’ un iyot solüsyonu ile lam ve lamel

arası preparatlar hazırlanarak ışık mikroskopunda (40X objektif) incelendi. Dışkıda parazitin olup olmaması eğer parazit varsa parazitin morfolojisi, saha sayımı ve hücre boyutu yönünden durumu değerlendirildi.

3.2.3. Trikrom boyama yöntemi

Kullanılan solüsyonların hazırlanması:

Trikrom boyası:

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

Karışım renkli cam şişede saklandı.

D'antoni iyot solüsyonu:

- Potasyum iyodür: 1 gr
- İyot kristalleri: 1.5 gr
- Distile su: 100 ml

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

%90' lık asit alkol:

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

Schaudin fiksativ:

- Civa klorür: 9.2 gr
- Distile su: 120 ml

Karışım benmaride 56 °C' de eritildi ve soğumaya bırakıldı, bir gece bekletildikten sonra filtre kağıdı ile süzüldü. Kullanılacak fiksativ; 100 ml civa klorür, 50 ml %95' lik etil alkol ve 2.5 ml gliserin ile karıştırılarak stok solüsyon hazırlandı. Stok kullanılacağı zaman 99.5 ml' ye 0.5 ml glasiyel asetik asit eklenerek kullanıldı.

Diğerleri:

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

Trikrom boyama yöntemi:

1. Dışkı örnekleri lam üzerine eküvyon çubuğu yardımı ile yayıldı.
2. Dışkı yayması tam kurumadan, yanlarından kurumaya başlayınca Schaudin fiksativ içine alındı. Fiksativ içinde 30 dk bekletildi.
3. Fiksativ içinden alınan lam direk D'antoni iyot solüsyonu içerisinde alınarak 1 dk bekletildi.
4. %70'lik metanol içerisinde 1 dk bekletildi.
5. %70'lik metanol içerisinde 1 dk bekletildi.
6. Trikrom boyası içinde 8-10 dk bekletildi.
7. %90' lık asit alkolde 8-10 sn bekletildi.
8. %100' lük metanolde çalkalandı.
9. %100' lük metanolde 30 sn bekletildi.

10. Ksilen içerisinde 1 dk bekletilen örnek ışık almayacak şekilde kurumaya bırakıldı ve mikroskopta incelendi.

Trikrom boyamanın mikroskopik incelemesi: Tüm örnekler boyama sonrası 100X objektifte lamın üzerine immersiyon damlatılarak incelendi ve parazitin olup olmasına göre değerlendirildi.

3.2.4. Direk Floresan Antikor (DFA) yöntemi

DFA yönteminde *Blastocystis* spp. 1 ve 3 subtiplerinin antijenlerine karşı tavşandan elde edilen poliklonal antikorların florescein isothiocyanate (FITC) ile işaretlenmesiyle elde edilen ticari ürün (Antibodies Inc., USA) kullanılarak yapılmıştır.

Kullanılan solüsyonların hazırlanması

PBS: 100 ml distile su içerisinde hazır tabletlerden 1 tane atılarak tabletin erimesi sağlandı. Hazır olan solüsyon otoklavda 1 atm basınç, 121 °C' de 15 dk steril edildi.

FITC çalışma solüsyonu

- 0.5 ml FITC (stok)
- 4.5 ml steril PBS
- 0.5 ml at serumu

Malzemeler karıştırıldıktan sonra folyo ile sarılmış 15 ml plastik tüp içerisinde +4 °C' de saklandı.

DFA yöntemi:

1- 0.2 ml' lik ependorf içerisine 50 µl hazırlanan boyada dışkının her bölgesine batırılarak alınan bir kısım örnek bu süspansiyon içinde homojenize edildi ve ependorfun kapağı kapatıldı.

2- Ependorf 37 °C etüvde bir buçuk saat inkübe edildi.

Değerlendirme: Etüvden çıkarılan örnekten 25 µl lam ve lamel arasına alınarak preparat hazırlandı ve floresan mikroskopunda 488nm dalga boyunda 40X objektifle parazitin olup olmamasına göre değerlendirildi.

3.2.5. Kültür yöntemi

Ringer solüsyonunun hazırlanması

- NaCl: 86 gr
- CaCl: 3.3 gr
- KCl: 3 gr
- L-Asparagin: 5 gr
- Distile su: 1000 ml olacak şekilde eklendi.

Bütün kimyasallar tartılarak cam kap içerisine alınıp 1000 ml' ye distile su ile tamamlandıktan sonra otoklavda (121 °C, 1 atm basınç, 15 dk) steril edildi. Hazırlanan bu solüsyon 10X stok solüsyon (Ringer Solüsyon) olarak +4 °C' de muhafaza edildi. Dışkı örnekleri için kültür yapılacağı zaman 10X' lik stok çözeltiden 1X' lik kültür solüsyonu (Ringer Solüsyon) hazırlanılarak kullanıldı.

Kültür yöntemi:

- 1-** 1X hazırlanan Ringer solüsyonundan her örnek için, 7.2 ml alınarak 15 ml' lik plastik tüp içine alındı.
- 2-** Tüp içerisindeki Ringer solüsyonu içerisine 800 µl at serumu (solüsyon içerisinde %10 at serumu içerecek şekilde) eklendi.
- 3-** Kültür solüsyonu içine şekilli dışkı 2-3 gr, sıvı dışkı örneği ise 200 µl alınarak solüsyon içinde süspanse edildi.
- 4-** Kültürü hazırlanan dışkı örneği 37 °C etüvde 3 gün inkübasyona bırakıldı.
- 5-** Inkübasyon sonrası etüvden alınan kültür örnekleri mikroskopta incelendi.

Kültür yönteminin mikroskopik incelemesi: Kültürün dip kısmındaki dışkı atıklarına dokunmadan, bu tabakanın üzerindeki bölgeden pastör pipeti yardımıyla alınıp lam-lamel arasında preparat hazırlanarak ışık mikroskopunda (40X objektif) incelendi. Parazitin olup olmaması, parazit varsa parazitin morfolojisi, saha sayımı ve hücre boyutu yönünden değerlendirildi.

3.2.6. PZR yöntemi

3.2.6.1. DNA eldesi

- Fenol Kloroform İzamil Alkol yöntemi ile Mobio Ultra Clean® Fecal DNA Isolation Kit (Carlsband/USA), Qiagen Mini Stool Kit (Germany) ve DNAzol® Reagent (MRC, USA) kitleri DNA eldesinde kullanıldı. Bu amaçla nativ-lugol ve trikrom boyama ile *Blastocystis* spp. olduğu belirlenen 10 örnek seçildi. DNA eldesinin kontrolü amacıyla genel *Blastocystis* primerleri ile amplifikasyon yapıp DNA varlığı kontrol edildi. Uygun DNA eldesi yöntemi belirlenerek DNA' lar alttür tayini için kullanıldı.

- DNAzol ile DNA eldesi kültürden yapılırken diğer DNA eldesi yöntemleri -80 °C' de saklanan dışkı örneklerinden yapıldı.

- DNA izolasyonu sonucu genel *Blastocystis* primerleri ile amplifikasyon yapıldı. DNA olup olmaması jel görüntülenmesi ile belirlendi.

- Qiagen Mini Stool Kit PZR sonuçlarının uygun olduğu belirlendi ve Qiagen Mini Stool Kit ile ekstrakte edilen DNA' lar tiplendirildi.

3.2.6.1.1. Qiagen Mini Stool Kit Protokolü

(-80 °C' de saklanan dışkı örnekleri kullanıldı.)

1. 180-220 mg kütleyle sahip dışkı -80 °C' den çıkarılıp 37 °C' de çözülmesi sağlandı ve 2 ml' lik ependorf tüplerine aktarıldı (Herbir örnek için 2 numune çalışıldı).

2. Her bir örnek üzerine 1,4 ml Buffer ASL eklendi. Dışkı örneği tamamen homojenize oluncaya kadar, yaklaşık 1 dk. vortekslendi.

3. Elde edilen karışımı 5 dk. 70°C' de inkübasyona bırakıldı.

4. Örnekler 15 sn. vortekslenip, en yüksek devirde 1 dk. dışkı çökeltisi elde edinceye kadar santrifüjlendi.

5. Üst sıvıdan 1,2 ml alınıp, yemi 2 ml' lik ependorf tüpleri içerisine pipetlendi ve çökelti kısımlarını atıldı.

6. Her bir örnek içerisine 1' er adet InhibitEX Tablet eklenip, sonrasında 1 dk. tablet tamamen eriyene kadar vortekslenip, inhibitörlerin InhibitEX matrix'ine yapışmasını sağlamak için, örnekler 1 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

7. Inhibitörlerin çökmesini sağlamak amacıyla örnekler en yüksek devirde 3 dk. santrifüjlendi.

- 8.** Üstte kalan sıvıdan, 200 µl' yi 1,5 ml' lik yeni ependorf tüpleri içerisine alınıp, çökelti kısımlarını atıldı ve ardından örnekler 3 dk. en yüksek devirde santrifüjlendi.
- 9.** Tüm örneklerin üzerlerine 25' er µl proteinase K eklendi.
- 10.** 200' er µl Buffer AL ekleyip, 15 sn. vortekslendi.
- 11.** 70°C' de 30 dk. inkübe ediniz. Tüp kapaklarındaki damlacıkları önlemek için santrifüjlendi.
- 12.** Lizatların üzerlerine 200' er µl ethanol (%96-100'lük) ekleyip, vorteksleyerek karışmaları sağlandı.
- 13.** Örnek sayısı kadar QIAamp spin kolon çıkartıp, kapak kısımlarını numaralandırıldı. Daha sonra, kapakları kapatıp 12. adımda elde edilen tüm lizat spin kolonlara aktarılıp, en yüksek devirde 1 dk. santrifüjlendi. Alttaki sıvılı kısmı atıp, filtre kısımlarını yeni boş 2 ml'lik collection tüplere aktarıldı (her örnekten çalışılan iki numune tek filtreden süzdürüldü).
- 14.** QIAamp spin kolonların kapaklarını dikkatlice açıp, içlerine 500' er µl AW1 eklendi. Daha sonra kapaklarını kapatıp, en yüksek devirde 1 dk. santrifüjlendi. Alttaki sıvılı kısmı atıp, filtre kısımlarını yeni boş 2 ml' lik collection tüplere aktarıldı.
- 15.** QIAamp spin kolonların kapaklarını dikkatlice açıp, içlerine 500'er µl AW2 ekleyiniz. Daha sonra kapaklarını kapatıp, en yüksek devirde 3 dk. santrifüjlendi.
- 16.** Alttaki sıvılı kısmı atıp, filtre kısımlarını yeni boş 2 ml' lik collection tüplere (sağlanmaz) aktarınız. Daha sonra en yüksek devirde 1 dk. santrifüjlendi.
- 17.** Alttaki sıvılı kısmı atıp, filtre kısımlarını yeni boş 1,5 ml' lik ependorf tüplerine (sağlanmaz) aktarıldı. QIAamp spin kolonların kapaklarını dikkatlice açıp, direkt membranların üzerlerine 200' er µl Buffer AE eklendi. Daha sonra kapaklarını kapatıp, 1 dk. oda ısısında inkübe edildi. Ardından en yüksek devirde 1 dk. santrifüjlenerek, DNA ayrıldı.
- 18.** 1,5 ml' lik tüplerin kapakları kapatılıp -20 °C' de PZR yapıncaya kadar saklandı.

3.2.6.1.2. Mobio İzolasyon Kiti Protokolü:

(-80 °C' de saklanan dışkı örnekleri kullanıldı.)

1. 0.25 gr dışkı örneği 2ml fecal dry bead (2ml lik tüp) tüpüne eklendi.
2. Üzerine fecal bead solüsyonundan 550 µl eklendi.
3. Alt üst edilir sonra 3-4 sn vortekslendi.
4. (S1 solusyonu kontrol edilir eğer çökme varsa ısıtılarak çözünmesi sağlanır.) S1 solusyonundan 60 µl karışıma eklenerek ters yüz edildi. (1kere)
5. 200 µl IRS solusyonu eklenerek tüplerin ağzı sıkıca kapatılıp 3-4 sn vortekslenip 70°C de 5dk bekletildi sonra 3-4 sn vortekslenerek 70°C de 5dk yeniden bekletildi ve son olarak 3-4 sn vortekslendi.
6. Tüpler 10.000 g de 30 sn santrifüjlenip süpernatant temiz 2ml' lik tüpe aktarıldı.
7. Üzerine 250 µl S2 solusyonu eklenerek 5sn vortekslenerek ardından 4 °C de 5 dk bekletildi. Tüpler 10.000 g de 1 dk santrifüjlendi.
8. Pellete dokunmadan dikkatlice 450 µl süpernatant yeni temiz 2ml' lik tüpe aktarıldı ve 900 µl S3 solüsyonu eklenerek 5sn vortekslendi.
9. Tüpün üzerinden 700 µl alınarak filtreli tüpe aktarılır, 10.000g de 1dk santrifüjlenir. Tüpün altında kalan süpernatant dökülür 2ml lik tüpte kalan kısım tekrar filtreli tüpün üzerine eklenerek 10.000 g de 1 dk santrifüjlenir. Tüpün altında kalan süpernatant döküldü.
10. Filtreli tüpün üzerine S4 solüsyonu eklenerek 30 sn 10.000 g de santrifüjlenerek, tüpün altında kalan süpernatant döküldü ve 1dk 10.000 g de yeniden santrifüjlenerek ve filtreli kısım dikkatlice yeni 2ml' lik tüpe yerleştirildi.
11. Beyaz filtre membranının orta kısmından 50 µl S5 solüsyonu eklenerek 30 sn 10.000 g de santrifüjlendi. Daha sonra filtre atılarak DNA S5 solüsyonu içerisinde hazır hale gelmiştir. DNA' lar -20°C PZR için saklandı.

3.2.6.1.3. DNAzol Protokolü:

- 1.** Kültürün  st kısmı orta tabakaya gelmeyecek şekilde dökülür ve kültür tabakasının orta kısmı toplanıp 4 katlı bezden s z l rek temiz grainer içine alındı.
- 2.** Temiz grainer içine alınan örnek üzerine 8-10 ml olacak kadar serumsuz 1X Ringer solüsyonu eklenerek 400 g' de 10 dk santrifüj edildi.
- 3.** Süpernatant kısmı d k l rek pellet üzerine 8-10 ml 1X Ringer solüsyonu eklenerek tekrar 400 g' de 10 dk santrifüj edildi.
- 4.** Süpernatant kısmı atılarak 1 ml kadar dip kısım bırakıldı ve 1.5 ml' lik ependorf içerisine alınarak maximum devirde (14.000 rpm) 2 dk santrifüjlendi.
- 5.** Örneğin süpernatant kısmı atılarak pellet üzerine 1 ml DNAzol eklendi. (DNA eldesi yapana kadar olan sürede +4  C' de ependorfların ağzı parafilmlelenerek bekletildi.)
- 6.** DNA eldesi için ependorflar maximum hızda 30 dk santrifüj edildi.
- 7.** Tüpteki sıvının üst kısmında görülen tabakadan 0.5 ml sıvı toplanıp ayrı bir tüpe koyuldu.
- 8.**  zerine %70 etanol eklenerek 10 dk manuel olarak ependorflar karıştırıldı ve 1 dk maximum hızda santrifüj edildi.
- 9.** %70 etanol ile tekrar yıkama, 1 dk maximum hızda santrifüj edildi.
- 10.** %95 etanol ile yıkama, 1 dk maximum hızda santrifüj edildi.
- 11.** Son yıkama sonrası ependorf içerisindeki sıvı boşaltılarak ependorflar vakum santrifüj içerisinde 5 dk santrifüj edildi (Pellet tamamen kurutulmadı)
- 12.** Kurutulan ependorflar içerisine ultrapure distile su eklenerek vortekslenip, 1 gece oda ısısında bekletildi.
- 13.** DNA miktarları nanodrop cihazında ölçüldü ve -20  C' de saklandı.

3.2.6.1.4. Fenol Kloroform İzoamil Alkol Yöntemi ile DNA eldesi Protokolü

Lökosit Parçalama Tamponu (LPT) Hazırlanışı

- Tris: 10 mM
- EDTA: 10 mM
- Sodium Klorid: 50 mM
- SDS: %2

50 ml FenoL-Kloroform-İzoamilkol (25:24:1) Hazırlanışı

25 ml fenol: 24 ml kloroform: 1 ml izoamil alkol karıştırılarak hazırlandı. Hazırlandıktan sonra kabın ağzı sıkı bir şekilde kapatılıp +4°C'de saklandı.

1. Dışkı örneğinden bir miktar alınıp ve 100µl serum fizyolojik içeren ependorfa aktarıldı.
2. Üzerine 100µL lökosit parçalama tamponu ve 10 µL Proteinaz K (100mg/ml) eklenerek 65°C'de 2 saat inkübe edildi.
3. Ardından 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek proteinaz K denatüre edildi.
4. 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Üst sıvı temiz tübe alındı ve çökelek kısım atıldı.
6. Üzerine 150 µL FKİ (25:24:1) eklenerek vortekslendi.
7. 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant dipteki bulanık çökeltiye dokunmadan, temiz tüplere alındı.
8. Üzerine 200 µL KI (24:1) eklenir ve vortekslendi.

9. 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant dipteki bulanık çökeltiye dokunmadan, temiz tüplere alındı.
10. Her 50 µL süpernatant için 125 µL (1:2.5) %100'lük etil alkol eklendi. Her 50 µL örnek için 125 µL etil alkol eklendi.
11. 14.000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
12. Bu aşamada süpernatant dökülerek, çökeleğe 200 µL %70'lik etil alkol eklendi. Yıkama ikinci defa tekrar edildi.
13. 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
14. Ependorf içerisindeki alkol, ependorfta hiç damla kalmayacak şekilde atıldı ve vakum santrifüjde kurutuldu.
15. Üzerine 30 µL Tris ve EDTA (TE) ile hazırlanan örnek çözme tamponu eklendi.

3.2.6.2. PZR Optimizasyonu:

Alttür tespiti için kullanılan STS primerleri (Tablo1) ve genel *Blastocystis* primerleri (Tablo 2) önce 100 pmol/µl olacak şekilde sulandırıldı. Daha sonra "Tm" dereceleri göz önüne alınarak belirlenen derecelerde gradient PZR yapıldı, bağlanma dereceleri her primer için belirlendi ve DNA' lar amplifiye edildi. Kültür pozitif örneklerin – 80 °C' ye ayrılmış dışkısından izole edilen DNA' lar alttür tayini için kullanılmıştı. Genel *Blastocystis* primerleri ile *Blastocystis*' in 1800 bp' lik rDNA bölgesinin 1100 bp' lik gen bölgesi çoğaltıldı.

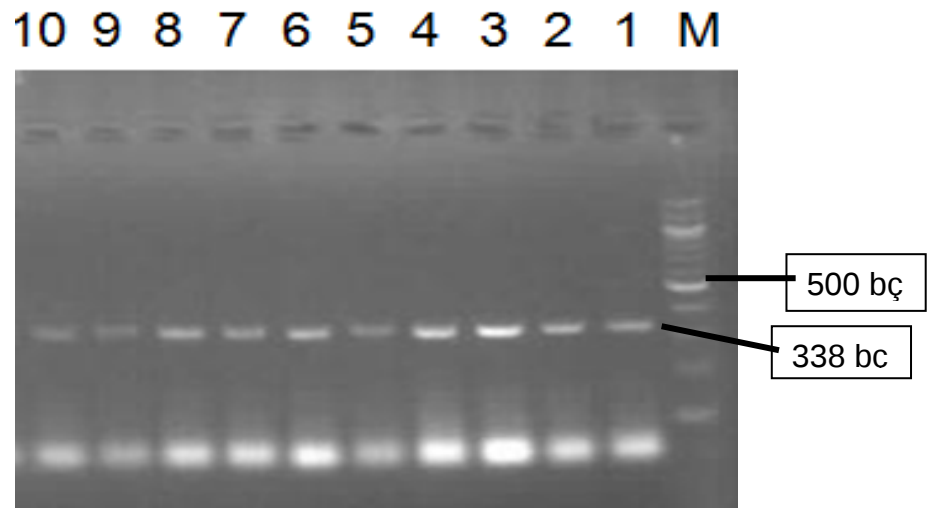
Tablo 1: Alttür belirlenmesinde kullanılan primerler ve yeni sınıflandırmaya ait alttür isimlendirmesi¹³

STS primer çifti	Alttür	Amplikon büyüklüğü (bç)	Primer ve sekanslar	Primer kaynağı	Genbank no
B83	ST1	351	F: GAAGAACTCTCTGACGATGA R: GTCCAAATGAAAGGCAGC	Nand II	AF166086
B155	ST7	650	F: ATCAGCCTACAATCTCCTC R: ATCGCCACTTCTCCAAT	B	AF166087
B227	ST3	526	F: TAGGATTTGGTGTGTTGGAGA R: TTAGAAGTGAAGGAGATGGAAAG	HV93-13	AF166088
B332	ST6	338	F: GCATCCAGACTACTATCAACATT R: CCATTTTCAGACAACCACTTA	HJ96AS-I	AF166091
B340	ST2	704	F: TGTTCTTGTGTCTTCTCAGCTC R: TTCTTTCACACTCCCGTAT	HJ96-I	AY048752
B336	ST5	317	F: GTGGGTAGAGGAAGGAAAACA R: AGAACAAGTAGATGAAGTGAGAT	SY94-3	AY048751
B337	ST4	487	F: GTCTTTCCCTGTCTATTCTGCA R: AATTCGGTCTGCTTCTCTG	RN94-9	AY048750

Tablo 2: Genel *Blastocystis* primerleri⁶⁹

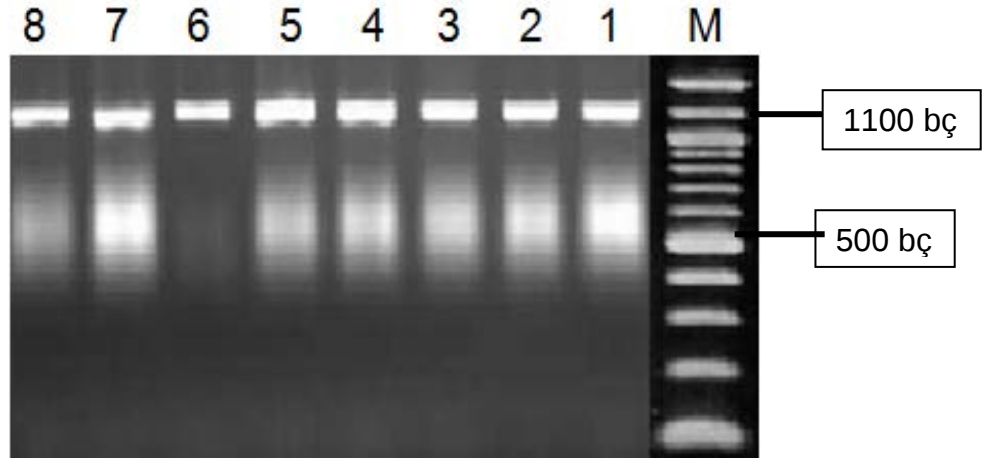
	Amplikon büyüklüğü	Primer
Genel <i>Blastocystis</i> primer	1100 bç	F: 5' GGAGGTAGTGACAATAAATC R: 5' ACTAGGAATTCCTCGTTCATG

Alttür belirlemek için kullanılan primerlerin bağlanma derecelerini belirlemek için, 55 °C, 55.2 °C, 55.7 °C, 56.6 °C, 57.6 °C, 59.1 °C, 60.5 °C, 61.8 °C, 63.1 °C, 64.2 °C, 65 °C ve 65.5 °C derecelerinde amplifiye edildi ve jelde yürütülen DNA' lar parlaklık derecelerine göre bağlanma dereceleri belirlenerek PZR protokolü oluşturuldu (Resim 2).



Resim 2: STS primerlerle yapılan gradient PZR ile alttür 6 suşunun jel elektroforez görüntüsü

Genel *Blastocystis* primerleri için kullanılan primerin bağlanma derecelerini belirlemek için; 51.6 °C, 52.7 °C, 54 °C, 55.4 °C, 56.8 °C, 59.2 °C, 60 °C, 60.4 °C derecelerinde amplifiye edildi ve jelde yürütülen DNA' lar parlaklık derecelerine göre bağlanma dereceleri belirlenerek PZR protokolü oluşturuldu (Resim 3).



Resim 3: Genel *Blastocystis* primerleri ile amplifiye edilen *Blastocystis* DNA'sının jel elektroforez görüntüsü

Primerler için belirlenen bağlanma dereceleri

ST1, ST3 ve ST5' in bağlanma derecesi 62 °C, ST2, ST4, ST6 ve ST7' nin bağlanma derecesi 61 °C, *Blastocystis* genel primerleri için ise 54 °C olarak belirlenmiştir.

Hemo Klen Taq PZR protokolü

1X Hemo Klen Taq Reaction Buffer: 60 mM Tricine, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 3.5 mM MgCl₂, %6 gliserol

- 5X Hemo Klen Taq Reaction Buffer: 5 µl
- Su: 13.5 µl
- dNTP: 0.5 µl
- Primer F: 0.75 µl
- Primer R: 0.75 µl
- Taq polimeraz: 2 µl
- DNA: 2.5 µl
- Toplam reaksiyon tampounu: 25 µl

Pozitif kontroller kullanılarak DNA ve Hemo Klen Taq polimeraz'ın PZR tamponu içerisinde belirtilen yukarıdaki miktarları yeniden belirlemiştir. Farklı miktarlarda DNA ve Taq polimeraz ile amplifiye edilen pozitif kontrollerin elektroforezdeki bant görüntüleri değerlendirilmiştir. Belirlenen miktarlar ile örnekler amplifiye edilmiştir. Bu optimizasyon sonrasında alttür belirlenmesi için aşağıdaki protokol kullanılmıştır.

Klen Taq PZR protokolü 1X: (Modifiye protokol)

- 5X Klen Taq Reaction Buffer: 5 µl
- Su: 15.5 µl
- dNTP: 0.5 µl
- Primer F: 0.75 µl
- Primer R: 0.75 µl
- Taq polimeraz: 0.5 µl
- DNA: 2 µl
- Toplam reaksiyon tamponu: 25 µl

PZR Isı Döngü Programı (STS primerleri için)

94 °C: 3dk

94 °C: 30 sn

61 °C (ST2-4-7) /62 °C (ST1-3-5)

72 °C: 1dk

72 °C: 7dk

} 30 döngü

PZR Isı Döngü Programı (Genel *Blastocystis* primerleri için ısı döngüsü)

94 °C: 5 dk

94 °C: 1 dk

54 °C: 1 dk

72 °C: 1.5 dk

72 °C: 10 dk

} 35 döngü

3.2.6.3. Jel Elektroforez Yöntemi

Jel Hazırlama

5X TBE hazırlanışı:

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

Yükleme Tamponu (Orange G)

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

Moleküler ağırlık standardı

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

Yöntem

1. Jel yürütme tamponu hazırlamak için; 20 ml EDTA ve tartılan kimyasallar 1000 ml' lik şişe içerisine alındı ve üzeri 1000 ml' ye kadar distile su ile tamamlanmıştır. Jel hazırlamak ve tank içerisinde jel yürütürken kullanmak için hazırlanan 5X TBE' den 1X TBE hazırlanmıştır. (200 ml 5X TBE+ 800 ml distile su)
2. Jel için; 100 ml 1X TBE içine 1.5 g agaroz tartıldı ve karışım içerisindeki agaroz kristalleri çözülünceye kadar mikrodalgada ısıtılmıştır. Daha sonra içerisine 3 µl etidyum bromür eklenerek taraklı tanka döküldü ve 30 dk jelin donması için bekletilmiştir. Donan jel içerisinde taraklar çıkarılarak yürütme tankına jel yerleştirilmiştir.
3. Tankın içi jel yüzeyini kaplayacak kadar 1X TBE tamponu ile doldurulmuştur.
4. Amplifiye edilen DNA' lar DNA: 6 µl, yükleme tamponu: 2 µl olacak şekilde ayrı bir yerde pipetajlanıp totalde 6 µl olacak şekilde jel içindeki kuyulara yüklenmiştir.
5. DNA'ların belirlemesi için 4 µl marker DNA örnekleri gibi ilk kuyuya yüklenmiştir. Yüklenen DNA' lar tank içinde 60 Amper, 100 Volt da 30-35dk yürütülmüştür.
6. Agaroz jel tanktan çıkarılarak jel görüntüleme sisteminde UV ışığı altında translüminatörde bantlar incelenmiştir.

Verilerin analizi SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $p < 0.05$ altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizlerde uygun veriler, tanımlayıcı istatistikler (sayı, yüzde olarak) olarak sunulmuştur. Gruplar arasındaki farkın saptanmasında Mc Nemar ki-kare testi kullanılmıştır. Testlerin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplanmıştır. Duyarlılık hesaplanmasında yeni test ile protozoon saptanan örnek sayısı/referans test ile saptanan örnek sayısı ve özgüllük hesaplanmasında yeni test ile protozoon saptanmayan örnek sayısı/ referans test ile protozoon saptanmayan örnek sayısı formülü kullanılmıştır. (Duyarlılık: $a/a+c$, Özgüllük: $d/b+d$) (Tablo 3) Testler arasındaki tutarlılık Kappa testi ile değerlendirilmiştir. 0,40-0,59 arası orta derecede, 0,60-0,79 arası güçlü/yüksek derecede, 0,80 ve üzeri ise çok yüksek /güçlü derecede tutarlı kabul edilmiştir.

Tablo 3: Duyarlılık ve özgüllük hesaplama

		Referans test	
		+	-
Yeni test	+	a	b
	-	c	d
Toplam		a+c	b+d

Bu çalışma metodolojik bir çalışmadır.

Çalışmanın kısıtlılıkları: Kültürde *Blastocytis* üreyen fakat PZR ile tiplendirilemeyen örnekler için, alttür tayininde yedi çift primer kullanılmış olup günümüzde insanda enfeksiyon etkeni olarak saptanmış diğer üç alttür araştırması yapılamamıştır. Aynı zamanda PZR sonucunda alttür tayini yapılamayan örnekler için yeni alttür olup olmadığının belirlenmesi amacıyla DNA dizi analizi yöntemi de kullanılamamıştır.

4. BULGULAR

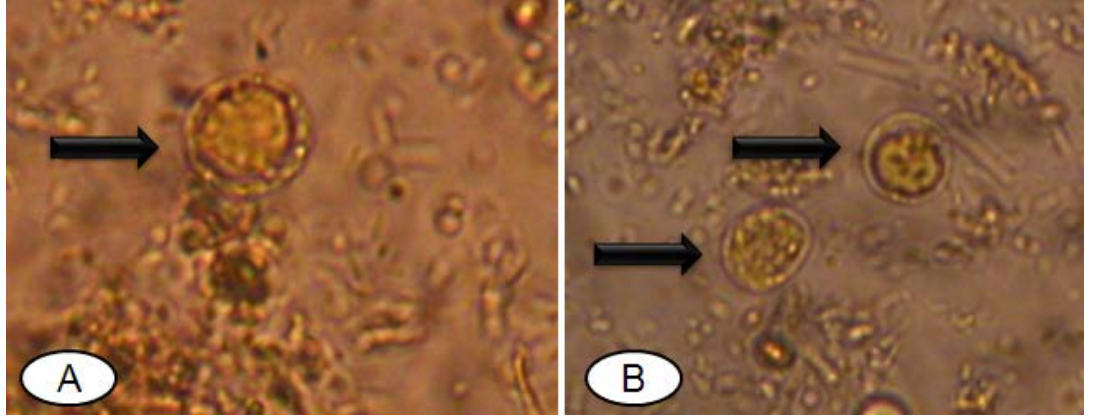
Bu çalışmada 350 hastanın dışkı örnekleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen 350 hastanın 157'si (%45) ishal, 193'ü (%55) ishal olmayan hastalardır (Tablo 4).

Tablo 4: Makroskobik değerlendirmeye göre hasta örneklerinin dağılımı

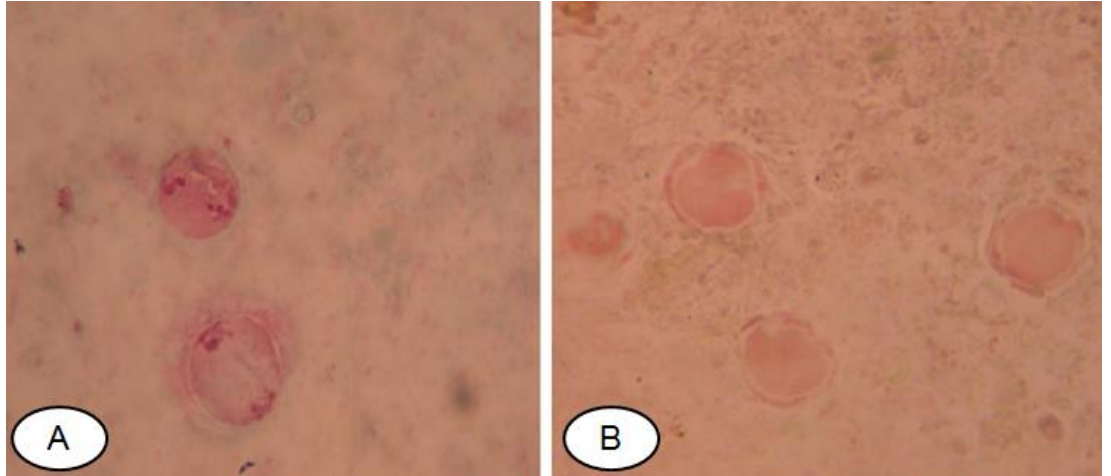
Makroskobik değerlendirme	Örnek sayısı	Yüzde*
İshal	157	45
İshal olmayan	193	55
Toplam	350	100

* :Yüzdelere satır yüzdesidir.

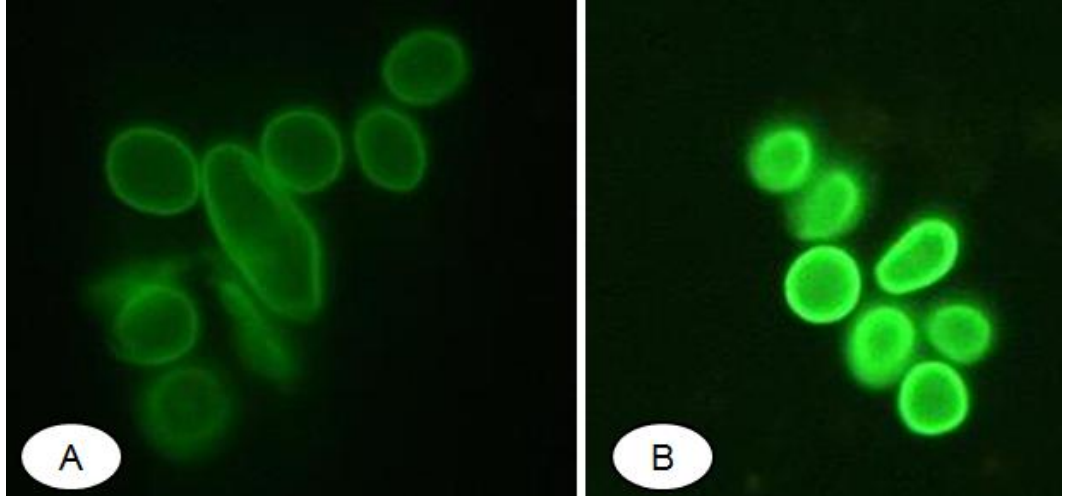
Tüm dışkı örnekleri nativ-lugol, floresan boyama ve trikrom boyama yöntemleri ile mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. (Resim 4,5,6,7,8)



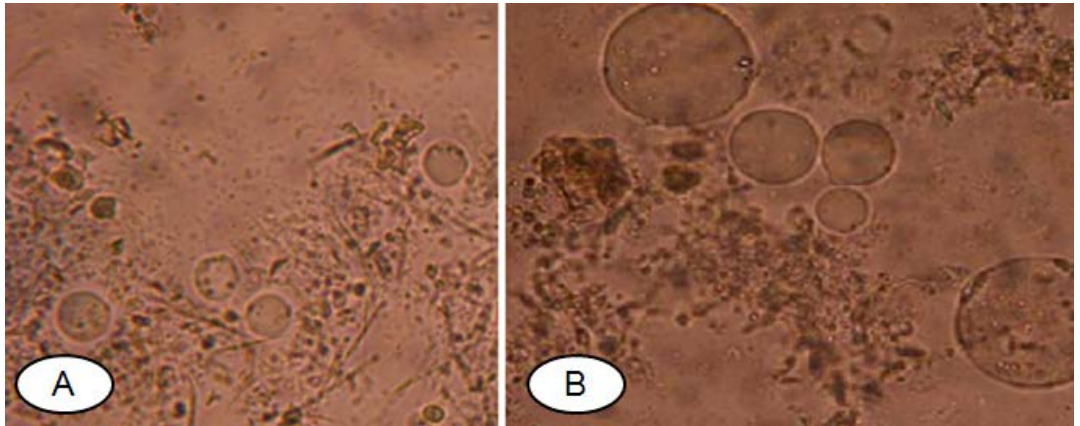
Resim 4: *Blastocystis* kistlerinin nativ-lugol preparat görüntüsü (40X büyütme) A,B: kist form



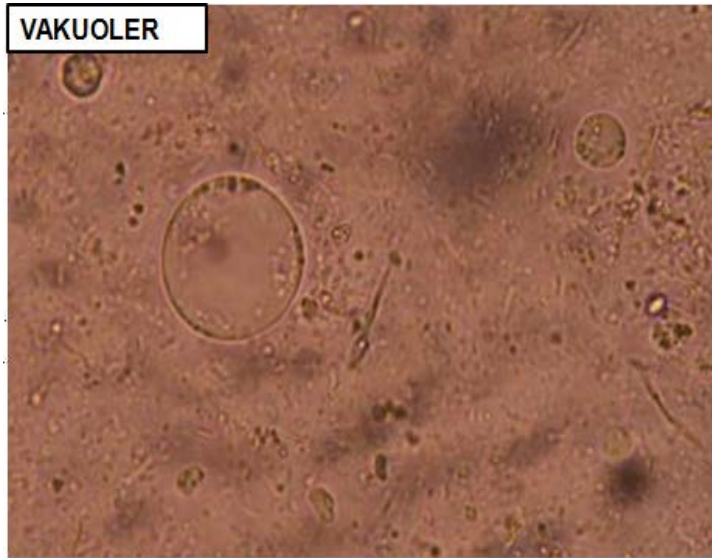
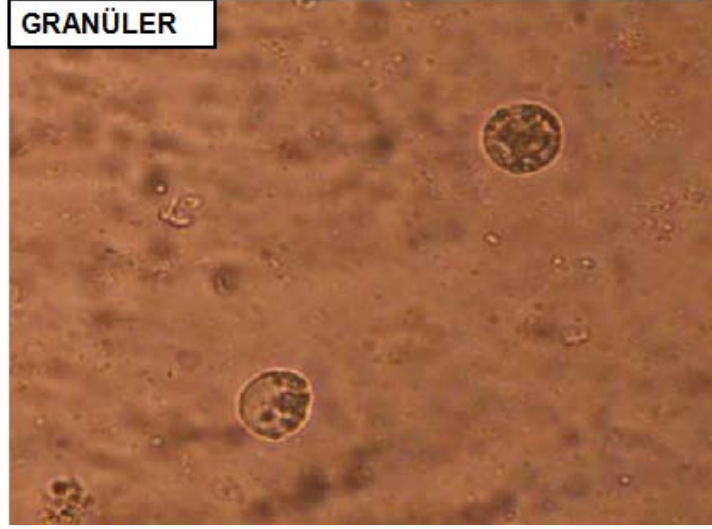
Resim 5: *Blastocystis* trikrom boyama preparat görüntüsü (100X büyütme) A: granüler form, B: vakuoler form



Resim 6: *Blastocystis*'in DFA yöntemindeki preparat görüntüsü (40X büyütme)



Resim 7: *Blastocystis* örneklerinde farklı hastalardan alınan kültürlerin mikroskopik incelemesinde farklı boyutlardaki *Blastocystis* görüntüleri (40X büyütme)



Resim 8: Kùltür mikroskobisinde farklı formlarda *Blastocystis* görüntüsü (40X büyütme)

Ayrıca tüm dışkı örneklerinin *Blastocystis* için Ringer solüsyonuna kùltür ekimi yapılmıştır. Kùltür pozitif bulunan örneklerin -80 °C' de ayrılmış dışkı numunelerinden DNA eldesi yapılmıştır. Elde edilen DNA' ların STS primerleri kullanılarak PZR yöntemiyle alttùr tayinleri belirlenmiştir.

Dışkı örnekleri incelenen 350 hastanın 42' sinde (%12) nativ-lugol incelemede, 58' inde (%17) trikrom boyamada, 66' sında (%19) floresan boyamada, 66' sında (%19) kültürde *Blastocystis* spp. saptanmıştır. Ringer solüsyonu ile kültür yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde *Blastocystis* saptanmasında direk nativ-lugol ve kültür yöntemlerinin arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Mc Nemar's Ki-kare test, $p < 0.001$) (Tablo 5).

Tablo 5: *Blastocystis* saptanmasında direk nativ-lugol ve kültür inceleme yöntemlerinin karşılaştırılması

		Kültür					
		YOK		VAR		TOTAL	
		sayı	yüzde*	sayı	yüzde*	sayı	yüzde*
Nativ-lugol	YOK	284	% 92.5	23	%7.5	307	100
	VAR	0	%0	43	%100	43	100
	TOTAL	284	% 81.1	66	% 18.9	350	100
		**p = 0,0001					
TUTARLILIK		Kappa= 0,752 p= 0,0001					

* :Yüzdeleer satır yüzdesidir. ** : Mc Nemar ki kare testi

Direk nativ-lugol ile yapılan incelemede *Blastocystis* saptanmayan örneklerin %7,5' da, saptanan örneklerin %100' de kültür yöntemi ile *Blastocystis* saptanmıştır. Direk NL yöntemi ile kültür yöntemi arasında *Blastocystis* saptanma durumları açısından istatistiksel olarak fark anlamlı olarak saptanmıştır. ($p < 0,05$) Nativ-lugol ve kültür yöntemi arasında güçlü derecede tutarlılık saptanmıştır (Kappa= 0.752) .

Direk NL yönteminin RL kültür yöntemine göre duyarlılığı %65, özgüllüğü ise %100 olarak saptanmıştır. (Tablo 5)

Blastocystis saptanmasında trikrom boyama ve RL kültür inceleme yöntemlerinin karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmıştır (Mc Nemar's Ki-kare test, $p=0.08$) (Tablo 6).

Tablo 6: *Blastocystis* saptanmasında trikrom boyama ve kültür inceleme yöntemlerinin karşılaştırılması

		Kültür					
		YOK		VAR		TOTAL	
		sayı	yüzde*	sayı	yüzde*	sayı	yüzde*
Trikrom boyama	YOK	284	% 97.3	8	% 2.7	292	100
	VAR	0	%0	58	%100	58	100
	TOTAL	284	% 81.1	66	% 18.9	350	100
		**p= 0,008					
TUTARLILIK		Kappa= 0.922 p= 0,0001					

* :Yüzdeleer satır yüzdesidir. **: Mc Nemar ki kare testi

TB ile yapılan incelemede *Blastocystis* saptanmayan örneklerin % 2.7' sinde, saptanan örneklerin % 100' ünde RL kültür yöntemi ile *Blastocystis* saptanmıştır. TB ve RL yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. ($p < 0,05$) TB ile RL yöntemlerinin arasında çok güçlü derecede tutarlılık saptanmıştır (kappa= 0.922). TB yönteminin RL kültür yöntemine göre duyarlılığı %88, özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır. *Blastocystis* saptanmasında DFA yöntemi ile RL kültür inceleme yöntemlerinin karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmamıştır (Mc Nemar's Ki-kare test, $p=1,00$) (Tablo 6).

Tablo 7: *Blastocystis* saptanmasında floresan boyama ve kültür inceleme yöntemlerinin karşılaştırılması

		Kültür					
		YOK		VAR		TOTAL	
		sayı	yüzde*	sayı	yüzde*	sayı	yüzde*
DFA yöntemi	YOK	284	% 100	0	% 0	284	100
	VAR	0	%0	66	%100	66	100
	TOTAL	284	% 81.1	66	% 18.9	350	100
		**p= 1,00					
TUTARLILIK		Kappa= 1,00 p= 0,0001					

* :Yüzdelere satır yüzdesidir. **: Mc Nemar ki kare testi

DFA yöntemi ile *Blastocystis* saptanan örneklerin tümünde RL kültür yöntemi ile *Blastocystis* saptanmıştır. DFA yöntemi ile RL kültür yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. ($p < 0,05$) DFA yöntemi ve RL kültür yöntemi arasında çok güçlü derecede istatistiksel olarak tutarlılık saptanmıştır (Kappa= 1.0). DFA yönteminin RL kültür yöntemine göre duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır.

Blastocystis saptanmasında direk nativ-lugol ve trikrom boyama yöntemlerinin karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmıştır (Mc Nemar's Ki-kare test, $p=0,0001$) (Tablo 8).

Tablo 8: *Blastocystis* saptanmasında direk nativ-lugol ve trikrom boyama yöntemlerinin karşılaştırılması

		Trikrom boyama					
		YOK		VAR		TOTAL	
		sayı	yüzde*	sayı	yüzde*	sayı	yüzde*
Nativ-lugol	YOK	292	% 95.1	15	% 4.9	307	100
	VAR	0	%0	43	%100	43	100
	TOTAL	292	% 83.4	58	% 16.6	350	100
		**p= 0,001					
TUTARLILIK		Kappa= 0,827 p= 0,0001					

* :Yüzdeleer satır yüzdesidir. **: Mc Nemar ki kare testi

Direk NL ile yapılan incelemede *Blastocystis* saptanmayan örneklerin % 4.9' unda, saptanan örneklerin %100' ünde TB yöntemi ile *Blastocystis* saptanmıştır. Direk NL yöntemi ile TB yöntemi arasında *Blastocystis* saptanma açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. ($p < 0,05$) NL ile TB yöntemi arasında çok güçlü derecede tutarlılık saptanmıştır (Kappa= 0.827). Direk nativ-lugol yönteminin trikrom boyama yöntemine göre duyarlılığı %74, özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır.

Blastocystis saptanmasında direk nativ-lugol ve DFA yöntemlerinin karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmıştır (Mc Nemar's Ki-kare test, $p=0,0001$) (Tablo 9).

Tablo 9: *Blastocystis* saptanmasında direk nativ-lugol ve floresan boyama yöntemlerinin karşılaştırılması

		DFA yöntemi					
		YOK		VAR		TOTAL	
		sayı	yüzde*	sayı	yüzde*	sayı	yüzde*
Nativ-lugol	YOK	284	% 92.5	23	% 7.5	307	100
	VAR	0	%0	43	%100	43	100
	TOTAL	284	% 81.1	66	% 18.9	350	100
		**p= 0,0001					
TUTARLILIK		Kappa= 0,752 p= 0,0001					

* :Yüzdeleer satır yüzdesidir. **: Mc Nemar ki kare testi

Direk NL ile yapılan incelemede *Blastocystis* saptanamayan örneklerin % 7.5 ' da, saptanan örneklerin% 100' ünde DFA yöntemi ile *Blastocystis* saptanmıştır. Direk NL ile DFA yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. ($p< 0,05$) Direk NL ile DFA yöntemi arasında güçlü derecede istatistiksel olarak anlamlı tutarlılık saptanmıştır (Kappa=0.752). Direk nativ-lugol yönteminin DFA yöntemine göre duyarlılığı %65, özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır.

Blastocystis saptanmasında trikrom boyama ve floresan boyama yöntemlerinin karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmıştır (Mc Nemar's Ki-kare test, $p=0,0001$) (Tablo 10).

Tablo 10: *Blastocystis* saptanmasında trikrom boyama ve floresan boyama yöntemlerinin karşılaştırılması

		DFA yöntemi					
		YOK		VAR		TOTAL	
		sayı	yüzde*	sayı	yüzde*	sayı	yüzde*
Trikrom boyama	YOK	284	% 97.3	8	% 2.7	292	100
	VAR	0	%0	58	%100	58	100
	TOTAL	284	% 81.1	66	% 18.9	350	100
		**p= 0,008					
TUTARLILIK		Kappa= 0,922 p= 0,0001					

* :Yüzdeleer satır yüzdesidir. **: Mc Nemar ki kare testi

TB yöntemi ile yapılan incelemede *Blastocystis* saptanmayan örneklerin % 2.7' sinde, saptanan örneklerin % 100' ünde FL yöntemi ile *Blastocystis* saptanmıştır. TB ile FL yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. ($p < 0,05$) TB ile FL yöntemi arasında çok güçlü derecede istatistiksel olarak anlamlı tutarlılık saptanmıştır (Kappa= 0.922). Trikrom boyama yönteminin floresan boyama yöntemine göre duyarlılığı %88, özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır.

Dışkı örneklerinin makroskopilerine göre alttör 3 saptanmasının değerlendirilmesinde anlamlı fark saptanmıştır (Mc Nemar's Ki-kare test, $p=0,0001$). Ancak istatistiksel olarak tutarlılık bulunmamıştır (Kapa= 0,002) (Tablo 11).

Tablo 11: Dışkı örneklerinin makroskopilerine göre Altör 3 saptanmasının değerlendirilmesi

		ALTTÖR 3					
		YOK		VAR		TOTAL	
		sayı	yüzde*	sayı	yüzde*	sayı	yüzde*
MAKROSKOPİ	İSHAL	150	% 95.5	7	% 4.5	157	% 100
	İSHAL OLMAYAN	184	% 95.3	9	% 4.7	193	%100
	TOTAL	334	% 95.4	16	% 4.6	350	% 100
		**p= 0, 0001					
MAKROSKOPİ VE ALTTÖR SAPTANMASI AÇISINDAN TUTARLILIK		Kapa= 0,002 p= 0,927					

* :Yüzdeleer satır yüzdesidir. ** : Mc Nemar ki kare testi

Makroskobilerine göre alttör 3 saptanma açısından incelenen örneklerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. ($p< 0,05$) Ancak istatistiksel olarak anlamlı tutarlılık saptanmamıştır.

Dışkı örneklerinin makroskopilerine göre miks alttür saptanmasının değerlendirilmesinde anlamlı fark saptanmıştır (Mc Nemar's Ki-kare test, $p=0,0001$). Ancak istatistiksel olarak tutarlılık bulunmamıştır (Kapa= 0,009) (Tablo 12).

Tablo 12: Dışkı örneklerinin makroskopilerine göre miks alttür saptanmasının değerlendirilmesi

		MİKS ALTTÜR					
		YOK		VAR		TOTAL	
		sayı	yüzde*	sayı	yüzde*	sayı	yüzde*
MAKROSKOPİ	İSHAL	152	% 96.8	5	% 3.2	157	% 100
	İSHAL OLMAYAN	185	% 95.9	8	% 4.1	193	%100
	TOTAL	337	% 96.3	13	% 3.7	350	% 100
		**p= 0,0001					
MAKROSKOPİ VE MİKS ALTTÜR SAPTANMASI AÇISINDAN TUTARLILIK		Kapa= 0,009 p= 0,637					

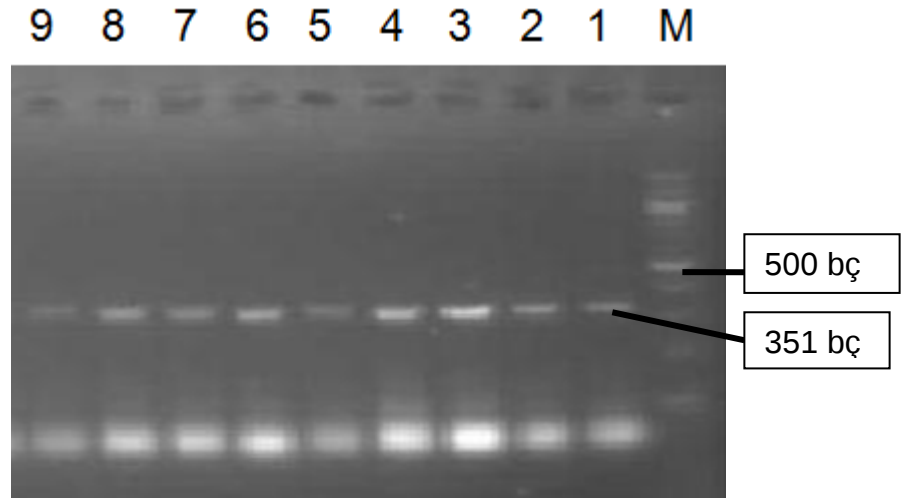
* :Yüzdeleer satır yüzdesidir. ** : Mc Nemar ki kare testi

Makroskobilerine göre miks alttür saptanması açısından incelenen örneklerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır.($p< 0,05$) Ancak istatistiksel olarak anlamlı tutarlılık saptanmamıştır.

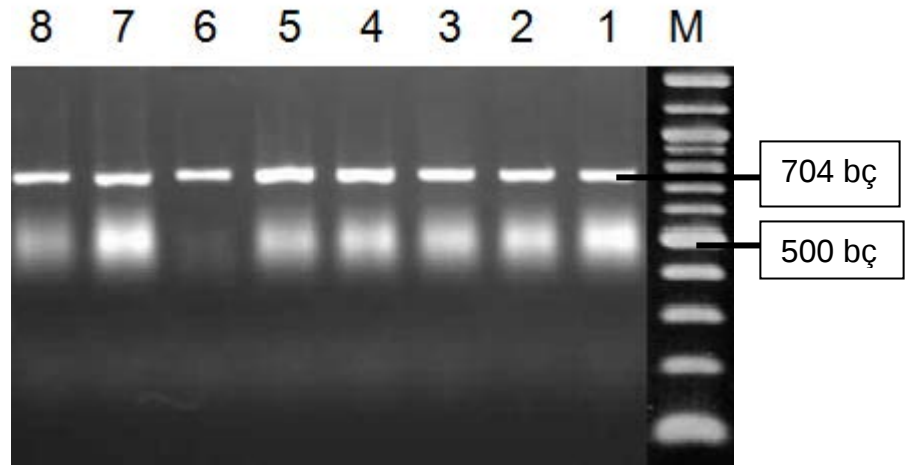
İncelenen 350 dışkı örneğinde en çok saptanan alttür ST3 (%31.5) olarak belirlenmiştir. Alttür değerlendirilmesinde 66 *Blastocystis* pozitif dışkı örneğinden 38' si (% 57.5) tiplendirilmiştir. Tiplendirilen örneklerden, % 31.5 alttür 3 (n=12) en baskın genotip olarak belirlenirken sırasıyla alttür 1 % 15.7 (n=6), alttür 4 % 13 (n=5), alttür 2 % 7.8 (n=3) ve alttür 6 % 2.7 (n=1) tespit edilmiştir (Resim 9,10,11,12,13). Bunlardan % 29' unda da (n=11) miks alttür saptanmıştır. Alttür 5 ve alttür 7 görülmemiştir (Tablo 13).

Tablo 13: Tiplendirilen örneklerin alttürlerle göre dağılımı

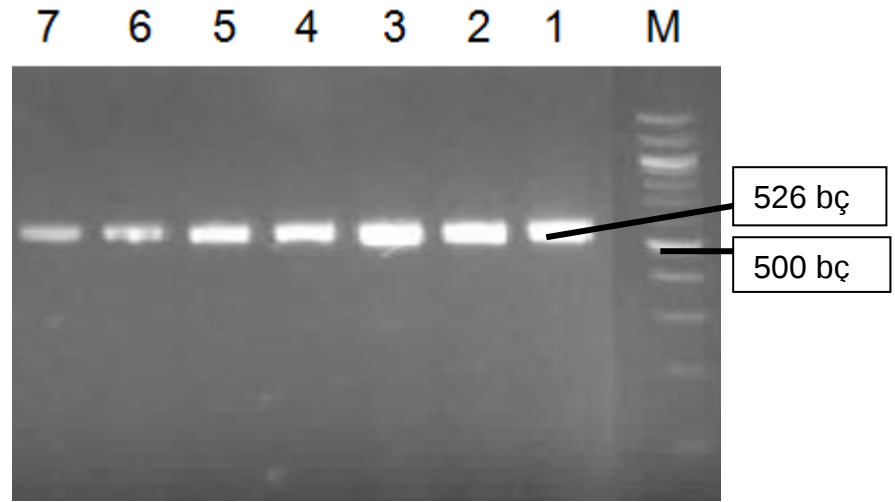
ALTTÜR	ÖRNEK SAYISI (n)	ÖRNEK YÜZDESİ
ST1	6	15.7
ST2	3	7.8
ST3	12	31.5
ST4	5	13
ST5	0	0
ST6	1	2.7
ST7	0	0
MİKS ALTTÜR	11	29
TOPLAM	38	100



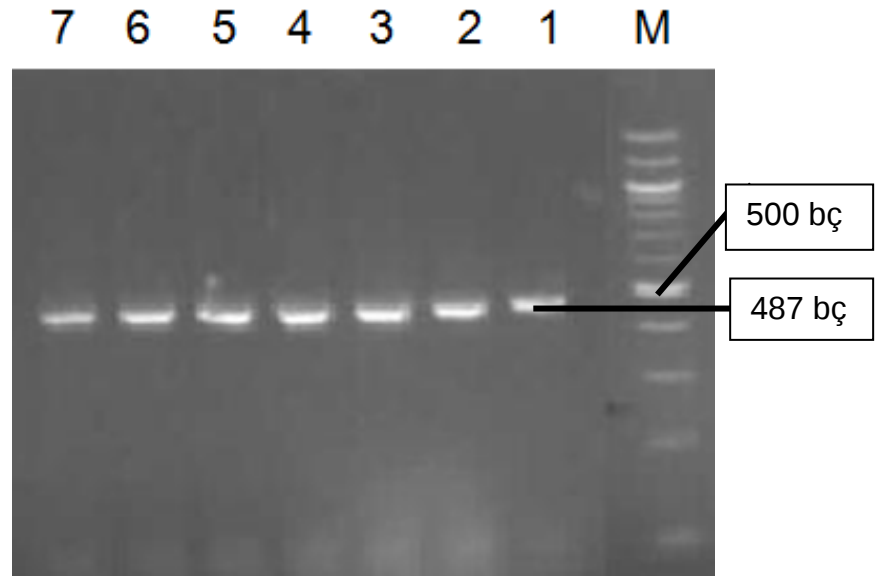
Resim 9: Alttür 1 Jel Elektroforezi görüntüsü



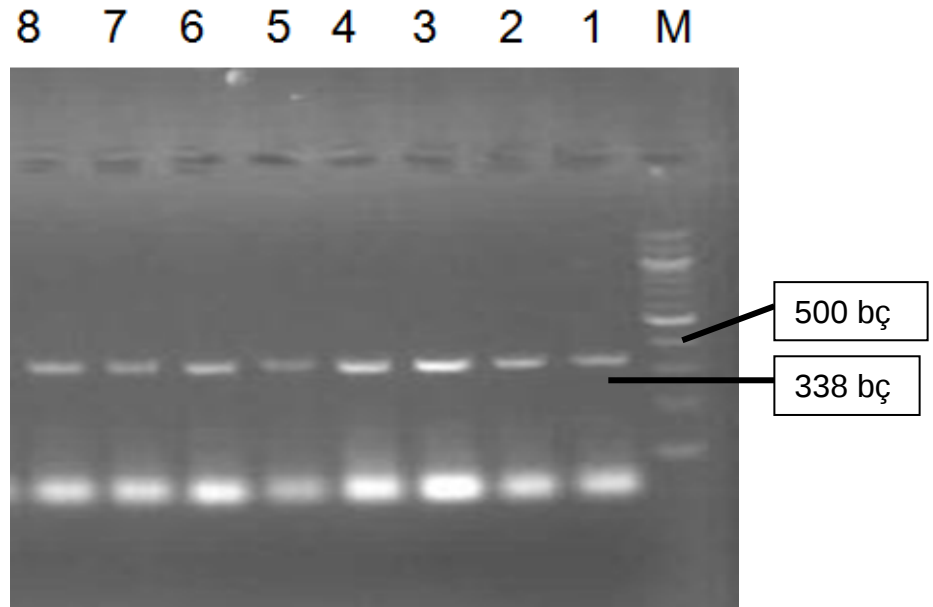
Resim 10: Alttür 2 Jel Elektroforezi görüntüsü



Resim 11: Alttür 3 Jel Elektroforezi görüntüsü



Resim 12: Alttür 4 Jel Elektroforezi görüntüsü



Resim 13: Alttür 6 Jel Elektroforezi görüntüsü

5. TARTIŞMA

Çalışmamıza dahil edilen 350 hastanın dışkı örneğinde kültür yöntemi ile % 19 (n=66) oranında *Blastocystis sp.* saptanmıştır. Kültür yöntemi altın standart olarak alındığında nativ-lugol yönteminin duyarlılığı % 65, özgüllüğü % 100, trikrom boyama yönteminin duyarlılığı % 88, özgüllüğü % 100, floresan boyama yönteminin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 100 olarak belirlenmiştir. Kültür yöntemi ile elde edilen 66 izolatin alttür tayini için protozoonun 18S rDNA bölgesine ait tasarlanmış STS primerleri kullanılmıştır. İzolatların % 57.5 'nın alttürü belirlenmiştir. En yaygın alttür, alttür 3 olup (%31.5) izolatların % 16.6 'nın ise miks alttür içerdiği görülmüştür.

Direk mikroskopik incelemede *Blastocystis'* in farklı boyutlarda olması, farklı morfolojik tiplerinin bulunması, deneyimsiz kişilerce yapılan inceleme sonucunda maya ve lökositlerle karıştırılabilmesi nedeniyle tanı zorluk taşımaktadır.²⁹ Trikrom boyama yöntemi ile parazitin saptanması nativ-lugole göre daha yüksek oranda bulunmaktadır.²⁸ Trikrom boyama yöntemi uzun ve zahmetli bir yöntem olup, preparat incelemeleri deneyim gerektirmektedir. Çalışmamızda 350 hasta örneğinin % 12 kadarı nativ-lugol ile, % 17 kadarı trikrom boyama yöntemi ile *Blastocystis* açısından pozitif olarak saptanmıştır. Her iki yöntem arasında *Blastocystis* saptama açısından istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur (p<0.005).

Parazitlerin tanısında nativ-lugol inceleme yanında trikrom boyama yöntemi de kullanılmaktadır.^{89,93,164}

Ancak *Blastocystis* tanısında altın standart test olarak kullanılan kültür yöntemlerinin duyarlılığı mikroskopik yöntemlere göre yüksektir. Yapılan çalışmalarda kültür yöntemlerinin *Blastocystis* saptamada başarıları yüksek olarak bulunmuştur.⁶²

Kültür, mikroskopi ve PZR yöntemleri *B. hominis* ve *Diantamoeba fragilis* tanısı için karşılaştırdığında kültür yönteminin mikroskopik inceleme ve PZR yönteminden daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. 155 Yapılan bir başka çalışmada kültür yönteminin direk mikroskopiye göre daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.¹⁶⁷

Bizim çalışmamızda da incelediğimiz 350 örneğin %19 kültür ile pozitif bulunurken nativ-lugol ile bu oran %12 olarak belirlenmiştir. Her iki yöntem arasında *Blastocystis* saptama açısından istatistiksel fark anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0,005$).

DFA yönteminin kullanıldığı çalışmaların duyarlılığı nativ-lugol incelemeye göre yüksek olarak saptanmış ve sonuçların kültürle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Nativ-lugol, trikrom boyama yöntemi ve IFA yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, nativ-lugol duyarlılığı % 36.7 ve trikrom boyama yönteminin duyarlılığı % 50 iken IFA boyama yönteminin duyarlılığı ise % 86.7 olarak belirlenmiştir.²⁹ Türk ve ark. Nın yaptıkları çalışmada da 105 hastada nativ-lugol, trikrom, Ringer solüsyonunda kültür ve Direkt Floresan Antikor (DFA) yöntemleri ile incelenmiş ve bu yöntemler *Blastocystis* pozitifliği açısından karşılaştırılmıştır. DFA yönteminin preparat incelemesinin kısa sürmesi, az sayıda protozoon içeren örneklerde ve morfolojisi ve boyutları sebebiyle

tanımlanamayan parazitlerin tanısını kolaylaştırması nedeniyle kültür yöntemine alternatif bir yöntem olabileceği bildirilmiştir.¹⁶⁸

Bizim çalışmamızda da incelenen örneklerin % 19 DFA yöntemi ile, % 19 kültür ile pozitif olarak saptanmış olup önceki çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Floresan yöntemi uygulaması kolay, deneyim gerektirmeyen hızlı bir yöntem olup, *Blastocystis* tanısında kullanılmasının yararlı olacağı gözlenmiştir. Kültür yönteminin 2-3 gün gibi bir süre alması, hazırlanması ve değerlendirilmesinin deneyim gerektirmesi nedeniyle DFA yönteminin bir tanı aracı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Son yıllarda moleküler yöntemler parazitoloji alanında da yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler olarak en yaygın PZR yöntemi kullanılmakla birlikte RT PZR, DNA dizi analizi ve pirosekans yöntemi çalışılmaktadır. Moleküler yöntemlerin kültüre göre daha duyarlı olduğunu bildiren çalışmaların yanında karşıt bulguların elde edildiği araştırmalarda mevcuttur.^{169,170}

Moleküler çalışmalarda dışkı örneğinin kullanımı çok partiküllü bir örnek olması, kompleks yapılı ve inhibitör içermesi nedeniyle zorluk yaratmaktadır. Bu nedenle dışkıya özgü DNA eldesi için ticari kitler geliştirilmiştir. Bu kitlerden en yaygın olarak direk dışkıdan protozoonun DNA'sının izolasyonu yapılan Qiagen stool mini kit kullanıldığı görülmektedir.¹⁶

Blastocystis izolatlarının yapılarının polimorfik olmasından dolayı farklı alttürler saptanmaktadır. Alttür saptanmasında farklı yöntemler kullanılmakla birlikte pek çok araştırmacı STS primerleri ile konvansiyonel PZR yöntemini tercih etmektedir. Bununla birlikte son yıllarda DNA dizi analizi ve pirosekans yöntemi ile alttür tayininin yapıldığı çalışmalar mevcuttur.¹³ Günümüzde *Blastocystis*' in 13 alttürü olduğu belirlenmiştir.¹⁶ Yapılan çalışmalarda alttür 3' ün tüm dünyada en sık saptanan alttür olduğu bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da tiplendirilen 27 örneğin % 31.5 alttür 3 saptanmıştır. Bunu sırasıyla %17.7 ile alttür 1, % 13 ile alttür 4, % 7.8 ile alttür 2 ve % 2.7 ile alttür 6 izlemektedir. İzolatların % 29 miks enfeksiyon olduğu belirlenmiştir.

Maymun, sığır, domuz, tavuk, bıldırcın ve sülün gibi hayvanlardan alınan 51 izolatın 39' u bilinen genotiplerden olduğu tespit edilmiştir. Dört tanesi karışık genotip, kalan sekiz tanesi ise bilinmeyen genotipler olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar daha önce hayvanlardan alınan 41 izolat ile birleştirilip 102 insan *B. hominis* izolatlarının genotip çeşitlilikleri ile karşılaştırıldığında, memeliler ve kuşlardan elde edilen izolatların %67.4'ü insanlarınki ile aynı olduğu belirlenmiştir.¹⁴³

Yan ve ark. nın iki insan ve 16 hayvan üzerinde yaptığı çalışmada alttür 5' in zoonotik kökenli olduğunu bildirilmiştir.¹⁶⁹

Nepal bölgesinde çocuklar ve maymunlar arasında *Blastocystis* moleküler olarak alttür tespiti yapılmıştır. Çocuklarda %20, %20 ve %60 oranında sırasıyla alttür 1, alttür 2 ve alttür 3 alttürleri en sık gözlenirken maymunlarda alttür 3 alttürü bulunmamıştır. Maymunlarda %50 ve %70 oranında sırasıyla alttür 1 ve alttür 2 alttürleri baskın olarak

tespit edilmiştir. ¹⁴⁰ Bir çalışmada da 19 asemptomatik, 16' sı semptomatik 35 hasta örneği incelendiğinde alttür 1 genotipinin baskın olduğu belirlenmiştir. ⁴⁵

Yapılan bir başka çalışmada 513 dışkı örneği farklı yöntemler ile incelenip PZR yöntemi ile alttür tespiti yapıldığında alttür 3 (%43) türünün en baskın alttür olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda mikroskopi yönteminin de duyarlılığı en az yöntem olduğu tespit edilmiştir. ¹⁶⁹

51 IBS' li 49 asemptomatik hasta incelendiğinde IBS' li hastalarda sırasıyla alttür 3, alttür 1 ve alttür 4, asemptomatiklerde ise alttür 3, alttür 4 ve alttür 2 olarak bulunmuştur. ¹⁷²

Kronik ishali olan hastalarda alttür 1 genotipi baskın iken, seyahat ilişkili ishali hastalarda ise alttür 3 genotipi yaygın olarak saptanmıştır. ¹⁷³

İspanya' da yapılan bir çalışmada 51 hasta örneği değerlendirildiğinde %94.1 oranında alttür 4 genotipi en çok izole edilen alttür olarak belirlenirken, %3.9 alttür 2 ve %2 oranında alttür1 tespit edilmiştir. ¹³⁴ Bir başka çalışmada da 25 hasta arasında alttür 4 (%76) diğer türlerden daha baskın bulunmuştur. ¹⁷⁴

Yoshikawa ve ark. farklı ülkelerdeki (Almanya, Tayland ve Bangladeş, Japonya ve Pakistan) insanlardan alınan 102 dışkı örneği STS primerleri ile *Blastocystis* alttür tespiti yapmışlar ve 99 örnek tiplendirilmiştir. Ülkelere

farklılık göstermekle birlikte tiplendirilen alttürlerden alttür 3 %41.7-%92.3 oranında en yaygın olarak bulunmuştur. Bu ülkelerdeki ikinci en sık genotip alttür1 (%7.7-%25) veya alttür 4 (%10-%22.9) olarak belirlenmiştir. alttür 5, alttür 2 ve alttür 7 sadece Almanya ve Japonya örneklerinde nadir olarak görülürken, alttür 6 genotipine rastlanmamıştır. ⁶⁹

Bizim çalışmamızda tiplendirilen örneklerden, alttür 3 (12) en baskın genotip olarak belirlenirken sırasıyla alttür 1 (6), alttür 4 (5), alttür 2 (3) ve alttür 6 (1) tespit edilmiştir. Bu çalışmanın verileri laboratuvarımızda yapılan çalışmaların verileriyle benzerlik göstermekle birlikte, alttür 4 ve alttür 6 ile ilk defa bu çalışmada belirlenmiştir. Semptomatoloji ile alttür arasında ilişkinin incelendiği çalışmalarda farklı bulgular elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda alttür 1' in semptomatoloji ile ilişkili olduğu, alttür 2' nin asemptomatoloji ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. ¹⁷⁵ Çalışmamızda en sık rastladığımız alttür 3 tiplendirme yapılan ishallerin % 58' inde saptanırken ishalleri olmayan olgularda bu oran % 42 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir. ($p \geq 0,05$)

Dışkıdan protozoon DNA' sının eldesi amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmakla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda ticari kitlerin yaygın olarak kullanıldığı gözlenmektedir. ^{176,177} *Blastocystis* DNA' sının araştırıldığı moleküler çalışmalarda da dışkıdan DNA eldesinde sıklıkla Qiagen Stool Mini Kit' in kullanıldığı saptanmıştır. ¹⁷⁸ Bununla birlikte dışkıdan *Blastocystis* DNA'sının eldesi amacıyla kullanılan ticari kitlerin karşılaştırıldığı çalışmada Qiagen mini stool kitinin (Germany) başarısı % 48 olarak belirlenmiştir. ¹⁵⁶

İnsan dışkılarından DNA eldesinde kullanılan Mobio Ultra Clean® Fecal DNA Isolation Kit (M), QIAamp DNA Stool Mini Kit (Q), FastDNA SPIN Kit (FSp) ve FastDNA SPIN Kit for Soil (FSO) karşılaştırıldığında, Q ve M kitinin inhibitörleri adsorbe etmek için belirli kimyasal maddeler (M için; IRS2 solution, Q için; InhibitEx tablet) kullanılmasına rağmen FSo ve FSp kitlerinde ihtiyaç duyulmamasına rağmen optimum DNA verimi elde edebilmek için FSo kiti önerilmektedir.¹⁷⁷

Dışkıdan *Giardia intestinalis* DNA eldesi için QIAamp DNA Stool Mini Kit ve fenol-kloroform-izoamilalkol yöntemi değerlendirildiğinde, DNA eldesinde en iyi yöntemin QIAamp DNA Stool Mini Kit ile bu kit öncesinde mini boncuklarla ve dondurup-çözme uygulaması yapılması önerilmektedir.¹⁷⁵

Bu çalışmada da fenol-kloroform-izoamil alkol, Mobio Ultra Clean® Fecal DNA Isolation Kit (California, USA), Qiagen Mini Stool Kit (Germany) ve DNAzol (MRC, Ohio) yöntemi ile DNA eldesi yapılmış ve elde edilen DNA' ların kaliteleri, miktarları ve genel *Blastocystis* primerleri primerleri ile amplifiye edilen bir grup örnekte PZR görüntüleri karşılaştırılmıştır. Qiagen Mini Stool Kit ile DNA izolasyonunda elde edilen DNA verimliliğinin en yüksek olduğu belirlenmiştir.

Blastocystis günümüzde en yaygın görülen gastrointestinal sistem protozoonu olup patojenitesi konusunda birçok belirsizlik içermektedir. Bu yönüyle birçok araştırmacının ilgi odağı haline gelmiştir. Özellikle son 15 yıldır bu konuda çok sayıda çalışmaya rastlanılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde %1.5-10 oranında saptanırken gelişmekte olan ülkelerde %30-50 oranında olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizde yapılan

epidemiyolojik çalışmalarda da gastrointestinal sistem protozoları içinde ilk sırada yer aldığı bildirilmektedir. ¹

Blastosistoz tanısında mikroskopik incelemenin yanında kültür ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmamızda kültür yönteminin duyarlılığı yüksek olarak belirlenmiştir. Dışkıdan DNA izolasyonunda kültürle saptanan 66 izolatın %57.5' inin alttür tayini yapılabilmektedir. Bu durum dışkıdan DNA izolasyonunda dışkının kompleks bir yapı olması ve çeşitli inhibitörler içermesinden kaynaklanabilmekte aynı zamanda yeni türlerin varlığı durumunda bu alttürlerin belirlenmesinde STS primerleri yetersiz kalmaktadır. Özellikle yeni alttürlerin belirlenmesinde DNA dizi analizi faydalı olmaktadır. Çalışmamızda DNA dizi analizi yapılmamıştır.

Son yıllarda az sayıda çalışmada kullanılan ve başarılı bulunan immün floresan yönteminin çalışmamızda da duyarlılığı yüksek olarak tespit edilmiş ve kültürle uyumlu bulunmuştur. Floresan boyama yönteminin *Blastocystis* tanısında rutin laboratuvarlarda kullanılabileceği görüşüne varılmıştır.

6. SONUÇ

Bu çalışmada 01 Haziran- 30 Ağustos 2011 tarihlerinde 350 hastanın dışkı örnekleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı' nda incelenmiştir. *Blastocystis* protozoonu mikroskopik, kültür yöntemleri ile araştırılıp alttör tayininin STS primerleri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 350 hastanın 157' si (%45) ishal, 193' ü (%55) ishal olmayan hastalardır. Dışkı örnekleri incelenen 350 hastanın 42' sinde (%12) nativ-lugol incelemede, 58' inde (%17) trikrom boyamada, 66' sında (%19) DFA yönteminde, 66' sında (%19) kültürde *Blastocystis* spp. saptanmıştır. Ringer solüsyonu ile kültür yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde *Blastocystis* saptanmasında direk nativ-lugol ve kültür yöntemlerinin arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. *Blastocystis* saptanmasında trikrom boyama ve RL kültür inceleme yöntemlerinin karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmıştır. *Blastocystis* saptanmasında floresan boyama ve RL kültür inceleme yöntemlerinin karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bu istatistiksel analizler sonucunda, DFA yönteminin bir tanı aracı olarak kullanılabileceği ve kültür yöntemine alternatif olabileceği belirlenmiştir.

Alttör değerlendirilmesinde ise, tiplendirilen örneklerden, % 31.5 alttör 3 (n=12) en baskın genotip olarak belirlenirken sırasıyla alttör 1 % 15.7 (n=6), alttör 4 % 13 (n=5), alttör 2 % 7.8 (n=3) ve alttör 6 % 2.7 (n=1) tespit edilmiştir. Bunlardan % 29' unda da (n=11) miks alttör saptanmıştır. Altör 5 ve altör 7 görülmemiştir. Dışkıdan DNA izolasyonunda kültürle saptanan 66 izolatın %57.5' inin alttör tayini

yapılabilmektedir. Bu durum dışkıdan DNA izolasyonunda dışkının kompleks bir yapı olması ve çeşitli inhibitörler içermesinden kaynaklanabilmekte aynı zamanda yeni türlerin varlığı durumunda bu alttürlerin belirlenmesinde STS primerleri yetersiz kalmaktadır. Özellikle yeni alttürlerin belirlenmesinde DNA dizi analizi faydalı olmaktadır. Çalışmamızda DNA dizi analizi yapılmamıştır.

7. ÖZET

Blastocystis memeliler, kuşlar, sürüngenler ve artropodlar gibi çok geniş konak popülasyonuna sahiptir. *Blastocystis* türleri blastosistozis adı verilen ishal, karın ağrısı, karında şişkinlik, hazımsızlık, bulantı, kusma gibi gastrointestinal sistem şikayetlerine neden olan klinik tablo oluşturmaktadır. Patojenitesi henüz tam olarak aydınlatılmamış olan parazitin genomunun geniş polimorfizm göstermesinden dolayı günümüzde 13 alttürü tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarları'na gönderilen 350 hastanın dışkı örneğinde *Blastocystis* protozoonu mikroskopik ve kültür yöntemleri ile araştırılıp, PZR yöntemiyle alttür tayininin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada mikroskopik yöntemlerde NL, trikrom boyama ve DFA yöntemi değerlendirilmiştir. Ringer solüsyonunda yapılan kültür yöntemi altın standart olarak kabul edilmiştir. PZR yönteminde ise STS primerleri kullanılarak alttür tayini yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 350 örneğin %19' unda kültür yöntemi ile *Blastosystis* elde edilmiştir. Alttür tayini yapıldığında ülkemizde ve yurtdışındaki çalışmalarda olduğu gibi en sık alttür 3 belirlenmiştir. Bunu sırasıyla alttür 1, alttür 4, alttür 2, alttür 6 izlemiş olup, miks enfeksiyon oranı %29 olarak saptanmıştır. Ülkemizde ilk defa alttür 6 bizim çalışmamızda tespit edilmiştir. Mikroskopik yöntemlerden DFA yönteminin

kültür yöntemiyle uyumlu olduğu belirlenmiş olup pratik ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle rutin tanıda kullanılabileceği görüşüne varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Blastocystis*, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, kültür

8. SUMMARY

Blastocystis have a very large host population like mammals, birds, reptiles and arthropods. *Blastocystis* species, cause gastrointestinal symptoms diarrhea, abdominal pain, abdominal bloating, indigestion, nausea, vomiting, is known as blastocystosis, causes this clinical picture. The genome of the parasite whose pathogenicity is not fully elucidated due to the various polymorphism, that is why 13 subspecies have been identified today.

In this study, stool specimens of 350 patients are taken in Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Numune Training and Research Hospital Microbiology Laboratory. The *Blastocystis* protozoon in these specimens are researched by microscopic and culture method and aimed to determine the assay of subspecies by PCR method.

In this study, native-lugol, trichrome and Direct Fluorescent Antibody method are evaluated in microscopic methods. The culture method, made in Ringer solution, is considered as the gold standard. In PCR method, the assay of subspecies is done by using STS primers.

Out of 350 samples 19% of *Blastocystis* is obtained in the culture method in the study. When the assay of subspecies is considered, as in the studies in our country and abroad, most common subspecies found is 3. This was followed by subspecies 1, 4, 2, 6 and the mixed infection ratio

is to be 29%. The subspecies 6 have been identified in our study for the first time in our country. Among the microscopic methods, DFA method is found to be compatible with the culture method and because it is a practical and rapid method it is concluded that it can be used in routine diagnosis.

Key Words: *Blastocystis*, Polymerase Chain Reaction, culture

KAYNAKLAR

1. İnceboz T, Usluca S, Över L, Yalçın G, Tuncay S, Özkoç S. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne 2005-2009 Yılları Arasında Başvuran Olgularda *Blastocystis hominis* Epidemiyolojisinin Araştırılması. Türkiye Parazit Derg 2011; 35:72-6.
2. Menounos GP, Spanakos G, Tegos N, Vassalos MC, Papadopoulou C, Vakalis CN. Direct detection of *Blastocystis* sp. in human faecal samples and subtype assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing. Molecular and Cellular Probes 2008; 22:24–29.
3. Meloni D, Sanci G, Poirier P, El Alaoui H, Chabe M, Delhaes L. et al. Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. Isolates from symptomatic patients in Italy. Parasitol Res 2011; DOI 10.1007/s00436-011: 2294-7.
4. Sohail MR, Fischer RP. *Blastocystis hominis* and travelers. Travel Medicine and Infectious Disease 2005; 3: 33–38.
5. Rhongbutsri P. Seasonal Prevalence of *Blastocystis hominis* among Patients Attending Thammasat Chalermprakiat Hospital, Pathum Thani Province, Thailand. J Trop Med Parasitol 2005; 28:39-42.
6. Iguchi A, Ebisu A, Nagata S, Saitou Y, Yoshikawa H, Iwatani S, Kimata I. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. Parasitology International 2007; 56: 107–112.

7. Gamra MMA, Elwakil HS, El Deeb HK, Khalifa KE, Abd Elhafiz HE. The potential use of 29 kDa protein as a marker of pathogenicity and diagnosis of symptomatic infections with *Blastocystis hominis*. Parasitol Res 2011; 108:1139–46.
8. Santos HJ, Rivera WL. Kinetic analysis of antibody responses to *Blastocystis hominis* in sera and intestinal secretions of orally infected mice. Parasitol Res 2009; DOI 10.1007/s00436-009-1556-0.
9. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji. Başustaoğlu AC, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M, Yapar M (Çev). 6. Basım, Ankara, Atlas Kitapçılık ve TİC. LTD. ŞTİ, 2010
10. Rivera WL. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. Veterinary Parasitology 2008; 156: 178–182.
11. Yoshikawa H, Abe N, Wasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. Genomic Analysis of *Blastocystis hominis* Strains Isolated from Two Long-Term Health Care Facilities. Journal of Clinical Microbiology 2000; 0095-1137/00/04.0010: 1324–30.
12. Snowden K, Logan K, Blozinski C, Hoevers J, Holman P. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis* isolates from animal hosts, Parasitol Res 2000; 86: 62-66

13. Stensvold CR, Traub RJ, Himmelstjerna GS, Jespersgaard C, Nielsen HV, Thompson RCA. *Blastocystis*: Subtyping isolates using pyrosequencing™ technology. *Experimental Parasitology* 2007; 116: 111–9.
14. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, Alaoui HE, 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. *JCM* 2011; p. 975–983
15. Li L-H, Zhou X-N, Du Z-W, Wang X-Z, Wang L-B, Jiang J-Y, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitology International* 2007; 56: 281–286.
16. Parkar U, Traub R. J, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology* 2010; 169: 8–17.
17. Denoeud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, et al. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Denoeud Genome Biology* 2011: 12: R29.
18. Tan KSW, Singh M, Yap EH. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *International Journal for Parasitology* 2002; 32: 789–804.

19. Abe N, Nagoshi M, Takami K, Sawano Y, Yoshikawa HA. Survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Veterinary Parasitology* 2002; 106: 203–212.
20. Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM. Epidemiology and Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28: 116-121.
21. Lynch KM. *Blastocystis hominis*: Its Characteristics And Its Prevalence In Intestinal Content And Feces In South Carolina. 1916; 369-377.
22. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*-Past and Future. *Clinical Microbiology Reviews* 1991; 4: 61-79.
23. Stenzel DJ, Boreham PFL. *Blastocystis hominis* Revisited. *Clinical Microbiology Reviews* 1996; 9: 563–84.
24. Sheehan DJ, Raucher BG, John C. McKittrick JC, Association of *Blastocystis hominis* with Signs and Symptoms of Human Disease. *Journal Of Clinical Microbiology* 1986; 24: 548-50.
25. Doğruman-Al F, Hökelek M. *Blastocystis hominis* Fırsatçı Bir Patojen mi?. *Türkiye Parazitoloji Derg* 2007; 31: 28-36.
26. Cavalier-Smith TA. Revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* 1998; 73: 203-66.
27. Tan KSW, Mirza H, Teo J. DW, Wu B, MacAry PA. Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep* 2010; 12:28–35.

- 28.** Tan KSW. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 2008; 21: 639–65.
- 29.** Doğruman-Al F, Şimşek Z, Boorum K, Ekici E, Şahin M, Tuncer C. Ve ark. Comparison of Methods for Detection of *Blastocystis* Infection in Routinely Submitted Stool Samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey 2010;5(11): e15484
- 30.** Singh M, Suresh K, Ho L. C, Ng G. C, Yap EH. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 1995; 81: 446-50.
- 31.** İnceboz T, Usluca S. *Blastocystis hominis* bağırsak hastalığı için potansiyel bir tehlike olabilir mi?. *DEÜ Tıp Fakültesi Derg* 2009; 23: 37-45.
- 32.** Mansour NS, Mikhail EM, El Masry NA, Sabry AG, Mohareb EW. Biochemical characterisation of human isolates of *Blastocystis hominis*. *J. Med. Microbiol* 1995; 42: 304-7.
- 33.** Wawrzyniak I, Roussel I, Diogon M, Couloux A, Texier C, Tan KSW, et al. Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitol* 2008; 38: 1377–82.
- 34.** Zierdt CH, Donnelly CT, Muller J, Constantopoulos G. Biochemical and Ultrastructural Study of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1988; 26: 965-70.

35. Mirza H, Tan KSW. *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitol Res* 2009; 104: 355–61.
36. Abdel-Hameed DM, Hassanin OM. Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitol Res* 2011.
37. Clark CG. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1997; 87: 79–83.
38. Tan TC, Suresh KG. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol Res* 2006; 98: 189–93.
39. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson R. C. A, Traub R. J, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends in Parasitology* 2007; 23: 93-6.
40. Carbajal JA, Del Castillo L, Lanuza MD, Villar J, Borrás R. Karyotypic Diversity among *Blastocystis hominis* Isolates. *International Journal for Parasitology* 1998; 27: 941-45.
41. Ho LC, Singh M, Jeyaseelan K, Yap EH. Genetic Relatedness Of The Elongation Factor-L Alpha In *Blastocystis* Isolates. Poster Sessions / *Parasitology International* 1998; 47: 283-389.
42. Tan TC, Ong SC, Suresh KG. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitol Res* 2009; 105:1283–6.

43. Özyurt M, Kurt Ö, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitology International* 2008; 57: 300–6.
44. Kaneda Y, Horiki N, Cheng X-J, Fujita Y, Maruyama M, Tachibana H. Ribodemes of *Blastocystis hominis* Isolated in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65: 393–6.
45. Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, et al. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol Res* 2006; 99: 597–601.
46. Doğruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt Ö, Demirel M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2008; 103:685–9.
47. Boreham PFL, Stenzel DJ. *Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology, and Epizootiology. *Advances In Parasitology* 1993; 32: 1-70.
48. Dagci H, Ustun S, Taner M. S, Ersoz G, Karacasu F, Budak S. Protozoon infections and intestinal permeability. *Acta Tropica* 2002; 81: 1–5.
49. Lee MG, Rawlins SC, Didier M, DeCeulaer K. Infective arthritis due to *Blastocystis hominis*. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1990; 49: 192-193.
50. Zuckerman MJ, Watts MT, Ho H, Meriano FV. *Blastocystis hominis* infection and intestinal injury. *Am J Med Sci.* 1994; 308(2):96-101.

51. Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, et al. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites & Vectors* 2008; 40: 1-16.
52. Chandramathi S, Suresh KG, Mahmood AA, Kuppusamy UR. Urinary hyaluronidase activity in rats infected with *Blastocystis hominis* evidence for invasion?. *Parasitol Res* 2010; 106:1459–63.
53. Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitol Res* 2009; 105:1589–92.
54. Kukoschke KG, Müller HE. Varying incidence of *Blastocystis hominis* in cultures from faeces of patients with diarrhoea and from healthy persons. *Zentralbl Bakteriol* 1992; 277(1):112-8.
55. Tasova Y, Sahin B, Koltas S, Paydas S. Clinical Significance and Frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish Patients with Hematological Malignancy. *Acta Med Okayama* 2003; 54(3): 133-6.
56. Babb RR, MD, Wagener S. *Blastocystis hominis* A Potential Intestinal Pathogen. *West J Med* 1989; 151:518-9.
57. Chen T-L, Chan C-C, Chen H-P, Fung C-P, Lin C-P, Chan W-L, Liu C-Y. Clinical Characteristics And Endoscopic Findings Associated With *Blastocystis hominis* In Healthy Adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2003; 69(2): 213–6.

58. Leder K, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Wolfe R. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2005; 20: 1390–4.
59. Nigro L, Larocca L, Massarelli L, Patamia I, Minniti S, Palermo F, et al. A Placebo-Controlled Treatment Trial of *Blastocystis hominis* Infection with Metronidazole. *J Travel Med* 2003; 10:128–30.
60. Shoai MR, Fischer PR. *Blastocystis hominis* and travelers. *Travel Medicine and Infectious Disease* 2005; 3: 33–38
61. Ramirez-Miranda ME, Hernandez-Castellanos R, Lopez-Escamilla E, Moncada D, Rodriguez-Magallan A, Pagaza-Melero C, et al. Parasites in Mexican patients with irritable bowel syndrome: a case-control study. *Ramirez-Miranda Parasites & Vectors* 2010, 3:96.
62. Üstün Ş, Turgay N. *Blastocystis hominis* ve Bağırsak Hastalıkları. *Türkiye Parazitol Derg.* 2006; 30 (1): 73-7.
63. Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KSW. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol Res* 2005; 97: 386–9.
64. Puthia MK, Sio SWS, Lu J, Tan KSW. *Blastocystis ratti* Induces Contact-Independent Apoptosis, F-Actin Rearrangement, and Barrier Function Disruption in IEC-6 Cells. *Infection And Immunity* 2006; 74 (7) 4114–23.

65. Stensvold CR, Nielsen HV, Molbak K, Smith HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* diagnostic limitations. Trends in Parasitology 2008; 25 (1): 23-9.
66. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, et al. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. Parasitol Res 2010; 106:505–11.
67. Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory E. L, Maddox C, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. International Journal for Parasitology 2009; 39: 473–9.
68. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. Parasitol Res 2008; 102: 853–60.
69. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali KMD, Hossain MB, et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. Parasitol Res 2004; 92: 22–9.
70. Katsarou-Katsari A, Vassalos CM, Tzanetou K, Spanakos G, Papadopoulou C, Vakalis N. Acute Urticaria Associated with Amoeboid Forms of *Blastocystis* sp. Subtype 3. Acta Derm Venereol 2008; 88: 80-1.

71. Yao FR, Qiao JY, Zhao Y, Zhang X, Yang J. H, Li X. Q. Experimental infection of mice with *Blastocystis hominis*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 2005; 23(6): 444-8.
72. Stark D, Van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Irritable bowel syndrome: A review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. International Journal for Parasitology 2007; 37: 11–20.
73. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho L. C, Tan SW, Chen X. Q, et al. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. Parasitol Res. 1997; 83(4): 319-25.
74. Elwakil HS, Hewedi IH. Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. Parasitol Res. 2010; 107:685–9.
75. Chandramathi S, Suresh K. Solubilized antigen of *Blastocystis hominis* facilitates the growth of human colorectal cancer cells, HCT116. Parasitol Res 2010; 106:941–5.
76. Puthia M. K, Lu J, Tan KSW. *Blastocystis ratti* Contains Cysteine Proteases That Mediate Interleukin-8 Response from Human Intestinal Epithelial Cells in an NF-kB-Dependent Manner. Eukaryotic Cell 2008; 7(3): 435–43.
77. Long HY, Handschack A, König W, Ambrosch A. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. Parasitol Res. 2001; 87(12): 1029-30.

- 78.** Tato CM, Hunter CA. Host-Pathogen Interactions: Subversion and Utilization of the NF- κ B Pathway during Infection. *Infection And Immunity* 2002; 3311–7.
- 79.** Mahmoud MS, Saleh WA. Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections. *J Egypt Soc Parasitol.* 2003; 33(1):13-30.
- 80.** Hussain R, Jaferi W, Zuberi S, Baqai R, Abrar N, Ahmed A, et al. Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1997; 56(3):301-6.
- 81.** Clark CG. Cryptic genetic variation in parasitic protozoa. *J. Med. Microbiol.* 2000; 49: 489-91.
- 82.** Yaman O, Hamamcı B, Çetinkaya Ü, Kaya M, Ateş S, Gözkenç N, ve ark. Yabancı Uyruklu Lise Öğrencilerinde İntestinal Parazitlerin Araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Derg.* 2010; 34 (3): 176-8.
- 83.** Yaman O, Yazar S, Özcan H, Çetinkaya Ü, Gözkenç N, Ateş S, ve ark. 2005-2008 Yılları Arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı' na Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. *Türkiye Parazitol Derg.* 2008; 32(3): 266 - 70.
- 84.** Yapıcı F, Tamer GS, Arısoy ES. Çocuklarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı ve Bununla İlişkili Etmenler. *Türkiye Parazitol Derg.* 2008; 32(4): 346 -50.

- 85.** Değirmenci A, Sevil N, Güneş K, Yolasığmaz A, Turgay N. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarında 2005 Yılı Boyunca Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitol Derg. 2007; 31(2): 133-5.
- 86.** Arslan MÖ, Sarı B, Kulu B, Mor N. Kars Doğum ve Çocuk Bakımevi Hastanesine Gastrointestinal Yakınmalarla Başvuran Çocuklarda Bağırsak Parazitlerinin Yaygınlığı. Türkiye Parazitol Derg. 2008; 32(3): 253 -6.
- 87.** Balcı YI, Türk M, Polat Y, Erbil N. Denizli'deki Çocuklarda İntestinal Parazitlerin Dağılımı. Türkiye Parazitol Derg. 2009; 33(4): 298 -300.
- 88.** Akdemir C, Helvacı R. Kütahya'da Parazitoloji Laboratuvar Sonuçlarının 15 ve Üzeri Yaş Grubunda Değerlendirilmesi. Türkiye Parazitol Derg. 2007;31(1): 37-40.
- 89.** Cengiz ZT, Çiçek M, Akbayram S, Yılmaz H. Van'da Süphan İlköğretim Okulu Öğrencilerinde Saptanan Bağırsak Parazitleri. Türkiye Parazitol Derg. 2009; 33(4): 294 – 7.
- 90.** Çelik T, Daldal N, Karaman Ü, Aycan Ö. M, Atambay M. Malatya İli Merkezinde Üç İlköğretim Okulu Çocuklarında Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitol Derg. 2006;30(1):35-8.
- 91.** Çulha G, Sangün Ö, İncecik F. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Başvuran 0-14 Yaş Çocuklarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitol Derg. 2005; 29 (4): 255-7.

- 92.** Doğan N, Demirüstü C, Aybey A. Eskişehir Osmangazi Üniversitesinin Beş Yıllık Bağırsak Paraziti Prevalansının Türlerine ve Cinsiyetlere Göre Dağılımı. Türkiye Parazitol Derg. 2008; 32 (2): 120 -5.
- 93.** Göz Y, Aydın A, Tuncer O. Hakkari 23 Nisan İlköğretim Okulu Öğrencilerinde Bağırsak Parazitlerinin Yaygınlığı. Türkiye Parazitol Derg 2005; 29 (4): 268-70.
- 94.** Güdücüoğlu H, Parlak M, Çiçek M, Yaman G, Öztürk Ö, Çıkman A, ve ark. Van Mustafa Cengiz İlköğretim Okulu Öğrencilerinde Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması. Türkiye Parazitol Derg 2010; 34 (3): 172-5.
- 95.** Kurtoğlu MG, Korkoca H, Çiçek M, Cengiz ZT. Van Yöresinde Gıda Sektörü Çalışanlarında Bağırsak Parazitlerinin Yaygınlığı. Türkiye Parazitol Derg 2007; 31 (4): 309-12.
- 96.** Hamamcı B, Çetinkaya Ü, Delice S, Erçal BD, Gücüyetmez S, Yazar S. Kayseri-Hacılar'da İlköğretim Öğrencilerinde Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması. Türkiye Parazitol Derg. 2011; 35: 96-9.
- 97.** Şahin İ, Yazar S, Yaman O, Gözkenç N. Kayseri-Karpuzsekisi Havzasında Yaşayanlarda Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması. Türkiye Parazitolo Derg 2006; 30 (3): 178-80.
- 98.** Usluca S, Yalçın G, Över L, Tuncay S, Şahin S, İnceboz T, ve ark. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2003-2004 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitol Derg 2006; 30 (4): 308-12.

- 99.** Usluca S, İnceboz T, Över L, Tuncay S, Yalçın G, Arcak SŞ, ve ark. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2005-2008 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. *Türkiye Parazitol Derg* 2010; 34(1):27- 31.
- 100.** Köksal F, Başlantı İ, Samastı M. A Retrospective Evaluation of the Prevalence of Intestinal Parasites in Istanbul, Turkey. *Türkiye Parazitol Derg.* 2010; 34 (3): 166-171.
- 101.** Özçakır O, Güreser S, Ergüven S, Yılmaz YA, Topaloğlu R, Haşcelik G. Türkiye'deki Bir Üniversite Hastanesinde *Blastocystis hominis* Enfeksiyonunun Karakteristiği. *Türkiye Parazitol Derg.* 2007; 31 (4): 277-82.
- 102.** Velasco J, Gonzalez F, Diaz T, Pena-Guillen J, Araque M. Profiles of enteropathogens in asymptomatic children from indigenous communities of Mérida, Venezuela. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5(4):278-85.
- 103.** Baldo ET, Belizario VY, De Leon WU, Kong H-H, Chung D- II. Infection status of intestinal parasites in children living in residential institutions in Metro Manila, the Philippines. *The Korean Journal of Parasitology* 2004; 42(2): 67-70.
- 104.** Cook DM, Swanson RC, Eggett DL, Booth GMA Retrospective Analysis of Prevalence of Gastrointestinal Parasites among School Children in the Palajunoj Valley of Guatemala. *J Health Popul Nutr* 2009; 27(1):31-40.

- 105.** Espinoza YA, Huapaya PH, Roldan WH, Jimenez S, Arce Z, Lopez E. Clinical And Serological Evidence Of Toxocara Infection In School Children From Morrope District, Lambayeque, Peru. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 2008; 50(2): 101-5.
- 106.** Guimaraes S, Soyagar MIL. *Blastocystis hominis*: Occurrence in Children and Staff Members of Municipal Day-Care Centers From Botucatu, Sao Paulo State, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio De Janeiro 1993; 88(3): 427-9.
- 107.** Haghighi A, Khorashad AS, Mojarad EN, Kazemi B, Nejad MR, Rasti S. Frequency of enteric protozoan parasites among patients with gastrointestinal complaints in medical centers of Zahedan, Iran. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2009; 103: 452-4.
- 108.** Nasiri V, Esmailnia K, Karimi G, Nasiri M, Akhavan O. Intestinal Parasitic Infections among Inhabitants of Karaj City, Tehran Province, Iran in 2006-2008. Korean J Parasitol 2009; 47(3): 265-8.
- 109.** Hsieh M-H, Lin W-Y, Chia-Yen Dai C-Y, Huang J-F, Huang C-K, Chien H-H, et al. Intestinal Parasitic Infection Detected By Stool Examination In Foreign Laborers In Kaohsiung. Kaohsiung J Med Sci. 2010; 26:136–43.
- 110.** Basualdo JA, Cordoba MA, De Luca MM, Ciarmela ML, Pezzani BC, Grenovero MS, et al. Intestinal Parasitoses And Environmental Factors In A Rural Population Of Argentina, 2002-2003. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 2007; 49(4): 251-5.

- 111.** Kitvatanachai S, Boonsilp S, Watanasatitarp S. Intestinal parasitic infections in Srimum suburban area of Nakhon Ratchasima Province, Thailand. *Tropical Biomedicine* 2008; 25(3): 237–42.
- 112.** Kuzehkanani B, Rezaei S, Babaei Z, Niyayati M, Hashemi SN, Rezaeian M. Enteric Protozoan Parasites in Rural Areas of Bandar-Abbas, Southern Iran: Comparison of Past and Present Situation. *Iranian J Publ Health* 2011; 40(1): 80-5.
- 113.** Azian N, MY, San, MY, YM, Gan, et al. Prevalence of intestinal protozoa in an aborigine community in Pahang, Malaysia. *Tropical Biomedicine* 2007; 24(1): 55–62.
- 114.** Cheng H-S, Haung Z-F, Lan W-H, Kuo T-C, Shin J-W. Epidemiology Of *Blastocystis hominis* And Other Intestinal Parasites In A Vietnamese Female Immigrant Population In Southern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 2006; 22: 166–70.
- 115.** Nascimento SA, Moitinho MLR. *Blastocystis hominis* And Other Intestinal Parasites In A Community Of Pitanga City, Parana State, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2005; 47(4): 213-7.
- 116.** Prasad KN, Nag VL, Dhole TN, Ayyagari A. Identification of Enteric Pathogens in HIV-positive Patients with Diarrhoea in Northern India. *J Health Popul Nutr* 2000; 18(1): 23-6.
- 117.** Zali MR, Mehr AJ, Rezaian M, Meamar AR, Vaziri S, Mohraz M. Prevalence of Intestinal Parasitic Pathogens among HIV-Positive Individuals in Iran. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2004; 57: 268-70.

- 118.** Berenji F, Sarvghad MR, Fata A, Hosseininejad Z, Saremi E, Ganjbakhsh M, Jahanparvar R. I. A study of the prevalence of intestinal parasitic infection in HIV positive individuals in Mashhad, Northeast Iran. Jundishapur Journal of Microbiology 2010; 3(2): 61-5.
- 119.** Brandonisio O, Maggi P, Panaro MA, Lisi S, Andriola A, Acquafredda A, et al. Intestinal protozoa in HIV-infected patients in Apulia, South Italy. Epidemiol. Infect. 1999; 123: 457-62.
- 120.** Chinchá LO, Bernabe-Ortiz A, Samalvides CF, Soto AL, Gotuzzo HE, Terashima IA. Infecciones parasitarias intestinales y factores asociados a la infección por coccidias en pacientes adultos de un hospital público de Lima, Peru. Rev Chil Infect 2009; 26 (5): 440-4.
- 121.** Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome in Brazil. Int J Infect Dis 1999; 3: 203-6.
- 122.** Simadibrata M, Tytgat GNJ, Yuwono V, Daldiyono, Lesmana LA, Syam AF, et al. Microorganisms and Parasites in Chronic Infective Diarrhea. Acta Med Indones-Indones J Intern Med 2004; 36(4): 211-4.
- 123.** Yakoob J, Jafri W, Jafri N, Khan R, Islam M, Beg MA, et al. Irritable Bowel Syndrome: In Search Of An Etiology: Role Of *Blastocystis hominis*.
- 124.** Doğruman Al F, Adisen E, Kuştımur S, Gürer MA. Ürtiker Etyolojisinde Protozoonların Yeri. Türkiye Parazitol Derg. 2009; 33 (2): 136 -9.

- 125.** Amin OM. Seasonal Prevalence Of Intestinal Parasites In The United States During 2000. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 66(6): 799–803.
- 126.** Kaya S, Sesli ÇE, Cicioğlu Arıdoğan B, Arıkan S, Demirci M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, A Clinical Reevaluation. *Türkiye Parazitol Derg.* 2007; 31 (3): 184-7.
- 127.** Miller SA, Rosario CL, Rojas E, Scorza JV. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Tropical Medicine and International Health* 2003; 8(4): 342-7.
- 128.** Qadri SMH, Al-Okaili GA, Al-Dayel F. Clinical Significance of *Blastocystis hominis*. *Journal Of Clinical Microbiology* 1989; 27(11): 2407-9.
- 129.** Hameed DMA, Hassanin OM, Zuel-Fakkar NM. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitol Res* 2011; 108: 553–60.
- 130.** Krüger K, Kamilli I, Schattenkirchner M. *Blastocystis hominis* as a rare arthritogenic pathogen. A case report. *Z Rheumatol.* 1994; 53(2): 83-5.
- 131.** Ghosh K, Ayyaril M, Nirmala V. Acute GVHD involving the gastrointestinal tract and infestation with *Blastocystis hominis* in a patient with chronic myeloid leukaemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 22: 1115–7.

- 132.** Carbajal JA, Castillo LD, Lanuza MD, Villar J, Borrás R. Karyotypic Diversity among *Blastocystis hominis* Isolates. International Journal of Parasitology 1997; 27: 941-945
- 133.** Dominguez-Marquez MV, Guna R, Munoz C, Gomez-Munoz T, Borrás R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). Parasitol Res 2009; 105: 949–55.
- 134.** Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, et al. Drinking Water: A Possible Source of *Blastocystis* spp. Subtype 1 Infection in Schoolchildren of a Rural Community in Central Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008; 79(3): 401–6.
- 135.** Leelayoova S, Rangsin R, Taamasri P, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M. Evidence Of Waterborne Transmission Of *Blastocystis Hominis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2004; 70(6): 658–62.
- 136.** Ithoi I, Jali A, Mak J. W, Sulaiman W. Y, Mahmud R. Occurrence of *Blastocystis* in Water of Two Rivers from Recreational Areas in Malaysia. Journal of Parasitology Research 2011; 2011.
- 137.** Nimri LF. Evidence of an Epidemic of *Blastocystis hominis* Infections in Preschool Children in Northern Jordan. Journal Of Clinical Microbiology 1993; 31(10): 2706-8.
- 138.** Nimri L, Batchoun R. Intestinal Colonization of Symptomatic and Asymptomatic Schoolchildren with *Blastocystis hominis*. Journal Of Clinical Microbiology 1994; 32(11): 2865-6.

- 139.** Suresh K, Ng GC, Ramachandran NP, Ho LC, Yap EH, Singh M. In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res 1993; 79: 456-60.
- 140.** Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, Pandey BD, Sherchand JB, Yanagi T, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. Veterinary Parasitology 2009; 160: 295–300
- 141.** Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of Intestinal Protozoan Morphology in Human Fecal Specimens Preserved in EcoFix: Comparison of Wheatley's Trichrome Stain and EcoStain. Journal Of Clinical Microbiology 1998; 36(7): 1974–6.
- 142.** Kain KC, Noble MA, Freeman HJ, Barteluk RL. Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 1987; 8(4): 235-44.
- 143.** Yoshikawa H, Abe N, Wu Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. Microbiology 2004; 150: 1147–51.
- 144.** Mirza H, Teo J. DW, Upcroft J, Tan KSW. 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(2): 637–8.

- 145.** Hareesh K, Suresh K, Anuar AK, Saminathan S. Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. Tropical Medicine and International Health 1999; 4(4): 274-7.
- 146.** Iguchi A, Yoshikawa H, Yamada M, Kimata I, Arizono N. Expression of interferon gamma and proinflammatory cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis* sp. strain RN94-9. Parasitol Res 2009; 105:135–40.
- 147.** Eroğlu C. Tüberküloz Tanısında Pcr. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu: 311-6.
- 148.** Monteiro L, Gras N, Megraud F. Magnetic Immuno-PCR Assay with Inhibitor Removal for Direct Detection of Helicobacter pylori in Human Feces. Journal Of Clinical Microbiology 2001; 39(10): 3778–80.
- 149.** Monteiro L, Bonnemaison D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, et al. Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: Helicobacter pylori Model. Journal Of Clinical Microbiology 1997; 35(4):995–8.
- 150.** Uyanık MH, Aktaş O, Özbek A, Yılmaz Ö, Ayyıldız A. Helicobacter Pylori Tanısında Çeşitli Yöntemlerin Karşılaştırılması. Enfeksiyon Dergisi 2008; 22 (4): 197-202.
- 151.** Yoshikawa H, Morimoto K, Wu Z, Singh M, Hashimoto T. Problems in speciation in the genus *Blastocystis*. Trends in Parasitology 2004; 20(6): 251-5.

- 152.** Yakoob J, Abbas Z, Beg MA, Naz S, Awan S, Hamid S, et al. In vitro sensitivity of *Blastocystis hominis* to garlic, ginger, white cumin, and black pepper used in diet. *Parasitol Res* 2011; DOI 10.1007/s00436-011-2265-z.
- 153.** Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, et al. *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol Res* 2010; 107: 679–84.
- 154.** Thathaisong U, Worapong J, Mungthin M, Tan-Ariya P, Viputtigul K, Sudatis A, et al. *Blastocystis* Isolates from a Pig and a Horse Are Closely Related to *Blastocystis hominis*. *Journal Of Clinical Microbiology* 2003; 41(3): 967–75.
- 155.** Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen H. V. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; 59: 303–7.
- 156.** Yoshikawa H, Doğruman-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. *Parasitol Res.* 2011; 109(4): 1045-50.
- 157.** Hoevers J, Holman P, Logan K, Hommel M, Ashford R, Snowden K. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis hominis* isolates from geographically diverse human hosts. *Parasitol Res* 2000; 86: 57-61.

- 158.** Doğruman-Al F, Adıyaman G, Yantıra TN, Hasgür S, Bağrıaçık Ü. Anti-paraziter Etkili İlaçların *Blastocystis* İzolatlarının Canlılıkları Üzerine Etkilerinin MTT Testi ile Belirlenmesi. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012;18: A167-A170.
- 159.** Santin M, Gomez-Munoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. Parasitol Res 2011; 109:205–12.
- 160.** Nassir E, Awad J, Abel AB, Khoury J, Shay M, Lejbkowitz F. *Blastocystis hominis* as a cause of hypoalbuminemia and anasarca. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 399–402.
- 161.** Jeddy TA, Farrington GH. *Blastocystis hominis* complicating ulcerative colitis. Journal of the Royal Society of Medicine 1991; 84: 623.
- 162.** Andiran N, Acikgoz ZC, Turkay S, Andiran F. *Blastocystis hominis*—an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. Journal of Pediatric Surgery 2006; 41: 1489–91.
- 163.** Tai W-P, Hu P-J, Wu J, Lin X-C. Six ulcerative colitis patients with refractory symptoms co-infective with *Blastocystis hominis* in China. Parasitol Res 2011; 108:1207–10.
- 164.** Alver O, Oral B, Töre O. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine 2005-2008 Yılları Arasında Başvuran Kişilerde Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitoloj Derg 2001; 35: 194-8.

- 165.** Doğruman-Al F, Kustimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Simsek Z, Tanyuksel M, ve ark. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2009; 104(5): 724-7.
- 166.** Türk S, Doğruman Al F, Kuştimur S. *Blastocystis* Türlerinin Tanısında Yeni Bir Yaklaşım: Direk Florasan Antikor Yöntemi. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2012; 18 (Suppl-A): A171-A174.
- 167.** Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D. Comparison of Microscopy, Culture, and Conventional Polymerase Chain Reaction for Detection of *Blastocystis* sp. in Clinical Stool Samples. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2011; 84(2): 308–12.
- 168.** Eida AM, Eida MM. Identification of *Blastocystis hominis* in Patients with Irritable Bowel Syndrome using Microscopy and Culture Compared to PCR. PUJ 2008; 2: 87 - 92
- 169.** Yan Y, Su S, Ye J, Lai X, Lai R, Liao H, et al. *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. Parasitol Res 2007; 101:1527–32.
- 170.** Fouad SA, Basyoni MMA, Fahmy RA, Kobaisi MH. The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. Arab Journal of Gastroenterology 2011; 12(4):194-200.

- 171.** Rene BA, Stensvold C. R, Badsberg J. H, Nielsen H. V. Subtype Analysis of *Blastocystis* Isolates from *Blastocystis* Cyst Excreting Patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2009; 80(4): 588–92.
- 172.** Stensvold CR, Christiansen DC, Olsen KEP, Nielsen HV. Short Report: *Blastocystis* sp. Subtype 4 is Common in Danish *Blastocystis* -Positive Patients Presenting with Acute Diarrhea. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2011; 84(6): 883–5.
- 173.** Doğruman-Al F, Dağcı HA possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res 2008;103:685–689
- 174.** Babaei Z, Oormazdi H, Rezaie S, Rezaeian M, Razmjou E. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. Exp Parasitol. 2011; 128(2):159-62.
- 175.** Guy RA, Payment P, Krull UJ, Horgen PA. Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage. Applied and Environmental Microbiology 2003; p. 5178–5185.
- 176.** J. Petrasova J, Uzlikova M, Kostka M, Petrzalkova KJ, Huffman MA, Modry D. Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania. International Journal for Parasitology 2011; 41: 1113–1120.
- 177.** Ariefdjohan MW, Savaiano DA, Nakatsu CH. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. Nutr J. 2010; 22:9:23.

EKLER

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve hazırlanmasında, destek olan ve değerli bilgileriyle katkıda bulunan, sabır ve anlayışı ile bana yol gösteren sevgili hocam Doç. Dr. Funda Doğruman-Al' a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Eğitimimde değerli bilgileri ile katkıda bulunan ve manevi desteğini hiç esirgemeyen sonsuz saygı duyduğum hocam Prof. Dr. Nedim Sultan ve Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. hocalarıma teşekkür ederim.

Manevi desteklerini eksik etmeyen, her aşamada yanımda olan ve birlikte çalıştığım yüksek lisans, doktora arkadaşlarıma ve laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Bana her zaman güvenen ve inanan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen canım aileme ve hayat arkadaşım Hakan Korkmaz' a çok teşekkür ederim.

Bio. Gülcan ADIYAMAN KORKMAZ

ÖZGEÇMİŞ

- **ADI:** GÜLCAN
- **SOYADI:** ADIYAMAN KORKMAZ
- **D.Y. VE TARİHİ:** 19.10.1986/ ANKARA

EĞİTİM:

- 2000-2003: LİSE EĞİTİMİ (YUNUS EMRE LİSESİ)
- 2005-2009: GAZİ ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAK. BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
- 2010-2012: GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAK. TIBBİ MİKROBİYOLOJİ A.D. YÜKSEK LİSANS

YABANCI DİL: İNGİLİZCE