

K.K.T.C.
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ'NDE SAPTANAN
BLASTOCYSTIS SPP. ETKEN VE SUBTİPLERİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

AYŞE SEYER

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

LEFKOŞA
2016

K.K.T.C.
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ'NDE SAPTANAN
BLASTOCYSTIS SPP. ETKEN VE SUBTİPLERİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

AYŞE SEYER

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN

EŞ DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Emrah RUH

LEFKOŞA
2016

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Turgut İMİR
Yakın Doğu Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN
Hitit Üniversitesi

Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. Emrah RUH
Yakın Doğu Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Nedim ÇAKIR
Yakın Doğu Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Tamer ŞANLIDAĞ
Yakın Doğu Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Yakın Doğu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İhsan ÇALIŞ
YDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve tezimin her aşamasında sonsuz emeği olan, bilgi ve deneyimleri ile her zaman yardımcı ve yanımda olan, ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN'a;

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince değerli bilgilerinden yararlandığım, destek ve ilgilerini esirgemeyen, Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı, Sayın Prof. Dr. Turgut İMİR'e;

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi, yardım ve desteklerinden dolayı eş danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Emrah RUH'a;

Araştırma sürecindeki sonsuz emeği, desteği, bilgisi ve işbirliği için Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Djursun KARASARTOVA'ya;

Laboratuvarında çalışmalarımı rahatça sürdürebilmem için ortam sağlayan ve her zaman destek olan değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Kaya SÜER'e;

Bugünlere gelebilmemde emeği olan, eğitim sürecimde karşıma çıkan tüm güzel yürekli eğitimcilere;

Hayatımın her anında olduğu gibi doktora eğitimim boyunca da yanımda olan ve beni başaracağıma inandıran mesai arkadaşım ve dostum Sayın Öğr. Gör. Halin BAREKE'ye;

Bu zorlu süreçte her türlü anlayış ve sabrı gösteren, maddi ve manevi desteğini eksik etmeyen değerli eşim Asaf ÇAĞATAN'a;

Yorulduğum ve zorlandığım zamanlarda yoluma devam etmemi sağlayan hayatımın ışığı kızım Elif Derin'e;

Ve en önemlisi tıpkı hayatımın her aşamasında olduğu gibi, doktora eğitimim boyunca da yanımda olan, çalışmalarım ve hayatımdaki en büyük destekçim muhteşem kadın, canım anneme ve beni küçük yaşlardan itibaren eğitimin önemine inandıran babama yürekten teşekkür ediyorum.

ÖZET

Seyer, A. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde Saptanan *Blastocystis* spp. Etken ve Subtiplerin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi. Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi, Lefkoşa, 2016.

Bu çalışmada Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti (KKTC)'nde *Blastocystis* spp. ve subtiplerinin (ST) prevalansının araştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda, *Blastocystis* spp.'in gastrointestinal semptomlardaki rolünün incelenmesi ve söz konusu parazit türleri ile subtiplerinin demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik verilerle ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada ayrıca, dışkı örneklerinin muhafaza edilmesi amacıyla kullanılan filtre kağıdına dayalı yöntemin *Blastocystis* spp.'in moleküler tanısındaki etkinliği de araştırılmıştır. Çalışmaya KKTC'de yaşayan toplam 230 gönüllü dahil edilerek, bu kişilerden dışkı örnekleri toplanmıştır. Toplanan her bir numune dondurulma ve filtre kağıtlarına aktarılma esasına dayalı iki farklı yöntem ile muhafaza edilmiştir. Tüm örnekler Nativ-Lugol ve trikrom boyalı preparatlar hazırlanarak mikroskopi ile incelenmiştir. Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonu (*polymerase chain reaction: PCR*) ve DNA dizi analizi uygulanarak, sırası ile *Blastocystis* spp. varlığı ve bu protozoonun subtipleri araştırılmıştır. Demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik veriler ile klinik öykü, katılımcıların anket formlarında verdikleri bilgilere göre değerlendirilmiştir. *Blastocystis* spp. prevalansı direkt mikroskopi, trikrom boyası ve PCR yöntemleri ile sırasıyla %10,5, %10,5 ve %27,8 olarak saptanmıştır. Dışkı örneklerinde *Giardia* spp. (n: 2; %0,8) ve *Entamoeba coli* (n: 1; %0,4) dışında diğer parazitlere rastlanmamıştır. İki şekilde saklanan dışkı örneklerinden izole edilen DNA'ların A260/A280 oranı 1,7-2,2 idi. Donmuş dışkı örneklerinden izole edilen DNA miktarı 25-405 ng/µl, ortalama DNA konsantrasyonu ise 151 ng/µl olarak ölçülmüştür. Filtre kağıdına aktarılan örneklerden izole edilen DNA miktarı 7-339 ng/µl ve ortalama DNA konsantrasyonu 122 ng/µl olarak ölçülmüştür. Dondurulmuş dışkı örneklerinden 49 (%21,3)'u, filtre kağıdına aktarılan dışkı örneklerinden 58 (%25,3)'i PCR ile pozitif saptanmıştır ($p=0,078$). PCR sonucunda, 43 dışkı örneği hem dondurulma hem de filtre kağıdı yöntemleri ile pozitif bulunmuştur. Donmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılmış numunelerden yapılan PCR'in duyarlılıkları sırası ile %86,4 ve %95,5, özgüllükleri ise %98,3 ve %99,4 olarak tespit edilmiştir. İki yüz otuz dışkı örneği arasında, her iki yöntemle saptanan en yaygın subtipler ST3 (n: 20; %31,2), ST2 (n: 18; %28,2), ST1 (n: 8; %12,5), ve ST4 (n: 7; %11) iken; diğer subtipler ise ST6 (n: 3; %4,7), ve ST7 (n: 2; %3,2) olarak gözlenmiştir. İki yöntemin DNA dizi analizinden elde edilen sonuçlara göre uyumu %90,7 olarak belirlenmiştir. *Blastocystis* spp.'in dağılımı ile demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca *Blastocystis* spp. pozitifliği ile gastrointestinal semptomlar arasında da belirgin bir istatistiksel fark saptanmamıştır. Aynı zamanda subtiplerin de demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörler ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma *Blastocystis* spp. ve subtiplerinin PCR ve DNA dizi analizi ile tanısında filtre kağıdı yöntemi kullanılarak yapılan DNA izolasyonunun, dondurulmuş dışkı yöntemine kıyasla daha duyarlı ve etkili olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Aynı zamanda bu çalışma KKTC'de *Blastocystis* spp. prevalansı ve epidemiyolojisi ile ilgili olarak yürütülen ilk çalışmadır. Sonuçlar toplumda *Blastocystis* spp. prevalansının yüksek olduğunu göstermesine rağmen, protozoonun varlığı ile gastrointestinal semptomlar arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu bulgular *Blastocystis* spp.'nin sağlıklı insanlarda bağırsak florasının bir üyesi olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: *Blastocystis* spp., *Blastocystis* spp. subtipleri, filtre kağıdı metodu, prevalans, epidemiyoloji

Destekleyen kurum: Yakın Doğu Üniversitesi (Proje No: CE016-2015)

Destekleyen kurum: Hitit Üniversitesi (Proje No: TIP19002.15.003)

ABSTRACT

Seyer, A. Detection of *Blastocystis* spp. Agents and Subtypes In Turkish Republic of Northern Cyprus (TRNC) By Molecular Methods. Near East University, Institute of Health Sciences, Phd. Thesis in Medical Microbiology and Clinical Microbiology Programme, Nicosia, 2016.

The target of the present study was to detect the prevalence of *Blastocystis* spp. and their subtypes (STs) in Turkish Republic of Northern Cyprus. This study also aimed to determine the role of *Blastocystis* spp. in gastrointestinal symptoms and to evaluate the presence of these parasites and their STs with respect to demographic, socioeconomic and epidemiological data. Furthermore, the efficiency of filter paper-based method that is used for the storage of stool samples was investigated in terms of molecular diagnosis of *Blastocystis* spp. A total of 230 volunteers who live in TRNC were included in this study, and fecal samples were collected from these individuals. Each specimen was stored by using two different techniques which were based on freezing the sample and use of the filter paper method. All samples were examined microscopically by both native-Lugol and trichrome staining methods. Then polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing were conducted for detection of *Blastocystis* spp. and its subtypes, respectively. Demographic, socioeconomic and epidemiological features, and clinical history of the participants were evaluated according to the data obtained by a questionnaire. Prevalence of *Blastocystis* spp. infection was found to be 10.5%, 10.5%, and 27.8%, by direct microscopy, trichrome method, and PCR, respectively. No other parasites were detected in the specimens except *Giardia* spp. (n: 2; 0.8%) and *Entamoeba coli* (n: 1; 0.4%). Pure DNA was obtained with a A260/A280 ratio of 1.7-2.2 in both storage methods. DNA yield from frozen stools was 25-405 ng/μl and average DNA concentration was 151 ng/μl; while these were 7-339 ng/μl and 122 ng/μl for the filter paper method, respectively. PCR positive samples from the frozen stool and filter paper methods were detected to be 49 (21.3%) and 58 (25.3%) respectively ($p=0.078$). Forty-three specimens were found positive by both frozen stool-PCR and filter paper-PCR. The sensitivity of frozen stool-PCR and filter paper-PCR was found 86.4% and 95.5%, while specificity of both tests was 98.3% and 99.4%, respectively. Among the 230 fecal samples, the most common subtypes were found to be ST3 (n: 20; 31.2%), ST2 (n: 18; 28.2%), ST1 (n: 8; 12.5%) and ST4 (n: 7; 11%); while other subtypes were detected as ST6 (n: 3; 4.7%) and ST7 (n: 2; 3.2%) by both storage methods. Concordance of DNA sequencing results obtained from the two methods was noted to be 90.7%. The distribution of *Blastocystis* spp. among all demographic, socioeconomic and other epidemiological factors was not found significant. Furthermore, there was no statistical significance between *Blastocystis* spp. positivity and gastrointestinal symptoms. Also the subtypes were not significantly related to any of the demographic, socioeconomic and epidemiological factors. This is the first study that demonstrates DNA extraction by using the filter paper method is more sensitive and effective than the frozen stool method for diagnosis of *Blastocystis* spp. and their subtypes by PCR and DNA sequencing. Also this study is the first investigation of the prevalence and epidemiology of *Blastocystis* spp. in TRNC. Our results indicated that the prevalence of *Blastocystis* spp. in the community was at high levels, however no significant correlation was found between the presence of the protozoan and the gastrointestinal symptoms. These findings suggest that *Blastocystis* spp. can be members of the intestinal flora in healthy humans.

Key words: *Blastocystis* spp., *Blastocystis* spp. subtypes, filter paper method, prevalence, epidemiology

Supported by Near East University (Grant No: CE016-2015)
Supported by Hitit University (Grant No: TIP19002.15.003)

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma	4
2.3. Morfoloji ve formların tanımlanması	7
2.3.1. Vakuolar form (santral cisim)	7
2.3.2. Granüler form	8
2.3.3. Ameboid form	8
2.3.4. Kist formu	8
2.3.5. Multivakuolar form	10
2.3.6. Avakuolar form	10
2.4. Hayat Döngüsü	11
2.5. Epidemiyoloji ve prevalans	13
2.6. İmmunolojik özellikler	18
2.7. Klinik ve patogeneze	19
2.8. Tanı	23
2.8.1. Mikroskopik tanı	23
2.8.2. Kültür	25
2.8.3. İmmunolojik tanı	27
2.8.4. Moleküler tanı	28

2.8.5. Diğer tanı yöntemleri	29
2.9. Tedavi ve korunma	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Gereç	32
3.2. Yöntemler	33
3.2.1. Örneklerin toplanması, hazırlanması ve saklanması	33
3.2.2. Mikroskopik inceleme	35
3.2.3. Moleküler analiz	37
4. BULGULAR	42
4.1. Anket sonuçları	42
4.1.1. Katılımcıların demografik ve sosyo-ekonomik yönden değerlendirilmesi	42
4.1.2. Katılımcıların epidemiyolojik özellikler yönünden değerlendirilmesi	47
4.2. Mikroskopi sonuçları	51
4.3. Moleküler test sonuçları	52
4.3.1. <i>Blastocystis</i> spp. DNA izolasyon sonuçları	52
4.3.2. <i>Blastocystis</i> spp. PCR sonuçları	53
4.3.3. <i>Blastocystis</i> spp. DNA dizi analizi sonuçları	55
4.3.4. <i>Blastocystis</i> spp. prevalansının demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlere göre değerlendirilmesi	56
4.3.5. <i>Blastocystis</i> spp. subtiplerinin demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlere göre değerlendirilmesi	60
5. TARTIŞMA	63
5.1. Yöntemlerin karşılaştırılması	63
5.2. Demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik verilerin değerlendirilmesi	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	74
KAYNAKLAR	76
EK 1. Etik Kurul İzin Formu	
EK 2. Anket Formu	
EK 3. Onam Formu	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>Blastocystis</i> spp.	<i>Blastocystis</i> türleri
Bp	Baz çifti
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FTA	<i>Flinders Technology Associates</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
IBS	İrritabl bağırsak sendromu
IFA	<i>Indirect Immunofluorescence Assay</i>
IgG2	İmmunoglobulin G2
IL-8	İnterlökin 8
LES	<i>Locke-Egg-Serum</i>
MgCl ₂	Magnezyum klorür
PCR	<i>Polymease Chain Reaction</i>
PVA	Polivinil alkol
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SSU-rRNA	<i>Small subunit ribosomal RNA</i>
SSU-rDNA	<i>Small subunit ribosomal DNA</i>
ST	Subtip
TAE	Tris-asetik asit-EDTA
TMP-SMX	Trimetoprim-sulfametoksazol

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	<i>Blastocystis</i> spp.'nin morfolojik formları. a. Vakuoler form, b. Granüler form, c. Ameboid form, d. Kist formu	9
Şekil 2.2.	Transmisyon elektron mikroskobunda incelenen taze dışkı örneğinde <i>Blastocystis</i> spp.'nin multivakuoler formu. V: vakuoller	10
Şekil 2.3.	Kolonoskopi örneğinde <i>Blastocystis</i> spp.'nin avakuoler formu	11
Şekil 2.4.	<i>Blastocystis</i> spp.'nin yaşam döngüsü	12
Şekil 2.5.	Otuz dokuz yaşında erkek hastada kronik <i>Blastocystis</i> enfeksiyonuna bağlı deri döküntüleri	20
Şekil 2.6.	(a) Taze bakıda (boyanmamış) <i>Blastocystis</i> spp. (b) Lugolle boyanmış <i>Blastocystis</i> spp.	24
Şekil 2.7.	Trikrom boyalı preparatta <i>Blastocystis</i> spp.	25
Şekil 3.1.	<i>Blastocystis</i> araştırmasına katılan 230 kişinin ikamet ettikleri bölgeler, KKTC, 2015	33
Şekil 3.2.	Taze dışkı örneklerinin serum fizyolojik içerisinde homojenize edildikten sonra filtre kağıdına aktarılması, KKTC, 2015	35
Şekil 3.3.	Agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA moleküler belirteci, NC: Negatif kontrol	40
Şekil 4.1.	Katılımcıların cinsiyete göre olan dağılımları, KKTC, 2015	43
Şekil 4.2.	Katılımcıların yaş gruplarına göre olan dağılımları, KKTC, 2015	43
Şekil 4.3.	Katılımcıların medeni duruma göre olan dağılımları, KKTC, 2015	44
Şekil 4.4.	Katılımcıların eğitim düzeylerine göre olan dağılımları, KKTC, 2015	44
Şekil 4.5.	Katılımcıların meslek gruplarına göre olan dağılımları, KKTC, 2015	45
Şekil 4.6.	Katılımcıların sosyo-ekonomik özelliklerine göre olan dağılımları, KKTC, 2015	45

Şekil 4.7.	Yirmi bir katılımcıda gözlenen diğer hastalıkların dağılımları, KKTC, 2015	46
Şekil 4.8.	Katılımcıların kullandıkları su kaynağına göre olan dağılımları, KKTC, 2015	48
Şekil 4.9.	Katılımcıların yurt dışı seyahat durumlarına göre olan dağılımları, KKTC, 2015	48
Şekil 4.10.	Katılımcıların yaşadıkları yerleşim yerlerine göre olan dağılımları, KKTC, 2015	49
Şekil 4.11.	Katılımcıların evcil hayvan sahibi olma durumuna göre dağılımları, KKTC, 2015	49
Şekil 4.12.	Katılımcılardaki gastrointestinal semptomlar, KKTC, 2015	50
Şekil 4.13.	Taze dışkı örneğinde saptanan <i>Giardia</i> spp., KKTC, 2015	51
Şekil 4.14.	Taze dışkı örneğinde saptanan <i>Entamoeba coli</i> , KKTC, 2015	51
Şekil 4.15.	Taze dışkı örneğinden hazırlanan trikrom boyalı preparatta saptanan <i>Blastocystis</i> spp., KKTC, 2015	52

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. <i>Blastocystis</i> spp.'nin sınıflandırılması	5
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar, sarf malzemeler ve kitler	32
Tablo 3.2. Trikrom boyama için hazırlanan reaktifler	36
Tablo 3.3. PCR 'da kullanılan primer dizileri ve özellikleri	38
Tablo 3.4. PCR karışımının hazırlanmasında kullanılan reaktifler ve miktarları	39
Tablo 3.5. Touchdown PCR protokolü	39
Tablo 4.1. Dondurulmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş numunelerin DNA miktarı ve saflık değerleri	53
Tablo 4.2. Donmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılmış numunelerden yapılan PCR'ın <i>Blastocystis</i> spp.'nin saptanma sonuçları açısından karşılaştırması	54
Tablo 4.3. Donmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılmış numunelerden yapılan PCR'ın <i>Blastocystis</i> spp.'nin saptanma sonuçları açısından mikroskopi ile karşılaştırılması	54
Tablo 4.4. Dondurulmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılan numunelerin DNA dizi analizi sonuçları	56
Tablo 4.5. <i>Blastocystis</i> spp. prevalansının demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlere göre olan dağılımı, KKTC, 2015	58
Tablo 4.6. <i>Blastocystis</i> spp. prevalansının gastrointestinal semptomlara göre olan dağılımı, KKTC, 2015	59
Tablo 4.7. <i>Blastocystis</i> suptiplerinin demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlere göre olan dağılımları, KKTC, 2015	61



EK 1

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli 1. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

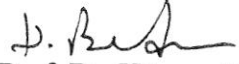


Sayı : E.Kurul -E-15-446
Konu:

446-no'lu çalışma

Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği'nden "Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde saptanan Blastocystis spp. etken ve subtiplerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi" konulu çalışma incelenmiş olup, Etik açıdan oy birliğiyle uygun görülmüştür.

26.03.2015


Prof. Dr. Hürrem Bodur
Etik Kurul Başkanı

ASLI GİBİDİR


Leriman ZEYBEL
Şube Müdürü
06.04.2015

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde saptanan Blastocystis spp. etken ve subtiplerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

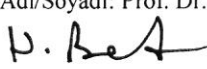
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Etik Kurul Sekreterliği Eğitim Merkezi Danışma Birimi B Blok -1.Kat Altındağ Ankara
	TELEFON	03125085174
	FAKS	3125084938
	E-POSTA	cirakogluten@hotmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Öğr. Gör. Djursun Karasartova			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Çorum			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	Hitit Üniversitesi			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	Öğr. Gör. Djursun Karasartova			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz : Metodolojik çalışma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

ASLI GİBİDİR

Leriman ZEYBEL
Şube Müdürü

06.04.2019

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Hürrem BODUR
İmza: 

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 446/2015		Tarih: 25.03.2015	
	Yukarıda bilgileri verilen Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Öğr. Gör. Djursun Karasartova sorumluluğunda yapılması planlanan "Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde saptanan Blastocystis spp. etken ve subtiplerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi" isimli klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Hürrem BODUR

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Hürrem BODUR	Enf. Hast.ve Kl.Mikrobiyoloji	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Süreyya BARUN	Farmakoloji	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Adil ERYILMAZ	Kulak Burun Boğaz	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ahmet Deniz BELEN	Beyin Cerrahi	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Adem ÖZKARA	Aile Hekimliği	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Sezer KULAÇOĞLU	Patoloji	Ankara Numune EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Altuğ TUNCEL	Üroloji	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Betül BOZKURT	Genel Cerrahi	Ankara Numune EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Doğan UNCU	Tıbbi Onkoloji	Ankara Numune EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. İsmail KARABULUT	Fizyoloji	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Uzm. Dr. Dilek KANYILMAZ	Halk Sağlığı	Ankara Numune EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Ecz. Dilek ATABEY	Eczacılık	Ankara Numune EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Avukat Buket ÖZBEK	Hukuk	Ankara Barosu	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Müftü Yard. M. Münip ŞALLIOĞLU	İlahiyat	Ankara İl Müftülüğü	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde saptanan Blastocystis spp. etken ve subtip moleküler yöntemlerle belirlenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Etik Kurul Sekreterliği Eğitim Merkezi Danışma Birimi B Blok -1.Kat Altındağ Ankara
	TELEFON	03125085174
	FAKS	3125084938
	E-POSTA	cirakogluten@hotmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Öğr. Gör. Djursun Karasartova			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Çorum			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	Hitit Üniversitesi			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	Öğr. Gör. Djursun Karasartova			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz : Metodolojik çalışma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐



Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Hürrem BODUR
İmza: *H. Bodur*

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SİGORTA	☐					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐					
	İLAN	☐					
	YILLIK BİLDİRİM	☐					
	SONUÇ RAPORU	☐					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐					
DİĞER:	☐						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 446/2015	Tarih: 25.03.2015					
	Yukarıda bilgileri verilen Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Öğr. Gör. Djursun Karasartov sorumluluğunda yapılması planlanan "Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde saptanan Blastocystis spp. etken ve subtipleri moleküler yöntemlerle belirlenmesi" isimli klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Hürrem BODUR

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Hürrem BODUR	Enf. Hast.ve Kl.Mikrobiyoloji	Ankara Numune EAH	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>H. Bodur</i>
Prof. Dr. Süreyya BARUN	Farmakoloji	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. Adil ERYILMAZ	Kulak Burun Boğaz	Ankara Numune EAH	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>A. Eryılmaz</i>
Prof. Dr. Ahmet Deniz BELEN	Beyin Cerrahi	Ankara Numune EAH	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>A. Deniz Belen</i>
Prof. Dr. Adem ÖZKARA	Aile Hekimliği	Ankara Numune EAH	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>A. Özkara</i>
Doç. Dr. Sezer KULAÇOĞLU	Patoloji	Ankara Numune EAH	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>S. Kulaçoğlu</i>
Doç. Dr. Altuğ TUNCEL	Üroloji	Ankara Numune EAH	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>A. Tuncel</i>
Doç. Dr. Betül BOZKURT	Genel Cerrahi	Ankara Numune EAH	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>B. Bozkurt</i>
Doç. Dr. Doğan UNCU	Tıbbi Onkoloji	Ankara Numune EAH	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>D. Uncu</i>
Doç. Dr. İsmail KARABULUT	Fizyoloji	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>I. Karabulut</i>
Uzm. Dr. Dilek KANYILMAZ	Halk Sağlığı	Ankara Numune EAH	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>D. Kanyılmaz</i>
Dr. Ecz. Dilek ATABEY	Eczacılık	Ankara Numune EAH	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>D. Atabay</i>
Avukat Buket ÖZBEK	Hukuk	Ankara Barosu	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Müftü Yard. M. Münip ŞALLIOĞLU	İlahiyat	Ankara İl Müftülüğü	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	

*:Toplantıda Bulunma



KKTC *Blastocystis* Projesi ANKET FORMU

*Bu çalışma Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde *Blastocystis* adlı parazitin varlığını saptamak amacı ile yapılmaktadır. Çalışmaya katılan gönüllülerin kimlik bilgileri kesinlikle gizli tutulacak olup, alınacak dışkı örnekleri de sadece bu çalışma için kullanılacaktır.

A. Adınız- soyadınız: ... B. Cinsiyet: ☐ E ☐ K C. Yaşınız: ... D. Eğitim durumunuz: ... E. Mesleğiniz: ...	F. Medeni durumunuz: ☐ Evli ☐ Bekâr G. Yaşadığınız yer: ☐ Köy ☐ İlçe ☐ Şehir merkezi ☐ Diğer H. Sosyo- ekonomik durumunuz: ☐ Düşük ☐ Orta ☐ Yüksek
---	---

I. Dışkılama alışkanlığı: J. Gaitanın görünümü: K. Yeme düzeni: L. İshal tablosu var mı? ☐ Evet ☐ Hayır Varsa ortaya çıktığı zaman: M. Karın ağrısı görülüyor mu? ☐ Evet ☐ Hayır Görülüyorsa sıklığı ne kadar?	N. Kramp görülüyor mu? ☐ Evet ☐ Hayır Görülüyorsa sıklığı ne kadar? O. Bulantı görülüyor mu? ☐ Evet ☐ Hayır Görülüyorsa sıklığı ne kadar? P. Gaz, şişkinlik görülüyor mu? ☐ Evet ☐ Hayır Görülüyorsa sıklığı ne kadar? R. Kabızlık görülüyor mu? ☐ Evet ☐ Hayır Görülüyorsa sıklığı ne kadar?
--	---

S. Son 6 ay içerisinde yurt dışı ziyaretinde bulundunuz mu? ☐ Evet ☐ Hayır Bulunduysanız hangi ülke(ler): T. Bilinen başka hastalığınız var mı? ☐ Evet ☐ Hayır Varsa nedir? U. Daha önce size IBS (İrritabl Barsak Sendromu) teşhisi konuldu mu? ☐ Evet ☐ Hayır Konuldu ise ne zaman? V. Daha önce size kolon kanseri teşhisi konuldu mu? ☐ Evet ☐ Hayır	Konuldu ise ne zaman? W. Uzun süredir kullandığınız ilaç(lar) var mı? ☐ Evet ☐ Hayır Varsa hangi ilaç/ ilaçlar ve ne sıklıkta? X. Evinizde beslediğiniz evcil hayvan var mı? ☐ Evet ☐ Hayır Varsa nedir? Y. Kullandığınız su kaynağı nedir? Şebeke suyu ☐ Diğer ☐
---	--

ANKETİMİZ BİTMİŞTİR, KATKILARINIZ VE KATILIMINIZ İÇİN TEŞEKKÜR EDERİZ.

**ASGARI BİLGİLENDİRİLMİŞ
GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

1. Bu “Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti’nde saptanan *Blastocystis* spp. etken ve subtiplerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi ” isimli çalışmadır.
2. Amaç; Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti’nde *Blastocystis* enfeksiyonu varlığı, varolan etken ve subtipler hakkında bilgi sahibi olunmasıdır. Çalışmaya gastrointestinal sistem şikayeti ve ishal tablosu ile hastanelere veya sağlık ocaklarına başvuran 150 hastadan ve asemptomatik 100 kişiden alınan, toplam 250 gaita örneği dahil edilecektir. Çalışmadan elde edilecek sonuçların Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti’nde mevcut *Blastocystis* enfeksiyonu, mevcut etken ve subtipler, olası enfeksiyon kaynakları hakkında aydınlatıcı ve açıklayıcı veriler sunması beklenmektedir. Ayrıca elde edilecek bu veriler doğrultusunda halkın bu enfeksiyon hakkında bilgilendirilmesi, farkındalığın artırılması ve olası enfeksiyon kaynaklarının kontrol altına alınması hedeflenmektedir.
3. Uygulanacak tedavi bulunmamaktadır. Fakat enfeksiyon saptanması halinde almanız gereken önlemlere yönelik bilgi verilecektir.
4. Semptomatik hastalardan (ishalli vakalar) ve asemptomatik kişilerden araştırma amaçlı olarak gaita örnekleri alınacaktır. Örnek alma işlemi gönüllüler açısından bir risk taşımamaktadır.
5. Elde edilecek gaita örnekleri yalnızca Mikrobiyoloji Laboratuvarında *Blastocystis* spp. açısından incelenecek olup başka bir birim tarafından kullanılmayacaktır. Bu bilgiler gizli olup hastanın isteği dışında başka bir kurum veya kişiyle paylaşılmayacaktır.
6. Bu çalışmada *Blastocystis* enfeksiyonu tanısı mikroskopik ve moleküler yöntemler ile konulacaktır. Gaita örnekleri nativ-lugol ve trikrom boyalı preparatlar hazırlanarak mikroskopta incelenecektir. Ayrıca tüm örnekler filtre kağıtlarına aktarılacaktır. Hem gaita örnekleri hem de filtre kağıtlarına aktarılan gaita örnekleri moleküler testlerin uygulanması için kullanılacaktır.
7. Biyolojik materyaller yurt dışında sadece bazı testlerin yapılması için kullanılacaktır.
8. Gönüllünün örnek verme dışında herhangi bir sorumluluğu bulunmamaktadır.
9. Araştırmaya katılım gönüllü olup kişiler istediği anda çalışmadan ayrılabilir.
10. Gönüllülerin klinik bilgileri gizli tutulacaktır. Araştırma sonuçları yayımlandığında dahi gönüllülerin kimlikleri gizli kalacaktır.
11. Gönüllü istediği her an çalışma hakkında bilgilendirilecektir.
12. Tahmini gönüllü sayısı 250’dir.

“Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu”ndaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum”.

Tarih-imza

.../.../...

Gönüllünün Adı Soyadı

Tarih-imza

.../.../...

Mikrobiyoloji Bilim Uzmanı Ayşe Seyer

Tarih-imza

.../.../...

Yrd. Doç. Dr. Emrah Ruh

1. GİRİŞ

Blastocystis türleri (*Blastocystis* spp.) insanların ve çoğu hayvan türlerinin bağırsaklarını istila edebilen, nötral pH ve 37°C'de optimal üreyen, zorunlu anaerobik, enterik parazitlerdir (Santos ve Rivera, 2013). Diyare, abdominal ağrı, mide gazı, anoreksi, mide bulantısı ve kusma gibi özgül olmayan gastrointestinal semptomlara neden olabilmektedir (Belleza ve diğerleri, 2015). Bu bağırsak protozoonunun gelişmekte olan ülkelerde %50'den daha yüksek bir prevalans ile, dünya çapında en sık rastlanan bağırsak protozoonu olduğu düşünülmektedir (Tan ve diğerleri, 2002). Bu oranın gelişmiş ülkelerde %1,5-10 arasında olduğu bildirilmektedir (Adıyaman Korkmaz ve diğerleri, 2015). İnsanlar arasındaki prevalansı, ülkelerin kanalizasyon donanımına ve kişisel hijyen koşullarına bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir (Nourrisson ve diğerleri, 2014).

Günümüzde bu protozoon üzerine araştırmalar yürüten bazı ileri düzey laboratuvarların varlığına rağmen, sadece morfolojik yapısı geniş ölçüde tanımlanabilmiştir. Hala bulaşı, patogenezi, kültür özellikleri, taksonomisi, hayat döngüsü, biyokimyası ve moleküler biyolojisi hakkında bilinenler sınırlıdır (Tan ve diğerleri, 2002). Tanıda standart tekniklerin bulunmaması ve özellikle de parazitin pleomorfik yapı sergilemesi nedeni ile veriler yanlış yorumlanabilmekte; bu da tanısının yapılamamasına, yaşam döngüsü, patogenezi ve prevalansının hala tam olarak bilinmemesine yol açmaktadır (Mumcuoğlu ve diğerleri, 2013). Patogenezi hakkında bilinenler sınırlı olmasına rağmen Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (*Centers for Disease Control and Prevention: CDC*) bu mikroorganizmayı patojen olarak kabul etmektedir (Santos ve Rivera, 2013).

Blastocystis enfeksiyonunun görüldüğü çoğu vakanın asemptomatik olarak seyretmesi nedeniyle, bu enfeksiyonun kliniği tartışmaya açıktır. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik araştırmalarda irritabl bağırsak sendromundan (IBS) muzdarip hastalarda, sağlıklı popülasyona veya diğer gastrointestinal sistem hastalıklarına sahip olanlara oranla, *Blastocystis* prevalansı daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle, bilim ve tıp dünyasında *Blastocystis* spp.'ye

karşı ilginin artmış olmasına rağmen, bu parazit türleri konusunda araştırma yürüten az sayıda laboratuvar bulunmaktadır. Morfolojik olarak tanımlanmış protozoonun genetik ve antijenik yapısındaki farklılıklar bilgilerin doğrulanmasını veya karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca hayvan modellerinin eksikliği, parazitin immünofizyolojisinin ve patofizyolojisinin çalışılmasını engellemektedir. Bu parazitin iyi tanımlanmış gen ve proteinlerinin azlığı da hücre ve moleküler biyolojisinin çalışılmasını engelleyici faktörler arasındadır (Tan ve diğerleri, 2002).

Türkiye’de yapılan epidemiyolojik araştırmalar, *Blastocystis* spp.’nin gastrointestinal sistem protozoonları arasında ilk sırada yer aldığına işaret etmektedir (Adıyaman Korkmaz ve diğerleri, 2015). Ancak literatür araştırmalarında Kıbrıs adasında bu parazit ile ilgili yapılmış hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu projede, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti (KKTC)’nde asemptomatik kişilerin ve semptomatik hastaların dışkı örneklerinde *Blastocystis* spp. varlığının araştırılması, ve insanlardaki *Blastocystis* spp.’nin prevelansı ile subtipleri (ST) hakkında bilgi sahibi olunması hedeflenmiştir. Bu araştırmada aynı zamanda, *Blastocystis* spp.’nin gastrointestinal semptomlarda rolü olup olmadığının gözlenmesi, söz konusu parazit türleri ve subtiplerinin demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik verilerle ilişkisinin değerlendirilmesi, ve olası enfeksiyon kaynaklarının saptanması amaçlanmıştır. Bu çalışmada ayrıca, dışkı örneklerinin muhafaza edilmesi amacıyla kullanılan filtre kağıdına dayalı yöntemin *Blastocystis* spp.’nin moleküler tanısındaki etkinliği de araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Blastocystis spp.'nin değişken morfolojik yapısı yıllar boyunca bu parazitlerin tanımlanmasında belirsizliğe yol açan esas faktör olmuştur. Mikroskopinin erken dönemlerinde, *Blastocystis* parazitinin farklı formları, sıklıkla birtakım kalıntılarla ve dejenere olmuş hücrelerle karıştırılmıştır (Zierdt, 1991). Geçmiş yıllardaki araştırmacılar *Blastocystis hominis*'i tanımlamada yetersiz oldukları için, hatalı olarak bu mikroorganizmayı kamçılı bir organizmanın kisti, bitki materyalleri, maya ve mantar hücreleri ile karıştırmışlardır (Tan ve diğerleri, 2002). 1849 yılında Londra'daki kolera epidemisi sırasında Brittan ve Swayne, *Blastocystis*'in de aralarında bulunduğu, bilinmeyen parazit yumurta ve kistlerini kolera etkeni olarak belirlemişlerdir. Brittan gördüğü *Blastocystis* formlarını 'dairesel hücreler' olarak, Swayne ise 'kolera cisimcikleri' olarak tanımlamış ve bu formları kolera etkeni olarak kabul etmişlerdir. Fakat ilerleyen yıllarda bu formların başka parazitlerin kistleri olduğu anlaşılmıştır. Yıllar boyunca birçok araştırmacı *Blastocystis*'i keşfetmeye çok yaklaşmış fakat yetersiz bilgiler nedeni ile bu gerçekleştirememiştir (Zierdt, 1991).

1900'lü yılların başında bu protozoon Alexieff ve Emile Brumpt tarafından birbirlerinden bağımsız olarak gözlemlenmiştir (Parija ve Jeremiah, 2013). 1911 yılında *Blastocystis* paraziti ile ilgili ilk morfolojik tanımlamayı yapan Alexieff, *Blastocystis enterocola* adını verdiği bu mikroorganizmayı bağırsakların zararsız saprofitik mayası olarak tanımlamıştır (Bangyozova ve diğerleri, 2008; Parija ve Jeremiah, 2013). Bu, sınıflandırmanın gereksinimlerini karşılayan ilk tanımlama olmuştur (Zierdt, 1991). 1912 yılında Brumpt, *Blastocystis hominis* olarak isimlendirdiği bu mikroorganizmanın insanlara zararsız saprofit bir bağırsak mayası olduğu konusunda Alexieff ile hemfikir olmuştur. Tür isminde yapılan bu değişikliğin bilim dünyasında kabul görmesinin nedeni Brumpt'un Alexieff'in aksine sadece insan dışkı örnekleri ile çalışmış olmasıdır. *B. hominis*, mikroskopik dışkı incelemelerinde maya benzeri ışıltılı görüntüye sahip olması, psödopodlarının bulunmaması,

hareketsiz olması, büyüklüğünün bir protozoondan çok daha fazla olması, ikiye bölünerek çoğalma şeklinin kolayca tomurcuklanma ile karıştırılabilmesi gibi nedenlerle maya olarak sınıflandırılmıştır (Zierdt, 1991).

1967’de Zierdt ve diğerleri, *Blastocystis*’in zorunlu anaerobik olması, mantar ve bakteriler için hazırlanan besiyerlerinde üreyememesine karşın bağırsak protozoonları için hazırlanan besiyerlerinde üremesi, antifungallere dirençli ve antiprotozoal ilaçlara duyarlı olması, hücre duvarının olmaması gibi fizyolojik ve morfolojik kriterlere dayanarak bu mikroorganizmayı protozoon olarak sınıflandırmıştır (Bangyozova ve diğerleri, 2008; Parija ve Jeremiah, 2013). Zierdt ve diğerlerinin, bu protozoonun çeşitli morfolojik formlarının olduğunu ortaya koydukları 1967 yılına kadar bu parazitle ilgili az sayıda araştırma bulunmaktaydı (Doğruman Al ve Hökelek, 2007). 1991’de Zierdt, *B. hominis*’in bağırsak hastalıklarındaki rolünü gösterip, bağırsak parazitleri arasına dahil ederek ilk kez bu protozoon hakkında biyologların ve klinisyenlerin ilgisini çekmeyi başarmıştır. Bu nedenle *Blastocystis* enfeksiyonu, “Zierdt-Garavelli hastalığı” olarak da bilinmektedir (Bangyozova ve diğerleri, 2008; Parija ve Jeremiah, 2013; Tan ve diğerleri, 2002).

2.2. Sınıflandırma

1976’dan itibaren araştırmacıların çoğu *Blastocystis* spp.’yi Sarcodina alt bölümünden fırsatçı bir protozoon olarak kabul etmişlerdir (Bangyozova ve diğerleri, 2008).

1989 yılında Johnson ve diğerleri, *Blastocystis* spp.’nin küçük altbirim ribozomal ribonükleik asit (*small subunit ribosomal RNA: SSU rRNA*) sekansının kısmi analizi ile mantarlar, sarkodinler ve sporozoonlarla monofiletik olmadığını ortaya koymuşlardır. Bu bilgiye dayanarak Johnson ve diğerleri (1989), *B. hominis*’in mayalarla ilişkili olmadığını, siliatlar ve apikompleksa grubuna dahil edilebileceğini ileri sürmüşlerdir (Tan ve diğerleri, 2002).

1996 yılında Silberman ve diğerleri, *Blastocystis* spp.'nin tüm ssrRNA genini sekanslayarak, ve *elongation factor 1- α* 'nın moleküler analizi ile bu mikroorganizmanın Cavalier-Smith'in Heterokontası ile eşanlamli olan Stramenofiller (algler, diatomlar, cıvık mantarlar gibi tek hücreli ve çok hücreli protistler) içerisinde sınıflandırılması gerektiğini belirtmişlerdir (Tan ve diğerleri, 2002). *Blastocystis* hiçbir zaman bu botanik kompleks içinde yer almadığı için, bu sınıflandırma moleküler düzeyde tatmin edici bulunsa da morfolojik açıdan *Blastocystis* ile diğer stramenofiller arasında zıtlık yaratmıştır. Bu nedenle *Blastocystis*'in mevcut beş alemde ayrı olarak yeni bir grup içerisinde sınıflandırılması gerektiği düşünülmüş ve bu yeni aleme Chromista adı verilmiştir (Parija ve Jeremiah, 2013).

Cavalier-Smith'in revize edilmiş ve altı alemi bulunan canlı sınıflandırmasına göre *Blastocystis* spp. daha önceleri belirtildiği gibi mantar veya protozoan olarak kabul edilemeyeceği ve silleri de olmadığı için, Tablo 2.1'de gösterildiği şekilde Chromista aleminde sınıflandırılmıştır (Cavalier-Smith, 2002). Bu sınıflandırma *Blastocystis hominis*'i insanda parazit olan ilk kromist yapmıştır (Tan ve diğerleri, 2002).

Tablo 2.1. *Blastocystis* spp.'nin sınıflandırılması.

Kingdom	Chromista
Subkingdom	Chromobiota
Infra kingdom	Heterokonta
Subphylum	Opalinata
Class	Sarcomastigophora
Order	Blastocystea
Family	Blastocystidae
Genus	Blastocystis

Blastocystis'in tür seviyesinde tanımlanması hala belirsizliğini koruyan bir konudur. İlk zamanlarda *Blastocystis* spp.'nin tür ismi izole edildiği konağa göre verilmiştir; örneğin insandan izole edilenler *Blastocystis hominis*, sıçanlardan izole edilenler ise *Blastocystis rattii* olarak isimlendirilmiştir.

Sonraki yıllarda *Blastocystis* çok çeşitli konaklardan izole edilmiş, ayrıca insan-hayvan ve hayvan-insan bulaşı da bildirilmiştir (Parija ve Jeremiah, 2013).

Yakın zamanda yapılan araştırmalarda insanları ve hayvanları enfekte eden tek bir *Blastocystis* türü olduğunun gösterilmesi üzerine 2007 yılında *Blastocystis hominis* teriminin kullanılmasından vazgeçilmiş ve insanlardan ve hayvanlardan izole edilen türlerin '*Blastocystis* spp. subtype nn' olarak adlandırılması kararlaştırılmıştır. Bu isimlendirmede 'nn' genetik olarak tanımlanmış farklı türlere ait numarayı ifade etmektedir (Eroğlu, 2015).

Daha sonraki zamanlarda araştırmacılar *Blastocystis*'in konak özgüllüğünün ve patojenik potansiyelinin SSU rRNA dizisindeki değişikliklerle ilişkili olduğunu farketmişlerdir. Bu değişikliklere göre *Blastocystis* cinsi, tür olarak da kabul edilebilecek çeşitli subtiplere ayrılmıştır. Günümüzde küçük altbirim ribozomal deoksiribonükleik asit (*small subunit ribosomal DNA: SSU rDNA*)'in subtiplerle daha iyi korelasyonu olduğu belirlenmiş ve bugüne kadar 17 adet subtip tanımlanmıştır. Tüm bu bilgilerin ışığında organizmayı "*Blastocystis* türleri" olarak isimlendirmenin ve SSU rRNA veya SSU rDNA sekansına göre daha ayrıntılı tanımlamanın daha uygun olduğu düşünülmektedir (Parija ve Jeremiah, 2013).

Modern moleküler tekniklerin gelişimi sayesinde çeşitli *Blastocystis* izolatlarının genomlarının heterojen olduğu tespit edilmiştir. Morfolojik olarak benzer olan insan ve hayvan izolatlarının büyük ihtimalle ayrı türler olabileceği düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda çeşitli *Blastocystis* spp. izolatlarının ssrRNA geninin nükleotid sekansı ve restriksiyon parça uzunluk çeşitliliği (*restriction fragment length polymorphism: RFLP*) karşılaştırması bu protozoonun konak özgüllüğünün olmayabileceğini ve zoonotik enfeksiyonlarda belli hayvanların potansiyel rezervuar olabileceğini göstermiştir. Bazı araştırmacılar, virülans konusundaki karışıklıkların genotip çeşitliliğine bağlı olabileceğini savunmaktadırlar (Tan, 2004).

2.3. Morfoloji ve formların tanımlanması

Blastocystis spp. morfolojik açıdan polimorfik bir mikroorganizmadır (Tan, 2004). Gerek dışkı örneklerinde gerekse kültürlerde farklı morfolojik formlarına rastlanmaktadır (Tan ve diğerleri, 2002). Formların birbirlerine dönüşümü hakkındaki bilgiler sınırlıdır (Tan, 2004). Ozmotik değişimler, bazı ilaçların ortamda bulunması ve metabolik durum gibi fiziksel faktörlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* morfolojiyi etkileyebileceği düşünülmektedir (Stenzel ve Boreham, 1996). Polimorfizmin patojenite ile ilişkisi henüz net olarak bilinmemektedir. Avakuoler forma insan bağırsağında rastlanırken, dışkı örneklerinde ise sıklık sırası ile vakuoler, granüler, multivakuoler ve kist formuna rastlanmaktadır (Tan ve diğerleri, 2002). Morfolojideki bu çeşitliliğin iyi biliniyor olması, *Blastocystis* spp.'nin mikroskobik tanıda gözden kaçmasını engelleyebilmesi nedeniyle önemli bir konudur (Stenzel ve Boreham, 1996).

2.3.1. Vakuoler form (santral cisim)

In vitro *Blastocystis* saf kültürlerinde ve rutin mikroskobik tanıda, genellikle tipik vakuoler forma rastlanmaktadır (Tan, 2004). Bu, saf sıvı kültürlerde baskın form olarak gözlemlenirken, daha küçük formlara ise taze dışkı örneklerinde rastlanmaktadır (Tan ve diğerleri, 2002). Çeşitli büyüklüklerde olabilen bu form karakteristik olarak büyük bir vakuole sahiptir ve Şekil 2.1.a'da görüldüğü üzere santral vakuol hücrenin neredeyse %90'ını kapsamaktadır (Tan ve diğerleri, 2002; Tan, 2004). Vakuolün etrafını ince bir sitoplazma sarmaktadır. Golgi cisimciği, çekirdek ve mitokondri gibi organeller sitoplazmik boşlukta bulunmaktadır (Tan, 2004). Sitoplazmik zarın dışında ise *slime* tabakası veya kapsül bulunmaktadır (Tan ve diğerleri, 2002). Bu form sıcaklığa, hipertonic/ hipotonik ortamlara ve oksijene duyarlıdır. Santral vakuolün görevi hala tam olarak bilinmemekle birlikte, bunun depo organeli olabileceği, şizogonide rol alabileceği veya apoptoz sırasında apoptotik cisimciklerin birikim yeri olabileceği düşünülmektedir (Tan, 2004).

2.3.2. Granüler form

Granüler forma daha ziyade saf olmayan veya yaşlı *Blastocystis* kültürlerinde rastlanmaktadır (Tan, 2004). Vakuoler formdan meydana geldiği düşünülmese de (Tan ve diğerleri, 2002), ortalama vakuoler formdan biraz daha büyüktür (Stenzel ve Boreham, 1996). Kültür ortamındaki serum konsantrasyonunu artırmak, hücrelerin başka kültür ortamına aktarılması, saf kültür üretimi veya belirli antibiyotiklerin kullanımı gibi faktörler bu dönüşümü indükleyebilmektedir (Tan ve diğerleri, 2002). İnce yapı olarak vakuoler forma benzemesine karşın, sitoplazmada veya santral vakuolde granüllerin bulunması ile farklılık göstermektedir (Şekil 2.1.b). Granüller, miyelin benzeri inklüzyonlar, küçük veziküller, kristalin granülleri veya lipid damlacıkları olabilmektedirler. Bu form da tıpkı vakuoler form gibi sıcaklığa, hipertonic/hipotonik ortamlara ve oksijene duyarlıdır (Tan, 2004).

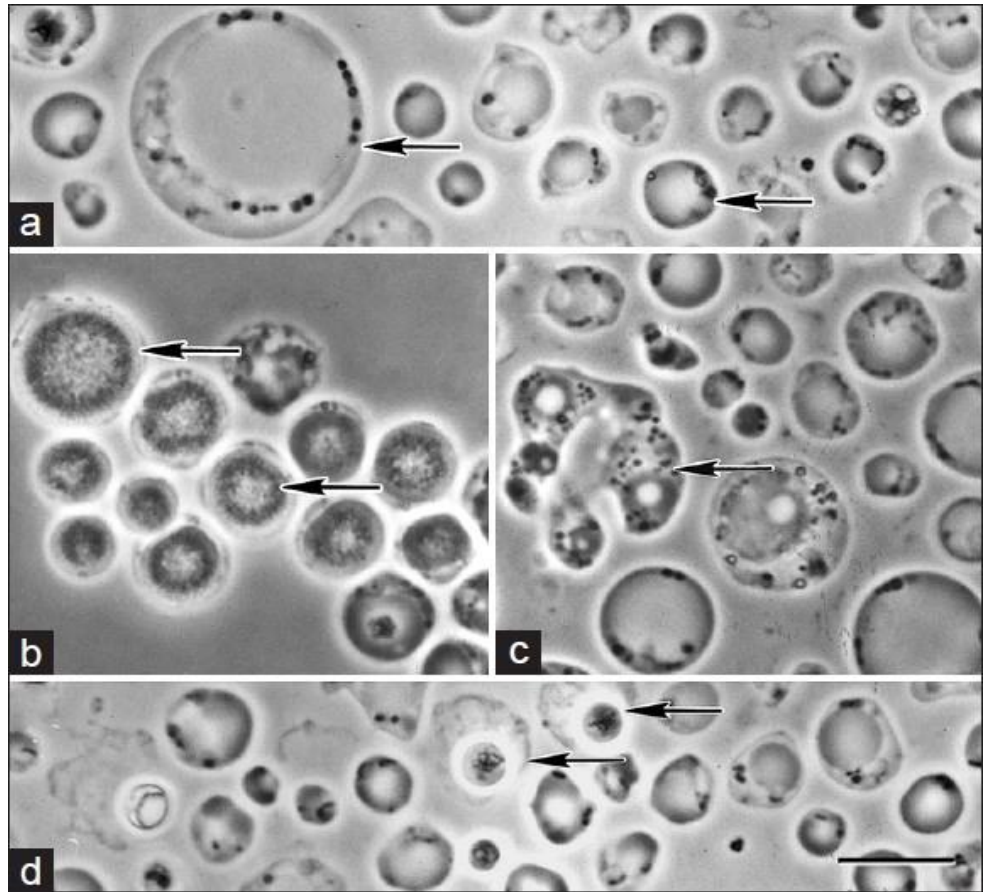
2.3.3. Ameboid form

Ameboid form eski ve ilaç ilave edilmiş kültürlerde veya dışkı örneklerinde gözlenebilmektedir (Tan, 2004). Düzgün olmayan bir hücre şekli ve uzamış psödopodları vardır (Şekil 2.1.c) (Stenzel ve Boreham, 1996). Ameboid forma dönüşümü indükleyen faktörler hakkındaki bilgiler sınırlıdır (Tan, 2004). Ancak, yakın zamanda yapılan bir çalışmada ameboid formun sadece semptomatik hastaların örneklerinde saptandığı, asemptomatik bireylerde ise çoğunlukla vakuoler formun bulunduğu bildirilmiştir. Ameboid formun bağırsak yüzeyine olan güçlü adezyonu ve bu yüzeyde çoğalması, bunun semptomlardan sorumlu olan form olduğunu düşündürmektedir (Malatyali ve Özçelik, 2011).

2.3.4. Kist formu

Blastocystis spp.'nin kist formu genellikle kültürlerdeki vakuoler ve granüler formlardan, ve taze dışkılarıdaki multivakuoler formlardan daha

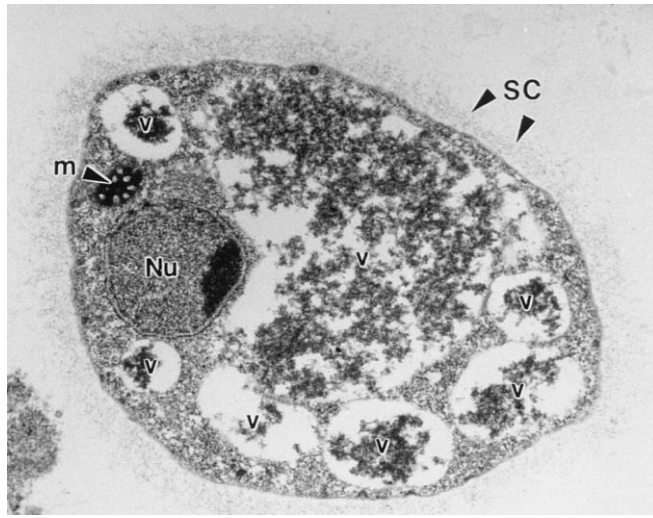
küçüktür (Stenzel ve Boreham, 1996). Şekil 2.1.d'de oklarla işaretli kısım, bu formun etrafının kalın ve çok katlı bir duvarla çevrili olduğunu göstermektedir (Tan, 2004). Sahip olduğu bu yapı onu çevre şartlarına karşı daha dirençli hale getirmektedir (Tan ve diğerleri, 2002). Bu formda büyük santral vakuol gözlenmemektedir. Distile su içerisinde parçalanmaya karşı dirençli olan ve on dokuz gün oda sıcaklığında yaşayabilen bu form, aşırı sıcak ve soğuk ısılarda, ayrıca dezenfektan karşısında frajil bir yapı sergilemektedir. Sitoplazmasında trikrom ile boyanmayan glikojen ve lipid içeren çok sayıda vakuol bulunmaktadır (Tan, 2004).



Şekil 2.1. *Blastocystis* spp.'nin morfolojik formları. a. Vakuoler form, b. Granüler form, c. Ameboid form, d. Kist formu (Parija ve Jeremiah, 2013).

2.3.5. Multivakuoler form

Multivakuoler form, sitoplazmasında çok sayıda ve küçük vakuollerin bulunması ile vakuoler formdan ayırt edilebilmektedir (Şekil 2.2). Bu forma en sık taze dışkı örneklerinde rastlanmaktadır (Tan ve diğerleri, 2002). Genellikle bir, nadiren iki adet çekirdeğe sahiptir (Stenzel ve Boreham, 1996). Kültür ortamında vakuoler veya granüler forma dönüşebilmektedir (Tan ve diğerleri, 2002).



Şekil 2.2. Transmisyon elektron mikroskopunda incelenen taze dışkı örneğinde *Blastocystis* spp.'nin multivakuoler formu. V: vakuoller (Stenzel ve Boreham, 1996).

2.3.6. Avakuoler form

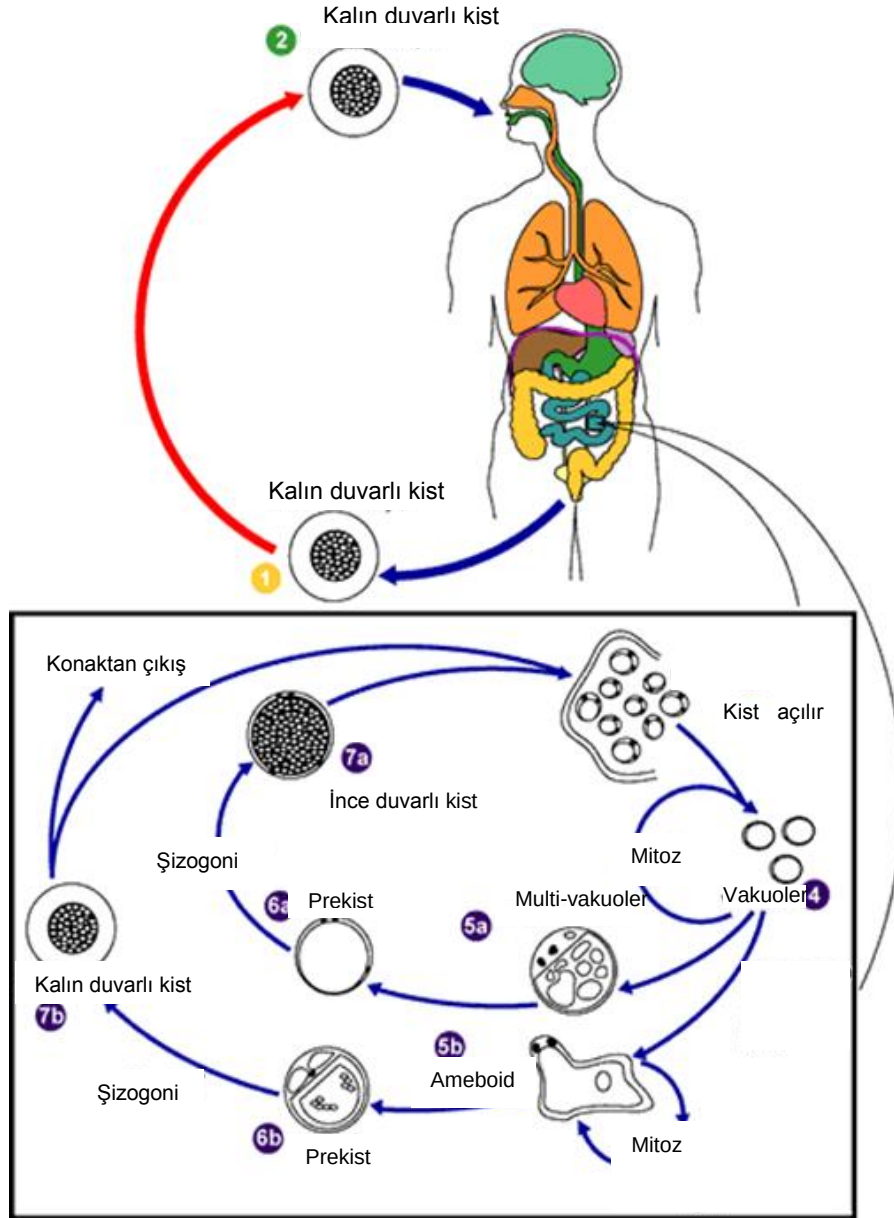
Avakuoler formda, yüzey örtüsü ve vakuol bulunmamaktadır (Şekil 2.3). Genellikle çok sulu dışkılarda veya kolonoskopi örneklerinde gözlenmektedir (Tan ve diğerleri, 2002).



Şekil 2.3. Kolonoskopi örneğinde *Blastocystis* spp.'nin avakuoler formu (Stenzel ve Boreham, 1996).

2.4. Hayat Döngüsü

Blastocystis spp.'nin ikiye bölünme (*binary fission*), tomurcuklanma, plazmotomi, endodiyojeni, çoklu bölünme ve şizogoni ile çoğaldığını belirten araştırmalar olmasına rağmen, en yaygın ve kabul görmüş üreme şekli vakuoler formun ikiye bölünmesidir. Multivakuoler formun vakuollerinin genişleyip birleşerek vakuoler formu oluşturduğu belirtilmektedir (Şekil 2.4). Enfektif form olarak kabul edilen 6-40 µm büyüklüğündeki kist formu ise ağız yoluyla alınmakta, bağırsakta ekskiste olarak sindirim kanalının epitel hücrelerinde aseksüel olarak çoğalmaktadır (Parija ve Jeremiah, 2013). Vakuoler form bağırsaklarda multivakuoler forma dönüşüp prekist formunu, prekist formu ise şizogoni ile ince duvarlı kist yapısını oluşturabilmektedir. İnce duvarlı kist yapısının otoenfeksiyondan sorumlu olduğu ifade edilmektedir. Öte yandan vakuoler form bağırsaklarda ameboid forma da dönüşebilmekte, oluşturduğu prekistler şizogoni ile kalın duvarlı kist formunu oluşturabilmektedir. Kalın duvarlı kist formunun dışkı ile dışarı atılan, bu nedenle de su ve gıdaları kontamine eden form olduğu bilinmektedir. Kültürde gözlenen vakuoler formlar, kültür ortamının özelliği değiştirildiği zaman granüler forma dönüşebilmektedir (Doğruman Al ve Hökelek, 2007).



Şekil 2.4. *Blastocystis* spp.'nin yaşam döngüsü. (1) İnsan bağırsağından çıkan kalın duvarlı kist yapısı (2) oral yolla vücuda alınır (3). Kalın duvarlı kist bağırsaklarda açılır ve (4) vakuoler forma dönüşür, mitozla çoğalan vakuoler form (5a) multivakuoler forma veya (5b) ameboid forma dönüşür, hem multivakuoler form hem de ameboid form mitozla (6a, 6b) prekist yapısını oluşturur. (7a, 7b) Prekist yapısı şizogoni ile kalın duvarlı kist yapısını oluşturur ve bu kistler fekal yolla vücuttan dışarıya atılır (CDC. (t.y.).

Erişim: 04 Mayıs 2016, <http://www.cdc.gov>. Türkçe'ye çevrilmiştir).

2.5. Epidemiyoloji ve prevalans

Blastocystis spp., enfeksiyon kaynağı insan olan (hasta veya taşıyıcı) ayrıca sürüngen ve artropodları da içine alan çok geniş bir konak popülasyonuna sahiptir (İnceboz ve diğerleri, 2011). Kuşlar ve memeliler gibi hayvanlar rezervuar görevi görebilmektedir. Esas bulaş fekal-oral yol ile olmasına rağmen, cinsel yol ve kontamine su kaynakları ile de bulaş bildirilmiştir. *Blastocystis* spp. kistleri ile kontamine olmuş su, gıda veya ellerin yanı sıra, toz partikülleri de enfeksiyon kaynakları arasında sayılabilmektedirler. Sporadik vakalar gözlenebileceği gibi, bir grup veya aile içinde bulaş veya büyük epidemiyolojik salgınlar da söz konusu olabilmektedir (Bangyozova ve diğerleri, 2008).

Blastocystis enfeksiyonu tüm yaş grupları ve tüm cinsiyetlerde görülmektedir, ancak en yaygın olarak çocuk ve yaşlılar enfekte olmaktadır. Enfeksiyonun kurbanları ise genellikle homoseksüeller ve yaşlılardır. Seyahat diyaresi olan kişilerde ya da ılıman ülkeleri ziyaret etmiş bireylerde *Blastocystis* enfeksiyonu daha sık karşımıza çıkabilmektedir (Bangyozova ve diğerleri, 2008).

Blastocystis enfeksiyonunun prevalansı mevsimlere bağlı değişiklik göstermektedir (Scanlan ve diğerleri, 2014). Yapılan çalışmalar, *Blastocystis* spp. ile ilişkili enfeksiyonların diğer parazit enfeksiyonlarında olduğu gibi ilkbahar ve yaz aylarında, çoğunlukla da Ağustos ayında yüksek oranda saptandığını göstermektedir (İnceboz ve diğerleri, 2011). Amerika'da yapılan bir başka epidemiyolojik araştırmada, *Blastocystis* spp.'ye bağlı gelişen enfeksiyonların en düşük Şubat ayında, en yüksek Temmuz-Eylül aylarında saptandığı belirlenmiştir (Amin, 2006). Yine Tayland'da yapılan bir araştırma enfeksiyonların yoğun yağış olan Temmuz-Eylül aylarında daha sık görüldüğünü ortaya koymuştur. Enfeksiyonların sıklıkla yağışların bol olduğu mevsimlerde gözlenmesi, su kaynaklarının veya diğer çevresel ortamların dışkı ile kontamine olması ile ilişkilendirilmiş ve *Blastocystis* spp.'nin su kaynaklı bulaşa yol açabileceğini düşündürmüştür (İnceboz ve diğerleri, 2011).

Blastocystis enfeksiyonunun tropikal, subtropikal iklimlerde ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak gözlenmesi nedeniyle, coğrafik dağılımın dünya genelinde olduğu varsayılmaktadır (Wang ve diğerleri, 2002). Ilıman ülkelerde bu parazitle karşılaşma oranı %30-%50 iken, düşük gelirli ülkelerde veya tropikal bölgelerdeki ülkelere seyahat eden kişilerde bu yüzdeliğin daha fazla olması beklenmektedir (Bangyozova ve diğerleri, 2008). Genellikle gelişmekte olan ülkelerde prevalansın daha yüksek olmasının, *Blastocystis* spp. ile kontamine olmuş su kaynakları, düşük sanitasyon düzeyi veya hayvanlarla yakın temas ile ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir (Kırkoyun Uysal ve diğerleri, 2014).

Bugüne kadar insan bağırsak florası ile ilgili yapılan çoğu araştırmada bakteriler incelenmiştir. Bu nedenle, *Blastocystis* spp. dahil diğer bağırsak mikroorganizmalarının çeşitliliği ve görevleri hakkındaki bilgiler yetersiz kalmıştır (Kırkoyun Uysal ve diğerleri, 2014). Günümüzde *Blastocystis* spp.'nin sınıflandırılması, epidemiyolojisi, patogenezi ve kliniği ile ilgili çalışmalara olan ilgi giderek artmıştır. Ancak insanlardan elde edilen epidemiyolojik veriler hala yetersizdir (Kırkoyun Uysal ve diğerleri, 2014). Bunun nedeni epidemiyolojik bilgilerin genellikle gastrointestinal şikayeti olan kişilere ait olması ve buna bağlı olarak toplumun geneline dair epidemiyolojik verileri yansıtmamasıdır (İnceboz ve Usluca, 2009).

Yürütülen epidemiyolojik çalışmalar, *Blastocystis* spp.'nin dünya genelinde en sık rastlanan parazit olduğunu ortaya koymuş ve bir ülkenin farklı coğrafik bölgelerindeki saptanma sıklığının bile farklı olabileceği bildirilmiştir. *Blastocystis* spp. prevalansı Japonya ve Singapur'da %0,5-%3,3; Güney Amerika ülkeleri, Mısır ve Endonezya'da ise %27,2-%60 olarak belirlenmiştir. Türkiye'de farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda bu oran %2,1-%23,5 olarak bildirilmiştir. Türk ve arkadaşları Ankara'da yürüttükleri bir çalışmada *Blastocystis* spp. pozitifliğini %28,6 gibi yüksek bir oranda bulmuşlardır (Türk ve diğerleri, 2012).

Genellikle gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalarda *Blastocystis* spp. oranı %1,5-%10 olarak belirtilirken (Wang ve diğerleri, 2002), en yüksek oran

%100 olarak Afrika'da Senegal'in nehir havzasında saptanmıştır (El-Safadi, 2014). Bu çalışmaya semptomatik ve asemptomatik çocuklardan toplanan 93 dışkı örneği dahil edilmiş ve tüm dışkı örnekleri (%100) *Blastocystis* spp. açısından pozitif bulunmuştur. *Blastocystis* enfeksiyonunun önemli bir halk sağlığı sorunu olarak değerlendirildiği bu çalışmada en sık rastlanılan subtip de ST3 olarak belirlenmiştir (Chen ve diğerleri, 2014).

Blastocystis spp.'ye bağlı gelişen asemptomatik enfeksiyonlar dünya genelinde yaygın olarak görülmektedir (Leelayoova ve diğerleri, 2004). Scanlan ve diğerleri çalışmalarında yüksek bir pozitiflik oranı saptamışlar ve bu paraziti insan sindirim kanalında yaygın bulunan bir mikroorganizma olarak değerlendirmişlerdir. Ayrıca subtip ve genotiplerde gözlenen yüksek varyasyonlar sonucunda *Blastocystis* spp.'nin sağlıklı insanların sindirim kanalında da herhangi bir semptom olmaksızın bulunabileceğini bildirmişlerdir (Scanlan ve diğerleri, 2014). Diğer yandan, Orta Doğu ve Avrupa'da yürütülen çalışmalarda IBS tanısı konulan kişilerin %30-%40'ının *Blastocystis* spp. taşıyıcısı olduğu belirtilmiştir (Boorom ve diğerleri, 2008).

Blastocystis spp.'nin bulaş şekli ve enfeksiyon kaynağı ile ilgili epidemiyolojik veriler sınırlı ve çelişkilidir. En yaygın kabul gören bulaş şekli diğer bağırsak protozoonlarında olduğu gibi fekal-oral yoldur. Kist formu dış çevre koşullarına en dirençli form olarak belirlendiği için (Moe ve diğerleri, 1996), bu formun bulaştan sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Kain ve diğerleri, 1987). Fekal-oral yol haricinde bu enfeksiyonun bulaşında kötü hijyen koşulları, toplu yaşam, hayvanlarla temas, diyabet, immün yetmezlik durumları gibi kişiye ait predispozan faktörler, riskli endemik bölgelere seyahat veya bu bölgelerden başka bölgelere göç edilmesi gibi faktörler de sayılabilmektedir (İnceboz ve diğerleri, 2011). Su kaynaklarının modern tesislerde, son teknolojiyle işlem gördüğü gelişmiş ülkelerde bu parazitin nasıl yayıldığı anlaşılamamış olmakla birlikte, bu durumun vektörler aracılığı ile, veya atık su arıtma tesislerinin ve işlem görmüş su kaynaklarının kontaminasyonu nedeniyle gerçekleşebileceği düşünülmektedir (Boorom ve diğerleri, 2008).

Suresh ve diğerkleri yaptıkları çalışmada, *Blastocystis hominis*'in kist formunu oral yolla farelere verdikten sonra, otopsi ile farelerin kalın bağırsak ve çekumlarında bu parazite rastlamışlardır. Bu çalışma sonucunda, dışkıda en sık rastlanan form olan vakuoler forma kıyasla kist formunun bulaş potansiyelinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *Blastocystis* spp. ile enfekte olma riski çevredeki kişi sayısı, mevsimsel koşullar, enfeksiyon süresi, bulaş aşamaları, tarım uygulamaları, konağın davranış ve aktivitesi, sosyo-ekonomik durum, etnik köken farklılıkları, coğrafi dağılım, iklim, hidrojeoloji ve sanitasyon ile ilişkili olabilmektedir (Suresh ve diğerkleri, 2005).

Birçok çalışmada, özellikle tropikal ülkelerde yaşayan bireylerde veya bu bölgelere seyahat etmiş olan kişilerde *Blastocystis* spp.'nin su kaynaklı bulaşının gözlenebileceği ifade edilmiştir (Kain ve diğerkleri, 1987). Saovane ve diğerkleri, arıtılmamış su tüketen askeri personelde *Blastocystis* spp. ile enfekte olma riskinin artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu bulgu *Blastocystis* spp.'nin su kaynaklı bulaşının olabileceğine dair güçlü kanıt sunmaktadır (Leelayoova ve diğerkleri, 2004). Su kaynaklı olduğu düşünülen iki *Blastocystis* enfeksiyonu salgını, *B. hominis* kistlerinin klora karşı dirençli olması nedeniyle, klorlanmış içme sularının da bu parazitin bulaşında potansiyel risk taşıyabileceğini göstermiştir. Ayrıca atık suların tekrar kullanıma sunulması ile bazı ülkelerde paraziter enfeksiyonlar hızlı bir artış kaydetmiştir (Suresh ve diğerkleri, 2005).

Blastocystis cinsinin farklı subtipleri farklı rezervuarlara, coğrafik dağılıma ve farklı bulaş şekillerine sahiptirler (Tall ve diğerkleri, 2013). Öte yandan, subtipler konağa özgün değildirler ve insanlarla hayvanlar arasında çapraz bulaş olabilmektedir. Hem enfeksiyonun kaynağı hem de bulaş döngüsü hakkında bilgiler sunması nedeniyle subtiplerin tanımlanması epidemiyoloji açısından oldukça önemlidir. İnsanlarda en sık görülen subtip ST3 olmasına rağmen (Leelayoova ve diğerkleri, 2008), Tayland ve Libya'da ST1'in en yaygın subtip olduğu gözlenmiştir (Thathaisong ve diğerkleri, 2013).

Günümüzde SSU rRNA yöntemi ile *Blastocystis* cinsi içinde 17 subtip tanımlanmıştır. Bu subtiplerden dokuz tanesi insanlardan izole edilmiştir. Buna göre ST1, insanlar da dahil olmak üzere tüm memelilerden; ST2, primatlardan ve domuzlardan; ST3, insanlardan ve primatlardan (Tall ve diğerleri, 2013); ST4, kemirgenlerden; ST5, sığırlardan ve domuzlardan; ST6 ve ST7, kuşlardan; ST8, maymun, sülün ve insanlardan; ST9 ise, nadir olarak insanlardan izole edilmiştir (Adıyaman Korkmaz ve diğerleri, 2015).

ST3, Türkiye'nin de içinde bulunduğu birçok ülkede izole edilmesi nedeni ile kozmopolit bir dağılım sergilediği kabul edilmektedir. ST4 ise en sık karşılaşılan ikinci subtipdir (Tall ve diğerleri, 2013). İspanya'da en sık görülen subtip olan ST4 (Roberts ve diğerleri, 2011) Birleşik Krallık, Avrupa ve Kuzey Afrika'da da yayılım göstermektedir. Daha nadir rastlanan ST2 ise genellikle Afrika, Avustralya ve Doğu Asya'da saptanmaktadır. ST5 ve ST9 da insan dışkısından nadiren izole edilebilmektedir (Tall ve diğerleri, 2013).

Bazı çalışmalarda ST1'in çiftlik hayvanlarından zoonotik bulaş ile insanlara geçtiği belirtilmiştir (Noël ve Dufernez, 2005; Tan, 2008). Leelayoova ve diğerleri, Libya'daki en yaygın subtipin ST1 olduğunu bildirmişlerdir. Söz konusu popülasyonun gerek yiyecek ve içecekler aracılığı ile gerekse sanitasyondaki eksiklikler nedeniyle dışkı kontaminasyonuna maruz kalmış olabileceği ve bu durumun *Blastocystis* enfeksiyonunun nedeni olabileceği düşünülmüştür (Leelayoova ve diğerleri, 2008).

Doğruman-Al ve diğerleri, semptomatik ve asemptomatik bireylerdeki kronik enfeksiyonların ST2 ve ST3 ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca kronik enfeksiyonu olan hastalarda zoonotik subtiplere (ST4, ST6, ST7) yaygın olarak rastlanmadığını da ifade etmişlerdir (Doğruman-Al ve diğerleri, 2009). Daha önceki bir çalışmada ise asemptomatik enfeksiyonun daha çok ST2 ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Türk ve diğerleri, 2012).

Günümüzde moleküler tekniklerin ilerlemesi ile *Blastocystis*'in bulaş yolları netlik kazanmaya başlamıştır. İnsan-insan, hayvan-hayvan, insan-

hayvan ve hayvan-insan bulaşları moleküler yöntemler kullanılarak ortaya konulmuştur (Doğruman AI ve diğerleri, 2008). Hayvancılıkla uğraşan kişilerde *B. hominis*'e yüksek oranda rastlanması, bu parazitin zoonotik özellik taşıdığını göstermiştir (Doğruman AI ve Hökelek, 2007).

2.6. İmmünolojik özellikler

Blastocystis spp. enfeksiyonuna karşı oluşan immün yanıtı dair yapılan çalışmalar sınırlıdır. Enfeksiyon tanısına öncülük edebilmesi amacı ile, semptomların gözlemlendiği bireylerdeki humoral antikor yanıtının incelendiği bir araştırmada, *Blastocystis* spp.'nin insan dokularını hiçbir zaman istila etmediği belirlenmiştir. Humoral yanıtın oluşumunda doku invazyonunun ön koşul olduğu göz önünde bulundurulduğu zaman, semptomların gözlenmediği fakat *Blastocystis* spp. ile enfekte olan bireylerde büyük olasılıkla serum antikorlarının oluşmayacağı düşünülmüştür (Horiki ve diğerleri, 1997).

Kaneda ve diğerleri, *Blastocystis* spp.'nin hem semptomatik hem de asemptomatik bireylerde bulunmasından ötürü, bu parazitin patojenik potansiyeli konusundaki belirsizliği açıklığa kavuşturmak amacı ile yaptıkları bir çalışmada, *Blastocystis* spp. ile enfekte olan fakat gastrointestinal semptomların gözlenmediği kişilerdeki serolojik yanıtı araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, araştırmacılar, asemptomatik bireylerin %70'inde indirekt immünfloresan yöntemi (*indirect immunofluorescence assay: IFA*) ile *B. hominis* serum antikorlarını tespit ettiklerini, oluşan antikor yanıtının organizmanın yüzey antijenlerine yönelik olduğunu ve en güçlü antikor yanıtının bu parazit ile iki yıl süresince kronik olarak enfekte olan bir kişide saptandığını belirtmişlerdir. Tüm bu sonuçlar ele alındığı zaman, *Blastocystis* spp.'nin yüzey antijenlerine karşı immün yanıtın oluşabilmesi için uzun süreli ve inatçı bir enfeksiyon tablosunun olması gerektiği ifade edilmiştir (Kaneda ve diğerleri, 2000).

Ashford ve Atkinson, *Blastocystis* spp. patojen olarak kabul edilecek ise, toplumun küçük bir kısmının bu enfeksiyona duyarlı olduğu ve bireysel

immüitenin tüm toplumun bağışıklığına etkide bulunmadığı hipotezini savunmuşlardır (Ashford ve Atkinson, 1992). Diğer araştırmacılar ise *Blastocystis* enfeksiyonunun kendi kendini sınırlayan bir enfeksiyon olmasının koruyucu immüite ile alakalı olduğunu düşünmüşlerdir. Ayrıca enfeksiyonun yetişkinlerde düşük oranda saptanmasının ve semptomların daha az olmasının daha önceden geçirilen *Blastocystis* enfeksiyonlarıyla indüklenen immüiteye bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (Stenzel ve Boreham, 1996).

2.7. Klinik ve patogenezi

Blastocystis spp.'nin hem semptomatik hastalarda hem de asemptomatik bireylerde gözleniyor olması, klinikle ilişkilendirilebilecek bulguların belirlenmesini oldukça zorlaştırmaktadır. Bu sebeple *Blastocystis* spp.'nin patogenezi yıllardır tam olarak anlaşılamamıştır. Günümüzde yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneylerde *Blastocystis* spp.'ye ait sisten proteazlar veya diğer olası virölans faktörlerinin belirlenmesi bu parazitin patojen olabileceği görüşünü güçlendirmektedir (El-Safadi ve diğerleri, 2014).

Blastocystis spp. enfeksiyonuna dair ilk raporlar 1899'da Perroncito ve 1917'de Lynch tarafından sunulmuştur (Kaneda ve diğerleri, 2000). *Blastocystis* enfeksiyonunda klinik olarak diyare, karın krampları, karında şişkinlik ve gaz, kabızlık, mide bulantısı, iştahsızlık, kilo kaybı, fekal lökosit, anemi, rektal kanama, kaşıntı, eozinofili gibi özgül olmayan gastrointestinal belirtilere ilaveten, eklemlerde şişlik ve ağrı da gözlenebildiği gibi, enfeksiyon asemptomatik de seyredebilmektedir (Üstün ve Turgay, 2006). Bunların yanı sıra, enfeksiyonun IBS veya akut-kronik ürtikeryal lezyonlarla ilişkili olabileceği şüphesi de bulunmaktadır. Öte yandan, *Blastocystis* spp.'nin kanser hastaları, insan immün yetmezlik virüsü (*human immunodeficiency virüs: HIV*) pozitif bireyler veya transplant hastaları gibi bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde de diyare ile ilişkili tablolarda rol alabileceği düşünülmektedir (Batista ve diğerleri, 2011; Tan ve diğerleri, 2009). Özellikle kanser hastaları ve HIV pozitif bireylerde gözlenen diyare tablolarından bu

parazitin sorumlu tutulabileceğini ifade eden raporların sayısı her geçen gün artmaktadır (Meloni ve diğerleri, 2012). Olgu sunumları *Blastocystis* spp.'nin enterit, kolit, ülseratif kolit, artrit, terminal ileit, diyabet ve lösemi ile ilişkili olabileceğini ortaya koysa da, veriler tek olgu bildirimleri ile sınırlı kaldığı için bunun doğruluğu tam olarak ispat edilememiştir (Stenzel ve Boreham, 1996).

Literatürde *Blastocystis* spp. ile ilişkilendirilebilecek deri döküntüleri konusunda 1993'ten başlayıp günümüze kadar artan sayıda raporlar mevcuttur. Yunanistan'da bir olgu sunumunda ST3'e bağlı deri döküntüsü bildirilmiştir (Şekil 2.5). Dermatologlar bu parazitle ilişkilendirilebilecek deri döküntülerini anlamlı istatistiksel verilerle bildirmektedirler (Boorom ve diğerleri, 2008).



Şekil 2.5. Otuz dokuz yaşında erkek hastada kronik *Blastocystis* enfeksiyonuna bağlı deri döküntüleri (Boorom ve diğerleri, 2008).

Blastocystis spp. insan bağırsağında birkaç hafta gibi kısa bir süre veya birkaç yıl gibi uzun bir süre boyunca kalabilmektedir. Diğer bağırsak

patolojilerinin eşlik etmesi, *B. hominis*'in bağırsaklarda daha çok ve daha rahat çoğalması için uygun bir ortam hazırlamaktadır (Üstün ve Turgay, 2006). Udkow ve Markell, herhangi bir nedenden dolayı insan bağırsak kanalının normal yapısını kaybetmesinin *B. hominis*'in çoğalması için uygun koşullar oluşturabileceğini ileri sürmüşlerdir. Vaka çalışmaları *B. hominis*'in bağırsakta enflamasyona neden olacak şekilde patojenik rol üstlendiğini göstermektedir. Bu bulguların tam tersini ifade eden çalışmalar da mevcuttur. Örneğin Zuckerman ve diğerleri, bu parazitin bulunduğu konaklarda bağırsakta enflamasyona ve bağırsak mukoza işlevselliğinin yitirildiğine dair hiçbir kanıt bulunamadığını belirtmişlerdir (Chen ve diğerleri, 2003).

Blastocystis spp.'nin tek bir parazitten ziyade bir "türler kompleksi" olması, bu parazit ile ilişkili semptomların özgül olmaması veya enfeksiyonun asemptomatik seyretmesi, örnek alma işleminin zorluğu, ve fazla miktarda örneğe gerek duyulması, ilk keşfinden bu yana 100 yıl geçmiş olmasına rağmen, bu mikroorganizmanın patojenitesinin hala tam olarak açıklanamamasına neden olmuştur (Clark, 2015).

IBS hastalarında *Blastocystis* spp.'ye daha sık rastlandığını belirten çalışmalar mevcuttur. Serolojik çalışmalarda kontrol gurubuna kıyasla semptomatik grupta *Blastocystis* spp.'ye karşı immünoglobülin G2 (*immunoglobulin G2: IgG2*) değerlerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Diğer yandan IBS ile *Blastocystis* spp. enfeksiyonu arasında bir ilişki olmadığını savunan çalışmalar da mevcuttur (Mumcuoğlu ve diğerleri, 2013).

Long ve diğerleri *Blastocystis* spp.'nin 24 saat sonunda interlökin-8 (*interleukin 8: IL-8*) ve granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktörde (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF*) artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, *Blastocystis*'in enfeksiyonun başlangıç aşamasında konağın bağışıklık sistemini baskıladığını ve böylece diğer fırsatçı patojenlerin konakta enfeksiyona sebep olmasını kolaylaştırdığını gözlemlemişlerdir (Tan ve diğerleri, 2010).

Blastocystis spp.'nin patojenitesinin ve virölans faktörlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bazı çalışmalarda, parazitin hücre kültürlerinde (HT-29 kolon epitel hücre dizisi) sitopatik etki yapabildiği gözlenmiştir (Iguchi ve diğerleri, 2009; Puthia ve diğerleri, 2005).

Blastocystis'in patogenezinin subtipleriyle ilişkili olabileceği varsayılmasına rağmen, araştırmalardan edinilen epidemiyolojik veriler bu görüşü tam anlamıyla destekler nitelikte olmamıştır (El-Safadi ve diğerleri, 2006). Fouad ve diğerleri, farklı *B. hominis* genotiplerinin patojenik özelliklerini inceledikleri bir çalışmada, IBS'li hastalarda *B. hominis* fekal taşıyıcılığına daha sık rastlandığını belirtmişlerdir. Çalışma sonucunda dört adet genotip belirlenmiştir. IBS'li hastalarda ST3, ST1 ve ST4'e rastlanırken, asemptomatik kişilerde ST3, ST4 ve ST2 saptanmıştır. ST3 ile ST4 her iki grupta da yer aldığı için, *B. hominis* patogenezinde istatistiksel olarak anlamsız bulunmuşlardır. Ayrıca IBS'de, patogeneze en çok ilişkili olan genotip ST1 olarak belirlenmiştir (Fouad ve diğerleri, 2011).

Blastocystis spp. immün sistemi baskılanmış bireylerde genel sağlık durumunu kötüleştirecek fırsatçı bir patojen olarak davranabilmektedir. Tayvan'da bir hastane yoğun bakım ünitesinde ventilasyon desteği alan, kardiyotomi operasyonu geçirmiş bir kişide ateş ve diyare tablosunun gözlenmesinin ardından yapılan testlerde *Blastocystis* spp. pozitifliği saptanmıştır. Söz konusu hasta metronidazol ile tedaviye yanıt vermiştir. Çalışmadan elde edilen veriler fırsatçı patojen *Blastocystis* spp.'nin ventilasyon desteği alan hastalarda ciddi enfeksiyon nedeni olabileceğini göstermiştir (Chen ve diğerleri, 2014).

Tan ve diğerleri tarafından yürütülen bir çalışmada, sekiz semptomatik ve sekiz asemptomatik olgudan *Blastocystis* spp. izole edilmiş ve bu parazitin kökenleri moleküler açıdan incelemiştir. Semptomatik olgulardan elde edilen kökenlerin %70'ten fazlasının aynı soydan (*clade*) geldiği, asemptomatik kökenlerin ise heterojen bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Bu veriler ışığında, semptomatik ve asemptomatik enfeksiyona neden olan *Blastocystis*

spp. kökenlerinin iki ayrı tür olduğu ve bu durumun patojenitedeki olası farklılığın temelini oluşturduğu sonucuna varılmıştır (Tan ve diğerleri, 2006).

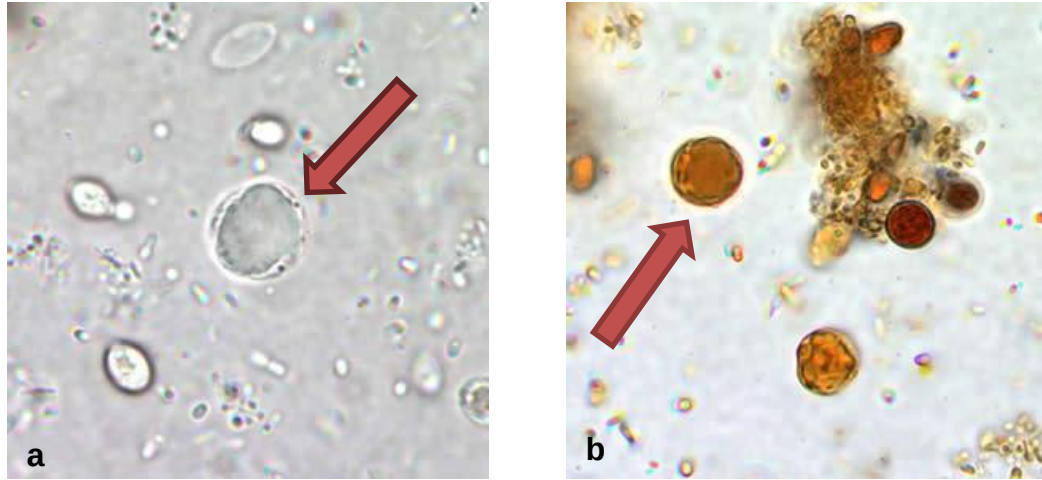
2.8. Tanı

2.8.1. Mikroskopik tanı

Blastocystis enfeksiyonunun tanısında rutin dışkı muayenesi esastır ve dışkı en sık olarak ışık mikroskopunda incelenmektedir (Örs ve diğerleri, 2011). Mikroskopi taze veya kalıcı preparatlar hazırlanarak veya konsantre dışkı örneklerine uygulanabilmektedir (Stensvold ve diğerleri, 2006). Şekil 2.6'da oklarla belirtilen kısımlar boyanmamış (a) ve lügolle boyanmış (b) preparatlarda *Blastocystis* spp. paraziti göstermektedir.

Dışkı örneği taze yayma yapılarak incelenmeyecekse, örneği tespit etmek ve korumak için Schaudinn veya polivinil alkol (PVA) gibi parazitolojide sıklıkla yararlanılan fiksatifler kullanılabilir. Schaudinn fiksatifi hem dışkı materyalinin hem de sigmoidoskopi örneklerinin tespit edilmesi için, PVA ise bağırsak protozoonlarının morfolojik şekillerinin korunması amacıyla kullanılabilir (Girginkardeşler ve Ok, 2011).

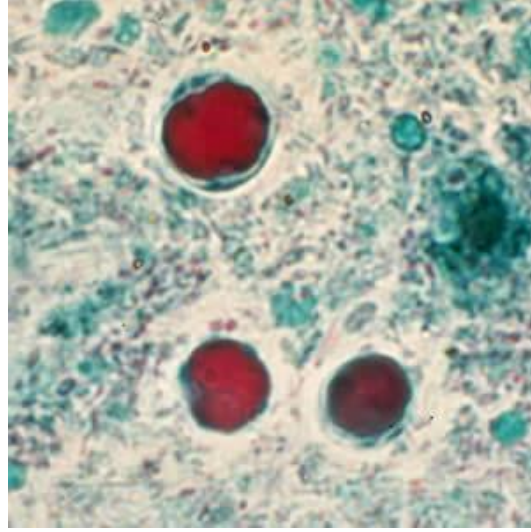
Kalıcı boyalı preparatlardan *B. hominis* tanısı, dünya genelinde en sık kullanılan tanı yöntemidir (Roberts ve diğerleri, 2011). Dışkı yaymalarından kalıcı preparat hazırlanmasında kullanılan trikrom boyası, hem kolay hem de tanıyı hızlıca koydurabilecek bir yöntemdir. Kolay hazırlanabilmesi, yüksek düzeyde stabil yapıya sahip olması ve raf ömrünün uzun olması sıklıkla tercih edilen bir yöntem olmasının nedenleridir. Bu preparatlar, boyanan organizmaların morfolojik yapılarının ayrıntılı olarak izlenebilmesi ve gözden kaçabilecek kadar küçük olan, nadir saptanan bağırsak protozoonlarının kolay saptanabilmesini sağlaması açısından avantajlıdır (Girginkardeşler ve Ok, 2011).



Şekil 2.6. (a) Taze bakıda (boyanmamış) *Blastocystis* spp. (b) Lugolle boyanmış *Blastocystis* spp. (CDC. (t.y.). Erişim: 04 Mayıs 2016, <http://www.cdc.gov>).

Mikroskopi *Blastocystis* spp. tanısında kullanılan en yaygın yöntem olmasına rağmen, parazitin pleomorfik yapısı morfolojiye bağılı tanıyı güçleştirmektedir. *Blastocystis* spp.'ye ait her morfolojik formun ayrı şekli ve büyüklüğü olması, ayrıca bu parazitlerin lökositlerle veya diğer protozoonların kist ve trofozoitleriyle kolayca karıştırılabilmesi nedeniyle mikroskopik incelemede gözden kaçan durumlar olabilmektedir (Stensvold ve diğerleri, 2006).

Tanıda rutin dışkı incelemesinin haricinde, kültür, formalin-eter tekniğı, trikrom boyası, modifiye Ziehl-Neelsen boyası veya moleküler teknikler gibi farklı tanı yöntemleri kullanılabilmektedir (Örs ve diğerleri, 2011). Formol-etil asetat sedimantasyon yöntemi parazitolojik tanıda standart olarak kabul edilmesine rağmen, işlem esnasında parazitin parçalanabilmesi nedeniyle, *Blastocystis* spp.'yi tespit edemeyebilmektedir (Stensvold ve diğerleri, 2006).



Şekil 2.7. Trikrom boyalı preparatta *Blastocystis* spp. (CDC. (t.y.).

Erişim: 04 Mayıs 2016, <http://www.cdc.gov>).

2.8.2. Kültür

Parazitlerin tanısında *in vitro* kültür nispeten daha detaylı, zaman alıcı ve kalite kontrolü zor olan bir yöntem olması nedeniyle bakteriyolojideki gibi öncelikli olarak tercih edilmemektedir. Amerikalı bir bilim insanı olan Diamond bunun zorluğunu şu sözlerle anlatmıştır: '*Protozoonların in vitro kültürü bilimden ziyade bir sanattır. Paraziter protozoa veya herhangi bir hücre veya canlının kültüründe başarılı olmak için kişi son derece sabırlı, inatçı ve zamanını sınırsız harcamaya istekli olmalıdır. Kültürü yapan kişi organizmanın davranışındaki en ufak bir farklılığa karşı duyarlı ve gözlemci olmalı ve hemen uygun bir şekilde yanıt verebilmelidir*' (Daldal ve Taylan Özkan, 2011). Ancak direkt mikroskopi veya serolojik yöntemler tanıya yetersiz kaldığı zaman, uygulanan tedavi yanıtının değerlendirilmesi veya etkene ait fizyolojik, biyolojik veya biyokimyasal özelliklerin incelenmesi gerektiği takdirde parazit kültürüne ihtiyaç duyulabilmektedir (Daldal ve Taylan Özkan, 2011). Dışkı materyalinde bulunan hücre sayısını artırarak tanı için gerekli zamanı azaltması nedeniyle *Blastocystis* spp. kültürünün tanıda altın standart olarak

kabul edilmesi gerektiğini belirten çalışmalar da mevcuttur (Santos ve Rivera, 2013).

Kültür yönteminin mikroskopiye kıyasla tanıda daha duyarlı olduğunu bildiren araştırmalara karşın, bu yöntemin zaman alıcı olması ve duyarlılığının örnekteki protozoon sayısına bağlı olması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Ancak mikroskopideki kalıcı boyalı preparatların fiksasyonu aşamasında kullanılan toksik özellikteki civa klorür laboratuvar personelinin sağlığını tehdit ettiği için, kültür yöntemi mikroskopiye kıyasla çevresel anlamda daha güvenilir bir tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Ayrıca hazırlanmasında ve saklanmasıdaki kolaylık, *Blastocystis* spp.'nin farklı morfolojik formlarının ayırımına olanak sağlaması ve duyarlılık ile özgüllüğünün yüksek olması açısından kültür yöntemi sıklıkla tercih edilen bir klinik tanı ve araştırma yöntemidir (Zhang ve diğerleri, 2012).

Günümüzde çeşitli kültür ortamlarında *B. hominis*'i üretmenin mümkün olduğu, ayrıca kültürün formol-etil asetat sedimentasyon tekniğine kıyasla daha duyarlı olduğu düşünülmektedir (Stensvold ve diğerleri, 2006). Kültür için anaerobik ortam ve 37°C gerekmede ve 48-72 saat içerisinde sonuç alınabilmektedir (Doğruman Al ve Hökelek, 2007).

Blastocystis spp.'nin tıpkı *Entamoeba histolytica* gibi, diğer mikrobiyota üyeleri ile kültürünün yapılması (ksenik kültür) gerekmektedir (Daldal, Taylan Özkan, 2011). *Baret serum-saline* besiyeri bu parazit için kullanılan ilk ksenik besiyeridir. *Blastocystis* spp.'nin aksenik kültürlerde doğrudan üretilmemiş olmasına rağmen, günümüzde Iscove'nun modifiye Dulbecco's besiyeri (*Iscove's Modified Dulbecco's medium: IMDM*) gibi aksenik kültürlerin kullanılabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Malatyali ve Özçelik, 2011).

Blastocystis spp.'nin *Dobell* ve *Laidlaw* besiyeri (%20 insan serumu ve streptomisin sülfat eklenmiş Ringer solüsyonu içeren), *Loeffler* besiyeri (%20 insan serumu eklenmiş Ringer solüsyonu içeren), *Diamond's trypticase panmede serum* (TP-S-1) monofazik besiyeri, %10 at serumu içeren minimal esansiyel besiyeri ve IMDM besiyeri (%10 at serumu içeren) gibi

besiyerlerinde kültürünün yapılabileceği bildirilmiştir (Stenzel ve Boreham, 1996). Ayrıca bu parazitin *Locke-Egg-Serum* (LES) besiyeri ve *Robinson* besiyerlerinde de kolay ve hızlıca çoğalması nedeniyle rutin tanı uygulamalarında bu besiyerleri de tercih edilebilmektedir (Malatyalı ve Özçelik, 2011).

2.8.3. İmmünolojik tanı

Blastocystis spp.'ye karşı oluşan serolojik yanıtın tespitinde IFA ve *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) en sık kullanılan yöntemlerdir (Örs ve diğerleri, 2011). Her iki testin çalışma prensibi oluşan antijen-antikor reaksiyonunu saptamaktır, ve her iki yöntem de hem pratik hem de teorik açıdan birçok avantaj taşımaktadır (Özcel ve diğerleri, 2011). Antikor yanıtının bu yöntemlerden biri ile ölçülebilmesi *Blastocystis* spp.'nin patojenik rolünü destekler nitelikte olmasına rağmen, bu teknikler rutin tanı için yararlı değildir (Tanyüksel ve Yazar, 2010).

İmmünolojik testler klinik tanıdan ziyade araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Asemptomatik bireylerde *Blastocystis* spp.'ye karşı oluşan serolojik yanıtın ölçülebilmesi için iki yıl kadar uzun bir süre öncesinden parazite maruz kalınmış olması gerekebilmektedir (Tanyüksel ve Kuru, 2009). ELISA yöntemi ile yapılan bir çalışmada 1/50 dilüsyon eşik değeri olarak kabul edilmiş ve *B. hominis* ile enfekte grupta kontrol grubuna kıyasla daha yüksek IgG antikorları tespit edilmiştir (Doğruman AI ve Hökelek, 2007). IFA yöntemi kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise tüm hücresel *B. hominis* antijenlerine karşı hazırlanan tavşan antiserumu kullanılmış ve parazitin vakuoler, ameboid ve granüler formları gözlenmiştir (Doğruman AI ve Hökelek, 2007).

2.8.4. Moleküler tanı

Rutin *Blastocystis* spp. tanısı için sıklıkla mikroskopi yöntemi kullanılmasına rağmen, bu yöntemlerin duyarlılığı (%48) düşüktür. Bu sebeple son yıllarda hem tanı hem de genotiplendirmede çeşitli moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır (Eroğlu, 2015).

Nükleik asit tespitine dayalı yöntemleri kullanmadan önce mutlaka amplifikasyonun yapılması gerekmektedir. Bu moleküler yöntemler arasında en çok kullanılan, genellikle hedeflenen bir gen bölgesinin çoğaltılıp görüntülenmesine dayanan polimeraz zincir reaksiyonudur (*polymerase chain reaction: PCR*). 1980 yılında Kary Mullis tarafından tasarlanmış olan PCR tekniği, moleküler araştırmaların gerçekleştirilmesinde büyük kolaylıklar sağlamış ve günümüzdeki PCR çalışmalarının temelini oluşturmuştur (Seyer, 2009).

Günümüzde polimorfik ve haploid genoma sahip *Blastocystis* türlerinin belirlenmesinde PCR tekniği kullanılmakta ve bu teknik ile genotip tayini de yapılabilmektedir. Bu amaçla SSU rDNA gen bölgesi ve sekans etiketli bölge (*sequence tagged site: STS*) primerleri tercih edilmektedir. Bu yöntem kullanılarak yapılan moleküler çalışmalarda *Blastocystis* subtipleri 1'den 9'a kadar tanımlanmıştır (Eroğlu, 2015).

Blastocystis spp.'nin genotip polimorfizminin belirlenmesi amacıyla kullanılan bir diğer PCR temelli yöntem ise rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (*random amplified polymorphic DNA: RAPD*) tekniğidir. Bu yöntemin temel prensibi, ilgili türün genomik DNA'sından rastgele seçilen 9-10 baz çifti (*base pair: bp*) uzunluğundaki oligonükleotidin türe özgül bir gen bölgesine bağlanması ve PCR ile çoğaltılmasıdır (Eroğlu, 2015).

RFLP yönteminde ise restriksiyon endonükleaz enzimi yardımı ile çift iplikli DNA molekülü özel bağlanma bölgesinden kesilmektedir. Bu DNA bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra tekrar endonükleazlarla muamele edilmektedir. Bu amaçla RD5/RD3 primerleri ve Hac III, Hha I, Hinf I, Rsa I, Msp I, Alu I, Taq I, Dde I, Sau3AI, Sa961, BstU I restriksiyon enzimleri

kullanılabilmektedir. Hovard ve diğerleri, SSU rDNA gen bölgesini hedef alan PCR-RFLP yöntemi ile, on iki *Blastocystis* genotipini belirlemişlerdir (Eroğlu, 2015).

DNA dizi analizi yöntemi ise DNA birincil yapılarının tanımlanmasında ve nükleotid diziliminin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu tekniğin esası, bir nükleik asit dizisinin bir diğerine olan hibridizasyonudur. Yapılan çalışmalarda dizi analizi yöntemi ile *Blastocystis*'in 17 subtipinin olduğu ve isimlendirmenin 1'den 17'ye kadar yapılması gerektiği belirlenmiştir (Eroğlu, 2015).

2.8.5. Diğer tanı yöntemleri

Endoskopi veya kolonoskopi yöntemleri *Blastocystis* enfeksiyonunun tanısı için kullanılabilecek invaziv yöntemler arasında yer almaktadır (Örs ve diğerleri, 2011).

Özellikle kolorektal kanser hastalarında incelenecek örneğin kolon yıkama sıvısı olduğu durumlarda *Blastocystis* spp.'nin tespit edilme olasılığı daha yüksektir. Önceki tanı teknikleri ile *Blastocystis* spp.'nin tespit edilemediği veya tedaviye yanıt alınamayan olgularda, hastaya kolonoskopi işlemi uygulanabilmektedir. Kolon veya rektumda bağırsak villusları arasında bulunabilen paraziti belirleme potansiyeli de olduğundan kolon yıkama sıvılarında daha yüksek oranda parazit saptanabilmektedir. Dışkı örnekleri ile çalışıldığı durumlarda, paraziti gözden kaçırmamak için düzenli ve ardışık olarak üç kez dışkı örneğinin alınması gerekmektedir. Bu nedenle, kolon yıkama sıvısının kullanılması, daha pratik olarak değerlendirilebilmektedir (Kumarasamy ve diğerleri, 2014).

2.9. Tedavi ve Korunma

Blastocystis spp. özgül olmayan semptomlara neden olabileceği için, bu protozoonun patojenitedeki rolü hala gizemini korumaktadır. Semptomatik

hastalarda tedaviye zaman kaybetmeden başlanmaktadır, ve tedavi için önerilen antimikrobiyal genellikle metronidazoldür. Metronidazolün yanı sıra paromomisin ve trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX) de kullanılabilmektedir. Ancak hem semptomatik hastalarda hem de asemptomatik bireylerde belirtiler herhangi bir tedavi gerekmeksizin de kendiliğinden ortadan kalkabilmektedir (Tall ve diğerleri, 2013).

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda metronidazol, TMP-SMX, emetin, furazolidon, ketokonazol, ornidazol, kinakrin, tinidazol, entereviaform *Blastocystis* spp.'ye karşı başarılı bulunmuştur (Hamamci ve diğerleri, 2004).

Guirges ve Al- Waili, sadece *B. hominis* ile enfekte olduğu bilinen 103 hastanın klinik semptomları ve tedavisini araştırdıkları çalışmalarında, seyrek görülen diyare ve abdominal kramplarla ilişkili şiddetli mide gazının esas klinik semptom olduğunu, tüm hastaların oral metronidazol ile tedaviye iyi yanıt verdiğini saptamışlardır. Çalışmaya katılan gönüllülerden 74'ünün dışkı örnekleri tedaviden 1-2 ay sonra tekrar incelendiği zaman enfeksiyona dair hiçbir bulgu saptanamamıştır. Bu nedenden ötürü oral metronidazol tedavisi ile enfeksiyonun eradike edilebileceği düşünülmüştür (Guirges ve Al-Waili, 2007).

Blastocystis enfeksiyonu tedavisinde ana seçenek metronidazol olmasına rağmen, tedavide başarısızlığının bildirildiği raporlar da mevcuttur. Bu durum *Blastocystis* spp. izolatlarında olası bir metronidazol direnci gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir (Abdel-Hafeez ve diğerleri, 2015). Türkiye'de yapılan bir çalışmada, Roma III kriterlerine göre IBS tespit edilen 55 hastanın 18'inde *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir. *Blastocystis* spp. pozitifliği saptanan hastalara yedi gün boyunca 750 mg/gün metronidazol uygulanmış ve 12 (%67) kişide tedavi sonrası parazitin yok olduğu gözlenmiştir. Diğer altı hastaya ise, yedi gün boyunca trimetoprim-sulfametoksazol (320 mg-1600 mg) uygulanmış ve bu hastalarda parazit tespit edilememiştir (Mumcuoğlu ve diğerleri, 2013).

Hamamcı ve diğerkleri yürüttükleri bir araştırmada, hastalardan izole edilen *Blastocystis* spp. izolatlarını *Robinson* besiyerinde üreterek ornidazol, metronidazol, azitromisin, itrakonazol ve TMP-SMX'in bu parazit üzerindeki *in vitro* etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçları *Blastocystis* spp. pozitif bireylerde en etkili ilacın ornidazol olduğunu ve bunu etki sırası ile metronidazol, azitromisin, itrakonazol ve TMP-SMX'in izlediğini göstermiştir (Hamamcı ve diğerkleri, 2016).

Öte yandan alopantik tıp alanında bazı bitkisel özütlerin, semptomların gerilemesi ve tedavi açısından anlamlı sonuçlar verdiği de açıklanmıştır (Abdel-Hafeez ve diğerkleri, 2015). Bitkisel özütlerin *Blastocystis* spp.'ye karşı olan anti-protozoal etkilerinin incelendiği bir çalışmada *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali)'nin en yüksek anti-protozoal etkiyi sergilediği gözlenmiştir (Girish ve diğerkleri, 2015).

Fekal-oral yolla bulaştığı bilinen söz konusu protozoonun neden olabileceği *Blastocystis* enfeksiyonundan korunmak için kişisel ve toplumsal hijyene dikkat edilmesi ve sanitasyon koşullarının düzeltilmesi gerekmektedir (Tall ve diğerkleri, 2013).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada kullanılan cihazlar, sarf malzemeler ve kitler Tablo 3.1’de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar, sarf malzemeler ve kitler.

Cihazlar	• Mikrosantrifüj • NanoDrop • Kuru ısıtıcı blok • Elektroforez tankı • Güç kaynağı • UV transillüminatör • Termal döngü cihazı • Yatay vorteks • Fotoğraf makinası • Laminar flow kabini • Kalibre mikropipetler (10, 100, 1000 µl)
Sarf malzemeler	• Steril, DNaz ve RNaz içermeyen Eppendorf tüpü (1,5 ml) • Steril, DNaz ve RNaz içermeyen PCR tüpü (0,2 ml) • Steril, DNaz ve RNaz içermeyen tüp (2 ml) • Steril, DNaz ve RNaz içermeyen filtreli pipet uçları (10, 100, 1000 µl) • Steril filtre kağıtları • Trikom boya seti • Lugol solüsyonu • Agaroz • Etidyum bromür • 50xTAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu • Taq polimeraz • 10 X PCR tamponu • 25mM MgCl₂ • dNTP • Primerler
Kitler	• EURx Stool DNA İzolasyon kiti

3.2. Yöntemler

3.2.1. Örneklerin toplanması, hazırlanması ve saklanması

Çalışma için gerekli olan etik kurul izni, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'ndan alınmıştır (E.Kurul- E-15- 446/26.03.2015). (Ek 1: Etik Kurul İzin Formu)

Çalışmaya Girne, Güzelyurt, Lefkoşa ve Mağusa gibi KKTC'nin farklı bölgelerinde yaşayan 230 gönüllüden toplanan dışkı örnekleri dahil edilmiştir. Katılımcıların ikamet ettikleri bölgeler Kıbrıs haritası üzerinde gösterilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Blastocystis* araştırmasına katılan 230 kişinin ikamet ettikleri bölgeler, KKTC, 2015

(<http://www.worldatlas.com/webimage/countrys/europe/outline/cy.htm>).

Örnek vermeyi kabul eden gönüllüler onam formunu imzalamış ve kendilerine sunulan anket formunu doldurmuşlardır. Yapılan ankette cinsiyet ve yaş gibi demografik faktörler; medeni durum, ekonomik durum, eğitim seviyesi ve meslek gibi sosyo-ekonomik faktörler; ayrıca su kaynağı, ikamet bölgesi, evcil hayvan varlığı ve gastrointestinal şikayetler (karın ağrısı, ishal, kabızlık, bulantı, şişkinlik) gibi epidemiyolojik faktörler sorgulanmıştır. Anketten elde edilen veriler çalışma sonunda *Blastocystis* spp.'nin pozitiflik oranı ile demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlerin ilişkisinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Ek 2: Anket formu, Ek 3: Onam formu).

Çalışmaya katılan gönüllülerin 148'i ishal (sulu, kanlı veya mukuslu), mide bulantısı, kusma, abdominal ağrı gibi genel gastrointestinal sistem şikayetleri ile KKTC'nin farklı bölgelerindeki hastanelere başvuran hastalar, 82'si ise normal dışkılama alışkanlığı olan asemptomatik kişilerdir. KKTC'deki *Blastocystis* spp. prevalansı ve subtip dağılımı araştırıldığı için ikametgahı KKTC olmayan kişilerin örnekleri çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışma için toplanan 230 dışkı örneğinin her biri daha sonraki mikroskopik ve moleküler incelemeler için dört farklı şekilde işlem görmüştür:

1. Dışkı örneklerinden 70 mg alınıp Eppendorf tüplerine aktarılmış ve DNA izolasyonu yapılana kadar Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında -20°C'de dondurulmuştur (Forsell ve diğerleri, 2012; Roberts ve diğerleri, 2011).

2. Her bir dışkı örneğinden 70 mg alınarak, 300 µl serum fizyolojik içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenize dışkı solüsyonu yaklaşık 4-5 cm çapında ve ince bir tabaka olacak şekilde filtre kağıtlarına aktarılmıştır (Şekil 3.2). Sulu dışkılar ise sulandırılmadan filtre kağıtlarına aktarılmış ve üç saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler küçük polietilen torbalarda DNA ekstraksiyonuna kadar Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında oda ısısında bekletilmiştir (Seyer ve diğerleri, 2016).

Ayrıca Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Parazitoloji Referans Laboratuvarı'ndan temin edilen PCR ve mikroskopi negatif olan beş adet kontrol örneği de yukarıda belirtilen işlemlere tabi tutulmuştur.

3. Tüm dışkı örnekleri toplandığı gün taze olarak Nativ-Lugol yöntemi ile incelenmiştir.

4. Dışkı örnekleri Trikrom boyası ile incelenmek üzere PVA içerisinde saklanmıştır.



Şekil 3.2. Taze dışkı örneklerinin serum fizyolojik içerisinde homojenize edildikten sonra filtre kağıdına aktarılması, KKTC, 2015.

3.2.2. Mikroskopik inceleme

Nativ-Lugol tekniği ile yapılan mikroskopik inceleme

Toplanan taze dışkı örnekleri Nativ-Lugol boyama yöntemi uygulanarak mikroskopik olarak incelenmiştir. Parazitolojide taze bakı yöntemi olarak da adlandırılan bu yöntem, temiz bir lamın bir yarısına serum fizyolojik, diğer yarısına ise Lugol solüsyonu damlatılarak yapılmıştır (Kilimcioğlu, Ok, 2011). Daha sonra lam üzerine damlatılmış her iki solüsyon üzerine bir miktar dışkı örneği eklenip karıştırılmış ve mikroskopta öncelikli olarak *Blastocystis* spp. varlığı ve olası diğer parazitler araştırılmıştır.

Trikrom boyalı preparatlardan yapılan mikroskopik inceleme

Trikrom boyama parazitolojide kalıcı preparatların elde edilebilmesi için uygulanan bir yöntemdir. Bu çalışmada toplanan örnekler ayrı lamlara yayılmış ve her lam Schaudinn fiksatifinde yarım saat bekletildikten sonra trikrom ile boyanmıştır. Trikrom boyama için hazırlanan reaktifler Tablo 3.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 3.2. Trikrom boyama için hazırlanan reaktifler (Girginkardeşler ve Ok, 2011).

Reaktif	Gerekli malzemeler	Hazırlanışı
Trikrom boya	• Chromotrope 2R • Lightgreen SF • Fosfotungustik asit • Glasiyal asetik asit • Distile/deiyonize su	3 gr Chromotrope 2R, 1,5 gr Lightgreen SF, 3,5 gr Fosfotungustik asit, 5 ml Glasiyal asetik asit karıştırılıp 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra karışımın üzerine 500 ml distile/deiyonize su eklenerek koyu renkli solüsyon elde edilmiştir.
%90 asit alkol	• Glasiyal asetik asit • %90 etil alkol	995,5 ml %90 etil alkole 4,5 ml glasiyal asetik asit eklenerek hazırlanmıştır.
D'antoni iyot solüsyonu	• Potasyum iyodür • İyot kristalleri 1,5 gr • Distile/deiyonize su 100 ml	1,0 gr potasyum iyodür, 1,5 gr iyot kristali, ve 100 ml distile/deiyonize su solüsyon kırmızı-kahverengi renk alana kadar karıştırılmıştır. Filtre kağıdından süzülüp %70 etil alkolle demli çay rengini alana kadar karıştırılmıştır.

Trikrom boyama yöntemi aşağıdaki belirtildiği şekilde uygulanmıştır (Girginkardeşler ve Ok, 2011);

1. Dışkı örnekleri fırça yardımı ile lamlara yayılıp kurutulmuş ve yarım saat Schaudinn fiksatifi içerisinde bekletilmiştir.
2. Preparatlar %70'lik alkol solüsyonunda 5 dakika bekletilmiştir.
3. D'Antoni'nin iyot solüsyonunda preparatlar 3-5 dakika bekletilmiştir.
4. %70'lik alkol solüsyonunda preparatlar 2-5 dakika bekletilmiştir.
5. Preparatlar tekrar %70'lik alkol solüsyonunda 2-5 dakika bekletilmiştir.
6. Preparatlar Schaudinn fiksatifi ile tespit edilmiş olduğu için 5-8 dakika arası trikrom boyasında bekletilmiştir.

7. Fazla boyanın uzaklaştırılması için preparatlar kağıt havlular üzerine dik bir biçimde yerleştirilmiştir.
8. Ardından preparatlar 2-3 saniye %90 asit alkol ile muamele edilmiştir.
9. %100 alkol içerisinde çalkalanan preparatlar daha sonra 2 kez %100 alkolde 2-5 dakika bekletilmiştir.
10. Son olarak preparatlar iki kez ksilende 2-5 dakika bekletilmiştir.
11. Trikrom boyalı preparatlar immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte mikroskopta incelenmiştir.

3.2.3. Moleküler analiz

***Blastocystis* spp. DNA izolasyonu**

Blastocystis spp. DNA izolasyonu hem -20°C'de saklanan dışkı örnekleri hem de filtre kağıtlarına aktarılan numuneler kullanılarak yapılmıştır. DNA izolasyonu -20°C'de saklanan dışkı örneklerinden 70 mg alınarak son elüsyon hacmi 100 µl olacak şekilde, GeneMATRIX Stool DNA izolasyon kitinde (EURx, Polonya) belirtilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Optimum DNA miktarının elde edilebilmesi için örnekler maksimum hızda, horizontal olarak vortekslenmiştir.

Filtre kağıdına aktarılmış dışkı örnekleri kontaminasyon riskinin ortadan kaldırılması amacıyla Sınıf II Biyogüvenlik kabini içerisinde çalışılmıştır. Kurumuş filtre kağıtları kazınmış ve toz halinde dışkı elde edilmiştir. DNA izolasyonu final elüsyon hacmi 100 µl olacak şekilde, GeneMATRIX Stool DNA İzolasyon kitinde (EURx, Polonya) belirtilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kontaminasyon kontrolü için dışkı örneği aktarılmamış filtre kağıtları kullanılmış ve bu filtre kağıtları da kit prosedürüne uygun olarak DNA izolasyonuna dahil edilmiştir.

-20°C'de saklanmış dışkı örnekleri ve filtre kağıtlarına aktarılmış numuneler olmak üzere her iki yöntemin de çalışmaya dahil edilmesinin amacı, izole edilecek *Blastocystis* spp. DNA'larının saflığının ve miktarının kıyaslanması, ayrıca her iki yöntemde de PCR inhibitörlerinin olup olmadığının araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda her iki yöntemle izole edilen DNA'ların miktarı ve saflığı Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000 cihazı ile ölçülmüştür. Ayrıca PCR inhibisyon testi de uygulanmıştır (Nantavisai ve diğerleri, 2007; Stensvold ve diğerleri, 2006; Tan ve diğerleri, 2006). Olası PCR inhibitörlerinin kontrolü Stensvold ve diğerlerinin kullandıkları yöntem ile gerçekleştirilmiştir (Stensvold ve diğerleri, 2006). Özetle 1 µl PCR pozitif DNA ve 4 µl PCR negatif DNA karıştırılıp, istenilen ampikonların tespiti için standart PCR protokolü izlenmiştir.

PCR ile amplifikasyon

Touchdown PCR yöntemi ile *Blastocystis* spp. SSU rRNA tespiti için RD5/BhRDr primer çifti kullanılmıştır (Scicluna ve diğerleri, 2006). Kullanılan primer dizileri Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. PCR'da kullanılan primer dizileri ve özellikleri.

Primer adı	Primer dizisi	Hedef <i>Blastocystis</i> ST	Özgüllük	Ürün büyüklüğü (bp)
RD5	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT	Tüm ST	18S rRNA	~ 600
BhRDr	GAGCTTTTAACTGCAACAACG	Tüm ST	18S rRNA	~ 600

Örneklerdeki *Blastocystis* spp.'nin saptanması amacıyla, RD5/BhRDr primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR yönteminin duyarlılığı da araştırılmıştır. PCR'da kullanılan PCR karışımı Tablo 3.4'de verilmiştir. 2 µl DNA solüsyonu PCR karışımına eklenmiş ve toplam PCR hacmi 25µl olarak

çalışılmıştır. Touchdown PCR aşaması; 94°C'de 45 saniye, 10 döngü; 65°C -55°C'de 45 saniye (sıcaklık her aşamada 1°C azaltılarak); 72°C'de 1 dakika; 94°C'de 45 saniye, 30 döngü; 61°C'de 45 saniye; 72°C'de 1 dakika olacak şekilde termal döngü (*thermal cycler*) cihazında gerçekleştirilmiştir. İzlenen Touchdown PCR protokolü Tablo 3.5'de belirtilmiştir. PCR işleminde negatif kontrol olarak steril ddH₂O kullanılmıştır.

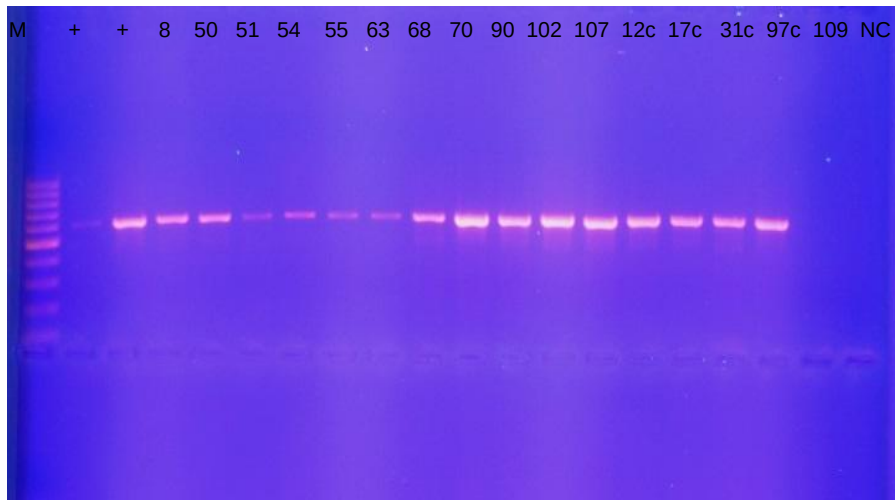
Tablo 3.4. PCR karışımının hazırlanmasında kullanılan reaktifler ve miktarları.

Reaktifler	Miktar (µl)
10X PCR tamponu (1 X 10 mM Tris-HCl (pH 8,8))	3
2,5 U <i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,4
1,5 mM MgCl ₂	1,8
200 µM dNTP (her bir dNTP' den)	0,4
25 pmol Primer F	0,8
25 pmol Primer R	0,8
Steril ddH ₂ O	15,8
DNA	2

Tablo 3.5. Touchdown PCR protokolü.

Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
94	45 saniye	10
65-55 (1°C azaltarak)	45 saniye	-
72	1 dakika	-
94	45 saniye	30
61	45 saniye	-
72	1 dakika	-
4	∞	

Elde edilen PCR ürününden 5 µl alınarak TBE (Tris-Borat-EDTA) tampon ile hazırlanan %1,7'lik agarozda jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jelde yürütülen DNA'lar etidyum bromür ile işaretlenmiş ve UV transillüminatör ile incelenmiştir (Şekil 3.3). PCR ürünlerinin büyüklükleri, DNA moleküler belirtecinin bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve jel görüntüleri dijital fotoğraf makinası ile görüntülenip bilgisayar ortamına aktarılmıştır. PCR yönteminden elde edilen sonuçlar, çalışmada kullanılan diğer yöntemlerle duyarlılık açısından karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.3. Agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA moleküler belirteci, NC: Negatif kontrol.

DNA dizi analizi

Dondurulmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıtlarına aktarılmış numunelerde PCR sonucunda pozitif bulunanlara DNA dizi analizi uygulanarak, *Blastocystis* spp. subtiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Pozitiflik saptanan tüm PCR ürünleri 'MacroGen' Laboratuvarları'na (Amsterdam, Hollanda) gönderilmiş ve PCR ürünlerinin SSU rRNA geninin dizi analizi *Blastocystis* suptype (18S) and sequence typing database (MLST)

(<http://pubmlst.org/blastocystis/>) online yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel analiz

Kullanılan her iki yöntemle elde edilen DNA konsantrasyonlarının karşılaştırılması için Mann-Witney U testi; bu yöntemlerde elde edilen PCR sonuçlarının değerlendirilmesi için McNemar testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Epidemiyolojik verilerin istatistiksel analizi için Stata yazılımı, sürüm 21 (StataCorp, College Station, TX, US) kullanılmıştır. Kontrol çift yönlü olarak yapılmış ve tip I hata olasılığı $\alpha = 0.05$ değeri kullanılarak hesaplanmıştır. *Blastocystis* spp. enfeksiyonunun prevalansı ile demografik, sosyo-ekonomik, epidemiyolojik ve klinik faktörler arasındaki ilişki Pearson ki-kare testi (*Pearson's chi-square test*) veya Fisher kesin testi (*Fisher's exact test*) kullanılarak değerlendirilmiştir. *Blastocystis* spp. subtiplerinin demografik, sosyo-ekonomik, epidemiyolojik ve klinik faktörlere göre dağılımlarının değerlendirilmesi için ise parametrik olmayan Wilcoxon işaretli sıralar testi (*non-parametric Wilcoxon signed-rank test*) kullanılmış ve $p < 0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

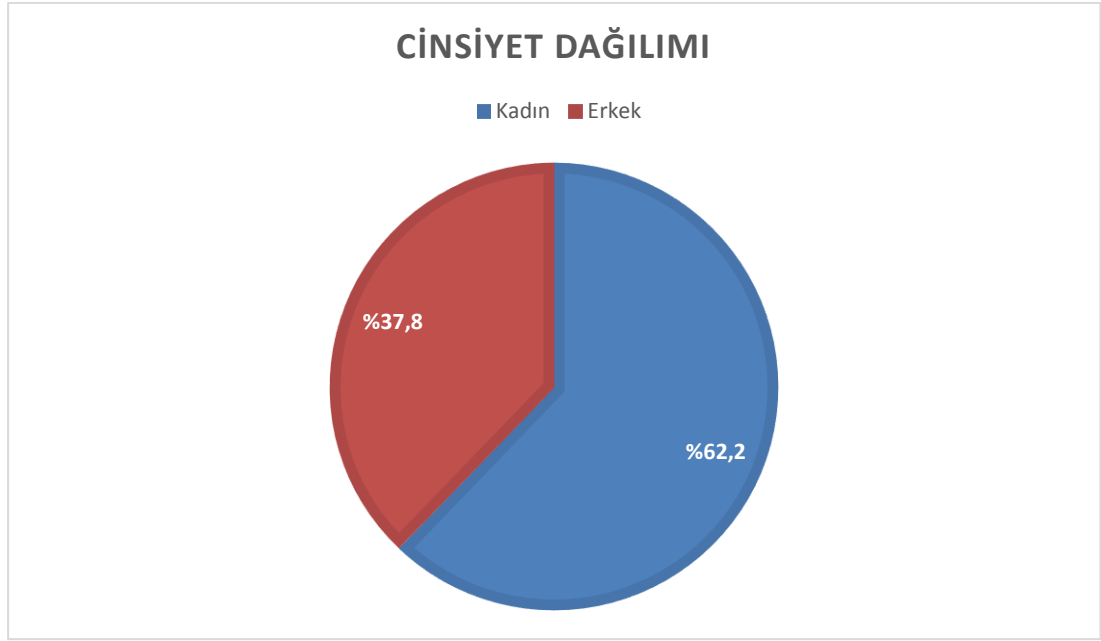
4. BULGULAR

4.1. Anket sonuçları

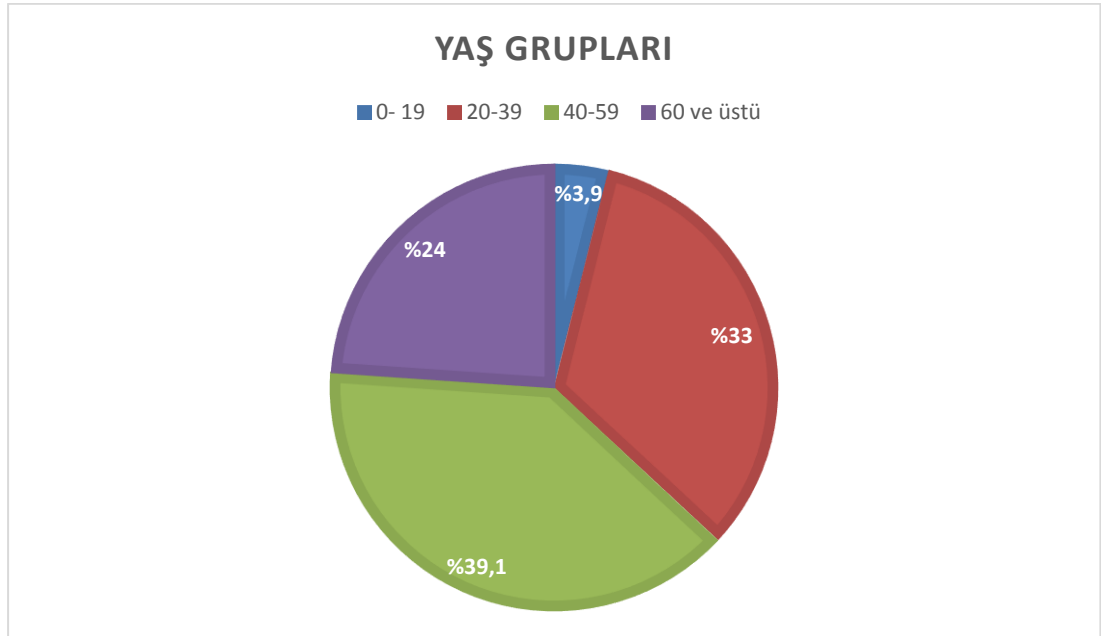
4.1.1. Katılımcıların demografik ve sosyo-ekonomik yönden değerlendirilmesi

Çalışmaya 143 (%62,2)'ü kadın ve 87 (%37,8)'si erkek olmak üzere toplam 230 kişi katılmıştır. Gönüllülerin dokuzu (%3,9) 0-19 yaş; 76 (%33)'sı 20-39 yaş; ve 90 (%39,1)'i 40-59 yaş gruplarında idi. Elli beş (%24) kişi ise 60 yaş ve üzerinde idi. Evli bireylerin sayısı 183 (%80) iken, bekar olanların sayısı 47 (%20) idi. Katılımcıların 175 (%76)'inin eğitim düzeyi lise ve bunun altı iken, 55 (%24) gönüllü üniversite mezunu idi. Kişilerin meslek gruplarına göre dağılımları 19 (%8,3) öğrenci; 16 (%7) işçi; 64 (%27,8) memur; 94 (%40,9) ev hanımı veya emekli; diğer meslek grupları ise 37 (%16) olarak belirlenmiştir. İki yüz on bir (%91,7) katılımcı orta ve yüksek gelirli, 19 (%8,3) kişi ise düşük gelirli olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmaya katılan gönüllülerin (n: 21/230) 12 (%57,1)'sinde diyabet, 4 (%19,04)'ünde IBS, 2 (%9,5)'sinde kanser; 2 (%9,5)'sinde Haşimato hastalığı ve 1 (%4,7)'inde talasemi olduğu bilgisi edinilmiştir.

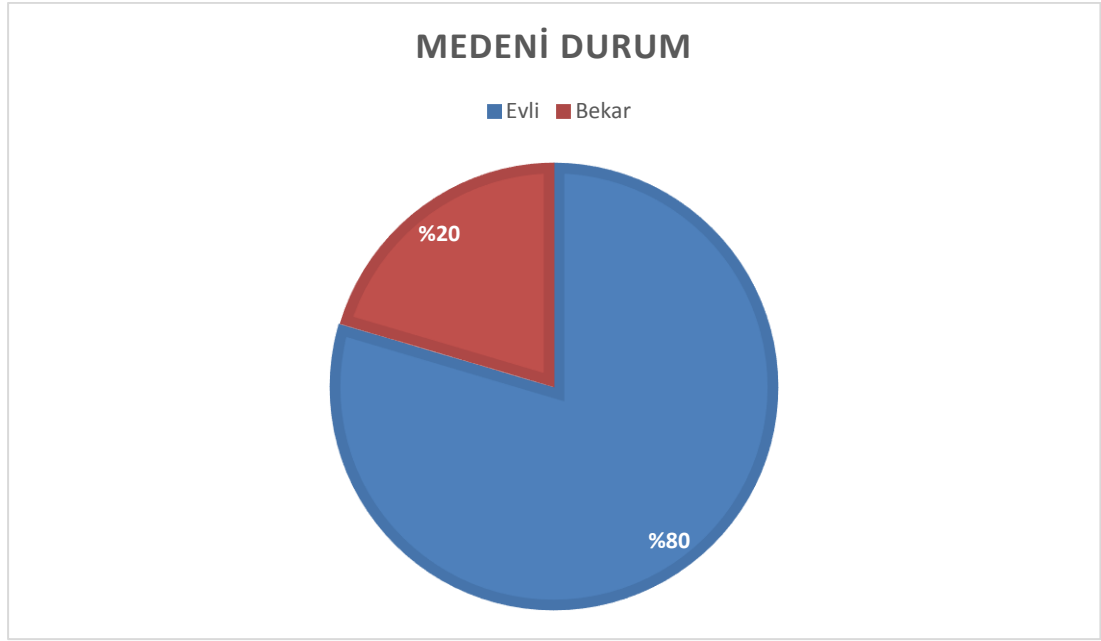
Katılımcıların demografik ve sosyo-ekonomik özellikleri sırası ile Şekil 4.1-4.7'de özetlenmiştir.



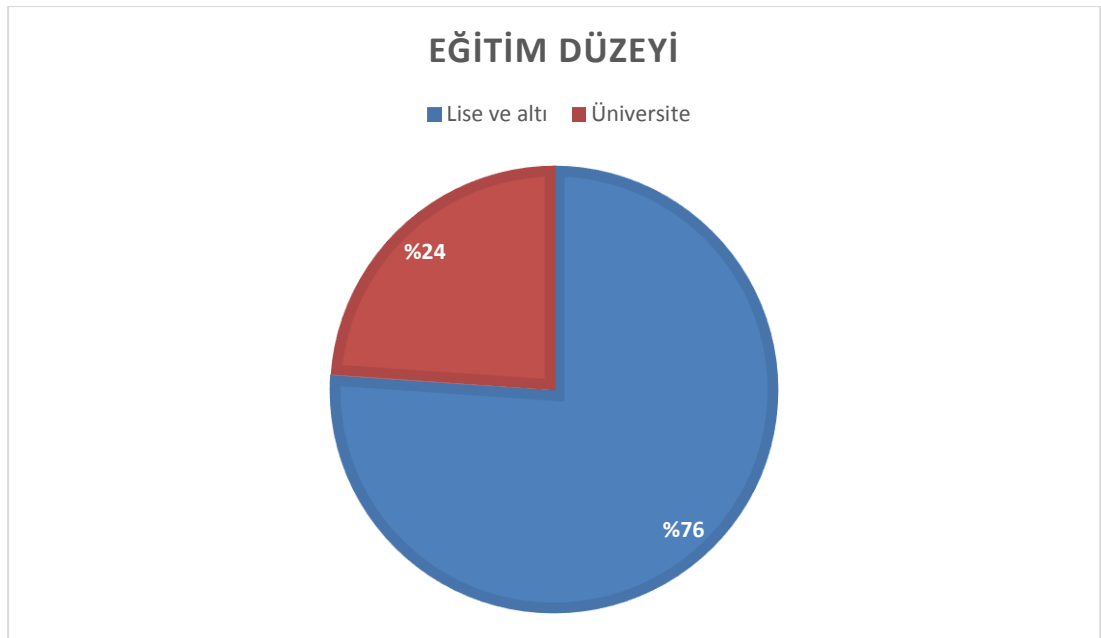
Şekil 4.1. Katılımcıların cinsiyete göre olan dağılımları, KKTC, 2015.



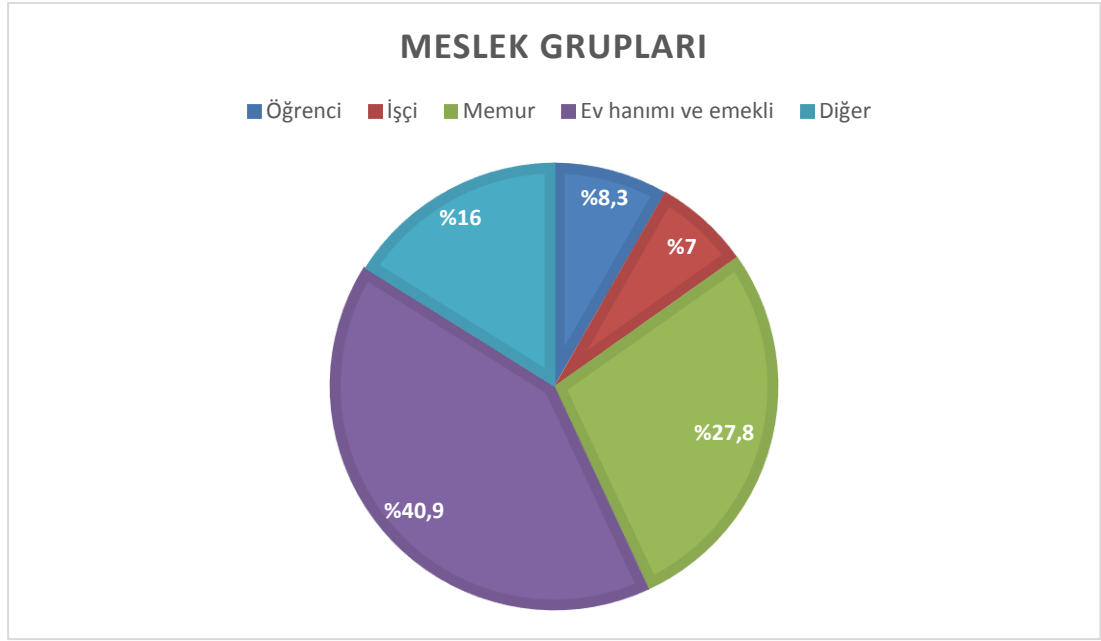
Şekil 4.2. Katılımcıların yaş gruplarına göre olan dağılımları, KKTC, 2015.



Şekil 4.3. Katılımcıların medeni duruma göre olan dağılımları, KKTC, 2015.



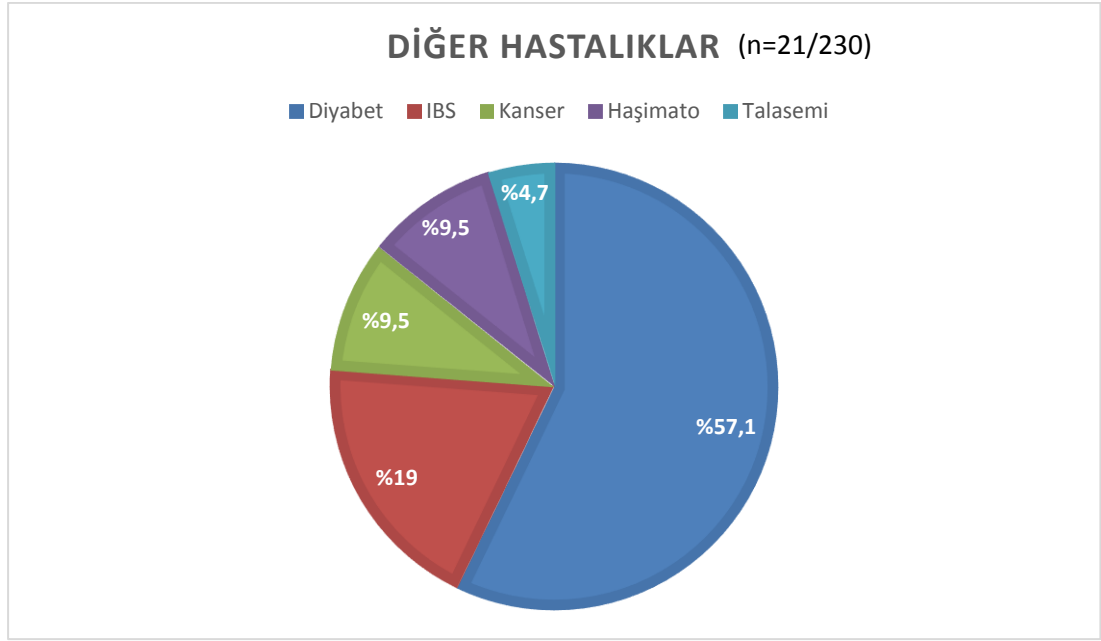
Şekil 4.4. Katılımcıların eğitim düzeylerine göre olan dağılımları, KKTC, 2015.



Şekil 4.5. Katılımcıların meslek gruplarına göre olan dağılımları, KKTC, 2015.



Şekil 4.6. Katılımcıların sosyo-ekonomik özelliklerine göre olan dağılımları, KKTC, 2015.

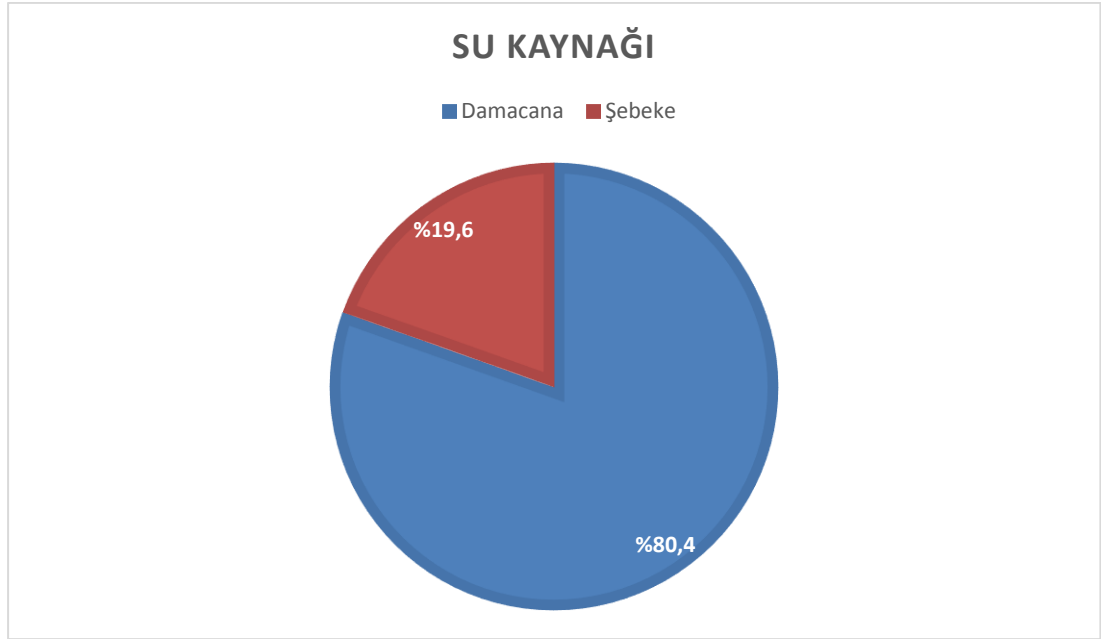


Şekil 4.7.Yirmi bir katılımcıda gözlenen diğer hastalıkların dağılımları, KKTC, 2015.

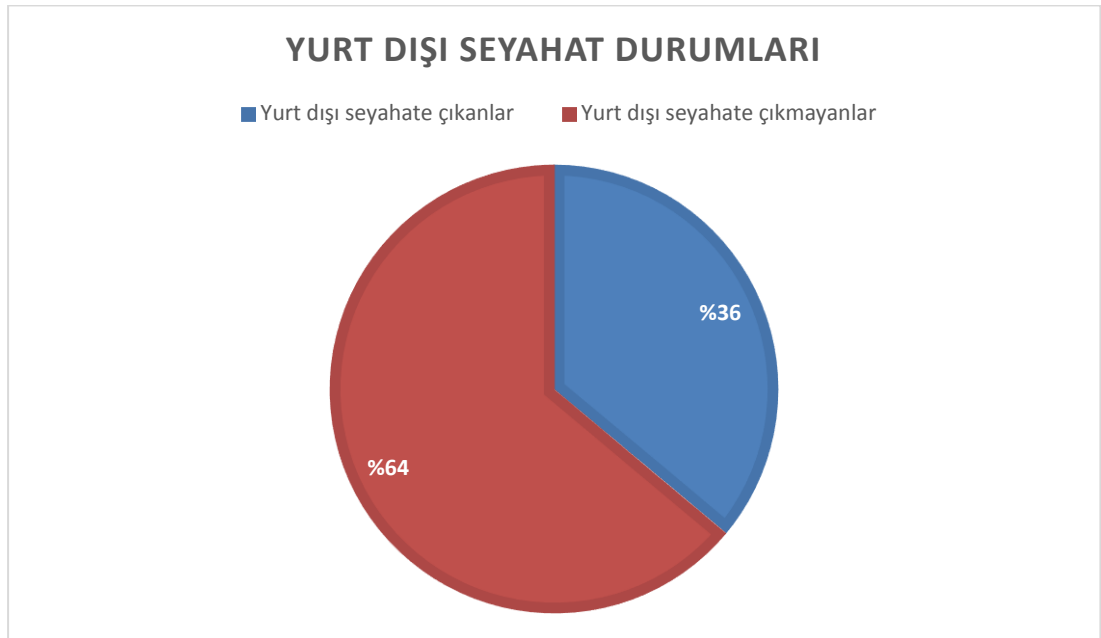
4.1.2. Katılımcıların epidemiyolojik özellikler yönünden değerlendirilmesi

Katılımcıların anket sorularına verdikleri yanıtların incelenmesi sonucunda 185 (%80,4) katılımcının damacana suyu; 45 (%19,6) kişinin ise şebeke suyu kullandığı belirlenmiştir. Gönüllülerin 83 (%36)'ünün yurt dışına (genellikle Türkiye) seyahat ettikleri, 147 (%64)'sinin ise seyahat etmediği anlaşılmıştır. Yüz kırk dokuz (%64,8) katılımcı şehir ve ilçelerde; 81 (%35,2) kişi ise köyde yaşamakta idi. Çalışmada evcil hayvana sahip olan katılımcı sayısı 85 (%37) iken; 145 (%63) kişi evcil hayvanı bulunmadığını belirtmiştir.

Katılımcıların epidemiyolojik özellikleri sırası ile Şekil 4.8-4.11'de özetlenmiştir.



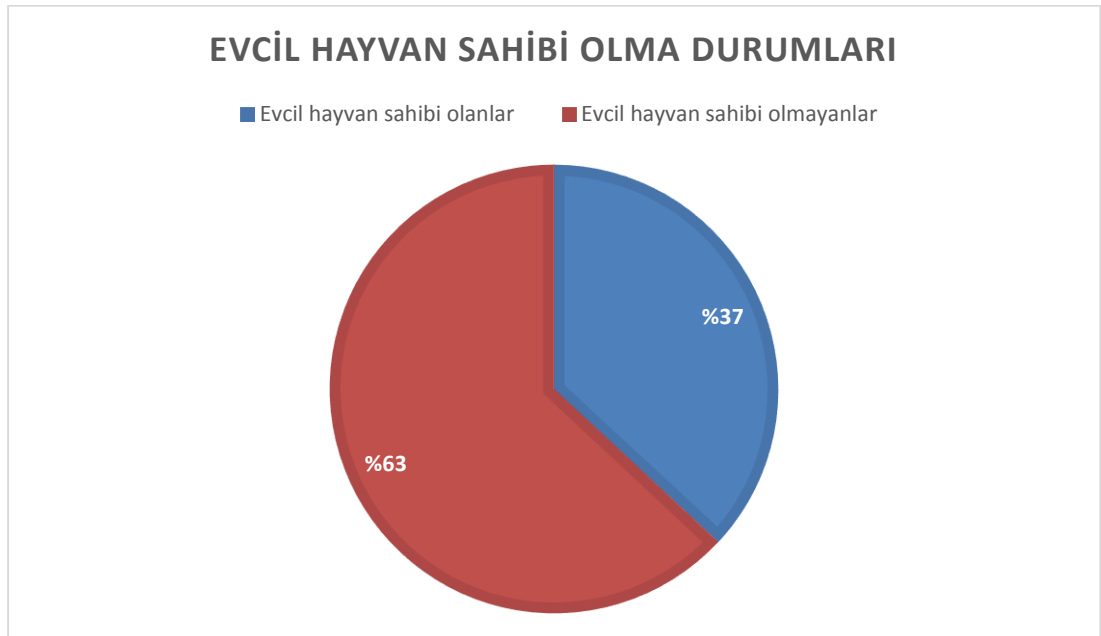
Şekil 4.8. Katılımcıların kullandıkları su kaynağına göre olan dağılımları, KKTC, 2015.



Şekil 4.9. Katılımcıların yurt dışı seyahat durumlarına göre olan dağılımları, KKTC, 2015.

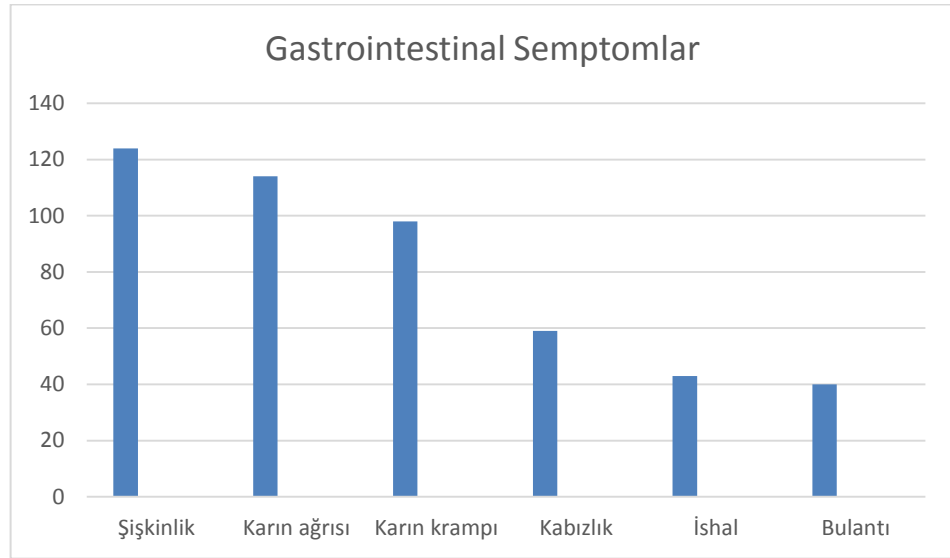


Şekil 4.10. Katılımcıların yaşadıkları yerleşim yerlerine göre olan dağılımları, KKTC, 2015.



Şekil 4.11. Katılımcıların evcil hayvan sahibi olma durumuna göre dağılımları, KKTC, 2015.

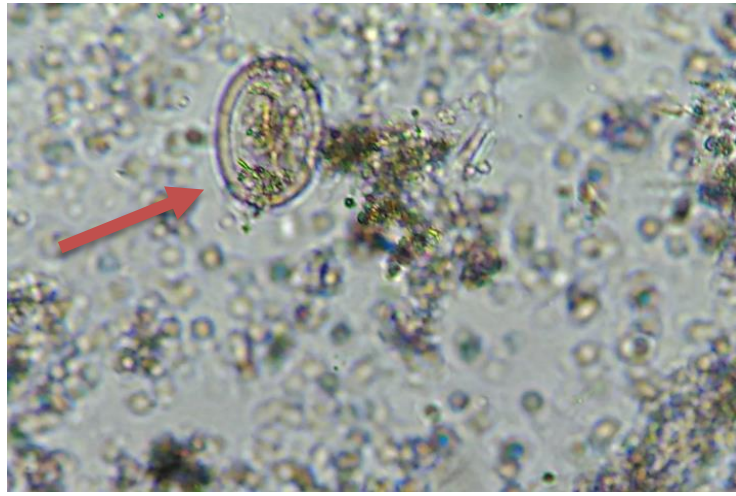
Gastrointestinal semptomların değerlendirilmesi sonucunda katılımcıların 114 (%49,6)'ünde karın ağrısı, 43 (%18,7)'ünde ishal, 98 (%42,6)'inde karında kramp, 40 (%17,4)'ında bulantı, 125 (%54,4)'inde karında şişkinlik ve 59 (%25,7)'unda kabızlık hikayesi olduğu belirlenmiştir. Katılımcılardaki gastrointestinal semptomlar Şekil 4.12'de özetlenmiştir.



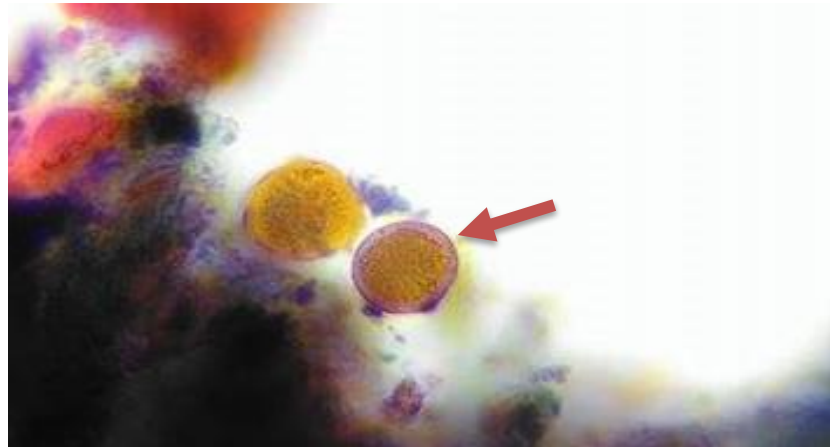
Şekil 4.12. Katılımcılardaki gastrointestinal semptomlar, KKTC, 2015.

4.2. Mikroskopi sonuçları

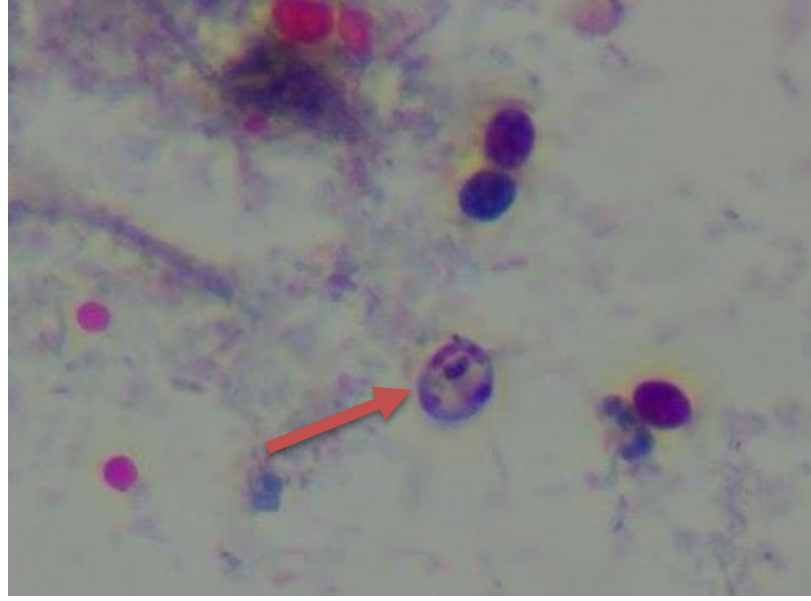
Dışkı örnekleri mikroskopik incelemede iki farklı uzman tarafından çift kör olarak değerlendirilmiştir. Nativ-Lugol ve trikrom boyalı preparatların incelenmesi sonucunda aynı bulgular saptanmıştır. Özetle dışkı örneklerinin 24 (%10,5)'ünde *Blastocystis* spp; iki (%0,8) tanesinde *Giardia* spp; birinde (%0,4) ise *Entamoeba coli* saptanmıştır (Şekil 4.13-4.15). Geri kalan örneklerde herhangi bir helmint veya protozoona rastlanmamıştır.



Şekil 4.13. Taze dışkı örneğinde saptanan *Giardia* spp., KKTC, 2015.



Şekil 4.14. Taze dışkı örneğinde saptanan *Entamoeba coli*, KKTC, 2015.



Şekil 4.15. Taze dışkı örneğinden hazırlanan trikrom boyalı preparatta saptanan *Blastocystis* spp., KKTC, 2015.

4.3. Moleküler test sonuçları

4.3.1. *Blastocystis* spp. DNA izolasyon sonuçları

Dışkı örneklerinin muhafaza edilmesi amacıyla kullanılan her iki yöntemde de 70 mg numune kullanılmıştır. *Blastocystis* spp. DNA'sının izolasyonu için kullanılan dondurulmuş dışkı örneklerinden ve filtre kağıdına aktarılan numunelerden izole edilen DNA'nın miktarı ve saflığı Tablo 4.1'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

A260/A280 dalga boyunda saf DNA ölçümü her iki yöntemle de 1.7-2.2 olarak saptanmıştır. Donmuş dışkı örneklerinden izole edilen DNA miktarı 25-405 ng/µl ve ortalama DNA konsantrasyonu 151 ng/µl iken; filtre kağıdına aktarılmış numunelerde bu oranlar sırası ile 7-339 ng/µl ve 122 ng/µl olarak saptanmıştır. Her iki yöntemle izole edilen DNA konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Mann-Witney U test ile $p=0,549$). Her iki yöntemle de negatif örneklerin hiçbiri pozitif olarak

saptanmamıştır. DNA izolasyonunda negatif kontrol olarak kullanılan dışkı içermeyen filtre kağıdından DNA izole edilmemiştir.

Tablo 4.1. Dondurulmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş numunelerin DNA miktarı ve saflık değerleri.

Yöntemin adı	DNA miktarı (min-max ng/μl)	Ortalama DNA miktarı (ng/μl)	DNA saflığı (A260/A280 dalga boyunda)
Dondurulmuş dışkı örnekleri	25-405	151	1,7-2,2
Filtre kağıdına aktarılan dışkı örnekleri	7-339	122	1,7-2,2

4.3.2. *Blastocystis* spp. PCR sonuçları

Çalışmaya dahil edilen toplam 230 dışkı örneğinin PCR sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir. Donmuş dışkı örneklerinin 49 (%21,3)’u ve filtre kağıdına aktarılan numunelerin 58 (%25,3)’i PCR yöntemi ile pozitif saptanmıştır. Kırk üç örnek ise her iki yöntemle pozitif olarak belirlenmiştir. İki yöntemle pozitif saptanan toplam örnek sayısı 64’dür. Bu örneklerin 15’i filtre kağıdı yöntemi ile pozitif; donmuş dışkı yöntemi ile negatif bulunmuştur. Buna karşın, 64 örneğin 6’sı donmuş dışkı yöntemi ile pozitif; filtre kağıdı yöntemi ile negatif olarak belirlenmiştir.

Donmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılmış numunelerden yapılan PCR’in sonuçları *Blastocystis* spp.’nin saptanması açısından mikroskopi ile karşılaştırılmış olup, her iki muhafaza yönteminin duyarlılık ve özgüllükleri belirlenmiştir (Tablo 4.3). Mikroskopi *Blastocystis* spp. tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir (Roberts ve diğerleri, 2014). Buna göre, donmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılmış numunelerden yapılan PCR’in duyarlılıkları sırası ile %86,4 ve %95,5, özgüllükleri ise %98,3

ve %99,4 olarak tespit edilmiştir. Her iki yöntemde de PCR inhibisyonu saptanmamıştır.

Tablo 4.2. Donmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılmış numunelerden yapılan PCR'ın *Blastocystis* spp.'nin saptanma sonuçları açısından karşılaştırılması.

		Donmuş dışkı örneklerinden yapılan PCR		
Filtre kağıdına aktarılmış dışkı örneklerinden yapılan PCR		Pozitif	Negatif	Toplam
	Pozitif	43	15	58
	Negatif	6	166	172
	Toplam	49	181	230
$p= 0,078$				

Tablo 4.3. Donmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılmış numunelerden yapılan PCR'ın *Blastocystis* spp.'nin saptanma sonuçları açısından mikroskopi ile karşılaştırılması.

		Mikroskopi		
Donmuş dışkı örneklerinden PCR yöntemi		Pozitif	Negatif	Toplam
	Pozitif	19	30	49
	Negatif	3	178	181
	Toplam	22	208	230
Duyarlılık: %86,4 Özgüllük: %98,3				
Filtre kağıdına aktarılmış dışkı örneklerinden PCR yöntemi		Pozitif	Negatif	Toplam
	Pozitif	21	37	58
	Negatif	1	171	172
	Toplam	22	208	230
Duyarlılık: %95,5 Özgüllük: %99,4				

4.3.3. *Blastocystis* spp. DNA dizi analizi sonuçları

DNA dizi analizi sonuçlarının doğruluğu mikroskopi ile konfirme edilen örneklerle göre değerlendirilmiştir. Ancak, mikroskopi ile konfirme edilen 22 numunenin üç tanesinde dondurulmuş dışkı örneklerinden PCR ile pozitiflik saptanamadığı için, bunlar değerlendirme dışı bırakılmışlardır.

Mikroskopi ile konfirme edilen 19 örneğin DNA dizi analizi sonuçlarının her iki muhafaza yönteminin kullanıldığı örneklerde tamamen aynı (%100 uyum) olduğu gözlenmiştir. Saptanan subtipler ST2:6, ST3:8, ST4:3 ve ST6:2 olarak belirlenmiştir.

Dondurulmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılan numunelere uygulanan DNA dizi analizi sonuçlarına göre, çalışma grubumuzdaki en yaygın olan subtipin ST3 olduğu ve bunu sırası ile ST2, ST4 ve ST1'in izlediği tespit edilmiştir. Her iki muhafaza yöntemiyle pozitif bulunan PCR ürünlerinin DNA dizi analizi bulguları arasındaki uyum %90,7 gibi yüksek bir oranda saptanmıştır. Söz konusu iki yöntemle çalışılan örneklerin DNA dizi analizi sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 4.4.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.4. Dondurulmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılan numunelerin DNA dizi analizi sonuçları.

Örnek saklama şekli	DNA dizi analizi sonuçları							
	ST1 n (%)	ST2 n (%)	ST3 n (%)	ST4 n (%)	ST6 n (%)	ST7 n (%)	Non-ST n (%)	Negatif n (%)
Donmuş dışkı (49 pozitif)	5 (7,8)	13 (20,3)	19 (29,7)	6 (9,4)	2 (3,2)	2 (3,1)	2 (3,1)	15 (23,4)
Filtre kağıdına aktarılmış dışkı (58 pozitif)	7 (10,9)	15 (23,5)	20 (31,3)	7 (11,0)	3 (4,7)	2 (3,1)	4 (6,2)	6 (9,4)
Her iki yöntem (39 pozitif)	5 (7,8)	8 (12,5)	14 (21,9)	6 (9,4)	2 (3,1)	2 (3,1)	2 (3,1)	NA
*Uyum: %90,7								

n: Sayı

NA: Not applicable (uygulanabilir değil)

Non-ST: Subtiplendirme yapılamayan

4.3.4. *Blastocystis* spp. prevalansının demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlere göre değerlendirilmesi

Mikroskopik inceleme, dondurulmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılan numunelerden yapılan PCR yöntemlerinin herhangi biri ile *Blastocystis* spp. varlığının saptanması durumunda, söz konusu örneğin alındığı kişi pozitif olarak kabul edilmiştir. Buna göre çalışmadaki toplam 82 katılımcı *Blastocystis* spp. açısından pozitif bulunmuştur.

Blastocystis spp. prevalansının demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlere göre olan dağılımı değerlendirilmiştir. Buna göre *Blastocystis* spp. prevalansı ile cinsiyet (erkek: %27,6; kadın: %27,9; $p=0,950$); yaş grupları (0-19 yaş: %11,1; 20-39 yaş: %35,5, $p=0,141$; 40-50 yaş: %25,5, $p=0,335$; ≥ 60 yaş: %23,6; $p=0,399$); medeni durum (evli: %30,6, bekar: %17; $p=0,064$); eğitim seviyesi (lise ve bunun altı: %30,3, üniversite ve

üzeri: %20; $p=0,138$); ekonomik durum (düşük gelirli: %31,6, orta ve yüksek gelirli: %27,4; $p=0,703$); ve meslek grupları (öğrenci: %21; memur: %29,6, $p=0,460$; ev hanımı veya emekli: %28,7, $p=0,494$; işçi: %25, $p=1,000$; diğer meslekler: %27; $p=0,625$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ayrıca yurt dışı seyahat durumu (seyahat öyküsü olan kişiler: %28,4, seyahat öyküsü olmayanlar: %27,2; $p=0,782$); yerleşim yeri (kırsal kesimde yaşayanlar: %28, şehirde yaşayanlar: %27,5; $p=0,887$); evcil hayvan varlığı (evcil hayvanı olanlar: %34,1, evcil hayvanı olmayanlar: %24,1; $p=0,103$); ve su kaynağı (şebeke suyu kullananlar: %22,2, damacana su kullananlar: %29,1; $p=0,225$) gibi epidemiyolojik faktörler ile *Blastocystis* spp. prevalansı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 4.5).

Blastocystis spp. prevalansının gastrointestinal semptomlara göre olan dağılımı değerlendirilmiştir. Çalışma grubundaki gastrointestinal semptomlar karın ağrısı (%49,6), diyare (%18,7), karın krampları (%42,6), bulantı (%17,4), şişkinlik (%54,4) ve kabızlık (%25,7) idi. Buna göre gastrointestinal semptomlar (karın ağrısı olan kişiler: %27,2, olmayanlar: %28,4, $p=0,832$; ishal tablosu bulunanlar: %30,2, bulunmayanlar: %27,2, $p=0,696$; karında kramp şikayeti olan kişiler: %29,5, olmayanlar: %26,5, $p=0,607$; bulantısı olanlar: %27,5, olmayanlar: %27,8, $p=0,960$; şişkinlik durumu bulunan katılımcılar: %26,4, bulunmayanlar: %29,5, $p=0,598$; kabızlığı olanlar: %20,3, olmayanlar: %30,4, $p=0,137$) ile *Blastocystis* spp. prevalansı arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.5. *Blastocystis* spp. prevalansının demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlere göre olan dağılımı, KKTC, 2015.

Faktörler	Sayı n/ %	<i>Blastocystis</i> spp. pozitifliği n/ %	OR (%95 CI)	p değeri
Cinsiyet:				
Erkek	87/ 37,8	24/ 27,6	1,0 (-)	-
Kadın	143/ 62,2	40/ 27,9	0,981 (0,541-1,779)	0,950
Yaş grupları:				
0-19	9/ 3,9	1/ 11,1	1,0 (-)	-
20-39	76/ 33,0	27/ 35,5	0,227 (0,027-1,911)	0,141
40-59	90/ 39,1	23/ 25,5	0,364 (0,043-3,071)	0,335
>=60	55/ 24,0	13/ 23,6	0,404 (0,046-3,537)	0,399
Eğitim seviyesi:				
Üniversite ve bunun altı	175/ 76,0	53/ 30,3	1,0 (-)	-
Üniversite mezunları	55/ 24,0	11/ 20,0	1,738 (0,833-3,625)	0,138
Medeni durum:				
Evli	183/ 80,0	56/ 30,6	1,0 (-)	-
Bekar	47/ 20,0	8/ 17,0	2,15 (0,944-4,896)	0,064
Meslek grupları:				
Öğrenci	19/ 8,3	4/ 21,0	1,0 (-)	-
Memur	64/ 27,8	19/ 29,6	0,632 (0,185-2,153)	0,460
Ev hanımı veya emekli	94/ 40,9	27/ 28,7	0,662 (0,201-2,175)	0,494
İşçi	16/ 7	4/ 25,0	0,800 (0,165-3,885)	1,000
Diğer meslekler	37/ 16	10/ 27,0	0,720 (0,192-2,696)	0,625
Sosyo-ekonomik durum:				
Düşük	19/ 8,3	6/ 31,6	1,0 (-)	-
Orta ve yüksek	211/ 91,7	58/ 27,4	1,218 (0,442-3,354)	0,703
Yurt dışı seyahat:				
Evet	83/ 36,0	24/ 29,0	1,0 (-)	-
Hayır	147/ 64,0	40/ 27,2	1,088 (0,599-1,978)	0,782
Yerleşim yeri:				
Kırsal	149/ 64,8	41/ 27,5	1,0 (-)	-
Şehir	81/ 35,2	23/ 28,4	0,957 (0,524-1,748)	0,887
Evcil hayvan sahibi:				
Evet	85/ 37,0	29/ 34,1	1,0 (-)	-
Hayır	145/ 63,0	35/ 24,1	1,628 (0,904-2,930)	0,103
İçme suyu kaynağı:				
Şebeke	45/ 19,6	10/ 22,2	1,0 (-)	-
Damacana	185/ 80,4	54/ 29,1	0,707 (0,404-1,239)	0,225

Tablo 4.6. *Blastocystis* spp. prevalansının gastrointestinal semptomlara göre olan dağılımı, KKTC, 2015.

Semptomlar	Sayı n/ %	<i>Blastocystis</i> spp. pozitifliği n/ %	OR (%95 CI)	<i>p</i> değeri
Karın ağrısı:				
Evet	114/ 49,6	31/ 27,2	1,0 (-)	-
Hayır	116/ 50,4	33/ 28,4	0,939 (0,528-1,673)	0,832
Diyare:				
Evet	43/ 18,7	13/ 30,2	1,0 (-)	-
Hayır	187/ 81,3	51/ 27,2	1,156 (0,559-2,388)	0,696
Karın krampı:				
Evet	98/ 42,6	29/ 29,5	1,0 (-)	-
Hayır	132/ 57,4	35/ 26,5	1,165 (0,652-2,082)	0,607
Mide bulantısı:				
Evet	40/ 17,4	11/ 27,5	1,0 (-)	-
Hayır	190/ 82,6	53/ 27,8	0,980 (0,457-2,103)	0,960
Şişkinlik:				
Evet	125/ 54,4	33/ 26,4	1,0 (-)	-
Hayır	105/ 45,4	31/ 29,5	0,856 (0,480-1,526)	0,598
Kabızlık:				
Evet	59/ 25,7	12/ 20,3	1,0 (-)	-
Hayır	171/ 74,3	52/ 30,4	0,584 (0,286-1,192)	0,137

4.3.5. *Blastocystis* spp. subtiplerinin demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlere göre değerlendirilmesi

Blastocystis subtiplerinin belirlenmesi amacıyla iki muhafaza yöntemiyle PCR sonucu pozitif saptanan toplamda 64 dışkı örneğinin PCR ürünlerine tek yönlü DNA dizi analizi uygulanmıştır. En yaygın saptanan subtipler ST3 (n: 20, %31,2), ST2 (n: 18, %28,2), ST1 (n: 8, %12,5), ve ST4 (n: 7, %11) iken; ST6 (n: 3, %4,7), ST7 (n: 2, %3,2), ve subtiplendirme yapılamayanlar (non-ST, n: 6, %9,4) daha az oranlarda tespit edilmiştir. Çalışmada belirlenen subtipler ile cinsiyet, yaş grupları, eğitim seviyesi, medeni durum, meslek grupları, ekonomik düzey, yurt dışına seyahat etme durumu, yerleşim yeri evcil hayvan sahibi olma durumu ve kullanılan su kaynağı gibi faktörler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 4.7).

Blastocystis spp. pozitiflik oranı ile gastrointestinal semptomlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemesi nedeniyle, saptanan subtipler ile gastrointestinal semptomlar arasındaki ilişki konusunda bir değerlendirme yapılmamıştır.

Tablo 4.7. *Blastocystis* suptiplerinin demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlere göre olan dağılımları, KKTC, 2015.

Faktörler	Pozitif n	Non-ST n	ST1 n	ST2 n	ST3 n	ST4 n	ST6 n	ST7 n
Cinsiyet:								
Erkek	24	4	1	5	10	2	2	-
Kadın	40	2	7	13	10	5	1	2
<i>p</i> değeri		0,317	0,655	0,180	n.c	0,317	0,317	n.c
Yaş grupları:								
0-19	1	-	-	1	-	-	-	-
20-39	27	2	6	9	7	3	-	-
40-59	23	2	1	6	10	-	2	2
>=60	13	2	1	2	3	4	1	-
<i>p</i> değeri		0,102	0,370	0,109	0,109	n.c	n.c	n.c
Eğitim seviyesi:								
Üniversite ve altı	53	4	5	16	16	7	3	2
Üniversite mezunu	11	2	3	2	4	-	-	-
<i>p</i> değeri		0,181	0,80	0,180	0,108	n.c	n.c	n.c
Medeni durum:								
Evli	56	6	6	15	19	6	3	1
Bekar	8	-	2	3	1	1	-	1
<i>p</i> değeri		n.c	0,180	0,180	0,655	0,655	n.c	n.c
Meslek grupları:								
Öğrenci	4	-	2	1	-	1	-	-
Memur	19	3	2	6	5	1	1	1
Ev hanımı veya emekli	27	2	2	7	9	5	2	-
İşçi	4	-	-	1	3	-	-	-
Diğer meslekler	10	1	2	3	3	-	-	1
<i>p</i> değeri		0,593	n.c	0,223	0,066	1,000	0,655	n.c

n.c: Non-countable (sayılamayan)

Tablo 4.7. (Devam) *Blastocystis* suptiplerinin demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlere göre olan dağılımları, KKTC, 2015.

Faktörler	Pozitif n	Non-ST n	ST1 n	ST2 n	ST3 n	ST4 n	ST6 n	ST7 n
Sosyo-ekonomik durum:								
Düşük gelirli	6	-	2	3	-	-	1	-
Orta ve yüksek gelirli	58	6	6	15	20	7	2	2
<i>p</i> değeri		n.c	0,180	0,180	n.c	n.c	0,655	n.c
Yurt dışı seyahat:								
Evet	24	-	1	8	10	3	1	1
Hayır	40	6	7	10	10	4	2	1
<i>p</i> değeri		n.c	0,655	0,180	n.c	0,655	0,180	n.c
Yerleşim yeri:								
Kırsal	41	3	6	9	12	7	2	2
Şehir	23	3	2	9	8	-	1	-
<i>p</i> değeri		n.c	0,180	n.c	0,180	n.c	0,655	n.c
Evcil hayvan sahibi:								
Evet	29	4	4	6	12	1	1	1
Hayır	35	2	4	12	8	6	2	1
<i>p</i> değeri		0,120	n.c	0,180	0,180	0,655	0,655	n.c
İçme suyu kaynağı:								
Şebeke	10	-	2	3	4	-	-	1
Damacana	54	6	6	15	16	7	3	1
<i>p</i> değeri		n.c	0,180	0,180	0,180	n.c	n.c	n.c

5. TARTIŞMA

5.1. Yöntemlerin karşılaştırılması

Blastocystis spp. dünya genelindeki en yaygın protozoonlardan biri olarak kabul edilmektedir. Bu protozoonun PCR yöntemi ile tanısı, taze veya donmuş dışkı örneklerinden *Blastocystis* spp. DNA'sının başarılı şekilde izole edilebilmesine bağlı olup, ayrıca genotiplendirmenin yapılması da gerekmektedir. (Roberts ve diğerleri, 2011; Forsell ve diğerleri, 2012; Stensvold, 2013). Ancak dışkı içeriğinde bulunan safra tuzları, karbonhidratlar, bilirubin, bakteriyel nükleazlar ve dışkının oksidasyonu PCR'ın duyarlılığını olumsuz şekilde etkileyebilmektedir (Nadkarni ve diğerleri, 2012). Aynı zamanda dışkı örneklerinin saklanması ve taşınmasındaki zorluklar, moleküler yöntemleri kısıtlamaktadır. Bu olumsuzluklar sonucunda PCR yönteminin duyarlılığının artırılması amacıyla etkili DNA izolasyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Filtre kağıdına dayalı yöntemlerin bu problemlere çözüm olabileceği düşünülmektedir. Buna karşın, insan dışkı örneklerinde parazit tanısı için filtre kağıdına dayalı yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar sınırlıdır (Carnevale ve diğerleri, 2000; Nantavisai ve diğerleri, 2007; Subrungruang ve diğerleri, 2004). Tüm bu sebeplerden ötürü, bu çalışmada donmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılan numuneler kullanılarak *Blastocystis* spp. ve subtiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Her iki dışkı saklama yöntemi ile elde edilen DNA konsantrasyonları ve saflığı, PCR'ın duyarlılığı ve DNA dizi analizi sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Son yıllarda insanlardan (Chen, 2016; Sirdah, 2014), bitkilerden (Roy ve Nassuth, 2005), hayvanlardan (Smith ve Burgoyne, 2004), böceklerden (Harvey, 2005), bakterilerden (Rajendram ve diğerleri, 2006), virüslerden (Picard-Meyer ve diğerleri, 2007) ve parazitlerden (Nantavisai ve diğerleri, 2007) farklı DNA çeşitlerinin tanımlanması amacıyla filtre kağıdına dayalı yöntemler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Filtre kağıdına dayalı yöntemlerin kullanıldığı daha önceki çalışmalarda Whatman filtre kağıdı, sıradan filtre kağıdı, *Flinders Technology Associates (FTA)* kağıdı gibi farklı

tiplerde filtre kağıtları kullanılmıştır (Mutwewingabo ve diğerleri, 1984; Harvey, 2005; Smit ve diğerleri, 2014). Selülozdan (%100) oluşan Whatman filtre kağıtlarının farklı gözenek büyüklüklerinde ve kalınlıklarda olan tipleri mevcuttur. Filtrasyon veya örnek hazırlama gibi rutin laboratuvar işlemlerinde kullanılan sıradan filtre kağıtları da %100 selülozdan oluşmaktadır. Bu filtre kağıtları yumuşak bir yüzeye sahiptir ve normal kalınlıkta dırlar. Diğer yandan FTA kağıtlarına patentli kimyasal karışımlar muamele edilmiştir. Bu işlem FTA kağıtları üzerinde elde edilen organizmalardan DNA izolasyonuna olanak sağlamaktadır (Rajendram ve diğerleri, 2006). FTA kağıtlarının avantajlı yanı, patojenik organizmaları inaktive etmesidir. Whatman tipi ve sıradan filtre kağıtlarında ise kontaminasyon riskinin daha yüksek olması nedeniyle, örneklerin bulaşma potansiyeli olduğu kabul edilmeli ve çalışma esnasında gerekli biyogüvenlik önlemleri alınmalıdır (Smit ve diğerleri, 2015).

Protozoonların tanısında FTA kağıtlarının kullanılmasının dezavantajı çalışılan örnek miktarının az olmasıdır. FTA kağıtlarına aktarılabilen sulandırılmış dışkı miktarı 15 µl ile sınırlıdır (Subrungruang ve diğerleri, 2004; Nantavisai ve diğerleri, 2007). Farklı filtre kağıtlarının kullanıldığı yöntemler maaliyet yönünden karşılaştırıldığı zaman, çalışmamızda kullanılan sıradan filtre kağıtlarının, DNA izolasyonundaki kit gereksinimine rağmen, FTA yönteminden iki kat daha ucuza mal olduğu sonucuna varılmıştır.

Dışkı örneklerinin muhafaza edilmesi amacıyla sıradan filtre kağıtlarının kullanılabileceği fikrini ilk kez 1950 yılında Lie Kian Joe ortaya atmıştır. Bu makalede dizanterik dışkıların laboratuvara gönderilmesine yönelik filtre kağıdının kullanılmasının avantajları belirtilmiştir. 1984'te Mutwewingabo ve diğerleri, sıradan filtre kağıdına aktarılan dışkı örneklerindeki Shiga basillerinin canlılığının korunmasında sıcaklığın ve zamanın bir önemi olmadığını göstermişlerdir (Mutwewingabo ve diğerleri, 1984).

Çalışmamızda 300-350 µl sulandırılmış dışkı örneği sıradan filtre kağıtları üzerine ince bir tabaka halinde yayılmıştır. Filtre kağıtlarına aktarılan dışkı örneklerinden edinilen DNA miktarı (122 ng/µl), donmuş dışkı

örneklerinden izole edilen DNA miktarı (151 ng/µl) ile karşılaştırıldığı zaman aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Her iki yöntemde de DNA inhibitörü saptanmamıştır. Filtre kağıdına aktarılan ve donmuş dışkı örneklerinden izole edilen DNA'ların stabilitesini koruduğu ve PCR ile kopyalanabilir olduğu gözlenmiştir.

Filtre kağıdı üzerine aktarılıp kurutulmuş dışkı örneklerinin kullanılmasındaki esas güçlük, filtre kağıdı üzerinden dışkıların kazınması aşamasında yüksek miktarda DNA kontaminasyon riskinin olmasıdır. Çalışma grubumuz, kontaminasyon riskinin minimuma indirilmesi için bu aşamanın hava akımının olduğu biyogüvenlik kabinleri içerisinde yapılmasını önermektedir.

Bu projede donmuş dışkı örnekleri ve filtre kağıdına aktarılmış numunelerden yapılan PCR'in duyarlılıkları sırası ile %86,4 ve %95,5, özgüllükleri ise %98,3 ve %99,4 olarak tespit edilmiştir. Nantavisai ve diğerleri, *Giardia duodenalis* tanısında filtre kağıdına aktarılmış dışkı örneklerini PCR ile test etmiş, ve bu yöntemin duyarlılığını %97,3, özgüllüğünü ise %100 olarak saptamışlardır. Araştırmacılar dışkı örnekleri kullanılarak uygulanan immünofloresan yönteminin duyarlılığının %91,9 ve özgüllüğünün %100 olduğunu belirtmişlerdir (Nantavisai ve diğerleri, 2007). Diğer bir çalışmada Subrungruang ve diğerleri, *Enterocytozoon bieneusi*'nin dışkıdan izolasyonu amacıyla kullanılan filtre kağıdından PCR yönteminin duyarlılığını %100 olarak belirtmişlerdir (Subrungruang ve diğerleri, 2004). *Enterocytozoon bieneusi*'nin tanısı için dışkı örneklerinin farklı koruma solüsyonları içerisinde saklandığı ve daha sonra filtre kağıdına aktarıldığı bir çalışmada ise, filtre kağıdı yönteminin örnek toplanması, gönderilmesi ve tanı için gayet kullanışlı ve etkili olduğu belirtilmiştir (Carnevale ve diğerleri, 2000). Chu ve diğerleri, hayvanlardan toplanan dışkı örneklerini başarılı şekilde filtre kağıtlarına aktarmış, ve bu yöntemin *Cyclospora cayetanensis* tanısında etkili olduğunu ifade etmişlerdir (Chu ve diğerleri, 2004).

Filtre kağıdına aktarıp kurutma işleminin dışkı örneklerindeki DNA'yı oksidasyon; UV ışınları ve nükleazların sebep olduğu hasar; ve

mikroorganizma kontaminasyonuna karşı koruduğu düşünülmüştür (Salvador ve De Ungria, 2003; Thacker ve diğerleri, 1999). Bu nedenle dışkı örnekleri filtre kağıtlarına aktarılıp saklandığı zaman PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olmaktadır. Bazı araştırmacılar dışkı örneklerinin -20°C’de saklanması bazen pozitif örnekleri negatife dönüştürebileceğini bildirmişlerdir (Boorom ve diğerleri, 2008). Bu nedenle taze ve dondurulmuş dışkı örneklerinden elde edilen PCR sonuçlarının da karşılaştırılması gerekmektedir.

Roberts ve diğerleri, dışkı örneklerinden *Blastocystis*’in saptanması için PCR’da iki farklı primer seti kullanmış ve PCR’ın duyarlılığını %94 ve %66 olarak saptamışlardır. Sonuçlar PCR’da doğru primer setinin kullanılmasının önemine dikkat çekmiştir (Roberts ve diğerleri, 2011). Çoğu araştırmacı konvansiyonel PCR’ın duyarlılığının ksenik *in vitro* kültür yönteminin duyarlılığından daha iyi olmadığı görüşünü savunmaktadır (Stensvold ve diğerleri, 2007). Bunun yanı sıra iki farklı çalışmada ksenik *in vitro* kültür yöntemi ve gerçek zamanlı PCR karşılaştırılmış ve iki yöntemin duyarlılıkları sırası ile %79 ve %52 olarak saptanmıştır (Poirier ve diğerleri, 2011; Stensvold ve diğerleri, 2012). Çalışmamızda *Blastocystis* spp. tanısında ilk kez denenen bir yöntem olan filtre kağıdına aktarılmış dışkı örneklerinden PCR yöntemi ile bulunan *Blastocystis* spp. pozitifliği %25,3, dondurulmuş dışkı örneklerinden PCR yöntemi ile saptanan PCR pozitifliği ise %21,3 olarak tespit edilmiştir. Filtre kağıdına aktarılmış dışkı örneklerine uygulanan PCR ile daha iyi sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen, bu yöntem ve dondurulmuş dışkı örneklerine uygulanan PCR’ın sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Mikroskopi ile konfirme edilmiş 19 örneğin SSU rRNA dizi analizi sonuçları iki yöntemle %100 uyumlu bulunmuştur. Diğer yandan ST1, ST2, ST3, ST4 ve ST6 filtre kağıdına dayalı yöntem ile daha yüksek oranlarda tespit edilmiş olup, sadece ST7 her iki yöntemle eşit oranlarda saptanmıştır. Bu nedenle, dizi analizi sonuçlarına göre iki yöntemin uyumu %90,7 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamız, filtre kağıdına aktarılan dışkı örneklerine uygulanan PCR'ın duyarlılığının yüksek olduğunu ve bu yöntemin dizi analizindeki etkinliğini net şekilde gösteren ilk araştırmadır. Ayrıca bu metodun dışkı örneklerinin toplanması, taşınması ve saklanması kolaylaştırmasının yanı sıra, DNA'ların uzun süre stabil ve saf kalmasını sağlayan düşük maliyetli bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2. Demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik verilerin değerlendirilmesi

Blastocystis enfeksiyonu özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak gözlenen bir sağlık problemi olmasına rağmen, bu protozoonun patogenezi ve epidemiyolojisi henüz tam olarak açıklanamamaktadır (Duda ve diğerleri, 1998). Bu çalışmada KKTC'de *Blastocystis* spp.'nin prevalansı ile subtiplerinin belirlenmesi, ve bunların gastrointestinal semptomlarla olan ilişkisinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda ayrıca *Blastocystis* spp. ve subtiplerinin demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik verilerle olan ilişkisi de araştırılmıştır. Bu çalışma KKTC'de *Blastocystis* spp. prevalansı ve epidemiyolojisi ile ilgili olarak yürütülmüş ilk çalışmadır.

Bu çalışmada Nativ-Lugol, trikrom ve PCR yöntemleri ile saptanan *Blastocystis* spp. prevalansı sırası ile %10,5, %10,5 ve %27,8 olarak belirlenmiştir. Boyalı ve direkt yaymalardan yapılan mikroskopinin genel olarak daha düşük duyarlılığa sahip olduğu (Dogruman AI ve diğerleri, 2010; Elghareeb ve diğerleri, 2015), PCR yönteminin ise tanıda en etkili yöntem olduğu kabul edilmektedir (Roberts ve diğerleri, 2011).

Blastocystis spp. prevalansı Japonya (%0,5) (Horiki ve diğerleri, 1997) ve Danimarka (%5,6) (Stensvold ve diğerleri, 2011) gibi gelişmiş ülkelerde düşük oranlarda; Libya (%22,1) (Abdulsalam ve diğerleri, 2013), İran (%26,9) (Kiani ve diğerleri, 2016), Türkiye (%15,2) (Dagci ve diğerleri, 2014), Brezilya (%17,8) (Cabrane-Santos ve diğerleri, 2015), Mısır (%33,3) (Rayan ve

diğerleri, 2007), Filipinler (%12,9) (Belleza ve diğerleri, 2015) ve Tayland (%21) (Yaicharoen ve diğerleri, 2005) gibi gelişmekte olan ülkelerde ise daha yüksek oranlarda bildirilmiştir. En yüksek *Blastocystis* spp. prevalansı ise Senegal (%100) (El- Safadi ve diğerleri, 2014), Katar (%71,1) (Abu-Madi ve diğerleri, 2015) ve Lübnan (%63)'da (Osman ve diğerleri, 2016) kaydedilmiştir.

KKTC'de hizmet sektörü ön plandadır ve özellikle turizm en dinamik sektörler arasında yer almaktadır. Ülke popülasyonu genellikle orta veya yüksek gelir seviyesine sahiptir. Halka sunulan sağlık hizmetleri ve diğer konulardaki olanaklar yeterli düzeydedir. Şebeke suyu genellikle kontrol edilmekte ve işlem görmektedir. Bu ülkede yaşayan insanlar genellikle sağlıklı ve güvenilir olarak nitelendirilen şişelenmiş ve damacanada bulunan suları kullanmaktadırlar. Araştırmamızdaki çalışma grubunun suya erişim problemi bulunmamaktaydı. Ayrıca atıkların ve kanalizasyon sisteminin düzenli bir şekilde işlem gördüğü bilinmektedir. Mevcut hijyen durumunun gelişmekte olan ülkelere kıyasla daha iyi durumda bulunması çalışmamızda prevalansın bu ülkelerdeki kadar yüksek saptanmamasının nedeni olabilir.

Bugüne kadar yürütülen epidemiyolojik çalışmalar, bağırsak parazitlerinin neden olduğu enfeksiyonların prevalansının demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlerle ilişkili olduğunu belirtmiştir (Okuyay ve diğerleri, 2004; Ostan ve diğerleri, 2007). Bizim çalışmamızda ise yaş ve cinsiyet ile *Blastocystis* spp. pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda *Blastocystis* spp. ile ilişkili enfeksiyonların erkeklerde daha sık gözlemlendiği bildirilirken (Al-Fellani ve diğerleri, 2007; Abdulsalam ve diğerleri, 2013; Cabrine-Santos ve diğerleri, 2015), prevalansın cinsiyetle ilişkili olmadığını savunan araştırmalar da mevcuttur (Abu-Madi ve diğerleri, 2015; Belleza ve diğerleri, 2015; Khoshnood ve diğerleri, 2015). *Blastocystis* spp. prevalansı ve yaş grupları arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda, en yüksek prevalansın 5-59 yaş arası (Belleza ve diğerleri, 2015), 18 yaş ve üstü (Abdulsalam ve diğerleri, 2013), 18-30 yaş arası (Yaicharoen ve diğerleri, 2005) veya 60 yaş ve üstünde (Li ve diğerleri, 2007) bulunduğu bildirilmiştir. Buna karşın, *Blastocystis* spp.

prevalansının yaş ile ilişkili olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (AbuOdeh ve diğerleri, 2016; Khoshnood ve diğerleri, 2015). Farklı çalışmalardan elde edilen çelişkili sonuçların, araştırmaların yürütüldüğü kesimlerdeki çevresel koşullarla ilişkili olduğu düşünülmüştür (Abdulsalam ve diğerleri, 2013). Abdulsalam ve diğerleri, Belleza ve diğerleri, ve Yaicharoen ve diğerleri yöntem olarak mikroskopi ve kültür tekniklerini kullanırken, bizim çalışmamızda PCR kullanılmıştır. Bu nedenle, birbiriyle uyumsuz sonuçların çalışmalarda kullanılan farklı tanı yöntemlerinden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda *Blastocystis* prevalansı bekarlarda daha yüksek oranda saptanmış olmasına rağmen, *Blastocystis* prevalansı ile katılımcıların medeni durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

Araştırma grubumuzdaki meslek sahibi olan katılımcılar ile herhangi bir yerde çalışmayan kişiler arasında *Blastocystis* prevalansı yönünden anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Önceki araştırmalar, çalışanlarda işsizlere göre daha yüksek enfeksiyon oranı olduğunu göstermiştir. Abdulsalam ve diğerleri, iş yerlerindeki yiyecekler ve çevresel koşullar nedeni ile enfeksiyon kaynağına daha çok maruz kalınabileceğinden dolayı çalışıyor olmanın *Blastocystis* prevalansında risk faktörü olabileceğini savunmuşlardır (Abdulsalam ve diğerleri, 2013). Quihui ve diğerleri, çalışmayan ve düşük eğitim seviyesine sahip annelerin çocuklarının paraziter enfeksiyonlar açısından daha yüksek risk taşıdığını bildirmişlerdir (Quihui ve diğerleri, 2006).

Hijyen alışkanlıkları ve sıhhi koşullar eğitim seviyesiyle ilişkilidir. Bu nedenle düşük eğitim düzeyinin *Blastocystis* enfeksiyonu ve diğer paraziter enfeksiyonlar açısından belirgin risk faktörü olduğu ifade edilmektedir (Abdulsalam ve diğerleri, 2013; Osman ve diğerleri, 2016; Ostan ve diğerleri, 2007). Hijyen alışkanlıklarının birçok bulaşıcı hastalıktan korunma ve bunların kontrolünde önemli bir faktör olduğu göz önünde bulundurulduğu zaman, düşük eğitim seviyesine sahip kişilerin bu konudaki bilgisizliğinin enfeksiyonların bulaşında da rol alabileceği düşünülmektedir. Ancak

çalışmamızda *Blastocystis* prevalansı ile katılımcıların eğitim düzeyleri arasında belirgin bir ilişki saptanmamıştır ($p= 0,138$).

Önceki çalışmalar yoksulluk, düşük gelir seviyesi ve düşük ekonomik durumun belirgin şekilde paraziter enfeksiyonları artırdığına ve toplum içerisinde enfeksiyonun bulaşını kolaylaştırdığına işaret etmiştir (Ostan ve diğerleri, 2007; Quihui ve diğerleri, 2006; Yaicharoen ve diğerleri, 2005). Çalışmamızda gönüllülerin büyük bir kısmı orta veya yüksek gelir seviyesine sahip olduğu (%91,7) halde, ilginç bir şekilde bu gruptaki *Blastocystis* enfeksiyon sıklığının yüksek (%27,4) olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda düşük gelir seviyesine sahip kişilerde de enfeksiyon sıklığının yüksek (%31,6) olduğu görülmüştür. Bu nedenle, çalışmamızda diğer araştırmaların aksine, gelir seviyesi ile *Blastocystis* prevalansı arasında belirgin bir ilişki olmadığı gözlenmiştir.

Blastocystis enfeksiyonunun fekal-oral yol, kontamine su kaynakları, kontamine gıdalar ve hayvanlar aracılığı ile bulaşabileceği bilinmektedir (Kevin ve diğerleri, 2010). Arıtılmamış kontamine yüzeysel su kaynaklarının içme suyu olarak kullanılmasının *Blastocystis* enfeksiyonu için potansiyel bir risk faktörü olduğu ifade edilmektedir (Taamasri ve diğerleri, 2000; Quihui ve diğerleri, 2006; Abdulsalam ve diğerleri, 2012). Ancak, arıtılmış su kaynağı kullanan bireyler ile arıtılmamış kaynaktan içme suyunu kullananlar arasında *Blastocystis* enfeksiyon sıklığı açısından belirgin bir fark olmadığını savunan çalışmalar da mevcuttur (Abdulsalam ve diğerleri, 2013; Osman ve diğerleri, 2016). Bizim çalışmamıza katılan gönüllülerin çoğu (%80,4) arıtılmış ve şişelenmiş su kaynağı kullanırken, geri kalanların (%19,6) musluk suyu kullandığı belirlenmiştir. Ancak, bu iki grup arasında enfeksiyon oranları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuç, yer altı suyunun *Blastocystis* ile kontaminasyonunun düşük seviyede olduğunu ve KKTC'deki su kaynağının parazitler açısından güvenli kabul edilebileceğini göstermektedir.

Blastocystis enfeksiyonu zoonoz olarak da kabul edilmektedir. Bu protozoon köpek (%70), kedi (%67,3) (Duda ve diğerleri, 1998), evde

beslenen tavuk (Lee, Stenzel, 1999) ve besi tavuklarının (%95) (Belova, Kostenko, 1990) dışkılarında yüksek oranlarda bulunmuştur. Hayvanlarla yakın teması olan kişilerde *Blastocystis* prevalansı daha yüksek oranda bildirilmiştir (Lee ve diğerleri, 2012; Parkar ve diğerleri, 2010; Salim ve diğerleri, 1999). Bazı çalışmalarda ise, bizim araştırmamızdaki gibi *Blastocystis* enfeksiyonu ile hayvanlarla temas arasında belirgin bir ilişki olmadığı belirtilmiştir (Abdulsalam ve diğerleri, 2013).

Daha önce yapılmış birçok çalışma kırsal kesimlerde yaşamının hem *Blastocystis* enfeksiyonunun hem de diğer parazit enfeksiyonların prevalansını belirgin şekilde etkilediğini bildirmiştir. Bu durum genellikle söz konusu bölgelerdeki zayıf olan sağlık ve hijyen koşulları, kontamine su kaynakları ve toprakla yakın temas gibi faktörlerin yanı sıra tuvalet olanaklarının bulunmaması ile ilişkilendirilmektedir (Nithyamathi ve diğerleri, 2016; Sungkar ve diğerleri, 2015). Diğer yandan Kiani ve diğerleri, kırsal kesim ve şehirde yaşayan kişiler arasında *Blastocystis* enfeksiyonu açısından istatistiksel bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir (Kiani ve diğerleri, 2016). Bizim çalışmamızda da buna benzer bulgular elde edilmiş olup, bu durumun kırsal kesimlerde gerekli tüm sıhhi koşulların sağlanmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmadaki katılımcıların %36'sı sıklıkla Türkiye ve Avrupa ülkelerine seyahat ettiklerini belirtmişlerdir. Çalışmamızın sonuçları seyahat öyküsünün *Blastocystis* enfeksiyonunun prevalansına etkisi olmadığını ortaya koymuştur. Bizim çalışmamızdan farklı olarak Jelinek ve diğerleri, tropikal ülkelere seyahat eden kişilerde gözlenen diyare tablosunun *B. hominis* ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir (Jelinek ve diğerleri, 1997).

Blastocystis spp.'in patogenezi henüz tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, bazı araştırmacılar parazitin vakuolar formunun bağırsağın lamina propria, submukozal ve mukozal katmanlarına invaze olarak enflamasyona ve aktif kolite yol açtığını göstermişlerdir (Elwakil ve Hewedi, 2010). *Blastocystis*'in virülans faktörü olan proteazların bağışıklık sisteminden kaçışta patojenik rol üstlendikleri ön görülmektedir (Abdel-Hameed ve

Hassanin, 2011). *Blastocystis* spp. enfeksiyonu hem semptomatik hastalarda hem de asemptomatik bireylerde gözlenebilmektedir (Tan, 2008). Bazı araştırmacılar bu protozoonu hem immün sistemi sağlam bireylerde hem de immün sistemi baskılanmış bireylerde potansiyel patojen olarak kabul etmektedirler (El-Safadi ve diğerleri, 2014; Karasartova ve diğerleri, 2015). Yakın zamanda yapılan araştırmalar *Blastocystis*'in normal bağırsak florasının sıklıkla karşılaşılan bir üyesi olduğunu ve farklı subtiplerin asemptomatik olarak gastrointestinal kanalı kolonize edebildiğini göstermiştir (Scanlan ve diğerleri, 2014). Bizim çalışma grubumuzdaki gastrointestinal semptomlar karın ağrısı (%49,6), diyare (%18,7), karın krampı (%42,6), bulantı (%17,4), şişkinlik (%54,4) ve kabızlık (%25,7) olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda *Blastocystis* prevalansı ile gastrointestinal semptomlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Bu nedenle bulgularımız semptomatik hastalardaki *Blastocystis* enfeksiyonu ile gastrointestinal semptomlar arasında güçlü bir ilişki olduğunu savunan önceki çalışmalar ile uyuşmamaktadır (Abdulsalam ve diğerleri, 2013; Kaya ve diğerleri, 2007; Nithyamathi ve diğerleri, 2016; Osman ve diğerleri, 2016; Tan ve diğerleri, 2002).

Bu çalışmada en yaygın saptanan subtipler ST3 (n: 20, %31,2), ST2 (n: 18, %28,2), ST1 (n: 8, %12,5), ve ST4 (n: 7, %11) iken; ST6 (n: 3, %4,7), ST7 (n: 2, %3,2), ve subtiplendirme yapılamayanlar (non-ST, n: 6, %9,4) daha az oranlarda tespit edilmiştir. Bu subtiplerin sadece dört tanesi (ST1, ST2, ST3 ve ST4) dünya genelinde yaygın olmakla birlikte, dağılımları coğrafik alana göre değişiklik göstermektedir (Al-Fellani ve diğerleri, 2013; Stensvold ve diğerleri, 2007; Tan, 2008). Türkiye'deki en yaygın subtip ST3 iken, bunu ST1 ve ST2 takip etmektedir (Dogruman Al ve diğerleri, 2008; Dogruman Al ve diğerleri, 2009; Eroglu, Koltas, 2010). Avrupa ülkelerinde subtip dağılımları benzer şekilde gözlenmekle birlikte, ST4 de yaygın olarak bulunmaktadır (Alfellani ve diğerleri, 2013). Diğer yandan ST5-ST9 insanlarda sporadik olarak saptanmaktadır (Al-Fellani ve diğerleri, 2013; Li ve diğerleri, 2007). *Blastocystis* spp. ile ilişkilendirilebilecek gastrointestinal semptomların belli başlı subtiplere bağlı olabileceği ön görülmektedir (Dogruman Al ve diğerleri,

2008; Eroglu ve diğeri, 2009). Ancak günümüzdeki bazı çalışmalarda bunun tam tersi de iddia edilmektedir (Clark ve diğeri, 2013). Bizim çalışmamızda *Blastocystis* spp. pozitifliği ile gastrointestinal semptomlar arasında anlamlı bir ilişkinin bulunmaması nedeniyle, *Blastocystis* subtiplerinin gastrointestinal semptomlarla olan ilişkisi değerlendirilmemiştir.

Bu çalışmada, *Blastocystis* subtiplerinin epidemiyolojisinin anlaşılması için, bu parazitin yayılımı cinsiyet, yaş, medeni durum, eğitim seviyesi, meslek, ekonomik durum, seyahat öyküsü, hayvanlarla yakın temas ve yerleşim yeri gibi faktörlere göre değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda, *Blastocystis* subtiplerinin prevalansı ile bu faktörler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. *Blastocystis* subtiplerinin yayılımının sosyodemografik ve epidemiyolojik faktörlere göre değerlendirildiği çok az çalışma mevcuttur. Mattiucci ve diğeri, ST3 ve ST1'e 15-50 yaş grubu hastalarda belirgin olarak daha sık rastlandığını bildirmişlerdir (Mattiucci ve diğeri, 2016).

Bu çalışma KKTC'de *Blastocystis* spp. epidemiyolojisinin incelendiği ilk araştırmadır. Çalışma sonuçları KKTC'de bu protozoonun prevalansının yüksek olduğunu fakat gastrointestinal semptomlarla *Blastocystis* spp. pozitifliği arasında bir ilişki olmadığını ortaya koymuştur. İlginç olarak demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörlere göre *Blastocystis* spp. ve subtiplerinin dağılımı tümüyle homojen olarak bulunmuştur. Bulgularımız bu faktörlerin hiçbirinin *Blastocystis* spp. ve subtiplerinin prevalansı üzerinde etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Çalışmamız bir bütün olarak ele alındığı zaman, verilerimiz *Blastocystis* spp.'nin sağlıklı kişilerde bağırsak florasının bir üyesi olduğu teorisini destekler niteliktedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Bu çalışmada iki farklı muhafaza yöntemi kullanılarak 230 dışkı örneğinde (dondurulmuş ve filtre kağıdına aktarılmış) mikroskopi ve PCR ile *Blastocystis* spp. varlığı araştırılmıştır. Bunun sonucunda *Blastocystis* spp. gelişmekte olan ülkelerden düşük, fakat gelişmiş ülkelerden daha yüksek oranda saptanmıştır. Söz konusu protozoonun prevalansı Türkiye başta olmak üzere komşu ülkelerdeki ile benzer oranda bulunmuştur.

2. PCR yönteminin mikroskopiden daha duyarlı olduğu görülmüştür. Donmuş dışkı örnekleri kullanıldığında 30, filtre kağıdına dayalı yöntem uygulandığında ise 37 örnek, mikroskopi sonucu negatif olmasına rağmen, pozitif olarak tespit edilmiştir. *Blastocystis* spp.'nin saptanmasında PCR yönteminin duyarlılığı yüksek olmasına rağmen, diğer enfeksiyonların tanısında mikroskobik incelemeden vazgeçilmemelidir.

3. Filtre kağıdına aktarılan dışkı örneklerine uygulanan PCR'ın duyarlılığının yüksek olduğu ve bu yöntemin dizi analizindeki etkinliği net bir şekilde gösterilmiştir. Aynı zamanda filtre kağıdına dayalı yöntem dışkı örneklerinin toplanması, taşınması, posta ile gönderilmesi ve korunmasını oldukça kolaylaştırmaktadır. Bu yöntemin ayrıca uygun fiyatlı olması ve DNA'ların uzun süre saf ve stabil olarak saklanmasını olanaklı kılması nedeniyle de gayet avantajlı bir yöntem olduğu düşünülmüştür.

4. Bu çalışmada *Blastocystis* spp. prevalansı ile yaş, cinsiyet, medeni durum, eğitim seviyesi, meslek, ekonomik durum, seyahat öyküsü, hayvanlarla yakın temas ve yerleşim yeri gibi epidemiyolojik faktörler arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

5. DNA dizi analizi sonucunda en yaygın saptanan subtipler ST3 (n: 20, %31,2), ST2 (n: 18, %28,2), ST1 (n: 8, %12,5), ST4 (n: 7, %11), ve daha az oranlarda ST6 (n: 3, %4,7) ile ST7 (n: 2, %3,2) olup, Avrupa ve Türkiye'deki ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

6. Bu çalışmada *Blastocystis* subtipleri ile demografik, sosyo-ekonomik ve epidemiyolojik faktörler arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

7. Bu çalışmada *Blastocystis* spp. ve subtipleri ile gastrointestinal semptomlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Hafeez, E. H., Ahmad, A. K., Andelgelil, N. H., Abdellatif, M. Z., Kamal, A. M., Mohamed, R. M. (2015). In vitro effect of some Egyptian herbal extracts against *Blastocystis hominis*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 45(1), 93–100.
- Abdel-Hameed, D. M., Hassanin, O. M. (2011). Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitology Research*, 109(2), 321–327.
- Abdulsalam A. M., Ithoi I., Al-Mekhlafi H. M., Ahmed A., Surin J., Mak J. M. (2012). Drinking water is a significant predictor of *Blastocystis* infection among rural Malaysian primary schoolchildren. *Parasitology*, 139(8), 1014–1020.
- Abdulsalam, M., Ithoi, I., Al-Mekhlafi, H. M., Khan, H., Ahmed, A., Surin, J., Mak, J. W. (2013). Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis* sp. in Sebha, Libya. *Parasit Vectors*, 6, 86.
- Abu-Madi, M., Aly, M., Behnke, J. M., Clark, C. G., Balkhy, H. (2015). The distribution of *Blastocystis* subtypes in isolates from Qatar. *Parasites & Vectors*, 8(1), 465.
- AbuOdeh, R., Ezzedine, S., Samie, A., Stensvold, C. R., ElBakri, A. (2016). Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in healthy individuals in Sharjah, United Arab Emirates. *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 158–162.
- Adıyaman Korkmaz, G., Doğruman Al, F., Mumcuoğlu, İ. (2015). Dışkı Örneklerinde *Blastocystis* spp. Varlığının Mikroskopik, Kültür ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Derneği*, 49(1), 85–97.
- Al-Fellani, M. A., Khan, A. H., Al-Gazoui R. M., Zaid, M. K., Al-Ferjani, M. A. (2007). Prevalence and Clinical Features of *Blastocystis hominis*

- Infection among Patients in Sebha, Libya. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 7(1), 35–40.
- Al-Fellani, M. A., Stensvold, C. R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E. S. U., Fagbenro-Beyioku, A. F., Clark, C. G. (2013). Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Tropica*, 126(1), 11–18.
- Amin, O. M. (2006). The Epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. *Research Journal of Parasitology*, 1(1), 1-10.
- Ashford, R. W., Atkinson, E. A. (1992). Epidemiology of *Blastocystis hominis* infection in Papua New Guinea: age-prevalence and associations with other parasites. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86:129–136.
- Bangyozova, V. B., Panayotova, M., Chakarova, B. (2008). Blastocystosis : ethiology, biology and prevalence. *Trakia Journal of Sciences*, 6(1), 90–93.
- Batista, M. V., Pierrotti, L. C., Abdala, E., Clemente, W. T., Girao, E. S., Rosa, D. R., ve diğerleri. (2011). Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. *Tropical Medicine and International Health*, 16(9), 1134–1142.
- Belleza, M. L. B., Cadacio, J. L. C., Borja, M. P., Solon, J. A., Padilla, M., Tongol-Rivera, P. N., ve diğerleri. (2015). Epidemiologic Study of *Blastocystis* Infection in an Urban Community in the Philippines. *Journal of Environmental and Public Health*, 2015, 1–7.
- Belova, L., Kostenko, L. (1990). *Blastocystis galli* sp. n. (Protista: Rhizopoda) from the intestines of domestic hens. *Parazitologiya*, 24(2), 164–168.
- Boorom, K. F., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U., ve diğerleri. (2008). Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites & Vectors*, 1(40).

- Cabrine-Santos, M., Cintra Edo, N., do Carmo, R. A., Nascentes, G. A., Pedrosa, A. L., Correia, D., ve diğerleri. (2015). Occurrence of *Blastocystis* spp. in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 57(3), 211–214.
- Carnevale, S., Velásquez, J. N., Labbé, J. H., Chertcoff, A., Cabrera, M. G., Rodríguez, M. I. (2000). Diagnosis of *Enterocytozoon bienersi* by PCR in stool samples eluted from filter paper disks. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(3), 504–6.
- Cavalier-Smith T. (2002). The neomuran origin of archaebacteria , the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (52), 7–76.
- Chen, C. (2016). Development of a Melting Curve-Based Allele-Specific PCR of Apolipoprotein E (APOE) Genotyping Method for Genomic. *PLoS ONE*, 1–11.
- Chen, C. H., Sun, H. Y., Chien, H. F., Lai, H. S., Chou, N. K. (2014). *Blastocystis hominis* infection in a post-cardiotomy patient on extracorporeal membrane oxygenation support: A case report and literature review. *International Journal of Surgery Case Reports*, 5(9), 637–9
- Chen, T. L., Chan, C. C., Chen, H. P., Fung, C. P., Lin, C. P., Chan, W. L., ve diğerleri. (2003). Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(2), 213–216.
- Chu, D. T., Sherchand, J. B., Cross, J. H., Orlandi, P. A. (2004). Detection of *Cyclospora cayentanensis* in Animal Fecal Isolates from Nepal Using an FTA Filter-base Polymerase Chain Reaction Method. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(4), 373–379.
- Clark, C. G. (2015). *What have we learned after 100 years of Blastocystis*

research? Bildiri] 1st International *Blastocystis* Symposium: 28-29 Mayıs 2015- Ankara (s. 1–2). Ankara: Gazi Üniversitesi.

Clark, C. G, van der Giezen, M., Alfellani, M. A, Stensvold, C. R. (2013). Recent developments in *Blastocystis* research. *Advances in Parasitology*, 82, 1-32.

Dagci, H., Kurt, Ö., Demirel, M., Mandiracioglu, A., Aydemir, S., Saz, U., Bart, A., van Gool, T. (2014). Epidemiological and Diagnostic Features of *Blastocystis* Infection in Symptomatic Patients in İzmir Province, Turkey. *Iranian Journal of Parasitology*, 9(4), 519- 529.

Daldal, N. ve Taylan Özkan, A. (2011). Parazitolojide Laboratuvar. Korkmaz, M., Ok, Ü. Z. (Ed.) *Parazit Kùltürleri* (s. 87–117). İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği.

Doğruman Al, F., Hökelek, M. (2007). *Blastocystis hominis* Fırsatçı Bir Patojen mi ? *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(1), 28–36.

Dogruman Al, F., Dagci, H., Yoshikawa, H., Kurt, Ö., Demirel, M. (2008). A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 103(3), 685–689.

Dogruman Al, F., Kustimur, S., Yoshikawa, H., Tuncer, C., Simsek, Z., Tanyuksel, M., ve diğerleri. (2009). *Blastocystis* Subtypes in Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease in Ankara, Turkey. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(5), 724–727.

Dogruman Al, F., Simsek, Z., Boorum, K., Ekici, E., Sahin, M., Tuncer, C., Kustimur, S., Altınbas, A. (2010). Comparison of Methods for Detection of *Blastocystis* Infection in Routinely Submitted Stool Samples and also in IBS/ IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS One*, 5(11).

Duda, A., Stenzel, D., Boreham, P. F. (1998). Detection of *Blastocystis* sp. in domestic dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 76(1), 9–17.

Elghareeb, A.S., Younis, M. S., Fakahany, A. F., Nagaty, I. M., Nagib, M. M.

- (2015). Laboratory Diagnosis of *Blastocystis* spp. in Diarrheic Patients. *Tropical Parasitology*, 5(1),36-41.
- El-Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., ve diğçerleri. (2014). Children of Senegal River Basin Show the Highest Prevalence of *Blastocystis* sp. Ever Observed Worldwide. *BMC Infectious Diseases*, 14(164).
- Elwakil, H. S., Hewedi, I. H. (2010). Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. *Parasitology Research*, 107(3), 685–689.
- Eroglu, F., Genc, A., Elgun, G., Koltas, I. S. (2009). Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitology Research*, 105.
- Eroglu, F., Koltas, I. S. (2010). Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitology Research*, 107(4), 841–845.
- Eroğlu, F. (2015). *Blastocystis*'in moleküler epidemiyolojisi. *Dicle Medical Journal*, 42(4), 541–545.
- Foesell, J., Granlund, M., Stensvold, C. R., Clark, G. C., Evengard, B. (2012) Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(7), 1689-1696.
- Fouad, S. A., Basyoni, M. M. A., Fahmy, R. A., Kobaisid, M. H. (2011). The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab Journal of Gastroenterology*, 12(4), 194–200.
- Girginkardeşler, N., Ok, Ü. Z. (2011). Parazitolojide Laboratuvar. Korkmaz, M., Ok, Ü. Z. (Ed.) *Kalıcı Boyalı Yaymalar* (s. 29–35). İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği.
- Girish, S., Kumar, S., Aminudin, N. (2015). Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia*): a possible therapeutic candidate against *Blastocystis* sp. *Parasites &*

Vectors, 8, 332.

Guirges, S. Y., Al-Waili, N. S. (2007). *Blastocystis hominis*: Evidence for Human Pathogenicity and Effectiveness of Metronidazole Therapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 14(4), 333–335.

Hamamci, B., Yazar, S., Şahin, İ. (2004). *Blastocystis hominis*'in in vitro Kültürü ve Antiprotozoal İlaçların in vitro Etkilerinin Araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(1), 7–15.

Harvey, M. L. (2005). An alternative for the extraction and storage of DNA from insects in forensic entomology. *Journal of Forensic Sciences*, 50(3), 627– 629.

Horiki, N., Maruyama, M., Fujita, Y., Yonekura, T., Minato, S., Kaneda, Y. (1997). Epidemiologic survey of *Blastocystis hominis* infection in Japan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56(4), 370–374.

Iguchi, A., Yoshikawa, H., Yamada, M., Kimata, I., Arizono, N. (2009). Expression of interferon gamma and proinflammatory cytokines in the cecalmucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis* sp. strain RN94-9. *Parasitology Research*, 105, 135–140.

İnceboz, T., Usluca, S. (2009). *Blastocystis hominis* bağırsak hastalığı için potansiyel bir tehlike olabilir mi ? *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 23 (1), 37–45.

İnceboz, T., Usluca, S., Over, L., Yalcin, G., Tuncay, S., Ozkoc, S. (2011). Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne 2005- 2009 Yılları Arasında Başvuran Olgularda *Blastocystis hominis* Epidemiyolojisinin Araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 35(2), 72–76.

Jelinek, T., Peyerl, G., Löscher, T., von Sonnenburg F., Nothdurft, H. D. (1997). The Role of *Blastocystis hominis* as a Possible Intestinal

- Pathogen in Travellers. *Journal of Infection*, 35(1), 63-66.
- Kain, K. C., Noble, M. A., Freeman, H. J., Barteluk, R. L. (1987). Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 8(4), 235–44.
- Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng, X. J., Tachibana, H., Tsutsumi, Y. (2000). Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 25(2), 51–56.
- Karasartova, D., Gureser, A. S., Zorlu, M., Turegun-Atasoy, B., Taylan-Ozkan, A., Dolapci, M. (2015). Blastocystosis in post-traumatic splenectomized patients. *Parasitology International*, (baskı öncesi online sunulan makale)
- Kaya, S., Çetin, E. S., Aridoğan, B. C., Arikan, S., Demirci, M. (2007). Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, A Clinical Reevaluation. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(3), 184–187.
- Khoshnood, S., Rafiei, A., Saki, J., Alizadeh, K. (2015). Prevalence and Genotype Characterization of *Blastocystis hominis* among the Baghmalek People in Southwestern Iran in 2013 - 2014. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(10), 4–8.
- Kiani, H., Haghighi, A., Rostami, A., Azargashb, E., Seyyed Tabaei, S. J., Solgi, A. (2016). Prevalence , Risk Factors and Symptoms Associated To Intestinal Parasite Infections Among Patients With Gastrointestinal Disorders in Nahavand , Western Iran. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58(42), 1–7.
- Kirkoyun Uysal, H., Akgül, O., Purisa, S., Oner, Y. A. (2014). İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nde 25 Yıllık İntestinal Parazit Prevalansı: Retrospektif Bir Çalışma. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 38(2), 97–101.
- Kilimcioğlu, A. A., Ok, Ü. Z. (2011) Parazitolojide Laboratuvar. Korkmaz, M.,

- Ok, Ü. Z. (Ed.). *Makroskopik İnceleme ve Taze Dışkı İncelemeleri* (s. 17–22). İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği.
- Kumarasamy, V., Roslani, A. C., Rani, K. U., Govind, S. K. (2014). Advantage of using colonic washouts for *Blastocystis* detection in colorectal cancer patients. *Parasites & Vectors*, 7(1), 1–5.
- Kuo, H. Y., Chiang, D. H., Wang, C. C., Chen, T. L., Fung, C. P., Lin, C. P., ve diğerleri. (2008). Clinical Significance of *Blastocystis hominis*: Experience from a Medical Center in Northern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 41(3), 222–226.
- Lee, L., Chye, T., Karmacharya, B., Govind, S. (2012). *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasites & Vectors*, 5(1), 130.
- Lee, M. G., Stenzel, D. J. (1999). A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitology Research*, 85(2), 109–117.
- Leelayoova, S., Rangsin, R., Taamasri, P., Naaglor, T., Thathaisong, U., Mungthin, M. (2004). Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(6), 658–662.
- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Thathaisong, U., Naaglor, T., Taamasri, P. (2008). Drinking Water : A Possible Source of *Blastocystis* spp . Subtype 1 Infection in Schoolchildren of a Rural Community in Central Thailand, 79(3), 401–406.
- Li, L. H., Zhang, X. P., Lv, S., Zhang, L., Yoshikawa, H., Wu, Z., ve diğerleri. (2007). Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitology Research*, 102(1), 83–90.
- Malatyali, E., Özçelik, S. (2011). *Blastocystis* spp.'in İnsandan İzolasyonu ve Besiğinde Farklı Evrim Şekillerinin İzlenmesi. *Türkiye Parazitoloji*

Dergisi, 35(1), 19–22.

- Mattiucci, S., Gabrielli, S., Paoletti, M., Cancrini, G. (2016). Molecular Epidemiology and Genetic Diversity of *Blastocystis* Infection in Humans in Italy. *Epidemiology and Infection*, 144(3), 635–646.
- Meloni, D., Poirier, P., Mantini, C., Noel, C., Gantois, N., Wawrzyniak, I., ve diğerleri. (2012). Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. *Parasitology International*, 61(4), 719–722.
- Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, S. W., Ng, G. C., ve diğerleri. (1996). Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitology Research*, 82(5), 439–44.
- Mumcuoğlu, I., Alaca Coskun, F., Aksu, N., Purnak, T., Gungor, C. (2013). İrrite Bağırsak Sendromunda *Dientamoeba fragilis* ve *Blastocystis* spp.'nin Rolü. *Turkish Journal of Parasitology*, 37(2), 73–77.
- Mutwewingabo, A., Bogaerts, J., Lemmens, P., Vandepitte, J. (1984). Dried Filter Paper for Sending Dysenteric Faeces to the Laboratory. A Neglected Method? *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale*, 64(1), 51-55.
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Hunter, N., Jacques, N. A. (2009). Methods for optimizing DNA extraction before quantifying oral bacterial numbers by real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 296(1), 45–51.
- Nantavisai, K., Mungthin, M., Tan-Ariya, P., Rangsin, R., Naaglor, T., Leelayoova, S. (2007). Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 581–583.
- Nithyamathi, K., Chandramathi, S., Kumar, S. (2016). Predominance of *Blastocystis* sp . Infection among School Children in Peninsular Malaysia. *PLoS ONE*, 1–14.

- Noël, C., Dufernez, F. (2005). Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 348.
- Nourrisson, C., Scanzi, J., Pereira, B., NkoudMongo, C., Wawrzyniak, I., Cian, A., ve diğerleri. (2014). *Blastocystis* Is Associated with Decrease of Fecal Microbiota Protective Bacteria: Comparative Analysis between Patients with Irritable Bowel Syndrome and Control Subjects. *PLoS ONE*, 9(11), 1-9.
- Okyay, P., Ertug, S., Gultekin, B., Onen, O., Beser, E. (2004). Intestinal parasites prevalence and related factors in school children, a western city sample--Turkey. *BMC Public Health*, 4(1), 64.
- Osman, M., Safadi, D. E., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., ve diğerleri. (2016). Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium* , *Giardia* , *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli , Lebanon. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 1–17.
- Ostan, I., Kilimcioğlu, A. A., Girginkardeşler, N., Ozyurt, B. C., Limoncu, M. E., Ok, U. Z. (2007). Health inequities: lower socio-economic conditions and higher incidences of intestinal parasites. *BMC Public Health*, 7(1), 342.
- Örs, O. P., Güçlü, Y. A., Yilmazer, T. T., Öngel, K. (2011). Rutin kontrol sırasında saptanan asemptomatik bir olgu : *Blastocystis hominis*. *Smyrna Tıp Dergisi*, 43-45.
- Özcel, M. A., Üner, A., Ertuğ, S. (2011). Parazitolojide Laboratuvar. Korkmaz, M., Ok, Ü. Z. (Ed.) *Parazitolojide İmmunofloresans* (s. 209–218). İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği.
- Parija, S., Jeremiah, S. (2013). *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology*, 3(1), 17–25.
- Parkar, U., Traub, R. J., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I., ve

- diğerleri. (2010). Molecular Characterization of *Blastocystis* Isolates from Zoo Animals and Their Animal-keepers. *Veterinary Parasitology*, 169(1), 8–17.
- Picard-Meyer, E., Barrat, J., Cliquet, F. (2007). Use of filter paper (FTA®) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. *Journal of Virological Methods*, 140(1), 174–182.
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F., Livrelli, V. (2011). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: Prospective study of patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 975–983.
- Puthia, M. K., Vaithilingam, A., Lu, J., Kevin S. W., T. (2005). Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitology Research*, 97(5), 386-389.
- Quihui, L., Valencia, M. E., Crompton, D. W. T., Phillips, S., Hagan, P., Morales, G., ve diğerleri. (2006). Role of the employment status and education of mothers in the prevalence of intestinal parasitic infections in Mexican rural schoolchildren. *BMC Public Health*, 6(1), 225.
- Rajendram, D., Ayenza, R., Holder, F. M., Moran, B., Long, T., Shah, H. N. (2006). Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. *Journal of Microbiological Methods*, 67(3), 582–592.
- Rayan, H. Z., Ismail, O. A., El Gayar, E. K. Prevalence and Clinical Features of *Dientamoeba fragilis* Infections in Patients Suspected to Have Intestinal Parasitic Infection. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 37(2), 599-608.
- Roberts, T., Barratt, J., Harkness, J., Ellis, J., Stark, D. (2011). Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. *American Journal*

of Tropical Medicine and Hygiene, 84(2), 308–312.

- Roy, Y., Nassuth, A. (2005). Detection of plant genes, gene expression and viral RNA from tissue prints on FTA cards. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23(4), 383–395.
- Salim, H. R., Kumar, G. S., Vellayan, S., Mak, J. W., Khairul Anuar, A., Init, I., ve diğeri. (1999). *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitology Research*, 85(12), 1032–1033.
- Salvador, J. M., De Ungria, M. C. (2003). Isolation of DNA from saliva of betel quid chewers using treated cards. *Journal of Forensic Sciences*, 48(4), 794– 797.
- Santos, H. J., Rivera, W. L. (2013). Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp. in human stool samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(10), 780–784.
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H. G. H. J., De Vos, W. M., O'Toole, P. W., ve diğeri. (2014). The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 326–330.
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., Cotter, P. D. (2015). Development and application of *Blastocystis* subtype-specific PCR reveals that mixed subtype infections are common in a healthy human population. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(12), 4071-4076.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026.
- Scicluna, S. M., Tawari, B., Clark, C. G. (2006). DNA Barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 157(1), 77-85.
- Seyer, A. (2009). Bazi mantarlarda sîderofor varlığının gösterilmesi. Yüksek

Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.

- Seyer, A., Karasartova, D., Ruh, E., Güreser, A. S., Imir, T., Taylan Özkan, A. (2016). Is "dried stool spots on filter paper method (DSSFP)" more sensitive and effective for detecting *Blastocystis* spp. and their subtypes by PCR and sequencing? (baskı öncesi online sunulan makale).
- Sirdah, M. M. (2014). Superparamagnetic-bead Based Method: An Effective DNA Extraction from Dried Blood Spots (DBS) for Diagnostic PCR. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(4),1-4.
- Smit, P.W., Elliott, I., Peeling, R. W., Mabey, D., Newton, P. N. (2014). An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(2),195-210
- Smith, L. M., Burgoyne, L. A. (2004). Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. *BMC Ecology*, 4(4).
- Stensvold, R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H. V., Arendrup, M. C. (2006). Detection of *Blastocystis hominis* in Unpreserved Stool Specimens By Using Polymerase Chain Reaction. *The Journal of the Parasitology*, 92(5), 1081–1087.
- Stensvold, C. R., Suresh, G. K., Tan, K. S., Thompson, R. C., Traub, R. J., Viscogliosi, E., ve diğerleri. (2007). Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *Trends in Parasitology*, 23(3), 93–96.
- Stensvold, C. R., Christiansen, D. B., Olsen, K. E., Nielsen, H. V. (2011). *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*- positive patients presenting with acute diarrhea. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(6).
- Stensvold, C. R., Ahmed, U. N., Andersen, L. O. B., Nielsen, H. V. (2012). Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific

- detection of *Blastocystis* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 1847–1851.
- Stensvold, C. R., Alfellani, M., Clark, C. G. (2012) Levels of Genetic Diversity Vary Dramatically Between *Blastocystis* Subtypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 263-273.
- Stensvold, C. R. (2013) *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Tropical Parasitology*, 3(1), 26-34.
- Stenzel, D. J., Boreham, P. F. (1996). *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(4), 129–136.
- Subrungruang, I., Mungthin, M., Rangsin, R., Naaglor, T., Chavalitshewinkoon-Petmitr, P., Leelayoova, S. (2004). Evaluation of DNA Extraction and PCR Methods for Detection of *Enterocytozoon bienuesi* in Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3490–3494.
- Sungkar, S., Pohan, A. P. N., Ramadani, A., Albar, N., Azizah, F., Nugraha, A. R. A., ve diğerleri. (2015). Heavy burden of intestinal parasite infections in Kalena Rongo village, a rural area in South West Sumba, eastern part of Indonesia: a cross sectional study. *BMC Public Health*, 15(1), 1296.
- Suresh, K., Smith, H. V., Tan, T. C. (2005). Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5619–5620.
- Taamasri, P., Mungthin, M., Rangsin, R., Tongupprakarn, B., Areekul, W., Leelayoova, S. (2000). Transmission of intestinal blastocystosis related to the quality of drinking water. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 31(1), 112–117.
- Tall, A., Teillon, A., Delesmont, R., Bodilis, J. (2013). Diversity of *Blastocystis* Subtypes in Humans. *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology*,

36(2), 88–97.

- Tan, T. C., Suresh, K. G., Thong, K. L., Smith, H. V. (2006). PCR fingerprinting of *Blastocystis* isolated from symptomatic and asymptomatic human hosts. *Parasitology Research*, 99(4), 459-465.
- Tan, K. S. W. (2004). *Blastocystis* in humans and animals: New insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitology*, 126, 121–144.
- Tan, K. S. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 639-665.
- Tan, K. S. W., Singh, M., Yap, E. H. (2002). Recent advances in *Blastocystis hominis* research: Hot spots in terra incognita. *International Journal for Parasitology*, 32(7), 789–804.
- Tan, K. S., Mirza, H., Teo, J. D., Wu, B., Macary, P. A. (2010). Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Current Infectious Disease Reports*, 12(1), 28–35.
- Tan, T. C., Ong, S. C., Suresh, K. G. (2009). Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitology Research*, 105(5), 1283-1286.
- Tanyüksel, M., Kuru Ö. (2009). Klinik Mikrobiyoloji Cilt 2. Başustaoğlu, A. C. (Ed.). *İntestinal ve Ürogenital Yerleşimli Amipler, Kamçılılar ve Silyalılar* (s. 2092–2112). Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti.
- Tanyüksel, M., Yazar S. (2010). Tıbbi Mikrobiyoloji. Başustaoğlu, A. C. (Ed.) *İntestinal ve Ürogenital Protozoonlar* (s. 821–834). Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti.
- Thacker, C., Phillips, C., Syndercombe-Court, D. (1999). Use of FTA cards in small volume PCR reactions. *Program in Forensic Genet*, 8, 473–475.
- Thathaisong, U., Siripattanapipong, S., Mungthin, M., Pipatsatitpong, D., Tan-

- Ariya, P., Naaglor, T., ve diğ erleri. (2013). Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the home for girls, Bangkok, Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(2), 352–358.
- Türk, S., Doğ ruman-Al, F., Kuş timur, S. (2012). *Blastocystis* Türlerinin Tanısında Yeni Bir Yaklaş ım : Direk Floresan Antikor Yöntemi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18, 171–174.
- Üstün, Ş ., Turgay, N. (2006). *Blastocystis hominis* ve Bağı rsak Hastalıkları. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30(1), 73–77.
- Wang, K. X., Li, C. P., Wang, J., Cui, Y. B. (2002). Epidemiological survey of *Blastocystis hominis* in Huainan City, Anhui Province, China. *World Journal of Gastroenterology*, 8(5), 928–932.
- Yaicharoen, R., Sripochang, S., Sermsart, B., Pidetcha, P. (2005). Prevalance of *Blastocystis hominis* Infection In Asymptomatic Individuals from Bangkok , Thailand, 36(0), 17–20.
- Zeyrek, F. Y., Erdoğan, D. D. (2011). ELISA. Korkmaz M., Ok, Ü. Z. (Ed.), *Parazitolojide Laboratuvar* (s. 219–234). İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneğ i.
- Zhang, X., Qiao, J., Wu, X., Da, R., Zhao, L., Wei, Z. (2012). In vitro culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(1), 23-28.
- Zierdt, C. H. (1991). *Blastocystis hominis*-Past and Future. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 61–79.