

## ***Blastocystis*'in moleküler epidemiyolojisi**

### ***Molecular epidemiology of Blastocystis***

**Fadime Eroğlu**

#### **ÖZET**

*Blastocystis* patojenitesi ve sınıflandırması moleküler genetik çalışmalarla yeni aydınlatılmış ve son zamanlarda birçok araştırmacının ilgi odağında bulunan bir parazittir. *Blastocystis*'in genotiplendirilmesinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), PCR-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizimi, rastgele arttırılmış polimorfik DNA, real-time polimeraz zincir reaksiyonu ve DNA dizi analizi gibi çeşitli moleküler yöntemler kullanılabilir. *Blastocystis* parazitleri ishal, karın ağrısı, şişkinlik, gaz, huzursuzluk, anoreksi, kramp, kusma, dehidratasyon, uykusuzluk, bulantı, iştahsızlık, kilo kaybı, yorgunluk, kaşıntı gibi semptomlara neden olduğu gibi asemptomatik olgularda da görülmektedir. Bu derlemede, *Blastocystis* alt tipleri ve patojenitesi arasındaki ilişkiyi özetlemek amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Blastocystis*, alt tip, patojenite

#### **ABSTRACT**

*Blastocystis* pathogenicity and classification was newly illuminated with molecular genetic studies and recently the parasite was found in the focus of many researchers. Several molecular methods such as; polymerase chain reaction (PCR), PCR-restriction fragment length polymorphism, random amplified polymorphic DNA, real-time polymerase chain reaction and DNA sequencing analyses can be used in genotyping of *Blastocystis*. *Blastocystis* parasites may cause diarrhea, abdominal pain, bloating, gas, irritability, anorexia, cramps, vomiting, dehydration, insomnia, nausea, loss of appetite, weight loss, fatigue symptoms and also could be asymptomatic cases. In this review, it was aimed to summarize the associations between *Blastocystis* subtypes and pathogenicity.

**Key words:** *Blastocystis*, subtype, pathogenicity

#### **GİRİŞ**

Bağırsak parazitleri toplumun sosyo-ekonomik düzeyine, temizlik, iklim koşullarına, eğitim ve çevre koşullarına bağlı olarak dünyada halen milyonlarca kişiyi etkilemektedir [1]. *Blastocystis* diğer bağırsak parazitlerinin aksine sosyo-ekonomik düzeyi yüksek toplumlarda da en sık rastlanan protozoon olarak bildirilmekte ve kozmopolit bir dağılım göstermektedir [2,3]. *Blastocystis* türlerinin gelişmiş ülkelerdeki prevalansı %1,5-10 oranında saptanırken, gelişmekte olan ülkelerde %30-50 oranındadır [4]. *Blastocystis* yaygınlığını etkileyen faktörler; hayvanlarla yakın temas, yetersiz sağlık koşulları, kontamine yiyecek ve su kaynakları olarak rapor edilmektedir [5,6].

Parazitin neden olduğu hastalık *Blastocystosis* olarak adlandırılmış ve *Blastocystis* saptanan olguların semptomları değerlendirildiğinde, olgularda en sık karın ağrısı (%39,3) şikayetinin görüldüğü, bunu kaşıntı (%36,1) ve ishalin (%3,3) izlediği belirlenmiştir [5,7]. *Blastocystis* sağlıklı bireylerde, gastrointestinal semptomlu hastalarda, irritable bağırsak sendromlu hastalarda, ülseratif kolitli hastalarda, çölyak hastalarında ve crohn hastalarında görülmektedir [8].

*Blastocystis* tanısında rutin laboratuvarlarda nativ-lugol ve trikrom boyama gibi mikroskopik yöntemler yaygın olarak kullanılır ancak bu yöntemlerin duyarlılığının düşük (%48) olduğu belirtilmektedir [9]. Bundan dolayı da *Blastocystis*'in ta-

nısında ve genotiplendirilmesinde çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaya başlanılmıştır. Moleküler yöntemlerin kullanılması ile *Blastocystis*'in coğrafik dağılımı, patojenitesi ve bulaş yolları ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Bu derlemede, günümüze kadar yapılan *Blastocystis* genotiplendirme çalışmaları ve *Blastocystis*'in genotiplendirilmesi ile patojenitesi arasındaki ilişki değerlendirildi.

## TARİHÇE VE TAKSONOMİ

Önceleri *Blastocystis*, yalancı ayaklarının olmaması ve hareketsiz olmasının yanı sıra direkt mikroskopide mantar gibi parlak görünümü ve şekli nedeniyle mantar olarak kabul edilmekteydi [7]. Alexief Blastocystis'e 1911 yılında *Blastocystis enterocola* adını, Brumpt ise 1912 yılında *Blastocystis hominis* (*B. hominis*) adını önerdi [10]. Zierdt'in 1970-1980 yılları arasında yaptığı çalışmalar sonucunda *Blastocystis* hücrelerinde çekirdek, düz ve kaba endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, mitokondri benzeri organellerin bulunmasına dayanarak etkeni sporozoa alt filumuna yerleştirildi. Sonrasında, Silberman ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptıkları gen sekanslarının analizi sonucu Stramenopiles grubuna dahil edildi [11].

Uzun yıllar insanlardan izole edilen *Blastocystis* türlerine *B. hominis*, hayvanlardan izole edilen türlere *B. ratti* gibi farklı isimler verildi [7]. Ancak yakın zamanda yapılan genetik çalışmalar insanları ve hayvanları enfekte eden tek bir *Blastocystis* türü olduğunu göstermiştir [7]. Bu yüzden, araştırmacılar 2007 yılında *B. hominis* teriminin kullanılmamasını, onun yerine insanlardan ve hayvanlardan izole edilen türler için "*Blastocystis* sp. subtype nn" isminin kullanılmasına karar vermişlerdir [7]. Bu tanımlamada "nn" genetik olarak tanımlanmış farklı türlere ait numarayı bildirmektedir [7].

## GENOTİPLENDİRME

Biyokimyasal analizler, *Blastocystis*'in fosfolipidler, nötral lipidler ve polar lipidlerle hayvan hücrelerine benzer bir lipid profili olduğunu ortaya koymuştur [12]. *Blastocystis* yapısında glukoz fosfat izomeraz, fosfoglukomutaz, malik enzim, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, sitokrom oksidaz ve hekzokinaz enzimleri taşımaktadır [10]. İzoenzim elektroforezi glukoz fosfat izomeraz, fosfoglukomutaz

ve L-malate izoenzimleri belirlemeye yarayan bir yöntemdir [10]. Bu yöntem ile NADP+ oksidoreduktaz *Blastocystis* parazitinde bulunduğu rapor edilmesine rağmen, diğer bağırsak parazitlerinde bulunmadığı rapor edilmiştir [10]. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), yüklü moleküllerin bir elektriksel alandaki hareketlerinin izlendiği tekniktir. Western blot ise dokudaki spesifik bir proteini analiz etmeyi sağlayan moleküller bir yöntemdir [13]. SDS-PAGE ve Western blot analizleri ile *Blastocystis*'de 12kDa, 29kDa, 50kDa ve 118kDa moleküler ağırlığında *Blastocystis*'e özel proteinler bulunduğu tespit edilmiştir [13].

*Blastocystis* polimorfik ve haploid bir genom sahiptir [14]. Günümüze kadar, *Blastocystis* türlerinin belirlenmesi için polimeraz zincirleme tepkimesi (PCR) temelli tanı testleri kullanılmıştır. PCR yöntemi, DNA içerisinde yer alan dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan bir yöntemdir [15].

*Blastocystis*'in PCR ile genotiplendirme çalışmalarında çoğunlukla small subunit ribosomal DNA (SSU-rDNA) gen bölgeleri hedef alınmış ve sequence tagged site (STS) primeleri kullanılmıştır [16]. Bu primer ile *Blastocystis* alt tipleri birden dokuza kadar adlandırılmış ve bu ifade uzun yıllar *Blastocystis* genotiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılmıştır. *Blastocystis* genotiplendirme çalışmalarında *Blastocystis* türlerine özgü tanınal primerler ile polimorfik DNA'sından randomize amplifikasyonu da yapılmıştır [16]. Rastgele artırılmış polimorfik DNA (RAPD) genetik polimorfizmi belirleyen PCR temelli bir tekniktir [17]. RAPD yönteminin temel prensibi, ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin türe özgün gen bölgelerine rastgele bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır [17]. Yoshikawa ve arkadaşları çeşitli kısa nükleotid uzunluğunda primerler kullanarak *Blastocystis* genotiplendirme çalışmaları yapmışlardır [18]. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analizi restriksiyon endonükleazların çift iplikli DNA'yı özel tanıma bölgelerinden kesmesi esasına dayanmaktadır [19]. PCR ile çoğaltılan DNA bölgesi restriksiyon enziminin kesimine tabi tutulur [20]. *Blastocystis*'in SSU rDNA gen bölgesi hedef alınarak PCR ve PCR-RFLP yöntemleri kullanılmıştır [21]. Birçok araştırmacı SSU rDNA gen bölgesini hedef alarak PCR-RFLP yön-

temi ile *Blastocystis*'in alt tiplerin tanımlanabileceğini rapor etmişlerdir [22]. Hoevers ve arkadaşları *Blastocystis*'in RFLP yöntemiyle 12 genotipinin belirlediklerini rapor etmişlerdir [20]. *Blastocystis*'in PCR-RFLP ile genotiplendirme yöntemlerinde RD5/RD3 primerleri ve HaeIII, HhaI, HinfI, RsaI, MspI, AluI, TaqI, DdeI, Sau3AI, Sa96I, BstUI gibi restriksiyon enzimleri kullanılmıştır [21]. Clark ve arkadaşları *Blastocystis* ribodeme 1 -7 olmak üzere, *Blastocystis*'i 7 alt tipe ayırmışlardır [22]. *Blastocystis* genotiplendirilmesinde real-time PCR yöntemi de kullanılmaktadır. Bu yöntem ile parazit genomunda 100-200 bp arasında bir bölge kullanılarak *Blastocystis*'in alt tipleri tanımlanabilmektedir [23,24]. DNA dizi analizleri ya da sekanslama DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid diziliminin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir [25]. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır [25]. Bazı araştırmacılar *Blastocystis*'in SSU rDNA gen bölgesini bir kısmını hedef alarak farklı primer dizilimleri ile 310 bp uzunluğunda ve 600 bp uzunluğunda PCR ürünlerinin dizi analizini yapmışlardır [26,27]. Noel ve arkadaşları SSU rDNA gen bölgesinin tamamının dizi analizini yaparak bu gen bölgesinin *Blastocystis* genotiplendirilmesi için uygun olduğunu bildirmişlerdir [28]. Stensvold ve arkadaşları *Blastocystis*'in SSU rDNA gen bölgesini hedef alıp, RD5 ve BhrDr pri-

melerini kullanarak *Blastocystis*'in genotiplendirme çalışmaları yapmışlardır [27]. DNA dizi analizleri sonucunda *Blastocystis*'in 17 farklı alt tipi olduğu ve bu alt tiplerin 1-17 alt tip olarak adlandırılması gerektiği bildirilmiştir [29-31]. Günümüze kadar *Blastocystis* genotiplendirilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar tablo 1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** *Blastocystis* genotiplendirilmesinde kullanılan yöntemler ve genotiplendirme sonuçları

Yöntem	Gen Bölgesi	Genotiplendirme
PCR	SSU-rDNA	1-9 alt tip
RAPD	SSU-rDNA	1-9 alt tip
PCR-RFLP	SSU-rDNA	1-12 alt tip
Real-time PCR	SSU-rDNA	1-10 alt tip
DNA Dizi Analizi	SSU-rDNA	1-17 alt tip

## EPİDEMİYOLOJİ VE GENOTİP ARASINDAKİ İLİŞKİ

Moleküler yöntemler ile yapılan çalışmaların sonuçlarına göre *Blastocystis*'in genetik çeşitliliği kanıtlanmıştır. *Blastocystis*'deki genetik çeşitlilik coğrafik özelliklere, izole edilen canlılara ve neden oldukları hastalıklara göre değişiklik göstermektedir.

**Tablo 2.** İnsanlardan izole edilen alt tip 1-9'un dünya genelinde ve hastalık çeşitlerine göre dağılımı (GS: Gastrointestinal semptom, IBD: inflamatuvar bağırsak hastalığı, IBS: irritabl bağırsak sendromu, Ü: ürtiker)

Alt tipler	Kaynak	Ülkeler	Hastalıklar
Alt tip 1	İnsan ve diğer memeliler	Brezilya, İran, İtalya, Katar, Kolombiya, Meksika, Tayland, Türkiye	IBD, IBS
Alt tip 2	Domuz	Brezilya, İran, İtalya, Katar, Kolombiya, Meksika, Tayland, Türkiye	GS, IBD, IBS, Ü
Alt tip 3	Sığır ve domuz	Brezilya, İran, İtalya, Katar, Kolombiya, Meksika, Tayland, Türkiye	IBD, IBS, Ü
Alt tip 4	Kemiriciler	Kolombiya, İtalya, Tayland, Türkiye	GS, IBD, IBS
Alt tip 5	Sığır ve domuz	İran, İtalya, Türkiye	IBD, IBS
Alt tip 6	Kuşlar	Kolombiya, İran, İtalya, Türkiye	IBS
Alt tip 7	Kuşlar	İtalya, Meksika	IBS
Alt tip 8	Maymun	İtalya	IBS
Alt tip 9	İnsan ve diğer memeliler	İtalya	IBS

Epidemiyolojik çalışmalarda *Blastocystis*'in 1-9 alt tiplerinin insanlardan izole edildiği, diğer alt tiplerin ise hayvanlardan izole edildiği rapor edilmektedir. Çalışmalarda en sık izole edilen alt tip 3'dür ve insan kaynaklı tek alt tip olarak bildiril-

mektedir [4]. İnsanlardaki *Blastocystis* görülme sıklığına bakıldığında alt tip 3'ü alt tip 1, alt tip 2 ve alt tip 4 takip etmektedir. *Blastocystis* alt tip 1, insan ve diğer memelilerden, alt tip 2 domuzlardan, alt tip 4 kemiricilerden, alt tip 5 sığır ve domuzlardan, alt tip

6 ve alt tip 7 kuşlardan, alt tip 8 ise maymunlardan izole edilmiştir [4] (Tablo 2). Farklı coğrafik bölgelerden ve farklı konaklardan *Blastocystis* izole edilmiş ve *Blastocystis* genotiplendirme çalışmaları yapılmıştır. İtalya'da *Blastocystis*'in 1'den 9'a kadar bütün alt tipleri rapor edilirken, Kolombiya'da alt tip 1, 2, 3, 4, 6, 8 alt tipleri rapor edilmiştir [31,32]. Brezilya'da alt tip 1, 2, 3 ve Meksika'da alt tip 1, 2, 3, ve 7 tespit edilmiştir [33,34]. Katar'da alt tip 1, 2, 3; Tayland'da alt tip 1, 2, 3, 4 ve İran'da alt tip 3, 5, 6 saptanmıştır [35-37] Türkiye'de alt tip 1-6 insan ve hayvanlardan tespit edilmiş, diğer alt tipler ülke genelinde rapor edilmemiştir [38] (Tablo 2). Dünyada *Blastocystis* genetik çeşitliğini anlamak için daha geniş bölgelerde daha fazla genotiplendirme çalışmaları yapılmalıdır.

## PATOJENİTE VE GENOTİP ARASINDAKİ İLİŞKİ

*Blastocystis*'in gerçek bir patojen mi, yoksa koşullara bağlı olarak patojen olma ihtimali taşıyan bir kommensal mi olduğu bilinmemektedir [12]. Bu nedenle birçok araştırmacı günümüzde hala parazitin patojenitesi ile ilgili araştırma yapmaktadır. Taşova ve arkadaşları, immün yetmezliği olmayan, ishalleri kontrol grubuyla karşılaştırmalı çalışmalarında, hematolojik malignite nedeniyle kemoterapi alan nötropenik ishalleri hastalarda *Blastocystis* insidansında anlamlı artış olduğunu bildirmiştir [39].

*Blastocystis* ile enfekte olan her hastada farklı klinik tablo görülmektedir. Diğer bağırsak parazitlerinde olduğu gibi *Blastocystis*'in alt tiplerinde büyük çaplı bir genetik çeşitlilik bulunduğunu, bazı alt tiplerin patojen bazı alt tiplerin ise non-patojen olabileceği düşünülmektedir [2]. *Blastocystis* alt tiplerinin semptomatoloji ve patojenitelerinin farklılık gösterdiği çeşitli çalışmalarda vurgulanmaktadır [4]. Yan ve arkadaşları alt tip 1'in semptomatik hastalarda alt tip 3'den fazla olduğunu rapor etmişlerdir [40]. Dominguez-Marquez ve arkadaşları akut ishalleri olgularda alt tip 4'ün en sık rastlanılan alt tip olduğunu bildirirken, Doğruman Al ve arkadaşları alt tip 1'in semptomatik, alt tip 2'nin ise asemptomatik enfeksiyonla ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir [41,42]. İnsanlardan izole edilen *Blastocystis* alt tipleri (alt tip 1-9) ile etken oldukları düşünülen hastalık gruplarında çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *Blastocystis*'in alt tiplerinin tespit edildiği klinik

hastalardaki dağılımı tablo 2'de görülmektedir. Gastrointestinal semptomlu, irritable bağırsak sendromlu, inflamatuvar bağırsak hastaları ve ürtikerli hastalarda yapılan çalışmalarda hastalık ile *Blastocystis* görülme sıklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş, ancak genotip ile ilişkisi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [43,44]. Bu durum, *Blastocystis* tespit edilen farklı hasta grupları ile daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiğini ortaya çıkartmıştır.

## SONUÇ

Gelecekte *Blastocystis* genotipleri ve patojenitesi arasındaki ilişki ile ilgili farklı çalışmalar yapılmalıdır. Parazit ile ilişkili hastalıklar konusunda yapılacak geniş çaplı prospektif vaka-kontrol çalışmalar parazitin patojenitesi ile ilgili daha somut veriler ortaya koymasından büyük önem taşımaktadır.

*Blastocystis* 20. yüzyılın başlarında bağırsaklarda yaşayan zararsız bir maya olarak tanımlanmakta ve uzun yıllar herhangi patolojiye yol açmadığı düşünülmekteydi. Günümüzde ise moleküler yöntemlerin gelişmesine bağlı olarak insanlarda en sık rastlanan ve çeşitli hastalıklara neden olabilen bağırsak paraziti olarak kabul edilmektedir. *Blastocystis* kozmopolit yayılım göstermesi ve dünyadaki en yaygın enfeksiyonlardan biri olması nedeniyle toplum sağlığı açısından çok önemli bir sorundur. Bu yüzden, *Blastocystis*'in patojenitesi ve tedavi edilmesi ile ilgili yeni bilimsel araştırmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Yapıcı F, Sönmez Tamer G, Arısoy ES. Çocuklarda bağırsak parazitlerinin dağılımı ve bununla ilişkili etmenler. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2008;32:346-350.
2. Kurt Ö. Blastocystis: Dünya'daki son çalışmalar üzerinden geleceğe bakış. 18.Ulusal Parazitoloji Kongresi; 29 Eylül-5 Ekim; Denizli-Türkiye 2013;31.
3. Pektaş B, Gökmen AA, İnci A, et al. Bir eğitim araştırma hastanesinde üç yıllık bağırsak parazitlerinin dağılımı: retrospektif bir çalışma. *J Clin Exp Invest* 2015;6:269-273.
4. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, et al. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop* 2013;126:11-18.
5. Ertuğ S, Malatyalı E, Ertabaklar H, et al. Aydın ilinde elde edilen *Blastocystis* izolatlarının alt tip dağılımı ve klinik semptomların değerlendirilmesi. *Microbiyol Bul* 2015;49:98-104.

6. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:639-665.
7. Malatyalı E, Özçelik S. *Blastocystis* spp.'nin insandan izolasyonu ve besiyerinde farklı evrim şekillerinin izlenmesi. *Türkiye Parazit Derg* 2011;35:19-22.
8. Doğruman Al F. Blastosistis enfeksiyonlarının günümüzde ilişkilendirildiği klinik tablolar, bağırsak mikrobiyon projesinin getirdikleri 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi Denizli-Türkiye 2013;32.
9. Adıyaman Korkmaz G, Doğruman Al F, et al. Dışkı örneklerinde *Blastocystis* spp. varlığının mikroskopik, kültür ve moleküler yöntemlerle araştırılması. *Microbiyol Bul* 2015;49:85-97.
10. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiol Rev* 1996;9:563-584.
11. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, et al. Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 1996;4:380(6573):398.
12. İnceboz T, Usluca S. *Blastocystis hominis* bağırsak hastalığı için potansiyel bir tehlike olabilir mi? *DEÜ Tıp Fak Derg* 2009;23:37-45.
13. Nagel R, Traub RJ, Kwan M, et al. *Blastocystis* specific serum immunoglobulin in patients with irritable bowel syndrome (IBS) versus healthy controls. *Parasit Vectors* 2015;15:8:453.
14. Stensvold CR. *Blastocystis*: genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Trop Parasitol* 2013;3:26-34.
15. [https://tr.wikipedia.org/wiki/polimeraz\\_zincir\\_tepkimesi](https://tr.wikipedia.org/wiki/polimeraz_zincir_tepkimesi)
16. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol Res* 2004;92:22-29.
17. Öz Aydın S. RAPD (Rastgele arttırılmış polimorfik DNA belirleyicileri ve bitki sistematigi) Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2004:113-130.
18. Yoshikawa H, Nagano I, Wu Z, et al. Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Mol Cell Probes* 1998;15:153-159.
19. [www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrfp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrfp)
20. Hoeyers J, Holman P, Logan K, et al. Restriction fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis hominis* isolates from geographically diverse human hosts. *Parasitol Res* 2000;86:57-61.
21. Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. Zoonotic genotypes of *Blastocystis hominis* detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphisms analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitol Res* 2003;90:124-128.
22. Clark CG. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;87:79-83.
23. Jones MS2nd, Ganac RD, Hiser G, et al. Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitol Res* 2008;103:551-557.
24. Stensvold CR, Ahmed UN, Andersen L, et al. Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *J Clin Microbiol* 2012;50:1847-1851.
25. [www.deu.edu.tr/uploadedFiles/Birimler/16928/dna\\_dizi\\_analizi.pdf](http://www.deu.edu.tr/uploadedFiles/Birimler/16928/dna_dizi_analizi.pdf)
26. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 2006;157:77-85.
27. Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, et al. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol* 2006;92:1081-1087.
28. Noel C, Peyronnet C, Gerbod D, et al. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. *Mol Biochem Parasitol* 2003;126:119-123.
29. Casero RD, Mongi F, Sanchez A, et al. *Blastocystis* and urticaria: examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. *Acta Trop* 2015;148:156-161.
30. Wawrzniak I, Courtine D, Osman M, et al. Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate W11. *Genomic Data* 2015;4:22-23.
31. Mattiucci S, Crisafi B, Gabrielli S, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiol Infect* 2015;21:1-2.
32. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, et al. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol* 2014;22:223-228.
33. Malheiros A, Stensvold C, Clark CG, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirape ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2011;85:1050-1053.
34. Villalobos G, Orozco-Mosqueda G, Lopez-Perez M, et al. Suitability of internal transcribed spacers (ITS) as markers for the population genetic structure of *Blastocystis* spp. *Parasit Vectors* 2014;7:461.
35. Badparva E, Sadraee J, Kheirandish F. Genetic diversity of *Blastocystis* isolated from cattle in Khorramabad, Iran. *Indishapur J Microbiol* 2015;8:e14810.
36. Popruk S, Udonsom R, Koompaong K. Subtype distribution of *Blastocystis* in Thai-Myanmar Border, Thailand. *Korean J Parasitol* 2015;53:13-19.
37. Abu-Madi M, Aly M, Behnke JM, et al. The distribution of *Blastocystis* subtypes in isolates from Qatar. *Parasit Vectors* 2015;8:405.
38. Dacı H, Kurt Ö, Demirel M, et al. Epidemiological and diagnostic features of *blastocystis* infection in symptomatic patients in İzmir province, Turkey. *Iran J Parasitol* 2014;9:519-529.
39. Tasova Y, Sahin B, Koltas S, et al. Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. *Acta Med Okayama* 2000;54:133-136.
40. Yan Y, Su S, Lai R, et al. Genetic variability of *Blastocystis hominis* soales in China. *Parasitol Res* 2006;99:597-601.
41. Dominguez-Marquez MV, Guna R, Munoz C, et al. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain) *Parasitol Res* 2009;105:949-955.
42. Doğruman Al F, Dacı H, Yoshikawa H, et al. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2008;103:685-689.
43. Pektaş B, Yıldırım A, Gökmen AA, et al. İrritabl barsak sendromlu hastalarda *blastocystis hominis* sıklığının araştırılması. *J Clin Exp Invest* 2014;5:242-245.
44. Casero RD, Mongi F, Sanchez A, et al. *Blastocystis* and urticaria: examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. *Acta Trop* 2015;148:156-161.

