

Aydın İlinde Elde Edilen *Blastocystis* İzolatlarının Alt Tip Dağılımı ve Klinik Semptomların Değerlendirilmesi

Subtype Distribution of *Blastocystis* Isolates and Evaluation of Clinical Symptoms Detected in Aydın Province, Turkey

Sema ERTUĞ¹, Erdoğan MALATYALI¹, Hatice ERTABAKLAR¹, Serçin ÖZLEM ÇALIŞKAN², Bülent BOZDOĞAN³

¹ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

¹ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Aydın, Turkey.

² Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Aydın.

² Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Aydın, Turkey.

³ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

³ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 09.09.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 05.11.2014

ÖZ

Blastocystis, dünyada ve ülkemizde rutin dışkı incelemelerinde en sık rastlanılan parazitlerden biri olup, genetik çeşitliliği ve patojenitesiyle ilgili oldukça tartışmalı bir konumdadır. İnsan ve hayvanları enfekte eden *Blastocystis*'in günümüzde çok sayıda alt tipi (Subtype; ST) tanımlanmış, bunlardan dokuzu insanlardan izole edilmiştir. Kolon yerleşimli anaerobik bir parazit olan *Blastocystis* uzun yıllar flora üyesi olarak kabul edilmiş ve enfeksiyonun genelde asemptomatik seyrettiği bildirilmiştir. Buna karşın son yıllarda, parazitin genotipleri ile patojenitesi ve klinik semptomlar arasında ilişki olduğunu gösteren bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Parazitoloji Laboratuvarına gönderilen dışkı örneklerinde saptanan *Blastocystis* izolatlarının alt tiplerinin belirlenmesi ve parazit ile ilişkili klinik semptomların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, *Blastocystis* ile enfekte 61 olgu (40 erkek, 21 kadın; yaş aralığı: 5-69 yıl, yaş ortalaması: 35 ± 19.1 yıl) dahil edilmiştir. Direkt mikroskopik incelemede *Blastocystis* kistleri görülen dışkı örnekleri Jones besiyerine ekilmiş ve 37°C'de 72 saatlik inkübasyon ile parazit çoğaltılmıştır. Genomik DNA izolasyonu, ticari bir kit ile (DNAzol, Invitrogen, ABD) besiyerlerinden direkt olarak veya saklanan pelletlerden yapılmıştır. *Blastocystis* genotipleri alt tipe özgül primerlerin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmış ve olgularda görülen semptomlar retrospektif olarak değerlendirilmiştir. PCR ile 61 *Blastocystis* izolatının 44 (%72.1)'ünde alt tip tayini yapılabilmiş, 17 (%27.9) izolat ise tiplendirilememiştir. Örneklerin 17 (%38.6)'si ST3, 13 (%29.5)'ü ST2 ve 9 (%20.5)'u ST1 olarak saptan-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Sema Ertuğ, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, 09010 Aydın, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 256 212 1850, **E-posta (E-mail):** sertug@adu.edu.tr

miş; 4 (%9.1) örnekte ST1 ve ST3, 1 (%2.3) örnekte ise ST1 ve ST2 birlikte tespit edilmiştir. *Blastocystis* pozitif olgularda saptanan şikayetler sırasıyla; karın ağrısı (n= 24, %39.4), kaşıntı (n= 22, %36.1), ishal (n= 4, %6.6) ve kabızlık (n= 2, %3.3) olarak izlenmiştir. Bu çalışma ile Aydın ilinde *Blastocystis* genetik çeşitliliği ilk kez araştırılmış olup, bulgular diğer bölgelerden bildirilenlerle örtüşmektedir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi baskın alt tipin ST3 olduğu saptanmış ve bu veri ST3'ün insan kaynaklı izolat olduğu fikrini desteklemiştir. Ayrıca, *Blastocystis* saptanan olgularda kaşıntı şikayetinin diğer çalışmalara göre daha yüksek oranda görülmesi dikkat çekici bulunmuştur. Sonuç olarak, parazitin patojenitesi ve ülkemizde *Blastocystis* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin aydınlatılmasında, çok merkezli ve geniş kapsamlı moleküler ve klinik çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Blastocystis*; alt tip; enfeksiyon; Aydın.

ABSTRACT

The pathogenic potential and genetic diversity of *Blastocystis* are poorly understood despite being one of the most frequent intestinal parasites in routine fecal examination all around the world as well as Turkey. There are numerous defined subtypes (ST) of *Blastocystis* which infect animals and nine of them were isolated from human fecal samples. *Blastocystis* is an anaerobic parasite and generally recognized as nonpathogenic microorganism that colonizes the colon. However recent studies have indicated that the genotypes may be related with the pathogenicity and clinical symptoms of the infection. The aims of this study were to investigate the subtypes of *Blastocystis* isolates obtained from stool samples submitted to the parasitology laboratory of Adnan Menderes University, Faculty of Medicine, and to evaluate the clinical symptoms of infected cases. A total of 61 cases (40 male, 21 female; age range: 5-69 years, mean age: 35 ± 19.1 years) were included in the study. Stool samples that were positive for *Blastocystis* cysts in direct microscopic examination, were inoculated in Jones medium and incubated at 37°C for 72 hours for the growth of parasite. Genomic DNAs were isolated from Jones medium directly or frozen samples with a commercial kit (DNAzol, Invitrogen, USA). The subtypes of *Blastocystis* were detected by polymerase chain reaction (PCR) using ST-specific primers and the symptoms of patients were evaluated retrospectively. Forty-four (72.1%) out of 61 isolates were subtyped by PCR, while 17 (27.9%) could not be typed. The distribution of *Blastocystis* subtypes were found as follows; ST3 in 17 (38.6%), ST2 in 13 (29.5%), ST1 in 9 (20.5%), ST1 + ST3 in 4 (9.1%), and ST1 + ST2 in one (2.3%) of the samples. The most common symptoms among *Blastocystis* infected cases were abdominal pain (n= 24, 39.4%), pruritus (n= 22, 36.1%), diarrhea (n= 4, 6.6%) and constipation (n= 2, 3.3%), respectively. This is the first study investigating the genotypes of *Blastocystis* in Aydın province (located at Aegean region of Turkey), and the findings were consistent with those reported from other regions. The predominant subtype was found as ST3, like other studies in our country and this data supports that ST3 is a human originated genotype of *Blastocystis*. Additionally, the higher rate of pruritus detected among our patients infected with *Blastocystis* compared with the other studies was considered remarkable. In conclusion, multicenter and large-scaled molecular and clinical studies are needed to elucidate the pathogenicity and the epidemiology of *Blastocystis* infections.

Keywords: *Blastocystis*; subtype; infection; Turkey.

GİRİŞ

Blastocystis, insan ve hayvanlarda bulunabilen kolon yerleşimli anaerobik bir protozondur. Dışkı örneklerinde en sık rastlanan protozoon olarak bildirilen *Blastocystis*, kozmopolit bir dağılım göstermektedir¹. Tanıda kullanılan geleneksel parazitolojik incelemelerin yanı sıra son yıllarda moleküler yöntemlerin kullanılması, gelişmiş ülkelerde de

yaygınlığının tahmin edilenden yüksek olduğunu göstermektedir². *Blastocystis* yaygınlığını etkileyen faktörler; hayvanlarla yakın temas, yetersiz hijyen koşulları, kontamine yiyecek ve su kaynakları olarak bildirilmiştir^{3,4}.

Blastocystis'in patojenitesi parazitle ilgili tartışılan konuların başında gelmektedir. Parazitin hem semptomlu hem de semptomsuz gruplarda görülmesi ve bildirilen semptomların özgül olmaması, bunun temelini oluşturmaktadır². Oldukça polimorfik ve haploid bir genomu sahip olan *Blastocystis*'in, SSU rDNA analizleri sonucu alt tip (ST) olarak adlandırılan 17 farklı genotipi tanımlanmıştır⁵. İnsanlardan izole edilen dokuz alt tipi bulunmakta olup, bunlardan başta ST3 olmak üzere, ST1, ST2 ve ST4 insanlar arasında en yaygın bildirilen genotiplerdir⁶. Alt tipler ile konak özgüllüğü arasında ilişkiler kurulabilmiş ancak patojenite konusunda yapılan çok sayıda araştırmaya rağmen henüz benzer bir ilişkiden söz etmenin mümkün olmadığı bildirilmiştir⁷. *Blastocystis* patojenitesinin konağın yaşı, immünitesi, parazitin genotipi, virülansı ve zoonotik potansiyeli gibi birçok faktöre bağlı olduğu düşünülmektedir⁸.

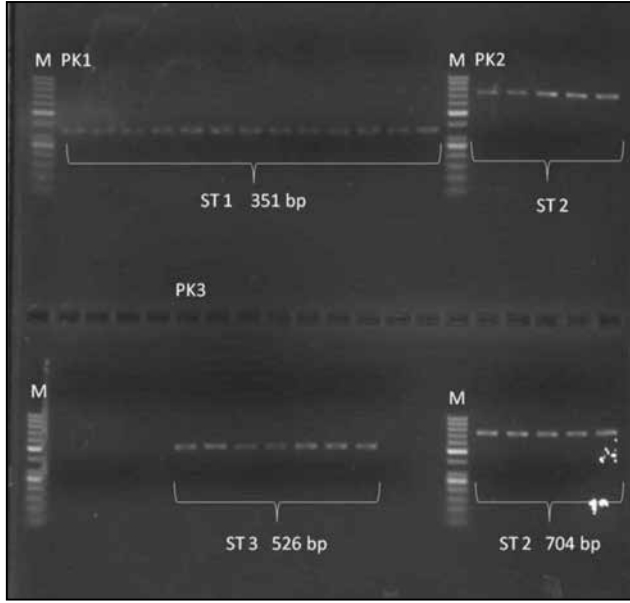
Türkiye'de yapılan çalışmalarda⁹⁻¹¹ *Blastocystis* prevalansı %1.4-%23.5 arasında değişen oranlarda verilmekte olup, Aydın'da bu oranlar %2.3-%15.5 olarak bildirilmiştir^{12,13}. Aydın ilinde bugüne kadar *Blastocystis* alt tipleri konusunda bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Laboratuvarında izole edilen *Blastocystis* suşlarının alt tiplerinin saptanması ve olgulardaki semptomların araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Adnan Menderes Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Parazitoloji Laboratuvarına değişik polikliniklerden rutin parazitolojik inceleme için gönderilen dışkı örneklerinden elde edilen 61 *Blastocystis* izolatı dahil edildi. Hastalara ait bilgiler hastane bilgi sisteminden retrospektif olarak tarandı, demografik ve klinik özellikleri kaydedildi.

Direkt mikroskopik incelemede *Blastocystis* saptanan dışkı örneklerinden yaklaşık 50 mg alınarak aynı gün 3 ml Jones besiyerine ekildi ve besiyerleri 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi¹⁴. Besiyeri hazırlanırken kaynaktaki¹⁵ bildirilenden farklı olarak at serumu yerine fetal dana serumu kullanıldı. *Blastocystis* görülen kültürler 3-4. gün 12.000 x g'de bir dakika santrifüj edildi ve pelletler DNA izolasyonunda kullanıldı.

Saklanan ve/veya taze pelletlerden DNA izolasyonu, DNAzol kiti (Invitrogen Life Technologies, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. *Blastocystis* alt tiplerinin belirlenmesinde Yoshikawa ve arkadaşları¹⁶ tarafından yedi farklı alt tip için (ST1-7) özgül olarak tasarlanan primerler kullanılarak PCR uygulandı. PCR karışımı; 2 µl kalıp DNA, 0.4 pmol her bir primer, 0.3 U Taq DNA polimeraz, 0.2 mM her bir dNTP, 3 µl 10x Taq polimeraz tamponu (NH₄)₂SO₄ şeklinde hazırlandı (Fermentas, ABD) ve distile su ile 30 µl'ye tamamlandı. Amplifikasyon ısı döngü cihazında; 94°C'de 3 dk ön denatürasyon sonrası, 30 döngü (94°C'de 30 sn, 59°C'de 30 sn ve 72°C'de 60 sn) ve 72°C'de 5 dk son uzama olarak gerçekleştirildi. 10 µl PCR ürünü %1 agaroz jelde tris borik asit-EDTA tamponunda yürütüldükten sonra agaroz jel görüntüleme sistemi (Infinity, Vilber Lourmat, Fransa) ile görüntülendi (Resim 1).



Resim 1. Bazı örneklerle ait agaroz jel görüntüsü [M: Moleküler belirteç (50 bç, Fermentas); PK: Pozitif kontrol, ST: Alt tip].

BULGULAR

Çalışmaya alınan 61 dışkı örneğinin 40'ı erkek, 21'i kadın olguya ait olup, olguların yaş ortalaması 35 ± 19.1 (yaş aralığı: 5-69) yıldır (Tablo I). Örneklerin besiyerinde kültürü sonucu çoğaltılan 61 izolatın 44 (%72.1)'ünde alt tipe özgül primerlerle amplifikasyon gözlenmiştir (Resim 1). En sık saptanan alt tip ST3 (n= 21, %47.7) olmuş, bunu ST2 (n= 14, %31.8) ve ST1 (n= 14, %31.8) izlemiştir. *Blastocystis* saptanan olguların demografik ve klinik özellikleri ile alt tiplerin dağılımı Tablo I'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Blastocystis insanlar arasında yaygın görülen bir parazit olmasına karşın, patojenik rolü ve genetik çeşitliliği konusunda halen yeterli bilgi bulunmamaktadır⁸. Laboratuvarımıza gönderilen dışkı örneklerinin direkt mikroskopik incelemesinde saptanan ve kültürde üretilen *Blastocystis* alt tiplerinin araştırıldığı bu çalışmada, izolatların %47.7'sinin ST3 olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde dünya genelinde ve ülkemizde yapılan çalışmaların çoğunda en yaygın saptanan alt tipin ST3 olduğu bildirilmiştir^{5,17-20}. Abdulsalam ve arkadaşları²¹ ST1'in kadınlarda anlamlı bir şekilde daha sık olduğunu bildirmiş ve ST3'ü diyare ile ilişkilendirmiştir. Doğruman ve arkadaşları²² ise, irritabl bağırsak sendromlu (IBS) ve kronik ishalli hastalarda ST3'den sonra en sık ST2 ve ST1'e rastladıklarını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar bir başka çalışmada, ST2'nin asemptomatik enfeksiyon ile ilişkili *Blastocystis* alt tipi olduğunu öne sürmüşlerdir²³. Yine Doğruman ve arkadaşları, ST3'ün hem semptomatik hem de asemptomatik grupta en sık rastlanan alt tip olduğu

Tablo 1. *Blastocystis* Saptanan Olguların Demografik Özellikleri, Semptomları ve Alt Tiplerin Dağılımı

	ST3	ST2	ST1	ST1 + 3	ST1 + 2	NT	Toplam
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Cinsiyet							
Erkek	12 (30)	8 (20)	5 (12.5)	2 (5)	-	13 (32.5)	40 (100)
Kadın	5 (23.8)	5 (23.8)	4 (19)	2 (9.5)	1 (4.7)	4 (19)	21 (100)
Yaş grubu (yıl)							
1-24	4 (17.4)	4 (17.4)	5 (21.7)	1 (4.3)	1 (4.3)	8 (34.7)	23 (100)
25-49	7 (33.3)	7 (33.3)	3 (14.3)	1 (4.7)	-	3 (14.2)	21 (100)
50-75	6 (35.2)	2 (11.7)	1 (5.8)	2 (11.7)	-	6 (35.2)	17 (100)
Semptomlar							
Kaşıntı	8 (36.4)	3 (13.6)	4 (18.2)	2 (9.1)	-	5 (22.7)	22 (100)
Karın ağrısı	6 (25)	6 (25)	2 (8.3)	2 (8.3)	1 (4.1)	7 (41.2)	24 (100)
İshal	1 (25)	1 (25)	-	-	-	2 (50)	4 (100)
Kabızlık	-	1 (50)	-	-	-	1 (50)	2 (100)
Diğer**	2 (22.2)	2 (22.2)	3 (33.3)	-	-	2 (22.2)	9 (100)
Toplam	17 (27.9)	13 (21.3)	9 (14.7)	4 (6.5)	1 (1.6)	17 (27.9)	61 (100)
* NT: Tiplendirilemeyen;							
** Vaskülit, idiyopatik trombositopenik purpura, epilepsi, anemi.							

nu ve *Blastocystis* alt tipleri ile gastrointestinal semptomlar arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir²⁴. Özyurt ve arkadaşlarının²⁵ çalışmasında da, izolatların %75.9'unun ST3 olduğu tespit edilmiş ve alt tiplerle semptomlar arasında ilişki kurulamamıştır. Buna karşın Eroğlu ve arkadaşları¹⁷, semptomlu hastaların tamamında ST1 ve semptomsuz grupta ise en fazla ST3 olduğunu bildirmiştir. Alt tipe özgül primerler yüksek özgüllük göstermekle birlikte *Blastocystis*'in ST1-7 arasındaki alt tiplerini belirleyebilmektedir. Çalışmamızda tiplendirilemeyen 17 (%27.9) izolatın, Tan ve arkadaşlarının²⁶ ifade ettiği gibi, bu yöntemle belirlenemeyen alt tipler olabileceği veya DNA izolasyonundaki sorunlardan kaynaklandığı düşünülmüştür. Benzer olarak Lee ve arkadaşları²⁷, *Blastocystis* izolatlarının %12.7'sinde ST primerleriyle sonuç alamadıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda *Blastocystis* saptanan olguların çoğunluğunu erkekler (%65.6) oluşturmaktadır. İnceboz ve arkadaşları²⁸ da *Blastocystis* pozitifliğinin erkekler arasında daha sık görüldüğünü belirtmişlerdir. Ancak çalışmamızdaki gibi *Blastocystis* pozitif olguların değerlendirildiği bir çalışmada, kadın olgu sayısının daha fazla olduğu rapor edilmiştir²⁹. Engsbro ve arkadaşları³⁰, IBS hastalarında *Blastocystis* varlığı ve yaş arasında pozitif bir korelasyon olduğunu vurgulamıştır. Bir başka çalışmada ise, çocuk yaş grubunda *Blastocystis* yaygınlığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir³¹. Çalışmamızda, *Blastocystis* pozitif olguların %37.7 (23/61)'sinin 1-24 yaş aralığında olduğu görülmüş; 25-49 yaş grubunda bu oran %34.4, 50-75 yaş grubunda ise %22.9 olarak izlenmiştir (Tablo 1).

Blastocystis saptanan olguların semptomları değerlendirildiğinde, olgularda en sık karın ağrısı (%39.3) şikayetin görüldüğü, bunu kaşıntı (%36.1) ve ishalin (%3.3) izlediği belirlenmiştir. Ertuğ ve arkadaşları³², *Blastocystis* saptadıkları olgularda en sık görülen üç klinik belirtinin; karın ağrısı (%81), karında gaz hissi (%67) ve ishal olduğunu bildirmiştir. Bir diğer çalışmada da benzer şekilde en sık bildirilen semptomlar, sırasıyla karın ağrısı, diyare ve gaz varlığıdır³³. Sakalar ve arkadaşları¹⁹, karın ağrısı, ishal ve dermatitin en yaygın gözlenen semptomlar olduğunu bildirmiş; Balint ve arkadaşları²⁹ da nedeni bilinmeyen deri lezyonlu hastalarda *Blastocystis*'in araştırılması gerektiğini ifade etmişlerdir²⁶. Çalışmamızda alt tipi belirlenen olgu sayısının yetersiz olması nedeniyle, alt tipler ve semptomlar arasında istatistiksel analiz yapılamamıştır. Özyurt ve arkadaşları²⁵ *Blastocystis* enfeksiyonu olan erkek hastalarda en yaygın şikayetin gastroenterit, kadınlarda ise dispepsi olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda, hem erkek hem de kadınlarda en sık rastlanılan şikayet karın ağrısıdır. Dolayısıyla olgularımızda saptanan alt tiplerin ve klinik bulguların, ülkemizde ve dünya genelinde bildirilenler ile benzer olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, ülkemizde *Blastocystis* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin aydınlatılmasında, çok merkezli ve geniş kapsamlı moleküler ve klinik çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev 2008; 21(4): 639-65.
2. Jantermtor S, Pinlaor P, Sawadpanich K, et al. Subtype identification of *Blastocystis* spp. isolated from patients in a major hospital in northeastern Thailand. Parasitol Res 2013; 12(4): 1781-6.
3. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. Vet Parasitol 2010; 169(1-2): 8-17.
4. Lee LI, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK. *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? Parasit Vectors 2012; 5: 130.
5. Stensvold CR. *Blastocystis*: genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. Trop Parasitol 2013; 3(1): 26-34.
6. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Trop 2013; 126(1): 11-8.
7. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. Adv Parasitol 2013; 82: 1-32.
8. Scanlan PD, Stensvold CR. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. Trends Parasitol 2013; 29(11): 523-9.
9. Çelik T, Daldal N, Karaman Ü, Aycan MÖ, Atambay M. Malatya ili merkezinde üç ilköğretim okulu çocuklarında bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2006; 30(1): 35-8.
10. Hamamcı B, Cetinkaya U, Delice S, Erçal BD, Gücüyemez S, Yazar S. Investigation of intestinal parasites among primary school students in Kayseri-Hacılar. Türkiye Parazit Derg 2011; 35(2): 96-9.
11. Tüzemen NÜ, Doğan N. Entamoeba histolytica'nın tanısında direkt mikroskopik, kültür, ELISA ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2014; 48(1): 114-22.
12. Karadam SY, Ertabaklar H, Ertuğ S. Aydın'da üç farklı kreş ve anasınıfındaki çocuklarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg 2008; 32(3): 257-60.

13. Yazıcı V, Siriken F, Ertabaklar H, Ertug S. Investigation of intestinal parasites in food workers in hospitals in Aydın, Turkey. *Türkiye Parazitol Derg* 2007; 31(2): 136-8.
14. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59(3): 303-7.
15. Stensvold CR. Culture of *Blastocystis* in Jones' medium. Available at: <http://www.blastocystis.net/p/lab-stuff.html>
16. Yoshikawa H, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals. *J Parasitol* 2003; 89(3): 585-94.
17. Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitol Res* 2009; 105(6): 1589-92.
18. Souppart L, Sancier G, Cian A, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res* 2009; 105(2): 413-21.
19. Sakalar Ç, Kandemir İ, Uyar Y, Kuk S, Gürbüz E, Yazar S. Türkiye'deki semptomatik hastalardan elde edilen *Blastocystis* spp. izolatlarının polimeraz zincir reaksiyonu ile alt tiplendirilmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2013; 33(4): 1064-8.
20. El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, et al. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 164.
21. Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, et al. Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis* sp. in Sebha, Libya. *Parasit Vectors* 2013; 6: 86.
22. Dogruman-Al F, Kustimur S, Yoshikawa H, et al. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(5): 724-7.
23. Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt O, Demirel M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2008; 103(3): 685-9.
24. Dogruman-Al F, Yoshikawa H, Kustimur S, Balaban N. PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in a major hospital in Ankara, Turkey. *Parasitol Res* 2009; 106(1): 263-8.
25. Ozyurt M, Kurt O, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int* 2008; 57(3): 300-6.
26. Tan TC, Ong SC, Suresh KG. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitol Res* 2009; 105(5): 1283-6.
27. Lee IL, Tan TC, Tan PC, et al. Predominance of *Blastocystis* sp. subtype 4 in rural communities, Nepal. *Parasitol Res* 2012; 110(4): 1553-62.
28. İnceboz T, Uslu S, Over L ve ark. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne 2005-2009 yılları arasında başvuran olgularda *Blastocystis hominis* epidemiyolojisinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2011; 35(2): 72-6.
29. Balint A, Dóczi I, Bereczki L, et al. Do not forget the stool examination!-cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. *Parasitol Res* 2014; 113(4): 1585-90.
30. Engsbro AL, Stensvold CR, Nielsen HV, et al. Prevalence, incidence, and risk factors of intestinal parasites in Danish primary care patients with irritable bowel syndrome. *Scand J Infect Dis* 2013; 46(3): 204-9.
31. Londono AL, Mejia S, Gomez-Marín JE. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitism in preschool children from the urban area of Calarca, Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota)* 2009; 11(1): 72-81.
32. Ertug S, Karakas S, Okyay P, Ergin F, Oncu S. The effect of *Blastocystis hominis* on the growth status of children. *Med Sci Monit* 2007; 13(1): CR40-3.
33. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of *Blastocystis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32(3): 335-43.