



Blastocystis sp. Subtip 3 Small-subunit Ribozomal Geninin Klonlanması

Cloning of *Blastocystis* sp Subtype 3 Small-subunit Ribosomal DNA

Çağrı Şakalar¹, Yunus Uyar², Mehmet Ali Yürürdurmaz³, Sadık Tokar³, Huzeyfe Yeşilkaya³, Esra Gürbüz², Salih Kuk², Süleyman Yazar²

¹Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

³Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, 3. Dönem Öğrencisi, Kayseri, Türkiye

ÖZET

Amaç: *Blastocystis*'in farklı alttipleri veya genetik varyasyonlarının farklı klinik semptomlara sebep olduğu veya asemptomatik seyrettiği düşünülmektedir. Bu çalışmada *Blastocystis*'in SSUrDNA gen kısmının klonlanması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmada *Blastocystis* sp. ile enfekte bir hastanın dışkılarından DNA izole edilmiştir. SSUrDNA genomik kısmının çoğaltılması için *Blastocystis* spesifik primerler kullanılmıştır. Çoğaltılan DNA parçası plazmid spesifik primerler kullanılarak bir plazmid içine klonlanarak sekanslanmıştır. Elde edilen DNA dizisi BLAST ile analiz edildi ve MEGA yazılımı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Bulgular: Çalışmamızda elde edilen *Blastocystis* izolatının subtip 3 olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Klonlanan ve sekanslanan hedef genomik bölgesinin filogenetik analiz çalışmalarında kullanılabileceği düşünülmektedir. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 13-8)

Anahtar Sözcükler: *Blastocystis* sp. SSUrDNA, klonlama, subtip

Geliş Tarihi: 15.08.2012 **Kabul Tarihi:** 08.12.2012

ABSTRACT

Objective: Different sub-types or genetic variations of *Blastocystis* sp. are thought to play a role in the differential symptoms caused by the parasite or asymptomatic cases. In this study, it was aimed to clone a fragment of SSUrDNA gene of *Blastocystis* from a patient in order to define its phylogenetic subtype.

Methods: In this study, DNA isolation from the stool of a *Blastocystis* infected patient was performed. *Blastocystis* specific primers were used to amplify a SSUrDNA genomic fragment. The amplified DNA fragment was cloned into a plasmid and sequenced using plasmid specific primers. The obtained DNA sequence was analyzed using BLAST and a phylogenetic tree was constructed using the software MEGA.

Results: It was found that the *Blastocystis* isolate in our study is subtype 3.

Conclusion: Cloning and sequencing of the target genomic region is suggested for phylogenetic analysis studies.

(*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 13-8)

Key Words: *Blastocystis* sp. SSUrDNA, cloning, subtype

Received: 15.08.2012 **Accepted:** 08.12.2012

GİRİŞ

Blastocystis, insan ve diğer birçok vertebralı canlının alt gastrointestinal sisteminde yerleşebilen anaerobik, tek hücreli, ökaryotik bir parazittir. İnsan dışkı örneklerinde mantar dışında en sık rastlanan ökaryotik organizmadır (1-4). Tüm dünyada yaygın olarak bulunan bu parazitin insan dışkı örneklerindeki prevalansı, gelişmiş ülkelerde %7-20, gelişmekte olan ülkelerdeki ise %30-60 oranında değişmektedir (5-9).

Hayat döngüsünde bazı tartışmaların bulunduğu *Blastocystis*'in kesin olmamakla birlikte genel olarak fekal-oral yol ve kontamine suların içilmesiyle bulaştığı kabul edilmektedir. Patojen olup olmadığı tartışması devam eden *Blastocystis*'in sebep olduğu hastalık blastocystosis olarak isimlendirilmektedir (10). Blastocystosis, ishal, karın ağrısı, bulantı, kusma, şişkinlik, kabızlık ve ciltte kızarıklık gibi semptomlar göstermesinin yanı sıra tamamen asemptomatik de olabilmektedir.

Ayrıca 1996 yılında yapılan gen sekanslarının analizi sonucu Stramenofiles grubuna ait olduğu bildirilmiştir (11, 12). Parazitin farklı semptomlara sebep olmasının temelinde, genetik varyasyonların ve farklı alt tiplerin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle semptom ve parazit alt tipleri arasındaki ilişki bir çok çalışmada ayrıntılı olarak incelenmiştir (13-19). Günümüze kadar insan ve hayvanlardan izole edilen parazitin small-subunit ribozomal DNA (SSU rDNA)'sına göre 14 farklı alt tipe ayrıldığı gösterilmiştir (20-22). Bu alt tiplerden en yaygını alt tip 3'tür (3).

Günümüzde gen klonlaması çalışmaları; gen izolasyonu, gen bankalarının oluşturulması, genlerin güvenlik altına alınarak onların yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA aşlarının geliştirilmesi ve rekombinant proteinlerin ekspresyonu gibi amaçlarla yapılmaktadır (23).

Bu çalışmada, Kayseri'de bir hastadan elde edilen *Blastocystis* sp.'nin SSUrDNA geninin klonlanması ve klonlanan genom bölgesinin sekanslanarak filogenetik analizi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Parazit

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi Gastroenteroloji bölümüne ishal şikâyetiyle başvuran 70 yaşında bir kadın hastadan alınan dışkı örneği ile yapılmıştır. Nativ, lügol yöntemi ve formol-eter-konsantrasyon tekniği (FEKT) kullanılarak incelenen örnekte *Blastocystis* sp. tespit edilmiştir (24). Dışkı örneği, DNA izolasyonu yapılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır.

DNA İzolasyonu

-20°C'de saklanan dışkı örneği çözünmesi beklenmeden bistüri ile kesilerek 200mg olacak şekilde tartıldıktan sonra DNA izolasyonu, QIAamp stool kit (QIAGEN, ABD) prosedürüne göre yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri PZR için -20°C'de saklanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda (PZR), 1800 baz çiftlik SSU-rDNA geninin 602 baz çiftlik bölümünü çoğaltan RD5 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') ve BhrDr (5'-GAGCTTTT-AACTGCAACAACG-3') primerleri kullanılmıştır (14).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için 5X Master mix (SolisBioDyne FIREPol, Estonia), son konsantrasyonu 10 µg/ml Genomik DNA ve 0.5 µM RD5 ve BhrDr primerlerinden oluşan toplam 25 µL'lik karışım hazırlanmış ve 94°C de 5 dk'lık ön ısıtma ile başlayan sırasıyla 94°C denatürasyon, 59°C bağlanma, 72°C uzamadan oluşan 35 döngü sonrası 72°C'de 10 dak'lık son uzama ile biten PZR programı kullanılmıştır. PZR sonrası ürün, %1.5'luk agaroz jelde yürütüldü ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla (Carestream, ABD) görüntülenmiştir.

Klonlama

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürününün klonlanmasında CloneJET PZR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama reaksiyonu için; 2X reaksiyon buffer, 1 µL DNA blunting enzim ve PZR ürününden son konsantrasyonu 0.15 pmol olacak şekilde 18 µL'lik karışım hazırlanmıştır. Karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70°C'de 5 dk inkübe edilerek buzlu suya konulmuştur. Üzerine son konsantrasyonda 150 ng pJET1.2/blunt Cloning Vector ve 5'i T4 DNA Ligaz eklenip 20 µL'ye tamamlanmıştır. Karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanılmıştır.

5 µL'lik ligasyon ürünü buzlu suda bekletilen 100 µL JM109 *E. coli* kompetan hücrelerine (Promega, ABD) eklendi ve 30 dk inkübe edilmiştir. Karışım sırasıyla 42°C'de 1 dk ve buzlu suda 1 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL ampisilinli LB besi yeri eklenmiştir. 37°C'de sallayıcı üzerinde 1.5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı LB katı besiyerine ekilerek bir gece inkübe edilmiştir.

Klonlamanın PZR Tarama ile Doğrulanması

Lurie-Bertani (LB) katı besiyerinde oluşan kolonilerin rekombinant plazmiti içerip içermediğini tespit etmek için PZR tarama yapılmıştır. PZR için her biri 5 µL Master mix (SolisBioDyne FIREPol, Estonia), birer µL RD5 ve BhrDr (20 pmol) primerleri ve katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril kürdanla alınan örnekler karışıma bulaştırılarak toplam 25 µL'lik karışımlar hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen PZR programı kullanıldıktan sonra PZR ürünü %1.5'luk agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiştir.

Klonlamanın Miniprep ile Doğrulanması

Rekombinant plazmitin üretilen kompetan hücrelerde varlığını doğrulamak için Miniprep yapılmıştır. Miniprep işleminde High Pure Plazmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Almanya) kullanılmıştır. Miniprep yapılmak üzere LB katı besiyerinden, Ampisilin'li LB sıvı besiyerlerine ekim yapılarak 37°C'de sallayıcı üzerinde bir gece inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen sıvı besiyerinden alınan 5 mL'lik örnek 6000g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvısı dökülüp plazmit izolasyonu için kit prosedürü takip edilmiştir. Elde edilen rekombinant plazmit pJET-BISSUrDNA olarak isimlendirilmiş ve 5 µL'si alınarak agaroz jelde yürütülmüştür.

Klonlamanın Restriksiyon Enzim Kesimi ile Doğrulanması

Saflaştırılan rekombinant plazmitler, restriksiyon enzimleri ile kesilerek klonlanan genin varlığı araştırılmıştır. Enzim kesimi için *BglII* ve *DraI* enzimleri kullanılmıştır.

BglII (Promega, ABD) ürünü pJET1.2/blunt Klonlama Vektörü'nü 2 yerden kesmektedir. Ürün bilgilerine uygun olarak 20 µL'lik karışım hazırlanarak 37°C'de bir saat inkübe edilmiştir.

DraI (Fermantas, ABD) ürünü pJET1.2/blunt Klonlama Vektörü'nü 7 yerden kesmektedir. Ürün bilgilerine uygun olarak 20 µL'lik karışım hazırlanarak 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübe edilen ürünler agaroz jelde yürütülerek klonlanan genin varlığı incelenmiştir.

Klonlamanın DNA Dizi Analizi ile Doğrulanması

DNA dizi analizi için pJET1.2 Forward Sequencing Primer, (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'), pJET1.2 Reverse Sequencing Primer, (5'-AAGAACATCGATTTCCATGGCAG-3') primerleri ve Bigdye Cycle Sequencing kit v 3.1 (Applied Biosystems, ABD) kullanılmıştır. Sonuçlar otomatik DNA dizi analiz cihazı (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, ABD)'nde analiz edilmiştir. Elde edilen DNA dizisi ve GenBANK'daki *Blastocystis* sp. DNA dizilerinin Biyoteknoloji Bilgi Ulusal Merkezi (NCBI)'nde BLAST analizi yapılmıştır. Elde edilen DNA dizisi GENBANK'a JX448397 numara ile kayıt edilmiştir.

Filogenetik Analiz

Filogenetik analiz için MEGA 5.0 programı kullanılmıştır (25). Bunun için elde edilen DNA dizisi ve GENBANK'ta depolanmış subtipler

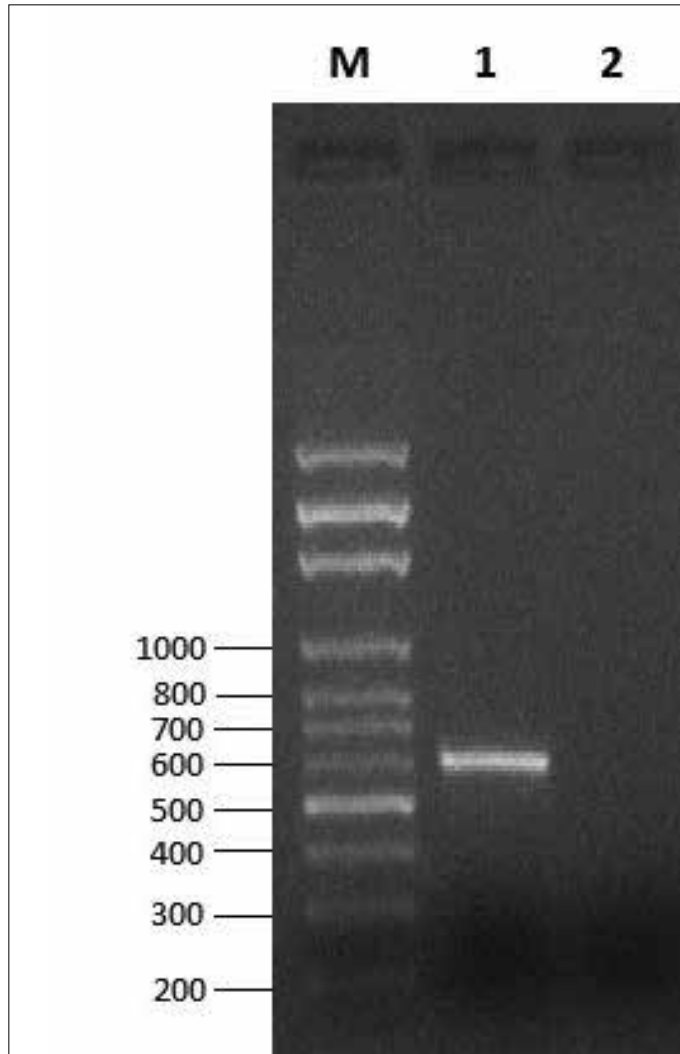
MEGA 5.0 programına girilmiş ve bu programla neighbor-joining (NJ) metodu kullanılarak Filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik analizde *Blastocystis* sp. dışında standart olarak; bir kamçılı olan *Preteromonas lacertae* (GENBANK no. U37108) kullanılmıştır. Bootstrap değeri olarak ise 1000 replikasyon kabul edilmiştir.

BULGULAR

Blastocystis sp. tespit edilen 70 yaşındaki kadın hastanın dışkı örneğinden *Blastocystis* sp. DNAsı QIAamp stool kit (QIAGEN, ABD) prosedürüne uygun olarak izole edildi. 602 baz çiftlik PZR ürünü agaroz jelde yürütülerek görüntüldü (Şekil 1).

Elde edilen 602 bç'lik DNA örneği CloneJET PZR Cloning Kit (Thermo Scientific, USA) kullanılarak pJET1.2/blunt Klonlama Vektörüne yerleştirildi. Ligasyon ürünü JM109 kompetan hücrelere transforme edildi. Bir gece inkübasyon sonrası oluşan koloniler tespit edildi (Şekil 2).

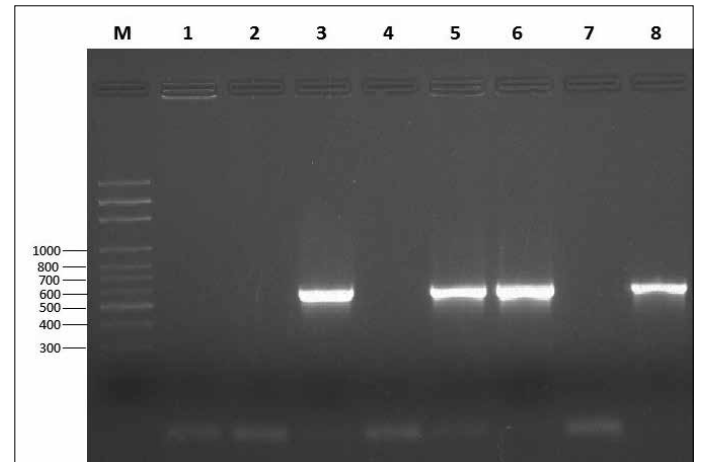
PZR-Tarama ile kolonilerin rekombinant plazmid içerdiği gösterildi (Şekil 3). Rekombinant plazmit varlığı tespit edilen iki koloniden miniprep yapılarak rekombinant plazmit saflaştırıldı ve PZR



Şekil 1. SSUrDNA PZR ürününün jel elektroforezde görünümü. M-100 bp'lik marker (*SolisBioDyne*), 1- *Blastocystis* sp. 602 bç'lik SSUrDNA 2- Negatif kontrol



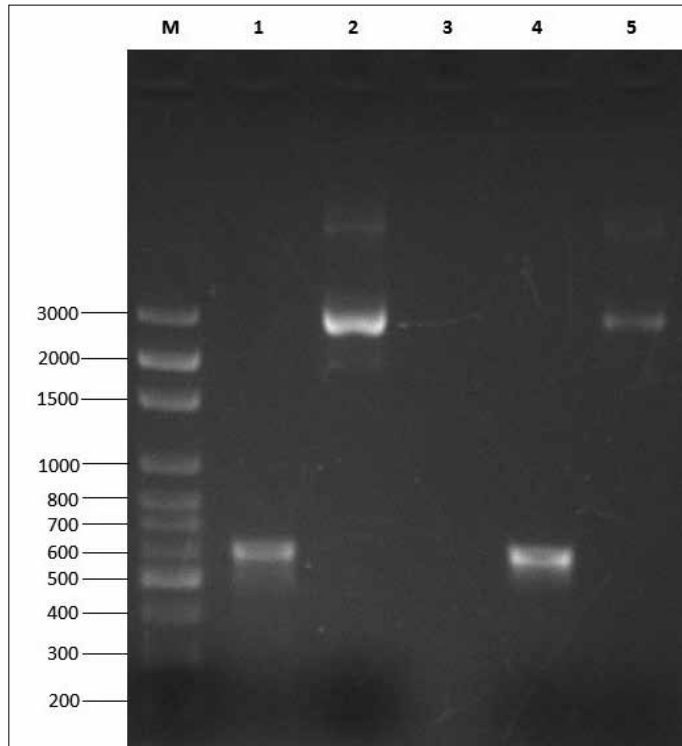
Şekil 2. Transformasyon sonrası oluşan koloniler



Şekil 3. Kolonilerin rekombinant plazmit varlığının PZR-Tarama ile doğrulanması. M-100 bp'lik marker (*SolisBioDyne*), 1, 2, 4 ve 7- PZR-Tarama sonucu negatif örnekler, 3, 5, 6 ve 8- PZR-Tarama ürünü 602 bç'lik SSUrDNA'lık pozitif örnekler

Tablo 1. pJET 1.2 vektörüne klonlanan *Blastocystis* spp. SSUrDNA'sının DNA dizisi

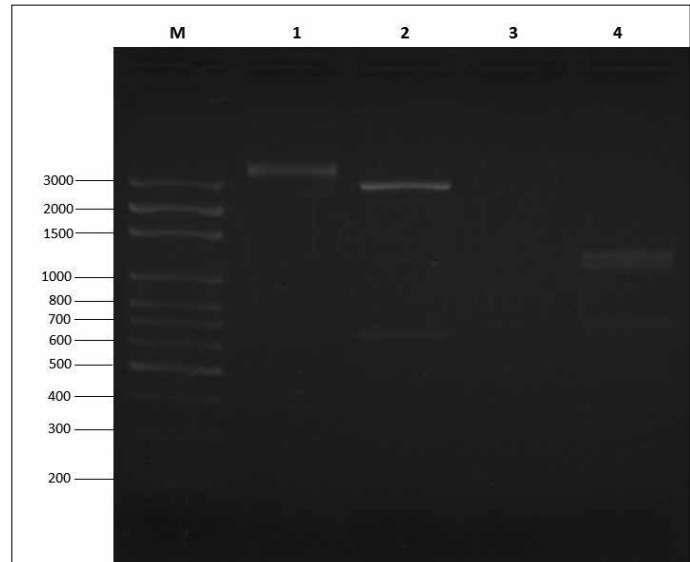
1	atctggtga	tcctgccagt	agtcatacgc	tcgtctcaaa	gattaagcca	tgcatgtgta
61	agtataaata	gttaactttg	aaactgcgaa	tggtcatta	tatcagttat	agtttatttg
121	atgaagaata	ctaattggat	aaccgtagta	attctagagc	taatacatgt	ataaagtctt
181	gtagactgca	tttattagaa	tgaaaaccat	aggtttcggc	ctattcgtga	gtaataataa
241	ctaatcatat	cgtagctta	tgtaacgatg	tgctttcaa	gtttctgcc	tatcagcttt
301	cgatggtagt	gtattggact	accatggcag	taacgggtaa	cgaagaattt	gggttcgatt
361	tcggagaggg	agcctgagag	atggctacca	catccaagga	aggcagcagg	cgcgtaaatt
421	acccaatcct	gacacagggg	ggtagtgaca	ataaatcaca	atgcggaaca	atgttttgca
481	attggattga	gaacaacgta	caaaccttat	cgataaacia	ttggagggca	agtctggtgc
541	cagcagccgc	ggtaattcca	gctccaatag	cgatatataa	cgttgttgca	gttaaaaaagc
601	tc					

**Şekil 4.** Rekombinant plazmit DNA'sı ve PZR sonucu. M-100 bp'lik marker (*SolisBioDyne*), 2, 5- miniprep sonucu kolonilerden saflaştırılan rekombinant plazmit DNA'ları, 1, 4- saflaştırılan rekombinant plazmit kaynaklı 602 bç'lik PZR ürünü, 3- negatif kontrol

ile klonlanan geni içerdiği gösterildi (Şekil 4). Saflaştırılan rekombinant plazmitler, *Bgl*III ve *Dra*I restriksiyon enzimleri ile kesildi ve klonlanan genin varlığı doğrulandı (Şekil 5). Ayrıca rekombinant plazmit, DNA dizi analizi yapılarak, klonlanan genin DNA dizisi ortaya çıkarıldı (Tablo 1). DNA dizi analizi MEGA 5 programına girilerek filogenetik ağaç oluşturulan izolatın subtip 3 olduğu tespit edildi (Şekil 6).

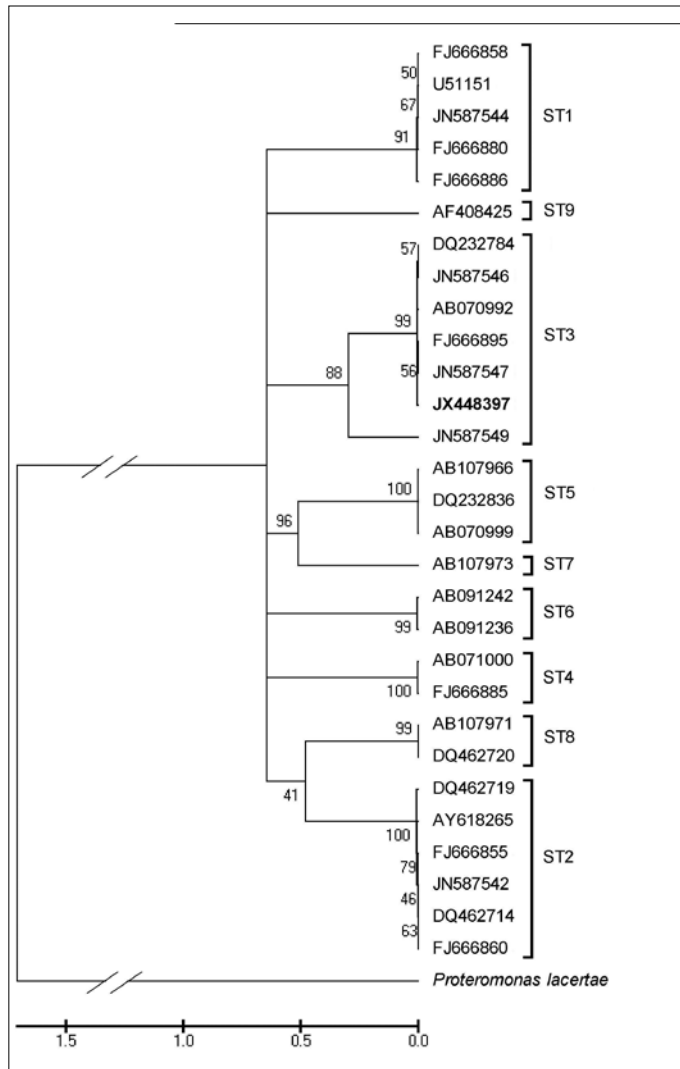
TARTIŞMA

Blastocystis sp. ile enfeksiyon etkeni olarak sıkça karşılaşılmaktadır (26). *Blastocystis* sp. tipleri ile vakaların semptomatik ya da

**Şekil 5.** Saflaştırılan rekombinant plazmitlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi. M-100 bp'lik marker (*SolisBioDyne*), 1- kesilmemiş rekombinant plazmit, 2- *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kesim sonucu, 3- negatif kontrol, 4- *Dra*I restriksiyon enzimi ile kesim sonucu

asemptomatik oluşu arasında ve ayrıca semptomatik vakalardaki semptomlarla tipler arasındaki ilişkiler incelenmiştir (27). Ayrıca insan ve hayvanlardan elde edilen *Blastocystis* sp.'lerin incelenmesiyle de transmisyon aydınlatılmaya çalışılmıştır (28). Bütün bu çalışmalarda *Blastocystis* sp.'ler tiplendirilerek sorulara cevap aranmıştır. Bu nedenle çalışmada elde edilen izolat RD5 ve BhrDr primerlerinin çoğalttığı gen ile tiplendirilmiştir. Türkiye'de elde edilen *Blastocystis* sp. izolatları PZR ile moleküler olarak alt tiplendirilmiş, ayrıca patolojik ve epidemiyolojik bulgular ortaya konmuştur. Bu çalışmalara göre alt tip 3 en yaygın olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bir çalışmada asemptomatik hastalarla alt tip 2 arasında ilişki bulunmuş iken diğer bir çalışmada ise semptomatik hastaların tümünde alt tip 1 tespit edilmiştir (29-32).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürünlerinin DNA dizi analiz çalışmalarında çoğu zaman primerlerin bağlanma bölgesi ve yakını istenen şekilde okunamamaktadır. Bunun için PZR ürünlerinin klon-



Şekil 6. Referans *Blastocystis* sp. tipleri ile karşılaştırılarak oluşturulan filogenetik ağaç. JX448397: Bu çalışmada insandan elde edilen izolat. *Blastocystis* sp. dışında standart: *Proteromonas lacertae* (GENBANK no. U37108), Bootstrap değeri: 1000 replikasyon

lanma sonrası DNA dizi analizleri plazmit spesifik primerlerle yapılmaktadır. Bu çalışmada *Blastocystis*'in SSUrDNA geni pJET 1.2 plazmidine klonlanmış ve vektör spesifik primerlerle DNA dizi analizi yapılmıştır.

Böylece gen klonlanmasıyla daha kesin bir DNA dizi analiz sonucu elde etmenin yanı sıra plazmit DNA kütüphanesi de oluşturulmuş olmaktadır. Ayrıca klonlanan ürün sonraki kantitatif çalışmalarda standart olarak kullanılabilmesi önemli bir avantaj sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada farklı türlerden izole edilen *Blastocystis* spp. genomik DNA'ları kullanılarak SSUrRNA geni PZR ile çoğaltılmış ve her bir PZR ürünü plazmite klonlanarak sekanslanmıştır. Elde edilen sekanslar ile filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir (33). Bu çalışmada da aynı şekilde PZR ile çoğaltılan ürün, pJET 1.2 plazmidine klonlanma sekanslanmış ve filogenetik analiz yapılmıştır. Ayrıca klonlanan bu sekans, oluşturulacak DNA kütüphanesinde saklanarak ülkemizde ve dünyada ileride yapılacak çalışmalara kaynak teşkil edebilecektir.

SONUÇ

Bir hastadan elde edilen *Blastocystis* sp. izolatından PZR ile SSUrDNA geni çoğaltılmış ve pJET 1.2 plazmidine Türkiye'de ilk kez bu çalışma ile klonlanmıştır. DNA dizi analiz sonucu filogenetik analizi yapılarak *Blastocystis* sp. subtip 3 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonrasında tiplendirme çalışmaları için kullanılacak PZR ürünlerinin DNA dizi analizlerinde gen spesifik primerlerden ziyade genin klonlanarak plazmit spesifik primerlerle DNA dizi analizi yapılabileceği gösterilmiştir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark GC, Evengard B. Subtype analysis of *Blastocystis* Isolates in Swedish Patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 1689-16. [\[CrossRef\]](#)
2. Stenzel DJ, Boreham PF *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 563-84.
3. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 639-65. [\[CrossRef\]](#)
4. Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* - diagnostic limitations. *Trends Parasitol* 2009; 25: 23-9. [\[CrossRef\]](#)
5. Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 588-92.
6. Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, et al. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res* 2007; 102: 83-90. [\[CrossRef\]](#)
7. González-Moreno O, Domingo L, Teixidor J, Gracenea M. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol Research* 2011; 108: 87-93. [\[CrossRef\]](#)
8. Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp in clinical stool samples. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84: 308-12. [\[CrossRef\]](#)
9. Amin OM. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 799-803.
10. Ok ÜZ. *Blastocystosis*. Özcel MA, editor. *Tıbbi Parazit Hastalıkları*. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hiz; 2007.p.383-6.
11. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 1996; 380: 98. [\[CrossRef\]](#)
12. Stechmann A, Hamblin K, Pérez-Brocá V, Gaston D, Richmond GS, Van Der Giezen M, et al. Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Biol* 2008; 18: 580-5.
13. Kaneda Y, Horiki N, Cheng XJ, Fujita Y, Maruyama M, Tachibana H. Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 393-6.
14. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 2006; 157: 77-85. [\[CrossRef\]](#)
15. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sancier G, Poirier P, El Alaoui H, et al. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res* 2010; 106: 505-11. [\[CrossRef\]](#)
16. Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt Ö, Demirel M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2008; 103: 685-9. [\[CrossRef\]](#)
17. Dogruman-Al F, Kustimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Simsek Z, Tanyuksel M, et al. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome

- and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 724-7. [\[CrossRef\]](#)
18. Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, Gómez-Muñoz MT, Borrás R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). Parasitol Res 2009; 105: 949-55. [\[CrossRef\]](#)
 19. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KEP, Nielsen HV. *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish Blastocystispositive patients presenting with acute diarrhea. Am J Trop Med Hyg 2011; 84: 883-5. [\[CrossRef\]](#)
 20. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for Blastocystis subtypes-a consensus. Trends Parasitol 2007; 23: 93-6. [\[CrossRef\]](#)
 21. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. Vet Parasitol 2010; 169: 8-17. [\[CrossRef\]](#)
 22. Fayer R, Santin M, Macarasin D. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. Parasitol Res 2012; 111: 1349-55. [\[CrossRef\]](#)
 23. Kuk S, Erensoy A. Gen Klonlama, Plazmit Seçimi ve *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Uygulamaları, Türkiye Parazit Derg 2008; 32: 16-22.
 24. Kilimcilioğlu AA, Ok ÜZ. Yoğunlaştırma yöntemleri. Korkmaz M, Ok ÜZ. editor. Parazitolojide Laboratuvar. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hiz; 2011.p.23-9.
 25. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 2011; 28: 2731-9. [\[CrossRef\]](#)
 26. Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen EP, et al. Blastocystis: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite Epidemiology and Infection 2009; 137: 1655-63. [\[CrossRef\]](#)
 27. Udkow MP, Markell EK. *Blastocystis hominis*: prevalence in asymptomatic versus symptomatic hosts. J Infect Dis 1993; 168: 242-4. [\[CrossRef\]](#)
 28. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali I, Hossain MB, et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. Parasitol Res 2004; 92: 22-9. [\[CrossRef\]](#)
 29. Ozyurt M, Kurt O, Mølbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of Blastocystis infections in Turkey. Parasitol Int 2008; 57: 300-6. [\[CrossRef\]](#)
 30. Eroglu F, Koltas IS. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. Parasitol Res 2010; 107: 841-5. [\[CrossRef\]](#)
 31. 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: 685-9. [\[CrossRef\]](#)
 32. Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. Parasitol Res 2009; 105: 1589-92. [\[CrossRef\]](#)
 33. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, et al. Molecular phylogenies of Blastocystis isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. J Clin Microbiol 2005; 43: 348-55. [\[CrossRef\]](#)