

# Ordu İlinden Alınan Su Örneklerinde *Blastocystis* Alt Türlerinin Araştırılması

## Investigation of *Blastocystis* Subspecies in Water Samples Collected from Ordu Province

✉ Zeynep Kolören<sup>1</sup>, ✉ Ülkü Karaman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

<sup>2</sup>Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

Cite this article as: Kolören Z, Karaman Ü. Ordu İlinden Alınan Su Örneklerinde *Blastocystis* Alt Türlerinin Araştırılması. Türkiye Parazitol Derg 2019;43(3): 111-7.

### ÖZ

**Amaç:** Ordu ilinden alınan su örneklerinde *Blastocystis* alt türlerinin yaygınlığını tespit etmek çalışmanın amacını oluşturmuştur. **Yöntemler:** Ordu il merkezi ve ilçelerindeki çevre sularından 75, içme sularından 25 örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler alüminyum sülfat kullanılarak çöktürülmüş ve sukroz gradiyent yöntemiyle konsantre edilmiştir. Bu örneklerden ribozomal RNA küçük alt birim (SSU rRNA) gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. Pozitif PZR ürünlerine sekans analizi yapılmış ve Bioedit kullanılarak baz dizileri hizalanmıştır. Bunu takiben filogeni ağacı çizilerek *Blastocystis* alt türlerinin tespiti yapılmıştır.

**Bulgular:** Toplam 100 örneğin dördünde *Blastocystis* spp. PZR ile bulunmuştur. İçme sularında herhangi bir pozitiflik tespit edilmemiştir. *Blastocystis* ST-1 alt türü, Bülbül Deresi, Kacalı Deresi ve Bolaman Çayı'nda tespit edilmiştir. *Blastocystis* ST-3 alt türü ise Karabalçık Deresi'nde bulunmuştur. Bülbül Deresi, Bolaman Çayı ve Kacalı Deresi örnekleri ile ST-1 alt türü arasında en düşük genetik uzaklık değerleri bulunmuştur. Bu örnekler ile ST-1 alt türü arasında sırasıyla %98,8, %76,6 ve %98,8 nükleotit benzerliği saptanmıştır. Karabalçık Deresi ile ST-3 arasındaki en düşük genetik uzaklık değeri bulunarak, %99,1 oranında nükleotit benzerliğine rastlanmıştır.

**Sonuç:** Bu çalışma, Karadeniz bölgesindeki Ordu ilinden alınan çevre suları ve içme suyu örneklerinde *Blastocystis* spp.'nin araştırıldığı ilk çalışmadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Blastocystis*, PZR, alt tür, Ordu, Türkiye, su örnekleri

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of the study was to determine the prevalence of *Blastocystis* subspecies in water samples collected from Ordu province.

**Methods:** Seventy-five surface water samples and 25 drinking water samples were collected from Ordu and its boroughs. The samples were flocculated by aluminum sulphate and concentrated by sucrose gradient method. *Small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA)* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). Sequence analysis was performed on the positive PCR products and the base sequences were aligned using Bioedit. Phylogeny trees were drawn and *Blastocystis* subspecies were identified.

**Results:** Four out of the 100 water samples were positive for *Blastocystis* spp. No positivity was found in the drinking water. *Blastocystis* ST-1 subspecies was detected in Bülbül River, Kacalı River and Bolaman Stream. *Blastocystis* ST-3 subspecies were found in Karabalçık River. The lowest genetic distance was found between ST-1 subspecies and the samples from Bülbül River, Kacalı River and Bolaman Stream. The nucleotide similarities between them were 98.8%, 76.6 and 98.8%, respectively. The lowest genetic distance was found between Karabalçık River and ST-3 subspecies and the nucleotide similarity between them was 99.1%.

**Conclusion:** This is the first study on the presence of *Blastocystis* spp. in the surface water and drinking water samples in Ordu province of the Black Sea area in Turkey.

**Keywords:** *Blastocystis*, PCR, subspecies, Ordu, Turkey, water samples



Geliş Tarihi/Received: 31.05.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 11.06.2019

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Ülkü Karaman, Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye  
E-Posta/E-mail: ulkukaraman44@hotmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0001-9708-2716

## GİRİŞ

*Blastocystis* türleri insan ve hayvanlarda bulunan zoonotik bağırsak protozoonlarıdır (1). *Blastocystis*'in kuşlar, sürüngenler, artropodlar ve memeliler gibi çok geniş konakçı popülasyonu bulunmaktadır. Tropikal ve subtropikal bölgelerdeki gelişmekte olan, hijyen şartlarının düşük olduğu ülkelerde %50, gelişmiş ve hijyen şartlarının yüksek olduğu ülkelerde ise %10 oranında bulunduğu bildirilmiştir (1-5).

Parazit fekal-oral yolla, enfekte gıdalar ve suların tüketilmesiyle taşınmaktadır (2-4). Ayrıca toplu yaşam, hayvanla temas, diyabet, kazanılmış bağışıklık yetersizliği sendromu ve diğer immün yetmezlik yapan hastalıklar, riskli endemik bölgelere seyahat veya buralardan diğer bölgelere göç *Blastocystis* enfeksiyonunun bulaşma yollarını oluşturmaktadır (6). *Blastosistosis*; ishal, karın ağrısı, kusma, kabızlık ve gaz problemleri gibi çeşitli gastrointestinal semptomlarla seyretmektedir (5).

Türkiye'nin ılıman kuşakta yer alması, toplumun bir kısmının ekonomik koşullarının yetersizliği ve eğitim seviyelerinin düşük olması, alt yapı eksikliği ve halkımızın parazit hastalıklarının bulaş yolları hakkında yeteri kadar bilgi sahibi olmaması, protozoon kaynaklı enfeksiyonların yaygın olmasının nedenleri olabilir. Türkiye'nin koşulları parazit enfeksiyonları için uygun olmasına rağmen araştırmalar insan, hayvan gaitası ve kan örnekleri ile sınırlı kalmıştır. Bu nedenle su kaynaklı salgınlara sebep olma ihtimali yüksek olan parazit enfeksiyonları hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Günümüze kadar yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalar arasında en yaygın parazitin *Cryptosporidium* spp. olduğu Bakır ve ark. (7), Çeber ve ark. (8), Koloren ve ark. (9), Aslan ve ark. (10), Koloren ve ark. (11), Koloren ve ark. (12), tarafından yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır. Türkiye'de şu ana kadar su kaynaklı *Blastocystis* spp. Karaman ve ark. (13,16) ile Koloren ve ark.'nın (17-19) yaptığı çalışmalarla su örneklerinde tespit edilmiştir.

Türkiyede *Blastocystis* türlerinin tanısı en sık dışkı örneklerinin ışık mikroskopunda direk ve boyalı preparatlarının incelenmesiyle yapılmıştır. Dışkı örneklerinde *Blastocystis* spp. Eskişehir'de %7 (20), İstanbul'da %2,1 (21), İzmir'de %4,38 (22), Ankara'da %22 (23) ve Manisa'da %7,64 (24) oranında saptanmıştır.

Moleküler tanı yöntemlerinden tanı duyarlılığının yüksek olması yanında alt tür tanımlamasının yapılması ve taksonomiye desteklemek amacıyla yararlanılmaktadır Fenotipik olarak aynı olan *Blastocystis* türlerinin alt tür tanımlaması ancak moleküler karakterizasyonunun yapılması ile gerçekleşmektedir (1-5). Moleküler teknikler konvansiyonel yöntemlere göre daha yüksek maliyetli olmalarına karşın, duyarlılığı yüksek, uygulanması kolay ve güvenilir sonuçlar vermektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda insanlardan, hayvanlardan (25-28) ve sularından (29) alınan örneklerde *Blastocystis* spp.'nin genetik çeşitliliği moleküler analizlerin kullanımı ile gösterilmiştir. İnsanlar, memeliler ve kuşlardan alınan örneklerde *Blastocystis* spp.'nin tanımlanması için küçük alt birim ribozomal ribonükleik asit gen bölgesi kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yönteminde hassas sonuçlar alınmış ve soyu tükenmiş-1'den (ST-1) ST-9'a kadar alt türler belirlenmiştir (30,31). Bunu takiben, ST-10 alt türü primatlarda (25), ST-11 ve ST-13 alt türleri ise hayvanlarda (31,32) tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, Ordu ilinden alınan su örneklerinde *Blastocystis* alt türlerinin yaygınlığının moleküler teknikler kullanarak tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

### Araştırma Alanı

Çalışmaya başlamadan önce parazitin tespiti için su örneklerinin alınacağı istasyonlar belirlenmiştir. İstasyonlar yerleşim yerlerine yakınlığına ve bölge halkının kullanım amacına göre seçilmiştir.

Çalışma bölgesindeki istasyonlar: Ordu il merkezinde: Turnasuyu Irmağı, Melet Irmağı, Civil Irmağı, Bülbül Deresi; Ünye ilçesinde: Ünye Merkez, Tabakhane Deresi, Cüri Deresi, Lahna, Cevizdere, Akçay Deresi; Fatsa ilçesinde: Fatsa Merkez, Çalışlar Deresi, İlica Deresi, Bolaman Çayı, Kavaklar, Sıcaksu, Serefiye, Çatak Dereleri; Perşembe ilçesinde: Perşembe Merkez, Kacalı Deresi, Karabalçık Deresi, Akçaova Deresi, Kışla Mevkii, Büyükağz, Belicesu'dur.

Toplam 25 istasyonun her birinden üçer örnek toplanmıştır. Bu doğrultuda Ordu il merkezi ve ilçelerindeki çevre sularından 75, içme sularından 25 su örneği toplanmıştır.

### Örneklerin Toplanması ve Alüminyum Sülfat ile Çöktürülmesi

Su örnekleri 10'ar litrelik tek kullanımlık plastik bidonlara alınmıştır. Su örneklerine 10 mL alüminyum sülfat  $Al_2(SO_4)_3$  konulmuş ve pH 5,4-5,8 olacak şekilde ayarlanmıştır Çökeltmenin gerçekleşmesi için örnekler 20-24 saat karanlık koşullarda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örneklerin üst kısmındaki süpernatant 1L kalana kadar atılmıştır. Daha sonra 2100 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı atılarak 50 mL'lik pellet kullanılıncaya kadar +4 °C'deki buzdolabında saklanmıştır (13).

### Örneklerin Saflaştırılması (Sheather'in Şekerli Yüzdürme Yöntemi)

Saflaştırma sürecinde 0,1M fosfat-tamponlu salin (PBS) (pH= 7,2) ve şeker çözeltisi (200 gram (g) glikoz, 6,5 g fenol, 320 mL saf su) hazırlanmıştır. Sonuçta şeker çözeltisi/PBS oranı farklı iki çözelti (solüsyon A:1/2, solüsyon B:1/4) elde edilmiştir. Steril 50 mL'lik poliprolen falkon tüpünün içine önce 15 mL solüsyon A konulup üzerine 15 mL solüsyon B eklenerek gözle görülebilir bir faz elde edilmiştir. Bu fazın üzerine 10 mL su örneği dikkatli bir şekilde konularak bir tabaka elde edilmiştir. Daha sonra üzeri saf su ile 50 mL'ye tamamlanıp 2100x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Yaklaşık 2 mL'lik pellet tüpün dibinde kalacak şekilde süpernatant atılmış ve pellet DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır (14,15).

### DNA İzolasyonu

Sheather'in şekerli yüzdürme yöntemiyle saflaştırılan örneklerden DNA izolasyonu QIAamp DNA mini kit (Qiagen) protokolü Karanis ve ark.'nın (33) yöntemine göre modifiye edilerek yapılmıştır.

Bu yöntemle göre örneklerin üzerine lizis tamponu eklenmiş ve 15 kez sıvı azot içinde dondurup-çözme işlemi yapılmıştır. Dondurma ve çözme işlemleri yaklaşık 1 dk süre tutularak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sırayla kit protokolü takip edilmiştir. Son aşamada elde edilen DNA 50 µL TE tampon içinde toplanmış ve PZR'de kullanılmak üzere + 4 °C'de saklanmıştır.

### PZR Metodu

Santin ve ark.'dan (28) alınan PZR protokolü modifiye edilerek küçük alt birim ribozomal RNA (*SSU rRNA*) geni çoğaltılmıştır. PZR reaksiyon karışımı 25 µL son hacimde hazırlanmıştır. Sıcak

başlangıç Taq DNA polimeraz kiti (10X PZR tamponu, 5X Q solution, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5U sıcak başlangıç taq DNA Polimeraz) (Qiagen), 25 mM dNTP mix, 10 pmol F ve R primerleri ve 1 µL DNA'da kullanılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri +4 °C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Her bir test için pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır. Oluşan ürünler etidyum bromürle boyanmış ve %1,5'lik agaroz jelle yüklenmiştir. Jel elektroforezde 100 V'de 60 dk yürütüldükten sonra ultraviyole altında (Prizma/Quantum ST-4) bantlar görüntülenmiştir. PZR ile çoğaltılan ürünler 479 bp uzunluğunda jelde gözlenmiştir.

### Sekans ve Filogenetik Analiz

Su örneklerine ait SSU rRNA gen bölgesi baz dizilimleri analizleri MacroGen (Hollanda) firmasından hizmet alınarak temin edilmiştir.

Bu firmadan gelen baz dizilimleri ile GenBank'tan alınan *Blastocystis* spp. alt türlerine ait baz dizileri "KM213435 (ST-1), JQ665863 (ST-1), KF306287 (ST-1), AM275361 (ST-1), AB107963 (ST-3), KF306294 (ST-3), KF242051 (ST-3), AM275393 (ST-4), AB091248 (ST-5), AB107972 (ST-6), AB091242 (ST-7), AB107971 (ST-8), AF408425 (ST-9), FM164413 (ST-10), GU256932 (ST-11), GU256905 (ST-12) ve GU256935 (ST-13)" BioEdit (34) programı kullanılarak hizalanmıştır. Bu dizilerin karşılaştırma işlemi ise ClustalW (35) modülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hizalanmış baz dizileri MEGA 5,05 paket programı kullanılarak maksimum olasılık analizleri, genetik uzaklık Kimura-2 parametre modeli ve seç bağla testi (Bootstrapping) 1000 tekrarlı hesaplanmıştır. Filogeni ağacı NeighbourJoining (NJ), maksimum-olasılık, maksimum-parsimony algoritmasıyla oluşturulmuştur. Örnekler ve referans baz dizileri arasındaki yüzde nükleotit benzerliği BioEdit programı, evrimsel uzaklık ilişkisi ise MEGA 5,05 programı kullanılarak tespit edilmiştir. Sulara çalışılması nedeniyle etik kurul onayı alınmamıştır. Çalışmada herhangi bir hasta kullanılmamıştır. Su örneklerinde çalışılması nedeniyle hasta onayı alınmamıştır.

## BULGULAR

### *Blastocystis* spp. DNA'sını Çoğaltmak İçin Kullanılacak PZR Metodunun Hassasiyeti

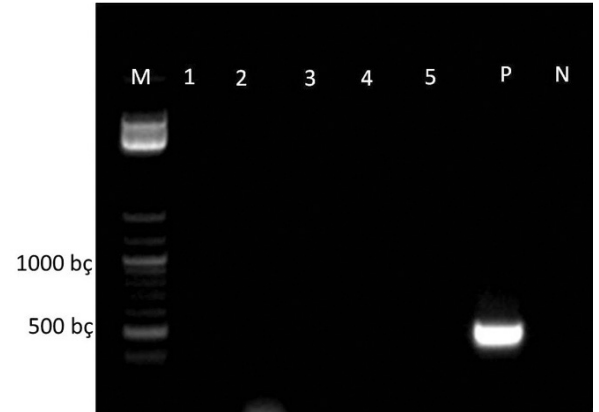
Bu çalışmada *Blastocystis* PZR deneyinin özgüllüğünü göstermek için hedef DNA olarak seçilen *Blastocystis*'den başka hedef DNA

olmayan *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia intestinalis*, *Babesia bovis* ve *Acanthamoeba castellanii* protozoonları da kullanılmıştır. *Blastocystis* DNA'sı standart PZR ile 479 bp'de pozitif olarak agaroz jelde gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda standart PZR reaksiyonuyla *Blastocystis* DNA'sı çoğalırken diğer protozoon DNA'larında herhangi bir çoğalma gözlenmemiştir (Şekil 1).

### Araştırma Alanındaki Örneklerde *Blastocystis* spp.'nin Görülme Sıklığı

Çalışmada toplam 100 su örneği incelenmiş olup PZR tekniğiyle 4 (%4) örnek pozitif olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Ordu merkezinden alınan 12 su örneğinin birinde, Fatsa ilçesinden alınan 24 su örneğinin birinde, Perşembe ilçesinden alınan su örneklerinin ikisinde PZR yöntemiyle *Blastocystis* DNA'sı pozitif olarak tespit edilmiştir. Ünye ilçesinden alınan 18 su örneğinin hiçbirinde *Blastocystis* tespit edilememiştir. Musluk suyu ve çevresel suların genel toplamı değerlendirildiğinde 100 su örneğinin dördü (%4) PZR metodu ile pozitif olarak bulunmuştur. Pozitif tespit edilen istasyonlar Ordu merkezde Bülbül Deresi, Fatsa ilçesinde Bolaman Çayı, Perşembe ilçesinde Kacalı ve



**Şekil 1.** *Blastocystis* DNA'sının özgüllüğünü gösteren agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp marker, N: Distile su (negatif), P: *B. hominis* DNA, 1: *C. parvum* DNA, 2: *T. gondii* DNA, 3: *G. intestinalis* DNA, 4: *Babesia bovis* DNA, 5: *A. castellanii* DNA  
*B. hominis*: *Blastocystis hominis*, *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*, *T. gondii*: *Toxoplasma gondii*, *G. intestinalis*: *Giardia intestinalis*, *A. castellanii*: *Acanthamoeba castellanii*

**Tablo 1.** Ordu merkezi ve ilçelerinden alınan su örneklerinde *Blastocystis* spp. varlığının PZR yöntemiyle gösterilmesi

Alınan su örnekleri	Araştırma alanı	İncelenen örnek sayısı	PZR ile pozitif örnek sayısı
Musluk suyu	Bütün istasyonlar	25	0
Ara toplam % pozitif		25	%0
Irmak suyu	Ordu merkez	12	1
	Ünye	18	0
	Fatsa	24	1
	Perşembe	21	2
Ara toplam % pozitif		75	4 (%5,33)
Genel toplam pozitif (%)		100	4 (%4)

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

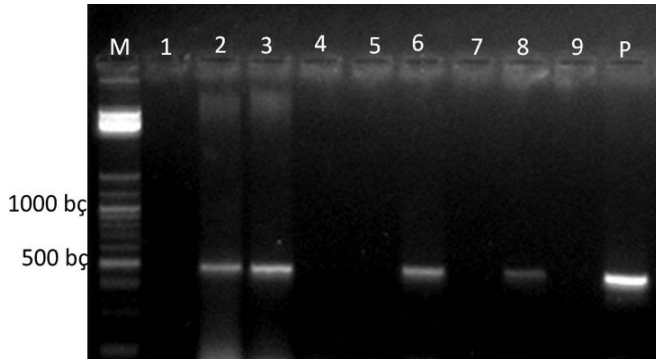
Karabalçık Dereleri olarak tespit edilmiştir. Ordu ilinden alınan örnekler üzerine uygulanan PZR metodunun agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 2'de verilmiştir.

### Ordu İlinden Alınan Yüzeysel Sulara Uygulanan PZR ve Sekans Analiz Sonuçları

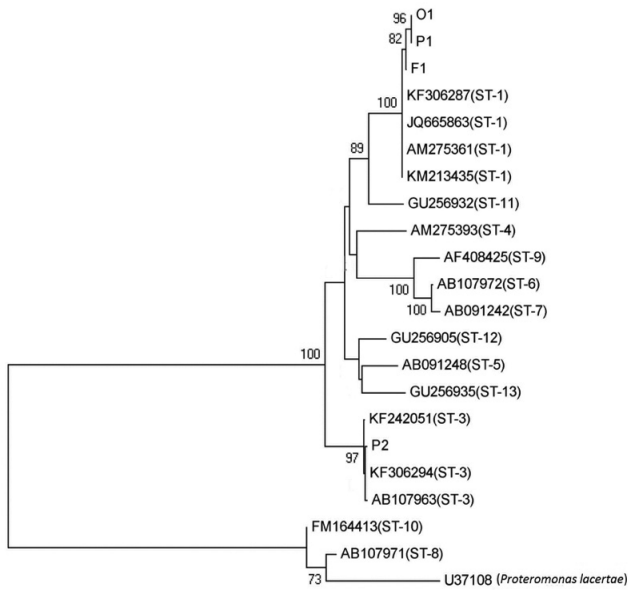
Çalışmada elde edilen 4 PZR ürününün sekansı başarılı bir şekilde alınmıştır. Tablo 2'de sekans sonuçları gösterilmiştir.

Su örneklerinde PZR tekniği kullanılarak elde edilen dört DNA ürününün sekans analiz sonuçları GenBank'tan alınan *Blastocystis* alt türlerine ait referanslarla karşılaştırılmıştır (34). *Blastocystis* pozitif su örnekleri (Bülbül Deresi-O1, Kacalı-P1 ve Karabalçık-P2 Dereleri, Bolaman Çayı-F4) ve gen bankasından alınan tüm *Blastocystis* alt türlerine (ST-1-ST-13) ait *SSU rRNA* gen bölgesini kapsayan komşu-birleştirme (NJ) filogeni ağacı Resim 3'te gösterilmiştir.

*Blastocystis* pozitif su örnekleri ile gen bankasından alınan referans *Blastocystis* alt türlerine ait *SSU rRNA* gen bölgesine ait yüzde benzerlik ve evrimsel uzaklık ilişkisi Tablo 3'te gösterilmiştir.



**Şekil 2.** Ordu'dan alınan su örneklerine ait *Blastocystis* PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü; M: 100 bç DNA marker; N: (distile su) negatif; P: *Blastocystis* DNA'sı, 1-9: PZR uygulanan su örnekleri



**Şekil 3.** Tüm *Blastocystis* alt türlerinin *SSU rRNA* gen bölgesine ait NJ filogeni ağacı

SSU rRNA: Küçük alt birim ribozomal RNA

*Blastocystis* alt türlerine (ST-1-ST-13) ait *SSU rRNA* gen bölgesi NJ filogeni ağacında seç bağla testi değeri %70'ten fazla olan NJ analizleri gösterilmiştir. Şekil 3'te gösterildiği gibi Karabalçık Deresi-P2 ile KF306294 (ST-3), AB107963 (ST-3), KF242051 (ST-3) arasında %97 oranında seç bağla testi değerleriyle NJ filogeni ağacında benzerlik ortaya konulmuştur. Bülbül Deresi-O1, Kacalı-P1 ve Bolaman Çayı-F4 ile KM 213435 (ST-1), KF306287 (ST-1), JQ 665863 (ST-1), AM275361 (ST-1) arasında %100 seç bağla testi değeriyle NJ filogeni ağacında benzerlik görülmüştür. Çalışmamızda Ordu ilinden alınan su örneklerinde Bülbül Deresi-O1, Kacalı-P1 ve Bolaman Çayı-F4 istasyonlarından alınan su örnekleri *Blastocystis* alt tür ST-1 olarak belirlenirken, Karabalçık Deresi-P2 istasyonundan alınan su örnekleri *Blastocystis* alt tür ST-3 olarak belirlenmiştir. Tablo 3'te

**Tablo 2.** Ordu ilinden alınan yüzeysel sulara uygulanan PZR ve sekans sonuçları

İstasyonlar ve kodları	PZR sonuçları	Sekans sonuçları ve alt tür (ST)
<b>Ordu Merkez</b>		
Bülbül Deresi (O1)	+	+ (ST1)
Melet Irmağı (O2)	- (sekansı alınamadı)	-
Civil Irmağı (O3)	-	-
Turnasuyu Irmağı (O4)	-	-
Perşembe		
Kacalı Deresi (P1)	+	+ (ST1)
Karabalçık Deresi (P2)	+	+ (ST3)
Perşembe Merkez (P3)	-	-
Akçaova Deresi (P4)	-	-
Kışla Mevkii (P5)	-	-
Büyükağz (P6)	-	-
Belicesu (P7)	-	-
Fatsa		
Fatsa Merkez (F1)	-	-
Çalışlar Deresi (F2)	-	-
Ilıca Deresi (F3)	-	-
Bolaman Çayı (F4)	+	+ (ST1)
Kavaklar (F5)	- (sekansı alınamadı)	-
Sıcaksu (F6)	-	-
Serefiye (F7)	-	-
Çatak (F8)	-	-
Ünye		
Ünye Merkez	-	-
Tabakhane Deresi	-	-
Cüri Deresi	-	-
Lahna	- (sekansı alınamadı)	-
Cevizdere	-	-
Akçay Deresi	-	-

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu, ST:

**Tablo 3.** Gen bankasından alınan *Blastocystis* alt türlerine ait referans gen bölgeleri ile ve su örneklerine ait *SSUrRNA* gen bölgesi arasındaki yüzde benzerlik ve evrimsel uzaklık ilişkisi

	O1	F4	P1	JQ665863(ST-1)	AM275361(ST-1)	KF306287(ST-1)	KM213435(ST-1)	P2	KF306294(ST-3)	KF242051(ST-3)	AB107963(ST-3)	AM275393(ST-4)	AB091248(ST-5)	AB107972(ST-6)	AB091242(ST-7)	AB107971(ST-8)	AF408425(ST-9)	FM164413(ST-10)	GU256932(ST-11)	GU256905(ST-12)	GU256935(ST-13)	U37108 ( <i>Proteromonas lacertae</i> )
O1	ID	0,764	1	<b>0,988</b>	<b>0,988</b>	0,448	0,437	0,395	0,372	0,391	0,397	0,871	0,886	0,856	0,851	0,319	0,849	0,244	0,875	0,896	0,88	0,319
F4	0,0082	ID	0,764	<b>0,766</b>	<b>0,766</b>	0,584	0,569	0,509	0,48	0,506	0,512	0,677	0,682	0,658	0,654	0,268	0,651	0,317	0,722	0,689	0,678	0,256
P1	0,0000	0,0082	ID	<b>0,988</b>	<b>0,988</b>	0,448	0,437	0,395	0,372	0,391	0,397	0,871	0,886	0,856	0,851	0,319	0,849	0,244	0,875	0,896	0,88	0,319
JQ665863(ST-1)	<b>0,0138</b>	<b>0,0055</b>	<b>0,0138</b>	ID	1	0,453	0,442	0,396	0,373	0,394	0,398	0,881	0,892	0,864	0,859	0,32	0,857	0,246	0,885	0,902	0,889	0,317
AM275361(ST-1)	0,0138	0,0055	0,0138	0,0000	ID	0,453	0,442	0,396	0,373	0,394	0,398	0,881	0,892	0,864	0,859	0,32	0,857	0,246	0,885	0,902	0,889	0,317
KF306287(ST-1)	0,0138	0,0055	0,0138	0,0000	0,0000	ID	0,974	0,767	0,817	0,762	0,771	0,381	0,378	0,357	0,354	0,179	0,355	0,294	0,409	0,385	0,375	0,165
KM213435(ST-1)	0,0138	0,0055	0,0138	0,0000	0,0000	0,0000	ID	0,747	0,792	0,739	0,747	0,37	0,367	0,347	0,343	0,172	0,345	0,284	0,398	0,373	0,363	0,158
P2	0,1797	0,1831	0,1797	0,1758	0,1758	0,1758	0,1758	ID	0,937	0,978	<b>0,991</b>	0,4	0,39	0,382	0,377	0,194	0,378	0,31	0,393	0,393	0,386	0,183
KF306294(ST-3)	0,1760	0,1794	0,1760	0,1722	0,1722	0,1722	0,1722	<b>0,0027</b>	ID	0,929	0,942	0,378	0,368	0,359	0,354	0,185	0,356	0,296	0,371	0,37	0,364	0,174
KF242051(ST-3)	0,1794	0,1760	0,1794	0,1689	0,1689	0,1689	0,1689	0,0055	0,0027	ID	0,982	0,399	0,387	0,378	0,374	0,192	0,375	0,307	0,397	0,391	0,386	0,18
AB107963(ST-3)	0,1794	0,1828	0,1794	0,1756	0,1756	0,1756	0,1756	0,0055	0,0027	0,0055	ID	0,402	0,392	0,385	0,38	0,194	0,381	0,31	0,395	0,395	0,389	0,183
AM275393(ST-4)	0,1750	0,1681	0,1750	0,1611	0,1611	0,1611	0,1611	0,1614	0,1579	0,1580	0,1612	ID	0,869	0,843	0,841	0,325	0,841	0,247	0,833	0,875	0,86	0,327
AB091248(ST-5)	0,1712	0,1712	0,1712	0,1643	0,1643	0,1643	0,1643	0,1781	0,1746	0,1746	0,1780	0,1746	ID	0,861	0,858	0,323	0,861	0,248	0,847	0,938	0,929	0,326
AB107972(ST-6)	0,2065	0,2066	0,2065	0,1993	0,1993	0,1993	0,1993	0,1920	0,1885	0,1885	0,1885	0,1885	0,2100	ID	0,989	0,315	0,952	0,243	0,811	0,872	0,856	0,306
AB091242(ST-7)	0,2173	0,2174	0,2173	0,2100	0,2100	0,2100	0,2100	0,2063	0,2027	0,2027	0,2027	0,1885	0,2099	0,0138	ID	0,313	0,946	0,241	0,807	0,868	0,852	0,303
AB107971(ST-8)	1,0933	1,0909	1,0933	1,0776	1,0776	1,0776	1,0776	0,9988	1,0106	1,0088	1,0125	1,0485	1,0457	1,1324	1,1635	ID	0,311	0,597	0,324	0,329	0,32	0,621
AF408425(ST-9)	0,2176	0,2178	0,2176	0,2103	0,2103	0,2103	0,2103	0,2027	0,1991	0,1991	0,2027	0,1956	0,2027	0,0656	0,0746	1,1424	ID	0,241	0,802	0,866	0,854	0,3
FM164413(ST-10)	1,0317	1,0292	1,0317	1,0167	1,0167	1,0167	1,0167	0,9733	0,9849	0,9829	0,9871	1,0500	0,9971	1,1021	1,1332	0,0422	1,1021	ID	0,259	0,253	0,245	0,492
GU256932(ST-11)	0,1152	0,1056	0,1152	0,0993	0,0993	0,0993	0,0993	0,1893	0,1857	0,1823	0,1892	0,1611	0,1680	0,2027	0,2099	1,0329	0,2319	0,9753	ID	0,845	0,84	0,308
GU256905(ST-12)	0,1542	0,1542	0,1542	0,1475	0,1475	0,1475	0,1475	0,1817	0,1781	0,1782	0,1816	0,1546	0,1023	0,1815	0,1850	1,0030	0,1850	0,9570	0,1577	ID	0,935	0,325
GU256935(ST-13)	0,1817	0,1783	0,1817	0,1713	0,1713	0,1713	0,1713	0,1967	0,1930	0,1895	0,1928	0,1934	0,1162	0,2247	0,2285	1,1071	0,2172	1,0559	0,1681	0,1025	ID	0,314
U37108 ( <i>Proteromonas lacertae</i> )	1,2321	1,2459	1,2321	1,2305	1,2305	1,2305	1,2305	1,1224	1,1350	1,1474	1,1357	1,2136	1,1391	1,3383	1,3784	0,1816	1,3851	0,1956	1,2001	1,1513	1,2204	ID

gösterildiği gibi Bülbül Deresi-O1 için en düşük genetik uzaklık bu dereyle JQ665863 (ST-1), AM275361 (ST-1), KF306287 (ST-1) ve KM213435 (ST-1) arasında 0,0138 değerinde ve en yüksek genetik uzaklık ise 1,0933 değeri ile AB107971 (ST-8) arasındadır. Bülbül Deresi ile JQ665863 (ST-1) arasındaki nükleotit benzerliği %98,8'dir. Bolaman Çayı-F4 ile JQ665863 (ST-1), AM275361 (ST-1), KF306287 (ST-1) ve KM213435 (ST-1) arasında en düşük genetik uzaklık 0,0055 değeri ile bulunmuştur. AB107971 (ST-8) ile arasındaki en yüksek genetik uzaklık ise 1,0909'dur. JQ665863 (ST-1), AM275361 (ST-1) ve Bolaman Çayı-F4 arasındaki nükleotit benzerliği %76,6'dır. Kacalı Deresi-P1 ile JQ665863 (ST-1), AM275361 (ST-1), KF306287 (ST-1) ve KM213435 (ST-1) arasında en düşük genetik uzaklık 0,0138 değeri bulunmuştur. AB107971 (ST-8) ile arasındaki en yüksek genetik uzaklık ise 1,0933'tür. JQ665863 (ST-1), AM275361 (ST-1) ve Kacalı Deresi-P1 arasındaki nükleotit benzerliği %98,8'dir. Karabalçık Deresi-P2 ile KF306294 (ST-3) arasındaki en düşük genetik uzaklık 0,0027 ve en yüksek genetik uzaklık ise AB107971 (ST-8) arasında 0,9988'dir. Nükleotit benzerlik oranı ise en yüksek AB107963 (ST-3) arasında %99,1 olarak belirlenmiştir.

## TARTIŞMA

*Blastocystis* spp. tanısında mikroskopik inceleme ucuz ve hızlı bir yöntem olmasına karşın, sonuçların güvenilirliği tamamen inceleme yapan kişinin tecrübesine bağlıdır. PZR analizi mikroskopik incelemeye iyi bir alternatiftir ve PZR'nin sekans analizi ile desteklenmesi aynı zamanda *Blastocystis* türlerinin

moleküler karakterizasyonunun belirlenebilmesini de mümkün kılmaktadır (25-28). Türkiye'de daha önce yapılan çalışmalarda *Blastocystis* spp. varlığı daha çok insan gaita örneklerinde standart mikroskop ve PZR kullanılarak gerçekleştirilmiştir (20-24). Bu araştırmanın çevresel su örneklerinde yapılmasının nedeni Türkiye'nin Ordu ilindeki çevresel sularda *Blastocystis* varlığının araştırılması ve *Blastocystis* enfeksiyonunun bulaşı açısından moleküler epidemiyolojik bilgiler edinilmesidir.

*Blastocystis* alt türlerinin geniş bir konakçı spektrumu olduğu için vahşi veya evcil hayvanların fekal atıklarıyla kirlenmiş yüzeysel sular ve tarımda kullanılan atık sular ile bu parazitlerin bulaştığı bilinmektedir (29). Ordu ili ve çevresinin aldığı yoğun yağışlar ve meydana gelen seller düşünüldüğünde *Blastocystis* türlerinin çevresel sularla hızla yayılmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir. Morfolojik görünümleri aynı olan *Blastocystis* türlerine ait tanı duyarlılığının artırılmasında alt tür tanımlamalarının yapılmasında moleküler yöntemlerin kullanılması gerekmektedir.

Türkiye'de parazit hastalıklarının epidemiyolojisi, parazit hastalıkları hakkında bilgi sahibi olup olmamaya, ekonomik koşullara ve halkın eğitim seviyesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Bu durum dikkate alındığında yapılması gereken, yaşanan çevrede mevcut parazit yaygınlığının ne oranda bulunduğunu tespit etmektir. Çalışmamızda da bulaşta etkili olabileceği düşünülen Ordu merkez ve ilçelerindeki su örneklerinde *Blastocystis* spp. parazitinin moleküler teknikler kullanılarak

varlığı araştırılmıştır. Yapılan literatür araştırmasına göre bu alanda yapılmış bir araştırmaya rastlanılmamıştır.

Samsun ve Giresun illerinden alınan sulara *Blastocystis* türlerinin varlığı hakkında Karaman ve ark. (13,16) yaptığı çalışmalarda, su kökenli parazitlerin genel dağılımı ışık mikroskobu kullanılarak direkt bakı yöntemiyle yapılmıştır. Yine Koloren ve ark. (17) Samsun ilinden alınan su örneklerinde *Blastocystis* türlerini ve alt türlerini PZR ve sekans analizi yaparak tespit etmişlerdir. Benzer olarak Koloren ve ark. (18,19) Sinop ve Amasya'dan alınan su örneklerine *Blastocystis* türlerini ve alt türlerini PZR ve sekans analizi yaparak belirlemişlerdir. Bu çalışma ise Karadeniz Bölgesi'nde Ordu merkez ve ilçelerindeki su kaynaklarında *Blastocystis* spp. ile ilgili moleküler düzeyde yapılan ilk araştırmadır.

İnsanlarda *Blastocystis* enfeksiyonlarının çoğunun enfekte primatlar, domuzlar ve kümes hayvanlarıyla temas neticesinde oluştuğu ve bu nedenle bu parazitin zoonotik patojen olarak değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (36). Aynı zamanda *Blastocystis*'in en önemli bulaş kaynağının sular olduğu Baldursson ve Karanis (37) tarafından yayınlanan 2004 yılından 2010 yılına kadar dünyadaki su kaynaklı parazit protozoonlar hakkındaki derlemede belirtilmiştir. Bu derlemede Avusturalya'da %46,7, Kuzey Amerika'da %30,6 ve Avrupa'da ise %16,5 oranında su kaynaklı salgınların meydana geldiği bildirilmiştir.

Türkiye'de Ordu ilindeki su kaynaklı *Blastocystis* spp. varlığını belirlemek için, çalışmanın araştırma alanı Ordu merkez ve ilçelerindeki yerleşim yerlerine yakın çevre sularından oluşturulmuştur. Çalışma alanı yaban domuzlarının ve hayvan çiftliklerinin yoğun olduğu bölgelerden seçilmiştir. Farklı çalışmalarda Noel ve ark. (26), *Blastocystis* ile enfekte insanlardan ve hayvanlardan alınan örneklerde bu parazitin morfolojik görünümünü birbirinden ayırt edemezken, moleküler yöntemlerle alt tür düzeyinde genetik farklılıkların tespit edileceğini belirtmişlerdir. Li ve ark. (38), tarafından da Çin'de yapılan bir çalışmada domuz sahibi kişilerin *Blastocystis* enfeksiyonu açısından risk oluşturduğu ortaya konulmuştur. Aynı zamanda %32,6 oranındaki *Blastocystis* enfeksiyonunun nedeni kaynatılmadan içilen içme suyu ve işlem görmemiş yüzeysel suların kullanılması şeklinde ifade edilmiştir. Ayrıca Leelayoova ve ark. (39), içme suyunu okuldan temin eden öğrencilerden alınan fekal örneklerde *Blastocystis* alt türlerini saptamışlardır. Araştırmacılar öğrencilerde mevcut *Blastocystis* enfeksiyonunun varlığının kontamine içme suyu kaynaklı olduğunu belirtmişlerdir. Lee ve ark. (40), 241 insan gaita örneğinde *in vitro* kültür yaparak *Blastocystis* spp.'nin varlığını PZR ve sekans analizleri ile tespit etmişlerdir. Altmış üç fekal örnekte *Blastocystis* spp. (%26,1) olup en yaygın alt türün ST-4 olduğu belirlemişlerdir. *Blastocystis* spp. ile enfekte bulunan 63 kişiden 51'inin filtre edilmiş veya kaynatılarak soğutulmuş su tüketmedikleri saptanmıştır. Bu çalışma, Nepal'in kırsal bölgelerine yapılan gezilerde *Blastocystis* spp.'nin sağlık endişesi yaratabileceği ve bu bölgelerde tüketilen sulara dikkat edilmesi gerektiğini göstermiştir.

Malezya'da iki içme suyu arıtma tesisinde %25,9 oranında (41) *Blastocystis* spp. varlığı tespit edilmiştir. Yine Malezya'nın köylerinde su havzalarında yapılan bir çalışmada, yağışlı dönemlerde *Blastocystis* spp. ST-1, ST-2 ve ST-3 alt türlerinin, kuraklığın arttığı mevsimlerde ise *Blastocystis* spp. ST-3'ün yaygın olduğu tespit edilmiştir (42).

Türkiye'de Samsun il ve ilçelerinden alınan su örneklerinde PZR yöntemi ile %4 *Blastocystis* spp. bildirilmiştir. Elde edilen PZR

ürünleri sekans analizinde Kürtün ve Miliç Çayı'nda alt tür 1, Mert Çayı'nda ise alt tür 3 olarak saptanmıştır (37).

Bu çalışmada belirlenen 25 istasyondan toplam 75 çevresel ve 25 içme suyu örneğinde *Blastocystis* spp. varlığı moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Yapılan inceleme sonucunda 75 çevresel su örneğinin 4 (%5,33) tanesinde, PZR yöntemi ile pozitiflik belirlenmiştir. Yine aynı dönemde toplanan içme sularının hiçbirinde *Blastocystis* spp. tespit edilmemiştir. Tüm örnekler bakıldığı zaman *Blastocystis* spp. varlığı %4 olarak tespit edilmiştir. PZR ürünlerinin sekans analiz sonucuna göre Ordu merkezde; Bülbül Deresi, Perşembe ilçesinde Kacalı Deresi ve Fatsa ilçesinde Bolaman Çayı'nda *Blastocystis* alt tür 1, Perşembe ilçesinde Karabalçık Dere'sinde ise *Blastocystis* alt tür 3 belirlenmiştir.

Su havzalarını besleyen nehir ve dere yataklarındaki yapılaşma, lağımın yeteri kadar arıtılmadan su kaynaklarına boşaltılması sanayi atıklarının nehirlere, derelere boşaltılması, yeraltına gömülen atıkların sızarak yeraltı sularına karışması su kaynaklarının kirliliğini hızlandıran bir etken olarak bildirilmiştir (11). Çalışmada bölgedeki atık su arıtım tesislerinin yetersizliği de göz önünde bulundurularak bölge halkının *Blastocystis* ve diğer su kaynaklı parazitler enfeksiyonları konusunda bilinçlendirilmesi ve ilgili kurumların bu konuda gereken önlemleri almaları gerektiği sonucuna varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ordu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından AR-1636 nolu proje ile desteklenmiştir.

### \* Etik

**Etik Kurul Onayı:** Sulara çalışılması nedeniyle etik kurul onayı alınmamıştır.

**Hasta Onayı:** Çalışmada herhangi bir hasta kullanılmamıştır. Su örneklerinde çalışılması nedeniyle hasta onayı alınmamıştır.

### Hakem Değerlendirmesi:

### \* Yazarlık Katkıları

**Konsept:** Z.K., Ü.K., Dizayn: Z.K., Ü.K., Veri Toplama veya İşleme: Z.K., Ü.K., Analiz veya Yorumlama: Z.K., Ü.K., Literatür Arama: Z.K., Ü.K., Yazan: Z.K., Ü.K.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar arasında bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Finansal Destek:** Çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından AR-1636 nolu proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev 1996;9:563-84.
2. Smith H, Nichols RA. Zoonotic protozoa-food for thought. Parasitologia 2006;48:101-4.
3. Cheng HS, Haug ZF, Lan WH, Kuo TC, Shin JW. Epidemiology of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a Vietnamese female immigrant population in southern Taiwan. Kaohsiung J Med Sci 2006;22:166-70.
4. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J Water Health 2007;5:1-38.

5. Doğurman Al F, Hökelek M. *Blastocystis Hominis* Fırsatçı Bir Patojen mi?. Türkiye Parazit Derg 2007;31:28-36.
6. Alver O, Öztüfekçi A, Kurt E, Özakin C, Töre O: Akciğer Kanseri Hastada *Blastocystis hominis*. Türkiye Parazit Derg 2004;28:199-201.
7. Bakir B, Tanyuksel M, Saylam F, Tanrıverdi S, Araz ER, Hacim AK, et al. Investigation of Waterborne Parasites in Drinking Water Sources of Ankara, Turkey. J Microbiol 2003;148:148-151.
8. Çeber K, Aslan G, Otağ F, Deli-alioğlu N, Öztürk C, Babür C, et al. Mersin ilinde içme suyu, kullanma suyu, atık su ve deniz sularında *Cryptosporidium* spp. oookistlerinin araştırılması. Türkiye Parazit Derg 2005;29:224-8.
9. Koloren Z, Sotiriadou I, Karanis P. Investigations and Comparative Detection of *Cryptosporidium* Species by Microscopy, Nested PCR and LAMP in Water Supplies of Ordu, Middle Black Sea, Turkey. Ann Trop Med Parasitol 2011;105:607-15.
10. Arslan MÖ, Ekinci İtik A. Kars Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium parvum* Subtiplerinin Belirlenmesi Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012;18:221-6.
11. Koloren Z, Avşar C, Kaya D. Monitoring of *Cryptosporidium* Species in Water Supplies of Sinop, Black Sea, Turkey by Acid-Fast Staining Method. J Appl Bio Sci 2012;6:41-3.
12. Koloren Z, Kaya D, Avşar C. Detection of *Cryptosporidium* species in the sea and tap water samples of Black Sea, Turkey. J Parasitol 2013;99:554-7.
13. Karaman Ü, Kolören Z, Demirel E, Ayaz E, Seferoğlu O. Giresun İlindeki Sularda Parazitlerin Varlığı. Dicle Med J 2016;43:521-6.
14. Arrowood MJ, Sterling CR. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. J Parasitol 1987;73:314-9.
15. Kourenti C, Karanis P. Evaluation and applicability of a purification method coupled with nested PCR for the detection of *Toxoplasma* oocysts in water. Lett Appl Microbiol 2006;43:475-81.
16. Karaman Ü, Kolören Z, Seferoğlu O, Ayaz E, Demirel E. Samsun İl ve İlçelerinden Alınan Çevresel Sularda Parazitlerin Varlığı. Türkiye Parazit Derg 2017;41:19-21.
17. Koloren Z, Gülabi BB, Karaman Ü: Identification of *Blastocystis* spp. in water samples collected from Samsun province and boroughs by Conventional PCR. 1st International *Blastocystis* Symposium 2015:28-29;p.66-67.
18. Koloren Z, Molecular characterisation of *Blastocystis* spp. in water samples collected from Yesilirmak River and Tersakan Stream. Symposium on Euroasian Biodiversity 2016;p.480.
19. Koloren Z, Gülabi BB: Investigation of *Blastocystis* spp. in sea water samples collected from Sinop Province by Polymerase chain reaction. Symposium on Euroasian Biodiversity; 2016;p.349.
20. Doğan N, Demirustu C, Aybey A. The prevalence of intestinal parasites according to the distribution of the patients' gender and parasite species for five years at the Osmangazi University Medical Faculty. Türkiye Parazit Derg 2008;32:1205.
21. Köksal F, Baslantı I, Samasti M. A retrospective evaluation of the prevalence of intestinal parasites in Istanbul, Turkey. Türkiye Parazit Derg 2010;34:166-71.
22. Inceboz T, Usluca S, Over L, Yalçın G, Tuncay S, Ozkoç S. The epidemiology research of *Blastocystis hominis* in the Dokuz Eylül University Medical Faculty Hospital between 2005 and 2009. Turk J Parasitol 2011;35:72-6.
23. Gülmez D, Sarıbaş Z, Akyön Y, Ergüven S. The results of Hacettepe university faculty of medicine parasitology laboratory in 2003-2012: evaluation of 10 years. Türkiye Parazit Derg 2013;37:97-101.
24. Duzyol D, Kilimcioglu AA, Ozyurt Cengiz B, Ozkan H, Girginkardeşler N. Incidence of intestinal parasites detected in the department of parasitology in Celal Bayar University Hospital between 2006 and 2010. Türkiye Parazit Derg 2012;36:147-51.
25. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H: Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. Parasitology 2003;126:1-9.
26. Noel C, Peyronnet C, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Sogin ML, et al. Phylogenetic Analysis of *Blastocystis* Isolates from Different hosts based on the comparison of Small-Subunit rRNA Gene Sequences. Mol Biochem Parasitol 2003;126:119-23.
27. Stensvold CR, Alfellani MA, Norkov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. Int J Parasitol 39;4:473-9.
28. Santin M, Gómez-Munoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a New PCR Protocol to Detect and Subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. Parasitol Res 2011;109:205-12.
29. Banaticla JEG, Rivera WL. Detection and subtype identification of *Blastocystis* isolates from wastewater samples in the Philippines. J Water Health 2011;9:128-37.
30. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* Subtypes a Consensus. Trends Parasitol 2007;23:93-6.
31. Meloni D, Sanci G, Poirier P, El Alaoui H, Chabé M, Delhaes L, et al. Molecular subtyping of *Blastocystis* spp. isolates from symptomatic patients in Italy. Parasitol Res 2011;109:613-9.
32. 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.
33. Karanis P, Sotiriadou I, Kartashev V, Kourenti C, Tsvetkova N, Stojanova K. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Water Supplies of Russia and Bulgaria. Environ Res 2006;102:260-71.
34. Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser 1999;41:95-8.
35. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX-Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 1997;25:4876-82.
36. National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine, Available: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>.
37. Baldruss S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks-an update 2004-2010. Water Res 2011;45:6603-14.
38. Li LH, Zhou XN, Du ZW, Wang XZ, Wang LB, Jiang JY, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. Parasitol Int 2007;56:281-6.
39. Leelayoova S, Siripattanapong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, et al. Drinking Water: A Possible Source of *Blastocystis* spp. Subtype 1 Infection in School children of a Rural community in Central Thailand. Am J Trop Med Hyg 2008;79:401-6.
40. Lee IL, Tan TC, Tan PC, Nanthiney DR, Biraj MK, Surendra KM, et al. Predominance of *Blastocystis* spp. subtype 4 in rural communities, Nepal. Parasitol Res 2012;110:1553-62.
41. Richard RL, Ithoi I, Abd Majid MA, Wan Sulaiman WY, Tan TC, Nissapatorn V, et al. Monitoring of Waterborne Parasites in Two Drinking Water Treatment Plants: A Study in Sarawak, Malaysia. Int J Environ Res Public Health 2016;28:13.
42. Noradilah SA, Lee IL, Anuar TS, Salleh FM, Abdul Manap SN, Mohd Mohtar NS, et al. Occurrence of *Blastocystis* spp. in water catchments at Malay villages and Aboriginal settlements during wet and dry seasons in Peninsular Malaysia. Peer J 2016;4:e2541.