

Blastocystis hominis Kistlerinin Tanısında Farklı Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Comparison of Different Staining Methods for Detecting *Blastocystis hominis* Cysts

Dr. Gülter YALÇIN^a
Dr. Songül BAYRAM DELİBAŞ^a

^aParazitoloji AD,
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
İzmir

Geliş Tarihi/Received: 09.07.2008
Kabul Tarihi/Accepted: 31.10.2008

Bu çalışma, 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi (18-25 Eylül 2005, İzmir)'nde poster olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Gülter YALÇIN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Parazitoloji AD, İzmir,
TÜRKİYE/TURKEY
gultey.yalcin@deu.edu.tr

ÖZET Amaç: *Blastocystis hominis* (*B. hominis*) insanlarda en sık görülen aynı zamanda yaygın hayvan konağı da olan intestinal bir protozoondur. Geniş coğrafik dağılımı olan *B. hominis*, literatürde daha çok üç formu ile gösterilmiş polimorfik bir organizmadır. Parazitin bulaş formu olduğu öne sürülen, morfolojik olarak ayrı bir kist formu yakın zamanda tanımlanmıştır. Çalışmamızın amacı, farklı dışkı boyama yöntemleri ile *B. hominis* kistlerinin tanımlanmasıdır. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada nativ-lugol ve trichrome sonrası *B. hominis*'in herhangi bir formuna rastladığımız 31 dışkı örneği çalışma kapsamına alındı. Dışkı örnekleri "Ficoll-Paque" konsantrasyon yöntemi sonrası "alcian blue" ve toluidin boya ile boyanarak, örneklerde *B. hominis* kistleri arandı. **Bulgular:** Çalışmamızda semptomu sorgulanan hastalardan %70.6'sının ishal, karın ağrısı, mide bulantısı gibi gastrointestinal sisteme ait şikâyetleri bulunmakta idi. Boyutları 3-10 µm arasında değişen kistlerin trichrome boyası ile yuvarlak veya oval, kırmızı-mor, toluidine ile koyu mavi ve kist çeper boyası olan alcian ile pembe olarak boyandıkları görüldü. *B. hominis* kistlerinin varlığı değerlendirildiğinde, trichrome boyası ile %96.6, toluidine boyası ile %84.6 ve alcian boyası ile %76 oranında *B. hominis* kistlerine rastlandı. Bir dışkı örneğinde yöntemlerin hiçbirisiyle kiste rastlanmadı. **Sonuç:** Bu çalışma ile *B. hominis* kistlerinin konsantrasyon sonrası çeşitli boyama yöntemleriyle tanınabileceğini gördük. Ayrıca, çalışmamızda kist formlarının büyük oranlarda diğer formlara eşlik ettiğini ortaya koyduk. Bu çalışma *B. hominis*'in doğada varlığını sürdürmesini sağlayan kist formunun tanımlanmasına yönelik ülkemizde yapılan ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: *Blastocystis hominis*; protozoon

ABSTRACT Objective: *Blastocystis hominis* (*B. hominis*) is the most common intestinal parasite in humans and is also present in a wide range of animal hosts. *B. hominis* is a polymorphic organism that can be seen in a wide geographic distribution, and it is mostly detected by three morphologic forms. Cystic stage that supposed to be the infective form of the parasite was confirmed and described recently. The aim of the present study is to identify the *B. hominis* cyst using the different staining methods. **Material and Methods:** Thirty one stool samples with *B. hominis* which was detected by saline-iodine or trichrome staining method were included in the study. Alcian blue and toluidine blue stained smears, prepared after the Ficoll-Paque concentration method, were examined for the *B. hominis* cysts. **Results:** 70.6% of the patients had complaints as diarrhea, abdominal pain and nausea. The cystic stages were generally measured as 3-10 µm. Cysts were spherical or ovoid and they were stained red-pink with trichrome staining, royal blue with toluidine blue, and stained pink with alcian blue. We determined the presence of *B. hominis* cysts 96.6% with trichrome, 84.6% with toluidine blue and 76.0% with alcian blue staining. In one of the stool samples no cystic stage was observed with any of the staining methods. **Conclusion:** As a result, in this study we showed that *B. hominis* cystic stages could have been detected by diverse staining methods after the concentration technique. We also showed that the cystic stages mostly accompany other forms. This is the first study in our country that isolated and recognized the cystic stage of the *B. hominis* which is the resistant form of the parasite that maintains the survival of the parasite in the environment.

Key Words: *Blastocystis hominis*; protozoa

Blastocystis hominis insanlarda ilk olarak 1912 yılında Brumpt tarafından bildirilmiş yaygın hayvan konağı da olan intestinal bir protozondur.¹ Gelişmekte olan ülkelerdeki %50 prevalansıyla dünyada en sık görülen insan bağırsak protozoonudur.² Bölgelerin sosyo ekonomik ve sosyokültürel durumları, yaşam standartları, iklim ve hijyen koşulları gibi faktörler blastocytosis prevalansında temel belirleyicilerdir.³

Enfeksiyon sıklıkla asemptomatik veya düşük patojeniteli olarak belirtilmiş, erişkin ve çocuklarda ishali hastalıklarda *B. hominis* varlığı gösterilmiştir. *B. hominis* ile ilişkilendirilen semptomlar şişkinlik, hazımsızlık, fekal lökosit ve eritrosit görülmeyen hafif ishal, abdominal ağrı ve mide bulantısıdır.⁴

B. hominis, literatürde daha çok üç formu ile gösterilmiş olmasına rağmen (vakuoler, granüler ve amoeboid), bunlardan başka kist formunun da olduğu ve bu formun bulaştan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

“Vakuoler form”, 2-200 µm arasında değişen büyüklüklerde dir. Vakuol depo fonksiyonu olduğu düşünülen ince granüler materyal içermektedir. Bu büyük yapı nedeni ile nükleus, mitokondri, golgi aparatı ve endoplazmik retikulum gibi organeller bulunan perifer sitoplazma ince bir bant şeklinde kalmaktadır. Vakuoler formdan geliştiği öne sürülen “granüler form” ise perifer sitoplazmada ya da daha çok santral vakuolde granüllerin olması dışında, vakuoler form ile birçok benzerlik göstermektedir. Parazitin “amoeboid formu” oldukça küçük (2.6-7.8 µm), oval, bir veya iki geniş psödo-podu olan, hücre membranı içermeyen bir yapı olarak tanımlanmıştır. Hücredeki lizozom benzeri yapıların içinde yutulmuş bakteriler gözlenmiştir.²

Morfolojik olarak ayrı bir “kist formu” nun tanımlanmasının göreceli olarak daha yakın zamanlı olmasının nedeni, boyutlarının küçük olması (3-5 µm) ve fekal artıklarla karışmasıdır.² Kistler çok tabakalı, kalın bir kist duvarı ile korunan yuvarlak veya oval yapılardır. İnternal selüler yapılarını, 1-4 nükleus, multipl vakuoller, glikojen ve lipid depositleri oluşturmaktadır.⁴ Olgun kistleri fibriler tabaka ile çevrilidir. *B. hominis* kistlerinde yapılan

canlılık testleri suda lizise uğramadıklarını, oda ısısında 19 güne dek canlılıklarını koruduklarını, dezenfektanlara, ekterm sıcaklık ve soğukluk derecelerine ise duyarlı olduklarını göstermiştir. Kloro dirençli kistik formun parazitin bulaş formu olduğu düşünülmektedir.^{2,5} Besiyerinde 24 s. içinde kistlerin vakuoler forma dönüşümü elektron mikroskopu ile gösterilmiştir.² Kistler, fekal materyalin “Ficoll-Paque” yöntemiyle konsantre edilmesi ve distile su ile yıkanmaları sonucunda gösterilebilmiştir.^{1,3,4}

Birçok laboratuvar *B. hominis* enfeksiyonunu dışkıdaki vakuoler ve granüler formların varlığına göre tanımlamaktadır. Oysa dışkı örneklerinde kist formlarının predominant olduğu olgular bildirilmiştir.² Bizim bu çalışmadaki amaçlarımız; *B. hominis*'in semptomlarla beraberliğini araştırmak, kist formlarının tanısında kullanılan boyama yöntemlerini karşılaştırmak ve saptanan *B. hominis* formları arasında kistlerin görülme sıklığını saptamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

DIŞKI ÖRNEKLERİ VE HASTA BİLGİLERİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Parazitoloji Laboratuvarına 20 Şubat-20 Nisan 2005 tarihleri arasında rutin koproparazitolojik bakı için başvuran ve nativ-lugol ile dışkısında *B. hominis* saptanan 31 olgunun dışkı örneği çalışmaya dahil edildi. Olgular için hazırlanan demografik bilgilerin ve semptomların sorgulandığı formlar bire bir görüşülerek dolduruldu.

YÖNTEM

Bütün örnekler, nativ-lugol ve “trichrome” boyama yöntemi sonrası ışık mikroskopunda incelendi. *B. hominis* kistlerinin varlığı “Ficoll-Paque” konsantrasyon yöntemi ardından uygulanan “alcian blue” ve “toluidine blue” boyamaları sonrasında araştırıldı.

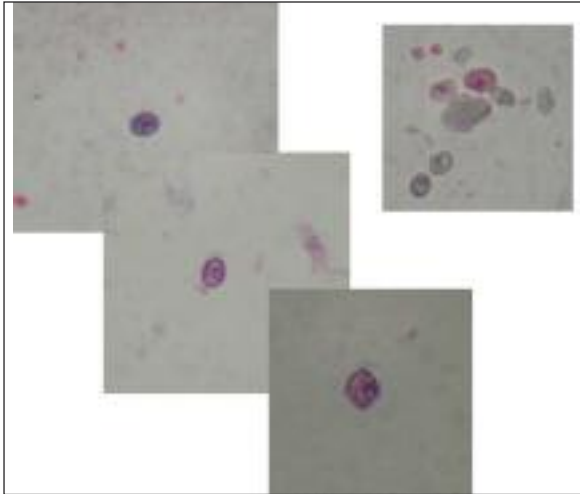
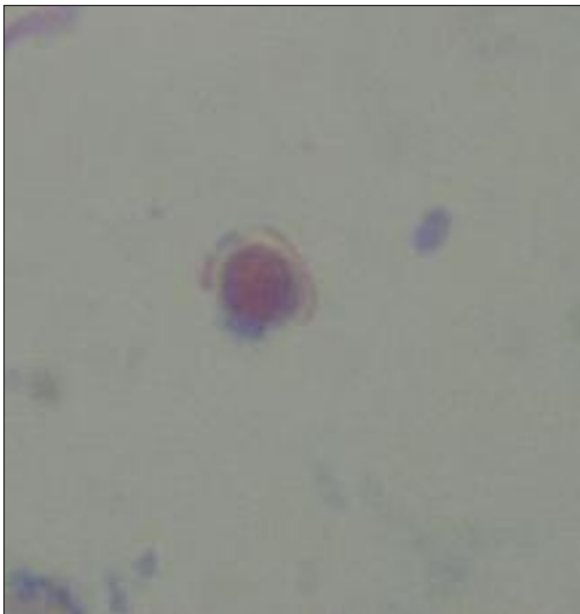
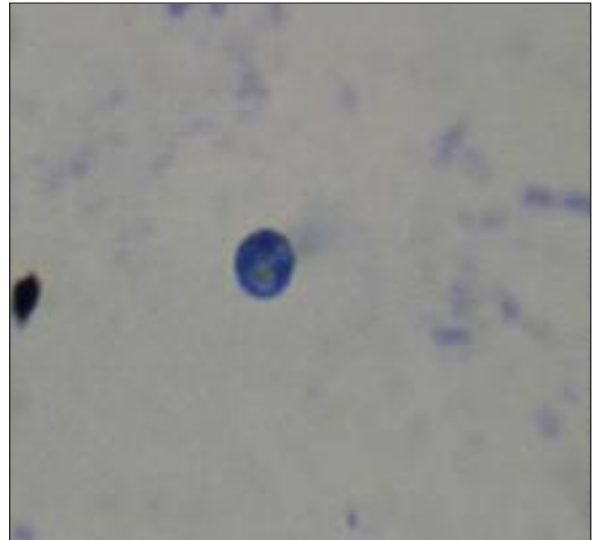
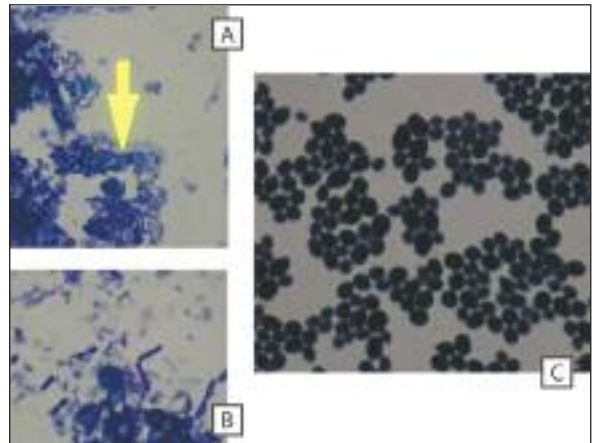
Trichrome Boyama Yöntemi (Gomori'nin Wheatley Modifikasyonu)

Hazırlanan yaymalar “Schaudin fiksati”nde en az yarım saat tutuldu. %70 etanol sonrası lamlar D'Aantoni'nin iyot solüsyonunda 1 dakika tutuldu.

TABLO 1: Örneklerin boyama özellikleri ve sonuçları.

Boyama yöntemi	Örnek sayısı	Kist rastlanan olgu sayısı	Boyama özellikleri
"Trichrome"	31	30	Kistler koyu pembe-mor nükleuslu
"Alcian blue"	26	20	Zemin kırmızı-pembe ve nükleuslar kırmızı, varsa fibriler tabaka mavi çeper şeklinde
"Toluidine blue"	24	20	Zemin açık mavi, nükleuslar koyu mavi

%70 etanolde 5 ve 3'er dakikadan sonra 10 dakika trichrome boyasında tutuldu. Sonra %90 asetik asit ve %100 etil alkolde çalkalanan lamalar ksilen sonrası kurutuldu, ışık mikroskopunda incelendi.

**RESİM 1:** "Trichrome" boyama sonrası *B. hominis* kistleri (10x100 büyütmede).**RESİM 2:** "Alcian blue" boyama sonrası fibriler tabaka ile çevrili *B. hominis* kisti (10x100 büyütmede).**RESİM 3:** "Toluidine blue" ile boyama sonrası 3 nükleuslu *B. hominis* kisti (10x100 büyütmede).**RESİM 4:** *B. hominis* kistlerinin kültürdeki maya hücreleri ile Gram boyama farklılıkları (10x100 büyütmede). (A, B: Çoklaştırma sonrası kistik yapılar, C: Maya hücreleri).

"Ficoll-Paque" Konsantrasyon Yöntemi

Zaman ve Khan'ın "Ficoll-Paque" modifiye konsantrasyon yöntemi ile ceviz büyüklüğünde dışkı 2 kat musluk suyu ile karıştırıldı, süzüldü, 3 kez 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldıktan sonra sediment 3 mL "ficoll" üzerine ta-

bakalandırıldı, 3500 rpm'de 30 dakika santrifüj sonrası yüzeyin 1-2 cm altında biriken hücreler alındı ve distile suda süspanse edilerek, 2000 rpm'de 3 kez yıkandı. Sediment lam üzerine yayılarak "alcian blue" ve "toluidine blue" boya-ları uygulandı.⁶

"Alcian Blue" Boyama Yöntemi

Çoklaştırma yöntemi sonrası oluşturduğumuz yay-malar, 1 g "alcian blue" ve %3'lük asetik asit karı-şımında 5 dakika tutuldu, distile suda yıkandıktan sonra 0.1 g "nuclear fast red" ve 2.5 g alüminyum sülfat ile oluşturulan %0.1 konsantrasyondaki "nuclear fast red" boyasında 5 dakika tutuldu, dis-tile suda yıkanıp %96'lık alkolde 5 dakika tutuldu, ışık mikroskobunda incelendi.⁷

"Toluidine Blue" Boyama Yöntemi

%1 sodium borate ve %1 "toluidine blue" karıştı-rıldı, süzüldü, hazırlanan yayma bu boyada 5 da-kika tutuldu, distile su ile yıkanıp %96'lık alkolde 5 dakika tutuldu, ışık mikroskobunda incelendi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 31 olgunun 17'sinin semp-tom sorgulanması yapıldı ve %76.4'ünün ishal, karın ağrısı, mide bulantısı gibi semptomlarla has-taneye başvurdıkları öğrenildi. Olguların 11 (%64)'inde ishal, 7 (%41.7)'sinde karın ağrısı, 5 (%29.4)'inde mide bulantısı ve kusma, 2 (%11.7)'sinde ise şişkinlik ve gaz şikâyetlerinin ol-duğu öğrenildi. Üç (%17.6) olguda bu 4 semptom birlikte görülürken, 4 (%23.6) olguda herhangi bir semptomu rastlanmadı.

Otuz bir olgunun 31'ine "trichrome", 26'sına "alcian blue" ve 24'üne "toluidine blue" boyama yöntemleri uygulandı. Uygulanan boyama yön-temlerine sırasıyla, olguların 30, 20 ve 20'sinde *B. hominis* kistlerine rastlandı. Örneklerin sonuçları ve boyama özellikleri Tablo 1'de görülmektedir.

"Trichrome" ile kistler koyu pembe-mor nükleuslu olarak boyandı (Resim 1).

"Alcian blue" ile zemin kırmızı-pembe ve nükleuslar kırmızı, varsa fibriler tabaka mavi çeper şeklinde boyandı (Resim 2). "Toluidine blue" ile

de zemin açık mavi, kist nükleusları koyu maviye boyandı (Resim 3).

"Trichrome" boyası ile 30 (%96), "toluidine blue" boyası ile 20 (%84) ve "alcian blue" boyası ile 20 (%76) örnekte *B. hominis* kistlerine rastlandı. Bir dışkı örneğinde yöntemlerin hiçbirisiyle kiste rastlanmadı. Bir olguda "Ficoll-Paque" sonrası elde ettiğimiz pelleti ayrıca Gram boyayarak, Gram bo-yanmış olan kültür maya hücreleri ile karşılaştırdık, elde ettiğimiz kistik yapılar maya görüntüleri ile benzer değildi (Resim 4).

TARTIŞMA

Son yıllarda yayınlanan araştırmalarda *B. homi-nis*'in en sık rastlanan parazitlerden biri olduğu gö-rülmekte olup, 2003-2004 yıllarını kapsayan süre içinde Dokuz Eylül Üniversite Hastanesine dışkıda parazit aranması için başvuran olgularda *B. homi-nis* görülme sıklığı %2.82 olarak saptanmıştır.⁸ *B. hominis* görülme sıklığının, bölgeler arasındaki sosyo-kültürel ve ekonomik farklılıklarla ilgili ol-duğu ancak patojenite kriteri olarak beş ve üzeri or-ganizmanın rapor edilmesinin sonuçları etkilediği düşünülmektedir.⁹

Üner ve ark.nın yaptığı çalışmada 92 olgudan 41'inde *B. hominis* tek parazit olarak saptanmış, bu olgulardan 30'u ile görüşülebilmiş, 17'sinde her-hangi bir semptomun bulunmadığı, 13 kişide ise karın ağrısı, ishal, kabızlık, ateş, diş gıcırdatması, gaz, bulantı, kusma gibi semptomların olduğu be-lirtilmiştir.¹⁰ Tropikal ülkelerden dönen 795 Alman turistten alınan dışkı örneğinde semptomları olan-ların %10.8'inde, asemptomatik olanların da %5.2'sinde *B. hominis*'e rastlanmıştır.¹¹ "Tokyo In-ternational Hospital Centre" a rutin muayene için başvuran 6400 kişiden alınan dışkı örneklerinde %0.5 sıklıkta *B. hominis* saptanmış olup bunların da %7'sinin semptomatik olduğu bildirilmiştir.¹² Çalışmamızda semptomu sorgulanabilmiş olguların %76.47'sinin ishal, karın ağrısı, mide bulantısı gibi semptomlarının olduğu görülmüştür. Olguların %64'ünde ishal, %41.7'sinde karın ağrısı, %29.4'ünde mide bulantısı ve kusma, %11.7'sinde ise şişkinlik ve gaz şikâyetlerinin olduğu, olguların %17.6'sında bu dört semptom birlikte görülürken, %23.6'sında herhangi bir şikâyete rastlanmamıştır.

Ok ve ark. pozitif buldukları 100 *B. hominis* olgusundan 49'unda (%49) trichrome boyama yöntemi ile teşhis ettikleri parazitleri nativ-lugol yöntemi ile bulamadıklarını açıklamışlardır.¹³ Üner ve ark.nın çalışmasında da 92 *B. hominis* olgusunun %34.7'sinde "trichrome" yöntemi ile bulunan parazitlerin nativ-lugol yöntemi ile görülemediği belirtilmiştir.¹⁰ Çalışmaya aldığımız olgulardan "trichrome" boyamada *B. hominis* formları rastlanan 6 (%19.35) olgunun nativ-lugol bakısında parazite rastlanmamıştır. Bu sonuçlar dışkıda parazit aranırken trichrome gibi kalıcı dışkı boyamalarının rutin olarak her örnek için uygulanmasının ve laboratuvar şartlarının buna göre ayarlanmasının önemini vurgulamaktadır.

Son 10 yılda gerek ultrasüruktürel gerek faz kontrast mikroskopi, ışık mikroskobu, flow cytometry yöntemleri ile yapılan çalışmalar ile *B. hominis* kist varlığı kesinleştirilmiş ve çeşitli çalışmalarda uygulanan hayvan inokülasyonları ile *B. hominis* kistlerinin eksternal geçişten sorumlu tutulduğu ve geçişin fekal-oral olarak gerçekleştiği görüşü önem kazanmıştır.^{1,5,6} Zaman tarafından 1997 yılında Karachi'deki Aga Khan Üniversitesi'ne başvuran olguların dışkılarından yapılan çalışmada, ışık mikroskobunda "alcian blue" boyama yöntemi kullanılarak, *B. hominis* kistleri, sık görülen diğer protozoon kistleri ile karşılaştırılmış ve farklılıkları gösterilmiştir.¹⁴ Suresh ve ark.nın yaptığı bir çalışmada elde edilen *B. hominis* pozitif olguların %20.5 (8/39)'inde "Ficoll-Paque" konsantrasyon yöntemiyle *B. hominis* kistleri saptanmıştır.³ Moe ve ark. beş yıldır blastocytosis enfeksiyonu olan olgunun dışkısından "Ficoll-Paque" konsantrasyon yöntemiyle elde edilen kistleri BALB/c farelerinde kullanarak yaptıkları bir çalışma sonucunda, dışkının direkt bakısında, yuvarlak ve oval 4-5 µm büyüklüğünde, bazen fibriler tabaka ile çevrelenmiş olarak kistler görülmüş, çekumda genellikle vakuoler ve granüler formlarının olduğu, kistik formların sadece kolonda bulunduğu bildirilmiştir.¹⁵ Aynı araştırma-

cılar "Ficoll-Paque" konsantrasyon yöntemiyle elde ettikleri kistlerin canlılıklarını araştırdıkları diğer bir çalışmada kistleri -20°C'de 24 saatte kaybettiklerini, 40-50°C'de canlı kalamadıklarını, 4°C ve oda sıcaklığında kuru ortamda 3 gün yaşayabildiklerini, %2.5 potasyum dikromatta 2 hafta tutulduğunda canlı kist kalmadığı bildirmişlerdir.⁶ Yapılan bir eksistasyon çalışmasında da kistler "Ficoll-Paque" konsantrasyon yöntemiyle elde edilmiştir.¹⁶ Tüm bu çalışmalarda vurgulandığı üzere patojenite kriteri olarak x40 büyütmede her sahada 5 ve üzeri parazitin alınması, kist formunun eksternal geçişteki önemini göz ardı edilmesi ve bu form ile ilgili rutinde kullanılabilir pratik bir tanı yönteminin olmayışı parazitin yayılımını arttırmakta ve dışkıda en sık görülen parazit olmasına yol açmaktadır. Bizim çalışmamızda *B. hominis* kist formunun varlığına dikkat çekmek için çoklaştırma sonrası uygulanan boya yöntemlerinde elde edilen sonuçlar rutin kullanılan "trichrome" boyama yönteminde elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. Çoklaştırma sonucunda elde edilen görüntüler, rutinde kullanılan "trichrome" boyama preparatlarında da aranmıştır. "Ficoll-Paque" çoklaştırma yöntemi sonrası uygulanan "toluidine" boyama ile %84.41 (22/26) ve "alcian" boyama ile %76.16 (19/24) oranında *B. hominis* kistlerine rastlanmıştır, bu yapıları "trichrome" boyalı preparatlarda %96.6 (30/31) oranında görülmüştür.

SONUÇ

Bu çalışma ile *B. hominis* kistlerinin konsantrasyon sonrası çeşitli boyama yöntemleriyle tanınabileceği ve kist formlarının büyük oranlarda diğer formlara eşlik ettiği saptanmıştır. Rutin koproparazitolojik bakıda, bulaş nedeni olan kist formlarının saptanmaması ve tedavinin ise sadece, her sahada 5 ve üzeri parazit görülmesi durumunda verilmesinin hastalığın yayılmasına neden olabileceği ve bunun da halk sağlığı açısından olumsuz bir durum olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Chen XQ, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Yap EH. In vitro encystation and excystation of *Blastocystis ratti*. *Parasitology* 1999;118 (Pt 2):151-60.
2. Tan KS, Singh M, Yap EH. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *Int J Parasitol* 2002;32(7):789-804.
3. Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(6):509-11.
4. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev* 1996;9(4):563-84.
5. Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamamari K, Iwatani S, Kimata I. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol Res* 2004;94(6):391-6.
6. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Ng GC, et al. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol Res* 1996;82(5):439-44.
7. Çabuk M. [Some Histochemical Staining Methods]. In: Küpeliöğlu A, Pabuççuoğlu U, eds. *Patoloji ve Sitopatoloji Laboratuvar Teknikleri*. 1st ed. İzmir: DEU Sağlık Meslek Yüksek Okulu Yayınları. DEU Press; 1995. p.77, 85.
8. Usluca S, Yalçın G, Over L, Tuncay S, Sahin S, Inceboz T, ve ark. [The distribution of intestinal parasites detected in the Dokuz Eylül University Medical Faculty Hospital between 2003 and 2004]. *Türkiye Parazitol Derg* 2006; 30(4):308-12.
9. Erçevik EH, İdil A. [Prevalence of intestinal parasites and associated factors of this in two primary school which have different socioeconomic level]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22(2):113-8.
10. Üner A, Ertuğ S, Yurdagül C, Ertabaklar H, Akisü Ç. [Prevalence of *Blastocystosis* in İzmir and its Surroundings]. *Türkiye Parazitol Derg* 1999;23 (3):247-50.
11. Jelinek T, Peyerl G, Löscher T, von Sonnenburg F, Notthdurft HD. The role of *Blastocystis hominis* as a possible intestinal pathogen in travellers. *J Infect*. 1997;35(1):63-6.
12. Horiki N, Maruyama M, Fujita Y, Yonekura T, Minato S, Kaneda Y. Epidemiologic survey of *Blastocystis hominis* infection in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56(4):370-4.
13. Ok ÜZ, Korkmaz M, Ok E, Özkan AT, Ünsal A, Özcel MA. [Comparison of Saline-Lugol, Formaline-Ether Concentration, and Trichrome Staining Procedures for Diagnosis of Intestinal Protozoa]. *Türkiye Parazitol Derg* 1996;20(1):75-82.
14. Zaman V. The differential identification of *Blastocystis hominis* cysts. *Ann Trop Med Parasitol* 1998;92(2):233-5.
15. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol Res* 1997;83(4):319-25.
16. Zaman V, Zaki M, Manzoor M, Howe J, NgM. Postcystic development of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 1999;85(6):437-40.