



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**İMMÜN YETERLİ VE İMMÜN YETMEZLİKLİ
İSHALLİ OLGULARDA GÖZDEN KAÇAN
PROTOZoonLARIN KONVANSİYONEL VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

FAKHRİDDİN SARZHANOV

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2020



**İMMÜN YETERLİ VE İMMÜN YETMEZLİKLİ İSHALLİ OLGULARDA
GÖZDEN KAÇAN PROTOZoonLARIN KONVANSİYONEL VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Fakhriddin SARZHANOV

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2020

Fakhriddin SARZHANOV tarafından hazırlanan “İMMÜN YETERLİ VE İMMÜN YETMEZLİKLİ İSHALLİ OLGULARDA GÖZDEN KAÇAN PROTOZOONLARIN KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından **OY BİRLİĞİ** ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Funda DOĞRUMAN AL

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

.....

Başkan: Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Gülay AKARSU

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Meltem YALINAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hitit Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Ayşe Esin AKTAŞ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 29/06/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Fakhriddin SARZHANOV

29.06.2020

İMMÜN YETERLİ VE İMMÜN YETMEZLİKLİ İSHALLİ OLGULARDA GÖZDEN KAÇAN PROTOZOONLARIN KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Fakhriddin SARZHANOV

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2020

ÖZET

Gastrointestinal semptomları olan olgularda *Blastocystis* ve *Dientamoeba fragilis* (*D. fragilis*)'in klinik önemi tartışmalı konulardan birisidir. Bu protozoonların patojenitesi tam olarak aydınlatılamadığı için çoğu rutin laboratuvar ve klinisyen tarafından ihmal edilen bir yaklaşım bulunmaktadır. Bu çalışmada immün yeterli (kadın: 99, erkek: 94, yaş ortalaması-standart sapma: 43,88±17,53) ve immün yetmezlikli (kadın: 136, erkek: 109, yaş ortalaması-standart sapma: 52,58±16,05) ishalleri hastaların dışkı örneklerinde *Blastocystis* ve *D. fragilis*'in görülme sıklığının konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi, *Blastocystis* alt türlerinin Yeni Nesil Dizi analizi (NGS) yöntemi kullanılarak saptanması amaçlanmıştır. Çalışmamıza toplam 245 immün yetmezlikli ve 193 immün yeterli hastaya ait toplam 438 örnek dahil edilmiştir. Tüm dışkı örnekleri direkt mikroskopik (Serum fizyolojik, Lugol) Formol-eter konsantrasyon tekniği, Trikom boyama, kültür ve moleküler yöntemlerle incelenmiştir. Çalışmamızda *Blastocystis* prevalansı %15,5, *D. fragilis* prevalansı ise %11,9 olarak saptanmıştır. *Blastocystis* ve *D. fragilis* prevalansı immün yetmezlikli hastalarda (sırasıyla %11,4 ve %10,6) immün yeterli olan hastalara (%20,7 ve %13,5) göre daha düşük bulunmuştur. *Blastocystis* prevalansı için her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($\chi^2=7,07$, $p=0,008$) saptanırken *D. fragilis* için istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. *Blastocystis* enfeksiyonu iki grup arasında erkeklerde kadınlara göre anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir ($\chi^2=6,83$, $p=0,01$). Toplam 68 *Blastocystis* izolatının NGS analiziyle alt tür analizi yapılmış ve alt tür dağılımı: ST3 %54,4 (n=37), ST2 %16,2 (n=11), ST1 %4,4 (n=3), ST6 %2,9 (n=2), ST4 %1,5 (n=1), ST2/ST3 %11,8 (n=8) ve ST1/ST3 %8,8 (n=6) şeklinde bulunmuştur. İki grup arasında *Blastocystis* alt tür dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark sadece miks alt türlerde saptanmış ($\chi^2=4,43$, $p=0,04$) ve immün yeterlilerde daha yüksek sıklıkta belirlenmiştir. İmmün yetmezlikli kadınlarda *Blastocystis* döngü eşiği (Ct) ortalaması immün yeterli kadınlara göre daha düşük bulunmuş dolayısıyla parazit yükü daha yüksek tespit edilmiştir ($p=0,04$). Her iki hasta grubunda da *Blastocystis* ve *D. fragilis* enfeksiyonunun yüksek prevalansta saptanması ishalleri olgularda bu etkenlerin gözönünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 1039

Anahtar Kelimeler : *Blastocystis*, *Dientamoeba fragilis*, ishal, immün yetmezlik, tanı, Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu, alt tür, Yeni Nesil Dizi analizi

Sayfa Adedi : 142

Danışman : Prof. Dr. Funda DOĞRUMAN AL

THE INVESTIGATION OF NEGLECTED PROTOZOANS IN IMMUNOCOMPETENT AND IMMUNODEFICIENT DIARRHEAL PATIENTS USING BY BOTH CONVENTIONAL AND MOLECULAR METHODS

(Ph. D. Thesis)

Fakhriddin SARZHANOV

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

June 2020

ABSTRACT

The clinical significance of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* in patients with gastrointestinal symptoms is a controversial issue. Since the pathogenicity of these protozoans cannot be fully elucidated, there is an approach neglected by most routine laboratories and clinicians. This study aimed to determine the prevalence of *Blastocystis* and *D. fragilis* using conventional and molecular methods and identify *Blastocystis* subtypes using the next-generation sequencing (NGS) method in the diarrheic stool samples of immunodeficient and immunocompetent patients. A total of 438 samples of 245 immunodeficient (female: 136, male: 109, mean age-standard deviation: 52,58±16,05 years) and 193 immunocompetent (female: 99, male: 94, mean age-standard deviation: 43,88±17,53 years) patients were included. All stool samples were examined by direct microscopy (serum physiologic, Lugol's staining), formalin-ether concentration technique, and trichrome staining, culture and molecular methods. In our study, the prevalence of *Blastocystis* was detected as 15,5%, and that of *D. fragilis* was 11,9%. The prevalence of *Blastocystis* and *D. fragilis* was lower in immunodeficient patients (11,4% and 10,6%, respectively) compared to the immunocompetent patients (20,7% and 13,5%, respectively). While there was a statistically significant difference ($\chi^2=7,07$, $p=0,008$) between the two groups for the *Blastocystis* prevalence, no statistically significant difference was found for *D. fragilis*. The rate of *Blastocystis* infection was significantly higher among males than females in both groups ($\chi^2=6,83$, $p=0,01$). A subtype analysis was performed by NGS on 68 *Blastocystis* isolates, which revealed the subtype distribution as follows: ST3 54,4% (n=37), ST2 16,2% (n=11), ST1 4,4% (n=3), ST6 2,9% (n=2), ST4 1,5% (n=1), ST2/ST3 11,8% (n=8) and ST1/ST3 8,8% (n=6). There was a statistically significant difference in the distribution of *Blastocystis* subtypes between the two groups only for mixed subtypes ($\chi^2=4,43$, $p=0,04$), which was determined at a higher rate among the immunocompetent patients. The mean of *Blastocystis* cycle threshold (Ct) was found to be lower in women with immunodeficiency compared to immunocompetent women; thus, the parasite load was higher in the former ($p=0,04$). The detection of *Blastocystis* and *D. fragilis* infection at high prevalence in both patient groups shows that these factors should be considered in cases with diarrhea.

Science Code : 1039

Key Words : *Blastocystis*, *Dientamoeba fragilis*, diarrhea, immunodeficiency, diagnostic, Real time Polymerase Chain Reaction, Next Generation Sequencing

Page Number : 142

Advisor : Prof. Funda DOĞRUMAN AL, MD

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın en başından sonuna kadar planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde emeklerini esirgemeyen, değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım başta tez danışmanım Prof. Dr. Funda DOĞRUMAN AL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışmayı destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje kod no: 01/2017-15) ve yöneticilere teşekkür ederim.

Değerli bilgi ve birikimlerini bizlerle paylaşan Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD'nin saygıdeğer akademisyenleri Sayın Prof. Dr. Nedim SULTAN, Sayın Prof. Dr. Meltem YALINAY, Sayın Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR ve Sayın Prof. Dr. Ayşe KALKANCI, Sayın Prof. Dr. Gülendamar BOZDAYI ve Sayın Prof. Dr. Işıl FİDAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Türkiye'de doktora yapmama vesile olan Sayın Prof. Dr. Musa YILDIZ hocama ve tüm Ahmet Yesevi Üniversitesi Mütevelli Heyet Başkanlığı çalışanlarına ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Doktora yapma sürecinde birlikte çalıştığım laboratuvar sorumluları Kenan YÜCE, Berrin ÖZTÜRK'e ve isimlerini sayamadığım laboratuvar da görevli tüm çalışma arkadaşlarıma minnettarım.

Her zaman iyi dilekleri ve hayır dualarıyla bana güç veren sevgili anneme, babama ve kardeşlerime, çalışma ortamımı hazırlayan ve her zaman destek olan eşime, minik kalpleriyle ve neşeleriyle manevi desteklerini sunan çocuklarıma çok teşekkür ederim.

Üniversitede tanıştığım, birlikte çalıştığım, beraber okuduğum ve anılar biriktirdiğim tüm arkadaşlarıma samimiyetlerinden dolayı teşekkür eder, başarılar dilerim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Blastocystis</i>	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Sınıflandırma	5
2.1.3. Morfolojisi ve biyolojik özellikleri	6
2.1.4. Yaşam döngüsü ve bulaş yolları	9
2.1.5. Genetik çeşitliliği	11
2.1.6. Patogenezi	13
2.1.7. Epidemiyolojisi ve alt tür dağılımı	16
2.1.8. Klinik hastalık	20
2.1.9. Tanı	21
2.1.10. Tedavi	26
2.1.11. <i>Blastocystis</i> 'in güncel durumu– <i>Blastocystis</i> ile intestinal mikrobiyota ilişkisi	28
2.2. <i>Dientamoeba fragilis</i>	29
2.2.1. Tarihçe	29
2.2.2. Sınıflandırma	30

	Sayfa
2.2.3. Morfolojisi ve biyolojik özellikleri	32
2.2.4. Yaşam döngüsü ve bulaş yolları.....	37
2.2.5. Genetik çeşitliliği.....	39
2.2.6. Patogenezi	40
2.2.7. Epidemiyolojisi.....	41
2.2.8. Klinik hastalık	46
2.2.9. Tanı	47
2.2.10.Tedavi	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	53
3.1. Gereçler	53
3.1.1. Cihazlar	53
3.1.2. Reaktifler ve kimyasallar	54
3.2. Yöntemler	55
3.2.1. Dışkı örneklerinin toplanması ve saklanması	55
3.2.2. Direkt mikroskopik inceleme	56
3.2.3. Formol eter çöktürme yöntemi	56
3.2.4. Boyama yöntemleri.....	58
3.2.5. Kültür yöntemleri	63
3.2.6. Moleküler yöntemler	64
3.2.7. <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> real time PCR için optimizasyon çalışmaları	67
3.2.8. Real time PCR çalışma protokolü.....	68
3.2.9. <i>Blastocystis</i> alt türlerinin belirlenmesi için Yeni Nesil Dizi analizi	70
3.2.10.İstatistiksel analiz	71
4. BULGULAR.....	73
4.1. Hasta Gruplarının Özellikleri	73
4.2. Hasta Gruplarında Farklı Yöntemlerle Tanımlanan Enterik Parazitlere Ait Bulgular	75

	Sayfa
4.3. Tanıda Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması	77
4.4. Real time PCR Bulguları	79
4.5. <i>Blastocystis</i> Alt Türlerinin Yeni Nesil Dizi Analizi Sonuçları	81
4.6. <i>Blastocystis</i> Alt Tür İçi Değişkenliği	83
4.7. <i>Blastocystis</i> Alt Türlerinin Filogenetik Analizi	84
4.8. Hasta Gruplarındaki <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in Cinse, Yaşa ve Mevsime Göre Dağılımına Ait Bulgular	85
4.9. <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> Pozitif Saptanan İmmün Yeterli ve Yetmezlikli Olguların Kliniklere Göre Dağılımına Ait Bulgular.....	87
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	103
KAYNAKLAR	107
EKLER.....	139
EK-1. Etik Kurul Raporu	140
ÖZGEÇMİŞ.....	142

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Blastocystis</i> 'in günümüzde geçerli olan sınıflandırması.....	6
Çizelge 2.2. İnsanlar ve hayvanlarda tespit edilen <i>Blastocystis</i> alt türleri	12
Çizelge 2.3. Farklı ülkelerdeki insanlarda izole edilen <i>Blastocystis</i> prevalansı	17
Çizelge 2.4. <i>Blastocystis</i> enfeksiyonun tedavi için kullanılan antimikrobiyal ajanlar listesi.....	27
Çizelge 2.5. <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in günümüzde geçerli olan sınıflandırması	31
Çizelge 2.6. <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in organellerinin özellikleri	37
Çizelge 2.7. Farklı ülkelerdeki insanlardan izole edilen <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in prevalansı	41
Çizelge 2.8. <i>Dientamoeba fragilis</i> DNA'nın çoğaltılması için geleneksel, nested ve real time PCR testlerinde kullanılan primer ve problemleri	49
Çizelge 2.9. <i>Dientamoeba fragilis</i> hedef geni içeren, ticari olarak temin edilebilen PCR kitleri	50
Çizelge 2.10. <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in tanı yöntemlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü.....	51
Çizelge 2.11. <i>Dientamoeba fragilis</i> enfeksiyonun tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlar listesi.....	51
Çizelge 3.1. Trikróm boyama solüsyonlarını değiştirme sıklığı	61
Çizelge 3.2. <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> real time PCR için kullanılan primer-prob oligonükleotid dizileri.....	66
Çizelge 3.3. <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> real time PCR için reaksiyon karışımı	67
Çizelge 3.4. Real time PCR için kullanılan amplifikasyon protokolü	68
Çizelge 3.5. <i>Blastocystis</i> 'in Yeni Nesil Dizi analizi ile alt tür belirlenmesinde kullanılan oligonükleotidler	70

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Çalışmamıza dahil edilen hastaların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımı	73
Çizelge 4.2. Çalışmamıza dahil edilen hastaların mevsime göre dağılımı	75
Çizelge 4.3. İmmün yetmezlikli ve immün yeterli ishallerli hastalarda saptanan enterik protozoonların dağılımı	76
Çizelge 4.4. <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in pozitifliğinin farklı tanı yöntemlerine göre dağılımı	77
Çizelge 4.5. Real time PCR ile saptanan <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> pozitifliğinin konvansiyonel yöntemler ile karşılaştırılması	78
Çizelge 4.6. Hasta gruplarında <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> için real time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde SF, Lugol, FECT, TB ve kültür yöntemlerinin karşılaştırılması	79
Çizelge 4.7. <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> real time PCR Ct değerlerinin ortalaması	80
Çizelge 4.8. Yeni Nesil Dizi analizi ile tanımlanan <i>Blastocystis</i> alt türlerinin immün yeterli ve immün yetmezlikli hasta gruplarına göre dağılımı	81
Çizelge 4.9. <i>Blastocystis</i> alt türlerinin hasta gruplarına göre dağılımı	82
Çizelge 4.10. Yeni Nesil Dizi analizi ile <i>Blastocystis</i> alt türlerinde saptanan benzersiz operasyonel taksonomik unitler	83
Çizelge 4.11. <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in araştırma grubundaki cinse, yaşa ve mevsime göre dağılımı	86
Çizelge 4.12. <i>Blastocystis</i> saptanan ve saptanmayan olguların kliniklere göre dağılımı	87
Çizelge 4.13. <i>Dientamoeba fragilis</i> saptanan ve saptanmayan olguların kliniklere göre dağılımı	88

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Blastocystis</i> 'in Alexeieff ve Zierdt tarafından önceki yıllarda sunulan yaşam döngülerinin orijinal çizimleri.....	9
Şekil 2.2. <i>Blastocystis</i> 'in günümüzde kabul gören en olası yaşam döngüsü ve bulaş yolu.....	10
Şekil 2.3. Dünyada <i>Blastocystis</i> alt tür dağılımı.....	13
Şekil 2.4. <i>Blastocystis</i> alt tür ST7'de tanımlanan salgısal proteinler ve virölans faktörleri	15
Şekil 2.5. <i>Blastocystis</i> ssu-rRNA geninin şematik gösterimi	26
Şekil 2.6. <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in Wenrich ve Jepps ve Dobell tarafından önceki yıllarda sunulan çizimleri	32
Şekil 2.7. <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in yaşam döngüsü ve bulaşma yolunun mevcut hipotezinin göstergesi	39
Şekil 3.1. İmmün yeterli ve immün yetmezlikli hastaların dışkı örneklerinin incelenmesinde kullanılan genel akış diyagramı.....	55
Şekil 3.2. Çöktürme yönteminin uygulama adımları.....	57
Şekil 3.3. Trikrom boyama seti ve uygulanması.	60
Şekil 3.4. Kinyoun acid-fast boyama seti ve uygulanması.	62
Şekil 3.5. Gradient real time PCR ile <i>Blastocystis</i> primerlerinin DNA'ya optimal bağlanma sıcaklığının belirlenmesi	67
Şekil 3.6. Gradient real time PCR ile <i>Dientamoeba fragilis</i> primerlerinin DNA'ya optimal bağlanma sıcaklığının belirlenmesi	68
Şekil 3.7. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>Blastocystis</i> DNA'sına ait 1/10'luk dilüsyonların amplifikasyon eğrileri	69
Şekil 3.8. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>Dientamoeba fragilis</i> DNA'sına ait 1/10'luk dilüsyonların amplifikasyon eğrileri.....	69
Şekil 4.1. Çalışmamıza dahil edilen hastaların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımları	73
Şekil 4.2. Çalışmamıza dahil edilen hastaların kliniklere göre dağılımı	74

Şekil	Sayfa
Şekil 4.3. Çalışmamıza dahil edilen hastaların mevsim ve aylara göre dağılımı.....	74
Şekil 4.4. İmmün yetmezlikli ve immün yeterli hasta gruplarındaki parazitlerin koenfeksiyon dağılımı.	77
Şekil 4.5. İmmün yetmezlikli ve immün yeterli hasta grubundaki <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> real time PCR yöntemindeki Ct değerlerinin genel toplam, cins ve yaş gruplarına göre dağılım grafiği.....	80
Şekil 4.6. Çalışma gruplarındaki <i>Blastocystis</i> alt tür dağılımı.....	82
Şekil 4.7. Çalışmamızda elde edilen <i>Blastocystis</i> gen dizilerinin kısmi filogenetik analizi	85
Şekil 4.8. <i>Blastocystis</i> ve <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in kliniklere göre dağılımı	87
Şekil 4.9. <i>Blastocystis</i> alt türlerinin kliniklere göre dağılımı.....	88

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Blastocystis</i> 'in faz-kontrast mikroskobu ile çekilen morfolojik formları	7
Resim 2.2. <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in Nativ-Lugol preparatta, trofozoitinin hiyalin psödopodu ve granüler sitoplazmasının görünümü	33
Resim 2.3. <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in trikrom boyasındaki trofozoitleri.....	34
Resim 2.4. <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in trikrom boyasıyla görülen bağlantı ipliği ..	34
Resim 2.5. <i>Dientamoeba fragilis</i> 'in dört izolatının dış yüzey yapılarını gösteren SEM mikrografisi	35
Resim 2.6. <i>Dientamoeba fragilis</i> trofozoitin ince yapısını gösteren TEM mikrografisi	36
Resim 4.1. Farklı yöntemlerle görüntülenen protozoonlar	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

µl

mikrolitre

gr

gram

k

Cohen'in kappa katsayısı

mg

milligram

ml

mililitre

χ^2

ki kare

Kısaltmalar

Açıklama

AIDS

Acquired Immune Deficiency Syndrome (Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu)

CDC

Centers for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi)

CI

Confidence interval (Güven aralığı)

Ct

Cycle threshold value (Döngü eşiği)

DHB

Demir-hematoksilen boyama

DM

Direkt mikroskopi (Nativ-Lugol inceleme)

DNA

Deoksiribonükleik asit

ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi)

FECT

Formol–eter konsantrasyon tekniği

GIS

Gastrointestinal Sistem

Kısaltmalar	Açıklama
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü)
IBD	Inflammatory bowel disease (İnflamatuvar bağırsak hastalıkları)
IBS	Irritable bowel syndrome (İrritabl bağırsak sendromu)
KAF	Kinyoun acid-fast
MBO	Mitokondri benzeri organeller
NGS	Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizi analizi)
OR	Odds ratio (Göreceli olasılıklar oranı)
OTU	Operational taxonomic unit (Operasyonel taksonomik birim)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RNA	Ribonükleik asit
Real time PCR	Real time Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
SEM	Scanning electron microscope (Taramalı elektron mikroskobu)
SF	Serum fizyolojik
<i>ssu-rRNA</i>	Small Subunit Ribosomal Ribonucleic Acid (Küçük alt üniteli Ribozomal Ribonükleik Asit)
ST	Subtype (Alt tür)
STS-PCR	Sequence tagged site-PCR
TB	Trikrom boyama
TEM	Transmission electron microscope (Geçirimli elektron mikroskobu)

1. GİRİŞ

Paraziter hastalıklar dünya çapında üç milyardan fazla insanı etkileyerek önemli derecedede morbidite ve mortaliteye neden olmaya devam etmektedir. Parazitlerin dağılımının toplumun sosyoekonomik durumuna, iklim ve çevre koşullarına, toplumsal özelliklerine, beslenme ve temizlik alışkanlıklarına, eğitim düzeyine ve vücudun immün kapasitesine göre değişebileceği bildirilmiştir [1]. Günümüzde malignite insidansının, organ transplantasyonunun, immün sistemi baskılayan hastalıkların artması ve farklı nedenlerle immünsüpresif tedavilerin yaygınlaşması immün yetmezlikli hasta sayısının artışına neden olmaktadır. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda ishal ve diğer gastrointestinal sistem (GİS) enfeksiyonlara neden olan farklı patojenler arasında bağırsak parazitlerinin de önemli bir rolü olduğunu bildirilmektedir [2, 3].

Parazitlerden tek hücreli olan *Blastocystis* ve *Dientamoeba fragilis* (*D. fragilis*) gibi protozoonların genellikle gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki sosyo-ekonomik durumu düşük toplumlarda daha yüksek prevalansta görüldüğü bildirilmekte, dünyada yaklaşık bir milyar insanın *Blastocystis* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir [4-7]. Yapılan çalışmalar şaşırtıcı olarak *Blastocystis* ve *D. fragilis*'in gelişmiş ülkelerde de önemsenecek düzeyde bir prevalansa sahip olduğu bildirilmektedir [8, 9]. Her iki protozoon da GİS semptomları olan ve olmayan hasta ve sağlıklı bireylerde en sık saptanan protozoonlar olarak dikkat çekmektedir [7, 10-12]. Protozoonların tespiti için real time PCR yönteminin kullanılması, tanı duyarlılığını arttırmakta ve *Blastocystis* ve *D. fragilis*'in epidemiyolojisi için daha doğru bilgi edinilmesini sağlamaktadır [13-16].

Blastocystis prevalansının gelişmiş ülkelerde %0,4-18,1, gelişmekte olan ülkelerde ise %30-100 arasında olduğu bildirilmiştir [6, 17, 18]. Türkiye'de yapılan çalışmalarda *Blastocystis* prevalansının ise %0,54-%37,9 arasında olduğu görülmektedir [19-28]. *D. fragilis*'in prevalansının kullanılan tanı yöntemlerine bağlı olarak % 0,4-71 arasında değiştiği ve gelişmiş ülkelerde de yaygın olarak (%4-6,3) saptandığı bildirilmektedir [9, 11, 29-31]. Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise *D. fragilis* prevalansı farklı çalışmalarda %0-18,3 olarak tespit edilmiştir [32-46].

Rutin laboratuvarlarda parazitolojik incelemelerde yaygın olarak direkt mikroskopik (DM) yöntemler (Nativ-Lugol preparat incelemesi) kullanılmaktadır. Hem bu

yöntemin duyarlılığının düşük olması hem de deneyim gerektirmesi, her iki protozoonun da semptomatoloji ile ilişkisinin belirlenememesi, gerçek prevalansının belirlenmesinde yetersizliğe neden olmasının yanı sıra klinik önemi konusunun da gözden kaçırılmasına sebep olmaktadır [11, 47].

Son on yılda, *Blastocystis*'in ve *D. fragilis*'in tanısında moleküler yöntemler yaygınlaşarak özellikle real time PCR sık kullanılmaya başlamıştır. Bu yöntem, hem konvansiyonel tanı yöntemlerinin etkinliğini değerlendirmek hem de bu protozoonların moleküler epidemiyolojisini, semptomatoloji ile ilişkisini, parazit yükünü belirlemek ve tedavi takibini daha da iyi yapmak için önemli bir katkıda bulunmaktadır [30, 48-50].

Blastocystis'in genetik çeşitliliğinden kaynaklanan günümüze kadar saptanmış 17 alt türü bulunmakta olup bu alt türlerden ST1-9 ve ST12 insanda tespit edilmiştir. Dünyada alt türlerden en yaygın olarak ST3'un görüldüğü bildirilmiştir. *Blastocystis*'in birçok bilinmezliğine ek olarak semptomatoloji ile alt türler arasında kesin bir ilişki saptanamamıştır [51-54].

Bir flagellat olarak tanımlanan *D. fragilis*'in ise iki genotipi bulunmakta, yaygın olarak enfeksiyonlarda genotip 1 saptanmaktadır [11, 55-57].

Bu çalışmanın temel amacı, Gazi Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen immün yetmezlikli ve immün yeterli ishallerli hastaların dışkı örneklerinde *Blastocystis* ve *D. fragilis*'in sıklığının konvansiyonel (DM, Formol-eter konsantrasyon tekniği, Trikróm boyama ve kültür) ve moleküler tanı yöntemleriyle belirlenmesi, ayrıca Yeni Nesil Dizi analizi (NGS) ile *Blastocystis* alt türlerinin saptanmasıdır. Ayrıca parazit sıklığının ve *Blastocystis* alt türlerinin yaş, cinsiyet ve mevsimsel özellik açısından değişkenlik gösterip göstermediğinde değerlendirilmesi de amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Blastocystis*

Blastocystis moleküler filogenetik analizlere dayanarak stramenopiller içinde açık bir şekilde sınıflandırılan genetik olarak farklı bir protozoon parazittir [58, 59]. İnsan ve birçok hayvanın gastrointestinal sisteminde yerleşen anaerobik enterik bir protozoon parazittir. Dünya çapında geniş dağılıma sahiptir ve insan GIS'inde en sık rastlanan protist protozoondur.

Bu protozoonun 1900'lerin başında tanımlanmasına rağmen biyolojik özelliklerine, epidemiyolojisine, özellikle de patojenitesine ve genom yapısına son yıllarda araştırmacıların ilgisinin arttığı görülmektedir [47, 60-63].

Günümüzde, *Blastocystis*'in bağışıklık sistemi baskılanmış ve bağışıklık sistemi baskılanmamış olgulardaki prevalansı, irritabl bağırsak sendromu, kolon kanseri, turist diyaresi, ürtiker ile olası ilişkisi gibi çeşitli klinik durumlardaki rolünü açıklamak için çalışmalar yapılmıştır [20, 64-67].

Blastocystis'in genom yapısındaki büyük değişkenlik ve çok sayıda alt türünün bulunması nedeniyle semptomatolojisi ile alt türler arasındaki ilişki, intestinal mikrobiyotadaki yeri ve sağlıklı bağırsak mikroçevresi için bir biyobelirteç olabileceğinin düşünülmesi araştırmacılar için ilgi çekici konulardır. Bu araştırmaların parazitin biyolojisi, yaşam döngüsü, patojenitesi hakkındaki birçok bilinmezliğe katkı sunacağı beklenmektedir [7].

2.1.1. Tarihçe

Blastocystis ilk defa, 1849'da Londra'daki ünlü kolera salgını sırasında, birbirinden bağımsız olarak çalışan Brittan ve Swayn tarafından fark edilmiştir [68-70]. *Blastocystis*'in bilimsel olarak ilk defa tanımlanması 1911 yılında Alexeieff tarafından yapılmıştır. Patojen olmayan bir maya türü veya dejenere olmuş bir protozoon kisti olarak tarif edilerek *Blastocystis enterocola* olarak isimlendirilmiştir [71]. Brumpt 1912 yılında *Blastocystis*'in farklı konaklarda farklı türlerinin olduğunu ve insanlardan izole edilen türüne de *Blastocystis hominis* denilmesini önermiştir [72].

Tüm dünyada yaygın bulunan ve özellikle tropikal ve subtropikal ülkelerde daha sık rastlanılan *Blastocystis* hakkında 1967 yılında Zierdt'in bu protozoonun çeşitli formları olduğunu tanımlamasına kadar olan süreçte, çok az sayıda araştırma yayınlanmıştır. Bu dönemden sonra bu protozoonla ilgili klinik ve deneysel çalışmalar artmaya başlamıştır [70].

Araştırmacılar *Blastocystis*'in ayrıntılı morfolojik ve biyolojik özelliklerini incelemeye başlamışlar ve basit yaşam döngüsünü ortaya koyarak protozoon ya da mantar grubunda sınıflandırmışlardır [73]. Sınıflandırma hakkındaki tartışmaları 1960'ların sonunda yapılan elektron mikroskopik incelemeler bile çözmemiştir [74].

Aşağıdaki zaman akışında *Blastocystis*'in geçmişten günümüze tarihçesindeki önemli ayrıntılar belirtilmiştir [75].

1911 ve 1912	<i>Blastocystis</i> hakkındaki ilk açıklamalar; Alexeieff bu protozoon için <i>Blastocystis enterocola</i> terimini kullandı ve bir yıl sonra Brumpt bu ifadeyi insanlardan izole edilen türler için <i>Blastocystis hominis</i> olarak değiştirdi [71, 72].
1921	<i>Blastocystis</i> 'in ilk olarak insan serumlu sıvı besiyerinde üretilmesi [76].
1967	Zierdt ve diğerlerinin <i>Blastocystis</i> 'i protozoa grubunun bir üyesi olarak yeniden sınıflandırması [77].
1973	Zierdt ve diğerlerinin <i>Blastocystis</i> ile ilgili morfolojik çalışmaları [78, 79].
1976	<i>Blastocystis</i> 'in patojenik potansiyelinin tanımlanması [80].
1983	<i>Blastocystis</i> için tedavi denemelerine ilk yaklaşımlar [81].
1986	<i>Blastocystis</i> ile irritabl bağırsak sendromunun ilişkilendirilmesine ait ilk çalışma [82].
1987	<i>Blastocystis</i> 'in hayvanlarda araştırılması [83].
1993	<i>Blastocystis</i> salgını hakkında ilk ayrıntılı çalışma [84].
1997	<i>Blastocystis</i> araştırmasında ilk fare modeli [85].
1997	<i>Blastocystis</i> enfeksiyonunun Irritabl bağırsak sendromuna neden olduğunu gösteren ilk çalışmalar [86].
1998	<i>Blastocystis</i> 'in <i>Heterokontid Chromista</i> aleminde bir Stramenopiles olarak sınıflandırılması

1999	<i>Blastocystis</i> 'in bazı alt türlerinin akut ve kronik enfeksiyonlarla ilişkili olabileceğini öne süren çalışmalar [87].
2000	Gastrointestinal semptomları olan ve olmayan hastalarda <i>Blastocystis</i> 'e karşı immün yanıtın araştırılması [88].
2005	<i>Blastocystis</i> genotiplerinin geniş kapsamlı ilk analizi [89].
2006	<i>Blastocystis</i> enfeksiyonu ile ilgili ilk büyük epidemiyolojik çalışma [90].
2007	Günümüzde yaygın olarak kabul gören yeni bir <i>Blastocystis</i> terminolojisinin önerilmesi [91].
2008	<i>Blastocystis</i> bulaşmasının içme suyu ile oluşabileceğini gösteren ilk çalışma [92].
2008	<i>Blastocystis</i> enfeksiyonu için ilk real time PCR testi [93].
2009	<i>Blastocystis</i> enfeksiyonunun kanser hastalarında ilk olarak genotiplendirilmesi [65].
2011	<i>Blastocystis</i> 'in ST 7 alt türünün ilk tam genom dizilimi [94].
2013	<i>Blastocystis</i> 'in 17 alt tür tayini [5].
2014	<i>Blastocystis</i> ile intestinal mikrobiyota ilişkisinin ilk defa araştırılması [95].

2.1.2. Sınıflandırma

Blastocystis'in sınıflandırılması uzun yıllar tartışma konusu olmuştur. İlk kez *Schizosaccharomyces* grubu mayalar içinde tanımlanmıştır [71, 96]. Daha sonra izole edildiği konaklara göre isimlendirilmiş olup insanlardan elde edilen izolatlar için *Blastocystis hominis* ifadesi önerilmiştir [72]. *Blastocystis*'in protozoon olarak tanımlanması, Zierdt'in 1967 yılındaki morfolojik ve fizyolojik çalışmaları ile hücre çeperinin protozoonlarınkine benzemesi, endodiyogeni ile çoğalması, yavaş hareket eden pseudopodlarının olması, önceden vakuol, bugün ise santral cisim olarak adlandırılan üreme organelinin varlığı sonucunda gerçekleşmiştir [77]. Araştırmacılar önce *Sporozoa* alt filumuna daha sonra da *Sarcodina* alt filumunda sınıflandırmıştır.

Blastocystis'in günümüzde kabul gören sınıflandırılması 1989'da başlayan moleküler filogenetik analizler ile mümkün olmuştur. *Blastocystis* küçük alt üniteli

ribozomal RNA (*ssu-rRNA*) gen kısmının dizi analizi, *Blastocystis*'in maya, *Sarcodina* veya *Sporozoa* ile aynı grupta olmadığını göstermiştir [97].

Bu bulguları destekler nitelikte yapılan moleküler çalışmalar sonucunda 1996 yılında, Silberman ve diğerleri *ssu-rRNA* geninin sekanslanmasını gerçekleştirmeleri [59] ile kahverengi algler, diatomlar, krizofitler, su küfleri gibi tek ve çok hücreli protistaların yer aldığı *Stramenopiles* (*Heterokonta*) grubunun içerisinde protist olarak tanımlanması gerektiği bildirilmişlerdir. Son olarak da Cavalier-Smith 1998'de *Stramenopiles*'in *Chromista* aleminin altındaki *Heterokonta* bölümüyle identik olduğunu belirterek *Blastocystis*'in *Heterokontid Chromista* olduğunu ifade etmiştir. *Blastocystis*'in günümüzde geçerli olan son güncel sınıflandırması aşağıdaki Çizelge 2.1'de bildirilmiştir [7, 98].

Çizelge 2.1. *Blastocystis*'in günümüzde geçerli olan sınıflandırması

Taksonomik sıralama		Taksonomist
➤ Alan	<i>Eukaryota</i>	
➤ Alem	<i>Chromista</i>	Cavalier-Smith (1981)
➤ Alt alem	<i>Chromobiota</i>	Cavalier-Smith (1991)
➤ Infra alem	<i>Heterokonta</i>	Cavalier-Smith (1995)
➤ Şube	<i>Bigyra</i>	Cavalier-Smith (1998)
➤ Alt şube	<i>Opalinata</i>	Earl (1971)
➤ Sınıf	<i>Blastocystea</i>	Zierdt (1978)
○ Cins	<i>Blastocystis</i>	Alexeieff (1911)

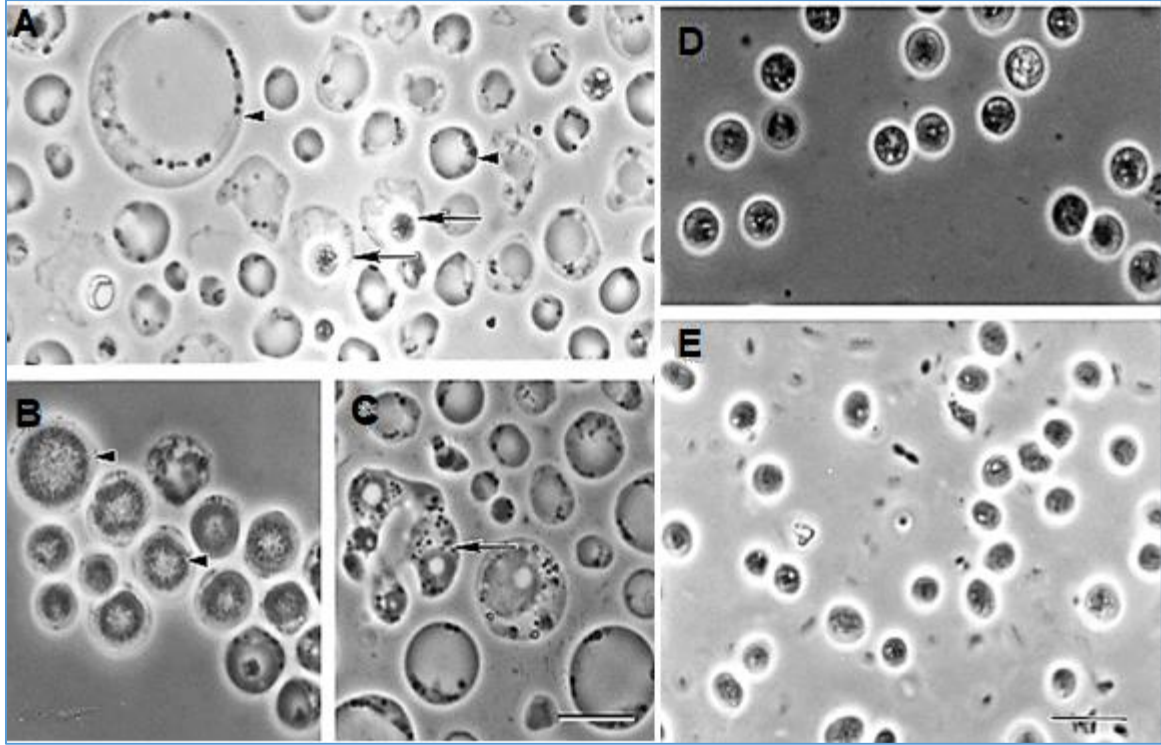
2.1.3. Morfolojisi ve biyolojik özellikleri

Blastocystis'in kültür ve dışkı örneklerinde farklı boyut ve morfolojik formları bulunmaktadır. Morfolojik formların patojenite ile ilişkisi tam olarak bilinmemektedir. Morfolojik formlar ile alt türler arasında da bir ilişki saptanmamıştır. Yine farklı konaklardan elde edilen *Blastocystis* izolatları arasında mikroskopik incelemede morfolojik formları açısından farklılık bulunmamıştır [7]. *Blastocystis*'in kültür ve klinik örneklerdeki boyutları çok farklılık gösterebilmektedir. Elektron mikroskopunun kullanılması ile *Blastocystis*'in morfolojisi, ince yapısı, hücre biyolojisi ve yaşam döngüsü konusunda yeni bilgilerin elde edilmesi mümkün olmuştur [7, 99, 100].

Elektron mikroskopik incelemelerde, *Blastocystis*'in tüm formlarında çekirdek içindeki elektron opak malzemenin, çekirdeğin kenarındaki kresentrik bant görünümünde olduğu bildirilmektedir. Bu morfolojik görüntünün hücre döngüsünün

evrelerinde veya fizyolojik koşullardan bağımsız olduğu da gözlemlenmiştir. *Blastocystis*'in sitoplazmasında yer alan mitokondri benzeri organellerin (MBO) farklı sayıda ve morfolojide olduğu, bunlarla birlikte golgi kompleksi, endoplazmik retikulum ve poliribozomlarında mevcut olduğu belirtilmiştir [101].

Blastocystis'in literatürde genel olarak dört morfolojik formu tanımlanmıştır. Bu formlar vakuolar, granüler, amoeboid ve kist formlarıdır (Resim 2.1) [7, 60, 70, 73, 77, 102, 103].



Resim 2.1. *Blastocystis*'in faz-kontrast mikroskobu ile çekilen morfolojik formları. (A), in vitro olarak aksenik kültürde üremiş olan vakuoler (◄) ve kist (←) formları, (B) Vakuol merkezinde çok sayıda granül içeren granüler form (◄), (C) Psödopod benzeri sitoplazmik uzantılar gösteren ameboid form (←), (D,E) in vitro kültürde inkübasyon süresi uzayınca kiste dönüşen formlar [7, 104]. Bar |—| 10 µm.

Vakuoler formu, insan dışkısı ve kültürlerde en sık görülen formdur. Bu formun boyutları 2-200 µm arasında değişmekle birlikte ortalama 4-15 µm olarak tanımlanmaktadır. Hücrenin çevresine yakın ince bir sitoplazma tabakası içinde golgi, çekirdekler ve MBO yer almaktadır, iç kısımda ise hücre hacminin yaklaşık %90'ını kaplayan büyük bir merkezi vakuol ile karakterize edilmektedir [7].

Vakuolün işlevi tamamen belli olmamakla birlikte, birçok ökaryotik hücrede olduğu gibi, yaşamını sürdürebilmek için bir depolama fonksiyonunu yaptığı öne

sürülmektedir. Vakuolün üreme sırasında hücre bölünmesi ve apoptotik cisimlerin çökmesi gibi diğer işlevleri de olduğu belirtilmekte, ancak bu işlevlerin net olarak ortaya koymak için daha fazla araştırılması gerekmektedir [7].

Granüler formlar, merkezi vakuolde yer alan çok ince yapıda ve çok sayıda granüller içermesi nedeniyle ayrı bir form olarak tanımlanmaktadır. Bu form vakuoler formdan daha büyüktür (ortalama 15-25 μm) ve büyüklüğü 3-80 μm arasında değiştiği bildirilmektedir. Yapılan kültürün uzun zaman bekletilmesi ile daha fazla görülme ve merkezi vakuol içindeki granüllerin görünümü ile tanınmaktadır [7, 105].

Merkezi vakuol içindeki granüllerin oluşumuna göre metabolik, lipitli ve üreme granülleri tanımlanmıştır. Metabolik granüller-hücre yaşamını korumak için gerekli olan kimyasal işlemlerde rol oynadığı bildirilmektedir. Üreme granüllerinin de genç hücrelerin gelişiminde işlev yaptığı tahmin edilmektedir. Bu hipotezler yalnızca mikroskopik incelemeye dayanarak yapıldığı için yanıltıcı olabileceği düşünülmektedir [106].

Kist formu. *Blastocystis* alt türlerinin kist formu diğer formlardan daha küçük (2 - 5 μm) ve dışkı örneklerinde tespit edilmesi ve tanımlanması oldukça zordur. Bu form küçük boyutları nedeniyle en son keşfedilmiştir. Çok katmanlı bir hücre duvarına ve bazen de gevşek bir dış çepere sahiptir. Kistlerin oksijen, sıcaklık ve dehidrasyon gibi streslere diğer formlara göre daha dirençli olduklarını gösteren kanıtlar vardır [7]. Bazı çalışmalar 25 °C'de bir ay ve 4 °C'de iki ay boyunca canlı kaldıklarını göstermektedir [7, 107, 108]. Hayvan deneylerinde, kist formunun fekal-oral bulaşmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir [107].

Amoeboid formu. *Blastocystis*'in amoeboid formu oldukça nadir rastlanan ve hareketsiz bir form olarak bilinmektedir. Tipik olarak hücre boyutu 2-15 μm 'dir. Bu formlarda bir veya iki psödopod olabileceği belirtilmiştir [7, 78, 109].

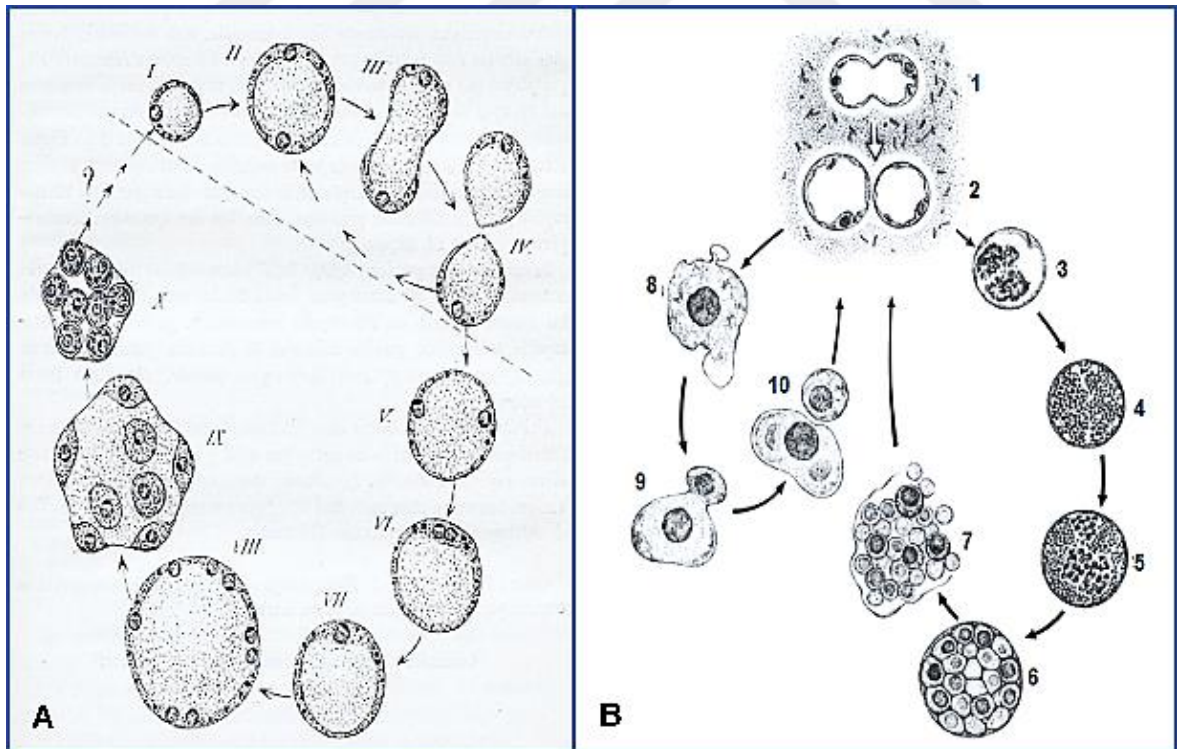
Amoeboid formların çoğunlukla gastrointestinal sistem semptomları olan hastalardan alınan kültür izolatlarında görüldüğü, gastrointestinal sistem semptomları olmayan hastalarda ise baskın olarak vakuoler formların ürettiği tespit edilmiştir [110]. Bu formun *in vivo* olarak bakterileri fagosite ederek beslendiği araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür [102].

Yapılan çalışmalarda **avakuoler** ve **multivakuoler** gibi formlar tanımlansa da bilimsel olarak onaylanmamıştır. *Blastocystis*'in belirgin ve küçük boyutlu bu morfolojik formları kistleşme (enkistasyon) veya kistten diğer forma geçiş (ekskistasyon) evresinde ortaya çıktığı mikroskobik araştırmalar sırasında öne sürülmüştür. Birçok araştırmacı bu formların aslında *in vivo* koşullarda gerçekleşmeyeceğini ve *in vitro* kültür ortamında oksijene maruz kalma nedeniyle oluşan (artefakt) formlar olduğunu bildirmişlerdir [60, 73, 100, 102, 104, 111].

2.1.4. Yaşam döngüsü ve bulaş yolları

Blastocystis'in günümüze kadar bilimsel olarak bir kaç yaşam döngüsü önerilmiştir. Ancak bunlardan hiçbiri *in vitro* veya *in vivo* olarak henüz doğrulanmamıştır. Bunun nedenlerinden biri de uygun bir başarılı hayvan modelinin olmamasıdır.

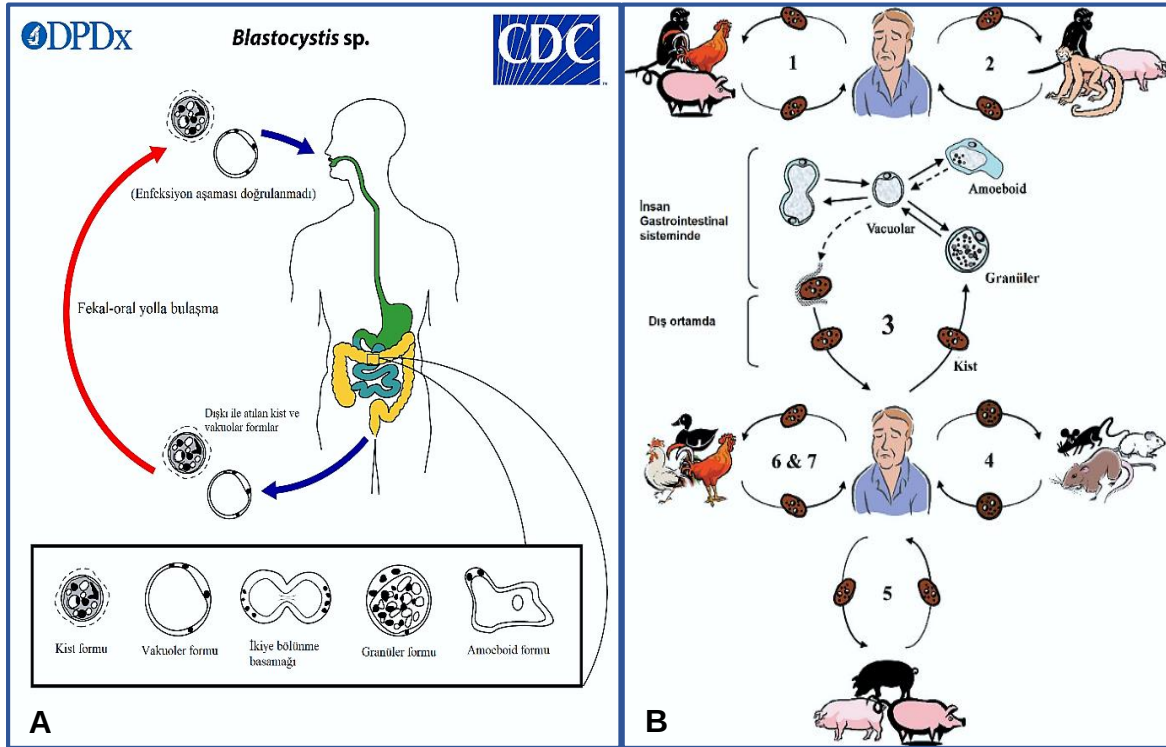
İlk olarak Alexeieff ve Zierdt tarafından farklı yaşam döngüsü hipotezleri ileri sürülmüştür (Şekil 2.1). *Blastocystis*'in başka formları ortaya çıkınca (özellikle kist formu) bu yaşam döngüsü varsayımları geçerliliğini yitirmiştir.



Şekil 2.1. *Blastocystis*'in (A) Alexeieff ve (B) Zierdt tarafından önceki yıllarda sunulan yaşam döngülerinin orijinal çizimleri [71, 79].

Genel fikir birliği ile kararlaştırılan *Blastocystis*'in en olası yaşam döngüsü Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

Moe ve diğerleri BALB/c fareleri ve Wistar fareleri üzerinde yaptıkları enfektivite çalışmalarında, *Blastocystis* kistlerinin bulaştan sorumlu tek form olduğunu ve fekal-oral yolla bulaştığını kanıtlamışlardır [85, 107]. Diğer bir çalışmada ise *Blastocystis* diğer formlarıyla kontamine olmuş su veya su bitkilerinin alınmasıyla insan gastrointestinal sistemine geçiş yapabileceği öne sürülmüştür [112, 113]. Diğer konaklara da fekal-oral yollardan kistlerle kontamine olmuş yiyecek ve su tüketimi sırasında bulaştığı bildirilmektedir [114].



Şekil 2.2. *Blastocystis*'in günümüzde kabul gören en olası (A) yaşam döngüsü ve (B) bulaş yolu [7, 115].

Yapılan çalışmalarda hayvanlardan-insana ve insanlardan-hayvanlara sık sık bulaşan çok sayıda zoonotik *Blastocystis* izolatının varlığı tespit edilmiş ve insan enfeksiyonları için hayvanların rezervuar olabileceği gösterilmiştir [7, 98]. Hayvan izolatlarından elde edilen alt tür analiz sonuçları, insan *Blastocystis* izolatlarının genetik çeşitliliği ile karşılaştırıldığında, benzer alt tür dizilimi gösterdikleri belirlenmiştir. Böylece, *Blastocystis* enfeksiyonlarının zoonotik potansiyeli bulunduğu saptanmıştır [116].

Günümüze kadar *Blastocystis* için etkili bir enfeksiyon modeli bulunmamasından dolayı, bu protozoonun konak gastrointestinal sistem mikrobiyotası ile ilişkisi hakkında

çok az şey bilinmektedir. Protozoonun amoeboid formu, fagotrofik özellik gösterirken, diğer formlarının sindirilmiş besin kalıntıları veya intestinal mukozası ile yakın ilişki sergileyerek biyotrofik özellik gösterebileceği düşünülmektedir [117, 118].

Yakın tarihte yapılan bir çalışmada, hayvan modeli konusunda çok umut verici sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir. Araştırmacılar farelerden farelere inokülasyon yaparak *Blastocystis* alt tür enfeksiyonunun sürekliliğini koruyabilmişler ve benzer histopatolojik bulgular elde ettiklerini bildirmişlerdir [118].

2.1.5. Genetik çeşitliliği

Blastocystis, yüksek düzeyde genetik çeşitliliğe sahip bir protozoondur. Bu parazitin insanlardan ve diğer konaklardan izole edilen alt türleri mikroskopik incelemede morfolojik olarak ayırt edilememektedir. Bu nedenle, *Blastocystis* izolatlarının çok sayıdaki alt türlerinin tespiti için moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzdeki son teknolojilerle yapılmakta olan moleküler epidemiyolojik çalışmalar *Blastocystis*'in konak türleri ve coğrafi bölgelere göre çok sayıda alt tür içerdiğini ve bazı alt türlerin dağılımında farklılık olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte yeni bir alt tür tanımlanabilmesi için *ssu-rRNA*'nın tüm diziliminde en az %5 oranında genetik farklılık göstermesi gerekmektedir [119].

Blastocystis alt türleri insanların yanı sıra diğer memeliler, kuş, sürüngen, amfibiler ve hatta böceklerden de izole edilmiştir [89]. *Blastocystis* enfeksiyonunun kaynağı ve bulaş yollarının tanımlanması için alt türlerinin belirlenmesi epidemiyolojik çalışmalarda önem taşımaktadır [120].

Küçük alt üniteli ribozomal RNA'nın dizi analizine dayanarak, insan ve diğer konaklarda günümüze kadar en az 17 alt tür tespit edilmiştir. Farklı konaklardan izole edilen ST1-ST9 alt türleri için 2007 yılında farklı araştırmaların sonuçlarının karşılaştırılmasında kolaylıklar sağlanmak amacıyla *Blastocystis* alt tür terminolojisinin standartlaştırılmasında görüş birliğine varılmıştır [91]. Günümüze kadar insanlardan ST1-ST9 ve ST12 alt türleri izole edilmiştir [51-53]. İnsan izolatlarının %90'dan fazlasını ST1-ST4 alt türleri oluşturmaktadır. İnsanlardan izole edilen alt türlerin diğer konaklardan izole edilenlerle aynı genom yapısına sahip

olduğu belirlenmiştir. Bu durum, diğer konakların *Blastocystis* enfeksiyonu için büyük bir potansiyel rezervuar kaynağı olabileceğini göstermektedir [121-123].

Farklı coğrafi bölgelerde yapılan çalışmalarda insanlarda *Blastocystis* alt türlerinden en yaygın ST3'ün saptandığı bildirilmektedir (Şekil 2.3) [54]. Diğer sık görülen alt türler ise ST1, 2 ve 4 olarak tespit edilmektedir [5]. Bununla birlikte ilginç olarak Avrupa'da en sık rastlanan alt türün ST4 olduğu bildirilmektedir [124]. Bugüne kadar ST9 alt türü sadece insanlardan izole edilmiştir [125]. Birden fazla alt türün saptandığı miks enfeksiyonlar da bildirilmiştir [64, 126, 127]. Miks enfeksiyonların klinik önemi henüz aydınlığa kavuşmamıştır.

İnsanlar ve hayvanlardaki *Blastocystis* alt türlerinin dağılımı Çizelge 2.2'de sunulmuştur [5, 128].

Çizelge 2.2. İnsanlar ve hayvanlarda tespit edilen *Blastocystis* alt türleri

Subtype	İnsanlarda bulunma sıklığı	Hayvan konakları	Filogenetik ağaç
ST1	+++	Primatlar, domuz, sığır	
ST2	++	Primatlar, domuz, sığır	
ST3	+++	Primatlar	
ST4	++	Kemirgenler	
ST5	+	Sığır, primatlar, domuz, deve	
ST6	+	Kuş	
ST7	+	Kuş	
ST8	+	Primatlar, sığır, kuş	
ST9	+	-	
ST10	-	Sığır	
ST11	-	Fil, primatlar	
ST12	+	Sığır, kanguru, zürafa	
ST13	-	Primatlar, kanguru, geyik	
ST14	-	Sığır, primatlar, deve	
ST15	-	Sığır, primatlar, fil	
ST16	-	Kanguru	
ST17	-	Kemirgenler	

İnsanlarda *Blastocystis* alt türlerinin küresel dağılımına dayanarak +, ++, +++ olarak sıklık seviyesi gösterilmiştir. (-, ilgili alt türlerin konakta saptanmadığını göstermektedir)

henüz *in vivo* olarak gösterilmiş kuvvetli bir bulgu bulunmaması [18, 139]; (iii) *Blastocystis*'in günümüzde bilinen diğer patojen protozoonlar gibi flagellası, lektinleri veya roptriaları gibi fenotipik virülans özelliklerinin tespit edilmemesi (sadece bir çalışmada bakterileri fagosite edebilme özelliği bildirilmiştir) [109]; (iv) *Blastocystis*'e bağlı bilinen salgınların doğrulanmaması; (v) *Blastocystis*'in tedaviyle eradikasyonu sonrası gastrointestinal semptomları düzelen hastalar konusundaki deneyimlerin yazılı kaynaklarına çok fazla rastlanılmaması ve (vi) *Blastocystis*'le ilişkili semptomların ortaya çıkmasında konağın immün kapasitesinin belirleyici rolünün etkili olması şeklinde sıralanmaktadır [140].

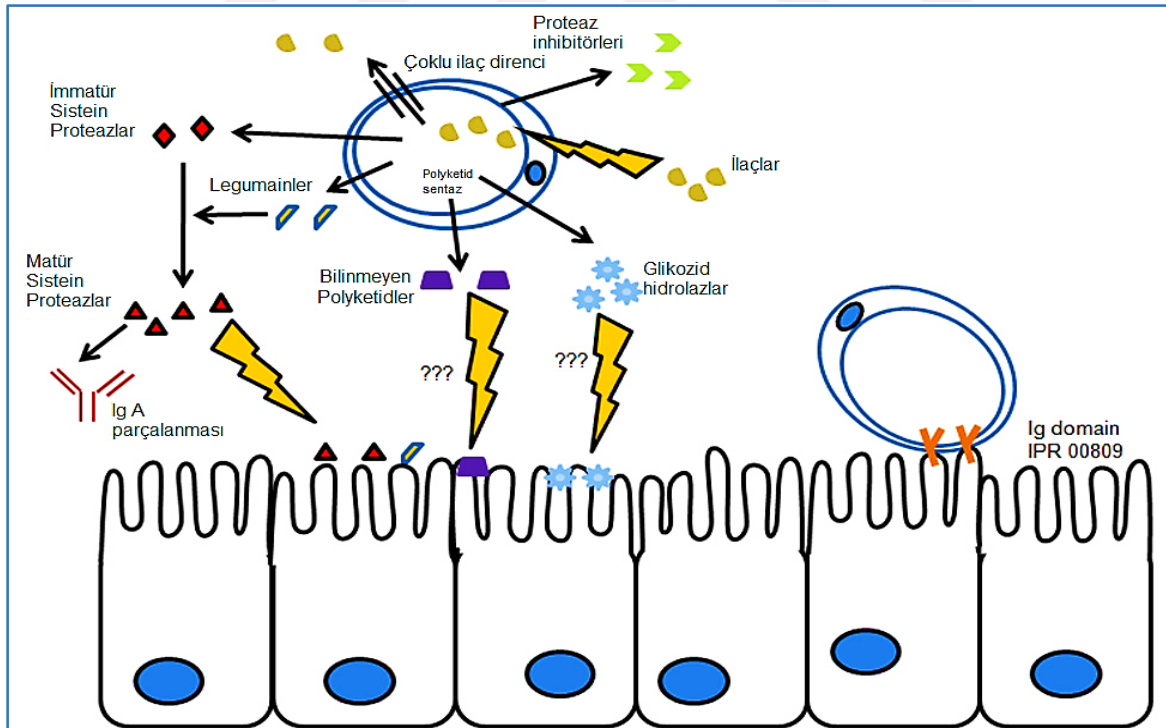
Blastocystis'in alt türleri arasında yüksek derecede genetik çeşitliliğin olması, alt türler ile patojenite arasında bir ilişki olup olmadığı konusunda merak uyandırmıştır. Bu da semptomatik ve asemptomatik gruplardaki alt tür dağılımlarını karşılaştıran çalışmaların konusu olmuştur. Sınırlı sayıdaki çalışmada ST1'in semptomatik olgularda anlamlı olarak daha yüksek sıklıkta saptandığı belirlenmiş [141-144] sadece bir çalışmada asemptomatik taşıyıcılık ile ilişkilendirilmiştir [145]. ST2 [127, 145] ve ST3 [143, 144, 146] için de benzer şekilde çelişkili sonuçların elde edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Semptomatik ve asemptomatik *Blastocystis* taşıyıcıları arasındaki alt tür dağılımında anlamlı bir fark olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur [19, 142].

Blastocystis'in ST3 alt türü olarak tanımlanmış ve morfolojik olarak da ameboid form görülen akut ürtiker olgusunda, konağın *Blastocystis*'in ameboid formuna karşı enflamatuar bir yanıt oluşturduğu için kutanöz semptomlara neden olabileceği ileri sürülmüştür [147]. Diğer ürtikerli bir olguda ise ST2 alt türü olarak tanımlanan *Blastocystis* dışında enfeksiyöz etken saptanmamış ve bu olguda ciddi gastrointestinal semptomların ve kronik ürtikerin olduğu gösterilmiştir. Bu vakada antibiyotik tedavisi sonrasında semptomlar devam etmiş, ancak kombine metronidazol ve paromomisin tedavisinden sonra semptomlar gerilemiştir [148]. Retrospektif bir çalışmada *Blastocystis* ile enfekte olguların % 11'nin (8/80) gastrointestinal semptomlarla birlikte dermatolojik semptomlara da sahip oldukları bildirilmiştir [149].

Blastocystis'in alt türleri içinde sadece 18,8 Mb genom büyüklüğü olan ve 6,020 gene sahip ST7 için tüm genom analizi yapılmıştır. Bu analiz bazı önemli noktalara ışık tutmuştur. *Blastocystis*'in horizontal gen aktarımıyla da kazanılmış, intestinal

ortama uyumu sağlayan proteinleri ifadeleyen genlere sahip olduğu gösterilmiştir. Tanımlanan genler arasında; konak fizyolojisi ve intestinal homeostaz üzerinde etkili olan proteaz, proteaz inhibitörleri ile immünofilinler ve glikoziltransferaz proteinlerini ifadeleyen genler tanımlanmıştır. Ayrıca protozoonun intestinal epitelle ilişkisinde önemli rol oynayan ve legumainle aktive olan sistein proteazlar, konak proteazları üzerinde etkili olan proteaz inhibitörleri, konak semptomlarından sorumlu olabileceği düşünülen poliketid sentaz, MBO fonksiyonlarından sorumlu olan proteinler ve immün sistemi aktive eden henüz tam olarak karakterize edilememiş proteinler karşılaştırmalı genomik analizle araştırılmıştır. *Blastocystis*'in sistein proteazlarının lüminal İmmüoglobulin A'yı (IgA) ve epitelyal mukozal bariyerini bozduğu bilinmektedir (Şekil 2.4) [94].

Blastocystis'in diğer alt türlerinin tüm genom analizleri yapıldıkça, protozoonun potansiyel patojenisitesinde etkili olan genlerin ve proteinlerin rollerini belirlemeye yardımcı olabilecek bilgiler elde edilecektir.



Şekil 2.4. *Blastocystis* alt tür ST7'de tanımlanan salgısal proteinler ve virülans faktörleri [94].

Blastocystis bağırsak mukozasına yapışmadan patojenik etkilere neden olduğunda, protozoonun bir virülans faktörü salgıladığı düşünülebilir. *Blastocystis*'in salgıladığı

proteinler, bunlardan özellikle sistein proteazların immünoglobulin A'yı parçaladığı ve NF-kB aktivasyonu yoluyla konak hücrelerinin pro-inflamatuar sitokin IL-8 üretimini indüklediği gösterilmiştir [150, 151]. Bununla birlikte *Blastocystis* alt türleri arasında sistein proteaz aktivitesinin farklı olabileceği de söylenmiştir [152].

Günümüzde de *Blastocystis*'in patojenitesi hala bir tartışma konusudur.

2.1.7. Epidemiyolojisi ve alt tür dağılımı

Blastocystis prevalansı ülkeden ülkeye farklılık göstermesine rağmen insanlarda gastrointestinal sistemde en sık yerleşen, protozoon parazittir. Gelişmekte olan ülkelerde ve hijyen koşullarının yetersiz olduğu toplumlarda prevalansı %22,1–%88,7'ye varan oranlarda saptanırken gelişmiş ülkelerde ve hijyen koşullarının iyi olduğu toplumlarda ise yaklaşık %0,5-%23,1 oranında olduğu bildirilmektedir [124, 146, 153-156]. Hatta Senegalli çocuk popülasyonunda %100 oranında saptanmıştır [6]. Yapılan araştırmalarda tespit edilen bu geniş prevalans aralığı, kullanılan araştırma metodlarının (mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler yöntemler gibi) çeşitliliği, bu metodların duyarlılığının farklı olması, mikroskopik incelemede deneyimin gerekliliği nedeniyle büyük değişkenlik gösterebilmektedir [19, 157].

Gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerdeki *Blastocystis*'in yüksek görülme sıklığı genel olarak arıtılmamış suların tüketilmesi, diğer potansiyel rezervuar konaklarla yakın temas ve aile içinde hijyen koşullarının düşük olması nedeniyle enfeksiyonun kolay bulaşmasıyla ilişkili bulunmuştur [154, 158, 159]. El Safai ve diğerleri *Blastocystis*'in yaz aylarında görülme sıklığının %23,2'ye kadar yükseldiğini, kış aylarında ise bu oranın %13,7 olarak tespit ettiklerini ve bu protozoonun mevsimsel olarak farklı prevalansa sahip olabileceğini de göstermişlerdir [155].

Son 15 yılda yapılan çalışmalar incelendiğinde özellikle *Blastocystis* alt türlerinin belirlenmesine yönelik araştırmaların sayılarındaki artış dikkat çekmektedir. Bu çalışmalar sayesinde birçok ülkede *Blastocystis* prevalansı ve alt tür dağılımı hakkında bilgi sahibi olunmuş ve *Blastocystis*'in moleküler epidemiyolojisi hakkında daha fazla sayıda veri toplanmaya başlanmıştır. Günümüze kadar *Blastocystis* ile enfekte vakaların dağılımı ve yerlerini gösteren önemli çalışmaların toplamı Çizelge 2.3'te verilmektedir.

Dünya genelinde *Blastocystis*'in prevalansı; Avrupa ülkelerinde (Fransa, İtalya, İspanya, Polonya, Hollanda, İsveç Danimarka) %1,2-%35,2 [2, 155, 160-165], Kuzey ve Güney Amerika ülkelerinde (Amerika Birleşik Devletleri, Kolombiya, Brezilya) %7,1-%88,7 [51, 126, 156, 166-171], Asya ülkelerinde (Hindistan, Tayland, Laos, Filipinler, Endonezya, Çin, Malezya, Kamboçya) %3,6-%82,8 [172-185], Orta Doğu ülkelerinde (İran, Katar, Suudi Arabistan, Lübnan) %4,7-%65,2 [154, 186-195], Afrika ülkelerinde (Tanzanya, Fildişi Sahili, Angola, Madagaskar, Nijerya, Tunus) %12,9-%84,9 [196-201], Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda *Blastocystis* %0,54-%37,9 [19-28] aralığında saptandığı bildirilmektedir.

Çizelge 2.3. Farklı ülkelerdeki insanlarda izole edilen *Blastocystis* prevalansı

Kaynak	İncelenen Örnek sayısı			Çalışma grubu	İzole edilen ST		Ülke
	n/N	%	Metod		ST'ler (%)	Metod	
Türkiye (% 0,54-37,9)							
[26]	275/ 50185	0,54	DM	Hastaneye başvuranlar	-	-	Van, Türkiye
[22]	35/ 468	7,4	Kültür	İlkokul çocukları	ST3 (34,2), ST1 (31,4), ST2 (25,7), STx(5,9), ST7 (2,8)	DDA	Muğla, Türkiye
[21]	12/ 150	8,0	Kültür	Ülser hastaları	ST3 (66,7), ST1 (16,7), ST2 (8,3), ST7 (8,3)	DDA	Aydın, Türkiye
[20]	25/ 232	10,8	Kültür	Kanser hastaları	ST3 (59), ST1(23), ST2(18)	STS	Aydın, Türkiye
[24]	88/ 345	25,5	Kültür	Hastaneye başvuranlar	ST3 (47,7), ST1 (13,6), STx(13,9), ST2 (13,6), ST1+3 (5,7), ST5 (1,1), ST6 (1,1) ST1+2 (1,1), ST2+3 (1,1), ST1+2+3 (1,1)	STS	Diyarbakır, Türkiye
[19]	66/ 203	32,5	Kültür	Hastaneye başvuranlar	ST3 (57,6), ST1 (15,2), ST2 (13,6), ST1+3 (10,6), ST1+2 (3,0)	STS	Ankara, Türkiye
[23]	115/ 303	37,9	real time PCR	Hastaneye başvuran çocuklar	STx(60,0), ST3 (17,4), ST1 (10,4), ST4 (4,3), ST2 (3,5), ST1+3 (2,6), ST1+2 (0,9), ST2+3 (0,9),	STS	Eskişehir, Türkiye
Avrupa (% 1,2-35,2)							
[2]	3/ 249	1,2	real time PCR	Hastaneye başvuranlar	-	-	Varşova, Polonya
[161]	674/ 7341	9,2	DM	Hastaneye başvuranlar	-	-	Padova, İtalya
[155]	143/ 788	18,1	real time PCR	Hastaneye başvuranlar	ST1 (20,0), ST2 (12,8), ST3 (43,3), ST4 (20,0), ST6 (2,1), ST7 (2,1), STx (1,4) (221 örnekten)	DDA	Fransa
[162]	258/ 756	34,1	real time PCR	Göçmen ve yerli halk	ST3 (26,7), ST1 (23,2), ST2 (7,7), ST4 (6,3), ST1+3 (17,1), ST1+3+4 (4,5), ST1+2+3 (4,0), ST3+4 (2,7), STx(7,8)	DDA	Verna, İtalya

Çizelge 2.3. (devam) Farklı ülkelerdeki insanlarda izole edilen *Blastocystis* prevalansı

[163]	63/ 179	35,2	B-pri	Kırsal halkı	ST2 (62,3), ST3 (17,0), ST1 (13,2), ST4 (7,5)	DDA	Álava, İspanya
[164]	122/?	?	Kültür	Seyahat edenler	ST3 (59,0), ST2 (19,7), ST1 (13,1), ST6 (3,3), ST7 (3,3), ST1+3 (1,6),	STS	Gdańsk, Polonya
[160]	189/?	?	DM	Hastaneye başvuranlar Semptomlu hastalar	(189 örnekten) ST3 (46-0), ST4 (21-7), ST1 (15-3), ST2 (13-8), ST6 (3-2), ST8 (0-5)	DDA	Roma, İtalya
Kuzey ve Güney Amerika (% 7,1-88,7)							
[166]	10/ 139	7,1	B-pri	50 aile	ST3 (50,0), ST2 (30,0), ST1 (20,0)	DDA	Kolorado, ABD
[126]	256/ 2026	12,6	DM	Hastaneye başvuran çocuklar	ST3 (55,5), ST1 (21,4), ST2 (19,5), ST6 (2,0), ST4 (0,8), ST7 (0,8)	DDA	Kolombiya
[170]	102/ 766	13,3	DM	Toplumdan	ST1 (36,3), ST2 (15,7), ST3 (41,2), ST4 (2,9), ST6 (1,0), ST8 (2,9)	DDA	Parana, Brezilya
[169]	5/ 217	34,6	FECT	Okul öğrencileri	-	-	Parana, Brezilya
[168]	64/ 180	35,5	Kültür	Hastane başvuranlar	ST1 (42), ST3 (49), ST2 (7), ST4 (2)	DDA	Rio de Janeiro, Brezilya
[171]	76/ 181	41,9	B-pri	Sosyal ekonomik durumu düşük Kreş	(57 örnekten) ST1 (54,4), ST3 (33,3), ST2 (7,0), ST7 (5,3)	DDA	Sao Paulo, Brezilya
[167]	164/ 294	55,8	Kültür	Kırsal halkı	ST3 (34,0), ST1 (27,0), ST2 (27,0), ST4 (3,5), ST8 (7,0), STx(1,5)	DDA	Rio de Janeiro, Brezilya
[156]	252/ 284	88,7	real time PCR	Rastgele	ST3 (34,5), ST2 (30,5), ST1 (29,6), ST4 (2,96), STx (2,5), ST6 (0,5)	DDA	Puerto Nariño, Kolombiya
Asya (% 3,6-82,8)							
[184]	37/ 1020	3,6	PCR	Hastaneye başvuranlar	-	-	Yunnan, Çin
[183]	15/ 308	4,9	DM	Okul öğrencileri	-	-	Battambang Kamboçya
[176]	20/ 400	5,0	DM	Okul öğrencileri	-	-	Majuro, Marshall Adaları
[185]	27/ 381	7,1	B-pri	Kanser hastaları	ST1 (44,5), ST3 (55,5)	DDA	Harbin, Çin
[182]	15/ 117	12,8	PCR	Sahadan	ST2 (40,0), ST3 (46,6), ST1 (13,4)	DDA	Ayutthaya, Tayland
[178]	165/ 1271	12,9	Kültür	Rastgele şehir halkı	ST3 (41,5), ST1 (22,6), ST4 (14,8), STx (13,9), ST2 (3,1), ST5 (4,1)	STS	Peteros, Filipinler
[179]	41/ 178	23,0	PCR	Gönüllüler	ST3 (68,0), ST1 (17), ST7 (7), ST2 (2,0), ST4 (2,0), ST6 (2,0), STx (2,0)	DDA	Chiang Rai, Tayland
[180]	13/ 220	23,0	Nested PCR	Sahadan	ST3 (84,6), ST2 (7,7), ST6 (7,7),	DDA	Ayutthaya, Tayland

Çizelge 2.3. (devam) Farklı ülkelerdeki insanlarda izole edilen *Blastocystis* prevalansı

[172]	65/ 250	26,0	B-pri	IBS+Control	ST3 (90,8), ST1 (9,2)	STS	Yeni Delhi, Hindistan
[174]	47/ 141	33,3	DM	İlkokul çocukları	ST3 (67,9), ST1 (26,4), ST2 (3,8), ST4 (1,9)	DDA	Jakarta, İndonesya
[173]	191/ 473	40,4	B-pri	Sahadan	ST3 (51,3), ST1 (32,4), ST2 (14,1), ST4 (2,2)	DDA	Kuala Krau, Malezyiya
[181]	416/ 1025	40,6	DM, FECT, LES, PCR	Okul öğrencileri	(109 örnekten) ST3 (58,7), ST1 (31,2), ST2 (10,1)	PCR- RFLP, STS	Tayland
[175]	25/ 60	41,7	Kültür	Sahadan	ST1 (64), ST3 (24), ST2 (8), ST7 (4)	DDA	Laotian, Laos
[177]	29/ 35	82,8	Kültür, B-pri	Rastgele şehir halkı	ST3 (65,5), ST1 (31,0), ST4 (3,5)	DDA	Peteros, Filipinler
Orta Doğu (% 4,7-65,2)							
[191]	27/ 580	4,7	PCR	Hastaneye başvuranlar	-	-	Hamad, Katar
[193]	133/ 1262	10,5	PCR	Hastaneye başvuranlar	ST3 (80,5), ST1 (14,5), ST2 (2,0),	STS	Mekke, Sudi Arabistan
[189]	69/ 481	14,3	DM	Hastaneye başvuranlar	ST3 (29,0), STx (27,7), ST1 (16,0), ST2 (4,3), ST4 (1,4), ST5 (5,8), ST1+3 (4,3), ST1+4 (4,3), ST3+4 (7,2)	STS	Ahvaz, İran
[186]	58/ 400	14,5	Kültür	Hastaneye başvuranlar	ST2 (36,2), ST3 (32,8), ST1 (31,0)	DDA	Tehran, İran
[188]	45/ 244	18,4	DM	Hastaneye başvuranlar	ST3 (46,7), ST1 (37,8), ST5 (8,9) ST4 (6,6)	STS	Ahvaz, İran
[187]	63/ 300	21,0	Kültür	Hastaneye başvuranlar	ST2 (36,5), ST1 (33,3), ST3 (30,2)	DDA	Tehran, İran
[194]	50/ 218	22,9	Kültür	Kanser (138) ve normal (80) hasta	ST1 (38,0), ST2 (40,0), ST5 (22,0),	STS	Mekke, Sudi Arabistan
[190]	146/ 618	23,6	B-pri	Hastaneye başvuranlar	ST3 (58,4), ST1 (20,8), ST2 (20,8)	DDA	Ahvaz, İran
[27]	64/ 230	27,8	B-pri	Gönüllüler	ST3 (31,3), ST2(28,1), ST1(12,6), ST4(10,9), STx(9,3), ST6(4,7), ST7(3,1)	DDA	Kuzey Kıbrıs
[195]	59/ 133	44,3	B-pri	Semptomsuz 13 farklı ülkeden gelenler	(39 örnekten) ST1 (28,2), ST2 (7,6), ST3 (58,9),	DDA	Şarika, Sudi Arabistan
[154]	157/ 249	63,0	Real time PCR	Okul öğrencileri	ST3 (46,3), ST2 (28,3), ST1 (25,4)	DDA	Trablus, Lübnan
[192]	479/ 735	65,2	real time PCR	Göçmenler	-	-	Katar
Afrika (12,9-84,9)							
[201]	68/ 524	12,9	DM, real time PCR	Gıda işleyicileri	(61 örnekten) ST3 (51) ST1 (30), ST2 (16), ST4 (1,5) ST7 (1,5)	DDA	Tunus
[198]	75/ 351	21,4	B-pri	Okul öğrencileri	ST1 (30,7), ST2 (30,7), ST3 (36,0), ST5 (1,3), ST7 (1,3)	DDA	Benguela, Angola

Çizelge 2.3. (devam) Farklı ülkelerdeki insanlarda izole edilen *Blastocystis* prevalansı

[197]	64/ 110	58,2	Real time PCR	Kırsal halkı	ST1 (50,0), ST3 (28,1), ST2 (21,9)	DDA	Sud-Comoé, Fildişi Sahili
[196]	106/ 174	60,9	real time PCR	Hastaneye başvuranlar	ST1 (34,0), ST2 (26,4), ST3 (25,5), STx(13,2), ST7 (0,9)	DDA	Jambiani, Tanzanya
[199]	185/ 265	69,8	real time PCR (Sybr Green)	Toplumdan	ST1 (46,8), ST3 (24,6), ST2 (21,1),	DDA	Mahajanga, Madagaskar
[200]	167/ 199	84,9	real time PCR	Kreş ve okul öğrencileri	ST1 (30,5), ST2 (25,1), STx (24,1), ST3 (19,7), ST7 (0,6)	DDA	İlero, Nijerya

STx = tanımlanamayan alttür, DDA=barcoding yöntemi.

Bu çalışmalarda ST3 alt türünün en sık saptanan alt tür olduğu bildirilmiştir. Dünya genelinde *Blastocystis* alt türlerinin araştırıldığı çalışmalar ayrıntılı olarak ele alındığında farklı moleküler yöntemlerin kullanıldığı ve birçok farklı coğrafi bölge ve ülkeye ait alt tür dağılımlarının rapor edildiği görülmektedir [5, 54].

Türkiye'de yapılan araştırmalarda *Blastocystis* alt tür dağılımı sıklık sırasına göre ST3, ST1, ST2 ve daha az sıklıkla ST4 olarak tespit edilmiştir. Diğer alt türler farklı çalışmalarda daha nadir olarak bildirilmektedir. Miks alt tür enfeksiyonlarının (%0,9- %10,6 aralığında) da olduğu rapor edilmiştir [19, 23, 24, 53, 64, 116, 127, 202].

Blastocystis prevalansının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda farklı metodların kullanılmasının yanı sıra en sık dışkının direkt mikroskopik incelenmesi kullanılmaktadır. Mikroskopik incelemede bazı araştırmacıların X40 objektifle incelenen mikroskop sahasında beş ve daha fazla sayıda *Blastocystis* saptadıklarında rapor ettikleri, bazı araştırmacıların ise sayıyı dikkate almadan raporlama yapmaları bu protozoonun prevalansının geniş sınırlarda yer almasının diğer bir sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır [203, 204].

2.1.8. Klinik hastalık

Blastocystis'in klinik öneminin olup olmadığı konusundaki bilinmezlikler hala devam etmektedir. *Blastocystis*'in, erişkin ve çocuklarda; diğer patojen parazit, bakteri veya virüslerin yokluğunda hastanın klinik bulgularını açıklayacak herhangi başka bir neden bulunamadığı durumlarda semptomlardan sorumlu olabileceği klinisyen

tarafından göz önünde bulundurularak tedavisinin planlanabileceği belirtilmiştir [4, 205].

Blastocystis'in semptomatoloji ile ilişkisine ait kanıtlar yetersiz olsa da yapılan çalışmalarda *Blastocystis* enfeksiyonunda ishal, karın ağrısı, şişkinlik, bulantı, kusma gibi spesifik olmayan gastrointestinal semptomlar görüldüğü ayrıca irritabl bağırsak sendromu, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) ve ürtiker ile ilişkili olabileceği konusunda çalışmalar mevcuttur [7, 73, 206-209]. Bazı çalışmalarda, *Blastocystis*'in irritabl bağırsak sendromlu (IBS) hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek sıklıkta olduğu gösterilmekle birlikte farklı bulguların elde edildiği çalışmalar da mevcuttur [210-213]. *Blastocystis*'in neden olduğu ileri sürülen intestinal ve ekstra intestinal semptom ve bulguların akut veya kronik olabildiği gözlenmiştir [7, 18, 66, 148, 214, 215].

Blastocystis'in patojenitesi ve semptomatolojisi ile alt türler arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir [18, 155, 208]. Bununla birlikte ST1, ST4 ve ST 7'nin semptomlarla ilişkili olduğu bildirilirken, ST2 ve ST3'ün semptomlarla ilişkili olmayan alt türler olduğu bildirilmiştir [216, 217]. Bazı araştırmacılar ise ST1 ve ST3'ü semptomatik olgularda yüksek prevalansta saptamışlardır [142, 143].

Bağışıklık sistemi baskılanmış olan HIV/AIDS hastaları; immünosupresif ilaç kullananlar, kanser ve transplantasyon hastaları ile bağışıklık sistemini etkileyen kalıtsal hastalıkları olanlarda (örneğin, konjenital agammaglobulinemi, konjenital IgA eksikliği) *Blastocystis*'in fırsatçı bir patojen olabileceği öne sürülmüştür [139, 207, 218]. Bu hasta gruplarında *Blastocystis* tanısında daha güvenilir yöntemler ile tanı konulması tedavi gerekliliği açısından önem taşımaktadır.

2.1.9. Tanı

Parazitler enfeksiyonların tanısında direkt ve indirekt tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Direkt yöntemler: direkt mikroskopik inceleme, boyalı preparat incelemesi, kültür yöntemleri, parazite ait antijenlerin immün tanısal yöntemlerle araştırılması, parazit DNA'sının moleküler yöntemlerle saptanması gibi yöntemleri içermektedir. İndirekt yöntemler ise esas olarak serumda parazit antijenlerine karşı konak immün sistemi tarafından üretilen antikorların tespitine dayanmaktadır [16].

Direkt mikroskopik inceleme düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmasına rağmen *Blastocystis*'in rutin tanısında en yaygın kullanılan yöntemdir. Konvansiyonel yöntemler içinde kültür ve kalıcı boyama yöntemleri de kısıtlı sayıda rutin tanı laboratuvarlarında kullanılmaktadır. *Blastocystis*'in DNA'sını tespit etmek için kullanılan moleküler yöntemler de vardır. Moleküler yöntemlerin yüksek duyarlılık, özgüllüğe sahip olmaları tanıda avantaj sağlarken, maliyetlerinin yüksek olması, donanımlı laboratuvar ve eğitilmiş personel ihtiyacı dezavantajını oluşturmaktadır.

Blastocystis'in patojenitesinin tartışmalı olmasından dolayı raporlanmasının göz ardı edildiği veya mikroskopik incelemede sayıya bağımlı (mikroskopta 40x objektif sahasında beş ve daha fazla *Blastocystis* görülmesi) bildirim yapılması epidemiyolojik verilerin elde edilmesinde ve karşılaştırılmasında sıkıntı yaratmaktadır [10, 47].

Mikroskopik tanı yöntemleri

Dünyada gastrointestinal sistem paraziter enfeksiyonlarının tanısında en yaygın kullanılan tanı yöntemidir.

Blastocystis'in tanısında da direkt mikroskopik inceleme dünyada en sık kullanılan düşük maliyetli tanı metodlarından biridir. Bu yöntemde taze dışkı örneğinden serum fizyolojik ve Lugol solüsyonu ile hazırlanan preparat ışık mikroskopunda incelenmektedir. *Blastocystis*'in farklı boyutlarının ve morfolojik yapılarının bulunması tanıyı zorlaştırmaktadır. Ayrıca dışkıda bulunan lökosit, iri maya hücreleri, bitki polenleri ve diğer artefaktlar nedeniyle direkt mikroskopik inceleme ile *Blastocystis*'in tanımlanması deneyim gerektirmektedir. Kalıcı boyama yöntemlerinden trikrom boyama yönteminin kullanılmasının tanıda duyarlılığı arttırdığı gözlenmiştir. DM inceleme yöntemiyle gözden kaçan *Blastocystis* formlarının trikrom ve diğer kalıcı boya yöntemleriyle tespit edilebileceği belirtilmiştir. Demir-hematoksilen (DHB), Gram, Giemsa ve Wright boyama yöntemlerinin de kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Stensvold ve diğerleri trikrom boyama yönteminin özgüllüğünü % 100 duyarlılığını ise % 82 olduğunu bildirmişlerdir [47].

Trikrom boyama yöntemi ile *Blastocystis*'in kırmızı boyanan küçük çekirdekleri, vakuoler formda dar sitoplazmanın içerisinde yerleşmiş olarak görülmekte, vakuolün yeşil veya kırmızı renkte boyandığı ve yeşil boyanan kalın hücre duvarı saptanabilmektedir. Dışkı mikroskopisinde özellikle (i) hastaların dışkı örneklerinin

10 gün içinde, farklı günlerde en az üç kez alınan örnekte incelenmesi, (ii) hastaların bakteriyel, viral ve diğer patojen parazitler açısından da değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir [4, 101, 219].

Blastocystis'in rutin laboratuvar tanısında en doğru yaklaşım olarak, kalıcı boyama yöntemleri ile kültür yöntemlerinin birlikte kullanılmasının doğru bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir.

Kültür yöntemleri

Blastocystis, % 10 at veya sığır serumu içeren çeşitli ksenik sıvı besiyerlerinde kültürü en kolay yapılan ve üreyebilen intestinal protozoondur. *Blastocystis*'in için laboratuvarlarda en sık Jones' besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyeri düşük maliyeti, kolay hazırlanması nedeniyle tercih edilmektedir. Bununla birlikte Robinson besiyeri, LYGM besiyeri, Boeck ve Drobohlav'ın yoğunlaştırılmış bifazik yumurtalı besiyeri, Dobell ve Laidlaw besiyeri, Diamond's triptikaz serum monofazik besiyeri, Minimal essential medium (MEM) ve Iscove's modified Dulbecco's medium *Blastocystis*'in üretilbileceği diğer besiyerleridir [4, 10, 101, 103, 220]. Bu besiyerleri genellikle %10 at serumu veya sığır serumu içermektedir. Kültür yöntemlerinin direkt mikroskopiden daha duyarlı olduğu bildirilmektedir [10]. Kültür yöntemi; zaman alıcı bir yöntem olup sonuçlar ekimden 2–3 gün sonra değerlendirilmektedir. Birden fazla alt tür içeren örneklerde bazı alt türlerin kültürde daha hızlı çoğaldığı ve ekimi tekrarlanan kültürlerde baskın hale gelebileceği bildirilmektedir [7, 139].

İmmün tanısal yöntemler

Klinik tanıya yönelik günümüzde ticari olarak kullanıma sunulmuş az sayıda tanı kiti bulunmaktadır: Direkt floresan yöntemine dayalı Blasto-Fluor (Antibodies Inc., Davis, CA, ABD) ve ParaFlor B (Boulder Diagnostics, Boulder, CO, ABD) ile *Blastocystis* antijenlerini saptamaya yönelik coproELISA™ *Blastocystis* (Savyon Diagnostics, Ashdod, İsrail) bu kitler arasında yer almaktadır. Direkt floresan yönteminde maliyeti yüksek olan floresan mikroskobu gerekmektedir. Gerek araştırmalarda gerekse rutin laboratuvarlarda bu kitlerin kullanımlarının yaygın olmaması yararlılık ve verimliliklerinin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır [10].

İndirekt tanı yöntemlerinden hali hazırda anti-*Blastocystis* antikorlarının saptanması için kullanıma sunulmuş ticari bir kit bulunmamaktadır. Chen ve diğerleri *Blastocystis* ile enfekte ishallerde sadece dört hastada kendi geliştirdikleri immünblot testi ile hasta serumlarının hiç birinde anti-*Blastocystis* IgG belirlemediklerini bildirmişlerdir [221]. Zierdt ve diğerleri ise *Blastocystis* ile enfekte semptomatik 28 hastanın % 25'inde ELISA yöntemi ile anti-*Blastocystis* IgG yanıtını göstermişlerdir [222].

Blastocystis'e karşı konak immün yanıtı ve protozoonun antijenik değişkenliği konusunda bilgilerin sınırlı olması, anti-*Blastocystis* antikorlarının belirlenmesine yönelik güvenilir ve duyarlı serolojik yöntemlerin geliştirilmesinde kısıtlılık yaratmaktadır [7].

Moleküler tanı yöntemleri

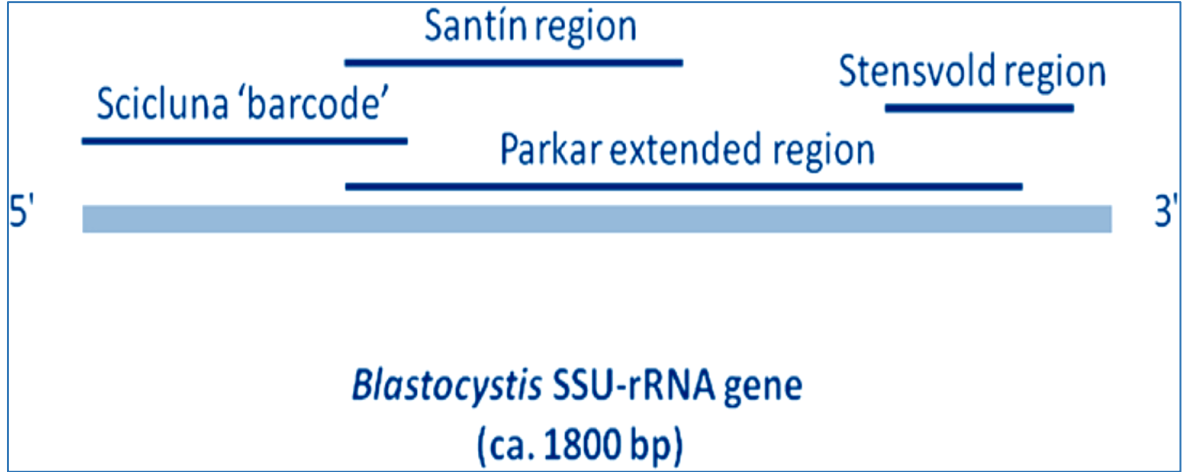
Gastrointestinal sistem paraziter enfeksiyonlarının tanısında mikroskopik inceleme yöntemlerinin (direkt ve boyalı preparat incelenmesi) kullanılması genellikle zaman alıcı, emek yoğun olmakta ve deneyim gerektirmektedir. Bununla birlikte rutin laboratuvarlarda tüm protozoon ve helmintlerin tanısına yönelik kültür, immün tanısal ve moleküler yöntemlerin bulunmaması nedeniyle Türkiye'de ve tüm dünyada tanıda en sık mikroskopik inceleme yöntemleri kullanılmaktadır. Moleküler yöntemlerin kullanılmaya başlamasıyla çeşitli hasta gruplarında *Blastocystis* prevalansının araştırılması ve alt tür analizinin yapılması konusu ilgi çekici bir araştırma alanı haline gelmiştir. *Blastocystis*'in alt tür tanısı için restriction fragment length polymorphism (RFLP) PCR yöntemi kullanılmıştır [223, 224]. Yoshikawa ve diğerleri *Blastocystis*'in insan ve hayvanlardaki alt türlerini saptamak için PCR temelli sequence-tagged site (STS) primerlerini tasarlamışlardır [225]. Bu konvansiyonel PCR yöntemlerinin uzun zaman alması, amplifikasyon sonrası DNA görüntülenmesi için ek olarak jel görüntülemesi işlemine gerek duyulması ve bu sırada DNA ile laboratuvar kontaminasyonu riskinin olması, real time PCR'a göre duyarlılığının düşük olması ve çok sayıda örnek incelenmesi için pratik olmaması kullanımlarında kısıtlılık yaratmaktadır. STS-PCR yöntemi alt tür tespiti için olarak sağlamakla birlikte *Blastocystis*'in prevalansının moleküler tanıyla saptanması için kullanılabilecek pratik yöntem özelliği taşımamaktadır. Son yıllarda teknolojinin gelişmesiyle birlikte moleküler parazitoloji alanında da real time PCR geniş kullanım

alanı bulmuştur. real time PCR konvansiyonel PCR'a göre daha pahalı olmakla birlikte daha hızlı, daha duyarlı bir yöntem özelliği taşımakta, kapalı sistemde DNA çoğaltılması ve görüntülenmesinin aynı anda yapılmasına, çok sayıda örnek incelenmesine imkan tanımakta ve *Blastocystis*'in prevalansının saptanması için bir tarama testi niteliği taşımaktadır. real time PCR ile *Blastocystis* saptanan örneklerde alt türlerin belirlenmesi amacıyla günümüzde sıklıkla *ssu-rRNA* bölgesinin 600 bp uzunluğundaki gen bölgesi barkodlama primerleriyle çoğaltıldıktan sonra DNA dizi analizi yapılmaktadır [62, 226-228].

Blastocystis tanısında araştırmacılar günümüzde moleküler tanı yöntemlerini sıklıkla kullanmaktadır. Clark ile Boehm-Groning ve diğerleri birbirinden bağımsız olarak 1997'de *Blastocystis*'in geniş genetik çeşitliliği olduğunu bildirmişlerdir [223, 229]. *Blastocystis*'in *ssu-rRNA* gen bölgesinin az korunmuş olması cinse özgü primerlerin tasarlanmasında yaşanan zorluğun nedenini oluşturmaktadır. Alt tür tespitinde alt türe özgü primerler tasarlanmıştır. Bu primerlerle bilinen alt türler tespit edilebilmekte yeni bir alt türün tespiti için genom dizilenmesi ve sonrasında bu alt tür için özgül primer tasarımı gerekmektedir. Yoshikawa ve diğerleri STS primerlerini tasarlayarak bu amaç için kullanmışlardır [225]. Bu primerlerle insan ve hayvanlardan izole edilen *Blastocystis* ST1-ST9 alt türlerinin tanımlanması mümkün olmuştur. Daha sonra insan ve hayvanlardan izole edilen ST1-ST9 alt türlerinin belirlenmesine için daha özgül olduğu bildirilen STS primerleri tasarlanmıştır [125]. STS primerleriyle yapılan alt tür tespitinde kültür sıvılarından izole edilen *Blastocystis* DNA'sı kullanılmıştır. Bu yöntemle miks alt tür enfeksiyonlarının belirlenmesi mümkün olmaktadır. Bununla birlikte kültür ortamında miks alt türlerin farklı yoğunlukta üremeleri nedeniyle STS-PCR ile her zaman tespit edilmeleri de mümkün olmamakta ve kültürde baskın olan alt tür belirlenmektedir. Konvansiyonel PCR yönteminin kullanıldığı STS-PCR ile çok sayıda örnek içeren çalışmalar emek yoğun olmakta ve rutin laboratuvarlarda kullanımı gerçekleştirilememektedir.

Stensvold ve diğerleri real time PCR yöntemiyle *Blastocystis* saptanması amacıyla cinse özgü primer ve probler tasarlamışlardır. Bu yöntem için direkt dışkıdan DNA izolasyonu yapılmaktadır [14, 230]. Bu yöntemle *Blastocystis* saptanan örnekler, *ssu-rRNA*'nın 600 bp'lik gen bölgesi barkodlama primerleri ile çoğaltıldıktan sonra alt tür tespiti için yine aynı primerler kullanılarak DNA dizi analiziyle tanımlanması yapılmıştır [63, 230]. Barkodlama ile yapılan alt tür tespitinde miks alt türlerin

belirlenememesi önemli bir eksikliktir. Bu sorunun giderilmesine yönelik hali hazırda az sayıda çalışma bulunmaktadır [17, 231]. Alt tür tespiti için bazı araştırmacılar 1800 bp uzunluğunda olan *ssu-rRNA*'nın farklı gen bölgelerine ait primerler tasarlayarak, bu gen bölgelerinin çoğatılması sonrasında DNA dizi analizini kullanmışlardır (Şekil 2.5) [62, 63, 226, 232].



Şekil 2.5. *Blastocystis ssu-rRNA* geninin şematik gösterimi. Araştırmacılar tarafından alt tür tanımlaması için kullanılan gen bölgeleri gösterilmiştir [60].

Real time PCR yönteminin *Blastocystis* prevalansının belirlenmesi amacıyla rutin laboratuvarlarda kullanılabilecek yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir moleküler tarama testi olduğu bildirilmiştir. Real time PCR'ın kullanım kolaylığı bu konu üzerinde araştırmacıların gerek TaqMan problemleri gerekse Sybr-Green kullanarak çeşitli araştırmalar yapmalarına olanak sağlamıştır. Bu yöntemle *Blastocystis* varlığı araştırılmakta fakat alt tür tanımlanması yapılamamaktadır [14, 233, 234].

Son yıllarda *Blastocystis* ile birlikte gastrointestinal sistemde yerleşen diğer protozoonların saptanmasına yönelik multipleks real time PCR yöntemine dayalı ticari kitler kullanıma sunulmuştur [49, 235]. Özellikle ishallerde erken tanı ve tedavi açısından bu testlerin rutin hasta hizmetinde kullanımı faydalı bulunmaktadır.

2.1.10. Tedavi

Blastocystis ile enfekte hastalarda tedavinin uygulanması konusunda tam olarak görüş birliği bulunmamaktadır. Semptomatik olguların yanı sıra asemptomatik olgularda da *Blastocystis* prevalansının belirli oranlarda saptanması, olguların klinik semptom ve bulgularının tek sorumlusunun *Blastocystis* olarak tanımlanmasının

mümkün olamayacağını belirten görüşler bulunmaktadır. Bununla birlikte *Blastocystis* enfeksiyonunda anaerobik organizmalara veya diğer protozoonlara da etkili olan çeşitli ajanlar (metronidazol, ornidazol, seknidazol, nitazoksanit, tinidazol, ketokonazol, pentamidin, kinin, iyodokinol, emetin, paromomisin ve sülfametoksazol-trimetoprim) kullanılmaktadır [207]. Günümüzde GİS semptom ve bulguları olan hastalarda yapılan incelemelerde, hastanın şikayetlerine neden olabilecek viral, bakteriyel ve diğer paraziter etkenlerin tespit edilemediği, hastanın klinik tablosunu açıklayabilecek başka bir intestinal sisteme ait neden bulunamadığı durumda tedavi kararının klinisyen tarafından verilebileceği belirtilmektedir [4].

Blastocystis enfeksiyonu tedavisinde dünya genelinde ilk tercih edilen ilacın metronidazol olduğu görülmektedir [7, 205, 236]. Bununla birlikte metronidazolun tedavi başarısızlığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır [236, 237]. Roberts ve diğerleri çalışmalarında metronidazol ile tedavi edilen 18 hastada *Blastocystis* eradikasyonun başarısız olduğunu bildirmişlerdir [205]. Henüz direnç genleri ve mekanizmaları tanımlanamamış olmasına rağmen metronidazole karşı *Blastocystis*'in suşlarının direnç geliştirebileceği *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir [238]. Trimetoprim (TMP)/sülfametoksazol (SMX) ve nitazoksanit ise ikinci seçenek ilaçlar olarak önerilmektedir [239].

Blastocystis enfeksiyonunda kullanılan ilaçların listesi Çizelge 2.4'de sunulmuştur [207, 237].

Tedavi sonrasında semptomların kaybolmasının, ilaç etkisinin *Blastocystis*'den daha çok diğer enterik patojenlerinin eradikasyonuna bağlı olduğu ileri sürülmektedir [236].

Çizelge 2.4. *Blastocystis* enfeksiyonun tedavi için kullanılan antimikrobiyal ajanlar listesi [237]

İlaç	Önerilen doz	Yan etkiler	Uygulanan doz	Etkisi (%)
Metronidazol	Erişkinlerde: 500–750 mg tid, 10 gün	Metalik tat, mide bulantısı	250–750 mg tid	33
			500 mg tid	100
			750 mg tid	100
			750 mg tid	100
			750 mg tid	100
	Çocuklarda: 20–30 mg/kg/d, 10 gün		800 mg tid	0
			1500 mg tek doz	80
			1500 mg tek doz	100
			2000 mg tek doz	0
			30 mg/kg bid	67

Çizelge 2.4. (devam) *Blastocystis* enfeksiyonunun tedavi için kullanılan antimikrobiyal ajanlar listesi

Trimetoprim (TMP) –sulfamethoxazole (SMX)	Erişkinlerde: 320 mg TMP + 1600 mg SMX, bid, 7 gün	Deride kazıntı, döküntü	6 mg/kg TMP + 30 mg/kg SMX, bid	95
	Çocuklarda: 6 mg/kg TMP + 30 mg/kg SMX, bid, 7 gün	iştahsızlık, bulantı, kusma, deri döküntüsü	320 mg TMP + 1600 mg SMX, bid 80 mg TMP + 400 mg SMX, tid	93 100
Nitazoxanide	Erişkinlerde: 500 mg tid, 3 gün	Sarımsı idrar, karın	500 mg tid 500 mg tid	100 100
	Çocuklarda: 1–3 yaş: 100 mg bid, 3 gün 4–11 yaş: 200 mg bid, 3 gün	ağrısı, baş ağrısı, mide bulantısı	N/A 100–200 mg bid (<12 yaş) 500 mg bid, (>12 yaş)	97 86
Paromomycine	Erişkinlerde: 500 mg tid, 10 gün	Mide bulantısı, karın	25 mg/kg tid, 10 gün	100
	Çocuklarda: 25 mg/kg tid, 10 gün	ağrısı, krampolar, ishal	500 mg tid, 10 gün 500 mg tid, 10 gün	77 100
Iodoquinol	650 mg tid, 10–20 gün	–	650 mg tid, 10–20 gün	0
Ketoconazole	200 mg/d, 14 gün	–	200 mg/g, 14 gün	100
Emetine	–	–	100 µg/ml	50
Ornidazole	–	Mide bulantısı	500 mg tid, 7 gün	50
Tinidazole	–	Mide bulantısı	2000 mg, tek doz veya 50 mg/kg/g, 5 gün	46
<i>Saccharomyces boulardii</i>	250 mg bid, 10 gün	–	250 mg bid, 10 gün	78
Paromomycine (PAR)– metronidazole (MTZ)	–	–	500 mg PAR bid + 750 mg MTZ tid, 10 gün	100
Üçlü tedavi (nitazoxanide+furazolidone +secnidazole)	–	–	–	0
Üçlü tedavi (diloxanide furoate+secnidazole+ TMP–SMX)	–	–	500 mg tid + 400 mg tid + 160 mg–800 mg bid	60

2.1.11. *Blastocystis*'in güncel durumu–*Blastocystis* ile intestinal mikrobiyota ilişkisi

Blastocystis sağlıklı insan popülasyonlarında yüksek prevalansta bulunmakta ve intestinal sistemde varlığı, yüksek bakterial çeşitlilikle pozitif korelasyon göstermektedir. İntestinal mikrobiyota kompozisyonu hakkında bir indikatör olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca vücut kitle indeksi (VKİ) normal olan kişilerde prevalansı, obez kişilere göre daha yüksek saptanmıştır [240, 241].

Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC) tarafından *Blastocystis*'in aktif bir araştırma alanı olduğu belirtilmekte ve UNESCO'nun Kuresel Su Patojenleri Projesi kapsamında değerlendirilmektedir [115, 242].

2.2. *Dientamoeba fragilis*

Dientamoeba fragilis insanlarda gastrointestinal sistem enfeksiyonlarının bir nedeni olarak klinik yaklaşımda “göz ardı edilen”, yaşam döngüsü ve patojenitesinin çeşitli yönleri hakkında tartışmalar içeren kamçılı bir protozoon parazittir. Parazitologlar tarafından “ihmal edilen bir parazit” olarak tanımlanmaktadır. *D. fragilis*'in son 100 yılda gastrointestinal sistem hastalıkları ile ilişkisini gösteren çalışmalar [243] bulanmasına rağmen, hala gerçek bir patojen olarak tanımlanmasında fikir birliği bulunmamaktadır. Rutin laboratuvarlarda tanısı genel olarak boyalı preparat incelenmesi ile gerçekleştirilmektedir. *D. fragilis* ile ilgili araştırmaların son yıllarda hızla arttığı dikkat çekmektedir, hayvan deneyleri ile bu kamçılıının insan enfeksiyonundaki potansiyel rolü hakkında ilgi çekici sonuçlar elde edilmiştir [244-246].

İlk başta bir amip türü olarak tanımlanan bu organizmanın günümüzdeki biyolojik sınıflandırmasında *ssu-rRNA* gen dizilerinin analizi sonrası *Histomonas* ile yakın ilişkisi ortaya çıkmıştır ve bir trikomonad olduğu saptanmıştır [247, 248]. *D. fragilis*'in *Enterobius vermicularis* yumurtaları yoluyla bulaşabileceğine dair bazı kanıtlar olmasına rağmen, protozoonun bulaş yolu tam olarak açıklanamamıştır [249]. Ayrıca, *D. fragilis*'in tanımlanmış olan iki farklı genotipinin virülansla ilişkisi konusunda henüz yeterli bilgi mevcut değildir [250].

2.2.1. Tarihçe

İngiliz araştırmacı Charles Venyon 1909 yılında, dışkı preparatlarını inceleme sırasında diğer amiplerden farklı olan yeni bir protozoonu tanımladığını kendi not defterlerinde bildirmiştir. Ancak, protozoonun bilimsel literatürde yer almasını 1918 yılında Margaret Jepps ve Clifford Dobell sağlamıştır [251]. Bu protozoonun insan gastrointestinal sisteminde bilinen diğer amiplerden belirgin bir şekilde farklı olduğunu bunun sadece yeni bir tür olarak değil, yeni bir şubede sınıflandırılması gerektiğini bildirmişlerdir [251].

Jepps ve Dobell bu protozoonun çekirdeğini organizmanın karakteristik bir özelliği olarak görmüşler, bu formun insanda bilinen diğer bağırsak amiplerinden kolayca ayırt edilen çift çekirdeğinin olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu protozoona insan vücudundan dışarı atıldıktan çok kısa süre içinde hızlı morfolojik dejenerasyon göstermesi ve kırılgan (fragil) doğası nedeniyle *D. fragilis* ismi verilmiştir. *D. fragilis* bir amoeboid organizma olarak kabul edilmesine rağmen, Dobell *D. fragilis*'in nükleer aparatının kamçıya benzediğini, çekirdek bölünmesinin amip için tipik olmadığını ve çekirdek bölünmesinin kamçılılara daha çok benzediği sonucuna çok sayıda deneyle varmıştır [252]. Dobell *D. fragilis*'in kamçılı olduğunu ileri sürmekle birlikte, kamçıyı göstermek için çeşitli deneyler yaptığını, ancak hepsinin başarısız olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte Dobell, *D. fragilis* ve *Histomonas meleagridis* (kümes hayvanları ve kuşların patojeni) arasındaki benzerlikleri tanımlamıştır ve *D. fragilis*'in evrimsel gelişimi süresinde kamçısını tamamen kaybeden bir protozoon olduğunu ifade etmiştir [253]. Daha sonra yapılan elektron mikroskopik incelemeler ve moleküler analizler ile *D. fragilis*'in «flagellası olmayan» bir flajellat protozoon olduğu ve *Histomonas meleagridis* ile yakın ilişkisi doğrulanmıştır [254-257]. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile yapılan incelemelerde, *D. fragilis*'in kamçıya benzer yapılarının dışsal olarak ifade edilmediği anlaşılmıştır [258].

Dientamoeba fragilis'in tanımlandığı 1918 yılından sonraki kısa dönemde yapılan çalışmalarda, protozoonun semptomatoloji ile ilişkisi konusunda çelişkili sonuçlar elde edilmiş ve bu durum günümüzde de belirsizliğini sürdürmeye devam etmiştir [251, 259-261].

2.2.2. Sınıflandırma

Jepps ve Dobell literatürde sadece *D. fragilis*'i tanımlamakla kalmayıp, aynı zamanda sınıflandırmasını yapan ilk araştırmacılarıdır [251]. 1918 yılına kadar literatürde gastrointestinal sistemde *Entamoeba*'ların üç türü; non-patojen *Entamoeba coli* ve *Entamoeba nana* (*Endolimax nana*) ile patojenik *Entamoeba histolytica* bilinmekteydi. Jepps ve Dobell bu yeni protozoonu *Entamoebidae* ailesinde sınıflandırırken, *D. fragilis*'in çift çekirdekli bir forma sahip olduğunu ve kist formunun olmadığını, bu nedenle yeni bir cins olarak tanımlanması gerektiğini belirtmişlerdir [251]. İnsan vücudunun dışında bu organizmanın “fajil–kırılgan” yapısı nedeniyle hızla dejenere olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra bu

protozoona *D. fragilis* adı verilmiştir ve günümüzde de aynı isimlendirme kullanılmaktadır.

Wenrich (1940) ve Grasse (1953) tarafından yapılan araştırmalar sonucunda *D. fragilis* ve *Histomonas meleagridis* *Dientamoebidae* ailesi içinde sınıflandırmıştır [262, 263].

Elektron mikroskopik incelemelerle birlikte Bird ve diğerleri (1970) *D. fragilis*'in tek ve çift çekirdekli trofozoitlerinin ince yapısını göstermişlerdir [264]. Camp ve diğerleri ise TEM'le *D. fragilis*'in bir *Trichomonas* olduğunu doğrulamışlar, böylece önceki yıllardaki Dobell'in gözlemlerini kanıtlamışlardır [265]. Dwyer ilk moleküler çalışmalar sonucunda *Entamoeba* türleri hariç *Dientamoeba*, *Histomonas* ve *Trichomonas* arasında önemli antijenik benzerlikler gösterdiğini elde etmiş [247, 266]. 1980 yılında Levine ve diğerleri *D. fragilis*'i *Trichomonadida* takımında yeniden sınıflandırmışlardır [267].

Dientamoeba fragilis'in taksonomideki yerini kesin olarak belirlemek için ilk moleküler yöntemler 1996 yılında kullanılmış ve filogenetik analiz *ssu-rRNA* dizilerine dayanılarak yapılmıştır [268]. *D. fragilis*'in *ssu-rRNA* geninin, diğer trikomonadlara kıyasla düşük G+C içeriğine sahip olduğu, ~100 ekstra nükleotid içerdiği gösterilmiştir ve trikomonadlarla yakın filogenetik ilişkide olduğu belirlenmiştir [268-270].

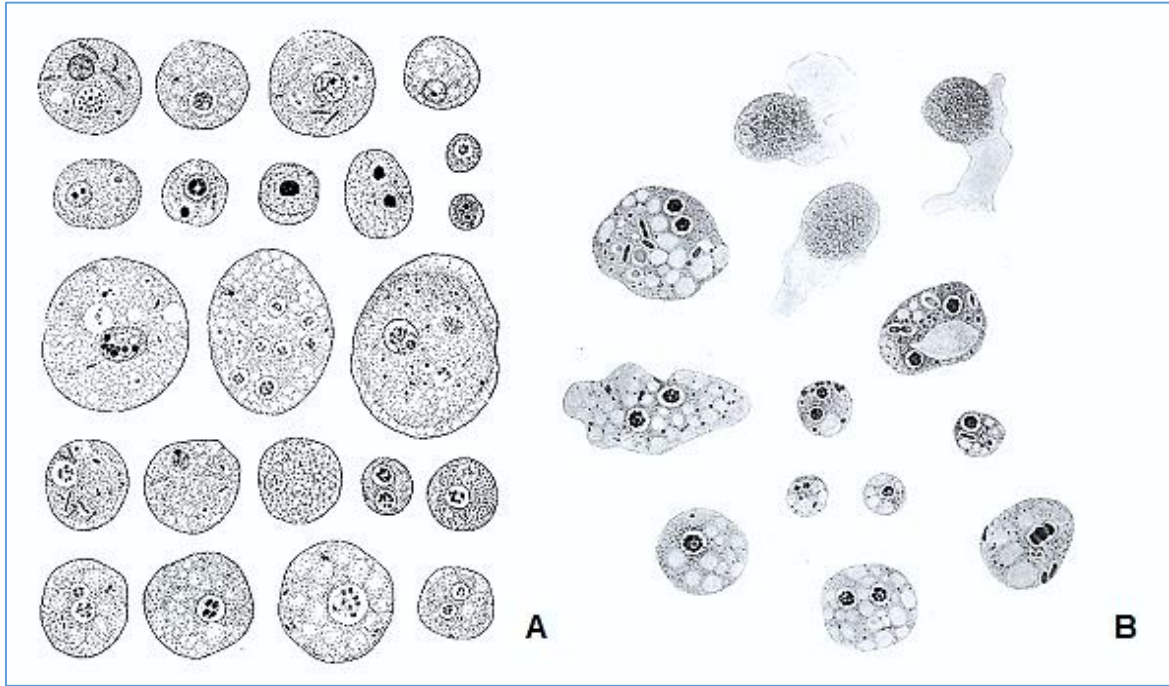
Dientamoeba fragilis'in günümüzde geçerli olan son güncel sınıflandırması aşağıdaki Çizelge 2.5'de bildirilmiştir

Çizelge 2.5. *Dientamoeba fragilis*'in günümüzde geçerli olan sınıflandırması

Taksonomik sıralama		Taksonomist
➤ Alan	<i>Eukaryota</i>	
➤ Alem	<i>Excavata</i>	Cavalier-Smith (2002)
➤ Altalem	<i>Metamonada</i>	Grasse (1952), Cavalier-Smith (2003)
➤ Şube	<i>Parabasalia</i>	Honigberg (1973)
➤ Sınıf	<i>Tritrichomonadidae</i>	Cepicka, Hampl & Kulda (2010)
➤ Takım	<i>Trichomonadida</i>	Kirby(1947), Brugerolle ve Patterson(2001)
➤ Aile	<i>Dientamoebidae</i>	Grasse (1953)
➤ Cins	<i>Dientamoeba</i>	Jepps and Dobell (1918)
○ Tür	<i>Dientamoeba fragilis</i>	Jepps and Dobell (1918)

2.2.3. Morfolojisi ve biyolojik özellikleri

Dientamoeba fragilis'in ışık mikroskobu ile yapılan morfolojik tanımlamalarının çoğu 1900 yıllarında yapılmıştır. Araştırmacılar *D. fragilis*'in morfolojik görüntülerinin çizimlerini yayınlamışlardır [251, 262, 271-276]. Bu çizimlerin bir kısmı direkt dışkı preparatından [262, 273-277], bir kısmı ise kültürlerden yapılmıştır [251, 252]. Bu nedenle çizimler arasında bazı farklılıklar görülmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. *Dientamoeba fragilis*'in (A) Wenrich (direkt dışkıdan) ve (B) Jepps ve Dobell (kültürden) tarafından önceki yıllarda sunulan çizimleri [251, 262].

Dientamoeba fragilis dışkıda DM incelemede genellikle yuvarlak ve 3,5 ila 12 μm boyutlarında görülmektedir [251]. Kültürde ise daha büyük boyutlara (20 ila 40 μm) eriştiği saptanmış, bu boyut aralığının da *E.histolytica*, *E.hartmanni* ve *Endolimax nana* ile örtüştüğü görülmüştür [278-280]. *D. fragilis*'in çekirdekleri DM inceleme preparatlarında görülememektedir. Taze dışkıda düzensiz loblu ince, hiyalin, yaprak benzeri yalancı ayaklarını kullandığı belirtilmiştir (Resim 2.2) [251]. *Entamoeba* türlerinin trofozoitlerinden farklı olarak, *D. fragilis* psödopodlarının endoplazma akışı ve ileri hareket göstermediği gözlenmiştir [281, 282].

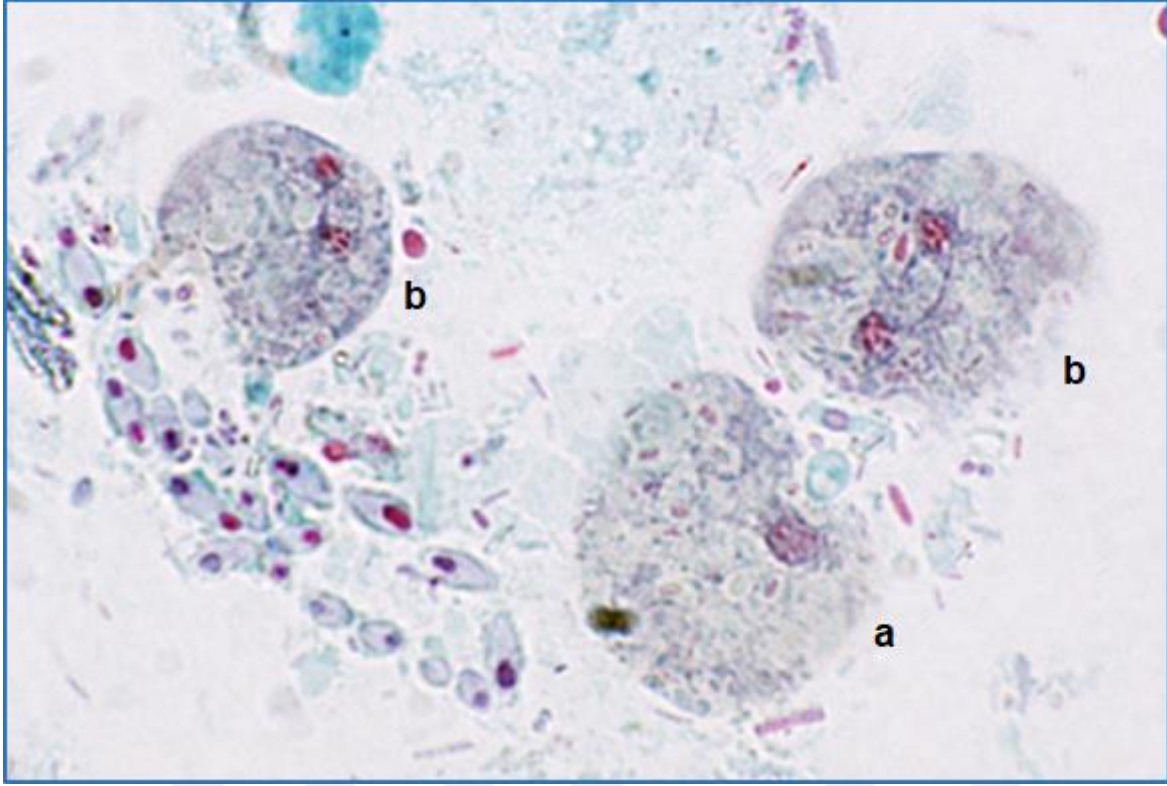


Resim 2.2. *Dientamoeba fragilis*'in Nativ-Lugol preparatta, trofozoitinin hiyalin psödopodu ve granüler sitoplazmasının görünümü [283].

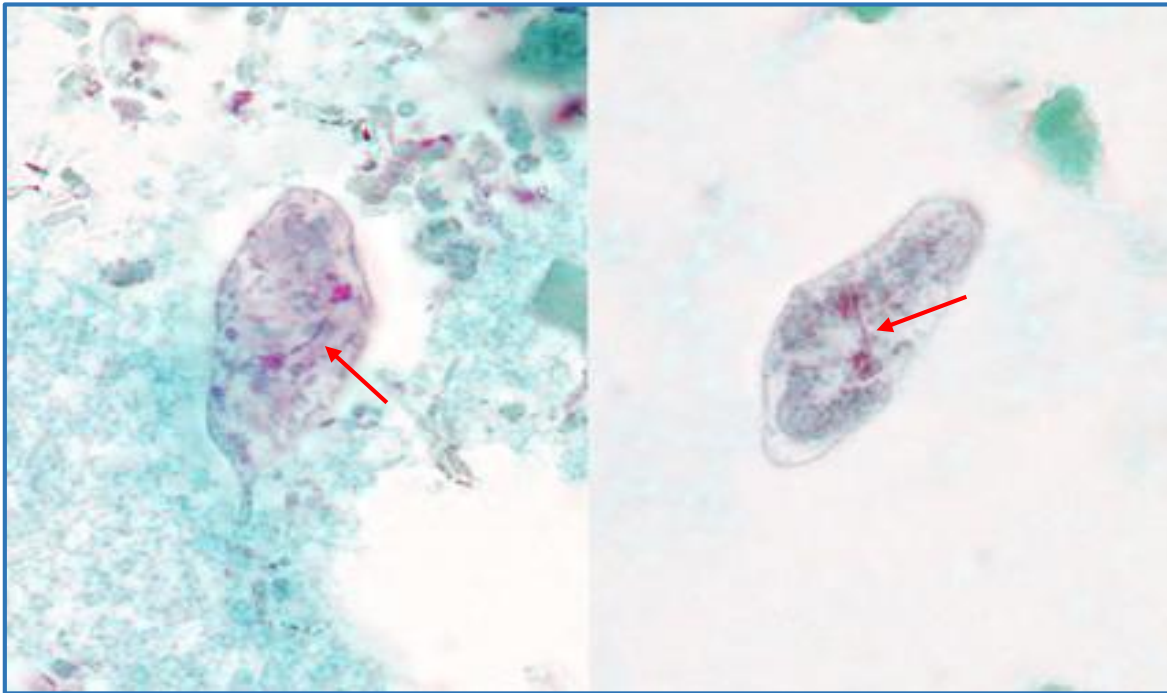
Jepps ve Dobell, kalıcı boyalarda *D. fragilis* trofozoitlerinin %80'inin çift çekirdekli ve %20'sinin tek çekirdekli olduğunu tespit etmişlerdir [251]. *D. fragilis*'in en çok çift çekirdekli tipik formu gözlenmektedir. Çekirdek sayısının aynı hastadan farklı günlerde alınan dışkı örneklerinde önemli ölçüde değişebildiğini belirtmişlerdir [273]. Daha az sıklıkla bazı trofozoitlerin dört veya beş çekirdekli şekilleri de tanımlanmıştır [252, 275]. Çekirdeklerin çapı 1 ila 3 μm arasında olmakla birlikte trofozoitin büyüklüğüne göre de değişebilmektedir [251, 262]. Genellikle çekirdekler parçalanmış görünüme sahip ve periferik kromatinsiz dört ila sekiz granül içermektedir (Resim 2.3) [262].

Hücrenin bölünmesi gövdesinin basitçe daralmasıyla gerçekleşmektedir. Çekirdeğin bölünmesi de sadece tek çekirdekli trofozoitlerde olmaktadır [252, 274]. Dobell, *D. fragilis*'in iki çekirdeğini bir araya getiren bir "bağlantı ipliği" tanımlamış ve bunu bir "centrodesmus" olarak adlandırmıştır (Resim 2.4). Bu yapı tek çekirdekli formlarında bulunmamıştır [252]. Wenrich bu yapının bir intranükleer bölünme merkezinden kaynaklandığını belirtmiş ve bu yapıyı "bölünme sonrası desmose" olarak isimlendirmiştir [274]. Camp'in, *D. fragilis* ile ilgili TEM çalışmasında, Dobell'in, nükleusları kalıcı olarak bağlayan bu yapıdan bahsettiği ve *D. fragilis* ile hindilerin patojeni olan *Histomonas meleagridis*'in morfolojik olarak benzerliğini de ilk defa bu

yapı ile karşılaştırmış olduğu belirtilmiştir. Nükleus yakınında iki dal halinde izlenen bu ektranükleer lifler, TEM görüntüleri ile de doğrulanmıştır [265].



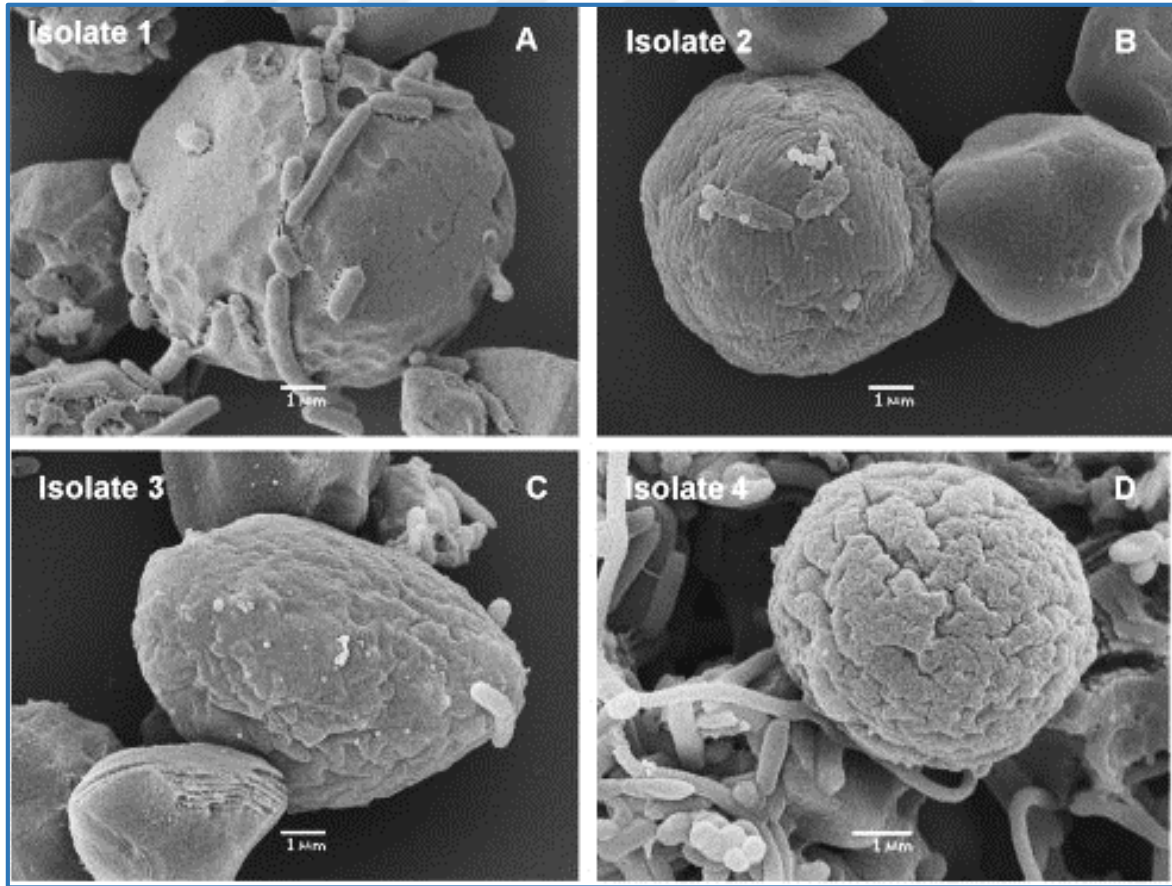
Resim 2.3. *Dientamoeba fragilis*'in trikrom boyasındaki trofozoitleri (a – tek çekirdekli, b – çift çekirdekli) [283].



Resim 2.4. *Dientamoeba fragilis*'in trikrom boyasıyla görülen bağlantı ipliği (centrodesmus) [283].

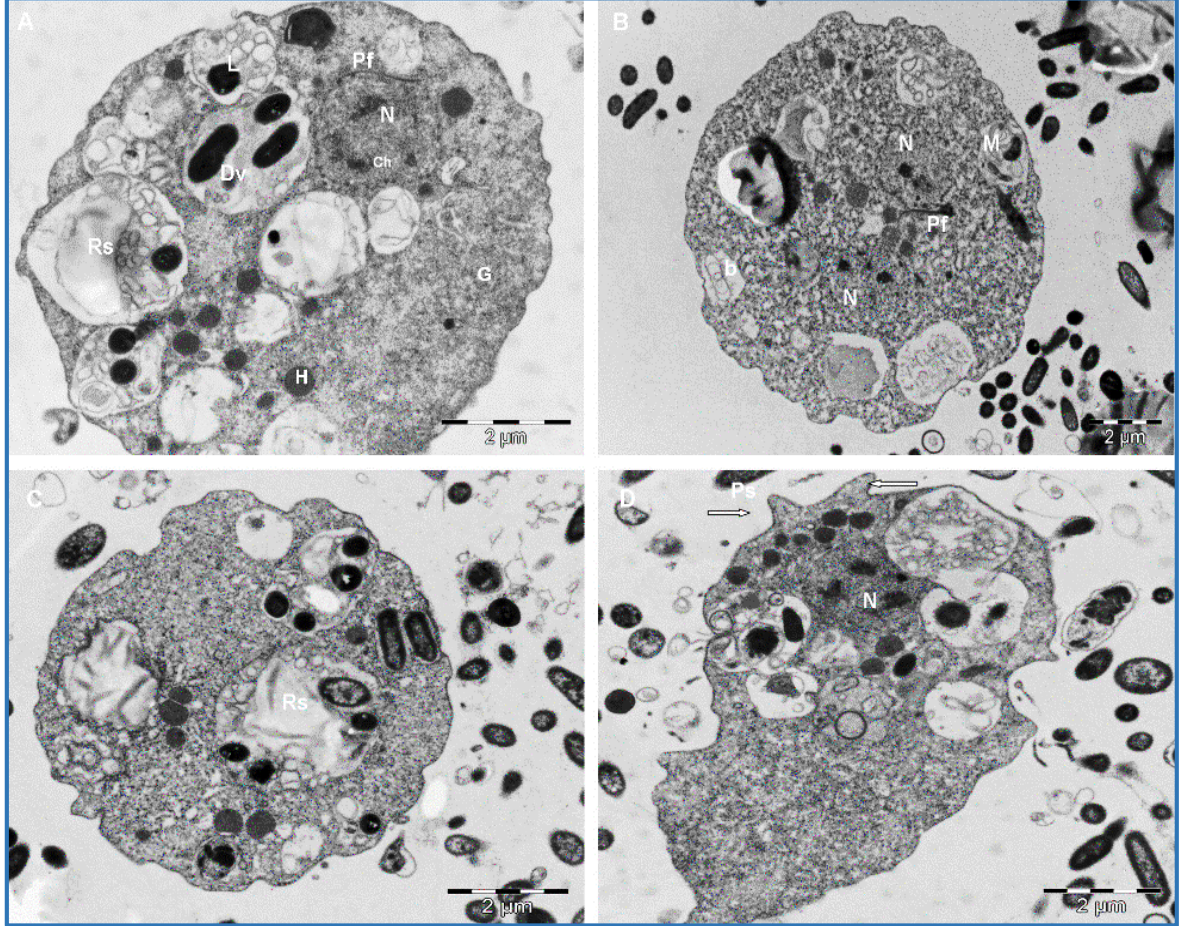
Dientamoeba fragilis 4 μm ila 20 μm arasında değişen pleomorfik trofozoitlere sahiptir (Resim 2.3 ve 2.4) [262, 264, 271, 273, 283]. Kültürdeki trofozoitleri ise 20 ila 40 μm boyutunda görülmektedir [279]. Boyalı dışkı preparatlarında periferik kromatin içermeyen büyük parçalanmış bir merkezi karyozomun görülmesi genellikle *D. fragilis* trofozoiti için tipiktir [56, 284]. Banik ve diğerleri son zamanlarda, ksenik kültürde üretilen *D. fragilis* yüzey yapılarını ve ince yapısal detaylarını kapsamlı bir şekilde araştırmışlardır [257]. Taramalı elektron mikroskopuyla (SEM), iki farklı trofozoit izolatının (pürüzsüz ve pürüzlü hücreler) olduğunu bildirmişlerdir (Resim 2.5). Bunun biyolojik olarak veya hatta parazitin patojenitesi açısından önemli olup olmadığı henüz açıklığa kavuşturulmamıştır.

Geçirimli elektron mikroskobu ile *D. fragilis*'in morfolojisi hakkında yapılan araştırmalar bulunmaktadır [254, 257, 265, 285]. Banik ve diğerleri SEM, TEM, konfokal ve ışık mikroskopisi yöntemlerini kullanarak *D. fragilis*'in morfolojisi hakkında detaylı inceleme yapmışlardır. *D. fragilis*'in dört farklı kültür izolatını kullanmışlardır (Resim 2.6) [257].



Resim 2.5. *Dientamoeba fragilis*'in dört izolatının dış yüzey yapılarını gösteren SEM mikroskopisi. (A) İzolat 1, (B) İzolat 2, (C) İzolat 3 ve (D) İzolat 4 [257].

İn vitro kültürlerden elde edilen dört *D. fragilis* izolatının çekirdek sayısı dahil olmak üzere farklı organellerin şekli, boyutu ve yapısı gibi morfolojik ve ince yapısal özellikleri Çizelge 2.6'da bildirilmiştir.



Resim 2.6. *Dientamoeba fragilis* trofozoitin ince yapısını gösteren TEM mikrografisi (A) tek çekirdekli (B) çift çekirdekli (C) çekirdeksiz (D) amoeboid - psödopodlu.

- | | |
|---------------------------|---------------------------|
| - B, bakteri; | - My, miyelin kılıfı; |
| - Ch, kromatin cisimleri; | - N, çekirdek; |
| - Dv, sindirim vakuol; | - Pf, parabasal filament; |
| - G, glikojen; | - Ps, psödopodi; |
| - H, hidrojenozomlar; | - Rs, piring nişastası. |
| - L, lizozom; | |

Çizelge 2.6. *Dientamoeba fragilis*'in organellerinin özellikleri [257]

Ad	Özellikleri	Boyutları
Çekirdek	- bir, iki veya üç; - çoğunlukla yuvarlak; - hücrenin merkezinde; - çift zarlı ve çok sayıda nükleer porlar içerir; - genellikle periferik kromatin içermeyen iki ila sekiz kromatin tanesi içerir - Vesiküler yapı genellikle perinükleer bölgede bulunur;	0,86–3,52 µm
Golgi kompleksi	- vesiküler yapı genellikle perinükleer bölgede bulunur; - 7-10 sisterna	Yaklaşık 450 nm uzunluğunda
Endoplazmik retikulum	- düzgün ve pürüzlü endoplazmik retikülumlar gözlenir; - çekirdeğin etrafında yerleşmiş	Yaklaşık 500 nm uzunluğunda
Hidrojenozomlar	- yuvarlak veya oval şekilli; - çift katmanlı membran; - sitoplazmada bulunur; - hücre başına 5-15 tane	0,12-0,83 µm
Sindirim vakuolleri	- sitoplazma boyunca bulunur; - hücre başına 1–10 tane	0,59–4,2 µm
Lizozomlar	- esas olarak hücrenin arka bölgesinde, hücre zarına yakın bir yerde bulunur	0,50–2 µm
Bazal gövde bileşenleri		
Aksostil	- mikrotübüller iplikçik; - genellikle hücrenin ön bölgesinde bulunur	
Kosta	- protein yapı	
Parabazal filament	- çekirdeğin yakınında bulunur; - tekil veya küme formunda; - 30-40 tüylü segmentten oluşur	

2.2.4. Yaşam döngüsü ve bulaş yolları

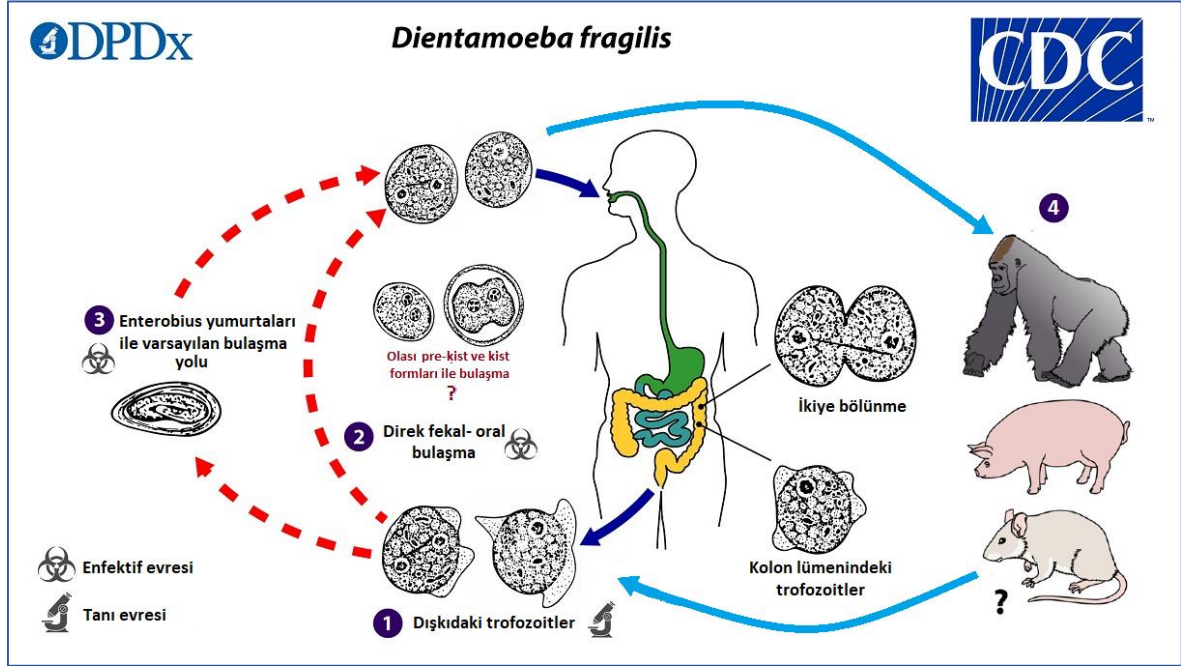
Dientamoeba fragilis'in yaşam döngüsü ve bulaşma yolları günümüze kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu protozoonun uzun zamandır sadece trofozoit formunun olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte, fare ve insan dışkı örneklerinde yapılan deneysel çalışmalarda *D. fragilis*'in kistik formlarının da bulunduğu ve bulaşmada rol oynayabileceği ileri sürülmüştür [4, 11, 258]. Bununla birlikte bazı araştırmacılar bu görünümünün dejenere trofozoit yapısı olabileceğini ifade etmektedirler [286]. Günümüzde *D. fragilis*'in kistik formunun var olup olmadığı hakkında, araştırmacılar tarafından kabul gören bir fikir birliği bulunmamaktadır.

Dientamoeba fragilis'in sadece trofozoit formunun olması dış ortam koşullarında uzun süre hayatta kalamayacağını ve bu nedenle de bulaşının helmint yumurtaları aracılığıyla olabileceği teorisini doğurmuştur [286, 287]. *D. fragilis*'in bir helmint vektörüne sahip olabileceği hipotezi, bu protozoona yakın benzerlik gösteren

H.meleagridis'in bir helmint vektörüne sahip olması ile ortaya atılmıştır [287]. Helmint vektör teorisi, insan kıl kurdu *Enterobius vermicularis*'in yumurtalarını yutarak kendini *D. fragilis* ile enfekte ettiğini bildirilen Ockert'in çalışmalarıyla da desteklenmektedir [288-290]. Yang ve Scholten, Girginkardeşler ve diğerleri daha sonra *E. vermicularis* ve *D. fragilis* insidansı arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir [291, 292].

Menghi ve diğerleri ilk olarak moleküler teknikler ile *D. fragilis*'in yaşam döngüsündeki *E. vermicularis*'in rolünü araştırmışlardır. *D.fargilis* ve *E.vermicularis* ile koenfekte hastalardan *E. vermicularis* yumurtalarını izole ederek DNaze ile yumurtaların dış kısmını dekontamine etmişlerdir. Bu yumurtalardan DNA izolasyonu yaparak PCR ile *D. fragilis* DNA'sını çoğaltmaya çalışmışlar ancak saptayamamışlardır [249]. Benzer şekilde, Stark ve diğerleri de *E.vermicularis* yumurtaları ile *D. fragilis* enfeksiyonu arasında bir ilişki tespit edememişlerdir [293]. Bununla birlikte, *E. vermicularis* enfeksiyonlarının kendiliğinden iyileşebileceğini, *D. fragilis* enfeksiyonunun ise kronikleşebileceğini ve de *D. fragilis* taşıyıcılarının her zaman *E.vermicularis* ile enfekte olmayacağını ileri sürmüşlerdir [56, 258]. Bununla birlikte *D. fragilis*'in domuz çiftliklerinde de tespit edilmesi, domuzların doğal taşıyıcılar olabileceğine dair hipotezleri desteklemektedir [294, 295].

Dientamoeba fragilis'in bulaş yolu ve yaşam döngüsü ile ilgili güncel hipotezler Şekil 2.7'da gösterilmektedir: *D. fragilis* bir veya daha fazla olası formda bir konak tarafından dış ortamdan alınmaktadır. İnsanlara veya hayvanlara bulaşında rol oynayan kesin formu henüz tanımlanmamıştır. Goriller, domuzlar ve kemirgenlerin de doğal konak olarak kabul edilmesine rağmen, insanların *D. fragilis*'in ana konağı olabileceği düşünülmektedir. *D. fragilis* insan vücuduna alındıktan sonra kalın bağırsağa geçerek ikiye bölünme ile çoğalmaktadır. *D. fragilis* trofozoitleri (olası prekestleri ve kistleri) dışkı ile dışarı atılarak gıda ve su kaynaklarına bulaşmaktadır. *D. fragilis* daha sonra yaşam döngüsünü tamamlaması için yeni bir konak tarafından oral yolla alınmaktadır.



Şekil 2.7. *Dientamoeba fragilis*'in yaşam döngüsü ve bulaşma yolunun mevcut hipotezinin göstergesi (CDC'den alınarak modifiye edilmiştir <https://www.cdc.gov/dpdx/Dientamoeba/index.html>).

Sonuç olarak, *D. fragilis* enfeksiyonunun hijyen koşullarının bozuk, kreş, ve yurt gibi kapalı ya da yarı kapalı kalabalık topluluklarda görülme sıklığının yüksek olması direkt olarak fekal-oral yolla bulaştığını gösterse de, bu bulaşma yolunun nasıl olduğu hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.2.5. Genetik çeşitliliği

Günümüzde mevcut literatüre dayanarak, *D. fragilis*'in genotip 1 ve genotip 2 (Bi/PA suşu olarak da bilinir) olarak iki genotipi bilinmektedir: Dünyada en yaygın genotip 1 tespit edilmiştir [11, 55-57]. Bu genotipler arasındaki farklılık 18S rRNA dizileri karşılaştırılarak saptanmış ve bu farklılığın %2 ila %4 oranında olduğu belirtilmiştir [31, 296-298]. Stensvold ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, *D. fragilis*'in her iki genotipi için aktin ve elongasyon faktörü 1α genleri karşılaştırılmış, genotipler arasında genlerdeki farklılıkların çok az olduğu (%3) saptanmış ve iki genotipin yakın zamanda birbirinden ayrıldığı gösterilmiştir [298]. Bu bulgu *D. fragilis*'in genetik çeşitliliğinin düşük düzeyde olduğunu belirtmekle birlikte bu konuda yapılan çalışma sayısı sınırlıdır [11].

2.2.6. Patogenez

Dientamoeba fragilis'in keşfinden günümüze kadar yaklaşık 100 yıl geçmesine rağmen patojenitesi hakkında tartışmalar hala devam etmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar bu protozoonun patojenik potansiyelini tam olarak belirleyememiştir. *D. fragilis*'in bir patojen olduğunu destekleyen çalışmalar, tedavi sonrasında semptomların gerilemesi ve laboratuvar incelemelerde parazitin tespit edilememesine dayanmaktadır. Bununla birlikte kontrol gruplarında ve asemptomatik olgularda *D. fragilis*'in hasta gruplarına göre daha yüksek sıklıkta tespit edilmesi bu parazitin GIS hastalıklarına neden olup olmadığı hakkında belirsizliğe yol açmaktadır [299].

Hali hazırda *D. fragilis* için uygun bir hayvan modelinin olmaması, bu protozoonun patojenitesi hakkındaki bilgilerin kısıtlı olmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, yeni geliştirilen fare modeli bu protozoonun patojenitesi hakkında yapılacak çalışmalar için ümit vaat etmektedir [258]. Bu hayvan modelinde Koch postülatının üç kriteri yerine getirilmiştir. *D. fragilis* ile enfekte edilen tüm farelerde enfeksiyon tespit edilmiş, şekilsiz dışkı yaptıkları ve istatistiksel olarak anlamlı derecede kilo kaybettikleri saptanmıştır. Enfekte farelerde yapılan histopatolojik doku incelemesinde, kontrol grubuna göre hafif bir inflamatuvar yanıt olduğu gösterilmiştir. Fekal kalprotektin seviyeleri de enfekte grupta kontrollere göre iki kattan fazla saptanmıştır. Ek olarak, enfekte farelerin dışkılarında yapılan mikroskopik incelemelerde polimorfonükleer lökositler tespit edilmiştir. Yaklaşık 600 trofozoitin enfeksiyon oluşturabileceği de gösterilmiştir [258].

Dientamoeba fragilis transkriptomu ile ilgili yapılan çalışmalarda, amoeba porbenzeri proteinler ve putative immünomodülatör proteinler gibi çeşitli potansiyel patojenite belirteçleri tanımlanmıştır. Bununla birlikte, yüksek oranda tespit edilen virülans faktörü transkriptlerinin, katepsin L-benzeri sistein proteaz ailesinin üyeleri olduğu belirlenmiştir. *D. fragilis*'te tanımlanan sistein proteaz transkriptlerinin büyük çoğunluğunun daha önce *Trichomonas vaginalis*'te virülans faktörleri olarak tanımlanan sitotoksik sistein proteazlarla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir [300, 301].

Gelecekte bu konuda yapılacak çalışmaların *D. fragilis*'in patojenik potansiyeline ışık tutabileceği ve muhtemel patojenite mekanizmalarını açıklayabileceği beklenmektedir.

2.2.7. Epidemiyolojisi

Dientamoeba fragilis tüm dünyada yaygın görülen bir GİS protozoonudur. *D. fragilis* prevalansı, kullanılan farklı tanı yöntemlerine göre % 0,04 ile % 91 arasında değişmektedir [302]. Yapılan çalışmalarda verilerde genellikle gelişmiş ülkelerde yaygın olduğunu bildirmektedir [11]. Bu durum *D. fragilis*'in tanısında kullanılan metodların az gelişmiş ülkelerde yaygın olmamasından kaynaklanmaktadır [302]. Günümüze kadar *D. fragilis* enfeksiyonu ile ilgili yapılan çalışmaların bir kısmı Çizelge 2.7'de sunulmuştur.

Dünya genelinde *D. fragilis*'in prevalansı; Avrupa ülkelerinde (İtalya, İspanya, Hollanda, Belçika, Portekiz, Danimarka, Britanya Adaları, İsveç, Almanya) %0,9-%82,9, Kuzey ve Güney Amerika ülkelerinde (Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya, Dominik Cumhuriyeti, Honduras, Meksika, Arjantin, Kanada, Venezuela) %0,04-%91, Avustralya ve Yeni Zelanda da %0,3-16,8, Asya ülkelerinde (Vietnam, Malezya, Pakistan, Endonezya) %2,1-%21, Orta Doğu ülkelerinde (Gazze Şeridi, İran, Mısır, Oman, İsrail, Lübnan) %1-%60,6, Afrika ülkelerinde (Güney Afrika Cumhuriyeti, Libya, Tunus, Cezayir, Madagaskar, Malavi) %1,1-%17 olarak tespit edilmiş, Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise *D. fragilis* prevalansı %0-%18,3 olarak bildirilmiştir (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.7. Farklı ülkelerdeki insanlardan izole edilen *D. fragilis*'in prevalansı

Kaynak	(%)	Hasta grubu	Hasta sayısı	Yöntem	Ülke
Türkiye (% 0-18,3)					
[32]	0	IBS hastalarda	55	TB ve kültür	Ankara, Türkiye
	0	Gastroenteritli hastalarda	80		
	0	Sağlıklı gönüllülerde	50		
[33]	0	Travma sonrası splenektomi hastaları	60	PCR	Ankara, Türkiye
[34]	0,2	İlköğretim okullarında öğrenim gören çocuklar	2975	DM	Van, Türkiye
[35]	0,6	Çocuklarda	1181	DM, FECT, Modifiye TB ve KAF	Malatya, Türkiye
[36]	0,8	Sağlık çalışanlarında	241	DM	Malatya, Türkiye

Çizelge 2.7. (devam) Farklı ülkelerdeki insanlardan izole edilen *D. fragilis*'in prevalansı

[37]	0,9	Sihhi ve Gayri Sihhi Müesseselerdeki İşletmeciler ve Çalışanlarda	2443	DM, FECT, Modifiye TB ve KAF	Malatya, Türkiye
[38]	1,3	Diyareli çocuklarda	225	DM, FECT	Eskişehir, Türkiye
[39]	2,7	Parazitoloji laboratuvarına başvuran hastalarda.	770	DM, FECT ve TB	Ankara, Türkiye
[40]	2,4	Huzurevinde yaşayan ve bilgilendirilmiş gönüllülerde	82	DM, FECT ve TB	Manisa, Türkiye
[41]	3,2	Gastrointestinal semptomları olan hastalarında	280	DM ve DHB	Van, Türkiye
[42]	5	Kronik ishalli çocuklarda	60	DM ve TB	Ankara, Türkiye
[43]	8,8	Parazitoloji laboratuvarına başvuran hastalarda.	400	DM, FECT ve TB	Manisa, Türkiye
[44]	9	Parazitoloji laboratuvarına başvuran hastalarda.	85707	DM ve TB	Ankara, Türkiye
[45]	10,7	Gastrointestinal şikayeti olan hastalarda	121	Real time PCR	Kayseri, Türkiye
[46]	18,3	Gastrointestinal semptomları olan poliklinik hastalarında	490	DM ve kültür	İzmir, Türkiye
Avrupa (% 0,9-82,9)					
[303]	0,9	Parazitoloji laboratuvarına başvuran yerli ve göçmen hastalarda.	1503	Giemsa boyama	Reggio nell'Emilio, İtalya
[304]	1,6	Parazitoloji laboratuvarına başvuran hastalarda	8313	DM	Katalonya, İspanya
[305]	3	<i>C. difficile</i> enfeksiyonu olan hastalar	259	Real time PCR	Hollanda
	14	<i>C. difficile</i> enfeksiyonu olmayan hastalar	455		
[306]	3,4	Çeşitli gastrointestinal şikayetleri olan hastalarda	1141	DM	İtalya
	11,3	Çeşitli gastrointestinal şikayetleri olan hastalarda	151		
[294]	3,7	Çeşitli gastrointestinal şikayetleri olan hastalarda	3139	DM	İtalya
[307]	4,1	Çeşitli gastrointestinal şikayetleri olan hastalarda	1989	DM	İtalya
[308]	6,3	Paraziter bağırsak enfeksiyonu şüpheli hastalarda	448	DM ve TFT	Brüksel, Belçika
[309]	6,3	Akut gastrointestinal hastalığı olan çocuklarda	176	Real time PCR	Portekiz
[310]	8	Gastrointestinal şikayeti olan bireylerde	-	-	Hollanda
[311]	11,7	Paraziter bağırsak enfeksiyonu şüpheli hastalarda	103	DM	Danimarka
[138]	14	IBS hastaları	100	Real time PCR	Danimarka
	15	Kontrol hasta grubu	96		
[312]	14,6	2002-2004 yılları arasında ek sağlık uygulamalarına katılan kişilerde	3719	DM	Britanya Adaları
	16,9	2005-2007 yılları arasında ek sağlık uygulamalarına katılan kişilerde	2491		
[313]	21,4	Paraziter bağırsak enfeksiyonu şüpheli hastalarda	491	Real time PCR	Parma, İtalya

Çizelge 2.7. (devam) Farklı ülkelerdeki insanlardan izole edilen *D. fragilis*'in prevalansı

[314]	23	4-16 yaş arası çocuklarda	220	Standart laboratuvar testleri	Hollanda
[30]	25,8	Gastroenteritli hastalarda	1374	Real time PCR	Hollanda
	37,6	Sağlıklı kontrol grupta	1026		
[315]	30,3	Parazitoloji laboratuvarına başvuran hastalarda.	1652	Real time PCR	Parma, İtalya
[29]	32	Gastrointestinal şikayeti olan hastalarda	397	DM ve Real time PCR	Zwolle, Hollanda
[271]	36,3	Psikiyatri hastanesindeki mahkumlarda	80	DM	Hollanda
[316]	38	Çocuk hastalarda	739	Real time PCR	Hollanda
[317]	43	Danimarka'daki Statens Serum Institut'a gönderilen örneklerde	9945	Real time PCR	Danimarka
[318]	43,2	Kronik karın ağrısı olan çocuklarda	132	Real time PCR	Hollanda
	50,6	Sağlıklı kontroller	77		
[319]	45	Kronik ishalli çocuk hastalarda	200	Real time PCR	Hollanda ve Belçika
	71	Sağlıklı kontroller	122		
[320]	60	Okullarında öğrenim gören çocuklar	299	Real time PCR	İsveç
	60	Okullarında öğrenim gören çocuklar	89		
[321]	62	Gastrointestinal semptomlar ile başvuran çocuk hastalarda	163	Multipleks real time PCR	Hollanda
[322]	82,9	Herhangi bir bağırsak protozoonu ile enfekte olmuş çocuklarda	123	DM	Almanya
Orta Doğu (% 1-60,6)					
[323]	1	Üniversite kız öğrencilerinde	305	DM ve FECT	Gazze Şeridi
[324]	1,1	Kanser hastalarda	85	DM ve FECT	Tehran, İran
	1,2	Birincil immünyetmezli hastalarda	80		
[325]	2,3	Çeşitli laboratuvarlardan alınan dışkı örnekleri	1000	Nested PCR	Tebriz, İran
[326]	5	IBS hastalarda	40	DM, FECT ve TB	Mısır
[327]	5,1	Rutin mikrobiyolojik analiz için başvuran hastalarda	857	DM	Oman
[328]	8,8	Parazitoloji laboratuvarına başvuran hastalarda.	319	DHB	Gazze Şeridi
[329]	6	Parazitoloji laboratuvarına başvuran hastalarda.	200	Real time PCR	Tehran, İran
	13,5			PCR	
[330]	8,9	Paraziter bağırsak enfeksiyonu şüpheli hastalarda	168	DM	Mısır
	29,8			Kültür	
[331]	20,1	Gastrointestinal şikayeti ile başvuran poliklinik hastalarında	1114	DM	İsrail
[154]	60,6	Okul çocukları	249	Real time PCR	Trablusşam, Lübnan
Afrika (% 1,1-17)					
[332]	1,1	Okul çocuklarında	94	Kültür	Durban, Güney Afrika Cumhuriyeti
[333]	2	Hastaneye başvuran çocuklar ve yeni doğanlarda	350	DM	Sirte, Libya

Çizelge 2.7. (devam) Farklı ülkelerdeki insanlardan izole edilen *D. fragilis*'in prevalansı

[334]	5,5	Üniversite hastanesine başvuran hastalarda	27053	DM	Safakes, Tunus
[335]	8,8	Üniversite hastanesine başvuran hastalarda	2603	DM, çoklaştırmaya ve TB	Cezayir, Cezayir
[199]	9,4	Yatan hastalar ve asemptomatik gönüllüler	265	Real time PCR	Mahajanga, Madagaskar
[336]	15,5	Gıda işleyicilerinde	8,502	DM	Tunus
[337]	17	HIV ile enfekte çocuklarda	35	Multipleks real time PCR	Malavi
Kuzey ve Güney Amerika (% 0,04-91)					
[338]	0,04	Gastrointestinal rahatsızlığı olan hastalarda	2604	DM ve TB	Rocky dağları, ABD
[339]	1,1	İshalli eşcinsel erkeklerde	274	DM	Şikago, ABD
[340]	1,2	HIV/AIDS hastalarından	82	DHB	São Paulo, Brezilya
[341]	1,3	Eşcinsel erkeklerde	150	DM	Kaliforniya, ABD
[342]	2	Hafif ila orta derecede dehidratasyon ve ishal olan hastalarda	100	DM	Dominik Cumhuriyeti
[343]	2,1	HIV-negatif hastalarda	48	DM	San Pedro Sula, Honduras
[212]	2,2 26,7	IBS hastalarında Sağlıklı kontrol grupta	45 45	PCR	Meksiko, Meksika
[344]	2,3	Göçmen çocuk hastalarında	87	DM	Buffalo, ABD
[345]	2,4	Parazitoloji laboratuvarına başvuran hastalarda	14203	DM	New York, ABD
[346]	2,7	Yerli aborijen toplum insanlarda	112	DM	Salta, Arjantin
[347]	3	Kırsal kesimdeki çocuklarda	266	DM	Honduras
[348]	3	HIV-pozitif hastalarda	34	DM	Kuzey Bölgesi, Brezilya
[349]	4 8,6	Anaokulu personeline Anaokulu çocuklarda	146 900	DM	Toronto, Kanada
[292]	4,2	Parazitoloji laboratuvarına başvuran hastalarda	43029	DM	Kanada
[350]	5	Yurtdışından evlatlık edilen çocuklarda	1042	Wheatley'in Modifiye TB	ABD
[351]	9,6	<i>Entamoeba histolytica</i> /E. <i>dispar</i> pozitif olan hastalarda	125	Kültür	Meksika, Meksika
[352]	21,6	Asemptomatik bireyler	88	PCR	São Paulo, Brezilya
[353]	25,6	İshal olmayan HIV ile enfekte hastalarda	82	DM	Buenos Aires, Arjantin
[354]	35,5	Kırsal toplumda	228	Real time PCR	Karakas, Venezuela
[355]	52,5	Ortak kullanım alanlarda yaşayan dini üyeler topluluğunda	219	DM	Los Angeles, ABD

Çizelge 2.7. (devam) Farklı ülkelerdeki insanlardan izole edilen *D. fragilis*'in prevalansı

[356]	2,6 91	Hastaneye başvuran çocuklarda Sağlıklı çocuklarda	5774 189	DM IFA	Ontario, Kanada
Avustralya ve Yeni Zelanda (% 0,3-16,8)					
	0,3	HIV ile enfekte homoseksüellerde	618		
[8]	0,8	HIV ile enfekte olmayan homoseksüellerde	628	DM	Sidney, Avustralya
	1,1	Homoseksüel olmayan hastalarda	622		
[250]	0,9	İshalli hastalarda	6750	DM	Sidney, Avustralya
[357]	1,5	İshalli hastalarda	260	Kültür	Brisbane, Avustralya
[358]	3	Gastrointestinal semptomları olan hastalarda	1350	DM	Christchurch, Yeni Zelanda
[293]	5,2	Gastrointestinal şikayetleri olan hastalarda	750	Real time PCR	Sidney, Avustralya
[359]	5,5	Mikrobiyoloji laboratuvarına başvuran hastalarda	472	Multipleks PCR	Sidney, Avustralya
[360]	16,8	Bir yerleşim yerindeki gastrointestinal şikayetlerin ortaya çıkması sırasında incelenen örneklerde.	125	DM	Sidney, Avustralya
Asya (% 2,1-21)					
[361]	2,1 2,3	Gastrointestinal semptomları olan hastalarda Sağlıklı kontrol grupta	180 88	Real time PCR	Da Nang, Vietnam
[362]	3,3	Kırsal toplumdan	150	Wheatley'in Modifiye TB	Negeri Sembilan, Malezya
	3,5		171	DM	
[210]	4 4	IBS ile ilişkili ishali olan hastalarda	171 171	Kültür PCR	Karachi, Pakistan
[363]	21	Toplumdan	242	DM	Irian Jaya, Endonezya

Yapılan çalışmalarda en sık ışık mikroskopunun kullanıldığı görülmekle birlikte, PCR veya kültüre göre daha düşük duyarlılığa sahip olduğu bildirilmektedir. Birçok araştırmacı mikroskopik incelemenin diğer yöntemlerle birlikte kullandığında, *D. fragilis*'in tanı duyarlılığının önemli ölçüde arttığını bildirmektedir [330]. Son zamanlarda *D. fragilis*'in tanısında geliştirilmiş real time PCR testlerinin kullanımıyla bu protozoonun prevalansının yüksek olarak saptandığı bulunmuştur [302].

Bununla birlikte, kültür yapmanın emek yoğun ve zaman alıcı, moleküler testlerin ise maliyetinin yüksek olması nedeniyle bu yöntemlerin rutin tanı laboratuvarlarında kullanımı mümkün olmamaktadır.

2.2.8. Klinik hastalık

Dientamoeba fragilis ile enfekte olgularda ishal, karın ağrısı, mide bulantısı, iştahsızlık, halsizlik, yorgunluk, kilo kaybı gibi semptom ve bulguların olduğu, bazı olgularda eozinofili saptandığı bildirilmiştir. Eozinofili çocuk hastaların %50'sinde ve yetişkin hastaların ise %10'unda belirlenmiştir. Bu parazit ile enfekte hastalarda en yaygın semptomların kronik ishal ve yorgunluk olduğu gözlenmiştir.

Haughwout ve Horrilleno 1920 yılında GIS şikayetleri olan üç Filipinli çocukta *D. fragilis* bildirmiştir [260]. Bu bildirimden kısa bir süre sonra 1927 yılında Gittings ve Waltz *D. fragilis* ile enfekte olan ve tedavi sonrası GIS semptomlarının kaybolduğu iki çocuk vakasını rapor etmişler [364]. Günümüze kadar da yüzlerce çalışma ve olgu sunumları *D. fragilis*'in potansiyel bir patojen olduğuna destek sağlamıştır [55, 56, 293]. Belirtilen raporların büyük çoğunluğuna göre *D. fragilis* ile enfekte hastalarda genellikle akut veya kronik ishal ile karın ağrısı bulunmaktadır. Bazı olgu çalışmaları *D. fragilis*'in kolit hastalarında bir etken olabileceğini bildirmiş, ancak istatistiksel olarak bu hastalık ile bağlantının zayıf olduğunu göstermişlerdir [55, 56, 365]. *D. fragilis*'in IBS ile ilişkisinin zayıf olduğu belirtilmiştir [366, 367].

Wenrich ve diğerleri ABD'deki 1 060 üniversite öğrencisinin dışkı örneklerinin % 4,3'de *D. fragilis* tespit etmişler ve bu hastalardaki başlıca semptomların ishal ve karın ağrısı olduğunu saptamışlardır [368]. Hakansson, *D. fragilis* ile enfekte olan hastaların çoğunun GIS şikayetlerinin olduğunu ve karbarson ile tedavi sonrası hastaların semptomlarının tamamen kaybolduğunu raporlamıştır [281, 282].

Norberg ve diğerleri retrospektif olarak yapan bir çalışmada, *D. fragilis* enfeksiyonunun okul öncesi yaştaki erkek çocuklarda en yüksek insidansı gösterdiğini ve bu hastaların çoğunun semptomatik olduğunu bildirmişlerdir [369].

İtalya'da gündüz bakımevine başvuran çocuk ve erişkin toplam 1989 hastada *D. fragilis*'in görülme sıklığının *Giardia duodenalis*'e göre iki kattan (% 4,1'e kıyasla %1,8) daha fazla olduğunu bulmuşlardır. *D. fragilis* ile enfekte olan hastaların klinik semptomlarını, *G. duodenalis* ile enfekte olanlara göre daha yüksek saptamışlardır [370]. Vandenberg ve diğerleri 488 hastada *D. fragilis* (% 6,3) ve *G. duodenalis*'yi (% 7,1) benzer prevalanslarda saptamışlar, *D. fragilis* ile en sık karşılaşılan semptomların karın ağrısı (% 69,2) ve diyare (% 61,5) olduğunu belirtmişlerdir [308]. Türkiye'de Manisa'da 400 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, *D. fragilis*'in (%8,8)

G. duodenalis (%8,5) kadar yaygın olduğu ve de karın ağrısı ve ishale ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Ancak, *D. fragilis* enfeksiyonu olan hastalarda bulantı veya kusma, anoreksi ve kilo kaybı gibi semptomların daha az olduğunu bildirilmiştir [43].

Wit ve diğerlerinin Hollanda'da yaptığı bir çalışmada, *D. fragilis*'i sağlıklı kontrol grubunda (% 14,6) GIS şikayeti olanların hastalara (% 10,3) göre daha yüksek sıklıkta saptanmıştır [371]. Bruijnesteijn ve diğerleri 1515 semptomlu hasta ve 1195 sağlıklı kontrol grubu içeren büyük bir vaka kontrol çalışmasında, *D. fragilis* prevalansını semptomlu olan hastalarda % 25,7, sağlıklı kontrol grubunda ise % 37,3 olarak bulmuşlardır [29]. Vaka kontrol çalışmaları *D. fragilis*'in insan GIS'inin normal flora üyesi olabileceğini düşündürmektedir.

Costa ve diğerleri yakın zamanda seyahat öyküsü olan ve eozinofili saptanan 11 çocuk hastanın yedisinin *D. fragilis* ile enfekte olduğunu tespit etmişler ve bu hastaların anoreksi, aralıklı kusma, karın ağrısı ve ishal gibi semptomlarının olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, *D. fragilis* pozitif olan hastaların dışkılarında kalprotektin artışı olduğunu tespit etmişler [372]. Türkiye'de de Aykur ve diğerleri *D. fragilis*'in potansiyel patojenitesinin fekal örneklerde parazit tespiti ve yüksek kalprotektin konsantrasyonları ile ilişkili olduğunu ve bu nedenle parazitin sadece zararsız bir komensal olmadığını ileri sürmüşlerdir [373].

2.2.9. Tanı

Mikroskopik tanı yöntemleri

Dientamoeba fragilis'in dış ortamda kalma süresi 24 ila 48 saat olarak bildirilmesine rağmen, morfolojik görünüşü açısından hayatta kalma süresi sınırlıdır ve dışkı örnekleri en kısa sürede incelenmeli veya defekasyon sonrası uygun bir fiksatife alınarak saklanmalıdır. Tanı duyarlılığını arttırmak için gün aşırı veya 10 gün içinde üç farklı günde dışkı incelenmesi yapılmalıdır [4]. Direkt lam-lamel arası incelemelerde parazit refraktil, yuvarlak formlar olarak görülebilmesine rağmen *D. fragilis*'in kesin tanısı için taze dışkı örneklerinin trikrom veya DHB gibi kalıcı boyalar hazırlanarak incelenmesi gerekmektedir. Kalıcı boyalı preparatların, deneyimli personel tarafından en az 300 alan olacak şekilde incelenmesi gerekmektedir.

Kültür yöntemleri

Dientamoeba fragilis'i tespit etmek ve üretmek için yaklaşık 90 yıldır kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Günümüze kadar Boeck ve Drbohlav besiyeri [374], Robinson besiyeri [375], Dobell ve Laidlaw's besiyeri [376], Cleveland-Collier besiyeri [377], Balamuth besiyeri [378] ve TYGM-9 [379] gibi çok çeşitli kültür teknikleri kullanılmıştır. Dobell ve Svensson, 1929'da *D. fragilis*'in "monoksenik" kültürünü yapan ilk araştırmacılarıdır. Önceki tüm yapılan kültürler *Blastocystis*'in aşırı çoğalmasına neden olmuştur. Dobell tarafından geliştirilen kültür tekniğini modifiye ederek, Ringer çözeltisinde seyreltilmiş yumurta akı, pirinç unu ve at serumundan oluşan iki fazlı bir ortam kullanmışlardır. Ayrıca, bu besiyerinde *D. fragilis*'in 42 °C'de en iyi şekilde ürediğini bildirmişlerdir [252].

Dientamoeba fragilis'i dışkıdan üretmek ve araştırma amaçlı çoğaltmak için birçok kültür teknikleri kullanılmıştır [300, 380]. Ancak, günümüzde *D. fragilis*'i üretmek için aksenik kültür mevcut değildir. *D. fragilis*, esas olarak besiyeri içeriğinde *Escherichia coli*'den oluşan ksenik kültürlerde oldukça iyi üreme göstermektedir. Çoğalması için 42 °C'lik bir sıcaklık ve anaerobik bir ortamın olması da önemli sayılmaktadır. Loeffler'in yatay iki fazlı besiyeri de *D. fragilis*'in iyi üremesini sağlamıştır [380]. Barratt ve diğerleri modifiye edilmiş kültür içeriğinde; kolesterol, ferrik amonyum sitrat ve pirinç nişastası içeren Earle'in dengeli tuz çözeltisi, anaerobik koşullar altında Loeffler'in serumlu yatay katı fazı içeren besiyeri ile birlikte kullanıldığında üstün bir üreme gösterdiğini bildirmişlerdir [380]. Bu kültür ortamı 24 saat oda sıcaklığında saklanan dışkıda ve 10 saate kadar soğuk ortamda saklanan dışkılarda başarılı bir üreme göstermiştir. Bağırsak parazitleri için kültür yöntemleri çok karmaşık ve zaman alıcıdır; bununla birlikte kalite kontrol gereksinimleri de zorunludur. *D. fragilis* için kültür yöntemlerinin kullanımı deneyimli parazitoloji laboratuvarlarıyla sınırlıdır [220].

İmmun tanısal yöntemler

Antijen tespiti

Antijen tespiti için ticari olarak mevcut bir ürün bulunmamaktadır. Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar mevcuttur [381]. Özellikle hızlı, yüksek duyarlı ve özgül testlerin geliştirilmesi, rutin laboratuvar ortamında kullanılması için son derece yararlı olacaktır.

Antikor tespiti

Chan ve diğerleri indirekt immüno Floresan testi geliştirerek *D. fragilis* enfeksiyonu tespit edilen hastalardan alınan serum örneklerinin pozitif titreye sahip olduğunu bulmuşlar ve bu örneklerin immunoblotting yöntemi ile 39-kDa *D. fragilis* proteinini gösterdiklerini ifade etmişlerdir [356]. Bu proteinin yapısı ve patojenitedeki rolü günümüze kadar açıklanamamıştır.

Moleküler tanı yöntemleri

İnsanları enfekte ederek farklı GIS semptomlara neden olan protozoonların hızlı, duyarlı ve özgüllüğü yüksek testlerle tanımlanmasını sağlamak için moleküler tanı yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır [16, 29, 321, 359]. Direkt mikroskopik yöntemler ile yapılan çalışmaların çoğunluğundaki duyarlılık eksikliği nedeniyle, enterik protozoonların tanısı için moleküler tanı yöntemlerin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.

Klinisyen tarafından *D. fragilis*'in bir patojen olarak tanımlanması veya göz ardı edilmesi, hasta takibi için de önemlidir, çünkü kronik enfeksiyonların ortaya çıkma olasılığını göz önünde bulundurarak tedavi gerekli olabilmektedir. Bunun için günümüzde iyi bir donanımlı rutin tanı laboratuvarlarında moleküler tanı yöntemleri mikroskopik tanı yöntemleriyle birlikte kullanılmaktadır. Mevcut olan multipleks real time PCR testleri, *D. fragilis*'i ve diğer enterik patojen protozoonları dışkı örneklerden hızlı bir şekilde tanımlamayı sağlamaktadır [382]. Dışkı örneklerinde *D. fragilis* DNA'sını saptamak için kullanılan primer ve prob lar ile ticari olarak temin edilebilen PCR kitleri Çizelge 2.8 ve 2.9'da listelenmiştir.

Çizelge 2.8. *Dientamoeba fragilis* DNA'nın çoğaltılması için geleneksel, nested ve real time PCR testlerinde kullanılan primer ve prob ları

Hedef geni	Amplikon boyutu	Primer ve prob oligonükleotid dizisi		Kaynak
Geleneksek PCR				
18S rRNA	1,7 kb	TRD5	5'-GATACTTG GTTGATCCTGCCAAGG-3'	[31]
		TRD3	5'-GATCCAACGGCAGGTTACCTACC-3'	
18S rRNA	850 bp	DF400	5'-TATCGGAGGTGGTAATGACC-3'	[383]
		DF1250	5'-CATCTTCCTCCTGCTTAGACG-3'	
18S rRNA	364 bp	DFpn_1f	5'-GCCAAGGAAGCACACTATGG-3'	[308]
		DFpn_364r	5'-GTAAGTTTCGCGCCTGCT-3'	
18S rRNA	662 bp	DF1	5'-CTCATAATCTACTTGGGAACCAATT-3'	[384]
		DF4	5'-CCCCGATTATTCTCTTTGATATT-3'	
ITS1-5.8S	300 bp	ssu2	5'-GGAATCCCTTGTAATGCGT-3'	[384]
		1su1	5'-AGTTCAGCGGGTCTTCCTG-3'	
ITS1	300 bp	ssu2	5'-GGAATCCCTTGTAATGCGT-3'	[384]
		5.8s1	5'-TGTGAGGAGCCAAGACATCC-3'	

Çizelge 2.8. (devam) *Dientamoeba fragilis* DNA'nın çoğaltılması için geleneksel, iki türlü nested ve real time PCR testlerinde kullanılan primer ve problemleri

Nested PCR				
18S rRNA	662 bp	DF1 DF4I	5'-CTCATAATCTACTTGAACCAATT-3' 5'-CCCCGATTATTCTCTTTGATATT-3'	[245]
18S rRNA	366 bp	DF322For DF687Rev	5'-GAGAAAGGCGCCTGAGAGATA-3' 5'-TTCATACTGCGCTAAATCATT-3'	
18S rRNA	850 bp	DF400 DF1250	5'-TATCGGAGGTGGTAATGACC-3' 5'-CATCTTCCTCCTGCTTAGACG-3'	[325]
18S rRNA	403 bp	DFF2 DFR2	5'-CGGGGATAGATCTATTTTCATGGC-3' 5'-CCAACGGCCATGCACCACC-3'	
ITS1	~540 bp	Ssu2 DF-ITSREV	5'-GGAATCCCTTGTAATGCGT-3' 5'-GCGGGTCTTCCTATATAAACAAGAACC-3'	[245]
ITS1	380 bp	Df-ITSnesFor ITSnesRev	5'-ATACGTCCCTGCCCTTTGTA-3' 5'-GCAATGTGCATTCAAAGATCGAAC-3'	
Real-time PCR				
18S rRNA	78 bp	DF3 DF4 <i>TaqMan</i> prob	5'-GTTGAATACGTCCCTGCCCTTT-3' 5'-TGATCCAATGATTTACCGAGTCA-3' 5'-FAM-CACACCGCCGTCGCTCCTACCG-TAMRA-3'	[385]
18S rRNA	101 bp	5DMB 3DMB <i>TaqMan</i> prob	5'-GGCGAAAGCATCTATCAAGTGAAT-3' 5'-CGGCATCGTTTAAGGTAGGAAC-3' 5'-FAM-ACCCGGGTCTCTGATCCGGTTGG-TAMRA-3'	
18S rRNA	662 bp	DF1 DF4	5'-CTCATAATCTACTTGAACCAATT-3' 5'-CCCCGATTATTCTCTTTGATATT-3'	[387]
5.8SrRNA	98 bp	Df-124F Df-221R Df-172revT	5'-CAACTTGGCTCTTTA-3' 5'-TGCATTCAAAGATCGAACTTATCAC-3' 5'-FAM-CAATTCTAGCCGCTTAT-3'-MGB	[316]

Çizelge 2.9. *Dientamoeba fragilis* hedef geni içeren, ticari olarak temin edilebilen PCR kiti [11]

Piyasadaki ticari adı	PCR türü	Hedef geni	Şirket
EasyScreen enteric parasite detection kit	3-baz teknolojisini kullanan multipleks PCR	18S rRNA	Genetic Signatures
Gastrointestinal parasite	Multipleks PCR	18S rRNA	AusDiagnostics
Rida Gene <i>Dientamoeba fragilis</i>	Real time PCR	18S rRNA	R-Biopharm
G-DiaFrag	Real time PCR	5.8S rRNA	Diagenode
LightMixModular <i>Dientamoeba</i>	Real time PCR	5.8S rRNA	Roche Diagnostics

Yapılan çalışmalarda *D. fragilis*'in DNA'sının real time PCR yöntemi ile %100'lük duyarlılık ve özgüllük ile tespit edildiği ifade edilmiştir. Tanı için kullanılan zamanı ve kontaminasyon riskini azaltması nedeniyle real time PCR'ın konvansiyonel PCR'a göre daha çok avantaja sahip olduğu vurgulanmıştır [29, 284, 313]. Stark ve diğerleri *D. fragilis*'in tanısı için altın standart tanı yöntemi belirlemek için dışkı örneklerini, kalıcı boyama, kültür, konvansiyonel PCR ve real time PCR yöntemlerini kullanarak incelemişler ve Çizelge 2.10'daki sonuçları elde etmişlerdir [284].

Çizelge 2.10. *Dientamoeba fragilis*'in tanı yöntemlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü

Tanı yöntemi ve örnek sayısı	Duyarlılığı	Özgüllüğü
Real time PCR (35/650)	%100	%100
Konvansiyonel PCR (15/650)	%42,9	%100
Kültür yöntemi (MBD)* (14/650)	%40	%100
TYM-9 kültürü (10/650)	%28,6	%100
Kalıcı boyama ve direkt mikroskopi yöntemi (12/650)	%34,3	%99

* Modifiye Boeck ve Drbohlav's Besiyeri (MBD)

Sonuç olarak günümüzde tüm dünyada moleküler yöntemleri kullanabilen iyi donanımlı parazitolojik rutin laboratuvarları sadece gelişmiş ülkelerde mevcuttur. Gelişmekte olan ülkeler için moleküler tanı yöntemlerini kullanmak maliyet nedeniyle mümkün olmamaktadır. Bu durumda, deneyimli laboratuvar personeli tarafından birkaç dışkı örneğinin ucuz olan kalıcı boyama yöntemleri kullanılarak incelenmesi *D. fragilis* tanısı için faydalı olacaktır.

2.2.10. Tedavi

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda *D. fragilis*'in eradikasyonuna yol açan antimikrobiyal tedavilerin genellikle sadece hastanın klinik semptomlarını hafiflettiğini göstermiştir. *D. fragilis* ile enfekte semptomatik olan hastaların semptomlarının tedavi sonra kaybolması, bu hastalarda protozoon patojenik potansiyelinin olabileceğini düşündürmektedir. Çeşitli tedavilerin etkinliği konusunda sınırlı çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, elde edilen bilgiler bu organizmanın semptomatik hastalardaki eliminasyonunun, klinik iyileşmeye yol açtığı gerçeğini desteklemeye devam etmektedir. *D. fragilis* ile enfekte hastalarda tedavi için kullanılan antimikrobiyal ajanların etkisi ve dozları Çizelge 2.11'de listelenmiştir.

Çizelge 2.11. *Dientamoeba fragilis* enfeksiyonun tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlar listesi [11]

İlaç	Uygulanan doz	Tedavi etkinliği % (hasta sayısı)
Clioquinol	10-21 gün boyunca günde 40 mg/kg	81,5 (27)
	7gün boyunca günde 3 kez 250 mg	83 (12)
Iodoquinol	20 gün boyunca günde 3 kez 650 mg	83,3 (12)
	7 gün boyunca günde 3 kez 500 mg	98 (61)
Paromomycin	4-5 gün boyunca günde 25-35 mg/kg	protozoonun eradikasyonu 80
		klinik iyileşme 87 (15)

Çizelge 2.11. (devam) *Dientamoeba fragilis* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlar listesi

	10 gün boyunca günde 30 mg/kg	70 (91)
Metronidazole	Çocuklar için 20 mg/kg ve yetişkinler için 1.5g	protozoonun eradikasyonu 69,6 klinik iyileşme 76,8 (56)
	3-10 gün boyunca günde 1 kez veya her 8 saate bir 400–750 mg	80 (35)
	10 gün boyunca günde 3 kez 500–750 mg	66,7 (15)
Secnidazole	Çocuklar için 30 mg/kg ve yetişkinler için 2 g	protozoonun eradikasyonu 97 ve klinik iyileşme 100 (35)
Ornidazole	Çocuklar için 30 mg/kg ve yetişkinler için 2 g	protozoonun eradikasyonu 92,9 ve klinik iyileşme 96,4 (56)

Nagata ve diğerleri tetrasiklin alan yetişkinlerde klinik iyileşme gözlemlendiğini ve diiodohidroksikin, metronidazol veya tetrasiklin alan çocuklarda ise semptomların giderildiğini gözlemişlerdir. Tedavi olarak ta iyodokinol, paromomisin, tetrasiklin, metronidazol veya kombinasyon tedavisini önermişlerdir [388].

Birçok yayında dientamebiyaz tedavisinde metronidazolün de etkili anti mikrobiyal ajanlar arasında gösterilmesine rağmen hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırmalı yapılan çalışmalarında tedavi etkisinin diğer ajanlara göre düşük olduğu bildirilmiştir. Avusturalya’da, Stark ve diğerleri paromomisin, iodoquinol verilerek yapılan dientamebiyaz tedavisinde 35 hastadaki protozoonun eradikasyonu ile birlikte semptomlarının da kaybolduğunu ifade edilmişler, sadece metronidazol kullanılan hastalarda ise tedavinin başarısız olduğunu ya da tekrarlanmasını gerektiğini ifade etmişler [293].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- Işık mikroskobu: Olympus CX 31, Japonya
- Çeker ocak: Nüve, Türkiye
- Biyolojik güvenlik kabini: Nuair, ABD
- Buzdolabı: UGUR USS 374 DTK, Türkiye
- Derin dondurucu (-20°C): UGUR UDD 200 BK, Türkiye
- Etüv: Nüve, Türkiye
- Pastör fırını: Nüve, Türkiye
- Santrifüj: Boeco U-32, Almanya
- Vortex: Boeco U-32, Almanya
- Hassas Terazî: Kern PFB 600-2M, Türkiye
- Doku parçalayıcı: Disruptor Genie, ABD
- Kuru ısı bloğu: Biosan, Türkiye
- Isı döngü cihazı
- Jel elektroforez cihazı
- Otoklav: Sanyo, Japonya
- Mikrodalga fırını
- Steril pipet uçları: 1000 µl, 100 µl, 40 µl, 20 µl, 10 µl
- Otomatik pipetler: 100-1000 µl, 10-100 µl, 0,5-10 µl
- Dışkı toplama kabı: 50 ml
- Santrifüj Tüpleri: 50 ml, 15 ml
- Plastik pastör pipeti: 3 ml, 1,5 ml
- Eküvyon çubuğu
- Lam lamel
- Boya şaleleri
- Ependorf tüpleri: 2 ml, 1,5 ml
- Cam boncuk: BioSpec Ø 0,1 mm
- Steril gazlı bez
- Mezür
- 15 ml cam tüpler

- 50 ml Enjektör
- Filtreler: AISIMO® Syringe Filter 0,45 µm

3.1.2. Reaktifler ve kimyasallar

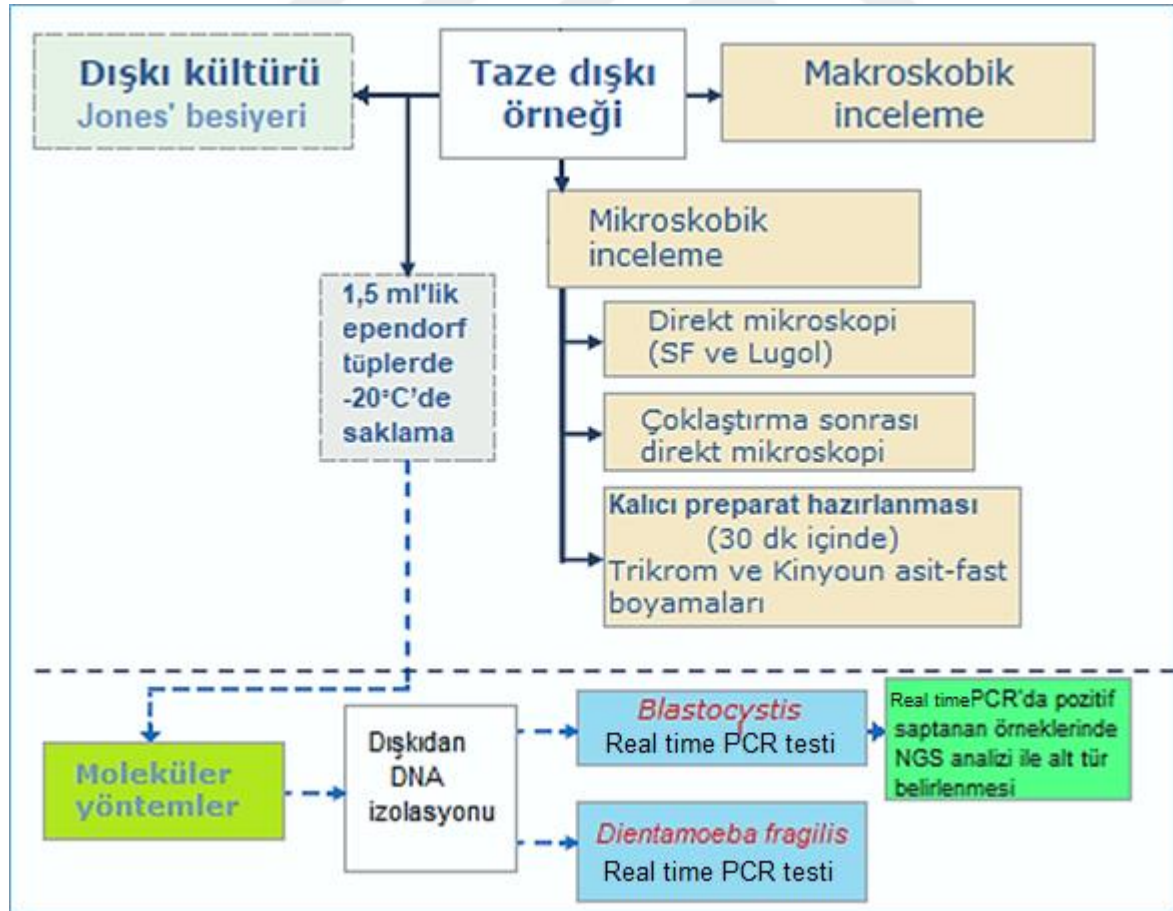
- Etanol %99,9
- Metanol
- Formaldehit
- Eter
- Phosphate buffered saline (PBS)
- 0,85% Sodium Chloride solution (Serum fizyolojik)
- Lugol solusyonu (KI + dH₂O)
- Steril at serumu (56 °C' de 30 dk inaktif edilmiş)
- Sodyum klorür: Sigma, Almanya
- Potasyum klorür: Sigma, Almanya
- Kalsiyum klorür: Sigma, Almanya
- Chromotrope 2R: Himedia, Hindistan
- Light green SF: Himedia, Hindistan
- Fosfotungstik asit: Himedia, Hindistan
- Sülfürik asit (%100)
- Glasiyal asetik asit(%100)
- Ksilen: Kimetsan, İngiltere
- Civa klorür: Fluka, ABD
- Potasyum iyodür
- İmmersiyon yağ
- Steril distile su
- Agaroz
- Etidyum bromür: SIGMA tablet
- Gliserol: Ambresco
- Orange G: Applichem
- Fenol
- İzamil alkol
- 10X TBE Buffer

3.2. Yöntemler

3.2.1. Dışkı örneklerinin toplanması ve saklanması

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına farklı kliniklerden gönderilen immün yeterli (n:193) ve immün yetmezlikli (n:245) toplam 438 erişkin hastanın ishalleri dışkı örnekleri dahil edildi. Dışkı örnekleri geniş ağızlı, burgu kapaklı, temiz ve kuru plastik toplama kaplarına alındı. Gelen örnekler makroskopik olarak değerlendirilerek ishalleri olan dışkı örnekleri incelemeye alındı ve kayıt edildi. Sonra direkt mikroskopik inceleme, boyalı preparat inceleme, çoklaştıma ve kültür yapıldı. Moleküler araştırmalar için her bir dışkı örneğinden 5'er adet örnek 1,5 ml ependorflara ayrılarak -20 °C'de dondurularak saklandı.

Çalışma için gerekli etik onay Gazi Üniversitesi Etik Komisyon'undan alındı (Onay tarihi: 09.05.2017 karar no:05, Araştırma kod No:2017-248).



Şekil 3.1. İmmün yeterli ve immün yetmezlikli hastaların dışkı örneklerinin incelenmesinde kullanılan genel akış diyagramı.

3.2.2. Direkt mikroskopik inceleme

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların dışkı örneklerinin direkt mikroskopik incelemesi serum fizyolojik ve lugol solüsyonlarıyla aynı lam üzerinde hazırlanarak yapıldı.

Serum fizyolojik (% 0,9 NaCl):

Lam üzerine bir damla serum fizyolojik damlatıldı. Ahşap eküvyon çubuk ile dışkı örneğinin farklı yerlerine birkaç kere batırarak örnek alındı ve damla süspansiyon haline geldikten sonra üzeri lamelle kapatılarak mikroskop altında, kısık ışıktaki, düşük büyütme (10X-40X) objektiflerle incelendi.

Lugol (Iodine) solüsyonu:

- Potasyum iyot: 1 gr
- İyot krisalleri: 1,5 gr
- Distile su: 100 ml

Lugol solüsyonunun hazırlanması: 100 ml distile su içinde 1 gr Potasyum iyot tamamen eritilir ve üstüne 1,5 gr iyot kristalleri eklenir. İyot kristalleri tamamen eriyene kadar karıştırılır. Solüsyon buharlaşmaması ve boyama özelliğini kaybetmemesi için, ışık almayacak ağzı kapalı şişede saklanmalıdır.

Preparat serum fizyolojik ile yapıldığı gibi hazırlandı. Yaklaşık 2-5 dakika bekletilen preparat mikroskop altında, kısık ışık, düşük büyütme (10X-40X) objektiflerle incelendi

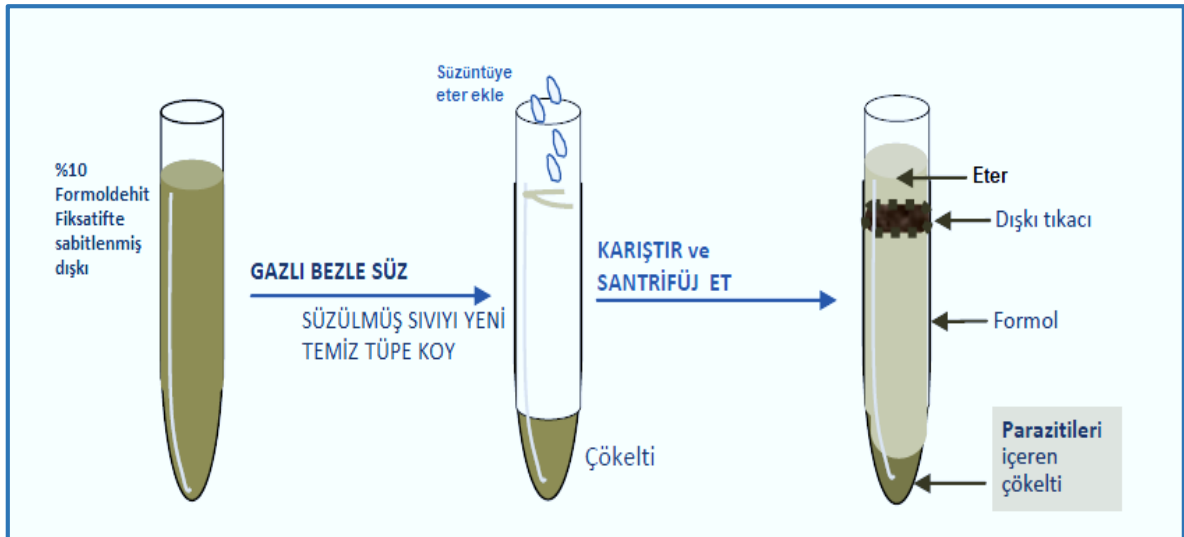
İnceleme sonrası dışkıda *Blastocystis* olup olmaması ve varsa diğer parazitlerin tespiti kayıt altına alındı.

3.2.3. Formol eter çöktürme yöntemi

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların dışkı örnekleri çeker ocak içinde formol eter çöktürme yöntemi ile yoğunlaştırıldıktan sonra lam üzerinde hazırlanan preparatın direkt mikroskopik incelemesi yapıldı.

1. Taze dışkıdan 1-1,5 gr, 10 ml %10'luk formol bulunan uygun 15 ml'lik konik santrifüj tüpünde tamamen ezildi.
2. Tam bir fiksasyon olması için 30 dakika bekletildi.

3. Süspansiyon iki tabaka gazlı bezden diğer temiz bir dışkı toplama kabı içine süzüldü.
4. Süzülen dışkı tekrar temiz konik 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak üzerine 3 ml eter eklendi.
5. Karışım tüpünün ağzı sıkıca kapatılarak kuvvetlice çalkalandı ve ara ara tüpün ağzı açılıp kapatılarak gaz çıkışı sağlandı.
6. Süspansiyon 500 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
7. Tüp santrifüjden çıkarıldığında 4 tabaka oluştuğu gözlemlendi:
 - a. En üstte eter tabakası,
 - b. Tüpün duvarlarına yapışmış bir dışkı artığı tabakası (dışkı tıkacı),
 - c. Formol tabakası,
 - d. Çökelti.
8. Dışkı tıkacı temiz bir eküvyon çubuk yardımıyla tüp duvarından ayrılarak diğer sıvı tabakalarıyla birlikte, dipteki çökelti korunacak şekilde boşaltıldı.
9. Dipte kalan çökelti tabakasına birkaç damla %10 formol eklenerek karıştırıldı.
10. Direkt mikroskopik inceleme için preparatlar hazırlanarak ışık mikroskopunda 10x ve 40x objektifler kullanılarak incelendi.
11. Çökeltiden ayrıca kinyoun acid-fast (KAF) boyası ile preparat hazırlandı.
12. Çökeltinin kalan miktarı 1,5 ml'lik tüpe alınarak +4 °C'de saklandı.



Şekil 3.2. Çöktürme yönteminin uygulama adımları.

3.2.4. Boyama yöntemleri

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların dışkı örneklerinden çeker ocak içinde trikrom ve KAF boyalı preparatlar hazırlanarak ışık mikroskopunda 100x objektifle immersiyon yağ kullanılarak incelendi.

Trikrom boyama yöntemi

Solüsyonların hazırlanması:

Schaudinn fiksatiği:

- - HgCl₂ : 110 gr
- - Distile su : 1000 ml

1. HgCl₂ distile su içinde ısıtılarak eritildi. Solüsyon 1 gün soğutmaya bırakıldı. Sonra dipteki oluşan kristal tabakasından arındırmak için koyu renkli temiz kapaklı cam şişeye süzüldü ve oda ısısında saklandı.
2. Hazır olan stok civa klorür solüsyonundan 600 ml alınarak üzerine 300 ml %95 etanol ve 15 ml gliserin eklenerek karıştırıldı.
3. Hazırlanan bu solüsyondan 60 ml şaleye aktararak üzeri 3 ml glasiyal asetik asit eklendi.
4. Her hafta fiksatif yenilendi.

Trikrom boyası:

- Chromotrope 2R: 3 gr
- Light green SF: 1,5 gr
- Fosfotungustik asit: 3,5 gr
- Glasiyal asetik asit: 5 ml
- Distile su: 500 ml

1. Hassas terazi ile tartılan kimyasal malzemeler temiz bir seramik kase içinde 5 ml glasiyal asetik asitle karıştırıldı ve 30 dakika bekletildi.
2. Karışım koyu renkli cam şişe içerisine aktararak 500 ml distile su eklendi ve iyice karıştırıldı.
3. Hazırlanan trikrom boyasından alüminyum folyo ile kaplanmış şale içine 60 ml aktararak kullanıma hazırlandı.
4. Kullanımda boya azaldıkça üzerine ekleme yapıldı ve her ay değiştirildi.

D'antoni iyot solüsyonu:

- Potasyum iyodür: 1 gr
- İyot kristalleri: 1,5 gr
- Distile su: 100 ml

1. Malzemeler karıştırıldıktan sonra solüsyon kırmızı-kahverengi olana kadar bekletildi ve oluşan bu stok çözelti koyu renkli cam şişede saklandı.
2. Kullanım için bu stok solüsyon ile etil alkol (%70) demli çay görünümü elde edilinceye kadar şale içinde karıştırıldı.
3. Her iki haftada bir solüsyon yenilendi.

%90'lık asit alkol:

- Etil alkol (%90): 995,5 ml
- Glasiyal asetik asit: 4,5 ml

Solüsyon kapaklı cam şişe içerisinde hazırlanarak saklandı.

%95'lik alkol:

- Etil alkol (%99,9): 95 ml
- Distile su: 5 ml

Solüsyon kapaklı cam şişe içerisinde hazırlanarak saklandı.

%70'lik alkol:

- Etil alkol (%99,9): 70 ml
- Distile su: 30 ml

Solüsyon kapaklı cam şişe içerisinde hazırlanarak saklandı.

Karbol – Ksilen solüsyonu:

- Fenol kristalleri: 15 gr
- Ksilen: 45 ml

1. Fenol kristalleri 56 °C'de su banyosu içinde sıvı hale gelene kadar eritildi ve üzerine ksilen eklenerek karıştırıldı.
2. Solüsyon cam kapaklı şişe içinde saklandı.

Diğer solüsyonlar:

- Ksilen direkt kullanıldı.

Preparat hazırlanma ve trikrom boyamasının uygulama yöntemi:

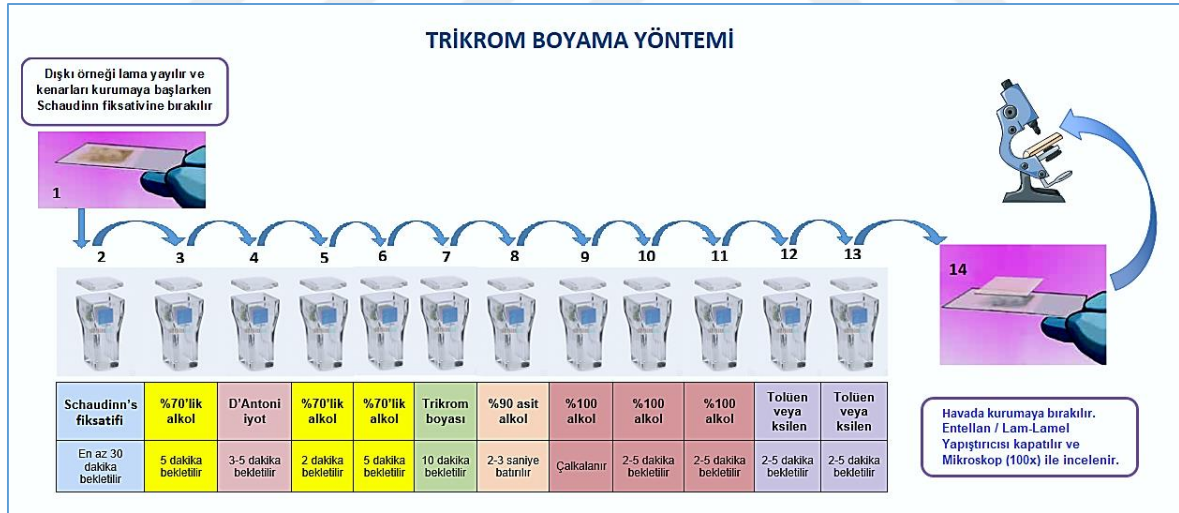
Taze dışkı örneğinin farklı yerlerinden temiz eküvyon çubuk ile dışkıdan temiz lam üzerine ince bir tabaka oluşturacak şekilde yayma yapıldı.

Yaymanın kenarları kurumaya başladığında Schaudinn fiksatifine içine daldırıldı.

En az 30 dakika fiksatifte bekletildi. Gerektiğinde lamlar gece boyunca fiksatifin içinde bırakıldı.

Daha sonra aşağıda tarif edildiği gibi trikrom boyama yöntemi gerçekleştirildi.

Boyamayı yapmak için çeker ocak içinde hazırlanan solüsyonları içeren 13 adet cam şale (boyama seti oluşturacak şekilde) sıralı bir şekilde yerleştirildi ve üstleri etiketlendi (Şekil 3.3) Aşağıdaki adımlarda lamlar bir şaleden diğerine aktarılırken boya kalitesini arttırmak amacıyla, lam kenarında biriken solüsyon bir kurutma kağıdına emdirilerek bir sonraki adımda şalenin kirlenmemesi sağlandı.



Şekil 3.3. Trikrom boyama seti ve uygulanması.

Schaudinn fiksatif basamağı sonrasında aşağıdaki adımlar izlenerek boyama yapıldı.

1. Preparat %70'lik alkol solüsyonunda 5 dakika bekletildi.
2. D'Anton'nin iyot solüsyonunda 5 dakika bekletildi.
3. %70'lik alkol solüsyonunda 5 dakika bekletildi.

4. Tekrar %70'lik alkol solüsyonunda 2 dakika bekletildi.
5. Trikrom boyasında 10 dakika bekletildi.
6. Lamların fazla boyası dik biçimde kağıt havlular üzerine yerleştirilerek süzüldü.
7. Lamlar 5-6 saniye %90 asit alkole batırılıp hafifçe çalkalandı.
8. Lam kenarı kağıt havluda süzdürüldükten sonra %95 alkolde 5-6 saniye çalkalandı.
9. Tekrar %95 alkolde 5-6 saniye çalkalandı.
10. Karbol-ksilende 5 dakika bekletildi.
11. Ksilende 5 dakika bekletildi.
12. Ksilende 2 dakika bekletilir.
13. Lamlar kurumaya bırakıldı.

Boyanan lamlar kuruduktan sonra entellanla kapıtılarak lamel üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskobunda 100× objektifle incelendi *Blastocystis* ve diğer protozoonlar açısından değerlendirildi.

İyi bir trikrom boyama yapabilmek için kullanılan solüsyonların belli aralıklarla yenilenmesi yapıldı. Yapılan değişim aralıkları Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1 Trikrom boyama solüsyonlarını değiştirme sıklığı

Solüsyonlar	Değişim zamanı			Özel hususlar
	Gün	Hafta	Ay	
Alkol, %95 (1+2)	+			
Schaudinn fiksatif		+		Stok solüsyondan taze olarak hazırlanır
Alkol, %70 (1+2+3)		+		
Asit-alkol %90		+		
D'antoni iyot solüsyonu		+		Renk açılırsa stoktan hazırlanmalıdır
Alkol, %100		+		
Ksilen			+	Dipte çökelti varsa değiştirilmelidir
Trikrom boya			2 ay	Değiştirme süresinden önce azaldıkça üstüne eklenir.

Modifiye Kinyoun acid-fast (KAF) boyama yöntemi

Solüsyonların hazırlanması:

Kinyoun karbol-fuksin:

- Bazik fuksin: 8 gr
- Fenol kristali: 16 gr
- %95'lik etanol: 40 ml
- Distile su: 200 ml

1. Bazik fuksin %95'lik etanol içinde eritildi (Solüsyon A). Fenol kristali distile su içinde 56°C su banyosunda eritildi (Solüsyon B).
2. A ve B solüsyonları karıştırıldı ve en az 2 gün bekletildi. Karışım kullanım öncesi Wathmann kağıt filtreden geçirilerek cam şişe içerisinde saklandı.

%50 etil alkol:

- Etil alkol (%99,9): 50 ml
- Distile su: 50 ml

Solüsyon cam şaleye aktarıldı.

%1 Sülfirik asit:

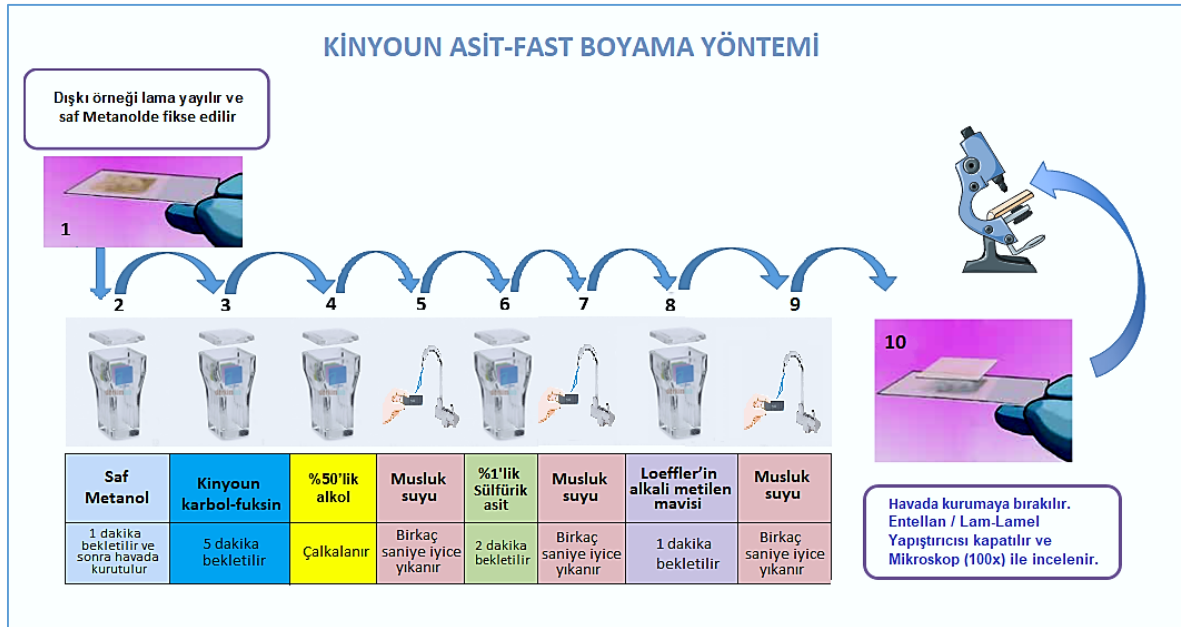
- Sülfirik asit: 1 ml
- Distile su: 99 ml

Solüsyon cam şaleye aktarıldı.

Loeffler'in alkali metilen mavisi:

- Metilen mavisi: 0,6 gr
- %95'lik etanol: 60 ml
- %0,01'lik KOH: 200ml

1. Metilen mavisi %95'lik etanol içerisinde eritildi ve üzerine %0,01 KOH ilave edildi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 yıl boyunca saklandı.



Şekil 3.4. Kinyoun acid-fast boyama seti ve uygulanması.

Preparat hazırlanması ve KAF boyama yöntemi:

Preparatlar trikrom boyama yöntemindeki gibi hazırlandıktan sonra lamalar kuruyuncaya kadar bekletildi. Daha sonra lamalar saf metanol içeren şaleye alınarak 1 dakika fikse edildi (Şekil 3.4). Bu süre sonunda lamalar tekrar kurumaya bırakıldı.

1. Kuruyan lamalar KAF boyası içeren şaleye daldırıldı ve 5 dakika bekletildi.
2. Şaleden çıkarılan lamaların fazla boyası kurutma kağıdında süzdürüldü.
3. Lamalar %50 etil alkol içeren şalede 3-5 saniye çalkalandı ve daha sonra hafif akan musluk suyu altında yıkandı.
4. Lamalar %2 sülfürik asit (renk giderici) içeren şalede 2 dakika (veya renk açılana kadar) bekletildi.
5. Daha sonra lamalar tekrar musluk suyunda yıkandı ve lamaların kenarı kurutma kağıdına değdirilerek fazla su alındı.
6. Lamalar Loeffler'in alkali metilen mavisini içeren şalede zemin boyanması için 1 dakika bekletildi.
7. Lamalar musluk suyunda yıkandı ve havada kurumaya bırakıldı.

Boyanan lamalar entellanla kapatılıp lamel üzerine bir damla immersiye yağı damlatılarak ışık mikroskobunda 100× objektifle asite dirençli protozoonlar araştırıldı.

İyi bir boyama yapabilmek için kullanılan solüsyonların belli aralıklarla yenilenmesi yapıldı.

1. Kinyoun karbol fuksin ve Loeffler'in alkali metilen mavisini boyaları kullanım sıklığına bağlı olarak 15 günde bir yenilendi (Şalede azaldıkça üzerine stok solüsyondan süzülerek ekleme yapıldı).
2. %50 etil alkol her gün, %2 H₂SO₄ ise haftada bir yenilendi.

3.2.5. Kültür yöntemleri

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların dışkı örneklerinin Jones' besiyerinde kültürü yapılarak *Blastocystis* üremesi değerlendirildi.

Jones' besiyerinin hazırlanması ve kültür basamakları

- | | |
|--------------------------------------|----------|
| - Na ₂ HPO ₄ : | 0,709 gr |
| - KH ₂ PO ₄ : | 0,227 gr |

- NaCl : 4,05 gr
- Maya özütü 0,06 gr
- Distile su: 550 ml

Yukarıdaki mazlemeler ağızı kapaklı cam şişede distile suda eritildikten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Oda ısısına geldikten sonra ekim yapılana kadar 4°C'de saklandı.

Uygulama:

1. Ekim öncesi solüsyon gerekli miktarda buzdolabından dışarı alınarak oda ısısına getirildi.
2. 2 ml'li ependorflara 1350 µl Jones' besiyeri ve 150 µl inaktive edilmiş at serumu (56 °C'de 30 dakika inaktive edilen) eklendi.
3. Taze dışkıdan eküvyon çubuğu ile katı şekilli dışkıdan 50 mg civarında (kırmızı mercimek kadar) şekilsiz-sıvı dışkıdan 100 µl alınarak kültür tüplerine aktarıldı. Ağız sıkıca kapatılarak 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrasında tüp dibinden otomatik pipet yardımıyla alınan bir damla örnekle hazırlanan preparat ışık mikroskopunda 10X ve 40X objektiflerle incelendi.

3.2.6. Moleküler yöntemler

Dışkı örneklerinden nükleik asit izolasyonu

Blastocystis ve *D. fragilis* DNA'sının -20 °C'de saklanan dışkı örneklerinden eldesi için Qiagen Mini Stool Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı. Genomik DNA izolasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve gerekli modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi.

Uygulama Protokolü:

1. Tüplere ayrılan dışkı örneklerinin -20 °C'den çıkarılıp oda ısısında çözülmesi sağlandı. Burgu kapaklı 2 ml'lik ependorf tüplerine 25 mg cam boncuk konuldu ve 150–180 mg civarında dışkı örnekleri aktarıldı.
2. Her bir örnek üzerine 1,4 ml Buffer ASL eklendi. Dışkı örneği tamamen homojenize oluncaya kadar, 15 dakika doku parçalayıcıda çalkalandı.
3. Elde edilen karışım 75 °C' de 6 dakika inkübasyona bırakıldı.

4. Örnekler 15 saniye vortekslenip, 14 000 rpm'de 2 dakika dışkı çökeltisi elde edilene kadar santrifüj edildi.
5. Üst sıvıdan 1,2 ml alınıp, yeni 2 ml'lik ependorf tüpler içerisine pipetlendi ve çökelti kısımlarını atıldı.
6. Her bir örnek içerisine 1'er adet InhibitEX tablet eklenip, sonrasında 1 dakika tablet tamamen eriyene kadar vortekslendi. İnhibitörlerin InhibitEX matriksine yapışmasını sağlamak için, örnekler 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
7. İnhibitörlerin çökmesini sağlamak amacıyla örnekler 14 000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi.
8. Üstteki tüm sıvı yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. Tekrar 14 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
9. Sıvının üst kısmından 200 µl, 1,5 ml'lik yeni ependorf tüpler içerisine alınıp, çökelti kısımları atıldı.
10. Alınan tüm örneklerin üzerlerine 15 µl proteinase K eklendi.
11. 200 µl Buffer AL ekleyip, 15 saniye vortekslendi.
12. 70 °C' de 10 dakika inkübe edildi. Tüp kapaklarındaki damlacıkları önlemek için tekrar kısa süreli santrifüjlendi.
13. Lizatların üzerlerine 200 µl soğuk absolut ethanol ekleyip, vorteksleyerek karışmaları sağlandı.
14. Örnek sayısı kadar QIAamp spin kolon çıkartılıp, kapak kısımları numaralandırıldı. Daha sonra, kapakları kapatılıp 13. adımda elde edilen tüm lizat spin kolonlara aktararak en yüksek devirde 1 dakika santrifüjlendi. Alttaki sıvılı kısmı atılıp, filtre kısımları yeni boş 2 ml'lik toplayıcı tüplere aktarıldı.
15. QIAamp spin kolonların kapakları dikkatlice açılıp, içlerine 500 µl AW1 eklendi. Daha sonra kapaklar kapatılıp, en yüksek devirde 2 dakika santrifüjlendi. Alttaki sıvılı kısmı atıldıktan sonra filtre kısımları yeni boş 2 ml'lik toplayıcı tüplere aktarıldı.
16. QIAamp spin kolonların kapakları dikkatlice açılıp, içlerine 500 µl AW2 eklendi. Daha sonra kapakları kapatılıp, en yüksek devirde 2 dakika santrifüjlendi.
17. Alttaki sıvı kısmı atılıp, filtre kısımları yeni boş 2 ml'lik toplayıcı tüplere aktarıldı. Daha sonra en yüksek devirde 1 dakika santrifüjlendi.
18. Alttaki sıvılı kısmı atılıp, filtre kısımları yeni boş 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. Tüpler 10 dakika oda ısısında kapakları açık şekilde bekletildi ve

dikkatlice direkt membranların üzerine 100 µl Buffer AE eklendi. Daha sonra kapakları kapatılıp, 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Ardından en yüksek devirde 1 dakika santrifüjlenerek genomik DNA izolasyonu tamamlandı.

19. Elde edilen DNA 0,5 ml'lik tüplere 50'şer µl alikotlanarak kapakları parafilm ile sarıldı ve -20 °C'de PCR yapıncaya kadar saklandı. (Her tüpün üzerine örnek numarası yazıldı).

Blastocystis ve *Dientamoeba fragilis* tanısı için real time PCR Yöntemi

Primer ve Prob: *Blastocystis* ve *D. fragilis* türlerini tespit etmek için Taqman probu real time PCR metodu optimizasyonlar yapıldıktan sonra kullanıldı. Test denemeleri pozitif kontrol olarak da kullanılan *Blastocystis* ve *D. fragilis* DNA'ları ile yapıldı. *Blastocystis* real time PCR için Blasto FWD F5 ve Blasto R F2 primerleri ve probu (Sentegen Biotech, Türkiye) *D. fragilis* için ise DF3 ve DF4 primerleri ve probu (Sentegen Biotech, Türkiye) kullanıldı. Kullanılan primer ve problemlerin listesi Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. *Blastocystis* ve *D. fragilis* real time PCR için kullanılan primer-prob oligonükleotid dizileri

Protozoon	Çoğaltma bölgesi	Oligonukleotid	Dizi (5'-3')	Amplikon boyu (bp)	Kaynak
<i>Blastocystis</i>	<i>ssu-rRNA</i>	Blasto_R_F2	CCTACGGAAACCTTGTTA CGACTTCA	118	[14]
		Blasto_FWD_F5	GGTCCGGTGAACACTTTG GATTT		
		Probe	FAM-TCGTGTAAATCTTAC CATTTAGAGGA-MGB NFQ		
<i>Dientamoeba fragilis</i>	<i>ssu-rRNA</i>	DF4	TGATCCAATGATTTCACC GAGTCA	78	[385]
		DF3	GTTGAATACGTCCCTGCC CTTT		
		Probe	FAM-CACACCGCCCGTCG CTCCTACCG-TAMRA		

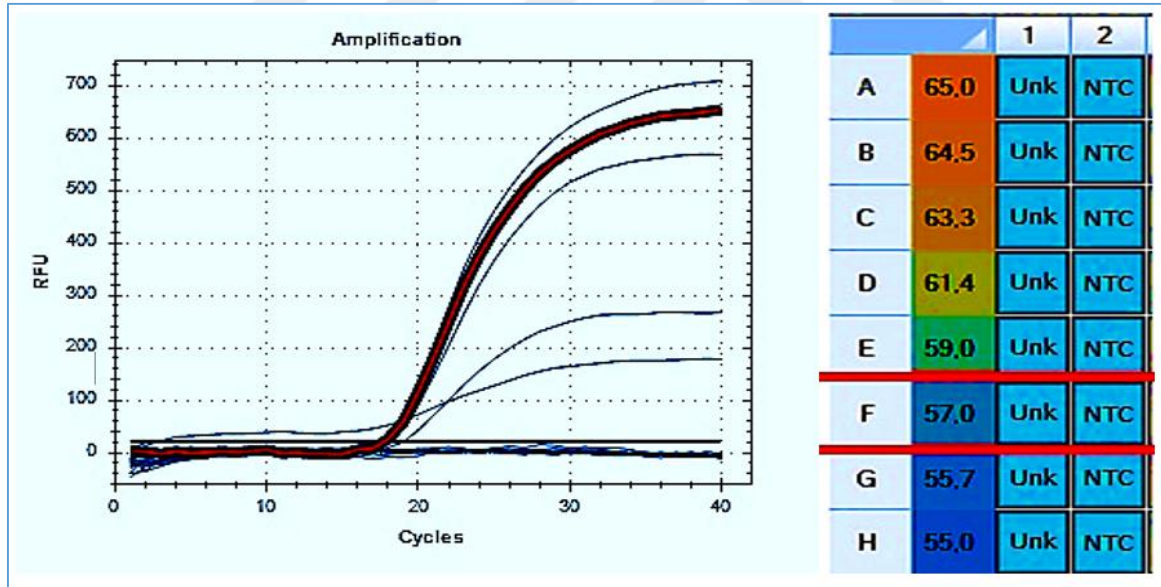
***Blastocystis* ve *D. fragilis* real time PCR miks karışımı:** Her iki protozoona ait real time PCR amplifikasyonu için toplam 25 µl den oluşan benzer PCR karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyonda karışım tamponu olarak iTaq Universal Probes Supermix (Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır. Real time PCR için karışım miktarları Çizelge 3.3 verilmiştir. DNA örnekleri 1/10 sulandırılarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. *Blastocystis* ve *D. fragilis* real time PCR için reaksiyon karışımı

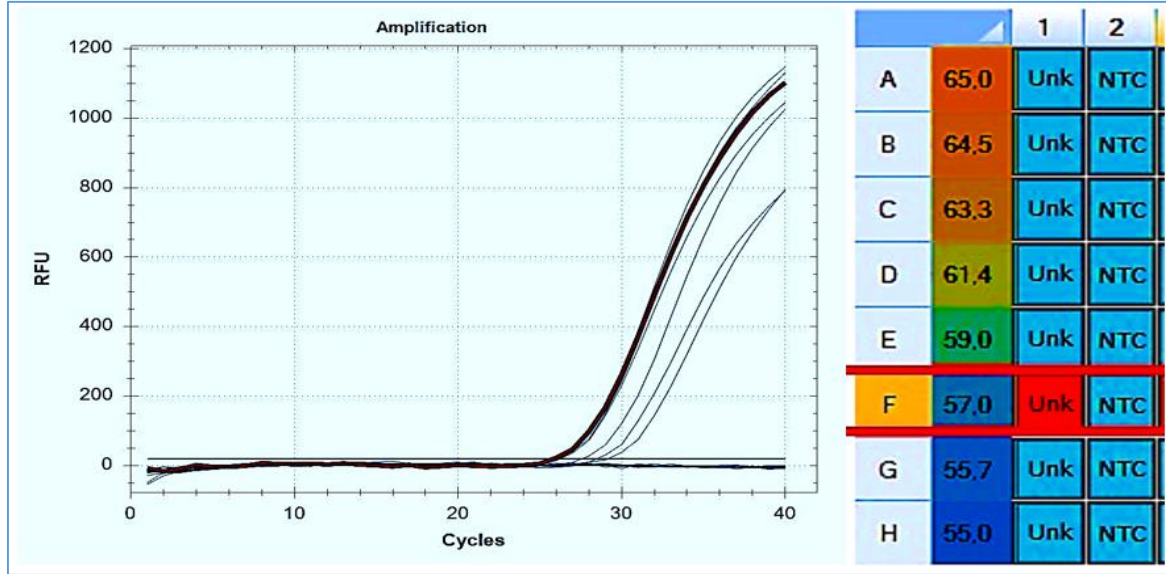
Stok konsantrasyon <i>pmol/μL</i>		Hacim <i>μl</i>	Son konsantrasyon <i>nM</i>
2x	iTaq Universal Probes	12,5	
10	Supermix (Bio-Rad)		
10	Probe	0,75	300
10	1x Forward Primer	1	400
10	1x Reverse Primer	1	400
	dH ₂ O	7,25	
	DNA örneği	2,5	
<i>pmol/μL</i> = <i>μM</i>		Total <i>μl</i>	25

3.2.7. *Blastocystis* ve *D. fragilis* real time PCR için optimizasyon çalışmaları

Blastocystis ve *D. fragilis*'in real time PCR amplifikasyonu için CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, ABD) real time PCR cihazında, kullanılan primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklıkları (annealing) gradient real time PCR yapılarak belirlenmiştir. Primerlerin DNA'ya en uygun bağlanma sıcaklığı her iki parazit DNA'sı için de 57°C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5 ve 3.6).



Şekil 3.5. Gradient real time PCR ile *Blastocystis* primerlerinin DNA'ya optimal bağlanma sıcaklığının belirlenmesi (optimal sıcaklık kırmızı renkle belirtilmiştir).



Şekil 3.6. Gradient real time PCR ile *D. fragilis* primerlerinin DNA'ya optimal bağlanma sıcaklığının belirlenmesi (optimal sıcaklık kırmızı renkle belirtilmiştir).

3.2.8. Real time PCR çalışma protokolü

Blastocystis ve *D. fragilis*'in real time PCR amplifikasyonu için PCR RotorGene Q (Qiagen, Almanya) real time PCR cihazında yaklaşık bir saat süren PCR protokolü kullanılmıştır (Çizelge 3.4).

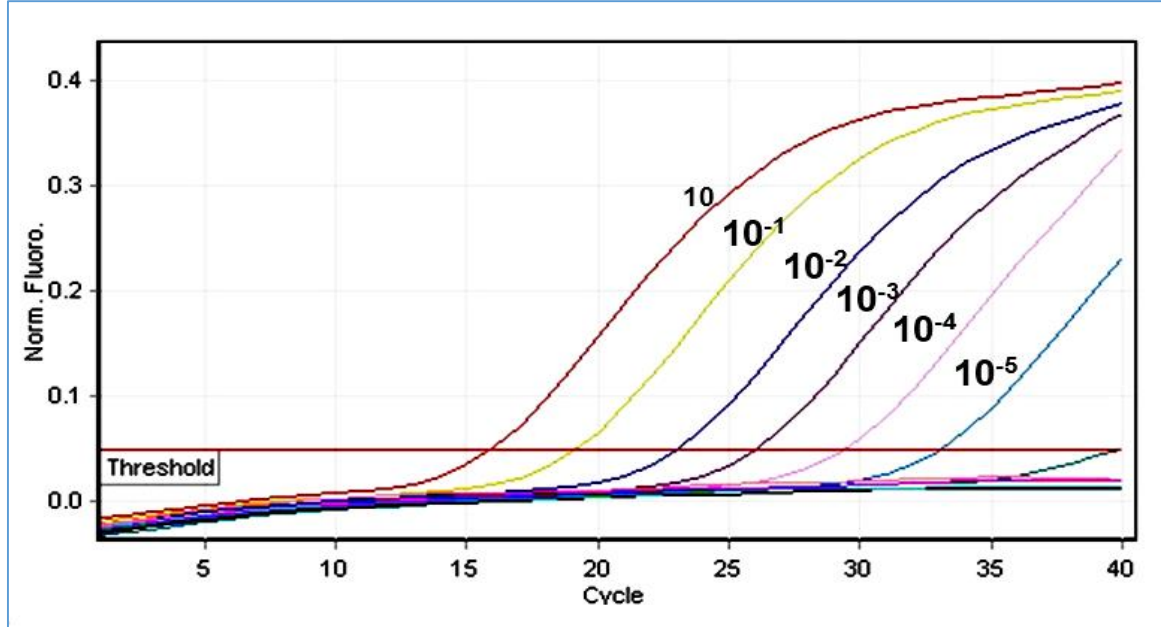
Çizelge 3.4. Real time PCR için kullanılan amplifikasyon protokolü

<i>Blastocystis</i>			
95°C	3 dakika	Ön Denatürasyon	1 döngü
95°C	10 saniye	Denatürasyon	40 döngü
57°C	30 saniye	Primer bağlanması	
<i>Dientamoeba fragilis</i>			
95°C	3 dakika	Ön Denatürasyon	1 döngü
95°C	10 saniye	Denatürasyon	40 döngü
57°C	30 saniye	Primer bağlanması	

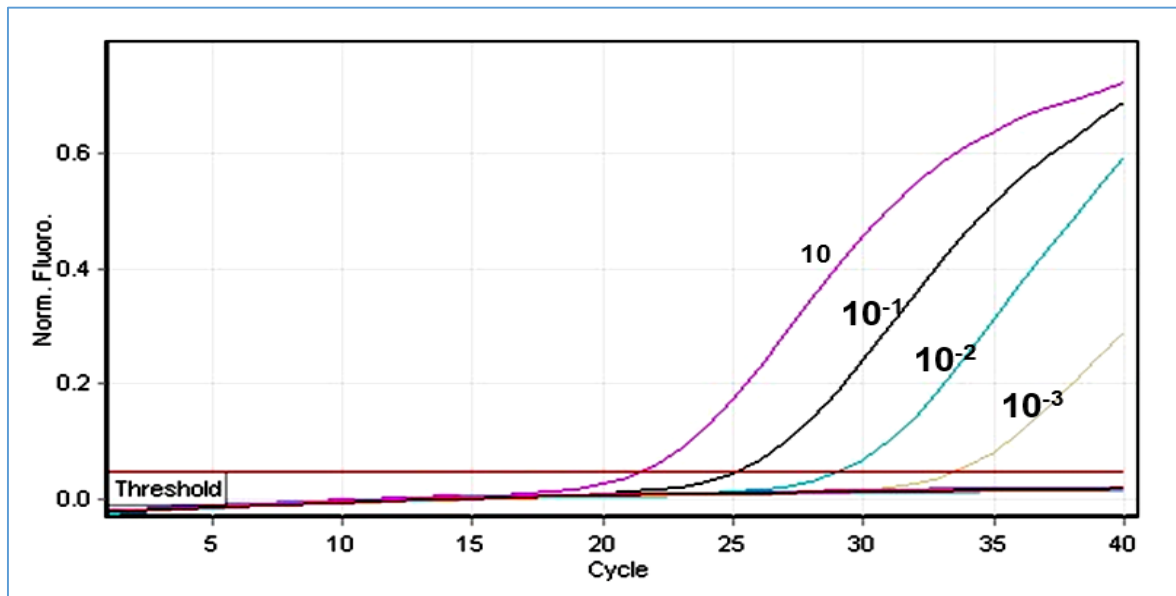
Real time PCR amplifikasyon eğrilerinin DNA kantitasyonu ile değerlendirilmesi *Blastocystis* için önceki çalışmalardan DNA dizi analizi ile ST3 olduğu belirlenen, *D. fragilis* için ise Rune Stensvold tarafından sağlanan DNA'lar kullanılmıştır.

İzole edilen *Blastocystis* ve *D. fragilis* DNA'larının distile su ile 10^0 - 10^{-8} aralığında 10 kat seri dilüsyonları hazırlandı. *Blastocystis* için 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} dilüsyonlarıyla yapılan real time PCR sonrasında, dilüsyonlara karşılık gelen Ct değerleri sırasıyla (eşik değerinin geçildiği reaksiyona girme döngüsü) 15, 19, 18,

23,03, 26,06, 29,41 ve 33,08 olarak belirlendi. *D. fragilis* için ise $10^0, 10^{-1}, 10^{-2}$ ve 10^{-3} dilüsyonlara karşılık gelen Ct değerleri sırasıyla 21,56, 25,20, 29,15, ve 33,65 olarak tespit edildi. Seri DNA dilüsyonlarının lineer aralığı ve standart eğrisi Şekil 3.7 ve 3.8'de sunulmuştur.



Şekil 3.7. Pozitif kontrol olarak kullanılan *Blastocystis* DNA'sına ait 1/10'lük dilüsyonların (10^0 - 10^{-1} - 10^{-2} - 10^{-3} - 10^{-4} - 10^{-5}) amplifikasyon eğrileri.



Şekil 3.8. Pozitif kontrol olarak kullanılan *D. fragilis* DNA'sına ait 1/10'lük dilüsyonların (10^0 - 10^{-1} - 10^{-2} - 10^{-3}) amplifikasyon eğrileri.

Optimizasyon sonuçlarına dayanarak her iki protozoon için ≥ 35 Ct üzerindeki değerler negatif olarak kabul edildi. Her iki protozoon için elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu bulundu [196, 234].

3.2.9. *Blastocystis* alt türlerinin belirlenmesi için Yeni Nesil Dizi analizi

Illumina yeni-nesil amplikon dizileme kütüphanesi hazırlanması için Maloney ve diğerlerinin çalışmasından faydalandı [231]. *Blastocystis* DNA'ları ILMN_Blast505_532F ve ILMN_Blast998_1017R primerleri ile çoğaltıldı (Çizelge 3.5). Kütüphane hazırlanmasında Illumina 16S Metagenomik dizileme kütüphane hazırlık protokolü (Part# 15044223 Rev. B) kullanıldı. PCR ürünleri QIAxcel (Qiagen, Valencia, ABD) cihazı kullanılarak analiz edildi. Kütüphane çift indeksleme stratejisi kullanılarak oluşturuldu.

Çizelge 3.5. *Blastocystis*'in NGS analizi ile alt tür belirlenmesinde kullanılan oligonükleotidler

Çoğaltma bölgesi	Oligonukleotid	Dizi (5'-3')	Amplikon boyu (bp)	Kaynak
ssu-RNA	ILMN_Blast505_532F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTG	~500	[231]
		TATAAGAGACAGGGAGGTAGT		
		GACAATAAATC		
	ILMN_Blast998_1017R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTG		
		TATAAGAGACAGTGCTTTTCGCA		
		CTTGTTTCATC		

Hazırlanan kütüphaneler normalizasyon öncesinde Quant-iT dsDNA Broad-Range Assay Kiti (ThermoFisher, Waltham, ABD) ile SpectraMax iD5 (Molecular devices, San Jose, ABD) cihazında kantite edildi. Son havuzlanmış kutuphane konsantrasyonu 8 pM %20 PhiX kontrol olacak şekilde Illumina MiSeq 600 cycle v3 chemistry (Illumina, San Diego, ABD) cihazı ile üretici firmasının önerileri doğrultusunda dizilenmesi yapıldı.

Elde edilen ham bcl dosyaları Illumina MiSeq Reporter yazılımı kullanılarak ayrıştırıldı. Eşleştirilmiş son okumalar BBTools v38.22 [389], VSEARCH v2.8.0 [390], ve BLAST+2.7.1 analiz programlarıyla değerlendirildi. Filtrelenen operasyonel taksonomik uniteler (OTU) BLAST+blastn komutu ile NCBI'den temin edilebilen tüm *Blastocystis*'in referans dizilerinin verileri ile karşılaştırıldı. Tüm OTU'lar blast sonuçlarında en uygun eşleşmeye yakın olan alt türlere eşleştirildi.

Blastocystis kısmi *ssu-rRNA* gen dizileri GenBank'dan indirilen referans dizilerle ClustalW algoritması ve MUSCLE programı ile karşılaştırılarak dizilerin başlangıç ve sonundaki muhtemel yanlış okunan bölgeler çıkarıldı. Bu amaçla kullanılan referans dizilerin GenBank erişim numaraları şu şekildedir: KU361320, AB107968 dizileri ST1 için; AB070997, KU361314 dizileri ST2 için; AB107965, KY675339, MK416182 dizileri ST3 için; MH285979, AY244620 dizileri ST4 için ve son olarak MG011651, KY964516 dizileri ST6 için kullanıldı.

Bu çalışmada elde edilen dizilerle MEGA X programında Neighbor-Joining metodu, bootstrap testleri (1000 tekrar) kullanılarak *Blastocystis* için genetik uzaklığa bağlı kısmi filogenetik analiz yapıldı [391]. Bu analizlerde *D. fragilis* 18S ribozomal RNA geni kısmi dizisi (U37461.1) dış grup olarak kullanıldı.

3.2.10. İstatistiksel analiz

Çalışmamıza dahil edilen immün yeterli ve immün yetmezlikli ishallerli olguların tümünün dışkı örneklerinde direkt mikroskopi, formol eter asetat konsatrasyon, kültür veya moleküler yöntemlerinden herhangi biriyle saptanan *Blastocystis* ve *D. fragilis* pozitifliği ile gruplar arasında yaş, cinsiyet, mevsim ve klinik bulgular arasındaki ilişki karşılaştırıldı. Bununla birlikte *Blastocystis* alt türleri ve hasta gruplarındaki olguların özellikleri ayrıca değerlendirildi. Gruplar arasındaki farkların değerlendirilmesinde ki-kare ve Student-T testleri kullanıldı. Tek değişkenli ve çok değişkenli lojistik regresyon analizleri (%95 güven aralıkları (CI) ile) odds oranları (OR) hesaplandı. İstatistiksel analizlerde $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Verilerin istatistiksel analizi Statistica 12 (StatSoft, Inc., ABD) ve OpenEpi version 3.01 (<https://www.openepi.com>) programları kullanılarak yapıldı.



4. BULGULAR

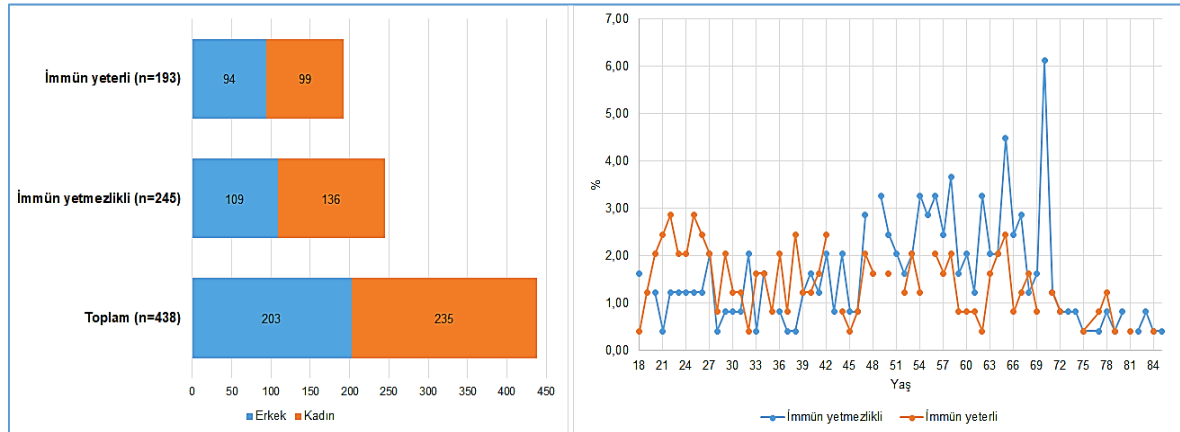
4.1. Hasta Gruplarının Özellikleri

Bu çalışmada 438 ishali olgunun dışkı örnekleri incelendi. Hematoloji, Medikal Onkoloji, Kemik iliği Transplantasyon Ünitesi, Nefroloji ve Romatoloji kliniklerinden gönderilen immün yetmezlikli olgulara ait 245 hasta örneği ile çeşitli klinik ve polikliniklerden gönderilen immün yeterli hastalara ait 193 örnek çalışmaya dahil edildi.

İmmün yetmezlikli hastaların 136'sını (%55,52) kadınlar, 109'nu (%44,48) erkekler oluşturmuştur. Hastaların yaşları 18-85 arasında değişmekte olup yaş ortalaması $\pm$ standart sapma: $52,58 \pm 16,05$ olarak bulunmuştur. İmmün yeterli hastaların ise 99'nı (%51,30) kadınlar, 94'nü (%48,70) erkekler oluşturmuştur. Hastaların yaşları 18-84 arasında değişmekte olup yaş ortalaması $\pm$ standart sapma: $43,88 \pm 17,53$ olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1, Şekil 4.1). Gruplar arasında cinsiyete göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken ($p=0,15$), iki grup arasında yaşa göre anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$). İmmün yetmezlikli olguların yaş ortalaması daha yüksek saptanmıştır.

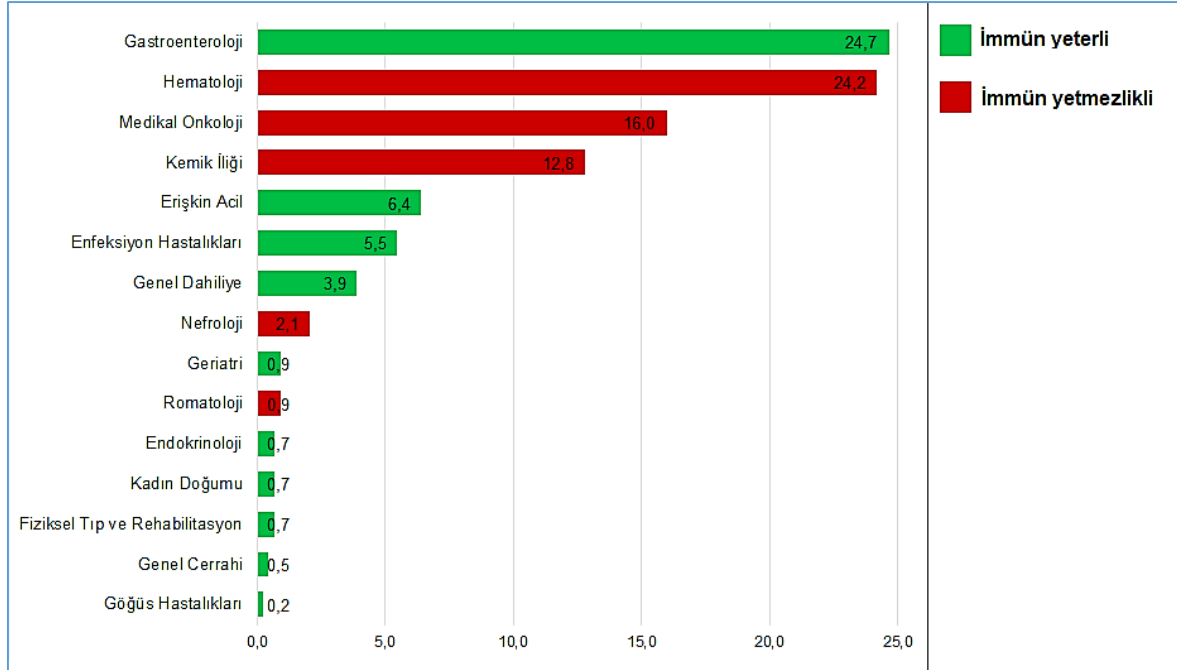
Çizelge 4.1. Çalışmamıza dahil edilen hastaların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımı

Hasta grubu	Hasta sayısı	Cinsi		Yaş			p
		Erkek (%) / Kadın n (%)	p	Ortalama	Std. sapma	Aralığı	
İmmün yetmezlikli	245	109 (44,5) / 136 (55,5)	0,15	52,58	16,05	18-85	<0,001
İmmün yeterli	193	94 (48,7) / 99 (51,3)		43,88	17,53	18-84	



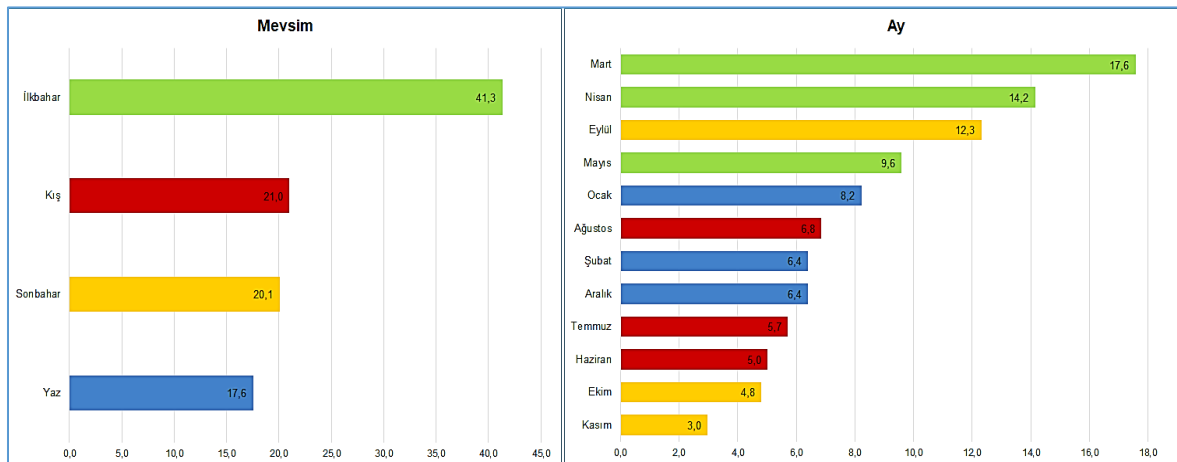
Şekil 4.1. Çalışmamıza dahil edilen hastaların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımları.

Örneklerin gönderildiği poliklinikler incelendiğinde büyük kısmının Gastroenteroloji (108 hasta %24,7), Hematoloji (106 hasta %24,2) ve Medikal Onkoloji (70 hasta %16,0) kliniklerinden gönderildiği gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Çalışmamıza dahil edilen hastaların kliniklere göre dağılımı (% dağılımı).

Çalışmamıza dahil edilen ishalleri hastaların mevsimsel dağılımı: ilkbahar (181 hasta %41,3), kış (92 hasta %21,0), sonbahar (88 hasta %20,1) ve yaz (77 %17,6) olarak yoğunlaştığı görülmüştür (Çizelge 4.2). Ay olarak incelendiğinde sırasıyla Mart (77 hasta %17,6), Nisan (62 hasta %14,2) ve Eylül (54 hasta %12,3) aylarında daha sık başvuruda bulundukları tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Çalışmamıza dahil edilen hastaların mevsim ve aylara göre dağılımı.

Çizelge 4.2. Çalışmamıza dahil edilen hastaların mevsime göre dağılımı

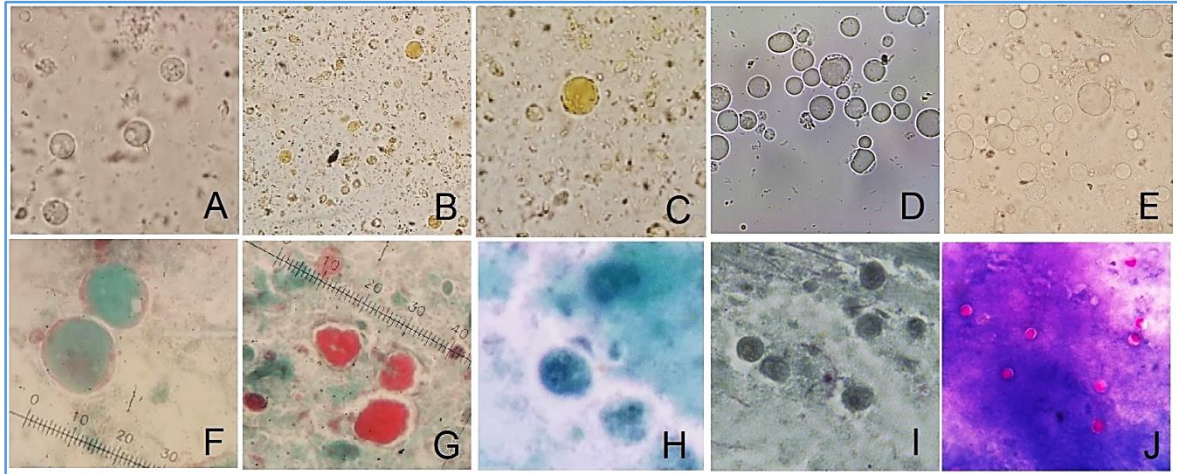
	İlkbahar	Kış	Sonbahar	Yaz	Hasta sayısı
İmmün yetmezlikli	97 % 39,6	49 % 20	52 % 21,2	47 % 19,2	245 100%
İmmün yeterli	84 % 43,5	43 % 22,3	36 % 18,7	30 % 15,5	193 100%
Toplam	181 % 41,3	92 % 21	88 % 20,1	77 % 17,6	438 100%

$\chi^2= 8,2$, SD= 3, p=0,60

İmmün yeterli ve immün yetmezlikli gruplar arasında mevsimlere göre hasta yoğunluğu açısından anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,60).

4.2. Hasta Gruplarında Farklı Yöntemlerle Tanımlanan Enterik Parazitlere Ait Bulgular

Çalışmaya dahil edilen tüm örnekler serum fizyolojik, lugol, FECT, TB ve KAF kalıcı boyaları ile mikroskopik olarak incelenmiştir. Ayrıca *Blastocystis* suşlarını üretmek için Jones' besiyeri kültür ortamı olarak kullanılmıştır. Mikroskopik incelemelere ait görüntüler Resim 4.1'de verilmektedir.



Resim 4.1. Farklı yöntemlerle görüntülenen protozoonlar: A-*Blastocystis* (SF40x objektif), B,C-*Blastocystis* (Lugol,40x objektif), D,E- *Blastocystis* (kültür-Jones' besiyeri,40x objektif), F,G- *Blastocystis* (TB,100x objektif), H,I- *Dientamoeba fragilis* (TB, 100x objektif), *Cryptosporidium* sp.(KAF,100x objektif).

Mikroskopik inceleme ve kültür yönteminin yanı sıra *Blastocystis* ve *D. fragilis* için tüm dışkı örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak real time PCR ile incelenmiştir. Toplam 438 hastanın %29'unda parazit saptanmıştır. İmmün yetmezlikli olgularda

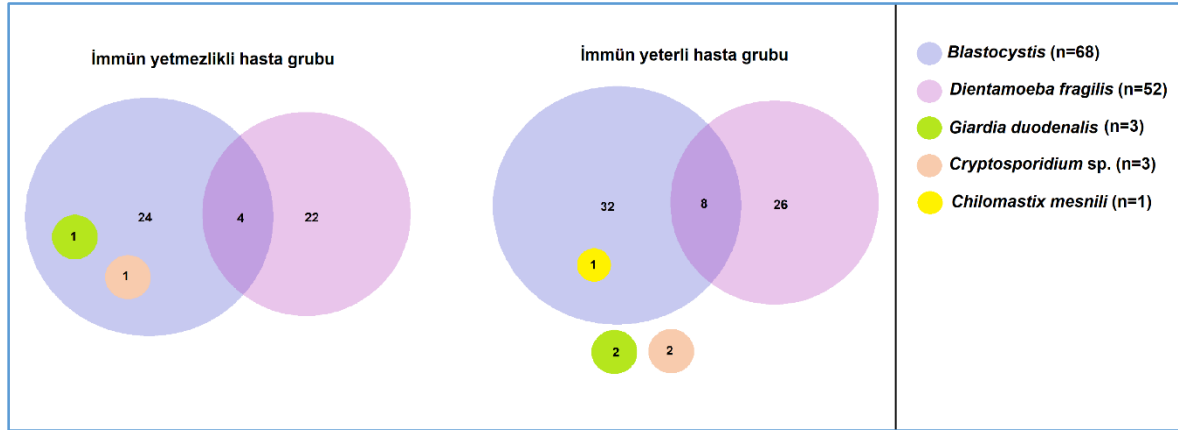
bu oran %22,9 olarak tespit edilirken, immün yeterli olgularda %36,8 olarak bulunmuştur. Her iki grup arasında parazit sıklığı açısından istatistiksel fark anlamlı olarak saptanmıştır ($\chi^2=10,17$, $p=0,001$). Hasta grupları arasında immün yetmezlikli olgulara göre immün yeterli olgularda parazit sıklığı daha yüksek belirlenmiştir. Her iki hasta grubunda en sık saptanan parazit *Blastocystis* olarak bulunmuş, helmintlere ait herhangi bir etken belirlenememiştir. İmmün yetmezlikli ve immün yeterli ishalleri hastalarda tespit edilen tüm protozoonların dağılımı Çizelge 4.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. İmmün yetmezlikli ve immün yeterli ishalleri hastalarda saptanan enterik protozoonların dağılımı

Protozoon	İmmün yetmezlikli (n=245)		İmmün yeterli (n=193)		p	Toplam (n=438)	
	N	Enfeksiyon oranı (%95 CI)	N	Enfeksiyon oranı (%95 CI)		N	Enfeksiyon oranı (%95 CI)
<i>Blastocystis</i> ^a	28	11,4 (7,9-15,9)	40	20,7 (15,5-26,9)	0,008	68	15,5 (12,4-19,2)
<i>Dientamoeba fragilis</i> ^a	26	10,6 (7,2-14,9)	26	13,5 (9,2-18,9)	0,36	52	11,9 (9,1-15,2)
<i>Giardia duodenalis</i> ^{b,d}	1	0,4 (0,02-2,0)	2	1,03 (0,2-3,4)	0,43	3	0,7 (0,2-1,9)
<i>Cryptosporidium</i> sp. ^c	1	0,4 (0,02-2,0)	2	1,03 (0,2-3,4)	0,43	3	0,7 (0,2-1,9)
<i>Chilomastix mesnili</i> ^{b,d}	-		1	0,5 (0,03-2,5)	0,25	1	0,2 (0,01-1,1)
Toplam	56	22,9 (17,9-28,4)	71	36,8 (30,2-43,8)	0,001	127	29 (24,9-33,3)

* a-real time PCR, b-SF, c-KAF ve d-TB yöntemi

Blastocystis ve *D. fragilis* koenfeksiyon oranı immün yetmezlikli hastalarda %1,63 (4/245), immün yeterli hastalarda ise %4,15 (8/193) olarak tespit edilmiştir ($\chi^2=2,55$, $p=0,11$). Ayrıca immün yetmezlikli hasta grubunda %0,4 (1/245) oranında *Blastocystis* ve *G. duodenalis* koenfeksiyonu ile %0,4 (1/245) oranında *Blastocystis* ve *Cryptosporidium* sp. koenfeksiyonu saptanmıştır. İmmün yeterli hasta grubunda ise sadece %0,52 (1/193) oranında *Blastocystis* ve *Chilomastix mesnili* koenfeksiyonu tespit edilmiştir. Hasta grupları arasında *Blastocystis* ve *D. fragilis* koenfeksiyonu açısından anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,11$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. İmmün yetmezlikli ve immün yeterli hasta gruplarındaki parazitlerin koenfeksiyon dağılımı.

4.3. Tanıda Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

Çalışmaya alınan tüm dışkı örneklerinde *Blastocystis* %11'i (48/438) SF incelemesi, %11,4'ü (50/438) Lugol incelemesi, %10,5'i (46/438) FECT'le, %10,7'si (47/438) trikrom boyama ve %12,6'sı (55/438) kültür yöntemi ile pozitif olarak saptanmıştır. *D. fragilis* için ise örneklerin %3,2'si (14/438) trikrom boyama ile pozitif sonuç vermiştir. Bu inceleme yöntemleri arasında her iki protozoon en yüksek olarak real time PCR yöntemi ile saptanmıştır. Tüm olgularda *Blastocystis* %15,5 (68/438) olarak *D. fragilis* ise %11,9 (52/438) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *Blastocystis* ve *D. fragilis*'in pozitifliğinin farklı tanı yöntemlerine göre dağılımı

	İmmün yetmezlikli (n=245)		İmmün yeterli (n=193)		Toplam (n=438)	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<i>Blastocystis</i>						
SF	20	8,16	28	14,50	48	11,0
Lugol	20	8,16	30	15,54	50	11,4
FECT	19	7,75	27	13,98	46	10,5
TB	20	8,16	27	13,98	47	10,7
Kültür	21	8,57	34	17,61	55	12,6
Real time PCR	28	11,4	40	20,72	68	15,5
<i>Dientamoeba fragilis</i>						
TB	4	1,63	10	5,18	14	3,2
Real time PCR	26	10,61	26	13,47	52	11,9

Bu çalışmadaki konvansiyonel yöntemler ile belirlenen *Blastocystis* ve *D. fragilis*'in dağılımındaki verileri moleküler yöntemler ile karşılaştırdığımızda gerçek pozitifliğin farklı olduğunu görmekteyiz. SF yöntemi ile *Blastocystis* saptanan 48 örneğin real time PCR yöntemiyle 39'u (%81,3) pozitif olarak saptanmıştır. Bununla birlikte TB

yöntemiyle *D. fragilis* saptanan 14 örneğin real time PCR yöntemi ile 10'u (%71,4) pozitif saptanmıştır. Aynı şekilde tüm yöntemlerin real time PCR ile karşılaştırılması Çizelge 4.5'te sunulmaktadır.

Çizelge 4.5. Real time PCR ile saptanan *Blastocystis* ve *D. fragilis* pozitifliğinin konvansiyonel yöntemler ile karşılaştırılması

		Real time PCR		t değeri	p değeri
		Pozitif	Negatif		
<i>Blastocystis</i>					
SF	Pozitif (n=48)	39	9	-3,00	p=0,002
	Negatif (n=390)	29	361		
	Toplam (n=438)	68	370		
Lugol	Pozitif (n=50)	42	8	-2,66	p=0,007
	Negatif (n=388)	26	362		
	Toplam (n=438)	68	370		
FECT	Pozitif (n=46)	40	6	-2,89	p=0,003
	Negatif (n=392)	28	364		
	Toplam (n=438)	68	370		
TB	Pozitif (n=47)	44	3	-2,43	p=0,02
	Negatif (n=391)	24	367		
	Toplam (n=438)	68	370		
Kültür	Pozitif (n=55)	53	2	-1,47	p=0,14
	Negatif (n=383)	15	368		
	Toplam (n=438)	68	370		
<i>Dientamoeba fragilis</i>					
TB	Pozitif (n=14)	10	4	-5,63	p<0,001
	Negatif (n=424)	42	382		
	Toplam (n=438)	52	386		

Blastocystis saptanmasında SF, Lugol, FECT ve TB yöntemlerinin real time PCR yöntemi ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). Ancak kültür ve real time PCR yöntemleri arasında istatistiksel olarak bir anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,14$). Bu da kültür yönteminin diğer yöntemlere (SF, Lugol, FECT ve TB) göre *Blastocystis* tanısında daha duyarlı olduğunu bildirmektedir. *D. fragilis* saptanmasında da TB yönteminin real time PCR yöntemi karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$).

Blastocystis ve *D. fragilis*'in çalışmamıza dahil edilen dışkı örneklerine uygulanan SF, Lugol, FECT, TB, kültür ve real time PCR yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükle ilgili karşılaştırma sonuçları Çizelge 4.6 verilmiştir. Tüm tanı yöntemleri için real time PCR altın standart olarak kabul edilerek duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif belirleyicilik (prediktif) değerleri hesaplanmıştır. Yöntemler arasındaki tutarlılık Kappa katsayısı ile değerlendirilmiştir ve $\kappa=0,21-0,40$ ise orta/düşük derecede, $\kappa=0,41-0,60$ ise orta derecede, $\kappa=0,61-0,80$ ise güçlü/yüksek derecede,

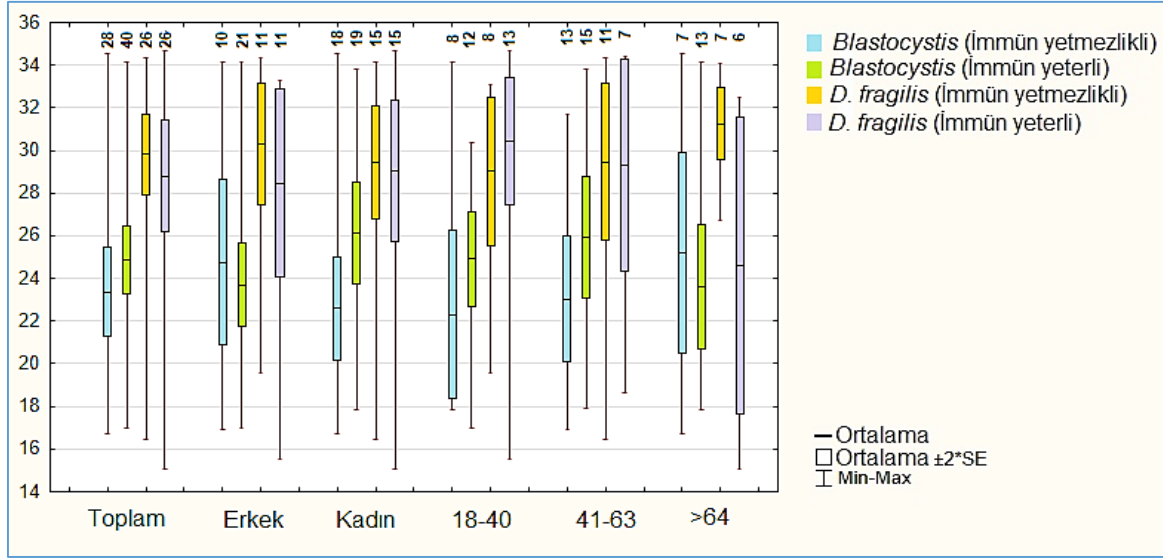
$\kappa \geq 0,81$ ise çok güçlü/çok yüksek derecede tutarlı kabul edilmiştir. *Blastocystis* için SF, Lugol, FECT ve TB yöntemlerinin tutarlılığı güçlü/yüksek derecede, kültür yönteminin ise çok güçlü/çok yüksek derecede saptanmıştır. *D. fragilis* için de TB yönteminin tutarlılığı orta/düşük derecede saptanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Hasta gruplarında *Blastocystis* ve *D. fragilis* için real time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde SF, Lugol, FECT, TB ve kültür yöntemlerinin karşılaştırılması

	SF	Lugol	FECT	TB	Kültür
<i>Blastocystis</i>					
Duyarlılık	% 57,35	% 61,76	% 58,82	% 64,71	% 77,94
Özgüllük	% 97,57	% 97,84	% 98,38	% 99,19	% 99,46
Pozitif prediktif değer	% 81,25	% 84	% 86,96	% 93,62	% 96,36
Negatif prediktif değer	% 92,56	% 93,3	% 92,86	% 93,86	% 96,08
κ değeri (tutarlılık)	0,62	0,66	0,66	0,73	0,84
<i>Dientamoeba fragilis</i>					
Duyarlılık	-	-	-	% 19,23	-
Özgüllük	-	-	-	% 98,96	-
Pozitif prediktif değer	-	-	-	% 71,43	-
Negatif prediktif değer	-	-	-	% 90,09	-
κ değeri (tutarlılık)				0,27	

4.4. Real time PCR Bulguları

Real time PCR ile toplam 438 örneğin 68'inde (%15,5) *Blastocystis*, 52'inde (%11,9) *D. fragilis* farklı Ct değerlerinde pozitiflik göstermiştir. İmmün yetmezlikli olan hasta grubundaki *Blastocystis*'in amplifikasyon Ct değeri ortaması 23,9 olarak belirlenmiş, en düşük Ct değeri 16,7 iken en yüksek Ct değeri 34,6 olarak gözlenmiştir. *D. fragilis*'in amplifikasyon Ct değeri ortaması ise 29,8 olarak saptanmış, en düşük 16,5 en yüksek 34,3 Ct değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.5, Çizelge 4.7).



Şekil 4.5. İmmün yetmezlikli ve immün yeterli hasta grubundaki *Blastocystis* ve *D. fragilis* real time PCR yöntemindeki Ct değerlerinin genel toplam, cins ve yaş gruplarına göre dağılım grafiği (Pozitif real time PCR sonuç sayısı hata çubuklarının üzerinde gösterilmiştir).

İmmün yetmezlikli kadınlarda *Blastocystis* Ct değeri ortalaması 22,58 saptanırken ve immün yeterli kadınlarda ise 26,14 olarak bulunmuş ve her iki grup arasındaki bu fark istatistiksel anlamlılık ifade etmiştir ($t=2,09$, $df=35$, $p=0,04$) (Çizelge 4.7). Bu durum immün yetmezlikli kadınlarda *Blastocystis* yoğunluğunun daha yüksek olduğunu göstermiştir. Genel olarak immün yetmezlikli hastalarda *Blastocystis* Ct değeri ortalaması 23,96 saptanırken ve immün yeterli hastalarda ise 24,86 olarak bulunmuş ve istatistiksel bir fark bulunmamaktadır ($p=0,24$). *D. fragilis*'in Ct değeri ortalaması ise immün yetmezlikli hastalarda 29,81 saptanırken ve immün yeterli hastalarda 28,79 olarak tespit edilmiştir ve istatistiksel bir fark bulunmamaktadır ($p=0,53$).

Çizelge 4.7. *Blastocystis* ve *D. fragilis* real time PCR Ct değerlerinin ortalaması

	<i>Blastocystis</i>			<i>Dientamoeba fragilis</i>		
	İmmün yetmezlikli	İmmün yeterli	<i>p</i>	İmmün yetmezlikli	İmmün yeterli	<i>p</i>
Erkek	24,76	23,71	0,54	30,29	28,47	0,69
Kadın	22,58	26,14	0,04	29,45	29,02	0,83
18 – 40	22,31	24,90	0,23	29,03	30,43	0,55
41 – 63	23,02	25,91	0,17	29,45	29,33	0,96
>64	25,19	23,62	0,55	31,25	24,60	0,07
Toplam	23,96	24,86	0,24	29,81	28,79	0,53

Real time PCR'da pozitif olarak belirlenen toplam 68 *Blastocystis* izolatının alt tür analizi NGS yöntemi ile yapılmıştır.

4.5. *Blastocystis* Alt Türlerinin Yeni Nesil Dizi Analizi Sonuçları

Her iki grup hasta örneklerinden real time PCR ile pozitif olarak belirlenen 68 örneğin alt türleri NGS Illumina Miseq platformu (ABD) kullanılarak yapıldı. Çalışmaya dahil edilen örneklerden toplam 18 813 471 okuma çifti oluşturuldu ve örnek başına ortalama 147 257 okuma yapıldı. Kırpma, çift birleştirme ve kalite filtrelemesinin ardından toplam 5 048 511 birleştirilmiş okuma elde edildi. Toplam 68 *Blastocystis* örneğin alt tür analizi 40 benzersiz OTU kullanılarak yapılmıştır.

Bu çalışmada toplam beş *Blastocystis* alt türü (ST1, ST2, ST3, ST4 ve ST6) tespit edilmiştir. Tek başına alt tür enfeksiyonları %79,4 (n=54) olarak saptanırken miks alt tür enfeksiyonları ise % 20,6 (n=4) olarak saptanmıştır. İmmün yetmezlikli ve immün yeterli hasta grupları arasındaki *Blastocystis* alt tür dağılımı Çizelge 4.8'de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Yeni Nesil Dizi analizi ile tanımlanan *Blastocystis* alt türlerinin immün yeterli ve immün yetmezlikli hasta gruplarına göre dağılımı

İmmün yeterli hasta grubu				İmmün yetmezlikli hasta grubu	
Hasta ID	Alt tür (yoğunluk %)	Hasta ID	Alt tür (yoğunluk %)	Hasta ID	Alt tür (yoğunluk %)
ID/F 016	ST2(4)*/ST3(96,0)	ID/F 158	ST3(100)	İY/F 001	ST3(100)
ID/F 018	ST1(15,5)/ST3(84,5)	ID/F 164	ST3(100)	İY/F 005	ST2(100)*
ID/F 033	ST3(100)	ID/F 165	ST1(85,8)*/ST3(14,2)	İY/F 006	ST3(100)
ID/F 037	ST3(100)	ID/F 169	ST3(100)	İY/F 026	ST3(100)
ID/F 038	ST3(100)	ID/F 170	ST2(99,7)*/ST3(0,3)	İY/F 034	ST2(99,7)*/ST3(0,3)
ID/F 042	ST1(99,7)*/ST3(0,3)	ID/F 173	ST2(100)*	İY/F 059	ST3(100)
ID/F 043	ST2(0,1)/ST3(99,9)	ID/F 180	ST2(100)	İY/F 074	ST3(100)
ID/F 045	ST3(100)	ID/F 184	ST1(100)*	İY/F 078	ST1(99,5)/ST3(0,5)
ID/F 047	ST3(100)	ID/F 185	ST3(100)	İY/F 082	ST1(99,8)/ST3(0,2)
ID/F 063	ST3(100)	ID/F 188	ST3(100)	İY/F 085	ST3(100)
ID/F 067	ST3(100)	ID/F 204	ST3(100)	İY/F 100	ST3(100)
ID/F 068	ST2(91,4)*/ST3(8,6)	ID/F 210	ST3(100)	İY/F 108	ST2(100)*
ID/F 071	ST3(100)			İY/F 109	ST2(100)*
ID/F 072	ST3(100)			İY/F 114	ST1(100)
ID/F 085	ST3(100)			İY/F 115	ST3(100)
ID/F 087	ST2(99,8)/ST3(0,2)			İY/F 121	ST3(100)
ID/F 089	ST3(100)			İY/F 124	ST2(100)
ID/F 091	ST1(100)			İY/F 133	ST3(100)
ID/F 099	ST1(99,3)/ST3(0,7)			İY/F 136	ST3(100)
ID/F 100	ST2(39,2)*/ST3(60,8)			İY/F 156	ST3(100)
ID/F 104	ST2(100)*			İY/F 170	ST3(100)
ID/F 109	ST6(100)			İY/F 171	ST3(100)
ID/F 115	ST3(100)			İY/F 174	ST6(100)
ID/F 125	ST2(100)*			İY/F 180	ST2(37,1)*/ST3(62,9)
ID/F 129	ST3(100)			İY/F 185	ST2(100)
ID/F 133	ST3(100)			İY/F 206	ST3(100)
ID/F 150	ST2(100)			ID/F 157 ¹	ST2(100)*
ID/F 151	ST4(100)			ID/F 159 ¹	ST3(100)

ID/F = İmmün yeterli hasta grubu,
İY/F = İmmün yetmezlikli hasta grubu

¹ Yanlışlıkla immün yeterli hasta grubunda kodlanmış
*= intra-subtype değişkenliğini gösterir

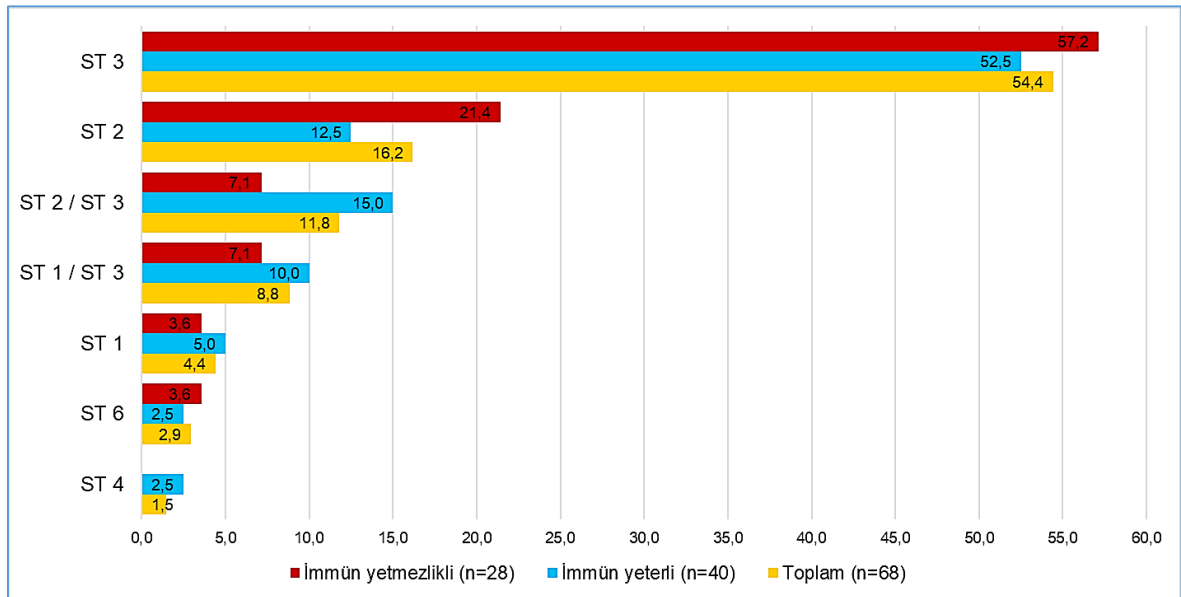
Çalışmamızda her iki hasta grubunda en yaygın alt tür olarak %54,4 (n=37) ST3 saptanmıştır. Sonraki alt tür görülme sıklığı ST2 %16,2 (n=11), ST1 %4,4 (n=3), ST6 %2,94 (n=2) ve ST4 %1,47 (n=1) olarak tespit edilmiştir. Hasta grupları arasında alt tür dağılımı istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir (Çizelge 4.9). En sık görülen miks alt tür ST2/ST3 (%11,8) olarak tespit edilmiş, ikinci olarak ST1/ST3 (%8,8) miks alt tür enfeksiyonu saptanmıştır (Çizelge 4.9). İmmün yeterli hasta grubunda miks alt türler (ST1/ST3 ve ST2/ST3: %25) immün yetmezlikli hasta grubuna göre (ST1/ST3 ve ST2/ST3: %14,28) anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (OR=3,29, p=0,04, lojistik regresyon analizi).

Çizelge 4.9. *Blastocystis* alt türlerinin hasta gruplarına göre dağılımı

	İmmün yetmezlikli (n=28) n (%)	İmmün yeterli (n=40) n (%)	Toplam (n=68) n (%)	χ^2	p
ST 1	1 (3,57)	2 (5)	3 (4,42)	0,07	0,77
ST 2	6 (21,43)	5 (12,5)	11 (16,18)	0,96	0,32
ST 3	16 (57,15)	21 (52,5)	37 (54,41)	0,14	0,70
ST 4	-	1 (2,5)	1 (1,47)	0,71	0,39
ST 6	1 (3,57)	1 (2,5)	2 (2,94)	0,06	0,79
ST 1 / ST 3	2 (7,14)	4 (10)	6 (8,82)	0,16	0,68
ST 2 / ST 3	2 (7,14)	6 (15)	8 (11,8)	0,98	0,32

$\chi^2=2,73$, SD=6, p=0,84

Her iki hasta grubundaki (n=68) alt tür dağılımı Şekil 4.6'da verilmektedir.



Şekil 4.6. Çalışma gruplarındaki *Blastocystis* alt tür dağılımı.

Alt türlerin dağılımında ST1, ST2 ve ST3 alt türleri *Blastocystis* izolatlarının %75,01'ni oluşturmuştur. ST4 sadece immün yeterli hasta grubunda bir örnekte, ST6 ise her iki hasta grubunda birer örnekte saptanmıştır.

4.6. *Blastocystis* Alt Tür İçi Değişkenliği (Intra-subtype)

Bu çalışmada beş farklı *Blastocystis* alt türü (ST1-ST4, ST6) tespit edilmiştir. Alt türleri belirlenen toplam 68 hasta örneğinin tümü 40 benzersiz OTU altında biriktirilmiştir. Bununla birlikte benzersiz OTU'lar değerlendirildiğinde çalışmada ST1 olarak saptanan 9 örneğin 3'ünde (%33,3) ve ST2 olarak saptanan 19 örneğin 13'ünde (%68,4) intra-subtype (alt tür içi) değişkenlik gözlenmiştir. Diğer ST3, ST4 ve ST6 olarak saptanan örneklerin arasında intra-subtype değişkenlik gözlenmemiştir. Buna göre en fazla ST2 alt türünde intra-subtype değişkenlik saptanmıştır. Ayrıca bir hasta örneğinde (hasta İY/F109) ST2 alt türünde ikiden fazla intra-subtype çeşitliliği tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Yeni Nesil Dizi analizi ile *Blastocystis* alt türlerinde saptanan benzersiz operasyonel taksonomik birimler (OTU'lar)

ST	Alt tür başına benzersiz OTU sayısı	Unique ID	Alt tür başına OTU içeren örnek sayısı	Hasta ID
ST 1	8	uniq-6	3	ID/F42*, İY/F82, İY/F114
		uniq-11	3	ID/F18, ID/F91, ID/F99
		uniq-12	1	ID/F184*
		uniq-26	1	İY/F78
		uniq-33	1	ID/F165*
		uniq-35	1	ID/F165*
		uniq-38	1	ID/F42*
		uniq-39	1	ID/F184*
ST 2	20	uniq-8	6	ID/F68*, ID/F104*, ID/F157*, ID/F170*, İY/F124, İY/F180*,
		uniq-25	4	ID/F16*, ID/F100*, İY/F34*, İY/F109*
		uniq-13	2	ID/F87, ID/F150
		uniq-17	2	ID/F68*, ID/F170*
		uniq-19	2	ID/F16*, İY/F5*
		uniq-23	2	ID/F125*, İY/F108*
		uniq-30	2	ID/F125*, İY/F5*
		uniq-14	1	ID/F180
		uniq-15	1	ID/F173*
		uniq-18	1	ID/F104*
		uniq-22	1	İY/F185
		uniq-24	1	İY/F34*
		uniq-27	1	İY/F109*
		uniq-29	1	ID/F157*
		uniq-31	1	İY/F108*
		uniq-32	1	İY/F180*
		uniq-34	1	ID/F100*
		uniq-36	1	İY/F109*
		uniq-37	1	ID/F173*
		uniq-40	1	ID/F43
ST 3	9	uniq-1	27	ID/F18, ID/F33, ID/F42, ID/F43, ID/F47, ID/F71, ID/F85, ID/F89, ID/F99, ID/F100, ID/F158, ID/F164, ID/F169, İY/F1, İY/F6, İY/F34, İY/F59, İY/F82, İY/F85, İY/F100, İY/F115, İY/F121, İY/F133, İY/F170, İY/F206, ID/F165, ID/F170

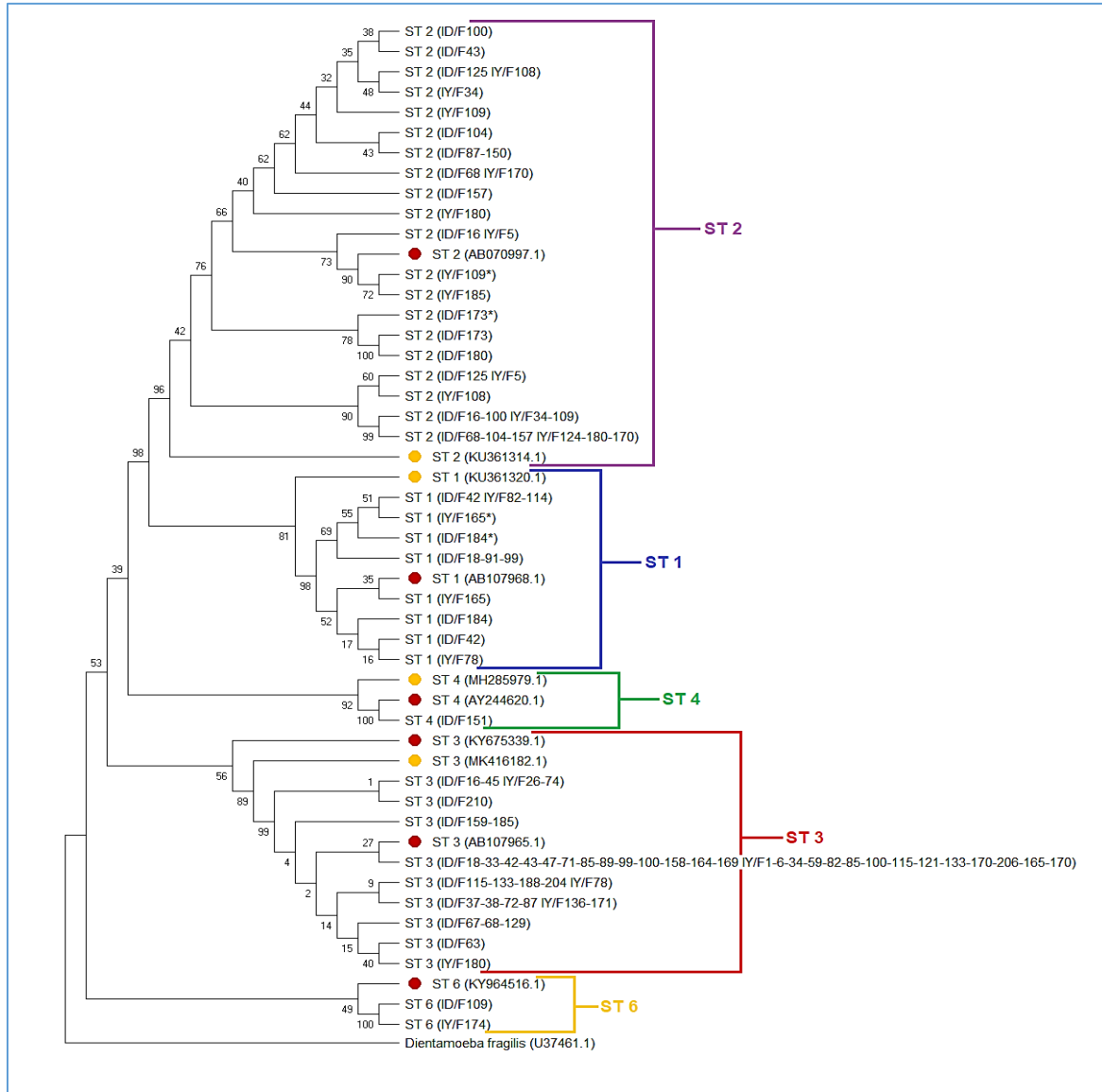
Çizelge 4.10. (devam) Yeni Nesil Dizi analizi ile *Blastocystis* alt türlerinde saptanan benzersiz operasyonel taksonomik unitler (OTU'lar)

		uniq-2	6	İD/F115, İD/F133, İD/F188, İD/F204, İY/F78, İY/F156
		uniq-3	6	İD/F37, İD/F38, İD/F72, İD/F87, İY/F136, İY/F171
		uniq-4	4	İD/F16, İD/F45, İY/F26, İY/F74
		uniq-5	3	İD/F67, İD/F68, İD/F129
		uniq-7	2	İD/F159, İD/F185
		uniq-9	1	İD/F210
		uniq-10	1	İD/F63
		uniq-28	1	İY/F180
ST 4	1	uniq-21	1	İD/F151
ST 6	2	uniq-16	1	İD/F109
		uniq-20	1	İY/F174

* intra-subtype değişkenlik içeren *Blastocystis* izolatları kalın yazılmıştır

4.7. *Blastocystis* Alt Türlerinin Filogenetik Analizi

Yeni nesil dizi analizi yöntemi ile alt türleri belirlenen toplam 68 *Blastocystis* izolatının gen dizileri Genbank'da kayıtlı referans diziler ile karşılaştırılarak sıralanmış ve evrimsel uzaklıkları belirlenmiştir (Şekil 4.7). *ssu-rRNA* dizilerinin veri tabanına girilmesi sonucu çalışmamızda belirlenen *Blastocystis* alt türleri ile filogenetik analiz sonuçlarının birbiriyle tamamen örtüştüğü görülmüştür. Alt türü ST3 olarak belirlenen toplam 51 örnek Genbank'da kayıtlı ST3 referans *ssu-rRNA* dizileri ile aynı dalda, ST2' olarak belirlenen 19 örnek ST2 referansları ile aynı dalda, ST1 olarak belirlenen 9 örnek ST1 referansları ile aynı dalda, ST4 olarak belirlenen 1 örnek ST4 referansları ile aynı dalda ve ST6 olarak belirlenen iki örnek de ST6 referansları ile aynı dallarda yer almıştır.



Şekil 4.7. Çalışmamızda elde edilen *Blastocystis* gen dizilerinin kısmi filogenetik analizi (● Genbankdaki yurtdışı suşları. ● Genbankdaki Türkiye’de elde edilen).

4.8. Hasta Gruplarındaki *Blastocystis* ve *D. fragilis*’in Cinse, Yaşa ve Mevsime Göre Dağılımına Ait Bulgular

İmmün yeterli ve immün yetmezlikli hasta gruplarında real time PCR ile *Blastocystis* ve *D. fragilis* pozitifliği ile yaş, cinsiyet ve mevsimler arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek için lojistik regresyon analizi yapılmıştır (Çizelge 4.11). *Blastocystis*’in görülme sıklığı immün yeterli hasta grubunda immün yetmezlikli hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($\chi^2=7,07$, %95 CI: 1,20–3,43, $p=0,008$). Cinse göre erkek kadın arasında bir fark gözlenmezken (OR=1,04, $p=0,89$ lojistik regresyon analizi), immün yeterli erkeklerde immün yetmezlikli

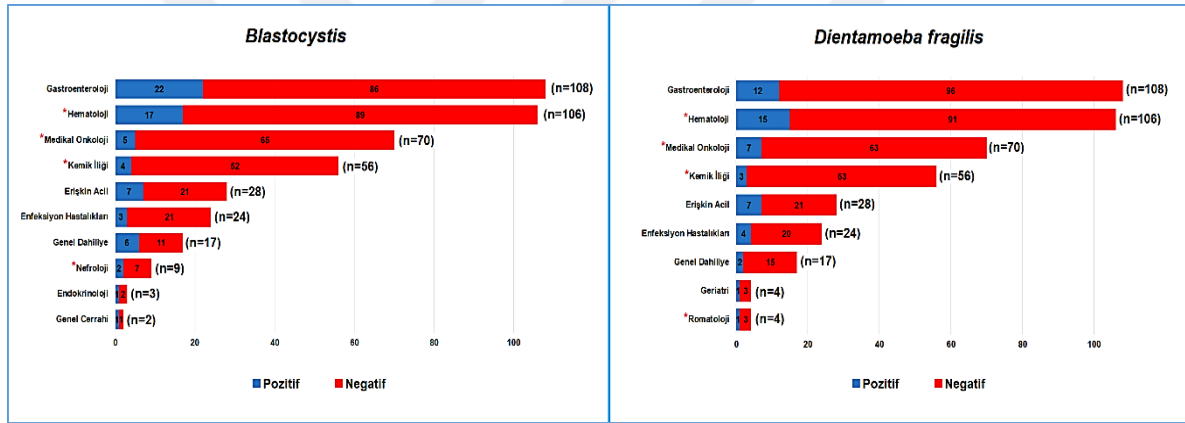
erkeklere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($\chi^2=6,83$, %95 CI: 1,27–6,41, $p=0,01$). Yaş grupları arasında *Blastocystis* pozitifliği açısından anlamlı farklılık saptanmazken, 64-74 yaş grubundaki immün yeterli hastalarda immün yetmezlikli olgulara göre anlamlı olarak *Blastocystis* pozitifliği daha yüksek oranda saptanmıştır ($\chi^2=14,43$, %95 CI: 0,03–0,38, $p<0,001$). *Blastocystis* pozitifliğinin mevsimlere göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamasına rağmen ($\chi^2=1,04$, SD=3, $p=0,79$), sonbaharda immün yeterli hastalarda görülme sıklığı immün yetmezlikli olgulara göre anlamlı olarak daha yüksek oranda saptanmıştır ($\chi^2=3,90$, %95 CI: 0,95–16,45, $p=0,04$). *D. fragilis* pozitifliği her iki gruptaki parametrelerde anlamlı bir fark göstermemiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. *Blastocystis* ve *D. fragilis*'in araştırma grubundaki cinse, yaşa ve mevsime göre dağılımı

	İmmün yetmezlikli n/N (%)	İmmün yeterli n/N (%)	χ^2	OR (%95 CI)	p değeri
<i>Blastocystis</i>					
Genel	28/245 (11,43)	40/193 (20,72)	7,07	2,03 (1,20-3,43)	0,008
Erkek	10/109 (9,17)	21/94 (22,34)	6,83	2,85 (1,27-6,41)	0,01
Kadın	18/136 (12,95)	19/99 (19,19)	1,52	1,56 (0,77-3,15)	0,22
$\chi^2=1,87$, SD=1, $p=0,17$					
Yaşa göre dağılım					
18 – 29	5/31 (16,13)	8/57 (14,03)	0,07	0,85 (0,25-2,86)	0,79
30 – 40	3/25 (12)	4/36 (11,11)	0,01	0,92 (0,19-4,51)	0,91
41 – 52	6/49 (12,24)	7/31 (22,58)	1,45	2,09 (0,63-6,94)	0,23
53 – 63	7/68 (10,29)	8/33 (24,24)	3,23	2,79 (0,91-8,51)	0,07
64 – 74	5/60 (8,33)	12/27 (44,44)	14,43	0,12 (0,03-0,38)	<0,001
75 - 85	2/12 (16,66)	1/9 (11,11)	0,13	0,63 (0,05-8,20)	0,72
$\chi^2=2,14$, SD=5, $p=0,83$					
Mevsime göre dağılım					
İlkbahar	14/97 (14,43)	16/84 (19,05)	0,69	1,40 (0,64-3,06)	0,40
Yaz	2/47 (4,25)	4/30 (13,33)	2,04	3,46 (0,59-20,22)	0,16
Sonbahar	3/52 (5,76)	7/36 (19,44)	3,90	3,94 (0,95-16,45)	0,04
Kış	9/49 (18,36)	13/43 (30,23)	1,77	1,93 (0,73-5,09)	0,19
$\chi^2=1,04$, SD=3, $p=0,79$					
<i>Dientamoeba fragilis</i>					
Genel	26/245 (10,61)	26/193 (13,47)	0,84	1,31 (0,73-2,34)	0,36
Erkek	11/109 (10,09)	11/94 (11,70)	0,14	1,18 (0,49-2,86)	0,71
Kadın	15/136 (11,03)	15/99 (15,15)	0,86	1,44 (0,67-3,10)	0,35
$\chi^2=0$, SD=1, $p=0,99$					
Yaşa göre dağılım					
18 – 29	5/31 (16,13)	6/57 (10,52)	0,56	0,61 (0,17-2,19)	0,45
30 – 40	3/25 (12)	7/36 (19,44)	0,62	1,77 (0,41-7,63)	0,44
41 – 52	7/49 (14,28)	4/31 (12,90)	0,03	0,89 (0,24-3,33)	0,86
53 – 63	4/68 (5,88)	3/33 (9,09)	0,34	1,60 (0,34-7,60)	0,55
64 – 74	7/60 (11,66)	4/27 (14,81)	0,16	1,32 (0,35-4,94)	0,68
75 - 85	-/12 (-)	2/9 (22,22)			
$\chi^2=5,47$, SD=5, $p=0,36$					
Mevsime göre dağılım					
İlkbahar	17/97 (17,52)	10/84 (11,90)	1,14	0,64 (0,27-1,48)	0,29
Yaz	2/47 (4,25)	2/30 (6,66)	0,21	1,61 (0,21-12,06)	0,64
Sonbahar	3/52 (5,77)	6/36 (16,66)	2,70	3,27 (0,76-14,04)	0,11
Kış	4/49 (8,16)	8/43 (18,60)	2,22	2,57 (0,72-9,24)	0,14
$\chi^2=4,15$, SD=3, $p=0,25$					

4.9. *Blastocystis* ve *D. fragilis* Pozitif Saptanan İmmün Yeterli ve Yetmezlikli Olguların Kliniklere Göre Dağılımına Ait Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 438 hasta 15 farklı klinikten gönderilmiştir. Toplam olgular göz önüne alındığında *Blastocystis* enfeksiyonu Genel Dahiliye kliniğinde diğer kliniklere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($\chi^2=5,27$, $p=0,02$). Bununla birlikte Medikal Onkoloji kliniğinden başvuruda bulunan olgularda ise diğer kliniklere göre anlamlı olarak daha az sıklıkta saptanmıştır ($\chi^2=4,46$, $p=0,03$). Diğer kliniklerde anlamlı bir fark saptanmamıştır (Çizelge 4.12). *D. fragilis* enfeksiyonu sadece Erişkin Acil'den başvuran olgularda diğer kliniklere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($\chi^2=4,92$, $p=0,02$) (Şekil 4.8, Çizelge 4.13).



Şekil 4.8. *Blastocystis* ve *D. fragilis*'in kliniklere göre dağılımı (*İmmün yetmezlikli olan hasta klinikleri).

Çizelge 4.12. *Blastocystis* saptanan ve saptanmayan olguların kliniklere göre dağılımı

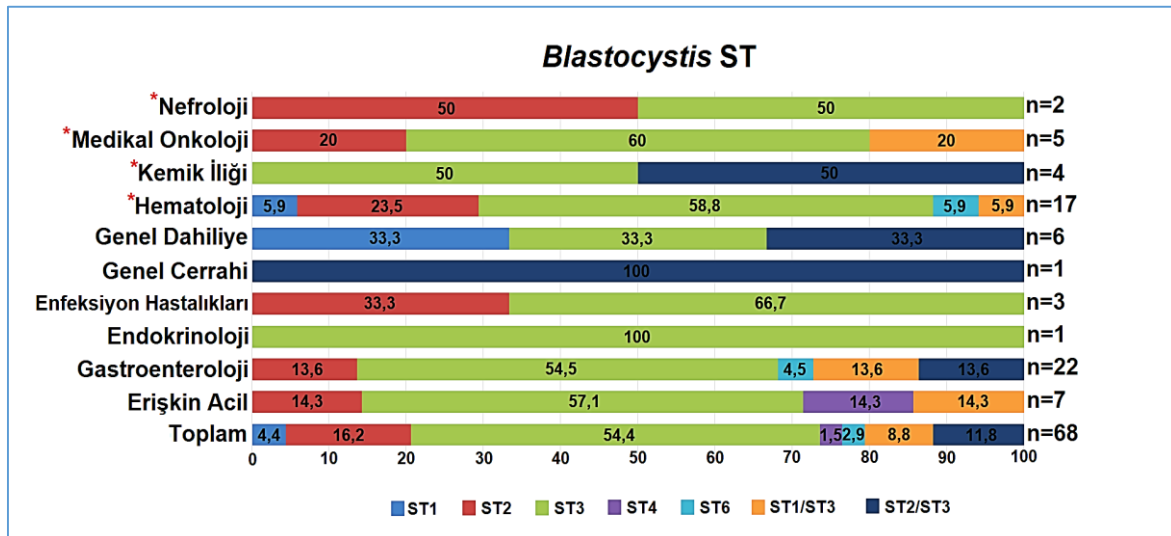
	Pozitif (n=68)		Negatif (n=370)		Toplam	χ^2	p
	Sayı	%	Sayı	%			
Genel Cerrahi	1	50	1	50	2	1,82	0,17
Genel Dahiliye	6	35,3	11	64,7	17	5,27	0,02
Endokrinoloji	1	33,3	2	66,7	3	0,73	0,39
Erişkin Acil	7	25	21	75	28	2,04	0,15
Nefroloji	2	22,2	7	77,8	9	0,31	0,57
Gastroenteroloji	22	20,4	86	79,6	108	2,56	0,11
Hematoloji	17	16,0	89	84,0	106	0,02	0,86
Enfeksiyon Hastalıkları	3	12,5	21	87,5	24	0,17	0,67
Medikal Onkoloji	5	7,1	65	92,9	70	4,46	0,03
Kemik İliği	4	7,1	52	92,9	56	3,44	0,06

Çizelge 4.13. *Dientamoeba fragilis* saptanan ve saptanmayan olguların kliniklere göre dağılımı

	Pozitif (n=52)		Negatif (n=386)		Toplam	χ^2	p
	Sayı	%	Sayı	%			
Romatoloji	1	25	3	75	4	0,66	0,41
Geriatrı	1	25	3	75	4	0,66	0,41
Erişkin Acil	7	25	21	75	28	4,92	0,02
Enfeksiyon Hastalıkları	4	16,7	20	83,3	24	0,55	0,45
Hematoloji	15	14,2	91	85,8	106	0,69	0,40
Genel Dahiliye	2	11,8	15	88,2	17	0,0002	0,98
Gastroenteroloji	12	11,1	96	88,9	108	0,07	0,77
Medikal Onkoloji	7	10	63	90	70	0,27	0,59
Kemik İliği	3	5,4	53	94,6	56	2,60	0,10

Çalışmaya dahil edilen tüm olgulara ait örnekler toplam 15 farklı poliklinik ve kliniklerden gönderilmiştir. Kadın Hastalıkları ve Doğum, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon ve Göğüs Hastalıklarından gönderilen hastalardan hiçbirinde parazit saptanmamıştır. Romatoloji ve Geriatrı poliklinik ve kliniklerinden gönderilen örneklerde *Blastocystis* gözlenmemiştir. *D. fragilis* ise Nefroloji ve Endokrinoloji poliklinik ve kliniklerinden gönderilen örneklerde görülmemiştir.

Blastocystis alt türlerinin kliniklere göre dağılımı Şekil 4.9'da gösterilmektedir. *Blastocystis* alt tür dağılım çeşitliliği en fazla Hematoji kliniğinden gelen örneklerde (ST1, ST2, ST3, ST6 ve miks alt tür olarak ST1/ST3) saptanmıştır. Çalışmamızda sadece bir örnekte alt tür ST4 saptanmış olup Erişkin Acil'den gönderilmiştir.



Şekil 4.9. *Blastocystis* alt türlerinin kliniklere göre dağılımı (Dikey çizgide *Blastocystis* pozitif olan hasta sayıları, yatay çizgide alt türler % olarak ifade edilmiştir.*İmmün yetmezlikli olan hasta klinikleri).

5. TARTIŞMA

Blastocystis ve *D. fragilis* dünyada insanlarda yaygın bulunan gastrointestinal sistem protozoonlarıdır. Gastrointestinal semptomları olan hastalarda *Blastocystis* ve *D. fragilis* sıklıkla bulunmasına rağmen, her iki protozoon da herhangi bir semptomu olmayan sağlıklı kişilerde de tespit edilmektedir [30, 392]. Bu protozoonların her ikisinin de patojenitesi hakkında kesin bilgiler bulunmamaktadır. Semptomatoloji ile ilişkileri konusunda yeterli bilgi bulunmaması bu organizmaların varlığı için rutin tanı testlerinin yapılmasının gerekip gerekmediği sorusuna yol açmaktadır [142, 393].

Bu çalışmada, immün yetmezlikli ve immün yeterli ishalleri hastalarda *Blastocystis* ve *D. fragilis*'in varlığı farklı tanı yöntemleriyle araştırılmış, bu tanı yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılıkları belirlenmiştir. Ayrıca *Blastocystis* alt tür belirlenmesi NGS yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Blastocystis ve *D. fragilis* tanısı birçok rutin tanı laboratuvarında ihmal edilmektedir. Her iki protozoonun patojenitesi konusunda süregelen tartışmalar dışkı örneklerinin incelenmesinde gereken önemin verilmemesine yol açmakta ve bu nedenle çok sayıda *Blastocystis* ve *D. fragilis* ile enfekte olgu gözden kaçırılmaktadır [10, 11]. Ayrıca rutin parazitolojik dışkı incelemelerinde en yaygın direkt mikroskopik inceleme gibi duyarlılığı düşük yöntemlerin kullanılması literatürdeki prevalans verilerinin gerçekliğini tartışmalı hale getirmektedir. Özellikle *D. fragilis* tanısında direkt mikroskopik incelemenin yerinin olmaması nedeniyle, sadece bu yöntemi kullanan laboratuvarının bu paraziti gözden kaçırmalarına neden olmaktadır. Bu protozoonun gerçek prevalansın saptanabilmesi için trikrom boyama yöntemi ve maliyeti yüksek olan moleküler tanı yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir [50, 284]. *Blastocystis* tanısında dünyada yaygın olarak direkt mikroskopik inceleme yöntemi kullanılmakla birlikte emek yoğun trikrom boyama yöntemide en sık kullanılan boyalı inceleme yöntemidir. Mikroskopik incelemelerin zaman alıcı olması ve deneyim gerekliliği, en az üç farklı günde alınmış örneğin incelenmesi, dışkıda bulunan artefaktlar, boyut ve şekil farklılıkları, lökosit, maya ve parazitlerle karıştırılabilmesi tanıda zorlukları oluşturmaktadır [4, 18, 47, 50, 157, 393, 394]. *Blastocystis* tanı duyarlılığını arttırmak için maliyeti düşük mini kültür yönteminin rutin kullanılması gerçek prevalansının ortaya konulmasında büyük katkı

sağlamakla birlikte az sayıda laboratuvar tarafından kullanılmaktadır [233]. *D. fragilis* tanısı için boyalı mikroskopik inceleme yine az sayıda laboratuvar tarafından kullanılmakta, pratik bir kültür yöntemi bulunmamaktadır [284]. Günümüzde mikrobiyal etkenlerin tanımlanmasında moleküler yöntemler giderek gelişerek real time PCR yöntemi mali kaynağı olan laboratuvarlarda tanıda yaygın olarak kullanılmakta ve altın standart tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. *Blastocystis* ve *D. fragilis* tanısında real time PCR yöntemine daha çok araştırmalarda yer verilmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda gerçek prevalansın mikroskopik inceleme sonucunda elde edilen verilerden daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir [16].

Dünyada yaklaşık 1 milyar insanın *Blastocystis* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. *Blastocystis* ve *D. fragilis*'in tanısında farklı yöntemlerin kullanıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar Çizelge 2.3 ve 2.7'de özetlenmiştir. Bu çalışmaların çok farklı coğrafi bölgelerde, farklı sosyo-ekonomik durumu olan toplumlarda ve farklı tanı yöntemleri kullanılarak yapıldığı görülmektedir. Özellikle konvansiyonel ve moleküler tanının kullanıldığı çalışmalar arasında farklı prevalans oranları dikkat çekmektedir. İnsan dışkı örneklerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle incelenmesinde *Blastocystis* enfeksiyonunun %0,54 ile %88,8 oranında olduğu görülmektedir (Bkz. Çizelge 2.3). *D. fragilis* enfeksiyonu ise %0–%91 sıklıkta görülmektedir (Bkz. Çizelge 2.7). Türkiye'de yapılan çalışmalarda da *Blastocystis*'in en sık saptanan intestinal parazit olduğu ve ülke genelindeki dağılımının %0,54–%37,9 arasında değiştiği bildirilmiştir [19-28]. *D. fragilis*'in Türkiye'deki prevalansının ise %0 ile %18,3 arasında değiştiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir [32-46].

Çalışmamızda toplam 438 ishali dışkı örneğinde *Blastocystis* SF, Lugol, FECT, TB ve kültür yöntemleri ile sırasıyla %11, %11,4, %10,5, %10,7 ve %12,6 olarak bulunmuş ve moleküler yöntem olarak real time PCR'da ise %15,5 sıklığında saptanmıştır. *D. fragilis* ise TB yönteminde %3,2 real time PCR'da %11,9 sıklığında saptanmıştır. Sonuçlarımız Türkiye'de yapılan diğer çalışmalardaki sonuçlarla uyumluluk göstermektedir [20, 43-45, 157]. *Blastocystis* tanısında kullanılan konvansiyonel yöntemler real time PCR ile karşılaştırıldığında trikrom boyama yöntemi ve kültür yönteminin duyarlılık ve özgüllüklerinin sırasıyla %64,71 ve %99,19 ile %77,94 ve %99,46 olduğu tespit edilmiştir. Yapılan değerlendirmede,

SF, Lugol, FECT ve TB yöntemlerin real time PCR yöntemi ile uyumları güçlü (sırasıyla $k=0,62$, $k=0,66$, $k=0,66$ ve $k=0,73$), kültür yönteminin real time PCR yöntemi ile uyumu ise çok güçlü ($k=0,84$) bulunmuştur. Trikróm boyama yönteminin SF, Lugol ve FECT'e göre parazitin morfolojisinin tanınmasında avantaj sağladığı görülmüştür. *Blastocystis* için kültür yönteminin daha duyarlı olduğuda belirlenmiştir. Stensvold ve diğerleri parazit şüphesi olan 93 (%23'ünde pozitif) hastaya ait 107 (%26'ında pozitif) örneği inceleyerek geleneksel ve moleküler yöntemleri karşılaştıran çalışmalarında *Blastocystis* tanısı için PCR yöntemi referans olarak alındığında, kültür, TB ve FECT yöntemlerinin duyarlılığını sırasıyla %89, %82 ve %50 olarak bildirilmişlerdir [47]. Adıyaman Korkmaz ve diğerleri ishali olan ($n=157$) ve olmayan ($n=193$) hastalara ait toplam 350 dışkı örneğinin %12'sinde ($n=42$) DM'da, %17'sinde ($n=58$) TB'da, %19'unda ($n=66$) DFA ve kültür yöntemleriyle *Blastocystis* pozitif saptamışlardır. Kültür yöntemi altın standart olarak alındığında, yöntemlerin duyarlılığını ise sırasıyla %65, %88 ve %100 olarak bildirmişlerdir [157].

Çalışmamızda *D. fragilis* tanısında kullanılan TB yöntemi real time PCR karşılaştırıldığında duyarlılık ve özgüllüğünün %19,23 ve 98,96 olduğu tespit edilmiştir. *D. fragilis* tanısında TB yönteminin real time PCR yöntemi ile uyumu düşük ($k=0,27$) olarak bulunmuştur. Sivcan ve diğerleri çeşitli kliniklerden başvuruda bulunan gastrointestinal şikayeti olan hasta ($n=101$) ve sağlıklı ($n=20$) bireylere ait 242 dışkı örneğini öncelikle DM ve sonra kültür ve diğer yöntemlerle incelemişlerdir. real time PCR altın standart olarak kabul edildiğinde 121 dışkıya ait duyarlılık DHB için %46, TB %0, PCR için %54 olarak tespit edilmiştir [45]. Calderaro ve diğerlerinin ishal, karın ağrısı gibi semptomları olan ve gelişmekte olan ülkelerden (Asya, Afrika, Doğu Avrupa, Orta ve Güney Amerika) göç eden veya evlat edilen 491 hastaya ait 959 örneğin incelemesinde real time PCR yöntemini altın standart olarak referans aldığı konvansiyonel yöntemlerin (DM ve kültür) duyarlılığının %37,1 olduğunu bildirmişlerdir [313]. Hamidi ve diğerlerinin İran'da gastrointestinal şikayetleri olan 200 katılımcının örneğini konvansiyonel ve moleküler yöntemler karşılaştırdıkları çalışmada real time PCR ile %13,5 ($n=27$) *D. fragilis* pozitifliği saptanırken kültür yöntemi ile %1 ($n=2$), DHB ile %5 ($n=10$) olarak *D. fragilis* tespit etmişlerdir [329].

Hasta örneklerinin incelemesinde konvansiyonel ve moleküler yöntemlerin (SF, Lugol, FECT, TB, kültür ve real time PCR) duyarlılıkları ve özgüllükleri karşılaştırıldığında önemli fark olduğu gözlenmektedir. Çalışmamızdaki geleneksel

ve moleküler yöntemler karşılaştırıldığında diğer çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hem *Blastocystis* hem *D. fragilis*'in tanısında kullanılan mikroskopik yöntemler deneyim gerektirdiğinden sıklıkla yanlış pozitif veya negatif sonuç elde edildiği gözlenmektedir. Özellikle *D. fragilis* tanısında mikroskopik yöntemlerin yetersiz olduğunu görmekteyiz ve bu protozoonun daha kısa zamanda kesin tanısının konulması için real time PCR yönteminin avantajlı olduğunu belirlemiş bulunmaktayız. Ayrıca *Blastocystis* için de real time PCR'nin kullanılmadığı durumlarda kültür yöntemiyle birlikte TB yönteminin kullanılmasının tanı duyarlılığını arttıracaklarını düşünmekteyiz. Dogruman AI ve diğerleri çalışmalarında birkaç yöntemin birlikte kullanılmasının yalancı negatif veya pozitif sonuçları önleyebileceğini bildirmişlerdir [393].

Çalışmamızda *Blastocystis* enfeksiyonu immün yetmezlikli hastalarda %11,4 (28/245) iken, immün yeterli hastalarda %20,7 (40/193) sıklığında saptanmıştır ($\chi^2=7,07$, $p=0,008$). İmmün yeterlilikli hastalarda *Blastocystis* sıklığının anlamlı olarak immün yetmezlikli olgulara göre daha yüksek olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Literatürlerde immün yetmezlikli olan hastalara ait *Blastocystis* enfeksiyonuyla ilgili az sayıda veri bulunmaktadır. Yersal ve diğerleri Türkiye'de kanserli hastalara ait 232 dışkı örneğinde PCR yöntemiyle %10,8 (n=25) *Blastocystis* belirlediklerini rapor etmişlerdir [20]. Bu verinin bizim çalışmadaki immün yetmezlikli hasta grubu ile uyumlu olduğunu görmekteyiz. Çakır ve diğerleri toplam 345 hastanın dışkı örneğini DM, TB ve kültür ile incelemelerinde gastrointestinal şikayeti olanlarda %16,2 (21/130), ürtikerli hastalarda %22,5 (18/80), radyoterapi alan hastalarda %22,2 (12/54) ve herhangi bir şikayeti olmayan sağlıklı bireylerde de %22,2 (18/81) *Blastocystis* enfeksiyonunu saptamışlardır. Araştırmacılar sağlıklı bireylerde ve immün yetmezlikli olgularda benzer sıklıkta *Blastocystis* tespit etmişlerdir [24]. Mohamed ve diğerleri Suudi Arabistan'da yaptıkları bir çalışmada toplam 218 gastrointestinal şikayeti olan olguda *Blastocystis* prevalansını kültür yöntemi ile kanserli hastalarda %27,5 (38/138) ve kanserli olmayan hasta grubunda ise %15 (12/80) olarak tespit etmişlerdir [194]. Çalışmamızdaki bizim bulgularımız bu çalışmaların sonuçları ile çelişkilidir. Poirier ve diğerleri Fransa'da iki gruba ait 186 hastayla yaptıkları prospektif bir çalışmada real time PCR yöntemiyle kemoterapi alan hematolojik maligniteli immün yetmezlikli olgularda %16 (15/94), kontrol grubunu oluşturan immün yeterli hastada ise %13 (12/92) *Blastocystis* tespit etmişlerdir. Esteghamati

ve diğerleri İran'da üç farklı gruba ait toplam 190 hastanın dışkı örneğini DM ile inceleyerek primer immün yetmezlikli olgularda %16,2 (13/80), kanserli hastalarda %22,3 (19/85) ve organ transplantasyonu olanlarda %0 (0/25) *Blastocystis* enfeksiyonu tespit etmişlerdir [324]. Rasti ve diğerleri İran'da toplam 385 hastaya ait dışkı örneğini DM ile inceleyerek immün yetmezlikli hastalarda %4,2 (11/265) kontrol gruptaki olgularda (0/120) ise ilginç olarak hiç *Blastocystis* enfeksiyonu tespit etmemişlerdir [395]. Rojas-Velázquez ve diğerleri Meksika'da toplam 182 gönüllü katılımcıya ait dışkı örneklerini PCR yöntemiyle inceleyerek %68,1'inde (n=124) *Blastocystis* enfeksiyonunu pozitif olarak tespit etmişlerdir [396]. de Boer ve diğerlerinin Hollanda'da gastrointestinal şikayeti olan 1374 ve şikayeti olmayan 1026 olguya ait dışkı örneklerini real time PCR yöntemiyle incelemede sırasıyla %25,8 (n=355) ve %40 (n=410) *Blastocystis* enfeksiyonunu tespit etmişlerdir [30].

Çalışmamızda *D. fragilis* enfeksiyonu immün yetmezlikli hastalarda %10,6 (26/245) iken, immün yeterli hastalarda %13,5 (26/193) sıklığında saptanmıştır ($\chi^2=0,84$, $p=0,36$). İki grup arasında enfeksiyonun görülme sıklığında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. *D. fragilis*'in immün yetmezlikli hastalardaki prevalansı konusunda bilgiler kısıtlıdır. Esteghamati ve diğerleri İran'da toplam 190 hastaya ait olan dışkı örneğini DM incelemede primer immün yetmezlikli olgularda %1,3 (1/80), kanserli hastalarda %1,2 (1/85) ve organ transplantasyonu olanlarda %0 (0/25) *D. fragilis* enfeksiyonu tespit etmişlerdir [324]. Stark ve diğerleri Avustralya'da toplam 1868 hastaya ait dışkı örneğini farklı üç grupta DM yöntemi ile incelediğinde homoseksüel HIV pozitif hastalarda %0,3 (2/618), homoseksüel HIV negatif hastalarda %0,8 (5/628) ve homoseksüel olmayan kontrol grubunda ise %1 (7/622) olarak *D. fragilis* tespit etmişlerdir [8]. Garcia ve Cimerman Brazelya'da HIV/AIDS ile enfekte toplam 82 hastaya ait 105 dışkı örneğini DHB yöntemiyle incelemede %1,2 (n=1) oranında *D. fragilis* saptadıklarını bildirmişlerdir [397]. de Boer ve diğerlerinin Hollanda'da gastrointestinal şikayeti olan 1374 ve şikayeti olmayan 1026 olguda multipleks real time PCR yöntemiyle sırasıyla %25,8 (n=354) ve %37,6 (n=386) *D. fragilis* pozitifliği tespit etmişler ve *D. fragilis* prevalansı gastrointestinal şikayeti olmayan kontrol grubunda daha yüksek olarak saptanmıştır [30]. Sivcan ve diğerleri Kayseri'de farklı kliniklerden gönderilen toplam 121 olguya ait dışkı örneklerini real time PCR ile inceleyerek gastrointestinal şikayeti olan hastalarda %11,8 (12/101), kontrol grubundaki bireylerde %5 (1/20) *D. fragilis* pozitifliği

tanımlamıştır [45]. Aykur ve diğerleri İzmir’de gastrointestinal semptomları olan 490 hastaya ait dışkı örneklerinde real time PCR yöntemiyle *D. fragilis* görülme sıklığını %12,04 (59/490) olarak tespit etmişlerdir [46] ve bizim bulgularımız da bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur.

Çalışmamızdaki *Blastocystis* ve *D. fragilis* koenfeksiyon oranı immün yetmezlikli hastalarda %1,63, immün yeterli hastalarda ise %4,15 olarak tespit edilmiştir. Aykur ve diğerleri çalışmasında bu iki protozoonun koenfeksiyon oranını %25,7 olarak tespit etmişler [46]. Burgana ve diğerleri toplam olarak 739 hastanın dışkı örneğini DM incelemesinde %33,5 (248/739) *D. fragilis Blastocystis* koenfeksiyonunu tespit etmişlerdir [398]. Yakoob ve diğerleri irritabl bağırsak sendromlu hastalarda PCR ile taramada *Blastocystis* ve *D. fragilis* koenfeksiyonunu kontrol grup hastalarında %0 (0/159), IBS hastalarında ise %3 (5/171) olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir [210]. Piubelli ve diğerleri İtalya’da farklı coğrafi bölgelerden göç eden hastalarda moleküler yöntemler kullanarak %24 (53/221) oranında *Blastocystis* ile *D. fragilis* koenfeksiyonu olduğunu raporlamışlardır [162]. Bizim çalışmamızdaki hasta gruplarında diğer çalışmalara göre daha düşük koenfeksiyon gözlenmiştir. Sadece Yakoob ve diğerlerinin IBS sendromlu hastalarda raporladıkları koenfeksiyon değerleri ile benzerlik göstermektedir. Bazı çalışmalarda sadece DM yöntemlerin kullanılmasının *Blastocystis* ve *D. fragilis*’in benzer morfolojik görüntülere sahip olması nedeniyle bu iki protozoonun tanımlanmasına engel olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca bu iki protozoonun yüksek derecede koenfeksiyon göstermesi bulaş kaynaklarının ortak olabileceğini de gösterebilmektedir.

Dışkı örneklerinde moleküler yöntemlerle bir mikroorganizmanın araştırılmasının ilk aşaması dışkıdan genomik DNA’nın uygun şekilde elde edilmesidir. DNA izolasyonu için kullanılan ticari kitlerin performanslarının farklı olmasına bağlı olarak yapılan çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmektedir [399]. Bununla birlikte dışkıdaki inhibitörlere bağlı olarak PCR ile yanlış negatif sonuçlar elde edilebilmektedir [142, 399].

Daha önce laboratuvarımızda DNA izolasyonu için ticari üç farklı kitin (QIAamp DNA Stool Mini kiti, Qiagen, Almanya, ZR dışkı DNA kiti, ZYMO Research, ABD ve ExgeneTM dışkı DNA mini, GeneAll, Güney Kore) performansları değerlendirilmiştir. Mikroskopik olarak SF, Lugol ve trikrom boyama ayrıca Jones besiyeri ile kültürde *Blastocystis* tespit edilen örneklerle çalışılmıştır. Test edilen her

üç ekstraksiyon kiti için protozoa kistlerinin lizisini arttırarak DNA ekstraksiyon verimini artırmak için üreticinin önerilerini uyarladık [400]. Bazı çalışmalarda ön aşama olarak cam boncuk kullanarak mekanik lizisin hem enzimatik hem de kimyasal lizis ile birleştirilmesinin ökaryotik enterik patojenlerin DNA ekstraksiyon verimini önemli ölçüde arttırdığı göstermişlerdir [401]. Bu çalışmamızda da lizis basamağında mekanik parçalama için cam boncuk kullandık. DNA izolasyonu sonrasında PCR ile *Blastocystis* varlığını araştırdığımızda Exgene™ dışkı DNA Mini kitinin *Blastocystis* DNA'sını tespit edemediği, QIAamp DNA Stool Mini kiti ve ZR Fekal DNA kitinin DNA izolasyonu için daha iyi performans gösterdiği gözlenmiştir [400]. Alınan bu sonuca dayanarak bu tez çalışmasında QIAamp DNA Stool Mini kiti DNA izolasyonu için tercih edilmiştir.

Forsell ve diğerleri çalışmalarında dışkının çok karmaşık bir klinik örnek olması ve yüksek miktarda inhibitör içermesiyle yalancı pozitiflik veya negatiflik verebileceğini ve dışkıdan elde edilen DNA'nın amplifikasyon öncesi 1/10 veya 1/20 oranında seyreltilmesiyle bu sorunun aşılabileceğini bildirmişlerdir [48]. Çalışmamızda da real time PCR öncesinde DNA örnekleri 1/10 sulandırım yapıldıktan sonra kullanılmıştır. Menu ve diğerlerinin protozoonların dışkıdan genomik DNA izolasyonu ile ilgili çalışmasında döngü eşiği (Ct) değeri 37'yi aştığında veya amplifikasyon eğrisi elde edilmediğinde real time PCR sonuçlarının negatif kabul edildiğini bildirmişlerdir [234]. Bizim çalışmamızda da yaptığımız optimizasyon denemeleri sonucunda (Bkz. gereç ve yöntem sayfa 68) Ct değeri ≥ 35 üzerinde olan sonuçlar real time PCR negatif olarak kabul edilmiştir.

İmmün yetmezlikli ve immün yeterli olan hasta grupları arasında *Blastocystis* pozitifliği için yapılan istatistiksel analizde: cinse göre immün yeterli erkeklerde ($\chi^2=6,83$, $p=0,01$), yaşa göre immün yeterli olguların 64-74 yaş aralığında ($\chi^2=14,43$, $p<0,001$) ve mevsime göre de immün yeterlilerde sonbaharda ($\chi^2=3,90$, $p=0,04$) immün yetmezlikli olgulara göre anlamlı olarak daha yüksek tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.11). İmmün yeterli ve immün yetmezlikli olgular arasında cinse, yaşa ve mevsime göre istatistiksel olarak karşılaştıran çalışmalar çok kısıtlıdır. Cinse göre bu çalışmadaki sonucumuz bazı araştırmacıların sonuçlarıyla uyumludur. Rasti ve diğerleri immün yetmezlikli olgularda *Blastocystis* enfeksiyon sıklığının erkeklerde %17,6 kadınlarda ise %5,4 olarak istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu bildirilmiştir ($p=0,002$) [395]. Piubelli ve diğerleri de İtalya'da farklı coğrafi

bölgelerden göç eden hastaların arasında *Blastocystis* enfeksiyonun erkeklerde kadınlara göre daha sık tespit etmişlerdir [162]. Diğer bazı çalışmalarda, istatistiksel analizleri anlamlı olmasa da, erkeklerde *Blastocystis* prevalansının kadınlardan daha yüksek olduğu bildirilmiştir [67, 396]. Yaşa göre de Dağcı ve diğerleri *Blastocystis* görülme sıklığının 20-29 yaş aralığında daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir [402]. El-Safadi ve diğerleri *Blastocystis* enfeksiyonuna 50 yaş üstüne göre 15-49 yaş aralığında daha sık rastladıklarını ve mevsime göre de yaz aylarında kış aylarına göre daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir [155]. Bizim çalışmamızda farklı olarak *Blastocystis* enfeksiyonu kış ve ilkbahar aylarında daha sık görülmektedir, ancak istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Çalışmamızda her iki grup arasında *D. fragilis* sıklığı cins, yaş ve mevsimsel değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Cinse göre ise *D. fragilis* enfeksiyonu kadınlarda erkeklere göre daha sık rastlanmıştır. Aykur ve diğerleri bizim bulgularımıza benzer olarak kadın hastalarda *D. fragilis* enfeksiyonunun daha sık olduğunu bildirmişlerdir [46]. Lagacé-Wiens ve diğerleri Kanada Manitoba'da *D. fragilis* ile enfekte hastaların %50'sinin 24 yaşından daha genç olduğunu ve yaz-sonbahar aylarında suların kontamine olmasıyla daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir [403]. Bizim çalışmamızda *D. fragilis* enfeksiyonu pozitif olguların ilkbahar ve kış mevsiminde daha sık olduğunu ama mevsime göre görülme sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *Blastocystis* prevalansı kış aylarında başvuran hastalarda daha yüksek (%48,59) *D. fragilis*'de ise ilkbahar aylarında başvuran hastalarda daha yüksek (%29,42) olarak tespit edilmesine rağmen mevsimler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Sadece *Blastocystis* enfeksiyonunun immün yeterli hastalarda (%19,4) immün yetmezliklere (%5,8) göre istatistiksel olarak sonbaharda daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0,04$). *Blastocystis*'in yaz aylarında kış aylarına göre daha sık saptandığını bildiren çalışmalar da mevcuttur [155].

Çalışmamızda *Blastocystis* enfeksiyonu Genel Dahiliye polikliniğinden gönderilen hasta örneklerinde %,35,3 (6/17) olarak diğer kliniklere göre daha yüksek rastlanmıştır. Medikal Onkolojide *Blastocystis* enfeksiyonu %7,1 (5/70) olarak tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.12). Çakır ve diğerleri çalışmasında *Blastocystis* enfeksiyonunun Gastroenteroloji polikliniğinden gelen örneklerde %16,2 (21/130),

Dermatoloji polikliniğinden gelen örneklerde %22,5 (18/80) ve Medikal Onkoloji kliniğinden gelen örneklerde ise %22,5 (12/54) görüldüğünü bildirmişlerdir [24].

Dientamoeba fragilis sıklığında Erişkin Acilden başvuruda bulunan hastalarda istatistiksel olarak diğer kliniklere göre daha yüksek (%25 (7/28)) oranda tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.13).

Küçük alt üniteli ribozomal RNA'nın dizi analizine dayanarak, insan ve diğer konaklarda günümüze kadar en az 17 alt tür tespit edilmiştir. Ancak bazı araştırmacılar *Blastosistis ssu-rRNA* genindeki polimorfizme dayalı 26 alt türünün bulunduğunu bildirmişlerdir [404]. Günümüze kadar insanlardan sadece ST1-ST9 ve ST12 alt türleri izole edilmiştir [51-53]. İnsan kaynaklı izolatların %90'dan fazlasını ST1-ST4 alt türleri oluşturmaktadır. İnsanlardan izole edilen alt türlerin diğer konaklardan izole edilen alt türlerle aynı genom yapısına sahip olduğu belirlenmiştir. *Blastocystis*'in epidemiyolojik verilerini değerlendirmede en önemli noktalardan biri de alt tür seviyesinde dağılımının incelenmesidir. Bazı *Blastocystis* alt türlerinin patojenik potansiyeli olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur [7, 189].

Çalışmamızda immün yetmezlikli 245 olgunun 28'inde ve immün yeterli 193 olgunun 40'ında saptanan toplam 68 *Blastocystis* izolatının alt türlerinin belirlenmesi NGS yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntem ile 68 *Blastocystis* izolatının üçü ST1 (%4,42), on biri ST2 (%16,18), 37'si ST3 (%54,41), biri ST4 (%1,47), ikisi ST6 (%2,94) olarak belirlenmiş, 6 ST1/ST3 (%8,82) ve 8 örnek ST2/ST3 (%11,76) miks alt tür olarak tanımlanmıştır. İmmün yetmezlikli ve immün yeterli hasta grupları arasında alt tür dağılımında (tek olarak tespit edilen) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Bkz. Çizelge 4.9). Rojas-Velazquez ve diğerleri NGS yöntemi kullanarak 124 *Blastocystis* izolatının alt tür belirlemede sırasıyla ST3 %67,7 (n=84), ST2 %11,3 (n=14), ST1 %7,3 (n=9), ST1/ST3 %7,3 (n=9), ST2/ST3 %4,0 (n=5) ve ST1/ST2/ST3 %2,4 (n=4) sıklıkta görüldüğünü bildirmişlerdir [396].

Son yıllarda *Blastocystis* alt türlerini farklı yöntemlerle araştıran çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. Bu yöntemler arasında daha popüler olarak NGS kullanılmaktadır. Bu çalışmalar sayesinde *Blastocystis*'in dünyadaki alt türlerinin moleküler epidemiyolojisi de daha iyi anlaşılacaktır. NGS yöntemi yüksek doğrulukla alt tür tanımlamasını ve miks alt türlerin içindeki yoğunluklarını belirleyebilmesiyle avantajlı

bulunmaktadır. Bu yöntem ile yapılan çalışmalar kısıtlı sayıda olduğundan barcoding ve STS yöntemlerini kullanan çalışmaları tartışacağız.

Bu çalışmadaki hasta gruplarında tespit edilen *Blastocystis* alt türlerinin dağılımının Türkiye’de ve dünyanın diğer bölgelerinde saptanan alt tür prevalansı ile benzer olduğu görülmektedir. Dünya genelinde ST1, ST2, ST3 ve ST4 alt türlerinin insanlardaki *Blastocystis* enfeksiyonunun %90’ını oluşturduğu ve en yaygın alt türün ise ST3 olduğu bildirilmektedir [5, 164, 202, 227, 396, 405]. Çalışmamızda da bu dağılıma uygun şekilde ST1, ST2, ST3 ve ST4 alt türleri tüm örneklerin %97’sini (66/68) oluşturmuş ve ST3 (%54,4) en sık alt tür olarak tespit edilmiştir. Türkiye’de bu alt türlere ek olarak ST5, ST6, ST7 ve miks alt türleri de bulunmaktadır. İç Anadolu bölgesinde Adıyaman Korkmaz ve diğerleri Ankara’da gastrointestinal şikayeti olan 350 hasta dışkı örneğinden *Blastocystis* alt türlerini STS-PCR yöntemiyle: ST3 (%28), ST1 (%13,9), ST4 (%11,6), ST7 (%11,6), ST2 (%7) ve ST6 (%2,3) şeklinde tespit etmişlerdir [157]. Yine Ankara’da IBS, IBD, kronik diyareli olan hastalarda ve asemptomatik kontrol grubunda yapılan bir çalışmada ST3 görülme sıklığı %62,8 (n=22), ST2 %34,3 (n=12) ve ST1 %8,5 (n=3) olarak bildirilmiştir [64]. Eskişehir’de farklı yaşlardaki çocuklarda STS-PCR yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada alt tür dağılımı: ST3 (%43,4), ST1 (%26,1), ST4 (%10,9) ve ST2 (%8,7) olarak bildirilmektedir. Ayrıca beş hasta örneğinde ST1/ST3 (n=3), ST1/ST2 (n=1), ST2/ST3 (n=1) miks alt türler saptanmıştır [23]. Kayseri’de, Erciyes Üniversitesi Hastanesi’nden DM yöntemiyle *Blastocystis* saptadıkları örneklerden DNA izolasyonu yaparak STS-PCR yöntemiyle en sık ST3 (%55,2), sonra ST1 (%37,9), ST2 (%13,8) ve ST4 (%6,8) tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Miks alt türlerden de bir olguda ST1/ST2, yine bir olguda da ST1/ST3 ve iki olguda ST3/ST4 alt türlerini saptadıklarını bildirmişlerdir [406]. Dağcı ve diğerleri Ege bölgesinde çiftçilerden topladıkları dışkı örneklerinde *Blastocystis* alt tür dağılımının: ST3 (%44,7), ST1 (%13,8), ST2 (%11,7), ST6 (%1,1), ST7 (%1,1) ve ST2/ST3 (%2,1) olduğunu bildirmişlerdir [402]. Aydın ilinde yapılan farklı üç çalışmada ST3 en sık olmak üzere ST1, ST2 ve ST7 alt türlerinin bulunduğu belirtilmiştir [20, 21, 407]. İstanbul’da Marmara bölgesinde toplam 50 hastada yapılan bir çalışmada da en sık saptanan alt türün ST3 olduğunu ve sırasıyla ST1, ST5, ST2 ve ST4’ün bulunduğu rapor edilmiştir [408]. Güney doğu Anadolu bölgesi Diyarbakır’da toplam 345 hasta örneğinden STS-PCR yöntemiyle: en yaygın olarak ST3 (% 60,9), sonra sırasıyla

ST1 (% 17,4), ST2 (% 17,4), ST5 (% 1,4) ve ST6 (% 1,4) tespit edilmiştir. Ayrıca *Blastocystis* miks alt türleri ST1/ST3 dört örnekte, ST1/ST2, ST2/ST3 ve ST1/ST2/ST3 birer hasta örneğinde saptamışlar [24].

Türkiye'deki *Blastocystis* alt türlerinin araştırıldığı çalışmalar ile bizim çalışmamızdaki alt tür dağılımı benzerlik göstermektedir. Ancak çalışmamızda *Blastocystis*'in ST2 alt türünün ST1'e göre daha sık saptandığı görülmektedir. Meksika'da yapılan bir çalışmada ST1'in hayvan bulaşıyla ilişkili olduğunu belirtmişler, ancak bu bulguyu doğrulamak için ST1 pozitif bireylerin sahip olduğu hayvanlarla ilişkisinin öğrenilmesi gerektiğini de ortaya koymuşlardır [396]. Özellikle insanlardan sonra ST1 için bildirilen en yaygın ikinci konak domuzlar ve sığırlar gibi artiodaktillerdir ve bu alt türün zoonotik bulaş potansiyeli olduğunu desteklemektedir. Bizim çalışmamızda hasta gruplarında şehir yaşamı hayvan ilişkisiyle sorgulanmakla birlikte ST1'in daha az sıklıkta görüldüğünü düşünmekteyiz.

Dünyada ve Türkiye'de üçüncü sıklıkta en çok tespit edilen alt tür ST2'dir. Bizim çalışmamızda ST2 bu bulgularla farklı olarak ST3'ten sonra ikinci sırada görülmüştür. Suudi Arabistan ve İrlanda'da yapılan bazı çalışmalarda ST2'nin en yaygın saptanan *Blastocystis* alt türü olduğu bildirilmiştir [146, 175, 193, 196]. Türkiye'de sadece Doğruman Al ve diğerlerinin çalışmasında ST3 en yaygın saptanmış ancak semptomsuz olan hastalarda ST2 sıklığının semptomlulara göre daha yüksek ikinci sırada görüldüğü belirlenmesi ve ST2'nin patojenik olmayan *Blastocystis* alt türü olduğunun ileri sürülmesine neden olmuştur [127]. Türkiye'deki çoğu çalışmada ST2, ST1'den sonra üçüncü sırada görülmektedir. Yan ve diğerleri, *Blastocystis* enfeksiyonu olan bir grup semptomatik hastada ST1'in daha sık görüldüğünü, ancak ST2'nin semptomlu hastalarda tespit edilmediğini raporlamışlardır [144].

Dünya genelinde alt türlerin araştırıldığı çalışmalarda genel olarak ST1, 2 ve 3'ün küresel bir dağılım gösterdiği ancak bunların arasında ST4'ün Avrupa ile sınırlı kaldığı bildirilmektedirler [227, 409]. Ancak, *Blastocystis* ST4 alt türünün Avrupa kıtasının dışında bulunduğunu bildiren çalışmalar da vardır [156]. Çalışmamızda Avrupa'da sık görülen *Blastocystis* ST4 sadece bir immün yeterli olan hastamızda tespit edilmiştir. Türkiye'de de ST4 alt türünün farklı illerde yapılan çalışmalarda rastlandığını bildiren veriler bulunmaktadır [23, 157]. İç Anadolu'da Ankara ve

Eskişehir’de yapılan çalışmalarda ST4’e sırasıyla %1,1 (1/87) ve %10,9 (5/46) olarak bildirilmiştir [23, 202]. Türkiye’nin iki coğrafi kıtanın kesiştiği konumda olması *Blastocystis* alt türlerinden ST4’ün nadir de olsa tespit edilmesi ayrıca önem taşımaktadır.

Çalışmamızda *Blastocystis* alt türünden ST6 her iki grupta birer örnekte tespit edilmiştir. *Blastocystis* alt tür dağılımları değerlendirildiğinde ST6’nın daha çok Asya kıtasında görüldüğü bildirilmiştir [227, 409]. Türkiye’de İç Anadolu Ankara’da ST6 %2,3, Ege bölgesinde %1,1 ve Türkiye’nin Doğusunda Diyarbakır’da %1,4 oranında tespit edildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur [24, 157, 402]. *Blastocystis* ST6 en çok kanatlılarda görülmektedir [54] ve buna göre kuşlardan bulaşma riski zoonotik potansiyeli nedeniyle ayrıca önem taşıyabilmektedir.

Blastocystis’in bazı alt türlerde saptanan intra-subtype değişkenliğinin bulaşma yolu ve patojenitesini anlamada rol oynayabileceği bildirilmiştir [117, 223, 231, 404]. Çalışmamızda alt türleri belirlenen toplam 68 hasta örneğinin tümü 40 benzersiz OTU altında biriktirilmiştir ve alt türler arasında intra-subtype değişkenliği ST1 ve ST2’de yüksek oranlarda ortaya çıkmıştır. Kalan ST3, ST4 ve ST6’da intra-subtype değişkenlik tespit edilmemiştir. Bununla birlikte benzersiz OTU’lar değerlendirildiğinde çalışmamızda ST1 olarak saptanan 9 örneğin 3’ünde (%33,3) ve ST2 olarak saptanan 19 örneğin 13’ünde (%68,4) intra-subtype değişkenlik gözlenmiştir. Buna göre en fazla ST2 alt türünde intra-subtype değişkenlik saptanmıştır. Ayrıca bir hasta örneğinde ST2 alt türünde ikiden fazla intra-subtype değişkenliği tespit edilmiştir. Meksika’da yapılan bir çalışmada intra-subtype değişkenliğinin ST2 ve ST1’de daha sık olduğunu ST3’ün daha homojen olduğunu bildirmişlerdir [396]. ST2 ve ST1’in daha sık intra-subtype değişkenlik göstermesi bu alt türlerin bulaş yolunun farklı kaynaklardan olabileceğini göstermektedir. ST3’ün daha homojenliği endemik bir alt tür olduğunu ve ortak bir kaynaktan bulaşılabilirliğini ve konak özgüllüğünün yüksek olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda miks alt tür enfeksiyonunun her iki hasta grubunda, pozitif olan tüm *Blastocystis* enfeksiyonunun %20,6’sini (n=14) oluşturduğu tespit edilmiştir. Miks alt türlerin kombinasyonları ST1/ST3 (n=6) ve ST2/ST3 (n=8) olarak gözlenmiştir. Bununla birlikte immün yeterli olan hastalarda immün yetmezlikli olan hastalara göre daha sık miks alt tür varlığı istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($\chi^2=3,70$, $p=0,04$).

Bu çalışmada kullandığımız NGS yönteminin avantajı, *Blastocystis*'in miks alt türlerini ve alt tür içindeki çeşitliliği belirleyebilmesidir [231, 405]. Ayrıca miks alt türler içinde hangi alt türün daha baskın olduğunu gösterebilmesidir. Miks alt türlerin patogeneze, semptomatoloji ve enfeksiyon kliniği açısından önemi konusunda henüz açıklanmış bilgi bulunmamaktadır. Scanlan ve diğerleri ST1'den ST4'de kadar olan *Blastocystis* alt türlerini multipleks nested PCR yöntemi ile araştırdıklarında, daha önce tek bir alt tür içerdiği gösterilen *Blastocystis* pozitif örneklerin %22'sinin miks alt tür içerdiğini saptamışlardır [17]. Nested PCR yönteminin pratik olmaması miks alt tür belirlenmesinde kullanımı sınırlandırmaktadır. Miks alt tür belirlenmesinde STS-PCR yöntemi emek yoğun olması ve uzun sürmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Türkiye'de yapılan tüm çalışmalarda miks alt türler STS-PCR yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir ve çalışmamızda belirlenen ST1/ST3 ve ST2/ST3 *Blastocystis* miks alt türleri bu çalışmalarda da tespit edilmiştir. Ayrıca Türkiye'de ST1/ST2, ST3/ST4 ve ST1/ST2/ST3 *Blastocystis* miks alt türleride görülmektedir [23, 24, 402, 406].



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gazi Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesinin çeşitli poliklinik ve kliniklerine ishal şikayeti ile başvuran 245 immün yetmezlikli ve 193 immün yeterli olan hastaya ait toplam 438 dışkı örneği Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında incelenmiştir. Tüm dışkı örnekleri serum fizyolojik, Lugol, formol eter konsantrasyon, trikrom boyama, Kinyoun asid fast boyama, kültür (sadece *Blastocystis* için Jones' besiyeri) ve real time PCR yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Ayrıca *Blastocystis* alt türlerini belirlemek için NGS yöntemi kullanılmıştır.

İncelenen 438 dışkı örneğinin 112'sinde (%25,57) gastrointestinal sistem parazitlerine rastlanmıştır. Saptanan parazitlerden 68'i (%15,5) *Blastocystis*, 52'si (%11,9) *Dientamoeba fragilis*, 3'ü (%0,7) *G. duodenalis*, 3'ü (%0,7) *Cryptosporidium* sp. ve 1'i (%0,2) *Chilomastix mesnili* olarak tanımlanmış, helmintlere ait hiçbir etken saptanmamıştır.

Toplam 245 immün yetmezlikli hastanın dışkı örneğinin 50'sinde (%20,4) gastrointestinal sistem parazitlerine rastlanmıştır. Saptanan parazitlerden 28'ini (%11,4) *Blastocystis*, 26'sını (%10,6) *Dientamoeba fragilis*, 1'i (%0,4) *G. duodenalis*, ve 1'ini (%0,4) *Cryptosporidium* sp. oluşturmuştur.

Toplam 193 immün yeterli hastanın dışkı örneğinin 62'sinde (%32,1) gastrointestinal sistem parazitlerine rastlanmıştır. Saptanan parazitlerden 40'ını (%20,7) *Blastocystis*, 26'sını (%13,5) *Dientamoeba fragilis*, 2'sini (%1,03) *G. duodenalis*, 2'sini (%1,03) *Cryptosporidium* sp. ve 1'ini (%0,5) *Chilomastix mesnili* oluşturmuştur.

İmmün yetmezlikli ve immün yeterli hasta grubu arasında *Blastocystis* sıklığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=7,07$, $p=0,008$). *Blastocystis* prevalansı immün yeterli hastalarda immün yetmezlikli hastalara göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir.

İmmün yetmezlikli ve immün yeterli olan hasta grupları arasında *D. fragilis* enfeksiyonunun dağılımında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Blastocystis enfeksiyonu tanısında real time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, SF, Lugol, FECT, TB ve kültür yöntemlerinin duyarlılık/özgüllük

değerleri sırasıyla %57,35/%97,57, %61,76/%97,84, %58,82/%98,38, %64,86/%99,19 ve %77,94/%99,46 olarak bulunmuştur.

Dientamoeba fragilis enfeksiyonu tanısında real time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde TB yönteminin duyarlılık/özgüllük değerleri sırasıyla %19,23/%98,96 olarak saptanmıştır.

Blastocystis enfeksiyonunun real time PCR ile tanısında immün yetmezlikli kadın hastaların örneklerinde Ct ortalaması 22,58 ve immün yeterli olanlarda ise bu değer 26,15 olarak saptanmış ve her iki Ct değeri arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuştur. Bu sonuç immün yetmezlikli kadınlarda *Blastocystis* yükünün daha fazla olduğunu göstermiştir ($t=2,09$, $df=35$, $p=0,04$).

Çalışmamızda toplam 68 hasta örneğinde *Blastocystis* pozitif olarak tespit edilen izolatların alt türü belirlenmiş olup alt tür dağılımı: ST3 %54,4 ($n=37$), ST2 %16,2 ($n=11$), ST1 %4,4 ($n=3$), ST6 %2,9 ($n=2$), ST4 %1,5 ($n=1$), ST2/ST3 %11,8 ($n=8$) ve ST1/ST3 %8,8 ($n=6$) olarak bulunmuştur.

İmmün yetmezlikli hasta grubunda toplam 28 hasta örneğinde *Blastocystis* pozitif olarak tespit edilen izolatların alt tür dağılımı: ST3 %57,2 ($n=16$), ST2 %21,4 ($n=6$), ST1 %3,6 ($n=1$), ST6 %3,6 ($n=1$), ST1/ST3 %7,1 ($n=2$) ve ST2/ST3 %7,1 ($n=2$) şeklinde saptanmıştır.

İmmün yeterli hasta grubunda toplam 40 hasta örneğinde *Blastocystis* pozitif olarak tespit edilen izolatların alt tür dağılımı: ST3 %52,5 ($n=21$), ST2 %12,5 ($n=5$), ST1 %5 ($n=2$), ST6 %2,5 ($n=1$), ST4 %2,5 ($n=1$), ST2/ST3 %15 ($n=6$) ve ST1/ST3 %10 ($n=4$) şeklinde bulunmuştur.

İmmün yetmezlikli ve immün yeterli olan hasta grubu arasında *Blastocystis* enfeksiyonunun cinse göre dağılımında immün yeterli olan erkek hastalarda immün yetmezlikli olan erkek hastalara göre daha sık görülmüştür ($\chi^2=6,83$, $p=0,01$).

İmmün yetmezlikli ve immün yeterli hasta grubu arasında *Blastocystis* enfeksiyonunun mevsimsel dağılımında sonbahar aylarında immün yeterli olan hastalarda immün yetmezlikli olan hastalara göre istatistiksel olarak daha yüksek saptanmıştır ($\chi^2=3,90$, $p=0,04$).

İmmün yetmezlikli ve immün yeterli olan hasta grubu arasında *Blastocystis* enfeksiyonunun yaş grubuna göre dağılımında immün yeterli olan 64-74 yaş aralığındaki hastalarda immün yetmezlikli olan hastalara göre istatistiksel olarak daha sık görüldüğü bulunmuştur ($\chi^2=14,43$, $p<0,001$).

Dientamoeba fragilis enfeksiyonu saptanan immün yetmezlikli ve immün yeterli olan hasta grupları arasında cinse, yaşa ve mevsime göre herhangi bir fark bulunmamıştır.

Blastocystis'in alt tür dağılımında immün yetmezlikli ve immün yeterli olan hasta grupları arasında miks alt tür sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($\chi^2=4,43$, $p=0,04$). *Blastocystis* miks alt türleri immün yeterli olan hasta grubunda daha yüksek sıklıkta saptanmıştır.

Blastocystis *ssu-rRNA* dizilerinin kısmi filogenetik analizinde ST1 ve ST2'nin ortak bir atadan ayrıldığı görülmektedir. Ayrıca ST3 ile ST6'nın ST4'e göre daha yakın olduğunu bulunmuştur.

İmmün yetmezlikli ve immün yeterli olan hasta grubu arasında *Blastocystis* enfeksiyonunun Genel Dahiliye ($\chi^2=5,27$, $p=0,02$) kliniklerinden başvuran olgularda daha yüksek olduğu ve Medikal Onkoloji ($\chi^2=4,46$, $p=0,03$) kliniklerinden başvuran olgularda ise diğer kliniklere göre düşük olduğu tespit edilmiştir.

İmmün yetmezlikli ve immün yeterli olan hastalar arasında *D. fragilis* enfeksiyonunun sadece Erişkin Acil'den başvuran olgularda anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($\chi^2=4,92$, $p=0,02$).

Blastocystis ve *D. fragilis*'in rutin tanısında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması sonucunda: direkt mikroskopik inceleme (SF ve Lugol) duyarlık ve özgüllüğü düşük (%57,35/%97,57) olduğu için yetersiz bulunmakta olup ikinci bir yöntemle (TB ve kültür) birlikte kullanılmasının faydalı olacağı görüşüne varılmıştır.

Blastocystis ve *D. fragilis*'in real time PCR kullanılarak tanımlanması kısa sürede yapılması, pratik olması duyarlılığı yüksek bir yöntem olması ve parazit yükünün takip edilebilmesi açısından avantajlı bir yöntem olmakla birlikte, sınırlı bütçesi olan laboratuvarlar için maliyeti yüksek bir yöntem niteliğindedir. Özellikle toplumlarda salgın sırasında ve immün yetmezlikli olgularda hastanın değerlendirilerek hızlı tanı

ve tedavi takibi açısından faydalı bir yöntemdir. Bununla birlikte yine kısıtlı bütçeye sahip laboratuvarların real time PCR ile yüksek uyum gösteren mini kültür yöntemini kullanmaları *Blastocystis* tanısında duyarlılığı arttıracak bir yöntem özelliği tanımaktadır.



KAYNAKLAR

1. Tamer, G. S., Caliskan, S. and Willke, A. (2008). Distribution of intestinal parasites among patients who presented at the parasitology laboratory of the Kocaeli University School of Medicine Hospital. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 32(2), 126-9.
2. Bednarska, M., Jankowska, I., Pawelas, A., Piwczyńska, K., Bajer, A., Wolska-Kuśnierz, B. (2018). Prevalence of *Cryptosporidium*, *Blastocystis*, and other opportunistic infections in patients with primary and acquired immunodeficiency. *Parasitology Research*, 117(9), 2869-2879.
3. Uysal, S., Tunali, V., Akdur Ozturk, E., Ardeniz, O., Isikgoz Tasbakan, M., Pullukcu, H. (2016). Incidence of parasitic diarrhea in patients with common variable immune deficiency. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 40(2), 67-71.
4. Garcia, L. S. (2017). *Diagnostic Medical Parasitology*, Washington: ASM Press, 576-583.
5. Alfellani, M. A., Jacob, A. S., Perea, N. O., Krecek, R. C., Taner-Mulla, D., Verweij, J. J. (2013). Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology*, 140(8), 966-971.
6. El Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I. (2014). Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 164.
7. Tan, K. S. W. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 639-665.
8. Stark, D., Fotedar, R., van Hal, S., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. T. (2007). Prevalence of enteric protozoa in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative men who have sex with men from Sydney, Australia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(3), 549-52.
9. Fletcher, S. M., Stark, D., Harkness, J. and Ellis, J. (2012). Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 420-449.
10. Stensvold, C. R. and Clark, C. G. (2016). Current status of *Blastocystis*: a personal view. *Parasitology International*, 65(6, Part B), 763-771.
11. Stark, D., Barratt, J., Chan, D. and Ellis, J. T. (2016). *Dientamoeba fragilis*, the neglected trichomonad of the human bowel. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 553-580.
12. Stensvold, C. R., Alfellani, M. A., Nørskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E. L., Maddox, C. (2009). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International Journal for Parasitology*, 39(4), 473-479.
13. Stensvold, C. (2015). Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. *Tropical Parasitology*, 5(1), 3-5.

14. Stensvold, C. R., Ahmed, U. N., Andersen, L. O. B. and Nielsen, H. V. (2012). Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 1847-1851.
15. van Gool, T., Weijts, R., Lommerse, E. and Mank, T. G. (2003). Triple faeces test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(5), 284-290.
16. Verweij, J. J. and Stensvold, C. R. (2014). Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 371-418.
17. Scanlan, P. D., Stensvold, C. R. and Cotter, P. D. (2015). Development and application of a *Blastocystis* subtype-specific PCR assay reveals that mixed-subtype infections are common in a healthy human population. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(12), 4071-4076.
18. Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Texier, C., Delbac, F. (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 1(5), 167-178.
19. Dogruman-Al, F., Yoshikawa, H., Kustimur, S. and Balaban, N. (2009). PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in a major hospital in Ankara, Turkey. *Parasitology Research*, 106(1), 263-268.
20. Yersal, O., Malatyali, E., Ertabaklar, H., Oktay, E., Barutca, S. and Ertug, S. (2016). *Blastocystis* subtypes in cancer patients: Analysis of possible risk factors and clinical characteristics. *Parasitology International*, 65(6 Pt B), 792-796.
21. Coskun, A., Malatyali, E., Ertabaklar, H., Yasar, M. B., Karaoglu, A. O. and Ertug, S. (2016). *Blastocystis* in ulcerative colitis patients: Genetic diversity and analysis of laboratory findings. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(9), 916-919.
22. Sankur, F., Ayturan, S., Malatyali, E., Ertabaklar, H. and Ertug, S. (2017). The distribution of *Blastocystis* subtypes among school-aged children in Mugla, Turkey. *Iranian Journal of Parasitology*, 12(4), 580-586.
23. Dogan, N., Aydin, M., Tuzemen, N. U., Dinleyici, E. C., Oguz, I. and Dogruman-Al, F. (2017). Subtype distribution of *Blastocystis* spp. isolated from children in Eskisehir, Turkey. *Parasitology International*, 66(1), 948-951.
24. Cakir, F., Cicek, M. and Yildirim, I. H. (2019). Determination the subtypes of *Blastocystis* sp. and evaluate the effect of these subtypes on pathogenicity. *Acta Parasitologica*, 64(1), 7-12.
25. Koltas, I. S. and Eroglu, F. (2016). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates using ssu-rRNA-DNA sequencing in rural and urban population in southern Turkey. *Experimental Parasitology*, 170, 247-251.

26. Beyhan, Y., Yilmaz, H., Cengiz, Z. and Ekici, A. (2015). Clinical significance and prevalence of *Blastocystis hominis* in Van, Turkey. *Saudi Medical Journal*, 36(9), 1118-1121.
27. Seyer, A., Karasartova, D., Ruh, E., Güreser, A. S., Turgal, E., Imir, T. (2017). Epidemiology and prevalence of *Blastocystis* spp. in North Cyprus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 16-0706.
28. Karaman, U., Koloren, Z., Ayaz, E. and Gur, U. (2018). Epidemiology of *Blastocystis* spp. in primary school students at a central village of Ordu province. *Medicine Science International Medical Journal*.
29. Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E. S., Wallinga, J. A., Ruijs, G. J. H. M., Bruins, M. J. and Verweij, J. J. (2009). Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(9), 869-874.
30. de Boer, M. D.-., Schuurs, T. A., Vermeer, M., Ruijs, G. J. H. M., van der Zanden, A. G. M., Weel, J. F. (2020). Distribution and relevance of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* species in gastroenteritis: results from a case-control study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(1), 197-203.
31. Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. and Harkness, J. (2005). Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *International Journal for Parasitology*, 35(1), 57-62.
32. Mumcuoğlu, I., Alaca Coskun, F., Aksu, N., Purnak, T. and Gungor, C. (2013). İrrite bağırsak sendromunda *Dientamoeba fragilis* ve *Blastocystis* spp.'nin Rolü. *Türkiye Parazitoloji Derneği*, 37(2), 73-77.
33. Karasartova, D., Gureser, A. S., Zorlu, M., Turegun-Atasoy, B., Taylan-Ozkan, A. and Dolapci, M. (2016). Blastocystosis in post-traumatic splenectomized patients. *Parasitology International*, 65(6, Part B), 802-805.
34. Taş Cengiz, Z., Akbayram, S., Çiçek, M. and Yılmaz, H. (2009). Van'da ilköğretim okulu öğrencilerinde saptanan bağırsak parazitolojileri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33(4), 289-293.
35. Calik, S., Karaman, U. and Colak, C. (2011). Prevalence of *Microsporidium* and other intestinal parasites in children from Malatya, Turkey. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 51(3), 345-349.
36. Karaman, U., Atambay, M., Aycan, O., Yologlu, S. and Daldal, N. (2006). Malatya temizlik işçilerinde bağırsak parazitlerinin görülme oranı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30(3), 181-183.
37. Karaman, U., Turan, A., Depelik, F., Gecit, I., Ozer, A., Karci, E. (2011). Sıhhi ve gayri sıhhi müesseselerdeki işletmeciler ve çalışanları ve bağırsak parazitlerinin sıklığı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 35(1), 30-33.
38. Doğan, N., Öz, Y., Koçman, N. and Nursal, A. (2012). Bağırsak parazitlerinin tanısında direkt mikroskopik incelemedeki bireysel farklılıkların karşılaştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 36(4), 211-214.
39. Özçakır, O., Güreser, S., Ergüven, S., Akyön Yılmaz, Y., Topaloğlu, R. and Hasçelik, G. (2007). Türkiye'deki bir üniversite hastanesinde *Blastocystis*

- hominis* enfeksiyonunun karakteristiği. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 31(4), 277-282.
40. Arserim, S. K., Limoncu, M. E., Gündüz, T. and Balcıoğlu, İ. C. (2019). Investigation of intestinal parasites in living nursing home. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 43(2), 74-77.
 41. Tanyuksel, M., Yilmaz, H., Ulukanligil, M., Araz, E., Cicek, M., Koru, O. (2005). Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. *Experimental Parasitology*, 110(3), 322-326.
 42. Maçın, S., Kaya, F., Çağdaş, D., Hizarcioglu-Gulsen, H., Saltik-Temizel, I. N., Tezcan, İ. (2016). Detection of parasites in children with chronic diarrhea. *Pediatrics International*, 58(6), 531-533.
 43. Girginkardeşler, N., Coşkun, Ş., Cü, Neyt Balcıoğlu, İ., Ertan, P., Ok, Ü. (2003). *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(2), 110-113.
 44. Gülmez, D., Sarıbaş, Z., Akyön, Y. and Ergüven, S. (2013). Hacettepe üniversitesi tip fakültesi parazitoloji laboratuvarı 2003-2012 yılları sonuçları: 10 yıllık değerlendirme. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 37(2), 102-106.
 45. Sivcan, E., Charyyeva, A., Ceylan, Ş., Yürük, M., Erdoğan, E. and Şahin, İ. (2018). Gastrointestinal şikayeti olan hastalarda *Dientamoeba fragilis* enfeksiyonu. *Mikrobiyoloji Bülteni* 52(2), 166-179.
 46. Aykur, M., Çalışkan Kurt, C., Dirim Erdogan, D., Biray Avcı, C., Vardar, R., Aydemir, S. (2019). Investigation of *Dientamoeba fragilis* prevalence and evaluation of sociodemographic and clinical features in patients with gastrointestinal symptoms. *Acta Parasitologica*, 64(1), 162-170.
 47. Stensvold, C. R., Arendrup, M. C., Jespersgaard, C., Mølbak, K. and Nielsen, H. V. (2007). Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59(3), 303-307.
 48. Forsell, J., Koskiniemi, S., Hedberg, I., Edebro, H., Evengård, B. and Granlund, M. (2015). Evaluation of factors affecting real-time PCR performance for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in clinical stool samples. *Journal of Medical Microbiology*, 64(9), 1053-1062.
 49. Friesen, J., Fuhrmann, J., Kietzmann, H., Tannich, E., Müller, M. and Ignatius, R. (2018). Evaluation of the Roche LightMix gastro parasites multiplex PCR assay detecting *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidia*, *Dientamoeba fragilis*, and *Blastocystis hominis*. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(12), 1333-1337.
 50. Roberts, T., Barratt, J., Harkness, J., Ellis, J. and Stark, D. (2011). Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(2), 308-12.
 51. Ramírez, J. D., Sánchez, A., Hernández, C., Flórez, C., Bernal, M. C., Giraldo, J. C. (2016). Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infection, Genetics and Evolution*, 41, 32-35.

52. Souppart, L., Moussa, H., Cian, A., Sanci, G., Poirier, P., El Alaoui, H. (2010). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitology Research*, 106(2), 505-511.
53. Stensvold, C. R. (2013). *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Tropical Parasitology*, 3(1), 26-34.
54. Forsell, J. (2017). *Genetic subtypes in unicellular intestinal parasites with special focus on Blastocystis*, Doctoral Thesis, Comprehensive Summary, Umeå Universitet, Umeå, 61.
55. Barratt, J. L. N., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J. T. and Stark, D. (2011). A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: Several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes*, 2(1), 3-12.
56. Johnson, E. H., Windsor, J. J. and Clark, C. G. (2004). Emerging from Obscurity: Biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(3), 553-570.
57. Windsor, J. J., Clark, C. G. and Macfarlane, L. (2004). Molecular typing of *Dientamoeba fragilis*. *British Journal of Biomedical Science*, 61(3), 153-155.
58. Arisue, N., Hashimoto, T., Yoshikawa, H., Nakamura, Y., Nakamura, G., Nakamura, F. (2002). Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(1), 42-53.
59. Silberman, J. D., Sogin, M. L., Leipe, D. D. and Clark, C. G. (1996). Human parasite finds taxonomic home. *Nature*, 380(6573), 398-398.
60. Clark, C. G., van der Giezen, M., Alfellani, M. A. and Stensvold, C. R. (2013). *Chapter One - Recent Developments in Blastocystis Research. Advances in Parasitology*. Rollinson, D., Academic Press, 82, 1-32.
61. Parkar, U., Traub, R. J., Kumar, S., Mungthin, M., Vitali, S., Leelayoova, S. (2007). Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology*, 134(Pt 3), 359-67.
62. Santín, M., Gómez-Muñoz, M. T., Solano-Aguilar, G. and Fayer, R. (2011). Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitology Research*, 109(1), 205-212.
63. Scicluna, S. M., Tawari, B. and Clark, C. G. (2006). DNA Barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 157(1), 77-85.
64. Dogruman-Al, F., Kustimur, S., Yoshikawa, H., Tuncer, C., Simsek, Z., Tanyuksel, M. (2009). *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(5), 724-727.
65. Tan, T. C., Ong, S. C. and Suresh, K. G. (2009). Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitology Research*, 105(5), 1283.
66. Verma, R. and Delfanian, K. (2013). *Blastocystis hominis* associated acute urticaria. *The American Journal of the Medical Sciences*, 346(1), 80-81.

67. Yakoob, J., Jafri, W., Jafri, N., Khan, R., Islam, M., Beg, M. A. (2004). Irritable bowel syndrome: In search of an etiology: Role of *Blastocystis hominis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(4), 383-385.
68. Swayne, J. and Budd, W. (1849). An account of certain organic cells peculiar to the evacuations of cholera. *The Lancet*, 54(1363), 398-399.
69. Brittan, F. (1849). *Report of a Series of Microscopical Investigations of the Pathology of Cholera*: Wilson & Ogilvy, 530-542.
70. Zierdt, C. H. (1991). *Blastocystis hominis*-past and future. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 61-79.
71. Alexeieff, A. (1911). Sur la nature des formations dites kystes de *Trichomonas intestinalis*. *Société de Biologie*, 71, 296-298.
72. Brumpt, E. (1912). *Blastocystis hominis* sp. et formes voisines. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 5, 725-730.
73. Stenzel, D. J. and Boreham, P. F. (1996). *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(4), 563-84.
74. Zierdt, C. H. and Tan, H. K. (1976). Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 50(3), 277-283.
75. Mehlhorn, H., Tan, K. S. and Yoshikawa, H. (2012). *Blastocystis: Pathogen or passenger?: An evaluation of 101 years of research* (Vol. 4). Düsseldorf: Springer Science & Business Media, 2-6.
76. Barret, H. P. (1921). A method for the cultivation of *Blastocystis*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 15(2), 113-116.
77. Zierdt, C. H., Rude, W. S. and Bull, B. S. (1967). Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *American Journal of Clinical Pathology*, 48(5), 495-501.
78. Tan, H. K. and Zierdt, C. H. (1973). Ultrastructure of *Blastocystis hominis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 42(4), 315-324.
79. Zierdt, C. H. (1973). Studies of *Blastocystis hominis*. *The Journal of Protozoology*, 20(1), 114-121.
80. Phillips, B. P. and Zierdt, C. H. (1976). *Blastocystis hominis*: Pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics. *Experimental Parasitology*, 39(3), 358-364.
81. Zierdt, C. H., Swan, J. C. and Hosseini, J. (1983). *In vitro* response of *Blastocystis hominis* to antiprotozoal drugs. *The Journal of Protozoology*, 30(2), 332-334.
82. Markell, E. K. and Udkow, M. P. (1986). *Blastocystis hominis*: Pathogen or Fellow Traveler? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35(5), 1023-1026.
83. Yamada, M., Yoshikawa, H., Tegoshi, T., Matsumoto, Y., Yoshikawa, T., Shiota, T. (1987). Light microscopical study of *Blastocystis* spp. in monkeys and fowls. *Parasitology Research*, 73(6), 527-531.

84. Nimri, L. F. (1993). Evidence of an epidemic of *Blastocystis hominis* infections in preschool children in northern Jordan. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(10), 2706-2708.
85. Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, S. W., Chen, X. Q. (1997). Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology Research*, 83(4), 319-325.
86. Hussain, R., Jaferi, W., Zuberi, S., Baqai, R., Abrar, N., Ahmed, A. (1997). Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56(3), 301-306.
87. Lanuza, M. D., Carbajal, J. A., Villar, J., Mir, A. and Borrás, R. (1999). Soluble-protein and antigenic heterogeneity in axenic *Blastocystis hominis* isolates: pathogenic implications. *Parasitology Research*, 85(2), 93-97.
88. Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng, X., Tachibana, H. and Tsutsumi, Y. (2000). Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 25(2), 51-6.
89. Noel, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V. P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L. C. (2005). Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 348-55.
90. Amin, O. M. (2006). Epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. *Journal of Parasitology Research*, 1(1), 1-10.
91. Stensvold, C. R., Suresh, G. K., Tan, K. S. W., Thompson, R. C. A., Traub, R. J., Viscogliosi, E. (2007). Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends in Parasitology*, 23(3), 93-96.
92. Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Thathaisong, U., Naaglor, T., Taamasri, P., Piyaraj, P. (2008). Drinking water: A possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(3), 401-406.
93. Jones II, M. S., Ganac, R. D., Hiser, G., Hudson, N. R., Le, A. and Whipps, C. M. (2008). Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitology Research*, 103(3), 551.
94. Denoeud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M. (2011). Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biology*, 12(3), R29.
95. Nourrisson, C., Scanzi, J., Pereira, B., Nkoudmongo, C., Wawrzyniak, I., Cian, A. (2014). *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: Comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS ONE*, 9(11), e111868.
96. Lynch, K. M. (1917). *Blastocystis hominis*: Its characteristics and its prevalence in intestinal content and feces in South Carolina. *Journal of Bacteriology*, 2(4), 369-377.

97. Johnson, A. M., Thanou, A., Boreham, P. F. L. and Baverstock, P. R. (1989). *Blastocystis hominis*: Phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. *Experimental Parasitology*, 68(3), 283-288.
98. Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73(3), 203-266.
99. Yoshikawa, H., Wu, Z., Howe, J., Hashimoto, T., Geok-Choo, N. and Tan, K. S. (2007). Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54(1), 33-7.
100. Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, S. W., Chen, X. Q. (1999). Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitology Research*, 85(2), 103-8.
101. Stenzel, D. J. and Boreham, P. F. L. (2001). *Blastocystis. Principles and Practise of Clinical Parasitology*. Gillespie, S. H. and Pearson, R. D. Chichester, Wiley, 355-368.
102. Boreham, P. F. L. and Stenzel, D. J. (1993). *Blastocystis in Humans and Animals: Morphology, Biology, and Epizootiology. Advances in Parasitology*. Baker, J. R. and Muller, R., Academic Press, 32, 1-70.
103. Tan, K. S. W., Singh, M. and Yap, E. H. (2002). Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *International Journal for Parasitology*, 32(7), 789-804.
104. Chen, X. Q., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, S. W. and Yap, E. H. (1999). *In vitro* encystation and excystation of *Blastocystis ratti*. *Parasitology*, 118 (Pt 2), 151-60.
105. Yamada, M. and Yoshikawa, H. (2012). *Morphology of Human and Animal Blastocystis Isolates with Special Reference to Reproductive Modes. Blastocystis: Pathogen or Passenger? An Evaluation of 101 Years of Research*. Mehlhorn, H., Tan, K. S. W., et al. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 9-35.
106. Tan, K. S. W. (2004). *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitology*, 126(1), 121-144.
107. Yoshikawa, H., Yoshida, K., Nakajima, A., Yamanari, K., Iwatani, S. and Kimata, I. (2004). Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitology Research*, 94(6), 391-396.
108. Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, S. W., Ng, G. C. (1996). Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitology Research*, 82(5), 439-444.
109. Dunn, L. A., Boreham, P. F. L. and Stenzel, D. J. (1989). Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *International Journal for Parasitology*, 19(1), 43-56.
110. Tan, T. C. and Suresh, K. G. (2006). Amoeboid form of *Blastocystis hominis* - a detailed ultrastructural insight. *Parasitology Research*, 99(6), 737-42.
111. Vdovenko, A. A. (2000). *Blastocystis hominis*: origin and significance of vacuolar and granular forms. *Parasitology Research*, 86(1), 8-10.

112. Lee, L. I., Chye, T. T., Karmacharya, B. M. and Govind, S. K. (2012). *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasites & Vectors*, 5(1), 130.
113. Li, L.-H., Zhou, X.-N., Du, Z.-W., Wang, X.-Z., Wang, L.-B., Jiang, J.-Y. (2007). Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitology International*, 56(4), 281-286.
114. Anuar, T. S., Ghani, M. K. A., Azreen, S. N., Salleh, F. M. and Moktar, N. (2013). *Blastocystis* infection in Malaysia: Evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. *Parasites & Vectors*, 6(1), 40.
115. Internet: Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Parasites - Blastocystis* spp. infection. Web: <https://www.cdc.gov/parasites/Blastocystis/> 24 Ekim 2019'de alınmıştır.
116. Eroglu, F. and Koltas, I. S. (2010). Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitology Research*, 107(4), 841-845.
117. Fayer, R., Elsasser, T., Gould, R., Solano, G., Urban, J. and Santin, M. (2014). *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitology Research*, 113(4), 1465-1472.
118. Ajjampur, S. S. R., Png, C. W., Chia, W. N., Zhang, Y. and Tan, K. S. W. (2016). *Ex vivo* and *In vivo* mice models to study *Blastocystis* spp. adhesion, colonization and pathology: Closer to Proving Koch's Postulates. *PloS ONE*, 11(8), e0160458.
119. Alfellani, M. A., Taner-Mulla, D., Jacob, A. S., Imeede, C. A., Yoshikawa, H., Stensvold, C. R. (2013). Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist*, 164(4), 497-509.
120. Thathaisong, U., Siripattanapipong, S., Mungthin, M., Pipatsatitpong, D., Tan-ariya, P., Naaglor, T. (2013). Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the home for girls, Bangkok, Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(2), 352-358.
121. Abe, N., Wu, Z. and Yoshikawa, H. (2003). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates. *Veterinary Parasitology*, 113(3), 321-325.
122. Arisue, N., Hashimoto, T. and Yoshikawa, H. (2003). Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology*, 126(1), 1-9.
123. Yoshikawa, H., Abe, N. and Wu, Z. (2004). PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology*, 150(5), 1147-1151.
124. Stensvold, C. R., Christiansen, D. B., Olsen, K. E. P. and Nielsen, H. V. (2011). *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(6), 883-885.
125. Yoshikawa, H. and Iwamasa, A. (2016). Human *Blastocystis* subtyping with subtype-specific primers developed from unique sequences of the ssu-rRNA gene. *Parasitology International*, 65(6, Part B), 785-791.

126. Ramírez, J. D., Flórez, C., Olivera, M., Bernal, M. C. and Giraldo, J. C. (2017). *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PLoS One*, 12(2), e0172586.
127. Dogruman-Al, F., Dagci, H., Yoshikawa, H., Kurt, Ö. and Demirel, M. (2008). A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 103(3), 685-689.
128. Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S. (2017). Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS One*, 12(1), e0169659.
129. Andiran, N., Acikgoz, Z. C., Turkay, S. and Andiran, F. (2006). *Blastocystis hominis*-an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. *Journal of Pediatric Surgery*, 41(8), 1489-1491.
130. Leelayoova, S., Rangsin, R., Taamasri, P., Naaglor, T., Thathaisong, U. and Mungthin, M. (2004). Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(6), 658-662.
131. Carrascosa, M., Martinez, J. and Perez-Castrillon, J. L. (1996). Hemorrhagic proctosigmoiditis and *Blastocystis hominis* infection. *Annals of Internal Medicine*, 124(2), 278-279.
132. Levy, Y., George, J. and Shoenfeld, Y. (1996). Severe *Blastocystis hominis* in an elderly man. *Journal of Infection*, 33(1), 57-59.
133. Skotarczak, B. (2018). Genetic diversity and pathogenicity of *Blastocystis*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(3), 411-416.
134. Leder, K., Hellard, M. E., Sinclair, M. I., Fairley, C. K. and Wolfe, R. (2005). No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20(9), 1390-1394.
135. Tungtrongchitr, A., Manatsathit, S., Kositchaiwat, C., Ongrotchanakun, J., Munkong, N., Chinabutr, P. (2004). *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel syndrome patients. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35, 705-710.
136. Parfrey, L. W., Walters, W. A., Lauber, C. L., Clemente, J. C., Berg-Lyons, D., Teiling, C. (2014). Communities of microbial eukaryotes in the mammalian gut within the context of environmental eukaryotic diversity. *Frontiers in Microbiology*, 5(298).
137. Scanlan, P. D. and Marchesi, J. R. (2008). Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *The ISME Journal*, 2(12), 1183-1193.
138. Petersen, A. M., Stensvold, C. R., Mirsepasi, H., Engberg, J., Friis-Møller, A., Porsbo, L. J. (2013). Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 48(5), 638-639.

139. Roberts, T., Stark, D., Harkness, J. and Ellis, J. (2014). Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens*, 6(1), 17.
140. Andersen, L. O. B. and Stensvold, C. R. (2016). *Blastocystis* in health and disease: Are we moving from a clinical to a public health perspective? *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 524-528.
141. Hussein, E. M., Hussein, A. M., Eida, M. M. and Atwa, M. M. (2008). Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitology Research*, 102(5), 853-860.
142. El Safadi, D., Meloni, D., Poirier, P., Osman, M., Cian, A., Gaayeb, L. (2013). Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), 1203-1206.
143. Eroglu, F., Genc, A., Elgun, G. and Koltas, I. S. (2009). Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitology Research*, 105(6), 1589-92.
144. Yan, Y., Su, S., Lai, R., Liao, H., Ye, J., Li, X. (2006). Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitology Research*, 99(5), 597-601.
145. Ramirez, J. D., Sanchez, L. V., Bautista, D. C., Corredor, A. F., Florez, A. C. and Stensvold, C. R. (2014). *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 22, 223-8.
146. Abdulsalam, A. M., Ithoi, I., Al-Mekhlafi, H. M., Al-Mekhlafi, A. M., Ahmed, A. and Surin, J. (2013). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates in Sebha, Libya. *PLoS One*, 8(12), e84372.
147. Katsarou-Katsari, A., Vassalos, C. M., Tzanetou, K., Spanakos, G., Papadopoulou, C. and Vakalis, N. (2008). Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Dermato-Venereologica*, 88(1), 80-1.
148. Vogelberg, C., Stensvold, C. R., Monecke, S., Ditzen, A., Stopsack, K., Heinrich-Gräfe, U. (2010). *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitology International*, 59(3), 469-471.
149. Bálint, A., Dóczi, I., Bereczki, L., Gyulai, R., Szűcs, M., Farkas, K. (2014). Do not forget the stool examination-cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. *Parasitology Research*, 113(4), 1585-1590.
150. Puthia, M. K., Vaithilingam, A., Lu, J. and Tan, K. S. (2005). Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitology Research*, 97(5), 386-9.
151. Puthia, M. K., Lu, J. and Tan, K. S. (2008). *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB-dependent manner. *Eukaryotic Cell*, 7(3), 435-43.

152. Mirza, H. and Tan, K. S. (2009). *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitology Research*, 104(2), 355-61.
153. Nithyamathi, K., Chandramathi, S. and Kumar, S. (2016). Predominance of *Blastocystis* sp. infection among school children in Peninsular Malaysia. *PLoS One*, 11(2), e0136709.
154. Osman, M., El Safadi, D., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P. (2016). Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004496.
155. El Safadi, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P. (2016). Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 451.
156. Sánchez, A., Munoz, M., Gómez, N., Tabares, J., Segura, L., Salazar, Á. (2017). Molecular epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among indigenous children from the Colombian Amazon Basin. *Frontiers in Microbiology*, 8.
157. Adiyaman Korkmaz, G., Dogruman Al, F. and Mumcuoglu, I. (2015). Investigation of the presence of *Blastocystis* spp. in stool samples with microscopic, culture and molecular methods. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(1), 85-97.
158. Ajjampur, S. S. R. and Tan, K. S. W. (2016). Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. — Interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitology International*, 65(6), 772-779.
159. Abdulsalam, A. M., Ithoi, I., Al-Mekhlafi, H. M., Ahmed, A., Surin, J. and Mak, J.-W. (2012). Drinking water is a significant predictor of *Blastocystis* infection among rural Malaysian primary schoolchildren. *Parasitology*, 139(08), 1014-1020.
160. Mattiucci, S., Crisafi, B., Gabrielli, S., Paoletti, M. and Cancrini, G. (2016). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiology and Infection*, 144(3), 635-646.
161. Bartolini, A., Zorzi, G. and Besutti, V. (2017). Prevalence of intestinal parasitoses detected in Padua teaching hospital, Italy, March 2011 - February 2013. *Le Infezioni in Medicina*, 25(2), 133-141.
162. Piubelli, C., Soleymanpoor, H., Giorli, G., Formenti, F., Buonfrate, D., Bisoffi, Z. (2019). *Blastocystis* prevalence and subtypes in autochthonous and immigrant patients in a referral centre for parasitic infections in Italy. *PLoS One*, 14(1), e0210171.
163. Paulos, S., Köster, P. C., De Lucio, A., Hernández-De-Mingo, M., Cardona, G. A., Fernández-Crespo, J. C. (2018). Occurrence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. *Zoonoses and Public Health*.

164. Rudzińska, M., Kowalewska, B., Wąż, P., Sikorska, K. and Szostakowska, B. (2019). *Blastocystis* subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland – A single center study. *Infection, Genetics and Evolution*, 75, 103926.
165. Bart, A., Wentink-Bonnema, E. M., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C. J., van Vugt, M. (2013). Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infectious Diseases*, 13, 389.
166. Scanlan, P. D., Knight, R., Song, S. J., Ackermann, G. and Cotter, P. D. (2016). Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* in family units living in the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, 45, 95-97.
167. Barbosa, C. V., Barreto, M. M., Andrade, R. D. J., Sodré, F., D'Avila-Levy, C. M., Peralta, J. M. (2018). Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. *PLoS One*, 13(3), e0193860.
168. Valenca Barbosa, C., de Jesus Batista, R., Pereira Igreja, R., d'Avila Levy, C. M., Werneck de Macedo, H. and Carneiro Santos, H. L. (2017). Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasites & Vectors*, 10(1), 518.
169. Seguí, R., Klisiowicz, D., Oishi, C. Y., Toledo, R., Esteban, J. G. and Muñoz-Antoli, C. (2017). Intestinal symptoms and *Blastocystis* load in schoolchildren of Paranaguá Bay, Paraná, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 59(0).
170. Seguí, R., Muñoz-Antoli, C., Klisiowicz, D. R., Oishi, C. Y., Köster, P. C., De Lucio, A. (2018). Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. *Parasites & Vectors*, 11(1).
171. Oliveira-Arbex, A. P., David, É. B. and Guimarães, S. (2018). *Blastocystis* genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 57, 59-63.
172. Das, R., Khalil, S., Mirdha, B. R., Makharia, G. K., Dattagupta, S. and Chaudhry, R. (2016). Molecular characterization and subtyping of *Blastocystis* species in irritable bowel syndrome patients from North India. *PLoS One*, 11(1), e0147055.
173. Noradilah, S. A., Moktar, N., Anuar, T. S., Lee, I. L., Salleh, F. M., Manap, S. N. A. A. (2017). Molecular epidemiology of blastocystosis in Malaysia: does seasonal variation play an important role in determining the distribution and risk factors of *Blastocystis* subtype infections in the Aboriginal community? *Parasites & Vectors*, 10(1).
174. Sari, I. P., Benung, M. R., Wahdini, S. and Kurniawan, A. (2018). Diagnosis and identification of *Blastocystis* subtypes in primary school children in Jakarta. *Journal of Tropical Pediatrics*, 64(3), 208-214.
175. Sanpool, O., Laymanivong, S., Thanchomnang, T., Rodpai, R., Sadaow, L., Phosuk, I. (2017). Subtype identification of human *Blastocystis* spp. isolated from Lao People's Democratic Republic. *Acta Tropica*, 168, 37-40.

176. Liao, C.-W., Chuang, T.-W., Huang, Y.-C., Chou, C.-M., Chiang, C.-L., Lee, F.-P. (2017). Intestinal parasitic infections: Current prevalence and risk factors among schoolchildren in capital area of the Republic of Marshall Islands. *Acta Tropica*, 176, 242-248.
177. Adao, D. E., Dela Serna, A. O., Belleza, M. L., Bolo, N. R. and Rivera, W. L. (2016). Subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from asymptomatic individuals in an urban community in the Philippines. *Annals of Parasitology*, 62(3), 193-200.
178. Belleza, M. L. B., Reyes, J. C. B., Tongol-Rivera, P. N. and Rivera, W. L. (2016). Subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from human and canine hosts in an urban community in the Philippines. *Parasitology International*, 65(3), 291-294.
179. Yowang, A., Tsaousis, A. D., Chumphonsuk, T., Thongsin, N., Kullawong, N., Popluechai, S. (2018). High diversity of *Blastocystis* subtypes isolated from asymptomatic adults living in Chiang Rai, Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 65, 270-275.
180. Palasuwan, A., Palasuwan, D., Mahittikorn, A., Chiabchalard, R., Combes, V. and Popruk, S. (2016). Subtype distribution of *Blastocystis* in communities along the Chao Phraya River, Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*, 54(4), 455-460.
181. Srichaipon, N., Nuchprayoon, S., Charuchaibovorn, S., Sukkapan, P. and Sanprasert, V. (2019). A simple genotyping method for rapid differentiation of *Blastocystis* subtypes and subtype distribution of *Blastocystis* spp. in Thailand. *Pathogens*, 8(1), 38.
182. Udonsom, R., Prasertbun, R., Mahittikorn, A., Mori, H., Changbunjong, T., Komalamisra, C. (2018). *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 65, 107-111.
183. Liao, C.-W., Chiu, K.-C., Chiang, I. C., Cheng, P.-C., Chuang, T.-W., Kuo, J.-H. (2017). Prevalence and risk factors for intestinal parasitic infection in schoolchildren in Battambang, Cambodia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 16-0681.
184. Zhang, S.-X., Zhou, Y.-M., Xu, W., Tian, L.-G., Chen, J.-X., Chen, S.-H. (2016). Impact of co-infections with enteric pathogens on children suffering from acute diarrhea in southwest China. *Infectious Diseases of Poverty*, 5(1).
185. Zhang, W., Ren, G., Zhao, W., Yang, Z., Shen, Y., Sun, Y. (2017). Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* and subtyping of *Blastocystis* in cancer patients: Relationship to diarrhea and assessment of zoonotic transmission. *Frontiers in Microbiology*, 8.
186. Alinaghizade, A., Mirjalali, H., Mohebbali, M., Stensvold, C. R. and Rezaeian, M. (2017). Inter- and intra-subtype variation of *Blastocystis* subtypes isolated from diarrheic and non-diarrheic patients in Iran. *Infection, Genetics and Evolution*, 50, 77-82.
187. Jalallou, N., Iravani, S., Rezaeian, M., Alinaghizade, A. and Mirjalali, H. (2017). Subtypes Distribution and Frequency of *Blastocystis* sp. Isolated from

- diarrheic and non-diarrheic patients. *Iranian Journal of Parasitology*, 12(1), 63-68.
188. Khademvatan, S., Masjedizadeh, R., Rahim, F., Mahbodfar, H., Salehi, R., Yousefi-Razin, E. (2017). *Blastocystis* and irritable bowel syndrome: Frequency and subtypes from Iranian patients. *Parasitology International*, 66(2), 142-145.
 189. Khademvatan, S., Masjedizadeh, R., Yousefi-Razin, E., Mahbodfar, H., Rahim, F., Yousefi, E. (2018). PCR-based molecular characterization of *Blastocystis hominis* subtypes in southwest of Iran. *Journal of Infection and Public Health*, 11(1), 43-47.
 190. Salehi, R., Haghighi, A., Stensvold, C. R., Kheirandish, F., Azargashb, E., Raeghi, S. (2017). Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* isolated from humans in Ahvaz, Southwestern Iran. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 10(3), 235-241.
 191. Boughattas, S., Behnke, J. M., Al-Ansari, K., Sharma, A., Abu-Alainin, W., Al-Thani, A. (2017). Molecular analysis of the enteric protozoa associated with acute diarrhea in hospitalized children. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 343.
 192. Abu-Madi, M., Boughattas, S., Behnke, J. M., Sharma, A. and Ismail, A. (2017). Coproscopy and molecular screening for detection of intestinal protozoa. *Parasit Vectors*, 10(1), 414.
 193. Mohamed, R. T., El-Bali, M. A., Mohamed, A. A., Abdel-Fatah, M. A., El-Malky, M. A., Mowafy, N. M. (2017). Subtyping of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia. *Parasites & Vectors*, 10(1).
 194. Mohamed, A. M., Ahmed, M. A., Ahmed, S. A., Al-Semany, S. A., Alghamdi, S. S. and Zagloul, D. A. (2017). Predominance and association risk of *Blastocystis hominis* subtype 1 in colorectal cancer: a case control study. *Infectious Agents and Cancer*, 12(1).
 195. Abuodeh, R., Ezzedine, S., Samie, A., Stensvold, C. R. and Elbakri, A. (2016). Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in healthy individuals in Sharjah, United Arab Emirates. *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 158-162.
 196. Forsell, J., Granlund, M., Samuelsson, L., Koskiniemi, S., Edebro, H. and Evengård, B. (2016). High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1–3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasites & Vectors*, 9(1).
 197. D'Alfonso, R., Santoro, M., Essi, D., Monsia, A., Kaboré, Y., Glé, C. (2017). *Blastocystis* in Côte d'Ivoire: molecular identification and epidemiological data. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(11), 2243-2250.
 198. Dacal, E., Saugar, J. M., De Lucio, A., Hernández-De-Mingo, M., Robinson, E., Köster, P. C. (2018). Prevalence and molecular characterization of *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and

- Blastocystis* spp. isolates in school children in Cubal, Western Angola. *Parasites & Vectors*, 11(1).
199. Greigert, V., Abou-Bacar, A., Brunet, J., Nourrisson, C., Pfaff, A. W., Benarbia, L. (2018). Human intestinal parasites in Mahajanga, Madagascar: The kingdom of the protozoa. *PLoS One*, 13(10), e0204576.
 200. Poulsen, C. S., Efunshile, A. M., Nelson, J. A. and Stensvold, C. R. (2016). Epidemiological aspects of *Blastocystis* colonization in children in Ilero, Nigeria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(1), 175-179.
 201. Ben Abda, I., Maatoug, N., Ben Romdhane, R., Bouhelmi, N., Zallegua, N., Aoun, K. (2017). Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* sp. in healthy individuals in the Tunis Area, Tunisia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 202-204.
 202. Özyurt, M., Kurt, Ö., Mølbak, K., Nielsen, H. V., Haznedaroglu, T. and Stensvold, C. R. (2008). Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitology International*, 57(3), 300-306.
 203. Aykan, B., Çağlar, K. and Kuştimur, S. (2005). Gaita örneklerindeki protozoonların trikrom boyası kullanılarak değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 29(1), 34-38.
 204. Yazar, S., Yaman, O., Gözkenç, N. and Şahin, İ. (2005). Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 29(4), 261-263.
 205. Roberts, T., Ellis, J., Harkness, J., Marriott, D. and Stark, D. (2014). Treatment failure in patients with chronic *Blastocystis* infection. *Journal of Medical Microbiology*, 63(2), 252-257.
 206. Boorom, K. F., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U. (2008). Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites & Vectors*, 1(1), 40.
 207. Tan, K. S. W., Mirza, H., Teo, J. D. W., Wu, B. and MacAry, P. A. (2010). Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Current Infectious Disease Reports*, 12(1), 28-35.
 208. Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivarès, C. P., Delbac, F. and El Alaoui, H. (2012). New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathogens*, 8(3), e1002545.
 209. Scanlan, P. D. (2012). *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends in Parasitology*, 28(8), 327-334.
 210. Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M. A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M. (2010). *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitology Research*, 107(3), 679-684.
 211. Fouad, S. A., Basyoni, M. M. A., Fahmy, R. A. and Kobaisi, M. H. (2011). The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab Journal of Gastroenterology*, 12(4), 194-200.

212. Jimenez-Gonzalez, D. E., Martinez-Flores, W. A., Reyes-Gordillo, J., Ramirez-Miranda, M. E., Arroyo-Escalante, S., Romero-Valdovinos, M. (2012). *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitology Research*, 110(3), 1269-1275.
213. Nagel, R., Cuttell, L., Stensvold, C. R., Mills, P. C., Bielefeldt-Ohmann, H. and Traub, R. J. (2012). *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Internal Medicine Journal*, 42(11), 1187-1195.
214. Abdel-Hameed, D. M. and Hassanin, O. M. (2011). Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype 3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitology Research*, 109(2), 321-327.
215. Zuel-Fakkar, N. M., Abdel Hameed, D. M. and Hassanin, O. M. (2011). Study of *Blastocystis hominis* isolates in urticaria: a case-control study. *Clinical and Experimental Dermatology*, 36(8), 908-910.
216. Mirza, H. and Tan, K. S. W. (2012). *Clinical Aspects of Blastocystis Infections: Advancements Amidst Controversies. Blastocystis: Pathogen or Passenger? An Evaluation of 101 Years of Research*. Mehlhorn, H., Tan, K. S. W., et al. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 65-84.
217. Malatyali, E. (2017). *Adnan Menderes Üniversitesi, tıp fakültesi parazitoloji laboratuvarında izole edilen Blastocystis alt tiplerinin sekanslama yöntemi ile belirlenmesi*, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 133.
218. Rao, K., Sekar, U., Iraivan, K. T., Abraham, G. and Soundararajan, P. (2003). *Blastocystis hominis*--an emerging cause of diarrhoea in renal transplant recipients. *Journal of the Association of Physicians of India*, 51, 719-21.
219. Doğruman-Al, F. and Hökelek, M. (2007). *Blastocystis hominis* fırsatçı bir patojen mi? *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31, 28-36.
220. Clark, C. G. and Diamond, L. S. (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 329-341.
221. Chen, J., Vaudry, W., Kowalewska, K. and Wenman, W. (1987). Lack of serum immune response to *Blastocystis hominis*. *The Lancet*, 330(8566), 1021.
222. Zierdt, C. H., Zierdt, W. S. and Nagy, B. (1995). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. *Journal of Parasitology*, 81(1), 127.
223. Clark, C. G. (1997). Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 87(1), 79-83.
224. Yoshikawa, H., Nagano, I., Wu, Z., Yap, E. H., Singh, M. and Takahashi, Y. (1998). Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Molecular and Cellular Probes*, 12(3), 153-159.
225. Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I. K. M. D., Hossain, M. B. (2004). Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology Research*, 92(1), 22-9.

226. Stensvold, R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H. V. and Arendrup, M. C. (2006). Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens using polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology*, 92(5), 1081-1087, 7.
227. Stensvold, C. R. and Clark, C. G. (2016). Molecular identification and subtype analysis of *Blastocystis*. *Current Protocols in Microbiology*, 43(1), 20A.2.1-20A.2.10.
228. Bell, A. S. and Ranford-Cartwright, L. C. (2002). Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends in Parasitology*, 18(8), 338-342.
229. Bohm-Gloning, B., Knobloch, J. and Walderich, B. (1997). Five subgroups of *Blastocystis hominis* isolates from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Tropical Medicine & International Health*, 2(8), 771-778.
230. Stensvold, C. R. (2013). Comparison of sequencing (Barcode Region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 190-194.
231. Maloney, J. G., Molokin, A. and Santin, M. (2019). Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 119-125.
232. Parkar, U., Traub, R. J., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I. (2010). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology*, 169(1), 8-17.
233. Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F. and Livrelli, V. (2011). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 975-83.
234. Menu, E., Mary, C., Toga, I., Raoult, D., Ranque, S. and Bittar, F. (2018). Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples. *BMC Research Notes*, 11(1).
235. Stark, D., Roberts, T., Ellis, J. T., Marriott, D. and Harkness, J. (2014). Evaluation of the EasyScreen™ enteric parasite detection kit for the detection of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba* complex, and *Giardia intestinalis* from clinical stool samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(2), 149-152.
236. Stensvold, C. R., Smith, H. V., Nagel, R., Olsen, K. E. P. and Traub, R. J. (2010). Eradication of *Blastocystis* carriage with antimicrobials: Reality or delusion? *Journal of Clinical Gastroenterology*, 44(2), 85-90.
237. Kurt, Ö., Doğruman Al, F. and Tanyüksel, M. (2016). Eradication of *Blastocystis* in humans: Really necessary for all? *Parasitology International*, 65(6), 797-801.
238. Rajamanikam, A., Hooi, H. S., Kudva, M., Samudi, C. and Kumar, S. (2019). Resistance towards metronidazole in *Blastocystis* sp.: A pathogenic consequence. *PLoS One*, 14(2), e0212542.

239. Internet: Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Parasites – Blastocystis spp. Infection – Treatment*. Web: https://www.cdc.gov/parasites/Blastocystis/health_professionals/index.html. 24 Ekim 2019'de alınmıştır.
240. Andersen, L. O., Bonde, I., Nielsen, H. B. and Stensvold, C. R. (2015). A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(7).
241. Audebert, C., Even, G., Cian, A., Safadi, D. E., Certad, G., Delhaes, L. (2016). Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific Reports*, 6(1), 25255.
242. de la Cruz, C. P. P. and Stensvold, C. R. (2019). *Blastocystis. Part Three. Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects*. Washington, DC, Global Water Pathogen Project.
243. Stark, D. J., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. T. and Harkness, J. (2006). Dientamoebiasis: clinical importance and recent advances. *Trends Parasitology*, 22(2), 92-6.
244. Barnish, G. and Ashford, R. W. (1989). Occasional parasitic infections of man in Papua New Guinea and Irian Jaya (New Guinea). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 83(2), 121-35.
245. Cacciò, S. M., Sannella, A. R., Manuali, E., Tosini, F., Sensi, M., Crotti, D. (2012). Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 18(5), 838-841.
246. Maritz, J. M., Land, K. M., Carlton, J. M. and Hirt, R. P. (2014). What is the importance of zoonotic trichomonads for human health? *Trends in Parasitology*, 30(7), 333-41.
247. Dwyer, D. M. (1972). Analysis of the Antigenic Relationships Among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba*, and *Entamoeba*. I. Quantitative Fluorescent Antibody Methods. *The Journal of Protozoology*, 19(2), 316-325.
248. Munsch, M., Mehlhorn, H., Al-Quraishy, S., Lotfi, A. R. and Hafez, H. M. (2009). Molecular biological features of strains of *Histomonas meleagridis*. *Parasitology Research*, 104(5), 1137-40.
249. Menghi, C., Makiya, R., Gatta, C. and Méndez, O. C. (2005). *Dientamoeba fragilis*: Molecular biology techniques for the elucidation of its mode of transmission. *Parasitologia Latinoamericana*, 60, 25-31.
250. Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. and Harkness, J. (2005). Prospective study of the prevalence, genotyping, and clinical relevance of *Dientamoeba fragilis* infections in an Australian population. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2718-2723.
251. Jepps, M. W. and Dobell, C. (1918). *Dientamoeba fragilis* n. g., n. sp., a new Intestinal Amoeba from Man. *Parasitology*, 10(3), 352-367.
252. Dobell, C. (1940). Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. *Parasitology*, 32(4), 417-461.

253. Hess, M., Liebhart, D., Bilic, I. and Ganas, P. (2015). *Histomonas meleagridis* – New insights into an old pathogen. *Veterinary Parasitology*, 208(1), 67-76.
254. Ockert, G. and Schneider, W. (1974). Electron microscopic findings in *Dientamoeba fragilis*. *Zeitschrift für die Gesamte Hygiene und ihre Grenzgebiete*, 20(8), 555-7.
255. Silard, R., Burghilea, B., Panaitescu, D. and Burcos, V. (1984). Ultrastructure of *Dientamoeba fragilis*: a study of the mononucleated stage. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale et de Microbiologie*, 43(1), 87-101.
256. Gerbod, D., Edgcomb, V. P., Noel, C., Zenner, L., Wintjens, R., Delgado-Viscogliosi, P. (2001). Phylogenetic position of the *Trichomonad* parasite of turkeys, *Histomonas meleagridis* (Smith) tyzzer, inferred from small subunit rRNA sequence. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(4), 498-504.
257. Banik, G. R., Birch, D., Stark, D. and Ellis, J. T. (2012). A microscopic description and ultrastructural characterisation of *Dientamoeba fragilis*: An emerging cause of human enteric disease. *International Journal for Parasitology*, 42(2), 139-153.
258. Munasinghe, V. S., Vella, N. G. F., Ellis, J. T., Windsor, P. A. and Stark, D. (2013). Cyst formation and faecal–oral transmission of *Dientamoeba fragilis* – the missing link in the life cycle of an emerging pathogen. *International Journal for Parasitology*, 43(11), 879-883.
259. Kofoed, C. A., Kornhauser, S. I. and Plate, J. T. (1919). Intestinal parasites in overseas and home service troops of the U.S. army. *Journal of the American Medical Association*, 72(24), 1721.
260. Haughwout, F. G. and Hoerilleno, F. S. (1920). The intestinal animal parasites found in one hundred sick Filipino children. *Philippine Journal of Science*, 16(1), 1-73.
261. Robertson, A. (1923). Specimens from a human case of infection with *Dientamoeba fragilis*, Jepps and Dobell, 1917. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 16(1), 48.
262. Wenrich, D. H. (1944). Studies on *Dientamoeba fragilis* (Protozoa). IV. Further Observations, with an outline of present-day knowledge of this species. *Journal of Parasitology*, 30(5), 322.
263. Grassé, P.-P. (1953). Famille des Dientamoebidae Grasse, nov., (E. Chatton, principal author: ordre des amœbiens nus ou Amœbaea). *Traité de Zoologie*, 50-54.
264. Bird, R. G., Sargeant, P. and Upton, C. P. (1970). Uni- and binucleate trophozoites of *Dientamoeba fragilis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 64(1), 18-18.
265. Camp, R. R., Mattern, C. F. T. and Honigberg, B. M. (1974). Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell I. Electronmicroscopic observations of the binucleate stages II. Taxonomic position and revision of the genus*. *The Journal of Protozoology*, 21(1), 69-82.

266. Dwyer, D. M. (1972). Analysis of the antigenic relationships among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba*, and *Entamoeba*. II. Gel diffusion methods. *The Journal of Protozoology*, 19(2), 326-332.
267. Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M. (1980). A newly revised classification of the protozoa*. *The Journal of Protozoology*, 27(1), 37-58.
268. Silberman, J. D., Clark, C. G. and Sogin, M. L. (1996). *Dientamoeba fragilis* shares a recent common evolutionary history with the trichomonads. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 76(1-2), 311-314.
269. Malik, S. B., Brochu, C. D., Bilic, I., Yuan, J., Hess, M., Logsdon, J. M., Jr. (2011). Phylogeny of parasitic parabasalia and free-living relatives inferred from conventional markers vs. Rpb1, a single-copy gene. *PLoS One*, 6(6), e20774.
270. Noda, S., Mantini, C., Meloni, D., Inoue, J., Kitade, O., Viscogliosi, E. (2012). Molecular phylogeny and evolution of parabasalia with improved taxon sampling and new protein markers of actin and elongation factor-1alpha. *PLoS One*, 7(1), e29938.
271. Brug, S. L. (1936). Observations on *Dientamoeba fragilis*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 30(4), 441-452.
272. Craig, C. F. (1926). The nuclear structure of *Dientamoeba fragilis*. *Journal of Parasitology*, 13(2), 137-142.
273. Wenrich, D. H. (1937). Studies on *Dientamoeba fragilis* (Protozoa). II. Report of unusual morphology in one case with suggestions as to pathogenicity. *Journal of Parasitology*, 23(2), 183.
274. Wenrich, D. H. (1939). Studies on *Dientamoeba fragilis* (Protozoa). III. Binary fission with special reference to nuclear division. *Journal of Parasitology*, 25(1), 43.
275. Wenrich, D. H. (1944). Nuclear structure and nuclear division in *Dientamoeba fragilis* (Protozoa). *Journal of Morphology*, 74(3), 467-491.
276. Wenrich, D. H. (1936). Studies on *Dientamoeba fragilis* (Protozoa). I. Observations with special reference to nuclear structure. *Journal of Parasitology*, 22(1), 76-83.
277. Halawani, A. E. (1930). *Dientamoeba fragilis* from a culture of human faeces. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 23, 326-327.
278. Silard, R., Colea, A., Panaitescu, D., Florescu, P. and Roman, N. (1979). Studies on *Dientamoeba fragilis* in Romania. I. *Dientamoeba fragilis* isolated from clinical cases. Problems of diagnosis, incidence, clinical aspects. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale Et de Microbiologie*, 38(3-4), 359-72.
279. Robinson, G. L. and Ng, P. H. (1968). The size of *Dientamoeba fragilis* in culture. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(1), 156-8.

280. Sargeaunt, P. G. and Williams, J. E. (1982). The morphology in culture of the intestinal amoebae of man. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(4), 465-72.
281. Hakansson, E. G. (1936). *Dientamoeba fragilis*, a cause of illness. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, s1-16(2), 175-185.
282. Hakansson, E. G. (1937). *Dientamoeba fragilis*: Some further observations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, s1-17(3), 349-362.
283. İnternet: Swierczynski, G. (2020). Atlas of human intestinal protozoa: *Microscopic İdentification*. Web: http://www.atlas-protozoa.com/gallery.php?SOT_CAP=F_DIENT#10 adresinden 24 Ekim 2019'da alınmıştır.
284. Stark, D., Barratt, J., Roberts, T., Marriott, D., Harkness, J. and Ellis, J. (2010). Comparison of microscopy, two xenic culture techniques, conventional and real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in clinical stool samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29(4), 411-416.
285. Silard, R. and Burghilea, B. (1986). Endosymbionts in *Dientamoeba fragilis* trophozoites resistant to antiprotozoal drugs. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale Et de Microbiologie*, 45(1), 65-74.
286. Clark, C. G., Röser, D. and Stensvold, C. R. (2014). Transmission of *Dientamoeba fragilis*: pinworm or cysts? *Trends in Parasitology*, 30(3), 136-140.
287. Barratt, J. L. N., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J. T. and Stark, D. (2011). The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis*: the need to investigate current hypotheses on transmission. *Parasitology*, 138(5), 557-572.
288. Ockert, G. (1972). Epidemiology of *Dientamoeba fragilis* Jepps and Dobell, 1918. 2. Attempt at species transfer with *Enterobius* eggs. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology*, 16(2), 213-21.
289. Ockert, G. (1972). Epidemiology of *Dientamoeba fragilis* Jepps and Dobell 1918. 1. Spread of the species in child collectives. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology*, 16(2), 213-21.
290. Ockert, G. (1975). Epidemiology of *Dientamoeba fragilis* Jepps and Dobell, 1918. 3. Further studies on *Enterobius* transmission through eggs. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology*, 19(1), 17-21.
291. Girginkardesler, N., Kurt, O., Kilimcioglu, A. A. and Ok, U. Z. (2008). Transmission of *Dientamoeba fragilis*: evaluation of the role of *Enterobius vermicularis*. *Parasitology International*, 57(1), 72-75.
292. Yang, J. and Scholten, T. (1977). *Dientamoeba fragilis*: A review with notes on its epidemiology, pathogenicity, mode of transmission, and diagnosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26(1), 16-22.
293. Stark, D., Barratt, J., Roberts, T., Marriott, D., Harkness, J. and Ellis, J. (2010). A review of the clinical presentation of Dientamoebiasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4), 614-619.

294. Crotti, D., Sensi, M., Crotti, S., Grelloni, V. and Manuali, E. (2007). *Dientamoeba fragilis* in swine population: A preliminary investigation. *Veterinary Parasitology*, 145(3), 349-351.
295. Simone, M. C., Anna Rosa, S., Elisabetta, M., Fabio, T., Marco, S., Daniele, C. (2012). Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans. *Emerging Infectious Disease Journal*, 18(5), 838.
296. Johnson, J. A. and Clark, C. G. (2000). Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4653-4654.
297. Peek, R., Reedeker, F. R. and van Gool, T. (2004). Direct amplification and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from human stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 631-635.
298. Stensvold, C. R., Clark, C. G. and Röser, D. (2013). Limited intra-genetic diversity in *Dientamoeba fragilis* housekeeping genes. *Infection, Genetics and Evolution*, 18, 284-286.
299. Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E. S., Dullaert-de Boer, M., Ruijs, G. J. H. M., van der Reijden, W. A., van der Zanden, A. G. M., Weel, J. F. L. (2015). Case-control comparison of bacterial and protozoan microorganisms associated with gastroenteritis: application of molecular detection. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(6), 592.e9-592.e19.
300. Barratt, J. L. N., Cao, M., Stark, D. J. and Ellis, J. T. (2015). The transcriptome sequence of *Dientamoeba fragilis* offers new biological insights on its metabolism, kinome, degradome and potential mechanisms of pathogenicity. *Protist*, 166(4), 389-408.
301. Barratt, J., Stark, D. and Ellis, J. (2012). 134. Cytotoxic and proteolytic molecules of the human parasite *Dientamoeba fragilis*, identified by RNA seq, provide support for its pathogenic capacity. *Toxicon*, 60(2), 163-164.
302. Cacciò, S. M. (2018). Molecular epidemiology of *Dientamoeba fragilis*. *Acta Tropica*, 184, 73-77.
303. Guidetti, C., Ricci, L. and Vecchia, L. (2010). Prevalence of intestinal parasitosis in Reggio Emilia (Italy) during 2009. *Le Infezioni in Medicina*, 18(3), 154-161.
304. González-Moreno, O., Domingo, L., Teixidor, J. and Gracenea, M. (2011). Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitology Research*, 108(1), 87-93.
305. SØEs, L. M., Holt, H. M., BÖTtiger, B., Nielsen, H. V., Andreassen, V., Kemp, M. (2014). Risk factors for *Clostridium difficile* infection in the community: a case-control study in patients in general practice, Denmark, 2009–2011. *Epidemiology and Infection*, 142(7), 1437-1448.
306. Crotti, D. and D'Annibale, M. L. (2007). Human intestinal parasitosis: Role of *Dientamoeba fragilis* in human infections. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva E di Comunita*, 19(1), 27-34.
307. Crotti, D. and D'annibale, M. (2007). Role of *Dientamoeba fragilis* in human bowel infections. *Le infezioni in medicina: rivista periodica di eziologia*,

- epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive*, 15(1), 30-39.
308. Vandenberg, O., Peek, R., Souayah, H., Dediste, A., Buset, M., Scheen, R. (2006). Clinical and microbiological features of dientamoebiasis in patients suspected of suffering from a parasitic gastrointestinal illness: A comparison of *Dientamoeba fragilis* and *Giardia lamblia* infections. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(3), 255-261.
 309. JÚlio, C., Furtado, C., Rocha, R., Escobar, C., Brito, M. J. and Oleastro, M. (2015). Detection of *Dientamoeba fragilis* in Portuguese children with acute gastroenteritis between 2011 and 2013. *Parasitology*, 142(11), 1398-1403.
 310. van Gool, T. and Dankert, J. (1996). 3 emerging protozoal infections in The Netherlands: *Cyclospora*, *Dientamoeba*, and *Microspora* infections. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, 140(3), 155-160.
 311. Stensvold, C. R., Arendrup, M. C., Mølbak, K. and Nielsen, H. V. (2007). The prevalence of *Dientamoeba fragilis* in patients with suspected enteroparasitic disease in a metropolitan area in Denmark. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(8), 839-842.
 312. Schuster, H. and Jackson, R. S. (2009). Prevalence of *Dientamoeba fragilis* among patients consulting complementary medicine practitioners in the British Isles. *Journal of Clinical Pathology*, 62(2), 182-184.
 313. Calderaro, A., Gorrini, C., Montecchini, S., Peruzzi, S., Piccolo, G., Rossi, S. (2010). Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Dientamoeba fragilis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(3), 239-245.
 314. Gijsbers, C., Benninga, M. and Büller, H. (2011). Clinical and laboratory findings in 220 children with recurrent abdominal pain. *Acta Paediatrica*, 100(7), 1028-1032.
 315. Calderaro, A., Montecchini, S., Rossi, S., Gorrini, C., De Conto, F., Medici, M. C. (2014). Intestinal parasitoses in a tertiary-care hospital located in a non-endemic setting during 2006–2010. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 264.
 316. Verweij, J. J., Mulder, B., Poell, B., van Middelkoop, D., Brienens, E. A. T. and van Lieshout, L. (2007). Real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples. *Molecular and Cellular Probes*, 21(5), 400-404.
 317. Röser, D., Simonsen, J., Nielsen, H. V., Stensvold, C. R. and Mølbak, K. (2013). *Dientamoeba fragilis* in Denmark: Epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32(10), 1303-1310.
 318. de Jong, M. J., Korterink, J. J., Benninga, M. A., Hilbink, M., Widdershoven, J. and Deckers-Kocken, J. M. (2014). *Dientamoeba fragilis* and chronic abdominal pain in children: A case-control study. *Archives of Disease in Childhood*, 99(12), 1109-1113.
 319. Brands, M. R., Van de Vijver, E., Haisma, S. M., Heida, A. and van Rheenen, P. F. (2019). No association between abdominal pain and *Dientamoeba* in Dutch and Belgian children. *Archives of Disease in Childhood*, 104(7), 686-689.

320. Ögren, J., Dienus, O., Löfgren, S., Einemo, I. M., Iveroth, P. and Matussek, A. (2015). *Dientamoeba fragilis* prevalence coincides with gastrointestinal symptoms in children less than 11 years old in Sweden. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(10), 1995-1998.
321. Maas, L., Dorigo-Zetsma, J. W., de Groot, C. J., Bouter, S., Plötz, F. B. and van Ewijk, B. E. (2014). Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(6), 545-550.
322. Preiß, U., Ockert, G., Brömme, S. and Otto, A. (1990). *Dientamoeba fragilis* infection, a cause of gastrointestinal symptoms in childhood. *Klinische Pädiatrie*, 202(02), 120-123.
323. Al-Hindi, A., Redwan, A. A., El-Egla, G. O., Abu Qassem, R. R. and Alshammari, A. (2019). Prevalence of intestinal parasitic infections among university female students, Gaza, Palestine. *Avicenna Journal of Medicine*, 9(4), 143-147.
324. Esteghamati, A., Khanaliha, K., Bokharaei-Salim, F., Sayyahfar, S. and Ghaderipour, M. (2019). Prevalence of intestinal parasitic infection in cancer, organ transplant and primary immunodeficiency patients in Tehran, Iran. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 20(2), 495-501.
325. Sarafraz, S., Farajnia, S., Jamali, J., Khodabakhsh, F. and Khanipour, F. (2013). Detection of *Dientamoeba fragilis* among diarrheal patients referred to Tabriz health care centers by nested PCR. *Tropical Biomedicine*, 30(1), 113-118.
326. Salem, A. I., El-Taweel, H. A., Madkour, M. A., Abd El-Latif, N. F. and Abd-Elrazeq, E. S. (2019). Irritable bowel syndrome in Egyptian patients: Plausible risk factors and association with intestinal protozoa. *Tropical Doctor*, 49(3), 184-188.
327. Windsor, J. J., Rafay, A. M., Shenoy, A. K. and Johnson, E. H. (1998). Incidence of *Dientamoeba fragilis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *British Journal of Biomedical Science*, 55(3), 172-175.
328. Al-Hindi, A. I. and Shammala, B. M. A. (2013). *Dientamoeba fragilis* in Gaza Strip: A neglected protozoan parasite. *Iranian Journal of Parasitology*, 8(2), 249-255.
329. Hamidi, N., Meamar, A. R., Akhlaghi, L., Rampisheh, Z. and Razmjou, E. (2018). *Dientamoeba fragilis* diagnosis by fecal screening: Relative effectiveness of traditional techniques and molecular methods. *Journal of Infection in Developing Countries*, 12(1), 52-59.
330. Rayan, H. Z. E., Ismail, O. A. and El Gayar, E. K. (2007). Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 37(2), 599-608.
331. Steinitz, H., Talis, B. and Stein, B. (1970). *Entamoeba histolytica* and *Dientamoeba fragilis* and the syndrome of chronic recurrent intestinal amoebiasis in Israel. *Digestion*, 3(3), 146-153.

332. Sargeaunt, P. G., Williams, J. E., Jackson, T. F. and Simjee, A. E. (1982). A zymodeme study of *Entamoeba histolytica* in a group of South African schoolchildren. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(3), 401-402.
333. Kasseem, H. H., Zaed, H. A. and Sadaga, G. A. (2007). Intestinal parasitic infection among children and neonatus admitted to Ibn-Sina Hospital, Sirt, Libya. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 37(2), 371-380.
334. Ayadi, A. and Bahri, I. (1999). *Dientamoeba fragilis*: Pathogenic flagellate? *Bulletin de la Societe de pathologie exotique*, 92(5), 299-301.
335. Chehboub, S. M., Achir, I. and Hamrioui, B. (2016). Prévalence de *Dientamoeba fragilis* (*Trichomonadida*, *Monocercomonadidae*) au centre hospitalier universitaire Mustapha d'Alger: Aspects diagnostiques et épidémiologiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2016(486), 71-77.
336. Siala, E., Guidara, R., Ben Abdallah, R., Ben Ayed, S., Ben Alaya, N., Zallaga, N. (2011). The intestinal parasites in the food handlers of Tunis area: Study of 8502 stool samples (1998-2008). *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 88(1-4), 77-84.
337. Huibers, M. H. W., Moons, P., Maseko, N., Gushu, M. B., Iwajomo, O. H., Heyderman, R. S. (2018). Multiplex real-time PCR detection of intestinal protozoa in HIV-infected children in Malawi: *Enterocytozoon bieneusi* is common and associated with gastrointestinal complaints and may delay BMI (Nutritional Status) recovery. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 37(9), 910-915.
338. Church, C., Neill, A. and Schotthoefer, A. M. (2010). Intestinal infections in humans in the Rocky Mountain region, United States. *The Journal of Parasitology*, 96(1), 194-196.
339. Peters, C. S., Sable, R., Janda, W. M., Chittom, A. L. and Kocka, F. E. (1986). Prevalence of enteric parasites in homosexual patients attending an outpatient clinic. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(4), 684-685.
340. Garcia, J. A. and Cimerman, S. (2012). Detection of *Dientamoeba fragilis* in patients with HIV/AIDS by using a simplified iron hematoxylin technique. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(2), 156-158.
341. Ortega, H. B., Borchardt, K. A., Hamilton, R., Ortega, P. and Mahood, J. (1984). Enteric pathogenic protozoa in homosexual men from San Francisco. *Sexually Transmitted Diseases*, 11(2), 59-63.
342. Tavaréz, L. A., Pena, F., Placencia, F., Mendoza, H. R. and Polanco, D. (1991). Prevalence of protozoans in children with acute diarrheal disease. *Archivos dominicanos de pediatria*, 27(2), 43-47.
343. Lindo, J. F., Dubon, J. M., Ager, A. L., de Gourville, E. M., Solo-Gabriele, H., Klaskala, W. I. (1998). Intestinal parasitic infections in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals in San Pedro Sula, Honduras. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(4), 431-435.
344. Meropol, S. B. (1995). Health status of pediatric refugees in Buffalo, NY. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 149(8), 887-892.

345. Kean, B. H. and Malloch, C. L. (1966). The neglected ameba: *Dientamoeba fragilis*. A report of 100 "pure" infections. *The American Journal of Digestive Diseases*, 11(9), 735-746.
346. Menghi, C. I., Iuvaro, F. R., Dellacasa, M. A. and Gatta, C. L. (2007). Survey of intestinal parasites among an aboriginal community in Salta. *Medicina*, 67(6 Pt 2), 705-708.
347. Kaminsky, R. G. (1991). Parasitism and diarrhoea in children from two rural communities and marginal barrio in Honduras. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(1), 70-73.
348. Lainson, R. and da Silva, B. A. (1999). Intestinal parasites of some diarrhoeic HIV-seropositive individuals in North Brazil, with particular reference to *Isospora belli* Wenyon, 1923 and *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell, 1918. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(5), 611-613.
349. Keystone, J. S., Yang, J., Grisdale, D., Harrington, M., Pillon, L. and Andreychuk, R. (1984). Intestinal parasites in metropolitan Toronto day-care centres. *Canadian Medical Association Journal*, 131(7), 733-735.
350. Staat, M. A., Rice, M., Donauer, S., Mekkada, S., Holloway, M., Cassedy, A. (2011). Intestinal parasite screening in internationally adopted children: importance of multiple stool specimens. *Pediatrics*, 128(3), e613-e622.
351. Sargeant, P. G., Williams, J. E., Kumate, J. and Jimenez, E. (1980). The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in Mexico City. A pilot survey I. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(5), 653-656.
352. David, É. B., Guimarães, S., de Oliveira, A. P., Goulart de Oliveira-Sequeira, T. C., Nogueira Bittencourt, G., Moraes Nardi, A. R. (2015). Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasites & Vectors*, 8(1), 103.
353. Méndez, O. C., Szmulewicz, G., Menghi, C., Torres, S., González, G. and Gatta, C. (1994). Comparison of intestinal parasite infestation indexes among HIV positive and negative populations. *Medicina*, 54(4), 307-310.
354. Incani, R. N., Ferrer, E., Hoek, D., Ramak, R., Roelfsema, J., Mughini-Gras, L. (2017). Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or real time PCR. *Acta Tropica*, 167, 64-70.
355. Millet, V., Spencer, M. J., Chapin, M., Stewart, M., Yatabe, J. A., Brewer, T. (1983). *Dientamoeba fragilis*, a protozoan parasite in adult members of a semicomunal group. *Digestive Diseases and Sciences*, 28(4), 335-339.
356. Chan, F., Stewart, N., Guan, M., Robb, I., Fuite, L., Chan, I. (1996). Prevalence of *Dientamoeba fragilis* antibodies in children and recognition of a 39 kDa immunodominant protein antigen of the organism. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 15(12), 950-954.
357. Sawangjaroen, N., Luke, R. and Prociv, P. (1993). Diagnosis by faecal culture of *Dientamoeba fragilis* infections in Australian patients with

- diarrhoea. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(2), 163-165.
358. Oxner, R. B., Paltridge, G. P., Chapman, B. A., Cook, H. B. and Sheppard, P. F. (1987). *Dientamoeba fragilis*: A bowel pathogen? *The New Zealand Medical Journal*, 100(817), 64-65.
 359. Stark, D., Al-Qassab, S. E., Barratt, J. L. N., Stanley, K., Roberts, T., Marriott, D. (2011). Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1), 257-262.
 360. Walker, J. C., Bahr, G. and Ehl, A. S. (1985). Gastrointestinal parasites in Sydney. *The Medical journal of Australia*, 143(10), 480-480.
 361. Ögren, J., Van Nguyen, S., Nguyen, M. K., Dimberg, J. and Matussek, A. (2016). Prevalence of *Dientamoeba fragilis*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica/dispar*, and *Cryptosporidium* spp in Da Nang, Vietnam, detected by a multiplex real-time PCR. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 124(6), 529-533.
 362. Anuar, T. S., Hasim, L., Moktar, N., Salleh, F. M. and Al-Mekhlafi, H. M. (2015). Prevalence of *Dientamoeba fragilis* among an orang asli population in rural Malaysia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 46(5), 844-849.
 363. Muller, R., Lillywhite, J., Bending, J. J. and Catford, J. C. (1987). Human cysticercosis and intestinal parasitism amongst the Ekari people of Irian Jaya. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(6), 291-296.
 364. Gittings, J. C. and Waltz, A. D. (1927). *Dientamoeba fragilis*. *American Journal of Diseases of Children*, 34(4), 542-546.
 365. Windsor, J. J. and Johnson, E. H. (1999). *Dientamoeba fragilis*: the unflagellated human flagellate. *British Journal of Biomedical Science*, 56(4), 293-306.
 366. Borody, T., Warren, E. F. and Wettstein, A. (2002). Eradication of *Dientamoeba fragilis* can resolve IBS-like symptoms. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17, A103.
 367. Krogsgaard, L. R., Engsbø, A. L., Stensvold, C. R., Nielsen, H. V. and Bytzer, P. (2015). The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: a population-based case-control study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 13(3), 507-513.e2.
 368. Wenrich, D., Stabler, R. and Arnett, J. H. (1935). *Endamoeba histolytica* and other intestinal protozoa in 1,060 college freshmen. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1(3), 331-345.
 369. Norberg, A., Nord, C. E. and Evengård, B. (2003). *Dientamoeba fragilis*-a protozoal infection which may cause severe bowel distress. *Clinical Microbiology and Infection: The official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9(1), 65-68.

370. Crotti, D., D'Annibale, M. L., Fonzo, G., Lalle, M., Cacciò, S. M. and Pozio, E. (2005). *Dientamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy. *Parasite (Paris, France)*, 12(2), 165-170.
371. de Wit, M. A., Koopmans, M. P., Kortbeek, L. M., van Leeuwen, N. J., Vinjé, J. and van Duynhoven, Y. T. (2001). Etiology of gastroenteritis in sentinel general practices in the netherlands. *Clinical Infectious Diseases*, 33(3), 280-8.
372. Costa, F., Mumolo, M. G., Bellini, M., Romano, M. R., Ceccarelli, L., Arpe, P. (2003). Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Digestive and Liver Disease*, 35(9), 642-7.
373. Aykur, M., Armagan, G., Vardar, R. and Dagci, H. (2020). Fecal calprotectin as a factor that supports the pathogenicity of *Dientamoeba fragilis*. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103868.
374. Boeck, W. C. and Drbohlav, J. (1925). The Cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11(5), 235-238.
375. Robinson, G. L. (1968). Laboratory cultivation of some human parasitic amoebae. *Journal of General Microbiology*, 53(1), 69-79.
376. Dobell, C. and Laidlaw, P. P. (1926). On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other Entozoic Amoebae. *Parasitology*, 18(3), 283-318.
377. Cleveland, L. and Collier, J. (1930). Various improvements in the cultivation of *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Hygiene*, 12(3).
378. Balamuth, W. (1946). Improved egg yolk infusion for cultivation of *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa. *American Journal of Clinical Pathology*, 16(6), 380-84.
379. Diamond, L. S. (1982). A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen-dwelling protozoa. *The Journal of Parasitology*, 68(5), 958-9.
380. Barratt, J. L. N., Banik, G. R., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J. T. and Stark, D. (2010). Newly defined conditions for the in vitro cultivation and cryopreservation of *Dientamoeba fragilis*: New techniques set to fast track molecular studies on this organism. *Parasitology*, 137(13), 1867-1878.
381. Chan, F. T., Guan, M. X. and Mackenzie, A. M. (1993). Application of indirect immunofluorescence to detection of *Dientamoeba fragilis* trophozoites in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(7), 1710-4.
382. McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Couturier, M. R. and Humphries, R. M. (2014). Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(3), 712-720.
383. Röser, D., Nejsun, P., Carlsgart, A. J., Nielsen, H. V. and Stensvold, C. R. (2013). DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*. *Experimental Parasitology*, 133(1), 57-61.
384. Bart, A., van der Heijden, H. M., Greve, S., Speijer, D., Landman, W. J. and van Gool, T. (2008). Intragenomic variation in the internal transcribed spacer

- 1 region of *Dientamoeba fragilis* as a molecular epidemiological marker. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3270-3275.
385. Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. and Harkness, J. (2006). Evaluation of three diagnostic methods, including real-time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1), 232-5.
 386. De Canale, E., Biasolo, M. A., Tessari, A., Bettanello, S., Besutti, V. and Mengoli, C. (2009). Real time PCR for *Dientamoeba fragilis*: A comparison between molecular and microscopical approach. *Microbiologia Medica*, 24(3).
 387. Hussein, E. M., Al-Mohammed, H. I. and Hussein, A. M. (2009). Genetic diversity of *Dientamoeba fragilis* isolates of irritable bowel syndrome patients by high-resolution melting-curve (HRM) analysis. *Parasitology Research*, 105(4), 1053-1060.
 388. Nagata, N., Marriott, D., Harkness, J., Ellis, J. T. and Stark, D. (2012). Current treatment options for *Dientamoeba fragilis* infections. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 204-215.
 389. Haider, B., Ahn, T.-H., Bushnell, B., Chai, J., Copeland, A. and Pan, C. (2014). Omega: An overlap-graph de novo assembler for metagenomics. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(19), 2717-2722.
 390. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. and Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
 391. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549.
 392. Dogruman Al, F., Sarzhanov, F. and Erganis, S. (2019). Is *Blastocystis* spp. friendly?: A current view of the intestinal microbiota. *European Journal of Therapeutics*, 25(4), 239-242.
 393. Dogruman-Al, F., Simsek, Z., Boorum, K., Ekici, E., Sahin, M., Tuncer, C. (2010). Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS One*, 5(11), e15484.
 394. Parija, S. C. and Jeremiah, S. (2013). *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology*, 3(1), 17-25.
 395. Rasti, S., Hassanzadeh, M., Hooshyar, H., Momen-Heravi, M., Mousavi, S. G. A. and Abdoli, A. (2017). Intestinal parasitic infections in different groups of immunocompromised patients in Kashan and Qom cities, central Iran. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 52(6-7), 738-741.
 396. Rojas-Velázquez, L., Maloney, J. G., Molokin, A., Morán, P., Serrano-Vázquez, A., González, E. (2019). Use of next-generation amplicon sequencing to study *Blastocystis* genetic diversity in a rural human population from Mexico. *Parasit Vectors*, 12(1), 566.
 397. Garcia, J. A. and Cimerman, S. (2012). Detection of *Dientamoeba fragilis* in patients with HIV/AIDS by using a simplified iron hematoxylin technique. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(2), 156-8.

398. Burgaña, A., Abellana, R., Yordanov, S. Z., Kazan, R., Pérez Ortiz, A. M., Ramos, C. C. (2019). Paromomycin is superior to metronidazole in *Dientamoeba fragilis* treatment. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 11, 95-100.
399. Yoshikawa, H., Dogruman-Al, F., Turk, S., Kustimur, S., Balaban, N. and Sultan, N. (2011). Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitology Research*, 109(4), 1045-50.
400. Sarzhanov, F. and Dogruman-Al, F. (2017). Preliminary study for comparison of commercial kits for isolation of *Blastocystis* sp. DNA in stool samples from patients. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 33(4), 178-181.
401. Babaei, Z., Oormazdi, H., Rezaie, S., Rezaeian, M. and Razmjou, E. (2011). *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Experimental Parasitology*, 128(2), 159-62.
402. Dagci, H., Kurt, Ö., Demirel, M., Mandiracioglu, A., Aydemir, S., Saz, U. (2014). Epidemiological and diagnostic features of *Blastocystis* infection in symptomatic patients in izmir province, Turkey. *Iranian Journal of Parasitology*, 9(4), 519-529.
403. Lagacé-Wiens, P. R., VanCaeseele, P. G. and Koschik, C. (2006). *Dientamoeba fragilis*: An emerging role in intestinal disease. *Cmaj*, 175(5), 468-9.
404. Maloney, J. G., Lombard, J. E., Urie, N. J., Shivley, C. B. and Santin, M. (2019). Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. *Parasitology Research*, 118(2), 575-582.
405. Maloney, J. G., Molokin, A., da Cunha, M. J. R., Cury, M. C. and Santin, M. (2020). *Blastocystis* subtype distribution in domestic and captive wild bird species from Brazil using next generation amplicon sequencing. *Parasite Epidemiology and Control*, 9, e00138.
406. Sakalar, C., Uyar, Y., Yürürdurmaz, M., Tokar, S., Yeşilkaya, H., Gürbüz, E. (2013). Cloning of *Blastocystis* sp. subtype 3 small-subunit ribosomal DNA. *Türkiye Parazitoloji Derneği*, 37, 13-8.
407. Ertuğ, S., Malatyalı, E., Ertabaklar, H., Özlem Çalışkan, S. and Bozdoğan, B. (2015). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates and evaluation of clinical symptoms detected in Aydın province, Turkey. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(1), 98-104.
408. Boral, Ö., Payçu, D., Akgül, A. and Issever, H. (2017). *Blastocystis* spp. saptanan 50 semptomatik hastada subtip dağılımının saptanması. *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3, 6-10.
409. Alfellani, M. A., Stensvold, C. R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E. S., Fagbenro-Beyioku, A. F. and Clark, C. G. (2013). Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Tropica*, 126(1), 11-8.





EK-1. Etik Kurul Raporu

Evrak Tarih ve Sayısı: 20/05/2017-E.73536



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Etik Komisyonu



Sayı : 77082166-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 24/04/2017 tarihli 14574941-100- 60425 sayılı yazı

İlgi yazınız ile göndermiş olduğunuz, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı **Doktora Öğrencisi Fakhreddin SARZHANOV'un Doç.Dr.Funda DOĞRUMAN AL** danışmanlığında yürüttüğü **"İmmün Yeterli ve İmmün Yetmezlikli İshalli Olgularda Gözden Kaçan Protozoonların Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması"** adlı tez çalışması ile ilgili konu Komisyonunuzun 09.05.2017 tarih ve 05 sayılı toplantısında görüşülmüş olup,

İlgilinin çalışmasının, Gazi Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmadığına oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Alper CEYLAN
Komisyon Başkanı

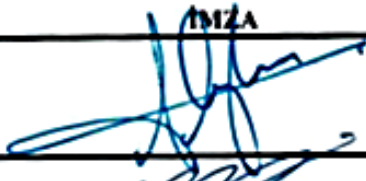
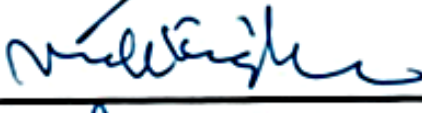
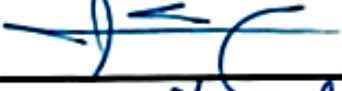
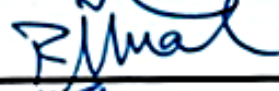
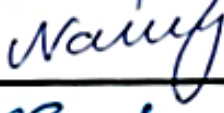
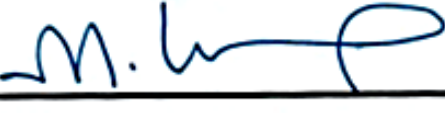
Araştırma Kod No: 2017-248

Ek:1 Liste

Ankara
Tel :0(312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0(312) 202 38 76
İnternet Adresi : <http://etikkomisyon.gazi.edu.tr/>

Bilgi için : Bengül BOŞNAK
Genel Evrak Sorumlusu

EK-1. (devam) Etik Kurul Raporu

GAZİ ÜNİVERSİTESİ ETİK KOMİSYONU KATILIM LİSTESİ	
TOPLANTI TARİHİ : 09.05.2017	TOPLANTI SAYISI : 05
ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Alper CEYLAN BAŞKAN	
Prof.Dr.Mustafa N.İLHAN BAŞKAN YRD.	
Prof.Dr.Mehmet KÜÇÜKKURT	
Prof.Dr.Fatma GÜMÜŞ	
Prof.Dr.Rahmi ÜNAL	
Prof.Dr.Mehmet Sayım KARACAN	
Prof.Dr.Naciye YILDIZ	
Prof.Dr.Mustafa SARIKAYA	
Prof.Dr.İbrahim DOĞAN	
Prof.Dr.C. Haluk BODUR	
Prof.Dr.Mustafa İLBAŞ	
Prof.Dr.Füsün DEMİREL	KATILMADI
Doç.Dr.Tuncay ÖNDER	KATILMADI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SARZHANOV Fakhriddin
 Uyuğu : KAZAKİSTAN
 Doğum tarihi ve yeri : 02.02.1987, KAZAKİSTAN
 Medeni hali : Evli
 Telefon : +905061806887, +77056818787
 Faks : -
 e-mail : fakhriddin.sarjanov@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji	2014 – Devam ediyor
Yüksek Lisans	Ahmet Yesevi Üniversitesi, Biyoloji	2008 – 2010
Lisans	Ahmet Yesevi Üniversitesi, Biyoloji	2004 – 2008

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2011-2014	Ahmet Yesevi Üniversitesi, Tıp Fakültesi	Öğretim görevlisi

Yabancı Dil

Rusça, İngilizce

Yayınlar

- Atalay, H.T., Uysal, B.S., **Sarzhanov, F.**, Usluca, S., Yeşilirmak, N., Özmen, M.C., Dogruman-Al, F., & Bilgihan, K. (2020). Rose bengal-mediated photodynamic antimicrobial treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Current Eye Research*, 1-6. doi:10.1080/02713683.2020.1731830
- Dogruman-Al, F., **Sarzhanov, F.**, & Erganis, S. (2019). Is *Blastocystis* spp. friendly?: A Current view of the intestinal microbiota. *European Journal of Therapeutics*, 25(4), 239-242. doi:10.5152/EurJTher.2019.18086
- Güreser, A.S., Duman, G.G., **Sarzhanov, F.**, Karasartova, D., Dogruman-Al, F., & Taylan Ozkan, A. (2019). Western blot assay of anti-*Echinococcus granulosus* antibody positive serum samples by indirect haemagglutination method. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 76(2), 195-202. doi:10.5505/TurkHijyen.2019.03779
- Atalay, H. T., Dogruman-Al, F., **Sarzhanov, F.**, Özmen, M. C., Tefon, A. B., Arıbaş, Y. K., & Bilgihan, K. (2018). Effect of Riboflavin/Rose Bengal-Mediated PACK-CXL on *Acanthamoeba* trophozoites and cysts in vitro. *Current Eye Research*, 43(11), 1322-1325. doi:10.1080/02713683.2018.1501074
- Sarzhanov, F.** and Dogruman-Al, F. (2017). Preliminary study for comparison of commercial kits for isolation of *Blastocystis* sp. DNA in stool samples from patients. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 33(4), 178-181.
- Yildiz, S., Doğan, İ., Doğruman-Al, F., Nalbantoğlu, U., Üstek, D., **Sarzhanov, F.**, & Yildirim, S. (2016). Association of Enteric Protist *Blastocystis* spp. and Gut Microbiota with Hepatic Encephalopathy. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 25(4), 489-497. doi:10.15403/jgld.2014.1121.254.yiz



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

