

**T.C**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KANSER TANISI ALAN HASTALARDA *DIENTAMOEB*  
*FRAGILIS*'İN MOLEKÜLER PREVALANSI VE MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan**  
**Makbule SALLANBAŞ**

**Danışman**  
**Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Ağustos 2025**  
**KAYSERİ**



T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

KANSER TANISI ALAN HASTALARDA *DIENTAMOEBA*  
*FRAGILIS*'İN MOLEKÜLER PREVALANSI VE MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU

Yüksek Lisans Tezi

Hazırlayan  
Makbule SALLANBAŞ

Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2024-13430 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Ağustos 2025  
KAYSERİ

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

**Adı-Soyadı: Makbule SALLANBAŞ**

**İmza:**

## YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

**“Kanser Tanısı Alan Hastalarda *Dientamoeba fragilis*’ in Moleküler Prevalansı ve Moleküler Karakterizasyonu”** adlı **Yüksek Lisans Tezi** Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**

**Makbule SALLANBAŞ**

**Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK**

**Anabilim Dalı Başkanı**

**Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK**

**Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK** danışmanlığında **Makbule SALLANBAŞ** tarafından hazırlanan “**Kanser Tanısı Alan Hastalarda *Dientamoeba Fragilis*’in Moleküler Prevalansı ve Moleküler Karakterizasyonu**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

..... / ..... / .....

**JÜRİ:**

Danışman : **Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK** .....

Üye : **Prof. Dr. Önder DÜZLÜ** .....

Üye : **Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk ŞAHİN** .....

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / ..... / .....

**Prof. Dr. Aydın ALAN**

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tıbbi parazitoloji Anabilim Dalında lisansüstü eğitimim boyunca, desteğini hissettiğim çalışmalarına büyük bir özveri ile katkıda bulunan tez danışmanım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK'E,

Lisansüstü eğitimim boyunca desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, akademik bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına büyük bir özveri ile gerek manevi gerekse bilimsel desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK'E, Dr. Öğr. Üyesi Ozan YAMAN'A ve Arő. Gör. Emrah ERDOğAN'A,

Tezimin laboratuvar çalıőmalarında beni yalnız bırakmayan bana yardımcı olan desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Eda SİVCAN, Tuba ŐABANOęLU ve Hanife TEMEL'e, diğer lisansüstü öğrencilerine ve parazitoloji çalıőanlarına,

Çalışma süresince TYL-2024-13430 kodlu proje ile maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeler Birimi'ne,

Büyük bir fedakarlık ve anlayıőla her konuda olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da beni destekleyen ve yaőamımın her döneminde bana duydukları güven için değerli aileme teşekkür ederim.

**Makbule SALLANBAŞ**

**KAYSERİ, Ağustos 2025**

# KANSER TANISI ALAN HASTALARDA *DIENTAMOEBA FRAGILIS*'İN MOLEKÜLER PREVALANSI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Makbule SALLANBAŞ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Parazitoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2025

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK

## ÖZET

*Dientamoeba fragilis*, insanların çekum ve kalın bağırsağının lümeninde yaşayan, yalnızca trofozoit şekli bulunan patojen kamçılı bir protozoondur. Dientamoebiasis, *Dientamoeba fragilis*'in neden olduğu, başlıca karın ağrısı, diyare ve gaz şikayetleri ile karakterize sindirim sistemi rahatsızlıklarına neden olan bir enfeksiyondur. Önceleri patojen olmadığı düşünülen *D. fragilis*'in bugün patojen olduğu ve tanı konulan hastaların tedavi edilmesi gerektiği bildirilmektedir. Özellikle kanser hastalarında önemi artan bu parazitozun moleküler tiplerinin kanser hastalıklarıyla ilişkisi hakkında veriler kısıtlıdır. Bu nedenle tanıda yönlendirici olması açısından semptomların inceleyen ve semptomlarla parazit genotipleri arasındaki ilişkiyi aydınlatan çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışma ile farklı kanser tiplerinin dahil edildiği hasta gruplarında *Dientamoeba fragilis*'in PCR tabanlı moleküler yöntemlerle araştırılarak parazitin moleküler prevalansının belirlenmesi ve moleküler karakterinin hastalık ile olan ilişkisi hakkında yeni verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, farklı kanser tiplerinin dahil edildiği hasta gruplarında *Dientamoeba fragilis* PCR tabanlı moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Çalışma kapsamına alınan hastalardan toplanan ve kontrol grubunu oluşturacak olan sağlıklı gönüllülerden alınan dışkı örnekleri çalışma kapsamındadır. Çalışmada, toplanan örneklerin total genomik DNA izolasyonunun ardından PCR testleri yapılmış ve *Dientamoeba fragilis* bakımından pozitif olduğu tespit edilen örneklerin dizi analizi yapılmıştır. Buna göre, kolon, rektum, lösemi, lenfoma ve diğer kanser tipleri ile hasta olan toplam 100 olgudan 6'sının aynı anda standart PCR ile de pozitif olduğu görülen, 11 olgunun qPCR ile pozitif olduğu tespit edilmiştir. Kanser tanılı kadın ve erkek hastalar arasında parazitin dağılımında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. *D. fragilis* ile enfekte olgulardan elde edilen izolatların sekans bilgisi incelendiğinde ortak bir dizi bilgisine sahip oldukları görülmüş ve bu dizinin GC oranının %38,2, AT oranının ise %61,8 olduğu, 118. ve 189. nükleotidlerinde sırasıyla A-C ve A-T değişimlerinin olduğu farklı bir genotip tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada kanser tanısı alan hastalar ile bu parazitin tespit edilen genotiplerinin arasında klinik bulguları etkileyebileceği düşünülen moleküler düzeyde bir ilişki olabileceğini gösterilmiştir. Parazitin genotiplerinin, çalışma kapsamına alınan olgularda klinik belirtilere etkisine ışık tutan bir çalışmadır. Bu çalışmanın, epidemiyolojik çalışmalara olduğu kadar tanı çalışmalarına da katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Çölyak Hastalığı; Crohn Hastalığı; *Dientamoeba fragilis*; Genotiplendirme; Ülseratif Kolit.

**MOLECULAR PREVALENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
*DIENTAMOEBIA FRAGILIS* IN PATIENTS DIAGNOSIS OF CANCER**

**Makbule SALLANBAŞ**

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences**

**Department of Parasitology**

**Master Thesis, August 2025**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Merve YÜRÜK**

**ABSTRACT**

*Dientamoeba fragilis* is a pathogenic flagellated protozoan that lives in the lumen of the cecum and large intestine of humans and exists only in trophozoite form. Dientamoebiasis is an infection caused by *Dientamoeba fragilis*, which causes digestive system disorders characterized by abdominal pain, diarrhea, and gas. Previously thought to be non-pathogenic, *D. fragilis* is now reported to be pathogenic and patients diagnosed should be treated. Data on the relationship between the molecular types of this parasitosis, which is of increasing importance especially in cancer patients, and cancer diseases are limited. Therefore, studies examining the symptoms and illuminating the relationship between symptoms and parasite genotypes are needed to guide diagnosis. This study aimed to determine the molecular prevalence of the parasite by investigating *Dientamoeba fragilis* in patient groups with different cancer types using PCR-based molecular methods and to obtain new data on the relationship between its molecular characteristics and the disease. For this purpose, *Dientamoeba fragilis* was investigated in patient groups with different cancer types using PCR-based molecular methods. The study included stool samples collected from patients included in the study and healthy volunteers who will form the control group. In the study, PCR tests were performed after total genomic DNA isolation of the collected samples and sequence analysis was performed on samples found to be positive for *Dientamoeba fragilis*. Accordingly, of the 100 cases diagnosed with colon, rectum, leukaemia, lymphoma, and other types of cancer, six were simultaneously positive by standard PCR, and 11 were positive by qPCR. No significant difference between male and female cancer patients was observed in the parasite distribution. Sequence analysis of isolates obtained from *D. fragilis*-infected cases revealed a common sequence. A distinct genotype was identified with a GC ratio of 38.2%, an AT ratio of 61.8%, and A-C and A-T substitutions at nucleotides 118 and 189, respectively. In conclusion, this study has shown that there may be a molecular relationship between patients diagnosed with cancer and the genotypes detected in this parasite, which is thought to affect clinical findings. It is a study that sheds light on the effect of the genotypes of the parasite on clinical symptoms in the cases included in the study. It is thought that this study will contribute to diagnostic studies as well as epidemiological studies.

**Keywords:** Crohn's Disease; Celiac Disease; *Dientamoeba fragilis*; Genotyping; Ulcerative Colitis,

## İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI .....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
KISALTMALAR ve SİMGELER .....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Giriş.....	3
2.2. Tarihçe .....	3
2.3. Sınıflandırma.....	4
2.4. Morfoloji .....	4
2.5. Hayat Döngüsü .....	5
2.6. Epidemiyolojisi .....	6
2.7. Dünyadaki Dağılımı .....	7
2.8. Türkiye’deki Dağılımı .....	7
2.9. Hastalığın Bulaşması ve Bulaşma Yolları .....	8
2.10. Patogenez ve Klinik Belirtiler .....	8
2.11. Tanı .....	9
2.12. Tedavi.....	10
2.13. Koruma ve Kontrol.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	12
3.1. GEREÇ.....	12
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	12
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler .....	12
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Solüsyon ve Kitler .....	12

3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. Örneklerin Toplanması .....	13
3.2.2. Moleküler Testler .....	14
3.2.2.1. Dışkı Örneklerinden Genomik DNA Ekstraksiyonu.....	14
3.2.2.2. Pozitif Kontrolün Klonlanması .....	15
3.2.2.2.1. <i>Dientamoeba fragilis</i> Spesifik Small Subunit rRNA (SSU-rRNA) Gen Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu .....	15
3.2.2.2.2. Klonlanlama ve Plazmid DNA İzolasyonu .....	16
3.2.2.2.3. Plazmitin Saflaştırılması.....	18
3.2.2.3. Tüm Örneklerin PCR ve QPCR Analizleri .....	18
3.2.3. İstatistiksel Analiz; Sekans Ve Filogenetik Analizler.....	19
4. BULGULAR.....	20
4.1. PCR ile Moleküler İnceleme sonucu elde edilen bulgular.....	20
4.2. Kanser Hasta Gruplarında PCR Analizleri .....	21
4.3. Sekans Analizi ve Filogenetik Karakterizasyon .....	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	30
6. KAYNAKLAR .....	34

## **EKLER**

## **ÖZGEÇMİŞ**

## KISALTMALAR ve SİMGELER

<b>µl:</b>	Mikrolitre
<b>AIDS:</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome
<b>bç:</b>	Baz çifti
<b><i>D.fragilis:</i></b>	<i>Dientamoeba fragilis</i>
<b>dk:</b>	Dakika
<b>EIA:</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>g:</b>	Gram
<b>GIS:</b>	Gastrointestinal Sistem
<b>MgCl<sub>2</sub>:</b>	Magnezyum klorür
<b>HIV:</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>kg:</b>	Kilogram
<b>MBD:</b>	Modified Boeck ve Drbohlav's Medium
<b>mg:</b>	Miligram
<b>ml:</b>	Mililitre
<b>mM:</b>	Milimolar
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PVA:</b>	Polivinil Alkol
<b>SAF:</b>	Sodyum Asetat-Asetik Asit-Formol
<b>SSU RDNA:</b>	Small-Subunit Ribosomal deoxyribonucleic acid

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.</b>	<i>Dientamoeba fragilis</i> ' in taksonomik sınıflandırması şu şekildedir.....	4
<b>Tablo 2.2.</b>	2012 yılında Hastalık Kontrol Merkezi tarafından dientamoebiasisin tedavisi için önerilen tedavi seçenekleri listesi.....	11
<b>Tablo 3.1.</b>	Deney gruplarının yaş, cinsiyet ve kişi sayıları.....	14
<b>Tablo 3.2.</b>	<i>D. fragilis</i> SSU rRNA geni için PCR koşulları .....	16
<b>Tablo 3.3.</b>	Ligasyon için hazırlanan karışım.....	17
<b>Tablo 3.4.</b>	QPCR Döngüleri .....	19
<b>Tablo 4.1.</b>	PCR sonucunda kanser hasta gruplarında tespit edilen pozitiflikler .....	22
<b>Tablo 4.2.</b>	QPCR sonucunda hasta ve kontrol gruplarında Cq değerleri.....	23
<b>Tablo 4.3.</b>	QPCR sonucunda kanser hasta gruplarında tespit edilen pozitiflikler .....	26
<b>Tablo 4.4.</b>	DfraCA-1 izolatının nükleotid içeriği.....	27

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1.** *Dientamoeba fragilis*’ in trofozoit formu ..... 5
- Şekil 2.2.** *Dientamoeba fragilis*’ in hayat döngüsü ..... 6
- Şekil 4.1.** *D. fragilis* SSU-rRNA gen bölgesinin Pozitif kontrol için PCR optimisasyonu; M: Marker, K: kontrol..... 21
- Şekil 4.2.** *D. fragilis* SSU-rRNA geni (364 bç) spesifik PCR ile elde edilen pozitif örneklerle ait jel görüntüleri; M: Marker, 1-6: Pozitif hastalar, P: Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol ..... 21
- Şekil 4.3.** *D. fragilis* SSU-rRNA geni spesifik QPCR ile elde edilen tüm örneklerle ait amplifikasyon eğrileri ..... 25
- Şekil 4.4.** *D. fragilis* SSU-rRNA data setindeki izolatlarla ait nükleotid sekansı..... 27
- Şekil 4.5.** *Dientamoeba fragilis* SSU-rRNA data setindeki izolatların NJ analizine göre filogenetik analiz sonuçları. Nodların önündeki rakamlar bootstrap (1000 tekrar) desteğini göstermektedir. Çalışmada elde edilen izolat DfraCA-1 olarak isimlendirilmiştir. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir..... 28
- Şekil 4.6.** *D. fragilis* SSU-rRNA data setindeki izolatlarla ait nükleotid sekanslarının çoklu hizalama analiz sonuçları. .... 29

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Dientamoeba fragilis*, insanların gastrointestinal sisteminde bulunan bir protozoon parazittir. İlk kez Jepps ve Dobell tarafından 1918'de bilimsel literatürde tanımlanmış ve antijenik analiz, elektron mikroskobu ve küçük alt birim ribozomal RNA (SSU rRNA) geninin moleküler çalışmaları organizmanın trikomonadlarla yani kamçılılara yakın akraba olduğunu göstermiştir. Son çalışmalar bu organizmanın patojenik potansiyelini belgelemiştir ve *D. fragilis* ile enfekte hastaların çoğunluğu ishal, gevşek dışkılama ve karın ağrısı gibi gastrointestinal semptomlar göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, dientamoebiasiste kronik semptomların yaygın olduğu, hastaların %32'sinin kalıcı ishalden şikayetçi olduğu ve tanı alan hastaların tedavi edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Crotti ve ark., 2005; Stark ve ark., 2005; Vandenberg ve ark., 2006). Dientamoebiasis tedavisinde en iyi uygulamanın ne olduğu konusunda şu anda bir fikir birliği yoktur ve tedavi seçeneklerini değerlendirmek için geniş çaplı randomize kontrollü çalışmalar yapılmamıştır.

Özellikle kanser hastalarında önemi artan bu parazitozun moleküler tiplerinin kanser hastalıklarıyla ilişkisi hakkında verilerin kısıtlı olması ileri araştırmalara ihtiyaç doğurmaktadır. Bu nedenle, parazitin bu hasta grupları arasındaki yaygınlığının hassas yöntemlerle yüksek doğrulukta ortaya konulması önemlidir. Tanıda yönlendirici olması açısından semptomların incelenmesi ve semptomlarla parazit genotipleri arasındaki ilişkinin aydınlatılması, epidemiyolojik çalışmaları olduğu kadar tanı çalışmalarına da katkı sağlayacaktır.

Dolayısıyla “Kanser Tanısı Alan Hastalarda *Dientamoeba fragilis*'in Moleküler Prevalansı ve Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı çalışma ile farklı kanser tiplerinin dahil edildiği hasta gruplarında *Dientamoeba fragilis*'in PCR tabanlı moleküler yöntemlerle araştırılarak kanser hastalarında *Dientamoeba fragilis*'in moleküler

prevalansını belirlemek ve bu parazitin moleküler karakterinin hastalık ile olan ilişkisi hakkında yeni veriler sağlamak amaçlanmıştır.

Bu ana amaç doğrultusunda, proje kapsamına alınan kanser hastalarına ait dışkı örnekleri toplanmış ve izolatlar elde edilmiş, *Dientamoeba fragilis* SSU rRNA Gen Bölgesine spesifik primerler kullanılarak optimizasyonunun ardından PCR analizleri yapılmış, plazmite klonlarak sekans analizlerine hazır hale getirilmiştir.

İzolatlara ait sekans verilerinin elde edilerek, Blast analizleri ve Geneious 9.1.3 yazılımı kullanılarak filoetik analizler yapılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılığı incelenerek belirtilen kanserli hasta gruplarında *Dientamoeba fragilis*'in moleküler olarak prevalansı ve moleküler karakteri proje kapsamında belirlenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Giriş

*Dientamoeba fragilis* (*D. fragilis*), insanın kolonuna yerleşen amibik bir morfolojiye sahip, kamçılı bir protozoondur (van Gestel ve ark., 2019). Dientamoebiasiste kaynak enfekte insanlardır. Konak zinciri insan-insan-insandır (Johnson ve ark., 2004). Tanı genellikle dışkı örneklerinden hazırlanan kalıcı boya preparatlarının mikroskopik incelemesi dayanmaktadır (Gureser ve ark., 2023; Johnson ve ark., 2004). Dünya çapında dağılıma sahip olan bu parazitin prevalansı %11 arasında değişmektedir (Stark ve ark., 2010) ila %71 (de Jong ve ark., 2014). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise *D. fragilis* prevalansı İzmir, Van, Malatya, Manisa, Çorum, Malatya ve Ankara bölgesinde sırasıyla %0,2, %0,4, %0,4, %1,02, %8,4, %0,6 ve %13,3 olarak bildirilmiştir (Calik ve ark., 2011; Gureser ve ark., 2023; İnal ve ark., 2022).

### 2.2. Tarihçe

*Dientamoeba fragilis*, ilk kez Jepps ve Dobell tarafından 1918 yılında tanımlanmıştır (Mumcuoğlu ve ark., 2013). Çift nükleuslu ve dış ortamda “fragil” olması nedeniyle bu isimlendirme yapılmıştır (Windsor ve ark., 1999). Taze preparatlarda psödopodları ile amibik hareketler yapması nedeniyle önceleri amipler arasında sınıflandırılmıştır. Fakat elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda çekirdek yapısının kümes hayvanlarının paraziti olan *Histomonas meleagridis*'e morfolojik olarak benzemesinden dolayı kamçılılar alemine mensup bir protozoon olabileceği düşünülmüş, *Entamoeba* cinsi içindeki parazitlerde olmayan atraktafor ve parabazal cisimcik benzeri organeller içerdiği ve kamçılı parazitlerin nükleoplazmasında görülen kromatin cisimcikleri içerdiği tespit edilmiştir (Güreser ve ark., 2004). Moleküler seviyede incelemeler sonrası SSU-rRNA dizi analizleri kullanılarak yapılan filogenetik çalışmalarda, *D. fragilis*'in kamçılı protozoonlarla yakın evrimsel ilişkiye sahip bir parazit olduğunu

göstermiştir; ancak *D. fragilis*'in kendisinde kamçı bulunmamaktadır (Silberman ve ark., 1996).

### 2.3. Sınıflandırma

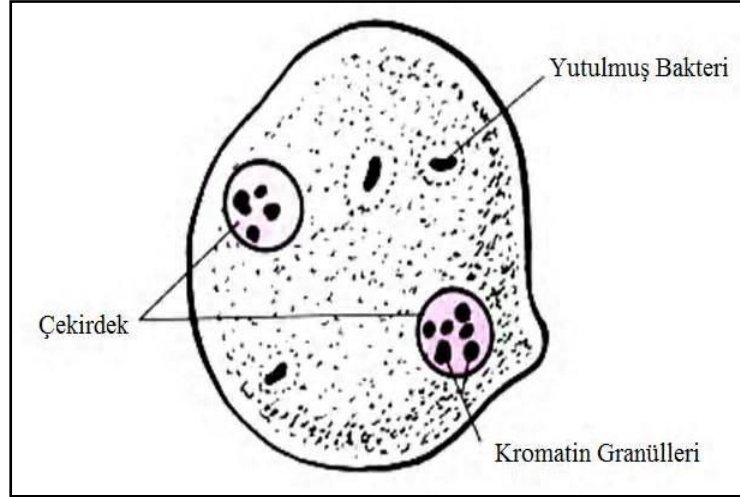
**Tablo 2.1.** *Dientamoeba fragilis*' in taksonomik sınıflandırması şu şekildedir (Girginkardeşler ve ark., 2007).

<b>Şube</b>	Protozoa
<b>Alt şube</b>	Sarcomastigophora
<b>Üst sınıf</b>	Mastigophora
<b>Sınıf</b>	Zoomastigophora
<b>Takım</b>	Trichomonadida
<b>Aile</b>	Monocercomonadidae
<b>Cins</b>	<i>Dientamoeba</i>
<b>Tür</b>	<i>Dientamoeba fragilis</i>

### 2.4. Morfoloji

*Dientamoeba fragilis*'in trofozoitlamak üzere tek tip yaşam formu tespit edilmiştir. Amip benzeri bu kamçılı organizmanın kist formu bulunmaz ve *D. fragilis*'in amibe benzeyen trofozoit formunun ebatı 3-22 µm arasında değişkenlik gösterebilir. Dış ortam koşullarına dayanıksız olan trofozoit formu kolayca bütünlüğünü kaybedebilmektedir. Hassas yapısı nedeniyle tür ismi olan 'fragilis' ile isimlendirilmiştir (Girginkardeşler ve ark., 2007). İnce granüler yapıya sahip bir sitoplazması vardır ve bu sitoplazma içinde bakteri veya maya gibi mikroorganizmaların fagosite edildiği çok sayıda besin vakuolu bulunur. Çekirdek zarında periferik kromatin görülmez, çekirdekçik ise tipik olarak geniş ve merkezi yerleşimli, genellikle dört veya birkaç tane granülden meydana gelmektedir (Girginkardeşler ve ark., 2007) (Şekil 2.1).

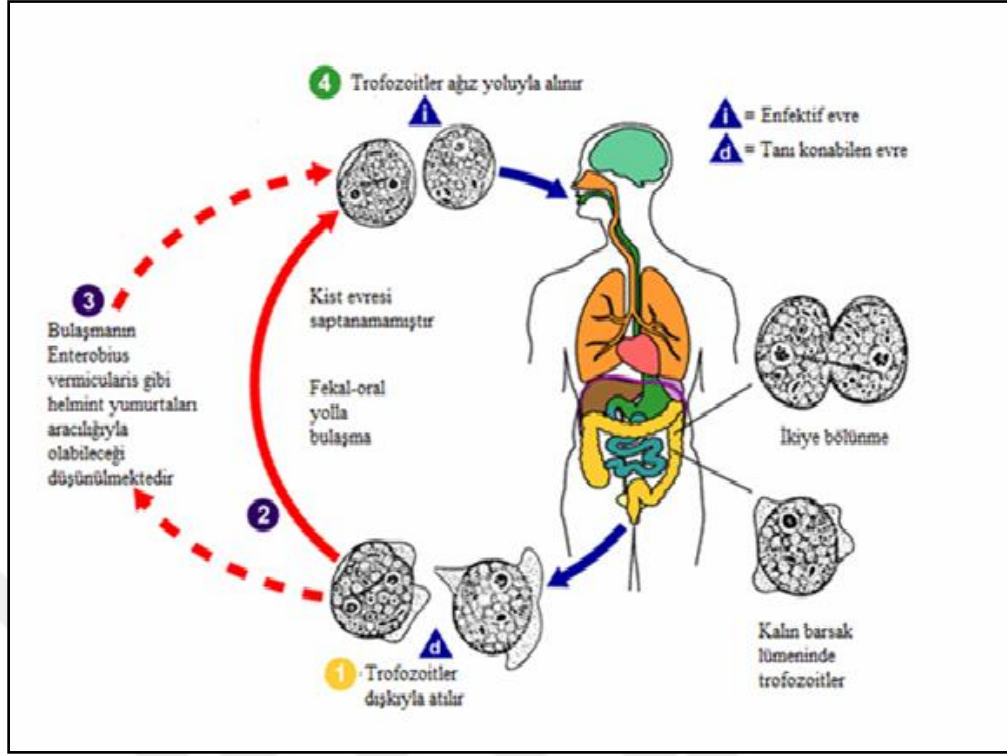
Taze preparatlarda ve kültürde, pseudopodları aracılığıyla hareket ettiği gözlemlenebilir. Daimi boyalı preparatlarda *D. fragilis* trofozoitlerinin %60-80 oranında iki, %20-40 oranında bir, nadiren de üç veya dört nükleuslu olduğu tespit edilmiştir. Uygun koşullarda iki nükleuslu şekli gözlemlenirken, tek nükleuslu şekline daha çok elverişsiz koşullarda rastlandığı bildirilmiştir.



Şekil 2.1. *Dientamoeba fragilis*' in trofozoit formu

## 2.5. Hayat Döngüsü

*Dientamoeba fragilis*'in son konağı insan olan monoksen bir parazit olduğu bildirilmiştir. *D. fragilis* için geliştirilen bir hayvan modeli yoktur. Bazı primatları, memelileri, kuşları ve domuzlarında enfekte edebildiği bildirilmiştir (Caccio ve ark., 2012). Parazitin kist formunun henüz gösterilememiş olması nedeniyle hayat döngüsünün insandan insana trofozoitlerin ağız yoluyla alınması yani fekal-oral yolla tamamlandığı bildirilmiştir. Trofozoitler insana kontamine ürünler veya *E.vermicularis* gibi bazı helmint yumurtaları aracılığıyla bulaşabilir. Parazit insanın çekum veya kolon lümenine yerleşerek dientamoebiosis'e neden olmaktadır (Windsor ve ark., 1999) (Şekil 2.2). Bağırsak lümenindeki trofozoitler dışkı ile dış ortama atılırlar ve yeniden başka bir konağın ağız yolu ile trofozoitleri almasıyla hayat döngüsü tamalanarak, bu şekilde tekrar eder.



Şekil 2.2. *Dientamoeba fragilis*' in hayat döngüsü

## 2.6. Epidemiyolojisi

Daha önceleri *D. fragilis*'in yaygın bir parazit olmadığını ileri sürülmüştür. Daha sonraki çalışmalarda ise *D. fragilis*'in prevalansının tanı yöntemine bağlı olarak %0.3 ile %52 olabileceği bildirilmiştir (Barratt ve ark., 2011; Stark ve ark., 2010; Verweij ve ark., 2007; Windsor ve ark., 2003). Prevalansı çalışmalarının çoğunda ışık mikroskopunun kullanıldığı bildirilmektedir. Mikroskopi ile birlikte PCR ve kültür yöntemleri gibi diğer tekniklerin bir arada kullanılması *D. fragilis*'in görülebilirliği büyük ölçüde arttırdığı bildirilmektedir (Bruijnesteijn ve ark., 2009; Stark ve ark., 2010; Rayan ve ark., 2007; Windsor ve ark., 2003).

Parazitin yaş, cinsiyet, İBS, HIV enfekte hastalar arasında bir ilişki olduğu söylenmektedir (Barratt ve ark., 2011). *D. fragilis*'in, memelileri, kuşları ve primatları enfekte ettiği (goriller, macaques ve babunların) bildirilmiştir. İtalya'da domuzlarda %43.8 oranında prevalansı olduğu bildirilmiştir (Caccio ve ark., 2012).

## 2.7. Dünyadaki Dağılımı

*Dientamoeba fragilis* tüm dünyada, çok farklı insidanslarda görülmektedir. Dünyadaki prevalansı %1.4 ile %52 arasında değişmektedir (Johnson ve ark., 2004). Kanada’da 1970-74 yılları arasında bağırsak parazitlerini araştırmak için 43.000 kişi üzerinde yapılan bir çalışmada %4.2 oranında *D. fragilis* saptanmıştır (Yang ve ark., 1977). Los Angeles’da sosyoekonomik düzeyi düşük bir topluluk üzerinde yapılan çalışmada; 220 kişinin 115’inde (%52) dientamoebiasis saptanmıştır. Ülkemizde *D. fragilis* üzerinde kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Millet ve ark., 1983). Barcelona’da 1981 yılında bir hastanenin mikrobiyoloji laboratuvarında parazitolojik inceleme için gönderilen 650 dışkı örneğinin 183’ünde (%28.2) bağırsak protozoonları belirlenirken, tüm dışkı örneklerinin %7.8’inde *D. fragilis* saptanmıştır (Portus ve Prats, 1981). Ülkemizde yapılan sınırlı sayıdaki araştırmada nativ-lugol, formol eter konsantrasyon ve trikrom boyama yöntemlerinin karşılaştırılmasının yapıldığı çalışmada 311 dışkı örneğinin %0,3’ünde Ok ve ark. (1996), *Blastocystis hominis* yaygınlığının araştırıldığı bir çalışmada 248 dışkı örneğinin %1,2’inde Üner ve ark. (1997), demir eksikliği saptanan erişkin hastalarda bağırsak protozoa insidansının nativ-lugol, formol etil asetat ve trikrom boyama yöntemlerinin uygulanarak araştırıldığı çalışmada ise 100 hastadan oluşan çalışma grubunun % 2’sinde Yereli ve ark. (1998), sindirim sistemi yakınması olan hastalarda dientamobiasis sıklığını araştırmak için koproloji laboratuvarına başvuran 400 hastanın %8,8’inde *D. fragilis* saptanmıştır (Girginkardeşler ve ark., 2003).

## 2.8. Türkiye’deki Dağılımı

Yurdumuzda bağırsak parazitlerinin araştırıldığı çalışmalarda *D. fragilis*’in saptandığı bazı çalışmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada, diyare ve karın ağrısı şikayeti olan 400 olgudan %8.8’inde (Girginkardeşler ve ark., 2003), mikroskopik incelemelerin ve EIA testlerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada 380 olgunun %2.3’ünde (Tanyüksel ve ark., 2005), 241 temizlik işçisi arasında yapılan başka bir çalışmada alınan selofan bant ve dışkı incelemeleri sonucu 2 kişide (Karaman ve ark., 2006), ilköğretim öğrencilerinde bağırsak parazitlerinin yayılışını araştıran bir çalışmada, nativ-Lugol, flotasyon ve trikrom yöntemi kullanılmış ve 2975 öğrencinin %4’ünde (Taş ve ark., 2009), nativ-lugol, trikrom ve asit-fast gibi farklı boyama yöntemlerinin kullanılarak bağırsak parazitlerinin sıklığının incelendiği çalışmada 2264 hastanın, %0.9’unda

(Karaman ve ark., 2011), arasında mikrosporidian parazitlerinde bulunduğu bazı intestinal parazitlerin prevalansının araştırıldığı ve çeşitli boyama yöntemlerinin kullanıldığı çalışmada 1,181 hastanın %0.7'inde (Çalık ve ark., 2011), intestinal parazitlerin direkt mikroskopisinin incelenmesiyle, 225 dışkı örneğinin intestinal parazitler açısından 64'ü pozitif olan hastalardan 3'ünde (Doğan ve ark., 2012), retrospektif bir çalışmada 85,707 dışkı örneğinin %9'unda *D. fragilis*'e rastlanmıştır (Gülmez ve ark., 2013).

## 2.9. Hastalığın Bulaşması ve Bulaşma Yolları

*Dientamoeba fragilis*'in kist formunun gösterilememesi genellikle direkt fekal-oral bulaşmayı akla getirmektedir (Clark ve ark., 2014). Bazı araştırmacılar, *D. fragilis*'in, *Trichuris*, *Ascaris* ve *Enterobius* gibi insan nematodlarının yumurtaları ile *Histomonas* 'larda olduğu gibi taşınabileceğini söylemişlerdir (Dobell ve ark., 1940).

Röser ve ark. tarafından kıl kurdu yumurtalarında *D. fragilis*'e ait DNA'nın olup olmadığının araştırılmıştır (Röser ve ark., 2013). Ögren ve ark. tarafından Real-Time PCR kullanarak yapılan çalışmada, *E. vermicularis* yumurtalarında 21 örneğin 18'inde (%85) *D. fragilis* DNA'sı tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, *E. vermicularis*'in, *D. fragilis*'in taşınmasında önemli bir role sahip olduğu desteklenmektedir (Ögren ve ark., 2013). *E. vermicularis*'in özellikle çocuklar arasında sık görülmesiyle parazitin taşınmasında önemli bir vektör olduğu bildirilmektedir (Burrows ve ark., 1956).

Yapılan bazı çalışmalarda ise *D. fragilis*'in yaşam döngüsü içinde bir kist evresinin bulunabileceği öne sürülmüştür (Munasinghe ve ark., 2013). Bu bulgular üzerine *D. fragilis*'in fekal-oral yolla aktarılması, dientamoebiasisin zoonotik bir hastalık olabileceğini düşündürmektedir (Barratt ve ark., 2011).

## 2.10. Patogenez ve Klinik Belirtiler

*Dientamoeba fragilis* dokuların içine girmez, ancak aşırı mukus salgılanması ve bağırsağın hipermotilitesi gibi mukoza irritasyonunu gösteren bazı kanıtlar vardır. *D. fragilis* enfeksiyonunda görülen belirtiler karın ağrısı, diyare, anoreksi, bulantı, kusma ve midede gazdır. Karın ağrısının karakteri, yerleşimi ve süresi oldukça değişkendir (Girginkardeşler ve ark., 2007). Dışkıda kan genellikle görülmez. Daha az görülen belirtiler ise baş ağrısı, ateş, kilo kaybı ve yorgunluktur. Ayrıca *D. fragilis* enfeksiyonlarında kaşıntı, ürtiker ve eosinofilinin görülebileceği de bildirilmiştir

(Girginkardeşler ve ark., 2007). Yalnızca *D. fragilis* saptanan 255 hastanın yarısından çoğunda ve önceden yapılan 19 çalışmada bildirilen 187 kayıtlı olguda diyare, karın ağrısı veya her ikisinin de görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca hastaların %11'inde anal kaşıntı olduğu saptanmıştır (Yang ve ark., 1977). *D. fragilis* saptadığımız 35 hastanın 32'sinde yalnızca bu parazit bulunurken, saf dientamoebiasis hastalarının tamamına yakınında sindirim sistemi yakınmaları belirlenmiştir. Bu yakınmalar arasında en sık olarak karın ağrısı (%81.3), diyare (%71.9), iştahsızlık (%15.6), yorgunluk (%9.4) ve azalan oranlarda diğer belirtiler saptanmıştır (Girginkardeşler ve ark., 2003).

### 2.11. Tanı

*Dientamoeba fragilis*'in tespit edilebilmesi, doğru tanının konulabilmesi için önemli etkiye sahiptir (Johnson ve ark., 2004). Nativ-lugol yöntemi ile hazırlanan preparatlarda *D. fragilis*'in iki çekirdekli nonspesifik görünümü nedeniyle zordur. Trofozoitlerin fragil yapısından dolayı dışkı hızlıca tespit edilmelidir (Johnson ve ark., 2004). Organizmanın dışkıda tanınabilir olarak kaldığı sürenin sınırlı olması nedeniyle, örneklerin ya dışkılamadan hemen sonra incelenmesi ya da uygun bir fiksatif içerisinde saklanması gerekmektedir. Bu amaçla, sodyum asetat-asetik asit-formalin (SAF), Polivinil alkol (PVA), modified Schaudinn's fiksatif ve fenol-alkol-formalin yaygın olarak kullanılan fiksatiflerdir. Daha sonra uygun boyama yöntemlerinin kullanıldığı daimi preparatların hazırlanması ve incelenmesi önerilmektedir (Spencer ve ark., 1982; Windsor ve ark., 1999). Demir hematoksilen boyama ve trikrom boyama yöntemleri parazitin tanısı için yaygın olarak kullanılan boyama yöntemleri arasındadır (Burrows ve ark., 1967; Johnson ve ark., 2004).

Genel olarak bağırsak parazitlerinin kültür ortamında üretilmeleri zor, zaman alıcı ve genellikle olumsuz sonuçlanabilmektedir. Bu kısıtlılıkları nedeniyle de rutin teşhis laboratuvarları tarafından uygulanmamaktadır. Bununla birlikte, Kültür yöntemleri *D. fragilis*'in tanısında kullanılmakta olup trofozoitlerin Dobell, Robinson ve Boeck-Drobohlav gibi difazik ve ksenik besiyerlerinde kolayca ürediği bilinmektedir (Girginkardeşler ve ark., 2007). Akselik kültür yöntemlerinde ise *D. fragilis*'in üretimi başarısız olmuştur (Chan ve ark., 1993; Chan ve ark., 1994). Ayrıca *D. fragilis* kültürünü, uzun süre devam eden pasajlarda yapmak zordur (Clark ve ark., 2002). Oda sıcaklığında 24 saat veya 4°C'de 10 saat saklanan dışkılarda *D. fragilis*' in kültüre

edilebildiği bildirilmiştir (Sawangjaroen ve ark., 1993).

Chan ve ark. (1993), saklanmış fekal örneklerde *D. fragilis* trofozoitlerini belirlemek için bir immünoflüoresan yöntem geliştirildiği bildirilse de *D. fragilis* için ticari immünolojik testler henüz mevcut değildir.

Dışkıdan DNA izolasyonunun yapılması ve izolasyon sonrası PCR testiyle enfeksiyonun tespit edilmesi de yaygınlaşmaktadır (Calderaro ve ark., 2010; Stark ve ark., 2005). *Dientamoeba fragilis*'in tanısı için SSU-rRNA geni hedef geleneksel PCR geliştirilmiştir (Stark ve ark., 2005). PCR yönteminin, %100 özgüllüğe ve %93,5 duyarlılığa sahip olup hızlı sonuç vermesigibi avantajları nedeniyle tanıda önemli ölçüde yararlı olacağı belirtilmiştir. Böylece parazitin tanısındaki teknik zorlukların ortadan kalkmış olacağı belirtilmiştir (Stark ve ark., 2006). Dışkı örneklerinden *D. fragilis*'i tanımlamak için geliştirilen diğer bir moleküler yöntem ise Real-Time PCR'dır. Bu yöntemde, TaqMan® prob ve/veya primerler ile LightCycler© sistemi kullanılmaktadır (Stark ve ark., 2006). Real-Time PCR yöntemi %100 duyarlılık ve özgüllük sahiptir ve standart PCR'dan farklı olarak ilave görüntüleme yöntemlerine ihtiyaç duymadan kısa bir sürede, hızlı sonuçlar vermektedir. Bu nedenle, konvansiyonel PCR yöntemlerinden daha avantajlı bir sistemdir (Peek ve ark., 2004; van Gool ve ark., 2003).

## **2.12. Tedavi**

Dientamobiasisin tedavisinde etkin kullanılan bazı antiparaziter ilaçlar ve ilaç kombinasyonlarının oluşturduğu protokoller mevcuttur. Dientamobiasisi tedavi etmek için Iodoquinol (diiodohydroxyquin) (Butler ve ark., 1996), metronidazol (Norberg ve ark., 2003), Paromomisin (Cuffari ve ark., 1998), ve tetrasiklin (Nagata ve ark., 2012) kullanılmaktadır. Bu ilaçların semptomları yok ettiği ve dientamobiasis tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. (Tablo 2.2)

Türkiye'de yapılan bir çalışmada; nitroimidazol türevi olan seknidazol kullanımının dientamobiasisi tedavi ettiği bildirilmiştir (Girginkardesler ve ark., 2003).

**Tablo 2.2.** Dientamoebiasisin tedavisi için Hastalık Kontrol Merkezi tarafından önerilen tedavi seçenekleri listesi (Nagata ve ark., 2012).

İlaç seçenekleri	İlaç Rejimi	
	Yetişkinlerde	Çocuklarda
<i>Iodoquinol</i>	650 mg, 20 gün	30–40 mg/kg/gün (max.2 g), 3 doz x 20 gün
<i>Paromomycin</i>	25–35 mg/kg/gün, 3 doz x 7 gün	25–35 mg/kg/gün, 3 doz x 7 gün
<i>Tetracycline</i>	500 mg, 10 gün	40 mg/kg/gün (max. 2 g), 4 doz x 10 gün
<i>Metronidazole</i>	500–750 mg PO 10 gün	35–50 mg/kg/gün, 3 doz 10 gün

### 2.13. Koruma ve Kontrol

Dientamoebiasisin bulaş yolu ile ilgili aydınlatılması gereken daha pek çok soru vardır. Bu nedenle de korunma için kesin uyarı ve öneriler vermek zordur. Ancak bulaş yolları henüz kanıtlanmamış olmasına rağmen, hijyen koşullarının ve sanitasyonun yetersiz olması veya enfekte bireyler arası yakın temasın bulunduğu durumlarda fekal-oral geçişin olabileceği ileri sürülmüştür. Helmint yumurtalarıyla kontaminasyonun olma ihtimaline yer verildiğinde, fekal-oral geçişi engellenmek için yenilen içilen maddelerin dışkıyla bulaşı önlenmeli ve toplum kişisel hijyen ve sanitasyon kurallarına dikkat edilmesi konularında eğitilerek bilinç kazandırılmalıdır. Dientamoebiasisin prevalansının yüksek olduğu, akıl hastaneleri ve çocuk bakım yuvaları ve cezaevleri gibi birçok kişinin toplu olarak kaldığı yerlerde epidemileri önlemek amacıyla tedbirler alınmalıdır (Millet ve ark., 1983).

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. GEREÇ

#### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar,

- Santrifüj (Sigma 1-14K, USA)
- LightCycler 480II (Roche, Mannheim, Germany)
- Güç kaynağı; Power Pac Basic cihazı (BioRad, USA)
- Otomatik pipetler (Gilson, PIPETMAN Classic, UK)
- ChemiDoc MP görüntüleme cihazı (BioRad, USA)

#### 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

- Steril pastör pipetleri
- 15 ml'lik steril falcon tüp (CellStar GreinerBio-one, Frickenhausen, Germany)
- 50 ml'lik steril falcon tüp (CellStar GreinerBio-one, Frickenhausen, Germany)
- 1,5 ml'lik microsantrifüj tüpü (CellStar GreinerBio-one, Frickenhausen, Germany)
- 200 µl PCR tüpü (CellStar Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany)
- 96'lık qPCR well plate

#### 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Solüsyon ve Kitleler

- Etanol (Merk Millipor, Germany)
- LightCycler 480 Sybr Green I Master Kit (Roche, Germany)
- 100 bp Ladder; DNA Marker (GeneSTA, Korea)
- DNA izolasyon kit-QIAamp Fast Stool Mini Kit (Qiagen, Germany)
- Agaroz RA (VWR Amresco, USA)

- TAE tamponu
- Taq Polimeraz (GeneAll Biotechnology, Korea)
- dNTP miks (BIORON GmbH, Germany )

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Örneklerin Toplanması

Farklı kanser tiplerinin dahil edildiği hasta gruplarında *Dientamoeba fragilis*'in PCR tabanlı moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamına alınan hastalardan toplanan ve kontrol grubunu oluşturacak olan sağlıklı gönüllülerden alınan dışkı örnekleri çalışma kapsamındadır. Çalışmada, toplanan örneklerin total genomik DNA izolasyonunun ardından PCR testleri yapılmış ve *Dientamoeba fragilis* bakımından pozitif olduğu tespit edilen örnekler yöntemlerin içinde anlatıldığı gibi hazırlanarak dizi analizi yapılmak üzere hizmet satın alımı yapılan firmaya gönderilmiştir. Elde edilen dizi bilgileri filogenetik araçlar kullanılarak analiz edilmiştir. Bunu göre tasarlanan projede izlenen yöntemler detaylarıyla aşağıdaki gibidir.

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına tetkik için gelen kanser hastalarından 100 ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı gönüllülerden alınan 20 dışkı örneği çalışma kapsamındadır. Çalışma kapsamında değerlendirilmiş olan bu örnekler için 2023/560 sayılı klinik araştırmalar etik kurulu kararı ile izin alınmış ve çalışmaya alınan hastalar 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' ile yazılı-imzalı onayları alındıktan sonra çalışmaya dâhil edilmiştir.

**Tablo 3.1.** Deney gruplarının yaş, cinsiyet ve kişi sayıları

<b>Deney grupları</b>	<b>Cinsiyet</b>	<b>Kişi Sayısı</b>	<b>Yaş Aralığı</b>
<b>Sağlıklı gönüllüler-Pozitif Kontroller</b>	Kadın	17	22-46
	Erkek	3	25-38
<b>Kolon Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	Kadın	1	44
	Erkek	9	46-78
<b>Rektum Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	Kadın	2	53-55
	Erkek	2	71-75
<b>Lösemi Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	Kadın	6	16-75
	Erkek	18	3-65
<b>Lenfoma Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	Kadın	6	47-72
	Erkek	18	9-69
<b>Diğer Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	Kadın	24	3-76
	Erkek	14	2-69

### 3.2.2. Moleküler Testler

#### 3.2.2.1. Dışkı Örneklerinden Genomik DNA Ekstraksiyonu

PCR analizlerinde kullanılmak üzere toplanan örneklerden DNA izolasyonu yapılmıştır. -20<sup>0</sup>C’de saklanmakta olan 180-220 mg dışkı örneği tartılarak 1,5 ml’lik santrifüj tüpüne alınmıştır. Tüpler ekstraksiyon öncesinde buz üzerine alınıp QIAamp Fast Stool Mini Kit (QIAGEN, Almanya) kullanılarak kit önerisine göre, aşağıda belirtilen basamaklar sırasıyla gerçekleştirilmiştir;

1. Buz üzerindeki örneklerin her birinin içerisine 1 ml InhibitEX tamponu eklenmiş, dışkı örnekleri tamamen homojenize olana kadar 1 dk boyunca vortekslenmiştir.
2. Örnekler 70<sup>0</sup>C’de 5 dk inkübe edilecek ve inkübasyon sonrası her bir örnek 15 sn vortekslenmiştir.
3. Vortekslenen örnekler 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
4. 15 µl Proteinaz K eklenmiş 1,5 ml’lik santrifüj tüplerine, santrifüj edilen örneklerin üst sıvısından alınarak 200 µl eklenmiştir.
5. Proteinaz K ilaveli örnekten oluşan karışımın üzerine 200 µl AL tamponu eklenerek her bir örnek 15 sn vortekslenmiştir.

6. Vorteks sonrasında tüpler 70<sup>0</sup>C’de 10 dk inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyon sonrası örneklerin üzerine 200 µl %96-100’lük etanol eklenerek vortekslenmiştir.
8. Vorteksleme işlemi sonrasında elde edilen karışım spin kolon (kit içerisindeki) aktarılarak, 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
9. QIAamp spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra üzerine 500 µl AW1 tamponu eklenerek 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
10. QIAamp spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra üzerine 500 µl AW2 tamponu eklenerek 14000 rpm’de 3 dk santrifüj edilmiştir.
11. QIAamp spin kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra 1dk 14000 rpm’de boş santrifüj edilmiştir.
12. QIAamp spin kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirdikten sonra kolon içerisindeki membranın direkt olarak üzerine gelecek şekilde 100 µl ATE tamponu eklenmiştir.
13. QIAamp spin kolon oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildikten sonra 1 dk 14000 rpm’de santrifüj edilerek elüsyon sağlanmıştır.
14. Elde edilen DNA’lar kullanılana kadar -20<sup>0</sup>C’de saklanmıştır.

PCR ile pozitif olarak tespit edilen örneklerden elde edilen DNA’lar, sekans analizlerinin yapılabilmesi için; PCR ile çoğaltıldıktan sonra aşağıda belirtilen protokol takip edilerek klonlanmıştır.

### **3.2.2.2. Pozitif Kontrolün Klonlanması**

#### **3.2.2.2.1. *Dientamoeba fragilis* Spesifik Small Subunit rRNA (SSU-rRNA) Gen Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu**

Röser ve arkadaşları tarafından AY730405 GenBank aksesyon numarası ile bildirilen SSU rRNA genine spesifik primerleri ile PCR uygulanmıştır. 364 bç’lik bölgeyi çoğaltan DFpn\_1f (5’-GCC AAG GAA GCA CAC TAT GG-3’) ve DFpn\_364r (5’-GTA AGT TTC GCG CCT GCT-3’) primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri; 2,5 µL 10x Buffer (Thermo Scientific, USA), 2 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µL 10 mM dNTP, 1’er µL F 10 ve R primerler (20 pmol/µl), 1 µL Taq DNA polimeraz (5 u/µl), 5 µL gDNA olacak şekilde toplam 25 µl’lik bir karışım hazırlanmıştır. Amplifikasyon, 15

5 dakika 95°C’de ilk denatürasyondan sonra, 94°C’de 30 saniye, 65°C’de 30 saniye, 72°C’de 30 saniye 35 döngü ve son uzatma 72°C’de 5 dakika olacak şekilde PCR koşulları ayarlanarak PCR tüpleri thermal cycler (SENSEQUEST, Almanya) cihazına yerleştirilmiştir (Tablo 3.1).

**Tablo 3.2.** *D. fragilis* SSU rRNA geni için PCR koşulları

Reaksiyon sıcaklığı	Süre	Döngü sayısı
Pre-denatürasyon	94°C	15 dk
denatürasyon	94°C	30 sn
Bağlanma	65°C	30 sn
Uzama	72°C	30 sn
Son uzam	72°C	5 dk
Soğuma	4°C	∞ <sup>+</sup>

5 µl etidium bromide ile boyanmış PCR ürünü %1, 5’luk agaroz jelde, 120V/400 mA’de 45 dk. TAE tamponu (1X) ile elektroforez edilmiştir. PCR analizlerinin geçerliliği ve kontaminasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini doğrulanması için; referans *Dientamoeba fragilis* izolatları pozitif kontrol olarak, sterilize edilmiş deiyonize su ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Daha sonra BioRad jel görüntüleme cihazında (Carestream, ABD) görüntülenmiştir. Tüm örneklerle yukarıda belirtilen PCR koşulları uygulanmıştır.

Ayrıca çalışmaya başlanılmadan önce tüm deneylerde standart olarak kullanılan pozitif kontrolün, *Dientamoeba fragilis* spesifik SSU-rRNA gen bölgesi yukarıda belirtilen PCR protokolü ile amplifiye edildikten sonra aşağıda belirtilen protokol uygulanarak plazmite klonlanmıştır. Standart PCR ve QPCR yöntemlerinde tüm örneklerle beraber Plazmit DNA’sı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

### 3.2.2.2.2. Klonlanma ve Plazmid DNA İzolasyonu

Sekanslama ve filogenetik analizler yapmak üzere, PCR sonrası elde edilen *D. fragilis* spesifik SSU-rRNA gen bölgesine ait bantlar High Pure PCR Product Purification Kiti (Roche) ile jelden pürifiye edilmiştir. Ürünler, plazmide CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kiti ile klonlanmıştır. Bunun için, ligasyon basamağını

gerçekleştirmek üzere gerekli olan içerik hazırlanmıştır (Tablo 3.2).

**Tablo 3.3.** Ligasyon için hazırlanan karışım

İçerik	Miktar
2X reaksiyon tamponu	10 µl
PCR ürünü	1-5 µl (~10ng/µl)
Nükleazsız steril su	2-6 µl
DNA Blunting enzim	1 µl
Toplam	18 µl

Elde edilen karışım vortekslenerek ve sonrasında santrifüj edilerek 70°C'de su banyosunda 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hemen buz üstüne alınmıştır. Karışımın üzerine 1 µl pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/ µl) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenmiştir ve böylece son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışım 25 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon işlemi için kullanılmıştır. Klonlama prosedürünün transformasyon basamağında 5 µL ligasyon ürünü buz üzerinde bekletilen E. coli TOP10 hücrelerine eklenerek, buz üzerinde 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelere önce 42°C'de 2 dk ısı şoku yapıp, tekrar buz üzerinde 4 dk bekletilmiş ve üzerine 250 µL SOC Medium eklenmiştir. Çalkalayıcı cihazına yerleştirilen transformasyon karışımı 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra ampisilin içeren LB (Lurie-Bertani) katı besiyerine ekilerek kolonilerin oluşması için 37°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. LB katı besiyerinde üretimi gerçekleşen kolonilerden izolat başına 2 koloni seçilmiştir. Koloniler steril kürdanlar ile alınıp işaretlenmiştir. LB katı besiyeri ihtiva eden ve bölmelere ayrılmış (4'lü veya 6'lı) plaklara yeniden ekilerek 37°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plasmidi içerip içermediğinin tespiti için aynı kolonilerin bulunduğu işaretlenmiş bölgelerin her birinden tek bir koloni seçilerek PCR tarama yapılmıştır. Vektöre spesifik olan pJET1.2 forward ve pJET1.2 reverse primerler (Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen bantlar %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Görüntüleme cihazında görüntülenerek vektör+insert varlığı yönünden doğrulanmıştır. Daha sonra doğrulanan ve çoğaltılan plazmidler, plazmid pürifikasyon kiti ile saflaştırılmıştır.

### 3.2.2.2.3. Plazmitin Saflaştırılması

Steril öze yardımıyla ile alınacak koloniler uygun konsantrasyonda ampisilin içeren 5 ml LB sıvı besiyerlerine ekilmiştir. Çalkalayıcı üzerinde 37°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Sıvı besiyerinde üreyen hücrelerden 2 ml alınıp 8000 rpm'de 2 dk santrifüj edilecek. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp hücrelerin bulunduğu pelletten GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ile plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Kit içeriğinde bulunan pellet çözücü solüsyonlar eklenmiştir. Daha sonra santrifüj edilen karışım kit içinden çıkan kolona aktararak plazmidlerin kolona tutunması sağlanmıştır. Kolona bağlı plazmidler yıkama solüsyonu ile yıkanarak santrifüj edilmiştir. Kolona bağlanan ve yıkanan plazmidler elüsyon tamponunun eklenmesi ile yeni bir tüpe aktarılmıştır. Saf olarak elde edilen plazmidlere insertlerin varlığı yönünden doğrulanmak için vektör spesifik pJET1.2 forward ve pJET1.2 reverse primerleri ile kit prosedürüne göre PCR uygulanmıştır. Sekans analizleri hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Doğrulandıktan ve saflaştırdıktan sonra *D. fragilis* spesifik SSU-rRNA gen bölgesini içeren için plazmid DNA'lar pJET1.2 F ve R primerleri ile tek yönlü olarak sekanslanmak üzere hizmet alımı yapılmış olan firmaya gönderilmiştir.

### 3.2.2.3. Tüm Örneklerin PCR ve QPCR Analizleri

Tüm örneklerin PCR reaksiyonları, yukarıda bahsedilen ve plazmid elde için kullanılan *D. fragilis* spesifik SSU-rRNA gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonunda olduğu gibi gerçekleştirilmiştir.

QPCR'nin yüksek duyarlılık ve özgüllüğü sayesinde düşük yoğunluktaki enfeksiyonların güvenilir biçimde tespit edilebilmesi ve elde edilen bulguların PCR sonuçları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilebilmesi amacıyla yöntem çalışmada kullanılmıştır.

*D. fragilis* SSU-rRNA genini hedefleyen QPCR primerleri (F:5'-GGGACTCCCTGCGTCTAAG -3', R:5'-AAGGACATCACGGACCTGTT -3') bu çalışmada kullanılmıştır. Hedef gene spesifik primerler ile toplam reaksiyon hacimi 20 µl olacak şekilde; 10µl Syber green master mix (2x), 1'er µl F ve R Primerleri (20pmol), 5 µl DNA, 3 µl dH<sub>2</sub>O kullanılarak qPCR reaksiyonunda hazırlanmıştır. Roche LightCycler 480 II (Roche, Mannheim, Germany) cihazı kullanılarak qPCR programı kurulmuştur (Tablo 3). Cq değerleri 'second maximum derivate yöntemi' ile

hesaplanarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 3.4.** QPCR Döngüleri

RT- PCR Basamakları	Sıcaklık	Süre	Döngüler	Analiz modu
Preinkübasyon	95°C	5 dakika	1	None
Amplifikasyon	95 °C	10 saniye		
	58-60 °C	10 saniye	45	Quantification
	72 °C	10 saniye		
Melting curve	95 °C	5 saniye		
	65 °C	1 dakika	1	Melting curve
	97 °C	continuous		
Cooling:	40 °C	30 saniye	1	None

### 3.2.3. İstatistiksel Analiz; Sekans Ve Filogenetik Analizler

*Dientamoeba fragilis* SSU-rRNA gen bölgesinin 5' ucu parsial bölgesinin çoğaltıldığı izolatlar tek yönlü olarak sekanslanmıştır. DNA dizisi ortaya çıkan izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edilip, Geneious 9.1.3 (Posada, 2008) yazılımı ile pairwise alignmentları yapılmış. İnsert olmuş hedef gen bölgesi belirlenerek izolatlara ait son dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapılmıştır.

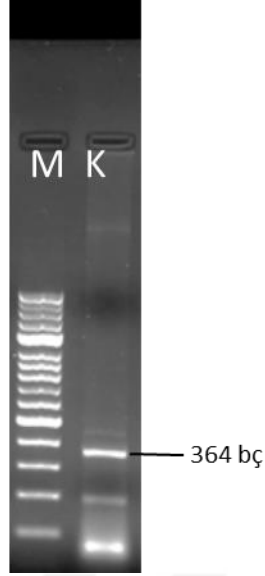
GenBank'ta bulunan homolog izolatlara ait ilgili gen sekanslarıyla Geneious 9.1.3 (Posada, 2008) yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid farklılıkları belirlenmiştir. Neighbour joining metodu ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Karakterizasyonu sağlanan tüm izolatların GenBank kayıtları sağlanmıştır.

## 4. BULGULAR

'Kanser Tanısı Alan Hastalarda *D. fragilis*'in Moleküler Prevalansı ve Moleküler Karakterizasyonu' başlıklı bu proje kanser tanısı alan hastalarda (n=100) ve sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunda (n=20) olmak üzere toplam 120 örnekte, intestinal yerleşimli patojen protozoon parazit olan *D. fragilis* pozitifliği araştırılmıştır. Daha hassas sonuçlar vererek tarama imkanı sunması nedeniyle bu olgulardan elde edilen dışkı örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak *D. fragilis* varlığı PCR ve QPCR yöntemleriyle araştırılmış ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Pozitif olduğu tespit edilen örneklerin sekans analizi yapılarak onkoloji hastalarında parazitin genotiplerinin arasındaki ilişki araştırılmıştır.

### 4.1. PCR ile Moleküler İnceleme sonucu elde edilen bulgular

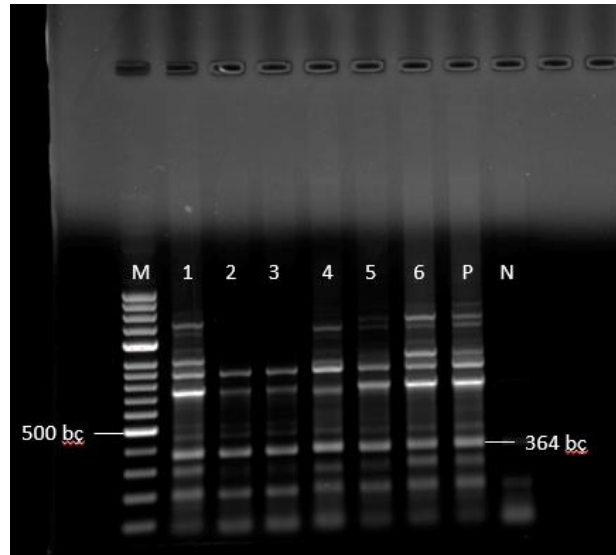
Kanser tanısı alan hastaların ve sağlıklı gönüllülerin dışkı örneklerinden DNA izolasyonu kit önerisine göre yapılarak, DNA örnekleri -80°C'de muhafaza edilmiştir. PCR testlerinde kullanılacak olan *D. fragilis* SSU-rRNA geni spesifik primerler sulandırılmış ve PCR işlemlerinde kullanıma hazır hale getirilerek -20°C'de saklanmıştır. Bu primerler kullanılarak optimizasyon işleminden sonra, pozitif kontrolü sağlamak üzere DNA bankamızda saklanan genomik DNA'dan PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 1). Klonlama için ligasyon reaksiyonu, CloneJET PCR Kiti (Thermo Scientific, ABD) ile kit prosedürü uyarlanarak yapılmıştır. Pürifiye edilen PCR ürünü ve ligasyon sonrası elde edilen rekombinant plazmidin 1/3 µl'si agoroz jele yüklenerek görüntülenmiştir (Şekil 1).



**Şekil 4.1.** *D. fragilis* SSU-rRNA gen bölgesinin Pozitif kontrol için PCR optimisasyonu; M: Marker, K: kontrol

#### 4.2. Kanser Hasta Gruplarında PCR Analizleri

Sağlıklı gönüllülerin katıldığı kontrol grubundan toplanan örneklerin DNA izolasyonu sonrası iç-pozitif kontrol ile optimize edilen koşullara göre PCR testi kurulmuştur. Pozitif örnekler tekrar amplifiye edilerek saflaştırılmış ve sekans analizi yapılmak üzere hizmet alımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2, Tablo 4.1).



**Şekil 4.2.** *D. fragilis* SSU-rRNA geni (364 bp) spesifik PCR ile elde edilen pozitif örneklere ait jel görüntüleri; M: Marker, 1-6: Pozitif hastalar, P: Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol

**Tablo 4.1.** PCR sonucunda kanser hasta gruplarında tespit edilen pozitiflikler

<b>Deney grupları</b>		<b>PCR pozitif örnek sayısı</b>
<b>Sağlıklı gönüllüler-Pozitif Kontroller</b> (n=20)	<b>Kadın (n=17)</b>	2
	<b>Erkek (n=3)</b>	1
<b>Kolon Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	<b>Kadın (n=1)</b>	0
	<b>Erkek (n=9)</b>	0
<b>Rektum Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	<b>Kadın (n=2)</b>	0
	<b>Erkek (n=2)</b>	1
<b>Lösemi Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	<b>Kadın (n=6)</b>	1
	<b>Erkek (n=18)</b>	3
<b>Lenfoma Kanseri tanılı Hasta Grubu</b>	<b>Kadın (n=6)</b>	0
	<b>Erkek (n=18)</b>	0
<b>Diğer Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	<b>Kadın (n=24)</b>	1
	<b>Erkek (n=14)</b>	0

#### **4.3. QPCR ile Moleküler İnceleme sonucu elde edilen bulgular**

QPCR analizi yapılarak ‘second maximum derivate yöntemi’ ile pozitiflikler hesaplanmış ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Tüm örneklerin Cq değerleri tabloda verilmiştir (Tablo 4.2, Şekil 4.3).

**Tablo 4.2.** QPCR sonucunda hasta ve kontrol gruplarında Cq değerleri

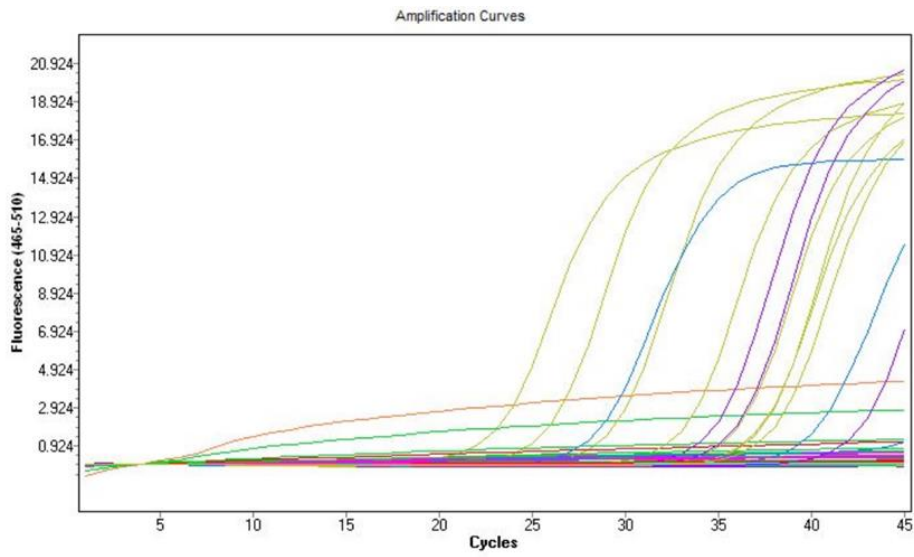
Olgular	Cq değerleri
İzolat 1	<40
İzolat 2	<40
İzolat 3	<40
İzolat 4	<40
İzolat 5	<40
İzolat 6	=40
İzolat 7	28,16
İzolat 8	=40
İzolat 9	<40
İzolat 10	<40
İzolat 11	<40
İzolat 12	13,00
İzolat 13	<40
İzolat 14	<40
İzolat 15	<40
İzolat 16	<40
İzolat 17	12,01
İzolat 18	5,00
İzolat 19	<40
İzolat 20	<40
İzolat 21	32,77
İzolat 22	<40
İzolat 23	<40
İzolat 24	<40
İzolat 25	<40
İzolat 26	<40
İzolat 27	<40
İzolat 28	<40
İzolat 29	<40
İzolat 30	<40
İzolat 31	<40
İzolat 32	15,49
İzolat 33	<40
İzolat 34	<40
İzolat 35	<40
İzolat 36	<40
İzolat 37	<40
İzolat 38	<40
İzolat 39	<40

**Tablo 4.2.** QPCR sonucunda hasta ve kontrol gruplarında Cq değerleri (Devam)

İzolat 40	<40
İzolat 41	<40
İzolat 42	<40
İzolat 43	<40
İzolat 44	<40
İzolat 45	<40
İzolat 46	<40
İzolat 47	<40
İzolat 48	<40
İzolat 49	<40
İzolat 50	<40
İzolat 51	<40
İzolat 52	<40
İzolat 53	<40
İzolat 54	<40
İzolat 55	<40
İzolat 56	<40
İzolat 57	<40
İzolat 58	<40
İzolat 59	<40
İzolat 60	<40
İzolat 61	<40
İzolat 62	<40
İzolat 63	<40
İzolat 64	<40
İzolat 65	<40
İzolat 66	<40
İzolat 67	<40
İzolat 68	<40
İzolat 69	<40
İzolat 70	<40
İzolat 71	<40
İzolat 72	<40
İzolat 73	<40
İzolat 74	<40
İzolat 75	6,00
İzolat 76	<40
İzolat 77	<40
İzolat 78	<40

**Tablo 4.2.** QPCR sonucunda hasta ve kontrol gruplarında Cq değerleri (Devam)

İzolat 79	<40
İzolat 80	<40
İzolat 81	<40
İzolat 82	<40
İzolat 83	<40
İzolat 84	<40
İzolat 85	<40
İzolat 86	<40
İzolat 87	34,63
İzolat 88	35,74
İzolat 89	<40
İzolat 90	=40
İzolat 91	36,80
İzolat 92	37,59
İzolat 93	<40
İzolat 94	<40
İzolat 95	<40
İzolat 96	<40
İzolat 97	<40
İzolat 98	<40
İzolat 99	<40
İzolat 100	<40



**Şekil 4.3.** *D. fragilis* SSU-rRNA geni spesifik QPCR ile elde edilen tüm örneklere ait amplifikasyon eğrileri

**Tablo 4.3.** QPCR sonucunda kanser hasta gruplarında tespit edilen pozitiflikler

<b>Deney grupları</b>		<b>PCR pozitif örnek sayısı</b>
<b>Sağlıklı gönüllüler-Pozitif Kontroller</b> (n=20)	<b>Kadın (n=17)</b>	2
	<b>Erkek (n=3)</b>	1
<b>Kolon Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	<b>Kadın (n=1)</b>	0
	<b>Erkek (n=9)</b>	4
<b>Rektum Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	<b>Kadın (n=2)</b>	0
	<b>Erkek (n=2)</b>	1
<b>Lösemi Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	<b>Kadın (n=6)</b>	1
	<b>Erkek (n=18)</b>	3
<b>Lenfoma Kanseri tanılı Hasta Grubu</b>	<b>Kadın (n=6)</b>	0
	<b>Erkek (n=18)</b>	0
<b>Diğer Kanseri Tanılı Hasta Grubu</b>	<b>Kadın (n=24)</b>	1
	<b>Erkek (n=14)</b>	0

#### 4.4. Sekans Analizi ve Filogenetik Karakterizasyon

*Dientamoeba fragilis* spesifik SSU-rRNA primerlerle sekans analizi sonucu kalite skorları yüksek kromotogramlar elde edilmiş ve DeNovo analizleriyle ilgili izolata ait final nükleotid dizilimleri saptanmıştır (Şekil 4.4).

```
1      10     20     30     40     50     60     70     80
AGTGTAAAGTTCAGGTAACAACTGCGAATAGCTCATTAAACACACTCATAATCTACTTGGAAACAATTTTTTAAAAATTTTAAATGGA
90     100    110    120    130    140    150    160    170
TAGCAGGAGTAATTCTCGTGCTAATACATGAAATTTTAATAATCTTAAATTAATCAGATTATTTTAAATACCTTTTAAATAGGTAATC
180    190    200    210    220    230    240    250    260
CAATCGAATGAGTGACCTATCAGGCCAGTACTTAGGGTCTTTACCTAAGTAAGCTATCACGGGTAAACGGGCGGGTTACCGTCGTACTGC
270    280    290    300    310    320    325
CGGAGAAGGCGCCTGAGAGATAGCGACTATATCCACGGGTAGCAGCAGGCGCGAAACTTAC
```

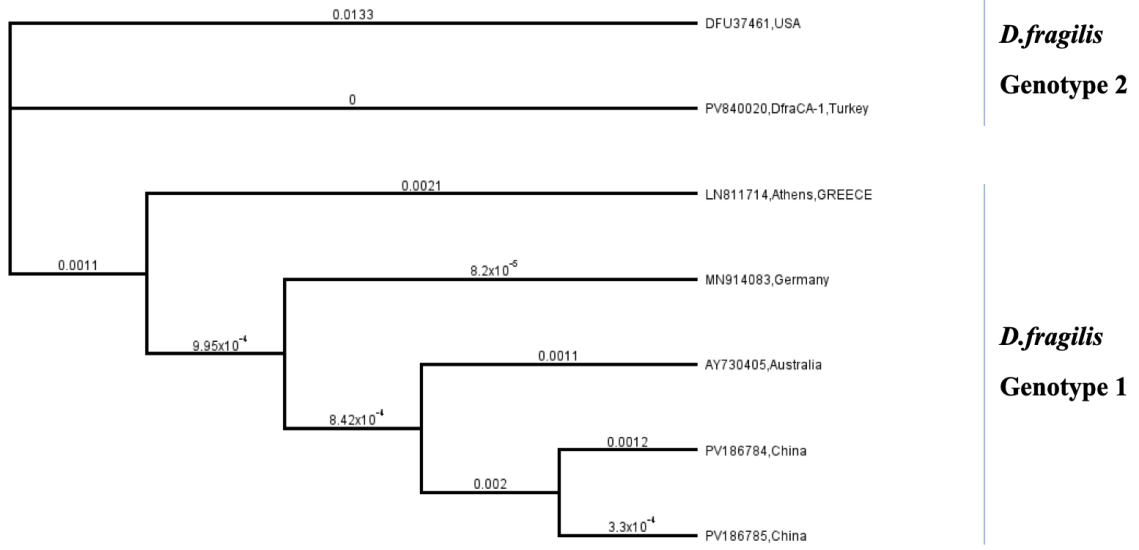
Şekil 4.4. *D. fragilis* SSU-rRNA data setindeki izolatlara ait nükleotid sekansı.

DfraCA-1 olarak isimlendirilen izolat PV840020 aksesyon numarası ile GenBank'a kaydedilmiştir. İzolatın nükleotid sekansları incelendiğinde GC oranının %38,2 AT oranının ise % 61,2 olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. DfraCA-1 izolatının nükleotid içeriği.

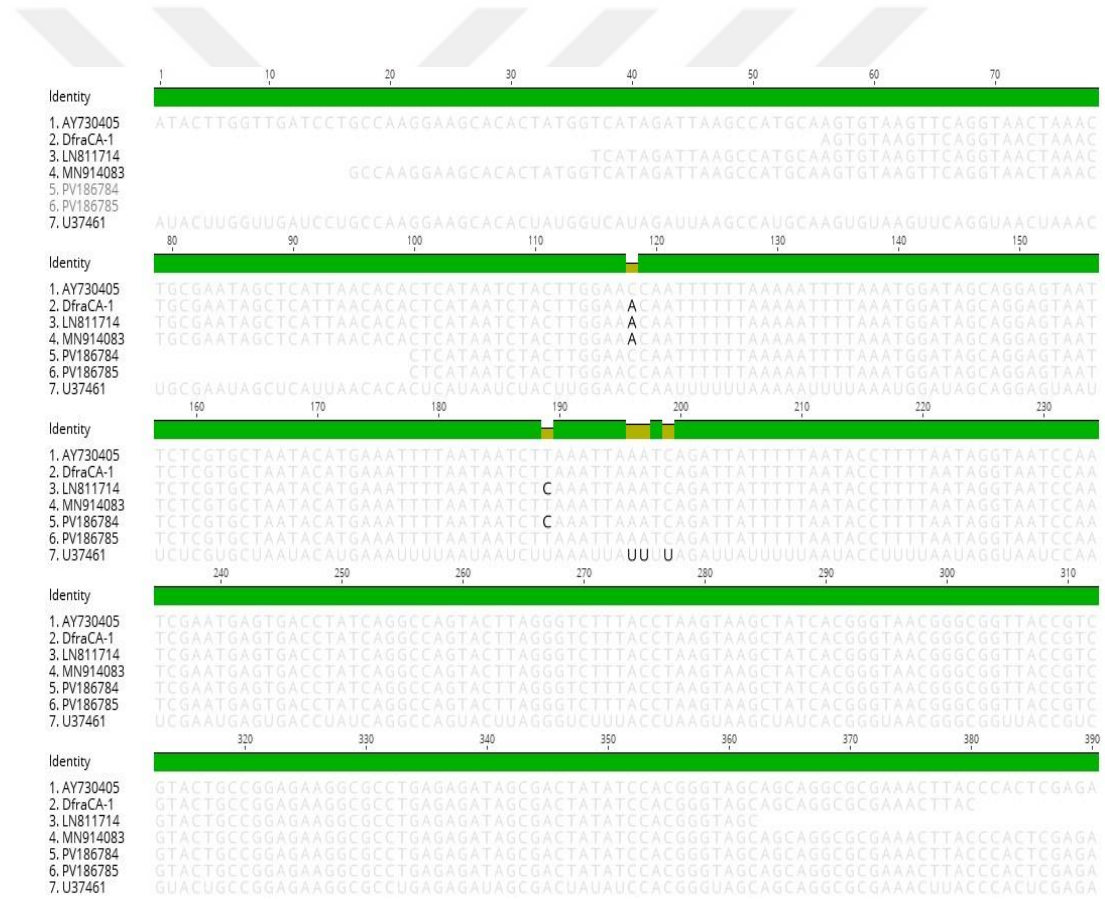
Bazlar	Total sayı	%
Adenin (A)	108	33,2
Citozin (C)	59	18,2
Guanin (G)	65	20
Timin (T)	93	28,6
GC	124	38,2
<b>Toplam</b>	<b>325</b>	<b>100</b>

*Dientamoeba fragilis* SSU-rRNA data setinin analizi sonucunda Neighbour Joining ağacı üzerinde DfraCA-1 izolatının rapor edilmiş izolatlarla daha yüksek identiklik gösterdiği (Şekil 4.4) ve birlikte küme oluşturdukları ve bu gruplanmanın filogenetik çözünürlüğünün yüksek bootstrap değerleri (1.00) ile desteklendiği tespit edilmiştir.



**Şekil 4.5.** *Dientamoeba fragilis* SSU-rRNA data setindeki izolatların NJ analizine göre filogenetik analiz sonuçları. Nodların önündeki rakamlar bootstrap (1000 tekrar) desteğini göstermektedir. Çalışmada elde edilen izolat DfraCA-1 olarak isimlendirilmiştir. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

Hizalama ve filogenetik analizler için GenBank veri tabanında mevcut olan *D. fragilis* 'e ait farklı çalışmalardan bildirilen insan ve hayvan izolatları ile data seti oluşturulmuştur. DfraCA-1 izolatının nükleotid dizilimlerinin GenBank veri tabanında mevcut olan homolog *D. fragilis* kısmi SSU-rRNA sekansları ile çoklu hizalamaları Şekil 4.6'da gösterilmiştir. SSU-rRNA data setinin analizinde ilgili genin *D. fragilis* 'in farklı ülkelerden bildirilmiş izolatlar arasında yüksek identiklik gösterdiği (ort. % 99,5 identiklik) ve nükleik asit sekansları temelinde oldukça korunmuş bir gen bölgesi olduğu görülmüştür. Genel olarak *D. fragilis* 'in SSU-rRNA sekanslarının hizalama analizlerinde DfraCA-1 izolatının 118. nükleotidinde A-C ve 189. Nükleotidinde T-C olmak üzere ana nükleotid değişimi belirlenmiştir (Şekil 6).



**Şekil 4.6.** *D. fragilis* SSU-rRNA data setindeki izolatlara ait nükleotid sekanslarının çoklu hizalama analiz sonuçları.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Dientamoeba fragilis*, insan vücudunda çekum veya kalın bağırsak lümenine yerleşerek dientamobiasise neden olmaktadır (Girginkardeşler ve Kurt, 2007). *D. fragilis*, gastrointestinal semptomları olan hastalarda sıklıkla tespit edilir, ancak patojenitesi belirsizdir. Bazı çalışmalar, *D. fragilis*'li ve *D. fragilis*'siz hastalar arasında klinik belirtilerde önemli bir fark bulamamış ve bunun bir patojen olmaktan çok komensal bir organizma gibi davranabileceğini öne sürmüştür (Bamini ve ark., 2024; Querol ve ark., 2022). Bu durum başka bir bakış açısıyla incelendiğinde, parazitin farklı genotiplerinin enfekte kişilerde klinik belirtilerin de farklı olmasına sebep olabileceğini düşündürmektedir. Bununla beraber dientamoebiazisde en sık görülen belirtiler karın ağrısı ve ishal iken diğer belirtiler bulantı, kusma, iştahsızlık, kilo kaybı ve ateştir (Stark ve ark., 2010b; Noberg ve ark., 2003a). Hastaların %32'si kronik semptomlara sahiptir. Ayrıca enfekte hastalarda eozinofiliye rastlanmaktadır (Cuffari ve ark., 1998; Stark ve ark., 2010b). *D. fragilis* ile ilişkili yaygın semptomlar tedavi gören kanser hastalarının yaşadığı semptomlarla örtüşebilir (Stark ve ark., 2010; Rayan ve ark., 2007). Bu nedenle, parazitin kanserli hasta grupları arasındaki yaygınlığının hassas yöntemlerle yüksek doğrulukta ortaya konulması önemlidir. Özellikle kanser hastalarında önemi artan bu parazitözün moleküler tiplerinin kanser hastalıklarıyla ilişkisi hakkında verilerin az olması ileri incelenmelere ihtiyaç doğurmuştur. Tanıda yönlendirici olması açısından semptomların incelenmesi ve semptomlarla parazit genotipleri arasındaki ilişkinin aydınlatılması, epidemiyolojik çalışmaları olduğu kadar tanı çalışmalarına da katkı sağlayacaktır. Dolayısıyla “Kanser Tanısı Alan Hastalarda *Dientamoeba fragilis*'in Moleküler Prevalansı ve Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı çalışma ile farklı kanser tiplerinin dahil edildiği hasta gruplarında *D. fragilis*'in PCR tabanlı moleküler yöntemlerle araştırılarak kanser hastalarında *D. fragilis*'in moleküler prevalansını belirlemek ve bu parazitin moleküler karakterinin hastalık ile olan ilişkisi hakkında yeni

veriler sağlamak amaçlanmıştır.

Kanser hastalarında *D. fragilis* sıklığı literatürde kapsamlı bir şekilde belgelenmemiştir. Ancak, birkaç çalışma farklı popülasyonlarda *D. fragilis* 'in değişen yaygınlık oranlarına işaret ederek, kanser hastalarını da etkileyebilecek gastrointestinal semptomlarla olası bir ilişki olduğunu öne sürülmüştür. Literatür incelendiğinde immun supresif hastalarda parazitlerin moleküler yöntemlerle araştırıldığı bazı çalışmalar olduğu tespit edilmiştir. Bunların arasında farklı hasta gruplarında *D. fragilis* araştırmalara göze çarpmaktadır.

Kanser, organ nakli ve primer immün yetmezlik hastalarında *D. fragilis* bağırsak parazit enfeksiyonunun prevalansı PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır (Esteghamati ve ark., 2018) fakat parazitin genotipleri ve moleküler karakteri incelenmemiştir.

*D. fragilis*'in enfeksiyon yüzdesini ve genotiplerini belirlemek için Roma'daki (Orta İtalya) semptomatik hastalardan iki yıl süreyle toplanan dışkı örnekleri qPCR yöntemi ile araştırılmıştır (Guadano-Procesi ve ark., 2024). Ancak bahsedilen çalışmalarda aynı anda kanser hastalarında *D. fragilis* parazitinin filogenetik incelemeleri yapılmamıştır.

Bizim çalışma konumuz bu anlamda farklılık göstermektedir.

Türkiye'de yapılan bazı çalışmalar da mevcuttur. *D. fragilis*'in varlığı, kanser hastalarında klinik tabloyu karmaşıklatabilecek ishal gibi daha şiddetli gastrointestinal semptomlarla ilişkilendirilmiştir (Aykur ve ark., 2019).

İmmünsüpresif hastalardaki intestinal protozoon prevalansının araştırıldığı bir çalışmada direkt tanı yöntemleri ve DFA yöntemi kullanılarak protozoonların dağılımı tespit edilmiştir (Kaya ve ark., 2021).

Türkiye'de *D. fragilis* paraziti ile ilgili yapılan çalışmalarda ya genotiplendirme çalışmaları bağırsağın kanser dışı hastalıkları ile yürütülmüştür ya da hasta gruplarında genotiplendirme yapılmadan standart tanı yöntemleri ile parazitin varlığı araştırılmıştır.

İran'da yapılan bir çalışmada, gastrointestinal ve gastrointestinal olmayan kanser hastalarında (n=158) ve bir kontrol grubunda (n=158) mikroskopik ve moleküler yöntemler kullanılarak bağırsak protozoon enfeksiyonlarının yaygınlığı araştırılmıştır. Çalışmada *Dientamoeba fragilis*'in yaygınlığı %1,3 olarak tespit edilmiştir. Kemoterapinin, hematolojik maligniteli hastalarda, özellikle lenfoma ve lösemi hastalarında intestinal Protozoon enfeksiyonlara karşı duyarlılığı artırdığını ve kanser

hastalarında kontrol grubuna göre fırsatçı enfeksiyonlar da dahil olmak üzere intestinal Protozoan enfeksiyonları riskinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Bahadorizadeh ve ark., 2024).

Kanser hastaları (n=85), organ nakli alıcıları (n=25) ve primer immün yetmezliği (n=80) olan hastalar dahil olmak üzere farklı hasta gruplarında bağırsak parazitlerinin yaygınlığının araştırıldığı bir başka çalışmada, toplam 190 dışkı örneğinde nested PCR ve PCR dizileme ile incelemeler yapılmıştır. Kanser hastalarında baskın bağırsak parazit enfeksiyonu *Blastocystis hominis* olup (%22,3), bunu *Giardia lamblia* (%2,3) ve *Dientamoeba fragilis* (%1,1) takip etmiştir. Primer immün yetmezlik hastalarında ise intestinal parazit enfeksiyonlarının prevalansının *Blastocystis hominis* 13 (%16,2), *Giardia lamblia* 10 (%12,5), *Cryptosporidium* 1 (%1,2), *Chilomastix mesnili* 1 (%1,2), *Dientamoeba fragilis* 1 (%1,2) olduğu tespit edilmiştir. *Blastocystis hominis* ile enfeksiyon oranının özellikle kolorektal kanser hastalarında yüksek olduğu, Organ nakli yapılan hastalarda primer immün yetmezlik hastalarına kıyasla parazitik bağırsak enfeksiyonunun başlıca nedeninin *Cryptosporidium* sp. olduğu tespit edilmiştir (Esteghamiti ve ark., 2019).

Yurdumuzda veya dünyanın farklı bölgelerinde yapılan bu çalışmalarda parazit genotiplerinin kanser hastalıklarıyla ilişkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla, kanserli bireylerde *D. fragilis* ile gastrointestinal semptomların şiddeti arasındaki ilişki karmaşık ve tartışılan bir konu olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, bu çalışma alanında ilk kez yapılmış özgün bir çalışmadır. Bu çalışmayla, belirlenen amaçlar doğrultusunda sekans analizleri ile *D. fragilis* 'in genotipik bir analizi yapılmış; farklı kanser hastalıkları ile tanı alan olgularda PCR, qPCR yöntemleri ile incelenen *D. fragilis*'in prevalansı ile yaş ve cinsiyet faktörlerinin ilişkisi gösterilmiştir. Buna göre, 6 hasta standart PCR ile pozitif olarak tespit edilirken 11 hastanın qPCR ile pozitif olduğu tespit edilmiştir. *D. fragilis* ile enfekte olgularda korunmuş bir bölge olan SSU-rRNA gen bölgesinde nükleotid temelinde üç farklı bölgede değişimin olduğu ve bu hastalarda genotip 2'nin varlığı saptanmıştır. Elde edilen verilerin gelecekte yapılacak çeşitli çalışmalara temel teşkil ettiği ve literatüre önemli bir katkı sağladığı düşünülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışmada kanser tanısı alan hastalar ile bu parazitin tespit edilen

genotiplerinin arasında klinik bulguları etkileyebileceği düşünölen moleköler düzeyde bir ilişki olabileceğini gösterilmiştir. Parazitin genotiplerinin, çalışma kapsamına alınan olgularda klinik belirtilere etkisine ışık tutan bir çalışmadır.

Ayrıca bu çalışmada *Dientamoeba fragilis*'in tanısında kullanılan yöntemler olan PCR ve qPCR yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak yaygınlığı araştırılmıştır. Elde edilen bulgular göre hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olduğu istatiksöl olarak gözlemlenmiştir. PCR yöntemiyle yanlış negatiflik verme olasılığının olması nedeniyle, qPCR yönteminin daha kısa zamanda tanı koydurucu ve tedaviye daha erken başlanması açısından kullanımının daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca örneklerin sekans analizine gönderilmesine alt yapı oluşturmak ve qPCR'nin hassasiyetini doğrulamak amacıyla PCR yöntemi de kullanılmıştır.

*Dientamoeba fragilis* ile ilgili yapılacak çalışmalarda, kanser hastalarında arasında parazitoza ait epidemiyolojik verilerin ortaya konması ile bilime katkı sağladığı açıktır. Bu hasta gruplarında doğru tanının konularak hızlı tedavi edilmesi kritik bir öneme sahip olabilir ve hastaların yaşam kalitesini etkileyebilir. Ayrıca *D. fragilis*'in hayat döngüsü içerisinde; bulaş ve taşınmasında bilinmeyenlerin olması sebebiyle ileri ki çalışmalarda bulaş ve taşınma konusunda araştırmaların yapılmasının gerekli olduğu kanaatindeyiz.

## 6. KAYNAKLAR

- Aykur, M., Aykur, M., Caliskan Kurt, C., Dirim Erdogan, D., Avci, C. B., Vardar, R., Aydemir, Ş., Girginkardeşler, N., Gündüz, C., & Dagci, H. (2019). Investigation of *Dientamoeba fragilis* Prevalence and Evaluation of Sociodemographic and Clinical Features in Patients with Gastrointestinal Symptoms. *Acta Parasitologica*, 64(1), 162–170. <https://doi.org/10.2478/S11686-018-00017-5>
- Bahadorizadeh L, Khanaliha K, Ghorbandoust S, Bokharei-Salim F, Minaeian S, Khodakarim N, Ghalamkari M, Salemi B. Prevalence and molecular identification of protozoan intestinal parasitic infections in cancer patients and a control group. *BMC Infect Dis*. 2024 Nov 27;24(1):1355. doi: 10.1186/s12879-024-10235-0.
- Bamini, G. T., Charpentier, É., Guémas, E., Chauvin, P., Fillaux, J., Valentin, A., Cassaing, S., Ménard, S., Berry, A., & Iriart, X. (2024). No evidence of pathogenicity of *Dientamoeba fragilis* following detection in stools: A case-control study. *Parasite*, 31, 40. <https://doi.org/10.1051/parasite/2024041>
- Barratt JL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D et al. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes* 2011;2:3-12.
- Barratt JL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis*: the need to investigate current hypotheses on transmission. *Parasitology* 2011;138:557-572.
- Burrows RB. A new fixative and technics for the diagnosis of intestinal parasites. *Tech Bull Regist Med Technol* 1967;37:208-212.
- Burrows RB and Swerdlow MA. *Enterobius vermicularis* as a probable vector of *Dientamoeba fragilis*. *Am J Trop Med Hyg* 1956;5:258-265.
- Bruijnesteijn van Copenraet LE, Wallinga JA, Ruijs GJ, Bruins MJ, Verweij JJ. 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. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:869-874.
- Caccio SM, Sannella AR, Manuali E, Tosini F, Sensi M, Crotti D, Pozio E. Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans. *Emerg Infect Dis* 2012;18:838-841.
- Calik S, Karaman U, Colak C. Prevalence of microsporidium and other intestinal parasites in children from malatya, Turkey. *Indian J Microbiol.* 2011 Jul;51(3):345-349.
- Chan FT, Guan MX, Mackenzie AM. et al. Application of indirect immunofluorescence to detection of *Dientamoeba fragilis* trophozoites in faecal specimens. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1710-1714.
- Chan FT, Guan MX, Mackenzie AM, Diaz-Mitoma F. et al. Susceptibility testing of *Dientamoeba fragilis* ATCC 30948 with iodoquinol, paromomycin, tetracycline and metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1157- 1160.
- Clark CG and Diamond L. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:329-341.
- Clark CG, Röser D, Stensvold CR. et al. Transmission of *Dientamoeba fragilis*: pinworm or cysts? *Trends Parasitol* 2014;30:136-140.
- Crotti D, D'Annibale ML, Fonzo G, Lalle M, Caccio SM, Pozio E, 2005. *Dientamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy. *Parasite* 12: 165 – 170.
- De Jong MJ, Kortelink JJ, Benninga MA, Hilbink M., Widdershoven J., Deckers-Kocken JM *Dientamoeba fragilis* ve çocuklarda kronik karın ağrısı: bir vaka kontrol çalışması. *Arch Dis Çocukluğu.* 2014; 99:1109–1113.
- Doğan N, Oz Y, Koçman NU, Nursal AF. Comparison of individual differences in the direct microscopic examination in the diagnosis of intestinal parasites. *Turkiye Parazitoloj Derg* 2012;36:211-214.
- Esteghamati A, Khanaliha K, Bokharaei-Salim F, Sayyahfar S, Ghaderipour M. Prevalence of Intestinal Parasitic Infection in Cancer, Organ Transplant and Primary Immunodeficiency Patients in Tehran, Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 20. (2), 495-501.
- Esteghamati A, Khanaliha K, Bokharaei-Salim F, Sayyahfar S, Ghaderipour M.

- Prevalence of Intestinal Parasitic Infection in Cancer, Organ Transplant and Primary Immunodeficiency Patients in Tehran, Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019 Feb 26;20(2):495-501. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.2.495.
- Gefen-Halevi S., Biber A., Gazit Z., Amit S., Belausov N., Keller N., vd. Geri dönen yolcularda kalıcı karın semptomları: klinik ve moleküler bulgular. *J Trav Med*. 2022; 29
- Girginkardeşler N, Coşkun S, Balcıoğlu İC, Ertan P, Ok ÜZ: *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, succesfully treated with secnidazole. *Clin Microbiol Infect*, 2003; 9, 110-113.
- Girginkardeşler N, Kurt Ö, Dientamoebiosis. Özcel MA (ed), Özcelin Tibbi Parazit hastalıkları. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 2007;411-421.
- Gough R, Ellis J, Stark D. *Dientamoeba fragilis* gerçek zamanlı PCR testlerinin kullanımına ilişkin karşılaştırma ve öneriler. *J Clin Microbiol*. 2019; 57:e01466–18.
- Guadano-Procesi I, Berrilli F, Margherita Montalbano Di Filippo, David Di Cave. Detection and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from symptomatic patients: New insights from Italy into a little-known gastrointestinal protozoan. *Parasitology International* 98:102816, 2024.
- Gülmez D, Sarıbaş Z, Akyön Y, Ergüven S. The results of Hacettepe University Faculty of Medicine Parasitology Laboratory in 2003-2012: evaluation of 10 years. *Türkiye Parazitol Derg* 2013;37:97-101.
- Gureser AS, Karasartova D, Sarzhanov F, Kosar N, Taylan Ozkan A, Dogruman Al F. Prevalence of Blastocystis and *Dientamoeba fragilis* in diarrheal patients in Corum, Türkiye. *Parasitology Research*. 2023. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07987-0>
- Gureser AS, Karasartova D, Sarzhanov F, Kosar N, Taylan-Ozkan A, Dogruman-Al F. Prevalence of Blastocystis and *Dientamoeba fragilis* in diarrheal patients in Corum, Türkiye. *Parasitol Res*, 2023 Oct 2.
- Güreser A. S, Ergüven S. *Dientamoeba fragilis* (Derleme). *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35:168-170.
- İnal N, Ünalın Altıntop T, Ergüven S, Akyön Yılmaz Y. Retrospective Results of Hacettepe University Faculty of Medicine Parasitology Laboratory Between

- 2014-2019. *Turkiye Parazitol Derg.* 2022 23; 46(2):114-118.
- Jepps MW, Dobell C, 1918. *Dientamoeba fragilis* n.g., n. sp., new intestinal amoeba from man. *Parasitology* 10: 352 – 367.
- Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG: Emerging from obscurity: Biological, clinical and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clin Microbiol Rev*, 2004; 17, 553-570.
- Karaman U, Atambay M, Ayçan O, Yologlu S, Daldal N. Incidence of intestinal parasites in municipal sanitary workers in Malatya. *Turkiye Parazitol Derg* 2006;30:181-183.
- Karaman U, Turan A, Depecik F, Geçit I, Ozer A, Karcı E, Karadan M. Frequency of intestinal parasites among administrators and workers in sanitary and non-sanitary institutions. *Turkiye Parazitol Derg* 2011;35: 30-33.
- Kaya F, İnkaya AÇ, Aksoy S, Abbasoğlu O, Ertenli Aİ, Büyükaşık Y, Arıkan Akdağlı S, Akyön Y, Ergüven S. Investigation of Intestinal Protozoon Prevalence in Immunocompromised Patients at a University Hospital. *Turkiye Parazitol Derg* 2021;45(1):39-44.
- Millet VE, Spencer MJ, Chapin MR, Garcia LS, Yatabe JH, Stewart ME. Intestinal protozoan infection in a semicomunal group. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32(1): 54-60.
- Montraveta Querol, M., Bovo, M. V., Roig-Abraham, N., Romani, N., Alcaraz, A., & Fernández-Rivas, G. (2022). Should *Dientamoeba fragillis* be looked for in pediatric digestive pathology of an unknown cause? A proposed pilot case-control study. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 40(8), 436–440. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2022.03.007>
- Mumcuoğlu İ, Coşkun F. A, Aksu N, Purnak T, Güngör Ç. İBS’de *D. fragilis* ve *Blastocystis* spp. Rolü. *Turkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 73-77.
- Munasinghe VS, Vella NG, Ellis JT, Windsor PA, Stark D et al. Cyst formation and faecal–oral transmission of *Dientamoeba fragilis* – the missing link in the life cycle of an emerging pathogen. *Int J Parasitol* 2013;43:879-883.
- Norberg A, Nord CE, Evengard B, 2003. *Dientamoeba fragilis* –a protozoal infection which may cause severe bowel distress. *Clin Microbiol Infect* 9: 65 – 68.
- Ok ÜZ, Korkmaz M, Ok GE, Özkan AT, Özcel MA. Bağırsak protozoasının tanısında

- nativ-lugol, formol-eter konsantrasyon ve trichrome boyama yöntemlerinin karşılaştırılması. Türkiye Parazitoloji Derg, 1996; 20(1): 75-82.
- Ögren J, Dienus O, Löfgren S, Iveroth P, Matussek A. et al. *Dientamoeba fragilis* DNA detection in *Enterobius vermicularis* eggs. Pathog Dis 2013;69:157-158.
- Peek R, Reedeker FR, van Gool T. et al. Direct amplification and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from human stool specimens. J Clin Microbiol 2004;42:631-635.
- Portus M, Prats G. Contribution to the knowledge of intestinal protozoa infestation in the hospital population of Barcelona. Med Clin 1981; 76 (5): 203-205.
- R.S. van Gestel, J.G. Kusters, J.F. Monkelbaan, A clinical guideline on *Dientamoeba fragilis* infections, Parasitology. 146 (2019) 1131–1139, <https://doi.org/10.1017/S0031182018001385>.
- Rayan HZ, Ismail OA, El Gayar EK. Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. J Egypt Soc Parasitol. 2007 Aug;37(2):599-608. PMID: 17985591.
- Röser D, Nejsum P, Carlsgart AJ, Nielsen HV, Stensvold CR. et al. DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*. Exp Parasitol 2013;133:57-61.
- Sawangjaroen N, Luke R, Prociv P. et al. Diagnosis by faecal culture of *Dientamoeba fragilis* infections in Australian patients with diarrhoea. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993;87:163-165.
- Silberman JD, Clark CG, Sagin ML. *Dientamoeba fragilis* shares a recent common evolutionary history with the trichomonads. Mol Biochem Parasitol 1996; 76: 311-4.
- Spencer MJ, MR Chapin and LS Garcia. *Dientamoeba fragilis*: a gastrointestinal protozoan infection in adults. Am J Gastroenterol 1982;77:565-569.
- Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. et al. Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. Int J Parasitol 2005;35:57-62.
- Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J, 2005. Prospective study of the prevalence, genotyping, and clinical relevance of *Dientamoeba fragilis* infections in an Australian population. J Clin Microbiol 43: 2718 – 2723.
- Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. A review of the clinical

- presentation of dientamoebiasis. Am J Trop Med Hyg. 2010 Apr;82(4):614-9. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0478. PMID: 20348509; PMCID: PMC2844584.
- Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J: A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. Am J Trop Med Hyg, 2010; 82: 614-619.
- Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. Comparison of microscopy, two xenic culture techniques, conventional and Real-Time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in clinical stool samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010;29:411-416.
- Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J and Harkness J. Evaluation of Three Diagnostic Methods, Including Real-Time PCR, for Detection of *Dientamoeba fragilis* in Stool Specimens. Journal of Clinical Microbiology, Jan. 2006, Vol. 44(1): 232–235.
- Stensvold CR, Clark CG, Röser D. et al. Limited intra-genetic diversity in *Dientamoeba fragilis* housekeeping genes. Infect Genet Evol 2013;18:284-286.
- Tanyuksel M, Yilmaz H, Ulukanligil M, Araz E, Cicek M, Koru O, Tas Z, Petri WA Jr. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. Exp Parasitol 2005; 110:322-326.
- Taş Cengiz Z, Akbayram S, Çiçek M, Yilmaz H. [Intestinal parasitoses detected in primary schoolchildren in the Van province]. Turkiye Parazitoloj Derg 2009;33:289-293.
- Unalan-Altıntop T, Vahabov C, Ergunay K, Kurt O, Kav T, Akyon Y, Sibel Erguven. Investigation of *Dientamoeba fragilis* and Blastocystis in patients from Turkey with ulcerative colitis and irritable bowel syndrome: Any relation with genotypes?. Acta Tropica 231:106451, 2022.
- Üner A, Ertuğ S, Yurdagül C, Ertabaklar H, Akısu Ç. İzmir ve çevresinde insanlarda blastocystosis yaygınlığının araştırılması. 10. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı 135, 1997.
- Vandenberg O, Peek R, Souayah H, Dediste A, Buset M, Scheen R, Retore P, Zissis G, van Gool T, 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. Int J Infect Dis 10: 255 – 261.

- Van Gool T, Weijts R, Lommerse E, Mank TG. et al. The triple faeces test: an effective tool for the detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:284-290.
- Verweij JJ, Mulder B, Poell B, van Middelkoop D, Brienen EA, van Lieshout L. Real-Time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples. *Mol Cell Probes* 2007;21:400-404.
- Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, Jones SK, Whiteside TM. Detection of *Dientamoeba fragilis* by culture. *Br J Biomed Sci* 2003;60:79-83.
- Windsor JJ, Johnson EH. *Dientamoeba fragilis*: the unflagellated human flagellate. *Br J Biomed Sci* 1999; 56: 293-306.
- Wong ZW, Faulder K, Robinson JL. Does *Dientamoeba fragilis* cause diarrhea? A systematic review. *Parasitol Res.* 2018 Apr;117(4):971-980. doi: 10.1007/s00436-018-5771-4. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29404747.
- Yang J, Scholten T. *Dientamoeba fragilis*: A review with notes on its epidemiology, pathogenicity, mode of transmission and diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26(1): 16-22.
- Yereli K, Saruç M, Özdemir E, Girginkardeşler N, Özbilgin A. Demir eksikliği anemisi saptanan erişkin hastalarda bağırsak protozoa insidansının araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Derg*, 1998; 22(1): 29-31.
- Yıldız İ, Ertuğ S, Tileklioğlu E, Malatyalı E, Güçlü Ö, Ertabaklar H. Investigation of *Dientamoeba fragilis* Frequency in Faecal Samples of Patients with *Enterobius vermicularis* Infection by Polymerase Chain Reaction. *Türkiye Parazit Derg.* 2021 Aug 4;45(3):195-200.
- Yılmaz U, Ostan İ, Kayran E, Özbilgin A. Celal Bayar Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2000-2001 yıllarında saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazit Derg* 2002; 26: 60-63.

### KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Kanser Tanısı Alan Hastalarda Dientamoeba fragilis'in Moleküler Prevalansı ve Moleküler Karakterizasyonu					
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU							
DEĞERLEN DİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dil			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI		A				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
DİĞER	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No :	2023/595	Tarih :	25.09.2023			
	Yukarıda bilgileri verilen prospektif başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/ çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						
<b>KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU</b>							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		Beşeri Tıbbi Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik					
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI		Prof. Dr. Nuri TUTAR					

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		Araştırma ile İlişki		Katılım (*)		İmza
Prof. Dr. Nuri TUTAR	Göğüs Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E	X	K		E	X	H
Prof. Dr. Adnan BAYRAM	Anest ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E	X	K		E	X	H
Prof. Dr. Zuhâl HAMURCU	Tıbbi Biyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E		K	X	E	X	H
Doç.Dr.Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	X	K		E	X	H
Doç. Dr. Hakan İMAMOĞLU	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	X	K		E	X	H
Doç. Dr. Oktay BOZKURT	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E	X	K		E	X	H
Doç. Dr. Duygu G. SEVİM	Göz Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E		K	X	E	X	H
Doç.Dr.Sibel YEL	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E		K	X	E	X	H
Doç.Dr.Murat TÜRK	Göğüs Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E	X	K		E	X	H
Doç. Dr. Gökhan ÇOBAN	Ortodonti	E.Ü. Diş Hek.Fak.	E	X	K		E	X	H
Doç. Dr. Mehmet PATMANO	Genel Cerrahi	Kayseri Şehir.Hst.	E	X	K		E	X	H
Doç. Dr. Gözde E. ZARARSIZ	Biyostatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E		K	X	E	X	H
Dr.Öğr.Üyesi Ercan BABUR	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	X	K		E	X	H
Av. Hasan TOSUN	Avukat	Kayseri Barosu	E	X	K		E	X	H
Sevrap KOÇER	Sivil Üye	Serbest	E		K	X	E	X	H

\*: Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Nuri TUTAR  
İmza:

*Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır*

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kanser Tanısı Alan Hastalarda Dientamoeba fragilis'in Moleküler Prevalansı ve Moleküler Karakterizasyonu
-----------------------	--

VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	
----------------------------------	--

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Mevlıgazi/KAYSERİ
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11
	FAKS	0 352 437 52 85
	E-POSTA	serifeserim@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Merve Yürük	
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Parazitoloji	
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji AD., Kayseri	
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI ADI SOYADI		
	DESTEKLEYİCİ		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>
FAZ 4		<input type="checkbox"/>	
Gözeysel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>	
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>	
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>	
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>	
Diğer ise belirtiniz	Yüksek Lisans Tezi		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ <input type="checkbox"/> ÇOKMERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/> ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>		

## KANSER TANISI ALAN HASTALARDA DIENTAMOEBİA FRAGİLİS'İN MOLEKÜLER PREVALANSI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>26</b> BENZERLİK ENDEKSİ	% <b>24</b> İNTERNET KAYNAKLARI	% <b>5</b> YAYINLAR	% <b>7</b> ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	------------------------------------	------------------------	--------------------------------

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>acikbilim.yok.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>16</b>
<b>2</b>	<b>Submitted to Erciyes Üniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	% <b>4</b>
<b>3</b>	<b>turkiyeparazitolojidernegi.org</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	<b>dspace.gazi.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	<b>acikarsiv.ankara.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>6</b>	<b>Submitted to Dokuz Eylul Üniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<b>Kiliçarslan, Özge Aksel. "Serebral kortikal malformasyonlu olgularda tubulin gen defektlerinin araştırılması", Dokuz Eylul Üniversitesi (Turkey), 2024</b> Yayın	<% <b>1</b>
<b>8</b>	<b>www.ncbi.nlm.nih.gov</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>9</b>	<b>docplayer.biz.tr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>10</b>	<b>abis-files.erciyes.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Makbule SALLANBAŞ  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Tarihi ve Yeri** :  
**Tel**  
**E-mail** :

### Öğrenim durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen-edebiyat Fakültesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	Kafkas Üniversitesi	2017-2021
Yüksek lisans	Tıbbi Parazitoloji ABD	Erciyes Üniversitesi	2022/2023- devam ediyor

**Tez danışmanı:** Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK

### ESERLER

#### Posterler

1- Sallanbaş M, Yürük M. Molecular prevalence and molecular characterization of *dientamoeba fragilis* in patients diagnosis of cance. 10. Uluslararası Katılımlı Erciyes Tıp Tıbbi Genetik Kongresi, 12-14 Haziran 2025. Kayseri, TÜRKİYE.

#### Katıldığı Kongreler:

1- 10. Uluslararası Katılımlı Erciyes Tıp Tıbbi Genetik Kongresi