

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İMMUN YETMEZLİĞİ OLAN VE
OLMAYAN İSHALLİ HASTALARDA
DIENTAMOEBİ FRAGİLİS'İN GÖRÜLME
SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE GENOTİP
PROFİLİNİN BELİRLENMESİ**

Z. GÜLTER YALÇIN

TIBBİ PARAZİTOLOJİ
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2010

DEÜ.HSI.PHD-2003970085

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İMMUN YETMEZLİĞİ OLAN VE
OLMAYAN İSHALLİ HASTALARDA
DIENTAMOEBİ
FRAGİLİS'İN GÖRÜLME SIKLIĞININ
ARAŞTIRILMASI VE GENOTİP PROFİLİNİN
BELİRLENMESİ**

**TIBBİ PARAZİTOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

Z. GÜLTER YALÇIN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Ümit Aksoy

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2006.KB.SAG.016 sayı ile desteklenmiştir

DEÜ.HSI.PhD-2003970085

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR.....	viii
TEŞEKKÜR.....	x
ÖZET	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Tarihçe.....	7
2.2. Taksonomi	8
Filogenezis.....	9
2.3. Morfoloji ve İnce Yapı.....	10
Işık Mikroskobu ile İzlenen Genel Morfoloji.....	10
Elektron Mikroskobu ile İzlenen İnce Yapısı.....	11
2.4. Yaşam Döngüsü- Bulaş Yolu	14
2.5. Patogenez	15

2.6. Klinik	17
2.7. Epidemiyoloji	20
2.8. Tanı	23
Direkt Tanı Yöntemleri	24
Mikroskopik Yöntemler	24
Moleküler Yöntemler	28
İndirekt Tanı Yöntemleri	33
2.9. Tedavi	34
2.10 Korunma	35
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	36
3.1 Araştırma Tipi	36
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	36
3.3. Araştırma Evreni ve Örneklemi	36
3.4. Çalışma Materyali/Yöntemi	37
3.4.1.Gereç ve Yöntem: Mikroskopi ile Değerlendirme	38
Boya Aşamasında Kullanılan Solusyonların Hazırlanması	39
Boyanan Lamların Değerlendirilmesi	42
Selofan Bant Yöntemi	43
3.4.2. Gereç ve Yöntem: PCR ile Değerlendirme	43

PCR Solusyonları	44
DNA Ekstrasyon Yöntemi	45
PCR Amplifikasyonu.....	47
Elektroforez.....	48
Purifikasyon	48
Pozitif Ürünlerin Genotiplendirilmesi	49
Sekansların Elde Edilmesi	49
3.5. Araştırma Değişkenleri	49
3.6. Veri Toplama Araçları	50
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	50
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	51
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	51
3.10. Etik Kurul Onayı.....	52
4. BULGULAR	53
4.1. Olgulara Ait Bulgular.....	53
Olguların Demografik Özellikleri	53
Olgulara Ait Klinik Bulgular	57
Olgularda <i>D. fragilis</i> Enfeksiyonunu İnceleme Yöntemleri	58
4.2. <i>D. fragilis</i> Saptanan Olgulara Ait Bulgular	60

<i>D. fragilis</i> Saptanan Olguların Demografik Özellikleri	60
<i>D. fragilis</i> Saptanan Olgulara Ait Klinik Bulgular.....	61
4.3. Tek Bir Enfeksiyon Etkeni Olarak <i>D. fragilis</i> Saptanan Olgulara Ait Klinik Bulgular ..	64
4.4. <i>D. fragilis</i> Saptanan Olgulardaki Kronik Barsak Hastalığı İlişkisi	67
Dientamoebiosisli Hastaların Bazı Laboratuvar Sonuçları İle İlişkisi	67
Olguların Gaita Kıvamları ile <i>D. fragilis</i> Görülmesi Arasındaki İlişki	68
Dientamoebiosisli Hastalardaki Semptomların Yaş Gruplarına Göre İncelenmesi	69
Dientamoebiosisli Hastalardaki Semptomların Cinsiyete Göre İncelenmesi	71
<i>D. fragilis</i> Saptanan Olguların Mikroskopik Değerlendirilmesi.....	72
4.5. <i>D. fragilis</i> Pozitif Preparat Görüntüleri.....	73
4.6. <i>D. fragilis</i> Saptanan Olguların Moleküler Değerlendirilmesi.....	80
4.7. PCR ile <i>D. fragilis</i> Saptanan Bazı PCR Ürünlerinin Sekans Analiz Sonuçları	82
5. TARTIŞMA.....	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	104
7. KAYNAKLAR.....	106
8. EKLER.....	114
EK 1 Etik Kurul Kararı.....	114
EK 2 Tez Başlığı Değişikliği	115
Özgeçmiş.....	116

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmaya alınan olguların gruplara göre yaş ortalamaları.....	53
Tablo 2. Olguların immün sisteme ve yaşa göre dağılımı	54
Tablo 3. Araştırma gruplarının cinsiyete göre dağılımı.....	54
Tablo 4. Araştırma gruplarının mevsimsel dağılımı.....	55
Tablo 5. Alınan gaita örneği kıvamlarının araştırma gruplarına göre dağılımı	57
Tablo 6. Araştırmaya alınan gruplarda kronik diyare varlığının dağılımı	57
Tablo 7. Araştırmaya alınan gruplarda barsak hastalıklarının dağılımı.....	58
Tablo 8. Araştırmaya alınan gruplarda PCR yöntemi ile tespit edilen <i>D. fragilis</i> 'in dağılımı	59
Tablo 9. Araştırmaya alınan gruplarda hematoksilen boyama yöntemi ile tespit edilen <i>D. fragilis</i> 'in dağılımı	59
Tablo 10. <i>D. fragilis</i> saptanan olguların cinsiyete göre dağılımı	60
Tablo 11. <i>D. fragilis</i> olgularının yaş gruplarına göre dağılımları	60
Tablo 12. <i>D. fragilis</i> 'in tek etken olduğu olgularının dispeptik şikayetle ilişkisi.....	64
Tablo 13. <i>D. fragilis</i> 'in tek etken olduğu olgularının intestinal gaz şikayeti ile ilişkisi.....	64
Tablo 14. <i>D. fragilis</i> 'in tek etken olduğu olgularının diyare ile aralıklı seyreden kabızlık şikayeti ile ilişkisi	65
Tablo 15. <i>D. fragilis</i> 'in tek etken olduğu olgularının ürtikeryal kaşıntı şikayeti ile ilişkisi.....	65
Tablo 16. <i>D. fragilis</i> 'in tek etken olduğu olgularının perianal kaşıntı şikayeti ile ilişkisi	66
Tablo 17. Dientamoebiosisli hastaların gastrointestinal semptomlarının yaş gruplarına göre dağılımları	70
Tablo18. Dientamoebiosisli hastaların gastrointestinal semptomlarının cinsiyete göre dağılımı	71
Tablo 19. Çalışma gruplarında demir hematoksilen boyama ve çoklaştırma yöntemi ile saptanan saptanan parazitler ve sıklıkları	79
Tablo 20. Demir hematoksilen boyama yöntemi ile PCR yöntemi arasındaki tutarlılık oranı	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 5.8 rRNA sekans bölgesine dayanan trikomonadlar arasındaki filogenetik ilişki.....	9
Şekil 2. <i>D. fragilis</i> 'in öngörülen yaşam döngüsü	15
Şekil 3. Karşılaştırılan <i>D. fragilis</i> tanı yöntemlerinin spesifite ve sensitiviteleeri.....	30
Şekil 4. Dientamoebiosis tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlar	34
Şekil 5. Gaita örneklerinin genelde izlenen kıvamları	38
Şekil 6. Selofan bant yöntemi	43
Şekil 7. Çalışma grubuna alınan hastalara ait veriler	50
Şekil 8. İmmun yetmezlikli ve immün yetmezliği olmayan hastaların İzmir ve İzmir dışında olan ikametlerine göre dağılımları.....	56
Şekil 9. PCR ve demir hematoksilin boyama yöntemleri ile <i>D. fragilis</i> saptananların mevsimlere göre sayısal dağılımları.....	61
Şekil 10. Çalışmadaki hastaların varolan gastrointestinal semptomları ve <i>D. fragilis</i> pozitifliği ile ilişkisi.	62
Şekil 11. Kronik barsak hastalığı, barsak malignitesi ve barsak dışı malignitesi olanlarda <i>D. fragilis</i> sıklığı	67
Şekil 12. Hastaların bazı laboratuvar parametrelerinin <i>D. fragilis</i> pozitifliği ile ilişkisi	68
Şekil 13. Gaita örneğinin kıvamı ile <i>D. fragilis</i> ilişkisi.	69
Şekil 14. Demir hematoksilin boyama ile saptanan <i>D. fragilis</i> yoğunluğu ile PCR pozitifliğinin karşılaştırılması	72
Şekil 15. PCR ile <i>D. fragilis</i> pozitif saptan bazı olguların PCR Ürünlerinin Sekans Analizi ..	83

RESİMLER

Resim 1. Kültür ortamında <i>D. fragilis</i>	12
Resim 2. Ekstranükleer lifler	12
Resim 3. Ekstranükleer lifler içeren mikrotübül demeti , Polar kompleks, parabazal cisimcik... ..	12
Resim 4. Atraktaför, parabazal filament	13
Resim 5. <i>D. fragilis</i> 'in nükleus yapısı	13
Resim 6. Eksentrik nükleus	13
Resim 7. Fagositozla beslenme	13
Resim 8. <i>D. fragilis</i> 'in ekzositozu	13
Resim 9. Fiksatifli örnekten hazırlanan nativ-Lugol preparat görüntüsü ve boyanmış <i>D.</i> <i>fragilis</i> preparatları	73
Resim 10. <i>D. fragilis</i> pozitif olarak değerlendirilen hastanın nativ-Lugol, Robinson Besiyeri ortamı ve boyalı preparat görüntüleri.....	74
Resim 11. Boyalı ve fiksatifli solusyondan uygulanan Lugol preparatlarda <i>D. fragilis</i> 'in motilitesini gösteren görüntüler	75
Resim 12. Demir hematoksilen ile boyanmış preparatlarda kist benzeri olduğu düşünülen yapılar	76
Resim 13. Robinson besiyeri ortamında <i>D. fragilis</i>	76
Resim 14. Farklı hasta örneklerindeki <i>D. fragilis</i> görüntüleri	77
Resim 15. Farklı hasta örneklerindeki <i>D. fragilis</i> ile beraber görülen ve <i>D. fragilis</i> ile karışabilen parazitler	78
Resim 16. % 1.5 Agaroz jelde yürütülen PCR ürünlerinin 863 bp.deki görüntüleri.....	80
Resim 17. PCR pozitif örneklerde RsaI enzimi ile kesilerek elde edilen RFLP görüntüsü.....	81
Resim 18. DdeI ve RsaI restriksiyon enzimi ile kesilmiş jel görüntüsü.....	81

KISALTMALAR

AIDS:	Edinilmiş bağışıklık sendromu
HIV:	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
SSU rRNA:	Ribozomun küçük alt birimine ait RNA'yı kodlayan bölge
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
ITS:	İnternal transkript bölgesi
Mt:	Mikrotübül
PC:	Polar kompleks
At:	Atraktafor
PF:	Parabazal filament
PB:	Parabazal cisim
N:	Nükleus
M:	Myelin
B:	Bakteri
RS:	Pirinç unu
DV:	Sindirim granülleri
RFLP:	Restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi
İBS:	İrritable barsak sendromu
IIF:	İndirekt immün floresan
SAF:	Sodyum asetat-asetik asit-formolin
MIF:	Mertiolat – iodin formalin
PVA:	Polivinil alkol
TFT:	Üçlü feçes test
BD:	Boeck ve Drbohlav's besiyeri
MBD:	Modifiye Boeck ve Drbohlav's besiyeri
ATCC:	"American Type Culture Collection"
HRM:	Yüksek çözünürlüklü erime eğrisi
Tm:	Erime sıcaklığı
IFAT:	İndirekt floresan antikör testi
DEÜH:	Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi
MLKL:	Merkez Laboratuvarı Koproparazitoloji Laboratuvarı
O-KTÜ:	Onkoloji Kemoterapi Tedavi Ünitesinde tedavi gören hastalar

BUCH: Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi

TESEKKÜR

Doktora tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ümit Aksoy'a bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak tez çalışmalarını boyunca verdiği tavsiyelerinden, cesaretlendirmelerinden ve çalışma direncime, azmime verdiği destekten dolayı çok teşekkür ederim. Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Çiler Akısü'ye tezi yapabilmemi sağlayacak gerekli çalışma yöntemi, disiplin ve bilgi ve becerilerimi kazanmamı sağladığı ve desteklediği için, DEÜ Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Arzu Sayiner'e konusundaki bilgi ve deneyimlerini tüm tez çalışmam boyunca paylaşarak çalışmanın ortaya çıkmasındaki büyük katkı ve yönlendirmeleri için, Celal Bayar Üniversitesi Parazitoloji AD. öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Nogay Girginkardeşler'e tez çalışmama başlangıç oluşturan bilgi ve deneyimi aktardığı ve bu süreci daha hızlı geçmemi sağlayan katkısı için, ve Behçet Uz Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları İmmunoloji Birimi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ferah Genel'e çalışma grubu örneklerini oluşturmamızı sağlayan katkı ve desteği için, Sayın Doç. Dr. Canan Vergin'e BUCH'den örnek almamızı sağlayan gerekli izinleri için, Celal Bayar Üniversitesi Halk Sağlığı AD. öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Erhan Eser'e tez çalışmamın istatistik bölümüne verdiği katkı ve desteği için, DEÜ Halk Sağlığı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Türkan Günay ve Sayın Araş. Gör. Dr. Hatice Şimşek'e çalışma gruplarını oluşturmamda gösterdikleri bakış açısı için, arkadaşım dostum Sayın Ali Salim Kayırcı'ya tezimin sayfa düzeninin oluşmasında ve şekillerin biçimlendirilmesinde verdiği katkı için, Ege Üniversitesi Histoloji AD. Yüksek Lisans öğrencisi Sayın Özen Akarca'ya çalışmamın en zorlu bölümü olan örnekleri oluşturma aşamasındaki yardımları ve desteği için, laboratuvar çalışmamız Sayın Laboratuvar Teknikeri Şeniz Kaçıkan'a gene bu aşamadaki katkısı için, Anabilim Dalımızdaki öğretim üyelerinin hepsine, doktora eğitimim boyunca kazandırdıkları bilgi, beceriler ve bunları kullanmamı sağlayacak olanakları sağladıkları için ve beraber yol aldığımız çalışma arkadaşlarıma, üniversitemiz'in Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına çok teşekkür ederim.

İMMUN YETMEZLİĞİ OLAN VE OLMAYAN İSHALLİ HASTALARDA
DİENTAMOEBİ FRAGİLİS'İN GÖRÜLME SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE GENOTİP
PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

Z. Gülder Yalçın, Tıp Fakültesi

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıbbi Parazitoloji AD. 35340 Balçova-İzmir

ÖZET

Dientamoeba fragilis, çeşitli gastrointestinal rahatsızlıklara neden olabilen, tanısının ise oldukça güç konabildiği bir kalın barsak protozoonudur. Bu tezde ülkemizde tanı yöntemi henüz standardize edilmemiş olan bu parazitin kalıcı boyama ve PCR yöntemleri ile tanısının yapılması, bu iki yöntemin karşılaştırılması, parazitin görülme sıklığı üzerine immun sistem etkisinin araştırılması, ayrıca parazitin genotip profilinin belirlenmesi hedeflenilmiştir

Doksan immun yetmezlikli ve 202 immun yetmezliği olmayan, diyareli hastanın gaita örnekleri demir hematoksilin boyama yöntemi ve PCR ile incelenmiştir. Genotip profili için RFLP yöntemi uygulanmış, ayrıca 18 pozitif örneğe sekans analizi yaptırılmış, sonuçları değerlendirilmiştir.

İmmun yetmezliği olan grupta demir hematoksilin boyama yöntemi ile iki (%2.2) olguda, PCR ile dört olguda (%4.4) *D. fragilis* pozitif saptanmıştır. İmmun sistemi sağlam olanlarda boyama yöntemi ile %22.8 (46/202), PCR yöntemiyle %24.3 (49/202) sıklıkta *D. fragilis* saptanmıştır. Tüm olgular arasında *D. fragilis* pozitifliği demir hematoksilin boyama ile %16.4 (48/292) olup, PCR ile %18.2 (53/292) bulunmuştur. Testler arasında tutarlılık $\kappa=0.77$ değeriyle oldukça iyi olarak değerlendirilmiştir. Diyare ile aralıklı kabızlık, gaz, dispeptik şikayetler, perianal kaşıntı, ürtikeryal kaşıntı şikayeti ve periferal eozinofili bulgusu olanlarda *D. fragilis* anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Onsekiz PCR ürününün sekans analizi yaptırılmış, İzmir 1, İzmir 2 ve İzmir 3 olarak adlandırılan örneklerden İzmir 1 ve 3 Genotip 1 grubunda, İzmir 2 ise Genotip 2 grubunda değerlendirilmiştir.

D. fragilis uygun tanı yöntemleri kullanıldığında, en sık görülen parazitler arasındadır. Nonspesifik gastrointestinal semptomlara sebep olması, tanısına önem verilmesi gerektiğini göstermiştir. Fiksatifli örneklerin boyanarak incelenmesi hatta kronik diyareli ve immun

yetmezlikli hastalarda PCR yönteminin kullanılması gerçek parazit sıklığına ve parazit hakkında açığa çıkmamış bilgilere ulaşılmasını sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Dientamoeba fragilis*, immun yetmezlik, tanı, PCR, genotip.

INVESTIGATION OF FREQUENCY AND DETERMINATION OF GENOTYPE
PROFILE OF *DIENTAMOEBEA FRAGILIS* IN DIARRHEAL PATIENTS WITH AND
WITHOUT IMMUNE DEFICIENCY

ABSTRACT

Dientamoeba fragilis is a protozoon of the large intestine, which may lead to various gastrointestinal disorders and which is difficult to diagnose. As diagnostic procedure has not been standardized in our country yet, the aim of this study is to diagnose *D. fragilis* by using iron hemotoxylin stain and PCR methods, as well as to compare these methods, to study the effect of immune system on frequency of parasite and determine genotype profile of the parasite.

Stool samples from ninety diarrheal patients with immune deficiency and 202 diarrheal patients without immune deficiency were investigated by iron hematoxylin staining and PCR method. RFLP method was applied for genotype profile, 18 positive samples underwent sequence analysis, and the results were evaluated.

In the group with immune deficiency, *D. fragilis* was detected in two (2.2%) cases by the staining method, and in four (4.4%) by the PCR. Among the immunocompetent patients, *D. fragilis* frequency was identified as 22.8% (46/202) using the staining method, and as 24.3% (49/202) using the PCR method. Among all cases, *D. fragilis* positivity was 16.4% (48/292) with iron hematoxylin staining, and 18.5% (53/292) with PCR. The compatibility between the tests was good (Kappa=0.77, p=0.000). *D. fragilis* was significantly more prevalent in those with complaints of diarrhea accompanied by constipation, flatulence, dyspepsy, perianal itch, urticarial itch and peripheral eosinophilia. Eighteen PCR products underwent sequence analysis, and among the samples which were defined as İzmir 1, İzmir 2 ve İzmir 3; İzmir 1 and 3 were evaluated in the Genotype 1 group, and İzmir 2 in Genotype 2 group.

As *D. fragilis* causes nonspecific gastrointestinal symptoms, more importance should be given for its diagnosis. The use of permanent staining for fixed samples, and even use of PCR method with chronic diarrhea or immunodepressed patients will provide access to real frequency of *Dientamoebiasis*.

Key words: *Dientamoeba fragilis*, immunodeficiency, diagnosis, PCR, genotype

1. GİRİŞ VE AMAC

İnsan kalın barsağını infekte eden *Dientamoeba fragilis* (*D. fragilis*), sadece trofozoit formu olan bir barsak protozoonudur. Trofozoit formu dayanıksız olan ve kist formu da olmayan *D. fragilis*, tüm dünyada yaygın olarak görülmesine rağmen, tanısının zor koyulabilmesi nedeniyle az sayıdaki merkez tarafından izlenebilmektedir. Bu nedenle de organizma ile ilgili bilgiler sınırlı ve tartışmalı kalmıştır. Literatürde kommensal parazitler arasında yer almış olmakla birlikte ilk olarak tanımlandığı 1927 yılından itibaren patojenitesi ile ilgili raporlar mevcuttur. Son yıllarda gittikçe artan sayıda kronik diyare etkeni olarak gösterilen ve başka birçok ciddi gastrointestinal semptomla hatta erişkinlerde kolit ile de ilişkilendirilen, patojenik protozoonlar arasında kabul gördüğü araştırmalar yayınlanmaktadır (1,2,3,4). *D. fragilis*'in araştırıldığı topluluklarda prevalansı %1.4-19 arasında görülmektedir. Hatta, kalabalık grupların birlikte yaşadığı, kişisel hijyen alışkanlıklarının olmadığı topluluklarda prevalans %53 olabilecek kadar yüksek oranlarda görülmüştür (5,6) Parazitin tanısı için gereken uygun yöntemler kullanıldığında bir çok çalışmada *B. hominis*'den sonra ikinci sıklıkta, *G. intestinalis*'ten ise daha sık olarak görülmektedir (7,8,9,10). Günümüzde AIDS hastalarının ve immunsupresif ilaç kullanan transplant hastalarının, sitotoksik ilaç tedavisi alan kanserli hastaların giderek daha da artması nedeniyle immun yetmezlik tablolarıyla gelişen parazit enfeksiyonları da önemli ve hayatı tehdit edici hale gelmeye başlamıştır (10). İmmun yetmezlik durumunda *D. fragilis*'in klinik seyri konusunda henüz kesin bir bilgi sahibi olunmamakla birlikte, Mendez ve ark, 82 HIV (+) olguda %25.3 oranında *D. fragilis* saptamışlardır (11). Bu çalışmada ele alınan temel parametrelerden biri, ihmal edilmiş bir protozoon olan *D. fragilis*'in klinik önemi gün geçtikçe daha fazla vurgulanırken, yaygın bir dağılıma da sahip olan enfeksiyonunun görülme sıklığı üzerine immun sistemin etkisini araştırmaktır. Bu amaçla görülme sıklığının daha fazla olabileceği düşünülen ishalleri hasta popülasyonu seçilmiştir. Çalışmanın dayandığı ana unsurlardan biri de bu parazitin saptanmasında en duyarlı tanı yöntemini belirlemek, bu konuda sınırlı çalışmaların bulunduğu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemini standardize ederek genotiplendirmesini yapmaktır. Parazitin görülme sıklığı üzerine immun yetmezliğin etkisini değerlendirebilmek için, immun sistemi sağlam olanlarla, immun yetmezlikli ishalleri hasta popülasyonunun karşılaştırılması planlanmış ve her iki grupta boyalı mikroskopik bakı ve

PCR yöntemi kullanılarak *D. fragilis* aranması ve PCR yöntemi ile pozitif bulunan örneklerde genotiplendirmenin de yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

D. fragilis ilk kez 1909'da Wenyon tarafından saptanmış olmasına karşın 1918'de Jepps ve Dobell tarafından tanımlanmış ve isimlendirilmiştir (12). İsimlendirilmesinde çift nükleuslu olması ve dışkı ile atılımını takiben kısa sürede yapısının bozulması özellikleri esas alınmıştır.

Önceleri kommensal parazitler arasında gösterilmiş olup, 1927'den itibaren *D. fragilis*'in patojen olabileceğiyle ilgili raporlar yayımlanmıştır (12).

İnsan kalın barsağının bir paraziti olan *D. fragilis*, taze preparatlarda hareketli olması ve psödopodları ile amibe benzemesi nedeniyle başlangıçta "Entamobidae" ailesinde sınıflandırılmıştır. Dobell, ışık mikroskobu, boyama ve kültür yöntemlerini birlikte kullanarak yaptığı çalışmalarda, bu organizmadaki "sentrodesmozomları" fark etmiştir ve kümes hayvanlarının bir paraziti olan kültür ya da doku invazyonu sırasında kamçısını kaybeden trikomonad kamçılısı olduğu düşünülen, *Histomonas meleagridis* (*H.meleagridis*)'e büyük benzerlik gösterdiğini rapor etmiştir. 1953'de Grasse tarafından Dientamobidae Entamobidae ailesinden çıkarılmıştır (12). 1972'de, *Trichomonas*, *Histomonas* ve *Dientamoeba*'nın ortak antijenleri gel difüzyon ve immunoelktroforez yöntemleri ile saptanmıştır. Buna bağlı olarak *Histomonas* ile yakın antijenik özellikler gösterdiği, *Trichomonas* ile kısmen ilişkili olduğu, *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba invadens* ile antijenik özellikleri bakımından farklı olduğu gösterilmiştir (13). Takiben 1974'de elde edilen transmisyon elektron mikroskobik görüntülerde, nükleus yapısının trikomonad kamçılısına benzediği, ayrıca artraktofor (ekstranükleer mitotik iğ) içerdiği, parabasal aparat benzeri organeli ile bölünme sırasında görülen ekstranükleer içciklerin (resim 3,4) olduğu rapor edilmiştir (14). Tüm bu bulgularla *D. fragilis*'in trikomonad'larla ilişkisi morfolojik açıdan desteklenmiştir (5,15). 1980'de "Trichomonadida" olarak, *Histomonas*, *Monocercomonas* ve *Trichomonas* ve *Hypermastigida* ile birlikte ve superorder "Parabasalidea"da yeniden sınıflandırılmıştır (2,15). 1996'dan itibaren, *Dientamoeba*'nın taksonomik pozisyonunda moleküler teknikler kullanılmıştır. Small subunit (SSU) rRNA gen sekanslarının (rDNA) karşılaştırmaları ile filogenetik ilişkiler saptanmış (2,16), *D. fragilis*'in kamçısının ve kinetozomunun tüm yaşam döngülerinde kalıcı olarak kaybolduğu ifade edilmiştir (17,18).

2.2. TAKSONOMİ

D. fragilis için bugün geçerli olan sınıflandırma aşağıdaki gibidir (15);

Alem: Protista

Kök: Protozoa

Kök altı: Sarcomastigophora

Sınıf üstü: Mastigophora

Sınıf: Zoomastigophora

Takım üstü: Parabasalidea

Takım: Trichomonadida

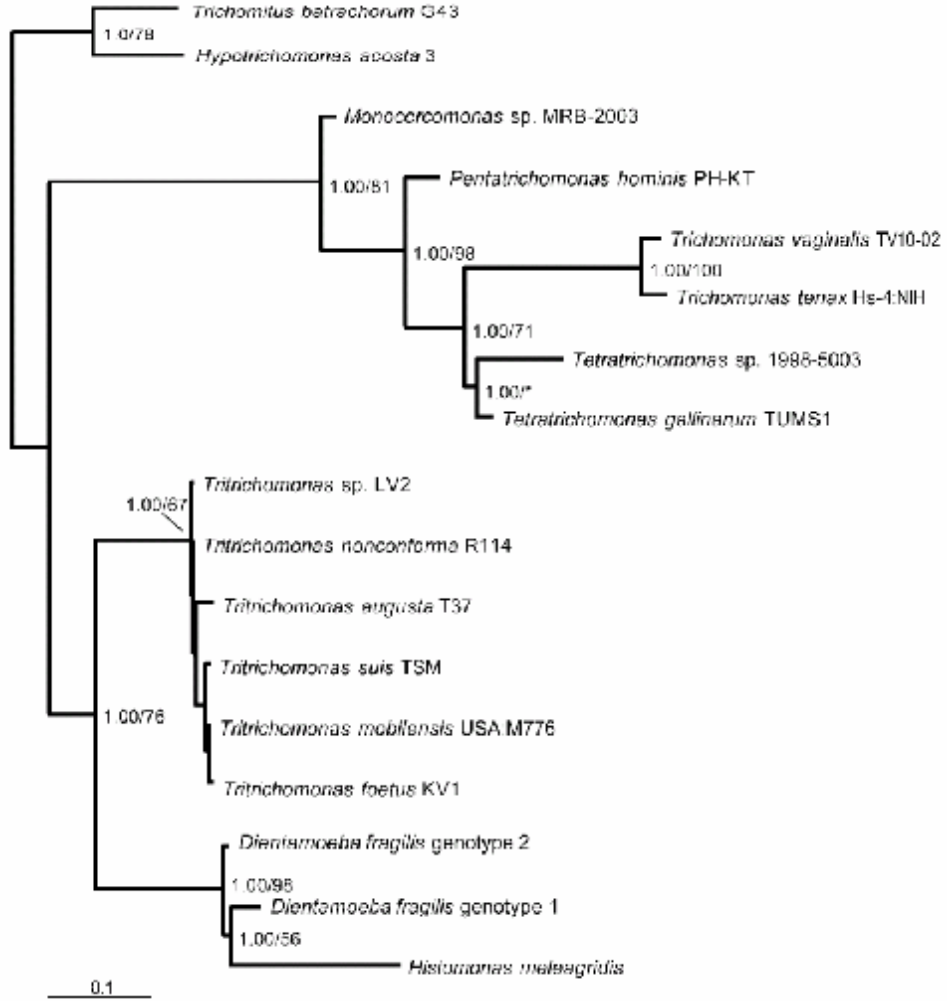
Aile: Monocercomonadidae

Cins: Dientamoeba

Tür: *Dientamoeba fragilis*

Filogenezis

Daha az korunmuş olan “internal transcript spacer” (ITS) bölgesinden yapılan çalışma sonucunda filogenetik ağaç oluşturulmuştur (şekil 1).



Şekil 1. 5.8 rRNA sekans bölgesine dayanan trikomonadlar arasındaki filogenetik ilişki (19)

Munsch ve ark, *H. meleagridis*'in “kist benzeri yapısı” olarak tanımladıkları formundan elde ettikleri PCR ürünleri ile, korunmuş kısımlar içeren 18S rRNA bölgesi ile hem korunmuş hem de korunmamış kısımlar içeren internal transkript bölgesini (ITS) hedefleyerek oluşturdukları filogenetik ağaçlarda, bu formun *H. meleagridis* olduğunun kesinleştiğini ifade etmişlerdir. Aynı zamanda 18S rRNA ile elde ettikleri filogenetik özelliklerde *Histomonas* ile ilişkili trikomonadlar arasında önceki filogenetik ağaçlara göre anlamlı bir farklılık olmadığı, fakat ITS bölgesi hedeflenerek yapılan filogenetik çalışmada

ise *H. meleagridis* ve *D. fragilis*'in yakın akrabalığının gözlenmediği rapor edilmiştir (20). *H. meleagridis* kist formunun sekansı ve *D. fragilis* trofozoit formunun sekansları ile elde edilen bu sonucun *D. fragilis*'in yaşam döngüsü üzerine de ışık tutabileceği tahmin edilmektedir.

2.3. MORFOLOJİ VE İNCE YAPI

İlk olarak 1918'de Jepps ve Dobell tarafından tanımlanan. *D. fragilis*'in elektron mikroskopik görüntüleri iç yapısı hakkında daha detaylı bilgi edinmemizi sağlamıştır Ancak yapısını tanımada en temel bilgiler, öncelikle ışık mikroskobu ile elde edilmiştir. İlk olarak Jepps ve Dobell tarafından farklı bir amip olarak tanımlanan *D. fragilis*, iki nükleuslu yapısından dolayı da "Dientamobea" olarak adlandırılmıştır. Buna karşın elektron mikroskopik görüntülerinde, parabasalidlerin (trikomonadida takımı) morfolojilerinde izlenen, hidrogenazom, parabazal aparat ve atraktafor (ekstranükleer mitotik lifler) benzeri yapılar tanımlanmıştır (16).

Işık Mikroskobu ile izlenen genel morfoloji

Organizma, 5-15µl boyutlarında, ince, yaprak görünümünde, hyalin olan pseudopoduyla düzensiz ve oldukça aktif bir şekilde hareket eden küresel, refraktil trofozoit yapısındadır (5,12). Bugüne kadar kist formu gösterilmemiştir. Sitoplazması, endoplazma ve ektoplazma olarak ikiye ayrılmaktadır (5,21). Besin vakuelleri, bakteri ve mantarları içermekte olup, endoplazmada sıklıkla ince granüller şeklinde görülmektedir. Lugol boya ile incelendiğinde endoplazmada glikojen depoları görülebilmektedir (12). Nativ preparatlarda başlangıçta yuvarlak görünümde olan trofozoitlerin, oda ısısında 5-10 dakika içinde yuvarlak şekilde görülmelerine neden olan paralizi durumlarından kurtularak, oluşturdukları tümsek ve çukurluklarla, karakteristik olarak fan şeklinde hareket kazandığı ifade edilmiştir. Amip trofozoitlerinden farklı olarak, endoplazmanın pseudopoda doğru akışı ve organizmanın ilerleme yönündeki hareketi görülmemektedir (5,12).

D. fragilis' in kültürde 11-19 µm boyutunda olduğu ancak 40µm'e kadar ulaşabildiği de rapor edilmiştir. Kültür preparatlarında, hareketsiz, çok sayıda pirinç unu granülleri içeren, refraktil cisim şeklinde görülmektedir (resim 1) (5,21).

D. fragilis'in tanınmasında karakteristik özellikte olan nükleusları, nativ ve Lugol preparasyonlarda görülmemektedir. İncelenecek olan gaita örneği pasajdan ayrıldıktan sonra, ilk 5-10 dakika içinde hazırlanmış olan preparatlarda trofozoitler tespit edilebilmektedir.

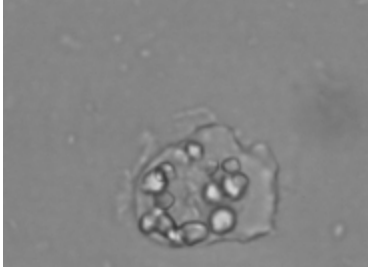
Ancak kesin tanı için bu yeterli olmayıp, kalıcı boyama yöntemi uygulanmalı ve preparatlardaki her bir nükleusun merkezinde yer alan 4-8 adet kromatin granüllerinin görülmesi gerekmektedir. Nükleus çapı, trofozoit çapına bağlı değişmekle birlikte genellikle 2µm'dir. Trofozoitlerin, %80'ni iki nükleuslu olup bu nükleuslar genellikle birbirlerinden uzak konumdadırlar. %20 trofozoit ise tek nükleuslu olarak rapor edilmiştir (5). Nadiren 3-4 nükleuslu olarak da görülebilmektedir (5,22).

İki nükleus arasındaki yapı *Dobell* tarafından "birleştiren iplikçik" ifadesiyle tanımlanmıştır (resim 2) (5,14). Bunun hücrenin sentrozomlarını birleştiren (sentrodezmöz) ve akromatik iğcik başlamasına yol açan fibröz yapı olduğunu ve tek nükleuslularda bu yapının görülmediğini belirtmiştir. İntranükleer bölünme merkezinden kaynaklandığını ileri sürülen bu yapılar "bölünme sonrası dezmoz" olarak ifade edilmiştir (5,14). Champ'in, *D. fragilis* ile ilgili elektron mikroskop görüntülerini açıkladığı çalışmasında, *Dobell*'in, nükleusları kalıcı olarak bağlayan bu yapıdan bahsettiği ve *D. fragilis* ile hindilerin patojeni olan *Histomonas meleagridis*'in morfolojik benzerliğini de ilk defa bu yapı ile karşılaştırmış olduğu belirtilmiştir. Nükleus yakınında iki dal halinde izlenen bu ekstranükleer lifleri (resim 2), daha sonra elektron mikroskop görüntüleri ile de doğrulamışlardır (14)

Elektron Mikroskobu İle İzlenen İnce Yapısı:

Nükleuslar arasında, polar kompleksten orjin alan ekstranükleer bir yapı bulunmuştur (resim 2,3). Ekstranükleer lifler, yaklaşık 30-40 mikrotübül içeren iki demet halindedir (resim 3). Birinci demet, nükleustan belirli bir uzaklıkta iken, diğeri nükleus bitişiğinde, sıklıkla nükleer kılıf kısmındadır. Mikrotübüller "polar kompleks"den orjin almaktadır (resim 3). Bu yapıda bir çift atraktafor (resim 4) bulunmaktadır ve parabazal filamentler atraktaforların dış yüzeyine doğru yanlamasına uzanmaktadır (resim 4). Golgi aparat kapsamındaki yapı, filamentler üzerinde uzanmakta ve trikomonad ve hipermastigotlardaki parabazal cisimciğe benzemektedir (resim 3). *D. fragilis*'in nükleer yapısı Entamoeba'lara nazaran trikomonad kamçılılarına daha yakındır (resim 5). Kromatin cisim veya granüller sıklıkla nükleusun içinde görülürler ve nükleer kılıf iki membrandan oluşur ve birçok por içerir (resim 5). Kromatin cisimlerin belirgin olmadığı durumlarda, tipik olarak eksentrik bir nükleolus (resim 6) izlenmektedir ve bu görüntünün interfazdaki nükleusu temsil edebileceği ifade edilmiştir. Elektron mikroskobu ile sitoplazmadaki "mikrocisim-benzeri" elektro-yoğun inklüzyonlar saptanmış ve bu inklüzyonlar daha sonra "hidrogenozom" olarak tanımlanmıştır.

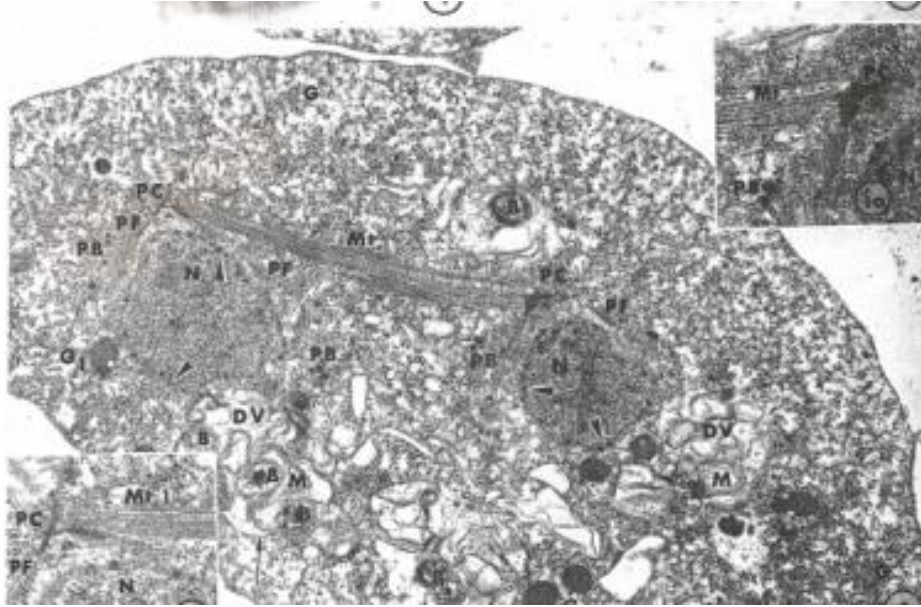
Sitoplazmada aynı zamanda myelin, bakteri veya pirinç unu içerebilen sindirim granülleri de bulunmaktadır (resim 5,7,8). *D. fragilis* fagositoz ile beslenmektedir (şekil 7) ve artık ürünler ekzositoz aracılığıyla sindirim vakuollerinden atılmaktadır (resim 8) (5,14)



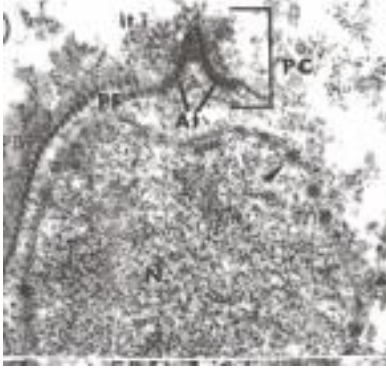
Resim 1. Kültür ortamında *D. fragilis*



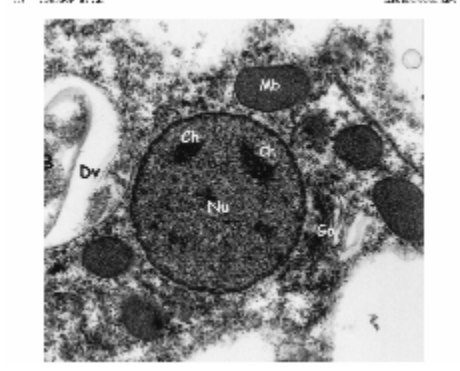
Resim 2. Ekstranükleer lifler



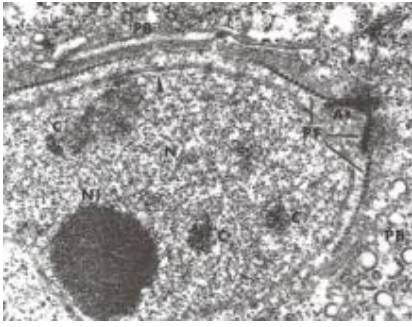
Resim 3. Ekstranükleer lifler içeren mikrotübül demeti (Mt), polar kompleks (PC), parabazal cisimcik (PB)



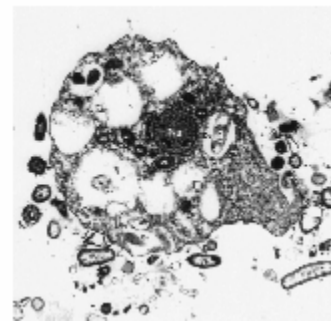
Resim 4. Atraktfor (At), Parabazal filament (PF)



Resim 5. *D. fragilis*'in nükleus yapısı



Resim 6. Eksentrik nükleus (N1)



Resim 7. Fagositozla beslenme

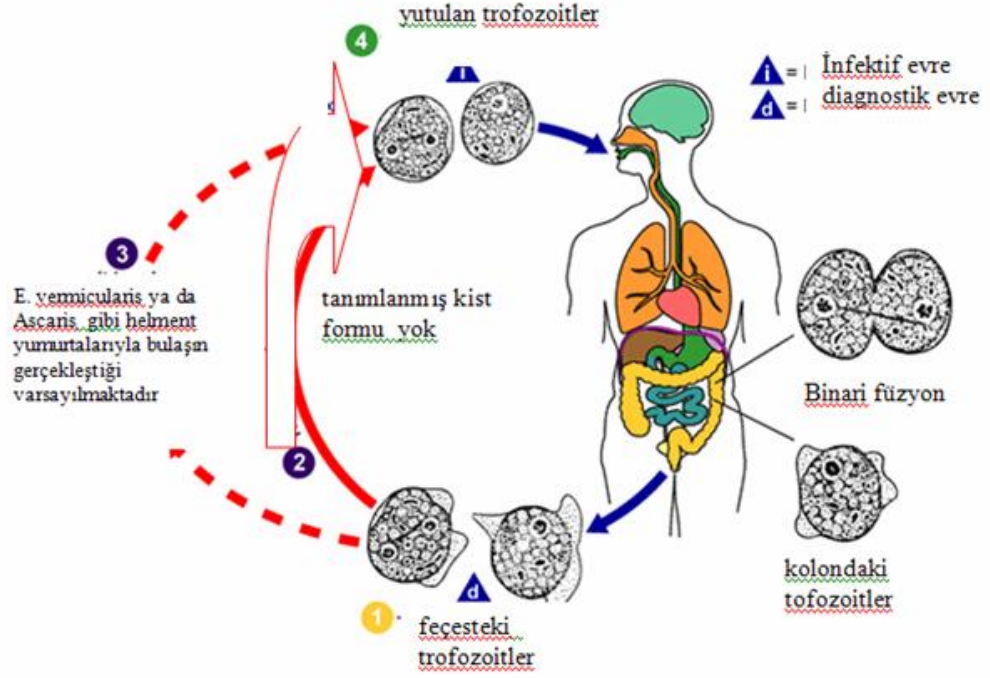


Resim 8. *D. fragilis*'in ekzositozu

2.4. YAŞAM DÖNGÜSÜ- BULAŞ YOLU

D. fragilis'in yaşam döngüsü ve bulaş yolu ile ilgili henüz kesin bir bilgiye ulaşılamamıştır. Bazı çalışmalarda *D. fragilis*'in psödokist, prekist, "kist benzeri" formları rapor edilmiş olsa da, daha sonraki çalışmalarda bu görünümünün dejenere trofozoit yapısı olabileceği ifade edilmiştir. Halihazırda kabul gören görüş, parazitin kist formunun olmadığı yönündedir (23). Birçok barsak protozoonunun kist formu ile tamamlanan yaşam döngüsünde fekal-oral bulaş yolu mevcuttur. Ancak *D. fragilis*'in kist formunun gösterilmemiş olması ve trofozoitlerinin de dış ortamda dayanıksız olması nedeniyle, bulaş yoluyla ilgili bilgiler henüz kesinlik kazanmamıştır (5). *Silard ve ark.*, kültür ortamında düzensiz, kalın zarlı, olası kistik yapıları faz kontrast mikroskopunda göstermiş ancak kalıcı boyama yöntemiyle doğrulayamamıştır. *Blastocystis hominis*'in (*B. hominis*) kist formunun da kabul görmesinin ancak 1991'de gerçekleştiği düşünüldüğünde, bu sürecin uzun sürmesi olasıdır. *Chan*'in ifade ettiğine göre *Dobell* (1940), *Wenrich* (1944), *Knoll ve Howell*'in (1945) gönüllü insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan enfeksiyonu bulaştırma denemeleri başarısız olmuştur (5,12). *D. fragilis* ile yakın filogenetik ve morfolojik ilişkisinin gösterildiği, kümes hayvanlarının paraziti olan *H. meleagridis*'in taşınmasında, nematod yumurtasının aracılık ettiği büyük oranda kabul görmektedir. *D. fragilis*'in de *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*) ya da *Trichuris trichiura* (*T. trichiura*) yumurtaları aracılığıyla evrimini tamamlamasının söz konusu olabileceği ileri sürülmüştür. *D. fragilis*'in bulaş yolu ile ilgili detaylı çalışmalar sonucu, *Enterobius vermicularis* (*E. vermicularis*) ile birlikteliğinin beklenenden 20 kat fazla olduğu rapor edilmiştir. Bu bilgiye dayanarak, trofozoitlerin taşınmasında *E. vermicularis* yumurtalarının rol oynayabileceği düşünülmüştür (24) (Şekil 2) (25). Bu hipotezi doğrulamak için *E. vermicularis* yumurtalarının kültür ortamında açılmasıyla yapılan *D. fragilis*'i izole etme çalışmalarından ve hayvan inokulasyon denemelerinden sonuç alınmadığı bildirilmiştir (22). Buna karşın *Ochert*'in, parazitolojik inceleme ile dışkısında *D. fragilis*'in bulunmadığını gözlemledikten sonra, *E. vermicularis* yumurtaları ile kendisini deneysel olarak enfekte ettiği, bunu takiben, dışkısında mikroskopik inceleme ile *D. fragilis*'i saptadığı bilgisine ulaşılmıştır (5,22,26). *Menghi ve ark.*, *E. vermicularis* DNA'sını ekstrakte ettikleri PCR çalışmasındaki örneklerde *D. fragilis* DNA'sını gösterememişlerdir (27). Bir başka çalışmada *D. fragilis*'in birlikteliği, *E. vermicularis* ile %5 iken *B. hominis* ile %40.3 bulunmuş ve sonuç olarak toplumlarda yüksek oranda görülen enfeksiyonların rastlantısal birlikteliklerinin de yüksek

olabileceğine işaret edilmiştir (28). *D. fragilis* enfeksiyonunun *E. vermicularis* ya da diğer nematod yumurtaların vektörlüğüyle taşınıyor olabileceği varsayımı henüz doğrulanmamıştır.



Şekil 2. *D. fragilis*'in öngörülen yaşam döngüsü (25)

Sonuç olarak, hijyen koşullarının bozuk olduğu kreş, yurt gibi kapalı ya da yarı kapalı topluluklarda görülme sıklığının yüksek olması (6,29) *D. fragilis* enfeksiyonunun direkt olarak fekal-oral yolla bulaştığını gösterse de, bu bulaşın nasıl olduğu açıklığa kavuşmamıştır. Son zamanlarda *H. meleagridis*'in kist formunun ışık mikroskobu ve elektron mikroskobuyla gösterildiği çalışmanın da katkısıyla *D. fragilis* kist formunun varlığını araştıran çalışmaların hız kazanabileceği düşünülmektedir (30).

2.5. PATOGENEZ

D. fragilis'in patojenitesi ile ilgili çok az veri bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çeşitli araştırmalarda gastrointestinal sistem yakınmalarına neden olduğu ve tedavi ile bu yakınmaların kaybolduğu bildirilmiştir (31,32,33,34,35). Bu konu ile ilgilenen birkaç araştırmacının (Hakansson, Burrows, Ockert) söz konusu protozoonla kendilerini enfekte ederek anoreksi, zayıflık gibi çeşitli semptomlarla hastalandıkları, bazı araştırmacıların ise (Kean ve Yang) *D. fragilis*'li çok az hastada, yoğunluğu haftalar içinde değişen kanlı

dışkılama rapor ettikleri bildirilmiştir. Proktit veya kolit şüphesi ile gerçekleştirilen endoskopik incelemelerde mukozada spesifik olmayan makroskobik ve histolojik bulgular elde edilmiş, hemorajik dışkı ve entero-invaziv davranış açıklığa kavuşmamıştır (3). Kanada’da enfeksiyon, %25 oranında semptomatik olarak rapor edilmiştir (1,36). Yalnızca *D. fragilis* ile enfekte olan 35 çocuğun 32’sinde (%91) gastrointestinal bulgular gösterilmiş, hastalığın akut aşamasında diyare en sık görülen bulgu iken, kronik aşamada ise karın ağrısının ön plandaki bulgu olduğu rapor edilmiştir (1,37). Asemptomatik olguların da varlığı gözönüne alındığında, birçok araştırmacı *D. fragilis*’in benzer morfolojide farklı patojeniteye sahip, patojenik ve nonpatojenik olabilen, heterojenik türlerin olabileceğine dair hipotezler geliştirmiştir (8). Moleküler düzeyde, “restriksiyon length polimorfizm” (RFLP) analizi (38,39), sekans karşılaştırmaları (19,40) ve “erime eğrisi” analizleri (41) kullanılarak bu heterojenite araştırılmıştır. Erime eğrisi analizi ile elde edilen dört farklı eğri profili hastaların diyare tipleri ile ilişkili bulunmuşsa da bu çalışmalar ile henüz kesin bir sonuca ulaşılamamıştır.

D. fragilis’in apendikte, akut süpüratif apendisitten, lenfoid hiperplazi ve hafif fibrozise kadar değişen lezyonlara yol açtığı görülmüştür. Araştırmacılar, *D. fragilis*’in düşük derecede iritan olduğunu ve fibrozis ile sonuçlanan kronik inflamatuvar reaksiyonlar geliştirdiğini ifade etmişler, ancak inceledikleri bu apendikslerde miks enfeksiyon olduğu için, fibrozise *D. fragilis*’in sebep olduğu kesin olarak rapor edilememiştir. Rektum ve sigmoid kolonda inflamatuvar değişikliklerin rapor edildiği çalışmalarda *D. fragilis*’e eşlik eden başka organizmaların bulunduğu bildirilmektedir (5).

D. fragilis’in çekumdan rektuma kadar olan mukozal kriptaları infekte ettiği ifade edilmiştir. Doku invazyonu yapmadığı bilinen *D. fragilis*’in kolon mukozasında eozinofilik inflamatuvar yanıtı uyurarak neden olduğu mukoza irritasyonu sonucu gelişen aşırı mukus salgılanması ve barsağın hipermotilitesi gibi etkilerle de kolit etkeni olarak ortaya çıkabildiği üzerinde durulmuştur (42,43,44)

Kronik diyaresi ve “protein enteropatisi” olan hastada kalın barsağın histolojik incelenmesi sonucunda kollajenez kolit saptanmış, daha önceki incelemeler ile de *D. fragilis*’in kalın barsak mukoza membranında fibrozise neden olduğu bilindiğinden, bu hastadaki kollajenez kolit ile de ilişkilendirilmiştir (34). Sekiz haftalık bir yenidoğanda anoreksi, kusma ve diyare saptandığı bildirilmiş, sığır ve soya proteinlerine intolerans gösteren hastanın diyetinde süt ve soya proteinlerinin kısıtlanması ile yakınmanın azaldığı

rapor edilmiştir. Aynı hastanın, 3 yaşında iken diyare ve kramp tarzında karın ağrılarının devam etmesi ve gaitasında mukus ve lökositlerin saptanması sonucunda yapılan kolonoskopisinde, kolon hiperemik ve ödematöz bulunmuştur. Lamina propriada eozinofilik infiltratlar görülmüş, granulomlar ve mikroabseler izlenmiştir. Ülser ya da eksudat görülmemiş olup, yapılan biyopside tüm kolon normal mukozal yapıda izlenmiştir. Eosinofiller ayrıca mikroagregasyon boyutunda kripta epitelinde de izlenmiştir. Eozinofilik kolit olarak değerlendirilen hastanın dışkısının parazitolojik incelemesinde *D. fragilis* saptanmış, tedavi ile birlikte hastanın semptomlarının kaybolduğu ifade edilmiştir (4).

Fonksiyonel barsak bozukluğu olan ve organik bozukluk olmadan defekasyon ile ilişkili karın ağrısı ve barsak alışkanlıklarının değişikliği olarak tanımlanan irritable barsak sendromu (İBS) etiolojisinde *B. hominis* ve *D. fragilis*'in rollerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. *D. fragilis*'in İBS benzeri kronik barsak bozukluklarına yol açması nedeniyle, *D. fragilis*'li hastaların İBS olarak yanlış tanı alabileceği savunulmuş İBS tanısı olan hastalarda, kontrol grubuna göre daha yüksek oranda *D. fragilis*'e rastladıklarını belirtmişlerdir (45,46,47,48). Aynı hipotezin laktoz intoleransı tanısı alan hastalarda da geçerli olduğu görülmüş, diyetinden laktoz çıkarılan hastaların hiçbirinin semptomlarında düzelmeye görülmemiş, laktoz intolerans testi uygulandığında çoğunda pozitiflik saptamamışlardır (49).

D. fragilis antikorlarının indirekt immunofloresan (IIF) ile incelendiği seroprevelans çalışmasında semptomatik, asemptomatik ve sağlıklı bireylerde geniş oranda seropozitiflik elde edilmiştir (gruplardaki pozitif dilüsyonlar sırasıyla; 80, 20-160, 10) (1,50)

2.6. KLİNİK

İlk keşfedildiği yıllarda apatojen olarak nitelenen *D. fragilis*'in ilerleyen yıllarda patojenitesi sorgulanmaya başlanmıştır. Başka mikroorganizmaların da eşlik ettiği dizanteri benzeri semptomların gösterildiği bazı çalışmalarda bu konudaki şüpheler dile getirilmiştir. Chan'in belirttiğine göre; Hakansson 1936 yılında, şiddetli koliti olan bir hekimde *D. fragilis*'i saptamış ve organizmanın sayıca çokluğunun klinik semptomların şiddetini arttırdığını ve *D. fragilis*'in masum bir organizmadan daha fazlası olduğuna dair görüşünü rapor etmiştir. Ayrıca Wenrich ve ark, 1937'de, Philadelphia'daki üniversite öğrencilerinin %4.3'ünün bu etken ile enfekte olduğunu ve bu oranın *E. histolytica* görülme sıklığına benzediği hatta *D. fragilis* ile enfekte olanların, *E. histolytica* ile enfekte olanlara göre daha fazla klinik semptom gösterdiğini bildirmişlerdir (5,12)

Genel olarak *D. fragilis* tanısını alan hastalarda yorgunluk, diyare, karın ağrısı, gaz ve yumuşak dışkılama şikayetlerinin olduğu, bu tabloya mide bulantısı, kilo kaybı, kusma ve anal kaşıntının eşlik edebildiği, nadiren de ateş ve gaitada kan tespit edilebildiği rapor edilmiştir (5,12,22). *D. fragilis*'in potansiyel patojen olarak incelendiği 19 çalışmadan derlenen, yalnızca *D. fragilis* saptanan 187 kayıtlı olguda %46.2 oranında diyare, %42.5 oranında karın ağrısı, %22.6 oranında mukus ya da kan içeren dışkı, %20.4'ünde mide bulantısı/kusma, %13.4'ünde halsizlik/yorgunluk, %13.4'ünde diyare-kabızlık tablosu, %10'unda kilo kaybı saptanmıştır (31). Bir başka çalışmada incelenen hastaların %11'inde anal kaşıntı olduğu tespit edilmiştir (40). Amerika'da yapılan bir çalışmada 237 *D. fragilis* olgusunun %79'unun çeşitli semptomlarla seyrettiği ve bunların çoğunda diyare ya da yumuşak dışkılama yakınmalarının ön planda olduğu belirtilmiştir (51). 2002-2004 yıllarını kapsayan 6750 hasta örneğinin incelendiği çalışmada, *D. fragilis* saptanan 60 hastanın hepsinde klinik bulguların mevcut olduğu, bunlardan 36'sında *D. fragilis*'in tek başına görüldüğü bildirilmiştir. Bu hastalardan birinde kusma, birinde irritable barsak sendromu, 19'unda 2 haftadan uzun süren diyare saptandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada kronik inatçı olguların yaygınlığı vurgulanmıştır (39). Türkiye'de *D. fragilis* saptanan 35 hastadan başka etkenin eşlik etmediği 32'sinde, en sık olarak karın ağrısı (%81.3), diyare (%71.9), istahsızlık (%15.6), yorgunluk (%9.4) saptanmıştır (40). Belçika'da *D. fragilis* enfeksiyonunda görülen klinik bulguların oranları; %69.2 karın ağrısı, %61.5 diyare, %15.4 kilo kaybı, %11.5 anoreksi, %11.5 anal kaşıntı olarak kaydedilmiştir (8). Mısır'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise diyare ve karın ağrısı gibi semptomların, nonpatojenik protozoanlarla karşılaştırıldığında, dientamobiasisde daha sık görüldüğü bildirilmiştir (52). *D. fragilis*'in sorumlu olduğu bu semptomların uygun antiparaziter tedaviye yanıt verdiği ifade edilmiştir (8,31,32,33, 48,53,54,55).

Çalışmalarda semptomatik olguların yanı sıra asemptomatik olguların varlığı da bildirilmektedir (9,48,49).

Son yıllarda organizmanın patojenitesine ait kanıtlar gittikçe değer kazanırken parazitin tanısına önem verilmesi gerektiği ifade edilmektedir (2,35,56). Parazitin tanısı için uygun yöntemlerin kullanıldığı birçok çalışmada *B. hominis*'den sonra ikinci sıklıkta görüldüğü (7,8,9,22,57), ayrıca, hem prevelans hem de klinik bulgu açısından *G. intestinalis*'ten daha sık görüldüğü rapor edilmiştir (7,9,29,56,58,59) *D. fragilis*'in barsak rahatsızlıkları arasındaki sıklığının %4.5 diyarelilerde görülme oranının %2.0 olduğu bildirilmiştir (59).

Enfeksiyon erişkinlerde çocuklara göre daha sık görülmesine rağmen, bazı yazarlar çocuklarda *D. fragilis* enfeksiyonunun erişkinlerine oranla daha sık klinik semptom verdiğini ifade etmişlerdir (3,9,29,37,48,60,)

D. fragilis aynı zamanda periferik eozinofili, ürtiker, apandisit, kaşıntı, kolit, irritable barsak sendromu ve HIV enfeksiyonlu hastalardaki diyare ile de ilişkilendirilmiştir (5,11,12,61). *D. fragilis* enfeksiyonlu hastalarda varolan IBS benzeri semptomlar nedeniyle bu olguların yanlışlıkla IBS tanısı alabilecekleri ifade edilmiştir (44,55). *D. fragilis* saptanan ve aynı zamanda IBS tanısı alan 21 kişi etkene yönelik tedavi aldıktan sonra IBS'nin de iyileştiği ifade edilmiştir (45). Aynı durum laktoz intoleransı için de vurgulanmıştır. Anoreksi, kusma ve uzamış diyaresi olan 8 haftalık bir bebeğin sığır ve soya proteinlerine intolerans gösterdiği, ve 3 yaşına geldiğinde yapılan kolonoskopisinin “eozinofilik kolit” olarak değerlendirildiği bildirilmiştir. Daha sonra gaitasının mikroskopik incelemesinde *D. fragilis* görülmesiyle, iodiquonal tedavisi verilmiş ve hastanın semptomlarının tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Bu olgunun ışığında *D. fragilis*'in allerjik kolitten ayırtedilemeyen klinik semptomlar gösterebileceğine de dikkat çekilmiştir (4)

D. fragilis çekumdan rektuma uzanan mukozal kriptaları enfekte etmektedir. Genellikle protozoal enfeksiyonlarda görülmeyen eozinofili, *D. fragilis* ile enfekte çocukların yaklaşık %50'sinde rapor edilmiştir. (43). Kronik diyare ve “protein enteropatisi” olan bir hastanın mikroskopik incelemelerinde *D. fragilis* görüldüğü ve metronidazol tedavisine yanıt verdiği, hiperproteinemisinin hızla düzeldiği bildirilmiştir (29)

Hastalarda semptomların bir hafta ile seneler arasında değişen süreçte gözlenebildiği ifade edilmiştir (22,48) Karın ağrısının karakteri, yerleşimi, süresi oldukça değişkendir. Dışkıda kan genellikle görülmemektedir. Diyare ve karın ağrısının sıklıkla birlikte görüldüğü, diyarenin hastalığın daha çok birinci veya ikinci haftasında, karın ağrısının ise bir veya iki ay sonrasında baskın hale geldiği bildirilmektedir.

Diyaresi olan AIDS'li hastalarda, amibiasis ve giardiasis olguları gibi, dientamoebiosisin de rapor edilmekte olduğu ifade edilmiştir. Ancak bu çalışmalarda, normal bireylerde olduğundan daha çok patojenik olduğu ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. *D. fragilis*, dışkıda fazla sayıda bulunduğu immün sistemi sağlam hastalarda bile, şiddetli diyare etkeni olarak görülebilmektedir. Bu nedenle, klinisyenlere HIV seropozitifliği olan hastaları değerlendirirken diyare nedenleri arasında *D. fragilis*' i de düşünmeleri gerektiği belirtilmiştir (61,62).

2.7. EPİDEMİYOLOJİ

Son yıllarda tanısına daha fazla önem verilmesi sonucunda, *D. fragilis*'in tüm dünyada yaygın ve en sık görülen parazitlerden biri olduğu ortaya çıkmıştır. Çeşitli araştırmalarda sıklığının %1.2 (22) ile %52.5 arasında değiştiği rapor edilmiştir (6). Kişisel hijyenin göz ardı edildiği kalabalık ve kapalı ortamlarda daha yüksek oranlarda görüldüğü ifade edilmiştir. Örnek alımı ve tanısına yönelik kullanılan yöntemlerin farklılığı, enfeksiyon sıklığının değişken oranlarda rapor edilmesinde etkili olmaktadır. Akıl hastaneleri, askeri personel, parazitoloji laboratuvarında çalışan sağlık personeli ve misyonerlerde görülme sıklığının daha yüksek olduğu ifade edilmiştir (5,12). Kısmi ortak yaşam alanları olan dini bir grubun incelenen gaita örnekleri sonucunda 81 erişkin üyesinden 33'ünde (%41) *D. fragilis* enfeksiyonu görülmüştür (6). Toronto'da, kreşlerdeki çocuklarda ve personelde yapılan parazitolojik incelemede, genel barsak parazitlerinin yaygınlığını sırasıyla %19 ve %14, *D. fragilis*'i ise her iki grupta sırasıyla %8.6 ve %4 olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada en yüksek dientamobiasis prevalansının 7-10 yaş grubunda, saptandığı bildirilmiştir (29) Mental retardasyonu olan çocukların devam ettiği bir kurumda ciddi diyaresi olan 5-15 yaş arası çocuklarda, *G. intestinalis* ve *D. fragilis* enfeksiyon hızlarının sırasıyla %24, %12 saptandığı rapor edilmiştir (63). Hollanda'da *D. fragilis* açısından yaş gruplarına göre yapılan incelemede, en sık 5-14 yaş grubunda görüldüğü ve sıklığının %19.8 olduğu bildirilmiştir. 14 yaşına kadar olan çocuklarda enfeksiyonun çoğunlukla semptomatik, erişkinlerde ise daha çok asemptomatik olduğu da ifade edilmiştir (64). *D. fragilis* sıklığının %3.4 olarak saptandığı İtalya'da gerçekleştirilen bir çalışmada, erişkinlerdeki oran %92 olarak belirtilmiştir. Aynı çalışmada kadınlarda erkeklere göre (sırasıyla %61.5-%38.5) daha yüksek oranda görüldüğü de rapor edilmiştir (59).

Kalıcı boyama yöntemi kullanılarak yapılan rutin gaita incelenmesi ile Kanada'da *D. fragilis*'in en sık görülen parazitler arasında yer aldığı tespit edilmiştir (65,66). Manitoba'daki bir laboratuvar, çalışmalarını değerlendirme raporunda *D. fragilis*'in *B. hominis*'den sonra ikinci sıklıkta görüldüğüne dikkat çekmiştir. Ayrıca bu araştırmada *B. hominis* ile olan birlikteliği de vurgulanmıştır. Diantamoebiosis görülen hastaların %50'sinin 24 yaşından daha genç olduğu bildirilmiştir. İnsidans hızının 5 yıllık periyotta mevsimsel fark göstermemesinin yanında yaz-sonbahar aylarında suların kontaminasyonu ile artış gösteren patojenlerden farklı bir seyir izlediği ifade edilmiştir (7).

Danimarka'da gastrointestinal yakınması olan hastalarda dientamoebiosis sıklığını araştırmak için yapılan bir çalışmada, gaita örneklerinin sodyum asetat-asetik asit-formolin (SAF) ile fiksasyonunu takiben boyalı preparat ile incelenmesi ile *D. fragilis* sıklığının %11.6 bulunduğu, fikse edilmeyenlerde ise parazitin saptanamadığı bildirilmiştir. *D. fragilis* saptananlarda yaş ortalamasının 20, saptanmayanların ise 40 olduğu ifade edilmiştir. Bu alışmada *D. fragilis*'in, *B. hominis*'ten sonra ikinci sıklıkta görüldüğu ve *G. intestinalis*'ten de 6 kat fazla bulunduğu bildirilmiştir. Gelişmiş, endüstrileşmiş ve yüksek hijyen standartlarına sahip bir ülke olan Danimarka'da bu parazitin endemik olduğu düşünölmüştür (57).

İngiltere'de, trikrom boyama yöntemi kullanarak yapılan bir çalışmada, *D. fragilis*'in %1.3 oranında tespit edildiği, aynı örneklere kültür yöntemi uygulandığında ise bu oranın %2.6'a yükseldiği ve buna dayanarak kültür yönteminin, *D. fragilis* tanı hızını önemli oranda arttırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca *B. hominis*'den sonra en sık görölen parazitin *D. fragilis* olduğu da aynı çalışmada belirtilmiştir (65). Bu araştırmada örneklerin SAF fikatifine içine alınmamasının *D. fragilis* görölme oranının düşük bulunmasına yol açmiş olabileceği vurgulanmıştır (23). İngiltere'de, gastrointestinal şikayetler ile birinci basamak hekimlerine başvuran hastalarla 2002-2004 ve 2005-2007 yılları arasında iki ayrı periyotta yapılan çalışmada, SAF fikatifine içine alınarak yapılan trikrom boyama uygulamasıyla *D. fragilis*'in yaygınlığı %15.6 olarak bildirilmiştir (23). Umman'da SAF fikatifine içine alınan gaita örneklerine, trikrom boyama uygulandığında *D. fragilis* prevalansı %5.1 olarak bulunmuş ve en sık görölen parazitler arasında ikinci sırada yer aldığı ileri sürölmüştür (22). Kaliforniya'da yapılan göçmen sağlığı programı kapsamındaki rutin sağlık taramasında *D. fragilis* sıklığının %3 olarak tespit edildiği ve *G. intestinalis*'ten sonra ikinci sıklıkta görölen parazit olduğu bildirilmiştir (67). Ülkemizde yapılan çalışmalar gözden geçirildiğinde; Manisa'da bu parazitin görölme sıklığının %8.8 bulunduğu ve tüm parazitler içinde ikinci sıklıkta saptandığı bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada en yüksek görüldüğu yaş grubunun 8-15 olduğu da rapor edilmiştir. (68) Ankara'da yapılan bir çalışmada mertolin iyodin formolin (MIF) fikatifine içine alınan gaita örneklerine trikrom boya uygulandığı, *D. fragilis* sıklığının %2.7 olduğu ve *B. hominis* ve *G. intestinalis*'ten sonra üçüncü sıklıkta saptandığı rapor edilmiştir (69).

Hijyen kurallarına uyulmayan kalabalık popülasyonda enfeksiyon sıklığının çok daha yüksek bulunması, enfeksiyonun yayılmasında direkt olarak oral-fekal bulaşı düşöndürmüştür ancak kist formunun olmaması nedeniyle de bulaş döngüsü iyi anlaşılamamıştır (65).

Parazitin herhangi bir şekilde suda veya çevre koşullarında canlı kalma özelliği yoktur. Parazit hem katı hem de yumuşak dışkılarda görülebilmektedir (70) Laksatif kullanımının ise organizmanın dışarıya atılımını arttırdığı ifade edilmiştir (6,12,22).

Avusturalya’da 2002-2004 yılları arasında 6750 hastanın incelenen gaita örneğinin yalnızca 60’ında *D. fragilis* (%0.9) pozitifliğinin bulunduğu rapor edilmiştir. Bunlardan 6’sının (%10) deniz aşırı ülkelere yolculuk öyküsünün bulunduğu, birinin HIV ile enfekte olduğu, diğerlerinin ise immun sistemi sağlam hastalar olduğu ifade edilmiştir (38). Kuzey Brezilya’da, 34 diyareli HIV seropozitif hastanın gaita örneklerinden yapılan incelemede, hastaların 11’inde (%32.3) *Isospora belli* (*I. belli*), ve 1’er hastada (%3) *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*), *D. fragilis*, *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), *Giardia lamblia* (*G. lamblia*) saptandığı bildirilmiştir. Bu hastaların, birinde *I. belli*, *D. fragilis* ve *Ancylostoma/Necator* yumurtası, birinde *G. lamblia* ile *T. trichiura* yumurtası, birinde *E. histolytica*, *Entamoeba coli* (*E. coli*), *Endolimax nana* (*E. nana*), *G. lamblia* ve *C. parvum* ookisti, üçünde *T. trichiura* yumurtası, birinde *T. trichiura* ve mantar birlikteliği, birinde *Ancylostoma/Necator* yumurtası, birinde *Strongyloides* larvası, birinde *Strongyloides* larvası ile *A. lumbricoides* ve *Ancylostoma/Necator* yumurtaları birlikteliği olmak üzere çeşitli helmint-protozoa birliktelikleri görülmüştür (61). Güneydoğu Venezuela’da 1997 ve 1998 yılları arasında HIV seropozitif olan diyareli hastaların gaita örneklerinin %57’sinde barsak parazitlerinin görüldüğü bildirilmiştir. Sırasıyla *B. hominis* (%28.6), *C. parvum* (%22.8), *I. belli* (%2.9), *A. lumbricoides* (%14.2), *T. trichiura* ve *Ancylostoma/Necator* (%8.6) saptandığı rapor edilmiştir (71). Arjantin’de 82 HIV seropozitif olan, diyaresi olmayan hasta ve 300 HIV enfeksiyonu olmayan diyareli hasta grubu ile yapılan gaita incelemesinde, barsak parazitlerinin HIV seropozitif olan hastalarda sık görülmesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir. Bu hasta grubunda saptanan parazitleri sırasıyla; %26.5 *E. histolytica*, %16.9 *I. butschlii*, %25.3 *D. fragilis*, %51.8 *B. hominis*, %7.2 *Cryptosporidium spp* ve %1.2 *I. belli* olarak rapor etmişlerdir (11).

Gaitadan atılan *D. fragilis* sayısı, tüm barsak parazitlerinde olduğu gibi, günden güne değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle bir hastadan farklı zamanlarda örneklerin alınmasının tanı açısından önemli olduğuna dikkat çekilmiştir. Kalifornia’da, 125 *E. histolytica*, 154 *G. lamblia* ve 60 *D. fragilis* tanısını alan hastalardan alınan örnek sayılarıyla ilgili yapılan çalışmada, %13’ünde tek bir gaita örneği incelenerek, %19’unda iki gaita örneğinin incelenmesiyle ve %65’inde üç gaita örneğinin incelenmesiyle ve %6’sında da üçten fazla

gaita örneğinin incelenmesiyle parazitin saptandığı görülmüştür (72). Bu konu ile ilgili yapılan bir başka gözlemede ise, 1.3×10^7 olarak saptanan organizmanın, bir gün önce hiç saptanmamış olduğu fark edilmiştir (31).

D. fragilis'in tek olarak ya da diğer parazitlerle beraber tespit edildiği çalışmalar, *E. histolytica* ile karşılaştırılmış ve *E. histolytica*'nın tersine bir durum olarak *D. fragilis*'in %60 oranında tek parazit olarak tespit edildiği rapor edilmiştir (12).

Ayrıca *Grendon ve ark.*'nin *D. fragilis* tanı yöntemlerini incelemek için yaptığı çalışmada, kalıcı boya yönteminin tüm örneklerle uygulanmasının tanı hızını beş kat artırdığı gösterilmiştir (60). Kültür yönteminin de tanıdaki duyarlılığı artırdığı ifade edilmiştir. Ockert'in hem boyama hem kültür yöntemi ile yaptığı iki ayrı incelemenin ilkinde boyama ile %3 olarak saptadığı *D. fragilis*'i, kültür sonucu %35 saptadığı, ikincisinde de boyama yöntemiyle %1.97 iken kültür yöntemi uygulandığında bu oranın %39.3'e yükseldiği ifade edilmiştir (5,73). Başka bir çalışmada da kültür yöntemi ile *D. fragilis*'in iki kat daha sık saptandığı ifade edilmiştir (21).

2.8. TANI

□ Direkt Tanı Yöntemleri

Mikroskobik Yöntemler

- Ø Kullanılan fiksatifler ve kalıcı boyama yöntemleri
- Ø Kültür yöntemi
- Ø Faz kontrast ve karanlık alan mikroskopisi
- Ø Mikroskobik tanıyı etkileyen diğer faktörler

Moleküler Yöntemler

- Ø Moleküler tanı
- Ø Moleküler epidemiyoloji ve genotiplendirme
- Ø Filogenetik çalışmalar

¶ İndirekt Tanı Yöntemleri

İmmunolojik yöntemler (ELISA, IFAT)

Direkt Tanı Yöntemleri

Mikroskopik Yöntemler

D. fragilis'in laboratuvar tanısı, morfolojik yapısının belirteci olan nükleus yapısının tanımlanmasıyla mümkün olabilmektedir. Çoğu kez iki, nadiren de tek bir nükleusu vardır ve nükleusun merkezinde 4-8 parçalı kromatin granülleri bulunmaktadır. Bu nükleus yapısı nativ ve Lugol incelemelerde görülmez, Ayrıca kist formu yoktur ve trofozoitlerin de dış ortamda hızla dejenere olması söz konusudur. Bu özellikler; tanısı için diğer protozoanlardan farklı yöntemlerin uygulanmasını gerektirmektedir. Doğru tanı için, örneğin deneyimli uzman tarafından, barsak pasajından çıktığı ilk yarım saat içinde incelenmesi, ya da bu mümkün olamıyorsa uygun bir fiksatif içine alınarak boyama yönteminin uygulanması gerekmektedir (2,5,12,22,31,73,74,75,76)

Kullanılan Fiksatifler ve Kalıcı Boyama Yöntemleri

İntestinal protozoanlarda kullanılan "Schaudinn" fiksatifi, polivinil alkol (PVA) ve SAF gibi fiksatifler *D. fragilis* için de kullanılabilir. Geçici boyama için pratik bir yöntem olan MIF metodunda fiksasyon ve boyama yönteminin birlikte uygulanmasına karşın, *D. fragilis*'in nükleusunun iyi boyanmadığı ileri sürülmüştür (5). Hem "Schaudinn" hem de PVA fiksatifi, civa klorürlü ($HgCl_2$) veya çinko sülfatlı ($ZnSO_4$) hazırlanabilmektedir. *Garcia ve ark.* yaptıkları bir çalışmada çinko-sülfatlı PVA ile yapılan trikrom boyamanın, morfolojik yapıyı görüntülemeye civa-klorürlü PVA kadar başarılı olmadığını ifade etmişler, buna karşın paraziti saptama açısından iki yöntem arasında bir fark bulunmadığını ileri sürmüşlerdir (77).

Boya-fiksatif kombinasyonunun uyumlu olması parazit morfolojisinin tam olarak ortaya çıkması açısından önemlidir. Genellikle PVA veya "Schaudinn fiksatifi" ile trikrom boyama veya SAF fiksatifi ile demir-hemotoksilen boyama yöntemi birlikte kullanılmaktadır (5,29,76). Ticari fiksatif ve boya kombinasyonları olan "Eco-fix" (formalin-civa içermeyen) ve "Eco-stain" birlikte kullanımının, "Eco-fix" ve "Wheatley's trichrome" kombinasyonunu karşılaştıran bir çalışmada, ilk kombinasyonun ikinciye göre daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (78). SAF fiksatifinin demir hematomoksilen boyama ile iyi sonuç vermesi, fiksatifi

oluşturan maddelerin diğerlerine göre daha az toksik olması ve SAF'ın çoklaştırma yöntemi için kullanılabilmesi gibi avantajları sonucu, SAF fiksatif ile demir hematoksilen boya birlikteliği tercih edilmektedir. Ayrıca demir hematoksilen boya prosedürüne “coccidian protozoanlar” için “asit-fast boyası” ve mikrosporidium için trikrom boyasının ikincil bir boya olarak eklenmesiyle, tüm barsak parazitleriyle aynı anda bu mikroorganizmaların boyanması sağlanabilmektedir (75). Bu durum laboratuvar çalışmasına kolaylık ve pratiklik ayrıca işlevsellik kazandırdığı gibi zaman kazancı ve ekonomik tasarruf da sağlamaktadır.

Van Gool ve ark. Hollanda'da parazitolojik bakı için “Üçlü feçes test” (Triple feces test-TFT) şeklinde geliştirdikleri yöntemle, hastadan ardışık üç gün içinde toplanan örneklerin, SAF fiksatifli kap içine de alınmasıyla, parazitin barsak pasajından çıktığı haliyle incelenmesini sağlamışlardır. TFT; ikisi SAF fiksatif solusyon içeren, biri de boş olan üç kap içermektedir. Hastadan dışkı örneğini, birinci gün, içinde SAF olan TFT1'e, ikinci gün boş olan TFT2'e, üçüncü gün de tekrar içinde SAF olan TFT3'e aktarması istenmiş ve SAF fiksatifli örnekler “chlorazol black” boyası ile boyanmıştır. “Chlorazol black boyası”, basamaklarının kısaltılmış olması ve birçok preparatın aynı anda boyanmasını sağladığı için tercih edilmiştir. Bu testin intestinal protozoanları tanımlamada etkili olduğu ifade edilmiş, buna ek olarak, direkt bakı ve konsantrasyon metotlarından daha iyi bir inceleme yöntemi olduğu da savunulmuştur (74). Kuzey Amerika'da, İngiltere'de çok az laboratuvarda ve Avrupa ülkelerinin bazı hastanelerinde SAF fiksatif ile demir hematoksilen boya veya PVA fiksatif ile trikrom boya kombinasyonları kullanılmaktadır. Birçok laboratuvarda bu fiksatif ve boyaların bulunmaması nedeniyle, fekal protozoanları da boyayabilen hızlı ve pratik boyama yöntemleri, “Giemsa” ve “Leishman's” boyları kullanılabilir. *D. fragilis* ve *B. hominis*'in kalıcı boyama yöntemi ile incelendiği bir çalışmada, *D. fragilis*'in direkt incelemelerde yuvarlak ve refraktil görünüm vermesi, nükleus yapısının görülememesinin yanı sıra *B. hominis*'in de morfolojik çeşitliliğinin ayırıcı tanıda zorluklara yol açması nedeniyle iki paraziti birlikte boyayan hızlı ticari tanı kitlerinin kullanılabilirliği ifade edilmiştir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında genellikle serebrospinal sıvı ve diğer sıvılardaki alyuvar hücrelerini ayırt etmekte kullanılan hızlı tanı kitlerinin, gaita örneklerinde mevcut trofozoitleri de saptamada kullanılabilirliği ileri sürülmüştür. Direkt bakıda yuvarlak, refraktil hücrelerin görülmesi sonucunda hazırlanan preparatların “Diff-3 kit” (GCC Diagnostics, Sandycroft, Flintshire) ile boyandığı ve hızlı tanı için kullanılan “Giemsa” ve “Leishman”, “Field” ile karşılaştırılabilir sonuçlar alındığı bildirilmiştir (79).

Kalıcı boya yönteminin sadece yumuşak ve ishalleri dışkılara değil tüm örneklerle uygulanması ile parazit saptanmasının beş kat arttığı gösterilmiş, böylelikle kalıcı boyama yönteminin tanıdaki önemine dikkat çekilmiştir (60).

Faz Kontrast ve Karanlık Alan Mikroskopisi

D. fragilis trofozoitlerinin bazen, *Entamoeba hartmanni* ve *Endolimax nana*'yı düşündüren aktif ve ilerleyici pseudopod hareketi mevcuttur. Ancak bu hareket, testere diş görünümü ve yaprak şeklindeki lobopoduyla intestinal amiplerinkinden farklıdır ve taze preparasyonlarda *D. fragilis*'in tanınmasını sağlayan karakteristik yapıdadır. Faz kontrast veya karanlık alan mikroskobisi yöntemi pseudopod hareketinin daha iyi fark edilmesini sağlayabilmektedir (12,73). Ancak taze preparasyonlarının tanıda kullanılabilirliği, *D. fragilis* trofozoitlerinin morfolojik yapısının hızla dejenere olması nedeniyle sınırlıdır.

Kültür Yöntemi

Salin-iyodine ile yapılan direkt mikroskobik bakı yöntemi, pratik ve basit olması nedeniyle laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntemdir. Özellikle, konak barsağından ayrıldıktan sonra hızlı bir şekilde dejenere olan *D. fragilis* tanısı için bu yöntem, ancak örneklerin gecikmeden incelenebildiği durumda geçerlidir. Vücut dışında bir saati geçen sürede trofozoitler direkt tanı açısından önemini yitirmekle birlikte canlılıklarını sürdürmekte ve kültüre edilebilmektedir (12). *Sawangjaroen ve ark*, pozitif kültürlerin oda ısısında 24 saat beklemiş, +4°C de ise 10 saat beklemiş gaita örneklerinden elde edilebileceğini ifade etmişlerdir (21). Bir başka çalışmada, oda ısısında ya da buzdolabında 24 saat bekletilen örneklerin Robinson besiyerine ekilmesi ile pozitif sonuç elde edildiği ifade edilmiştir. Konak dışında canlı kalma süresinin örnek özelliklerine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Nişasta içeriği zengin olan gaita örneklerinde *D. fragilis* trofozoitlerinin daha uzun süre canlı kaldığı ve oda ısısında 48 saat bekleyen örneklerden dahi izole edilebildiği rapor edilmiştir (65).

D. fragilis, intestinal protozoonların kültüründe kullanılan çeşitli ksenik besiyerlerinde monofazik ya da bifazik olarak üreyebilmektedir ancak aksenik kültürde üretilmemiştir. Ksenik besiyerlerinin hepsinde, pirinç unu, bakteriler için karbonhidrat gereksinimini sağlamaktadır (5). *Balamuth*'un oluşturduğu monofazik sıvı besiyerinde tüm entamoeba suşları, kamçılılar ve *D. fragilis* çoğaltılmıştır. *D. fragilis*'in diksenik kültürü geliştirilmiş ve ticari olarak (Bi/pa) kullanıma sunulmuştur. Bu besiyerindeki bakterilerin *Klebsiella*

pneumoniae (*K. pneumoniae*) ve *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) olduğu ifade edilmiştir ancak bu suşu kullanan Chan, anaerobic bakteriyi *Bacteroides vulgatus* (*B. vulgatus*) olarak izole ettiğini bildirmiştir (1). *D. fragilis* için uygulanan kültür yöntemleri genellikle boyama yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Bazı koşullarda *D. fragilis*'i boyanmış preparatlarda dahi ayırt etmek zor olabilmektedir. Çoğunlukla tek nükleuslu trofozoitlerin bulunduğu preparatlarda, nükleus granüllerinin kendine has olan özellikte görülmemesi veya bu granüllerin boya artıkları ile örtülmesi sonucu *E. nana* trofozoitleri ile karışması söz konusu olabilmektedir. *E. nana* trofozoitlerinin atipik nükleus yapı özelliği, iki nükleuslu trofozoitlerinin de olması ya da nükleofaj ile kolonize (hiperparazit) olmaları da buna neden olabilmektedir. Aynı zamanda *B. hominis*'in de çift nükleuslu yapıları, boyanmış preparatlarda *D. fragilis* trofozoitleri ile karışabilmektedir (21,76). Kültür yöntemi, boyalı preparatları değerlendirecek deneyimde uzmanın olmadığı laboratuvarlarda veya boyalı preparatlardaki diğer mikroorganizmalarla karıştığı durumlarda *D. fragilis* tanısına katkı sağlamaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda kalıcı boyama yöntemine göre daha sensitif bulunmuştur (73,79). *D. fragilis*'in tanısı için kültürün en güvenilir yöntem olduğu ifade edilmiştir. Almanya da 3670 çocuğun gaita örneğinden hızlı boyama yöntemi ile yapılan çalışmada *D. fragilis* oranı %0.6, çocuklar üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise %3 bulunmuştur. (12,73). Bu iki çalışmada da, boyama ve kültür yönteminin birlikte kullanılmasıyla *D. fragilis* sıklığının %35'e yükseldiği görülmüştür.

Dobel'in, *D. fragilis*'i *in vitro* olarak en kolay izole edilen ve çoğaltılan barsak protozoonu olarak tanımladığı ve eğimli katı fazını oluşturan at serumu ile yumurta akı, pirinç unu eklenmiş Ringer solusyonu ile birlikte oluşturulan difazik besiyerinde, diğer protozoanlardan farklı olarak, en iyi 41^oC'de ürediğini ifade ettiği rapor edilmiştir (5,12,80). Ockert'in ise, katı fazda koagüle insan serumu kullanarak bu yöntemi modifiye ettiği ifade edilmiştir (12,73). Organizmayı izole etmek ve çoğaltmak için Ringer solüsyon içine %5-10 sığır serumu ve pirinç unu ekleyerek elde edilen sıvı besiyeri de kullanılabilir. İzolasyon kültürlerinin bazen sınırladığı optimal büyümeyi, idame kültürlerin ortadan kaldıracabileceği belirtilmiş, primer kültürde %40 pozitiflik yakalanırken, ilk subkültürde bunun %80'e ulaştığı, ikinci de ise %100'e ulaştığı ancak subkültürler ile yapılacak tanı çalışmalarının, pratikte uygulanabilirliğinin az olduğu ifade edilmiştir (5,12,65,73,80). "Modified Boeck ve Drbohlav's" (MBD), "TYSGM-9" ve "Entamoeba besiyeri" olmak üzere 3 farklı kültür yönteminin karşılaştırılması sonucunda da MBD besiyerinin *D. fragilis*'i

saptamada daha uygun bulunduğu rapor edilmiştir (21). Windsor ve ark. rutin mikrobiyolojik analiz uygulanan gaita örneklerinin tümünü “Robinson besiyerine” ekmişler ve elde ettikleri sonuçları trikrom boyama ile karşılaştırmışlardır. Kültürde %2.6 *D. fragilis* tespit edilirken, trikrom boyama ile %1.3’de tespit edilebildiği bildirilmiştir (65).

Besiyerinde üretilen *D. fragilis* trofozoitleri, 48 saat inkübasyon sonrası, yuvarlak, sitoplazmalarında çok sayıda pirinç unu görülen refraktil hücreler olarak izlenmektedir. Oda ısısında 10 dakika kaldığında yavaş, düzensiz, kısa pseudopodlar görülmektedir. Değişken boyutlarda ve refraktil yapıya sahip olmaları nedeniyle *B. hominis* ile karışsa da *D. fragilis* trofozoitlerinin içinde pirinç unu granüllerinin olması, *B. hominis*’den ayırt edilmesini sağlamaktadır. Amipler de aynı besiyerlerinde üremektedir ancak *D. fragilis*’in karakteristik hareketliliği ayırıcı tanıda önemlidir (5).

Mikroskopik Tanıyı Etkileyen Diğer Faktörler

Trofozoitlerin barsak pasajı dışında çabuk bozunması tanıyı güçleştiren önemli bir faktördür, buna ilave olarak önerilen fiksasyon ve kalıcı boyama yöntemlerinin uygulanmaması ve gaitadaki parazit sayısının günlere göre değişiklik göstermesi de bu parazitin tanısını olumsuz yönde etkilemektedir (21,31). Kilo kaybetme ve periyodik nöbetler şeklinde şiddetli karın ağrısı, mide bulantısı ve güçsüzlük şikayetleri olan 9 yaşındaki bir kız çocuğundaki gastrointestinal semptomlarının *D. fragilis* ile ilişkili olabileceği düşünülmüş ve farklı günlerde alınan birden fazla gaita örneği incelendiğinde, yedi örneğin ikisinde *D. fragilis* tespit edildiği bildirilmiştir. Etkene yönelik 10 günlük tedaviden sonra hastanın kilo almaya başladığı ve semptomlarının iyileştiği rapor edilmiştir (31).

Moleküler Yöntemler

Moleküler Tanı

D. fragilis’in mikroskopik tanısına ilişkin yukarıda sayılan zorluklar nedeniyle, moleküler biyolojik tekniklerin yüksek sensitivite ve spesifite potansiyeline sahip uygun alternatif yöntemler olduğu ifade edilmiştir. İnterspesifik çeşitlilikler gösterse de ribozomal DNA (rDNA) bölgesinin her yerde bulunması ve doğada korunmuş DNA sekanslarını içermesi nedenleriyle, PCR tekniğinde uygun hedef bölge olduğu ifade edilmiştir. Bu yüzden söz konusu bölgeler hem filogenetik analizlerde, hem de tanıda kullanılmaktadır (81).

Mikroskopik olarak 60 pozitif *D. fragilis* örnekle yapılan konvansiyonel bir PCR çalışmasında, 54 gaita örneğin ekstraksiyon ve amplifikasyonun gerçekleştiği, 6 örneğin ise 7 günden fazla beklediği için ekstakte edilemediği ileri sürülmüştür. 54 örnekten 50'sinde beklenen büyüklükte bant elde edildiği bildirilmiştir (39). Vandenberg ve ark.nın yaptığı çalışmada mikroskopik bakıda *D. fragilis* pozitif bulunan ve saklama koşulları PCR çalışması için uygun olan 15 örnekten 9'unun PCR ile de pozitif bulunduğu belirtilmiştir 6 örneğin PCR sonucunun başarısız olmasının, uygun olmayan depolama koşullarına ya da ekstraksiyon prosedüründeki gecikmeye bağlı olabileceği ifade edilmiştir (8).

Johnson ve Clark tarafından yapılan çalışmada; çeşitli nedenlerle parazitoloji laboratuvarına başvuran hastalara ait dışkıların nativ incelemesi sonucu trofozoit saptadıkları 17 örneğe, nükleus yapısını gösteren hızlı bir boyama metodu olan Leishman boyayı (Romonowski boya benzeri) uyguladıklarını, bunlardan çift nükleus saptadıklarını Robinson besiyerine ettiklerini bildirmişler, ardından bu örneklerin 9'unda "Trichomonad SSU rRNA" genini amplifiye ettiklerini ifade etmişlerdir (82). Windsor ve ark. kültür yöntemi ve kalıcı boya yöntemi ile saptadıkları 43 *D. fragilis*'li hastadan DNA ekstraksiyonunu gerçekleştirdiklerini ve sadece 33 tanesinde trikomonad SSU-rDNA genini amplifiye edebildiklerini rapor etmişlerdir. 43 örneğin 5'inde DNA'nın amplifiye olmadığı, 5'inde de çok küçük ürün elde edilmesi sonucunda tiplendirme yapılamadığı belirtilmiştir. Bu sorunun DNA ekstraksiyonun gaita örneğinden elde edilmesiyle ilgili olabileceği düşünülmüştür. Gaitadaki çeşitli inhibitör faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülen bu durumun, pozitif kültürlerin idame pasajlarının yapılmasıyla çözümleneceği ifade edilmiştir (83). Peek ve ark çok sayıda gaita örneği ile çalışırken kültür yönteminin moleküler yöntemler için uygun olamayacağını ifade etmişlerdir. Bu nedenle mikroskopik olarak pozitif bulunan 11 gaita örneğini -20 °C sakladıklarını ve sonrasında DNA ekstraksiyonunu gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir. Toplam 11 örneğin sadece 3'ünden elde edilen üründe beklenen boyutta amplifikasyon elde ettiklerini, tüm hasta örneklerinde ise çok miktarda nonspesifik bantların görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu sonuçla, *D. fragilis* tanısı için, o zamana kadar tek rapor edilmiş PCR metodunun, türe spesifik olmadığını ve gaita örneklerinin direkt amplifikasyonunda etkisiz kaldığını ifade etmişlerdir. Bunun üzerine *D. fragilis* SSU rRNA genini hedef alan primerler geliştirdiklerini, her bir örnekteki ~0.1 *D. fragilis* trofozoitini veya 10 plazmid kopyayı PCR tanı limit eşdeğeri olarak saptadıklarını belirtmişlerdir. Söz konusu çalışmada, kalın barsakta yerleşen *D. fragilis*'in aralıklı olarak barsaktan atılımının PCR ile de

tespit edildiği bildirilmiştir. Ardışık üç gün TFT1, TFT2, TFT3 olarak (üçlü feçes test - TFT1 ve TFT3 fiksatifli, TFT2 fiksatifsiz-) alınan gaita örneklerinden TFT1 ve TFT3'e mikroskopik tanı, TFT2 içindeki fiksatifsiz örneğe de PCR uygulandığı ifade edilmiştir. Eğer hem TFT1 hem de TFT3 pozitif ise PCR uygulanan TFT2'nin pozitiflik oranının %74 bulunduğu, eğer mikroskopik olarak sadece TFT1 veya TFT3'den birinde pozitiflik varsa TFT2'nin PCR ile pozitiflik oranının %18 saptandığı bildirilmiştir (38). Stark ve ark, *D. fragilis*'in SSU rRNA genini baz alarak oluşturdukları konvansiyonel PCR yöntemiyle, mikroskopik bakıda pozitif olan 31 örnekten 29'unu PCR'da da pozitif saptadıklarını ve diğer protozoanlarla çarpaz reaksiyon oluşmadığını bildirmişler, PCR protokolünün spesifitesini %100, sensitivitesini %93.5 olarak açıklamışlardır. Çalışmadaki DNA ekstraksiyonunun, doğrudan gaita örneklerinden gerçekleştirildiği, böylece parazitin kültüre edilmesinden kaynaklanan teknik zorlukların önüne geçildiği rapor edilmiştir (81).

İzleyen çalışmalarda ise *D. fragilis*'in DNA'sının real-time PCR yöntemi ile %100'lük sensitivite ve spesifite ile elde edildiği ifade edilmiştir. Bunun sonucu olarak, tanı için kullanılan zamanı ve kontaminasyon riskini azaltması yönüyle real-time PCR'ın konvansiyonel PCR'a göre daha çok avantaja sahip olduğu vurgulanmıştır (84,85,86). *D. fragilis*'in altın standart tanı yöntemini belirlemek için, çalışmaya alınan tüm gaita örneklerine, kalıcı boyama yöntemi, kültür yöntem, konvansiyonel PCR ve real-time PCR yöntemleri uyguladıklarını bildirmişlerdir. Sonuçlar;

	sensitivite	spesifite
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 ile mikroskopi yöntemi (12/650)	%34.3	%99

Şekil 3. Karşılaştırılan *D. fragilis* tanı yöntemlerinin spesifite ve sensitivite (84).

*MBD (modifiye Boeck ve Drbohlav besiyeri)

D. fragilis'in enfeksiyonunun bulaş yolunu araştırmak için hem *E. vermicularis* hem de *D. fragilis* ile enfekte bireylerde gerçekleştirilen PCR çalışmasında *E. vermicularis* yumurta DNA'sı ekstraktlarının *D. fragilis*'i tanımlamadığı ifade edilmiştir (27).

Moleküler Epidemiyoloji ve Genotiplendirme

D. fragilis'in epidemiyolojisini ve genetik farklılığını ortaya koymak için de moleküler yöntemler kullanılmaktadır. PCR-RFLP gendeki minör varyasyonları saptayan bir metottur. PCR kullanılarak ribozomal gende yapılan RFLP analizi ile araştırmacılar genotip1 ve genotip2 olarak iki farklı genotip göstermişlerdir. Genotip2 çok nadir görülmüş olup sadece "American Type Culture Collection" (ATCC) suşu Bi/pa'da ve 2 yaşındaki Avustralya'lı bir erkek çocukta gösterilmiştir. ATCC suşu çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılan suş olup, 2 yaşındaki erkek çocuğa ait olan örnek dışında, bu konudaki çalışmaların bütününe kapsayan örnekler, genotip1 olarak gösterilmiştir. Elde edilen *D. fragilis* örnekleri ile Bi/pa suşunun SSU rRNA genotip sekanslarını karşılaştırmışlar ve bu iki genotip sekansı arasında %2 farklılık olduğunu hesaplamışlardır (82). *Stark ve ark.*, Avustralya izolatlarının SSU rRNA bölgesinin sekansı ile ATCC Bi/pa suşununki arasında % 4 oranında farklılık elde ettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca bu popülasyonda, *D. fragilis* SSU rRNA'sında çok az değişkenlik olduğu da gösterilmiştir. ATCC Bi/pa suşunun bu klinik örnekleri temsil etmemesinin nedeni, bu izolatın *in vitro* kültür ortamına adapte olduğu ve diğer "vahşi" tiplerden farklı olabileceği şekliyle açıklanmıştır (39).

Genotip çalışmaları ile *E. histolytica/dispar*'da olduğu gibi aynı morfolojideki organizmaların klinik etkideki farklılıklarını ortaya koymak amaçlanmıştır. SSU rRNA geni tanısal PCR analizinin sensitivite ve spesifitesi açısından yararlı olmuştur, ancak bu genotiplendirmeler epidemiyolojik olarak yararlı olmamış, klinik farklılıklar bu iki genotip ile tanımlanamamıştır.

Klinik tablodaki farklılığı tanımlayabilmek için *D. fragilis*'in ITS-1 bölgesi, moleküler epidemiyolojik marker olarak kullanılmıştır. *D. fragilis*'in ITS-1 bölgesi sekans kromotogramından sadece C nükleotid piklerinin analizi ile C-profilleri oluşturulmuştur. *D. fragilis*'in ITS-1 bölgesindeki intragenomik varyasyonu karakterize edilmiş ve tanımlanmıştır. Bu bölgenin oldukça değişken olduğu saptanmış ve 11 farklı allel gösterilmiştir. Bundan başka *D. fragilis*'in her iki genotip rRNA'sının ITS bölgesindeki varyasyonu gösterilmiş, aynı zamanda her genotipte olan heterojenite de gösterilmiştir. Buna rağmen fazla miktardaki AT içeriği ve *D. fragilis*'in intragenomik varyasyon çeşitliliği yüzünden bu tekniklerin ITS sekansı ile tatmin edici sonuçlar alınamamıştır (41). Benzer şekilde, *Windsor ve ark.* aynı *D. fragilis* suşlarının sekans kopyaları arasındaki çok sayıdaki varyasyonu göstermişlerdir (87).

Bir başka çalışmada, *D. fragilis*'in genetik varyasyon olasılığı, SSU rRNA genini amplifiye eden PCR ile yüksek çözünürlüklü erime eğrisi (HRM) kullanılarak araştırılmıştır. DNA çift sarmalın ayrılması, klasik olarak yavaş ısınma sırasındaki ultraviyole absorbansı ile moniterize edilmektedir. Bu amaçla genellikle ürünleri erime sıcaklıkları “melting temperature” (T_m) ile tanımlayan DNA çift sarmalını ortaya koyan boyalar kullanılmaktadır. DNA erime eğrisi analizinin gücü sarmalın ayrılma duyarlılığına bağlıdır. Her örnek için elde edilen floresan oranı en tepedeki ve en alttaki sıcaklık değerlerinin floresan oranlarının hesaplanmasıyla oluşmaktadır. Farklı genotipler, normalize edilen erime eğrileri arasındaki floresan farklılığın işaretlenmesiyle kolayca ayırtedilmektedir. Normalize edilen ve ısı değişimiyle işaretlenmiş aynı örnekler dört grupta toplamış, elde edilen profil ve diyare tipleri arasındaki ilişki bulunmuştur. Hastaların çoğunun, profil 1 (%73.4) ve profil 4'de (%75) olduğu ve bu hastaların kronik intermitten diyare şikayetlerinin olduğu görülmüştür. Profil 2'deki hastaların akut diyareli, Profil 3'dekilerin ise konstipasyon-diyare değişimiyle giden hastalardan oluştuğu gözlenmiştir (42).

Filogenetik çalışmalar:

1996'dan itibaren *D. fragilis*'in taksonomik pozisyonunu belirlemek için moleküler teknikler kullanılmaya başlamıştır. Filogenik ilişkiler SSU rRNA gen sekansları karşılaştırılarak oluşturulmaktadır. Silberman'ın oluşturduğu moleküler filogenezis birçok trikomonad ile çeşitli ökaryotların ve *D. fragilis*'in SSU rDNA sekanslarının tamamını kapsamaktadır (16). Tüm filogenetik çalışmalar *D. fragilis*'in trikomonadlarla yakın ilişkili olduğunu göstermektedir.

Trikomonal beta-tubulin geninin aminoasit sekansına dayanan filogenetik ağaçta, Histomonal suşlar ve *D. fragilis*'in beraber gruplandığı dal, *Monocercomonas sp* ve *Trichomonas. foetus*'tan (*T. foetus*) ayrılmıştır. Bunun, çalışılan genin zayıf filogenetik çözümlenmesi nedeniyle olabileceği, filogenetik tanımlama için daha uygun başka genlerin çalışılması gerektiği ifade edilmiştir (80).

Filogenetik dallanmaları gösteren şemalar taksonomi bölümünde verilmiştir.

İndirekt Tanı Yöntemleri

İmmunolojik Yöntemler (IFAT, WB)

D. fragilis'in aksenik kültürünün elde edilememesi nedeniyle immüno­lojik testleri üzerinde yeterince gelişme sağlanamamıştır. *Chan ve ark.* 1993'de fikse edilmiş gaita örneğinden *D. fragilis* tanısı için ilk immüno­floresan tanı yöntemini geliştirmiştir. Diksenik *D. fragilis* Bi/pa suşunun kültürünü kullanarak tavşandan anti-*D. fragilis* antiserumunu elde ettiklerini bildirmişlerdir. Kültürdeki bakteriler, *Klebsiella pneumonia* ve *Bacteroides vulgatus* ile antiserumun absorpsiyonundan sonra, fikse edilmiş gaita örneklerinde indirekt floresan antikor testi (IFAT) ile *D. fragilis* arandığı, diğer parazitlere karşı çarpaz reaksiyon görülmediği belirtilmiştir (1,5). Bir diğer çalışmada *Chan ve ark.*, *D. fragilis*'in seroprevelansını hem semptomatik hastalarda hem de sağlıklı kontrol grubunda, indirekt immüno­floresan yöntemle araştırdıklarını pozitif buldukları örneklerde, immüno­blotting yöntemi ile 39-kDa *D. fragilis* proteinini gösterdiklerini ifade etmişlerdir. Ancak bu proteinin yapısı ve patojenitedeki rolü henüz açıklanmamıştır (5,50)

2.9. TEDAVİ

Birçok çalışmada *D. fragilis*'in tedavisi sonucunda klinik semptomların düzeldiği rapor edilmiştir (4,5,31,33,34,48,68). İodoquinol (diiodohydroxyquin) dientamoebiosis tedavisi için Kuzey Amerika'da en yaygın kullanılan antimikrobiyal ajandır. Paromomisin, tetrasiklin de tedavide kullanılan ajanlardır. Kullanım dozları şekil 4'de verilmiştir.

İlaç	Erişkin ozu	Pediyatrik doz
İodoquinol	650 mg x 3 doz, 20 gün	40mg/kg/gün, 3 dozda, 20 gün
Paromomycin	25-30 mg/kg/gün, 3 dozda, 7 gün	25-30mg/kg/gün, 3dozda, 7 gün
Tetracycline	500 mg x4 doz, 10 gün	40 mg/kg/gün, 4 dozda, 10 gün (8 yaşından küçük çocuklara verilmez)

Şekil 4. Dientamoebiosis tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlar (“The Medical Letter 1992”) (12)

Belçika'da 2006'da yapılan bir çalışmada, *D. fragilis* ile enfekte olan 15 çocuğun paromomisin ile tedavisinden bir ay sonraki kontrollerinde, 12'sinde parazitolojik iyileşme (%80), 13'ünde de klinik düzelme (%87) görülmüştür (33). Türkiye'de yapılan bir çalışmada dientamoebiosisli 35 hastaya tek doz seknidazol oral olarak verilmiş, 34 hastada yedinci ve ondördüncü günlerde tek dozda, bir hastada ise ikinci dozda parazitolojik iyileşme, sağlanmıştır. Bu hastalardan sadece *D. fragilis* enfeksiyonu olan 18 çocuğun 16'sında (%88.9), 14 erişkinin ise dokuzunda (%64.3) semptomların kaybolduğu ifade edilmiştir (68). *Preiss ve ark.* dientamoebiosisli 115 hastada gerçekleştirdikleri çalışmada ilaçlar ve tedavi oranlarını yayınlamışlardır; metronidazol %70, oksitetrasiklin 90, doksisisiklin %75, eritromisin %50, hidroksikinolin %20 oranında tedavi ettiği belirtilmiştir (3). Birçok yayında dientamoebiosis tedavisinde metronidazolün de etkili ajanlar arasında gösterilmesine rağmen hasta ve kontrol grupları ile yapılan çalışmalarda tedavi oranı düşük olarak izlenmektedir. Avustralya'da, paromomisin, iodoquinol verilerek yapılan dientamoebiosis tedavisinde

parazit eradikasyonu ile birlikte semptomlarının da düzeldiği ifade edilmiş, sadece metronidazol kullanılan hastalarda tedavide başarısızlık ya da tedavinin tekrarlanması söz konusu olduğu ifade edilmiştir (56).

2.10 KORUNMA

Enfeksiyonun geçiş yolu açıklık kazanmadığı için korunma önerileri genel bilgiler üzerinden verilebilmektedir. *D. fragilis* ile enfekte olmuş kişilerin bilgileri gözden geçirildiğinde, bulaşta hijyen ve sanitasyon yetersizliğin önemli olduğu gözlenmekte, fekal oral geçiş olası gözükmemektedir. *E. vermicularis* yumurtaları ile taşınma olasılığı da göz önüne alındığında genel hijyen kurallarına uyulması, çiğ yenen yiyeceklerin iyice yıkanarak yenmesi, ellerin temizliğinin öneminin vurgulanması değerini korumaktadır. Ayrıca *D. fragilis*'in yüksek oranda görülebildiği çocuk bakım yuvaları, kreşler, akıl hastaneleri gibi birçok kişinin birlikte kaldığı, toplu yaşanan yerlerde hijyen ve sanitasyon konusundaki eğitimlerinin sürekliliği ve böyle yerlerde özel önlemlerin alınması da epidemileri önlemek açısından önemlidir (40).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

90 hastadan oluşan immun yetmezlikli, diyareli grup ve 202 hastadan oluşan immun yetmezliği olmayan diyareli grup ile iki farklı çalışma grubu oluşturulmuştur. Bu hastalardan alınan gaita örneklerinde *D. fragilis*, mikroskopi ve PCR olmak üzere iki yöntemle araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan gereç ve yöntemler bölüm 3.4.1 ve 3.4.2'de açıklanmaktadır.

3.1 Araştırma Tipi

Çalışma tanımlayıcı bir çalışmadır

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma DEÜTF Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında 1.12.2006-10 Haziran 2010 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir

3.3. Araştırma Evreni ve Örnekleme

~ Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi (DEÜ) Merkez Laboratuvarı Kopro parazitoloji Laboratuvarına (MLKL) çeşitli gastrointestinal sistem yakınmaları ile başvuran hastalar

~ Onkoloji Kemoterapi Tedavi Ünitesinde tedavi gören hastalar (O-KTÜ) (immün sistemi bozulmuş olan hasta grubu)

~ Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi (BUCH) Onkoloji Bölümü ve BUCH Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları İmmunoloji biriminde yatan hastalar (primer ve sekonder immün yetmezlikli hasta grubu)

İmmün sistemi bozulmuş hastalardan oluşan çalışma grubu örnekleri Mayıs 2007-Haziran 2009 döneminde alınırken, immün sistemi sağlam kişilerden oluşan grubundan Ekim 2007-Haziran 2009 arasında, örnek sayısı/zaman açısından sistematik olmayan biçimde rastgele alınmıştır.

Çalışma Grupları

Bu çalışma kapsamında; 90 immün yetmezlikli hasta (sekiz primer immün yetmezlikli, 49 kanser tedavisi alan, dokuz nefrotik ve otoimmün hastalığı olan, dört HIV pozitif, dokuz organ transplantasyonlu ve sınıflanmamış immün yetmezliği olan 11 hasta) ve 202 immün sistemi sağlam hastaya ait olmak üzere toplam 292 hastaya ait gaita örneği incelenmiştir. İmmün yetmezlikli hastalardan üçü BUCH Onkoloji Bölümünden ve yedisi BUCH İmmunoloji Biriminden alınmıştır 32'si DEÜH O-KTÜ'den alınmıştır. DEÜH O-KTÜ'den alınan gaita örnekleri dışında kalan tüm hasta gruplarından diyareli ya da gevşek gaita örnekleri toplanmış olup, bu hastalar gastrointestinal yakınmalarla hastanenin çeşitli polikliniklerine başvurmuş ve MLKL'ne yönlendirilmiş hastalardır. BUCH İmmunoloji birimindeki hasta grubu primer immün yetmezlikli hasta grubudur. Tüm birimlerdeki diğer immün sistem bozukluğu olanlar sekonder immün yetmezliklilerdir.

3.4. Çalışma Materyali / Yöntemi

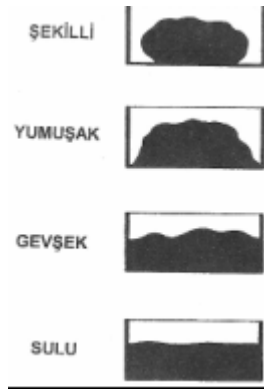
Gaita Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Hasta gruplarının gaita örnekleri iki farklı yolla alınmıştır:

- Ø DEUTF MLKL'den alınan gaita örnekleri (I. grup), laboratuvardaki rutin mikroskopik incelemenin ardından hematoksilen boya aşamasında kullanılmak üzere, fiksasyonlu sıvı içeren bir kaba, solusyon/gaita oranı 3/1 olacak şekilde düzenek hazırlanmış ve kap içinde gaita karıştırılmıştır. Fiksatif içermeyen boş bir ikinci kaba aynı örnek alınmış ve çalışmanın PCR aşaması için -20°C de saklanmıştır.
- Ø DEUTF Onkoloji- Kemoterapi Ünitesi ile BUCH Onkoloji ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Biriminde tedavi gören hastalardan alınan gaita örnekleri (II. grup), fiksatif solusyon içeren ve fiksatif içermeyen olmak üzere iki ayrı kaptan toplanmıştır. Fiksatif solusyon içeren örnek ile hematoksilen boyama aşaması gerçekleştirilmiştir. Fiksatif içermeyen kaptaki örnek, çalışmanın PCR aşaması için -20°C de saklanmıştır

Çalışma Kapsamına Alınan Gaita Örneklerinin Tanımlanması ve Sınıflandırması

Gaitanın makroskobik tanımı genellikle şekilli, yumuşak, gevşek veya sulu olarak sınıflandırılmaktadır. Gevşek ishali ve sulu gaita örneklerinde trofozoit şekillerine sıkça rastlanırken, kist şekillerine ise şekilli gaitalarda daha sık rastlanmaktadır (88)



Şekil 5. Gaita örneklerinin genelde izlenen kıvamları (88)

Biz çalışmamızda;

- Ø Yumuşak (mukuslu ve/veya kanlı)
- Ø Gevşek (mukuslu ve/veya kanlı)
- Ø Sulu (mukuslu ve/veya kanlı) gaita örneklerini kullandık.

3.4.1 Gereç Ve Yöntem: Mikroskopi ile Değerlendirme

Gaita örnekleri laboratuvara kabul edildikten sonraki ilk 30 dakika ile 4 saat arasındaki zaman aralığında, SAF içeren kabın içine aktarılmıştır. Bir akşam bekletildikten sonra demir hematoksilin ve modifiye hematoksilin ile boyanan preparatlar X1000 büyütme ile *D.fragilis* açısından incelenmiştir.

Ø Demir hematoksilin boya, alınan örnekleri *D. fragilis* ve diğer barsak protozoanları açısından değerlendirmek amaçlı kullanılmıştır.

Ø Modifiye demir hematoksilin boya ise hem asit-fast ile boyanan barsak protozoanlarını (*Cryptosporidium spp*, *Cyclospora spp*, *Isospora spp*) değerlendirmek amaçlı kullanılmış, hem de *D. fragilis* ve diğer barsak protozoonları için ikinci değerlendirme preparatı olmuşlardır (72).

I. gruptan aldığımız gaita örneklerinin (DEUTF MLKL'den alınan) rutin inceleme sonuçları (nativ-Lugol, çöktürme, kültür, trikrom boyama ve selofan bant yöntemleri) da çalışma verilerine ek olarak kaydedilmiştir

II. grubu oluşturanlar, çalışma için rutin laboratuvar dışından edindiğimiz hastalar oldukları için, SAF içine alınan örneklere ayrıca çoklaştırma yöntemi de uygulanmıştır (barsak helmintleri açısından da değerlendirilebilmesi için).

Ø Çoklaştırma yöntemi uygulanan preparatlar helment yumurtaları açısından değerlendirilmiş ve X100 büyütme ile incelenmiştir.

Tüm gruplardan alınabilmiş selofanlı lamalar ise *E. vermicularis* yumurtaları açısından değerlendirilmiş, ve X100 büyütme ile incelenmiştir

Boya Aşamasında Kullanılan Solusyonların Hazırlanması

SAF

- Ø Sodyum asetat.....15 g (Carlo Erba)
- Ø Glasiyal asetik asit.....20 ml (Merc)
- Ø Formol.....40 ml (Merc)
- Ø Distile su.....920 ml

Hazırlandı, boş gaita kaplarına 10'ar ml aktarıldı.

Mayer's Albumin

- Ø Gliserin ve yumurta akı eşit miktarda karıştırılarak +4°C de saklandı

%70 Etil alkol

%95 Etil alkol

%100 Etil alkol (Merc)

Ksilen (Merc)

0.5'lik Hidroklorik asit solusyonu

- Ø Hidroklorik asit.....2.5 ml(Riedel-de Haän)
- Ø Distile su.....500 ml

Demir Hematoksilen Boya Solusyonları (Spencer-Monroe)

Solusyon I

Ø Hematoksilen toz.....10 g(Merc)

Ø %100 etil alkol.....1000ml

10 g hematoksilen 1000 ml etil alkol içinde eritildi, ağzı kapatılarak en az 1 hafta güneş ışığında tutuldu.

Solusyon II

Ø Ferröz amonyum sülfat $(\text{FeNH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$10 g(Merc)

Ø Ferrik amonyum sülfat $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$10 g(Merc)

Ø Konsantre hidroklorik asit.....10 ml(Riedel-de Haän)

Ø Distile su.....1000 ml

kariştirildi.

Çalışma Solusyonu

Ø Solusyon I ve solusyon II eşit oranda kariştirildi. Haftalık olarak yeniden hazırlandı.

Boyama Yönteminin Uygulama Basamakları:

Ø Etiketlenen lamın üzerine 1 damla mayer albumini koyuldu, 1 damla SAF fiksatif içindeki materyal dipten alınarak mayer albumini ile kariştirildi ve lam dik tutularak, materyalin süzülerek lama yayılması sağlandı. En az 30 dakika (30-60 dk) oda ısısında kurutuldu.

Ø Kuruyan lam, 5 dakika %70'lik etil alkolde fikse edildi.

Ø Akmakta olan çeşme suyunda 10 dakika yıkandı

Ø 5 dakika hematoksilen boya-çalışma solusyonunda tutuldu

Ø Akmakta olan çeşme suyunda 10 dakika yıkandı.

Ø 5 saniye %0.5'lik Hidroklorik asit solusyonunda tutuldu (89)

Ø Akmakta olan çeşme suyunda 5 dakika yıkandı.

Ø 5 dakika %70 alkolde,

Ø 5 dakika %95 alkolde,

Ø 5 dakika %100 alkolde,

Ø 5 dakika %100 alkolde bırakıldı

- Ø 5 dakika ksilende tutuldu
- Ø 5 dakika ksilende tutuldu.

Kurutulduktan sonra 100x objektif ile incelendi

Modifiye Demir Hematoksilen Boya Solusyonları (Kربول fuksin basamağını içeren)

- Ø Hazırlanan hematoksilen çalışma solusyonu bu boyada da kullanılmıştır

Kربول fuksin

Solusyon A

- Ø Bazik fuksin.....0.3.g (Merc)
- Ø %95 etil alkol.....10 ml

Solusyon B

- Ø Phenol kristalleri.....5 g (Riedel-de Haän)
- Ø Distile su.....100 ml

Çalışma solusyonu

- Ø A ve B solusyonları karıştırıldı

Pikrik asit (Fluka)

- Ø Eşit miktarda % 1-2'lik pikrik asit ve distile su karıştırıldı.

Asit-alkol dekolorizer

- Ø Konsantre hidroklorik asit.....30 ml
- Ø Alkol.....1000 ml

%70 alkol ve amonyak

- Ø %70 alkol.....50 ml

Ø Amonyak.....0.5 ml

Boyama Yöntemi

Ø Etiket bilgileri yazılmış lamın üzerine 1 damla mayer albumini, 1 damla SAF fiksatif içindeki materyal dipten alınarak karıştırıldı ve lamı dik tutarak, materyalin süzülerek lama yayılması sağlandı. En az 30 dakika (30-60 dk) oda ısısında kurutuldu.

- Ø 5 dakika %70'lik etil alkolde tutuldu
- Ø Şalede bulunan çeşme suyunda 2 dakika yıkandı.
- Ø 5 dakika karbol fuksin boya-çalışma solusyonunda tutuldu
- Ø Akan çeşme suyunda 1 dakika yıkandı.
- Ø 4 dakika asit-alkolde dekolorize edildi
- Ø Akan çeşme suyunda 1 dakika yıkandı.
- Ø 8 dakika hematoksilen boya-çalışma solusyonunda tutuldu
- Ø 1 dakika distile suda yıkandı.
- Ø 3-5 dakika pikrik asit solusyonunda tutuldu
- Ø Akan çeşme suyunda 10 dakika yıkandı.
- Ø 3 dakika %70 alkol-amonyak solusyonunda tutuldu
- Ø 5 dakika %95 alkolde,
- Ø 5 dakika %100 alkolde,
- Ø 5 dakika ksilende tutuldu

Kurutulduktan sonra immersiyon ile 100x objektif ile incelendi

Boyanan Lamaların Değerlendirilmesi

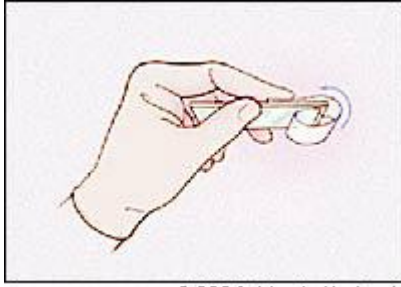
Her bir bireye ait tek bir materyalden iki lam hazırlanarak, bir tanesi hematoksilen boya ile boyanırken, diğeri modifiye demir hematoksilen ile boyandı ve iki preparat birlikte değerlendirilerek sonuçları kaydedildi.

- Ø İncelenen tüm preparatta 1-3 arası organizma +
- Ø 6-20 sahada bir 1-2 organizma; ++
- Ø 1-5 sahada bir 1-2 organizma; +++
- Ø 1-2 sahada bir 3 ve üzeri organizma; ++++ olarak değerlendirildi ve

sonuçlar kaydedildi.

Selofan Bant Yöntemi

Selofan bant, lamın üzerine, lam boyunca olacak şekilde yapıştırıldı. Selofan bandın lamın altına gelen ucu, uygulama sırasında bandı kaldırmayı sağlayacak şekilde kıvrıldı. Hastaya 3 adet verilerek, birbirini takip eden günlerde, sabah bandın yapışkan olan yüzünü perianal bölgeye değdirerek uygulaması söylendi (Şekil 6)



© 2004 Marcia Hartsok

Şekil 6.Selofan bant yöntemi (90)

3.4.2. Gereç ve Yöntem: PCR ile Değerlendirme

PCR çalışmak üzere -20°C'de saklanan örneklerin DNA'ları ekstrakte edildi (QIAamp DNA Stool Mini Kit veya ZR Fecal DNA Kit). *D. fragilis* SSU rDNA gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak uygulanan termal döngüler sonucunda DNA amplifiye edildi.

Kullanılan Primerler: (Genmar, TIB MOLBIOL, HPLC 10.0 OD)

Ø DF1250 (CATCTTCCTCCTGCTTAGACG),

Ø DF400 (TATCGGAGGTGGTAATGACC)

Elde edilen PCR ürünü marker ile birlikte %1.5 agarose jelde elektroforez yöntemi ile yürütüldü. Ethidium bromür ile boyanan jel, transilluminatörde görüntülendi.

PCR Aşamasında Kullanılan Gereçler

Ø Santrüfuj cihazı (Labnet-Spektrafuge 16M)

Ø Vorteks cihaz (Labnet CE)

Ø Isıtıcı cihaz (Grant)

Ø Termal cykler (Techne TC-142)

Ø Yatık elektroforez tankı (Thermo EC340-Maxicell Primo)

- Ø Elektroforez güç kaynağı (Thermo EC250-90)
- Ø Translüminatör (Vilber lourmat CN 1000, Software-Infinity)
- Ø Pipetörler (Finnpipette Thermo 0.5-10 µl)
 - § Finnpipette Thermo 10-100 µl
 - § Finnpipette Thermo 1000 µl
- Ø Filtreli pipet uçları
 - § Thermo -Finntip filter-sterile 10 µl (lot 812920)
 - § Thermo -Finntip filter-sterile 100 µl (lot 812920)
 - § Thermo -Finntip filter-sterile 1000 µl (lot 812920)
 - § Greiner bio-one filter tip Gilson style 10 µl (lot AO9030EN/0278)
 - § Greiner bio-one filter tip Gilson style 100 µl (lot A090507E/00036)
 - § Greiner bio-one filter tip Gilson style 1000 µl (lot 71818505/00021)

PCR Solusyonları

Elektroforez Buffer (5X TBE-Stok sol. 1L)

- Ø Tris base (121.1mw).....54.5g(Ambresco, lot:2977B04)
- Ø Borik asit (61.8 mw)..... 27.8g(AppliChem, lot:66007131)
- Ø EDTA (asitsiz) (292.2)..... 2.9g(AppliChem, lot:8P001784)
- Ø Distile su.....1000ml

%1.5- 0.5 cm Agarose Jel Solusyonu

- Ø Agarose.....2.55 g(Prona-Basic LE, lot:101674)
- Ø 1XTBE..... 170 ml

Elektroforez Tank Buffer (1X TBE)

- Ø 5XTBE.....300 ml
- Ø Distile su.....1200 ml

Ethidium Bromide Boyama Solusyonu

- Ø Ethidium bromide sol (10 mg/ml).....20µl (DZEB-10, lot:071152)
- Ø 1X TBE..... 400 ml

Boyama Yöntemi

Ø Örnekler jel elektroforezi uygulandıktan sonra hazırlanan boya solusyonunda yarım saat tutuldu, görüntüledi

Primerlerin Sulandırımı (100pmol'luk solusyon)

- Ø SSU rDNA-DF40044.8 µM
- Ø Steril su..... 448 µl

- Ø SSU rDNA-DF1250.....50.8 µM
- Ø Steril su.....508 µl

DNA marker solusyonu

- Ø DNA ladder 1µl (Fermentas, lot:00020166)
- Ø Loading sol 1µl (Fermentas, lot:00020166)
- Ø Distile su 4µl

oranlarında sulandırıldı. Elde edilen solusyon 2µl olarak kullanıldı.

DNA Ekstraksiyon Yöntemi, (QIAGEN-QIAamp DNA Stool Mini Kit, lot:127144923)

(1-196 no'lu hasta örnekleri)

- Ø 2 ml'lik santrüfuj tüpüne 180-200 mg gaita örneği eklendikten sonra tüp buzun üstünde tutuldu
- Ø Her bir dışkı örneğine 1.4 ASL Buffer eklendi. 1 dk vortekslendi
- Ø Örnek 5 dk 70 °C de tutuldu
- Ø 15 sn vorteksle, dışkı partüküllerinin çökmesi için 14.000 rpm hızda 1 dk santrüfujlendi
- Ø Üst sıvının 1.2 ml'si yeni bir mikrosantrüfuj tüpüne alındı ve çökelti atıldı

- Ø 1 adet inhibitex tb eklendi, 1 dakika vortekslendi. Süspansiyon 1 dk oda ısısında inkübe edildi
- Ø 14.000 rpm hızda 3 dk santrüfüjlendi
- Ø Üst sıvı 1.5 ml'lik mikrosantrüfüj tüpüne alındı ve çökelti atıldı, 14.000 rpm hızda 3dk santrüfüjlendi
- Ø 15 µl proteinase-K' 1.5 ml'lik mikrosantrüfüj tüpüne alındı.
- Ø En son elde etmiş olduğumuz 200 µl'lik üst sıvı proteinaz-K içeren 1.5 ml mikrosantrüfüj tüpüne aktarıldı.
- Ø 200 µl Buffer AL eklendi ve 15 s vortekslendi
- Ø 70°C de 10 dakika inkübe edildi
- Ø Lizata 200 µl ethanol (% 96-100) eklendi ve vortekslendi
- Ø QIAamp spin kolon etiketlenerek 2 ml koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Ethanol eklenmiş olan lizatin tümü QIAamp spin kolona aktarıldı. 1 dk 14.000 rpm hızda santrüfüjlendi. QIAamp spin kolonu yeni bir 2 ml koleksiyon tüpüne aktarıldı.
- Ø QIAamp spin kolona 500 µl Buffer AW1 eklendi. 1dk 14.000 rpm hızda santrüfüjlendi. OIAamp spin kolonu yeni bir 2 ml koleksiyon tüpüne aktarıldı.
- Ø QIAamp spin kolona 500 µl Buffer AW2 eklendi. 14.000 rpm hızda 3 dk santrüfüjlendi. Filtrat içeren koleksiyon tüpü atıldı.
- Ø QIAamp spin kolonu yeni etiketlenmiş 1.5 ml mikrosantrüfüj tüpüne aktarıldı
- Ø QIAamp membran üzerine 200 µl Buffer AE pipetlendi. 1 dk oda ısısında inkübe edildi, 14.000 rpm hızda 1 dk santrüfüjlenerek DNA elde edildi

DNA Ekstraksiyon Yöntemi (ZYMO RESEARCH-ZR Fecal DNA Kit)

Alınmış olan (QIAGEN) ekstraksiyon kitlerinin tümünün kullanılması sonucu, ikinci ihale usulü alımda, ön inceleme yapılarak farklı bir ekstraksiyon kitinin alımı yapılmış, ilk aşamada bir önceki kitle karşılaştırılmış, gaita örneğinden başarı ile ekstraksiyonu gerçekleştirdiği görülmüş ve çalışmaya bu ikinci kit ile (**ZR Fecal DNA Kit**) devam edilmiştir (197-292 no'lu hasta örnekleri ekstrakte edildi)

Ø“Zymo-Spin IV-HRC Spin Filter” koleksiyon tüpüne yerleştirildi, 9000 rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi

Ø “BashingBead Lysis” tüpüne 50 mg gaita örneği koyuldu, 750 µl “Lysis Buffer” eklendi. 5 dk son hızda vortekslendi.

Ø Gaita örneği koyulan “ZR BashingBead Lysis” tüpe 14000 rpm hızda 1 dakika santrifüj uygulandı

Ø 400 µl üst sıvı, koleksiyon tüpünde olan “Zymo Spin IV Spin Filter”a aktarıldı 7000 rpm hızda 1 dakika santrifüj uygulandı

Ø Koleksiyon tüpündeki filtrata 1200 µl “Fecal DNA Binding Buffer” eklendi

Ø Karışımın 800 µl’sini koleksiyon tüpündeki “Zymo Spin IIC Column”a transfer edildi ve 14.000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi

Ø Koleksiyon tüpüne akanı atıldı ve bir önceki basamak tekrarlandı

Ø 200 µl DNA Pre Wash Buffer’ı yeni bir koleksiyon tüpündeki “Zymo Spin IIC Column”a eklendi 14.000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi

Ø 500 µl “Fecal DNA Wash Buffer” “Zymo Spin IIC Column”a eklendi ve 14.000 rpm hızda 1 dakika santrifüj uygulandı

Ø “Zymo Spin IIC Column” temiz 1.5 ml lik mikrotüpe aktarıldı ve 100 ul “DNA Elution Buffer” kolum matrisine eklendi. 14.000 rpm hızda 30 saniye santrifüjlendi

Ø Elde edilen elue DNA’yı temiz bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüpte olan “Zymo Spin IV-HRC Spin Filter”a eklendi ve 9.000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi. Filtre olan DNA ile PCR basamağına geçildi.

PCR amplifikasyonu

Ø *D.fragilis* SSU rDNA gen bölgesine spesifik olan liyofilize primerler, 100 pmol’luk stok solusyon olarak sulandırımı yapıldı, kullanım aşamasında ise 10 kat daha sulandırarak, gerekli olan 10 pmol’lük konsantrasyona getirildi

Ø Reaksiyon 50 µl’lik olacak şekilde; 23.7µl dH₂O, hot start Taq DNA Polymerase 0.5µl (5U/ µl)(Fermentas, lot:0002138), 10x buffer 5 µl (Fermentas, lot:00022451), 25Mm MgCl₂ 5 µl (Fermentas, lot:00022451), primer DF1250 (10pmol) 3 µl, primer DF 400 (10pmol) 3µl, dNTP Mix 1µl (10mM each) (Fermentas, lot:00022451) ve örnek DNA da 10µl hazırlandı.

Ø 95°C 3 dakika, 30 siklus 94°C 1 dk, 57 °C de 1dk, 72°C de 1 dk ve son ekstansiyon 72 °C de 5 dk olmak üzere termal döngü uygulandı.

Elektroforez

Ø Agaroz jel %1.5'luk hazırlandı, yatık elektroforez tankına yerleştirilerek, elektroforez tank solüsyonu ile beraber hazır edildi.

Ø 10 µl PCR ürününe, 2 µl "loading dye" eklendi ve jelde hazırlanan kuyulara yüklendi.

Ø Aynı jele DNA Ladder (100 bp, Fermentas,lot:00020166), DNA içermeyen, negatif kontrol ve sekans işlem sonucunda pozitif kontrol olarak elde ettiğimiz örnekler de yüklendi ve jel 100 Volt güç ile yürütüldü

Ø Yarım saat ethidium bromide boyama solusyonunda bekletildikten sonra, sonuçlar transilluminatörde görüntülendi.

Purifikasyon

Ø PCR ürünlerine RFLP işlemi uygulamadan önce, bu ürünlere purifikasyon işlemi uygulandı.

Purifikasyon Yöntemi (İnvitrogen; PureLink PCR Purification Kit,lot:425407)

- Ø 10 ml % 100 isopropanol "Binding Buffer"a eklendi
- Ø 2.3 ml isopropanol "Binding Buffer HC"e eklendi
- Ø 32 ml % 100 etanol"Wash Buffer" a eklendi
- Ø 1 hacim PCR ürününe (50 µl) 4 hacim "Binding Buffer" (200 µl) eklendi, karıştırıldı
- Ø "Spin Column"a bir önceki basamakta elde edilen miks aktarıldı
10,000 x g 1 dk. santrüfuj edildi, akan kısım atıldı, "spin colmn" yeni bir tüpe aktarıldı
- Ø 650 µl "Wash Buffeur", "spin column"a eklendi
- Ø 14.000 rpm hızda 1 dk santrüfuj edildi, akan kısım atıldı, "spin column" yeni bir tüpe aktarıldı
- Ø Kolon 14.000 rpm hızda 3 dk. tekrar santrüfuj edildi
- Ø "spin column" yeni bir temiz tüpe aktarıldı, 50 µl "elution buffer" "spin column"a eklendi
- Ø 1 dk oda ısısında inkübe edildi
- Ø 14.000 rpm hızda 2 dk santrüfuj edildi ve purifiye ürün elde edildi.

Pozitif ürünlerin genotiplendirilmesi

Ø *D.fragilis*'in PCR ile elde edilen ürünleri RsaI (10U/ µl, Fermantas) ve DdeI (10U/ µl, Fermantas) kesici enzimleri kullanıldı.

RsaI Restriksiyon Enziminin Hazırlanması

Her bir kesim reaksiyon hacmi 30 µl olacak şekilde hazırlandı

- Ø Steril su.....16 µl
- Ø RsaI enzimi.....2 µl
- Ø Buffer (10x)... 2 µl
- Ø Örnek PCR ürünü10 µl

Dde I Restriksiyon Enziminin Hazırlanması

Her bir kesim reaksiyon hacmi 30 µl olacak şekilde hazırlandı

- Steril su.....16 µl
- DdeI enzimi.....2 µl
- REact 3 buffer (10x)... 2 µl
- Örnek PCR ürünü10 µl

Karışım 37°C'de 1 saat inkübe edildi

Kesim ürünlerine DNA Ladder (100 bp, Fermentas) ile %1.5'lük agaroz jelde elektroforez uygulandı ve transilluminatörde (Vilber Jourmat CN 1000, Software -Infinity) görüntülendi, ürünler farklılıklarına göre değerlendirildi.

Sekansların elde edilmesi

PCR ile elde edilen 18 pozitif ürüne sekans analizi yaptırıldı (İontek laboratuvar-İstanbul). Sekanslar, gen bankasındaki orijinal dizi (U37461) ile, BLASTN programı kullanılarak karşılaştırıldı, değerlendirildi.

3.5. Arastırma Değişkenleri

Diyareye yol açan *D. fragilis* etkeninin, immun sistem yetmezliği mevcudiyetindeki etkisini görmek istedik. Çalışmamızda bağımsız değişken *D. fragilis*, bağımlı değişken immun sistem yetmezliği mevcudiyetindeki diyare olarak incelenmiştir. İmmun sistemi sağlam olan diyareli grup kontrol grubu olarak alınmıştır

3.6. Veri Toplama Araçları:

Olguların tümüne, gönüllü bilgilendirme formunu da içeren bir anket uygulanmıştır. Ayrıca hastaların hastane bilgi bankasındaki verileri de (Genesis) kullanılmıştır. Anket formunda hazırlanmış olan immun yetmezlik parametreleri, araştırmanın ek laboratuvar istem ödeneği olmadığı için kullanılamamıştır.

<i>Dientamoeba fragilis</i> Hasta Anket Formu	
Hasta No :	Tarih :
Ad-soyad :	Gönderilen poliklinik:
Yaş/ Cinsiyet :	Hastalık:
Yolculuk:	
Şu anda ya da bir süredir olan şikayet işaretlenecek, ne kadar zamandır bu şikayetin olduğu hemen karşısına yazılacak.	
İshal	() gün/ hafta/ay/ yıl'dır
Karın Ağrısı	()gün/hafta/ay/yıl'dır
Şişkinlik	() gün/ hafta/ay/ yıl'dır
Hazımsızlık	()gün/ hafta/ay/ yıl'dır
Mide bulantısı	() gün/ hafta/ay/ yıl'dır
Zayıflama	()gün/ hafta/ay/ yıl'dır
Kabızlık	()gün/ hafta/ay/ yıl'dır
Diş gıcırdatması	()gün/ hafta/ay/ yıl'dır
Gaz	()gün/ hafta/ay/ yıl'dır
Ateş	()gün/ hafta/ay/ yıl'dır
Diğer	()gün/ hafta/ay/ yıl'dır
Labarotuvuar bulguları:	
Ateş	Lenfosit alt grupları
Lökosit sayısı	CD3
Lenfosit sayısı	CD4
eozinofili	CD8
Mutasyon analizi	CD19
IgG1	CD3+ HLADR+
G2	NK
G3	IVIG kullanımı
G4	Diğer
IgM	

Şekil 7. Çalışma grubuna alınan hastalara ait veriler

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

- Ø Paraziti tanımaya yönelik çalışmalar yapıldı (Temmuz-Haziran 2006)
- Ø Demir hematoksilen boyama ile parazit tanındı (Haziran 2007-Aralık 2007)
- Ø Örnek alımına yönelik planlama (Aralık 2007)
- Ø PCR ön çalışmalarına başlandı. Ön çalışma kapsamında *D. fragilis* pozitif değerlendirilmiş ve -20°C saklanmış dışkı örnekleri QIAamp stool mini kit ile ekstrakte edildi (Aralık 2007- Haziran 2007)
- Ø Örnek toplanması ve mikroskopik çalışma aşaması gerçekleştirildi (Aralık 2007-Haziran 2009)

Ø PCR optimizasyonu ve alınan örneklerin çalışılması gerçekleştirildi (Mart 2008-Aralık 2009)

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Ø Veriler SPSS 15.0 paket programında değerlendirilmiştir.

Ø İmmun yetmezliği olan ve immün yetmezliği olmayan gruplardaki *D. fragilis* sıklığı Ki kare ile karşılaştırılmıştır.

Ø Çeşitli değişkenlerin parazitin görülmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu analizler için, frekans, Ki kare, Fisher kesin testi, student's t testi analiz yöntemleri kullanılmıştır.

Ø Parazit tanısında; demir hematoksilin boyama ile PCR tanı yönteminin tutarlılığı Kappa ile analiz edilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

D. fragilis tanısında güçlükler olan bir parazittir. Konvansiyonel mikroskopik tanı olan salin-iyodin baki ile tanısı gerçekleşmemektedir. Barsak pasajından çıkışını takiben kalıcı boyama yöntemi ile uyumlu olan fiksatif solusyona alınması ve takiben boyanması gerekmektedir. Ya da kültür gibi ek yöntemlerin uygulanması gerekmektedir. Tüm bu yöntemler aynı zamanda zaman alıcı ve deneyimli eleman gerektiren uygulamalardır.

Zaman alıcı olan işlemlerle beraber bilgi alımı ve örnekleri çalışılacak hastalara ulaşmada problemler, gecikmeler yaşanmıştır. Tüm bunlar çalışmanın süresinin uzamasına neden olmuştur.

İmmün yetmezlikli çalışma grubuna ait örnekleri toplamada zorluklar yaşanmış, daha çok örneğe ulaşma amacıyla gerçekleştirilen BUCH ile yapılan çalışma planı ile de tam olarak istenen örnekler sağlanamamıştır. Bu zorluklar kısmen aşılmasına rağmen hedeflenen 150 hastalık grup oluşturulamamıştır. Çalışma grubu olarak planlanan bu grubun, planlanan sayısına planlanan zamanda ulaşamamış olması nedeniyle, çalışmaya immün yetmezliği olan ve immün yetmezliği olmayan diyareliler olmak üzere iki grup dahilinde devam edilmesi kararlaştırılmıştır.

E. vermicularis tanısı için kullanılacak olan selofan bant yöntemi uygulamadaki zorluk nedeniyle çoğu hastadan elde edilememiştir. Bu yöntem, mikroskopik bakısında *D. fragilis* tanısı konan hastaların bir kısmından elde edilebilmiştir

PCR da bu güçlükler nedeniyle kullanılabilir olan bir tanı yöntemidir. Araştırmada kullandığımız konvansiyonel PCR yöntemi real-time PCR'a göre daha düşük sensivite göstermektedir. Mikroskobik tanısı sırasında da gaita örneğinin hızlı bir şekilde fiksatif solusyona alınmasındaki güçlükler araştırmanın boya ile tanı sonuçlarını etkilemiştir. Ayrıca immun yetmezliği olan grup sulu diyaresi olan grup olduğu gibi aynı zamanda hastane de yatarak tedavi gören hastalardır. Bu hastalara proflaksi ve geniş spektrumlu antibiyoterapi tedavisi uygulandığı için de, immun yetmezliği olan hastalardaki araştırma sonuçlarımızı etkilediğini düşünmekteyiz.

3.10. Etik Kurul Onayı

Ø Çalışmanın etik onayı DEÜTF Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alındı (protokol numarası :179/26 Ekim 2006)

Ø Çalışma evrenimizde yer alan BUCH hastaları için de İzmir 4 No'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 13/06/2007 tarihinde etik onayı alınmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada 303 yumuşak/gevşek/sulu nitelikli gaita örnekleri üç grupta incelendi. İki örneğin katı-şekilli kıvamda olması, üç kişiye ve bilgilerine ulaşılamaması, beş kişiye ait, mikroskobuyla eş zamanlı -20°C'deki örneğe ulaşılamaması ve bir kişiye ait örnek miktarının yetersiz olması nedeniyle 11 örnek çalışma kapsamından çıkarıldı. Bu nedenle çalışma kapsamında 292 gaita örneği incelendi.

Örnekler immun yetmezliği olan ve olmayan olmak üzere iki grupta incelendi. İmmun yetmezliği olan grubun kapsamı şu şekildedir: Primer immun yetmezlikliler, kanser tedavisi alanlar (en az üç kür) , HIV enfeksiyonlular, organ transplant hastaları ve farklı kronik hastalık nedenleriyle immunsupresif tedavi alanlar olmak üzere toplam 90 hastadır. İmmun yetmezliği olmayan grubu ise gastrointestinal ya da alerjik şikayetlerle kliniklere başvurmuş 202 hasta oluşturdu.

Tüm örnekler mikroskobik ve moleküler yöntemle incelendi.

4.1. Olgulara Ait Bulgular

Olguların Demografik Özellikleri

Olgular yaş ve cinsiyet özelliklerine göre incelenmiştir. Buna göre olguların yaş gruplarına göre ortalamaları Tablo 1'de verilmektedir.

Tablo 1. Çalışmaya alınan olguların gruplara göre yaş ortalamaları

Grup	Sayı	Ortalama	Std. Sapma	P*
İmmun yetmezlikli**	88	45,20	21,488	0.003
İmmun yetmezliği olmayan	202	36,44	23,643	

* Student's t test

** İki hastanın yaş bilgisine ulaşılamamıştır

Hastaların immün sistemlerine göre yaş grupları ele alınıp incelendiğinde, immün yetmezlikli grubun yaş ortalamasının, immün yetmezliği olmayan gruba göre daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 1).

Tablo 2. Olguların immün sisteme ve yaşa göre dağılımı

		Yaş aralığı				Toplam
		0_5 (%)	6_14 (%)	15_64 (%)	65 üzeri (%)	
Grup	İmmün yetmezlikli	7 (7,8)	6 (6,7)	67 (74,4)	10 (11,1)	90
	İmmün yetmezliği olmayan	26 (12,9)	29 (14,49)	116 (57,4)	31 (15,3)	202
Toplam		33 (11,3)	35 (12,0)	183 (62,7)	41 (14,0)	292

Ki kare= 8.2 , SD= 3, p=0.043

Çalışmaya alınan olgular anlamlı olarak 15-64 yaş grubunda daha yüksek orandaydılar.

Araştırma grupları cinsiyete göre incelendiler. Veriler Tablo 3’de gösterilmektedir.

Tablo 3. Araştırma gruplarının cinsiyete göre dağılımı

	Erkek (%)	Kadın (%)	Toplam
İmmün yetmezlikli	45 (50.0)	45 (50.0)	90
İmmün yetmezliği olmayan	96 (47.5)	106 (52.5)	202
Toplam	141	151	292

Ki kare= 0.15, SD= 1, p=0.70

Çalışmaya alınan gruplarda cinsiyet açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

Olgulara Ait Çevresel Faktörler

Tablo 4’de Hastaların hastaneye geldikleri mevsime göre dağılımları incelenmiştir.

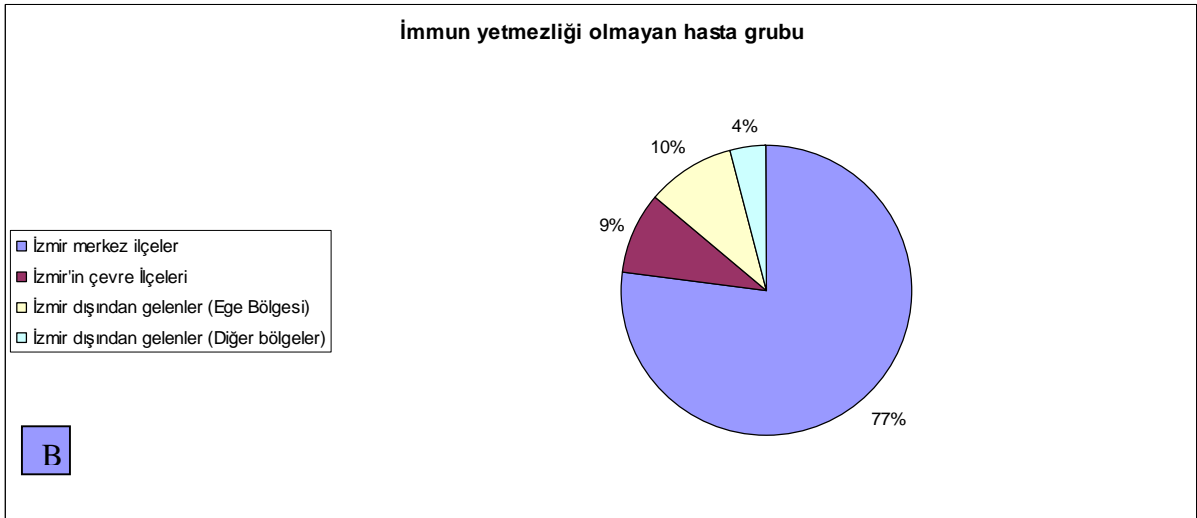
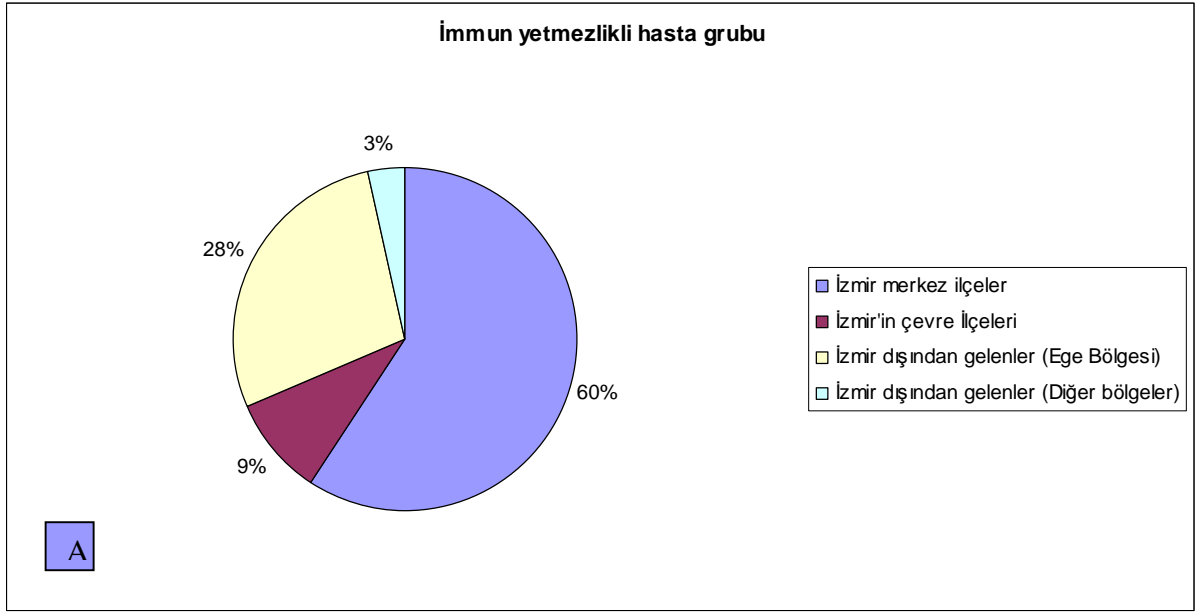
Tablo 4. Araştırma gruplarının mevsimsel dağılımı

		Mevsimler		
		İlk / Sonbahar (%)	Yaz / Kış (%)	Toplam
Grup	İmmun yetmezlikli	55 (61,1)	35 (38,9)	90
	İmmun yetmezliği olmayan	102 (50,5)	100 (49,5)	202
Toplam		157	135	292

Ki kare= 2.82, SD= 1, p=0.092

İmmun yetmezliği olan olguların gaita örnekleri daha yüksek oranda yağışların bol olduğu ilkbahar ve sonbahar aylarında toplanmıştır. İmmun yetmezlikli hastaların yağışlı olan bahar aylarında ve kurak olan yaz-kış mevsimlerinde birbirine yakın oranlarda hastaneye geldiği görülmektedir.

İncelemeye alınan bir diğer çevresel faktör de hastaların yerleşim yerlerine göre dağılımıdır. İmmun yetmezlikli ve immün sistemi sağlam hasta gruplarında yerleşim yerlerine göre dağılım Şekil 8’de verilmektedir.



Şekil 8. İmmun yetmezlikli 90 hastanın (A) ve immün yetmezliği olmayan 202 hastanın (B) İzmir ve İzmir dışında olan ikametlerine göre dağılımı.

İmmün yetmezlikli grupta İzmir dışından gelen hastaların oranı immün yetmezliği olmayanlara göre daha yüksektir.

Olguların Dışkı Kıvamlarına Ait Bulgular

Hem immün yetmezliği olan hem de immün sistemi sağlam olanlar için bu oran Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Alınan gaita örneği kıvamlarının araştırma gruplarına göre dağılımı

		Gaita kıvam niteliği		
		Yumuşak+Gevşek (%)	Sulu (%)	Toplam
Grup	İmmun yetmezlikli	60 (66,7)	30 (33,3)	90
	İmmun yetmezliği olmayan	179 (89,5)	21 (10,5)	200*
Toplam		239	51	290

Ki kare= 22.3 , SD= 1, p=0.0001

*İmmun yetmezliği olmayan 2 hastanın gaitasının kıvamına ait bilgi kaydedilmemiş

Çalışmaya gevşek/sulu kıvamda gaita örnekleri alınmıştır. Ancak %15.5 (45/292) oranında O-KTÜ grubundan yumuşak gaita örneği de alınmıştır. “Yumuşak + Gevşek” kıvamlı gaita örneği hem immün yetmezliği olan hem de olmayan hasta grubunda daha yüksek orandadır ancak sulu diyare immün yetmezliği olan grupta daha yüksek orandadır.

Olgulara Ait Klinik Bulgular

Araştırma popülasyonunu, yumuşak gaita kıvamı olanların dışında (%15.5) gevşek ya da sulu olmak üzere diyareli hastalar oluşturmaktadır. Hastaların %82.9 gastrointestinal semptomları mevcuttur (242/292). İmmün yetmezlikli grupta herhangi bir gastrointestinal semptomu olan %76.7 (69/90), immün yetmezliği olmayan grupta ise %85.6 (173/202)'dir. Araştırmaya alınan gruplar, kronik diyare şikayetleri açısından Tablo 6. da incelenmiştir.

Tablo 6. Araştırmaya alınan gruplarda kronik diyare varlığının dağılımı

		Kronik diyare		
		Yok (%)	Var (%)	Toplam
Grup	İmmün yetmezlikli	74 (82,2)	16 (17,8)	90
	İmmün yetmezliği olmayan	165 (81,7)	37 (18,3)	202
Toplam		239	53	292

Ki kare= 0.012 , SD= 1, p=0.91

İmmun yetmezliği olan ve olmayan gruplar arasında kronik diyare görülmesi açısından fark yoktur

Araştırmaya alınan hasta gruplarında kronik barsak hastalıklarının dağılımı Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Araştırmaya alınan gruplarda barsak hastalıklarının dağılımı

		Kronik Barsak Hast.			Toplam
		Barsak hast yok (%)	Barsak hast var (%)	Barsak malignt (%)	
Grup	İmmun yetmezlikli	76 (84,4)	2 (2,2)	12 (13,3)	90
	İmmun yetmezliği olmayan	179 (88,6)	21 (10,4)	2 (1,0)	202
Toplam		255	23	14	292

Ki kare= 25.2 , SD= 2, p=0.0001

Ülseratif kolit, Crohn, İBS ve fonksiyonel barsak hastalığı gibi barsak ile ilişkili kronik hastalıklar immün yetmezliği olan grupta da olmayan grupta da daha az sıklıkta görülmüştür. Bu barsak hastalıklarından herhangi biri olmak üzere immün yetmezliği olmayan grupta %10.4 ile daha yüksek sıklıkta görülürken, immün yetmezlikli hasta grubunda barsak malignitesi %13.3 ile daha sık görülmüştür.

Olgularda *D. fragilis* Enfeksiyonunu İnceleme Yöntemleri

Tüm hastalar hem PCR ile hem de demir hematoxilen boyası ile incelenmiştir. Tablo 8’de araştırmaya alınan gruplarda PCR yöntemi ile tespit edilen *D. fragilis*’in dağılımı gösterilmektedir.

Tablo 8. Araştırmaya alınan gruplarda PCR yöntemi ile tespit edilen *D. fragilis*'in dağılımı

		PCR yöntemi		
		<i>D. fragilis</i> yok (%)	<i>D. fragilis</i> var (%)	Toplam
Grup	İmmun yetmezlikli	86 (95,6)	4 (4,4)	90
	İmmun yetmezliği olmayan	153 (75,7)	49 (24,3)	202
Toplam		239	53 (18.2)	292

Ki kare= 16.5 , SD= 1, p=0.0001

İmmun yetmezliği olmayan grupta *D. fragilis* anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır.

Tablo 9'da araştırmaya alınan hastalarda demir hematoksilin boyama ile tespit edilen *D. fragilis*'in dağılımı gösterilmektedir.

Tablo 9. Araştırmaya alınan gruplarda demir hematoksilin boyama yöntemi ile tespit edilen *D. fragilis*'in dağılımı

		Demir hematoksilin boyama yöntemi		
		<i>D. fragilis</i> yok (%)	<i>D. fragilis</i> var (%)	Toplam
Grup	İmmun yetmezlikli	88 (97,8)	2 (2,2)	90
	İmmun yetmezliği olmayan	156 (77,2)	46 (22,8)	202
Toplam		244	48 (16.4)	292

p= 0.0001 (Fisher Kesin testi)

İmmun yetmezliği olmayan grupta *D. fragilis* anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

4.2. *D. fragilis* Saptanan Olgulara Ait Bulgular

Araştırmaya alınan olguların gaita örnekleri, demir hematoksilin boya ve PCR yöntemleriyle incelenmiştir. PCR yöntemiyle %18.2 oranında (53/292) *D. fragilis*'e rastlanmıştır. Demir hematoksilin boyama yöntemiyle ise %16.4 oranında (48/292) *D. fragilis*'e rastlanmıştır. Pozitif olguların öncelikle demografik özellikleri ele alınmıştır.

D. fragilis Saptanan Olguların Demografik Özellikleri

Araştırmada yer alan erkek ve kadınlardaki *D. fragilis* dağılımı Tablo 10.da gösterilmiştir

Tablo 10. *D. fragilis* saptanan olguların cinsiyete göre dağılımı

	Cins		
	Erkek (%)	Kadin (%)	Toplam
<i>D. fragilis</i> yok	115 (48.1)	124 (51,9)	239
<i>D. fragilis</i> Var	26 (49.1)	27 (50.9)	53
Toplam	141	151	292

Ki kare= 0.15 , SD= 1, p=0.90

Erkeklerde kadınlar arasında *D. fragilis* görülme açısından fark yoktur.

Pozitif olguların yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 11'de verilmektedir.

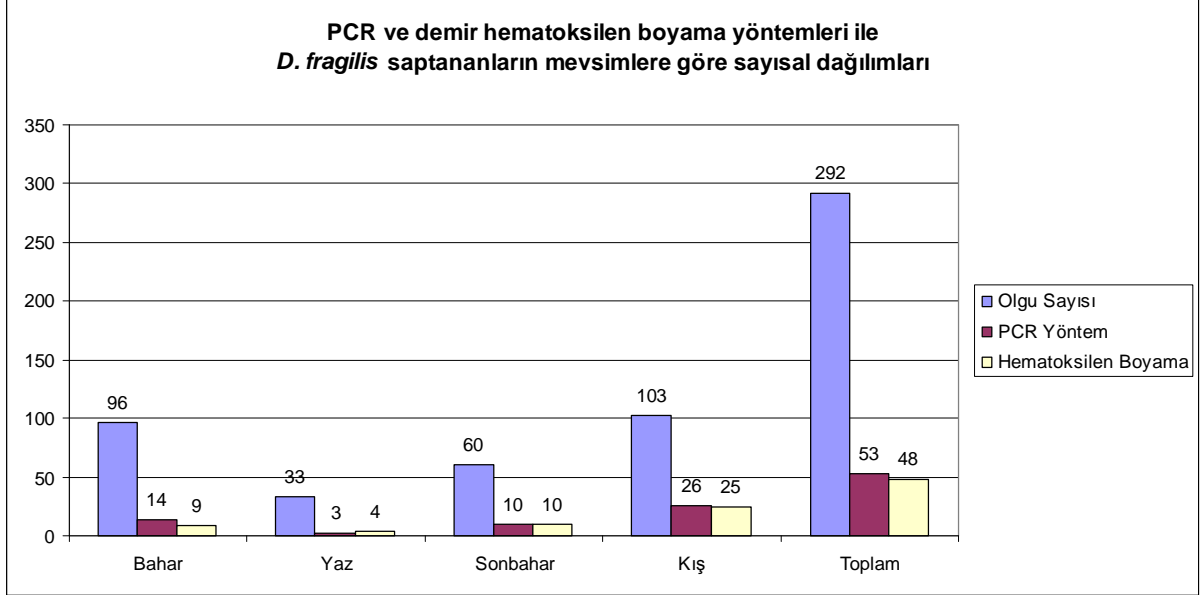
Tablo 11. *D. fragilis* olgularının yaş gruplarına göre dağılımları

	Yaş aralığı				Toplam
	0-5 (%)	6-14 (%)	15-64 (%)	65üzeri (%)	
<i>D. fragilis</i> yok	31 (13,0)	25 (10,5)	152 (63,6)	31 (13,0)	239
<i>D. fragilis</i> var	2 (3,8)	10 (18,9)	31 (58.5)	10 (18,9)	53
Toplam	33	35	183	41	292

Ki kare= 7.06 , SD= 3, p=0.070

15-64 yaş grubunda *D. fragilis* görülme sıklığı %58.5 ile, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir.

PCR ve hematoksilen boyama yöntemleri ile *D. fragilis* saptanan olguların hastaneye geldikleri mevsime göre dağılımları Şekil 9’da gösterilmiştir.

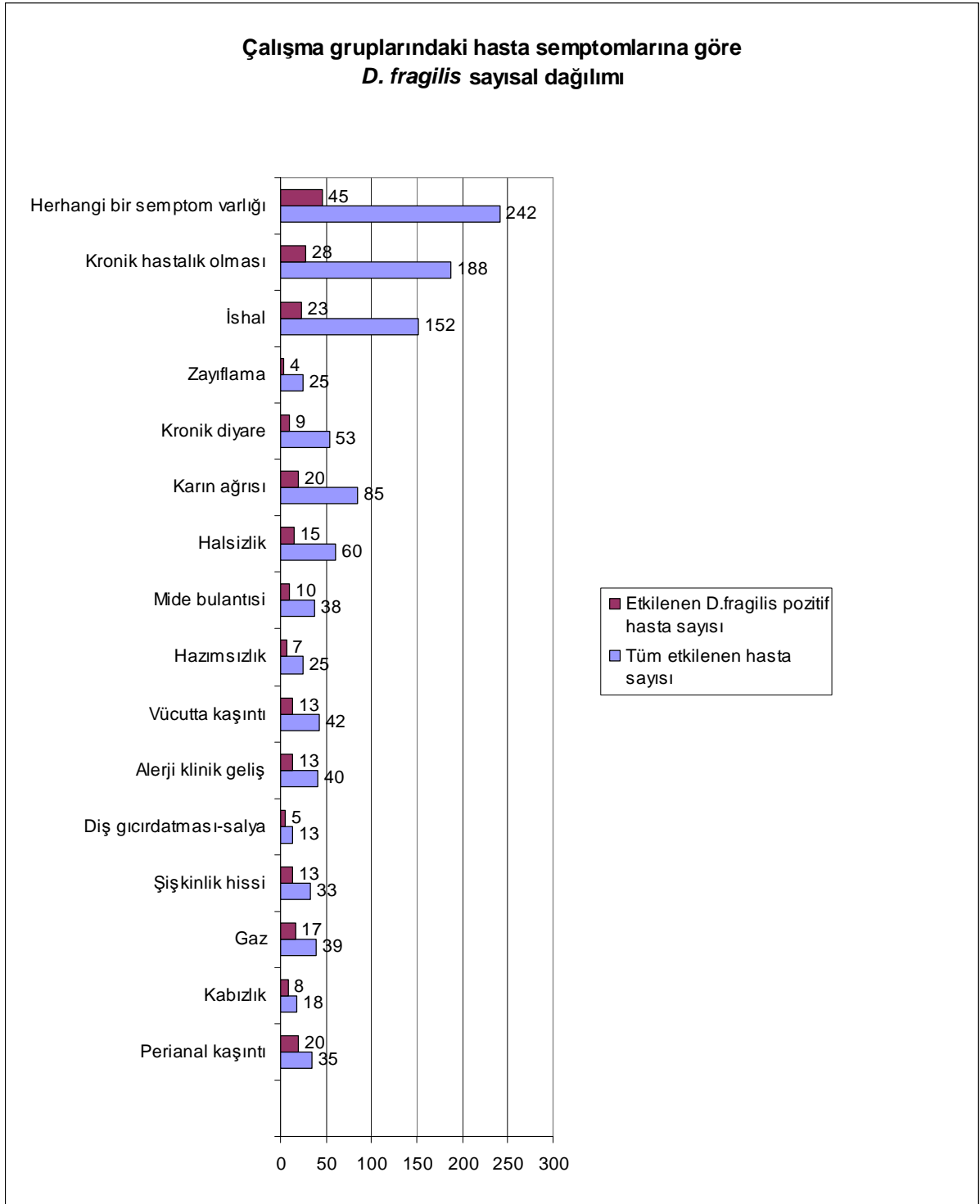


Şekil 9. PCR ve demir hematoksilen boyama yöntemleri ile *D. fragilis* saptananların mevsimlere göre sayısal dağılımları (Ki kare demir hematoksilen boyama :8.53, p=0.36, p>0.05, Ki kare PCR:6.22, p=0.10, p>0.05)

Çalışmaya alınan hastalar % 35.3 oranında kışın, %32.9 ilkbaharda, %20.5 sonbaharda, %11.3 oranında yaz mevsiminde gelmişlerdir. En yüksek oranda *D. fragilis*'e %25.2 ile kışın gelen hastalarda saptanmıştır. Sayıca dağılımları farklı olmasına rağmen bahar ve sonbaharda saptanan *D. fragilis* oranları birbirine yakın ve sonbaharda daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla %14,6, %16,7). Yazın saptanan *D. fragilis* oranı da %9,1'dir.

***D. fragilis* Saptanan Olgulara Ait Klinik Bulgular**

Çalışmaya alınan olgulardan *D. fragilis* saptananların %92,5'inde (49/53) herhangi bir gastrointestinal semptom varlığı söz konusuydu. *D. fragilis* enfeksiyonlu olgularda görülen semptomlar Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. Çalışmadaki hastaların varolan gastrointestinal semptomları ve *D. fragilis* pozitifliği ile ilişkisi görülmektedir.

D. fragilis pozitifliği % 68.8 oranında diğer parazitlerle birlikte.

- Kronik diyaresi olan olguların *D. fragilis* sıklığı % 14.9'dur. ($p=0.65$, $p>0.05$)

- Karın ağrısı şikayeti olanlardaki *D. fragilis* sıklığı: %23.5 ($p=0.17$, $p>0.05$)
- İshal şikayeti olanlarda *D. fragilis* sıklığı % 15.1 olmayanlara göre daha yüksek bulunmuştur ($p=0.08$, $p>0.05$)
- Kabızlığı olan olgularda *D. fragilis* %44.4sıklıkla olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0.008$, $p<0.05$).
- Perianal kaşıntısı olan olguların *D. fragilis* sıklığı %57.1 ile olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0.00$, $p<0.05$).
- Gaz şikayeti olan olgularda *D. fragilis* sıklığı %43.6olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0.00$, $p<0.05$).
- Şişkinlik-dolgunluk şikayeti olanlarda *D. fragilis* sıklığı %39.4 ile olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0.002$, $p<0.05$)
- Diş gıcırdatma-ağız sulanması şikayeti olan olgularda *D. fragilis* sıklığı anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (sıklığı:%38.5, $p=0.052$, $p<0.05$)
- Alerji ile ilgili poliklinikten gelen hastalarda *D. fragilis* sıklığı olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (sıklığı:%32.5, $p=0.019$, $p<0.05$)
- Vücut kaşıntısı-ürtiker şikayeti olan olgularda *D. fragilis* sıklığı olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (sıklığı:%31.0, $p=0.035$, $p<0.05$)
- Herhangi bir semptomu olan olguların *D. fragilis* sıklığı, olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (sıklığı:% 18.6, $p=0.03$, $p<0.05$)
- Kronik hastalığı olan olguların *D. fragilis* sıklığı, olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (sıklığı:% 14.9, $p=0.075$, $p>0.05$)
- İshal, karın ağrısı, şişkinlik hissi, gaz, diş gıcırdatma, vücut kaşıntısı, anal kaşıntı şikayeti olanlar ile alerji ilişkili klinikten gelenlerde, *Blastocystis hominis* sıklığı, bu şikayetleri olmayanlara göre daha yüksek bulunmuştur.
- *G. intestinalis* ve *E. nana* görülen olgularda semptomları olanlar ile olmayanlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır

4.3 Tek Bir Enfeksiyon Etkeni Olarak *D. Fragilis* Saptanan Olgulara Ait Klinik Bulgular

Tek başına *D. fragilis* saptanan olgular incelendiğinde, *D. fragilis* saptananların %90.9'unda (20/22) herhangi bir gastrointestinal semptom varlığı sözkonusuydu. Tek başına *D. fragilis* enfeksiyonu olanlar ile dispeptik şikayet ilişkisi Tablo 12'de görülmektedir.

Tablo 12. *D. fragilis*'in tek etken olduğu olgularının dispeptik şikayetle ilişkisi

	Hazımsızlık-Şişkinlik		
	Yok (%)	Var (%)	Toplam
Tek başına <i>D. fragilis</i> yok	235 (88.0)	32 (12.0)	267
Tek başına <i>D. fragilis</i> var	16 (72.7)	6 (27.3)	22
Toplam	251	38	289*

Ki kare= 4.16, SD= 1, p=0.042

*üç hastaya ait hazımsızlık şikayeti ile ilgili veri kaydı eksiktir

Dispeptik şikayetleri olanlarda *D. fragilis* anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Tek bir enfeksiyon etkeni olarak *D. fragilis* saptanan olguların intestinal gaz şikayeti ile ilişkisi Tablo 13'de görülmektedir

Tablo 13. *D. fragilis*'in tek etken olduğu olgularının intestinal gaz şikayeti ile ilişkisi

	İntestinal gaz şikayeti		
	yok (%)	var (%)	Toplam
Tek Başına <i>D. fragilis</i> yok	238 (88.1)	32 (11.9)	270
Tek Başına <i>D. fragilis</i> var	15 (68.2)	7 (31.8)	22
Toplam	253	39	292

Ki kare= 7.09, SD= 1, p=0.08

Gaz şikayeti olanlarda *D. fragilis*, anlamlık düzeyine yakın oranda daha yüksek bulunmuştur (anlamlılık düzeyi $p<0.05$)

Tek bir enfeksiyon etkeni olarak *D. fragilis* saptanan olguların diyare ile aralıklı seyreden kabızlık ile ilişkisi Tablo 14’de görülmektedir.

Tablo 14. *D. fragilis*’in tek etken olduğu olgularının diyare ile aralıklı seyreden kabızlık şikayeti ile ilişkisi

	Diyare/Kabızlık		
	yok (%)	var (%)	Toplam
Tek başına <i>D. fragilis</i> yok	257(95.2)	13 (4.8)	270
Tek başına <i>D. fragilis</i> var	17 (77.3)	5 (22.7)	22
Toplam	274	18	292

Ki kare= 11.29, SD= 1, $p=0.001$

Diyare ile aralıklı seyreden kabızlık şikayeti olanlarda *D. fragilis* anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur

Tek bir enfeksiyon etkeni olarak *D. fragilis* saptanan olguların ürtiker ya da alerjik kaşıntı ilişkisi Tablo 15’de görülmektedir.

Tablo 15. *D. fragilis*’in tek etken olduğu olgularının ürtikeryal kaşıntı şikayeti ile ilişkisi

	Ürtikeryal kaşıntı		
	yok (%)	yar (%)	Toplam
Tek başına <i>D. fragilis</i> yok	235 (87.0)	35 (13.0)	270
Tek başına <i>D. fragilis</i> var	15 (68.2)	7 (31.8)	22
Toplam	250	42	292

Ki kare= 5.87, SD= 1, $p=0.015$

Ürtiker ya da alerjik kaşıntılı hastalarda *D. fragilis* sıklığı anlamlı olarak yüksekti.

Tek bir enfeksiyon etkeni olarak *D. fragilis* saptanan olgular ile perianal kaşıntı ilişkisi Tablo 16'de görülmektedir.

Tablo 16. *D. fragilis*'in tek etken olduğu olgularının perianal kaşıntı şikayeti ile ilişkisi

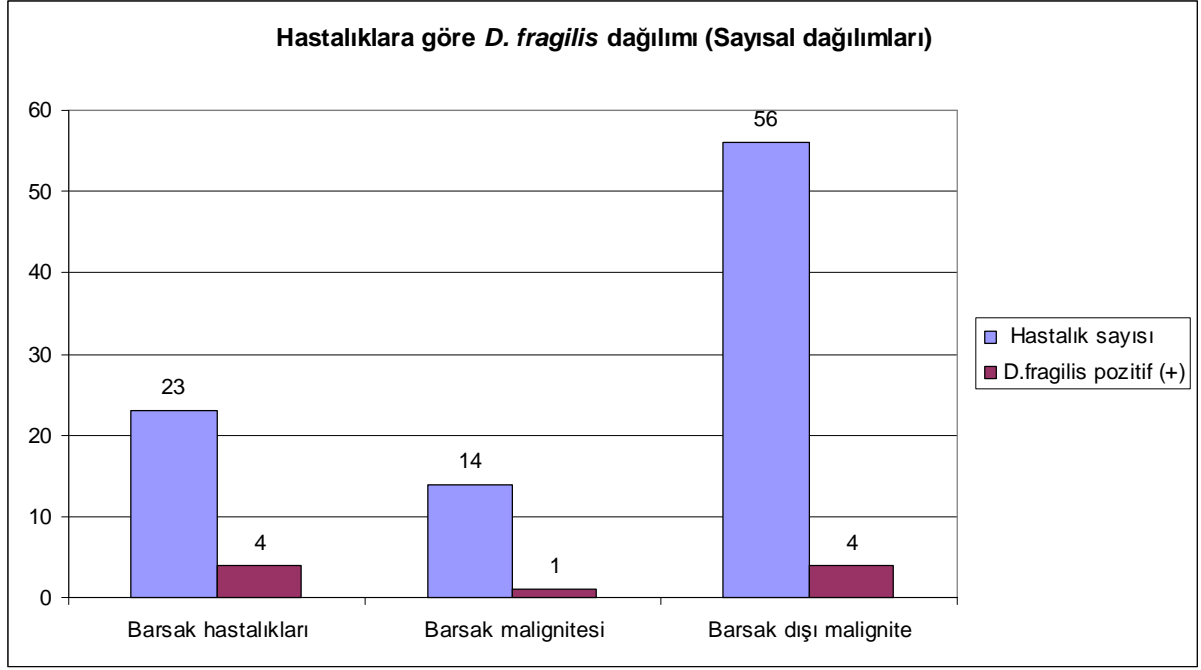
	Perianal kaşıntı		
	yok (%)	var (%)	Toplam
Tek başına <i>D. fragilis</i> yok	241 (89.3)	29 (10.7)	270
Tek başına <i>D. fragilis</i> var	16 (72.7)	6 (27.3)	22
Toplam	257	35	292

Ki kare= 5.27, SD= 1, p=0.022

Tek bir enfeksiyon olarak *D. fragilis* saptanan olgular, diğer parazitlerle beraberliğindekine benzer şekilde dispeptik şikayetler, gaz, diyare ile beraber seyreden kabızlık şikayeti, kaşıntı ve perianal kaşıntısı olanlarda *D. fragilis* varlığı anlamlı olarak yüksek bulundu. *D. fragilis*, kr. diyarelilerde %9.1 (2/22), akut diyarelilerde %45.5 (10/22), karın ağrısı şikayeti olanlarda %22.7 (5/22) sıklığında görülmüştür.

D. fragilis'in diğer parazitlerle beraberliğindeki oranlar tek başına dientamoebiosis enfeksiyonu ile benzer sonuç verdiği için ilk gruptaki daha yüksek sayıdaki olgu ile analizlere devam edilmiştir. Şekil 11'de kronik barsak hastalıkları ve kanser varlığında *D. fragilis* enfeksiyon ilişkisi görülmektedir.

***D. fragilis* Saptanan Olgulardaki Kronik Barsak Hastalığı İlişkisi**

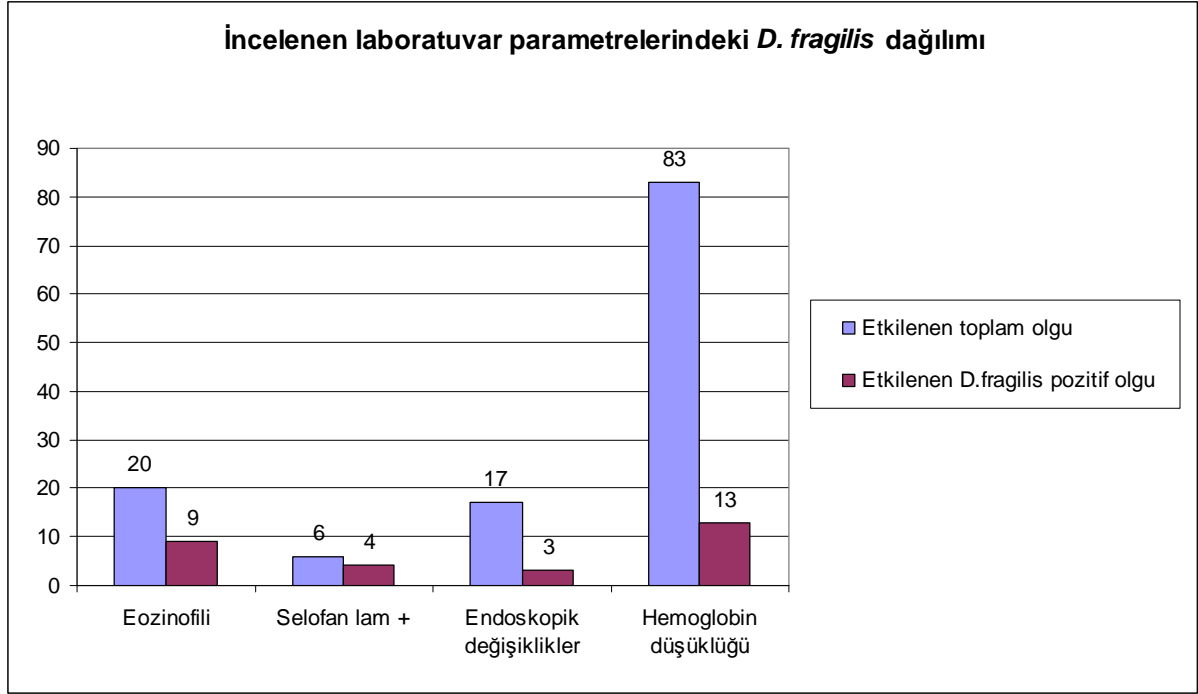


Şekil 11. Kronik barsak hastalıkları (Crohn, ülseratif kolit, irritable barsak sendromu ve diğer fonksiyonel barsak hastalıkları), barsak malignitesi ve barsak dışı malignitesi olanlarda görülen *D. fragilis* sıklığı.

- Herhangi bir barsak hastalığı olanda *D. fragilis* görülme sıklığı %17.4'dür (p=0.541, p>0.05)
- Barsak malignitesi olanlarda *D. fragilis* görülme sıklığı %7.1'dir.
- Herhangi bir kanser hastalığı olanda *D. fragilis* görülme sıklığı %7.1'dir.

Dientamoebiosisli Hastaların Bazı Laboratuvar Sonuçları ile İlişkisi

Literatürlerde *D. fragilis* enfeksiyonu ile ilişkilendirilen bazı laboratuvar parametrelerinin çalışmamızda *D. fragilis* enfeksiyonu ile ilişkisi Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. Hastaların bazı laboratuvar parametrelerinin *D. fragilis* pozitifliği ile ilişkisi

- Periferik eozinofilisi olanlarda *D. fragilis* sıklığı olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (sıklığı: %45.0, $p=0.012$, $p<0.05$). Ancak yukarıdaki klinik parametrelerinden farklı olarak tek başına *D. fragilis* enfeksiyonu olanlar ile eozinofili bulgusu olanlar arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (sıklığı: % 17.6, $p=0.22$, $p>0.05$)

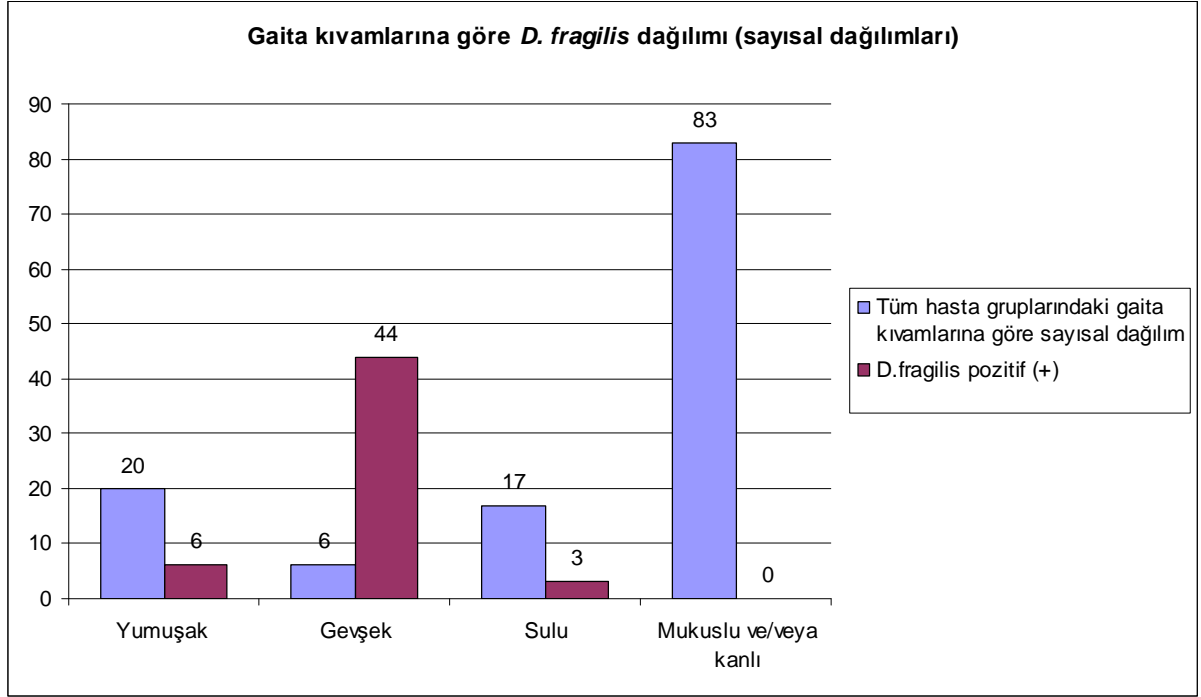
- Selofan lam pozitif olarak incelenen olgulardaki *D. fragilis* sıklığı %66.7'dir ($P=0.352$, $p>0.05$)

- Endoskopik incelemesi yapılan hastalardaki, ödem/enflamasyon /hiperemi/hiperpigmentasyon gibi değişikliklerden herhangi birinin olması durumunda *D. fragilis* pozitifliği % 17.6 olarak bulunmuştur ($p=0.503$, $p>0.05$).

- Hemoglobin düşüklüğü olan hastalardaki *D. fragilis* sıklığı %15.7'dir ($p=0.159$, $p>0.05$)

Olguların gaita kıvamları ile *D. fragilis* görülmesi arasındaki ilişki

Hastaların incelenen gaita örneklerinin kıvamları ile *D. fragilis* saptanması arasındaki ilişki Şekil 13. de gösterilmektedir.



Şekil 13. Çalışma materyali olarak alınan gaita örneğinin kıvamı ile *D. fragilis* saptanması arasındaki ilişki

- Gevşek gaita örneklerinde *D. fragilis* saptanma sıklığı %23.6 olup, diğer kıvamdaki örneklerde saptanan *D. fragilis* oranlarından anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0.008$, $p<0.05$). Yumuşak gaita örneğinde %13.3, sulu diyareli örnekte %6.0 oranında saptanmış, mukusluve/veya kanlı örneklerin hiç birinde *D. fragilis* saptanmamıştır.

Dientamoebiosisli Hastalardaki Semptomların Yaş Gruplarına Göre İncelenmesi

Dientamoebiosisli hastalardaki semptomların yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 17 de görülmektedir.

Tablo 17. Dientamoebiosisli hastaların gastrointestinal semptomlarının yaş gruplarına göre dağılımları

Semptomlar	0-5 % (n ^{df+} /n)	6-14 % (n ^{df+} /n)	15-64 % (n ^{df+} /n)	65 üzeri % (n ^{df+} /n)
Kronik diyare	0	37.5 (3/8)	12.5 (4/32)	11.1 (1/9)
Akut diyare	5 (1/20)	28.6 (4/14)	14.3 (13/91)	18.5 (5/27)
Karın ağrısı	9.1 (1/11)	60.0 (9/15) P<0.05	17.8 (8/45)	14.3 (2/14)
Hazımsızlık-şişkinlik	6.7 (2/30)	28.6 (10/35)	37.9 (11/29) P<0.05	37.5 (3/8)
Mide bulantısı	0	37.5 (3/8)	26.1 (6/23)	20 (1/5)
Gaz	50 (1/2) P<0.05	50 (4/8)	39.1 (9/23) P<0.05	50.0 (3/6)
Kabızlık	0	100.0 (1/1)	40 (4/10)	60.0 (3/5)
Diş gıcırdatması-salya	66.7 (2/3)	0	33.3 (2/6)	50 (1/2)
Allerjik kaşıntı	0	40 (2/5)	30.3 (10/33) P<0.05	1/3 (33.3)
Perianal kaşıntı	50 (1/2)	50 (5/10) P=0.076	70.0 (14/20) P<0.05	0
Eozinofili	66.7 (2/3)	50.0 (2/4)	22.2 (2/8)	75.0 (3/4)

6-14 yaş grubunda *D. fragilis* görülmesi ile karın ağrısı ve perianal kaşıntı şikayetleri arasında anlamlı ilişki vardır.

6-14 yaş grubunda kronik diyarelilerde *D. fragilis* görülme sıklığı %37.5, akut diyarelilerde ise %28'dir.

15-64 yaş grubunda *D. fragilis* görülmesi ile hazımsızlık-şişkinlik, intestinal gaz, allerjik kaşıntı ve perianal kaşıntı şikayetleri arasında anlamlı ilişki vardır.

65 yaş üzerinde ise diyare ile aralıklı görülen kabızlık şikayeti olanlarda *D. fragilis* %60 sıklıkta, periferik kanda eozinofilisi olanlarda ise *D. fragilis* sıklığı ise %75 olarak görülmüştür.

Dientamoebiosisli Hastalardaki Semptomların Cinsiyete Göre İncelenmesi

Dientamoebiosisli hastalarda görülen semptomların cinsiyet ile ilişkisi Tablo 18.de görülmektedir.

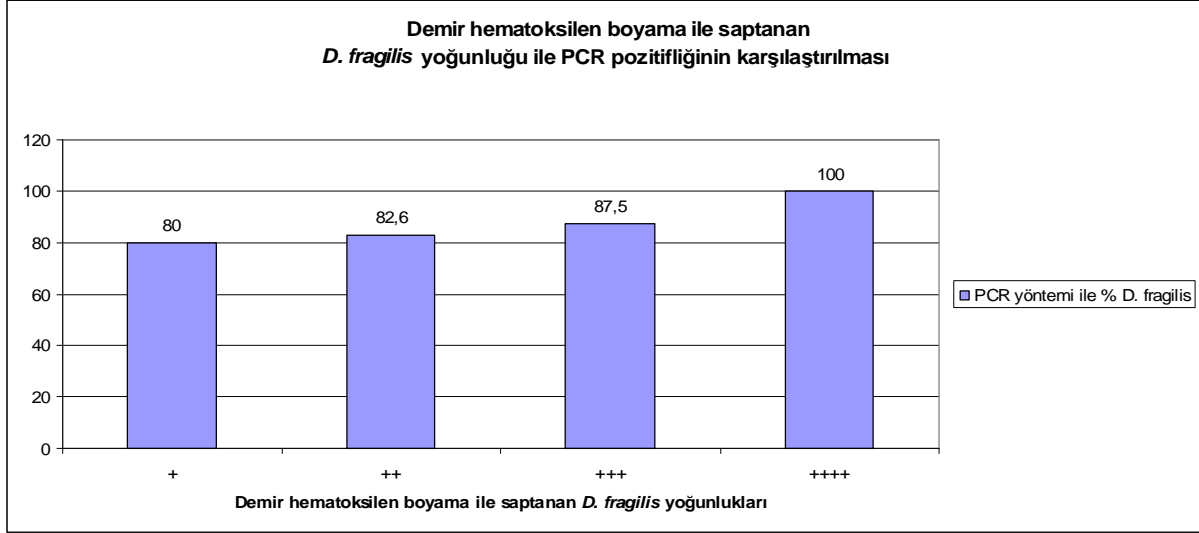
Tablo18. Dientamoebiosisli hastaların gastrointestinal semptomlarının cinsiyete göre dağılımı

Semptomlar	Erkek % (n ^{df+} /n)	Kadın % (n ^{df+} /n)
Kronik diyare	20.5 (3/29)	20.8 (5/24)
Akut diyare	15.5 (11/71)	14.8 (12/81)
Karın ağrısı	20.0 (8/40)	26.7 (12/45) P=0.066
Hazımsızlık-şişkinlik	28.6 (6/21)	52.9 (9/17)
Gaz	43.5 (10/23) P<0.05	43.8 (7/16) P<0.05
Kabızlık	45.5 (5/11) P<0.05	42.9 (3/7)
Allerjik kaşıntı	33.3 (6/18) P=0.081	29.2 (7/24)
Perianal kaşıntı	47.1 (8/17) P<0.05	66.7 (12/18) P<0.05
Eozinofili	36.4 (4/11)	55.6 (5/9) P<0.05

Kronik diyare ve akut diyare, gaz şikayeti olanların gaita örneklerinde *D. fragilis* saptanması erkek ve kadınlarda benzer oranlarda görülmüştür (sırasıyla %20.5, 20.8; %15.5, 14.8; %43.5, 43.8). *D. fragilis* kadınlarda karın ağrısı şikayeti olanlarda %26.7 (p=0.066), hazımsızlık-şişkinlik olanlarda ise %52.9 ve perianal kaşıntısı olanlarda %66.7 (p<0.05), eozinofilisi olanlarda ise %55.6 (p<0.05) oranları ile erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur

D. fragilis Saptanan Olguların Mikroskopik Değerlendirilmesi

Hematoksilen boyama ile değerlendirilen parazit yoğunluğu ve PCR ile *D. fragilis* saptanması arasındaki ilişki Şekil 14. de gösterilmiştir.



Şekil 14. Demir hematoksisilen boyama ile saptanan *D. fragilis* yoğunluğu ile PCR pozitifliğinin karşılaştırılması

Demir hematoksisilen ile boyanan tüm preparatta 1-3 arası *D. fragilis* trofozoiti bulunan ve yoğunluk derecesi “**bir pozitif**” olarak değerlendirilen 5 adet preparatın 4’ünde (%80) PCR yöntemi ile *D. fragilis* pozitifliği saptanmıştır.

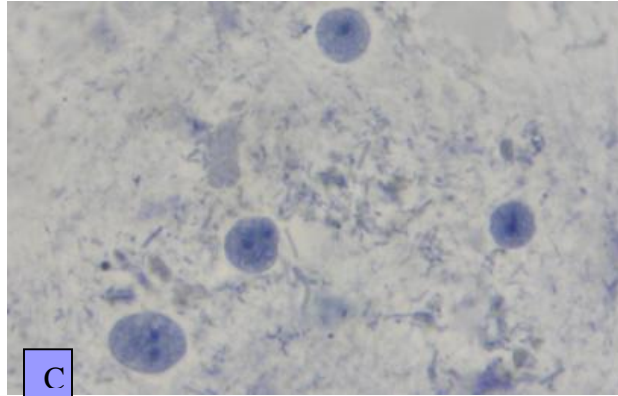
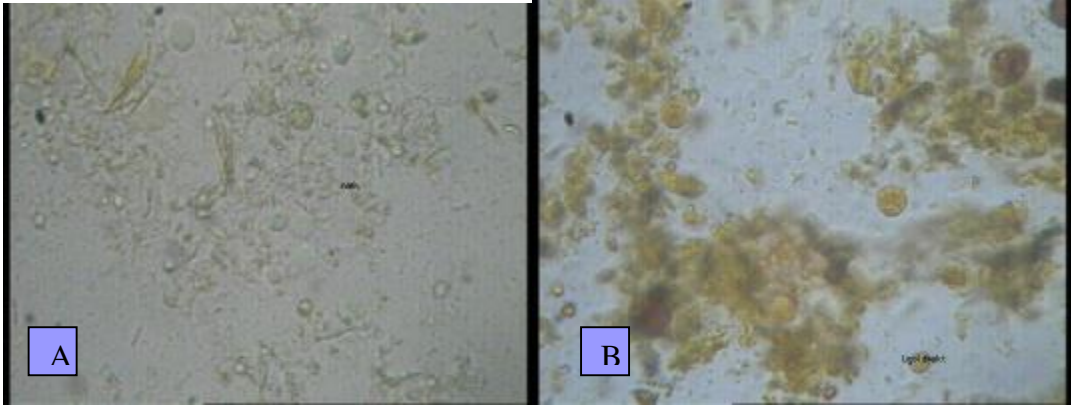
6-20 sahada 1-2 *D. fragilis* trofozoiti ile “**iki pozitif**” olarak değerlendirilen 23 preparatın 19’unda (%82.6) PCR yöntemi ile *D. fragilis* pozitifliği saptanmıştır.

1-5 sahada 1-2 *D. fragilis* trofozoiti ile “**üç pozitif**” olarak değerlendirilen 16 preparatın 14’ünde (%87.5) PCR yöntemi ile *D. fragilis* pozitifliği saptanmıştır.

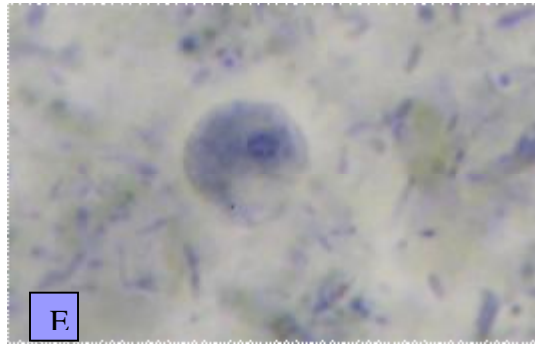
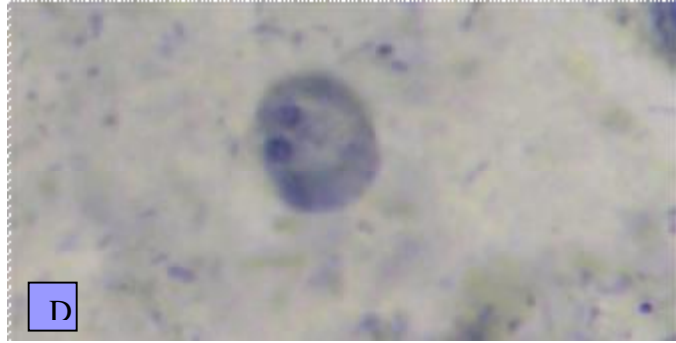
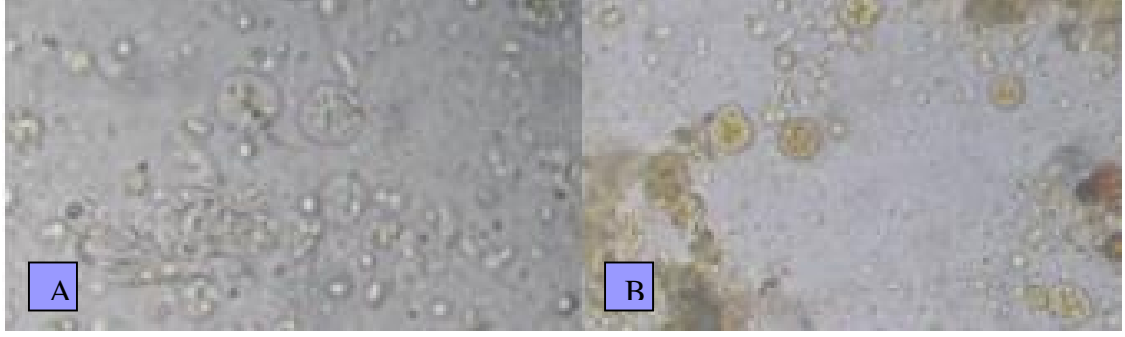
1-2 sahada 3 ve üzeri *D. fragilis* trofozoiti bulunan ve **dört pozitif** olarak değerlendirilen 4 preparatın 4’ünde de (%100) PCR yöntemi ile *D. fragilis* pozitifliği saptanmıştır. *D. fragilis* trofozoitlerin boyalı preparattaki yoğunluk oranlarındaki artışın, PCR ile *D. fragilis* saptanma sıklığını arttırdığı gözlenmiştir.

4.5. Mikroskopi ile Elde Edilen *D. fragilis* Pozitif Preparat Görüntüleri

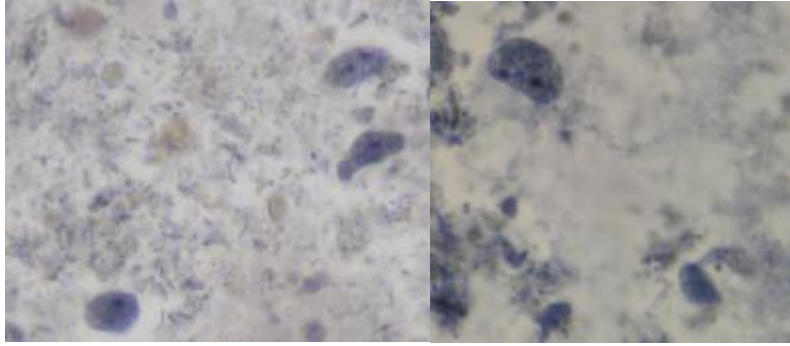
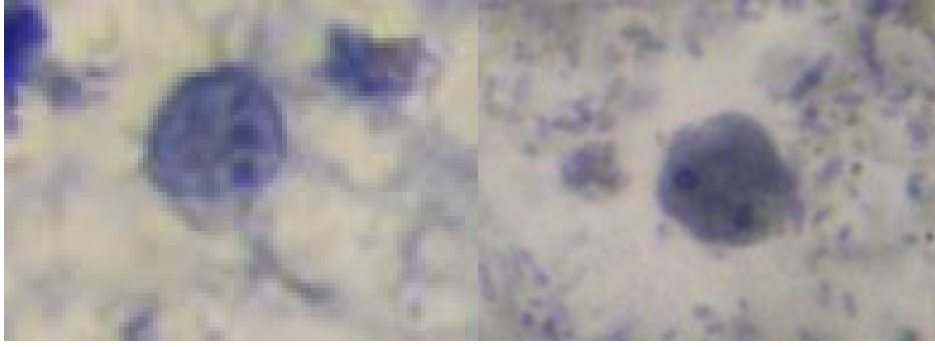
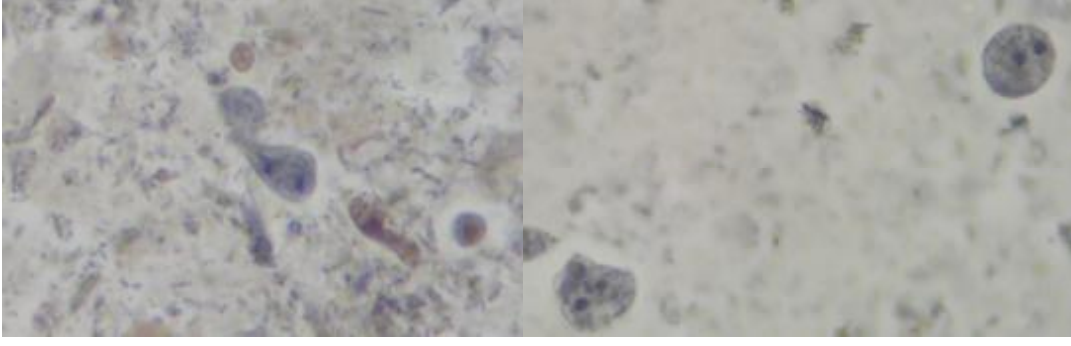
SAF içine alınan gaita örneklerinden nativ-Lugol ile hazırlanan preparatların x400 büyütme ile ve demir hematosilen boyama sonucu elde edilen preparatların x1000 büyütme ile değerlendirilen mikroskopik görüntüleri aşağıda verilmiştir.



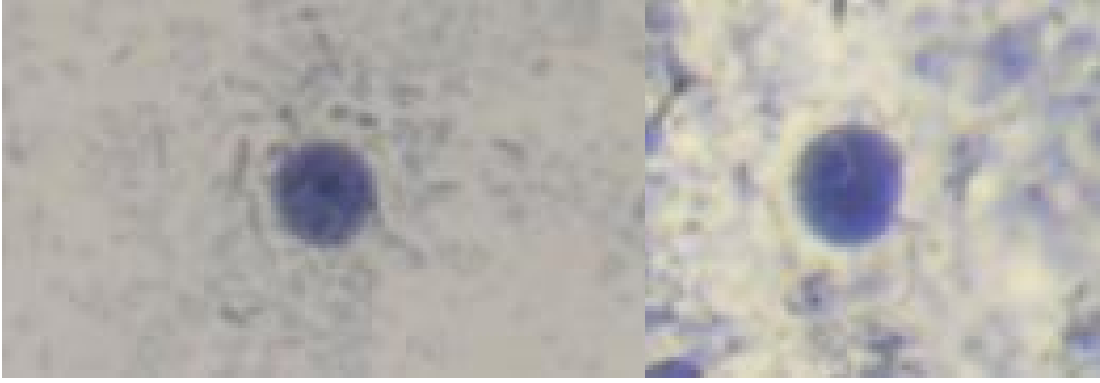
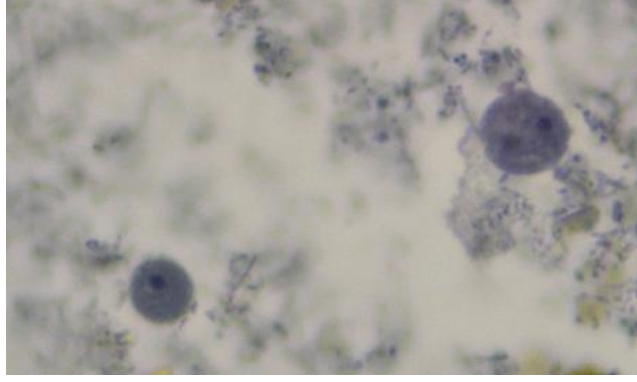
Resim 9. “dört pozitif” olarak değerlendirilen *D. fragilis*’li hastanın fiksatifli örnekten hazırlanan nativ-Lugol preperat görüntüsü (A,B) ve bir başka dört pozitif değerlendirilmiş hastanın demir hematosilen ile boyanmış preperatı (C,D)



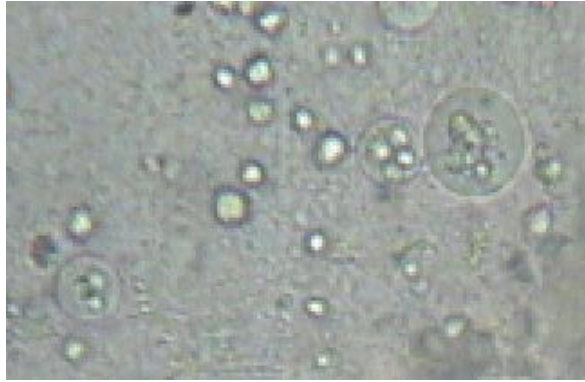
Resim 10. *D. fragilis* pozitif olarak değerlendirilen hastanın sırasıyla nativ-Lugol (A,B), Robinson Besiyeri ortamı (C), çift nükleus (D) ve tek nükleuslu, demir hematoksilin ile boyanmış preparat görüntüleri (E)



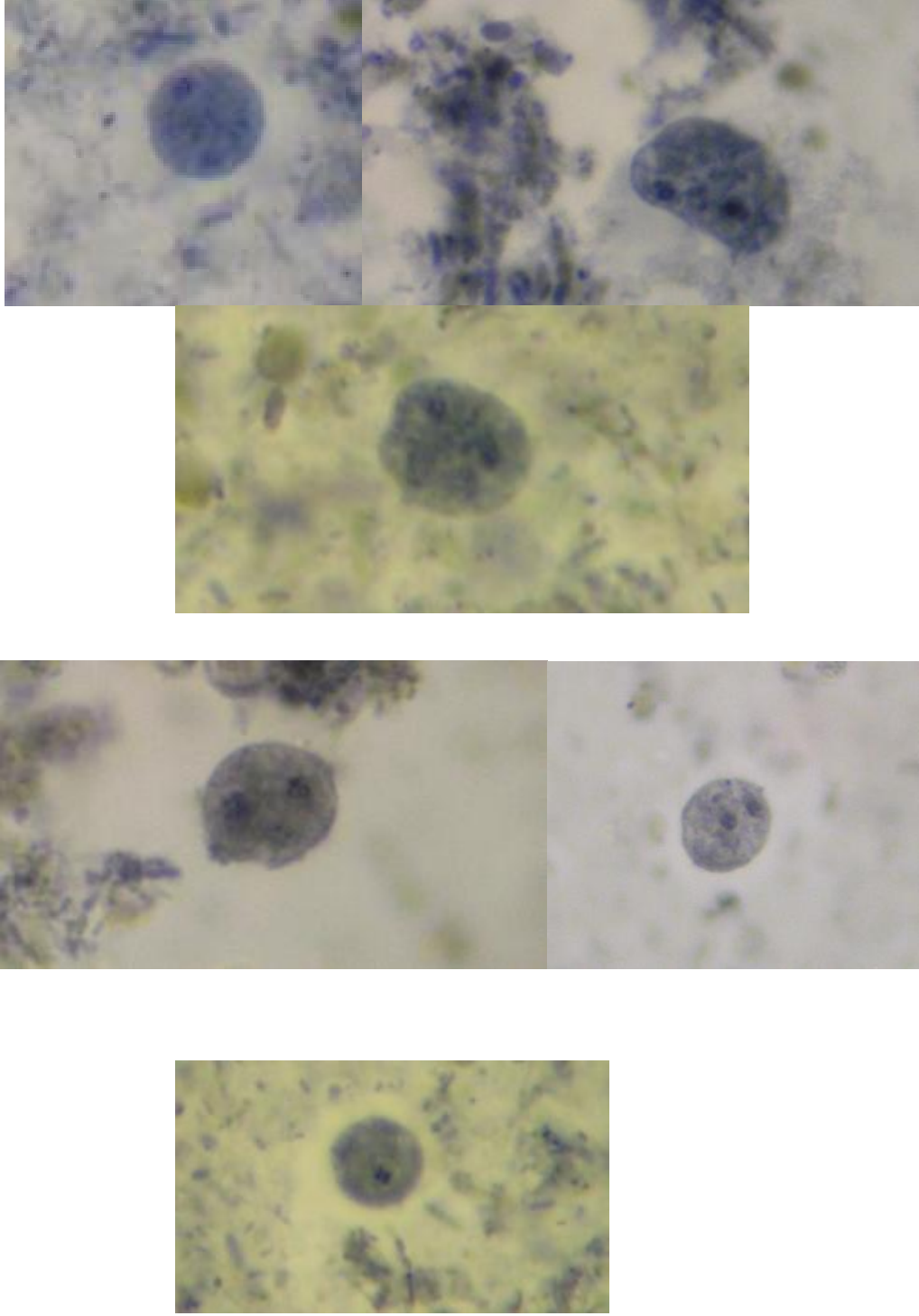
Resim 11. Demir hematoksilin ile boyanmış ve fiksatifli solusyondan hazırlanmış olan Lugol preparatlarıdaki *D. fragilis*'in motilitesini gösteren görüntüler



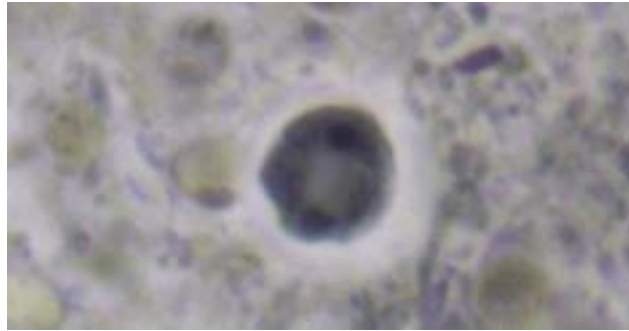
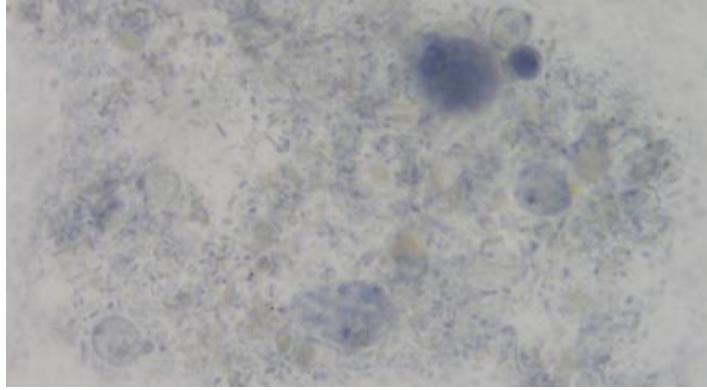
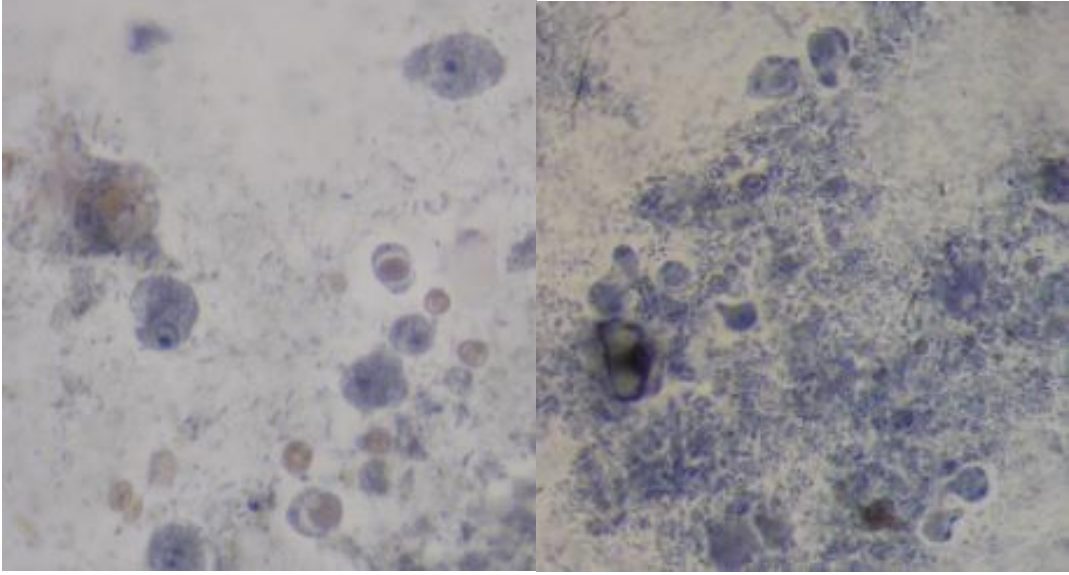
Resim 12. Demir hematoksilin ile boyanmış preparatlarda kist benzeri olduğu düşünülen yapılar



Resim 13. Robinson besiyeri ortamında *D. fragilis*



Resim 14. Farklı hasta örneklerindeki boyama ile elde edilen *D. fragilis* görüntüleri



Resim 15. Farklı hasta örneklerindeki *D. fragilis* ile beraber görülen ve *D. fragilis* ile karışabilen parazitler (*J. bütschilii*, amoeboid *B. hominis*, *E. nana*, *E. coli* prekestik yapılar, iki çekirdekli *B. hominis*)

Demir hematoksilen boyama ile saptanan protozoanlar ve rutin laboratuvarında saptanmış helment sonuçları Tablo 19’da görülmektedir

Tablo 19. Çalışma gruplarında demir hematoksilen boyama ve çoklaştırma yöntemi ile saptanan parazitler ve sıklıkları

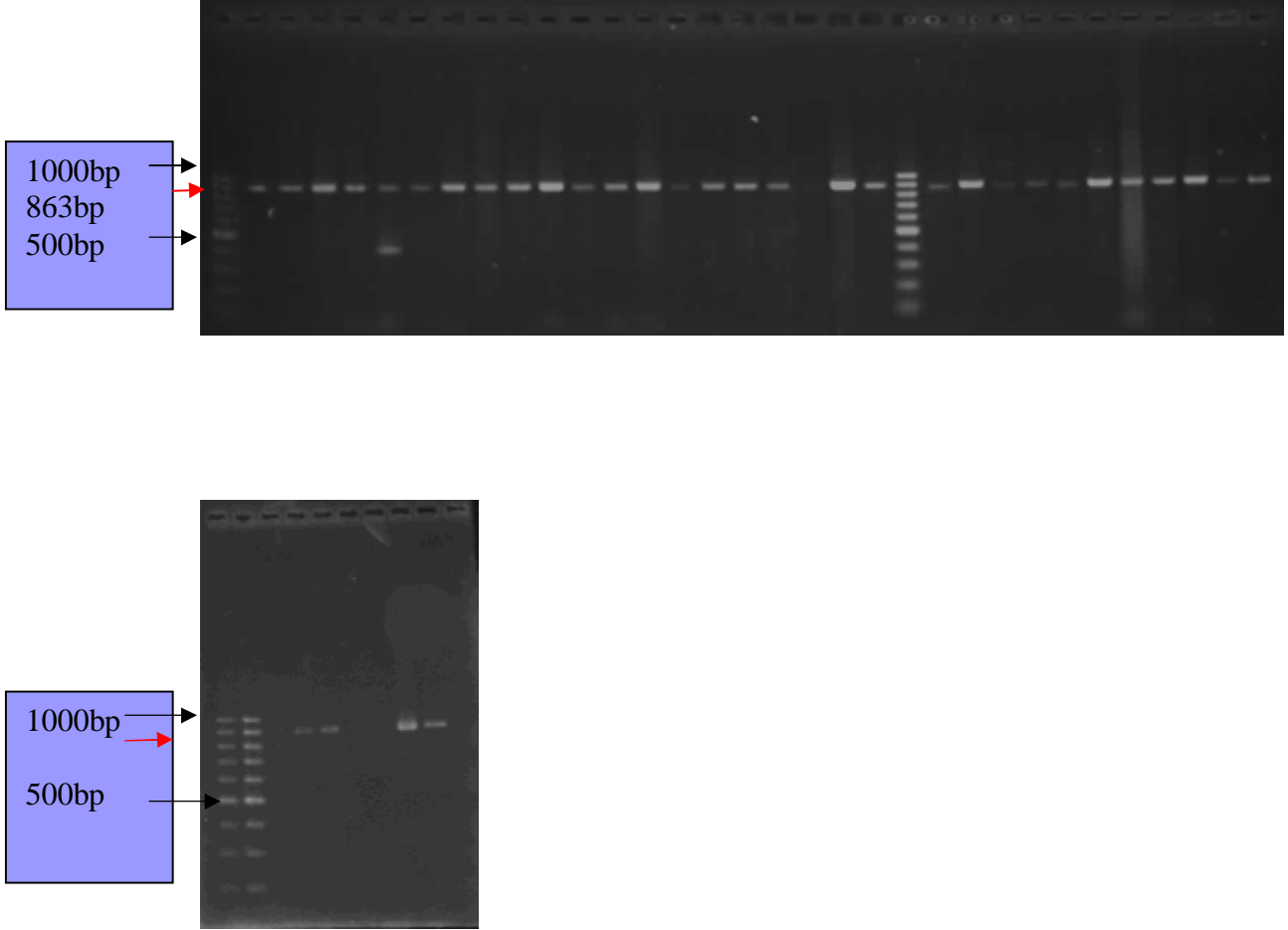
<u>Diğer Parazitler</u>	<u>İmm. vet (+)</u> % (n)	<u>İmm. vet (-)</u> % (n)	<u>Toplam</u> % (n)
<i>B. hominis</i>	12.2 (11)	31.7 (64)	25.7 (75)
<i>D. fragilis</i>	2,2 (2)	23.2 (46)	16.4 (48)
<i>E. nana</i>	2.2 (2)	7.9 (16)	6.2 (18)
<i>I. butschlii</i>	2.2 (2)	4.5 (9)	3.8 (11)
<i>E. coli</i>	0	4.0 (8)	2.7 (8)
<i>G. intestinalis</i>	2.2 (2)	2.0 (4)	2.1 (6)
<i>Cryptosporidium spp.</i>	2.2 (2)	1.5 (3)	1.7 (5)
<i>E. histolytica</i>	1.1 (1)	0	0.3 (1)
<i>E. hartmani</i>	0	1.0 (2)	0.7 (2)
<i>E. vermicularis</i>	0	3.4 (7)	2.1 (7)
<i>T. saginata</i>	2.2 (2)	0.5 (1)	2.8 (3)
<i>A. lumbricoides</i>	0	1.5 (3)	1.0 (3)
<i>T. intestinalis</i>	0	1.0 (2)	0.7 (2)

Demir hematoksilen boyama yöntemi ile *B. hominis* en sık, *D. fragilis* ise *B. hominis*’den sonra ikinci sıklıkta tespit edilen parazit olmuştur.

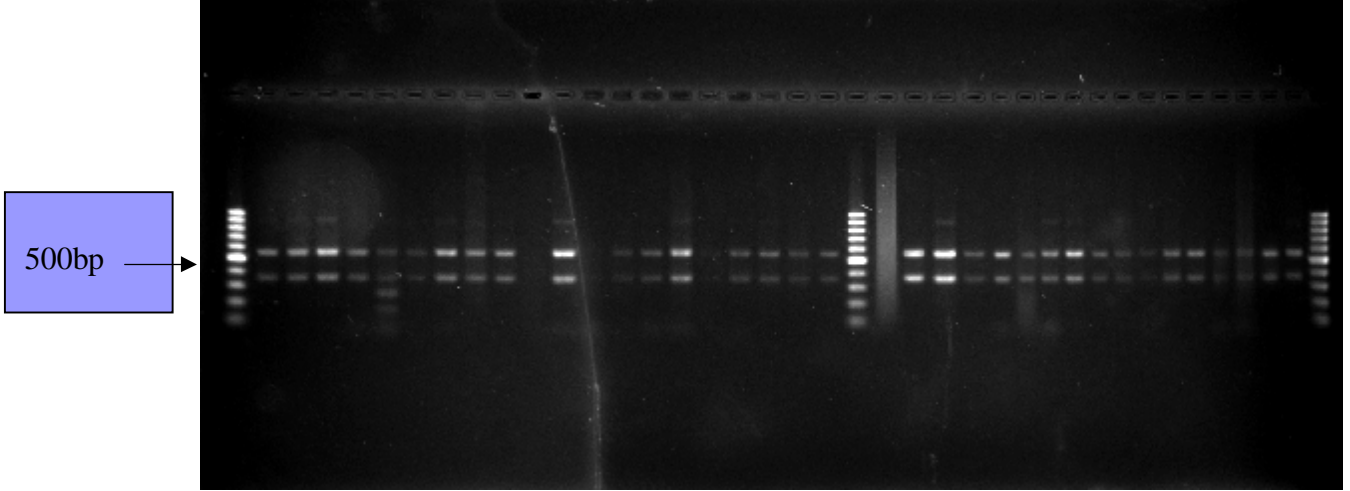
- Ø Demir hematoksilen boyama ile saptanan tüm parazitlerin sıklığı %36 (105/292),
- Ø Demir hematoksilen boyama ile *D. fragilis* dışında saptanan parazitlerin sıklığı %31.5 (92/292)’dur.
- Ø Aynı örneklerdeki, rutin inceleme yöntemleri ile (fiksatifsiz inceleme) saptanan parazit sıklığı ise %21.9 (64/292)’dur.

4.6. *D. fragilis* Saptanan Olguların Moleküler Değerlendirilmesi

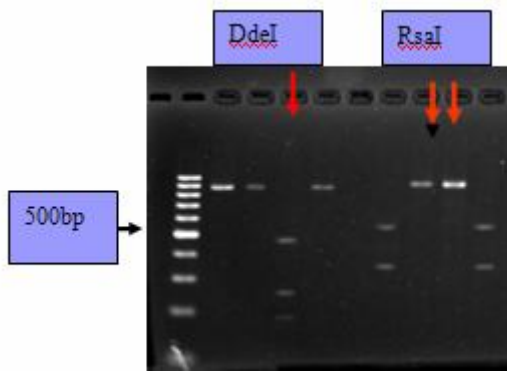
DF400 ve DF1250 primerleri kullanılarak yapılan PCR yöntemi ile elde edilen 863bp'lik band gözlemlendi. Sekans analizi sonrası *D. fragilis*'e ait band olduğu görüldü. Pozitif kontrol olarak sekans analizine gönderilmiş örnek ile çalışıldı.



Resim 16. % 1.5 Agaroz jelde yürütülen PCR ürünlerinin 863 bp.deki görüntüleri



Resim 17. PCR pozitif örneklerde RsaI enzimi ile kesilerek elde edilen RFLP görüntüsü. Bu jelde görüntülediğimiz tüm örnekler RsaI ile aynı bölgelerden kesilmiştir.



Resim 18. DdeI restriksiyon enzimi ile kesilmiş ilk dört örnek ve RsaI restriksiyon enzimi ile kesilmiş ikinci dört örneğin jel görüntüsü (RsaI grubundaki 2. ve 3. örnekler aynı hastaya aittir).

İşaretli olanlar Genotip 2 olarak değerlendirilen örnektir. Sadece Genotip 2 olarak değerlendirilen tek bir örnek DdeI ile kesilmiş (kırmızı ok ile işaretli), RsaI ile de yukarıdaki jel görüntüsünün tersine sadece bu örnek kesilmemiştir (RsaI etiketinin altında yer almış olan kırmızı ok ile işaretli iki kuyuya koyulmuş olan örnek)

Araştırmada kullandığımız tanı yöntemleri olan demir hematoksilen boyama yöntemi ile PCR yöntemlerinin birbirleri ile tutarlılığını Tablo 20. de inceledik.

Tablo 20. Demir hematoksilen boyama yöntemi ile PCR yöntemi arasındaki tutarlılık oranı

		PCR yöntem		Toplam
		Df yok	Df var	
Demir hematoksilen	Df yok	232	12	244
	Df var	7	41	48
	Toplam	239	53	292

Kappa: 0.77, P= 0.000

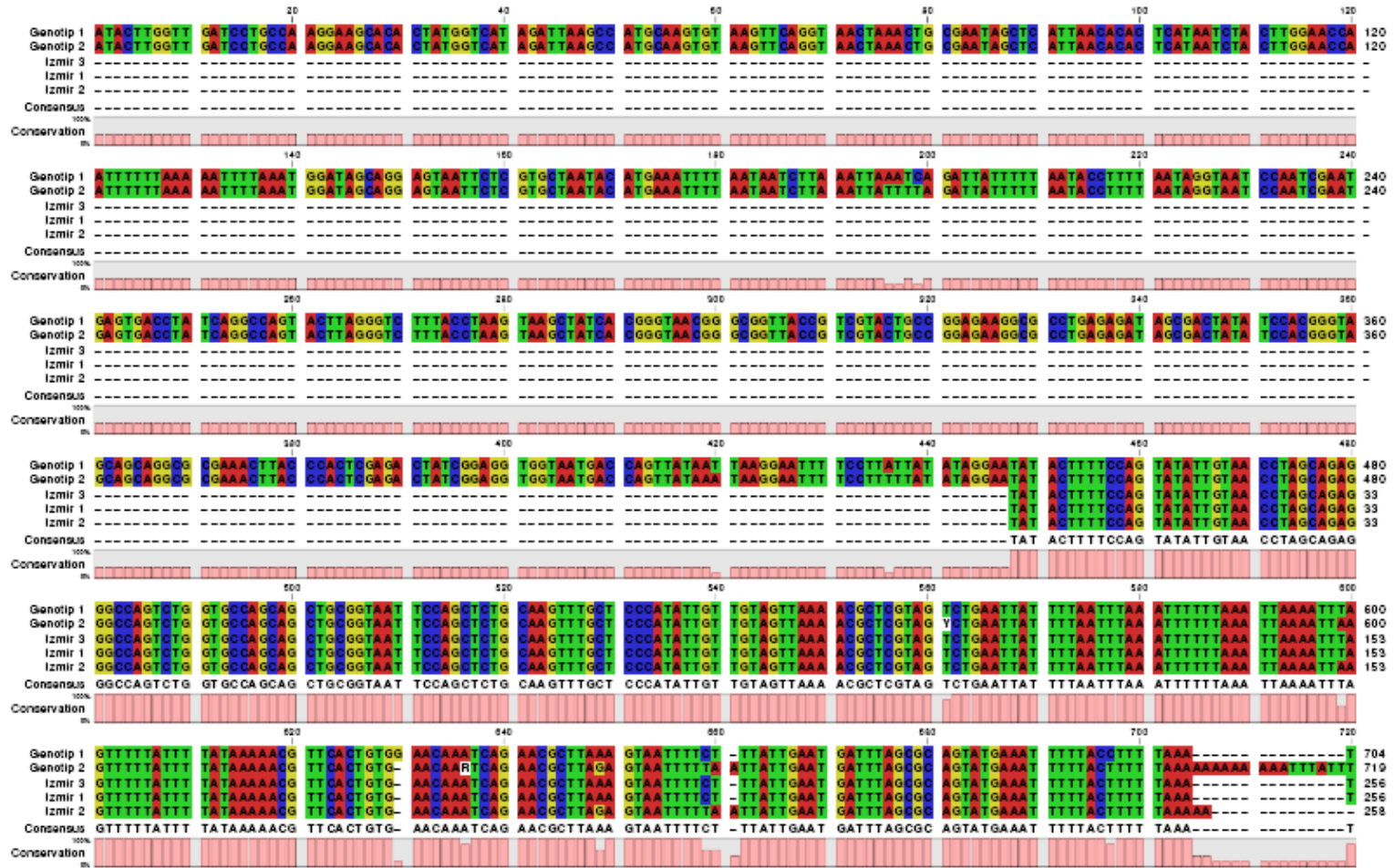
Demir hematoksilen boyama yöntemiyle PCR yöntemi birbiriyle “**iyi düzeyde**” tutarlı bulunmuştur.

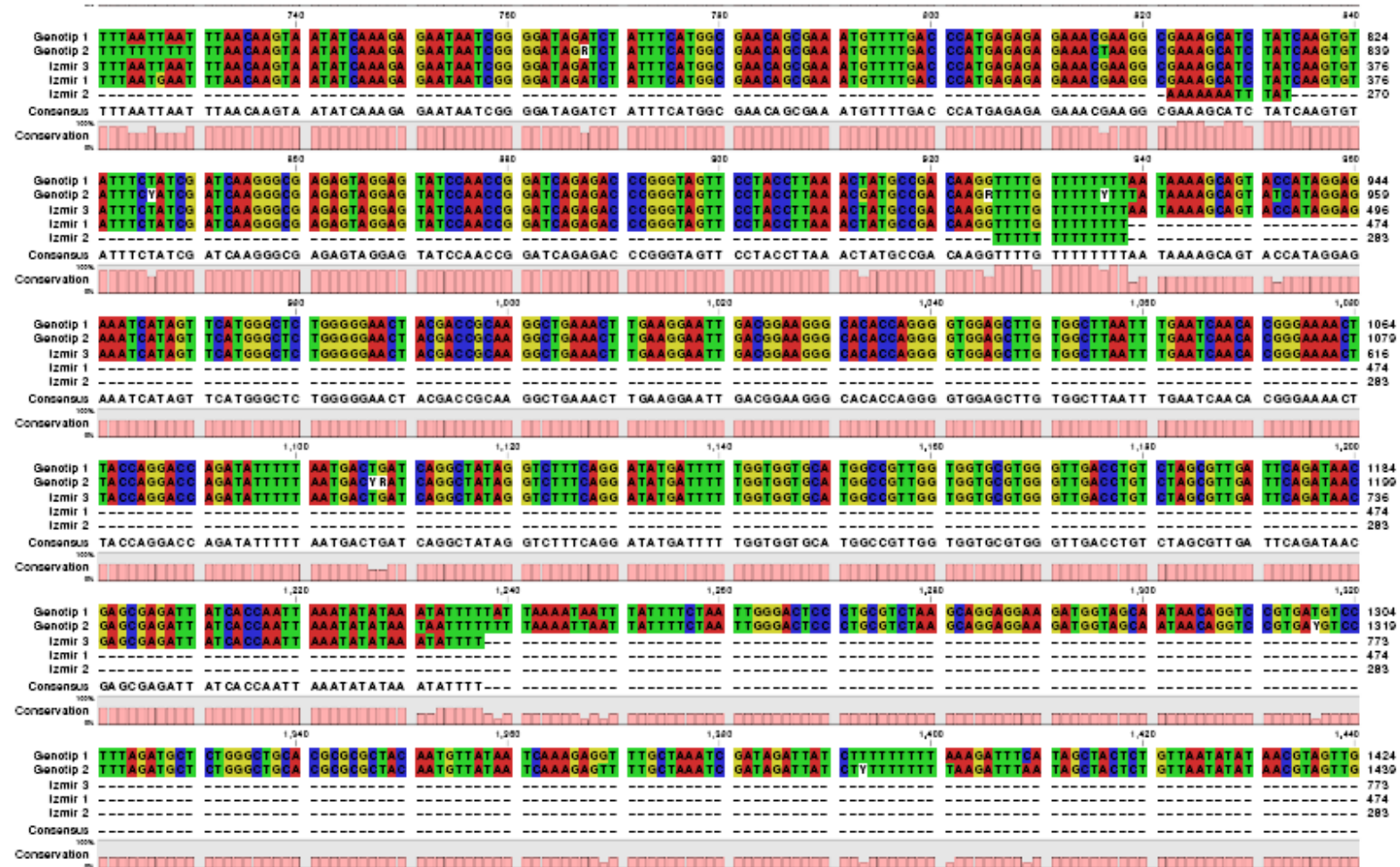
PCR ile pozitif saptadığımız 18 örneğin sekans analizlerini İontek (İstanbul) laboratuvarında yaptırdık. Bu örneklerin sekansları ve değerlendirme sonuçları aşağıda verilmiştir.

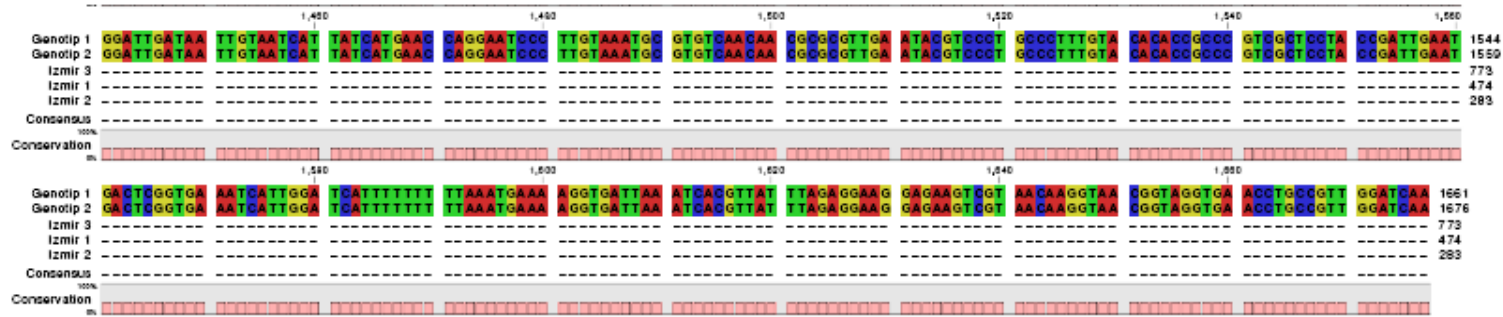
4.7. PCR ile *D. fragilis* Pozitif Saptanan Bazı PCR Ürünlerinin Sekans Analiz Sonuçları

PCR ile *D. fragilis* pozitif saptadığımız 18 ürünün İontek (İstanbul) Laboratuvarında sekans analizi yaptırılmıştır. Bu analiz ve bu sonuçlara göre yapılan genotiplendirme analizi İontek Laboratuvar sonucu olarak aşağıda verilmiştir.

PCR ile *D. fragilis* pozitif saptan bazı olguların PCR Ürünlerinin Sekans Analizi







Toplam 18 adet örneğin iki yönlü dizilemesi yapıldı: 1,2,3,4,5,6,7,8,9,12,13,14,16,18,19,20,21 ve 22. Dizilerin analizi sonrasında 3,4,5,6,7,8,9,12,13,14,16,18,19,20,21 ve 22 numaralı dizilerin birebir aynı olduğu gözlemlendi ve bu diziye İzmir 3 adı verildi. 1 ve 2 numaralı örneklerin dizisi İzmir 3'den farklı olduğu için bunlara sırasıyla İzmir 1 ve İzmir 2 adları verildi. DF400 ve DF1250 primerleri arasında kalan 863 baz uzunluğundaki bölgenin tamamı belirlenmeye çalışılmış ancak dizileme kromatogramlarının kalitesi buna izin vermemiştir. Buna karşın 16 kromatogramın analizi sonucunda elde edilen İzmir 3 dizisinin uzunluğu 773 bazdır. 1 numaralı örnek iki yönlü dizilenmesine karşın sadece bir yönde kısmen okuma alınabilmiş bu sebeple 474 baz uzunluğunda İzmir 1 dizisi elde edilmiştir. 2 numaralı örnek ise sadece bir yönde dizilenmiştir. Okuma kalitesi ancak 283 baz uzunluğunda İzmir 2 adlı dizinin oluşturulmasına olanak vermiştir. Özetlenecek olursa:

Dizinin Adı	Uzunluk	Hangi örnekler kullanıldı
İzmir 1	474 baz	1
İzmir 2	283 baz	2
İzmir 3	773 baz	3,4,5,6,7,8,9,12,13,14,16,18,19,20,21 ve 22

Literatür araştırması sonunda iki adet genotip bulunmuştur. Genotiplerin numaralı, Genbank referans numaraları ve açıklamaları aşağıda sunulmuştur. Genotiplerin dizilerine referans numarasını kullanarak NCBI'dan erişilebilir.

Genotip	GenBank Referans	Açıklama
Genotip 1	AY730405.1	small subunit ribosomal RNA gene, Avustralya, Sidney
Genotip 2	DFU37461.1	16S-like rRNA, Bi/PA (ATCC 30948) suşu

Analiz

İzmir 1,2 ve 3 dizilerinin Genotip 1 ve 2 ile karşılaştırmaları NCBI Blast yazılımı ile yapılmıştır (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dizilerin sıra ile karşılaştırılması sonucunda yüzde olarak verilen maximum benzerlik değerleri aşağıda sunulmuştur.

İzmir 1,2 ve 3 dizilerinin Genotip 1 ve 2 ile NCBI Blast ile karşılaştırılması sonucunda elde edilen benzerlik skorları.

	Genotip 1	Genotip 2
İzmir 1	%99	%93
İzmir 2	%97	%100
İzmir 3	%99	%95

Blast ile yapılan her karşılaştırmada diziler arasındaki bütün farklılıklar belirlenmiş ve Tablo 2 ile ayrıntılı olarak sunulmuştur. Farklılıkların konumları Genotip 1 ve 2 dizilerini referans alınarak belirtilmiştir. Sözelimi İzmir 1 ile Genotip 2 arasında bulunan farklılardan birisi “723 T>A” ifadesi ile belirtilmiş olsun. Bunun manası: Genotip 2’nin 723’ncü konumunda T bazı, bu konumun İzmir 1’de denk gelen yerinde ise A bulunmaktadır.

İzmir 1,2 ve 3 dizilerinin Genotip 1 ve 2'den farkları

	Genotip 1	Genotip 2
İzmir 1	630 Gdel 696 C>T 711 T>G	599 A>T 648 G>A 658 T>C 659 AA>T 704 AAAAAAAAAATTTAATdel 723 T>A 724 T>A 727 T>A 728 T>A 815 T>G 912 G>T
İzmir 2	599 T>A 630 Gdel 649 A>G 659 C>T 660 T>AA 696 C>T	-
İzmir 3	630 Gdel 696 C>T	599 A>T 648 G>A 658 T>C 659 AA>T 704 AAAAAAAAAATTTAATdel 723 T>A 724 T>A 727 T>A 728 T>A 815 T>G 912 G>T 938 T>A 951 T>C 1230 T>A 1231 A>T

Sonuçlar

1. İzmir 2 dizisi Genotip 2 ile birebir uyum sağlamaktadır. Dolayısı ile 2 numaralı örneğin genotipine “Genotip 2” denilebilir.
2. İzmir 1 ve İzmir 3 dizileri Genotip 1’e %99 oranında uyum sağlamaktadır. Bu nedenle bu dizinin elde edildiği 3,4,5,6,7,8,9,12,13,14,16,18,19,20,21 ve 22 örneklerin genotipine “Genotip 1” denilebilir.

3. İzmir 1'i İzmir 3'den ayıran tek bir özellik bulunmaktadır: 711 T>G farklılığı. Dolayısı ile 1 numaralı örneğin genotipi "Genotip 1" olmakla birlikte Genotip 1'den sadece bir baz farkı ile ayrılmaktadır.

4. Genotip 2'nin 644 numaralı pozisyonunda yer alan (CTTAG) restriksiyon bölgesi sadece 2 numaralı örnekte bulunmaktadır. İzmir 1 ve İzmir 2 ile Genotip 2'nin hizalanması sonucunda gözlenebilen 648 G>A değişimi diğer örneklerde aynı restriksiyon bölgesinin oluşmasını engellemektedir.

5. Genotip 2'nin 704 numaralı pozisyonunda yer alan (AAAAAAAAATTTAAT) dizisi sadece 2 numaralı örnekte gözlenmiştir. İzmir 1 ve 3'de 15 bazlık bu bölge silinmiştir.

İzmir 1,2,3 ve Genotip 1,2'nin DNA dizileri

İzmir 1

```
TATACTTTTCCAGTATATTGTAACCTAGCAGAGGGCCAGTCTGGTGCCAGCAGCTGCGGTAATTCAGCTCTG
CAAGTTTGCTCCCATATTGTTGTAGTTAAAACGCTCGTAGTCTGAATTATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTA
GTTTTATTTTATAAAAAACGTTCACTGTGAACAAATCAGAACGCTTAAAGTAATTTCTTTATTGAATGATTTAGCGCA
GTATGAAATTTTACTTTTTAAATTTAATGAATTTAACAAGTAATATCAAAGAGAATAATCGGGGATAGATCTATTTT
ATGGCGAACAGCGAAATGTTTTGACCCATGAGAGAGAAAACGAAGGCGAAAGCATCTATCAAGTGTATTTCTATCGATC
AAGGGCGAGAGTAGGAGTATCCAACCGGATCAGAGACCCGGGTAGTTCCTACCTTAAACTATGCCGACAAGTTTTG
TTTTTTT
```

İzmir 2

```
TATACTTTTCCAGTATATTGTAACCTAGCAGAGGGCCAGTCTGGTGCCAGCAGCTGCGGTAATTCAGCTCTG
CAAGTTTGCTCCCATATTGTTGTAGTTAAAACGCTCGTAGTCTGAATTATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTA
GTTTTATTTTATAAAAAACGTTCACTGTGAACAAATCAGAACGCTTAGAGTAATTTTAAATTTATTGAATGATTTAGCGC
AGTATGAAATTTTACTTTTTAAAAAAAAAAAAATTTATTTTTTTTTTTTTT
```

İzmir 3

```
TATACTTTTCCAGTATATTGTAACCTAGCAGAGGGCCAGTCTGGTGCCAGCAGCTGCGGTAATTCAGCTCTG
CAAGTTTGCTCCCATATTGTTGTAGTTAAAACGCTCGTAGTCTGAATTATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTA
GTTTTATTTTATAAAAAACGTTCACTGTGAACAAATCAGAACGCTTAAAGTAATTTCTTTATTGAATGATTTAGCGCA
GTATGAAATTTTACTTTTTAAATTTAATTTAATTTAACAAGTAATATCAAAGAGAATAATCGGGGATAGATCTATTTT
ATGGCGAACAGCGAAATGTTTTGACCCATGAGAGAGAAAACGAAGGCGAAAGCATCTATCAAGTGTATTTCTATCGATC
AAGGGCGAGAGTAGGAGTATCCAACCGGATCAGAGACCCGGGTAGTTCCTACCTTAAACTATGCCGACAAGTTTTG
TTTTTTTAAATAAAAGCAGTACCATAGGAGAAATCATAGTTCATGGGCTCTGGGGGAACTACGACCGCAAGGCTGAAA
CTTGAAGGAATTGACGGAAGGGCACACCAGGGGTGGAGCTTGTGGCTTAATTTGAATCAACACGGGAAAACTTACCA
GGACCAGATATTTTTAATGACTGATCAGGCTATAGGTCTTTCAGGATATGATTTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGGTGG
TGCGTGGGTTGACCTGTCTAGCGTTGATTCAGATAACGAGCGAGATTATCACC AATTAATATATAAATATTTT
```

Genotip 1

ATACTTGGTTGATCCTGCCAAGGAAGCACACTATGGTCATAGATTAAGCCATGCAAGTGTAAGTTCAGGTAAC
TAAACTGCGAATAGCTCATTAAACACACTCATAATCTACTTGGAAACCAATTTTTTAAAAATTTTAAATGGATAGCAGGAG
TAATTCTCGTGCTAATACATGAAATTTTAATAATCTTAAATTAATCAGATTATTTTTAATACCTTTTAAATAGGTAATCC
AATCGAATGAGTGACCTATCAGGCCAGTACTTAGGGTCTTTACCTAAGTAAGCTATCACGGGTAACGGGCGGTTACC
GTCGTAAGTCCGGGAGAAGGGCCTGAGAGATAGCGACTATATCCACGGGTAGCAGCAGGCGGAAACTTACCCACTC
GAGACTATCGGAGGTGGAATGACCAGTTATAATTAAGGAATTTTCCTTATTATATAGGAATATACTTTTCCAGTATAT
TGTAACCTAGCAGAGGGCCAGTCTGGTGCCAGCAGCTGCGGTAATCCAGCTCTGCAAGTTTGCTCCCATATTGTTGT
AGTTAAAACGCTCGTAGTCTGAATTATTTAATTTAAATTTTTTAAATTAATAATTTAGTTTTTATTTATAAAAAACGTTT
ACTGTGGAAACAAATCAGAACGCTTAAAGTAATTTTCTTTATTGAATGATTTAGCGCAGTATGAAATTTTACCTTTTAA
ATTTTAATTAATTTAACAAGTAATATCAAAGAGAATAATCGGGGATAGATCTATTTTCATGGCGAACAGCGAAATGTTTT
GACCCATGAGAGAGAAACGAAGGCGAAAGCATCTATCAAGTGTATTTCTATCGATCAAGGGCGAGAGTAGGAGTATC
CAACCGGATCAGAGACCCGGGTAGTTCTTACCTTAAACTATGCCGACAAGGTTTTGTTTTTTTTAATAAAAAGCAGTAC
CATAGGAGAAATCATAGTTCATGGGCTCTGGGGAACTACGACCGCAAGGCTGAAACTTGAAGGAATTGACGGAAGG
GCACACCAGGGGTGGAGCTTGTGGCTTAATTTGAATCAACACGGGAAAACTTACCAGGACCAGATATTTTAAATGACT
GATCAGGCTATAGGTCTTTTCCAGGATATGATTTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGGTGGTGCCTGGGTTGACCTGTCTAGC
GTTGATTGAGATAACGAGCGAGATTATCACCATAAATATATAAATATTTTTTATTAATAAATTTTATTTTCTAATTGG
GACTCCCTGCGTCTAAGCAGGAGGAAGATGGTAGCAATAACAGGTCCGTGATGTCCTTTAGATGCTCTGGGCTGCAC
GCGCGCTACAATGTTATAATCAAAGAGGTTTGTAAATCGATAGATTATCTTTTTTTTTAAAGATTTTATAGCTACTCT
GTTAATATATAACGTAGTTGGGATTGATAATTGTAATCATTATCATGAACCAGGAATCCCTTGTAATGCGTGTCAAC
AACGCGGTTGAATACGTCCCTGCCCTTGTACACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAATGACTCGGTGAAATCAT
TGGATCATTTTTTTTTTAAATGAAAAGGTGATTAATCACGTTATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTAACGGT
AGGTGAACCTGCCGTTGGATCAA

Genotip 2

ATACTTGGTTGATCCTGCCAAGGAAGCACACTATGGTCATAGATTAAGCCATGCAAGTGTAAGTTCAGGTAAC
TAAACTGCGAATAGCTCATTAAACACACTCATAATCTACTTGGAAACCAATTTTTTAAAAATTTTAAATGGATAGCAGGAG
TAATTCTCGTGCTAATACATGAAATTTTAATAATCTTAAATTAATTTTAGATTATTTTTAATACCTTTTAAATAGGTAATCC
AATCGAATGAGTGACCTATCAGGCCAGTACTTAGGGTCTTTACCTAAGTAAGCTATCACGGGTAACGGGCGGTTACC
GTCGTAAGTCCGGGAGAAGGGCCTGAGAGATAGCGACTATATCCACGGGTAGCAGCAGGCGGAAACTTACCCACTC
GAGACTATCGGAGGTGGAATGACCAGTTATAAATAAGGAATTTTCCTTTTTATATAGGAATATACTTTTCCAGTATAT
TGTAACCTAGCAGAGGGCCAGTCTGGTGCCAGCAGCTGCGGTAATCCAGCTCTGCAAGTTTGCTCCCATATTGTTGT
AGTTAAAACGCTCGTAGYCTGAATTATTTAATTTAAATTTTTTAAATTAATAAATTAAGTTTTTATTTATAAAAAACGTTT
ACTGTGAACAARTCAGAACGCTTAGAGTAATTTTAAATTAATTTGAATGATTTAGCGCAGTATGAAATTTTACTTTTTAA
AAAAAAAAAATTTATTTTTTTTTTTTTTAAACAAGTAATATCAAAGAGAATAATCGGGGATAGRTCTATTTTCATGGCGA
ACAGCGAAATGTTTTGACCCATGAGAGAGAACTAAGGCGAAAGCATCTATCAAGTGTATTTTCYATCGATCAAGGGC
GAGAGTAGGAGTATCCAACCGGATCAGAGACCCGGGTAGTTCTTACCTTAAACGATGCCGACAAGTTTTGTTTTTYT
TTATAAAAGCAGTATCATAGGAGAAATCATAGTTCATGGGCTCTGGGGAACTACGACCGCAAGGCTGAAACTTGAA
GGAATTGACGGAAGGGCACACCAGGGGTGGAGCTTGTGGCTTAATTTGAATCAACACGGGAAAACTTACCAGGACCA
GATATTTTTAATGACYRATCAGGCTATAGGTCTTTTCCAGGATATGATTTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGGTGGTGCCTG
GGTTGACCTGTCTAGCGTTGATTCAGATAACGAGCGAGATTATCACCATAAATATATAAATTTTTTTTTTAAATTA
ATTATTTTCTAATTGGGACTCCCTGCGTCTAAGCAGGAGGAAGATGGTAGCAATAACAGGTCCGTGAYGTCCTTTAGA
TGCTCTGGGCTGCACGCGCTACAATGTTATAATCAAAGAGTTTTGCTAAATCGATAGATTATCTYTTTTTTTTTAAGA
TTAATAGCTACTCTGTTAATATATAACGTAGTTGGGATTGATAATTGTAATCATTATCATGAACCAGGAATCCCTTGT
AAATGCGTGTCAACAACGCGGTTGAATACGTCCCTGCCCTTGTACACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAATGA
CTCGGTGAAATCATTGGATCATTTTTTTTTTTAAATGAAAAGGTGATTAATCACGTTATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGT
AACAAGGTAACGGTAGGTGAACCTGCCGTTGGATCAA

*İntek laboratuvar sekans analiz raporu

5. TARTIŞMA

İlk olarak 1909'da tespit edilen, 1918'de tanımlanan ve isimlendirilen *D. fragilis* hakkında 1927'den itibaren patojenik olabileceğiyle ilgili çeşitli raporlar yayınlanmış olmasına rağmen genel literatürde kommensal parazit olarak kabul görmüştür. Son yıllarda bu konudaki araştırmalar hız kazanmış olup ihmal edilen bir parazit olduğu ile ilgili ve patojenitesi hakkında artan sayıda raporlar sunulmaktadır (2,3,4,5,22,34,48,49,56, 64,59,83,86,91). Bununla birlikte kist formunun olmaması, trofozoit formunun barsak dışında çok hızlı bir şekilde bozulması nedeniyle, tanısı ancak barsak pasajından çıkmasını takiben en kısa sürede fiksatif içeren kaplara aktarılmasını gerektiren özel laboratuvar koşullarında yapılabilmektedir (2,5,12,22,74). Tüm dünyada yaygın ve en sık görülen parazitlerden olduğu uygun tanı yöntemiyle yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda açıklığa kavuşmuştur (6,7,8,9,23,28,29,35,40,53,57,58,64). Tanısındaki kısıtlılıkların yanısıra gaitadaki parazit çıkışının günlere göre değişkenlik göstermesi de *D. fragilis*'in tanınmasını zorlaştırmaktadır (12,22,31,74). Bunların sonucunda bu parazit ile enfekte olan bir çok olgunun tedavi edilememesi ya da yanlış/eksik tedavisi de söz konusu olmaktadır (28,29,54,64,92). Avustralya, Hollanda ve İngilterede az sayıdaki laboratuvar ve hastanede fiksatif ve onunla uyumlu boyama yöntemi kullanılmaktadır (35,57). Amerika ve Kanada'da ise rutin laboratuvar incelemelerinde fiksatif kullanımı söz konusudur (74). Stensvold ve ark. (2007) Danimarka'da SAF fiksatif içine alarak, boyadıkları 103 hastanın 12'sinin gaita örneğinde *D. fragilis*'e rastladıklarını, fiksatif kullanılmadığında ise parazitin saptanmadığını bildirmişlerdir (57). İngiltere'de, gastrointestinal şikayetler ile birinci basamak hekimlerine başvuran hastalarla 2002-2004 ve 2005-2007 yılları arasında iki ayrı periyotta yapılan çalışmada, SAF fiksatifi içine alınıp, trikrom boyama uygulanmasıyla *D. fragilis*'in yaygınlığı %15.6 olarak bildirilmiştir. *D. fragilis*'in %1.3 oranında tespit edildiği bir başka çalışmada, örneklerin SAF fiksatifi içine alınmamasının, *D. fragilis*'in görülme oranının düşük bulunmasına yol açmış olabileceği vurgulanmıştır (23,65). Bizim SAF içine alarak demir hematoksilin ile boyadığımız 292 gaita örneğinden 48'inde (%16.4) *D. fragilis* saptadık. Türkiye'de, gaita örneklerinin, barsak pasajından çıkışını takiben SAF fiksatif içine alınarak

uygulanen boyama yöntemi ile ilgili çalışmaya rastlayamadık. Bu yönü ile çalışmamız bilime katkı sağlar niteliktedir. Ayrıca çalışma Türkiye'nin alt yapı koşullarının iyi düzeyde, hijyen standartlarının daha yüksek olduğu bir ilinde yapılmıştır. Bölgeler arasındaki hijyen standartları ve diğer parazit sıklık farklılıkları da göz önüne alındığında, oldukça farklı sonuçların söz konusu olabileceği tahmin edilmektedir. Çalışmamızda İzmir içinden olan olgularda *D. fragilis* sıklığı %16.0 iken, İzmir ilçelerinden gelenlerde *D. fragilis* sıklığı %25.9 bulunmuştur ($p>0.05$). İzmir ve ilçeleri hatta tüm Ege bölgesinden gelen hastalarda (%18.2) *D. fragilis* pozitifliği açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ege bölgesi illerinden olan Manisa'da bir üniversite hastanesinde yapılan çalışmada *D. fragilis* sıklığı %8.8 olarak saptanmıştır (68). Söz konusu çalışmadaki sonuç, gaita örneği fiksatif solusyon içine alınmadan, şüphenilen mikroskopik bakı sonucu yapılan boyama yöntemine dayanarak elde edilmiştir ve bu da gaita örneğinin fiksatif içine aktararak incelenmesinde elde edilebilecek sıklığın daha yüksek olacağına işaret etmektedir.

Gaita örneğinin fiksatif içine alınarak kullanıldığı birçok çalışmada, görülme sıklığının *B. hominis*'den sonra ikinci sıklıkta olduğu da rapor edilmiştir (7,8,9,22,57,65). Kanada'da gaita örneğinin kalıcı boyama yöntemi kullanılarak incelendiği rutin kapsamda, *D. fragilis*'in en sık görülen parazitlerin arasında yer aldığı bildirilmiştir (54,55). Manitoba'daki bir laboratuvarın çalışmalarının değerlendirilmesinde *D. fragilis*'in *B. hominis*'ten sonra ikinci sıklıkta görüldüğü ve *B. hominis* ile olan birlikteliğinin de yüksek oranda olduğu vurgulanmıştır (7). Çalışmamızda *B. hominis* sıklığı boyama yöntemi ile % 25.7 (75/292) bulunmuştur ve *D. fragilis*, *B. hominis*'den sonra ikinci sıklıktadır (% 16.43), ayrıca çalışmamızda benzer sonuçta, *D. fragilis* pozitif olguların *B. hominis* ile birlikteliği de anlamlı bulunmuştur. *D. fragilis* pozitif olan 53 olgudan 27'sinde *B. hominis* enfeksiyonu da görülmüştür ($p<0.05$). Ancak bu birliktelik daha önceki çalışmalarda da değerlendirildiği gibi (23), sık görülen parazitlerin rastlantısal birlikteliği olarak düşünülmüştür. Aynı zamanda çeşitli çalışmalarda *G. intestinalis*'ten de daha sık görüldüğü de rapor edilmiştir (21,38,40,41,92) Bizim çalışmamızda da *G. intestinalis* %2.0 olarak sıklığı düşük olan parazitler arasında görülmüştür Bu açıdan da çalışmamız ilgili literatür sonuçlarıyla uyumludur.

Manitoba'daki derlenen laboratuvar sonuçlarında dientamoebiosis insidans hızının 5 yıllık periyotta mevsimsel fark göstermediği ve yaz-sonbahar aylarında suların kontaminasyonu ile artış gösteren patojenlerden farklı bir seyir izlediği ifade edilmiştir (56). Biz ise *D. fragilis* pozitif olguların kış mevsiminde daha yüksek (%25.2) oranda olduğunu fakat mevsimsel

görülme sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın bulunmadığını, ilgili literatürle uyumlu olarak gözlemledik.

Çalışmamızda SAF'a aldığımız örneklerde hematoksilen boya ile %31.5 (92/292) oranında barsak paraziti saptadık (*D. fragilis* dışında). Aynı örnekler, SAF'a alınmadan ve inceleme süresi birkaç saat içinde olabilen rutin laboratuvar koşullarında %21.9 (64/292) oranında saptanabilmiştir. Bu sonuç da literatürlerle uyumlu olarak, örneklerin mümkün olduğunca hızlı bir şekilde fiksatife alınarak incelenmelerinin önemi vurgulamaktadır. Son zamanlarda, *D. fragilis*' in patojen protozoanlar arasında yer aldığının anlaşılması ve kronik diyaredeki rolünün yanısıra kronik barsak hastalıklarının patogeneğinde etken olduğunun düşünülmesi nedeniyle tanısı gittikçe önem kazanmaktadır. Ancak kalıcı boyama yönteminde nükleusunun parçalı yapısının izlenemediği durumlarda, çift nükleuslu *B. hominis*, *E. nana* trofozoit (bazen iki nükleuslu da görülebilmektedir) *İ. bütschlii* trofozoiti gibi protozoanlar ve dejenere polimorfonükleer lökositler gibi yapılar ile karışabilmesi (12,21) söz konusudur. Biz de çalışmamızda hematoksilen ile boyadığımız ve PCR ile negatif bulduğumuz örneklerin boyalı preparatlarını tekrar incelediğimizde, dört örnekte *D. fragilis* olarak değerlendirdiğimiz protozoanların aslında *E. nana* ve *İ bütschlii* trofozoitleri olduğunu fark ettik.

Kalıcı boyama yöntemleri ile birlikte uygulanan çalışmalarda, kültür yöntemi kalıcı boyama yöntemine göre daha sensitif bulunmuştur (73,79). Kültür ortamındaki pirinç tanelerinin parazitin içinde görülmesi ile *B. hominis*'den kolayca ayırt edici tanısı yapılabilmektedir. Ancak kültür yönteminin uygulamadaki teknik olarak zorluğu, zaman alıcılığı, çalışmaya alınan tüm örneklere uygulanmasına engel teşkil etmektedir (2,84,86)

Mikroskobik tanısındaki kısıtlılıklar nedeniyle uygulanan moleküler biyolojik tekniklerin yüksek sensitivite ve spesifite potansiyeline sahip uygun alternatif yöntemler olduğu ifade edilmiştir (81). Johnson ve Clark tarafından yapılan çalışmada, boyama yöntemiyle *D. fragilis* saptadıkları örneklere konvansiyonel PCR yöntemi uyguladıklarını ve boyama ile elde ettikleri pozitif örnekleri PCR ile de saptadıklarını bildirmişlerdir. Trichomonadida takımından olan *D. fragilis*, için "Trichomonad SSU rRNA" genini amplifiye ettikleri, kalıcı boyama yöntemi ile saptadıkları 17 örnekten 9'unda amplifikasyonu gerçekleştirdikleri rapor edilmiştir (82).

Windsor ve ark. kültür yöntemi ve kalıcı boyama yöntemi ile saptadıkları 43 *D. fragilis*'li hastadan DNA ekstraksiyonunu gerçekleştirdiklerini ve sadece 33 tanesinde trikomonad SSU rDNA genini amplifiye edebildiklerini rapor etmişlerdir. 43 örneğin 5'inde DNA'nın

amplifiye olmadığı, 5'inde de çok küçük ürün elde edilmesi sonucunda tiplendirme yapılamadığı belirtilmiştir (83). Peek ve ark çok sayıda gaita örneği ile çalışırken kültür yönteminin moleküler yöntemler için uygun olamayacağını ifade etmişler, mikroskopik olarak pozitif bulunan 11 gaita örneğini -20 °C saklayarak, sonrasında DNA ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Toplam 11 örneğin sadece üçünde, beklenen boyutta amplifikasyon elde ettiklerini, tüm hasta örneklerinde ise çok miktarda nonspesifik bantların görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu sonuç ile, *D. fragilis* tanısı için, o zamana kadar rapor edilmiş tek PCR metodunun, türe spesifik olmadığını ve gaita örneklerinin direkt amplifikasyonunda etkisiz kaldığını ifade etmişlerdir. Bunun üzerine *D. fragilis* SSU rRNA genini hedef alan primerler geliştirdiklerini belirtmişlerdir.

Stark ve ark, *D. fragilis*'in SSU rRNA genini baz alarak oluşturdukları konvansiyonel PCR yöntemiyle, mikroskopik bakıda pozitif saptadıkları 31 örnekten 29'unu PCR'da da pozitif saptadıklarını ve diğer protozoanlarla çarpaz reaksiyon oluşmadığını bildirmişler, PCR protokolünün spesifitesini %100, sensitivitesini %93.5 olarak açıklamışlardır (81). Mikroskopik olarak 60 pozitif *D. fragilis* örnekle yapılan konvansiyonel bir PCR çalışmasında, 54 gaita örneğin ekstraksiyon ve amplifikasyonun gerçekleştiği, 54 örnekten 50'sinde beklenen büyüklükte bant elde edildiği bildirilmiştir (39). Vandenberg ve ark. yaptıkları çalışmada mikroskopik bakıda *D. fragilis* pozitif bulunan ve saklama koşulları PCR çalışması için uygun olan 15 örnekten dokuzunun PCR ile de pozitif bulunduğunu belirtmişlerdir (8). İzleyen çalışmalarda ise *D. fragilis*'in DNA'sının real-time PCR yöntemi ile %100'lük sensitivite ve spesifite ile elde edildiği ifade edilmiştir. Bunun sonucu olarak, tanı için kullanılan zamanı ve kontaminasyon riskini azaltması yönüyle real-time PCR'ın konvansiyonel PCR'a göre daha çok avantaja sahip olduğu vurgulanmıştır (84,85,86). *D. fragilis*'in altın standart tanı yöntemini belirlemek için, çalışmaya alınan tüm gaita örneklerine, kalıcı boyama yöntemi, kültür yöntemi, konvansiyonel PCR ve real-time PCR yöntemleri uyguladıklarını bildirmişler, sensitivite ve spesifiteyi sırasıyla, konvansiyonel PCR'da %42.9- %100, kültür yönteminde %40 -%100, kalıcı boyama ile %34.3 - %99, real-time PCR ile %100 - %100 olarak göstermişlerdir Bu çalışmada real-time PCR ile 650 örnekten 35'inde, konvansiyonel PCR ile 15'inde, kültür yöntemi ile 14'ünde, kalıcı boyama yöntemi ile 12'inde *D. fragilis*'i tespit etmişlerdir (84).

Biz çalışmamızda konvansiyonel PCR yöntemini kullandık. PCR çalışmak üzere -20°C'de saklanan örnekleri ekstrakte ettik ve *D. fragilis* SSU rDNA gen bölgesine spesifik primerler

kullanılarak uyguladığımız amplifikasyon ile 292 örnekten 53'ünde (%18.2) 863 bp'lik bölgeyi elde ettik. Kalıcı boyama yöntemiyle 48 hasta örneğini *D. fragilis* pozitif olarak saptadık (%16.4). PCR ile saptadıklarımızın 12'ini (%4.9) boyama yöntemiyle saptayamadık. Boyama yöntemiyle pozitif bulduğumuz 7 olguyu (%14.6) da PCR yöntemiyle saptayamadık. Her ikisiyle saptadığımız 41 olgu (%85.6) mevcuttu. Herhangi birini altın standart olarak alamadığımız bu iki yöntemin birbiriyle "iyi düzeyde" tutarlı olduğunu gördük. Çalışmada demir hematoksilen ve PCR yöntemleri ile birbirinden farklı olgular pozitif bulunmuştur. PCR yönteminde, inhibitör faktörlerin ya da parazitin gaita örneğinde yoğun olmadığı durumlar gibi sulu diyareli olma durumunun da paraziti saptayamamada etkili olduğu düşünülmüştür. Hematoksilen boya yöntemindeki kısıtlılığa ise, gaita örneğinin, pasajdan çıkmasını takiben SAF fiksatif içine hemen aktarılamadığı durumlar ile birlikte sadece tek bir örneğin incelenmesinin neden olduğu düşünülmüştür. Çalışmamızda demir hematoksilen boyama ile saptanan preparatlardaki *D. fragilis*'in yoğunluğu ile PCR ile saptadığımız *D. fragilis* arasındaki ilişkiyi de inceledik Mikroskopik bakıda iki pozitif ve yukarısı olarak tespit edilen *D. fragilis* trofozoitlerinin yoğunluk oranının PCR ile de *D. fragilis*'in saptanma oranını arttırdığını gördük. PCR ile tanıda sulu diyareli olgularda bantların çok silik olarak görülmesi ve hematoksilen boyamada bu örneklerin negatif olarak değerlendirilmeleri, bu tip örneklerin çoklaştırma işlemi yapıldıktan sonra PCR için -20°C'de saklanması veya SAF'a alındıktan sonra çoklaştırılarak boyanmasının sulu diyareli enfeksiyon pozitifliğinin saptanmasında önemli olabileceğini düşündürmüştür. PCR ve boya ile elde ettiğimiz sonuçlar ilgili literatürlerle uyumlu olup, *D. fragilis* tanısındaki zorlukların bu yöntemlerle büyük oranda aşılmış olduğu ancak bazı sınırlılıklarının da olduğu aynı literatür bilgileriyle örtüşmektedir.

Bu çalışma, ülkemizde şimdiye kadar yapılan çok az çalışma dışında genel olarak ihmal edilen bir parazit olan *D. fragilis*'in tanısının PCR yöntemi ve fiksatif içine alınarak uygulanan boyama yönteminin birlikte kullanılarak yapıldığı bilginiz dahilinde olan tek çalışmadır

Kalın barsakta yerleşen *D. fragilis*'in aralıklı olarak barsaktan atılımının PCR ile de tespit edildiği bildirilmiştir. Üçlü feçes test ile alınan gaita örneklerinden fiksatifli olan ikisine mikroskopik tanı, fiksatifsiz örneğe de PCR uygulandığı çalışmada, mikroskopik bakı uygulanan her iki örnekte *D. fragilis* pozitif ise, PCR uygulanan örneğin pozitiflik oranı %74

bulunurken, mikroskopik olarak sadece birinde pozitiflik varsa PCR ile pozitiflik oranının %18 saptandığı bildirilmiştir (38). Biz de çalışmamızda, bazı hastalardan birden fazla aldığımız gaita örneklerinin her birinde pozitiflik saptayamadığımızı rastlantısal olarak gözlemledik.

Çalışmamızda PCR ile *D. fragilis* pozitif saptadığımız 53 olgu, *D. fragilis*'in genotiplendirilmesi amacıyla da incelenmiş, RsaI enzimi ile kestığımız PCR ürünlerinde bir örnek dışında, aynı bant kesim yerleri gözlenmiştir. Sadece bir örneğin RsaI ile herhangi bir bölgesinden kesilmediği gözlenmiştir. DdeI enzimi ile de bunun tersi olarak RsaI ile kesilmeyen örnek kesilmiş, diğer örneklerin hiç birinde kesim bölgesi izlenmemiştir. Uyguladığımız bu RFLP yöntemi ile bir örneğin hem RsaI enzimi ile hem de DdeI enzimi ile diğerlerinden farklı karakteristik kesim özelliklerine sahip olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda 53 pozitif olgudan 18 tanesine sekans analizi yaptırılmış, sekans sonuçları, İzmir 1, İzmir 2 ve İzmir 3 olarak 3 grupta incelenmiştir. İzmir 1 , %99 benzerlik skoru ile gen bankasında AY730405.1 olarak işaretlenen Genotip 1'e dahil edilmiş, İzmir 2 ise %100 benzerlik skoru ile gen bankasında DFU37461.1 olarak işaretlenmiş olan Genotip 2'e dahil olmuş, İzmir 3 grubuna giren 16 örnek ise birbiriyle bire bir aynı sekansta izlenmiş, %99 oranında benzerlik skoru ile Genotip 1'e dahil edilmiştir. İzmir 2 olarak Genotip 2'de yer alan olgu asemptomatik olup bu konuda yapılmış olan çalışmalarda (biri gen bankasındaki örneğin laboratuvarında tutulan kültürüdür) 3 örnekten biri olmuştur. Sekans analizi ile Genotip 2 olarak belirlenen örnek aynı zamanda RsaI ve DdeI enzimleri ile diğerlerinden farklı kesim özelliğine sahip olan örnektir. Çalışmamız büyük çoğunlukla semptomatik olgulardan oluşmuştur. Genotip 2 grubuna giren örneğimiz ise asemptomatik bir hastamıza aittir. Sekansını yaptırdığımız bu olgu haricindeki diğer 16 olguda çeşitli semptomlar mevcuttur. Literatürde yer alan Genotip 2 dahilindeki örneklerin kliniği ile ilgili bilgiye rastlanılmamıştır, o yüzden bu örnekteki asemptomatikliğin söz konusu genotiplendirme ile ilişkilendirilebilmesi için daha detaylı ve semptomlar açısından gruplandırılarak elde edilecek daha fazla sekans sonuçlarının değerlendirilmesine ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

Genel olarak *D. fragilis* tanısını alan hastalarda diyare, karın ağrısı, gaz, yorgunluk ve yumuşak dışkılama olduğu, bu tabloya mide bulantısı, kilo kaybı, kusma ve anal kaşıntının eşlik edebildiği, nadiren de ateş ve gaitada kan tespit edilebildiği rapor edilmiştir (2,5,8,12). Klinik semptomların özetlendiği 19 yayında, sadece *D. fragilis* enfeksiyonu saptanan hastaların %46'sında diyare, %42.5'unda karın ağrısı, %20.4'ünde bulantı kusma

şikayetlerinin olduğu, %22.4'ünün de gaitasının kanlı ve mukuslu olduğu belirtilmiştir (31). Amerika'da yapılan bir çalışmada *D. fragilis* saptanan hastaların çoğunda diyare ya da yumuşak dışkılama yakınmalarının ön planda olduğu belirtilmiştir (51). 2002-2004 yıllarını kapsayan bir çalışmada, *D. fragilis*'in tek başına görüldüğü 36 hastadan birinde kusma, birinde irritable barsak sendromu, 19'unda 2 haftadan uzun süren diyare saptandığı ve bunların kronik, inatçı olgular olduğu bildirilmiştir (39). Mısır'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise diyare ve karın ağrısı gibi semptomların, nonpatojenik protozoanlarla karşılaştırıldığında, dientamoebiosisde daha sık görüldüğü bildirilmiştir (52). Windsor ve ark.nın (1998) Umman'da gerçekleştirdikleri rutin mikrobiyolojik inceleme sonuçlarında, *D. fragilis*, örneklerin % 5.12'inde görülmüş, sadece *D. fragilis* enfeksiyonu olan hastaların %83'ünde karın ağrısı şikayetinin olduğu ifade edilmiştir. İtalya'daki bir çalışmada nonspesifik gastrointestinal yakınmaları olan hastaların %4.5'unda, diyaresi olanların %2'sinde *D. fragilis* saptanmıştır. *D. fragilis*'in İBS benzeri kronik barsak bozukluklarına yol açması nedeniyle, *D. fragilis*'li hastaların İBS olarak yanlış tanı alabileceği savunulmuş, diyare, konstipasyon, abdominal kramp, şişkinlik, mide bulantısı yorgunluk ile seyreden İBS benzeri semptomları olan ve İBS tanısı konmuş *D. fragilis* saptanan 21 hastaya, iodoquinol ve doksisisiklin tedavisi verilmiş ve hastaların hepsinde *D. fragilis*'in eradike olduğu, 14'ünün İBS semptomlarının düzeldiği bildirilmiştir (54). Türkiye'de *D. fragilis* kliniği ile ilgili yapılmış olan tek çalışmada *D. fragilis* saptanan 35 hastadan başka etkenin eşlik etmediği 32'sinde, en sık olarak karın ağrısı (%81.3), diyare (%71.9), istahsızlık (%15.6), yorgunluk (%9.4) saptanmıştır (40).

Diyareli olan AIDS'li hastalarda, amibiasis ve giardiasis olguları gibi, dientamoebiosisin de rapor edilmekte olduğu ifade edilmiştir. Ancak bu çalışmalarda, normal bireylerde olduğundan daha çok patojenik olduğu ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. İmmun yetmezlikli olan diabetik ve lösemili hastalar ile *B. hominis* ilişkisi birçok çalışmada gösterilmiştir (93,94). Ayrıca AIDS'li hastalarda *B. hominis*'in kronik diyareye neden olduğu da ifade edilmiş (95). Arjantin'de yapılan bir çalışmada, 82 HIV pozitif olguda %25.3 oranında *D. fragilis*'e rastlanılmıştır (11). Bunun yanı sıra Şikago'da diyaresi olan homoseksüellerde ve Avusturalya'da HIV enfeksiyonlular ile yapılan çalışmalarda *D. fragilis* enfeksiyonu açısından daha yüksek hızlara rastlanılmamıştır (62,96) *D. fragilis*, dışkıda fazla sayıda bulunduğu immun sistemi sağlam hastalarda bile şiddetli diyare etkeni olarak görülebilmektedir. Bu nedenle, klinisyenlere HIV seropozitifliği olan hastaları

değerlendirirken diyare nedenleri arasında *D. fragilis*'i de düşünmeleri gerektiği önerilmektedir (61,62). Biz de literatürlerdeki bu bilgilerin ışığında, immun yetmezliği olan hasta grubunda *D. fragilis* sıklığını inceledik. Çeşitli kanser hastalıkları nedeniyle kemoterapi alan 49 kişi, nefrotik sendrom ve otoimmun hastalığı olan dokuz kişi, HIV enfeksiyonlu dört kişi, organ transplantasyonlu dokuz kişi, primer immun yetmezlikli sekiz kişi ile birlikte başka çeşitli nedenlerle immunsupresif tedavi alan 11 kişi olmak üzere toplam 90 kişi immun yetmezlikli grup olarak incelenmiştir. Bunun yanında çeşitli kronik hastalığı olan fakat immunsupresif tedavi almayan 102 kişi ile kronik hastalığı olmayan 100 kişi olmak üzere toplam 202 kişi immun yetmezliği olmayan grup olarak incelenmiştir. İmmun yetmezliği olan grupta herhangi bir gastrointestinal semptomu olan 69 (%76.7) kişi ile semptomu olmayan 21 kişi (%23.3), immun yetmezliği olmayan grupta ise herhangi bir gastrointestinal semptomu olan 173 (%85.6) kişi ile semptomu olmayan 29 kişi (%14.4) bulunmaktadır. İmmun yetmezliği olmayanlarda görülen diyare, şişkinlik hissi, gaz, dış gıcırdatma, ürtikeryal kaşıntı ve perianal kaşıntı gibi şikayetler ile *D. fragilis* sıklığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. Aynı zamanda allerjik olgularda ve eozinofilisi olanlarda da *D. fragilis* saptanması anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Dientamoebiosisli hastalardaki klinik bulgular, immun yetmezlikli olan ve olmayan tüm hasta grupları beraber değerlendirildiğinde de geçerliliğini korumuştur.

Çalışmamızda *D. fragilis* pozitifliği, gaita örnekleri gevşek olan grupta, yumuşak olan gaitalara ve sulu diyare örneklerine göre anlamlı olarak daha yüksek oranda saptanmıştır ve bu sonuçlar literatürlerdeki *D. fragilis*'in gevşek dışkılarda daha çok görüldüğü bilgisiyle de uyumludur.

Çalışmamızda, immun sistem yetersizliği olan grupta, immun sistemi sağlam olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük oranda (%5.6) *D. fragilis* pozitif olguya rastladık. Bunun birkaç nedenden kaynaklanıyor olabileceğini düşündük. Birincisi bu hasta grubunun sulu diyareli örneklerinin daha çok olması ve çoklaştırma yöntemi kullanmadan incelediğimiz bu örneklerde enfeksiyon pozitifliğinin saptanamamış olma olasılığıdır ki, PCR yöntemi ile çok silik bantlar gözlemleyip tekrarladığımız, fakat pozitifliğinden emin olmayarak negatif sonuç verdiğimiz örnekler söz konusu oldu. Bu tip silik bantların olduğu hastalar, daha çok immun yetmezlikli ve diyaresi olan hasta grubunda idi. Çalışmamızda karşılaştığımız bu durumun, araştırmamızın ön görüşü olan immun yetmezlikli hastalarda *D. fragilis*'in görülme sıklığını etkilediğini düşünmekteyiz. Bir diğer önemli etken

ise bu gruptaki hastaların kronik hastalıkları nedeniyle takip edilen hastalar olup, aynı zamanda enfeksiyonlara karşı profilaktik tedavi de kullanan hastalar olmalarıdır. Çalışmamızda hastaların kullandıkları tedavi sorgulanamamıştır. Ancak ülkemizde *D. fragilis* tedavisinde de ilk seçenek olarak kullanılan metronidazol, bir çok enfeksiyonda yaygın olarak kullanılmaktadır (*H. pylori* eradikasyonunda, bir çok kadın genital enfeksiyonlarında ve tüm düşünülen parazitozlarda). Bu nedenlerle aynı konunun, hastayı gönderen klinisyenlerle direkt ilişki içinde ve ishal olur olmaz, tedavi verilmeden gaita örneğini alabilecek koşullarda incelenmesinin gerekliliği görülmüştür.

Çalışmamızda *D. fragilis* sıklığı kronik diyarelilerde % 15.1, karın ağrısı olanlarda ise % 23.5, akut diyareli olgularda %15.1 olarak bulunmuştur. Diyare ile aralıklı seyreden kabızlık şikayeti olanlarda %44.4 , perianal kaşıntısı olanlarda %57.1, gaz şikayeti olanlarda %43.6, şişkinlik, dolgunluk şikayeti olanlarda % 15.8, kaşıntı şikayeti olanlarda %31.0, allerjiyle ilgili klinikten gelenlerde ise % 32.5 olarak, bu şikayetleri olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır. Sadece *D. fragilis* enfeksiyonu olan 22 hasta incelendiğinde ise tablo hemen hemen aynı kalmıştır. Kronik diyaresi olanlarda %3.8, karın ağrısı olanlarda %15.9, akut diyare şikayeti olanlarda % 6.6 olarak *D. fragilis* saptanmıştır. Diyare ile birlikte kabızlık şikayeti olanlarda %27.8, perianal kaşıntısı olanlarda % 17.1, gaz şikayetli olgularda %17.9, hazımsızlık-şişkinlik şikayeti olanlarda % 15.8, kaşıntı şikayeti ile gelen olgularda ise % 16.7 oranında bu şikayetleri olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek *D. fragilis* pozitifliği tek başına parazit olarak saptanmıştır. Herhangi bir gastrointestinal semptomu olmayanların ise %4.0'ünde tek başına *D. fragilis* enfeksiyonu saptanmıştır. Klinik bulgular, daha sık görülen *B. hominis*, patojen protozoan olarak *G. intestinalis* ve *Crptosporidium spp.* ve ayrıca üçüncü sıklıkta görülmüş olan apatojen protozoan *E. nana* açısından da değerlendirilmiştir. *B. hominis*'li olgularda akut ishal şikayeti, karın ağrısı, karında şişlik hissi, gaz, vücut kaşıntısı ve anal kaşıntısı olanlar ve allerji ilişkin klinikten gelenler istatistiksel olarak anlamlı yükseklikte görülmesiyle birlikte herhangi bir gastrointestinal semptomu olmayanlarda tek başına *B. hominis* enfeksiyonunun sıklığı ise %24.0 olarak bulunmuştur. Bu da *B. hominis* ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunan değişkenlerin *B. hominis*'e değil, daha çok birlikte bulunduğu enfeksiyonlara bağlı olabileceğini göstermektedir. *G. intestinalis* ve *E. nana* ile gastrointestinal şikayetlerin hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişkili bulunmamıştır. *G. intestinalis* açısından, bu sonucun, *G. intestinalis* pozitif olgu sayısındaki düşüklükle bağlantılı olduğu düşünülmüştür.

Manitoba’da dientamoebiosis görülen hastaların %50’sinin 24 yaşından daha genç olduğu bildirilmiştir. Hollanda’da yapılan bir çalışmada yaş gruplarına ve gastrointestinal şikayeti olup olmamasına göre olgular *D. fragilis* açısından incelendiğinde pozitif olguların en sık 5-14 yaş grubunda görüldüğü ve oranının %19.8 olduğu bildirilmiştir. Çocuklarda 14 yaşa kadar *D. fragilis* enfeksiyonu çoğunlukla semptomatik iken, erişkinlerde çoğunlukla asemptomatik bulunduğu da ifade edilmiştir (9). İtalya’da yapılan bir çalışmada ise, *D. fragilis*’in erişkinlerdeki sıklığının %92 olmasına karşın çocuklarda % 7.7 oranında seyrettiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada kadınlarda oranın (%61.5) erkeklere göre (%38.5) daha yüksek olduğu bildirilmiştir (59). Stumpel ve ark.nın inceledikleri çalışmalardan yaptıkları derleme sonucunda da *D. fragilis*’in kolondaki kriptalarda bulunduğu, enfekte çocuklarda genellikle karın ağrısı şikayetinin olduğu, erişkinlerde ise genellikle asemptomatik seyrettiği vurgulanmıştır (64). İtalya’nın merkezinde bir gündüz bakımevlerinde yapılan bir çalışmada 966’sı çocuk, 1023’ü erişkin 1989 hasta incelenmiş, *D. fragilis*, erişkinlerin %7.3’ünde, çocukların %0.6’sında saptanmıştır. Ciddi diyare yakınması olan popülasyon içindeki çocuklarda %2, erişkinlerde %4.5, aralıklı diyaresi olanlarda ise çocuklarda %2, erişkinlerde %6.6 sıklıkta *D. fragilis* görülmüştür. Aynı çalışmadaki *G. intestinalis*; çocukların %0.5’inde, erişkinlerin %3.7’sinde saptanmış, ciddi diyaresi ve aralıklı diyaresi olan çocuklarda hiç saptanmamış olup, erişkinlerde ise sırasıyla % 1.7 ve %5.3 oranlarında saptanmıştır, *D. fragilis*’in *G.intestinalis*’den daha sık görülmesini ise, tüm örneklere kalıcı boyama yönteminin uygulanmış olmasına bağlamışlardır (92). Bizim çalışmamızda *D. fragilis* pozitifliği, (0-5) yaş grubunda %6.1, (6-14) yaş grubunda %28.6, (15-64) yaş grubunda %16.9 iken yaşlılarda (65 ve üzeri) %24.4 oranında saptanmıştır. Yaşlılarda görülen bu sıklığın da zayıflamış bağışıklık sistemi nedeniyle oluşabileceği düşünülmüştür. 6-14 yaş grubundakilerde görülen *D. fragilis* pozitifliği diğer yaş gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç Manisa’daki yaş gruplarına göre dientamoebiosis saptanması oranları ile ve yurt dışında yapılan bir çalışmadaki dientamoebiosis yaş grubu sonuçlarıyla da uyumludur (7,9,68). Aynı zamanda bu yaş grubundaki *D. fragilis* enfeksiyonu olanlarda herhangi bir gastrointestinal sistem semptomunun varlığı %37 sıklıkta olup, diğer yaş gruplarından daha yüksek bulunmuştur. Kronik diyareli çocuklarda *D. fragilis* %33.3 iken, kronik diyareli erişkinlerde %27.6, kronik diyareli yaşlılarda %27.3 bulunmuştur. Karın ağrısı şikayeti de 6-14 yaş grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş, akut diyare sıklığı da %28.6 ile en yüksek bu grupta saptanmıştır. Şişkinlik hissi ve gaz şikayetleri ise erişkin

yaş grubunda anlamlı olarak daha yüksektir. Bu bulgu da çocuklarda görülen *D. fragilis* enfeksiyonunun erişkinlerinkine göre daha sık klinik semptom gösterdiğini ifade eden yazarların verileri ile örtüşmektedir (3,9,29,37,48,60,). Dientamoebiosis gene bu yaş grubunda daha sık rastlanması ise, şiddetli olan semptomlar nedeniyle hastaneye de daha sık başvurmuş olmaları ile açıklanabilir. Erişkin ve yaşlı grupta dispeptik şikayetlerin daha çok görülmesi ise enfeksiyonla sık karşılaşılması sonucunda, şiddetli semptomların yerini daha hafif semptomlara bırakarak parazitin varlığını sürdürdüğünü düşündürmüştür. Yurt dışında çoğunlukla Amerika, Kanada, Avustralya, İngiltere, Hollanda, Danimarka, İtalya, Almanya gibi gelişmiş ülkelerden yapılan yayınlarda ise kronik diyare, karın ağrısı ve akut diyare daha ön planda olan semptomlardır. Bu da parazitoz sıklığının düşük olduğu bölgelerde, enfeksiyonun daha şiddetli seyrettiğini göstermektedir. Çalışmamızda ürtikeryal kaşıntı ve perianal kaşıntı 15-64 yaş grubunda sırasıyla % 30.3 ve %70.0 olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($P<0.05$), 6-14 yaş grubunda ise aynı semptomlar sırasıyla %40 ve % 50 olarak bulunmuştur. Genellikle protozoal enfeksiyonlarda görülmeyen eozinofili, Cowden ve ark.nın çalışmasında *D. fragilis* ile enfekte çocukların yaklaşık %50'sinde rapor edilmiştir (43). Bizim çalışmamızda da eozinofili bulgusu (0-5) yaş grubunda %66.7, 6-14 yaş grubunda %50.0, (15-64) yaş grubunda %17.8 ve 65 yaş üzerinde ise % 75.0 olarak bulunmuştur. Periferik eozinofili olanlardaki *D. fragilis* pozitifliği olmayanlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak tek başına *D. fragilis* enfeksiyonu olanlar değerlendirildiğinde ise eozinofili ile *D. fragilis* sıklığı arasındaki anlamlı ilişki gözlenmemiştir.

Cinsiyetler arasında *D. fragilis* görülme sıklığı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. İshal yakınması olan erkeklerde *D. fragilis* görülme sıklığı %15.5, kadınlarda %14.8, karın ağrısı olan erkek ve kadınlarda *D. fragilis* sırasıyla %20.0 ve %26.7 oranında tespit edilmiştir. Çalışmamızda *D. fragilis* ile istatistiksel olarak anlamlı birlikteliği olan semptomlar, hem erkek hem kadınlarda benzer oranlarda olup dispeptik şikayetler erkek ve kadınlarda sırasıyla %25, %36.4, gaz şikayeti %43.5, %43.8, ürtikeryal kaşıntı %33.3, %29.2, perianal kaşıntı %47.1, %66.7, eozinofili görülmesi %30, %55.6 olarak bulunmuştur. Kronik diyare şikayeti olanlarda ise *D. fragilis* erkeklerde %10.3, kadınlarda %20.8 oranında saptanmıştır.

Çalışmada *D. fragilis* enfeksiyonunun *E. vermicularis* ya da diğer nematod yumurtalarının vektörlüğüyle taşınma hipotezi (24) de değerlendirilmiştir. Selofan lam preparatlarında *E. vermicularis* yumurtalarının pozitif olarak değerlendirildiği olgulardaki *D. fragilis* sıklığı %66.7 ($p>0.05$) olarak yüksek oranda saptanmıştır. Ancak incelenen selofan

lam sayısının altı olgu ile sınırlı olması bu konudaki değerlendirmenin yetersiz olacağını göstermektedir. Bu konudaki incelemeye ışık tutması için hastalarda perianal kaşıntı sorgulanmıştır. Perianal kaşıntısı olanlarda *D. fragilis* sıklığı %57.1 olup, istatistiksel olarak anlamlıdır. Perianal kaşıntısının ise *E. vermicularis* yumurtalarının oluşturduğu lezyonlar sebebiyle olabileceği düşünüldüğünde, *D. fragilis* enfeksiyonunun taşınmasında *E. vermicularis* yumurtalarının vektör olabileceği görüşü bizim çalışmamız tarafından da desteklenmektedir.

Rektum ve sigmoid kolonda inflamatuvar değişikliklerin rapor edildiği çalışmalar mevcuttur, ancak bu çalışmalarda da *D. fragilis*'e eşlik eden başka organizmalar bulunmaktadır (5). Proktit veya kolit şüphesi ile gerçekleştirilen endoskopik incelemelerde mukozada spesifik olmayan makroskobik ve histolojik bulgular elde edilmiş, hemorajik dışkı ve entero-invaziv davranış açıklığa kavuşmamıştır (3). *D. fragilis*'in çekumdan rektuma uzanan mukozal kriptaları enfekte ettiği ifade edilmiş, invazyon ise gösterilmemiştir. Kolon mukozasında eozinofilik inflamatuvar yanıtı uyararak neden olduğu mukoza irritasyonu sonucu gelişen aşırı mukus salgılanması ve barsağın hipermotilitesi gibi etkilerle de kolit etkeni olarak ortaya çıkabildiği üzerinde durulmuştur (42,43,44). Çalışmamızda *D. fragilis* ile birlikte *G. intestinalis* enfeksiyonu olan hastanın kolorektal biyopsisinde lamina propriada lenfosit ve eozinofili, bir başka hastada kolon mukozasında ödem saptanmıştır. Bir hasta ülseratif kolit, bir başka hasta çölyak hastalığı tanılıdır. Ülseratif kolit tanılı hastanın 2.5 yıldır devam eden ishal şikayeti olup, Mekke-Medine ziyaretinden sonra başlamıştır. Hastanın eozinofilisi ile birlikte kolonoskopisinde mukoza hiperemik, ödemli, anüs ve rektum hemorajik olarak bulunmuştur. Hastanın yapılan gaita incelemesi ile *D. fragilis* tek bir enfeksiyon olarak rapor edildikten sonra metronidazol tedavisi verilmiştir (3x1,15 gün). Tedavi sonrası daha önceki biyopsi bulguları ile birlikte eozinofilinin de kaybolduğu görülmüş olup 69 yaşındaki bu erkek hastanın eozinofilisi ile birlikte dispeptik şikayetleri mevcut olan eşinde de *D. fragilis* ile birlikte *B. hominis* saptanmıştır. Bir başka *D. fragilis* enfeksiyonu olan hastanın Gastroenteroloji Kliniği tarafından İBS olarak izlendiği görülmüştür. *B. hominis* ile beraber *D. fragilis* enfeksiyonu saptanan bir başka hastanın kronik diyaresi de mevcut olup, kolorektal biyopsisinde epitelde enflamasyon ve seyrek eozinofili görülmüştür. IgG düzeyi yüksek olan, alerjik astım tanılı ve diyaresi olan bir çocukta *D. fragilis* ile birlikte birden fazla paraziter enfeksiyon saptanmış, metronidazol tedavisi sonucunda IgG düzeyinde düşme izlenmiştir. Çalışmamızdaki bu olgular, daha önce

literatürlerde yer almış olgularla uyumludur (4,34,45,46). Çalışmamızda kronik barsak hastalıkları (crohn, ülseratif kolit, İBS ve diğer fonksiyonel barsak hastalıkları), barsak malignitesi ile *D. fragilis* ilişkisi de incelenmiştir. Herhangi bir barsak hastalığı olanlarda *D. fragilis* görülme sıklığı %17.4'dür (p=0.541). Bu oran anlamlılık düzeyine çok yakın olup, barsak hastalığı olanlarda *D. fragilis* görülme oranının olmayanlara göre daha yüksek olduğunu vurgulamaktadır ve *D. fragilis*'in ciddi barsak bozukluklarına yol açabileceğine dikkat çeken literatürlerle uyumludur (31,48). Barsak malignitesi olanlarda ise *D. fragilis* görülme sıklığı %7.1 bulunmuştur.

Hastaların mikrobiyolojik kültür sonuçları da hastane kayıt sisteminden alınmıştır. Mikrobiyolojik kültür sonucunda etken saptanan 7 hastanın hiçbirinde *D. fragilis* ya da bir başka parazit görülmemiştir. Bu da hastaların bakteriyel ya da viral semptomlarla paraziter enfeksiyon semptomlarının ayrılmış olduğunu göstermiştir. Ayrıca mikrobiyolojik etken saptananların 7'inde de ishal şikayeti, bir olguda (%3.2) karın ağrısı şikayeti, üç olguda ateş yüksekliği bulunmaktadır. Bu konuda incelenebilen sadece 7 olgu olmasına rağmen tüm bu sonuçlar bakteriyel ya da viral etken ile enfekte hasta semptomları hakkındaki genel bilgilerle uyumludur. Bu sonucun çalışmamızın diğer sonuçlarının etkinliğini göstermede bir parametre olabileceği düşünülmektedir.

Tanısındaki güçlükler nedeniyle rutin laboratuvarlarda saptanamaması alınacak küçük önlemlerle ve planlamalarla giderilebilecektir. Çalışmamızda da SAF içine alınarak boyanan örneklerde parazit saptanması ile rutin sonuçları anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Gaita örneğinde *D. fragilis* saptadıklarımızın selofan bant preparatlarında *E. vermicularis* yumurtalarını göremesekte, anal kaşıntı şikayeti olanların oldukça yüksek olmasının enfeksiyonun taşınımında bu ilişkiye işaret ettiğini kanısı oluşmuştur. Daha fazla sayıda olgunun incelenmesinin, *E.vermicularis* ve *D.fragilis* arasındaki ilişkinin belirlenmesine de katkı sağlayacağını düşünülmektedir.

6. SONUC VE ÖNERİLER

D. fragilis tanısında güçlükler olan bir parazittir. Konvansiyonel mikroskopik tanı olan nativ-Lugol bakı ile tanısı gerçekleşmemektedir. Barsak pasajından çıkışını takiben kalıcı boyama yöntemi ile uyumlu bir fiksatif solusyona alınması ve takiben boyanması gerekmektedir. Ya da kültür gibi ek yöntemlerin uygulanması gerekmektedir. Tüm bu yöntemler aynı zamanda zaman alıcı ve deneyimli eleman gerektiren uygulamalardır. PCR da bu güçlükler nedeniyle kullanılabilir bir tanı yöntemidir.

Çalışmada demir hematoksilen ve PCR yöntemleri ile birbirinden farklı olgular pozitif bulunmuştur. Bu olgular herhangi bir yöntemle göre yanlış pozitif olarak değerlendirilmemiş, her iki yöntem için de yakalanamayan pozitiflikler olarak değerlendirilmiştir. Bu yakalanamama da, PCR yönteminde gaita örneğindeki inhibitör faktörlerin ya da parazitin yoğun olmadığı durumların etkili olduğu, hematoksilen boya yönteminde de, SAF fiksatif içine hızlı bir şekilde alınmamasının etkili olduğu düşünülmüştür. Tanısındaki güçlükler nedeniyle rutin laboratuvarlarda saptanamaması alınacak küçük önlemlerle ve planlamalarla giderilebilecektir. Çalışmamızda da SAF içine alınarak boyanan örneklerde parazit saptanması ile rutin laboratuvar sonuçları anlamlı olarak farklı bulunmuştur.

D. fragilis görülmesi üzerine immün sistemin etkisini araştırdığımız çalışmada, immün yetmezlikli hasta grubunda beklediğimizin tersine daha az pozitif olgu saptadık. İmmün yetmezlikli grubun doktor kontrolü altında olması ve hastalıkları nedeniyle genellikle profilaktik ilaçlar, özellikle *D. fragilis* tedavisinde etkili olan metronidazol kullanmaları nedeniyle bu grupta *D. fragilis* sıklığını az bulduğumuzu düşündük. İmmün yetmezliği olmayan hastalarda şiddetli diyareye neden olabildiği için sağlık kontrolü olmayan, profilaksi

kullanmayan immun yetmezlikli hastalarda klinisyenlerin, diyare etkeni olarak *D. fragilis*'i akıllarına getirmelerinin önemli olduğunu düşünmekteyiz

Gaita örneğinde *D. fragilis* saptadıklarımızın çoğunun selofan bant preparatlarında *E.vermicularis* yumurtalarını göremesekte, perianal kaşıntı şikayeti olanların oldukça yüksek oranda olmasının, dientamoebiosisin taşınımında ve bulaşında *E.vermicularis* ile ilişkiye işaret ettiği kanısı oluşmuştur. Daha fazla sayıda olgunun incelenmesinin, *E.vermicularis* ve *D.fragilis* arasındaki ilişkinin belirlenmesine de katkı sağlayacağını düşünülmektedir.

İhmal edilen bir parazit olan *D. fragilis* ile ilgili ülkemizde yapılan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. *D. fragilis* tanısında PCR ile birlikte fiksatif içine alarak uygulanan boyama yöntemlerinin kullanıldığı, ülkemizde yapılmış olan bilgimiz dahilindeki, ilk ve tek çalışmadır. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçların bu parazitin tanısı ve semptomatolojisi hakkındaki ulusal ve uluslar arası bilimsel çalışmalara katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda *D. fragilis* ile gastrointestinal semptomlar açısından anlamlı ilişki saptanmıştır ancak bu konuda oluşturulacak daha kapsamlı çalışmalara basamak oluşturduğumuzu ve kronik barsak hastalıklarının insan sağlığındaki yeri de göz önüne alındığında parazitin kronik barsak hastalıkları açısından patojenitesini sorgulayan farklı çalışmaların da planlanması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. **Chan FT, Guan MX, Mackenzie AM.** Application of indirect immunofluorescence to detection of *Dientamoeba fragilis* trophozoites in fecal specimens. J Clin Microbiol, 1993;31(7):1710-4.
2. **Stark DJ, Beebe N, Marriott D, Ellis JT, Harkness J.** Dientamoebiasis: clinical importance and recent advances. Trends Parasitol, 2006; 22(2): 92-6.
3. **Preiss U, Ockert G, Brömme S, Otto A.** *Dientamoeba fragilis* infection, a cause of gastrointestinal symptoms in childhood. Klin Padiatr, 1990;202(2):120-3.
4. **Cuffari C, Oligny L, Seidman EG.** *Dientamoeba fragilis* masquerading as allergic colitis. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1998; 26(1): 16-20.
5. **Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG.** Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. Clin Microbiol Rev, 2004;17(3): 553-70.
6. **Millet V, Spencer MJ, Chapin M, Stewart M. et al.** *Dientamoeba fragilis*, a protozoan parasite in adult members of a semicomunal group. Dig Dis Sci, 1983;28(4):335-9
7. **Lagace-Wiens P, VanCaseele P, Koschik C.** *Dientamoeba fragilis*: an emerging role in intestinal disease. CMAJ.2006 Aug 29;175(5):468-9. Erratum in: CMAJ, 2006;175(7):777.
8. **Vandenberg O, Peek R, Souayah H, Dediste A, et al.** 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, 2006;10(3):255-61.
9. **de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, van Leeuwen NJ, et al.** Etiology of gastroenteritis in sentinel general practices in the Netherlands. Clin Infect Dis, 2001;33(3):280-8.
10. **Stark D, Barratt JL, van Hal S, Marriott D, et al.** Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. Clin Microbiol Rev, 2009;22(4):634-50.

11. **Méndez OC, Szmulewicz G, Menghi C, Torres S, et al.** Comparison of intestinal parasite infestation indexes among HIV positive and negative populations. *Medicina (B Aires)*, 1994;54(4):307-10.
12. **Chan FT.** Advances in the study of *Dientamoeba fragilis*. University of Ottawa, Canada, Ph. D. Thesis, 1996.
13. **Dwyer DM.** Analysis of the antigenic relationship among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. I. Quantitative fluorescent antibody methods. *J. Protozool*, 1972; 19:316-325
14. **Camp RR, Mattern CF, Honigberg BM.** Study of *Dientamoeba fragilis* Jepp&Dobell. I. Electronmicroscopic observations of the binucleate stages. II. Taxonomic position and revision of the genus. *J. Protozool*, 1974;21(1): 69-82
15. **Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, et al.** A new revised classification of the protozoa. *J. Protozool*, 1980;27:37-58
16. **Silberman JD, Clark CG, Sogin ML.** *Dientamoeba fragilis* shares a recent common evolutionary history with the trichomonads. *Mol Biochem Parasitol*, 1996;76(1-2):311-4.
17. **Windsor JJ, Johnson EH.** *Dientamoeba fragilis*: the unflagellated human flagellate. *Br J Biomed Sci.* 1999; 56(4): 293-306.
18. **Gerbod D, Edgcomb VP, Noël C. et al.** Phylogenetic position of the trichomonad parasite of turkeys, *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, inferred from small subunit rRNA sequence. *J Eukaryot Microbiol.* 2001;48(4):498-504.
19. **Windsor JJ, Macfarlane L, Clark CG.** Internal transcribed spacer dimorphism and diversity in *Dientamoeba fragilis*. *J Eukaryot Microbiol*, 2006;53(3):188-92.
20. **Munsch M, Mehlhorn H, Al-Quraishy S, Lotfi AR, et al.** Molecular biological features of strains of *Histomonas meleagridis*. *Parasitol Res.* 2009;104(5):1137-40.
21. **Sawangjaroen N, Luke R, Prociv P.** Diagnosis by faecal culture of *Dientamoeba fragilis* infections in Australian patients with diarrhoea. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1993;87(2):163-5.
22. **Windsor JJ, Rafay AM, Shenoy AK, Johnson EH.** Incidence of *Dientamoeba fragilis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *Br J Biomed Sci*, 1998;55(3):172-5.

23. **Schuster H, Jackson RS.** Prevalence of *Dientamoeba fragilis* among patients consulting complementary medicine practitioners in the British Isles. *J Clin Pathol*, 2009;62:182184doi:10.1136/jcp.2008.059659.URL:[http://jcp.bmj.com/content/62/2/182](http://jcp.bmj.com/content/62/2/182.full).full
24. **Burrows RB, Swerdlow MA.** *Enterobius vermicularis* as a probable vector of *Dientamoeba fragilis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1956;5(2): 258-65.
25. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>
26. **Girginkardeşler N, Kurt O, Kilimcioğlu AA, Ok UZ.** Transmission of *Dientamoeba fragilis*: evaluation of the role of *Enterobius vermicularis*.*Parasitol Int.* 2008;57(1):72-5.
27. **Menghi CI, Makiya R, Gatta CL, Oscar CM.** *Dientamoeba fragilis*: molecular biology techniques for the elucidation of its mode of transmission. *Parasitol Latinoam*, 2005;60:25-31.
28. **Ayadi, A., and I. Bahri.** *Dientamoeba fragilis*: flagelle pathogene. *Bull. Soc. Pathol. Exot*, 1999;5:299–301.
29. **Keystone JS, Yang J, Grisdale D, Harrington M. et al.** Intestinal parasites in metropolitan Toronto day-care centres. *Can. Med. Assoc*, 1984; J. 131:733–735.
30. **Munsch M, Lotfi A, Hafez HM, Al-Quraishy S, et al.** Light and transmission electron microscopic studies on trophozoites and cyst-like stages of *Histomonas meleagridis* from cultures. *Parasitol Res*, 2009;104(5):1137-40. Epub 2008 Dec 11.
31. **Desser SS, Yang YJ.** Letter: *Dientamoeba fragilis* in idiopathic gastrointestinal disorders. *Can Med Assoc J*, 1976;114(4):290–293.
32. **Dickinson EC, Cohen MA, Schlenker MK.** *Dientamoeba fragilis*: a significant pathogen. *Am. J. Emerg. Med*, 2002; 20:62–63.
33. **Vandenberg O, Souayah H, Mouchet F, Dediste A, et al.** Treatment of *Dientamoeba fragilis* infection with paromomycin. *Pediatr Infect Dis J*, 2007;26(1):88-90.
34. **Ito R, Sakagami J, Kataoka K, Nakamura H, et al.** Chronic diarrhea and protein-losing gastroenteropathy caused by *Dientamoeba fragilis*. *J Gastroenterol*, 2004; 39(11): 1117-9.
35. **Windsor JJ, Johnson EH.** More laboratories should test for *Dientamoeba fragilis* infection. *BMJ*, 1999;318(7185):735

36. **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.
37. **Spencer MJ, Garcia LS, Chapin MR.** *Dientamoeba fragilis*. An intestinal pathogen in children? *Am J Dis Child*, 1979;133(4):390-3.
38. **Peek R, Reedecker FR, van Gool T.** Direct amplification and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from human stool specimens. *J Clin Microbiol*, 2004;42(2):631-5.
39. **Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, et al.** Prospective study of the prevalence, genotyping, and clinical relevance of *Dientamoeba fragilis* infections in an Australian population. *J Clin Microbiol*, 2005; 43(6): 2718-23
40. **Girginkardeşler N, Kurt Ö.** Dientamoebiosis. In: Özcel MA, editör. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları, 1. baskı. İzmir: Meta Basım;2007.p. 415
41. **Bart A, van der Heijden HM, Greve S, Speijer D, et al.** Intragenomic variation in the internal transcribed spacer 1 region of *Dientamoeba fragilis* as a molecular epidemiological marker. *J Clin Microbiol*, 2008;46(10):3270-5.
42. **Hussein EM, Al-Mohammed HI, Hussein AM.** Genetic diversity of *Dientamoeba fragilis* isolates of irritable bowel syndrome patients by high-resolution melting-curve (HRM) analysis. *Parasitol Res*, 2009;105(4):1053-60.
43. **Cowden JD, Hotez PJ.** A field guide to emerging enteric protozoa. *Contemporary Pediatrics*, 2001;18:40–47.
44. http://www.cmpt.ca/pdf_para_2006/0604_2_dfrag.pdf.cmpt. ClinicalMicrobiology Proficiency Testing. Enteric Parasitology. 0604-2 Stool: *Dientamoeba fragilis*. (Kasım 2009'da alındı)
45. **Borody T, Warren E, Wettstein A, et al.** Eradication of *Dientamoeba fragilis* can resolve IBS-like symptoms. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002;17(Suppl): A103.
46. **Stark D, van Hal S, Marriott D, Ellis J, et al.** Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int J Parasitol*, 2007;37(1):11-20. Epub 2006 Oct 12.
47. **Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, et al.** Blastocystis hominis and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol Res*, 2010;107(3):679-84. Epub 2010 Jun 8.

48. **Norberg A, Nord CE, Evengard B.** *Dientamoeba fragilis*-a protozoal infection which may cause severe bowel distress. *Clin Microbiol Infect*, 2003; 9(1): 65-8.
49. **Windsor JJ, Macfarlane L,** Irritable bowel syndrome: the need to exclude *Dientamoeba fragilis*. *Am J Trop Med Hyg*, 2005;72 (5):501
50. **Chan F, Stewart N, Guan M, et al.** Prevalence of *Dientamoeba fragilis* antibodies in children and recognition of a 39 kDa immunodominant protein antigen of the organism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1996;15(12):950-4.
51. **Grendon JH, DiGiacomo RF, Frost FJ.** Descriptive features of *Dientamoeba fragilis* infections. *J Trop Med Hyg*, 1995 Oct;98(5):309-15.
52. **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;37(2):599-608.
53. **Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, et al.** *Dientamoeba fragilis* as a cause of travelers' diarrhea: report of seven cases. *J Travel Med*, 2007;14(1):72-3.
54. **Chan FT, Guan MX, Mackenzie AM, Diaz-Mitoma F.** Susceptibility testing of *Dientamoeba fragilis* ATCC 30948 with iodoquinol, paromomycin, tetracycline, and metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994;38(5):1157-60
55. **Butler WP.** *Dientamoeba fragilis*. An unusual intestinal pathogen. *Dig Dis Sci*, 1996;41(9):1811-3
56. **Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D.** A review of the clinical presentation of dientamoebiosis. *Am J Trop Med Hyg*, 2010;82(4):614-9.
57. **Stensvold CR, Arendrup MC, Mølbak K, Nielsen HV.** The prevalence of *Dientamoeba fragilis* in patients with suspected enteroparasitic disease in a metropolitan area in Denmark. *Clin Microbiol Infect*, 2007;13(8):839-42.
58. **Crotti D, D'Annibale ML.** Human intestinal parasitosis: role of *Dientamoeba fragilis* in human infections. *Ann Ig*, 2007;19(1):27-34.
59. **Crotti D, D'Annibale ML.** Role of *Dientamoeba fragilis* in human bowel infections. *Infez Med*, 2007;15(1):30-9.
60. **Grendon JH, Digiacomo RF, Frost FJ.** *Dientamoeba fragilis* detection methods and prevalence: a survey of state public health laboratories. *Public Health Rep*, 1991;106(3):322-5.

61. **Lainson R, da Silva BA.** 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1999;94(5):611-3.
62. **Peters CS, Sable R, Janda WM, Chittom AL, et al.** Prevalence of enteric parasites in homosexual patients attending an outpatient clinic. *J Clin Microbiol*, 1986;24(4):684-5.
63. **Naiman HL, Sekla L, Albritton WL.** Giardiasis and other intestinal parasitic infections in a Manitabo residential school for the mentally retarded. *Can Med Assoc J*, 1980;122(2):185-8.
64. **Stumpel OFB, Tolboom JJM, Warris A, Beckers PJA, et al.** *Dientamoeba fragilis*, vooral bij kinderen pathogeen? *Tijdschrift voor infectieziekten*, 2006;1(4):155-9
65. **Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, et al.** Detection of *Dientamoeba fragilis* by culture. *Br J Biomed Sci*, 2003;60(2):79-83.
66. **Gibbs Ap, Church DL.** Is it worth looking for *Dientamoeba fragilis*? *Can J Infect Dis*, 1998; 9: 326.
67. **Garg PK, Perry S, Dorn M, Hardcastle L, et al.** Risk of intestinal helminth and protozoan infection in a refugee population. *Am J Trop Med Hyg*, 2005;73(2):386-91.
68. **Girginkardeşler N, Coşkun S, Cüneyt Balcioglu I, Ertan P, ark.** *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. *Clin Microbiol Infect*, 2003;9(2):110-3.
69. **Ozçakir O, Güreser S, Ergüven S, Yilmaz YA, et al.** Characteristics of *Blastocystis hominis* infection in a Turkish university hospital. *Turkiye Parazitol Derg*, 2007;31(4):277-82.
70. **Fujii K, Ansari-Lari A.** Case presentation: *Dientamoeba fragilis*. *The John Hopkins Microbiology Newsletter*, 2002;21:7
71. **Caraballo A, Orozco I, Muñoz L** Intestinal parasitic infections in human immunodeficiency virus positive individuals in southeastern Venezuela. *Bol Chil Parasitol*, 2001;57:1-7
72. **Hiatt RA, Markell EK, Ng E.** How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am J Trop Med Hyg*, 1995;53(1):36-9.

73. **Ockert G.** Symptomatology, pathology, epidemiology, and diagnosis of *Dientamoeba fragilis*, In B. M. Honigberg (ed.), *Trichomonads parasitic in humans*. Springer Publications, New York, N.Y. 1990;394–410.
74. **Van Gool, T, Weijts R, Lommerse E, Mank TG.** Triple faeces test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 2003; 22:284–290.
75. **Garcia LS, Bruckner DA.** *Diagnostic Medical Parasitology*. 3rd Edition. ASM Press, Washington DC. 1997; 73-81
76. **Yang J, Scholten T.** A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. *Am. J. Clin. Pathol*, 1977;67:300–304.
77. **Garcia LS, Shimizu RY, Shum A, Bruckner DA.** Evaluation of intestinal protozoan morphology in polyvinyl alcohol preservative: comparison of zinc sulfate- and mercuric chloride-based compounds for use in Schaudinn's fixative. *J Clin Microbiol*, 1993;31(2):307-310
78. **Garcia LS, Shimizu RY.** Evaluation of intestinal protozoan morphology in human fecal specimens preserved in EcoFix: comparison of Wheatley's trichrome stain and EcoStain. *J. Clin. Microbiol*, 1998;36: 1974–1976.
79. **Windsor JJ, Bamber AI, Macfarlane L.** Detection of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis hominis* using a simple staining method. *Br J Biomed Sci*. 2006;63(1):27-8.
80. **Clark CG, Diamond LS.** Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev*, 2002;15(3):329-41. Review.
81. **Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, et al.** Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *Int J Parasitol*, 2005;35(1):57-62.
82. **Johnson JA, Clark CG.** Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. *J. Clin. Microbiol*, 2000;38:4653–4654.
83. **Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, et al.** Evaluation of three diagnostic methods, including real-time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. *J Clin Microbiol*, 2006;44(1):232-5
84. **Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, et al.** 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(4):411-6.

85. **Bruijnesteijn van Coppentraet LE, Wallinga JA, Ruijs GJ, Bruins MJ, et al.** 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(9):869-74. Epub 2009 Jul 14.
86. **Calderaro A, Gorrini C, Montecchini S, Peruzzi S, et al.** Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Dientamoeba fragilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010;67(3):239-45.
87. **Windsor JJ, Macfarlane L, Clark CG.** Internal transcribed spacer dimorphism and diversity in *Dientamoeba fragilis*. *J Eukaryot Microbiol*, 2006;53(3):188-92.
88. **Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E.** Dışkı inceleme yöntemleri, In: Özcel MA, Altıntaş N ed. Parazit hastalıklarında tanı. İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi,1997;14
89. **Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E.** Dışkı inceleme yöntemleri, In: Özcel MA, Altıntaş N ed. Parazit hastalıklarında tanı. İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi,1997;45
90. <http://www.aafp.org/afp/2004/0301/p1161.html>. 10/05/2010'da alındı
91. **Windsor JJ, Clark CG, Macfarlane L.** Molecular typing of *Dientamoeba fragilis*. *Br J Biomed Sci*, 2004;61(3):153-5.
92. **Spencer MJ, Chapin MR, Garcia LS.** *Dientamoeba fragilis*: a gastrointestinal protozoan infection in adults. *Am J Gastroenterol*, 1982;77(8):565-9.
93. **El Masry NA, Bassily S, Farid Z, et al.** Potential clinical significance of *Blastocystis hominis* in Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1990;84:695.
94. **Garavelli PL, Soaglione L, Libanore M, et al.** *Blastocystis*: a new disease in patients with leukemia. *Haematologica*, 1991;76:80.
95. **Brites C, Barberino MG, Bastos MA, Silva N.** *Blastocystis hominis* as a potential cause of diarrhea in AIDS patients: a report of six cases in Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis*, 1997;1:91-4.
96. **Stark D, Fotedar R, van Hal S, Beebe N, et al.** Prevalence of enteric protozoa in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative men who have sex with men from Sydney, Australia. *Am J Trop Med Hyg*, 2007;76(3):549-52.

EK 1

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI SAYISI	: 26	TOPLANTI GÜNÜ	: Salı
TOPLANTI TARİHİ	: 25.07.2006	TOPLANTI GÜNÜ	: 10.00

14/ Enstitümüz Parazitoloji Anabilim Dalı Tıbbi Parazitoloji doktora programı öğrencisi Zeliha GÜLTER YALÇIN'ın, tez danışmanı Doç.Dr. Ümit AKSOY tarafından 21.07.2006 tarihli yazı ile önerilen tez konusunun Etik Kurul sonucuna göre aşağıdaki şekilde kabulüne mevcudun oy birliği ile karar verildi.

Tez konusu : ' İmmun Yetmezliği Olan İshalli Hastalarda Dientamoeba Fragilis'in Görülme Sıklığı Araştırılması ve Genotip Profilinin Belirlenmesi'

EK2

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI SAYISI : 16

TOPLANTI GÜNÜ : Cuma

TOPLANTI TARİHİ : 21.05.2010

TOPLANTI SAATİ : 11.00

KARAR 06/ Enstitümüz Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Parazitoloji doktora programı öğrencisi Zeliha Güler YALÇIN'ın, tez danışmanı Prof. Dr. Ümit AKSOY tarafından 17/05/2010 tarihli yazı ile önerilen ve Etik Kurul onayı alınan tez başlığı değişikliğinin aşağıdaki şekilde kabulüne mevcudun oy birliği ile karar verildi.

Yeni Tez Başlığı: “İmmün Yetmezliği Olan ve İmmün Yetmezliği Olmayan İshalli Hastalarda Dientamoeba Fragilis'in Görülme Sıklığının Araştırılması ve Genotip Profilinin Belirlenmesi”