

# Gastrointestinal Şikayeti Olan Hastalarda *Dientamoeba fragilis* Enfeksiyonu

## *Dientamoeba fragilis* Infection in Patients with Gastrointestinal System Complaints

Eda SİVCAN<sup>1</sup>, Arzuw CHARYYEVA<sup>2</sup>, Şirin Sahra CEYLAN<sup>3</sup>, Merve YÜRÜK<sup>1</sup>,  
Emrah ERDOĞAN<sup>1</sup>, İzzet ŞAHİN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

<sup>1</sup> Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Kayseri, Turkey.

<sup>2</sup> Ostrava Üniversitesi Bilim Fakültesi, Yaşam Bilimleri Araştırma Merkezi, Ostrava, Çek Cumhuriyeti.

<sup>2</sup> Ostrava University Faculty of Science, Life Science Research Center, Ostrava, Czech Republic.

<sup>3</sup> Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

<sup>3</sup> Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 27.10.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 28.01.2018

### ÖZ

Bu çalışmada, gastrointestinal şikayeti olan hastalarda *Dientamoeba fragilis*'in farklı tanı yöntemleriyle yaygınlığının araştırılması ve tanıda kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, çeşitli kliniklerden gelen ve özellikle üst karın ağrısı, abdominal ve pelvik ağrı, bulantı ve kusma, gastroenterit ve kolit, sebebi bilinmeyen ateş ve ishal gibi gastrointestinal şikayeti olan 101 hasta ve sağlıklı bireylerden oluşan 20 kontrol olgusuna ait dışkı örneği öncelikle nativ-Lugol (N-L) yöntemiyle incelenmiş ve tümü Robinson besiyerine ekilmiştir. Toplam 121 olguya ait tüm dışkı ve kültür örnekleri demir hematoksilin boyama (DHB) ve trikrom boyama (TB) ile boyanmıştır. Bu 242 örneğin tümü ayrıca polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve kantitatif gerçek zamanlı-PCR (QPCR) yöntemleriyle *D. fragilis* açısından araştırılmıştır. Toplam 121 dışkı örneğinin 13 (%10.7)'ü DHB, 2 (%1.7)'si TB, 7 (%5.7)'si PCR, 13 (%10.7)'ü QPCR ile pozitif bulunurken, aynı sayıdaki kültür örneğinin 7 (%5.8)'si DHB, 4 (%3.3)'ü TB, 2 (%1.7)'si PCR, 3 (%2.5)'ü QPCR yöntemiyle pozitif olarak tespit edilmiştir. Yüz yirmi bir dışkı örneğinin 15'inin ishalleri olduğu belirlenmiştir. Ishalleri 15 dışkı örneğinin hiçbirisi DHB veya TB ile pozitif bulunmamıştır. Ishalleri ve ishalleri olmayan dışkıların sırasıyla 1 (%1)'i ve 6 (%4.9)'sı PCR yöntemiyle pozitif iken, QPCR yönteminde ishalleri ve ishalleri olmayan dışkıların sırasıyla (-/negatif) ve 13 (%10.7)'ü pozitif olarak tespit edilmiştir. QPCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde 121 dışkıya ait duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla, DHB için %46 ve %93, TB için 0 ve %99, PCR için %54 ve %100 olarak tespit edilirken, kültür örneklerinde DHB için %67 ve %96,

**İletişim (Correspondence):** Eda Sivcan, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Melikgazi, 38039, Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 352 207 6666, **E-posta (E-mail):** edasvcn\_38@hotmail.com

TB için %33 ve %98 ve PCR için %67 ve %100 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, hasta ve kontrol gruplarına uygulanan konvansiyonel ve moleküler yöntemlerin (DHB, TB, PCR ve QPCR) duyarlılıkları ve özgüllükleri karşılaştırıldığında önemli bir fark olduğu gözlemlenmiş olup, çalışmanın konvansiyonel ve moleküler yöntemler açısından karşılaştırıldığı diğer çalışmaları desteklediği gözlenmiştir. *D. fragilis*'in tanısında boyama yöntemleri deneyim gerektirdiğinden, sıklıkla yanlış pozitif veya negatif sonuç elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca, daha kısa zamanda kesin tanı konulması ve tedaviye başlanması bakımından QPCR yönteminin avantajlı olduğu, QPCR'nin bulunmadığı durumlarda ise DHB ve konvansiyonel PCR yöntemlerinin birlikte kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmanın, Türkiye'de *Dientamoeba* üzerine yapılacak olan epidemiyolojik çalışmalara ve bilimsel çalışmalara katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

**Anahtar sözcükler:** *Dientamoeba fragilis*; DHB; TB; PCR; QPCR; Kayseri.

## ABSTRACT

In this study, we aimed to investigate the incidence of *Dientamoeba fragilis* with different diagnostic methods in patients with gastrointestinal symptoms and determine the sensitivity and specificity of existing diagnostic methods. Fecal samples collected from 101 patients with gastrointestinal complaints (especially upper abdominal pain, abdominal and pelvic pain, nausea and vomiting, gastroenteritis and colitis, unexplained fever and diarrhea) and 20 control cases from various clinics were included in the study. Samples were first examined with native-Lugol (N-L) method and cultured in Robinson medium. All 121 stool and culture samples were stained with iron hematoxylin stain (IHS) and trichrome stain (TS) methods and examined by PCR and QPCR for *D. fragilis*. Among 121 stool samples 13 (10.7%), 2 (1.7%), 7 (5.7%) 13 (10.7%), and 7 (5.8%), 4 (3.3%), 2 (1.7%), 3 (2.5%) of cultured samples were determined positive with IHS, TS, PCR, QPCR respectively. Fifteen of the 121 stool samples were determined as diarrheal. All diarrheal stool samples were negative with IHS and TS. One of the diarrheal stools and 6 (4.9%) of the non-diarrheal stools were positive by PCR. All of the diarrheal stools were negative. Thirteen of the non-diarrheal stool samples (10.7%) were positive by QPCR. When the QPCR method was considered as gold standard, sensitivity and specificity values were determined as 46% and 93% in IHS, 0% and 99% in TS, 54% and 100% by PCR and sensitivity and specificity values were 67% and 96% in IHS, 33% and 98% in TS, 67% and 100% by PCR among cultured stool samples. As a result, it was determined that there was a statistically significant difference between the samples of the patients and the control groups and the sensitivity and specificity of the conventional and molecular methods (IHS, TS, PCR and QPCR) determined in this study supported the results of other compared studies. It has been determined that staining methods used for the diagnosis of *D. fragilis* gave false positive or negative results. In addition, the QPCR method is more advantageous in terms of time saving for the diagnosis and initiation of the treatment and in cases where QPCR is not available, IHS and conventional PCR methods should be used together. In our opinion, this study will contribute to the results of epidemiological and scientific studies on *D. fragilis* in Turkey.

**Keywords:** *Dientamoeba fragilis*; IHS; TS; PCR; QPCR; Kayseri.

## GİRİŞ

*Dientamoeba fragilis* insanların kalın bağırsağında yaşayan, psödopodlarıyla hareket eden amip benzeri patojen bir protozondur<sup>1</sup>. Başlangıçta amoeboid organizma olarak tanımlanmasına rağmen, bir dizi elektron mikroskopi ve immünolojik bulgular ışığında kamçılı protozoon olarak yeniden sınıflandırılmıştır<sup>2</sup>. *D. fragilis*'in dış ortamda hayatta kalması için kist formunun bulunması gerektiği düşünülürken, psödokist, prekist ve kist varlığı açısından yapılan çalışmalar sonucunda kist formu olmayan paraziti kabul edilmiştir. Kist formu olmadığı için insanlara bulaş yolunun besin-su bulaşından ziyade fekal-oral yolla olduğu düşünülmektedir<sup>3</sup>. Bulaşın ayrıca, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris*

*trichiura* ve *Ascaris lumbricoides* gibi helmint yumurtaları aracılığıyla bulaşabileceği gösterilmiştir. Bu parazit ile enfekte bireylerde en sık görülen belirtiler; karın ağrısı, şişkinlik, yorgunluk, iştahsızlık, ishal ve bulantı olmakla birlikte; eozinofilinin de görülebileceği bildirilmiştir<sup>4-8</sup>. *D. fragilis*'in dünyadaki prevalansı kullanılan tanı yöntemine göre %0.3-52 arasında değişiklik göstermektedir<sup>9-11</sup>. *D. fragilis*'in tanısı taze dışkı örneği ve boyama yöntemi kullanılsa bile güç olmaktadır<sup>9</sup>. *D. fragilis*'in belirlenmesinde kullanılan en yaygın boyama yöntemi demir-hematoksilen (DHB) ve trikrom boyama (TB) yöntemidir<sup>2</sup>. Boyama yöntemi öncesinde trofozoitler hızlı bir şekilde dejenere olduğu için dışkının uygun fiksatiflerle fikse edilmesi gerekmektedir<sup>12</sup>. *D. fragilis*'in tanımlanmasında ksenik kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Ksenik kültür yöntemleri içerisinde Boeck ve Drbohlav besiyeri, Robinson besiyeri, Dobell ve Laidlow besiyeri, Cleveland-Collier besiyeri, Balamuth besiyeri ve TYGM-9 besiyeri yer almaktadır<sup>2</sup>. Konvansiyonel tanı yöntemlerinin yanı sıra moleküler tanı yöntemi olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve kantitatif gerçek zamanlı-PCR (QPCR) yöntemleri kullanılmaktadır. QPCR yönteminin konvansiyonel yöntemlerden daha hassas ve özgül olduğu görülmüştür<sup>12</sup>.

Bu çalışmada, gastrointestinal şikayeti olan hastalarda, önceleri patojen olmadığı düşünülen fakat bugün patojen olduğu bilinen, akut veya kronik GİS hastalık sebebi olan *D. fragilis*'in farklı tanı yöntemleri ile yaygınlığının araştırılması ve tanıda kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı tarafından etik kurul onayı alındı (23.11.2013-2013/638).

### Örneklerin Toplanması

Çalışmada kullanılacak olan dışkı örnekleri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına çeşitli polikliniklerine başvuran ve tetkik için Parazitoloji Anabilim Dalına gelen hastalar ile sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubundan alındı. Dışkı örneği alınan hastalar ile sağlıklı gönüllüler bilgilendirilip yazılı onamaları alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya çeşitli kliniklerden gelen ve gastrointestinal şikayeti olan 101 hasta grubu ve kontrol grubu olarak ise 20 kişiden oluşan, herhangi bir kronik rahatsızlığı ve gastrointestinal şikayeti bulunmayan sağlıklı gönüllüler dahil edildi. Hasta grubuna ait örneklerin 15'i ishalleri iken, kontrol grubunda ishalleri hasta bulunmadı.

### Örneklerinin Konvansiyonel Yöntemlerle İncelenmesi

Yüz bir hasta ve 20 kontrol grubuna ait birer dışkı örneği öncelikle Nativ- Lugol (N-L) yöntemiyle incelendi. Tüm dışkı örneklerinden 180-200 mg alınarak Robinson besiyerine ekim yapıldı. Aynı zamanda 121 dışkı örneğinden TB yöntemi için PVA fiksatif içerişine, DHB yöntemi için ise SAF fiksatif içerişine bir miktar dışkı (dışkı: 1 hacim, fiksatif: 3 hacim) eklendi. Geriye kalan 121 dışkı örneği DNA izolasyonunda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

## Örneklerinin Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi; PCR ve QPCR

Yüz yirmi bir dışkı örneğinden ve bu dışkı örneklerinin ekilmesi sonucu elde edilen 121 izolatın tümünden DNA ekstraksiyonu yapıldı. -20°C'de saklanan dışkı örneklerinden 180-220 mg tartılarak 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Kültür örnekleri öncelikle 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 3500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Daha sonra QIAamp Fast Stool Mini Kit (QIAGEN, Almanya) protokolüne göre DNA'lar elde edildi ve kullanıma kadar -20°C'de saklandı.

Çalışmada, Röser ve arkadaşları<sup>13</sup> tarafından tasarlanan *D.fragilis*'e özgül 364 bp'lik bir bölgeyi amplifiye eden DFpn 1F: (5'-GCC AAG GAA GCA CAC TAT GG-3') ve DFpn 364R: (5'-GTA AGT TTC GCG CCT GCT-3') primerleri kullanıldı. PCR yöntemi için; 10x Tampon çözeltisinden 2.5 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>'den 2 µl, 10 mM dNTP miksdan 0.5 µl, 20 pmol forward ve reverse primerlerin her birinden 1 µl, 5 u/µl Taq DNA polimerazdan 1 µl (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve genomik DNA'dan 5 µl alınarak toplamda 25 µl'lik karışım hazırlandı. 95°C'de 15 dk ön ısıtma, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 65°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 30 sn uzamadan oluşan 35 döngü sonrası 72°C'de 5 dk'lık son uzamadan oluşan PCR programı kullanıldı. PCR ürünü %2'lik agaroz jelde 120V'da 400 mA'de 45 dk yürütüldü. Agaroz jel, etidyum bromürle boyanarak ardından Bio-Rad Chemidoc MP (ABD) jel görüntüleme cihazında görüntüledi.

*D.fragilis* için AY730405 GenBank aksesyon numarası ile bildirilen SSU rRNA gen bölgesi hedef alınarak "Roche Diagnostics Universal Probe Library (UPL) Assay Design Center" programı ile primerler (DFpn 1F ve DFpn 364R) ve prob (5'-ggaggaag-3') tasarlandı. LightCycler 480II (Roche Diagnostic, Almanya) cihazında QPCR yapılarak analiz edildi. QPCR reaksiyonunda; 2x Probes master miksten 10 µl, probdan 0.4 µl, 20 pmol/µl forward ve reverse primerlerin her birinden 1 µl, genomik DNA'dan 5 µl olmak üzere toplamda 20 µl'lik karışım 96'lık steril plaklarda hazırlandı. 95°C'de 10 dk denatürasyon, 95°C'de 10 sn denatürasyon, 60°C'de 30 sn bağlanma, 72°C'de 1 sn uzamadan oluşan 45 döngü sonrası 40°C'de 30 sn son uzamadan oluşan QPCR programı kullanıldı.

## BULGULAR

Çalışmaya; üst karın ağrısı, abdominal ve pelvik ağrı, bulantı ve kusma, gastroenterit ve kolit, sebebi bilinmeyen ateş ve ishal gibi gastrointestinal şikayeti olan toplam 101 hasta ve 20 kişilik kronik rahatsızlığı olmayan, sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubu dahil edilmiştir. Toplam 121 dışkı örneğinin tümü öncelikle N-L yöntemiyle incelenmiş olup, *D.fragilis* dışında belirlenen parazitler ve ishal durumuna göre dağılımı verilmiştir (Tablo I). İncelenen 121 dışkı örneğinin tümüne DHB, TB, PCR ve QPCR yöntemleri uygulanmış ve *D.fragilis* saptama sıklıkları belirlenmiştir (Tablo II). Dışkı örneklerinden 13 (%10.7)'ü DHB (Şekil 1), 2 (%1.7)'si TB (Şekil 2), 7 (%5.7)'si PCR (Şekil 3) ve 13 (%10.7)'ü QPCR (Şekil 4) yöntemleriyle *D.fragilis* açısından pozitif olarak tespit edilmiştir. Kullanılan yöntemlere ait pozitiflik yüzdeleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görülmüştür ( $\chi^2 = 0.505$ ,  $p < 0.05$ ).

**Tablo I.** Dışkı Örneklerinde N-L Yöntemi ile *D.fragilis* Dışında Belirlenen Parazitlerin; Hasta Grubu, Kontrol Grubu ve İshal Durumuna Göre Dağılımı

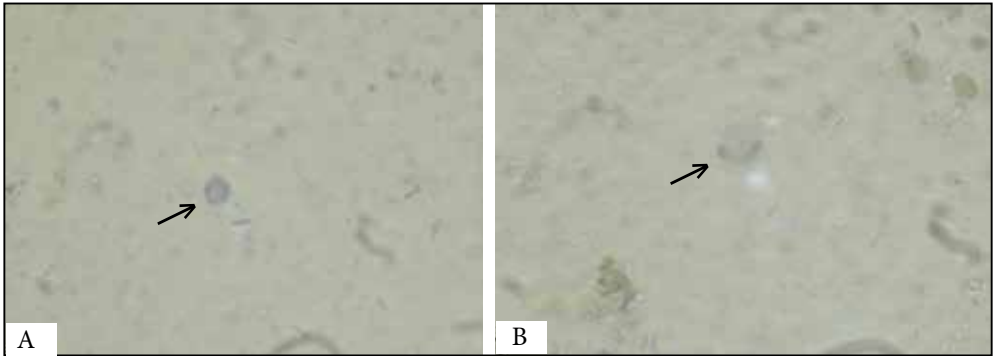
	Hasta grubu (n= 101)	Kontrol grubu (n= 20)	İshal durumu	Toplam
<i>Blastocystis</i> spp.	26	7	-	33
<i>Entamoeba coli</i>	-	1	-	1
<i>Giardia intestinalis</i>	1	-	-	1
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	-	-	1

DHB: Demir hemotoksilen boyama, TB: Trikrom boyama, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, QPCR: Kantitatif real-time PCR.

**Tablo II.** Dışkı Örneklerinde, *D.fragilis*'in Pozitif Olarak Saptanma Sıklığının Yöntemler Arasındaki Dağılımı

Yöntem	Dışkı Örnekleri				Toplam	
	Hasta grubu (n= 101)		Kontrol grubu (n= 20)		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
DHB	12	11.8	1	5	13	10.7
TB	2	1.9	-	-	2	1.7
PCR	6	5.9	1	5	7	5.7
QPCR	12	11.8	1	5	13	10.7

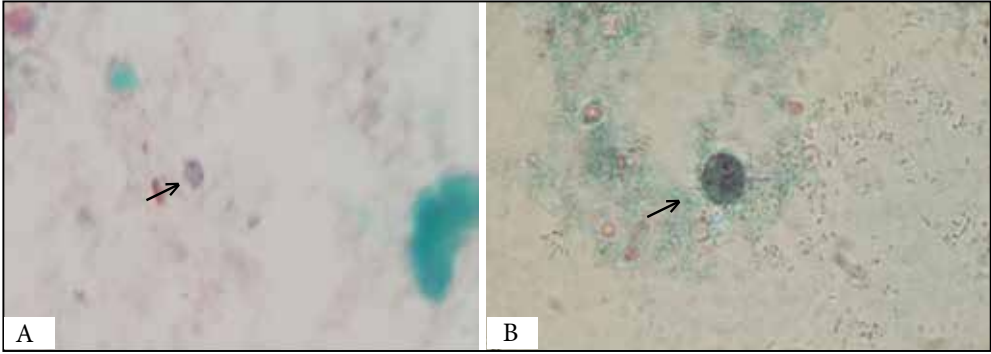
DHB: Demir hemotoksilen boyama, TB: Trikrom boyama, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, QPCR: Kantitatif real-time PCR ( $\chi^2= 0.505$ ,  $p< 0.05$ ).



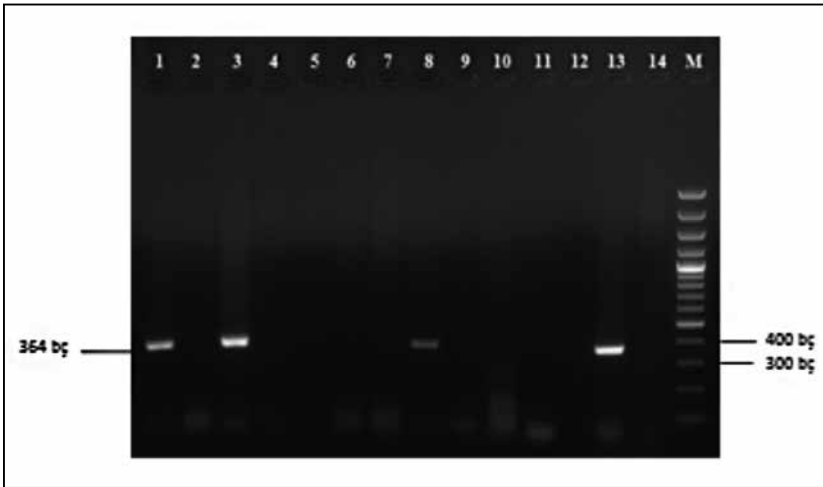
**Şekil 1.** DHB sonucu dışkı örnekleri; A,B: *D.fragilis* (x1000).

Toplam 121 kültür örneğine uygulanan DHB, TB, PCR ve QPCR yöntemlerinin, *D.fragilis* pozitiflik yüzdelerinin dağılımı belirlenmiştir (Tablo III). Kültür örneklerinin 7 (%5.8)'si DHB (Şekil 5), 4 (%3.3)'ü TB (Şekil 6), 2 (%1.7)'si PCR (Şekil 7) ve 3 (%2.5)'ü QPCR (Şekil 8) yöntemleriyle pozitif olarak tespit edilmiştir. Kullanılan yöntemler sonucunda elde edilen pozitif sonuçlar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görülmüştür ( $\chi^2= 1.371$ ,  $p< 0.05$ ).

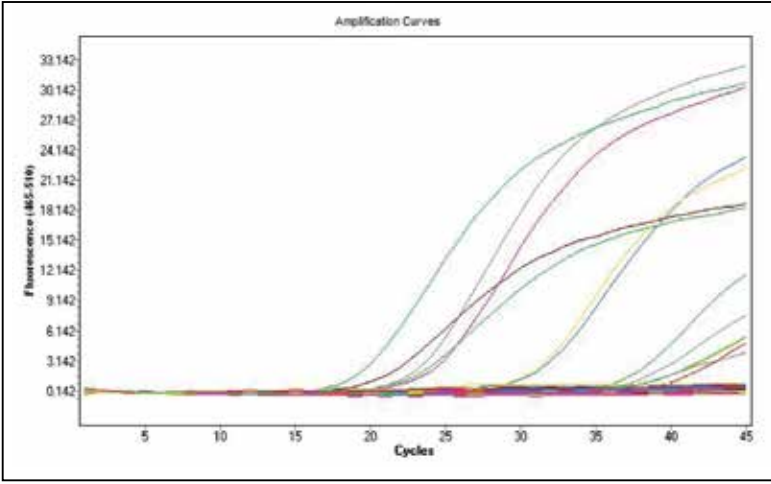
İshalli 15 dışkı örneğinin hiçbiri DHB, TB ve QPCR yöntemleriyle *D.fragilis* açısından pozitif bulunmamıştır. PCR yöntemi ile ishaller dışkıların 1 (%6.6)'i pozitif bulunmuştur. *D.fragilis* açısından; ishaller 15 dışkı örneğinin, ishaller olmayan örneklerdeki pozitiflik oranlarının kullanılan yöntemlere göre karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görülmüştür ( $\chi^2= 2.244$ ,  $p< 0.05$ ) (Tablo IV).



Şekil 2. TB sonucu dışkı örnekleri; A,B: *D.fragilis* (x1000).



Şekil 3. PCR yöntemi ile *D.fragilis* açısından pozitif olarak belirlenen bazı örneklerin agaroz jel üzerindeki görüntüsü; 1, 3, 8: Pozitif örnekler, 2,4-7,9-12: Negatif örnekler, 13: Pozitif kontrol, 14: Negatif kontrol; M: Moleküler ağırlık belirteci (Thermo Fisher Scientific, ABD), 100 bp.

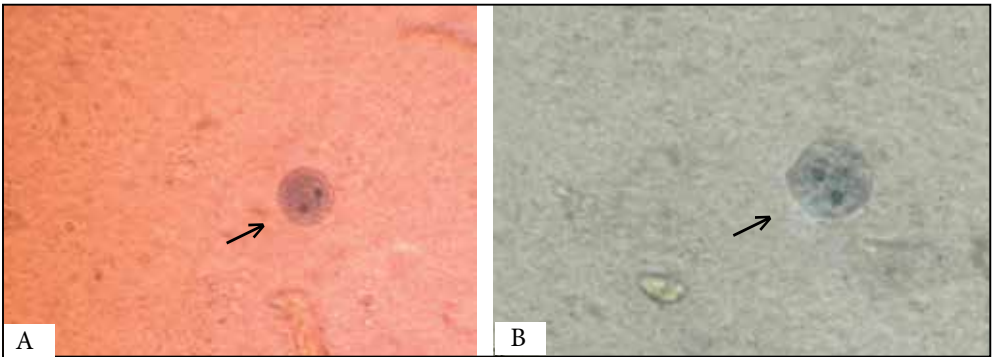


Şekil 4. Dışkı örneklerinde *D.fragilis* SSU rRNA gen bölgesini hedef alan prob bazlı QPCR.

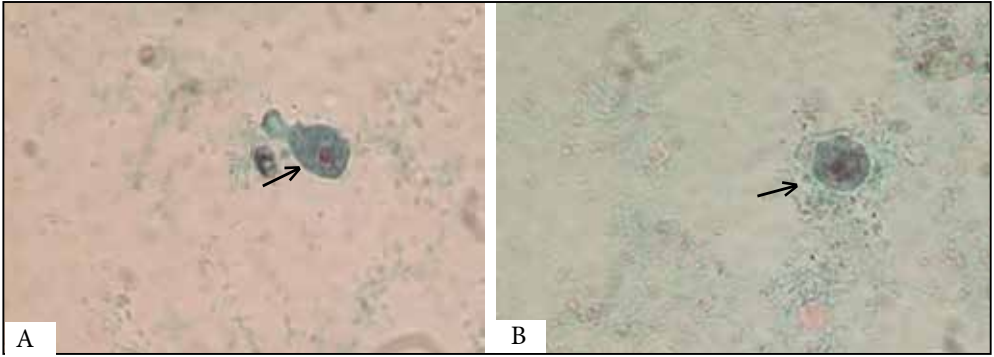
Tablo III. Kültürü Yapılan Dışkı Örneklerinde, *D.fragilis*'in Pozitif Olarak Saptanma Sıklığının Yöntemler Arasındaki Dağılımı

Yöntem	Kültür Örnekleri				Toplam	
	Hasta grubu (n= 101)		Kontrol grubu (n= 20)		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
DHB	6	5.9	1	5	7	5.8
TB	4	3.9	-	-	4	3.3
PCR	2	1.9	-	-	2	1.7
QPCR	3	2.9	-	-	3	2.5

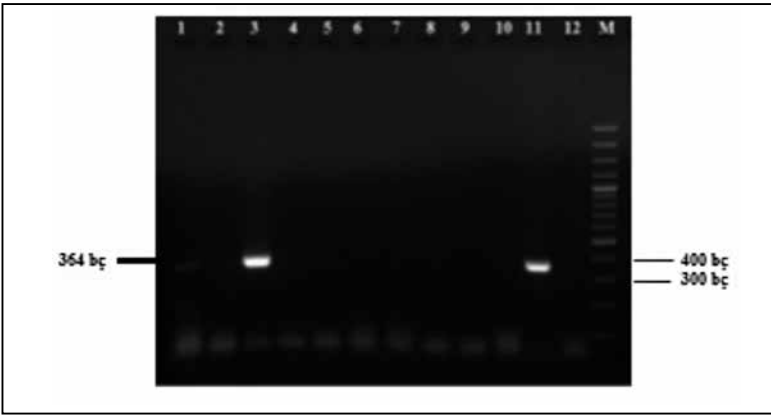
DHB: Demir hemotoksilen boyama, TB: Trikrom boyama, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, QPCR: Kantitatif real-time PCR ( $\chi^2= 1.371$ ,  $p< 0.05$ ).



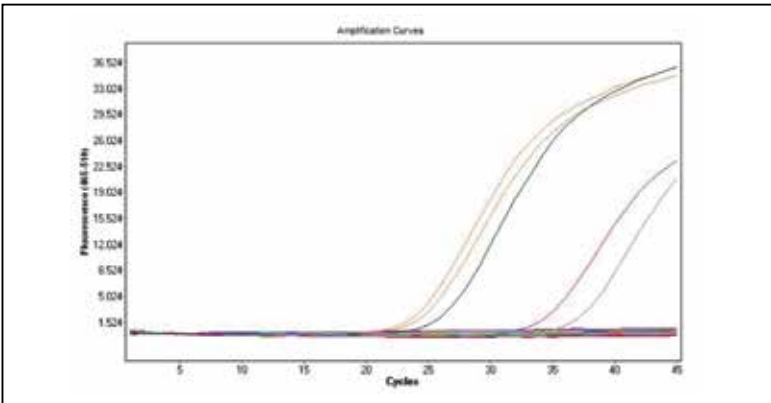
Şekil 5. DHB sonucu kültürü yapılan dışkı örnekleri; A,B: *D.fragilis* (x1000).



Şekil 6. TB sonucu kültürü yapılan dışkı örnekleri; A,B: *D. fragilis* (x1000).



Şekil 7. PCR yöntemi ile *D. fragilis* açısından pozitif olarak belirlenen kültür örneklerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü; 3: Pozitif örnek, 1, 2, 4-10: Negatif örnekler, 11: Pozitif kontrol, 12: Negatif kontrol. M: Moleküler ağırlık belirteci (Thermo Fisher Scientific, ABD), 100 bp.



Şekil 8. Kültürü yapılan dışkı örneklerinde *D. fragilis* SSU rRNA gen bölgesini hedef alan prob bazlı QPCR sonuçları.



QPCR yöntemi altın standart olarak kabul edilerek, 121 dışkı örneğinde DHB, TB ve PCR yöntemlerine ait duyarlılık ve özgüllük sonuçları belirlenmiştir. Buna göre QPCR'nin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla; DHB'ye göre %44 ve %83; TB'ye göre 0 ve %99, PCR'ye göre %54 ve %100 olarak tespit edilmiştir (Tablo V).

Ayrıca, 121 kültür örneğine ait duyarlılık ve özgüllük değerlerindeki değişim de belirlenmiştir. Buna göre; QPCR'in duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla, DHB'ye göre %67 ve %96, TB'ye göre %33 ve %98, PCR'ye göre ise %66 ve %100 olduğu tespit edilmiştir (Tablo VI).

**Tablo IV. *D. fragilis*'in Pozitif Bulunma Sıklığının İshal Durumuna Göre Dağılımı**

Yöntem	İshal durumu				Toplam	
	Var		Yok			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
DHB	-	-	13	12.2	13	10.7
TB	-	-	2	1.9	2	1.7
PCR	1	6.6	6	5.7	7	5.8
QPCR	-	-	13	12.2	13	10.7

DHB: Demir hemotoksilen boyama, TB: Trikróm boyama, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, QPCR: Kantitatif real-time PCR. Hasta grubu (n= 101), Kontrol grubu (n= 20) ( $\chi^2= 2.244$ ,  $p< 0.05$ ).

**Tablo V. QPCR'a Göre DHB, TB ve PCR Yöntemlerinin Dışkı Örneklerindeki Duyarlılık ve Özgüllük Değerleri**

Yöntem		QPCR			
		Pozitif	Negatif	Duyarlılık %	Özgüllük %
DHB	Pozitif	6	8	46	93
	Negatif	7	100		
TB	Pozitif	-	1	0	99
	Negatif	13	107		
PCR	Pozitif	7	-	54	100

DHB: Demir hemotoksilen boyama, TB: Trikróm boyama; PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, QPCR: Kantitatif real-time PCR. Hasta grubu (n= 101), Kontrol grubu (n= 20).

**Tablo VI.** QPCR'a Göre DHB, TB ve PCR Yöntemlerinin Kültür Örneklerindeki Duyarlılık ve Özgüllük Değerleri

Yöntem	QPCR			Duyarlılık %	Özgüllük %
	Pozitif	Negatif			
DHB	Pozitif	2	5	67	96
	Negatif	1	113		
TB	Pozitif	1	3	33	98
	Negatif	2	115		
PCR	Pozitif	2	-	66	100
	Negatif	1	108		

DHB: Demir hemotoksilen boyama; TB: Trikróm boyama, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu. Hasta grubu (n= 101), Kontrol grubu (n= 20).

## TARTIŞMA

*D. fragilis*, insanlarda gastrointestinal sisteme yerleşen patojen bir parazittir. Yaşam döngüsü, bulaş yolu hakkında bilgi eksikliği, aksenik kültürde üretilmemesi ve tanı testlerinin yetersizliği gibi kısıtlılıklar *D. fragilis* ile ilgili epidemiyolojik çalışmaların artmasına sebep olmuştur<sup>14-18</sup>. Parazitin kullanılan tanı yöntemlerine göre direkt bakı ve boyama yöntemleri ile tanısı zor olması sebebiyle dünyadaki insidansı değişiklik göstermektedir<sup>8-10</sup>.

Çalışmaya dahil edilen gastrointestinal şikayeti olan toplam 101 hastadan ve 20 kişilik sağlıklı gönüllüden oluşan kontrol grubundan elde edilen örnekler ile *D. fragilis*'in tanısında kullanılan QPCR, DHB, TB, PCR ve Robinson kültür yöntemleri karşılaştırılmıştır.

HIV/AIDS ile enfekte hastanın 82 dışkı örneğinin incelendiği bir çalışmada, örnekler DHB ile boyanmış ve *D. fragilis*'i belirlemede diğer tekniklere oranla bu yöntemin 2.7 kat daha hassas olduğu bildirilmiştir<sup>19</sup>. Gastrointestinal şikayeti olan hastalarda yapılan başka bir çalışmada, mikroskopisi pozitif 31 hastanın 29'u PCR yöntemi ile pozitif olarak saptanmıştır ve PCR yönteminin %100 duyarlı ve %93.5 özgül olduğu bildirilmiştir<sup>14</sup>. Dışkı örneklerinin (n= 6750) incelendiği bir diğer çalışmada, kalıcı boyama yöntemi ile pozitif bulunan 60 dışkı örneği PCR yöntemiyle doğrulanmıştır. Hastaların 32'sinin ishal ve abdominal karın ağrısı şikayeti bulunan kronik semptomlu hastalar olduğu bildirilmiştir. QPCR yönteminin; dışkı örneklerinde %100 duyarlılık ve özgüllük göstermesi, aynı zamanda iki saat gibi daha kısa bir sürede sonuç verilebilmesi, hem tanı süresinin hem de kontaminasyon riskinin azaltılmasıyla konvansiyonel PCR'ye göre avantajlı olduğu bildirilmiştir<sup>15,20</sup>. Calderaro ve arkadaşları<sup>21</sup> tarafından yapılan ve *D. fragilis* 5.8S rDNA'sını hedef alan QPCR yöntemiyle kültür yöntemi uygulanan intestinal parazit şüpheli 491 hastadan alınan 959 dışkı örneği karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda kültür yöntemine ek olarak QPCR'de 117 örneğin daha pozitif olduğu belirlenmiştir. Gastrointestinal şika-

yeti olan ve yaşları 0-18 arasında değişen çocuk hastalarda intestinal protozoonları belirlemek için yapılan bir çalışmada, 163 çocuk hastanın dışkı örneklerinin 114'ünün multipleks QPCR ile *Blastocystis*, *D. fragilis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* türleri ve *Entamoeba* türleri bakımından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Çocuk hastaların 101'inin *D. fragilis*, 49'unun ise *Blastocystis hominis* ile enfekte iken 47'sinin ise başlıca *D. fragilis* olmak üzere birden fazla parazit kombinasyonu ile enfekte olduğu bildirilmiştir<sup>22</sup>. Retrospektif olarak yapılan bir çalışmada, kronik karın ağrısı olan 132 ve gastrointestinal şikayeti olmayan 77 çocukta, multipleks QPCR yöntemi kullanarak *D. fragilis*'i belirlemek amaçlanmıştır. Bu çalışmada 132 hastanın 57'sinde, kontrol grubunda ise 77 kişiden 39'unda *D. fragilis*'in pozitif olduğu belirlenmiştir<sup>23</sup>. Başka bir çalışmada, SSU rRNA genini hedef alan 5'nükleaz bazlı (TaqMan) QPCR, konvansiyonel PCR ve modifiye edilmiş DHB yöntemleri karşılaştırılmıştır. Toplamda 200 hastanın mikroskopi ile 50'sinin (%92.4 duyarlılık ve %98.7 özgüllük), konvansiyonel PCR ile 48'inin (%88.9 duyarlılık ve %100 özgüllük), QPCR ile 51'inin (%100 duyarlılık ve özgüllük) pozitif olduğu bildirilmiştir<sup>24</sup>. Altı yüz elli dışkının 35 (%5.4)'inin *D. fragilis* açısından QPCR ile pozitif bulunduğu bir çalışmada, konvansiyonel PCR ile 15'i, MBD kültür yöntemiyle 14'ü, TYGM-9 kültür yöntemiyle 10'u, mikroskopi ile 12'si pozitif bulunmuştur. Diğer tanı yöntemlerine kıyasla QPCR'de daha fazla pozitif sonuç bildirilmiştir. Yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin sırasıyla, QPCR'de %100, konvansiyonel PCR'de %42.9 ve %100, MBD kültüründe %40 ve %100, TYGM-9 besiyerinde %28.6 ve %100, mikroskopide ise %34.3 ve %99 olduğu gösterilmiştir<sup>8</sup>. Konu ile ilgili olarak Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Enflamatuvar bağırsak sendromu bulunan hastalarda direkt mikroskopi, TB ve spesifik kültür yapılarak *D. fragilis* ve *B. hominis* sıklığının araştırıldığı bir diğer çalışmada, *D. fragilis*'in hiç tespit edilmediği bildirilmiştir<sup>25</sup>. İshali olan 400 hastada *D. fragilis*'in patojenitesinin incelendiği bir çalışmada, 35 *D. fragilis* pozitif hastanın 34'ünde seknidazol ile tedavisinden sonra parazite rastlanmamıştır. Çalışmada sonuç olarak, *D. fragilis*'in sık görüldüğü, patojenik olduğu ve seknidazolün tedavide etkili olduğu tespit edilmiştir<sup>26</sup>. Parazitoloji laboratuvarına başvuran 5178 hastanın dışkı örneklerinde bağırsak parazitlerinin sıklığının N-L ile araştırıldığı bir başka çalışmada 10 (%1.8) hasta *D. fragilis* pozitif olarak tespit edilmiştir<sup>27</sup>.

Çalışmada, hasta ve kontrol grubu örnekleri DHB ve TB yöntemiyle boyanmıştır. TB yönteminde, görece daha kısa sürede örnek inceleme avantajı sağlanmasına rağmen, her iki gruba ait örneklerde DHB ile yüksek oranda pozitiflik tespit edilmiş ve DHB yönteminin parazitin morfolojik olarak belirlenmesinde daha avantajlı olduğu tespit edilmiştir. Kültür sonrası *D. fragilis* pozitifliğinin farklı tanı yöntemlerine göre gruplar arası dağılımı değişmiş, pozitiflik oranı kültürden sonra daha yüksek bulunmuştur. Parazitin kültürünün uzun süre devam ettirilememesinden dolayı, devam eden pasajlardan sonra pozitiflik oranında düşüş tespit edilmiştir.

*D. fragilis* enfeksiyonu ile ishal arasındaki ilişkiyi araştırmak için Al-Hindi ve Shammala tarafından Al-Nuseirate Mülteci Kampı Kliniğinde yapılan çalışmaya yaşları 1-75 arasında değişen, ishal ve karın ağrısı şikayeti olan kişiler dahil edilmiştir. Yapılan çalışmada;

*D. fragilis* ile enfekte 28 kişinin %96.4'ünün karın ağrısı, %71.4'ünün ishal şikayeti olduğu belirtilmiştir<sup>28</sup>. 2011-2013 yılları arasında akut gastroenteritli çocuklarda *D. fragilis*'in belirlenmesi için Júlio ve arkadaşları<sup>29</sup> tarafından yapılan çalışmada, 103 (%58.5)'ü erkek, 144 (%81.8)'ü 0-5 yaş arasında olan ve 32 (%18.2)'si 6 yaş üstü olan toplam 176 çocuk çalışmaya dahil edilmiştir. Çocuk hastaların %6.3 (11/176)'ü *D. fragilis* açısından pozitif bulunmuş ve enfekte hastalarda kusma, karın ağrısı, ateş ile birlikte ishali gözlemlendiği belirtilmiştir. Çalışmamızda incelemesi yapılan toplam 121 dışkı örneğinin 15'inin ishali olduğu tespit edilmiştir. İshali olan dışkılarından 1 (%6.6)'inin sadece PCR yöntemiyle pozitif olduğu saptanmıştır. Gastrointestinal şikayeti olan hastalarda ishali görülmesi durumunda, *D. fragilis* tanısı için sadece bu belirtinin yeterli olmayacağını düşünmekteyiz.

Bu çalışmada kullanılan boyama yöntemleri PCR ve QPCR yöntemleri ile karşılaştırıldığında, boyama sonrası mikroskopide *D. fragilis* pozitif olarak bulunan örnek sayısının daha fazla olduğu görülmüştür. PCR yöntemi boyama yöntemine göre daha hassas bir yöntem olmasına rağmen, pozitif örnek sayısının daha az görülmesi; *D. fragilis*'in morfolojik olarak birbirlerine benzerlik gösteren parazitlerle karıştırılabilemesinden ve kültür yönteminin sadece bu parazit için özgül olmayıp birçok parazitin besiyeri ortamında üremesi nedeniyle yanlış pozitiflik elde edilmesinden kaynaklanmaktadır. Konvansiyonel PCR'de negatif olduğu tespit edilen örneklerin QPCR'de pozitif olduğu görülmüştür. Bu durum, PCR yönteminin QPCR yöntemi kadar hassas olmamasından kaynaklanmaktadır. Kültürden önce incelenen dışkı örneklerinde QPCR yöntemi ile kıyaslanan yöntemlerin duyarlılıkları ve özgüllükleri sırasıyla DHB ile %46 ve %93; TB ile %0 ve %99; PCR ile %54 ve %100 olarak bulunmuştur. Kültürden sonra ise QPCR yöntemi ile kıyaslanan yöntemlerin duyarlılıkları ve özgüllükleri sırasıyla DHB ile %67 ve %96; TB ile %33 ve %98; PCR'de %67 ve %100 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak; hasta ve kontrol gruplarına uygulanan konvansiyonel ve moleküler yöntemlerin (DHB, TB, PCR ve QPCR) duyarlılıkları ve özgüllükleri karşılaştırıldığında önemli bir fark olduğu gözlemlenmiş olup çalışma konvansiyonel ve moleküler yöntemler açısından, karşılaştırıldığı diğer çalışmaları destekler nitelikte bulunmuştur. *D. fragilis*'in tanısında boyama yöntemlerini değerlendirmek deneyim gerektirmekte, aksi takdirde sık yanlış pozitif veya negatif sonuçların elde edildiği görülmektedir. Ayrıca, daha kısa zamanda kesin tanı konulması ve tedaviye başlanması bakımından QPCR yönteminin avantajlı olduğu, QPCR'ın bulunmadığı durumlarda ise DHB ve konvansiyonel PCR yöntemlerinin birlikte kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmanın, Türkiye'de *Dientamoeba* üzerine yapılacak olan epidemiyolojik çalışmalarda verilerin ortaya konması ile bilime katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, *D. fragilis*'in hayat döngüsünde; bulaşma mekanizmasında ve taşınmasında çok fazla bilinmeyen olması sebebiyle ileri araştırmaların yapılması kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Girginkardeşler N, Kurt Ö. Özcel'in tıbbi parazit hastalıkları: *Dientamoeba fragilis*, pp: 411-21. Türkiye Parazitoloji Derneği; 2007
2. 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.
3. Burrows RB, Sweedlow M. *Enterobius vermicularis* as a probable vector of *Dientamoeba fragilis*. Am J Trop Med Hyg 1956; 5(2): 258-65.
4. Katz D, Taylor DN. Parasitic infections of the gastrointestinal tract. Gastroenterol Clin North Am 2001; 30(3): 797-815.
5. Preiss U, Ockert G, Broemme S, Otto A. On the clinical importance of *Dientamoeba fragilis* infections in childhood. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1990; 35(1): 27-34.
6. Cuffari C, Oligny L, Seidman EG. *Dientamoeba fragilis* masquerading as allergic colitis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998; 26(1): 16-20.
7. Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. Am J Trop Med Hyg 2010; 82(4): 614-9.
8. Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. Comparison of microscopy, two xenic culture techniques, conventional and real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in clinical stool samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29(4): 411-6.
9. Windsor J, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, Jones SK, Whiteside TM. Detection of *Dientamoeba fragilis* by culture. Br J Biomed Sci 2003; 60(2): 79-83.
10. Verweij JJ, Mulder B, Poell B, van Middelkoop D, Brienen EA, van Lieshout L. Real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples. Mol Cell Probes 2007; 21(5-6): 400-4.
11. Windsor JJ, Johnson EH. *Dientamoeba fragilis*: the unflagellated human flagellate. Br J Biomed Sci 1999; 56(4): 293.
12. Stark DJ, Beebe N, Marriott D, Ellis JT, Harkness J. Dientamoebiasis: clinical importance and recent advances. Trends Parasitol 2006; 22(2): 92-6.
13. Röser D, Nejsum P, Carlsgart AJ, Nielsen HV, Stensvold CR. DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*. Exp Parasitol 2013; 133(1): 57-61.
14. Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. Int J Parasitol 2005; 35(1): 57-62.
15. Peek R, Reedeker FR, van Gool T. Direct amplification and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from human stool specimens. J Clin Microbiol 2004; 42(2): 631-5.
16. Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. 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.
17. Johnson JA, Clark CG. Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. J Clin Microbiol 2000; 38(12): 4653-4.
18. Windsor J, Clark C, Macfarlane L. Molecular typing of *Dientamoeba fragilis*. Br J Biomed Sci 2004; 61(3): 153.
19. Garcia JA, Cimerman S. Detection of *Dientamoeba fragilis* in patients with HIV/AIDS by using a simplified iron hematoxylin technique. Revista da SBMT 2012; 45(2): 156-8.
20. Van Gool T, Weijts R, Lommerse E, Mank T. Triple faeces test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22(5): 284-90.
21. Calderaro A, Gorrini C, Montecchini 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.
22. Maas L, Dorigo-Zetsma J, Groot C, Bouter S, Plötz FB, van Ewijk BE. Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. Clin Microbiol Infect 2014; 20(6): 545-50.
23. de Jong MJ, Korterink JJ, Benninga MA, Hilbink M, Widdershoven J, Deckers-Kocken JM. *Dientamoeba fragilis* and chronic abdominal pain in children: a case-control study. Arch Dis Child 2014; 99(12): 1109-13.

24. Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. 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.
25. Mumcuoğlu I, Coşkun FA, Aksu N, Pürnak T, Güngör C. Role of *Dientamoeba fragilis* and Blastocystis spp. in Irritable Bowel Syndrome. Türkiye Parazitol Derg 2013; 37(2): 73-7.
26. Girginkardeşler N, Coşkun S, Balcioğlu CI, Ertan P, Ok UZ. *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. Clin Microbiol Infect 2003; 9(2): 110-3.
27. Tamer GS, Calışkan S, Willke A. Distribution of intestinal parasites among patients who presented at the parasitology laboratory of the Kocaeli University School of Medicine Hospital. Türkiye Parazitol Derg 2008; 32(2): 126-9.
28. Al-Hindi AI, Shammala BM. *Dientamoeba fragilis* in Gaza Strip: a neglected protozoan parasite. Iran J Parasitol 2013; 8(2): 249-55.
29. Júlio C, Furtado C, Rocha R, Escobar C, Brito MJ, Oleastro M. Detection of *Dientamoeba fragilis* in Portuguese children with acute gastroenteritis between 2011 and 2013. Parasitology 2015; 142(11): 1398-403.