

Enterobius vermicularis Saptanan Olguların Dışkılarında PZR Yöntemi ile Dientamoeba fragilis Varlığının Araştırılması

Investigation of Dientamoeba fragilis Frequency in Faecal Samples of Patients with Enterobius vermicularis Infection by Polymerase Chain Reaction

İbrahim Yıldız¹, Sema Ertuğ¹, Evren Tileklioğlu¹, Erdoğan Malatyalı¹, Özgür Güçlü², Hatice Ertabaklar¹

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

²Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Üniversitesi, Sultanhisar Meslek Yüksek Okulu, Aydın, Türkiye

Cite this article as: Yıldız İ, Ertuğ S, Tileklioğlu E, Malatyalı E, Güçlü Ö, Ertabaklar H. Investigation of Dientamoeba fragilis Frequency in Faecal Samples of Patients with Enterobius vermicularis Infection by Polymerase Chain Reaction. Türkiye Parazitoloj Derg 2021;45(3):195-200.

ÖZ

Amaç: Dientamoeba fragilis (D. fragilis), amip benzeri morfolojiye sahip, gastrointestinal yerleşimli, kamçılı bir protozondur. Parazitin Enterobius vermicularis (E. vermicularis) yumurtalarıyla taşındığı hipotezi kabul görmektedir. Çalışmamızda D. fragilis ve E. vermicularis birlikteliğini incelemek, bulunan D. fragilis'lerin genotiplerini belirlemek ve D. fragilis tanısında yaygın olarak kullanılan trikrom boyama ile polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemlerini karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmamızda Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Laboratuvarı'na 1 Ekim 2017-1 Ekim 2018 tarihleri arasında dışkı ve selofan lam örneği birlikte gönderilmiş toplam 391 olgu örneği incelenmiştir. Selofanlı lam örneklerinde E. vermicularis saptanan tüm gönüllü olguların (74 olgu) dışkı örneği ile E. vermicularis negatif 74 olgunun dışkı örneği çalışılmıştır. Tüm dışkıları trikrom boyama ve PZR yöntemleri ile D. fragilis varlığı açısından incelenmiştir. Saptanan D. fragilis izolatlarının 18S ribozomal RNA bölgesi sekanslanmıştır. Olguların demografik özellikleri ve kliniği değerlendirilmiştir.

Bulgular: Toplam 148 olgunun 42'sinde (%28,37) D. fragilis saptanmıştır. D. fragilis pozitif olan 42 olgunun %66,6'sını E. vermicularis pozitif olgular oluşturmuş ve iki parazitin birlikteliği anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Sekanslanan tüm izolatlar genotip 1 olarak saptanmıştır. Klinik bulgular, yaşanan bölge ve cinsiyet ile parazit varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p>0,05).

Sonuç: Araştırmamızda D. fragilis'in sıklıkla E. vermicularis ile birliktelik gösterdiği ve bu olgularda D. fragilis varlığına ayrıca dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Yanlış sonuçları engellemede, yüksek duyarlılığa sahip PZR gibi yöntemlerin önemi bir kez daha görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Dientamoeba fragilis, PZR, Enterobius vermicularis, trikrom

ABSTRACT

Objective: Dientamoeba fragilis (D. fragilis) is a flagellated protozoan with an amoeba-like morphology, located in the gastrointestinal tract. The hypothesis was that the parasite was transported by Enterobius vermicularis (E. vermicularis) eggs. This study aimed to determine the association of D. fragilis and E. vermicularis with the genotypes of the identified strain of D. fragilis. Results of trichrome staining were compared with those of polymerase chain reaction (PCR), which is widely used in the diagnosis of D. fragilis.

Methods: A total of 391 samples were obtained. The stool and cellophane slide samples were sent together to the Parasitology Department Laboratory, Faculty of Medicine, Aydın Adnan Menderes University, between 1 October 2017 and 1 October 2018. Stool samples of all patients with E. vermicularis (n=74) and without E. vermicularis (n=74) infection were used. All samples were examined for the presence of D. fragilis by trichrome staining and PCR. The 18S ribosomal RNA region of D. fragilis isolates was sequenced. Demographic characteristics and clinical findings of the patients were evaluated.

Results: D. fragilis was detected in 42 (28.37%) of 148 samples; 28 (66.6%) of them were detected in patients with E. vermicularis infection. The coexistence of two parasites was significant (p<0.05). All isolates sequenced were genotype 1. No significant relationship was found between the presence of parasites and clinical findings, living area and gender (p>0.05).

Conclusion: D. fragilis is frequently associated with E. vermicularis, so the presence of D. fragilis should be also considered in affected patients. The use of high-sensitivity molecular methods such as PCR is important in preventing false results.

Keywords: Dientamoeba fragilis, PCR, Enterobius vermicularis, trichrome

Geliş Tarihi/Received: 09.12.2020 Kabul Tarihi/Accepted: 30.01.2021

Yazar Adresi/Address for Correspondence: İbrahim Yıldız, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Tel/Phone: +90 256 213 7839 25 **E-Posta/E-mail:** dr.ibrahimyildiz@gmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-8525-6280

GİRİŞ

İntestinal yerleşimli protozoonlar arasında yer alan *Dientamoeba fragilis* (*D. fragilis*), 5-15 µm boyutlarında olup dışkı örneklerinde sıklıkla trofozoit formunda saptanmaktadır. Dünya çapında kozmopolit bir dağılım göstermektedir (1). Parazit 1918 yılında apatojen bir amip türü olarak tanımlanmıştır. Ancak, yıllar içerisinde yapılan detaylı morfolojik ve genetik çalışmalar sonucu parazitin evrimsel olarak kamçılı trikomonadlar grubunda yer aldığı ortaya konulmuştur. Enfeksiyon olguların çoğunda asemptomatik olarak geçirilmekte, semptomatiklerde ise iştah kaybı, ishal, konstipasyon ve bulantı-kusma gibi non-spesifik gastrointestinal bulgular görülebilmektedir (2).

Tanımlanmasının üzerinden yüzyıldan fazla zaman geçmiş olmasına karşın *D. fragilis*'in kist formunun varlığı kesin olarak saptanamamıştır. Yapılan güncel çalışmalarda parazitin kist formunun da bulunduğu ancak dışkı örneklerinde sıklıkla trofozoit formunun görüldüğü belirtilmektedir. Trofozoit formunun ise dış ortam koşullarına son derece dayanıksız olduğu göz önüne alındığında fekal-oral bulaşta rolünün olmadığı öngörülmektedir. *Dientamoeba fragilis*'in bulaşının *Enterobius vermicularis* (*E. vermicularis*) yumurtaları ile taşınan trofozoitler aracılığıyla olduğu hipotezi, halen araştırmacılar tarafından kabul gören en yaygın görüştür (3).

D. fragilis'in kesin tanısı, karakteristik nükleer yapının boyanmamış dışkı örneklerinde görülememesi nedeniyle kalıcı boyama yöntemlerini gerektirmektedir. Parazitin dış ortama oldukça dayanıksız yapısı, değişken bir morfolojiye sahip oluşu, deneyimli laboratuvar çalışanına gereksinim duyulması parazitin kalıcı boyalı preparatlarla da sıklıkla tanısının atlanmasına neden olmaktadır ve son yıllarda moleküler yöntemlerin bu parazitin tanısındaki popülaritesi artmıştır (2). *D. fragilis* varlığının saptandığı olgular tüm kıtalarda birçok ülkeden bildirilmiş olmakla beraber gelişmiş ülkelerden bildirilen çalışmalar gelişmekte olanlara oranla daha fazla olduğu dikkati çekmektedir (4,5). Parazitin görülme sıklığının bildirildiği çok sayıda çalışma literatürde yer almaktadır. Ancak, bu çalışmalarda kullanılan yöntemlerin farklı olması nedeniyle oranlar büyük farklılık gösterebilmektedir (%0,2-82). Ayrıca, diğer bağırsak parazitlerinin aksine gelişmiş ülkelerde daha yüksek görülme sıklıkları rapor edilmiş olsa da bu farklılıkların güvenilirliği sınırlıdır, çünkü tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri büyük oranda değişiklik göstermektedir. Ayrıca çalışmaların tasarlanış şekilleri arasındaki farklılıklar da bildirilen oranlardaki büyük farklılıkların nedeni olabilir. Bunun yanı sıra, moleküler yöntemlerin kullanıldığı prevelans çalışmaları göz önüne alındığında; Avrupa, Amerika ve Orta Doğu ülkelerinde parazitin görülme sıklığının oldukça yüksek (>%20) olduğu rapor edilmiştir (5-7). Bu çalışmada öncelikle *D. fragilis* ile *E. vermicularis* birlikteliğinin araştırılması ve saptanan izolatların genotiplendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, *D. fragilis* olgularının demografik özelliklerinin ve klinik bulgularının değerlendirilmesi çalışmanın bir diğer amacını oluşturmaktadır.

YÖNTEMLER

Örnekler

Ekim 2017-Ekim 2018 arasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Laboratuvarı'na gönderilen 391 olguya ait rutin selofanlı lam ve dışkı örnekleri çalışmamız kapsamında değerlendirilmiştir. Selofanlı lam örneklerinde *E.*

vermicularis yumurtaları saptanan ardışık 74 olgunun dışkı örneği ile aynı tarih aralığında *E. vermicularis* saptanmayan 74 olguya ait dışkı örneği basit rastgele örnekleme metodu ile araştırmaya alınmıştır. Olgulara ulaşılarak bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatılmış ve gönüllüler çalışmaya alınmıştır. Gönüllü olan olgulara cinsiyet, yaş, semptomlar ve yaşanan yer bilgilerini kapsayan anket uygulanmıştır.

Direkt Mikroskopi, Boyama ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalışma kapsamına alınan 148 dışkı örneğinin tamamı trikrom boyama yöntemi ile boyanmış ve hazırlanan boyalı preparatlar 100X büyütme ile mikroskop altında *D. fragilis* açısından incelenmiştir. Ayrıca tüm dışkı örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış ve PZR yöntemi ile *D. fragilis* DNA'sının varlığı açısından incelenmiştir. QIAamp Fast DNA stool mini kit kullanılarak yapılan genomik DNA izolasyonu aşamasında kit prosedürü üretici firmanın bildirildiği şekilde uygulanmıştır. PZR yöntemi için DF400 (ileri 5-TATCGGAGGTGGTAATGACC-3) ve DF1250 (geri 5'-CATCTTCCTCCTGCTTAGACG-3') primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon koşulları: ön denatürasyon 94 °C üç dk, 30 döngü (denatürasyon: bir dk 94 °C, annealing: 57 °C'de 1,5 dk ve elongasyon 72 °C'de iki dk), final uzama ise 72 °C'de 10 dk olarak uygulanmıştır.

Sekans Analizi ve Genotiplerin Belirlenmesi

Saptanan *D. fragilis*'ler alt tiplerinin belirlenmesi amacıyla ticari bir firmaya sekanslanması amacıyla gönderilmiştir. Basic local alignment search tool (BLAST) kullanılarak *D. fragilis* 18S rRNA sekansları Genbank'da yer alan mevcut sekanslar ile karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda sekansların tam veya en yüksek benzerliğe sahip oldukları alt tipler belirlenmiş ve evrim ağacı oluşturulmuştur. İzolatlar arasındaki genetik uzaklık ilişkisi 18S rRNA gen sekansları temel alınarak belirlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Anket verileri SPSS for Windows 15.0 kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Parazitlerin birlikteliğini ve tanı yöntemlerini karşılaştırmak ayrıca demografik özellikler ve klinik bulgular ile parazit varlığı arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla ki-kare testi uygulanmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya 67'si kadın (%45,28), 81'i erkek (%54,72) toplam 148 gönüllü dahil edilmiş olup olguların yaş aralığı 1 ile 85 arasında (ortalama: 23,87±11,89) değişmektedir. Trikrom boyama yöntemi ile *E. vermicularis* pozitif 74 olgunun üçünde (%4), PZR ile ise 28 olguda (%37,8) *D. fragilis* pozitifliği belirlenmiştir. Trikrom boyama yöntemi ile kontrol grubundaki 74 olgunun birinde (%1,3), PZR ile 14'ünde (%18,9) *D. fragilis* pozitifliği görülmüştür (Tablo 1). İstatistiksel olarak *D. fragilis* ile *E. vermicularis*'in birlikteliğinin (Tablo 2) anlamlı olduğu saptanmıştır (p<0,05).

Genotiplendirme için basit rastgele örnekleme metoduyla 26 izolat seçilerek bunların sekans analizi yapılmıştır. Sekanslanan tüm *D. fragilis* izolatları genotip 1 olarak saptanmıştır. Dizileme için gönderilen 26 örnek analiz edildiğinde 24 izolatın sekanslarının tamamen aynı olduğu belirlenmiştir ve bu dizi Genbank'a (referans no: AduDf14, erişim kodu: MN560149) kaydedilmiştir. Bunların dışındaki iki sekansın da birbiriyle aynı olduğu

saptanmış olup Genbank'a ayrı bir dizi olarak kaydedilmiştir (referans no: AduDf138, erişim kodu: MN560150). Çalışmamızda elde ettiğimiz AduDf14 ile genotip 1 arasında bir baz farklılık bulunmakta olup BLAST analizine göre iki sekans arasında %99,75 benzerlik saptanmıştır. AduDf138 olarak adlandırıldığımız diğer izolat genotip 1 ile karşılaştırıldığında ise %99,63 benzerlik ve iki baz farklılığı bulunmuştur. Çalışmamızdaki diziler genotip 2 ile karşılaştırıldığında benzerlik oranları AduDf14 için %95,01 ve AduDf138 için %94,89 olarak saptanmıştır. Sekanslanan tüm *D. fragilis* izolatları ve referans diziler filogenetik analiz için birlikte değerlendirilerek evrim ağacı oluşturulmuştur (Şekil 1). Elde edilen veriler ışığında sekanslanan 26 izolatın da genotip 1'e ait olduğu saptanmıştır.

Olguların yaşadıkları yer ve cinsiyetleri ile parazit varlığı arasında anlamlılık saptanamamıştır (Tablo 3). *D. fragilis* pozitifliği ile olguların semptomları arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir (Tablo 4).

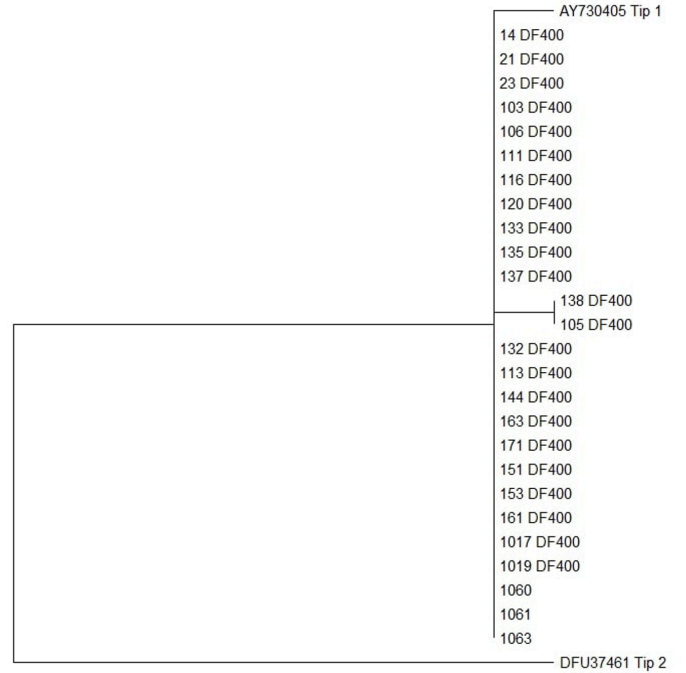
TARTIŞMA

İlk defa Jepps ve Dobell tarafından 20. yy başlarında klinik önemi olmayan bir amip olarak tanımlanan *D. fragilis*'in günümüzde insan kolonunda yerleşen kamçılı bir protozoon olduğu bilinmektedir. Morfolojik olarak amip benzeri bir yapıda ve 5-15 µm boyutlarında olan parazit, dışkı incelemelerinde çoğunlukla çift çekirdekli trofozoit formu ile görülmektedir. Parazitin tanımlanmasından itibaren geçen bir asırlık süre boyunca yapılan ileri genetik, immünolojik ve morfolojik incelemeler sonucunda *D. fragilis*'in filogenetik olarak trikomonad kamçılılar ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (1,8). Son yıllarda yapılan kısıtlı sayıdaki çalışmada parazitin kist formunun saptandığı rapor edilmiş olsa da bu formun varlığı halen kesinlik kazanmamıştır. Kist formunun olabileceği görüşü bulaş yolu hakkında yeni fikirlerin ortaya çıkmasına neden olsa da parazitin *E. vermicularis* yumurtalarıyla fekal-oral olarak kişiden kişiye bulaştığı hipotezi araştırmacılar tarafından kabul edilen en yaygın görüş olarak varlığını sürdürmektedir. Dış ortam şartlarında canlılığını kısa sürede kaybeden *D. fragilis* trofozoitlerinin bir nematod olan *E.*

vermicularis yumurtaları içerisinde korunarak mide asidinden geçtiği ve bağırsaklara ulaştığı yaygın olarak kabul edilmektedir (8). Cerva ve ark. (9) iki parazitin birlikteliğini araştırdıkları çalışmalarında 414 apendiks örneğini incelemiştir. İncelenen apendiks kesitlerinde *D. fragilis* %4,8, *E. vermicularis* ise %8,7 oranında pozitif bulunmuştur. Ayrıca iki parazitin birlikteliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Nematod yumurtalarının *D. fragilis* bulaşındaki rolünü araştıran Ockert, saflaştırdığı *E. vermicularis* yumurtalarını oral yoldan alarak *D. fragilis* ile kendisini enfekte etmiştir (10). Tanı yöntemi olarak PZR'nin seçildiği 2012-2017 tarihleri arasında Avusturya'da gerçekleştirilen araştırmada *D. fragilis* pozitif 163 olgunun retrospektif incelemesinde olguların %23,3'ünün eş zamanlı olarak *E. vermicularis* ile de enfekte olduğu görülmüştür (11). Ülkemizde iki parazitin birlikteliğinin incelemek amacıyla üç gün ard arda dışkı ve selofan bant örneği alınan olgularda, *D. fragilis* ve *E. vermicularis* birlikteliğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0,05$) bildirilmiştir (12). Yaptığımız çalışmada *E. vermicularis* negatif olgulardan oluşan kontrol grubundaki 74 olgunun 14'ü (%18,91) ve çalışma grubundaki *E. vermicularis* ile enfekte 74 olgunun 28'i (%37,83) *D. fragilis* varlığı açısından pozitif bulunmuştur. Kontrol grubundaki (*E. vermicularis* negatif) olgularda *D. fragilis* saptanma oranı *E. vermicularis* pozitif olguların yarısı kadar olup saptanan değer istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) çıkmıştır. Aynı parazitlerin birlikteliğinin incelendiği diğer çalışmalar ile bulgularımız benzerlik göstermektedir.

Tablo 1. Tanı yöntemlerinin karşılaştırılması		
<i>Enterobius vermicularis</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i>	
Selofan bant	PZR	Trikrom
Pozitif (n=74)	Pozitif n=28 (%37,84)	Pozitif n=3 (%4,05)
	Negatif n=46 (%62,16)	Negatif n=71 (%95,95)
Negatif (n=74)	Pozitif n=14 (%18,91)	Pozitif n=1 (%1,35)
	Negatif n=60 (%81,09)	Negatif n=73 (%98,65)

PZR: Polimeraz zincir reaksiyon



Şekil 1. Genotip 1 (AY30405) ve genotip 2 (DFU37461) ile elde edilen AduDf14 ve AduDf138 dizilerinin evrimsel uzaklıkları

Tablo 2. *Enterobius vermicularis* ile *Dientamoeba fragilis* birlikteliğinin değerlendirilmesi

		<i>E. vermicularis</i>				Toplam	χ^2	p
		Pozitif (n=74), negatif (n=74)						
		Sayı	%	Sayı	%			
<i>D. fragilis</i>	Pozitif	28	66,66	14	33,34	42	6,515	0,010
	Negatif	46	43,40	60	56,60	106	-	-

Tablo 3. Yerleşim yeri ve cinsiyet ile *Dientamoeba fragilis* varlığı arasındaki ilişki

		<i>Dientamoeba fragilis</i> Pozitif (n=42), negatif (n=106)							
		Sayı	%	Sayı	%	Toplam	χ^2	P	
Cinsiyet	Kadın	17	40,48	50	47,17	67	0,544	0,460	
	Erkek	25	59,52	56	52,83	81	-	-	
Yerleşim	İl	12	28,57	34	32,09	46	-	-	
	İlçe	12	28,57	46	43,39	58	5,205	0,074	
	Köy	18	42,86	26	24,52	44	-	-	

Tablo 4. Semptomlar ile *Dientamoeba fragilis* varlığı arasındaki ilişkinin karşılaştırılması

		<i>Dientamoeba fragilis</i> Pozitif (n=42), negatif (n=106)							
Semptom	Sayı	%	Sayı	%	Toplam	χ^2	p		
Kaşıntı	12	21,05	45	78,05	57	1,139	0,237		
Karın ağrısı	12	40	18	60	30	2,500	0,113		
İştah kaybı	10	21,27	37	78,73	47	1,709	0,191		
Gaz	8	33,33	16	66,66	24	0,346	0,556		
Bulantı-kusma	6	33,33	12	66,66	18	0,247	0,618		
Kabızlık	3	50	3	50	6	1,438	0,230		
İshal	2	16,66	10	83,33	12	0,881	0,347		
Kilo kaybı	2	15,38	11	84,62	13	1,183	0,276		

Farklı ülkelerde yapılan genotiplendirme çalışmalarında saptanan *D. fragilis* izolatlarının sıklıkla genotip 1'e ait olduğu göze çarpmaktadır. Geniş kapsamlı bir genotiplendirme çalışmasında *D. fragilis* ile enfekte olguların dışkı örneğinden parazit DNA'sı elde edilmiş ve SSU rRNA analiziyle *D. fragilis* genotipleri belirlenmiştir. Çalışmaya 30'u Avustralya, 19'u Brezilya, 37'si İtalya ve 25'i Danimarka'da ikamet eden toplam 111 olgunun dışkı örneği dahil edilmiş ve bunların 110'ununda saptanan *D. fragilis*'lerin genotip 1'e ait olduğu belirlenmiştir (13). Asemptomatik 126 olgunun incelendiği 2015 tarihli Brezilya merkezli araştırmada 19 örnekte *D. fragilis* DNA'sı saptanmış ve yapılan sekans analizinde tüm izolatların genotip 1'e ait olduğu belirlenmiştir (14). Genotiplendirme konusunda yapılan birçok çalışmaya benzer şekilde bizim araştırmamızda da sekans analizi yaptığımız tüm *D. fragilis* izolatları genotip 1 olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda genotip 2'nin daha nadir saptanması sebebiyle bu alt tipi yakalayabilmek amacıyla örneklem büyüklüğünün yapılacak ileri tarihli çalışmalarda genişletilmesi gerektiği düşünülmüştür.

D. fragilis'in patojenitesi hakkında da farklı görüşler mevcuttur. Bulunduğu konakta sıklıkla asemptomatik olarak varlığını sürdürmesi parazitin apatojen olabileceği veya apatojen alt tiplerinin bulunabileceği fikrini ortaya çıkartmıştır. Vietnam'da klinik bulguları olan 180 olgu ile sağlıklı 88 olgunun dışkısı *D. fragilis* DNA'sının varlığı açısından real-time PZR ile incelenmiş, asemptomatik olguların %2,3'ünde, semptomatiklerin ise %2,1'inde *D. fragilis* DNA'sının saptandığı rapor edilmiştir. *D. fragilis* pozitifliği ile klinik bulgular arasında anlamlı bir ilişki istatistiksel olarak saptanamamıştır (15).

Hollanda'da gastrointestinal sistem yakınmaları olan 132 olgu ile sağlıklı 77 olgu dışkısında real-time PZR ile *D. fragilis* varlığı araştırılmış, sağlıklı olgularda semptomatiklere kıyasla parazitin daha yüksek oranda saptandığı bildirilmiştir (sırasıyla:

%50,6 ve %43,2). Çalışmada ayrıca klinik bulgular ile parazit varlığı arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı vurgulanmıştır (16). Benzer şekilde çalışmamızda da *D. fragilis* pozitifliği ile semptomlar arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p>0,05$). Bulgularımız bu konuda yapılan diğer çalışmalarla benzerlik gösterse de çalışmamızdaki olguların tıp fakültesi hastanesine değişik yakınmalarından dolayı başvuran hastalardan oluşması ve *D. fragilis* varlığından bağımsız olarak olguların tümünün en az bir klinik bulgu göstermesi, *D. fragilis* pozitifliği ile klinik bulgular arasında anlamlı bir ilişki saptanamamasının sebebi olabileceği düşünülmüştür.

Ülkemizde boyama yöntemleri ile *D. fragilis* varlığının araştırıldığı çalışmalarda parazitin prevalansı %0,2 ile %9 oranlarında değişen oranlarda rapor edilmiştir (17,18). Örneklem seçiminde araştırmamıza benzerlik gösteren bir çalışmada Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Laboratuvarı'na gönderilen 400 dışkı örneğinin %8,8'inde *D. fragilis* saptandığı bildirilmiştir (19). Yaptığımız bu çalışmada trikrom boyama metoduyla *D. fragilis* varlığını araştırdığımız 148 dışkıdan %2,7'sinde parazit trofozoitleri görülmüş olup bu konuda ülkemizde yayımlanan diğer veriler ile bulduğumuz oran benzerlik göstermektedir. Ancak *D. fragilis* varlığının araştırıldığı yöntem olarak PZR baz alındığında bildirilen oranlar yükselmektedir. Kurt ve ark. (20) 156 sağlıklı olgudan aldıkları dışkı örneğini PZR ile *D. fragilis* DNA'sının varlığı açısından incelemiş ve gönüllülerin %26,9'unda parazit DNA'sının saptandığını bildirmişlerdir. Olguların sağlıklı gönüllülerden oluşmasına rağmen saptanan yüksek pozitiflik oranı dikkati çekmiştir (20). İzmir'de moleküler yöntemlerin kullanıldığı bir diğer araştırmada 292 olgu dışkısında PZR metodu ile *D. fragilis* DNA'sı araştırılmış ve örneklerinin %18,2'sinde beklenen boyutta bant saptanmıştır (21). Çalışmamıza dahil edilen örneklerde *D. fragilis* varlığı PZR ile araştırıldığında örneklerin %28,37'sinde

D. fragilis DNA'sının olduğu görülmüştür. Bulduğumuz oranın yapılan diğer çalışmalara oranla görece fazla çıkmasının nedeni olarak, çalışılan örneklerinin yarısının *E. vermicularis* pozitif olgulardan elde edilmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Sadece *E. vermicularis* negatif olgular baz alındığında 74 olgunun %18,9'unda PZR ile *D. fragilis* varlığı saptanmış olup bu oran İzmir'de 2010 yılında gerçekleştirilen çalışma ile yakın benzerlik göstermektedir. Tamamı farklı metodların birlikte uygulandığı çalışmalarda kullanılan tanı yöntemine göre saptanan *D. fragilis* oranlarının bariz olarak değiştiği dikkat çekmektedir. Real-time PZR, geleneksel PZR ve trikrom boyama yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmada Sivcan ve ark. (22) 121 olgunun dışkı örneğini *D. fragilis* varlığı açısından incelemiştir. Parazitin varlığını saptamada, real-time PZR ile 13 (%10,7), PZR ile 7 (%5,7) ve trikrom boyama ile iki (%1,7) olgunun dışkısında *D. fragilis* saptandığı bildirilmiştir (22).

SONUÇ

Laboratuvar tanısında sıklıkla boyama ve kültür yöntemleri kullanılan *D. fragilis*'in nativ-lugol gibi direkt mikroskopik yöntemler altında tespit edilmesi oldukça güçtür. Moleküler tekniklerin gelişmesi, kolay ulaşılabilir ve uygulanabilir olmasıyla birlikte *D. fragilis* tanısında bu tekniklerin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Çalışmamızda *D. fragilis*'in sıklıkla *E. vermicularis* pozitif olgulara eşlik edebileceği görülmüş ve bu olgularda *D. fragilis* varlığının araştırılması gerektiği vurgulanmıştır. Ayrıca rutin uygulamada tanısı sıklıkla atlanabilen bir protozoon olan *D. fragilis*'in tanısında yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip PZR, real-time PZR gibi moleküler yöntemlerin yanlış sonuçları önlemek amacıyla kullanılmasının yararlı olabileceği düşünülmüştür. Asemptomatik ve farklı bulgulara sahip semptomatik olguların tümünde saptanan *D. fragilis* suşlarının aynı genotipe sahip olması, *D. fragilis*'in patojen ve apatojen farklı genotiplerinin olabileceğini düşündürmekte ve bu konuyla ilgili yapılacak yeni çalışmaların gerekliliğini göstermektedir.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dekanlığı Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan izin alınmıştır (2017/1218).

Hasta Onayı: Çalışmamız kapsamında dışkı ve selofan bant örneği kullanılan tüm olgulara çalışma kapsamında bilgi verilmiş ve "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" doldurtularak onayları alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulunda olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

** Yazarlık Katkıları

Konsept: İ.Y., E.M., H.E., Dizayn: S.E., E.M., Ö.G., H.E., Veri Toplanma veya İşleme: İ.Y., E.T., E.M., Analiz veya Yorumlama: İ.Y., Ö.G., H.E., Literatür Arama: İ.Y., S.E., Yazan: İ.Y., H.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: ÖYP tez bütçesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Windsor JJ, Johnson EH. *Dientamoeba fragilis*: the unflagellated human flagellate. Br J Biomed Sci 1999; 56: 293-306.

2. Stark D, Barratt J, Chan D, Ellis JT. *Dientamoeba fragilis*, the Neglected Trichomonad of the Human Bowel. Clin Microbiol Rev 2016; 29: 553-80.
3. Garcia LS. *Dientamoeba fragilis*, One of the Neglected Intestinal Protozoa. J Clin Microbiol 2016; 54: 2243-50.
4. Barratt JL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. Gut Microbes 2011; 2: 3-12.
5. Incani RN, Ferrer E, Hoek D, Ramak R, Roelfsema J, Mughini-Gras L, et al. Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR. Acta Trop 2017; 167: 64-70.
6. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, et al. *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. Parasitol Res 2010; 107: 679-84.
7. Holtman GA, Kranenberg JJ, Blanker MH, Ott A, Lisman-van Leeuwen Y, Berger MY. *Dientamoeba fragilis* colonization is not associated with gastrointestinal symptoms in children at primary care level. Fam Pract 2017; 34: 25-9.
8. Girginkardeşler N, Kurt Ö. Dientamoebiosis. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastahkları. 1. baskı. İzmir: Meta Basım 2007. p. 415-6.
9. Cerva L, Schrottenbaum M, Kliment V. Intestinal parasites: a study of human appendices. Folia Parasitol (Praha) 1991; 38: 5-9.
10. Ockert G. Zur Epidemiologie von *Dientamoeba fragilis* Jepps et Dobell, 1918. 2. Versuch der Übertragung der Art mit Enterobius-Eiern [Epidemiology of *Dientamoeba fragilis* Jepps and Dobell, 1918. 2. Attempt at species transfer with Enterobius eggs]. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1972; 16: 213-21.
11. Menéndez C, Fernández-Suarez J, Boga Ribeiro JA, Rodríguez-Pérez M, Vázquez F, Gonzalez-Sotorrios N, Rodríguez-Guardado A. Epidemiological and clinical characteristics of *Dientamoeba fragilis* infection. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed) 2019; 37: 290-5.
12. Girginkardeşler N, Kurt O, Kilimcioğlu AA, Ok UZ. Transmission of *Dientamoeba fragilis*: evaluation of the role of *Enterobius vermicularis*. Parasitol Int 2008; 57: 72-5.
13. Cacciò SM, Sannella AR, Bruno A, Stensvold CR, David EB, Guimarães S, et al. Multilocus sequence typing of *Dientamoeba fragilis* identified a major clone with widespread geographical distribution. Int J Parasitol 2016; 46: 793-8.
14. David ÉB, Guimarães S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Nogueira Bittencourt G, Moraes Nardi AR, et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. Parasit Vectors 2015; 8: 103.
15. Ögren J, Van Nguyen S, Nguyen MK, Dimberg J, Matussek A. Prevalence of *Dientamoeba fragilis*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica/dispar*, and *Cryptosporidium* spp. in Da Nang, Vietnam, detected by a multiplex real-time PCR. APMIS 2016; 124: 529-33.
16. 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: 1109-13.
17. Mumcuoğlu I, Coşkun FA, Aksu N, Purnak T, Güngör C. İrrite Bağırsak Sendromunda *Dientamoeba fragilis* ve *Blastocystis* spp.'nin Rolü [Role of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* spp. in Irritable Bowel Syndrome]. Türkiye Parazit Derg 2013; 37: 73-7.
18. Gülmez D, Sarıbaş Z, Akyön Y, Ergüven S. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı 2003-2012 Yılları Sonuçları: 10 Yıllık Değerlendirme [The results of Hacettepe University Faculty of Medicine Parasitology Laboratory in 2003-2012: evaluation of 10 years]. Türkiye Parazit Derg 2013; 37: 97-101.
19. Girginkardeşler N, Coşkun S, Cüneyt Balcıoğlu I, Ertan P, Ok UZ. *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 110-3.

20. Kurt Ö, Okullu SÖ, Özen NM, Ünübol N, Cat S, Nurdağı ŞŞ, et al. *Dientamoeba fragilis* Dost mu, Düşman mı? İstanbul'dan farklı Kohortlara Ait Hasta ve Sağlıklı Bireylerle Yürütülen Bir Çalışma. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020; 50: 244-9.
21. Yalçın ZG. İmmun yetmezliği olan ve olmayan ishalli hastalarda *Dientamoeba fragilis*'in görülme sıklığının araştırılması ve genotip profilinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2010, 127.
22. Sivcan E, Charyyeva A, Ceylan ŞŞ, Yürük M, Erdoğan E, Şahin İ. Gastrointestinal şikayeti olan hastalarda *dientamoeba fragilis* enfeksiyonu [*Dientamoeba fragilis* infection in patients with gastrointestinal system complaints]. Mikrobiyol Bul 2018; 52: 166-79.