

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İRRİTE BARSAK SENDROMUNDA
DIENTAMOEBA FRAGILIS
VE BLASTOCYSTIS SPP.'NİN ROLÜ**

İpek MUMCUOĞLU

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Çiğdem GÜNGÖR**

2011- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Parazitoloji Doktora Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21 / 01 / 2011


Prof. Dr. T. Murat ÖZSAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Sibel ERGÜVEN
Hacettepe Üniversitesi


Prof. Dr. Çiğdem GÜNGÖR
Ankara Üniversitesi


Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN
Ankara Üniversitesi


Prof. Dr. Yakut AKYÖN YILMAZ
Hacettepe Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	
1.1. İrrite Barsak Sendromu	1
1.1.1. Tanım	1
1.1.2. Epidemiyoloji	1
1.1.3. Klinik Bulgular	2
1.1.4. Tanı ve Ayırıcı Tanı	2
1.1.4.1. Roma-III Kriterleri:	2
1.1.5. Patofizyoloji	3
1.1.6. Tedavi	4
1.2. <i>Dientamoeba fragilis</i>	4
1.2.1. Diyarenin ihmal edilen etkeni	4
1.2.2. Tarihçe ve sınıflandırma	4
1.2.3. Morfoloji	7
1.2.4. Bulaş Yolları	11
1.2.5. Patogenez	11
1.2.6. Klinik Yaklaşım	12
1.2.7. Epidemiyoloji	13
1.2.8. Moleküler epidemiyoloji ve genetik çeşitlilik	14
1.2.9. Tanı	16
1.2.10. Tedavi	18
1.2.11. <i>Dientamoeba fragilis</i> ve IBS ilişkisi	19
1.3. <i>Blastocystis spp.</i>	20
1.3.1. Tarihçe	20
1.3.2. Sınıflandırma	20
1.3.3. Morfoloji	21
1.3.4.Yaşam Döngüsü	25
1.3.5. Epidemiyoloji ve Prevalans	26
1.3.6. Enfeksiyon ve Hastalık	27
1.3.7. Laboratuvar Tanısı	28
1.3.8. Tedavi	31
1.3.9. <i>Blastocystis spp.</i> enfeksiyonu ve IBS ilişkisi	32
2. GEREÇ VE YÖNTEM	33
2.1. İrrite Barsak Sendromlu Hasta Grubu	33
2.2. Kontrol Grubu 1 ve 2	33
2.3. Örneklerin Temini İncelenmesi ve Saklanması	34
2.4. Mikroskopik İnceleme	34
2.4.1. Direkt Bakı	34
2.4.2. Lugol Yöntemi	34

2.4.3. Trikrom Boyama İçin Solüsyon ve Boyaların Hazırlanması	35
2.4.4. Robinson Besiyeri	37
2.4.5. Blastocystis spp. için Kültür Yöntemi	38
2.4.6. Ekimlerin Yapılması	39
2.5. <i>D. fragilis</i> ve <i>Blastocystis spp.</i> tedavi ve takipleri	39
2.6. İstatistiksel Analiz	40
3. BULGULAR	41
3.1. İrrite Barsak Sendromlu Hasta Grubu	41
3.2. Kontrol Grubu 1	44
3.3. Kontrol Grubu 2	45
4. TARTIŞMA	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
ÖZET	56
SUMMARY	57
KAYNAKLAR	58
EKLER	
Ek-1	65
Ek-2	66
ÖZGEÇMİŞ	70

ÖNSÖZ

Eğitimim süresince Tıbbi Parazitoloji en keyif aldığım, zevkle öğrendiğim bilim alanıydı. Bu komplike canlıların hastalandırıcılık yetenekleri, yaşam döngüleri, bulaş yolları, hayatta kalmak için immün sistemle verdikleri savaş, tanılarındaki zorluklar ve tedavilerinde çekilen onca sıkıntı insana ürküntü ile beraber öğrenme ve mücadele isteği de vermekteydi. Meslek hayatıma başladığım 1994 yılından bugüne ülkemizde görülen parazitozlarda trajik azalma bu canlılarla mücadelede parazitologların ne kadar yol aldığının çok güzel bir ifadesidir. Ancak bugün yeni, tanısı-tedavisi halen net olmayan patojenler parazitolojide tartışılmaktadır. Ben de doktora eğitimimi Tıbbi Parazitoloji alanında yapmaktan ve hala tam anlaşılamamış iki paraziti hakkında tez hazırlamaktan müthiş bir mutluluk duymaktayım. Zorluklarla karşılaşmakla beraber çalışmalarımın her aşamasında çok keyif aldım.

Doktora eğitimim süresince bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen, tez danışmanım Prof. Dr. Çiğdem Güngör'e, her türlü soru ve sorunumunda desteğini alabildiğim, dostluğundan büyük mutluluk duyduğum Uz. Dr. Gülay Aral Akarsu'ya, bana güzel bir çalışma ortamı sağlayan Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Şefi Neriman Balaban'a, çalışmalarım sırasında bana manevi ve teknik destek sağlayan çalışma arkadaşlarım Dr. Feride Alaca Coşkun ve Mik.Uz. Şenol Kurşun'a, Ankara Tıp Parazitoloji laboratuvarı ve Ankara Numune Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca, sevgili eşim Doç.Dr. Tarkan Mumcuoğlu'na, canım çocuklarım Atakan, Atalay ve Pınar'a hoşgörülerini ve bana verdikleri yaşam sevinci için teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

İBS:	İrrite Barsak Sendromu
GİS:	Gastrointestinal Sistem
ATCC:	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA:	Deoksiribonükleik asit
RNA:	Ribonükleik asit
SSU r(DNA):	Small subunit ribozomal deoksiribonükleik asit
SSU r(RNA):	Small subunit ribozomal ribonükleik asit
RT-PCR:	Real time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1. Demir Hematoksilen boyama. <i>D. fragilis</i> pleomorfik trofozoitleri. Karakteristik çift çekirdekli ve küçük tek çekirdekli trofozoitler $\times 1,000$. (Johnson ve ark., 2004 alınmıştır)	9
Şekil 1.2. Trichrome boyama. <i>D. fragilis</i> , çift çekirdekli trofozoit formları. (CDC'nin resmi internet sitesinden alınmıştır.)	9
Şekil 1.3. <i>D. fragilis</i> 'in Robinson besiyerinde gelişmiş, nişasta fagosite etmiş, yalancı ayaklarla hareketli trofozoit formları. $\times 400$. (Johnson ve ark., 2004 alınmıştır)	10
Şekil 1.4. <i>D. fragilis</i> mononükleer trofozoitin elektron mikrosafı. Nükleus (Nu) ne kromatin (Ch) işaretlenmiştir. Nükleus elektron-yoğun mikrocisim benzeri inklüzyonlarla çevrilidir. Beslenme vakuolleri (Dv) açıkça görülebilmektedir ve birinin içinde fagosite edilmiş bakteri mevcuttur (B). $\times 5,200$ büyütme. (Johnson ve ark., 2004 alınmıştır).	10
Şekil 1.5. <i>Blastocystis</i> sp. Subtip 4 faz-kontrast mikroskobisi. (A): İn vitro aksenik kültürde farklı boyutlarda görülen vakuolar formlar ve okla gösterilen fekal kist fomları. (B): Granuler formlar, santral vakuolle birlikte belirgin granüler inklüzyonlar mevcut. (C): Kültürde psödopod benzeri stoplazmik uzantılar gösteren ameboid formlar. Bar, 10 μm . (Tan, 2008)	24
Şekil 1.6. <i>Blastocystis</i> sp. Subtip 4 elektron mikrosafı. (A): İnce periferel sitoplazmik bantla çevrili büyük santral vakuol (CV) içeren vakuolar form. resulting in a thin band of peripheral cytoplasm. (B): Tüm santral vakuolü kaplayan granüllerle kaplı granüler form. (C): Santrol vakuol ve boş vakuol içeren (EV) irregüler şekilli ameboid form. M: Mitokondri benzeri organel. N: Nükleus. Bar, 1 μm . (Tan, 2008).	24
Şekil 1.7. Yaşam siklusu, farklı konakları olan zoonotik genotipler (subtip 1-7) göz önüne alınarak hazırlanmıştır. İnsan ve hayvanlar fekal kistlerle enfekte olur ve kistler kalın barsakta vakuoler forma dönüşür. İnsanlarda vakuoler formlar ikiye bölünerek çoğalır ve bu aşamada ameboid ve granüler formlar gelişebilir. Ameboid formdan vakuoler forma ve vakuoler formdan kist formuna geçişle ilgili yeterince bilgi olmadığından bu hipotetik yollar kesik çizgilerle gösterilmiştir. (Tan, 2008'den alınmıştır).	25

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 3.1. İBS hasta grubuna ait bilgiler.	42
Çizelge3.2. İrrite Barsak Sendromlu hasta grubu, kontrol grubu 1 ve 2’de direkt mikroskobi, trikrom boyama ve kültür yöntemi ile tespit edilen <i>Blastocystis spp.</i> infekte kişi sayıları	46

1. GİRİŞ

Bu çalışmada, Roma III tanı kriterlerine göre irrite barsak sendromu (İBS) tanısı konulmuş hastaların dışkılarında *Dientamoeba fragilis* ve *Blastocystis* spp. parazitlerinin prevalansının mikroskopi ve kültür yöntemleri ile araştırılması, ve bu parazitlerin İBS oluşumuyla bağlantılarının olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

1.1. İRRİTE BARSAK SENDROMU

1.1.1.Tanım

İrrite barsak sendromu (İBS), başlıca semptomları karın ağrısı ya da huzursuzluk olan, barsak alışkanlıklarında değişikliklerle seyreden, etiyojisi tam olarak bilinmeyen, kronik ve tekrarlayıcı bir hastalıktır (Longstreth ve ark. 2006).

1.1.2 Epidemiyoloji:

Dünya genelinde İBS görülme sıklığı %4-35 arasında bildirilmektedir (Longstreth ve ark. 2006). Türkiye’de Roma-II kriterlerine göre yapılan populasyon çalışmalarında, İBS prevelansı İzmir bölgesinde %12,4 (Akpınar ve ark., 1999), Sivas bölgesinde %19.1 olarak bulunmuştur (Karaman ve ark., 2003). Türkiye genelinde yapılan bir çalışmada ise bu oran %19 olarak bulunmuştur (Özden ve ark., 2006) Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda kadınların çoğunlukta olduğu (kadın erkek oranı 2/1) ve büyük çoğunluğu 45 yaş altı nüfusun oluşturduğu saptanmıştır (Saito ve ark., 2002).

1.1.3 Klinik Bulgular

İBS hastaları iki geniş klinik gruba ayrılırlar. Birinci grupta karın ağrısına değişen barsak alışkanlığı ile birlikte kabızlık, diyare veya ikisi birden eşlik ederken ikinci grupta ağrılı diyare vardır (Drossman ve ark., 1997; Lynn ve ark., 1993). İBS hastaları genel olarak artmış gazı bağlanabilecek abdominal şişkinlik, geğirme veya huzursuzluktan yakınırırlar (Mayer ve ark., 1994).

1.1.4. Tanı ve Ayırıcı Tanı

İBS patogonomik anormallik belirlenmeyen bir hastalık olduğundan, tanısı pozitif klinik bulguların belirlenmesi ve diğer organik hastalıkların elenmesine bağlıdır. Ayrıntılı anamnez ve fizik muayene tanı koymak için yeterlidir. Zaman içerisinde değişen barsak alışkanlığı ile birlikte tekrarlayan karın ağrısı, semptomların stres veya duygusal bozukluk dönemlerinde başlaması, ateş ve kilo kaybı gibi sistemik semptomların yokluğu, hiçbir kan bulgusu olmayan düşük miktarda dışkılama İBS araştırmayı gerektirir (Silverman ve ark., 1997).

İBS' nin başlıca semptomları olan karın ağrısı, karında şişkinlik, barsak alışkanlığında değişiklik; gastrointestinal sistemin (GİS) birçok organik hastalığının ortak şikayetleri olduğundan, ayırıcı tanı listesi uzundur. İBS tanısı konulmadan önce her hastada; dışkı muayenesi, tam kan sayımı, sedimentasyon, sigmoidoskopi ve gerektiğinde batin ultrasonografi, kolonoskopi, üst GİS endoskopisi yapılmalıdır (Yamada, 1998; s.:387-393).

Ayrıntılı bir anamnez ve fizik muayene ile İBS tanısının konabileceği kabul edilmektedir. Klinisyenlere tanıda yardımcı olmak için, uluslararası çalışmalarla 1992' de Roma I kriterleri, 1999' da Roma II kriterleri ve son olarak 2006' da Roma III kriterleri oluşturulmuştur. Çalışmamızda

değerlendirilen hastaların seçilmesinde temel alınan Roma III kriterleri (Drossman, 2006) aşağıda belirtilmiştir.

1.1.4.1. Roma-III Kriterleri:

Son üç ayda, ayda en az 3 gün görülen tekrarlayıcı karın ağrısı veya rahatsızlık hissinin aşağıdakilerden 2 veya daha fazlasıyla birlikte olması ve semptomların hasta başvurusundan 6 ay veya daha uzun süre önce başlaması:

- Semptomların dışkılama ile hafiflemesi
- Dışkılama sıklığındaki bir değişim ile ilişkili başlangıç
- Dışkının görünümünde değişim ile ilişkili başlangıç (Longstreth ve ark. 2006).

1.1.5. Patofizyoloji

İBS de patofizyoloji tam anlaşılmış değildir. Etiyolojik faktör bilinmediğinden hastalığın oluşum mekanizması da açıklığa kavuşmamıştır. Son yıllarda bilimsel gelişmeler ışığında İBS oluşumunda rolü olduğu düşünülen faktörler aşağıda belirtilmiştir (Özden ve ark., 2006):

1. Psikolojik faktörler
2. Visseral duyu algılama bozukluğu
3. Barsak enfeksiyonu ve inflamasyonu
4. Santral sinir sistemi fonksiyon bozukluğu
5. Anormal intestinal motor aktivite
6. Genetik

1.1.6. Tedavi

Tedavi; öncelikle doğru tanıya, semptomların neden ortaya çıktığının açıklamasına ve bunlarla baş etme yönündeki önerilere dayanmaktadır. İlaç tedavisi baskın semptomlara yöneliktir. İlaçlar yalnızca belirli hastalardaki bazı semptomları düzeltmektedir. İBS' de baskın semptomlar için olası ilaçlar son olarak Longstreth (2006) tarafından düzenlenmiştir.

1.2. *DIENTAMOEBA FRAGILIS*

1.2.1. Diyarenin ihmal edilen etkeni:

D. fragilis bilimsel literatürde ilk defa 1907 yılında Wenyon tarafından bulunmuş, daha sonra 1918 yılında Jepps ve Dobell tarafından tanımlanmış amibe benzeyen, sadece trofozoit formu bulunan, insan çekum ve kalın barsağının lümeninde yaşayan bir protozoondur (Johnson ve ark., 2004). Keşfedileli 90 yıl gibi bir süre olmasına rağmen, bu protozoonla ilgili bilgiler diğer protozoonlarla karşılaştırıldığında çok azdır. Yaşam döngüsü ve bulaş yolları bilinmemektedir ve üretilmesi için geliştirilmiş aksenik kültür veya hayvan modelleri yoktur. Bununla beraber son zamanlarda yapılan çalışmalar bu organizmanın anlaşılmasına belirgin bir katkıda bulunmuş ve bu patojenin belirsizlikten çıkmasını sağlamıştır.

1.2.2. Tarihçe ve Sınıflandırma

D. fragilis bilimsel literatürde ilk defa 1907 yılında Wenyon tarafından bulunmuş daha sonra 1918 yılında Jepps ve Dobell tarafından tanımlanmış bir insan barsak protozoonudur (Johnson ve ark., 2004). Jepps ve Dobell 1918'de binükleer formlu, kist evresi olmayan bu paraziti tanımladıklarında sadece yeni bir amip türüne değil aynı zamanda yeni bir cinse ait olduğunu

bildirmişlerdir. Çift çekirdekli olması ve dış ortamda kolayca parçalanması nedeniyle *Dientamoeba fragilis* ismini önermişlerdir ve bu isim hala kullanılmaktadır. Bu iki araştırmacı *D.fragilis*'i *Endamoebidae* ailesine yerleştirmişlerdir (Johnson ve ark., 2004).

Dobell, sadece ışık mikroskobu, boyama, kültür teknikleri kullanarak *D. fragilis*'in bölünme evresi ile bir ameboflajellat olan *Histomonas meleagridis* arasında benzerlikler olduğunu tanımlamıştır. *D. fragilis*, 1953 yılında *Endamoebidae* ailesinden çıkarılmış ve *Histomonas* ile birlikte yeni oluşturulan *Dientamoebidae* ailesinin içine yerleştirilmiştir (Dwyer, 1972c).

Kalitatif jel difüzyon sonuçları, *Trichomonas*, *Histomonas* ve *Dientamoeba*'nın yapısal olarak benzer antijenler taşıdıkları göstermiştir (Dwyer, 1972c). İmmünoelektroforetik kantitatif yöntemlerle, *Dientamoeba*'nın *Histomonas* ile daha yakın antijenik benzerliği olmakla beraber *Trichomonas*'a da benzediği gösterilmiştir (Dwyer, 1972a). Ayrıca bir diğer çalışmayla *Dientamoeba*'nın antijenik olarak *Entamoeba histolytica*'dan farklı olduğu da gösterilmiştir (Dwyer, 1972b).

Camp (1974), elektron mikroskobu ile yaptığı çalışmalarda, *D. fragilis* ile *Histomonas* arasında bariz benzerlikler bulmuştur. Levine (1980), *D. fragilis*'i; *Histomonas*, *Trichomonas* ve *Monocercomonas* ile birlikte Trichomonadida sınıfı içinde tekrar sınıflandırmıştır. *Trichomonadida* ve *Hypermastigida* sınıfları ise, üst sınıf *Parabasabidea* içinde gruplandırılmıştır.

Dientamoeba'nın taksonomik pozisyonunu belirlemek için, moleküler teknikler kullanılmıştır. Filogenetik ilişkileri "small subunit rRNA" (SSU rRNA) gen sekanslarının karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Silberman (1996), *D. fragilis*'in, çeşitli trichomonad gruplarının ve bazı ökaryotların moleküler filogenetiklerini SSU rRNA genlerini temel alarak gerçekleştirmiştir. Benzerlik hesaplamalarında *D. fragilis* ve diğer parabazalid flajellatlar arasında açık bir benzerlik gösterilmiştir.

SSU rRNA'nın ileri moleküler çalışmaları, parabazalidler arasında *D. fragilis*'in kesin pozisyonunun belirlenmesini sağlayamamıştır (Delgado-Viscogliosi ve ark., 2000). *H. meleagridis*'in filogenetik pozisyonu SSU rRNA analizi ile belirlenmiş ve diğer trichomonadlarla karşılaştırıldığında, azalmış G+C oranı ve artmış zincir uzunluğu gösterilmiştir (Gerbod ve ark., 2001). Bu durum *D. fragilis*'te de gözlenir. Filogenetik analizlerde *H. meleagridis* ile *D. fragilis* arasında yakın ilişki olduğunu belirlenmiştir. Karmaşık bir hücre iskeleti yapısı gösteren her iki organizmanın ortak atalardan geldiği gösterilmiştir (Gerbod ve ark., 2001).

Sonuç olarak tüm bulgular *D. fragilis*'in, kamçı ve kinetosomunu kaybetmiş bir trichomonad olduğu hipotezini doğrulamaktadır.

D. fragilis'in son yapılan sınıflandırması şöyledir (Garcia, 1997).

Alem (kingdom)	:	Protista
Alt alem (subkingdom):		Protozoa
Kök (phylum)	:	Sarcomastigophora
Kök altı (subphylum):		Mastigophora
Sınıf (class)	:	Zoomastigophora
Takım (order)	:	Trichomonadida
Aile (family)	:	Monocercomonadidae
Cins (genus)	:	<i>Dientamoeba</i>
Tür (species)	:	<i>D. fragilis</i>

1.2.3. Morfoloji

D. fragilis'in kist evresi rapor edilmemiştir, sadece trofozoit formu görülmektedir. Dışkıdan hazırlanan preparatlarda görülen morfoloji ile kültürden hazırlananlar arasında farklılıklar vardır. Jepps ve Dobell (1918), dışkıdan hazırladıkları preparatlarda boyutları 3-12 µm arasında bildirirken, kültürden yapılan incelemelerde 20-40 µm arasında daha büyük boyutlar bulmuşlardır. Bunun üzerine Dobell (1940), *D. fragilis* dışkıda çok hızlı parçalandığı için dışkıdan hazırlanan preparatların gerçek morfolojiyi bildiremeyebileceğini öne sürmüştür. *D. fragilis*'in kültürde tespit edilen boyutları *E. histolytica*, *E. hartmanni*, ve *E. nana*'nın boyutları ile örtüşmektedir (Johnson, 2004).

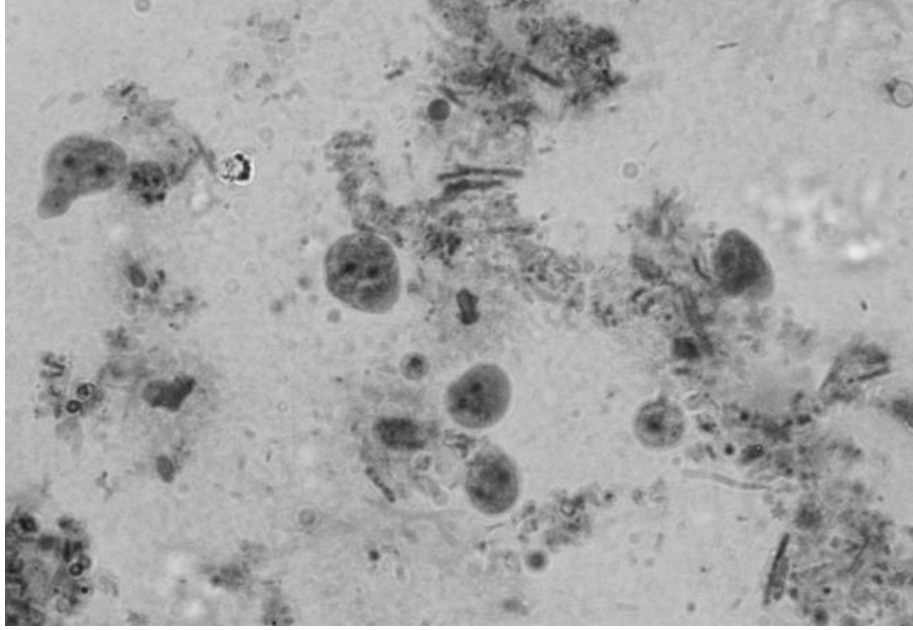
Jepps ve Dobell (1918) kalıcı boyalı preparatlarda *D. fragilis* trofozoitlerinin %80'inin çift çekirdekli, %20'sinin tek çekirdekli olduğunu bulmuşlardır. Çok nadir olmakla birlikte 4-5 çekirdekli trofozoitler de görülmüştür (Dobell, 1940). Wenrich (1944), çekirdeklerin çapı trofozoitin büyüklüğüne göre değişmekle beraber genellikle 1-3 µm olduğunu bildirmiştir. Demir-hematoksilen ve trikrom boyama ile hazırlanan preparatlarda çekirdek membranı incedir, çekirdek parçalıdır, 4-8 granül içerir ve periferik kromatin yoktur (Şekil 1.1-1.2). Genellikle bir granül diğerlerinden daha büyüktür ve daha koyu boyanmaktadır. Tipik izlenen form iki çekirdekli formdur. İki çekirdekli formdan daha küçük olan tek çekirdekli formlar bölünmekte olan formlardır (Johnson ve ark., 2004).

D. fragilis ince, hyalin yapıda, yaprak benzeri düzensiz loblu psödopodlarını kullanarak hareket etmektedir (Şekil 1.3). Hakansson (1936), kendi dışkısını alındığı ilk anda incelediğinde yuvarlak hareketsiz trofozoitleri görmüş, oda ısısında 10 dakika sonra parazitin bu ilk andaki geçici paralizden kurtularak loblar ve girinti çıkıntılardan oluşan karakteristik fan benzeri harekete başladığını göstermiştir. *Entamoeba* trofozoitlerinden farklı olarak *D. fragilis*'te psödopod içine endoplazmanın akışı yoktur (Hakansson,

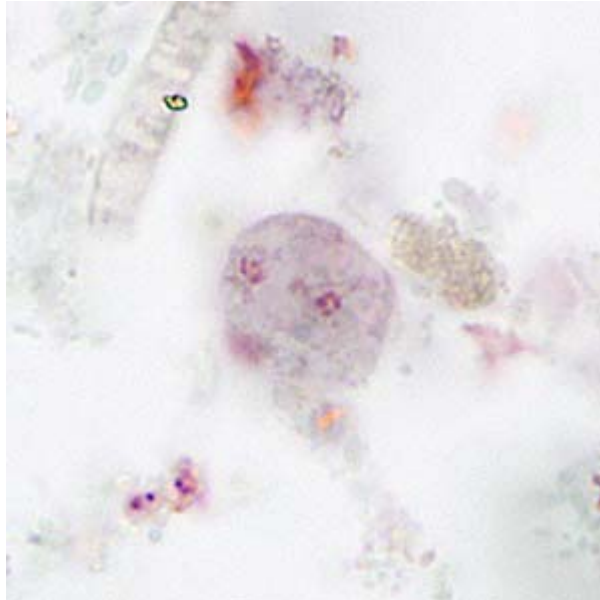
1936). Dışkı örnekleri buzdolabına konulduğu takdirde hareket tamamen kaybolmaktadır.

Camp (1974), elektron mikroskopuyla yaptığı çalışmada *D. fragilis* Bi/pa suşunun çift çekirdekli formunu kapsamlı şekilde incelemiştir. Bu çalışma Dobell (1940) tarafından ışık mikroskobu ile yapılan incelemeler sonucu ortaya atılan *D. fragilis*'in flajellat özelliğini doğrulamıştır. Nükleuslar arasında iğ şeklinde bir yapı görülmüş ve bu yapının hipermastigotlarda bulunan, bazal cisim kökenli, sentriol gibi davranan, çubuk şeklinde bir yapı olan atraktofor ile homolog olduğu açıklanmıştır. Parabazal filamentler atraktoforların dış yüzeyinde lateral olarak uzanmaktadır. Filamentlerin üzerine yayılan geniş golgi kompleksleri, trikomonad ve hipermastigotlarda görülen parabazal cisim ile çok benzemektedir. Çekirdekler arasındaki bu iğ yapısı her biri 30-40 mikrotübülden oluşan iki demetten meydana gelmektedir. Bu demetlerden birisi nükleustan biraz uzak dururken diğeri sıklıkla nükleer zara yapışık durmaktadır. *D. fragilis*'in nükleer yapısı *Entamoeba* türlerinden çok trikomonad flajellatlara yakındır. Kromatin cisimcikler veya granüller sıklıkla nükleoplazmanın içinde görülür ve çekirdek zarı iki membrandan oluşmaktadır (Şekil 1.4).

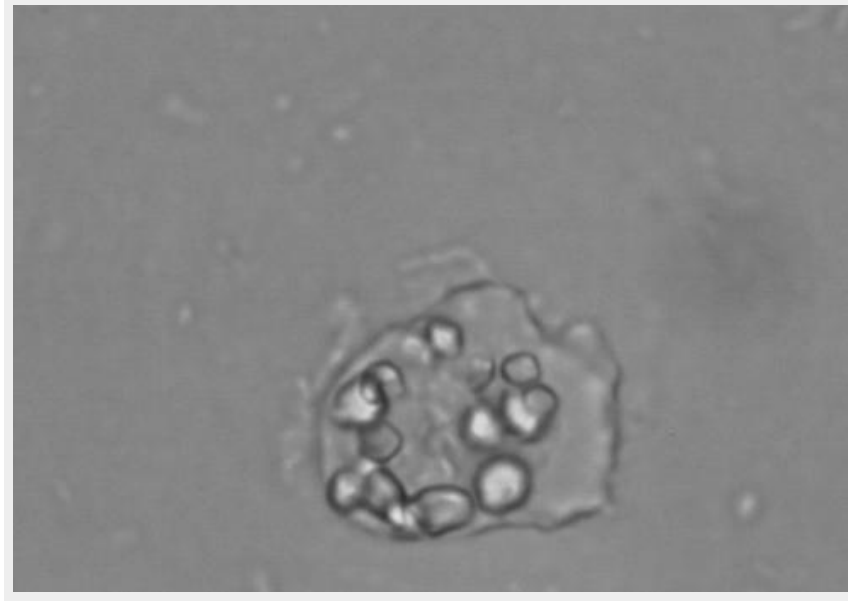
Elektron mikroskobu ile sitoplazmada "mikrocisim benzeri" olarak isimlendirilen ve ilk başta trikomonadlardaki paraksostilar granüllere benzediği düşünülen inklüzyon cisimcikleri tespit edilmiştir (Camp ve ark., 1974). Daha sonra Muller ve ark., (1975) bu inklüzyonların hidrojen ve karbondioksit üretiminde görev alan membrana bağlı bir organel olan hidrojenozom olduğunu tanımlamışlardır. Besin vakuolleri sitoplazmada bolca bulunur ve myelin, bakteri ve nişasta granülleri içermektedir (Şekil 1.4). *D. fragilis* fagositozla beslenmekte ve atık ürünler besin vakuollerinden ekzositozla salınmaktadır.



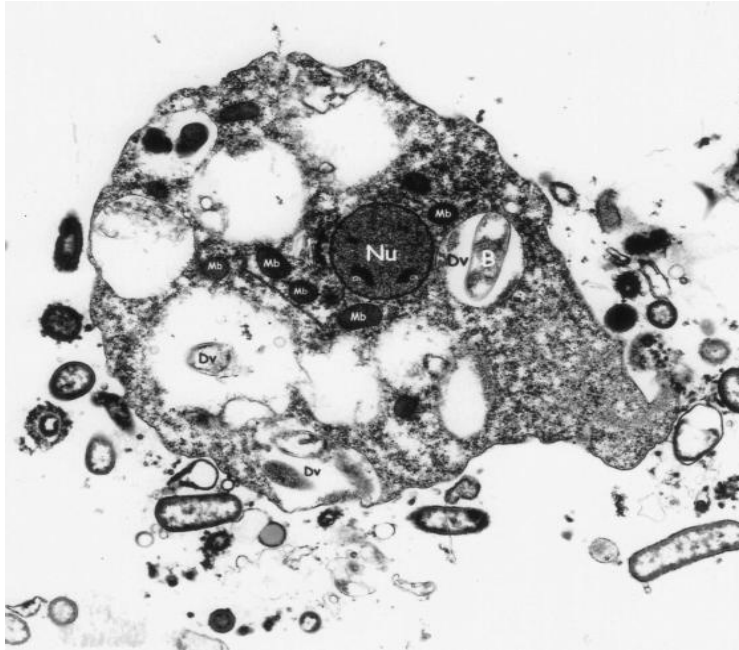
Şekil 1.1. Demir Hematoksilen boyama. *D. fragilis* pleomorfik trofozoitleri. Karakteristik çift çekirdekli ve küçük tek çekirdekli trofozoitler $\times 1,000$. (Johnson ve ark., 2004 alınmıştır)



Şekil 1.2. Trikróm boyama. *D. fragilis*, çift çekirdekli trofozoit formları. (CDC'nin resmi internet sitesinden alınmıştır.)



Şekil 1.3. *D. fragilis*'in Robinson besiyerinde gelişmiş, nişasta fagosite etmiş, yalancı ayaklarla hareketli trofozoit formları. $\times 400$. (Johnson ve ark., 2004 alınmıştır)



Şekil 1.4. *D. fragilis* mononükleer trofozoitin elektron mikrografı. Nükleus (Nu) ve kromatin (Ch) işaretlenmiştir. Nükleus elektron-yoğun mikrocisim benzeri inklüzyonlarla çevrilidir. Beslenme vakuolleri (Dv) açıkça görülebilmektedir ve birinin içinde fagosite edilmiş bakteri mevcuttur (B). $\times 5,200$ büyütme. (Johnson ve ark., 2004 alınmıştır).

1.2.4. Bulaş yolları

D. fragilis'in bulaş şekli bilinmemektedir. Bu parazite çok benzeyen ve bir kuş patojeni olan *Histomonas meleagridis* konaktan konağa bir nematod olan *Heterakis gallinorum* ile taşındığı için *D. fragilis*'in de benzer bir şekilde bulaşıp bulaşmadığı araştırılmıştır. Birkaç çalışmada *E. vermicularis*'in bulaştaki rolü incelenmiş ve koenfeksiyonları görülmüştür (Yang ve Scholten, 1977; Preiss ve ark., 1991). Ülkemizde yapılan bir çalışmada koenfeksiyon oranı % 25.4 olarak gösterilmiştir (Girginkardeşler ve ark., 2007). Bu çalışmalar; parazitin çabuk parçalanan doğası ve kist evresinin olmaması nedeniyle bir vektörle taşınmasının olası olduğunu ileri sürmektedir.

Ancak bazı çalışmalarda iki enfeksiyon arasında korelasyon olmadığı bildirilmektedir (Stark ve ark., 2005). Pek çok çalışmada *D. fragilis* enfeksiyonu olan hastaların oral fekal yolla bulaşan diğer enterik protozoonları da taşıdığı gösterilmiştir (Stark ve ark., 2005; Windsor ve ark., 1998). Stark ve ark. (2005), Dientamoebiasisli hastaların %40'ının diğer enterik parazitlerle koinfekte olduğunu bildirmişlerdir. *D. fragilis* enfeksiyonu kişisel hijyenin zayıf olduğu yerlerde daha yüksek oranda görülmekte ve bu durum direkt bulaşı desteklemektedir (Millet ve ark., 1983; Stark ve ark., 2005; Windsor ve ark., 1998). *D. fragilis* maymun, makak ve koyunlarda gösterilmesine rağmen (Windsor ve Johnson, 1999) insanlardaki yüksek oranı göz önüne alınınca insan bu organizmanın primer konağı sayılmaktadır. *D. fragilis*'in kesin bulaş yollarını bulabilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

1.2.5. Patogenez

D. fragilis'in patolojisine dair çok az çalışma vardır. Burrows ve ark. (1954), *D. fragilis* ile infekte dört hastanın apendiksinden hazırlanan preparatlarda benzerlikler bildirmişlerdir. Dört vakada da subserozada belirgin fibrozis

vardır ve doku invazyonu olmaksızın lümende trofozoitler izlenmiştir. *D. fragilis* trofozoitlerinin içinde fagosite edilmiş eritrositler görülmüş bu patojenliklerinin bir belirtisi olarak varsayılmıştır. Ancak bu çalışmada dört vakanın üçünde diğer bazı parazitlerin de varlığı gösterildiğinden, fibrozisin nedenini *D. fragilis* olarak kabul etmenin zor olduğu bildirilmiştir. Swerdlow ve Burrows (1955) tarafından 11 vakalık incelemede submukozada genişlemiş fibrozis tespit edilmiştir ve *D. fragilis*'in düşük düzeyde iritan etkisiyle fibrozisle sonlanan inflamatuvar reaksiyona neden olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmada da vakaların sadece üçünde saf *D. fragilis* enfeksiyonu vardır. Hayvan modellerinin olmaması *D. fragilis*'in patolojisiyle ilgili kesin verilerin elde edilmesini zorlaştırmaktadır.

1.2.6. Klinik yaklaşım

Başlangıçta Jepps ve Dobell bu parazitin non-patojenik olduğunu açıklamışlardır. İlk olarak Hakansson (1936) *D. fragilis*'in masum olmadığını iddia etmiştir. *D. fragilis*'in patojenitesinden şüphe edilmesinin nedeni, bazı yayınlarda *D. fragilis*'in hiç klinik semptom göstermeyen hastalarda da bulunmuş olması ve sıklıkla diğer patojenlerle birlikte görülmesidir. Ancak bugün, bu organizmayla ilgili patojeniteyi destekler bilgilerin sürekli artması non-patojen kabul edilmesinin yanılgı olduğunu düşündürmektedir (Johnson ve ark., 2004). Avustralya'dan prospektif bir çalışmada, 30 aylık bir sürede 6750 örnek *D. fragilis* açısından incelenmiş, klinik verileri toplanmış ve takip edilmiştir. Demir hematoksilen boyama ile 60 hastada (%0.9) trofozoitler görülmüş, PCR ile doğrulanmıştır. Diyare ve karın ağrısı hastaların tamamında izlenirken %32'sinde kronik sendromlar gözlenmiştir. Kontrol grubu olarak 900 hasta incelenmiş ve hiç *D. fragilis* belirlenememiştir (Stark ve ark., 2005).

Son çalışmalar *D. fragilis*'in prevalansının *G. intestinalis*'ten fazla olduğunu göstermektedir (Girginkardeşler ve ark., 2003; Crotti ve ark., 2005).

Diğer birçok çalışma bu parazitin eliminasyonunun klinik iyileşme sağladığını göstermiştir (Johnson ve ark., 2004; Windsor ve Johnson 1999). Bu bilgiler parazitin bir kommensal olduğu fikrini değiştirmektedir.

İlk kez Borody ve ark., (2002) *D. fragilis* ile İBS arasında bağlantı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Avustralya’da yapılan bu çalışmada, İBS şikayeti olan 21 hastada *D. fragilis* enfeksiyonu varlığı gösterilmiş ve iyodokuinol-doksisiklin tedavisinden sonra *D. fragilis* eradikasyonu ve hastaların çoğunda klinik iyileşme görüldüğü bildirilmiştir.

D. fragilis enfeksiyonunda en sık görülen belirtiler karın ağrısı, diyare, anoreksi, bulantı, kusma ve midede gazdır. Dışkıda kan görülmez. Çeşitli çalışmalarda bu parazitin ürtiker (Yang ve Scholten, 1977), biliyer enfeksiyon (Talis ve ark., 1971), kolit (Shein ve Gelb, 1983), irrite barsak hastalığı (Borody ve ark., 2002) ve HIV’li hastalarda diyare (Mendez ve ark., 1994) ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Peek (2004), *D. fragilis*’in, iki farklı genotipini bulmuş, ancak bunların virulans ve patojenite açısından daha fazla vakada çalışmaları ve karşılaştırılmaları gerektiğini bildirmiştir. Şu ana kadar çalışılan vaka serilerinde hem semptomatik hem asemptomatik bireylerde genotip 1 bulunmuştur. Genotip 2’nin çok nadir bulunması hastalığındaki rolünün incelenmesini zorlaştırmaktadır.

1.2.7. Epidemiyoloji

Çok sayıda ülkeden gelen veriler *D. fragilis*’in tüm dünyada yaygın olduğunu göstermektedir. Enfeksiyon oranlarının, populasyon yoğunluğu, hijyen düzeyi tarafından etkilendiği tespit edilmiş ve ayrıca uygulanan tanısal yöntemlerin de raporları etkilediği bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2004). Grendon (1991), sadece sulu ve yumuşak dışkıların değil tüm dışkıların boyama yöntemiyle

incelenmeye başlanması ile *D. fragilis* tanısının 5 kat arttığını göstermiştir. *D. fragilis*' in dışkıda atılımı pek çok parazitte olduğu gibi günden güne çok farklılık gösterebilmektedir. Hiatt ve ark., (1995) farklı günlerde örnek toplananının tanısı %30 oranında arttırdığı gözlemiştir. Kültür yapılmasının ise tanısı iki kat arttırdığı bildirilmiştir (Windsor ve ark., 2003).

Dünyada prevalans %1.4 ile % 52 arasında değişmektedir (Johnson ve ark., 2004). Ülkemizde yapılan az sayıda çalışmada ise *D. fragilis* prevalansı İzmir, Van, Malatya ve Manisa bölgesinde sırasıyla %0,2; %0,4; %0,4 ve %1,02 olarak bildirilmiştir. (İnceboz ve Üner, 2001; Cengiz ve ark., 2009; Karaman ve ark., 2006; Yılmaz ve ark., 2002).

Bir çok çalışmada, enfeksiyonun ve klinik belirtilerin çocuk yaş grubunda daha sık gözlemlendiği bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2004).

D. fragilis enfeksiyonlarında güvenilir epidemiyolojik verilerin elde edilmesi için, tanıda birden fazla dışkı örneğinin boyama veya kültür yöntemiyle çalışılması gerekmektedir.

1.2.8. Moleküler epidemiyoloji ve genetik çeşitlilik

Johnson ve Clark (2000), ksenik kültür ortamında üretilen 12 *D. fragilis*'in ribozomal genlerinin PCR-RFLP analizleri ile en az iki genotipi olduğunu tespit etmişlerdir. Onbir örnek genotip 1, 1 klinik örnek ve standart suş olan ATCC tip Bi/pa (ATCC 30948) genotip 2 olarak tanımlanmıştır. *D. fragilis*'in iki SSU rDNA genotipi arasında %2'lik bir sekans farklılığı olduğunu bulmuşlardır. Bu veri Peek (2004) tarafından Hollanda'da yapılan direkt dışkıdan izole edilen 59 *D. fragilis* izolatından elde ettikleri SSU rDNA'nın 558 baz çiftlik bölgesinin sekanslanmasıyla ve bunun mevcut sekans verileriyle karşılaştırılmasıyla desteklenmiştir.

Genotip 1'in sekans verileri Stark ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Stark ve ark., 2005a). Yedi izolatın sekansları çalışılmış, hepsi aynı bulunmuş ve ATCC suşuyla arasındaki fark %4 olarak saptanmıştır. Avustralya izolatlarının Hollanda'da bulunanlarla benzer oldukları ve polimorfik *D. fragilis* 644. pozisyonda bulunan polimorfik Dde I bölgesini (CTTAG) içermediklerini bulmuşlardır. Yine Stark (2005b) tarafından 50 suş ile yapılan çalışmada yatan, ayaktan gelen ve seyahat eden kişilerin tamamında genotip 1 gösterilmiştir. Sadece bir örnekte gösterildiği için genotip 2'nin çok nadir olduğu düşünülmektedir. *D. fragilis* ATCC Bi/pa genotip 2 olması tüm türü temsil eden bir durum değildir. İn vitro kültürden elde edilen bu suşun vahşi tipten farklı olabileceği bildirilmiştir (Peek ve ark., 2004). Bu moleküler epidemiyolojik çalışmalar, *D. fragilis*'in SSU rDNA'sında küçük bir varyasyon olduğunu göstermektedir. Diğer gen bölgelerinin analiziyle *D. fragilis* taksonu içinde birden fazla tür olup olmadığı belirlenebilecektir.

Genetik çeşitliliğin anlaşılmasının klinik ve epidemiyolojik bilgilerin değerlendirilmesi açısından önemli olduğu kesindir. *D. fragilis* için geliştirilmiş iki PCR yöntemi vardır. Peek ve ark. (2004) geliştirdiği yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü belirtilmemişken Stark ve ark.'nın (2005b) geliştirdiği yöntem %100 duyarlılık ve ve %93.5 özgüllük göstermektedir. Aynı çalışmada tüm prosedür bir günde tamamlanmaktadır. Ayrıca moleküler epidemiyolojik incelemeler için de hızlı, basit ve etkili bir yöntemdir. Dışkıdan direkt ekstraksiyon yapıldığı için kültürün getirdiği teknik zorluklar ortadan kaldırılmaktadır.

Dışkı örneklerinden *D. fragilis*'in belirlenmesi için bir real time PCR (RT-PCR) yöntemi de geliştirilmiştir (Stark ve ark., 2006) ve duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak bildirilmiştir. Bu yöntemin avantajları; hızlı, duyarlı ve özgül tanının iki saat içinde konulabilmesidir. Ayrıca bu yöntemde kontaminasyon riskinin olmaması da klasik PCR'a olan bir diğer üstünlüğüdür.

1.2.9. Tanı

1.2.9.1. Mikroskopi

Serum fizyolojik ve lugol solüsyonuyla hazırlanan preparatlarda nükleer yapı izlenememektedir. Parazit 5-15 µm çapında yuvarlak yapılar olarak görüldüğünden tanı konulamaz. *D. fragilis*'in tanısında en iyi sitolojik sonuçlar uygun fiksatif ve boya kombinasyonunun kullanılmasıyla elde edilmektedir. Parazitin kolay parçalanır yapısı nedeniyle konsantrasyon yöntemleri *D. fragilis* için önerilmemektedir (Johnson ve ark., 2004).

1.2.9.2. Fiksatifler

D. fragilis trofozoitleri dejenere olunca tanınmaları çok zordur. Optimal sonuçlar için dışkı örnekleri en kısa sürede uygun fiksatif içine alınmalıdır. Polivinil alkol (PVA), modifiye Schaudinn fiksatif ve sodyum asetat formalin (SAF) gibi protozoonlar için kullanılan fiksatifler *D. fragilis* için de uygundur. SAF'ın avantajı diğer fiksatiflere oranla daha az toksik olması ve konsantrasyon yöntemleri için de uygun olmasıdır (Johnson ve ark., 2004).

1.2.9.3. Boyama

D. fragilis'in tanısı için birçok boya kullanılmaktadır. Bunlardan en sık tercih edilen Wheatley'in trikrom boyası ve demir-hematoksilen boyamadır. Fiksatif ve boya kombinasyonunun seçimi protozoon morfolojisini büyük ölçüde etkilediği için önemlidir. Genellikle PVA ve Schaudinn fiksatif ile Wheatley'in trikrom boyaması birlikte tercih edilmekte veya SAF ile demir hematoksilen kombinasyonu kullanılmaktadır (Johnson ve ark., 2004). Garcia ve Shimizu (1998), çalışmalarında ticari çinko-sülfat bazlı Schaudinn fiksatif ile (EcoFix/Meridian Diagnostic, Inc) fikse ettikleri materyalleri ticari EcoStain (Meridian Diagnostic, Inc) ve Wheatley'in trikrom boyaması ile boyamışlardır.

EcoFix+EcoStain kombinasyonunun daha iyi sonuçlar verdiğini tespit etmişlerdir. Van Gool ve ark. (2003), "Üçlü dışkı testi" adını verdikleri yöntemde 3 gün topladıkları dışkı örneklerini SAF ile tespit ettikten sonra klorazol siyahı ile boyamışlar ve ksilenle dehidrasyon basamağına gerek duymayan bu boyamanın, *D. fragilis* dahil intestinal protozoonların tanısında hızlı ve uygulaması kolay bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

1.2.9.4. İmmünolojik tanı

İlk olarak Chan ve ark. (1993), fiksatif eklenmiş dışkı örneklerinden hazırlanmış preparatlarda *D. fragilis*'in tespit edildiği bir immünfloresan yöntem geliştirmişlerdir. *D. fragilis* Bi/pa suşunun diksenik kültürünü kullanarak tavşanlardan antiserum elde etmişlerdir. Geliştirdikleri IFA yöntemini kültür yöntemiyle de doğrulamışlardır ve çalıştıkları dokuz örneğin yedisinde pozitif sonuç, az sayıda trofozoit içeren iki örnekte ise şüpheli pozitif sonuç rapor etmişlerdir. Yine Chan ve ark. (1996) geliştirdikleri bir immünblot yöntemle *D. fragilis* enfeksiyonu geçiren kişilerin serumunda *D. fragilis* 39 kDa proteinini bulmuşlardır. Bu proteinin yapısı, patojenitede oynadığı rol veya immünproflaktik özelliğinin olup olmadığı bilinmemektedir. *D. fragilis* rutin tanısında kullanılacak immünolojik testler şu anda bulunmamaktadır.

1.2.9.5. Kültür

D. fragilis için ksenik kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Tüm ksenik kültür ortamlarında, pirinç nişastası bakterilerin üremesi için karbonhidrat kaynağını sağlar. Eritromisin, penisilin ve streptomisin gibi antibiyotikler gram pozitif bakterilerin üremesini engeller. Genellikle ksenik kültür ortamları eğik agar ve üzerinde sıvı besiyeri olacak şekilde bifaziktirler. Bununla birlikte monofazik besiyerleri de başarıyla kullanılmaktadır (Johnson ve ark., 2004).

Bugüne kadar yapılan aksenik kültür çalışmalarının hepsi başarısız olmuştur. Aksenik kültür sistemlerinin kullanılamaması bu parazitle ilgili çalışmaların kısıtlı olmasının en büyük nedenlerinden biridir (Johnson ve ark., 2004).

Pek çok ksenik kültür ortamı *D. fragilis* için kullanılırken, en sık tercih edilen Robinson besiyeridir. Robinson (1968), bu besiyerini amip tanısı için formüle etmiştir. Katı faz olarak tuzlu agar, sıvı faz olarak kendi formüle ettiği ve *E. coli* içeren bir karışım kullanmıştır. Diğer ilaveler eritromisin, at serumu, potasyum fitalat, pepton ve pirinç nişastasıdır. Kültürde 48 saat inkübasyondan sonra hazırlanan preparatlarda nişasta granülü içeren yuvarlak yapılar görülmektedir. Oda ısında 10 dakika kaldıktan sonra düzensiz kısa psödopodları oluşmaktadır. Kültürdeki boyutları 6-40 µm arasındadır. Kültürde üretilen *D. fragilis*'in karakteristik hareketi diğer amiplerden tamamen farklı olmakla birlikte tanı mutlaka bir boyama yöntemi ile doğrulanmalıdır (Johnson ve ark., 2004).

Tüm barsak protozoonları gibi *D. fragilis*'in de kültürünü yapmak teknik olarak zordur, zaman alıcıdır ve çoğu zaman başarısızdır. Bu yöntemler özelleşmiş parazitoloji laboratuvarları için önerilmekte, rutin laboratuvarlar için önerilmemektedir. Kültür sistemlerinin bir diğer dezavantajı parazit dış ortamda kısa sürede parçalandığı için ekimin çok hızlı yapılmasının gerekliliğidir (Johnson ve ark., 2004).

1.2.10. Tedavi

Terapötik ilaçların *D. fragilis*' e etkisiyle ilgili bilgi saf kültürünün yapılamaması ve hayvan modellerinin olmaması nedeniyle çok sınırlıdır. Literatürde tetrasiklin, metranidazol, iyodokuinol, eritromisin, paramomisin ve seknidazolle başarıyla tedavi edilmiş *D. fragilis* enfeksiyonları rapor edilmiştir (Johnson ve ark., 2004).

Yapılan çalışmalarda *D. fragilis*'ın antimikrobiyal ajanlar kullanılarak eliminasyonundan sonra klinik semptomların azaldığı bildirilmiştir (Windsor ve Johnson., 1999).

Ülkemizde yapılan bir çalışma da seknidazolün tek dozunun 35 hastanın biri hariç hepsinde etkili olduğunu bu tek kişinin ikinci doz tedaviden sonra iyileştiği izlenmiştir (Girginkardeşler ve ark., 2003).

Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi (Center for Disease Control and Prevention=CDC) (2004), tarafından önerilen tedavi protokolünde; metranidazol, 2x500-750 mgX10 gün, tetrasiklin çocuklarda önerilmezken erişkinlerde 4x500mg X 10 gün, iyodokuinol 2x650 mgX20 gün, paramomisin için 3x25-35 mg/kgX7 gün dozlarında önerilmektedir. *D. fragilis* için önerilen tüm tedaviler Amerikan Besin ve İlaç İdaresi tarafından (Food and Drug Administration=FDA) araştırma aşamasında olarak kabul edilmektedir.

1.2.11. *Dientamoeba fragilis* ve İBS ilişkisi

D. fragilis, İBS benzeri semptomlara yol açan kronik bir hastalık yaptığı için, bazı hastalarda *D. fragilis* enfeksiyonu İBS olarak yanlış tanı almaktadır. Bu hastalar, iyodokuinol ve doksisisiklin ile tedavi edildiğinde, *D. fragilis*'in eliminasyonu ile İBS benzeri semptomların gerilediği Borody ve ark., (2002). tarafından bildirilmiştir.

1.3. *BLASTOCYSTIS* SPP.

1.3.1. Tarihçe

Blastocystis pek çok hayvan ve insanın enterik protozoon parazitidir. Tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. Parazit 1900'lü yılların başından itibaren bilinmesine rağmen sadece son on yıldır *Blastocystis* biyolojisini açıklayan gelişmeler olmuştur. Bununla birlikte parazitin pleomorfik yapısı ve standardize tetkiklerin bulunmaması verilerde yanlış yorumlamalara neden olmaktadır. Bu durum parazitin laboratuvar tanısında ve çoğalması, yaşam siklusu, prevalans ve patogenezinin anlaşılmasında aksamalara neden olmaktadır. Artan epidemiyolojik, in vivo ve in vitro çalışmalar *Blastocystis*'in patojen olduğunu düşündürmektedir. Doğada birçok genotip mevcuttur ve insan çok sayıda zoonotik genotipin konağıdır. Bu genetik çeşitliliğin, patogenezele ilgili akıl karıştırıcı bilgilerden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Tan, 2008).

1.3.2. Sınıflandırma

Blastocystis izolatları arasında morfolojik farklılıklar olduğunu bildiren yayınlar olmasına rağmen sadece morfolojik kriterlere bakılarak suşların birbirinden ayrılması mümkün gözükmemektedir. *Blastocystis* türlerinin genetik farklılıklarını ortaya koyabilmek için bazı moleküler teknikler çalışılmıştır. En sık kullanılanlar "PCR-restriction fragment length polymorphism" (RFLP), Dideoksi sekanslama ile izlenen PCR ve subtip spesifik primerler [STS] kullanılarak yapılan PCR yöntemleridir (Tan, 2008). Noel ve ark. (2005), tarafından yapılan en geniş çalışmada 7 grup bulunmuş ve 6 tanesinin hem insan hem de hayvanlarda bulunduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmalar insandan hayvana ve hayvandan insana bulaş olduğunu ortaya koymaktadır.

Modern moleküler filogenetik yöntemler uzun yıllardır kullanılmasına rağmen, *Blastocystis* türlerinin *Stramenophiles* içinde kesin sınıflandırılması ancak yakın geçmişte kesin olarak yapılabilmektedir (Arisue ve ark., 2002). Başlangıçta maya olarak sınıflandırılmış daha sonra, bir veya daha fazla çekirdeği olması, endoplazmik retikulumu, golgi cisimleri, mitokondri benzeri organelleri, mantar besiyerlerinde ürememesi, antifungal ilaçlara dirençli ve antiprotozoal ilaçlar olan metranidazole ve emetine duyarlı olması gibi bazı özelliklerinden dolayı protista sınıfı içinde tekrar sınıflandırılmıştır (Zierdt, 1991). *Blastocystis* ssrRNA'nın ve elongasyon faktörü 1- α (EF-1- α)'nın moleküler analizleri maya, sarcodina veya protozoalarla monofilogenetik olmadığını ve *Stramenopile* olarak sınıflandırılması gerektiğini göstermiştir (Silberman ve ark., 1993). *Stramenopile* grubunun üyeleri mastigonemli (kamçıya yatay olarak uzanan saç benzeri çıkıntı) bir kamçıya sahip olmalarıyla karakterizedir. Ancak, *Blastocystis* türlerinde kamçı olmaması ve hareketsiz olmaları nedeniyle yeni bir sınıf oluşturulmuştur. Bu yeni sınıfa *Blastocystea* adı verilmiş ve subphylum *Opalinata*, infrakingdom *Heterokonta*, subkingdom *Chromobiota*, kingdom *Chromista* altında yer almıştır (Cavalier-Smith, 1998). *Blastocystis* için halen tam olarak kabul edilmiş bir sınıflandırma yoktur (Tan, 2008). Son bir filogenetik çalışma homolog genleri arasında genetik farklılıkları dayanarak *Blastocystis* spp.'nin 12 veya daha fazla türe bölündüğünü göstermiştir (Noel ve ark., 2005).

İnsanlar, farklı memelilerden (subtip 1), primat ve domuzlardan (subtip 2), rodentlerden (subtip 4), sığır ve domuzlardan (subtip 5) ve kuşlardan (subtip 6 ve 7) olarak *Blastocystis* spp.'nin konağı olabilir (Noel ve ark., 2005).

1.3.3. Morfoloji

Polimorfik bir protozoon olan *Blastocystis*'in literatürde 4 ana formu bildirilmektedir. *Blastocystis* spp. tek bir kültürde çok farklı formlar

göstermektedir. Bu çeşitlilik hücre biyolojisini değerlendirmeyi güçleştirmekte ve verilerin zaman zaman yanlış değerlendirilmesine neden olmaktadır.

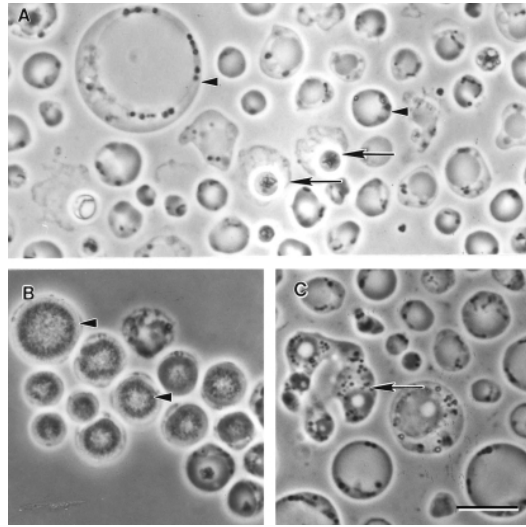
Santral vakuoler form: Kültür ve dışkılarda en sık gözlenen formdur. Yuvarlak, boyutu büyük farklılıklar gösterecek şekilde 2 to 200 μm (ortalama 4 -15 μm) arasında değişen, hücre hacminin %90'ını kaplayan büyük bir santral vakuol içeren yapılardır (Şekil 1.5A). Nükleus ve mitokondri benzeri organeller hücrenin kenarlarında sıkışıp incelmış sitoplazmik bölgede izlenmektedir (Stenzel ve Boreham, 1996). Periodik asit schiff ile karbonhidrat, Sudan Black B boyası ile lipid varlığının gösterilmesi bu vakuolün depo görevini ortaya koymaktadır (Tan, 2008). Bu vakuolün aynı zamanda şizogoni benzeri bir çoğalmaya da ortam sağladığı düşünülmektedir (Suresh ve ark., 1994). Sitoplazma ökaryotlarda tipik olarak izlenen organelleri içermektedir. Transmisyon elektron mikroskobu ile bir veya daha fazla nükleus, golgi cisimciği, endosom benzeri vakuoller, mikrotübüller ve mitokondri benzeri organeller izlenmektedir (Şekil 1.6A). Organizma sıklıkla farklı kalınlıkta olan yüzeysel bir kapsülle sarılıdır. Bu kapsül ilk izolasyonda kalın iken uzayan kültürlerde incelmektedir (Dunn ve ark., 1989). Kapsülün; bakterileri tutmak, osmotik şoka karşı hücreyi korumak ve önemli plazma membran proteinlerini immün sistemden korumak için bir bariyer görevi yaptığı düşünülmektedir (Tan, 2008).

Granüler form: Vakuoler forma benzemekle birlikte ondan sitoplazma ve vakuol içinde izlenen granüllerin varlığı ile ayırt edilir (Şekil 1.5B, 1.6B). Bu formlar sıklıkla non-aksenize, yaşlı, antibiyotikle karşılaşmış kültürlerde görülür ve farklı bir form olmaktan ziyade granül içeren vakuoler formlar oldukları düşünülmektedir (Boreham ve Stenzel, 1993). İntrasellüler granüller heterojendirler ve myelin benzeri inklüzyonlar, küçük veziküller, kristal granülleri ve yağ damlaları oldukları açıklanmıştır (Dunn ve ark., 1989). Santral vakuoldeki reproduktif granüllerin şizogoni benzeri bölünmede rol oynadıkları bildirilmiştir (Singh ve ark., 1995).

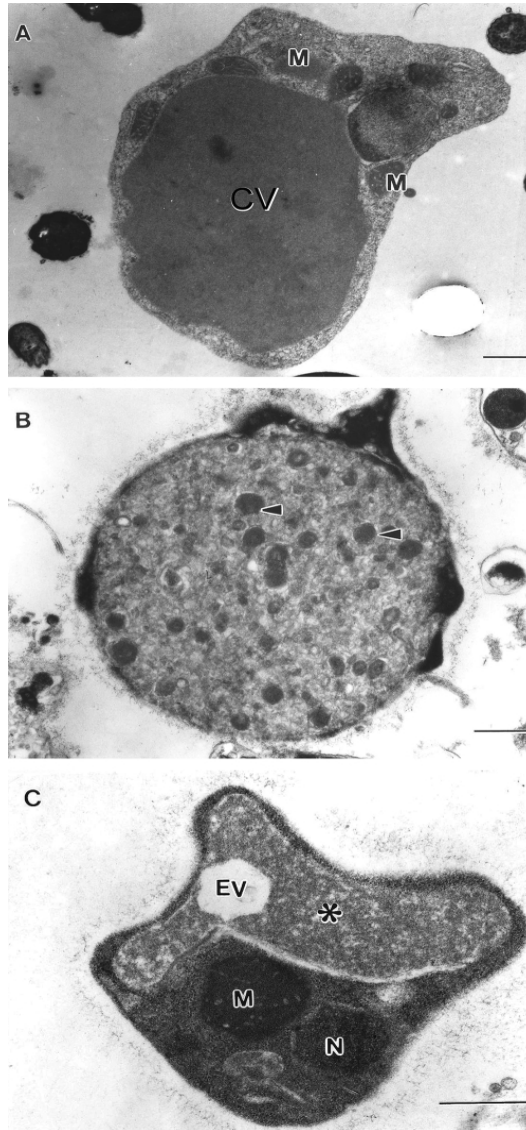
Ameboid form: Çok nadiren görülen bu morfolojik yapının içeriği ile ilgili tartışmalı açıklamalar bulunmaktadır. İnvitro kültürlerde üretilen bu formların ışık ve elektron mikroskopisi ile incelenmeleri sonucunda 10-15 µm boyutunda, tipik vakuoler form morfolojisinde ancak, bir veya iki psödopod içeren yapılar olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.5C, 1.6C). Bu formların içinde görülen bakteri ve artıkları, ameboid formun beslenmede rolü olduğunu ve patogeneizde rol oynadığını düşündürmektedir. Bu form psödopod benzeri sitoplazmik çıkıntılar gözlenmesine rağmen hareketsizdir (Tan, 2008).

Kist formu: Parazitin en son açıklanan formudur ve geç bulunması boyutunun çok küçük olmasından kaynaklanmaktadır (2-5 µm). Kültürlerde nadiren görülmekte ve fekal artıklarla karışmaktadır. Çoğunlukla oval ya da yuvarlak yapıdadır (Şekil 1.5A) ve çok katmanlı bir kist duvarı ile sarıdır. Sitoplazmalarında 1-4 nükleus, mitokondriler, glikojen depoları ve küçük vakuoller bulunmaktadır (Zaman ve ark., 1995). *Blastocystis* spp. kistlerinin normal ısıli sularda 19 güne kadar yaşadığı ancak farklı ısılara ve genel dezenfektanlara duyarlı olduğu bulunmuştur. Vakuoler ve granüler formlar ısı değişikliklerine, ozmotik şoka ve hava ile temasa duyarlıdır (Zierdt, 1991). Wistar farelerinde yapılan invitro çalışmalarda kist formunun bulaştan sorumlu olduğu kanıtlanmıştır (Suresh ve ark., 1993).

Diğer formlar: Bu 4 ana form haricinde formlar da bildirilmiştir. Bunlar avakuoler ve multivakuoler formlardır. Avakuoler formlar santral vakuol içermezken, multivakuoler formlarda birden fazla küçük vakuoller bulunur. Bu formlar kültürlerde üreyen formlardan oldukça küçüktür (5-8 µm) ve sadece taze dışkılarda görüldükleri düşünülmüştür. Küçük boyut ve farklı formların tür varyasyonları veya eksistasyon ve enkistasyonun farklı aşamaları olabilecekleri ileri sürülmektedir (Stenzel ve ark., 1991).



Şekil 1.5. *Blastocystis* spp. subtip 4, faz kontrast mikroskopisi. (A): İn vitro aksenik kültürde farklı boyutlarda görülen vakuolar formlar ve okla gösterilen fekal kist formları (B): Granüler formlar, santral vakuolle birlikte belirgin granüler inklüzyonlar mevcut. (C): Kültürde psödopod benzeri stoplazmik uzantılar gösteren amoeboid formlar. Bar, 10 µm. (Tan, 2008)

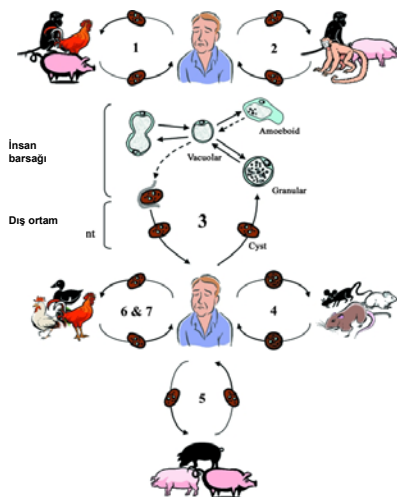


Şekil 1.6. *Blastocystis* spp. Subtip 4 elektron mikrografı. (A): İnce periferik sitoplazmik bantla çevrili büyük santral vakuol (CV) içeren vakuoler form. (B): Tüm santral vakuolü kaplayan granüllerle kaplı granüler form. (C): Santral vakuol ve boş vakuol içeren (EV) irregüler şekilli amoeboid form. M: Mitokondri benzeri organel. N: Nükleus. Bar, 1 µm. (Tan, 2008).

1.3.4. Yaşam Döngüsü

Blastocystis için açıklanmış birbiriyle çelişkili yaşam sikluslarının olma nedeni bu parazitin farklı çoğalma yollarının olmasıdır. Şizogoni, tomurcuklanma, endodiogeni ile çoğalma hipotezlerinin organizmanın pleomorfik yapısından kaynaklandığı ve bu parazitin gerçek çoğalma yolları olmadığı düşünülmektedir (Tan, 2008). Çoklu bölünmeyle çoğalan kalın ve ince duvarlı kistleri içeren bir yaşam siklusu Singh ve ark. (1995) tarafından öne sürülmüştür. Bu araştırmacılar kalın duvarlı kistlerin eksternal bulaştan ve ince duvarlı kistlerin otoenfeksiyondan sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Şizogoni benzeri çoğalma ile ilgili hipotezler olmasına rağmen bunu destekleyen çok az bilimsel kanıt vardır (Zierdt, 1991). Canlı hücre görüntüleme teknolojileri uygulandığı takdirde bu organizmanın çoğalması daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir (Tan, 2008).

Tan (2008) tarafından, son yapılan çalışmalar göz önüne alınarak bir yaşam siklusu önerilmiştir (Şekil 1.7) (Noel ve ark., 2005; Yan ve ark., 2007; Rivera, 2008). Yapılan az sayıda çalışma ile klasik olarak açıklanan formlar arasındaki dönüşüm tam olarak açıklanamamıştır. Kistin öncelikle vakuoler forma dönüştüğü, bu formdan granüler ve ameboid formların oluştuğu düşünülmektedir (Tan, 2008).



Şekil 1.7. Yaşam siklusu, farklı konakları olan zoonotik genotipler (subtip 1-7) göz önüne alınarak hazırlanmıştır. İnsan ve hayvanlar fekal kistlerle enfekte olur ve kistler kalın barsakta vakuoler forma dönüşür. İnsanlarda vakuoler formlar ikiye bölünerek çoğalır ve bu aşamada ameboid ve granüler formlar gelişebilir. Ameboid formdan vakuoler forma ve vakuoler formdan kist formuna geçişle ilgili yeterince bilgi olmadığından bu hipotetik yollar kesik çizgilerle gösterilmiştir. Subtip 1 memeli ve kuşlar arasında çapraz enfeksiyon yapar. Subtip 2, 3, 4, ve 5 sırasıyla, primat/domuz, insan, kemirgen ve domuzları içerir ve subtip 6 ve 7 kanatlı izolatlarını içerir (Tan, 2008'den alınmıştır).

1.3.5. Epidemiyoloji ve Prevalans

Blastocystis spp. tüm dünyada yaygın olarak bulunan ve epidemiyolojik çalışmaların bir çoğunda en sık rastlanılan parazittir (Tan, 2008). Prevalansı ülkeden ülkeye veya aynı ülke içinde farklı topluluklar arasında değişebilmektedir. Genel olarak gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha sık görülmektedir ve bunun düşük hijyen, hayvanlarla temas ve kontamine su ve yiyeceklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Prevalans Japonya'da %1 iken (Hirata ve ark., 2007), Brezilya'da %40.9 (Aguiar ve ark., 2007), Mısır'da %33.3 (Rayan ve ark. 2007) olarak bildirilmiştir. Ülkemizde bu oran % 5.9-19.7 arasında değişmektedir (Balcı ve ark., 2009; Özçakır ve ark., 2007; Özyurt ve ark., 2007; Yaman ve ark., 2008).

PCR yöntemi eklenerek yapılmış epidemiyolojik çalışmalar insan ve hayvanlarda görülen genotiplerin dağılımını belirlerken aynı zamanda bulaş yolları ve kaynaklarla ilgili bilgi sağlamıştır. Beş ülke verilerini içeren bir çalışmada en sık genotip 3 görülürken, bunu genotip 1 ve 6 izlemiştir (Tan, 2008). Ülkemizde yapılan bir çalışmada da subtip 3 (%75.9) en sık bulunan genotip olmuştur (Özyurt, 2008). Bu çalışmalar genotip 3'ün insan kaynaklı olduğunu ve coğrafik orjinle genotip arasında herhangi bir ilişki olmadığını göstermektedir (Tan, 2008).

Bazı çalışmaların aksine (Leder ve ark., 2005; Tungtrongchitr ve ark., 2004), 2003 ve 2008 yılları arasında yapılan çalışmaların çoğu *Blastocystis*'in patojen olduğunu desteklemektedir (Andıran ve ark, 2006; Özçakır ve ark., 2007; Yakoob ve ark., 2004). Tan (2008) bazı popülasyonların *Blastocystis* spp. enfeksiyonlarına daha duyarlı olabileceğini ve risk faktörlerinin; immün yetmezlik, düşük hijyen, tropik bölgelere yolculuk, hayvanlarla temas veya kontamine su ve yiyecekler olduğunu ileri sürmektedir (Tan, 2008).

Blastocystis spp. ile ilgili en önemli sorulardan biri hastalıkla genotip arasında ilişki olup olmadığıdır. Bazı çalışmalar genotip ve hastalık arasında

bir ilişki olmadığını bildirmektedir (Böhm-Gloning ve ark., 1997; Yoshikawa, ve ark., 2004). Bir çalışmada kolonoskopi ile inflamasyon bulguları bulunan hastalarda subtip 1,2 ve 4 bulunurken insanlarda en sık bulunan genotip 3'ün semptomlarla ilişkili olmadığı görülmüştür (Kaneda ve ark., 2001). Bir diğer çalışmada subtip 1'in en patojen tür olduğu ileri sürülürken (Yan ve ark., 2006), ülkemizde yapılan bir çalışmada subtip 2'nin semptomatik hastalarda yüksek olduğu bulunmuştur (Dogruman-AI ve ark., 2008).

1.3.6. Enfeksiyon ve Hastalık

1.3.6.1. Belirti ve semptomlar

En sık kaydedilen semptomlar; karın ağrısı ve diyaredir (Suresh ve Smith, 2004). Semptomlar hafif diyareden, kronik diyareye veya akut gastroenterite kadar değişebilmektedir. Bir çok çalışma gastrointestinal şikayetlerle birlikte X400 büyütmede her sahada 5'ten fazla *Blastocystis* spp. görülmesini enfeksiyon olarak kabul etmektedir (Cirioni ve ark., 1999; Giacometti ve ark., 1999; Kain ve ark., 1987; Kaya ve ark., 2007; Moghaddam ve ark., 2005; Nigro ve ark., 2003; Ok ve ark., 1999; Sheehan ve ark., 1986). *Blastocystis* spp. enfeksiyonu ile ilgili diğer belirtiler fekal lökosit varlığı, eozinofili deri döküntüleri ve ürtikerdir. Bazı helmintler ve *Giardia*'nın yanı sıra *Blastocystis* türlerinin de ürtikere neden olduğuna dair yayınlar bulunmaktadır ve parazitin tedavisiyle deri semptomları gerilemektedir (Tan, 2008).

1.3.6.2. Patojenik potansiyel

Blastocystis spp., ile intestinal hastalık arasında bağlantı olmadığını bildiren çalışmalar semptomatik ve asemptomatik hastalar arasında prevalans farklılıkları olmadığını, sadece dışkıda tek başına *Blastocystis* spp. bulunduğu durumlarda bu iki grup arasında fark olduğunu öne sürmüşlerdir (Chen ve ark., 2003; Leder ve ark., 2005; Udkow vw Markell, 1993). Ancak

asemptomatik seyirli *Giardia* ve *E. histolytica* enfeksiyonlarının daha sonra semptomatik hale geçebilmesi durumu *Blastocystis* türleri için de geçerli olabilir. Ayrıca konak ve parazite ait bazı faktörlerde kliniğin ortaya çıkışını etkilemektedir. *Blastocystis*'ten başka patojenin bulunmadığı ishal vakalarıyla yapılan ve parazitin eradikasyonu ile şikayetlerin geçtiğini bildiren plasebo kontrollü çalışmalar (Nigro ve ark., 2003, Rossignol ve ark., 2005) bu parazitin patojenik potansiyeli olduğunu desteklemektedir.

1.3.7. Laboratuvar tanısı

1.3.7.1. Mikroskopi

Blastocystis tanısı koymanın rutin tanı laboratuvarları için pek çok sıkıntısı vardır. Parazitin patogenezi ile ilgili şüpheler olduğundan bazı laboratuvarlar rapor edilmesinde tereddütler yaşamaktadır. Bir diğer problem, organizmanın polimorfik yapısı nedeniyle, mikroskobide mantarlarla, *Cyclospora* spp. ve yağ globülleri ile karıştırılmasıdır. Ayrıca, klasik vakuoler formlar dışında baskın değilse ve daha küçük olan kist formları mevcutsa tanı koymak güç olmaktadır (Stenzel ve ark., 1991; Tan, 2008).

Direkt mikroskobide boyalı preparatlar tercih edilmektedir. Parazitin düzensiz atılımı nedeni ile çoklu dışkı incelemeleri yapılmaktadır. Lugol solüsyonu ile hazırlanan ıslak preparatlar ve asid-fast, Giemsa ve Trikom boyamalar tanıda uygulanmakla birlikte, Trikom en sık kullanılan boyama yöntemidir (Tan, 2008). İn vitro kültürler özgüllüğü arttırmaktadır (Termmathurapoj, 2004). Formol-etil-asetat yöntemi bu parazitin tanısında uygun değildir (Stensvold, 2007). *Blastocystis*'in rapor edilmesinde önerilen genel kriter ıslak preparatlarda (X400) veya boyalı preparatlarda (X1000) her sahada beş veya daha fazla parazitin görülmesidir (Garcia, ASM Press 2007; Cirioni ve ark., 1999; Giacometti ve ark., 1999; Kain ve ark., 1987; Kaya ve ark., 2007; Moghaddam ve ark., 2005; Nigro ve ark., 2003; Ok ve ark., 1999;

Sheehan ve ark., 1986). Bazı çalışmalar parazit yoğunluğu ile semptomlar arasında bir paralellik olduğunu belirtirken (Ok ve ark., 1999; Sheann ve ark., 1986) bazı çalışmalar ise böyle bir paralelliğin olmadığını göstermektedir (Leder ve ark., 2005; Özyurt ve ark., 2008). Bu farklılığın nedeni açık olmamakla birlikte genotipik farklılıklar ve konak faktörleri olabileceği ileri sürülmektedir (Tan, 2008).

1.3.7.2. Kültür

Jones besiyeri insan örneklerinden izolasyon için en sık kullanılan ksenik besiyeridir (Tan, 2008; Suresh ve Smith, 2004, Termmathurapoj ve ark., 2004). Yoshikawa ve ark. (2004) tarafından geliştirilen at serumlu asparjinli Ringer solüsyonu bir diğer besiyeridir. Aksenize kültürler için Modifiye Dulbecco besiyeri veya Locke solüsyonlu bifazik yumurtalı besiyeri kullanılmaktadır (Tan, 2008). Sodyum tiyoglukonat eklenmiş yumuşak agarda veya solid agarda bakteri kolonilerine benzer koloniler yaparlar ve bu koloniler aksenizasyon işlemi için kullanılır (Tan ve ark., 2000). Aksenik kültürlerin yapılması moleküler ve biyokimyasal çalışmalar için çok önemlidir. Ancak, bakteri ve mantarların uzaklaştırılması için antibiyotik kokteyllerinin kullanılması birkaç hafta sürebilecek uzun bir işlemdir ve kontaminantların uzaklaştırılması garanti değildir. Ayrıca bazı izolatlar bakteri olmaksızın canlılıklarını sürdürememektedirler (Tan, 2008).

1.3.7.3. Seroloji

Blastocystis spp.'ye karşı IgG ve IgA yanıtı oluşmaktadır. Bu yanıt, IFA ve ELISA testleri ile belirlenmektedir. ELISA titreleri 1:50 ve 1:1,600 arasında değiştiği ve yüksek titrelerin semptomatik enfeksiyonlarla ilişkili olduğu Zierdt ve ark., (1995) tarafından gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda ise semptomatik hastaların serum titrelerinde çok az bir artış olduğunu bildirilirken (Kaneda ve ark., 2000), kronik enfeksiyonlarda anlamlı artışın olduğu bildirilmiştir (Zierdt ve ark., 1995). Bu farklılıklar antijen elde edilen suşların antijenik ve genotipik

farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Şu anda mevcut olmamasına rağmen, insanları enfekte eden genotiplerin monoklonal antikorlarının, antijen belirleme çalışmalarında yararlı olabileceği düşünülmektedir (Tan, 2008).

Blastocystis ilişkili semptomlar kendi kendini sınırlayıcıdır ve genellikle 1-14 gün arasında sonlanmaktadır (Leder ve ark., 2005). Bununla birlikte bazı enfeksiyonlar tedavi edilmezse aylarca sürebilmektedir. Kronik enfeksiyonda serolojik sonuçlarla ilgili çelişkili raporlar vardır (Kaneda ve ark., 2000; Zierdt ve ark., 1995). Sonuç olarak *Blastocystis* türlerine karşı konak yanıtı ve antijenik farklılıklarla ilgili bilgiler kısıtlı olduğu için, rutin laboratuvar tanısında seroloji kullanılmamalıdır (Tan, 2008).

1.3.7.4. Moleküler yaklaşımlar

Blastocystis identifikasyonu için PCR temelli diagnostik testler açıklanmıştır. Subtip spesifik tanısal primerler, *Blastocystis* türlerinin polimorfik DNA'sının randomize amplifikasyonundan geliştirilmiştir (Yoshikawa ve ark., 2000). Böylesi bir yaklaşımın epidemiyolojik çalışmalar için oldukça faydalı olduğu ve insan ve hayvanlarda hastalık yapan genotiplerin dağılımı hakkında bilgi sağladığı görülmüştür. Birçok çalışmada direkt dışkıdan yapılan analizlerde boya ve kültür yöntemleri ile karşılaştırıldığında PCR yönteminin üstün olduğu gösterilirken (Stensvold ve ark., 2007) bazı çalışmalar da direkt dışkıdan bakılan PCR'ın kültürden düşük performanslı olduğu gösterilmiştir (Termmathurapoj, 2004). Stensvold ve ark. (2007) geliştirdiği PCR yöntemi dışkıdan *Blastocystis* spp. tanısında %100 özgüllük göstermiş ve dışkıda az parazit bulunması ve parazitlerin dejenere olması durumunda bile çalışmıştır. *Blastocystis* spp. tanısında kullanılacak RT-PCR yöntemi de açıklanmıştır (Jones ve ark., 2008). Bu yöntemle parazit genomunda 152 bp'lik bir bölge kullanılarak subtip 1, 3 ve 4'e ait türler belirlenebilmektedir.

Özet olarak; *Blastocystis* spp.'nin laboratuvar tanısında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Trikrom boyama yöntemi duyarlı bir yöntemdir ve sahada

beşten fazla parazit olup olmadığıyla ilgili bilgi de vermektedir. Boyama yöntemi daha duyarlı olduğu için lugol solüsyonu ile preparat değerlendirilmesinin tanı sürecinde önemli bir katkısı yoktur. Düşük parazit sayısı veya kist sayısının çoğunlukta olduğu fekal ya da çevresel örneklerde kültür yöntemi tanı için faydalıdır (Suresh ve Smith, 2004). Kültür ve boyama yöntemleri beraber kullanıldığı takdirde tanı için hem ucuz hem de özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek yöntemlerdir. Genotip ve parazit patogenezi arasında bir ilişki olduğu kanıtlanırsa gelecekteki laboratuvar uygulamalarında PCR yöntemleri de yerini almalıdır. Taze dışkıdan PCR analizi mikroskopiye iyi bir alternatiftir ve analiz aynı zamanda genotipin belirlenmesini de mümkün kılmaktadır (Tan, 2008). Real time PCR ise güvenilir, hızlı ve çoklu genotipleri ayırabilecek avantajlı bir tanı yöntemi olarak bildirilmektedir (Jones ve ark., 2008).

1.3.8. Tedavi

Blastocystis ile enfekte kişilerin tedavisi, parazitin kesinleşmemiş patogenezi ve hastalığın kendini sınırlayıcı özelliği nedeniyle tartışmalıdır. Tedavi önerildiğinde en sık tercih edilen ajan metranidazoldür (Nigro ve ark., 2003; Taşova ve ark., 2000). Paramomisin (Pasqui ve ark., 2004) ve kotrimaksazol (Andıran ve ark., 2006) gibi ajanlarla kombine halde de önerilmektedir. Nitrozoksanide ile tedavi edilen vaka grupları da bildirilmektedir (Rossignol ve ark., 2005). Ancak yapılan tüm çalışmalarda %100 tedavi sağlanan grup olmamış hatta aynı ilaç için farklı bölgelerden çok farklı duyarlılıklar bildirilmiştir (Moghaddam ve ark., 2005; Ok ve ark., 1999). Bunun nedeninin bölgesel ilaç direnci farklılıkları olduğu düşünülmektedir. Özellikle kist formlarının daha dirençli olduğu görülmüş ve invitro çalışmalarda paramomisin, kotrimaksazol gibi ajanların direkt parazite etkili olmadığı halde beslenme kaynağı olan bakterileri öldürerek parazite dolaylı etkili olduğu düşünülmüştür (Zierdt ve ark., 1983).

Sonuç olarak; bazı tedavi başarısızlıklarına rağmen metranidazol ilk seçenek ilaç olarak bildirilmekte kotrimaksazol ve nitozoxanid ise ikinci seçenek ilaçlar olarak önerilmektedir. Tedavi kronik diyarelerde dışkıda başka bir patojen görülmemesi durumunda önerilmektedir (CDC, 2004).

1.3.9. *Blastocystis* spp. enfeksiyonu ve İBS ilişkisi

İki çalışmada İBS hastalarında *Blastocystis*'e daha sık rastlanıldığı bildirilmektedir (Giacometti ve ark., 1999; Yakoob ve ark., 2004). Serolojik bir çalışmada ise İBS hastalarında *Blastocystis*'e karşı IgG2 değerlerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Hussain ve ark., 1997). Bazı araştırmacılar ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İBS ile *Blastocystis* spp. enfeksiyonları arasında herhangi bir korelasyon olmadığını bildirmişlerdir (Tungtrongchitr ve ark., 2004). Udkow ve Markell (1993), İBS'de oluşan anormal intestinal koşulların parazitin aşırı çoğalması için uygun ortam sağlayabileceğinin öne sürmektedir. Mevcut veriler İBS ile *Blastocystis* spp. arasında bir ilişki olduğunu düşündürmekle birlikte *Blastocystis* spp. henüz İBS'nin etyolojik ajanı olarak kabul edilmemektedir.

Bu çalışmada, Roma III tanı kriterlerine göre irrite barsak sendromu (İBS) tanısı konulmuş hastaların dışkılarında *Dientamoeba fragilis* ve *Blastocystis* spp. parazitlerinin prevalansının mikroskopi ve kültür yöntemleri ile araştırılması, ve bu parazitlerin İBS oluşumuyla bağlantılarının olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Eylül 2009-Şubat 2010 tarihleri arasında Roma III kriterlerine göre İBS tanısı konulan 55 hasta, çeşitli polikliniklere gastroenterit şikayetleriyle başvuran 80 hasta ve hastaneye başka şikayetlerle başvurmuş hiçbir gastroenterit şikayeti olmayan 50 hastaya ait dışkı örnekleri laboratuvarımızda incelemeye alınmıştır.

2.1. İrrite Barsak Sendromlu Hasta Grubu

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Kliniği'ne başvurarak Roma III kriterlerine göre (Drossman, 2006) İBS tanısı almış 55 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastalara fizik muayenenin yanı sıra tam kan sayımı, sedimentasyon, karaciğer fonksiyon testleri, üre, kreatinin, dışkıda gizli kan testi yapılmıştır. Roma III kriterlerinin tamamına uyan bu hastaların hepsine kolonoskopi uygulanmıştır. Hastalar Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarına dışkı incelemesi için yönlendirilmiş ve her bir hasta için Ek-1'de görülen hasta takip formuna, klinik semptomları, yaş, cinsiyet, varsa diğer hastalıkları, yolculuk hikayeleri, immün durumları, geçirdikleri paraziter enfeksiyonlar ve iletişim bilgileri not edilmiştir. Ayrıca hastalara gönüllü bilgilendirme formu imzalatılmıştır (Ek-2).

2.2. Kontrol Grubu 1 ve 2

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi çeşitli polikliniklerine gastroenterit şikayetleriyle başvuran 80 hasta Kontrol Grubu 1 olarak ve hastaneye başka şikayetlerle başvurmuş hiçbir gastroenterit şikayeti olmayan 50 hasta Kontrol Grubu 2 olarak Ek-1'de görülen hasta takip ve rapor formuna bilgileri kaydedilerek çalışmaya dahil edilmiştir.

2.3. Örneklerin Temini, İncelenmesi ve Saklanması

Tüm hastalara dışkı örneği vermeleri için uygun örnek kapları verilmiştir. Hastalara evden getirilen dışkı örneklerinin kabul edilmeyeceği, hastanede verdikleri örneklerin de hemen laboratuvara teslim edilmesi gerektiği aksi halde zaman kaybı nedeniyle incelemenin yanlış negatif sonuçlar verebileceği anlatılmıştır. Laboratuvara teslim edilen tüm dışkı örneklerinden bekletilmeden trikrom ve Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama için preparatlar hazırlanmış, nativ-Lugol incelemeleri yapılmış, Robinson besiyerine (Clark ve Diamond, 2002) ve at serumlu-asparjinli Ringer solüsyonuna (Yoshikawa ve ark., 2004) ekimleri yapılmıştır. Dışkı örnekleri ayrıca bakteriyolojik olarak *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* ve *E.coli* O157 enfeksiyonu açısından standart prosedürlerle incelenmiştir. Dışkıların *C. difficile* toksin ve viral etkenler açısından incelemeleri yapılmamıştır.

2.4. Mikroskopik İnceleme

2.4.1. Direkt bakı (Nativ Yöntemi)

Bir lam üzerine hastanın protokol numarası yazıldıktan sonra, bir damla %0,9 NaCl solüsyonu ile uygun miktarda dışkı dikkatlice karıştırılmış ve üzerine lamel kapatılarak x40 büyütme objektif ile ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir.

2.4.2. Lugol Yöntemi

Lugol boyama yöntemiyle, kistlerin iç yapılarının ayrıntılı olarak görülmesi ve birbirlerinden ayırt edilmesi sağlanır. 1 gr potasyum iyodür 100 ml distile su içinde çözdürülmüş, doymuş solüsyon elde edilinceye kadar 1.5 gr iyot kristali eklenmiş ve solüsyon koyu renkli bir şişede saklanmıştır. İnceleme için uygun miktarda dışkı ile 1 damla lugol solüsyonu, temiz bir lam üzerinde

karıştırılıp, lamelle kapatılarak x40 büyütmele objektif ile ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir.

2.4.3. Trikrom Boyama İçin Solüsyon ve Boyaların Hazırlanması

2.4.3.1. Schaudinn Fiksativ

1. 85 gr civa klorür (HgCl_2) 1000 ml distile su içinde ısıtılarak eritilmiştir.
2. Soğumaya bırakılan doymuş civa klorür solüsyonu süzülerek cam kapaklı bir şişede saklanmıştır.
3. 600 ml doymuş civa klorür solüsyonu, 300 ml %95 etil alkol ve 15 ml gliserin ile karıştırılarak “Stok Schaudinn Solüsyonu” elde edilmiştir.
4. Kullanım öncesi, 95 ml stok solüsyona 5 ml glasiyal asetik asit eklenmiştir.

2.4.3.2. Trikrom Boyası

1. Çalışmada hazır trikrom boyası (SIGMA HT Lot no:31016) kullanılmıştır.

2.4.3.3. D’Antoni’nin Modifiye İyot Solüsyonu

1. 1 gr potasyum iyodür 100 ml distile suda eritilmiştir.
2. Solüsyona 1,5 gr iyot kristalleri eklenmiş, kırmızı-kahverengi arası bir renk oluşana ve doymuş solüsyon elde edilene dek çalkalanmıştır.
3. Solüsyon süzülüp cam kapaklı ve koyu renkli bir şişede saklanmıştır.

2.4.3.4. %90 Asit Alkol

995,5 ml % 90 etil alkole 4,5 ml glasiyal asetik asit eklenerek elde edilmiştir.

2.4.3.5. Karbol-Ksilen Solüsyonu

Bir ölçek karbolik asit ile üç ölçek ksilen karıştırılır ve solüsyon cam şişede 1 yıl veya daha fazla saklanabilir.

2.4.3.6. Trikrom Boyama Yöntemi

1. Trikrom boyama yöntemi için kapaklı, derin, cam şaleler kullanılmıştır. Her şalenin kapağına sıra numarası, solüsyonun içeriği ve yaymanın bu şalede kalma süresi yazılmıştır. Yaymalar bir şaleden diğerine aktarılırken kurutma kağıtlarına değdirilerek fazla sıvı alınmış ve bu şekilde solüsyonların karışması engellenmiştir.

2. Rodajlı bir lam alınarak hastanın protokol numarası yazılmıştır. Temiz bir eküvyon ile alınan dışkı örneğinden lamın 1/3 alt kısmını kaplayacak şekilde ince bir yayma hazırlanmıştır. Yaymalar kurumadan Schaudinn fiksatifine daldırılmış ve en az 30 dakika, en çok bir gece bekletilmiştir.

3. Fikse edilmiş yaymalar, % 70'lik etil alkole demli çay rengi oluşuncaya dek D'Antoni'nin iyot solüsyonu eklenmesiyle elde edilen solüsyonda 2-4 dakika tutulmuştur.

4. İki ayrı % 70 alkol solüsyonunda 2-4 dakika tutulmuştur.

5. Yaymalar hazır trikrom boyası içeren şalede 5-8 dakika tutulmuştur.

6. Fazla boyası kurutma kağıtlarında süzülen lamlar daha sonra dekolizasyon için 2-3 saniye % 90 asit-alkol solüsyonuna daldırılmış, iki ayrı % 95'lik alkol solüsyonunda çalkalanmış ve karbol-ksilen solüsyonuna aktarılmıştır.

7. İki ayrı karbol-ksilen solüsyonunda 2-4 dakika tutulmuştur.

8. İki ayrı ksilen içeren şalede 2-4 dakika tutulmuştur.

9. Yaymalar Entellan damlatılarak 22x22 mm'lik lamelle kapatılmış ve ışık mikroskopunda x100'lük büyütme immersiyo objektifinde incelenmiştir.

2.4.4. Robinson Besiyeri (Robinson, 1968):

2.4.4.1. Eritromisin Solüsyonu

0.5 g eritromisin solüsyonu 20 ml %70 etanol içinde çözündürülmüş, distile su ile son konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır.

2.4.4.2. Baktopepton Solüsyonu

Saf su ile %20 baktopepton solüsyonu hazırlanır. Otoklavlanır ve buzdolabında saklanır.

2.4.4.3. 10X Potasyum Fitalat Stok Solüsyonu

102 g potasyum hidrojen fitalat ve 50 ml %40 sodyum hidroksid karıştırılır. Saf su ile bir litreye tamamlanır, pH 6.3'e ayarlanır. Otoklavlanır, oda ısında saklanır. Kullanılmadan önce steril saf su ile 10 kat sulandırılır.

2.4.4.4. Stok Fitalat-Baktopepton Solüsyonu

100 ml 1xfitalat solüsyonuna 1.25 ml %20 Bacto Peptone solüsyonu eklenerek hazırlanır. Buzdolabında saklanır.

2.4.4.5. 10x R stok besiyeri

Distile su içinde 25.0 g sodyum klorid; 10.0 g sitrik asit; 25.0 g potasyum fosfat, 5.0 g monobazik amonyum sülfat; 0.25 g magnezyum sülfat· 7H₂O; ve 20 ml 85% laktik asit solüsyonu karıştırılır ve 500 ml'ye distile su ile tamamlanır. 10 kat dilüe edilir ve pH 7'ye ayarlanır. Otoklavlanır, oda ısında saklanır.

2.4.4.6. BR besiyeri

1xR konsantrasyon besiyeri standart *E. coli* suşu (ATCC 25922) ile karıştırılır. 37°C'de 48 saat inkübe edilir ve oda ısında saklanır.

2.4.4.7. BRS besiyeri

Eşit miktarda inaktive edilmiş sığır serumu ve BR besiyeri karıştırılır ve 37°C de 24 saat inkübe edilir ve oda ısında saklanır.

2.4.4.8. Noble Agar

Agar kısmını ayarlamak için vida kapaklı tüplerde distile su ile %1.5 Noble agar hazırlanır, otoklavlanır. 3-5 ml olacak şekilde tüplere dağıtılır, tekrar otoklavlanır ve 1,5 cm'lik bir yüzey oluşacak şekilde eğilerek soğutulur. Oda ısında veya buzdolabında saklanır.

2.4.5. *Blastocystis* spp. için kültür yöntemi:

Çalışmamızda Yoshikawa ve ark. (2004), tarafından önerilen at serumlu asparjinli Ringer solüsyonu kullanılmıştır.

2.4.5.1. Ringer Solüsyonu:

8.6 g sodyum klorid, 0.3 g potasyum klorid ve 0,33 g kalsiyum klorid 1000 ml distile suda çözdürülerek hazırlanmıştır. Bu solüsyona 50 mg asparjin eklenerek buzdolabında saklanmıştır. Fekal örnekler inoküle edilmeden önce Ringer solüsyonuna %10 at serumu eklenmiş ve 2 ml'lik ependorf tüplerine 1'er ml dağıtılmıştır.

2.4.6. Ekimlerin yapılması

Robinson Besiyerine ekim yapılması: Ekimin yapılmasından hemen önce agarlı tüplere 3 ml 1xfitalat-baktopepton, 1 ml BRS besiyeri ve 50 µl eritromisin solüsyonu eklenir. Gönderilen örneklerden bekletilmeden fındık büyüklüğünde dışkı inoküle edilmiştir. Her örnekten iki kültür hazırlanmıştır. 37 °C'de inkübe edilen tüplerden 48, 72 ve 96. saatlerde direkt preparat hazırlanarak incelenmiştir.

At serumlu-asparjinli Ringer solüsyonuna ekim yapılması: Gönderilen örneklerden bekletilmeden pirinç tanesi miktarında dışkı inoküle edilmiştir. Her örnekten iki kültür hazırlanmıştır. 37 °C'de inkübe edilen tüplerden 24, 48 ve 96. saatlerde direkt preparat hazırlanarak incelenmiştir.

2.5. *D. fragilis* ve *Blastocystis* spp. tespit edilen hastaların tedavi ve takipleri

D. fragilis tespit edilen hastalara Girginkardeşler ve ark. (2003), önerisi doğrultusunda, yetişkinlere 2 g tek doz olarak seknidazol verilmesi planlanmıştır. *Blastocystis* spp. tespit edilen hastalarda ise metranidazol 750 mg/gün 7 gün kullanılması planlanmıştır (Nigro ve ark., 2003; Taşova ve ark., 2000). Sağaltım tamamlandıktan bir gün sonra tüm hastalar kontrole çağırılmış, kısa bir görüşme yapıp semptomların ortadan kalkıp kalkmadığı,

verilen ilacın yan etkiye yol açıp açmadığı sorgulanmış, daha sonra aynı yöntemlerle dışkının parazitolojik incelemesi yapılmış ve parazitin eradike olup olmadığı araştırılmıştır. Eradikasyonun sağlanmaması durumunda *D. fragilis* için hastaya aynı dozda ikinci bir seknidazol kürü verilmesi, *Blastocystis* spp. için ise trimetoprim-sulfametaksazol (320 mg TMP, 1600 mg SMX) 7 gün verilmesi planlanmıştır (Ok ve ark., 1999). Sağaltım tamamlandıktan bir hafta sonra kontroller tekrarlanmıştır.

2.6. İstatistik Analiz:

Analizlerde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 11.5 PC programı kullanıldı. Kategorik değişkenlerin analizinde Ki-kare testi (ve/veya Fisher' s exact testi) kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. İrrite Barsak Sendromlu Hasta Grubu

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvurarak Roma III kriterlerine göre İBS tanısı almış 13 erkek 42 kadın olmak üzere 55 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların yaş ortalaması $37.07 \pm 11,17$ olarak bulunmuştur.

Hastalarda, karın ağrısı (%83.6), kabızlık (%80) ve şişkinlik (%78.2) en sık rastlanan şikayetlerdi. İshal (%30.9), bulantı (%23.6), kusma (%9) ve iştahsızlık (%7) görülen diğer şikayetlerdi. Semptomlar kadın ve erkeklerde eşit dağılımdaydı. Çalışmaya alınan hastaların şikayetleri en az 6 ay, en çok 10 yıldır devam etmekteydi (ort 2,6 yıl).

On hasta son bir yıl içinde yurt içi yakın illere seyahat ettiğini bildirirken, hiçbir hasta yurt dışına çıkmamıştır. Yedi kişide daha önce geçirilmiş kıl kurdu, 3 kişide şerit düşürme ve 1 kişide *Giardia* enfeksiyonu hikayesi mevcuttu. Bu hasta grubuna ait demografik bilgiler Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Hastaların 16'sında (%29.1) direkt mikroskopi ile, 18'inde (%32.7) trikrom boyama ve kültür yöntemi ile *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir. *Blastocystis* spp., 10 kadın ve 8 erkek hastada saptanmıştır. Direkt mikroskopilerinde *Blastocystis* spp. tespit edilen 16 hastanın tamamında her sahada 5 ve üzeri *Blastocystis* spp. görülmüştür.

Yurt içi seyahat, cinsiyet, yaş gibi faktörler ile *Blastocystis* enfeksiyonu arasında korelasyon görülmemiştir ($p=0,2$).

Çizelge 3.1. İBS hasta grubuna ait bilgiler.

Sıra no	Karın Ağrısı	Şişkinlik/Gaz	Kabızlık	İshal	Bulantı	Kusma	İştahsızlık	Şikayet süresi (yıl)	Cinsiyet	Yaş	Yolculuk	Direkt Mik.	Trikrom	Kültür
1	✓	✓	✓					1	K	45		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
2	✓	✓	✓	✓	✓			1	E	36				
3	✓		✓		✓			2	K	34				
4	✓	✓	✓		✓	✓		4	K	29				
5	✓	✓	✓	✓				2	K	29				
6	✓	✓		✓	✓	✓		1	K	45		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
7	✓		✓					3	K	50				
8	✓	✓	✓					3	E	34		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
9	✓	✓	✓					4	K	37				
10	✓	✓	✓					6 ay	K	34				
11	✓	✓	✓		✓			1	E	47				
12	✓		✓		✓	✓		1	K	24				
13	✓			✓				5	K	35	YURT İÇİ	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
14	✓		✓					4	E	21				
15	✓		✓					2	K	42				
16	✓	✓	✓	✓				2	K	29				
17	✓	✓		✓				2	K	50		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
18	✓	✓	✓					3	K	39		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
19	✓			✓			✓	1	K	40				
20		✓	✓					8 ay	K	61				
21	✓	✓	✓					2	E	38				
22	✓	✓	✓					3	E	25		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
23	✓	✓	✓					2	K	41		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
24	✓		✓					5	K	29				
25	✓	✓	✓	✓				1	K	51				
26	✓	✓	✓		✓			2	E	25		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
27	✓		✓	✓				1	K	21	YURT İÇİ			
28	✓		✓		✓			1	K	47				

Çizelge 3.1. İBS hasta grubuna ait bilgiler (devamı).

Sıra no	Karın Ağrısı	Şişkinlik/Gaz	Kabızlık	İshal	Bulantı	Kusma	İştahsızlık	Şikayet süresi (yıl)	Cinsiyet	Yaş	Yolculuk	Direkt Mik.	Trikrom	Kültür
29		✓	✓		✓	✓		6	K	23				
30		✓	✓			✓		2	K	60				
31		✓	✓		✓			5	K	37			Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
32	✓	✓	✓	✓				1	E	44		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
33		✓	✓					2	K	59				
34			✓				✓	2	K	54				
35	✓	✓	✓					2	K	32	YURT İÇİ			
36	✓	✓	✓					2	K	18				
37	✓	✓	✓					5	E	32		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
38	✓	✓						4	K	32		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
39	✓	✓	✓	✓			✓	10	K	53				
40	✓	✓	✓					6	K	59				
41	✓	✓	✓		✓			8 ay	K	27	YURT İÇİ		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
42	✓	✓					✓	2	K	40	YURT İÇİ			
43		✓						4	K	45	YURT İÇİ			
44	✓	✓	✓	✓				3	K	34				
45		✓	✓					3	K	47	YURT İÇİ			
46	✓	✓						6 ay	E	45		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
47				✓				5	E	35	YURT İÇİ	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
48	✓	✓	✓		✓			8 ay	K	21	YURT İÇİ	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.
49	✓	✓	✓					2	K	23				
50	✓	✓	✓	✓				6 ay	E	35				
51	✓	✓	✓		✓			9	K	24				
52	✓	✓		✓				2	K	21	YURT İÇİ			
53	✓	✓						3	K	34				
54	✓	✓	✓	✓				1	K	33				
55	✓	✓	✓	✓				3	E	34		Blastocystis spp.	Blastocystis spp.	Blastocystis spp.

Blastocystis spp. tanısında kültür yöntemi altın standart olmakla birlikte, İBS Hasta Grubu'nda; direkt mikroskopi, trikrom boyama ve kültür yöntemleri tanısıl olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Her üç yöntemle hiçbir hastada *D. fragilis* tespit edilmemiştir.

Yapılan bakteriyolojik kültürlerde *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. ve *E.coli* O157 izole edilmemiştir.

Yapılan nativ-Lugol, trikrom ve Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama incelemeleri sonucunda *Blastocystis* spp. harici patojen ya da apatojen hiçbir parazite rastlanmamıştır.

Hastaların 18'inde (%32,7) direkt mikroskobik incelemede dikkati çekecek şekilde floraya hakim olmuş mantar sporlarının varlığı not edilmiştir.

3.2. Kontrol Grubu 1

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi çeşitli polikliniklerine akut gastroenterit şikayetleriyle başvuran 80 hasta Kontrol grubu 1 olarak isimlendirilmiştir. Bu grupta 33 erkek ve 47 kadın hasta mevcuttu ve yaşları 4 ila 81 arasında değişmekte idi (ortalama 32.0).

Hastalarda, karın ağrısı (%88,8), ishal (%73,8) ve kusma (%22,5) en sık rastlanan şikayetlerdi. Çalışmaya alınan hastaların şikayetleri en az 1 gün en çok 5 gündür devam etmekteydi.

Bu hasta grubunda; 1 kişide *Salmonella* spp., 2 kişide *Giardia intestinalis*, 1 kişide *Iodamoeba butschlii* ve 1 kişide de *Entamoeba coli* tespit edilmiştir.

Hastaların 6'sında (%7.5) direkt mikroskopi ile, 8'inde (%10,0) trikrom boyama ile ve 15'inde (%18.8) kültür yöntemi ile *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir. Direkt mikroskopilerinde *Blastocystis* spp. tespit edilen 6 hastanın tamamında her sahada 5 ve üzeri *Blastocystis* spp. görülmüştür. *Iodamoeba butschlii* ve *Entamoeba coli* görülen kişilerin her ikisinde *Blastocystis* spp.'de tespit edilmiştir.

Kontrol grubu 1'de; *Blastocystis* spp. tanısında direkt mikroskopi, trikrom boyama ve kültür yöntemleri tanısız olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak direkt mikroskopi ile kültür arasında anlamlı fark bulunurken ($p<0,05$), Trikrom boyama ile kültür arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Her üç yöntemle hiçbir hastada *D. fragilis* tespit edilmemiştir.

3.3. Kontrol Grubu 2

Hastanemize başka şikayetlerle başvurmuş hiçbir gastroenterit şikayeti olmayan 50 hasta Kontrol grubu 2 olarak isimlendirilmiştir. Bu grupta 17 erkek ve 33 kadın hasta mevcuttu ve yaşları 15 ila 59 arasında değişmekteydi (ortalama 34.5).

Bu hasta grubunda; 1 kişide (%2,0) direkt mikroskopi ve trikrom boyama ile ve 3 kişide (%6) kültür yöntemi ile *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir. Direkt mikroskopi ile *Blastocystis* spp. tespit edilen hastanın incelemesinde her sahada 5'ten az *Blastocystis* spp. görülmüştür.

Kontrol grubu 2'de başka bir bakteriyel veya paraziter patojene rastlanmamıştır.

İrrite barsak sendromlu hasta grubu, kontrol grubu 1 ve 2’de direkt mikroskopi, trikrom boyama ve kültür yöntemi ile tespit edilen *Blastocystis* spp. ile infekte hastalar Çizelge 3.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. İrrite barsak sendromlu hasta grubu, kontrol grubu 1 ve 2’de direkt mikroskopi, trikrom boyama ve kültür yöntemi ile tespit edilen *Blastocystis* spp. infekte kişi sayıları

	İBS Hasta Grubu n(%)	Kontrol Grubu 1 n(%)	Kontrol Grubu 2 n(%)
Direkt Mikroskopi	16 (%29.1)	6 (%7.5)	1 (%2,0)
Trikrom Boyama	18 (%32.7)	8 (%10,0)	1 (%2,0)
Kültür	18 (%32.7)	15 (%18.8)	3 (%6)
Toplam	18 (%32.7)	15 (%18.8)	3 (%6)

Blastocystis spp. tespit edilen hasta sayıları karşılaştırıldığında, irrite barsak sendromlu hasta grubu ile kontrol grubu 1 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İrrite Barsak Sendromlu hasta grubundan ve kontrol grubu 2’den *Blastocystis* spp. tespit edilen hasta sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Blastocystis spp. tespit edilen hastalar telefonla haberdar edilerek hastanemiz Gastroenteroloji Kliniği’ne veya en yakın Sağlık Ocağı’na tedavi olmak üzere yönlendirilmişlerdir. Tedavi için metranidazol 750 mg/gün 7 gün kullanılmıştır. Sağaltım tamamlandıktan bir gün sonra tüm hastalar kontrole çağrılmış, kısa bir görüşme yapıp semptomlarının ortadan kalkıp kalkmadığı sorgulanmış, daha sonra aynı yöntemlerle dışkının parazitolojik incelemesi yapılmış ve parazitin eradike olup olmadığı araştırılmıştır. İBS hasta

grubunda *Blastocystis* spp. tespit edilen 18 hastanın 12'sinde (%67) tedavi sonrası parazitin eradike olduğu görülmüş, geri kalan 6 hastaya trimetoprim-sulfametaksazol (320 mg TMP, 1600 mg SMX) 7 gün verilmiştir. Bu 6 (%33) hastanın da tedavi sonrası parazitolojik incelemelerinde parazitin tamamen eradike olduğu görülmüştür. Tedavi sonrası 15. gün ve 1. ayda yapılan görüşmelerde 4 kişi (%22,2) (3 erkek, 1 kadın) şikayetlerinin tamamen geçtiğini bildirirken, 11 (%61,1) hasta diğer bulgularda hafifleme olmakla birlikte kabızlığının devam ettiğini bildirmiş, 3 (%16,7) hasta ise şikayetlerinde hiçbir değişiklik olmadığını bildirmiştir.

Kontrol grubu 1'de, direkt mikroskopi ile her sahada 5 veya daha fazla *Blastocystis* spp. görülen 6 hastaya metranidazol tedavisi önerilmiştir. Bu hastalardan hiçbiri kontrole gelmemiştir. Telefonla ulaşılabilen 5 hasta şikayetlerinin tamamen geçtiğini bildirmiştir.

Kontrol grubu 2'de *Blastocystis* spp. tespit edilen hastalara tedavi önerilmemiştir.

4. TARTIŞMA

İBS ülkemizde %12,4 ile %19 oranında görülen (Akpınar ve ark., 1999; Karaman ve ark., 2003; Özden ve ark., 2006) dünyada ise % 4-35 arasında görülen, kişinin günlük yaşam kalitesini bozan, karın ağrısı, diyare ve/veya kabızlıkla karakterize kronik bir hastalıktır. Nedeni tam bilinmemekte ve temelde psikonörotik bir hastalık olduğu düşünülmekle birlikte son çalışmalarda İBS hastalarında barsakta kronik bir immün aktivasyon olduğu tespit edilmiştir (Liebregts ve ark.,2007). Araştırmalar, İBS vakalarının önemli bir kısmında mikroskopi ve kültür yöntemleri ile *Blastocystis* spp. ve *D. fragilis* protozoonlarının varlığından söz etmektedir (Boorom ve ark.,2008; Stark ve ark., 2006).

Blastocystis spp., insanlarda en sık rastlanan intestinal protozoonlardan birisidir. Gittikçe daha fazla sayıda yayında parazitin gastrointestinal şikayetlerden sorumlu olduğu bildirilmesine rağmen, bu organizmanın spesifik patojenitesi tam olarak belirlenememiştir. Bununla birlikte parazitin pleomorfik yapısı ve standardize tetkiklerin bulunmaması, verilerde yanlış yorumlamalara da neden olmaktadır. Artan epidemiyolojik, in vivo ve in vitro çalışmalar *Blastocystis*'in patojen olduğunu düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda İBS hastalarında *Blastocystis* spp.' ye daha sık rastlandığı bildirilmiştir (Giacometti ve ark., 1999; Yakoob ve ark., 2004). Doğada birçok genotip mevcuttur ve insan çok sayıda zoonotik genotipin konağıdır (Noel ve ark., 2005; Tan, 2008). Patogenezle ilgili akıl karıştırıcı bilgilerin patojenik ve nonpatojenik genotiplerin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Clark, 1997).

D. fragilis, sadece trofozoit formu bulunan, insan çekum ve kalın barsağının lümeninde yaşayan bir protozoondur. Keşfedileli 90 yıl gibi bir süre olmasına rağmen, bu protozoonla ilgili bilgiler diğer protozoonlarla karşılaştırıldığında çok azdır. Yaşam döngüsü ve bulaş yolları

bilinmemektedir ve üretilmesi için geliştirilmiş aksenik kültür veya hayvan modelleri yoktur. *D. fragilis*'in hiç klinik semptom göstermeyen hastalarda da bulunmuş olması ve sıklıkla diğer patojenlerle birlikte görülmesi, patojenitesiyle ilgili tartışmalara neden olmuştur (Johnson ve ark., 2004). Bununla beraber son zamanlarda yapılan çalışmalar organizmanın anlaşılmasına belirgin bir katkıda bulunmuş ve belirsizlikten çıkmasını sağlamıştır. Bir çok çalışma bu parazitin eliminasyonunun klinik iyileşme sağladığını gösterirken (Johnson ve ark., 2004; Windsor ve Johnson 1999). bazı çalışmalar da *D. fragilis*'in prevalansının *G. intestinalis*'ten fazla olduğunu göstermektedir (Girginkardeşler ve ark., 2003; Crotti ve ark., 2005). Bu protozoonla ilgili patojeniteyi destekler bilgilerin sürekli artması *D. fragilis*'in bir kommensal olduğu fikrini değiştirmelidir. Borody ve ark., (2002), İBS benzeri semptomlara yol açan kronik hastalık yaptığı için bazı hastalarda *D. fragilis* enfeksiyonunun İBS olarak yanlış tanı almakta olduğu bildirilmiştir Aynı çalışmada iyodokuinol ve doksisisiklin ile bu hastalar tedavi edildiğinde *D. fragilis*'in eliminasyonu ile İBS benzeri semptomların gerilediği gösterilmiştir.

Çalışmamızda İBS tanısı alan 55 hasta, çeşitli polikliniklere gastroenterit şikayetleriyle başvuran 80 hasta ve hiçbir gastroenterit şikayeti olmayan 50 hastaya ait dışkı örnekleri, *Blastocystis* spp. ve *D. fragilis* açısından incelemeye alınmıştır.

Roma III kriterlerine göre İBS tanısı almış 13 erkek 42 kadın olmak üzere, 55 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların yaş ortalaması $37.7 \pm 11,17$ olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda kadın/erkek oranı genellikle 2:1 olarak bildirilirken (Saito ve ark, 2002) bizim çalışmamızda 3:1 olarak tespit edilmiştir.

İBS grubundaki hastaların 16'sında (%29.1) direkt mikroskopi ile, 18'inde (%32.7) trikrom boyama ve kültür yöntemi ile *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir. Akut gastroenterit şikayetleri olan kontrol grubu 1'deki hastalardan 6'sında (%7.5) direkt mikroskopi ile, 8'inde (%10,0) trikrom boyama ile ve

15'inde (%18.8) kültür yöntemi ile *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir. GİS şikayeti olmayan kontrol grubu 2'de; 1 kişide (%2,0) direkt mikroskopi ve trikrom boyama ile ve 3 kişide (%6) kültür yöntemi ile *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir.

Blastocystis spp. görülme sıklığı açısından İBS hasta grubu ile gastroenteritli hastalardan oluşan kontrol grubu 1 arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). İBS hasta grubu ve kontrol grubu 1 ile GİS şikayetleri olmayan kontrol grubu 2 arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). *Blastocystis* spp.'nin patojenitesi hala tartışmalıdır. Bunun nedeninin konak faktörleri, genotip farklılıkları ve alınan parazit sayısı ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. İBS grubunda konak faktörü ve genotipe bağlı olarak daha patojen türler yer alırken, kontrol grubu 1'de patojen ve apatojen genotiplerin bulunması olasıdır.

İBS hasta grubunda direkt mikroskopi ve boyama ile tanı, kültür yöntemi ile aynı güvenilirlikte bulunurken ($p>0,05$), kontrol gruplarında direkt mikroskopi ve boyama yönteminin kültür kadar tanı sağlamaması ($p<0,05$) İBS hastalarında parazit sayısının daha yüksek olduğunu düşündürmüştür. Direkt mikroskopilerinde *Blastocystis* spp. tespit edilen 16 hastanın tamamında her sahada 5 ve üzeri *Blastocystis* spp. görülmesi bu düşüncüyü doğrulamaktadır.

Kontrol grubu 1'de direkt mikroskobide her sahada 5 ve üzeri *Blastocystis* spp. tespit edilen 6 hastanın tamamında başka hiçbir patojene rastlanmamış olması ve tedavi sonrası şikayetlerin geçmesi *Blastocystis* spp.'nin şikayet ve mikroskopi eşliğinde değerlendirilerek tedavi edilmesi gereken bir patojen olduğuna dair inancı güçlendirmektedir.

İBS hasta grubunda yurt içi seyahat, cinsiyet, yaş gibi faktörler ile *Blastocystis* enfeksiyonu arasında korelasyon görülmemiştir ($p=0,2$).

Giacometti ve ark. (1999), 81 İBS'li hastanın 15'inde (%18,5) *Blastocystis* spp. göstermiş bu oranın diğer GİS şikayetleri olan hastalardaki orandan yüksek olduğunu (%0.7) bildirmişlerdir. Ayrıca bizim çalışmamızla benzer olarak İBS hastalarında her mikroskopi sahasında daha fazla parazit görüldüğünü bildirmişlerdir.

Yakoob ve ark. (2004), İBS hastalarının %32'sinde direkt mikroskopi ve %46'sında kültür ile *Blastocystis* spp. pozitifliği bulmuş ve bu oranın kontrol grubundakinden (%7) anlamlı şekilde yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada, kültür yöntemi direkt mikroskopiye üstün görülmektedir.

Bu çalışmalardan farklı olarak Tungtrongchitr ve ark. (2004), İBS hastalarının %13.6'sında *Blastocystis* spp. pozitifliği bulmuş ve bu oranın kontrol grubundan farklı olmadığını bildirmiştir. Ancak bu çalışmada sadece direkt mikroskopi ve Trikom boyama kullanılmış, kültür yöntemi kullanılmamıştır.

İBS Hasta Grubu'nda *Blastocystis* spp. tespit edilen 12 (%67) hastada metranidazol ile 6 (%33) hastada trimetoprim-sulfametaksazol ile parazit eradikasyonu sağlanmıştır. Tedavi sonrası 15. gün ve 1. ayda yapılan görüşmelerde 4 (%22,2) hasta (3 erkek, 1 kadın) şikayetlerinin tamamen geçtiğini bildirirken, 11 (%61,1) hasta diğer bulgularla hafifleme olmakla birlikte kabızlığının devam ettiğini, 3 (%16,7) hasta ise şikayetlerinde hiçbir değişiklik olmadığını bildirmiştir. Yapılan çalışmalarda *Blastocystis* spp. enfeksiyonlarında kronik bir immün aktivasyon olduğu (Liebregts ve ark., 2007) ve parazitin bağırsak epiteline yapışarak *E. histolytica benzeri* lizis mekanizması başlattığı ve kültür filtratlarında bir diyarejenik toksin varlığı bildirilmiştir (Walderich ve ark., 1998). Bunlar göz önüne alındığında immün durumuna bağlı olarak iyileşme süresinin kişiye göre değişebileceği ve bu kişilerin şikayetlerindeki iyileşmeyi gözleyebilmek için daha uzun süre takip edilmesi gerektiği düşünülmüştür. Ayrıca *Blastocystis* spp.'nin patojenitesinde

genotiplerin rolünün de hala tartışıldığı düşünülürse, iyileşmedeki farklılıklarının sebebinin bu olabileceği düşünülmektedir. Udkow ve Markell (1993) İBS hastalarında oluşan anormal intestinal koşulların bazı non-patojen subgrupların aşırı çoğalması için uygun ortam sağlayabileceğini öne sürmüştür.

İBS grubu hastaların 18'inde (%32,7) direkt mikroskopik incelemede mantar sporlarının floraya hakim olması dikkati çekmiş ancak bunun kabızlık nedeniyle pasajı yavaşlamış dışkıda mayaların aşırı çoğalması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Her üç yöntemle hiçbir hastada *D. fragilis* tespit edilmemiştir. Parazitin çabuk parçalanması ve kist evresinin olmaması nedeniyle, bulaşın *Enterobius vermicularis* yumurtalarıyla gerçekleştiğini öneren çalışmalar vardır (Girginkardeşler ve ark., 2008; Ockert ve Schmidt, 1976). Bu çalışmada, İBS hasta grubunda 7 kişi geçirilmiş kıl kurdu enfeksiyonu hikayesi vermiş, ancak bu hastalarda *D. fragilis*'e rastlanmamıştır.

Ülkemizde *D. fragilis* epidemiyolojisiyle ilgili yeterince çalışma yoktur. Sadece boyama yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda *D. fragilis* prevalansı %0,2 ile %1,02 arasında bildirilmiştir (İnceboz ve Üner, 2001; Cengiz ve ark., 2009; Karaman ve ark., 2006; Yılmaz ve ark., 2002).

Çalışmamızda hem hasta hem de kontrol gruplarında hiç *D. fragilis* rastlanmamış olmasının nedeni, bölgemizde artan kişisel hijyen bilincine paralel olarak enfeksiyon oranlarının çok düşük olması olabilir. Bölgemizde ve ülkemizde *D. fragilis* epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır.

İBS hastalarında her mikroskopi sahasında (X40) 5 ve üzeri *Blastocystis spp*'nin sık görülmesi ve bu hastaların önemli bir kısmında tedavi

ile şikayetlerin gerilemesi, İBS ile *Blastocystis* spp. enfeksiyonları arasında anlamlı bir bağlantı olabileceğini düşündürmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, *Blastocystis* spp. ve *D. fragilis* protozoonlarının İBS etyolojisindeki rolünün belirlenmesi amacıyla, Roma III kriterlerine göre İBS tanısı konulan 55 hastaya ait dışkı örnekleri incelemeye alınmıştır. Hastanemize gastroenterit şikayetleriyle başvuran 80 hastaya (Kontrol Grubu 1) ve hiçbir gastroenterit şikayeti olmayan 50 kişiye (Kontrol Grubu 2) ait dışkı örnekleri kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Blastocystis spp. görülme sıklığı İBS hasta grubunda yüksek olmakla birlikte (%32.7), gastroenteritli hastalardan oluşan kontrol grubu 1 (%18.8) ile arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). İBS hasta grubu ve kontrol grubu 1 ile GİS şikayetleri olmayan kontrol grubu 2 (%6) arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Konak faktörleri, genotip farklılıkları ve alınan parazit sayısı *Blastocystis* spp.'nin patojenitesini etkilediği düşünülmektedir. Çalışmamızda, İBS grubunda konak faktörü ve genotipe bağlı olarak daha patojen türler yer alırken, kontrol grubu 1'de hem patojen hem de apatojen genotiplerin bulunması olasıdır. Bu konuya açıklık getirebilmek için çalışmanın moleküler düzeyde devam ettirilmesi amaçlanmaktadır.

İBS hasta grubunda, *Blastocystis* spp. tespit edilen 16 hastanın tamamında her sahada (X40) 5 ve üzeri *Blastocystis* spp. görülmesi bu hastalarda parazit sayısının daha yüksek olduğunu düşündürmüştür. Kontrol gruplarında kültür yöntemi, direkt mikroskopi ve boyama ile tanıya üstün bulunurken ($p<0,05$); İBS hasta grubunda, her üç yöntemin de aynı güvenilirlikte bulunması ($p>0,05$) bu düşüncemizi desteklemektedir.

İBS hasta grubunda *Blastocystis* spp. tespit edilen 12 (%67) hastada metranidazol ile, metranidazol tedavisine cevap vermeyen 6 (%33) hastada ise trimetoprim-sulfametaksazol ile parazit eradikasyonu sağlanmıştır. Tedavi sonrası 15. gün ve 1. ayda yapılan görüşmelerde 4 hasta (%22,2)

şikayetlerinin tamamen geçtiğini bildirirken, 11 (%61,1) hasta diğer bulgularda hafifleme olmakla birlikte kabızlığın devam ettiğini, 3 (%16,7) hasta ise şikayetlerinde hiçbir değişiklik olmadığını bildirmiştir. Yapılan çalışmalarda *Blastocystis* spp. enfeksiyonlarında kronik bir immün aktivasyon olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *Blastocystis* spp.'nin patojenitesinde genotiplerin rolünün de hala tartışıldığı düşünülürse iyileşme farklılıklarının sebebi bu da olabilir. Anormal intestinal koşulların bazı non-patojen subgrupların aşırı çoğalması için uygun ortam sağlayabileceği de daha önce ileri sürülmüştür. Bunlar göz önüne alındığında, iyileşme süresinin parazite ve kişiye göre değişebileceği ve bu hastaların şikayetlerindeki gerileme ve reenfeksiyon açısından daha uzun süre takip edilmesi gerektiği düşünülmüştür.

İBS hastalarında her mikroskopi sahasında (X40) 5 ve üzeri *Blastocystis* spp'nin sık görülmesi ve bu hastaların önemli bir kısmında tedavi ile şikayetlerin gerilemesi, İBS ile *Blastocystis* spp. enfeksiyonları arasında anlamlı bir bağlantı olabileceğini düşündürmüştür.

Kontrol grubu 1'de direkt mikroskopilerinde her sahada 5 ve üzeri *Blastocystis* spp. tespit edilen 6 hastanın tamamında başka hiçbir patojene rastlanmamış olması ve tedavi sonrası şikayetlerin geçmesi *Blastocystis* spp.'nin şikayet ve mikroskopi eşliğinde değerlendirilerek tedavi edilmesi gereken bir patojen olduğuna dair inancı güçlendirmektedir.

Çalışmamızda, hiçbir hastada *D. fragilis* tespit edilmemiştir. Tanısındaki güçlükler nedeniyle ülkemizde ve dünyada *D. fragilis* epidemiyolojisiyle ilgili yeterince çalışma yoktur. Çalışmamızda hem hasta hem de kontrol gruplarında hiç *D. fragilis* rastlanmamış olmasının nedeni bölgemizde artan kişisel hijyen bilincine paralel olarak enfeksiyon oranlarının çok düşük olması olabilir. Bölgemizde ve ülkemizde öncelikle *D. fragilis* epidemiyolojisi ve bulaş kaynakları ile ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

İrrite Barsak Sendromunda *Dientamoeba fragilis* ve *Blastocystis* spp.'nin Rolü

Bu çalışma, irrite barsak sendromu (İBS) tanısı konulmuş hastalarda *Dientamoeba fragilis* ve *Blastocystis* spp. parazitlerinin sıklığı ve İBS oluşumuyla ilişkilerinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. İBS tanısı almış 55 hastadan, akut gastroenterit şikayetleri olan 80 hastadan (Kontrol Grubu 1) ve sağlıklı 50 gönüllüden (Kontrol Grubu 2) toplanan dışkı örnekleri çalışmaya alınmıştır. İBS grubunda direkt mikroskopi ile %29,1, trikrom boyama ve kültür yöntemi ile %32,7 hastada *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir. Kontrol grubu 1'de direkt mikroskopi ile %7,5 trikrom boyama ile %10,0 ve kültür yöntemi ile %18,8 oranında *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir. Kontrol grubu 2'de; direkt mikroskopi ve trikrom boyama ile %2,0, kültür yöntemi ile %6 oranında *Blastocystis* spp. tespit edilmiştir. *Blastocystis* spp. görülme sıklığı açısından İBS hasta grubu ile Kontrol grubu 1 arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). İBS hasta grubu ile Kontrol grubu 2 arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). İBS hasta grubunda, direkt mikroskopide (X40) her sahada 5 ve üzeri *Blastocystis* spp. görülmesi kontrol gruplarından daha sıktır. *Blastocystis* spp. tanısı için, İBS hasta grubunda direkt mikroskopi ve boyama ile tanı, kültür yöntemi ile aynı güvenilirlikte bulunurken ($p>0,05$), kontrol gruplarında kültür yöntemi mikroskopiden üstün bulunmuştur ($p<0,05$). İBS hasta grubunda *Blastocystis* spp. tespit edilen 18 hastaya metranidazol tedavisi uygulanmış, 12 (%67) hastada metranidazol ile parazit eradikasyonu sağlanırken, kalan 6 (%33) hastada trimetoprim-sulfametaksazol ile parazit eradikasyonu sağlanabilmiştir. Tedavi sonrası takiplerde 4 (%22,2) hasta şikayetlerinin tamamen geçtiğini bildirirken, 11 (%61,1) hasta diğer bulgulara hafifleme olmakla birlikte kabızlığın devam ettiğini, 3 (%16,7) hasta ise şikayetlerinde hiçbir değişiklik olmadığını bildirmiştir. İBS hastalarında her mikroskopi sahasında (X40) 5 ve üzeri *Blastocystis* spp.'nin sık görülmesi ve bu hastaların önemli bir kısmında tedavi ile şikayetlerin gerilemesi, İBS ile *Blastocystis* spp. enfeksiyonları arasında bir bağlantı olabileceğini düşündürmüştür. Hiçbir hastada *D. fragilis* tespit edilmemiştir. Bunun nedeni bölgemizde artan kişisel hijyen bilincine paralel olarak enfeksiyon oranlarının çok düşük olması olabilir.

Anahtar kelimeler: *Blastocystis* spp., *Dientamoeba fragilis*, İrrite barsak sendromu, Robinson besiyeri, Trikrom boyama,

SUMMARY

Role of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* spp. in irritable bowel syndrome

This study was designed to investigate prevalence of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* spp. in irritable bowel syndrome (IBS) patients and evaluate whether there was a possible link between IBS and parasitic infections. Stool specimens collected from 55 IBS patients, 80 patients with gastroenteritis (Control group 1) and 50 healthy volunteers (Control group 2) were included the study. *Blastocystis* spp. was found 29,1% of IBS group by direct examination and 32,7% by trichrome staining and culture method. In control group 1, *Blastocystis* spp. was found 7.5% of patients by direct microscopy, 10.0% by trichrome staining and 18.8% by culture method. *Blastocystis* spp. were identified in 2,0% of patients with direct microscopy and trichrome staining and 6% by culture method in control group 2. There was no significant difference in prevalence of *Blastocystis* spp. between IBS patients and control group 1 ($p > 0.05$). Statistically significant difference was found between IBS patients and the control group 2 ($p < 0.05$). Patients with IBS were significantly have five or more *Blastocystis* spp. per field than control groups. Direct microscopy, staining method and stool culture were found to have same reliability in IBS group ($p > 0.05$), whereas stool culture method was found more sensitive than microscopy ($p < 0.05$) in control groups. Eighteen patients in IBS group who had *Blastocystis* spp. infection treated with metranidazole and parasite eradication was ensured in 12 (%67) patients, remaining 6 patients (%33) were cured by trimethoprim-sulfamethoxazole. After eradication all symptoms were cured in four patients (%22,2), there were only constipation problem left in eleven patients (%61,1) and there were no change in clinical findings in 3 (%16,7) patients. Significantly having five or more *Blastocystis* spp. per field (X40) in IBS patient and regression of IBS symptoms after the treatment in most of the patients was thought there could be possible link between IBS and *Blastocystis* spp. infections. No *D. fragilis* was found in none of the patients. The reason could be awareness of personal hygiene in our region leading to low infection rate.

Key Words: *Blastocystis* spp., *Dientamoeba fragilis*, Irritable bowel syndrome, Robinson culture medium, Trichrome stain,.

KAYNAKLAR

- AGUIAR, J.I., GONCALVES, A.Q., SODRE, F.C., PEREIRA SDOS, R., BOIA, M.N., DE LEMOS, E.R., DAHER, R.R. (2007). Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **40**:631-634.
- AKPINAR, H. (1999). Ege Bölgesinde İrrite Barsak Sendromu sıklığının araştırılması. *Turkish J Gastroenterol*; **1**:20-21.
- ANDIRAN, N., ACIKGOZ Z.C., TURKAY S., ANDIRAN F. (2006). *Blastocystis hominis*, an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. *J. Pediatr. Surg.* **41**:1489-1491.
- ARISUE, N., HASHIMOTO, T., YOSHIKAWA, H., NAKAMURA, Y., NAKAMURA, G., NAKAMURA, F., YANO, T.A., HASEGAWA, M. (2002). Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J. Eukaryot. Microbiol.* **49**:42-53.
- BALCI, Y.I., TÜRK, M., POLAT, Y., ERBİL, N. (2009). Denizli'deki çocuklarda intestinal parazitlerin dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* **33**(4):298-300.
- BOOROM, K.F., SMITH, H., NIMRII, L., VISCOGLIOSI, E., SPANAKOS, G., PARKAR, U., LI, L.H., ZHOU, X.N., OK, U.Z., LEELAYOOVA, S., JONES, M.S. (2008). Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors.* Oct **21**;1(1):40.
- BOREHAM, P.F., STENZEL, D.J. (1993). *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv. Parasitol.* **32**:1-70.
- BORODY, T.J., WARREN, E.F., WETTSTEIN, A., ROBERTSON, G., RECABARREN, P., FONTELA, A., HERDMAN, K., SURACE, R. (2002). Eradication of *Dientamoeba fragilis* can resolve IBS-like symptoms. *J Gastroenterol Hepatol.* **17** (Suppl): A103..
- BÖHM-GLONING, B., KNOBLOCH, J., WALDERICH, B. (1997). Five subgroups of *Blastocystis hominis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Trop. Med. Int. Health.* **2**:771-778.
- BURROWS, R. B., M. A. SWERDLOW, J. K. FROST, C. K. LEEPER. (1954). Pathology of *Dientamoeba fragilis* infections of the appendix. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **3**:1033-1039.
- CAMP, R.R., MATTERN, C.F., HONIGBERG, B.M. (1974). Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell. I. Electronmicroscopic observations of the binucleate stages. II. Taxonomic position and revision of the genus. *J. Protozool.* **21**:69-82.
- CAMP, R.R., MATTERN, C.F., HONIGBERG, B.M. (1974). Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell. I. Electronmicroscopic observations of the binucleate stages. II. Taxonomic position and revision of the genus. *J. Protozool.* Feb;**21**(1):69-82.
- CAVALIER-SMITH, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **73**:203-266.
- CDC. Drugs for parasitic infections. (2004). *Med Lett Drugs Ther.* Aug 16, **46**(1189):e1-12.
- CENGİZ, Z., AKBAYRAM, S., ÇİÇEK, M. (2009). Van'da ilköğretim okulu öğrencilerinde saptanan bağırsak parazitizmleri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* **33**(4):289-293
- CHAN, F., GUAN M.X., MACKENZIE, M. (1993). Application of indirect immunofluorescence to detection of *Dientamoeba fragilis* trophozoites in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1710-1714.
- CHAN, F., STEWART, N., GUAN, M., ROBB, I., FUIE, L., CHAN, I., DIAZ-MITOMA F., KING J., MACDONALD N., MACKENZIE, A. (1996). 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.* **15**:950-954.

- CHEN, T.L., CHAN, C.C., CHEN, H.P., FUNG, C.P., LIN, C.P., CHAN, W.L., LIU, C.Y. (2003). Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**:213-216.
- CIRIONI, O., GIACOMETTI, A., DRENAGGI, D., ANCARANI, F., SCALISE, G. (1999). Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *Eur. J. Epidemiol.* **15**:389-393.
- CLARK, C.G. (1997). Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **87**:79-83.
- CLARK, C.G., DIAMOND, L.S. (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev.* Jul;**15**(3):329-41.
- CROTTI, D., D'ANNIBALE, M.L., FONZO, G., LALLE, M., CACCIÒ, S.M., POZIO, E. (2005). *Dientamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy, *Parasite* **12**:165-170.
- DELGADO-VISCOGLIOSI P, VISCOGLIOSI E, GERBOD D, KULDA J, SOGIN ML, EDGCOMB VP. (2000). Molecular phylogeny of parabasalids based on small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Trichomonadinae subfamily, *J. Eukaryot. Microbiol.* **47**: 70-75.
- DOBELL, C. (1940). Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. X. The life history of *Dientamoeba fragilis*: observations, experiments, and speculations. *Parasitology* **32**:417-461.
- DOGRUMAN-AL, F., DAGCI H., YOSHIKAWA H., KURT O., DEMIREL M. (2008). A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* **103**: 685-689.
- DROSSMAN, DA. (1997). American Gastroenterological Association technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* **112**: 2120-30.
- DROSSMAN, DA. (2006). The Functional Gastrointestinal Disorders and the Rome III Process. *Gastroenterology.* **130**:1377-1390
- DUNN, L.A., BOREHAM, P.F., STENZEL, D.J. (1989). Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *Int. J. Parasitol.* **19**:43-56.
- DWYER, D.M. (1972a). Analysis of the antigenic relationships among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. III. Immunoelectrophoresis techniques, *J. Protozool.* **21**:139-145.
- DWYER, D.M. (1972b). Analysis of the antigenic relationship among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. I. Quantitative fluorescent antibody methods, *J. Protozool.* **19**, : 316-325.
- DWYER, D.M. (1972c). Analysis of the antigenic relationship among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. II. Gel diffusion methods, *J. Protozool.* **19**: 326-332.
- GARCIA, L.S. (1997). Classification of human parasite. *Clin. Infect Dis.* **25**:21-23.
- GARCIA, L.S. (2007). Diagnostic medical parasitology, 5th ed. ASM Press, Washington, DC.
- GARCIA, L.S., SHIMIZU, R.Y. (1998). Evaluation of intestinal protozoan morphology in human fecal specimens preserved in EcoFix: comparison of Wheatley's trichrome stain and EcoStain. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1974-1976.
- GERBOD, D. (2001). Phylogenetic position of the Trichomonad parasite of turkeys, *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, inferred from small subunit rRNA sequence, *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**: 498-504.
- GIACOMETTI, A., CIRIONI, O., FIORENTINI, A., FORTUNA, M., SCALISE, G. (1999). Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**: 436-439.
- GIRGINKARDEŞLER, N., COŞKUN, S., BALCIOĞLU, I., ERTAN, P., OK, U.Z. (2003). *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**: 110-113.
- GIRGINKARDEŞLER, N., KURT, O., KILIMCIOĞLU, A.A., OK, U.Z. (2008). Transmission of *Dientamoeba fragilis*: evaluation of the role of *Enterobius vermicularis*. *Parasitol Int.* **57**(1): 72-5.

- GRENDON, J.H., DIGIACOMO, R.F., FROST F.J. (1991). *Dientamoeba fragilis* detection methods and prevalence: a survey of State Public Health Laboratories. *Public Health Rep.* **106**: 322-325.
- HAKANSSON, E. G. (1936). *Dientamoeba fragilis*, a cause of illness: report of case. *Am. J. Trop. Med.* **16**: 175-183.
- HIATT, R. A., MARKELL, E. K., NG, E. (1995). How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**:36-39.
- HIRATA, T., NAKAMURA, H., KINJO, N., HOKAMA, A., KINJO, F., YAMANE, N., FUJITA, J. (2007). Prevalence of *Blastocystis hominis* and *Strongyloides stercoralis* infection in Okinawa, Japan. *Parasitol. Res.* **101**:1717-1719.
- HUSSAIN, R., JAFERI, W., ZUBERI, S., BAQAI, R., ABRAR, N., AHMED, A., ZAMAN, V. (1997). Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56**: 301-306.
- İNCEBOZ, T., ÜNER, A. (2001). *Blastocystis hominis* in epidemiyolojisinin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* **25**(2):135-138.
- JEPPS, M.W., DOBELL, C. (1918). *Dientamoeba fragilis*, new intestinal amoeba from man. *Parasitology.* **10**:352-367.
- JOHNSON, E.H., WINDSOR, J.J., CLARK, C.G. (2004). Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*, *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:553-570.
- JOHNSON, J.A., CLARKE, G.C. (2000) Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 4653-4354.
- JONES, M.S., GANAC, R.D., HISER, G., HUDSON, N.R., LE, A., WHIPPS, C.M. (2008). Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitol. Res.* **103**: 551-557.
- KAIN, K.C., NOBLE, M.A., FREEMAN, H.J., BARTELUK, R.L. (1987). Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **8**:235-244.
- KANEDA, Y., HORIKI, N., CHENG, X., TACHIBANA, H., TSUTSUMI, D Y. (2000). Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **25**:51-56.
- KANEDA, Y., HORIKI, N., CHENG, X. J., FUJITA, Y., MARUYAMA, M., TACHIBANA, H. (2001). Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**:393-396.
- KARAMAN, N., TÜRKAY, C., YÖNEM, Ö. (2003). Irritable bowel syndrome prevalence in city center of Sivas. *Turkish Journal of Gastroenterology*, **14**(2):128-131.)
- KARAMAN, Ü., ATAMBAY, M., AYCAN, Ö., YOLOĞLU, S., DALDAL, N. (2006). Malatya temizlik işçilerinde bağırsak parazitlerinin görülme oranı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* **30**(3):181-183
- KAYA, S., CETIN, E. S., ARIDOGAN, B. C., ARIKAN, S., DEMIRCI, M. (2007). Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Turkiye Parazit. Derg.* **31**:184-187.
- LEDER, K.M., HELLARD, E., SINCLAIR, M.I., FAIRLEY, C.K., WOLFE, R. (2005). No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *J. Gastroenterol Hepatol.* **20**:1390-1394.
- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* **27**: 37-58.
- LIEBREGTS, T., ADAM, B., BREDACK, C., RÖTH, A., HEINZEL, S., LESTER, S., DOWNIE-DOYLE, S., SMITH, E., DREW, P., TALLEY, N.J., HOLTMANN, G. (2007). Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* **132**(3):913-20.
- LONGSTRETH, G.F., THOMPSON, W.G., CHEY, W.D., HOUGHTON, L.A., MEARIN, F., SPILLER, R.C. (2006). Functional bowel disorders. *Gastroenterology.* **130**:1480-1491.

- MAYER, A.E., GEDHART, G.F. (1994). Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia. *Gastroenterology*. **107**: 271.
- MENDEZ, O.C., SZMULEWICZ G., MENGHI, C., TORRES, S., GONZALEZ, G., GATTA, C. (1994). Comparison of intestinal parasite infestation indexes among HIV positive and negative populations. *Medicina* (Buenos Aires) **54**:307-310.
- MILLET, V.E., SPENCER, M.J., CHAPIN, M.R., GARCÍA, L.S., YATABE, J.H., STEWART, M.E. (1983). Intestinal protozoan infection in a semicomunal group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 54-60.
- MOGHADDAM, D. D., GHADIRIAN, E., AZAMI, M. (2005). *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/ sulfamethoxazole. *Parasitol. Res.* **96**: 273-275.
- MULLER, M. (1975). Biochemistry of protozoan microbodies: peroxisomes, alpha-glycerophosphate oxidase bodies, hydrogenosomes. *Annu. Rev. Microbiol.* **29**:467-483.
- NIGRO, L., LAROCCA, L., MASSARELLI, L., PATAMIA, I., MINNITI, S., PALERMO, F., CACOPARDO, B. (2003). A placebo-controlled treatment trial of *Blastocystis hominis* infection with metronidazole. *J. Travel. Med.* **10**:128-130.
- NOËL, C., DUFRERNEZ, F., GERBOD, D., EDGCOMB, V.P., DELGADO-VISCOGLIOSI, P., HO, L.C., SINGH, M., WINTJENS, R., SOGIN, M.L., CAPRON, M., PIERCE, R., ZENNER, L., VISCOGLIOSI, E. (2005). Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J. Clin. Microbiol.* **43**:348-355.
- OCKERT, G., SCHMIDT, T. (1976). On the epidemiology of *Dientamoeba fragilis* Jepps and Dobell 1918. 4th communication: evidence of *Dientamoeba fragilis* in *Enterobius* eggs using isoelectric point determination. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* **20**(1):76-81.
- OK, U.Z., GIRGINKARDESLER, N., BALCIOGLU, C., ERTAN, P., PIRILDAR, T., KILIMCIOGLU, A. A. (1999). Effect of trimethoprim-sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. *Am. J. Gastroenterol.* **94**:3245-3247.
- ÖZCAKIR, O., GÜRESER, S., ERGÜVEN, S., YILMAZ, Y. A., TOPALOĞLU R., HASÇELİK, G. (2007). Characteristics of *Blastocystis hominis* infection in a Turkish university hospital. *Türkiye Parazit. Derg.* **31**:277-282.
- ÖZDEN, A., KÖKSAL, A.s., OĞUZ, D., ÇİÇEK, B., YILMAZ, U., DAĞLI, Ü., PARLAK, E., BAHAR, K., ŞAHİN, B., ÖZLER, J., ÖZDEN, A. (2006). Türkiye'de birinci basamak sağlık kurumlarında irritabl barsak sendromu görülme sıklığı. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi.* **5**(1):4-15.
- ÖZYURT, M., KURT, O., MÖLBAK, K., NIELSEN, H. V., HAZNEDAROĞLU, T., STENSVOLD, C. R. (2008). Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol. Int.* **57**:300-306.
- ÖZYURT, M., KURT, Ö., YAMAN, O., ARDIÇ, N., HAZNEDAROĞLU, T (2007). Bir eğitim hastanesi koproloji laboratuvarında geçen dört yıllık dönemde saptanan bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* **31**(4):306-308.
- PASQUİ, A. L., SAVINI, E., SALETTI, M., GUZZO, C., PUCCETTI, L., AUTERI, A.. (2004). Chronic urticaria and *Blastocystis hominis* infection: a case report. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **8**:117-120.
- PEEK, R., REEDEKER F. R., GOOL T. (2004). Direct amplification and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from human stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* **42**:631-635.
- PREISS, U., OCKERT, G., BROEMME, S., OTTO, A. (1991). On the clinical importance of *Dientamoeba fragilis* infections in childhood. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* **35**(1):27-34.
- RAYAN, H. Z., ISMAIL, O. A., EL GAYAR, E. K. (2007). Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **37**:599-608.
- RIVERA, W.L. (2008). Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Vet. Parasitol.* **156**:178-182.

- ROBINSON, G.L. (1968). The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **62**:285-294.
- ROSSIGNOL, J.F., KABIL, S.M., SAID, M., SAMIR, H., YOUNIS A.M. (2005). Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis hominis*. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **3**:987-991.
- SAITO, Y.A., SCHOENFELD, P., LOCKE, G.R.I. (2002). The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America: a systemic review. *Am J Gastro-enterol.* **97**: 1910-1915.
- SHEEHAN, D. J., RAUCHER B. G., MCKITRICK J. C. (1986). Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. *J. Clin. Microbiol.* **24**:548-550.
- SHEIN, R., GELB, A. (1983). Colitis due to *Dientamoeba fragilis*. *Am. J. Gastroenterol.* **78**:634-636.,
- SILBERMAN, J. D., SOGIN, M. L., LEIPE, D. D., CLARK, C. G. (1996). Human parasite finds taxonomic home. *Nature.* **380**:398.
- SILBERMAN, J.D., CLARK, C.G., SOGIN, M.L. (1996). *Dientamoeba fragilis* shares a recent common evolutionary history with the trichomonads, *Mol. Biochem. Parasitol.* **76**: 311-314.
- SILVERMAN, D.H., MUNAKATA, J.A., ENNES, H., MANDELKERN, M.A., HOH, C.K., MAYER, E.A. (1997). Regional cerebral activity in normal and pathological perception of visceral pain. *Gastroenterology.* **112**(1):64-72.
- SINGH, M., SURESH, K., HO, L. C., NG, G. C., YAP, E. H. (1995). Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* **81**:446-450.
- STARK, D., BEBE, N., MARRIOTT, D., ELLIS, J., HARKNESS, J. (2005). Prospective study of the prevalence, genotyping, and clinical relevance of *Dientamoeba fragilis* infections in an Australian population. *J Clin Microbiol.* **43**(6):2718-23.
- STARK, D., BEEBE, N., MARRIOTT, D., ELLIS, J., HARKNESS, J. (2005). *Detection of Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *Int J Parasitol.* **35**(1):57-62.
- STARK, D., BEEBE, N., MARRIOTT, D., ELLIS, J., HARKNESS, J. (2006). Evaluation of three diagnostic methods, including real-time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* **44**(1):232-5.
- STARK, D., VAN HAL, S., MARRIOTT, D., ELLIS, J., HARKNESS, J. (2007). Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int J Parasitol.* **37**(1):11-20.
- STENSVOLD, C. R., ARENDRUP, M. C., JESPERSGAARD, C., MOLBAK, K., NIELSEN, H. V. (2007). Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **59**:303-307.
- STENZEL, D. J., BOREHAM, P. F., MCDUGALL, R. (1991). Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *Int. J. Parasitol.* **21**:807-812.
- SURESH, K., HOWE, J., NG, G. C., HO, L. C., RAMACHANDRAN, N. P., LOH, A. K., YAP, E. H., SINGH, M. (1994). A multiple fission-like mode of asexual reproduction in *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* **80**:523-527.
- SURESH, K., NG, G. C., RAMACHANDRAN, N. P., HO, L. C., YAP, E. H., SINGH, M. (1993). In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* **79**:456-460.
- SURESH, K., SMITH, H. (2004). Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**:509-511.
- SWERDLOW, M.A., BURROWS, R.B. (1955). *Dientamoeba fragilis*, an intestinal pathogen. *JAMA.* **158**:176-178.
- TALIS, B., STEIN, B., LENGY, J. (1971). *Dientamoeba fragilis* in human feces and bile. *Isr. J. Med. Sci.* **7**:1063-1069.
- TAN, K.S. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* **21**(4):639-65.
- TAN, K. S., NG, G. C., QUEK, E., HOWE, J., RAMACHANDRAN, N. P., YAP, E. H., SINGH, M. (2000). *Blastocystis hominis*: a simplified, high-efficiency method for clonal growth on solid agar. *Exp. Parasitol.* **96**:9-15.

- TASOVA, Y., SAHİN, B., KOLTAS, S., PAYDAS, S. (2000). Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. *Acta Med. Okayama*. **54**:133-136.
- TERMMATHURAPOJ, S., LEELAYOOVA, S., AIMPUN, P., THATHAISONG, U., NIMMANON, T., TAAMASRI, P., MUNGTHIN M. (2004). The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol. Res.* **93**:445-447.
- TUNGTRONGCHITR, A., MANATSATHIT, S., KOSITCHAIWAT, C., ONGROTCHANAKUN, J., MUNKONG, N., CHINABUTR, P., LEELAKUSOLVONG, S., CHAICUMPA, W. (2004). *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel syndrome patients. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. **35**:705-710.
- UDKOW, M.P., MARKELL E.K. (1993). *Blastocystis hominis*: prevalence in asymptomatic versus symptomatic hosts. *J. Infect. Dis.* **168**:242-244.
- VAN GOOL, T., WEIJTS R., LOMMERSE E., MANK T.G. (2003). Triple faeces test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**:284-290.
- WALDERICH, B., BERNAUER, S., RENNER, M., KNOBLOCH, J., BURCHARD, G. D. (1998). Cytopathic effects of *Blastocystis hominis* on Chinese hamster ovary (CHO) and adeno carcinoma HT29 cell cultures. *Trop. Med. Int. Health* . **3**:385-390.
- WENRICH, D. H. (1944). Studies on *Dientamoeba fragilis* (protozoa). IV. Further observations, with an outline of present-day knowledge of this species. *J. Parasitol.* **30**:322-337.
- WINDSOR, J. J., MACFARLANE, L., HUGHES-THAPA, G., JONES, S. K. A., WHITESIDE, T. M. (2003). Detection of *Dientamoeba fragilis* by culture. *Br. J. Biomed. Sci.* **60**:79-83.
- WINDSOR, J.J., JOHNSON, E.H. (1999). *Dientamoeba fragilis*: the unflagellated human flagellate. *Br. J. Biomed. Sci.* **56**: 293-306.
- WINDSOR, J.J., RAFAY, A.M., SHENOY, A.K., JOHNSON, E.H. (1998). Incidence of *Dientamoeba fragilis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *Br J Biomed Sci.* Sep;55(3):172-5.
- YAKOOB, J., JAFRI, W., JAFRI, N., KHAN, R., ISLAM, M., BEG, M. A., ZAMAN, V. (2004a). Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**:383-385.
- YAKOOB, J., JAFRI, W., JAFRI, N., ISLAM, M., ASİM BEG, M. (2004b). In vitro susceptibility of *Blastocystis hominis* isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Br. J. Biomed. Sci.* **61**:75-77.
- YAMADA T. (1998). Handbook of Gastroenterology, Lippincott, Philadelpha, 387-393.
- YAMAN, O., YAZAR, S., ÖZCAN, H., ÇETİNKAYA, Ü., GÖZKENÇ, N., ATEŞ, S., ŞAHİN, İ. (2008). 2005-2008 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. **32**(3):266-270.
- YAN, Y., SU, S., LAI, R., LIAO, H., YE, J., LI, X., LUO, X., CHEN, G. (2006). Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol. Res.* **99**:597-601.
- YAN, Y., SU, S., YE, J., LAI, X., LAI, R., LIAO, H., CHEN, G., ZHANG, R., HOU, Z., LUO, X. (2007). *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitol. Res.* **101**:1527-1532.
- YANG, J., SCHOLTEN, T. H. (1977). *Dientamoeba fragilis*: a review with notes on its epidemiology, pathogenicity, mode of transmission, and diagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**:16-22.
- YILMAZ, U., ÖSTAN, İ., KAYRAN, E., ÖZBİLGİN, A. (2002). Celal Bayar Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2000-2001 yıllarında saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. **26**(1):60-63.
- YOSHIKAWA, H., WU, Z., KIMATA, I., ISEKI, M., ALI, I. K., HOSSAIN, M. B., ZAMAN, V., HAQUE, R., TAKAHASHI, Y. (2004). Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol. Res.* **92**:22-29.

- YOSHIKAWA, H., ABE, N., IWASAWA, M., KITANO, S., NAGANO, I., WU, Z., TAKAHASHI, Y. (2000). Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1324-1330.
- ZAMAN, V., HOWE, J., NG, M. (1995). Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitol. Res.* **81**:465-469.
- ZIERDT, C.H., SWAN, J.C., HOSSEINI, J. (1983). In vitro response of *Blastocystis hominis* to antiprotozoal drugs. *J. Protozool.* **30**:332-334.
- ZIERDT, C.H., ZIERDT, W.S., NAGY, B. (1995). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. *J. Parasitol.* **81**:127-129.
- ZIERDT, C.H. (1991). *Blastocystis hominis*-past and future. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:61-79.

EK-1**HASTA TAKİP VE RAPOR FORMU****HASTA BİLGİLERİ**

TARİH :

ADI SOYADI :

YAŞ :

CİNSİYET :

GİS ŞİKAYETLERİ :

YOLCULUK HİKAYESİ :

DİĞER HASTALIKLARI :

GEÇİRDİĞİ DİĞER PARAZİTER ENFEKSİYONLAR:

İLETİŞİM ADRESİ :

İLETİŞİM TELEFONU :

GAİTA DEĞERLENDİRME FORMU

MAKROSKOBİK İNCELEME :

MİKROSKOBİK İNCELEME :

KÜLTÜR :

TRİKROM BOYAMA :

EK-2

"BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU"

"İrrite Barsak Sendromunda *Dientamoeba fragilis* ve *Blastocystis hominis*'in Rolü" isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırın ve bu bilgileri ailenizle ve/veya doktorunuzla tartışın. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

Çalışmanın amaçları ve dayanağı nelerdir, benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

İrrite Barsak Sendromundan muzderip olan kişilerde etken olabileceği düşünülen *Dientamoeba fragilis* ve *Blastocystis hominis* isimli parazitler düşküda araştırılacaktır.

- Bu konuyla ilgili literatürde az sayıda çalışma olmakla beraber, bu parazitleri taşıdığı tespit edilen ve parazite yönelik tedavi alan hastaların semptomlarının düzeldiği görülmüştür (Bu tedavide kullanılan ilaçlar klinik çalışmalarla etkinliği kanıtlanmış ve uzun yıllardır uluslararası rehberlerde de standart tedavide önerilen ilaçlardır.)
- Çalışmaya 100 kişinin alınması planlanmaktadır.

Bu çalışmaya katılmalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar vererseniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalasanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından sizin için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten doktor çalışmaya devam etmenizin sizin için yararlı olmayacağına karar verebilir ve sizi çalışma dışı bırakabilir, bu durumda da sizin için en uygun tedavi seçilecektir.

EK-2 (devamı)

Bana önerilen araştırma yöntemi/ilacı dışında başka alternatif tedaviler var mı?

Bu parazitleri taşıdığınız belirlenirse, tedavilerinde uluslar arası rehberlerle standart olarak belirlenmiş ilaçlarla tedavi olabilirsiniz.

Bu çalışmaya katılırsam beni neler bekliyor?

- Bu çalışmaya katılırsanız sizden sadece 3 gün süreyle dışkı örneği getirmeniz istenecektir.
- Eğer dışkınızda bu parazitler bulunursa tedavilerinde önerilen standart ilaçları kullanabilirsiniz. Bu durumda sizden bir ay sonra tekrar bir dışkı örneği vermeniz istenecektir.

Ne yapmam gerekiyor?

Bu çalışmaya katılırsanız sizden sadece dışkı örneği getirmeniz istenecektir.

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları nelerdir, göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacak ?

Çalışmada sadece dışkı örneği vereceğiniz için herhangi bir rahatsızlık ya da yan etki görmeniz söz konusu değildir.

- Danışmak istediğiniz durumlar için iletişim bilgileri şöyledir:
İpek Mumcuoğlu
Tel: 0 312 508 44 77
Cep: 0 505 861 85 94

Çalışmada yer almamanın yararları nelerdir ?

İrrite Barsak Hastalığı kronik bir hastalıktır ve günlük yaşam kalitesini düşürür. Etkeni veya etkenleri tam olarak açıklanamamıştır. Ancak enfeksiyon sebebiyle oluştuğu güçlü olasılıklardan biridir. Çalışmamızda sözü edilen iki parazitin sizde tespit edilmesi durumunda isterseniz uluslararası standartlarla belirlenmiş ilaçları kullanabilirsiniz. Siz de görülen İrrite Barsak Hastalığının etkeni bu parazitlerse şikayetlerinizin geçme olasılığı vardır.

EK-2 (devamı)

Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir ?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak ?

Çalışma doktorunuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz çalışma boyunca hekiminiz tarafından gizli tutulacaktır. Çalışmanın sonunda, bu bilgiler hakkında bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim ?

Çalışma ilacı ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : İpek Mumcuoğlu
GÖREVİ : Mikrobiyoloji ve Kl. Mik. Uzmanı
TELEFON : 0 312 508 44 77

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi II. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği'nde , Mik.Uz. İpek Mumcuoğlu tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

EK-2 (devamı)

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr Tuğrul Pürnak'ı 0312 508 48 22 ve 0505 891 61 14 nolu telefonlardan ve adresten arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı: İpek Mumcuoğlu, Mik. Ve Kl. Mik Uzmanı

Adres:GATA Lojmanları Serter Apt Daire:14 Basınevleri ANKARA

Tel: 0 312 508 4477 0 505 861 8594

İmza:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: İPEK

Soyadı: MUMCUOĞLU

Doğum yeri ve tarihi: İZMİR - 28.07.1972

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: EVLİ

İletişim adresi ve telefonu: GATA Loj. Serter Apt. D:14 Etlik/ANKARA

0312 5084477 ipekmumcuoglu@gmail.com

II. Eğitimi

1989-1993 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ

1994-1997 ANKARA NUMUNE EĞT. VE ARAŞ. HASTANESİ MİKROBİYOLOJİ
VE KL. MİK.UZMANLIK EĞİTİMİ

III. Ünvanları

1993 TIBBİ BİYOLOG

1997 MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ UZMANI

IV. Mesleki Deneyimi

1997-2000 TATVAN DEVLET HASTANESİ MİK.ve KL. MİK. UZ.

2000-2003 MANİSA DEVLET HASTANESİ MİK.ve KL. MİK. UZ.

2003-HALEN ANKARA NUMUNE HASTANESİ MİK.ve KL. MİK. UZ.

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

TÜRK PARAZİTOLOJİ DERNEĞİ

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ

VI. Katıldığı Kongreler (2004-2010)

XVI. ULUSAL PARAZİTOLOJİ KONGRESİ, 1-7 Kasım 2009, ADANA

XVII th ECCMID 31 March - 3 April 2007, Munich, Germany

XV. ULUSAL PARAZİTOLOJİ KONGRESİ, 18-23 Kasım 2007, Ürgüp/Kayseri

III. ULUSAL TROPİKAL HASTALIKLAR KONGRESİ, 2006, Diyarbakır.

VII. Yayınlar (2004-2010)

İPEK MUMCUOĞLU, GÜLAY ARAL AKARSU, NERİMAN BALABAN, İBRAHİM KELEŞ. Eristalis Tenax As A Cause Of Urinary Myiasis.Scandinavian Journal Of Infectious Diseases, 2005;37(11-12):942-3.

İPEK ÖSTAN, **İPEK MUMCUOĞLU**, ÖZGÜR KURT, KOR YERELİ. Manisa Yöresinde Nozokomiyal Bağırsak Parazitolojilerinin Araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2004; 28(1): 27 - 30.

F.D. Al, H. Yoshikawa, **İ. Mumcuoğlu**, S. Türk, S. Kuştımur, N. Balaban. Blastocystis protozoonunun tanısında mikrokültür ve direkt floresan yöntemlerinin kullanılması. 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 07-11 Kasım 2010 GİRNE, KKTC. PB 100.