

GIARDİA İNTESTİNALİS ENFEKSİYONLARININ TANISINDA MİKROSKOBİ VE İNDİREKT İMMUN FLUORESAN YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARISON OF MICROSCOPY AND INDIRECT IMMUNOFUORESCENCE METHODS IN THE DIAGNOSIS OF GIARDIA INTESTINALIS INFECTIONS

*Mustafa KAPLAN**, *Ahmet GÖDEKMERDAN**, *Ahmet KALKAN***

*Selahattin KAZAZ***, *Süleyman FELEK***

ÖZET: Çalışmamızda, giardiozis tanısında indirekt immunfloresan (IFA) yöntemi ile rutin olarak kullanılan nativ-lugol ve çinkosülfat yüzdürme yöntemlerinin karşılaştırılması ve IFA yönteminin rutin tanıdaki yerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Fırat Üniversitesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarlarına ishal şikayetiyle başvuran ve yaşları 1-66 yıl (ortalama: 26 ± 15) arasında değişen 129 olgu alındı. Mikroskopik yöntemlerle 23 olguda G. intestinalis kist ve/veya trofozoitleri saptandı. Bu 23 olguda ve ayrıca mikroskopik yöntemlerle G. intestinalis kist ve/veya trofozoitleri saptanmayan 43 olguda olmak üzere toplam 66 olguda IFA testi ile IgG+IgM pozitifliği saptandı. Bu sonuçlara göre, IFA yönteminin özgüllüğü %59, duyarlılığı ise %100 olarak bulundu. Sonuç olarak, mikroskopik yöntemlerin IFA yöntemine göre daha az zaman ve cihaz ihtiyacı göstermesi, daha ekonomik olması ve dışkıda G. intestinalis dışında diğer parazitlerin de değerlendirilmesine olanak sağlaması nedeniyle tanıda ilk başvurulacak yöntem olarak kullanılması gerektiği görüşündeyiz. Giardiozis semptomları bulunduğu halde, rutin yöntemlerle parazit saptanamayan olgularda, tedavinin izlenmesinde IFA yöntemi, ek bir tanı aracı olarak kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Giardiosis, tanı, IFA, duyarlılık, özgüllük.

Summary: In this study, it was aimed to compare the indirect immunofluorescence (IFA) method with the native-lugol and zinc sulphate floating techniques in the diagnosis of giardiasis and to evaluate the use of the IFA method for routine diagnosis. Stool samples from 129 patients aged between 1-66 years old (mean age: 26 ± 15 yrs) who were admitted to Fırat University Hospital, Microbiology and Infectious Diseases Laboratory, Elazığ with the complaints of

* Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ.

** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ.

diarrhoeae were included to the study. Cysts and/or trophozoits of *G. intestinalis* were determined in 23 cases by microscopic methods, and all of these 23 positive cases and additionally 43 microscopy negative cases (total 66 cases) were found IgG+IgM antibody positive by IFA method. The specificity and sensitivity of the IFA method were 59% and 100%, respectively. As a result, it was concluded that, the microscopic methods are more economic, rapid and practical when compared with IFA technique, and also usefull for the detection of other parasites together with *G. intestinalis*, so they should be used for initial diagnosis especially in developing countries. IFA may be used as an additional method to detect antibodies against *G.intestinalis* in cases with suspected infections but negative microscopy and to follow up the response to the therapy.

Key words: Giardiasis, diagnosis, IFA, sensitivity, specificity.

GİRİŞ

Giardiozis, her yaşta görülmekle birlikte okul çağındaki çocuklarda daha siktir. Karın ağrısı, akut ve kronik ishal, gelişme geriliği gibi yakınmalarla hekime başvuran giardiozisli olguların tanısı benzer belirtileri yapan diğer hastalıklarla karışabilir¹. Tanı daha çok dışkıda veya entero-test ve duodenum aspirasyonu ile alınan örneklerde *Giardia intestinalis* kist ve trofozoitlerinin görülmesi ile konur². Yoğunlaştırma yöntemlerinin uygulandığı durumlarda bile, parazitin çoğalma periyoduna bağlı olarak olguların ancak %50 kadarında parazit saptanabilmektedir. Yoğunlaştırma işlemlerinin duyarlılığı, laboratuvar çalışanının tecrübesi, preparat başına yaptığı hazırlık ve mikroskopta inceleme süresi ile değişebilmektedir. Ayrıca, hastanın antibiyotik alması ve uygunsuz nakil ortamları da sonuçları olumsuz etkileyebilmektedir³.

Duodenal biyopsi ve aspirasyon yöntemleri, özellikle asemptomatik veya hafif semptomlu giardiozis olgularının saptanmasında yararlı olabilmesine rağmen pahalı ve invaziv girişimler olup zaman alıcıdır⁴. Giardioziste sistemik immün yanıtın varlığı 1970'li yıllarda ortaya konmuştur. Günümüzde *G. intestinalis*'e karşı sistemik immün cevap oluştuğu bilinmekte ve buna dayalı serolojik tanı yöntemleri kullanılmaktadır^{5,6}.

Çalışmamızda, giardiozis tanısında IFA yöntemi ile nativ-lugol ve çinko sülfat yüzdürme yöntemlerinin karşılaştırılması ve IFA yönteminin tanıdaki yerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fırat Tıp Merkezi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarına ishal yakınması ile başvuran 129 olgu dahil edildi. Olguların her birinden dışkı örnekleri özel dışkı kaplarına ve kan örnekleri 5 ml olmak üzere steril tüplere alındı. Dışkılar

bekletilmeden nativ lugol, çinko sülfat yüzdürme yöntemi ve şüpheli olgularda Giemsa ile boyalı preparat hazırlanarak incelendi. Serumlar ayrıldıktan sonra çaişilincaya kadar -20°C'de derin dondurucuda bekletildi.

IFA yöntemi için antijen olarak, giardiosisli hastaların dışkılarından sükröz gradient yöntemi ile saflaştırılan *G. intestinalis* kistleri ve deneysel olarak enfekte edilen farelerin ince barsağından elde edilen trofozoitler kullanıldı⁷⁻⁹. Antijenler teflon kaplı lamlara yayılarak oda ısısında kurutuldu ve saf asetonla tespit edilerek -20°C'de bekletildi.

G. intestinalis kist ve/veya trofozoit antijenlerine karşı pozitif olarak saptanan serumlar pozitif kontrol, negatif olarak saptanan serumlar ve fosfatlı tampon çözeltisi (PBS) de negatif kontrol serum olarak kullanıldı. Kontrol serumlarla birlikte hasta serumlarının 1/32, 1/64, 1/128 ve 1/256 olacak şekilde hazırlanan sulandırımıları antijen kaplı lamlara 15 µl olmak üzere eklendi ve 37°C'de nemli ortamda 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra PBS ile iki kez 5'er dakika yıkanarak kurutuldu. Üzerlerine floresan izotiosiyanat ile işaretli anti-insan IgG (γ-chain specific) ve anti-insan IgM (μ-chain specific) konjugatından (Sigma Chemical Co.) ayrı ayrı olmak üzere 15'er µl eklendi. 37°C'de nemli ortamda 30 dakika inkübe edildikten sonra PBS ile iki kez 5'er dakika yıkandı. Lamlar kurumadan kapatma solüsyonu (9 kısım gliserin+ 1 kısım PBS) damlatılarak lamelle kapatıldı ve bekletilmeden fluoresan mikroskobu ile incelendi.

Testin değerlendirilmesi için floresan şiddeti (-) ile (++++) arasında derecelendirildi. En az %75 organizmanın fluoresan vermesi +1 olarak değerlendirildi. Pozitif floresan veren en yüksek serum sulandırımı antikor titresi olarak kaydedildi^{10,11}.

G. intestinalis kist ve/veya trofozoit antijenlerine karşı IgG ve IgM antikorlarından herhangi birinin pozitif saptandığı olgular IFA pozitif olarak değerlendirildi.

B U L G U L A R

Çalışmaya alınan olguların 78'i (%60) erkek, 51'i (%40) bayan olup, yaşları 1-66 (ort. 26±15 yıl) arasında değişmekteydi. Nativ lugol ve çinko sülfat yüzdürme yöntemleri ile 129 dışkı örneğinin 22'sinde tek başına ve birinde de *Entamoeba coli* ile birlikte olmak üzere toplam 23'ünde (%17.8) *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoitleri saptandı. Bu 23 dışkı örneğinin tümünde ve ayrıca mikroskobik yöntemlerle *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoitleri görülmeyen dışkı örneklerinden 43'ünde olmak üzere toplam 66 (%51.1) olguda IFA ile IgG ve/veya IgM antikor pozitifliği saptandı. Olguların dışkı örneklerinin mikroskobik değerlendirme sonuçları ile IFA sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo I: Mikroskopik İnceleme ve IFA Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

Parazit	Mikroskopisi		IFA	
	n	%	Pozitif	Negatif
Saptanmayan	88	68.2	34	54
G. intestinalis	22	17.0	22	0
E. histolytica	2	1.5	2	0
E. coli*	8	6.2	6	2
I. bütschlii	1	0.7	0	1
A. lumbricoides	2	1.5	0	2
T. trichura	1	0.7	0	1
C. mesnili	2	1.5	0	2
E. coli+ G. intestinalis	1	0.7	1	0
E. coli + B. hominis	1	0.7	1	0
E. coli + H. nana	1	0.7	0	1
Toplam	129	100.0	66	63

* Entamoeba coli.

Bu sonuçlara göre, IFA testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %59, pozitif prediktif değeri %34 ve negatif prediktif değeri %100 olarak bulundu. (Tablo II).

Tablo II: IFA Yönteminin Duyarlılık ve Özgüllüğü

IFA	Dışkı mikroskopisi		Toplam
	G. intestinalis pozitif	G. intestinalis negatif	
Pozitif	23	43	66
Negatif	0	63	63
Toplam	23	106	129

TARTIŞMA

Giardiozis düşünülen olgularda tanı, etkenin gösterilmesi, serolojik yöntemler veya DNA saptanmasına yönelik moleküler tanı yöntemleri ile konulmaktadır¹²⁻¹⁴. Mikroskopik yöntemlerin; tek bir dışkı örneği incelemesinin yeterli olmaması, ince barsak biyopsisinin invaziv olması, duodenal aspirasyon ve enterotestin çocuklar için pratik olmaması gibi dezavantajları vardır^{2,4}. Ayrıca, barsak içeriğinin değişmesi, kişinin immun durumu, uygunsuz saklama ve taşıma koşulları gibi faktörler G. intestinalis kist ve trofozoitlerinin ölmesine, parçalanmasına veya dış görünümünün değişmesine neden olabilmektedir. Bu gibi durumlarda da mikroskopik tanıda güçlükler ortaya çıkabilmektedir³. Yetersiz tedavi sonucu kronikleşen olgularda, parazitlerin şekilleri değişmekte ve yine mikroskopik tanı zorlaşmaktadır^{3,16,17}.

Serolojik tanı yöntemleri antijen-antikor ilişkilerinin in vitro olarak incelendiği yöntemlerdir. Bu yöntemler, klinik olarak giardiozisin düşünüldüğü ancak rutin laboratuvar yöntemleri ile sonuç alınamayan olgularda, hastaların tedavisinin izlenmesinde ve araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde parazitte oluşan morfolojik değişiklikler ile sonuçlar etkilenmemektedir⁴.

Serumda *G. intestinalis*'e karşı oluşan antikorların IFA yöntemi ile araştırılmasında tam partikül antijenler kullanılabilir. Bu durum testin kolay ve çabuk değerlendirilebilmesine olanak tanır. IFA'nın kullanıldığı değişik çalışmalarda, antijen olarak hastaların dışkı ve duodenum sıvılarından izole edilen *G. intestinalis* kist ve trofozoitleri kullanılmıştır^{8,10,18,19}. Çalışmamızda da antijen olarak, hastalardan izole edilen kistler ve bunlarla enfekte edilen farelerden elde edilen trofozoitler kullanıldı.

Çalışmamızda, mikroskopik yöntemlerle 23 olguda *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoitleri saptadık. Bu olguların tümünde ve mikroskopik yöntemlerle *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoitleri saptanmayan 43 olguda olmak üzere toplam 66 olguda IFA ile IgG ve/veya IgM pozitifliği saptadık. Giardiozis tanısında direkt mikroskopik yöntemlerle IFA testinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, pozitiflik sınırının farklı kabul edilmesine bağlı olarak IFA sonuçlarının değiştiği, yüksek sulandırımelerde pozitiflik oranının düştüğü görülmektedir^{8,11,18-25}. Ayrıca, *G. intestinalis*'in diğer intestinal parazitlerle çapraz reaksiyonlarının araştırıldığı serolojik çalışmalarda, 1/16-1/32 altındaki titrelerde çapraz reaksiyonların sık olduğu bildirilmiştir^{8,11,19,20}. Çalışmamızda pozitiflik sınırı 1/32 olarak kabul edildi. Bununla birlikte, dışkı mikroskopisinde *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoitleri saptanan 23 olgunun tümünde IFA testi değerleri 1/32'nin üzerinde pozitif idi. *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoitleri saptadığımız 22 olguda başka barsak paraziti saptanmazken, 1 olguda *G. intestinalis* ile birlikte *Entamoeba coli* saptandı. Ayrıca, *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoitleri negatif, IFA pozitif 43 olgunun 9'unda değişik barsak parazitleri saptandı (Tablo I). Pozitiflik sınırını 1/32 olarak almamız nedeniyle çapraz reaksiyonları en aza indirdiğimizi ve saptadığımız IFA pozitifliğinin *G. intestinalis*'e bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Bunu göre, 129 olgunun 66'sında (%51.1) saptadığımız IFA pozitifliğinin gerek çapraz reaksiyonlardan gerekse serum sulandırımından etkilenmediği kanısındayız.

Giardioziste IFA yönteminin tanı değerinin araştırıldığı değişik çalışmalarda, bu yöntemin özgüllüğünün %79.5-%90, duyarlılığının ise %92.5-%96 arasında olduğu bildirilmiştir^{20,24}. Çalışmamızda, IFA yönteminin özgüllüğünü %59, duyarlılığını ise %100 olarak saptadık. Bizim sonuçlarımıza göre, IFA yönteminin özgüllüğü düşük bulunmuştur. Bunun nedeninin, olgularımızda tek bir dışkı örneği incelemesi yapabilmemizle ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Çakıroğlu ve arkadaşları⁸, giardiozislili olguların %50'sini yalnızca duodenal aspirasyon sıvısının mikroskopik incelenmesi ile saptayabildiklerini, Ridley ve arkadaşları¹⁹ ise, jejunal aspiratlarda *G. intestinalis* saptanan olguların ancak %85'inde dışkı mikroskopisinin

pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, hem tek bir dışkı örneği incelenebilmiş hem de duodenal aspirasyon yöntemleri uygulanamamıştır. Eğer bunlar yapılabilseydi, direkt mikroskopide *G. intestinalis* saptanan olgu sayısının ve buna bağlı olarak da IFA yönteminin özgüllüğünün artması beklenebilirdi.

Sonuç olarak, mikroskopik yöntemlerin IFA yöntemine göre daha az zaman ve cihaz ihtiyacı göstermesi, daha ekonomik olması, dışkıda *G. intestinalis* dışında diğer parazitlerin değerlendirilmesine de olanak sağlaması nedeniyle tanıda ilk başvurulacak yöntem olarak kullanılması gerektiği görüşündeyiz. IFA yönteminin, giardiosis semptomları bulunduğu halde, rutin yöntemlerle parazit saptanamayan olgularda ve tedaviye cevabın izlenmesinde ek bir tanı aracı olarak kullanılabileceğini ve ayrıca epidemiyolojik çalışmalarda yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Monroe LS: *Giardia lamblia*, pp: 4278-4282. In: Berk JE (Ed), Bockus Gastroenterology. 1985, Fourth Edition. WB Saunders Company, Spain.
2. Christie AB: Giardiasis. Infectious Disease, Epidemiology and Clinical Practice. 1987, Fourth Edition. Longman Group (FE) Ltd, Hong Kong.
3. Stibs HH: Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for *Giardia lamblia* antigen in human stool. *J Clin Microbiol* 1989, 27: 2582-2588.
4. Özcel MA, Üner A: Giardiosis. 1997, 1. Baskı. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.
5. Faubert GM: The immune response to *Giardia*. *Parasitol Today* 1996, 12: 140-145.
6. Shetty N, Narasimha M, Elliott E, et al: Age-specific seroprevalance of amoebiasis and giardiasis in Southern Indian infants and children. *J Trop Pediatr* 1992, 38: 57-63.
7. Al-tukhi MH, Al-ahdal NM, Peters W: A simple method for excystation of *Giardia lamblia* cysts. *Ann Trop Med Parasitol* 1991, 85: 427-31.
8. Çakıroğlu A, Altıntaş N: *Giardia intestinalis* tanısında duodenal sıvı, dışkı incelemesi ve indirekt floresans antikor (IFA) yönteminin değerlendirilmesi. *Ege Tıp Derg* 1994, 33: 173-178.
9. Rice EW, Schaffer III FW: Improved in vitro excystation procedure for *Giardia lamblia* cysts. *J Clin Microbiol* 1981, 14: 709-10.
10. Radulescu S, Iancu L, Simionescu O: Serum antibodies in Giardiosis. *J Clin Pathol* 1983, 29: 863.
11. Visvesvara GS, Smith PD, Healy GR, et al: An immunofluorescence test to detect serum antibodies to *G. lamblia*. *Ann Inter Med* 1980, 93: 802-805.
12. Farthing MJG: Giardiasis as a disease, pp: 15-37. In: Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery AJ (Eds), *Giardia: From molecules to Disease*. 1994. CAB International, Cambridge, England.
13. Kuman HA, Altıntaş N: Protozoon Hastalıkları. 1996. 1. Baskı. Ege Üniversitesi Basımevi. Bornova, İzmir.
14. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M: Unat'ın Tıp Parazitolojisi. İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. 1995, 5. Baskı. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayınları, İstanbul.
15. Garcia LS, Bruckner DA: *Giardia lamblia*. Diagnostic Medical Parasitology. 1993, Second Edition. American Society for Microbiology, Washington DC.
16. Nash TE, Herrington DA, Levine MM: Usefulness of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Giardia* antigen in feces. *J Clin Microbiol* 1987, 25: 1169-1171.

17. Rosenblatt JE, Sloan LM, Schneider SK: Evaluations of enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* in stool specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993, 16: 337-341.
18. Jokipii L, Miettinen A, Jokipii AMM: Antibodies to cysts of *G. lamblia* in primary Giardiasis and in the absence of Giardiasis. *J Clin Microbiol* 1988, 26: 121-125.
19. Ridley MJ, Ridley DS: Serum antibodies and jejunal histology in Giardiasis associated with malabsorption. *J Clin Path* 1976, 29: 30-34.
20. Wittner M, Maayan S, Farrer W et al: Diagnosis of Giardiasis by two methods. *Arch Pathol Lab Med* 1983, 107: 524-527.
21. Winiecka J, Kasprzak W, Kociecka W, et al: Serum antibodies to *Giardia intestinalis* detected by immunofluorescence using trophozoites as antigen. *Tropenmed Parasitol* 1984, 35: 20-21.
22. Islam A, Stoll BJ, Ljungström I, et al: *G. lamblia* infections in a cohort of Bangladeshi mothers and infants followed for one year. *J Pediatr* 1983, 103: 996-1000.
23. Şaşmaz E, Hashempoor GR, Açıkgöz M ve ark: Giardiasis'li hasta serumlarında *G. lamblia* kist ve trofozoitlerinin karşılaştırmalı antijenik analizi. *T Parazitol Derg* 1995, 19: 6-13.
24. Torres ID, Matamoros VM, Rojas RL, et al: Assessment of the antibody response in patients with giardiasis. *Rev Cubana Med Trop* 1993, 45: 27-31.
25. Sullivan RMD, Linneman CC, Clark CS, et al: Seroepidemiologic study of Giardiasis patients and high-risk groups in a Midwestern City in the United States. *Am J Public Health* 1987, 77: 960-963.