

Dışkı Örneklerinde *Giardia intestinalis* Antijeninin ELISA ile Araştırılması ve Sonuçların Mikroskopi ile Karşılaştırılması

Özden Büyükbaba, Ayşegül Uyar, Gülçin Babaoğlu, Handan Katrancı, Hayriye Kırkoyun, Ergene Büget

Özet: Sosyoekonomik düzeyi düşük ve sanitasyon koşulları yetersiz bir bölgedeki ilkokulun yedi yaş grubundaki 74 öğrencisinin dışkı örneklerinde mikroskop incelemesi ve ELISA ile *G.intestinalis* araştırılmıştır. Sadece mikroskop incelemesi ile 13 (% 17.5)'ünde *G.intestinalis* kisti belirlenmiş, mikroskop incelemesinde *G.intestinalis* kisti belirlenmeyen 61 dışkı örneğinin 12 (% 19.6)'sinde ELISA ile *G.intestinalis* antijeni belirlenmiştir. Mikroskop incelemesi ile karşılaştırıldığında ELISA'nın duyarlılığının % 100, özgüllüğünün ise % 80 olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Giardia intestinalis*, ELISA.

Summary: Detection of the antigen of *Giardia intestinalis* by ELISA and comparison of the results by microscopy. *Giardia intestinalis* was investigated by ELISA and microscopy in the faeces of 74 primary school students, all seven years old and from a low socioeconomic region with inadequate sanitation conditions. In only 13 (17.5%) of the microscopic investigations, *G. intestinalis* cysts were detected. By ELISA, *G. intestinalis* cysts were found to be positive in the 12 of 61 (19.6%) faecal samples. When compared with microscopy, sensitivity and specificity of ELISA was 100% and 80%, respectively.

Key Words: *Giardia intestinalis*, ELISA.

Giriş

Giardia intestinalis, dünyada yaygın olarak bulunan, özellikle 10 yaşın altındaki çocuklarda ilk sırada yer alan barsak protozoonudur (1,2). Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda, yaş grubu, iklim ve çevresel hijyene bağlı olarak prevalansın % 2-25 arasında değiştiği gösterilmiştir (3). Yurdumuzda değişik yaş gruplarında yapılan çalışmalarda insidansın % 6.8-39 arasında olduğu bildirilmiştir (4-8).

G.intestinalis'in başlıca rezervuarı, dışkıları ile günde milyonlarca kist çıkarabilen insanlardır. *G.intestinalis* ile doğal ve ya deneysel olarak infekte birçok memeli türü (koyun, sığır, köpek, kedi, kunduz) bildirilmiş, bunların genetik izoenzim ve antijenik yapılarının insan izolatları ile benzer olduğu belirlenmiştir de, bu hayvanların insana bulaşmada bir rezervuar rolü oynayıp oynamadıkları kesinlik kazanmamıştır. Ancak Kanada'da yapılan bir çalışmada kunduz dışkıları ile kontamine suların bulaşmada kesin bir rol oynadığı bildirilmiştir (9-11).

G.intestinalis, özellikle çocuklarda semptomatik diyare etkenidir ve diyare malabsorbsiyona bağlı olarak gelişmektedir. İnfeksiyon için 10-25 kistin sindirim yolundan alınması yeterlidir. Sindirim yolundan alınan kistler açılır, trofozoitler emici disk (adezif disk)'lerindeki spesifik reseptörleri ile incebarsak mukozasına ya da barsak villusları arasında tutunur, bu yolla barsağın peristaltik hareketini engeller (12,13). Giardiyazda birçok patojenik mekanizma açıklanmıştır. Bunlar, barsak villuslarının harap edilmesi, mukozal invazyon ve enterotoksin oluşturma-

madır. Elektron mikroskopi çalışmaları ile barsak villuslarının kaybolduğu ve giardiyazlı hastalarda disakarid yetmezliğinin geliştiği gösterilmiştir (12-14).

Giardiyazın klasik tanısı dışkı örneklerinde mikroskop incelemesi ile kist ve trofozoitlerinin belirlenmesine dayanır. Dışkı örneklerinin mikroskopik incelenmesi çoğunlukla kistlerin; duodenal aspirasyon ve biyopsi örnekleri ise trofozoitlerin saptanmasında yararlıdır. Bu nedenle erken ya da kronik infeksiyonlu hastalardan alınan birden fazla dışkı örneğinin incelenmesi ile doğru tanı konulabilir. Oysa dışkıda trofozoit ve kistlerde ortak bulunan *G. intestinalis*'e özgü 65 kDa'luk antijenin ELISA ile dışkıda aranması, *G. intestinalis*'in her iki yaşam evresinde saptanmasını sağlar (15,16).

Bu amaçla yedi yaşındaki 74 ilkokul öğrencisinin dışkı örneklerinde, 65 kDa'luk antijene karşı monoklonal antikor içeren ELISA (Alexon) kiti ile dışkıda *G. intestinalis* antijeni araştırılmış ve sonuçlar mikroskop incelemesininkilerle karşılaştırılmıştır.

Yöntemler

İstanbul'un sosyoekonomik düzeyi düşük ve alt yapı koşulları yetersiz olan Halkalı bölgesindeki bir ilkokuldan yedi yaş grubundaki 74 öğrencinin dışkı örnekleri alınmıştır. Dışkı örnekleri ikiye bölünmüş bir bölümü *G.intestinalis* kistlerinin yoğunlaştırılması için önerilen formol-eter yöntemi ile çöktürülmüş ve hazırlanan preparasyonlar mikroskopta incelenmiştir. Dışkı örneklerinin diğer bölümünde ise ELISA ile 65 kDa'luk *G.intestinalis*'e spesifik antijen araştırılmıştır.

Tablo 1. Dışkıda *Giardia intestinalis*'in Belirlenmesinde ELISA'nın Duyarlılık ve Özgüllük Yönünden Mikroskop İncelemesi ile Karşılaştırılması

	Mikroskop İncelemesi Pozitif	Mikroskop İncelemesi Negatif	Toplam
ELISA ile pozitif	13 (a)	12 (b)	25
ELISA ile negatif	0 (c)	49 (d)	49
Toplam	13	61	74
Duyarlılık: $\frac{a}{a+c} \cdot 100 \rightarrow \frac{13}{13+0} \cdot 100 = \% 100$			
Özgüllük: $\frac{d}{d+b} \cdot 100 \rightarrow \frac{49}{49+12} \cdot 100 = \% 80$			

Sonuçlar

İncelenen 74 dışkı örneğinin 13 (% 17.5)'ünde mikroskop incelemesi ile *G.intestinalis* kistleri belirlenmiş, bu örneklerin tümünde ELISA ile de pozitif sonuç alınmıştır. Mikroskop incelemesinde *G. intestinalis* belirlenmeyen 61 dışkı örneğinin 12 (% 19.6)'sında ELISA ile *G.intestinalis* antijeni belirlenmiştir.

Çalışmamızda dışkıda ELISA ile antijen belirlenmesi, mikroskop incelemesi ile karşılaştırıldığında; ELISA'nın duyarlılığının % 100, özgüllüğünün ise % 80 olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

Mikroskop incelemesinde *G.intestinalis* kisti belirlenemeyen ancak ELISA ile pozitif sonuç alınan 12 dışkı örneğinde ortalama absorbans değerinin 0.456 olduğu, buna karşılık hem mikroskop incelemesinde kist görülen, hem de ELISA ile pozitif sonuç alınan 13 dışkı örneğinin ortalama absorbans değerinin 1.568 olduğu belirlenmiştir.

İrdeleme

Özellikle yuva ve ilkökul çocuklarında malabsorbsiyona bağlı uzun süreli diyare ve kilo kaybı ile seyreden, anemi ve bü-yüme geriliklerine neden olabilen giardiyaz dünyanın birçok yerinde görülen önemli bir barsak hastalığıdır. Çeşitli araştırma sonuçlarında çocuk yuvalarında *G. intestinalis* prevalansının % 20-50'den fazla olduğu bildirilmiştir (1,2). Bu çalışmada 7 yaş grubu 74 ilkökul öğrencisinden 25 (% 33.8)'inin *G. intestinalis* ile infekte olduğu belirlenmiştir.

Giardiyazın klasik tanısı mikroskop incelemesi ile dışkıda kist/trofozoitlerin gösterilmesi ile yapılır. Ancak infeksiyonlu bireyler daha çok yarı katı dışkı çıkardığı için, bu dışkılarda trofozoitler görülmektedir. Bu nedenle birden fazla dışkı örneğinin incelenmesi ile genellikle kistlerin belirlenebileceği bildirilmiştir (13,17).

Kistlerin araştırılmasında formol-eter ve çinko sülfat ile çöktürmenin en iyi konsantrasyon yöntemleri olduğu, ancak tek dışkı örneğine bu yöntemler uygulandığında mikroskop incelemesinde *G.intestinalis* saptama oranının (% 50-70), üç farklı dışkı örneğinin incelenmesi ile % 90'a çıktığı, müşil verilerek alınan örneklerin incelenmesinin bu oranı yükseltmediği bildirilmiştir (17,18).

Akut ve kronik giardiyazlı bireylerde kist çıkarma oranı oldukça değişkendir. Bu nedenle giardiyazlı hastanın tekrarlanan

dışkı incelemesinde kistler görülmeyebilir. Bu durumda 65 kDa'luk *Giardia*-spesifik antijene karşı monoklonal antikor içeren ELISA kitlerinin kullanılması tanıyı kolaylaştırmaktadır. Bu konuda yapılan bir çalışmada 223 dışkı örneği incelenmiş; 13'ünde hem ELISA hem de mikroskopi ile *G.intestinalis* belirlenmiş; sadece ELISA ile pozitif bulunan beş hastadan üçünün tekrarlanan mikroskop incelemesinde *G.intestinalis* kistleri görülmüş, ikisinin ise *G.intestinalis* için yeni tedavi olmuş bireyler olduğu bildirilmiştir (23). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan benzer bir çalışmada da mikroskop incelemesi negatif, ELISA ile pozitif bulunan hasta dışkıları, birkaç kez incelendiğinde *G.intestinalis* kistleri görüldüğü; ELISA'nın yalancı pozitif sonuç vermediği; duyarlılığının % 93.9 özgüllüğünün ise % 100 olduğu saptanmıştır (20). İngiltere'de yapılan bir çalışmada da benzer şekilde mikroskopi negatif, ELISA ile pozitif 20 hastadan tekrarlanan dışkı örneği incelemelerinde *G.intestinalis* kistleri belirlenmiştir (24).

Bu çalışmada incelenen dışkı örneklerinin % 7.5'inde hem mikroskop incelemesi, hem de ELISA ile pozitif sonuç alınmıştır. Bu dışkı örneklerinin ELISA ile ortalama absorbans değeri yüksek (1.568) bulunurken, sadece ELISA ile pozitif sonuç veren dışkı örnekleri ile elde edilen ortalama absorbans değerinin (0.456) pozitiflik sınırları içinde, ancak daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bir lamel kapatılmış mikroskop alanında sadece iki *G.intestinalis* kisti görülen bir örnekte ELISA ile pozitiflik sınırları içinde, ancak mikroskop incelemesinde daha bol kist görülen örneklere göre daha düşük (0.602) absorbans değeri elde edilmiş, benzer şekilde mikroskop incelemesinde altı kist belirlenen bir örnekte absorbans değerinin 0.844 olduğu saptanmıştır.

Mısır'da yapılan bir çalışmada, çalışmamızdakine benzer şekilde, dışkıdaki kist sayısı ile ELISA'da elde edilen absorbans değerleri arasında iyi bir korelasyon olduğu, bunun da tedavi sonrası takipte (sık tekrarlayan infeksiyonlar nedeni ile) çok yararlı olacağı bildirilmiştir (25). Peru'da çocuklardan alınan 1131 dışkı örneği mikroskopi ve ELISA ile incelenmiş 44'ünde ELISA, 17'sinde mikroskop incelemesi ve 91'inde her iki yöntemle de *G.intestinalis* belirlenmiş, ELISA'nın dışkıda *G.intestinalis* antijen belirlenmesinde yararlı ve mikroskop incelemesinden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (26). ABD'de gastrointestinal yakınmaları olan 411 hastadan alınan dışkı örneklerinde, formol-eter yoğunlaştırma ile mikroskop incelemesi, ELISA ve direkt floresan antikor (DFA) yöntemleri ile *G.intestinalis* araştırılmıştır. *G.intestinalis* saptanan 29 örnekte 10'u her üç yöntemle, 17'si sadece ELISA ile, ikisi mikroskop incelemesi ve DFA ile pozitif bulunmuştur. ELISA'nın duyarlılığının % 91, özgüllüğünün ise % 98 olduğu saptanmıştır. Bu üç yöntemin maliyetinin sırası ile 11.00 \$, 8.95 \$ ve 12.80 \$ olduğu, ELISA'nın diğerlerine göre daha ucuz, hızlı ve duyarlı bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (27).

Bu çalışmada giardiyaz tanısı konan 24 hastanın dışkı örneklerinde ELISA ile pozitif sonuç alınmış, *G.intestinalis* dışında başka barsak parazitleri olan hastalardan alınan dışkı örneklerinde ELISA ile negatif sonuç alındığı bildirilmiştir. Mikroskop incelemesi negatif olan giardiyaz şüpheli 25 hastanın 17 (% 68)'sinde ELISA ile pozitif sonuç alınmış, anti giardiyal tedavi gören bu hastalardan ikinci kez alınan dışkı örnekleri ELISA ile negatif bulunmuştur (28).

Çalışmamızın sonuçları ile, bu konuda yapılan diğer çalış-

maların verileri birbiriyle uyumlu bulunmuştur. ELISA, dışkıda tek dışkı örneğinin mikroskop incelemesine göre çok daha duyarlı, hızlı ve güvenilir; ayrıca giardiyaz şüpheli, ancak mikroskopi ile tanı konulmayan hastalarda ve tedavinin izlenmesinde yararlı bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.

Kaynaklar

- Gilman RH, Brown KH, Visvesvara GS, et al. Epidemiology and serology of Giardia lamblia in a developing country: Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985;79:469-73
- Gilman RH, Marquis GS, Miranda E, et al. Rapid reinfection by Giardia lamblia after treatment in a hyperendemic third world community. *Lancet* 1988; 1:343-5
- Budak S. Giardiasis. In: Özcel MA, ed. *GAP ve Parazit Hastalıkları*. İzmir: Türk Parazitoloji Derneği Yayını No. 11, 1993: 121-6
- Haznedaroğlu T, Tanyüksel M, Başustaoğlu AC, Gün H. GATA Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran 4742 hastanın barsak protozoonları yönünden incelenmesi. *Deniz Tıp Bül* 1992; 25:5-8
- Özcel MA, Mergen H, Özbilgin A, Ünek T, Özbel Y, Şehirli S. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda yatan 100 hastada barsak parazitlerinin dağılımı. *Türk Parazit Derg* 1991; 15(3-4):54-6
- Östian İ, Özler N. Son bir yılda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran kişilerde parazitler hastalıklarının dağılımı. *Türk Parazit Derg* 1982; 5(1):23-9
- Mete Ö. Diyarbakır ve çevresinde değişik halk sınıfları 0-6 yaş grubu çocuklarda patojen ve apatojen barsak protozoonları üzerinde sistematik araştırma. *Diyarbakır Üniv Tıp Fak Derg* 1975; 4:333-6
- Ökten A, Köksal İ, Mocun H, Gedik Y, Erduran E. Trabzon yöresinde parazitöz. *Türk Parazit Derg* 1990; 14(2):69-74
- Castor SB, Lindqvist KB. Canine giardiasis in Sweden. No evidence of infectivity to man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84:249-50
- Bemirck WJ, Erlandes SL. Giardiasis-is it really a zoonosis? *Parasitol Today* 1988; 4:69-71
- Isaac-Renton JL, Corderio C, Safaris K, Shahriari H. Characterization of Giardia duodenalis isolates from water-borne outbreak. *J Infect Dis* 1993; 167:431-40
- Farthing MJ. Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges. Pathogenesis of giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87(Suppl 3):17-21
- Hill DR. Giardia lamblia. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fourth ed. New York: Churchill Livingstone, 1995: 2487-93
- Buret A, Gall DG, Nation PN, Olson ME. Intestinal protozoa and epithelial cell kinetics, structure and function. *Parasitol Today* 1990; 6:375-80
- Stibbs HH. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for Giardia lamblia antigen in human stool. *J Clin Microbiol* 1989; 27:2582-8
- Janoff EN, Craft JC, Pickerin LK, Novotny T, Bluser MJ, Krisly CV, Reller LB. Diagnosis of Giardia lamblia infections by detection of parasite-specific antigens. *J Clin Microbiol* 1989; 27:431-5
- Wolfe MS. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:93-100
- Thornton SA, West AH, Du Pont HL, Pickering LK. Comparison of methods for identification of Giardia lamblia. *Am J Clin Pathol* 1983; 80:858-60
- Naik SR, Rau NR, Vinayak VK. A comparative evaluation of three stool samples, jejunal aspirates and jejunal mucosal impression smears in the diagnosis of giardiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1987; 72:491-2
- Addiss DG, Mathews HM, Stewart JM, et al. Evaluation of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay immunoassay to detect Giardia lamblia antigen in stool. *J Clin Microbiol* 1991; 29:1137-42
- Rosoff JD, Sanders CA, Sonnad SS, et al. Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect Giardia-specific antigen 65 (GSA-65). *J Clin Microbiol* 1989; 27:1997-2002
- Rollender W, Rollender K, Romano P. Detection of Giardia specific antigen 65 by enzyme-linked immunosorbent assay in preserved stool specimens [abstract]. In: *93rd Annual Meeting of the American Society for Microbiology*. Abstract C-426, 1993
- Scheffler EH, van Etta LL. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of Giardia lamblia in formalin-preserved stool specimens. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1807-8
- Schieven BC, Hussain Z. Evaluation of an enzyme-immunoassay test kit for diagnosing infections with Giardia lamblia. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 1990; 4:109-13
- Hassan MM, Farghaly AM, Darwish RA, Soukrany N, El-Hayawan IA, Nassar AK. Detection of Giardia antigen in stool samples before and after treatment. *J Egypt Soc Parasitol* 1995; 25:175-82
- Vidal MF, Gilman RH, Ungar BL, et al. Detection of G. lamblia antigen in children living in a Peruvian periurban shantytown (Pueblo Joven). *J Clin Microbiol* 1992; 29:636-7
- Aldeen WE, Hale D, Robinson AJ, Carol K. Evaluation of a commercially available ELISA assay for detection of Giardia lamblia in fecal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 21:77-9
- Dutt P, Mehta S, Viyanak VK. Enzyme-linked immunosorbent assay for copro-diagnosis of giardiasis and characterization of a specific Giardia lamblia antigen in stools. *J Clin Microbiol* 1991;34:271-5