



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIARDIA INTESTINALIS' İN PCR İLE SAPTANMASI

Furkan Yağız KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TİBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2022

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GIARDIA INTESTINALIS' İN PCR İLE SAPTANMASI

Furkan Yağız KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Murat ARAL

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mustafa Altay ATALAY

KAHRAMANMARAŞ 2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Furkan Yağız KAYA



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2020/9-13 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu araştırma, 2020/9-13 YLS kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle yaklaşan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA'ya teşekkür ederim.

Yaptığımız çalışmada bize destek olan ve yardımını esirgemeyen saygı değer hocam Prof. Dr. Murat ARAL'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmada gerçekleştirilen istatistiksel analizlerin hazırlanmasında her zaman yardımcı olan Doç. Dr. Adem DOĞANER hocama teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan Tıbbi Mikrobiyoloji bölümündeki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme sonsuz teşekkürler ederim.

AĞUSTOS - 2022

Furkan YAĞIZ KAYA

GIARDIA INTESTINALIS'İN PCR İLE SAPTANMASI

Yüksek Lisans Tezi

Furkan Yağz KAYA

ÖZET

Giardia intestinalis enfeksiyonu tüm dünyada yaygındır ve hem çocuk hem de erişkinlerde diyarenin en sık karşılaşılan etkenlerden biridir. Gaita ile atılan kistlerinin doğrudan veya dolaylı ağızdan alınmasıyla bulaşmaktadır.

Giardiyazis laboratuvar tanısı parazitin kist veya trofozoitinin gaitada mikroskopik olarak gösterilmesi, antijenlerinin immünolojik yöntemlerle ya da nükleik asitin moleküler yöntemlerle saptanması ile konulmaktadır.

Çalışmamızın amacı Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na parazit şüphesi ile gönderilen gaita örneklerinde *Giardia intestinalis*'in saptanmasında mikroskopi ve moleküler yöntemin karşılaştırılmasıdır.

Çalışma kapsamında 110 gaita örneği mikroskopi ve gerçek zamanlı PCR yöntemi ile incelenmiştir. *Giardia intestinalis* trofozoit ve kistlerini görmek üzere mikroskopik inceleme direkt ve çöktürme işleminden sonra yapılmıştır. Mikroskopi ve gerçek zamanlı PCR yönteminin sonuçları karşılaştırılmıştır.

Mikroskopik inceleme ile üç örnekte (% 2,73) *Giardia* kisti tespit edilmiştir. Gerçek zamanlı PCR ile 11 (% 10) örnekte *Giardia intestinalis* DNA'sı saptanmıştır. Mikroskopik incelemede kist görülen üç örneğin hepsi PCR ile pozitif bulunmuştur.

Giardia intestinalis enfeksiyonunun laboratuvar tanısında günümüzde halen rutin olarak kullanılan mikroskopik yöntemin düşük hassasiyeti göz önünde bulundurulduğunda yüksek maliyetine karşın gerçek zamanlı PCR yönteminin rutin tanıda daha sık kullanılmasının enfeksiyonun tanısı ve yayılımının önlenmesinde daha faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Giardia intestinalis*, mikroskopi, PCR

Sayfa Adedi: 44

Danışman: Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA

DETECTION OF *GIARDIA INTESTINALIS* BY PCR

Master Thesis

Furkan Yağız KAYA

ABSTRACT

Giardia intestinalis infection is common worldwide and is one of the most common causes of diarrhea in both children and adults. It is transmitted by direct or indirect oral ingestion of cysts excreted with feces.

Laboratory diagnosis of giardiasis is made by showing the cyst or trophozoite of the parasite microscopically in the stool, by detecting the antigens by immunological methods or by detecting the nucleic acid by molecular methods.

The aim of our study was to compare microscopy and molecular methods for the detection of *Giardia intestinalis* in stool samples sent to Kahramanmaraş Sütçü İmam University Health Practice and Research Hospital Microbiology Laboratory with suspected parasite infection.

Within the scope of the study, 110 stool samples were examined by microscopy and real-time PCR method. Microscopic examination was performed directly and after precipitation to see *Giardia intestinalis* trophozoites and cysts. The results of microscopy and the real-time PCR method were compared.

Giardia cysts were detected in three samples (2.73 %) by microscopic examination. *Giardia intestinalis* DNA was detected in 11 (10 %) samples by real-time PCR. All three specimens with cysts on microscopic examination were positive by PCR.

Considering the low sensitivity of the microscopic method, which is still routinely used in the laboratory diagnosis of *Giardia intestinalis* infection, it is thought that the more frequent use of real-time PCR method in routine diagnosis, despite its high cost, would be more beneficial in the diagnosis and prevention of the spread of the infection.

Keywords: *Giardia intestinalis*, microscopy, PCR

Page Number: 44

Supervisor: Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Giardia İntestinalis	2
2.1.1. Giardia intestinalis'in sınıflandırılması	3
2.2.2. Giardia intestinalis'in morfolojisi	3
2.2.2.1. Kist formu	3
2.2.2.2. Trofozoit formu	4
2.3. Biyolojik Özellikleri	5
2.4. Yaşam Döngüsü	6
2.5. Patogenez ve İmmün Yanıt	8
2.6. Klinik	9
2.7. Epidemiyoloji	10
2.8. Tanı Yöntemleri	12
2.8.1. Direkt bakı (Nativ-Lugol) yöntemi	12
2.8.2. Yoğunlaştırma yöntemi	13
2.8.3. Boyama yöntemi	13
2.8.4. Biyopsi	14
2.8.5. Entero-test	14
2.8.6. Kültür yöntemi	14
2.8.7. Antijen testleri	14
2.8.8. Antikor testleri	15
2.8.9. PCR testi	15
2.9. Tedavi	15
2.10. Korunma	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17

3.1. Mikroskopik İnceleme	17
3.1.2. Direkt mikroskopik inceleme	18
3.1.3. Çöktürme ile konsantrasyondan işleminden sonra mikroskopik inceleme	18
3.2. Gerçek Zamanlı PCR	18
3.2.1. Fekal DNA izolasyonu.....	18
3.2.2. Gerçek zamanlı PCR.....	21
3.2.3. İstatistiksel analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1. Mikroskopik İnceleme	24
4.1.2. Direkt mikroskopik inceleme	24
4.1.3. Çöktürme ile konsantrasyon işleminden sonra mikroskopik inceleme	24
4.2. Gerçek Zamanlı PCR (rt-PCR).....	25
4.3. Analitik Duyarlılık.....	26
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	32
7. KAYNAKLAR.....	33
8. ŞEKİLLER DİZİNİ	39
10. TABLOLAR DİZİNİ.....	41
11. EKLER DİZİNİ	42
12. EKLER.....	43
13. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
IgA	: İmmünoglobulin A
IgG	: İmmünoglobulin G
IgM	: İmmünoglobulin M
Mg	: Miligram
Rrna	: Ribozomal RNA
rt-PCR	: Real Time/Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Giardia lamblia, *Giardia intestinalis* ve *Giardia duodenalis* olarak da adlandırılan *Giardia intestinalis*, ilk kez 1681 yılında Leeuwenhoek tarafından keşfedilmiştir (1). Neden olduğu giardiyaz tüm dünyada en yaygın görülen ishale seyreden protozoon kaynaklı enfeksiyondur. Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarda, bölgelere göre değişmekle birlikte % 0,8-% 54,8 arasında değişen oranlarda saptandığı bildirilmiştir (4,5).

G. intestinalis enfeksiyonu, kistlerle kontamine besin veya suyun bilinçsizce yutulması veya enfekte insan ya da hayvanlar ile doğrudan temas sonucu meydana gelmektedir (6). *G. intestinalis* ile enfekte olan kişilerin birçoğu asemptomatik olup semptomatik hastalarda akut enfeksiyon diğer protozoal, viral ve bakteriyel patojenler ile oluşan enfeksiyonlara benzer şekilde seyretmektedir. Yaklaşık 10-20 günlük inkübasyondan sonra mide bulantısı, titreme, düşük ateş, üst karın ağrısı ve sulu dışkı gibi şikayetler olabileceği belirtilmektedir. Hasta kişilerde devamlı ishal, mide bölgesinde rahatsızlık, karın bölgesinde şişkinlik ve mide yanması gibi belirtiler ile beraber subakut veya kronik enfeksiyon görülebileceği belirtilmektedir (7).

Giardiyazın klinik tanısında belirtiler patognomik değildir (1). Gaitanın rutin mikroskopik incelemesi en yaygın kullanılan tanı yöntemidir. Biyomedikal alandaki gelişmelerle birlikte morfolojik tanımlama dışı yeni yöntemler geliştirilmiştir. Antijen saptamaya yönelik immünolojik testler özellikle çok numune işleyen büyük laboratuvarlarda yavaş yavaş yer almaya başlamıştır. PCR tabanlı yöntemler sadece mükemmel duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmaları yanı sıra *Giardia*'nın genotiplendirmesine de olanak sağlamaktadır (3).

Bu çalışmamızda, *G. intestinalis* enfeksiyonunun rutin laboratuvar tanısında kullanılan 'çöktürerek yoğunlaştırma ve mikroskopik inceleme' ile yeni ve daha duyarlı olan 'moleküler yöntemin (gerçek zamanlı PCR)' karşılaştırılması ve moleküler yöntemin rutin kullanıma uygunluğunun değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

G. intestinalis dünya genelinde enfeksiyona ve genellikle çocuklarda kronikleşme sonucunda gelişim bozukluğuna neden olmaktadır. *G. intestinalis* parazit kaynaklı ishalin en yaygın nedenlerinden biridir. Fekal-oral yol ile bulaşmaktadır (9). Giardiyazisin etiyolojik teşhisi; gaitada mikroskopik olarak etkenin kistlerinin gösterilmesi, immünolojik yöntemle antijenlerinin veya moleküler yöntemle nükleik asitinin saptanmasıyla yapılmaktadır. Duodenal içeriğin aspirasyonu ve trofozoitlerin gösterilmesi de tanı için kullanılmıştır. *Giardia*'yı hasta dışkı örneklerinden tekrarlanabilir şekilde izole etmenin zorluğundan dolayı dışkı kültürü rutin olarak kullanılmamaktadır. Bununla birlikte dışkı kültürleri, bir hastanın semptomlarının nedeni olarak diğer patojenleri ekarte etmede faydalıdır. İmmünoglobulin G (IgG) seviyeleri uzun süre yüksek kaldığı için akut giardiyaz tanısında koymada yararlı değildir. Serum anti-*Giardia* immünoglobulin M (IgM) akut enfeksiyonlar ile geçirilmiş enfeksiyonları ayırt etmede faydalı olabilir (7).

2.1. *Giardia İntestinalis*

G. intestinalis'in yol açtığı parazitoz giardiyaz olarak isimlendirilmektedir. Genellikle iyi ve dengeli beslenmeyen çocuklarda rastlanılmakta olup sindirim sisteminin görevini yerine getirememesine neden olmaktadır. Bunun yanı sıra özellikle gelişmekte olan toplumlarda malnütrisyon ve malabsorbsiyon sonucu çocuklarda bedensel ve zihinsel gelişimde geriliğe neden olduğu belirtilmektedir (10).

G. intestinalis dünya genelinde memeli hayvanlarda da bağırsakta emilim bozukluğuna bunun neticesinde diyareye neden olan bir bağırsak parazitidir. Maymun, sığır, keçi, kedi, köpek, kuş türleri, kertenkele ve hatta balıklar dahil tüm omurgalı türlerde bu parazite rastlanmıştır. *G. intestinalis* enfeksiyonunun büyük baş hayvan ve küçükbaş hayvanlar üzerindeki etkisinden dolayı ekonomik zararları da bulunduğu belirtilmektedir. İnsanlara en muhtemel zoonotik bulaşma riski evcil köpek ve kedilerden kaynaklanmaktadır (2).

2.1.1. Giardia intestinalis'in sınıflandırılması

Giardia intestinalis'in sınıflaması (11).

Alem:	Protista
Alt alem:	Protozoa
Şube:	Sarcomastigophora
Alt şube:	Mastigophora
Sınıf:	Zoomastigophora
Takım:	Diplomonadida
Aile:	Hexamitidae
Cins:	Giardia
Tür:	Giardia intestinalis

Giardia'nın tür düzeyinde sınıflaması geleneksel olarak morfoloji ve konakçıya göre yapılmaktadır. Geleneksel sınıflama ile birçok tür tanımlanmıştır; insanlarda *G. intestinalis*, farelerde *G. muris*, amfibilerde *G. agilis*, muhabbet kuşlarında *G. psittaci*, fare ve misk sıçanlarında *G. microti*. Ancak daha sonra yapılan moleküler çalışmalarda, morfolojik olarak özdeş parazitlerin hem insanlarda hem de hayvanlarda bulunduğu gösterilmiştir. Moleküler tiplendirme ile A'dan H'ye isimlendirilen sekiz genotip tanımlanmıştır. İnsan ve memeli hayvanlarda en sık enfeksiyona neden olan genotipler A (özellikle subtip AII) ve B'dir. Deneyisel çalışmalarda genotiplerin farklı enfeksiyon ve hastalık yapma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir, ancak insanlardaki doğal enfeksiyonda genotiplerin farklı virülansa sahip olup olmadıkları bilinmemektedir (7).

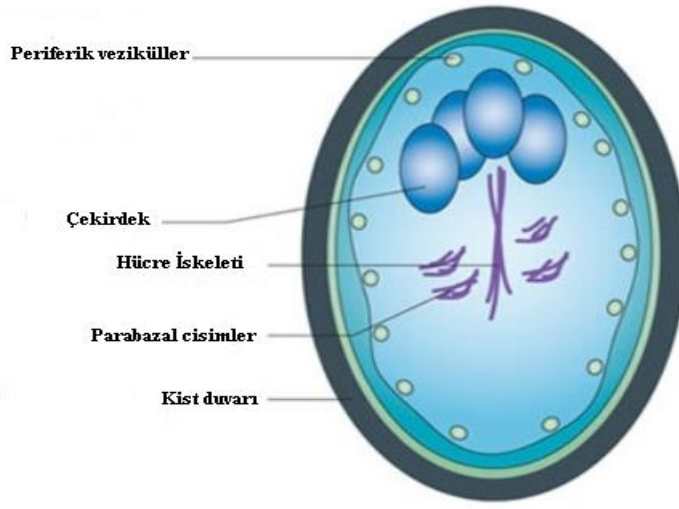
2.2.2. Giardia intestinalis'in morfolojisi

G. intestinalis, kist ve trofozoit olarak adlandırılan iki farklı formda bulunmaktadır.

2.2.2.1. Kist formu

G. intestinalis kistinin sitoplazma içinde gelişigüzel dağılım gösteren, nükleer zarf ile çevrili dört adet yuvarlak çekirdeği bulunmaktadır. Kist zarı kalınlığı 0,3 µm'dur. Kist zarının ana yapısını sert bir proteinöz madde olan N-asetilgalaktozamin oluşturur. Parazitin kist formu dış

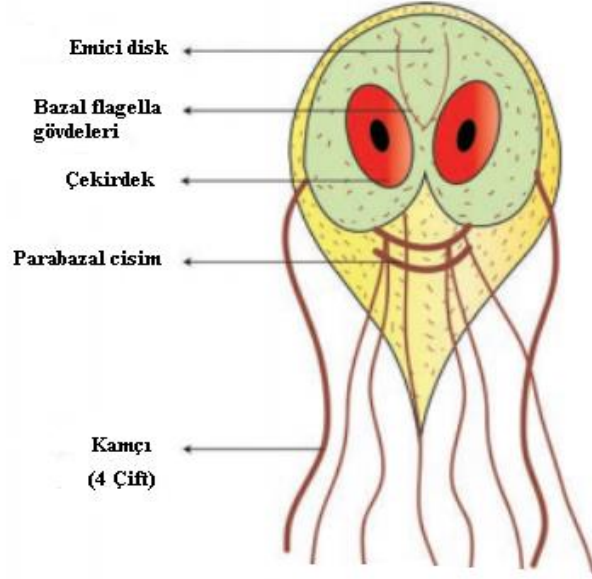
ortamda uzun süre canlı kalır ve enfeksiyonun yayılmasında rol oynamaktadır (Şekil 2.2.2.1) (12,13).



Şekil 1. *Giardia intestinalis*'in kist yapısının görünümü (14).

2.2.2.2. Trofozoit formu

G. intestinalis'in trofozoit formu 9-21 μm uzunluğunda, 5-15 μm genişliğinde ve armuda benzer şekildedir. Dorsal yüz dış bükey, ventral yüzü ise iç bükey olup ventral yüzeyinde bulunan ventral diskten (emici veya yapışkan disk) dolayı tanımlanması kolaydır. Bu disklerin arkasında iki nükleus ve dört adet kamçı bulunmaktadır. Her iki nükleusun ortasında belirgin karyozom ve parazitin tüm genomu bulunmaktadır. Nükleus boyu vücut boyunun çeyreği kadardır. Boyalı preparatlarda nükleuslar tipik olarak yüze benzer görüntü oluşturmaktadır. Trofozoit formun orta kısmında yer alan ve enine pençe görünümü veren cisimcikler (sıkıca toplanmış mikrotübüller; parabazal cisimcikler) morfolojik olarak farklı *Giardia* tiplerinin ayırımında kullanılmıştır. *Giardia* türlerinden sadece *G. intestinalis* *in vitro* kültürde çoğaltılabilmektedir. Kültürde çoğaltma, parazitin konakta ince barsakta yerleşmesi ile uyumlu olarak, biliyer lipidler ve yüksek sistein konsantrasyonu ile artmaktadır. Trofozoitler uzunlamasına ikiye bölünerek çoğalır ve kültürde iki katına çıkma süresi 6-12 saattir. Aerotoleran anaerob metabolizmaya sahiptir. Glukozu ana karbonhidrat enerji kaynağı olarak kullanır ve glukoz metabolizması sonucu asetat, etanol, alanin, karbondioksit ve adenozin trifosfat (ATP) oluşur. Parazitin ATP oluşturmak için kullandığı diğer yol arjinin dihidrolaz yolağıdır. Kasılabilen proteinler içeren diskler ile bağırsak mukoza epiteline tutunur (Şekil 2) (7,13,15,16).



Şekil 2. *Giardia intestinalis*'in trofozoit görünümü (17).

2.3. Biyolojik Özellikleri

Prototipik genotip A izolatının genomu yaklaşık 11,7 megabaz uzunluğundadır ve beş kromozomda dağılmış halde bulunmaktadır. Bazı ribozomal RNA alt ünitelerinin ve yolak genlerinin analizi, parazitin evrimsel olarak en erken değişikliğe uğrayan ökaryotlardan biri olduğunu göstermektedir. DNA sentezi, transkripsiyon, RNA işleme ve hücre döngü mekanizmalarını kapsayan basit ve yoğun bir genoma sahiptir (7).

Parazitin fosfolipid, yağ asitleri, kolesterol ve pürin-pirimidin nükleozid sentez yolları azalmış ya da hiç yoktur. Bu nedenle esansiyel yapıtaşlarını yerleştiği ince barsak lümeninden temin eder. Lipid membran komponentlerini sentezleyecek enzimleri bulunmamaktadır, sadece şekillerini değiştirebilecek enzimlere sahiptir. Alanın dışındaki aminoasitleri bulunduğu ortamdan temin eder (7).

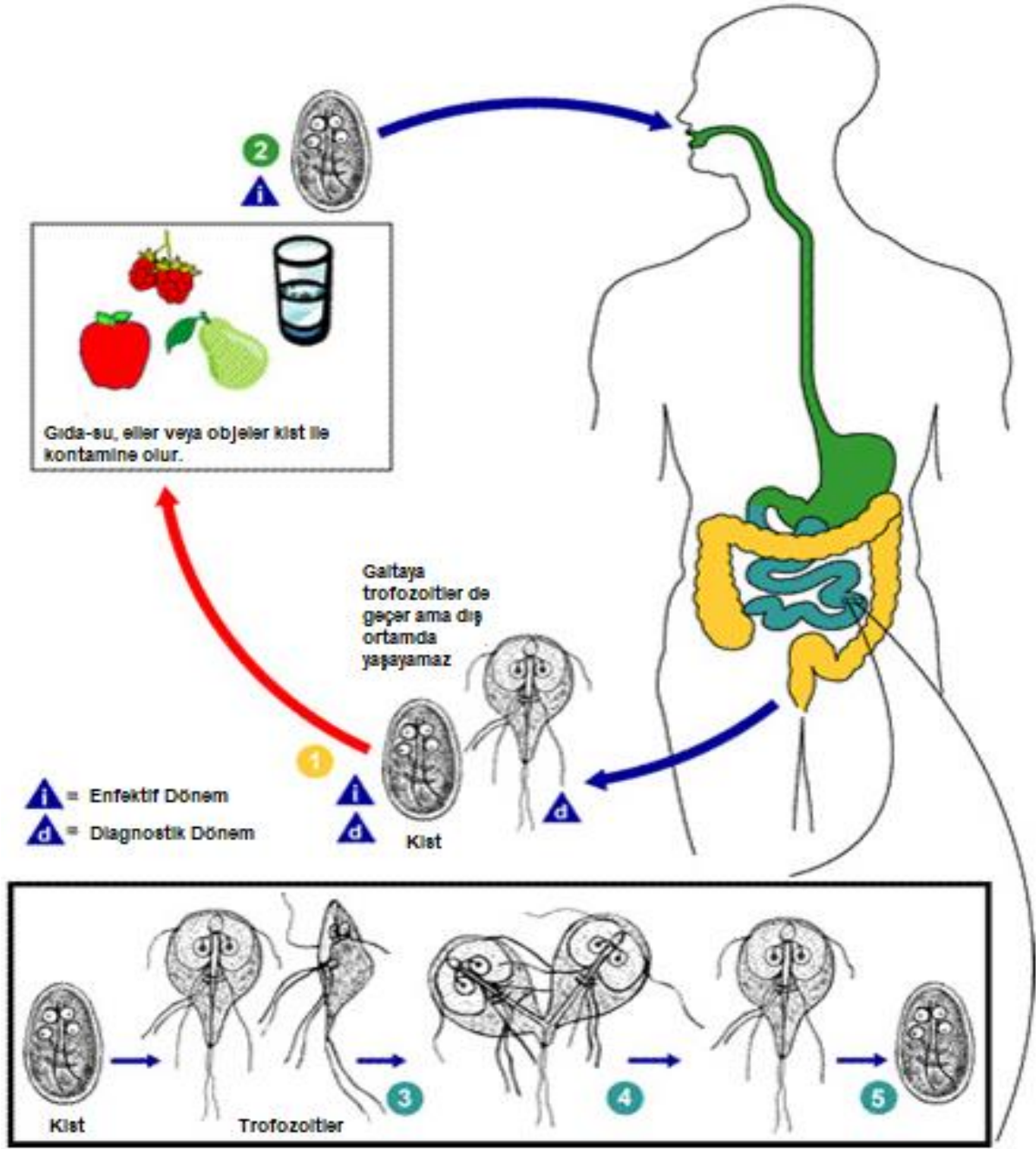
Giardia sık antijenik değişikliğe uğramaktadır. Varyanta özgül yüzey proteini (VSP) parazitin çoğalması sırasında değişmekte ve yeni kuşaklarda tamamen farklı yeni protein oluşmaktadır. VSP'ler, genel yapısı birbirine benzeyen ve korunmuş transmembran karboksiterminal diziye sahip, yaklaşık 250 farklı sisteinden zengin proteinden oluşan bir ailedir. Genomunda tüm bu proteinler kodlanmasına rağmen aynı anda sadece bir tanesi parazitin yüzeyinden ifade edilmektedir. Diğer proteinler muhtemelen araya giren RNA mekanizmaları ile elimine edilmektedir. Antijenik değişiklik, insan ve hayvan enfeksiyonlarında, *in vitro* kültürde ve ensistasyon sırasında meydana gelmektedir. Konağın

immün yanıtından kaçmada önemli olmakla birlikte kazanılmış bağışık yanıt olmaksızın da bazı VSP'ler özellikle tercih edilmekte ya da hiç ifade edilmemektedir. VSP'lerin her birinin kendine özgü fizikokimyasal özellikleri olduğu, parazitin bulunduğu intestinal ortam ve konağa göre tercih yapıldığı düşünülmektedir (7).

2.4. Yaşam Döngüsü

Enfekte kişilerin parazitin kist formunu içeren gaitaları ile kontamine gıda veya suyun ağızdan alınması ile yaşam döngüsü başlar (18).

Vücuda alınan kistler mide ve duodenumda, asit ve pankreas enzimleri varlığında eksistasyona uğrayıp trofozoit formuna dönüşür. Bu trofozoitler 9-12 saatlik bir sürede ikiye bölünerek hızla çoğalır ve ince bağırsağa geçer. Burada nötr pH ve sekonder safra tuzlarına maruz kalınması ile ince bağırsak epiteline emici diskleri ile yapışmaktadır. Trofozoitlerin belirli aralıklarda dökülmesi ve gaita içeriğine katılması, barsakta ilerlerken kist formuna dönüşerek gaita ile atılması ile döngü tekrarlanmaktadır (Şekil 2.4) (19).



Şekil 3. *Giardia intestinalis*' in yaşam döngüsü (20).

G. intestinalis trofozoitleri, 8-12 μm uzunluğunda ve 7-10 μm eninde fibriler, oval, ince duvarlı kistler oluşturmak üzere ensistasyona uğrar. *In vitro* olarak da indüklenen ensistasyon, pek çok temel işlevi içeren karmaşık bir süreçtir. Erken evrede, kist duvar proteinleri (CWP1-3) ve diğer moleküllerin işlendiği karakteristik ensistasyon vezikülleri oluşur. Geç evrede kist duvar proteinleri yüzeye taşınır ve kist duvarında N-asetilgalaktozaminle birleştirilir, hücre bölünmesi olmaksızın nükleer bölünme ve DNA

replikasyonu gerçekleşir. Hücre duvarı, çözünmez fibriller halinde kist duvar proteinleri ile N-asetilgalaktozaminden ibarettir (7).

Eksistasyon, kistlerin gastrik asit ve pankreatik enzimler gibi çevresel uyaranlara maruz kaldığında başlayan koordine bir süreçtir. Morfolojik olarak iyi tanımlanmış olmasına karşın moleküler düzeyde iyi anlaşılamamıştır. Kist önce dört nükleus içeren eksizoite dönüşür. Daha sonra eksizoit, DNA replikasyonu olmaksızın ard arda iki kez bölünerek dört trofozoit oluşur (7,19).

2.5. Patogenez ve İmmün Yanıt

Giardia önceleri zararsız komensal olarak değerlendirilmiştir. Semptomatik diyare, çocuklarda malabsorbsiyon, su kaynaklı salgın ve deneysel insan enfeksiyonları ile patojenitesi net bir şekilde ortaya konmuştur. *Giardia* enfeksiyonu sonucu oluşan ishal ve bağırsakta emilim bozukluğuna neden olan mekanizma çok faktörlü olduğundan tam olarak aydınlatılamamıştır. Enfeksiyon 10-25 kadar az sayıda kistin ağız yoluyla alınmasıyla başlamaktadır. *Giardia* kistleri suda iki üç ay dayanabilecek şekilde canlılığını koruyabilmektedir. Genellikle filtrelenmemiş yüzey suların yutulması, kötü hijyen koşullarında insandan insana bulaş en sık görülen yayılım yöntemidir. Daha nadir görülen yayılım ise bebekleri olan bireylerin bebek bezi ile teması sonu yetersiz el yıkanması, yaşlı bakım mesleği çalışanları, anaokuluna giden enfeksiyona uğramış çocuklar ile temas sonucu yayılım riski vardır. Gıda ve hayvan kaynaklı yayılımlarda görülmektedir fakat önemli bir yayılma yolu değildir (7,19).

Parazitin enfeksiyon ve diyareye neden olma yeteneği izolat, genotip ve muhtemelen VSP ifade paternlerine göre değişiklik göstermektedir. Eksistasyondan sonra ince barsağın yukarı kısmında epitelin fırçası yüzeyine emici diskleri aracılığı ile tutunarak yaşamaktadır. İnce barsak biyopsilerinin çoğunda düşük düzeyde enflamasyon gözlenmektedir, ancak bazı olgularda villuslarda kısalma ve atropi eşlik edebilmektedir. Anormal histolojik bulgu düzeyi arttıkça klinik seyir de ağırlaşmaktadır. Trofozoitlerin mukoza invazyonu, enterotoksin salınımı ve fırçası epitel yüzeyini bozduğuna dair az sayıda kanıt bulunmaktadır. İnsan intestinal mukoza epitel hücre dizilerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda, disakkaritler de dahil olmak üzere, parazitin fırçası kenar enzimlerinin işlevini bozduğu gösterilmiştir. Trofozoitler ayrıca hücreler arası bağlantıları bozarak geçirgenliği artırmakta ve apoptozisi indüklemektedir. Ksiloz, disakkaridler, yağlar ve yağda erir vitaminlerin malabsorbsiyonu kilo kaybına neden olmaktadır. İnce barsak epitelindeki bozulmaya ek olarak parazitin

lümendeki etkilerinin de malabsorbsiyon ve diyare gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte ince barsak yapısında ışık mikroskopu ile değişikliğin görülmediği kişilerde de diyare meydana gelmektedir (7,19,21).

Parazitin vücuttan temizlenmesinde, reenfeksiyona karşı korunmada ve patogeneizde konak bağışıklığı önemli rol oynamaktadır. Ancak, immünite ile ilgili veriler daha çok fare ve gerbillerde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Ayrıca, özellikle insanda akut seyirli giardiyaza immün yanıt ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Fare modellerinde parazitin temizlenmesi alfa-defansin işlevi, mast hücre proteazı ve antikor üretimi ile birlikte seyretmektedir. Enfeksiyonun erken döneminde IL-6 salınımı olmaktadır. T hücre yanıtı enfeksiyonun kontrol altına alınmasında etkiliyken daha sonra B hücre yanıtı öne çıkmaktadır. *Giardia* enfeksiyonuna karşı kısmi bağışıklık gelişebilir. Reenfeksiyon daha çok çocuklarda görülür. Reenfeksiyonun olası nedenleri; farklı bir genotipe maruz kalma, parazitin farklı VSP ifade etmesi, konağın yaşı ve beslenme durumu ile tek bir enfeksiyondan sonra intestinal bağışıklığın gelişmemesidir. Hem B hem de T hücreleri koruyucu bağışıklıkta önemli rol oynamaktadır. *Giardia* ile enfekte kişilerde sistemik antikor yanıtı oluşmaktadır. Kompleman ile birlikte trofozoite letal etkili serum IgM ve IgG oluşmasına karşın parazitin yerleştiği barsakta lümene salınan IgA antikorları daha önemli rol oynamaktadır. *Giardia* antijenlerine özgül IgA geliştirmedeki başarısızlığın insanlarda kronik giardiyaz ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (7,19).

2.6. Klinik

Giardia enfeksiyonları her yaşta, en fazla çocuklarda görülmektedir. Giardiyazın klinik semptomları gaitadan kist atılımlı asemptomatik enfeksiyondan akut diyareye ve hastanede tedavi gerektiren dehidratasyona kadar değişmektedir. Enfeksiyonlar kısa veya uzun seyredebilmekte, malabsorbsiyonun eşlik ettiği kronik diyare gelişebilmektedir. Enfeksiyonun bir toplumda semptomatik seyretme oranı, *Giardia* prevalansı, ilk temas edilen yaş, endemik bölgede yaşama, konağın beslenmesi, bağışıklık durumu, genetik özellikleri, diğer enterik mikroorganizmalarla koenfeksiyon ve bölgede baskın *Giardia*'nın genotipik özelliklerine bağlıdır. Asemptomatik veya semptomatik hastalar tamamen iyileşebilir veya bazen yıllar süren kronik enfeksiyonlar gelişebilir (1,7,19).

Kistlerin yutulmasından sonra belirtilerin başlamasına dek yaklaşık 1-2 haftalık inkübasyon süresi bulunmaktadır. Semptomatik giardiyaz; akut başlayan diyare, abdominal kramp, abdominal şişkinlik ve flatulans ile karakterizedir. Hastada genellikle halsizlik,

bulantı, iştahsızlık ve bazen sülfür kokulu geğirme bulunur. Sıklıkla kötü kokulu yellenme ve dışkılama, kilo kaybından şikayeti vardır. Kusma ve üst gastrointestinal sistem semptomları daha az sıklıkta görülür ancak bazen dominant semptom olarak tanının gecikmesine neden olabilir. Ateş ve tenesmus atipik belirtilerdir ve diğer etkenler göz önünde bulundurulmalıdır. Başlangıçta gaita sulu ve bol miktardadır, dışkılama sayısı dokuzu bulabilir. Gaitada makroskopik kan, püy, mukus ve mikroskopik polimorfonükleer beyaz küre bulunmaz; varlığında başka etken ya da koenfeksiyon düşünülmelidir (1,7,19).

2.7. Epidemiyoloji

Giardiyaz tüm dünyada en yaygın görülen enterik protozoal parazit enfeksiyonudur. Ilıman ve tropikal bölgelerde; sıklıkla yaz ve sonbaharın erken dönemlerinde görülmektedir (1,2,7).

Giardiyaz her yaşta insanı etkilemektedir. Prevalansı gelişmiş ülkelerde % 2-5'tir (19). En fazla 1-9 yaş arası çocuklarda ve 40-45 yaş yetişkinlerde saptanmaktadır (7).

Gelişmekte olan ülkelerde bebekleri enfekte eden ilk patojenlerden biri *Giardia*'dır. Hayatın ilk iki yılında giardiyaz insidansı % 37,7 ile % 96,4 arasında değişmektedir ve bebeklerin % 40' ında 8 haftadan fazla süren persistan enfeksiyon gelişmektedir. Enfeksiyon prevalansı 10 yaş altı çocuklarda pik yapmaktadır. *Giardia* sıklıkla diğer enterik viral, bakteriyel ve paraziter etkenlerle birlikte saptanmaktadır (7). Ülkemizde son yıllarda farklı illerde yapılan çalışmalarda *Giardia* prevalansı % 0,64 ile % 15,1 arasında bulunmuştur (22-34). Adana, Ankara, Düzce, Gaziantep, İstanbul, İzmir, Konya, Manisa, Rize ve Van'da yapılan bu çalışmaların sonuçları Tablo 2.7' de gösterilmiştir. Tez çalışmasının yapıldığı Kahramanmaraş ilinde 2000-2002 döneminde 3509 örnek ile yapılan bir çalışmada *G. intestinalis* görülme sıklığı % 6,5 bulunmuştur (5).

Tablo 1. Türkiye’de Son Yıllarda Yapılan Prevalans Çalışmalarının Sonuçları

No	Yıl	Şehir / Ülke	Yöntem	Yaş Grubu Sayı	Prevalans (%)	Yazar (Kaynak No)
1	2008-2011	Van	Mikroskopi	0 -75 9.911	4,7	Bayram Y ve ark. (22).
2	1988-2012	İstanbul	Mikroskopi	Yaş grubu ? 111.889	3	Uysal HK ve ark. (23)
3	1999-2009	İstanbul	Mikroskopi	1-60 27.664	1,4	Köksal F ve ark. (24)
4	2012-2013	Rize	Mikroskopi	0-102 9.994	12,1	Çiçek ÇA ve ark. (25)
5	2011	Adana	Mikroskopi	18-55 500	2,6	Bayramoğlu Ö ve ark. (26)
6	2011-2012	Gaziantep	Mikroskopi	Yaş grubu ? 5.453	2,15	Ekşi F ve ark. (27)
7	2009-2012	Düzce	Mikroskopi	6 - 19 826 örnek	15,1	Aytar AA ve ark. (28)
8	2010-2012	Konya	Mikroskopi	Yaş grubu ? 41.967	0,70	Pektaş B ve ark. (29)
9	2014-2018	İzmir	Mikroskopi	0-89 24.786	0,64	Bilman FB ve ark. (30)
10	2011-2015	Manisa	Mikroskopi	Yaş grubu ? 19.042 örnek	1,45	Baştemir S ve ark. (31)
11	2018-2019	Ankara	Mikroskopi	Yaş grubu ? 4303	1,56	Sarzhanov F ve ark. (32)
12	2003-2012	Ankara	Mikroskopi	Yaş grubu ? 87.100	1,33	Gülmez D ve ark. (33)
13	2008-2017	İzmir	Mikroskopi	Yaş grubu ? 58.669	3,9	Uluslan Ö ve ark. (34)

Ülkemize yakın/komşu ülkeler olan Bulgaristan ve Romanya’da yapılan çalışmalarda *Giardia* prevalansı sırasıyla % 3,4 ve % 1,87 olarak saptanmıştır (35-36). İran’da iki farklı şehirde yapılan çalışmada % 3,16 ve % 9,9 sıklıkta *Giardia* görülmüştür (37,38). Irak’ta yapılan bir çalışmada ise 5-10 ve 11-15 yaş grubunda sırasıyla % 52,63 ve % 47,36 sıklıkta *Giardia* bulunmuştur (39).

G. intestinalis’in kaynağı, bu paraziti vücutlarında bulunduran insanlardır. Bu kişilerin dışkılarından kist ve trofozoit şeklinde günlük milyonlarca parazitin dışarı atılmaktadır. Dış ortamda kist formu yaşamına devam edebilirken trofozoit formu yaşamını yitirmektedir. *Giardia* kistleri özellikle soğuk suda uzun süre canlı kalabilmektedir. Parazit fekal-oral yolla; kontamine su, gıda ya da insan-insan teması ile kistlerin ağız yoluyla alınması sonucu bulaşmaktadır. Kist formu, klorlanma uygun koşullarda yapılmadığında canlı kalabildiğinden içme sularına kimyasallı filtrasyon uygulanması önerilmektedir. Yüzme havuzları ve göller de *Giardia* için risk teşkil edebilmektedir. Yüzey suları insan veya hayvan dışkısı ile kontamine olabilmektedir. Enfekte gıda sektörü çalışanları kontamine elleri ile enfeksiyonu bulaştırmaktadır. *Giardia*, ortak tüketilen kontamine gıda-su ile salgınlara neden

olabilmektedir. İnsandan insana bulaşma sıklıkla yakın temas ve gaita ile kontaminasyonun çok olduğu küçük çocuklu ailelerde ve kreşlerde meydana gelmektedir. Küçük çocukların çoğunda enfeksiyon asemptomatik seyretmekte ve sekonder yayılımında rol oynamaktadır (1,2,7).

Gelişmiş ülkelerde yurtdışına seyahat eden insanlarda ishal görülmesi durumunda ilk akla gelen etken *G. intestinalis*'tir (1,7).

Bir kemirgen türü olan gerbil, fare, kunduz, sığır, köpek ve kedi gibi pek çok memeli hayvanın insanlardakine benzer morfolojiye veya genotipe sahip *Giardia* ile enfekte olduğu ya da deneysel olarak enfekte edilebileceği gözlenmiştir. Genetik subtipleme, hayvan izolatlarının çoğunda zoonotik potansiyelin düşük olduğunu işaret etmektedir. En güçlü epidemiyolojik bağlantı, Kanada'da kunduz ile ilişkilendirilen su kaynaklı salgınlarda gösterilmiştir (1,2,7).

Giardia enfeksiyon sıklığı açısından ırklar arasında fark bulunmamıştır. Giardiyaz erkeklerde kadınlara nazaran hafifçe daha sık görülmektedir (19).

2.8. Tanı Yöntemleri

Özellikle malabsorbsiyon ve kilo kaybı ile birlikte uzamış diyaresi olan ve beraberinde kaynağı belirsiz içme suyu kullanma, kreşe giden çocuk/çocukla temas öyküsü olan kişilerde mutlaka giardiyaz akla gelmelidir. Komplike olmayan giardiyaz olgularında beyaz küre sayısı normaldir, eozinofili bulunmaz ve gastrointestinal görüntüleme bulguları nonspesifiktir. Tanı parazitin gaitada mikroskopik olarak görülmesi veya antijen ya da DNA'sının saptanması ile konulmaktadır (1,7,19).

2.8.1. Direkt bakı (Nativ-Lugol) yöntemi

Gastrointestinal parazitlerin tanısında geleneksel yöntem gaitanın mikroskopik incelenmesi ile trofozoit ve kist/yumurta formlarının görülmesidir. Mikroskopi genel olarak, zaman gerektiren ve duyarlılığı gaitada bulunan parazit miktarına, incelemeyi yapan kişinin yetkinliğine, incelenen gaita miktarına ve inceleme süresine bağlı olan bir yöntemdir. *Giardia* enfeksiyonunun tanısında mikroskopi ile ≥ 90 başarı şansı yakalamak için farklı günlerde alınmış en az üç örneğin incelenmesi gerekmektedir (1,3,7).

Bilhassa sulu dışkı örneklerinde ışık mikroskobu ile hareketli trofozoitler görülebilir. Nativ yönteminde, lam üzerine yan yana bir damla fizyolojik tuzlu su ve eşit miktarda dışkı

konur, karıştırılır, üzeri lamel ile kapatılır ve ışık mikroskopunda incelenir. Trofozoit ve kistler boyanmayıp şeffaf olarak görülmektedir. Trofozoitler armut şeklinde ve kamçılarıyla hareketli görülmektedir. Lugol yönteminde ise fizyolojik su yerine lugol çözeltisi kullanılır. Lugol ile parazit içi organeller sarı-kahverengi tonlarında boyanarak daha belirgin ve kolay tanınır hale gelir (Şekil 2.8.1). Fazla ekipman gerektirmemesi, pratik ve ucuz olması bakımından en çok kullanılan yöntemdir; fakat dezavantajı yalancı negatif sonuç alınabilmesidir (12).



Şekil 4. *Giardia intestinalis*'in Nativ Lugol mikroskopi yöntemi ile görünümü (a: kistler, b: trofozoit) (40).

2.8.2. Yoğunlaştırma yöntemi

Kistler her gün dışkıda bulunamayacağı gibi dışkının her tarafında da görülmeyebilir görülme şansını arttırmak için dışkıdaki kistleri çöktürerek yoğunlaşmasına dayanmaktadır. Nativ-Lugol yöntemine göre daha fazla malzemeye gereksinim duyulmakta ve ona göre daha pahalı yöntem olduğu ifade edilmekte olup araştırmaya yönelik çalışmalarda önerilmektedir. Bu yöntem basit döndürme ile çöktürme ve formalin-asetat ile çöktürme olarak iki şekilde uygulanabilmektedir (41).

2.8.3. Boyama yöntemi

Dışkıda parazit varlığının tespit edilip, hangi parazitin tespit edilemediği durumlarda kalıcı örnek elde etmek için uygulanan yöntem olduğu olup; sıklıkla Giemsa, Heidennhain'in Demir Hematoksilen ve Trikom boya yöntemleri kullanılır (2). Giemsa boyama, uygulaması kolay ve kalıcı bir yöntemdir. Mikroskopi görüntüsü ise flagella kırmızımsı pembe sitoplazma gri mavi renkte gözlemlendiği tespit edilmiştir. Demir hematoksilen boyama ile parazit siyah

renk ile boyanmakta fakat yaygın olarak kullanılmamaktadır. Trikrom boyamada ise parazit yeşil veya yeşilimsi renkte görülmektedir (42).

2.8.4. Biyopsi

Giardiyaz şüphesinde gaita örneklerinde parazitin görülmemesi durumunda duodenal biyopsi alınarak yapılan mikroskopik incelemede trofozit form görülebilmektedir (1,3,7). Jejunumdan alınan biopsi örneklerinde villusların kısalması, düzleşmesi, lamina propriada hücre birikimi izlenmektedir (1).

2.8.5. Entero-test

Giardiyaz şüphesinde gaita örneklerinde parazitin görülmemesi durumunda duodenal biyopsi alınarak yapılan mikroskopik incelemede trofozit form görülebilmektedir (1,3,7). Entero-Test veya string testinde, ucunda absorban materyal olan ip hastaya yutturulur. İp duodenuma ulaştıktan sonra duodenumda bulunan *Giardia* trofozoitleri absorban materyale tutunur. İp ağızdan geri çekilir ve mikroskopik olarak incelenir (1). İnvaziv olmayan ve yüksek duyarlılığa sahip yeni geliştirilmiş testler nedeniyle ağızdan ulaşarak alınan ince barsak materyalinin incelenmesine nadiren gerek duyulmaktadır (7).

2.8.6. Kültür yöntemi

Rutin olarak kullanılmayan bir yöntemdir. *G. intestinalis*'in kültürü trofozit şekli ile *in vitro* olarak yapılmaktadır. Kültür, ilaç keşfi, direnç izleme ve serolojik çalışmalar için yapılmaktadır. Genellikle *G. intestinalis* kültürü oksijen oranı azaltılmış büyük hacimli tüplerde, hava geçirmeyecek şekilde hazırlanıp kültürü yapılır. Aşırı emek ve dikkat gerektirmektedir. Bunun yanında verimliliği düşük ve zaman alıcı olduğundan çok fazla tercih edilmemektedir. Son zamanlarda mikropilaka ile kültür alternatif olsa da henüz standardize edilmemiştir ve yüksek kontaminasyon riski bulunmaktadır (43).

2.8.7. Antiijen testleri

Özgül solubl kist duvarı ya da kisti saptayan immüno-kromatografi, ELISA gibi uygulaması kolay, hızlı ve daha duyarlı, özgül yöntemler mevcuttur. Genellikle mikroskopiden daha ucuzdur. Bu testler % 85-98 duyarlılık ve % 90-100 özgüllüğe sahiptir (7,19). ELISA, çok sayıda örneği birlikte çalışmaya olanak sağlamaktadır (2).

2.8.8. Antikor testleri

G. intestinalis'e karşı gelişen IgM, IgG ve IgA antikorları saptayan ELISA testleri geliştirilmiştir (19).

Önceki enfeksiyonlarda gelişen antikorların varlığı nedeniyle sistemik anti-*Giardia* antikoru aranması akut enfeksiyonun tanısında yararlı değildir. IgG antikorların saptanması seroepidemiyolojik çalışmalarda faydalı olabilir (7,19).

2.8.9. PCR testi

Antijen testlerine göre daha duyarlı PCR tabanlı testler de kullanıma girmiştir ve giderek artan sıklıkta kullanılmaktadır (2,7). PCR ile ayrıca asemptomatik enfeksiyon da saptanabilmektedir. 2009 yılında yapılan bir çalışmada PCR testinin % 98,4 duyarlılık ve % 100 spesifik olduğu hesaplanmıştır. PCR testi ile su örneklerinde de parazitin saptanabileceği bildirilmiştir (19). Duyarlılığının optimuma ulaşabilmesi için PCR öncesi uygulanan nükleik asit izolasyon işleminin de etkin bir şekilde yapılması gereklidir (12). Mikroskopik gaita incelemesine göre daha duyarlı olmasına karşın tanının sadece *Giardia*'yı hedefleyen PCR ile yapılması durumunda diğer etkenler/koenfeksiyon saptanamamaktadır. Bu nedenle son zamanlarda aynı anda birden fazla paraziter etkenin saptandığı multipleks PCR yöntemleri geliştirilmiştir (19).

2.9. Tedavi

G. intestinalis tedavisi 1955 yılında keşfedilmiştir. Günümüzde birçok parazit enfeksiyonlarında kullanılan nitroimidazol sınıfı ilaçlar metronidazol, tinidazol, ornidazol ve seknidazol ajanlarını da içermektedir (45). Tinidazol Amerika Birleşik Devletleri dışında birinci tercih olarak kullanılmasının nedeni metronidazol'den daha az yan etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (19). Tedavide kullanılan diğer ilaçlar nitazoksanid, paramomisin, kinakrin ve furazolidondur (7, 45). Yapılan bir araştırmada nitroimidazolun, seknidazoldan daha etkili olduğu ifade edilmiştir (46).

2.10. Korunma

Giardiyazisten korunma diğer gastrointestinal parazitozlarda olduğu gibidir. *G. intestinalis*'ten korunmada en önemli nokta insan dışkısının uygun şekilde yok edilmesi ve kişisel hijyen kurallarının (en önemlisi el yıkama) uygulanmasıdır (1).

Giyardiyazı önlemek için güvenilir su kaynağı temin edilmesi ve kişisel hijyen kurallarına uymak gerekmektedir. Halojenizasyon (klor ve iyot) *Giardia* kistlerini öldürmede etkindir ancak suyun sıcaklığı, temizliği, pH, temas süresi gibi değişkenler klorun etkinliğini değiştirebilir ve daha yüksek (4-6 mg/litre) klor düzeylerine ihtiyaç duyulabilir. Klorlamanın etkin olabilmesi için suyun ayrıca koagülasyon-flokülasyon, sedimentasyon ve filtreleme işlemlerinden geçirilmesi gerekmektedir. Sosyoekonomik düzeyi düşük ülkelerde ve doğada su kaynakları potansiyel olarak *Giardia* kisti kontaminedir. Suyu içmeden önce kaynatmak kisti öldürmek için yeterlidir. Kontamine su ile hazırlanan gıdaların çiğ tüketilmesinden kaçınılmalıdır (1,7).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın amacı *G. intestinalis* enfeksiyonunun rutin laboratuvar tanısında kullanılan ‘çöktürerek yoğunlaştırma + mikroskopik inceleme’ ile yeni ve daha duyarlı olan moleküler yöntemin (PCR) karşılaştırılması ve moleküler yöntemin rutin kullanıma uygunluğunun değerlendirilmesidir.

Çalışmada Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’na Ocak 2021- Eylül 2021 tarihleri arasında kliniklerden rutin parazit araştırılması için gönderilen 110 gaita gaita örneği analiz edilmiştir. Örneklerin aldığı hasta grubu 58 erkek (yaş aralığı; 0-77, ortalama yaş; $36 \pm 20,1$) ve 52 kadından (yaş aralığı; 5-85, ortalama yaş; $41 \pm 20,4$) oluşmaktadır.

Gönderilen dışkılar önce yarım saat içerisinde özellikle *G. intestinalis* trofozoitlerinin varlığı açısından nativ yöntem ile mikroskopik olarak incelenmiştir.

Ardından %10 formaldehit-etil asetat çözeltisi ile çöktürerek yoğunlaştırma işleminden sonra özellikle parazit kistleri nativ lugol preparatı hazırlanarak aranmıştır.

Gerçek zamanlı PCR öncesi, gaita örneklerinden DNA izolasyonu spin-kolon yöntemi ile yapılmıştır.

Saflaştırılan örnekler PCR testine kadar eksi 80°C’de saklanmıştır.

Gerçek zamanlı PCR testi, Promega GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Katalog no: A6101, Promega Corporation, Madison, ABD) ve parazitin beta-giardin geninde 222-296. nükleotid pozisyonlarını hedefleyen primer ve kalıp ile uygulanmıştır (Metabion, Steinkirchen, Almanya). PCR testinde DNA izolasyon kontrolü için bakteriyel 16S rRNA genini hedefleyen primer ve kalıp kullanılmıştır (Metabion, Steinkirchen, Almanya).

3.1. Mikroskopik İnceleme

Kullanılan Malzeme:

- Lam ve Lamel
- Serum fizyolojik
- Lugol solüsyonu (% 0,3 iyot + % 0,7 potasyum iyodür)
- Parazit kist/yumurta çöktürme kiti (Apacor Midi Parasep SF Faecal Parasite Concentrator, Katalog No: 149900, Berkshire, İngiltere)

- Triton X-100 (Sigma, Katalog No: T8787, St.Louis, ABD)
- Santrifüj, 15 ml tüp için (Heraeus Labofuge 400 Function Line, Hanau, Almanya)
- Işık mikroskobu (Olympus CX41, Nagano, Japonya)
- Plastik gaita karıştırma çubuğu

3.1.2. Direkt mikroskopik inceleme

Gönderilen dışkılar önce yarım saat içerisinde *G. intestinalis* trofozoitlerinin varlığı açısından nativ yöntem ile mikroskopik incelendi. Bu amaçla gaita, hareketli trofozoitleri görebilmek için doğrudan veya yoğun ise bir damla serum fizyolojik ile karıştırarak, trofozoit/kistleri sarı-kahverengi boyayarak daha belirgin hale getirmek için 1 damla lugol çözeltisi ile lam üzerinde karıştırarak x400 büyütme ile incelendi.

3.1.3. Çöktürme ile konsantrasyondan işleminden sonra mikroskopik inceleme

Gaita örneklerini yoğunlaştırmak amacıyla % 10 formalin içeren Parazit kist/yumurta çöktürme kiti (Katalog No: 149900, Apacor Midi Parasep SF Faecal Parasite Concentrator, Berkshire, İngiltere) kullanıldı. Üreticinin önerileri doğrultusunda;

- 8 ml % 10 formalin içeren tüpe sürfaktan olarak 20 mikrolitre Triton X-100 eklendi.
- Tüpe yaklaşık 0,5 gram (bezelye tanesi kadar) gaita eklenerek vorteks ile iyice karışması sağlandı.
- 3.000 rpm’de 3 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant döküldü.
- Dipteki çökeltiden 1 damla, önceden hazırlanmış temiz lama aktarıldı ve 1 damla lugol çözeltisi ile karıştırılarak homojenize edildi. Üzerine lamel kapatılarak mikroskopta incelendi.

3.2. Gerçek Zamanlı PCR

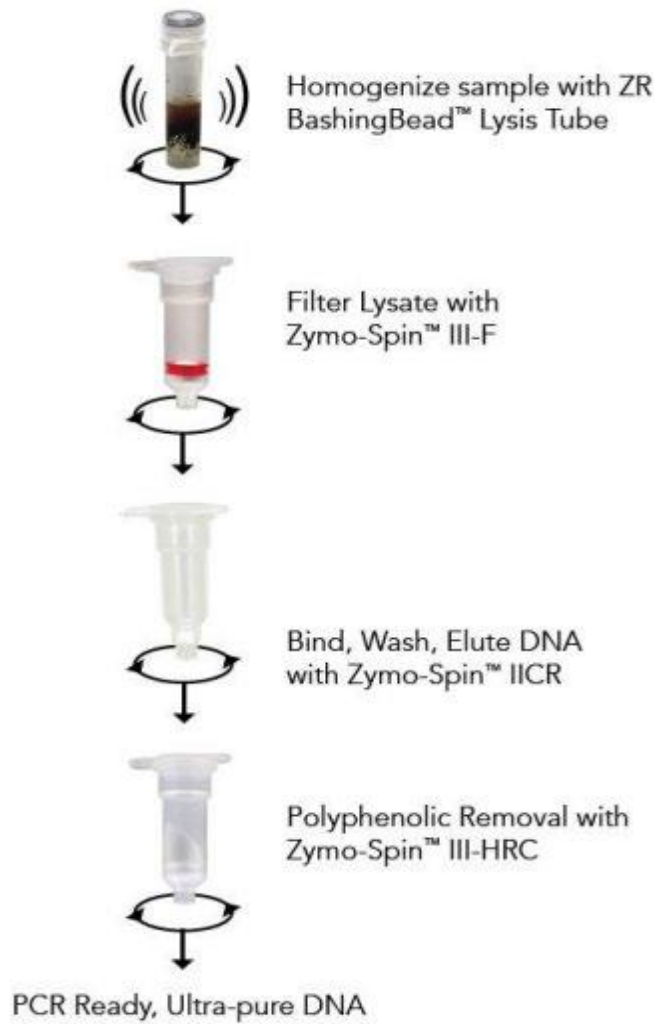
Kontaminasyonu engellemek amacıyla PCR işleminin üç aşaması (PCR karışımının hazırlanması, fekal DNA izolasyonu ve PCR karışımına saf DNA’nın eklenmesi, cihaza yükleme ve görüntüleme ayrı tahsis edilmiş odalarda gerçekleştirildi.

3.2.1. Fekal DNA izolasyonu

Kullanılan Malzeme:

- Fekal DNA izolasyon kiti (Zymo Research Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit, Katalog No: D6010, Irvine, ABD)
- Vidalı kapaklı, steril, RNaz-DNaz içermeyen 2 ml tüp (Medpoint, Katalog No: MP-002-CT, Çin)
- Vorteks (Dragon Lab MX-S)
- Mekanik Parçalama Cihazı (Analytikjena SpeedMill P12)
- Mikrosantrifüj
- Plastik gaita kaşığı
- Spektrofotometre (Thermo Nanodrop 2000 Spectrophotometer)

Gaita örneklerinden fekal DNA izolasyonu/ekstraksiyonu için kitin kullanım prosedürü birebir uygulandı (Şekil 5):



Şekil 5. Fekal DNA'nın spin-kolon yöntemi ile saflaştırılması (kit kullanım kılavuzundan)

1. Mikroskopik incelemeden sonra izolasyon işlemine dek eksi 80°C’de saklanan gaita örnekleri oda sıcaklığında çözündürüldü.
2. Oda sıcaklığına ulaşan gaita örneklerinden gaita kaşığı yardımı ile ≤ 150 mg (silme gaita kaşığı) BashingBead™ Lysis tüpüne aktarıldı ve üzerine 750 μ l BashingBead™ Buffer eklendi.
3. Mekanik parçalama cihazında 8 dakika tutularak iri partiküller parçalandı ve homojenize edildi.
4. BashingBead™ Lysis tüpü mekanik parçalamadan çıkarılarak 10.000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonunda tüp içerisinden 400 μ l süpernatant kısmı alınarak Zymo-Spin™ III-F filtresine transfer edilip Collection tüp içinde 8000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Collection tüpüne geçen filtratın üzerine 1.200 ml Genomic Lysis Buffer eklendi ve vorteksenerek iyice karışması sağlandı.
7. Karışım Zymo-Spin™ IICR kolonuna aktararak 10.000 x g’ de 1 dakika santrifüjlendi.
8. Collection tüp değiştirilerek Zymo-Spin™ IICR kolonun üzerine 200 μ l DNA Pre-Wash Buffer eklendi.
9. 10.000 x g’ de 1 dakika santrifüjlendi.
10. Collection tüp değiştirilerek Zymo-Spin™ IICR kolonun üzerine 500 μ l DNA Wash Buffer eklendi.
11. 10.000 x g’ de 1 dakika santrifüjlendi.
12. Zymo-Spin™ IICR kolonu 2 ml tüpe yerleştirildi.
13. Üzerine 100 μ l DNA Elution Buffer eklenerek 10.000 x g’ de 30 saniye santrifüjlendi.
14. Zymo-Spin™ III-HRC Filter, Collection tüpüne alınarak üzerine 600 μ l Prep Solution eklendi, 8000 x g’ de 3 dakika santrifüj edildi.
15. Zymo-Spin™ IICR kolondan elüsyonu yapılan sıvı hazırlanmış Zymo-Spin™ III-HRC filtresine aktarıldı ve 16.000 x g’ de 3 dakika santrifüj edildi.
16. Filtrattaki DNA’nın saflığı spektrometrede değerlendirildi, 260/280 nm absorbans oranı 1,8-2,2 aralığında ölçülen filtratlar artık/proteinden arındırılmış kabul edildi. Aralık dışı ölçüm veren örneklerde DNA izolasyon işlemi baştan itibaren tekrarlandı.
17. Saflaştırılmış DNA olarak PCR’da kullanıldı.

3.2.2. Gerçek zamanlı PCR

Kullanılan Malzeme:

- Gerçek zamanlı PCR/real-time qPCR karışımı (Promega GoTaq® Probe qPCR Master Mix, Katalog no: A6101, Promega Corporation, Madison, ABD)
- Hedef primer: *G. intestinalis* beta-giardin geninde 222-296. nükleotid pozisyonlarını hedefleyen primer ve kalıp (Metabion, Steinkirchen, Almanya) (Tablo 3.1).
- İnternal kontrol primer ve kalıbı: Bakteriyel 16S rRNA genini hedefleyen primer ve kalıp (Metabion, Steinkirchen, Almanya) (Tablo 2.).
- Isı döngü cihazı (BioRad CFX96 TOUCH Real-Time PCR Detection, Katalog No: 1855196, ABD)

Tablo 2. Gerçek Zamanlı PCR testinde kullanılan Primer ve kalıp dizileri

Hedef	Primer-Kalıp Adı	Dizi (5'→3')	Kaynak
<i>G. intestinalis</i> beta-giardin geni	P241-F	CATCCGCGAGGAGGTCAA	47
	P241-R	GCAGCCATGGTGTCGATCT	
	P241-P	FAM-AAGTCCGCCGACAACATGTACCTAACGA-BHQ-1	
Bakteriyel 16S rRNA geni	RW01	AACTGGAGGAAGGTGGGGAT	48
	DG74	AGGAGGTGATCCAACCGCA	
	RDR245	FAM-TACAAGGCCCGGGAACGTATTACCG-TAMRA	

Gerçek zamanlı PCR testi, gerçek zamanlı PCR/real-time qPCR karışımı kiti üreticisinin önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Hedef ve internal kontrol primer-kalıp dizileri iki ayrı kaynaktan alındığı ve aynı floresan boyayı içerdiği için bir örnek iki ayrı tüpte çalışıldı. Prosedür:

1. PCR öncesi temiz odada soğuk blok üzerinde; hedef giardin genini çoğaltmak için örnek sayısı, negatif, pozitif kontrol ve pipetaj kaybı (+1 reaksiyon) göz önünde bulundurularak Tablo 3.2.2'ye göre reaksiyon karışımı hazırlandı.
2. Isı döngü cihazına uygun PCR strip tüplerine 16 µl dağıtıldı.

Tablo 3. Hedef giardin geni için PCR karışımı

Reagen (mikrolitre)	1 Reaksiyon için miktar (µl)
DNaz-RNaz içermeyen su	3
GoTaq® Probe qPCR Master Mix, 2X	10
241-F (18 mikrom)	1
241-R (18 mikrom)	1
241-T (5 mikrom)	1
DNA	4
Toplam	20

3. PCR öncesi temiz odada soğuk blok üzerinde; internal kontrol genini çoğaltmak için örnek sayısı, negatif, pozitif kontrol ve pipetaj kaybı (+1 reaksiyon) göz önünde bulundurularak Tablo 3.2.3'e göre reaksiyon karışımı hazırlandı.
4. Isı döngü cihazına uygun PCR strip tüplerine 16 µl dağıtıldı.

Tablo 4. İnternal kontrol geni için PCR karışımı

Reagen (mikrolitre)	1 Reaksiyon için miktar (µl)
DNaz-RNaz içermeyen su	3
GoTaq® Probe qPCR Master Mix, 2X	10
İK Primer-F/RW01 (18 mikrom)	1
İK Primer-R/DG74 (18 mikrom)	1
Kalıp/RDR245 (5 mikrom)	1
DNA	4
Toplam	20

5. Karışım dağıtılmış PCR strip tüpleri soğuk blok üzerinde PCR odasına taşınarak burada üzerlerine 4 µl DNA eklendi.
6. Tüpler, sıcaklık-okuma profili Tablo 5' e göre ayarlanan ısı döngü cihazına yerleştirildi.

Tablo 5. Isı döngü cihazı sıcaklık ve okuma profili

Döngü Sayısı	Sıcaklık ve Süre
1	95°C'de 2 dakika
50	95°C'de 15 saniye
	60°C'de 1 saniye [OKUMA]

7. Cihaz çalışmasını tamamladıktan sonra sonuçlar değerlendirildi. Sigmoidal görünen her eğri pozitif sinyal olarak değerlendirildi. Hedef tüpte negatif veren örnekler ancak internal kontrol tüpünde pozitif sinyal varlığında negatif olarak değerlendirildi.

3.2.3. İstatistiksel analiz

Bulguların değerlendirmesinde değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. PCR testinin laboratuvar koşullarında alt saptama limitini belirlemek için Probit regresyon analizi uygulandı. Dağılım için Log_{10} tabanında verilere dönüşüm uygulandı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Veriler IBM SPSS versiyon 22 ve R.3.3.2 yazılımları ile geręekleřtirildi.



4. BULGULAR

Çalışmada 110 gaita örneği incelenmiştir. İncelenen örneklerin alındığı hastaların 52' si kadın, 58' i erkek idi; yaş ortalaması 38,3 yıl (yaş aralığı; 0-85) idi. Hastaların demografik özellikleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 6. Çalışma grubunun demografik özellikleri

Cinsiyet	Sayı (%)	Yaş Aralığı	Ortalama Yaş
Kadın	52	5-85	41
Erkek	58	0-77	36
Toplam	110	0-85	38,3

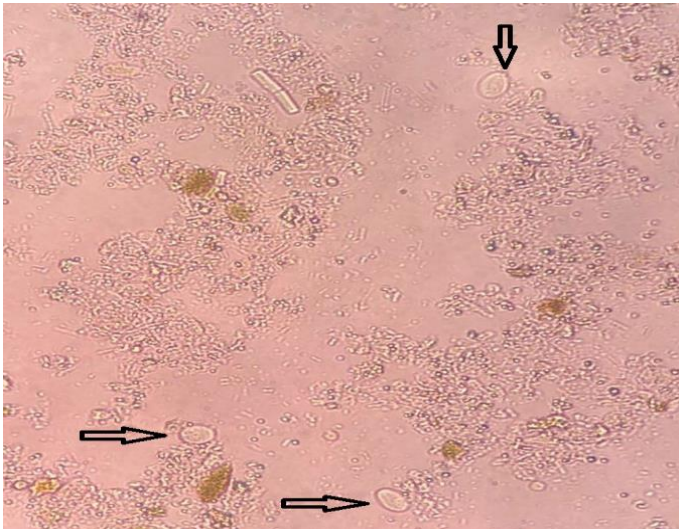
4.1. Mikroskopik İnceleme

4.1.2. Direkt mikroskopik inceleme

Direkt mikroskopik inceleme ile hiçbir örnekte *G. intestinalis* trofozoiti veya kisti görülmemiştir.

4.1.3. Çöktürme ile konsantrasyon işleminden sonra mikroskopik inceleme

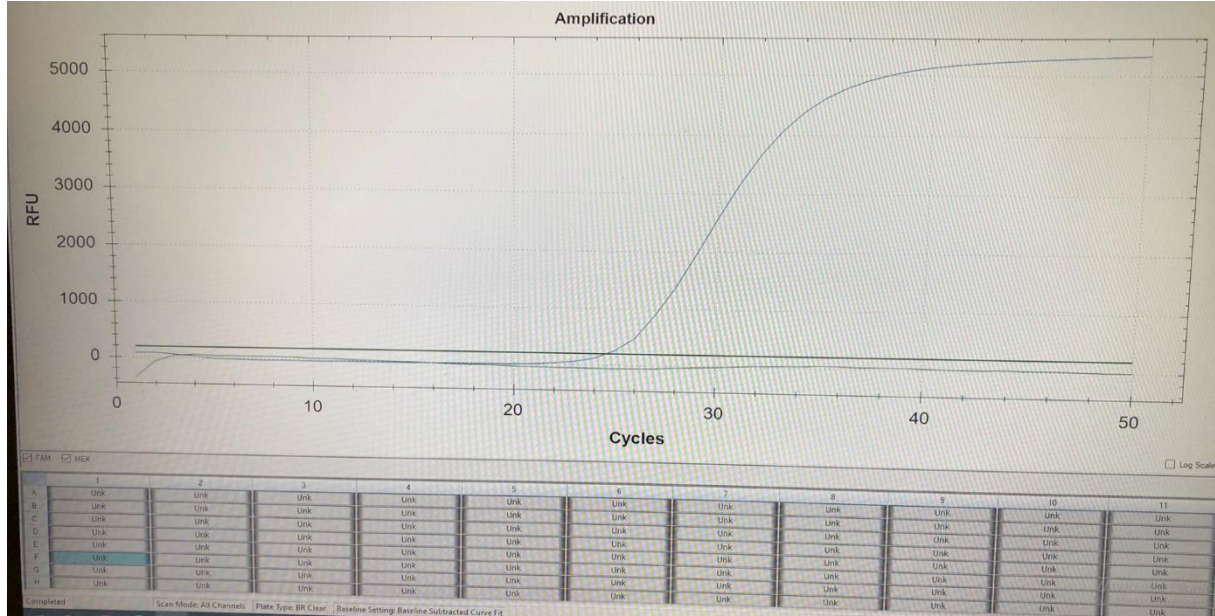
% 10 formol asetat ile yapılan çöktürme işleminden sonra yapılan mikroskopik incelemelerde 3 örnekte (% 2,7) *G. intestinalis* kisti saptanmıştır (Resim 4.1).



Resim 1. Çöktürme ile konsantrasyondan işleminden sonra *Giardia intestinalis* kistleri

4.2. Gerçek Zamanlı PCR (rt-PCR)

Gerçek zamanlı PCR testi ile 11 örnekte (% 10) *G. intestinalis* DNA'sı saptanmıştır (Resim 4.2). Real-Time PCR test sonucu pozitif bulunan örneklerin mikroskopi sonuçları ve hastaların demografik özellikleri Tablo 7' de gösterilmiştir.



Resim 2. Pozitif sonuç veren örnekte real-time PCR cihazı ekran görüntüsü

Tablo 7. PCR testi pozitif bulunan örneklerin mikroskopi sonuçları ve hastaların demografik özellikleri

Sıra	Mikroskopik İnceleme (<i>Giardia Kisti</i>)	rt-PCR Ct Değeri	Yaş	Cinsiyet
1	Pozitif	28,4	27	Kadın
2	Negatif	23,52	27	Kadın
3	Pozitif	22,46	33	Kadın
4	Negatif	30,42	33	Kadın
5	Negatif	40,86	33	Kadın
6	Negatif	41,12	37	Kadın
7	Negatif	30,01	48	Kadın
8	Negatif	30,73	65	Kadın
9	Negatif	29,43	11	Erkek
10	Negatif	36,7	33	Erkek
11	Pozitif	24,6	36	Erkek

Ct: Cycle of threshold.

Konsantre edilmiş gaita örneklerinde yapılan mikroskopik incelemede *G. intestinalis* kisti görülen 3 örneğin rt-PCR testi de pozitif sonuç vermiştir. PCR testinde ek olarak mikroskopisi negatif sonuç veren 8 örnekte daha PCR ile pozitif sonuç alınmıştır. İki yöntemin karşılaştırmalı sonuçları Tablo 8’ de gösterilmiştir. PCR referans alınarak yapılan istatistiksel analizde, iki testin karşılaştırmasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,001$). Mikroskopinin duyarlılığı % 27,3; özgüllüğü % 100 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 8. Mikroskopi ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması

		Mikroskopi		P
		Pozitif	Negatif	
PCR	Pozitif	3	8	P<0,001*
	Negatif	3	99	
Toplam (n=110)		0	107	

Kappa katsayısı: 0,403; *: İstatistiksel olarak anlamlı; Referans test: PCR.

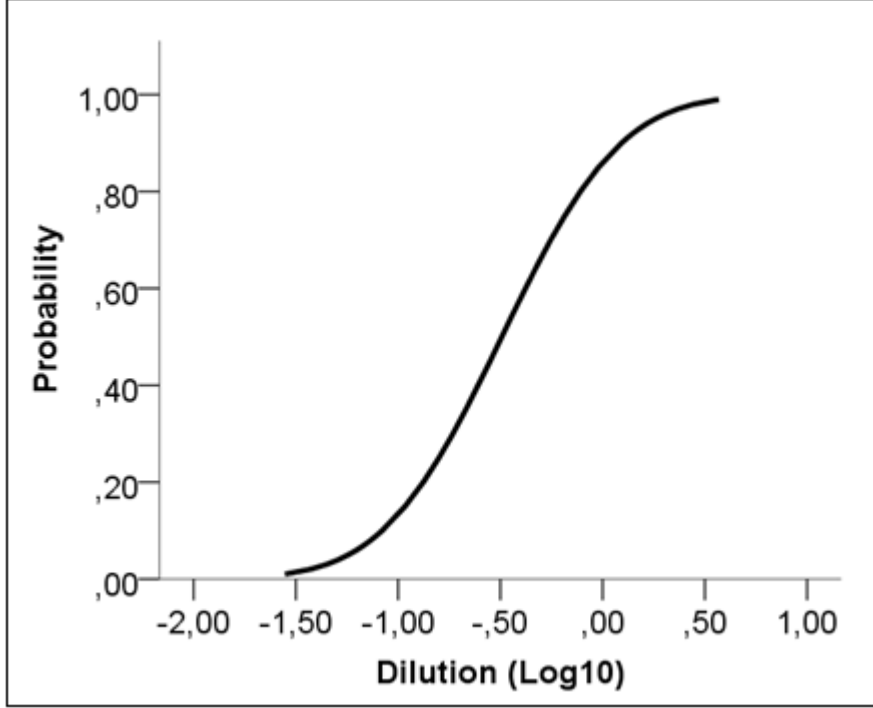
4.3. Analitik Duyarlılık

Gerçek zamanlı PCR testinin laboratuvar koşullarında analitik duyarlılığı belirlenmiştir. Bu amaçla, mikroskopide *G. intestinalis* kisti görülen örneklerden biri rastgele seçilerek mililitredeki kist sayısı ‘improved’ Neubauer lamında sayılmış ve 1.250.000 olarak belirlenmiştir. Daha sonra bu örneğin saflaştırılmış DNA’sının seri sulandırımı yapılarak her sulandırım 3 kez olmak üzere rt-PCR ile çalışılmıştır. Sulandırım oranları, mililitredeki kist sayısı ve PCR sonuçları Tablo 9’da gösterilmektedir.

Tablo 9. Probit analizi öncesi dilüsyon oranları, kist sayısı ve rt-PCR sonuçları

Sıra	Dilüsyon	Mililitrede Kist Sayısı	rt-PCR 1. Çalışma Sonucu	rt-PCR 2. Çalışma Sonucu	rt-PCR 3. Çalışma Sonucu
1	1	1.250.000	+	+	+
2	1/3	416.667	+	+	+
3	1/9	138.889	+	+	+
4	1/27	46.296	+	+	+
5	1/81	15.432	+	+	+
6	1/243	5.144	+	+	+
7	1/729	1.715	+	+	+
8	1/2.187	572	+	+	+
9	1/6.561	191	+	+	+
10	1/19.683	64	-	-	+
11	1/59.049	21	-	+	-
12	1/177.147	7	-	-	-

Probit analiz ile testin laboratuvar koşullarında analitik duyarlılığı %95 güven aralığında mililitrede 570,3 kist ($1/2.192$ dilüsyon; $-1,554 \text{ Log}_{10}$) olarak belirlenmiştir (şekil 4.1).



şekil 6. Probit analizi

5. TARTIŞMA

G. intestinalis enfeksiyonu dünya çağında en sık görülen parazit kaynaklı enfeksiyonlardan biridir (10). Asya, Afrika ve Latin Amerika’ da 200 milyon insanın bu parazit enfeksiyonun maruz kaldığı ve sadece çocuklarda yılda yaklaşık 500.000 yeni enfeksiyon geliştiği bildirilmektedir (45).

Ülkemizde son yıllarda farklı illerde yapılan çalışmalarda *Giardia* prevalansı % 0,64 ile % 15,1 arasında bulunmuştur (22-34).

Giardia enfeksiyonunun belirtisi görülemeyeceği gibi kusma, anoreksi, diyare, abdominal ağrı ve gaz, bulantı ile seyreden akut ve kronik gastrointestinal semptomlarla seyredebilmektedir. Kronik enfeksiyon sonucu özellikle çocuklarda kilo kaybı, yetersiz beslenme, bedensel ve zihinsel gelişme geriliği gelişebilmektedir (49-50).

Giardiyaz tanısında günümüzde en çok tercih edilen yöntem direkt mikroskopidir. Ancak yeni geliştirilmekte olan ve parazitin antijen veya nükleik asitin tespitine dayalı testler de giderek artan sıklıkta kullanılmaya başlamıştır (2).

Suudi Arabistan’da *G. intestinalis*’in de içlerinde bulunduğu bazı parazitlerin tanısında immunoassay, mikroskopi ve gerçek zamanlı PCR tanı yöntemlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, PCR diğer iki yönteme göre daha duyarlı bulunmuştur. Testlerin duyarlılıkları immunoassay, mikroskopi ve gerçek zamanlı PCR için sırası ile % 95,2; % 85,7 ve % 100 olarak tespit edilmiştir (51).

Rutin mikroskopik inceleme için gönderilen 472 dışkı örneği ile yapılan bir çalışmada multipleks PCR, gerçek zamanlı PCR ve mikroskopi (demir-hematoksilen boyama) yöntemleri karşılaştırılmıştır. Multipleks PCR ile rt-PCR sonuçları % 100 uyumlu bulunmuştur. Gerçek zamanlı PCR ile karşılaştırıldığında multipleks PCR’in duyarlılık ve özgüllüğü % 100 ve % 100; mikroskopinin % 50 ve % 100 bulunmuştur (52).

Irak’ ta yapılan bir çalışmada, çocuk hastanesine gelen 180 hastadan toplanan dışkı örneğinde mikroskopi, immünokromatografik test ve PCR tanı yöntemi karşılaştırılmıştır. Yöntemlerin duyarlılıkları sırası ile % 84, % 84 ve % 100 olarak hesaplanmıştır. PCR yöntemi diğer yöntemlere göre daha hassas ve spesifik bulunduğu için tanıda kullanılması tavsiye edilmiştir (39).

Batı Kenya’ da yapılan bir çalışmada, yüksek duyarlılığına karşın maliyeti nedeniyle kullanılamayan PCR testi temel alınarak mikroskopinin güvenilirliğinin saptanması hedeflenmiştir. Mikroskopinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 64,4 ve % 83,6 olarak hesaplanmış ve kısıtlı kaynağa sahip bölgelerde güvenilir bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (53).

Suudi Arabistan’ın Cidde kentinde 100 örnekle yapılan bir araştırmada mikroskopi, hızlı kromatografik test, immünoassay ve gerçek zamanlı PCR tanı yöntemleri karşılaştırılmış; duyarlılıkları sırası ile % 73,9; % 73,9; % 91,3 ve % 95,7 olarak bulunmuştur. Gerçek zamanlı PCR kolay, zaman kazandıran ve çok sayıda numuneyi inceleme imkanı sağlayan bir yöntem olduğu için rutin olarak kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (54).

İran’ın farklı şehirlerinde yapılan çalışmada *G. intestinalis* enfeksiyonunun rutin tanısında mikroskopi ve PCR yöntemleri karşılaştırılmış, PCR yönteminin % 100 duyarlı olduğu saptanmıştır. Mikroskopi yönteminin uzman personel gerektirmesi nedeni ile doğru ve hızlı tanı için rutinde gerçek zamanlı PCR yöntemi tavsiye edilmiştir (55).

Cezayir’de 2013-2018 yılları arasında dört farklı hastaneden elde edilen 119 örnek ile yapılan çalışmada ise genotiplleme amaçlanmış fakat beraberinde mikroskopi ve gerçek zamanlı PCR testinin karşılaştırması yapılmıştır. PCR ile pozitiflik saptanan 80 örneğin 66’sında mikroskopide parazit saptanmıştır. Mikroskopinin pozitif olduğu 14 örnek PCR ile negatif sonuç vermiştir. PCR ile negatif sonuç alınması, mikroskopik incelemede yanlış yorum ve kistlerin DNA içeriğini kaybetmiş olabilecekleri ile ilişkilendirilmiştir (56).

Türkiye’ de 2017 yılında yapılan bir çalışmada sindirim sistemi rahatsızlığı olan hastalara ait 94 dışkı örneğinde ELISA, mikroskopi ve gerçek zamanlı PCR yöntemlerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Gerçek zamanlı PCR ile mikroskopi yönteminde 38 ortak pozitiflik saptanmış; mikroskopinin negatif olarak değerlendirildiği 37 örnek gerçek zamanlı PCR ile pozitif sonuç vermiştir. PCR ile karşılaştırıldığında mikroskopi % 50,7 duyarlı ve % 100 özgül bulunmuştur. Sonuçlar, mikroskopi yönteminin yetersizliği olarak yorumlanmıştır (49).

Gerçek zamanlı PCR, hızlı immünolojik test ve mikroskopinin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada ise PCR yönteminin çapraz kontaminasyon nedeni ile özgüllüğünün düşük olduğu, ek bir test olarak kullanılması ve mikroskopinin tamamlayıcısı olarak kalması gerektiği belirtilmiştir (57).

Burkina Faso’da farklı okullardaki çocuklardan alınan 882 dışkı örneğinde yapılan çalışmada, mikroskopi ile *G. intestinalis* görülen 92 örnek ve rastgele seçilen 53 negatif örnekte gerçek zamanlı PCR çalışılmıştır. Mikroskopi referans alındığında gerçek zamanlı PCR testinin duyarlılığı ortalama % 76,6; özgüllüğü % 96,2 bulunmuştur. Çalışmada her ne kadar mikroskopi altın standart kabul edilse de mikroskopi pozitif, PCR negatif sonuçların mikroskopide yanlış yorumlama (kist görünümünün Morel mantarı sporlarına benzemesi) nedeniyle potansiyel yalancı pozitiflik ya da örneklerin saklanması sırasında DNA’nın lize uğraması kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (58).

Fransa’ da 12 şehirden toplanan örnekler ile yapılan çalışmada *G. intestinalis* ile birlikte *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii*’nin saptanmasında multipleks PCR ve mikroskopi yöntemleri karşılaştırılmıştır. PCR’ın *Giardia* için duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla % 89,7 ve % 96,9 bulunmuştur. Sonuç olarak rutin tanıda kullanılması tavsiye edilmiştir (59).

Giardia yanında *Blastocystis* sp., *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis* ve *Cyclospora cayetanensis*’i saptayan 3 ticari multipleks rt-PCR testinin değerlendirildiği bir çalışmada ise testlerin *Giardia* için duyarlılık/özgüllükleri % 92,5/% 100, % 92,5/% 99,3 ve % 97,5/% 100 hesaplanmıştır. Ticari PCR testi seçiminde kitin performansının da göz önünde bulundurulması gerektiği vurgulanmıştır (60).

Bizim çalışmamızda ise parazitoloji laboratuvarımıza gelen 110 dışkı örneğinde çöktürme işleminden sonra yapılan mikroskopik ile incelemede 3 pozitif, gerçek zamanlı PCR yöntemi ile 11 örnekte pozitif sonuç saptanmıştır. Mikroskopi ile *Giardia* kisti görülen 3 örneğin hepsi PCR ile pozitif sonuç vermiştir. PCR referans alınarak yapılan istatistiksel analizde, iki testin karşılaştırmasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,001$). Mikroskopinin duyarlılığı % 27,3; özgüllüğü % 100 olarak hesaplanmıştır. Gerçek zamanlı PCR’ın mikroskopiye göre daha duyarlı olduğu değerlendirilmiştir.

PCR testinin analitik duyarlılığını tespit etmek için ideal yaklaşım hedef beta-giardin geninin bilinen miktarını içeren referans bir örnek kullanılması olmasına karşın, kaynak kısıtlılığı nedeniyle çalışmamızda mikroskopik olarak kist görülen bir örnek ile Probit analizi yapılması tercih edilmiştir. Probit analizinde, testin laboratuvar koşullarında analitik duyarlılığı % 95 güven aralığında mililitrede 570,3 kist ($1/2.192$ dilüsyon; $-1,554 \log_{10}$) olarak belirlenmiştir. İki ticari test kitinde analitik test duyarlılığı optimum koşullarda (hacim verilmeksizin; reaksiyon başına) en az 100 kopya olarak belirtilmiştir (61, 62). Çalışmamızda

yaklaşık 0,5 ml gaitada bulunan DNA 100 µl elüsyon hacmi ile saflaştırılıp bu miktarın 4 mikrolitresi PCR reaksiyonunda kullanıldığı için saptadığımız duyarlılık limitinin karşılaştırılabilir olduğu düşünülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

G. intestinalis enfeksiyonunun laboratuvar tanısında günümüzde halen rutin olarak kullanılan mikroskopik yöntemin düşük hassasiyeti göz önünde bulundurulduğunda yüksek maliyetine karşın gerçek zamanlı PCR yönteminin rutin tanıda daha sık kullanılmasının enfeksiyonun tanısı ve yayılımının önlenmesinde daha faydalı olacağı düşünülmektedir.

Diğer testlerde olduğu gibi rt-PCR testinde de rutin uygulanmaya başlanmadan önce DNA izolasyon yöntemiyle bütün olarak performansının değerlendirilmesinin gerektiğine inanılmaktadır.



7. KAYNAKLAR

1. Miman Ö, Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. s. 61-67, 1. Basım, Karakış Basım Matbaacılık San. Tic. Ltd. Şti., İstanbul, 2018.
2. Cacciò SM, Sprong H. Epidemiology of Giardiasis in Humans. Ed: Luján HD, Svärd S. Giardia. pp 17-28. Springer, Vienna, Austria, 2011. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0198-8_2]
3. Smith HV, Mank TG. Diagnosis of Human Giardiasis. Ed: Luján HD, Svärd S. Giardia. pp 353-377. Springer, Vienna, Austria, 2011. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0198-8_22]
4. Yılmaz Ü, Östan İ, Kayran E, Özbilgin A. Celal Bayar Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2000-2001 yıllarında saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2002; 6 (1) : 60-63.
5. Çıragil P, Aral M, Ekerbiçer HÇ, Gül M. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2003; 27 (2): 136-138.
6. Ryan U, Caccio SM. Zoonotik potential of Giardia. Int J Parasitol. 2013; 43 (12-13): 943-56.
7. Nash TE, Bartelt LA. Giardia lamblia. Eds: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Principles and Practice of Infectious Diseases (Ninth Ed.). pp 3388-3395.e3, Elsevier, New York, USA, 2020. [[VitalSource Bookshelf version]. Retrieved from vbk://9780323550277.]
8. Wolfe MS. Giardiasis. Clinical Microbiology Reviews, 1992; 5 (1): 93-100.
9. Akısü Ç, Korkmaz M. Tıbbi Parazitolojide Tedavi. Ed Özcel MA. Tıbbi Parazitoloji Derneği. Ege Üniversitesi. Yayın No: 20. İzmir 2005. s. 40-41.
10. Roxström LK, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG. Giardia immunity-an update. Trends in Parasitology 2006; 22 (1): 26-31.
11. Ali V, Nozaki T. Current therapeutics their problems and sulfur-containing-aminoacid metabolism as a novel target against infections by 'Amitochondriate' protozoan parasites. Clin Microbiology 2007; 20 (1): 164-187.

12. Karadam, SY. Dışkıda *Giardia intestinalis* tanısında üç yöntemin (mikroskopik inceleme, direkt floresan antikor testi, immunokromatografik yöntem) karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın, 2014.
13. Cömert M. Hastanemize başvuran bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia intestinalis* sıklığının araştırılması. Harran Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 2019.
14. <https://microbenotes.com/giardia-duodenalis/>
15. Durak Fatih. Kanserli çocuklarda bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Malatya, 2007.
16. Küçük ŞK. Tekirdağ'da insanlarda *Giardia* spp. Varlığının mikroskopik yöntem ve PCR aracılığıyla takibi. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, 2013.
17. <https://www.learninsta.com/giardia-lambliia-of-medical-parasitology/>
18. Gülel GT, Çadırcı Ö, Gücükoğlu A, Alisharlı M. Gıda yoluyla bulaşan parazitler hastalıkları. Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics 2015; 1(3):109-16.
19. <https://emedicine.medscape.com/article/176718-workup>
20. <http://publichealth.lacounty.gov/acd/docs/GiardiasisLifeCycle.pdf>
21. Doni NY. Bağırsak parazitlerinin 0-6 yaş arası çocuklarda fiziksel, mental ve nöromotor gelişim üzerine etkileri. Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 2008.
22. Bayram Y, Parlak M, Çıkman A. Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde *Giardia intestinalis* ve *Entamoeba histolytica/dispar* prevalansı: Dört yıllık izlem. Dicle Medical Journal. 2013; 40 (1): 40-44.
23. Uysal HK, Akgül Ö, Purisa S, Öner YA. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nde 25 Yıllık İntestinal Parazit Prevalansı: Retrospektif Bir Çalışma. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2014; 38: 97-101.
24. Köksal F, Başlantı İ, Samastı M. A Retrospective Evaluation of the Prevalence of Intestinal Parasites in Istanbul, Turkey. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2010 34 (3): 166-171.

25. Çiçek AÇ, Direkel Ş, Gündoğdu DZU, Ertürk A, Sarı A. Rize İlinde Üniversite ve Devlet Hastanelerine Başvuran Hastalarda Görülen Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Int J Basic Clin Med. 2013;1(2):78-82.
26. Bayramoğlu Ö, Pekmezci D, Başarı F. Adana İli Gıda Çalışanlarında *Giardia* ve *Cryptosporidium* Prevalanslarının Farklı Yöntemler ile Araştırılması. Türkiye Parazitol Dergisi. 2013; 37: 4-8.
27. Ekşi F, Doğan Y, Özdemir G, Zer Y, Bayram A, Karslıgil T. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Bir Yıllık Sürede Gaita Örneklerinde Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Fırat Tıp Dergisi 2013; 18 (4): 235-238.
28. Aytar AA, Öztürk EC, Göçmen Ş, Çalışkan E, Özaras F, Avcıoğlu F, Çelebiler NY, Ankaralı H, Şahin İ, Yavuz MT, Öğrencilerde Bağırsak Parazitlerinin ve Hijyen Bilgi Düzeylerinin Araştırılması. Türkiye Parazitol Dergisi. 2015; 39: 277-85.
29. Pektaş B, Gökmen AA, İnci A, Biten AA, Keşli R, Ülker T. Bir Eğitim Araştırma Hastanesi'nde Üç Yıllık Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı: Retrospektif Bir Çalışma. Journal of Clinical and Experimental Investigations. 2015; 6 (3): 269-273.
30. Bilman FB, Yetik M. Bağırsak Parazitlerinin Epidemiyolojisi: Beş Yıllık Değerlendirme. İKSSTD 2019;11(3):184-189.
31. Baştemir S, Öncel K, Yereli K, Kilimcioğlu AA, Balcıoğlu C, Girginkardeşler N. Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarında 2011-2015 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi. 2016; 46 (2): 76-81.
32. Sarzhanov F, Köster P, Doruman-Al F, Bailo B, Dashti A, Demirel-Kaya F, Carmena D. Detection Of Enteric Parasites And Molecular Characterization of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in Patients Admitted to Hospital in Ankara, Turkey. Parasitology 2021; 148 (5): 550-561. [doi:10.1017/s0031182020001821]
33. Gülmez D, Sarıbaş Z, Akyön Y, Ergüven S. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı 2003-2012 Yılları Sonuçları: 10 Yıllık Değerlendirme. Turkish Journal of Parasitology. 2013; 37: 97-101.
34. Uluşan Ö, Zorbozan O, Yetişmiş K, Töz S, Ünver A, Turgay N. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Direkt Tanı Laboratuvarında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı; On Yıllık Değerlendirme. Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2019; 49 (2): 86-91. [doi:10.5222/TMCD.2019.086]

35. Rainova I, Harizanov R, Kaftandjiev I, Tsvetkova N, Mikov O, Kaneva E. Human Parasitic Diseases in Bulgaria in Between 2013-2014. *Balkan Med J* 2018; 35:61-7.
36. Jarca A, Zagon D, Jarca C, Cozma A, Cozma V, Draghici S, Dumitrascu D. Retrospective evaluation of human giardiasis prevalence in Bihor County, Romania. *Sci Parasitol* 2015; 16 (1-2): 33-40.
37. Saki J, Khademvatan S, Rad MF, Gharibzadeh M. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections in Haftkel County, Southwest of Iran. *International Journal of Infection* 2017 4 (4): e15593.
38. Masoumeh R, Farideh T, Mitra S, Heshmatollah T. Intestinal Parasitic Infection among School Children in Golestan Province, Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2012; 15(23):1119-1125.
39. Shakir MJ and Hussein AA. Comparison Of Three Methods (Microscopy, Immunochromatography And Real-Time PCR Technique) For The Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Iraqi Journal of Biotechnology*, 2015; 14 (2): 207-218.
40. Rebih AN, Boutaiba S, Aboualchamat G, Souttou K, Hakem A, Nahhas A. Molecular And Epidemiological Characterization Of *Giardia intestinalis* Assemblages Detected In Djelfa. *J Parasit Dis* 2020; 44 (2): 281-288.
41. Başlantı İ. İstanbul'un Çevre İlçelerindeki İlköğretim Okulu Öğrencilerinde Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2011.
42. Hooshyar H, Rostamkhani P, Arbabi M, Delavari M. *Giardia lamblia* Infection: Review Of Current Diagnostic Strategies. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2019; 12 (1): 3-12.
43. Guo-Xia Zheng , Xue-Mei Zhang , Yu-Suo Yang , Shu-Rui Zeng , Jun-Feng Wei , Yun-Hua Wang , et al. An Integrated Microfluidic Device For Culturing And Screening of *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology* 2014; 137: 1-7.
44. Dorian VB, Lieselotte C, Jacob V, Marjian VE. Comparison of Four Rapid Diagnostic Tests, ELISA, Microscopy And PCR For The Detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in feces. *Journal of Microbiological Methods*. 2015; 110: 78-84.
45. Gardner TB, Hill DR. Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14 (1): 114-28.

46. Gonzalez ME, Villafranca RC, Álvarez G, Brito K. Nitazoxanide For The Treatment Of *Giardia duodenalis* Infection: A Comparative Trial With Secnidazole. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2010; 67 (3): 113 – 119.
47. Guy RA, Payment P, Krull UJ, Horgen PA. Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 5178-5185.
48. Ohlin A, Backman A, Bjorkqvist M, Molling P, Jurstrand M, Schollin J. Real-time PCR of the 16S-rRNA Gene In The Diagnosis Of Neonatal Bacteraemia. *Acta Paediatrica* 2008; 97: 1376-1380.
49. Beyhan YE, Taş Cengiz Z. Comparison Of Microscopy, ELISA, And Real-Time PCR For Detection Of *Giardia intestinalis* In Human Stool Specimens. *Turk J Med Sci*. 2017; 47: 1295-1299.
50. Yazar S, Yaman O, Gözkenç N, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2005; 29 (4): 261-263.
51. Salah HE, Thekra N, Maqati A, Hussein MI, Adam AA, Mohamed M, Hassan A, Zahrani EMA. Comparison Of Microscopy, Rapid Immunoassay, And Molecular Techniques For The Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol Res*. 2013; 112:1641–1646.
52. Stark D, Al-Qassab S E, Barratt JLN, Stanley K, Roberts T, Marriott D, Harkness J, and Ellis JT. Evaluation of Multiplex Tandem Real-Time PCR for Detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in Clinical Stool Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49 (1): 257-262.
53. Emisiko J, Shaviya N, Shiluli C, Kiboi N, Wamalwa R, Jumba B, Zablón J, Mambo F, Barasa M. Comparison of Microscopy and PCR for Detection of *Giardia Lamblia* and *Entamoeba Histolytica* in Human Stool Specimens in a Resource Limited Setting in Western Kenya. *Ethiop J Health Science* 2020; 30 (6): 891-896.
54. Alharbi A, Fawzia HT, Wakid MH, Azhar E, Farraj S, Mirza AA. Detection of *Giardia lamblia* by Microscopic Examination, Rapid Chromatographic Immunoassay Test, and Molecular Technique. *Cureus* 2020; 12 (9): e10287.
55. Bairami A, Rezaei S, Rezaeian M. Evaluation of a New Primer in Comparison with Microscopy for the Detection of *Giardia lamblia* Infection in Stool Samples. *Iran J Parasitol*. 2016; 11 (1): 19-23.

56. Belkessa S, Lopez DT, Houali K, Ghalmi F and Stensvold CR. Molecular Characterization of *Giardia duodenalis* in Children and Adults Sampled in Algeria. *Microorganisms* 2021; 9 (1): 54.
57. Schuurman T, Lankamp P, van Belkum A, Kostra SA, Van Zweet A. Comparison of Microscopy, Real-Time PCR And A Rapid Immunoassay For The Detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 1186–1191.
58. Diagbouga S, Kientega T, Erismann S, et al. . Evaluation of a Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Laboratory Diagnosis of *Giardia intestinalis* in Stool Samples from Schoolchildren from the Centre-Ouest and Plateau Central Regions of Burkina Faso. *Applied Microbiology: Open Access* 2017; 3: 1.
59. Morio F, Valot S, Laude A, et al. Evaluation of a New Multiplex PCR Assay (Paragene G-Amoeba Real-Time PCR Kit) Targeting *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii* from Stool Specimens: Evidence for the Limited Performances of Microscopy-Based Approach for Amoeba Species Identification. *Clinical Microbiology and Infection* 2018; 24 (11): 1205-1209.
60. Nicolas Argy N, Nourrisson C, Aboubacar A, et al. Selecting a multiplex PCR panel for accurate molecular diagnosis of intestinal protists: a comparative study of Allplex (Seegene), G-DiaParaTrio (Diagenode), and RidaGene (R-Biopharm) assays and microscopic examination. *Parasite* 2022; 29: 5.
61. Nzytech *Giardia intestinalis* Real-time PCR Kit (<https://www.nzytech.com/products-services/molecular-diagnostics/human-pathogen/human-parasites/md01401/>)
62. Genesig *Giardia intestinalis* Real-time PCR Kit (https://www.genesig.com/assets/files/g_intestinalis_std.pdf)

8. ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Giardia intestinalis</i> 'in kist yapısının görünümü .	4
Şekil 2. <i>Giardia intestinalis</i> 'in trofozoit görünümü.....	5
Şekil 3. <i>Giardia intestinalis</i> ' in yaşam döngüsü.	7
Şekil 4. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Nativ Lugol mikroskopi yöntemi ile görünümü (a: kistler, b: trofozoit).....	13
Şekil 5. Fekal DNA'nın spin-kolon yöntemi ile saflaştırılması (kit kullanım kılavuzundan)..	19
Şekil 6. Probit analizi	27



9. RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1. Çöktürme ile konsantrasyondan işleminden sonra *Giardia intestinalis* kistleri24

Resim 2. Pozitif sonuç veren örnekte real-time PCR cihazı ekran görüntüsü.....25



10. TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Türkiye’de Son Yıllarda Yapılan Prevalans Çalışmalarının Sonuçları.....	11
Tablo 2. Gerçek Zamanlı PCR testinde kullanılan Primer ve kalıp dizileri.....	21
Tablo 3. Hedef giardin geni için PCR karışımı	22
Tablo 4. İnternal kontrol geni için PCR karışımı	22
Tablo 5. Isı döngü cihazı sıcaklık ve okuma profili	22
Tablo 6. Çalışma grubunun demografik özellikleri.....	24
Tablo 7. PCR testi pozitif bulunan örneklerin mikroskopi sonuçları ve hastaların demografik özellikleri.....	25
Tablo 8. Mikroskopi ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması	26
Tablo 9. Probit analizi öncesi dilüsyon oranları, kist sayısı ve rt-PCR sonuçları	26

11. EKLER DİZİNİ

Sayfa No

Ek 1. Etik Kurulu Karar Formu	43
--	----



12. EKLER

Ek 1. Etik Kurulu Karar Formu

