

T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

**GIARDIA INTESTINALIS'İN AKSENİK KÜLTÜRÜ,
PATOGENEZİ VE TANISAL ÖZELLİKLERİ**

107779

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

PARAZİTOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

T 107779

SERPİL DEĞERLİ

Kasım – 2001
SİVAS

T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

***GIARDIA INTESTINALIS*'İN AKSENİK KÜLTÜRÜ,
PATOGENEZİ ve TANISAL ÖZELLİKLERİ**

PARAZİTOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

SERPİL DEĞERLİ

Danışman öğretim üyesi
Prof. Dr. SEMRA ÖZÇELİK

Kasım – 2001
SİVAS

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I - GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II - GENEL BİLGİLER.....	3
III - GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
IV - BULGULAR.....	33
V - TARTIŞMA.....	51
VI - SONUÇ.....	71
VII - ÖZET.....	73
VIII - SUMMARY.....	74
IX - KAYNAKLAR.....	76

SEKİLLER

Sayfa

Şekil 1. İnfekte kemenin incebağırsağından elde edilen trofozoitlerin görünümü (x40).....	46
Şekil 2. İnfekte kemenin incebağırsağından elde edilen trofozoitlerin 24 saat sonraki görünümleri (x40).....	46
Şekil 3. <i>Giardia intestinalis</i> WB suşunun GI besiyerindeki görünümü (x40) (Ortamda <i>Candida</i> blastosporları da görülmektedir).....	47
Şekil 4. Canlı <i>Giardia intestinalis</i> WB suş'unun GI besiyerinde 3. gündeki görünümü (x40).....	47
Şekil 5. <i>Giardia intestinalis</i> WB suş'unun Giemsa ile boyanmış trofozoiti (x100).....	48
Şekil 6. <i>G. intestinalis</i> ile infekte kemenin incebağırsağından yapılan kesitte villus üzerine tutunmuş olan trofozoitlerin görünümleri (Hematoksilen- eozin, x100).....	48
Şekil 7. <i>G. intestinalis</i> ile infekte kemenin incebağırsağından yapılan kesitte villuslar arasında dağınık olarak görülen trofozoitlerin görünümleri (Hematoksilen- eozin, x100).....	49
Şekil 8. IFAT ile giyardiyozlu hasta serumlarında IgG (+) durum (x100).....	49
Şekil 9. IFAT ile giyardiyozlu hasta serumlarında IgM(+) durum (x40).....	50
Şekil 10. IFAT ile giyardiyozlu hasta serumlarında IgA(+) durum (x100).....	50
Şekil 11. IFAT ile giyardiyozlu hasta serumlarında IgA(+) durum (x40).....	51
Şekil 12. <i>G. intestinalis</i> ile infekte kemenin serumunda IgA (+) durum (x40).....	51

T A B L O L A R

	sayfa
Tablo 1. Safılaştırılan Kistlerin Ekskistasyonunda Uygulanan Değişik Yöntemler ve Bunların Modifiye Şekilleri	35
Tablo 2. Deneş Hayvanlarını İnfekte Etme Çalışmalarında Elde Edilen Bulgular.....	43
Tablo 3. ELISA Testiyle Elde Edilen Bulgular.....	44
Tablo 4. IFAT Yöntemiyle Giyardiyozlu Hastalarda Saptanan İmmünglobulinlerin Dağılımı.....	45
Tablo 5. IFAT Yöntemi İle İncelenen Hasta Serumlarının Titrelere Göre Dağılımı.....	45

GRAFİK

Grafik . İnfekte Edilen Normal ve Kortizonlu Kemelerde <i>G. intestinalis</i> Kist Atılımının Durumu.....	44
--	----

TEŐEKKÜR

Çalıőmalarımın her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK'e, kùltür aşamasında kullandığımız bazı maddeleri yurtdışından temin eden, değerli bilgilerini ve tecrùbelerini her an için bizlere aktarmaktan zevk duyan hocam Sayın Prof. Dr. Gülendame SAYGI'ya, Yrd. Doç. Dr. Ali ÇELİKSÖZ'e, deneylerin yapılması sırasında gösterdikleri emek ve yardımdan dolayı İbrahim KOÇ, Baőhemőire yardımcısı Ergül KOÇAK, hemőire Fatma POLAT'a, ve Parazitoloji Anabilim dalındaki tüm arkadaőlarıma teőekkür ederim.

Çalıőmalarım sırasında her zaman yanımda olan eleőtirileri ve önerileri ile destek olan aőım Yrd. Doç. Dr. Naci DEğERLİ'ye ve kızım Serin'e sonsuz teőekkürler ederim.



"Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarih ve 84 / 1 no'lu kararıyla kabul edilen tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır."

GİRİŞ

Giardia intestinalis insanda tanımlanan en eski protozoonlardan olmasına rağmen, insanda ve diğer memelilerde belirgin bir hastalık oluşturduğu ancak yakın zamanlarda anlaşılmıştır. Son 40 yılda yapılan çalışmalarla çok nazlı olan bu parazitin kültürü yapılmaya başlanmış ve bu sayede karanlıkta kalmış pek çok konu aydınlatılmaya çalışılmıştır. Tüm bu çalışmalara rağmen *Giardia* ile ilgili hala bilinmeyen ve araştırılması gereken pek çok konu olduğu da bilinmektedir.

Bu çalışmada öncelikle, *Giardia intestinalis*'in uzun süreli kültürünün yapılabilmesi amaçlanmıştır. İn vivo ve in vitro koşullarda yapılan ekskistasyonla, farklı besiyerlerinde gerçekleştirilen kültürler arasında karşılaştırmalar yapılmış, ekskistasyon ve kültür koşullarından en uygun olanı belirlenmiştir. Parazitin, uzun süreli kültürleri başarılı olduğu takdirde ise, çeşitli biyokimyasal, immünolojik ve farmakolojik araştırmaların yapılabilmesi ve böylece, bu yönde yapılacak çalışmaların artmasının sağlanması amaçlanmıştır.

İnsanlarda giyardiyozun klinik görünümü, asemptomatik taşıyıcılıktan ciddi malabsorbsiyon sendromuna kadar değişiklik göstermektedir. Klinik görünümdeki bu çeşitliliğe katkıda bulunan faktörler arasında, *G. intestinalis* süşunun virulansı, alınan kist sayısı, konağın yaşı ve infeksiyon sırasında konağın immün sisteminin durumu yer almaktadır. Tüm bunlar bilinmesine rağmen giyardiyozun patogenezi mekanizması hakkında bilinenler hala kısıtlıdır (1,36).

Çalışmamızın ikinci aşamasında parazitin patogenezi mekanizması hakkında daha fazla bilgi edinmek amacıyla, fare, keme ve tavşan gibi deney hayvanları *G. intestinalis* ile deneysel olarak infekte edilerek, parazitin ince bağırsakta yerleştiği yere göre oluşturduğu patolojik değişiklikler belirlenmiştir. Deneysel olarak oluşturulan bu infeksiyonların hem normal hem

de immün sistemi baskılanmış bireylerdeki patogenezinin araştırılması da bu çalışmada amaçlanmıştır. Ayrıca *Giardia intestinalis*'in epidemiyolojisinde rol oynadığı iddia edilen bazı evcil hayvanlar (kedi, köpek gibi) da aynı şekilde insandan elde edilen suşlarla infekte edilerek parazitin bu canlılarda infeksiyon oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır.

Giardia intestinalis ile infekte kişilerde parazitin tanısı, direkt inceleme, bazı çoğaltma yöntemleri, kalıcı boya ile hazırlanmış preparatlar (Trichrome, Giemsa, vs), Entero-test gibi yöntemlerle yapılabilmektedir (49,53,74,111, 115,143). Son yıllarda bu yöntemlere ek olarak serumda antikor arama ve dışkıda antijen saptanması gibi farklı serolojik yöntemler de uygulanmaktadır. Çalışmamızda tanıda kullanılan yöntemlerin hem zaman hem de ekonomik yönden en uygun olanının saptanması da amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

İlk kez 1681 yılında Leeuwenhoek, kendi dışkısından hazırladığı preparatı basit mikroskopunda incelerken *Giardia intestinalis*'i görmüş ve bu gözlemini " The Secretary of Royal Society" e bildirmiştir. Bu durum kayıtları inceleyen bilim adamları tarafından da desteklenmiştir (9,25). Lambl ise 1859 yılında bu kamçılı parazite *Cercomonas intestinalis* adını vermiştir. *Giardia intestinalis*'in trofozoit şeklini Benser, kist şeklini ise Rodenwaldt 1911 yılında ayrıntılarıyla tanımlamışlardır (143).

Giardia, konağının ince barsağının üst kısımlarına yerleşen kamçılı bir protozoonudur. Parazitin infektif şekli olan kistlerin konak tarafından ağızdan alınmasıyla bulaşma gerçekleşmekte ve trofozoitler duodenumda serbest hale geçerek ince bağırsak mukozasına tutunmaktadır. Bağırsak lümeninde trofozoitler mitotik bölünmeye devam etmekte, bazıları da kendilerini korumak için enkiste olmakta ve bu şekilde konak dışkısıyla atılmaktadırlar (35,47,56,68,101,103,113,125,143).

Giardia türleri kamçılı protozoonlar içerisinde geniş bir grup oluşturmaktadırlar. İnsan dışında maymun, pek çok kemirgen türü, kedi, köpek, at, sığır, koyun, keçi, kuş türleri, kertenkele, kurbağa yavruları ve balıkların da dahil olduğu pek çok omurgalının bağırsaklarında bu parazit bulunmuştur. (12,77,99).

Yaklaşık 300 yıldır bilim adamlarının ilgisini çeken bu parazitin 2001 yılına ait bir kaynaktaki sınıflandırılması aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

Superkingdom	Eukaryota
Kingdom	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Class	Zoomastigophorea
Order	Diplomonadida
Suborder	Diplomonadina
Family	Hexamitidae
Genus	<i>Giardia</i>

Parazitin tür ayırımında önceleri trofozoitin şekil ve boyutları, konak özgüllüğü ve orta cismin morfolojisi göz önünde tutularak, 40 kadar tür ismi belirlenmiştir. Daha sonra ise bu 40 türün orta cisim ve trofozoitinin şekil ve büyüklüğüne bağlı olarak 3 grupta toplanabileceği kararlaştırılmıştır. Son zamanlarda ise bu üç gruba yenileri eklenmiş ve *Giardia* cinsine ait tür sayısı 6'ya çıkarılmıştır. *Giardia* cinsine ait bilinen tür ve belirleyici özellikleri aşağıda özetlenmiştir (99).

Tür	Yerleştiği konak	Belirleyici özellikler
<i>Giardia duodenalis</i>	Omurgalılar	Pençe şeklinde orta cisim
<i>Giardia agilis</i>	Amfibiler	Çomak şeklinde orta cisim
<i>Giardia muris</i>	Kemirgenler	Yuvarlak, küçük orta cisim
<i>Giardia intestinalis</i>	İnsan	Pençe şeklinde orta cisim
<i>Giardia psittaci</i>	Kuş	Pençe şeklinde orta cisim
		Yandan basık kenarlı trof.
<i>Giardia ardae</i>	Muhabbet kuşu	Damla şeklinde nükleus
	Büyük mavi balıkçıl	Tek kuyruk kamçısı

Değişik soy ve tür adları ile tanımlanan bu protozoona batı yarımküre ve batı Avrupa'da *Giardia lamblia* veya *G. intestinalis*, Fransa, eski Sovyetler Birliği ve Doğu Avrupa'da ise *Lambliia intestinalis* adı verilmektedir. Ülkemizde ise *Giardia intestinalis* adı öncelik kazanmış ve bu şekilde kullanılmaktadır (99).

Morfoloji

Giardia intestinalis 8 kamçılı bir protozoondur. Parazitin evriminde trofozoit ve kist şekilleri bulunmaktadır (41,46,78,91). Trofozoitler, 10-15 µm uzunluğunda ve 6-10 µm genişliğindedir. Ön ucu geniş ve yuvarlak olup, arkaya doğru gittikçe incelmektedir. Sırt yüzü konvektir. Karın yüzünde vücudun 3/4 ön kısmını kaplayan emici disk denilen bir yapı bulunmaktadır.

Sitoplazması granüllü ve vaküolsüzdür. Emici diskin çevresi çıkıntılı olup ön tarafı liflidir. Ön uca yakın, eşit büyüklükte 2 oval çekirdeği bulunur. Çekirdeklerin tam ortasında çekirdekçikler yer alır. *Giardia* 'nın trofozoitinde mikrotübüller, blefaroplast, emici disk, aksonem yer alırken, mitokondri ve golgi bulunmaz. Son çalışmalarla *G. intestinalis*'in kromozom sayısının 5 olduğu saptanmıştır (6,21,99,112).

Giardia cinsinde genelde tek olan orta cisim *Giardia intestinalis* türünde çifttir. Demirli hematoksilen, trikrom ve Giemsa gibi kalıcı boyalarla boyanmış preparatlarda çekirdek, orta cisim ve kamçıları iyi görülmektedir. Parazitin 4 çift kamçısı bulunur ve kamçıların çıktığı yerlerde 4 çift blefaroplast bulunur. Aksostiller, doğrudan vücudun arka ucuna doğru uzanır, iki kalın çubuk gibi ilerler ve kamçıların arka çiftini oluştururlar (99,125).

Dört çekirdekli kist şekli ise parazitin enfektif olan şeklidir. *Giardia intestinalis* kistleri genellikle oval, 8-12 µm uzunluğunda, 7-10 µm genişliğindedir. Sitoplazması ince granüllü olup, içinde aksonemleri, kamçıları, orta cisimleri ve emici diskin kenarlarını destekleyen fibrilleri bulundurur. Olgunluk derecesine göre çekirdek sayısı 2 ya da 4 adettir (15,16). Kist çeperinin 0.3 µm kalınlığında, ana yapısı N-asetil galaktozamin olan fibröz proteinöz bir yapıdan oluştuğu bildirilmiştir (87). Kistler dış çevre koşullarına oldukça dayanıklı bir yapıya sahiptirler. Nemli ortamlarda haftalarca canlılıklarını sürdürebilirler. Sulu dışkılarda ve idrar örneklerinde bir hafta canlı kalabildikleri ve klorlanmış içme sularında da kistlerinin canlılığını koruduğu gösterilmiştir (62,99).

Giardia intestinalis, insanda ince bağırsağın üst kısımlarına yerleşir. Fare, keme, tavşan, kedi, köpek... gibi hayvanlarda bulunan *Giardia* türlerinin, insanlardaki *Giardia* türünden farklı olduğu düşüncesi yaygındır (63,125).

Parazitin 8 kamçılı ve 2 çekirdekli trofozoitlerinin normal yaşama yeri ince bağırsağın 2/3 ön kısmı (duodenum ve jejunum) olup, parazit burada

villuslar üzerine emici diskleriyle yapışmakta ve 2'ye bölünerek çoğalmaktadır.

Kist formu, trofozoitlerin yuvarlaklaşması ve kist duvarının meydana gelmesiyle ince bağırsaklarda oluşmaya başlar, bu işlem kolonun alt kısımlarında tamamlanır. Kistler dışkı ile dışarı atılırlar. Doğaya atılan bu kistleri uygun bir konak ağız yoluyla aldığı takdirde, midenin asit koşullarında önce kist zarı incelik, yumuşar ve parazit duodenuma geçer. Olgun ve 4 çekirdekli olan bu kistlerin açılmasıyla 2 çekirdekli 2 adet trofozoit, bölünerek açığa çıkar. Trofozoitler bükülerek hareket eder. Şiddetli ishallerde dışkıda da trofozoitlere rastlanabilmektedir (99,125).

Patogenez

Giardia intestinalis'in patojen bir parazit olduğu ancak 1970 li yıllarda anlaşılabilmiştir ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ=WHO) bu paraziti 1981'de patojen parazitler listesine almıştır (123).

G. intestinalis'in neden olduğu patojenitenin mekanizması tam olarak bilinmediği için neden bazı infekte konaklarda infeksiyon oluşturup semptomatik seyrederken, diğer bazı konaklarda asemptomatik seyrettiği açık değildir (108,121).

Birkaç konak türünde *Giardia* ile infeksiyon sonucu villus atrofisi ve kript hiperplazisi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarla, infeksiyonun, ince bağırsağın üst kısımlarında, mukoza yapısına daha fazla zararlı olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca, giyardiyozun, ince barsağın üst kısımlarında villus atrofisine, distalinde ise villusların uzamasına yol açtığı gösterilmiştir. Bu durum *Eimeria acervulina* infeksiyonundaki durum ile diğer parazitik infeksiyonlardakine benzerdir. Gillon, 1982 de, giyardiyozun, farede, ileumda villus atrofisine, jejunumda da villus hipertrofisine yol açtığını ve ikisinin birlikte görüldüğünü bildirmiştir. Villus atrofisiyle sonuçlanan epitelde emilim yüzeyinin azalması durumunun giyardiyoza ishalin başlıca nedeni

olduğu öne sürölmüştür. Bununla birlikte, infekte insan ve kemiricilerde villus atrofi olmadan da klinik belirtilerin ortaya çıkabildiği gösterilmiştir. Böylece, villus atrofinin giyardiyoza tek başına hastalık oluşumunu açıklamadığı ortaya konmuştur (125).

Viral gastroenteritlilerde sindirim bozukluğu ve malabsorbsiyon, epitelin olgunlaşmamış enterositlerle kaplanmasıyla artmaktadır. *Giardia muris* ve *Giardia intestinalis* ile infeksiyonun da bu epitel yenilenmesinde artışa neden olduğu ispatlanmıştır. Bu durum hastalık sırasında görölen kript hiperplazisiyle de ilişkilidir. Bununla birlikte, olgunlaşmamış kript benzeri enterositlerin bir işareti olan timidin kinaz aktivitesi sadece duodenumdan izole edilen enterositlerde artmakta fakat jejunum ve ileumdan izole edilenlerde değişmemektedir. Yine duodenumda, işaretlenmiş disakkaridaz eksikliği meydana geldiği saptanmıştır. Bu durum, ince bağırsağın büyük bir kısmında enterosit olgunlaşmasının infeksiyon nedeniyle etkilenmediğini göstermektedir. Ayrıca giyardiyoza ile ilişkili olan mukozal anormallikler, villus yüzeyindeki olgunlaşmamış epitel hücrelerinin varlığına bağlı değildir. Memeli duodenumunun tüm aktif elektrolit ve su absorpsiyonuna katkısı, ileum ve jejunumla kıyaslandığında, en az olduğu için duodenumdaki ince bağırsak enterositlerinin olgunlaşmasının gecikmesinin giyardiyoza ishalin temel nedenlerinden biri olamayacağı bildirilmiştir (125).

Bağırsak Enzimleri

Bağırsak enzim aktivitelerinin bozulması, giyardiyoza birlikte görölen anormalliklerin başında gelmektedir. Mukozal ve luminal enzimlerin her ikisi de giyardiyoza birlikte bozulmaktadır. Giyardiyoza, mukozal maltaz, sukraz, laktaz, sakkaraz, trehalaz ve alkalın fosfataz aktivitesi önemli ölçüde azalmaktadır. Bu enzimlerdeki eksiklikler hem in vivo hem de in vitro olarak gösterilmiştir ve hatta ölü trofozoitlerin çözünebilir özütleri canlı parazit kadar bu eksikliğe neden olabilmektedir (79,125).

G. intestinalis ile deneysel olarak infekte edilen çöl farelerinde (gerbillerde), trofozoit sayısına bağlı olarak mukozal enzimlerde parazite maruz kalan Caco2 hücre kültürlerindeki kadar önemli bozulmalar meydana gelmiştir. Son çalışmalar, ayrıca enzim yetersizliklerinin inokulumda kullanılan suşa bağlı olduğunu göstermiştir. İnfeksiyon sırasında gözlenen bu bulgular, parazite ve konağa ait faktörlerin mukozal enzim eksikliklerinin oluşumundan sorumlu olduğunu ve bağırsakta kolonize *Giardia* trofozoitlerinin sayısı ve suşunun da infeksiyonun klinik görünümünde etkili olduğunu göstermektedir (125).

Giyardiyozda tripsin, kemotripsin, lipaz ve amilaz gibi luminal enzimler de bozulabilmektedir. Giyardiyozlu çocuklarda yapılan bir çalışmada stimüle olmuş pankreatik lipaz enzimi aktivitesinin azaldığı ve bu durumun yağlı dışkılama ile birlikte devam ettiği gösterilmiştir. İlginç olan bir diğer durum da ölü ya da parçalanmış trofozoitlerin tripsin aktivitesini bozabilmesidir. Giyardiyoz esnasında benzer luminal enzimlerin bozulmasına neden olan mekanizma ise bilinmemektedir (125).

Epitelyal İnce Yapı

Giardia ile infekte konağın ince bağırsak epitel yüzeyinin ince yapısı incelendiğinde bozulmalar gözlenmemiştir. Brush border'a penetre olan trofozoitlerin ventral emici diskinin bulunduğu yerlerdeki mikrovillusların bükülüp kısalmasına neden olduğu kadar glikokalikte de bazı değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. Ancak bu gibi kısıtlı değişiklikler daha önce tanımlanan yaygın ve kalıcı enzim değişikliklerini tam olarak açıklayamamaktadır.

Bununla birlikte infekte ve infekte olmayan kemiricilerin ince bağırsağından elde edilen kesitler TEM (Transmission Electron Micrographs) ile karşılaştırıldığında infeksiyonun yaygın kısalmış epitel mikrovilluslarına neden olduğunu ve ince bağırsak boyunca brush border da yoğun kayıpların meydana geldiğini (özellikle trofozoitlerin yapıştığı bölgelerde) göstermektedir (22,43). Bu gibi değişimler, mukozal villusların uzunluğunda herhangi bir değişiklik olmadığında da gözlenebilmektedir. Üstelik, kemirici duodenumunda parazitik

kolonizasyonun kalıcılığı ile brush border bölgesindeki alanın azalması disakkaridaz eksikliği ile paraleldir. Jejunumda trofozoit yoğunluğu azaldığında, disakkaridaz aktivitesindeki iyileşmeyle birlikte brush borderdaki değişiklikler de kendiliğinden düzelmektedir (43). Saptanan bulgular maddeler halinde şu şekilde özetlenebilir:

- 1- Giyardiyoza mikrovillus yüzey alanının kaybı ince bağırsakta sindirim ve emilimi kısıtlayıcı esas faktördür.
- 2- İnfeksiyon sonucu oluşan mikrovilluslardaki kısalma yeniden düzelebilir.
- 3- Mikrovillusların kısalması trofozoit sayısına paralel olarak artmaktadır.

İntestinal Taşınma

Yapılan son araştırmalarda, *Giardia* infeksiyonu sırasında görülen fonksiyonel değişikliklerle ince bağırsak mukozasındaki morfolojik anormalliklerin birbirine paralel olarak sürdüğü görülmüştür. Giyardiyoza oluşturma çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir hayvan modeli olan gerbillerde, insan *Giardia intestinalis* suşu ile oluşturulan infeksiyon sonucu ince bağırsakta oluşan sıvı, elektrolit ve eriyik halindeki maddelerin taşınmasındaki değişiklikler değerlendirilmiştir. Bu bulgular ışığında, giyardiyozun in vivo olarak, jejunumda glikoz tarafından stimüle edilen Na, Cl ve K absorpsiyonunu bozduğu saptanmıştır (7,125).

Giyardiyoza ishalin patofizyolojisi multifaktöriyeldir ve şöyle özetlenebilmektedir.

- 1- Villus atrofi giyardiyoza hastalığının oluşumuna katkıda bulunabilir. Fakat oluştuğunda tek patofizyolojik faktör değildir.
- 2- İnfeksiyon kript hiperplazisi ve enterosit göç oranında artmaya neden olur. Fakat bu durum ince bağırsağın absorbtif epitel hücrelerinin çoğunun olgunlaşmasında gecikmeye neden olmaz.

- 3- Disakkaridaz ve luminal enzim eksiklikleri giyardiyoza sıklıkla gözlenir ve giyardiyoza sindirim bozuklukları ile sonuçlanan ishalin oluşumuna katkıda bulunur.
- 4- Giyardiyoza, epitel mikrovilluslarının yoğun olarak kısalması yoluyla ince bağırsak brush border yüzey alanının azalmasına yol açar ve bu mekanizma infeksiyon esnasında sindirim bozuklukları ve malabsorbsiyon oluşumu ile ilgilidir.
- 5- İnce barsağın üst kısımlarında besin tarafından stimüle edilen su, eriyik madde ve elektrolitlerin malabsorbsiyonu, giyardiyoza ishalin oluşmasının temel mekanizması olarak görülür.

Giyardiyozun patogeneğinde iki faktörden daha söz edilmektedir. Bunlardan birincisi; safra tuzu dekonjugasyonu ve yağ malabsorbsiyonu sonucu bakterilerin fazla çoğalması olup bu durum genellikle infeksiyonla birlikte. İkinci faktör ise; *Giardia* kist ve trofozoitlerinin içinde yaşamını sürdürebilen patojenik endosimbiyontlardır (125).

Giyardiyoza akut ya da kronik ishale yol açabilmekte, ancak diğer türlerde olduğu gibi insanlarda da asemptomatik seyredabilmektedir. İnfeksiyon esnasındaki semptom çeşitliliği kısmen konağın immun durumundaki farklılıklara bağlı olabilmektedir. Buna ilaveten suş farklılıkları ve antijenik varyasyon infeksiyonun asemptomatik ya da semptomatik gelişimine katkıda bulunabilmektedir (38,57,98).

Giardia intestinalis karyotiplerinin varyasyonları farklı coğrafik alanlar içinden olduğu kadar, farklı kıtalardan izole edilenler arasında da gösterilmiştir. Yapılan in vivo çalışmalarla farklı *Giardia intestinalis* suşlarının arasında virulans çeşitliliğinin olduğuna işaret edilmiştir. Bu gözlemler ışığı altında farklı *Giardia* izolatlarına maruz bırakılan hücre kültürlerinde disakkaridaz eksikliği gözlenirken, aynı ortama aynı miktarda başka bir suş inoküle edildiğinde değişiklik gözlenmemiştir. *E. histolytica* da olduğu gibi

patojenik ve non-patojenik *Giardia* türlerinin varlığı gösterildiği takdirde semptomatolojideki farklıklar kısmen de olsa açıklanabilecektir (123,125).

Sonuçta infeksiyonun patofizyolojisinin ne kadarının suşa bağlı olduğu ve bazı semptomatik olguların kronikliğinde antijenik varyasyonunun bu duruma ne derece katkıda bulunduğu bilinmemektedir. Suşun biyolojik özelliği ve antijenik varyasyonun in vivo patojenite üzerine katkısı olup olmadığının anlaşılması için daha ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Hastalığın oluşumunda biyokimyasal, immunolojik, patolojik ve genetik özellikler rol oynamaktadır. Özetle *Giardia* 'nın kolonizasyonu ince bağırsakta mukozal anormalliklere neden olmakta, muhtemelen parazite ait excretory/secretary (E/S) ürünlerin salınması ya da konak yanıt faktörlerinin etkisiyle bu anormalliklerin oluştuğu sanılmakta ancak kesin olarak bilinmemektedir. İnfeksiyon sırasında oluşan mukozal yaralanma ince bağırsağın üst kısımlarında en şiddetlidir ve mikrovillusların kısalmasıyla karakterizedir. Bu olay mukozal villusların boyunda oluşan değişimden bağımsız olarak meydana gelmektedir (125).

Ince bağırsakta mikrovilluslar üzerinde epitel hücrelerine yapışan parazit yapmış olduğu mekanik tahrişle burada mukozanın kabarmasına ve epitel tabakasının soyulmasına neden olur. Bazı giyardiyozluların jejunum biyopsilerinde; villusların kısalıp küntleştiği, mukoza epitel hücrelerinin kısaldığı görülür. Bu kişilerde A ve B₁₂ vitaminin emilimi bozulmakta ve avitaminoz gelişmektedir. Ayrıca parazitin sayısının çok arttığı durumlarda mukoza tamamen örtülerek bağırsaktan emilim engellenebilmektedir (99).

Giyardiyozda lümenin daraldığı, ince bağırsaklarda ülserlerin geliştiği olgular bildirilmiş, hatta giyardiyoz ve şiddetli malabsorbsiyon sendromundan ölmüş hastaların otopsi materyallerinde üzeri ağır iltihapla kaplı ülserler saptanmıştır. Ağır *Giardia intestinalis* infeksiyonlarında mukozada akut iltihaplanma gözleendiği, kriptlerde, bazen de villuslarda epitelin bir bölgesinin iltihaplanma özelliklerinde olduğu ve bundan polimorfonükleer lökositler ve

nadiren de eozinofillerin sorumlu olduğu bildirilmiştir (99,125). Ayrıca parazit nadir olarak safra yolları ve safra kesesine yerleşebilmektedir. *Giardia intestinalis*'e bağlanmış sũregen safra kesesi nezlesi ve safra yolları yangısı ve en çok dizi tutan sinovit olgusu da bildirilmiştir (131).

Parazitin uzun sũreli patojen etkisine bağlı olarak, ince bağırsağın ve karaciğerin fonksiyonlarında da önemli bozukluklar ortaya çıkabilir. Ayrıca parazitin metabolik atıklarının ve ölen parazitlerin sindirilerek emilmesi sonucunda da konakta genel toksilerjik reaksiyonlar oluşabilmektedir (99,125).

Salgısal IgA yetmezliği olan hastalarda *Giardia intestinalis*'in neden olduğu reaktif artrit olgusu bildirilmiştir (45,120)

Kronik ishal, kilo kaybı, düşük albümin ve anemisi olan, karaciğer biyopsisi ile kolanjit ve granüloamatöz hepatit tanısı konulan bir hastada *Giardia intestinalis* kistleri saptanmıştır. Hasta giyardiyoz açısından tedavi edildikten sonra alınan ikinci biyopsi örneğinde ise histolojik kesitlerdeki hızlı düzelme dikkati çekmiştir. Granüloamatöz hepatit ve kolanjitin giyardiyozla bağlantılı olarak geliştiği sonucuna varılmıştır (106).

Epidemiyolojisi

Giyardiyoz, tüm dünyada yaygın olarak görũlen bir parazitozdur. Yaşa, iklim koşullarına ve çevresel hijyene bağlı olarak %2-25 veya daha yüksek oranlarda görũlebildiđi bildirilmiştir. Hastalık en çok 6-12 yaş arasındaki çocuklarda görũlmektedir. Özellikle okul çağındaki çocuklarda birbirleriyle olan yakın ve direkt temas infeksiyonun görũlme oranını arttırmaktadır (123).

İnsanları ve bazı evcil ve vahşi hayvanları infekte edebilen yaygın bir parazit olan *Giardia intestinalis*, Asya, Afrika ve Latin Amerika'da yaklaşık 200 milyon insanda bulunmakta ve her yıl 500 bin yeni olgu ortaya çıkmaktadır. Gelişmiş ũlkelerde de giyardiyoz, cryptosporidiyoz ile birlikte sudan bulaşmaları nedeniyle başlıca halk sağlığı sorunlarından biri olarak görũlmektedir. Özellikle

anaokullarındaki ishalleri nedeniyle giyirdiyoz önemi artan parazit enfeksiyonlarından biri olarak değerlendirilmektedir (123).

Fenotipik ve genotipik kriterlerle yapılan çalışmalar insan ve çeşitli hayvan gruplarından alınan *Giardia* izolatlarının iki temel genetik gruptan oluştuğunu ortaya koymaktadır. Tüm dünyada yaygın olarak bulunan bu gruplar farklı ülkelerde farklı adlarla tanımlanmışlardır. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda her genetik grup içerisinde farklı genetik özellikler taşıyan alt grupların varlığı ortaya konmuştur. A grubu adı verilen grup, yapılan araştırmalarda A1 ve A2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. A1 alt grubu tüm dünyada yaygın olarak bulunmakta ve temelde insan ve hayvan izolatlarında görülebilmektedir. Bu nedenle A1 alt grubu zoonotik geçiş potansiyeli açısından önem taşımaktadır. A2 alt grubu ise yalnızca insan izolatlarında bulunmaktadır. B grubu çoğunlukla insanlarda bulunmakla birlikte bu gruba bazı hayvan genotipleri de dahil edilmiştir. B grubundaki çeşitliliğin A grubuna göre daha fazla olması ve alt genotipler arasında A grubundakilere kıyasla daha büyük genetik farklılıklar olması, B grubunun A grubundan daha eski olduğunu düşündürmektedir (123).

Halk sağlığı açısından bakıldığında Grup A, alt grup A1 ve daha az oranda Grup B genotipleri en yüksek zoonotik geçiş riski taşımaktadır. Ancak farklı konaklarda benzer genotiplerin görülmesi zoonotik geçişin varlığına tek başına kanıt oluşturmamaktadır. Bu konu aynı coğrafik bölgede yaşayan konaklar arası *Giardia* geçişinin dinamiğinin araştırılmasıyla açıklığa kavuşturulacaktır. *Giardia* genotipinin belirlenmesi zoonotik geçişin kanıtlanması ve özellikle salgınlarda enfeksiyon kaynağının belirlenmesi yönünde yardımcıdır.

Yurdumuzda, 1982-1996 yılları arasında bağırsak parazitlerinin belirlenmesine yönelik olarak çeşitli araştırmacılar tarafından yapılmış olan incelemeler *G. intestinalis*'in prevalansı yönünden değerlendirildiğinde % 12.3 oranında bu parazitin saptandığı anlaşılmaktadır. Saptanan oranlar bölgelere göre ele alındığında; İç Anadolu'da %11.1, Doğu Anadolu'da % 7.3,

Karadeniz'de % 9.9, Marmara'da % 7.8, Ege'de % 11.6, Güney Doğu Anadolu'da % 28 ve Akdeniz'de % 10.2 oranlarında *G. intestinalis* bulunmuştur (100).

İmmünoloji

Giardia cinsinde son yıllarda yapılan çalışmalarda; giardin, hücre iskelet proteinleri, ısı-şok proteinleri, yüzey protein lektinleri ve yüksek molekül ağırlıklı çözüner protein antijenleri saptanmıştır. *Giardia* yüzey antijen çeşitliliği kesin olarak gösterilmiş olmakla beraber, bunun infeksiyonun kronikleşmesinden sorumlu olduğuna dair çok az delil vardır. *Giardia*'nın toksin ürettiği güçlü kanıtlara dayanmaktadır ancak bu toksinlerin patogenezdaki rolü hala tartışmalıdır. Parazit mikrovillus enterositlerinin yaygın olarak kısılmasına, mikrovillus enzim aktivitesinin bozulmasına ve besin taşınımının engellenmesine neden olur. Bu, bağırsak mukozasındaki parazitin yaygın toksik salgı etkisi olarak kabul edilmektedir. Trofozoitlerin dorsal ve ventral yüzeyleri boyunca lizozomal vakuollere rastlanmıştır. Bu vakuoller çok iyi tanımlanmamakla beraber, hidrolitik enzimleri içerdiği ve büyük bir olasılıkla toksin olarak adlandırılan moleküllerin burada bulunduğu sanılmaktadır (98,122).

Giardia'lar, infeksiyon süresince konağın tepkilerine karşı, VSP (Variant Surface Protein) denilen temel yüzey antijenlerindeki sürekli antijenik değişiklik yoluyla hayatta kalmayı başarmaktadırlar. Olağanüstü değişik büyüklükte olabilen bu değişken yüzey antijenleri sistince zengin proteinlerin tek formudur (92,95).

Giardia suşlarının virülans farklarından dolayı insanlarda değişen düzeylerde direncin geliştiği düşünülmektedir. Giyardiyozun oluşması, immün sistemi baskılayan ilaçların alınması, IgA eksikliği, hipogammaglobulinemiyle ve mide asiditesinin azalmasıyla kolaylaşmaktadır (40,96,120).

Giardia trofozoitlerinin eliminasyonunda temel olarak humoral immünite rol oynamaktadır (120,125,132). Parazitin ortadan kaldırılmasında sellüler immüitenin fazla bir etkisi yoktur. *Giardia* ile infekte kişilerde parazitin eliminasyonu fazında serum ve bağırsak mukoza antikor seviyelerinde artış görülmektedir. Bu kişilerde parazitin yüzey ve sitozolik antijenlerine karşı antikor gelişmektedir. Doğal infekte kişiler ve deneysel olarak infekte edilmiş sıçanlarda infeksiyondan ortalama 10 gün sonra kanda ve bağırsak mukozasında *Giardia* 'ya özgü IgM tipi antikorlar gelişmektedir. Bundan 1 hafta sonra ise IgG ve IgA seviyeleri yükselmektedir. Koyun, kedi ve köpeklerde ise IgG ve IgA antikorları oluşmamaktadır. Bu durumun, konağın *Giardia* antijenlerini tanıma yeteneğinin azlığına veya IgM den IgA ve IgG ye geçişte bir bozukluğa bağlı olabileceği bildirilmiştir. Antikor ilişkili immün yanıt ile *Giardia* kist ve trofozoitlerinin ortadan kaldırıldığı hatta oluşan kistlerin canlılığını kaybettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (98).

İnsanlarda bu parazite karşı koruyucu bağışıklık tam olarak gösterilmemişse de bağışık yanıtın varlığını destekleyen bulgular bulunmaktadır. Giyardiyoza humoral bağışıklığın çok önemli bir rol oynadığının en büyük kanıtı hipogamaglobulinemili kişilerde görülen yüksek prevalansdır. Bağışıklığın baskılandığı durumlarda da kronik giyardiyoza eğilim artmaktadır (98).

Giyardiyoza hastalarda serum immünoglobulin düzeyleri kesin olarak belirlenmemektedir, serum immunglobulin düzeyleri hipogamaglobulinemi, diğer immün yetmezlik veya bozukluklu bulunanlar dışında çoğu hastada normal bulunmaktadır. AIDS' li ve 14'ü giyardiyoza toplam 29 hastada yapılan bir çalışmada, sadece bir hastada IgM antikorları pozitif bulunmuştur (125).

Giyardiyoza hastalarda *Giardia intestinalis*'e karşı IgM oluşmakta ve 2-3 hafta içerisinde belirli bir yüksekliğe ulaştıktan sonra hızla gerilemektedir. IgG tipi antikorlar ise, daha geç oluşmakta ve primer infeksiyondan sonra kalıcı olmaktadır (99,125).

Salgısal IgA'nın giyardiyozu önlediği düşünülse de, bu durum, çoğunlukla, IgG eksikliği olan belirtili infeksiyonlarda tesbit edilmiştir. Yine salgısal IgA antikoru anne sütü ile çocuğa geçtiği için süt emen çocuklar *Giardia intestinalis* infeksiyonuna karşı dirençlidir. Giyardiyozlu hastalarda IgM oluşturan, ince bağırsaktaki lamina propriadaki plazma hücrelerinin yüzdesinde ve sayısında artış olduğu belirlenmiştir (10,124).

Fare modelinde, bağırsaktaki salgısal IgA antikorları, trofozoitlerin ince bağırsağa yapışmasını ve tutunmasını önlemektedir. Bu önlemeyi aglütinasyonla, trofozoitlerin hareketlerini bozmakla veya yapışmada rol alan yüzey reseptörleriyle ilişki kurmakla yaptığı sanılmaktadır. Buna karşın, parazitin vücuttan atılmasında; lenfosit, makrofaj ve mast hücrelerinden oluşmuş hücre topluluklarının rol aldığı düşünülmektedir.

Tanısı

Giyardiyozun tanısı temel olarak üç şekilde yapılabilmektedir.

1. Etkensel tanı: Dışkı örneğinde parazitin kist ya da trofozoit formunun görülmesi ile tanı konur.
 - a. Serum fizyolojik yöntemi
 - b. Lugol (iyot) yöntemi
 - c. Çoğaltma yöntemleri: Daha fazla miktarda dışkı incelemesini mümkün kılan ve kistlerin görülme şansının artmasını sağlayan bir yöntemdir.
 - MIFC(Merthiolat-Formaldehit Konsantrasyon yöntemi)
 - Ritchie'nin Formaldehit- Eter Yöntemi
 - Otto'nun çinko sülfat ile yüzdürme yöntemi: En sık olarak kullanılan yöntemdir.
 - d. Boyama Yöntemleri: Giemsa, trichrome, demirli hematoksilen, vs

- e. Duodenal sıvının incelenmesi
- f. Entero- Test
- g. Biyopsi materyalinin incelenmesi

2. Kültür yöntemleri

Giardia intestinalis' in kültürü son yıllarda gerçekleştirilmiş olmasına karşın konuyla ilgili çalışmalar oldukça eskidir. İlk başarılı kültür Karapetyan (1960) tarafından triptik et zeti, serum, civciv embriyo zeti, Hank's solüsyonu, antibiyotik ve canlı *Candida guilliermandii* eklenen bir besiyerinde yapılmıştır (67). Burada trofozoitler direkt olarak besiyerine ekilmiştir. Meyer 1965 yılında Karapetyanın tekniğini modifiye ederek tavşan ve iniladan aldıkları *Giardia* trofozoitlerinin kültürünü yapmayı başarmıştır (87).

Meyer 1976 da yeni bir besiyeri tarif etmiş ve bu besiyerinde (HSPI) giyardiyozlu bir kadının duodenum sıvısından aldığı trofozoit formundaki parazitleri üretmeyi başarmıştır (88). Sonraları bu besiyerinin modifikasyonlarını da yapmıştır (86). Visvesvera (1980), Meyerin HSP-2 besiyerinde üretmekte olduğu suşu alarak Diamond'un TPS-I besiyerine alıştırmıştır (135).

Karapetyan'dan başlayarak 1979 yılına kadar sözü geçen besiyerlerinde oluşturulan kültürler duodenum sıvısından elde edilen trofozoitlerin ekilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Bingham ve Meyer'in (1979) *Giardia intestinalis* kistlerinin düşük pH'lı çözeltelerde in vitro ekskistasyonunu gerçekleştirmesinden sonra, Giyardiyozlu hasta dışkılarında saflaştırılan kistlerin, ekskistasyonu takiben in vitro aksenik kültürleri de başarıyla yapılabilmemiştir (89). Bu yolla giyardiyozlu kişilerden elde edilen suşların çeşitli özellikleri, patojenik karakterlerinde farklılıklar olup olmadığı da araştırılmaya çalışılmıştır. *Giardia intestinalis*

kistlerinin ekskistasyonu amacıyla çok sayıda ekskistasyon yöntemi bildirilmiştir (23,71,104,113,114,126).

Renton ve arkadaşları (1986) L- cysteine ve sığır safrasını TPS-1 besiyerine ilave ederek *Giardia* kistlerinin ekskistasyonunu gerçekleştirmişlerdir (103). Günümüze kadar bu besiyerleri ve bunların pek çok modifiye şekli olan besiyerleri (GI Medium, BI-S-33, HSP3 ,TPS 1 ,TYI-S-33 , HSP₃) parazitin kültüründe kullanılmıştır (11,13,14,20,33,34,39,55,60,69,82,102,107).

3. İndirekt tanı yöntemleri

Antikor aramaya yönelik yöntemler

- a. ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay)
- b. IFA (İndirekt Floresan Antikor)
- c. KBD (Kompleman Birleşmesi Deneyi)
- d. GID (Jel İmmün Diffüzyon) (131)
- e. CIE (Counter Immun Elektroferez)

Antijen aramaya yönelik yöntemler

- a. ELISA
- b. DOT-ELISA
- c. RIA (Radio-Immunoassay)
- d. PCR (Polimerase Chain Reaction)

Yapılan pek çok çalışmada ELISA yöntemi kullanılarak hem *Giardia*'ya özgü antikorlar hem de *Giardia* antijenleri saptanmış ve bu yöntemin oldukça spesifik ve duyarlı olduğu gösterilmiştir (19,108,129).

Giardia intestinalis'e karşı oluşan antikorların saptanmasına yönelik çalışmalarda en sık olarak kullanılan yöntem IFA yöntemidir. Yapılan pek çok çalışma ile bu yöntemin giyardiyozun serolojik tanısında kullanılacak güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir (3,42,119,134,137).

Giardia'nın genetik yapısını aydınlatma çabalarında in vitro çoğaltma metodları yetersiz kalmıştır, çünkü, özellikle, hayvan orjinli *Giardia* izolatları in vitro gelişime karşı dirençlidir. PCR yönteminin kullanımıyla in vitro kültürlerle gereksinim kalmamış ve daha önce belirlenemeyen genotipler belirlenebilmiştir (99,125).

Giardia kistlerinin tayininde PCR ve IFA arasında % 100 lük bir korelasyonun saptandığı ve bu korelasyonun *Cryptosporidium* için daha az olduğu bildirilmiştir. PCR'ın *Giardia* açısından su örneklerinin analizi için çok uygun bir yöntem olduğu ortaya konmuştur (83).

Tedavisi

Giyardiyozun tedavisinde semptomatik ve ilaçla olmak üzere iki tedavi protokolü uygulanır. Semptomatik tedavide çocuklarda demir eksikliği varsa demirli preparatlar, B vitamini eksikliği varsa B vitamini kompleksleri, folik asit eksikliği varsa folik asit ve proteinden zengin diyet uygulanır. Sadece proteinden zengin diyetle dışkıda kistlerin kaybolduğu bildirilmiştir (99).

İlaçla tedavide ise, 9- Aminoacridine türevleri (Atabrin), Nitroimidazol türevleri (Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol, Niridazol ve Secnidazol), Nitrofuran türevleri (Furazolidon) kullanılmaktadır (28,125).

Deneme safhasında olan ilaçlar arasında ise, antibakteriyel aminoglikozitler (Paromomisin), makrolid grubu antibiyotikler (Eritromisin, Azitromisin), Tetrasiklinler, Diamidinler ve benzimidazol türevi ilaçlar bulunmaktadır.

Aşı Çalışmaları

Giardia genotipleri üzerinde yapılan araştırmalarda elde edilen bulgular özellikle *Giardia* aşı çalışmalarına temel oluşturmaktadır. *Giardia* aşı çalışmalarının bir diğer temeli ise giyardiyozun kliniğine bağlıdır. Su kaynaklı salgınlarda ve hayvan-insan bulaşında önem taşıyan giyardiyozun kliniği asemptomatik olgulardan, gastrointestinal sistem hastalıkları veya allerjik

hastalıklara kadar değişkenlik göstermektedir. Özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde kronik infeksiyon oluşabilirken, endemik bölgelerde yaşayan kişilerde giyardiyoza karşı kısmi direnç geliyor olması aşılama çalışmalarının bu parazitozun kontrolünde etkili olabileceğini düşündürmüştür. Giyardiyoza immünoproflaksinin öncelikle yüksek risk taşıyan doğal çevrenin kontaminasyonunun azaltılması amacıyla kullanımı öngörülmektedir. Veteriner hekimler de evcil hayvanlar arasında oldukça sık görülen ve zoonotik bulaş riski taşıyan *Giardia* türlerine karşı aşıya ihtiyaç duymaktadır.

Farklı memeli türlerinden gelmiş olsa da *Giardia* izolatlarındaki proteinlerde homojenlik ortaya konmuştur. Proteinlerdeki homojenlik *Giardia* genomundaki varyasyonla korelasyon göstermemektedir. Yüksek molekül ağırlıklı membrana, hücre iskelet yapısına veya sitozole ait yapılar daha immunojenik oldukları için aşı çalışmalarına uygun antijendir. Bunlardan sitozole ait antijenler parazitin yüzeyinde bulunabildikleri ve antitoksin aktivitesi gösterdikleri için *Giardia* aşısında önem taşımaktadırlar. Tüm hücre kullanılarak hazırlanan antijenlerle immunize edilen insanlar ve hayvanlar doğal veya deneysel olarak infekte olduklarında pek çok *Giardia* izolatlarına ait ortak antijenlere karşı yanıt geliştirmektedirler. Bu sonuç bir çeşit suştan hazırlanan aşının diğer suşlarla çapraz reaksiyon verebileceğini düşündürmüştür. Yapılan bir çalışmada tek bir suşla aşılanan hayvanların farklı suşlara karşı bağışıklık kazandığı gösterilmiştir (98). Parçalanmış trofozoitlerden hazırlanan aşılar besiyeri ekstraktlarından hazırlananlara göre daha başarılı olmuştur. BALB/c farelerle yapılan bir başka çalışmada ise intraperitoneal immunizasyon sonrası *Giardia muris*'e maruz bırakılan fareler % 80 oranında bağışıklık kazanmıştır. Kontrol grubundaki farelerin dışkılarında 8 hafta boyunca kist görülmesine rağmen immunize edilen farelerin dışkılarında kiste rastlanmamıştır (98).

Farklı bir takım çalışmalarda da elde edilen benzer sonuçlar ticari bir *Giardia* aşısının üretimine imkan tanımıştır. Fort Dodge Hayvan Sağlığı, Overland Park, Kansas, A.B.D.'de hazırlanan bu ticari *Giardia* aşısı (*Giardia*

VaxTM) Amerika'da köpek ve kedilerde kullanım için lisans almıştır. Yapılan bir çalışmada köpeklerin % 97'sinde aşıyla ilişkili lokal veya sistemik reaksiyonlar görülmediği bildirilmiştir (98).



GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Toplanması: Çalışmalarımızda kullandığımız giyardiyoZlu hastaların dışkı ve kan örneklerini Sivas'ın merkez köylerinden olan Güney Köyü İlköğretim Okulu öğrencileri arasında yaptığımız bağırsak parazitleri taramasından elde ettik. Bu amaçla toplam 117 çocuktan dışkı örnekleri ve *Giardia intestinalis* kisti saptanan 35 çocuktan da kan örnekleri alındı. GiyardiyoZlu hastaların sayısı Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran çocuk hastalardan alınan dışkı örnekleri ile 50 ye tamamlandı.

GiyardiyoZlu olduğu saptanan toplam 50 hastanın ve kontrol grubunu oluşturacak olan ve herhangi bir parazite rastlanmayan 45 kişinin dışkıları direkt olarak incelendi. Bu dışkı örnekleri, ELISA yöntemiyle *Giardia intestinalis* antijenlerini saptamada kullanılmak üzere % 10 luk formalin içine alındı ve kullanılıncaya kadar oda ısısında bekletildi.

Yine giyardiyoZlu 35 hastadan alınan kan örneklerinin serumları ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C de saklandı.

Çalışma başlıca üç farklı aşamada yapılmıştır:

- Kültür çalışmaları
- Patogenez çalışmaları
- Tanı

Kültür çalışmaları

Giardia intestinalis'in in vitro kültürünü yapabilmek için öncelikle parazitin kist formunun bol olarak bulunduğu dışkılar elde edildi. Bu sağlandıktan sonra kistlerin dışkıdan saflaştırılması işlemi gerçekleştirildi. Kistlerin saflaştırılmasında, Louise - Anne Buchel ve arkadaşlarının kullandığı yöntem uygulandı (23).

Kistlerin saflaştırılması: Bol *Giardia intestinalis* kisti bulunan dışkı örnekleri öncelikle çeşme suyu ile 1/10 oranında sulandırıldı ve iyice homojenize

edildikten sonra 3-4 katlı gazlı bezden süzüldü. Daha sonra 0.75 M sukroz çözeltisi hazırlanarak 3'er ml olacak şekilde santrifüj tüplerine dağıtıldı. Bunun üzerine 3 ml sulandırılmış dışkı süspansiyonundan çok yavaş bir şekilde bir pipet yardımıyla dağıtıldı. 1500 rpm de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra su-sukroz interfazından kistler bir pastör pipetiyle toplandı. Toplanan kistler 1/10 oranında damıtık suyla sulandırılıp 5 dakika santrifüj edildi. Pelet yeniden 0,75 M sukroz üzerine dağıtılıp sukroz-gradient uygulandı. Kistler yeniden su-sukroz interfazından toplandı ve çöküntü tekrar sulandırıldı. Bu şekilde en az 3 kez yıkandı. Saflaştırılan kistler kullanıncaya kadar +4 °C de damıtık su içinde saklandı.

Giardia intestinalis'in in vitro ekskistasyonunu yapabilmek için saflaştırılan kistler öncelikle bir indükleme solüsyonunda belli süre tutulmakta daha sonra ise yıkama işlemine geçilmektedir. Yıkama işleminde de yine kistler belli süre yıkama solüsyonlarında tutulmaktadır. Tüm işlemlerden sonra kistler hazırlanan uygun besiyerine inoküle edilmektedir.

Çalışmamızda indükleme, yıkama ve inkübasyon aşamalarında çeşitli solüsyonlar ve besiyerleri denendi. İndükleme aşamasında pepsin-asit solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyonun içeriği ve hazırlanışı aşağıdaki şekildedir.

Pepsin asit solüsyonu:

Na H CO ₃	25 mM
KCl	12 mM
NaCl	40 mM
Pepsin	1500 U/ml

pH, HCl ile 2 ye ayarlandı. 0,5 ml saflaştırılmış kist süspansiyonu (4×10^6 kist /ml) üzerine 5 ml pepsin-asit solüsyonu eklendi. Pepsin-asit solüsyonuna alınan kistler 37°C de 1 saat inkübe edildi.

Yıkama aşaması; Bu aşamada tripsinin, Tyrode solüsyonu içinde %0,5 lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti hazırlandıktan sonra, süzgeç kağıdından süzüldü. 600 x g de 15 dakika santrifüj edildi ve pH: 8 e ayarlandı.

İnkübasyon aşaması; Bu aşamada 5 farklı besiyeri kullanıldı.

a. HSP₃ besiyeri:

Triptikaz (BBL)	1.0 gr
Glukoz	0.5 gr
L-sistein hidroklorid	0.2gr
Damıtık su	42.5 ml
Hank's solüsyonu	42.5 ml

pH 6.8 `e ayarlandı. 10 dakika 121 °C de otoklavlandı. Otoklavdan çıkarılıp soğutulduktan sonra süzülerek steril edilmiş 10 ml sığır serumu eklendi. Ayrıca 5 ml vitamin 18 eklenerek 100 ml ye tamamlandı. Yine 250 mg/ml Streptomisin, 50µg/ml Gentamisin ve 250 IU/ml Penisilin eklendi. 16x1.5 cm lik vidalı kapaklı steril tüplere % 80 kapasiteyle dağıtıldı. Besiyerlerinde kullanılan vitamin 18 yerine NCTC 135 kullanıldı.

b. TYI S 33 besiyeri

Bu besiyerinin içeriğinde aşağıdaki kimyasallardan oluşmaktadır:

K ₂ HPO ₄	100 mg
KH ₂ PO ₄	60 mg
Triptikaz	2 gr
Maya özütü	1 gr
Glukoz	1 gr
NaCl	200 mg
L-sistein hidroklorid monohidrat	200 mg
L-Askorbik asit	20 mg
Demir amonyum sitrat	2.28 mg
Susuz sığır safrası	50 mg

Damıtık suyla 80 ml'ye tamamlanıp, pH 7 ye ayarlandı.

İnaktive sığır serumu	10 ml
-----------------------	-------

Vitamin 18

10 ml eklenerek,

Zeiss filtresinden (0.45 milipordan) süzülüp steril edildi. 16x1.5 cm lik vidalı kapaklı tüplere % 80 kapasiteyle dağıtıldı.

c. BİS-33 besiyeri:

Triptikaz	2 gr
Maya özütü	1 gr
Glukoz	1gr
NaCl	0.2 gr
L-sistein hidroklorid monohidrat	0.2 gr
Askorbik asit	0.02 gr
Susuz sığır safrası	0.06 gr
Demir amonyum sitrat	2.3 mg
KH ₂ PO ₄	0.1 gr
Inaktive fötal dana serumu	10 ml
Penicilin-G	10 ⁴ Ünite
Streptomisin sülfat	10 mg .
Gentamisin sülfat	5 mg
Damıtık su	80 ml
NCTC 135	10 ml

Serum eklenmeden pH 7-7.2 ye ayarlandı, filtrasyonla steril edildi.

d. TPS-1 besiyeri:

Bu besiyerinin içeriğinde bulunan Panmade (öküz karaciğer hidrolizati) yurtdışında bulunamadığı için bu madde yurtdışından Prof. Dr. Gülendame SAYGI tarafından temin edilmiştir. Besiyerinin içeriği aşağıda belirtildiği şekildedir.

Triptikaz	1.0 gr
Panmade	2.0 gr

Glikoz	0.50 gr
L-sistein hidroklorid monohidrat	0.1 gr
Askorbik asit	0.02 gr
NaCl	0.5 gr
Potasyum fosfat monobazik	0.06 gr
Potasyum fosfat dibazik	0.1 gr
Damıtık su	87.5 ml

pH 7 ye ayarlandı, filtre edilerek steril edildi; 10 ml steril sığır serumu ve 2.5 ml NCTC 135 eklendi.

Kültür çalışmaları sırasında İsviçre'den Dr. Norbert Mueller, *Giardia intestinalis*'in WB suşunu gönderdi. Bu suşun üretilmesinde ise *Giardia lamblia* medium (GI) isimli bir besiyerini hazırlamamızı önerdi. Mueller'in önerdiği GI besiyerinin içeriği aşağıda verildiği gibidir:

e. GI besiyeri

Kazein	2 gr
Maya özütü	1 gr
Glikoz Monohidrat	1 gr
NaCl	0.2 gr
K ₂ HPO ₄	0.1 gr
KH ₂ PO ₄	0.06 gr
L-sistein hidroklorid monohidrat	200 mg
L-Askorbik asit	20 mg

Tüm maddeler 80ml damıtık su içerisinde çözüldü ve NaOH ile pH. 7-7.2 ye ayarlandı.

Penisilin/Streptomisin	1 ml
Erişkin sığır serumu	10 ml
Demir amonyum sitrat (purum)	100 ml

Susuz sığır safrası

52 mg

100 ml ye damıtık su ile tamamlandı ve filtre ile steril edildi.

GI besiyeri hazırlandıktan sonra WB suş undan steril vidalı kapaklı küçük cam tüplere ekim yapıldı. Bu besiyerinin yanı sıra, TPS 1, TYI-S-33, HSP₃ ve RPMI 1640 besiyerine % 10 FCS, 1 ml penicilin ve 1ml NCTC 135 eklendi ve bu ortamda direkt olarak trofozoitlerin kültürleri denendi.

Mueller tarafında ikinci kez *Giardia intestinalis* GS/M-83-H7 suşu gönderildi. Gelen parazitin kültüründe aşağıdaki besiyerleri denendi.

- RPMI/1640 + %10 FBS+ 1ml NCTC 135
- GI Medium
- BI-S-33 besiyeri
- HSP₃ besiyeri
- Mc Coy besiyeri+ %10 FBS+ 1 ml NCTC 135

Ekskistasyon aşamasında uyguladığımız yöntemlerden bir kısmı literatürde geçen yöntemler olup bir kısmı da tarafımızdan modifiye edilmiş yöntemlerdir. Bu ekskistasyon yöntemleri kısaca bulgular kısmında özetlenmiştir.

Patogeneze çalışmalarını

Çalışmamızın ikinci aşamasında bazı deney hayvanlarına (fare, keme, tavşan, kedi ve köpek) *Giardia intestinalis* kistleri ağızdan verilerek bu hayvanlarda infeksiyon oluşturulmaya çalışıldı. İnfeksiyon gelişen hayvanlarda oluşan patolojik değişiklikler incelendi.

Çalışmayı 3 grup altında toplamak mümkündür:

- I. Grup: Bu grupta *Giardia intestinalis* kistleri deney hayvanlarına gavajla direkt olarak verildi
- II. Grup: Bu gruba ait hayvanlara belli oranlarda kortizon (IM) uygulandıktan sonra kistler verildi.
- III. Grup (kontrol grubu): Bu gruptaki hayvanlara hiçbir şey uygulanmadı.

I. Grup:

- a. Çalışma başlamadan 10 gün önce tüm hayvanlar Metronidazol ile tedavi edildi (20 mg/gün olacak şekilde 3 gün).
- b. Çalışmaya 15-20 günlük fare, 3-6 haftalık keme, 8 haftalık tavşanlar ve 1,5 aylık kedi ve köpek yavruları alınmıştır.
- c. Her bir grupta yer alan hayvanlar tek tek ayrı kafesler içine konuldu ve 3 gün boyunca 7×10^7 kist/ ml olacak şekilde kistler verildi.
- d. Kistler verildikten sonra yaklaşık 25 gün boyunca her gün dışkı incelemesi yapıldı.
- e. Günlük atılan kist sayıları hesaplanarak en fazla kistin ne zaman atıldığı saptandı.
- f. İnfekte olmayan yani kist atımı olmayan hayvanlar ikinci haftadan itibaren öldürülerek, ince bağırsakları çıkarıldı ve % 10 luk formaline alındı.
- g. İnfekte olan hayvanlar 25. günde sakrifiye edildi. Daha sonra ince bağırsakları çıkarılarak üç kısma ayrıldı ve bu kısımlar kesitler alınmaya kadar % 10 luk formalin içinde saklandı.

Patogenez çalışmaları birinci basamak (Fındık farelerinde giyardiyoz oluşturma çalışmaları):

Çalışmamıza 4 fare ile başlandı ve dışkı incelemeleri yapılan bu farelerde herhangi bir parazite rastlanmadı. Normal grup olarak seçilen farelere 6×10^6 kist/ ml olacak şekilde sukroz yoğunluk yöntemi ile saflaştırılmış *G. intestinalis* kistlerinden 2-3 damla yani yaklaşık 0.5 ml (sabah akşam olmak üzere 3 gün) verildi. Çalışmada 20 günlük erkek fındık fareleri kullanıldı. İlk gün dışkı kontrolü yapıldı ve bunu izleyen günlerde dışkı incelemesine devam edildi. 20 gün boyunca yapılan incelemelerde kist atımına rastlanmadı. Bunun üzerine farelere ikinci kez yeniden (6×10^6 kist/ml) kistlerden verildi. Yirmi iki gün sonra ilk fare sakrifiye edildi ve ince bağırsağı alınarak 3 eşit parçaya

bölündü. Bağırsak içeriği kazındı ve incelendi; *Giardia* kist ya da trofozoitlerine rastlanmadı. Aynı işlemler diğer 3 fareye de uygulandı ve 4 fareden birinin doğal *Giardia* enfeksiyonuna sahip olduğu görüldü.

Patogenez çalışmaları ikinci basamak (Kemelerde giyardiyoZ oluşturma çalışmaları):

Sütten yeni kesilmiş 4 erkek keme alındı ve farelere uygulanan işlemlerin aynısı uygulandı, ancak belli bir süreden sonra kemelerde nematod enfeksiyonu geliştiği halde giyardiyoZun oluşmadığı görüldü. Bunun üzerine hayvanların kafeslerinden yemine, suyuna, hatta talaşına kadar her şey steril edildi ve yeni bir grup alınarak metranidazol (2mg/kg) ile tedavi edildi. Kemelere, önce ağızdan daha sonra gavaj yoluyla saflaştırdığımız kistlerden (6×10^6 kist/ml) verildi. Kemelerden biri 7 gün sonra enfekte oldu ve kist atmaya başladı. 21 gün sonra bu keme sakrifiye edildi. Ancak daha önce kalbinden kan alınarak serumu ayrıldı ve saklandı. Daha sonra keme açıldı ve duodenumdan itibaren ince bağırsak çıkarılarak üç parçaya ayrıldı. Bunlardan yayma preparatlar hazırlanarak Giemsa ile boyandı. Bağırsaklar %10 luk formaline alındı ve histopatolojik incelemeler için saklandı.

Patogenez çalışmaları üçüncü basamak (Tavşanlarda giyardiyoZ oluşturma çalışmaları):

8 haftalık erkek tavşanlara diğer gruptaki hayvanlara uyguladığımız şekilde *Giardia* kistleri verildi. Tavşanların hergün dışkı incelemesi yapıldı. Ancak kist atımı olmadı bu yüzden hayvanlar sakrifiye edilmedi.

Yaklaşık 1,5 aylık kedi ve köpeğe de kistler verilerek giyardiyoZ oluşturma çalışmaları uygulandı ancak bu hayvanlarda da enfeksiyon geliştirilemedi.

Çalışmada , her bir hayvan grubu için farklı suşlar kullanıldı.

II. Grup:

Çalışmamızın bu aşamasında 4 yavru fareye 2mg/ kg olacak şekilde dexamethasone uygulandı (IM). Bu işleme 5 gün devam edildi. Daha sonra farelere gavajla saflaştırılmış kistlerden 6×10^6 kist/ ml olacak şekilde verildi (3 gün sabah akşam). Ertesi günden itibaren yaptığımız dışkı incelemeleri sonucunda *Giardia* kist ya da trofozoitlerine rastlanmadı. Kistlerin verilmesinden 25 gün sonra tüm fareler sakrifiye edildi, ince bağırsak üç kısma ayrılarak % 10' luk formaline alındı ve kesitler yapıncaya kadar oda ısısında saklandı. Yeni bir grup fare alınarak yeniden aynı işlemler uygulandı.

Farelerdeki çalışmaların ardından kemelere de şu işlemler uygulandı.

- Sütten yeni kesilmiş 4 erkek keme alındı ve metronidazol ile tedavi edildi. Tedavi sonrası dışkı incelemesi yapılarak parazitolojik açıdan incelendi.
- 5 gün boyunca 2 mg/kg olacak şekilde dexamethasone (IM) verildi.
- Kortizon uygulamasını takiben 2 gün sonra saflaştırdığımız kistlerden gavaj yoluyla kemelere verildi (7×10^7).
- Hayvanların dışkı incelemesi yapılarak kist atımı olup olmadığı araştırıldı. İnfeksiyon ilk aşamada oluşturulamadı.

Kortizonlu kemede yapılan işlemler başka bir grup kemede yeniden tekrarlandı. Yapılan dışkı incelemeleri sonucunda kortizon uygulanan kemelerden birinin 4 gün sonra kist atmaya başladığı saptandı.

Kist atımından yaklaşık 25 gün sonra kemenin öncelikle serum antikorlarının IFAT yöntemiyle saptanması amacıyla kalbinden kan alındı ve daha sonra kesildi. Kemenin ince bağırsağı çıkarıldı ve üç kısma ayrıldı. Bu üç kısmın hem bağırsak içeriği hem de kazıntı materyali incelendi. Her üç parçadan bir kısım histopatolojik incelemeler için % 10'luk formaline alındı.

Trofozoitin bol olduğu kısım Hanks' solüsyonu ile yıkandı TPS1 besiyerine alındı. Ancak kültürler ertesi gün incelendiğinde canlı trofozoitler görülmezken ölü trofozoitlere rastlandı.

III.Grup:

Kontrol grubunu oluşturan hayvanların da ince bağırsakları çıkarıldı ve histopatolojik incelemeler için % 10 luk formaline alındı.

Giyardiyozun tanısına yönelik çalışmalar

Sivas'ın merkez köylerinden olan Güney Köyü İlköğretim Okulu öğrencileri arasında yaptığımız bağırsak parazitleri taramasında toplam 117 çocuktan dışkı örnekleri alındı. *Giardia intestinalis* saptanan 35 çocuktan ayrıca kan örnekleri de elde edildi. Giyardiyozlu hastaların sayısı Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi Rutin Parazitoloji Laboratuvarına başvuran çocuk hastalardan alınan dışkı örnekleri ile 50 ye tamamlandı. Elli giyardiyozlu hastanın ve 45 herhangi bir paraziter infeksiyonu olmayan hastanın dışkısı ELISA yöntemiyle *Giardia intestinalis*'e özgü antijenlerin saptanması ve bu yöntemin tanıdaki öneminin araştırılması amacıyla incelendi. Bu amaçla Meridian Premier *Giardia* 550080 (96 Test) kit'i kullanıldı. ELISA yönteminin giyardiyozun tanısındaki özgüllüğü ve duyarlılığı şu şekilde hesaplanmaktadır:

Duyarlılık : Doğru pozitif (DP) / Doğru pozitif (DP)+ yalancı negatif (DN)

Özgüllük: Doğru negatif (DN)/ Doğru negatif (DN) + yalancı pozitif (YP)

Pozitif sonucun prediktif değeri: DP / DN + YP

Negatif sonucun prediktif değeri: DN / DN + YN

Sonuçların güvenilirliği: DN + DP / Toplam örnek sayısı

IFAT ile serum IgA, IgG ve IgM antikorlarının saptanması

Direkt inceleme ile dışkısında *G. intestinalis* kistleri saptanan 35 çocuktan ve kontrol amacıyla 15 çocuktan kol venasından 5 cc kan örnekleri alındı ve serumları ayrılarak kullanılıncaya kadar -20 °C de saklandı.

IFAT yöntemiyle serum antikorlarının saptanması amacıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

- Giyardiyozlu hastaların dışkılarından 0.75 M lık sukroz solusyonu kullanılarak *G. intestinalis* kistleri saflaştırıldı.

- Teflon çukurlu lamlara %1 oranında yumurta akı ile sulandırılmış, 25µl saflaştırdığımız kistlerden konuldu ve havada kuruması sağlandı böylece kist antijenleri lamlara yapıştırılmış oldu.
- Lamlar kuruduktan sonra saf asetondan geçirilerek tesbit edildi.
- 56 °C de 30 dk inaktive edilen serumlardan bu çukurlara 25 µl konuldu ve nemli bir ortam sağlanarak 37 °C de 30 dakika bekletildi.
- Shaker-etüv de PBS ile lamlar üç kez beşer dakika yıkandı ve lamların kenarları kurutuldu
- Lamdaki çukurlara anti-human IgA (α-chain specific) FITC konjugatından 25 µl kondu ve nemli bir ortam sağlanarak 37 °C de 30 dakika bekletildi.
- Tekrar Shaker-etüv de PBS ile lamlar üç kez beşer dakika yıkandı ve lamların kenarları kurutuldu
- Daha sonra gliserin tamponu damlatılarak floresan mikroskopunda incelendi.

Aynı işlemler IgG ve IgM tipi antikörlerin saptanmasında da kullanıldı. Sadece konjugat damlatma aşamasında çukurlara FITC işaretli anti-human IgG (Fab specific) ve anti-human IgM /FITC konjugatından konuldu.

Daha sonraki işlemlerde ise inaktive edilmiş serumlar PBS ile 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve 1/128 oranlarında sulandırılarak sonuçlar değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmalarımızda elde ettiğimiz bulgular 3 ana başlık altında toplanmıştır.

1. Kültür çalışmaları
2. Patogenez çalışmaları
3. Tanıya yönelik çalışmalar

1. Kültür çalışmalarında elde ettiğimiz bulgular

Sivas'ın merkez köylerinden olan Güney Köyü İlköğretim Okulu öğrencileri arasında yaptığımız bağırsak parazitleri taramasında toplam 117 çocuktan dışkı örnekleri alındı ve bu çocukların 35 inde *G. intestinalis* kisti saptandı. Kist atımı fazla olan hastalardan alınan bol dışkı örnekleri çeşme suyu ile sulandırıldı ve saflaştırma işlemleri yapılmaya kadar buzdolabında +4 °C da bekletildi. Dışkı incelemesi yapılan çocuklarda saptadığımız diğer parazitlerin dağılımı ise şu şekildedir: 5 kişide *Entamoeba coli* kisti, 3 kişide *Hymenolepis nana* yumurtası, 1 kişide *Ascaris lumbricoides* yumurtası ve 1 kişide *Entamoeba histolytica* kisti saptanmıştır.

Kistlerin saflaştırılmasında uygulanan, Louise - Anne Buchel ve arkadaşlarının kullandığı yöntemin en uygun yöntem olduğu kanısına varıldı.

Tablo 1. Saflaştırılan Kistlerin Ekskistasyonunda Uygulanan Değişik Yöntemler ve Bunların Modifiye Şekilleri

<u>İndüklenme aşaması</u>	<u>Yıkama aşaması</u>	<u>İnkübasyon aşaması</u>
1. pH 1.3 HCl	HSP ₃	HSP ₃
2. pH 2 HCl	HSP ₃	HSP ₃
3. pH 2 pepsin-asit	Trypsin-Tyrode	Trypsin-Tyrode
4. % 1 lik pepsin SF	TPS	TPS
5. pH 2 SF	TPS	TPS
6. Asit TPS	Trypsin-Tyrode	TPS
7. pH 2 pepsin asit	Trypsin-Tyrode	TPS
8. pH 2 pepsin-asit	Trypsin-Tyrode	HSP ₃

Birinci yöntemde *G. intestinalis* kistleri pH 1.3 olan HCl ile 10dk muamele edildi. Damıtık su ile 1500 rpm de 5 dk santrifüj edilip HSP₃ besiyerinden bir miktar eklendi, tekrar 1500 rpm de santrifüj edilip yıkandı. Üst sıvı dökülerek yeni HSP₃ besiyeri eklendi. Bu ortamda ilk günü ve ertesi günü incelemelerimizde canlı trofozoite rastlanmadı. Bu yöntemin ekskistasyon için uygun bir yöntem olmadığı belirlendi.

İkinci yöntemde kistler pH sı 2 olan HCl ile 10 dk muamele edildi. Daha sonra damıtık su ile 1500 rpm de 5 dk santrifüj edilip, HSP₃ besiyerinden bir miktar eklendi, tekrar 1500 rpm de santrifüj edilip yıkandı. Üst sıvı dökülerek yeni HSP₃ besiyeri eklendi. Bu ortamda canlı trofozoite ilk günü ve ertesi günü incelemelerimizde rastlanmadı. Bu yöntemin de ekskistasyon için uygun bir yöntem olmadığı saptandı.

Üçüncü yöntemde kistler pH 2 olan pepsin-asit solüsyonunda 60 dk tutuldu. Daha sonra ticari olarak mevcut olan Tripsin-Tyrode solüsyonunda yıkayıp yeniden Tripsin-Tyrode solüsyonuna alındı ve bu ortamda 1 saat 37 °C

de inkübe edildi. İlk inceleme yapıldığında canlı trofozoitlerin olduğu yani ekskistasyonun gerçekleştiği görüldü. Ancak ertesi gün yapılan incelemelerde canlı trofozoit görülmezken ölü trofozoitlere rastlandı.

Dördüncü yöntemde kistler % 1 lik pepsin-serum fizyolojikli ortamda 1 saat 37°C de inkübe edildi. Daha sonra damıtık su ile yıkayıp TPS besiyerine alındı. 30 dk sonra incelendi ve yeni TPS besiyeri eklenerek tüpler yatay olarak inkübe edildi ancak ekskistasyon başarılı olmadı.

Beşinci yöntemde kistler pH 2 olan SF içerisinde 1 saat tutuldu ve üzerine TPS besiyeri eklendi. Yapılan incelemelerde canlı trofozoite rastlanmadı.

Altıncı yöntemde ise benzer çalışmalar yapıldı ve kistlerin ekskiste olduğu görüldü. Ancak ertesi günkü incelemelerimizde trofozoitlerin öldüğü saptandı.

Yaptığımız bu ekskistasyon yöntemlerinden 7. ve 8. no' lu yöntemlerin (Bingham ve Meyer'in (1979) ekskistasyon yönteminin) yani, pH 2 pepsin-asit solüsyonunda indüklenen kistlerin Tripsin-Tyrode solüsyonunda inkübasyonu ve daha sonra HSP₃ besiyeri ortamına alınmasının en uygun ve başarılı ekskistasyon yöntemi olduğu saptanmıştır.

Ekskistasyon aşamasından sonra trofozoitlerin uzun süreli kültürlerinin oluşturulabilmesi amacıyla şu besiyerleri denenmiştir:

- GI Besiyeri
- BI-S-33 besiyeri
- TPS 1 besiyeri
- TYI-S-33 besiyeri
- HSP₃ besiyeri
- RPMI/1640 + %10 FBS+ 1ml NCTC 135
- Mc Coy besiyeri+ %10 FBS+ 1 ml NCTC 135

Eksikte olan trofozoitlerin üretilmesinde en uygun besiyerinin HSP₃ besiyeri olduğu sonucuna varılmıştır. Trofozoitler bu besiyerinde en fazla 27 saat canlılıklarını koruyabildiler, bu süreden daha sonraki incelemelerimizde ölü trofozoitler görülürken canlı trofozoite rastlanmadı.

Yurt dışından temin edilen *G. intestinalis* WB suşunun üretilmesi amacıyla ise; GI besiyerinin yanı sıra, TPS 1, TYI-S-33, HSP₃ ve RPMI 1640 besiyerine % 10 FCS 1 ml penisilin ve 1ml NCTC 135 eklenmiş ortamlar denendi. Her gün trofozoitlerin canlılık durumları inverted mikroskopta gözlemlendi. Trofozoitler en uzun süre (1 hafta) HSP₃ besiyerinde canlılıklarını korurken, RPMI/1640 besiyerinde ise 5 gün canlı kaldıkları gözlemlendi. Mantar kontaminasyonunu önlemek amacıyla kültür tüplerine Triflukan eklendi ancak bir hafta sonra bu suş mantar kontaminasyonundan kaybedildi (Şekil 3-4-5).

Dr Mueller tarafından ikinci kez gönderilen *G. intestinalis* GS/M-83-H7 suşunun kültüründe ise aşağıdaki besiyerleri denendi.

- RPMI/1640 + %10 FBS+ 1ml NCTC 135, GI besiyeri, BI-S-33 besiyeri, HSP3 besiyeri, Mc Coy medium+%10 FBS+ 1 ml NCTC 135

Her bir besiyerine gelen stok kültürden ekim yapıldı. McCoy ve BI-S-33 besiyerinde dört gün canlılığını koruyan trofozoitler RPMI/1640 da beşinci günden itibaren öldüler. HSP₃ besiyerinde ise 10 gün canlı trofozoitler görüldü. GI ortamına ise trofozoitler çok güzel adapte olup çoğalmaya ve monolayer oluşturmaya başladılar. Bu besiyerinde kontaminasyon olmadan 2 hafta parazitin kültürü devam ettirilmiş daha sonra bu trofozoitlerin kryoprezervasyonu denenmiş ve % 7 lik gliserin içinde -70 °C de saklanmıştır.

2. Patogenez çalışmalarında elde edilen bulgular (Tablo 2):

I. Grup:

a. Fındık farelerinde giyardiyoz oluşturma: Normal grup olarak seçilen farelere 6×10^6 kist / ml olacak şekilde sukroz gradient yöntemi ile saflaştırılmış *G. intestinalis* kistlerinden 2-3 damla yani yaklaşık 0.5 ml (sabah akşam olmak

üzere 3 gün) verildi. Çalışmada, 20 günlük erkek findık fareleri kullanıldı. Her gün dışkı incelemesine devam edildi ve kist atımına rastlanmadı. Farelere yeniden gavaj yoluyla kistler verildi ve 22 gün sonra ilk fare sakrifiye edildi ve ince bağırsağı alınarak 3 eşit parçaya bölündü, bağırsak içeriği kazındı ve incelendi; *Giardia* kist yada trofozoitlerine rastlanmadı. Aynı işlemler diğer 3 fareye de uygulandı ve bunlardan birinin doğal *Giardia* infeksiyonuna sahip olduğu görüldü.

Çalışmanın başında ayrıca 2 tane de kontrol faresi alındı ve incelenen tüm farelerin ince bağırsakları % 10 formaline alındı. Sonuç olarak farelerde deneyler iki kez tekrarlandı ancak infeksiyon oluşturulamadı.

b. Kemelerde (Rat) giyardiyo z oluşturma: Dört süttten yeni kesilmiş keme alındı ve farelere uygulanan işlemlerin aynısı uygulandı. Kemelerden biri 7 gün sonra infekte oldu ve kist atmaya başladı. 25 gün sonra bu keme de sakrifiye edildi. Ayrıca sakrifiye edilmeden önce kalbinden kan alınarak serumu ayrıldı ve saklandı. Açılan kemenin duodenumundan itibaren ince bağırsak çıkarıldı ve üç parçaya ayrıldı. Bağırsak içerikleri ve kazıma preparatları incelendiğinde ilk 10 cm lik kısımda bir şey görülmezken 3. kısımda (ileumda) çok yoğun trofozoitlere rastlandı. Bunlardan yayma preparatlar hazırlanarak Giemsa ile boyandı. Bağırsaklar %10 luk formaline alındı ve histopatolojik incelemeler için saklandı.

Daha sonra bu trofozoitler 2 tüp TPS 1ve 5 tüp HSP₃ besiyerine ekildi. Trofozoitler besiyerlerine inoküle edilmeden önce, besiyeri ile yıkandı ve daha sonra ekim yapıldı (Şekil 1-2). Ekim yapıldıktan 26 saat sonra dahi oldukça canlı trofozoitlere rastlandı ve trofozoitlerin jenerasyon süresinin 18 saat olduğu saptandı.

c. Tavşanlarda giyardiyo z oluşturma: 8 haftalık erkek tavşanlara diğer gruptaki hayvanlara uyguladığımız şekilde kistler verildi. Tavşanların her gün dışkı

incelemesi yapıldı. Ancak kist atılımı olmadı bu yüzden hayvanlar sakrifiye edilmedi.

ç. Kedi ve köpekte giyardiyoza oluşturma: Yaklaşık 1 aylık kedi ve köpekde giyardiyoza oluşturmaya çalıştık ancak bu hayvanlarda da infeksiyon geliştiremedik.

II. Grup:

Çalışmamızın bu aşamasında 4 yavru fareye 2mg/ kg olacak şekilde dexamethasone intramüsküler olarak (IM) verildi. Bu işleme 5 gün devam edildi. Daha sonra saflaştırılmış kistlerden 6×10^6 kist/ml olacak şekilde gavaj yoluyla farelere verildi (3 gün sabah akşam). Ertesi günden itibaren yaptığımız dışkı incelemeleri sonucunda *Giardia* kist yada trofozoitlerine rastlanmadı ve 25gün sonra fareler sakrifiye edildi, ince bağırsak üç kısma ayrılarak % 10 luk formaline alındı ve kesitler yapıncaya kadar saklandı. Yeni bir grup fare alınarak yeniden aynı işlemler uygulandı ancak kortizon verilmesine rağmen farelerde *G. intestinalis* infeksiyonu geliştirilemedi.

Farelerdeki çalışmaların ardından kemelere de aynı işlemler uygulandı. Hayvanların dışkı incelemesi yapılarak kist atımı olup olmadığı araştırıldı. İnfeksiyon ilk aşamada oluşturulamadı. Kortizonlu kemede yapılan işlemler başka bir grup kemede yeniden tekrarlandı. Yapılan dışkı incelemeleri sonucunda kortizon uygulanan kemelerden birinin 4 gün sonra kist atmaya başladığı saptandı. Günlük olarak atılan kistlerin sayımı yapıldı. En fazla kistin 7. günde atıldığı görüldü.

Kist atımından yaklaşık 25 gün sonra kemenin öncelikle serum antikorlarının IFAT yöntemiyle saptanması amacıyla kalbinden kan alındı ve daha sonra sakrifiye edildi. Kemenin incebağırsağı çıkarıldı ve üç kısma ayrıldı. Bu üç kısmın hem bağırsak içeriği hem de kazıntı materyali incelendi. İkinci parçada bol trofozoite rastlandı. Her üç parçadan bir kısım histopatolojik incelemeler için % 10 luk formaline alındı.

Trofozoitin bol olduğu kısım Hank's solüsyonu ile yıkanarak TPS1 besiyerine alındı. Ancak kültürler ertesi gün incelendiğinde canlı trofozoitler görülmezken ölü trofozoitlere rastlandı.

III. Grup:

Bu grupta yer alan ve kontrol grubunu oluşturan hayvanların da ince bağırsakları histopatolojik incelemeler için % 10 luk formaline alındı.

Histopatolojik incelemeler:

Patogenez çalışmalarında infekte olan ve olmayan hayvanların incebağırsakları % 10 luk formaline alınarak kesitlerin alınacağı güne kadar oda ısısında saklandı. Tespit solüsyonunda saklanan örneklerin kesit alma ve hematoksilin – eozin ile boyanması ve kesitlerin incelenmesi işlemleri, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

Yapılan incelemelere göre, infekte edilen hayvanlarla normal hayvanların incebağırsaklarında gözlenen patolojik durumlar şu şekilde özetlenebilir (Şekil 6-7):

- Normal kemededen alınan ve 3 kısma ayrılan incebağırsağın her üç kısmında villus yapısının normal olduğu görüldü.
- Normal fareden alınan ve 3 kısma ayrılan incebağırsağın her üç kısmında da villus yapısının normal olduğu saptandı.
- İnfekte kemenin ince bağırsağının 1. kısmında villuslar normal, 2. kısmında villuslar hafif düzleşmeye başlamıştı ve villus kript oranında 1/1 oranında artma saptandı.
- İnfekte kemenin ince bağırsağının 3 kısmının 1. parçasında (ileum) ara ara villuslarda düzleşme, yine 3. kısmın 2. ve 3. parçasında da yer yer villus düzleşmeleri ve kript oranında artma saptandı
- Kortizonlu normal kemenin incebağırsağının villus yapılarının normal olduğu gözlemlendi.

- Kortizonlu infekte kemenin 1 ve 2 no' lu parçasında villus kript oranının eşit olduğu görüldü
- Kortizonlu infekte kemenin 3. kısmının 1 parçasında villuslarda fokal düzleşmelerin olduğu görülürken, 3. kısmın 2 parçasında villuslarda düzleşme ve villus kript oranında artma görüldü.
- Kortizonlu infekte kemenin 3 kısmının 3 parçasında ise villuslardaki düzleşmenin belirgin olduğu saptandı
- İncelenen incebağırsağın üç kısmında da yangı hücrelerinin normal oranda bulunduğu görüldü.

3. Taniya yönelik çalışmalarda elde edilen bulgular:

ELISA yöntemiyle elde edilen bulgular

50 giyardiyoza ve 45 herhangi bir paraziter enfeksiyonu olmayan hastanın dışkı ELISA yöntemiyle dışkıda *Giardia*'ya özgü antijenlerin varlığının saptanması ve bu yöntemin tanıdaki önemini araştırılması amacıyla incelendi. Bu amaçla Meridian Premier *Giardia* 550080 (96 Test) kiti kullanıldı.

Kit içerisinde belirtilen tüm işlemler uygulandıktan sonra, plaklar 450/630nm dalga boyunda okutulduğunda, dışkı incelemesi ile giyardiyoza olduğu saptanan 50 hastanın sadece birinde ELISA yöntemi ile *Giardia*'ya özgü antijenler saptanmamıştır. Diğer 49 hastada ELISA (+) bulunmuştur (Tablo 3).

Dışkı incelemesi sonucu herhangi bir paraziter enfeksiyonu bulunmayan 45 hastanın ise dördünde ELISA yöntemiyle *Giardia* antijenleri saptandı.

Buna göre ELISA' nın duyarlılığı % 98, özgüllüğü % 92, pozitif sonucun prediktif değeri %92, negatif sonucun prediktif değeri % 97 ve sonuçların güvenilirliği % 99 olarak hesaplanmıştır.

IFAT ile Serumda IgA, IgG ve IgM Antikorlarının Tayinine İlişkin Bulgular

Direkt inceleme ile dışkısında *G. intestinalis* kistleri saptanan çocuk hastaların 35'inin ve kontrol grubundaki 15 çocuğun kol venasından 5 ml kan örnekleri alındı ve serumları ayrılarak kullanılıncaya kadar -20°C de saklandı.

IFAT ile yapılan inceleme sonucunda 35 hastanın 14'ünde hem IgG hem de IgA antikorları, 11'inde IgG + IgM + IgA antikorları, 6 'sında sadece IgG antikorları, 4' ünde ise IgG + IgM antikorlarının varlığı saptandı. Buna göre inceleme yapılan serumların hepsinde *G. intestinalis*'e özgü antikorlar bulundu (Tablo 4).

Kontrol grubundaki çocukların 6 sında IgA tipi, 5 çocukta da IgG tipi antikorlar belirlendi. Bu grupta yer alan toplam 15 çocuğun 11'inde de *G. intestinalis*'e özgü antikorlar saptandı.

Yapılan sulandırmalar sonucunda, 31 IgG (+) hastanın 24'ünde 1/16, 6 sında 1/32, 1'inde ise 1/128 sulandırmada pozitiflik saptandı. IgM antikorları saptanan 15 hastanın 2'sinde 1/4, 6 sında 1/16, 7 hastada ise 1/64 oranında antikor saptanmıştır. IgA antikorları saptanan 25 hastanın 5'inde 1/32, 14'ünde 1/64 ve 6'sında 1/128 sulandırmalarda antikor titreleri pozitif bulunmuştur (Tablo 5).

Kontrol grubundaki IgG si pozitif olan 5 çocukta 1/32 sulandırmada pozitiflik saptanırken, IgA sı pozitif olan 6 çocuğun 2 sinde 1/16, 4 ünde ise 1/128 sulandırmada pozitiflik gözlenmiştir (Şekil 8-11).

Tablo 2. Deney Hayvanlarını İnfekte Etme Çalışmalarında Elde Edilen

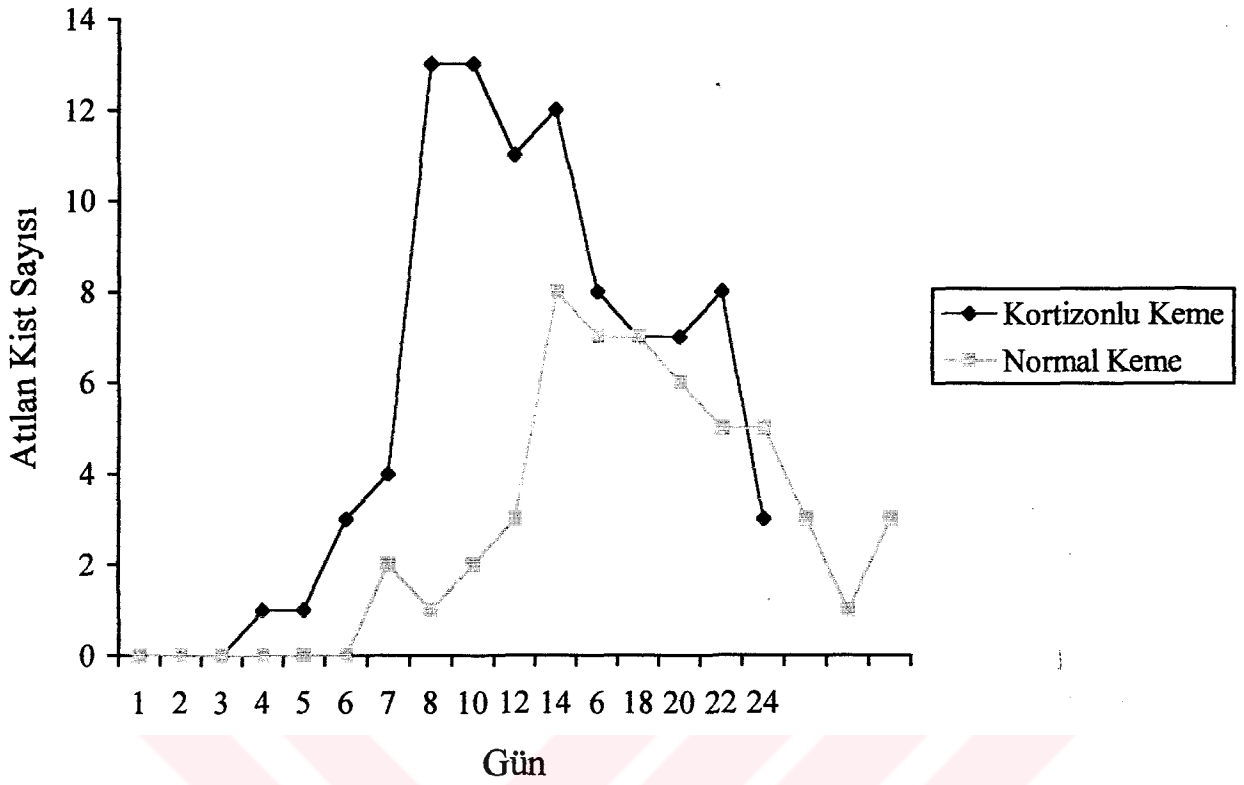
Bulgular

Deneye alınan	İnfekte edilen*	
	normal hayvan sayısı	kortizonlu hayvan sayısı
Fare (8)	-	-
Keme (8)	1	1
Tavşan (4)	-	-
Kedi (1)	-	- **
Köpek (1)	-	- **

* Her gruba farklı *G. intestinalis* suşu verildi.

** Kortizon uygulanmadı.

n: Deneye alınan toplam hayvan sayısı



Grafik . İnfekte Edilen Normal ve Kortizonlu Kemelerde *G. intestinalis* Kist Atılımının Durumu

Tablo 3. ELISA Testiyle Elde Edilen Bulgular

	Antijen saptanan		Antijen saptanmayan		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	
Deney grubu	49	98	1	2	50
Kontrol grubu	4	8.9	41	91.1	45

Tablo 4. IFAT Yöntemiyle Giyardiyozlu Hastalarda Saptanan

İmmünglobulinlerin Dağılımı

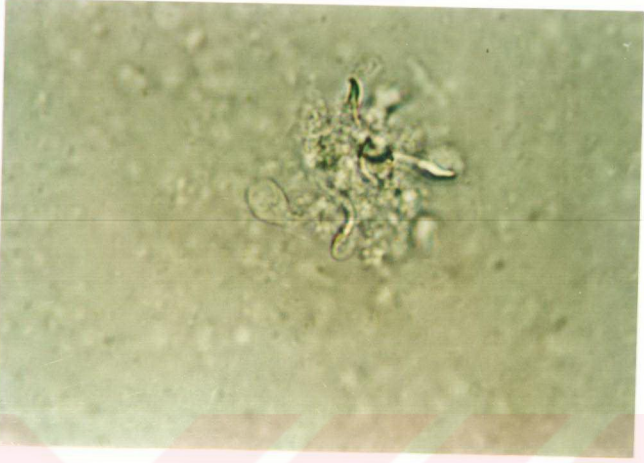
Saptanan immünoglobulinler	Giyardiyozlu grup	Kontrol Grubu
	Sayı (n: 35)	Sayı (n: 15)
Sadece IgG	6	5
Sadece IgM	-	-
Sadece IgA	-	6
IgG + IgM	4	-
IgG+ IgA	14	-
IgM+ IgA	-	-
IgG+ IgM+ IgA	11	-
Toplam	35	11

Tablo 5. IFAT Yöntemi İle İncelenen Hasta Serumlarının Titrelere Göre

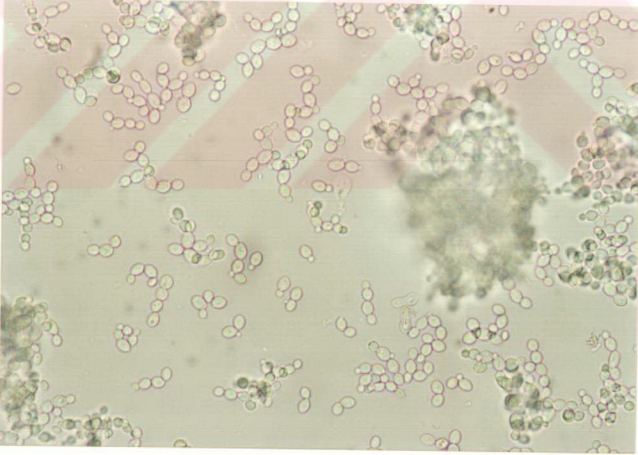
Dağılımı

Saptanan	Sulandırılmalar						Toplam
	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
IgG	-	-	24	6	-	1	31*
IgM	2	-	6	-	7	-	15
IgA	-	-	-	5	14	6	25

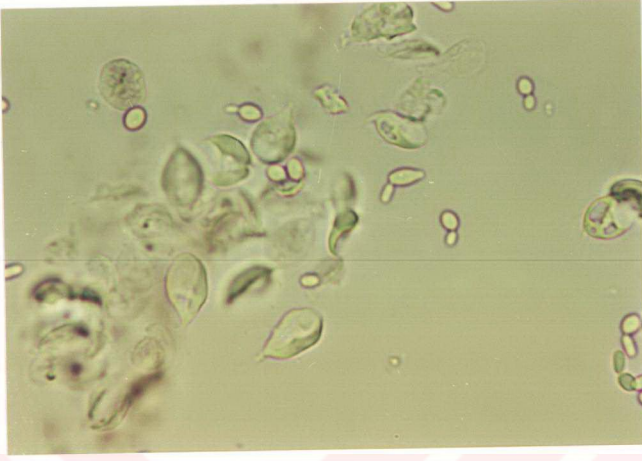
* Dört hasta serumu yetersiz olduğu için antikor titreleri çalışılmadı.



Şekil 1. İnfekte kemenin incebağırsağından elde edilen *Giardia intestinalis* trofozoitlerinin görünümü (x40).

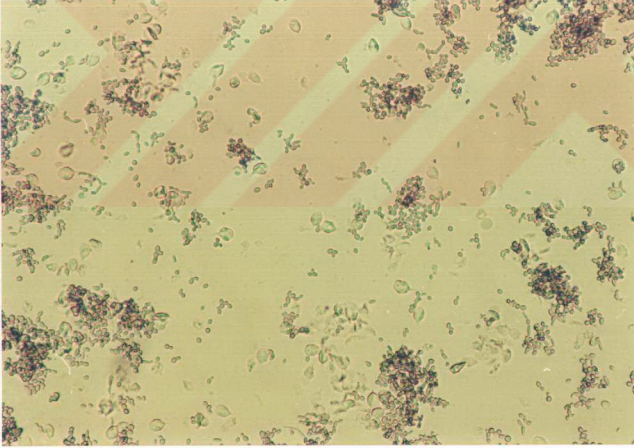


Şekil 2. İnfekte kemenin incebağırsağından elde edilen *Giardia intestinalis* trofozoitlerinin 24 saat sonraki görünümleri (x40).

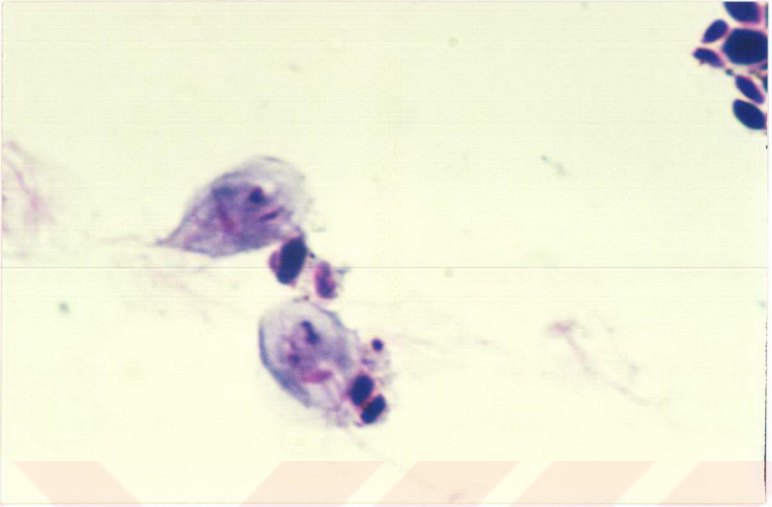


Şekil 3. *Giardia intestinalis* WB suşunun GI besiyerindeki görünümü (x40)

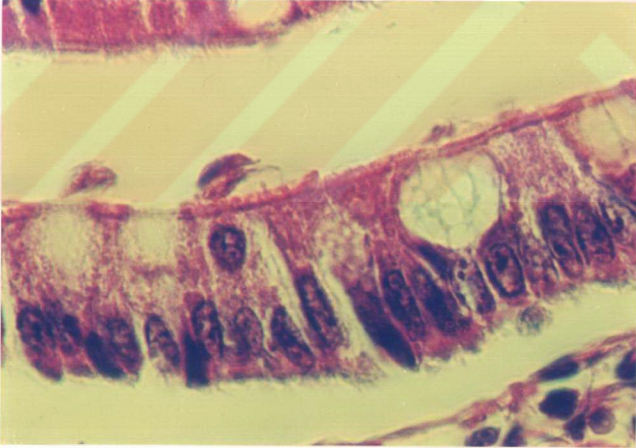
(Ortamda *Candida* blastosporları da görülmektedir)



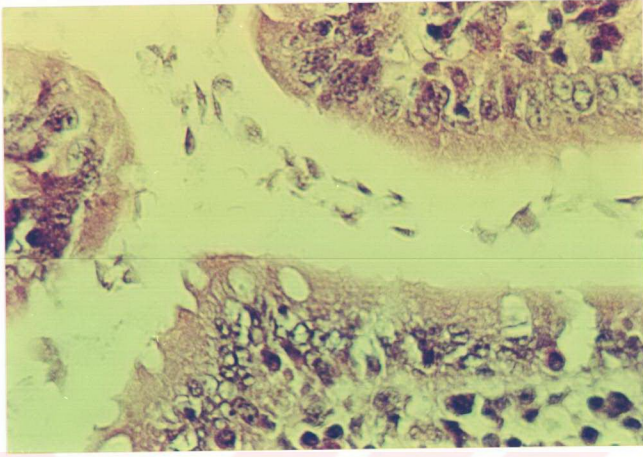
Şekil 4. Canlı *Giardia intestinalis* WB suş'unun GI besiyerinde 3. gündeki görünümü (x10)



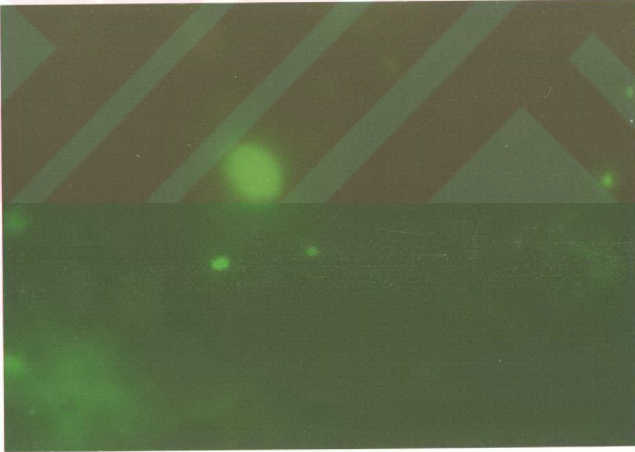
Şekil 5. *Giardia intestinalis* WB suşunun Giemsa ile boyanmış trofozoiti (x100)



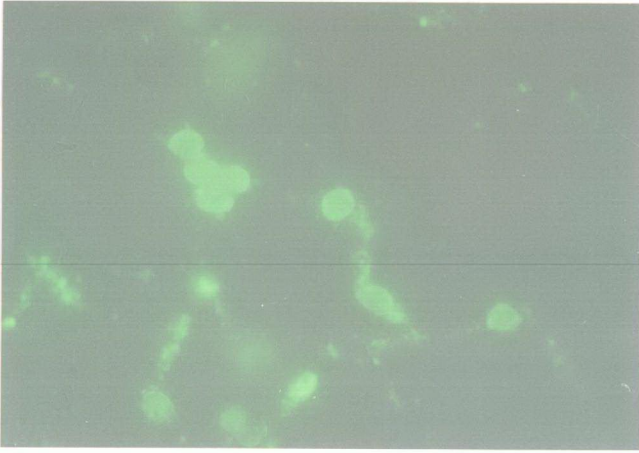
Şekil 6. *G. intestinalis* ile infekte kemenin incebağırsağından yapılan kesitte villus üzerine tutunmuş olan trofozoitlerin görünümleri (Hematoksilen- eozin, x 100)



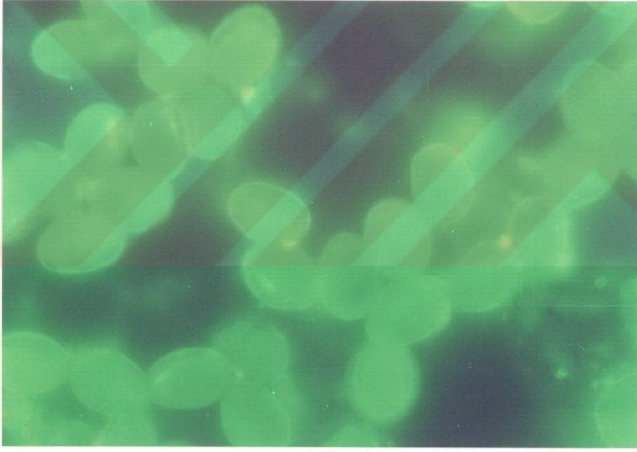
Şekil 7. *G. intestinalis* ile infekte kemenin incebağırsağından yapılan kesitte villuslar arasında dağınık olarak görülen trofozoitlerin görünüşleri (Hematoksilen- eozin, x 40)



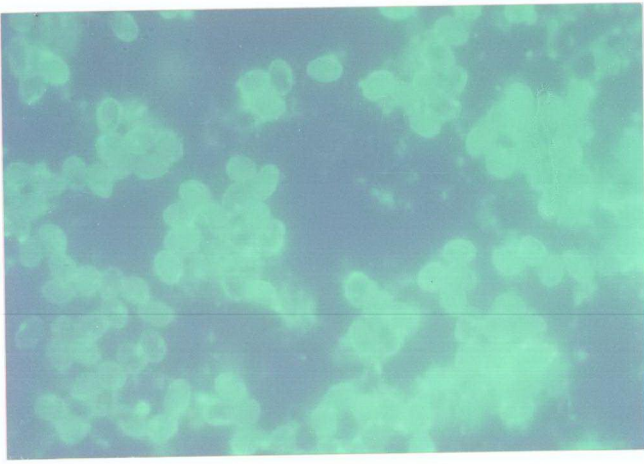
Şekil 8. IFAT ile giyardiyoğlu hasta serumlarında IgG (+) durum (x100)



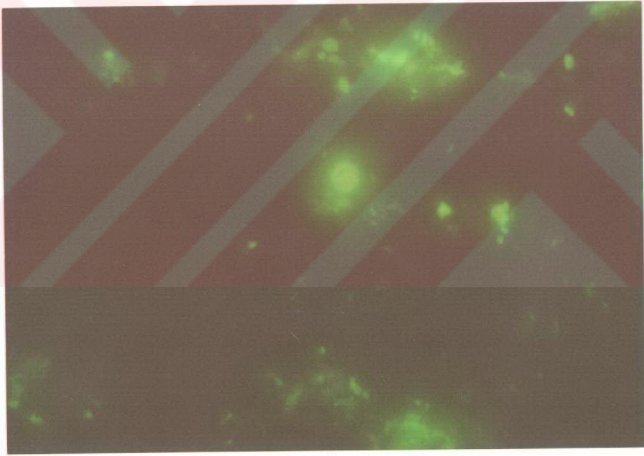
Şekil 9. IFAT ile giyardiyoZlu hasta serumlarında IgM(+) durum (x40)



Şekil 10. IFAT ile giyardiyoZlu hasta serumlarında IgA(+) durum (x100)



Şekil 11. IFAT ile giyardiyoZlu hasta serumlarında IgA(+) durum (x40)



Şekil 12. *G. intestinalis* ile infekte keminin serumunda IgA (+) durum (x40)

TARTIŞMA

Giyardiyoz, dünyanın hemen her yerinde sıklıkla görülen bir ince bağırsak infeksiyonudur. Parazite her iklim ve coğrafik bölgede rastlamak mümkündür (2,10,32,48,81,85,97). Gelişmiş ülkelerde % 2-3, gelişmekte olan ülkelerde ise % 20-30 oranında giyardiyoz görülmektedir (38).

Giardia intestinalis, önemli bir enterik patojen olmasının yanı sıra, ökaryotik soyun en erken safhasına ait olması nedeniyle, ökaryotik hücrelerin evrimleşmesini sağlayan genetik yeniliklerin iç yüzünün anlaşılmasında ilginç bir modeldir. *Giardial* genomun oluşturulmasının tamamlanması, protozoonların temel biyolojisinin anlaşılmasını kolaylaştıracaktır. Böylece konak-patojen etkileşiminin daha iyi anlaşılması ve tedavi amaçlı strateji ve aşuların geliştirilmesine olanak sağlanmış olacaktır (37).

Giyardiyozun klinik önemi 20.yüzyılın ortalarına doğru anlaşılmasına rağmen, bugün, akut ve kronik ishale malabsorbsiyona dolayısıyla da özellikle çocuklarda büyüme ve gelişme geriliğine neden olduğu kesin olarak bilinmektedir. Yakın zamanda bu parazite olan ilgi artmış ve oldukça nazlı olan *Giardia*'nın kültürü, patogenezi ve tanısı üzerinde fazlaca durulmuştur (58,59,65,93).

Parazitin ilk başarılı kültürü Karapetyan (1960) tarafından yapılmıştır (67). *G. intestinalis* ile doğal infekte tavşanlardan alınan trofozoitler bu kültür çalışmasında kullanılmıştır. Hayvanlar öldürülmüş ve peritoneal kavite açıldıktan sonra ince bağırsak tamamen çıkarılarak steril petri kabına alınmıştır. Farklı yerlerden farklı preparatlar hazırlanarak incelenmiştir. İlk olarak bağırsağın 10-15 cm'lik kısmı boyuna kesilmiş ve bağırsak içeriği dikkatlice kazınarak çıkarılmıştır. Bağırsak duvarının altındaki mukoza zarı kazınmıştır. Bu kazıntı pastör pipeti yardımıyla 15-20 ml Hanks' solüsyonu içerisine alınmıştır. Doku parçalarından *Giardia*'yı ayırmak için süspansiyona CO₂ üflenmiş ve süspansiyon gazlı bezden süzölmüştür. Süzöntü 1000 rpm de

10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant atıldıktan sonra *Giardia* içeren çökelti besiyeri içeren penisilin şişelerine ekilmiştir (67).

Meyer, 1976 da yeni bir besiyeri tanımlamış ve bu besiyerinde (HSP₁) giyardiyozlu bir kadının duodenum sıvısından aldığı trofozoit formundaki parazitleri üretmeyi başarmıştır (88). Sonraları bu besiyerinin modifikasyonlarını da yapmıştır (86). Visvesvera (1980), Meyer' in HSP₂ besiyerinde üretmekte olduğu suşu alarak Diamond'un TPS1 besiyerine alıştırmıştır (135).

Bingham ve Meyer (1979)'in *Giardia intestinalis* kistlerinin düşük pH'lı çözeltilerde in vitro ekskistasyonu gerçekleştirmesinden sonra, Giyardiyozlu hasta dışkılarından saflaştırılan kistlerin ekskistasyonu takiben in vitro aksenik kültür ortamlarında üretilebileceğini ortaya koymuştur (17).

Duodenal aspirasyon materyali ve ekskistasyon yöntemi ile elde edilen trofozoitlerin TPS1 besiyeri ve safra eklenmiş BI-S-33 ortamında aksenik kültürleri Kasprzak tarafından gerçekleştirilmiştir (70).

Meloni ve arkadaşları, köpekten elde edilen *G. intestinalis* trofozoitlerinin kültürünü denemiş ve trofozoitleri öncelikle Tyrode solüsyonunda sulandırmıştır. Daha sonra, bu trofozoitleri direkt olarak kültür tüplerine ekmiş ve kültürünü başarmıştır (84).

G. intestinalis'in kültüründe yukarıda adı geçen besiyerlerinin dışında da değişik besiyerleri ve bunların modifikasyonları denenmiştir. *Entamoeba histolytica*'nın aksenik kültüründe kullanılan TYI-S-33 besiyeri, sığır safrası ile tamamlanarak *Giardia* nın aksenik kültürünün oluşturulmasında kullanılmış ve başarılı olunmuştur (72,138).

Kültür çalışmalarımızda çeşitli besiyerlerinde hem ekskistasyon sonucu elde edilen trofozoitlerin, hem de in vivo olarak deney hayvanlarında oluşturulan infeksiyon sonucu elde edilen trofozoitlerin üretilmesine çalışıldı. Bunların yanı sıra yurtdışından sağladığımız, WB ve GS/M-83-H7 suşlarının da kendi hazırladığımız besiyerlerinde kültürü denendi.

Ekskistasyon işlemi sonucu elde edilen trofozoitlerin ve infekte ettiğimiz kemededen alınan trofozoitlerin kültüründe: GI, BI-S-33, HSP₃, TPS1, TYI-S-33, HSP₃ besiyerleri denendi. Bu trofozoitlerin üretilmesinde en uygun besiyerinin HSP₃ besiyeri olduğu sonucuna varıldı ve bu ortamda trofozoitlerin en fazla 27 saat canlılıklarını koruyabildikleri gözlemlendi.

WB ve GS/M-83-H7 suşlarının kültüründe de bu besiyerlerine ilaveten, RPMI/1640 ve Mc Coy besiyerleri (% 10 FBS ve NCTC 135 eklenerek) denenmiştir. En iyi üremenin GI besiyerinde olduğu, ancak HSP₃ besiyerinde de trofozoitlerin 10 gün canlılığını korudukları saptanmıştır.

Giardia'nın insanda malabsorbsiyon sendromuna yol açtığı kesin olarak bilinmektedir. Ancak malabsorbsiyonun patogenezi ile ilgili olarak çeşitli teoriler ve tartışmalar bulunmaktadır. Trofozoitlerin emici diskleriyle mukozaya saldırdıkları ve bu formun besinlerin emilimini engelleyen mekanik bir bariyer gibi görev yaptığı bilinmektedir.

Visvesvara ve arkadaşları, giyardiyozun oluşturulmasında deney hayvanı olarak keme, süt emen ve erişkin fareler, kedi, köpek, tavşan, çöl faresi ve koyun gibi çeşitli hayvanları kullanmıştır. Bunlar arasında devamlı olarak olumlu sonuç, sadece süt emen fareler ve çöl farelerinde elde edilmiştir (136). Araştırmacı çalışmasında, 10 farklı insan izolatu ile 12 çöl faresinin hepsini infekte etmiş ve duodenum ile ileumun proksimalinin trofozoitlerle kaplı olduğunu görmüştür. Gerbillerin % 8'i 40 ila 50 kist ile, % 15'i 100 kist ile infekte olurken, 1000 ve daha üzeri kist verilen hayvanların hepsi infekte olmuştur. İnfeksiyon sırasında en az 25 gün kist atımının sürdüğü ve bunun aralıklı ve düzensiz olduğu bulunmuştur. Hayvanlardaki kist atımının en erken 5, en geç ise 10. günde başladığı bildirilmiştir (136).

Bizim yaptığımız giyardiyoz oluşturma çalışmalarında, farelere ve kemelere 6×10^6 kist/ml olacak şekilde kistler verildi. Farelerde üst üste iki kez kist verilmesine rağmen infeksiyon geliştirilemedi.

Kemelerde ise, normal grupta ikinci kez kistler verildiğinde infeksiyon oluşurken, kortizonlu kemede ilk kist verdiğimizde giyardiyozun geliştiğini

gözledik. Normal kemede 7. günde kist atımı başlarken, kortizonlu kemede kist atımı 4. günde başladı. Hem normal hem de kortizonlu kemede, kist atımı başladıktan sonra, en yüksek kist atımının 7. günde gerçekleştiği saptandı.

Tavşan, kedi ve köpeğe de aynı şekilde insandan izole edilen kistlerin verildiği çalışmamızın sonucunda, bu hayvanlarda da infeksiyon oluşmadı. Bunun kullandığımız suşun farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çünkü, her bir hayvan grubuna verdiğimiz kistler farklı kişilerden alınmış kistlerdi. Dolayısıyla bazı hayvanlarda infeksiyonun gelişmesine karşın bazılarında gelişmemesi bu duruma bağlanabilir. Verilen kist sayısı her grup için hemen hemen aynı olduğundan kist sayısının bu başarısızlıkta etkili olduğu düşünülmemektedir.

Campbell ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Giardia* trofozoitlerinin, enkiste olmuş trofozoitlerin ve kistlerin gerbil bağırsağındaki dağılımı 30 günün üstündeki bir zaman periyodunda incelenmiştir. Trofozoitler ve enkiste olmuş trofozoitler ince bağırsağın üç eşit boyuttaki kesitinde bulunmuştur ancak kolonda daha az sayıda gözlenmiştir. Kistler ise sadece bağırsağın ikinci, üçüncü kesitlerinde ve kolonda görülmüştür (26).

Giardia ile infekte insan ve hayvanlardaki mukozal hasarların mekanizması, mide makrofajlarının trofozoitleri öldürücü etkisi bilinmesine rağmen iyi bir şekilde anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, makrofaj ürünlerinin doku yaralanmalarında, infeksiyon sırasındaki inflamatuvar yanıtta ve diğer inflamatuvar hastalıklarda önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Goyal ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, infekte Balb/c farelerinden elde edilen mide makrofajları ve enterositlerin devamlı kültürleri kullanılmıştır. Doku hasarlarının derecesi, enterosit hasarlarının enzim markırları, laktat dehidrogenazı ölçülerek değerlendirilmiştir. Çeşitli proteazların ve enterosit hasarlarında aktive olmuş makrofajlardan salınan serbest oksijen radikallerinin rolünü araştırmak için çeşitli proteazlar ve serbest oksijen radikalleri kullanılmıştır. Süperoksit radikali ve bazı proteazların farede infeksiyon esnasında enterosit hasarlarının oluşumunda önemli role sahip olduğu

bulunmuştur. Semptomatik suşlarla infekte farelerdeki parazit sayısı, laktat dehidrogenaz salınımı ve lipid peroksidaz derecesinin asemptomatiklere oranla daha fazla olduğu görülmüştür (54).

Scott ve arkadaşları, *Giardia*'nın bağırsağa kolonize olmasıyla, malabsorbsiyon ve sindirim bozukluğu ile sonuçlanabilecek, disakkaridaz eksiklikleri ve yaygın brush border mikrovillus değişikliklerine yol açtığını bildirmişlerdir (116).

Williamson ve arkadaşları tarafından, *Giardia* suşlarının virulans farklılıklarının, konağın parazite karşı oluşturduğu yanıtın ve patogenezinin karşılaştırılmasının amaçlandığı bir çalışma yapılmıştır. İnsan (BRIS/83/HEPU/106) ve kuş (BRIS/95/HEPU/2041) *Giardia* izolatları ile infekte edilmiş yeni doğan farelerin serum antikor düzeyleri ve histopatolojik incelemelerinde farklılıklar gözlenmiştir. Kuş suşları ile infeksiyonun insan suşuna göre 6-7 kez daha ağır seyrettiği saptanmıştır. Yine kuş suşlarının çok daha patojenik olduğu ve mide mukozasında çok daha büyük patofizyolojik değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Villus atrofisinde artış, goblet hücrelerinde hiperplazi ve epitel hücrelerinde vakuolleşmenin de kuş suşu ile olduğu bildirilmiştir. Kuş suşu ile infekte edilen farelerin insan suşu ile infekte edilenlere göre daha fazla total IgA ürettiği görülmüştür. Bu durum akla, kuş *G. intestinalis* suşlarının memeli konaklar için çok daha enfektif olduğunu ve bunun zoonotik infeksiyonlara bağlanabileceğini getirmektedir (139).

Scott ve arkadaşlarına göre, *Giardia*'nın neden olduğu mikrovillus hasarlarının patogenezinde, T hücrelerinin ve/veya sitokinlerin rolü açık değildir. Araştırmacılar, in vivo olarak farelerde oluşturulan akut giyardiyoza da görülen brush border patofizyolojisinde T hücrelerinin ve Interlökin 6'nın (IL-6) rolünü araştırmak istemişlerdir. Parazit farelere inoküle edildikten 6 gün sonra yapılan incelemelerde, immün sağlam farelerde brush border mikrovillus yüzey alanının yaygın olarak azaldığı, maltaz ve sukraz enzim aktivitelerinin ve jejunumda IL-6 konsantrasyonunun düştüğü gösterilmiştir. Atimik kontrol

ve infekte farelerde ise jejunal brush border yüzey alanları ve disakkaridaz aktiviteleri yüksek ancak doku IL-6 seviyesi düşük bulunmuştur. Sonuç olarak, giyardiyoza görülen malfonksiyon ve brush border enterosit hasarlarının (en azından bir kısmında) timus kaynaklı T lenfositlerle ilişkili olduğu ve bu baskılanmış jejunal IL-6'nın genellikle mikrovillus kısalmasında rol oynamadığı bildirilmiştir (116).

Kemelerde oluşturduğumuz infeksiyondan ötürü ince bağırsakta patolojik değişikliklerin meydana gelip gelmediği araştırıldığında: normal kemeden alınan ve 3 kısma ayrılan incebağırsağın her üç kısmında villus yapısının normal olduğu görüldü. İnfekte kemelerin incebağırsağının 1. kısmında villuslar normal, 2. kısmında villusların hafif düzleşmeye başladığı ve villus kript oranında 1/1 oranında artma olduğu saptandı. 3. kısımda yani ileumda ise villuslardaki düzleşmenin arttığı gözlemlendi. Hem normal hem de kortizonlu kemede *Giardia* trofozoitlerine en yoğun olarak ileumda rastlandı. Dolayısıyla da, her iki kemede en fazla patolojik değişimin ileumda meydana geldiği saptandı. Parazitin normal yerleşim yeri olarak bilinen duodenumda ise daha az, ya da hiçbir patolojik değişikliğin olmadığı gözlemlendi.

Yapılan başka bir çalışmada, Mongolian gerbil ve farelerde giyardiyoza oluşturulmaya çalışılmış ve her iki modelde de infeksiyon oluşturulmasına rağmen bazı tatmin etmeyici durumlar saptanmıştır. İki hayvan modelinde de insanlarda görülen bazı patolojik durumlara benzerlik saptanmamıştır. Kistler verildikten sonra farelerin birkaç hafta sürekli, gerbillerin ise insandakine benzer olarak aralıklı bir şekilde kist atımı gösterdiği saptanmıştır. İnsan kaynaklı kistlerin bir kısmı gerbilleri infekte ederken bir kısmı infeksiyon oluşturamamıştır. Bu infeksiyonlarda trofozoit oluşumu gözlenirken bir kısmında kist atımı olmamıştır. *Giardia muris* kistleriyle bir fareyi infekte edebilmek için 1-15 kist yeterli olmakta iken, gerbillerde yüzden fazla sayıda kist verildiğinde hayvanların % 70'inin infekte olduğu bulunmuştur (89).

Meloni ve arkadaşlarının yaptığı çeşitli araştırmalarla, köpek ve kedilerde giyardiyozun yaygın olarak görüldüğü ve Avustralya'nın batısındaki

köylerde bu enfeksiyona kedilerde % 14, köpeklerde % 21 oranında rastlandığı bildirilmiştir. İnsan ve köpektan elde edilen trofozoitler in vitro olarak üretilmeye çalışılmış ve insan orijinli trofozoitlerin % 44 ünde aksenik kültürler oluşturulurken köpeklerden alınan trofozoitlerin kültürü yapılamamıştır (84).

Çalışmamızda, kedi ve köpeklere insandan alınan kistleri vererek deneysel olarak giyardiyoZ oluşturmaya çalıştık. Ancak her iki hayvanda da enfeksiyon oluşturulamadı. Burada kullanılan denek sayısının azlığı, sonucu etkileyen en büyük faktör olmakla birlikte, insandan elde etmiş olduğumuz, ancak, semptomatik olup olmadığını bilmediğimiz suşlarla enfeksiyon oluşturmaya çalışmamız da bu başarısızlığı açıklayabilecek önemli nedenler arasındadır. Bu nedenle, köpek ve kedilerde insandan alınan suşlarla enfeksiyon oluşturulabilmesi için gerekli olan koşulların tamamının yerine getirilmesinin gerektiği, örneğın, denek sayısının artırılması ve semptomatik giyardiyoZlu kişilerden elde edilen kistlerin verilmesiyle enfeksiyonun oluşturulmasına çalışılmasının daha doğru olacağı kanısındayız.

Hewlett ve arkadaşları, giyardiyoZun yabani ve evcil hayvanlar arasındaki geçişine ışık tutabilmek amacıyla insan dışkısından elde edilen kistler ve kültürden alınan trofozoitleri ağız yoluyla Mongrel köpeklerine vermiştir. İnsan suşu ile enfeksiyonun oluşup oluşmayacağını saptamak amacıyla yapılan bu çalışmada 8 köpeğın 3'ünde enfeksiyonun geliştiğı dışkı incelemesi yapılarak görülmüştür. İnfekte olan üç köpeğın ikisinde trofozoitlerin kullandığı bildirilmiştir. İnfeksiyonun latent periyodu ve kist atımının insanlardakine benzer olduğu bulunurken, köpeklerin klinik olarak hasta olmadığı saptanmıştır. Bu çalışma ile *Giardia*'nın türler arasında kistlerle olduğu gibi trofozoitlerle de bulaşabildiğı gösterilmiştir (61). Araştırmacıların kullandığı 8 köpeğın ancak 3'ünde enfeksiyon oluşturulabilmesi yukarıda belirttiğimiz düşünceleri doğrulamaktadır.

Buret ve arkadaşları tarafından, evcil ruminantlarda giyardiyoZun zoonotik potansiyeli ve prevalansının saptanması amacıyla da çalışmalar

yapılmıştır. Bunun sonucunda da koyunlarda % 17.7 ve sığırlarda % 10.4 oranında giyardiyoza rastlandığı bildirilmiştir. Evcil, geniş getiren hayvanların insanlar için, insanların da bu hayvanlar için rezervuar konak olabilecekleri ve dolayısıyla giyardiyozun zooantroponotik bir hastalık olduğu vurgulanmıştır (24).

Toukhi ve arkadaşları tarafından, Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada Riyad suşunun patojen olup olmadığının araştırılması amacıyla bu suşun kist ve trofozoit formları farelere verilmiştir. Bunun sonucunda parazitin farelerde oluşturduğu patolojik durum histolojik yöntemlerle ve elektron mikroskobu ile incelenmiştir. *Giardia intestinalis*'in Riyad, Portland 1 ve *Entamoeba histolytica* suşları immunblotting yöntemiyle karşılaştırılmış; Riyad ve P-1 suşu arasında bir çok ortak antijenik benzerlik olduğu görülürken, Riyad ve *E. histolytica* suşları arasındaki antijenik benzerliğin az olduğu görülmüştür.

Aynı araştırmacı farelerde oluşan patolojik bulguları ışık mikroskobunda değerlendirdiğinde, trofozoitlerin en yoğun olarak jejunumdaki kesitlerde gözlemlendiğini belirtmiştir. İnfekte olan 5 fareden ikisi kontrol faresiyle karşılaştırıldığında kayda değer patolojik bulgular gözlemezken, geri kalan 3 fareden ise; jejunal kesitlerde lamina propria'da inflamatuvar hücrelerin hafif arttığı ve villusların küntleştiği saptanmıştır (130).

Yapılan bir başka çalışmada ise, 60 fare alınmış ve bunlar iki gruba ayrılmıştır. 1. Grup, 30 splenektomize fare içermektedir ve bunlara oral yoldan *Giardia intestinalis* kistleri verilmiştir. 2. Grup sağlam infekte edilmiş 30 fare içermekte olup kontrol grubudur. Grup 1 deki farelerde giyardiyoza oluşturulmuş ve bağırsak kesitlerinde (PAS ile boyanmış) trofozoitler gösterilmiştir. Diğer taraftan bağırsak kesitleri HE ile boyanmış ve kısalmış villusla, ağır lenfositik infiltrasyon gibi patolojik değişiklikler gözlenmiştir (142).

Mueller ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, 15 sağlıklı ve gönüllü kişiye iki insan *Giardia intestinalis* suşu (GS/M, Isr) trofozoitleri

verilmiştir. GS/M suşu verilen gönüllülerin hepsi infekte olurken Isr suşu verilenlerde infeksiyon oluşmamıştır. Hastalık oluşan 5 gönüllüden üçünde giyardiyozun tipik semptomları ve ishal gelişmiştir. Parazitin GS/M suşu ile infekte edilen bu üç kişi tedavi edilmiş ve ilk inokülasyondan 12 hafta sonra 5 yeni kontrol grubuyla birlikte bunlara da yeniden ağız yoluyla trofozoitler verilmiştir. İkinci kez kist verilenler yeniden infekte olmuş ancak bu kez infeksiyon asemptomatik seyretmiştir. Bunlarda serum IgM antikoru % 100, IgG % 70, IgA % 60 ve bağırsak sıvısı IgA % 50 sinde oluşmuştur (92).

Majewska ve arkadaşları, gönüllü insanlar ve gerbillere, kemelerden alınan *Giardia* kistlerini vererek infeksiyon oluşturmaya çalışmışlardır. İnsanlardaki ve gerbillerdeki kist atımı ve sayısının farklı olduğu bulunmuştur. Gerbillerdeki latent periyodun insanlardakine göre daha uzun olduğu ve insanlardakinin tersine devamlı olarak kist atımının olduğu saptanmıştır. Bu çalışma giyardiyozun zoonotik karakterine delil oluşturan bir başka çalışmadır (80).

Craft ve arkadaşları tarafından, kemeler oral olarak *G. intestinalis* kistleriyle infekte edilerek infeksiyonun varlığı direkt inceleme, CIE ve bağırsak biyopsisi ile saptanmıştır. 150 kistle infeksiyonun % 100 oranında geliştiği ve kistlerin en erken dördüncü günde gözlemlendiği bildirilmiştir. İnfeksiyonun klinik belirtileri 7. günde artmış ve 20. güne kadar devam etmiştir. Sulandırılmış dışkılarıdaki kistlerin 4°C'de dereceli olarak infektivitesinin azaldığı ancak bir yıl bu enfektifliğini devam ettirdiği gösterilmiştir. Kemelerde infeksiyonun gösterilmesinde mikroskopik incelemenin daha az etkili olduğunu (% 40-70), hayvanların infekte olup olmadıklarının bağırsak biyopsisi ile gösterildiğini vurgulamışlardır. CIE ile bağırsak biyopsisi karşılaştırıldığında bağırsak biyopsisinin daha duyarlı olduğu görülmüştür. Kemelerdeki antijenin varlığının 12 ay devam ettiği CIE ile gösterilmiştir (30).

G. intestinalis'in malabsorbsiyona neden olduğu bilinmemekte ise de, patogenezi mekanizması hakkında bilinenler hala kısıtlıdır. Patogenezi araştırma

çalışmalarında insan dışkısından elde edilen kistler erkek farelere verildiğinde ve normal farelerle bunlar karşılaştırıldığında; infekte farede, glukoz ve glisin taşınımında önemli düşüş olmakta ve bunların ikisi de aktif olarak absorbe edilmektedir. Bunun yanı sıra potasyum taşınımının etkilenmediği bildirilmektedir. Bunun sonucunda ise *Giardia* trofozoitlerinin ince bağırsak mukozasının aktif transport mekanizmasına karşı koyduğu bulunmuştur. (7)

Aggarwal ve arkadaşları, semptomatik ishalleri, asemptomatik ishalsiz ve asemptomatik kist taşıyıcısı olan 15 hastanın dışkısından aldıkları *G. lamblia* kistlerini intraözefagal olarak farelere vermişlerdir. Bu izolatların virulansı duodenumdaki trofozoitlerin sayımı ve iki saatte atılan kistlerin oranına bakılarak yapılmıştır. Kist atılımının temel modeli tüm gruplarda benzer olarak bulunmuştur. Semptomatik ishalleri hastalardan alınan kistlerle infekte edilen farelerdeki kist atılımının istatistiksel olarak diğer iki gruba göre daha fazla olduğu saptanmıştır (5).

Khanna ve arkadaşları tarafından, intraözefagal olarak aksenik *G. intestinalis* Portland 1 trofozoitleri verilen ve deksametazon ile immunsuprese edilen farelerin jejunumdaki trofozoit sayısından dolayı ciddi infeksiyon olduğu saptanmıştır. Kortizon ile brush border membran enzimlerinin çok ciddi etkilenmesiyle sonuçlanmasına rağmen disakkaridaz (sukraz, maltaz ve laktaz) ve alkalik fosfataz önemli oranda azalmıştır. Enzimatik aktivitedeki değişiklikler normal immuniteli hayvanlarda da gözlenirken brush border membran hasarları infekte hayvanlarda da gözlenmiştir. *Giardia* infeksiyonları sırasında immün düşük bireylerde brush border membran hasarları artmakta ve ciddi malabsorbsiyona neden olmaktadır (73).

Anand ve arkadaşları, giyardiyozda malabsorbsiyonun patogenezi çalışmak ve *Giardia* nın transport fonksiyonları üzerine etkisini göstermek için bir hayvan modeli oluşturmuştur. İncebağırsak tamamen çıkarılmış, 4 cm uzunluğunda 3 parçaya (ön orta ve arka) bölünerek mikroskopta incelenmiştir. Sadece *Giardia* trofozoitleri görülen kısımlar transport çalışmalarına alınmış ve 3 parçanın glukoz, glisin ve potasyum konsantrasyonları araştırılmıştır. Işık

mikroskobu ile yapılan incelemelerde, mukozada *Giardia* trofozoitlerinin varlığı dışında morfolojik anormallikler gözlenmemiştir (8). Çalışmanın sonucunda glikoz ve glisin konsantrasyonunun her ikisinde önemli oranda azalma görülmüştür. Kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bununla birlikte potasyum taşınımı etkilenmeden kalmıştır. Aktif transport mekanizmasında gereken bu maddeler etkilenirken, pasif difüzyonda kullanılan potasyum konsantrasyonunun değişmediği görülmüştür. Bu sonuçlar, *Giardia* trofozoitlerinin incebağırsağın aktif absorpsiyonu ile ilgili olayları etkilediğini göstermektedir (8).

Gasser ve arkadaşları tarafından yapılan, gerbillerin ve AJ- suşu farelerin *G. intestinalis*'in Swiss suşuna karşı duyarlılığının araştırıldığı bir çalışmada, insan, köpek, kedi ve koyundan elde edilen suşlarla 4-10 haftalık gerbillerde infeksiyon oluşturulmaya çalışılmıştır. 6 haftalık AJ-suşu farelerin insan köpek ve kediden elde edilen suşlara karşı duyarlı olmadığı saptanmıştır. Her bir kemiriciye 5000-12.600 kist inoküle edilmiştir. Kedi orjinli kistler gerbillere verildiğinde (6300 kist) 4-5 gün sonra %31'i kist atımına başlamıştır. Kist atımının çoğunlukla aralıklı olduğu ve 5-28 gün sürdüğü bildirilmiştir. Gerbillere verilen koyun suşundan trofozoitler elde edilerek in vitro kültürü yapılmış ve kryoprezervasyon yapılarak saklanmıştır (44).

Giyardiyozun tanısında kullanılan pek çok yöntemden biri olan direkt mikroskopik incelemeyle dışkıda parazitin kist ve trofozoit formlarının görülerek tanı konulması zaman alıcı bir yöntemdir. Ayrıca bu yöntem kullanılarak tek bir dışkı incelemesi ile kist atımının aralıklı olması ve dışkıda kist sayısının az olması gibi nedenlerden dolayı % 10- 50 arasında yanlış sonuç alınması mümkün olabilmektedir. Bu yüzden de giyardiyozun tanısında hızlı ve güvenilir bir yöntem olan ve dışkıda *Giardia intestinalis*'e ait antijenlerin gösterilmesine dayanan ELISA yöntemi geliştirilmiştir (4).

Yapılan pek çok çalışmada ELISA yönteminin direkt mikroskopik inceleme yöntemine göre daha spesifik ve duyarlı olduğu gösterilmiştir.

Bizim yaptığımız çalışmada, dışkı incelemesi ile giyardiyoza olduğu saptanan 50 hastanın sadece birinde ELISA yöntemi ile *Giardia intestinalis*'e özgü antijenler saptanmamıştır. Diğer 49 hasta da ise ELISA yöntemiyle *G. intestinalis* antijenleri saptanmıştır. Dışkı incelemesi sonucu herhangi bir paraziter infeksiyon saptanmayan 45 hastanın ise 4'ünde ELISA yöntemiyle *Giardia intestinalis* antijenleri saptanmıştır.

Giyardiyoza tanısı, dışkıda ve duodenal sıvıda trofozoit ya da kistlerin mikroskopik olarak tayin edilmesi ya da ince bağırsaktan hazırlanan yayma preparatların incelenmesi ve biyopsisi ile konulmaktadır (52). Bu tip geleneksel yöntemler hem fazla zaman hem de fazla emeğe, ayrıca deneyimli elemana gereksinim göstermektedir. Giyardiyoza olduğu bilinen hastalardan alınan 3 dışkı örneğine rağmen bunların %15'inde negatif sonuç çıkabileceği görülmüştür.

Yukarıdaki bu bulgularla bizim elde ettiğimiz bulguları karşılaştırdığımızda, bizim çalışmamızda direkt inceleme ile saptadığımız ve pozitif olduğunu bildiğimiz 50 hastanın 49 unda ELISA ile pozitiflik saptanmış ancak negatif belirlediğimiz 45 kişide ise 4 pozitiflik elde edilmiştir. Bu durumda bizim negatif olarak değerlendirdiğimiz 4 kişi ELISA yöntemi ile yakalanabilmiştir. Bu nedenle biz de ELISA'nın direkt inceleme ile birlikte kullanılmasının giyardiyoza tanısında yararlı olacağı kanısındayız.

Son zamanlarda *Giardia*'ya karşı oluşan antikoru saptamaya ya da dışkıda *Giardia* antijenlerini tanımaya yönelik serolojik yöntemler geliştirilmiştir. Giyardiyoza oluşan antikordan biri de IgA'dır ve bu antikor serum, dışkı ve tükürükte saptanabilmektedir. Toukhi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, giyardiyoza hasta dışkılarında yüksek seviyede salgısal IgA saptanmıştır. Bununla birlikte *Giardia* infeksiyonu ve tükürük IgA titresi arasında zayıf bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Giyardiyoza hastaların serumlarında tükürük IgA'nın saptanmasında IFA yönteminin % 95 duyarlı olduğu bildirilmiştir (127).

Rosoff ve arkadaşları tarafından, giyardiyozlu hastaların dışkılarından, crossed ve line immünelektroforez ve counter immünelektroforez (CIE) yöntemi kullanılarak *Giardia lamblia*'ya spesifik olan GSA 65 antijeni izole edilmiştir ve bu deneyde *Giardia* kistlerine karşı tavşanda oluşturulan anti serum kullanılmıştır. Tavşan anti-GSA 65 monospesifik antijen kullanılan CIE yöntemiyle parazitin kist ve trofozoitinde ve de sulu dışkılarda GSA 65 antijeninin varlığı gösterilmiştir. SDS-PAGE yöntemiyle bu antijenin 65 000 molekül ağırlığında olduğu bulunmuştur. CIE ile giyardiyozlu 40 hastanın 36 sında GSA 65 tayin edilmiştir. Bu çalışmalar diğer parazitik protozoon cinsleri arasında çapraz reaksiyonun varlığını araştırmak için de yapılmış ancak GSA 65 antijeninin yalnızca *Giardia* suşlarında var olduğu saptanmıştır (109).

Bir çok infeksiyon hastalığında olduğu gibi giyardiyozlu hastalarda da *Giardia intestinalis*'e karşı IgM tipi antikorlar erken oluşmakta ve belirli bir yüksekliğe eriştikten sonra, genel olarak yaklaşık 2-3 hafta içerisinde hızla düşmektedir. IgG tipi antikorlar ise IgM e göre daha geç oluşmakta ve primer infeksiyondan sonra dahi kalıcı olmaktadır (50).

Smith ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *G. intestinalis*'e karşı oluşan antikorlar ELISA yöntemiyle gösterilmiş ve akut infeksiyonun tedavisinden sonra takip edilen hastalarda 2 haftadan 15 aya kadar değişen sürelerde IgG antikorlarının kalıcı olduğu bildirilmiştir (117).

Castor ve arkadaşları, dışkı incelemesi ve serumda antikorların incelenmesiyle kedi ve köpeklerde giyardiyoz saptamışlardır (27). 448 dışkı ve 588 serum örneği incelendiğinde, dışkı örneklerinin 25 inde (%5.5) kistler görülürken, serum örneklerinin 156 sında (% 36.5) antikor saptanmıştır (125).

Kumkum ve arkadaşları tarafından, pediatrik popülasyonda kronik ve akut giyardiyozlu hastalarda *Giardia* trofozoitlerinin Mr. 82,000 antijenine karşı spesifik anti plazma membran ya da yüzeye spesifik serum antikorlarının araştırıldığı bir çalışmada, akut giyardiyozlu hastalarda bu antikorların önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Akut olgularda IgM sınıfı antikorlar yüksek iken

kronik olgularda ve asemptomatik taşıyıcılarda anti *Giardial* IgG antikorları predominant saptanmıştır. (75).

Rosoff ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, giyardiyozun tanısında ticari olarak mevcut ELISA testleri ile direkt inceleme yöntemi karşılaştırılmıştır. 93 giyardiyozlu oldukları mikroskopik incelemeyle gösterilmiş hasta ve 232 diğer normal kişilerden dışkılar toplanmıştır. 93 dışkının hepsi immunoassay ile güçlü pozitiflik vermiştir. 232 rasgele seçilen örnekten 16'sı pozitif saptanırken, 6 ayrı dışkı incelenmesi negatif olan örnek, immünoassay yöntemiyle pozitif olarak bulunmuştur. Dışkı incelemesi (+) olan 1 dışkı ise immünoassay ile negatif olarak saptamıştır. Bu 6 olgu doğru pozitif kabul edildiğinden, immunoassay dışkı incelenmesinde % 30 oranında daha fazla olguyu belirleyebilmektedir. Duyarlılık direkt incelemede %96, IA'da %100, özgüllük ise direkt incelemede %74, IA'da %100 olarak saptanmıştır (110).

Wittner ve arkadaşları, giyardiyoza antikor yanıtını IFA ve ELISA yöntemini kullanarak 125 serum örneğinde ölçmüşlerdir. Bunlardan 29'u semptomatik, 30'u asemptomatik, 40'ı diğer parazitik infeksiyonu bulunan, 16'sı inflamatuvar bağırsak hastalığı olan ve 10'u da normal kişilerdir. Semptomatik giyardiyozu olan hastalardaki IFA titresleri diğerlerinden yüksek bulunmuştur. *Giardia* IFA'da 1/64 veya daha yüksek olan serumlar *Giardia* ve diğer parazit antijenleriyle absorbe edilmiştir. Sadece *Giardia* ile absorpsiyon titrelerinde önemli ölçüde düşmeye neden olmuştur. ELISA tekniğinin, IFA yöntemine göre daha fazla yalancı pozitiflik verdiği ve daha az spesifik olduğu bildirilmiştir (141).

Yapılan bir çalışmada, pediatrik popülasyondaki kronik ve akut giyardiyoz olgularındaki antikor miktarları araştırılmış ve önemsiz bir fark olduğu görülmüştür. Akut olgularda daha çok IgM sınıfı antikorlar, kronik olgularda ve asemptomatik taşıyıcılarda ise IgG tipi antikorların saptandığı bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada *G. intestinalis*'in Mr. 82000 adı verilen yüzey antijeninin izole edilmesi ve tanınması mümkün olmuştur. Yüzey

antijenlerinin konak immün sistemi ile karşılaşan ilk antijenler olduğu ve infeksiyonun seyri açısından önemli olduğu bilinmektedir. Değişik anti-giyardiyal tedaviye yanıt vermeyen inatçı olgularda, parazitin ilaçlara karşı direnç kazanmasından çok, Mr. 82000 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının düşük olmasının etkili olabileceği belirtilmiştir (76).

Moody ve arkadaşları tarafından, ciddi giyardiyozlu hastaların bağırsağının üst kısımlarından izole edilen enterobakter ve *G.intestinalis*'e karşı oluşan serum antikorları IFA yöntemiyle kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya yedi bağırsak hastalığını bulunduran 51 kişi alınmış ve hastaların serumları incelenmiştir. *Giardia*'ya ve enterobakterlere karşı, malabsorbsiyonlu giyardiyozlu olguların hepsinde antikor saptanırken, 5 invaziv amöbiyozlu ve 6 kontrol serumunda antikor saptanamamıştır. Bakteriyel antikorlar diğer bağırsak hastalıklarından 5 grupta 38 olgunun 29'unda bulunmuştur. *Giardia* antikorları diğer gruplardan sadece ikisinde bulunmuştur (Tropical sprue ve coeliac hastalığı). Bunun sonucunda *Giardia* antikorlarının aktif giyardiyozu işaret etmediği, kısıtlı bir dağılıma sahip olduğu ve bazen de oldukça yüksek titrede olduğu belirtilmiştir (90).

Jokipii ve arkadaşları, indirekt floresan antikor yöntemiyle *Giardia* kistlerine bağlanan serum antikorlarının önemini araştırmışlardır. Erişkinlerde gözlenen titreler çocuklarınkine oranla daha yüksek bulunurken, kadınlardaki titrenin erkeklere oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Buna rağmen erkeklerdeki titreler 45 günden fazla sürede yüksek olarak kalmıştır. Nitroimidazol ile tedavi edildikten sonra alınan serumlardaki titreler tedaviden önceki titrelere oranla daha düşük bulunmuştur. Ancak kontrol grubuna göre daha yüksek titrelere saptanmıştır. Sonuç olarak pek çok kişide diğer immünojenler tarafından *G. intestinalis* ile çapraz reaksiyonlar antikor oluşturabilmekte ve bu primer giyardiyoz antikor yanıtının uzamasına neden olmaktadır (64).

Arıcı ve arkadaşları, dışkılarında *G. intestinalis* kisti saptanan 100 hastadan aldıkları serum örneklerinde IFA ve IFA-C yöntemini kullanarak bu

parazite karşı oluşan antikorların varlığını araştırmışlardır. Serumları incelenen 100 hastanın 66 (% 66) sında IgG, IgM ve kompleman bağlayan antikorlar saptanamamıştır. IgG ve IgM yanıtının ancak bireylerin % 34 ünde olduğu gözlenmiştir. Kompleman bağlayan antikorlar ise 100 hastanın yedisinde bulunmuştur (9).

Giyardiyozlu hastalardaki antikorların (IgA, IgM, IgG) IFAT yöntemi kullanılarak araştırıldığı çalışmamızda; 35 hastanın 14'ünde hem IgG hem de IgA antikorlarının, 11 hastanın IgG + IgM + IgA antikorlarının, 6 hastada sadece IgG antikorlarının, 4 hastada ise IgG + IgM antikorları bulundu. Kontrol grubundaki çocukların 6 tanesinde IgA tipi antikorlar, 5 çocukta da IgG tipi antikorlar saptandı.

Ridley ve arkadaşları tarafından, malabsorbsiyonla seyreden giyardiyozda jejunal histoloji ve serum antikorları araştırılmıştır. *Giardia* kistlerinin antijen olarak kullanıldığı IFA testinde 36 *Giardia* 'lı olgunun 32'si pozitif sonuç vermiştir. Giyardiyozu olmayan 17 hastanın hiçbirinde pozitif sonuç alınmamıştır. Dışkı incelemesi ve biyopsi ile *G. intestinalis* tespit edilmeyen 34 malabsorbsiyonlu hastanın 10'unda IFA testi pozitif sonuç vermiştir, bu olguların bazılarının kriptik giyardiyozlu olabileceği tahmin edilmektedir. Jejunumda histolojik lezyonlarla antikor titresi arasında kesin bir ilişki olduğu bildirilmiştir (105).

Soliman ve arkadaşları tarafından, belirtili ve belirtisiz seyreden giyardiyozlu çocuklarda parazite karşı oluşan serum antikor yanıtları karşılaştırılmıştır. Bunun için IFA, ELISA veya immünblotting yöntemi kullanılmıştır. Belirtili ve belirtisiz seyreden hastaların antikor yanıtlarında belirgin bir farklılık olduğu, belirtili hastalarda antikor titresinin daha yüksek saptandığı bildirilmiştir (118).

Giyardiyozun tanısı genellikle zordur. Yapılan bir çalışmada, giyardiyozun tanısındaki önemini araştırmak amacıyla dışkının mikroskopik incelenmesi, duodenal sıvı ve duodenal biyopsi örneklerinin incelenmesi ile dışkıda CIE ile antijen arama yöntemi karşılaştırılmıştır. Yeni Zelanda beyaz

tavşanları, saflaştırılmış *Giardia* kistleriyle ve trofozoitlerle immünize edilmiş ve oluşan anti serum CIE ile antijen tayini için kullanılmıştır. Akut ve kronik ishalleri 276 hastanın standart yöntemlerle 66 sında *Giardia* görülmüştür. Pozitifliğin tanısı 62'si direkt inceleme, 3'ü duodenal sıvı ve 1'i de duodenal biyopsi örneğinin incelenmesi ile konulmuştur. CIE testi ile ise bu 66 giyardiyoza hastanın 65'inde antijen saptanmıştır (31).

Goka ve arkadaşları, giyardiyoza tanısında dışkı incelemesi ile duodenal sıvı incelemesini karşılaştırarak hangisinin daha iyi sonuç verdiğini araştırmak istemişlerdir. 292 hasta incelenmiş ve bunların 72'sinde direkt inceleme ile *Giardia*'nın varlığı gösterilmiştir. Bu 72 hastanın duodenal aspiratı incelendiğinde ise sadece 32'sinde parazit görülmüştür. Bununla şimdiye kadar vurgulanan, duodenal aspiratların incelenmesinin dışkı incelemesinden daha öncelikli olduğu inancına karşı çıkmıştır. Ancak her iki yöntemin birlikte kullanılmasının daha faydalı olduğu bildirilmiştir (49).

Giardia ve *Cryptosporidium* antijenlerinin saptanması amacıyla, üç farklı klinik laboratuvarından elde edilen 556 hastanın dışkısı rapid immünoassay yöntemiyle incelenmiştir. Bu yöntemde hem taze hem de formalinde tespit edilmiş dışkı örneklerini kullanabilmek mümkündür. Çalışmanın sonucunda, yöntemin *Giardia*'nın tanısındaki duyarlılığı % 96.1 ve özgüllüğü % 98.5 olarak bulunmuştur (29).

Vidal ve arkadaşları, giyardiyoza tanısında direkt inceleme ve dışkıda *Giardia* antijenlerinin aranması yöntemlerinin karşılaştırılması amacıyla 30 Peru'lu çocuktan 1131 dışkı örneği almışlardır. Bu dışkıların 44'ünde sadece ELISA, 17'sinde sadece direkt inceleme ve 91'inde her iki yöntem birlikte kullanılarak *G. intestinalis* saptanmıştır. Dışkı incelemesiyle negatif olduğu saptanan 17 kişilik başka bir grupta ise, ELISA yöntemiyle 6 kişide daha *Giardia* saptandığı bildirilmiştir. Çalışmanın sonucunda ELISA'nın duyarlılığı % 84 ve özgüllüğü % 96 olarak bildirilmiştir (133).

Bizim yaptığımız çalışmada ise; ELISA'nın duyarlılığı % 98, özgüllüğü % 92, pozitif sonucun prediktif değeri %92, negatif sonucun prediktif değeri % 97 ve sonuçların güvenilirliği % 99 olarak hesaplanmıştır.

Toukhi ve arkadaşları, kan örnekleri emdirilmiş filtre kağıdında anti-*Giardia* spesifik IgG antikorlarının tayini için ELISA yöntemini kullanmışlardır. 88 dışkı incelemesi negatif olan ve 45 giyardiyozlulu hastadan kan örnekleri alınmıştır. Testin duyarlılığı % 91 (45 giyardiyozlulu hastada 2 yalancı negatif saptanmış), özgüllüğü % 95 (88 negatif hastada 4 yalancı pozitiflik saptanmış) olarak bildirilmiştir. Bu yöntemin geniş çaplı araştırmalarda ve merkezi laboratuvarlarda kullanılabilecek uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir (128).

Karanis ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, hayvan dışkılarında *Giardia* kistlerinin tayini için ticari direkt immünofloresan (DIF) testi ile faz kontrast mikroskopisinin tanıdaki önemi karşılaştırılmak istenmiş ve bu amaçla 40 sığırdan dışkı örneği alınmıştır. 31 *Giardia* kisti saptanan dışkı örneğinin 31 inde de DIF testi ile pozitiflik saptanırken, mikroskopik inceleme ile 17 sinde *Giardia* kistleri bulunmuştur. Tanısı konulan kistlerin *Giardia intestinalis* grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. Yabani kemiricilerden toplam 216 dışkı örneği toplanmış ve bunların 103 ünde *Giardia* kistleri saptanmıştır. DIF yöntemi ile bu 103 örneğin 97 sinde, mikroskopi ile 57 sinde, her iki yöntem ile 51 inde pozitiflik saptanmıştır. 90 kemiriciden toplanan kistlerin morfolojik olarak *G. intestinalis*'e benzediği bildirilmiştir. Sonuç olarak, DIF testinin hayvan dışkılarında *Giardia* kistlerinin tayini için daha üstün bir yöntem olduğu bildirilmiştir (66).

Goldin ve arkadaşları tarafından, Bangladeş'te yaşayan 229 küçük çocuktan toplanan dışkı örnekleri, dışkıda *Giardia intestinalis* antijenlerinin tayini için ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Dışkıdaki *Giardia* kist sayısı ile ELISA optik dansitesi arasında bir ilişki olduğu belirtilerek, diğer kamçılı protozoonların varlığında ELISA sonuçlarında yalancı pozitiflik görülmediği

belirtilmiştir. ELISA yönteminin infeksiyonun tanısındaki duyarlılığının %100, mikroskopi yönteminin ise %92.4 olduğu vurgulanmıştır (51).

Winiecka ve arkadaşları, antijen olarak kültürdeki trofozoitlerin kullanıldığı IFA testiyle 88 semptomatik ve asemptomatik hasta serumunda anti-*Giardia* antikörlerini araştırmışlardır. Yirmi sekizinde diğer bağırsak parazitlerinin bulunduğu 40 kişinin serumu da kontrol grubu olarak çalışılmıştır. Giyardiyoza hastaların serumlarının %82'sinde 1/10-1/256 titrelerde antikor bulunmuştur. Tanı koydurucu olduğu düşünülen 1/32 titrede, %66 oranında pozitiflik saptanmıştır. Kontrol grubunda sadece 7 kişide pozitiflik görülmüştür. Serumda *Giardia*'ya karşı oluşan antikörleri tayin etmede IFA testinin kullanılabilmesi gösterilmiştir. Ancak sıklıkla negatif sonuçlar özellikle kronik infeksiyonlu kişilerde daha sık meydana gelebilecekleri için giyardiyozun serolojik tanısında daha fazla kritik değerlendirmeler gerekmekte olduğu vurgulanmıştır (140).

Zheng-yi ve arkadaşları tarafından, giyardiyozun immünolojik tanısı, prevalansı ve deneysel olarak gerbillerde oluşturulmasına yönelik olarak geniş çaplı bir araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada Çin'in değişik il ve ilçelerinden çeşitli yaş gruplarını içeren toplam 3121 dışkı örneği toplanmıştır. Erişkinlerdeki prevalans %1.2, çocuklardaki ise % 6.1 olarak bulunmuştur. Dışkıdaki *Giardia* antijenlerinin CIE yöntemiyle ve serumda parazite karşı oluşan antikörlerin saptanmasının dışkı incelemesini tamamlayıcı olarak giyardiyozun tanısında kullanılabilmesini belirtmişlerdir. Ayrıca yine bu çalışma içerisinde gerbillerin giyardiyoza için iyi bir deneysel model olduğu gösterilmiştir (144).

Goka ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, *Giardia*'ya karşı oluşan IgM ve IgG antikörlerinin ishallerde hastalarda tayini için ELISA yöntemi kullanılmıştır. Giyardiyoza hastaların serumunda anti-IgM yanıtının varlığı belirlenmiştir fakat, tedaviden 2-3 hafta sonra hastaların 2/3'ünde seviyeler normale dönmüştür. Duyarlılık ve özgüllük ELISA'da % 96 olarak bulunmuştur. Serum anti *Giardia* IgG tüm hastalarla ve kontrolde tayin edilmiş

fakat bunun o anki ya da önceki enfeksiyona mı bağı olduğunu ayırt etmek mümkün olmamıştır (50).

Birkhead ve arkadaşları, su kaynaklı gastroenterit salgını olan yerde yaşayan kişilerden aldıkları serum örneklerinde spesifik IgM, IgG seviyelerinin yerli olmayanlara oranla daha yüksek olduğunu saptamışlardır. *Giardia*'ya karşı oluşan antikor seviyeleri özellikle IgA, *Giardia* ile kontamine su ve su kaynaklı ishal salgınları esnasındaki giyardiyozun tayin edilmesinde kullanılabilmektedir. Ayrıca giyardiyozlu 9 yerli hastanın, spesifik IgA seviyesi (IgM ve IgG değil) 15 sağlıklı yerli hastaminkinden çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca çeşme suyu tüketenlerdeki IgA seviyesi diğerlerinden daha yüksek bulunmuştur (18)

SONUÇLAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları maddeler halinde aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür.

1. Ekskistasyon yöntemi ile elde ettiğimiz *Giardia intestinalis* trofozoitlerinin kültüründe değişik besiyerleri denenmiş ve en uygun olanının HSP3 besiyeri olduğu sonucuna varılmıştır. Trofozoitlerin bu besiyerinde en fazla 27 saat canlılıklarını koruyabildikleri saptanmıştır.
2. Deneysel olarak *G. intestinalis* kistleriyle infekte edilen kemelerden alınan trofozoitlerin kültüründe de yine HSP₃ besiyerinin en uygun olduğu gözlenmiştir.
3. WB ve GS/M-83-H7 suşlarının kültüründe de değişik besiyerleri denenerek en güzel üremenin GI besiyerinde olduğu ancak HSP₃ besiyerinde de trofozoitlerin 10 gün canlılığını koruduğu saptanmıştır.
4. Giyardiyoz oluşturma çalışmalarında, fare, keme, tavşan, kedi ve köpeğe 6×10^6 kist/ml olacak şekilde kistler verilmiş ancak keme dışındaki hayvanlarda üst üste iki kez kist verilmesine rağmen infeksiyon geliştirilememiştir.
5. Kemelerde normal grupta ikinci kez kistler verildiğinde, kortizonlu kemede ise ilk kist verildiğinde giyardiyozun geliştiği gözlenmiştir. Normal kemede 7. günde kist atımı başlarken, kortizonlu kemede kist atımı 4. günde başlamıştır. Hem normal hem de kortizonlu kemede en çok sayıda kist atımının 7. günde gerçekleştiği bulunmuştur.
6. Normal kemedden ve fareden alınan ve 3 kısma ayrılan incebağırsağın her üç kısmında villus yapısının normal olduğu görülmüştür. İnfekte kemenin ince bağırsağının 1. kısmında villuslar normal, 2. kısmında villusların hafif düzleşmeye başlamış olduğu, 3. kısmının 1. parçasında (ileum) ara ara villuslarda düzleşme, yine 3. kısmın 2. ve 3. parçasında da yer yer villus düzleşmeleri ve kript oranında artma saptanmıştır. Özet olarak, infekte hayvanların ileumunda en fazla patolojik değişimlerin olduğu bulunmuştur.

7. GiyardiyoZlu olduğu saptanan 50 hastanın sadece birinde ELISA yontemi ile *Giardia*'ya ozgu antijenler saptanmazken 49 hastada *Giardia* antijenleri gozlenmistir. DıŐki incelemeği sonucu herhangi bir paraziter infeksiyon saptanmayan 45 hastanın ise 4'unde ELISA yontemiyle *Giardia* antijenlerinin varlığı saptanmiŐtır.
8. ELISA nın duyarlılığı % 98, ozgulluğu % 92, pozitif sonucun prediktif değeri % 92, negatif sonucun prediktif değeri % 97 ve sonuÇların guvenirliği % 99 olarak hesaplanmiŐtır.
9. IFAT yontemiyle, 35 giyardiyoZlu hastanın 14'unde hem IgG hem de IgA, 11'inde IgG + IgM + IgA, 6'sında IgG, 4'unde ise IgG + IgM antikorları bulunmuştur. Kontrol grubundaki 15 çocuğun 6'sında IgA tipi antikorlar saptanırken, 5 çocukta da IgG tipi antikorlar saptanmiŐtır.

ÖZET

Çalışmamızda *G. intestinalis* trofozoitlerinin kültüründe en uygun besiyerinin saptanması amacıyla, üç farklı şekilde elde edilen trofozoitlerin HSP₃, TPS1, TYI-S-33, BI-S-33, RPMI 1640, GI ve Mc Coy gibi besiyerlerinde kültürleri denenmiştir. İlk olarak insandan elde edilen farklı suşlara ait kistlerin eksistasyonu sonucu oluşturulan trofozoitler denenmiş ve en uygun olanının HSP₃ besiyeri olduğu sonucuna varılmıştır. İkinci aşamada deneysel olarak *G. intestinalis* kistleriyle infekte edilen kemelerden alınan trofozoitlerin kültürü denenmiş ve burada da HSP₃ besiyerinin en uygun olduğu gözlenmiştir. Üçüncü olarak kültüre alıştırılmış WB ve GS/M-83-H7 suşlarının kültürü yapılarak hem GI hem de HSP₃ besiyerinde de trofozoitlerin uzun süre canlılığını koruduğu saptanmıştır.

Giyardiyoz oluşturma çalışmalarında, fare, keme, tavşan, kedi ve köpeğe 6×10^6 kist/ml olacak şekilde kistler verilmiş ancak keme dışındaki hayvanlarda infeksiyon geliştirilememiştir. Hem normal hem de kortizonlu kemelerde en fazla kist atımının 7. günde gerçekleştiği bulunmuştur. İnfekte edilebilen hayvanlarda, parazitin ileum bölgesine yerleştiği ve bu nedenle de patolojik değişimlerin bu bölgede yoğunlaştığı belirlenmiştir.

Giyardiyozun tanısına yönelik olarak yaptığımız çalışmanın birinci kısmında, giyardiyozlu 50 hastanın, 49'unda ELISA yöntemi ile dışkıda *Giardia intestinalis*'e özgü antijenler saptanırken, 1 hastada saptanmamıştır. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda, ELISA'nın duyarlılığı % 98, özgüllüğü % 92 olarak belirlenmiştir.

Tanı çalışmalarının ikinci kısmında IFAT yöntemiyle kendi hazırladığımız antijen kullanılarak, 35 giyardiyozlu hastanın 14'ünde hem IgG+IgA, 11'inde IgG + IgM + IgA, 6'sında sadece IgG, 4'ünde ise IgG + IgM antikorları bulunmuştur. Kontrol grubundaki 15 çocuğun 6'sında IgA tipi antikorlar, 5 çocukta da IgG tipi antikorlar saptanmıştır.

SUMMARY

Axenic Cultivation, Pathogenesis, and Diagnosis Properties of *Giardia intestinalis*

In this study, we have tried to find out the best culture medium for *Giardia intestinalis* trophozoites. For this purpose, we used three strains of *G. intestinalis* obtained from different sources and tried to cultivate it in HSP₃, TPS1, TYI-S-33, BI-S-33, RPMI 1640, GI and Mc Coy media. We can summaries our results as below:

1. The trophozoites obtained by the excystation of cysts of human origin were used in inoculating of the above media. According to our results the HSP₃ medium was the most appropriate culture medium.
2. Rats were infected with the cysts of *G. intestinalis* of human origin; then the trophozoites obtained from these animals were used in the inoculation of 7 media which mentioned above. Again, the HSP₃ was found as the best medium for the cultivation of *Giardia intestinalis* trophozoites.
3. WB and GS/M-83-H7 strains, which were adapted to in vitro cultivation again used in the inoculation of the 7 test media. In this case we have detected that trophozoites were multiplied and remained alive for a long period of time in GI and HSP₃ media.

We have tried to establishing giardiosis in laboratory animals (some of them were given cortisone) such as mice, rats, rabbits, cat and dog. These were inoculated with an average of 6×10^6 cysts/ml via gastric lavage except the dog which was infected through its drinking water. Except rats, none of these animals were infected. The maximum number of cyst excretion was obtained on the seventh day post infection both in cortisone treated and normal rats. Interestingly, in the infected animals trophozoites were observed in ileum and pathological findings were found in the same area too.

Using ELISA test, the antigens of *G. intestinalis* were detected in 49 of 50 infected patients. When we compared this study group with the control group the sensitivity was detected as 98% whereas specificity was 92 %.

In the second part of our serological studies, we have screened a total of 35 patients with giardiasis for the presence of anti-*G. intestinalis* antibodies using IFAT. In this study we used homemade antigen prepared from cysts of this parasite. 14 of 35 patients were positive for specific IgG plus IgA; 11 patients had IgG, IgM plus IgA; 6 patients had only IgG whereas 4 patients had IgG in addition to IgM. In control group, which consisted of 15 children, 6 had IgA and 5 had IgG.



KAYNAKLAR

1. **Abaza H, Hilal G, Asser L, Abdo L, El-Sawy M:** Histocompatibility and immunological studies in *Giardiasis*. *Trans Soc Trop Med Hyg.*, 82: 437, 1988.
2. **Abdel Fattah SM, Maklad KA, Gadallah MA:** Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in different age groups in Cairo. *J Egypt Soc Parasitol.*, 21(3):707-713, 1991.
3. **Abdel Hamid MY, Makled KM, Kamel AM, Metwally DM, Azab ME:** Serodiagnosis of *Giardiasis* by counterimmunoelectrophoresis and indirect immunofluorescence tests. *J Egypt Soc Parasitol.*, 23(3): 603-608, 1993.
4. **Addis DG, Mathew HM, Stewart JM, Wahlquist SP, Williams RM, Finton RJ, Spencer HC, Juranek DD:** Evaluation of a commercially available ELISA for *Giardia lamblia* antigens in stool. *J Clin Microbiol.* 29(6): 1137-1142, 1991.
5. **Aggarwal A, Bhatia A, Naik SR, Vinayak VK:** Variable virulence of isolates of *Giardia lamblia* in mice. *Ann Trop Med Parasitol.*, 77(2): 163-167, 1983.
6. **Ament ME, Rubin CE:** Relation of *Giardiasis* to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. *Gastroenterology.*, 62(2): 216-226, 1972.
7. **Anand BS, Kumar M, Chakravarti RN, Sehgal AK, Chhuttani PN:** Pathogenesis of malabsorption in *Giardia* infection: an experimental study in rats. *Trans Soc Trop Med Hyg.*, 74(5): 565-569, 1980.
8. **Anand BS, Mahmood A, Ganguly NK, Rehani MM, Dilawari JB, Mahajan RC:** Transport studies and enzyme assays in mice infected with human *Giardia lamblia*. *Trans Soc Trop Med Hyg.*, 76(5): 616-619, 1982.
9. **Arıcı S, Öner YA, Büyükbaba Ö, Büğet E:** Giyardiyazlı hastalarda İndirekt- Floresan- Antikor- Kompleman tekniği ile *Giardia intestinalis*'e karşı oluşan antikorların araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*, 24: 270-273, 1994.

10. **Azab ME, Abdel-Fattah SM, Makled KM, el Kholy MS, Youssef MA, Abo Amer ER, Samy G:** Prevalence of *Giardia lamblia* antibodies in serum and milk in lactating women from different social classes in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.*, 21(3): 611-619, 1991.
11. **Belosevic M, Faubert GM, Croll NA:** *Giardia lamblia*: axenic growth in autoclaved and filtered Diamond's TYI-S-33 medium. *Can J Zool.*, 60: 1673-1675, 1982.
12. **Belosevic M, Faubert GM, Mac Lean JD, Law C, Croll NA:** *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: An animal model. *J Infect Dis.* 147(2): 222-226, 1983.
13. **Bhatia UN, Warhurst DC:** Hatching and subsequent cultivation of cysts of *Giardia intestinalis* in Diamond's medium. *J Trop Med Hyg.*, 84: 45, 1981.
14. **Bifulco JM, Schaefer FW 3d:** Serial subcultivation of *Giardia lamblia* in Keister's modified TYI-S-33 medium containing ultrosor G. *J Protozool.*, 39(1): 211-213, 1992.
15. **Bihz N, Thompson RCA, Lymbery AJ, Hobbs RP:** Comparative studies on the growth dynamics of two genetically distinct isolates of *G. duodenalis* in vitro. *J Parasitology.*, 22: 195-202, 1992.
16. **Bihz N, Thompson RCA, Meloni BP, Lymbery AJ:** A simple method for cloning *Giardia duodenalis* from cultures and faecal samples. *J Parasitology.*, 77: 627-631, 1991.
17. **Bingham AK, Meyer EA:** *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. *Nature.*, 277: 301-302, 1979.
18. **Birkhead G, Janoff EN, Vogt RL, Smith PD:** Elevated levels of immunoglobulin A to *Giardia lamblia* during a waterborne outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol.*, 27(8): 1707-1710, 1989.
19. **Boone JH, Wilkins TD, Nash TE, Brandon JE, Macías EA, Jerris RC, Lyerly DM:** TechLab and alexon *Giardia* enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein. *J Clin Microbiol.*, 37(3):11-14, 1999.

20. **Boucher SEM, Gillin FD:** Excystation of in vitro-derived *G. lamblia* cysts. *Infect Immun.*, 58: 3516-3522, 1990.
21. **Bowie WR, Isaac- Renton JL, Prasad N:** *Giardia duodenalis*. Enhanced growth in cell culture. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 82: 433-436, 1988.
22. **Brandborg LL, Tankersley CB, Gottlieb S, Barancik M, Sartor VE:** Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. *Gastroenterology.*, 52(2):143-150, 1967.
23. **Buchel LA, Gorenffot A, Chonchillon C, Savel J, Gobent JG:** In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *J Parasitology.*, 73: 487-493, 1987.
24. **Buret A, den Hollander N, Wallis PM, Befus D, Olson ME:** Zoonotic potential of *Giardiasis* in domestic ruminants. *J Infect Dis.*, 162: 231-237, 1990.
25. **Büget E:** *Giardia intestinalis* kültürleri üzerine çalışmalar. Doçentlik Tezi, İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi, 1981.
26. **Campbell JD, faubert GM:** Comparative studies on *Giardia lamblia* encystation in vitro and in vivo. *J Parasitol.*, 80(1): 36-44, 1994.
27. **Castor SB, Lindqvist KB:** Canine *Giardiasis* in Sweden: no evidence of infectivity to man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 84(2): 249-250, 1990.
28. **Cervetto JL, Ramonet M, Nahmod LH, Gallardo F:** *Giardiasis*. Functional, immunological and histological study of the small bowel. Therapeutic trial with a single dose of tinidazole. *Arq Gastroenterol.* 24(2):102-112, 1987.
29. **Chan R, Chen J, York MK, Setijono N, Kaplan RL, Graham F, Tanowitz HB:** Evaluation of a combination rapid immunoassay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens. *J Clin Microbiol.*, 38: 393-394, 2000.
30. **Craft JC:** Experimental infection with *Giardia lamblia* in rats. *J Infect Dis.*, 145(4): 495-498, 1982.

31. Craft JC, Nelson JD: Diagnosis of *Giardiasis* by counterimmunoelectrophoresis of feces. *J Infect Dis.*, 145(4): 499-504, 1982.
32. Değerli S, Özçelik S, Ataş AD, Oğuztürk H, Çeliksöz A: *Giardia intestinalis* kistlerinin canlılığı ve eksistasyonu üzerine klor ve pH nin etkisi. *T Parazitol Derg.*, 24(4): 350-353, 2000.
33. Diamond L.S: Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like Amebae. *J Parasitology.*, 54 (5): 1047-1056, 1968.
34. Diamond LS, Clark CG, Cunnick CC: YI-S, casein – free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *J Euk Microbiol.*, 42(3): 277-278, 1995.
35. Douglas H, Reiner DS, Gillin FD: A new method for purification of *Giardia lamblia* cysts. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 81: 315-316, 1987.
36. Duncombe VM, Bolin TD, Davis AE, Cummins AG, Crouch RL: Histopathology in *Giardiasis*: a correlation with diarrhoea. *Aust N Z J Med.*, 8(4): 392-396, 1978.
37. Eckmann L, Gillin FD: Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial- mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 280(1): 1-6, 2001.
38. Farthing MJG: Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges pathogenesis of *Giardiasis*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 87(3): 17-21, 1993.
39. Farthing MJG, Varon SR., Keusch T: Mammalian bile promotes growth of *Giardia lamblia* in axenic culture. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 77(4): 467-469, 1983.
40. Faubert G: Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rew.*, 13(1): 35-54, 2000.

41. Feely DE: A simplified method for in vitro excystation of *Giardia muris*. *J Parasitol.*, 72(3): 474-5, 1986.
42. Ganguly NK, Mahajan RC, Vasudev V, Radha Krishna V, Anand BS, Dilawari JB, Chandanani RE: Comparative evaluation of indirect haemagglutination and immunofluorescence tests in serodiagnosis of *Giardiasis*. *Indian J Med Res.*, 73:111-113, 1981.
43. Ganguly NK, Mahajan RC, Vasudeva V, Mahmood A, Dudeja PK, Radhakrishna V, Dilawari JB, Anand BS: Intestinal uptake of nutrients and brush border enzymes in normal and thymectomised *Giardia lamblia* infected mice. *Indian J Med Res.*, 75: 33-39, 1982.
44. Gasser RB, Eckert J, Rohrer L: Infectivity of Swiss *Giardia* isolates to birds and mice, and in vitro cultivation of trophozoites originating from sheep. *Parasitol Res.*, 74(2): 103-111, 1987.
45. Gato Morais R, Banez Sanchez F, Pascual Garcia J, Fernandez Crisostomo C, Garcia Jimenez C: [Reactive arthritis due to *Giardia lamblia* in a patient with IgA deficiency]. *An Med Interna.*, 15(7): 398-399, 1998.
46. Gillin FD, Boucher SE, Rossi SS, Reiner DS: *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. *Exp Parasitol.*, 69(2):164-174, 1989.
47. Gillin FD, Goulth, MJ, Hofmann AF, Gurantz D, Sauch JF: Biliary lipids support serum free growth of *Giardia lamblia*. *Infect Immun.*, 52: 641-645, 1986.
48. Gilman RH, Brown KH, Visvesvara GS, Mondal G, Greenberg B, Sack B: Epidemiology and serology of *Giardia lamblia* in a developing country: Bangladesh. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 79: 469-473, 1985.
49. Goka AK, Rolston DD, Mathan VI, Farthing MJ: The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of *Giardiasis*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 84(1): 66-67, 1990.

50. Goka AK, Rolston DD, Mathan VI, Farthing MJ: Diagnosis of *Giardiasis* by specific IgM antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* , 26 (2): 184-186, 1986.
51. Goldin AJ, Hall A, Sarker RN, Warhurst DC, Miles MA: Diagnosis of *Giardia duodenalis* infection in Bangladesh infants: faecal antigens capture ELISA. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 87: 428-432, 1993.
52. Gordst B, Hemelhof W, Retore P, Rahman M , Cadranel S, Burtzler JP: Routine culture of *Giardia lamblia* trophozoites from human duodenal aspirates. *Lancet*, 21: 137, 1984.
53. Gordst B, Hemelhof W, Tilborgh KV, Retore P, Cadranel S, Burtzler JP: Evaluation of a new method for routine in vitro cultivation of *Giardia lamblia* from human duodenal fluid. *J Clin Microbiol.*, 29: 702-704, 1985.
54. Goyal R, Mahajan RC, Ganguly NK, Sehgal R, Gorowara S, Singh K: Macrophage-mediated enterocyte damage in Balb/c mice infected with different strains of *Giardia lamblia*. *Scand J Gastroenterol.*, 28(9): 845-848, 1993.
55. Guy RA, Bertrand S, Faubert GM: Modification of RPMI 1640 for use in vitro immunological studies of host-parasite interactions in *Giardiasis*. *J Clin Microbiol.*, 29(3):627-629, 1991.
56. Halliday CEV, Clark C, Farthing MJG: *Giardia*-bile salt interactions in vitro and in vivo. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*,82: 428-432,1988.
57. Hartong WA, Gourley WK, Arvanitakis C: *Giardiasis*: clinical spectrum and functional--structural abnormalities of the small intestinal mucosa. *Gastroenterol.*, 77(1):61-69, 1979.
58. Hashkes PJ, Spira DT, Deckelbaum RJ, Granot E: Salivary IgA antibodies to *Giardia lamblia* in day care center children. *Pediatr Infect Dis.*, 13(11): 953-958, 1994.
59. Hautus MA, Abdillahi H, Laarman JJ: Circulating IgG and IgA anti-*Giardia lamblia* antibodies in sera of symptomatic *Giardiasis* patients. *Acta Leiden.*, 56:47-55, 1987.

60. Hautus MA; Kortbekk LM, Vetter JCM, Learman JJ: In vitro excystation and subsequent axenic growth of *Giardia lamblia*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 82: 858-862, 1988.
61. Hewlett EL, Andrews JR, Ruffier J, Schaefer FW III: Experimental infection of Mongrel dogs with *Giardia lamblia* cysts and cultured trophozoites. *J Infect Dis.*, 145: 89-93, 1982.
62. Hill DR, Pohl R, Pearson RD: *Giardia lamblia*: A culture method for determining parasite viability. *Am J Trop Hyg.*, 36: 1129-1133, 1986.
63. Inge PM, Edson CM, Farthing MJ: Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. *Gut.*, 29(6):795-801, 1988.
64. Jokipii L, Miettinen A, Jokipii AM: Antibodies to cysts of *Giardia lamblia* in primary *Giardiasis* and in the absence of *Giardiasis*. *J Clin Microbiol.*, 27(8): 1707-1710, 1989.
65. Kane AV, Ward HD, Keusch GT, Pereira EA: In vitro encystation of *Giardia lamblia*: Large-scale production of in vitro cysts and strain and clone differences in encystation efficiency. *J Parasitology.*, 77(6): 974-981, 1991.
66. Karanis P, Opiela K, Al-Arousi M, Seitz HM: A comparison of phase contrast microscopy and an immunofluorescence test for the detection of *Giardia* spp. In faecal specimens from cattle and wild rodents. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 90: 250-251, 1996.
67. Karapetyan A: In vitro cultivation of *Giardia duodenalis*. *J Parasitology.*, 48(3): 337-340, 1962.
68. Kasprzak W, Majewska AC: Efficacy of methods for assessing *Giardia* cyst viability: *Wiad Parazytol.*, 33: 147-155, 1987.
69. Kasprzak W, Majewska AC: Improvement in isolation and axenic growth of *Giardia intestinalis* strains. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 79: 551-557, 1985.

70. Kasprzak W, Majewska AC: Isolation and axenic growth of fresh *Giardia intestinalis* strains in TPS-1 medium. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 77: 223-224, 1983.
71. Kasprzak W, Majewsko AC: Infectivity of *Giardia* sp. cysts in relation to eosin exclusion and excystation in vitro. *Tropenmed Parasitol.*, 37:70-72, 1983.
72. Keister DB: Axenic culture of *G. lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 77: 487-488, 1983.
73. Khanna R, Vinayak VK, Mehta S, Kum Kum, Nain CK: *Giardia lamblia* infection in immunosuppressed animals causes severe alterations to brush border membrane enzymes. *Dig Dis Sci.*, 33(9): 1147-1152, 1988.
74. Korman SH, Hais E, Spira DT: Routine in vitro cultivation of *Giardia lamblia* by using the string test. *J Clin Microbiol.*, 28: 368-369, 1990.
75. Kumkum, Khanna R, Khuller M, Mehta S, Vinayak VK: Plasma membrane associated antigens of trophozoites of axenic *Giardia lamblia*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 82: 439-444, 1988.
76. Kumkum, Khanna R, Nain CK, Mehta S, Vinayak VK: Depressed humoral immune responses to surface antigens of *Giardia lamblia* in persistent Giardiasis. *Pediatr Infect Dis.*, 7(7): 492-498, 1988.
77. Lu SQ, Wang ZY, Zhu H: Establishment of an axenic culture of *Giardia lamblia* through preliminary passage in suckling gerbil. *Chin Med J (Engl.)*, 103(7): 583-587, 1990.
78. Lujan HD, Mowatt MR, Nash TE: Lipid requirements and lipid uptake by *Giardia lamblia* trophozoites in culture. *J Eukaryot Microbiol.*, 43(3):237-242, 1996.
79. Mac Donald TT, Ferguson A, Path MRC: Small intestinal epithelial cell kinetics and protozoal infection in mice. *Gastroenterology.*, 74(3): 496-500, 1978.

- 80. Majewska AC:** Successful experimental infections of a human volunteer and Mongolian gerbils with *Giardia* of animal origin. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 88: 360-362, 1994.
- 81. Markell EK, John DT, Krotoski WA:** Medical Parasitology. 8th ed. W.B. Saunders Company. USA, 252, 1999.
- 82. Mathias A.H.; Kortbeek LM, Johannes CMV, Jacob JL:** In vitro excystation and subsequent axenic growth of *Giardia lamblia*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 82: 858-861, 1988.
- 83. Mayer CL, Palmer CJ:** Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl Environ Microbiol.*, 62(6): 2081-2085, 1996.
- 84. Meloni BP., Thompson RCA:** Comparative studies on the axenic in vitro cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 81: 637-640, 1987.
- 85. Merdivenci A:** Medikal Protozooloji Ders Kitabı, (2.Baskı), İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, No: 80, 30-34, 1981.
- 86. Meyer EA Schaefer FW III:** Models for excystation. In: *Giardia* and Giardiasis, Erlandsen SL, Meyer EA (Ed.) New York: Plenum Press, 131-144, 1984.
- 87. Meyer EA, Radulescu S:** *Giardia* and Giardiasis. *Advances in Parasitology.*, 17: 1-47, 1980.
- 88. Meyer EA:** *Giardia lamblia*: Isolation and Axenic Cultivation. *Exp Parasitol.*, 39: 101-105, 1976.
- 89. Meyer EA:** Giardiasis. (E.A. Meyer Ed), *Giardiasis*, Elsevier Science Publishers B.V, 1990.
- 90. Moody AH, Ridley DS, Tomkins AM, Wright SG:** The specificity of serum antibodies to *Giardia lamblia* and to enterobacteria in gastrointestinal disease. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 76(5): 630-632, 1982.

91. **Muller N, Stager S:** Periodic appearance of a predominant variant antigen type during a chronic *Giardia lamblia* infection in a mouse model. *Int J Parasitol.*, 29(12):1917-1923, 1999.
92. **Muller N, Gottstein B:** Antigenic variation and the murine immune response to *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol.*, 28(12):1829-1839,1998.
93. **Naik SR, Sehgal S, Krishnan S, Broor SL, Vinayak VK:** Immunoglobulins in serum and duodenal juice and peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with *Giardiasis*. *Trop Geogr Med.*, 31(4): 493-498, 1979.
94. **Nash TE, Herrington DA, Losonsky GA, Levine MM:** Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J Infect Dis.*, 156(6): 974-984, 1988.
95. **Nash TE, Lujan HT, Mowatt MR, Conrad JT:** Variant-Specific Surface Protein Switching in *Giardia lamblia*. *Infect Immun.*, 69(3):1922-1923,2001.
96. **Ochs HD, AmentME, DavisSD:** Giardiasis with malabsorption in X-linked agammaglobulinemia. *N Engl J Med.*, 287(7): 341-342, 1972.
97. **Oğuztürk H, Özçelik S, Değerli S, Çeliksöz A:** *Giardia intestinalis* kistlerinin canlılığı üzerine sıcaklığın etkisi. *T Parazitol Derg.*, 25(1): 31-33, 2001.
98. **Olson ME, Ceri H, Morck DW:** *Giardia* vaccination. *Parasitology Today.*, 16(5): 213-217,2000.
99. **Özcel MA, Üner A:** (Editör)Giardiosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 14, 1997.
100. **Özçelik S, Değerli S:** Türkiye’de Giardiosis. *T Parazitol Derg.*, 22(3): 292-298,1998.
101. **Özçelik S, Değerli S, Aras D, Yıldız E, Şanlıdağ T:** Lokal *Giardia intestinalis* suşlarının saflaştırılması, ekskistasyonu ve in vitro üretilme koşullarının denenmesi. *T Parazitol Derg.*, 24(4): 354-359, 2000.
102. **Ponce Macotella M, Martinez Gordillo MN, Alvarez Chacon R.**

- Excystation and culture of *Giardia* spp. from human source. *Arch Invest Med (Mex)*, 20(2):123-127, 1989.
- 103. Renton JI, Proctor EM, Prameya R, Wong Q:** A method of excystation and culture of *G. lamblia*. Correspondence. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 80; 989, 1986.
- 104. Rice EW, Schaefer FW III:** Improved in vitro excystation procedure for *Giardia lamblia* cysts. *J Clin Microbiol.*, 709-710, 1981.
- 105. Ridley MJ, Ridley DS:** Serum antibodies and jejunal histology in *Giardiasis* associated with malabsorption. *J Clin Pathol.*, 29(1): 30-34, 1976.
- 106. Roberts-Thomson IC, Anders RF, Bhathal PS:** Granulomatous hepatitis and cholangitis associated with *Giardiasis*. *Gastroenterology*, 83(2): 480- 483, 1982.
- 107. Rodulescu S, Meyer EA:** In vitro cultivation of *Giardia* trophozoites. (E. A. Meyer Ed), *Giardiosis; Elsevier Science Publishers B.V*, 99-110, 1990.
- 108. Rosekrans PC, Lindeman J, Meijer CJ:** Quantitative histological and immunohistochemical findings in jejunal biopsy specimens in *Giardiasis*. *Virchows Arch Pathol Anat Histol.*, 393(2):145-151, 1981.
- 109. Rosoff JD, Sanders CA, Sonnad SS, De Lay PR, Hadley WK, Vincenzi FF, Yajko DM, O'Hanley PD:** Stool diagnosis of *Giardiasis* using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia* – specific antigen 65 (GSA65). *J Clin Microbiol.*, 27(9): 1997-2002, 1989.
- 110. Rosoff JD, Stibbs HH:** Isolation and identification of a *Giardia lamblia* specific stool antigen (GSA 65) useful in coprodiagnosis of *Giardiasis*. *J Clin Microbiol.*, 23(5): 905-910, 1986.
- 111. Saygı G:** Temel Tıbbi Parazitoloji. Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas, 1998.
- 112. Saygı G:** Genel Parazitoloji. Genişletilmiş 2. Baskı. Esnaf ofset matbaacılık, Sivas, 1999.
- 113. Schaefer FW III:** Methods for excystation of *Giardia*. *Giardiasis* (E.A.Meyer Ed), Elsevier Science Publishers B.V, 111-133, 1990.

- 114. Schaefer FW III, Rice EW, Hoff JC:** Factors promoting in vitro excystation of *Giardia muris* cysts. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 78: 795-800, 1984.
- 115. Schupp DG, Erlandsen SL:** Determination of *Giardia muris* cyst viability by differential interference contrast, phase, or brightfield microscopy. *J Parasitol.*, 73(4): 723-729, 1987.
- 116. Scott KGE, Logan MR, Klammer GM, Teoh DA, Buret AG:** Jejunal Brush border microvillus alterations in *Giardia muris*- infected mice: Role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infection and Immunity.*, 68(6): 3412-3418, 2000.
- 117. Smith PD, Gillin FD, Brown WR, Nash TE:** IgG antibody to *Giardia lamblia* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Gastroenterology.*, 80: 1476, 1981.
- 118. Soliman MM, Taghi-Kilani R, Abou-Shady AF, El-Mageid SA, Handousa AA, Hegazi MM, Belosevic M:** Comparison of serum antibody responses to *Giardia lamblia* of symptomatic and asymptomatic patients. *Am J Trop Med Hyg.*, 58(2): 232-239, 1998.
- 119. Sullivan PB, Neale G, Cevallos AM, Farthing MJ:** Evaluation of specific serum anti-*Giardia* IgM antibody response in diagnosis of Giardiasis in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 85(6): 748-749, 1991.
- 120. Susano RC, de Quiros JF, Caminal L, Ferro J, Busono C, Gomez C:** [Reactive arthritis caused by *Giardia lamblia* in a patient with secretory IgA deficiency]. *Acta Med Port.*, 6(12): 593-597, 1993.
- 121. Taylor GD, Wenman WM:** Human immune response to *Giardia lamblia* infection. *J Infect Dis.*, 155(1): 137-140, 1987.
- 122. Tewari SG, Tandon BN:** Functional and histological changes of small bowel in patients with *Giardia lamblia* infestation. *Indian J Med Res.*, 62(5): 689-695, 1974.
- 123. Thompson RCA, Hopkins RM, Homan WL:** Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today.*, 16(5):210-

217, 2000.

- 124. Thompson RIC, Mitchell GF:** Giardiasis in mice: Prolonged infections in certain mouse strains and hypothyroid (nude) mice. *Gastroenterology*, 75: 42-46, 1978.
- 125. Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery AJ:** *Giardia*: From Molecules to Disease CAB International, Cambridge, 1994.
- 126. Tukhi MHA, Ahdal MNA, Ackers JP:** A simple method for excystation of *Giardia lamblia* cysts. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 85(4): 427-431, 1991.
- 127. Tukhi MHA, Ahdal MNA, Ackers JP, Peters W:** Prevalence of *Giardia lamblia* infection in the city of Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Medical Journal*, 17(4): 482-486, 1996.
- 128. Tukhi MHA, Ackers JP, Ahdal MNA, Peters W:** Enzyme-linked Immunosorbent assay for the detection of anti- *Giardia* specific Immunoglobulin G in filter paper blood samples. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 87: 36-38, 1993.
- 129. Tukhi MHA, Ackers JP, Ahdal MNA, Taha MA, Peters W:** ELISA for detection of anti- *Giardia* specific IgM: response in serum. *J Trop Med Hyg.*, 96: 333-336, 1993.
- 130. Tukhi MHA, Ahdal MNA, Das SR, Sadıqı S, Sıddıqı Y, Ackers JP, Peters W:** Pathogenicity and antigenic components of excysted *Giardia lamblia* isolated from patients in Riyadh, Saudi Arabia. *Am J Trop Med Hyg.*, 45(4): 442-452, 1991.
- 131. Unat EK, Yücel A, Aktaş K, Samastı M:** Unat'ın Tıp Parazitolojisi. (5. Baskı) İst. Üni. Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları, Yayın No: 15, 1995.
- 132. Velasques E, Reyes L, Thors C, Miettinen A, Chinchilla M, Linder E:** Autoantibodies give reactions in the serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 87: 35, 1993.
- 133. Vidal MFC, Gilman RH, Ungar LP, Varestegui MR, Benel AC, Marquis G:** Detection of *G. lamblia* antigen in children living in a

- Peruvian periurban shantytown. *J Clin Microbiol.*, 29(3): 636-637, 1991.
- 134. Vinayak VK, Jain P, Naik SR:** Demonstration of antibodies in Giardiasis using the immunodiffusion technique with *Giardia* cysts as antigen. *Ann Trop Med Parasitol.*, 72(6): 581-582, 1978.
- 135. Visvesvara GS:** Axenic growth of *Giardia lamblia* in Diamond's TPS-1 medium. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 74(2): 213-215, 1980.
- 136. Visvesvara GS, Dickerson JW, Healy GR:** Variable infectivity of human- derived *Giardia lamblia* cysts for mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Clin Microbiol.*, 26(5): 837-841, 1988.
- 137. Visvesvara GS, Smith PD, Healy GR, Brown WR.** An immunofluorescence test to detect serum antibodies to *Giardia lamblia*. *Ann Intern Med.*, 93(6): 802-805, 1980.
- 138. Wallis PM, Wallis HM:** Excystation and culturing of human and animal *Giardia* sp. by using gerbils and TYI-S-33 medium. *App Environ Microbiol.*, 51: 647- 651, 1986.
- 139. Williamson AL, O'Donoghue PJ, Upcroft JA, Upcroft P:** Immune and pathophysiological responses to different strains of *Giardia duodenalis* in neonatal mice. *Int J Parasitol.*, 30(2): 129-136, 2000.
- 140. Winiğcka J, Kasprzak W, Kociecka W, Plotkowiak J, Myjak P:** Serum antibodies to *Giardia intestinalis* detected by immunofluorecence using trophozoites as antigen. *Tropenmed Parasitol.*, 35(1): 20-22, 1984.
- 141. Wittner M, Maayan S, Farrer W, Tanowitz HB:** Diagnosis of Giardiasis by two methods. Immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Arch Pathol Lab Med.*, 107(10): 524-527, 1983.
- 142. Yassien NA, el-Kowrany SE, Atta FA, Ghoraba HM:** Immunological and histopathological study on splenectomized mice infected with *Giardia lamblia*. *J Egypt Soc Parasitol.*, 26(3): 661-669, 1996.
- 143. Yılmaz M:** Giyardi yazın Tanısı ve *Giardia intestinalis* (Lambl, 1859) Alexief, 1914 Üzerine Çalışmalar. C.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi, 1985.

144. Zheng-yi W, Lu Si -qi, Yue-qing Z, Jia- liang S, Yan W, Shu-huan G:

Investigations on the prevalance, immunodiagnosis and experimental model of Giardiasis. *Chinese Medical Journal.*, 99(12): 961-968, 1986.

