

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Nermin ŞAKRU

***GIARDIA INTESTINALIS* İZOLATLARININ
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Cemal ÇİÇEK

EDİRNE-2013

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde ve tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen danışmanım, Prof. Dr. Nermin Şakru'ya, sayın hocalarım, Prof. Dr. H. Murat Tuğrul'a, Prof. Dr. Őaban avuşlu'ya, Prof. Dr. Őaban Gürcan'a, Doç. Dr. Neşe Akış'a, Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin Turan'a Araş. Gör. Őebnem Bukavaz'a, Araş. Gör. Dr. Kıymet Tabakıoğlu'na, Edirne Devlet Hastanesi'nde görevli Dr. Özge Özen Karaşahin'e, asistan arkadaşlarıma ve laboratuvar personeli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
<i>GIARDIA</i> CİNSİNİN TAKSONOMİSİ	2
<i>GIARDIA</i> CİNSİNİN MORFOLOJİSİ	4
<i>GIARDIA INTESTINALIS</i> 'İN YAŞAM DÖNGÜSÜ.....	5
<i>GIARDIA</i> 'DA TÜR VE SUŞ BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	7
<i>GIARDIA INTESTINALIS</i> 'İN EPİDEMİYOLOJİSİ.....	8
GIARDİASİS	16
GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
BULGULAR	42
TARTIŞMA	50
SONUÇLAR	60
ÖZET	61
SUMMARY	63
KAYNAKLAR	65
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

bg	: Beta giardin
Bst	: Bacillus stearothermophilus
DFA	: Direk Floresan Antikor Testi (Direct Fluorescent Antibody test)
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
Ef-1 α	: Elongasyon faktör 1- alfa
EIA	: Enzim Immun Assay
ELISA	: Enzim-Linked Immuno Sorbent Assay
gdh	: Glutamat dehidrogenaz
IFA	: İndirek Floresan Antikor testi (Indirect Fluorescent Antibody test)
LAMP	: İlmige dayalı izotermal çoğaltma (Loop-Mediated Isothermal Amplification)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Deoksiribonükleik Asit (Random Amplification of Polymorphic DNA)
RFLP	: Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	: Ribo Nükleik asit
Taq	: Thermus aquaticus
TBE	: Tris Borat Etilendiamin Tetra Asetik Asit
tpi	: Trioz fosfat izomeraz
UV	: Ultraviyole

GİRİŞ VE AMAÇ

Giardia cinsi; insanları, vahşi ve evcil hayvanları etkileyen, yaygın olarak görülen bir bağırsak parazitidir (1,2). *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*) insanda hastalık yapan tek *Giardia* türü olmakla beraber, *Giardia* cinsinin diğer türleri evcil hayvanlarda, çiftlik hayvanlarında ve yabani hayvanlarda bulunur (3,4).

Giardia cinsi fekal oral yolla bulaşabilen, su ve gıda kaynaklı salgınlara neden olabilen ve toplum sağlığını etkileyen bir protozondur. Bu nedenle klinisyenlerin ve biyologların 300 yıldır merakını uyandırmaktadır (2). Dünyanın her tarafında görülmekte olup, yaygınlığı %20-30 arasındadır (5). Giardiasiste her yaş grubundan insan etkilenir. Yeni doğanlar ve çocuklardaki enfeksiyon beslenme bozukluğunu artırır (5,6). Enfeksiyona hem erkek, hem de kadınlar eşit derece duyarlıdır. *G. intestinalis*; sanitasyonun ve sağlıkla ilgili tedbirlerin zayıf olduğu yoksul bölgelerde endemik olarak yüksek oranda görülmektedir (7).

Ülkemizde paraziter hastalıkların prevalansı ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak *G. intestinalis* genotiplendirilmesi konusunda yapılmış sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (8,9,10,11). *G. intestinalis* suşlarının moleküler analizi konusunda Edirne ilinde ve Trakya bölgesinde daha önce hiç çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada; Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Merkez Laboratuvarı Parazitoloji Bölümü ve Edirne Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen *G. intestinalis* kisti ve/veya trofozoiti pozitif dışkı örneklerinin moleküler yöntemlerle analizi amaçlandı. Ayrıca bu çalışma ile bölgemizde bulunan *G. intestinalis* izolatları hakkında bilgi sahibi olmak, *G. intestinalis* genotiplerini belirlemek ve bu alanda yapılan toplum sağlığı çalışmalarına katkı sağlamak hedeflendi.

GENEL BİLGİLER

Giardia intestinalis ilk olarak 1681’de Antony van Leeuwenhoek tarafından, araştırmacının kendi dışkısını mikroskopta incelenmesi sonucu keşfedildi. Araştırmacı *Giardia*’yı “bazen çok güzel hareket eden hayvan hücrelerinden bazıları kan globlinden biraz daha büyük, diğerleri daha kk, boyları enlerinden daha düz görünümlü, temiz besi yerinde ve globülinlerin arasında yer değiştiren çabuk hareket etmesine karşın az mesafe kaydeden organizmalar olarak” tanımladı (12).

Giardia lamblia veya *Giardia duodenalis* olarak da bilinen *G. intestinalis*, memelilerde yaşamını sürdüren kamlı protozoondur (13).

GIARDIA CİNSİNİN TAKSONOMİSİ

Bir bağırsak protozoonu olan *Giardia*, Hexamitidae ailesine mensup olup, insanda hastalık yapabilen ve sindirim sisteminde yaşayan tek türdür (Tablo 1) (14,15).

Tablo 1. *Giardia intestinalis* taksonomisi (15)

Alem	Protista
Altalem	Protozoa
şube	Sarcomastigophora
Altşube	Mastigophora
Sınıf	Zoomastigophora
Takım	Diplomonadida
Aile	Hexamitidae
Cins	<i>Giardia</i>
Tr	<i>intestinalis</i>

Giardia yapısının daha iyi anlaşılmasına 1990'lerden sonraki çalışmalar yol açtı (1). Ancak *Giardia* türlerinin arasındaki morfolojik farklılıkların az olması sınıflandırmayı zorlaştırmıştır. *G. intestinalis* izolatlarının genetik yapıları aşırı heterojen olup, ilk moleküler çalışmalarda bu izolatlar Genotip A ve B olmak üzere iki ayrı genotipe ayrıldı (1,16,17).

Yirminci yüzyılın ilk yarısında *Giardia* cinsi ile ilgili yapılan ilk tanımlamalar oldukça karmaşıktı. Sınıflandırma morfolojik yapıdan ziyade temelde hastalık etkeni olduğu konağa göre yapıldı (1). 1952'de Francis Filice *Giardia* türlerini morfoloji ve orta cisimlerini dikkate alarak sınıflandırdı ve yaptığı bu sınıflandırma ile *G. intestinalis*, *G. muris* ve *G. agilis* olmak üzere üç farklı *Giardia* türü tanımladı. *G. intestinalis*, insan dahil bir çok memelide, *G. muris*; kemirgenlerde, *G. agilis*; amfibilerde bulunur. 2000'li yıllarda elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar neticesinde üç farklı *Giardia* türü daha sınıflandırmaya dahil edildi. Bunlar; *G. psittaci*; muhabbet kuşlarında, *G. ardae*; balıkçılarda, *G. microti*; tarla faresi ve misk faresinde bulunmaktadır (18).

Günümüzde *G. intestinalis* sınıflandırılması genotiplerine göre yapılmaktadır. Yedi (Genotip A-G) alt türe ayrılmaktadır (Tablo 2) (2,19,20,21). Moleküler çalışmalar sonucunda *G. intestinalis* suşlarının alt genotipleri belirlenerek, potansiyel zoonotik rezervuarlar ve insanlardaki enfeksiyonlar ve geçiş döngüleri arasındaki ilişkiler belirlenebilmektedir (2,19,20).

Tablo 2. *Giardia* türleri ve *G. intestinalis* genotiplerinin konaklardaki dağılımı (2,4,21)

<i>Giardia</i>		Konaklar
<i>G. intestinalis</i>	Genotip A	İnsanlar, diğer primatlar, köpekler, kediler, kemirgenler, diğer vahşi memeliler, çiftlik hayvanları
	Genotip B	İnsanlar, diğer primatlar, köpekler, çiftlik hayvanları, kemirgenler, diğer vahşi memeliler, çiftlik hayvanları
	Genotip C/D	Köpekler, kediler, kurtlar
	Genotip E	Sığırlar, diğer çiftlik hayvanları
	Genotip F	Kediler
	Genotip G	Sıçanlar
<i>G. agilis</i>		Amfibiyanlar
<i>G. ardae</i>		Kuşlar
<i>G. microti</i>		Fareler
<i>G. muris</i>		Kemirgenler
<i>G. psittaci</i>		Kuşlar

GIARDIA CİNSİNİN MORFOLOJİSİ

Giardia cinsi, sahip olduğu çekirdek ve çekirdek zarı, hücre iskeleti elemanları ve hücre içi zarlı organelleri ile tipik olarak ökaryotik bir organizmadır (18).

Trofozoit ve kist formları bulunmaktadır.

Trofozoitleri yaklaşık olarak 10-12 µm uzunluğunda ve 5-7 µm genişliğindedir. Hücre iskeletini oluşturan yapılar; bir median gövde, iki üç adet ventral yüzey, ön tarafta bir adet konkav yüzey, değişken sayıda emici disk veya ventral disk ve dört çift kamçıdır. İki çekirdek, bir golgi aparatı, sitoplazmada lizozomal vakuelleri mevcuttur (18,22,23). Sitoplazmasında ribozomal ve glikojen granülleri vardır. *Giardia* primitif ökaryottur. Mitokondri, düz endoplazmik retikulum, çekirdekçik ve peroksizomlar gibi pek çok ökaryotik organel yoktur (18,22,24). Golgi organeli enkistasyon sırasında trofozoitlerde görülebilir (18,23).

Yapışma diskinin arkasında vücut uzunluğunun dörtte biri büyüklüğünde iki oval çekirdek, iki median cisim, iki çekirdeğin arasından her birinden birer adet kamçının çıktığı kaide cisimciği (blefaroblast) bulunmaktadır (25). Median cisimler pençe seklindedir ve fonksiyonlarının emici diskle bağlantılı olabileceği belirtilmiştir (22). Bağırsakta tutunmayı sağlayan emici diskler iki çekirdeğin bulunduğu alanda gövdenin ön kısmında bulunur (7).

Lateral kamçı çifti doğrudan vücudun iki yanından çıkar. Dorsal kamçı çifti ise çapraz yaparak yapışma diskinin ön tarafından çıkararak dorsa-laterale doğru uzanır. Ventral kamçı çifti yapışma diskinin arka ucunda vücuttan çıkarken, posterior kamçı çifti ise orta blefaroblastlardan kalın iki aksonem olarak çıkmakta ve vücudun en arka kısmından serbest kalarak geriye doğru uzanmaktadır (25). Kamçılar trofozoitlerin hareketinde önemli rol oynamasına karşın konağın ince bağırsak duvarına tutunmasında etkili değildir (18).

Giardia türlerinin trofozoitleri farklı morfolojik yapıdadır ve bu türlerin tanımlanmasında önemli rol oynar. *Giardia* türlerinin tanımlanmasında kullanılan morfolojik ayırım özellikleri Tablo 3'te görülmektedir (2).

Trofozoitler bağırsak boşluğunda kistlere dönüşür. Dışkıda mikroskopik incelemede görülen oval kistlerin boyutları 8-14 µm ile 7-10 µm arasında değişmektedir (26,27). Kist duvarı düz ve renksizdir. Kist lügol solüsyonu ile boyandığında, median cisimler ve çekirdekler görülür (26). Kist duvarı ince hyalin yapıdadır. Başlangıçta iki çekirdekli iken, kist olgunlaştığında dört çekirdek, aksonemler ve median cisimler oluşur (27).

Giardia anaerobik, prokaryotlara benzeyen özelliklere sahip, sıra dışı ökaryotik bir organizmadır (22,24).

Tablo 3. *Giardia* türlerinin morfolojik özellikleri (2)

Tür	Morfoloji	Uzunluk	Genişlik
<i>G. intestinalis</i>	Armut şekilli trofozoitler, Pençe şekilli median gövde	12-15 µm	6-8 µm
<i>G. agilis</i>	Uzun dar trofozoitler, Çomak şeklinde median gövde	20-30 µm	4-5 µm
<i>G. muris</i>	Yuvarlak trofozoitler, Küçük yuvarlak median gövde	9-12 µm	5-7 µm
<i>G. ardeae</i>	Yuvarlak trofozoitler, ventral disk çentikli, kuyruklu kamçı, yuvarlak-oval pençe median gövde	~10 µm	~6.5 µm
<i>G. psittaci</i>	Armut gövdeli trofozoitler, ventro-lateral kenar yok Pençe şekilli median gövde	~14 µm	~6 µm
<i>G. microti</i>	Trofozoitler <i>G. intestinalis</i> ' e benzer.	12-15 µm	6-8 µm

GIARDIA INTESTINALIS'İN YAŞAM DÖNGÜSÜ

Yaşamını tek konak üzerinde sürdüren bir parazit olan *G. intestinalis*'in konak zinciri bir insandan diğer insana aktarılarak devam eder. *Giardia* cinsi iki ayrı formda yaşamını sürdürür. Bu formlar çoğalan ve beslenen trofozoit ile çevre koşullarına dayanıklı şekli olan kist formudur (28,29).

Trofozoit Formu

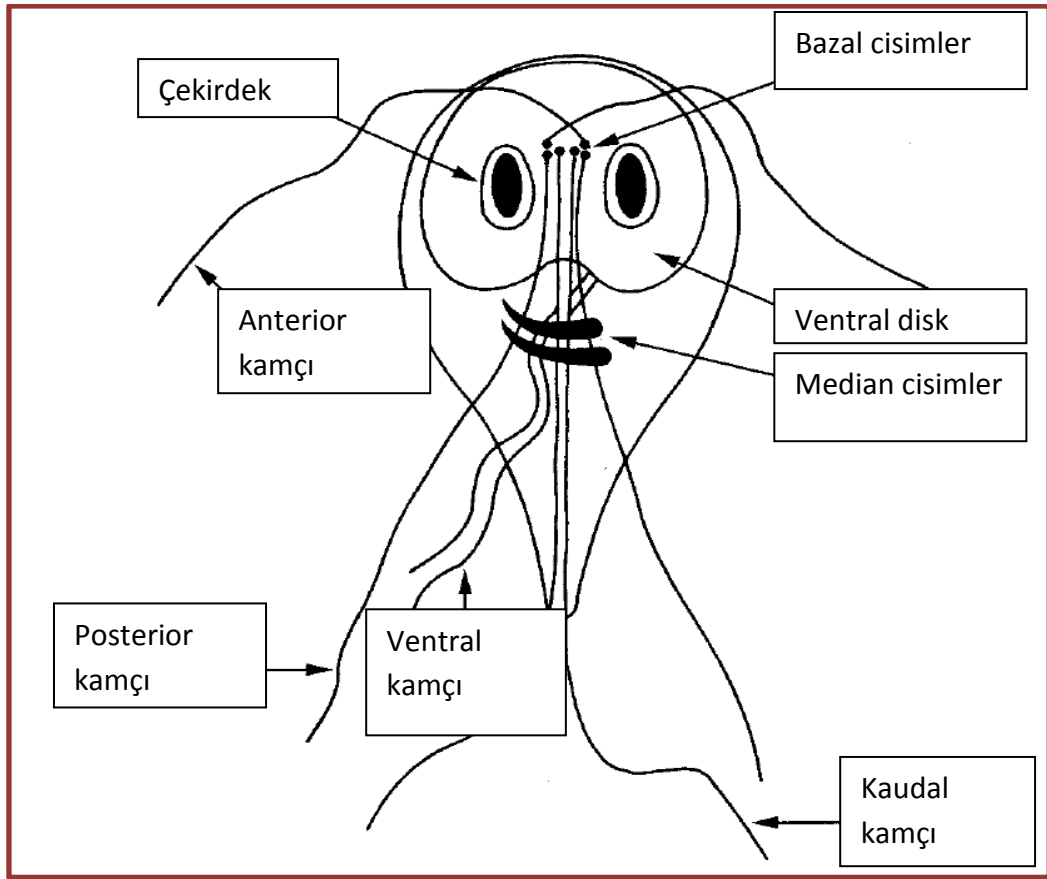
Giardia intestinalis'in trofozoit evresi gözyaşı veya boyuna ikiye bölünmüş armut şekline benzemektedir (22). Trofozoit uzun aksı boyunca yavaş ve kararsız bir şekilde hareket eder (7).

Ekskistasyon ince bağırsaklarda kistlerden trofozoit oluşum sürecidir. Bu süreçte trofozoitler düşük pH, duodenal ve pankreatik sıvıların etkisiyle oluşur. Daha sonra ince bağırsakta epitele bağlanır ve çoğalır (5).

Trofozoitlerde bulunan konkav yapılı ventral disk ile diğer tüm kamçılı organizmalardan ayrılır. Trofozoitlerin konak ince bağırsağında hayatta kalmasında, hücre iskeleti ve özellikle bu ventral disk önemli bir rol oynamaktadır. Bu organelle *Giardia* konak hücrenin ince bağırsak yüzeyine tutunarak gerekli olan besin maddelerini bağırsaktan alır. *Giardia* kültür ortamında da ventral disk yardımı ile tutunur (Şekil1)(18). Ventral emici disklerde bulunan mikroşeritler; sitoskelatal proteinler ve *Giardia*'ya özgü beta giardinden oluşmaktadır ve çapraz köprülerle mikrotübüllere bağlanmayı sağlar (7).

Trofozoit formu ince bağırsağın proksimal bölümünde kolonize olur. Bu durum ishal ve malabsorbsiyona neden olur (5). Trofozoitte görünür halde yer alan ve aynı boyutlara sahip transkripsiyonel olarak aktif mikro çekirdek ve makro çekirdek bulunur (18,30). Bu iki çekirdek varlığı *Giardia* spp. ve diğer diplomonadlarda gözlenen özgün bir özelliktir (18).

Eşeyli çoğalma *Giardia* türlerinde hiçbir zaman gözlenmemiştir, ancak eşeyli çoğalma potansiyeli ile ilgili bazı deliller bulunmaktadır (4,18). Çoğalma esnasında yavru hücrelere aktarılan çekirdeklerden bir tanesi eski çekirdek diğeri ise yeni çekirdektir (31).



Şekil 1. *Giardia intestinalis* trofozoitinin şematik yapısı (24)

Kist Formu

Trofozoitler bağırsak yüzeyinden ayrılıp aşağıda ince bağırsaklarda alt kısımlara ilerlerken kist formuna dönüşürler (22). Trofozoitlerden kist oluşum sürecine enkistasyon denir. Bu süreç üç kısımda incelenir. Enkistasyon sürecinin spesifik genler aracılığıyla uyarılması, ikinci olarak kist duvar bileşenlerinin sentezlenmesi, hücre içinde nakli ve son olarak ekstrasellüler kist duvarının yapılması gerçekleşir (32). Kist oluşumunda önce kamçıları kısılır ve hareket yavaşlar, ardından sitoplazmanın yoğunlaşması ve kalın kist duvarının oluşumu gözlemlenir (22).

Gelişim sürecinde iki çekirdekli kistin çekirdekleri bölünür ve iki çekirdekli kisten dört çekirdekli kist meydana gelir. Eğer bağırsak hareketleri çok hızlı olursa, enkistasyon için yeterli zaman olmaz, dışkıda trofozoitlerde görülebilir. Trofozoit dış ortamda yaşayamaz, kiste dönüşür (Şekil 2) (22).

Giardia intestinalis'in yaşam döngüsünde trofozoit formu çoğalma evresindeki form iken, kist formu çevresel streslere karşı oluşan formdur (33). Kist oluşmasında katkısı olan çevresel etkenler, primer safra tuzları ve yüksek pH'dır (22). Trofozoitler 37 °C'de yaşamlarına devam ederlerken, 21°C'de kist haline dönüşürler. Kistler çeşme suyunda 8 °C'de yaklaşık 5 hafta kadar canlı kalabilir ve dezenfeksiyon dozundaki klor miktarına dirençlidirler (7). Kiste trofozoite göre metabolizma oranı %10 ile %20 arasında değişmektedir (34). Giardiasis genelde kist formu ile bulaşır, insanda enfeksiyon oluşması için 10 kist yeterlidir (5,20,22). *G. intestinalis*'in yaşam döngüsü Şekil 2'de görülmektedir.

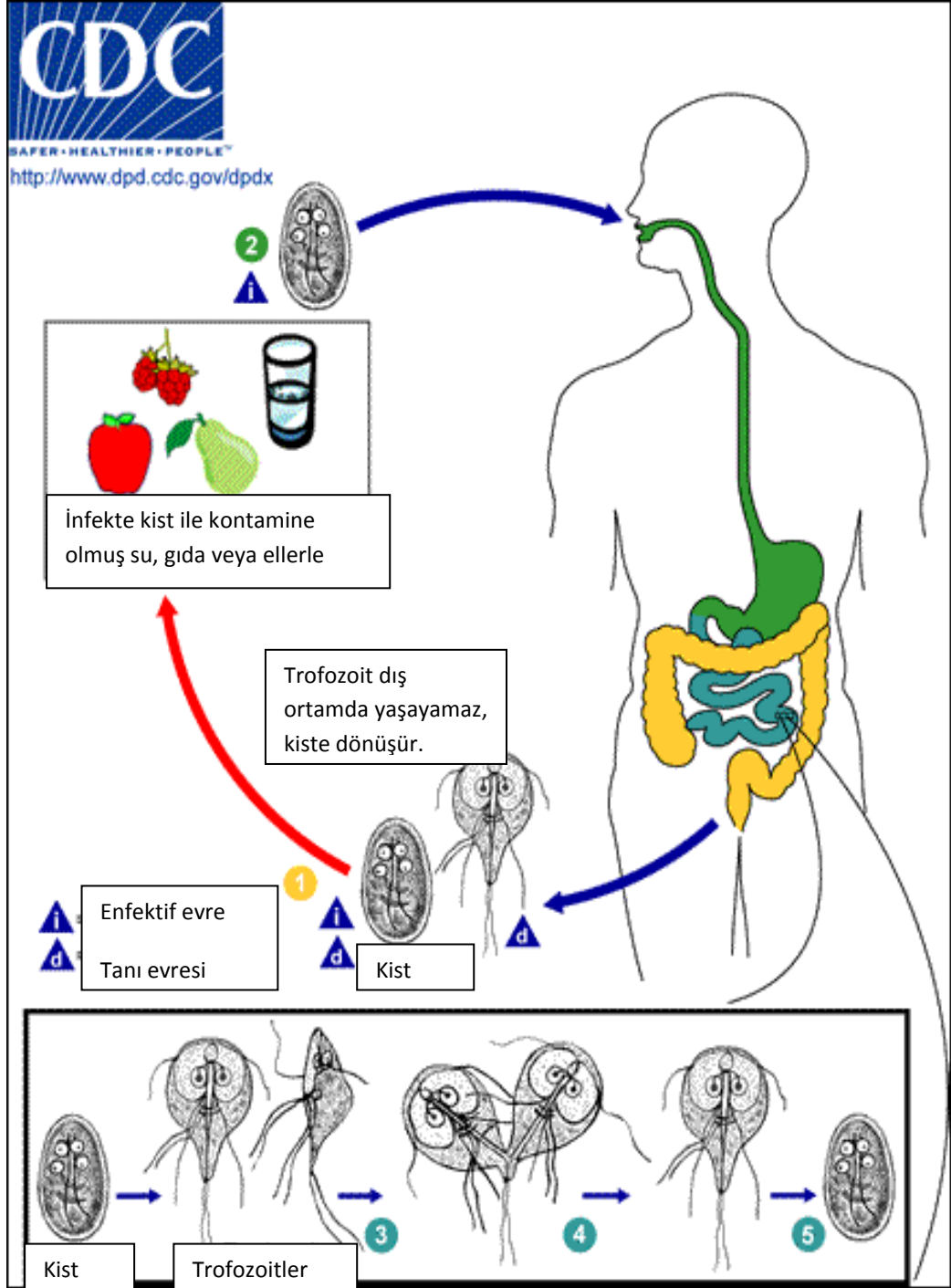
GIARDIA'DA TÜR VE SUŞ BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Giardia türlerinin belirlenmesi ışık mikroskopundaki trofozoitin ve median cismin şekline, kamçı, ventral disk ve ventero-lateral oluk özelliğine göre yapılır (Tablo 2) (2).

Ancak, moleküler teknikler ile *Giardia* cinsinin daha önceden tanımlanamamış genetik farklılıklarının analizini ve karakterinin belirlenmesini sağlar. İnsanlarda ve evcil hayvanlardaki giardiasis etkeninin epidemiyolojisini, genetik popülasyonunu ve taksonomisini belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır (33). Bu yöntemler aynı zamanda *Giardia* izolatlarının konak aralığının ve patogenezinin değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir (18,36).

Genetik çalışmalar sonucunda bilinen pek çok *G. intestinalis* genotipi olmasına rağmen insanlarda ve diğer memeli türlerinde Genotip A ve B olarak iki ana genetik grubun bulunduğu görülmüştür (1,23). Genotip C-G ise insanlarda bulunmaz ve konağa özgü gruplardır (20). *G. intestinalis* genotipleri ile hastalık belirtileri arasında ilişkinin olabileceğini gösterilmiştir. Avustralya'da çocuklarda yapılan araştırmada Genotip A ishal ile ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde Bangladeş'te yapılan çalışmada Genotip A, Genotip B'ye göre iki kat fazla ishal şikâyeti ile ilişkilendirilmiştir (37).

Giardia tür ve suşlarının belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemlerden tanı bölümünde ayrıntılı olarak bahsedilecektir.



Şekil 2. *Giardia intestinalis* cinsi protozoonların yaşam döngüsü (35)

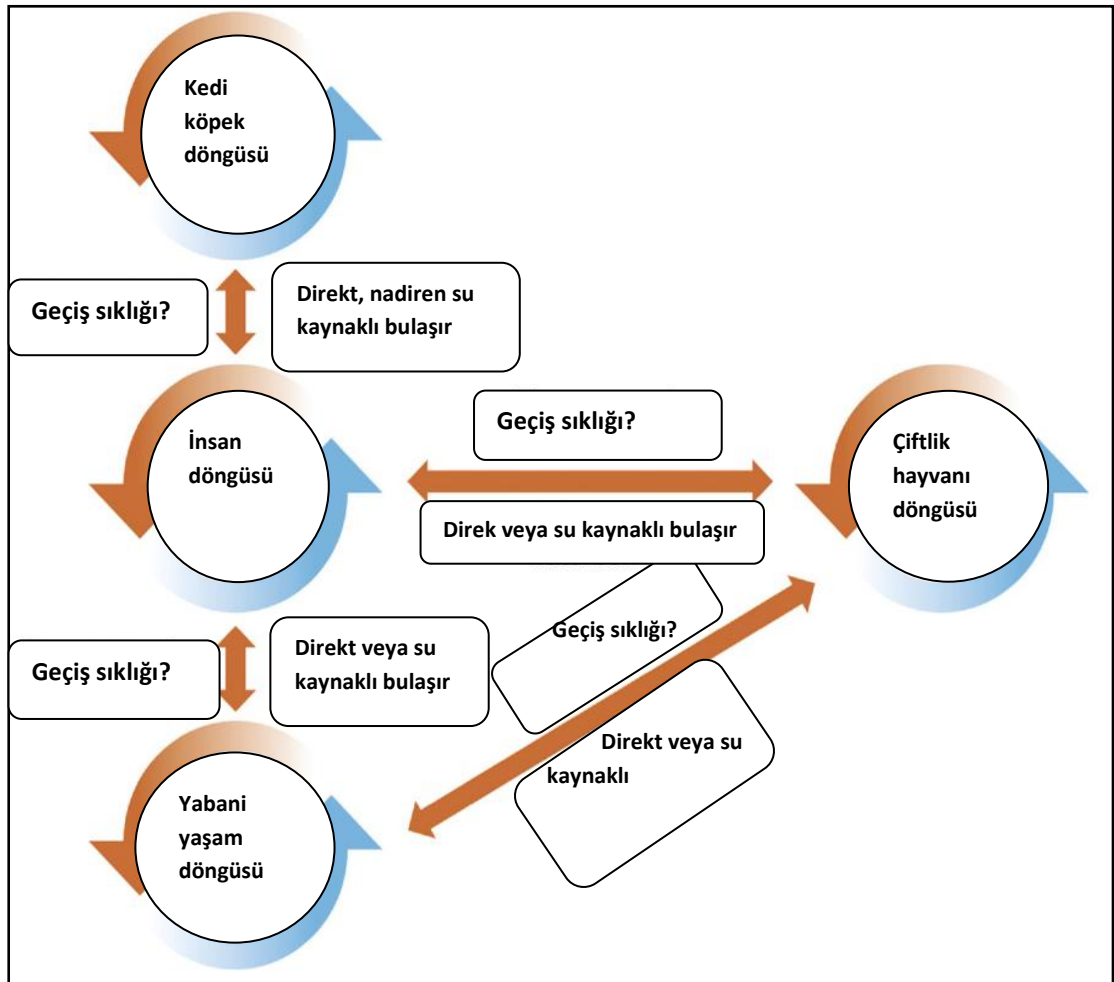
GIARDIA INTESTINALIS'İN EPİDEMİYOLOJİSİ

Giardia intestinalis'in Epidemiyolojik Önemi

Giardia kistlerinin bulaşması direkt veya indirek olarak, fekal oral yolla olmaktadır. Bu insanlar ve hayvanlarda kendi aralarında olabildiği gibi çapraz geçiş şeklinde de olabilir.

Ancak bu geçiş Őekillerinin sıklığı bilinmemektedir (Şekil 3). Artılmamış eğence suları, banyoda olumsuz hijyen koşulları, lağım suları, yüzme havuzu gibi su kaynaklarından ve kontamine olmuş gıdalardan bulaşma olmaktadır (38,39).

Giardiasis sanitasyonun yetersiz olduğu bölgelerde daha yüksek yaygınlığa sahiptir. Tüm yaş grupları *Giardia*'dan etkilenebilmekle beraber endemik bölgelerde özellikle yeni doğanlarda görölme daha siktir (6). Ayrıca gıda kaynaklarının hazırlanması sırasında kontamine su kullanımı veya ellerden kaynaklanan bulaşma sonucu *G. intestinalis* geçişi olur (38,39).



Şekil 3. *Giardia* cinsinin bulaşma döngüleri (2)

Bulaşma Yolları

Giardia intestinalis kistleri son derece enfektiftir ve enfeksiyon oluşması için 10 kistin alınması yeterlidir (22). BulaŐmada temel etken, bulaŐmadan sorumlu form olan kistin uygun çevre koŐullarında uzun süre canlılığını koruyabilmesidir (5). Kistler özellikle soğuk su

yüzeyinde birkaç hafta canlılığını koruma yeteneğine sahiptir. Kontamine suların içilmesi ile en sık bulaşma olurken (5,40), gıda yoluyla geçiş daha az oranda görülmektedir (7,29,40).

Suların *G. intestinalis* ile kontaminasyon sonucu epidemik salgınların olduğu rapor edildi (22,41). Standart klorlama ile kist formları inaktive edilemez (5). Bu nedenle, şehirlerde su sisteminde yetersiz filtrasyon uygulanması, *G. intestinalis*'e bağlı su ve gıda kaynaklı salgınların oluşmasına neden olabilir (42,43). Hastalığın oluşmasında insanların kullandığı sularda dışkıya bağlı kirlenmenin olması ve bu kirlenmenin derecesi önemli rol oynar (44).

Bulaşma özellikle çocuklarda yaygındır. Çocukların ev etrafında bulunan dışkılar ile elle teması ve ellerin ağza götürülmesi ile fekal oral bulaş görülür (7,40). Gündüz bakımevlerinde görülen *G. intestinalis* ishalleri salgınlara neden olabilir. Cinsel olarak aktif homoseksüel erkeklerde insandan insana bulaşma olabilmektedir (43,45).

Dünya’da *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis görülme sıklığı ülkelere göre değişkenlik göstermekte ve çevresel hijyenin düşük olduğu bölgelerde daha yüksek oranda görülmektedir. Dünya’da görülme sıklığının yüksek olduğu bölgeler, Rusya (eski SSCB), Güney ve Güneydoğu Asya, Güney Amerika, Meksika ve Güney Afrika olarak sıralanabilir (6). DSÖ’nün tahminlerine göre Dünya’da 200 milyon kişi semptomatik giardiasis hastasıdır ve her yıl 500.000 yeni olgu eklenmektedir (46). Farklı Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda *G. intestinalis* prevalansı %1-17 arasında değişmektedir (47).

Giardia intestinalis Norveç’in Bergen şehrinde 2004 yılında 2500 kişiyi etkileyen su kaynaklı bir salgına neden oldu. Bu salgında kesin olgu sayısı 1300 olup, salgının kaynağı kanalizasyon borularında sızıntının olması ve içme suyuna yetersiz müdahale olduğu belirlenmiştir(41). Julio ve ark.’nın (48) Portekiz’de gündüz çocuk bakım evinde yaptığı çalışmada *G. intestinalis* prevalansı toplumda %6.8 olarak saptanmıştır. İspanya’nın Valencia şehrinde konaklayan, Afrika’dan göç etmiş Sahra çocuklarında intestinal parazitik enfeksiyon oranları Soriano ve ark. (49) tarafından araştırılmıştır. Yaşları altı ile 12 arasında değişen 270 çocuktan dışkı örneklerinin incelendiği çalışmada; 78 (%29) çocukta *G. intestinalis* görülmüştür.

İran’ın Tahran şehrinde 2005 yılında intestinal parazitlerin epidemiyolojisinin belirlenmesi için bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 18 aylık bir süre boyunca Zakaria Razi Laboratuvarına gelen hasta örnekleri ve sosyo demografik bilgileri incelenmiştir. 4.371 hastanın, 466’sında intestinal parazit bulunmuştur. En sık %10.7 ile *Blastocystis hominis* ve

G. intestinalis görülmüştür. Olguların 712'si erkek (%29.7), 49'u kadın (%21.6) toplam 120 (%25.8) kişide *G. intestinalis* çıkmıştır (50).

Tacikistan'ın batısında Matthys ve ark. (51) ilkokullarda parazit yaygınlığını ve risk faktörlerini araştırmıştır. 602 çocukta yapılan çalışmada, helmintler %32, protozoonlar %47.1 oranında bulunmuştur. En sık görülen helmint *Hymenolepsis nana* (%25.8) iken en sık görülen protozoon *G. intestinalis* (%26.4) olmuştur. Çalışmada *G. intestinalis*'ten korunmada içme suyu olarak çeşme suyunun kullanılması ve hijyen koşullarının düzeltilmesinin faydalı olabileceği belirtilmiştir.

Mehraj ve ark. (52) 2006'da Pakistan'da 1-5 yaş arası 350 çocuğa ait dışkı örneğini incelemiştir. İntestinal parazit oranı %52.8 oranı ile en sık görülen parazit *G. intestinalis* olmuştur Sık görülen diğer parazitler *Ascaris lumbricoides*, *B. hominis* ve *H. nana* olmuştur. Olguların %43'ü bir, %10'u birden fazla parazit ile enfekte çıkmıştır. Parazitlerin yüksek oranda bulunmasının nedeninin fakirlik olduğu, fakirliğin azaltılmasının parazit taşıyıcılığını azaltacağı, sağlık ve hijyen alanında eğitime ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde toplumda görülme oranı %1.5 ile %20 arasında değişmektedir ve kontamine su kaynaklı ishallerin esas nedeni olduğu düşünülmektedir (26). Toplum sağlığını olumsuz etkilemesi nedeniyle, ABD'de 2002'den itibaren *Giardia* ile ilgili sürveyans çalışması yapılmaktadır (53). 2003 yılında yapılan bir çalışmada *G. intestinalis* ABD'de klinik laboratuvarlarda dışkı örneklerinden en sık izole edilen parazittir ve laboratuvara gelen dışkı örneklerinden izole edilme oranı %4'tür (43). Su kaynaklı salgınların önemli bir nedeni genellikle altyapı sorunları ve gerekli korunma tedbirlerinin yeterince alınmamasıdır. Eylül 2003'te ABD'nde Boston şehrinde Halk Sağlığı laboratuvarında örneklerde *G. intestinalis* saptanmış ve zamanla olgu sayısında artış gözlenmiştir. Bunun nedeninin kentte bulunan yüzme havuzu olduğu belirlenmiş ve salgında havuzu kullanan 584 kişiden 149'unun hastalığa yakalandığı saptanmıştır (54).

Küba'nın Matanzas şehrinde gündüz bakımevinde bulunan beş yaş altındaki çocuklarda intestinal parazit oranına bakılmıştır. Yapılan vaka kesit çalışmasında 104 çocukta üçer sefer taze dışkı örneği toplanmıştır. Çalışmada çocukların %71.1'inde en az bir tane intestinal parazit saptanmıştır. En sık saptanan iki parazit olan *G. intestinalis* ve *Blastocystis* spp. görülme oranları sırasıyla 57 (%54.8) ve 40 (%38.5) bulunmuştur (55).

Kamerun'un Buea bölgesinde insanlarda intestinal protozoon enfeksiyonlarının araştırıldığı bir çalışmada, rastgele seçilmiş 356 hastadan dışkı örnekleri alınmıştır. Olguların %28.1'inde (100/356) protozoon bulunmuştur. Kadınların 56/182 (%29.7) erkeklerden 46/174

(%26.4) daha fazla enfekte olduğu görülmüştür. Parazitoz oranı kırsal alanda 55/142 (%38.7), kentsel alandan 45/214 (%21.0) daha yüksek bulunmuştur. 6-12 yaş grubunda enfeksiyon 30/70 (%42.9) en yüksek oranda bulunmuştur. Saptanan intestinal protozoonlardan *Entamoeba histolytica* (%24.4), *Entamoeba. coli* (%11.2) ve *G. intestinalis* (%0.6) oranında görülmüştür (56).

Yağmur sezonunda meydana gelen ishal nedenlerini araştırmak için Madagaskar'da 2008-2009 yıllarında vaka kontrol çalışması yapılmıştır. 14 farklı bölgede akut ishalleri 2196 ve beş yaşın altındaki 496 çocuk çalışmaya alınmıştır. Çalışmada rotavirus, adenovirus ve astroviruslere ticari ELISA kiti ile tanı konulmuş ve bu tanımlar PZR ile kesinleştirilmiştir. İshalleri hastaların %54.6'sında ve sağlıklı bireylerin %45.9'unda bir etken rastlanılmıştır. İshalleri hastalarda en sık rastlanılan etkenin *Campylobacter* spp. (%9.7) olduğu görülmüştür. *E. histolytica*, *Trichomonas intestinalis* ve *G. intestinalis*'e ishalleri olanlarda olmayan gruba göre daha sık rastlanılmıştır(57).

Türkiye'de *Giardia intestinalis*

Türkiye'de görülme sıklığı sosyoekonomik koşullara bağlı olarak değişkenlik göstermekte olup, yapılan yayınlarda %1.24 ile %28.57 arasında bildirilmektedir. Bu yayınlara göre en düşük oran İzmir'de, en yüksek oran ise Diyarbakır'dadır (58,59). 2010 yılı rakamlarına göre Türkiye'de bildirilen olgu sayısı 14605 olup insidans yüz binde 20.07 dir (60).

Trakya bölgesi *G. intestinalis* görülme sıklığı açısından, olguların en az görüldüğü bölgedir. *G. intestinalis*'in görülme oranları Karadeniz bölgesinde %17, İç Anadolu bölgesinde %15.9, Akdeniz bölgesinde %14.7, Doğu Anadolu bölgesinde %11.4, Ege bölgesinde %8.5 ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde %6.2 iken, Marmara bölgesinde %4.7 dir (61).

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi çocuk polikliniğine çeşitli yakınmalarla getirilen 400 çocukta yapılan incelemede çocukların 156'sında (%39) bir veya daha fazla parazit saptandı. En sık görülen etkenler; *G. intestinalis* (%19.8) ve *Enterobius vermicularis* (%15) idi. Parazit rastlanma oranı; anne-baba eğitim düzeyi düşük, sosyoekonomik düşük seviye, ilköğretim çağında olanlar, kırsal bölgede oturanlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (62). Edirne'de Nisan 1983'te sosyoekonomik düzeyi farklı Meriç ve Kurtuluş İlköğretim okulu öğrencilerde bağırsak parazitleri oranları arasındaki fark incelenmiştir (63). 1997 yılında ise Otkun ve ark. (64) tarafından aynı okullarda çalışma

tekrarlanmıştır. Bu çalışmaya göre okul içindeki öğrenciler arasındaki sosyo-ekonomik düzey farklılıkları parazit sıklığını etkilemediği, *E. vermicularis* (%67) ilk sırada iken *G. intestinalis*'in (%27.5) ikinci sırada olduğu görülmüştür.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne 2005-2008 tarihleri arasında gastrointestinal yakınmalarla başvuran 14246 olgu değerlendirilmiştir. Örneklerin 1320'sinde (%9.3) bir veya birden fazla parazit saptanmıştır. *G. intestinalis* 176 (%1.24) örnekte bildirilmiştir (58). Şubat-Nisan 2005 tarihleri arasında Aydın ilinde yemekhanelerde çalışan 58 personelde bağırsak parazitleri varlığına bakılmıştır. 17 (%29.31) örnekte bir veya iki parazit görülmüştür. Bu parazitler dokuz kişide *B. hominis* (%15.51), beş kişide *E. vermicularis* (%8.62), bir kişide *G. intestinalis* (%1.72), bir kişide *E. histolytica/dispar* ve *E.coli* (%1.72) saptanmıştır (65).

Mersin İli Sosyal Hizmetler Çocuk Yuvası ve Yetiştirme Yurdunda yaşayan 106 çocuğun %43.4'ünde bir veya birden fazla parazit bulunmuştur. En sık *G. intestinalis* (%17)'e rastlanmıştır. DSÖ ve ABD Sağlık İstatistikleri Merkezi standartlarına göre çocukların %16,1'inin kısa boylu, %17'sinin düşük kilolu ve %14,1'inin zayıf olduğu belirlenmiştir. Çocuklarda saptanan parazitler ile fiziksel büyüme ve hijyen alışkanlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadığı bildirilmiştir (66).

Isparta'da bağırsak parazit prevalansının ortaya konması amacıyla, il merkezinde 6 sağlık ocağı bölgesinde bulunan 800 kişiden örnek alındı. 77 (%9.6) örnekte parazite rastlandı. *E. coli* 26 (%34.2), *G. intestinalis* 20 (%26.3), *E. vermicularis* 14 (%19.2), *B. hominis* 8 (%10.4), *Iodamoeba bütschlii* 4 (%5.2) örnekte olduğu saptanmıştır. Çalışmada aynı bölgede daha önceden yapılan çalışmalara göre parazit oranları düşük bulunmuştur (67).

Çulha ve ark. (68) Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına, 0-14 yaş grubundaki gastrointestinal ve anal kaşıntı şikâyetleriyle başvuran 602 çocuk hastayı çalışmaya almıştır. 104 örnekte bir ve birden fazla bağırsak paraziti saptanmıştır. Bunlar; 24 (%4.27) *G. intestinalis*, 9 (%1.64) *E. histolytica*, 3 (%0.53) *T. saginata*, 4 (%0.71) *Dicrocoelium dendriticum*, 51 (%9.09) *B. hominis* idi. İncelenen 534 selofanlı lam örneğinden 85'inde (%15.91) *E. vermicularis* bulunmuştur. Hatay ilinde bulunan kız ve erkek yetiştirme yurtlarında kalan çocuklardaki parazit sıklığını belirlemek için, 177 çocuk bağırsak parazitleri yönünden araştırılmıştır. Dışkı örneklerinin 87'sinde (%49.2) bir veya birden fazla parazit saptanmıştır. Saptanan parazitlerden en sık görülen; 57 (%32.2) örnekte *E. vermicularis* iken, *G. intestinalis* 14 (%7.9) ile ikinci sırada bulunmuştur (69).

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına 2000-2004 yılları arasında başvuran 34.883 kişiden alınan dışkı örnekleri ve aynı kişilerden alınan 9.879 anal bant preparatı incelenmiştir. Örneklerin 9.704'ünde (%27.8) bağırsak paraziti saptanmıştır. Bu parazitler; *B. hominis* 6.723 (%19.3), *E. coli* 1.007 (%2.9), *G. intestinalis* 892 (%2.6), *E. histolytica/E. dispar* 798 (%2.3), *Endolimax nana* 486 (%1.4) olguda görülmüştür (70).

Ataş ve ark. (71) 2008'de Yozgat'ta sosyoekonomik düzeyleri farklı iki ilköğretim okulunda dışkı ve selofan bat yöntemiyle parazit taraması yapmıştır. Örneklerin 367'si dışkı ve 356'si selofan bant olmuştur. Toplam 367 öğrencinin 128'inde (%34.9) bir veya daha fazla bağırsak parazitine rastlanmıştır. En sık rastlanan parazit, *E. coli* (%16.1) iken, saptanan diğer parazitler, *G. intestinalis* (%15.5), *E. vermicularis* (%8.4), *H. nana* (%2.2) olmuştur.

Sivas'ta Belediyeye ait Çevre-Gıda ve Tıbbi Tahlil Laboratuvarına 1993-2006 yıllarında gelen 732 dışkı örneği ile 186 selofan bant preparatı Ataş ve ark. (72) tarafından incelenmiştir. Bu örneklerdeki parazit oranları *E. vermicularis* %34.4, *E. histolytica/dispar* %3.7, *G. intestinalis* %12.4 olarak saptanmıştır. Değerli ve ark.'nın (73) Mayıs 2002–Kasım 2004 tarihleri arasında saptanan parazitlerin dağılımını retrospektif olarak değerlendirdiği çalışmada; 5057 örneğin 532'sinde (%10.5) bağırsak paraziti saptanmıştır. İlk sırada *G. intestinalis* %3.7, sonra sırayla *E. histolytica/dispar* %2.4, *E. coli* %2.5 olarak bulunmuştur.

Rize şehir merkezinde Özgümüş ve ark. (74) yaptığı bir çalışmada, iki özel kreşte yaşları 1-6 arasında olan toplam 73 çocukta bağırsak parazitleri araştırılmıştır. Örneklerin %15'inde parazit saptanmış, bunların %11'inin *G. intestinalis* olduğu belirlenmiştir. Çamlıhemşin Sağlık Merkezi'ne başvuran 142 kişide yapılan çalışmada ise kişilerin %17,6'sında parazite rastlanmıştır. *G. intestinalis* %20, *E. histolytica/dispar* %56 oranında tespit edilmiştir. Parazite rastlama oranı en yüksek (%52) 0-19 yaş grubunda belirlenmiştir (75).

Van'da Cengiz ve ark. (76) 2009 yılında Süphan İlköğretim Okulu öğrencilerinin 395'inin 114'ünde (%28.9) bir veya daha çok sayıda parazit türü saptanmıştır. Örneklerde yaygın olarak *G. intestinalis* (%15.4) ve *B. hominis* (%3.3) görülmüştür. Van İl Halk Sağlığı Laboratuvarına portör muayenesine gelen 739 kişinin örneklerini Çiçek ve ark. (77) incelemiştir. Parazit saptanan 131 (%17.71) örneğin, 95'inde bir tür, 30'unda iki tür, beşinde üç tür ve birinde ise dört tür parazit görülmüştür. Bu parazitlerin %19.08'i helmint, %80.91'i ise protozoon olmuştur. Araştırmada; *A. lumbricoides* %1.21, *B. hominis* %4.87, *E. coli* %3.24, *G. intestinalis* %2.84 ve *I. bütschlii* %2.02 oranında görülmüştür.

Daldal ve ark. (78) Malatya ili Çocuk Yuvası ve Yetiştirme Kurumundaki çocuklarda bağırsak parazitlerinin yaygınlığı, 2007 yılı 2000 yılı ile karşılaştırılmıştır. Çocukların 84'ünde (%37) parazit bulunmuştur. 2007'de 2000 yılına göre parazit oranlarında anlamlı bir düşüş belirlenmiştir ($p<0.05$). Çalışmaya göre cinsiyetler arasında anlamlı fark yokken, yaş gruplarından 7-12 yaş grubu arasında artış saptanmıştır.

Diyarbakır'da, sosyoekonomik düzeyi farklı beş ilköğretim okulunda öğrencilerden alınan 933 örneğin 490'ında (%52.51) çeşitli bağırsak parazitleri görülmüştür. Bunların arasında %30.81 ile en yüksek oranda *G. intestinalis* görülmektedir. Çalışmaya göre, sosyoekonomik düzeyi düşük bölgede bulunan ilköğretim okullarında parazitlik oranı daha yüksek çıkmıştır (59). Göz ve ark. (79) 2005 yılında Hakkâri 23 Nisan İlköğretim Okulu'nun 114 öğrencinin 66'sında (%57.8) bir ve birden fazla bağırsak paraziti saptamışlardır. Bu parazitlerden en sık görülen *G. intestinalis* (%28.9) olmuştur.

Hayvanlarda epidemiyoloji:

Giardia evcil hayvanlarda, özellikle köpekler, kediler başta olmak üzere ve çiftlik hayvanlarında ayrıca vahşi hayvanlarda en sık rastlanan bağırsak parazitidir. *G. intestinalis* ise memelilerde ve insanlarda giardiasis hastalığına neden olan zoonotik bir hastalıktır (33,80).

Genotiplendirme *G. intestinalis*'in epidemiyolojisinin anlaşılmasında, türler arası geçişin bulaşma risklerinin ve çevresel faktörlerin belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntemdir. Hayvanlarda görülen genotiplere baktığımızda Genotip A ve B memeli hayvanlarda görülmekle beraber özellikle Genotip A1'de zoonotik geçiş söz konusudur. Genotip C ve D köpeklerde, Genotip E çiftlik hayvanlarında, Genotip F kedilerde ve Genotip G sıçanlarda görülmektedir (33,81).

Almanya'da yapılan, kedi ve köpeklerde *Giardia* ve *Cryptosporidium* varlığının araştırıldığı bir çalışmada; 81 köpeğin beşinde ve 19 kedinin ikisinde *G. intestinalis* görülmüştür. Genotip A olduğu saptanan bu örnekler zoonotik genotiplerle karşılaştırılmış ve örneklerin zoonotik patojen olabileceği sonucuna varılmıştır (82).

Kanada'da 118 köpek ve 15 kediden elde edilen dışkı örneklerinden *G. intestinalis* izolatları elde edilmiş, kedilerde %87 ve köpeklerde %64 oranında genotiplendirilmiştir. Köpeklerden elde edilen 75 örneğin 51'i Genotip D, 23'ü Genotip C iken yalnızca bir izolat potansiyel zoonotik genotip olan Genotip B çıkmıştır. Kedilerden elde edilen genotiplerin tamamı zoonotik genotipler çıkmıştır. Elde edilen 13 izolatın 12'si Genotip A ve birinin Genotip B olduğu bulunmuştur (83). Başka bir çalışmaya göre kedilerdeki *G. intestinalis*

genotiplerinin belirlenmesi, hastalığın bulaşmasında kedilerin yaşam alanına yakın temasın rol oynadığını göstermiştir (84). ABD’de yapılan bir çalışmada *G. intestinalis*’in zoonotik etken olduğu ve asemptomatik köpeklerin rezervuar olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir. Köpeklerin insanlarda görülen A ve B genotiplerini de taşıdığı görülmüştür (85).

İtalya’da Mart 2005’de 450 koyunluk bir sürünün yarısını etkileyen bir salgın görülmüştür. Laboratuvar incelemesinde etkenin *G. intestinalis* olduğu saptanmıştır. Duodenal aspirasyondan toplanan örneklerin Genotip B olduğu saptanmıştır (86). Papini ve ark. (87) İtalya’da 63 ev kuşu ve hayvanat bahçesinde bulunan kuşlardan toplanan 83 dışkı örneğinde parazit taraması yapmıştır. *G. intestinalis* kuşlarda bulunmuştur. Bu örneklerde yapılan genotiplendirmede Genotip A olduğu ve zoonotik geçişte rol oynayabileceği bulunmuştur. Başka bir çalışmada; Batı atlardan elde edilen *G. intestinalis* örneklerinin, Genotip A1, Genotip A2 ve Genotip B4 olduğu saptanmıştır (88).

Kabuklu deniz ürünleri, fok, denizaslanı, balina gibi deniz hayvanları insanlardaki *G. intestinalis* enfeksiyonları açısından rezervuardırlar. Yapılan bir çalışmada yunus, fok, ringa martısı, yumuşak tüylü av kuşları ve köpek balıklarından alınan dışkı örneklerinde *G. intestinalis* görülmüş, genotiplendirme ile deniz vertebralılarında, Genotip A ve B’ye rastlanmıştır (89). Vahşi hayvanlardan 20 maymun, üç çinçilya, iki devekuşu ve bir jaguarın dışkı örneğinde *G. intestinalis* kisti saptanmış, genotiplendirmede Jaguardan elde edilen örnek Genotip A1 iken, diğer örnekler Genotip B olarak bulunmuş, insan izolatlarındaki Genotip B4 ile yakın ilişkisi belirlenmiştir. Bu sonuca göre *G. intestinalis* taşıyan konakların, zoonotik geçişte potansiyel olarak rezervuar olabileceği belirtilmiştir (90).

Yapılan bir araştırmada 37 insan, 15 köpek, yedi sığır, yedi kunduz, sekiz fare ve bir sıçan izolatu çalışmaya alınmıştır. Misk farelerinden üç örnekte *G. muris*, diğer örneklerden *G. intestinalis* elde edilmiştir. Çalışmanın sonucunda altı izolat genotip A, 44 izolat Genotip B, 15 izolat Genotip C, yedi izolat Genotip E olarak tanımlanmıştır. Filogenetik analiz sonucunda kunduzların tamamında, fare, misk sıçanı ve tavşanların bir kısmında, insanlarda bir örnekte Genotip B bulunmuştur. İnsandaki *G. intestinalis*’in olası kaynağının hayvan izolatları olduğu düşünülmüştür (16).

GIARDİASIS

Giardia intestinalis insanlarda en sık görülen enteropatojen bir protozoondur (5). Dört çekirdekli kist yoluyla bulaşır. Sindirim yolu ile alındıktan sonra eksistasyon sürecinde iki çekirdekli iki trofozoit oluşur. Jejunumun üst kısımlarında ve özellikle duodenumda çoğalır. Bu evrede klinik semptomlar ortaya çıkar (91,92). Klinikte sulu ishal, iştahsızlık, kramp tarzı

karın ağrısı, epigastrik hassasiyet, yağlı dışkılama ve malabsorbsiyon sendromu ortaya çıkabilir (26,91). Bu protozoondan erişkinlerden daha ziyade çocuklar olumsuz etkilenir. Enfekte çocuklarda bilişsel fonksiyonları ve gelişmeyi etkiler (33).

Giardia intestinalis büyük salgınlara neden olabilen önemli bir halk sağlığı sorunudur (33). Giardiasis, 2004 yılında Sağlık Bakanlığı tarafından oluşturulan Bulaşıcı Hastalıkların Bildirimi Sistemi'ne göre D Grubu bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır. Bu yönetmeliğe göre laboratuvarında saptanan *G. intestinalis* olgularının günlük olarak İl Sağlık Müdürlüğü'ne bildirilmesi gereklidir (93).

Patogenez ve İmmunite

Giardia intestinalis'in neden olduğu hastalığın oluş mekanizması tam anlaşılamamış ve özgül olmayan virulans faktörleri tanımlanmıştır. Bu konuda iki ayrı görüş vardır. Bunlardan birincisi mekanik irritasyona neden olduğu ve ince bağırsaklarda oluşan mukozal hasarın hastalığa neden olduğu, ikincisi ise intestinal epitele yapışması sonucunda immatür enterositlerin emilim kapasitesinin azalması ve ishal oluşumu şeklindedir (94).

Klinik, biyolojik ve epidemiyolojik açıdan değerlendirildiğinde Giardiasis hastalığında trofozoitler anahtar rol oynar. Trofozoitlerin intestinal epitele kolonizasyonundan sonra enfeksiyonla ilgili değişik bulgular ve semptomlar oluşur. Kistlerden oluşan trofozoitler üst ince bağırsak epitelinde, mikrovillüslara ventral yüzde bulunan diskleri aracılığı ile yapışırlar, fakat mukoza invazyonu göstermezler (95).

Trofozoitler burada çevresel faktörlerle iletişime girer, parazit büyümesi ve farklılaşması için metabolik ihtiyaçlarını konaktan alır. Bu maddeleri konağın epitelyum hücrelerine üretir ve sekrete ettirir (95). İnce bağırsaklarda villöz yapı bozukluklarına neden olurlar. Bu bozukluk sonucunda normal villöz görünümünden subtotal villöz atrofiye kadar değişebilen anormallikler olur. Villöz yapıda oluşan değişiklikler daha sonra kript hiperplazisine dönüşebilir (5). Bu iletişim sonucunda konağın doğumsal ve spesifik immun sistem yanıtı aktive olur (95).

Klinik durumu; trofozoitin konak ile olan iletişimi, parazitin virulansı, konağın beslenme durumu, yaşı ve immunolojik durumu arasındaki ilişki belirler (95,96). Hastalığın ciddiyetini ve enfeksiyonun süresini anne sütü gibi immunolojik olmayan faktörlerde etkilemektedir (97,98). Almanya'da yapılan bir çalışmada *Giardia*'nın yayılmasında çocukların ve erkek cinsiyetin risk faktörü olduğu saptanmıştır (99).

Konaktaki *G. intestinalis* enfeksiyonuna karşı immun yanıtın hem hücresel, hem humoral immunité sorumludur. Parazitin ortadan kaldırılmasında IgA, Ig G ve IgM antikoları

rol oynar (6). Oluşan immün yanıtı rağmen *G. intestinalis*'te oluşan antijenik değişimler, etkenin konağın immün sisteminden korunmasına neden olmaktadır (100).

İnsanlarda *G. intestinalis* enfeksiyonu, asemptomatik taşıyıcılıktan, malabsorbsiyon sendromu, diyare, karın ağrısı, kilo kaybı, halsizlik gibi klinik belirtilere kadar değişkenlik göstermektedir (97,101). Klinik belirtilerin bu kadar değişken olması farklı suşlara hatta farklı genotiplere bağlanabileceği, bazısının patojen bazısının da apatojen olabileceği düşünülmektedir. Semptomların ağırlığı farklı *Giardia* genotiplerine bağlayan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (101).

Giardiasis hastalığının oluşumunda *G. intestinalis*'in epitelyum hücrelerine yapışması ve konakta hastalığa neden olması, trofozoit yüzeyinde bulunan veya sekrete edilen moleküllerin rol aldığı çok etkenli bir süreçtir. *G. intestinalis*'in, konak hücrelerine olan etkilerinin ve virulans faktörlerinin daha iyi anlaşılması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (95).

Klinik

Giardia kistleri vücuda alındıktan beş-yedi hafta sonra hastalık semptomları ortaya çıkar (102).

Giardiasis semptomları kişiden kişiye, enfeksiyonun süresine göre değişebilir (6). Sağlıklı kişilerde giardiasis kendi kendini sınırlayan bir hastalık yapabilir (5). Giardiasis kişilerde asemptomatik olabildiği gibi semptomatik hastalık da oluşturabilir. Tüm yaşlarda oluşabilen semptomlar; hafif ishal, iştahsızlık, kramp tarzında abdominal ağrı, şişkinlik, epigastrik hassasiyet ve yağlı dışkılamadır (7). Bu enfeksiyonların çoğunluğu asemptomatiktir, ancak çocuklarda kronik ishale ve kilo kaybına yol açar. Çocuklarda büyüme geriliğine neden olan faktörlerden biri olarak düşünülmektedir (22). Bunun dışında çocuklarda çölyak hastalığına benzer klinik yapabilir iken, erişkinlerde non tropikal sprue, ciddi olgularda bol beyaz renkli, yağlı dışkı, hipoproteinemi, hipogamaglobulinemi, folik asit ve yağda eriyen vitamin eksikliğine ve intestinal villuslarda yapı değişikliklerine neden olur (26).

Gastrektomi, kronik pankreatit, hipoklorhidri ve aklorhidri enfeksiyon olasılığını artırmaktadır. Yaygın değişken hipogamaglobulinemi, X'e bağlı agamaglobulinemi, IgA eksikliği ve humoral immün yetmezlikler, kronik semptomatik *Giardia* enfeksiyonuna zemin hazırlamaktadır. Bu durumlarda giardiasis tedavisi zorlaşmaktadır. Giardiasis gastrik asitin azaldığı durumlarda, crohn hastalığında ve kistik fibrosizde artmaktadır. Bu hastalık ayrıca

iridosiklit, ürtiker, kolesistit, artrit, retinal artrit ve pankreatit ile ilişkilendirilmiştir. Tedavi sırasında ve sonrasında laktoz intoleransı gelişebilirken, bazı olgularda irritabl bağırsak sendromu tablosu görülebilir (103). Bazı olgularda *Cryptosporidium* spp. gibi diğer etkenlerle beraber polimikrobiyal enfeksiyon yapabilir (103).

Giardiasis'te klinik; asemptomatik taşıyıcılık, akut ve kronik olmak üzere üç şekilde kendini göstermektedir.

Asemptomatik taşıyıcılık: *G. intestinalis*'in yaptığı en sık hastalık formu asemptomatik taşıyıcılıktır. Enfeksiyon subklinik bulgularla seyreder veya hiçbir sistemik etki göstermez. Bunun nedeninin patojen olmayan suşlar mı olduğu veya *G. intestinalis* sayısının azlığından mı kaynaklandığı tam belli değildir (5).

Akut giardiasis: Bu hastalık özellikle düşük endemik alanlardan yüksek endemik alanlara yolculuk yapanlarda belirgindir. Semptomlar ortalama 7 gün olmak üzere 3-20 gün arasında ortaya çıkar. Başlıca semptomlar ishal başta olmak üzere yağlı dışkılama, bulantı, karında şişlik ve kilo kaybı sayılabilir (5).

Akut evre bulguları, bulantı, iştahsızlık, erken dönemde ateş, üşüme gibi bulgular söz konusudur. Daha sonra sulu kötü kokulu ishal, abdominal şişkinlik, gaz çıkarma görülebilir. Epigastrik kramplar, kanlı ve mukuslu dışkılama da nadiren olur (6).

Kronik giardiasis: Semptomatik hastalarda süregen ishal, yağ malabsorbsiyonu, A ve B12 vitamin eksikliğine neden olur. İmmun sistemi baskılanmış kişilerde süregen ishal ve yağlı dışkılama olur. Bu durumda %10-20 arasında kilo kaybedilir (5). Uzun dönemde subakut ve kronik enfeksiyonda ise aralıklı ishal görülür. Kronik dönemde baş ağrısı, myalji, kilo kaybı ve malabsorbsiyon görülür (6).

TANI

Giardia intestinalis tanısında kullanılan direkt tanı yöntemlerinde örnek olarak, dışkı, endoskopik fırça, ince bağırsak biyopsisi, duodenal drenaj, aspirat ve biyopsi örnekleri, enterotest kapsülü kullanılır (6). ELISA ve IFA gibi dolaylı tanı yöntemlerinde materyal olarak dışkı ve serum kullanılır (104,105,106). Salgınlarda ve endemik bölgelerde kaynağın belirlenmesinde su ve dışkı örneklerine bakılır (107,108) .

Direkt Tanı Yöntemleri

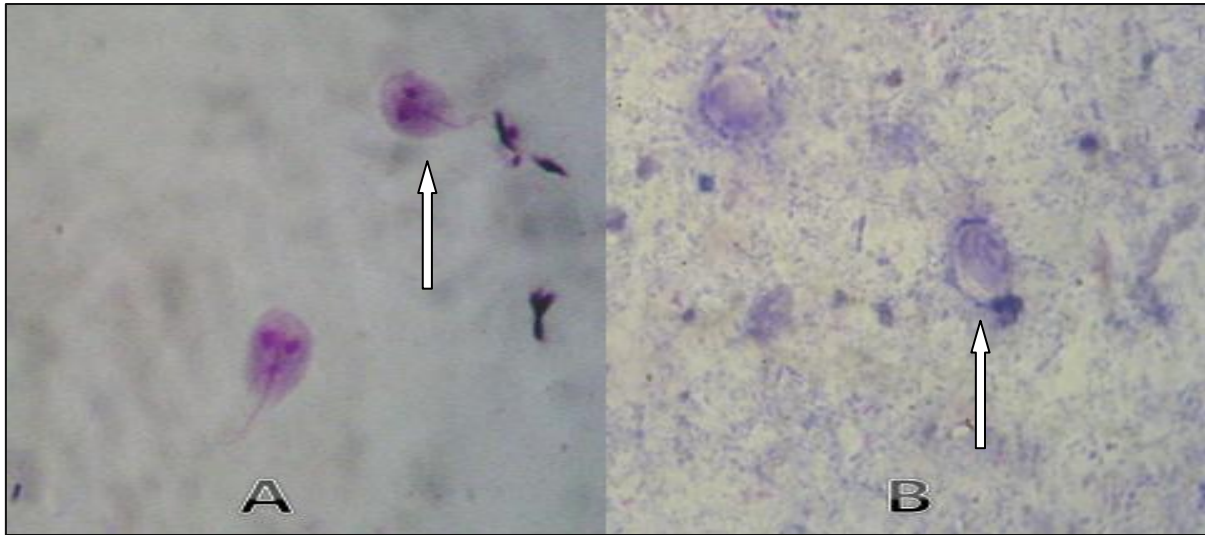
Tanı genellikle şüpheli hastalardan alınan dışkı örneklerinde, ışık mikroskopunda, tipik olarak trofozoit veya kistlerin görülmesi ile konur (22,109). *G. intestinalis* taşıyan tüm hastalarda dışkıda kist saptanamayabilir. Bunun nedeni etken vücuda alındıktan sonra ilk üç

haftada dışkı ile kist atılımı yüksek olmaktadır, zamanla bu oran düşmektedir. Dışkıda düşük sayıda kist varlığında ışık mikroskopunda hastaların sadece %40'ında kist saptanabilir (7).

Dışkının makroskopik incelemesi: Kıvamına göre dışkılar sulu, yumuşak veya şekilli olarak adlandırılır. Parazitlerin trofozoitleri genellikle gevşek ve sulu dışkılarda bulunur. Dışkının kötü kokulu olması giardiasiste sık rastlanılır ve emilim bozukluğunu gösterir (110).

Dışkının mikroskopik incelemesi: Dışkıda bulunan *G. intestinalis* kistleri ve trofozoitleri ışık mikroskopunda görülebilir (5). Kamçılı trofozoitlerin, ışık mikroskopunda tuzlu suda hareketli olarak görülmesi ile tanı konulur (111). *G. intestinalis* tanısında ışık mikroskopu yaygın olarak kullanılır. Örneklerde bulunan kist formu ışık mikroskopunda lügol solüsyonu ve serum fizyolojik ile görülebilir (26).

Boyama yöntemleri ile yapılan incelemede parazitin morfolojik yapısı daha ayrıntılı görülmekte, tür tanısı konulabilmekte ve kalıcı preparat yapılabilir. *G. intestinalis* tanısında Giemsa, demirli hematoksilen ve trikrom boyama sık kullanılır (98). Yapılan bir çalışmada Çağlar ve ark. 159 dışkı örneğinde bulunan 174 protozoonu boyama ile incelemiştir. Bu örneklerden kist ve trofozoit bulunan 166 örneğin 153'ünde trikrom boyama ile tür düzeyinde tanı konulmuştur. Buna göre trikrom boya güvenilir bir boyama yöntemi olup, tanı oranı %92.16 olduğu görülmüştür (112). Trikrom boyama yöntemi ile boyanmış *G. intestinalis* trofozoit ve kistleri Şekil 4'te görülmektedir.



Şekil 4: Trikrom boyası ile boyanmış *Giardia intestinalis*
(A) Trofozoitler (B) Kistler (X1000 Işık Mikroskobu).

Giardia intestinalis mikroskopik olarak dışkı incelemesinde santrifüj ve formalin etil asetat sedimantasyon veya çinko sülfat yüzdürme gibi konsantrasyon teknikleri gibi uygulamalardan sonra lügol solüsyonunda veya immunofloresan boyama tekniği ile kistlerin

görülmesi ile tanınabilir. Dışkı örneğinden konsantre edilmiş ve lügol solüsyonu ile hazırlanan preparatlarda duyarlılık %98.7 iken özgüllük %100 olarak belirtilmiştir (113).

Sulu dışkılarda hem kist hem de trofozoitler görülebilir (5). Ayrıca hastalığın tanısında kist atılımı günden güne değişebildiği için birkaç dışkı muayenesi gerekebilir (5,7).

Hastaların bazılarında kronik ishal olmasına rağmen, dışkının mikroskopik incelemesinde parazit saptanmayabilir. Bu nedenle bu tür hastalarda duodenum içeriği de incelenmelidir (22). Duodenal sıvı ip testi yöntemiyle elde edilerek, bu örnekte trofozoit veya kist varlığının gösterilmesi ile tanı konulabilir. Duodenal biyopsi ile elde edilen örnekte de kist ve trofozoitler belirlenebilir. Histolojik kesitlerde epitelyum yüzeyindeki trofozoitler hematoksilen eozin ile boyanabilir (7). Jejunal biyopsi örneklerinde mukozada trofozoitler gösterilebilir (92).

Su örneklerinde kist izolasyonunda; filtreleme, santrifüj ve immunomanyetik ayırım yöntemi kullanılmaktadır (104).

Serolojik Yöntemler

Hastaların 2/3'ünde serolojik testler enfeksiyon alındıktan üç hafta sonra pozitiflik verir (106). Giardiasis tanısında bazen dışkı incelemelerinden sonuç alınamaması, duodenum aspirasyonu ve ince bağırsak biyopsi yöntemlerinin invaziv oluşu, kültür yöntemlerinin pratik olmayışı sebebiyle dışkıda antijen saptamaya yönelik duyarlılıkları ve özgüllükleri yüksek tanı yöntemleri geliştirilmiştir (114,115). *G. intestinalis* antijenlerinin/antikorlarının taranması için ELISA, Dot-ELISA, DFA, IFA ve counter immünelektroforez gibi farklı serolojik yöntemler kullanılmaktadır (116).

Giardia intestinalis tanısında kullanılan yöntemlerden birisi de immunokromotografik yöntemlerdir. Bu yöntemler hazır ticari kit halinde bulunmaktadır. Bu kitlerin özgüllüklerinin ve duyarlılıklarının incelendiği DFA yöntemi ile karşılaştırıldığı iki ayrı çalışmada; duyarlılıklarının %81,3-97,2 ve özgüllüklerinin %99,5-100 arasında değiştiği görülmüştür. Çalışılan testlerin avantajının testin 10 dk.'da sonuçlanması, başka parazitlerle çapraz reaksiyon vermemesi, dezavantajının ise kist sayısının az olduğu durumlarda yalancı negatiflik verebilmesi olduğu belirtilmiştir (117,118).

Bir başka çalışmada ise Almanya'nın Berlin şehrinde Tropikal Tıp Merkezi Tanı Laboratuvarına gelen 220 dışkı çalışmaya alınmıştır. Örneklerin 45'inde *Giardia* ve 17'sinde *Cryptosporidium* saptanmıştır. Ridascreen Giardia, Rida Quick Combi, Rida Quick Giardia

(R-Biopharm, Darmstadt, Almanya) ve Giardia-Strip (Coris BioConcepts, Gembloux, Belçika) testlerinin duyarlılıkları sırasıyla %82, %80, %80 ve %44 oranında çıkmıştır (119).

Su kaynaklı bir *G. intestinalis* salgını 1986'da İsveç'te olmuştur. Salgın sonrası 352 kişiden örnek alınıp, mikroskopik muayene yapılmış ve IFA testi ile IgA ve IgG bakılmıştır. Mikroskopik olarak pozitif örneklerde %68 IFA ile pozitif bulunmuştur. Mikroskopik olarak negatif örneklerde ise %22 oranında pozitiflik saptanmıştır. Bu nedenle *G. intestinalis*'in düşük oranda görüldüğü yerlerde *G. intestinalis*'ten şüphelenilen ancak mikroskopik bakının negatif olduğu durumlarda, serolojik testlerin kullanılması gerektiği bildirilmiştir (106).

Dışkıda *G. intestinalis* antijeninin saptanmasında kullanılan yöntemlerden biri de ELISA yöntemidir (104,105). ELISA yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %87–100 arasında değişmektedir (5, 69). Serumda *G. intestinalis*'e karşı oluşan antikorlar ELISA tekniği ile saptanabilir (7). Brezilya'da Guimaraes ve ark.'nın (109) gündüz bakımevinde çocuklarda yaptığı bir çalışmada 147 örnek alınıp, bunların 93 (%63.3)'ünde mikroskopik inceleme ile dışkıda *Giardia* gösterilmiştir. Serumda bulunan antikorlar IFA ile 93 (%63.3) ve ELISA ile 100 (%68) olgu pozitif bulunmuştur. Duyarlılık oranları IFA ile %82, ELISA ile %72 olarak saptanmıştır. Ancak ELISA yönteminin özgüllüğü daha düşük bulunmuştur.

Akut ishal etkenlerinin araştırıldığı, Mısır'da yapılan hastane verilerine dayanan bir çalışmada 2005–2007 tarihlerinde iki ayrı bölgede beş yaş altındaki akut ishalleri çocuklar çalışmaya alınmış, Adenovirus, Astrovirus, Norovirus, *G. intestinalis* ve *E. histolytica* tanısı için enzim immün assay (EIA) testi uygulanmıştır. Adenovirus %2 (34), Astrovirus %3 (56), Norovirus %9 (191) ve *G. intestinalis* %7 (146) oranında saptanırken *E. histolytica* hiç görülmemiştir. Etkeni saptanamayan ishal olgularında EIA tekniğinin kullanılmasının faydalı olacağı bildirilmiştir (120).

Giardia intestinalis açısından endemik olmayan bir bölge olan İsveç'in Salen şehrinde su kaynaklı bir salgında, mikroskopik muayenede 1400 kişide *G. intestinalis* pozitifliği bulunmuştur. Serum örneği alınan 352 kişinin 93'ünde western blot tekniği ile IgG varlığı saptanmıştır (121).

Moleküler Yöntemler

Moleküler çalışmalarda DNA temelli genetik belirleme ve tanımlama teknikleri kullanılır (Tablo 4) (122). Bu yöntemle örnekteki düşük sayıdaki patojen tespiti mümkündür (107,108). Moleküler analizler salgın durumlarında ve endemik bölgelerde *G. intestinalis*'in kaynağının saptanmasında önemlidir (13).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu, “polymerase chain reaction”(PCR) iki oligonükleotid primer arasında bulunan bir DNA fragmentinin enzimatik olarak çoğaltılmasıdır. Primerlerden biri hedef dizinin bir tarafındaki DNA molekülünün bir zincirine komplementer, diğer primer de hedef dizinin zıt tarafındaki DNA molekülünün diğer zincirine komplementerdir. Primerler, aralarında kalan diziyi DNA polimeraz ile sentez ederler (123).

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, “Real Time polymerase chain reaction”(RT-PCR) yönteminde floresan ışık veren madde ile boyalı PZR ürününün varlığı ve miktarı dijital kamera ile ölçülür. Bu yöntemde amplifikasyon sonrası ek işleme gerek yoktur. Ayrıca sistem kapalı tüp şeklinde olduğu için dış etkilerden etkilenmez. Erime eğrisi analizi ile farklı diziler için bu yöntem kullanılabilir (124).

Az sayıda kist veya trofozoit varlığında bile *Giardia*'yı tespit edebilen bir tekniktir. Abdel Fattah ve ark.'nın (125) yaptığı çalışmaya göre taze dışkıda; 20 trofozoit bulunması durumunda bile DNA izole edilebilmekte ve genotiplendirme yapılabilmektedir. 2010 yılında yapılan bir başka çalışmada Real Time PZR ile *G. intestinalis* tanısının konulmasında %100 duyarlı ve özgül olduğu bulunmuştur (126).

Yuvalanmış Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Yuvalanmış polimeraz zincir reaksiyonu, “Nested polymerase chain reaction” yönteminde ilk olarak standart PZR tekniği yapılır. Ardından elde edilen ürün ikinci PZR için kullanılır. Burada hedef bölge primerleri artefak ve primer dimer oluşumundan kaçınmak için farklıdır. Yuvalanmış primerlerle çoğaltılan bölge daha kısadır Bu yöntemin sonunda elde edilen üründe artefaktlar ve non spesifik ürünler olmadığı için, Nested PZR tekniği standart Real Time PZR'a göre daha duyarlıdır (127).

Nested PZR tekniği *Giardia* olgularının değerlendirilmesinde kullanılan tekniklerden biridir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada tpi gen bölgesine yönelik primerler kullanılarak *Giardia* genotiplendirmesi yapılmıştır (128).

Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Deoksiribonükleik Asit Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu, “random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction” (RAPD-PCR), nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş tek bir primer kullanılarak DNA'nın çoğaltılması temeline dayanan bir polimorfizm inceleme yöntemidir. Bu yöntemde çoğaltılacak hedefler kısa oligonükleotit

sekanslarıdır (129,130). RAPD yönteminde; klasik PZR'deki spesifik sekans kullanımının yerine tekli DNA sekansı kullanılmaktadır, DNA dizisinde belirlenen bölge PZR ile çoğaltılmaktadır. (129,131). RAPD analizi ile farklı primerler kullanılarak *Giardia* suşları A ve B genotiplerine ayrılabilir (132).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi

Polimeraz zincir reaksiyonu–restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi, “polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism” (PCR-RFLP) yönteminde; seçilen hedef dizi belirli spesifik primerler kullanılarak belirli bir sıcaklıkta PZR yöntemi ile çoğaltılır (124). Çoğaltılan DNA örnekleri restriksiyon endonukleazları ile kesilir ve farklı uzunluktaki DNA dizileri ve polimorfizmi belirlenir (32,124,127). *Giardia*'ya bağlı salgınlarda ve insanlar ve hayvanlardaki geçişlerin belirlenmesindeki araştırmalarda kullanılacak bir tekniktir (133). Bu teknikle ssrRNA, bg ve gdh bölgelerinin çalışıldığı 61 olguluk Tayland'da yapılan bir çalışmada örnekler alt genotiplerine ayrılmıştır (134).

İlmiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma Yöntemi

İlmiğe dayalı izotermal çoğaltma “Loop-Mediated Isothermal Amplification” (LAMP) yönteminde altı adet primer, DNA'nın sekiz farklı noktasını tanıır. Sabit sıcaklıkta (60-70 °C) bir saatte tek bir kopyadan milyarlarca kopya çoğaltılabilir. Kapalı bir sistem olduğu için kontaminasyon riski azdır. Farklı miktarlardaki yabancı DNA, yöntemin duyarlılığını etkilemez. Protozoonların tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemlerden biri olan LAMP tekniğiyle *G. intestinalis* belirlenebilir. LAMP yöntemi yüksek duyarlılığa sahip ve kolay uygulanabilir yöntemdir (135).

Plutzer ve Karanis (136). 2009 yılında *G.intestinalis*'in small subunit RNA üzerinde bulunan Ef-1 α gen bölgesi varlığına bakmıştır. IFA testi ile pozitif olduğu tespit edilen 35 örneğin, 18S rRNA PZR ve dizi analizinde %68'inde, gdh PZR ve dizi analizi ile %43'ünde, tpi Genotip B RT-PZR'de %10'unda ve Ef-1 α LAMP ile %69'unda pozitiflik saptanmıştır. Bu sonuçlara göre LAMP yönteminin diğer moleküler tekniklere göre daha duyarlı olduğu görülmüştür. Aynı araştırmacıların yaptığı bir başka çalışmada ise 2 μ m çaplı polyester mikrofiber mikrofiltre (ARAD) ve LAMP analizinin birlikte kullanımının; içme sularında *Cryptosporidium* spp. ve *G. intestinalis*'in varlığının belirlenmesinde, duyarlı olduğu belirlenmiştir (137).

Mikroarray Analizi

Genomun içinde 1-6 bp'lik sık sık tekrarlanan, basit tekrarlanan diziler veya ard arda gelen tekrarlar veya mikrosatellitler bulunmaktadır. Genomda ayrıca mikrosatellitlerden daha

uzun (10-199 bp) yine basit tekrarlayan diziler bulunur. Çalışmada bu bölgelerin varlığının araştırılması amaçlanır (124). Wang ve ark. (138) 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada olionukleotit mikroarray diziler kullanarak *E. histolytica*, *E. dispar*, *G. intestinalis* ve *C. parvum* izolatlarının genotiplendirmesini yapmıştır.

Dizi (Sekans) Analizi

Dizi analizi yönteminde gen parçasının veya genin çoğaltılan kısmının dizi sıralaması yapılır bu şekilde polimorfizmlerin veya genetik değişikliğin belirlenerek tür tayininin yapılması altın standarttır ve dünyada en sık kullanılan tekniktir (124). Bu nedenle *Giardia*'nın yapısının anlaşılmasında dizi analizi ve genetik çalışmalar temel öneme sahiptir (2). Genetik çalışmalara göre pek çok *Giardia* alt grupları olmasına rağmen, insanlarda ve diğer memeli türlerinde bulunan iki ana genetik grup, Genotip A ve B'dir (Tablo 2) (1, 23,96). A ve B genotipi aynı zamanda birçok evcil ve yaban hayvanda da bulunmaktadır. Bazı genotiplerin konak özgüllüğü olduğu ve bu genotiplerin insanlarda herhangi bir enfeksiyona yol açmadığı bildirilmiştir (Tablo 2) (96).

Giardia'nın yapısının daha iyi anlaşılmasında farklı nükleotid dizileri yaygın olarak kullanılmaktadır (139). *G. intestinalis*'in genotiplendirilmesi çoğunlukla; 16S ribozomal DNA (16S rDNA), small subunit ribozomal RNA (ssu-rRNA), beta giardin (bg), glutamat dehidrogenaz (gdh), elongasyon faktör 1-alfa (Ef-1 α), trioz fosfat izomeraz (tpi), GLORF-C4 (C4) geni ve inter-genomic rRNA spacer (IGS) gen bölgesinin çoğaltılmasına ve analizine dayanmaktadır (Tablo 4) (19,33,96,140).

Tablo 4: *Giardia intestinalis* ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan gen bölgeleri ve moleküler yöntemler (36)

Hedef bölge	Moleküler yöntem	Amaç
16S rDNA	Nested PZR, Dizi analizi, Microarray	Tür ve genotiplerin belirlenmesi
Gdh	Nested PZR, Dizi analizi, RFLP	Tür ve genotiplerin belirlenmesi
Tpi	Nested PZR, Dizi analizi, RT-PZR, Microarray	Tür ve genotiplerin belirlenmesi
Bg	Nested PZR, Dizi analizi, RT-PZR, RFLP, Microarray	Genotiplerin belirlenmesi
Ef-1 α	Nested PZR, Dizi analizi	Tür ve genotiplerin belirlenmesi
GLORF-C4	Dizi analizi, RT-PZR, RFLP, Microarray	Genotiplerin belirlenmesi

Elongasyon faktör proteinleri: Transkripsiyon uzama oranlarını düzenleyen proteinlerdir. Transkripsiyon uzama oranı, protein sentezinde, peptid bağlanma basamaklarını içerir. Bu basamak protein sentezinin uzamasını veya kısalmasını içermektedir (124). Ef-1 α proteini ilk olarak 1994 yılında Hashimoto ve ark. (141) tarafından bulunmuş olup mRNA tarafından kodlanmaktadır. Gerçekte 442 amino asit içermesine ve içinde hiç intron bulunmamasına rağmen ilk çalışmada 396 amino asit uzunluğunda olduğu bulundu. Bu protein *G. intestinalis*'in de içinde bulunduğu mitokondrisi olmayan ökaryotlar arasındaki filogenetik ilişkiyi belirler. Bu proteinin gen dizisi farklı *Giardia* türleri arasında farklılık göstermekte olup, genotiplendirmede kullanılmaktadır (124).

Giardinler: İlk olarak 1985'de Crossley ve Holberton tarafından belirlendi (142). Giardin ailesi proteinleri α , β ve γ giardinden oluşan *Giardia*'ya spesifik proteinlerdir ve ventral disk üzerinde bulunurlar (22,124,143). α ve γ giardin gen dizisi 3. kromozomda yer alırken, β giardin 4. kromozomda yer alır (124). Bu proteinlerden α giardinler mikroribbonların dış kenarında, β giardin; mikrotübüllerle yakın ilişkili çizgili liflerinde ve γ giardinler de mikroribbon proteinlerinde bulunur (143). β giardin 28 kDa molekül ağırlığındadır, 819 bp uzunluğunda intron içermeyen bir gen tarafından kodlanır. β giardin *Giardia*'nın eksistasyon sürecinde daha belirgin ortaya çıkar. *Giardia* türlerinde bu proteinleri kodlayan genler arasında belirgin farklılıklar bulunur. Bu nedenle *G. intestinalis*'in genotiplendirilmesinde kullanılmaktadır (124).

Moleküler biyolojide genetik varyasyonların ve polimorfizmde çoğaltılan gen bölgelerinin dizi analizi yapılması altın standart olarak kabul edilmektedir (124). İnsanlardan elde edilen *G. intestinalis* izolatlarının genotiplendirilmesi ile ilgili bazı çalışmalar Tablo 5'te özetlenmiştir.

Giardia'nın sekans analizi ile ilgili olarak İtalya'da 30 insandan dışkı örneği incelenmiş, PZR-RFLP ve ardından sekans analizi yapılmıştır. Çalışmanın sonunda A genotipine ait A1, A2, A3 ve B genotipine ait B1, B2, B3, B4 genotipleri bildirilmiştir (3). Konu ile ilgili yapılan diğer çalışmada insan ve hayvanlar arası olası *G. intestinalis* geçişine bakılmış, Avustralya'da keseli hayvanlarda, insanlarda görülen Genotip A, insan ve memeli hayvanlarda görülen Genotip B3 ve B4 tespit edilmiştir. Yapılan analizde insanlardan elde edilen sekanslar ile keselilerdeki *Giardia*'ların büyük benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (144).

Etiyopya'da yapılan bir çalışmada insanlardan elde edilen 59 izolatın PZR-RFLP analizi ile bg gen bölgesi çoğaltılmış, 31'i (%52) Genotip A ve 13'ü (%22) Genotip B, yedisi (%15) miks enfeksiyon olarak bulunmuştur. Sekans analizinde ise yedi (A+F) izolatın üçü

Tablo 5: İnsanlardaki *Giardia. intestinalis* izolatlarının genotiplendirilmesi ile ilgili bazı çalışmalar

Ülke	Örnek	Gen	A genotipi	B genotipi	Diğer	Kaynak
İngiltere	Sporadik	tpi	8 (%36) A2	14 (%64) B		(145)
Fransa	Sporadik	tpi	8 (%32) A2	8 (%32)B3, 5 (%20) B4	4 (%16) Tiplendirme(-)	(146)
Hollanda	Çocuk yuvası (salgın)	gdh, ssu-RNA	34 (%35) A	64 (%65) B	-	(147)
İtalya	Sporadik	bg	24 (%80) A	6 (%20) B	-	(3)
İtalya	Sporadik	bg	16 (%43) A	10 (%27) B	11 (%30) Multiple pik	(14)
Norveç	Su kaynaklı salgın	bg, gdh	-	21 (%100) B	-	(148)
İtalya	Sporadik	bg	23 (%33.8) A	45 (%66.2) B	-	(124)
Türkiye	Sporadik	tpi	19 (%43) A	25 (%57) B	-	(8)
Türkiye	Sporadik	tpi	38 (%70.4) A	16 (%29.6)B	-	(9)
A.B.D.	Su kaynaklı tarama	tpi	111 (%84) A	20 (%16) B	-	(149)
Arjantin	Sporadik	tpi	3 (%7) A2	40(%93) B	-	(150)
Peru	olgu taraması	gdh	3 (%18) A1, 1 (%6) A2	6 %38)B3/B4 6 (%38) B4	-	(151)
Etiyopya	Sporadik, olgu taraması	bg	31 (%52)A	13 (%22) B	15(%25)A+B	(152)
Mısır	Sporadik	tpi	1 (%5)	16 (%80)	3 (%15)E	(153)
Mısır	Sporadik	tpi	24 (%58.5) A1 7 (%17.1) A2	8 (%19.5) B	2 (%4)A2+B	(123)
Bangladeş	Vaka kontrol	tpi	20 (%7.5) A	231(%86.5) B	16 (%6) A+B	(37)
Filistin	Sporadik	gdh, 18s rRNA	6 (%75) A2	2 (%25) B	-	(154)
Tayland	Sporadik	bg, gdh, ssrRNA,	5 (%8) A	31 (%51) B	25(%41) A+B	(134)
Hindistan	Sporadik	gdh	5 (%42) A	7 (%58) B	-	(155)

Genotip A ve dördü Genotip F çıkmıştır. Çalışmada bulunan Genotip F kedilere özgü bir gruptur ve ilk olarak burada insanlarda saptanmıştır (152).

Giardia sekans analizi için çalışılan bölgelerden biri de tpi gen bölgesidir. Mısır'da insan örneklerinde yapılan bir çalışmada 52 örneğin 18'inde (%34.6) *G. intestinalis* saptanmıştır.

PZR ve sekans analizi yapılmış olup, örneklerin iki tanesi miks genotip içermektedir. Örneklerden elde edilen genotipler, 16 tane Genotip B, üç tane Genotip E ve bir tane Genotip A idi. Genotip E daha önce insanlarda hiç saptanmamış iken burada rapor edilmiştir (153).

Rosales ve ark. (151) 2008'de Peru'da 845 çocuktan intestinal parazit taraması yaptığı çalışmada %23.8 oranında *G.intestinalis* saptamıştır. Elde edilen 210 *G. intestinalis* örneğinden yapılan gdh gen bölgesi PZR-RFLP tekniği ile 16 örnek çoğaltılmıştır. Ardından yapılan sekans analizi sonucunda genotiplerin dokuzunun Genotip A1, birinin Genotip A2 ve altısının Genotip B4 olduğu bulunmuştur.

Tedavi

Sağlıklı insanlarda nadiren *G. intestinalis*'e karşı antikor saptanabilir. Bu pozitiflik *G. intestinalis* ile olan teması gösterir. Bu nedenle mikroskopi pozitif hastaların yanında mikroskopi negatif ancak antikor pozitif, semptomatik hastalar da tedavi edilmelidir (106).

Giardia tanısı konulan hastalarda hikâye dikkatlice alınmalıdır. Çünkü reenfeksiyon olabilir. Aynı ilacın ikinci sefer kullanımında daha yüksek dozda ve uzun süreli kullanılması gerekmektedir. Reenfeksiyon durumunda farklı ilaç kullanımı veya ilaç kombinasyonları yine tedavide başarısızlığa neden olabilir (156). Etkili tedavide tedavi başladıktan iki gün sonra kist atılımı ve bir iki hafta içinde ishal biter. Bir iki aya kadar da ince bağırsak fonksiyonları ve morfolojisi normale döner (7).

Giardia intestinalis tedavisinde kullanılan ilaçlar arasında nitroimidazoller, kinakrin, furazolidon, benzimidazoller, paromomisin ve basitrasin bulunmaktadır (157).

Nitroimidazol sınıfında bulunan metronidazol, ornidazol, seknidazol ve tindazol *G. intestinalis* tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçlardan metronidazol *Entamoeba*, *Giardia* ve *Trichomonas* gibi pek çok anaerob protozoon tedavisinde ilk seçenektir. Ancak ilaç toksisitesi ve ilaca karşı görülen direnç önemli bir sorundur. Nitroimidazoller, baş ağrısı, vertigo, ürtiker, bulantı, alkol alımında disulfiram benzeri reaksiyon, nadir olarak santral sinir sistemi toksisitesi, reversibl nötropeni, pankreatit ve periferik nöropatiye neden olabilir (43,157).

Giardia intestinalis tedavisinde kullanılan ilaçlardan furazolidon, Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz enzim eksikliğinde hemoliz yapabilir (157,158). Ayrıca ishal, bulantı, kusma, idrarda kahverengi renk değişikliği olabilir (157). Furazolidon ile alkol birlikte alınmamalıdır, çünkü alkol alımında disulfiram benzeri reaksiyon görülebilir (157,159). Furazolidon yan etkisi az olduğu ve suspansiyon formu da olduğu için çocuklarda tercih edilir (5) . Kinakrin kullanımı ile bulantı, kusma, baş ağrısı, baş dönmesi, mukoz membranlarda ve ciltte sarı-turuncu renk değişikliği olabilir (157,160). Çocuklarda santral sinir sistemi stimülasyonu ve psikotik ataklar görülebilir (26,158).

Paramomisin aminoglikozid ailesine üye bir ilaç olup, kullanımı ise kramp, bulantı ve kusmaya neden olabilir. Ayrıca ototoksik ve nefrotoksiktir. Gebelere ilk trimesterde ilaç vermekten kaçınılmalıdır. Eğer tedavi gerekiyorsa intestinal sistemden emilimi daha az olan paramomisin verilebilir (156,157,158).

Albendazol ve mebendazol benzimidazol grubunda bulunan iki ilaçtır. Albendazolün anoreksi, kabızlık, karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme ve reversibl nötropeni gibi yan etkileri vardır (157).

Basitrasin karın ağrısı, bulantı, kusma ve nefrotoksisiteye neden olur (157).

Giardiasis için 2009 yılında yapılan randomize klinik çalışmalara göre; metronidazol 15-50 mg/kg/gün veya 500-750 mg olarak günde 3 kez (5-10 gün), tinidazol 2 mg/kg/gün veya 2 mg tek doz, albendazol 400 mg tek doz veya günde bir kez (5 gün) veya 10 mg/kg/gün günde bir kez (5 gün), mebendazol 200 mg günde 3 kez (5 gün), ornidazol 20-40 mg/kg/gün günde 3 kez (1-5 gün) ve nitazoksanid 500 mg günde 1 kez (1 gün) kullanılmasının en etkili doz olduğu bulunmuştur (161).

Giardia tedavisinde kullanılan ilaçlardan metronidazol ve albendazole karşı direnç olduğunu bildiren yayınlar vardır (157). Tedavide rifampin, bithionol, diklorofen, heksaklorofen, pyrimetamin, sodyum fusidat, meflokin ve klorokin *in vitro* çalışmalarda etkili bulunmuştur. Tedavi için *in vitro* çalışma çok sayıda iken *in vivo* çalışma azdır (157,161). Tedavinin değerlendirilmesi ve standartizasyonu için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca artan direnç oranı da bu çalışmalarda göz önüne alınmalıdır (161).

Tedavide kürün sağlanma süresi kullanılan ilaca ve tedavi dozuna göre değişmektedir. Direnç veya relaps durumunda nitroimidazol ve kinakrin veya farklı sınıflardaki ilaçlar kendi aralarında kombine edilmelidir. Ayrıca bu tedavi en az iki hafta uygulanmalıdır (157).

Korunma ve Kontrol

Giardia büyük olasılıkla çevreden tümüyle ortadan kaldırılamayacaktır. Bunun nedeni rezervuar konak olan hayvanlarda ve insanlarda, haftalarca ve aylarca kalabilmesi ve dünyanın pek çok yerinde konakların nemli ortamları ve suları kontamine etmesidir (5). Temiz içme suyu kullanımı, ellerin temizliği ve dışkının uygun şekilde bertaraf edilmesi *G. intestinalis*'in geçişini engelleyecektir. Enfekte kişiler veya risk altında olanlar ellerini dikkatlice yıkamalı ve dışkı ile temas etmemelidir (7,156,162).

Kişiden kişiye ve gıda kaynaklı bulaşma görülmekte ancak en sık su kaynaklı geçiş olmaktadır (163). Bunun önlenmesi için suların kontamine olmaması önemlidir (5,7,26,92,164). Standart klorlama teknikleri bağırsak protozoonlarını öldürmede yetersiz kalabilmektedir (54,164). Kamuda saf suyun temin edilmesinde, yeterli düzeyde klorlama, sedimentasyon ve filtrasyon işlemleri uygulanmalıdır (156).

Kullanılan sulardaki *Giardia* kistlerinin dezenfeksiyonunda kimyasal dezenfektanlar kadar, ortamın ısısı, pH'sı, dezenfektan miktarı ve temas süresi oldukça önemlidir (156,165). Kistler düşük doz klor ve kloramine dirençlidir (166). Suyun 50°C'nin üzerinde ısıtılması ise kistleri öldürmektedir (7). İçme suları < 1 µm'den küçük çaplı filtrelerle filtre edilmeli veya en az beş dakika kaynatılmalıdır (156,162). Klorun *Giardia* kistlerine olan etkisi üzerine yapılan bir çalışmaya göre; 25°C'de, 1.5 mg/lt klor 10 dk.'da, 5°C'de, 1 mg/lt klor 60 dk.'da, kistlerin tamamını öldürmektedir (80). Yapılan bir başka çalışmada ozon 5°C'de 0.53 mg-min/lt dozunda ve 25°C'de 0.17 mg-min/lt uygulandığında kistlerin %99'u inaktive olduğu gösterilmiştir (167).

Su kaynaklarının kontrolü, özellikle yüzme havuzlarında zor olmaktadır. Bu nedenle enfekte kişiler yüzme havuzu, göl ve nehir gibi yerlere gitmemelidir (156).

Hastalığın kontrolü, sokaklarda lağım sularının akmaması, uygun tuvaletlerin bulunması, temiz yiyecek ve suyun sağlanması ile mümkündür. Ayrıca tüm korunma önlemlerine ilaveten, halk eğitim programları uygulanmalıdır (168).

Julio ve ark. (48) yaptığı bir çalışmada *G. intestinalis*'in Lizbon'un dış bölgelerinde oturan ailelerin çocuklarında yapmış olduğu asemptomatik enfeksiyon prevalansı incelenmiştir. Işık mikroskopunda %1.6 (16/844), ELISA'da ise %6.7 (56/807) oranında pozitiflik saptanmıştır. *Giardia* prevalansı ile çocukların ebeveynlerinin eğitimi arasında yakın ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Eğitimsiz annelerin çocuklarında oran %26 iken eğitilmiş anne çocuklarında oran %6 olmuştur. Buna benzer olarak eğitimsiz baba çocuklarında oran %42 iken eğitilmiş baba çocuklarında oran %6 olarak bulunmuştur.

Brezilya'nın Salvador şehrinde Barreto ve ark. (169), 1-4 yaş grubundaki, 1998'de 681 ve 2003-2004'de 976 çocuk üzerinde bir çalışma yapılmıştır. Görüşmede ev halkı ve mahalle sağlık koşulları değerlendirilmiştir. Çalışmada iki dönem arasında *G. intestinalis* enfeksiyon oranının %14.1'den %5.3'e ve *A. lumbricoides* enfeksiyonunun %24.4'ten %12'ye düştüğü görülmüştür. Bunun nedeninin her mahallede yapılan kanalizasyon sistemleri olduğu saptanmıştır. Çalışmada yaşanan çevredeki iyileştirmelerin bağırsak parazitlerinin oranını azaltacağı sonucuna varılmıştır.

Anne sütü içerdiği IgA ile yeni doğanlar için özellikle gelişmekte olan ülkelerde koruyucu olabilir. Ayrıca *in vitro* çalışmalarda anne sütünde bulunan enzimlerin *G. intestinalis* trofozoitlerini öldürdüğü gösterilmiştir (156,170).

Giardia intestinalis hijyenin kötü olduğu alanlarda turist ishalinin ve çocukluk ishalinin sık nedenlerinden birisidir. Endemik alanlara giden turistler pişmemiş gıdaları, kontamine su ile hazırlanmış, yıkanmış veya büyütülmüş olabileceği için yemekten kaçınma önerilmektedir (156,163).

Toplum sağlığı açısından yiyecek sektöründe görev yapan personelin portörlük durumları için düzenli aralıklara sağlık taraması yapılmalıdır. Taşıyıcı olduğu tespit edilen olgular tedavi edilmelidir. Giardiasisli olgulara 10-15 gün yatak istirahati verilmelidir (60,103).

Özellikle kurumlarda ve gündüz bakım evinde çalışan insanların hijyene dikkat etmesi fekal oral yoldan bulaşmayı önleyecektir (5,156,162).

Hijyen koşullarının bozuk olduğu durumlarda birden fazla partnerle ve homoseksüel cinsel ilişki ile de bulaşma olabileceği anlatılmalıdır. Ayrıca kişiler oral-anal ve oral genital ilişkilerden kaçınılmalıdır (103,162).

Kedi ve köpeklere *G. intestinalis*'e karşı aşı önerilmektedir (144,171). Ancak halen insanlarda uygulanan bir aşı yoktur (172). Oral yoldan verilen, farelerde denenilen bir aşı ile kısmen başarı elde edilmiştir. Bu aşının, bağırsak lümenindeki parazit kolonizasyonunu engellediği ve uyguladıktan sonra 9-11'inci günlerde trofozoitlerin ortadan kalktığı saptanmıştır. ABD'de son yıllarda köpekler ve kediler için üretilmiş ticari aşılar satılmaktadır. Aşıların kist atılımını azalttığı, köpek ve kedilerde klinik bulguları engellediği bildirilmiştir (98).

Taşıyıcı olabileceği için hamam böcekleri ve karasineklerle mücadele edilmelidir ve insan dışkıları gübre olarak kullanılmamalıdır (162).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alınarak (Ek-1) ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (TÜBAP) tarafından 2011/139 numaralı proje desteği (Ek-2) ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi.

ÇALIŞMA AKIŞI

1. Örneklerin Toplanması ve Direkt Mikroskopik İnceleme
2. Kistlerin Saklanması ve DNA İzolasyonu
3. Elongasyon faktör -1 alfa (Ef-1 α) Gen Bölgesinin LAMP Yöntemi ile Analizi
4. Beta giardin (bg) Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması ve Dizi Analizi
5. İstatistiksel Analiz

ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZLAR

1. Işık mikroskobu (Olympus CX21FS1, Japonya)
2. Santrifüj cihazı (Heraeus Sepatec Labofuge200, Almanya)
3. Hassas terazi (Kern EMB600-2, Almanya)
4. Mikrosantifüj cihazı (Hetting, Almanya)
5. Isı bloğu (Techne DRI-BLOCK BB-2A, ABD)
6. Vorteks cihazı (Elektro-mag M16, Türkiye)

7. Mikrodalga fırın (Arçelik MD500, Türkiye)
8. Yatay elektroforez cihazı (BioRad Wide mini-sub cell GT cell, Almanya)
9. Ultraviyole lamba ve DNA jel görüntüleme cihazı (BioRad UV Transilluminator 2000, Almanya)
10. Buzdolabı (Arçelik 4252N, Türkiye)
11. Güç kaynağı (BioRad Power PAC 200, Almanya)
12. Ultraviyole spektrofotometre (Hitachi U-1800, Japonya)
13. Termal Cycler Cihazı (Bio Rad ICycler IQ, ABD)
14. Soğutmalı santrifüj cihazı (Heraeus-Sepatech Biofuge 22R, Almanya)
15. Nano drop cihazı (Thermo Scientific Nanodrop, 2000c)
16. Kırık buz yapma makinesi (ITV IQ 45C, Avrupa)
17. Mikro eliza cihazı mikropalak okuyucu (Biotek- μ Quant MQX200, ABD)
18. Biorad Universal Hood Görüntüleme Cihazı (Biorad, İtalya)

Örneklerin Toplanması ve Direkt Mikroskopik İnceleme

A. Kullanılan kimyasallar:

- % 0,9 İzotonik sodyum klorür solüsyonu (Medifleks 100 ml; Eczacıbaşı, Türkiye)

Stok lügol solüsyonunun hazırlanması

1. 10 gr potasyum iyodür (KI) (Sigma Aldrich, Almanya) 100 ml distile su içinde çözüldü.
2. Üzerine 5 gr iyot (Sigma, ABD) eklendi.
3. Elde edilen solüsyon koyu renkli ve cam kapaklı şişeye süzülerek aktarıldı.
4. Bu solüsyon stok solüsyonu olarak kullanıldı.

Ardından stok solüsyonundan çalışmada kullanılacak lügol solüsyonu hazırlandı.

Çalışma solüsyonunun hazırlanışı

- | | |
|--|-------|
| 1. Lügol (%5'lik stok solüsyonundan) | 5 ml |
| 2. %0,9 İzotonik sodyum klorür solüsyonu | 20 ml |

B. Örneklerin toplanması:

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Merkez Laboratuvarı ve Edirne Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen, *G. intestinalis* kist ve/veya

trofozoit pozitif çıkan dışkı örnekleri çalışmaya alındı. Örnekler laboratuvarında, ışık mikroskobunda inceleninceye kadar, +4°C'de buzdolabında saklandı (173).

C. Direkt mikroskopik inceleme:

Gelen örnekler 24 saat içinde trofozoit ve kist varlığı açısından, ışık mikroskobunda incelendi. İncelemede iki ayrı yöntem kullanıldı (174).

1) Nativ inceleme: Çalışmada, 1 damla %0,9 NaCl solüsyonu ile yaklaşık 2 mg dışkı, lif ve partikül kalmayacak şekilde dikkatlice karıştırıldı, üzerine 22x22 mm'lik lamel kapatılarak homojen bir preparat hazırlandı. Preparat X400 büyütme ile değerlendirildi.

2) Lügol ile inceleme: Hazırlanan lügol solüsyonu *G. intestinalis* kist ve trofozoitlerin saptanması için kullanıldı. Temiz bir lam üzerinde, yaklaşık 2 mg dışkı lamın iki ucuna ayrı ayrı konuldu. Dışkının birine bir damla lügol solüsyonu, ikincisine bir damla %0,9 NaCl konularak dikkatlice karıştırıldı. Örneklerin üzerleri 22x22 mm'lik lamellerle kapatılarak homojen bir preparat hazırlandı. Preparat ışık mikroskobunda X400 büyütme ile incelendi.

D. Kist sayılarının değerlendirilmesi:

Hem nativ hem de lügol yöntemiyle incelenen her örnek, X400 lük büyütmede en az 50 alan taranarak ortalama kist sayısı saptandı. Taranan 50 alanda alan başına ortalama 1'den az kist olması (+), her alanda 1-3 kist (++) ve her alanda 3 den fazla kist görülmesi (+++) olarak kayıt edildi.

Kistlerin Saklanması ve DNA İzolasyonu

A. Kistlerin saklanması:

Moleküler çalışmalar için örneklerden kistlerin saflaştırılmasında Fernandes ve ark.'nın (175) yapmış olduğu yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Örnekler en fazla 5 gr olacak şekilde 15 ml distile su ile dört katlı gazlı bezden geçirildi. Gazlı bezin üzerinde kalan kaba materyal atıldı. Elde edilen filtrat 400 xg'de 10 dk. santrifüj edildi. Üst kısmı atıldı. Kalan 2-3 ml örneğin üzerine 12-13 ml distile su eklendi. Tekrar 400 xg'de 10 dk. santrifüj edildi. Dışkı ile distile su arasındaki bölgeden kistler izole edilerek, 2 ml'lik ependorf tüpe konuldu. Örnekler moleküler çalışılma yapılına kadar -20 °C'de saklandı (123).

B. DNA izolasyonu ve DNA miktarının ölçülmesi:

1) DNA izolasyonu:

Örneklerin DNA izolasyonu, QIAamp DNA stool mini kiti (Qiagen Almanya) kullanılarak yapıldı (123).

- Kit içinde bulunan kimyasallar:

- 1) Buffer ASL (Stool lysis buffer)
- 2) Buffer AL (Lysis buffer)
- 3) Buffer AW1 (Wash buffer 1)
- 4) Buffer AW2 (Wash buffer 2)
- 5) Buffer AE (Elution buffer)
- 6) Proteinaz K Solusyonu
- 7) İnhibitEX inhibitör adsorbsiyon tableti

DNA izolasyon protokolleri

Protokol 1: Kistlerin saflaştırıldığı örnekler için:

Fernandes ve ark.'nın (175) yapmış olduğu yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Önce kistler dışkıdan saflaştırıldı ve -20 °C'de saklandı. Daha sonra bu kistlerden DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. -20 °C'de saklanan örnekler çıkartıldı. Materyaller 45 dk. çözünmesi beklendikten sonra 10.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
2. Üstteki kısım atılarak, dipteki 500 µl örnek çalışmaya alındı.
3. 2 ml'lik ependorf tüpüne 0,5 gr 3 mm'lik steril cam boncuk konuldu.
4. Üzerine 1000 ml Buffer ASL eklendi.
5. 15 dk. vortekslendi.
6. 10 dk. 100 °C kaynar suyun içinde bekletildi.
7. Üzerine 400 ml Buffer ASL eklendi.
8. Santrifüj cihazında 600 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi .
9. 1.2 ml süpernatant yeni bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı.
10. Bu tüpe 1 adet inhibitEX tablet eklendi, önce vortekslendi ardından 3 dk. santrifüj edildi.
11. Yeni bir mikro santrifüj tüpüne 15 µl proteinaz K eklendi.
12. Bir önceki tüpün süpernatant kısmından 200 µl alınıp proteinaz K'nın üzerine eklendi. Bunun üzerine 200 µl Buffer AL solüsyonu eklendi ve 15 sn. vortekslendi.
13. 70 °C'de 10 dk. inkübe edildi.

14. Üzerine 200 µl etanol eklendi ve vortekslendi.
15. QIAamp spin column, 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve bir önceki örnek üzerine konuldu. 1 dk. 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
16. Dipteki filtrat atıldı. Yeni toplama tüpüne alınan QIAamp spin column'a 500 µl Buffer AW1 konuldu. 14.000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi.
17. Dipteki filtrat atıldı. Yeni toplama tüpüne alınan QIAamp spin column'a 500 µl Buffer AW2 konuldu. 14.000 rpm'de 3dk. santrifüj edildi.
18. QIAamp spin column yeni 2 ml'lik ependorf tüpüne alındı.
19. Son basamakta ise 40 µl Buffer AE eklenerek DNA elde edildi.

Protokol 2: Direkt dışkıdan DNA izolasyonu yapılan örnekler için:

DNA izolasyonu için Svard ve ark. (20) tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek kullanıldı.

1. Taze dışkı örneğinden 2-3 gr tartıldı. Dışkı ağırlığı 2 gr'dan az olanların tamamı izolasyon için kullanıldı.
2. 50 ml'lik falcon tüpüne 1.5 gr 3 mm'lik steril cam boncuk konuldu.
3. Üzerine 1000 ml Buffer ASL eklendi.
4. 15 dk. vortekslendi.
5. 10 dk. 100 °C sıcaklığında kaynar suyun içinde bekletildi.
6. Üzerine 400 ml Buffer ASL eklendi.
7. Santrifüj cihazında 600 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
8. 1.2 ml supernatant yeni bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı.
9. Bu tüpe 1 adet inhibitEX tablet eklendi, önce vortekslendi ardından 3 dk. santrifüj edildi.
10. Yeni bir mikro santrifüj tüpüne 15 µl proteinaz K eklendi.
11. Bir önceki tüpün süpernatant kısmından 200 µl alınıp proteinaz K'nın üzerine eklendi. Bunun üzerine 200 µl Buffer AL eklendi ve 15 sn. vortekslendi.
12. 70 °C 10 dk. inkübe edildi.
13. Üzerine 200 µl etanol eklendi ve vortekslendi.
14. QIAamp spin column, 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve bir önceki örnek üstüne konuldu. 1 dk. 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
15. Dipteki filtrat atıldı. Yeni toplama tüpüne yerleştirilen QIAamp spin column'a 500 µl AW1 konuldu. 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.

16. Dipteki filtrat atıldı. QIAamp spin column Yeni toplama tüpüne yerleştirildi ve üzerine 500 µl AW2 konuldu. 14.000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi.
17. QIAamp spin column yeni 2 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirildi.
18. Son basamakta ise Buffer AE 40 µl kullanılarak, DNA elde edildi.
Elde edilen DNA örnekleri ölçüm yapılana kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

2) DNA Miktarının ölçülmesi ve değerlendirme:

DNA ekstraksiyon işleminden sonra, elde edilen üründeki DNA miktarı Thermo Scientific Nano Drop 2000c cihazında ölçüldü. Ardından örnekler PZR işlemi yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

Elongasyon Faktör -1 Alfa (Ef-1 α) Gen Bölgesinin LAMP Yöntemi ile Analizi

Elde edilen DNA'larda Ef-1 α gen bölgesinin gösterilmesi amacıyla LoopAMP ticari kiti kullanıldı.

A. Kullanılan kimyasallar ve Primerler:

Analizin yapılmasında LoopAmp *Giardia* Saptama Kiti (Eiken Japonya) kullanıldı.

- Kit içinde bulunan kimyasallar:

- 1) Reaksiyon Mix
- 2) Primer Mix. Gia (PM Gia)
- 3) Bst DNA Polimeraz
- 4) Distile su
- 5) *G. intestinalis* pozitif kontrol

- Kit içinde bulunan primerler (136):

F3 5'-ATGGACGACGGCCAGG-3'

B3 5'-CCCTCGTACCAGGGCATC-3'

FIB 5'-AGCCGATGTTCTTGAGCTGCTTGTACTCGAAGGAGCGCTACG-3'

BIP 5'-GAAGAAGGCCGAGGAGTTCGTTGTCGGACCTCTCCATGA-3'

LB 5'-CTGGACCGGGACAACA-3'

LF 5'-ATCATCTCGCCCTTGATCTCG-3'

B. LAMP Yöntemi ve değerlendirme:

PZR'de pozitif kontrol olarak, kitin içinde bulunan *G. intestinalis* DNA'sı ve negatif kontrol olarak DNAase ve RNAase içermeyen saf su kullanıldı. LAMP testinin yapılması işlemlerinin tamamı buz üzerinde gerçekleştirildi.

İlk olarak buz üzerinde, toplam 20 µl olacak şekilde master mix karışımı hazırlandı:

- PZR Master Mix Karışımı:

2 x Reaksiyon Mix	12.5 µl
Primer Mix. Gia	2.5 µl
Bst DNA Polimeraz	1.0 µl
Distile su	4.0 µl

DNA örnekleri 5 µl olacak şekilde hazırlandı, 95 °C'de, 5 dk. inkübe edildi. Bu işlemin ardından hemen örnekler buza konuldu. PZR için hazırlanmış olan master mix karışımından 20 µl alınarak, DNA örneklerinin üzerine konuldu. Ardından Tablo 6'daki protokole göre PZR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 6: LAMP PZR protokolü

PZR Basamağı	Hedef sıcaklık	İnkübasyon süresi	Döngü sayısı
Denatürasyon	63 °C	60 dk.	1
İnaktivasyon	80 °C	5 dk.	1

Değerlendirme: LAMP analizinde, DNA'ya bağlı olarak oluşan bulanıklık derecesi 400 nm dalga boyunda mikropate spektrofotometre ile okutuldu (176). Negatif kontrol absorbans değerinden daha yüksek değer veren tüm örnekler pozitif olarak kabul edildi.

Beta giardin (bg) Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması ve Dizi Analizi

Elde edilen izolatlarda bg gen bölgesinin varlığının belirlenmesi için Caccio ve ark.'nın (3) yapmış olduğu PZR yöntemi kullanıldı.

A. Kullanılan Kimyasallar ve Primerler:

- Kullanılan Kimyasallar:

1. 2 mM dNTP (Fermentas, Litvanya): Her bir dNTP (100 mM)'den 2 µl alınıp 98 µl distile su ile karıştırıldı.

2. Primerler (Biomatik, Kanada): Primerler önce her biri için belirtilen nmol değerlerine göre 100 µM olacak şekilde distile su ile sulandırıldı. Ardından distile su ile 1/9 oranında sulandırılarak 10 µM'lık konsantrasyon elde edildi.

3. Taq Polimeraz: 5 U/µl (Thermo Scientific, Litvanya)

4. 2 mM MgCl₂ solüsyonu (Thermo Scientific, Litvanya)

5. 6 X Yükleme boyası (Thermo Scientific, Litvanya)

6. 100-3000 bp DNA boyut markırı (Thermo Scientific, Litvanya)

- Kullanılan Beta giardin Primerleri:

384 bp'lık Beta giardin gen bölgesi için kullanılan primerler (3):

F (G376) : 5'-CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3'

R (G759) : 5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'

B. Beta giardin (bg) gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ve değerlendirme:

- PZR Master Mix Karışımı:

10 µl.....10X PZR Tamponu,

3 µl..... MgCl₂,

2.5 µl..... dNTP,

1.5 µl..... primer (G376),

1.5 µl.....primer (G759),

1 µl.....Taq DNA polimeraz,

2 µl..... DNA örneği.

Toplam hacim 50 µl olacak şekilde ajirojen distile su eklendi ve PZR işlemleri gerçekleştirildi.

Amplifikasyon işleminde pozitif kontrol olarak Prof. Dr. Sema Ertuğ'dan (Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji AD) temin edilen *G. intestinalis* DNA'sı ve negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı.

Amplifikasyon: Bio Rad Thermo Light Cycler cihazı kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 7).

Tablo 7. Beta giardin gen bölgesi için uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu protokolü

PZR Basamağı	Hedef sıcaklık	İnkübasyon süresi	Döngü sayısı
Denatürasyon	94 °C	5 dk.	1
Amplifikasyon	94 °C	30 sn.	40
	65 °C	30 sn.	
	72 °C	60 sn.	
Son uzama	72 °C	7 dk.	1

Elektroforez ve değerlendirme:

- Kullanılan Kimyasallar:

1. 0.5x TBE tampon solüsyonu (Multicell, Kanada): 10X TRIS borate–EDTA buffer solüsyon distile su ile 1/20 oranında sulandırıldı.

2. %2 agaroz jel (Multicell, Kanada): 1 g agaroz 50 ml 0.5x TBE tampon solüsyonu içinde eritildi. Karışım; mikrodalga fırında kaynatıldı, soğuması için bir süre bekletildi.

3. 5 µl etidyum bromid (10 mg/ml, Biomatik, Kanada): Agaroz jel karışımına eklendi ve elektroforez tankına dökülerek katılaşmaya bırakıldı.

4. 10 µl PZR ürünü ile 2 µl 6 X yükleme boyası (Thermo Scientific, Litvanya) karıştırılıp %2'lik agaroz jelde kuyulara yüklendi.

Elektroforez tampon solüsyonu olarak 0.5x TBE kullanıldı ve elektroforez cihazında 120 V 500 mA 'de bir saat yürütüldü. Daha sonra jel Biorad Universal Hood görüntüleme sisteminde UV ışığı altında görüntülenerek bg (384 bp) gen bölgesi varlığı gösterildi. Beta giardin gen bölgesi çoğaltılan örnekler -20 °C'de saklandı.

DNA Dizi analizi:

Bütün örnekler çalışıldıktan sonra elde edilen DNA'lara dizi analizi Refgen (Ankara, Türkiye) firması tarafından önce Clustal W yöntemi ile diziler sıralandı. Sonra neighbour-joining yöntemi ile filogenetik ağaç çizildi.

Örneklerin genotiplendirilmesi ise İontek (İstanbul, Türkiye) firmasına yaptırıldı. Gen bölgesi referans dizileri Tablo 8'de listelenmiştir.

Tablo 8. Çalışmada kullanılan *Giardia intestinalis* genotipleri ve GenBank erişim numaraları

<i>G. intestinalis</i> genotipi	GenBank erişim numarası	Kaynak
Genotip A 1	GenBank:AY072722.1	NCBI
Genotip A 2	GenBank:AY072723.1	NCBI
Genotip A 3	GenBank:AY072724.1	NCBI
Genotip B 1	GenBank:AY072725.1	NCBI
Genotip B 2	GenBank:AY072726.1	NCBI
Genotip B 3	GenBank:AY072727.1	NCBI
Genotip B 4	GenBank: AY072728.1	NCBI

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, SPSS 20 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Ölçülebilen verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Kolmogorov Smirnov testi ile analiz edildi, normal dağılım göstermeyen gruplar arası kıyaslamalarda Kruskal Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi kullanıldı.

Niteliksel verilerde Yates düzeltmeli Pearson χ^2 testi ve Kolmogorov Smirnov iki örnek testi ve Mc Nemar testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak Median (Minimum-Maksimum) değerleri verildi. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak seçildi.

BULGULAR

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Edirne Devlet Hastanesinde 01 Eylül 2011-30 Nisan 2013 tarihleri arasında parazitolojik inceleme istenen kişilerden dışkıda *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoit pozitif bulunan 39 örnek çalışmaya alındı.

Örneklerin Toplanması ve Direkt Mikroskopik İnceleme

Örneklerin demografik özellikleri: Olguların 30'unun (%78) Edirne merkez ilçeden geldiği belirlendi. Edirne merkez ilçenin dışında, Tekirdağ'da (Merkez) üç, Çerkezköy'de (Tekirdağ) iki, Lüleburgaz (Kırklareli), Uzunköprü, Keşan (Edirne) ve Çorlu'da (Tekirdağ) birer olgunun ikamet ettikleri görüldü (Tablo 9).

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Edirne Devlet Hastanesinden gelen 39 örnek incelendiğinde; bu olguların yaşı ortanca 20 yaş (minimum-maksimum: 1-74) olup %76,9'unun erkek, %23,1'nin kadın olduğu görüldü. Erkeklerin oranının fazla olmasının nedeni Edirne Devlet Hastanesinden gelen 18'i (%46.15) pozitif örneğin portör muayenesi için gelen askerlere ait olması idi. Olguların 12'si (%30.8) çocuk yaş grubundaki olgulardı. Çocuk olgulara ait örnekler Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezinden toplandı.

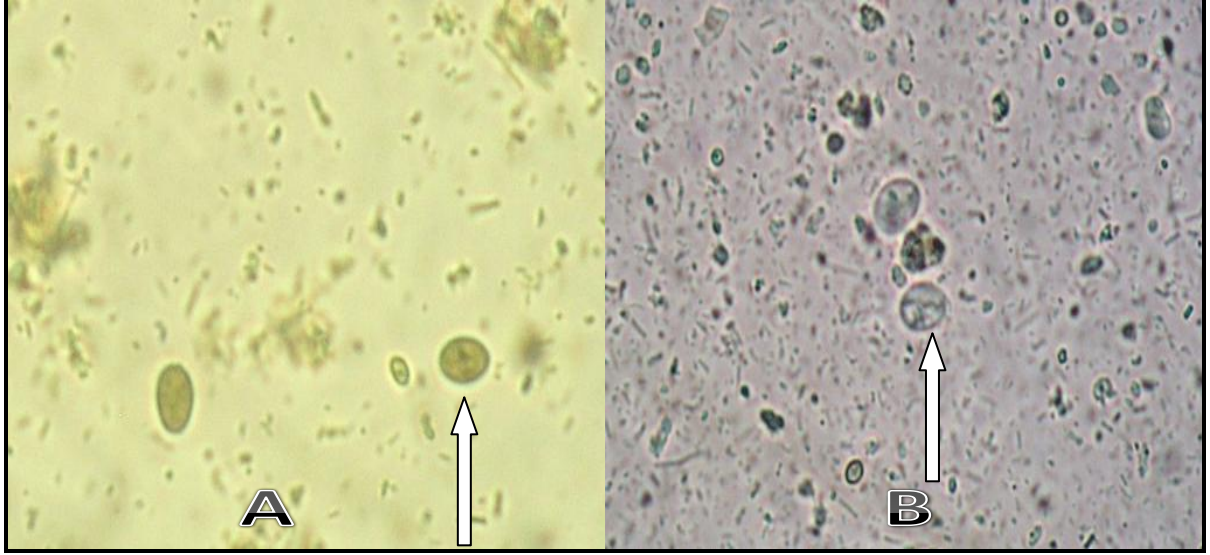
Tablo 9. *Giardia intestinalis* saptanan olguların demografik özellikleri

No	Cinsiyet	Yaş	Hastane	Poliklinik	Adres
1	Erkek	26	TÜTF	Mikrobiyoloji Laboratuvarı	Uzunköprü
2	Erkek	23	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
3	Kadın	5	TÜTF	Çocuk Hastalıkları	Tekirdağ
4	Erkek	7	TÜTF	Çocuk Hastalıkları	Edirne
5	Erkek	23	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
6	Erkek	21	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
7	Erkek	10	TÜTF	Çocuk Acil	Edirne
8	Erkek	33	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
9	Erkek	21	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
10	Erkek	21	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
11	Erkek	22	TÜTF	Genel Dahiliye	Edirne
12	Erkek	3	TÜTF	Çocuk Hastalıkları	Tekirdağ
13	Erkek	4	EDH	Çocuk Hastalıkları	Edirne
14	Erkek	21	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
15	Kadın	65	TÜTF	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
16	Erkek	13	TÜTF	Çocuk Hastalıkları	Edirne
17	Erkek	4	TÜTF	Çocuk Hastalıkları	Çerkezköy
18	Erkek	18	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
19	Kadın	8	TÜTF	Çocuk Hastalıkları	Edirne
20	Kadın	1	TÜTF	Çocuk Hastalıkları	Çorlu
21	Kadın	13	TÜTF	Çocuk Hematoloji Servis	Lüleburgaz
22	Erkek	13	TÜTF	Çocuk Hastalıkları	Edirne
23	Kadın	6	TÜTF	Çocuk Hastalıkları	Tekirdağ
24	Erkek	20	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
25	Erkek	20	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
26	Erkek	20	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
27	Erkek	20	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
28	Erkek	20	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
29	Erkek	20	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
30	Erkek	21	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
31	Kadın	30	EDH	Genel Dahiliye	Edirne
32	Erkek	21	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
33	Erkek	67	TÜTF	Kardiyoloji Servisi	Keşan
34	Erkek	20	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
35	Kadın	17	TÜTF	Çocuk Hastalıkları	Çerkezköy
36	Erkek	21	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
37	Erkek	21	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne
38	Kadın	74	TÜTF	Acil Servis	Edirne
39	Erkek	21	EDH	Enfeksiyon Hastalıkları	Edirne

TÜTF: Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi.

EDH: Edirne Devlet Hastanesi.

Direkt mikroskopik inceleme ve kist sayılarının değerlendirilmesi: *Giardia intestinalis* pozitif dışkı örneklerindeki kist miktarları değişti (Şekil 5). Kist sayıları (+), (++) ve (+++) olarak kayıt edildi. Işık mikroskopunda X400'lük büyütmede yapılan alan taramasına göre; 22 örnek (+), 11 örnek (++) ve altı örnek (+++) olarak saptandı (Tablo 10).



Şekil 5: Dışkıda *Giardia intestinalis* kistleri (Büyütme: X400 Işık Mikroskobu)

A) Lügol solüsyonu ile görünen kistler B) Serum fizyolojik ile görünen kistler.

Kistlerin Saklanması ve DNA İzolasyonu

Kistlerin saklanması: Moleküler çalışmalar için gerekli malzemeler temin edilene kadar geçen sürede gelen ilk 17 örnekte kistler saflaştırıldıktan sonra dışkılarından elde edilen kistlerin korunması ve daha sonra DNA izolasyonu yapılması amacıyla, -20 °C'de saklandı (123,172). Diğer 22 örnekte ise gelen materyaller kist varlığı açısından değerlendirildikten sonra, dışkıdan direk DNA izolasyonu yapıldı.

İzole edilen DNA miktarının ölçülmesi: Örneklerden elde edilen DNA'lar Thermo Scientific Nanodrop spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. DNA miktarları 37.7 ile 477 ng/μl arasında değişmekteydi. DNA miktarları Tablo 10'da gösterildi.

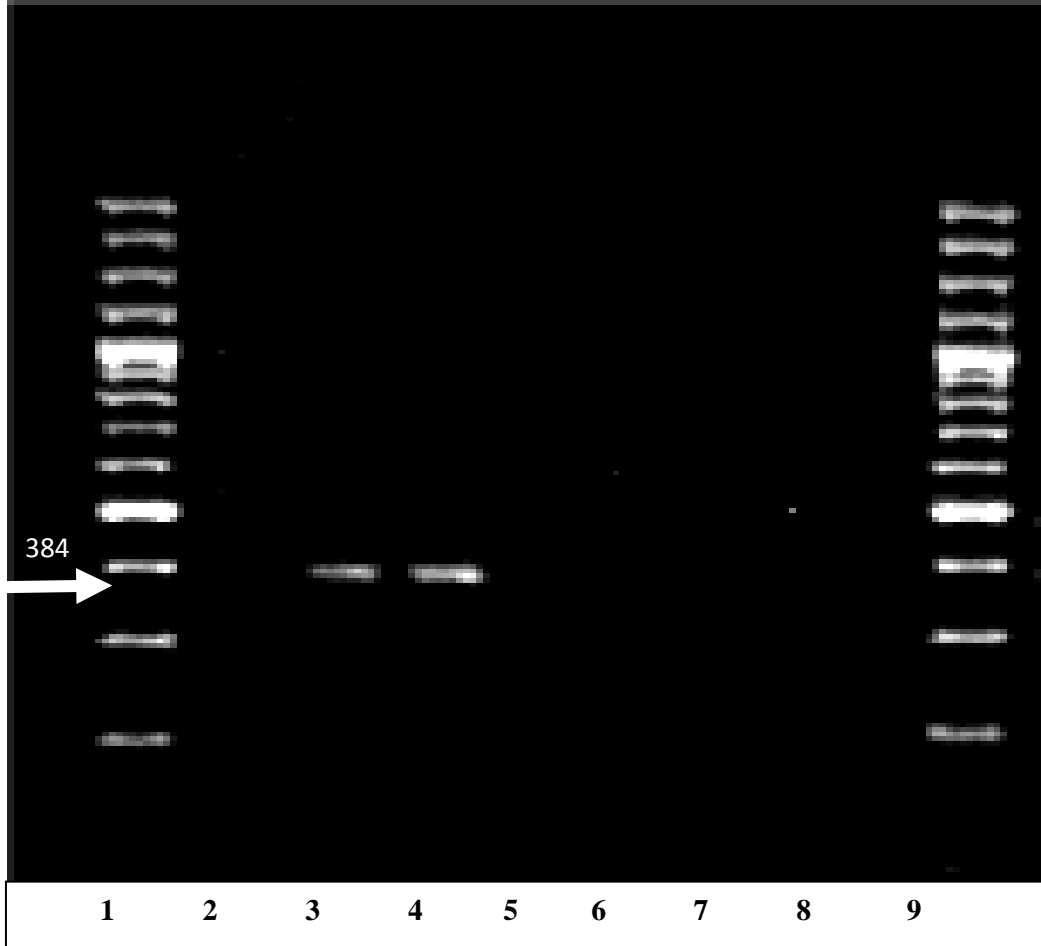
Elongasyon faktör-1 alfa (Ef-1α) Gen Bölgesinin LAMP Yöntemi ile Analizi

İlmiğe dayalı izotermal çoğaltma analizinde; pozitif olan örneklerde, son ürün olarak magnezyum pirofosfat ile bulanıklık oluştu. Pozitif örneklerdeki bulanıklık seviyesinin belirlenmesinde 400 nm dalga boyunda Mikro-Eliza Spektrofotometre kullanıldı. Negatif kontrol absorbans değerinden daha yüksek değer veren tüm örnekler pozitif olarak kabul edildi.

Giardia intestinalis pozitif 39 DNA örneğinden 32'sinde (%82) Ef-1 α gen bölgesi LAMP analizi ile çoğaltıldı. LAMP pozitif 32 örneğin 19'unda bg gen bölgesi PZR ile çoğaltılırken, LAMP ile negatif bulunan yedi örnek aynı zamanda bg PZR ile de negatif bulundu (Tablo 10).

Beta giardin (bg) Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması ve Dizi Analizi

Beta giardin (bg) gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ve değerlendirme: Elde edilen DNA'lar daha önceden belirlenen protokole göre PZR ile çoğaltıldı. Daha sonra bu ürünler %2'lik agaroz jel elektroforezde yürütülerek, 384 bp'lik bg gen bölgesinin olup olmadığına bakıldı (Şekil 6). 39 örnekten 19'unda (%48.72) 384 bp'lik bg gen bölgesi saptandı.



Şekil 6. Elektroforezde *Giardia intestinalis* 384 bp'lik polimeraz zincir reaksiyonu bant görüntüsü

1,9- DNA ladder 2- Negatif kontrol 3-Pozitif kontrol.

4-8- Çalışılan örnekler (4 no'lu örnek pozitif, diğer örnekler negatif).

Kist saflaştırması yapıp,-20 °C’de, 0-6 ay süre ile saklanmış örneklerde %33.3 (3/9) oranında PZR pozitifliği saptanırken, 7-12 ay saklanan örneklerde %25 (2/8) oranda PZR pozitifliğine bağlı bant saptandı. Taze dışkıdan DNA izolasyonunun yapıldığı örneklerde ise %63.63 (14/22) oranında PZR ile *bg* gen bölgesi çoğaltıldı.

Çalışma sırasında elde edilen 39 izolata *Ef-1α* gen bölgesi için LAMP ve *bg* gen bölgesi için PZR yapıldı. Bu testlerin pozitiflik oranları *bg* PZR ile %48.7 (19/39) ve *Ef-1α* LAMP testi ile %82 (32/39) olarak çıktı (Tablo 9). Pozitiflik oranları McNemar ki kare analizi ile karşılaştırıldı ve *Ef-1α* LAMP testinde pozitiflik oranı anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p=0.0001).

Pozitiflik oranları ile kist yoğunluğu karşılaştırıldığında (++) ve (+++) yoğunluktaki 17 örneğin tümünde *Ef-1α* ve *bg* gen bölgeleri pozitif olarak bulundu. Kist yoğunluğu düşük olan 22 örnekte ise *Ef-1α* örneklerin %68.2’sinde, *bg* ise örneklerin %9.1’inde pozitif olarak saptandı. PZR yönteminin pozitifliği ile kist yoğunlukları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark (p=0.0001) bulunmasına rağmen, LAMP yönteminin pozitifliği ile kist yoğunlukları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0.078). DNA miktarı bakımından PZR pozitif olanlarla negatif olanlar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark olup PZR pozitif örneklerin DNA miktarı daha yüksektir (p=0.0001). DNA miktarları ile LAMP testi sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0.872).

DNA Dizi Analizi

Elektroforezde görüntülenen örnekler DNA dizi analizi ve filogenetik analizi yapılmak üzere Refgen (Ankara, Türkiye) firmasına gönderildi. Çalışma sonucunda elde edilen dendogram Şekil 7’de görülmektedir.

Genotiplendirme: İzolatların genotiplendirilmesi İontek (İstanbul Türkiye) firmasına yaptırıldı. *G. intestinalis* pozitif 39 örnekten 19’unda (%48.7) 384 bp’lik *bg* gen bölgesi saptandı ve örneklerin ancak 17’sinde genotiplendirme yapıldı.

Bu örneklerin dokuzu Genotip A ve sekizi Genotip B’dir. Bu izolatların A2, A3, B2, B3 ve B4 alt genotiplerine ait olduğu görüldü. Çalışma sırasında elde edilen izolatların altı tanesi A2, üç tanesi A3, altı tanesi B2, bir tanesi B3 ve bir tanesinin de B4 genotipine ait olduğu saptandı (Tablo 10).

Klinik ve genotipler: Çalışmamızda elde edilen örneklerin 21’i karın ağrısı, ishal, şişkinlik ve yağlı dışkılama gibi klinik belirti ve bulguları bulunan, dışkı bakımında pozitiflik

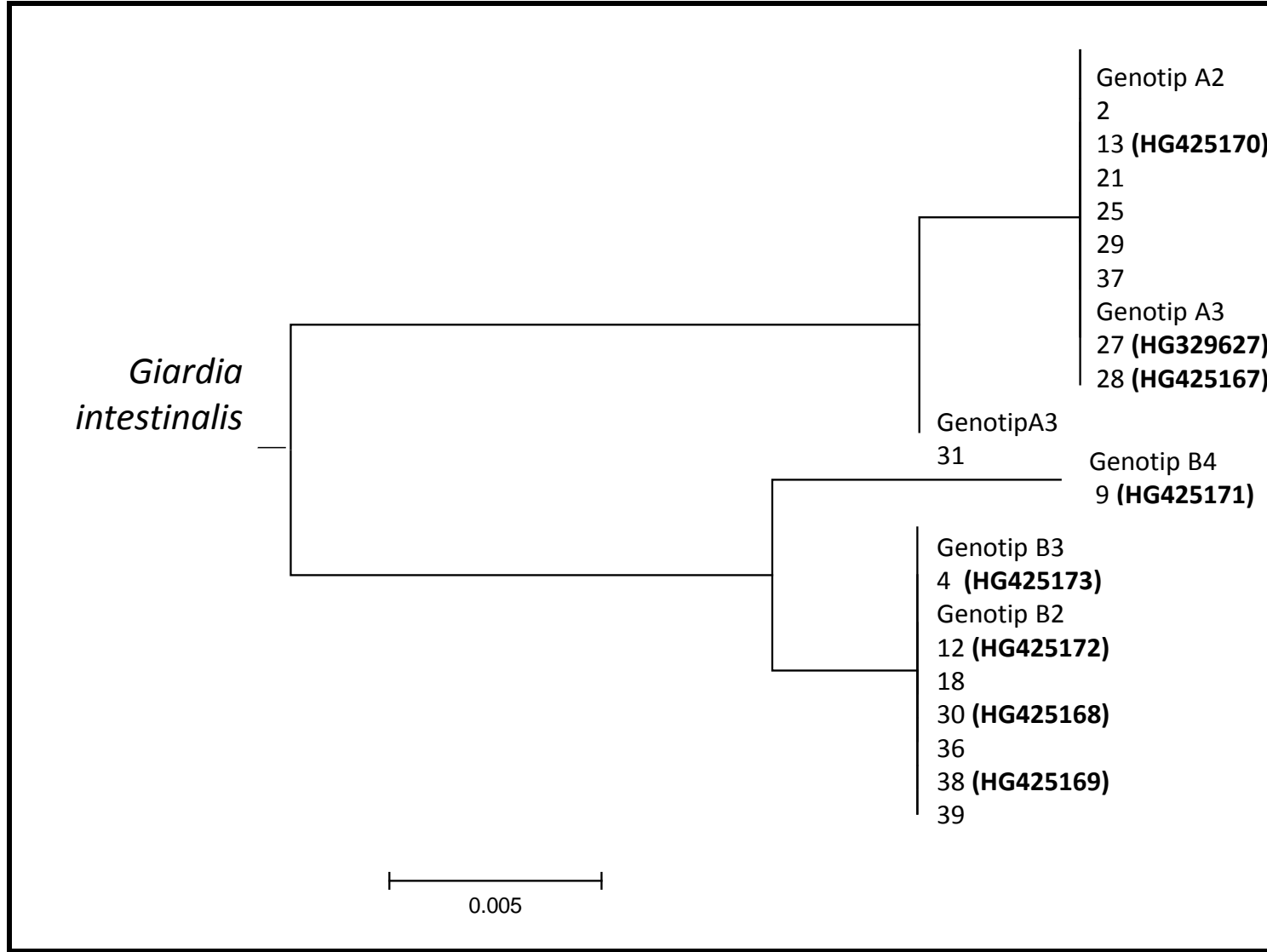
saptanan olgulara aitti. Geriye kalan 18 örnek ise portör muayenesi sırasında pozitif çıkan, herhangi bir klinik bulgu vermeyen asemptomatik örnekler idi. Genotiplendirme yapılan örneklerin 8'i ise semptomatik olgulara ve 9'u ise asemptomatik olgulara aitti. Bu sonuçlara göre semptomatik olgularda Genotip B (%62.5) daha fazla iken asemptomatik olgularda Genotip A (%66.7) daha fazla görüldü (Tablo 10). Klinik bulgular ile genotipler arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p=0.347$).

Dizi analizi ve kayıt: Beta giardin bölgesi gen dizi analizi sonuçları değerlendirildiğinde beş farklı grubun varlığı tespit edildi. Örneklerimize ait gen dizileri European Nucleotid Archive (ENA) gen bankası veri tabanına kaydedildi (Ek 3-10). İzolatlar ve erişim numaraları Şekil 7'de gösterilmektedir.

Tablo 10. *Giardia intestinalis* örneklerinin mikroskobik ve moleküler analiz sonuçları

Olgu No	Klinik	Kist Sayısı	DNA (ng/μL)	LAMP (Ef-1α)	PZR (β giardin)	Genotip
1	(-)	(+)	88.4	Neg		
2	(-)	(++)	281.3	Poz	(+)	A2
3	(+)	(+)	63.1	Poz		
4	(+)	(++)	268.8	Poz	(+)	B3
5	(-)	(+)	373.2	Poz		
6	(-)	(+)	158.7	Neg		
7	(+)	(+)	75.6	Poz		
8	(+)	(+)	58.7	Poz		
9	(-)	(+++)	88.1	Poz	(+)	B4
10	(-)	(+)	56.3	Poz		
11	(+)	(+)	79.2	Poz		
12	(+)	(++)	74.3	Poz	(+)	B2
13	(+)	(+++)	156.8	Poz	(+)	A2
14	(-)	(+)	59.1	Poz		
15	(+)	(+)	63.4	Neg		
16	(+)	(+)	106.2	Poz		
17	(+)	(+)	37.7	Poz		
18	(+)	(++)	72.2	Poz	(+)	B2
19	(+)	(+)	80.6	Poz		
20	(+)	(+)	137.9	Poz		
21	(+)	(++)	152.7	Poz	(+)	A2
22	(+)	(+)	68.2	Poz		
23	(+)	(+)	80.3	Neg		
24	(-)	(+)	61.9	Poz		
25	(-)	(++)	137.2	Poz	(+)	A2
26	(-)	(++)	113.6	Poz	(+)	*
27	(-)	(+++)	235	Poz	(+)	A3
28	(-)	(+++)	338	Poz	(+)	A3
29	(-)	(++)	237	Poz	(+)	A2
30	(-)	(+++)	477	Poz	(+)	B2
31	(+)	(+)	395	Poz	(+)	A3
32	(-)	(+)	82.5	Neg		
33	(+)	(+)	118.9	Neg		
34	(+)	(+)	112.5	Poz	(+)	*
35	(-)	(+)	301.1	Neg		
36	(-)	(++)	107.6	Poz	(+)	B2
37	(-)	(++)	272.1	Poz	(+)	A2
38	(+)	(+++)	326	Poz	(+)	B2
39	(+)	(++)	291	Poz	(+)	B2

*Genotiplendirme yapılamadı, Poz: pozitif, Neg: negatif.



Şekil 7. Filogenetik analiz sonucu elde edilen dendrogram ve ENA gen bankası erişim numaraları

TARTIŞMA

Giardia intestinalis insanları, evcil ve vahşi hayvanları enfekte edebilen ve dünyanın her tarafında bulunabilen bir parazittir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (7,26,33,36,177). Özellikle çocuklarda büyümeyi ve bilişsel fonksiyonları olumsuz etkiler (33).

Avrupa'da 2010 yılında en sık görülen üçüncü gastrointestinal enfeksiyon etkenidir. Tüm toplumda görülme oranı yüz binde 5.68 ve en sık görüldüğü 0-4 yaş grubunda ise yüz binde 16.8 olarak saptanmıştır (47). Türkiye'de aynı yılda bildirilen olgu sayısı 14605 olup insidansı yüz binde 20.07 dir (60).

Giardiasis genellikle geri kalmış veya az gelişmiş ülkelerde ve yerleşimlerinde görülmekle beraber toplumlarda su ve gıda kaynaklı salgınlara neden olabilir (33,36,60). ABD'de 1991-1998 yılları arasında 15 su kaynaklı *Giardia* salgını, İngiltere'de ise 1991-2000 yılları arasında bir içme suyu kaynaklı salgın ortaya çıkmıştır (178). Bu durumun olmaması için ülkemizde dahil olmak üzere aktif sürveyans sistemi dünyanın birçok yerinde uygulanmaktadır (47,92,179).

Ülkemizde; *G. intestinalis*, Bulaşıcı Hastalıkların Bildirimi Sistemi'ne göre D Grubu bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır. *G. intestinalis* olguları, günlük olarak Sağlık Bakanlığı'na bildirilmektedir. Türkiye'de görülme oranı çalışma yapılan bölgeye göre %4.7 ile %17 arasında değişmektedir. Trakya bölgesi *G. intestinalis* görülme sıklığı açısından, olguların en az görüldüğü bölge iken, Güney Doğu Anadolu bölgesinde en yüksek oranda görülmektedir ve bu yükseklik, gelirlerin dengesiz dağılımı, altyapının yetersizliği ve eğitim seviyesinin düşük olmasına bağlanmaktadır (55,60).

Giardia intestinalis sıklıkla kreşlerde, gündüz bakımevinde çocuklar arasında, toplu yaşam alanlarında, sanitasyonun ve hijyenin kötü olduğu alanlarda sıklıkla kişiden kişiye yayılır. Endemik ve epidemik alanlarda *G. intestinalis*'in yayılmasında fekal-oral yolla bulaşma önemlidir. Asemptomatik kist taşıyıcılığı özellikle çocuklar ve gıda işçilerinde yaygındır. Bu kişiler aynı zamanda enfeksiyon için potansiyel kaynaklardır (6,170). Bu nedenle risk gruplarında ve prevalansın yüksek olduğu bölgelerde özellikle 0-16 yaş arası çocuklarda sık aralıklara koprolojik bakı yapılması önerilmektedir (168). Çocuklarda; erişkinlerden daha sık görülmekte olup, görülme sıklığı %1 ile %36 arasında değişmektedir. Gelişmekte olan ülkelerin çoğunda beş yaşına kadar çocuklar en az bir kere *G. intestinalis* enfeksiyonuna yakalanmaktadır (170).

Giardia intestinalis geçişinin önlenmesinde asemptomatik ve hafif geçirilen enfeksiyonların kontrolü anahtar rol oynar. Bu olguların tedavi edilmesi kistlerin çevreye ve başka insanlara yayılmasını, enfeksiyona bağlı komplikasyonların oluşmasını önleyebilecektir (180,181). Ülkemizde 24.04.1930 tarihli Umumi Hıfzıssıhha Kanununun 126 ve 127. maddelerine istinaden Sağlık Bakanlığı'nın yayınlamış olduğu 27.01.2005 tarih ve 1059 sayılı genelgesine göre sıhhi müesseselerde çalışanlarda ve gıda işi ile uğraşanlarda portör taramasının yapılması zorunludur. Portör olduğu saptananların geçici olarak işten uzaklaştırılması veya işyerinde yaptığı işin geçici olarak değiştirilmesi de dahil olmak üzere hastalık yayılımını engelleyecek tedbirlerin alınması önerilmektedir (182).

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Edirne Devlet Hastanesinden gelen 39 örnek incelendiğinde; bu olguların yaşı ortanca 20 yaş (minimum-maksimum: 1-74) olup %76,9'unun erkek, %23,1'nin kadın olduğu görüldü. Erkeklerin oranının fazla olmasının nedeni portör muayenesi için gelen askerlere ait olması idi. Olguların 12'si (%30.8) çocuk yaş grubundaki olgulardı. Çocuk olgulara ait örnekler Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesinden toplandı. Bu da bize toplumda asemptomatik olguların varlığını, bu kişilerin hastalığın yayılmasına katkıda bulunabileceğini ve portör taramalarının önemini göstermiştir.

Giardia intestinalis tanısı genellikle ışık mikroskopunda kist ve/veya trofozoitlerin görülmesi ile konulmaktadır (111,183,184). Moleküler yöntemler; *G. intestinalis*'in taksonomisinin, genetik yapısının ve epidemiyolojisinin anlaşılmasına yardımcı olmakta, genetik farklılıklar da bu şekilde daha iyi analiz edilebilmektedir (19,33). *G. intestinalis* tanısında, dışkı incelemelerinde kullanılan moleküler teknikler, mikroskopik inceleme gibi diğer tanı yöntemlerine göre daha özgündür ve duyarlıdır (126). Ancak farklı genetik bölgelere

göre tanımlanan izolatların değerlendirilmesinde standart bir protokol bulunmamaktadır (185).

Moleküler çalışmalarda DNA'nın bozulması veya inhibisyonu PZR başarı oranını azaltır. Dışkı, DNA izolasyonu yapılan diğer örneklerle göre daha karmaşık ve değişken içeriğe sahiptir. Dışkıda hedef bölgenin dışında başka bakteri ve hücrelerin DNA'ları da bulunur. Ayrıca DNA izolasyonunu engelleyebilecek değişik maddeleri ve PZR inhibitörlerini içermektedir. Bu maddeler arasında demir iyonları, bilirubin, safra asitleri, hemoglobin, humik asit, fenoller ve fulvik asit gibi maddeler sayılabilir (186,187,188). Dışkıda *G. intestinalis* kisti bozulduğunda, ortamda endojen tamir mekanizmaları bulunmadığı için açığa çıkan DNA muhtemelen azalmaktadır (187).

Kist sayısının az olduğu örneklerde DNA izolasyon yöntemleri moleküler yöntemle yapılan tanımlamayı etkilemektedir (188). Kist sayıları, DNA izolasyon yöntemleri ile PZR sonuçlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada; kist sayıları önceden bilinen örnekler, Whatman filtre kağıdı, QIAmp stool mini kiti ve fenol kloroform yöntemleri kullanılarak PZR yapılmıştır. DNA izolasyonunda kullanılan filtre kâğıdı yöntemi 168 kist/ml'de, diğer iki yöntem 674 kist/ml'de pozitiflik vermiştir (189). RT-PZR ile *G. intestinalis* kistlerinde bg gen bölgesinin hedeflendiği bir çalışmada 1 gr dışkıda en az 2×10^3 kist bulunması gerektiği tespit edilmiştir (126).

Giardia intestinalis için yapılan PZR sonuçlarının duyarlılığını kist duvarını parçalamanın zorluğu da etkilemektedir (126,190,191). İran'da DNA elde edilmesinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, 10^6 kist kullanılarak altı ayrı yöntem denenmiştir. Bu yöntemlerde DNA izolasyon oranlarının %0 ile %100 arasında değiştiği görülmüştür. Kistlerin cam boncuk ve dondurma çözündürme yöntemiyle işlem görmesinden sonra QIAmp kiti kullanımının DNA izolasyon oranını arttığı, PZR sonuçlarını iyileştirdiği bildirilmiştir (191). Çalışmamızda DNA izolasyonu için yaptığımız denemelerde bazı çalışmalarda (190,191) uygulanmış olan cam boncuk yöntemi denendi. Denemelerde 3 mm'lik cam boncuklar ile örneğin 15 dk. vortekslenmesi ile ışık mikroskopunda kist duvarları parçalandığı görüldü. Buna ek olarak üreticinin önerdiği protokole uygulanan 70 °C 5 dk. olan bekletme süresi 100 °C 10 dk.'ya çıkartıldığında örneklerden DNA izolasyonu başarılı oldu.

Giardia intestinalis tespiti için kullanılan standart bir PZR yöntemi bulunmamaktadır (189). Kist saflaştırması sonrası yapılan PZR oranları, örneklerin saklama koşullarına bağlı olarak azalabilmektedir (187). Kistlerin uzun süre -20 °C'de saklanması sonrasında DNA'nın

geç izolasyonunun PZR'de başarısızlığa neden olabileceği belirtilmiştir (9). Cordon ve ark. (151) 2005 yılında çocuklardan 210 pozitif dışkı örneği toplamış, elde edilen DNA'ları 12 ay süreyle -20°C'de saklamışlar, 210 örnekten ancak 16'sında (%8) *gdh* gen bölgesini çoğaltılabilmişlerdir. Minivele ve ark. (150) yaptığı çalışmada *G. intestinalis* pozitif 60 örnekten 43'ünün *tpi* gen bölgesini RFLP-PZR'de çoğaltmışlardır. PZR pozitifliğinin az olması örneklerdeki inhibitör varlığına ve DNA kalitesinin düşük olmasına bağlanmıştır.

Çalışmamızda (++) ve (+++) kist yoğunluğundaki örneklerin tümünde *Ef-1α* ve *bg* gen bölgeleri çoğaltılabilmiş iken, (+) kist yoğunluğundaki 22 örnekte ise *Ef-1α* gen bölgesi örneklerin %68'inde ve *bg* gen bölgesi örneklerin %9'unda çoğaltılabilmıştır. PZR yönteminin pozitifliği ile kist yoğunlukları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark ($p=0.0001$) bulunmasına rağmen, LAMP yönteminin pozitifliği ile kist yoğunlukları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.078$). DNA miktarı bakımından PZR pozitif olanlarla negatif olanlar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark olup PZR pozitif örneklerin DNA miktarı daha yüksektir ($p=0.0001$). Kist saflaştırması yapıp, -20 °C'de, 0-6 ay süre ile saklanmış örneklerde %33.3 (3/9) oranında PZR pozitifliği saptanırken, 7-12 ay saklanan örneklerde %25 (2/8) oranda PZR pozitifliğine bağlı bant saptandı. Taze dışkıdan DNA izolasyonunun yapıldığı örneklerde ise %63.63 (14/22) oranında PZR ile *bg* gen bölgesi çoğaltıldı.

Bu sonuçlar; diğer çalışmalarda da belirtildiği gibi, örneklerde bulunan düşük kist sayısı ve DNA miktarının (126,150,189, 192,193) ya da kistlerin uzun süre saklandıktan sonra geç DNA izolasyonunun (9,151,186,187) PZR yöntemini olumsuz etkilediğini göstermiştir.

Loop-Mediated Isothermal Amplification yöntemi Notomi ve ark. (194) tarafından geliştirilen bir nükleik asit amplifikasyon tekniğidir. Bu teknik izotermal şartlarda uygulanır, hızlı sonuçlanır, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir (136,137,195,196,197). Bu yöntemin kullanıldığı etkenler arasında *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, Norovirus, Coronavirus, Dengue virüs bulunmaktadır (198). Ayrıca *Toksoplasma* (199), *Leishmania* (200), *Plasmodium* (201), *Cryptosporidium* (202) ve *Giardia* (137) gibi paraziter etkenlerin moleküler analizi için yapılan araştırmalar da bulunmaktadır.

Elongasyon faktör proteinleri, transkripsiyon uzama oranlarını düzenleyen proteinlerdir. Transkripsiyon uzama oranı, protein sentezinde, peptid bağlanma basamaklarını içerir (124). *Ef-1α* mRNA tarafından kodlanmakta ve bu gen LAMP yöntemi kullanılarak yapılan *G. intestinalis* tanısında kullanılmaktadır (141,203).

Nago ve ark. (197) yaptığı çalışmada *C. parvum* ve *G. intestinalis* etkenlerini LAMP yöntemi ile incelemişlerdir. Bu örneklerden *G. intestinalis* pozitif 19 dışkı örneğinin 16'sı (%84) pozitif sonuç vermiştir. Üç örneğin negatif olmasının nedeni dışkı artıklarına bağlanmıştır. DNA izolasyonunda ek dilusyonlara devam edilmesinin ve reaksiyon karışımına sığır serum albümin eklenmesinin hatalı negatif sonuçları engelleyebileceği belirtilmiştir.

Macaristan'da su kuşları üzerine yapılan bir çalışmada, alınan 132 dışkı örneğinde saptanan *Cryptosporidium* ve *Giardia* örnekleri LAMP analizi ile incelenmiştir. *G. intestinalis* saptanan dışkılarda IFA yöntemi ile dört, PZR, dizi analizi ve Ef-1 α LAMP analizi ile beş örnek pozitif sonuç vermiştir. Dizi analizinde bu izolatların insanlarda da bulunabilen genotipler olduğu ve bu izolatlardan. birinin Genotip A, üçünün Genotip B ve birinin de *Giardia* spp. olduğu saptanmıştır (203). Plutzer ve ark. (137) içme sularını 2 μ m çaplı ARAD mikrofiltreden geçirmişler, filtrenin üzerinde kalan örnekler *Cryptosporidium* ve *G. intestinalis* açısından LAMP yöntemi ile incelenmiştir. Bu iki yöntemin birlikte kullanımının etkenlerin saptanmasında etkili olduğu bulunmuştur.

Plutzer ve Karanis (136) 2009 yılında dışkı ve çevresel örneklerde IFA testi ile pozitif bulunan 35 örneği çalışmaya almışlardır. Bu örneklerde, 18S rRNA PZR ile %68, gdh PZR ile %43 ve Ef-1 α LAMP ile %69 oranında pozitiflik bulunmuştur. Real Time PZR'de tpi gen bölgesi %10 oranında çoğaltılmış, çalışılan on insan dışkı örneğinin sekizi LAMP ile pozitif sonuç vermiştir. Çin'de 72 köpekten dışkı örnekleri toplanmış, mikroskopik incelemede beş, PZR ile yedi ve LAMP ile sekiz örnekte *G. intestinalis* pozitifliği saptanmıştır. PZR dizi analizinde tüm örneklerin köpeklere spesifik olan Genotip D olduğu görülmüştür (195).

Çalışmamız sırasında elde edilen 39 izolata Ef-1 α gen bölgesi için LAMP ve bg gen bölgesi için PZR yapıldı. Bu testlerin pozitiflik oranları bg PZR ile % 48.7 (19/39) ve Ef-1 α LAMP testi ile % 82 (32/39) olarak çıktı. Pozitiflik oranları McNemar ki kare analizi ile karşılaştırıldı ve Ef-1 α LAMP testinde pozitiflik oranı anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p=0,0001). Çalışmamızda diğer çalışmalara (136,137,195,197) benzer olarak yüksek LAMP testi pozitifliği elde edilmiştir.

Giardia'nın yapısının anlaşılmasında dizi analizi ve genetik çalışmalar temel öneme sahiptir (2). *G. intestinalis*'in genotiplendirilmesi çoğunlukla; 16S ribozomal DNA, small subunit ribozomal RNA, beta giardin, glutamat dehidrogenaz, elongasyon faktör 1-alfa, trioz fosfat izomeraz, GLORF-C4 geni ve inter-genomic rRNA spacer gen bölgesinin çoğaltılmasına ve analizine dayanmaktadır. Bu gen bölgelerine bağlı olarak PZR pozitiflik oranları oldukça değişkenlik göstermektedir (19,80,96,139).

Moleküler yöntemlerde hedef gen olarak giardin genlerinin kullanılmasının avantajı, bu bölgenin parazit için özgül olmasıdır. Buna ek olarak Mahbubani ve ark. tarafından geliştirilmiş olan, beta giardin genini temel alan 218 bp'lik gen bölgesinin çoğaltılması son derece spesifiktir. Bu bölgenin PZR ile çoğaltılması sırasında konak, protozoon, mantar, bakteri veya alglerin DNA'sı ile çapraz reaksiyon gözlenmemiştir (3). Bg geni aminoasit değişimlerine karşı koruma altındadır. Birinci ve üçüncü kodonlarda değişim güç olmaktadır (204).

Genetik çalışmalara göre pek çok *Giardia* alt grupları olmasına rağmen, insanlarda ve diğer memeli türlerinde bulunan iki ana genetik grup, Genotip A ve B'dir (1,23,96). Bu nedenle A ve B genotipi aynı zamanda birçok evcil ve yaban hayvanda da bulunmaktadır. Bazı genotiplerin konak özgülüğü olduğu ve bu genotiplerin insanlarda herhangi bir enfeksiyona yol açmadığı bildirilmiştir (Tablo 2) (96). 2005 yılında yapılan bir çalışmada *G. intestinalis*'in A genotipinin 8 ve B genotipinin 6 alt genotipi olduğu gösterilmiştir (14). Genotip A1 ev hayvanları, çiftlik hayvanları ve insanlarda, A3 ise yabani hayvanlarda baskın olarak bulunmaktadır. Klinik örneklerden en sık Genotip A2 izole edilmektedir ve bu genotip insan enfeksiyonları ile ilişkilidir (1,33,40,205,206). İnsan izolatları B3 ve B4 genotipinde iken, hayvan izolatları B1 ve B2 genotipinde bulunmaktadır (19).

Moleküler yöntemlerden PZR sonrasında yapılacak genotiplendirmenin önemli bir katkısı da enfeksiyonun bulaşma yolları hakkında bir fikir vermesidir (207). Günümüzde insanlarda A ve B genotipi bulunmakla beraber, ev hayvanları, çiftlik hayvanlarının da içinde bulunduğu pek çok hayvanda farklı genotipler bulunmaktadır (2,4,21). Epidemiyolojik delil olmamasına rağmen, zoonotik ve konak spesifik genotiplerle çiftlik hayvanlarının yakınında bulunan hayvanlarda enfekte olabilir. Hayvancılık işlemleri sırasında yüzey suları ve toprak kontamine olabilir (208).

Malezya'da Pahang bölgesinde yaşayan yerel bir topluluk olan Aborjinler grubunda yapılan çalışmada 76 *Giardia* pozitif dışkı örneğinden 42 örnekte PZR başarılı olmuştur. Olguların 41'i Genotip B, biri Genotip A çıkmıştır. Genotip B'nin sayısının fazla olması bu bölgede enfeksiyonun insandan insana bulaşma yolu ile yayıldığını düşündürmüştür (209).

Marangi ve ark. (81) dışarı kapalı bir topluluk olan Romenlerin yaşadığı kampta, çocuklardan ve köpeklerden 14'er dışkı toplanıp PZR ile bg gen bölgesine bakılmıştır. Dışkı örneklerinde çocuklarda altı, köpeklerde dokuz örnek pozitif saptanmış olup olguların tamamı Genotip A1 çıkmıştır. Köpeklerde Genotip C ve D olması beklenirken, çocuklardaki gibi Genotip A1 olması nedeninin çocuklarla köpekler arasında *Giardia* geçişi olabileceğini

düşündürmüştür. Hindistan'da yapılan bir çalışmada, köpeklerle insanlar arasında *G. intestinalis* geçişi olup olmadığına bakılmıştır. Genotiplendirme sonucunda köpeklerde insanlarda bulunan A1 ve A2 alt genotiplerinin bulunması, insanlarla köpekler arasında zoonotik geçişin olabileceğini göstermiştir (210).

Tayland'da giardiasis için risk faktörlerinin araştırıldığı çalışmada örneklerin Genotip A2 ve Genotip B4 olduğu bulunmuştur. Bu genotiplerden Genotip A2'nin su kaynaklı olarak insanlara bulaşabildiği gösterilmiştir (211). İtalya'da Caccio ve ark. (14) yaptığı çalışmada, insan, köpek, inek ve kedi dışı örneklerinde *G. intestinalis* bg gen bölgesine PZR ile bakılmıştır. Köpeklerde altı örnek Genotip A, ineklerde 12 örnek Genotip A ve beş örnek Genotip B olduğu bulunmuştur. Burada elde edilen izolatların köpeklerde C veya D, ineklerde E olması beklenirken insanlarda görülen A ve B genotipinde olması nedeniyle, insanlarla hayvanlar arasında geçiş olduğu düşünülmüştür.

Konu ile ilgili yapılan diğer çalışmada insan ve hayvanlar arası olası *G. intestinalis* geçişine bakılmış, Avustralya'da keseli hayvanlarda, insanlarda da görülen Genotip A, insan ve memeli hayvanlarda görülen Genotip B3 ve B4 tespit edilmiştir. Yapılan analizde insan ve keselilerdeki genotiplerin büyük benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (144).

Giardia intestinalis genotiplerinin saptanma oranları çalışmanın yapıldığı bölgelere göre farklılıklar göstermektedir.

Cezayir Batı Sahra Çölünde yaşayan çocuklardan toplanan 120 dışkı örneğinin 41'inde *G. intestinalis* görülmüştür. Nested PZR yöntemi ile tpi gen bölgesi %78 ve gdh gen bölgesi %68 örnekte çoğaltılmıştır (212). Tayland'da *Giardia* pozitif 61 dışkı örneği PZR ile 384 bp'lik bg.%72, 753 bp'lik bg. %46, gdh %36 ve ssRNA %22.9 oranında çoğaltılmış ve izolatların Genotip A ve B olduğu görülmüştür (134).

Rosales ve ark. (151) 2008'de Peru'da 845 çocuktan intestinal parazit taraması yaptığı çalışmada %23.8 oranında *G.intestinalis* saptamıştır. Elde edilen 210 *G. intestinalis* örneğinden yapılan gdh gen bölgesi PZR-RFLP tekniği ile 16 örnek çoğaltılmıştır. Ardından yapılan sekans analizi sonucunda genotiplerin dokuzunun Genotip A1, birinin Genotip A2 ve altısının Genotip B4 olduğu bulunmuştur. Etiyopya'da yapılan bir çalışmada insanlardan elde edilen 59 izolatın PZR-RFLP analizi ile bg gen bölgesi çoğaltılmış, 31'i (%52) Genotip A ve 13'ü (%22) Genotip B, yedisi (%15) mikس enfeksiyon olarak bulunmuştur. Sekans analizinde ise yedi (A+F) izolatın üçü Genotip A ve dördü Genotip F çıkmıştır. Çalışmada bulunan Genotip F kedilere özgü bir gruptur ve ilk olarak burada insanlarda saptanmıştır (152).

İtalya’da Caccio ve ark. (3) 2002 yılında insan ve köpeklerden elde edilen 30 örnekte Genotip A1-3, B1-4 ve Genotip E varlığını göstermişlerdir. *G. intestinalis* tanısında kullanılan yöntemlerden biri olan RT-PZR’nin kullanıldığı bir çalışmada 53 örnek Genotip A ve 59 örnek Genotip B çıkmıştır (126). Fernandes ve ark. (175) tarafından Brezilya’da yapılan bir çalışmada 87 *G. intestinalis* pozitif dışkıdan 60’ı Genotip A1 ve biri Genotip A2 çıkmıştır. Evcil hayvanlardan yedi köpek ve bir kediden alınan örneklerde de Genotip A1 çıkması üzerine zoonotik geçiş olabileceği belirtilmiştir.

Ülkemizde *G. intestinalis* ile ilgili moleküler alanda yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ankara’da 2004 yılında yapılan çalışmada asemptomatik ve semptomatik hastalardan alınan 44 dışkı ve 12 duodenal aspirasyon örneği çalışmaya alınmıştır. İzole edilen DNA’larda tpi gen bölgesine bakılmıştır. Çalışmanın sonunda semptomatik hastalar Genotip A ile asemptomatik hastalar ise Genotip B ile ilişkilendirilmiştir (8). Değerli ve ark. (10) duodenal aspirasyon ve dışkıdan elde edilen 17 trofozoit örneğinde tpi gen bölgesine göre PZR yapmışlardır. Örneklerin dokuzu Genotip A ve dördü Genotip B çıkmış, kalan dört örnekte ise genotiplendirme yapılamamıştır.

Yereli ve ark.’nın yaptığı (9) Manisa’da dışkı örneklerinden elde edilen *G. intestinalis* izolatlarında tpi gen bölgesi çoğaltılarak genotiplendirme yapmıştır. Çalışmada 54 örneğin 38’i (%70.37) Genotip A, 16’sı (%29.63) Genotip B ve B1 bulunmuştur. Manisa’da yapılan bir başka çalışmada 45 hastanın dışkı örnekleri RT-PZR yöntemi kullanılarak genotiplendirilmiştir. Örneklerin tpi gen bölgesine göre %73,3’ü Genotip A, %11,1’i Genotip B ve %15,5’inin miks (A+B) enfeksiyon olduğu belirlenmiştir. Çalışmada yöntemin duyarlı bir yöntem olduğu, salgınlarda ve olgu taramalarında kullanılabileceği belirlenmiştir (190).

Aydın’da insanlarda *G. intestinalis* saptanan 15 dışkı çalışmaya alınmıştır. Bu örneklere hem 16srRNA PZR, hemde bg PZR yapılmıştır. PZR sonucunda pozitif bant saptanan on örneğe dizi analizi uygulanmıştır. 16srRNA PZR yapılan beş örneğin üçünde Genotip A1, bg PZR yapılan beş örneğin biri Genotip A2 ve ikisi Genotip B çıkmıştır (11).

Giardia intestinalis pozitif 39 örnekten ancak 19’unda (%48.7) PZR ile 384 bp’lik bg gen bölgesi saptandı ve örneklerin 17’sinde genotiplendirme yapıldı. Bu örneklerin dokuzu Genotip A ve sekizi Genotip B’dir. Bu izolatların A2, A3, B2, B3 ve B4 alt genotiplerine ait olduğu görüldü. Çalışma sırasında elde edilen izolatların altı tanesi A2, üç tanesi A3, altı tanesi B2, bir tanesi B3 ve bir tanesinin de B4 genotipine ait olduğu saptandı.

Araştırmamızda insan izolatlarında sıklıkla (3,14) saptanan A2, B3 ve B4 genotiplerinin yanında, evcil ya da yabani hayvanlarda sıklıkla (33), insanlarda nadiren

(3,213) saptanan A3 ve B2 genotipleri de tespit edildi. Bu çalışma ile daha önce yapılan çalışmalardan (8,9,10,11) farklı olarak, Türkiye’de A3, B2, B3 ve B4 genotiplerinin de bulunduğu görüldü. Buradaki alt genotip sayısının çeşitli olmasının nedeninin, toplanan örneklerin yarıya yakının portör muayenesi için gelen askerlerden (Türkiye’nin farklı şehirlerinde ikamet eden, askerlik hizmeti nedeniyle geçici olarak Edirne’de bulunan) kaynaklandığını düşünüyoruz. Hayvanlarda sıklıkla rastlanılan genotiplere rastlamış olmakla beraber, izolatların antroponotik mi ya da zoonotik mi oldukları konusunda bir yorum yapmamız mümkün değildir.

Haque ve ark. (37) çocuk yaş grubunda yaptığı çalışmada Genotip A ishal ile ilişkilendirmiştir. Thompson ve ark. (214) yaptığı çalışmada da A genotipi (6/7), B genotipine (3/16) göre daha fazla ishale neden olmaktadır. Buna karşılık B genotipinin ısrarcı ishale, A genotipinin ise aralıklı ishale neden olduğu iki ayrı çalışmada gözlemlenmiştir (215,216).Çocuk yuvasında çıkan bir salgının araştırıldığı başka bir çalışmada genotipler ile semptomlar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (217).

Türkiye’de Tanyüksel ve ark.’nın yaptığı çalışmada A genotipi semptomatik olgularla ve B genotipi ise asemptomatik olgularla ilişkilendirilmiştir (8). Manisa’da yapılan 45 örneğin çalışıldığı bir çalışmada A genotipinin %94, B genotipinin %100 ve miks olguların %100 oranında semptomlara neden olduğu bulunmuştur (190). Giardia semptomları ile genotip ilişkisinin bakıldığı başka bir çalışmada ise olguların %71.2’sinde karın ağrısı ve ishale ilişkili semptomlar belirlenmiştir. Ayrıca Genotip B’nin karın ağrısı ve ishale ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (9).

Çalışmamızda yer alanların 21’i semptomatik, 18’i asemptomatik olgular idi. Genotiplendirme yapılan örneklerin 8’i ise semptomatik olgulara ve 9’u ise asemptomatik olgulara aitti. Bu sonuçlara göre semptomatik olgularda Genotip B (%62.5) daha fazla iken asemptomatik olgularda Genotip A (%66.7) daha fazla görüldü. Semptomatik/aseptomatik olgular ile genotipler arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı (p=0.347). Bulgularımız (208,218) uyumlu olmasına rağmen, diğer çalışmalarla (8,9,37,190,214) uyumsuzdur. *Giardia* genotiplerinin asemptomatik veya semptomatik hastalıklarla olan ilişkilerinin belirlenmesinde olgu sayısının fazla olduğu yeni çalışmalara gereksinim olduğunu düşünüyoruz.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile hastalardan ve portörlerden elde edilen *G. intestinalis* izolatları iki farklı moleküler yöntemle incelendi. LAMP testi ile örneklerin %82’sinde pozitiflik saptandı. Beta giardin bölgesinin dizi analizi sonucunda Trakya Bölgesinde A2, A3, B2, B3 ve B4 alt genotiplerinin bulunduğu gösterildi. Bu genotiplerden

A3, B2, B3 ve B4 alt genotipleri ülkemizde ilk olarak bu çalışma ile gösterildi. Bu bulgular önemli bir halk sağlığı sorunu olan *G. intestinalis*'in moleküler yapısı konusunda özellikle Trakya bölgesi için yönlendirici bir veridir. Çalışmada elde ettiğimiz genotipik veriler, Trakya bölgesinde ortaya çıkabilecek salgınların analizinde ve yapılacak epidemiyolojik çalışmalarda yol gösterici olacaktır. Ayrıca *G. intestinalis*'in genetik yapısının, epidemiyolojisinin ve bulaşma yollarının daha iyi anlaşılması için yapılacak yeni çalışmalarda moleküler yöntemlerin kullanılması faydalı olacaktır.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Edirne Devlet Hastanesinde Eylül 2011-Nisan 2013 tarihleri arasında parazitolojik inceleme istenen kişilerden, dışkıda *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoit pozitif bulunan 39 dışkı örneği çalışmaya alındı. Bu dışkı materyallerinde bulunan kistlerin DNA'ları izole edildi. Ef-1 α gen bölgesinin varlığının gösterilmesinde LAMP yöntemi kullanıldı. Ayrıca PZR ile bg geni çoğaltılan örneklerle dizi analizi yapılarak bölgemizde bulunan *G. intestinalis* alt genotipleri belirlendi.

Çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

1. Ef-1 α gen bölgesinin LAMP yöntemi ile analizi düşük sayıdaki kist varlığında bile *G. intestinalis* olguları saptanabilmektedir.
2. Dizi analizinde A2, A3, B2, B3 ve B4 olmak üzere beş farklı alt genotip saptanmış olup, A3, B2, B3 ve B4 alt genotiplerinin Türkiye'de bulunduğu ilk defa gösterildi.
3. Semptomatik olgular ile genotipler arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı.
4. Giardiasis hastalığının kontrol altına alınması için semptomatik olgular kadar asemptomatik olguların da tanısının konulması ve tedavi edilmesi gerekmektedir.
5. Bu çalışma bir ön çalışma olmuştur ve elde ettiğimiz bu genotipik veriler, Trakya bölgesinde ortaya çıkabilecek salgınların analizinde veya yapılacak epidemiyolojik çalışmalarda yol gösterici olacaktır.

ÖZET

Giardia intestinalis su ve gıda kaynaklı salgınlara neden olabilen, insanlarda sık görülen protozoondur. Dünya’da ve Türkiye’de önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu çalışmanın amacı; insanlardan elde edilen *Giardia intestinalis* izolatlarının moleküler yöntemlerle analizidir.

01 Eylül 2011-31 Nisan 2013 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Edirne Devlet Hastanesine başvuran kişilerin dışkılarından elde edilen 39 izolat çalışmaya alındı. Örnekler ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi ile analiz edildi. Ayrıca bu izolatlardaki beta giardin geni polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılıp, dizi analizi yapıldı.

Otuz dokuz örneğin 32’sinde (%82) ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi ile pozitiflik saptandı. Polimeraz zincir reaksiyonu ile pozitiflik saptanan 19 örneğin 17’si genotiplendirildi. Genotiplendirme sonucunda, örneklerin dokuzu Genotip A ve sekizi Genotip B olarak belirlendi. Semptomatik olgularda Genotip B (%62.5), asemptomatik olgularda ise Genotip A (%66.7) daha fazla görüldü. Semptomatik/aseptomatik olgular ile genotipler arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p=0.347$). Polimeraz zincir reaksiyonu pozitifliği ile kist yoğunluğu arasında anlamlı istatistiksel fark bulundu ($p=0.0001$). Ek olarak aynı farklılık polimeraz zincir reaksiyonu ile DNA konsantrasyonu arasında da bulundu ($p=0.0001$).

Sonuç olarak moleküler yöntemlerden, ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin kullanılması Trakya bölgesinde ortaya çıkabilecek salgınlara analizinde ve yapılacak epidemiyolojik çalışmalarda yol gösterici olacaktır.

Anahtar kelimeler: *Giardia intestinalis*, Polimeraz zincir reaksiyonu, genotip, Trakya, Türkiye

GENOTYPING OF *GIARDIA INTESTINALIS* ISOLATES

SUMMARY

Giardia intestinalis is a common protozoon that may elicit water and food-borne outbreaks in humans. It is regarded as a major public health problem worldwide and in Turkey as well. The purpose of the present study is to implement the molecular analysis and genotyping of the isolates of *Giardia intestinalis* obtained from human stool.

Overall, 39 isolates obtained from the stool of subjects who have been admitted to Trakya University Health Research and Application Center and State Hospital between 01 September 2011-31 April 2013 have been included in the present study. The samples were then analyzed through loop-mediated isothermal amplification method. Additionally, polymerase chain reaction method was also used to test beta-giardin gene on the isolates, and subsequently, sequence analysis was performed.

Thirty-two out of thirty-nine samples (82%) were found to be positive for *Giardia intestinalis* via loop-mediated isothermal amplification method. Genotyping was implemented in 17 out of 19 samples that were positive for polymerase chain reaction. Among the overall 17 products, nine had the pattern of Genotype A while the rest harbored the features of Genotype B. Symptomatic patients with Genotype B (62.5%) and asymptomatic patients with Genotype A (66.7%) were encountered more frequently. There was no significant association between symptomatic status and genotypic patterns of subjects ($p=0.347$). A significant difference was found between positive polymerase chain reaction and the intensity of the cyst ($p=0.0001$). In addition, significant different was found between a positive polymerase chain reaction and concentration of DNA ($p=0.0001$).

In conclusion, among the molecular methods, loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction might have the potential to provide a substantial guidance in the thorough analysis of outbreaks and epidemiological studies as well in the Thrace region.

Key words: *Giardia intestinalis*, polymerase chain reaction, genotyping, Thrace, Turkey.

KAYNAKLAR

1. Thompson RCA, Hopkins RM, Homan WL. Nomenclature and Genetic Groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today* 2000;16:210-3.
2. Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: Towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 2009;25:93-100.
3. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol* 2002;32:1023-30.
4. Cacciò SM, Sprong H. *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol* 2010;124:10-12.
5. Farthing MJG, Cevallos AM, Kelly P. Intestinal protozoa. Gordon C Cook (Ed.) *Mansons Tropical Disease* 20th ed. London W. B. Saunders Co. 1996;Ch5E:p.1271-81.
6. Wolfe MS. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:93-100.
7. Wright SG. Giardiasis. Strickland GT. (Ed.) *Hunter Tropical Medicine* 7th edit. Philadelphia WB Saunders Co. 1991; Ch5A:p.565-70.
8. Aydin AF, Besirbellioglu BA, Avci IY, Tanyuksel M, Araz E, Pahsa A. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into Groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;50:147-51.
9. Balcıoğlu C, Kurt Ö, Sevil N, Dağcı H, Tetik A, Ergunay K. ve ark. Genotyping of *Giardia lamblia* in a Cohort of Turkish Patients: A Search for a relationship between Symptoms and Genotypes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012;18(Suppl-A):A125-A31.
10. Değerli S, Değerli N, Çeliksöz A, Özçelik S. Genotyping of *Giardia intestinalis* isolated from people living in Sivas, Turkey. *Turk J Med Sci* 2012;42:1268-72.

11. Ertuğ S, Özlem S, Ertabaklar H, Bozdoğan B. Aydın İlinde İnsandan izole edilen *Giardia intestinalis* genotiplerinin tanımlanması: Ön çalışma. 7. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi, Özet Kitabı s.288 Ankara 2012.
12. Dobell C. The discovery of the intestinal protozoa of man. Proceedings of the Royal Society of Medicine, Section of the History of Medicine 1920;XIII:1-15.
13. Cooper MA, Sterling CR, Gilman RH, Cama V, Ortega Y, Adam RD. Molecular Analysis of Household Transmission of *Giardia lamblia* in a Region of High Endemicity in Peru. The J Infect Dis 2010;202:1713-21.
14. Lalle M, Pozio E, Capelli GF, Bruchi F, Crotti D, Caccio SM. Genetic heterogeneity at the b-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. Int J Parasitol 2005;35:207-13.
15. Keas BE. Taxonomy of *Giardia lamblia*. <http://www.msu.edu/course/zol/316/glamtax.htm/15.01.2013>.
16. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM. et al. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. Emerg Infect Dis 2003;9:1444-53.
17. Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. Parasitology 1995;111:11-7.
18. Adam RD. Biology lamblia of *Giardia*. Clin Microbiol Rev 2001;14:447-75.
19. Cacciò SM, Sprong H. Epidemiology of Giardiasis in Humans. Lujan HD, Svard S. (Eds) *Giardia A Model Organism*. Wien Austria Springer-Verlag 2011;Ch2:17-26.
20. Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO, Svenungsson B. Multilocus Genotyping of Human *Giardia* Isolates Suggests Limited Zoonotic Transmission and Association between Assemblage B and Flatulence in Children. PLoS Negl Trop Dis 2011;5(8):e1262.
21. Morrison HG, Svärd S. Genomics of *Giardia* Lujan HD, Svard S. (Eds), *Giardia A Model Organism*. Wien Austria Springer-Verlag 2011;Ch5:95-101.
22. Adam RD. The biology of *Giardia* spp. Clin Microbiol Rev 1991;55:706-32.
23. Adams PJ, Monis PT, Elliot AD, Thompson RCA. Cyst morphology and sequence analysis of the small subunit rDNA and ef-1 α identifies a novel *Giardia* genotype in a quenda (*Isoodon obesulus*) from Western Australia. Infect Genet Evol 2004;4:365-70.
24. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. Int J Hyg Environ Health 2010;213:321-33.
25. Holberton DV. Attachment of *Giardia* - A Hydrodynamic Model Based On Flagellar Activity. J Exp Biol 1974;60:207-21.

26. Edward K. Lumen Dwelling Protozoa *Giardia lamblia*. Markell KE, John DT, Krotoski WA. (Eds) Markell and Voge's Medical Parasitology 8th edition Philadelphia W. B. Saunders Co. 1999;Ch 3:p.56-62.
27. Ivanov AI. *Giardia* and Giardiasis. Bulg J Vet Med 2010;13:65-80.
28. Carmena D. Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection, surveillance and implications for public health 2010. www.formatex.info/microbiology2/3-14.pdf/15.01.2013.
29. Flanagan PA. *Giardia* - diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. Epidemiol Infect 1992;109:1-22.
30. Kabnick KS, Peattie DA. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. J Cell Sci 1990;95:353-60.
31. Yu LZ, Birky CW, Adam RD. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. Eukaryot Cell 2002;1(2):191-9.
32. Nash TE, Herrington DA, Levine MM. Usefulness of an enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Giardia* antigen in feces. J Clin Microbiol 1987;25:1169-71.
33. Feng Y, Xiao L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. Clin Microbiol Rev 2011;24:110-40
34. Duerden BI, Reid TMS, Jewsbury JM, Turk DC. Protozoa. Duerden BI, Reid TMS, Jewsbury JM, Turk DC.(Eds) A new Short Textbook of Microbial and Parasitic Infection Frome and London Butler Tanner Ltd. 1987;Ch11:p.143-53.
35. <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>/15.05.2013.
36. Caccio SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends Parasitol 2005;21:430-7.
37. Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* Assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. J Infect Dis 2005;15:2171-3.
38. Porter JDH, Gaffney C, Heyman D, Parkin W. Food-borne Outbreak of *Giardia lamblia* Am J Public Health 1990;80:1259-60.
39. Takizawa MD, Falawigna DL, Gomes ML. Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Paraná, Southern Brasil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009;51(1):31-5.
40. Ali SA, Hill DR. *Giardia intestinalis*. Curr Opin Infect Dis 2003;16:453-60.
41. Nygård K, Schimmer B, Søbstad Ø, Walde A, Tveit I, Langeland N. et al. A large community outbreak of waterborne giardiasis- delayed detection in a non-endemic urban area. BMC Public Health 2006;6(141):1-10.

42. Kent GP, Greenspan JR, Herndon JL, Mofenson LM, Harris JA, Eng TR et al. Epidemic Giardiasis Caused by a Contaminated Public Water Supply. *Am J Public Health* 1988;78:139-43.
43. Petri WA. Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol* 2003;19:523-6.
44. Fricker CR. Protozoan parasites (Cryptosporidium, Giardia, Cyclospora) Guidelines For Drinking Water Quality World Health Organisation p.70-118 www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob5.pdf./10.02.2013.
45. Latifah I, Teoh KY, Wan KL, Normaznah Y, Rahmah MA. Study on PCR-RFLP of *Giardia duodenalis* in Malaysia. *J Parasitol* 2007;29:25-31.
46. World Health Organisation. Infectious disease according to mode of transmission. *The World Health Report 1996*. France 1996;Ch1:p.23-58.
47. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2012. Giardiasis p.85-7.
48. Júlio C, Vilares A, Oleastro M, Ferreira I, Gomes S, Monteiro L et al. Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: a case study in Portugal. *Parasit Vectors* 2012;5(22):1-8.
49. Soriano JM, Domènech G, Martínez MC, Mañes J, Soriano F. Intestinal parasitic infections in hosted Saharawi children. *Trop Biomed* 2011;28:557-62.
50. Arani AS, Alaghebandan R, Akhlaghi L, Shahi MA, Lari AR. Prevalance of intestinal parasites in a population in South of Tehran Iran. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2008;50:145-149.
51. Matthys B, Bobieva M, Karimova G, Mengliboeva Z, Jean-Richard V, Hoimnazarova M et al. Prevalence and risk factors of helminths and intestinal protozoa infections among children from primary schools in western Tajikistan. *Parasit Vectors* 2011;4:1-8.
52. Mehraj V, Hatcher J, Akhtar S, Rafique G, Beg MA. Prevalence and Factors Associated with Intestinal Parasitic Infection among Children in an Urban Slum of Karachi. *PLoS One*. 2008;3(11):e3680
53. Environmental Protection Agency USA. Cryptosporidiosis Surveillance United States, 2006–2008 and Giardiasis Surveillance United States, 2006–2008 Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries 2010;59:1-25.
54. Katz DE, Heisey-Grove D, Beach M, Dicker RC, Matyas BT. Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. *Epidemiol Infect* 2006;134:935-41.
55. Cañete R, Díaz MM, Garcia RA, Martinez PML, Ponce FM. Intestinal Parasites in Children from a Day Care Centre in Matanzas City, Cuba. *PLoS One*. 2012;7(12):e51394.
56. Mbuh JV, Ntonifor HN, Ojong JT. The incidence, intensity and host morbidity of human parasitic protozoan infections in gastrointestinal disorder outpatients in Buea Sub Division, Cameroon. *J Infect Dev Ctries* 2010;4:38-43.

57. Randremanana R, Randrianirina F, Gousseff M, Dubois N, Razafindratsimandresy R Hariniana ER. et al. Case-Control Study of the Etiology of Infant Diarrheal Disease in 14 Districts in Madagascar. PLoS One. 2012;7(9):e44533.
58. Usluca S, İnceboz T, Över L, Tuncay S, Yalçın G, Arcak SS. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2005-2008 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitol Derg 2010;34:27-31.
59. Uzun A, Tekay F, Karaşahin Ö, Yeşilmen S, Topçu M, Gül K. Diyarbakır İl Merkezinde Farklı Bölgelerdeki Beş İlköğretim Okulunda Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması. Türkiye Parazitol Derg 2004;28:133-5.
60. Ertem M, İnandı T, Çan G, Ergör A, Şaşmaz CT, Ayoğlu F ve ark. Türkiye Halk Sağlığı Raporu 2012 Giardiasis. Halk Sağlığı Uzmanları Derneği 2012;2:s.52-84.
61. Kuman HA, Altıntaş N. Mastigophora (Kamçılılar) Alt Şubesi. Protozoon Hastalıkları Ege Üniversitesi Basımevi İzmir: 1996 s.56-112
62. Yapıcı F, Tamer GS, Arısoy ES. Çocuklarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı ve Bununla İlişkili Etmenler. Türkiye Parazitol Derg 2008;32:346-50.
63. Öğütman R, Kalyoncu C, Tuğrul HM. İnsan Bağırsağı helmint ve protozoanlarının prevalansı üzerine epidemiyolojik bir çalışma. Türkiye Parazitol Derg 1986;9:19-36.
64. Otkun MT, Eskiocak M, Akata F, Karabay O, Tuğrul HM. Edirne'de sosyoekonomik düzeyi farklı iki ilkokulda 14 yıl sonra tekrarlanan kopro-parazitolojik çalışmanın sonuçları. Türkiye Parazitol Derg 2000;24:277-82.
65. Yazıcı V, Sırıken F, Ertabaklar H, Ertuğ S. Aydın İl Merkezindeki Hastanelerde Çalışan Mutfak Personelinde Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması. Türkiye Parazitol Derg 2007;31:136-8.
66. Börekçi G, Üzel A. Mersin İli Sosyal Hizmetler Çocuk Yuvası ve Yetiştirme Yurdundaki Çocuklarda Bağırsak Parazitleri, Fiziksel Büyüme ve Hijyen Alışkanlıklarının Belirlenmesi. Türkiye Parazitol Derg 2009;33:63-72.
67. Kaya S, Demirci M, Demirel R, Arıdoğan BC, Öztürk M, Şirin C. Isparta Şehir Merkezinde Bağırsak Parazitleri Prevalansı. Türkiye Parazitol Derg 2004;28(2):103-5.
68. Çulha G, Sangün Ö, İncecik F. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Başvuran 0-14 Yaş Çocuklarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitol Derg 2005;29:255-7.
69. Turhan E, İnandı T, Çetin M, Taş S. Hatay İli Çocuk Esirgeme ve Yetiştirme Kurumlarında Kalan Çocuklarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitol Derg 2009;33:59-62.
70. Yazar S, Yaman O, Gözkenç N, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitol Derg 2005;29:261-3.

71. Ataş AD, Alim A, Ataş M, Oğuzkaya M. Artan Yozgat İl Merkezinde Farklı Sosyo-Ekonomik Bölgelerdeki İki İlköğretim Okulunda Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması. *Turkiye Parazitol Derg* 2008;32:261-5.
72. Ataş AD, Alim A, Ataş M. Sivas Belediyesi Çevre-Gıda ve Tıbbi Tahlil Laboratuvarına 1993-2006 Yıllarında Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazit Dağılımlarının İncelenmesi. *Turkiye Parazitol Derg* 2008;32:59-64.
73. Değerli S, Özçelik S, Çeliksöz A. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. *Turkiye Parazitol Derg* 2005;29:116-9.
74. Özgümüş OB, Karaoğlu ŞA. Rize Şehrinde Özel Kreşlerdeki Çocuklarda Bağırsak Parazitlerinin Taranması. *Turkiye Parazitol Derg* 2007;31:205-7.
75. Özgümüş OB, Efe Ü. Çamlıhemşin Sağlık Merkezi'nde Temmuz 2005-Ocak 2007 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. *Turkiye Parazitol Derg* 2007;1:142-4.
76. Cengiz ZT, Çiçek M, Akbayram S, Yılmaz H. Van'da Süphan İlköğretim Okulu Öğrencilerinde Saptanan Bağırsak Parazitleri. *Turkiye Parazitol Derg* 2009;33:294-7.
77. Kurtoğlu MG, Korkoca H, Çiçek M, Cengiz ZT. Van Yöresinde Gıda Sektörü Çalışanlarında Bağırsak Parazitlerinin Yaygınlığı. *Turkiye Parazitol Derg* 2007;31:309-12.
78. Daldal N, Karaman Ü, Aycan ÖM, Çolak C, Miman Ö, Çelik T ve ark. Çocuk Yuvası ve Yetiştirme Kurumundaki Çocuklarda Bağırsak Parazitleri Yaygınlığının İncelenmesi. *İnönü Ün Tıp Fak Derg* 2007;14:231-5.
79. Göz Y, Aydın A, Tuncer O. Hakkâri 23 Nisan İlköğretim Okulu Öğrencilerinde Bağırsak Parazitlerinin Yaygınlığı. *Turkiye Parazitol Derg* 2005;29:268-70.
80. Jarroll EL, Bingham AK, Meyer EA. Effect of Chlorine on *Giardia lamblia* Cyst Viability. *Appl Environ Microbiol* 1981; 41: 483-7
81. Marangi M, Berrilli F, Otranto D, Giangaspero A. Genotyping of *Giardia duodenalis* Among Children and Dogs in a Closed Socially Deprived Community From Italy. *Zoonoses Public Health* 2010;57:e54-e8.
82. Sotiriadou I, Pantchev N, Gassmann D, Karanis P. Molecular identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from dogs and cats. *Parasite* 2013;20:1-8.
83. McDowall RM, Peregrine AS, Leonard EK, Lacombe C, Lake M, Rebelo AR et al. Evaluation of the zoonotic potential of *Giardia duodenalis* in fecal samples from dogs and cats in Ontario. *Can Vet J* 2011;52:1329-33.
84. Paoletti B, Otranto D, Weigl S, Giangaspero A, Di Cesare A, Traversa D. Prevalence and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in cats from Italy. *Res Vet Sci* 2011;91:397-9.

85. Covacin C, Aucoin DP, Elliot A, Thompson RCA. Genotypic characterisation of *Giardia* from domestic dogs in the USA. *Vet Parasitol* 2010;19;177(1-2):28-32.
86. Aloisio F, Filippini G, Antenucci P, Lepri E, Pezzotti G, Caccio SM. et al. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. *Vet Parasitol* 2006;142:154-8.
87. Papini R, Girivetto M, Marangi M, Mancianti F, Giangaspero A. Endoparasite Infections in Pet and Zoo Birds in Italy. *Scientific World Journal* 2012;253127:1-9.
88. Traub R, Wade S, Read C, Thompson A, Mohammed H. Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of *Giardia duodenalis* in horses. *Vet Parasitol* 2005;130:317-21.
89. Lasek-Nesselquist E, Bogomolni AL, Gast RJ, Welch DM, Ellis JC, Sogin ML et al. Molecular characterization of *Giardia intestinalis* haplotypes in marine animals: variation and zoonotic potential. *Dis Aquat Org* 2008;81:39-51.
90. Soares RM, de Souza SL, Silveira LH, Funada MR, Richtzenhain LJ, Gennari SM. Genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* from exotic and wild animals kept in captivity in Brazil. *Vet Parasitol* 2011;180:344-8.
91. Nash TE. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997;352:369-75.
92. Bulaşıcı Hastalıkların Bildirimi Sistemi Yönergesi. T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Tarih:24.02.2004/ Sayı:1534.
93. www.virox.com/msds/pdf/EntericProtozoaGiardiaandCryptosporidium.pdf/01.07.2013.
94. Bell PEC, Bahr M, Bell DR. Disease commonly presenting as diarrhoea. Bell PEC, Bell DR. (Eds) *Manson's Tropical Disease* 19th Edition Suffolk UK ELBS 1987;Ch 17: p.301-39.
95. Ortega-Pierres G, Bazan-Tejeda ML, Fonseca-Linan R, Bermudez-Cruz RM. Interaction of *Giardia* with Host Cells. Lujan HD, Svard S. (Eds) *Giardia - A Model Organism*-. Wien Austria Springer-Verlag 2011;Ch 17:261-74.
96. Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 2008;160:75-80.
97. Faubert G. Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:35-54.
98. Ak M, Türk M, Güneş K. Giardiosis. *Tıbbi Parazit Hastalıkları*. Özcel MA. (Editör) *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:22*, İzmir 2007;323-44.
99. Espelage W, Heiden M, Stark K, Alpers K. Characteristics and risk factors for symptomatic *Giardia lamblia* infections in Germany. *BMC Public Health* 2010;10(41):1-9.

100. Ropolo AS, Saura A, Carranza PG, Lujan HD. Identification of Variant-Specific Surface Proteins in *Giardia muris* Trophozoites. *Infect Immun* 2005;73(8):5208-11.
101. Altıntaş N, Korkmaz M. Giardiosis'in İmmunolojisi. Özcel MA, Üner A. (Editörler). *Giardiosis, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:14, İzmir 1997;s.41-62.*
102. Keystone JS, Krajden S, Warren MR. Person-to-person transmission of *Giardia lamblia* in day-care nurseries. *Can Med Assoc J* 1978;119:241-8.
103. [https://www.clinicalkey.com/topics/infectious-disease/giardiasis.html/20.07.2013.](https://www.clinicalkey.com/topics/infectious-disease/giardiasis.html/20.07.2013)
104. Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Törökné A, Márialigeti K. Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. *Int J Hyg Environ Health* 2008;211:524-33.
105. Akyar I, Gültekin M. Dışkı Örneklerinde ELISA Yöntemi ile Saptanan *Entamoeba histolytica* ve *Giardia* Antijenlerinin Beş Yıllık Sürveyansı. *Turkiye Parazitol Derg* 2012;36:12-6.
106. Ljungström I, Castor B. Immune response to *Giardia lamblia* in a water-borne outbreak of giardiasis in Sweden. *J Med Microbiol* 1992;36:347-52.
107. Guy RA, Payment P, Krull UJ, Horgen PA. Horgen Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5178-85.
108. Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EA, Rooyen MA et al. Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):1220-3.
109. Guimarães S, Sogayar MI. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. *Rev Saúde Pública* 2002;36:63-8.
110. Kilimcioğlu A, Ok ÜZ. Makroskopik inceleme ve taze dışkı incelemeleri. Korkmaz M, Ok ÜZ (Editörler). *Parazitolojide Laboratuvar. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:23 İzmir. Meta Basım 2011;Bölüm 2.2:s.17-23.*
111. *Basic Laboratory Methods In Medical Parasitology Faecal speciemens. WHO Geneva Printed in England. 1991;Section1:p.9-32.*
112. Aykan B, Çağlar K, Kuştimur S. Gaita Örneklerindeki Protozoonların Trikróm Boyası Kullanılarak Değerlendirilmesi. *Turkiye Parazitol Derg* 2005;29;34-8.
113. Chakarova B. Comparative Evaluation Of The Diagnostic Methods For Detection Of *Giardia intestinalis* in Human Fecal Samples. *Trakia Journ of Sci* 2010;8:174-9.
114. Duffy TL, Montenegro-Bethancourt G, Solomons NW, Belosevic M, Clandinin MT. Prevalence of Giardiasis in Children Attending Semi-urban Daycare Centres in Guatemala and Comparison of *Giardia* Detection Tests. *J Health Popul Nutr* 2013;31(2):290-3.

115. Stibbs HH. Monoclonal Antibody-Based Enzyme Immunoassay for *Giardia lamblia* Antigen in Human Stool. J Clin Microbiol 1989;27:2582-8.
116. Uyar Y, Özkan AT. Amebiyazis, Giardiyazis ve Kriptosporidiyazis Tanısında Antijen Tarama Yöntemlerinin Yeri. Türkiye Parasitol Derg 2009;33(2):140-50.
117. Garcia LS, Garcia JP. Detection of *Giardia lamblia* Antigens in Human Fecal Specimens by Solid-Phase Qualitative Immunochromatographic Assay. J Clin Microbiol 2006;44(12):4587-8.
118. Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causer L, Wilkins PP. Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens. J Clin Microbiol 2003;41(2):623-6.
119. Weitzel T, Dittrich S, Möhl I, Adusu E, Jelinek T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. Clin Microbiol Infect 2006;12(7):656-9.
120. El-Mohammady H, Mansour A, Shaheen HI, Henien NH, Motawea MS, Raafat I et al. Increase in the detection rate of viral and parasitic enteric pathogens among Egyptian children with acute diarrhea. J Infect Dev Ctries 2012;6:774-781.
121. Palm JE, Weiland ME, Griffiths WJ, Ljungström I, Svärd SG. Identification of Immunoreactive Proteins during Acute Human Giardiasis. J Infect Dis 2003;187:1849-59.
122. Environmental Protection Agency USA *Giardia*: Human Health Criteria Document Analysis and treatment of *Giardia* (VII) 1998 August;Ch7:p.1-56.
123. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Tıbbi genetikte İnsan moleküler genetiği için araçlar (çeviri: E. Yılmaz). Thompson and Thompson. Ankara Güneş Kitabevi 2005;s.33-50.
124. Almeida AAS. *Cryptosporidium* and *Giardia*. Review 2011;1:19-60 <http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/24612/5/4.pdf> /01.04.2013.
125. Helmy MM, Abdel-Fattah HS, Rashed L. Real-Time PCR/RFLP assay to detect *Giardia intestinalis* genotypes in human isolates with diarrhea in Egypt. J Parasitol 2009;95:1-5.
126. Calderaro A, Gorrini C, Montecchini S, Peruzzi S, Piccolo G, Rossi S et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the laboratory diagnosis of Giardiasis. Diagn Microbiol Infect Dis 2010;66:261-7.
127. Goode T, Ho WZ, O'Connor T, Busteed S, Douglas SD, Shanahan F. Nested RT-PCR Sensitivity Controls are Essential to Determine the Biological Significance of Detected mRNA. Walker JM (Editor) Methods in Molecular Biology RT-PCR Protocols. Humana Press New Jersey. 2002;p.64-78.
128. Ajjampur SSR, Sankaran P, Kannan A, Sathyakumar K, Sarkar R, Gladstone BP et al. Short Report: *Giardia duodenalis* Assemblages Associated with Diarrhea in Children in South India Identified by PCR-RFLP. Am J Trop Med Hyg 2009;80:16-19.

129. Scott V, Tingey SV, Tufo JP. Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Plant Physiol* 1993;101:349-352.
130. Singii B. Molecular Methods for Diagnosis and Epidemiological Studies of Parasitic Infections. *Int J Parasitol* 1997;27:1135-45.
131. Paintlia AS, Mahajan RC, Chakraborti A, Sehgal R, Ganguly NK. Characterization of *Giardia lamblia* groups A and B from North India by isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. *Parasitol Res* 1999;85:510-2.
132. Deng M, Cliver DO. Rapid DNA extraction methods and new primers for randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Giardia duodenalis*. *J Microbiol Methods* 1999;37:193-200.
133. Baruch AC, Isaac-Renton J, Adam RD. The Molecular Epidemiology of *Giardia lamblia*: A Sequence-Based Approach. *J Infect Dis* 1996;174:233-6.
134. Tungtrongchitr A, Sookrung N, Indrawattana N, Kwangsi S, Ongrotchanakun J, Chaicumpa W. *Giardia intestinalis* in Thailand: Identification of Genotypes. *J Health Popul Nutr* 2010; 28:42-52.
135. Kolören Z, Avşar C, Şekeroğlu ZA. Protozoonların Tanısında İlimiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma Yöntemi (LAMP). *Turkiye Parazitoloj Derg* 2010;34:207-11
136. Plutzer J, Karanis P. Rapid identification of *Giardia duodenalis* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. *Parasitol Res* 2009;104:1527-33.
137. Plutzer J, Törökne' A, Karanis P. Combination of ARAD microfibre filtration and LAMP methodology for simple, rapid and cost-effective detection of human pathogenic *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in drinking water. *Lett Appl Microbiol* 2010;50:82-88.
138. Wang Z, Vora GJ, Stenger DA. Detection and Genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* by Oligonucleotide Microarray. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7):3262-71.
139. Sulaiman IM, Cama V. The Biology of Giardia Parasites Ortega YR (Ed.) *Foodborne Parasites Hardcover* 2006;Ch 2:15-32.
140. Mahdy MAK. Genotyping of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* from human and environmental samples (Thesis). University of Malay Kuala Lumpur 2008.
141. Hashimoto T, Nakamura Y, Nakamura F, Shirakura T, Adachi J, Goto N et al. Protein Phylogeny Gives a Robust Estimation for Early Divergences of Eukaryotes: Phylogenetic Place of a Mitochondria-lacking Protozoan, *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol* 1994;11(1):65-71.
142. Holberton RCD. Assembly of 2-5 nm filaments from giardin, a protein associated with cytoskeletal microtubules in *Giardia*. *J Cell Sci* 1985;78:205-31.

143. Feliziani C, Merino MC, Rivero MR, Hellman U, Pistoiresi-Palencia MC, Rópolo AS. Immunodominant proteins a-1 giardin and b-giardin are expressed in both assemblages A and B of *Giardia lamblia*. BMC Microbiology 2011;11(233):1-10.
144. Thompson RCA, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. Vet Journal 2008;177:18-25.
145. Amar CFL, Dear PH, McLauchlin J. Detection and genotyping by real-time PCR/RFLP analyses of *Giardia duodenalis* from human faeces. J Med Microbiol 2003;52:681-3.
146. Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of Two Target Genes for Detection and Genotyping of *Giardia lamblia* in Human Feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. J Clin Microbiol 2005;43:5940-4.
147. Giessen JWB, Vries A, Roos M, Wielinga P, Kortbeek LM, Mank TG. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: A phylogenetic analysis of human and animal isolates. Int J Parasitol 2006;36:849-58.
148. Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK, Strand E, Alvsva°g JO, Langeland N. Application of Genotyping during an Extensive Outbreak of Waterborne Giardiasis in Bergen, Norway, during Autumn and Winter 2004. Appl Environ Microbiol. 2006;72(3):2212-7.
149. Sulaiman IM, Jiang J, Singh A, Xiao L. Distribution of *Giardia duodenalis* Genotypes and Subgenotypes in Raw Urban Wastewater in Milwaukee, Wisconsin. Appl Environ Microbiol 2004;70:3776-80.
150. Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008;103:98-103.
151. Cordón GP, Soldan OCP, Vásquez FV, Soto JRV, Bordes LS, Moreno MS et al. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. Parasitol Res 2008;103:459-65.
152. Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacci`o SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. Acta Trop 2007;102:92-9.
153. Foronda P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, Periago MV, Valero MA, Valladares B et al. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. Parasitol Res 2008;103:1177-81.
154. Hussein AIA, Yamaguchi T, Nakamoto K, Iseki M, Tokoro M. Multiple-subgenotype infections of *Giardia intestinalis* detected in Palestinian clinical cases using a subcloning approach. Parasit Int 2009;58:258-62.
155. Paintlia AS, Descoteaux S, Spencer B, Chakraborti A, Ganguly NK, Mahajan RC et al. *Giardia lamblia* Groups A and B Among Young Adults in India. Clin Infect Dis 1998;26:190-1.
156. Nazer H. Giardiasis. Katz J. (Ed.) <http://emedicine.medscape.com/article/176718-overview#a0156/20.07.2013>.

157. Gardner TB, Hill DR. Treatment of Giardiasis. Clin Microbiol Rev 2001;14(1):114-28.
158. Nash TE, Ohl CA, Thomas E, Subramanian G, Keiser P, Moore TA. Treatment of Patients with Refractory Giardiasis. Clin Infect Dis 2001;33:22-8.
159. Tanyüksel M. *Giardia lamblia*. Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. (Editörler) Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 3. Baskı İstanbul Nobel Tıp Kitabevi 2008; Bölüm 29: s.2571-9.
160. Aksoy Ü, Özkoç S. Protozoon Hastalıklarının Tedavisi Özcel MA. (Koordinatör) Tıbbi Parazitolojide Tedavi. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:20 İzmir 2005; Bölüm 2:s.33-50.
161. Busatti HGNO, Santos JFG, Gomes MA. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we? Biologics. 2009;3:273-87.
162. Turgay N. Giardiasis. Doğanay M, Altıntaş N. (Editörler) Zoonozlar hayvanlardan insanlara bulaşan enfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2009;s.727-37.
163. Kappagoda S, Singh U, Blackburn BG. Antiparasitic Therapy. Mayo Clin Proc 2011;86(6):561-83.
164. Özbilgin A. Barsak Protozoonları. Ankem Derg 2006;20 (Ek 2):165-181.
165. Rubin AJ, Evers DP, Eyman CM, Jarolli EL. Inactivation of Gerbil-Cultured *Giardia lamblia* Cysts by Free Chlorine. Appl Environ Microbiol 1989;55:2592-4.
166. Environmental Protection Agency USA *Giardia*: Drinking Water Health Advisory November 1999; p.1-39.
167. Wickramanayake GB, Rubin AJ, Sproul OJ. Inactivation of *Giardia lamblia* Cysts with Ozone. Appl Environ Microbiol 1984;48(3):671-2.
168. Budak S, Atay MG. Giardiosisten Korunma. Özcel MA, Üner A. (Editörler) Giardiosis Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:14 İzmir 1997;s.131-6.
169. Barreto ML, Genser B, Strina A, Teixeira MG, Assis AMO, Rego RF. Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. Environ Health Perspect 2010;118:1637-42.
170. Environmental Protection Agency USA *Giardia*: Risk for Infants and Children 1999;Ch 4:p.33-7.
171. Anderson KA, Brooks AS, Morrison AL, Reid-Smith, RJ, Martin SW, Benn DM et al. Impact of Giardia vaccination on asymptomatic *Giardia* infections in dogs at a research facility. Can Vet J 2004;45:924-30.
172. Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective. Clin Microbiol Rev 2012;25(3):420-49.
173. Carroll MJ. Collection of Fresh Specimens. Isenberg HD. (Ed.) Clinical Microbiology Procedures Handbook 2nd Edition ASM Press Washington 2007;9.2.1.

174. Crede P. Microscopic Examination of Fecal Specimens: Direct Smears. Isenberg HD. (Ed.) Clinical Microbiology Procedures Handbook 2nd edition Washington ASM Press 2007;9.3.3.
175. Volot~ao AC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brand~ao A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using Beta-giardin gene: A phylogenetic analysis. Acta Tropica 2007;102:10-9.
176. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. Biochem Biophys Res Commun 2001;289:150-4.
177. Fayer R. Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control Waterborne zoonotic protozoa *Giardia*. World Health Organization (WHO). V (16): p.261-5.
178. Hunter PR, Andersson Y, Von Bonsdorff CH, Chalmers RM, Cifuentes E, Deere D. Surveillance and investigation of contamination incidental waterborne outbreaks. Dufour A, Snozzi M, Koster W, Bartram J, Ronchi E, Fewtrell L. (Eds) Microbial safety of drinking water: Improving approaches and methods 1st published. WHO Cornwall, UK 2003;ch7:p. 205-36.
179. Yoder JS, Gargano JW, Wallace RM, Beach MJ. Morbidity Mortality Weekly Report Cryptosporidiosis Surveillance United States, 2009-2010 and Giardiasis Surveillance United States, 2009-2010. US Department of Health and Human Services 2012; 61(5):13-23.
180. Prado MS, Cairncross S, Strina A, Barreto ML, Oliveria-Assis AM, Rego S. Asymptomatic giardiasis and growth in young children; a longitudinal study in Salvador. Brazil Parasitol 2005;131(1):51-6.
181. Prasertbun R, Sukthana Y, Popruk S. RTeMaHI-time PCR: Benefits for Detection of Mild and Asymptomatic *Giardia* Infections. Trop Med Health 2012;40(2):31-35.
182. Portör Muayenelerine Esas Laboratuar Tetkikleri Genelge. T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Tarih:27.01.2005/Sayı:1059.
183. Gherbawy SL, Banaja YA. Molecular characterization of *Giardia* parasite isolated from stool samples collected from different hospitals in Taif City (Saudi Arabia). Trop Biomed 2011;28(3):487-96.
184. Caccio SM, Beck R, Lalle M, Marinculic E, Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. Int J Parasitol 2008;38:1523-31.
185. Siripattanapipong S, Leelayoova S, Mungthin M, Thompson RCA, Boontanom P, Saksirisamphant W et al. Determination of discriminatory power of genetic markers used for genotyping *Giardia duodenalis* Southeast Asian. J Trop Med Public Health 2011;42(4):764-71.
186. Kuk S, Yazar S, Cetinkaya U. Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012;107(8):965-8.

187. Wilke H, Robertson LJ. Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *J Microbiol Methods* 2009;78:292-6.
188. Robertson LJ, Lim YAL. Waterborne and Environmentally-Borne Giardiasis. Lujan HD, Svard S. (Eds) *Giardia A Model Organism*. Springer-Verlag Wien Austria 2011; Ch.3:29-70.
189. Nantavisai K, Mungthin M, Tan-ariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of the Sensitivities of DNA Extraction and PCR Methods for Detection of *Giardia duodenalis* in Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45(2):581-3.
190. Görgün S. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Giardiasis tanısı konulan olgularda *Giardia intestinalis* genotiplerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılması (Tez) Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Manisa 2011.
191. Babaei Z, Oormazdi H, Rezaie S, Rezaeian M, Razmjou E. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Exp Parasitol* 2011;128:159-62.
192. Rochelle PA, Leon RD, Stewart MH, Wolfe RL. Comparison of Primers and Optimization of PCR Conditions for Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in Water. *Appl Envir Microbiol* 1997;63:106-14.
193. Mahbubani MH, Schaefer FW, Jones DD, Bej AK. Detection of *Giardia* in Environmental Waters by Immuno-PCR Amplification Methods. *Current Microbiol* 1998;36:107-13.
194. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28(12):1-7.
195. Li J, Wang P, Zhang A, Zhang P, Alsarakibi M, Li G. Sensitive and Rapid Detection of *Giardia lamblia* Infection in Pet Dogs using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Korean J Parasitol* 2013;51(2):237-41.
196. Fu S, Qu G, Guo S, Ma L, Zhang N, Zhang S et al. Applications of Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification. *Appl Biochem Biotechnol* 2011;163:845-50.
197. Nago TT, Tokashiki YT, Kisanuki K, Nakasone I, Yamane N. Laboratory-based evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to detect *Cryptosporidium* oocyst and *Giardia lamblia* cyst in stool specimens. *Rinsho Byori*. 2010;58(8):765-71.
198. Tezel A, Özkök S, Çalım HD, Zeynep T, Burkan ZT, Akçelik EN ve ark. Tek Tüpte Mikrobiyolojik Tanı Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Dergisi* 2010;1:13-20
199. Zhang H, Thekiso OMM, Aboge GO, Kyan H, Yamagishi J, Inoue N et al *Toxoplasma gondii*: Sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Exper Parasitol* 2009;122:47-50.
200. Khan GM, Bhaskar KRH, Salam A, Akther T, Pluschke G, Mondal D. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of

- Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasit Vectors* 2012;280(5):1-8.
201. Hopkins H, González IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asimwe C et al. Highly Sensitive Detection of Malaria Parasitemia in a Malaria-Endemic Setting: Performance of a New Loop-Mediated Isothermal Amplification Kit in a Remote Clinic in Uganda. *J Infect Dis.* 2013;208:637-44.
 202. Karanis P, Thekisoe O, Kiouptsi K, Ongerth J, Igarashi I, Inoue N. Development and Preliminary Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Procedure for Sensitive Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Fecal and Water Samples. *Appl Envir Microbiol* 2007;73(17):5660-2.
 203. Plutzer J, Tomor B. The role of aquatic birds in the environmental dissemination of human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary. *Parasitol Int* 2009;58:227-31.
 204. Kosuwin R, Putaporntip C, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: evidences for intragenicrecombination and purifying selection at the beta giardin locus. *Gene* 2010;449(1-2):1-8.
 205. Nolan MJ, Jex AR, Pangasa A, Young ND, Campbell AJ, Stevens M. Analysis of nucleotide variation within the triose-phosphate isomerase gene of *Giardia duodenalis* from sheep and its zoonotic implications. *Electrophoresis* 2010;31:287-98.
 206. Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW, Zoopnet network and partners. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(12):e558.
 207. Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol* 2004;126:15-35.
 208. Thompson RCA, Monis PT. Taxonomy of *Giardia* Species Giardiasis Lujan HD, Svard S. (Eds) *Giardia A Model Organism*, Wien Austria Springer-Verlag 2011;Ch1:3-16.
 209. Mahdy AKM, Surin J, Wan KL, Mohd-Adnan A, Al-Mekhlafi MSH, Lim YA. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. *Acta Trop* 2009;112:67-70.
 210. Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Menck N, Thompson RCA. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitol* 2004;128:253-62.
 211. Ratanapo S, Mungthin M, Soontrapa S, Faithed C, Siripattanapipong S, Rangsin R et al. Multiple Modes of Transmission of Giardiasis in Primary Schoolchildren of a Rural Community, Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78(4):611-5.
 212. Lalle M, Bruschi F, Castagna B, Campa M, Pozio E, Cacciò SM. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103:834-9.

213. Huey CS, Mahdy MAK, Al-Mekhlafi HM, Nasr NA, Lim YAL, Mahmud R et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Malaysia. *Infect Genet Evol* 2013;17:269-76.
214. Thompson RCA. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol* 2002;3:229-31.
215. Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol* 2001;31:822-6.
216. Thompson A. Human giardiasis: genotype-linked differences in clinical symptomatology. *Trends Parasitol* 2001;17(10):465.
217. Amar CFL, Dear PH, Pedraza-Dí'az S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. Sensitive PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Detection and Genotyping of *Giardia duodenalis* in Human Feces. *J Clin Microbiol* 2002;40(2): 446-52.
218. Al-Mohammed HI. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitol Res* 2011;108:1375-81.

EKLER

Ek 1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI BİLİMSEL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TUBADK 2011/150				
	PROTOKOL ADI	Giardiantestinalis İzolatlarının Genotiplendirilmesi				
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Nermin ŞAKRU				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ					
	DESTEKLEYİCİ					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	<input checked="" type="checkbox"/> Tek Merkez <input type="checkbox"/> Ulusal	<input type="checkbox"/> Çok Merkez <input type="checkbox"/> Uluslararası				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 14/ 12	Tarih: 06.07.2011				
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nermin ŞAKRU'nun sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Araş. Gör. Dr. Cemal ÇİÇEK'in tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin T.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (TUBAP) tarafından karşılanması koşuluyla gerçekleştirilmesince etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oybirliği ile karar verilmiştir.					
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TUBADK Yönergesi					
ÜYELER						
Ünvanı/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Başkan	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan ÜMIT Başkan Yardımcısı	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İznil
Doç. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Biyoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İznil
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Tunç KUTOĞLU Üye	Anatomi	T.Ü.T.F. Anatomi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Erhan TABAKOĞLU Üye	Göğüs Hastalıkları	T.Ü.T.F. Göğüs Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Figen KULOĞLU Üye	Enfeksiyon Hastalıkları	T.Ü.T.F. Enfeksiyon Hastalıkları A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İznil
Prof. Dr. Yener YORUK Üye	Göğüs Cerrahisi	T.Ü.T.F. Göğüs Cerrahisi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ümit Nusret BAŞARAN Üye	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Gülden ATILLA ÖZTÜRK Üye		T.Ü. Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürüğü	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Murat DİKMENGİL
Dekan

Ek 3

Giardia intestinalis partial bg gene for beta-giardin, isolate
ID HG329627; SV 1; linear; genomic DNA; STD; INV; 342 BP.
XX
AC HG329627;
XX
DT 30-JUL-2013 (Rel. 117, Created)
DT 30-JUL-2013 (Rel. 117, Last updated, Version 1)
XX
DE Giardia intestinalis mitochondrial partial bg gene for beta-giardin,
isolate
DE edr1
XX
KW .
XX
OS Giardia intestinalis
OC Eukaryota; Diplomonadida; Hexamitidae; Giardiinae; Giardia.
OG Mitochondrion
XX
RN [1]
RP 1-342
RA .;
RT ;
RL Submitted (01-JUL-2013) to the INSDC.
RL Medical Microbiology, Medical Faculty, 22030, Edirne, TURKEY.
XX
RN [2]
RA Cicek C., Nermin S. ;
RT "Giardia intestinalis clinical isolates at Trakya region of Turkey";
RL Unpublished.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT source 1..342
FT /organism="Giardia intestinalis"
FT /organelle="mitochondrion"
FT /host="Homo sapiens"
FT /isolate="edr1"
FT /mol_type="genomic DNA"
FT /country="Turkey:Trakya"
FT /sex="mixed"
FT /db_xref="taxon:5741"
FT CDS <1..342
FT /codon_start=1
FT /transl_table=1
FT /gene="bg"
FT /product="beta-giardin"
FT /protein_id="CDG32257.1"
FT
FT /translation="SLTTSDRALPRRTQKGRRCTTSSTRRSQRASPASPPRSRRRRSPA
FT
FT RGPLVLPRQKRYKHEARREVRQRAARERRLGDPYPGGDRREKAERKEAEDKIVNTLED
FT VVSKIQGGL"
XX
SQ Sequence 342 BP; 92 A; 97 C; 112 G; 41 T; 0 other;
agcttgacga cctcggacag ggcattgcca cggagaacgc agaaaggaag aagatgtacg 60
accagctcaa cgagaaggtc gcagagggct tcgcccgcac ctccgccgcg atcgagaagg 120
agacgatcgc ccgcgagagg gccgttagtg ctgccacgac agaagcgcta caaacacgaa 180
gctcgtcgag aagtgcgtca acgagcagct cgagaacgtc gcctcggaga tccgcgctat 240
ccaggaggag atcgccgcca gaaggccgag cgcaaggagg cagaggacaa gatcgtcaac 300
actctcgagg acgtcgtctc gaagatccag ggcggcctct ga 342

Ek 4

Giardia intestinalis partial bg gene for beta-giardin, isolate
HG425167; SV 1; linear; genomic DNA; STD; INV; 307 BP.

XX

AC HG425167;

XX

DT 02-SEP-2013 (Rel. 118, Created)

DT 02-SEP-2013 (Rel. 118, Last updated, Version 1)

XX

DE Giardia intestinalis partial bg gene for beta giardin, isolate edr2

XX

KW .

XX

OS Giardia intestinalis

OC Eukaryota; Diplomonadida; Hexamitidae; Giardiainae; Giardia.

XX

RN [1]

RP 1-307

RA ;

RT ;

RL Submitted (12-AUG-2013) to the INSDC.

RL Medical Microbiology, Medical Faculty, 22030, Edirne, TURKEY.

XX

RN [2]

RA Cicek C., Bukavaz S., Cavuslu S., Sakru N.;

RT "Clinical Giardia intestinalis isolates at Trakya region of Turkey";

RL Unpublished.

XX

FH Key Location/Qualifiers

FH

FT source

1..307

FT /organism="Giardia intestinalis"

FT /host="Homo sapiens"

FT /isolate="edr2"

FT /mol_type="genomic DNA"

FT /country="Turkey:Trakya"

FT /db_xref="taxon:5741"

FT CDS <1..>307

FT /codon_start=1

FT /transl_table=1

FT /gene="bg"

FT /product="beta giardin"

FT /protein_id="CDG66205.1"

FT

/translation="RTQKGRRCTTSSTRRSQRASPASPPRSRRRRSPARGPLVLPQKR

FT

SQTRSSSSRSASTSSSRTSPRRSALSRRRSTARRPSARRQTRSSSTLSRTSFEDPGRP"

XX

SQ Sequence 307 BP; 85 A; 87 C; 100 G; 35 T; 0 other;

agaacgcaga aaggaagaag atgtacgacc agctcaacga gaaggtcgca gagggcttcg

60

cccgcacatc cgccgcgac gagaaggaga cgatcgcccg cgagagggcc gttagtgtc

120

ccacgcacaga agcgctcaca aacacgaagc tcgctcgagaa gtgcgtcaac gagcagctcg

180

agaacgtcgc ctcggagatc cgcgctatcc aggaggagat cgaccgagag aaggccgagc

240

gcaaggaggc agaggacaag atcgtcaaca ctctcgagga cgctcgttcga agatccaggg

300

cggcctc

307

Ek 5

Giardia intestinalis partial bg gene for beta-giardin, isolate
ID HG425168; SV 1; linear; genomic DNA; STD; INV; 308 BP.
XX
AC HG425168;
XX
DT 02-SEP-2013 (Rel. 118, Created)
DT 02-SEP-2013 (Rel. 118, Last updated, Version 1)
XX
DE Giardia intestinalis partial bg gene for beta giardin, isolate edr3
XX
KW .
XX
OS Giardia intestinalis
OC Eukaryota; Diplomonadida; Hexamitidae; Giardiinae; Giardia.
XX
RN [1]
RP 1-308
RA .;
RT ;
RL Submitted (12-AUG-2013) to the INSDC.
RL Medical Microbiology, Medical Faculty, 22030, Edirne, TURKEY.
XX
RN [2]
RA Cicek C., Bukavaz S., Cavuslu S., Sakru N.;
RT "Clinical Giardia intestinalis isolates at Trakya region of Turkey";
RL Unpublished.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT source 1..308
FT /organism="Giardia intestinalis"
FT /host="Homo sapiens"
FT /isolate="edr3"
FT /mol_type="genomic DNA"
FT /country="Turkey:Trakya"
FT /db_xref="taxon:5741"
FT CDS <1..>308
FT /codon_start=1
FT /transl_table=1
FT /gene="bg"
FT /product="beta giardin"
FT /protein_id="CDG66206.1"
FT
FT /translation="RTPRGRRRCMTSSSTRKSQRASPASPLPSRRRRSPARGPSAPPRQRP
FT
FT SQRTRSSSSRSASTSSSRTSPRRSAPSRRRSTARRQSARRQRTSSSTHSRTSSRRSRAAS"
XX
SQ Sequence 308 BP; 85 A; 92 C; 99 G; 32 T; 0 other;
agaacgccga gaggaagaag atgtatgacc agctcaacga gaaagtcgca gagggcttcg
60
cccgcattctc cgctgccatc gagaaggaga cgatcgcccg cgagagggcc gtcagcgccg
120
ccacgacaga ggcctcaca aacacgaagc tcgctgagaa gtgcgtcaac gagcagctcg
180
agaacgtcgc ctcggagatc cgcgccatcc aggaggagat cgaccgagag aaggcagagc
240
gcaaggaggc agaggacaag atcgtcaaca cactcgagga cgctcgtctcg aagatccagg
300
gcggcctc
308

Ek 6

Giardia intestinalis partial bg gene for beta-giardin, isolate
ID HG425169; SV 1; linear; genomic DNA; STD; INV; 308 BP.
XX
AC HG425169;
XX
DT 02-SEP-2013 (Rel. 118, Created)
DT 02-SEP-2013 (Rel. 118, Last updated, Version 1)
XX
DE Giardia intestinalis partial bg gene for beta giardin, isolate edr4
XX
KW .
XX
OS Giardia intestinalis
OC Eukaryota; Diplomonadida; Hexamitidae; Giardiinae; Giardia.
XX
RN [1]
RP 1-308
RA ;
RT ;
RL Submitted (12-AUG-2013) to the INSDC.
RL Medical Microbiology, Medical Faculty, 22030, Edirne, TURKEY.
XX
RN [2]
RA Cicek C., Bukavaz S., Cavuslu S., Sakru N.;
RT "Clinical Giardia intestinalis isolates at Trakya region of Turkey";
RL Unpublished.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT source 1..308
FT /organism="Giardia intestinalis"
FT /host="Homo sapiens"
FT /isolate="edr4"
FT /mol_type="genomic DNA"
FT /country="Turkey:Trakya"
FT /db_xref="taxon:5741"
FT CDS <1..>308
FT /codon_start=1
FT /transl_table=1
FT /gene="bg"
FT /product="beta giardin"
FT /protein_id="CDG66207.1"
FT
FT /translation="RTPRGRRRCMTSSSTRKSQRASPASPLPSRRRRSPARGPSAPPRQRP
FT
FT SQTRSSSSRSASTSSSRTSPRRSAPSRRRSTARRQSARRQTRSSSTHSRTSSRRSRAAS"
XX
SQ Sequence 308 BP; 85 A; 92 C; 99 G; 32 T; 0 other;
agaacgccga gaggaagaag atgtatgacc agctcaacga gaaagtcgca gagggcttcg
60
cccgcattctc cgctgccatc gagaaggaga cgatcgcccg cgagagggcc gtcagcgccg
120
ccacgacaga ggcctcaca aacacgaagc tcgctgagaa gtgcgtcaac gagcagctcg
180
agaacgtcgc ctcggagatc cgcgccatcc aggaggagat cgaccgagag aaggcagagc
240
gcaaggaggc agaggacaag atcgtcaaca cactcgagga cgctcgtctcg aagatccagg
300
gcggcctc
308

Ek 7

Giardia intestinalis mitochondrial partial bg gene for beta-giardin, isolate

ID HG425170; SV 1; linear; genomic DNA; STD; INV; 308 BP.

XX

AC HG425170;

XX

DT 02-SEP-2013 (Rel. 118, Created)

DT 02-SEP-2013 (Rel. 118, Last updated, Version 1)

XX

DE Giardia intestinalis partial bg gene for beta giardin, isolate edr5

XX

KW .

XX

OS Giardia intestinalis

OC Eukaryota; Diplomonadida; Hexamitidae; Giardiainae; Giardia.

XX

RN [1]

RP 1-308

RA ;

RT ;

RL Submitted (12-AUG-2013) to the INSDC.

RL Medical Microbiology, Medical Faculty, 22030, Edirne, TURKEY.

XX

RN [2]

RA Cicek C., Bukavaz S., Cavuslu S., Sakru N.;

RT "Clinical Giardia intestinalis isolates at Trakya region of Turkey";

RL Unpublished.

XX

FH Key Location/Qualifiers

FH

FT source

1..308

FT /organism="Giardia intestinalis"

FT /host="Homo sapiens"

FT /isolate="edr5"

FT /mol_type="genomic DNA"

FT /country="Turkey:Trakya"

FT /db_xref="taxon:5741"

FT CDS <1..>308

FT /codon_start=1

FT /transl_table=1

FT /gene="bg"

FT /product="beta giardin"

FT /protein_id="CDG66208.1"

FT

/translation="KTQKGITCTTSSTRRSQRASPASPPRSRRRRSPARGPLVLPQKR

FT

SQTRSSSSRSASTSSSRTSPRRSALSRRRSTARRPSARRQTRSSSTLSRTSSRRSRAAS"

XX

SQ Sequence 308 BP; 85 A; 90 C; 97 G; 36 T; 0 other;

aaaacgcaga aaggaatcac atgtacgacc agctcaacga gaaggtcgca gagggcttcg

60

cccgcattctc cgccgcgata gagaaggaga cgatcgcccg cgagagggcc gttagtgtctg

120

ccacgcacaga agcgctcaca aacacgaagc tcgctcgagaa gtgcgtcaac gagcagctcg

180

agaacgtcgc ctcggagatc cgcgctatcc aggaggagat cgaccgagag aaggccgagc

240

gcaaggaggc agaggacaag atcgtcaaca ctctcgagga cgctcgtctcg aagatccagg

300

gcggcctc

308

Ek 8

Giardia intestinalis partial bg gene for beta-giardin, isolate

```
ID  HG425171; SV 1; linear; genomic DNA; STD; INV; 286 BP.
XX
AC  HG425171;
XX
DT  02-SEP-2013 (Rel. 118, Created)
DT  02-SEP-2013 (Rel. 118, Last updated, Version 1)
XX
DE  Giardia intestinalis partial bg gene for beta giardin, isolate edr6
XX
KW  .
XX
OS  Giardia intestinalis
OC  Eukaryota; Diplomonadida; Hexamitidae; Giardiinae; Giardia.
XX
RN  [1]
RP  1-286
RA  .;
RT  ;
RL  Submitted (12-AUG-2013) to the INSDC.
RL  Medical Microbiology, Medical Faculty, 22030, Edirne, TURKEY.
XX
RN  [2]
RA  Cicek C., Bukavaz S., Cavuslu S., Sakru N.;
RT  "Clinical Giardia intestinalis isolates at Trakya region of Turkey";
RL  Unpublished.
XX
FH  Key          Location/Qualifiers
FH
FT  source       1..286
FT              /organism="Giardia intestinalis"
FT              /host="Homo sapiens"
FT              /isolate="edr6"
FT              /mol_type="genomic DNA"
FT              /country="Turkey:Trakya"
FT              /db_xref="taxon:5741"
FT  CDS          <1..>286
FT              /codon_start=3
FT              /transl_table=1
FT              /gene="bg"
FT              /product="beta giardin"
FT              /protein_id="CDG66209.1"
FT
FT  /translation="MTSSTRKSQRASPPSPRRRRSPARGPSAPPRQRPSQTRSSSR
FT              SASTSSSRTSPRRSAPSRRRSTARRQSARRQTRLLTHSRTSSRRSRAAS"
XX
SQ  Sequence 286 BP; 75 A; 88 C; 91 G; 32 T; 0 other;
    gtatgaccag ctcaacgaga aagtcgcaga gggcttcgcc cgcactccg ccgccatcga
60
    gaaggagacg atcgcccgcg agagggccgt cagcgcgcc acgacagagg ccctcacaaa
120
    cacgaagctc gtcgagaagt gcgtcaacga gcagctcgag aacgtcgctt cggagatccg
180
    cgccatccag gaggagatcg accgcgagaa ggcagagcgc aaggaggcag aggacaagat
240
    tgттаacaca ctcgaggacg tcgtctcgaa gatccagggc ggcctc
286
//
```

Ek 9

Giardia intestinalis partial bg gene for beta-giardin, isolate

```
ID  HG425172; SV 1; linear; genomic DNA; STD; INV; 288 BP.
XX
AC  HG425172;
XX
DT  02-SEP-2013 (Rel. 118, Created)
DT  02-SEP-2013 (Rel. 118, Last updated, Version 1)
XX
DE  Giardia intestinalis partial bg gene for beta giardin, isolate edr7
XX
KW  .
XX
OS  Giardia intestinalis
OC  Eukaryota; Diplomonadida; Hexamitidae; Giardiinae; Giardia.
XX
RN  [1]
RP  1-288
RA  .;
RT  ;
RL  Submitted (12-AUG-2013) to the INSDC.
RL  Medical Microbiology, Medical Faculty, 22030, Edirne, TURKEY.
XX
RN  [2]
RA  Cicek C., Bukavaz S., Cavuslu S., Sakru N.;
RT  "Clinical Giardia intestinalis isolates at Trakya region of Turkey";
RL  Unpublished.
XX
FH  Key          Location/Qualifiers
FH
FT  source       1..288
FT              /organism="Giardia intestinalis"
FT              /host="Homo sapiens"
FT              /isolate="edr7"
FT              /mol_type="genomic DNA"
FT              /country="Turkey:Trakya"
FT              /db_xref="taxon:5741"
FT  CDS         <1..>288
FT              /codon_start=1
FT              /transl_table=1
FT              /gene="bg"
FT              /product="beta giardin"
FT              /protein_id="CDG66210.1"
FT
FT  /translation="MYDQLNEKVAEGFARISAAIEKETIARERAVSAATTEALTNTKLV
FT              EKCVNEQLENVASEIRAIQEEIDREKAERKEAEDKIVNTLEDVVSKIQGGL"
XX
SQ  Sequence 288 BP; 76 A; 89 C; 91 G; 32 T; 0 other;
    atgtatgacc agctcaacga gaaagtcgca gagggtctcg cccgcatctc cgctgccatc
60
    gagaaggaga cgatcgcccg cgagagggcc gtcagcgccg ccacgacaga ggccctcaca
120
    aacacgaagc tcgtcgagaa gtgcgtcaac gagcagctcg agaacgtcgc ctcggagatc
180
    cgcgccatcc aggaggagat cgaccgcgag aaggcagagc gcaaggaggc agaggacaag
240
    atcgtcaaca cactcgagga cgtcgtctcg aagatccagg gcggcctc
288
//
```

Ek 10

Giardia intestinalis partial bg gene for beta-giardin, isolate
ID HG425173; SV 1; linear; genomic DNA; STD; INV; 306 BP.
XX
AC HG425173;
XX
DT 02-SEP-2013 (Rel. 118, Created)
DT 02-SEP-2013 (Rel. 118, Last updated, Version 1)
XX
DE Giardia intestinalis partial bg gene for beta giardin, isolate edr8
XX
KW .
XX
OS Giardia intestinalis
OC Eukaryota; Diplomonadida; Hexamitidae; Giardiainae; Giardia.
XX
RN [1]
RP 1-306
RA .;
RT ;
RL Submitted (12-AUG-2013) to the INSDC.
RL Medical Microbiology, Medical Faculty, 22030, Edirne, TURKEY.
XX
RN [2]
RA Cicek C., Bukavaz S., Cavuslu S., Sakru N.;
RT "Clinical Giardia intestinalis isolates at Trakya region of Turkey";
RL Unpublished.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT source 1..306
FT /organism="Giardia intestinalis"
FT /host="Homo sapiens"
FT /isolate="edr8"
FT /mol_type="genomic DNA"
FT /country="Turkey:Trakya"
FT /db_xref="taxon:5741"
FT CDS <1..>306
FT /codon_start=1
FT /transl_table=1
FT /gene="bg"
FT /product="beta giardin"
FT /protein_id="CDG66211.1"
FT
FT /translation="NAERKKMYDQLNEKVAEGFARISAAIEKETIARERAVSAATTEAL
FT
FT TNTKLVEKCVNEQLENVASEIRAIQEEIDREKAERKEAEDKIVNTLEDVVSKIQGGL"
XX
SQ Sequence 306 BP; 82 A; 93 C; 98 G; 33 T; 0 other;
aacgccgaga ggaagaagat gtatgaccag ctcaacgaga aagtcgcaga gggcttcgcc
60
cgcattctccg ctgccatcga gaaggagacg atcgcccgcg agagggccgt cagcgcgcc
120
acgacagagg cctcaca aaa cacgaagctc gtcgagaagt gcgtcaacga gcagctcgag
180
aacgtcgcct cggagatccg cgccatccag gaggagatcg accgcgagaa ggccgagcgc
240
aaggaggcag aggacaagat cgtcaacact ctcgaggacg tcgtctcgaa gatccagggc
300
ggcctc
306