

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ \* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ'NDE (MANİSA)  
GIARDİASİS TANISI KONULAN OLGULARDA  
*GIARDIA INTESTINALIS* GENOTİPLERİNİN  
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU  
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Serhan GÖRGÜN**

**Anabilim Dalı : Biyoloji**

**Programı : Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji**

**MANİSA 2011**

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ \* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ'NDE (MANİSA)  
GIARDİASİS TANISI KONULAN OLGULARDA  
*GIARDIA INTESTINALIS* GENOTİPLERİNİN  
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU  
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Serhan GÖRGÜN**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14 Mart 2011**

**Tezin Savunulduğu Tarih : 28 Mart 2011**

**Tez Danışmanı : Doç Dr. Özgür KURT**

**Diğer Jüri Üyeleri : Prof.Dr. A. Üsame TAMER  
Prof.Dr. Ahmet ÖZBİLGİN**

**MANİSA 2011**

## İÇİNDEKİLER

|                                                 |      |
|-------------------------------------------------|------|
| İÇİNDEKİLER                                     | III  |
| SEMBOL ve KISALTMALAR LİSTESİ                   | VII  |
| ŞEKİL LİSTESİ                                   | IX   |
| ÇİZELGE LİSTESİ                                 | X    |
| TEŞEKKÜR                                        | XI   |
| ÖZET                                            | XII  |
| ABSTRACT                                        | XIII |
| 1.GİRİŞ                                         | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER                               | 4    |
| 2.1 SİSTEMATİK VE TARİHÇE                       | 4    |
| 2.1.1 Evrim                                     | 5    |
| 2.1.2 <i>Giardia</i> cinsinin sınıflandırılması | 5    |
| 2.1.3 <i>Giardia</i> Cinsinde Tür Ayrımı        | 6    |
| 2.2 MORFOLOJİ, YAŞAM DÖNGÜSÜ VE BİYOLOJİSİ      | 7    |
| 2.2.1 Morfoloji                                 | 7    |
| 2.2.1.1 Trofozoit Formu                         | 7    |
| 2.2.1.2 Kist formu                              | 7    |
| 2.2.2 <i>G. intestinalis</i> 'in Yaşam Döngüsü  | 9    |
| 2.2.2.1 <i>G. intestinalis</i> 'in Konakları    | 10   |
| 2.2.3 Hücre Biyolojisi                          | 11   |
| 2.2.3.1 Trofozoit                               | 11   |
| 2.2.3.1.1. Nükleer Yapı ve Çoğalma              | 11   |
| 2.2.3.1.2. Eşeyli Üreme                         | 11   |
| 2.2.3.1.3. Hücre İskeleti ve Hareket            | 12   |
| 2.2.3.2. Kist                                   | 14   |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.4. Biyokimyasal Yapı ve Metabolizma                                      | 15 |
| 2.2.5. Genetik Yapı ve Moleküler Biyoloji                                    | 17 |
| 2.2.5.1. Genom Yapısı                                                        | 17 |
| 2.2.5.2. Transkripsiyon ve Translasyon                                       | 18 |
| 2.2.5.3. <i>G. intestinallis</i> 'in Moleküler Tiplendirilmesi ve Genotipler | 18 |
| 2.2.5.4. <i>Giardia intestinalis</i> Genotiplerinin Filogenik İlişki         | 20 |
| 2.2.5.5. Genotip ile Fenotip Arasındaki Bağını                               | 23 |
| <b>2.3 EPİDEMİYOLOJİ</b>                                                     | 24 |
| 2.3.1 Giardiasisin Bulaş Yolları                                             | 24 |
| 2.3.1.1 İnsandan İnsana Bulaş                                                | 25 |
| 2.3.1.1.1 Fekal oral yol ile insandan insana bulaş                           | 25 |
| 2.3.1.1.2 Kontamine yiyecek ve içecekler ile çevresel bulaş                  | 25 |
| 2.3.1.2 Zoonotik Bulaş                                                       | 26 |
| 2.3.2 Giardia Kistlerinin Sulardaki Canlılıkları                             | 28 |
| <b>2.4 PATOGENEZ VE KLİNİK</b>                                               | 29 |
| 2.4.1 Lokal ve Klinik Belirtiler                                             | 31 |
| 2.4.1.1 Asemptomatik Taşıyıcılık                                             | 31 |
| 2.4.1.2 Akut Tablo                                                           | 31 |
| 2.4.1.3 Kronik Tablo                                                         | 31 |
| 2.4.2 Giardiasiste İmmünite                                                  | 32 |
| <b>2.5 GİARDİASİS TANISI</b>                                                 | 34 |
| 2.5.1 Saklama Solüsyonları                                                   | 34 |
| 2.5.1.1 %10 Formaldehit Solüsyonu                                            | 34 |
| 2.5.1.2 %5 Formaldehit - Tuz ( %0.85 Serum Fizyolojik ) Solüsyonu            | 34 |
| 2.5.1.3 Mertiolat - İyot - Formaldehit (MIF) Solüsyonu                       | 34 |
| 2.5.1.4. Polivinil Alkol (PVA) Solüsyonu                                     | 35 |
| 2.5.1.5 Sodyum asetat - Asetik asit - Formaldehit (SAF) Solüsyonu            | 35 |

|                                                   |           |
|---------------------------------------------------|-----------|
| 2.5.2 Etyolojik Tanı                              | 35        |
| 2.5.2.1 Dışkıda etkensel tanı                     | 35        |
| 2.5.2.1.1 Direkt Bakı (Nativ- Lugol ) Yöntemi     | 35        |
| 2.5.2.1.2 Çoklaştırma (Konsantrasyon) Yöntemleri  | 36        |
| 2.5.2.1.3 Sedimentasyon (Çöktürme) Yöntemleri     | 36        |
| 2.5.2.1.4 Flotasyon (Yüzdürme) Yöntemi            | 37        |
| 2.5.2.1.5 Boyama Yöntemleri                       | 37        |
| 2.5.2.1.5.1 Giemsa Boyama Yöntemi                 | 37        |
| 2.5.2.1.5.2 Trikrom Boyama Yöntemi                | 37        |
| 2.5.2.1.5.3 Demir Hematoksilen Boyama Yöntemi     | 38        |
| 2.5.2.2 Duodenal Sıvıda Etkensel Tanı             | 38        |
| 2.5.2.2.1 Duodenal Aspirasyon                     | 38        |
| 2.5.2.2.2 Duodenal Kapsül Tekniği (Entero - test) | 38        |
| 2.5.2.2.3 Duodenal Biyopsi                        | 40        |
| 2.5.2.3 Kültür Yöntemleri                         | 40        |
| 2.5.3 Dolaylı (İndirekt) Tanı Yöntemleri          | 40        |
| 2.5.3.1 Dışkıda Antijen Aranması                  | 41        |
| 2.5.3.2 ELİSA (Enzym-Linked İmmunosorbent assay)  | 41        |
| 2.5.3.3 Monoklon Antikorlar                       | 41        |
| 2.5.3.4 İmmundiffüzyon ve İmmunelektroforez       | 41        |
| 2.5.3.5 Western Blot (Immunoblotting)             | 42        |
| 2.5.4 Genetik Esaslı Tanı Yöntemleri              | 42        |
| <b>2.6 TEDAVİ VE KORUNMA</b>                      | <b>44</b> |
| 2.6.1 Tedavi                                      | 44        |
| 2.6.2 Korunma                                     | 44        |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                         | <b>46</b> |
| 3.1. Örnekler                                     | 46        |

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.1. Hastalara Parazitoloji laboratuvarında tanı konulması için uygulanan yöntemler | 46        |
| 3.2. DNA izolasyonu                                                                   | 49        |
| 3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu                                                      | 49        |
| 3.4. Gerçek- Zamanlı PZR (Real-Time-PCR)                                              | 50        |
| 3.5. Erime Eğrisi Analizi                                                             | 51        |
| 3.6. Gerçek Zamanlı PZR İşlemi                                                        | 51        |
| 3.7. tpi Geninin Amplifikasyonu                                                       | 52        |
| 3.8. İkinci Aşama Gerçek Zamanlı PZR İşlemi                                           | 53        |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                                    | <b>55</b> |
| 4.1. Gerçek Zamanlı PZR Bulguları                                                     | 55        |
| 4.2. Genotip, Semptom ve Yaş İlişkisi                                                 | 59        |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                                    | <b>63</b> |
| <b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>                                                              | <b>68</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                                      | <b>69</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                       | <b>81</b> |

## SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

|                        |                                    |
|------------------------|------------------------------------|
| CBÜ                    | : Celal Bayar Üniversitesi         |
| <i>G. intestinalis</i> | : <i>Giardia intestinalis</i>      |
| <i>G. duodenalis</i>   | : <i>Giardia duodenalis</i>        |
| <i>G. lamblia</i>      | : <i>Giardia lamblia</i>           |
| <i>G. muris</i>        | : <i>Giardia muris</i>             |
| <i>G. agilis</i>       | : <i>Giardia agilis</i>            |
| <i>G. psittaci</i>     | : <i>Giardia psittaci</i>          |
| <i>G. ardeae</i>       | : <i>Giardia ardeae</i>            |
| <i>G. microti</i>      | : <i>Giardia microti</i>           |
| <i>T. vaginalis</i>    | : <i>Trichomonas vaginalis</i>     |
| Syn                    | : Sinonim                          |
| PZR                    | : Polimeraz zincir reaksiyonu      |
| µm                     | : mikrometre                       |
| mM                     | : Mikromolar                       |
| DNA                    | : Deoksiribonükleik asit           |
| RNA                    | : Ribonükleik asit                 |
| rDNA                   | : Ribozomal DNA                    |
| rRNA                   | : ribozomal RNA                    |
| FISH                   | : Floresan in situ hibridizasyon   |
| kDa                    | : Kilodalton                       |
| N-AGA                  | : N- asetil galaktozamin           |
| H <sub>2</sub> O       | : Su                               |
| CO <sub>2</sub>        | : Karbondioksit                    |
| ATP                    | : Adenozintrifosfat                |
| tRNA                   | : Transfer RNA                     |
| PFGE                   | : Pulsed-field gel electrophoresis |
| Mb                     | : Megabaz                          |
| UTR                    | : Untranslated region              |
| ssu-rRNA               | : rRNA'nın küçük subünitesi        |

|          |                                                       |
|----------|-------------------------------------------------------|
| bg       | : Beta giardin                                        |
| gdh      | : Glutamat dehidrogenaz                               |
| ef-1     | : Elongasyon (uzama) faktörü alfa 1                   |
| tpi      | : Trioz fosfat izomeraz                               |
| GLORF-C4 | : <i>Giardia lamblia</i> open reading frame C4        |
| RFLP     | : Restriksiyon endonukleaz analizleri                 |
| IgA      | : İmmunoglobilin A                                    |
| IgM      | : İmmunoglobilin M                                    |
| MIF      | : Mertiolat - İyot - Formaldehit Solüsyonu            |
| PVA      | : Polivinil Alkol Solüsyonu                           |
| SAF      | : Sodyum asetat - Asetik asit - Formaldehit Solüsyonu |
| ELISA    | : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                   |
| GSA 65   | : <i>Giardia</i> stool antijeni                       |
| AD       | : Anabilim Dalı                                       |

| <b><u>ŞEKİL LİSTESİ</u></b>                                                                                        | <b><u>SAYFA NO</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>Şekil 2.1.</b> <i>G. intestinalis</i> trofozoitinin dorsal yüzden görünüşü                                      | 8                      |
| <b>Şekil 2.2.</b> <i>G. intestinalis</i> 'in kist şekli                                                            | 8                      |
| <b>Şekil 2.3.</b> <i>G. intestinalis</i> 'in yaşam döngüsü                                                         | 10                     |
| <b>Şekil 2.4.</b> Ventral diskin bir bölümü                                                                        | 14                     |
| <b>Şekil 2.5.</b> Trofozoitin koronal kesiti                                                                       | 14                     |
| <b>Şekil 2.6.</b> <i>G. intestinalis</i> genotiplerinin filogenetik ilişkisi                                       | 21                     |
| <b>Şekil 2.7.</b> <i>G. intestinalis</i> genotiplerinin filogenetik ilişkisi                                       | 22                     |
| <b>Şekil 2.8.</b> A ve B genotiplerinin potansiyel bulaşma yolları                                                 | 26                     |
| <b>Şekil 2.9.</b> Trofozoitlerin ince bağırsak hücrelerinin yüzeyine tutunması                                     | 29                     |
| <b>Şekil 2.10.</b> Lugol ile boyanmış <i>G. intestinalis</i> kist ve trofozoiti                                    | 39                     |
| <b>Şekil 2.11.</b> Trikom boyada <i>G. intestinalis</i> kisti ve trofozoiti                                        | 39                     |
| <b>Şekil 2.12.</b> Demir hemotoksilen <i>G. intestinalis</i> trofozoiti                                            | 39                     |
| <b>Şekil 4.1.</b> A genotipi primer ve problemleri kullanılarak gerçekleştirilen örneklerin amplifikasyon eğrileri | 56                     |
| <b>Şekil 4.2.</b> Tek bir A genotipine ait amplifikasyon eğrisi                                                    | 57                     |
| <b>Şekil 4.3.</b> B genotipi primer ve problemleri kullanılarak gerçekleştirilen örneklerin amplifikasyon          | 57                     |
| <b>Şekil 4.4.</b> Tek bir B genotipine ait amplifikasyon eğrisi                                                    | 58                     |
| <b>Şekil 4.5.</b> A genotipi erime eğrisi analizi                                                                  | 58                     |
| <b>Şekil 4.6.</b> B genotipi için erime eğrisi analizi                                                             | 59                     |
| <b>Şekil 4.7.</b> Karın ağrısı ve ishal semptomlarının genotiplere göre dağılımı                                   | 60                     |
| <b>Şekil 4.8.</b> A genotipi ile ilişkili semptomlar                                                               | 60                     |
| <b>Şekil 4.9.</b> B genotipi ile ilişkili semptomlar                                                               | 61                     |
| <b>Şekil 4.10.</b> Karışık enfeksiyon ile ilişkili semptomlar                                                      | 61                     |
| <b>Şekil 4.11.</b> 0-5 yaş arası hasta izolatlarının genotiplere göre dağılımı                                     | 61                     |
| <b>Şekil 4.12.</b> 6-10 yaş arası hasta izolatlarının genotiplere göre dağılımı                                    | 62                     |
| <b>Şekil 4.13.</b> 21 yaş üstü hasta izolatlarının genotiplere göre dağılımı                                       | 62                     |

**ÇİZELGE LİSTESİ****SAYFA NO**

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 2.1.</b> <i>Giardia</i> türleri                                                                | 6  |
| <b>Çizelge 2.2.</b> <i>Giardia</i> genotipleri ve konakları                                               | 19 |
| <b>Çizelge 2.3.</b> Vahşi ve evcil hayvanlarda <i>G. intestinalis</i> genotipleri                         | 20 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> tpi gen bölgesinin 1. aşama amplifikasyonu için hazırlanan Reaksiyon karışımı         | 52 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> 1. PZR için termal profil                                                             | 52 |
| <b>Çizelge3.3.</b> A genotipini belirlenmesi için amplifiye edilen gen bölgesi                            | 53 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> B genotipini belirlenmesi için amplifiye edilen gen bölgesi                           | 53 |
| <b>Çizelge 3.5.</b> A ve B genotip hazırlanan reaksiyon bileşenleri ve miktarları                         | 54 |
| <b>Çizelge 3.6.</b> A ve B genotipi için termel profil ve erime eğrisi profil                             | 54 |
| <b>Çizelge 4.1.</b> <i>G.intestinalis</i> genotiplerinin yaş ve cinsiyet göre dağılımları                 | 55 |
| <b>Çizelge 4.2.</b> Semptomların, genotipler ve toplam örnek sayısı içindeki dağılımı                     | 56 |
| <b>Çizelge 5.1.</b> İnsanda <i>Giardia duodenalis</i> 'in genotip A ve B prevalansı ile ilgili çalışmalar | 67 |

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her alanda bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Özgür KURT'a, tez çalışmam sırasında CBÜ Tıp Fakültesi Parazitoloji A.D'nin laboratuvar imkânlarını bana sunan sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN'e ve sayın Prof. Dr. Cüneyt BALCIOĞLU'na, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sayın Prof.Dr. Seray ÖZENSOY TÖZ'e ve Doç. Dr. Hande DAĞCI'ya, tezin moleküler alt yapısının hazırlanmasında bana yardımcı olan sayın Doç. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e ve sayın Dr. Aslı TETİK'e, tezin yazım aşamasında bana yardımcı olan değerli arkadaşım Tuba OYUR'a, örnek toplama aşamasında bana yardımcı olan CBÜ Tıp Fakültesi Parazitoloji laboratuvar çalışanlarına, teşekkür ederim. Ayrıca bana her türlü konuda destek olan Filiz ERATAŞ'a, maddi ve manevi her konuda desteklerini her zaman hissettiğim aileme; özveri ve desteklerinden dolayı teşekkürü manevi bir borç bilirim

## ÖZET

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi parazitolojik hastalıkların tanısında son yıllarda etkili bir şekilde kullanılmaktadır. *G. intestinalis*'e ait, mikroskopi ile ayırt edilemeyen 7 farklı grup olduğu (A-G), bunlardan sadece A ve B'nin insan enfeksiyonuyla ilişkili olduğu anca bu genotiplerin başta evcil hayvanlar olmak üzere birçok memelide bulunabildiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Bugüne dek yapılmış çalışmalarda, *Giardia* enfeksiyonlarında görülen farklı klinik tablolar ile A ve B grupları arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, Manisa'da insanlarda ve hayvanlarda bulunan *Giardia intestinalis* genotiplerinin, moleküler epidemiyolojilerinin ve enfeksiyon karakterlerinin araştırılması planlanmıştır. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran ve *G.intestinalis* yönünden pozitif 45 hastaya ait dışkı örneği çalışmaya alınmıştır. Bu örneklerin DNA izolasyonu sonrası "trioz fosfat izomeraz" gen bölgeleri gerçek zamanlı "nested" polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle amplifiye edilmiş, diziye özgü DNA problemleri kullanılarak erime eğrisi analizi ile genotipik ayrımları yapılmıştır. Analizleri yapılan 45 izolatının 33'ü (%73,3) A genotipi, 5'i (%11,1) B genotipi ve 7'si (15,5) A+B karışık genotip bulunmuştur. Hastaların çoğunda 43/45 (%95,5) *Giardia* enfeksiyonu ile ilişkili bir ya da birden fazla semptoma rastlanırken sadece 2 hastada herhangi bir semptom bildirilmemiştir. Hastalar tarafından en sık bildirilen semptomların karın ağrısı (%37,7) ve ishal (%24,4) olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda rutin mikroskopik incelemeler ile pozitif bulunan tüm örnekler gerçek zamanlı PZR ile de pozitif bulunmuş olup işlemin %100 duyarlılık ve özgünlüğe sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, Manisa bölgesinden toplanan klinik örneklerde, önceki çalışmada olduğu gibi *G. intestinalis*'in A genotipine daha sık rastlanmıştır. Uygulanan yöntemin daha fazla örnekle test edilerek elde edilen sonuçların doğrulanması durumunda, bölgemizde giardiasisin epidemiyolojisi hakkında daha doğru bilgiler elde edileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** *Giardia intestinalis*, genotip, gerçek zamanlı PZR, Türkiye

## ABSTRACT

Real time PCR has been used commonly in the diagnosis of many parasitological diseases. *Giardia* is a genus of intestinal flagellate protozoa, including six species that infect several vertebrates. *Giardia intestinalis* is currently the only known species found in humans, while it is also found in other mammals such as pets and livestock. The morphological differences among the isolates of *G. intestinalis* are quite little; however, latest molecular biological studies have demonstrated seven distinct assemblages (A-G) belonging to *G. intestinalis*, which is not possible to discriminate with routine microscopic methods.

The purpose of the study was to assess the genotypes of clinical isolates of *Giardia intestinalis* using Real Time PCR, and evaluate their epidemiological and clinical characteristics in Manisa, Turkey. Forty-five isolates from *G. intestinalis*-infected patients diagnosed during the routine microscopic examination with wet mount, formalin ethyl acetate concentration and trichrome staining in the laboratory of Celal Bayar University School of Medicine Department of Parasitology, were included in the study. The isolates were amplified successfully with real time nested PCR by targeting triose phosphate isomerase and using sequence-specific DNA probes for identified genotypes by melting-point analysis. Thirty-three of 45 samples (73.3%) were found to be genotype A, 5 samples (11.1%) were found to be genotype B, while the remaining 7 (15.5%) samples were found to be mixed infection (A+B). Real time PCR was found to be 100% sensitive and specific.

In the present study, a Real Time PCR test procedure with 100% of sensitivity and specificity was identified to be used in the clinical diagnosis of giardiasis patients. In addition, the results showed that Assemblage A was more common in our patient series, as identified in the previous study conducted in Manisa. After confirmation of the method through assessments with more clinical samples, we will surely obtain more precise data concerning the epidemiology of giardiasis in our region.

**Key words:** *Giardia intestinalis*, genotype, real time PCR, Turkey

## 1.GİRİŞ

*Giardia* genusu, onu 1681’de ilk keşfeden Antony van Leewenhoek’den beri biyologların ve klinisyenlerin ilgisini çekmiştir (Monis et al,2009). Dünyada en iyi bilinen, en sık rastlanan ancak henüz tam anlamıyla anlaşılamamış bir parazitik organizmadır (Thompson, 2000). Alışılmışın dışında birkaç özelliği nedeniyle karmaşık ve ilgi çekici bir organizma olarak tanımlanmaktadır (Monis et al,2008). Bu ilgi sadece parazitini, veterinerlik ve medikal alanda öneminden değil primitif doğası ve ökaryotik bir organizma olmasına karşın sahip olduğu bazı ilkel prokaryotik özelliklerden kaynaklanmaktadır (Cacciò ve Sprong 2010). Hemen hemen aynı anda replike olan ve transkripsiyonel olarak aktif 2 çekirdeği ve yapışma diski gibi özgün organellerinin bulunması, buna karşın; mitokondri, peroksizom, çekirdekçik ve trofozoitlerinde golgi kompleksinin bulunmaması karmaşık ve ilgi çekici olarak nitelendirilmesinin sebebidir (Adam 2000; Adam, 2001; Monis et al, 2009).

*Giardia* cinsi; insan, maymun, bir çok kemirgen, köpek, kedi, at, sığır, keçi, koyun, kuş türleri, kurbağa yavrusu, kertenkele, balıklar da dahil olmak üzere omurgalılara ait tüm sınıfların intestinal sistemlerinde bu cinse ait örnekler gösterilmiştir (Daldal ve Özensoy, 1997; Ak ve diğerleri, 2007).

1952’de Francis Filice *Giardia* türlerini morfoloji ve orta cisimlerini dikkate alarak yaptığı sınıflandırma ile 3 farklı *Giardia* türünü ayırt etmiştir. *Giardia intestinalis* (syn:*G.duodenalis*, *G.lambli*); insan dahil bir çok memelide, *G. muris*; kemirgenlerde, *G. agilis* ; amfibilerde bulunan türlerdir. Son yıllarda elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar neticesinde 3 farklı *Giardia* türü daha ayırt edilmiştir. Bunlar; *G. psittaci* muhabbet kuşlarında, *G. ardeae* balıkçılarda, *G.microti* tarla faresi ve misk faresinde bulunan türlerdir (Adam,2001).

*G. intestinalis* insanda hastalık yapan tek *Giradia* türü olmasına karşın evcil hayvanlarda, çiftlik hayvanlarında ve geniş bir ölçüde vahşi hayvanlarda bulunabilmektedir (Thomson,2000; Cacciò et al,2002).

Az gelişmiş ülkelerde özellikle çocuklar için beslenme güçlükleri önemli bir problem olarak varlığını korumaktadır. Bu nedenle çocuklarda büyüme ve gelişme geriliği yaratan çeşitli enfeksiyonlarla başa çıkma zorunluluğunu ve enfeksiyon karakterlerinin belirlenmesinin önemi net bir biçimde göz önüne getirmektedir. Çocuklarda bu problemler göz önüne alındığında parazitolojik açıdan ilk akla gelen *Giardia* genusu ve yol açtığı hastalıktır. Kamçılı bir protozoon olan *G. intestinalis*’in yol açtığı hastalığa giardiasise denir. Enfeksiyon özellikle çocuklarda çok sık rastlanmakta ve uzun süreli olarak devam etmektedir. Az gelişmiş toplumlarda, giardiasisin neden olduğu sindirim ve beslenme bozukluklarına bağlı olarak malnütrisyon ve malabsorbsiyona neden olan hastalık, çocuklarda çok ağır seyredebilir, bedensel ve zihinsel gelişme bozukluklarına sebep olabilmektedir. Çoğunlukla duodenumda, nadiren safra kesesi ve safra yollarında parazitlenmesiyle oluşan ve başta sindirim bozuklukları olmak üzere birçok

belirtiye neden olabilen bir enfeksiyona yol açmaktadır (Unat,1995; Ak ve diğerleri, 2007). Sağlıklı görünen erişkinlerin bir kısmında ise yağlı dışkılamaya yol açan *G. intestinalis* aynı zamanda tüm dünyada gezginci ishali olarak bilinen tablodan da sorumlu tutulmaktadır. *G. intestinalis*'in her yıl yaklaşık 280 milyon vakaya sebep olduğu ve gelişmekte olan ülkelerde en sık rastlanılan parazit türü olduğu bildirilmektedir. Asya, Afrika ve Latin Amerika'da her yıl 500000 yeni olgu rapor edilirken, 200 milyon insanında semptomatik giardiasis olduğu bilinmektedir (WHO, 1996)

*G. intestinalis* viral enfeksiyonlardan sonra en sık rastlanan diyare etmenidir (WHO, 1996; Thompson et al, 2000). Dünyada ılıman bölgelerden tropikal kuşağa kadar gelişmiş ülkelerde %2-5 arasında değişen oranlarda, gelişmekte olan ülkelere ise %20-30'a varan oranlarda yayılım göstermektedir (Ak ve diğerleri2007). Özellikle çocuklarda çok sık rastlanmakta ve uzun süreli olarak devam etmektedir (Unat,1995; Ak ve diğerleri, 2007). Gelişmiş ülkelere kreşlerde ve yurtlarda salgınlardan sorumlu olduğundan önemli bir parazittir ( Ak ve diğerleri 2007).

Ülkemizde giardiasis en yaygın rastlanan bağırsak parazitlerindendir. Ülkemizde erişkinlerde *G. intestinalis*' e rastlanma oranı ortalama %7,5 iken çocuklarda bu oran % 12 civarındadır (Özçelik ve Değerli, 1997). Bu oranlar, alt yapı sorunu olan bölgelerde ve topluluk halinde yaşanan özellikle yurt, kreş vb. yerlerde artmaktadır. Yapılan çalışmalar parazite rastlanma sıklığının sosyo-ekonomik faktörler ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir (Ak ve diğerleri 2007).

İnsandan insana bulaş parazitin en yaygın bulaşma biçimi olup çapraz geçiş olarak adlandırılan hayvandan insana veya insandan hayvana geçişin mümkün olabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Thompson,2000; Geurden et al 2010, Thompson et al 2010 Ballweber et al, 2010).

Son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalar *G. intestinalis*'in en az 7 farklı genotipe (A-G) sahip olduğu belirtilmiştir. Bu genotiplerden sadece 2 tanesi insanlarda hastalığa neden olduğu gösterilmiştir. Ancak insanda bulunan A ve B genotipi birçok memelide bulunmaktadır. İnsan ve memelilerden elde edilen izolatları moleküler yapılarının heterojeniteye sahip olduğu saptanmıştır. Bu da *Giardia* türlerinin zoonotik potansiyelinin ve taksonomisinin anlaşılması için çok önemli katkı sağlamıştır. Bu durum hastalığın hayvanlardan insanlara geçebileceğine dair güçlü bir kanıt olarak da sunulmaktadır ( Thompson, 2000; Cacciò, 2005).

*Blastocystis hominis* ve *Entamoeba histolytica* gibi bazı bağırsak protoozonlarında farklı genotiplerin patojenite özelliklerinin de farklı olduğu gösterilmiştir. Bu durumun belirlenmesi ile hastalığa neden olmayan suşların tanımlanması sağlanarak tedavi süresini ve niteliğinin değiştirilmesi veya tedavi verilmemesi mümkün olabilecektir.

Bu çalışmada parazitoloji laboratuvarında çeşitli yöntemler ile *G. intestinalis* kist veya trofozoiti rastlanan olgulardan toplanan gaita örneklerinden izole edilen DNA'lar, gerçek zamanlı

polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılarak bölgede bulunan *G.intestinalis* suşlarının genotipleri ve genotipler arasındaki farklılığı belirlenmek birincil amaç olarak planlanmıştır. İkncil amaç olarak saptanan *Giardia intestinalis* genotipleri ile hasta semptomları arasında kolerasyonunu araştırmak ayrıca, kullandığımız yöntemin standartizasyonunu sağlayarak rutin gaita incelemelerinde kullanılabilirliğini göstermek çalışmanın amaçlarındandır. Bugüne kadar *Giardia* izolatlarının genotipik farklılıklarının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, Polimeraz zincir reaksiyonu- Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP) metodu kullanılmıştır. Jele dayalı RFLP yöntemi güvenilir bir yöntem olmakla birlikte çok sayıda örneğin analiz edilmesi gerektiğinde oldukça zaman alıcı bir yöntem olması nedeniyle tercih edilmemektedir. Bu nedenle geniş epidemiyolojik çalışmalar için RFLP uygun bir yöntem değildir. Çalışmamızda, daha kısa zamanda daha fazla örneğin bir arada çalışılabilirdiği ve kontaminasyon riskinin en az olduğu yöntem olan gerçek-zamanlı PZR metodu uygulanması planlanmaktadır

Çalışma ile bölgedeki suşların genotip ayrımı yapılarak genotiplerin, bölgesel moleküler epidemiyolojisi hakkında fikir sahibi olmamız sağlanacaktır. Elde edilen bilgilerin yurt içi ve yurt dışı benzeri çalışmalar ile karşılaştırılarak hastalığın yayılış biçimi, parazitin biyolojisi hakkında önemli bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır. Gerek biyologlara gerekse klinisyen hekimlere daha ayrıntılı bilgi verilebilmesi ve tıbbi açıdan epidemiyolojik verileri zenginleştirerek ülkemizdeki toplum sağlığı açısından yeni stratejilerin oluşturulmasına olanak sağlamak istenmektedir

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. SİSTEMATİK VE TARİHÇE

1681’de Antony van Leeuwenhock (1631-1723) kendi ishali dışkısını incelediğinde gördüğü organizmayı şöyle tarif etmiştir; “Bazen çok güzel hareket eden hayvan hücreleri görüyorum. Bunlardan bazıları kan globülünden biraz daha büyük, diğerleri daha küçük, boyları enlerinden daha düz görünümlü, temiz besi yerinde ve globülünlerin arasında yer değiştiren çabuk hareket etmesine karşın az mesafe kaydeden organizmalardır” İngiliz bilim adamı Dobell 1932’de Van Leeuwenhock’un *Giardia*’yı tarif ettiğini savunmuş ve hastalığın vegetatif evresini tanımladığını düşünmüştür. Bu tez, kayıtları inceleyen diğer bilim adamları tarafından da desteklenmiştir (Daldal ve Özensoy, 1997; Smith ve Paget, 2007).

*G. intestinalis*’ ilk kez 1859 yılında Çek Doktor Vilem Lambl tarafından ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. Lambl organizmayı *Cercomonas* genusuna ait olduğunu düşünmüş ve *Cercomonas intestinalis* olarak isimlendirmiştir. 1879’da Grassi kemirgenlerde bulduğu bir paraziti Lambl’in önceki tanımlamalarını dikkate almayarak *Dimorphus muris* olarak isimlendirmiştir. Ancak bu parazit bugün *Giardia* genusunda bulunmaktadır. 1882 ve 1883’de Kuntstler kurbağa yavrularında yaptığı araştırmalar sonucu tanımladığı organizmaya *Giardia* ismini vermiştir ve böylece *Giardia* ismi ilk kez genus ismi olarak kullanılmıştır. Bu gün bu organizmanın Filice’in 1952’de tanımladığı *Giardia agilis* olduğu düşünülmektedir. (Adam,2001; Smith ve Paget, 2007). 1888’de Blanchard, parazite *Lambli intestinalis* ismini önerdi, bu ismi 1902’de Stiles, *Giardia duodenalis* olarak değiştirdi. Sonraki yıllarda Kofoid ve Christiansen *Giardia lamblia* ismini, 1920’de ise *Giardia enterica* ismi önerdi (Adam,2001). *Giardia* genusu üzerindeki tür ismi ve tür sayısı tartışmaları uzun yıllar devam etmiştir. Bazı araştırmacılar konak orjinlerine göre sınıflandırma yaparken diğerleri morfolojilerini dikkate alarak sınıflandırma yapmışlardır. Tür ayırımında konak orjinleri dikkate alındığında 40’dan fazla *Giardia* türü tanımlanmıştır (Daldal ve Özensoy, 1997; Adam, 2001). Buna karşın Simon morfolojik kriterleri dikkate alarak *G. lamblia* ile *G. muris* arasındaki farkı tanımladı ve insanda bulunan türün *G. lamblia* olduğunu bildirmiştir (Simon, 1922). 1952 de Filice, tür olarak kabul edilen 40 *Giardia* örneğini orta cisimlerinin şekline ve trofozoitin şekil ve büyüklüğüne bağlı olarak incelemiş ve 3 farklı morfolojik grup olduğunu kanıtlamıştır. Böylece *Giardia* tür sayısı 3’e düşürülmüştür. *Giardia agilis* kurbağalardan, *Giardia muris* kemirgenler, sürüngenler ve kuşlardan, *Giardia duodenalis* insan dahil birçok omurgalıdan izole edilmiştir (Filice,1952). Daha sonraları elektromikroskopik ve moleküler teknikler ile yapılan detaylı araştırmalar bu üç türe ilave olarak üç farklı daha tür olduğunu göstermiştir (Lymbery ve Tibayrenc, 1994) Böylece tür sayısı altıya çıkmıştır (Çizelge 2.1).

*Giardia lamblia* tür ismi olarak geniş bir ölçüde kabul edilmiş ve 1970'lere kadar kullanılmıştır. 1980'lerde bazı araştırmacılar *Giardia duodenalis* ismini kullanmayı tercih etmişler, 1990'lara gelindiğinde ise *Giardia intestinalis* ismi araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Adam, 2001). Günümüzde üç isimde kullanılmakta ve ülkemizde yaygın kullanımı *Giardia intestinalis*'dir (Daldal ve Özensoy 1997).

### 2.1.1. Evrim

*Giardia* sahip olduğu nukleus ve nukleer zar, hücre iskeleti elemanları ve hücre içi zarlı organelleri ile tipik olarak ökaryotik bir organizmadır. Buna karşılık *Giardia*; nukleolus, peroksizom, mitokondri ve oksidatif fosforilasyon için gerekli bileşenlerden yoksun anaerobik bir canlıdır. Bu özellikleri ve basit hücre içi organizasyon göstermeleri *Giardia*'ların primitif ökaryotik organizma olduklarını düşündürmüştür (Adam, 2001; Morrison et al 2007).

Plastit ve mitokondri gibi organellerin ökaryot hücrelerle birlikte yaşamaya başlayan prokaryot canlılardan köken aldığını ileri süren endosimbiyotik teori geniş ölçüde kabul edilmektedir. *Giardia*'nın evrimi ile ilgili olarak iki temel düşünce ortaya atılmıştır. Bu teorilerden biri *Giardia* ve diğer mitokondrisiz ökaryotlar (diğer diplomonadlar; *Trichomonas vaginalis*) üzerinde yapılan filogenetik çalışmalar bu organizmaların simbiyotik olaydan önce Archezoa soyundan geldiğini göstermiştir (Cavalier,1987; Cavalier ve Chao,1996). Bununla beraber *G. intestinalis* ve *T.vaginalis* genomlarında mitokondriyel genlere sahip olması mitokondrisiz tek hücreli organizmaların mitokondrilerini kaybettikleri düşüncesi belirtilmiştir (Bui et al 1996; Roger et al,1998). Sonuç olarak bazı araştırmacılar *Giardia*'nın ökaryotların erken soy dallanmasından evrimleştiğini düşünürken diğer araştırmacılar *Giardia*'nın mikroaerofilik ortama adapte olmuş, mitokondriyel atanın endosimbiyotik olayından önce gelen ökaryotik bir soydan evrimleştiği düşüncesini savunulmaktadır (Thompson ve Monis,2004; Morrison et al, 2007).

### 2.1.2. *Giardia* cinsinin sınıflandırılması (Daldal ve Özensoy,1997):

|                  |                        |
|------------------|------------------------|
| <b>Bölüm</b>     | <i>Protozoa</i>        |
| <b>Üst sınıf</b> | <i>Mastigophora</i>    |
| <b>Sınıf</b>     | <i>Zoomastigophora</i> |
| <b>Takım</b>     | <i>Diplomonadida</i>   |
| <b>Aile</b>      | <i>Hexamitidae</i>     |
| <b>Cins</b>      | <i>Giardia</i>         |

### 2.1.3. *Giardia* Cinsinde Tür Ayrımı

*Giardia agilis*: Kurbağalardan izole edilen *Giardia* türüdür. 20- 30 µm boyutlarında, uzun ve dar olan trofozoitleri, uzun damla şekilli orta cisimleri bulunmaktadır. Kistleri 4- 5µm boyutlarındadır (Daldal ve Özensoy, 1997).

*Giardia muris*: Kemirgenlerde bulunan türdür. 9-12 µm boyutlarında, yuvarlağımsı armut şeklinde olan trofozoit, merkezde iki küçük yuvarlak orta cisim bulundurmaktadır. Kistleri 5- 7 µm boyutlarındadır.

*Giardia intestinalis*: İnsanlarda ve geniş ölçüde diğer memelilerde bulunan türdür. 12-15 µm boyutlarında, gözyaşı veya boyuna ikiye bölünmüş armut şeklinde olan trofozoitleri, birbirine paralel eğri çomak, tırnak ya da virgül biçiminde iki adet nadiren bir tane orta cisimlere sahiptir. Kistleri 6-8 µm boyutlarında oval veya eliptiktir.

*Giardia ardea*: Balıkçılarda bulunan türdür. Yaklaşık 10 µm boyutlarında, yuvarlağımsı trofozoitleri küçük yuvarlak veya pençe şeklinde orta cisimlere sahiptir. Ventral diskte belirgin bir şekilde çentik bulunmakta ayrıca kuyruk kamçısı iyi gelişmemiştir. Kistleri 6-7 µm boyutlarındadır.

*Giardia psittaci*: Psittaciformes (muhabbet kuşu, papağan vb.) ordosu üyesi kuşlarda bulunmaktadır. Yaklaşık 14 µm boyutunda armut şeklinde olan trofozoitler, pençe şeklinde orta cisime sahiptir. Ayrıca trofozoitlerde ventro-lateral yaka bulunmamaktadır. Kistleri yaklaşık 6 µm boyutundadır.

*Giardia microti*: Kemirgenlerde bulunan türdür. 12 -15 µm boyutlarında olan trofozoit *G. intestinalis*'e benzer. Kistleri 6-8 µm boyutlarındadır.

Çizelge 2.1. *Giardia* türleri (Adam,2001)

| <b><i>Giardia</i> Türleri</b> |                             |                                                |                                                       |                                                                                 |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tür</b>                    | <b>Konaklar</b>             | <b>Morfoloji</b><br><b>Işık Mikroskobu</b>     | <b>Elektron Mikroskobu</b>                            | <b>Moleküler veri</b>                                                           |
| <i>G. agilis</i>              | Amfibiler                   | Uzun ve silindirik. Orta cisim damla şeklinde  |                                                       | -                                                                               |
| <i>G. muris</i>               | Ratlar                      | Kısa ve yuvarlak. Orta cisim kısa ve yuvarlak. |                                                       | Filogenetik olarak <i>G.intestinalis</i> 'den uzak                              |
| <i>G. intestinalis</i>        | İnsan ve birçok memeli      | Armut şeklinde. Orta cisim pençe şeklinde      |                                                       | Bir çok farklı genotipi bulunmaktadır.                                          |
| <i>G. ardea</i>               | Balıkçılarda                | <i>G. intestinalis</i> 'e benzer               | Ventral disk ve kaudal kamçı <i>G.muris</i> 'e benzer | Filogenetik olarak <i>G.intestinalis</i> 'e <i>G. muris</i> 'den daha yakındır. |
| <i>G. psittaci</i>            | Kuşlar                      | <i>G. intestinalis</i> 'e benzer               | Ventro- Lateral yaka gelişmemiş. Uç oluk yok.         | -                                                                               |
| <i>G. microti</i>             | Tarla faresi<br>Misk faresi | <i>G.intestinalis</i> 'e benzer                | Kist iki adet trofozoit ve olgun ventral disk içerir. | Filogenetik olarak <i>G. intestinalis</i> 'e benzer                             |

## 2.2. MORFOLOJİ, YAŞAM DÖNGÜSÜ VE BİYOLOJİSİ

### 2.2.1. Morfoloji

*G. intestinalis*'in iki formu bulunmaktadır. Bunlar; Parazit olarak yaşayan trofozoit formu ile olumsuz çevre koşullarına dayanıklı, aynı zamanda enfeksiyonun bulaşmasını sağlayan kist formudur.

#### 2.2.1.1. Trofozoit Formu

*G. intestinalis* insanda bulunan bileteral simettrili, tek parazitik organizmadır. Parazitin trofozoit evresi gözyaşı veya boyuna ikiye bölünmüş armut şekli olarak tarif edilmektedir (Daldal ve Özensoy, 1997; Göçmen,2000; Adam,2001). Organizma yaklaşık olarak 9- 21  $\mu\text{m}$  boyunda, 5- 15  $\mu\text{m}$  eninde, 2-4  $\mu\text{m}$  kalınlığında, dorsal yüzü konveks, ventral yüzü konkav, dorsoventral basık olup, önden yuvarlak ve geniş, arkaya doğru gittikçe daralır ve arka uçta sivri olarak sonlanır (Daldal ve Özensoy, 1997). Kalınca ve geniş olan ön ucun ventral düz yüzeyi geleneksel olarak vantuz veya çekmen olarak isimlendirilen bir yapışma diski (emici disk) şekillendirir (Göçmen 2000).

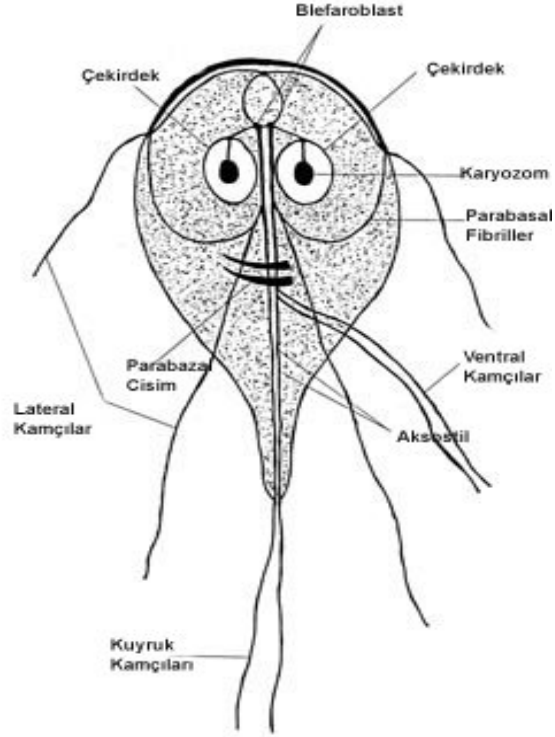
Genel olarak hücre iskeletini, orta cisim, 4 çift kamçı ve yapışma diski oluşturur (Adam, 2001). Yapışma diskinin arkasında vücut uzunluğunun  $\frac{1}{4}$ ' ü kadar olan iki oval nukleus, orta cisim, iki nukleus arasında 8 adet kamçının çıktığı simetrik yerleşimli 8 adet kamçı kaide cisimciği (blefaroblast) bulunmaktadır. Bu kamçılardan lateral kamçı çifti doğrudan vücudun iki yanından çıkar, dorsal kamçı çifti çapraz yaparak yapışma diskinin ön tarafından çıkarak dorsalaterale doğru uzanır. Ventral kamçı çifti yapışma diskinin arka ucunda vücuttan çıkarken, posterior kamçı çifti ise orta blefaroblastlardan kalın iki aksonem olarak çıkmakta vücudun en arka kısmından serbest kalarak geriye doğru uzanmaktadır (Şekil 2.1) (Göçmen, 2000; Daldal ve Özensoy, 1997).

Orta cisim olarak adlandırılan merkezi mikrotübüler yapılar bir ya da iki tane olup fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Orta cisimlerin sayısı ve şekli *Giardia* cinslerinin tür ayırımında kullanılmaktadır. *G. intestinalis*'in orta cisimleri pençe şeklinde ve iki adettir (Daldal ve Özensoy, 1997; Ankarklev et al, 2010).

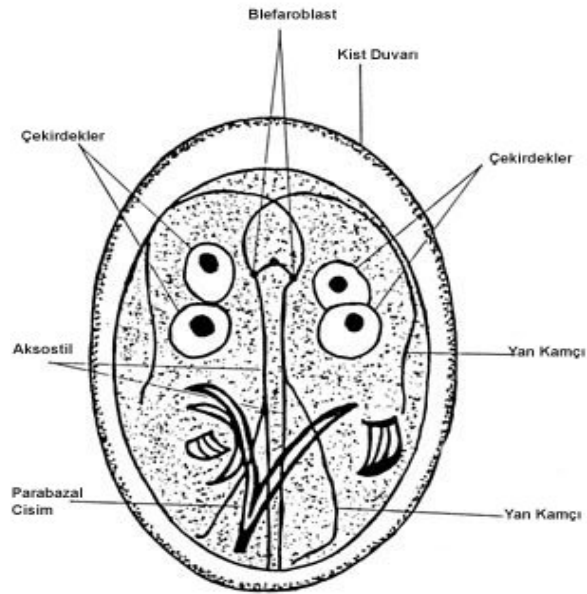
#### 2.2.1.2. Kist formu

*G. intestinalis*'in kistleri 8-12  $\mu\text{m}$  uzunluğunda, 7-10  $\mu\text{m}$  genişliğinde oval, sitoplazmaları ince granüllü yapıdadır. Kist içinde orta cisimler, emici disk, kamçı ve diğer hücre organel

kalıntıları ile bir uçta toplanmış 2-4 nükleus yer alır (Şekil 2.2) (Orhan, 1987; Kurman ve Altıntaş,1996).



Şekil 2.1. *G. intestinalis* trofozoitinin dorsal yüzden görünüşü (Daldal ve Özensoy,1997)



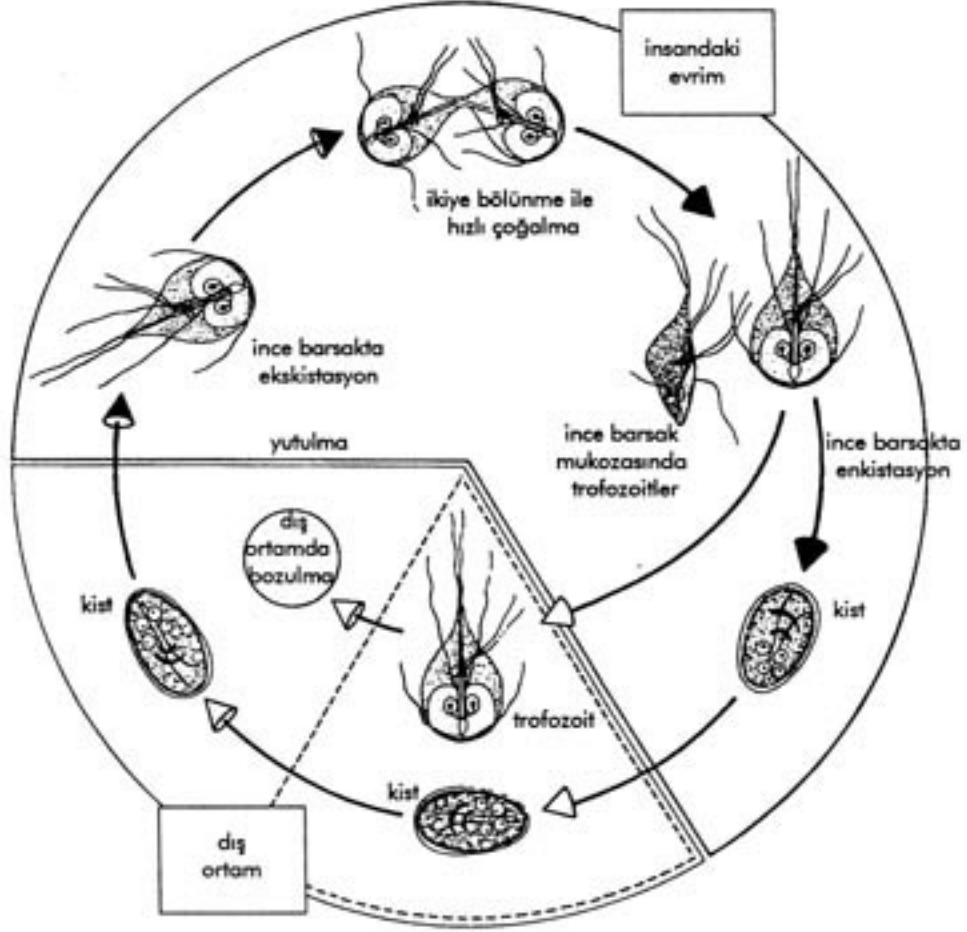
Şekil 2.2. *G. intestinalis*'in kist şekli (Daldal ve Özensoy,1997)

### 2.2.2. *G. intestinalis*'in Yaşam Döngüsü

Monoksen bir parazit olan *G. intestinalis*'in konak zinciri yaşadığı konağın bir bireyinden diğerine sürüp gitmekte, yaşam döngüsü trofozoit ve kist dönemlerinden geçmektedir (Orhan,1987). Trofozoitler yapışma diskleri ile insanlarda duodenum, jejunum ve ileumun üst kısmına yapışıp kolonize olmaktadır (Meyer, 1994; Thompson et al, 1993; Kurman ve Altıntaş, 1996). Trofozoitler ortadan ikiye bölünerek aseksüel olarak çoğalırlar ve bağırsak epiteline yapışarak gerekli olan besin maddelerini konak hücreden alırlar. Bu evre, parazitin hastalığa neden olduğu evresidir (Daldal ve Özensoy, 1997; Ankarklev et al 2010). Şiddetli enfeksiyonlarda her hücrenin serbest yüzeyi parazitlerle kaplanabilir. Trofozoitler bağırsak epitelinden ayrıldığında, peristaltik hareketlerle ilerleyerek dışkı ile dışarı atılabilir. Böylece sulu dışkılarda trofozoitler saptanabilir. Bağırsaklardaki geçiş süresinin kısaldığı diyareli dışkı örneklerinde genellikle trofozoitler saptanırken, geçiş süresinin uzun olduğu şekilli dışkı örneklerinde kist formları gözlenir (Meyer, 1994).

Trofozoitlerin, kist formuna transformasyonuna enkistasyon denir. Enkistasyon, trofozoitler ince bağırsağın son bölümlerine sürüklendiklerinde veya göç ettiklerinde safra tuzlarının etkisi, düşük kolesterol düzeyi ve ortamın pH'si gibi konağa özgü faktörlerin etkisiyle başladığı ve uzun bir sürede tamamlandığı bildirilmiştir (Thompson et al, 1993; Lauwaet et al,2007; Erlandsen et al, 1996). Enkistasyon temel olarak iki ana evrede oluşmaktadır. İlk evrede, enkistasyon için gerekli olan protein, kist duvarı bileşenleri gibi moleküller sentezlenir. Bu aşamada golgi benzeri yapılar gözlenmektedir. İkinci evrede morfolojik değişimler gözlenir (Erlandsen et al, 1996). Enkistasyonun başlarında kamçılar kısalıp hareketi yavaşlamakta, sitoplazma yoğunlaşmaktadır. Parazit, yapışma diskinin parçalanmasından dolayı epitel hücrelere tutunma özelliğini kaybeder (Palm et al, 2005) ve metabolik olarak durgunluğa girer (Paget et al, 1998). Sonuçta iki nukleuslu trofozoitten iki nukleuslu, kalın duvarlı bir kist oluşur. Kist içindeki her bir nukleus bölünerek dört nukleuslu kisti oluşturur (Daldal ve Özensoy, 1997).

Oluşan kistler, dışkı ile dışarı atıldıktan sonra uygun sıcaklık ve nemde aylarca canlı kalabilmektedir (Bingham et al, 1979). Kistler, uygun konak tarafından sindirim yolu ile alındığında; mide asidi, pankreas salgıları ve düşük CO<sub>2</sub> gibi faktörlere bağlı olarak incebağırsakta açılır (Baucher ve Gillin, 1990; Meyer, 1994; Gillin et al, 1996). Bu olay, enkistasyonun tersine çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir (Buchel et al, 1987; Coggins ve Schaefer,1984;1986).



Şekil 2.3. *G. intestinalis*'in yaşam döngüsü (Daldal ve Özensoy, 1997)

Ekskistasyon sırasında kist duvarında açılan ilk delikten kamçılar çıkmakta bunu takiben hücre dışarı çıkmaktadır (Buchel et al, 1987). Kist duvarının degrades olmasında sistein proteazların rol oynadığı bildirilmiştir (Ward et al, 1997). Kistten çıkan trofozoit dört nükleuslu ve oval yapıdadır. Daha sonra trofozoit daha yuvarlak bir yapı alır ve hücre bölünmesi geçirir. Böylece bir tane kistten iki adet trofozoit oluşarak ince bağırsak epiteline ulaşır ve *G. intestinalis*'in yaşam döngüsü tamamlanmış olur (Daldal ve Özensoy, 1997; Orhan 1987) (Şekil 2.3).

#### 2.2.2.1. *G. intestinalis*'in Konakları

*G. intestinalis*'in konağı insan olup bunun yanında kunduz, köpek, tilki, kedi, lemur, maymun, goril, sığır, manda, at, alpaka, koyun, keçi, geyik, karaca, kanguru, çinçilya, domuz, tavşan, kobay, ev faresi, misk faresi, yunus, fok, deniz aslanı gibi memeli hayvanların yanı sıra;

ördek ve kaz gibi sucul kuşlarda, bazı tatlı su balıklarında klasik ve moleküler yöntemler ile türe ait örnekler saptanılmıştır (Adam, 2001; Traub et al, 2005; Cacciò ve Ryan, 2008; Thompson et al, 2008; Volotao et al, 2008; Monis et al, 2009; Plutzer ve Tomor, 2009; Geurden et al, 2010).

### **2.2.3. Hücre Biyolojisi**

#### **2.2.3.1. Trofozoit**

##### **2.2.3.1.1. Nükleer Yapı ve Çoğalma**

*G.intestinalis*'in trofozoitlerinin görünür halde bulunan ve aynı boyutlara sahip transkripsiyonel olarak aktif iki adet nükleus bulunmaktadır (Wiesehahn et al, 1984). *In situ* hibridizasyon rDNA problemleri kullanılarak yapılan çalışmalar, iki nükleusunda yaklaşık olarak eşit sayıda rDNA genine sahip olduğunu göstermiştir (Kabnic ve Peattie, 1990). Daha sonra yapılan çalışmalar bu görüşü desteklemiştir. *G.intestinalis*'in bu özelliği ile diğer iki nükleus taşıyan, örneğin; *Tetrahymena* ve *Paramecium* gibi tek hücreli canlılarınkinden farklı olduğu bilinmektedir (Prescott, 1994). Bu organizmaların sahip olduğu mikronükleus transkripsiyonel olarak aktif değildir. Mikronükleus, makronükleus tarafından şekillendirilir. *Giardia* spp ve diğer diplomonadlarda gözlenen aktif iki nükleus özgün bir özellik olup diğer gruplardan ayırt edici bir niteliktedir (Adam, 2001).

Yüksek ökaryotlarda kolayca gözlenen ve rRNA (ribozomal RNA) sentezi yapan ve ribozom alt birimlerinin birleşmesini sağlayan esas itibarıyla ribonükleoproteinlerden oluşan nükleolus, *Giardia* türlerinde ayırt edilememektedir (Adam, 2001). Bu durum *G. intestinalis*'de rRNA transkripsiyonunun ve işlevlerinin nükleusun belirli bir bölgesinde yapılmadığını düşündürmektedir (Narcisi et al, 1998).

Hücresel bölünme sırasında nükleuslar hücrenin kenarlarına doğru hareket eder ve bunu takiben nükleer bölünme gerçekleşmektedir. Sonuçta 4 nükleuslu trofozoit oluşmakta, trofozoitin boyuna bölünmesiyle de yavru hücreler meydana gelmektedir (Filice, 1952; Cerva ve Nohynkova, 1992; Kabnic ve Peattie, 1990; Daldal ve Özensoy, 1997). Yavru hücrelere aktarılan nükleuslardan bir tanesi eski nükleus diğeri ise yeni nükleustur (Yu et al, 2002). Diğer ökaryotlardan farklı olarak mitoz bölünmenin telofaz safhası *Giardia* genusunda daha uzamış ve hücre bölünmesi yavaşlamıştır (Sagolla et al, 2006).

##### **2.2.3.1.2. Eşeyli Üreme**

*Giardia* türlerinde eşeyli üreme hiçbir zaman gözlenmemiş olmasına karşın eşeyli üreyebilme potansiyeli üzerine bazı kanıtlar bulunmaktadır (Cacciò ve Sprong, 2009; Ankarklev et al, 2010).

*Giardia* türlerinde potansiyel olarak eşeyli üreme özelliği olup olmadığı üzerine ilk araştırma Ramesh ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Ramesh ve arkadaşları *G. intestinalis* genomunda mayotik çoğalmayla ilgili diğer ökaryotlarda da bulunan genleri araştırmışlardır. Genel olarak ökaryotik hücrelerde mayozla ilgili olarak 5 gen (Dmc1, Spo11, Mnd1, Hop1 ve Hop2) bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar bu genlerin *Giardia* türlerinde de bulunduğu gösterilmiştir (Cacciò ve Sprong, 2009).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, Dcm1 geni ile homolog olan iki gen (Dcm1a ve Dcm1b) ve Spo11 ve Hop1 genleri ile homolog bir tane genin mayozla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu üç genin enkistasyon (kist oluşumu) ve ekskistasyon (kistin açılması) sırasında genetik materyal aktarımında görev alabileceği düşünülmüştür (Melo et al, 2008). Bu durum *Giardia* türlerinde eşeyli bir üremenin gerçekleşebileceğine dair kanıt olarak sunulmaktadır (Ankarklev et al, 2010). Ancak birçok mayotik bölünmede ve süreçlerden sorumlu genler ve proteinler [(Muts homolog 4 (Msh4), Mutl homolog 3 (Mlh3), mayotik bölünme proteini 8 (REC8) ve kardeş kromatit uyum proteini (pDs5)] *Giardia* türlerinde bulunamamıştır (Malik et al, 2008).

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile epizomal plazmid probu kullanılarak yapılan çalışma sonucunda enkistasyon sırasında epizomun diğer nukleusa transfer olabileceği gösterilmiş ancak nukleer bir birleşme veya nukleer bir bölünme olup olmadığı saptanamamıştır (Poxleitner et al 2008).

Eşeyli üreyen organizmalarda allelik hetrozigotluk derecesi mayoz bölünmeden dolayı kural olarak düşüktür. Ancak bu oran eşeysiz üreyen organizmalarda oldukça yüksektir (Welch ve Meselson, 2000). *Giardia* spp eşeysiz ürettiği bilindiği için allelik heterozigotluk derecesinin yüksek olduğu düşünülmekteydi. Bunun tam tersine yapılan çalışmalar, *G. intestinalis*'in düşük allelik hetrozigotluk gösterdiğini ortaya koymuştur. Düşük derecedeki allelik heterozigotluğun nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Sonuç olarak bu durum *Giardia* türlerinde tanımlanmamış bir eşeyli üreme olabileceğini düşündürmektedir (Adam, 2001)

#### 2.2.3.1.3. Hücre İskeleti ve Hareket

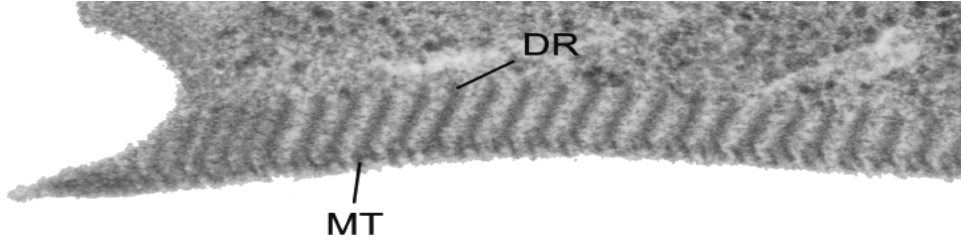
*Giardia* türlerinde iskelet yapısı mikrotübüllerden yapılmış ventral disk; (yapışma diski), bazal cisimler, aksonemler ve kamçı; orta cisimler; kuyruk aksonemleri ile ilişkili fibriller olmak üzere dört organel grubundan oluşmaktadır (Daldal ve Özensoy, 1997).

*Giardia*, trofozoitlerinde bulunan konkav yapılmış ventral disk ile diğer tüm kamçılı organizmalardan ayrılır. Bu organel sayesinde, konak hücrenin ince bağırsak yüzeyine tutunarak gerekli olan besin maddelerini alır (Daldal ve Özensoy, 1997; Adam, 2001). Ventral disk sadece ince bağırsak duvarına tutunmayı sağlamakla kalmaz aynı zamanda aksenik kültürde ortama tutunmasını da sağlamaktadır (Adam, 2001).

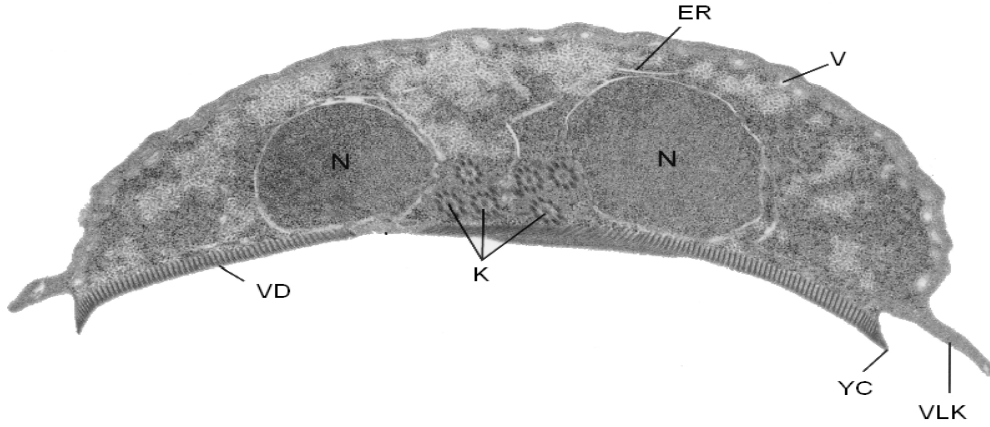
Ventral disk 0,4  $\mu\text{m}$  derinlikte içbükey bir yapı olup trofozoitin ventral yüzeyinin yaklaşık 2/3'nü kaplar. Esnek olan dış kısım diski çevreler ve kenarlara doğru daralır (Erlandsen ve Chase, 1974). Disk kontraktıl proteinler; aktinin,  $\alpha$  aktinin, miyosin ve tipomiyosin içermektedir (Feely ve Erlandsen, 1982). İnce yapı olarak ventral disk ventral membrana bağlı ve 13 protofilamentten oluşan mikrotübül kümesi içerir (Adam, 2001). Ventral diskten dorsal olarak sitoplazmaya mikro şeritler uzanmaktadır. ( Şekil: 2.4) Bunlar karşılıklı köprüler ile birbirine ve ayrıca plazma membranına komşu olan mikrotübüllere ventral olarak bağlanmaktadır. Diskin dışarı çıkıntı yapan kenarı, fibröz yapıdan oluşmuş ve sitoplazma mebranının yan çıkıntısına sıkıca bağlanmaktadır (Peattie, 1990).

Mikrotübül inhibitörlerinin ve kontraktıl proteinlerin inhibisyonu in vitro yapışmayı azalttığı bildirilmiştir (Kateleris et al, 1995; Adam, 2001), ayrıca lektine spesifik D- mannozil ve D- glikozil içeren monosakkarit ve glikoproteinlerin, yapışmayı inhibe etmesi, konak reseptörlerine bağlanma fonksiyonu olduğu düşünülen lektinlerin yapışmada rolü olduğunu göstermiştir (Inge et al, 1988; Kateleris et al, 1995). Ancak *G. intestinalis* trofozoitleri reseptörlere bağlanmanın söz konusu olamayacağı cam veya plastik gibi kültür ortamı yüzeylerine tutunabilmesi, bununla beraber iskelet fonksiyonu inhibisyonun, lektin inhibisyonuna göre tutunmayı daha fazla etkilediği gösterilmiştir. Sonuç olarak trofozoitlerin bağırsak duvarına tutunmasında emici disk ve iskelet yapı elemanlarının, reseptöre bağlanmadan çok daha önemli olduğu belirlenmiştir (Kateleris et al, 1995; Thompson et al, 1993). Bu nedenle hücre iskeleti ve özellikle ventral disk organizmanın, konak ince bağırsağında hayatta kalmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Adam, 2001).

*Giardia*'da en önemli iskelet yapı proteini tubulin olduğu, ayrıca ventral disk mikro şeritlerinin giardin denilen protein içerdikleri bildirilmektedir. Tubulin proteini mikrotübüllerin yapısında bulunurken mikro şeritlerin yapısında bulunmamaktadır. Benzer şekilde giardin proteini mikro şeritlerin yapısında bulunurken mikrotübüllerin yapısında bulunmamaktadır (Peattie et al, 1989; Soltys ve Gupta, 1994). *Giardia*'ya özgü olan giardin proteinleri yalnızca ventral diskte bulunmaktadır.



Şekil:2.4. Ventral diskin bir bölümü. Mikrotübül (MT); Dorsal Ribon,(DR) (Adam,2001)



Şekil 2.5. Trofozoitin koronal kesiti. Nukleus (N), kamçı (K), endoplazmik retikulum (ER), vakuol (V), ventral disk (VD), lateral çıkıntı (YC), ventro-lateral kamçı (VLK) (Adam,2001)

Giardin proteinleri alfa heliks yapıda olup moleküler ağırlıkları 29-38 kDa arasında olduğu gösterilmiştir (Peattie, 1990). Yapılan çalışmalar tubulin ve giardin proteinlerinin kemoterapötik ajanlar için iyi bir hedef olabileceğini göstermiştir (Edlind et al,1990; Chen et al, 1992; Thompson et al, 1993).

Trofozoitlerde dört çift kamçı bulunmaktadır. Kamçılar trofozoitin anterior, posterior, kaudal ve ventral bölgelerinden çıkmaktadır (Şekil: 2.2). Kamçılar diğer ökaryotik organizmalarda olduğu gibi iki mikrotübülün etrafını çeviren dokuz çift mikrotübülden oluşmaktadır (Şekil 2.5). Trofozoitlerin hareketi çok tipik olup sıçrama ve bükülme şeklindedir. Bu hareket düşen bir yaprağa benzetilmektedir (Saygı,1998). Kamçılar trofozoitlerin hareketinde önemli rol oynamasına karşın konağın ince bağırsak duvarına tutunmada etkili olmadıkları bildirilmiştir (Adam, 2001).

#### 2.2.3.2. Kist

*G. intestinalis*'in kistleri 8-12  $\mu\text{m}$  uzunluğunda, 7-10  $\mu\text{m}$  genişliğinde oval veya eliptik şekildedir. Kistler kalınlığı 0,3- 0,5  $\mu\text{m}$  olan iki tabakalı bir kist duvarına sahiptirler. Bu duvar, dışta ana yapısı N-asetil galaktozamin (N-AGA) olan fibröz proteinöz bir yapıdan, iç tarafta ise plazma membranından oluşmaktadır (Daldal ve Özensoy, 1997 ). Kist duvarının dış kısmı 7-20

nm uzunluğundaki filamentler ile örülüdür (Erlandsen et al,1989; 1990). Bu bölgede dört temel protein ayırt edilmiştir (Erlandsen et al,1990).

Kistlerin sitoplazmaları ince granüllü yapı göstermektedir. Kist içinde orta cisimler, kamçılar, aksonemler ve emici diskin kenarlarını destekleyen fibriller fark edilebilir. Nükleer bölünmenin tamamlanmasına bağlı olarak 2-4 nükleus bir uçta toplanmış olarak bulunur (Unat,1995; Daldal ve Özensoy, 1997). (Şekil 2.2) Dört nükleuslu olgun kistler parazitin bulaşmasını sağlayan infektif formudur (Saygı,1998).

#### 2.2.4. Biyokimyasal Yapı ve Metabolizma

*Giardia*'da nuklei, ribozomlar ve lizozomal vakuoller, multiple linear kromozomlar olduğu belirtilmiştir. *Giardia*'da mitokondri, peroksizomlar ve nukleoli noksan olup, çok basit intrasellular organizasyonlar olduğu bildirilmiştir. Trofozoitlerde golginin eksikliği vardır fakat enkistasyon sırasında golginin görülebileceği ifade edilmiştir (Adam, 2001; Marti et al, 2003a, 2003b ; Thompson, 2004).

*Giardia* genusundaki organizmaların anaerobik metabolizmaları olup, bunların substrat düzeyinde fosforilasyon, demir-sülfür protein ve flavoprotein kullanarak, enerji sağlanması için elektron transportu için aracılık ettikleri belirtilmiştir. *Giardia*'da mitokondri ve mikrobodilerin noksan olduğu fakat ferritin toplanması ve asit fosfataz ve aryl sulfatase ile gerçekten boyanan lizozoma benzer organeller içerdiği bildirilmiştir (Garcia, 2005).

Mevcut olan fosfolipidlerin; fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilgliserol, fosfatidilfosfatidilinozitol, fosfatidilserin ve sfingomiyelin olduğu belirtilmiştir. Mevcut nötral lipidlerin, steroller, mono-, di- ve triaçilgliseridleri kapsadıkları, yağ asitlerinin ise fosfo ve nötral lipidleri kapsadıkları saptanmıştır. Artan doymamış yağ asidi ve depolanan lipidlerin birikimi, parazitin kist formuna değişimi ile tutarlı olup, böylelikle konak dışında yaşabildikleri belirtilmiştir. Trofozoitlerde, nükleik asit gereksinimlerinin, pirimidin, pürin ve diğer nükleozidler ile karşılandığı bildirilmiştir (Garcia, 2005).

Çoğu ökaryotik organizmada olduğu gibi enerji üretimi temel olarak aerobik metabolizmaya dayanmaktadır. Ancak *Trichomonas* spp., *Entamoeba* spp. ve *Giardia* spp gibi bazı ökaryotlarda mitokondri ve sitokrom elemanları eksiktir. Bu özellikleri nedeniyle ortamda oksijen olsa bile fermentatif bir metabolizma ile enerji üretmek zorundadırlar. Bu organizmalar fosfat düzeyinde fosforilasyon yaparak glikozu yıkıma uğratırlar. Bu reaksiyonlarda glikoz, karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve suya (H<sub>2</sub>O) tamamıyla okside olmamakta, bunun yerine kısmen asetat, etanol, alanin, ve CO<sub>2</sub> son ürün olarak oluşmaktadır (Adam, 2001).

*Giardia*'nın glikozu sadece bir karbon kaynağı olarak kullanmadığı, *Giardia* trofozoitlerinin büyümesi ve gelişmesi için mutlaka glikoza ihtiyaç olduğu bildirilmiştir. Glikozun respirasyonu desteklediği, eksogenous glukozun varlığında *Giardia* trofozoitlerinin, organik son ürünler olarak

etanol ve asetat ürettiği bildirilmiştir. Aerobik olarak, etanolden 6 kat daha fazla asetat ve anaerobik olarak asetatdan iki kat fazla etanol üretildiği belirtilmiştir. Her iki durumda da sadece karbondioksit gazı son ürün olarak saptanmıştır. Karbondioksit modeline dayalı olarak kültür çalışmaları, *Giardia* trofozoitlerinin preform lipidleri içeren isoprenoid yağları yeniden sentez etme kapasitesi olduğunu göstermiştir. Ayrıca steril esterler'in enkistasyon sırasında fazla olduğu ve enkistasyon süresince miktarlarının yükseldiği, bu sırada trigliseritlerin düşük olduğu bildirilmiştir (Ellis et al, 1996; Gibson et al, 1999).

Birçok çalışmada *Giardia*'nın üretilmesinde 30–50 mM glikoz içeren besi yerlerinden yararlanıldığı bildirilmiştir. Glikoz konsantrasyonunun 50 mM'den 10 mM ye indirilmesinin trofozoit gelişiminde, alanin, etanol ve asetat gibi ürünlerin oluşumunda biraz etkili olduğu saptanmıştır. Glikozun 10 mM'den daha az azaltılması halinde etanol miktarında belirgin bir azalma, alanin miktarında ise biraz azalma gözlenmiş, asetat miktarında ise hiç bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Glikozun ilave edilmediği besi yerinde trofozoitler büyümeye devam etse de, 50 mM glikozun yarı miktarının mutlaka gerektiği bildirilmiştir. Bu durumlarda gerekli olan glikoz miktarının besi yeri içeriğine ve miktarına bağlı olarak 2-3 mM olduğu saptanmıştır (Schofield et al, 1991; Schofield ve Edwards, 1994). Glikoz miktarının az olduğu besi yerinde trofozoitlerin üremesi ve glikozun azalması, glikoz metabolizması esnasında karbonun değişimi hakkında bazı önemli sonuçları ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlardan biriside etanol, alanin, asetat üretiminde piruvatın merkezi bir rolünün olduğunun tahmin edilmesidir. Glikoz seviyesinin yok denecek kadar az bir seviyeye düşürülmesi ile etanol üretiminin % 95'e düştüğü bildirilmiştir. Bu seviyedeki glikozun ise asetat üretimine hiçbir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Schofield ve Edwards 1994).

*Giardia*'da katabolik aşamalar oksijen miktarına da hassastır. Hızlı bir şekilde anaerobik ortamdan aerobik ortama geçişin, son ürün oluşumunda büyük değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir. Anaerobik ortamda etanol, alanin ve karbondioksit miktarlarının yaklaşık olarak eşit molar konsantrasyonda olduğu gözlemlenmiştir. Aerob ortamda ise, çözünen oksijen miktarı 3 mM gibi düşük bir konsantrasyon da olsa bile karbon dengesinin önemli ölçüde değiştiği bildirilmiştir (Schofield ve Edwards 1994).

Enkistasyon ve ekskistasyon aşamasında görülen çok sayıda metabolik değişikliğin ortak olduğu gözlemlenmiştir. Enkistasyon sırasında oksijen tüketiminin başlangıçta arttığı fakat sonradan azaldığı saptanmıştır. Glikozdan pürüvat aracılığı ile asetat, alanin ve etanol olduğu bildirilmiştir (Tamer ve diğerleri, 2009).

*Giardia* metabolizmasında çok sayıda amino asitin önemli rol oynadığı görülmüştür. En önemli aminoasitlerin alanin ve arginin olduğu belirtilmiştir. Alanin'in *Giardia* metabolizmasının en büyük uç ürünü olduğu saptanmıştır. Trofozoit gelişiminin ilk safhaları sırasında, en büyük uç ürün olarak hem etanol hem de asetat olduğu bildirilmiştir. *Giardia*'ya ait alanin

aminotransferaz saptanmış, enzimin aktivitesinin trofozoitin büyümesi sırasında hücre sayısı ile orantılı olarak arttığı ifade edilmiştir (Schofield ve Edwards 1994).

Besi yerinde argininin ilk iki gün içinde ortamda azalması buna bağlı olarak trofozoitlerin büyümesinin durduğu gözlemlenmiştir. Besi yerinde bu hızlı kullanılmanın, argininin enerji kaynağı olarak belli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Normal besiyerinin 2-3mM arginin içerdiği fakat 5-10mM arginin ilavesi ile ilk 2 günden sonra trofozoitlerin üremesinin hızlandığı saptanmıştır. Bu yüksek konsantrasyonlarda bile bütün arginin ilk 2 gün içinde kullanıldığı bildirilmiştir. Arginin metabolizmasının son ürünü olarak amonyak ve ornithinin olduğu gözlemlenmiştir. Arginin besi yerinden uzaklaştırılması hücre üretiminin azalmasına yol açtığı bildirilmiştir. Arginin katabolizmasından ATP oluşumunun glikozun katabolizmasından 7-8 kat fazla olduğu saptanmıştır. Böylelikle arginin ATP üretiminin en büyük kaynağı olduğu gösterilmiştir (Schofield ve Edwards 1994).

Birçok ökaryotik parazit gibi *Giardia*'nın da sınırlı metabolik yapı sergilediği bildirilmiştir. Bütün olarak tRNA sentetaz var olduğu halde amino asit metabolizması bile çok sınırlıdır. Lipid metabolizması için *Giardia* genomu içerdiği enzimler fosfolipidlerin değişiminde ve modifikasyonunda olduğu gibi, sınırlı sayıda yağ asitlerinin uzantısına ve sfingomiyelin toplanmasına neden olabileceği bildirilmiştir. Her ne kadar, lipidlerin yeni baştan sentezi için yeterli değilseler de bu enzimlerin membran bileşenlerinden biçimlenmesine izin verebilecekleri belirtilmiştir (Morrison et al, 2007).

## **2.2.5. Genetik Yapı ve Moleküler Biyoloji**

### **2.2.5.1. Genom Yapısı**

*G. intestinalis*'in genom yapısı, diğer ökaryotik organizmalarda da olduğu gibi linear kromozomlara ve diğer ökaryotlara benzer telemeraz sekanslarına sahiptir (Adam, et al, 1991; Le Blancq et al, 1991a). Ökaryotların kromozomal DNA'ları dört adet histon proteini ile ilişkilidir. *G. intestinalis*'de bulunan histonlar diğer ökaryotik organizmalar ile benzer özellikler göstermektedir ve Archaea üyelerinde bulunan histon benzeri proteinler ile hiçbir benzerlik göstermemektedir (Wu et al, 2000). "Pulsed-field gel electrophoresis" (PFGE) yöntemi ile yapılan çalışmalar *G. intestinalis*'in boyutları 1,6 ile 3,8 Mb arasında değişen beş kromozoma sahip olduğu göstermiştir. *Giardia*'nın tüm genomu yaklaşık olarak 11,7 Mb boyutlarındadır (Adam, 2000).

### 2.2.5.2. Transkripsiyon ve Translasyon

*G. intestinalis* transkripsiyona açık bir şekilde ökaryotik organizasyondur. Ancak birkaç özelliği prokaryotik karakter taşımaktadır. Bazı prokaryotik özellikler transkripsiyon sonrası RNA'nın olgunlaştırılma aşamasında kendini göstermektedir. 5' translasyona uğramayan bölge (UTR=untranslated region) genel olarak intron bulundurmayıp tipik olarak prokaryotlara ait bir özelliktir. Bununla beraber diğer ökaryotların tersine kısa genlerin transkripsiyonu sonrası 5' ucuna kep eklenmemektedir. Fakat daha uzun nükleotit dizisine sahip genlerin 5' UTR ucuna kep eklenmektedir (Adam, 2000).

Transkripsiyon sonrası, RNA'nın 5' ucunun fosforilasyona uğradığı ancak kep eklenmediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Poliadenile edilmiş RNA'larda 5' ucunda 7 metil guanozin veya başka bir kep bulunmamaktadır (Adam, 2000).

Transkripsiyon sonrası RNA'nın 3' ucuna Adenin nükleotitlerinden oluşan bir poli A kuyruğu eklenir. Poli A kuyruğu yaklaşık 10 nükleotitten oluşur ve poliadenilasyon sinyalini oluşturur. Bu işlemler tipik olarak ökaryotik organizmalarda gerçekleşir (Peattie et al 1989; Adam, 1991).

*G. intestinalis*'in ribozomal RNA (rRNA) molekülü, diğer ökaryotlardaki rRNA'nın 18S'lik küçük alt ünitesinden (SS rRNA) veya 23S'lik büyük alt ünitesinden (LS rRNA) daha küçük olduğu hatta *Escherichia coli*'ye ait 16S ve 23S'lik rRNA molekülünden de küçük olduğu bildirilmiştir (Boothroyd et al, 1987; Edlind et al, 1987). Translasyonla ilgili diğer elemanlar (uzama faktörü  $\alpha 1$ , uzama faktörü  $\alpha 2$ , Eukaryotik salma faktör 1 (eRF1), eRF3, RNA polimeraz II büyük alt ünitesi (RPB1) ve RNA polimeraz III) açık bir şekilde ökaryotik organizmalar ile uyumludur (Adam, 2001).

### 2.2.5.3. *G. intestinalis*'in Moleküler Tiplendirilmesi ve Genotipler

*G. intestinalis* genetik varyasyonlarının araştırılmasında kullanılan hedef gen bölgeleri rRNA'nın küçük subünitesi (ssu-rRNA), beta giardin (bg), glutamat dehidrogenaz (gdh), elongasyon (uzama) faktörü alfa 1 (ef-1), trioz fosfat izomeraz (tpi), GLORF-C4 (*Giardia lamblia* open reading frame C4) genleri ve son zamanlarda genomlar arası rRNA aralık bölgeleri ve alfa tubulin gen bölgeleri yapılan bir çok çalışmada kullanılmıştır (Aydın ve diğerleri, 2004; Caccio et al, 2005; Lee et al, 2006). Bu genlerin genom üzerindeki lokasyonlarının birbirleri ile (A tipi suş) bağlantılı olmayışı genetik çalışmalarda istenilen bir özellik olarak bildirilmiştir. Genlerin lokasyonu; tpi geni 95921 ile 96694 bazları arasında 200,000 baz çiftlik bir parça üzerinde, bg geni 55484 ile 56302 bazları arasında 90,000 baz çiftlik bir parça üzerinde, gdh geni 60579 ile 61928 bazları arasında 231, 000 baz çiftlik bir parça üzerinde, ef-1 geni 40230 ile 41558 bazları arasında 61,000 baz çiftlik bir parça üzerinde, ve C4 geni 68643 ile 69239 bazları arasında 80,000 baz çiftlik bir parça üzerinde bulunmaktadır (Tamer ve diğerleri, 2009).

Pulse field yöntemi ile yapılan kromozom hibridizasyon çalışmaları tpi genini 4. kromozom üzerinde haritalarken rRNA gen kopyalarını genellikle birinci kromozom üzerinde haritalamıştır (Tamer ve diğerleri, 2009).

Dünya çapında, gerek insan gerekse hayvan kaynaklı örneklerle uygulanan gen dizi analizleri ve çeşitli yöntemler ile genlere ait polimorfizimler ortaya konmuştur. Özellikle tpi ve gdh genlerinde polimorfizim oranı yüksektir. Bu açıdan en fazla korunan bölgeler ef-1 ve ssr RNA genleridir (Tamer ve diğerleri, 2009).

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar *Giardia* izolatlarında genetik bir farklılık olduğunu düşündürmüştür. Bu konuda yapılan ilk çalışma (Bertram et al, 1983). 1983 yılında Bertram ve arkadaşları tarafından Zymodeme analizi kullanarak yapılmış ve aynı enzimlerin farklı izoenzim noktaları bulunmuş ve bu durum farklı bir gen kodunun olabileceğini düşündürmüştür. 1985'de Nash ve arkadaşları restriksiyon endonukleaz analizleri ile (RFLP) *Giardia* izolatlarını üç gruba ayırmış ve grup 3'ün grup 1 ve grup 2'den daha farklı olduğunu göstermiştir (Nash et al, 1985). 1992'de Homan ve arkadaşları izoenzim elektroforezi ve DNA sekans analizleri ile *Giardia* izolatlarını 2 gruba ayırmıştır (Polish ve Belgian). 1995'de Mayrhofer ve arkadaşları izoenzim elektroforez yöntemi ile *Giardia* izolatlarını 2 ana gruba ayırmıştır. (A ve B). 1996'da Monis ve arkadaşları glutamat dehidrogenaz gen bölgesini kullanarak *Giardia* izolatlarını iki gruba ayırıp, A ve B grubu olarak isimlendirmiştir. Daha sonraları birçok gen bölgesiyle yapılan çalışmalar önceki birçok çalışma ile paralellik göstermiştir (Paul et al, 2009). Günümüzde diğer birçok memeliden elde edilen *Giardia* izolatları kullanılarak yapılan tiplendirme çalışmaları, insanlardan elde edilen izolatlarda saptanan, temelde 2 ana genotip grubuna ek olarak 5 genotip grubu daha eklemiştir (Adam, 2001).

Çizelge 2.2: *Giardia* genotipleri ve konakları (Adam, 2001)

| Genotip     | Nash Grup | Mayrhofer Assemblage (grup) | Konaklar                                                                     |
|-------------|-----------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Genotip A-1 | 1         | A (1. grup)                 | İnsan, kunduz, kedi, lemur, koyun, sığır, köpek, çinçilya, alpaka, at, domuz |
| Genotip A-2 | 2         | A (2. grup)                 | İnsan ve kunduz                                                              |
| Genotip B   | 3         | B (3. ve 4. grup )          | İnsan, kunduz, kobay, köpek, maymun                                          |
|             |           | C                           | Köpek                                                                        |
|             |           | D                           | Köpek                                                                        |
|             |           | E                           | Sığır, koyun, keçi, domuz, alpaka                                            |
|             |           | F                           | Kedi                                                                         |
|             |           | G                           | Rat                                                                          |

Yapılan çalışmalar; A ve B genotipinin insan dahil birçok memelide; C ve D genotipinin köpeklerde; E genotipinin geniş getiren hayvanlarda; F genotipinin kedilerde; G genotipinin ise ratlarda izole edildiğini göstermiştir (Çizelge 2.2). İnsanda sadece genotip A ve B izole edilmiştir. Diğer genotiplerin insan enfeksiyonu ile ilişkisinin olmadığı yapılan birçok çalışmada açık olarak gösterilmiştir (Monis et al,1999; Sulaiman et al, 2003). Genotip A ve B çeşitli vahşi hayvanlarda ve evcil hayvanlarda bulunabilmektedir. Sekans analizleri ve filogenetik araştırmalar bunların zoonotik potansiyelini belirleyebilmektedir. Özellikle gdh gen bölgesi ile yapılan sekans analizleri A ve B genotiplerinin alt tiplerini ortaya koymuştur (Tamer ve diğerleri, 2009).

Son dönemlerde yapılan DNA tabanlı genotiplendirmeler ile insanlar ve hayvanlardan daha fazla subtiplerin tanımlanmasına olanak vermiş ve aynı zamanda da yapılan subtiplerini doğrulamıştır (Lale et al, 2005; Sulaiman, 2003). Bu çalışmalarda subtipleri tanımlamak için farklı bir terminoloji kullanılmıştır; örneğin A3, A4, A5, veya B1, B2, B3 gibi. (Lale et al, 2005; Sulaiman et al, 2003; Caccio ve Ryan, 2008).

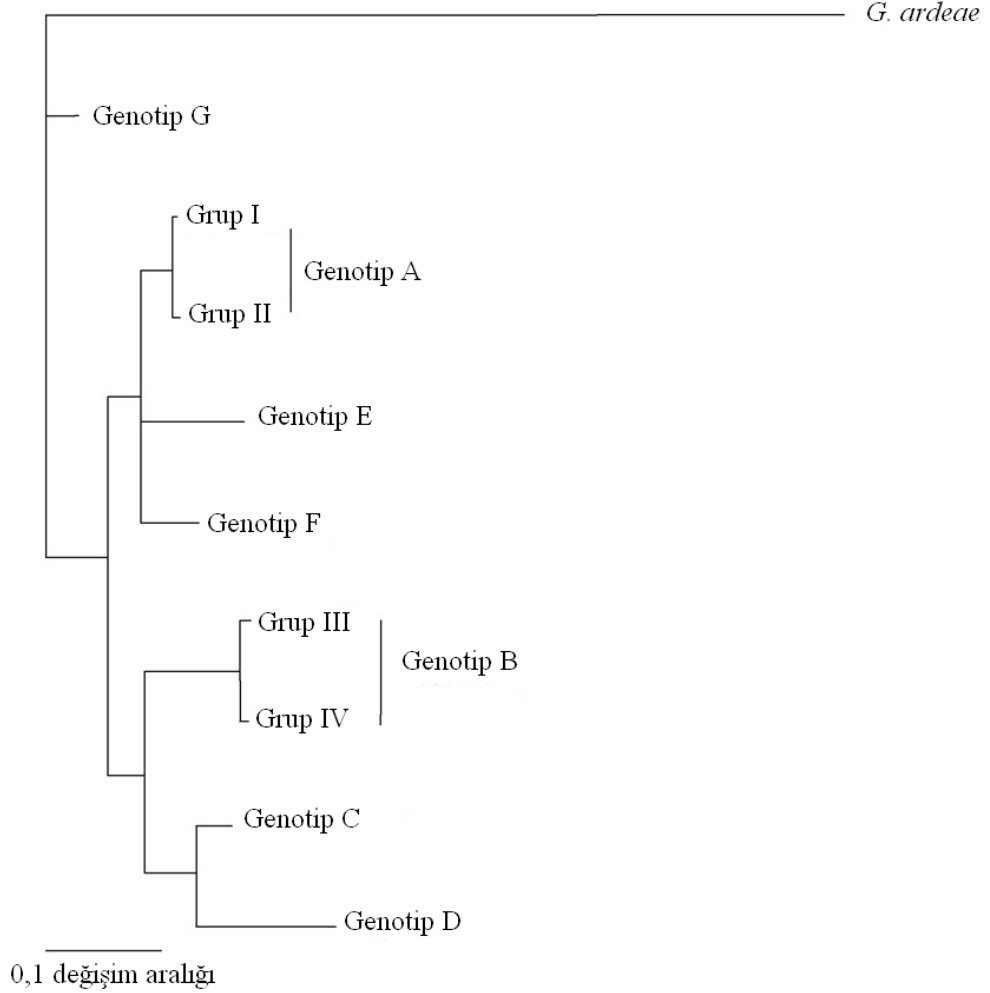
Çizelge 2.3. Vahşi ve evcil hayvanlarda *G. intestinalis* genotipleri (Caccio ve Ryan, 2008)

| Konak                  | Genotip                 | Gen Bölgesi | Metod        |
|------------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| <b>Vahşi Hayvanlar</b> |                         |             |              |
| Kunduz                 | B                       | tpi, bg     | Sekans       |
| Kunduz, fare, tavşan   | B                       | tpi         | Sekans       |
| Geyik                  | A1 ve A <sup>a</sup>    | tpi,bg      | Sekans       |
| Alageyik               | A*                      | tpi,bg      | Sekans       |
| Gelincik               | A1                      | gdh, bg     | Sekans       |
| Tilki                  | A1, A <sup>a</sup> , B3 | Bg          | Sekans       |
| Maymun                 | B4                      | Gdh         | Sekans       |
| Fare                   | A <sup>a</sup>          | gdh, bg     | Sekans, RFLP |
| Manda                  | A1                      | Bg          | Sekans       |
| <b>Evcil Hayvanlar</b> |                         |             |              |
| Kedi                   | A1                      | Gdh         | Sekans       |
| Kedi                   | B4                      | Gdh         | Sekans, RFLP |
| Köpek                  | A1                      | Gdh         | Sekans       |
| Köpek                  | A1,A2, B3/B4            | Tpi         | Sekans       |
| Köpek                  | A1 ve A3                | Bg          | Sekans       |
| Siğir                  | B                       | ssu- RNA    | Sekans       |
| Siğir                  | A2,A3                   | Bg          | Sekans       |
| Siğir                  | A2, B                   | gdh, bg     | Sekans       |
| At                     | A1, A2,B4               | Tpi         | Sekans       |
| Kuzu                   | B4                      | Tpi         | Sekans       |
| Koyun                  | B                       | gdh, bg     | Sekans       |
| Koyun                  | A1                      | Bg          | Sekans, RFLP |

#### 2.2.5.4. *Giardia intestinalis* Genotiplerinin Filogenik İlişkisi

*G. intestinalis* genotipleri üzerine ilk detaylı araştırmayı Monis ve arkadaşları (Monis et al 1999=yeşil 15) gulutamat dehidrogenaz, tiroz fosfat izomeraz, uzama faktörü  $\alpha$  1 ve ribozomal RNA'nın küçük alt ünitesi gen bölgelerini kullanarak yapmıştır. Bu çalışma, enzim elektroforez yöntemi ile tespit edilen genotiplerin farklı evrimsel bir yoldan geldiğini kanıtlar niteliktedir.

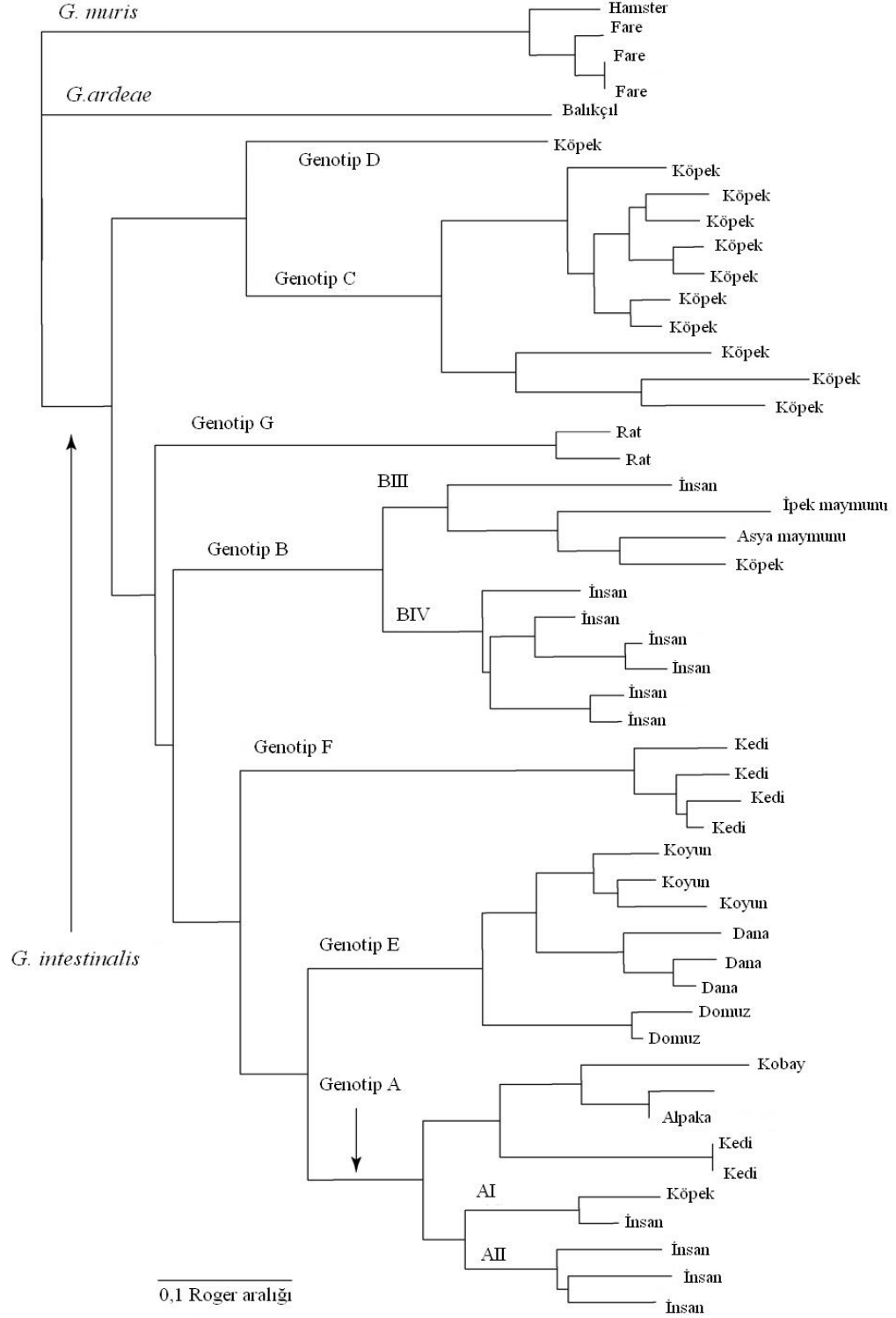
Enzim elektroforez sonuçları ile DNA sekans sonuçları arasında genel olarak bir paralellik söz konusudur. Yapılan detaylı çalışmalar, bazı genotiplerin konak özgüllüğü olduğunu veya bazı konaklarda kısıtlı etki yaptığını göstermiştir (Monis et al, 2009).



Şekil 2.6. *G. intestinalis* genotiplerinin filogenetik ilişkisi (Monis et al, 2009).

Genotiplerin konak özgüllüğü veya belli konaklarda enfeksiyon oluşturmaları yapılan filogenik analizler ve moleküler tiplendirme yöntemleri ile gösterilmiştir. Temel olarak genotip A ve B insanlarda, genotip C ve D köpeklerde, genotip E çiftlik hayvanlarında ve genotip F kedilerde bulunmaktadır. Genotiplerin filogenetik olarak akrabalık dereceleri, bulundukları memeli konaklar arasındaki akrabalık derecesini yansıtmamaktadır. Örneğin; kediler filogenik olarak köpeklere daha yakın olmalarına rağmen geniş getiren hayvanlarda bulunan genotip E kedilerde bulunan genotip F 'ye daha yakın bir akrabalık derecesine sahiptir (Şekil 2.6) Benzer bir şekilde insanlarda bulunan iki genotipin (A ve B) filogenik soy ilişkisi bakımından aynı evrimsel dalda yer alması gerekirken bir birlerinden uzak iki farklı dalda yer almaktadır. Bu

durum konak ile parazitin beraber evriminden ziyade konak özgülüğü ile ilişkili bir durumdur. (Monis et al, 2009).



Şekil 2.7. *G. intestinalis* genotiplerinin filogenetik ilişkisi (Monis et al, 2009)

#### 2.2.5.5 Genotip ile Fenotip Arasındaki Bağını

Genotipler ile fenotipik ilişkileri ilke 1990'ların başlarında gösterilmiştir. A genotipinin aksenik kültür koşullarında B genotipine göre daha iyi uyum sağladığı, bunun tam tersi olarak yavru fare pasajlarında ise B genotipinin A genotipine göre daha iyi uyum sağladığı gözlenmiştir (Andrews et al, 1992). Enfeksiyon ve klinik tablonun gelişimi genotip veya genotip ile çevresel faktörlere bağlı olabilmektedir. Geurden ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada süt ineklerinde A ve E genotipinin oranları bir birine yakın olarak bulunurken kasaplık sığırlarda E genotipi A genotipine büyük bir oranda baskın bulunmuş ve hastalık belirtileri E genotipi ile ilişkilendirmiştir (Geurden et al, 2005).

Yapılan klinik çalışmalar genotip ile hastalık belirtileri arasında bir ilişkinin olabileceğini göstermiştir. Bazı araştırmalarda A genotipi ile semptomlar arasında bağlantı bulunurken bir kısmında ise B genotipi semptomlar ile ilişkilendirilmiştir. Bir kısmında ise A ve B arasında bir fark olmadığı belirtilmiştir. Avustralya'da çocuklarda yapılan araştırmada A genotipi ishal ile ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde Bangladeş'te yapılan çalışmada A genotipi B genotipine göre 2 kat fazla ishal şikayeti ile ilişkilendirilmiştir (Haque et al, 2005). Bir diğer çalışmada 5 yaş altı çocuklarda A semptomatik enfeksiyonla ilişkilendirilirken 5 yaş üstünde enfeksiyon ile A ve B genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı belirtilmiştir (Sahagun J ve Clavel A, 2008). Arjantin'de yapılan çalışmada ise B genotipi ishal ile ilişkilendirilmiştir (Minvielle et al, 2008). Bazı araştırmalarda ise genotipler ile enfeksiyon şiddeti arasında bir ilişki tespit edilmemiştir. Ancak enfeksiyon şiddeti ve karakteri sadece genotipe bağlı olmayıp konağın yaş, cinsiyet, bağışıklık sistemi gibi konak faktörlerine de bağlı bir durumdur.

### 2.3. EPİDEMİYOLOJİ

Giardiasis insan için en yaygın protozoon enfeksiyonlarından biri olarak bilinmektedir. Enfeksiyon tropikal ve subtropikal bölgelerde diğer bölgelere oranla daha sık rastlanır. Giardiasis, incelenen yaş gruplarına, iklim şartlarına ve çevresel hijyene bağlı olarak endüstriyel ülkelerde %2-5 arasında değişen oranda, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ise %20-30 arasında değişen oranlarda yayılış göstermektedir ( Budak, 1995; Marshall et al, 1997; Ortega ve Adam, 1997; Ak ve diğerleri 2007).

Giardiasis Orta Avrupa'da erişkinlerin ortalama %1-10'unda, çocukların ortalama % 5-20'sinde görülürken (Giboda et al, 1982), İtalya'da % 18 -39 (Ricciardi et al 1978), Romanya'da % 6,8 (Donescu and Panaitescu1984), Bulgaristan'da % 8,1 (Wladislawoff,1982) ve Fransa'da % 2-6 (Roche et al, 1991) oranında görüldüğü bildirilmektedir. Bu oranlar Finlandiya'da % 2- 25 Avustralya'da %20- 30 (Kerlin et al,1978) ve A.B.D' de % 1,5-20 arasında değişmektedir (Budak, 1995)

1958 yılında Unat, *G. intestinalis*'in Türkiye'de yayılış sıklığını gösteren ilk büyük çalışmayı yapmıştır. Bu araştırmada Türkiye'nin 7 coğrafi bölgesine ait 10.000 ilkokul çocuğundan dışkı örnekleri alınmıştır. Araştırmaya göre; Marmara Bölgesi'nde % 4,7, Ege Bölgesi'nde % 8,5, Akdeniz Bölgesi'nde % 14,7, İç Anadolu Bölgesi'nde % 15,9, Karadeniz Bölgesi'nde % 17, Doğu Anadolu Bölgesi'nde % 11,4 ve Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nde % 6,2 oranlarında *G. intestinalis* saptanmıştır (Budak, 1995).

1982- 1996 yılları arasında yurdumuzda bağırsak parazitlerini değerlendirmeye yönelik tüm çalışmalar derlenerek *G. intestinalis*'in insidansı saptanmıştır. Buna göre incelemeye alınan toplam 301.785 dışkı örneğinin 36.956'sında (% 12,24) *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoitleri saptanmıştır. Parazitlerin bölgelere göre dağılımı; İç Anadolu Bölgesi'nde % 10,7, Doğu Anadolu Bölgesi'nde % 5,32, Karadeniz Bölgesi'nde % 10,1, Marmara Bölgesi'nde % 2,57, Ege Bölgesi'nde % 11,4, Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nde % 28,1 ve Akdeniz Bölgesi'nde % 9,2 oranlarında *G. intestinalis* saptanmıştır. Bu araştırmada *G. intestinalis*'in görülme oranları inceleme yapılan yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde ise, erişkinlerde ortalama oran % 7,5 iken çocuk yaş gruplarında % 12,8'e çıktığı gözlenmiştir (Özçelik ve Değerli 1997).

#### 2.3.1. Giardiasisin Bulaş Yolları

Giardiasisin insanlar arasında fekal-oral veya cinsel yolla yayıldığı bilinmektedir. Daha sonra yapılan çalışmalarda, hayvanlarda bulunan *Giardia* türlerinin de insanları enfekte edebileceğini gösteren kuvvetli deliller elde edilmiş ve zoonotik bulaşın mümkün olabileceği ileri sürülmüştür (Üner ve Ertuğ, 1997)

### 2.3.1.1. İnsandan İnsana Bulaş

#### 2.3.1.1.1. Fekal oral yol ile insandan insana bulaş;

Fekal-oral yoldan bulaş giardiasisde en sık rastlanan bulaşma şeklidir. Sağlıksız ve hijyen koşullarının bozuk olduğu ortamlarda bulunan insanlarda gelişmiş ülkelerde bile yüksek oranlarda (% 5-43) giardiasise rastlanmaktadır (Thompson et al 1994). Enfeksiyon fekal – oral yoldan, dışkı ile kirlenmiş yiyecek veya içeceklerle, çocuklarda oyuncak alış veriş ile ve oral – anal seksüel ilişki yoluyla insandan insana yayılmaktadır. Birkaç gram dışkı içinde bulunan on adet kistin sindirim yoluyla alınması ile enfeksiyon oluşabilmektedir (Ak ve diğerleri,2007).

Parazitin yurt, kreş ve ana okulu gibi merkezlerde çocuktan çocuğa yayılması gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerdeki giardiasis ile ilgili en güncel sorun olarak bildirilmektedir (Thompson,1994; Read et al,2002; Ak ve diğerleri, 2007). Evlerden veya bakım merkezlerinden atık olarak atılan çocuk bezleri hastalığın yayılma hızına etki etmektedir. (Novotny et al 1990; Thompson, 1994; Overturf,1994; Ak ve diğerleri, 2007).

#### 2.3.1.1.2. Kontamine yiyecek ve içecekler ile çevresel bulaş

*Giardia* kistleri, insan ve hayvanların dışkılarıyla su kaynaklarına ulaşmaktadır. Giardiasisin su yoluyla bulaşmasında akla ilk gelen, içme sularının lağım sularıyla kontaminasyondur (Sykora et al, 1988; Chin, 2000). İçme suyunun çok az bir dışkı ile kirlenmiş olması enfeksiyonun alınması için yeterli olmaktadır. İçme sularının bakteriyel kontaminasyona karşı klorlanması *Giardia* enfeksiyonuna karşı yetersiz olabileceği çeşitli çalışmalar göstermiştir (Erlandsen,1995; Payment, 1999; AAP, 2000). *Giardia* kistlerinin doğal sulara, çeşme sularında ve distile suda haftalarca canlı kalabildiği, suyun ısısının *Giardia* kistlerinin canlı kalma sürelerini ve oranlarını etkilediği, soğuk sulara kistlerin canlı kalma oranlarının yüksek olduğu, suyun diğer özelliklerinin ise *Giardia* kistlerinin yaşam süresi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Üner ve Ertuğ, 1997).

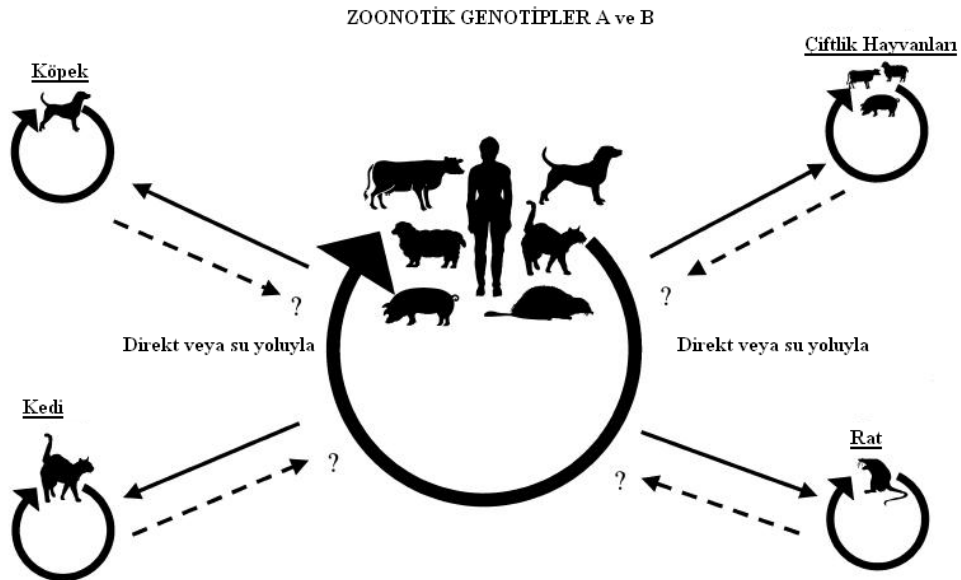
Su kaynaklı giardiasisten genellikle kanalizasyon sistemleri sorumlu tutulmaktadır. Özellikle yüzey sularının (nehirlerin ve göllerin) su kaynağı olarak kullanıldığı ve kanalizasyonların bu sulara karıştığı yerlerde insanlar sürekli giardiasis riski ile birlikte yaşamaktadır. İçme suları ile atık sularının birbirine karışması nadiren görülmekle birlikte, bu tür kontaminasyonlar büyük giardiasis salgınlarına neden olduklarından önemli olarak nitelendirilmektedir (Üner ve Ertuğ, 1997).

Kontamine yiyecek ve sular yoluyla çevresel bulaş, nüfusun büyük bir kısmını tek bir kaynaktan enfekte edebildiğinden giardiasisin epidemiyolojisinde en büyük tehlike olarak görülmektedir. İlk defa 1965 yılında ABD Colorado'da lağım sularının içme sularına karışması

sonucu giardiasis salgını meydana gelmiştir. Kuzey Amerika'da farklı bölgelerde yapılan çalışmalar sonucunda, su örneklerinin %80 inde *Giardia* kistleri saptanmıştır. Yalnızca A.B.D'de 1971-1986 yılları arasında yüze yakın su kaynaklı giardiasise salgın meydana gelmiş ve binlerce kişi etkilenmiş milyonlarcası da risk altında kalmıştır (Thompson et al,1994).

### 2.3.1.2. Zoonotik Bulaş

Hayvanların, insanlara giardiasisin bulaşmasındaki epidemiyolojik rolünü saptamak, *Giardia* türlerinin konak özgüllüğünün bulunup bulunmadığını veya insanlardan hayvanlara bulaşın gerçekleşip gerçekleşmediği araştırmak için yapılan çalışmalardan elde edilen deneysel bulgular *Giardia*'ların hayvanlardan insanlara zoonotik transferini destekler niteliktedir (Üner ve Ertuğ,1997). İnsanlardan elde edilen *Giardia* izolatları mongolian gerbillere çapraz bulaşımı deneysel olarak gösterilmiştir (Belosevic et al, 1983; Visvesvara et al,1988). Ayrıca neonatal fareler ve neonatal sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda da çapraz bulaşımın mümkün olabileceği gösterilmiştir (Craft,1982; hill et al, 1983). Bazı hayvanlardan elde edilen *Giardia* izolatları ile ışık mikroskobunda *G. intestinalisten* ayırt edilememektedir. Yapılan moleküler tiplendirme çalışmaları *G. intestinalisten* yedi farklı genotipinin bulunduğu insanlarda bulunan iki genotipin diğer birçok evcil ve vahşi hayvanlarda da bulunduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bazı genotiplerin konak özgüllüğü olduğu ortaya konmuş ve insanlarda herhangi bir enfeksiyona yol açmadığı bildirilmiştir (Caccio ve Ryan, 2008).



Şekil 2.8. A ve B genotiplerinin potansiyel bulaşma yolları (Monis et al, 2009).

Zoonotik yolla *Giardia*'nın bulaşıp bulaşmadığını belirlemek için şüpheli giardiasis salgınlarının olduğu bölgelerde *Giardia* kistlerinin enfekte insanlardan, bulaşmada rolü olduğu düşünülen şüpheli hayvanlardan ve çevredeki yüzey suları, yiyecek gibi örneklerden izole edilmesi gerekmektedir (Thompson et al, 1994). Bu tarz bir çalışma Isaac-Renton ve arkadaşları (Isaac-Renton et al, 1993) tarafından pulse field jel elektroforez yöntemi kullanılarak yapılmış, çalışmaya göre, Kanada'da belirli bir bölgede kunduzlardan insanlara su yoluyla bir geçişin olduğunu göstermiştir. Benzeri bazı çalışmalarda; PZR tabanlı moleküler yöntemler, aynı bölgede yaşayan insanlar ve köpekler arasında bir bulaşma olabileceğini göstermiştir (Traub, 2003).

Son yıllarda yapılan moleküler tiplendirme çalışmaları giardiasisin moleküler epidemiyolojisi ve zoonotik potansiyeli hakkında yeni deliller sunmuştur (Çizelge 2.3)

*G. intestinalis*'in insanlardan izole edilen A ve B genotiplerinin alt tipleri (A1,A2 B3,B4) olduğu çeşitli moleküler yöntemler ve değişik gen bölgeleri kullanılarak gösterilmiştir. İnsanlardan izole edilen A ve B genotipi birçok hayvanda bulunabilmektedir. A1 genotipi genellikle hayvanlarda, A2 genotipi ise temel olarak insanlarda bulunurken hayvanlarda da bulunabilmektedir (Fayer et al,2006; Castro-Hermida, 2007 ).

B genotipi büyük oranla insanlarda bulunduğu düşünülürken son yapılan çalışmalar kunduz, sığır, köpek, at, maymun, misk faresi, tavşan ve koyunlarda B genotipinin bulunduğu gösterilmiştir (Çizelge 2.3). B genotipinin 30-90 günlük koyunlarda enfeksiyona yol açtığı ve beslenme bozukluğu, kilo kaybı ve kötü kokulu dışkılama gibi klinik belirtilere neden olduğu belirtilmiştir(Aloisio et al, 2006)

Macaristan'da sucuk kuşlar üzerinde yapılan çalışmada göç eden kaz ve ördeklerde genotip A ve B tespit edilmiştir (Plutzer ve Tomor, 2009). Avustralya'da keseliler üzerinde yapılan çalışmalar genotip A, BIII ve BIV bulunmuş. Sekans analizleri insanlardan elde edilen sekanslar ile büyük benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Thompson J. et al, 2008). Atlarda yapılan çalışmada AI ve AII genotipleri elde edilmiştir (Troub et al, 2005). Brezilya'da kahverengi Howler maymunlarında yapılan çalışmada tüm izolatlarda genotip AI bulunmuştur (Volotao, 2008).

Balıklar ile yapılan araştırmada *Giardia* prevalansı % 3,8 bulunmuş ve izolatların genotipi A,B,E ve *Giardia microti* olduğu tespit edilmiştir. Deniz memelilerinde yapılan diğer çalışmalarda A ve B genotipleri yunus, fok ve deniz aslanında, C ve D genotipi liman fokunda tespit edilmiştir. Ren geyikleri ve karacalar ile yapılan çalışmalarda tüm izolatlar genotip A bulunmuştur. Yapılan filogenetik çalışmalar bu izolatların insan izolatları ile aynı soydan gelmediğini belirtmiştir. (Robertson et al, 2007 ).

İnsanda enfeksiyona yol açan A ve B genotipleri vahşi hayvanların yanı sıra yüksek bir oranda evcil ve çiftlik hayvanlarında bulunmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalar çiftlik hayvanlarında özellikle sığırlarda genotip A yüksek oranda bulunmaktadır. Bu durum çiftlik hayvanlarının rezervuar olma potansiyelini ortaya koymaktadır (Geurdenet et al, 2008)

Çiftliklerin ve kesim hanelerin atık sularında yapılan çalışmalarda izole edilen *G. intestinalis* kistlerinin A ve E genotipi olduğu gösterilmiştir (Bertrand ve Schwartzbrod, 2004).

Gerek yüzey suları gerekse atık sularında yapılan çalışmalar giardiasisin yayılmasında suyun önemli bir vektör olabileceğini vurgularken enfeksiyon kaynağının belirlenmesindeki güçlükler nedeniyle enfeksiyonun, hayvanlar tarafından kontamine edilen suların kullanımıyla bir bulaşın gerçekleşip gerçekleşmedi konusu tam anlamıyla netliğe kavuşmamıştır.

### **2.3.2. Giardia Kistlerinin Sulardaki Canlılıkları**

*Giardia* kistleri göl, nehir gibi doğal sularda, çeşme suyunda ve distile suda haftalarca canlı kalabildiği su sıcaklığının bu süreci etkilediği saptanmıştır (Regnier et al,1989)

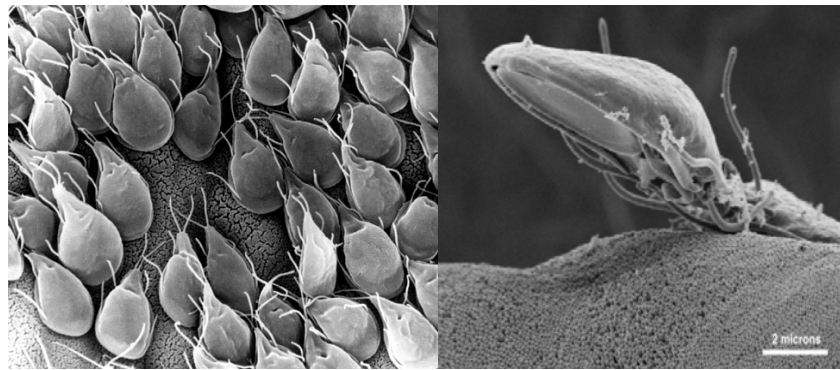
*G. intestinalis* kistleri 8°C'de klorlanmış suda 77 gün, *G. muris* kistleri 20-28 °C'de klorlanmış çeşme suyunda 7-14, sıcaklığı 5-7°C olan distile suda 56 gün, sıcaklığı 3,3°C olan doğal sularda 56-84 gün canlı kalabildikleri görülmüştür. Her iki türünde sulardaki sulardaki yaşam süreleri oldukça uzun olmasına karşın bu süreler sonunda çok az kistin canlı kalabildiği ve düşük dereceli sıcaklıklarda kistlerin bozulduğu gözlemlenmiştir. ( Regnier et al,1989; Thompson et al, 1994).

## 2.4. PATOGENEZ VE KLİNİK

Bir zamanlar kommensal olduğu düşünülen *G. intestinalis*, enfekte kişilerde diyare, malabsorbsiyon gibi bulguların tanımlanmasının ardından patojen olarak değerlendirilmeye başlanmıştır. Bu bulgular parazitin suşu, sayısı, konağın bağışıklık durumu gibi birçok faktöre bağlı olarak oluşmaktadır (Aklan, 1997 )

Enfeksiyonun kistlerin ağız yolu ile alınmasının ardından oluştuğu ve on tane kistin bile enfeksiyona neden olabileceği bildirilmektedir. Ekskistasyonun ardından trofozoitler ince bağırsağın üst bölgelerinde çoğalmaya başlar ve diskleri ile ince bağırsakta enterositlere yapışırlar. Şiddetli enfeksiyonlarda her hücrenin serbest yüzeyi parazitlerle kaplanabilir (Şekil 2.9). Parazit nadir olarak da safra kesesi ve safra yollarının epitel yüzeylerine yerleşmektedir (Ak ve diğerleri, 2007). Giardiasisin neden olduğu patolojik değişiklikler arasında, ince bağırsaklarda ülserasyonlar, lümende kısmi daralma ve ülser zemini üzerine gelişmiş akut yangı bildirilmiştir (Hill, 1995; Ak ve diğerleri, 2007).

Elektron mikroskopik çalışmalarda fokal akut yangıya bağlı epitelial hücre yıkımına ek olarak, özellikle kriptalarda epitel hasarına ait bulgular ve villuslardaki epitel hücrelerinden bir kısmında tamamlanmamış olgunlaşmayı düşündüren değişiklikler gözlemlendiği bildirilmiştir. Giardiasisli çocuklarda başlangıçta tüm mukozanın yapışkan bir mukusla kaplandığı, çoğalan parazitlerin bu mukuslu yüzeye yapışarak mukusun arasından uzattıkları emici diskleri ile enterositlere tutundukları gözlenmiştir. Enfeksiyon kronikleştikçe villus yapısının kütleşmeye ve genişlemeye başladığı, tüm yüzeyi kaplayan bu mukusun sertleşerek bir kabuk veya pseudo-membran görüntüsüne büründüğü, bu mukoid membran yapısında mukus dışında doku artıkları, enterositler ve ölü trofozoitlerin bulunabildiği bildirilmiştir (Taneli, 1996).



Şekil 2.9. Trofozoitlerin ince bağırsak hücrelerinin yüzeyine tutunması

Giardiasisde görülen diyarenin ve dışkıda aşırı miktarda yağ bulunmasının nedeni tam olarak açıklanamamakla birlikte bunu açıklayabilmek için çeşitli görüşler bildirilmiştir. Bu görüşler; mukoza ve mukozal epiteldeki kanalların çok fazla sayıda parazit tarafından mekanik

olarak tıkanması; fırça epiteli ve mikrovili yapısında bozulma; yağ emilimi için gerekli bağırsak içi bileşenlerinin bozulması; parazitin ve konağın besin için rekabette girmesi; artan mukus sekresyonu; parazit tarafından salgılanan toksinin bağırsak üzerine etkisi olarak sayılabilmektedir (Alkan, 1997; Ak ve diğerleri, 2007).

Günümüzde *G. intestinalis*'in ince bağırsak mukozasında hasara yol açtığı görüşü ağırlık kazanmaktadır. İnce bağırsak biyopsilerinin ışık mikroskopunda yapılan incelemelerinde villuslarında kısmen veya tamamen küçülme görülmektedir. Ayrıca mikrovillus membran disakkaridaz aktivitesinde ve glikoz aktif transportunda azalmada belirlenmiştir (Alkan, 1997).

Giardiasisde parazitin salgıladığı hyaluronidaz, proteaz ve mukopolisakkaridaz gibi enzimlerle parazitin kolon mukozasına invaze olmasını kolaylaştırdığı bildirilmektedir (Ak ve diğerleri, 2007). *G. intestinalis*'in salgıladığı sisteince zengin bir protein ekzotoksin olarak görev yaptığı ve bağırsak epitel hücrelerinde harabiyete yol açtığı gösterilmiştir (Chen et al, 1995).

*G. intestinalis* konağın tripsini tarafından aktive edilen mannoz bağlayıcı yüzey lektinin enterositler üzerine doğrudan zarar verici etkisi olabileceği gösterilmiştir. Bağırsak mukozasında artan lektin veya anti -CD4 antikörlerinin T hücresi aktivitesinin artırması, villuslarda küçülmeye yol açmaktadır (Ak ve diğerleri, 2007).

Çeşitli konaklarda *Giardia* enfeksiyonu sonucu olduğu bildirilen villus küçülmesinin, epitel yüzeyde besin ve su emiliminde azalmaya neden olması ile diyare oluşabileceği, ancak diyareli bazı konaklarda villus atrofisi gözlenmemesinin bu patolojik değişikliğin diyareden tek başına sorumlu olamayacağı görüşünü desteklediği bildirilmiştir (Farthing, 1994).

Giardiasisli hastalarda maltaz, sukraz, laktaz, sakkaraz ve alkalin fosfataz gibi mukozal ve tripsin, kemotripsin, lipaz ve amilaz gibi luminal enzimlerde yetmezlik görüldüğü çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Taneli, 1996). İnce barsaklarda oluşan mukozal değişikliğinin sekretin ve kolesistokinin gibi enterik hormonların salınımını azalttığı, bu hormonların eksikliğinin ise pankreatik ekzokrin yetmezliğine, ardından amilaz, proteaz ve lipaz yetmezliğine ve dolayısıyla karbonhidrat, yağ ve protein malabsorbsiyonuna yol açtığı bildirilmektedir (Markel, 1982).

Giardiasisde diyareyi ve sindirim bozukluklarını etkileyen başka faktörlerde bulunmaktadır. Bazı hastalarda intestinal bakteri artışı safra tuzlarının bakteriler tarafından kullanılması yağ emiliminde azalma olabileceğini göstermiştir (Ak ve diğerleri, 2007).

Sonuç olarak giardiasisin fizyopatolojisinde villus atrofisi, kript hiperplazisi ve enterositlerde yenileme hızındaki artışın önemli olmadığı, disakkaridaz ve luminal enzim yetmezliklerinin ise önemli rol oynadığı ileri sürülmüş, bağırsak yüzey alanının azalması ve mikrovilluslarda kütleşme ile, elektrolit, eriyik besin ve su malabsorbsiyonunun ise temel mekanizmaları oluşturduğu günümüzde yaygın olarak kabul edilmektedir (Aklan, 1997).

#### 2.4.1. Lokal ve Klinik Belirtiler

Yetişkinler ve büyük çocuklar genellikle *G. intestinalis* enfeksiyonunu hiçbir belirti göstermeden taşımaktadır. Oluşan enfeksiyonlarda asemptomatik kist çıkarıcılara, genellikle kendiliğinden iyileşen akut diyare tablolarına veya kronik diyare, malabsorbsiyon ve kilo kaybıyla kendini gösteren belirtilere rastlanabilmektedir (Gürüz, 1997; Ak ve diğerleri, 2007).

Diyare giardiasisde en sık görülen belirti olup bunu dışında özellikle çocuklarda büyüme ve gelişme geriliği, karın ağrısı sık gözlenen belirtilerdir. Bunların dışında karında şişkinlik, iştahsızlık, bulantı, kusma, ateş kötü kokulu yağlı dışkı gibi belirtiler gözlenmektedir. (Unat 1995; Ak ve diğerleri, 2007).

Sindirim yoluyla alınan kistler, alınmasını takiben 1- 2 haftalık inkübasyon döneminin sonunda bulgular görülmeye başlar. Dışkıda kistlerin görülmesine kadar geçen dönemin inkübasyondan daha uzun sürebileceği, yani enfeksiyon başlangıcında dışkı bakışının negatif olma olasılığının yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu süreçte ortalama kilo kaybının 3-4 kg civarında gerçekleşmektedir (Ak ve diğerleri, 2007).

Giardiasisde klinik; asemptomatik taşıyıcılık, akut ve kronik olmak üzere üç başlık altında incelenmektedir.

##### 2.4.1.1. Asemptomatik Taşıyıcılık

Hastalığın en yaygın şekli olup aralıklarla diyare dönemleri olmaktadır. Enfeksiyonun hastalık şeklinde ortaya çıkmayışının nedeni tam olarak açıklanamamıştır. Bu durumun konağın bağışıklık sisteminin durumu ve savunma mekanizmalarının gücünün etkili olabileceği düşünülmektedir (Ak ve diğerleri, 2007).

##### 2.4.1.2. Akut Tablo

Akut tabloda semptomlar ortalama bir hafta içinde ortaya çıkmaktadır. Genellikle hastalık 2-4 haftalık periyot içinde sürmekte ve kendiliğinden geçme eğilimi göstermektedir. Ancak hastalığa yakalananların %25'inde belirtiler 7 hafta kadar sürmektedir. Semptomlar sulu diyare şeklinde başlayıp, yağlı ve kötü kokulu dışkılama, bulantı, karın ağrısı, kilo kaybı şeklinde devam etmektedir (Unat, 1995; Gürüz, 1997; Ak ve diğerleri, 2007).

##### 2.4.1.3. Kronik Tablo

Sağlıklı bireylerin çoğunda enfeksiyon kendi kendine geçme eğiliminde olsa bile bazen %30-50'ye varan oranlarda kronik diyare, bununla birlikte yağlı ve kokulu dışkılama, kilo kaybı,

yağ emiliminde bozulma, yağda eriyen vitaminin emiliminde bozulma, bunları takiben karbonhidrat ve protein emiliminde bozulma gibi belirtiler devam edebilmektedir. Hastalığın bu aşamasında kronik giardiasisten bahsedilmektedir (Thompson et al, 1993). Başka bir deyişle besin maddelerinin emiliminin bozulmasına bağlı olarak besin yetersizliği ve bir dizi problem oluşmaktadır. Bu durum özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda gelişme ve zeka geriliği, şişkin karın ve uzun ince ekstremiteler gözlenmektedir. Bozulmuş yağ ve ksiloz emilimine ek olarak A ve B12 vitamini ve laktoz emilimi de bozulmaktadır. Ayrıca demir emilimdeki bozulmaya bağlı olarak anemi görülebilmektedir (Ak ve diğerleri 2007)

#### 2.4.2. Giardiasiste İmmünite

*Giardia* enfeksiyonunun insanlarda oldukça farklı belirtilere neden olduğu bilinmektedir. Bazı kişilerde diyare, karın ağrısı, kilo kaybı, halsizlik gibi klinik belirtiler görülmesine karşın bazılarında hiçbir belirti rastlanmadığı bilinmektedir. Ayrıca enfeksiyon bazı kişilerde birkaç hafta içinde kendiliğinden iyileşme gözlenirken bazı kişilerde ise kronikleşmektedir. Klinik belirtilerin bu kadar değişken olması farklı *Giardia* suşlara hatta farklı genotiplere bağlanabileceği, bazısının patojen bazısının da apotejen olabileceği düşünülmektedir. Semptomların ağırlığı farklı *Giardia* genotiplerine bağlayan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Altıntaş ve Korkmaz, 1997; Shagun et al, 2008; Marta et al, 2008; ; Geurden et al, 2010).

*G. intestinalis*'e karşı kişilerin direnci yaşa ve bağışıklık sistemine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bazı araştırmacılar giardiasise karşı koruyucu bağışıklığın enfeksiyonun geçirilmesinden sonra geliştiğini ileri sürmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda enfeksiyon geçiren hayvan modellerinin tekrar enfeksiyona karşı bir direnç geliştirdikleri belirlenmiştir. Edinsel bağışıklığı düşündüren bu gözlemler insan giardiasis çalışmalarında da desteklenmiştir. Araştırmaya göre endemik bir bölgede uzun süre yaşayanlarda semptomatik enfeksiyon oranı ziyaretçilere oranla daha düşük bulunduğu gözlemlenmiştir (Hill, 1995). Ancak bu gün koruyucu bağışıklığın tam olarak mümkün olmadığı da bildirilmektedir. Çünkü *G. intestinalis*'in birbirinden oldukça farklı çok sayıda antijenik yapı ve antijenik yapıda birbirini izleyen değişimler gösterilmektedir (Smith et al, 1982; Nash et al, 1983; Nash ve Keister, 1985). Koruyucu bağışıklığın gelişimi için en önemli bileşen ince bağırsak lümenindeki *G. intestinalis*'e özgü anti – *Giardia* sekretuar IgA'sı olarak görülmektedir. Bununla birlikte *Giardia* antijenlerine karşı IgM türü antikor yanıtı da saptanmıştır (Altıntaş ve Korkmaz, 1997).

Farelerde denen bir *Giardia* aşısı çalışmaları oral yoldan kısmen başarıya ulaşmıştır. Kullanılan aşısı parazitin bağırsak lümenindeki kolonizasyonunu engellemeyi yanı sıra uygulamanın ardında (9-11 gün) trofozoitlerin de ortadan kalktığı bildirilmiştir. Son yıllarda A.B.D'de kediler ve köpekler üzerinde uygulanan ticari aşılar satılmaktadır. Aşıların köpek ve

kedilerde klinik bulgularını engellemek ve dışkı ile kist atımının azatlığı bildirilmiştir (Ak ve diğerleri, 2007).

Bazı *in vitro* çalışmalar insan sütünün *Giardia* enfeksiyonlarına karşı koruyucu rol oynadığını ve *Giardia* trofozoitlerini öldürdüğünü göstermiştir (Ak ve diğerleri, 2007).

## 2.5. GIARDİASİS TANISI

Rutin dışkı incelemeleri, bütün bağırsak protoozonlarında olduğu gibi giardiasisin teşhisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. *Giardia intestinalis* trofozoitleri, emici diskleri ile bağırsak mukozasına çok sıkı tutunmasından dolayı arka arkaya alınan seri dışkı incelemelerinde bile organizmanın görülememesine neden olmaktadır (Özbel ve Dağcı, 1997). Hastalığın belirtileri gözlenen kişilerde ilk dışkı incelemesinde *G. intestinalis* kist veya trofozoitleri saptanabildiği halde hastalık belirtisi göstermeyen kişilerde ve şüpheli durumlarda 3 kez seri dışkı incelemesi tavsiye edilmektedir (Hiatt 1995).

Dışkının makroskopik olarak incelenmesi mikroskopik incelemeyi yapacak kişilere önemli derecede fikir verebilir. Bu nedenle gelen dışkılar mutlaka makroskopik olarak değerlendirilmelidir (Özbel ve Dağcı, 1997).

Rutinde kullanılacak dışkı örnekleri, eğer hemen incelenemeyecekse veya daha sonra boyama veya konsantrasyon yöntemlerine gereksinim duyulursa çeşitli yöntemlerle saklanabilir.

### 2.5.1. Saklama Solüsyonları:

Dışkı örnekleri genellikle 3 kısım fiksatife 1 kısım dışkı olacak şekilde saklanır.

#### 2.5.1.1. %10 Formaldehit Solüsyonu

Formolde korunan dışkıya kolaylıkla standart formol-etil asetat çöktürme yöntemi uygulanabilmesine rağmen, kalıcı boya yaymaları uygulanamaz (Ash ve Oribel, 1987).

#### 2.5.1.2. %5 Formaldehit - Tuz ( %0.85 Serum Fizyolojik ) Solüsyonu

Kolay hazırlanan ve uzun süre saklamak için uygun olan formolde saklanmış materyallere konsantrasyon yöntemlerinin uygulanması kolay olmasına karşın, daha sonra uygulanan kalıcı boyamalardan istenilen sonuç alınamamaktadır (Ok ve diğerleri, 1997).

#### 2.5.1.3. Mertiolat - İyot - Formaldehit (MIF) Solüsyonu

MIF içinde saklanmış materyallere konsantrasyon yöntemleri rahatlıkla uygulanmakta, ancak kalıcı boyaların gerçekleştirilmesi güç olmaktadır (Ok ve diğerleri, 1997).

#### 2.5.1.4. Polivinil Alkol (PVA) Solüsyonu

Dışkı alındıktan hemen sonra iyi fikse edilirse çok uzun süre saklanabilmektedir. PVA, özellikle intestinal protozoonların trofozoit evreleri için iyi bir fiksatifdir. PVA'da saklanmış dışkılarından yapılan kalıcı preparatlarda organizmaların boyanma kalitesinin yüksek olduğu görülmüştür. PVA fiksatifinin en önemli avantajlarından biri, yapılan yaymaların hemen veya aylar sonra boyanabilmesidir. PVA'da saklanan örneklerde konsantrasyon yöntemleri de uygulanabilmektedir (Ok ve diğerleri, 1997).

#### 2.5.1.5. Sodyum asetat - Asetik asit - Formaldehit (SAF) Solüsyonu

Yumuşak fiksatif olarak isimlendirilen sıvı haldeki SAF içinde saklanmış materyal, hem konsantrasyon tekniklerinde hem de kalıcı boyalı yaymalarda kullanılabilir. Toksik civa bileşikleri içermemesi nedeniyle bazı merkezlerde tercih sebebi olmaktadır (Özbel ve Dağcı, 1997). Kalıcı yayma hazırlamak için çöktürden preparat yapılabilir.

Giardiasisin tanı yöntemleri üç ana grupta incelenebilmektedir. Kullanılacak metodun seçiminde sadece duyarlılık ve özgüllüğün değil, testin kolaylığı, maliyeti, çalışacak personel sayısı ve kaç adet testin yapılacağına da göz önünde bulundurulması gerektiği bildirilmiştir (Garcia et al, 2003).

### 2.5.2. Etiyolojik Tanı

#### 2.5.2.1. Dışkıda etkenel tanı

*Giardia intestinalis*' in kist veya trofozoitlerinin mikroskopta görerek tanı konulmasıdır.

##### 2.5.2.1.1. Direkt Bakı (Nativ- Lugol ) Yöntemi;

Laboratuar yöntemleriyle tanıyı koymanın en kolay yolu ışık mikroskobu ile direkt dışkı incelemesi yapmaktır. Özellikle sıvı görünümüne ve beklememiş dışkı örneğinden hazırlanan preparatlarda hareketli trofozoit görmek mümkündür. (Ok ve diğerleri, 1997; Ak ve diğerleri 2007). Bağırsak hareketleri parazit organizmaların dışkıda neredeyse eşit olarak dağılmasına yol açar, bununla birlikte eğer organizma sayısı az ise direkt taze bakı için kullanılan az miktarda dışkı örneği organizmanın varlığını çıkarmada yetersiz kalabilir. Bu nedenle direkt inceleme yöntemleri paraziter enfeksiyonların bir çoğunun kesin tanısında tek başına yetersiz olmaktadır (Estevez ve Levine, 1985; Özbel ve Dağcı, 1997).

Nativ inceleme; dışkının serum fizyolojik içinde incelenmesi ile gerçekleştirilen basit, etkili ve maliyeti düşük bir yöntemdir. Bu yöntemde temiz bir lam üzerine bir damla serum fizyolojik damlatılır ve üzerine dışkının çeşitli yerlerinden alınan örnek konarak karıştırılır. Lamelle kapatılan preparat x 40 büyütmele objektifle fazla vakit kaybedilmeden incelenir (Özbel ve Dağcı, 1997).

Nativ inceleme ile özellikle diyareli dışkı örneklerinde hareketli trofozoitleri görmek mümkün olmaktadır. Taze olmayan sulu dışkı örneklerinde ise trofozoitlere pek rastlanmamaktadır. Hareketli trofozoitlerin saptanması açısından nativ bakı önem taşımaktadır (Ok ve diğerleri, 1997).

Lugol yönteminde ise fizyolojik su yerine lugol eriyiği kullanılmaktadır. Geçici boyalar, özellikle protozoonların saptanması ve ayırımına yardımcı olmak üzere genellikle nativ yöntem ile birlikte kullanılmaktadır. İyot trofozoitleri öldürdüğü ve tahrip ettiği için daha çok parazitlerin kist evrelerini tanısı için kullanılır. Bununla beraber kistlerin nükleus ve morfolojik görünümünü daha belirgin halle getirmektedir (Özbel ve Dağcı, 1997; Ak ve diğerleri, 2007).

Nativ- Lugol bakı tüm taze dışkı örneklerinden hazırlanabilmesine karşın preparatları değerlendirebilecek deneyimli personel ve hazırlanma şekli ve zamanı önemlidir (Özbel ve Dağcı, 1997).

#### **2.5.2.1.2. Çoklaştırma (Konsantrasyon) Yöntemleri**

Bu yöntemlerin amacı dışkıdaki *Giardia intestinalis* kistleri çöktürerek veya yüzdürerek bir araya toplanmasını sağlayarak tanı koyma şansını arttırmaktır . Yöntemler santrifüj yardımıyla parazitleri dışkı artıklarından özgül ağırlıklarındaki farklılığı kullanarak ayrılmasını sağlamaktadır ( Özbel ve Dağcı, 1997).

Konsantrasyon işlemleri sedimantasyon (çöktürme) yüzdürme (flotasyon) yöntemleri olmak üzere iki ana başlık altında incelenir.

#### **2.5.2.1.3. Sedimantasyon (Çöktürme) Yöntemleri**

Santrifüj kullanılarak yapılan bir yöntemdir. Sediment dışkıda görülen tüm parazitleri içermektedir. En büyük dezavantajı dışkı artıklarının fazla olmasıdır. En çok kullanılan yöntem formol-etil asetat çöktürme yöntemidir. Yöntemde bir miktar dışkı formol ile fiske edilir ve süzülür. Süzülen sıvı santrifüj tüpüne konur ve üzerine iki üç damla etil asetat eklenerek çalkalanır, solüsyon 400-500 X g'de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üst sıvı atılır ve sediment lam üzerinde lugol ile boyanarak incelenir.

#### 2.5.2.1.4. Flotasyon (Yüzdürme) Yöntemi

Flotasyon yöntemi, yüksel özgül ağırlığındaki solüsyonların parazitleri dışkı artıklarından bağımsız olarak yüzdürmesi prensibine dayanmaktadır. Yöntem ile parazitler dışkı artıklarından arındırılmış olarak mikroskopta rahatlıkla görülmektedir. Bu yöntemde protoozon kistleri ve çoğu nematod yumurtaları kolaylıkla yüzmektedir. Daha ağır olan trematod ve cestod yumurtaları dibe çökebilmektedir (Ok ve diğerleri, 1997).

Flotasyon yöntemleri içinde en yaygın olarak kullanılanı çinko- sülfat yöntemidir. Bunun yanı sıra doymuş tuzlu su ve doymuş şekerli su eriyikleri kullanılmaktadır.

#### 2.5.2.1.5. Boyama Yöntemleri

Boyama yöntemlerinin ana prensibi parazit ile dış ortam arasında renk kontrastı sağlamaktır. Böylece parazitlerin morfolojik yapıları daha ayrıntılı olarak görülmekte, türler arasındaki ayrımı sağlanabilmekte ve sürekli preparat elde edilmesi sağlanmaktadır (Giardiasis kitabı). Bunlar arasında Giemsa, demir hemotoksilen ve trikrom boya yöntemleri *Giardia intestinalis* tanısında sık kullanılan boya yöntemleridir (Ak ve diğerleri, 2007).

##### 2.5.2.1.5.1. Giemsa Boyama Yöntemi

Trofozoitlerin boyanmasında etkili bir yöntemdir. Özellikle trofozoitlerin kamçıları bu yöntem ile kolaylıkla ayırt edilebilir. Yöntemin dezavantajı ortamda iyi kontrast sağlamaması ve beklemiş dışkı örnekleriyle iyi sonuç vermemesidir ( Hill, 1995).

##### 2.5.2.1.5.2. Trikrom Boyama Yöntemi

Bu boyama yöntemi, fekal yaymaların hazırlanması için çabuk ve kolay bir yöntemdir. Boyama işleminin çabuk ve kolay olması, boyanın uzun süre dayanması ve dekolarize edici ajan olarak kullanılan asit alkollün organizmanın morfolojik detaylarını belirginleştirmesi bu yöntemin en önemli avantajlarıdır (Özbel ve Dağcı, 1997).

İyi tespit edilmiş dışkı yaymalarında organizmaların boyanma özellikleri oldukça sabittir. Protoozonların sitoplazması genellikle mavi –yeşilden morumsu bir renge boyanırken, nükleus, nükleer kromatin, kromatoid cisimcikler ve diğer inklüzyon cisimcikleri kırmızı-kırmızısı mor, sindirilmeyen besinler, maya ve mantarları içeren arka zemin ise genellikle yeşil boyanır (Ok ve diğerleri, 1997)

### 2.5.2.1.5.3. Demir Hematoksilen Boyama Yöntemi

İyi boyanmış dışkı yayması elde etmede uzun süre Heidenhain'in demir hemotoksilen boya yöntemi önerilmiştir. Ancak bu yöntem karmaşık ve zaman alıcı olduğundan daha kısa ve basit modifiye şekilleri geliştirilmiştir. Yöntem trikrom yöntemine göre daha fazla zaman alıcıdır (Ok ve diğerleri, 1997).

Yayma ve boyama doğru şekilde yapıldığında gerek zemin gerekse organizmalar mavi-gri boyanırken kistleri ise daha koyu mavi renk alır. Çekirdek yapıları, kromatoid cisimler ve diğer inklüzyonlar sitoplazmaya oranla daha koyu bir renk alır (Ok ve diğerleri, 1997).

### 2.5.2.2. Duodenal Sıvıda Etkensel Tanı

#### 2.5.2.2.1. Duodenal Aspirasyon

*G. intestinalis* trofozoitleri duodenumdan alınan sıvı örneklerinde de görülebildiğinden seri dışkı incelemelerinde devamlı negatif sonuç elde edildiği halde giardiasisten şüphelenildiği durumlarda duodenal sıvı çeşitli yöntemlerle elde edilerek incelenebilir. Bir sonda yardımıyla burun ve mide yolundan, ince bağırsakların üst kısımlarına ulaşılarak duodenal sıvı toplanabilir. (Özbel ve Dağcı, 1997; Ak ve diğerleri, 2007).

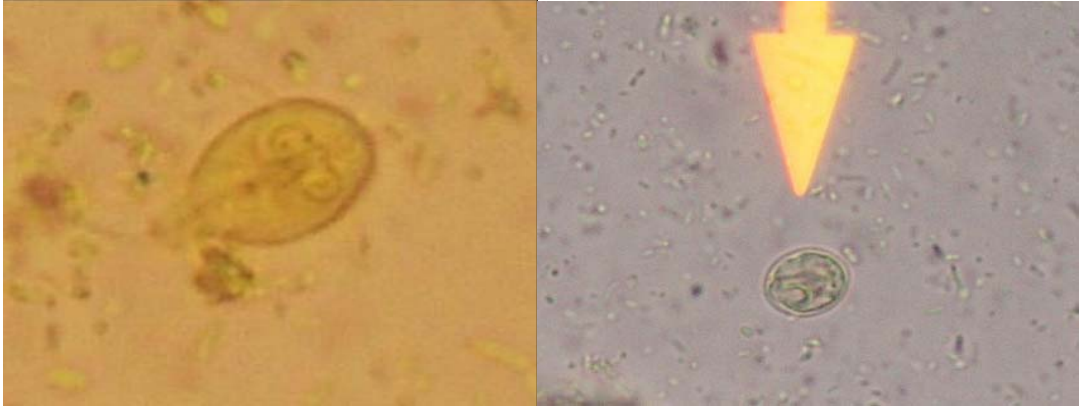
İnce bağırsağın üst kısmından alınan 0,5-3 ml duodenal sıvı direkt olarak veya kalıcı boyama yöntemleri uygulanarak incelenir. Direkt bakıda *G. intestinalis* trofozoitleri mukusa saplandığı için spesifik hareketleri nadir olarak görülmektedir (Özbel ve Dağcı, 1997).

Giadiosis'in teşhisinde seri dışkı incelemeleri ile duodenal aspirasyon incelemeleri karşılaştırıldığında üç kez dışkı incelemesiyle %85 oranında giardiasis saplanırken duodenal aspiratların sadece %44 de pozitif sonuç alındığı ve bu iki yöntemin birbirini tamamladığı gösterilmiştir (Özbel ve Dağcı, 1997; Ok ve diğerleri, 1997).

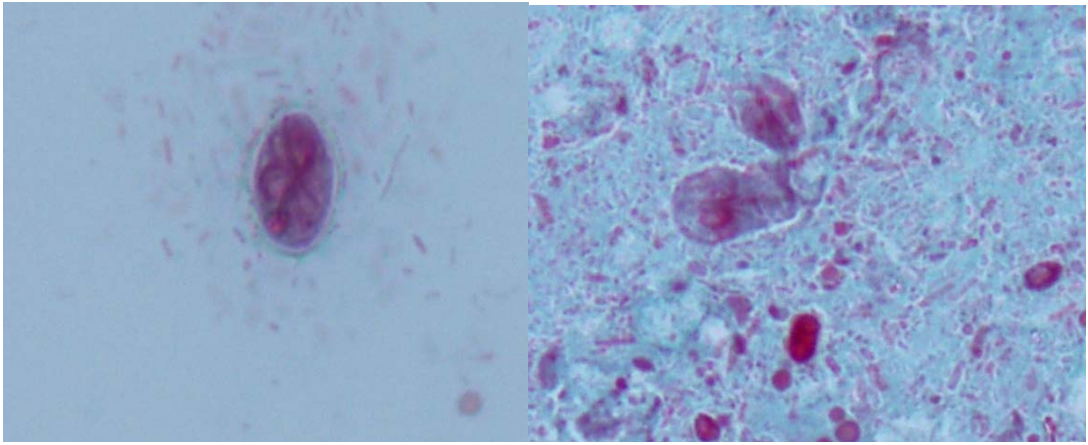
#### 2.5.2.2.2. Duodenal Kapsül Tekniği (Entero - test)

Entero –test 1970'li yıllarda Beal ve arkadaşları tarafından duodenal içeriklerin incelenmesi amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir.

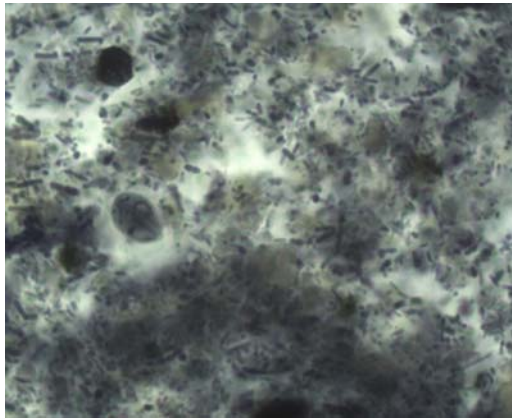
Çocuklar ve yetişkinler için farklı entero test kitleri bulunmaktadır. Test kitinde yaklaşık 140 cm uzunluğunda naylon ip, bir kapsül içine yerleştirilmiştir. İpin ucu hasta ağzına tespit edilerek kapsül hastaya yutturulur. 3- 4 saat sonra test kiti çekilir ve alt ucu bir lama sürülerek direkt olarak veya boyalı preperat hazırlanarak mikroskopta *G. intestinalis* kist veya trofozoitleri araştırılır (Özbel ve Dağcı, 1997 Budak ve diğerleri 1997).



Şekil 2.10\*. *G. intestinalis* trofozoiti lugol ile boyanmış(solda), *G. intestinalis* kisti.(ok)



Şekil 2.11\*. *G. intestinalis* kisti (solda) ve trofozoiti (sağda)



Şekil 2.12\*. *G. intestinalis* trofozoiti (Demir hemotoksilen boya).

\* Fotoğraflar, C.B.Ü Tıp Fakültesi Parazitoloji A.D. arşivinden alınmıştır.

### 2.5.2.2.3. Duodenal Biyopsi

Bu yöntemde endoskopi yapılarak ince bağırsağın mukoza epitelinin uğradığı morfolojik değişiklikler ve protozoonun kendisi doğrudan gösterilebilmektedir. Duodenal biyopsi örneği çeşitli boylar ile boyanıp mikroskopta *G. intestinalis* trfozoitleri araştırılır (Ak ve diğerleri, 2007).

### 2.5.2.3. Kültür Yöntemleri

*in vitro* kültür yöntemleri ve *in vivo* hayvan inokulasyon yöntemleri, direkt mikroskopik yöntemlerin yetersiz kaldığı veya kesin tanıya gidilemediği durumlarda kullanılmaktadır. Ayrıca biyokimyasal, immunolojik ve serolojik çalışmalarda kullanılan antijenlerin hazırlanmasında, ilaç denemelerinde, parazitlerin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin araştırılması çalışmalarında kültür yöntemleri kullanılmaktadır ( Daldal ve diğerleri, 1997).

Hastalardan *Giardia* suşları serolojik testlerde, genetik, biyokimyasal ve immunolojik çalışmalarda kullanmak amacıyla izole edilmektedir. *Giardia* trofozoitlerinin kültürü ilk kez Karapetyan tarafından yapılmış olup monoksenik olarak mantar ile birlikte devam ettirilmiştir *Giardia*'nın ilk aksenik kültürü ise Meyer tarafından yapılmıştır (Daldal ve diğerleri 1997).

*Giardia*'nın besiyerine ekim yapılabilmesi için öncelikle kistlerin saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Bu işlem temel olarak dört basamaktan oluşmaktadır (Daldal ve diğerleri 1997);

- Kistlerin sukroz gradient santrifüj yöntemi ile dışkı artıklarından ayrılması ve konsantre edilmesi
- Asidik solüsyon içerisinde eksistasyonun sağlanması
- Uygun besi yerine ekim yapılması
- Aksenzasyonun sağlanması amacıyla besi yerine antibiyotik ve antimikotik solüsyonların eklenmesi

*G. intestinalis*'in kültürü kolay olmadığından rutin tanıda pratik değeri fazla değildir (Özbilgin ve Sermet, 1987). Son 20 yılda yapılan araştırmalar sonucunda *Giardia intestinalis* genotiplerinin aksenik kültürde üreme başarısı arasında farklar olduğu da gösterilmiştir (Moniset al 2008).

### 2.5.3. Dolaylı (İndirekt) Tanı Yöntemleri

Dışkıda veya duodenal sıvıda parazit organizmayı direkt mikroskopta görerek tanı konulmasının yanı sıra hastaların kanında *Giardia*'ya karşı olmuş antikorları göstererek veya dışkı örneğinde *Giardia* antijenlerinin gösterilmesi ile giardiasis tanısı konulmasını sağlayan yöntemler de bulunmaktadır (Ak ve diğerleri, 2007). Giardiasisin tanısında immunfloresans

yöntemi, ELISA, Western Blot gibi serolojik ve immünolojik yöntemler kullanılmaktadır (Özbel ve Dağcı, 1997 ).

#### **2.5.3.1. Dışkıda Antijen Aranması**

Giardiasis tanısında bazı durumlarda dışkı incelemelerinden sonuç alınamaması, duodenum aspirasyonu ve ince barsak biyopsi yöntemlerinin invaziv oluşu, kültür yöntemlerinin pratik olmayışı sebebiyle dışkıda antijen saplamaya yönelik hassasiyetleri ve özgüllükleri yüksek olan çeşitli yöntemler geliştirilmiştir(Nash et al, 1987; Stibbs, 1989).

#### **2.5.3.2. ELİSA (Enzym-Linked İmmunosorbent assay)**

Giardiasis tanısı eğer serumunda antikor araştırılarak yapılacak ise tanısız değeri yoktur. Çünkü, serolojik yöntemlerin geçirilmiş ve yeni geçirilen enfeksiyon arasında ayırım yapmadığı gösterilmiştir. Buna karşın spesifik anti - *Giardia* IgM düzeyleri akut enfeksiyonlarda hızlı bir şekilde yükselmekte ve hastalığın tedavi ile birlikte düştüğü bildirilmektedir (Özbel ve Dağcı, 1997). Dışkıda *Giardia*'ya özgül moleküller ELISA ile aranmaktadır. Parazitte karşı geliştirilmiş olan monoklonal antikorlar veya poliklonal antikorlar kullanılarak *Giardia* stool antijeni (GSA 65) aranmaktadır ( Ak,1997; Smith ve Paget, 2007).

Yapılan çalışmalar ELISA'nın tekrarlanan mikroskopik incelemeler kadar duyarlı olduğu bildirilmiştir (Tamer ve diğerleri, 2009).

İmmünoassay kitleri ile yapılan çalışmalar; testlerin duyarlılığının %94-100 arasında, özgüllüğünün ise % 100 olduğunu göstermiştir (Smith ve Paget, 2007; Tamer ve diğerleri,2009).

#### **2.5.3.3. Monoklon Antikorlar**

Ticari olarak satılan monoklon antikor testleri, aseton ile fiske edilmiş örneklerin direk boyamasında kullanılmaktadır. Floresan işaretli monoklon antikorları *G. intestinalis* kist duvarına spesifik olarak bağlanmaktadır. Örnekler floresan mikroskopunda incelenerek giardiasis tanısı konulmaktadır (Özbel ve Dağcı, 1997).

#### **2.5.3.4. İmmundiffüzyon ve İmmunelektroforez**

İmmundifizyon ve immunelektroforez analizleri temel olarak antijen ve ona özgü antikor arasındaki reaksiyona dayanır. Günümüzde birçok immundifizyon ve immunelektroforez yöntemi geliştirilmiştir (Altıntaş ve Korkmaz, 1997).

İmmundifizyon yönteminin amacı presipitasyon reaksiyonu ile antijen ve antikor saptanmasına yöneliktir. Bu reaksiyonlar da çökelti oluşturan antikorlara presipitimler olarak adlandırılır. Reaksiyonun başlarında antijen ve antikorlar kompleks oluşturarak çözünmez çökeltiler oluştururlar. Agar içine oyulmuş çukurlara konan antijen ve antikor agar içinde difüze olur ve karşılaştıkları noktada antijen antikor kompleksi oluşur. Reaktanların denge bölgesine yakın bölgede presipitasyon (yay) çizgileri oluşur ve çeşitli yöntemler ile bu çizgiler görüntülenir. (Altıntaş ve Korkmaz, 1997).

Bir solüsyonda birden fazla ilgilenilen antijen olduğu zamanlarda İmmunelektroforez yöntemi ile bunları birbirlerinden ayrılabilir. Proteinler elektroforetik hareketliliğine göre ayrılırlar. Yöntemde destek ortamı olarak genellikle agar bazen de selüloz asetat kullanılır. Kullanılan tamponlar serum veya plazma proteinlerine negatif yük kazandırır. Elektrik akımı sayesinde moleküller elektriksel özelliklerine bağlı olarak jel içinde göç ederler. Örneklerin konulduğu çukurlara paralel olarak açılan çukurlara anti-serum konur. Protein fragmanları ve antikorlar jel içinde difüze olup presipitasyon çizgisi oluştururlar. Her bir proteine spesifik şekil ve pozisyonda çizgiler oluşur (Altıntaş ve Korkmaz, 1997).

İmmunelektroforez yöntemi giardiasis tanısı için dışkıda antijen araştırmalarında kullanılmıştır. Yöntemin duyarlılığı %70-95 arasında, özgüllüğü ise %80-95 arasında olduğu çeşitli çalışmalar göstermiştir (Altıntaş ve Korkmaz, 1997).

#### 2.5.3.5. Western Blot (Immunoblotting)

Western blotting veya immunoblotting adı verilen immunokimyasal yöntemler bir membran üzerine sabitleştirilmiş proteinleri tanımlamada kullanılmaktadır. Bu yöntem elektroforez ile ayrıştırılmış proteinlere spesifik antikorların bağlanması ve çeşitli yöntemler ile görüntülenmesi temeline dayanmaktadır (Altıntaş ve Korkmaz, 1997).

Çeşitli araştırmalar yöntemin giardiasis tanısında kullanılan *G. intestinalis* spesifik dışkı antijeni (GSA 65) izole ederek tanı koyulabileceğini göstermiştir (Altıntaş ve Yazar, 1997).

#### 2.5.4. Genetik Esaslı Tanı Yöntemleri

Dışkı örneklerinde *G. intestinalis* kist ve trofozoitlerinin nükleik asit tabanlı yöntemlerle saptanması temeline dayanan bu yöntemde; kistlerin zor erimesi, klinik örnekte inhibitör maddelerin ve yabancı DNA'nın fazla miktarda olması gibi güçlüklerin aşılması gerekmektedir (Aklan ve diğerleri, 1997)

Yöntem *G. intestinalis* kist ve trofozoitlerinin bulunduğu dışkı, duodenum sıvısı ve doudenal biyopsi örneklerinden elde edilen parazit genomunun belirli bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *in vitro* olarak çoğaltılıp jel elektroforez gibi yöntemler ile görüntülenmesi

esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle, *G. intestinalis*'nin genotipleri arasındaki farklılığı ve genetik değişiklikleri ortaya koymak olasıdır ( Tamer ve diğerleri, 2009).

Dışkı, duodenum aspirasyon sıvısı, duodenal biyopsi örneklerine geleneksel PZR ve gerçek zamanlı PZR ile hedef *G.intestinalis* amplifikasyonun yapılması ve tanımlanması yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak primerlerin bağlama bölgelerindeki yanlış baz eşleşmelerinin moleküler tekniklerdeki başarısızlığın nedeni olabileceği vurgulanmaktadır (Tamer ve diğerleri, 2009).

Moleküler tanı yöntemleri, yüksek özgüllüğe ve duyarlığa sahip bir yöntem olup parazitolojik incelemelerde insan hatasını en aza indirmesi, parazit yoğunluğunun az olduğu örneklerde dahi tanı konulmasına yardımcı olması gibi özellikleri nedeniyle önemli bir tanı yöntemidir. Bununla beraber suşların moleküler olarak tiplendirilmesi, onların enfeksiyon karakterlerini daha iyi tanımamıza olanak vermektedir. Ayrıca enfeksiyon kaynağının belirlenmesini sağlamaktadır ve böylece doğada rezervuar olabilecek türleri belirlememize olanak vererek gerekli önlemlerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

## 2.6. TEDAVİ VE KORUNMA

### 2.6.1. Tedavi

*G. intestinalis* dünyanın her bölgesinde endemik olarak bulunmaktadır. Çocuklarda enfeksiyonun çok fazla yinelenmesi ve buna bağlı olarak tedavide kullanılan ilaçların tekrar edilmesi ilaç toksisite olasılığını arttırmaktadır. Giardiasis sağaltımında değişik suşların ortaya çıkmasıyla ilaçların etkinliğinde sorunlar ortaya çıkmaktadır (Reynoldson,1995).

Giardiasis tedavisinde modern ilaç tedavisi deneysel olarak hayvanlarda ve insanda ilk kez Paul Ehrlich'in 1949'da çalışmalarıyla başlamıştır. İlk olarak denenen ilaçlar sıtma tedavisinde de kullanılan kinakrin ve sentetik bir nitroimidazol olan azomisindir. Cosar 1959'da 5-nitroimidazol türevi metronidazolü geliştirmiş, 1961 yılında da metronidazolün giardiasis tedavisinde etkinliği gösterilmiştir. Tinidazol, ornidazol, satranidazol ve seknidazol giardiasis tedavisinde başarı ile yararlanılan yeni 5-nitroimidazollerdendir. Yararlanılan diğer ilaçlar arasında sentetik nitrofuran, furazolidon ve paromomisin sayılmaktadır (Boreham 1995).

### 2.6.2. Korunma

Giardiasisde hastalık kaynağı enfeksiyon geçiren insanlar olup hastalık kistlerin çeşitli kaynaklardan sindirim yoluyla alınması ile bulaşmaktadır. İnsandan insana bulaşın yanında su kaynaklı bulaşmada *Giardia* enfeksiyonlarında sık gözlenen bir durumdur.

*G. intestinalis*'in prevalansı, fazla kalabalık ve sanitasyonun yetersiz olması nedeniyle akıl hastanelerinde, cezaevlerinde, çocuk bakım merkezlerinde, yurtlarda, aynı bölgedeki genel popülasyona göre daha yüksek olmaktadır (Budak ve Atay, 1997).

Hastalığın kontrolü, şehirlerin alt yapısının iyileştirmek ile, toprağın ve suyun insan dışkısı ile kirletilmediği, temiz yiyecek ve suyun sağlanması ile mümkündür.

Suların hijyenik olması giardiasis enfeksiyonun kontrolü için önemlidir. Standart klorlama teknikleri *Giardia*'ların elemine etmede yetersiz kalabilmektedir. Sulara eklenen klor (0,25-0,50mg/l) enterik bakterileri öldürdüğü halde parazitleri çok fazla etkilememektedir. Suyun ısı, berraklığı, pH'ı ve suyla temas süresi gibi faktörler klorun etkisini değiştirebilmektedir. Genel su kaynakları için kum filtrasyonları, koagülasyon filtreleri gibi filtrasyon ve sedimentasyon işlemlerine gerek duyulmaktadır (Budak ve Atay, 1997).

Alt yapısı yetersiz, gelişmekte olan veya kırsal bölgelerdeki suların potansiyel olarak insan ve hayvan dışkıları ile kontamine olduğu düşünüldüğünde suların 10dk veya daha uzun süre kaynatılması *Giardia* kistlerini öldürmek için yeterlidir. Kaynatmanın mümkün olmadığı durumlarda baz klor ile halojenizasyon (Halozene her bir litreye 5 tablet/30dk,klorlu çamaşırsuyu %5.25'likten galon başına 5ml) veya baz iyot (bir litreye 1 tablet/30dk.),ya da

satüre kristal iyot (12,5ml/lt 30dk ) etkili olmaktadır. *Giardia* kistleri 70°C'de 10 dakikada kistlerin %95'i inaktive olabilirken 50-60°C'de kistlerin %98'i inaktive olabilmektedir (Budak ve Atay, 1997).

Tuvalet kullanma alışkanlığının ve tuvalet sonrası tam gelişmemiş olması, bazı yerlerde insan dışkısının gübre olarak kullanılması toprak ve suyun kirlenmesine yol açmaktadır. İnsan dışkısının gübre olarak kullanıldığı yerlerde, giardiasis çığ olarak yenen iyi yıkanmamış sebze ve meyveler ile bulaşabileceği bildirilmektedir (Ak ve diğerleri,2007)

Giardiaosisde kişi hijyeni, aile hijyeni ve grup hijyeni önemli olduğundan tüm korunma tedbirlerinin gerek okullarda gerekse halk eğitim programları ile birlikte uygulanması gerekmektedir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran ve rutin tanı işlemleri sonrası dışkı örneklerinde *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoitleri saptanan 22'si kadın, 23'ü erkek toplam 45 hastadan alınan gaita örnekleri çalışmamıza dâhil edilmiştir. Çalışmaya alınan hastalara ait kişisel bilgiler ile hastalık yakınmaları kaydedilmiştir.

#### 3.1.1. Hastalara Parazitoloji laboratuvarında tanı konulması için uygulanan yöntemler

##### Dışkı Örneğinin Temini ve Saklanması

Hastalara dışkı örneği vermeleri için geniş ağızlı, kapaklı, plastik birer kap verilmiştir. Hastalardan dışkı örneklerini mümkünse evden getirmemeleri istenmiş, aksi halde oluşacak zaman kaybı sonucu, özellikle trofozoit formlarının bozulabileceği ve incelemenin yanlış negatif sonuçlar verebileceği anlatılmıştır. Ayrıca, hastalara getirilecek dışkı örneklerinin en az bir ceviz büyüklüğünde (20-25 gr) ya da ishali örnekler için 5 - 6 çorba kaşığı hacminde olması gerektiği bildirilmiştir.

Polikliniğe teslim edilen tüm dışkı kaplarına hastanın adı ve protokol numarası yazılmış ve bekletilmeden nativ-Lugol, formol-etil asetat ve trikrom boyama yöntemleri ile kültür için besiyerlerine ekim işlemleri gerçekleştirilmiştir.

##### Nativ Yöntemi

Dışkının % 0,9 NaCl (serum fizyolojik) içinde incelenmesi ile gerçekleştirilen basit ve etkili bir yöntemdir. Nativ inceleme ile, özellikle ishali dışkı örneklerinde hareketli trofozoitleri görmek mümkündür. Nativ preparatlarının hazırlanma ve incelenme zamanı ile incelemeyi yapacak personelin deneyimi önemlidir.

Çalışmada, bir lam üzerine hastanın protokol numarası yazıldıktan sonra, 1 damla nativ (% 0,9 NaCl) solüsyonu ile yaklaşık 2 mg dışkı, lif ve partikül kalmayacak şekilde dikkatlice karıştırılmış, üzerine 22x22 mm'lik lamel kapatılarak homojen bir preparat hazırlanmıştır. Preparat zaman kaybetmeden x40 büyütme objektif ile düşük ışık yoğunluğunda ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir.

##### Lugol Yöntemi

Lugol boyama yöntemiyle, kistlerin iç yapılarının ayrıntılı olarak görülmesi ve birbirlerinden ayırt edilmesi sağlanır.

##### Lugol solüsyonunun hazırlanması

1. 10 gr potasyum iyodür (KI) 100 ml distile su içinde çözünmüştür.
2. Doymuş solüsyon elde edilinceye kadar 5 gr iyot kristali eklenmiş, bir miktar iyot kristali çözünmeden kalmıştır.

3. Stok solüsyon koyu renkli ve cam kapaklı bir şişeye süzülerek aktarılmıştır.
4. Kullanım öncesi stok solüsyonu distile su ile 1:5 oranında sulandırılarak çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Çalışma solüsyonu, demli çay rengine olup rengi açılana dek, yaklaşık 2 hafta, kullanılmıştır.

#### **Yöntem**

Yaklaşık 2 mg dışkı ile 1 damla Lugol solüsyonu, temiz bir lam üzerinde, lif ve partikül kalmayacak şekilde dikkatlice karıştırılıp, üzeri 22x22 mm'lik lamelle kapatılarak homojen bir preparat hazırlanmıştır. Preparat zaman kaybetmeden x40 büyütme objektif ile düşük ışık yoğunluğunda ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir.

#### **Formol-Etil asetat Çoklaştırma Yöntemi**

Dışkıda parazitlerin çöktürülerek bir araya toplanması ve böylece tanı koyma şansının artırılması amacı ile kullanılır.

#### **%10'luk formolün hazırlanması**

1. 100 ml formaldehit solüsyonu 900 ml distile su ile karıştırılmıştır.

#### **Yöntem**

1. 1-2 gr taze dışkı 10 ml %10'luk formol ile temiz bir dışkı kabında iyice karıştırılmıştır. İshalli dışkıları ise 5-6 ml örnek kullanılmıştır.
2. Karışım, üzerine iki kat gazlı bez konulmuş plastik bir süzgeç yardımıyla temiz bir kaba süzölmüş, 10 ml kadar sıvı santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
3. Tüpteki bu süspansiyonun üzerine 3 ml etil asetat eklenmiş, lateks eldiven giyilerek tüpün ağzı baş parmak ile kapatılıp yaklaşık 1 dakika hızla karıştırılmıştır. Tüp içindeki basıncı azaltmak için ara sıra baş parmak kaldırılarak gaz çıkışı sağlanmıştır.
4. Süspansiyon, 400-500 g'de 2-3 dakika santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası tüpte yukarıdan aşağı doğru sırasıyla şu 4 tabaka tespit edilmiştir:
  - a) Etil-asetat tabakası
  - b) Duvara yapışan dışkı artıklarının oluşturduğu tabaka
  - c) Formol tabakası
  - d) Çökelti
5. Dışkı artıklarının neden olduğu tıkaçı ortadan kaldırmak için çubuk ile karıştırılmış ve üstteki üç tabakanın dökülmesi sağlanmıştır. Kenarlarda kalan sıvının az miktarının çökelti üzerine aktığı görülmüştür.
6. Cam Pastör pipeti ile bu sıvı ve çökelti karıştırılmış, karışımdan bir damla alınarak bir lam üzerine ayrı ayrı damlatılmış nativ ve Lugol solüsyonları ile karıştırılmıştır.
7. Her iki karışım 22x22 mm'lik lamellerle kapatılarak ışık mikroskopunda x10 büyütme objektifle helmint yumurtaları açısından, x40 büyütme objektifle ise protozoon kistleri açısından incelenmiştir.

## **Trikrom Boyama Yöntemi**

### **Schaudinn Fiksatif**

#### **Fiksatifin Hazırlanması**

1. 85 gr civa klorür ( $\text{HgCl}_2$ ) 1000 ml distile su içinde ısıtılarak eritilmiştir.
2. Soğumaya bırakılan doymuş civa klorür solüsyonu cam kapaklı bir şişeye süzülerek saklanmıştır.
3. 600 ml doymuş civa klorür solüsyonu, 300 ml %95 etil alkol ve 15 ml gliserin ile karıştırılarak "Stok Schaudinn Solüsyonu" elde edilmiştir.
4. Kullanım öncesi, 95 ml stok solüsyona 5 ml glasiyel asetik asit eklenmiştir.

#### **Yöntem**

1. Rodajlı bir lam alınarak hastanın protokol numarası kurşun kalemle yazılmıştır.
2. Temiz bir suluboya fırçası ile alınan dışkı örneğinden lamın 1/3'ünü kaplayacak şekilde ince bir yayma hazırlanmıştır.
3. Katı dışkıları yayma öncesi birkaç damla serum fizyolojik ile yumuşatılmış, ishalleri dışkıların lama daha iyi yapışabilmesi için lama önceden bir damla distile su ile %20'lik sıgır serum albümini ince bir tabaka halinde sürülmüştür.
4. Boyama sonunda iyi bir preparat elde edebilmek için yaymanın ince olmasına önem verilmiş, arkasındaki gazete yazısı okunabilen yaymalar, kurumaları beklenmeden hızla Schaudinn fiksatifine daldırılmıştır.

### **Trikrom Boyası**

Hazır trikrom boyası (SIGMA HT 3-10-16) kullanılmıştır.

#### **D'Antoni'nin Modifiye İyot Solüsyonu**

1. 1 gr potasyum iyodür (KI) 100 ml distile suda eritilmiştir.
2. Solüsyona 1,5 gr iyot kristalleri eklenmiş, kırmızı-kahverengi arası bir renk oluşana ve doymuş solüsyon elde edilene dek çalkalanmıştır.
3. Bir miktar iyot kristali çözünmemiş olarak kalmıştır.
4. Solüsyon cam kapaklı ve koyu renkli bir şişeye süzülüp saklanmış, her 15 günde bir yeni solüsyon hazırlanmıştır.

#### **%90 Asit Alkol**

995,5 ml % 90 etil alkole 4,5 ml glasiyel asetik asit eklenerek elde edilmiştir.

#### **Karbol-Ksilen Solüsyonu**

1. Bir ölçek karbolik asit (sıvı fenol kristalleri) ile üç ölçek ksilen karıştırılmıştır.
2. Solüsyon cam kapaklı şişede 1 yıl veya daha fazla saklanabilir.

#### **Trikrom Boyama Yönteminin Uygulanması**

Trikrom boyama yöntemi için her biri 9 lam alabilen kapaklı, derin, cam şaleler kullanılmıştır. Her şalenin kapağına sıra numarası, solüsyonun içeriği ve yaymanın bu şalede kalma süresi

yazılmıştır. Yaymalar bir şaleden diğerine aktarılırken kurutma kağıtlarına değdirilerek fazla sıvı alınmış ve bu şekilde solüsyonların karışması engellenmiştir.

1. Dışkılardan hazırlanan yaymalar kurumadan Schaudinn fiksatifine daldırılmış ve en az 30 dakika, en çok bir gece bırakılmıştır.
2. Fikse edilmiş yaymalar, % 70'lik etil alkole demli çay rengi oluşuncaya dek D'Antoni'nin iyot solüsyonu eklenmesiyle elde edilen solüsyonda 4 dakika tutulmuştur.
3. Yaymalar iki ayrı % 70 alkol solüsyonundan ilkinde 3, ikincisinde 4 dakika tutulmuştur.
4. Yaymalar hazır trikrom boyası içeren şalede 7 dakika tutulmuştur.
5. Fazla boyası kurutma kağıtlarında süzülen lamalar daha sonra dekolorizasyon için 2-3 saniye % 90 asit-alkol solüsyonuna daldırılmış, iki ayrı % 95'lik alkol solüsyonlarında çalkalanmış ve karbol-ksilen solüsyonuna aktarılmıştır.
6. Yaymalar iki ayrı karbol-ksilen solüsyonundan ilkinde 3, ikincisinde 4 dakika tutulmuştur.
7. Yaymalar iki ayrı ksilen içeren şalede sırasıyla 3 ve 4 dakika tutulmuştur.
8. Yaymalar kurumadan Entellan® solüsyonu damlatılarak 22x22 mm'lik lamelle kapatılmış ve ışık mikroskopunda x100'lük büyütmeli immersiyon objektifinde incelenmiştir.

### 3.2. DNA izolasyonu

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji A.D. Parazitoloji Laboratuvarı'nda mikroskopik incelemeler ile *G. intestinalis* açısından pozitif bulunan hastalara ait gıata örnekleri DNA izolasyonları yapılıncaya kadar birkaç gün +4°C'de tutulmuştur. *G. intestinalis* kistlerinin kist duvarlarının güçlü olması nedeniyle DNA izolasyonunda zorluk çıkmaktadır. Bu nedenle izolasyon işleminden önce kistlerin parçalanması amacıyla Roche Manga-Lyser® ile muamele edilmiştir. İçinde 1,4 mm çapında seramik boncuk bulunan (Manga Lyser Green Beads) 2ml'lik özel plastik tüplere 500 µl tamponlu bir tuz çözeltisi olan soğutulmuş 1 M PBS (Phosphate Buffered Saline) eklenir. Üzerine yaklaşık 1,5 mg gaita örneği eklenir ve yüksek hızda vorteks yardımıyla 30 sn kadar karıştırılır. İşlemin sonunda örnekler Magnalyser cihazında 6500 devirde 1 dk karıştırma işlemi uygulanır. İşlem sonunda tüp içerisindeki süspanse halindeki örnekten 200 µl alınır ve 2 ml mikrosantrifüj tüpüne konur. DNA izolasyon işlemi bu aşamadan itibaren DNA izolasyon kitinin gaita izolasyon protokolüne uygun olarak Qiagen® dışkı izolasyon kitiyle (QIAmp DNA Stool Mini Kit, Cat. No. 51504) yapılmıştır. Elde edilen izolatlar PZR işlemi yapılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

### 3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu

Herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' da dizisi bilinen herhangi bir bölgenin enzimatik olarak çoğalmasına (amplifikasyon) olanak veren *in vitro* DNA sentez yöntemidir. PZR, çift iplikli

bir DNA molekülünde hedef dizilere uygun oligonükleotid primerlerin bağlanması ve uzaması esasına dayanmaktadır. PZR, tekrarlanan 3 basamaktan oluşmaktadır;

- 1) Çoğaltılmak istenen DNA' nın yüksek sıcaklıkta denatüre edilerek tek zincirli hale getirilmesi (denatürasyon) (90 - 95 °C)
- 2) Özgül hibridizasyonun gerçekleşmesini sağlayacak sıcaklıkta (T<sub>m</sub> değerinin 3 – 5 °C altındaki sıcaklık), primerlerin hedef bölgeye bağlanması (annealing ) (37 - 65 °C)
- 3) *Taq* DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72 °C de zincirin primerlerden itibaren uzaması (elongation) (70 -75°C).

### 3.4. Gerçek- Zamanlı PZR (Real-Time-PCR)

LightCycler cihazı kullanılarak yapılan gerçek-zamanlı PZR reaksiyonu, moleküler genetikte bir reaksiyonda polimorfik DNA bölgelerinin kantifikasyonunun ve tek nükleotid polimorfizm (SNP) genotiplendirilmelerinin yapılabildiği yeni bir tekniktir (Reuter et al, 2005). Bu teknik kullanılarak nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif değerler elde edilebilmektedir. Hedefe özgül problemler kullanılarak yapılan PZR işleminde problemlerin birinde 3' ucundan floresans boya ile işaretli (donör boya) diğeri 5' ucunda alıcı boya (acceptor dye=akseptör boya) ile işaretlenmiştir. Problemler hedef ampliconlar üzerinde bir birine yakın (1-5 nükleotit uzaklıkta) bir yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. Floresans rezonans enerji transferi (FRET) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine başka bir ifade ile PZR döngü süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artmaktadır (Durmaz, 2001)

LightCycler cihazı ile genotipleme çalışmalarında özgün primerlerin yanında testin özgüllüğünü arttırmak amacıyla hedefe özgü hibridizasyon problemleri kullanılmaktadır. Bu hibridizasyon problemleri, Floresans boya ile işaretlenen diziye özgü oligonükleotid problemlerdir. LC cihazının ışık kaynağından (LED= Light Emitting Diode) yayılan 470 nm' deki mavi ışık, fluorescein ile işaretlenmiş olan sensör probunu uyararak daha uzun dalga boyundaki (530 nm) yeşil floresans ışığının yayılmasına neden olmaktadır. LC cihazının optik ünitesi, 3 farklı kanal ile aynı zamanda floresans ölçümü yapabilmektedir. 530 nm' de Kanal 1 (F1) SYBR Green I ve fluorescein boya ile kullanılarak, 640 nm' de LC Red 640 boyasını kullanarak Kanal 2' de (F2), 705 nm' de LC Red 705 boyası kullanılarak Kanal 3' de (F3) sinyalleri ölçmektedir.

### 3.5. Erime Eğrisi Analizi

Amplifikasyon metodunun gerçek zamanlı olarak görüntülenmesine ek olarak amplifikasyondan sonra erime eğrisi analizi aşamasında diziye özgü hibridizasyon problemlerinin tek iplikli DNA' ya hibridizasyonu ile mutasyonların, tek nükleotid polimorfizmlerinin belirlenmesini ve gerçek zamanlı olarak görüntülenmesi gerçekleştirilmektedir.

Bu aşamada sıcaklık yavaş yavaş 40°' den 75°C' ye yükselir. Hibridizasyon problemlerinin DNA zincirine hibridizasyonunu sağlayan kritik sıcaklık (T<sub>m</sub>), mutasyon veya SNP' nin var olup olmadığına belirleyicisidir (Reuter et al, 2005).

Herhangi bir baz değişikliğinin oluşmadığı bir durumda, hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşir. Baz değişikliğinin söz konusu olduğu durumlarda ise hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşemez. İki eşleşme karşılaştırıldığında baz değişikliğini içermeyen DNA kalıbı, baz değişikliğini içeren DNA kalıbına göre daha yüksek erime sıcaklığı derecesine sahip olmaktadır. İki T<sub>m</sub> derecesi arasındaki fark ile DNA zincirinde mutasyon olup olmadığı belirlenebilmektedir. Bu erime eğrisi analizi sonucunda, floresan şiddetinin düşüşüne neden olan sıcaklık derecesine göre değerlendirilerek hastanın o gen için genotiplendirilmesi yapılmaktadır. Buna göre homozigot wild type genotipler yüksek sıcaklıkta tek pik, homozigot mutant genotipler düşük sıcaklıkta tek pik, ve heterozigot genotipler ise düşük ve yüksek sıcaklıkta 2 pik oluşturmalarına göre 3 farklı genotip belirlenebilmektedir.

Hızlı ısıtma ve soğutma özelliğine sahip olan LightCycler cihazı, 20-30 dakika içinde 30-40 PCR döngü gerçekleştirdiğinden çalışmalarda oldukça avantaj sağlamaktadır (Lohmann et al, 2000; Reuter et al, 2005). Gerçek zamanlı-PZR cihazı yüksek hızı yanında, kontaminasyon riskini de minimuma indirmektedir. Ayrıca, amplifikasyon işlemi eş zamanlı olarak bilgisayarda görüntülenebildiği için PZR döngüsü başarısız olduğunda, reaksiyon çok geçmeden sonlandırılabilir veya döngü artışı yapılabilir (Reuter et al, 2005). Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon ürünlerinin gözlenmesi en büyük kolaylığı sağlamaktadır. LC cihazı ile günde yaklaşık 200 örnek çalışılabilirken, RFLP ile günde maksimum 20 örnek çalışılabilir.

### 3.6. Gerçek Zamanlı PZR İşlemi

İzole edilen DNA örneklerinde genotipik farklılıklarının belirlenmesi, LightCycler™ Instrument (Roche Applied Science; Mannheim, Germany) cihazı kullanılarak gerçek-zamanlı PZR metodu ile analiz edilmiştir. *Giardia intestinalis*'in *tpi* gen bölgesindeki genotipik farklılıkların belirlenmesi için termal profil oluşturulmuştur. Termal profil; denatürasyon, amplifikasyon, erime eğrisi analizi ve soğutma programlarından oluşmaktadır. Analiz için

uygulanması planlanan termal profil çizelgele 3.2 ve 3.6'da verilmiştir. Bu veriler LightCycler cihazının hafızasına çalışma protokolü olarak kaydedilecektir.

Her bir hasta örneği, *Giardia intestinalis*'in *tpi* gen bölgesindeki genotipik farklılıkların belirlenmesi için iki aşamalı bir PZR planlanmıştır. Aynı ayrı hazırlanan reaksiyonlar, farklı zamanlarda LightCycler cihazına ait özel camdan yapılmış 20 µl' lik kapiller tüp içerisine konmuştur. Kapiller tüpler 4.000 rpm' de 10 saniye santrifüj edilerek reaksiyon karışımının her bir kapiller tüpün dibine çökmesi sağlanmıştır. Tüpler reaksiyon tepsisine dizilmiş ve sonra tepsi ile birlikte LightCycler cihazına yerleştirilmiştir. Sonuçlar hem kantitatif olarak değerlendirilmiş, hem de erime eğrisi analizi ile özgünlüğü saptanmıştır. Genotipik farklılıkların belirlenmesi, kanal 1' den floresan ölçümü yapılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.7. *tpi* Genini Amplifikasyonu

Elde edilmiş tüm izolatların *tpi* geni amplifiye edilmiştir. Forward primer olarak 5' TGGACCGGCGAGACAAG-3, reverse primer olarak 5'GCTTCCCTCAAGCCGGA-3 primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon 10 µl hacimde Light Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı ve termel profil çizelge 3.1 ve 3.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *tpi* gen bölgesinin 1. aşama amplifikasyonu için hazırlanan Reaksiyon karışımı

| Reaksiyon Bileşenleri          | Miktar |
|--------------------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O               | 3,7 µl |
| MgCl <sub>2</sub>              | 0,8 µl |
| Forward primer                 | 1 µl   |
| Reverse primer                 | 1 µl   |
| Taq polimeraz ve dNTP karışımı | 1 µl   |
| Genomik DNA                    | 2,5 µl |
| Total Hacim                    | 10 µl  |

Çizelge 3.2. 1. PZR için Termal profil

|                        | Hedef sıcaklık (°C) | İnkübasyon zamanı dk veya sn | Döngü Sayısı |
|------------------------|---------------------|------------------------------|--------------|
| <b>Denatürasyon</b>    | 95 (°C)             | 10 dk                        | 1            |
|                        | 95 (°C)             | 10 sn                        |              |
| <b>Amplifikasyon</b>   | 53 (°C)             | 10 sn                        | 45           |
|                        | 72 (°C)             | 15 sn                        |              |
| <b>Soğutma Analizi</b> | 40 (°C)             | 30 sn                        | 1            |

### 3.8. İkinci Aşama Gerçek Zamanlı PZR İşlemi

Amplifiye edilmiş *tpi* bölgesi içinde sekans analizleri neticesinde nispeten daha küçük bir bölge seçilerek bu bölgelere özgü primer ve problemler dizayn edilerek genotipik ayrımların yapılabilmesi sağlanmıştır. Gen bölgesindeki genotipik farklılıklar, A genotipi için Forward: 5'CTGCGTCGGAGAGACCCTTGG-3, reverse: 5-CGTAAGCAATGACAACCTCCTTCC-3 primerleri B genotipi için forward: 5'-CAGAGTGCTAAAGAAGGCGAAG-3, reverse: 5'CGTTCTCCCATAACTTCTTTGATTC-3 primerleri kullanılmıştır. A genotipi sekans örnek analiz sonuçlarından elde edilen veriler kullanılarak dizayn edilen 5'GCCTCAAGCTGGGCGATGTTACC-FL ve 5'-LC640-CATGGTGCGGTTGGCCTTGCG-PH DNA problemleri kullanılacaktır. Aynı şekilde B genotipi sekans örnek analiz sonuçlarından elde edilen veriler kullanılarak dizayn edilen 5'-AAGAGCCTCGAGCTGAGCAATATTCACC-FL ve 5'-LC640-CATAGTGTTTATTGGCCTTGCGTTCATCC-PH problemleri kullanılmıştır (Şekil 3.3 ve 3.4).

Kullanılan primerler elimize liyofilize (toz) halde gelmiş olup 251µl distile su ile sulandırılarak 20 µM'lık derişim sağlanmıştır. Reaksiyon; toplam 20 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. *Tpi* gen bölgesindeki genotipik farklılıklar, analiz sonucunda elde edilen spesifik erime eğrisi pik derecelerine göre belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. A genotipini belirlenmesi için amplifiye edilen 131 bp'lik gen bölgesi. Altı çizili diziler kullandığımız primerler, yeşil ve kırmızı diziler problemler.

**CTGCGTCGGAGAGACCCTTGG**ATGAG**CGCAAGGCCAACC****GCACCATG**  
GAG**GGTGAACATCGCCAGCTTGAGGC**GCTTGGCAAGGAGCTCGGAGA  
GTCCAAGATGCTCT**GGAAGGAGGTTGTCATTGCTTACG**

Çizelge 3.4. B genotipini belirlenmesi için amplifiye edilen 169 bp'lik gen bölgesi. Altı çizili diziler kullandığımız primerler, yeşil ve kırmızı diziler problemler

**CAGAGTGCTAAGAAGGCGAAG**CGTGCTCTGGACAAAGGTATGACTGTTA  
TCTTCTGCACCGGAGAGACCCT**GGATGAACGCAAGGCCAATAACACTATG**  
GAG**GGTGAATATTGCTCAGCTCGAGGCTCTT**AAGAAGGAGATTGGAG**GAA**  
**TCAAAGAAGTTATGGGAGAACG**

Tüm örneklerin 1. aşama PZR sonucu oluşan ürünleri kalıp olarak kullanılarak 2. aşamada A ve B genotipine özgün primer ve problemler kullanılarak tüm örnekler ayrı ayrı reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyonlar 10 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilip erime eğrisi analizi yapılmıştır. A genotipi için reaksiyon karışımı her bir örnek için 1,7 µl distile su, 0,8 µl- 25 µM'lık Magnezyum iyonu, forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, prob 1(donör) 1 µl, prob 2

(akseptör) 1 µl *Taq* polimeraz enzimi 1 µl ve son olarak 1. PZR ürünü olan kalıp DNA'dan 2,5 µl sırasıyla 20 µl'lik kapiller reaksiyon tüplerine konmuştur. Kapiller tüpe konduktan sonra tüpler 10 sn 4000 devirde kısa süreliğine santrifüj edilerek reaksiyon karışımının tüpün dibine çökmesi sağlanmıştır. Aynı işlemler tüm örnekler B genotipine ait primer ve problemler kullanılarak tekrar aynı hacimde ve aynı işlemleri tekrarlıyarak yapılmıştır (Çizelge 3.5) Tüpler LightCycler™ cihazına yerleştirilmiş ve örnek numaraları ve termel profil bilgisayara girilerek reaksiyon başlatılmıştır. A ve B genotipine ait termel profil Çizelge 3.6 da verilmiştir. A ve B genotipleri PZR işleminden sonra erime eğrisi analizleri LightCycler™ cihazının bilgisayar yazılımı ile yapılmıştır.

Çizelge 3.5; A ve B genotip hazırlanan reaksiyon bileşenleri ve miktarları

| Reaksiyon Bileşenleri         | Miktar |
|-------------------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O              | 1,7 µl |
| MgCl <sub>2</sub>             | 0,8 µl |
| Forward primer                | 1 µl   |
| Reverse primer                | 1 µl   |
| Prob 1 (donör)                | 1 µl   |
| Prob 2 (akseptör)             | 1 µl   |
| <i>Taq</i> polimeraz enzimi   | 1 µl   |
| 1.Aşama PZR ürünü(DNA kalıbı) | 2,5 µl |
| Total Hacim                   | 10 µl  |

Çizelge 3.6; A ve B genotipi için termel profil ve erime eğrisi profili

|                                | Hedef ısı<br>(°C)    | İnkübasyon Zamanı<br>dk-sn   | Döngü Sayısı |
|--------------------------------|----------------------|------------------------------|--------------|
| Pre- İnkübasyon                | 95                   | 10dk                         |              |
| Amplifikasyon                  | 95<br>58<br>54<br>72 | 10sn<br>10sn<br>10sn<br>15sn | 45           |
| A için<br>Erime Eğrisi Analizi | 90<br>40<br>80       | 0<br>10sn<br>0               | 1            |
| B için Erime Eğrisi<br>Analizi | 90<br>50<br>40<br>80 | 0<br>10sn<br>10sn<br>0       | 1            |
| Soğutma Analizi                | 40                   | 30sn                         | 1            |

#### 4. BULGULAR

Çalışmada toplam 45 hastanın dışkı örneği *Giardia intestinalis* kist ve/veya trofozoitlerinin gerçek zamanlı PZR cihazında diziye özgü DNA problemleri kullanılarak yapılan analizler ile genotipleri belirlenmiştir. Hastaların büyük bir kısmını %71,1'ni 10 yaş altı hastalar oluştururken genel hasta yaş ortalaması 10,7'dir (yaş aralığı 1-48). Analizi yapılan örneklerin %51,1 erkek, %49,9 kadın hastalara aittir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. G.intestinalis genotiplerinin yaş ve cinsiyete göre dağılımları

| Genel Özellikler |        | G. intestinalis grupları (Genotip) |      |   |      |     |      | Toplam n(%) |
|------------------|--------|------------------------------------|------|---|------|-----|------|-------------|
|                  |        | A                                  | n%   | B | n%   | A+B | n %  |             |
| Yaş Grupları     | 0-5    | 14                                 | 73,6 | 1 | 5,3  | 4   | 21   | 19 (%42,2)  |
|                  | 6-10   | 8                                  | 61,5 | 3 | 23   | 2   | 15,4 | 13 (%28,9)  |
|                  | 11-15  | 6                                  | 100  | 0 | 0    | 0   | 0    | 6 (%13,3)   |
|                  | 16-20  | 0                                  | 0    | 0 | 0    | 1   | 100  | 1 (%2,2)    |
|                  | ≥ 21   | 5                                  | 83,3 | 1 | 16,7 | 0   | 0    | 6 (%13,3)   |
|                  | Toplam | 33                                 | 73,3 | 5 | 11,1 | 7   | 15,5 | 45(%100)    |
| Cinsiyet         | Kadın  | 16                                 | 72,7 | 1 | 4,5  | 5   | 22,8 | 22(%49,9)   |
|                  | Erkek  | 17                                 | 73,9 | 4 | 17,4 | 2   | 8,7  | 23(%51,1)   |
|                  | Toplam | 33                                 | 73,3 | 5 | 11,1 | 7   | 15,5 | 45 (%100)   |

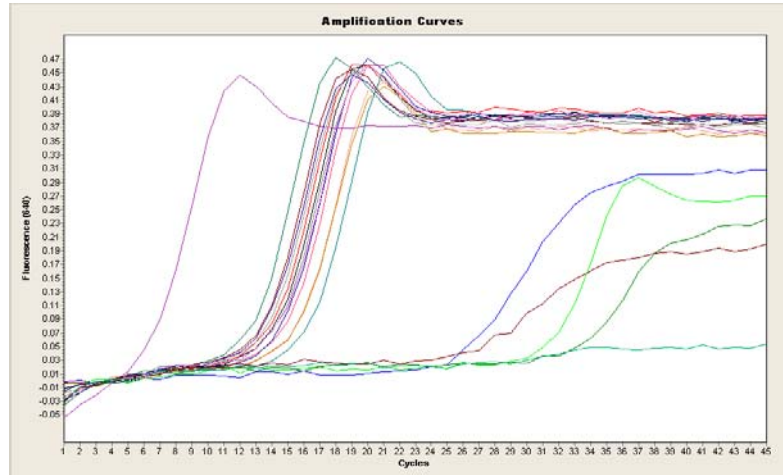
##### 4.1. Gerçek zamanlı PZR Bulguları

Toplam 45 izolatin hepsi 1. aşama PZR ile başarılı bir şekilde amplifiye olmuşlardır. İkinci aşama PZR'de A ve B genotiplerine özgü primer ve prob kullanılarak 45 örnek başarılı bir şekilde amplifiye edilmiş ve erime eğrisi analizleri ile genotipik ayrımları yapılmıştır. A genotipi için erime sıcaklığının pik değeri olarak ( $T_m$ )  $72,15^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ ), B için  $T_m$  değeri ise  $69,64^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ ) olarak hesaplanmıştır. Bazı örnekler  $T_m$  değeri olarak yaklaşık  $69^{\circ}\text{C}$  ve  $72^{\circ}\text{C}$ 'de iki adet pik verdikleri gözlemlenmiştir. Bu örnekler, çok lokuslu gene sahip olduklarından karışık enfeksiyon (A+B) olarak bulunmuştur. Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6'da A ve B genotiplerine ait amplifikasyon eğrileri ve erime eğrileri analizlerini göstermektedir.

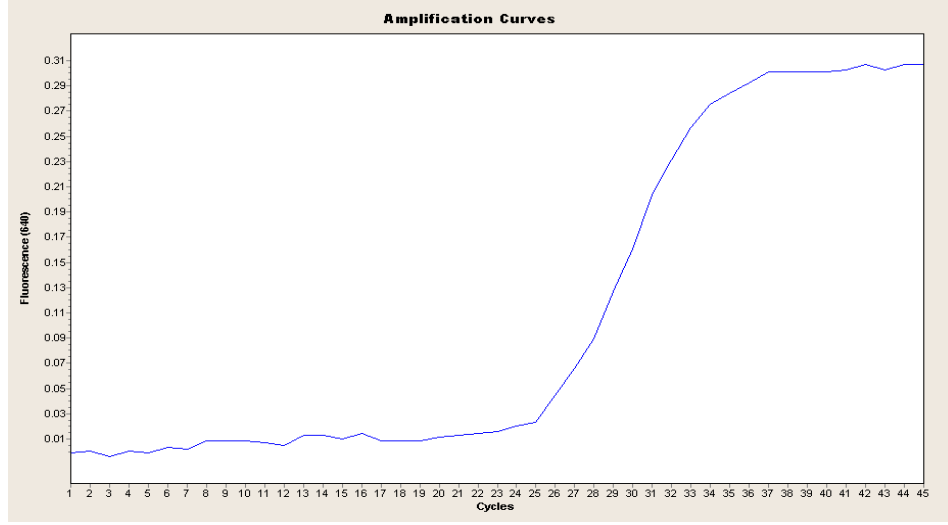
Erime eğrisi analizleri sonrasında 45 örneğin 33'ü (%73,3) A genotipi, 5 örnek (% 11,1) B genotipi, 7 örneğin ise (%15,5) karışık enfeksiyon A ve B genotipi olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Semptomların, genotipler ve toplam örnek sayısı içindeki dağılımı

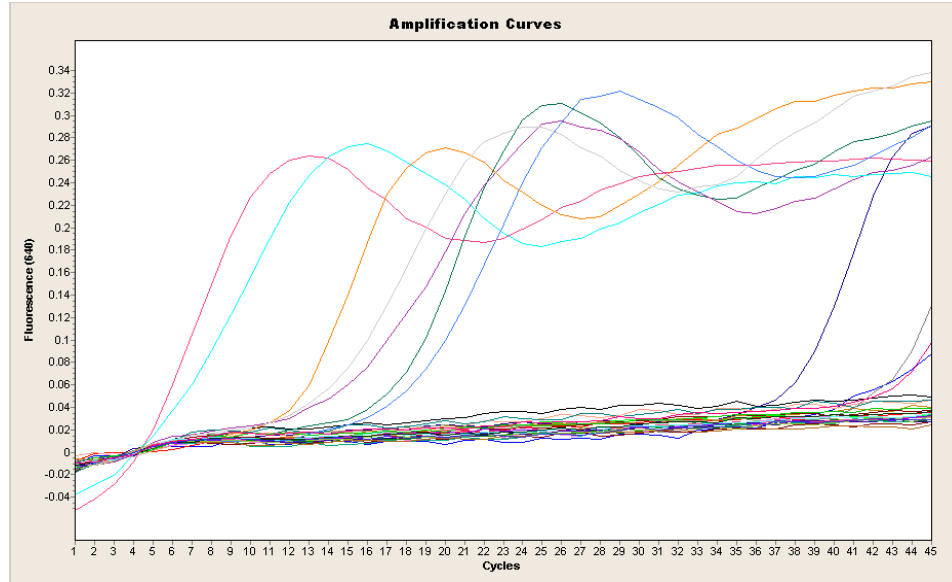
| SEMPTOMLAR              | Giardia Genotip  |                 |                 | TOPLAM<br>n (%) |
|-------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                         | A<br>n (%)       | B<br>n (%)      | A+B<br>n(%)     |                 |
| Karın ağrısı            | 12 (26,6)        | 2 (4,4)         | 3 (6,6)         | 17 (37,7)       |
| İshal                   | 8 (17,7)         | 1 (2,2)         | 2 (4,4)         | 11 (24,4)       |
| Karın ağrısı ve ishal   | 0                | 1(2,2)          | 0               | 1(2,2)          |
| İshal ve ateş           | 1(2,2)           | 0               | 0               | 1(2,2)          |
| Alerji                  | 3 (6,6)          | 0               | 0               | 3 (6,6)         |
| İshal ve alerji         | 1 (2,2)          | 0               | 0               | 1 (2,2)         |
| Gelişme geriliği        | 1 (2,2)          | 0               | 0               | 1 (2,2)         |
| Gaz ve şişkinlik        | 2 (4,4)          | 0               | 1 (2,2)         | 3 (6,6)         |
| Kilo kaybı              | 0                | 0               | 1(2,2)          | 1(2,2)          |
| Mide bulantısı          | 1 (2,2)          | 0               | 0               | 1 (2,2)         |
| İshal ve mide bulantısı | 2 (4,4)          | 0               | 0               | 2 (4,4)         |
| Makat ağrısı            | 0                | 1(2,2)          | 0               | 1(2,2)          |
| Semptom yok             | 2 (4,4)          | 0               | 0               | 2 (4,4)         |
| <b>TOPLAM<br/>n(%)</b>  | <b>33 (73,3)</b> | <b>5 (11,1)</b> | <b>7 (15,5)</b> | <b>45(100)</b>  |



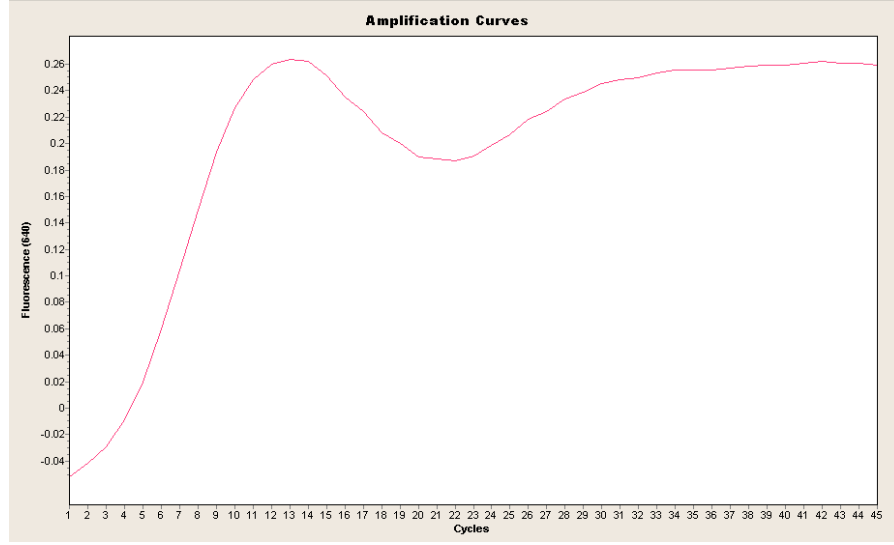
Şekil 4.1. A genotipi primer ve problemleri kullanılarak gerçekleştirilen örneklerin amplifikasyon eğrileri



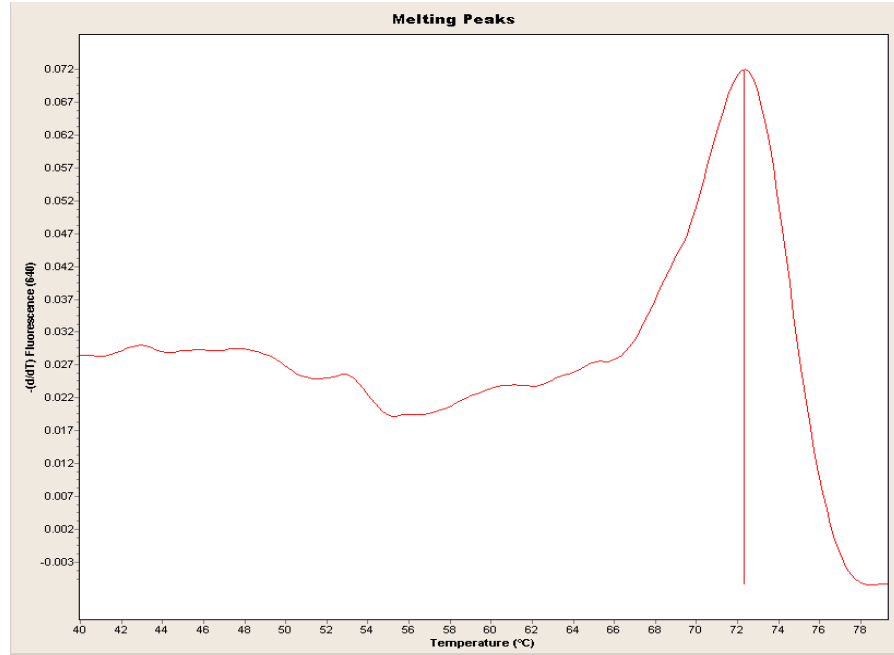
Şekil 4.2. Tek bir A genotipine ait amplifikasyon eğrisi



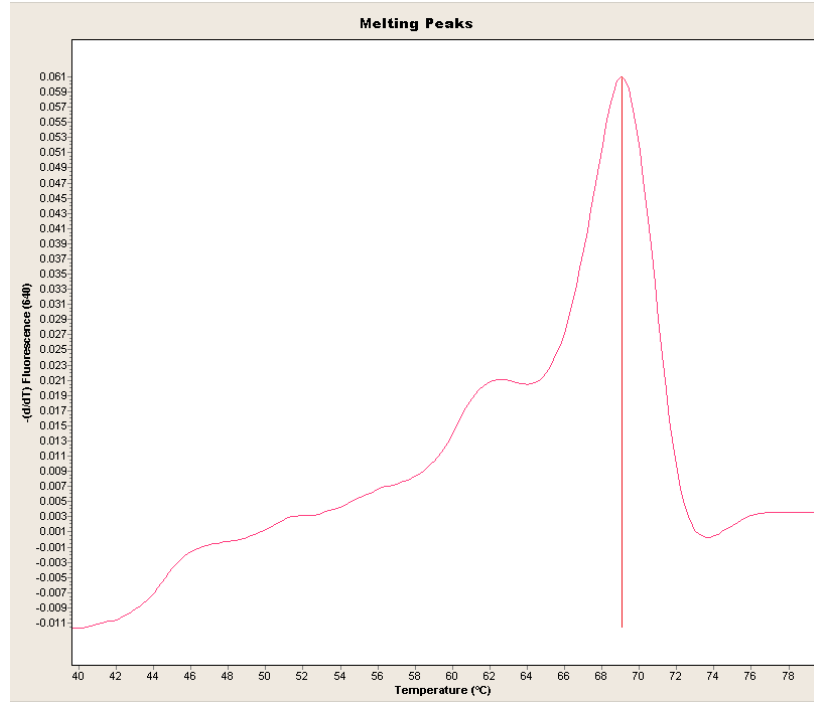
Şekil 4.3. B genotipi primer ve probaları kullanılarak gerçekleştirilen örneklerin amplifikasyon eğrileri. Döngüye girmeyen örnekler B genotipine ait olmayan izolatlarıdır.



Şekil 4.4. Tek bir B genotipine ait amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.5. A genotipi erime eğrisi analizi. T<sub>m</sub> değeri 72,32°C



Şekil 4.6. B genotipi için erime eğrisi analizi T<sub>m</sub> değeri 69,06°C

#### 4.2 Genotip, Semptom ve Yaş İlişkisi

Hastaların çoğunda 43/45 (%95,5) *Giardia* enfeksiyonu ile ilişkili bir ya da birden fazla semptoma rastlanırken sadece 2 hastada herhangi bir semptom bildirilmemiştir. Hastalar tarafından en sık bildirilen semptomların karın ağrısı 17/45 (%37,7) ve ishal 11/45 (%24,4) olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2). Karın ağrısı belirtilerini gösteren toplam 17 hastanın 12 (%70,6) A genotipi, 2'si (%11,78) B genotipi ve 3'ü (17,6) A+B genotipi bulunmuştur. İshal belirtileri gösteren toplam 11 hastanın 8'i (%72,8) A genotipi, 1'i (%9) B genotipi, 2'si (%18,2) A+B genotipi olduğu gösterilmiştir (Şekil: 4.7).

Semptomların genotiplere göre dağılımında A genotipi diğer genotiplerden daha fazla sayıda semptomla ilişkili olduğu dikkat çekmiştir. A genotipi olarak saptanan 33 örneğin 12/33'ü (%37) karın ağrısı, 8/33'ü (%24) ishal, 3/33'ü (%9) alerji semptomları gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.8).

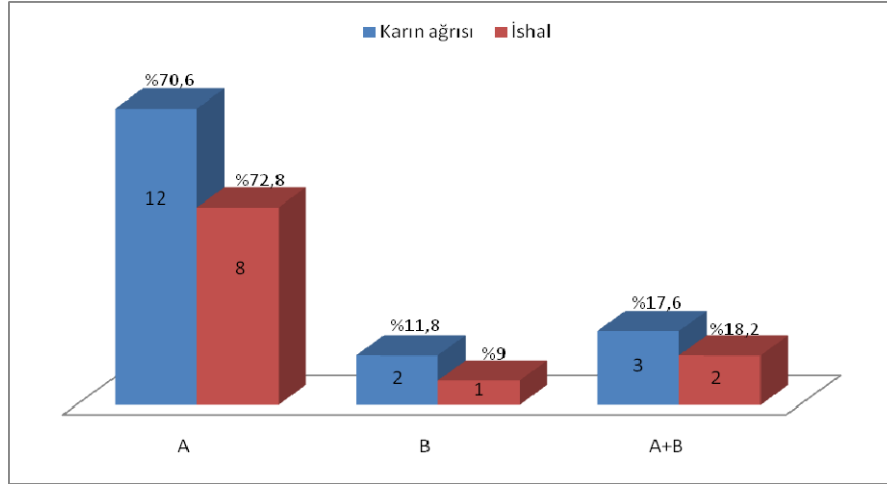
B genotipi olarak saptana 5 örneğin 2/5'i (%40) karın ağrısı belirtileri gösterirken geri kalan 3 örneğin biri isahal, biri karın ağrısı ve ishal ve diğeri ise makat ağrısı belirtileri gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.9).

Çalışmada karışık enfeksiyon olarak saptanan 7 izolata, karın ağrısı ve ishal belirtilerinin baskın olduğu dikkat çekici olarak bulunmuştur (Şekil 4.10)

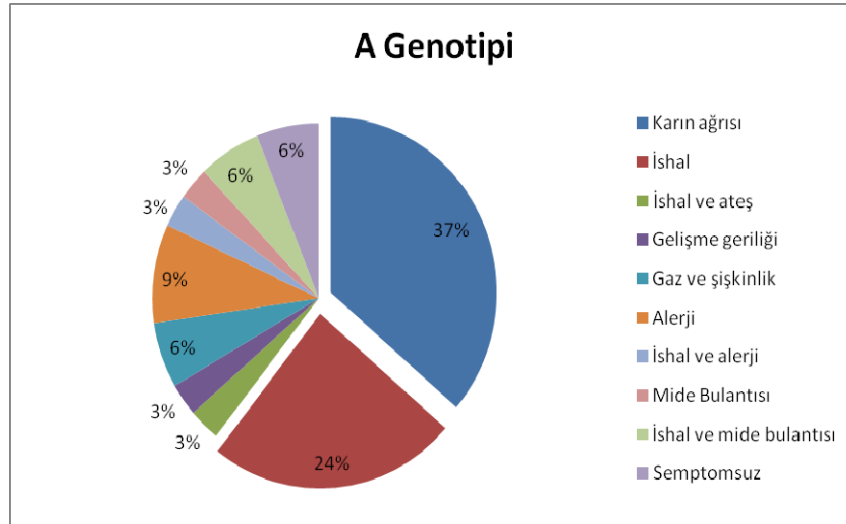
Beş yaş altı 19 hastanın 14/19'u (%73,7) A genotipi bulunurken 4/19'u (%21,1) A+B genotipi bulunmuştur. Sadece 1/19 (%5,2) hastanın B genotipi olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.11).

Altı – on yaş arası 13 hastanın 8/13'ü(%61,5) A genotipi, 3/13'ü (%23,1) B genotipi olarak bulunurken 2/13'ü (15,4) karışık enfeksiyon olarak bulunmuştur (Şekil 4.12) Onbir- onbeş yaş arası toplam 6 hastanın hepsi A genotipi olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1).

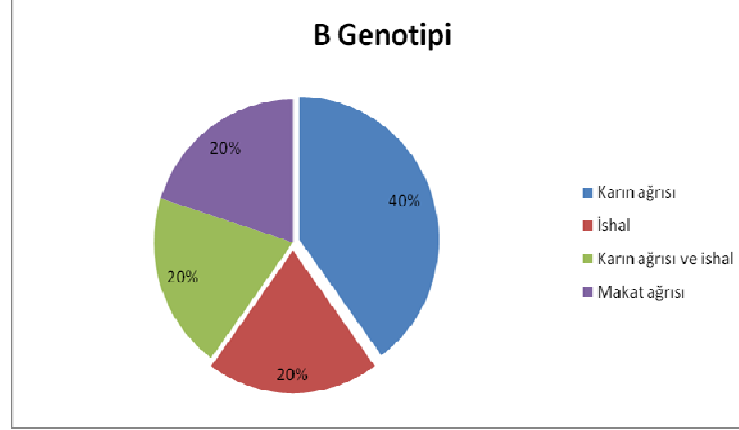
Yirmi bir yaş üstü toplam 6 hastaya ait izolatin 5/6'i (%83,3) A genotipi, 1/5'i (%16,7) B genotipi olduğu gösterilirken karışık enfeksiyona rastlanmamıştır. (Şekil:4.13)



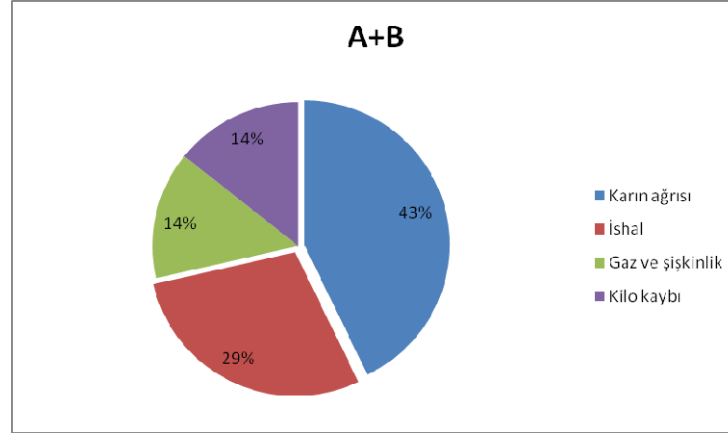
Şekil 4.7. Karın ağrısı ve ishal semptomlarının genotiplere göre dağılımı



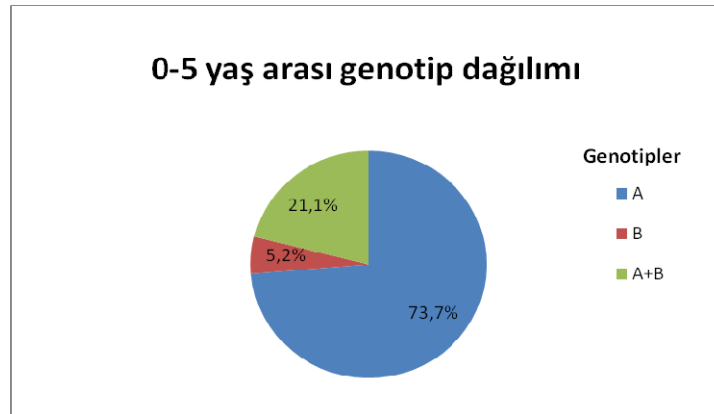
Şekil 4.8. A genotipi ile ilişkili semptomlar



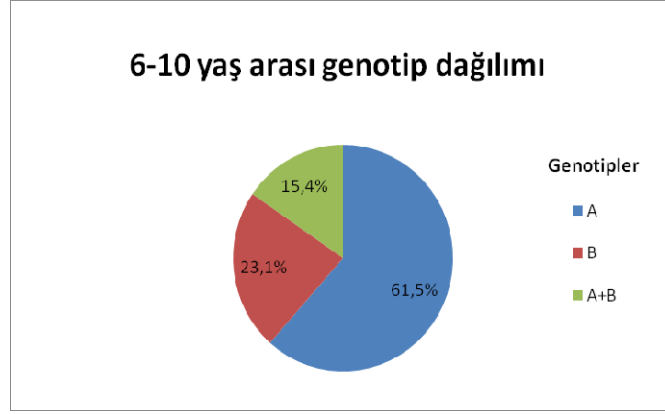
Şekil 4.9. B genotipi ile ilişkili semptomlar



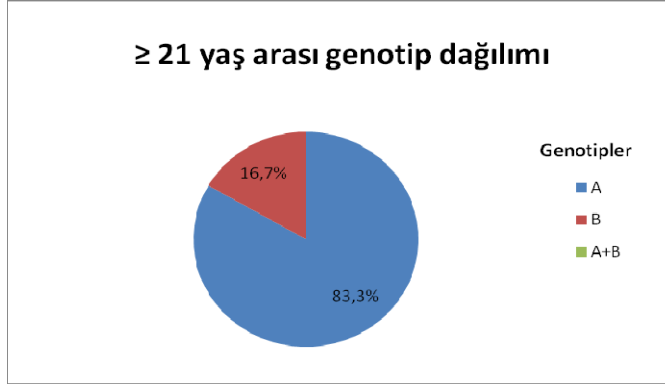
Şekil 4.10. Karışık enfeksiyon ile ilişkili semptomlar



Şekil 4.11. 0-5 yaş arası hasta izolatlarının genotiplere göre dağılımı



Şekil 4.12. 6-10 yaş arası hasta izolatlarının genotiplere göre dağılımı



Şekil 4.13. 21 yaş üstü hasta izolatlarının genotiplere göre dağılımı

## 5. TARTIŞMA

Farklı konaklara sahip 6 *Giardia* türü bulunmasına karşın *G. intestinalis* insanda hastalık yapan tek türdür. Bununla beraber *G. intestinalis*, evcil hayvanlarda, çiftlik hayvanlarında ve geniş bir ölçüde vahşi hayvanlarda bulunabilmektedir. Moleküler biyolojik tekniklerin gelişmesiyle birlikte insan ve memelilerden elde edilen izolatların, moleküler yapılarının heterojeniteye sahip olduğu saptanmıştır. Moleküler biyolojik ve enzim analizi çalışmaları *G. intestinalis*'in 7 farklı genotipten (grup) oluşan bir tür kompleks olduğunu gösterilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan hayvan çeşitliliği artıkça ve buna paralel olarak kullanılan yöntemler geliştikçe bu 7 genotipin alt tipleri belirlenmiş ve yeni genotiplerin bulunmasında olası hale gelmiştir. Son zamanlarda deniz memelilerinden elde edilen *G. intestinalis* suşlarından yapılan sekans analizleri diğer 7 genotipten farklı bir genotipin varlığı gösterilmiştir (Lasek et al, 2010).

Yedi farklı genotipi bulunmasına karşın insanda hastalığa neden olan ve izole edilen *G. intestinalis* genotipleri çok büyük bir oranı A ve B genotipidir. Bir grup çalışmada intermittan diyare ile *Giardia*'nın A grubu, ısrarcı tip diyare ile ise B grubu arasında anlamlı ilişki bulunduğu bildirilirken (Homan ve Mank, 2001), diğer çalışmalarda B grubunun semptomsuz çocuklarda daha sık görüldüğü bildirilmektedir (Read et al,2001).

*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica* gibi bağırsak protozoonlarını tanısında genellikle gaita örneklerinin mikroskopik incelemeler sonucunda tanı konulmaktadır. Ancak mikroskopik incelemelerin; deneyimli mikroskopiste ihtiyaç duyması, tek gaita incelemelerinin düşük duyarlılığa sahip olması ve protozoonların gaitada gün aşırı olarak bulunması veya az sayıda bulunması aynı hastanın farklı günlerde alınmış gaita örneklerinin incelenmesi gerekliliği, patojen olan *E. histolytica* ile patojen olmayan *E. dispar* arasında morfolojik bir fark olmadığından mikroskopik olarak ayırt edilememesi, uzun zaman alması gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır (ten Hove et al,2007). Moleküler teknikler, özellikle PZR'ye dayalı yöntemler, tek gaita incelemelerinde mikroskobiye ve antijen testlerine göre aynı oranda veya daha yüksek oranda duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir. Ayrıca Gerçek Zamanlı PZR kısa sürede güvenilir sonuçlar verebilmekte, geniş epidemiyolojik çalışmalarda zaman ve maliyet açısından diğer yöntemlerden daha verimli olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir. Moleküler yöntemler ile *G. intestinalis* genotipleri ayırt edilerek enfeksiyon kaynaklarının belirlenmesi sağlanabilmektedir. (Verweij et al 2003; Bruijnesteijn van Coppenraet et al, 2009; Almedia et al, 2010; Caldero et al,2010). Hollanda 'da yapılan bir çalışmada gerçek zamanlı PZR ile yapılan analizde 152 örneğin 44'ü *G.intestinalis* açısından pozitif bulunurken, mikroskopik incelemeler ile 29 örnek pozitif bulunmuştur (Bruijnesteijn van Coppenraet et al, 2009). Benzer bir çalışmada mikroskopik olarak negatif bulunan 21 örnek  $\beta$  giardin gen bölgesi hedef alınarak uygulanan gerçek zamanlı PZR analizleri ile 13'ü pozitif bulunmuştur. Konveksiyonel yöntemlere göre gerçek zamanlı PZR analizi %100 duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca

incelenen 53 örnek A genotipi bulunurken, 59 örnek B genotipi bulunmuştur (Caldero et al,2010) *G. intestinalis*'in *tpi*, *gdh* ve GLORFC4 gen bölgelerini hedefliyen gerçek zamanlı PZR analizleri tek bir *G. intestinalis* kistini saptayabilecek duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir. Yöntemin su ve gıda kaynaklarının parazitolojik açıdan analizlerinde kullanılabilirlik etkili bir yöntem olduğu düşünülmüştür (Almedia et al, 2010).

Bu çalışmada, hastalardan alınan dışkı örneklerinden elde edilen DNA örnekleri gerçek zamanlı PZR tekniğiyle incelenerek Manisa bölgesinde bulunan *G. intestinalis* suşlarının alt gruplarının farklılığını ve yaygınlığını ortaya koymak, moleküler çalışmalar sonucunda insanlardaki *Giardia* enfeksiyonları için hangi bulaş yolunun bölgemiz için etkin olduğunu saptayarak halk sağlığı açısından korunma yolları belirlenmesine katkı sağlamak, enfeksiyon karakterini ortaya konulması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda insana ait 45 *G. intestinalis* açısından pozitif gaita örneğinden izole edilen DNA'lar gerçek zamanlı PZR işlemi ile *tpi* gen bölgesi amplifiye edilmiş diziye özgü problemler kullanılarak erime eğrisi analizleri sonucu genotipik ayrımları yapılmıştır. Analizler sonucunda 45 izolatin 33'ü (%73,3) A genotipi, 5'i (%11,1) B genotipi olarak tespit edilmiş olup 7'sinin (%15,5) ise A+B karışık enfeksiyon olduğu bulunmuştur.

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Parazitoloji A.D.'nda daha önce gerçekleştirilen ve Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) departmanınca desteklenen (TIP 2005–015) çalışmada, geleneksel PZR ve "Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP" yöntemleri kullanılarak yine Manisa bölgesinden toplam 52 giardiasisli hastadaki *G. intestinalis*'lerin genotipleri dışkı örneklerinde araştırılmıştır. Çalışmada 52 örneğin 37'sinin (%71,2) A Grubu (Assemblage A), 15 örneğin ise (%28,8) B Grubu (Assemblage B) olduğu belirlenmiştir.

Türkiye'de *G. intestinalis* genotiplerinin moleküler yöntemlerle araştırıldığı literatürde yer alan ilk çalışma, Ankara'da gerçekleştirilmiştir (Aydın et al, 2004). Bu çalışmada, mikroskopik olarak *G. intestinalis* saptanan 20 semptomatik ve 24 asemptomatik toplam 44 hastaya ait gaita örnekleri ile 6 semptomatik, 6 asemptomatik 12 hastaya ait duodenal aspirasyon örneklerinden izole edilen *G. intestinalis* genomlarının *tpi* gen bölgesi PZR-RFLP yöntemi ile araştırılmıştır. Semptom belirten hastaların dışkı izolatlarının 17'si (%85) A genotipi bulunurken, semptom belirtmeyen hastaların dışkı izolatlarının 22'si (%92) B genotipi bulunmuştur. Çalışma sonucu A genotipi ishal ile ilişkilendirilirken B genotipi semptomsuz hastalar ile ilişkilendirilmiştir (Aydın et al, 2004). Bizim çalışmamızda yüksek oranda (%73,3) A genotipi bulunmuş olup semptom gösteren hastalardan izole edilen 43 izolatin 31'i (%72,1) A genotipi, 5'i (%11,6) B genotipi ve 7'si (%16,3) A+B karışık genotip olarak bulunmuştur. Semptom göstermeyen 2 hastadan izole edilen örnekler ise A genotipi olarak bulunmuştur.

Etiyopya'da hem kırsal hem de kentsel farklı bölgelerden elde edilmiş *G. duodenalis* insan izolatlarının PZR-RFLP yöntemi ile yapılan araştırmada 59 izolatin 31'inde (52%) A genotipi ve 13'ünde (22%) B genotipi saptandığı bildirilirken geri kalan 15 izolatin karışık enfeksiyon

olduğu gösterilmiştir. Bunların 7'si A ve F genotipi, 8'i A ve B genotipi olarak saptandığı bildirilmiştir (Gelanew et al, 2007).

Volotao ve arkadaşlarının Brezilya'da yaptıkları bir çalışmada da, hedef gen bölgesi olarak  $\beta$ -giardin genini kullanmışlar ve 62 *G. intestinalis* pozitif örneğe yapılan moleküler analizle B genotipine ait hiçbir olguya rastlanmamıştır (Volotao et al, 2007). Aynı şekilde Meksika'da yapılan başka bir çalışmada  $\beta$ -giardin gen bölgesi kullanılmış ve RFLP analizleri sonucunda tüm örneklerde A genotipi saptandığı bildirilmiştir (Eligio et al, 2008 ) Portekiz'de yapılan benzer bir çalışmada, *G.intestinalis* ile enfekte 38 dışkı örneğinin tiplendirilmesi sonucunda tüm örneklerin A grubunda olduğu, B grubundan hiçbir olguya rastlanmadığı bildirilmiştir. (Sousa et al,2006). Tek bir genotipin baskın olduğu çalışmalarda bu durumun enfeksiyon kaynağı ile doğrudan ilişkili olduğu ve tek bir kaynaktan enfeksiyonun yayıldığı düşünülmektedir. Malezya'da yerel bir kominite (Aborjinler) üzerinde yapılan çalışmada 42 izolatın 41'i B genotipi bulunurken sadece 1 izolatın A genotipi olarak bulunmuştur. Bu durum enfeksiyonun bu yerel toplulukta büyük bir olasılıkla insandan insana bulaşmasının bir sonucu olduğu düşünülmüştür (Mahdy et al, 2009). Tayland'da kırsal kesimde bir ilk öğretim okulunda giardiasis için risk faktörlerinin araştırıldığı bir çalışmada yapılan anket çalışması, gaita incelemeleri ve örneklerin PZR-RFLP analizleri sonucu bölgedeki *G. intestinalis* All genotipinin su kaynaklı olarak insanlara bulaştığı saptanmıştır (Ratanapo et al,2008). Çizelge 5.1'de de görüldüğü üzere salgın veya topluluk halinde yaşanan ortamlarda (askeri kışla, kreş, okul vb.) görünen enfeksiyonların moleküler karakteri genellikle tek bir *G. intestinalis* genotipine ait olduğu gözlemlenmiştir.

Nablus'da yapılan çalışmada pozitif olarak bulunan 8 örneğin 6'sı A genotipi 2'sinin ise B genotipi olduğu belirtilmiştir (Hussein et al, 2009).

Helmy ve arkadaşlarının Mısır'da yaptıkları çalışmada 41 örneğin 31'i (%75,6) A genotipi (Alve All), 8'i (%19,5) B genotipi ve 2'si (%4,9) karışık enfeksiyon olarak bulunmuştur (Helmy et al, 2009)

Bugüne dek yapılan çalışmaların çoğunda B grubunun daha baskın olduğu gösterildiyse de (Çizelge 5.1) son zamanlarda dünyanın çeşitli bölgelerinde bu konuda yapılan çalışmaların sayısının artmasıyla birlikte *Giardia* türlerinin elde edilen izolatlardaki genotip prevalansı ülkeden ülkeye hatta aynı ülkedeki farklı çalışmalarda çok farklılıklar göstermektedir. Genotipler arası farklılıklarda coğrafi dağılımın önemli olmadığı düşünülmektedir. *G. intestinalis* genotiplerinin dünya üzerinde belirli bölgelerde belirli genotiplerin yaygın olduğuna dair tutarlı bir kanıt bulunmamaktadır (Çizelge 5.1).

Nikaragua'dan bildirilen bir çalışmada ise insan izolatlarının 94'inde (% 79) grup B ve 2'sinde (%21) ise grup A saptandığı bildirilmiştir (Lebbad et al,2008).

Brezilya'da çocuk hastalardan toplanan 108 dışkı örneğinin tiplendirilmesi sonucunda olguların %74,1'inde B genotipi %15,5'inde A grubu *G. intestinalis*'ler saptanırken, geriye kalan %10,3'de her iki grup bir arada saptanmıştır (Kohli et al, 2008). Bu veriler Haque ve

arkadaşlarının Bangladeş'te yaptığı yakın tarihli çalışma ile aynı yöndedir. Haque ve arkadaşları amplifiye edebildikleri 263 *G.intestinalis* izolatının 231'sinde B genotip, 20'sinde A genotip ve 16'sında A/B genotipi miks olarak saptandığı bildirilmiştir (Haque et al, 2005) .

Çalışmamızda ayrıca saptamış olduğumuz gruplarla semptomlar arasındaki ilişki irdelenmiş ve hastaların çoğunda (%95,5) *Giardia* enfeksiyonu ile ilişkili bir ya da birden fazla semptoma rastlanırken hastalar tarafından en sık bildirilen semptomların karın ağrısı ve ishal olduğu görülmüştür. A genotipinin tüm semptomlarda genellikle baskın olduğu dikkat çekici olarak bulunmuştur.

Benzer şekilde Haque ve arkadaşlarının Bangladeş'te yaptığı çalışmada da hastalardaki semptomlar ile saptanan *Giardia* grubu arasında anlamlı bir ilişki gösterilemediği rapor edilmiştir. Yine de bugüne dek insanlardaki *Giardia* enfeksiyonlarını gruplara göre ayırarak değerlendiren geniş çaplı bir çalışma yapılmadığından insanlardaki *Giardia*'lar arasında enfeksiyon oluşturanların oranı henüz bilinmemektedir (Cacciò ve Ryan, 2008).

Avustralya'da bir anaokulunda yapılan çalışmada, A grubu *Giardia* taşıyan çocukların B grubu taşıyanlara göre 2 kat daha fazla ishale yakalandığı gösterilmişti. Bu durumda ishal olmadıkları için *Giardia*'nın B grubunu taşıyan çocukların anaokuluna devam edecekleri göz önüne alındığında, bu durumun anaokulundaki tüm çocuklar için yaratacağı sağlık sorunları araştırılmaya değerdir (Caccia ve Ryan,2008).

Moleküler çalışmalar sonucunda insanlardaki *Giardia* enfeksiyonları için zoonotik geçişin son derece önemli olduğu, söz konusu zoonotik geçişin engellenememesi durumunda insanlardaki enfeksiyonları kontrol altına almanın güç olacağı vurgulanmıştır. Ayrıca insan atıklarının yer altı ve yüzey sularına karışması, bu suların gerek tarım gerekse normal olarak kullanılması enfeksiyonun bulaşmasına neden olmaktadır. Bu çerçevede enfeksiyonların kontrol altına alınması için suların temizliğinin önemi vurgulanmıştır.

Çizelge 5.1: İnsanda *Giardia duodenalis*'in genotip A ve B prevalansı ile ilgili çalışmalar (Caccia ve Ryan,2008).

| ÜLKE          | Örnekler<br>(Örnek sayısı) | Kullanılan<br>gen bölgesi | Genotip A (%)<br>(Assemblage) | Genotip B (%)<br>(Assemblage) | A + B (%)      |
|---------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|
| İtalya        | Sporadik (20)              | <i>ssu-rRNA, bg</i>       | (54%)39                       | (32.5%)16                     | (13.5%)        |
| İngiltere     | Salgın (21)                | <i>tpi</i>                |                               | 21 (100%)                     |                |
| Hollanda      | Normal pop (18)            | <i>gdh</i>                | 9 (50%)                       | 9 (50%)                       |                |
| Hollanda      | Sporadik (98)              | <i>ssu-rRNA gdh</i>       | 34 (35%)                      | 64 (%)                        |                |
| Fransa        | Sporadik (25)              | <i>tpi</i>                | 9(36%)                        | 16 (64%)                      |                |
| İspanya       | Olgu çalışma (108)         | <i>tpi</i>                | 43 (39.8%)                    | 61 (56.5%)                    | 4 (3.7%)       |
| Norveç        | Su Salgını (21)            | <i>bg, gdh</i>            |                               | 21 (100%)                     |                |
| Norveç        | Sporadik (63)              | <i>bg, gdh, tpi</i>       | 3 (5%)                        | 60 (95%)                      |                |
| Arnavutluk    | Sporadik (22)              | <i>ssu-rRNA</i>           | 10 (45%)                      | 12 (55%)                      |                |
| Uganda        | Sporadik (3)               | <i>ssu-rRNA</i>           | 3 (100%)                      |                               |                |
| Fildişi       | Askerler (14)              | <i>tpi</i>                |                               | 14 (100%)                     |                |
| Etopya        | Sporadik (59)              | <i>bg, gdh</i>            | 31 (52%)                      | 13 (22%)                      | 15 (25%)       |
| Peru          | Sporadik (25)              | <i>tpi</i>                | 6 (24%)                       | 19 (76%)                      |                |
| Brezilya      | Sporadik (37)              | <i>gdh</i>                | 29 (78%)                      | 8 (22%)                       |                |
| Brezilya      | Sporadik (62)              | <i>bg</i>                 | 62 (100%)                     |                               |                |
| USA           | Sporadik (14)              | <i>ssu-rRNA</i>           | 14 (100%)                     |                               |                |
| USA           | Sporadik (2)               | <i>tpi</i>                |                               | 2(100%)                       |                |
| Meksika       | Sporadik, (9)              | <i>bg</i>                 | 9 (100%)                      |                               |                |
| Kanada        | Su Salgını(6)              | <i>ssu-rRNA</i>           | 6 (100%)                      |                               |                |
| Avustralya    | Sporadik (8)               | <i>ssu-rRNA, gdh</i>      | 2 (25%)                       | 6 (75%)                       |                |
| Avustralya    | Normal pop. (23)           | <i>ssu-rRNA</i>           | 7 (30%)                       | 16 (70%)                      |                |
| Avustralya    | Sporadik (12)              | <i>ssu-rRNA</i>           |                               | 11 (92%)                      | 1 (8%)         |
| Türkiye       | Sporadik (44)              | <i>tpi</i>                | 19 (43%)                      | 25 (57%)                      |                |
| Bangladeş     | Olgu çalışma (267)         | <i>tpi</i>                | 20 (7.5%)                     | 231 (86.5%)                   | 16 (6%)        |
| Hindistan     | Sporadik (10)              | <i>tpi</i>                |                               | 10 (100%)                     |                |
| Hindistan     | Sporadik (19)              | <i>tpi, EF1-α</i>         | 6 (32%)                       | 9 (47%)                       | 4 (21%)        |
| Hindistan     | Sporadik (12)              | <i>gdh</i>                | 5 (42%)                       | 7 (58%)                       |                |
| Laos          | Sporadik (5)               | ORF-C4                    |                               | 5 (100%)                      |                |
| Çin           | Sporadik (8)               | <i>ssu-rRNA</i>           | 4 (50%)                       | 4 (50%)                       |                |
| Kore          | Sporadik (5)               | <i>ssu-rRNA</i>           | 5 (100%)                      |                               |                |
| <b>Toplam</b> |                            |                           | <b>391 (35%)</b>              | <b>671 (60%)</b>              | <b>56 (5%)</b> |

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada öncelikle parazitolojik tanı seçeneği olarak *G. intestinalis* tanısında Gerçek zamanlı PZR yöntemi için uygun olarak kullanılabilecek test koşulları belirlenmiş, bunun yanında Manisa bölgesinden toplam 45 hastanın dışkı örneklerinde saptanan *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoitlerinin genotip ayrımı gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PZR yöntemi uygulandıktan sonra, erime eğrisi analizleri neticesinde 45 örneğin 33'ü (%73,3) A, 5 örneğin (%11,1) B genotipi olduğu, 7 örneğin ise (%15,5) hem A hem B genotipi içerdiği ("mixed infection") belirlenmiştir. Hastaların çoğunda (%95,5) *Giardia* enfeksiyonu ile ilişkili bir ya da birden fazla semptoma rastlanırken hastalar tarafından en sık bildirilen semptomların karın ağrısı ve ishal olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, daha önce geleneksel PZR yöntemi ile gerçekleştirilen çalışmada olduğu gibi, Manisa bölgesinden elde edilen *G. intestinalis* izolatlarında A genotipine B genotipinden daha sık rastlandığı görülmüştür. Yapılan çalışmalarda hayvanlarda A genotipinin yüksek oranda bulunabileceği vurgulanmıştır. Bu konuda yapılacak sonraki çalışmalarda istatistiksel analizlere olanak vermesi için çok daha fazla sayıda örnek ile çalışılması ve hayvan izolatlarının da çalışmaya dâhil edilmesiyle giardiasisli olgulardaki zoonotik potansiyel hakkında daha somut veriler elde edilmesi sağlanmalıdır. Benzer çalışmalarda değerlendirilen zoonotik geçişin son derece önemli olduğu göz önüne alındığında, insanlardaki enfeksiyonları kontrol altına almanın güç olacağı sanılmaktadır.

Bunun yanında, klinik çalışmalarda hasta örneklerindeki protozoonların tanımlanmasında duyarlılık ve özgüllük açısından %100'e varan oranlarda güvenli olduğu bildirilen Gerçek Zamanlı PZR yönteminin rutin parazitolojik tanı için kullanılması henüz uygun olmasa da, şüpheli olguların aydınlatılmasında, hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılması yararlı olacaktır. Ayrıca yapılan bir çok çalışma, moleküler yöntemlerin tek bir kisti dahi saptayabildiği, bu nedenle de su ve gıda kaynaklarının parazitolojik yönden analizlerinde kullanılabilecek etkili bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

İleri aşamalarda tür ayrımı yapılan örneklerin grupların alt gruplarına yönelik çalışmalarla, hem semptomlarla suş farklılığı arasındaki korelasyonun araştırılması hem de bu şekilde moleküler düzeyde bölgesel epidemiyolojik bilgi tabanının temellerinin atılması ve ülke içi yayılım biçimleri hakkında bilgi edinilebilmesi için alt yapı oluşturulması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adam RD, TE Nash, and TE Wellems.** 1991. Telomeric location of Giardia rDNA genes. Mol. Cell. Biol. 11: 3326–3330.
- Adam RD.** 1991. The biology of Giardia spp. Microbiol. Rev. 55: 706–732.
- Adam RD,** 2000. The Giardia lamblia genome. Int J Parasitol. 2000 Apr 10;30(4):475-84.
- Adam RD,** 2001. Biology of Giardia lamblia. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447–475
- Andrews RH, Chilton NB, Mayrhofer G, 1992.** Selection of specific genotypes of Giardia intestinalis by growth in vitro and in vivo. Parasitology, 105, 375–386
- Ak M, Türk M, Güneş K,** 2007. Giardiasis. Özcel MA. (Editör), Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türk. Parazitoloji Dern. Yay No: 22, İzmir, 323- 344
- Aklan Z, Özbel Y, Özensoy S, Atambay M,** 1997. Moleküler Biyolojik Yöntemler. Parazit Hastalıklarında Tanı. Özcel MA, Altıntaş N.(editörler) Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 15, İzmir, 373-411
- Alkan MZ,** 1997. Giardiosis'de Patogenez. Giardiosis. Özcel MA, Üner A. (Editörler), Türk. Parazitoloji Dern. Yay, No:14, İzmir, 37-40
- Aloisio F, Filippini G, Antenucci P, Lepri E, Pezzotti G, Cacciò SM, Pozio E,** 2006. Severe weight loss in lambs infected with Giardia duodenalis assemblage B. Vet Parasitol. 142:154-8
- Almeida A, Pozio E, Cacciò SM,** 2010. Genotyping of Giardia duodenalis cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. Appl Environ Microbiol, 76(6): 1895-901
- Altıntaş N ve Yazar S,** 1997. Western Blot. Parazit Hastalıklarında Tanı. Özcel MA, Altıntaş N.(editörler) Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 15, İzmir, 343-372
- Altıntaş N ve Korkmaz M.,** 1997a. Giardiosis'in İmmunolojisi. Giardiosis. Özcel MA, Üner A. (Editörler), Türk. Parazitoloji Dern. Yay, No:14, İzmir, 41-62
- Altıntaş N ve Korkmaz M,** 1997b. Immundifüzyon ve Immunelektroforez. Parazit Hastalıklarında Tanı. Özcel MA, Altıntaş N.(editörler) Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 15, İzmir, 261-291
- American Academy of Pediatrics.** 2000. Red Book, Report of the Committee on Infectious Diseases. 252-253.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG,** 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species. Nat Rev Microbiol. 6: 413-22.
- Ash LR, Oribel TC,** 1987. Parasites: A guide to laboratory procedures and identification. ASP Press, Chicago, , 7-52

**Aydin AF, Besirbellioglu BA, Avci IY, Tanyuksel M, Araz E, Pahsa A**, 2004. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 50: 147-51.

**Ballweber LR, Xiao L, Bowman DD, Kahn G, Cama VA**, 2010. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol*. Apr;26(4):180-9.

**Belosevic M, Faubert GM, Maclean JD, Law C, Croll NA**, 1983. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. *Journal of Infectious Diseases*, 147: 222-226

**Bertram, MA, EA Meyer, JD Lile, and SA Morse**, 1983. A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. *J. Parasitol*. 69: 793–801.

**Bertrand I, Schwartzbrod J**, 2007. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and faecal contamination origin. *Water Res*. 41(16):3675-82.

**Bingham AK, Jarroll EL, Meyer EA, Radulescu S**, 1979. *Giardia* sp. : physical factors of excystation im vitro and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol*, 47: 281-291

**Bockman DE and WB Winborn**, 1968. Electron microscopic localization of exogenous ferritin within vacuoles of *Giardia muris*. *J. Protozool*. 15: 26–30.

**Boreham PFL**, 1995. The current status of chemotherapy for Giardiasis. In: *Giardia from molecules to disease*. Eds. Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery JACAB International, Wellington, 317-28.

**Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Wallinga JA, Ruijs GJ, Bruins MJ, Verweij JJ**, 2009. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin Microbiol Infect*., 15: 869-74

**Budak S**. 1995. Giardiosis. In: Güneydoğu Anadolu Projesini tehdit eden parazit hastalıkları. Eds. Prof. Dr. MA Özcel, İzmir, 133- 57.

**Budak S ve Atay MG**, 1997. Giardiosis'ten Korunma. *Giardiosis*. Özcel MA, Üner A. (Editörler), Türk. Parazitoloji Dern. Yay, No:14, İzmir, 131-135.

**Buchel LA, A. Gorenflot, C. Chochillon, J. Savel and JG. Gobert**, 1987. In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *J. Parasitol*. 73: 487–493.

**Boucher SEM, Gilin FD**, 1990. Excystation of in vitro derived *Giardia lamblia* cycts. *Infect Immun*, 58 (11): 3516-3522.

**Buchel LA, A. Gorenflot, C. Chochillon, J. Savel and JG. Gobert**. 1987. In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *J. Parasitol*. 73: 487–493.

**Budak S, Akısü Ç, Dağcı H**, 1997. Diğer Tanı Metaryelleri ve Uygun Tanı Yöntemleri. *Parazit Hastalıklarında Tanı*. Özcel MA, Altıntaş N. (editörler) Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 15, İzmir, 97-148

- Bui, E. T., P. J. Bradley, and P. J. Johnson**, 1996. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9651–9656.
- Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E**, 2002. 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.* 32: 1023-30.
- Cacciò SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV**, 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21; 430–437
- Caccio SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV**, 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21: 430-7.
- Caccio MS, Ryan U**, 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular&Biochemical Parasitology* 160: 75-80.
- Cacciò SM, Sprong H**, 2010. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol.* Jan;124(1):107-12
- Calderaro A, Gorrini C, Montecchini S, Peruzzi S, Piccolo G, Rossi S, Gargiulo F, Manca N, Dettori G, Chezzi C**, 2010. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the laboratory diagnosis of giardiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 66(3): 261-7
- Castro-Hermida JA, Almeida A, González-Warleta M, Correia da Costa JM, Rumbo-Lorenzo C, Mezo M**, 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitol Res.* 101(5):1443-8.
- Cavalier-Smith T**, 1987. The origin of eukaryotic and archaebacterial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 503: 17–54.
- Cavalier-Smith, T, and EE. Chao**, 1996. Molecular phylogeny of the free-living archezoan *Trepomonas agilis* and the nature of the first eukaryote. *J. Mol. Evol.* 43: 551–562
- Cerva, L, and E. Nohy'nkova'**, 1992. A light microscopic study of the course of cellular division of *Giardia intestinalis* trophozoites grown in vitro. *Folia Parasitol. (Prague)* 39: 97–104.
- Chen LM, Y. Chern, SJ. Ong and JH. Tai**, 1994. Molecular cloning and characterization of a ras-related gene of ran/tc4/spi1 subfamily in *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 269:17297–17304.
- Chen XM, O'Hara SP, Huang BQ, Splinter PL, Nelson JB, LaRusso NF**, 2005. Localized glucose and water influx facilitates *Cryptosporidium parvum* cellular invasion by means of modulation of host-cell membrane protrusion. *Proc Natl Acad Sci.* 102: 6338–43.
- Chin J (ed)**, 2000. Control of communicable diseases manual. Seventeenth edition. American Public Health Association.
- Coggins JR, and FW. Schaefer**, 1984. *Giardia muris*: scanning electron microscopy of in vitro excystation. *Exp. Parasitol.* 57: 62–6
- Coggins JR and FW. Schaefer**, 1986. *Giardia muris*: ultrastructural analysis of in vitro excystation. *Exp. Parasitol.* 61: 219–228.
- Craft JC**, 1982. Experimental infection with *Giardia lamblia* in rats. *Journal of Infectious Diseases*, 145: 495- 498.

**Daldal N, Özensoy S, Aksoy Ü, Akısü Ç**, 1997. Besiyerleri ve Hayvan İnokülasyonları Parazit Hastalıklarında Tanı. Özcel MA, Altıntaş N.(editörler) Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 15, İzmir, 149-182.

**Daldal N, Özensoy S**, 1997. *Giardia intestinalis*'in morfolojisi ve evrimi. Özcel MA, Üner A. (Editör), Giardiosis. Türk. Parazitoloji Dern. Yay, No:14, İzmir, 1- 16.

**deRegnier DP, Cole L, Schupp DG, Erlandsen SL**, 1989. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. *Appl Environ Microbiol.* 55: 1223-9

**Donescu ME, Panaitescu D**, 1984. Human *Giardia* (lamblia) in Braila City.: During the period from 1970 to 1982. 4<sup>th</sup> Europ Multicoll Parasitol, 151.

**Durmaz R**, 2001. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tipleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Durmaz R. (Editör).Kozan Ofset, Ankara, 35-41

**Edlind TD and PR. Chakraborty**, 1987. Unusual ribosomal RNA of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res.* 15: 7889–7901.

**Edlind TD, J Li, GS Visvesvara, MH Vodkin, GL McLaughlin and SK Katiyar**, 1996. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol. hylogenet. Evol.* 5: 359–367.

**Eligio-García L, Cortes-Campos A, Cota-Guajardo S, Gaxiola S, Jiménez-Cardoso E**, 2008. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using beta-giardin restriction gene. *Vet Parasitol.* 156:205-9

**Elis JE, Wyder MA, Jarroll EL, Kaneshiro ES**, 1996. Changes in lipid composition during in vitro encystation and fatty acid desaturase activity of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 81(1):13-25.

**Erlandsen, S. L., W. J. Bemrick, and J. Pawley**. 1989. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J. Parasitol.* 75:787–797

**Erlandsen SL, WJ Bemrick, DE Schupp, JM Shields, EL Jarroll, JF Sauch and JB Pawley**, 1990. High-resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. *J. Histochem. Cytochem.* 38: 625–632.

**Erlandsen SL, PT Macechko, H. van Keulen and EL Jarroll**, 1996. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43: 416–429.

**Erlandsen SL and DG Chase**, 1974. Morphological alterations in the microvillous border of villous epithelial cells produced by intestinal microorganisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 27: 1277–1286.

**Estevez EG, Levine JA**, 1985. Examination of preserved stool specimens for parasites: Lack of value of direct wet mount. *J. Clin. Microbiol.* 22: 666-667

**Farthing MJG**, 1994. Giardiosis as a disease. In: *Giardia: From Molecules to Disease*. Eds. Thompson RAC, Reynoldson JA, Lymbery AJ. CAB International, Wallingford UK, 15-37

**Fayer R, Santin M, Trout JM, DeStefano S, Koenan K, Kaur T**, 2006. Prevalence of Microsporidia, *Cryptosporidium* spp, and *Giardia* spp. In beavers (*Castor canadensis*) in Massachusetts. *J Zoo Wildl Med*. 37(4):492-7.

**Feely DE, JV Schollmeyer and SL Erlandsen**, 1982. *Giardia* spp.: Distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp. Parasitol*. 53: 145–154.

**Filice FP**, 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ. Calif. Publ. Zool*. 57: 53–146.

**Garcia LS, Shimizu RY, Novak S, Carroll M, Chan F**, 2003. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. *J Clin Microbiol*. 41: 209-12.

**Garcia LS**, 2005. Giardiasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD (eds). *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections*. 10th ed, ASM press. P: 240-954.

**Geurden Thomas, Vercruysse Jozef, Claerebout Edwin**, 2010. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Experimental Parasitology*. *Exp Parasitol*. 124(1): 98-106

**Geurden T, Vercruysse J, Claerebout E**, 2010. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp Parasitol*. 98-106

**Gelanewa T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacci'o SM**, 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Tropica*., 102: 92–99

**Giboda M, Hildebrand T**, 1982. Detection of *Giardia intestinalis* in duodenal aspirate and in the stool. *Folia Parasitol*, 30(2): 181.

**Gibson GR, Ramirez D, Maier J, Castillo C, Das S**, 1999. *Giardia lamblia*: Incorporation of free and conjugated fatty acids into glycerol-based phospholipids. *Exp Parasitol*. 92: 1- 11.

**Gillin FD, Reiner DS, McCaffery JM**, 1996. Cell biology og primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Ann. Rev. Microbiol*. 50, 679-705

**Göçmen B**, 2000. Genel Parazitoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No.168, İzmir, 107-110

**Gürüz AY**, 1997. Giardiosis Kliniği. *Giardiosis*. Özcel MA, Üner A. (Editörler), Türk. Parazitoloji Dern. Yay, No:14, İzmir, 63-67

**Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER**, 2005. *Giardia* Assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis.*, 15;192(12):2171-3

**Hiatt RA, Markell EK, Ng E**, 1995. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa ? *Am J Trop Med Hyg*, , 53(1): 36-9.

**Hill DR, Guerrant RL, Pearson RD, Hewlett EL**, 1983. *Giardia lamblia* infection of suckling mice. *Journal of Infectious Diseases*, 147: 217-221

**Hill DR**. *Giardia lamblia*. 1995. In: *Principles and practice of infectious diseases*. Eds. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. 4<sup>th</sup> Ed., Churchill Livingstone, New York, 2487 - 93.

- Homan WL, Mank TG**, 2001 Human giardiasis: Genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.*, 31: 822-6
- Inge PMG, Edson CM, Farthing**, 1988. Attachment of *Giardia lamblia* to intestinal epithelial cell. *Gut* 29: 795- 801
- Isaac-Renton JL, C Cordeiro, K Sarafis and H Shahriari**, 1993. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *J. Infect. Dis.* 167:431–440.
- Kabnick KS and DA Peattie**, 1990. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J. Cell Sci.* 95:353–360.
- Katellaris PH, Naeem A, Farthing MJG**, 1995. Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to cultured human intestinal cell line. *Gut* 37. 512-518
- Kerlin P, Radnaike RN, Butler R, Gehling N, Grant AK**. Prevalence of giardiasis a study at upper gastrointestinal endoscopy. *Dig Dis Sci.* 1978, 23(10): 940
- Kuman HA, Altıntaş N**, 1996 *Giardia intestinalis*. Protozoon Hastalıkları, Ege Üniv. Basımevi, İzmir, 60-8.
- Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E Newman RD, Sears CL, Lima AA, Guerrant RL**, 2008. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102: 718-25.
- Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D. Caccio SM**, 2005. Genetic heterogeneity at the *giardin* locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic sub-genotypes. *Int J Parasitol.* 35:207-13.
- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML**, 2010. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol*, 40(9):1063-74
- Lauwaet T, Davids BJ, Reiner DS. & Gillin FD**, 2007. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 554–559
- Le Blancq S M, RS Kase and LH, Van der Ploeg**, 1991. Analysis of a *Giardia lamblia* rRNA encoding telomere with [TAGGG]<sub>n</sub> as the telomere repeat. *Nucleic Acids Res.* 19: 5790–5790.
- Lee JH, Lee J, Park SJ, Yong TS, Hwang UW**, 2006. Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacers (IGS)-based PCR. *Korean J Parasitol.* 44: 343-353.
- Lohmann S, Lehmann L, Tabiti K**, 2000. Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System, *Biochemica*,. 4: 23-28
- Lymbery AJ, Tibayrenc M**, 1994. Discussants Report: Population Genetics and Systematics: How many Species of *Giardia* are there?, In: *Giardia: From Molecules to the Disease*. RCA Thompson, JA Reynoldson, AJ Lymbery (eds.). CAB Int. UK, s:71-79
- Mahdy AK, Surin J, Mohd-Adnan A, Wan KL, Lim YA**, 2009. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* isolated from Semai Pahang Orang Asli (Peninsular Malaysia aborigines). *Parasitology*; 136(11):1237-41.

**Malik SB, Pightling AW, Stefaniak LM, Schurko AM & Logsdon JM Jr**, 2008. An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. PLoS ONE **3**, e2879

**Markell EK, Voge M, John DT**, 1982. The flagellates. In : Medical parasitology. 7<sup>th</sup> Ed., WB Saunders Co., Philadelphia, 63 - 95.

**Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR**, 1997. Waterpork protozoan pathogens. Clin. Microbiol. Rev. **10**, 67-85

**Marti M, Li Y, Schraner EM, Wild P, Kohler P, Hehl AB**, 2003a. The secretory apparatus of an ancient eukaryote:protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient golgi-like compartments. Mol.Biol. Cell. **14**: 1433-1447.

**Marti M, Regos A, Li Y, Schraner EM, Wild P, Muller N, Knopf LG, Hehl AB**, 2003b. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. J. Biol Cell. **14**: 1433-1447.

**Melo SP, Gómez V, Castellanos IC, Alvarado ME, Hernández PC, Gallego A, Wasserman M**, 2008. Transcription of meiotic-like-pathway genes in *Giardia intestinalis*. Memorias Instituto Oswaldo Cruz **103**, 347–350

**Meyer EA**,1994. *Giardia* as an organism. In: *Giardia: From Molecules to Disease*. RCA Thompson. JA Reynoldson, AJ Lymbery (eds.) CAB Int. UK, 1994, 3- 13.

**Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA**,2008. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. Mem Inst Oswaldo Cruz,**103**: 98-10

**Monis PT, Caccio SM, Thompson RC**, 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus Trends Parasitol. Feb;**25**(2):93-100.

**Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD**, 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science. **317**: 1921-1926.

**Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML**, 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science **317**, 1921–1926

**Narcisi EM, CV Glover and M Fechheimer**, 1998. Fibrillarin, a conserved pre-ribosomal RNA processing protein of *Giardia*. J. Eukaryot. Microbiol. **45**: 105–111.

**Nash TE, FD Gillin and Smith PD**, 1983. Excretory-secretory products of *Giardia lamblia*. J. Immunol. **131**: 2004–2010

**Nash TE, and DB Keister**, 1985. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. J. Infect. Dis. **152**:1166–1171.

**Nash T E, T McCutchan, D Keister, JB Dame, JD Conrad and FD Gillin**, 1985. Restriction-  
endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. J.  
Infect. Dis. 152: 64–73.

**Nash TE, Herrington DA, Levine MM**, 1987. Usefulness of an enzyme - linked immunosorbent  
assay for detection of *Giardia* antigen in feces. J Clin Microbiol. 25(6): 1169 – 71

**Novotny TE, Hopkins RS, Shillam P, Janoff EN**, 1990. Prevalence of *Giardia lamblia* and risk  
factors for infection among children attending day-care facilities in Denver. Public Health  
Reports 1990; 105: 72-5.

**Orhan V**, 1987. *Giardia intestinalis*'in morfolojisi, fizyolojisi ve evrimi. Giyardi yaz. Ed. Yaşarol  
Ş. Türk. Parazitoloji Dern. Yay, No:6, İzmir, 9- 20.

**Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E**, 1997. Dışkı inceleme yöntemleri.  
Parazit Hastalıklarında Tanı. Özcel MA, Altıntaş N.(editörler) Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın  
No: 15, İzmir, 1-61

**Ortega YR and Adam RD**, 1997. *Giardia* overview and update. Clin. Infect. Dis. 25, 545-550

**Overturf GD**, 1994. Editorial response: Endemic giardiasis in the United States-role of the  
daycare center. Clinical Infectious Diseases, 18: 764-765.

**Özbel Y, Dağcı H**, 1997. Giardiasis'in Laboratuvar Tanısı. Giardiasis. Özcel MA, Üner A.  
(Editörler)., Türk. Parazitoloji Dern. Yay, No:14, İzmir, 79- 127

**Özbilgin A, Sermet İ**, 1987. *Giardia intestinalis* kistlerinin in vitro ekskistasyonu üzerine  
çalışmalar. T Parazitol Derg, 11(2): 24-30

**Özçelik S, Değerli S**, 1997. Türkiye'de giardiasis. 10. Ulusal Parazitoloji Kongresi 8-12 Eylül  
1997 - Ankara, Kongre Kitabı, 179

**Paget T A, Macechko PT & Jarroll EL**, 1998. Metabolic changes in *Giardia intestinalis* during  
differentiation. J. Parasitol. 84, 222–226

**Palm D, Weiland M, McArthur AG, Winiecka-Krusnell J, Cipriano MJ, Birkeland SR,  
Pacocha SE, Davids B, Gillin F, Linder E, Svärd S**, 2005. Developmental changes in the  
adhesive disk during *Giardia* differentiation. Mol. Biochem. Parasitol. 141, 199–207

**Payment P**, 1999. Poor efficacy of residual chlorine disinfectant in drinking water to inactivate  
waterborne pathogens in distribution systems. Can J Microbiol;45(8): 709-715

**Peattie DA, RA Alonso, A Hein and JP Caulfield**, 1989. Ultrastructural localization of giardins  
to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein  
sequence of alpha giardin. J. Cell Biol. 109:2323–2335.

**Peattie DA**, 1990. The giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. Parasitol  
Today, 6: 52-56

**Plutzer J, Tomor B**, 2009. The role of aquatic birds in the environmental dissemination of  
human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary.  
Parasitology International 58, 227–231

**Poxleitner MK, Carpenter ML, Mancuso JJ, Wang CJ, Dawson SC, Cande WZ**, 2008. Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science* 319, 1530–1533

**Ratanapo S, Mungthin M, Soontrapa S, Faithed C, Siripattanapipong S, Rangsin R, Naaglor T, Piyaraj P, Taamasri P, Leelayoova S.**, 2008. Multiple modes of transmission of giardiasis in primary schoolchildren of a rural community, Thailand. *Am J Trop Med Hyg.*,78(4):611-5.

**Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RCA.** Correlation between genotypes of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int. J. Parasitol.* 2002; 32, 229–231

**Reuter M , K üpper Y , Schmitz A , Breuer JP, Wend U , Hennig J**, 2005. Detection of new single nucleotide polymorphisms by means of real time PCR *Journal of Genetics*, Vol. 84, No. 3

**Reynoldson JA.** 1995. New approaches in chemotherapy. In: *Giardia from molecules to disease*. Eds. Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery JA. CAB International, Wellington, 339-55.

**Ricciardi ML, De Paolis C, Ferrans G**, 1978. Investigation on intestinal parasitism in pediatric age: Comparison between healthy and ill children. 4<sup>th</sup> Int Cong Parasitol., C 10.

**Robertson L J, Forberg T, Hermansen L, Hamnes IS and Gjerde B**, 2007. *Giardia duodenalis* Cysts Isolated From Wild Moose And reindeer In Norway: Genetic Characterization By PCR-RFLP And Sequence Analysis At Two Genes. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(4): 576–585

**Roche H, Roche C, Chausse S**, 1991. Role de la Giardiose dans la dyspepsie non ulcèreuse. *La Press Med*, 20: 20

**Roger AJ, SG Svard, J Tovar, CG Clark, MW Smith, FD Gillin and ML Sogin**, 1998. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 229–234

**Sagner G, Goldstein C, and van Miltenburg R**, 1999. Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Germany Detection of Multiple Reporter Dyes in Real-time, On-line PCR Analysis with the LightCycler System. *BIOCHEMICA* · No. 2 n; 7-11

**Sagolla MS, Dawson SC, Mancuso JJ & Cande W Z**, 2006. Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J. Cell Sci.* 119, 4889–4900

**Sahagun J, Clavel A**, 2008. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*; 27: 81–83

**Saygi G**, 1998. Temel Tıbbi Parazitoloji. Es Form Ofset, Sivas. Sy:39-42

**Sousa MC, Morais JB, Machado JE Poiares Da Silva J**, 2006. Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PZR-RFLP and sequencing. *J Eukaryot Microbiol.*, 53(S1): S174-6.

**Schofield PJ, Edwards MR, Kranz P**, 1991. Glucose metabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol and Biochemical parasitol.* 45: 39-48.

**Schofield PJ, Edwards MR**, 1994. Biochemistry-is *Giardia* opportunistic in its use of substrates? *Giardia: From molecules to Disease*. Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery AJ eds. CAB International, England, pp: 171-184.

**Schupp DG, MM Januschka, LA Sherlock, H H Stibbs, EA Meyer, WJ Bemrick and SL Erlandsen**, 1988. Production of viable *Giardia* cysts in vitro: determination by fluorogenic dye staining, excystation, and animal infectivity in the mouse and Mongolian gerbil. *Gastroenterology* 95:1-10.

**Simon CE**, 1922. A critique of the supposed rodent origin of human giardiasis. *Am. J. Hyg.* 2:406-434.

**Smith HV, Paget T**, 2007. *Giardia*. Simjee S. (Editör), *Foodborn Diseases*. Human Press Inc., Totowa, NJ.

**Soltys BJ and RS Gupta**, 1994. Immunoelectron microscopy of *Giardia lamblia* cytoskeleton using antibody to acetylated alpha-tubulin. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41: 625-632.

**Stibbs HH**, 1989. Monoclonal antibody - based enzyme immunoassay for *Giardia lamblia* antigen in human stool. *J Clin Microbiol*, 27 (11): 2582 - 8.

**Sulaiman IM, Fayer R, Bern C**, 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis.*9: 1444-1452.

**Sykora JL, Bancroft WD, Brunwasser AH, States SJ, Shapiro MA, Boutros SN, ConleyLF**, 1988. Monitoring as a tool in waterborne giardiasis prevention. *Advances in Giardia Research*; 103-106

**Tamer GS, Üstün Ş, Ak M**, 2009. *Giardia*'larda Moleküler Biyolojik Yapı ve Çalışmaları. Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H. (Editörler) *Moleküler Parazitoloji. Türk. Parazitoloji Dern. Yay No: 22*, İzmir, 453-466

**Taneli N**, 1996. Metabolic disturbances in children with chronic giardiasis. In: *Parasitology for the 21<sup>st</sup> century*. Eds. Özcel MA, Alkan MZ. CAB International, UK, 127-40

**ten Hove R, Schuurman T, Kooistra M, Möller L, van Lieshout L, Verweij JJ**, 2009. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*, 13: 1001-7

**Thompson RCA, Reynoldson JA Mendis HW**,1993. *Giardia* and Giardiasis. *Advances in Parasitology*. 32: 71-160

**Thompson RCA, Reynolds JA, Mendis AHW**,1993. *Giardia* and Giardiasis, In: *Advances in parasitology*, JR Baker, K. Muller (eds.), Academic Pres, UK 32: 72-87

**Thompson SC**, 1994. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: A review of the literature. *J Paediatr Child Health*, 30:202-209

**Thompson RC**, 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol.* Nov;30(12-13):1259-67.

**Thompson RCA**, 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol.* 126: 15-35.

**Thompson RCA and Monis PT**, 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv. Parasitol.* 58, 69–137

**Thompson Jacqui, Yang Rongchang, Power Michelle, Hufschmid Jasmin, Beveridge Ian, Reid Simon, Ng Josephine, Armson Anthony, Ryan Una**, 2008. Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in marsupials in Australia. *Experimental Parasitology* 120, 88–93

**Thompson RC, Smith A, Lymbery AJ, Averis S, Morris KD, Wayne AF**, 2010. *Giardia* in Western Australian wildlife. *Vet Parasitol.* 170(3-4):207-11

**Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC**, 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology* 128: 253–262

**Traub Rebecca, Wade Susan, Read Carolyn, Thompson Andrew, Mohammed Hussni**, 2005. Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of *Giardia duodenalis* in horses. *Veterinary Parasitology* 130, 317–321

**Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M**, 1995. *Giardia intestinalis* ve parazitliği. Unat EK (Editör). *Unat'ın Tıp Parazitolojisi*. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayın No: 15, Doyuran Matbaası, İstanbul, 544 – 51.

**Üner A. ve Altuğ S**, 1997. Giardiosis'in Epidemiyolojisi. Özcel MA, Üner A. (Editör), *Giardiosis. Türk. Parazitoloji Dern. Yay, No:14, İzmir*, 1- 16.

**Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM**, 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes*, 17(5):223-5.

**Visvesvara GS, Dickerson JW, Healy GR**, 1988. Variable infectivity of human derived *Giardia lamblia* cysts for mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 887-841

**Volotão ACC, Souza Ju'nior JC, Grassini C, Peralta JM, Fernandes O**, 2008. Genotyping of *Giardia duodenalis* from Southern Brown Howler Monkeys (*Alouatta clamitans*) from Brazil. *Veterinary Parasitology* 158, 133–137

**Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O**, 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop.*, 102(1):10-9.

**Ward W, Alvarado L, Rawlings ND, Engel JC, Franklin C, McKerrow JH**, 1997. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell* 89, 437–444

**Welch DM, and M Meselson**, 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* 288:1211–1215.

**Wiesehahn GP, EL Jarroll, DG Lindmark, EA Meyer and LM Hallick**, 1984. *Giardia lamblia*: autoradiographic analysis of nuclear replication. *Exp. Parasitol.* 58: 94–100.

**Wladislawoff H**, 1978. Giardiasis and other intestinal parasites in intestinal disorders. 4<sup>th</sup> Int Cong Parasitol. C 17.

**World Health Organisation**, 1996. The World Health Report. World Health Organisation, Geneva

**Wu G, AG McArthur, A Fiser, DA Salidouble and ML Sogin**, 2000. Core histones of the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. Mol. Biol. Evol. 17: 1156–1163.

**Yu LZ, Birky CW, Jr & Adam RD**, 2002. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. Eukaryot. Cell 1, 191–199

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

**Ad-Soyad** : Serhan GÖRGÜN

**Doğum Yeri-Tarihi** : İzmir- 12 Temmuz 1985

### Öğrenim Bilgileri

2004-2008 Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

1999-2003 İzmir Bornova Mustafa Kemal YDA Lisesi

1996-1999 Nedret İlhan Keten Orta Okulu

1991-1996 Özkanlar İlköğretim Okulu

### Yabancı Dil

Orta seviyede İngilizce yazma, konuşma ve anlama

### Bilgisayar Bilgisi

MS Office ve Bilgisayar donanımı

### Katıldığım seminer-kurs-kongre vb.

2010 Fourth International Conference On Phthiraptera. Türkiye Parazitoloji Derneği

14.06.2010 - 18.06.2010

2008 MATED TS EN ISO 22000 güvenli gıda yönetim sistemi (H.A.C.C.P) (2gün/14 saat)

2007 Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik hafta sonu II semineri (3gün)

### Stajlar

2007 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı stajı

2006 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Parazitoloji bölümü stajı