

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

**GİARDİASİS TANILI HASTALARIN DIŞKI
ÖRNEKLERİNDE TPI GEN LOKUSU
HEDEFLERENEREK *G.intestinalis* GENOTİPLERİNİN
PCR – RFLP YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. Yalçın VURUPALMAZ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK**

**ŞANLIURFA
2012**

Yalçın VURUPALMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji

UZMANLIK

ŞANLIURFA -2012

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

**GIARDİASİS TANILI HASTALARIN DIŞKI
ÖRNEKLERİNDE TPI GEN LOKUSU
HEDEFLENEREK *G.intestinalis* GENOTİPLERİNİN
PCR – RFLP YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. Yalçın VURUPALMAZ

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK**

Bu tez , Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2011/53 Proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2012

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve hoşgörülerini esirgemeyen, maruz kaldığım hastalıkla mücadelede destek ve de yardımlarından dolayı da ayrıca minnettarlık duyduğum değerli hocalarım; tez danışmanım Doç. Dr. Fadile Yıldız Zeyrek ve Prof. Dr. Sami Taşçı, Prof. Dr. Mehmet Bayraktar'a saygılarımı ve teşekkürlerimi arz ederim. Çalışmalarında katkılarını esirgemeyen Esma Ceylan, Dilek Esen, Ali Küçük ve tüm laboratuvar personeline ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan asla beni üzmeyen Seray Tümer, tezimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen hayat arkadaşım, eşim Özgül Vurupalmaz ve de biricik oğlum Berk Vurupalmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL DİZİNİ	V
TABLO LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VII
ÖZET	VIII
SUMMARY	X
1-GİRİŞ	1
2-GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Tarihçesi	3
2.2. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Taksonomisi	4
2.3. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Morfolojisi	5
2.3.1. <i>Giardia intestinalis</i> 'in İnce Yapısı	6
2.3.2. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Trofozoit Şekli	6
2. 3.3. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Kist Şekli	8
2.3.4. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Yaşayış, Beslenme ve Enerji Kaynakları	9
2.4. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Evrimi	10

2.5. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Bulaşma Yolları	13
2.6. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Epidemiyolojisi	14
2.6.1. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Dünyadaki Yayılımı	15
2.6.2. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Türkiyedeki Yayılımı	16
2.7. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Patogenezi	17
2.8. <i>Giardia</i> İntestinalis'te İmmünoloji	19
2.9. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Kliniği	20
2.9.1. Asemptomatik Taşıyıcılık	21
2.9.2. Akut Tablo	21
2.9.3. Kronik Tablo	22
2.10. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Tanısı	23
2.10.1. Direk Tanı Yöntemleri	24
2.10.1.1. Dışkı	24
2.10.1.2. Duodenal Sıvı	25
2.10.2. İndirek Tanı Yöntemleri	27
2.10.2.1. Serolojik Yöntemler	27
2.10.2.2. Moleküler Yöntemler	28
2.11. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Ayırıcı Tanısı	31
2.11.1. <i>Enteromonas hominis</i>	31

2.11.2. <i>Chilomastix mesnili</i>	32
2.11.3. <i>Embadomonas intestinalis</i>	32
2.11.4. <i>Trichomonas hominis</i>	33
2.11.5. <i>Trichomonas tenax</i>	33
2.12. <i>Giardia intestinalis</i> 'in Tedavisi	34
2.13. <i>Giardia intestinalis</i> 'ten Korunma	36
3- GEREÇ VE YÖNTEMLER	39
3.1. DNA Ekstraksiyonu	40
3.2. DNA Amplifikasyonu	43
3.3. RFLP	43
3.4. Ürün Görüntüleme	44
3.5. İstatistiksel Analizler	45
4- BULGULAR	46
4. 1. Genel Bulgular	46
4. 2. PCR-RFLP Bulguları	48
5- TARTIŞMA	51
6- SONUÇ	57
7- KAYNAKLAR	58

ŞEKİL DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 2.1. <i>G.intestinalis</i> 'in trofozoit şekli; A) Lugol boyama B) Trikrom boyama	8
Şekil 2.2. <i>G.intestinalis</i> 'in kist şekli A)Lugol boyama, B)Trikrom boyama	9
Şekil 2.3. <i>G. intestinalis</i> yaşam siklüsü	12
Şekil 3.1. DNA ekstraksiyon aşamaları	42
Şekil 3.2. Ürün görüntüleme basamakları	44
Şekil 4.1. Kapiller jel elektroforez PCR amplifikasyon görüntüsü	48
Şekil 4.2. Kapiller jel elektroforez RFLP görüntüsü	49

TABLO LİSTESİ

	SAYFA
Tablo 4. 1. Olguların cinsiyete göre dağılımı	46
Tablo 4. 2. Olguların yaş gruplarına göre dağılımı	46
Tablo 4. 3. Mikroskopi ile saptanan morfolojik şekillerin dağılımı	47
Tablo 4. 4. Olguların klinik olarak semptomatik ve asemptomatik dağılımı	47
Tablo 4. 5. Giardia kist pozitif bulunan hastalarda semptom ve bulguların dağılımı	47
Tablo 4. 6. Olguların PCR-RFLP çalışmasında elde edilen genotiplerine göre dağılımı	49
Tablo 4. 7. Olguların PCR-RFLP çalışmasında elde edilen genotiplerin semptomatik ve asemptomatik hastalara göre dağılımı	50

KISALTMALAR

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA : Deoksi Ribonükleik Asit

G. duodenalis : Giardia Duodenalis

TPI : Trioz Fosfat İzomeraz

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

Kda : Kilodalton

IFA : İmmün Floresan Antikor

ÖZET

GIARDİASİS TANILI HASTALARIN DIŞKI ÖRNEKLERİNDE TPI GEN LOKUSU HEDEFLERENEK *G.intestinalis* GENOTİPLERİNİN PCR – RFLP YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

Amaç: Giardia birçok omurgalı konağı enfekte edebilen kamçılı bir bağırsak parazitidir. Giardiasis insan için en yaygın protozoon enfeksiyonu olarak bilinmektedir. Gelişmekte olan ülkelerin tümünde ve Amerika'da hem önemli, hem de en sık rastlanan protozoon hastalığı olarak bilinmektedir. İnfeksiyon asemptomatik seyredebileceği gibi vakaların çoğunda olduğu gibi yağlı, yumuşak dışkılama, karında şişkinlik, gaz, kramp şeklinde karın ağrısı, epigastrik bölgede duyarlılık ve malabsorbsiyon sendromu gibi belirtilere neden olabilmektedir. Mutlaka tedavi edilmesi gereken bir enfeksiyondur (78, 79).

Farklı coğrafik bölgelerde yaşayan insanlardan izole edilen binden fazla dışkı örneğinden PCR ile elde edilen DNA'nın incelenmesi sonucunda *G. duodenalis*'in A ve B tiplerinin insan enfeksiyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. A tipi ile enfekte olmuş hastaların B tipi ile enfekte olmuş hastalara göre iki kat fazla ishal şikayeti olduğu ve B tipinin asemptomatik giardia ile istatistiksel olarak ilişkilendirildiği rapor edilmiştir. Moleküler çalışmalarla insanlarda giardiasis'in farklı klinik tablolar şeklinde görülmesi, *G. intestinalis* genotip gruplarının farklı patojenitelere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Giardia'ların genotiplendirilmesi gerçekleştirilmiş, sonuçların semptomlarla ilişkisi araştırılmış ve saptanan A ve B gruplarından birer örneğin DNA dizisi belirlenmiştir (77).

Çalışmamızın amacı giardiasis tanılı hastalarda TPI gen lokusu hedeflenerek PCR ve RFLP yöntemi ile *G. intestinalis*'in moleküler olarak grup A ve grup B olarak genotiplendirilmesi ve bu genotiplerin hastalığın klinik olarak semptomatik ve asemptomatik tablolarla ilişkisi ve genotiplerin dağılımının araştırılmasıdır.

Yöntem ve Gereç: 2008-2011 yılları arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda giardiasis tanısı almış olan 75 hasta dışkı numunesi incelenmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda 75 hastanın 69'u semptomatik 6 tanesi asemptomatik olgulardan oluşmaktaydı. 69 adet semptomatik olgunun 67 adedi genotip A olarak bulunmuş iken, 2 adedi genotip B olarak bulunmuştur. 6 adet asemptomatik olgunun ise tamamı genotip B olarak gözlemlenmiştir.

Sonuç: Semptomatik olgular ile *G. intestinalis* genotip A arasında anlamlı bir ilişki olduğu ($p<0.05$) gözlemlenmiştir. Giardiasis tanısı alan olgularda tip A genotipinin sayıca tip B genotipine göre anlamlı olarak ($p<0.05$) daha fazla olduğunu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Giardiasis, PCR, RFLP, Genotip A, Genotip B

SUMMARY

INVESTIGATION OF *G. intestinalis* GENOTYPES BY TPI GEN LOCUS TARGETED PCR-RFLP METHOD IN STOOL SPECIMENS OF PATIENTS DIAGNOSED AS GIARDIASIS

Aim: Giardia is an intestinal parasite that infects various vertebrates. Giardiasis is known to be the most common protozoan infection in humans. In America and all developing countries, it is accepted as the most common and the most important protozoal disease. Although, the infection can course without symptoms, it can cause symptoms like soft stools, abdominal bloating, abdominal gas, abdominal cramps, epigastric tenderness and malabsorption syndrome as seen in most of the cases. It is an infection which must be treated (78, 79).

Results of the investigations on DNA excretions with PCR from more than a thousand of samples of the feces revealed that *G. intestinalis*, type A and B are related with human infections. It has been reported that the patients infected by Type A had diarrhea symptoms more than two folds according to patients infected by Type B and the statistical relation between Type B infections and asymptomatic giardiasis was significant. Since molecular studies have shown that giardiasis can be seen in different clinical appearances, it is thought that *G. intestinalis* genotypes can have different pathogenities. Genotyping of Giardia's have been revealed, the relation between results and symptoms have been investigated and an example from each group of defined Type A and B have been determined (77).

The aim of this study was genotyping *G. intestinalis* as group A and B by molecular techniques such as PCR and RFLP with targeting TPI gen locus in patients diagnosed as giardiasis and investigating the relation of these genotype groups with clinical status of the disease as symptomatic or asymptomatic and also examining of the distribution of these genotypes.

Material and methods: The stool specimens of 75 patients diagnosed as giardiasis in Harran University Medical Faculty, Department of Microbiology between 2008 and 2011 were investigated.

Results: In our study, 69 of 75 patients were symptomatic and 6 of them were asymptomatic. While 67 of 69 symptomatic cases had genotype A, two of them had genotype B and all of the asymptomatic patients had genotype B.

Conclusion: We observed the significant relation between symptomatic patients and genotype A ($p < 0.05$). We determined the predominance of genotype A according to genotype B numerically ($p < 0.05$).

Key words: Giardiasis, PCR, RFLP, Genotype A, Genotype B

1. GİRİŞ

Giardia birçok omurgalı konağı enfekte edebilen kamçılı bir bağırsak paraziti olup insanlarda duodenum ve jejunumda bulunan tek patojen protozoondur. *G. intestinalis*' in (*G. lamblia*) neden olduğu hastalığa giardiasis denir. *G. lamblia* insanlar için zayıf patojendir. Bu parazitin yaşam döngüsünde trofozoit ve kist formu bulunur. Trofozoit şekli ince barsak mukozasına emici diskleri ile tutunur ve ikiye bölünerek çoğalır, dokulara geçemez. Trofozoitler kolona geçtiklerinde tipik olarak kistleşir. Bu hastalıkta; asemptomatik taşıyıcılık, akut ve kronik olmak üzere üç tip klinik tablo görülebilmektedir. Kistler, asemptomatik kişilerde dışkıda fazla sayıda bulunur. Dış ortamda trofozoitler yaşamlarını yitirirken kistler uzun süre canlı kalmaktadır. Enfeksiyon, parazitin dört çekirdekli olgun kistlerinin ağız yoluyla alınmasıyla oluşmakta ve on kadar kist bile enfeksiyona neden olabilmektedir. Bulaşık yiyecek ve içeceklerle veya bulaşlı parmaklarla ağızdan alınan giardia kistleri mide ve bağırsak öz sularının etkisi ile açılırlar ve içlerinden açığa çıkan trofozoitler özellikle duodenum olmak üzere ince barsak çeperine yapışırlar (7, 11, 12, 14-16, 49).

Giardiasis insan için en yaygın protozoon enfeksiyonu olarak bilinmektedir (19, 20). Giardia enfeksiyonları dünyanın her bölgesinde ve tüm yaş gruplarında görülebilmekle birlikte, bu parazitin yol açtığı hastalığa çocukluk yaşlarında daha sık rastlanmaktadır. Prevelansı Avrupa ve Kuzey Amerika'da % 2-7 arasındayken bu oran gelişmekte olan ülkeler için %40'a kadar çıkmaktadır. Enfeksiyon, semptom vermeden seyredebileceği gibi kısa dönemli akut ishal veya vakaların çoğunda olduğu gibi yağlı, yumuşak dışkılama, karında şişkinlik ve gaz, kramp şeklinde karın ağrısı, epigastrik bölgede duyarlılık ve malabsorbsiyon sendromu gibi belirtilere neden olabilmektedir. Mutlaka tedavi edilmesi gerekmektedir. Farklı coğrafik bölgelerde yaşayan insanlardan izole edilen binden fazla dışkı örneğinden PCR ile elde edilen DNA'nın incelenmesi sonucunda *G. duodenalis*' in A ve B tiplerinin insan

infeksiyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *G. duodenalis*'i morfolojik olarak çok az farklılıklar gösteren ancak genetik analizleri sonucu yedi farklı alt türe ayıran veriler de bildirilmektedir. Hastalığın ciddiyeti parazitin virülansı ile enfekte ettiği bireyin yaşı, beslenmesi ve immünolojik durumu ile ilgilidir. A tipi ile enfekte olmuş hastaların B tipi ile enfekte olmuş hastalara göre iki kat fazla ishal şikayeti olduğu ve B tipinin asemptomatik giardiasis ile istatistiksel olarak ilişkilendirildiği rapor edilmiştir. İnfeksiyonun epidemiyolojisini etkileyen diğer faktörler de vardır. İnsanlarda enfektif olan doz 10 ile 100 kist arasındadır. Kistler dışkı ile dışarı atıldığında hemen etkili hale geçerler ve insandan insana veya hayvandan hayvana bulaşabilirler. Moleküler çalışmalarla insanlarda giardiasisin farklı klinik tablolar şeklinde görülmesi, *G. intestinalis* genotip gruplarının farklı patojenitelere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Giardia'ların genotiplendirilmesi gerçekleştirilmiş, sonuçların semptomlarla ilişkisi araştırılmış ve saptanan A ve B gruplarından birer örneğin DNA dizisi belirlenmiştir (73-75).

Bizim çalışmamızın amacı ise giardiasis tanılı hastalarda TPI gen lokusu hedeflenerek PCR-RFLP yöntemi ile *G.intestinalis*'in moleküler olarak grup A ve grup B olarak genotiplendirilmesi ve bu genotiplerin hastalığın klinik olarak semptomatik ve asemptomatik tablolarla ilişkisi ve genotip dağılımlarının araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. *Giardia intestinalis*'in Tarihçesi

G. intestinalis'i ilk kez 1681 yılında Danimarkalı Antony Van Leewenhoek kendi dışkısından hazırladığı preparasyonda görerek bunu“ Royal Society of London” a gönderdiği mektupta anlatmıştır (1). Bundan 250 yıl sonra İngiliz bilim adamı Clifford Dobell, Leewenhoek'un yazılarını bir parazitolog olarak incelemiş ve giardianın ilk kez Leeuwenhoek tarafından tariflendiğini ortaya çıkarmıştır (1). Bir Çekoslovak doktor olan Vilem Lambl 1859 yılında bu protozoonu ve bağırsaklardaki yerleşimini çok daha detaylı olarak tanımlamış ve *Cercomonas intestinalis* adını vermiştir (2). 1889'da Blanchard bu flagella türünün ilk kez Lambl tarafından görüldüğünü düşünerek protozooya *Lambliia* adını uygun görmüştür. Stiles,1915'te Giard ve F. Lamb'ın bu konudaki çalışmalarına bir şükran borcu olarak protozoonu *Giardia lamblia* olarak isimlendirmiştir (1). 1875 yılında Davaine ise *Hexamites duodenalis* olarak adlandırmıştır. Bugün giardianın doğru cins ismi olduğu konusunda fikir birliği bulunmakta, *intestinalis*'in de *duodenalis* ve *lamblia*'ya göre kronolojik önceliği olduğu düşünülmektedir (3). Sonuç olarak *G. intestinalis* insanları infekte eden giardia türleri için doğru isim olarak görülmektedir.

Unat'a göre *G. intestinalis*' de kistin oluştuğunu 1887'de Perroncito, bu parazitin bağırsaktaki hareketli şeklini E. Müler (1899), bugünkü trofozoitinin şeklini W. Benser ve kistin şeklini E. Rodenwaldt (1911), Heidenhain geliştirdiği demirli hemotoksilenle

boyanarak iç yapısının daha iyi incelenmesini (1891), Wenyon ve O'Connar ise 1917'de parazitin ikiye bölünmesini tarif etmiştir (4).

Uzun yıllardır tanınmasına karşın giardia'nın kommensal mi yoksa insanda hastalığa yol açan bir organizma mı olduğu sorusu yakın zamanlarda cevaplanmıştır. Her ne kadar 1926 yılında R. Muler ve 1939 yılında P. Veghalyi Giardia'nın absorpsiyon bozukluklarına neden olduğunu, steatoreye yol açarak yağda eriyen vitaminlerin emilimini engellediğini bildirdilerse de, 1950'lerde hala birçok araştırmacıya göre apatojen olarak kabul ediliyordu. Sonraki çeyrek yüzyıl içinde yapılan araştırmalar, giardianın patojenitesine açıklık getirmiştir. 1978 yılında Kulda ve Nohynkova hastalık semptomları, malabsorpsiyon, histopatoloji temellerine dayanarak organizmanın hastalık yaptığına dair tüm şüpheleri ortadan kaldırmışlardır. Bu sonuç Dünya Sağlık Örgütü'nce de (WHO) 1981 yılında onaylanmıştır (1).

2. 2. *Giardia intestinalis*'in Taksonomisi

Bölüm : Protozoa

Alt Bölüm : Sarcomastigophora

Üst Sınıf : Mastigophora

Takım : Polymastigida

Aile : Hexamitidae

Cins : Giardia

Tür : *Giardia intestinalis*

2. 3. *Giardia intestinalis*'in Morfolojisi

Hücresel biyoloji ile ilgilenen araştırmacılar için iyi bir örnek olan parazitin trofozoit formu, ön yüzünden bakıldığında genel görünüm olarak armutu andırmaktadır. Parazitin ön yüzünde genişleyen bölümün tamamını kaplayan bir yapı olan emici disk yer almakta, bu yapı sayesinde parazit tutunmak istediği yüzeylere tutunabilmektedir. Bu diskin hemen arkasında (armutun iç kısmında) iki adet oval şekilde nukleus bulunmaktadır. Nukleus içinde genellikle merkezi yerleşimli olan büyük karyozomlar görülmektedir. *G. intestinalis*'in trofozoit şekline profilden bakıldığında ise ventral (ön) yüzünün yere paralel olacak biçimde düz, dorsal (sırt) yüzünün ise bombeli olduğu, eğer armut şeklinde iki parça olarak düşünülürse iki simetrik parçadan oluştuğu görülmektedir. Her iki parçada da her yapıdan birer tane bulunmakta olup parazit simetrik yapıdadır. İki nukleus arasında adeta mikroorganizmayı ikiye ayıran ve armutun dar ucuna doğru uzanan aksonem, median cisimler ve organizmanın 4 çift kamçıya adeta kök oluşturan kinetosomal kompleksler yer almaktadır. Bu cümleden anlaşılacağı gibi, *G. intestinalis*; anterior, lateral, ventral ve posterior olmak üzere dört çift kamçıya sahiptirler. Ön kamçılar aksonemlerin uzantısı olup, başka bir deyişle, aksonemler ön kamçıların bir miktar kavis almış olan intrasitoplazmik parçaları gibidirler. Median cisimler mikrotübüler yapılar olarak görülmektedir (5, 6, 7). *G. intestinalis*'in kist şekli ise 8-12 µm uzunluğunda ve 7-10 µm genişliğinde oval, sitoplazmaları ince granüllü olup içinde orta cisimler, kamçı ve diğer hücre organel kalıntıları ile 2-4 nukleus kistin bir ucunda toplanmış olarak görülmektedir (7).

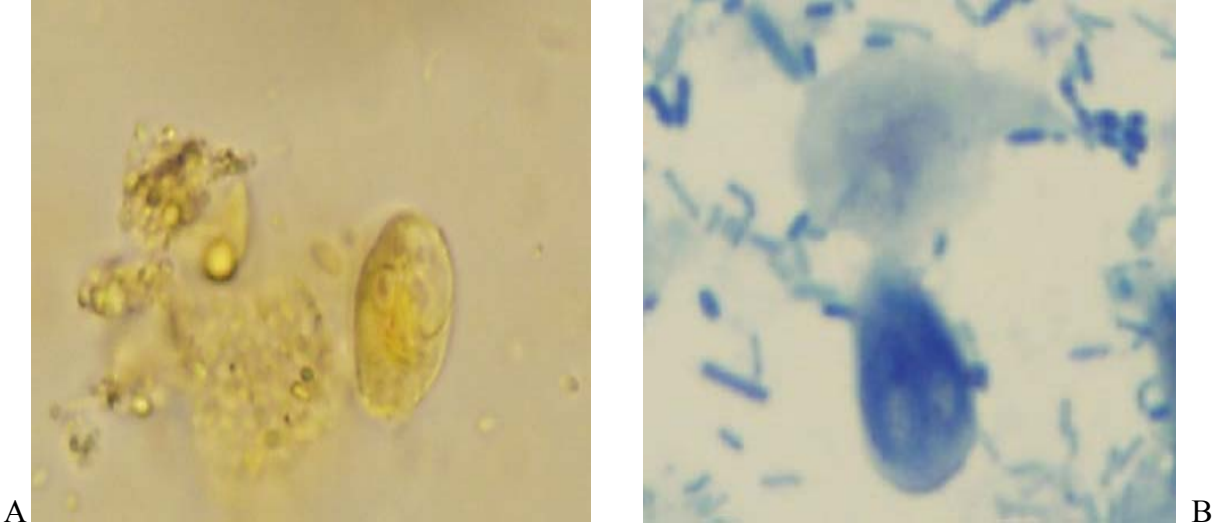
2. 3. 1. *Giardia intestinalis*'in İnce Yapısı

Mitokondrisi ve golgi cisimciği bulunmamasına rağmen ökaryot olan *G. intestinalis*, pinositozla etrafında çok sayıda besin vakuolu bulundurmaktadır. Oval şekilli kistleri ise ikiden dörde kadar değişen sayıda nukleus ve trofozoit organellerinin kalıntılarını içermektedirler. *G. intestinalis* ince barsağın üst kısımlarında mukozal epitele ventral yüzündeki emici disk aracılığıyla tutunarak yerleşmektedir. Parazitin intestinal (özellikle duodenal) mukozaya yapışmasını kolaylaştırabilen ilginç bir özellik de, salgıladığı bir lektin proteinin bu tutunmayı kolaylaştırması ve aynı zamanda duodenum salgılarının bu lektinin oluşumunu uyarmasıdır. Böylece mukozal epitele tutunabilen protozoon yapışma sonucu yol açtığı mekanik etki sayesinde mukozal irritasyona da neden olur. Bu da giardiamın patojen etkilerinden birini oluşturmaktadır (5, 8).

2. 3. 2. *Giardia intestinalis*'in Trofozoit Şekli

Konkav yapıda, sert ve birkaç yapısal elementten oluşan emici diskten dorsal olarak sitoplazmaya mikroşeritler uzanmakta ve bunlar karşılıklı köprülerle birbirlerine, ayrıca plazma membranına komşu olan mikrotübüllere ventral olarak bağlanmaktadır. Fibröz yapıdan oluşmuş diskin dışarı çıkıntı yapan kenarı, sitoplazma membranının yan çıkıntısına sıkıca bağlanmaktadır (Şekil 2.1). Ventrolateral kenar, içten biyokimyasal yapısı bilinmeyen iki filamentöz tabaka ile desteklenmekte ve bu tabakaların ventrolateral kenarın hareketi ile ilgili kontraktil bir rol oynayabilecekleri tahmin edilmektedir (9).

G. intestinalis'in en önemli iskelet yapısı proteininin tubulin olduğu, ayrıca emici disk mikroşeritlerinin giardin denilen protein içerdikleri bildirilmektedir. *G. intestinalis*'e özgün olan bu giardin proteinlerinin, yalnız emici diskte bulunduğu, boyutlarının yaklaşık 29-38 kDA arasında değiştiği, emici diskin fonksiyonunda önemli rol oynadığı ve yeni geliştirilecek kemoterapötik ajanlar için iyi hedef oldukları sanılmaktadır. Mikrotübüllerden oluşan ventral disk, aksonemler ve kamçı, basal cisimler, orta cisimler ve kuyruk aksonemleri ile bağlantılı fibriller olmak üzere 4 organel parçadan oluşan iskelet yapısında, orta cisimlerin seneler önce parabasal cisim, kinetoplast, kromatoid cisimler olarak isimlendirilmesine rağmen, elektron mikroskopik araştırmaların sonucunda bunlardan hiçbirisi olmadıkları bildirilmiştir. Orta cisimlerin organizmanın arka kısmına destek olabilecekleri ya da enerji metabolizmasına katılabilecekleri ileri sürülmüş ancak fonksiyonları henüz aydınlatılamamıştır (10). Sadece giardia türlerinde çift olarak bulunan orta cisimler, mikrotübül paketinden oluştuğunun belirlenmesine karşın, fonksiyonları henüz bilinmemekte, emici diskin oluşumunda rol aldıklarının öne sürüldüğü ve biyokimyasal yapıları hakkında ileri çalışmaların gerektiği bildirilmektedir. *G.intestinalis*'te mitokondri, perokzimler, glikozomlar ve hidrogenozomların olmadığı ve flexamitidae ailesindeki diğer cinslerde olduğu gibi golgi cihazının da bulunmadığı bildirilmişse de son zamanlarda golgi cihazının varlığına dair kanıtlar bulunmuştur (8). Eşit büyüklükte ve simetrik iki nükleus bir tek giardia cinsinde bulunmakta, morfolojik olarak ayırdedilemeyen iki nükleusun, DNA yapılarının da aynı olduğunu düşündüren sonuçların bulunmasına rağmen DNA analizleri ve kromozom sayı analizleri ile ilgili çalışmalara devam edilmektedir.



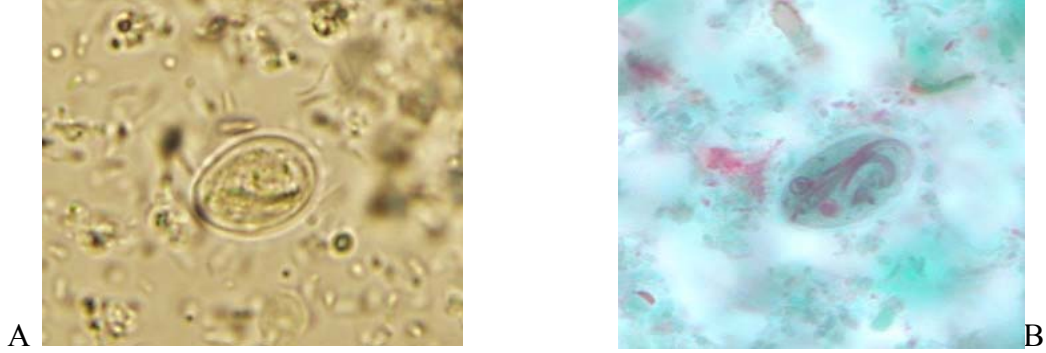
Şekil 2.1. *G.intestinalis*'in trofozoit şekli; A) Lugol boyama, B) Trikrom boyama

2. 3. 3. *Giardia intestinalis*'in Kist Şekli

Plazma membranı, sitoplazmayı kist duvarından ayırmaktadır. Sitoplazma'nın periferik kısmında, vakuollerin bulunduğu şeffaf bölüm bulunmaktadır. Kist çeperinin, 0. 3 mm kalınlığında olduğu, ana yapısının N-asetil-galaktozamin olan fibröz proteinöz bir yapıdan oluştuğu bildirilmektedir. Genellikle 4 nükleus, kistlerin sitoplazmasında rastgele dağılmış, dikey şeritler şeklinde, paralel mikrotübül dizileri, trofozoit şeklinin emici diskin birleşmemiş parçalarını oluşturmaktadır. Nükleus yuvarlak-oval şekilli, tipik nükleer zarfla çevrilmiş ve orta yoğunlukta nükleoplazma içermektedir. Merkeze yakın nükleolus olduğu düşünülen büyük, yoğun granüler bir yapı bulunmaktadır. Kamçıların aksonemleri nükleus çevresinde bulunmakta, daha oval şekilli kistlerde, kist merkezinde uzunlamasına yerleşebilmekte, 8 aksonem de genellikle seçilebilmektedir (Şekil 2.2) (11, 12).

Birçok giardia izolatının trofozoit ve kistlerinde endosim biyontlar olarak bakteri, mikoplazma ve virüslerin gözleendiği bildirilmiştir. Bunlardan bazı izolatlarda bulunan ve spesifik olarak giardiayı enfekte eden iki zincirli bir ribo-nükleik asit (dsRNA) virüsü, giardia

virüs (GLV) olarak tanımlanmış ve ayrıntılı olarak incelenmiştir. In vitro trofozoitlerin büyüme oranı ve yapışma özelliklerinin azalması ile ilişkili olduğu bulunmuş, ağır enfeksiyonlarda hücre lizisinden çok, parazitin çoğalmasının inhibisyonuna yol açtığı düşünülmüştür (13).



Şekil 2.2. *G.intestinalis*'in kist şekli; A)Lugol boyama, B)Trikrom boyama

2. 3. 4. *Giardia intestinalis*'in Yaşayış, Beslenme ve Enerji Kaynakları

Parazitin trofozoit şekli hareketli olup kamçılarıyla düzensiz olarak hareket etmektedir. Bu hareket tarzı düşen bir yaprağın hareketine benzetilebilir. Emici diskleri ile ince bağırsağın yukarı kısımlarındaki epitel hücrelerine kuvvetle yapışmaktadırlar. Bazen bağırsak salgı bezleri içine girebilir, bazen de duodenumdan safra kanallarına geçebilir ve safra kesesinde de görülebilmektedir.

İnsanda *G. intestinalis*, bağırsaklarda erimiş haldeki maddeleri absorbe edebilmektedir. İnvitro olarak besiyerlerine ekim işlemini gerçekleştirmek için giardia kistlerinin saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Bu izolasyon işlemi için sukroz gradient santrifüj ile kistlerin dışkı artıklarından ayrılması ve konsantre edilmesi, asidik solüsyon içinde eksistasyonun in vitro ortamda kistlerin açılarak trofozoit şekline dönüştürülmesinin

sağlanması gibi işlemler uygulanmakta ve besiyerlerine ekilerek üretimi devam ettirilmektedir.

G. intestinalis trofozoitlerinin %7 gliserol içinde -70°C'de 2 yıl canlı olarak kalabildikleri saptanmıştır. Kistlerin sudaki ömürlerinin, ortam ısısına bağlı olarak 8°C'de 2 ay, 21°C'de 5-24 gün, 37°C'de 4 gün olduğu bildirilmekte, %0, 5 klorlu suda 2-3 gün, dışkı ile birlikte sinekler tarafından alınan *G. intestinalis* kistlerinin sineklerin bağırsaklarında 24 saat canlı kalabildikleri de bildirilmektedir. Kistler 65°C'de 2 dakikada ölmekte, dondurma ve çözündürme işlemi ise % 99' un üzerinde öldürücü etki yapmaktadır.

Giardia trofozoitlerinin büyümesi, gelişmesi ve çoğalması için enerji kaynağı olarak mutlaka glikoza ihtiyacı vardır. Son gözlemler, argininin ve alanin başta olmak üzere bir çok aminoasidin, Giardia'nın besiyerinde üremesi esnasında enerji metabolizmasına dahil olduğunu göstermektedir (14).

2. 4. *Giardia intestinalis*'in Evrimi

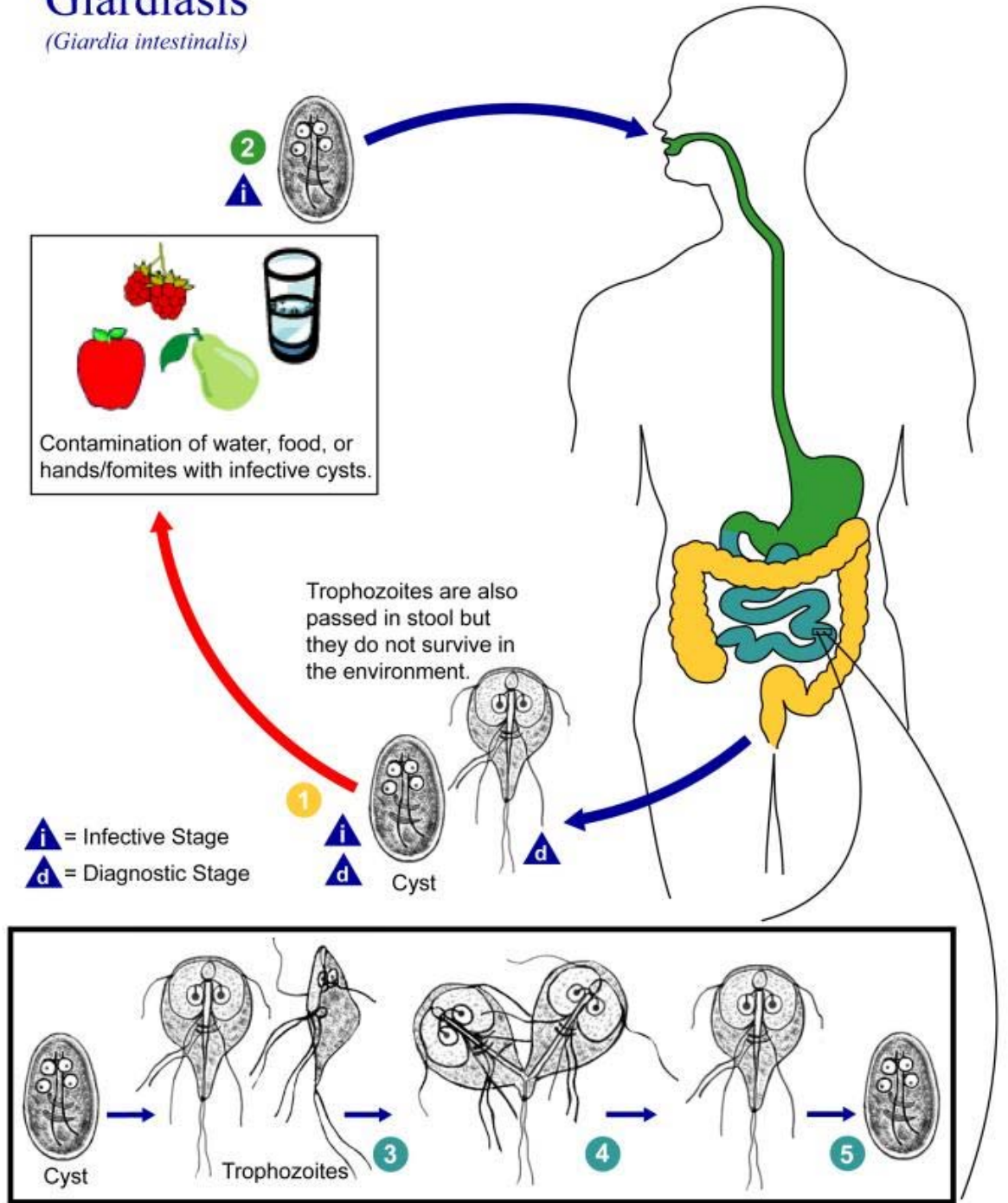
Giardianın yaşam döngüsü iyi bilinmektedir. Dışkı ile atılan kistler uygun bir konak tarafından oral yoldan yiyecek ve içeceklerle alınırlarsa bu döngü konak omurgalının ince barsağında başlamaktadır. Kist duvarının parçalanması yoluyla kist formunun trofozoite dönüşmesi süreci de ekskistasyon olarak isimlendirilmektedir. Özellikle konağın mide asiditesi, bu sürecin başlangıcını tetikleyici yönde etkilemekte, sonuçta bu sayede özellikle duodenumda rüptüre olan kist duvarından geriye dört nukleuslu bir sitoplazma kalmakta, bu da süratle her biri tek nukleusa sahip olan dört trofozoite dönüşmekte ve de yeni konağın ince bağırsak duvarında yerini almaktadır.

Trofozoit formu ait olduğu omurgalı konağın ince bağırsak mukozasına emici disk yardımıyla yapışarak tutunur. Burada nükleus ikiye bölünür ve trofozoit ardından tekrar tutunma sürecine başlar. Sonuçta çok fazla sayıda trofozoit, konak olan omurgalının ince bağırsak mukoza epiteline yapışmış veya invaze olmuş biçimde yaşamlarını sürdürmektedirler. Trofozoitler intestinal epitelden ayrıldıkça, peristaltizmin etkisiyle bağırsak içeriği ile birlikte sürüklenmekte ve dışkı ile atılmaktadırlar. Giardia trofozoit formunun kist formuna transformasyonu, konak olan omurgalının ince barsağında gerçekleşmekte ve bu süreç zaman almaktadır. Bu yüzden dışkı daha şekilsiz ve sıvı iken, dışkı örneklerinde daha çok trofozoit görülmektedir. Çünkü bağırsak içeriğinin bağırsakta durma süresi kısa olup parazitin trofozoit formundan kist formuna geçişi için gerekli olan süre kadar ince bağırsak lümeninde kalamamaktadır. Bunun karşılığı olarak da kist formu, daha çok şekilli dışkı örneklerinde görülmektedir.

Trofozoit formunun kist formuna dönüşmesi enkistasyon olarak adlandırılmakta ve enkistasyon süreci iki nükleuslu trofozoitin iki nükleuslu kist formuna dönüşümüyle sonlanmaktadır. Daha sonra bu iki nükleus da ikiye bölünerek dört nükleuslu kist formu oluşmaktadır (Şekil 2.3) (7).

Giardiasis

(*Giardia intestinalis*)



Şekil 2.3. *G. intestinalis* yaşam siklüsü (76)

2. 5. *Giardia intestinalis*'in Bulaşma Yolları

G. intestinalis insan ve çevresinde yaşayan memeli hayvanların yanı sıra kunduz, tarla faresi ve lağım farelerinde de bulunmuştur. Bu kemirgenlerin infeksiyonu insanlardan aldıkları bilinmektedir. Ancak bunların dışkıları ile parazitin enkiste formunu çıkarıyor olmaları, dağlardan gelen kaynak sularının da kirlilik riskini artırmakta, buralardan su içenler de infekte olmaktadır. Bu yolla infekte olan kampçı ve dağcılarının yanı sıra, bu suların karıştığı sularda dalış yapan dalgıçlar için de aynı risk söz konusu olmaktadır. İnsandan insana geçiş infeksiyonunun en yaygın bulaşma biçimi olup bununla birlikte çapraz geçiş olarak adlandırılan ve hayvandan insana ya da insandan hayvana geçişi anlatan bulaşma biçimi de bilinmekte ve güncelliğini korumaktadır. İnfeksiyon, çocuklarda oyuncak alışverişiyle, fekal - oral yoldan kist formu ile kirlenmiş yiyecek ya da içeceklerle ve oral - anal seksüel ilişki yoluyla yayılmaktadır. Birkaç gram dışkının içinde bulunabilen yaklaşık 10 adet kadar kistin oral yoldan alınması ile infeksiyon oluşabilmektedir. *G. intestinalis*'in kist formu nemli ortamda 3 hafta kadar canlı kalabilmekte ve eğer su yetersiz klorlanmışsa sudaki klorla da direnç göstermektedir. İçme suyunun çok az bir dışkıyla kirlenmiş olması infeksiyonun alınabilmesi için yeterli olmaktadır. Dolayısı ile içme sularının bakteriyel kontaminasyonu ortadan kaldırmaya yönelik miktarlarda düzenli olarak klorlanmasının bile riski ortadan kaldırmadığı bildirilmektedir (15).

Parazitin, günlük çocuk bakım merkezlerinde çocuktan çocuğa bulaşması oldukça güncel olarak yaşanan bir sorun şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Evlerden veya aynı şekilde bakım merkezlerinden atık olarak dışarıya çıkarılan çocuk bezleri de hastalığın hızlı yayılmasını etkilemektedir. Paraziti asemptomatik olarak taşıyan toplum bireylerinin sayılarının hiç az olmadığı düşünülürse, paraziti dışkı ile çıkaran çocukların bezlerinin toplum için oldukça önemli bir kaynak olduğu anlaşılmaktadır. Bu çocukların dışkı örneklerinde, 13 - 30 aylık olanlarda 12 aylıktan küçük olanlara oranla, giardia kist formu daha sık görülmüştür. İlk 12 ay içindekiler arasında, özellikle günlük bakım merkezlerinde olanların 3 aylıktan büyük olan çocukların küçüklere oranla daha fazla kist çıkardıkları saptanmıştır (16).

Çocukların sıklıkla gittiği yüzme havuzlarında meydana gelen istenmeyen su kirlenmeleri de çocuklar ve yetişkinler için başka birer infeksiyon kaynağı oluşturmaktadır. Yüzme havuzlarının suları klorlanmakta, ancak bunun elliser dakika arayla düzenli olarak yapılması gerekmektedir. Çünkü uygun yapılmış bir klorlamayla bile kist ancak 50 dakikalığına elimine edilmekte, klorlama düzensiz uygulandığında bu yalnızca bakteriyel kontaminasyona karşı koruma sağlamaktadır. Bulaşmasında önemli bir konu, yiyecek hazırlama sektöründe çalışanların hijyen kurallarına dikkat etmemesi sonucu oluşan infeksiyonlardır. Ayrıca aile içinde kişisel hijyen kurallarına uyumdaki eksiklik sonucu ortaya çıkan yayılma, insanlar arasındaki bulaşımın önemli bir kısmını oluşturmaktadır (17). Bugün karşımıza gelen bir başka bulaşma şekli seksüel transmisyonudur. Günümüzde artan erkek homoseksüalitesi, oral - anal seksüel ilişki gibi faktörler hastalığın bulaşmasında yer tutmaya başlamıştır. Parazitin bulaşmasının doğrudan cinsel aktivite esnasında meydana geldiğini, bu yolla geçişini gösteren çalışmalar yapılmış ve tutarlı sonuçlar elde edilmiştir (18).

2. 6. *Giardia intestinalis*'in Epidemiyolojisi

Giardiasis insan için en yaygın protozoon infeksiyonu olarak bilinmektedir. Ilıman bölgelerden tropikal kuşağa kadar, endüstriyel ülkelerde %2-5 arasında değişen oranda, gelişmekte olan ülkelerde %20-30'a varan oranlarda yayılış göstermektedir. Özellikle çocuklarda yüksek oranda görüldüğü dikkati çekmektedir. Yaşa özgün prevalans çocukluktan infantil döneme doğru gidildikçe artmakta, özellikle adolesan çağda olmak üzere erişkinliğe doğru ise azalmaktadır (19, 20).

2. 6. 1. *Giardia intestinalis*'in Dünyadaki Yayılımı

Gelişmekte olan ülkelerin tümünde ve Amerika' da da endemik, hem önemli, hem de en sık rastlanan protozoon hastalığı olarak bilinmektedir. İlk kez salgını lağım sularının içme sularına karışmasından kaynaklandığı tesbit edilen Colorado'da 1965 yılında ortaya çıkmış ve dışkı muayene sonuçlarına göre %23 oranında bir pozitiflik bulunmuştur. Amerika'da 1971-1986 yılları arasında 95 salgınının meydana geldiği ve bu salgınlardan 24000 den fazla sayıda insanın etkilendiği tesbit edilmiştir. Amerika'da meydana gelen bu salgınlara nedenleri incelendiğinde, suların kullanıma verilmeden önce filtre edilmediği veya uygun şekilde filtrasyon yapılmadığı, klorlama işlemlerinin yetersiz kaldığı saptanmış ve lağım sistemi ile içme su borularının birbirlerine yakın döşenmiş olmalarının da bir etken olduğu ileri sürülmüştür. Kanada'da meydana gelen salgınlara su kaynaklı oldukları tesbit edilmiştir. Ayrıca Yeni Zelanda, İskoçya ve İsveç'in kuzey kesimlerinde de meydana gelen salgınlara kaynağının lağım sularıyla kontamine olan içme suları olduğu saptanmıştır (21). Hindistan Yeni Delhi' de diyareli 127 çocuktan alınan dışkı örneğinde %11 oranında *G. intestinalis* tespit edilmiştir (22). Japonya'da 1998-2001 yılları arasında 1790 hastanın dışkıları incelenmiş ve *G. intestinalis* kistleri % 0, 95 oranında tesbit edilmiştir. Bu hastalar kist taşıyıcısı olduklarından, laboratuvarlarda yapılan incelemelerde, infeksiyon kaynağı olarak kist taşıyıcılarına daha dikkat edilmesi gerektiği belirtilmiştir (23). Norveç'te toplam 22 tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarına 1998-2002 yılları arasında gelen hastalardan incelenen dışkı sonuçlarına göre farklı laboratuvarlarda %1 ile %6 oranında giardiasis saptanmıştır (24).

2. 6. 2. *Giardia intestinalis*'in Türkiyedeki Yayılımı

Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde giardiasis konusunda değişik şehirlerde %0.8 ile %54.8 gibi farklı sayılarda değerler bulunmuştur. Bu şehirlere göre giardiasisin dağılımına bakıldığında; Malatya'da %5.2, %26.3 ve %6.2 (7, 25, 26); Kahramanmaraş'da %52.87 (27), İstanbul'da %0. 8-%54.8 (28, 29, 30, 31); Kayseri' de %44. 6 (32); İzmir'de %2.3 ve %4 (33); Sivas'ta %2.1 ve %15 (34, 35); Manisa'da %9.6 (36); Ankara'da %3.8 (37); Kırıkkale'de %4. 4 (38); şanlıurfa'da sırasıyla %20.65, %13. 2, %17.7, %46.7 (39, 40, 41), GAP bölgesinde kırsal kesimde %12.6, kentsel kesimde %21. 9 ve toplam olarak %18.1 (42) gibi. GAP bölgesinden ayrıca ocuk esirgeme kurumlarına, farklı hastanelere ve Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Parazitoloji laboratuvarına başvurular ile ilköğretim okulları gibi toplumun farklı kesimlerinde araştırmaların yapıldığı gözlemlenmiştir.

Bu alışmalar arasında en yüksek seviyede olan sonuç, İstanbul gibi evre koşullarının ve alt yapı sorunlarının diğer bazı şehirler ile kıyaslandığında çok iyi olduğu bilinen ve beklenen bu ilde %54.8 gibi yüksek oranlarda parazite rastlanması lokal olarak ciddi düzeylerde alt yapı sorunlarının olduğunu göstermektedir. Bu çalışmaların ortak sonucu olarak, rastlanma sıklığını etkileyen en önemli faktörün sosyoekonomik koşullar olduğu sonucuna varılmıştır.

2. 7. *Giardia intestinalis*'in Patogenezi

G. intestinalis kistleri mide barajını aştıktan sonra ince bağırsakların alkalen ortamında trofozoit şekle geçme olanağı bulmaktadır. *G. intestinalis*'in trofozoitleri duodenum, jejunum ve ileumun üst kısmı ile ender olarak safra kesesi ve safra yollarının epitel yüzeylerinde yerleşmektedir. Giardiasis'de görülen diare ve steatorenin patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte, bunu açıklayabilmek için bazı mekanizmalar ileri sürülmektedir. Bunlar; mukozanın ve mukozal epiteldeki kanalların çok fazla sayıda parazit tarafından mekanik olarak tıkanması; fırça epiteli ve mikrovili yapısında bozulma; yağ emilimi için gerekli bağırsak içi komponentlerin bozulması; parazitin ve konağın besin için yarışmaya girmesi; artan mukus sekresyonu; parazitin salgıladığı bir toksinin bağırsaklar üzerine etkisi olarak sayılabilmektedir (43, 44).

Ancak bugün için *G. intestinalis*'in ince bağırsak mukozasında hasara yol açtığı görüşü ağırlık kazanmaktadır. İnce bağırsak biyopsilerinin ışık mikroskopunda yapılan incelemelerinde, villuslarda parsiyelden subtotale kadar değişen seviyelerde atrofi görülmektedir. Bunlara mukozada inflamasyon ve intraepitelial lenfosit miktarında artma da eşlik etmektedir. Mikrovillus membran disakkaridaz aktivitesinde ve glikozun aktif transportunda azalma da belirlenmiştir. Giardiasis'in yol açtığı hasarla ilgili ilgi çekici bir başka hipotez de parazitin salgıladığı hyaluronidaz, proteaz ve mukopolisakkaridaz gibi enzimlerle parazitin kolon mukozasına invaze olmasını kolaylaştırması olarak değerlendirilmektedir. Salgıladığı bir ekzotoksin aracılığıyla bağırsak epitel hücrelerinde harabiyete yol açmaktadır. Bununla birlikte parazitin taşıdığı çeşitli proteinazların varlığı, mikrovillus membranının yüzey proteinleri üzerine olası yıkıcı etkileri hakkında fikir vermektedir. *G. intestinalis* ayrıca konağın tripsini tarafından aktive edilen mannoz bağlayıcı bir yüzey lektinine sahiptir. Bu lektinin villus yapısında oluşturması beklenen iki değişiklik bilinmektedir: Birincisi lektinin enterositler üzerine doğrudan zarar verici etkisi olabilir. İkincisi ise; giardianın taşıdığı mannoz bağlayıcı lektin concavalin A ile bir takım benzerlikler göstermektedir ve bu madde bir mitojen gibi enterositlerin yarılanma ömrünü azaltarak gelişmemiş çok sayıda enterosit oluşumunu, dolayısıyla da disakkaridaz aktivitesinde

azalmayı indüklemektedir. Tabii ki her iki mekanizma da şu an için kanıtlanmamıştır. Bunun yanında mukozada meydana gelen inflamasyon da epitel hasarının oluşumunda rol oynamaktadır. Diğer inflamatuvar bağırsak hastalıklarında olduğu gibi giardiasisde de lamina propriada inflamatuvar değişiklikler olmaktadır. Ayrıca ince bağırsak mukozasında artan lektin veya anti-CD₄ antikorlarının T hücresi aktivitesini arttırması, villöz atrofiye yol açmaktadır. Yani giardiasisde T hücre aktivitesinin artması spesifik giardia antijenleri veya giardia lektininin olası doğrudan etkisine bağlı olmaktadır. Artan lenfositlerin yanı sıra, bölgeye göç eden mast hücreleri ve bunların yol açtığı lokal anafilaktik etkiler giardiasisdeki inflamatuvar yanıtı daha da belirgin kılmaktadır. Bütün bu sayılan mukozal etkiler immünitesi baskılanmış kişilerde çok daha ciddi olarak ortaya çıkmaktadır (5, 45).

Giardiasisde diareyi etkileyen başka faktörler de bulunmaktadır. Bazı hastalarda giardiasise sekonder intestinal bakteri artışı, bunu takiben bakteriler tarafından safra tuzlarının daha fazla miktarda konjugasyonu sonucu, yağ emiliminde bir azalma tarif edilmektedir. Aynı zamanda parazitin kendisi tarafından tüketilen safra tuzları da yağ emilimini olumsuz yönde etkileyen ve pankreatik lipazın etkisini de azaltan bir dizi intestinal olaya yol açmaktadır. Bunun yanında Giardia trofozoitleri konağın hidrolitik enzimleri ile etkileşime girmekte; böylece tripsin aktivitesi ve lipoliz inhibe olmaktadır. Semptomatik vakalarda pankreasın ekzokrin fonksiyonlarında azalma söz konusudur. Bu hastalarda tripsin ve kimotripsin aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Parazitin eradikasyonundan sonra bu fonksiyonların düzelmesi bunun bir kanıtı olarak sayılabilmektedir (13, 46).

Giardiasis için risk taşıyan gruplar şöyle sayılabilir:

- Bebeklik ve süt çocukluğu döneminde özellikle anne sütünden yoksun kalanlar,
- Yetersiz beslenen bebek ve çocuklar, bu grup özellikle hastalığın kronikleşmesine adaydır
- Turistler, özellikle hastalığın endemik olmadığı bir bölgeden endemik olduğu bir bölgeye seyahat edenler,
- İmmün yetmezlik, infeksiyonun meydana gelmesini predispoze eder. Sekretuar IgA eksikliği ve hipogamaglobulinemi predispozandır. Semptomların kalıcılığı için de uygun bir

ortam oluşturmakta, bunların içinde HIV infeksiyonu pozitif olanlar önemli bir grubu oluşturmaktadır.

-Erkek homoseksüeller, HIV pozitif olanlar ve olmayanlar ayrı ayrı risk grupları oluşturmaktadır.

- Doku antijeni gruplarından HLA A, A₂, B₈ ve B₁₂'li hastalarda giardiasis diğerlerine göre daha yüksek bulunmuştur.

- Bazı gastrointestinal sistem hastalıklarının varlığı, özellikle peptik ülser, safra kanalı hastalıkları, pankreatit, aklorhidri, gastrektomi ve kistik fibrosis gibi hastalıklar, giardiasisin oluşması için uygun ortamlar meydana getirmektedir (20).

2. 8. *Giardia intestinalis*'te İmmünoloji

Giardiasise karşı bir aşı geliştirilmesi fikri eskiden beri araştırmacıların ilgilerini çekmektedir. Bazı araştırmacılar giardiasise karşı koruyucu immunitenin, *G. intestinalis* infeksiyonunun hemen ardından geliştiğini ileri sürmektedirler. Ancak bugün koruyucu immunitenin tam olarak mümkün olmadığı da bilinmektedir. Çünkü *G. intestinalis* birbirinden oldukça farklı çok sayıda antijenik yapı ve antijenik yapıda birbirini izleyen değişimleri gösterebilmektedir. Parazitin bir çok değişik antijenik yapı içeren alt tiplerinin bulunması problem oluşturmaktadır. Koruyucu immunitenin gelişimi için en önemli bileşen ince bağırsak lümenindeki *G. intestinalis*'e özđü anti-giardia sekretuar IgA'sı olarak görülmektedir. Bununla birlikte giardia antijenlerine karşı IgM türü antikor yanıtı da saptanmıştır (10, 47). Farelerde denenen bir giardia aşısı çalışmasında oral immunizasyonun kısmen mümkün olduğu saptanmış, aşı amacıyla kullanılan bu oral antijen sadece parazitin ince bağırsak lümenindeki kolonizasyonunu engellemekle kalmamış, aynı zamanda uygulamadan 9-11 gün sonra trofozoitleri de ortadan kaldırmıştır. Son zamanlarda Amerika' da kediler ve köpeklerde kullanılmak üzere giardiasisin klinik bulgularını engellemek ve dışkı ile kist

çıkartımını azaltmak üzere bir aşı satılmaya başlanmıştır. Bu aşı yapılırken tamamen giardianın bugün bilinen antijenik yapısı ve immünolojik özelliklerine dayandırılmıştır. Ancak aşının immunoprolifaktik ve immunoterapötik uygulaması ve yararları halen tartışılmaktadır (48).

Bazı in vitro çalışmalar insan sütünün giardia infeksiyonuna karşı koruyucu rol oynadığını ve *G. intestinalis* trofozoitlerini öldürdüğünü göstermiştir. Bu etki sekretuar IgA 'ya bağlı olmadığı, daha çok insan sütünde bulunan bir lipaz aktivitesine bağlı olduğu yayınlanmıştır. Ancak infeksiyonu bulunan bebeklerin bazılarının annelerinin sütünde sekretuar IgA düzeylerinin de arttığı gösterilmiştir. Lipazın *G. intestinalis* trofozoitleri üzerine öldürücü etkisi, safra tuzlarının etkisi ile sütteki trigliseridlerden serbest yağ asitlerinin ortaya çıkarmasıyla mümkün olmaktadır. Buradan anne sütünün bununla beslenen bebekler için intestinal protozoonlara karşı koruyucu olduğu sonucu çıkartabilmektedir (5).

2. 9. *Giardia intestinalis*'in Kliniği

Yetişkinler ve büyük çocuklar genellikle *G. intestinalis*'i semptomsuz olarak taşımaktadırlar. Ancak infeksiyon eğer hayatın erken döneminde ise çoğunlukla semptomatiktir. Diare en sık görülen şikayet olup bunun dışında davranış bozuklukları, gelişme geriliği, kronik karın ağrısı ve dışkı tutamama gibi şikayetler de oldukça sık görülmektedir. Çocukluk ya da bebeklik çağında bu semptomlar varsa, diare bunlardan biri veya bir kaçının gölgesinde kalmış olabilir. Dışkı sulu olabilir, ama daha çok şekilsiz, çok miktarda ve kokuludur. Bunların dışında karında şişkinlik, iştahsızlık, kramp tarzında karın ağrıları, epigastrik hassasiyet, steatore ve malabsorbsiyon sendromu gibi başka şikayet ve bulgular da olabilmektedir (5, 49).

Giardiasis'in inkübasyon süresi 10-30 gün arasındadır ve bu süre 10-100 günlük ısrarcı semptomatik sürecin içerisindedir. Bu süreç içinde ortalama kilo kaybı 3-4 kg

civarında gerçekleşmekte, hastalığın yeniden alevlenme oranı da %25'e kadar ulaşabilmektedir (50, 51). Bu hastalıkta; asemptomatik taşıyıcılık, akut ve kronik olmak üzere üç tip klinik tablo görülebilmektedir.

2. 9. 1. Asemptomatik Taşıyıcılık

Hastalığın en yaygın şekli olup, zaman zaman gelip geçen diare dönemleri de olsa, hasta fazla şikayetçi değildir. İnfeksiyonun hastalık şeklinde ortaya çıkmayışının altında yatan mekanizmalar çok iyi tanımlanmamış olsa da, konağın immün sisteminin durumu ve savunma mekanizmalarının gücünün etkili olduğu düşünülmektedir (49).

2. 9. 2. Akut Tablo

Özellikle endemisi açısından düşük orana sahip bir bölgeden daha yüksek bir bölgeye giden bir kişide ortaya çıkan klinik görünümdür. Semptomlar ortalama bir hafta içinde (3-20 gün) ortaya çıkmaktadır. Çoğunluğunda hastalık 2-4 haftalık bir periyod ile kendini sınırlamaktadır. Yine de hastalığa yakalananların %25 kadarında semptomlar, 7 hafta ya da daha uzun bir süre inatçı olabilmektedir. Bu semptomlar genellikle sulu diare şeklinde başlayıp, daha sonra form kazanan bir steatore, bulantı, abdominal rahatsızlık, karında şişkinlik ve sıklıkla kilo kaybı şeklinde devam etmektedir. Semptomların peptik ülseri veya safra kesesi hastalıklarını taklit edebileceği bildirilmektedir (49, 52).

2. 9. 3. Kronik Tablo

Sağlıklı bireylerin çoğunluğunda infeksiyon kendi kendine geçerse de, bazen %30-50'ye varan oranlarda kronik diare, bununla birlikte sıklıkla steatore, vücut kitlesinin %10-20'sini bulabilen kilo kaybı, yağ emiliminde bozulma, yağda eriyen vitaminlerin emiliminde bozulma ve anemi, bunları izleyen karbonhidrat ve protein emiliminde bozulma gibi semptom ve bulgular devam edebilmektedir. İşte bu aşamada kronik giardiasisten söz etmek gerekmektedir (79). Başka bir deyişle kronik giardiasis, kronik malabsorbsiyon sendromuna yol açmaktadır. Yani kısaca; giardiasisin en büyük ve önemli komplikasyonu beslenme yetersizliği sonucu bir dizi problem ortaya çıkmasıdır. Özellikle bu komplikasyonu geliştirmekte olan ve gelişmemiş ülke çocuklarında en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Herhangi bir yaşta da görülebilecek bu semptomlar, genellikle bebeklik ve küçük yaşlarda karşımıza çıkmaktadır. Genel belirtiler olarak en çok şişkin karın, uzun-ince ekstremiteler ve gelişme geriliği sayılabilmektedir. Periferik veya jeneralize ödem de görülebilmektedir. Sağlıklı bireylerdeki giardiasisin aksine, eozinofili nadir görülmektedir. Dışkıda artmış yağ ekskresyonu, azalmış serum karoteni ve bozulmuş ksiloz emilimi sık görülmektedir. Yağ ve ksiloz malabsorbsiyonuna ek olarak A ve B₁₂ vitamini ve laktoz emilimi de bozulmuş olabilmektedir (5).

Zaman zaman kas ve eklem ağrıları, ürtiker ve eozinofili de görülmektedir. Aslında hipersensitivite reaksiyonları sıklıkla helmint infeksiyonlarında karşımıza çıkmaktadır, protozoon infeksiyonları için ise bunun tersi söz konusu olmaktadır (13). Fakat giardiaside eozinofil ve ürtiker tabloya eklenebilmektedir. *G. intestinalis* infeksiyonlarından sonra görülebilen olası reversibl sekeller de artralji, sinovit ve artrit olarak bildirilmektedir (53, 54). Giardiasisin yol açtığı malabsorbsiyon düşünüldüğünde demir emilim bozukluğu da akla gelmelidir. Gerçekten giardiasiste demir eksikliği anemisi ve buna bağlı olarak hipokrom - mikrositer bir anemi görülebilmektedir (55).

2. 10. *Giardia intestinalis*'in Tanısı

Giardiasise doğru tanı koyabilmek için öncelikle hastadan iyi bir anamnez alınmalıdır. Anamnezde bazı ipuçları, örneğin yakın zamanda gerçekleştirilmiş bir yabancı ülke seyahati veya endemik bölgeden gelme tanıyı aydınlatmaya yardımcı olabilmektedir (13).

Giardiasisli hastaların en sık şikayeti olan diare, akut veya kronik, sık veya devamlı, zaman zaman konstipasyonla yer değiştirebilen karakterde olabilmektedir. Dışkı gevşek veya sulu, genelde mukuslu ama nadiren kanlı, zaman zaman da yağ içermektedir. Ayrıca abdominal ağrı, bulantı, kusma, iştahsızlık, karında gaz, şişkinlik, yorgunluk hali, kilo kaybı ve nonspesifik psikik bazı semptomlar görülebilmektedir. Laboratuvar bulguları arasında, dışkı örneğinde yağ cisimcikleri ile gösterilebilecek steatore, steatore varlığında düşük serum karoten düzeyi, bazı hastalarda serum folat düzeylerinde düşme, eğer protein kaybettiren enteropati gelişmişse düşük serum protein düzeyi, immun yetmezlik söz konusu olduğunda son derece düşük antikor değerleri vb. sayılabilmektedir (56, 57). Giardiasisin tanı yöntemleri üç ana grupta incelenebilmektedir (58, 59).

2. 10. 1. Direk Tanı Yöntemleri

2. 10. 1. 1. Dışkı

Direk Bakı (Nativ-Lugol) Yöntemi: Laboratuar yöntemleriyle tanıyı koymanın en kolay yolu ışık mikroskopu ile direkt dışkı bakısı yapmaktır. Özellikle sıvı görünümlü bir dışkı örneğinde uygun incelemelerle hareketli trofozoitleri görmek mümkün olabilecektir. Nativ yönteminde bir lam üzerine dışkının çeşitli yerlerinden alınan az miktardaki materyal konular, üzerine bir damla fizyolojik tuzlu su eklenerek karıştırılmakta, bir lamelle kapatılarak kısa zamanda incelenmektedir. Bu yöntemle hareketli trofozoitler ve boyanmamış kistler görülebilir. Lugol yönteminde ise fizyolojik tuzlu su yerine Lugol eriyiği kullanılmaktadır. Bu yöntemle trofozoitler hareketsiz, tipik armut şeklinde, 2 nükleuslu olarak görülmektedir. Kistler ise sitoplazmadan ayrılmış kist duvarı ve sitoplazma içindeki fibrillerle kolayca tanınmakta, nükleusları ise zor görülmektedir. Nativ-Lugol yöntemleri, sıvıların birbirine karışmaması şartı ile aynı lam üzerinde uygulanabilmektedir. Son derece kolay olması ve fazla alet gerektirmemesi nedenleri ile çok kullanılan yöntemler olup, yanlış negatif sonuçların oldukça sık görülmesi, bu yöntemin dezavantajı olarak yorumlanmaktadır.

Şüpheli kişilerde kist şekilleri hergün görülmeyebilir. Bu nedenle birden fazla dışkı örneği farklı günlerde alınmalı, değişik yöntemler ve boyama teknikleri kullanılarak daha güvenilir sonuçlar elde edilmeye çalışılması gerekmektedir. Hastanın şikayeti giardiasisi şüphelendiriyorsa dışkı örneğinin incelenmesine ısrarla devam edilmelidir. Eğer örnek sıvı durumdaki dışkı ise, trofozoitleri görebilmek için alındıktan en çok bir saat içinde incelenmesi gerekmektedir. Çünkü çoklukla sıvı dışkıda bulunan trofozoit şekilleri, son derece labil olduklarından kısa zamanda bozulabilir. Buna alternatif olarak da dışkı örnekleri MIF,

merthiolate, iyot, formaldehit, %10'luk formalin ya da polivinil alkol gibi fiksatifler içine konarak daha sonra incelenmek üzere saklanmaktadır.

Çoklaştırma Yöntemi: Bu yöntemlerin amacı dışkıdaki kistlerin çöktürülerek (sedimentasyon yöntemleri: formalin-etil asetat "formalin-eter" sedimentasyon tekniği "Ritchie") veya yüzdürülerek (çinko sülfat veya doymuş tuzlu su ile flotasyon) biraraya toplanması ve tanı koyma şansının artırılmasıdır.

Boyama Yöntemi: Özellikle dışkıda protozoonların görülüp, tanımlanamadığı durumlarda veya sürekli preparat elde etmek amacı ile uygulanmaktadır. Bunlar arasında Giemsa, Heidenhain'ın Demir Hematoxylene ve Trichrome boya yöntemleri sayılmaktadır (58,59).

Kültür yöntemi: Serolojik yöntemlerde gerekli olan antijenlerin elde edilmesinde, genetik, biyokimyasal ve immünolojik araştırmalar için kullanılmak üzere giardia suşlarının hasta dışkılarından saf olarak izole edilmesi gerekmektedir. Bu izolasyon işlemi; **a)** Sukroz gradient santrifüj ile kistlerin dışkı artıklarından ayrılması ve konsantre edilmesi, **b)** Asid solüsyonu içinde ekskistasyonun sağlanması, **c)** Ekskiste olmuş parazitin Karapetyan, TY1-S-33, HSP-1 ve HSP-2 gibi besiyerlerine ekilmesi **d)** Aksenik kültürün elde edilebilmesi için antibiyotik ve antimikotik solüsyonların kullanılması, gibi basamaklardan oluşmaktadır (59).

2. 10. 1. 2. Duodenal Sıvı

Duodenum Aspirasyonu: Giardia trofozoitleri duodenumdan alınan sıvı örneklerinde de görülebilmektedir. Bu yöntem için bir Horoskop ve bir duodenal tüp gerekli olup, yöntemin bir gastroenterolog veya iç hastalıkları uzmanınca uygulanması gerekmektedir. Bu uygulamanın giardia trofozoitlerinin yanısıra cryptosporidium ve isospora

ookistlerinin ve strongyloides larvalarının saptanmasında en duyarlı yöntem olduğu bildirilmiştir. Duodenum içine 10-15 ml serum fizyolojik enjekte edilip sonra aspire edilebilir. Daha sonra 30 ml %33' lük magnezyum sülfat enjeksiyonu ile mukus salgısı uyarılabilir ve 5-10 dakika sonra aspirasyon yolu ile lümene dökülen parazitler aspirasyonla elde edilebilir. Fakat giardiasisli hastaların duodenum mayilerinde trofozoit formunu görebilme oranı neredeyse %50 oranındadır. Bu oran dışkıının direkt yöntemlerle incelenmesinde %85'e kadar çıkmaktadır. Yani bu iki inceleme yöntemi birbirini tamamlayıcı olarak kullanılmalıdır. Bazı giardiasisli hastalarda duodenum aspirasyonu, biopsisi veya dışkı örneği negatif sonuç verebilmektedir. Aslında bu organizmalar ince bağırsağın üst bölümlerinde yaşadığı için duodenum ya da jejunumdan alınan örneklerin inceleme sonuçları, dışkı incelemesine göre daha güvenilir olmaktadır (59).

Enterotest: Çocuklar ve erişkinler için farklı Entero-test kitlerinin kullanılmasıyla da duodenumda bulunan parazitlerin tanısı konabilmektedir. Bu test kitinde yaklaşık 140 cm'lik bir naylon ip, bir kapsül içine yerleştirilmiştir. Kapsül dışında kalan ve silikondan yapılmış olan ipin 15-20 cm lik kısmın ucu hastanın ağız çevresine tesbit edilerek, kapsül hastaya yutturulur. Yaklaşık 3-4 saat hiçbir şey yemeyen hastadan bu ipli test kiti yavaşça çekildikten sonra alt ucu bir lama sürülerek mikroskopta *G. intestinalis* trofozoit ve kistleri araştırılmaktadır. Test genel olarak güvenli olmakla beraber, koagülopatisi olan veya özefagus varisi bulunan hastalara bu testin uygulanması sakıncalı görülmektedir (59).

Duodenal Biyopsi: Daha sensitif ve spesifik bir yöntem olarak sunulmaktadır. Bu yöntemde endoskopi yapılarak ince bağırsak mukoza epitelinin uğradığı morfolojik değişiklikler ve protozoonun kendisi doğrudan gösterilebilmektedir. Alışılmış formalin fiksasyonu ve hematoksilen eosin boyamasında, duodenal biopsi materyali ile elde edilen intraluminal preparasyonlarda *G. intestinalis*'i tanımak zordur. Duodenal aspirasyon materyalini ya da luminal yüzey sürüntüsünü lam üzerine hafifçe sürme şeklinde yayıp, ince yayma yapıldıktan sonra Giemsa boyası kullanarak hazırlanan preparatlarda *G. intestinalis*'i tanımak nisbeten daha kolay olmaktadır. Yine aynı şekilde jejunumdan endoskopi esnasında alınan mayinin boyanmadan direkt incelenmesinde armutun uzunlamasına ikiye kesilmiş şeklinde hareketli trofozoitlerin görülmesi tanıyı kesinleştirmektedir (57,59).

2. 10. 2. İndirek Tanı Yöntemleri

2. 10. 2. 1. Serolojik Yöntemler

Direkt yöntemlerin dışında tanı konulmasında kullanılan indirek yöntemler de bulunmaktadır. Bunlar hastanın kanında giardiaya karşı oluşmuş antikorları göstermek olabileceği gibi, dışkı örneğinde immünolojik yöntemlerle giardia antijeninin gösterilmesi olabilmektedir. Bu yöntemlerin sensitivite ve spesifitesinin %90'dan fazla olduğu bazı araştırmalarla gösterilmiştir. Giardiasisin tanısına İFA, ELISA, Western Blot gibi serolojik ve immünolojik yöntemlerle yaklaşım gittikçe gelişmektedir. Bunlar göstermektedir ki, geçmişte oluşmuş infeksiyonlarla bugün oluşmuş infeksiyonlardaki anti-giardia IgG düzeyleriyle bugünkü infeksiyonlardaki antikor düzeyinde fark görülmemektedir. Buna karşın spesifik IgM düzeyleri akut infeksiyon olduğunda hızla yükselmekte, infeksiyonun vücuttan eradikasyonu ile birlikte düşmektedir (59, 72).

2. 10. 2. 2. Moleküler Yöntemler

Giardia için spesifik DNA problemlerinin geliştirilmesiyle DNA bazlı moleküler tanı yöntemleriyle dışkı tetkiklerinin yapılması da mümkündür. İlk çalışmalar bu yaklaşımının kullanışlı olduğunu düşündürmekle birlikte giardia kistlerinden DNA izolasyonunda bir takım güçlükler olduğu bildirilmiştir. PCR gibi amplifikasyon teknikleriyle bu konudaki sensitiviteyi arttırmanın mümkün olduğu gösterilmiştir (71).

PCR, nükleik asitlerin in-vitro olarak (canlı organizma dışında), uygun koşullar altında çoğaltılmasına dayanmaktadır. Hem araştırmada hem de klinik laboratuvar tanısındaki uygulama alanlarıyla büyük öneme sahip olan PCR'ın geliştirilmesindeki çalışmaları nedeniyle, K. Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülünü almaya hak kazanmıştır. PCR, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur.

Bir PCR döngüsü sırasıyla, deoksiribonükleik asidin (DNA) iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (Denatürasyon-Denaturation); sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (Hibridizasyon-Annealing) ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması (Polimerizasyon-Extension) aşamalarından meydana gelir. PCR tekniği, tek ve çift sarmallı DNA ya da RNA için kullanılabilir.

PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, 18-25 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR'ın önemli bir avantajı da çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır.

Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana madde vardır: DNA örneği, bu genelde genomik DNA'dır; çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer; deoksiribonükleotit trifosfatlar (dNTP); yüksek ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi; uygun pH ve iyon koşullarını (Mg⁺²) sağlayan tampon karışımı ve MgCl₂.

Moleküler genetik çalışmaları için birçok farklı kaynak materyalden farklı yöntemler kullanarak DNA izole edilebilmektedir, PCR' da kalıp görevi gören DNA'nın temiz ve PCR inhibitörlerinden arındırılmış olması, sonucu etkileyen en önemli adımlardan biridir.

.PCR yöntemi ile çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı özellikte 18-25 baz uzunluğunda, sentetik olarak sentezlenebilen oligonükleotidlere primer denir. Bu diziler çeşitli tasarım programları kullanılarak hedeflenen gen bölgesine özgü olarak sentezlenmektedir. Primer tasarımında genel olarak dikkat edilmesi gereken bazı noktalar bulunmaktadır. Öncelikle primer dizisi hedeflenen DNA'ya özgün olmalıdır, bu nedenle ayrıntılı bir sekans araştırması tavsiye edilmektedir, primerin 3' ucunda 1-2 adet G/C nükleotidi bulunmalı aynı şekilde primer genelinde G/C oranı %45-55 olmalıdır. Forward ve reverse primerlerin seçiminde birbirlerine yakın Tm değerlerine sahip olmalarına, bu aralığın 55-65° C arasında olmasına özen gösterilmelidir. Ayrıca primerlerin kendi içinde veya birbirleri ile komplementer olmamalarına dikkat edilmelidir.

Forward ve reverse primer arasındaki uzunluğun 100-600 baz olması tavsiye edilmektedir. Stok primerin ayrı olarak saklanması, devamlı kullanım için seyreltik primerlerin kullanımı tavsiye edilmektedir. Bu şekilde stok primerin daha uzun ömürlü olarak saklanması sağlanacak ve kontaminasyon riski minimuma inecektir. Taq DNA polimeraz, tamamlayıcı DNA dizisinin sentezi sırasında serbest dNTP'ye (deoksiribonucleotid-trifosfat) ihtiyaç duymaktadır. Taq DNA Polimeraz enzimi, ortamdaki dNTP'leri kullanarak kalıp DNA iplikçığıne tamamlayıcı bir DNA ipliğini meydana getirecek sentez reaksiyonunu katalizler. Enzim, tamamlayıcı DNA sentezini başlatmak için primerlere ihtiyaç duymaktadır. Sentezin yönü 5' ucundan 3' ucuna doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin fosfodiester bağları ile bağlanması sonucu yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır.

MgCl₂ ortamda bulunan serbest dNTP'ler ile bir araya gelerek Taq DNA polimerazın tanıyabileceği çözünebilir bileşikler oluşturmaktadır. Mg⁺²'deki artış enzim aktivitesini etkilemekte ve çift zincirli DNA'nın Tm ısını arttırmaktadır. Reaksiyonda bulunan fazla miktarda Mg⁺², spesifik olmayan primer bağlanmalarına ve buna bağlı olarak da spesifik olmayan bantlara neden olabilmektedir. Ortamda bulunması gereken MgCl₂ konsantrasyonu en yaygın olarak 1,5 mM kullanılmakla birlikte 1-5 mM arasında olmalıdır.

RFLP, restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır. Bu yöntem polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Restriksiyon enzimleri, DNA üzerinde yaklaşık 5-10 baz uzunluğunda belirli bir nükleotid dizisini tanıyarak bu noktada kesim yapar ve DNA'yı ikiye ayırır. İlki Hamilton tarafından keşfedilen *Hind* III başta olmak üzere, 200 den fazla farklı bakteri türünden, her biri bakterinin orijinal isminin kısaltması ile anılan çok sayıda restriksiyon enzimi bulunmuştur. Her DNA molekülü farklı kesim noktalarına sahip bölgeleri içerir. Bu DNA bölgeleri aynı restriksiyon enzimi kullanılarak kesildiğinde bireylerin taşıdığı mutasyonlara bağlı olarak değişik miktar ve uzunlukta parçalar elde edilebilmektedir.

Yöntem temelde dört adımdan meydana gelmektedir; DNA izolasyonu, PCR, elde edilen PCR ürününün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi ve elektroforez ile kesilen fragmanların ayrımı, görüntülenmesi. RFLP analizinin daha kolay uygulanır olabilmesi açısından seçilen enzim büyük önem taşımaktadır. Seçilen enzimin kesilmek istenilen DNA'yı birden fazla noktada kesmesi sonucu oluşan çok sayıda ve birbirine yakın büyüklükte ki fragmanlar analizi zorlaştırmaktadır. RFLP tek nokta mutasyon analizlerinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Tek nokta mutasyonları ile meydana gelen veya zarar gören enzim kesim noktaları kullanılarak bu bölgelerde oluşan mutasyonları tespit etmek mümkündür. Mutasyon noktasını çevreleyen primerler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun ardından tek nokta mutasyon bölgesinden kesen bir enzim seçilerek analiz edilir (95) .

2. 11. *Giardia intestinalis*'in Ayırıcı Tanısı

İskoçya 'da yapılan bir çalışmada irritabl bağırsak sendromu, lenfoma, dizanteri, Ülseratif kolit, Crohn hastalığı, gastrointestinal allerji, kistik fibrosis, çölyak hastalığı ve depresyon ile giardiasisin karıştırıldığı saptanmıştır. Gerçekten de ayırıcı tanı için bu hastalıkların elimine edilmesi veya öncelikle bu hastalıklar düşünüldüğünde daha kolay olan *G. intestinalis*'in aranması önerilmektedir. İki hafta ya da daha fazla süreyi bulan diarezi olan herhangi bir hastada *G. intestinalis*'in akla getirilmesi gerekmektedir. Endemik bir bölgeye seyahat hikayesi, günlük çocuk bakım merkezlerindeki çocuklardan biriyle temas, erkek homoseksualitesinin varlığı veya hijyenik durumu belli olmayan su içilmesi durumlarında, düşünülmesinin doğru olacağı bildirilmektedir (49). *G. intestinalis* sindirim sisteminde bulunan ve genellikle apatojen olarak bilinen diğer kamçılılar ile de karıştırılmaması gerekmektedir. Bu nedenle diğer kamçılıların morfolojik özellikleri bilinmelidir (60).

2. 11. 1. *Enteromonas hominis*

Kist ve trofozoit şekilleri bulunmaktadır. Trofozoit şekilleri; oval, armut şeklinde 5-10 mikron büyüklüğünde, üçü önde biri arkaya uzanan toplam 4 kamçısı bulunmaktadır. Canlı muayenede çok hızlı hareket etmektedirler. Hematoksilenle boyandığı zaman ön uca yakın bir nükleus görülmekte, sitostom ve aksostil bulunmamaktadır. Kistleri ise oval, 4-8 mikron büyüklüğünde, 1-4 nükleuslu ve bu nükleuslar kistin karşılıklı kutuplarında yerleşmektedir. Zaman zaman sitoplazmada kromadial cisimcikler görülmektedir. Kozmopolit olup ülkemizde görülmektedir. *G. intestinalis* trofozoitinden, tek nükleus ve 4 tek kamçılı olması ile ayrılmaktadır (60).

2. 11. 2. *Chilomastix mesnili*

Kist ve trofozoit şekilleri bulunmaktadır. Trofozoit şekilleri; 10-20 mikron boyunda ve 5-6 mikron eninde bir parazit olup üçü önde birisi arkada ve sitostom içinde uzanan 4 kamçısı bulunmaktadır. Canlı halde hareketleri çok hızlı, boyanmış preparatlarda parazitin yarısı kadar belirgin bir sitostom gözlenmektedir. Sitostomun ön ucuna yerleşmiş nükleus ve nükleusun önünde blefaroblast bulunmaktadır. Vücudu bir ucundan bir ucuna kateden karakteristik bir helozonik oyuk görülmektedir. Kistleri ise 7-9 mikron büyüklüğünde, limon şeklinde, çoğunlukla bir, nadir olarak 2 nükleus bulunmaktadır. Dışkıda kistlere rastlanmaktadır. Kozmopolit olan bu parazit ülkemizde görülmektedir. *G. intestinalis* trofozoitinden, tek nükleus ve 4 tek kamçılı olması, ayrıca paraziti uzunlamasına kateden helozonik bir oyuk ile ayrılmaktadır (60).

2. 11. 3. *Embadomonas intestinalis*

Retortomonas intestinalis ismi ile de bilinmektedir. Trofozoit ve kist şekilleri bulunmaktadır. Trofozoit şekilleri; 5-7 mikron büyüklükte olup bağırsakta yaşayan kamçılıların en küçüğü olup iki kamçısı gözlenmektedir. Hızlı hareketli, sitostomlu, sitoplazması ince granüllü ve vakuollü görülmektedir. Hematoksilinle boyandıkları zaman ince zarlı ve karyozomu merkezde bir nükleus ve bunun önünde iki blefaroblast bulunmaktadır. Kistleri ise 5 mikron kadar büyük ve içlerinde de tek bir nükleus gözlenmektedir. Kozmopolit olup ülkemizde görülmektedir. *G. intestinalis* trofozoitinden, tek nükleus ve 2 tek kamçılı olması ile ayrılmaktadır (60).

2. 11. 4. *Trichomonas hominis*

Kist şekli olmayıp sadece trofozoit şekilleri bulunmaktadır. Trofozoitler; 10-15 mikron uzunluğunda ve 7-10 mikron genişliğinde, armut biçiminde, 3-5 kamçısı bulunmaktadır. Hematoksilenle boyanmış preparatlarda sitoplazmaları ince granüllü ve vakuollü görülmektedir. İnce bir zarla çevrili ve ortasında karyozomubulunan bir nükleus ve onun önünde blefaroblastlar gözlenmektedir. Kamçıların üçü öne doğru birisi arka uca kadar uzanan bir dalgalı zar şeklinde uzanmaktadır. Aksostil arka uçtan sivri olarak çıkmaktadır. Kozmopolit olup ülkemizde bulunmaktadır. *G. intestinalis* trofozoitinden, tek nükleus ve 3-5 tek kamçılı, ayrıca dalgalanan zarı olması ile, *Trichomonas vaginalis* trofozoitinden ise nükleusunda merkezi bir karyozomunun bulunması, dalgalı zarının parazitin arka ucuna kadar uzaması ve bağırsaklarda yani sindirim sisteminde bulunması ile ayrılmaktadır (60).

2. 11. 5. *Trichomonas tenax*

Ağız boşluğunda yaşamakta ve *Trichomonas elongata* olarak da bilinmektedir. Kist şekli olmayıp, 8-12 mikron uzunluğunda, 4-8 mikron eninde olan trofozoitleri armut şeklindedir. Ön ucunda 4 ve arkaya uzanan dalgalı zar şeklinde toplam 5kamçısı bulunmaktadır. Boyanmış preparatlarda iç kromatin yapısı iri taneli olan nükleusu ve sitostomu mevcuttur. *G. intestinalis* trofozoitinden, tek nükleus ve 5 tek kamçılı olması, ayrıca dalgalanan zarı olması ile, *Trichomonas vaginalis* trofozoitinden ise nükleusunda iç kromatin yapısı iri taneli olması, morfolojik olarak küçük ve ağızda bulunması ile ayrılmaktadır (60).

2. 12. *Giardia intestinalis*'in Tedavisi

Her ne kadar giardiasisli insanların bir kısmı asemptomatik olsalar da, radikal tedavi gerekmektedir. Semptomatik tedavide, çocuklarda demir eksikliği anemisi varsa demirli preparatlar, B vitamini eksikliği varsa B vitamin kompleksleri, Folik asit eksikliği varsa Folik asit ve proteinden zengin diyet verilmesi tavsiye edilmektedir. Sadece proteinden zengin diyetle dışkıda kistlerin kaybolduğu bildirilmektedir (61).

Tedavide kullanılan ilaçlar üç ana grupta incelenmektedir:

A. Nitroimidazol türevleri: Metronidazol, seknidazol, ornidazol tinidazol

B. Akridin boyaları: Mepakrin, kinakrin

C. Nitrofuran grubu: Furazolidon (62).

Standart tedavide ilk seçenek metronidazoldur. 5 gün boyunca üç eşit dozda alınan 750 mg/gün; veya çocuklar için yine üç eşit dozda alınacak günlük kilogram başına 15 mg'lık dozun yeterli olduğu bildirilmiştir. Ama bu ilaç sadece trofozoitleri etkilemektedir. Kist formu üzerine hiçbir etkisi bulunmamaktadır. Bu tedavi sonucunda kistlerin infekte etme özelliğini korudukları saptanmıştır (57). Metranidazole tedavisinin %20 hastada yetersizlik gösterdiği bildirilmiştir. Bu durumda tedavinin başka kuşak bir ilaçla kombine edilmesi önerilmektedir (63).

Seknidazol'un da oldukça etkili olduğu bildirilmiştir. Parazit hücrelerine pasif difüzyonla girdiği ve hücrelerin amino gruplarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Bu azalma sonucunda hücre içine daha fazla ilacın gireceği belirtilmiştir. Parazit DNA'sı tüm 5-nitroimidazoller için hedef olduğu, 5-nitroimidazole'lerin DNA kopyalamasını durdurup mevcut DNA'yı parçaladıkları ve DNA'nın çift sarmallı yapısını bozdukları bildirilmiştir. Bu etkinin radyasyonun DNA'ya etkisine benzer olduğu belirtilmiştir. Seknidazol ağızdan alındıktan 2 saat sonra tamamen emilmekte, maksimum plazma konsantrasyonuna ağızdan

alındıktan 1 saat sonra eriştiği, karaciğerde metabolize olduğu, 72 saat sonra dışkıda görülmediği, böbreklerden ve safra salgısıyla aynı şekilde ve aynı zamanda atıldığı bildirilmiş, 2 gr. tek doz alımından 72 saat sonra %22'sinin idrarla atıldığı gözlenmiştir. Diğer 5-nitroimidazole'lerden daha uzun plazma yarı ömrü 20-22 saat olduğundan etkisinin daha uzun süreli olduğu bildirilmektedir. Doz olarak, erişkinlere günde 2 gr. tek doz halinde verilmesi önerilmektedir. Çocuklara ise tek doz 30 mg/kg olarak verilmesi önerilmiştir. Seknidazol'un 5-nitroimidazole'lere hassas olanlara ve hamilelere verilmesi sakıncalı görülmektedir. Plasentadan geçebildiği ve anne sütünde bulunabildiği bildirilmiştir (64).

Tinidazol bir başka etkili ilaç olarak sunulmaktadır. Yetişkinlerde günde 2 gr, çocuklarda da 50 mg/ kg lık günlük tek dozların yeterli olduğu bildirilmiştir.

Ornidazol günlük iki eşit doza bölünerek kullanılmaktadır. Giardiasisli gastrointestinal immun yetmezlik sendromlu hastalarda 6 - 8 hafta süren metronidazol tedavisi mukozada oluşmuş anormal değişikliklerin normale doğru geri dönüşümünü sağlamaktadır. Bazı immun yetmezlikli hastaların tedavisinde 6 ay boyunca ilaç kullanmaları gerektiği bildirilmektedir (57).

Mepakrin nitroimidazol türevleriyle neredeyse aynı yeterlilikte etkiye sahip olmasına rağmen iyi tolere edilememektedir. Kinakrin de aynı grupta ve giardiasisde etkili bir ilaç olup 5 gün boyunca yemeklerden sonra olmak üzere günde üç kez 0.1 gr oral yoldan alınması önerilmektedir. Ancak her iki ilaç özellikle çocuklarda belirgin bazı santral sinir sistemi yan etkilerine yol açmaktadırlar. Bunların içinde geri dönüşümlü sinirsel bozukluklara neden olmaları ve altta yatan bir deri hastalığı olanlarda psöriasis gibi lezyonların oluşumunu provake etmeleri sayılabilmektedir. Akridin boyaları türevlerinin psikotik öyküsü veya psöriasis ve benzeri deri hastalığı olan hastalara önerilmemesi bildirilmektedir (5, 57).

Furazolidon bazen daha az etkili olsa bile süt çocukluğu ve çocukluk döneminde kullanılması sıvı formu oluşu yönünden daha kullanışlı olabilmektedir. Yetişkinler için 7 gün boyunca günde 4 kez 100 mg, çocuklar için kilogram başına 1.25 mg verilmesi önerilmektedir (57).

Yukarıda sayılan ilaçların hiç birisi gebelikte rahatça kullanılacak güvenliğe sahip değildirler. Bu yüzden hamilelerde ve diğer ilaçların yan etki ya da toksisitesinin yüksek görüldüğü hastalarda paromomisin tavsiye edilmektedir. Bu ilacın gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu oldukça zor olduğundan hamilelerde kullanılması uygun olup 25-30 mg/kg/gün üç eşit doza bölünerek 7 gün boyunca alması önerilmektedir (65).

Bunların dışında etkili olan ve üzerinde çalışılan başka ilaçlar da bulunmaktadır. Günlük 400 mg olarak 5 gün boyunca kullanılan Albendazolun giardiasisde oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (57,66). Albendazol ile aynı gruptan olan mebendazol, metronidazole yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada yan etki açısından daha tolere edilebilir bulunmuş, ancak tedavi etkinliği olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Fluorokinolon grubundan bir antibiyotik olan Siprofloksasin ile yapılan bir çalışmada, *G. intestinalis* trofozoitleri üzerine morfolojik olarak yıkıcı ve öldürücü etkisi dirençli vakaların tedavisinde de alternatif olarak gösterilmiştir (67). Son zamanlarda albendazol ve metronidazole dirençli vakalarda Nitazoksanid ile tedavide başarı elde edilmiş, ayrıca edinilmiş immun yetmezlikli hastalarda giardiasis tedavisinde de etkili bulunmuştur. Ayrıca 3 günlük nitazoksanid tedavisinin 5 günlük metronidazol tedavisi ile aynı sonuçları verdiği saptanmıştır (68, 63). Sodyum fusidat, D - propranolol, meflokin, doksisisiklin, rifampisin de anti-giardial etkileri gösterilmiş olan ve dirençli vakalarda kombinasyonlarıyla başarı sağlanabilecek olan ilaçlar olarak bildirilmektedir. Son senelerde yapılan araştırmalarda, ivermektin adlı antiparaziter bir ilacın in vivo deneylerde hem akut, hem de kronik giardiasisin eliminasyonu için 2 - 3 haftalık uygulamalar sonucunda etkili olduğu bildirilmiştir (69).

2. 13. *Giardia intestinalis*'ten Korunma

G. intestinalis oldukça fazla konakta yaşamını sürdürebilmekte ve kendine uygun bir konak buldukça uzun süre de yaşayabilmektedir. Giardiasisin giderek artan bir zoonoz olması, hayvanlardan, insanlardan ya da çevreden tam olarak elimine edilmesini neredeyse olanaksız kılmaktadır. Bunun için su kaynaklarının *G. intestinalis*'den tamamen temizlenmesi ve su kaynaklarının durumunun sürekli izlenerek temizlik için alınan önlemlerin durmaksızın

uygulanmaya devam edilmesi gerekmektedir. Bireysel olarak alınabilecek en etkili önlem ise kişisel hijyen kurallarına tam uyulmasıdır. Bu önlem, özellikle gündüz çocuk bakımevleri, huzurevleri ve seksüel transmisyon gibi yollardan insandan insana geçiş riskini en aza indirmeyi sağlamaktadır. Kullanım ve içme sularının hijyenik kurallara uygun tutulması, kaynaktan evlerde suyu kullanıncaya kadar alınacak bir dizi temizleme önlemiyle mümkün olmaktadır.

Her ne kadar uygun ve periyodik olarak doğru düzeyde suyu klorlama *G. intestinalis* kistlerini öldürmeye yeterli olursa da, önemli bazı değişkenler; örneğin, su sıcaklığı, berraklığı, pH' sı, temas zamanı klorun etkisinin yeterliliğini etkilemekte ve daha yüksek klor düzeyleri (4-6 mg/l) gerekmektedir. Nitekim klorlamaya ek olarak su kaynaklarının içindeki taneciklerden arındırılması ve filtre edilmesi önerilmektedir. Ayrıca başka yerlere; özellikle de kırsal bölgelere ve vahşi hayatın yoğun olduğu yerlere yolculuk yapanlar için, tüm su kaynaklarını şüpheli olarak yorumlamak gerekmektedir. Çünkü kullanılacak suların vahşi hayvanlar ve insan rezervuarların çıkartılarıyla kirlenmiş olma riski bulunmaktadır. Suyu kaynatmak tüm protozoon kistlerini yok etmektedir. Por çapı 1 mikron veya daha küçük olan kişisel kullanım filtreleri bulunmaktadır ve bunlar da yararlı olabilmektedir. Aynı şekilde, iyi yıkanmamış ya da kirlı su ile yıkanmış olan pişmemiş yiyeceklerden kaçınmanın gerekli olduğu bildirilmiştir. Besin işlerinde, besin sanayisinde ve dağıtımında çalışan personelin, insandan insana kirlenmiş ellerle doğrudan geçebilecek olan *G.intestinalis* bakımından, periyodik olarak kontrollerinin yapılması ve besin hijyeni kurallarına uymaları sağlanarak bilgilendirilmeleri gerekmektedir.

Dışkı ile bulaşan diğer parazitlerde olduğu gibi *G. intestinalis*'in bulaşımında karasinek ve hamamböceklerinin rolü olabileceği düşünülerek bunlarla mücadele edilmesi gerekmektedir. Giardiasisin seksüel yolla bulaşmasının önlenmesi için, oral - anal ve oral - genital cinsellikten kaçınmak ve yine sağlık eğitimi ile mümkün olabilmektedir.

Günlük çocuk bakım merkezlerindeki endemik odaklar bugün için büyük problem olmaktadır. Kreş ve anaokullarına yeni başlayan çocuklarda dışkı incelemesinin mutlaka yapılmasının ve periyodik olarak sürdürülmesi önerilmektedir. *G. intestinalis* kist ve trofozoitlerinin dışkı ile çıkarılması zaman zaman azaldığından koprolojik bakılarda bu

kamçılı protozoona rastlanmadığında dışkı bakıları birkaç gün ara ile birkaç kez tekrarlanmalıdır.

Yenidoğan bebeklerde anne sütünün IgA tipindeki anti giardia antikolarla koruyucu rolü nedeniyle ishalden çok etkilenen bu bebeklerin süt emmesi enfeksiyonun kontrolü açısından önerilmektedir. İyi beslenen ve bakılan çocuklardaki kronik veya asemptomatik taşıyıcılık dahi önemli bir enfeksiyon odağı haline gelebilmektedir. Ayrıca bu çocukların hastalığın kronikleşmesi veya asemptomatik taşıyıcılığı nedeniyle sağlıklarının bozuk olarak kabul edilip edilmemesi gerekliliği tartışılmaktadır. Bu yüzden ve ayrıca da ilaçların olası yan etkilerinin çokluğundan dolayı yalnızca gerçekten semptomatik olan hasta çocukların tedavi edilmeleri önerilmektedir. Öte yandan infekte çocuklar giardiasisi ailelerine de taşıyabilmektedirler. Bu durum toplumun daha fazla sayıda bireyinin infekte olmasına yol açmaktadır. Olgularının kontrol altına alınabilmesi için sonuç olarak kişisel hijyen eğitiminin tüm bireylere, ama özellikle çocuklara kesin kurallarıyla verilmesi gerekmektedir. Halk; parazit, yaptığı hastalık ve bulaşma yolları gibi konular da eğitilerek, paraziter hastalıklardan korunmada en etkili yöntem olan halkın katkısının sağlanması önerilmektedir (49, 70).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2008-2011 yılları arasında Harran Üniversitesi Araştırma Hastanesi Parazitoloji Laboratuvar'ına Giardiasis ön tanısı ile başvuran hastaların gaita numuneleri Nativ-Lugol ve çoklaştırma (Modifiye Ritchie) yöntemleri kullanılarak mikroskop altında x10 ve x40'luk büyütme ile incelenmiştir. Nativ yönteminde bir lam üzerine dışkının çeşitli yerlerinden alınan az miktardaki materyal konulur, üzerine bir damla fizyolojik tuzlu su eklenerek karıştırılmakta, bir lamelle kapatılarak kısa zamanda incelenmektedir. Bu yöntemle hareketli trofozoitler ve boyanmamış kistler görülebilir. Lugol yönteminde ise fizyolojik tuzlu su yerine Lugol eriyiği kullanılmaktadır. Bu yöntemle trofozoitler hareketsiz, tipik armut şeklinde, 2 nükleuslu olarak görülmektedir. Kistler ise sitoplazmadan ayrılmış kist duvarı ve sitoplazma içindeki fibrillerle kolayca tanınmakta, nükleusları ise zor görülmektedir. Bu yöntemler ile giardia kisti pozitif bulunan 75 hastanın dışkı örneği herhangi bir ek materyal eklenmeden -20 C° de DNA ekstraksiyon işlemi yapılanaya kadar saklanmıştır.

3.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için QIAamp DNA Mini Stool Kit (QIAGEN GmbH 40724 Hilden) kullanılmıştır. Bu işlem için protokol şu şekilde uygulanmıştır.

1. 180 -220 mg kütleyle sahip dışkıyı 2 ml'lik ependorf tüplerine alınıp, tüpler buz üzerinde muhafaza edilmiştir (Sıvı dışkı örneklerinden ise 200µl miktarında alınmıştır).

2. Herbir örnek üzerine 1.4 ml Buffer ASL eklenip, dışkı örneği tamamen homojenize oluncaya kadar yaklaşık 1 dakika vortekslenmiştir.

3. Elde edilen karışım 5 dakika 70° C de inkübasyona bırakılmıştır.

4. Örnekler 15 saniye vortekslenip, en yüksek devirde (13000 rpm) 1 dakika dışkı çözültisi elde edilinceye kadar santrifüjlenmiştir.

5. Üst sıvıdan 1.2 ml alınıp, yeni 2 ml'lik ependorf tüpleri içerisine pipetlenmiş ve çökelti kısımları atılmıştır.

6. Herbir örnek içerisine 1'er adet InhibitEX tablet eklenip, sonrasında 1 dakika tablet tamamen eriyene kadar vortekslenmiştir. İnhibitörlerin InhibitEX matrix'ine yapışmasını sağlamak için örnekler 1dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

7. İnhibitörlerin çökmesini sağlamak için örnekler en yüksek devirde 3 dk santrifüjlenmiştir.

8. Üstte kalan sıvıdan 200 µl'si 1.5ml'lik yeni ependorf tüpleri içine alınıp çökelti kısımları atılmıştır. Ardından örnekler 3 dakika en yüksek devirde santrifüjlenmiştir.

9. Tüm örneklerin üzerine 15'er µl proteinase K eklenmiştir.

10. 200'er µl Buffer AL eklenip, 15 saniye vortekslenmiştir.

11. 70°C de 10 dakika inkübe edilmiştir.

12. Lizatların üzerlerine 200'er µl etanol (%96) eklenip, vortekslenerek karışmaları sağlanmıştır.

13. Herbir örnek için QIAamp spin kolon çıkarılıp, 12. adımda elde edilen tüm lizat bu spin kolonlara aktarılıp, en yüksek devirde (13000 rpm) 1 dakika santrifüjlenmiştir. Alttaki sıvı kısım atılıp filtre kısım yeni boş 2 ml'lik kolleksiyon tüplerine aktarılmıştır.

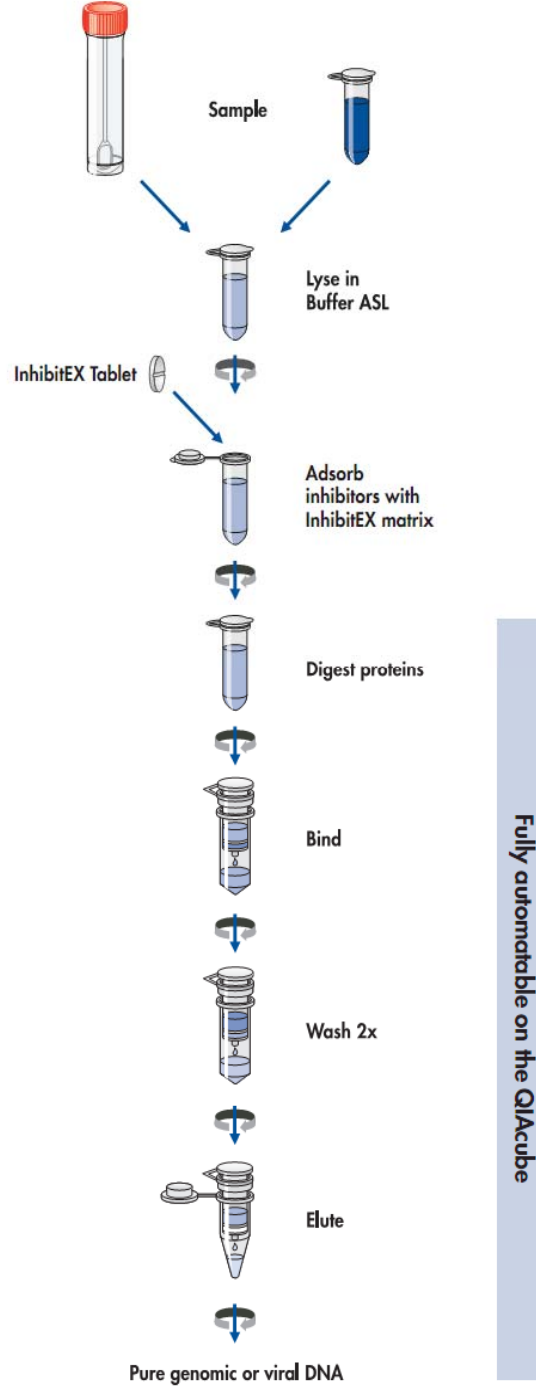
14. QIAamp kolonların kapakları dikkatlice açılıp içlerine 500'er µl AW1 eklenmiş. Daha sonra kapaklar kapatılıp, en yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilip, alttaki sıvı atılıp, filtre kısım yeni boş kolleksiyon tüplerine aktarılmıştır.

15. QIAamp kolonlarının kapakları dikkatlice açılıp içlerine 500'er µl AW2 eklenip, daha sonra kapakları kapatılıp en yüksek devirde 3 dk santrifüjlenmiştir.

16. Alttaki sıvı kısım atılıp filtre kısım yeni boş 2 ml'lik kolleksiyon tüplerine aktarılıp, en yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilmiştir.

17. Alttaki sıvı kısım atılıp, filtre kısımları yeni boş 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. 14. adımdaki QIAamp kolonların kapakları dikkatlice açılıp içlerine 200'er µl Buffer AE eklenip, kapakları kapatılıp 1 dakika oda ısısında inkübe edilip, ardından en yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilmiş olup, filtre kısım atılmış ve elimizdeki 1.5 ml'lik tüplerde 200'er µl DNA elde edilmiş ve ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.1).

QIAamp DNA Stool Mini Procedure



Şekil 3.1. DNA ekstraksiyon aşamaları

3.2. DNA Amplifikasyonu

Bu işlem için Taq PCR Core Kit (Qiagen-Germany) kullanılmıştır. Kit içeriğinde üreticinin sağladığı Taq polimeraz enzimi, 10X Coraload PCR Buffer, 25 mMol MgCl₂, dNTP, distile su mevcuttu. Primerler *G.duodenalis* TPI gene PCR: (forward) 5' - TGGACTGGCGAGACAAG-3' ve (reverse) 5' -TCCGGCTTGAGGGAA GC-3' kullanılmıştır. PCR karışımı hazırlanmıştır. Karışım için uygulanan miktarlar bir PCR tüpü için mix karışımın da 5 µl 10x buffer, 6µl Mgcl₂, 2µl dNTP, her bir primer den 2µl, 0.3µl taq polimeraz enzimi ve son olarak 3µl DNA template konulup toplamda 50 µl elde edilmiştir. 10 saniye vortekslenip, 15 saniye santrifüj (düşük hızda) edilerek amplifikasyon aşamasına geçilmiştir.

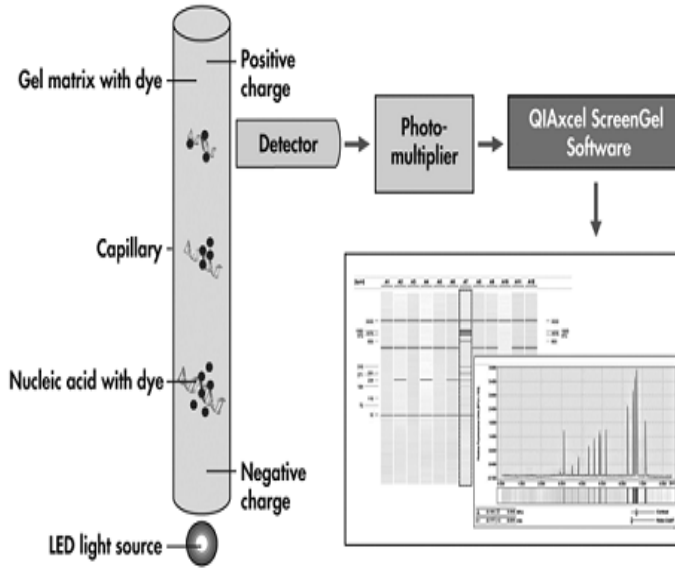
Amplifikasyon işleminde GeneAmp 9700 PCR System (PE Applied Biosystem) kullanılmıştır. PCR şartları 94°C 3 dakika (başlangıç sıcaklığı), 94°C de 45 saniye (denatürasyon), 57 °C de 45 saniye (annealing) 72 °C de 45 saniye (ekstansiyon) olmak üzere toplam 35 siklüs ve son olarak 72 °C de 10 dakika olarak uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünü, restriksiyon işlemi için +4 derecede saklanmıştır.

3.3. RFLP

Restriksiyon işlemi için *XhoI* (Fermantas) enzimi kullanılmıştır. Enzimin etki gösterdiği gen bölgesi 5'...C ↓T C G A G...3', 3'...G A G C T↑ C...5'. Kit içeriği 10u/µl *XhoI* enzimi, 2x1ml 10X Buffer R , 1ml 10X Buffer Tango mevcuttu. PCR amplifikasyonu sonrası PCR ürünün restriksiyon işlemi şu şekilde yapılmıştır. PCR amplifiye DNA 10µl, 18µl distile su, 2µl 10X Buffer R, 2µl *XhoI* miktarlarında konulup ve 37 °C de 16 saat inkübe edilmiştir ve ürün görüntüleme işlemine geçilmiştir.

3.4. Ürün Görüntüleme

Görüntüleme işleminde kapiller jel elektroforez kit (QIAxcel DNA Screening KIT, Qiagen Germany) kullanılmıştır. Bu işlem basamağında PCR ürününleri, restriksiyon işlemine tabi tutulmuş DNA örnekleri yüklenmiştir. İşlem basamaklarında her bir örnek otomatik olarak tek tek kapillerlere yüklenip ve elektrik akımına tabi tutulmuştur. Kapiller içerisindeki nükleik asit molekülleri negatif uçtan pozitif uca hareket etmiştir. Agaroz jel elektroforezindeki gibi düşük molekül ağırlığa sahip moleküller yüksek molekül ağırlığına sahip olan moleküllerden daha hızlı hareket etmiştir. Moleküllerin hareketi kapillerden geçerken kapiller içerisinde bulunan florasan dedektörler tarafından hareket ve miktar olarak tespit edilmiştir. Çoklu dedektörler yayım sinyallerini elektronik sinyallere çevirip software eşliğinde veri görüntüsü, jel görüntüsü almak üzere bilgisayara aktarılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Ürün görüntüleme basamakları

Çalışmamızda Kullandığımız Diğer Gereçler

- 1.5 ml ve 2 ml kapaklı mikrosantrifüj tüpleri
- 0.5 ml'lik ince çeperli DNAase, RNAase free PCR tüpleri
- Pipetler (0. 5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000µl otomatik pipetler)
- 10µl DNAse, RNAse free filtreli pipet uçları
- 100µl DNAse, RNAse free filtreli pipet uçları
- 1000 µl DNAse, RNAse free filtreli pipet uçları
- Mikrosantrifüj (Hettich- Mikro22)
- Vorteks (Biosan- V1)

3.5. İstatistiksel Analizler

Veriler SPSS for Windows (version 11.0) paket programı kullanılarak bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Ortalama değerler “aritmetik ortalama \pm standart sapma” olarak gösterilmiştir. P değeri Pearson Chi-square yöntemiyle değerlendirilmiş olup, ($p<0.05$) anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4. 1. Genel Bulgular

Çalışmamızda değerlendirmeye aldığımız 75 hastanın 46 tanesi erkek (% 61.3), 29 tanesi kadın (% 38.7) olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1. Olguların cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)
Kadın	46	61.3
Erkek	29	38.7
Toplam	75	100

Olgular 2-50 yaşları arasında olup yaş ortalaması 13. 8 olarak bulunmuştur (Tablo 4.2).

Tablo 4. 2. Olguların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş grupları	2-9	10-20	31-40	41-50
Olgu sayısı	40	33	1	1
Yüzde (%)	53. 33	44	1. 33	1.33

Olgular mikroskopik olarak incelendiğinde 75 olgunun 75'inde de giardia kist formu izlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4. 3. Mikroskopi ile saptanan morfolojik şekillerin dağılımı

Morfolojik şekil	Olgu sayısı	Yüzde (%)
Trofozoit	0	0
Kist	75	100
Toplam	75	100

75 olgunun 69 (%92) tanesinde semptom mevcut olup, 6 (%2) tanesinde herhangi bir semptom belirtilmemiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4. 4. Olguların klinik olarak semptomatik ve asemptomatik dağılımı

Klinik belirti	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)
Semptomatik	69	92
Asemptomatik	6	8
Toplam	75	100

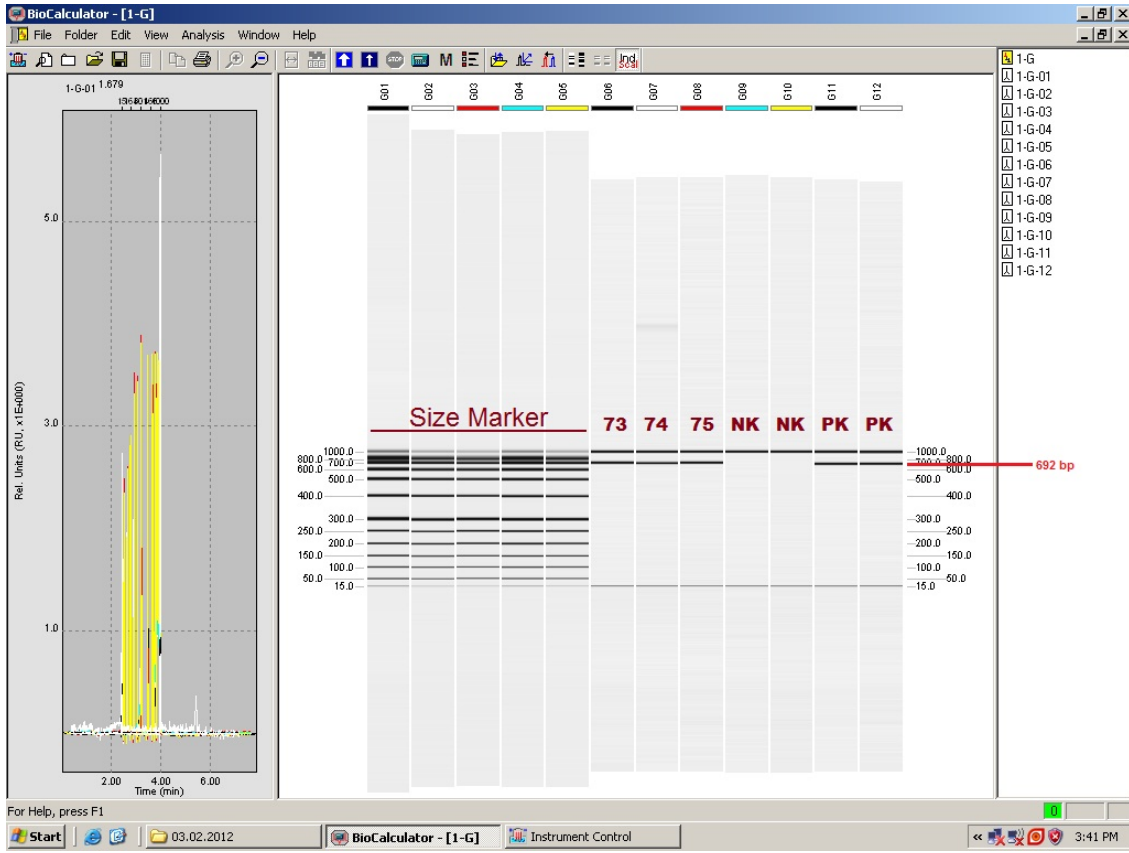
Semptomatik hastaların hemen hemen tamamında semptom olarak ishal ve karın ağrısı bulunmakta olup bu semptomlara ek olarak bazı hastalarda anemi, ateş ve allerjik reaksiyonlar da eşlik ettiği belirtilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4. 5. Giardia kist pozitif bulunan hastalarda semptom ve bulguların dağılımı

Semptom	Sayı	Grup A	Grup B
Karın ağrısı	35	33	2
Diare	34	34	
Anemi+Diare	14	14	
Allerjik reaksiyon	7	7	
Ateş +karın ağrısı	2	2	

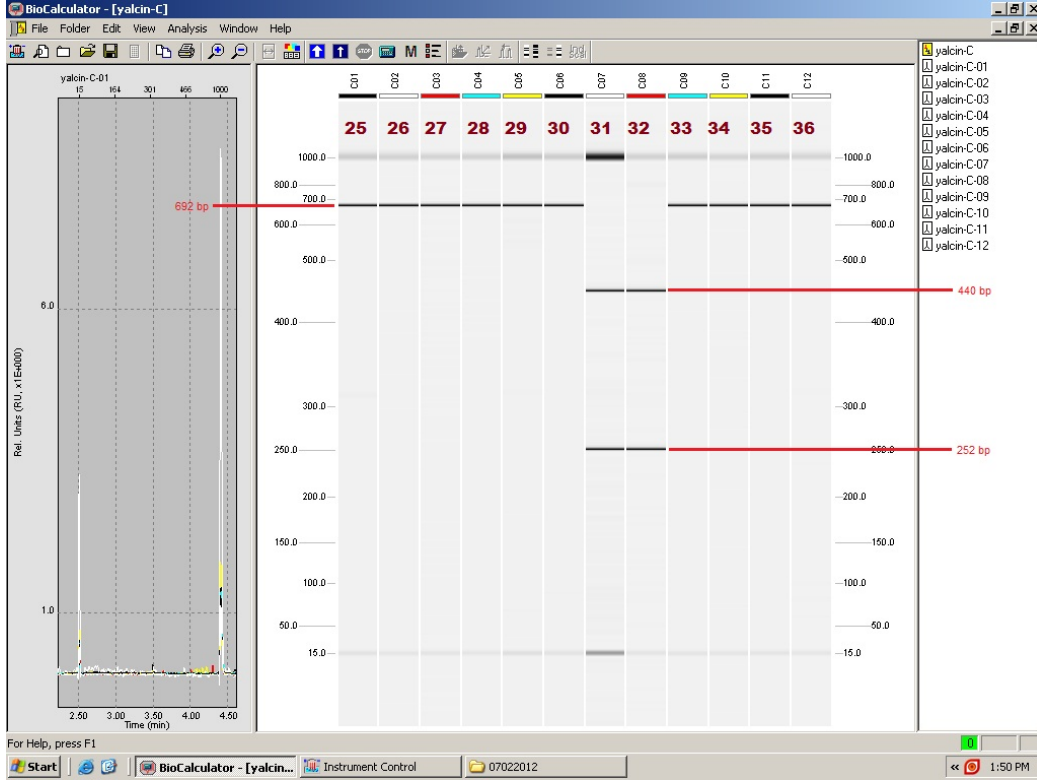
4. 2. PCR-RFLP BULGULARI

75 giardiasis tanısı almış hasta dışkı örneklerinin TPI gen lokusu hedef alınmış ve PCR amplifikasyonları tüm örneklerde 692 bp de görüntülenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Kapiller jel elektroforez PCR amplifikasyon görüntüsü

RFLP basamağında tüm örnekler *XhoI* enzimi ile muamele edilmiş ve 8 örnekte 440bp ve 252bp lik iki fragman elde edilmiştir (Tip B genotipi). 67 örnekte ise *XhoI* enzimine direnç görülmüş ve ayrılma izlenmemiştir. Ayrılmayan örnekler 692 bp'de kalmıştır (Tip A genotipi) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Kapiller jel elektroforez RFLP görüntüsü

PCR-RFLP ile yapılan moleküler çalışmada 75 olgunun 67 tanesinde tip A, 8 tanesinde tip B genotipi bulunmuştur (Tablo 4.6). Olguların genotiplerine göre dağılımında ise istatistiksel olarak Tip A oranı anlamlı olarak ($p < 0.05$) daha fazla bulunmuştur.

Tablo 4. 6. Olguların PCR-RFLP çalışmasında elde edilen genotiplerine göre dağılımı

Genotip	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)
Tip A	67	89.3
Tip B	8	10.7
Toplam	75	100

PCR RFLP ile yapılan moleküler çalışmada 69 adet semptomatik hastanın 67 tanesinde tip A genotipi izlenmiştir. Asemptomatik 6 hastanın tamamında ve semptomatik 69 hastanın 2'sinde ise tip B genotipi izlenmiştir (Tablo 4.7). Semptomatik olgularla Tip A genotipi arasında ve asemptomatik olgularla Tip B genotipi arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir korelasyon bulunmuştur.

Tablo 4. 7. Olguların PCR-RFLP çalışmasında elde edilen genotiplerin semptomatik ve asemptomatik hastalara göre dağılımı

Genotip	Semptomatik	Aseptomatik
Tip A	67	0
Tip B	2	6
Toplam	69	6

5. TARTIŞMA

Bir protozoon olan *G. intestinalis*'in neden olduğu hastalığa Giardiasis denir. Bu parazitin yaşam döngüsünde trofozoit ve kist formu bulunur. Giardiasisin dünya çapındaki dağılımına bakıldığında insan için en yaygın protozoon enfeksiyonu gibi durmaktadır. Ilıman bölgelerden tropikal kuşağa kadar, endüstriyel ülkelerde %2-5 arasında değişen oranda, gelişmekte olan ülkelerde %20-30'a varan oranlarda yayılış göstermektedir. Özellikle çocuklarda yüksek oranda görüldüğü dikkati çekmektedir. Yaşta özgün prevalans çocukluktan infantil döneme doğru gidildikçe artmakta, özellikle adolesan çağda olmak üzere erişkinliğe doğru ise azalmaktadır (17, 19). Ülkemizdeki dağılımına bakıldığında yapılan çalışmalar arasında en yüksek seviyede olan sonuç, İstanbul gibi çevre koşullarının ve alt yapı sorunlarının diğer bazı şehirler ile kıyaslandığında çok iyi olduğu bilinen ve beklenen bu ilde %54, 8 gibi yüksek oranlarda parazite rastlanması lokal olarak ciddi düzeylerde alt yapı sorunlarının olduğunu göstermektedir. Yapılan bu çalışmaların ortak sonucu olarak, rastlanma sıklığını etkileyen en önemli faktörün sosyoekonomik koşullar olduğu sonucuna varılmıştır (28-31). Farklı coğrafik bölgelerde yaşayan insanlardan izole edilen binden fazla dışkı örneğinden PCR ile elde edilen DNA'nın incelenmesi sonucunda *G. duodenalis*'in A ve B tiplerinin insan enfeksiyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *G. duodenalis*'i morfolojik olarak çok az farklılıklar gösteren ancak genetik analizleri sonucu yedi farklı alt türe ayıran veriler de bildirilmektedir. Hastalığın ciddiyeti parazitin virülansı ile enfekte ettiği bireyin yaşı, beslenmesi ve immünolojik durumu ile ilgilidir. A tipi ile enfekte olmuş hastaların B tipi ile enfekte olmuş hastalara göre iki kat fazla ishal şikayeti olduğu ve B tipinin asemptomatik giardia ile istatistiksel olarak ilişkilendirildiği rapor edilmiştir. Moleküler çalışmalarla insanlarda giardiasisin farklı klinik tablolar şeklinde görülmesi, *G. intestinalis* genotip gruplarının farklı patojenitelere sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Giardia'ların genotiplendirilmesi gerçekleştirilmiş, sonuçların semptomlarla ilişkisi araştırılmış ve saptanan A ve B gruplarından birer örneğin DNA dizisi belirlenmiştir (73-75).

Çalışmamızın amacı giardiasis tanılı hastalarda TPI gen lokusu hedeflenerek PCR ve RFLP yöntemi ile *G. intestinalis*'in moleküler olarak grup A ve grup B olarak genotiplendirilmesi ve bu genotiplerin hastalığın klinik olarak semptomatik ve asemptomatik tablolarla ilişkisi ve genotiplerin dağılımının araştırılması hedeflenmiştir.

2008-2011 yılları arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilimdalı'nda giardiasis tanısı almış olan 75 hasta dışkı numunesi incelenmiştir. Kist pozitif örnekler DNA ekstraksiyon işleminden geçirilmiştir. Elde edilen DNA'ların amplifikasyonu için PCR işlemine tabi tutulmuştur. PCR ürünleri *XhoI* enzimi ile RFLP işlemine tabi tutulmuştur. 37 C de 16 saat inkübe ettiğimiz DNA'lar görüntüleme işlemi için kapiller jel elektroforezine (QIAxel System) aktarılmıştır. PCR basamağında elde ettiğimiz ürünlerin tamamı 692 bp de görüntülenmiştir. RFLP işlemine tabi tuttuğumuz 75 adet DNA örneklerinden 8 tanesinin 440 bp ve 252 bp de iki fragmana ayrıldığı gözlemlenmiştir, 67 amplifiye DNA örneğinin ise fragmente olmayıp 692 bp de kaldığı gözlemlenmiştir. Ayrılmaya dirençli 67 DNA örneği Tip A genotipi olarak, iki fragmana ayrılan 8 adet DNA örneği ise Tip B genotipi olarak değerlendirilmiştir.

M. C. Sousa ve arkadaşlarının PCR-RFLP ve Sequencing yöntemiyle yaptıkları çalışmada giardia kist pozitif 25 hasta dışkı örneğini çalışmaya dahil etmiş, 12 tanesinde çalışma başarılı olmuştur. Amplifiye DNA ürünlerini jel elektroforezinde 682 bp de görüntülemişler, amplifiye edilen DNA ların restriksiyonu için *XhoI* enzimini kullanmışlar. 12 olgu da *Xho I* enzim kesimine direnç göstermiş ve tip A genotipi olarak belirtmişlerdir. Tip B genotipine hiçbir örnekte rastlamamışlardır. Tip A'nın semptomatik enfeksiyonla ilişkili olduğu görüşüne varmışlardır (80). Çalışmamızda da semptomatik 69 olgunun 67 sinde Tip A genotipi tespit edilmiş olup Tip A genotipinin sayıca fazla olması ve semptomlarla ilişkili bulunması bu çalışmayla uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Anjana Sighn ve arkadaşları Nepal de yaptığı bir çalışmada ise giardia pozitif dışkı örnekleri kullanılarak *G.intestinalis*'in iki genotipinin semptomlarla ilişkisini araştırmayı hedeflemiştir. Bunun için 35 örnek SYBR Green qPCR ile amplifiye edilmiş *BsrBI* ile restriksiyon işlemine tabi tutmuşlardır. 35 örneğin 26 tanesinin Tip B, 7 tanesinin tip A

olduğunu belirtmişlerdir (81). Biz çalışmamızda ise 75 örneğin 67 tanesini Tip A, 8 tanesini Tip B olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmada genotip A istatistiksel olarak daha fazla bulunmuştur.

Moshira ve arkadaşlarının Mısır'da yaptığı bir çalışmada giardia kist pozitif 30 örneğe ve 11 negatif örneğe TPI gen lokusu hedeflenerek RT-PCR ve RFLP yöntemleri uygulanmış. RFLP işleminde enzim olarak *RsaI* kullandıklarını belirtmişlerdir. Tüm örneklerin 31 tanesinde TipA (24 TipA1, 7 TipA2), 8 tanesinde Tip B, 2 tanesinde miks tip tespit edilmiştir. Tip A olgularının aralıklı diare, Tip B olgularının ısrarcı diare ile ilişkili olduğunu ve Mısır'da daha çok aralıklı diare görüldüğünü belirtmişlerdir (82). Çalışmamızda tespit edilen Tip A olgularının tamamı semptomatik, TipB olgularının ise sadece %25'i semptomatik olduğu tespit edilmiştir. Tip B olgularının tamamının semptomatik olması, bizim çalışmamızda ise Tip B'lerin % 75'inin asemptomatik olması nedeniyle uyumsuzluk olduğu gözlemlenmiştir. Ancak toplam olgu sayısına bakıldığında Mısır'da görülen giardia örneklerindeki Tip A olgu sayısı bizim çalışmamızdaki giardia örneklerindeki Tip A olgu sayısı ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Samuelson ve arkadaşları Hindistan da yaptığı bir çalışmada genç erişkinlerde giardianın tiplendirilmesi için PCR-RFLP yöntemiyle TPI gen lokusunu hedeflemiş ve restriksiyon enzimi olarak *XhoI* kullanılmışlardır. 12 hastadan 6 tanesinde şiddetli diare izlenirken, 6 tanesinde semptomla rastlanmamıştır. Yapılan çalışmada 6 tane semptomatik olgunun 4 tanesinde Tip A, 2 tanesinde Tip B bulunmuştur. 6 asemptomatik olgunun 5 tanesinde Tip B, 1 tanesinde Tip A bulunmuştur. Yapılan çalışmadaki örnek sayısının az olması nedeniyle semptomla grup ilişkilendirilmesinin anlamlı sonuç vermediği kanaatine varmışlardır (83). Bu çalışmada, çalışmamızla uyumlu olarak semptomatik olgularda daha çok Tip A tespit edilmiştir. Ancak toplam olgu sayısına bakıldığında tespit edilen Tip A sayısının oranı bizim çalışmamızdaki Tip A sayısının oranıyla uyumsuz bulunmuştur.

Ratanapo ve arkadaşlarının Tayland'ın kırsal kesimlerinde yaptığı bir çalışmada giardia tanılı 33 örnek incelenmiş. Yaptığı PCR-RFLP çalışmasında GDH gen lokusu hedeflenerek seminested PCR uygulamış. 12 örnek amplifiye edilebilmiş ve 5 tanesinin genotip A (sub2) 7 tanesinin genotip B (sub4) olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmadaki toplam

olgu sayısına bakıldığında tespit edilen Tip A sayısının oranı çalışmamızdaki Tip A sayısının oranıyla, uyumsuz bulunmuştur (84).

Bertrand ve arkadaşlarının Fransa'da yaptığı bir çalışmada iki farklı gen bölgesi hedeflenerek 26 giardia kist pozitif dışkı örneği incelenmiş. TPI gen lokusu hedeflendiğinde 26 örneğin 25'i, GDH gen lokusu hedeflendiğinde 21 tanesinin amplifiye olduğunu gözlemlemişlerdir. RFLP işleminde enzim olarak *RsaI* ve *NlaIV* kullanmışlar ve bu işlemlerin sonucunda 9 tane genotip A, 16 tane genotip B bulmuşlardır. Gen lokusu olarak TPI gen lokusunun hedeflendiği çalışmanın daha verimli olduğunu belirtmişlerdir (85).

Ahmet F.Aydın ve arkadaşlarının Türkiye'de yaptığı bir çalışmada 20'si semptomatik 24'ü asemptomatik, giardia kist pozitif toplam 44 dışkı örneğini PCR-RFLP yöntemleri ile incelenmişlerdir. TPI gen lokusu hedeflenen çalışmada *XhoI* restriksiyon enzimi kullandıklarını belirtmişlerdir. 20 semptomatik olgunun 17'sinde (%85) Tip A, 24 asemptomatik olgunun 2'sinde Tip A bulunmuştur. 24 asemptomatik olgunun 22'sinde (%91.6) Tip B, 20 semptomatik olgunun 3'ünde Tip B bulunmuş ve semptomlarla grup A'nın ilişkili olduğu kanaatine varmışlardır (86). Gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda da bu çalışmayla benzer olarak 69 semptomatik olgunun 67'sinde (%97.1) Tip A, asemptomatik olguların ise tamamı Tip B olarak tespit edilmiş ve semptomlarla genotip A arasında, asemptomatik olgularla genotip B arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Böylece bu çalışmayla bizim çalışmamızdaki olguların semptomlarına göre genotip oranları benzerlik göstermektedir. Ancak çalışmaya alınan toplam olgu sayısı dikkate alındığında bu çalışmada bulunan Tip A sayısının oranı % 43.2, Tip B sayısının oranı %56.8 bulunmuş bizim çalışmamızda ise Tip A oranı % 89.3, Tip B oranı % 10.7 olarak bulunmuştur ve toplam olgu sayısının genotiplere göre dağılımları açısından bizim çalışmamızla uyumsuz bulunmuş bunun nedeni olarakta seçilen hasta grubu olduğu kanaatine varılmıştır.

Esmael Fallah ve arkadaşlarının İran'da, toplam 34 giardia pozitif örnekten yaptıkları PCR çalışmasında TPI gen lokusu hedeflenmiş ve 34 örneğin 31 tanesi amplifiye edilmiş. 31 örnekten 17 tanesi genotip A, 13 tanesi genotip B olarak bulunmuştur (87). Bu çalışmada bulunan genotiplerin toplam olgu sayısına oranına bakıldığında Tip A % 54.8, Tip B ise % 45.2 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda Tip A oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla bulunmuş ve bu çalışmayla uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

J.A.D.L.Yason ve arkadaşlarının Filipinlerde yaptığı bir çalışmada 133 giardia kist pozitif dışkı örneği incelenmiştir. TPI gen lokusu hedeflenerek nested PCR–RFLP yöntemi ile 133 olgunun 115'i (%86.47) genotip B olarak bulunmuş ve genotip B bulunan olguların tamamının asemptomatik olduğunu belirtmişlerdir (88). Çalışmamızda da asemptomatik olguların tamamı genotip B olarak bulunmuş, istatistiksel olarak asemptomatik olgularla Tip B arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiş ve bu çalışmayla uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Ancak çalışmaya alınan toplam olgu sayısı dikkate alındığında bu çalışmada bulunan Tip A sayısının oranı % 6, Tip B sayısının oranı % 94 bulunmuş bizim çalışmamızda ise Tip A oranı % 89.3, Tip B oranı % 10.7 olarak bulunmuştur ve toplam olgu sayısının genotiplere göre dağılımları açısından bu çalışma bizim çalışmamızla uyumsuz olarak değerlendirilmiştir.

Gelanew ve arkadaşları Etyopya'da 59 giardia pozitif örneğe β giardin gen lokusunu hedefleyerek nested PCR yapmış olup, RFLP yönteminde *HaeIII* restriksiyon enzimi kullandıklarını belirtmişlerdir. 59 örneğin 31'i genotip A, 13'ü genotip B olarak bulunmuş, geri kalan numuların mix tip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca semptomatik olguların kuvvetle genotip B ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (89). Bu çalışmada bulunan genotiplerin toplam olgu sayısına oranına bakıldığında Tip A % 52.5, Tip B ise % 47.5 olarak bulunmuş ve bizim çalışmamızla uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu çalışmada semptomların Tip B ile bizim çalışmamızda ise semptomların Tip A ile ilişkili olarak bulunması uyumsuz çıkmıştır.

Tungtrongchitr ve arkadaşlarının Tayland'da 61 giardia kist pozitif dışkı örneğinde TPI gen lokusunu hedefleyerek PCR-RFLP ile yaptıkları bir çalışmada % 8 oranında genotip A, % 51 oranında genotip B ve kalan numuların mix olduklarını belirtip semptomların genotip B ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (90). Bizim çalışmamızda ise Tip A oranı % 89.3, Tip B oranı % 10.7 olarak, semptomlar ise Tip A ile ilişkili olarak bulunmuş ve bu çalışmayla uyumluluk göstermemiştir.

Ajjampur ve arkadaşları Güney Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada 50 diare semptomlu ve 51 asemptomatik olmak üzere toplam 101 giardia pozitif örneği TPI gen lokusu hedefleyerek PCR-RFLP yöntemleri ile incelemişler ve grup A'nın gruplandırılması için RFLP de *RsaI* enzimini seçmişlerdir. Çalışmanın sonucunda diare semptomlu 50 hastanın

% 80'inde Tip B, asemptomatik 51 hastanın ise % 94'ünde genotip B tespit etmişlerdir (91). Çalışmamızda semptomatik olguların % 97.1'i Tip A olarak bulunmuş ve bu sonuç çalışmayla uyumsuzdur. Ancak bizim çalışmamızda bu çalışmayla uyumlu olarak asemptomatik olguların %100' ü Tip B olarak bulunmuştur.

Boontanom ve arkadaşlarının Tayland'da yaptıkları bir çalışmada okul çağı çocuklarında mikroskopik olarak giardia pozitif 11 adet örneği çalışmaya dahil etmişlerdir. 10 adet örnek amplifiye edilmiştir. Çalışmada PCR için GDH ve SSU gen lokusları hedef alınmış, RFLP için *Nla* IV ve *Bsr*I enzimleri kullanmış olup, 7 örnek GenotipB (BIII, BIV), 3 örnek GenotipA (AII) olarak bulunmuştur (92). Bu çalışmada Tip A oranı % 30, Tip B oranı % 70 olarak bulunmuş, çalışmamızda ise Tip A oranı % 89.3, Tip B oranı % 10.7 olarak bulunmuştur ve toplam olgu sayısının genotiplere göre dağılımları açısından bu çalışma bizim çalışmamızla uyumsuzdur.

Sahagun ve arkadaşları İspanya'da giardiasis tanılı 108 hasta örneğinden genotiplendirme yapmış, semptomlarla giardia geotipleri arasında bir korelasyon olduğunu bulmuşlardır. 5 yaş altı olgularda semptomatiklerde genotip A, asemptomatiklerde genotip B arasında anlamlı bir ilişki tespit etmişlerdir (93). Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla uyumlu olarak semptomatik olgularla Tip A, asemptomatik olgularla Tip B arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Perez Cordon ve arkadaşlarının Peru'lu giardia kist pozitif çocuklar üzerinde yaptıkları PCR-RFLP ve Sequencing çalışmasında GDH gen lokusu kullanmış ve semptom veren (diare) tüm örneklerin genotip A ile ilişkili olduğunu, semptom vermeyen olguların ise genotip B ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (94). Yaptığımız çalışmada da bu çalışmayla uyumlu olarak semptomatik olgularla Tip A, asemptomatik olgularla Tip B arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

6. SONUÇ

Çalışmamız da tip A' nın toplam incelenen olgu sayısında anlamlı olarak fazla olduğu, semptomatik hastalıkla kuvvetle beraberlik gösterdiği, tip B'nin ise asemptomatik hastalıkla ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar çeşitli ülkelerde yapılan çalışmaların bir kısmı ile uyumlu bir kısmı ile uyumsuz olarak bulunmuştur. Bizce, giardia genotiplendirilmesinde çalışmaya alınan olguların yaşadıkları coğrafik konumlar, sosyoekonomik düzeyler, yaş grupları gibi faktörler farklı sonuçların elde edilmesindeki sebepler gibi durmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Meyer EA: Giardiasis. Elsevier Science Medical Publishers B.V (BiomedicalDivision)., 1-9, 215-233, 1990
2. Unat Ek, Yücel A, Aktaş K, Samastı M: Unat' ın Tıp Parazitolojisi. (5.Baskı). İst. Uni. Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları, Yayın No: 15, 544-551, 1995
3. Heyworth MF: Giardiasis. Classification disease spectrum clinical approach.Diagnostic Medical Parasitology. ASM General Meeting. 1-5, 1994
4. Unat EK, Orhan V, Budak S, Sermet İ, Kuman A: Giyardiyo. T.Parazitol. Derg. Yayın No: 6, 1-76, 1987
- 5-Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology, , 7th ed, W. B. Saunders Company, 63-79, 1992.
- 6-Ak M. Giardia intestinalis'in biyokimyası. "Giardiasis" Özcel MA, Üner A, Eds. Türkiye Parazitoloji Derneği Yay. no: 14, s.69-78, 1997.
- 7-Daldal N, Özensoy S. Giardia intestlnalis'in morfolojisi ve evrimi. "Giardiasis" Özcel MA, Üner A, Eds. Türkiye Parazitoloji Derneği Yay. no:14, s.1-16, 1997.
- 8- Gillin FD, Reiner DS, McCaffery M. Organel of protein transport in Giardia lamblia. Farasitol Today, 7:113-116, 1991,
- 9- Lymbery AJ, Tibayrenc H. Discussants Report: Population Genetics and Systematics: Mow many Species of Giardia are there?. In: Giardia: Prom Molecules to disease. RCA Thompson, JA Reynoldson. AJ Lymbery (eds.) CAB Int. UK, ISBN 0 85198 840 7, p.71-79, 1994.
- 10-Nash TE. Immunology;The role of the Parasite. Ch. 10. Eds: Thompson RAC. Reynoldson JA, Lymbery AJ. Giardia from molecules to disease. CAB. International Wallingford. Oxan OX 10 8DE. UK. ISBN 0851938407. 139-154, 1994.

- 11- Sheffield HG, Bjorvatn B. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. *Am J Trop Med Hyg*, 26(1): 23-30, 1976
- 12- Meyer EA. *Giardia* as an organism. Ch, 1. Eds: Thompson RAC. Reynoldson JA, Lymbery AJ. *Giardia from molecules to disease*. CAB. International Wallingford. Oxan OX 10 8DE. UK. ISBN 0851988407. 3-13, 1994.
- 13- Thompson KCA, Reynoldson JA, Mendis HW. *Giardia* and Giardiasis: Advances in Parasitology. 32: 71-160, 1993,
- 14- Binz N, Thompson RCA, Lymbery AJ, tlobbs RP. Comparative studies on the growth dynamics of two genetically distinct isolates of *Giardia duodenalis* in vitro, *Int J Parasitol*, 22:195-202, 1992.
- 15- Erlandsen SL. Biotic transmission-Is Giardiasis a Zoonosis. Ch. 6. Thompson RAC. Reynoldson JA, Lymbery AJ. 1994. *Giardia from molecules to disease*, CAB. International Wallingford. Oxan OX 10 8DE. UK. ISBN 0851988407. 83-97, 1995.
- 16- Hoque ME, Hope VT, Scragg R, Kjellstrom T, Lay-Yee K. Nappy handling and risk of giardiasis. *Lancet*, Mar 31; 357 (9261): 1017-8, 2001.
- 17- Farthing MJ. Giardiasis. *Gastrointestinal Clin North Am*, 25 (3), 493-515, Review. 1996.
- 18- Schmerin MJ, Jones TC, Klein H. Giardiasis association with homosexuality. *Ann Intern Med*, 88 (6), 801-3, 1978.
- 19- Buret A, Hardin J A, Olson HE, Gall DG. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia latnblia*. *Gastroenterology*, 103 (2): 506-513; 1992.
- 20- Farthing MJG. Giardiasis as a disease. Ch. 2. Eds; Thompson RAC. Reynoldson JA, Lymbery AJ. *Giardia from molecules to disease*. CAB, International Wallingford. Oxan OX 10 8DE. UK. ISBN 0851988407. 15-37. 1994.
- 21- Üner A, Ertuğ S. Giardiasisin epidemiyolojisi. "Giardiasis" Özcel MA, Üner A, Eds. *Türkiye Parazitoloji Derneği Yay. no:14*, s. 17-35, 1997.
- 22- Kaur K, Rawat D, Kakkar M, Uppal B, Sharma VK. Intestinal parasites İn children with diarrhea in Delhi, India, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 33 (4): 725-729, 2002.
- 23- Morimoto N, Komatsu C, Kataoka H, Ogura K, Su-giura T. Incidence and clinical features of *Giardia lamblia*. *Rinsho Byori*. 51 {7}:633-6, 2003.
- 24- Nygard K, Void L, Robertson L, Lassen J. Are domestic *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Norway underdiagnosed? *Tidsskr Hor Laegeforen*. 123 (23): 3406-9, 2004.
- 25- Direkel Ş, Özerol İ H, Bayraktar MR. Malatya merkezinde bağırsak parazitlerinin dağılımı. *T. Parazitol Derg*; 26 (1): 52-55, 2002.

- 26- Çelik T, Atambay M, Daldal N. Malatya ilinde ishallerde bağırsak protozoonlarının dağılımı. T Parazit Derg, 27 (2): 129-132, 2003.
- 27- Çıragil F, Aral M, Ekerbiçer HÇ, Gül M. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. T Parazit Derg, 27 (2): 136-138, 2003.
- 28- Kocazeybek B. Özel bir hastanede akut gastrointestinal infeksiyon etkeni mikroorganizmaların prevalansının araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 31 (1-2): 69-72, 2001.
- 29- Gürer Ü. S., Adalati, K., Gürbüz, B. Bağırsak parazitlerinin direkt ve çöktürme yöntemleri ile karşılaştırmalı incelenmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 31 (3-4):280-284, 2001.
- 30- Küçükateş E, Kocazeybek B, Çakan H, Mutlu H. Dışkı örneklerinin parazitolojik inceleme sonuçları, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 32 (3-4):250-252, 2002.
- 31- Öner YA, Sahip N, Uysal H, Büğet E. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda 1997.
- 32- Yazar S, Akman MAA, Hamamcı B, Birhan M, Şener S, Şahin İ. Kayseri sosyal Hizmetler çocuk esirgeme kurumu (5HÇEK) çocuk yuvasındaki 0-7 yaş çocuklarda bağırsak parazitlerinin araştırılması. T Parazit Derg, 26 (1): 48-51, 2002
- 33- İnceboz T, Ayhan Y, İnan S. İzmir Behçet Uz Çocuk Mastanesi'nde retrospektif olarak bağırsak parazitlerinin araştırılması. T Parazit Derg, 26 (2):205-207. 2002.
- 34- Saygı G, Oğuztürk H, Akın Z. İki köy ilköğretim okulu öğrencilerinde bağırsak parazitlerinin dağılımı. T Parazit Derg, 26 (3): 292-298, 2002.
- 35- Şenel S, Özçelik S, Değerli S. Çocuklarda bağırsak parazitizasyon ve eozinofili arasındaki ilişkinin araştırılması. T Parazit Derg, 26 (3); 274-277, 2002
- 36- Demirel MM, İnceboz T, Yegane S. Manisa'daki çocuklarda bağırsak parazitlerinin epidemiyolojisi. T Parazit Derg, 26 (3): 282-285, 2002.
- 37- Babür C, Kılıç S, Özkan AT, Esen B . Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Parazitoloji Laboratuvarında 1995-2000 yıllarında saptanan bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. T Parazit Derg, 26 (3): 286-291, 2002.
- 38- Apan TZ. Kırıkkale ilindeki berberlerde ekto ve endo parazitlerin araştırılması. T Parazit Derg, 26 (3): 308-311, 2002.
- 39- Yıldız Zeyrek F, Özbilge H, Zeyrek CD, Taşçı S.Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. T Parazit Derg, 26 (3): 278-28, 2002.

- 40- Yıldız Zeyrek F, Zeyrek CD, Özbilge H, Uzala Mızraklı A. Şanlıurfa'da İlköğretim Çocuklarında Barsak Parazitlerinin Dağılımını Etkileyen Faktörler Ve Büyümeye Etkisi. Türkiye Parazitoloj Derg, 27(3): 203-206, 2003.
- 41- Simsek Z, Yıldız Zeyrek F, Kurcer MA. Effect of Giardia Infection on Growth and Psychomotor Development of Children Aged 0-5 Years. J Trop Pediatr, 50: 90-93, 2004.
- 42- Akpınar A, Jones TK, Özcel MA. The distribution of the intestinal parasitic diseases in the Southeast Anatolian (GAP=SEAP) region of Turkey. Parasite. Farasitol Res. 99 (2): 146-152. Epub 2006 March 7, 2006.
- 43- Katelaris F, Seow F, Ngu, M. The effect of Giardia lamblia trophozoites on Lipolysis in vitro. Parasitology, 103: 35-39, 1991.
- 44- Alkan MZ. Giardiasisde Patogenez. " Giardiasis" Özcel MA, Üner A, Eds. Türkiye Parazitoloji Derneği Yay. no: 14, S.37-40, 1997.
- 45- Oberhuber G, Stolte M: Analysis of histological changes in biopsy specimens of 80 patients. J Clin Pathol, 43:641-643, 1990.
- 46- Edwards MR, Grote R, Fayne KD, O'Sullivan WJ. Abstracts: Giardia Biochemistry. ³¹P and ¹³C NMR Studies of Giardia intestinalis. Eds:Thompson RAC, Reynoldson JA, Lymbery AJ. Giardia from molecules to disease, CAB. International Wallingford. Oxan OX 10 8DE. UK. ISBN 0851988407, 339-355, 1994.
- 47- Altıntaş N, Korkmaz M. Giardiasisin immünolojisi. "Giardiasis" Özcel, MA, Üner A, Eds. Türkiye Parazitoloji Derneği Yay. no: 14, s. 41-63, 1997.
- 48- Olson ME, Ceri H, Mock DW. Giardia vaccination. Parasitol. Today, 16 (5):213-217. 2000-2001 yılları arasında parazitolojik yönden incelenen 15714 dışkı örneğinden elde edilen sonuçlar. T Parazitoloj Derg, 26 (3): 303-304, 2002.
- 49- Smith JM, Wolfe MS. Giardiasis. Ann Rev Med, 31: 373-383, 1980.
- 50- Mandell GL, Bennett JE, Dolin K. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed.. Copyright © Churchill Livingstone, Inc. 2000.
- 51- Homan WL, Mank TG. Human Giardiasis: Genotype Linked Differences in Clinical Symptomatology, Int J Parasitol, 31 (8): 822-6. 2001.
- 52- Gürüz AY. Giardiasis Kliniği. "Giardiasis" Eds: Özcel MA, Üner A. Türkiye Parazitoloji Derneği Yay. no: 14, s.63-67, 1997.
- 53- Letts M, Davidson D, Lalonde F. Synovitis secondary to giardiasis in children. Am J Orthop, 27 (6):451-454, 1998.
- 54- Letts M, Meza-Ortiz F. Giardiasis-associated arthralgia in children. Arch Med Res, May; 32 (3):248-250 2001.

- 55- De Vizia B, Poggí V, Vajro F, Cucchiara S, Acampora Iron malabsorption in giardiasis, *J Pediatr*, 107 (1): 75-78. 1985.
- 56- Butcher FD, Farthing MJG, DMA probes for the faecal diagnosis of *Giardia lamblia* infections in man, *Biochemical Society Transactions*, 17: 363-364. 1989.
- 57- Fine KD. Diarrhea. In: Steisenger & Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. Feldman M, et al, Eds. 6th ed, Philadelphia, WB Saunders, p.128-152. 1998.
- 58- Ok ÜZ, Girginkardeşler, N, Kilimcioğlu, A, Limoncu, Dışkı inceleme yöntemleri. "Parazit Hastalıklarında Tanı". Özcel MA, Altıntaş N, Eds.: Türkiye Parazitoloji Derneği Yay. no:15, s.1-61, 1997.
- 59- Ozbel Y, Dağcı H, Giardiasisin Laboratuvar tanısı. "Giardiasis". Özcel MA, Üner A, Eds. Türkiye Parazitoloji Derneği Yay, no:14, s.79-117, 1997.
- 60- Yaşarol Ş. Medikal Parazitoloji. E.Ü, Tıp Fak. Yay. No: 93. 2. baskı, 81-87, 1984.
- 61- Kuman HA. Giardiasis sağaltımı "Giardiasis" Özcel MA, Üner A, Eds.: Türkiye Parazitoloji Derneği Yay. no:14, s.117-129, 1997.
- 62- Gorbae KMC, Games EJ, Gonzales VF, Diaz CJ. A comparative study in intestinal amebiasis and giardiasis in infant and pre-school children: efficacy and tolerance of secnidazole versus metronidazole and etofamide. *Invest Med Int*, 16 (2):79-82, 1989.
- 63- Abboud P, Lemee V, Gargafa G, Successful treatment of metronidazole and albendazole-resistant with nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*, 32(12): 1792-4. 2001.
- 64- Alvarez CR, Wang CM, Cob SCE. Efficacy of furazolidone, metronidazole and secnidazole in the treatment of giardiasis, *Compend, Invest Clin Latinoam*, 11 (2): 41-44, 1991.
- 65- Reynoldson JA, Behnke JM, Gracey M, Horton, KJ, Spargo K, Hopkins KM, Constantine CC, Gilbert F, Stead C, Hobbs RP, Thompson KC. Efficacy of albendazole against *Giardia* and hookworm in a remote Aboriginal community in the north of Western Australia. *Acta Trop*, 71 (1): 27-44, 1998.
- 66- Reynoldson JA, New approaches in chemotherapy. Chapter 22. Thompson RAC. Reynoldson JA, Lymbery AJ. 1994. *Giardia from molecules to disease*. CAB. International Wallingford. Oxon OX 10 8DE. UK. ISBN 0851988407. 339-355, 1995.
- 67- Sousa MC, Polares-da-Silva J. The cytotoxic effects of ciprofloxacin in *Giardia lamblia* trophozoites, *Toxicol In Vitro*, 15 (4-5): 297-301, 2001.

- 68- Boreham PFI. The current status of chemotherapy for giardiasis. Chapter 20. Giardia from molecules to disease Eds: Thompson RAC, Reynoldson JA, Lymbery AJ. CAB. International Wallingford. Oxan OX 10 8DE. Uk. ISBN 0851988407, 317-328, 1994.
- 69- Hassan SI, Nessim NG, Mahmoud SS, Nosseir MM. Effect of a broad spectrum antiparasitic drug ivermectin In acute and chronic experimental giardiasis using different dose regimens. J Egypt Soc Parasitol, 31 (2):419-28, 2001.
- 70- Budak S, Atay MG. Giardiasisden korunma. "Giardiasis" Özcel MA, Üner A, Eds. Türkiye Parazitoloji Derneği Yay. no: 14, s. 131-136, 1997.
- 71- Char S, Farthing MJG. DNA probes for diagnosis of intestinal infection. Gut Jan, 32 (1): 1-3. 1991.
- 72- Özcel MA, Üner A, Ertuğ S. immunfloresans yöntemi. "Parazit hastalıklarında tanı". Özcel MA, Altıntaş N, Eds. Türkiye Parazitoloji Derneği Yay. no: 15, s. 215-239, 1997.
- 73- Amar, C. F., Dear, P. H., Pedraza-Diaz, S., Looker, N., Linnane, E. & McLauchlin, J. (2002). Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of Giardia duodenalis in human feces. J Clin Microbiol 40, 446–452.
- 74- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G. & Ey, P.L. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan Giardia intestinalis. Molecular Biology and Evolution 16: 1135-1144.
- 75- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G. & Ey, P.L. (2003). Genetic diversity within the morphological species Giardia intestinalis and its relationship to host origin. Infection, Genetics and Evolution 3: 29-38.
- 76- http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/G-L/Giardiasis/body_Giardiasis_
- 77- Eckmann L. 2003. Mucosal defenses against Giardia. Parasite Immunol. 25, 259-270.
- 78- Adam RDA, 2001. The Giardia lamblia genome Int J Parasitol. 30: 475-84.
- 79- Thompson RCA, 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis. Vet Parasitol. 126: 15-35.
- 80- M.C. Sousa. Genotyping of Giardia lamblia Human Isolates from Portugal by PCR-RFLP and Sequencing, J. Eukaryot. Microbio., 53(S1), 2006 pp. S174-S176
- 81- Anjana Singh. Giardia intestinalis Assemblages A and B Infections in Nepal Am. J. Trop. Med. Hyg., 81(3), 2009, pp. 538-539
- 82- Moshira M.F. Real-Time PCR/RFLP assay to detect Giardia intestinalis genotypes in human isolates with diarrhea in Egypt J. Parasitol., 95(4), 2009, pp. 1-5
- 83- Samuelson. Giardia lamblia Groups A and B among Young Adults in India Clinical Infectious Diseases 1998; 26:190-1

- 84-Supawat Ratanapo. Multiple Modes of Transmission of Giardiasis in Primary Schoolchildren of a Rural Community, Thailand *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 78(4), 2008, pp.611-615
- 85-Isabelle Bertrand. Comparison of Two Target Genes for Detection and Genotyping of *Giardia lamblia* in Human Feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. *Journal Of Clinical Microbiology*, Dec.2005, p.5940-5944
- 86-Ahmet F.Aydn Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into Groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 50 (2004) 147-151
- 87-Esmaeel Fallah. Genetic Characterization of *Giardia intestinalis* Strains from Patients Having Sporadic Giardiasis by Using PCR Assay. Short Communication *J.Med.Sci.*, 2008
- 88-J.A.D.L Yason. Genotyping *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. *Parasito Res* (2007) 101:681-687
- 89-Tesfaye Gelanew. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia *Acta Tropica* 102 (2007) 92-99
- 90-Anchalee Tungtrongchitr. *Giardia intestinalis* in Thailand: Identification of Genotypes. *J Health Popul Nutr* 2010 Feb;28(1):42-52
- 91-Sitara S.R.Ajjampur. Short Report: *Giardia duodenalis* Assemblages Associated with Diarrhea in Children in South India Identified by PCR-RFLP. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 80(1), 2009, pp. 16-19
- 92-Boontanom, P. Epidemiology of giardiasis and genotypic characterization of *Giardia duodenalis* in preschool children of a rural community, central Thailand. *Tropical Biomedicine* 28(1): 32-39 (2011)
- 93-Sahagun J. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Abstract Eur J Clin Microbial Infect Dis*; 2008, 27: 81-83.
- 94-Perez-Cordon G. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitol Res* 103: 459-465.
- 95- <http://www.drzeydanli.com.tr/index.php?page=icerikgoster&menuID=30#PCR>