

# Trakya Bölgesi'ndeki *Giardia intestinalis* İzolatlarının Genotiplendirilmesi\*

## Genotyping of *Giardia intestinalis* Isolates in the Thrace Region, Turkey

Cemal ÇIÇEK<sup>1</sup>, Nermin ŞAKRU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Muş Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Muş.

<sup>1</sup> Mus State Hospital, Microbiology Laboratory, Mus, Turkey.

<sup>2</sup> Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne.

<sup>2</sup> Trakya University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Edirne, Turkey.

\* Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (TÜBAP) tarafından 2011/139 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 12.05.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 18.08.2015

### ÖZ

*Giardia intestinalis* su ve gıda kaynaklı salgınlara neden olabilen, insanlarda sık görülen bir protozoon-dur. Dünyada ve Türkiye'de önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. *G. intestinalis*'in epidemiyolojisi, genetik popülasyonu ve taksonomisini belirlemede moleküler teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. *G. intestinalis*'in insanlarda genotip A ve genotip B olmak üzere iki genotipi bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı; insanlardan elde edilen *G. intestinalis* izolatlarının moleküler yöntemlerle analizidir. Çalışmaya, Eylül 2011-Nisan 2013 tarihleri arasında, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Edirne Devlet Hastanesine başvuran kişilerin (30 erkek, 9 kadın; yaş aralığı: 1-74 yıl, ortanca yaş: 20) dışkılarından elde edilen 39 izolat alınmıştır. Hem nativ hem de lugol yöntemiyle mikroskopik olarak incelenen her örnekte, x400'lük büyütmede en az 50 alan taranarak ortalama kist sayısı saptanmıştır. Daha sonra örnekler, ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi (LAMP) ile uzama faktörü-1 alfa (EF-1 $\alpha$ ) gen bölgesi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile de beta-giardin (bg) gen bölgesinin varlığı yönünden analiz edilmiş; ayrıca bg geninin dizi analizi yapılmıştır. Otuz dokuz örneğin 32'sinde (%82) LAMP yöntemiyle, 19'unda ise (%48.7) PCR ile, sırasıyla EF-1 $\alpha$  ve bg pozitifliği saptanmıştır. Genotiplendirmenin yapılabildiği 17 örneğin dokuzu genotip A, sekizi genotip B olarak belirlenmiş; alt genotipler olarak A2 (n= 6), A3 (n= 3), B2 (n= 6), B3 (n= 1) ve B4 (n= 1) tanımlanmıştır. Semptomatik 21 olgunun tiplendirilebilen sekiz izolatında genotip B (n= 5)'nin, asemptomatik 18 olgunun tiplendirilebilen dokuz izolatında ise genotip A (n= 6)'nın daha fazla görüldüğü izlenmiştir. Semptomatik ya da asemptomatik olgular arasında genotipler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p= 0.347). PCR pozitiflik oranı, kist yoğunluğu yüksek ve düşük olan olgular arasında anlamlı fark göstermiştir (p= 0.0001). Sonuç

**İletişim (Correspondence):** Prof. Dr. Nermin Şakru, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 22030 Edirne, Türkiye. Tel (Phone): +90 284 235 76 41/1624, E-posta (E-mail): nsakru@yahoo.com

olarak, LAMP ve PCR gibi moleküler yöntemlerin kullanılması, ortaya çıkabilecek salgınların analizinde yol gösterici olacaktır. Ayrıca bölgemizdeki *G.intestinalis* alt tip tanımlamasının, global epidemiyolojik verilere katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Giardia intestinalis*; LAMP; genotip; epidemiyoloji; Trakya.

## ABSTRACT

*Giardia intestinalis* is a common protozoon that infects humans and may cause water and food-borne outbreaks. It is regarded as a major public health problem worldwide and in Turkey as well. Molecular techniques are widely used to determine the epidemiology, genetic populations and taxonomy of *G.intestinalis*. It has two genotypes including genotype A and genotype B in humans. The purpose of the present study is to implement the molecular analysis and genotyping of the isolates of *G.intestinalis* obtained from human stool samples. A total of 39 isolates obtained from the stool samples of persons (30 male, 9 female; age range: 1-74 years, median age: 20) who have admitted to Trakya University Medical Research and Practice Health Center and Edirne State Hospital between September 2011- April 2013 were included in the study. The average number of cysts were identified both with native and lugol methods among all microscopically detected samples by screening at least 50 field with x400 magnification. The samples were then analyzed through loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for the presence of elongation factor-1 alpha (EF-1 $\alpha$ ) gene, and polymerase chain reaction (PCR) method for the presence of beta-giardin (bg) gene regions. In addition, sequence analysis of *bg* gene was performed. Of 39 samples, 32 (82%) and 19 (48.7%) were found to be positive for *G.intestinalis* EF-1 $\alpha$  and *bg* genes by LAMP and PCR methods, respectively. Genotyping was implemented in 17 out of 19 samples yielding nine genotype A and eight genotype B strains. The sub-genotypes of these strains were identified as A2 (n= 6), A3 (n= 3), B2 (n= 6), B3 (n= 1) and B4 (n= 1). In eight isolates that could be typed among 21 symptomatic patients, genotype B (n= 5) and in nine isolates that could be typed among 18 asymptomatic patients, genotype A (n= 6) were more frequently observed. There was no significant association between symptomatic or asymptomatic status and genotypic patterns of the cases ( $p= 0.347$ ). The PCR positivity rate showed a significant difference between patients with higher cyst density and lower cyst density ( $p= 0.0001$ ). In conclusion, molecular methods such as LAMP and PCR might have the potential to provide a substantial guidance for the analysis of outbreaks. In addition, the determined subtypes of *G.intestinalis* in our region is expected to contribute to the global epidemiological data.

**Keywords:** *Giardia intestinalis*; LAMP; genotype; epidemiology; Turkey.

## GİRİŞ

*Giardia* cinsi; insanları, evcil ve vahşi hayvanları etkileyen, yaygın olarak görülen bir bağırsak parazitidir. *Giardia intestinalis* insanda hastalık yapan tek *Giardia* türüdür, diğer türleri evcil hayvanlarda, çiftlik hayvanlarında ve yabani hayvanlarda bulunur<sup>1</sup>. *G.intestinalis* görülme sıklığı ülkelere göre değişiklik göstermekte ve çevresel hijyenin düşük olduğu bölgelerde daha yüksek oranda görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tahminlerine göre, dünyada 200 milyon kişi semptomatik giardiyaz hastasıdır ve her yıl 500.000 yeni olgu eklenmektedir<sup>2</sup>. 2010 yılı rakamlarına göre farklı Avrupa ülkelerinden bildirilen olgu sayısı 17.130 olup, 0-4 yaşta en yüksek oranda rapor edilmiştir<sup>3</sup>. Türkiye'de görülme sıklığı ise, sosyoekonomik koşullara bağlı olarak değişiklik göstermekte olup, 2010 yılı verilerine göre olgu sayısı 14.605 ve insidans yüz binde 20.07'dir<sup>4</sup>.

*G.intestinalis*'in epidemiyolojisini, genetik popülasyonunu ve taksonomisini belirlemede moleküler teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. *G.intestinalis*'in genotiplendirilmesi çoğunlukla; 16S ribozomal DNA, küçük alt ünite ribozomal RNA, beta-giardin, glutamat dehidrogenaz, uzama faktörü 1-alfa, trioz fosfat izomeraz, GLORF-C4 geni ve inter-genomik rRNA spacer gen bölgesinin çoğaltılmasına ve analizine dayanmaktadır. Bu gen bölgelerine bağlı olarak PCR pozitiflik oranları oldukça değişkenlik göstermektedir. Genetik çalışmalar sonucunda bilinen pek çok *G.intestinalis* genotipi olmasına rağmen insanlarda genotip A ve B olarak iki ana genetik grup bulunmaktadır<sup>5-7</sup>.

Ülkemizde paraziter hastalıkların prevalansı ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak *G.intestinalis*'in genotiplendirilmesi konusunda yapılmış sınırlı sayıda çalışma mevcuttur<sup>8-12</sup>. *G.intestinalis* suşlarının moleküler analizi konusunda Edirne ilinde ve Trakya Bölgesi'nde daha önce hiç çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile, bölgemizde bulunan *G.intestinalis* izolatları hakkında bilgi sahibi olmak, *G.intestinalis* genotiplerini belirlemek ve bu alanda yapılan toplum sağlığı çalışmalarına katkı sağlanmak hedeflenmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alınarak, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Örnekler, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi ile Edirne Devlet Hastanesinden Eylül 2011-Nisan 2013 tarihleri arasında toplandı. Dışkıda *G.intestinalis* kist ve/veya trofozoit pozitif bulunan 39 örnek çalışmaya alındı. Hem nativ hem de lugol yöntemiyle mikroskopik olarak incelenen her örnekte, x400'lük büyütmede en az 50 alan taranarak ortalama kist sayısı saptandı. Her alanda ortalama 1'den az kist olması (+), 1-3 kist olması (++) ve 3'ten fazla kist görülmesi (+++) olarak kaydedildi.

## DNA İzolasyonu

Moleküler çalışmalar için ilk 17 örnekte kistlerin saflaştırılmasında Volotao ve arkadaşlarının<sup>13</sup> tanımladığı yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Örnekler en fazla 5 gr olacak şekilde 15 ml distile su ile dört katlı gazlı bezden geçirildi. Gazlı bezin üzerinde kalan kaba materyal atıldı. Elde edilen filtrat 400xg'de 10 dk santrifüj edildi; üst kısmı atıldı. Kalan 2-3 ml örneğin üzerine 12-13 ml distile su eklendi. Tekrar 400xg'de 10 dk santrifüj edildi. Dışkı ile distile su arasındaki bölgeden kistler izole edilerek, 2 ml'lik ependorf tüpüne konuldu. Örnekler çalışılincaya -20°C'de saklandı. Diğer 22 örnekte ise dışkıdan direkt DNA izolasyonu yapıldı.

Örneklerden DNA izolasyonu, QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Almanya) kullanılarak minör modifikasyonlar ile yapıldı. Dışkı örneğinden 2-3 gr tartıldı. Dışkı ağırlığı 2 gr'dan az olanların tamamı izolasyon için kullanıldı. 50 ml'lik falkon tüpüne 1.5 gr 3 mm'lik steril cam boncuk konuldu. Üzerine 1000 ml tampon ASL eklendi. 15 dk vortekslendi ve 10 dk kaynar suyun içinde bekletildi. Üzerine 400 ml tampon ASL eklendi. Santrifüj cihazında 600 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. 1.2 ml supernatan yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Diğer basamaklar üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı. Elde edilen DNA miktarı NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, ABD) cihazın-

da ölçüldü. Ardından örnekler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi uygulanıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) Yöntemi

Uzama (elongation) faktörü-1 alfa (EF-1 $\alpha$ ) gen bölgesinin gösterilmesi amacıyla, LoopAMP *Giardia* Saptama Kiti (Eiken, Japonya) kullanıldı; işlemler üretici firmanın önerisi doğrultusunda yapıldı. PCR'de pozitif kontrol olarak, kitin içinde bulunan *G.intestinalis* DNA'sı ve negatif kontrol olarak DNaz ve RNaz içermeyen saf su eklendi.

### Beta-giardin (bg) Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması ve Dizi Analizi

Elde edilen izolatlardaki *bg* gen bölgesinin varlığının belirlenmesinde, Caccio ve arkadaşlarının<sup>14</sup> tanımladığı PCR yöntemi uygulandı. Primer olarak F(G376): 5'-CATAAC-GACGCCATCGCGGCTCTC AGGAA-3' ve R(G759): 5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAG ACGAC-3' kullanıldı. Elde edilen PCR ürünleri elektroforez cihazında 120 V 500 mA'de bir saat yürütüldü. Daha sonra jel, Biorad Universal Hood görüntüleme sisteminde UV ışığı altında görüntülenerek *bg* (384 bp) gen bölgesi varlığı gösterildi. Beta giardin gen bölgesi çoğaltılan örnekler -20°C'de saklandı.

Dizi analizi için, Refgen (Ankara, Türkiye) firması tarafından önce Clustal W yöntemi ile diziler sıralandı. Sonra *neighbour-joining* yöntemi ile filogenetik ağaç çizildi. Örneklerin genotiplendirilmesi ise İontek (İstanbul, Türkiye) firmasına yaptırıldı. Referans dizileri; A1: M36728.1, A2: AY072723, A3: AY072724, B1: AY072725, B2: AY072726, B3:AY072727, B4: AY072728 şeklinde olup, GenBank'tan sağlandı.

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, SPSS 2.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Ölçülebi- len verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Kolmogorov Smirnov testi ile analiz edildi; normal dağılım göstermeyen gruplar arası kıyaslamalarda Kruskal Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi kullanıldı. Niteliksel verilerde Yates düzeltmeli Pearson X<sup>2</sup> testi ve Kolmogorov Smirnov iki örnek testi ve McNemar testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak medyan (minimum-maksimum) değerleri verildi. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı p< 0.05 olarak seçildi.

### BULGULAR

Çalışmaya alınan 39 örneğin, 30'u (%76.9) erkek, 9'u (%23.1) ise kadın olgulara aittir. Olguların yaş aralığı 1-74 yıl (ortanca yaş: 20 yıl) olup, 12 (%30.8) örnek çocuk yaş grubundaki olgulardan alınmıştır (Tablo I). Erkek cinsiyetin fazla olmasının nedeni, Edirne Devlet Hastanesinden gelen 18 (%46.1) pozitif örneğin, portör muayenesi için gelen kişilere ait olmasındandır. Olguların 30'u Edirne merkez ilçede ikamet etmektedir.

Işık mikroskopunda x400'lük büyütmede yapılan alan taramasında, ortalama kist sayısına göre 22 örnek (+), 11 örnek (++) ve 6 örnek (+++) olarak değerlendirilmiştir. Örneklerden elde edilen DNA miktarı 37.7 ile 477 ng/ $\mu$ l arasında değişmektedir (Tablo I). Çalışılan örneklerin %48.7'si (19/39) PCR ile *bg* geni; %82'si (32/39) de LAMP ile EF-1 $\alpha$

**Tablo 1.** Olguların Demografik Özellikleri, Mikroskopik ve Moleküler Analiz Sonuçları

Olgu no	Yaş-Cinsiyet	Semptom	Kist yoğunluğu	DNA düzeyi (ng/μL)	LAMP (EF-1α)	PCR (β-giardin)	Genotip
1	26-E	(-)	(+)	88.4	Neg		
2	23-E	(-)	(++)	281.3	Poz	(+)	A2
3	5-K	(+)	(+)	63.1	Poz		
4	7-E	(+)	(++)	268.8	Poz	(+)	B3
5	23-E	(-)	(+)	373.2	Poz		
6	21-E	(-)	(+)	158.7	Neg		
7	10-E	(+)	(+)	75.6	Poz		
8	33-E	(+)	(+)	58.7	Poz		
9	21-E	(-)	(+++)	88.1	Poz	(+)	B4
10	21-E	(-)	(+)	56.3	Poz		
11	22-E	(+)	(+)	79.2	Poz		
12	3-E	(+)	(++)	74.3	Poz	(+)	B2
13	4-E	(+)	(+++)	156.8	Poz	(+)	A2
14	21-E	(-)	(+)	59.1	Poz		
15	65-K	(+)	(+)	63.4	Neg		
16	13-E	(+)	(+)	106.2	Poz		
17	4-E	(+)	(+)	37.7	Poz		
18	18-E	(+)	(++)	72.2	Poz	(+)	B2
19	8-K	(+)	(+)	80.6	Poz		
20	1-K	(+)	(+)	137.9	Poz		
21	13-K	(+)	(++)	152.7	Poz	(+)	A2
22	13-E	(+)	(+)	68.2	Poz		
23	6-K	(+)	(+)	80.3	Neg		
24	20-E	(-)	(+)	61.9	Poz		
25	20-E	(-)	(++)	137.2	Poz	(+)	A2
26	20-E	(-)	(++)	113.6	Poz	(+)	*
27	20-E	(-)	(+++)	235	Poz	(+)	A3
28	20-E	(-)	(+++)	338	Poz	(+)	A3
29	20-E	(-)	(++)	237	Poz	(+)	A2
30	21-E	(-)	(+++)	477	Poz	(+)	B2
31	30-K	(+)	(+)	395	Poz	(+)	A3
32	21-E	(-)	(+)	82.5	Neg		
33	67-E	(+)	(+)	118.9	Neg		
34	20-E	(+)	(+)	112.5	Poz	(+)	*
35	17-K	(-)	(+)	301.1	Neg		
36	21-E	(-)	(++)	107.6	Poz	(+)	B2
37	21-E	(-)	(++)	272.1	Poz	(+)	A2
38	74-K	(+)	(+++)	326	Poz	(+)	B2
39	21-E	(+)	(++)	291	Poz	(+)	B2

\* Genotiplendirme yapılamadı. E: Erkek; K: Kadın; Poz: Pozitif; Neg: Negatif.

geni açısından pozitif olarak saptanmıştır. Pozitiflik oranları McNemar ki kare analizi ile karşılaştırıldığında, *EF-1α* LAMP testindeki pozitiflik oranı, anlamlı olarak daha yüksektir ( $p= 0.0001$ ). LAMP pozitif 32 örneğin 19'unda *bg* gen bölgesi PCR ile çoğaltılırken, LAMP ile negatif bulunan 7 örnek aynı zamanda *bg* PCR ile de negatif bulunmuştur.

PCR pozitifliği; kist saflaştırması yapılarak  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de, 0-6 ay süre ile saklanmış örneklerde %33.3 (3/9), 7-12 ay saklanan örneklerde ise %25 (2/8) oranında saptanmıştır. Taze dışkıdan DNA izolasyonunun yapıldığı örneklerde ise %63.6 (14/22) oranında PCR ile *bg* gen bölgesi çoğaltılmıştır.

Pozitiflik oranları ile kist yoğunluğu karşılaştırıldığında; (++) ve (+++) yoğunluktaki 17 örneğin tümünde *EF-1α* ve *bg* gen bölgeleri pozitif olarak bulunmuştur. Kist yoğunluğu düşük olan 22 örnekte ise *EF-1α* örneklerin %68.2'sinde, *bg* ise örneklerin %9.1'inde pozitif olarak saptanmıştır. Kist yoğunlukları ile PCR pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken ( $p= 0.0001$ ), LAMP pozitifliği arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p= 0.078$ ). DNA miktarı bakımından PCR pozitif olanlarla negatif olanlar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark olup, PCR pozitif örneklerin DNA miktarı daha yüksektir ( $p= 0.0001$ ). DNA miktarları ile LAMP testi sonuçları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p= 0.872$ ).

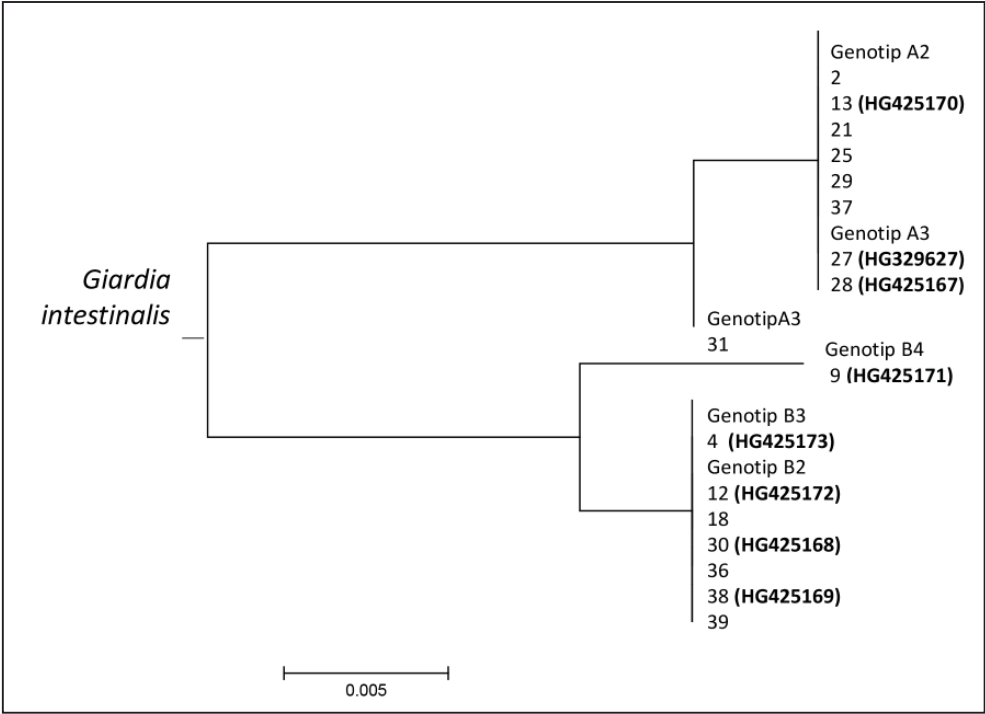
*G.intestinalis* pozitif 39 örnekten 19'unda (%48.7), 384 baz çift (bp)'lik *bg* gen bölgesi çoğaltılmış ve örneklerin ancak 17'sinde genotiplendirme yapılabilmektedir. Bu örneklerin 9'u genotip A, 8'i genotip B olup, alt genotipler olarak A2 (n= 6), A3 (n= 3), B2 (n= 6), B3 (n= 1) ve B4 (n= 1) tanımlanmıştır (Tablo I).

Çalışmamızda elde edilen örneklerin 21'i; karın ağrısı, ishal, şişkinlik ve yağlı dışkılama gibi klinik belirti ve bulguları bulunan, dışkı bakımında pozitiflik saptanan olgulara aittir. Diğer 18 örnek ise, portör muayenesi sırasında pozitif çıkan, herhangi bir klinik bulgusu olmayan asemptomatik kişilerden alınmıştır (Tablo I). Genotiplendirilen örneklerin 8'i semptomatik ve 9'u asemptomatik olgulara aittir. Semptomatik olgularda genotip B (%62.5), asemptomatik olgularda ise genotip A (%66.7)'nin daha yaygın olduğu izlenmiştir; ancak klinik bulgular ile genotipler arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır ( $p= 0.347$ ).

Örneklere ait gen dizileri, European Nucleotide Archive (ENA) gen bankası veri tabanına kaydedilmiştir. Filogenetik analiz sonucu elde edilen dendrogram ve ENA gen bankası erişim numaraları Şekil 1'de gösterilmektedir.

## TARTIŞMA

*G.intestinalis* insanlarda sık görülen bir protozondur. Giardiyaz semptomları kişiden kişiye, enfeksiyonun süresine, alınan suya, parazit sayısına ve kişinin yaşına göre değişmektedir. Sağlıklı kişilerde giardiyaz, kendini sınırlayabilen bir hastalıktır; bu enfeksiyonların çoğunluğu asemptomatiktir. Tüm yaşlarda oluşabilen semptomlar; ishal, iştahsızlık, kramp tarzında abdominal ağrı, şişkinlik, epigastrik hassasiyet ve yağlı dışkılamadır. Çocuklarda kilo alımının durmasına, malnütrisyona, bilişsel fonksiyonlarının azalmasına ve gelişme geriliğine sebep olmaktadır. Giardiyaz olgularında vitamin B12, vitamin A ve folik asit malabsorbsiyonu bildirilmiştir<sup>5,15-17</sup>.



**Şekil 1.** Filogenetik analiz sonucu elde edilen dendrogram. Tablo 1'deki olgular ve ENA gen bankası erişim numaraları belirtilmiştir.

LAMP testi; su ve dışkı gibi çeşitli materyallerde çalışılabilen, basit, hızlı, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek moleküler bir yöntem olarak tanımlanmaktadır. Çalışmamıza dahil edilen 39 izolata, *EF-1α* gen bölgesi için LAMP ve *bg* gen bölgesi için PCR yöntemi uygulanmış ve bu testlerin pozitiflik oranları sırasıyla %82 ve %48.7 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda, diğer çalışmalara<sup>18-20</sup> benzer olarak, LAMP testinde daha yüksek pozitiflik elde edilmiştir.

Çalışmada, (++) ve (+++) kist yoğunluğundaki örneklerin tümünde *EF-1α* ve *bg* gen bölgeleri çoğaltılabildi; buna karşın (+) kist yoğunluğundaki 22 örneğin %68'inde *EF-1α* ve %9'unda *bg* gen bölgesi çoğaltılabildi. PCR yönteminin pozitifliği ile kist yoğunlukları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark ( $p=0.0001$ ) bulunmasına rağmen, LAMP yönteminin pozitifliği ile kist yoğunlukları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0.078$ ). Kist saflaştırması yapılarak  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de, 0-6 ay süre ile saklanmış örneklerde %33.3 oranında PCR pozitifliği saptanırken, bu oran 7-12 ay saklanan örnekler için %25 olarak izlenmiştir. Taze dışkıdan DNA izolasyonunun yapıldığı örneklerde ise %63.6 oranında PCR ile *bg* gen bölgesi çoğaltılmıştır. Bu sonuçlar; diğer çalışmalarda da belirtildiği gibi, örneklerde bulunan düşük kist sayısı ve düşük DNA miktarının<sup>21,22</sup> ya da kistlerin uzun süre saklandıktan sonra DNA izolasyonu yapılmasının<sup>9,23</sup>, PCR yöntemini olumsuz etkilediğini göstermiştir.

Genetik çalışmalara göre pek çok *Giardia* alt grupları olmasına rağmen, insanlarda ve diğer memeli türlerinde bulunan iki ana genetik grup, genotip A ve B'dir. Günümüzde insanlarda A ve B genotipi bulunmakla beraber, ev ve çiftlik hayvanlarını da içeren çoğu hayvanda farklı genotipler bulunmaktadır<sup>5</sup>. 2005 yılında yapılan bir çalışmada, *G.intestinalis*'in A genotipinin sekiz ve B genotipinin altı alt genotipi olduğu gösterilmiştir<sup>24</sup>. Alt genotip A1 ve A2 insanlarda; A1, A3 ve A4 ise hayvanlarda baskın olarak bulunmaktadır. İnsan izolatları B3 ve B4 alt genotipinde iken, hayvan izolatları B1 ve B2 alt genotipindedir. Yapılan çalışmalarda, 2.800'den fazla örneğin moleküler analizi sonucunda, genotip B'nin (%58) tüm dünyada daha yaygın olduğu gösterilmiştir<sup>5,7,24</sup>. İnsanla ilişkili *G.intestinalis* genotiplerinin saptanma oranları, çalışmanın yapıldığı bölgelere göre değişmektedir. ABD, Portekiz ve İtalya'da genotip A daha fazla iken; genotip B'nin baskın olduğu ülkeler İngiltere, Fransa, Hollanda, Norveç, Arjantin, Mısır ve Bangladeş'tir. Tayland'da ise karışık genotip oranı %41 olarak bulunmuştur<sup>5,7,22</sup>. Ülkemizde *G.intestinalis* ile ilgili moleküler alanda yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ankara'da<sup>8</sup> yapılan çalışmada genotip B baskın olarak saptanırken; Sivas<sup>10</sup>, Aydın<sup>11</sup> ve Manisa'da<sup>9,12</sup> yapılan çalışmalarda genotip A baskın olarak bulunmuştur. Manisa'da yapılan çalışmada, örneklerin %15.5'inin karışık genotip (A + B) olduğu belirlenmiştir<sup>12</sup>.

*Giardia intestinalis* pozitif 39 örnekten ancak 19'unda, PCR ile 384 bp'lik *bg* gen bölgesi saptanmış ve örneklerin 17'si genotiplendirme yapılabilmektedir. Bu örneklerin dokuzu genotip A ve sekizi genotip B olup; alt genotipler A2, A3, B2, B3 ve B4 olarak tanımlanmıştır. Araştırmamızda insan izolatlarında sıklıkla saptanan A2 (n= 6), B3 (n= 1) ve B4 (n= 1) alt genotiplerinin yanında, evcil ya da yabani hayvanlarda sıklıkla, ancak insanlarda nadiren saptanan A3 (n= 3) ve B2 (n= 6) alt genotipleri de tespit edilmiştir<sup>5,14,24</sup>. Bu çalışma ile, daha önce yapılan çalışmalardan<sup>8-11</sup> farklı olarak, Türkiye'de A3, B2, B3 ve B4 alt genotiplerinin varlığı gösterilmiştir. Buradaki alt genotip çeşitliliğinin fazla olmasının, toplanan örneklerin yarıya yakınının (%46.1) portör muayenesi için gelen askerlerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Hayvanlarda sıklıkla rastlanılan genotiplere rastlamış olmakla beraber, izolatların zoonotik olup olmadıkları konusunda bir yorum yapmamız mümkün değildir. Bunun için; tüm Türkiye'yi kapsayan, hayvan izolatlarını da içeren, fazla sayıda örnek ile çalışmalar yapılması gerektiği kanısındayız.

Çalışmamızda değerlendirilen olguların 21'i semptomatik, 18'i asemptomatik olup, bu olgulara ait izolatların sırasıyla sekiz ve dokuz tanesi genotiplendirilebilmiştir. Bu sonuçlara göre, semptomatik olgularda genotip B (%62.5) daha fazla iken, asemptomatik olgularda genotip A (%66.7) daha fazla görülmüştür. Olguların semptomatik ya da asemptomatik olması ile genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p= 0.347). Semptom varlığı ile *G.intestinalis* genotipleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bazı çalışmalarda<sup>8,25,26</sup> genotip A'nın; bazı çalışmalarda<sup>9,16,27</sup> ise genotip B'nin, diyare gibi semptomlarla ilişkisi anlamlı olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızın sonuçları ise, semptomlar ile genotipler arasında ilişki saptamayan diğer çalışmalara<sup>24,28,29</sup> benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, hastalardan ve portörlerden elde edilen *G.intestinalis* izolatları, iki farklı moleküler yöntemle incelenmiş; LAMP ve PCR yöntemleri ile pozitiflik



oranları sırasıyla %82 ve %48.7 olarak saptanmıştır. Beta-giardin bölgesinin dizi analizi sonucunda, Trakya Bölgesinde A2, A3, B2, B3 ve B4 alt genotiplerinin bulunduğu belirlenmiş; bu genotiplerden A3, B2, B3 ve B4 alt genotipleri ülkemizde ilk olarak bu çalışma ile gösterilmiştir. Bu bulgular, önemli bir halk sağlığı sorunu olan *G.intestinalis*'in moleküler yapısı konusunda ülkemiz için yönlendirici bir veridir. Çalışmada elde ettiğimiz genotipik veriler, Türkiye ve özellikle Trakya bölgesinde ortaya çıkabilecek salgınların analizinde ve yapılacak epidemiyolojik çalışmalarda yol gösterici olacaktır. Ayrıca *G.intestinalis*'in genetik yapısı, epidemiyolojisi ve bulaşma yollarının daha iyi anlaşılması için yapılacak yeni çalışmalarda moleküler yöntemlerin kullanılması yararlı olacaktır.

## TEŞEKKÜR

Çalışmamız sırasında, bilgi ve tecrübelerini bizimle paylaşan Prof. Dr. Şaban Çavuşlu'ya, istatistik alanında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin Turan'a, moleküler çalışmalarda destek olan Arş. Gör. Şebnem Bukavaz'a ve pozitif kontrol desteği için Prof. Dr. Sema Ertuğ'a çok teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Monis PT, Cacciò SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol 2009; 25(2): 93-100.
2. World Health Organization. Infectious disease according to mode of transmission, pp: 23-58. The World Health Report 1996. WHO, Geneva.
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Giardiasis, p: 85-7. In: Annual Epidemiological Report 2012. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. 2013, ECDC, Stockholm.
4. Ertem M, İnandı T, Çan G ve ark (ed). Giardiasis, s: 52-84. Halk Sağlığı Uzmanları Derneği Türkiye Halk Sağlığı Raporu 2012. Erişim: <http://hasuder.org/anasayfa/index.php/yayinlar/hasuder-yayinlari>
5. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clin Microbiol Rev 2011; 24(1): 110-40.
6. Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. Mol Biochem Parasitol 2008; 160(2): 75-80.
7. Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of *Giardia*. Int J Parasitol 2013; 43(12-13): 943-56.
8. Aydın AF, Besirbellioğlu BA, Avcı İY, Tanyuksel M, Araz E, Pahsa A. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 50(2): 147-51.
9. Balcıoğlu C, Kurt Ö, Sevil N, et al. Genotyping of *Giardia lamblia* in a cohort of Turkish patients: a search for a relationship between symptoms and genotypes. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012; 18(Suppl-A): A125-31.
10. Değerli S, Değerli N, Çeliksöz A, Özçelik S. Genotyping of *Giardia intestinalis* isolated from people living in Sivas, Turkey. Turk J Med Sci 2012; 42(1): 1268-72.
11. Ertuğ S, Özlem S, Ertabaklar H, Bozdoğan B. Aydın ilinde insandan izole edilen *Giardia intestinalis* genotiplerinin tanımlanması: Ön çalışma. 7. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi, 5-8 Haziran 2012, Ankara. Kongre Kitabı, s: 288, PP-064.
12. Görgün S. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Giardiasis tanısı konulan olgularda *Giardia intestinalis* genotiplerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılması. Uzmanlık Tezi, 2011. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Manisa.
13. Volotao AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandao A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. Acta Tropica 2007; 102(1): 10-9.

14. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol* 2002; 32(8): 1023-30.
15. Leber AL, Novak-Weekley S. Intestinal and urogenital amebae, flagellates, and ciliates, p: 2149-71. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2011, 10<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, D.C.
16. Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, Mørch K, Langeland N. Giardiasis-why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol* 2010; 26(2): 75-82.
17. Edward K. Lumen dwelling protozoa *Giardia lamblia*, p: 56-62. In: Markell KE, John DT, Krotoski WA (eds), *Markell and Voge's Medical Parasitology*. 1999, 8<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Co, Philadelphia.
18. Plutzer J, Karanis P. Rapid identification of *Giardia duodenalis* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. *Parasitol Res* 2009; 104(6): 1527-33.
19. Plutzer J, Törökne A, Karanis P. Combination of ARAD microfiber filtration and LAMP methodology for simple, rapid and cost-effective detection of human pathogenic *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in drinking water. *Lett Appl Microbiol* 2010; 50(1): 82-8.
20. Nago TT, Tokashiki YT, Kisanuki K, Nakasone I, Yamane N. Laboratory-based evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to detect *Cryptosporidium* oocyst and *Giardia lamblia* cyst in stool specimens. *Rinsho Byori* 2010; 58(8): 765-71.
21. Calderaro A, Gorriani C, Montecchini S, et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the laboratory diagnosis of giardiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66(3): 261-7.
22. Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(1): 98-103.
23. Pérez Cordon G, Cordova Paz Soldan O, Vargas Vásquez F, et al. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitol Res* 2008; 103(2): 459-65.
24. Lalle M, Pozio E, Capelli GF, Bruchi F, Crotti D, Caccio SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 2005; 35(2): 207-13.
25. Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis* 2005; 192(12): 2171-3.
26. Laishram S, Kang G, Ajjampur SS. Giardiasis: a review on assemblage distribution and epidemiology in India. *Indian J Gastroenterol* 2012; 31(1): 3-12.
27. Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Caccio SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop* 2007; 102(2): 92-9.
28. Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102(7): 718-25.
29. Lebbad M, Ankarklev J, Tellez A, Leiva B, Andersson JO, Svard S. Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. *Acta Trop* 2008; 106(1): 44-53.