

Aydın'da İnsanlardan İzole Edilen *Giardia intestinalis* Suşlarının Genotiplendirilmesi*

Genotyping of *Giardia intestinalis* Strains Isolated From Humans in Aydın, Turkey

Sema ERTUĞ¹, Hatice ERTABAKLAR¹, Serçin ÖZLEM ÇALIŞKAN², Erdoğan MALATYALI¹, Bülent BOZDOĞAN³

¹ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

¹ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Aydın, Turkey.

² Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Aydın.

² Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Aydın, Turkey.

³ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

³ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.

* Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (TPF 07023).

Geliş Tarihi (Received): 09.06.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 29.10.2015

ÖZET

Tüm dünyada yaygın olarak bulunan *Giardia intestinalis*, insan ve diğer memelileri enfekte eden ince bağırsak yerleşimli kamçılı bir protozoon parazittir. Parazitin günümüze kadar sekiz farklı genotipi tanımlanmış olup, bunlardan insanlarda enfeksiyon oluşturan zoonotik karakterli genotip A ve B'nin, düşük konak özgüllüğüne sahip olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda farklı genotipe sahip izolatların farklı patojenik ve klinik özelliklere sahip oldukları ifade edilmektedir. Bu çalışmada Aydın'da saptanan *G. intestinalis* izolatlarının genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında, Ocak 2011 ve Aralık 2014 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi, Parazitoloji Laboratuvarına değişik polikliniklerden rutin parazitolojik inceleme için gönderilen ve direkt mikroskopik inceleme sonucu *G. intestinalis* saptanan toplam 40 dışkı örneği değerlendirilmiştir. Pozitif örneklerden DNA izolasyonu ticari bir kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Almanya) ile yapılmış, *G. intestinalis*'in 16S rRNA ve beta-giardin gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmış ve elde edilen ampliconlar dizilenmiştir. 16S rRNA gen bölgesine yönelik PCR ile 40 izolatin 11'inde (%27.5) ve beta-giardin gen bölgesine yönelik PCR ile 10'unda (%25) olmak üzere toplam 21 örnekte beklenen boyutta bantlar görülmüştür. Dizilenen 21 ampliconun 10'u (%47.6) referans diziler ile %98-100 benzerlik göstermiş ve genotipleri belirlenebilmiştir. Genotiplerin dağılımı; A1 (n: 3), A2 (n: 3), A3 (n: 2) ve B (n: 2) şeklinde bulunmuştur. Elde edilen veriler ışığında insanlarda saptanan türlerin zoonotik olabileceği öngörülmektedir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi, bölgemizde de genotip A'ya (8/10) genotip B'den (2/10) daha

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Sema Ertuğ, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, 09010 Aydın, Türkiye. Tel (Phone): +90 256 212 1850, E-posta (E-mail): sertug@adu.edu.tr

fazla rastlanmıştır. Toplamda 40 izolattan 10'unun (%25) genotipi belirlenebilmiş; *G.intestinalis* genotiplerinin belirlenmesinde beta-giardin genine yönelik dizi analizinin, 16S rRNA için olana göre daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Bu nedenle, iki gen bölgesinin karşılaştırılmasına olanak sağlayan, örnek sayısının fazla olduğu çalışmaların gerekli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: *Giardia intestinalis*; genotiplendirme; beta-giardin; Türkiye.

ABSTRACT

Giardia intestinalis which is a flagellate, intestinal protozoon of humans and a variety of mammalian species, shows worldwide distribution. To date, eight genotypes of the parasite have been identified. Among these genotypes, assemblage A and B have zoonotic characteristics with low host specificity, thus they are responsible for the human infections. The aim of this study was to identify *G.intestinalis* genotypes in Aydın, located in Aegean region of Turkey. A total of 40 stool samples that were found positive for *G.intestinalis* by direct microscopic examination, from Adnan Menderes University, Research and Training Hospital, Parasitology Laboratory from January 2011 to December 2014 were included in the study. DNA isolation from stool samples performed with commercial kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Germany) followed by polymerase chain reaction (PCR) for *G.intestinalis* 16S rRNA and beta-giardin genes and then the amplicons were sequenced. Out of 40 isolates 11 (27.5%) were positive with 16S rRNA PCR and 10 (25%) were positive with beta-giardin PCR. Of 21 sequenced amplicons, 10 (47.6%) of them showed 98%-100% similarity with reference sequences and their genotypes could be identified. The distribution of genotypes were as follows: cluster A1 (n: 3), cluster A2 (n: 3), cluster A3 (n: 2) and assemblage B (n: 2). In the light of our results the isolates detected in humans might be zoonotic origin. In accordance with the previous reports in Turkey, assemblage A (8/10) was more common than assemblage B (2/10). In the present study, 10 (25%) out of 40 isolates could be genotyped and sequencing of beta-giardin gene yielded more effective results than sequencing of 16S rRNA for the determination of assemblages. The present study indicated that, there is a need for prospective studies with extended number of cases allowing the comparison of the two genes used for *G.intestinalis* genotyping.

Keywords: *Giardia intestinalis*; genotyping; beta-giardin; Turkey.

GİRİŞ

Giardia, kuşlar, sürüngenler, memeliler ve insanlarda görülebilen gastrointestinal yerleşimli, kamçılı bir protozoon parazittir. İnsanda enfeksiyona neden olan tek tür *G.intestinalis* olup zoonotik geçişin de mümkün olduğu bildirilmiştir. Kozmopolit bir dağılım gösteren *G.intestinalis*, gelişmekte olan ülkelerde daha yaygın görülmekte ve bu ülkelerde önemli bir çocukluk çağı ishal etkeni olarak bildirilmektedir¹. Ülkemizde son yıllarda yapılan bir çalışmada, *G.intestinalis* yaygınlığının %2.6 ile %15.6 arasında değiştiği rapor edilmiştir². Aydın'da yapılan çalışmalarda ise parazit pozitifliği oranları %1.7-15.5 arasında değişmektedir^{3,4}.

Yapılan araştırmalar, *G.intestinalis*'in en az sekiz adet genotipten (assemblage A-H) oluştuğunu ortaya koymuştur. Bunlardan genotip A ve B, insanda enfeksiyona neden olan zoonotik karakterli genotipler olarak bildirilmiştir⁵. Genotip tayini, farklı moleküler yöntemlerle [enzim elektroforez paternleri, iki turlu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)-restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP), gerçek zamanlı PCR ve glutamat dehidrogenaz, beta-giardin, uzama faktörü-1 alfa, trioz fosfat izomeraz ve 16S rRNA genlerinin

dizi analizleri] yapılabilmektedir⁶. Beta-giardin gen dizisine göre genotip A 3 (A1-3), genotip B ise 4 (B1-4) alt gruba ayrılmaktadır⁷. Genotiplerde görülen farklılığın; parazitin fenotipi, metabolizması, biyokimyası, in vitro/in vivo çoğalma hızı, ilaç duyarlılığı, besiyeri pH tercihi, *G.intestinalis* virusuna duyarlılığı ve enfeksiyonların kliniğinde etkili olduğu ifade edilmektedir⁸. Ayrıca gruplar arasında kromozom sayısının ve büyüklüğünün de farklılık gösterdiği bildirilmiştir⁹. Buna karşın, konak özgülüğünü belirleyen genetik faktörler henüz tam olarak aydınlatılamamıştır¹⁰. Bu çalışmada, laboratuvarımızda saptanan *G.intestinalis* suşlarının genotiplendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ocak 2011-Aralık 2014 tarihleri arasında, Adnan Menderes Üniversitesi, Parazitoloji Laboratuvarında direkt mikroskopik inceleme sonucu *G.intestinalis* saptanan toplam 40 dışkı örneği alındı. Örnekler 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde herhangi bir fiksatif eklenmeden -20°C'de saklandı.

Örneklerden DNA izolasyonu, QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. *G.intestinalis* 16S rRNA geninin 292 baz çift (bç)'lik kısmı RH11 (5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3') ve RH4 (5'-AGTCCAACCC-TGATTCTCCGCCAGG-3') primerleri ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonu 30 µl hacimde; 2 mmol MgCl₂ (Fermentas), 0.2 mmol dNTP (Fermentas), 0.4 pmol her bir primer, 0.3 U Taq polimeraz (Fermentas), 1x Taq tamponu (NH₄)₂SO₄ (Fermentas) olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon işlemi, ısı döngü cihazında (TC-312, Techne), ön denatürasyon 96°C'de 2 dk, 25 döngü (96°C'de 20 sn, 59°C'de 20 sn ve 72°C'de 30 sn), son uzama 72°C'de 7 dk olacak şekilde gerçekleştirildi. *G.intestinalis* beta-giardin geninin 753 bç'lik kısmı G7 (5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3') ve G759 (5'-GAGGCCGCCCTGGATCTT CGAGACGAC-3') primerleri 16S rRNA'da olduğu gibi hazırlandı. Amplifikasyon işlemi, ön denatürasyon 94°C'de 5 dk, 35 döngü (94°C'de 30 sn, 65°C'de 30 sn ve 72°C'de 60 sn), son uzama 72°C'de 7 dk olacak şekilde uygulandı. Reaksiyonların sonunda elde edilen PCR ürünlerinden 10 µl alınarak SYBR Safe (Invitrogen) ve 50 bç'lik belirteç (Fermentas) ile %1.5 agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

PCR sonucu elde edilen ampliconlar, dizilenmek üzere Macrogen Inc. (Güney Kore) firmasına gönderildi. Çalışmamızda elde edilen diziler 16S rRNA ve beta-giardin referans dizileri ile Clustal X kullanılarak karşılaştırıldı¹¹. Beta-giardin geni için referansların GenBank erişim numaraları ve genotipleri; AY258617(A1), AY072723(A2), AY072725 (B1) ve AY072726 (B2) şeklinde idi. Ayrıca, Portland-1 (M54878) dizisi de 16S rRNA için referans olarak kullanıldı.

BULGULAR

Çalışılan *G.intestinalis* pozitif 40 dışkı örneğinden 16S rRNA gen bölgesine yönelik PCR ile örneklerin 11'inde (%27.5), beta-giardin gen bölgesine yönelik PCR ile 10'unda (%25) beklenen boyutta (sırasıyla 292 ve 753 bç) bantlar gözlenmiştir. Bu örneklerin tamamında sadece tek yöntemle pozitif sonuç alınmıştır. Beta-giardin geni çoğaltılan örnekler ile 16S rRNA geni çoğaltılan örnekler farklı olup, her iki gen bölgesinin de çoğaltıldığı izolat bulunmamaktadır.

16S rRNA PCR pozitif 11 örneğe ait dizilerden 3'ünün (%18) GenBank'dakilerle %99 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu örnekler referans diziler ile karşılaştırıldığında A1 olarak tanımlanmış; ayrıca her üç örnekte de 272. bazdan sonra bir "guanin" in fazla olduğu gözlenmiştir (Tablo I). Bu dizi GenBank'a gönderilmif ve erişim numarası alınmıştır (KR297232). Diğer 7 diziden bazıları *G.intestinalis*'e özgü olmadığı için, bazıları da dizi kalitesinin düşük olması nedeniyle değerlendirilememiştir.

Beta-giardin PCR ile bant görülen 10 örneğe ait diziler GenBank'daki verilerle karşılaştırıldığında 7'sinin farklı *G.intestinalis* suşları ile %98-100 arasında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Geriye kalan 3 örnek de dizi kalitesinin düşük olması nedeniyle değerlendirilememiştir. Çalışmamızda elde edilen 7 dizinin referanslar ile karşılaştırılması sonucu 3'ü A2, 2'si A3 ve 2'si B olarak saptanmıştır (Tablo II ve III). Diziler GenBank'a gönderilmif ve erişim numaraları alınmıştır (KR297233, KR297234).

TARTIşMA

Giardia intestinalis kompleksinden genotip A ve B, insanlarda ve bazı memelilerde enfeksiyon oluşturabilen zoonotik karakterli genotiplerdir⁶. Çalışmamızda, dizi analizi yapılabilen 10 izolattan sekizi genotip A, ikisi de genotip B olarak saptanmıştır. Ayrıca genotip A izolatları kendi içinde A1 (n: 3), A2 (n: 3) ve A3 (n: 2) olarak gruplandırılmıştır. Ancak genotip B için benzer bir gruplandırma yapmak mümkün olmamıştır. Dünya genelindeki

Tablo I. Dizi hizalaması sonucu "Portland 1" 16S rRNA Dizisine Göre Aydın İzolatlarında Saptanan Farklılıklar

Referans	M54878	TCGCGGCGCGCCGAGGGCCCCGACGCCTGG- CGGAGAATCAGGGTTCGACTCCGGAGA	299
İzolot no	1	*****G*****	214
	2	*****G*****	214
	3	*****G*****	214

Tablo II. *G.intestinalis* İzolatlarının Beta-Giardin Dizilerinin Genotip A ile Karşılaştırılması Sonucu Saptanan Farklılıklar

		Nükleotid değişimleri ve pozisyonları				Genotip
		415	423	561	684	
Referans diziler	AY072723	C	T	T	G	A2
	AY258617	C	T	C	A	A1
	AY072724	T	C	T	G	A3
İzolot no	4	C	T	T	G	A2
	5	C	T	T	G	A2
	6	C	T	T	G	A2
	7	T	C	T	G	A3
	8	T	C	T	G	A3

Tablo III. *G. intestinalis* İzolatlarının Beta-Giardin Dizilerinin Genotip B İle Karşılaştırılması Sonucu Saptanan Farklılıklar

		Nükleotid değişimleri ve pozisyonları										Genotip	
		165	228	282	309	312	393	519	564	600	603		609
Referans diziler	AY072725	T	A	T	T	T	T	T	C	C	A	C	B1
	AY072726	C	G	C	C	C	C	T	C	C	G	C	B2
	AY072727	C	A	C	C	T	C	T	C	C	G	C	B3
	AY072728	C	A	C	T	T	C	C	T	T	G	T	B4
İzolot no	9	A (T C)	A	C	T (C)	T	C	T	C	C	G	C	B*
	10	T (C)	A	C	C (T)	T	C	T	C	T (C)	G	C	B*

* 9 ve 10 no'lu izolatlar genotip B olmakla birlikte alt grupları 165, 309 ve 600. sıradaki bazlardan dolayı belirlenmemiştir.

araştırmalar değerlendirildiğinde, genotip B'nin daha yaygın (%60-69) olduğu görülmektedir^{12,13}. Ancak Türkiye'de PCR-RFLP yöntemiyle ve beta-giardin geni dizilenerek yapılan araştırmalarda, çalışmamızda olduğu gibi genotip A'nın B'den daha yaygın olduğu saptanmıştır¹⁴⁻¹⁶. İnsanlardaki farklı genotipler ile enfektivite ve enfeksiyonun kliniği arasındaki ilişkinin irdelendiği çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar elde edilmektedir. Aydın ve arkadaşları¹⁷, semptomlu olgularda genotip A'nın, semptomsuz olgularda ise genotip B'nin anlamlı şekilde yüksek görüldüğünü bildirmiştir. Balcıoğlu ve arkadaşları¹⁴, enfekte 63 olgunun 54'ünde genotip A (%70.4), dokuzunda (%29.6) ise genotip B'yi saptamışlar; genotip B'nin kadınlarda daha sık görüldüğünü, karın ağrısı ve diyare ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca, üç izolata ait tpi gen dizisi de tanımlamışlardır¹⁴. Kocaeli'nde çocuk yaş grubunda yapılan bir araştırmada, 22 izolatin 11'i (%50) genotip A, yedisi (%31.8) genotip B ve dördü karışık genotip (AB) olarak bulunmuştur¹⁶. Aynı araştırmada, yaş ile karışık genotiple enfekte olgular arasında anlamlı bir ilişki bulunurken, diğer genotiplerde benzer bir ilişkinin bulunmadığı da ifade edilmiştir¹⁶.

Dışkıda bulunan inhibitörlerin PCR'de negatif sonuçlar alınmasına neden olduğu vurgulanmaktadır¹⁸. Buna ek olarak, Değerli ve arkadaşları¹⁵, kist duvarı nedeniyle *G. intestinalis* kistlerinin parçalanmasının trofozoitlere göre daha zor olduğunu ve yalnızca kist görülen dışkı örneklerinden PCR ile sonuç alamadıklarını bildirmişlerdir. Babei ve arkadaşlarının¹⁹, dışkıdan farklı izolasyon kitlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada, bizim çalışmamızda da kullanılan QIAamp Stool Mini Kit'in diğerlerine göre daha duyarlı olduğu saptanmış; ayrıca izolasyon öncesi yapılacak bazı modifikasyonlarla da başarı oranının artırılacağı belirtilmiştir. Çalışmamızda da direkt mikroskopi ile *G. intestinalis* saptanan 40 dışkı örneğinin 11'inde (%27.5) 16S rRNA PCR ile, 10'unda (%25) ise beta-giardin PCR ile beklenen boyutta bantlar gözlenmiştir. Örneklerin büyük kısmında PCR ile bant saptanamamasında, yukarıda ifade edilen sorunların rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda 16S rRNA PCR ile elde edilen amplikonların %30'u, beta-giardin PCR ile elde edilen amplikonların %70'inin genotipi belirlenebilmiştir. 16S rRNA PCR ile genotipi belirlenemeyen dizilerde birden fazla amplifikasyona bağlı olabilecek arka planlar

görülmüştür. 16S rRNA geni bakterilerde de bulunduğu için *G.intestinalis*'e özgü genin dışında diziler elde edildiği düşünülmektedir. Ancak beta-giardin geni hedef alındığında başarı şansının daha yüksek olduğu izlenmiştir. Bu gen bakterilerde bulunmadığı için 16S rRNA PCR'dakine benzer bir durumun olmaması bu yönteme avantaj sağlamaktadır. Çalışmamızda genotiplendirilebilen örnek sayısının az olması her ne kadar çalışmamızın kısıtlılığı olarak düşünülse de, bu çalışma konuyla ilgili Türkiye'de yapılan az sayıdaki çalışmalardan biridir. Ayrıca ilimize ait ilk sonuçları içeren bu çalışmanın ilerideki çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz. Sonuç olarak çalışmamızın verileri, ülkemizdeki diğer bölgelerde olduğu gibi Aydın'da da genotip A'nın baskın olduğunu göstermektedir. Araştırmamızda genotipi belirlenebilen izolat sayısının düşük olması, parazitin DNA izolasyonunda yeni yaklaşımlara olan ihtiyacı ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Muhsen K, Levine MM. A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. Clin Infect Dis 2012; 55(4): 271-93.
2. Bayram Y, Parlak M, Çıkman A. Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde *Giardia intestinalis* ve *Entamoeba histolytica/dispar* prevalansı: Dört yıllık izlem. Dicle Med J 2013; 40(1): 40-4.
3. Kapdağlı A, Ertabaklar H, Yaman S, Ertuğ S. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji laboratuvarına 2002 yılında başvuran olgulardaki bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. Türkiye Parazit Derg 2003; 27(4): 31-4.
4. Yazıcı V, Siriken F, Ertabaklar H, Ertuğ S. Investigation of intestinal parasites in food workers in hospitals in Aydın, Turkey. Türkiye Parazit Derg 2007; 31(2): 136-8.
5. Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol 2009; 25(2): 93-100.
6. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clin Microbiol Rev 2011; 24(1): 110-40.
7. Caccio 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.
8. Thompson RC, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. Adv Parasitol 2004; 58: 69-137.
9. Tumova P, Hofstetrova K, Nohynkova E, Hovorka O, Kral J. Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. Chromosoma 2007; 116(1): 65-78.
10. Jerlstrom-Hultqvist J, Franzen O, Ankarklev J, et al. Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. BMC Genomics 2010; 11: 543.
11. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 1997; 25(24): 4876-82.
12. Caccio SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. Mol Biochem Parasitol 2008; 160(2): 75-80.
13. Tak V, Mirdha BR, Yadav P, Vyas P, Makharia GK, Bhatnagar S. Molecular characterisation of *Giardia intestinalis* assemblages from human isolates at a tertiary care centre of India. Indian J Med Microbiol 2014; 32(1): 19-25.
14. Balcıoğlu C, Kurt O, 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): 125-31.

15. Değerli S, Değerli N, Celiksoz A, Özçelik S. Genotyping of *Giardia intestinalis* isolated from people living in Sivas, Turkey. Turk J Med Sci 2012; 42(1): 1268-72.
16. Tamer GS, Kasap M, Er DK. Genotyping and phylogenetic analysis of *Giardia duodenalis* isolates from Turkish children. Med Sci Monit 2015; 21: 526-32.
17. Aydın AF, Beşirbellioğlu BA, Avcı İY, Tanyüksel 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.
18. Jiang J, Alderisio KA, Singh A, Xiao L. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. Appl Environ Microbiol 2005; 71(3): 1135-41.
19. Babaei Z, Oormazdi H, Rezaie S, Rezaeian M, Razmjou E. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. Exp Parasitol 2011; 128(2): 159-62.