

GIARDİASİS TANILI HASTALARIN DIŞKI ÖRNEKLERİNDE TPI GEN LOKUSU HEDEFLENEREK

G. intestinalis GENOTİPLERİNİN PCR – RFLP YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

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

Yalçın VURUPALMAZ¹, Volkan ÖTER²

¹Uzman Doktor, Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

²Operatör Doktor, Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Gastroenteroloji Cerrahisi Bölümü

ÖZ

Amaç: Giardia birçok omurgalı konağı enfekte edebilen kamçılı bir bağırsak parazitidir. Giardiasis insan için en yaygın protozoon enfeksiyonu olarak bilinmektedir. Mutlaka tedavi edilmesi gereken bir enfeksiyondur. Farklı coğrafik bölgelerde yaşayan insanlardan izole edilen binden fazla dışkı örneğinden PCR ile elde edilen DNA'nın incelenmesi sonucunda G. intestinalis'in A ve B tiplerinin insan enfeksiyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. 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.

Gereç ve Yöntem: 2008-2011 yılları arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda giardiasis tanısı almış olan 75 hasta dışkı numunesi incelenmiştir. Kist tanısı için lugol ile mikroskopik inceleme, DNA amplifikasyonu için PCR ve genotip tayini için restriksiyon analizi (RFLP) kullanılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda 75 hastanın 69'u semptomatik 6'sı asemptomatik olgulardan oluşmaktaydı. Semptomatik 69 olgunun 67'si genotip A olarak bulunmuş iken, 2'si genotip B olarak bulunmuştur. Asemptomatik 6 olgunun 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

Aim: Giardia is an intestinal parasit that infects various vertebrates. Giardiasis is known to be the most common protozoa infection in humans. It is an infection which must be treated. 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. 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 distrubution of these genotypes.

Materials 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. Microscopic examination with iodine for cyst, PCR for DNA amplification and RFLP for genotype analysis were used.

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 significiant 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

Geliş Tarihi / Received: 13.08.2015

Kabul Tarihi / Accepted: 14.04.2016

Yazışma Adresi / Correspondence: Uzm. Dr. Yalçın Vurupalmaz
Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı
vurupalmaz@hotmail.com

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. intestinalis* 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 (1-6).

Farklı coğrafik bölgelerde yaşayan insanlardan izole edilen binden fazla dışkı örneğinden PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile elde edilen DNA'nın incelenmesi sonucunda *G. intestinalis*' 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 giardiasis ile istatistiksel olarak ilişkilendirildiği rapor edilmiştir. Moleküler çalışmalarla insanlarda giardiasisin farklı klinik tablolar şeklinde görülmesi, *G. intestinalis* genotip gruplarının farklı patojenitelere sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızın amacı ise giardiasis tanılı hastalarda TPI gen lokusu hedeflenerek PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 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.

GEREÇ ve YÖNTEM

Harran Üniversitesi Araştırma Hastanesi Parazitoloji Laboratuvar'ına 2008-2011 yılları arasında 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 konulmuş, üzerine bir damla fizyolojik tuzlu su eklenerek karıştırılıp, bir lamelle kapatılarak kısa zamanda incelenmiştir. Bu yöntemle hareketli trofozoitler ve boyanmamış kistler görülebilmektedir. Lugol yönteminde ise fizyolojik tuzlu su yerine Lugol eriyiği kullanılmıştır. Bu yöntemle 2 nükleuslu trofozoitler hareketsiz, tipik armut şeklinde gözlenmiş, nükleusları zor görünen ancak sitoplazmadan ayrılmış kist duvarı ve sitoplazma içindeki fibrillerle kolayca tanınan kistler görülmüştür. Bu yöntemler ile giardia kisti pozitif bulunan 75 hastanın dışkı örneği herhangi bir ek materyal eklenmeden -20 C° de DNA ekstraksiyon işlemi yapılan kadar saklanmıştır.

Bu çalışma için Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 2011/53 numarası ile onay alınmıştır.

a. 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 kütleye sahip dışkıyı 2 ml'lik ependorf tüplerine alınıp, tüpler buz üzerinde muhafaza edilmiştir (Sıvı dışkı örneklerinden ise 200µl miktarda alınmıştır).
2. Herbir örnek üzerine 1.4 ml Buffer ASL eklenip, dışkı örneği tamamen homojenize olunca ya 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 çözeltisi elde edilinceye kadar santrifürlenmiştir.

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. Inhibitörlerin InhibitEX matrix'ine yapışmasını sağlamak için örnekler 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

7. Inhibitörlerin 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 ethanol (%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.

b. DNA Amplifikasyonu

Bu işlem için Taq PCR Core Kit (Qiagen-Germany) kullanılmıştır. Kit içeriğinde üreticinin sağladığı Taq polimeraz enzimi, 10X Coralload PCR Buffer, 25 mMol MgCl, dNTP, distile su mevcuttu. Primer olarak G. intestinalis TPI gene PCR: (forward) 5'-TGGACTGGCGAGACAAG-3' ve (reverse) 5'-TCCGGCTTGAGGGAA GC-3' kullanılmıştır. Toplam volüm 50µl olacak şekilde her bir PCR tüpü için; 5 µl 10x buffer, 6µl MgCl, 2µl dNTP, her bir primer den 2µl, 0.3µl taq DNA polimeraz enzimi ve son olarak 3µl DNA template konularak 10 saniye vortekslenip, 15 saniye santrifüj (düşük hızda) edilerek amplifikasyon aşamasına geçilmiştir.

Amplifikasyon işleminde GeneAmp 9700 PCR System (PE Applied Biosystem Inc., US) 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 siklus ve son olarak 72 °C de 10 dakika olarak uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünü, restriksiyon işlemi için +4 °C de saklanmıştır.

c. RFLP

Restriksiyon işlemi için XhoI (Fermantas, Thermo Fischer Scientific Inc., US) enzimi kullanılmıştır. Enzimin etki gösterdiği gen bölgesi 5'...C ↓ T C G A G...3'; 3'...G A G C T ↑ C...5' idi. 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. Her bir eppendorf tüpüne 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.

d. Ürün Görüntüleme

Görüntüleme işleminde kapiller jel elektroforez

kit (QIAxcel DNA Screening KIT, Qiagen Germany) kullanılmıştır. Restriksiyon işlemine tabi tutulmuş DNA örnekleri tek tek kapillere yüklenip ve elektrik akımına tabi tutulmuştur. Moleküllerin hareketi florasan dedektörler tarafından tespit edilmiştir. Çoklu dedektörler yayım sinyallerini elektronik sinyallere çevirip software eşliğinde veri görüntüsü, jel görüntüsü almak üzere bilgisayara aktarılmıştır.

e. 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.

BULGULAR

Çalışmamızda değerlendirmeye aldığımız 75 hastanın 46 tanesi erkek (% 61.3), 29 tanesi kadın (% 38.7) olarak bulunmuştur. Olgular 2-50 yaşları arasında olup yaş ortalaması 13. 8 olarak bulunmuştur.

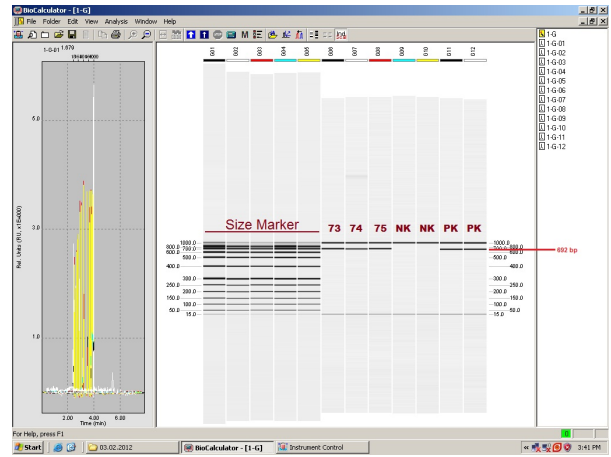
Olgular mikroskopik olarak incelendiğinde 75 olgunun 75'inde de giardia kist formu izlenmiş, trofozoit formuna rastlanmamıştır. Çalışmadaki 75 hastanın 69 (%92)' unda semptom mevcut olup, 6 (%2) 'sında herhangi bir semptom belirtilmemiştir. Semptomatik hastaların hemen hemen tamamında semptom olarak ishal ve karın ağrısı bulunmakta olup bu semptomlara ek olarak bazı hastalarda anemi, ateş ve allerjik reaksiyonlar da eşlik ettiği belirtilmiştir (**Tablo.1**).

Tablo 1. Giardia kist pozitif bulunan hastalarda semptom ve bulguların dağılımı

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

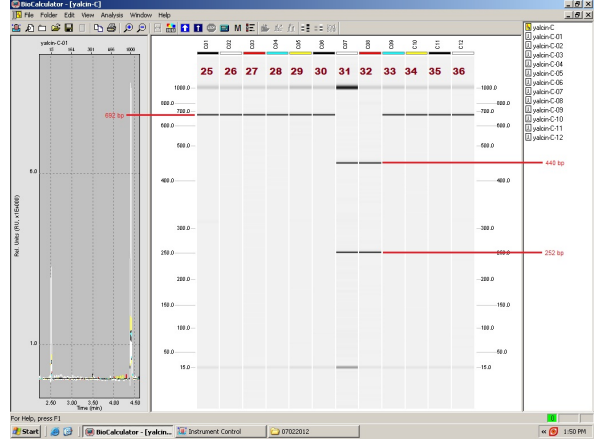
Giardiasis tanısı almış 75 hastaya ait dışkı örneklerinin TPI gen lokusu hedef alınmış ve ilgili gen bölgesi tüm örneklerde 692 bp büyüklüğünde görüntülenmiştir (**Şekil.1**).

RFLP basamağında tüm örnekler XhoI enzimi ile



Şekil 1. Kapiller jel elektroforez PCR amplifikasyon görüntüsü

muamele edilmiş ve 8 örnekte 440 bp ve 252 bp'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.2**).



Şekil 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.2). Olguların genotiplerine göre dağılımında ise istatistiksel olarak Tip A oranı anlamlı olarak ($p < 0.05$) daha fazla bulunmuştur.

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.2**). Semptomatik olgularla Tip A genotipi arasında ve asemptomatik olgularla Tip B genotipi arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur.

Tablo 2. Olguların PCR-RFLP çalışmasında elde edilen genotiplerine, semptomatik ve asemptomatik hastalara göre dağılımı

	Semptomatik n=69 (%92)	Asemptomatik n=6 (%8)	Toplam n=75 (%100)
Genotip A	67 (%89.3)	0	67 (%89.3)
Genotip B	2(%2.7)	6(%8)	8 (%10.7)

TARTIŞMA

Bir protozoon olan *G. intestinalis*'in neden olduğu hastalığa giardiasis denir. 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 yayılım 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 (7,8). 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 sosyo ekonomik koşullar olduğu sonucuna varılmıştır (9,10,11,12). Farklı coğrafik bölgelerde yaşayan insanlardan izole edilen binden fazla dışkı örneğinden PCR ile elde edilen DNA'nın incelenmesi sonucunda *G. intestinalis*' in A ve B tiplerinin insan enfeksiyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *G. intestinalis* 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. *G. intestinalis*'in ge-

notiplendirilmesi gerçekleştirilmiş, sonuçların semptomlarla ilişkisi araştırılmış ve saptanan A ve B gruplarından birer örneğin DNA dizisi belirlenmiştir (13,14,15).

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 Xho I enzimi kullanmışlardır. Olguların 12' sinde 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 (16). 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 yaptıkları bir çalışmada ise giardia pozitif dışkı örneklerinde *G.intestinalis*'in iki genotipinin semptomlarla ilişkisini araştırmayı hedeflemişlerdir. Bunun için 35 örnek SYBR Green qPCR ile amplifiye edilmiş BsrBI ile restriksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Örneklerin 26' sında Tip B, 7 tanesinin tip A olduğunu belirtmişlerdir (17). Bizim çalışmamızda ise 75 örneğin 67 tanesi Tip A, 8 tanesi 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 işlemi enzim olarak RsaI kullandıklarını belirtmişlerdir. Tüm örneklerin 31 tanesinde Tip A (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 (18). Çalışmamızda tespit edilen Tip A olgularının tamamı semptomatik, Tip B 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. Bu uyumsuzluğun Seçilen hasta gruplarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. 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 araştırmayı hedeflemiş ve restriksiyon enzimi olarak XhoI kullanılmışlardır. Toplam 12 hastadan 6 tanesinde şiddetli diare izlenirken, 6 tanesinde semptomla rastlanmamışlardır. Yapılan çalışmada 6 tane semptomatik olgunun 4 tanesinde Tip A, 2 tanesinde Tip B bulunmuşlardır. Asemptomatik olan 6 olgunun 5 tanesinde Tip B, 1 tanesinde Tip A genotipi bulunmuşlardır. Yapılan çalışmadaki örnek sayısının az olması nedeniyle semptomla grup ilişkilendirilmesinin anlamlı sonuç vermediği kanaatine varmışlardır (19). 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 ve PCR-RFLP çalışmasında GDH gen lokusu hedeflenerek seminested PCR uygulamıştır. Örneklerden 12 tanesi 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 (20).

Bertrand ve arkadaşlarının Fransa'da yaptığı bir çalışmada iki farklı gen bölgesi hedeflenerek 26 giardia kist pozitif dışkı örneği incelenmiştir. TPI gen lokusu hedeflendiğinde 26 örneğin 25'i, GDH gen lokusu hedeflendiğinde 21 tanesinin amplifiye olduğunu gözlemlenmişlerdir. RFLP işleminde enzim olarak RsaI ve NlaIV

kullanmışlar ve bu işlemlerin sonucunda 9 tane genotip A, 16 tane genotip B bulunmuşlardır. Gen lokusu olarak TPI gen lokusunun hedeflendiği çalışmanın daha verimli olduğunu belirtmişlerdir (21).

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 incelenmiştir. 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. Asemptomatik 24 olgunun 22'sinde (%91.6) Tip B, 20 semptomatik olgunun 3'ünde Tip B bulunmuş ve semptomlarla grup A'nın ilişkili olduğu kanaatine varmışlardır (22). 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 olarak seçilen hasta grubundaki farklılık 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 edilmiştir. Bunlardan 17 tanesi genotip A, 13 tanesi genotip B olarak bulunmuştur (23). 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 (24). 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. Bu uyumsuzluğun etnik köken ve çevresel faktörlerin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

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 (25). 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 (26). 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 enzimi seçmişlerdir. Çalışmanın sonucunda diare semptomlu 50 hastanın % 80'inde Tip B, asemptomatik 51 hastanın ise % 94'ünde genotip A tespit etmişlerdir (27). 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 BsrI enzimleri kullanmış olup, 7 örnek Genotip B (BIII, BIV), 3 örnek Genotip A (All) olarak bulunmuştur (28). 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 genotipleri arasında bir korelasyon olduğunu bulmuşlardır. 5 yaş altı olgularda semptomatiklerde genotip A, asemptomatiklerde genotip B arasında anlamlı bir ilişki tespit etmişlerdir (29). 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 (30). Yaptığımız çalışmada da bu çalışmayla uyumlu olarak sempto-

matik olgularla Tip A, asemptomatik olgularla Tip B arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

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.

KAYNAKLAR

- Özcel MA, Üner A. "Giardiasis"; Daldal N, Özensoy S. Giardia intestinalis'in morfolojisi ve evrimi. Türkiye Parazitoloji Derneği 1997;14:1-16.
- Sheffield HG, Bjorvatn B. Ultrastructure of the cyst of Giardia lamblia. Am J Trop Med Hyg. 1976; 26(1):23-30.
- 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. ÜK. 1994; ISBN: 0851988407, 3-13.
- 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, 1992;22(2):195-202.
- Hoque ME, Hope VT, Scragg R, Kjellstrom T, Lay-Yee K. Nappy handling and risk of giardiasis. Lancet. 2001;31(3):1017-8.
- Smith JM, Wolfe MS. Giardiasis. Ann Rev Med, 1980;31:373-383.
- Farthing MJ. Giardiasis. Gastrointestinal Clin North Am, 1996;25(3):493-515.
- Buret A, Hardin J A, Olson HE, Gall DG. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with Giardia latnbli. Gastroenterology, 1992;103(2):506-513.
- Kocazeybek B. Özel bir hastanede akut gastrointestinal enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların prevalansının araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 2001;31(1-2):69-72.
- Gürer Ü. S., Adalati, K., Gürbüz, B. Bağırsak parazitlerinin direkt ve çöktürme yöntemleri ile karşılaştırmalı incelenmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 2001;31(3-4):280-284.
- Küçükateş E, Kocazeybek B, Çakan H, Mutlu H. Dışkı örneklerinin parazitolojik inceleme sonuçları, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 2002;32(3-4):250-252.
- Küçükateş E, Kocazeybek B, Çakan H, Mutlu H. Dışkı örneklerinin parazitolojik inceleme sonuçları, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 2002;32(3-4):250-252.
- Amar C.F, Dear P. H, Pedraza-Diaz S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of Giardia duodenalis in human feces. J Clin Microbiol 2002;40,446-452.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan Giardia intestinalis. Molecular Biology and Evolution 1999;16:1135-1144.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species Giardia intestinalis and its relationship to host origin. Infection, Genetics and Evolution 2003;3:29-38.
- M.C. Sousa. Genotyping of Giardia lamblia Human Isolates from Portugal by PCR-RFLP and Sequencing, J. Eukaryot. Microbio. 2006;53(S1):174-176
- Anjana Singh. Giardia intestinalis Assemblages A and B Infections in Nepal Am.J.Trop.Med.Hyg., 2009;81(3):538-539
- Moshira M.F. Real-Time PCR/RFLP assay to detect Giardia intestinalis genotypes in human isolates with diarrhea in Egypt J.Parasitol. 2009;95(4):1-5.
- Samuelson. Giardia lamblia Groups A and B Among Young Adults in India Clinical Infectious Diseases 1998;26(1):190-191
- Supawat Ratanapo. Multiple Modes of Transmission of Giardiasis in Primary Schoolchildren of a Rural Community, Thailand Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008;78(4):611-615
- 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, 2005;11:5940-5944
- Ahmet F.Aydın. Classification of Giardia duodenalis parasites in Turkey into Groups A and B using restriction fragment length polymorphism. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2004;50:147-151
- Esmael Fallah. Genetic Characterization of Giardia intestinalis Strains from Patients Having Sporadic Giardiasis by Usig PCR Assay. Short Communication J.Med.Sci. 2008; 8(3): 310-315
- J.A.D.L Yason. Genotyping Giardia duodenalis isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. Parasito Res. 2007;101:681-687
- Tesfaye Gelanew. Molecular characterization of human isolates of Giardia duodenalis from Ethiopia Acta Tropica 2007;102:92-99
- Anchalee Tungtrongchitr. Giardia intestinalis in Thailand: Identification of Genotypes. J Health Popul Nutr. 2010;28(1):42-52
- 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. 2009;80(1):16-19.
- Boontanom, P. Epidemiology of giardiasis and genotypic characterization of Giardia duodenalis in preschool children of a rural community, central Thailand. Tropical Biomedicine. 2011;28(1):32-39.

29. Sahagun J. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. Abstract Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008;27(1):81-83.

30. Perez-Cordon G. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. Parasitol Res 2008;103(2):459-465.