

Giardia intestinalis Genotiplerinin, Real-Time PCR Yöntemi ile Dışkı Örneklerinden Belirlenmesi

Mehmet DEMİRCİ*[Ⓜ], Akın YİĞİN**[Ⓜ], Cemil DEMİR***[Ⓜ], Düriye Pelin ACEL****[Ⓜ]

*Beykent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

**Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa

***Mardin Artuklu Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Mardin

****Gaziantep Üniversitesi, Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Gaziantep

ÖZ

Amaç: Giardia intestinalis flagellalı, Giardiyaz'a neden olan bir protozoonundur ve dünya çapında önemli bir sorundur. Moleküler yöntemlerle sekiz farklı genotipi saptanan G. intestinalis'de, A ve B genotipinin, insan ve memelilerde hastalıklarla ilişkili olduğu ve farklı genotiplerin, farklı klinik tablolar meydana getirebildiği bildirilmektedir. Biz de bu bilgiler ışığında, giardiyaz tanısı almış ve G. intestinalis pozitif saptanan dışkı örneklerinde bulunan G. intestinalis genotiplerinin dağılımını real-time PCR yöntemi ile belirlemeyi ve moleküler epidemiyolojik bir veri sunmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Ocak 2016-Ocak 2018 tarihleri arasında, hem nativ hem de lugol ile mikroskopik olarak incelenen dışkı örnekleri içinde G. intestinalis kist ve/veya trofozoit'i pozitif bulunan 50 G. intestinalis pozitif hastanın dışkı numuneleri çalışmaya dâhil edildi. Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra genotip A ve genotip B için spesifik primerler kullanılarak real-time PCR ile analiz edildi.

Bulgular: Çalışmamıza dâhil edilen 50 giardiyaz tanılı hastanın dışkı örneklerinde, 28'inde (%56) A genotipi saptanırken, 17'sinde (%34) B genotipi, 5'inde (%10) ise hem A, hem de B genotipi bulundu. Cinsiyete göre saptanan genotipler incelendiğinde, erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla 25 (%50) ve 25 (%50) olarak bulundu.

Sonuç: Sonuç olarak, çalışmamız ile ülkemizde giardiyaza neden olan ama ayrımı yalnızca moleküler yöntemlerle ortaya konabilen G. intestinalis genotipleri incelenerek, G. intestinalis'in A genotipinin, B genotipine oranla biraz daha fazla olduğu belirlendi. Ülkemizde G. intestinalis'in moleküler epidemiyolojisine yönelik veriler sınırlıdır. Bu çalışmanın buna katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Giardia intestinalis, genotip, real-time PCR

ABSTRACT

Determination of Giardia intestinalis Genotypes in Stool Specimens by Real-Time PCR Method

Objective: As a causative agent giardiasis, Giardia intestinalis is a flagellated protozoa, and it is a major problem worldwide. Eight different genotypes have been identified in G. intestinalis by molecular method. It has been reported that the genotypes A and B are related to diseases in human and mammals and different genotypes cause different clinical pictures. In this study, we aimed to determine the distribution of G. intestinalis genotypes in stool specimens of G. intestinalis positive patients by real-time PCR and to present a molecular epidemiological data.

Material and Methods: Between January 2016 and January 2018, stool samples from fifty G. intestinalis cyst and / or trophozoite positive patients were included in the study. Native and lugol-treated stool specimens were microscopically examined. DNA isolation from stool specimens was performed and then analyzed by real-time PCR using specific primers for genotypes A and B.

Results: In stool samples of fifty patients with diagnosis of giardiasis included in our study, genotype A (n=28: 56%), genotype B (n=17: 34%) and both genotype A and genotype B (n=5: 10%) were detected. These genotypes were found in 25 (50%) male, and 25 (50%) female patients.

Conclusion: In conclusion, we investigated G. intestinalis genotypes which cause giardiasis in our country but these genotypes can only be distinguished by molecular methods. We found that G. intestinalis genotype A is slightly more frequent than genotype B. In our country, the data on the molecular epidemiology of G. intestinalis genotypes are very limited. We believe this work will contribute to this.

Keywords: Giardia intestinalis, assemblages, real-time PCR

Alındığı tarih: 06.06.2018

Kabul tarihi: 24.06.2018

Yazarların ORCID bilgileri:

Mehmet Demirci 0000-0001-9670-2426 Akın Yiğit 0000-0001-9758-1697

Cemil Demir 0000-0002-6365-0196 Düriye Pelin Acel 0000-0001-5792-2792

GİRİŞ

Giardia intestinalis (*G. intestinalis* ile eşanamlı *Giardia duodenalis* ve *Giardia lamblia*) flagellalı, giardiyaza neden olan bir protozondur⁽¹⁾. Viral ve bakteriyel olmayan ishallerin başlıca nedeni olan giardiyaz, dünya çapında önemli bir sorundur ve her yıl dünya çapında 280 milyon yeni olgu görülmektedir⁽²⁾. Giardiyaz, 200 milyon kişinin asemptomatik taşıyıcı olarak düşünüldüğü ve her yıl yaklaşık 500.000 yeni olgunun görüldüğü Asya, Afrika ve Latin Amerika gibi bölgelerde 2004 yılından beri Dünya Sağlık Örgütü tarafından ihmal edilen hastalık girişimine dâhil edilmiştir⁽²⁾. Giardiyaza neden olan *G. intestinalis* türü üyelerinin morfolojik olarak hemen hemen özdeş olduğu ancak protein veya DNA polimorfizmlerine dayanan moleküler yöntemlerle incelendiğinde en az sekiz farklı genotipinin (A-H) olduğu bilinmektedir⁽³⁾. Bu sekiz genotip'ten A ve B genotipinin, insan ve memelilerde hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilirken, köpek cinslerinde C ve D, geviş getiren hayvanlarda E, kedilerde F, kemirgenlerde G ve deniz memelilerinde H genotipinin görüldüğü bilinmektedir. C-H genotiplerinin sıklıkla konak spesifik olduğu düşünülmektedir. C-H genotiplerinin insanlarda zoonotik etkileri net değildir⁽⁴⁾. Fakat A genotipi ile gelişen ishal olgularının, B genotipine göre daha şiddetli olduğu bildirilmektedir⁽⁵⁾. Klasik yöntemlerle bu tiplerin belirlenmesi olası değildir. Ayrıca polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler tekniklerin hassasiyeti, mikroskop gibi klasik yöntemlere göre daha iyidir. Bu da özellikle dışkı örnekleri gibi düşük sayıdaki parazitlerin bulunduğu numunelerde bu parazitin saptanmasında ve genotipinin belirlenmesinde büyük yarar sağlar⁽⁶⁾. Gerçek zamanlı PZR (real-time PCR) özellikle farklı tiplerin numune içerisinde aynı anda bulunması durumunda, PCR yöntemine göre daha güvenilir ve daha doğru sonuçlar sunabilen bir moleküler yöntemdir⁽⁷⁾. A ve B genotipinde bildirildiği gibi farklı genotiplerle gelişen, giar-

dia enfeksiyonlarında, farklı klinik tabloların gözlenmesi, *G. intestinalis* genotip gruplarının farklı patojenik özelliklere sahip olabileceğini ve bunların ayrımının yapılmasının kliniğe tedavi açısından yarar sağlayabileceğini düşündürmektedir. Ülkemizde *G. intestinalis*'in prevalansı ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına karşın⁽⁸⁾, *G. intestinalis*'in moleküler epidemiyolojisine yönelik veriler sınırlıdır. Biz de bu çalışma ile giardiyaz tanısı almış ve *G. intestinalis* pozitif saptanan dışkı örneklerinde bulunan *G. intestinalis* genotiplerinin dağılımını real-time PCR yöntemi ile belirlemeyi ve moleküler epidemiyolojik bir veri sunmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2016-Ocak 2018 tarihleri arasında hastaneye başvuran giardiyaz şüpheli semptomatik hastaların dışkı örnekleri dâhil edildi. Hem nativ hem de lugol ile mikroskopik olarak incelenen dışkı örnekleri içinde *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoit'i pozitif bulunan 50 *G. intestinalis* pozitif hastanın dışkı numuneleri çalışmaya dahil edilmek üzere saklandı. Tüm dışkı örnekleri DNA izolasyonuna alınmaya kadar -20°C'da saklandı. Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu, QIAamp DNA stoolmini test kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi⁽⁹⁾. DNA örnekleri real-time PCR işlemlerine kadar -20°C'da saklandı.

DNA'lardan *G. intestinalis* genotiplerinin belirlenmesi için genotiplere spesifik primerler kullanıldı. A genotipi için translasyon başlatma faktörü geni (Tif-Gen ID: GL50803 39587), B genotipi için cathepsin L prekürsör genine (Cath-Gen ID: GL50581 3714) özgün primerler seçildi⁽⁷⁾ ve primerler IDT (Integrated DNA Technologies inc, Coraville, IA, Amerika) firmasından sağlandı.

Real-time PCR işlemlerinde LightCycler 480

SybrGreen I master kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kiti üretici direktifleri doğrultusunda kullanıldı. Her bir reaksiyonda, 0.3 nmol primer kullanıldı ve toplam 20 µl hacimde çalışma gerçekleştirildi. Real-time PCR reaksiyonları için LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) sistemi üretici direktifleri doğrultusunda kullanıldı. Real-time PCR reaksiyonu 95°C'da 5 dk. denatürasyonu takiben, 45 döngülük çoğaltma programında 95°C'da 10 sn, 55°C'da 20 sn ve 72°C'da 15 sn olacak şekilde gerçekleştirildi. 72°C'da veri toplandı. Reaksiyonlarda özgün PCR ürünleri olduğunu kontrol edebilmek amacıyla çoğaltma programını takiben erime eğrisi programı uygulandı, bunun için 95°C'da 5 sn, 60°C'da 1 dak. ve 97°C'da sürekli floresan toplama şeklinde program oluşturuldu.

BULGULAR

Çalışmamıza dâhil edilen 50 giardiyaz tanılı

hastanın dışkı örneklerinin retrospektif olarak demografik verileri incelendiğinde, bunların 1 ile 54 yaş arasında olduğu yaş ortalamasının 14.42 olduğu görüldü. Bu dışkı örneklerinden yapılan tif ve cath genleri real-time PCR çalışmaları sonrasında 28'inde (%56) A genotipi saptanırken, 17'sinde (%34) B genotipi ve 5'inde (%10) hem A hem de B genotipi bulundu. Cinsiyete göre saptanan genotipler incelendiğinde, erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla 25 (%50) ve 25 (%50) olarak bulundu (Tablo 2).

Yaş gruplarına ait veriler incelendiğinde, 0-9 ve 10-19 yaş grubunun çalışmadaki dışkı örneklerinin %78'ini oluşturduğu ve A genotipinin 18 (%36) ve B genotipinde 16 (%32) oranında olduğu saptanırken, ilerleyen yaşlarda hemen hemen tüm örneklerde yalnızca A genotipinin saptandığı gözlemlendi. Cinsiyet açısından bakıldığında, genotiplerin erkek ve kadınlarda eşit dağılım gösterdiği görülmektedir (Tablo 2).

Tablo 1. Real-time PCR'da kullanılan primer dizileri ve özellikleri⁽⁷⁾.

Primer Adı	Dizi	Gen ID	Amplikon Büyüklüğü (bp)	Erime Sıcaklığı
TIF Ass. A F	5' AGAAGTGCCTGGACTGGGTCT 3'	GL50803_39587	168	87.8
TIF Ass. A R	5' CGTGAATTGCAATCGTTAAAC 3'			
CATH Ass. B F	5' GCGATTTCCGCGGAAGGTTGT 3'	GL50581_3714	99	81.2
CATH Ass. B R	5' AGAGGCATCATAAACATAAACC 3'			

Tablo 2. Yaş gruplarına ve cinsiyete göre hastalarda saptanan A, B ve AB genotiplerinin dağılımı n (%).

	<i>Giardia intestinalis</i> genotipi			
	A	B	AB	Toplam
Yaş grubu (ortalama ± SD)				
1-9 (5.24±2.83)	11 (22)	10 (20)	4 (8)	25 (50)
10-19 (14±3.05)	7 (14)	6 (12)	1 (2)	14 (28)
20-29 (24.6±2.87)	2 (4)	1 (2)	0 (0)	3 (6)
30-39 (34.8±2.79)	5 (10)	0 (0)	0 (0)	5 (10)
>40 (48.7±4.11)	3 (6)	0 (0)	0 (0)	3 (6)
Toplam (14.42±13.01)	28 (56)	17 (34)	5 (10)	50 (100)
Cinsiyet				
Erkek	14 (28)	9 (18)	2 (4)	25 (50)
Kadın	14 (28)	8 (16)	3 (6)	25 (50)

TARTIŞMA

Giardiyaz, dünya çapında insanlarda en yaygın bağırsak parazit hastalıklarından birisi olarak kabul edilir ve bu enfeksiyon özellikle çocuklar üzerinde güçlü bir klinik etkiye sahiptir⁽¹⁰⁾. Ülkemizde *G. intestinalis*'in prevalansı ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına karşın^(8,11), *G. intestinalis*'in moleküler epidemiyolojisine yönelik veriler sınırlıdır. Morfolojik açıdan benzer olmalarına rağmen, *G. intestinalis*'in moleküler yöntemlerle sekiz farklı genotipi tanımlanmıştır ve özellikle A ve B genotipinin, insan ve memelilerde hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmektedir⁽¹²⁾. Patojenitelerinin farklılığı kaynaklı, farklı klinik tablolar oluşturabilen bu genotiplerinin hızlı ve doğru tanısının yapılması bu nedenle önemlidir. Yurtdışında yapılan çalışmalar incelendiğinde, Jerez Puebla ve ark.'nın⁽¹⁰⁾, 2017 yılında Küba'da çocuklarda yaptıkları bir çalışmada, semptomatik hastaların 24'ünde B, 10'unda A ve yedisinde AB genotiplerini saptadıkları görülmektedir. Yine aynı çalışmada, semptomatik ve asemptomatik çocuklarda cinsiyetlere göre genotiplerinin durumu incelendiğinde, erkek çocuklarında sırasıyla 13, 17 ve 7 olarak, kız çocuklarında ise 4, 14 ve 7 olarak A, B ve AB genotipleri bildirilmiştir. Mbae ve ark.'nın⁽¹³⁾ 2016 yılında Kenya'da çocuklarda yaptıkları bir çalışmada, 72 *G. intestinalis* pozitif örneğin iki tanesinde A, 64'ünde B ve 7'sinde AB genotipleri bildirilmektedir. Yine aynı çalışmada, semptomatik çocuklarda cinsiyetlere göre genotiplerinin durumu incelendiğinde, erkek çocuklarında sırasıyla 1, 39 ve 4 olarak, kız çocuklarında ise 0, 25 ve 3 olarak A, B ve AB genotiplerini bildirilmişlerdir⁽¹³⁾. Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada, semptomatik olan ve olmayan tüm çocuklardan elde edilen 40 *G. intestinalis* kökeninin 23 tanesinin A, 15 tanesinin ise B genotipinde olduğu bildirilirken, semptomatik olan çocukların yalnızca 7'sinde A genotipinin olduğu belirtilirken, B genotipi saptanan 15 çocuğun tamamının semptomatik oldu-

ğu saptanmıştır⁽¹⁴⁾. Minetti ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ İngiltere'de 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada, kökenlerin %64'ünü genotip B, %36'sını da genotip A olarak bildirmişlerdir. Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde, Tamer ve ark.⁽¹⁶⁾, 2015 yılında çocuklarda yaptıkları çalışmalarında, sırasıyla A, B ve AB genotipini semptomatik çocuklarda 8, 2 ve 3 olarak asemptomatik çocuklarda ise 3, 5 ve 1 olarak bildirmişlerdir. Çiçek ve Şakru⁽¹⁷⁾, 2015 yılında yaptıkları çalışmalarında, 17 örneğin dokuzunu genotip A, sekizini genotip B olarak bildirmişlerdir. Ertuğ ve ark.⁽¹⁸⁾, 2016 yılında yaptıkları çalışmada, 10 *G. intestinalis* kökeninin sekizinin A ve ikisinin B genotipinde olduğunu görülmektedir. Vurupalmaz ve Öter'in⁽⁵⁾ 2016 yılında yaptıkları çalışmalarında, 69 *G. intestinalis* kökeninin 67'sinin genotip A saptandığı, yalnızca 2'sinin genotip B olduğu belirtilmiştir. Balcıoğlu ve ark.'nın⁽¹⁹⁾ 2012 yılında, farklı yaş gruplarında yaptıkları çalışmalarında, sırasıyla A ve B genotipini 38 ve 16 olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. Ulusal ve uluslararası yapılan bu çalışmaların sonuçları genel olarak incelendiğinde farklı ülkelerde, farklı genotiplerle karşılaşıldığı bazı ülkelerde A, bazı ülkelerde de B genotipinin baskın olduğu ama ülkemizde dahi verilerin değişkenlik gösterebildiği görülmektedir. Sonuçlarımız ülkemizdeki sonuçlarla genel olarak A genotipi yoğunluğunun fazla oluşu açısından benzerlik gösterirken, yurtdışında tartışmaya aldığımız uluslararası çalışmalara göre B genotipinin az oluşu yönüyle fark içermektedir. Bunun nedeninin yukarıda da düşündüğümüz gibi özellikle *G. intestinalis* genotiplerinin ülkeden ülkeye farklılık gösterebilmesi kaynaklıdır. Çalışmamızda yer verilmemesine karşın farklı çalışmalarda, *G. intestinalis* genotiplerinin farklı klinik tablolar meydana getirebildiği görülmektedir^(9,19). Bu nedenle kliniğe veri sağlaması açısından morfolojik olarak mikroskop altında ayırt edilemeyen bu parazitin genotiplerinin çalışmamızda kullanılan real-time PCR gibi moleküler yöntemlerle hızlı belirlenmesi değerlidir.

Sonuç olarak, çalışmamız ile ülkemizde giardiya neden olan genotipler ortaya konulmakta, A ve B genotipinin çocuklarda semptomatik olgularda birbirine yakın oranlarda gözlemlendiği ama ilerleyen yaş gruplarında genotip A'nın daha yaygın olduğu görülmektedir. Ülkemizde *G. intestinalis*'in prevalansı ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına karşın, *G. intestinalis*'in moleküler epidemiyolojisine yönelik veriler sınırlıdır ve bu çalışmanın epidemiyolojik olarak katkı sağlayacağı ve ülkeden ülkeye değişim gösterebilen genotip dağılımını anımsatmayı sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Lloyd D, Harris JC, Maroulis S, et al. The "primitive" microaerophile *Giardia intestinalis* (syn. *lamblia*, *duodenalis*) has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating functions. *Microbiology*. 2002;148(5):1349-54. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-5-1349>
2. Vanni I, Cacciò SM, van Lith L, et al. Detection of *Giardia duodenalis* assemblages A and B in human feces by simple, assemblage-specific PCR assays. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8):e1776. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001776>
3. Thompson RC, Monis P. *Giardia*-from genome to proteome. *Adv Parasitol*. 2012;78:57-95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394303-3.00003-7>
4. Helmy YA, Spierling NG, Schmidt S, et al. Occurrence and distribution of *Giardia* species in wild rodents in Germany. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):213. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2802-z>
5. Vurupalmaz Y, Öter V. Giardiasis tanılı hastaların dışkı örneklerinde TPI gen lokusu hedeflenerek *G. intestinalis* genotiplerinin PCR-RFLP yöntemiyle araştırılması. *Kocatepe Tıp Derg*. 2016;17(4):109-17. <https://doi.org/10.18229/kocatepetip.289092>
6. Guy RA, Xiao C, Horgen PA. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2004;42(7):3317-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3317-3320.2004>
7. Van Lith L, Šoba B, Vizcaino VV, et al. A real-time assemblage-specific PCR assay for the detection of *Giardia duodenalis* assemblages A, B and E in fecal samples. *Vet Parasitol*. 2015;30;211(1-2):28-34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.017>
8. Kirkoyun Uysal H, Akgül O, Purisa S, Oner YA. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 25 yıllık intestinal parazit prevalansı: Retrospektif bir çalışma. *Türkiye Parazit Derg*. 2014;38(2):97-101. <https://doi.org/10.5152/tpd.2014.3327>
9. Minetti C, Taweanan W, Hogg R, et al. Occurrence and diversity of *Giardia duodenalis* assemblages in livestock in the UK. *Transbound Emerg Dis*. 2014;61(6):e60-7. <https://doi.org/10.1111/tbed.12075>
10. Jerez Puebla LE, Núñez FA, Santos LP, et al. Molecular analysis of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children from La Habana, Cuba. *Parasite Epidemiol Control*. 2017;24;2(3):105-13. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2017.05.003>
11. Okyay P, Ertug S, Gultekin B, Onen O, Beser E. Intestinal parasites prevalence and related factors in school children, a western city sample-Turkey. *BMC Public Health*. 2004;4:64. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-4-64>
12. Plutzer J, Lassen B, Jokelainen P, et al. Review of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the eastern part of Europe, 2016. *Euro Surveill*. 2018;23(4):16-00825. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.16-00825>
13. Mbae C, Mulinge E, Guleid F, et al. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children in Kenya. *BMC Infect Dis*. 2016;16:135. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1436-z>
14. Al-Mohammed HI. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitol Res*. 2011;108(6):1375-81. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2033-5>
15. Minetti C, Lamden K, Durband C, Cheesbrough J, Fox A, Wastling JM. Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. *Parasit Vectors*. 2015;8:444. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1059-z>
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. <https://doi.org/10.12659/MSM.892318>
17. Çiçek C, Şakru N. Trakya Bölgesi'ndeki *Giardia intestinalis* izolatlarının genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2015;49(4):576-85. <https://doi.org/10.5578/mb.10107>
18. Ertuğ S, Ertabaklar H, Özlem Çalışkan S, Malatyalı E, Bozdoğan B. Aydın'da insanlardan izole edilen *Giardia intestinalis* suşlarının genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50(1):152-8. <https://doi.org/10.5578/mb.10387>
19. 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):A125-31. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2011.5968>