

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Studium prevalence *Giardia intestinalis*

Bakalářská práce

Kristýna Brožová

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Milan Jirků

České Budějovice 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Tato práce je součástí projektu, který byl posouzen Etickou komisí Biologického centra AV ČR v. v. i. v Českých Budějovicích jako eticky přípustný (číslo rozhodnutí 1/2017).

V Českých Budějovicích dne

Podpis.....

Brožová K., (2019): Studium prevalence *G. intestinalis* [Study of *G. intestinalis* prevalence. Bc. Thesis, in Czech] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The present project is focused on the study of a prevalence of the gut protist, *Giardia intestinalis*, in human and animal samples using two diagnostic approaches: (i) coproscopical diagnostics, specifically Sheather flotation technique, and (ii) PCR. First, three PCR protocols for different genes (triosephosphate isomerase, beta-giardin and small ribosomal subunit) were optimized by gradient PCR. Based on these result, the gene TPI was chosen as the best option for molecular diagnostics of *G. intestinalis* in the collected stool and fecal samples. *Giardia* was detected only in the animal samples (2/41, dog and rabbit samples), all the analysed human samples remained negative. Further, the TPI protocol showed low sensitivity for diagnostics of *G. intestinalis*.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce MVDr. Kateřině Jirků PhD. za trpělivost, cenné rady a připomínky. Velké díky patří také odbornému školiteli RNDr. Milanovi Jirků za jeho ochotu a odborné vedení mé práce. Velmi děkuji i Mgr. Kateřině Sobotkové Ph.D. za pomoc se psaním mé práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře parazitární terapie za pomoc a přátelské prostředí. Mé díky patří i Laboratoři veterinární a medicínské protistologie, za možnost využít jejich pracoviště. Moc bych chtěla poděkovat i mé rodině a přátelům za velkou podporu, motivaci a cenné rady.

Obsah

I. Úvod.....	1
1.1. Životní cyklus a morfologie <i>Giardia intestinalis</i>	2
1.2. Role <i>Giardia intestinalis</i> v lidském zdraví	3
1.2.1. Role <i>Giardia intestinalis</i>	3
1.2.2. Klinická manifestace giardiózy.....	3
1.2.3. Giardióza u imunosuprimovaných jedinců.....	5
1.3. Hostitelská specifita <i>Giardia intestinalis</i>	6
1.4. Diagnostické metody detekce.....	7
1.4.1. Koproskopické metody.....	7
1.4.2. Molekulárně diagnostické metody	8
1.4.3. Serologické metody.....	10
1.4.4. Srovnání citlivosti diagnostických metod pro detekci giardie.....	10
1.5. Terapie	10
II. Cíle.....	12
III. Materiál a metody	13
3.1. Sběr a zpracování vzorků.....	13
3.1.1. Sběr vzorků	14
3.1.2. Koproskopické vyšetření vzorků.....	14
3.2. Molekulární diagnostika.....	15
3.2.1. Izolace celkové DNA.....	15
3.2.2. PCR.....	15
3.2.3. Testování senzitivity primerů pro gen TPI.....	17
3.2.4. Gelová elektroforéza.....	17

3.2.5.	Izolace DNA z gelu.....	18
3.2.6.	Sekvenování PCR produktu	18
3.2.7.	Klonování.....	18
3.3.	Experimentální infekce zvířat.....	19
IV.	Výsledky	20
4.1.	Stanovení prevalence <i>Giardia intestinalis</i> pomocí koproskopický metod	20
4.2.	Stanovení prevalence <i>Giardia intestinalis</i> pomocí molekulární diagnostiky	20
4.2.1.	Optimalizace teploty nasedání primerů pro geny TPI, BG a SSU rRNA	21
4.2.2.	Výběr genu vhodného pro stanovení prevalence <i>G. intestinalis</i>	23
4.2.3.	Prevalence giardie stanovená pomocí nested PCR genu TPI	23
4.2.4.	Srovnání výsledků flotace a PCR genu TPI	24
4.2.5.	Testování senzitivity použitých primerů	24
4.3.	Experimentální infekce zvířat	25
V.	Diskuse.....	26
VI.	Závěr	33
VII.	Literatura	34

I. Úvod

Giardia intestinalis (také známa pod názvem *Giardia lamblia* nebo *Giardia duodenalis*) je kosmopolitně rozšířený střevní prvok. Kolonizuje tenké střevo především savců, včetně člověka (Volf a Horák, 2007). Je původcem onemocnění zvané giardióza. *Giardia intestinalis* je řazena do skupiny Excavata, kmene Fornicata, třídy Trepomonadea, řádu Diplomonadida a čeledi Giardiidae (Volf a Horák, 2007). Trofozoiti *G. intestinalis* byli poprvé objeveni Antoniem van Leeuwenhoekem v roce 1681 při vyšetřování jeho vlastní stolice (Dobell, 1920). Popsána byla až českým lékařem a profesorem Vilémem Dušanem Lamblem v roce 1859 (Lambl, 1859).

Tento prvok infikuje ročně kolem 280 miliónů lidí (např. Einarsson *et al.*, 2016). Prevalence giardie byla stanovena mezi 2 až 5 % populace v industrializovaných zemích. Naopak v rozvojových zemích je *G. intestinalis* rozšířena mnohem více, a to u 20 až 40 % populace (Abdullah *et al.*, 2016; Obr. 1).

Prevalence of <i>Giardia</i> worldwide			
Country	Area of study	Prevalence (%) reported	Reference
Bangladesh	ICDDR Hospital, Dhaka	0.37	Alam <i>et al.</i> (2013) ^[6]
Egypt	Damanhur city,	14.8	Hegazy <i>et al.</i> (2014) ^[26]
Ethiopia	NorthGondar,	41.9	Ayalew <i>et al.</i> (2011) ^[9]
Ghana	Kumasi,	0.2	Walana <i>et al.</i> (2014) ^[72]
Iraq	Abu-Malah & Harer, Basrah	45.16 & 18.7	Jarallah <i>et al.</i> (2012) ^[32]
Iraq	Kadhmiyah hospital, Baghdad	1.77	Ibrahim and Qays <i>et al.</i> (2012)
Iraq	Erbil/Kurdistan	13.13	Hama & Rahemo <i>et al.</i> (2014) ^[27]
Iran	Abyek, Qazvin	3.0	Akhlaghi <i>et al.</i> (2013) ^[8]
India	Aurangabad	55	Jain <i>et al.</i> (2015) ^[33]
India	Barabanki, UP	19.13	Chaudhary <i>et al.</i> (2012) ^[15]
	Buca, Cameroon	21.4	Mbuh <i>et al.</i> (2010) ^[48]
India	Chandigarh	7.96	Sehgal <i>et al.</i> (2010) ^[64]
India	Gujarat	5	Jethwa <i>et al.</i> (2015) ^[34]
Kenya	Thika District,	6.9	Ngonjo <i>et al.</i> (2012) ^[53]
Libya	Sebha Province	3.19	Bernawi <i>et al.</i> (2013) ^[13]
Malaysia	Inanam sabah	35.48	Mahsol <i>et al.</i> (2006) ^[46]
Mexico	Coacalco-de Berriozabal	18	Diaz <i>et al.</i> (2003) ^[17]
Nepal	Dadeldhura	7.47	Tiwari <i>et al.</i> (2013) ^[67]
Nepal	Dharan	6.8	Sah <i>et al.</i> (2013) ^[59]
Nigeria	Delta and Edo States	0.51 & 3.1	Omorodion <i>et al.</i> (2012) ^[55]
Oman	Dhahira	10.5	Patel <i>et al.</i> (2006) ^[57]
	Gaza, Palestine	10.3	Alhindi <i>et al.</i> (2008) ^[3]
Philippines	Metro Manila	11.6	Baldo <i>et al.</i> (2004) ^[11]
Pakistan	Muzaffarabad	11.8	Chaudhary <i>et al.</i> (2012) ^[15]
Pakistan	Quetta	32	Wadood <i>et al.</i> (2005) ^[71]
Rwanda	Kigali,	3.6	Emile <i>et al.</i> (2013) ^[20]
Thailand	Thai	1.56	Songsern <i>et al.</i> (2012) ^[66]
Tajikistan	Western	26.4	Matthys <i>et al.</i> (2011) ^[45]

Obr. 1: Prevalence *Giardia intestinalis* ve světě (převzato z publikace Abdullah *et al.*, 2016).

V USA je ročně giardií infikováno kolem 20 tisíc lidí (DuPont, 2013) a například v Malajsii se její prevalence pohybuje mezi 0,2 až 25 % (Lim *et al.*, 2008). Na obrázku 1 jsou uvedeny prevalenční studie z různých zemí.

V rozvojových zemích jsou nákazy *G. intestinalis* nejčastěji spojovány s kontaminovanou vodou a dále s nízkými hygienickými návyky. Dokonce se uvádí, že na venkově v rozvojových zemích jsou infikované téměř všechny děti, ačkoli většina z nich zůstává bez symptomů. Děti jsou infikovány častěji než dospělí pravděpodobně z důvodu nezralosti jejich imunitního systému (Ignatius *et al.*, 2012; Kotloff *et al.*, 2012). Symptomatické infekce *G. intestinalis* se často vyskytují i u pacientů s imunodeficiencí a imunokompromitovaných jedinců (Adamu *et al.*, 2013; Boaitay *et al.*, 2012; Oksenhendler *et al.*, 2008).

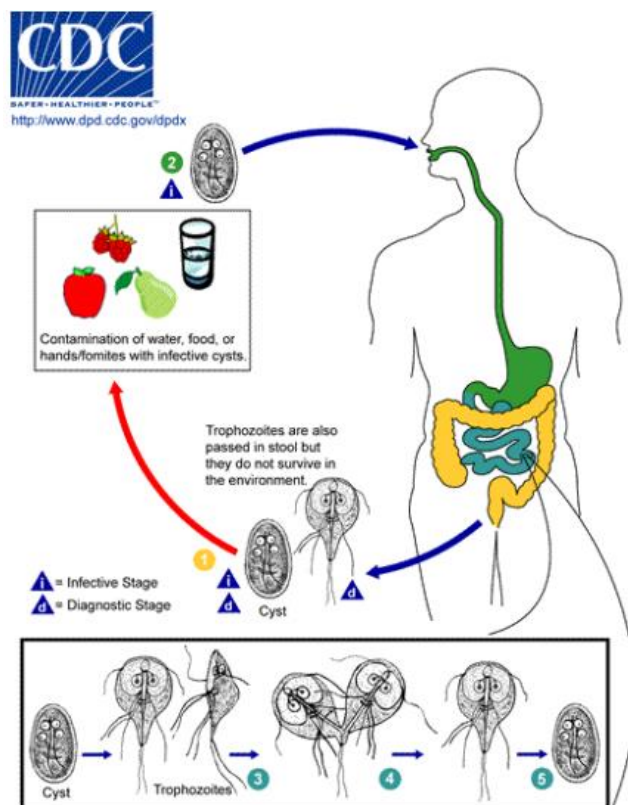
1.1. Životní cyklus a morfologie *Giardia intestinalis*

Životní cyklus *G. intestinalis* (Obr. 2) zahrnuje dvě stádia – bičíkatého trofozoita a cystu, tj. stádium zodpovědné za přenos mezi hostiteli. K infekci giardiemi stačí požití deset cyst (Rendtorff, 1954).

Trofozoiti jsou pohyblivá stádia giardií hruškovitého tvaru obsahující dvě jádra, osm bičíků a přichytný disk, díky kterému se přichytí na střevní epitel. Velikost trofozoita se pohybuje mezi 1 až 20 μm na délku a 6 až 16 μm na šířku. Cysty giardií mají oválný tvar, čtyři jádra a dokáží přežít v pitné vodě až několik měsíců. Velikost cyst dosahuje 8 až 12 μm na délku a 7 až 10 μm na šířku (Volf a Horák, 2007; Zajac a Conboy, 2012). Spolehlivým likvidátorem cyst giardií je teplo, v potravinách jsou spolehlivě inaktivovány během několika minut při teplotě 85 až 95 °C (Cacciò *et al.*, 2007; Taghi-Kilani *et al.*, 1996).

Zdrojem nákazy *G. intestinalis* je nejčastěji voda nebo potrava kontaminovaná výkaly obsahující cysty giardií. Po pozření nejprve cysty prochází žaludkem. K excystaci dochází v tenkém střevě, kdy se z jedné cysty uvolní dva trofozoiti. Trofozoiti se množí podélným dělením a zůstávají v lumenu tenkého střeva, kde se přichytí ke sliznici střeva pomocí přísavného disku (Bingham *et al.*, 1979; Erlandsen a Feely, 1984). Trofozoiti mohou kolonizovat tenké střevo týdny až roky (Fink a Singer, 2017). Encystace nastává při přechodu trofozoitů do tlustého střeva, a poté jsou cysty spolu se stolicí v nepravidelných intervalech vylučovány z těla hostitele ven a kontaminují životní prostředí (např. Graczyk *et al.*, 2007).

Cysty jsou infekční ihned po vyloučení z těla. Kromě toho bylo prokázáno, že cysty giardií přežívají ve vodě po dobu až dvou měsíců při teplotách nižších než 8 °C (Bingham *et al.*, 1979; Meyer a Jarroll, 1980).



Obr. 2: Životní cyklus *Giardia intestinalis*
(<https://www.cdc.gov/parasites/whipworm/biology.html>).

1.2. Role *Giardia intestinalis* v lidském zdraví

Ačkoliv je *Giardia intestinalis* původcem onemocnění zvaného giardióza, její role ve zdraví člověka není zcela jasná a je předmětem mnoha studií. Ukazuje se například, že by *G. intestinalis* mohla hrát významnou roli v mikrobiomu hostitele (např. Gerbaba *et al.*, 2015).

1.2.1. Role *Giardia intestinalis*

Giardie je řazena mezi oportunní patogeny. Za normálních okolností není pro člověka nebezpečná, ale za určitých podmínek (hlavně při snížení imunity) jsou schopny vyvolat

klinické onemocnění (např. Brown *et al.*, 2012). U zdravých lidí tedy může být komenzálem, ale může se chovat i jako patogen. Důležitými faktory, které přispívají k tomu, jestli je giardie komenzálem nebo patogenem, je její virulence, úroveň výživy, imunita a složení střevního mikrobiomu hostitele (DuPont, 2013; Fink and Singer, 2017; Singer a Nash, 2000).

Zejména o pozici, kterou *G. intestinalis* zaujímá ve střevním mikrobiomu se toho stále mnoho neví. Např. ve studii Barash *et al.* (2017) zjistili, že vlivem kolonizace tenkého střeva giardií dochází u myši k dysbióze aerobních a anaerobních komenzálních bakterií, která ale může být příčinou nebo důsledkem zánětlivých a metabolických změn ve střevě (Barash *et al.*, 2017). Naopak v několika studiích zabývajících se vlivem *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus* a jiných kmenů na průběh giardiózy zjistili, že tyto probiotické mikroorganismy jsou schopny giardiózu na několika úrovních inhibovat (Allain *et al.*, 2017; Shukla *et al.*, 2008).

Další experimentální studií zaměřenou na roli střevní mikroflóry hostitele během infekce giardií bylo nedávno použito jako hostitel háďátka obecné (*Caenorhabditis elegans*; Gerbaba *et al.*, 2015). Háďátka bylo inkubováno s komenzálními střevními bakteriemi (*Escherichia coli*) v přítomnosti i nepřítomnosti trofozoitů *G. intestinalis*. Samotná kolonizace giardií nebo *E. coli* neovlivnily životaschopnost červů, ale kombinace bakterie *E. coli* a *G. intestinalis* měla pro háďátka letální dopad. Závěrem tedy usoudili, že giardie změnila genovou expresi *E. coli*, čímž se z komenzální bakterie mohl stát oportunní patogen (Gerbaba *et al.*, 2015).

Studie Toro-Londono *et al.* (2019) navíc přispěla pozorováním, že přítomnost střevních helmintů (např. *Ascaris*) společně s giardií působí na diversitu střevní mikroflóry a pozitivně ovlivňuje rovnováhu přítomných bakteriálních komunit.

Interakce mezi *G. intestinalis* a střevní bakteriální mikroflórou tedy nejsou zcela jasné, ale začíná být zřejmé, že střevní mikrobiom bude v patogenitě giardií hrát zásadní roli (Allain *et al.*, 2017; Barash *et al.*, 2017; Beatty *et al.*, 2017; Keselman *et al.*, 2016). Změny v bakteriálním mikrobiomu by pak mohly souviset s obrovskou variabilitou, jakou na kolonizaci *G. intestinalis* hostitelé reagují (Barash *et al.*, 2017).

1.2.2. Klinická manifestace giardiózy

Uvádí se, že přibližně 60 % lidí infikovaných *G. intestinalis* zůstává asymptomatických. Pokud ale dochází k propuknutí giardiózy, první symptomy se projevují za šest až 15 dní po infekci (Ortega a Adam, 1997). Klinická giardióza se manifestuje silnými průjmy mastného vzhledu, úbytkem váhy, dehydratací, špatným stavem kůže či srsti, bolestmi břicha, nadýmáním a zvracením. Ve 20 až 40 % případů se projevuje také laktázový deficit (Minetti *et al.*, 2016). Giardióza zpravidla má krátkodobý charakter (DuPont, 2013), ale i po odeznění infekce se mohou objevit další komplikace, jako jsou syndrom dráždivého tračnicku, potravinové alergie, artritida a chronický únavový syndrom (Hanevik *et al.*, 2017; Mørch *et al.*, 2009; Wensaas *et al.*, 2012).

V průběhu klinické giardiózy dochází k omezenému vstřebávání bílkovin a tuků, tedy i v nich rozpustných vitamínů (A, D, E, K), které jsou důležité pro stav kůže a srsti (např. Abdullah *et al.*, 2016). Také dochází k omezenému vstřebávání zinku významného pro správnou funkci imunitního systému, čímž může docházet ke snížení odolnosti organismu vůči dalším infekcím při giardióze (Jendryczko *et al.*, 1993). Tyto a další nutriční nedostatky při dlouhodobém trvání mohou způsobit až poškození orgánů. V některých případech dokonce *G. intestinalis* osídlí i žlučník, čímž může vyvolat žloutenku a koliku (Ali a Hill, 2003; Abdullah *et al.*, 2016).

Pokud je infekci giardiemi vystaven zdravý jedinec poprvé, mohou se u něj projevit akutní symptomy giardiózy, při dalším vystavení giardií je hostitel většinou již bez symptomů s krátkodobou kolonizací (DuPont, 2013). Einarsson *et al.* (2016) navíc uvádí, že jedinci infikovaní giardií mohou být dokonce chráněni před jiným průjmovým onemocněním.

1.2.3. Giardióza u imunosuprimovaných jedinců

Ačkoliv je asymptomatická kolonizace giardií častým jevem, pokud je infekci vystaven jedinec trpící např. podvýživou, trofozoiti se snadněji přichytí ke střevnímu epitelu hostitele a jsou schopni dlouhodobě odolávat obranným mechanismům (DuPont, 2013). Přichycením ke střevní sliznici ji poškozují tak, že může docházet ke zvýšení permeability střevní stěny v důsledku zkracování klků, apoptózy enterocytů, dále například dochází k hypermotilitě střev, to vše může vést až ke vzniku chronického zánětu sliznice (Halliez a Buret, 2013). Zvláště náchylní ke chronické infekci giardií jsou podvyživené děti a pacienti s imunosupresí, zvláště lidé

s hypogamaglobulinémií a HIV pozitivní pacienti (Einarsson *et al.*, 2016). Bez léčby může zejména u dětí docházet ke zhoršení vstřebávání živin, podvýživě nebo jejímu prohloubení a růstové retardaci (Ajjampur *et al.*, 2011; Ignatius *et al.*, 2012; Muhsen *et al.*, 2012). U HIV pozitivních jedinců a lidí podstupujících imunosupresivní terapii může být tato infekce spojená s chronickým průjmem, zvracením, těžkou kolikou a podvýživou. U dlouhodobých infekcí HIV pozitivních pacientů pak dochází k výraznému snižování kvality a zkracování předpokládané délky života (Lim *et al.*, 2011).

1.3. Hostitelská specifita *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis je komplex druhů vykazujících vysokou genetickou rozmanitost. Dnes je známo osm různých genotypů, které se často označují jako asambláže A-H (Ryan a Cacciò, 2013). U člověka byly nalezeny jen asambláže A a B, které však mají širokou hostitelskou specifitu a jsou zoonotické (Berrilli *et al.*, 2012; Ryan a Cacciò, 2013; Sprong *et al.*, 2009; Vanni *et al.*, 2012). Kromě člověka byla asambláž A nalezena i u dobytka-ovcí, koz a prasat (Sprong *et al.*, 2009). Asambláž B byla nalezena u králíků, činčil (Pantchev *et al.*, 2014) a bobrů (Prystajacky *et al.*, 2015).

Na základě sekvenčních analýz genu GDH (glutamát dehydrogenáza) je známo, že se asambláž A dělí na dva subtypy AI a AII. Člověk je běžněji infikován subtypem AII (Feng a Xiao, 2011). V jiných lokusech jako jsou TPI (triózafosfát-izomeráza) a BG (beta-giardin) byla nalezena i podskupina AIII nacházející se u koček, dobytka a u volně žijících zvířat. Mezi podskupinou AIII a podskupinami AI a AII jsou však výrazné sekvenční rozdíly (Sprong *et al.*, 2009). Asambláž B má mnohem více subtypů než asambláž A (Feng a Xiao, 2011). Asambláže C, D, E, F, G a H mají úzkou hostitelskou specifitu. Asambláže C a D se vyskytují hlavně u psů a psových šelem (např. Covacin *et al.*, 2011). Asambláž E je často u ovcí, prasat a skotu (např. Liu *et al.*, 2014). Nedávno byla asambláž E nalezena i u lidí v Austrálii, což opět naznačuje zoonotický přenos *G. intestinalis* (Zahedi *et al.*, 2017). Asambláže E, F a H byly nalezeny u koček (např. Lebbad *et al.*, 2010). Podrobnější druhové zastoupení zvířat a lidí v jednotlivých asamblážích je uvedeno v tabulce 1 (Feng a Xiao, 2011; Heyworth, 2016).

Tab. 1: Přehled zastoupení jednotlivých asambláží *Giardia intestinalis* (upraveno z publikací Feng a Xiao, 2011; Heyworth, 2016).

Asambláž	Hostitel
A	člověk, dobytek, ovce, koza, prase, morče, pes, kočka, jelen, bobr, kůň
B	člověk, ondatra, bobr, králík, činčila, pes, jelen, kůň, morče, ovce
C	pes, prase, dobytek
D	pes, dobytek, liška
E	ovce, prase, jelen, kůň, kočka
F	kočka, prase
G	potkan, krysa
H	kočka, racek

1.4. Diagnostické metody detekce *Giardia intestinalis*

K diagnostice *G. intestinalis* je možné použít různých metodických přístupů. Často používané metody jsou koproskopické metody (flotace, sedimentace), molekulární metody (konvenční PCR a qPCR) či serologické metody (např. ELISA).

1.4.1. Koproskopické metody

V tomto případě je diagnostika giardií založena na detekci cyst ve vzorcích trusu/stolice. Je také možné zjistit přítomnost trofozoitů z duodenální tekutiny (Gordts *et al.*, 1984). K identifikaci cyst ve vzorku dochází často po použití různých způsobů barvení jako je např. barvení trichromem, hematoxylinem nebo methylenovou modří (Modrý *et al.*, 2018). Cysty a trofozoiti *G. intestinalis* jsou gramnegativní a při barvení safraninem, stejně jako trichromem jsou viditelná jádra, a příchytý disk (Joseph *et al.*, 2006).

Všeobecně není giardiózu jednoduché detekovat kvůli nepravidelnému vylučování cyst (např. Danciger a Lopez, 1975). Tudíž pro co nejpřesnější zjištění positivity či negativity vzorku je nutné vyšetřit více vzorků od jednoho pacienta/zvířete s časovým odstupem – typicky tři vzorky odebrané ve třech po sobě jdoucích dnech (např. Ghoshal *et al.*, 2016). Výpovědní hodnota koproskopických metod tedy může být ovlivněna nepravidelným vylučováním cyst a je nezbytná zkušenost diagnostika.

Flotace

Flotace je diagnostická metoda využívající rozdílné specifické hmotnosti životních stádií parazitů a viskozity flotačního roztoku. Pomocí flotace se nejčastěji detekují vajíčka hlístic, tasemnic a cysty prvoků (Modrý *et al.*, 2018). V této práci je používána modifikovaná Sheatherova flotační metoda, která využívá cukerný flotační roztok o specifické hustotě 1,33 (Arrowood a Donaldson, 1996).

Sedimentační metoda MIF

Podstatou této sedimentační metody je samovolná sedimentace vajíček a cyst v roztoku merthiolát-jód-formaldehydu (MIF) na dno zkumavky, která případně může být urychlena odstředěním. Jedná se o metodu pro diagnostiku cyst prvoků a vajíček helmintů, především vajíček motolic (Blagg *et al.*, 1955).

1.4.2. Molekulárně diagnostické metody

Molekulární diagnostika umožňuje detekovat infekce *G. intestinalis* na základě celkové DNA z exkrementů. Nejvíce používanými molekulárními metodami pro detekci *G. intestinalis* jsou PCR a real-time PCR (qPCR). Molekulární diagnostika může mít vyšší sensitivitu a oproti konvenčním metodám se široce používá i pro genotypizaci. Metody založené na PCR se ukázaly být vhodnější pro laboratorní diagnostiku giardiózy na základě specifity a sensitivity ve srovnání s detekcí pomocí antigenů nebo mikroskopie (Adeyemo *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2016).

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro diagnostiku giardie se často používá PCR genu pro RNA malé ribozomální podjednotky (SSU rRNA; např. Minetti *et al.*, 2015). Tato metoda byla použita i v této práci a byly amplifikovány produkty o velikosti 292 párů bazí (bp).

Nested PCR

Obecně nested (neboli odstupňovaná) PCR využívá vnějších a vnitřních primerů. Amplifikace probíhá ve dvou krocích, kdy v primární reakci dochází k amplifikaci pomocí vnějších primerů. Takto vzniklý produkt slouží jako templát pro sekundární reakci, kde dochází k amplifikaci pomocí vnitřních primerů (Šmarda *et al.*, 2005). Díky těmto dvěma krokům dochází ke zvýšení specifity této metody oproti konvenčnímu PCR (např. Nikaeen *et al.*, 2005; Castro-Hermida *et al.*, 2015).

Pro diagnostiku giardie se nejčastěji používá nested PCR genů kódujících triózafosfát-izomerázu (TPI; Sulaiman *et al.*, 2003), beta-giardin (BG; Minetti *et al.*, 2015) a glutamát dehydrogenázu (GDH; Minetti *et al.*, 2015). V této práci byly použity protokoly pro TPI a BG. Pro gen TPI byly během primární reakce amplifikovány produkty o velikosti 605 bp a během sekundární reakce produkty o velikosti 530 bp (Sulaiman *et al.*, 2003). Pro gen BG byly během primární reakce amplifikovány produkty o velikosti 753 bp a během sekundární reakce produkty o velikosti 511 bp (Minetti *et al.*, 2015).

Diagnostika *Giardia intestinalis* pomocí qPCR

Tento typ PCR se používá pro kvantifikaci určitého úseku DNA ve vzorcích a umožňuje sledování amplifikace tohoto úseku v reálném čase. Při real-time PCR (qPCR) dochází k amplifikaci kratších úseků, čímž dochází ke zvýšení senzitivity. Navíc, míra amplifikace výsledného produktu je detekována prostřednictvím fluorescenční sondy již během probíhající reakce, což kromě výhody kvantifikace umožňuje obdržení výsledků za podstatně kratší dobu (Adeyemo *et al.*, 2018; Guy *et al.*, 2003).

Pomocí qPCR je možné detekovat různé geny *G. intestinalis* např. gen pro malou ribozomální podjednotku rRNA (Haque *et al.*, 2007), beta-giardin (Guy *et al.*, 2003), triózafosfát-izomerázu nebo glutamát-dehydrogenázu (Almeida *et al.*, 2010). Poměrně nedávno byly také vyvinuty primery pro qPCR, které umožňují rychlou detekci asambláží A, B i smíšené AB v jedné reakci u lidí i zvířat (Solarczyk *et al.*, 2018).

1.4.3. Serologické metody

Serologické metody jsou schopny detekovat infekce probíhající (ze stolice), ale umožňují odhalit i ty již odeznělé (ze séra; Flanagan, 1992). Velmi často užívanou metodou je ELISA a imunofluorescenční test. Obě tyto metody slouží především ke zjištění antigenů nebo protilátek ze stolice. Tyto metody jsou používány hlavně v laboratořích bez parazitologické, resp. mikroskopické praxe a v nemocnicích, protože jsou časově méně náročné (Chappell a Matson, 1992; Jahan *et al.*, 2014).

1.4.4. Srovnání citlivosti diagnostických metod pro detekci giardie

Srovnáním různých metod používaných v diagnostice *G. intestinalis* se zabývali autoři práce Schuurman *et al.* (2007), kde srovnávali mikroskopické vyšetření, real-time PCR (SSU rDNA) a rychlý imunologický test (ELISA). Všechny tři metody byly shledány dostatečně citlivými a specifickými. U koproskopického vyšetření byla senzitivita 99 % a specifita ≥ 97 %, real-time PCR mělo senzitivitu 100 %, ale specifitu pouze 92 %. Rychlý imunologický test měl naopak senzitivitu 98 % a specifitu 100 %. Závěrem tedy ustanovili koproskopickou diagnostiku jako primární vyšetření infekce *G. intestinalis*, jelikož dokáže detekovat i jiné střevní prvoky. Mikroskopické vyšetření stolice je ale časově náročné a vyžaduje odborníka s parazitologickou praxí, proto je pro většinu laboratoří snazší použít rychlý imunologický test (Schuurman *et al.*, 2007).

1.5. Terapie

Lékem první volby giardiózy dnes je tinidazol. Léčba tinidazolem je spojená s větší úspěšností léčby než metronidazolem, který se dříve běžněji užíval. V řadě prací panují různé názory o volbě vhodného léku na giardiózu. Každý z léků má nějaké vedlejší účinky. Např. v práci Ordóñez-Mena *et al.* (2018) poskytují další důkazy o tom, že tinidazol je dnes jeden z nejlepších dostupných léčiv pro léčbu giardiózy u dětí i dospělých (Ordóñez-Mena *et al.*, 2018).

Metronidazol byl dříve velmi používaným léčivem giardiózy u lidí, zjistilo se však, že má mnoho vedlejších účinků, jako jsou nevolnost, závratě a bolesti hlavy. A navíc zejména u dětí býval špatně snášen. V některých případech mohou být giardie vůči metronidazolu dokonce rezistentní (Leme'e *et al.*, 2000). Vlivem rostoucí rezistence giardií k metronidazolu je

odhadovaná míra selhávání až 20 % (Upcroft a Upcroft, 2001). Metronidazol je známý mutagen bakterií, a na zvířecích modelech (u myši a potkanů) byla prokázána karcinogenita. Nicméně u lidí mutagenita prokázána nebyla (Beard *et al.*, 1988; Falagas *et al.*, 1998). Dalším možným lékem je albendazol, který má však slabší účinky než tinidazol (Ordóñez-Mena *et al.*, 2018). V práci Solaymani-Mohammadi *et al.* (2010) byl porovnáván účinek metronidazolu s albendazolem u lidí a bylo zjištěno, že albendazol je stejně účinný jako metronidazol.

II. Cíle

Hlavním cílem bylo zjistit prevalenci střevního prvoka *Giardia intestinalis* a jejich asambláží v souboru dobrovolníků a zvířat (se kterými jsou v kontaktu) v České republice.

Dílčí cíle:

- porovnat citlivost dvou diagnostických přístupů – flotace vs. PCR;
- vybrat vhodný gen pro diagnostické PCR (TPI, BG a SSU rRNA) na základě senzitivity a specifity;
- ověřit senzitivitu vybraného PCR protokolu pomocí sestupné ředící řady počtu trofozoitů *G. intestinalis* z kultury;
- zjistit případný zoonotický potenciál (lidé vs. zvířata) v ČR;

III. Materiál a metody

Seznam použitých chemikálií:

- DNA Ladder 100 bp (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- EcoRI (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).
- ethidium-bromid (Sigma–Aldrich)
- GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma–Aldrich)
- IPTG (isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) (Sigma–Aldrich)
- kit pGEM-T Easy Vector Systém I (Promega, Wisconsin, USA)
- mastermix (AccuPower® Taq PCR PreMix; Bioneer, Tedžon, Jižní Korea)
- modifikovaný Sheatherův roztok (specifická hustota - 1,33)
 - 259 ml destilované vody; 405 g cukru; 7,29 g fenolu
- milli-Q voda
- PSP Spin Stool DNA kit pro izolaci DNA ze stolice/trusu (Stratec, Německo)
- SOC médium (trypton, kvasničný extrakt, NaCl, glukóza)
- TAE pufr (1 %; Tris-Acetát-EDTA) (Biogen, Massachusetts, USA)
- X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid) (Biogen)

Použité přístroje:

- cykler T100™ (Bio-Rad Laboratories, USA)
- světelný mikroskop CX22LED (Olympus, ČR)
- termoblok Bio TDB-100 (Biosan, Riga, Latvia)
- termostat Sanyo Mir-153 (Sanyo, Ósaka, Japonsko)
- UV transiluminátor Ultra-Lum (Claremont, USA)
- vortex V1 plus (Biosan)

3.1. Sběr a zpracování vzorků

Předložená práce navazuje na předchozí studii zaměřenou na prevalenci prvoka *Blastocystis* spp. (Lhotská, 2019). V rámci této studie byly využity všechny vzorky lidské stolice a vzorky trusu zvířat s cílem zjistit prevalenci dalšího střevního prvoka *Giardia intestinalis*. Vzorky

od zvířat byly sbírány pouze od takových, se kterými byli dotyční lidé v častém kontaktu. Trus zvířat byl získán pro případné ověření zoonotického potenciálu. Část každého vzorku byla vždy ihned koproskopicky vyšetřena, část byla použita pro molekulární diagnostiku a zbylá část byla zamrazena pro případné pozdější použití.

3.1.1. Sběr vzorků

Vzorky stolice/trusu byly získány od dobrovolníků z různých částí České republiky, kteří souhlasili s dobrovolnou a neplacenou účastí ve výše zmíněném projektu zaměřeném na *Blastocystis* spp. Dobrovolníky byli často příslušníci rodiny a známí, ale i lidé, kteří se o studii dozvěděli prostřednictvím informačních plakátů a novin (Lhotská, 2019). Pro účely studie o *Blastocystis* spp, byli sbírané také informace formou dotazníků, ve kterých dobrovolníci uváděli pohlaví, věk, národnost, lokalitu bydliště, frekvenci cestování (EU, mimo EU), povolání, případnou dietu a zda jsou ve styku se zvířaty, popř. se kterými. Pro účely této práce byla využita pouze informace, jestli jsou lidé v kontaktu se zvířaty, či nikoli. Celkem bylo získáno 411 vzorků, přičemž v rámci této práce bylo zpracováno 151 vzorků. Veškerá data byla důsledně anonymizována a zpracována dle zákona č. 101/2000 Sb. o ochraně osobních údajů.

3.1.2. Koproskopické vyšetření vzorků

Všechny vzorky získané od dobrovolníků a jejich zvířat byly vždy koproskopicky vyšetřeny pomocí modifikované Sheatherovy flotace a v případě nálezu *G. intestinalis* byla intenzita infekce semikvantitativně vyhodnocena dle stupnice od jednoho do čtyř křížků.

Modifikovaná Sheatherova flotační metoda

Trus/stolice přibližně o velikosti hrášku byly rozmíchány v malém množství (cca 2-3 ml) destilované vody a homogenizovány na třecí misce. Veškerá suspenze byla přelita přes sítko do skleněné zkumavky a následně odstředěna při 600 g/3 min. Supernatant byl odstraněn a pelet byl rozmíchán nejprve v malém objemu (cca 1-2 ml) Sheatherova roztoku, poté byla zkumavka doplněna Sheatherovým roztokem přibližně 1 cm pod okraj a převrácením promíchána. Směs byla opět odstředěna při 600 g/3 min. Vzniklá povrchová blanka byla bakteriologickou kličkou

opatrně přenesena na podložní skříčko a preparát byl vyšetřen pod světelným mikroskopem při zvětšení 20-100×.

3.2. Molekulární diagnostika

Molekulární diagnostika zahrnovala v prvním kroku izolaci celkové DNA ze stolice/trusu. Následovala polymerázová řetězová reakce (tzv. PCR), ve které byla DNA použita jako templát. Produkty z PCR reakce byly dále vizualizovány na gelové elektroforéze a fragmenty DNA o patřičné velikosti byly sekvenovány pro potvrzení sekvence.

3.2.1. Izolace celkové DNA

Celková DNA z výše uvedených vzorků byla izolována pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA dle pokynů výrobce.

3.2.2. PCR

Pro každý krok PCR reakcí byl připraven tzv. premix obsahující komerčně dodávaný 2× koncentrovaný mastermix, primery a milli-Q vodu. Tato směs byla po promíchání přenesena do zkumavek pro jednotlivé vzorky a přidána DNA. Každá reakce obsahovala vždy negativní a pozitivní kontrolu. Negativní kontrola obsahovala místo DNA milli-Q vodu. V případě pozitivní kontroly byla přidána DNA z kultury *G. intestinalis*. Nakonec byly všechny vzorky promíchány na vortexu a vloženy do cykleru. Pro každou PCR reakci o celkovém objemu 20 µl, bylo použito: 10 µl zásobního roztoku mastermixu, po 1 µl každého z páru primerů (forward a reverse, pracovní koncentrace 10 nM), x µl DNA, a množství milli-Q vody, které bylo dopočítáno dle použitého množství DNA.

3.2.2.1. Gradientová PCR

V gradientové PCR byly testovány různé teploty pro optimalizaci nasedání primerů pro každý z genů pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA), beta-giardin (BG) a triózafosfát-izomerázu (TPI). Pro každý gen byly testovány čtyři skupiny vzorků (negativní kontrola, negativní vzorek, pozitivní kontrola a pozitivní vzorek). Negativní a pozitivní kontrola měla

stejné složení jako u všech PCR (viz výše). Negativní vzorek obsahoval celkovou DNA izolovanou z trusu zvířete, které bylo dle koproskopických metod opakovaně negativní na *G. intestinalis*. Pozitivní vzorek obsahoval celkovou DNA izolovanou z trusu zvířete dle koproskopických metod pozitivního na *G. intestinalis*. Každá skupina vzorků byla připravena v šesti opakováních, které se mezi sebou lišily pouze teplotou nasedání primerů během PCR reakce, a to v rozmezí teplot od 55 °C do 65 °C. Konkrétně se jednalo o teploty: 55 °C; 56,9 °C; 58,8 °C; 61,1 °C; 63 °C a 65 °C.

3.2.2.2. Specifická PCR pro detekci *G. intestinalis*

Přítomnost *G. intestinalis* v trusu/stolici molekulárně diagnostickými metodami byla testována amplifikací tří různých genů specifických pro *G. intestinalis*: TPI, BG a SSU rRNA.

Pro SSU rRNA bylo využito jednokrokové konvenční PCR, zatímco pro ostatní geny byla použita nested PCR. Každá sada primárních PCR reakcí sestávala ze vzorků obsahujících jako templát DNA, dále vzorek negativní kontroly a pozitivní kontroly. V případě nested PCR se sekundární reakce lišila pouze použitými primery a templátem, kterým byl PCR produkt z primární reakce.

PCR genu SSU rRNA

Pro PCR genu SSU rRNA byly použity primery RH11 (5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3') a RH4 (5'-AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3') (Minetti *et al.*, 2015). Jako templát byly přidávány 3 µl DNA.

Nested PCR genu TPI

Do primární PCR byly přidány 3 µl DNA a byly použity primery G1F (5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG-3') a G1R (5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3') (Sulaiman *et al.*, 2003). Do sekundární reakce byl přidán 1 µl DNA z primární reakce a byly použity primery G2F (5'-CCCTTCATCGGIGGTAACCTT-3') a G2R (5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3') (Sulaiman *et al.*, 2003).

Nested PCR genu pro BG

Do primární i sekundární PCR bylo přidáno 1,5 µl DNA. V primární reakci byly použity primery G7 (5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3') a G759 (5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3') (Minetti *et al.*, 2015). V sekundární reakci byly použity primery BGf (5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3') a BGr (5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3')

3.2.3. Testování senzitivity primerů pro gen TPI

Gen TPI se ukázal ze všech tří genů nejvíce specifickým a nejvhodnějším genem, proto byly vzorky ověřovány jen tímto genem, protože ostatní dva geny neprokázaly dostatečnou specifitu pro zachycení *G. intestinalis* (viz kapitola IV. Výsledky). Po zvolení genu TPI jako hlavního genu pro zpracování vzorků, byla ověřena citlivost tohoto PCR protokolu. Pro tyto účely byla připravena sestupná ředící řada, ve které sloužila jako templát DNA z trofozoitů *G. intestinalis*.

Z kultury trofozoitů o známém počtu (poskytnuté Laboratoří medicínské a veterinární protistologie) byly desítkovou ředící řadou připraveny koncentrace od 10^{-2} do 10^4 trofozoitů (ředěno PCR vodou). Množství DNA obsažené v koncentraci 10^{-2} přibližně odpovídá množství $\frac{1}{4}$ DNA obsažené v jednom trofozoitu. Do každé zkumavky s trofozoity byl přidán trus negativního potkana. Z takto připravených vzorků byla izolována celková DNA a ta byla použita jako templát pro nested PCR genu TPI dle výše uvedeného protokolu.

3.2.4. Gelová elektroforéza

Nejprve byla navážena agaróza a v Erlenmeyerově baňce smíchána s připraveným TAE pufrem (Tab. 2). V mikrovlnné troubě byla agaróza v pufru rozpuštěna. Pod tekoucí vodou se nechala Erlenmeyerova baňka ochladit na cca 50 °C. Bylo přidáno cca 1-2 µl ethidium-bromidu (10 mg/ml). Gel byl nalit do nalévací vany, poté byly do gelu vloženy hřebeny a cca 10-15 minut byl ponechán v laboratorní teplotě pro ztuhnutí. Po ztuhnutí byla vanička s gelem vložena do elektroforetické vany s TAE pufrem, hřebeny byly vyjmuty z gelu a do vzniklých jamek nanášeny PCR reakce. Po nanášení všech PCR produktů byl na gel nanášen velikostní marker (ladder). Vana byla zavřena a připojena ke zdroji při napětí 70-100 V (záleží na velikosti gelu). Vzorky DNA na gelu byly vizualizovány pomocí UV trans-iluminátoru. Fragmenty,

které velikostně odpovídaly očekávanému výsledku, byly z gelu vyříznuty pro následnou izolaci DNA a její sekvenování.

Tab. 2: Navážka agarózy a množství TAE pufru dle požadované velikosti gelu.

Velikost vany	Objem TAE pufru [ml]	Hmotnost agarózy [g]
Malá 7 x 8 cm	30	0,45
Střední 9x11 cm	50	0,75
Velká 12x14 cm	90	1,35

3.2.5. Izolace DNA z gelu

K izolaci DNA z gelu byl použit GenElute™ Gel Extraction Kit. Izolace byla prováděná dle návodu výrobce. DNA byla rozpuštěna v 30 µl milli-Q vody a uchována při teplotě – 20 °C.

3.2.6. Sekvenování PCR produktu

Vzorek určený k sekvenování obsahoval 5 µl DNA fragmentu ze sekundární reakce nested PCR přečištěný pomocí kitu GenElute™ Gel Extraction Kit, 1 µl jednoho z primerů ze sekundární reakce nested PCR a 4 µl milli-Q vody. Sekvenování bylo zajištěno firmou Eurofins GATC biotech.

Výsledné sekvence byly zobrazovány v programu Bioedit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3. a následně ověřeny pomocí online serveru Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.2.7. Klonování

Kandidátní PCR produkty, které obsahovaly v sekvenci více signálů nebo velmi slabý signál DNA, byly dále klonovány pomocí komerčního kitu pGEM-T Easy Vector System I dle pokynů výrobce. Nejprve byl připraven plazmid smícháním složek uvedených v tabulce 3 a vše bylo ponecháno k inkubaci přes noc při teplotě 12 °C. Klonovací vektor byl smíchán se 100 µl kompetentních buněk *E. coli* (XL-1) a nechán inkubovat 10 min na ledu. Poté byl 40 sekund ve vodní lázni při teplotě 42 °C, následně byl krátce zchlazen na ledu. Ke směsi bylo přidáno 150 µl SOC média (předehřátého na 37 °C) a byla ponechána třepat 40 min při teplotě 37 °C v horizontální poloze.

Na Petriho misky s agarem bylo rozetřeno pomocí hokejek 35 μ l 2 % zásobního roztoku X-gal a 5 μ l 20 % IPTG. Na tyto misky byly následně nanесeny i bakteriální kultury, které byly přes noc inkubovány při teplotě 37 °C. Po namnožení několika klonů obsahujících PCR produkt byly z každé plotny vybrány tři bílé kolonie a sterilní špičkou přeneseny do zkumavky s tekutým LB médiem obsahujícím ampicilin. Zkumavky poté byly ponechány třepat přes noc při teplotě 37 °C. Narostlá bakteriální kultura byla krátce odstředěna a z peletu buněk pomocí kitu na izolaci plazmidové DNA byl vyizolován plazmid podle pokynů výrobce. Vyizolovaná DNA byla skladována při teplotě -20 °C.

Pro ověření přítomnosti DNA fragmentu v plazmidu bylo použito štěpení restriční endonukleázou *EcoRI*, kdy byla namíchána reakční směs o celkovém objemu 10 μ l obsahující: 1 μ l odpovídajícího 10x koncentrovaného pufru, 2 jednotky enzymu *EcoRI*, a 4 μ l plazmidové DNA a destilovanou vodu (doplněna do celkového objemu 10 μ l). Po smíchání byla směs inkubována 30 min. při teplotě 37 °C. Produkty štěpení byly ověřeny pomocí elektroforézy.

Po ověření velikosti odštěpeného fragmentu byly vybrané klony sekvenovány prostřednictvím firmy Eurofins GATC Biotech. Vzorky pro sekvenaci byly připraveny smícháním 5 μ l plazmidové DNA, 1 μ l primeru T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG 3'-) a 4 μ l milli-Q vody.

Tab. 3: Sloučeniny a jejich potřebný objem pro přípravu vektoru.

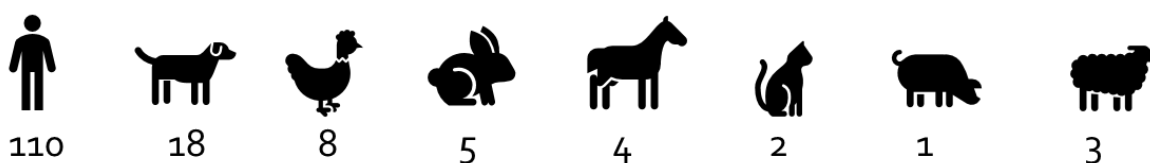
Položka	Objem [μ l]
Rapid ligation buffer	5
pGem	1
ligáza	0,9
milli-Q voda	0,8
PCR fragment	2,3

3.3. Experimentální infekce zvířat

Součástí této práce byla i experimentální infekce hlodavců druhu pískomil mongolský (*Meriones unguiculatus*), kterým byla perorálně jícnovou sondou podána infekční dávka 10^6 trofozoitů *G. intestinalis* v 1 ml PBS. Kultury trofozoitů *G. intestinalis* potřebné ve vybraných experimentech byly ochotně poskytnuty Laboratoří veterinární a medicínské protistologie.

IV. Výsledky

Z celkového počtu 411 nasbíraných vzorků bylo v rámci této bakalářské práce zpracováno 151 vzorků stolice a trusu (viz kapitola V. Diskuse) s cílem zjistit v nich přítomnost některých prvoků, mezi nimi také *Giardia intestinalis*. Zpracováno bylo 110 vzorků lidské stolice a 41 vzorků trusu zvířat, se kterými byli dotyční lidé v častém kontaktu (Obr. 3). Přítomnost *G. intestinalis* byla zjišťována pomocí dvou různých přístupů: koproskopicky a molekulárně diagnostickými metodami.



Obr. 3: Počty zpracovaných vzorků od dobrovolníků a jednotlivých druhů zvířat.

4.1. Stanovení prevalence *Giardia intestinalis* pomocí koproskopický metod

Flotací byly zachyceny cysty *G. intestinalis* pouze u dvou zvířat ze všech 151 vyšetřených vzorků, a to v trusu králíka a psa. Z lidských vzorků nebyly touto metodou zachyceny žádné cysty *G. intestinalis*. Stanovená prevalence je tedy 4,9 % ze zvířecích vzorků. Celková prevalence u lidí a zvířat vyšla 1,3 %. Shrnutí prevalence *G. intestinalis* zjištěné pomocí flotace je uvedeno v tabulce 4.

Tab. 4: Prevalence *G. intestinalis* stanovená flotací.

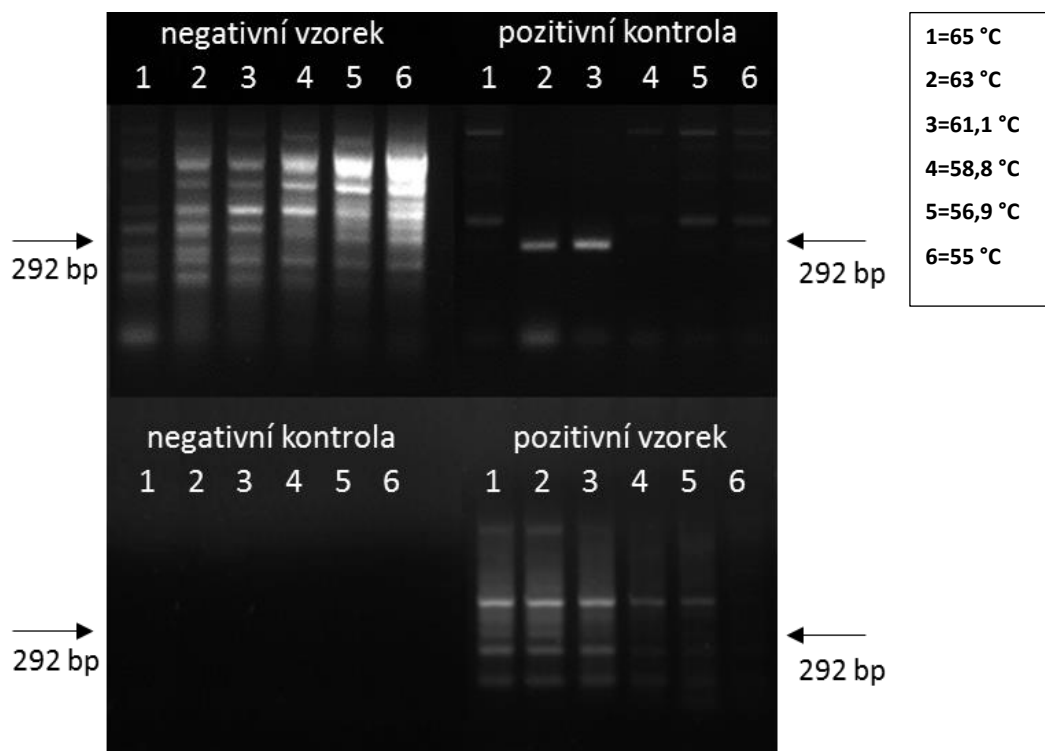
Prevalence u lidí	Prevalence u zvířat	Prevalence celková
0	4,9	1,3

4.2. Stanovení prevalence *Giardia intestinalis* pomocí molekulární diagnostiky

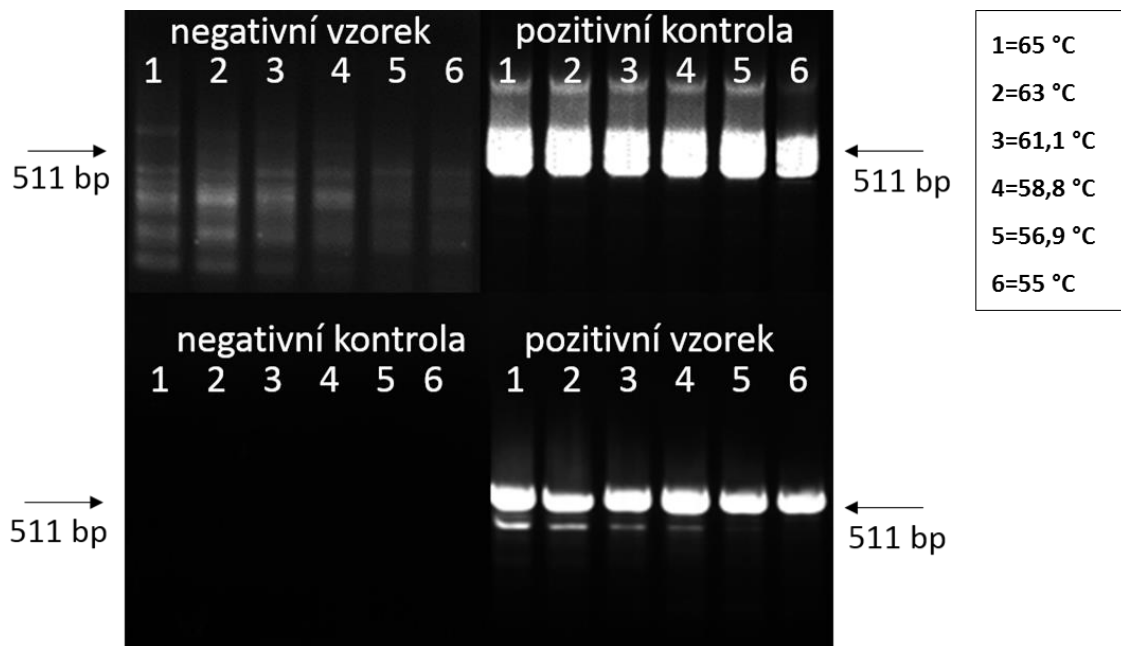
Přítomnost *G. intestinalis* v trusu/stolici molekulárně diagnostickými metodami byla testována amplifikací tří různých genů specifických pro *G. intestinalis*: TPI, BG a SSU rRNA. Nejprve bylo třeba stanovit optimální teploty pro nasedání primerů pro jednotlivé geny pomocí gradientové PCR.

4.2.1. Optimalizace teploty nasedání primerů pro geny TPI, BG a SSU rRNA

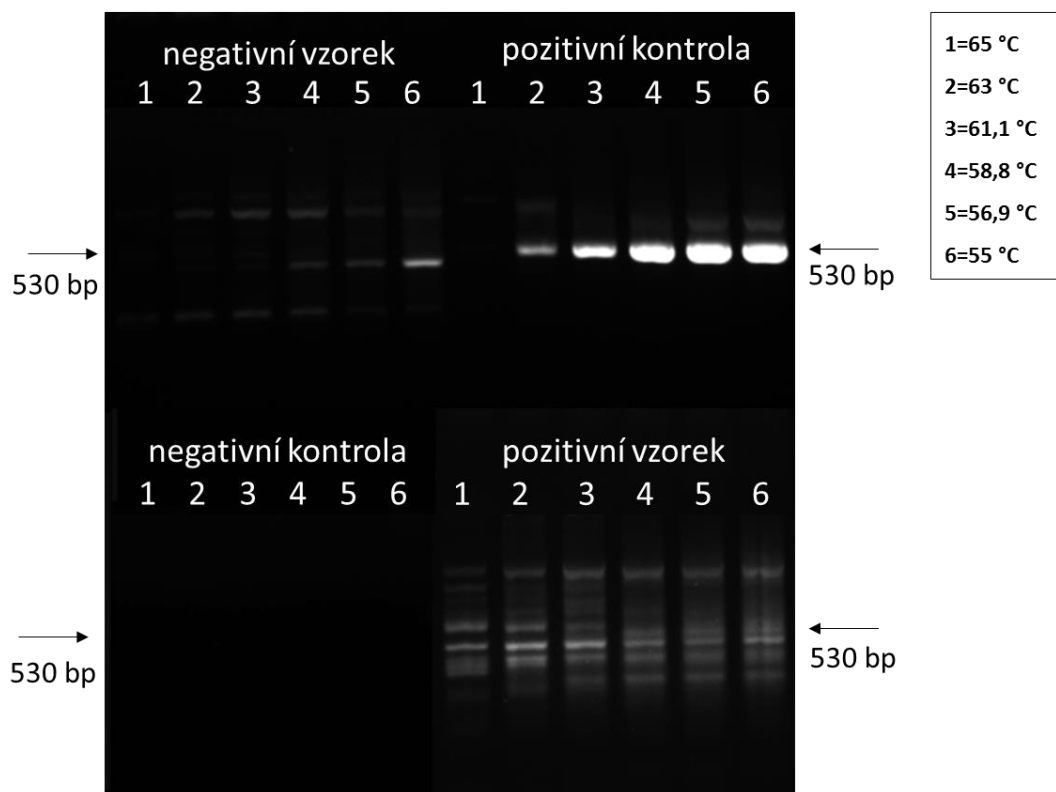
Pomocí gradientové PCR byly testovány optimální teploty pro nasedání primerů v rozmezí 55 až 65 °C. Při PCR docházelo k amplifikaci různých nespecifických produktů, jejichž množství se však zmenšovalo se zvyšující se teplotou nasedání primerů, hlavně u negativního vzorku, dobře viditelné u genu SSU rRNA (Obr. 4). Pro gen SSU rRNA byla zvolena teplota nasedání primerů 63 °C, pro gen BG to bylo 65 °C a pro gen TPI 63 °C (Obr. 4-6). Optimalizované protokoly pro jednotlivé geny v cyklieru jsou uvedeny v tabulce 5.



Obr. 4: Gradientová PCR genu SSU rRNA (292 bp) skládající se ze vzorku trusu negativního zvířete (negativní vzorek), z kultury trofozoitů *G. intestinalis* (pozitivní kontrola), z trusu pozitivního zvířete (pozitivní vzorek) a z milli-Q vody (negativní kontrola).



Obr. 5: Gradientová PCR genu BG (511 bp) skládající se ze vzorku trusu negativního zvířete (negativní vzorek), z kultury trofozoitů *G. intestinalis* (pozitivní kontrola), z trusu pozitivního zvířete (pozitivní vzorek) a z milli-Q vody (negativní kontrola).



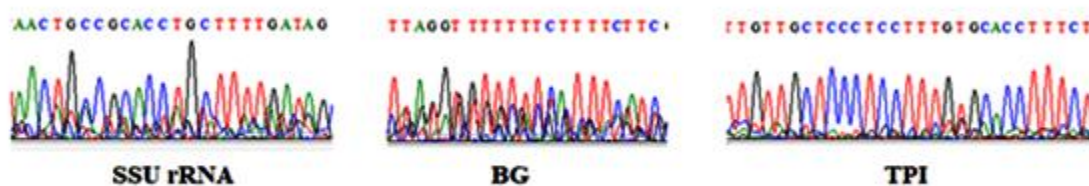
Obr. 6: Gradientová PCR genu TPI (530 bp) skládající se ze vzorku trusu negativního zvířete (negativní vzorek), z kultury trofozoitů *G. intestinalis* (pozitivní kontrola), z trusu pozitivního zvířete (pozitivní vzorek) a z milli-Q vody (negativní kontrola).

Tab. 5: Optimalizované protokoly v cykleru pro jednotlivé geny. Teplota nasedání primerů pro jednotlivé geny v kroku 3.

Kroky	SSU rRNA		BG		TPI	
	Teplota	Čas	Teplota	Čas	Teplota	Čas
1.	95 °C	3:00	94 °C	3:00	95 °C	3:00
2.	94 °C	0:20	94 °C	0:20	94 °C	0:45
3.	63 °C	0:30	65 °C	0:30	63 °C	0:45
4.	72 °C	1:00	72 °C	1:00	72 °C	1:00
opak. 1.-4.	35 cyklů		35 cyklů		30 cyklů	
5.	72 °C	5:00	72 °C	5:00	72 °C	5:00

4.2.2. Výběr genu vhodného pro stanovení prevalence *G. intestinalis*

Gen vhodný pro stanovení přítomnosti *G. intestinalis* v trusu/stolici pomocí molekulární diagnostiky byl vybírán ze tří genů testovaných na přítomnost *G. intestinalis*. Na základě výsledků gradientové PCR a následného sekvenčního ověření PCR produktů byla přítomnost *G. intestinalis* v pozitivním vzorku trusu potvrzena pouze genem TPI (Obr. 6). PCR pro geny BG a SSU rRNA neprokázaly dostatečnou specifitu pro zachycení přítomnosti *G. intestinalis* v pozitivním vzorku trusu, tzn. sekvence nepotvrdily přítomnost *G. intestinalis* (Obr. 7). Zatímco TPI sekvence vždy ukazovala jeden výrazný signál, na jehož základě bylo možné v databázi Blast zjistit přítomnost *G. intestinalis*. Sekvence dalších dvou genů ukazovaly vždy mnohočetný signál, který nepotvrdil přítomnost *G. intestinalis* v pozitivním vzorku. Tento problém nevyřešilo ani klonování. Proto pro samotné diagnostické PCR byla použita nested PCR genu TPI.



Obr. 7: Sekvence genů SSU rRNA, BG a TPI a získané ze vzorku pozitivního na *G. intestinalis*.

4.2.3. Prevalence giardie stanovená pomocí nested PCR genu TPI

Pomocí zvolených molekulárně diagnostických metod byla přítomnost *G. intestinalis* zjištěna pouze v jednom vzorku ze všech 151 testovaných. Ze vzorků stolice nebyla přítomnost

G. intestinalis sekvenčně prokázána u žádného z testovaných 110 lidských vzorků. Jediný sekvenčně ověřený výskyt *G. intestinalis* byl potvrzen u vzorku králičího trusu, kde pomocí genu TPI bylo zjištěno zařazení *G. intestinalis* do asambláže B. Trus psa, u kterého byly při flotaci nalezeny cysty, byl při PCR negativní. Stanovená prevalence pomocí této metody je u zvířat 2,4 %. Celková prevalence u lidí a zvířat vyšla 0,7 %. Prevalence stanovené molekulární diagnostikou jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 6.: Prevalence stanovená molekulárně diagnostickými metodami.

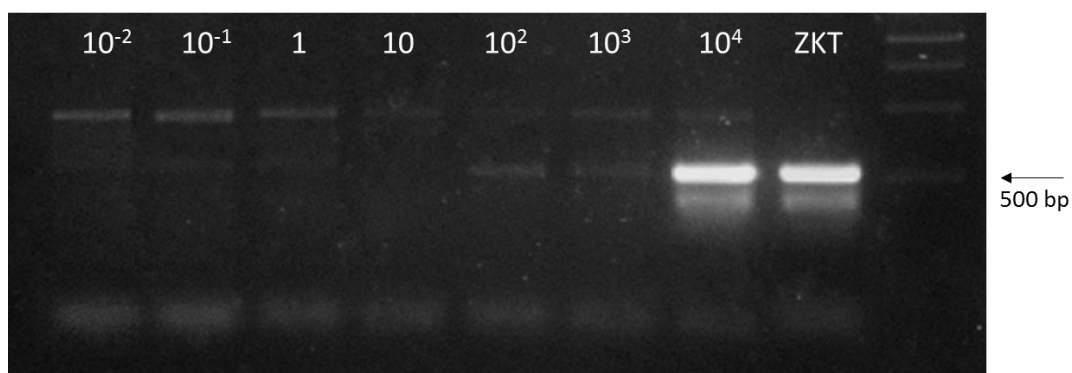
Prevalence u lidí	Prevalence u zvířat	Prevalence celková
0	2,4	0,7

4.2.4. Srovnání výsledků flotace a PCR genu TPI

Pomocí Sheatherovy flotace byly zachyceny dva pozitivní vzorky trusu (králík a pes). Pomocí PCR pro gen TPI byl zachycen pouze jeden pozitivní vzorek trusu (králík). U lidí nebyl pomocí flotace ani PCR pro gen TPI zachycen žádný pozitivní vzorek. Celková prevalence stanovená pomocí flotace byla 1,3 %, prevalence pomocí PCR vyšla nižší, a to 0,7 %.

4.2.5. Testování senzitivity použitých primerů

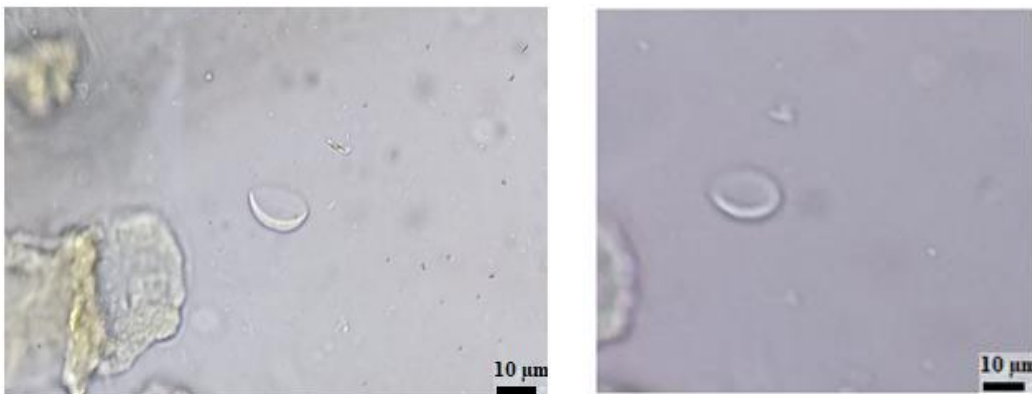
Záchytnost primerů použitých při nested PCR genu TPI byla testována přímo na ředící řadě vytvořené z kultury trofozoitů *G. intestinalis* o známé koncentraci (viz kapitola III. Materiál a metody). Záchytnost použitých primerů za daných podmínek byla od koncentrace 10^2 trofozoitů, ale dobře viditelná záchytnost byla na gelu zřejmá až od 10^4 trofozoitů (Obr. 8).



Obr. 8: Obrázek gelu z PCR ředící řady vytvořené z kultury trofozoitů *G. intestinalis* o známé koncentraci (ZKT=zásobní kultura trofozoitů).

4.3. Experimentální infekce zvířat

Experimentální infekce pískomilů byla provedena s infekční dávkou přibližně 10^6 trofozoitů. Tato infekce byla úspěšná, k nepravidelnému vylučování cyst došlo přibližně po třech týdnech. Infekce byla však natolik slabá, že při flotačním vyšetření docházelo k nálezům jen několika málo cyst na preparátu (většinou 1-2 cysty; Obr. 9). Při ověřování pozitivity pomocí nested PCR genu TPI se však nepodařilo *G. intestinalis* sekvenčně zachytit. Tento výsledek koresponduje se zjištěnou senzitivitou diagnostického PCR pro *G. intestinalis*.



Obr. 9: Fotografie cyst *G. intestinalis* (zvětšení mikroskopu 40×; Olympus CX22LED).

V. Diskuse

Dříve byla *Giardia intestinalis* považována za patogen, ale ukázalo se, že její role v lidském zdraví a nemoci závisí na několika faktorech, jako je virulence giardie, úroveň výživy, imunita a složení střevního mikrobiomu hostitele (Barash *et al.*, 2017; DuPont, 2013). Dále se ukazuje, že by *G. intestinalis* mohla hrát významnou roli v mikrobiomu hostitele (např. Allain *et al.*, 2017; Barash *et al.*, 2017; Beatty *et al.*, 2017; Gerbaba *et al.*, 2015). Nicméně toto téma je stále předmětem mnoha diskusí.

Srovnání prevalence v industrializovaných a rozvojových zemích

Naše laboratoř se zabývá prevalenčními studii různých prvoků (*Blastocystis* spp., *Dientamoeba fragilis* a *G. intestinalis*) ve zdravé populaci lidí a zvířat. Cílem této práce bylo zjistit prevalenci *G. intestinalis* u zdravých lidí v ČR, a zda se vyskytují i její asymptomatické infekce. O prevalenci *G. intestinalis* u zdravých lidí ve vyspělých zemích se mnoho neví, protože jsou většinou diagnostikovány hlavně případy klinické giardiózy (např. Fletcher *et al.*, 2012; Seguí *et al.*, 2018). Všeobecně ale platí, že se prevalence *G. intestinalis* v industrializovaných zemích pohybuje mezi 2 až 5 % (DuPont, 2013), zatímco v rozvojových zemích je rozšířenější, a to u 20 až 40 % populace (Abdullah *et al.*, 2016).

Výsledky naší studie, kde jsme nezachytili žádný pozitivní lidský vzorek ze 110 celkově otestovaných vzorků pro *G. intestinalis*, víceméně korelují s prevalencemi z ostatních zemí západního světa. Např. v Německu byla dle práce Sagebiel *et al.* (2006) zjištěna prevalence 1,5 %, v Portugalsku se pak ukázala prevalence vyšší, a to 6,8 % (Júlio *et al.*, 2012), na Slovensku v práci Dudlová *et al.* (2016) zjistili prevalenci 0,72 % a v USA v práci Zylberberg *et al.* (2017) byla zjištěna prevalence 0,11 %. Oproti tomu prevalence zjištěné např. v Africe jsou výrazně vyšší, např. u dětí z vesnic v Guinea Bissau byla zjištěná prevalence 56 % (Ferreira *et al.*, 2012), prevalence *G. intestinalis* u lidí z vesnic v Keni byla 41 % (Easton *et al.*, 2016), v Tanzánii byla stanovená prevalence 53 % (Forsell *et al.*, 2016) a v Ugandě byla prevalence 40,7 % (Johnston *et al.*, 2010).

Naopak v Argentině autoři studie Minvielle *et al.* (2008) zkoumali prevalenci a zastoupení genotypů *G. intestinalis* u lidí i zvířat, kdy s použitím stejného PCR protokolu byla u lidí detekována vysoká prevalence 72 %. Většinou se jednalo o asambláž B (93 %), asambláž A byla detekována pouze u 7 %.

Vyšší prevalence byly zachyceny i ve studiích Rudohradská *et al.* (2012) a Ramírez *et al.* (2015), kteří se zabývali přítomností *G. intestinalis* u dětí bez klinických symptomů na Slovensku a v Kolumbii. Na Slovensku potvrdili infekci *G. intestinalis* u 25 % romských dětí ve věku do 14 let, kdy nejvyšší prevalence (67 %) byla zjištěna u dětí ve věku mezi prvním až pátým rokem života (Rudohradská *et al.*, 2012). U dětí v Kolumbii zjistili prevalence od 76 až 80 % (Ramírez *et al.*, 2015).

Co se týká prevalence u zvířat, detekovali jsme 2 pozitivní vzorky z celkového počtu 41 zpracovaných vzorků trusu (tj. 4.9 %). Jednalo se o vzorek králíka a psa. Giardie ze vzorku králíka patřily do asambláže B. Vzorek psa byl shledán pozitivním pouze koproskopickým vyšetřením, při PCR se ale jevil opakovaně negativní, proto nedošlo k zařazení do asambláže. Prevalence *G. intestinalis* u zvířat byla zjišťována např. i v Číně, kde molekulárně zjistili 8% prevalenci u závodních koní (22 pozitivních ze 264 vzorků; Deng *et al.*, 2017). V Polsku zase zachytili cca. 3-4% prevalenci u koček (Jaros *et al.*, 2011). Studie Minvielle *et al.* (2008) popisuje jen jeden pozitivní vzorek z deseti vzorků zvířat (zejména psů a krav). Podobně jako v naší studii zde byla zjištěna falešná negativita PCR protokolu, tzn. že po koproskopickém vyšetření byly vzorky pozitivní, ale molekulární analýzy přítomnost giardií nezachytily (Minvielle *et al.*, 2008). V těchto studiích byly zachyceny u zvířat asambláže A, B, D a G.

Studie *Giardia intestinalis* v rámci ČR

Naše práce je jednou z mála prací, která se zabývá prevalencí *G. intestinalis* u zdravých lidí a zvířat, kteří jsou s těmito lidmi v bližším kontaktu (např. psi, slepice, králíci, koně, kočky, ovce a prasata) v rámci České republiky. Ke stanovení prevalence *G. intestinalis* jsme použili koproskopickou a molekulární diagnostiku. V případě koproskopické metody se jednalo o modifikovanou Sheatherovu flotaci, kterou byla zachycena celková prevalence 1,3 %, zatímco PCR zachytila prevalenci pouze 0,7 % (viz dále). V rámci zvířecích vzorků pak byla prevalence stanovena na 4,9 % flotací a 2,4 % pomocí PCR.

V rámci ČR byla již dříve provedena prevalenční studie *G. intestinalis* u psů a jejich ošetřovatelů Zemanové *et al.* (2005), která se zaměřila na psy z domácích chovů a z útulků za pomoci koproskopické diagnostiky. Celkově vyšetřili 326 psích a 20 lidských vzorků. *Giardia* byla nalezena u psů z domácích chovů v 2,4 % a v trusu psů chovaných v útulcích v 11 %. Kvůli případnému ověření zoonotického potenciálu byli vyšetřeni i ošetřovatelé, u kterých nebyl zjištěn žádný případ přítomnosti *G. intestinalis*. Nepoužili však žádnou molekulární diagnostickou metodu, takže nemohli určit asambláže. V naší studii jsme vyšetřili celkem 110 lidí a 18 psů. I v našem případě byla zjištěna 0% prevalence u lidí. U psů měli autoři výše zmíněné studie výrazně vyšší prevalenci *G. intestinalis*, protože měli k dispozici více psích vzorků, my jsme však naopak měli k dispozici široké spektrum zvířat. V naší práci byly vzorky vyšetřeny koproskopicky stejně jako ve zmíněné práci Zemanová *et al.* (2005), ale navíc jsme použili i PCR, takže jsme mohli zjistit zařazení *G. intestinalis* do příslušné asambláže. Nám se podařilo zachytit jeden pozitivní vzorek psa, který se při PCR ale jevil jako negativní, takže nebylo možno zjistit příslušnou asambláž.

Výběr a optimalizace vhodného diagnostického PCR

V naší práci byly optimalizovány tři protokoly pro molekulární diagnostiku *G. intestinalis*, a to prostřednictvím různých genů - triózafosfát-izomerázy (TPI), beta-giardinu (BG) a RNA malé ribozomální podjednotky (SSU rRNA). Při výběru primerů a sestavování protokolu pro gen TPI jsme vycházeli z práce Sulaiman *et al.* (2003) a Minetti *et al.* (2015). Pro gen BG a SSU rRNA jsme se inspirovali prací Minetti *et al.* (2015).

Při ověřování a optimalizaci protokolů pomocí gradientové PCR jsme zjistili, že nejvíce specifický ze všech genů vychází gen TPI, jako tomu je i v mnoha dalších pracích (např. Damitie *et al.*, 2018; David *et al.*, 2011; Minetti *et al.*, 2015).

Srovnání specifity PCR protokolů pro *G. intestinalis*

V rámci testování nejvhodnějšího PCR protokolu, pouze PCR genu TPI dokázala potvrdit přítomnost *G. intestinalis* v trusu králíka. Všechny tři PCR protokoly (TPI, BG, SSU rRNA) sice ukazovaly suspektní amplikony ve správné velikosti pro každý z nich (530 bp, 511 bp, 292 bp), ale pouze protokol využívající gen TPI vykazoval dostatečnou specifitu pro detekci *G. intestinalis*.

Sekvence genu TPI *G. intestinalis* zobrazovaly jeden výrazný signál, který potvrdil přítomnost giardie. Naopak sekvence ostatních dvou genů (BG, SSU rRNA) obsahovaly shluky signálů, ze kterých nebyla prokázána přítomnost *G. intestinalis* ani po použití klonování.

Tento fakt byl důležitým ukazatelem pro výběr PCR protokolu s genem TPI jako nejvhodnějšího pro diagnostiku giardie ze vzorků stolice a trusu. Navíc užitečnou výhodou tohoto protokolu je, že dokáže přímo rozlišit asambláže giardií na základě získaných sekvencí a následném ověřování v databázi Blast. Nevýhodou se později ukázala být nízká senzitivita tohoto protokolu a občasná amplifikace nejen *G. intestinalis*, ale i některých plísní a bakterií. To bylo nejspíše důvodem občasného výskytu suspektně pozitivních vzorků, u kterých se přítomnost *G. intestinalis* nepodařilo potvrdit sekvenčně. Tento problém se nepodařilo vyřešit ani pomocí klonování.

Ke srovnání čtyř různých PCR protokolů na základě odlišných genů (TPI, BG, glutamát dehydrogenázy - GDH a SSU rRNA) přistoupili v práci Minetti *et al.* (2015), kde ověřovali 406 vzorků stolic od pacientů s potvrzenou giardiózou v Severozápadní Anglii. Přítomnost giardie byla potvrzena u 54 % vzorků na základě PCR genů pro TPI, BG a GDH. Podobně jako v naší práci se PCR genu TPI ukázala nejvíce specifická ve srovnání s ostatními protokoly, protože zachytila nejvíce pozitivních vzorků, a to 86 %. PCR genu pro BG zachytila 76 % a PCR genu GDH 70 % pozitivních vzorků. Vzorky, které byly negativní ve všech třech předešlých PCR protokolech (TPI, BG a GDH), byly ještě podrobeny PCR genu pro SSU rRNA, z nichž bylo detekováno pozitivních dalších 41 % vzorků a zbylých 59 % vzorků zbylo negativních (Minetti *et al.*, 2015).

Srovnání flotace vs. PCR

Obecně je zřejmé, že k diagnostice *G. intestinalis* se používá velké množství metod s různým výsledkem – koproskopické metody (Jaros *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2015; Zemanová *et al.*, 2005), molekulární metody (Deng *et al.*, 2017; Jaros *et al.*, 2011; Minvielle *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2015) a serologické metody (Beyhan a Tas, 2017; Rudohradská *et al.*, 2012). Na tomto místě je třeba zdůraznit, že diagnostikovat přítomnost *G. intestinalis* ve vzorku trusu nebo stolice může být poměrně náročné (např. Ghosh *et al.*, 2000). Srovnání senzitivity a specifity jednotlivých diagnostických testů je proto předmětem mnoha publikací (např. Schuurman *et al.*, 2007; Nantavisai *et al.*, 2007). Např. v práci Ramírez *et al.* (2015) zjišťovali

prevalenci u dětí v Kolumbii, při koproskopickém vyšetření zjistili prevalenci 13 %, nicméně molekulárně byla detekována výrazně vyšší prevalence a to 76 až 80 %. Nižší záchytnost při použití koproskopických metod může být způsobena již zmíněným intermitentním vylučováním a naopak PCR diagnostika může být ovlivněna nízkou specifitou a senzitivitou testu.

Po otestování tří výše zmíněných protokolů se ukázala nejvíce specifická PCR genu TPI. Pro diagnostiku jsme proto dále používali jen PCR genu TPI a flotaci. Z těchto dvou metod se ukázala více senzitivní flotace, která zachytila dva pozitivní vzorky trusu (králíka a psa). Pomocí PCR genu TPI byl zachycen pouze jeden pozitivní vzorek trusu z králíka, který byl zařazen do asambláže B. Vzorek psa, u kterého byla *G. intestinalis* flotačně potvrzena, byl však molekulárně negativní. Jednalo se tedy o tzv. falešnou negativitu, která se v souvislosti s genem TPI objevila i ve studii Minvielle *et al.* (2008). Výsledek nulové prevalence u lidí se shodoval u obou použitých metod.

V práci Rahimian *et al.* (2018) se zabývali prevalencí *G. intestinalis* u lidí na území Íránu, kde posbírali 1790 vzorků stolice. K diagnostice přistupovali stejným způsobem jako v naší studii, kdy nejprve přítomnost giardie vyšetřovali koproskopicky (Sheatherovou flotací) se záchytností ve 4 % vzorků (tj., 78 pozitivních / 1790 vzorků celkem). Zároveň vzorky také ověřovali molekulárně pomocí nested PCR genu TPI dle práce Sulaiman *et al.* (2003). Prevalence dle molekulárních metod byla 3,3 % (tj., 60 pozitivních / 1790 vzorků celkem), tedy o něco méně než flotací (4 %; Rahimian *et al.*, 2018), stejně jako tomu bylo v našem případě (1,3 % po flotaci vs. 0,7 % po PCR ze všech vzorků).

Testování senzitivity nested PCR genu TPI

Poté, co jsme zvolili PCR genu TPI jako molekulárně diagnostickou metodu pro zjištění prevalence *G. intestinalis* jsme si chtěli ověřit citlivost této metody. Jinými slovy, od jakého počtu trofozoitů *G. intestinalis* ve vzorku jsme schopni pozitivitu zachytit. Pro účely experimentu jsme použili trofozoity z kultury *G. intestinalis*, protože se nám pro tento experiment nepodařilo získat dostatečné množství cyst z experimentálně infikovaných pískomilů. Z kultury trofozoitů jsme desítkovou ředící řadou připravili koncentrace od 10^4 - 10^{-2} trofozoitů (kde 10^{-2} trofozoitů odpovídá přibližně $\frac{1}{4}$ DNA z jednoho trofozoita). Slabě viditelná byla záchytnost od 10^2 trofozoitů, avšak dobře viditelná byla na gelu

až od 10^4 trofozoitů. Experiment byl opakován dvakrát se stejným výsledkem. Kvůli velmi nízké citlivosti PCR genu TPI byla zpracování vzorků zastaveno na čísle 151, protože tímto způsobem není možné zachytit slabší úroveň infekce.

V práci Nantavisai *et al.* (2007) srovnávali citlivost PCR pro geny SSU rRNA, BG a TPI, a to tak, že citlivost ověřovali pomocí připravených koncentrací cyst (3,368; 674; 337 a 168 cyst/ml) a desítkové ředící řady z trofozoitů (10^5-1). Jako nejvíce citlivá při ověřování cyst se ukázala PCR genu SSU rRNA, která zachytila nejnižší koncentraci, a to 168 cyst/ml. Také při použití trofozoitů byla nejvíce senzitivní PCR genu SSU rRNA, která zachytila už 10 trofozoitů. PCR genu pro BG zachytila DNA z trofozoitů od 10^2 a PCR genu TPI až od 10^3 trofozoitů (Nantavisai *et al.*, 2007).

Do budoucna bude vhodné pro zpracování vzorků zvolit jinou citlivejší metodou (např. qPCR). V práci Verweij *et al.* (2003) zjišťovali detekční limit qPCR založený na SSU rRNA, a to sériovým ředěním z 2000 cyst. Zjistili, že qPCR je schopná zachytit DNA z ředění 10^{-1} cysty. Shledali tedy qPCR citlivou a specifickou metodou pro detekci *G. intestinalis*.

Experimentální infekce pískomilů

Pískomily jsme infikovali trofozoity *G. intestinalis* z kultury (dávku 10^6 trofozoitů perorálně). Přestože trofozoiti obvykle nejsou stádia zodpovědná za přenos giardií, díky nižší žaludeční kyselosti je infekce tímto působem u pískomilů možná. Pískomilové jsou proto velmi vhodným modelem pro studie *G. intestinalis*, proto mohou být infikovány izoláty z řady hostitelů, a to pomocí cyst i trofozoitů (Majewska, 1994; Tantawiwattananon *et al.*, 2006; Thompson, 1999). Naše infekce trofozoity byla úspěšná, nicméně docházelo k vylučování velmi malého množství cyst, a to cca 1-2 cysty na preparátu.

V práci Majewska (1994) infikovali sedm pískomilů perorálně, kdy každému pískomilovi podali 2×10^5 trofozoitů. Pro srovnání úspěšnosti infekce se spolu s pískomily infikoval i sám autor spolknutím gelové kapsle se stejným počtem trofozoitů. Trofozoiti byli v tomto případě chráněni použitím gelové kapsle, která se rozpustila až v tenkém střevě hostitele. U lidského dobrovolníka byla inkubační doba šest dní a docházelo k nepravidelnému vylučování cyst (max. 21 500 cyst/gram trusu). Ze sedmi pískomilů se infekce objevila pouze u dvou s inkubační dobou devět dní. U pískomilů docházelo k vylučování většího počtu cyst

(4 314 300 cyst/gram trusu; Majewska, 1994). Intenzita infekce u pískomilů v této práci byla výrazně silnější než u námi infikovaných pískomilů. Při koproskopickém vyšetření flotací jsme nacházeli maximálně jednu až dvě cysty na sklíčku, což odpovídá po semikvantitativním vyhodnocení flotace přibližně jednomu křížku, tedy velmi slabé infekci. Pozitivitu pískomilů se nicméně molekulárními metodami nepodařilo potvrdit. Tento výsledek je však v souladu s nízkou citlivostí výše zmíněného PCR protokolu používaného k detekci giardií. V případě králíka, u kterého se jednalo o infekci potvrzenou flotací s cca 10^2 cyst na preparátu, což odpovídá přibližně dvěma křížkům po semikvantitativním vyhodnocení flotace. V tomto případě se nám již podařilo přítomnost giardie potvrdit i prostřednictvím PCR.

Zoonotický potenciál

Jedním z cílů této práce bylo i ověřit zoonotický potenciál giardií. To se však nepodařilo kvůli velmi nízké prevalenci *G. intestinalis* ve vzorcích zvířat a 0% prevalenci u lidí. Zoonotický potenciál zjišťovali i v již zmíněné práci Zemanová *et al.* (2005), kdy měli k dispozici 326 vzorků psů a jejich 20 ošetřovatelů. U žádného z lidských vzorků však nebyla infekce *G. intestinalis* doložena. Naopak autorům studií Tsui *et al.* (2018) a Isaac-Renton *et al.* (1993) se podařilo prokázat zoonotický přenos *G. intestinalis* v Kanadě, kde byl rezervoárem prokázán bobr.

Na základě sekvenování celých genomů giardií v práci Tsui *et al.* (2018) charakterizovali 89 izolátů *G. intestinalis* pocházejících z míst vypuknutí nákazy a sporadické infekce. Z lidských vzorků pocházelo 38 izolátů, 29 izolátů pocházelo z vodních zdrojů a 22 izolátů od zvířat (bobři, psi, ovce, kočky). U všech izolátů byly zjištěny pouze asambláže A a B.

VI. Závěr

Ke stanovení prevalence *Giardia intestinalis* jsme použili dva diagnostické přístupy, a to koproscopickou (modifikovanou Sheatherovu flotaci) a molekulární diagnostiku (PCR a nested PCR). Prvním cílem byla optimalizace vybraných PCR protokolů založených na třech různých genech (BG, TPI a SSU rRNA) a vybrat z nich protokol vhodný pro diagnostiku *G. intestinalis* v naší laboratoři. Jako nejvhodnější molekulárně diagnostický přístup byla zvolena nested PCR genu TPI. Pouze tento protokol sekvenčně potvrdil přítomnost *G. intestinalis* v DNA trusu zvířete, u kterého byly giardie nalezeny při flotačním vyšetření. Navíc, tento protokol umožňuje přímo rozlišit asambláže giardií na základě získaných sekvencí.

Prevalence *G. intestinalis* u lidí a zvířat v České republice byla stanovena ze 151 vzorků stolice/trusu (110/41). Celková prevalence byla poměrně nízká, a to 1,3 % (2 ze 151 vzorků) na základě flotačního vyšetření a 0,7 % (1 ze 151 vzorků) pomocí PCR. U lidí přitom byla zjištěna 0% prevalence pomocí obou diagnostických přístupů. Zoonotický potenciál *G. intestinalis* se nám vlivem nízkého počtu pozitivních vzorků nepodařilo ověřit. V rámci zvířecích vzorků byla prevalence stanovena na 4,9 % flotací a 2,4 % pomocí PCR. Flotace se tedy ukázala jako citlivější metoda oproti použitému PCR protokolu (nested PCR genu TPI), jelikož zachytila pozitivitu vzorků králíka a psa. Naopak pomocí molekulární diagnostiky jsme byli schopni zachytit jen jeden pozitivní vzorek, a to vzorek králíka, který byl zařazen do asambláže B.

Při ověřování senzitivity PCR genu TPI bylo zjištěno, že pomocí tohoto genu jsme schopni zachytit přítomnost *G. intestinalis* až od přítomnosti DNA z cca 10^2 a více trofozoitů ve vzorku. Stejného výsledku jsme dosáhli i po opakování experimentu a zpracování dalších vzorků bylo zastaveno. Abychom byli schopni zachytit i slabé a asymptomatické infekce zejména u lidí, bude třeba pokračovat v diagnostice citlivější metodou, např. qPCR.

VII. Literatura

- Abdullah I, Tak H, Ahmad F (2016).** Predominance of gastrointestinal protozoan parasites in children: A brief review. *Journal of Health Education Research & Development*, 1:1-6.
- Adamu H, Wegayehu T, Petros B (2013).** High prevalence of diarrhoeagenic intestinal parasite infections among non art HIV patients in Fitcha Hospital, Ethiopia. *Plos One*, 8:5-9.
- Adeyemo EF, Singha G, Reddy P, Stenström TA (2018).** Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. *Acta Tropica*, 184:15-28.
- Ajjampur SS, Koshy B, Venkataramani M, Sarkar R, Joseph AA, Jacob KS, Ward H, Kang G (2011).** Effect of cryptosporidial and giardial diarrhoea on social maturity, intelligence and physical growth in children in a semi-urban slum in south India. *Annals of Tropical Paediatrics International Child Health*, 31:205-212.
- Ali SA, Hill DR (2003).** *Giardia intestinalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16:453-460.
- Allain T, Amat CB, Motta JP, Manko A, Buret AG (2017).** Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue Barriers*, 5:e1274354.
- Almeida A, Pozio E, Cacciò SM (2010).** Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:1895–1901.
- Arrowood MJ, Donaldson K (1996).** Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43:89.
- Barash NR, Maloney JG, Singer SM, Dawson SC (2017).** *Giardia* alters commensal microbial diversity throughout the murine gut. *Infection and Immunity*, 85:48-56.
- Beard CM, Noller KL, O'Fallon WM (1988).** Cancer after exposure to metronidazole. *Mayo Clinic Proceedings*, 63:147–153.
- Beatty JK, Akierman SV, Motta JP, Muise S, Workentine ML, Harrison JJ (2017).** *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal microbiota biofilms. *International Journal for Parasitology*, 47:311–326.
- Berrilli F, D'Alfonso R, Giangaspero A (2012).** *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Côte d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106:191–195.

- Beyhan YE, Tas CZ (2017).** Comparison of microscopy, ELISA, and real-time PCR for detection of *Giardia intestinalis* in human stool specimens. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 47:1295-1299.
- Bingham AK, Jarroll EL, Meyer EA, Radulescu S (1979).** *Giardia* sp.: physical factors of excystation in vitro and excystation vs. eosin exclusion as determinants of viability. *Experimental Parasitology*, 47:284-291.
- Blagg W, Schloegel EL, Mansour NS, Khalaf GI (1955).** A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 4:23–28.
- Boaitay YA, Nkrumah B, Idriss A, Tay SCK (2012).** Gastrointestinal and urinary tract pathogenic infections among HIV seropositive patients at the Komfo Anokye Teaching Hospital in Ghana. *BMC Research Notes*, 5:454.
- Brown SP, Cornforth DM, Mideo N (2012).** Evolution of virulence in opportunistic pathogens: Generalism, plasticity, and control. *Trends in Microbiology*, 20:336-342.
- Cacciò SM, Rinaldi L, Cringoli G (2007).** Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in the Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Parasitology*, 150:146–149.
- Castro-Hermida JA, González-Warleta M, Mezo M (2015).** *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: the need for safe drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218:132–138.
- Covacin C, Aucoin DP, Elliot A, Thompson RCA (2011).** Genotypic characterisation of *Giardia* from domestic dogs in the USA. *Veterinary Parasitology*, 177:28–32.
- Damitie M, Mekonnen Z, Getahun T, Santiago D, Leyns L (2018).** Molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in humans in Southern Ethiopia: a triosephosphate isomerase gene-targeted analysis. *Infectious Diseases of Poverty*, 5:7-17.
- Danciger AM, Lopez A (1975).** Numbers of giardia in the feces of infected children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24:237-42.
- David EB, Coradi ST, Oliveira-Sequeira TCG, Ribolla PEM, Katagiri S, Guimarães S (2011).** Diagnosis of *Giardia* infections by PCR-based methods in children of an endemic area. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17:209-215.
- Deng L, Li W, Zhong Z, Liu X, Chai Y, Luo X, Song Y, Wang W, Gong C, Huang X, Hu Y, Fu H, He M, Wang Y, Zhang Y, Wu K, Cao S, Peng G (2017).** Prevalence and molecular

characterization of *Giardia intestinalis* in racehorses from the Sichuan province of southwestern China. *Plos One*, 12:1-9.

Dobell C (1920). The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proceedings of the Royal Society*, 13:1-15.

Dudlová A, Juriš P, Jurišová S, Jarčuška P, Krčmér V (2016). Epidemiology and geographical distribution of gastrointestinal parasitic infection in humans in Slovakia. *Helminthologia*, 4:309–317.

DuPont HL (2013). *Giardia*: both a harmless commensal and a devastating pathogen. *Journal of Clinical Investigation*, 123:2352–2354.

Easton AV, Oliveira RG, O’Connell EM, Kepha S, Mwandawiro CS, Njenga SM (2016). Multi-parallel qPCR provides increased sensitivity and diagnostic breadth for gastrointestinal parasites of humans: field-based inferences on the impact of mass deworming. *Parasites & Vectors*, 9:38-60.

Einarsson E, Showgy M, Sward GS (2016). An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34:47-52.

Erlandsen SL, Feely DE (1984). Trophozoite motility and the mechanism of attachment. In: Erlandsen SL, Mevyer EA, *Giardia* and giardiasis, New York: Plenum Press.

Falagas ME, Walker AM, Jick H, Ruthazer R, Griffith, Snyderman DR (1998). Late incidence of cancer after metronidazole use: a matched metronidazole user/nonuser study. *Clinical Infectious Diseases*, 26:384–388.

Feng Y, Xiao L (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24:110–140.

Ferreira FS, Centeno-Lima S, Gomes J, Rosa F, Rosado V, Parreira R (2012). Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children from the Cufada Lagoon Natural Park, Guinea-Bissau. *Parasitology Research*, 111:2173–2177.

Flanagan P (1992). *Giardia*-diagnosis, clinical course and epidemiology. *Epidemiology and Infection*, 109:1-22.

Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J (2012). Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 25:420–449.

Fink MY, Singer SM (2017). The intersection of immune responses, microbiota, and pathogenesis in giardiasis. *Trends in Parasitology*, 33:901–913.

- Forsell J, Granlund M, Samuelsson L, Koskiniemi S, Edebro H, Evengard B (2016).** High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1–3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasites & Vectors*, 9:370-382.
- Gerbaba T, Gupta P, Rioux K, Hansen D, Buret AG (2015).** *Giardia duodenalis*-induced alterations of commensal bacteria kill *Caenorhabditis elegans*: a new model to study microbial interactions in the gut. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308:550–561.
- Ghoshal U, Shukla R, Pant P, Ghoshal UC (2016).** Frequency, diagnostic performance of coproantigen detection and genotyping of the *Giardia* among patients referred to a multi-level teaching hospital in northern India. *Pathogens and global health*, 110:316–320.
- Ghosh S, Debnath A, Sil A, De S, Chattopadhyay DJ, Das P (2000).** PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. *Molecular and Cellular Probes*, 14:181–189.
- Gordts B, Retore P, Cadranel S, Helemhof XV, Rahman M, Butzler JP (1984).** Routine culture of *Giardia lamblia* trophozoites from human duodenal aspirates. *Lancet*, 2:137-138.
- Graczyk TK, Lucy FE, Tamang L, Miraflor A (2007).** Human enteropathogen load in activated sewage sludge and corresponding sewage sludge end products. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:2013–2015.
- Guy RA, Payment P, Krull UJ, Horgen PA (2003).** Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:5178-5185.
- Halliez MC, Buret AG (2013).** Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World Journal of Gastroenterology*, 19:8974–8985.
- Hanevik K, Kristoffersen E, Mørch K, Rye KP, Sørnes S, Svård S, Bruserud Ø, Langeland N (2017).** *Giardia*-specific cellular immune responses in post-giardiasis chronic fatigue syndrome. *BMC Immunology*, 18:5.
- Haque R, Roy S, Siddique A, Mondal U, Rahman SM, Mondal D, Houpt E, Petri WA, (2007).** Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76:713–717.
- Heyworth MF (2016).** *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*, 23:13.
- Chappell CL, Matson CC (1992).** *Giardia* antigen detection in patients with chronic gastrointestinal disturbances. *The Journal of Family Practice*, 35:49-53.

- Ignatius R, Gahutu JB, Klotz C, Steininger C, Shyirambere C, Lyng M, Mockenhaupt F P (2012).** High prevalence of *Giardia duodenalis* assemblage B infection and association with underweight in Rwandan children. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6:1677.
- Isaac-Renton J, Cordeiro C, Sarars K, Shahriari H (1993).** Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *Journal of Infection*, 167:431-440.
- Jahan N, Khatoon R, Ahmad SA (2014).** Comparison of microscopy and enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of *Giardia lamblia* in human faecal specimens. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8:11-13.
- Jaros D, Zygnier W, Jaros S, Wedrychowicz H (2011).** Detection of *Giardia intestinalis* Assemblages A, B and D in domestic cats from Warsaw, Poland. *Polish Journal of Microbiology*, 60:259–263.
- Jendryczko A, Sodowska H, Drozd M (1993).** Zinc deficiency in children infected with *Giardia lamblia*. *Wiadomości Lekarskie*, 46:32–35.
- Johnston AR, Gillespie TR, Rwego IB, McLachlan TLT, Kent AD, Goldberg TL (2010).** Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in western Uganda. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 4:e683.
- Joseph J, Murthy S, Garg P, Sharma S (2006).** Use of different stains for microscopic evaluation of corneal scrapings for diagnosis of microsporidial keratitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:583–585.
- Júlio C, Vilares A, Oleastro M, Ferreira I, Gomes S, Monteiro L, Angelo H (2012).** Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: a case study in Portugal. *Parasites & Vectors*, 5:22.
- Keselman A, Li E, Maloney J, Singer SM (2016).** The microbiota contributes to CD8+ T cell activation and nutrient malabsorption following intestinal infection with *Giardia duodenalis*. *Infection and Immunity*, 84:2853–2860.
- Kotloff KL, Blackwelder WC, Nasrin D, Nataro JP, Farag TH, van Eijk A, Adegbola RA, Alonso PL, Breiman RF, Golam Faruque AS, Saha D, Sow SO, Sur D, Zaidi AK, Biswas K, Panchalingam S, Clemens JD, Cohen D, Glass RI, Mintz ED, Sommerfelt H, Levine MM (2012).** The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) of diarrheal disease in infants and young children in developing countries: epidemiologic and clinical methods of the case/control study. *Clinical Infectious Diseases*, 55:232–245.
- Lambl W (1859).** Mikroskopische untersuchungen der Darmexcrete. *Vierteljahrsschr Prakst Heikunde*, 61:1–58.

- Lebbad M, Mattsson JG, Christensson B, Ljungström B, Backhans A, Andersson JO, Svärd SG (2010).** From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Veterinary Parasitology*, 168:231–239.
- Leme´e V, Zaharia I, Nevez G, Rabodonirina M, Brasseur P, Ballet JJ, Favennec L (2000).** Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46:819–821.
- Lim Y, Iqbal A, Surin J, Sim B, Jex A, Nolan M, Smith H, Gasser R (2011).** First genetic classification of *Cryptosporidium* and *Giardia* from HIV/AIDS patients in Malaysia. *Genetics and Evolution*, 11:968–974.
- Lim YA, Ahmad RA, Smith HV (2008).** Current status and future trends in *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology in Malaysia. *Journal of Water and Health*, 6:239–254.
- Liu A, Yang F, Shen Y, Zhang W, Wang R, Zhao W (2014).** Genetic analysis of the Gdh and Bg genes of animal-derived *Giardia duodenalis* isolates in Northeastern China and evaluation of zoonotic transmission potential. *PLoS One*, 9:e95291.
- Majewska AC (1994).** Successful experimental infections of a human volunteer and mongolian gerbils with *Giardia* of animal origin. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88:360-362.
- Meyer EA, Jarroll EJ (1980).** *Giardiasis*. *American Journal of Epidemiology*, 111:1-12.
- Minetti C, Chalmers RM, Beeching NJ, Probert C, Lamden K (2016).** *Giardiasis*. *British Medical Journal*, 27:355-364.
- Minetti C, Lambden K, Durband C, Cheesbrough J, Fox A, Wastling JM (2015).** Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. *Parasites & Vector*, 8:444.
- Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA (2008).** First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103:98-103.
- Modrý D, Pafčo B, Petrželková KJ, Hasegawa H (2018).** Parasites of Apes, an atlas of coproscopic diagnostics. In: Doležalová J, Pafčo B, Modrý D, Pomajbíková KJ, Parasite quantification, Edition Chimaira, ISBN:978-3-89973-116-3.
- Mørch K, Hanevik K, Rortveit G (2009).** Severity of *Giardia* infection associated with post-infectious fatigue and abdominal symptoms two years after. *BMC Infectious Diseases*, 9:206-215.

- Muhsen K, Levine MM (2012).** A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clinical Infectious Diseases*, 55:271–293.
- Nantavisai K, Mungthin M, Tan-ariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S (2007).** Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:581–583.
- Nguyen TT, Traub R, Pham PD, Nguyen HV, Nguyen KC, Phung CD, Dalsgaard FE (2016).** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in environmental samples in Hanam province, Vietnam. *Food and Waterborne Parasitology*, 3:13–20.
- Nikaeen M, Mesdaghinia AR, Jeddi-Tehrani M, Rezaeian M, Makimura K (2005).** A Nested-PCR Assay for Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Water Samples. *Iranian Journal of Public Health*, 34:13-18.
- Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, Viallard JF, Gardembas M, Galicier L, Schleinitz N, Suarez F, Soulas-Sprauel P, Hachulla E, Jaccard A, Gardeur A, Théodorou I, Rabian C, Debré P (2008).** Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clinical Infectious Diseases*, 46:1547-1554.
- Ordóñez-Mena JM, McCarthy ND, Fanshawe TR (2018).** Comparative efficacy of drugs for treating *giardiasis*: a systematic update of the literature and network meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73:596-606.
- Ortega YR, Adam RD (1997).** *Giardia*: overview and update. *Clinical Infectious Diseases*, 25:545-549.
- Pantchev N, Broglia A, Paoletti B, Globokar Vrhovec M, Bertram A, Nöckler K (2014).** Occurrence and molecular typing of *Giardia* isolates in pet rabbits, chinchillas, guinea pigs and ferrets collected in Europe during 2006–2012. *Veterinary Record*, 175:18-28.
- Prystajacky N, Tsui CK-M, Hsiao WWL, Uyaguari-Diaz MI, Ho J, Tang P, Isaac-Renton J (2015).** *Giardia* spp. are commonly found in mixed assemblages in surface water, as revealed by molecular and whole-genome characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 81:4827–4834.
- Rahimian F, Sadraei J, Pirestani M, Ghaffarifar F (2018).** A modified PCR-RFLP method to determine genetic diversity of *Giardia lamblia* human isolates based on triosephosphate isomerase (TPI) gene. *Acta Tropica*, 186:58–62.

- Ramírez JD, Heredia RD, Hernández C, León CM, Moncada LI, Reyes P, Pinilla AE, Lopez MC (2015).** Molecular diagnosis and genotype analysis of *Giardia duodenalis* in asymptomatic children from a rural area in central Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 32:208–213.
- Rendtorff RC (1954).** The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. *Giardia lamblia* cysts given in capsules, *American Journal of Hygiene*, 59:209–220.
- Reynoso-Robles R, Ponce-Macotela M, Rosas-López LE, Ramos-Morales A, Martínez-Gordillo MN, González-Maciél A (2015).** The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an in vivo model. *Scientific Reports*, 5:151-168.
- Rudohradská P, Halánová M, Ravaszová P, Goldová M, Valenčáková A, Halán M, Papajová I, Pohorencová A, Valko J, Čisláková L, Juriš P (2012).** Prevalence of intestinal parasites in children from minority group with low hygienic standards in Slovakia. *Helminthologia*, 49:63-66.
- Ryan U, Cacciò SM (2013).** Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43:943–956.
- Sagebiel D, Weitzel T, Stark K, Leitmeyer K (2009).** Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin. *Parasitology Research*, 105:681–687.
- Seguí R, Muñoz-Antoli C, Klisiowicz DR, Oishi CY, Köster PC, Lucio A, Carmena D (2018).** Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. *Parasites & Vectors*, 11:490-509.
- Shukla G, Devi P, Sehgal R (2008).** Effect of *Lactobacillus casei* as a probiotic on modulation of giardiasis. *Digestive Diseases and Sciences*, 53:2671–2679.
- Schuurman T, Lankamp P, Belkum A, Kooistra-Smid M, Zwet A (2007).** Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. *Clinical Microbiology and Infection*, 13:1187–1191.
- Singer SM, Nash TE (2000).** The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 181:1510–1512.
- Solarczyk P, Wojtkowiak-Giera A, Hołysz M, Słodkiewicz-Kowalska A, Jagodziński PP, Stojęcki K, Rocka A, Majewska AC, Skrzypczak L (2018).** New primers for fast detection of *Giardia duodenalis* assemblages A and B using realtime PCR. *Acta Protozoologica*, 57:43-48.

- Solaymani-Mohammadi S, Genkinger J, Loffredo Ch, Singer S (2010).** A meta-analysis of the effectiveness of albendazole compared with metronidazole as treatments for infections with *Giardia duodenalis*. *Neglected Tropical Diseases*, 4:682-692.
- Sprong H, Cacciò SM, Giessen JW (2009).** Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 3:558-570.
- Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L (2003).** Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases*, 9:1444-1452.
- Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J (2010).** Metody molekulární biologie, Brno, Masarykova univerzita, ISBN: 9788021038417.
- Taghi-Kilani R, Gyurek LL, Millard PJ, Finch GR, Belosevic M (1996).** Nucleic acid stains as indicators of *Giardia muris* viability following cyst inactivation. *International Journal for Parasitology*, 26:637-46.
- Toro-Londono MA, Bedoya-Urrego K, Garcia-Montoya GM, Galvan-Diaz AL, Alzate JF (2019).** Intestinal parasitic infection alters bacterial gut microbiota in children. *PeerJ*, 7:7:e6200.
- Tantawiwattananon N, Sangloun Ch, Buddhironkawatr R, Sukthana Y (2006).** Cultivation of *Giardia duodenalis* in Mongolian gerbils. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 3:21-3.
- Thompson RCA (1999).** Animal models of giardiasis. In: Zak O, Sande MA, Handbook of animal models of infection. San Diego: *Academic Press*, 1999:867-872.
- Tsui C, Miller R, Uyaguari-Diaz M, Tang P, Chauve C, Hsiao W, Isaac-Renton J, Prystajecy N (2018).** Beaver fever: whole-genome characterization of waterborne outbreak and sporadic isolates to study the zoonotic transmission of giardiasis. *mSphere*, 3:1-17.
- Upcroft P, Upcroft JA (2001).** Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:150-164.
- Vanni I, Cacciò SM, Lith L, Lebbad M, Svärd SG, Pozio E, Tosini F (2012).** Detection of *Giardia duodenalis* assemblages A and B in human feces by simple, assemblage-specific PCR assays. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6:e1776.
- Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, Rooyen MAA, Lieshout L, Polderman AM (2003).** Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Molecular and Cellular Probes*, 17:223-225.
- Volf P, Horák P (2007).** Paraziti a jejich biologie, Triton, Praha, ISBN 978-80-7387-008-9.

- Wensaas KA, Langeland N, Hanevik K, Mørch K, Eide GE, Rortveit G (2012).** Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 3 years after acute giardiasis: historic cohort study. *Gut*, 61:214-219.
- Zahedi A, Field D, Ryan U (2017).** Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland-first report of assemblage E. *Parasitology*, 144:1154-1161.
- Zajac AM, Conboy GA (2012).** Veterinary clinical parasitology, Wiley-Blackwell, USA, ISBN: 978-0-8138-2053-8.
- Zemanová I, Husník R, Svobodová V (2005).** *Giardia intestinalis* u psů – výskyt, zoonotický potenciál a využití endoskopické diagnostiky. *Veterinářství*, 55:319–325.
- Zylberberg HM, Green PH, Turner KO, Genta RM, Lebwohl B (2017).** Prevalence and predictors of *Giardia* in the United States. *Digestive Diseases and Sciences*, 62:432–40.