Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Průzkum výskytu oportunního prvoka, *Giardia intestinalis*, u zdravých lidí a jejich zvířat v ČR s použitím qPCR

Diplomová práce

Bc. Kristýna Brožová

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Milan Jirků

České Budějovice 2021

Brožová K., 2021: Průzkum výskytu oportunního prvoka, *Giardia intestinalis*, u zdravých lidí a jejich zvířat v ČR s použitím qPCR. [Survey of the occurrence of the opportunistic protist, *Giardia intestinalis*, in healthy people and their animals in the Czech Republic with using qPCR. Mgr. Thesis, in Czech] –45 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The main aim of this study was to optimize the qPCR diagnostic protocol for determination of the prevalence of intestinal protist, *Giardia intestinalis*, in a volunteer group across the Czech Republic. A total of 428 samples were collected from gut-healthy humans (296) and from animals (132) with which these people were in close contact. The overall prevalence of *G. intestinalis* was 7 % in humans and 19 % in animals. In addition, we compared the sensitivity of two molecular methods for detecting of the presence of giardia, specifically qPCR and conventional PCR. Based on our results, we found out that qPCR is more sensitive method than PCR.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

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 7.12. 2021 Podpis……..…

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce MVDr. Kateřině Jirků, Ph.D. a odbornému školiteli RNDr. Milanovi Jirků za trpělivost, cenné rady a odborné vedení mé diplomové 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. Na závěr bych ještě chtěla poděkovat Studentské grantové agentuře za udělení studentského grantu a Mgr. Kláře Petrželkové, Ph.D. za pomoc se statistickým vyhodnocením.

Obsah

1 Úvod 1

1.1 Životní cyklus *Giardia intestinalis* 1

1.2 Genetická diverzita a hostitelská specifita 3

1.3 Klinické příznaky a patogeneze 4

1.4 *Giardia intestinalis* a mikrobiom člověka 5

1.5 Výskyt *Giardia intestinalis* 7

1.5.1 Výskyt u lidí 7

1.5.2 Výskyt u psů a koček 9

1.6 Diagnostika *Giardia intestinalis* 9

1.6.1 Koproskopická diagnostika 9

1.6.2 Imunodiagnostika 10

1.6.3 Molekulární diagnostika 10

2 Cíle 12

3 Materiál a metodika 13

3.1 Sběr vzorků 13

3.2 Molekulární diagnostika 13

3.2.1 Izolace celkové DNA 14

3.2.2 Diagnostika qPCR 14

3.2.4 Statistické srovnání citlivostí dvou molekulárních přístupů pro detekci giardie 15

3.3 Souvislost mezi specifickými faktory a výskytem *Giardia intestinalis* 15

3.4 Modifikovaná Sheatherova flotační metoda 16

4 Výsledky 17

4.1 Získaný soubor vzorků 17

4.2 Výskyt a prevalence *Giardia intestinalis* na základě qPCR 17

4.3. Kvantifikace intenzity infekce giardií v pozitivních vzorcích 18

4.4 Porovnání senzitivity diagnostických metod 19

4.5 Asambláže 20

4.6 Korelace výskytu *Giardia intestinalis* s vybranými specifickými faktory 21

4.6.1 Životní styl 21

4.6.2 Kontakt se zvířaty 21

4.6.3 Pohlaví a věk 22

4.7 Testování vnitřní inhibice 23

5 Diskuze 24

6 Závěr 32

7 Seznam použité literatury 34

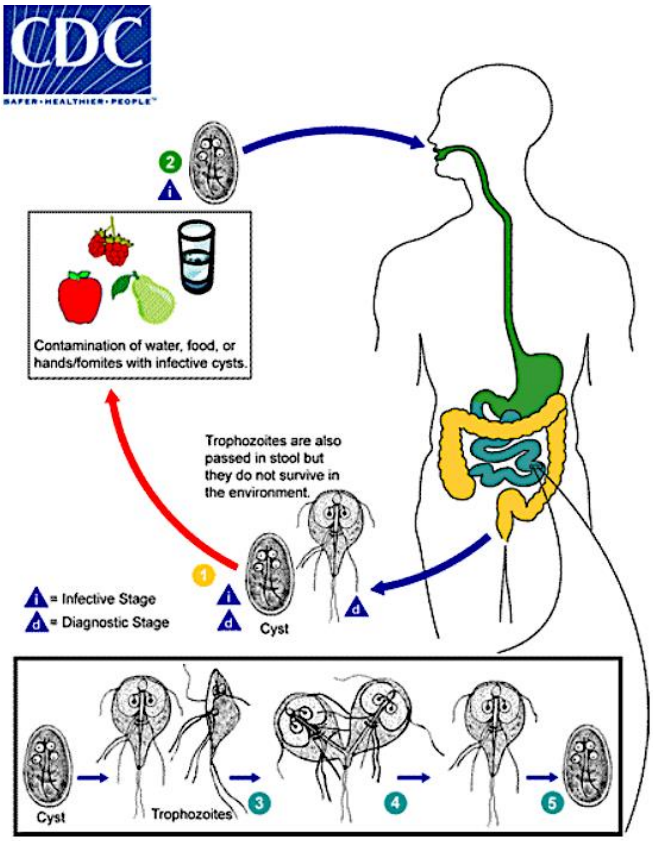
1 Úvod

Giardia intestinalis (*Giardia lamblia, Giardia duodenalis*) je kosmopolitně rozšířený střevní prvok, který ročně způsobuje odhadem 180 miliónů symptomatických infekcí (Torgerson et al., 2015). Patří do skupiny Excavata, řádu Diplomonadida (Volf a Horák, 2007). *Giardia intestinalis* kolonizuje střevo mnoha druhů savců včetně člověka (Plutzer et al., 2010). Je původcem onemocnění zvané giardióza. Giardióza je celosvětově považována za jedno z nejčastějších střevních parazitárních onemocnění u lidí (Puebla et al., 2017).

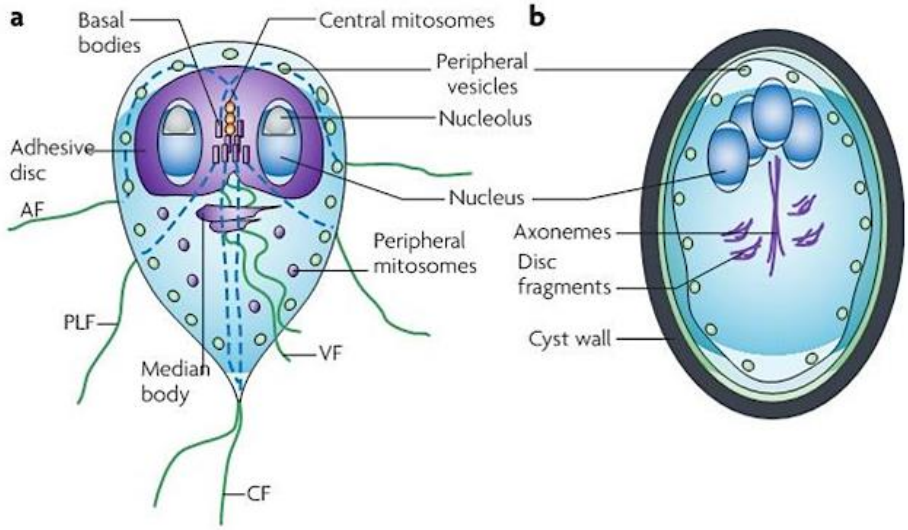
1.1 Životní cyklus *Giardia intestinalis*

Životní cyklus *G. intestinalis* (Obr. 1) je přímý a zahrnuje dvě stádia – bičíkatého trofozoita (Obr. 2a), který se váže na střevní mikroklky, a infekční cystu (Obr. 2b), která přetrvává v životním prostředí a je zodpovědná za přenos mezi hostiteli (Nosala a Dawson, 2015). K přenosu giardie dochází buď přímo (fekálně-orální cestou), nebo nepřímo (prostřednictvím kontaminovaných potravin a vody), přičemž druhá alternativa je hlavní cestou přenosu (Thompson et al., 2000).

Excystace cyst giardií začíná v žaludku, kde je stěna oslabena žaludečními šťávami hostitele a kyselým pH, a následně je dokončena v tenkém střevě. V tenkém střevě se z každé cysty uvolňují dva trofozoiti, kteří se dělí binárním dělením. Trofozoiti se přichycují ke střevnímu epitelu prostřednictvím ventrálního adhezivního disku. Životní cyklus giardie je uzavřen ve chvíli, kdy se trofozoiti oddělí od střevního epitelu a začnou se pohybovat gastrointestinalním traktem směrem k slepému a tlustému střevu, kde encystují. Takto nově vytvořené cysty jsou vylučovány spolu s exkrementy v nepravidelných intervalech do prostředí. Cysty jsou infekční ihned po vyloučení z těla hostitele a jsou velmi odolné, protože mohou přežít i několik měsíců ve studené vodě. Inkubační doba giardiózy se pohybuje od 9 do 15 dní po požití cyst (Feng a Xiao, 2011; Nosala a Dawson, 2015).



Obr. 1:. Životní cyklus *Giardia intestinalis* (https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index html).



Obr. 2: Morfologie životních stádií prvoka *Giardia intestinalis*: (a) trofozoit, velikost 10–20 µm × 5–15 µm, (b) stádium cysty, velikost 11–14 µm × 7–10 µm (https://sites.google.com/site/giardiaintestinalisvalkotovich/home/characteristics-of-giardia-intestinalis).

1.2 Genetická diverzita a hostitelská specifita

Výzkumy DNA polymorfismů odhalily, že by giardie mohla být považována za komplex několika druhů (Cacciò et al., 2018). I když jsou morfologicky nerozlišitelné, klasifikují se do osmi skupin označovaných jako asambláže A-H, které jsou fylogeneticky vzdálené (Ryan a Zahedi 2019; Cacciò et al., 2018). Asambláže byly rozlišovány na základě alozymových fylogenetických analýz (Monis et al. 1998). Fylogenetické analýzy byly prováděny hlavně na základě sekvencí genů pro glutamátdehydrogenázu (GDH) (Monis et al., 1998; Monis et al., 1999), trióza-fosfátizomerázu (TPI) (Monis et al., 1999) a pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) (Capewell et al., 2020).

U člověka byly dosud zaznamenány asambláže A a B, které vykazují širší hostitelskou specifitu a také zoonotický potenciál (Cacciò et al., 2018; Heyworth, 2016) (Tab. 1). Například psi mohou být potenciálně infikováni (zoonotickými) asambláženi A a B (De Quadros et al., 2016; Zahedi et al., 2017). Asambláže A a B lze ještě dále rozdělit. Asambláž A je rozdělena do tzv. sub-asambláží AI–AIV (Feng a Xiao, 2011; Zahedi et al., 2017). Sub-asambláže AI a AII byly běžně detekovány u lidí, zatímco AI, AIII a AIV jsou sub-asambláže zvířat (Hooshyar et al., 2017). Zoonotický potenciál je spojen pouze se sub-asambláží AI (Hooshyar et al., 2017). Asambláž B je kategorizovaná do čtyř sub-asambláží BI-BIV. Podle dostupné literatury byly u lidí nalezeny sub-asambláže BIII a BIV, zatímco BI a BII jsou specifické pro zvířata (Heyworth, 2016; Hooshyar et al., 2017). Sub-asambláže byly zavedeny na základě multilokusové sekvenční typizace za použití tří genů: BG (β-giardin), TPI a GDH (Cacciò et al., 2008).

Asambláže C až H mají, na rozdíl od předchozích, užší hostitelskou specifitu. Psi bývají infikováni asambláženi C a D (Zahedi et al., 2017). U koček se většinou vyskytuje asambláž F (Ramírez-Ocampo et al., 2017). Asambláž E se vyskytuje u kopytníků. Přítomnost asambláže E byla detekována také u lidí, i když s mnohem nižší frekvencí než asambláže A a B (Zahedi et al., 2017; Cacciò et al. 2018). Asambláž G se vyskytuje u hlodavců a asambláž H u ploutvonožců (více informací v tabulce 1) (Cacciò et al., 2018). Sporadicky byly asambláže C až H také zjištěny u lidí (Ryan a Zahedi, 2019). Sekvence z těchto izolátů se totiž vysoce shodovaly se sekvencemi asambláží C–H. Toto vše naznačuje, že současné nástroje pro molekulární genotypizaci mají své limity, a navíc může mít *G. intestinalis* širší

zoonotický potenciál, než se původně předpokládalo (Ryan a Zahedi, 2019; Capewell et al., 2020).

Tab. 1: Druhové zastoupení hostitelů v jednotlivých asambláží prvoka *Giardia intestinalis* (převzato z publikace Heyworth, 2016)

Asambláž	Hostitel
A	člověk, pes, kočka, slepice, kráva, ovce, koza, jelen, fretka, prase, bobr, činčila, jaguár, kůň, nehumánní primáti, tuleň, lachtan, los, sob, racek, kytovci
B	člověk, pes, kráva, gazela, jelen, kůň, bobr, ondatra, činčila, fretka, králík, morče, nehumánní primáti, slepice, ovce, tuleni, prase, lachtan, pštros, delfín, racek
C	pes, klokan, kráva, prase, kytovci
D	pes, liška, činčila, klokan, kráva, kytovci
E	kráva, ovce, prase, koza, kůň, liška, jelen, kočka
F	kočka, prase, kytovci
G	krysa, myš
H	tuleň, racek

1.3 Klinické příznaky a patogeneze

Giardia je neinvazivní prvok, který kolonizuje lumen tenkého střeva (Certad et al., 2017). Kolonizace hostitelského střeva giardiemi se může projevit jako akutní průjem, který pokud není léčen může přecházet v průjem chronický (Certad et al., 2017). Dále mezi typické klinické příznaky patří tzv. mastný průjem (vlivem přichycených trofozoitů na střevní sliznici nedochází ke vstřebávání tuků), nevolnost, ztráta hmotnosti, dehydratace. Méně časté příznaky jsou zvracení, krev ve stolici, nebo horečka (Certad et al., 2017). K manifestaci symptomů giardiózy jsou nejvíce náchylné malé děti (Thompson a Ash, 2016). Ovšem na základě studií se zdá být většina infekcí *G. intestinalis* asymptomatická (Muadica et al., 2020; Oliveira-Arbex et al., 2016; Puebla et al., 2017, Reh et al., 2019).

Patogenní mechanismus *G. intestinalis* u pacientů se zjevným klinickým onemocněním spočívá v přichycení trofozoitů na střevní epitel hostitele (Fink a Singer, 2017). Tím, že trofozoiti často pokrývají celý povrch epitelu tenkého střeva, mohou narušit příjem živin a vody (Fink a Singer, 2017). To následně odpovídá výše popsaným klinickým příznakům

a může vést k závažným gastrointestinálním poruchám a také k imunitní odezvě (Fink a Singer, 2017; Capewell et al., 2020).

Inkubační doba giardiózy většinou trvá jeden až dva týdny (Certad et al., 2017). Akutní fáze giardiózy obvykle přetrvává od jednoho do tří týdnů, ale příznaky mohou trvat někdy i měsíce (Certad et al., 2017). Většina infekcí sama odezní, ale v endemických oblastech je běžná recidiva akutního onemocnění. Chronické infekce mají za následek podvýživu, nedostatek mikroživin (vitamínů A, D, E, K a zinku), malabsorpci (hlavně tuků), ztrátu hmotnosti a jsou spojovány s narušením růstu a kognitivním vývojem u malých dětí (Abdullah et al., 2016; Allain a Buret, 2020; Certad et al., 2017; Squire a Ryan, 2017).

1.4 *Giardia intestinalis* a mikrobiom člověka

Během posledních let bylo dosaženo pokroku v pochopení vlivu *G. intestinalis* na diverzitu střevního bakteriálního mikrobiomu u člověka. Nicméně k úplnému pochopení vlivu giardie na střevní mikrobiom je stále potřeba dalších studií (Fekete et al., 2021). Obecně střevní mikroflóra hraje klíčovou roli v homeostázi střev a celkového zdraví jedince. Během gastrointestinálních onemocnění dochází velmi často k její změně. Giardie interaguje se střevním mikrobiomem jak přímo, tak i nepřímo a díky tomu může modulovat metabolismus hostitele a imunitní odpověď. To vše může mít systémové účinky, které potenciálně přetrvávají i poté, co je patogen odstraněn (Berry et al., 2020; Fekete et al., 2021).

Dysbióza střevní bakteriální mikroflóry způsobená přítomností giardií je často spojována se ztrátou bariérové funkce střevního epitelu (Barash et al., 2017). To může vést ve vzácných případech až k post-infekčním komplikacím, jako jsou dlouhodobé poruchy střev podobné syndromu dráždivého tračníku (Allain a Buret, 2020), chronická únava (Hanevik et al., 2017), post-infekční artritida, nebo bolest kloubů (Painter et al., 2017). Dieta může představovat nový rizikový faktor pro rozvoj těžké giardiózy a pro rozvoj post-infekčních komplikací, zejména u podvyživených dětí. Bylo prokázáno, že strava ovlivňuje složení střevní mikroflóry, což může způsobovat velmi různé symptomy při giardióze (Fekete et al., 2021).

Roli ve střevním mikrobiomu při giardióze hraje také užívání antibiotik (Singer a Nash, 2000; Maertens et al., 2021). Cílená infekce giardiemi u myší vykazuje proměnlivou míru úspěšnosti kolonizace ve střevě, kterou lze překonat perorálním podáváním antibiotik. Antibiotika výrazně snižují bakteriální diverzitu v trávicím traktu. U myší léčených antibiotiky byl zaznamenán daleko chroničtější průběh infekce giardií, než u myší bez užívání antibiotik (Singer a Nash, 2000; Maertens et al., 2021). Tato zjištění naznačují důležitou roli mikrobiomu při vzniku infekce *G. intestinalis* (např. Maertens et al., 2021). Giardióza se zpočátku hůře diagnostikuje, což často vede k předepisování antibiotik kvůli možné bakteriální infekci. Běžná antibiotika nejsou na giardii účinná, navíc přispívají k výraznému zhoršení průběhu infekce. Nesprávná léčba giardie antibiotiky může vést k závažnějším a déletrvajícím infekcím (Beer et al., 2017).

Nedávný výzkum se zaměřil také na význam probiotik v prevenci a léčbě giardiózy, a to v *in vitro* a *in vivo* experimentech. Výsledky naznačují, že některá probiotika mohou mít vliv na zmírnění průběhu giardiózy (Allain et al., 2018; Fekete et al., 2021). Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství prospívají zdraví hostitele. Jedná se o velkou třídu mikroorganismů, včetně bakterií a kvasinek. Probiotika mohou mít určité ochranné účinky proti jiným gastrointestinálním onemocněním, včetně některých parazitárních infekcí (Hill et al., 2014; Fekete et al., 2021). Za poslední dvě desetiletí několik studií zkoumalo účinky probiotických kmenů na zmírnění průběhu infekce giardiemi jako alternativní strategii prevence a léčby giardiózy (Allain et al., 2018; Fekete et al., 2021). Několik bakterií, které jsou používány v probioticích, vykazovaly cytotoxické účinky pro trofozoity giardie. Nejvýraznější účinky vykazovaly laktobacily, přičemž i několik dalších druhů vykazovalo takové účinky, tj. *Bifidobacterium* spp., *Weissella paramesenteroides*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii* (Allain et al., 2018; Fekete et al., 2021). Tudíž se zdá být užívání probiotik jako možnost podpůrné léčby giardiózy.

1.5 Výskyt *Giardia intestinalis*

1.5.1 Výskyt u lidí

Výskyt *G. intestinalis* je kosmopolitní a její prevalence se výrazně liší mezi rozvojovými a industrializovanými zeměmi. Vysoké prevalence giardie jsou hlášeny v rozvojových zemích, zejména v obydlených oblastech s nízkými hygienickými standarty a převážně u dětí (Sánchez et al., 2017). V rozvojových zemích je prevalence *G. intestinalis* vyšší, než ve vyspělých zemích, a to kolem 20 až 40 % (Abdullah et al., 2016; Samie et al., 2020). Je dobře známo, že v rozvojových zemích jsou infekce giardiemi spojeny se špatnými hygienickými podmínkami a špatnou kvalitou vody (Younas et al., 2008). Například studie z Jihoafrické republiky ukázala, že patogeny mohou být přenášeny požitím zeleniny zavlažované opětovným použitím odpadních vod (Gumbo et al., 2010).

Studie v Jižní Africe u dětí odhalily prevalenci giardie 1-30 % (Samie et al., 2009). V Zambii byla zjištěná 10% prevalence (33/329) u asymptomatických dětí ve věku 3–16 let (Tembo et al., 2020). V Malajsii byla zjištěna prevalence 12 % (Choy et al., 2014). V kolumbijském povodí Amazonky byla pozorována vysoká prevalence giardie, a to 65 % (184/284) ve vzorcích stolice získaných od dětí do 15 let. Takto vysoká prevalence souvisí s faktem, že lidé žijící v těchto oblastech mají špatné hygienické podmínky, což usnadňuje fekálně-orální přenos infekce (Sánchez et al., 2017). Prevalence giardiózy u lidí v různých regionech Íránu byla zjištěna od 1 % do 38 % (Daryani et al., 2012; Hooshyar et al., 2017). V nejnovějších studiích v Íránu zjistili 4% prevalenci (78/1790) *G. intestinalis* (Rahimian et al., 2018) a 8% prevalenci (84/1000) (Viesy et al.. 2020).

Prevalence giardie ve vyspělých zemích se pohybuje mezi 2 a 5 % (Abdullah et al., 2016; Samie et al., 2020). Nicméně o prevalenci *G. intestinalis* v populaci zdravých lidí (tzn. bez klinických příznaků charakteristických pro onemocnění střev) ve vyspělých zemích není mnoho informací, protože jsou převážně diagnostikovány pouze případy klinické giardiózy u pacientů (Seguí et al., 2018). V průmyslových zemích jsou případy giardie obvykle spojovány s cestováním a imigrací (Ekdahl a Andersson, 2005). K rizikovým skupinám patří zejména kojenci, malé děti ve školách a školkách, homosexuálové a imunosuprimovaní jedinci (Cacciò et al., 2018; Yoder et al., 2007; Samie et al., 2020).

Ve Spojených státech a Velké Británii je *G. intestinalis* nejběžnějším prvokem způsobujícím střevní potíže u lidí (Coffey et al., 2021). Ve Spojených státech je giardióza ojediněle zjišťována od roku 1992. V letech 1995 až 2016 byl v USA průměrný počet hlášených případů giardie 19 781 za rok (rozpětí 14 623–27 778 případů) (Coffey et al., 2021). V posledních letech se roční výskyt giardiózy ve Spojených státech snížil, a to u všech věkových skupin. Incidence giardie u mužů a starších věkových skupin neklesla v takové míře jako u žen a dětí (Coffey et al., 2021). V Anglii a Walesu je detekováno kolem 3000 až 4000 případů ročně (Public Health England, Londýn, Spojené království). Ve Spojeném království byla u asymptomatických dětí a dospělých zachycena 17% prevalence *G. intestinalis* (37/212) (Waldram et al., 2017) a 1% prevalence u 230 asymptomatických dětí (Davies et al., 2009).

Dalším příkladem země, ve které je *G. intestinalis* poměrně významným parazitárním onemocněním, je Kuba. Na Kubě infekce giardií představuje jednu z nejvýznamnějších střevních parazitárních infekcí u dětí vůbec a má zvláště silný klinický dopad na dětskou populaci (Núñez et al., 2003; Puebla et al., 2017). Prevalence se pohybuje mezi 9 až 22 % (Cañete et al., 2012; Puebla et al., 2014). U dětí v jeslích (0,5 – 5 let) na Kubě byla zachycena vysoká prevalence *G. intestinalis,* a to 54,8 % (57/104) (Cañete et al., 2012). Ve studii Puebla et al. (2017) u dětí na Kubě zjistili nižší prevalenci 8 % (68/847).

Dále byla zjišťována prevalence *G. intestinalis* např. i v Portugalsku a v dalších industrializovaných zemích. U zdravé dětské populace v Portugalsku zjistili prevalenci 1,9 % (16/844) (Júlio et al., 2012). Zajímavostí je, že ve Španělsku byla u asymptomatických dětí ve věku 1 rok až 16 let zjištěna prevalence *G. intestinalis* vyšší, a to 17,4 % (263/1512) (Muadica et al., 2020). V Maďarsku byla detekována giardie u 2 % lidí (6/300) (Plutzer et al., 2014). Například v Nizozemsku byla detekována prevalence 5,4 % u pacientů s gastroenteritidou a 3,3 % u asymptomatických osob (de Wit et al., 2001, Plutzer et al., 2014).

V České republice bylo v letech 1975 až 1982 vyšetřeno celkem 1 750 imunokompetentních osob na přítomnost gastrointestinálních parazitů. Jednalo se převážně o lidi zaměstnané v zemědělských podnicích. *Giardia intestinalis* byla pomocí mikroskopie zachycena u 1 % lidí (14/1750) (Stěrba et al., 1988).

1.5.2 Výskyt u psů a koček

Nedávná studie Bouzid et al. (2015) odhalila ve Velké Británii prevalenci *G. intestinalis* u psů 15,2 % a u koček 12 %. Autoři další studie Uiterwijk et al. (2018) popisují prevalenci u zdravých dospělých psů mezi 0,4–34 %, u psů se známkami gastrointestinálního onemocnění 2,3–25 %, u štěňat 7–63 % a u psů žijících ve skupinách 2,3–50 %. V České republice byla provedena studie pro zjištění prevalence *G. intestinalis* u psů žijících v domácnostech a v útulcích (Dubná et al., 2007). Výrazně vyšší prevalenci zaznamenali ve venkovských oblastech (2,2 %) ve srovnání s městem Praha (0,1 %). Tato studie také popsala korelaci mezi pobytem psa v útulku a infekcí giardií, jejíž prevalence se po delším pobytu v útulku 11× zvyšuje (Dubná et al., 2007). U psů z útulků byly detekovány následující prevalence *G. intestinalis*: 45,3 % (29/64) v ČR (Hammerbaurová, 2021), 55,2 % (101/183) v Itálii (Papini et al., 2005), 40,6 % (221/544) ve Španělsku (Ortuño a Castella, 2011) a 45,5 % (61/134) v Srbsku (Sommer et al., 2017).

V Dánské studii zaměřené na výskyt *G. intestinalis* u koček byla zjištěna 7% prevalence (20/284) (Enemark et al., 2020). V České republice bylo v roce 2017 vyšetřeno 118 toulavých a domácích koček (Kváč et al., 2017). Z nich bylo 5,9 % pozitivních na giardii, vyšší prevalence byla nalezena u toulavých koček (7,8 %), než u domácích koček (3,6 %).

1.6 Diagnostika *Giardia intestinalis*

Laboratorní diagnostika *G. intestinalis* je často založena na přímém mikroskopickém průkazu cyst, případně trofozoitů v exkrementech. Nicméně v současnosti je pro diagnostiku giardie k dispozici také několik imunologických testů a molekulárních metod (Hooshyar et al., 2019). Všechny diagnostické metody vykazují různý stupeň citlivosti a specificity (např. Uiterwijk et al., 2018).

1.6.1 Koproskopická diagnostika

Koproskopická detekce je považována za tzv. zlatý standard pro diagnostiku giardie (Laude et al., 2016). Touto metodou se detekují především cysty přítomné v exkrementech. Citlivost mikroskopických technik závisí na výběru metody, na počtu vyšetřených vzorků exkrementů a na zkušenostech diagnostika (Hooshyar et al., 2019). Využívají se barvené roztěry trusu (giemsa, trichrom, methylenová modř, lugolův roztok) a koncentrační metody (nejčastěji

flotace) (Hooshyar et al., 2019). Vzhledem k tomu, že cysty giardie jsou s exkrementy vylučovány v nepravidelných intervalech, lze citlivost těchto metod zvýšit odběrem a testováním tří vzorků od jedince ve třech po sobě jdoucích dnech (Soares a Tasca, 2016; Garcia et al., 2018). Vyšetření jednoho vzorku exkrementu zachytí přítomnost giardie v 60 až 80 % případů, vyšetření dvou vzorků stolice umožní detekci 80 až 90 % případů a vyšetřením třech vzorků stolice je možné detekovat přes 90 % infekcí (Hooshyar et al., 2019). Nevýhodou koproskopických metod je nízká citlivost, zejména pak v případě nízké intenzity infekce. Tyto podprahové infekce *G. intestinalis* u asymptomatických jedinců jsou velmi běžné (Alharbi et al., 2020). Proto je pro co nejpřesnější diagnostiku giardie vhodné využívat i jiné metodické přístupy (Soares a Tasca, 2016).

1.6.2 Imunodiagnostika

Během posledních třiceti let byly vyvinuty různé imunologické metody pro detekci *G. intestinalis* na základě detekce antigenů, nebo specifických protilátek ve stolici (Johnston et al., 2003). Jednou z nejčastěji užívaných imunodiagnostických metod pro detekci protilátek je ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Tyto metody jsou používány převážně v laboratořích bez zkušeností s parazitologickou diagnostikou a v nemocnicích, protože se jedná o časově nenáročné testy (Johnston et al., 2003; Hooshyar et al., 2019). Ovšem doporučením v případě imunodiagnostiky giardiózy je doplnění mikroskopickým vyšetřením (Hooshyar et al., 2019).

1.6.3 Molekulární diagnostika

Molekulární diagnostika umožňuje detekovat infekce *G. intestinalis* s využitím celkové DNA získané z exkrementů. Nejčastěji používanými molekulárními metodami jsou PCR a real-time PCR (qPCR) (Hooshyar et al., 2017, 2019).

Diagnostika pomocí PCR a qPCR

V průběhu let bylo zavedeno několik molekulárních markerů určených pro detekci a následně pro zkoumání genetické diverzity *G. intestinalis*. V tomto kontextu jsou nejčastěji používané geny kódující BG, TPI a GDH (Capewell et al., 2020). Navíc stejně jako u jiných druhů organizmů se pro molekulární genotypizaci využívá PCR a sekvenování části genu pro SSU rRNA (Wielinga a Thompson, 2007). Oblast SSU rRNA by měla být vhodnější

pro diagnostiku přítomnosti giardie, než ostatní geny, kvůli vyšší citlivosti, protože se jedná o gen, který je v genomu obsažen ve více kopiích (60 až 130 v jednom jádře) (Nantavisai et al., 2007). Nicméně kvůli vysokému obsahu GC bazí v oblasti pro SSU rRNA dochází k problémům se specificitou (Capewell et al., 2020; Wielinga a Thompson, 2007). Existují také některé zřídka používané markery, jako je spacer (ITS-1) nebo elongační faktor 1 (EF-1). Lze je však amplifikovat daleko obtížněji než jiné markery, proto se moc nepoužívají (Capewell et al., 2020). K určení asambláží *G. intestinalis* ve studiích se velmi často používá gen pro TPI (Brožová, 2019; Deng et al., 2017, Minetti et al., 2015; Rahimian et al., 2018).

Diagnostické metody založené na qPCR jsou vhodné jako cenný diagnostický nástroj v rámci epidemiologických studiích, protože vykazují nejvyšší citlivost (Uiterwijk et al., 2018). Ke qPCR detekci giardie se využívají geny pro BG (Hijjawi et al., 2018), SSU rRNA (Boadi et al., 2014; Verweij et al., 2004), GDH (Boadi et al., 2014; Yang et al., 2014) a TPI (Elwin et al., 2014). Avšak qPCR metody nejsou vhodné pro stanovení genetické diverzity, protože se pro amplifikaci využívají velmi krátké úseky genů (Laude et al., 2016). Detekce giardie pomocí qPCR byla shledána jako citlivější metoda pro diagnostiku, než je ELISA a mikroskopie. Například autoři studie Beyhan a Cengiz (2017) odhalili nejvyšší citlivost pro diagnostiku giardií u qPCR přístupu, oproti mikroskopii a ELISA. Podobně je to popsáno i v další studii Laude et al. (2016), kde qPCR diagnostika vykazovala citlivost 92 % a specifitu 100 % u detekce giardií. Například v práci Uehlinger et al. (2017) byla zjištěna velmi špatná citlivost a specifita konvenčního PCR (58 %; 56 %) oproti imunofluorescenci, mikroskopii a komerčně dostupným testům (SNAP Giardia).

Abychom byli lépe schopni porozumět molekulární epidemiologii a biologii *G. intestinalis*, bude do budoucna zapotřebí najít a zoptimalizovat vhodnější nástroje nejen pro její detekci, ale také pro její pro genotypizaci (Capewell et al., 2020).

2 Cíle

Hlavním cílem této studie bylo zjistit výskyt střevního prvoka *Giardia intestinalis* u zdravých dobrovolníků (tj. u lidí bez střevních potíží) s použitím qPCR diagnostiky. Následně zjistit, zda se *G. intestinalis* vyskytuje u zvířat, se kterými jsou tito lidé v kontaktu.

Dílčí cíle byly následující:

- optimalizovat qPCR protokol pro detekci *G. intestinalis*;
- zjistit prevalenci prvoka *G. intestinalis* v souboru dobrovolníků a jejich zvířat v České republice;
- porovnat citlivost qPCR metody a konvenčního PCR pro diagnostiku *G. intestinalis*;
- zjistit korelace mezi přítomností *G. intestinalis* a specifickými faktory (cestování, život na vesnici či ve městě, kontakt se zvířaty, pohlaví a věk).

3 Materiál a metodika

3.1 Sběr vzorků

Tato studie navazuje na rozsáhlý výzkum výskytu dalšího střevního prvoka *Blastocystis* sp. u zdravých lidí bez střevních potíží (Lhotská et al., 2020). Vzorky stolice a trusu (428) byly získány od asymptomatických dobrovolníků a jejich zvířat z různých částí České republiky v letech 2017 až 2019. V mojí studii bylo získáno o osm lidských vzorků více než v Lhotská et al. (2020). Žádný ze zahrnutých dobrovolníků netrpěl gastrointestinálními příznaky, jako je například průjem, bolest břicha nebo plynatost. Vzorky trusu zvířat jsme získávali pouze od zvířat, se kterými byli tito lidé v blízkém kontaktu, abychom ověřili případnou existenci zoonotického potenciálu [podrobnosti viz Lhotská et al. (2020)]. Pro účely této studie účastníci vyplnili dotazník, ve kterém poskytli informace o pohlaví, věku, lokalitě (město / vesnice), cestování (Evropa / mimo Evropu) a kontaktu se zvířaty (Lhotská et al., 2020). Každý účastník podepsal informovaný souhlas s účastí ve studii. Tato studie byla posouzena jako eticky přípustná a odpovídající rozsahu Etické komise Biologického centra AV ČR v.v.i. v Českých Budějovicích (číslo rozhodnutí 1/2017). Veškerá data byla přísně anonymizována a zpracovávána v souladu s platnými zákony České republiky (např. Zákon č. 101/2000 Sb. O ochraně osobních údajů).

3.2 Molekulární diagnostika

V rámci této studie byla pro diagnostiku *Giardia intestinalis* v souboru vzorků lidí a zvířat využita metoda real-time PCR (qPCR). V mojí bakalářské práci jsem se zabývala sensitivitou a specifitou několika protokolů konvenčního PCR pro diagnostiku giardií (Brožová, 2019). Nicméně jsem zjistila, že jejich citlivost je poměrně nízká a je obtížné zachytit nízké intenzity infekce, které se u asymptomatických jedinců vyskytují relativně často. Z těchto důvodů jsme se rozhodli zavést qPCR diagnostický protokol pro detekci *G. intestinalis* a zároveň srovnat citlivost obou molekulárních přístupů.

3.2.1 Izolace celkové DNA

Celková DNA ze získaných vzorků exkrementů byla extrahována pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA (Stratec, Německo) podle protokolu výrobce. Z každého vzorku bylo takto získáno 200 µl DNA (koncentrace v rozmezí 120 až 850 ng/µl), která byla skladována při teplotě -20 °C.

3.2.2 Diagnostika qPCR

Ve studii byly všechny vzorky DNA využity pro qPCR diagnostiku *G. intestinalis*. Protokol qPCR je navržen pro amplifikaci fragmentu genu pro SSU rRNA o velikosti 62 bp, s použitím specifických primerů Giardia 80 F a Giardia 127 R, a pro následnou detekci je použita TaqMan sonda Giardia 105 T (Verweij et al., 2004). Sekvence primerů a sondy jsou uvedeny v tabulce 2. Uvedený protokol pro qPCR byl optimalizován pro cykler LC 480 I (Roche, Basilej, Švýcarsko) a přizpůsoben konkrétním podmínkám, například polymeráze Master Mix – 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus ROX (Solis BioDyne, Estonsko).

Vlastní reakční podmínky qPCR protokolu byly následující: počáteční denaturace 95 °C/10 min, 50 × (95 °C/15 s, 60 °C/30 s, 72 °C/30 s). Každá reakce obsahovala 1 µl každého primeru, 1 µl sondy TaqMan, 4 µl polymerázy, 8 µl miliQ vody a 5 µl extrahované DNA. Na každé reakční desce byla vždy přítomna také negativní kontrola (DNA nahrazena miliQ vodou) a kontrola pozitivní (DNA z *in vitro* kultury trofozoitů *G. intestinalis*).

Tab. 2: Přehled použitých primerů a sondy dle Verweij et al. (2004)

Primery a sonda	**Sekvence**
Giardia 80 F	5′-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3′
Giardia 127 R	5′-TTGCCAGCGGTGTCCG-3′
Sonda TaqMan Giardia 105 T	FAM-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-BHQ-1

Sestrojení kvantifikační křivky: Pro vyhodnocení intenzity infekce *G. intestinalis* v pozitivně testovaných vzorcích byla sestavena kvantifikační křivka. Tato křivka byla vytvořena na základě desítkové ředící řady DNA buněk z kultury trofozoitů giardie a byla nastavena v řádovém rozmezí 10^{-1} až 10^{5} trofozoitů.

Kontrola vnitřní inhibice při qPCR: Ve vzorcích DNA získané z exkrementů může docházet k blokování vlastního amplifikačního procesu během PCR, tzv. vnitřní inhibici (Stensvold et al., 2012). Pro účely ověření / vyloučení vnitřní inhibice jsme použili vzorky, ve kterých nebyla detekována *G. intestinalis* a ani žádný z dalších prvoků sledovaných v naší laboratoři (tj., *Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis*). Možnou vnitřní inhibici jsme testovali přidáním cizorodé DNA k analyzovanému templátu. Tzv. cizorodá DNA byla izolovaná z tkáně potkana a použili jsme protokol pro amplifikaci „house-keeping" potkaního genu pro beta-2 podjednotku mikroglobulinu (B2M) (s komerčními primery a Taqman sondou; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

3.2.4 Statistické srovnání citlivostí dvou molekulárních přístupů pro detekci giardie

Rozdíl v citlivosti pro detekci *G. intestinalis* mezi dvěma molekulární přístupy (i) qPCR a (ii) konvečním PCR (Brožová, 2019) byl vyhodnocen s použitím McNemarova testu s Yatesovou korekcí (0,5). Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru SciStatCalc 2013 (https://scistatcalc.blogspot.com/2013/11/mcnemars-test-calculator.html).

3.3 Souvislost mezi specifickými faktory a výskytem *Giardia intestinalis*

Podobně jako v práci Lhotská et al. (2020) jsem se zabývala souvislostmi mezi některými zvolenými specifickými faktory a výskytem *G. intestinalis*. Jednalo se o vliv životního stylu (život ve městě / vesnici a cestování), kontakt se zvířaty, pohlaví a věk. U všech lidských vzorků testovaných na přítomnost giardie byl zjišťován vliv životního stylu na výskyt *G. intestinalis*. Tato kategorie zahrnuje dva faktory, a to (i) život ve městě / vesnici a (ii) cestování. Vesnice byla definována počtem obyvatel do 2000 obyvatel. Cestování bylo rozděleno do tří kategorií – žádné cestování, cestování v rámci Evropy a cestování mimo Evropu, podobně jako v předchozí studii Lhotská et al. (2020). Počet vzorků lidí (viz kapitola 3.1) se v porovnání se studií Lhotská et al. (2020) lišil (288 vs. 296) (viz kapitola 4.1). Rozdíly mezi kategoriemi v prevalenci *G. intestinalis* byly vyhodnoceny s využitím chí-kvadrát testu pomocí softwaru GraphPad Prism 5.0.

3.4 Modifikovaná Sheatherova flotační metoda

Všechny získané vzorky exkrementů (lidské i zvířecí) byly vždy také vyšetřeny koproskopicky s využitím Sheatherovy flotace (více informací v Brožová, 2019).

Část každého vzorku (přibližně o velikosti hrášku) byla rozmíchána v destilované vodě (cca 2-3 ml) a homogenizována ve třecí misce. Suspenze byla poté přelita přes sítko do skleněné zkumavky a odstředěna při 600 g po dobu 3 minut. Supernatant byl pak odstraněn a zbylý pelet rozmíchán nejprve v malém objemu (cca 1-2 ml) Sheatherova roztoku (cukerný flotační roztok o specifické hustotě 1, 33 (Sheather, 1923). Následně byl Sheatherův roztok do zkumavky doplněn přibližně 1 cm pod okraj a převracením byla zkumavka promíchána. Směs byla opět odstředěna při 600 g / 3 min. Na závěr byla povrchová blanka pomocí bakteriologické kličky přenesena na podložní sklíčko a preparát byl vyšetřen pod světelným mikroskopem (CX22LED, Olympus, ČR) při zvětšení 20-100×.

4 Výsledky

4.1 Získaný soubor vzorků

Pro účely epidemiologické studie na střevních prvocích (více viz Lhotská et al., 2020) bylo získáno 428 vzorků. Počet vyšetřených vzorků se lišil v porovnání se studií Lhotská et al. (2020), kde bylo zpracováno 288 lidských a 136 zvířecích vzorků na přítomnost *Blastocystis* sp. V této studii jsme vyšetřili 428 vzorků, z toho 296 vzorků stolice od zdravých lidí a 132 vzorků trusu od zvířat ze 14 regionů České republiky (Obr. 3).

Obr. 3: Mapa ČR s původem získaných vzorků (převzato z publikace Lhotská et al., 2020).

4.2 Výskyt a prevalence *Giardia intestinalis* na základě qPCR

Pomocí zoptimalizovaného qPCR protokolu specifického pro *G. intestinalis* byl otestován celý soubor vzorků (Tab. 3). Byla zjištěna 7% prevalence *G. intestinalis* u lidí (22/296). U zvířat byla *G. intestinalis* zjištěna u 19 % vzorků (25/132). Ve vzorcích trusu zvířat byla giardie detekována u psů (10/54), koček (4/19), králíků (5/13), prasat (2/3), krávy (1/2), kozy (1/4), morčete (1/2) a koně (1/15) (více informací v tabulce 3). V jednom případě byla zjištěna giardie u majitele pozitivního králíka. Bohužel se nám nepodařilo získat sekvenci z pozitivního vzorku majitele, proto nebylo možné vzorky sekvenčně porovnat a vyjádřit se k zoonotickému potenciálu (viz dále). Navíc jsem odhalila také čtyři případy, kdy byla pozitivní zvířata (psi, kočky, králíci), ale jejich majitelé byli sami negativní.

Tab. 3: Přehled testovaných lidských a zvířecích vzorků pomocí qPCR protokolu pro *Giardia intestinalis* (N=počet)

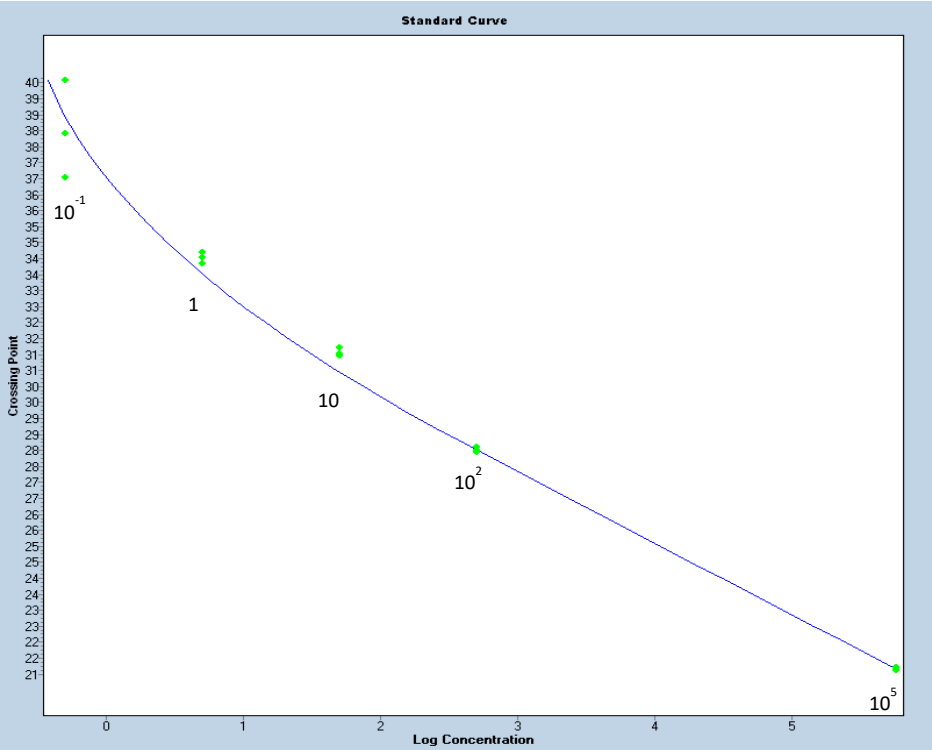
hostitel	kategorie	N	N pozitivní
Homo sapiens	asymptomatičtí lidé	296	22 (7%)
Canis lupus familiaris	psi	54	10 (19%)
Felis silvestris catus	kočky	19	4 (21%)
Anas platyrhynchos domesticus	kachny	1	0
Anser anser domesticus	husy	1	0
Gallus gallus domesticus	slepice	8	0
Columba livia domestica	holubi	1	0
Psittacus erithacus	papoušci	1	0
Sus scrofa domestica	prasata	3	2 (67%)
Bos primigenius taurus	krávy	2	1 (50%)
Capra aegagrus hircus	kozy	4	1 (25%)
Ovis aries	ovce	6	0
Oryctolagus cuniculus domesticus	králíci	13	5 (39%)
Phodopus sungorus	křečci	1	0
Cavia aperea porcellus	morčata	2	1 (50%)
Equus caballus	koně	15	1 (7%)
Atelerix albiventris	ježci	1	0

4.3. Kvantifikace intenzity infekce giardií v pozitivních vzorcích

Ve 47 vzorcích, pozitivně testovaných na giardii na základě qPCR, byla zjišťována intenzita infekce s použitím kvantifikační křivky v řádovém rozmezí 10^{-1} až 10^{5} trofozoitů na vzorek (Obr. 4; Tab. 4). Ve většině případů se jednalo o velmi slabé infekce, odpovídající hodnotám 1-10^{1} trofozoitů na vzorek (Tab. 4).

Tab. 4: Vyhodnocení intenzity infekce s využitím kvantifikační křivky v rozmezí řádů 10^{-1} až 10^{5} trofozoitů na vzorek (N=počet)

intenzita infekce	N pozitivních vzorků
1-10^{1}	42
10^{2}	3
10^{4}	2



Obr. 4: Kvantifikační křivka pro qPCR, nastavena v rozmezí řádů 10^{-1} až 10^{5} trofozoitů na vzorek.

4.4 Porovnání senzitivity diagnostických metod

Diagnostika *G. intestinalis* pomocí qPCR byla zvolena na základě výsledků mé bakalářské práce, kde jsem zjistila velmi nízkou citlivost konvenčního PCR (Brožová, 2019).

Při posouzení senzitivity mezi konvenčním PCR a qPCR jsme porovnali 142 vzorků, které byly testovány pomocí obou metod. Zatímco konvenční PCR odhalila *G. intestinalis* pouze ve 2 případech (2/142), tak u qPCR to bylo ve 22 případech (22/142) (Tab. 5). Mezi oběma metodami byl nalezen statisticky významný rozdíl. Detekce pomocí qPCR je citlivější (χ^2 = 19,01; $p<0,01$; Tab. 6). Real-time PCR zachytilo vyšší prevalenci u lidí a zvířat (11 %; 27 %), než konvenční PCR (1 %; 2 %) (Tab. 5).

Kromě toho byly všechny vzorky (428) vyšetřeny také pomocí Sheatherovy flotace, kde byly zachyceny pouze 2 pozitivní vzorky (člověk, králík). Tento výsledek odpovídá výsledkům získaných z konvenčního PCR.

Tab. 5: Prevalence *G. intestinalis* získané na základě dvou diagnostických metod (PCR a qPCR) na částečném souboru 142 vzorků

	PCR		**qPCR**	
	Lidé	Zvířata	Lidé	Zvířata
Prevalence	1% (1/101)	2% (1/41)	11% (11/101)	27% (11/41)

Tab. 6: Porovnání výsledků dvou diagnostických metod (PCR a qPCR) u 142 vzorků. McNemarův test

		qPCR		
		pozitivní	negativní	
PCR	pozitivní	2	0	2 (1%)
	negativní	20	120	140 (99%)
		22 (15%)	120 (85%)	142

4.5 Asambláže

Vzhledem k tomu, že jsem s pomocí qPCR zaznamenala převážně slabé intenzity infekcí giardií ve vzorcích, které byly negativní v konvenčním PCR, bylo téměř nemožné získat sekvence pro určení asambláží. Proto se mi podařilo získat pouze dvě sekvence ze celkových 47 vzorků pozitivních metodou qPCR. Konkrétně se jednalo o vzorek králíka a člověka, kteří spolu nebyli v žádném kontaktu. Oba vzorky patří do asambláže B.

4.6 Korelace výskytu *Giardia intestinalis* s vybranými specifickými faktory

Na základě informací z vyplněných dotazníků od dobrovolníků (více informací viz kapitola 3.1) bylo u všech vzorků pozitivních v qPCR zjišťováno, jestli existují nějaké korelace mezi výskytem *G. intestinalis* a některými faktory uvedenými níže.

4.6.1 Životní styl

Život ve městě / vesnici

Ze souboru 296 vzorků lidí žije na vesnici 83 lidí (28 %) a ve městě 213 lidí (72 %). U lidí na vesnici byla zjištěna prevalence 5 % (4/83), zatímco u lidí žijících ve městě, byla detekována prevalence vyšší, a to 8 % (18/213). Rozdíl mezi oběma kategoriemi je statisticky nevýznamný ($p = 0,14$).

Cestování

Z celkového počtu vzorků lidí, 52 (18 %) uvedlo, že vůbec necestovalo a v rámci Evropy cestovalo 244 lidí (82 %), z nichž 104 lidí (35 %) cestovalo i mimo Evropu. U jedinců, kteří necestují, byla detekována 10% prevalence *G. intestinalis* (5/52), u cestovatelů v rámci Evropy byla zachycena prevalence 7 % (17/244) a u lidí, kteří cestovali i mimo Evropu, byla zachycena prevalence 9 % (9/104). Nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl ($p = 0,25$) mezi skupinami, které necestují nebo cestují pouze v rámci Evropy a ani u skupin, které necestují nebo cestují mimo Evropu ($p = 0,42$).

4.6.2 Kontakt se zvířaty

Pro vyhodnocení korelace mezi výskytem *G. intestinalis* a kontaktem se zvířaty jsem vytvořila dvě kategorie a to (i) domácí zvířata (psi, kočky) a (ii) hospodářská zvířata (krávy, prasata, koně, ovce, kozy, drůbež). Z 296 vyšetřených lidských vzorků byl kontakt se zvířaty velmi častý, a to u 252 lidí (85 %). V kontaktu se zvířaty nebylo pouze 44 lidí (15 %).

Giardia intestinalis byla zachycena u 22 lidí, kteří byli v kontaktu se zvířaty. To znamená, že byla zjištěna prevalence 9 % (22/252); u lidí bez kontaktu se zvířaty to bylo 0 %.

Kontakt se zvířaty byl ještě rozdělen na dvě podskupiny – kontakt s domácími zvířaty (252) a kontakt i s hospodářskými zvířaty (72). U lidí v kontaktu s domácími zvířaty bylo 22 pozitivních vzorků z celkových 252 vzorků (9 %). U lidí v kontaktu i s hospodářskými zvířaty, bylo pozitivních 5 vzorků ze 72 (7 %). Je statisticky významné, jestli byli lidé v kontaktu se zvířaty ($p = 0,02$), ale není statistický rozdíl v tom, zda se jednalo o domácí nebo hospodářská zvířata ($p = 0,31$).

4.6.3 Pohlaví a věk

Vliv pohlaví na prevalenci giardie

Z 296 získaných lidských vzorků se jednalo ve 172 případech o ženy a ve 124 o muže. O trochu vyšší prevalenci jsme zachytili u žen, a to 9 % (16/172). U mužů byla prevalence 5 % (6/124). Rozdíl mezi kategoriemi v prevalenci giardie u mužů a žen není statisticky významný ($p = 0,07$).

Vliv věku na prevalenci

Testované lidské vzorky byly rozděleny do osmi věkových kategorií (Lhotská et al., 2020) za účelem zjištění prevalencí v konkrétních věkových skupinách. Kategorizace dle věku v naší studii vytvořila různě velké soubory s nerovnoměrně zastoupenými počty vzorků, které lze velmi obtížně srovnávat. Nejpočetněji zastoupené věkové skupiny byly 18-30 let (73 získaných vzorků) a 31-49 let (88 vzorků). Naopak nejméně zastoupenou skupinou byla skupina 13-17, kde byly získány pouze 4 vzorky. Počty vzorků v jednotlivých kategoriích lze vidět v tabulce 7. Nejvíce pozitivních vzorků giardie bylo nalezeno u věkových skupin 18-30 let (7 pozitivních vzorků; 10 %) a 31-49 let (7 pozitivních vzorků; 8 %). Nejvyšší prevalence byla zaznamenána u věkové skupiny 0-3 let (11 %), nicméně v této skupině bylo získáno méně vzorků, než v ostatních skupinách. Naopak *G. intestinalis* nebyla nalezena u dětí a dospívajících ve věkových skupinách 4-6 let, 7-12 let a 13-17 let (více informací v tabulce 7).

Tab. 7: Výskyt *Giardia intestinalis* dle věkových kategorií

Věkové kategorie	Vyšetřené vzorky	Pozitivní vzorky	Prevalence
0-3 let	18	2	11 %
4-6 let	14	0	0 %
7-12 let	16	0	0 %
13-17 let	4	0	0 %
18-30 let	73	7	10 %
31-49 let	88	7	8 %
50-60 let	36	3	8 %
Nad 60 let	47	3	6 %

4.7 Testování vnitřní inhibice

Všechny vzorky, které vyšly negativně na přítomnost střevních prvoků (248), byly podrobeny testu vnitřní inhibice. Ukázalo se, že k vnitřní inhibici nedošlo u žádného ze vzorků.

5 Diskuze

Výskyt střevního prvoka *Giardia intestinalis* je kosmopolitní a jeho prevalence se výrazně liší mezi rozvojovými a industrializovanými zeměmi. O výskytu a prevalenci *G. intestinalis* u zdravých lidí (tj. u lidí bez střevních obtíží) ve vyspělých zemích se stále mnoho neví, protože se pozornost v klinickém sektoru zaměřuje především na akutní případy giardiózy (Seguí et al., 2018).V rámci mé diplomové práce jsem zjišťovala výskyt a prevalenci *G. intestinalis* ve zdravé populaci lidí a zvířat v České republice. Pomocí qPCR byl otestován celý soubor 428 vzorků stolice / trusu, tj. 296 vzorků od lidí a 132 vzorků od zvířat. V případě vzorků trusu zvířat jsme testovali pouze ta zvířata, která byla v blízkém kontaktu s dobrovolníky zařazenými do studie (pro více informací kapitola 3.1).

Prevalence u asymptomatických lidí

V této práci byla zjištěna 7% prevalence *G. intestinalis* u lidí (22/296). Moje výsledky se téměř shodují s běžně uváděnou prevalencí giardie ve vyspělých zemích, a to 2 až 5 % (Samie et al., 2020). Naopak v rozvojových zemích je prevalence vyšší a to v rozmezí od 20 do 40 % (Abdullah et al., 2016; Samie et al., 2020). Dosud ovšem není žádná srovnatelná epidemiologická studie zaměřená na výskyt *G. intestinalis* u asymptomatických lidí, které by navíc využili qPCR pro diagnostiku. Studie o asymptomatických infekcí *G. intestinalis* byly zatím prováděny převážně u dětí nikoliv ve zdravé populaci dospělých (např. Muadica et al., 2020; Oliveira-Arbex et al., 2016; Reh et al., 2019; Tembo et al., 2020).

Například autoři studie provedené ve Španělsku se zaměřili na výskyt giardie u asymptomatických dětí s využitím qPCR. U asymptomatických dětí zachytili prevalenci 17 % (263/1512) (Muadica et al., 2020). My jsme v našem souboru vzorků u asymptomatických lidí zachytili prevalenci 7 % (22/296) a u dětí ve srovnatelné věkové kategorii jako u španělské studie se jednalo o prevalenci 4 % (2/52). Rozdíl ve zjištěných prevalencích může souviset s faktem, že ve studii Muadica et al. (2020) bylo analyzováno mnohem větší množství vzorků od dětí (1512), než v naší studii (52). V ní jsme se totiž zaměřili na více věkových kategorií, než jen na děti.

Prevalence u zvířat

Giardia intestinalis byla diagnostikována u 19% zvířecích vzorků (25/132). Giardie byla zachycena u těchto zvířat - psů (10/54), koček (4/19), králíků (5/13), prasat (2/3), krávy (1/2), kozy (1/4), morčete (1/2) a koně (1/15). Prevalence giardie u psů se obecně pohybuje mezi 0,4 a 34 % (Becker et al. 2012; Solarczyk a Majewska, 2010; Uiterwijk et al., 2018). Ve studii Uiterwijk et al. (2018) vyšetřili pomocí qPCR 646 vzorků trusu psů z Holandska a detekovali prevalenci 29 % (189/646). V naší studii byla u psů zjištěna prevalence nižší, a to 19 % (10/54). V případě koček byla ve studii Enemark et al. (2020) zaznamenána prevalence 7 % (20/284). V naší studii byla u koček zjištěna prevalence vyšší, a to 21 % (4/19). Například v Etiopii dosahovala prevalence *G. intestinalis* u telat 38 % (126/330) (Hailu et al., 2020). V naší práci jsme u krav zachytili prevalenci 50 % (1/2). Nicméně získali jsme pouze dva kravské vzorky oproti studii v Etiopii, kde vyšetřili mnohem více vzorků (330). V Číně detekovali prevalenci *G. intestinalis* u ovcí a koz. U koz zaznamenali prevalenci 4,8 % (16/336) a u ovcí 21,8 % (71/325) (Chen et al., 2019). V naší studii jsme u koz zjistili prevalenci 25 % (1/4) a u ovcí jsme giardii nezachytili vůbec (0/6). V Číně také zjišťovali přítomnost *G. intestinalis* u králíků a zaznamenali prevalenci 3,54 % (19/537) (Tang et al., 2021). V naší studii jsme u králíků detekovali prevalenci vyšší, a to 39 % (5/13). Například na Taiwanu zjistili prevalenci giardie u prasat 4,26 % (6/141) (Lam et al., 2021). V Dánsku se také zaměřili na prevalenci *G. intestinalis* u prasat a zaznamenali prevalenci 33 % (86/259) (Stensvold et al., 2021). V této studii jsme u prasat zjistili prevalenci 67 % (2/3). Získali jsme však méně vzorků.

Porovnání senzitivity diagnostických metod

Pro posouzení senzitivity při detekci *G. intestinalis* mezi konvenčním PCR a qPCR byla použita pouze část souboru vzorků (101 vzorků od lidí a 41 vzorků od zvířat). Tyto vzorky byly otestovány oběma metodami. Srovnáno bylo pouze 142 vzorků, protože v mé bakalářské práci (Brožová, 2019) byla zjištěna velmi nízká citlivost konvenčního PCR. Z těchto důvodů jsme pomocí konvenčního PCR zpracovali pouze 142 vzorků a rozhodli jsme se raději zavést qPCR diagnostický protokol pro detekci *G. intestinalis*. U 142 srovnávaných vzorků jsme pomocí qPCR zachytili vyšší prevalenci giardie (11 % u lidí; 27 % zvířecích vzorků), než pomocí konvenčního PCR (1 % u lidí; 2 % zvířecích vzorků).

Rozdíly mezi oběma metodami byly statisticky významné. Detekce pomocí qPCR je citlivější ($\chi^2 = 19{,}01$; $p < 0{,}01$).

Testování citlivosti konvenčního PCR pro detekci *G. intestinalis* na základě genu pro triosafosfátizomerázu (TPI) pro detekci *G. intestinalis* bylo předmětem mojí bakalářské práce (Brožová, 2019). Citlivost konvenčního PCR jsem testovala na sérii vzorků obsahující různé počty trofozoitů giardie získané z kultury, tzn. byla vytvořena desítková ředící řada od 10^{-2} do10^4 buněk. Výsledky ukázaly, že konvenční PCR snadno odhalí intenzity infekce od 10^4 buněk ve vzorku, ale slabší infekce není schopno zachytit (Brožová, 2019). Obecně je problém s citlivostí i specificitou dostupných genů pro detekci *G. intestinalis*. Tento problém je diskutován například v práci Capewell et al. (2020). Citlivost qPCR zde byla vyšší. Dle kvantifikační křivky (v řádovém rozmezí 10^{-1} až 10^5 trofozoitů na vzorek) byly vyhodnoceny intenzity infekcí ve 47 (47/428) pozitivně testovaných vzorcích. Ve většině případů se jednalo o velmi slabé infekce, odpovídající hodnotám 1-10^1 trofozoitů na vzorek. Podobné výsledky popisují také autoři studie Belkessa et al. (2021) s tím, že qPCR je citlivější metoda pro detekci giardie než konvenční PCR pro gen TPI. Oba molekulární přístupy autoři testovali na 119 vzorcích stolice získaných od pacientů v Alžírsku. Zatímco qPCR odhalilo 80 pozitivních vzorků, tak konvenční PCR pouze 48 pozitivních vzorků.

Dostupná literatura uvádí, že prevalence *G. intestinalis* se v rozvinutých zemích pohybuje mezi 2 až 5 % (Samie et al., 2020). Většina těchto studií však používala konvenční PCR, což by mohlo vysvětlit rozdíly v prevalenci oproti naší studii. Naše výsledky poukazují na fakt, že qPCR je citlivější metoda vhodná k detekci asymptomatických infekcí *G. intestinalis*. Také ve studii Uiterwijk et al. (2018) doporučují autoři qPCR jako cenný screeningový nástroj, protože vykazoval velmi vysokou citlivost (97 %).

Ve studii Tembo et al. (2020) v Zambii se také zaměřili na asymptomatické jedince, a to konkrétně na 329 asymptomatických školních dětí ve věku 3–16 let. Giardii mikroskopicky nalezli v 10 % (33/329) vzorků stolice. V našem souboru vzorků jsme mikroskopicky pomocí flotace zachytili prevalenci *G. intestinalis* pouze 0,5 % (2/428) (člověk, králík). Nejcitlivější metodou v naší práci se ukázalo qPCR (47/428).

Asambláže

Asambláže lze určit pouze na základě sekvencí získaných z konvenčního PCR pro gen TPI a následného Sangerova sekvenování. Ale tento vlastní PCR protokol ovšem nemá dostatečnou citlivost, jak je zmíněno výše (Brožová, 2019). Na základě kvantifikační křivky pro qPCR jsem následně při vyhodnocování intenzit infekcí u 47 pozitivních vzorků zjistila, že se většinou jednalo o velmi slabé infekce v řádových hodnotách $1\text{-}10^1$ trofozoitů na vzorek. Vlivem slabých infekcí a nedostatečné citlivosti konvenčního PCR se mi proto podařilo získat pouze dvě sekvence. Jednalo se konkrétně o vzorek člověka a králíka, kteří spolu nebyli v bližším kontaktu. Oba vzorky patří do asambláže B.

Podobná situace je popisována autory studie Azcona-Gutie´rrez et al. (2017), kteří také měli problém se získáním sekvencí kvůli nízké citlivosti konvenčního PCR. Pomocí qPCR zachytili 90 pozitivních vzorků od pacientů z nemocnice, ale následnou amplifikací pomocí konvenčního PCR získali pouze 16 sekvencí. Tato fakta jsou podpořena také další studií Belkessa et al. (2021), kde na základě výsledků konstatovali, že qPCR je citlivější metoda pro diagnostiku *G. intestinalis* a že získání sekvencí na základě genu pro TPI je možné jen u středně až silně pozitivních vzorků.

Do budoucna bude potřeba najít nové nástroje pro určování asambláží giardií u jedinců se slabou intenzitou infekce. Současné markery pro genotypizaci giardie totiž neposkytují dostatečné kvality k získání sekvencí u slabých infekcí. Navíc situaci může komplikovat pohled na asambláže jako na samostatné druhy s podstatně širší vnitrodruhovou variabilitou, než se očekávalo (Monis et al., 2009; Capewell et al., 2020).

Korelace výskytu *Giardia intestinalis* s vybranými specifickými faktory

V této práci jsme se díky získaným informacím z dotazníků (Lhotská et al., 2020) také zaměřili na korelace mezi vybranými specifickými faktory a výskytem *G. intestinalis*. V případě této studie se jednalo o využití informací o vlivu životního stylu (život ve městě / na vesnici a cestování), kontaktu se zvířaty, pohlaví a věku.

Život ve městě / na vesnici

Lidé žijící ve venkovských oblastech jsou pravděpodobně častěji vystaveni zdrojům infekce giardiemi, kterými jsou kontaminovaná voda, potrava a kontakt se zvířaty (Al-Mekhlafi, 2017). Například Al-Mekhlafi (2017) sledoval výskyt giardie a souvislost s rizikovými faktory ve venkovských komunitách v Jemenu. Zjistil prevalenci *G. intestinalis* 28 % (170/605). V Argentině ve venkovských oblastech byla detekována prevalence giardie 25 % (54/218) (Candela et al., 2021). Langbang a kol., se zaměřili na porovnání výskytu střevních parazitů mezi venkovskými a městskými populacemi v jižní Indii (Langbang et al., 2017). Celkem vyšetřili 500 vzorků stolice od lidí z vesnic a 506 z městského prostředí. U venkovského obyvatelstva zaznamenali 2x vyšší prevalenci giardie (21 %) než u lidí z měst (10 %). Také ve studii Viesy et al. (2020) byla giardie zachycena častěji ve venkovských oblastech (64 %), než ve městech (36 %). V naší studii jsme naopak zjistili mírně vyšší prevalenci u lidí pocházejících z městských oblastí, a to 8 % (18/213). U lidí žijících na vesnici to bylo 5 % (4/83). Zjištěné rozdíly ale nejsou statisticky významné ($p = 0,14$) a mohou být způsobeny tím, že v naší studii jsme obdrželi méně vzorků z vesnic oproti vzorkům z měst. Ze získaných výsledků v České republice se tedy zdá, že výskyt asymptomatických infekcí *G. intestinalis* je ve městě i na vesnici srovnatelný.

Cestování

Za jeden z důležitých faktorů přispívajících k nákaze giardií je považováno cestování (např. Ferguson et al., 2020). Proto jsem analyzovala možný vliv cestování na výskyt giardie u lidí z České republiky.

Soubor lidských vzorků jsem rozdělila do tří skupin podle vztahu k cestování a jeho charakteru dle Lhotská et al. (2020), a to na: (i) lidi, kteří necestují, (ii) lidi cestující pouze v rámci Evropy a (iii) lidi cestující i mimo Evropu. Nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl ($p = 0,25$) mezi skupinami, které necestují (10 %) nebo cestují pouze v rámci Evropy (7 %). Statistický rozdíl ($p = 0,42$) nebyl nalezen ani u skupin, které necestují (10 %) nebo cestují mimo Evropu (9 %).

V práci Reses et al. (2018) autoři zjistili výskyt giardie u 199 lidí v USA a poukazují na spojení výskytu giardií s cestovními aktivitami sledovaných lidí. Podobně může

představovat zvýšenou pravděpodobnost nákazy giardií také kempování, a to kvůli konzumaci nedostatečně tepelně upraveného jídla, pití neupravené vody z přírodních zdrojů a omezeným hygienickým podmínkám (Reses et al., 2018).

Kontakt se zvířaty

U lidí jsou giardiové infekce většinou způsobeny asambláž emi A a B. Tyto dvě asambláže vykazují širokou hostitelskou specifitu, a tedy i jistý zoonotický potenciál (Cacciò et al. 2018). Asambláže C až H jsou hostitelsky specifické (zvířecí hostitelé). U lidí byly zjištěny pouze sporadicky; získané sekvence byly totiž podobné asambláž im C až H (Fantinatti et al., 2020, Ryan a Zahedi, 2019). Zmíněná fakta naznačují, že současné nástroje pro genotypizaci giardie mají své limity a že více asambláží giardie má oproti dřívějším předpokladům zoonotický potenciál (Capewell et al., 2020).

V naší studii byla *G. intestinalis* pomocí qPCR zachycena pouze u 22 lidí, kteří byli v kontaktu se zvířaty. Zjištěná prevalence u této skupiny lidí byla 9 % (22/252). Naopak u skupiny lidí bez kontaktu se zvířaty nebyla giardie zjištěna vůbec (0/44). Je tedy statisticky významné, jestli byli lidé v kontaktu se zvířaty ($p = 0,02$).

Lidi, kteří byli v kontaktu se zvířaty, jsem ještě dále rozdělila na dvě podskupiny: (i) lidé v kontaktu s domácími zvířaty (252) a (ii) lidé, kteří jsou v kontaktu i s hospodářskými zvířaty (72) (Lhotská et al. 2020). U lidí v kontaktu s domácími zvířaty bylo 22 pozitivních vzorků z celkových 252 vzorků pozitivních (9 %) a u lidí, kteří jsou navíc i v kontaktu s hospodářskými zvířaty, bylo pozitivních 5 vzorků ze 72 (7 %). Tento rozdíl není statisticky významný ($p = 0,31$). Naopak statisticky významné je, jestli byli lidé v kontaktu se zvířaty nebo nikoli ($p = 0,02$), není ale podstatné, zda se jednalo o domácí, nebo hospodářská zvířata ($p = 0,31$). Úzký kontakt se zvířaty se zdá být jedním z klíčových faktorů pro přenos giardie na člověka i v dalších studiích (Al-Mekhlafi, 2017; Candela et al., 2021). V Brazílii se zaměřili na detekci asambláží psů a dětí ze stejných domácností (De Quadros et al., 2016). Autoři zjistili, že infekce dětí a psů sdílejících stejnou domácnost bývá stejnou asambláží (B-IV), což naznačuje, že psi mohou být potenciálním zdrojem *G. intestinalis* pro člověka.

Pohlaví

Dalším hodnoceným faktorem bylo pohlaví sledovaných osob. Existuje více studií, ve kterých byla zaznamenána vyšší prevalence giardie u mužů než u žen (např. Al-Mekhlafi, 2017; Ferguson et al., 2020; Viesy et al., 2020.) V naší práci jsme zaznamenali naopak vyšší prevalenci u žen, a to 9 %. U mužů vyšla prevalence 5 %. Tento rozdíl ovšem není statisticky významný (p = 0,07). Podobně i v Samie et al. (2020) zaznamenali vyšší prevalenci *G. intestinalis* u žen (24 %) než u mužů (14 %).

Věk

Dalším faktorem, na který jsme se zaměřili, byl věk. Testované lidské vzorky byly rozděleny do osmi věkových kategorií za účelem zjištění prevalencí v konkrétních věkových skupinách. Kategorizace dle věku v naší studii vytvořila různě velké soubory vzorků s nerovnoměrně zastoupenými počty vzorků, které lze obtížně srovnávat. Největší zastoupení pozitivních vzorků giardie bylo nalezeno u věkových skupin 18-30 let (7 pozitivních vzorků) a 31-49 let (7 pozitivních vzorků). Také ve studiích Viesy et al. (2020) a Ferguson et al. (2020) zaznamenali v těchto věkových skupinách nejvíce pozitivních nálezů. V naší studii byla nejvyšší prevalence zjištěna u věkové skupiny 0-3 let (11 %), ale v této skupině bylo získáno méně vzorků než v ostatních skupinách. Stejně tak ve studii Al-Mekhlafi (2017) byla nejvyšší prevalence zjištěna u malých dětí do 5 let a méně (33,3 %). Prevalence giardie u takto malých dětí patřila také ve studii Ferguson et al. (2020) k jedné z nejvyšších zaznamenaných prevalencí.

V naší studii nebyla *G. intestinalis* nalezena u dětí a dospívajících ve věkových skupinách 4-6 let, 7-12 let a 13-17 let. Autoři studie Viesy et al. (2020) také pozorovali nejnižší úroveň infekce ve skupině 13-19 let. Naopak ve studii Candela et al. (2021) zaznamenali giardii nejčastěji u skupiny 4-6 let. Nám se u této skupiny nepodařilo nalézt žádný pozitivní vzorek.

V projektu Sánchez et al. (2017) byla využita qPCR diagnostika k vyšetření stolice získané od dětí ve věku 1 až 15 let na území kolem kolumbijského povodí Amazonky. Autoři zachytili daleko vyšší prevalenci, a to 65 % (184/284). Takto vysoká prevalence nejspíše souvisí s tím, že lidé žijící v podobných oblastech mají mnohem horší hygienické podmínky, což podporuje fekálně-orální přenos giardie (Sánchez et al., 2017). My jsme v našem

souboru vzorků u asymptomatických lidí zachytili prevalenci 7 % (22/296) a u dětí do 16 let se jednalo o 4% prevalenci (2/52). V Zambii se také zaměřili na asymptomatické jedince, a to konkrétně na 329 asymptomatických školních dětí ve věku 3–16 let (Tembo et al., 2020). Zjistili 10% prevalenci giardie (33/329).

6 Závěr

V této práci se mi pomocí qPCR podařilo otestovat 428 vzorků na přítomnost střevního prvoka *Giardia intestinalis*. Jednalo se o 296 vzorků stolice od zdravých dobrovolníků (tj. u lidí bez střevních potíží) a 132 vzorků trusu od zvířat (s nimiž jsou vyšetřovaní lidé v kontaktu) z České republiky. Zavedla jsem diagnostický qPCR protokol pro detekci *G. intestinalis* a zjistila její prevalenci. Celková prevalence *G. intestinalis* u lidí byla 7 %. U zvířat jsme zachytili 19 % pozitivních vzorků.

Při porovnání dvou molekulárních diagnostických metod (konvenční PCR a qPCR) se qPCR ukázala jako citlivější a vhodnější metoda pro detekci výskytu *G. intestinalis*. Citlivost obou metod byla porovnána na částečném souboru 142 vzorků (101 lidských a 41 zvířecích). Konvenčním PCR byla zjištěna prevalence 1 % u lidí a 2 % u zvířecích vzorků. Pomocí qPCR byla odhalena vyšší prevalence, a to 11 % u lidí a 27 % u zvířecích vzorků. Metoda qPCR se ukázala být 11x citlivější pro detekci giardie, protože zachytí slabé intenzity infekcí v řádech až 10^{-1}. Oproti tomu pomocí konvenční PCR je možné zachytit pouze intenzity infekce až od 10^4 a více trofozoitů na vzorek.

Dále jsme u všech vzorků zjišťovali vliv několika vybraných faktorů na přítomnost *G. intestinalis*. Zaznamenali jsme vyšší prevalenci giardie u lidí žijících ve městech 8 %, než u lidí na vesnici 5 %. Tyto rozdíly nejsou ale statisticky významné ($p = 0,14$). U faktoru cestování nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl ($p = 0,25$) mezi skupinami, které necestují (10 %) nebo cestují pouze v rámci Evropy (7 %). Statistický rozdíl ($p = 0,42$) nebyl nalezen ani u skupin, které necestují vůbec (10 %) nebo cestují mimo Evropu (9 %).

Další kategorií, u které se *G. intestinalis* vyskytovala, jsou lidé v kontaktu se zvířaty (prevalence 9 %). U lidí bez kontaktu se zvířaty nebyl nalezen žádný případ přítomnosti giardie. Je tedy statisticky významné, jestli byli lidé v kontaktu se zvířaty ($p = 0,02$), ale není statisticky významné ($p = 0,31$), zda se jednalo o domácí (9 %) nebo hospodářská zvířata (7 %). V kategorii pohlaví jsme zaznamenali prevalenci *G. intestinalis* vyšší u žen (9 %), než u mužů (5 %). Tento rozdíl ovšem není statisticky významný ($p = 0,07$). Rozdíly v prevalenci byly zaznamenány mezi věkovými kategoriemi, kdy nejvyšší procento pozitivních vzorků bylo zaznamenáno u věkové skupiny 0-3 let (11 %), což může ale být zkresleno nižším počtem získaných vzorků od této skupiny. Naopak překvapivě

G. intestinalis nebyla nalezena u dětí a dospívajících ve věkových skupinách 4-6 let, 7-12 let a 13-17 let. Opět to může být způsobeno tím, že od těchto skupin bylo získáno méně vzorků. Nicméně vzhledem k nerovnoměrnému počtu vzorků zastoupených u jednotlivých věkových kategorií nelze příliš vyvozovat vážnější závěry.

7 Seznam použité literatury

Abdullah I, Tak H, Ahmad F (2016). Predominance of gastrointestinal protozoan parasites in children: A brief review. *Journal of health education research and development,* 1: 01–06.

Alharbi A, Toulah FH, Wakid MH, Azhar E, Farraj S, Mirza AA (2020). Detection of *Giardia lamblia* by microscopic examination, rapid chromatographic immunoassay test, and molecular technique. *Cureus,* 12:e10287.

Al-Mekhlafi HM (2017). *Giardia duodenalis* infection among rural communities in Yemen: A community-based assessment of the prevalence and associated risk factors. *Asian pacific journal of tropical medicine,* 10: 987–995.

Allain T, Chaouch S, Thomas M, Travers M, Valle I, Langella P (2018). Bile salt hydrolase activities : A novel target to screen anti- Giardia Lactobacilli. *Frontiers in microbiology,* 9: 89.

Allain T and Buret AG (2020). Pathogenesis and post-infectious complications in giardiasis. *Advances in parasitology,* 107:173-199.

Azcona-Gutie´rrez M, Lucio AD, Herna M, Soria-Blanco LM, Fuentes I, Carmena D (2017). Molecular diversity and frequency of the diarrheagenic enteric protozoan *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp . in a hospital setting in Northern Spain. *Plos One,* 12: e0178575.

Barash NR, Maloney JG, Singer SM, Dawson SC (2017). Giardia alters commensal microbial diversity throughout the murine gut. *Infection and immunity,* 85: e00948.

Becker AC, Rohen M, Epe C, Schnieder T (2012). Prevalence of endoparasites in stray and fostered dogs and cats in northern Germany. *Parasitology research,* 111:849–57.

Beer KD, Coller SA, Du F, Gargano JW (2017). Giardiasis diagnosis and treatment practices among commercially insured persons in the United States Karlyn. *Clinical infectious diseases,* 64: 1244–1250.

Belkessa S, Thomas-Lopez D, Houali K, Ghalmi F, Stensvold CR (2021). Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children and adults sampled in Algeria. *Microorganisms,* 9: 54.

Berry ASF, Johnson K, Martins R, Sullivan MC, Farias Amorim C, Putre A, Scott A, Wang S, Lindsay B, Baldassano RN, Nolan TJ, Beiting DP (2020). Natural infection with Giardia is associated with altered community structure of the human and canine gut microbiome. *mSphere,* 5:e00670-20.

Beyhan MY and Cengiz ZT (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.

Boadi S, Polley SD, Kilburn S, Mills GA, Chiodini PL (2014). A critical assessment of two real-time PCR assays targeting the (SSU) rRNA and gdh genes for the molecular identification of *Giardia intestinalis* in a clinical laboratory. Journal of clinical pathology, 67:811-816.

Bouzid M, Halai K, Jeffreys D, Hunter PR (2015). The prevalence of Giardia infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Veterinary parasitology,* 207: 181–202.

Brožová K, (2019): Studium prevalence *G. intestinalis* [Study of prevalence *G. intestinalis*. Bc. Thesis, in Czech] – 45 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E (2008). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International journal for parasitology,* 38:1523–31.

Cacciò SM, Lalle M, Svärd SG (2018). Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infection, genetics nd evolution,* 66:335-345.

Candela E, Goizueta C, Periago MV, Muñoz-Antoli C (2021). Prevalence of intestinal parasites and molecular characterization of *Giardia intestinalis*, *Blastocystis* spp. and

Entamoeba histolytica in the village of Fortín Mbororé (Puerto Iguazú, Misiones, Argentina). *Parasites and vectors,* 14: 510.

Cañete R, Díaz MM, Avalos García R, Laúd Martinez PM, Manuel Ponce F (2012). Intestinal parasites in children from a day care centre in Matanzas City, Cuba. *Plos One,* 7: e51394.

Capewell P, Krumrie S, Katzer F, Alexander CL, Weir W (2020). Parasitology molecular epidemiology of Giardia infections in the genomic era. *Trends in parasitology,* 37: 142–153.

Chen D, Zou Y, Li Z, Wang SS, Xie SC, Shi LQ, Zou FC, Yang JF, Zhao GH, Zhu XQ (2019). Occurrence and multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in black-boned sheep and goats in southwestern China. *Parasites and vectors,* 12:102.

Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM (2017). Pathogenic mechanisms of Cryptosporidium and Giardia. *Trends in parasitology,* 33: 561–576.

Choy SH, Al-Mekhlafi HM, Mahdy MAK, Nasr NN, Sulaiman M, Lim YAL (2014). Prevalence and associated risk factors of Giardia infection among indigenous communities in rural Malaysia. *Scientific reports,* 4: 6909.

Coffey CM, Collier SA, Gleason M E, Yoder JS, Kirk MD, Richardson AM (2021). Evolving epidemiology of reported giardiasis cases in the United States, 1995-2016. *Clinical infectious diseases,* 72: 764–770.

Daryani A, Sharif M, Nasrolahei M, Khalilian A, Mohammadi A, Barzegar G (2012). Epidemiological survey of the prevalence of intestinal parasites among schoolchildren in Sari, northern Iran. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene,* 106: 455–459.

Davies AP, Campbell B, Evans MR, Bone A, Roche A, Chalmers RM (2009). Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United kingdom. *The Pediatric infectious disease journal,* 28:838-40.

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: e0189728.

De Quadros RM, Weiss PHE, Marques SMT, Miletti LC (2016). Potential cross-contamination of similar giardia duodenalis assemblage in children and pet dogs in southern Brazil, as determined by PCR-RFLP. *Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo,* 58: 3–9.

de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, van Leeuwen NJ, Bartelds AI, van Duynhoven YT (2001). Gastroenteritis in sentinel general practices, the Netherlands. *Emerging infectious diseases*, 7:82-91.

Dubná S, Langrová I, Nápravník J, Jankovská I, Vadlejch J, Pekár S, Fechtner J (2007). The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Veterinary parasitology*, 145: 120–128.

Ekdahl K and Andersson Y (2005). Imported giardiasis: Impact of international travel, immigration, and adoption. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 72: 825–830.

Elwin K, Fairclough HV, Hadfield SJ, Chalmers RM (2014). *Giardia duodenalis* typing from stools: a comparison of three approaches to extracting DNA, and validation of a probe-based real-time PCR typing assay. *Journal of medical microbiology*, 63:38-44.

Enemark HL, Starostka TP, Larsen B, Takeuchi-Storm N, Thamsborg SM (2020). Giardia and Cryptosporidium infections in Danish cats: risk factors and zoonotic potential. *Journal of parasitology research*, 119: 2275–2286.

Fantinatti M, Gonçalves-Pinto M, Lopes-Oliveira LAP, Da-Cruz AM (2020). Epidemiology of *Giardia duodenalis* assemblages in Brazil: There is still a long way to go. *Memórias do instituto Oswaldo Cruz,* 115: e200431.

Fekete E, Sosnowski O, Buret AG (2021). *Giardia* spp. and the gut microbiota : Dangerous

liaisons. *Frontiers in microbiology*, 11: 618106.

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

Ferguson LC, Smith-Palmer A, Alexander CL (2020). An update on the incidence of human giardiasis in Scotland, 2011-2018. *Parasites and Vectors*, 13: 291.

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

Garcia LS, Arrowood M, Kokoskin E, Al E (2018). Laboratory diagnosis of parasites from the gastrointestinal tract. *Clinical microbiology reviews*, 31: e00025.

Gumbo JR, Malaka EM, Odiyo JO, Nare L (2010). The health implications of wastewater reuse in vegetable irrigation: a case study from Malamulele, South Africa. *International journal of environmental health research*, 20: 201–211.

Hailu M, Asmare K, Gebremedhin EZ, Sheferaw D, Gizaw D, Di Marco V, Vitale M (2020). *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in dairy calves in southern Ethiopia. *Parasite epidemiology and control*, 10: e00155.

Hanevik K, Kristoffersen E, Mørch K, Rye KP, Sørnes S, Svärd S (2017). Giardia-specific cellular immune responses in post-giardiasis chronic fatigue syndrome. *BMC Immunology*, 18: 5.

Hammerbaurová I (2021): Molecular characterization and zoonotic potential of *Giardia intestinalis* populations from pets. Mgr. Thesis, 76 p., Faculty of Science, Charles University.

Heyworth MF (2016). *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*, 23: 13.

Hijjawi N, Yang R, Hatmal M, Yassin Y, Mharib T (2018). Comparison of ELISA, nested PCR and sequencing and a novel qPCR for detection of Giardia isolates from Jordan. *Experimental Parasitology*, 185: 23–28.

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B (2014). The International scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews gastroenterology & hepatology,* 11: 506–514.

Hooshyar H, Ghafarinasab S, Arbabi M (2017). Genetic variation of *Giardia lamblia* isolates from food-handlers in Kashan, Central Iran. *Iranian journal of parasitology,* 12: 83–89.

Hooshyar H, Rostamkhani P, Arbabi M, Delavari M (2019). *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterology and hepatology* 12: 3–12.

J**ohnston SP, Ballard MM, Ballard MM, Beach MJ, Beach MJ (2003).** Evaluation of three commercial assays for detection. *Society,* 41: 623–626.

Júlio C, Vilares A, Oleastro M, Ferreira I, Gomes S, Monteiro L (2012). Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. *Parasites and Vectors,* 5: 22.

Kváč M, Hofmannová L, Ortega Y, Holubová N, Horčičková M, Kicia M, Hlásková L, Květoňová D, Sak B, McEvoy J (2017). Stray cats are more frequently infected with zoonotic protists than pet cats. *Folia parasitologica,* 64:034.

Lam HYP, Chen TT, Tseng YC, Chang KC, Yang TH, Peng SY (2021). Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* from cattle and pigs in Hualien country, Eastern Taiwan. *Journal of microbiology, immunology and infection*, 54:718-727.

Langbang D, Dhodapkar R, Subhash CP (2017). Prevalence of intestinal parasites among rural and urban population in Puducherry, South India - A community-based study. *Journal of family medicine and primary care,* 6: 169–170.

Laude A, Valot S, Desoubeaux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C (2016). Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum/Cryptosporidium hominis* and *Entamoeba histolytica* from stool samples. *Clinical microbiology and*

infection, 22: 190.e1-190.e8.

Lhotská Z, Jirků M, Hložková O, Brožová K, Jirsová D, Stensvold CR (2020). A Study on the prevalence and subtype diversity of the intestinal protist *Blastocystis* sp. in a gut-healthy human population in the Czech Republic. *Frontiers in cellular and infection microbiology,* 10:1–14.

Maertens B, Gagnaire A, Paerewijck O, De Bosscher K, Geldhof P (2021). Regulatory role of the intestinal microbiota in the immune response against Giardia. *Scientific reports,* 11: 10601.

Minetti C, Lamden K, Durband C (2015). Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. Parasites and vectors, 8: 444.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular biology and evolution,*16: 1135-44.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac-Renton JL, Ey PL (1998). Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology,*116: 7-19.

Monis PT, Caccio SM, Thompson RCA (2009). Variation in Giardia : towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in parasitology,* 25: 93–100.

Muadica AS, Köster PC, Dashti A, Bailo B, Hern M, Reh L (2020). Molecular diversity of *Giardia duodenalis* , *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* sp. in asymptomatic school children in Leganés, Madrid (Spain). *Microorganisms,* 8: 466.

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.

Nosala C and Dawson S (2015). The critical role of the cytoskeleton in the pathogenesis of Giardia. *Current clinical microbiology reports,* 2: 155–162.

Núñez FA, López JL, de la Cruz A, Finlay CM (2003). Risk factors for *Giardia lamblia* infection in children in daycare centers in Havana, Cuba. *Cadernos de Saúde Pública,* 19: 677–682.

Oliveira-Arbex AP, David EB, Oliveira-Sequeira TC, Bittencourt GN, Guimarães S (2016). Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission. *Epidemiology and infection,* 144: 1418–1428.

Ortuño A, Castella J (2011). Intestinal parasites in shelter dogs and risk factors associated with the facility and its management. *Israel journal of veterinary medicine*, 66: 103–107.

Painter JE, Collier SA, Gargano JW (2017). Association between Giardia and arthritis or joint pain in a large health insurance cohort: Could it be reactive arthritis? *Epidemiology and infection,* 145: 471–477.

Papini R, Gorini G, Spaziani A, Cardini G (2005). Survey on giardiosis in shelter dog populations. *Veterinary parasitology*, 128: 333–339.

Plutzer J, Ongerth J, Karanis P (2010). Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International journal of hygiene and environmental health,* 213: 321–333.

Plutzer J, Törökné A, Szénási Z, Kucsera I, Farkas K, Karanis P (2014). Detection and genotype analysis of *Giardia duodenalis* from asymptomatic Hungarian inhabitants and comparative findings in three distinct locations. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica,* 61:19-26.

Public Health England. Giardia: guidance and data. Giardia data 2006 to 2015. https://www.gov.uk/guidance/giardia#epidemiology. Accessed 23 May 2017.

Puebla LJ, Núñez FA, Santoz LP, Rojas L, Martínez I, Ayllón L (2017). Molecular analysis of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children from La Habana, Cuba. *Parasite epidemiology and control,* 2: 105–113.

Puebla LJ, Núñez FA, Fernández YA, Fraga J, Rivero LR, Millán IA (2014). Correlation of *Giardia duodenalis* assemblages with clinical and epidemiological data in Cuban children. *Infection, genetics and evolution,* 23: 7–12.

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-Ocampo S, Cotte-Alzate JD, Escobedo ÁA, Rodríguez-Morales AJ (2017). Prevalence of zoonotic and non-zoonotic genotypes of *Giardia intestinalis* in cats: A systematic review and meta-analysis. *InfezMed,* 25: 326–328.

Reh L, Muadica AS, Köster PC, Balasegaram S, Verlander NQ, Chércoles ER, Carmena D (2019). Substantial prevalence of enteroparasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in asymptomatic schoolchildren in Madrid, Spain, November 2017 to June 2018. *Eurosurveillance* 24:1900241.

Reses HE, Gargano JW, Liang JL, Cronquist A, Smith K, Collier SA (2018). Risk factors for sporadic Giardia infection in the USA: A case-control study in Colorado and Minnesota. *Epidemiology and infection,* 146: 1071–1078.

Ryan U and Zahedi A (2019). Molecular epidemiology of giardiasis from a veterinary perspective. *Advances in parasitology,* 106:209-254.

Samie A, Guerrant RL, Barrett L, Bessong (2009). Prevalence of intestinal parasitic and bacterial pathogens in diarrhoeal and non-diarroeal human stools from Vhembe district, South Africa. *Journal of health, population and nutrition,* 27: 739–745.

Samie A, Tanih NF, Seisa I, Seheri M, Mphahlele J, Elbakri A (2020). Prevalence and genetic characterization of *Giardia lamblia* in relation to diarrhea in Limpopo and Gauteng provinces, South Africa. *Parasite epidemiology and control,* 9: e00140. f

Sánchez A, Munoz M, Gómez N, Tabares J, Segura L, Salazar Á (2017). Molecular epidemiology of *Giardia, Blastocystis* and *Cryptosporidium* among indigenous children from the Colombian Amazon basin. *Frontiers in microbiology,* 8: 248.

Seguí R, Muñoz-Antoli C, Klisiowicz DR, Oishi CY, Köster PC, De Lucio A (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 and vectors,* 11: 490.

Sheather A L (1923). The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. *Journal of comparative pathology and therapeutics,* 36:266-275.

Singer SM and Nash TE (2000). The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *The journal of infectious diseases,* 181: 1510–1512.

Soares R and Tasca T (2016). Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *Journal of microbiological methods,* 129: 98–102.

Solarczyk P, Majewska AC (2010). A survey of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting household and sheltered dogs. *Parasitol research,* 106:1015–1019.

Sommer MF, Zdravković N, Vasić A, Grimm F, Silaghi C (2017). Gastrointestinal parasites in shelter dogs from Belgrade, Serbia. *Veterinary parasitology,* 7: 54–57.

Squire SA and Ryan U (2017). *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasites and vectors,* 10: 195.

Stensvold CR, Ahmed UN, Andersen LOB, Nielsen HV (2012). Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of clinical microbiology,* 50: 1847–1851.

Stensvold CR, Jirků-Pomajbíková K, Tams KW, Jokelainen P, Berg R, Marving E, Petersen RF, Andersen LO, Angen Ø, Nielsen HV (2021). Parasitic intestinal protists of zoonotic relevance detected in pigs by metabarcoding and teal-time PCR. *Microorganisms,* 9:1189.

Stěrba J, Ditrich O, Prokopič J, Kadlcík K (1988). Gastrointestinal parasitoses discovered in agricultural workers in South Bohemia, Czechoslovakia. *Folia parasitologica,* 35:169-73.

Tang H, Ye Y, Kang R, Yu J, Cao Y (2021). Prevalence and multi-locus genotyping of *Giardia duodenalis* in rabbits from Shaanxi province in northwestern China. *Parasite*, 28:54.

Tembo SJ, Mutengo MM, Sitali L, Changula K, Takada A, Mweene AS (2020). Food and waterborne parasitology prevalence and genotypic characterization of *Giardia duodenalis* isolates from asymptomatic school-going children in Lusaka, Zambia. *Food and waterborne parasitology*, 19: e00072.

Thompson RCA and Ash A (2016). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, genetics and evolution*, 40: 315–323.

Thompson RC, Hopkins RM, Homan WL (2000). Nomenclature and genetic groupings of Giardia infecting mammals. *Parasitology today*, 16: 210–3.

Torgerson PR, Devleesschauwer B, Praet N, Speybroeck N, Willingham AL, Kasuga F (2015). World health organization estimates of the global and regional disease burden of 11 foodborne parasitic diseases, 2010: A data synthesis. *Plos medicine*, 12: e1001920.

Uehlinger FD, Naqvi SA, Greenwood SJ, McClure JT, Conboy G, O'Handley R, Barkema HW (2017). Comparison of five diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in fecal samples from young dogs. *Veterinary parasitology*, 244:91-96.

Uiterwijk M, Nijsse R, Kooyman FNJ, Wagenaar JA, Mughini-gras L, Koop G (2018). Comparing four diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in dogs using latent class analysis. *Parasites and vectors*, 11: 439.

Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EAT, Rooyen MAA Van (2004). *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex. *Journal of clinical microbiology*, 42: 1220–1223.

Viesy S, Abdi J, Rezaei Z, Feizi J (2020). Evaluation of the prevalence of Giardia infection in people referred to the laboratories of Ilam city. *Journal of clinical and diagnostic research*, 14, 1–4.

Volf P, Horák P (2007). Paraziti a jejich biologie, Triton, Praha, 318 p. ISBN 978-80-7387-008-9.

Waldram A, Vivancos R, Hartley C, Lamden K (2017). Prevalence of Giardia infection in households of Giardia cases and risk factors for household transmission. *BMC Infectious diseases,*17: 486. d

Wielinga CM and Thompson RCA (2007). Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data, 134: 1795–1821.

Yang R, Jacobson C, Gardner G, Carmichael I, Campbell AJ, Ryan U (2014). Development of a quantitative PCR (qPCR) for Giardia and analysis of the prevalence, cyst shedding and genotypes of Giardia present in sheep across four states in Australia. *Experimental parasitology,* 137:46-52.

Yoder JS, Beach MJ, Centers for disease control and prevention (CDC) (2007). Giardiasis surveillance–United States, 2003-2005. MMWR Surveillance Summaries, 56: 11–18.

Younas M, Shah S, Talaat A (2008). Frequency of *Giardia lamblia* infection in children with recurrent abdominal pain. *Journal of Pakistan medical association,* 58: 171–174.

Zahedi A, Field D, Ryan UNA (2017). Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland–first report of Assemblage E. *Parasitology*, 144: 1154–1161.