

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých
Budějovicích



Bakalářská práce

Genotypizace izolátů *Giardia intestinalis*

Vypracovala: Eliška Šrámová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

České Budějovice, 2009

Šrámová E., 2009: Genotypizace izolátů *Giardia intestinalis*. (Genotyping of *Giardia intestinalis* isolates) – 25p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this work was assemble isolates of *Giardia intestinalis* from humans and other mammals. Stools samples were examined for presence of cysts by concentration settling method. Consequently sequencing of 532 bp parts of the TPI gene after previous amplification by the nested PCR was performed. *In vitro* cultures of selected isolates were established using experimental model hosts, gerbils.

Anotace:

Cílem práce bylo shromáždit izoláty *Giardia intestinalis* z lidí a dalších savců. Vzorčky stolic byly vyšetřeny na přítomnost cyst koncentrační sedimentační metodou. Následně bylo sekvenováno 532 bp části TPI genu po předchozí amplifikaci pomocí nested PCR. Díky experimentálnímu modelu pískomila byly vybrané izoláty převedeny do *in vitro* kultury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem uvedenou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

V Českých Budějovicích dne 12. května 2009

Eliška Šrámová

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a obětavost. Také bych chtěla poděkovat kolektivu laboratoře oportunních parazitóz (RNDr. Daně Květoňové, RNDr. Bohumilu Sakovi, PhD., Ing. Martinu Kváčovi, PhD.) za pomoc a cenné rady při práci. Děkuji také mé rodině a přátelům za morální podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	1
1.1	<i>Giardia intestinalis</i>	1
1.1.1	Taxonomie	1
1.1.2	Charakteristika životních stádií	2
1.1.3	Životní cyklus	4
1.1.4	Rozšíření, hostitelské spektrum	4
1.1.5	Patogeneze	5
1.1.6	Léčba	6
1.2	Genotypizace	6
1.2.1	Asambláže	6
2	CÍLE PRÁCE	8
3	MATERIÁL A METODY	9
3.1	Materiál	9
3.2	Metody	9
3.2.1	Koncentrační metoda	9
3.2.2	Molekulární metody	10
3.2.3	Experimentální infekce zvířat	14
4	VÝSLEDKY	16
4.1	Sledování vylučování cyst <i>Giardia intestinalis</i> pomocí metody M.I.F.C.	16
4.2	Experimentální infekce laboratorních hlodavců cystami <i>Giardia intestinalis</i> a zavedení in vitro kultur	16
4.3	Vyšetření vzorků stolice infikovaných studentů na výskyt <i>Giardia intestinalis</i>	16
4.4	Vyhodnocení sekvencí	17
5	DISKUSE	18
6	ZÁVĚRY	20
7	LITERATURA	21

1 ÚVOD

1.1 *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis (LAMBL, 1859) ALEXEIEFF, 1914 (syn. *Giardia duodenalis* (FILICE, 1952), *Giardia lamblia* (KUNSTLER, 1882)) je jednobuněčný parazitický organismus, který způsobuje průjemová onemocnění u lidí, stejně jako u zvířat (MAYER 1985).

1.1.1 Taxonomie

Giardia intestinalis patří do čeledi Hexamitidae, řádu Diplomonadida (WENYON, 1926; korigováno BRUGEROLLE, 1975), třídy Trepomonadea, kmene Metamonada GRASSÉ, 1952 korigováno CAVALIER-SMITH, 1981 (CAVALIER SMITH, 1993).

Giardia byla prvně popsána v roce 1681 van Leeuwenhoekem, když mikroskopem zkoumal vlastní průjemovou stolicí. Mikroorganismus byl detailně popsán v roce 1859 Lambem, který parazitického prvoka zařadil do rodu *Cercomonas* a pojmenoval ho *Cercomonas intestinalis* (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996). Mnoho dřívějších popisů druhu *Giardia* předpokládalo existenci různých druhů pro jednotlivé hostitele, čímž došlo k nadhodnocení počtu existujících druhů (ADAM 2001). V roce 1951 Filice vydal studii, v které navrhoval, že by měly být rozpoznávány pouze tři morfologicky odlišné druhy: *G. duodenalis* byla navržena pro formu vyskytující se u mnoha savců, včetně lidí, primátů a dobytka; *G. agilis* u obojživelníků; *G. muris* u hlodavců (FILICE, 1952). Druhy se od sebe liší přítomností mediálního tělíska. *G. intestinalis* má hruškový tvar a jedno či dvě transverzální mediální tělíska, která mají tvar drápu. *G. agilis* je dlouhá a štíhlá, její mediální tělísko má tvar slzy či kapky (FILICE, 1952; FEELY, ERLANDSEN 1985).

U izolátů těch druhů rodu *Giardia*, které byly na základě morfologických kritérií rozlišitelných světelným mikroskopem zařazeny pod *G. intestinalis*, lze pomocí elektronového mikroskopu odhalit rozdíly, které umožňují popis nových druhů: *G. psittaci*, který cizopasí v malých papoušcích (ERLANDSEN, BEMRICK, 1987), a *G. ardeae*, který parazituje ve volavkách (ERLANDSEN *et al.* 1990).

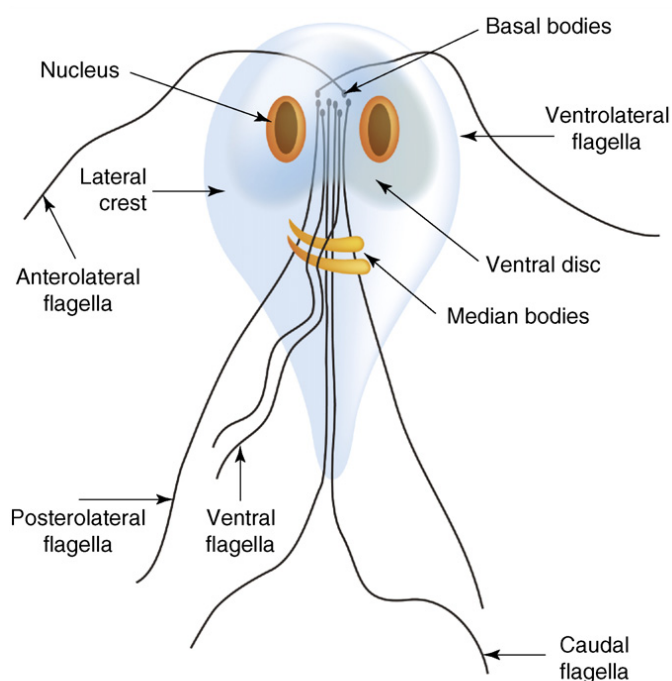
Diplomonády byly považovány za primitivní, kvůli nedostatku typických eukaryotických organel, jako jsou mitochondrie, peroxizómy (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996). *G. intestinalis* je anaerobní organismus, který postrádá jakékoli komponenty oxidativní fosforylace. Nicméně následné objevení mitochondriálních genů v genomech druhů *T. vaginalis* a *G. intestinalis* vedlo k hypotéze, že prvoci, kteří nemají mitochondrie je ztratili druhotně (ADAM 2001).

1.1.2 Charakteristika životních stádií

Giardia má jednoduchý životní cyklus skládající se z infekčních cyst a vegetativních trofozoitů. Trofozoiti mají tvar hrušky (Obr. 1), měří 12–15 μm na délku a 5–9 μm na šířku. Cytoskeleton se skládá z mediálního tělíska, čtyř párů bičíků (anteriorní, posteriorní, kaudální a ventrální) a ventrálního přísavného disku (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996). *Giardia* je životně závislá na celistvosti komplexního mikrotubulárního cytoskeletonu (EY *et al.* 1997). Trofozoiti kolonizují tenké střevo svého hostitele, zejména střední lačník. Hřbetní část je vyklenutá, břišní plochá s přísavným diskem, kterým se giardie přichycují na epitel tenkého střeva (KULDA 1977). Pro pevné přichycení k povrchu enterocytů je na ventrální straně buňky vytvořen z mikrotubulů a lamel proteinu giardinu nepárový přísavný disk (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996). Přichycení závisí na aktivním metabolismu a je inhibováno při teplotách nižších než 37 °C, při zvýšených hladinách obsahu kyslíku, či snížených koncentracích cysteinu (GILLIN, REINER 1982; GILLIN, DIAMOND 1981). Pohyb bičíků poskytuje nezbytnou hydrodynamickou sílu k přichycení adhezivního disku (HOLBERTON, 1974), samotný pohyb bičíku však nestačí pro přichycení parazita (ADAM, 1991). Adhezivní disk slouží pouze k přichycení parazita, nikoli k příjmu potravy. Trofozoiti se živí tekutinami střevního obsahu, které přijímají pinocytosou (KULDA 1977). Při dělení bičíkovce je nepárový přísavný disk dezintegrován a dceřinné buňky si ho musí znovu vytvořit. Jako zásobárna mikrotubulů pro tvorbu nového přísavného disku slouží mediální tělísko (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996).

Trofozoit má čtyři páry bičíků, které začínají ve dvou sadách (tetrádách) bazálních tělísek. Tetrády bývají umístěny ve středu mezi předními póly dvou jader vedle sebe podél buněčné osy. Každé bazální tělísko leží pod bičíkem. Mediální tělísko se nachází ve středové linii v dorzální pozici vůči kaudálním bičíkům a skládá se ze skupiny mikrotubulů (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996). Mediální tělísko rodu *Giardia* je užitečným znakem pro rozdělení různých druhů giardií (ADAM 2001).

Druh *G. intestinalis* má dvě jádra, která jsou v konečném stavu identická a obsahují stejný počet rDNA genů (KABNICK, PEATTIE 1990). Během buněčného dělení se jádra laterálně posunou a následně replikují, což má za následek trofozoity se čtyřmi jádry. Trofozoiti se poté rozdělí podél podélné roviny tak, že zachovávají pravo – levou asymetrii (ČERVA, NOHÝNKOVÁ 1992; FILICE, 1952). V cytoplasmě se dále nacházejí lysosomální vakuoly, ribosomální a glykogenní granula. Golgiho komplex lze sledovat u encystujících se trofozoitů, avšak jeho přítomnost nebyla potvrzena u vegetativních stádií (GILLIN, REINER, MCCAFFERY 1996).



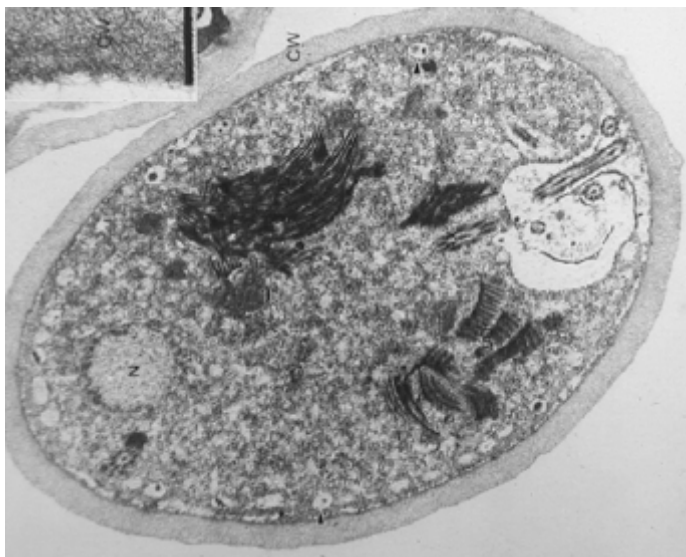
TRENDS in Parasitology

Obr. 1. Trofozoit *Giardia intestinalis* (MONIS, CACCIO, THOMPSON 2009)

Infekčním stádiem giardií je cysta (Obr.2), která je relativně odolná proti nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí stejně jako žaludeční kyselině v žaludku infikovaného hostitele. Cysta je 5–8 μm dlouhá, obklopená stěnou o tloušťce 0,3 μm , která se skládá ze dvou membrán.

K encystaci dochází poté co organismy prodělaly dělení jádra, ale ještě předtím než dojde k cytokinězi, proto mají cysty čtyři jádra. Při dělení trofozoitů a kolonizaci tenkého střeva někteří trofozoiti pokračují dál do lačnicku, kde se encystují, poté co jsou vystaveni žlučovým sekretům. Specifickými podmínkami pro encystaci je lehce zásadité prostředí (pH 7,8) a konjugované žlučové soli plus mastné kyseliny (GILLIN, REINER, BOUCHER 1988). Tento

proces ustane po přidání cholesterolu, což naznačuje, že k encystaci dochází v důsledku nedostatku cholesterolu (ADAM 2001).



Obr. 2. Cysta *Giardia intestinalis* (NOHÝNKOVÁ)

1.1.3 Životní cyklus

Infekce hostitelského organismu je vyvolána požitím cyst v kontaminované potravě, vodě či fekálně-orálním přenosem. V těle hostitelského organismu dochází k excystaci poté, co cysty projdou přes kyselé prostředí žaludku a jsou vystaveny obsahu tenkého střeva, tím dochází k uvolnění trofozoitů (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996). Tento proces probíhá optimálně při pH 1,3–2,7 (BINGHAM, MEYER, 1979). Z duodena se trofozoiti postupně šíří do jejunu, kde se nepohlavně množí, někdy je nalézáme také ve žlučovodech a žlučníku. Encystace – tvorba stěny cysty, tím dochází k uzavření trofozoita, což se odehrává v ileu. Cysty odcházejí ve stolici z hostitele v nepravidelných intervalech. Ihned po vyloučení je cysta infekční. (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996)

1.1.4 Rozšíření, hostitelské spektrum

Giardia je nejčastěji izolovaný střevní parazit způsobující onemocnění giardiózu celosvětově (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996). V rozvojových zemích propuká giardióza hlavně v dětských centrech, kde bývají podmínky napomáhající přímému osobnímu přenosu (JÍROVEC 1948). U většiny pacientů se giardióza vyskytuje jako asymptomatická nákaza. Voda je stále označována jako hlavní médium pro přenos giardiózy (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996). Kal

odpadních vod může být zdrojem znečištění životního prostředí, obzvláště jestli je kal vypouštěn do vody, která je následně použita pro pití, relaxaci či zemědělské účely (ROBERTSON, HERMANSEN, GJERDE 2006). U cestovatelů bývá giardióza častěji symptomatická (JÍROVEC 1948).

Giardióza je onemocnění se zoonotickým charakterem (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996). Giardiae bývají často nalezeny u vodních savců např. bobrů, ondatery stejně jako u běžných domácích zvířat. Předpokládá se, že lidské infekce mohou být získány od jiných savčích hostitelů a naopak (BARUCH, ISAAC-RENTON, ADAM 1996). Největší zoonotické nebezpečí je u genotypů asambláže A a nejmenší u genotypů asambláže B. Dokonalejší určení by mohly poskytnout studie zkoumající dynamiku přenosu giardií mezi hostiteli žijícími ve stejné geografické oblasti (THOMPSON, HOPKINS, HOMAN 2000).

1.1.5 Patogeneze

Infekční dávka je velmi malá, 10 životaschopných cyst stačí k vyvolání infekce (RENDTORFF, 1954). Inkubační doba giardiózy je 1–3 týdny po příjmu potravy s cystami (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996). Hlavním příznakem onemocnění je nekrvavý průjem s hlenem bez hnisavé příměsi, různého trvání a intenzity, doprovázený bolestmi břicha, říháním, nevolností až ztrátou chuti k jídlu (WOLFE 1992). Nákazu provází porucha štěpení a vstřebávání sacharidů, tuků v duodenu, vzniká steatorrhea (přítomnost tuků ve stolici), průjmová stolice bývá světlá a mastná. U malých dětí se při chronickém průběhu nemoci, může nákaza projevit celkovým strádáním, které je způsobené malabsorpcí tuků, laktózy, vitamínu A a vitamínu B12 (NOTIS, 1972; SOLOMONS 1982). Důležitým faktorem je jakost potravy. Při převážně bílkovinné (masité) stravě ustupují bičíkovci do pozadí, naopak ve stravě bohaté na sacharidy se bičíkovci silně rozmnožují. (KULDA 1977)

Mikroskopické vyšetření stolice pro cysty a trofozoity je obvykle první diagnostickou metodou provedenou u pacientů s podezřením na giardiózu. Cysty giardií bývají nalézány ve stolici většiny pacientů s giardiózou (GOKA *et al.* 1990). Cysty mohou být také objeveny označením imunofluorescenční protilátkou (SMITH *et al.*, 1982).

1.1.6 Léčba

Řada účinných chemoterapeutik je dostupná pro léčení giardiózy, včetně atebrinu, nitroimidazolů metronidazol a tinidazol, furazolidonu (DAVIDSON, 1984). Mechanismus účinku metronidazolu na giardie byl velmi důkladně prostudován. Tato látka využívá anaerobních metabolických cest v giardiích. Metronidazol je rychle a zcela absorbován po ústním podání (TRACY, WEBSTER 1996). Nejběžnějšími vedlejšími účinky po léčbě metronidazolem bývají bolesti hlavy, závratě, zvedání žaludku a kovová chuť v ústech (LEVI, DE AVILA, NETO 1977). Metronidazol je mutagenní pro bakterie (ROSENKRANZ, SPECK, 1975) a ve vysokých dávkách po dlouhou dobu je karcinogenní pro myši (RUSTIA, SHUBIK, 1972). Atebrin byl poprvé představen jako antimalarikum v roce 1930, brzy po druhé světové válce se stal významným terapeutikem proti giardióze s klinickou účinností 90% (HARTMAN, KYSER, 1941). Furazolidon je častěji užíván u dětí, protože atebrin má vedlejší gastrointestinální účinky a hořkou chuť. Nevýhoda furazolidonu je v jeho nižší účinnosti oproti atebrinu a metronidazolu (DAVIDSON 1984). Jako jediný je dostupný v tekutém stavu, což je také důvod, proč je používán u dětí (LERMAN, WALKER 1982).

Triose phosphate isomeráza (TPI) je glykolytický enzym. Znalost prostorové struktury a katalytických vlastností proteinů z parazitů by mohly pomoci při navrhování léků proti parazitům. TPI gen může být považován za velmi užitečný genetický znak populační genetické struktury *G. intestinalis* (LU *et al.* 2002).

1.2 Genotypizace

1.2.1 Asambláže

Pomocí allozymatické (izoenzymové) analýzy izolátů získaných z lidí a zvířat byly identifikovány do dvou hlavních genetických linií, asambláže A a asambláže B (ANDREWS *et al.* 1989). DNA analýzy rozdělily asambláž A podle Nashe na skupinu I a II, zatímco asambláž B na skupiny III (WEISS, VAN KEULEN, NASH 1992). Asambláž A odpovídá „polské“ skupině popsané Homanem *et. al.* 1992 a zahrnuje dvě jasně definované větve: genetické skupiny I a II (EY, ANDREWS, MAYRHOFER 1993). Asambláž B odpovídá „belgické“ skupině popsané Homanem *et. al.*, 1992 a zahrnuje genetické skupiny III a IV (ANDREWS, CHILTON, MAYRHOFER 1992). Popis těchto odlišných linií podporuje hypotézu, že

druh *G. intestinalis* je komplexem druhů (ANDREWS *et al.*, 1989). Molekulární studie ukázaly, že *G. intestinalis* se rozpadá na nejméně sedm genotypů (asambláží) geneticky od sebe tak vzdálených, že se nejspíš jedná o samostatné, morfologicky nerozeznatelné druhy (THOMPSON, HOPKINS, HOMAN 2000). Asambláž A se skládá z izolátů, které mohou být seskupeny do dvou odlišných skupin. Tyto skupiny mají různé termíny cluster A-I a A-II (MONIS *et al.*, 1998). Cluster A-I se skládá ze směsi zvířecích a lidských izolátů (Tab. 1). Velká část genotypů týkajících se zoonotického potenciálu náleží do skupiny cluster A-I. Cluster A-II se skládá pouze z lidských izolátů. Asambláž B zahrnuje geneticky různorodou skupinu převážně z lidských izolátů, ale bývají sem zahrnuty i některé zvířecí genotypy (EY *et al.* 1997). Větší genetická vzdálenost oddělující jedince s unikátními genotypy naznačuje, že asambláž B obsahuje dříve nalezené geny než ty nalezené u asambláže A (THOMPSON, HOPKINS, HOMAN 2000). Další sekvenční studie izolátů *G. intestinalis* ze zvířat identifikovaly dodatečné skupiny: asambláže C a D zahrnující izoláty ze psů (HOPKINS *et al.*, 1997, 1999; MONIS *et al.*, 1998); asambláž E zahrnující izoláty z dobytka (EY *et al.*, 1997); asambláže F a G zahrnující izoláty z koček a krys, v tomto pořadí (MONIS *et al.*, 1999) (viz Tab. 1).

Tab. 1: Genotypy a hostitelské spektrum uvnitř druhu *Giardia intestinalis* (doplněno) (THOMPSON, HOPKINS, HOMAN 2000).

Genotyp	Hostitelské spektrum
Asambláž A	Lidé, dobytek, kočky, psi, bobři, morčata, ondatry, hraboši
Asambláž B	Lidé, opice, outloni, psi, činčily, bobři, ondatry, krysy, hraboši,
Asambláž C	Psi, kojoti
Asambláž D	Lamy, skot, kozy, prasata, ovce
Asambláž E	Dobytěk
Asambláž F	Kočky, potkani

2 CÍLE PRÁCE

1. Zpracovat kriticky literární rešerši o tématu
2. Shromáždit izoláty giardií z lidí a z dalších savců, vybrané izoláty převést do *in vitro* kultury
3. Sekvenovat 500 bp části TPI genu s použitím nested PCR
4. Srovnat výsledky s literárními údaji a připravit si materiál pro podrobnější analýzy

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

Na přítomnost cyst giardií byly vyšetřovány vzorky stolice lidí poskytnuté Zdravotním ústavem se sídlem v Praze, a jedinců po návratu z tropů. V průběhu dvou let bylo získáno celkem 400 vzorků lidské stolice, přičemž 10 z nich pocházelo od studentů Přírodovědecké fakulty v Českých Budějovicích (7 mužů a 3 ženy), kteří se vrátili z Papui Nové Guineji, dalších šest jsem shromáždila od cestovatelů z východní Asie.

Dále bylo vyšetřeno 12 psích vzorků od soukromého chovatele a 56 vzorků z telat ze soukromé farmy Vráblík.

Vzorky stolice byly při nemožnosti okamžitého vyšetření uchovány v chladícím boxu při teplotě 4 °C.

3.2 Metody

3.2.1 Koncentrační metoda

M.I.F.C.

Sedimentační metoda používaná k diagnostice parazitů ve stolici.

Použité roztoky:

- roztok MIF (500 ml H₂O; 50 ml 40% formaldehydu; 400 ml 0,1% roztoku mertiolátu sodného; 10 ml glycerinu)
- Lugolův roztok (1 g krystalického jodu; 2 g KJ; 100 ml H₂O)

Postup:

1. Vzorek odebrané stolice spolu s 5 ml MIF a 1 ml Lugolova roztoku byl zhomogenizován ve zkumavce.
2. Homogenní směs byla přefiltrována přes gázový filtr.
3. K čistému extraktu bylo přidáno 6 ml éteru, roztřepáno a centrifugováno 2 minuty při 250 g.
4. Vzniklý prstenec byl uvolněn špejlí a supernatant byl slit.
5. Následovalo prohlížení sedimentu usazeného na dně zkumavky.

3.2.2 Molekulární metody

Extrakce DNA ze vzorku trusu

K 180–200 mg trusu bylo přidáno 200 μ l ASL pufru a 150 mg skleněných kuliček o průměru 0,5 mm. Následně bylo provedeno rozbití cyst v mini-beateru (MINI-BEADBEATER™), což je zařízení umožňující dokonalé zhomogenizování biologického materiálu po dobu 2 minut při maximální rychlosti (120 s/5 000 kmitů). Následující kroky byly provedeny dle návodu výrobce komerčně dodávaného izolačního kitu QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), jež je určen pro čištění a izolaci DNA ze vzorků trusu pro následující detekci patogenů. Kromě výše zmíněného ASL pufru jsou součástí kitu také inhibiční (inhibitEX) tablety, promývací pufr AL, AW1 a AW2, eluční pufr AE, proteináza K lyzující bílkoviny a QIAamp kolony se sběrnými zkumavkami. Získaná DNA byla uchována při teplotě -20° C.

Polymerázová řetězová reakce (nested PCR)

Celkový objem reakční směsi (viz Tab. 2, 3) pro každou PCR byl 25 μ l a součástí každé PCR reakce byla také pozitivní a negativní kontrola. Byly použity primery (viz Tab. 4) amplifikující část genu TPI.

Použité roztoky:

- 10 \times koncentrovaný kompletní pufr pro Taq purple DNA polymerázu (15 mM MgCl₂)
- Taq purple DNA polymeráza (TOP-BIO, 1 U/ μ l)
- Deoxyribunukleosid trifosfáty (d'NTP's; 10 mM roztok – 2,5 každé báze)
- Primery (20 pmol/ μ l)

Tab. 2: Reakční směs pro primární PCR

pufr	2,5 µl
d´NTP´s	0,5 µl
primer F1	0,5 µl
primer R1	0,5 µl
Taq polymeráza	0,3 µl
BSA	1,0 µl
templátová DNA	5,0 µl
sterilní deionizovaná H ₂ O (PCR H ₂ O)	14,7 µl
celkem	25,0 µl

Tab. 3: Reakční směs pro sekundární PCR

pufr	2,5 µl
d´NTP´s	0,5 µl
primer F2	0,5 µl
primer R2	0,5 µl
Taq polymeráza	0,3 µl
DNA z primární PCR	2,0 µl
sterilní deionizovaná H ₂ O (PCR H ₂ O)	18,7 µl
celkem	25,0 µl

U získané DNA jsme pomocí nested PCR (dvě po sobě jdoucí PCR s dvěma sadami primerů) amplifikovali část genu TPI.

Tab. 4: Použité primery

Primery	Sekvence	Produkt	Původ primerů
F1	AAA TIA TGC CTG CTC GTC G	605 bp	SULAIMAN, FAYER, BERN, GILMAN, TROUT 2003
R1	CAA ACC TTI TCC GCA AAC C		
F2	CCC TTC ATC GGI GGT AAC TT	532 bp	SULAIMAN, FAYER, BERN, GILMAN, TROUT 2003
R2	GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC		

Amplifikační program pro termocykler (T3 TERMOCYCLER, BIOMETRA) pro primární i sekundární PCR.

1. počáteční denaturace 94° C, 3 min
 2. denaturace 94° C, 45 s
 3. nasedání primerů 50° C, 45 s
 4. syntéza nového řetězce 72° C, 1 min
 5. dosyntetizování nového řetězce 72° C, 7 min
- počet cyklů: 35

Gelová elektroforéza

Délka DNA fragmentů byla ověřena gelovou elektroforézou, což je metoda, při které se fragmenty DNA rozdělí v agaróze podle molekulových hmotností díky působení elektrického pole.

Použité chemikálie:

- 50× TAE pufr (242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA)
- Agaróza (SERVA)
- Ethidium bromid (SIGMA), případně SYBR Green (SIGMA)
- 100 bp DNA Ladder (BioLabs)

Postup při přípravě 1% agarózového gelu:

1. Požadované množství agarózy bylo smícháno s 1x TAE pufrem, rozpuštěno v mikrovlnné troubě a zchlazeno pod tekoucí vodou na přibližně 50 °C.
2. Následně byl přidán ethidium bromid v takové míře, aby jeho výsledná koncentrace v gelu byla 0,5 µl na ml. Pokud byl místo něho použit Syb Green, který se vmíchá k PCR produktům těsně před nanesením do gelových jamek v elektroforetickém tanku v množství 1 µl SyBR na 20 µl PCR produktu, tento krok odpadl.
3. Gel byl nalit do předem připravené formy, vložen hřeben a gel byl nechán ztuhnout asi 10 minut.
4. Dále byl gel vložen do elektroforetického tanku naplněného 1× TAE pufrem. Do vzniklých jamek bylo nanášeno 20 µl PCR produktu a 4 µl 100 bp ladderu.
5. Elektroforéza probíhala při napětí 70 V přibližně 45 minut, což je doba potřebná pro separaci DNA fragmentů.
6. Pro vizualizaci DNA fragmentů byl použit UV transiluminátor s vlnovou délkou 302 nm.

Extrakce z gelu

Postup:

1. Vyříznutý fragment DNA z gelu byl dán do mikrozkušavek.
2. Přidán QG pufr (na 100 mg gelu 300 µl QG pufru).
3. Inkubováno 10 min při 50 °C.
4. Přidán isopropanol (na 100 mg 100 µl isopropanolu).
5. Veškerý objem byl převeden na kolonu a centrifugován 1 min při 16 100 g.
6. Pipetou bylo přidáno 500 µl QG pufru a centrifugováno 1 min při 16 100 g.
7. Kolona byla promyta přidáním 750 µl PE pufru, inkubace trvala 2–5 min při lab. teplotě a centrifugováno 1 min při 16 100 g.
8. Eluce byla provedena přidáním 30 µl EB pufru, inkubováno 1 min a poté centrifugováno 1 min při 16 100 g.

Sekvenace

Získaná DNA byla vysušena pomocí evaporizátoru DyNA Vap (Labnet). Po vysušení byl vzorek zaslán do laboratoře genomiky BC AV ČR. Sekvenace byla provedena na sekvenátoru

(ABI 3130 HITACHI). Výsledné sekvence byly vyhodnoceny pomocí programu DNA SeqMan 5.06 program (DNASTAR) a porovnány se sekvencemi v GenBank.

Sekvenovaná byla část genu TPI o velikosti 532 bp.

3.2.3 Experimentální infekce zvířat

Pro metodu pomnožení kmene *G. intestinalis* izolovaného ze stolice studentů Přírodovědecké fakulty a pro následné založení *in vitro* kultury trofozoitů získaných z duodena infikovaných zvířat bylo použito pět krys malých (*Mastomys coucha*) a pět pískomilů (*Meriones unguicatus*). Zvířata byla infikována žaludeční sondou dávkou 5×10^4 cyst/zvíře. Od zvířat byly odebrány vzorky trusu a vyšetřeny koncentrační metodou M.I.F.C. pro zachycení cyst giardií v trusu. Následně byly vzorky prohlíženy pomocí světelného mikroskopu. Další použitou metodou byla polymerázová řetězová reakce (PCR) (viz výše). Infikovaná zvířata byla utracena a bylo získáno duodenum obsahující trofozoity.

Kultivace

Kultivování byli trofozoiti z části tenkého střeva přenesení do média (Tab. 7). Kultivace probíhala po dobu 2 dnů, při teplotě 37 °C ve zkumavkách upevněných v zešíkmené poloze. Následně byla kultivovaná populace zamražena pro uchování genetického materiálu.

Médium: Třísluškové kultivační médium sestávalo z roztoku A (Tab. 5), který byl po namíchání autoklávován, roztoku B (Tab. 6), , a roztoku C (2N NaOH v destilované vodě), které byly přefiltrovány přes membránový filtr s velikostí pórů 0,22 µm (Millipore).

Tab. 5: Roztok A

	na 1 l
Casein digest 97023 (hydrolyzát)	22,3 g
Yeast extract (autolyzát)	11,1 g
Glukóza	11,1 g
Hovězí žluč (Siema B 8381) (bile bacteriological)	0,55 g
NaCl	22,2 g
Kyselina ascorbová	0,22 g
K ₂ HPO ₄	1,11 g
KH ₂ PO ₄	0,67 g
Citrát železito-amonný	0,025 g
Redestilovaná voda	890 ml

Tab. 6: Roztok B

L-cystein HCl	2,0 g
Destilovaná voda	100 ml

Tab. 7: Kompletní médium

Vše sterilní	100 ml
Roztok A	80 ml
Bovinní sérum	10 ml
Roztok B	10 ml
Roztok C	20 kapek
Gentamycin	0,3 ml
Antimykotika	1,0 ml

4 VÝSLEDKY

4.1 Sledování vylučování cyst *Giardia intestinalis* pomocí metody M.I.F.C.

Vzorky stolice byly vyšetřeny koprologicky pomocí metody M.I.F.C. (kapitola 2). Celkem bylo vyšetřeno 468 vzorků pocházejících od lidí, psů a telat. Žádný vzorek z pacientů ze Zdravotního ústavu se sídlem v Praze nebyl pozitivní. Z 10-ti vyšetřených vzorků od studentů účastnících se exkurze v zahraničí bylo 7 pozitivních na přítomnost cyst giardií. Infikována byla pouze mužská část výpravy. Také všech šest jedinců po návratu z východní Asie bylo pozitivních.

Z 56 vyšetřených vzorků trusu telat a 12 vzorků trusu psů byl vždy jeden vzorek pozitivní na přítomnost cyst giardií.

4.2 Experimentální infekce laboratorních hlodavců cystami *Giardia intestinalis* a zavedení *in vitro* kultur

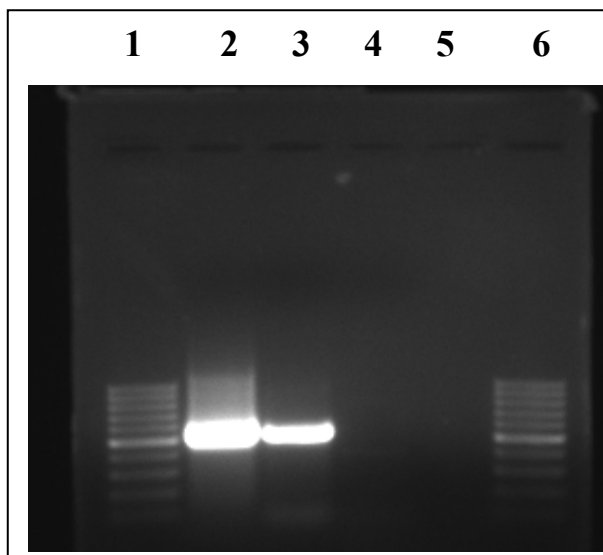
Izolát získaný ze studentů byl infekční pro pískomily, kteří vylučovali cysty giardií od 17. DPI do 22. DPI. Přestože metoda M.I.F.C. nepotvrdila přítomnost cyst giardií po 23. DPI, pitvou a následnou kultivací částí střeva se podařilo získat stabilní kulturu trofozoitů z pískomilů utracených 24.–26. DPI.

Metoda M.I.F.C. prokázala, že ten samý izolát nebyl infekční pro krysy malé. Pitva byla provedena 20.–22. DPI, ale přítomnost parazita neprokázala.

4.3 Vyšetření vzorků stolice infikovaných studentů na výskyt *Giardia intestinalis*

Diagnostickou metodou PCR bylo vyšetřeno celkem 10 vzorků (směsný vzorek cyst ze studentů účastnících se exkurze, vzorek z trofozoitů získaných po pitvě infikovaného pískomila těmito cystami, jednotlivé pozitivní vzorky jedinců a zvířat). Pouze jeden vzorek

byl negativní, a to vzorek trofozoitů z pískomila (viz předchozí kapitola). Výsledek PCR směšného vzorku cyst získaného ze stolice studentů, kteří se účastnili exkurze je na Obr. 3.



Obr. 3. Detekce *Giardia intestinalis* ze směšného vzorku stolice studentů Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity, výsledek gelové elektroforézy. **1, 6:** ladder (100 bp), **2:** DNA *G. intestinalis* ze směšného vzorku stolice studentů Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity, **3:** pozitivní kontrola, **4, 5:** negativní kontrola.

4.4 Vyhodnocení sekvencí

Sekvence části genu TPI *G. intestinalis* získaná ze stolice studentů Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity byla porovnána s dostupnými sekvencemi *G. intestinalis* v GenBank. Výsledná sekvence o velikosti (532 bp) byla vyhodnocena jako genotyp **B**. Stejným způsobem proběhlo porovnání sekvencí ostatních vzorků, které jsou uvedeny v Tab. 8. Nejčastěji byl u lidí diagnostikován genotyp B (71%) následovaný genotypem A (29%). U zvířat byl nalezen genotyp **B** a **E**.

Tab. 8: Genotypizace izolovaných vzorků pomocí sekvenace části genu TPI.

Číslo vzorku	Hostitel	Genotypizace
G 1	pískomil	neamplifikovala
G 2 (směšný ze 7 jedinců)	člověk	B
G 3	člověk	A
G 4	člověk	B
G 5	člověk	B
G 6	člověk	A
G 7	člověk	B
G 8	člověk,	B
G 9	pes	B
G 10	tele	E

5 DISKUSE

V Evropě a v severní Americe během posledních dvou desetiletí významně poklesla prevalence giardiózy. Tato skutečnost se dá vysvětlit zlepšujícími se hygienickými podmínkami a zejména zvýšením kvality pitné vody. Většina případů giardiózy u lidí přenesená vodou je způsobená kontaminací povrchových a podzemních zdrojů pitné vody odpadní vodou (JAKUBOWSKI, CRAUN, 2002). Konzumace průmyslově nefiltrované vody představuje významné riziko giardiózy (HOQUE *et al.*, 2002; JAKUBOWSKI, CRAUN, 2002), které je u nás nižší i díky účinné filtraci vodovodní vody i konzumaci balené vody. Proto se s giardiózou setkáváme hlavně jako s importovanou infekcí u turistů, přistěhovalců nebo vojáků po návratu ze zahraničních misí a není již možné získat tak velké množství pozitivních lidských vzorků, jako dříve.

Také studenti, kteří se účastnili exkurze v Papui Nové Guinei, se infikovali cystami *G. intestinalis* pravděpodobně z vody. Infekce se projevila pouze u mužské části výpravy, což naznačuje, že ženy se nedostaly do kontaktu s kontaminovanou vodou. Mužská část studentů se tedy mohla nakazit nápojem, který jim byl nabídnut, když do Wanangu dorazili, protože podezřele vypadající nápoj vypili pouze muži. Muži se také chodili koupat často společně, podle zdejší tradice na jiné místo než ženy. Ve Wanangu se studenti zdrželi po dobu 10 dnů, cesta k Mt. Wilhelm trvala asi 5 dní, zde se projevily symptomy giardiózy představované silným vodnatým průjmem, bolestmi břicha a nadýmáním.

PCR a následná sekvenace byla použita pro zařazení izolátů do jednotlivých genotypů. Výsledná sekvence části genu TPI o velikosti 532 bp získaná z izolátu studentů Přírodovědecké fakulty odpovídala genotypu B v GenBank. Zjištěné genotypy A a B jsou přenosné mezi lidmi a zvířaty, není tak vyloučeno, že získaná infekce měla zoonotický původ.

Součástí studie bylo infikovat laboratorní zvířata genotypem B. Pískomilové (*Meriones unguicatus*) a krysy malé (*Mastomys coucha*) byli infikováni takovou dávkou cyst, která by měla vést k infekci v případě, že je zvíře citlivé. Během sledovaného období vylučovali pískomilové cysty nepravidelně, což naznačuje možnost, že i když pískomilové byli infikováni, nebyly cysty vždy detekovány. Vzhledem k nepravidelnosti vylučování cyst je z lékařského hlediska doporučováno odebírat tři vzorky stolice za sebou (KULDA, NOHÝNKOVÁ 1996). Cysty byly nalezeny pouze u pískomilů. Jednou z možností proč infekce

nebyla u kryš malých detekována je, že kryš malé nejsou citlivé k infekci lidským izolátem *G. intestinalis*. Studie tedy potvrdila, že přenos napříč druhy je možný. Byly testovány různé zvířecí modely, nejčastěji se však používá model pískomila (BELOSEVIC *et al.*, 1983). Model pískomila je pro *in vivo* kulturu mnohem vhodnější než model kryš malé. Hlavními nevýhodami používání kryš malých, jako modelového zvířete je, že se běžně nemohou nakazit lidskými izoláty *G. intestinalis* a izoláty *G. muris* nebyly axenicky kultivovány. Proto lidské izoláty nemohou být srovnávány v modelech kryš malé. Schopnost dokončit životní cyklus *in vivo* nám může pomoci lépe porozumět tomuto důležitému procesu v *G. intestinalis* a také regulaci životních cyklů v jiných organismech (ADAM 1991).

V západní Kanadě byl proveden podobný pokus s pískomili, kteří byli úspěšně infikováni genotypem B z lidských vzorků stolic. DNA získaná izolací byla amplifikována metodou PCR části genu TPI (MCINTYRE *et al.*, 2000). Sulaiman se svými kolegy našli asambláž B ve dvou izolátech, u kterých se prokázala nákaza kontaminovanou potravou, pomocí sekvenční analýzy TPI genu (SULAIMAN *et al.* 2003). Průzkum v Austrálii prokázal, že infekce asambláží B převládá (70%) v porovnání s asambláží A (30%) (READ *et al.* 2002). Amar a jeho kolegové pozorovali směs asambláže A skupiny II a asambláže B v 9% z 35 vzorků (AMAR *et al.* 2002), zatímco Lu a jeho vědecký tým našli současně asambláž A skupiny I a asambláže B v 33 % z 3 vzorků (AMAR *et al.*, 2002; LU, BARUCH, ADAM 1998). Gen TPI je vhodnější pro rozlišení dvou hlavních asambláží než gen GDH (BERTRAND, ALBERTINI, SCHWARTZBROD 2005). Studie provedená v Egyptě identifikovala genotypy *G. intestinalis* ze vzorků stolic. Vzorky byly vyšetřeny PCR a DNA sekvenční analýzou pro gen TPI. DNA sekvence ukázala, že nejvíce převládá genotyp B (80%), 15% pozitivních vzorků patřilo genotypu E a 5% genotypu A. Genotypy A a B jsou lidské, nicméně doposud nebylo známo, že genotyp E může být také infekční pro lidi (FORONDA *et al.*, 2008).

6 ZÁVĚRY

1. Koncentrační metodou M.I.F.C. bylo diagnostikováno 15 pozitivních vzorků z 468 vyšetřených.
2. Metodou nested PCR se mi podařilo amplifikovat část genu TPI o velikosti 532 bp a následně izolované vzorky osekvenovat. Nejčastěji diagnostikovaným genotypem byl zoonotický genotyp B.
3. Perorální aplikace infekční dávky (5×10^4 cyst/zvíře) byla dostačující k propuknutí infekce *G. intestinalis* u pískomilů.
4. Experimentálním modelem pískomila se podařilo získat kulturu trofozoitů *in vitro*, která byla zmrazena v dusíku pro uchování materiálu k dalším analýzám.

7 LITERATURA

- AMAR, C. F. L., DEAR, P. H., PEDRAZA-DÍAZ, S., LOOKER, N. LINNANE, E., MCLAUCHLIN J. 2002. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and Genotyping of *Giardia duodenalis* in Human Feces. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 446–452.
- ANDREWS, R. H., CHILTON, N. B., MAYRHOFER, G. 1992. Selection of specific *Giardia intestinalis* by different growth conditions. *Parasitol.* **105**: 375–386.
- ANDREWS, R. H., ADAMS, M., BOREHAM, P. F. L., MAYRHOFER, G., MELONI, B. P. 1989. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int. J. Parasitol.* **19**: 183–190.
- BARUCH, A. C., ISAAC-RENTON, J., ADAM, R. D. 1996. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: A sequence-based approach. *J. Infect. Dis.* **174**: 233–236.
- BELOSEVIC, M., FAUBERT, G. M., MACLEAN, J. D., LAW, C., CROLL, N. A. 1983. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. *J. Infect. Dis.* **147**: 222–226.
- BERTRAND, I., ALBERTINI, L., SCHWARTZBROD, J. 2005. Comparison of Two Target Genes for Detection and Genotyping of *Giardia lamblia* in Human Feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5940–5944.
- BINGHAM, A. K., MEYER, E. A. 1979. *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. *Nature* **277**: 301–302.
- CAVALIER SMITH, T. 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla, in *Advances in parasitology* (BAKER, J. R., MULLER, R., ROLLINSON, D. ed.), pp. 69–137, Academic Press.
- ČERVA, L., NOHÝNKOVÁ, E. 1992. A light microscopic study of the course of cellular division of *Giardia intestinalis* trophozoites grown in vitro. *Folia Parasitol. (Prague)* **39**: 97–104.
- DAVIDSON, R. A. 1984. Issues in clinical parasitology: the treatment of giardiasis. *Am. J. Gastroenterol.* **79**: 256–261.
- ERLANDSEN, S. L., BEMRICK W. J. 1987. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J. Parasitol.* **73**: 623–629.
- ERLANDSEN, S. L., BEMRICK, W. J., WELLS, C. L., FEELY, D. E., KNUDSON, L., CAMPBELL, S. R., VAN KEULEN, H., JARROLL, E. L. 1990. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *J. Parasitol.* **76**: 717–724.

- EY, P. L., ANDREWS, R. H., MAYRHOFER, G. 1993. Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitol.* **106**: 347–356.
- EY, P. L., MANSOURI, M., KULDA, J., NOHÝNKOVÁ, E., MONIS, P. T., ANDREWS, R. H., MAYRHOFER, G. 1997. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J. Euk. Microbiol.* **44**: 626–635.
- FEELY, D. E., ERLANDSEN, S. L. 1985. Morphology of *Giardia agilis*: observation by scanning electron microscopy and interference reflexion microscopy. *J. Protozool.* **32**: 691–693.
- FILICE, F. P. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ. California Publ. Zool.* **57**: 53–146.
- FORONDA, P., BARGUES, M. D., ABREU-ACOSTA, N., PERIAGO, M. V., VALERO, M. A., VALLADARES, B., MAS-COMA, S. 2008. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitol. Res.* **103**: 1177–1181.
- GILLIN, F. D., DIAMOND, L. S. 1981. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. *Exp. Parasitol.* **52**: 9–17.
- GILLIN, F. D., REINER, D. S. 1982. Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*: role of reducing agents, serum, temperature, and ionic composition. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 369–377.
- GILLIN, F. D., REINER, D. S., BOUCHER, S. E. 1988. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Infect. Immun.* **56**: 705–707
- GILLIN, F. D., REINER, D. S., MCCAFFERY, J. M. 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 679–705.
- HARTMAN, H. R., KYSER, F. A. 1941. Giardiasis and its treatment. *JAMA* **116**: 2835–2839
- HOMAN, W. L., VAN ENCKEVORT, F. H. J., LIMPER, L., VAN EYS, G. J. J. M., SCHOONE, G. J., KASPRZAK, W., MAJEWSKA, A. C., VAN KNAPEN, F. 1992. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and DNA probes. *Parasitol. Res.* **78**: 316–323.
- HOPKINS, R. M., MELONI, B. P., GROTH, D. M., WETHERALL, J. D., REYNOLDSON, J. D., THOMPSON, R. C. A. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J. Parasitol.* **83**: 44–51.

- HOPKINS, R. M., CONSTANTINE, C. C., GROTH, D. A., WETHERALL, J. D., REYNOLDSON, J. A., THOMPSON, R. C. A. 1999. PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitol.* **118**: 531–539.
- HOUQUE, M. E., HOPE, V. T., KJELLSTROM, T., SCRAGG, R., LAY-YEE, R. 2002. Risk of giardiasis in Aucklanders: a case-control study. *Int. J. Infect. Dis.* **6**: 191–197.
- JAKUBOWSKI, W., CRAUN, G. F. 2002. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: *Giardia: The cosmopolitan parasite* (B.E. Olson, M.E. Olson, P.M. Wallis, eds.), pp.217–238. Wallingford, UK: CAB Int.
- JÍROVEC, O. 1948. Parasitologie pro zvěrolékaře. Nákladem České akademie věd a umění, Praha. pp 436.
- KABNICK, K. S., PEATTIE, D. A. 1990. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J. Cell. Sci.* **95**: 353–360.
- KULDA, J. 1977. In *Parasitologie pro lékaře* (JÍROVEC, O. *et al.*, ed.), pp 244–248, Avicenum/ Zdravotnické nakladatelství.
- KULDA, J., NOHÝNKOVÁ, E. 1996. *Giardia* in humans and animals, in *Parasitic Protozoa* (KREIER, P. P., ed.), pp 69–104, Academic Press.
- LERMAN, S. J., WALKER, R. A. 1982. Treatment of giardiasis. Literature review and recommendations. *Clin. Pediatr.* **21**: 409–414.
- LEVI, G. C., DE AVILA, C. A., NETO, V. A. 1977. Efficacy of various drugs for treatment of giardiasis. A comparative study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**: 564–565.
- LU, S. Q., BARUCH, A. C., ADAM, R. D. 1998. Molecular comparison of *Giardia lamblia* isolates. *Int. J. Parasitol.* **28**:1341–1345.
- MCINTYRE, L., HOANG, L., ONG, C. S., LEE, P., ISAAC-RENTON, J. L. 2000. Evaluation of molecular techniques to biotype *Giardia duodenalis* collected during an outbreak. *J. Parasitol.* **86**: 172–177.
- MEYER, E. A. 1985. The epidemiology of giardiasis. *Parasitol. Today.* **1**: 101–105.
- MONIS, P. T., ANDREWS, R. H., MAYRHOFER, G., MACKRILL, J., KULDA, J., EY, P. L., ISAAC-RENTON. 1998. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dog in Australia. *Parasitol.* **116**: 7–19.
- MONIS, P. T., ANDREWS, R. H., MAYRHOFER, G., EY, P. L. 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol. Biol. E.* **16**: 1135–1144.

- MONIS, P. T., CACCIO, S. M., THOMPSON, R. C. A. 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* **25**(2): 93–100.
- NOTIS, W. M. 1972. Giardiasis and vitamin B12 malabsorption. *Gastroenterol.* **63**: 1085
- READ, C., WALTERS, J., ROBERTSON, I. D., THOMPSON, R. C. 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoeas. *Int. J. Parasitol.* **32**: 229–231.
- RENDTORFF, R. C. 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am. J. Hyg.* **59**: 209–220.
- ROBERTSON, L. J., HERMANSEN, L., GJERDE, B. K. 2006. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(8): 5297–303.
- ROSENKRANZ, H. S., SPECK, W. T. 1975. Mutagenicity of metronidazole: activation by mammalian liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**: 520–525.
- RUSTIA, M., SHUBIK, P. 1972. Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J. Natl. Cancer Inst.* **48**: 721–729.
- LU, S., LI, J., ZHANG, Y., WEN, J., WANG, F. 2002. The intraspecific difference of the triose phosphate isomerase (tim) gene from *Giardia lamblia*. *Chin. Med. J.* **115**(5): 763–766.
- SMITH, P. D., ELSON, C. O., KEISTER, D. B., NASH, T. E. 1982. Human host response to *Giardia lamblia*. I. Spontaneous killing by mononuclear leukocytes *in vitro*. *J. Immunol.* **128**: 1372–1376.
- SOLOMONS, N. W. 1982. Giardiasis: nutritional implications. *Rev. Infect. Dis.* **4**: 859–869.
- SULAIMAN, I. M., FAYER, R., BERN, C., GILMAN, R. H., TROUT, J. M., SCHANTZ, P. M., DAS, P., LAL, A. A., XIAO, L. 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 1444–1452.
- THOMPSON, R. C. A., HOPKINS, R. M., HOMAN, W. L. 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol. Today.* **16**: 210–213.
- TRACY, J., WEBSTER, L. T. 1996. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections, pp 987–1008. *In* HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E. (ed.), *The pharmacological basis of therapeutics*, 9th ed. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y.
- WEISS, J. B., VAN KEULEN, H., NASH, T. E. 1992. Classification of subgroups of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequence using the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**: 73–86.

WOLFE, M. S. 1992. Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 93–100.