

## Genotypowanie izolatów *Giardia duodenalis* uzyskanych od ludzi w zachodnio-centralnej Polsce

## Genotype analysis of *Giardia duodenalis* isolates obtained from humans in West-central Poland

Piotr Solarczyk, Anna Werner, Anna C. Majewska

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań

Autor do korespondencji Piotr Solarczyk; E-mail: psolar@ump.edu.pl

**ABSTRACT.** *Giardia duodenalis* (syn. *G. intestinalis*, *G. lamblia*) is a cosmopolitan flagellate organism belonging to the most common intestinal protozoan parasites of humans and animals. Great genetic heterogeneity has been found within *G. duodenalis*, where only genotypes representing assemblages A and B have zoonotic potential. Fecal samples (447 specimens) obtained from 232 humans in West-central region of Poland were examined by microscopy and PCR. The total prevalence of *Giardia* in humans was 1.3%. DNA was extracted from three positive fecal samples and PCR products were obtained after amplification using the  $\beta$ -*giardin* primers G7 and G759. Sequence and phylogenetic analyses showed that *G. duodenalis* isolates from humans belonged to A and B genotypes. Moreover, three subgenotypes, including a cosmopolitan subgenotype A2 and two new subgenotypes A and B were detected.

**Key words:** *Giardia*,  $\beta$ -*giardin*, genotype, human, molecular typing, Poland

### Wstęp

Kosmopolityczny wiciowiec *Giardia duodenalis* (syn. *G. intestinalis*, *G. lamblia*) należy do najczęstszych pasożytniczych pierwotniaków jelitowych ludzi, jak i wielu gatunków ssaków [1–3]. Częste występowanie *Giardia* u ludzi świadczy zarówno o łatwości zarażenia, jak i o licznych drogach transmisji tego pasożyta. Najczęstszym sposobem szerzenia się *Giardia* wśród ludzi jest bezpośrednia transmisja cyst pasożyta na drodze fekalno-oralnej. Dotyczy to głównie dzieci przebywających w żłobkach i przedszkolach, pacjentów instytucji psychiatrycznych i członków ich rodzin oraz osób preferujących stosunki oralno-genitalne lub oralno-analne [4]. Do zarażenia *Giardia* dochodzi również na drodze pośredniej, poprzez spożywanie zanieczyszczonej kalem żywności i wody. Do zanieczyszczenia żywności cystami *Giardia* dochodzi najczęściej w trakcie

przygotowywania posiłków, rzadziej wskutek nawożenia upraw roślinnych odchodami ludzkimi lub wykorzystywania zanieczyszczonej wody do nawadniania upraw. Obecność cyst *Giardia* stwierdzono na warzywach i owocach [5,6]. Chociaż transmisja cyst *Giardia* poprzez żywność była sugerowana już w latach dwudziestych ubiegłego wieku, to dotychczas opisano niewiele epidemii żywnościopochodnych. Do tej pory udokumentowano osiem epidemii giardiozy po spożyciu sałatek, surowych warzyw, puddingu, flaków i łososia [7]. Natomiast w piśmiennictwie jest wiele doniesień o wodnopochodnych epidemiach giardiozy; w ostatnich trzech dekadach udokumentowano 165 wodnopochodnych epidemii [8].

Występowanie morfologicznie identycznych populacji *G. duodenalis* u licznych gatunków żywcieleli, jak i istnienie wielu możliwości zarażenia stanowi istotne ograniczenie w poznaniu epidemiologii

i transmisji tego pasożyta.

Coraz częstsze wykorzystywanie technik biologii molekularnej w celu molekularnej charakterystyki izolatów *G. duodenalis* wykazało znaczne zróżnicowanie genetyczne w obrębie tego gatunku. Wyniki licznych badań ponownie wskazywały, że większość izolatów *Giardia* uzyskanych od ludzi i zwierząt w różnych regionach świata należy do dwóch głównych zbiorów genotypów, które dawniej określano jako „polskie” i „belgijskie” [9], a obecnie są powszechnie nazywane jako zbiory genotypów A i B [10,11]. Ponadto wykazano, że izolaty *G. duodenalis* od uzyskane od kotów, psów, normików, piżmaków, szczurów i zwierząt kopytnych należą do odrębnych genotypów (C-G), które cechują się wąską specyficnością żywicielską [12–18]. Oprócz tego, stale są opisywane nowe genotypy *Giardia*, które występują głównie u dziko żyjących zwierząt [19–21]. Ponadto, wykazano, że zróżnicowanie genetyczne *G. duodenalis* jest dużo większe niż dotychczas sądzono i w obrębie niektórych zbiorów genotypów wyodrębniono subgenotypy [12,17, 22–24].

Do identyfikacji molekularnej *Giardia* najczęściej wykorzystywana jest technika PCR wraz z jej odmianami oraz analiza sekwencji (jednego bądź kilku) markerów molekularnych. W Banku Genów (National Center for Biotechnology Information – NCBI) znajduje się duża liczba sekwencji genów reprezentujących markery molekularne izolatów *Giardia* uzyskanych od ludzi i zwierząt z różnych regionów świata, w tym najwięcej (ponad 200) zdeponowano sekwencji fragmentu genu kodującego białko  $\beta$ -giardinę [25].

Celem pracy było określenie częstości występowania *G. duodenalis* u ludzi z rejonu Wielkopolski oraz identyfikacja genotypów i subgenotypów tego pasożyta na podstawie analizy sekwencji fragmentu genu kodującego  $\beta$ -giardinę.

## Material i metody

Ogółem uzyskano 447 prób kału od 232 osób pochodzących z pięciu miejscowości położonych na terenie Wielkopolski. Największą liczbę prób kału (200 prób) uzyskano od 100 dzieci z dwóch przedszkoli w Swarzędzu. Próby kału były dwukrotnie pobierane przez rodziców dzieci. Do badań wykorzystano 130 prób kału od 65 osób skierowanych do badań w kierunku obecności pasożytów jelitowych do Katedry i Zakładu Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Po-

znaniu. Od każdej osoby badano dwie próby kału. Materiał do badań stanowiło również 36 prób kału uzyskanych od 36 dzieci hospitalizowanych na Oddziale Dziecięcym Szpitala w Śremie. Zbadano także próby kału od osób mających częsty kontakt ze zwierzętami hodowanymi i/lub ich odchodami. Próby kału uzyskano od sześciu osób pracujących i/lub przebywających w stadninie koni. Ponadto, do badań włączono próby kału pochodzące od 25 osób mających kontakt z bydłem; od każdej osoby zbadano trzy próby kału.

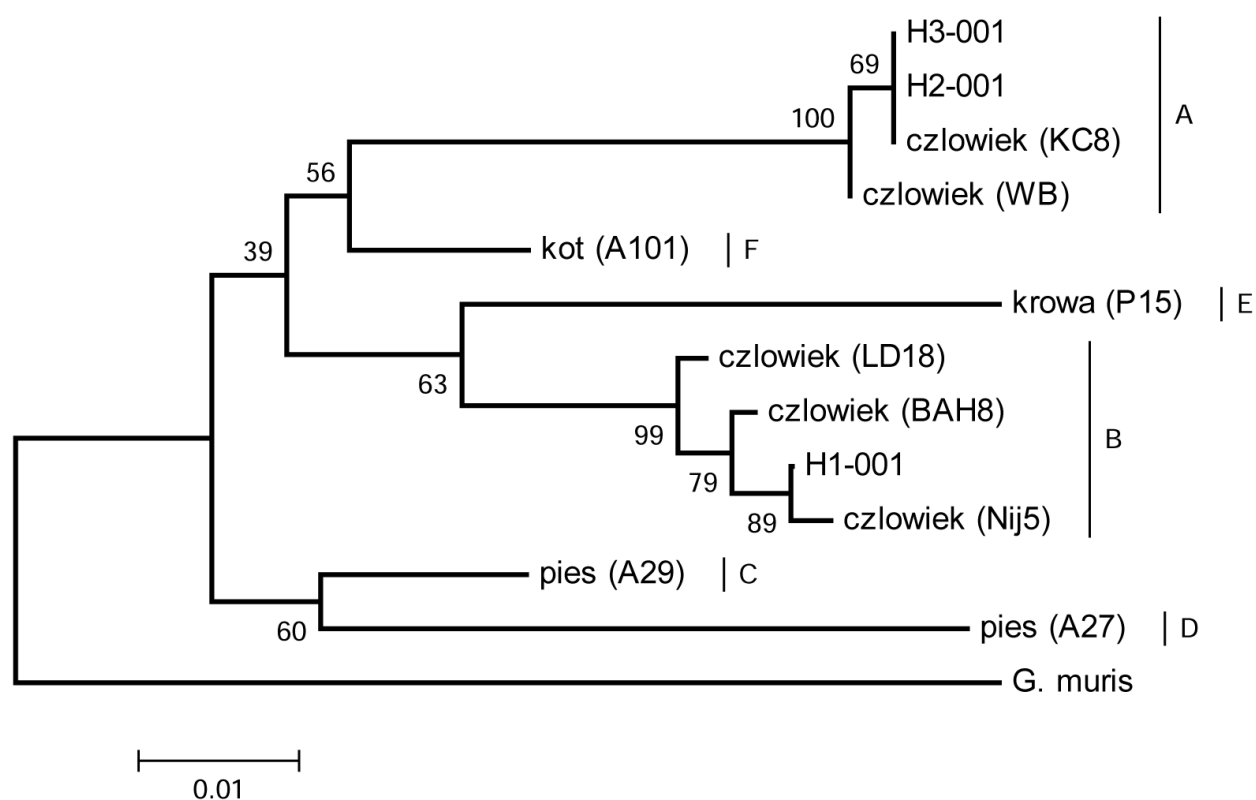
W celu wykrycia cyst *Giardia* z każdej, dokładnie wymieszanej próby kału wykonywano trzy cienkie rozmazy na odtłuszczonych szkiełkach podstawowych; dwa świeże rozmazy (jeden w 0,6% roztworze soli fizjologicznej i drugi podbarwiany płynem Lugola) oraz rozmaz trwały, barwiony trichromem. Preparaty przeglądano w mikroskopie świetlnym (Axioskop, Zeiss) stosując obiektyw immersyjny (1000× powiększenie).

Z pozytywnych w kierunku obecności *Giardia* prób kału izolowano DNA pasożyta metodą Fast-Prep według protokołu opisanego przez da Silva i współpracowników [26]. Izolowany z cyst *Giardia* roztwór DNA (100  $\mu$ l) oczyszczano na kolumnkach wykorzystując komercyjny zestaw QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., USA). Oczyszczanie DNA przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.

Łańcuchową reakcję polimerazy przeprowadzono według protokołu opisanego przez Cacciò i współpracowników [22]; reakcję prowadzono przy użyciu pary starterów G7 i G759, które powielają fragment genu  $\beta$ -giardiny *G. duodenalis* o wielkości 753 pz, polimerazy Taq AmpliTaq Gold (Applied Biosystem, USA) oraz termocyklera GeneAmp 2400 (Applied Biosystem, USA). Do każdej serii badań włączano dwie kontrole – kontrolę pozytywną stanowiło 5  $\mu$ l roztworu DNA izolowanego z trofozoitów *Giardia* (referencyjny szczep Portland-1) utrzymywanych w hodowli *in vitro*, natomiast kontrolę negatywną stanowiła próba, do której dodawano 5  $\mu$ l sterylnej wody dejonizowanej zamiast matrycy DNA.

Rozdział produktów PCR przeprowadzano w 2% żelu agarozowym SeaKem (FMC) stosując aparat do elektroforezy (GibcoBRL, Horizon 11–14). Wybarwiony bromkiem etydyny żel oglądano w świetle UV przy użyciu transiluminatora UV (PhotoPrep I, Photodyne).

Do sekwencjonowania używano produkt PCR z mieszaniny reakcyjnej o objętości minimum 15  $\mu$ l.



Rys. 1. Klasyfikacja filogenetyczna 13 izolatów *Giardia* uzyskanych od ludzi i różnych gatunków zwierząt.

Objaśnienia: H1-001, H2-001 i H3-001 – badane izolaty *Giardia* uzyskane odpowiednio od osoby dorosłej i dwojga dzieci; WB, KC8, BAH8, Nij5, LD18 – referencyjne izolaty *Giardia* uzyskane od ludzi (nr: X85958, AY072723, AY072727, AY072725, AY072726); A101- referencyjny izolaty *Giardia* od kota (nr: AY647264); P15 – referencyjny izolaty *Giardia* od krowy (nr: AY072729); A27 i A29 – referencyjne izolaty *Giardia* od psów (nr: AY545648A i AY545646). Drzewo zostało zorientowane (*rooted*) za pomocą sekwencji fragmentu genu  $\beta$ -giardyny *G. muris* (nr: AY258618).

Fig. 1. Phylogenetic relationship of *Giardia* from humans and animals.

Notes: H1-001 – sequence of partial  $\beta$ -giardin gene of *Giardia* isolate obtained from adult; H2-001 and H3-001 – sequence of partial  $\beta$ -giardin gene of *Giardia* isolates from two boys; WB, KC8, BAH8, LD18, Nij5 – reference *Giardia* isolates from humans (accession numbers: X85958, AY072723, AY072727, AY072725 and AY072726, respectively); A101- reference *Giardia* isolate from cat (accession number AY647264); P15 – reference *Giardia* isolate from cow (accession number AY072729); A21 and A29 – reference *Giardia* isolates from dogs (accession numbers: AY545644 and AY545646, respectively). *G. muris* (accession number AY258618) represents as outgroup. Phylogenetic relationship of 13 *Giardia* isolates inferred by the neighbor-joining analysis of the  $\beta$ -giardin nucleotide sequences.

Produkty amplifikacji sekwencjonowano w dwóch orientacjach przy wykorzystaniu odczynników Big-Dye v3.1 i automatycznego sekwenatora ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems, USA).

Do analizy sekwencji fragmentu genu  $\beta$ -giardyny ogólnodostępne programy komputerowe (BioEdit i GenDoc). Analizę filogenetyczną przeprowadzono przy wykorzystaniu programu komputerowego MEGA version 4.0 [27]. Do utworzenia drzewa filogenetycznego wykorzystano algorytm „neighbor-joining”, a topologię drzewa oceniano przy wykorzystaniu algorytmu „bootstrap” [28].

## Wyniki

Ogółem, spośród 447 badanych prób kału uzyskanych od 232 osób, cysty *Giardia* stwierdzono w trzech próbach kału (0,7%), a częstość występowania tego pasożyta u ludzi wynosiła 1,3%. Wszystkie pozytywne próby kału pochodziły od osób mieszkających w Poznaniu. Cysty *Giardia* stwierdzono w próbach kału pobranych od dwóch chłopców oraz od trzydziestoletniego mężczyzny. Natomiast nie wykryto cyst *Giardia* w próbach kału pobranych od dzieci uczęszczających do dwóch przedszkoli w Swarzędzu i dzieci hospitalizowanych

w szpitalu w Śremie, a także u osób mających stały kontakt ze zwierzętami i/lub ich odchodami.

Przy wykorzystaniu techniki PCR oraz pary starterów G7 i G759 uzyskano produkty amplifikacji fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny*, które zsekwencjonowano. Długości uzyskanych sekwencji fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* trzech izolatów *Giardia* od ludzi wynosiły 700 pz, 726 pz i 736 pz. Następnie, porównano sekwencje fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* badanych izolatów *Giardia* od ludzi względem siebie oraz z sekwencjami zdeponowanymi w Banku Genów (NCBI). Stwierdzono, że dwa badane izolaty *Giardia* od dzieci (H2-001 i H3-001) należały do zbioru genotypów A, a izolat uzyskany od dorosłej osoby (H1-001) do zbioru genotypów B. Wykazano także, iż sekwencja DNA fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* izolatu H1-001 uzyskanego od mężczyzny była w 99% identyczna z sekwencją izolatu *G. duodenalis* Nij5 pochodzącego od człowieka z Holandii (nr akcesyjny AY072725) i określonego jako subgenotyp B1; sekwencje badanego markera molekularnego izolatu H1-001 i Nij5 różniły się jedynie w trzech miejscach nukleotydowych (3 SNP). Z kolei, sekwencja fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* izolatu *Giardia* H2-001 pochodzącego od dwuletniego chłopca była w 100% identyczna z sekwencją fragmentu tego samego genu izolatu *Giardia* KC8 uzyskanego od człowieka z Izraela (nr akcesyjny AY072723) i należącego do zbioru genotypów A i subgenotypu A2. Natomiast sekwencja fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* izolatu *Giardia* H3-001 uzyskanego od drugiego od dziecka była identyczna w 99% z sekwencją tego samego izolatu *Giardia* – KC8. Stwierdzono różnicę tylko w jednym miejscu nukleotydowym (1 SNP). W Banku Genów (NCBI) zdeponowano 3 sekwencje fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* (nr akcesyjne: FJ009207, FJ009208, GU396696) izolatów *Giardia* od ludzi (H1-001 i H2-001, H3-001).

Klasyfikację filogenetyczną opartą na sekwencjach fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* izolatów *Giardia* przedstawia Rys. 1.

Filogenetyczna analiza sekwencji fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* wykazała wysoką wartość *bootstrap* (70%) badanych izolatów (H1-001, H2-001, H3-001) *G. duodenalis* wykrytych u ludzi z terenu Poznania. Sekwencje fragmentów markera molekularnego ułożone są w różnych kładach (grupach) – izolaty H2-001 i H3-001 są wyraźnie dopasowane (70%) do zbioru genotypów A (subgenotyp A2; szczep KC8), podczas gdy izolat H1-001 jest zgrupowany (91%) w obrębie kładu z subgenotypem B1 (szczep Nij5).

## Dyskusja

*G. duodenalis* jest jednym z najczęstszych pasożytów jelitowych człowieka. Jednak częstość występowania giardiozy u ludzi jest odmienna w różnych regionach świata i waha się od 2 do 5% w krajach rozwiniętych, natomiast w krajach rozwijających się częstość występowania jest wyższa i wynosi od 20 do 73% [29,30]. W niniejszych badaniach ogólna częstość występowania giardiozy u ludzi była niska i wynosiła 1,3%. Cysty *Giardia* wykryto jedynie w kale trzech osób mieszkających w Poznaniu; giardiozę stwierdzono u jednej osoby dorosłej z 36 badanych (2,8%) oraz u dwóch z 29 badanych dzieci (6,9%). Chociaż ogólna częstość występowania giardiozy u ludzi w Wielkopolsce stwierdzona w tych badaniach była niska, to jednak była trzykrotnie wyższa niż ta, którą stwierdzono kilka lat temu u ludzi z tego samego regionu [31]. Częstość występowania giardiozy w innych regionach Polski waha się od 1 do 8,8% [32,33]. Nie mniej, ogólna liczba przypadków giardiozy u ludzi w Polsce jest niska [34].

W prezentowanej pracy nie stwierdzono *Giardia* u osób mieszkających w czterech małych miejscowościach Wielkopolski, a co więcej – również u dzieci uczęszczających do przedszkoli. Jest to zaskakujące, ponieważ giardioza wśród dzieci przedszkolnych w krajach rozwiniętych często występuje i ekstensywność zarażenia może wynosić nawet 35% [29].

W prezentowanych badaniach do określenia genotypu i subgenotypu *Giardia* wykorzystano fragment genu  $\beta$ -*giardiny* jako molekularny marker. Dotychczas sklonowano kilka genów kodujących giardinę:  $\beta$ 1-*giardina*,  $\alpha$ 2-*giardina*,  $\beta$ -*giardina* i  $\gamma$ -*giardina* [35–37]. Za użyciem w tych badaniach tego markera molekularnego zdecydowało kilka faktów. Geny kodujące giardiny są unikalne dla *Giardia* [38], a zatem w trakcie PCR nie dochodzi do krzyżowej amplifikacji DNA pochodzącego z innych źródeł (żywicieli, grzyby, glony, bakterie lub inne pasożyty) [39]. Ta wysoka specyficzność amplifikacji fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* stanowi istotną przewagę nad pozostałymi markerami molekularnymi, które wykorzystywano do genotypowania izolatów *Giardia* [22]. Ponadto, w porównaniu z innymi markerami molekularnymi, w Banku Genów (NCBI) zdeponowano najwięcej sekwencji fragmentów genu  $\beta$ -*giardiny* izolatów *Giardia* uzyskanych od ludzi i zwierząt z różnych regionów świata [25]. Duża liczba zdeponowanych sekwencji frag-



mentów tego markera molekularnego pozwoliła na dokładniejszą analizę molekularną badanych izolatów *Giardia* oraz na przeprowadzenie bardziej wiarygodnej analizy filogenetycznej.

Przeprowadzona w tych badaniach molekularna charakterystyka trzech izolatów *G. duodenalis* od ludzi wykazała, że dwoje dzieci było zarażonych genotypem A tego pasożyta, podczas gdy giardioza u mężczyzny była wywołana genotypem B. Badania dotyczące występowania genotypów *G. duodenalis* u ludzi w Wielkopolsce przeprowadzono kilkanaście lat temu [9]. Wyniki tych badań wykazały, że u ludzi z regionu Wielkopolski występował genotyp A *G. duodenalis*, określony wówczas jako „polski” [9]. Częste występowanie zbioru genotypów A *G. duodenalis* u ludzi w różnych regionach świata stwierdzano w ostatnich dwóch dekadach ubiegłego wieku [40]. Jednak wyniki genotypowania ponad tysiąca izolatów tego pasożyta uzyskanych od ludzi z różnych regionów świata wskazują, że obecnie u ludzi częściej wykrywane są genotypy B *G. duodenalis* niż genotypy A [41]; np. częstość występowania genotypu B *G. duodenalis* u ludzi: w Norwegii i w Indiach wynosi 100% [18,42], w Bangladeszu – 86,5% [43], w Peru – 76% [18], w Australii – 70% [44] i w Hiszpanii – 56% [46]. Niektórzy autorzy wskazują, że przyczyną częstszego występowania genotypu B *G. duodenalis* u ludzi w różnych regionach jest fakt, że zarażenie tym genotypem pasożyta jest bezobjawowe [3,43,46]. Potwierdzeniem tego są wyniki badań dzieci przedszkolnych w Australii; u dzieci zarażonych izolatami *Giardia* należącymi do genotypu A niemal 30-krotnie częściej występowała biegunka niż u dzieci zarażonych genotypem B *G. duodenalis* [46]. Zatem dzieci zarażone genotypem A *Giardia* były leczone, podczas gdy te, zarażone genotypem B nadal uczęszczały do przedszkola. Natomiast inni autorzy wykazali, że występowanie genotypu B *G. duodenalis* u ludzi w Holandii wiąże się z długotrwałą biegunką [47]. Również genotyp B *G. duodenalis* był przyczyną epidemii w żłobku [48].

W niniejszej pracy stwierdzono, że objawowa giardioza występowała zarówno u dwóch chłopców zarażonych genotypem A *G. duodenalis*, jak i u mężczyzny, który był zarażony genotypem B tego pasożyta. Toteż, powiązanie objawów giardiozy z genotypem *Giardia* wymaga dalszych i długofalowych badań oraz wnikliwszej analizy genotypów. Być może wyniki takich badań pozwolą na określenie znaczenia różnic między genotypami a wirulencją pasożyta.

Filogenetyczna analiza sekwencji fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* potwierdziła, że izolaty *G. duodenalis*, wykryte u ludzi z terenu Poznania, zawarte są w obrębie zbiorów genotypów A i B oraz wykazała, że badane izolaty różnią się między sobą. Izolaty *Giardia* uzyskane od dzieci są bardzo blisko spokrewnione z izolatem KC8 uzyskanym od człowieka z Izraela i określonym jako subgenotyp A2, podczas gdy izolat uzyskany od mężczyzny wykazywał pokrewieństwo z izolatem Nij5 pochodzącym od człowieka z Holandii i określonym jako subgenotyp B1. Ze względu na to, że sekwencja fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* izolatu *G. duodenalis* H2-001 pochodzącego od chłopca była w 100% identyczna z sekwencją fragmentu tego samego genu izolatu KC8, należy przyjąć, że izolat ten należy do subgenotypu A2, który występuje kosmopolitycznie i jest identyfikowany głównie u ludzi, jakkolwiek wykryto go również u bydła we Włoszech [23] oraz u owiec i kóz w Belgii [49]. Natomiast sekwencja fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* izolatu *Giardia* H3-001 uzyskanego od drugiego od dziecka była w 99% podobna do izolatu KC8, różniąc się jedynie w 103 pozycji nukleotydowej (C↔A). Zatem ten izolat *G. duodenalis* (H3-001) jest nowym subgenotypem w obrębie zbioru genotypów A. W tych badaniach stwierdzono również, że wykryty u mężczyzny izolat *Giardia* (H1-001) jest nowym subgenotypem obrębie zbioru genotypów B, ponieważ sekwencja fragmentu genu  $\beta$ -*giardiny* tego izolatu różniła się od sekwencji odpowiadającego markera molekularnego izolatu Nij5 w trzech miejscach nukleotydowych: 339 (T↔C), 660 (A↔G), 744 (C↔A).

## Wnioski

Częstość występowania *G. duodenalis* u ludzi z terenu Wielkopolski była niska i wynosiła 1,3%. Na podstawie molekularnej charakterystyki izolatów *Giardia* pochodzących od ludzi zidentyfikowano dwa genotypy *G. duodenalis* należące do zbioru A i B oraz trzy subgenotypy, w tym kosmopolityczny subgenotyp A2 i dwa nowe subgenotypy A i B.

## Literatura

- [1] Andersen M.D., Neumann N.F. 2007. *Giardia intestinalis*: new insights on an old pathogen. *Reviews in Medical Microbiology* 2: 35-42.
- [2] Lane S., Lloyd D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology* 28: 123-147.

- [3] Thompson R.C.A. 2008. Giardiasis: Modern Concepts in Control and Management. *Annales Nestlé* 66: 23-29.
- [4] Majewska A.C. 1998. Epidemiologia giardiozy. *Biuletyn Metodyczno-Organizacyjny Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej* 31: 81-92.
- [5] de Oliveira C.A., Germano P.M. 1992. Presence of intestinal parasites in vegetables sold in the metropolitan area of São Paulo-SP, Brazil. Research on intestinal protozoans. *Revista de Saúde Pública* 26: 332-335.
- [6] Jędrzejewski S., Majewska A.C. 2007. Contamination of fresh food products with dispersive stages of intestinal parasites. *Wiadomości Parazytologiczne* 53: 104.
- [7] Smith H.V., Paget T. 2007. Giardia. In: *Foodborne Diseases*. (Ed. S. Simjee). Humana Press Totowa, USA: 303-336.
- [8] Karanis P., Kourenti C., Smith H. 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health* 5: 1-38.
- [9] Homan W.L., van Enkevort 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 recombinant DNA probes. *Parasitology Research* 78: 316-323.
- [10] Mayrhofer G., Andrews R.H., Ey P.L., Chilton N.B. 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology* 111: 11-17.
- [11] Monis P.T., Mayrhofer G., Andrews R.H., Homan W. L., Limper L., Ey P. L. 1996. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology* 112: 1-12.
- [12] Cacciò S.M., Ryan U. 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 160: 75-80.
- [13] Ey P., Mansouri M., Kulda J., Nohynkova 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. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 44: 626-635.
- [14] Hopkins R.M., Meloni B.P., Groth D.M., Wetherall J.D., Reynoldson J. A., Thompson R.C.A. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolated recovered from humans and dogs living in the same locality. *The Journal of Parasitology* 83: 44-51.
- [15] Leonhard S., Pfister K., Beelitz P., Wielinga C., Thompson R.C. 2007. The molecular characterization of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Veterinary Parasitology* 150: 33-38.
- [16] Monis P.T., Andrews R.H., Mayrhofer G., Ey P.L. 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1135-1144.
- [17] Monis P.T., Andrews R.H., Mayrhofer G., Ey P.L. 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infection, Genetics and Evolution* 3:29-38.
- [18] 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*. *Emerging Infectious Diseases* 9: 1444-1452.
- [19] Adams P., Monis P., Elliot A., Thompson R. 2004. Cyst morphology and sequence analysis of the small subunit rDNA and ef1 alpha identifies a novel *Giardia* genotype in a quenda (*Isoodon obesulus*) from Western Australia. *Infection, Genetics and Evolution* 4: 365-367.
- [20] Lalle M., Frangipane di Regalbono A., Poppi L., Nobili G., Tonanzi D., Pozio E., Cacciò S.M. 2007. A novel *Giardia duodenalis* assemblage A-subtype in fallow deer. *The Journal of Parasitology* 93: 426-428.
- [21] Gaydos J.K., Miller W.A., Kreuder-Johnson C., Zornetzer H., Melli A.C., Packham A.E., Jeffries J., Lance M.M., Conrad P.A. 2008. Novel and canine genotypes of *Giardia duodenalis* in Harbour Seals (*Phoca vitulina richardsi*). *The Journal of Parasitology* 94: 1264-1268.
- [22] Cacciò S.M., De Giacomo M., Pozio E. 2002. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology* 32: 1023-1030.
- [23] Lalle M., Pozio E., Capelli G., Bruschi F., Crotti D., Cacciò S.M. 2005. Genetic heterogeneity at the  $\beta$ -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal for Parasitology* 35: 207-213.
- [24] Traub R.J., Monis P.T., Robertson I., Irwin P., Mencke N., Thompson R.C.A. 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology* 128:253-262.
- [25] Wielinga C.M., Thompson R.C. 2007. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology* 134: 1795-1821.
- [26] da Silva A.J., Bornay-Llinares F.J., Moura I.N., Slemenda S., Tuttle J.L., Pieniazek N.J. 1999. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Molecular Diagnosis* 4: 57-64.
- [27] Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology*

- and *Evolution* 24: 1596-1599.
- [28] Volotão A.C., Costa-Macedo L.M., Haddad F.S., Brandão A., Peralta J.M., Fernandes O. 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using  $\beta$ -giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Tropica* 102: 10-19.
- [29] Ortega Y.R., Adam R.D. 1997. *Giardia*: overview and update. *Clinical Infectious Diseases* 25: 545-549.
- [30] Gelanew T., Lalle M., Hailu A., Pozio E., Cacciò S. M. 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Tropica* 102: 92-99.
- [31] Werner A., Majewska A.C., Słodkiewicz A., Juszczyk J., Barańkiewicz G. 2004. Częstość występowania pierwotniaków jelitowych u mieszkańców Poznania i okolic. *Wiadomości Parazytologiczne* 50 (suppl.): 127.
- [32] Okulewicz J., Lucińska A., Galary E. 1998. Occurrence of *Giardia intestinalis* in hospitalized children from orphanages. *Wiadomości Parazytologiczne* 44: 322.
- [33] Stelmaszyk Z.J., Owsikowski J. 2001. Parasitic diseases in children in selected schools in Western Pomerania. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 45.
- [34] Bajer A. 2008. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. *Parasitology Research* 104: 1-17.
- [35] Aggarwal A., Merritt J.W., Nash T.E. 1989. Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 32: 39-48.
- [36] Alonso R.A., Peattie D.A. 1992. Nucleotide sequence of a second alpha giardin gene and molecular analysis of the alpha giardin genes and transcripts in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 50: 95-104.
- [37] Nohria A., Alonso R.A., Peattie D.A. 1992. Identification and characterization of  $\gamma$ -giardin and the  $\gamma$ -giardin gene from *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 56: 27-38.
- [38] Faubert G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 35-54.
- [39] Mahbubani M.H., Bej A.K., Perlin M., Schaefer III F.W., Jakubowski W., Atlas R.M. 1992. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 74-78.
- [40] Monis P.T., Thompson R.C.A. 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infection, Genetics and Evolution* 3: 233-244.
- [41] Cacciò S.M., Ryan U. 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 160: 75-80.
- [42] Robertson L.J., Hermansen L., Gjerde B.K., Strand E., Alvsvåg J.O., Langeland N. 2006. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2212-2217.
- [43] Haque R., Roy S., Kabir M., Stroup S.E., Mondal D., Houghton E.R. 2005. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *The Journal of Infectious Diseases* 192: 2171-2173.
- [44] Read C.M., Walters J., Robertson I.D., Thompson R.C. 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *International Journal for Parasitology* 32: 229-231.
- [45] 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. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5940-5944.
- [46] Sahagún J., Clavel A., Goñi P., Seral C., Llorente M.T., Castillo F.J., Capilla S., Arias A., Gómez-Lus R. 2008. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 27: 81-83.
- [47] Homan W.L., Mank T.G. 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *International Journal for Parasitology* 31: 822-826.
- [48] Hopkins R.M., Constantine C.C., Groth D.A., Wetherall J.D., Reynoldson J.A., Thompson R.C. 1999. PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intragenic rDNA spacer. *Parasitology* 118: 531-539.
- [49] Geurden T., Thomasa P., Casaerta S., Vercruyssa J., Claerebouta E. 2008. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. *Veterinary Parasitology* 155: 142-145.

Wpłynęło 16 marca 2010

Zaakceptowano 15 kwietnia 2010