

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra LEBAR

**UGOTAVLJANJE OKUŽB S PARAZITOM *Giardia*
intestinalis Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra LEBAR

**UGOTAVLJANJE OKUŽB S PARAZITOM *Giardia intestinalis* Z
VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETECTION OF *Giardia intestinalis* INFECTIONS USING A
POLYMERASE CHAIN REACTION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je bil imenovan prof. dr. Jernej Logar, za somentorico asist. dr. Barbara Šoba, za recenzenta prof. dr. Alojz Ihan ter za predsednico komisije prof. dr. Darja Žgur-Bertok.

Mentor: prof. dr. Jernej Logar, univ. dipl. biol.

Somentorica: asist. dr. Barbara Šoba, univ. dipl. mikrobiol.

Recenzent: prof. dr. Alojz Ihan, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Darja Žgur-Bertok, univ. dipl. biol. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	prof. dr. Jernej Logar, univ. dipl. biol. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Članica:	asist. dr. Barbara Šoba, univ. dipl. mikrobiol. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Član:	prof. dr. Alojz Ihan, dr. med. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Petra Lebar

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 616.993.1-078:577.2.083 (043)=163.6
KG	paraziti/giardioza/ <i>Giardia intestinalis</i> /diagnostične metode/neposredni imunofluorescenčni test/molekularne tehnike/PCR v realnem času
AV	LEBAR, Petra
SA	LOGAR, Jernej (mentor)/ŠOBA, Barbara (somentorica)/IHAN, Alojz (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	UGOTAVLJANJE OKUŽB S PARAZITOM <i>Giardia intestinalis</i> Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 49 str., 5 pregl., 12 sl., 1 pril., 53 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Pražival <i>Giardia intestinalis</i> je ena najpogostejših povzročiteljc črevesnih parazitov po vsem svetu. Za giardiozo lahko zbolijo ljudje vseh starosti, čeprav so okužbe pogostejše pri otrocih. Namen diplomskega dela je bil optimizirati verižno reakcijo s polimerazo (PCR) v realnem času za ugotavljanje DNA <i>G. intestinalis</i> v blatu bolnikov, obolelih za gastroenteritisom. Z optimizirano PCR v realnem času smo testirali 131 vzorcev blata bolnikov z gastroenteritisom in rezultate primerjali z rezultati neposrednega imunofluorescenčnega testa (DIF), ki ga v Laboratoriju za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo uporabljajo v vsakodnevni diagnostiki giardioze. Od skupno 131 vzorcev smo z DIF okužbo ugotovili v 15 (11,45 %) primerih, s PCR v realnem času pa v 17 (12,97 %) primerih. Zaradi možne prisotnosti inhibitorjev PCR v blatu bolnikov, smo v PCR v realnem času vključili interno kontrolo. Inhibicijo pomnoževanja DNA smo zasledili v enem primeru (0,76 %). Z redčenjem vzorca smo inhibicijo tudi uspešno odpravili. Na podlagi izsledkov našega dela lahko zaključimo, da je PCR v realnem času bolj občutljiva metoda od komercialnega testa DIF, zato bi jo lahko v rutinski diagnostiki giardioze skupaj z DIF testom uspešno uporabljali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 616.993.1-078:577.2.083 (043)=163.6
 CX parasites/giardiasis/*Giardia intestinalis*/diagnostics/direct immunofluorescence assay/molecular techniques/real-time PCR
 AU LEBAR, Petra
 AA LOGAR, Jernej (supervisor)/ŠOBA, Barbara (co-advisor)/IHAN, Alojz (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2012
 TI DETECTION OF *Giardia intestinalis* INFECTIONS USING A POLYMERASE CHAIN REACTION
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO X, 49 p., 5 tab., 12 fig., 1 ann., 53 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB *Giardia intestinalis* is a flagellated eukaryotic microorganism that commonly causes diarrheal disease throughout the world. Persons of all ages are infected, but the disease is more frequent with young children. The aim of the study was to develop a molecular method of a Real-Time Polymerase chain Reaction (Real-Time PCR) in order to increase the sensitivity and minimize the time required for the detection of DNA *G. intestinalis* in stool of patients with gastroenteritis. We tested 131 stool samples with Real-Time PCR and compared the results with the results of direct immunofluorescence test (DIF), which is used in every day diagnosis in the Laboratory of Parasitology in Ljubljana. Internal amplification control was included in PCR reactions to test for the presence of the PCR inhibitors in samples of stool. We detected a low percentage of inhibition of DNA *G. intestinalis* amplification, 0,76 %, but with dilution we eliminated the inhibition. We also establish the sensitivity and the specificity of DIF compared to Real-Time PCR. Our data showed the sensitivity of DIF method 88,23 % and the specificity of 100 %. Based on the results of our study we can conclude that the Real-Time PCR is more sensitive than DIF. That is way we could successfully used Real-Time PCR, together with DIF, in every day diagnosis of giardiasis.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED IN TAKSONOMSKA UVRSTITEV	2
2.2 BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI PRAŽIVALI IZ RODU <i>Giardia</i>	3
2.3 MORFOLOGIJA IN ŽIVLJENSKI KROG	4
2.4 GENOM	6
2.5 EPIDEMIOLOGIJA	6
2.6 KLINIČNA SLIKA	8
2.7 ZDRAVLJENJE	8
2.8 IMUNSKI ODZIV GOSTITELJA	8
2.9 PREPREČEVANJE OKUŽB	9
2.10 DIAGNOSTIKA GIARDIOZE	9
2.10.1 Mikroskopija	9
2.10.2 Serološka diagnostika	11
2.10.3 Molekularna diagnostika	11
2.10.3.1 Teoretične osnove PCR in PCR v realnem času	11
3 MATERIALI IN METODE DELA	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Vzorci blata	14
3.1.2 Materiali in reagenti za neposredni imunofluorescenčni test Merifluor TM <i>Cryptosporidium/Giardia</i> (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio, ZDA)	14
3.1.3 Materiali in reagenti za osamitev DNA iz vzorcev blata s komercialnim kompletom reagentov QIAamp [®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Nemčija)	15
3.1.4 Materiali in reagenti za PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti DNA parazita <i>G. intestinalis</i>	15
3.1.5 Materiali in reagenti za PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti DNA interne kontrole	15
3.1.6 Material za analizo pridelkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo	16

3.1.7	Potrošni material	16
3.1.8	Laboratorijska oprema	17
3.2	METODE DELA	18
3.2.1	Neposredni imunofluorescenčni test Merifluor™ <i>Cryptosporidium/Giardia</i>	18
3.2.2	Molekularno biološke metode	18
3.2.2.1	Osamitev DNA iz vzorcev blata	18
3.2.2.2	PCR v realnem času	20
3.2.2.2.1	Optimizacija PCR v realnem času za pomnoževanje DNA <i>G. intestinalis</i>	20
3.2.2.2.1.1	Vpliv koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA <i>G. intestinalis</i>	20
3.2.2.2.1.2	Vpliv koncentracije sonde na uspešnost pomnoževanja DNA <i>G. intestinalis</i>	21
3.2.2.2.1.3	Vpliv temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA <i>G. intestinalis</i>	22
3.2.2.2.2	Ugotavljanje DNA <i>G. intestinalis</i> v kliničnih vzorcih	23
3.2.2.2.3	Preverjanje uspešnosti pomnoževanja z interno kontrolo	23
3.2.2.2.4	Analiza pridelkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo	24
3.2.2.2.5	Kontrola kontaminacije	25
4	REZULTATI	26
4.1	ZNAČILNOSTI TESTIRANIH VZORCEV	26
4.2	REZULTATI NEPOSREDNEGA IMUNOFLUORESCENČNEGA TESTA MERIFLUOR™ <i>Cryptosporidium/Giardia</i>	27
4.3	OPTIMIZACIJA PCR V REALNEM ČASU	27
4.3.1	Vpliv koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA <i>G. intestinalis</i>	27
4.3.2	Vpliv koncentracije sonde na uspešnost pomnoževanja DNA <i>G. intestinalis</i>	29
4.3.3	Vpliv temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA <i>G. intestinalis</i>	31
4.4	UGOTAVLJANJE DNA <i>G. intestinalis</i> V KLINIČNIH VZORCIH	32
4.5	PRIMERJAVA PCR V REALNEM ČASU DIF	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	37
5.1	RAZPRAVA	37
5.2	SKLEPI	43
6	POVZETEK	44
7	VIRI	45
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA <i>G. intestinalis</i> , koeficient variacije in cikel praga detekcije pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov.	27
Preglednica 2: Učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA <i>G. intestinalis</i> , koeficient variacije in cikel praga detekcije pri različnih koncentracijah sonde.	30
Preglednica 3: Učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA <i>G. intestinalis</i> , koeficient variacije in cikel praga detekcije pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov.	31
Preglednica 4: Pozitivni vzorci testiranja z optimizirano PCR v realnem času in njihove lastnosti.	33
Preglednica 5: Rezultati vzorcev bolnikov z gastroenteritisom testiranih s testom DIF in PCR v realnem času.	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski krog <i>G. intestinalis</i> (CDC, 2012).	4
Slika 2: Cista (A) in trofozoit (B) <i>G. intestinalis</i> z označenimi strukturami (Logar, 1999)	6
Slika 3: Grafični prikaz števila obolelih ljudi za giardiozo v letih od 1997 do 2010 v Sloveniji.	7
Slika 4: Ciste <i>G. intestinalis</i> pod fluorescenčnim mikroskopom (EPA, 2010)	10
Slika 5: Prikaz krivulje pomnoževanja (ICMG, 2009).	13
Slika 6: Razporeditev bolnikov z gastroenteritisom, vključenih v raziskavo, glede na starost	26
Slika 7: Grafični prikaz pomnoževanja redčitev DNA <i>G. intestinalis</i> pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov (ΔR_n – jakost fluorescenčnega signala).	28
Slika 8: Pridelki PCR v realnem času preverjeni z gelsko elektroforezo, M – velikostni standard lestvice 50 bp, NK _{PCR} – negativna kontrola, PK _{PCR} – pozitivna kontrola, 1 – pridelek PCR v realnem času (63 bp dolg odsek gena za 18S rRNA <i>G. intestinalis</i>)	29
Slika 9: Grafični prikaz pomnoževanja redčitev DNA <i>G. intestinalis</i> pri različnih koncentracijah sonde (ΔR_n – jakost fluorescenčnega signala).	30
Slika 10: Grafični prikaz pomnoževanja redčitev DNA <i>G. intestinalis</i> pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov (ΔR_n – intenziteta fluorescenčnega signala).	31
Slika 11: Število pozitivnih vzorcev na okužbo z <i>G. intestinalis</i> pri različnih starostnih skupinah bolnikov, glede na rezultate PCR v realnem času.	34
Slika 12: Okvir z ročaji za vrednosti C_T pri vzorcih, pozitivnih s PCR v realnem času (levo), pri vzorcih, pozitivnih s PCR v realnem času in pozitivnih z DIF (sredina), ter vzorcih, pozitivnih s PCR v realnem času in negativnih z DIF (desno). Slika prikazuje mediano, kvartile ter največjo in najmanjšo vrednost C_T .	35

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati testiranja in lastnosti zbranih vzorcev bolnikov z gastroenteritisom.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin trifosfat (angl. adenosine-5'- triphosphate)
BHQ	dušilec sonde (angl. black hole quencher)
Bp	bazni par
C _T	cikel praga detekcije (angl. threshold cycle)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
dUTP	deoksiuracil trifosfat
dGTP	deoksigvanin trifosfat
dATP	deoksiadenin trifosfat
dCTP	deoksitimin trifosfat
DIF	neposredna imunofluorescentna metoda (angl. direct immunofluorescent assay)
ELISA	encimskoimunski test (angl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
F	pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid (angl. forward primer)
FAM	karboksi-fluorescein
<i>G. intestinalis</i>	pražival <i>Giardia intestinalis</i>
kDa	kilo Dalton
min	minuta
nM	nanomolarna koncentracija, nmol/L
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
R	negativno usmerjen začetni oligonukleotid (angl. reverse primer)
ROX	6-karboksi-N,N,N',N'-tetrametil-rodamin
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (angl. ribosomal ribonucleic acid)
<i>spp.</i>	latinska okrajšava za več vrst nekega rodu
sek	sekunda
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	raztopina Trisa, acetata in EDTA
VIC	lastnik imena je Applied Biosystems
μM	mikromolarna koncentracija, μmol/L

1 UVOD

Pražival *Giardia intestinalis*, imenovana tudi *Giardia lamblia*, je bičkar, razširjen povsod po svetu. Je eden najpogostejših povzročiteljev črevesnih parazitov pri nas. Povzroča bolezen giardiozo, ki navadno poteka v obliki akutnih, lahko tudi kroničnih drisk z bolečinami v trebuhu in hujšanjem. Pogostejša je pri otrocih. Pri nekaterih ljudeh giardioza poteka brez bolezenskih znakov, vendar so lahko ti ljudje pomembni prenašalci okužbe (Logar, 1999, 2010; Stark in sod., 2009; Wolfe, 1992).

Infektivna oblika parazita so ciste, ki jih gostitelj izloča z blatom. Okužba je fekalno-oralna (Wolfe, 1992). Pomemben vir okužbe je voda kontaminirana s cistami. Hidrične epidemije giardioze so pogoste v razvitih državah, zlasti pa v nerazvitih državah, kjer so še posebej za okužbe dovzetni popotniki in turisti (Brodsky in sod., 1974).

Pri odkrivanju in preprečevanju širjenja giardioze je pomembna hitra in občutljiva diagnostika. Diagnostične metode za ugotavljanje okužb s parazitom *G. intestinalis* večinoma temeljijo na svetlobni in fluorescenčni mikroskopiji. Običajno preiskujemo vzorce blata bolnikov, v katerih ugotavljamo prisotnost cist, pri močnih driskah pa tudi trofozoite parazita (Wolfe, 1992). V zadnjih letih molekularne biološke metode večinoma uporabljajo v raziskovalne namene in v referenčnih diagnostičnih laboratorijih. V vsakodnevni diagnostiki giardioze pa visoka cena teh metod marsikdaj pretehta njihovo visoko občutljivost in specifičnost (Stark in sod., 2011).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil optimizirati verižno reakcijo s polimerazo (PCR) v realnem času za ugotavljanje okužb s parazitom *G. intestinalis* pri bolnikih, obolelih za gastroenteritisom, in jo primerjati z neposrednim imunofluorescenčnim testom (DIF), ki ga v Laboratoriju za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani uporabljajo v vsakodnevni diagnostiki giardioze.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na rezultate podobnih raziskav, ki so jih opravili drugod po svetu, smo pričakovali, da bo PCR v realnem času občutljivejša v primerjavi z DIF. Natančnejša diagnostika bi pomenila boljši vpogled v pogostnost giardioze pri nas in s tem tudi pripomogla h učinkovitejšemu preprečevanju bolezni.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED IN TAKSONOMSKA UVRSTITEV

Pražival *Giardia intestinalis* je leta 1681 prvi opazil Leeuwenhoek pri pregledu svojega fecesa (Dobell, 1920). Organizem je podrobneje opisal Lambl 178 let kasneje. Prepričan je bil, da pripada rodu *Cercomonas* in ga imenoval *Cercomonas intestinalis* (Lambl, 1859). Ime *Giardia* kot rodovno ime je leta 1882 vpeljal Kunstler, šest let kasneje pa je Blanchard predlagal ime *Lamblia intestinalis* v čast Lamblu (Blanchard, 1888). Danes se v zahodnih državah sveta za ime rodu večinoma uporablja *Giardia*, v vzhodnih pa *Lamblia* (Logar, 1999). Tudi glede poimenovanja vrste se raziskovalci vse do danes niso poenotili. Še pred nekaj desetletji so vrsto te praživali določali glede na gostitelja, pri katerem parazitira ali pa glede na njene morfološke značilnosti. Tako je bilo v uporabi več kot 40 različnih imen vrst (Adam, 2001). Leta 1952 je Filice objavil natančen morfološki opis rodu *Giardia* in predlagal priznanje le treh vrst, ki se med seboj razlikujejo po morfologiji sredinskega telesca (Filice, 1952):

- *Giardia duodenalis* (*Giardia lamblia*): trofozoit te vrste je hruškaste oblike z 1-2 ukrivljenima paličastima sredinskima telescema; to vrsto najdemo pri ljudeh in številnih drugih sesalcih,
- *Giardia muris*: trofozoit te vrste je veliko manjši od trofozoitov ostalih dveh vrst in ima okroglo sredinsko telesce; to vrsto najdemo le pri glodavcih,
- *Giardia agilis*: trofozoit te vrste je daljši in tanjši od trofozoita *G. lamblia* in ima sredinsko telesce v obliki solze; to vrsto najdemo le pri dvoživkah (Adam, 2001).

Z razvojem elektronske mikroskopije in na podlagi razlik v zaporedjih gena za 18S rRNA so kasneje priznali še tri vrste giardij, ki pa so morfološko in molekularno precej podobne vrsti *G. intestinalis*. To so vrste *Giardia ardeae* (čaplje), *Giardia psittaci* (papige) in *Giardia microti* (glodavci) (Erlandsen, 1987).

Ime *Giardia lamblia* se je mednarodno uveljavilo šele po letu 1970, v letih od 1980 in 1990 pa se je za to vrsto pogosteje uporabljalo ime *Giardia duodenalis*. Ime *Giardia intestinalis* je pogosteje v uporabi šele od leta 1990.

Pražival *G. intestinalis* po klasifikaciji iz 80. let uvrščamo:

- Kraljestvo: Animalia
- Podkraljestvo: Protozoa
- Deblo: Sarcomastigophora
- Razred: Mastigophora – Flagellata (bičkarji)
- Red: Giardiia

- Družina: *Giardiidae*
- Rod: *Giardia*
- Vrsta: *Giardia intestinalis* (Logar, 1999)

Razvoj molekularnih diagnostičnih metod je močno pripomogel k razumevanju patogeneze parazita *G. intestinalis* in k identifikaciji različnih gostiteljev te praživali.

Vrsto *G. intestinalis* najdemo pri človeku in tudi pri drugih sesalcih, kot so bobri, mačke, lemurji, ovce, teleta, psi, činčile, alpake, konji, prašiči in govedo. Kljub temu, da gre za isto vrsto parazita, se zaporedja, ki kodirajo proteine, med različnimi izolati *G. intestinalis*, ki parazitirajo pri različnih gostiteljih, med seboj razlikujejo. Na podlagi teh razlik delimo izolate *G. intestinalis* v 7 skupin (angl. assemblage) od A-G. Človeške izolate najdemo izključno v skupinah A in B. Omenjeni skupini se med seboj razlikujeta tudi po zaporedjih gena za 18S rRNA. Z raziskavami so ugotovili, da je skupina B za človeka bolj patogena. (Adam, 2001).

2.2 BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI PRAŽIVALI IZ RODU *Giardia*

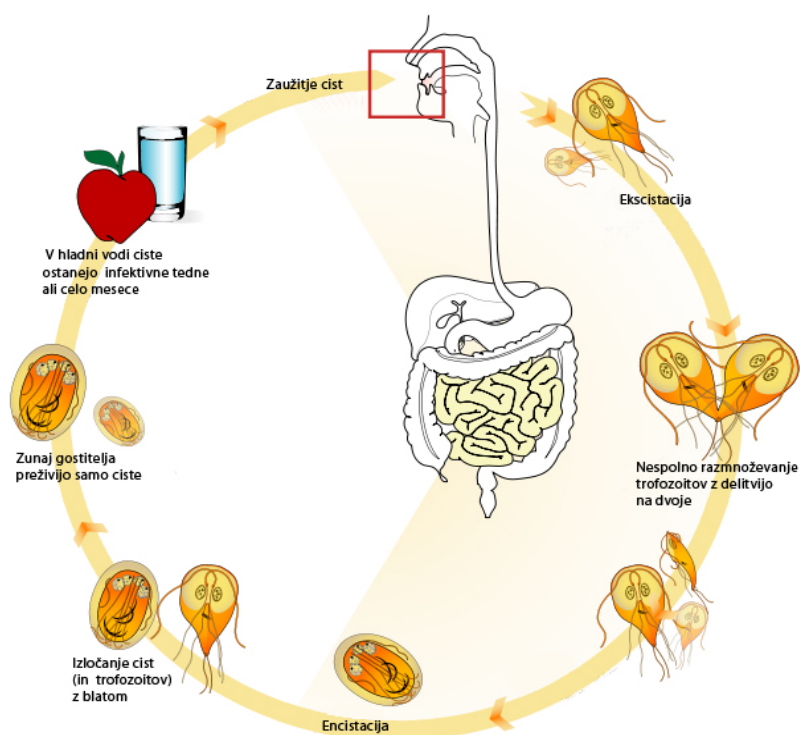
Paraziti iz rodu *Giardia* so enocelični evkariontski organizmi, ki spadajo med praživali. Po morfologiji jih uvrščamo med bičkarje. Pojavljajo se v dveh oblikah, v vegetativni obliki ali aktivno delečem se trofozoitu in v t. i. infektivni obliki ali cisti (Wolfe, 1992). So anaerobni paraziti. Imajo razločno vidno jedro, jedrno membrano, citoskelet in endomembranski sistem – vse to jih uvršča med evkarionte. Manjka jim Golgijev aparat, mitohondriji, nukleoli, peroksisomi, lizosomi, endoplazmatski retikulum in ostale komponente oksidativne fosforilacije. Imajo t.i. karbohidratni fermentacijski metabolizem. Glikoliza in pridobivanje ATP-ja sta odvisna od substratne fosforilacije. Glukoza se v tem procesu ne oksidira popolnoma do CO₂ in H₂O, ampak se nepopolno katabolizira do acetata, etanola, alanina in CO₂. Katerega produkta bo nastalo več je odvisno od stopnje anaerobnosti (v striktno anaerobnih pogojih nastane le alanin). Proces je odvisen tudi od koncentracije glukoze (Adam, 2001). V nekaterih zapisih najdemo, da trofozoiti vendarle producirajo posamezne proste kisikove radikale in imajo razvit mehanizem za detoksifikacijo kisika z encimi, kot so superoksid dismutaza in katalaza (Adam, 1991; Wolfe, 1992).

Vse katabolne reakcije potečejo pri praživalih iz rodu *Giardia* v citosolu ali na površini citosolnih membran (Lindmark, 1980). Med njihove glavne vire energije spadajo glukoza in nekatere aminokisline, kot so alanin, aspartat, arginin in cistein. Cistein jih tudi ščiti pred toksičnim šokom. Same sintetizirajo le alanin in valin, ostale aminokisline pa dobijo iz gostiteljevega črevesja. Aminokisline običajno pridejo v celico s pasivno difuzijo ali aktivnim transportom (Lujan in Nash, 1994). Respiracija cist in trofozoitov je stimulirana z etanolom, pri trofozoitih pa tudi z glukozo (Adam, 2001).

Za rast trofozoitov v dvanajstniku in v črevesju naj bi bile odgovorne žolčne soli, vzpodbujali naj bi jo tudi holesterol, fosfatidilholini in glikolati, ki jih trofozoiti dobijo od gostitelja (Gillin in sod., 1996).

2.3 MORFOLOGIJA IN ŽIVLJENSKI KROG

Giardia intestinalis se, prav tako kot ostale vrste iz rodu *Giardia*, pojavlja v obliki trofozoita in v obliki ciste (Wolfe, 1992; Logar, 1999, 2010).



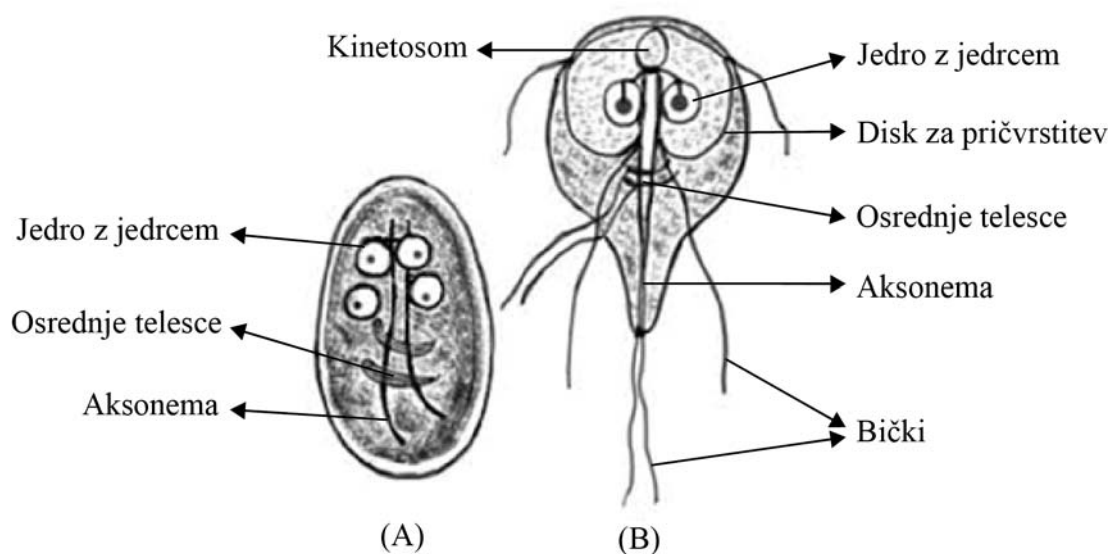
Slika 1: Življenjski krog *G. intestinalis* (CDC, 2012).

Trofozoit je hruškaste bilateralno simetrične oblike, dolg 12-15 μm in širok 5-9 μm (Logar, 1999). Ima 2 jedri brez nukleolov, 4 pare bičkov, na spodnji strani telesca pa diskast predel, ki služi za pritrdjevanje (Adam, 2001). V telesu ima dve garnituri organelov, razporejeni kot siamski dvojček; 2 jedri, 2 ukrivljeni paličasti sredinski telesci z neznano vlogo, 2 aksonemi ali aksostila, ki parazitu služita za oporo (Logar, 1999, 2010). V citoplazmi ima lizosome ter ribosomalne in glikogenske granule (Adam, 2001). Za trofozoite je značilno tudi posebno gibanje, ki spominja na padajoč list, zato jih je v nativnem preparatu lahko prepoznati (Brooks in sod., 2007). Obe jedri trofozoita imata enako količino DNA in enako število genov za rRNA (Kabnick in Peattie, 1990). Citoskelet in diskast predel s setom mikrotubulov in kontraktilnih proteinov (miozin, aktin)

imata glavno vlogo pri pritrjevanju trofozoitov na površino epitelnih celic črevesne stene gostitelja in posledično vplivata na preživetje parazita. Pritrjevanje je odvisno od aktivnosti metabolizma trofozoita. Inhibirajo ga temperatura pod 37 °C, povečana koncentracija kisika in zmanjšana količina cisteina (Adam, 2001). Trofozoiti živijo v dvanajstniku in v zgornjih odsekih tankega črevesa gostitelja. Lahko potujejo po žolčevodu in povzročajo kotišča infekcij v žolčniku. Razmnožujejo se z delitvijo na dvoje (Logar, 1999).

Trofozoiti se encistirajo, ko pridejo v debelem črevesu v gostejši medij. Encistacija običajno poteče v rahlo alkalnem okolju s pH 7-8 in ob prisotnosti soli ter maščobnih kislin. Do nje nikoli ne pride zunaj gostitelja. Encistacija poteče po delitvi jedra, pred citokinezo, zato cista vsebuje 4 jedra.

Ciste so dolge 11-14 µm in široke 7-10 µm. So elipsoidne oblike. Prekriva jih 0,3-0,5 µm debela stena, ki jim zagotavlja visoko odpornost na vplive iz okolja (Brooks in sod., 2007). Stena cist je iz galaktozamina, v njej pa so tudi 4 različni proteini, veliki 29, 75, 88 in 102 kDa (Adam, 2001). V zreli cisti vidimo sredinski telesci, ostanke aksonem in bičkov. Metabolna aktivnost cist znaša le 20-30 % tiste pri trofozoitih. Ciste preživijo v hladni vodi tudi do 3 mesece, ne uniči pa jih niti standardna koncentracija klora (Wolfe, 1992). Ciste so infektivna oblika parazita. Gostitelj jih zaužije s kontaminirano hrano ali vodo. Okužba je fekalno-oralna. Ciste potujejo skozi želodec ne da bi se pri tem uničile ali kakorkoli poškodovale. Kislo okolje želodca sproži ekscistacijo, do katere pride v dvanajstniku ali v zgornjih odsekih tankega črevesa (Adam, 2001). Iz matične ciste nastaneta dva trofozoita, ki nato potujeta skozi tanko v debelo črevo (Wolfe, 1992).



Slika 2: Cista (A) in trofozoit (B) *G. intestinalis* z označenimi strukturami (Logar, 1999)

2.4 GENOM

Genom *G. intestinalis* je podoben genomu večine evkariontov. Kromosomi so linearni s končnimi telomeri, ki so po zaporedju (TAGGG) enaki telomerom ostalih evkariontov. Praživali iz rodu *Giardia* imajo vse štiri jedrne histone (H2a, H2b, H3 in H4), ki so podobni histonom kromosomske DNA ostalih evkariontov (McArthur in sod., 2000; Le Blancq in Adam, 1998). Vsebnost gvanina in citozina znaša 49 %. Genom *G. intestinalis* ima 5 parov kromosomov, velikih od 1,6-3,8 Mbp. Velikost haploidnega genoma praživali iz rodu *Giardia* znaša v povprečju 12 Mbp (Wu in sod., 2000; Fan in sod., 1991).

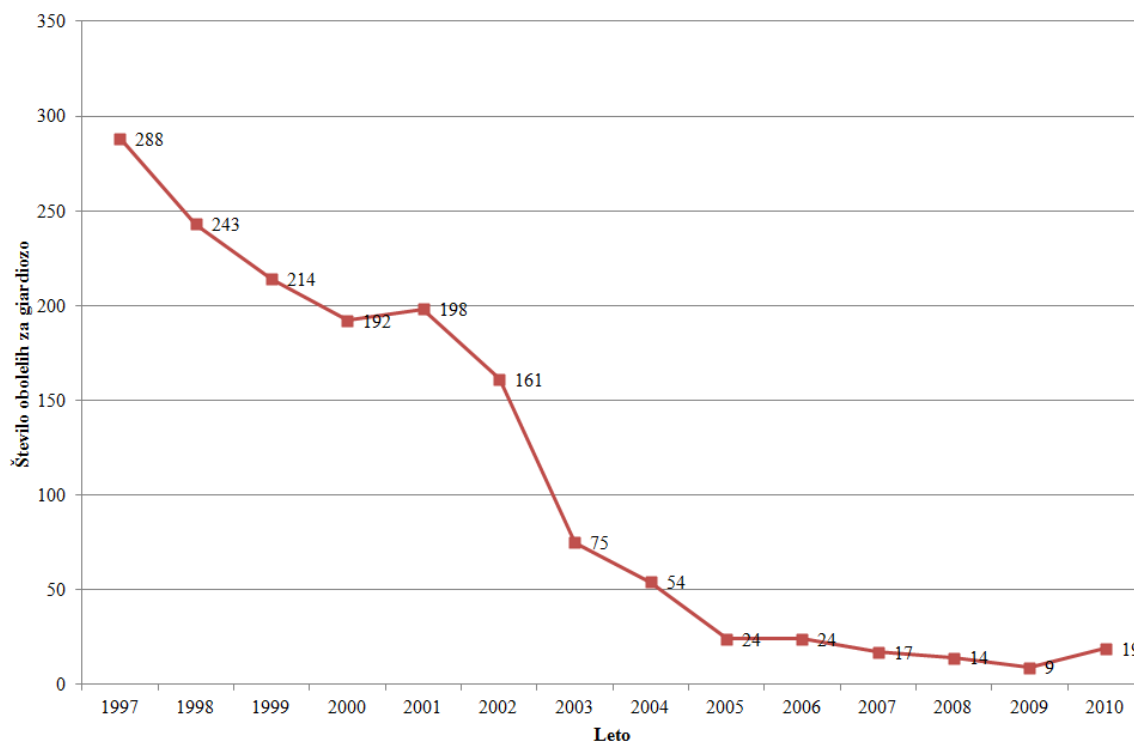
2.5 EPIDEMIOLOGIJA

Giardioza je razširjena povsod po svetu. Okužijo se lahko ljudje vseh starosti, čeprav je bolezen bolj pogosta pri otrocih (Logar, 1999). Pogostnost okužbe je 2-5 %, v državah v razvoju, kjer so sanitarne razmere slabše, tudi do 20 %. Petintrideset do 70 % okužb poteka brez bolezenskih znakov. Države z visoko prevalenco giardioze so države vzhodne Evrope, vzhodne Azije, tropske Afrike, Mehika in države južne Amerike. Giardioza je tudi najpogostejše prijavljena parazitska bolezen v ZDA (Wolfe, 1992).

Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije se giardioza pri nas pojavlja v manj kot 2 %. Od leta 1997 do 2010 je bilo prijavljenih 1532 primerov giardioze pri človeku. Incidenca okužb z *G. intestinalis* z leti pada (Slika 3).

Leta 2009 so v Sloveniji zabeležili 9 primerov giardioze. Leta 2010 je bila ta številka nekoliko višja, in sicer so zabeležili 19 prijavljenih primerov giardioze. V povprečju se s

tem parazitom okuži okrog 18 ljudi na leto. Poročajo tudi o hidrični epidemiji giardioze pri nas (Hojs, 2004).



Slika 3: Grafični prikaz števila obolelih ljudi za giardiozo v letih od 1997 do 2010 v Sloveniji.

Giardioza se med ljudmi prenaša neposredno z osebe na osebo ali posredno s kontaminirano hrano, pogosteje pa z vodo (Wolfe, 1992; Baruch in sod., 1996). Okužba je fekalno-oralna. Epidemije giardioze zaradi kontaminirane pitne vode so opisane v smučarskih središčih, vrtcih in kampih. Infektivni odmerek je majhen. Običajno je za okužbo dovolj manj kot 100 cist parazita. Ljudje smo glavni rezervoar *G. intestinalis*, vendar so molekularno biološke raziskave pokazale, da so z *G. intestinalis* okužene tudi nekatere živali. To je sprožilo ugibanja o tem, ali je giardioza tudi zoonoza (Brooks in sod., 2007; Madigan in Martinko, 2006). Do danes domneva o zoonotskem potencialu *G. intestinalis* ni niti potrjena niti ovržena. Davies in sodelavci so leta 1979 dokazali prenos okužbe z bobra na človeka (Wolfe, 1992).

2.6 KLINIČNA SLIKA

Klinični znaki giardioze se razlikujejo od bolnika do bolnika. Odvisni so od velikosti inokuluma, gostiteljeve odpornosti in od dejavnikov parazita. Na potek bolezni vpliva tudi število zajedavcev; okužba z večjim številom cist se kaže v zgodnejši in bolj intenzivni bolezni kot okužba z manjšim številom cist. Nekateri ljudje so lahko gostitelji *G. intestinalis* vse življenje brez kakršnihkoli bolezenskih znakov, spet za druge je ta pražival patogena. Poročajo, da se pri osebah z manj želodčne kisline in z zmanjšano imunostjo okužba z *G. intestinalis* skoraj vedno kaže z bolezenskimi znaki (Wolfe, 1992).

Po okužbi z *G. intestinalis* sledi 9-15 dnevna inkubacija. Akutna faza bolezni se kaže kot hujšanje, izguba apetita, koprivnica, pojavi se lahko tudi vročina in bolečine v zgornjem podrebrju (Logar, 1999, 2010). Akutna faza traja 3-4 dni, običajno jo spremlja vodena driska, krči in vetrovi. Ponavadi se bolezen spontano pozdravi, bolniki niti ne vedo, da imajo giardiozo. Akutna okužba lahko pri nekaterih bolnikih napreduje v kronično okužbo. Ta lahko traja tudi do dve leti, spremlja jo hujšanje, glavoboli in neprestana driska. Kronična giardioza je pogostejša pri otrocih, kjer jo povezujejo tudi z drugimi boleznimi, kot so pankreatitis in urtikarija (Wolfe, 1992).

2.7 ZDRAVLJENJE

Za zdravljenje giardioze je na voljo mnogo zdravil: metronidazol, kvinakrin, furazolidon, tinidazol, ornidazol, nimorazol. Med najučinkovitejša zdravila spada kvinakrin (Atabrine), ki je uspešen v 90-95 % primerov. Njegova slabost so neprijetni stranski učinki (Wolfe, 1992). Za zdravljenje giardioze priporočajo tudi antibiotike in vitamine, ki ne delujejo neposredno na zajedavca, ampak izboljšujejo splošno zdravstveno stanje bolnika.

Kadar je okužba asimptomatska, večina zdravnikov zdravila ne bo predpisala. Ker so asimptomatski nosilci lahko pomemben vir okužbe, pa kaže zdraviti tudi te. Le na ta način se je mogoče uspešno boriti proti širjenju bolezni (Logar, 1999, 2010).

2.8 IMUNSKI ODZIV GOSTITELJA

Giardia intestinalis sproži v svojem gostitelju močan imunski odziv, ki pa je navadno neučinkovit zlasti iz dveh razlogov. *Giardia intestinalis* ima kompleksen življenjski krog z dvema povsem različnima stadijema, ki se razvijata v različnih delih telesa in sta med seboj antigensko različna. Hkrati je *G. intestinalis* evkariontski organizem in se zato zlahka prilagodi na svojega gostitelja (Logar, 1999). Kljub naštetemu *G. intestinalis* po okužbi v gostitelju vzbudi humoralno in celično imunost.

Največjo vlogo pri odstranjevanju parazitov iz telesa imajo sekrecijski imunoglobulini in protitelesa IgM. V serumu bolnikov so prisotna za giardijo specifična protitelesa IgG in IgM, ki lahko pomagajo tudi pri prepoznavi nedavno okuženih bolnikov od tistih s kronično ali že predhodno zdravljeno okužbo.

Raziskave so pokazale, da so za razvoj odpornosti na okužbo z giardijo nujne celice T pomagalk (Wolfe, 1992). Včasih se zgodi, da po okužbi imunski sistem gostitelja okužbe ne more obvladati. Kljub tvorbi protiteles okužba traja in postane subklinična, brez izrazitih bolezenskih znakov. Takšna imunost se imenuje premunicija ali nesterilna imunost, ki lahko traja tudi vse življenje (Logar, 1999, 2010).

2.9 PREPREČEVANJE OKUŽB

Preventivnega zdravila za giardiozo ni. Okužbo preprečujemo z zagotavljanjem neoporečne pitne vode, s pravilnim odstranjevanjem odpadne vode, s čistočo in osebno higieno. Zlasti pomembna je higiena rok. Pomembno je tudi, da uživamo dobro prekuhano hrano (Wolfe, 1992).

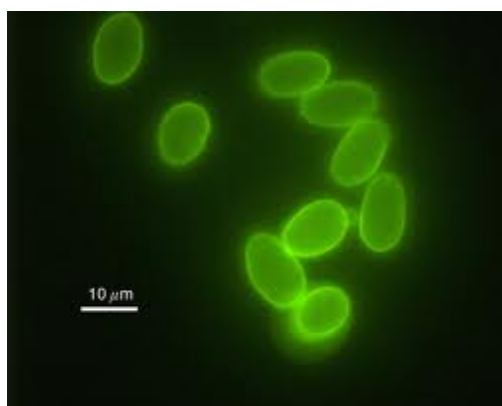
Ciste uniči enominutno prevretje vode, 0,5 % raztopina joda ali 2-4 kapljice 20 % hipoklorita. Kloriranje učinkuje pri večini enteričnih organizmov, ciste giardij pa potrebujejo za popolno uničenje višje koncentracije klora, zlasti v hladni vodi (Wolfe, 1992; Logar, 1999, 2010).

2.10 DIAGNOSTIKA GIARDIOZE

2.10.1 Mikroskopija

Diagnostika giardioze temelji na ugotavljanju cist ali trofozoitov *G. intestinalis* v vzorcih blata bolnikov. Priporočljiv je odvzem vsaj treh zaporednih vzorcev v razmiku 3-5 dni, saj včasih traja več dni preden se okužba razvije in oboleli začne izločati giardije v svojem blatu (Brooks in sod., 2007). Vzorce blata lahko konzerviramo s formalinom ali polivinil alkoholom (Adam, 1991). Mikroskopski pregled je prvi diagnostični test, ki ga uporabimo za pregled blata bolnika s sumom na giardiozo. Pripravimo nativne preparate in jih pregledamo pod svetlobnim mikroskopom. V blatu bolnika najdemo ciste parazita, trofozoite pa le izjemoma ob močnih driskah. Trofozoite običajno najdemo v duodenalnem soku. V nativnem preparatu jih spoznamo po značilnem gibanju, ki je podobno gibanju padajočega lista. Nativni preparat lahko izboljšamo z dodatkom joda ali lugolove raztopine. V takšnih preparatih hitreje in lažje opazimo ciste parazita, hkrati pa s tem tvegamo, da bomo pomorili trofozoite in zato njihovo značilno gibanje ne bo več opazno (Wolfe, 1992).

V diagnostiki giardioze pogosto uporabljajo metodo direktne imunofluorescence. Testi, ki temeljijo na tej metodi, so komercialno dostopni in so od mikroskopiranja nativnih preparatov ustrežnejši predvsem zaradi lažjega odčitavanja rezultatov ter večje občutljivosti in specifičnosti. Občutljivost takšnih testov se giblje med 95-100 %, medtem ko je specifičnost skoraj vedno 100 %. Test poteka tako, da se na posušen in fiksiran preparat, pripravljen iz bolnikovega vzorca blata, nanese reagent, ki vsebuje monoklonska protitelesa označena s fluorescenčnim barvilom. Ta protitelesa so usmerjena proti antigenom stene cist giardij. Če so v preiskovanem vzorcu prisotni paraziti, pride do reakcije oziroma do povezovanja med antigeni in protitelesi. Zaradi dodanega barvila se stena cist giardij fluorescenčno obarva in parazite opazimo pod fluorescenčnim mikroskopom (Adam, 2001).



Slika 4: Ciste *G. intestinalis* pod fluorescenčnim mikroskopom (EPA, 2010)

Občutljivost mikroskopskega pregleda enega vzorca blata bolnika variira med 50-70 %. Občutljivost se močno poveča ob pregledu vsaj treh vzorcev blata bolnika, ki jih odvzamemo v treh različnih dneh (Adam, 1991).

Pri nekaterih bolnikih z giardiozo, ki imajo kronično drisko, je lahko mikroskopski pregled blata negativen. V takih primerih lahko postavimo diagnozo s pomočjo pregleda vsebine duodenuma s t. i. entero testom. Pri tem testu bolnik pogoltne želatinasto kapsulo, pritrjeno na vrvi iz najlona. Kapsula ostane v črevesju do 4 ure, nato se jo izvleče in pregleda pod mikroskopom. V nekaterih primerih je nujna celo duodenoskopija ali biopsija dvanajstnika. Histološke preparate pridobljene na ta način, se lahko nato barva po Giemsi (Adam, 2001).

2.10.2 Serološka diagnostika

Seroloških testov se v vsakodnevni diagnostiki giardioze običajno ne uporablja, saj imajo prenizko občutljivost in specifičnost. Serološki testi se uporabljajo le v epidemiološke namene. Med njimi naj omenimo indirektni imunofluorescenčni test (IFT) in encimsko-imunski test (ELISA), s katerim ugotavljamo prisotnost protiteles proti trofozoitom *G. intestinalis* v serumu preiskovancev. Glavna prednost takih testov je enostavna interpretacija rezultatov, kar pa ne pretehta njihove nizke specifičnosti (Adam, 2001; Logar, 1999).

2.10.3 Molekularna diagnostika

2.10.3.1 Teoretične osnove PCR in PCR v realnem času

Verižna reakcija s polimerazo ali PCR (ang. polymerase chain reaction) je neposredna metoda za hitro pomnoževanje DNA *in vitro* (Herzog – Velikonja in Gruden, 2008; Poljak in sod., 1994). Kljub temu, da je to zelo občutljiva in visoko specifična metoda, se za dokazovanje DNA *G. intestinalis* v vsakodnevni diagnostiki le redko uporablja. Njena uporaba je omejena zlasti na raziskovalne laboratorije.

Velika prednost metode PCR je, poleg hitrosti, tudi sposobnost ločevanja med različnimi vrstami in genotipi giardij. Med glavne slabosti PCR se uvršča visoka cena in potreba po izboljšanju oz. standardizaciji postopkov priprave vzorcev, osamitve tarčne DNA in dokazovanja pomnoženih pridelkov PCR (Guy in sod., 2004; Hove in sod., 2007; Verweij in sod., 2004).

Pri PCR gre v osnovi za pomnoževanje specifičnega dela molekule DNA s temperaturno obstojno polimerazo DNA. Najbolj razširjena je uporaba polimeraze Taq, ki so jo izolirali iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*. Pomembna je tudi izbira začetnih oligonukleotidov (ang. primers), ki nalegata na začetne in končne dele tarčne DNA in služita kot matrica za začetek pomnoževanja verige DNA. Začetni oligonukleotidi so kratke (18-28 nukleotidov), enoverižne molekule DNA s 50-60 % deležem gvanina in citozina in znanim nukleotidnim zaporedjem.

V reakcijsko mešanico za PCR dodamo še deoksiribonukleotid trifosfate (dNTP) in primeren pufer. Reakcijski pufer mora imeti optimalno vrednost pH in ionsko jakost za izbrani encim.

V reakcijski zmesi je izredno pomembna koncentracija ionov Mg^{2+} . Ta vpliva na celoten potek PCR. Vpliva na vezavo začetnih oligonukleotidov, na temperaturo denaturacije dvoverižnih molekul DNA, na specifičnost produktov, na nastanek oligonukleotidnih

dimerov ter na encimsko natančnost. Optimalno koncentracijo Mg^{2+} ionov določimo za vsako reakcijo posebej, saj je odvisna od kombinacije začetnih oligonukleotidov, tarčne DNA in encima. Običajno je optimalna koncentracija Mg^{2+} ionov v reakcijski mešanici za 0,5-2 mM večja od skupne koncentracije vseh dNTP-jev. Pri dodajanju dNTP-jev moramo paziti, da je koncentracija vseh štirih (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) v reakcijski zmesi enaka (ponavadi okrog 20 μ M). S tem se izognemo napačnemu vgrajevanju nukleotidov v produkte PCR (Herzog – Velikonja in Gruden, 2008).

Primerno pripravljena reakcijska mešanica je predpogoj za uspešno izvedbo PCR. To navadno sestavlja od 25 do 40 zaporednih ponovitev temperaturnega cikla z denaturacijo DNA, z vezavo izbranih začetnih oligonukleotidov s komplementarnimi zaporedji ter s sintezo nove komplementarne DNA v področju med začetnima oligonukleotidoma. V vsakem ciklu reakcije dobimo iz ene molekule tarčne DNA dve molekuli. Z vsakim naslednjim krogom se število molekul DNA eksponentno poveča. Vsaka novo sintetizirana kopija tarčne DNA služi kot matrica v naslednjem ciklu reakcije. Pridelke PCR običajno dokažemo z elektroforezo v gelu ali s hibridizacijo z ustrezno označenimi sondami v mikrotitrski ploščici (Herzog – Velikonja in Gruden, 2008; Poljak in sod., 1994).

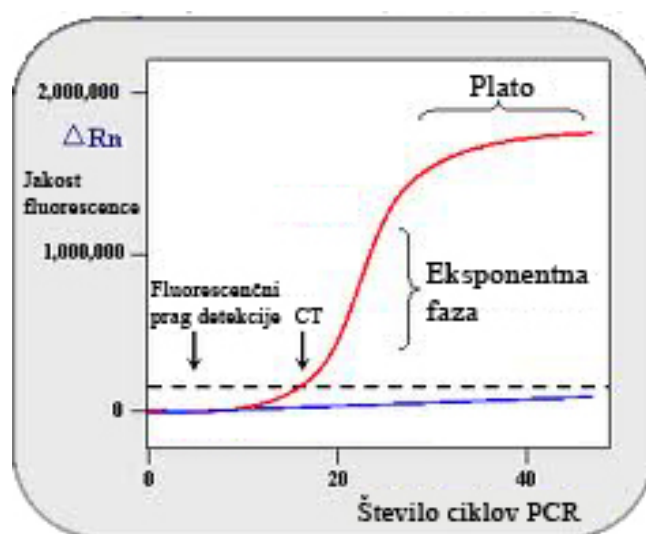
Danes je v diagnostični mikrobiologiji najbolj razširjena metoda PCR v realnem času (ang. real-time PCR). Gre za nadgradnjo klasične PCR, kjer pomnoževanje in detekcija pridelkov reakcije potekata istočasno. Za prikaz nastalih pridelkov PCR uporabljamo s fluorogenimi molekulami označene oligonukleotidne lovke (sonde), ki se specifično vežejo na tarčno zaporedje DNA med obema začetnima oligonukleotidoma, ali pa fluorescenčna barvila, ki se nespecifično vežejo v nastajajočo dvoverižno DNA.

Največkrat se za reakcijo PCR v realnem času uporabijo sonde, kot so TaqMan sonda (sistem hidrolizirajočih lovok), molekularna svetila (ang. Molecular Beacon probes) ali FRET sistem hibridizacijskih lovok. Najpogosteje uporabljajo TaqMan sonde. To so kratka zaporedja DNA, ki imajo na 5' koncu vezan fluorofor, na 3' koncu pa dušilec (ang. quencher). Ko sta fluorofor in dušilec v lovki dovolj tesno skupaj, fluorofor prejeta svetlobno energijo sicer oddaja v obliki fluorescence, vendar jo dušilec sprejme in odda v obliki toplote. V tem primeru fluorescence oziroma signala ne zaznamo.

Ko polimeraza tekom reakcije doseže hibridizirano sondo, jo zaradi 5' eksonukleazne aktivnosti razreže in s tem loči fluorofor od dušilca. Dušilec zaradi oddaljenosti ne more več sprejemati svetlobne energije fluorofora in zato fluorescenco zaznamo. Količina oddane svetlobe je sorazmerna količini razgrajene sonde, ta pa s količino tarčnih odsekov. Več imamo PCR pridelka, močnejša in bolj intenzivna bo fluorescenca.

Rezultate reakcije spremljamo sproti na zaslonu računalnika. V obliki sigmoidne krivulje jih izpisuje program, ki nam podaja tudi vrednost C_T (ang. cycle threshold). Začetni pomnožki tarčnega zaporedja niso vidni, ker je fluorescenčni signal reporterskega fluorofora prešibek, da bi ga lahko ločili od fluorescence ozadja. Nastali produkt lahko

dokažemo šele, ko njegova fluorescenca preseže fluorescenco ozadja oz. prag detekcije. To točko imenujemo C_T . Nižja kot je vrednost C_T , več kopij tarčne DNA je bilo v vzorcu. Ko je ozadje reakcije preseženo, se začne izrisovati eksponentna krivulja, saj se z vsakim ciklom reakcije število molekul DNA eksponentno poveča. Med reakcijo se z vsakim ciklom porabljajo dodani reagenti in akumulirajo inhibitorji. Eksponentni fazi tako sledi plato, ko pride do nasičenja reakcije. Reakcija se upočasni in fluorescenčni signal se ne povečuje več (Class in sod., 2007; Espy in sod., 2006).



Slika 5: Prikaz krivulje pomnoževanja (ICMG, 2009).

Prednost PCR v realnem času je v njeni visoki občutljivosti in specifičnosti, metoda je hitra, hkrati pa ne zahteva naknadnega rokoovanja s pridelki PCR, kar močno zmanjša možnost kontaminacije delovnega okolja z njimi (Espy in sod., 2006; Stark in sod., 2011; Hove in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci blata

V diplomsko nalogo smo vključili vzorce blata bolnikov z gastroenteritisom, ki so prispeli v Laboratorij za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani v redno laboratorijsko diagnostiko v času od 5. junija 2010 do vključno 25. novembra 2010. V tem obdobju smo zbrali 131 vzorcev blata bolnikov starosti od 1 do 89 let, obeh spolov, iz različnih koncev Slovenije. Poleg omenjenih 131 vzorcev smo v raziskavo vključili 18 vzorcev blata, v katerih so v Laboratoriju za parazitologijo z neposrednim imunofluorescenčnim testom predhodno ugotovili prisotnost cist parazita *G. intestinalis*.

Vse vzorce blata smo do obdelave hranili pri temperaturi +4 °C.

Podatki o bolnikih so zbrani v Prilogi A.

3.1.2 Materiali in reagenti za neposredni imunofluorescenčni test Merifluor™ *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio, ZDA)

- detekcijski reagent – monoklonska protitelesa proti antigenom stene oocist kriptosporidijev in stene cist giardij, označena s fluorescein izotiocianatom (FITC)
- kontrastno barvilo
- 20x koncentrirani spiralni pufer
- pozitivna kontrola – v formalinu konzerviran pripravek blata, pozitiven na ciste giardij in oociste kriptosporidijev
- negativna kontrola – v formalinu konzerviran pripravek blata, negativen na ciste giardij in oociste kriptosporidijev
- namestitveno sredstvo – olje
- stekelca s tremi krožnimi polji
- plastična zanka – eza

3.1.3 Materiali in reagenti za osamitev DNA iz vzorcev blata s komercialnim kompletom reagentov QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Nemčija)

- pufer ASL
- pufer AL
- pufer AW1
- pufer AW2
- pufer AE
- tabletke InhibitEx
- encim proteinaza K
- epruvetke z membrano
- zbiralne epruvetke

3.1.4 Materiali in reagenti za PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti DNA parazita *G. intestinalis*

- sterilna voda brez nukleazne aktivnosti (Qiagen, Hamburg, Nemčija)
- reakcijska mešanica Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix – UDG with ROX (Invitrogen, Kalifornija, ZDA)
- začetna oligonukleotida in sonda (TIB MOLBIOL, Berlin, Nemčija):
 - pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid giardia-80F:
5'-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3'
 - negativno usmerjen začetni oligonukleotid giardia-127R:
3'-TTGCCAGCGGTGTCCG-5'
 - sonda giardia-105T: 5'-6FAM-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-BHQ1-3'
- pozitivna kontrola (DNA, osamljena iz vzorca blata, v katerem so v Laboratoriju za parazitologijo z neposrednim imunofluorescenčnim testom predhodno ugotovili prisotnost cist parazita *G. intestinalis*)
- negativna kontrola (sterilna destilirana voda)

3.1.5 Materiali in reagenti za PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti DNA interne kontrole

- sterilna voda brez nukleazne aktivnosti (Qiagen, Hamburg, Nemčija)
- reakcijska mešanica Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix – UDG with ROX (Invitrogen, Kalifornija, ZDA)

- začetna oligonukleotida in sonda (TIB MOLBIOL, Berlin, Nemčija):
 - pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid:
5'-CTGATTTTCTTGCGTCGAGTTT-3'
 - negativno usmerjen začetni oligonukleotid:
3'-TCAAGTAACAACCGCGAAAAAG-5'
 - sonda: 5'-VIC-AGACCTTTCGGTACTTCGTCCACAAACACAA-BHQ1-3' (Metabion, Martinsried, Nemčija)
- pozitivna kontrola (DNA interne kontrole)
- negativna kontrola (sterilna destilirana voda)

3.1.6 Material za analizo pridelkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo

- agaroz v prahu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
- pufer TAE
- etidijev bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
- nanašalni pufer (MBI Fermentas, Hanover, Maryland, ZDA)
- velikostni standard lestvice 50 bp (Roche, Basel, Švica)
- steklena čaša
- kalup z elektroforeznimi glavnički
- elektroforezna kadička

3.1.7 Potrošni material

- sterilne plastične 0,2 ml, 1,5 ml in 2 ml epruvetke
- nastavki s filtri za avtomatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- staničevina
- zaščitne rokavice
- fiziološka raztopina
- etanol (96-100 %)
- plastična pipeta
- krovna stekelca
- destilirana voda
- steklene palčke

3.1.8 Laboratorijska oprema

- brezprašna komora za varno in sterilno delo (Iskra PIO, LFV 9, Iskra, Šentjernej, Slovenija)
- namizne centrifuge (Eppendorf Mini Spin, Centrifuge S424, Centrifuge 5430R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- vibracijsko mešalo (Fischer Scientific Top Mix FB15024, Fischer Scientific, Nepean Ontario, Kanada)
- avtomatske pipete (območja pipetiranja: 0,2-0,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl, Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- merilni valji
- zbiralniki za odpadke
- aparat StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA) za izvedbo PCR v realnem času
- termo blok
- fluorescentni mikroskop s filtrom 450 do 490 nm (Nikon ECLIPSE E600, Nikon, Tokio, Japonska)
- mikrovalovna pečica
- napajalnik za elektroforezo
- laboratorijska tehtnica
- gorilnik (Fireboy Plus, Integra Bioscience, Chur, Švica)
- ultravijolični presvetljevalnik (Gel Doc, Biocompare, ZDA)
- plastično stojalo za epruvete
- vlažna komora
- škatla za shranjevanje preparatov

3.2 METODE DELA

3.2.1 Neposredni imunofluorescenčni test Merifluor™ *Cryptosporidium/Giardia*

Razmaze vzorcev blata bolnikov z gastroenteritisom smo pregledali na prisotnost cist *G. intestinalis* s komercialno dostopnim kompletom reagentov za neposredno imunofluorescenco Merifluor™ *Cryptosporidium/Giardia*. Pri izvajanju testa smo se držali priloženih navodil proizvajalca.

Vzorci blata smo najprej resuspendirali v fiziološki raztopini. Kapljico resuspendiranega iztrebka smo s stekleno palčko prenesli na označeno polje stekelca, priloženega v testnem kompletu. Razmaze smo posušili na sobni temperaturi in jih nato fiksirali z dvakratnim potegom prek plamena gorilnika. Na posušene in fiksirane preparate smo nanесли eno kapljico detekcijskega reagenta in eno kapljico kontrastnega barvila. Kapljici smo previdno premešali s plastično zanko in inkubirali preparat v vlažni komori 30 min v temi na sobni temperaturi. Nevezana monoklonska protitelesa smo po inkubaciji sprali z raztopino za spiranje.

Preparate smo osušili na sobni temperaturi in na rahlo vlažne dodali eno kapljico t. i. namestitvenega sredstva, ki je mešanica glicerolnega pufra s formalinom, sredstva proti izsuševanju in 0,05 % natrijevega azida.

Kapljico smo pokrili s krovnim stekelcem in preparate pregledali pod 400x povečavo fluorescentnega mikroskopa s filtrom 450-490 nm.

V vsak test smo vključili tudi pozitivno in negativno kontrolo, ki sta priloženi v testnem kompletu, in ju obdelali na enak način kot vzorce.

Rezultat testa smo opredelili kot pozitiven v primeru, če smo v preparatu našli vsaj eno cisto parazita *G. intestinalis* z izrazito svetlo zeleno fluorescenco.

3.2.2 Molekularno biološke metode

3.2.2.1 Osamitev DNA iz vzorcev blata

DNA smo iz blata osamili v komori za sterilno delo. Pol ure pred pričetkom dela smo v komori prižgali luč UV in si tako zagotovili sterilne pogoje.

Za osamitev DNA iz vzorcev blata smo uporabili komercialni komplet reagentov QIAamp® DNA Stool Mini Kit. Pri osamitvi DNA smo se držali navodil proizvajalca.

V 2 ml sterilne epruvetke smo odmerili 200-300 µl vzorca blata. Če je bil iztrebek formiran, smo mu dodali fiziološko raztopino in ga dobro premešali s stekleno palčko.

Odpipetiranemu vzorcu blata v 2 ml epruveti smo dodali 1,4 ml pufru ASL. Pufer ASL izzove lizo celic, kar omogoči sprostitvev DNA iz njih. Mešanico smo 1 min mešali na mešalu, nato pa inkubirali 10 min pri 95 °C. Visoka temperatura je potrebna za uspešen razpad izredno odpornih cist parazita. Po končani inkubaciji smo vzorec 15 sek mešali na mešalu in ga nato centrifugirali 1 min pri 14.000 obratih/min.

V novo 2 ml plastično epruvetko smo odpipetirali 1,2 ml supernatanta, usedlino, nastalo med centrifugiranjem pa smo zavrgli. Supernatantu smo nato dodali po eno tabletko InhibitEx in mešali tako dolgo, dokler se ni tabletko popolnoma raztopila. Tabletko InhibitEx veže moteče in zaviralne sestavine iz blata. Blato namreč vsebuje številne sestavine, ki lahko negativno delujejo na DNA ali jo poškodujejo, zavirajo lahko encimsko reakcijo, ki sledi v nadaljevanju ali celo PCR.

Ko se je tabletko raztopila, smo vzorec inkubirali 1 min na sobni temperaturi. Vzorec smo dvakrat centrifugirali 3 min pri 14.000 obratih/min. Po vsakem centrifugiranju smo nastalo usedlino zavrgli.

Po drugem centrifugiranju smo 200 µl supernatanta prepipetirali v sterilno 1,5 ml epruvetko, ki je že vsebovala 15 µl encima proteinaze K. Mešanici smo dodali 200 µl pufru za lizo AL, dobro premešali in inkubirali 10 min na 70 °C. Encim proteinaza K pri temperaturi 70 °C razgradi beljakovine v vzorcu.

Po končani inkubaciji smo v vzorec dodali 200 µl hladnega 96-100 % etanola in premešali. Etanol izzove precipitacijo DNA.

Vzorec smo na hitro centrifugirali in celoten lizat prenesli v epruvetko z membrano, vstavljeno v zbiralno epruvetko. Na membrani omenjenih epruvet so vezani delci silicijevega dioksida. Nanje se veže precipitirana DNA. Po enominutnem centrifugiranju pri 14.000 obratih/min smo zbiralno epruvetko z izpirkom zavrgli in jo nadomestili z novo. V epruvetko z membrano smo dodali 500 µl pufru za spiranje AW1, ponovili centrifugiranje in ponovno prenesli epruveto z membrano v novo zbiralno epruvetko. Spiranje smo ponovili še s pufrom AW2 in pri tem vzorec centrifugirali pri 14.000 obratih/min 3 min. Po centrifugiranju smo zbiralno epruvetko zamenjali z novo in še enkrat centrifugirali, s čimer smo odstranili vse sledi pufru. Epruvetko z membrano smo prestavili v čisto 1,5 ml epruvetko. DNA smo z membrane eluirali z 200 µl elucijskega pufru AE in centrifugiranjem 1 minuto pri 14.000 obratih/min.

Izolirano DNA iz vzorcev blata smo do nadaljnje obdelave hranili pri -20 °C.

3.2.2.2 PCR v realnem času

3.2.2.2.1 Optimizacija PCR v realnem času za pomnoževanje DNA *G. intestinalis*

Reakcijo pomnoževanja DNA smo izvedli v aparatu StepOne™ Real-Time PCR System. Pogoje pomnoževanja DNA smo povzeli po članku Verweij in sod., 2003, in jih nato optimizirali za aparat StepOne™ Real-Time PCR System. Za PCR smo uporabili komercialno dostopno reakcijsko mešanico Platinum® Quantitative PCR SuperMix – UDG with ROX.

Omenjena reakcijska mešanica je 2x koncentrirana in vsebuje Platinum® Taq DNA polimerazo, Tris – HCl, KCl, 6 nM MgCl₂, 400 μM dGTP, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 800 μM dUTP, uracil DNA glikozilazo (UDG), 1 μM ROX fluorescenčno barvilo in stabilizatorje. Platinum® Taq DNA polimeraza je rekombinantna DNA polimeraza, povezana s protitelesom, ki blokira njeno polimerazno aktivnost pri sobni temperaturi. Encim postane aktiven šele pri temperaturi, pri kateri tekom PCR pride do denaturacije DNA. UDG uniči vse dvovijačne DNA, ki imajo v svoji strukturi namesto timina uracil. S tem se zmanjša možnost kontaminacij, saj UDG prepreči prenos PCR produktov med različnimi reakcijami. Fluorescenčno barvilo ROX normalizira fluorescenčni signal aparata in nam s tem omogoči vrednotenje in primerjavo rezultatov PCR.

V reakcijsko mešanico smo dodali začetna oligonukleotida, ki smo ju povzeli po članku Verweij in sod., 2003: giardia-80F, giardia-127R in sondo giardia-105T. Omenjeni par začetnih oligonukleotidov je oblikovan tako, da z njim pomnožimo 63 bp dolg del gena za 18S rRNA *G. intestinalis*. Sonda, dodana v reakcijsko mešanico, nam je omogočala spremljanje nastalih produktov PCR v realnem času. Označena je bila s fluorescenčnim fluoroforom FAM, na koncu pa je imela pripet nefluorescenčni dušilec BHQ1.

Pri optimizaciji PCR smo pripravljali reakcijske mešanice z različnimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov in sonde, prilagajali pa smo tudi temperaturo pripenjanja začetnih oligonukleotidov.

3.2.2.2.1.1 Vpliv koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA *G. intestinalis*

Za PCR smo najprej pripravili reakcijske mešanice, ki so se razlikovale v koncentracijah začetnih oligonukleotidov: 100, 200, 300, 600 in 900 nM. Po spodaj opisanem postopku smo v sterilne 0,2 μl epruvetke odpipetirali 20 μl različnih reakcijskih mešanic in jim dodali 5 μl neredčene ali 10, 100, 1000 ali 10000-krat redčene DNA pozitivnega vzorca ali

5 µl negativne kontrole – voda brez nukleazne aktivnosti. Vsako reakcijsko mešanico smo pripravili v dveh ponovitvah.

Reakcijske mešanice smo pripravili po naslednjem postopku:

- 12,5 µl reakcijskega pufra
- pozitivno (giardia-80F, 10 µM) in negativno (giardia-127R, 10 µM) usmerjen začetni oligonukleotid. Volumen začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici je bil odvisen od njihove končne koncentracije: 0,25 µl, 0,5 µl, 0,75 µl, 1,5 µl, 2,25 µl.
- 0,5 µl sonde (giardia-105T, 10 µM)
- voda brez nukleazne aktivnosti (dodali smo volumen do skupnih 20 µl)

Reakcijo smo izvedli pod naslednjimi temperaturnimi pogoji:

- 50 °C, 2 min: aktivacija UDG
- 95 °C, 2 min: aktivacija DNA polimeraze
- 45 ciklov zanke:
 - 95 °C, 15 sek: denaturacija DNA
 - 57,5 °C, 30 sek: pripenjanje začetnih oligonukleotidov
 - 72 °C, 30 sek: podaljševanje DNA

Po končani reakciji smo analizirali vpliv različnih koncentracij začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA *G. intestinalis*. Na podlagi rezultatov pomnoževanja neredčene ter 10, 100, 1000 in 10000-krat redčene DNA pozitivnega vzorca smo izrisali standardne krivulje. Učinkovitost reakcije smo izračunali iz podatka naklona linearne regresijske premice po enačbi (Rutledge in sod., 2003):

$$E = 10^{(-1/k)} - 1 \quad \dots(1)$$

3.2.2.2.1.2 Vpliv koncentracije sonde na uspešnost pomnoževanja DNA *G. intestinalis*

Za ugotavljanje uspešnosti pomnoževanja DNA *G. intestinalis* kot posledico koncentracije sonde, smo pripravili reakcijske mešanice z različnimi koncentracijami sonde: 100, 200, 300 in 400 mM. Po spodaj opisanem postopku smo v sterilne 0,2 µl epruvetke odpipetirali 20 µl reakcijske mešanice in jim dodali 5 µl neredčene ali 10, 100, 1000 ali 10000-krat redčene DNA pozitivnega vzorca ali 5 µl negativne kontrole. Vsako reakcijsko mešanico smo pripravili v dveh ponovitvah.

Reakcijske mešanice smo pripravili po naslednjem postopku:

- 12,5 µl reakcijskega pufra
- 0,75 µl pozitivno (giardia-80F, 10 µM) in negativno (giardia-127R, 10 µM) usmerjenega začetnega oligonukleotida
- sonda (giardia-105T, 10 µM). Volumen sonde v reakcijski mešanici je bil odvisen od njene končne koncentracije: 0,25 µl, 0,5 µl, 0,75 µl in 1 µl.
- voda brez nukleazne aktivnosti (dodan volumen do skupnih 20 µl)

Reakcijo smo izvedli pod enakimi temperaturnimi pogoji, kot smo jih uporabili pri ugotavljanju vpliva koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA *G. intestinalis*. Po končani reakciji smo, podobno kot pri ugotavljanju vpliva koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA *G. intestinalis*, analizirali vpliv različnih koncentracij sonde na uspešnost pomnoževanja DNA. Na podlagi dobljenih rezultatov smo izrisali standardne krivulje in izračunali učinkovitost reakcije.

3.2.2.2.1.3 Vpliv temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA *G. intestinalis*

Za ugotavljanje uspešnosti reakcije, kot posledico temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov, smo v reakciji PCR preizkusili 4 različne temperature pripenjanja: 55 °C, 57,5 °C, 60 °C in 62,5 °C. Za vsako različno temperaturo pripenjanja začetnih oligonukleotidov smo pripravili reakcijsko mešanico volumna 20 µl v dveh ponovitvah po naslednjem postopku:

- 12,5 µl reakcijskega pufra
- 0,75 µl pozitivno (giardia-80F, 10 µM) in negativno (giardia-127R, 10 µM) usmerjenega začetnega oligonukleotida
- 0,5 µl sonde (giardia-105T, 10 µM)
- 5,5 µl vode brez nukleazne aktivnosti

Tako pripravljeni mešanici smo v brezprašni komori v drugem prostoru dodali 5 µl neredčene ali 10, 100, 1000 ali 10000-krat redčene DNA pozitivnega vzorca ali 5 µl negativne kontrole ter izvedli reakcijo pod prej opisanimi temperaturnimi pogoji, pri čemer smo spreminjali temperaturo pripenjanja začetnih oligonukleotidov. Po končani reakciji smo, tako kot pri ugotavljanju vpliva koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde na uspešnost pomnoževanja DNA *G. intestinalis*, izrisali standardne krivulje in iz naklona regresijske premice izračunali učinkovitost pomnoževanja.

3.2.2.2.2 Ugotavljanje DNA *G. intestinalis* v kliničnih vzorcih

Po končani optimizaciji smo s PCR testirali zbrane vzorce, ki smo jim predhodno osamili DNA. V komori za sterilno delo smo v 0,2 ml sterilnih epruvetkah pripravili 20 µl reakcijske mešanice po naslednjem postopku:

- 12,5 µl reakcijskega pufra
- 0,75 µl pozitivno (*giardia*-80F, 10 µM) in negativno (*giardia*-127R, 10 µM) usmerjenega začetnega oligonukleotida
- 0,5 µl sonde (*giardia*-105T, 10 µM)
- 5,5 µL vode brez nukleazne aktivnosti

Najprej smo odpipetirali vodo, nato ostale reagente.

V vsako epruvetko z reakcijsko mešanico smo nato v brezprašni komori drugega prostora dodali 5 µl DNA iz vzorca ali 5 µl negativne (voda brez nukleazne aktivnosti) ali pozitivne (DNA predhodno pozitivnega vzorca blata) kontrole. Epruvetke smo vstavili v aparat StepOne™ Real-Time PCR System.

Reakcijo smo izvedli pod naslednjimi temperaturnimi pogoji:

- 50 °C, 2 min
- 95 °C, 2 min
- 45 ciklov zanke:
 - 95 °C, 15 sek
 - 57,5 °C, 30 sek
 - 72 °C, 30 sek

Po končani PCR smo s pomočjo programa StepOne™ Software v 2.0 odčitali in analizirali rezultate pomnoževanja.

3.2.2.2.3 Preverjanje uspešnosti pomnoževanja z interno kontrolo

Interna kontrola nam je služila za preverjanje uspešnosti pomnoževanja DNA. Z uspešnostjo pomnoževanja interne kontrole smo preverjali ali smo tekom postopka osamitve DNA iz vzorcev uspeli odstraniti inhibitorne substance. Reakcijske mešanice za pomnoževanje interne kontrole smo pripravili v 0,2 ml sterilnih epruvetkah po naslednjem postopku:

- 12,5 µl reakcijskega pufra
- 0,375 µl vsakega začetnega oligonukleotida za pomnoževanje interne kontrole (10 µM)

- 0,375 µl sonde (10 µM)
- 5,375 µl vode brez nukleazne aktivnosti

V vsako epruvetko z reakcijsko mešanico smo v komori za sterilno delo drugega prostora dodali 5 µl DNA vzorca in 1 µl DNA interne kontrole. Vključili smo še pozitivno kontrolo, pri kateri smo namesto DNA vzorca dodali 5 µl vode brez nukleazne aktivnosti. Reakcijo pomnoževanja interne kontrole smo izvedli pod enakimi temperaturnimi pogoji kot pri reakcijah, kjer smo ugotavljali DNA *G. intestinalis* v kliničnih vzorcih.

Če se nam interna kontrola tekom reakcije ni pomnožila oz. se je pomnožila več kot 3 cikle kasneje kot v pozitivni kontroli (5 µl vode in 1 µl DNA interne kontrole), smo predvidevali, da so v vzorcu osamljene DNA prisotni inhibitorji. V tem primeru smo vzorec 10-krat redčili in s tako redčenim vzorcem ponovili tako reakcijo pomnoževanja DNA *G. intestinalis* kot tudi reakcijo pomnoževanja DNA interne kontrole.

3.2.2.2.4 Analiza pridelkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo

Ustreznost pridelkov PCR smo ugotavljali z vodoravno elektroforezo v 2 % agaroznem gelu, ki smo ga pripravili po standardnem postopku. Dokazovali smo pridelke velikosti 63 bp.

V stekleno čašo smo odtehtali 1 g agaroze v prahu in ji dodali 50 ml 1x pufru TAE (0,04 M Tris-HCl, 0,02 M Na-acetat, 0,02 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,3). Raztopino smo premešali in jo v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča, da se je agarosa popolnoma raztopila. Nato smo raztopino delno ohladili (~60 °C) in ji dodali 4,5 µl etidijevega bromida. Dokončno smo raztopino ohladili v kalupu z elektroforeznim glavničkom. Strjen gel smo položili v elektroforezno kadičko in ga prelili z puffrom TAE. V vdolbinice gela smo nanašali mešanico, pripravljeno iz 10 µl pridelka PCR in 2 µl nanašalnega pufru. Velikost pridelkov PCR smo primerjali z velikostnim standardom lestvice 50 bp, ki vsebuje delce DNA velikosti 50, 100, ..., 750 in 2642 bp. Elektroforeza v gelu je potekala pri sobni temperaturi 45 do 60 min in napetosti 75 V. Po končani elektroforezi smo gel pregledali pod svetlobo UV.

Specifičnost namnoženega pridelka PCR je določala njegova velikost glede na velikost pozitivne kontrole in velikostnega standarda.

3.2.2.2.5 Kontrola kontaminacije

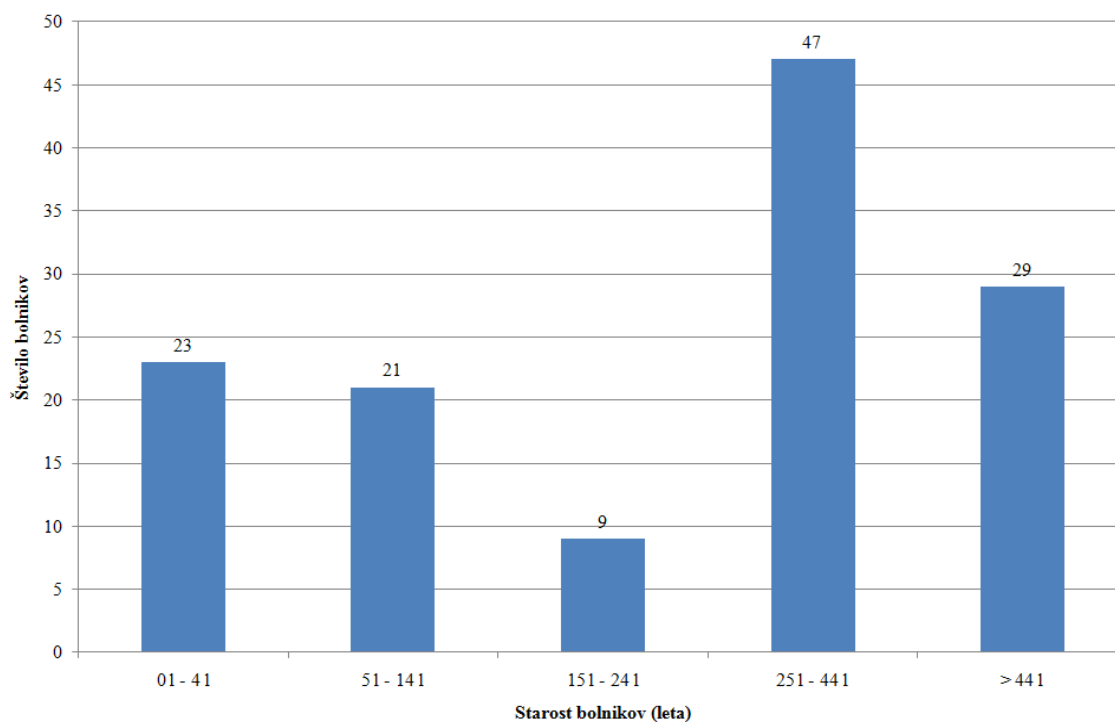
Z namenom, da bi preprečili morebitno kontaminacijo med pripravo reakcijske mešanice ali med dodajanjem DNA v reakcijsko mešanico, smo upoštevali stroge previdnostne ukrepe. Delali smo v skladu s pravili in zapisanimi postopki Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo. Posamezne faze dela smo izvajali v ločenih prostorih, z različnimi seti pipet in ostalega materiala. Uporabljali smo nastavke, ki so bili opremljeni z membranskimi filtri. Pred in po delu smo delovne površine pobrisali s sredstvom za odstranjevanje DNA.

4 REZULTATI

4.1 ZNAČILNOSTI TESTIRANIH VZORCEV

V raziskavo smo vključili 131 vzorcev blata bolnikov z gastroenteritisom. Od vseh 131 vzorcev jih je bilo 75 (57,25 %) od bolnikov moškega spola in 56 (42,75 %) od ženskega spola. Povprečna starost bolnikov je bila 26,2 leti. Najnižja starost je bila 1 leto, najvišja pa 89 let.

Kot je razvidno iz Slike 6, je bilo glede na starost v raziskavo vključenih 23 (17,8 %) bolnikov starih od 0 do 4 leta, 21 (16,3 %) jih je bilo starih od 5 do 14 let, 9 (7 %) od 15 do 24 let, 47 (36,4 %) od 25 do 44 let in 29 (22,5 %) več kot 44 let. Za dva bolnika podatka o starosti nismo imeli.



Slika 6: Razporeditev bolnikov z gastroenteritisom, vključenih v raziskavo, glede na starost

4.2 REZULTATI NEPOSREDNEGA IMUNOFLUORESCENČNEGA TESTA MERIFLUORTM *Cryptosporidium/Giardia*

Razmaze vseh 131 zbranih vzorcev blata bolnikov z gastroenteritisom smo na prisotnost cist *G. intestinalis* pregledali s komercialno dostopnim kompletom reagentov za neposredno imunofluorescenco MerifluorTM *Cryptosporidium/Giardia*. Z omenjenim testom smo ciste parazita *G. intestinalis* ugotovili v 15/131 (11,5 %) vzorcih blata. Pri vseh 15 bolnikih je bil parazit *G. intestinalis* edini parazitski povzročitelj gastroenteritisa.

4.3 OPTIMIZACIJA PCR V REALNEM ČASU

Za optimizacijo PCR v realnem času smo uporabili naslednje razredčine DNA močno pozitivnega vzorca: 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Te razredčine smo z istim protokolom reakcije testirali v dveh ponovitvah.

4.3.1 Vpliv koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA *G. intestinalis*

Učinkovitost reakcije pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov je prikazana v Preglednici 1 in na Sliki 7. Učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA je variirala med 89,76 % in 105,22 %.

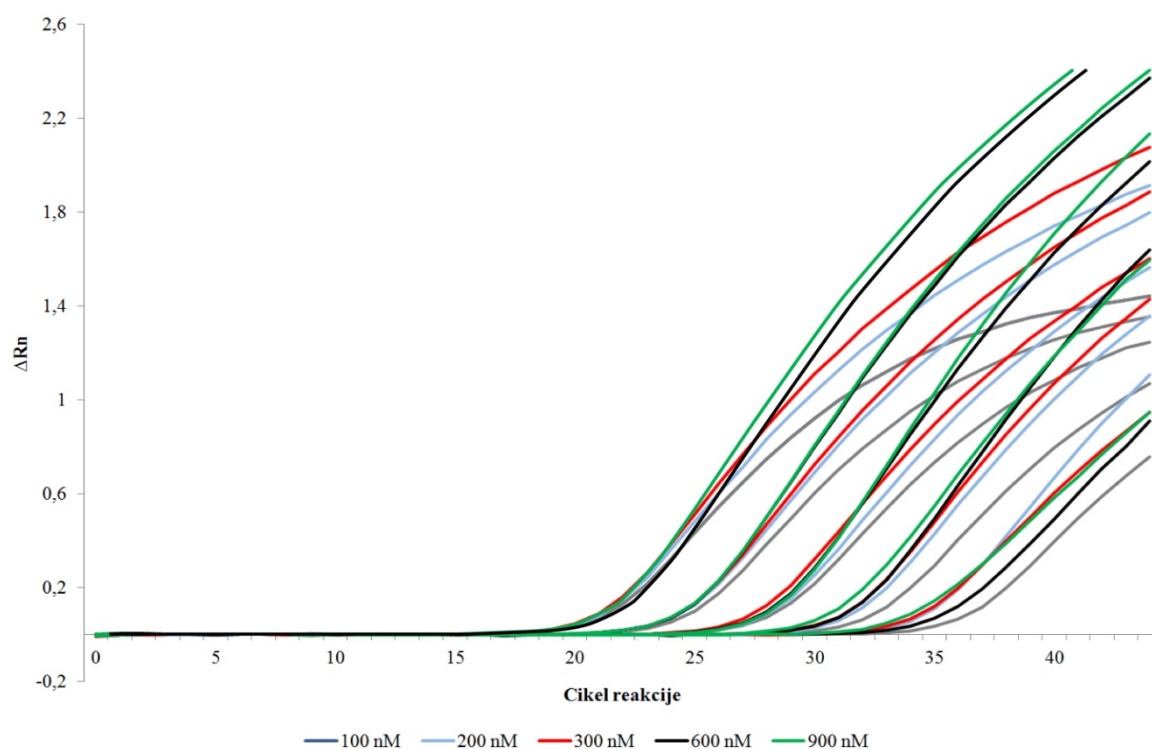
Preglednica 1: Učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA *G. intestinalis*, koeficient variacije in cikel praga detekcije pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov.

Koncentracija začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici (nM)	Učinkovitost reakcije (E, %)	Koeficient variacije (R^2)	Cikel praga detekcije (C_T) neredčenega pozitivnega vzorca
100	89,76	0,992	22,15
200	95,47	0,999	22,00
300	96,13	0,999	21,94
600	94,37	0,995	21,82
900	105,22	0,998	22,09

Po primerjanju dobljenih rezultatov smo se odločili, da bomo kot najprimernejšo koncentracijo začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici v nadaljevanju uporabljali

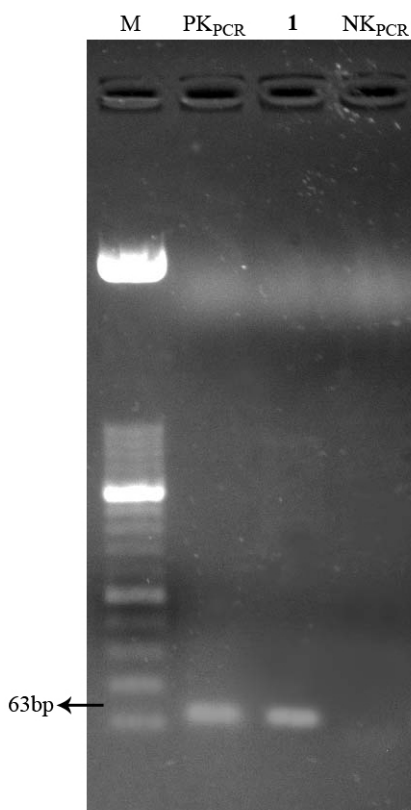
300 nM koncentracijo. Pri tej koncentraciji smo določili koeficient variacije (R^2) 0,999. Učinkovitost reakcije (96,13 %) pri tej koncentraciji začetnih oligonukleotidov ni bila najvišja, vendar je uporaba te koncentracije s finančne plati bolj opravičljiva kot uporaba 900 nM koncentracije začetnih oligonukleotidov.

Pri testiranju različnih redčitev DNA močno pozitivnega vzorca in njihovih ponovitev smo določili tudi najvišjo vrednost C_T . Ocenili smo, da je najvišja vrednost za doseganje stabilnosti signala pomnoževanja DNA pri 300 nM koncentraciji začetnih oligonukleotidov C_T 39.



Slika 7: Grafični prikaz pomnoževanja redčitev DNA *G. intestinalis* pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov (ΔR_n – jakost fluorescenčnega signala).

Specifičnost pridelkov PCR pri optimizaciji reakcije PCR v realnem času smo potrdili z agarozno gelsko elektroforezo (Slika 8).



Slika 8: Pridelki PCR v realnem času preverjeni z gelsko elektroforezo, M – velikostni standard lestvice 50 bp, NK_{PCR} – negativna kontrola, PK_{PCR} – pozitivna kontrola, 1 – pridelek PCR v realnem času (63 bp dolg odsek gena za 18S rRNA *G. intestinalis*)

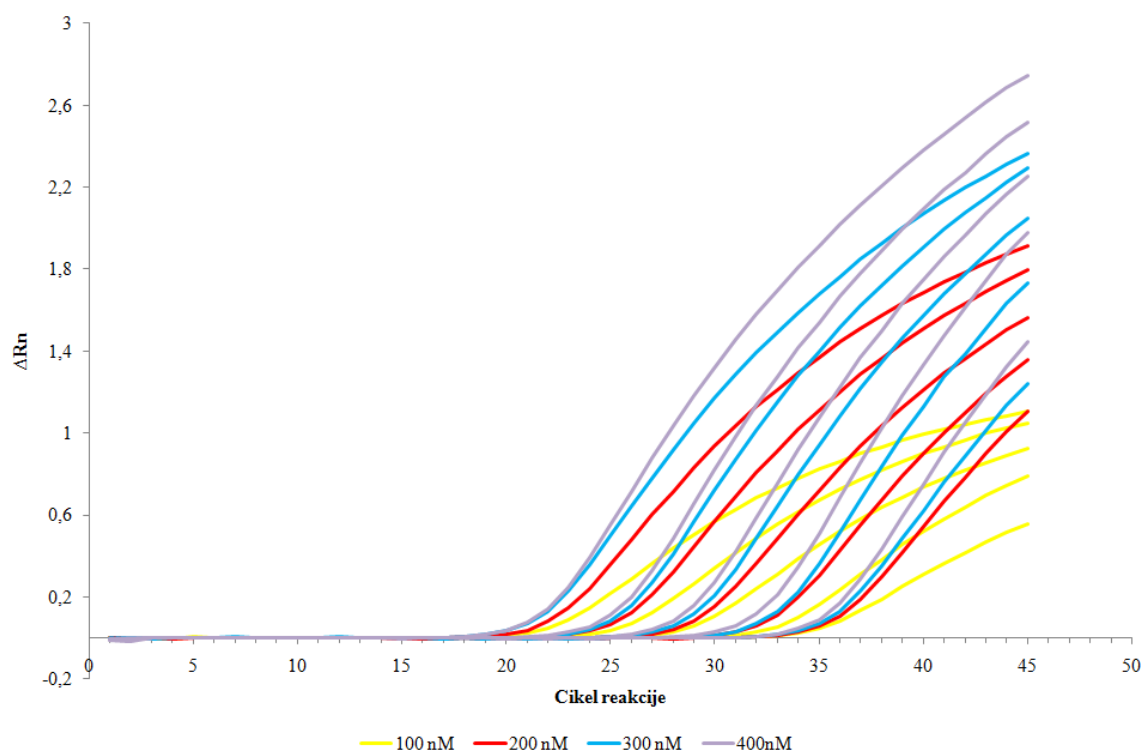
4.3.2 Vpliv koncentracije sonde na uspešnost pomnoževanja DNA *G. intestinalis*

Učinkovitost reakcije pri različnih koncentracijah sonde je prikazana v Preglednici 2 in na Sliki 9. Učinkovitost reakcije pomnoževanja je variirala med 92,22 % in 99,53 %. Najboljša učinkovitost reakcije (99,53 %) je bila pri koncentraciji sonde 100 nM, vendar pa je bil pri tej koncentraciji koeficient variacije (0,996) nižji kot pri 200 nM koncentraciji sonde (0,999). Prav tako so bili C_T razredčin DNA pozitivnega vzorca nižji, intenziteta fluorescence pa višja pri 200 nM koncentraciji kot pri 100 nM koncentraciji sonde (Slika 9). Odločili smo se, da bomo kot najprimernejšo koncentracijo sonde v nadaljevanju uporabljali 200 nM koncentracijo.

Preglednica 2: Učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA *G. intestinalis*, koeficient variacije in cikel praga detekcije pri različnih koncentracijah sonde.

Koncentracija sonde v reakcijski mešanici (nM)	Učinkovitost reakcije (E, %)	Koeficient variacije (R^2)	Cikel praga detekcije (C_T) neredčenega pozitivnega vzorca
100	99,53	0,996	22,91
200	95,43	0,999	22,30
300	92,22	0,999	21,34
400	94,68	1,000	21,14

Pri ugotavljanju vpliva koncentracije sonde na pomnoževanje DNA *G. intestinalis* smo pri 200 nM koncentraciji ocenili C_T 39 kot najvišjo vrednost C_T , pri kateri je signal še stabilen.



Slika 9: Grafični prikaz pomnoževanja redčitev DNA *G. intestinalis* pri različnih koncentracijah sonde (ΔR_n – jakost fluorescenčnega signala).

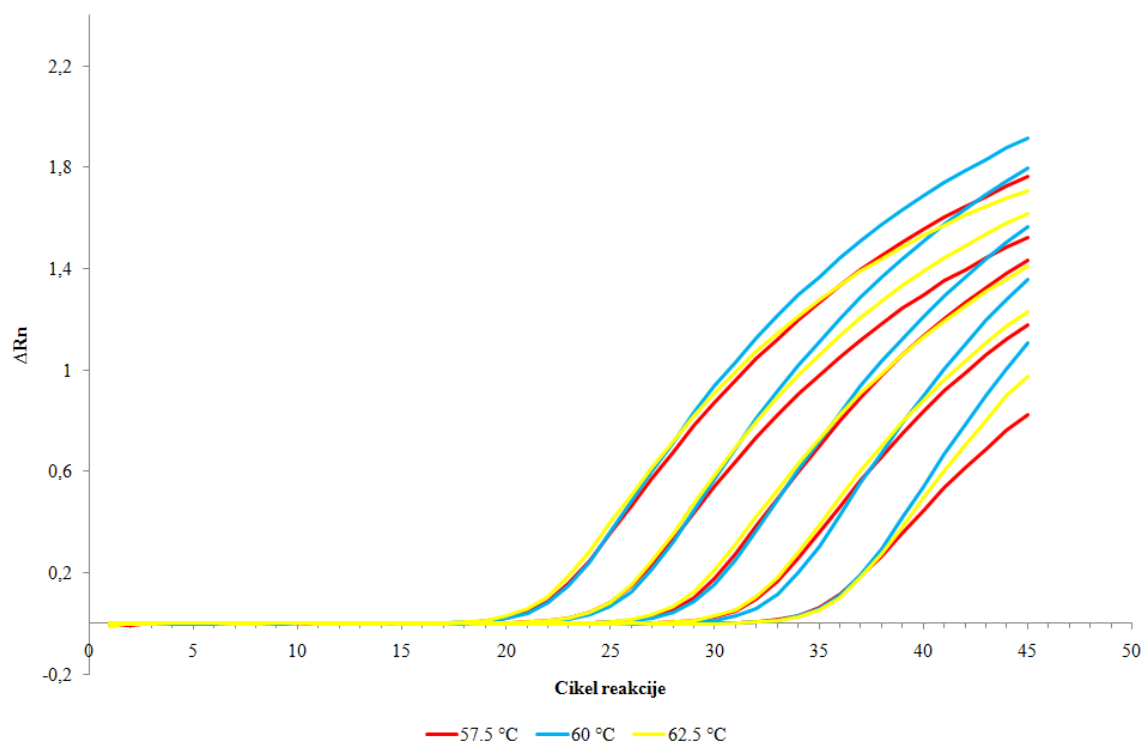
4.3.3 Vpliv temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA *G. intestinalis*

Učinkovitost reakcije pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov je prikazana v Preglednici 3 in na Sliki 10.

Učinkovitost reakcije pomnoževanja je pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov variirala med 87,00 % in 97,44 %.

Preglednica 3: Učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA *G. intestinalis*, koeficient variacije in cikel praga detekcije pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov.

Temperatura pripenjanja začetnih oligonukleotidov (°C)	Učinkovitost reakcije (E, %)	Koeficient variacije (R^2)	Cikel praga detekcije (C_T) neredčenega pozitivnega vzorca
55	87,00	0,989	25,70
57,5	97,44	0,999	22,37
60	95,53	0,998	22,25
62,5	93,74	0,998	22,57



Slika 10: Grafični prikaz pomnoževanja redčitev DNA *G. intestinalis* pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov (ΔR_n – intenziteta fluorescenčnega signala).

Kot optimalno temperaturo pripenjanja začetnih oligonukleotidov v PCR v realnem času za pomnoževanje DNA *G. intestinalis* smo določili temperaturo 57,5 °C. Pri tej temperaturi je bila učinkovitost reakcije najboljša (97,44 %), hkrati je bil tu najvišji tudi koeficient variacije (0,999).

Po tem, ko smo določili najbolj optimalne pogoje reakcije pomnoževanja DNA *G. intestinalis* smo s PCR v realnem času preverili uspešnost pomnoževanja DNA v 18 vzorcih, za katere smo vedeli, da vsebujejo DNA *G. intestinalis*. V vseh vzorcih se je DNA s PCR v realnem času uspešno pomnožila.

4.4 UGOTAVLJANJE DNA *G. intestinalis* V KLINIČNIH VZORCIH

Z optimizirano PCR v realnem času smo testirali vseh 131 zbranih vzorcev blata, iz katerih smo pred reakcijo pomnoževanja osamili njihovo DNA. Rezultati testiranja in lastnosti vseh zbranih vzorcev so podani v Prilogi A.

Vseh 131 vzorcev osamljene DNA smo testirali tudi na prisotnost inhibitorjev, ki bi lahko zavirali pomnoževanje DNA v poteku PCR v realnem času. Testiranje smo izvedli s pomočjo interne kontrole, ki smo jo vključili v reakcijo pomnoževanja. V 130 (99,24 %) vzorcih inhibicije pomnoževanja DNA nismo zasledili, saj se nam je interna kontrola pomnožila v skladu s postavljenimi kriteriji. Pri enem vzorcu (0,76 %) pomnožitev interne kontrole ni bila uspešna. Ta vzorec smo zato 10-krat redčili in nato ponovili reakcijo pomnoževanja DNA *G. intestinalis* kot tudi reakcijo pomnoževanja interne kontrole. Po redčenju vzorca se je interna kontrola ustrezno pomnožila. Še več, v vzorcu smo potrdili okužbo z *G. intestinalis*. Ta vzorec bi v primeru, če uspešnosti pomnoževanja ne bi preverjali z interno kontrolo in ga torej ne bi redčili, ostal »lažno negativen«.

Izmed 131 vzorcev blata je bilo 17 (12,98 %) takšnih, ki so dali pozitiven rezultat pri testiranju s PCR v realnem času. Ostalih 114 (87,02 %) vzorcev blata je bilo negativnih. Enajst od 17 (64,70 %) pozitivnih vzorcev blata je bilo od bolnikov moškega spola, 6/17 (35,30 %) pa od bolnic. Odstotek okuženih moških je znašal 14,67 %, odstotek okuženih žensk pa 10,76 %.

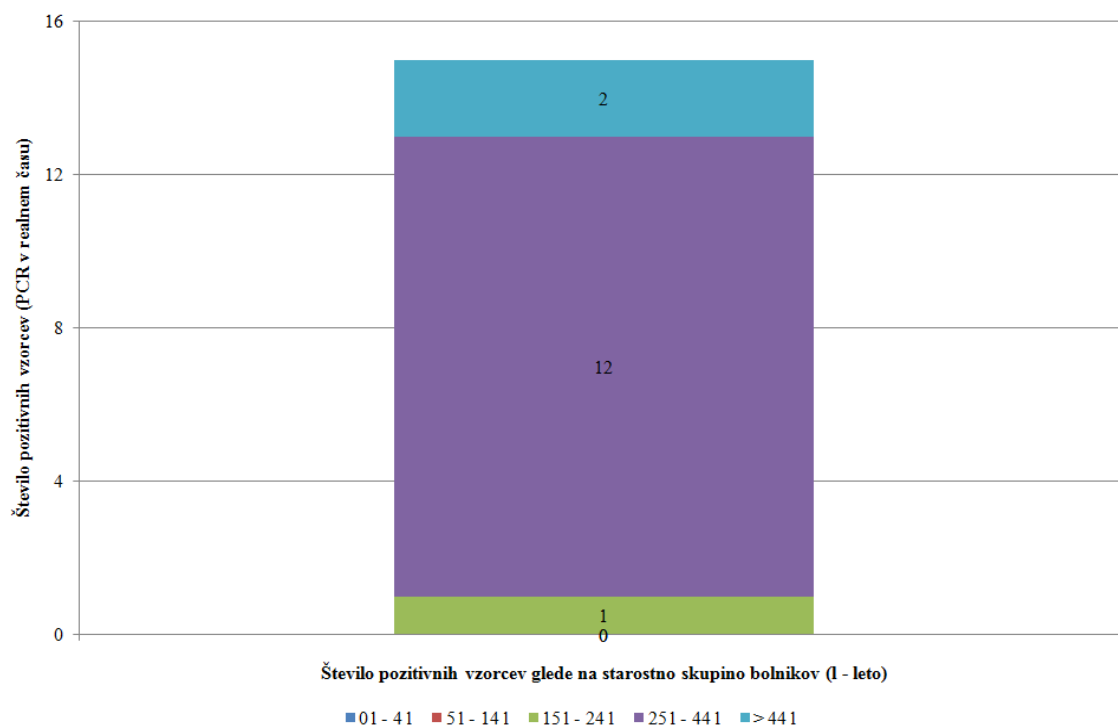
Pražival *G. intestinalis* smo kot edino parazitsko povzročiteljico gastroenteritisa prepoznali v 16/17 (94,12 %) primerih. V 1/17 (5,88 %) primeru je šlo za sočasno okužbo s parazitom *Cryptosporidium* spp.

Preglednica 4: Pozitivni vzorci testiranja z optimizirano PCR v realnem času in njihove lastnosti.

Zaporedna številka	Spol	Starost (leta)	Paraziti v blatu	Rezultat DIF	PCR v realnem času	
					Rezultat	C _T
1	Ž	34	<i>G. intestinalis</i>	P	P	34,0
2	M	38	<i>G. intestinalis</i>	P	P	30,5
3	M	50	<i>G. intestinalis</i>	P	P	31,2
4	Ž	29	<i>G. intestinalis</i>	P	P (po redčenju)	39,0
5	Ž	31	<i>G. intestinalis</i>	P	P	30,0
6	M	64	<i>G. intestinalis</i>	P	P	28,9
7	M	27	<i>G. intestinalis</i>	P	P	38,0
8	M	ni podatka	<i>G. intestinalis</i>	N	P	39,0
9	Ž	ni podatka	<i>G. intestinalis</i>	P	P	33,4
10	M	37	<i>G. intestinalis</i>	P	P	29,1
11	M	30	<i>G. intestinalis</i>	P	P	22,6
12	M	26	<i>G. intestinalis</i> , <i>Cryptosporidium spp.</i>	N	P	38,0
13	Ž	29	<i>G. intestinalis</i>	P	P	39,0
14	M	29	<i>G. intestinalis</i>	P	P	35,8
15	M	18	<i>G. intestinalis</i>	P	P	27,8
16	Ž	26	<i>G. intestinalis</i>	P	P	27,0
17	M	35	<i>G. intestinalis</i>	P	P	38,0

Iz Preglednice 4 je razvidno, da so bili vsi DIF pozitivni vzorci (15 vzorcev) pozitivni tudi s PCR v realnem času. Poleg teh vzorcev smo s PCR v realnem času ugotovili 2 pozitivna vzorca, ki sta z DIF dala negativen rezultat.

Povprečna starost bolnikov, pri katerih smo okužbo z *G. intestinalis* ugotovili s PCR v realnem času, je bila 33,5 let. Iz grafičnega prikaza na Sliki 11 je razvidno, da je bilo največ bolnikov, pri katerih smo ugotovili okužbo z *G. intestinalis*, starih med 25 in 44 let (80 %). Odstotek z *G. intestinalis* okuženih bolnikov z gastroenteritisom, starih od 0-4 leta je znašal 0 %, starih od 5-14 let 0 %, starih od 15-24 let 11,1 %, starih od 25-44 let 25,5 % in tistih, ki so bili stari več kot 44 let 0,07 %.

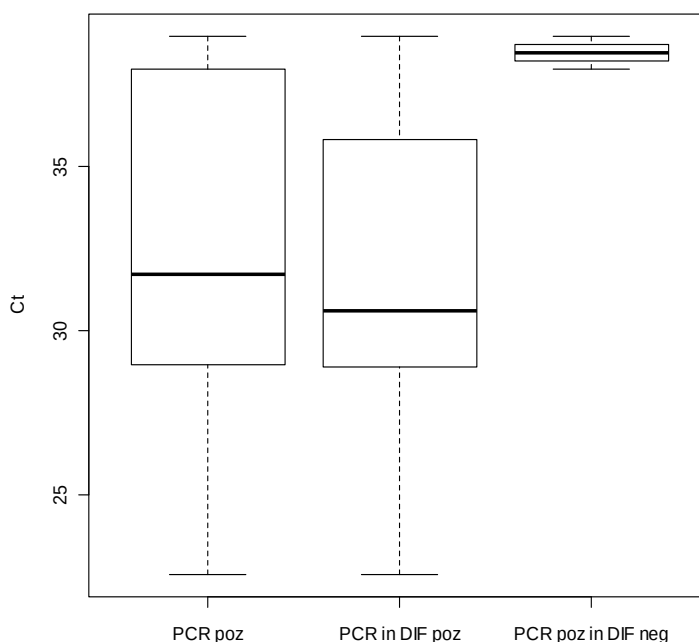


Slika 11: Število pozitivnih vzorcev na okužbo z *G. intestinalis* pri različnih starostnih skupinah bolnikov, glede na rezultate PCR v realnem času.

4.5 PRIMERJAVA PCR V REALNEM ČASU DIF

Po primerjanju rezultatov DIF in PCR v realnem času smo ugotovili, da so se rezultati obeh omenjenih metod za dokazovanje *G. intestinalis* v vzorcih blata bolnikov ujemali v 15 (88,2 %) primerih, v 2 (11,8 %) primerih pa ne. Metoda PCR v realnem času nam je v teh dveh primerih dala pozitiven rezultat, medtem ko cist *G. intestinalis* z DIF v omenjenih primerih nismo našli.

Vrednost C_T smo določili pri vsakem vzorcu pri katerem se je DNA *G. intestinalis* s PCR v realnem času uspešno pomnožila. Slika 12 prikazuje okvirje z ročaji za vrednosti C_T . Povprečni C_T , pri katerem se je začela pomnoževati DNA *G. intestinalis*, je znašal 33. Najnižji zabeleženi C_T je bil 22,6, najvišji pa 39. C_T vzorcev, ki so bili DIF negativni (2 primera), je bil visok, in sicer 38 in 39.



Slika 12: Okvir z ročaji za vrednosti C_T pri vzorcih, pozitivnih s PCR v realnem času (levo), pri vzorcih, pozitivnih s PCR v realnem času in pozitivnih z DIF (sredina), ter vzorcih, pozitivnih s PCR v realnem času in negativnih z DIF (desno). Slika prikazuje mediano, kvartile ter največjo in najmanjšo vrednost C_T .

Mediana C_T , vzorcev, pozitivnih s PCR v realnem času, je bila po pričakovanjih višja pri skupini tistih vzorcev, ki je vključevala tudi dva DIF negativna vzorca (Slika 12, skrajno levo, mediana=32,3), kot pri skupini tistih vzorcev, ki je vključevala le DIF pozitivne vzorce (Slika 12, sredina, mediana=30,8). V skladu s pričakovanji je bila mediana C_T dveh vzorcev, ki sta bila z DIF negativna, najvišja (Slika 12, skrajno desno, mediana=38,5).

Preglednica 5: Rezultati vzorcev bolnikov z gastroenteritisom testiranih s testom DIF in PCR v realnem času.

TEST		DIF		SKUPAJ
		poz	neg	
PCR v realnem času	poz	15	2	17
	neg	0	114	114
SKUPAJ		15	116	131

Na podlagi rezultatov PCR v realnem času smo izračunali občutljivost in specifičnost DIF. Občutljivost je zmožnost metode oz. testa, da pravilno identificira osebe z okužbo oz. njihove vzorce kot pozitivne. Specifičnost je zmožnost metode oz. testa, da pravilno identificira neokužene osebe oz. njihove vzorce kot negativne. Računali smo po formuli (Gordis, 2004):

$$\text{Občutljivost (\%)} = \frac{\text{resnično pozitivni}}{\text{resnično pozitivni} + \text{lažno negativni}} \times 100 \% \quad \dots(2)$$

$$\text{Specifičnost (\%)} = \frac{\text{resnično negativni}}{\text{resnično negativni} + \text{lažno pozitivni}} \times 100 \% \quad \dots(3)$$

Od 17 vzorcev, pri katerih smo s PCR v realnem času ugotovili DNA *G. intestinalis*, jih je bilo z DIF pravilno ugotovljenih 15. Dveh vzorcev z DIF nismo ugotovili kot pozitivnih. Občutljivost DIF je tako 88,2 %.

Od 114 vzorcev, pri katerih s PCR v realnem času nismo ugotovili DNA *G. intestinalis*, jih je bilo z DIF pravilno ugotovljenih kot negativnih vseh 114. Specifičnost DIF je tako 100 %.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Giardioza je parazitska črevesna bolezen, ki jo povzroča pražival *G. intestinalis*. Okužba je mogoča kjerkoli po svetu. Pogosta je predvsem v tropskih in subtropskih krajih s slabšimi sanitarnimi razmerami. Za okužbo z *G. intestinalis* so zato dovzetnejši popotniki in turisti. Okužijo se lahko ljudje vseh starosti, vendar je pogostejša pri majhnih otrocih. Ti tudi prej razvijejo bolezenske znake, medtem ko je večina odraslih samo nosilcev parazita. Pogoste so hidrične epidemije giardioze o katerih poročajo zlasti iz vrtcev, šol, kampov in smučarskih središč (Wolfe, 1992). Giardioza je ozdravljiva bolezen, le v redkih primerih je smrtna, vendar pa zanjo ne obstaja nobena oblika kemoprofilakse, prav tako pa ni učinkovitega cepiva. Ravno iz tega razloga je pomembna hitra in učinkovita diagnostika.

Diagnostika giardioze temelji na mikroskopskem pregledu vzorcev blata okuženega bolnika. Večinoma uporabljajo metodo direktne imunofluorescence. Z vse hitrejšim razvojem molekularnih tehnik narašča povpraševanje po občutljivejših in hitrejših testih. Najobčutljivejša metoda molekularne mikrobiologije za ugotavljanje okužb z *G. intestinalis* je trenutno PCR in njene različice (PCR v realnem času, itn.).

Vpeljevanje visoko občutljivih in specifičnih molekularnih metod v vsakodnevno laboratorijsko diagnostiko giardioze lahko pomembno prispeva k omejitvi širjenja okužb in k njihovem obvladovanju. S pomočjo molekularnih metod lahko namreč učinkovito odkrivamo nosilce parazita in preprečujemo okužbe imunsko oslabljenih bolnikov. Namen diplomske naloge je bil optimizirati in preizkusiti PCR v realnem času pri ugotavljanju okužb z *G. intestinalis*. Metodo smo povzeli po predhodno opisani metodi avtorjev Verweij in sodelavcev (Verweij in sod., 2004).

Določili smo optimalne pogoje reakcije za aparat StepOne™ Real-Time PCR System in za reagente, ki smo jih uporabili. Za razliko od Verweij in sodelavcev, ki so za PCR v realnem času uporabljali reagente proizvajalca Qiagen, smo mi uporabili reagente proizvajalca Invitrogen. Zaradi spremenjenih pogojev objavljene metode smo morali ponovno preveriti značilnosti reakcije oz. izvesti optimizacijo metode PCR v realnem času. Pri optimizaciji smo spreminjali koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde, prilagajali pa smo tudi temperaturo pripenjanja začetnih oligonukleotidov. Kot najbolj primerno končno koncentracijo začetnih oligonukleotidov smo med koncentracijami 100, 200, 300, 600 in 900 nM določili koncentracijo 300 nM (Slika 7). Med končnimi koncentracijami sonde 100, 200, 300 in 400 nM smo kot najbolj primerno določili koncentracijo 200 nM (Slika 9). Za optimalno temperaturo smo določili temperaturo 57,5 °C (Slika 10).

Pri določanju optimalnih pogojev PCR v realnem času smo spremljali učinkovitost reakcije (E, (%)). S pomočjo računalniškega programa StepOne™ Software v 2.0 smo na podlagi

rezultatov pomnoževanja DNA izrisali standardne krivulje. Učinkovitost smo nato izračunali iz podatka naklona linearne regresijske premice. Najboljšo učinkovitost reakcije pri ugotavljanju vpliva koncentracije začetnih oligonukleotidov na pomnoževanje DNA *G. intestinalis* smo zaznali pri koncentraciji 900 nM, in sicer 105,22 %. Da bi čim bolj zmanjšali stroške izvedbe PCR v realnem času, te koncentracije nismo izbrali za najprimernejšo. Kot najbolj primerno koncentracijo začetnih oligonukleotidov smo določili koncentracijo 300 nM, pri kateri je bila učinkovitost reakcije 96,13%. Pri tej koncentraciji smo določili rahlo višji koeficient variacije kot pri koncentraciji začetnih oligonukleotidov 900 nM, prav tako pa so se vse razredčine pozitivnega vzorca, na podlagi katerih smo izrisali standardno krivuljo, začele pomnoževati nekoliko prej kot v reakciji s koncentracijo začetnih oligonukleotidov 900 nM.

Pri ugotavljanju vpliva koncentracije sonde na pomnoževanje DNA *G. intestinalis* je bila najboljša učinkovitost reakcije 99,5 %, in sicer pri koncentraciji 100 nM. Vendar pa je imela reakcija pod temi pogoji nižji koeficient variacije, ki je kazalec kvalitete za ocene in mora biti večji od 0,98. Prav tako so se pri koncentraciji sonde 100 nM vse razredčine pozitivnega vzorca, na podlagi katerih smo izrisali standardno krivuljo, začele pomnoževati nekoliko kasneje kot v reakciji s koncentracijo sonde 200 nM. Zato smo kot najbolj primerno koncentracijo sonde določili 200 nM.

Pri ugotavljanju vpliva temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA *G. intestinalis* smo najboljšo učinkovitost reakcije zaznali pri temperaturi 57,5 °C (97,44 %). Iz tega razloga smo to temperaturo določili kot optimalno temperaturo pripenjanja začetnih oligonukleotidov.

Specifičnost pridelkov PCR v realnem času smo pri optimizaciji preverjali z agarozno gelsko elektroforezo. Specifičnost produkta je določevala njegova velikost 63 bp.

Občutljivost optimizirane PCR v realnem času smo najprej testirali tako, da smo preverili uspešnost pomnoževanja DNA tistih vzorcev, za katere smo v naprej vedeli, da vsebujejo DNA *G. intestinalis*. V vseh primerih se nam je DNA uspešno pomnožila.

Z optimizirano PCR v realnem času smo nato na prisotnost DNA *G. intestinalis* testirali vzorce blata bolnikov z gastroenteritisom. Rezultate reakcije smo primerjali z rezultati DIF.

V času od 5. junija 2010 do vključno 25. novembra 2010 smo zbrali 131 vzorcev blata. V raziskavo smo s tem vključili 75 (57,25 %) vzorcev blata bolnikov moškega spola in 56 (42,75 %) vzorcev blata žensk. Povprečna starost vseh bolnikov, vključenih v raziskavo, je bila 26,2 leti.

Zbrane vzorce blata bolnikov smo najprej testirali s komercialno dostopnim kompletom reagentov za neposredno imunofluorescenco MerifluorTM *Cryptosporidium/Giardia*. V preparatih, pripravljenih iz blata bolnikov, smo pod fluorescenčnim mikroskopom

ugotavljali prisotnost cist parazita *G. intestinalis*. Ciste parazita smo z omenjenim neposrednim imunofluorescenčnim testom ugotovili v 15/131 (11,45 %) vzorcih blata. V drugih raziskavah, v katerih so avtorji primerjali PCR v realnem času s klasičnimi testi za ugotavljanje okužb z *G. intestinalis*, so kot primerjalne teste uporabljali svetlobno mikroskopijo nativnih preparatov z dodatkom joda ali pa so razmaze vzorcev blata obarvali s klorazol črnim (Hove in sod., 2007; Verweij in sod., 2004).

Iz vseh 131 vzorcev blata smo nato osamili DNA. Za osamitev smo uporabili komercialni komplet reagentov QIAamp® DNA Stool Mini Kit. Metodo osamitve bi lahko označili kot primerno, vendar precej zamudno. Smiselno bi bilo nadaljnje raziskave usmeriti v preizkušanje hitrejšega, morda celo avtomatiziranega načina osamitve DNA iz vzorcev blata.

S PCR v realnem času smo ugotovili 17/131 (12,97 %) pozitivnih vzorcev, torej vzorcev pri katerih se je DNA *G. intestinalis* uspešno pomnoževala. Ostalih 114/131 (87,03 %) vzorcev je bilo negativnih. Med vzorci so bili nekateri pozitivni na druge parazite. Tako smo hkrati preverili tudi specifičnost PCR v realnem času.

Med vzorci, pri katerih smo *G. intestinalis* ugotovili s PCR v realnem času, jih je bilo 11/17 (64,7 %) od bolnikov moškega spola, 6/17 (35,3 %) pa od ženskega spola. Vzrok za višji odstotek okuženih moških bi lahko pripisali slabši higieni predstavnikov moškega spola. Splošno znano je namreč, da si moški redkeje umivajo roke, slabše očistijo hrano, ki jo zaužijejo, ter da so glede na način življenja večinoma bolj izpostavljeni slabšim higienskimi razmeram kot ženske. Povprečna starost bolnikov s pozitivnim vzorcem PCR v realnem času je bila 33,5 let. Iz starostne porazdelitve (Slika 11) je razvidno, da visok odstotek teh bolnikov (80 %) pripada starostni skupini med 25 in 44 let. Ugotovili smo torej, da giardioza ni bila pogostejša pri otrocih, kot ugotavljajo v večini drugih raziskav (Wolfe, 1992; Verweij in sod., 2004). Okužbe z *G. intestinalis* nismo ugotovili pri nobenem otroku mlajšem od 15 let. Res pa je, da v raziskavo nismo vključili zadostnega števila vzorcev, da bi lahko prišli do signifikantnih zaključkov.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo lahko med seboj primerjali PCR v realnem času in neposredni imunofluorescenčni test. Ugotovili smo, da so se rezultati obeh omenjenih metod ujemali v 15/17 (88,2 %) primerih, v 2/17 (11,8%) primerih pa ne.

Pozitivne rezultate PCR v realnem času smo v naši raziskavi vrednotili v obliki izrisane krivulje in cikla praga detekcije (C_T), ki ju izpisuje računalniški program. Vrednost C_T smo določili pri vsakem vzorcu, pri katerem se je DNA *G. intestinalis* z optimizirano PCR v realnem času uspešno pomnožila. Nizka vrednost C_T kaže na visoko začetno količino tarčne DNA v vzorcu in obratno.

Povprečni C_T vseh pozitivnih vzorcev je v naši raziskavi znašal 33. To pomeni, da se je približno v 33 ciklu reakcije pomnožilo dovolj DNA *G. intestinalis*, da je fluorescenčni signal sonde presegel ozadje reakcije. V podobnih raziskavah so zaznali nižji povprečni C_T

– 28,6 (Hove in sod., 2007) in 29,9 (Verweij in sod., 2004). Razlike bi lahko pripisali različni količini izhodne DNA v vzorcih blata naših in tujih bolnikov z giardiozo. To bi lahko pomenilo, da naši bolniki s kliničnimi znaki giardioze izločajo v svojem blatu manj cist *G. intestinalis*.

Mediana vrednosti C_T nam pove, da ima polovica vzorcev C_T nad to vrednostjo, polovica pa pod njo. Med seboj smo primerjali mediano vseh s PCR v realnem času pozitivnih vzorcev in mediano s PCR v realnem času pozitivnih vzorcev, brez dveh DIF negativnih vzorcev. V skladu s pričakovanji je bila mediana višja (32,3) pri skupini tistih s PCR v realnem času pozitivnih vzorcev, ki je vključevala tudi dva DIF negativna vzorca, kot pri skupini tistih s PCR v realnem času pozitivnih vzorcev, ki je vključevala samo DIF pozitivne vzorce (30,8) (Slika 12). Cikel praga detekcije je bil pri dveh DIF negativnih vzorcih visok. Pomnoževanje DNA *G. intestinalis* smo pri teh dveh vzorcih zaznali šele v 38 oz. 39 ciklu. Kot je razvidno iz Slike 12 je bil najvišji C_T (39) pri skupini s PCR v realnem času pozitivnih vzorcev, ki je vključevala tudi dva DIF negativna vzorca, enak najvišjemu C_T pri skupini s PCR v realnem času pozitivnih vzorcev, iz katere smo dva DIF negativna vzorca izključili. To pomeni, da smo visoke C_T zaznali tudi pri nekaterih vzorcih, ki so bili DIF pozitivni. Je pa res, da smo v DIF pozitivnih vzorcih z visokim C_T ugotovili prisotnost le 1-2 cist *G. intestinalis* v volumnu vzorca, ki smo ga pripravili za DIF.

Pri računanju občutljivosti in specifičnosti DIF smo privzeli 100 % občutljivost in specifičnost PCR v realnem času. Občutljivost DIF smo računali tako, da smo kot resnično pozitivne predvideli vzorce (17 vzorcev), pri katerih smo s PCR v realnem času ugotovili prisotnost *G. intestinalis*. Specifičnost pa smo računali ravno obratno. Kot resnično negativne smo predvideli vzorce, kjer s PCR v realnem času *G. intestinalis* nismo ugotovili. Teh vzorcev je bilo 114.

Izračunali smo, da je občutljivost DIF 88,23 %. To pomeni, da bomo z neposrednim imunofluorescenčnim testom pri hipotetično 100 osebah, ki so zbolele za giardiozo, pravilno ugotovili okužbo pri 88 osebah. Pri 12 osebah bodo naši rezultati lažno negativni. Tudi drugi viri poročajo, da daje DIF lažno negativne rezultate, in sicer predvsem takrat, ko je koncentracija cist *G. intestinalis* v vzorcih nizka (Adam, 2001). S PCR v realnem času smo od 17 pozitivnih vzorcev ugotovili 2 lažno negativna rezultata DIF. Kot smo že omenili, smo vzorcema z lažno negativnima rezultatom DIF določili njuno vrednost C_T . Vrednost C_T teh dveh vzorcev je bila visoka, in sicer 38 in 39. Visoka vrednost C_T nakazuje na to, da je v vzorcu relativno malo DNA *G. intestinalis*, iz česar lahko sklepamo, da je nizka tudi koncentracija cist v vzorcu. Cist je bilo v teh vzorcih blata najverjetneje tako malo, da jih zaradi manjše občutljivosti DIF pod fluorescenčnim mikroskopom nismo zaznali.

Zaradi visokih vrednosti C_T teh dveh vzorcev se poraja vprašanje ali je *G. intestinalis* v teh primerih sploh povzročiteljica gastroenteritisa. V enem izmed teh primerov so v

Laboratoriju za parazitologijo ugotovili okužbo s *Cryptosporidium* spp., ki bi prav tako lahko bil povzročitelj gastroenteritisa. V drugem primeru v Laboratoriju za parazitologijo niso ugotovili okužbe z drugimi paraziti. Povzročiteljica gastroenteritisa bi lahko bila tudi bakterijska ali virusna okužba.

Specifičnost DIF je bila 100 %. To pomeni, da bomo hipotetično pri 100 neokuženih osebah pravilno določili negativen rezultat pri vseh. Kot navaja Adam v svojem članku, je bila v njegovi raziskavi specifičnost mikroskopiranja v povprečju okrog 70 %. Glavni razlog za tako nizek odstotek navaja človeško zmotljivost. Ta odstotek se je bistveno povečal pri pregledu 3 zaporedno odvzetih vzorcev blata istega bolnika (Adam, 1991).

Po navedbah proizvajalca neposrednega imunofluorescenčnega testa MerifluorTM *Cryptosporidium/Giardia* je občutljivost testa 95-100 %, specifičnost pa 100 %. V naši raziskavi smo torej ugotovili nekoliko nižjo občutljivost testa DIF (88,23 %), specifičnost pa je bila po pričakovanjih 100 %.

Občutljivost in specifičnost PCR v realnem času je bila 100 %. Zaradi visoke občutljivosti PCR v realnem času je vprašljivo, če so vsi (šibko) pozitivni vzorci, ki jih PCR v realnem času zazna, tudi klinično pomembni. Lahko so prvi znak resne okužbe, lahko kažejo na nosilce bolezni, pri katerih se bolezen sploh ne razvije. Takšne bolnike je potrebno slediti ali pa ugotoviti možne druge povzročitelje gastroenteritisa. V raziskavi, opravljeni na Nizozemskem, kjer so z multiplo PCR v realnem času (angl. multiplex) v vzorcih blata ugotavljali prisotnost tudi drugih parazitov, niso imeli težav z lažno pozitivnimi in lažno negativnimi rezultati. Tudi njihova PCR v realnem času je bila 100% občutljiva in specifična (Verweij in sod., 2004).

Z našo raziskavo smo potrdili pričakovanja, da so molekularne metode bolj občutljive od klasičnih testov (mikroskopija). Ti običajno ne zahtevajo drage opreme in reagentov in so zato široko uporabljeni v diagnostičnih parazitoloških laboratorijih.

Poleg visokih stroškov uporabe PCR v realnem času v vsakodnevni laboratorijski diagnostiki, so njena omejitve lahko tudi lažno negativni rezultati zaradi prisotnosti inhibitorjev reakcije v vzorcih. Inhibitorjev PCR je v vzorcih blata veliko. Tekom osamitve DNA iz vzorcev jih je zato zelo pomembno učinkovito odstraniti.

Za ugotavljanje inhibitorjev v vzorcih osamljene DNA in za ugotavljanje uspešnosti pomnoževanja DNA smo v naši raziskavi uporabili interno kontrolo. Odstotek inhibicije je bil 0,76 %, kar pomeni, da je do inhibicije pomnoževanja DNA prišlo le v 1/131 primeru. Vzorec z ugotovljeno inhibicijo pomnoževanja DNA smo 10-krat redčili in ponovno izvedli PCR v realnem času. Ponovno smo v tem vzorcu poskusili pomnožiti tako DNA *G. intestinalis*, kot tudi interno kontrolo. Po desetkratnem redčenju vzorca se je interna kontrola uspešno pomnožila. Še več, v omenjenem vzorcu se je pomnožila tudi DNA *G. intestinalis*. S tem smo potrdili smiselnost uporabe interne kontrole za ugotavljanje prisotnosti inhibitorjev PCR. V primeru, da uspešnosti pomnoževanja ne bi preverjali z interno kontrolo, bi ta vzorec ostal lažno negativen.

Poleg interne kontrole smo pri izvajanju PCR v realnem času v vsako reakcijo vključili tudi pozitivno in negativno kontrolo pomnoževanja, kot ju zahteva vsak protokol PCR.

Negativna kontrola je ostala v vseh izvedenih zagonih negativna, kar pomeni, da pri pripravi reakcijske mešanice ni prišlo do kontaminacije vzorcev. Pozitivna kontrola nam je služila za preverjanje pravilne priprave reakcijske mešanice in poteka PCR v realnem času. Z njeno uporabo smo se prepričali, da so bili izpolnjeni vsi pogoji, da bi se DNA *G. intestinalis* v vzorcih uspešno pomnožila. Kot pozitivno kontrolo smo uporabljali pozitiven vzorec DNA *G. intestinalis*. Pozitivna kontrola se nam je v vseh zagonih reakcije uspešno pomnožila.

Vsaka od metod, ki smo ju primerjali v naši raziskavi, ima svoje prednosti in slabosti. Klasične metode bodo zaradi nizke cene, hitre izvedbe in enostavne uporabe kljub nekoliko nižji občutljivosti najverjetneje ostale široko uporabne v diagnostičnih parazitoloških laboratorijih. Pri uvajanju visoko občutljive in specifične PCR v realnem času v vsakodnevno diagnostiko parazitskih obolenj namreč naletimo na nekatere težave. To so predvsem visoka cena, potreba po izurjenem laboratorijskem osebju in po standardizaciji in validaciji postopkov. Le na ta način bodo lahko rezultati molekularnih metod primerljivi med različnimi laboratoriji, kar je izrednega pomena pri njihovi uvedbi v vsakodnevno diagnostiko. Ravno zato so na tem področju potrebne dodatne raziskave.

5.2 SKLEPI

- S PCR v realnem času smo DNA *G. intestinalis* ugotovili v 17 (12,98 %) od 131 pregledanih vzorcev blata bolnikov z gastroenteritisom, z DIF pa smo ciste parazita ugotovili v 15/131 (11,45 %) vzorcih.
- Na podlagi starostne analize pozitivnih vzorcev smo prišli do sklepa, da giardioza ni bila najpogostejša pri otrocih, pač pa bolnikih starih od 25 do 44 let.
- Z uporabo interne kontrole smo ugotovili inhibicijo pomnoževanja DNA pri 1/131 (0,76 %) vzorcu. Z 10-kratim redčenjem vzorca smo inhibicijo odpravili. V tem istem vzorcu smo po ponovnem testiranju s PCR v realnem času ugotovili okužbo z *G. intestinalis*. S tem smo se prepričali o smiselnosti uporabe interne kontrole za ugotavljanje prisotnosti inhibitorjev PCR v vzorcih.
- Povprečen C_T vseh s PCR v realnem času pozitivnih vzorcev je znašal 33.
- Ugotovili smo, da je PCR v realnem času zelo občutljiva metoda za ugotavljanje okužb z *G. intestinalis* v vzorcih blata bolnikov. Skupaj z DIF kot prvo preiskavo bi PCR v realnem času lahko uspešno uporabljali v rutinski diagnostiki giardioze.

6 POVZETEK

Giardioza spada med najpogostejše parazitske črevesne okužbe. Danes se v vsakodnevni diagnostiki giardioze večinoma uporabljajo metode, ki temeljijo na svetlobni in fluorescenčni mikroskopiji. Njihova občutljivost in specifičnost marsikdaj ni zadostna. Namen diplomske naloge je bil zato optimizirati in preizkusiti PCR v realnem času za ugotavljanje DNA *G. intestinalis* v blatu bolnikov, obolelih za gastroenteritisom.

S PCR v realnem času smo testirali 131 vzorcev blata bolnikov z gastroenteritisom. Te vzorce smo na prisotnost cist *G. intestinalis* pregledali tudi s komercialnim testom DIF. Uporaba obeh testov nam je omogočala njuno primerjavo.

Za PCR v realnem času smo uporabili začetna oligonukleotida, s katerima smo pomnoževali 63 bp dolg odsek gena za 18S rRNA *G. intestinalis*. S PCR v realnem času smo DNA *G. intestinalis* ugotovili v 17 (12,98 %) od 131 pregledanih vzorcev blata bolnikov z gastroenteritisom, z DIF pa smo ciste parazita ugotovili v 15/131 (11,45 %) vzorcih. Z molekularno metodo smo tako dokazali dva primera okužbe z *G. intestinalis* več kot z DIF.

Na podlagi izsledkov našega dela lahko zaključimo, da je PCR metoda v realnem času bolj občutljiva od komercialnega DIF testa in bi jo zato veljalo skupaj z DIF testom vpeljati v vsakdanjo diagnostiko giardioze.

7 VIRI

- Adam R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews, 14, 3: 447-475
- Adam R.D. 1991. The biology of *Giardia spp.*. Microbiological Reviews, 55, 4: 706-732
- Baruch A.C., Isaac-Renton J., Adam R.D. 1996. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. Journal of Infectious Diseases, 174: 233-236
- Beltram M.A., Mayer E.A., Lile J.D., Morse S.A. 1983. A comparasion of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. Journal of Parasitology, 69: 793-801
- Blanchard R. 1888. Remarques sur le megastome intestinal. Bulletin de la Societe zoologique de France, 13: 18-18
- Bouزيد M., Steverding D., Tyler K.M. 2008. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. Current Opinion in Biotechnology, 19: 302-306
- Brodsky R.E., Spencer H.C., Schultz M.G. 1974. Giardiasis in American travelers to the Soviet Union. Journal of Infectious Disease, 130: 319-323
- Brooks G.F., Carroll K.C., Butel J.S., Morse S.A. 2007. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 24th ed. New York, The McGraw Hill: 818 str.
- Buchel L.A., Gorenflot A., Chochillon C., Savel J., Gobert J.G. 1987. *In vitro* excystation of *Giardia lamblia* from humans: a scanning electron microscopy study. Journal of Parasitology, 73: 487-493
- Burd E.M. 2010. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews, 23: 550-576
- CDC. 2012. *Giardia intestinalis* life cycle. Atlanta, CDC- Center for Disease Control and Prevention: 1 str.
<http://www.cdc.gov> (februar 2012)
- Class C.J.E., Melchers J.G.W., Van den Brule J.C.A. 2007. The role of Real-time PCR in routine microbial diagnostics. V: Real-time PCR in microbiology: From diagnosis to characterization. Mackay M. I. (ed.). Wymondham, Caister Academic: 231-269

- Dobell C. 1920. The discovery of the intestinal protozoa of man. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 13: 1-15
- EPA. 2010. *Giardia* image sequence 1. New York, EPA- Environmental Protection Agency: 1str.
http://www.epa.gov/microbes/gda_seq1.html (april 2012)
- Erlandsen S.L., Bemrick W.J. 1987. SEM evidence for a new species *Giardia psittaci*. *Journal of Parasitology*, 73: 623-629
- Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yoo J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R., Smith T.F. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 165-256
- Fan J.B., Korman S.H., Contor C.R., Smith C.L. 1991. *Giardia lamblia*: haploid genome size determined by pulsed field gel electrophoresis is less than 12 Mb. *Nucleic Acids Research*, 19: 1905-1908
- Feely D.E., Erlandsen S.L. 1985. Morphology of *Giardia agilis*: observation by scanning electron microscopy and interference reflexion microscopy. *Journal of Protozoology*, 32: 691-693
- Filice F.P. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *University of California Publication in Zoology*, 57: 53-146
- Gillin F.D., Gault M.J., Hofmann A.F., Gurantz D., Sauch J.F. 1986. Biliary lipids support serum-free growth of *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*, 53: 641-645
- Gillin F.D., Reiner D.S., McCaffery J.M. 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annual Review of Microbiology*, 5: 679-705
- Gordis L. 2004. *Epidemiology*. 3rd ed. Philadelphia, Elsevier Saunders: 323 str.
- Gradus M.S. 1989. Water quality and waterborne protozoa. *Clinical Microbiology News*, 11: 121-125
- Guy R.A., Payment P., Krull U.J., Horgen P.A. 2003. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9: 5178-5185

- Guy R.A., Xiao C., Horgen P.A. 2004. Real-time PCR Assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 3317-3320
- Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2008. Praktikum iz molekularne biologije-teoretični del. Ljubljana, Scripta: 104 str.
- Hojs A. 2004. Hidrične epidemije v Sloveniji v letih 1981 – 2002. *Zdravstveni vestnik*, 43: 29-37
- Hove R., Schuurman T., Kooistra M., Moller L., van Lieshout L., Verweij J.J. 2007. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practise patients in the Netherlands by multiplex Real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 10: 1001-1007
- ICMG. 2009. What is real time PCR. Montreal, ICMG- Ion Channel Media Group: 2 str. <http://www.rt-pcr.com/> (april 2012)
- Jarroll E.L., Bingham A.K., Meyer E.A. 1981. Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 41: 483-487
- Kabnick K.S., Peattie D.A. 1990. *In situ* analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are eqwivalent. *Journal of Cell Science*, 95: 353-360
- Lambl W. 1859. Mikroskopische untersuchungen der Darmexcrete. *Vierteljahrsschr Prakst Heikunde*, 61: 1-58
- Le Blancq S.M., Adam R.D. 1998. Structural basis of karyotype heterogeneity in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 97: 199-208
- Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Pagl F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology*, 27: 37-58
- Lindmark D.G. 1980. Energy metabolism of the anaerobic protozoon *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1: 1-12
- Logar J. 1999. Parazitologija v medicini. 1. izd. Ljubljana, DZS: 217 str.
- Logar J. 1999. Protozologija. Ljubljana, Scripta: 102 str.

Logar J. 2010. Parazitologija človeka. 1. izd. Ljubljana, Didakta: 261 str.

Logar J., Šoba B., Tomažič J. 2007. Zajedavci, ki se na človeka prenesejo z vodo. Medicinski razgledi, 46: 111-113

Lujan H.D., Nash T.E. 1994. The uptake and metabolism of cysteine by *Giardia lamblia* trophozoites. Journal of Eukaryotic Microbiology, 41: 169-175

Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. San Francisco, Pearson: 992 str.

McArthur A.G., Morrison G., Nixon E.J., Passamaneck N.Q.E., Kim U., Hinkle G., Crocker M.K., Holder M.E., Farr R., Reich C.I., Olsen G.E., Aley S.B., Adam R.D., Gillin F.D., Sogin M.L. 2000. The *Giardia* genome project database. FEMS Microbiology Letters, 189: 271-273

Poljak M., Avšič T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo - nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. Medicinski razgledi, 33: 379-400

Rutledge R.G., Cote C. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. Nucleic Acids Research, 31, 16: e93, doi: 10.1093/nar/gng/093: 6 str.

Sogin M.L., Gunderson J.H., Elwood H.J., Alonso R.A., Peattie D.A. 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. Science, 243: 75-77

Soltys B.J., Falah M., Gupta R.S. 1996. Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody. Journal of Cell Science, 109: 1909-1917

Stark D., Al-Qassab S.E., Barratt J.L.N., Stanley K., Roberts T., Marriot D., Harkness J., Ellis J.T. 2011. Evaluation of Multiplex Tandem Real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* in clinical stool samples. Journal of Clinical Microbiology, 49, 1: 257-262

Stark D., Barratt J.L., van Hal S., Marriot D., Harkness J., Ellis J.T. 2009. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. Clinical Microbiology Reviews, 22, 1: 634-650

- Sun J., Jiang H., Flores R., Wen J. 2010. Gene duplication in the genome of parasitic *Giardia lamblia*. BMC Evolutionary Biology, 10, 49: doi: 10.1186/1471-2148-10-49: 8 str.
- Verweij J.J., Blange R.A., Templeton K., Schinkel J., Brien E.A.T., van Rooyen M.A.A., van Lieshout L., Polderman A.M. 2004. Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by using multiplex Real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology, 42: 1220-1223
- Verweij J.J., Schinkel J., Laeijendecker D., van Rooyen M.A.A., van Lieshout L., Polderman A.M. 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. Molecular Cell Probes, 17: 223-225
- Wolfe M.S. 1992. Giardiasis. Clinical Microbiology Reviews, 5, 1: 93-100
- Wu G., McArthur A.G., Fiser A., Salidouble D.A., Sogin M.L. 2000. Core histones of the amitochondriate protist *Giardia lamblia*. Molecular Biology and Evolution, 17: 1156-1163

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Jerneju Logarju, univ. dipl. biol. in somentorici asist. dr. Barbari Šoba, univ. dipl. mikrobiol., ki sta mi omogočila opravljanje zanimive diplomske naloge.

Posebna zahvala gre asist. dr. Barbari Šoba, univ. dipl. mikrobiol., za praktično uvajanje v molekularno diagnostiko parazitov, za pomoč in svetovanje pri pisanju in oblikovanju diplomskega dela in za ves čas, ki mi ga je morala nameniti.

Iskrena hvala tudi prof. dr. Jerneju Logarju, univ. dipl. biol. in prof. dr. Alojzu Ihanu, dr. med., za hitri strokovni pregled diplome.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za parazitologijo, Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, zlasti Sabini, za potrpežljivost, nasvete in pomoč.

Najlepša hvala tudi Alešu za oblikovanje diplomske naloge in priganjanje k čimprejšnjemu dokončanju le-te.

Največja zahvala pa gre mojim staršem. Njuni nasveti, spodbude, finančna in moralna podpora so mi omogočili dokončanje študija in lajšali vse dneve v Ljubljani.

Hvala vsem.

PRILOGE

Priloga A: Rezultati testiranja in lastnosti zbranih vzorcev bolnikov z gastroenteritisom.

Zaporedna številka	Spol	Starost (leta)	Paraziti v blatu	Rezultat DIF	PCR v realnem času	
					Rezultat	C _T
1	Ž ^a	45		N ^c	N	
2	Ž	42		N	N	
3	Ž	43		N	N	
4	M ^b	18		N	N	
5	Ž	10		N	N	
6	M	7		N	N	
7	M	65		N	N	
8	M	13		N	N	
9	M	1		N	N	
10	Ž	40		N	N	
11	Ž	34	<i>G. intestinalis</i>	P ^d	P	33,98
12	M	13		N	N	
13	M	7		N	N	
14	M	9		N	N	
15	Ž	13		N	N	
16	M	2		N	N	
17	Ž	57		N	N	
18	M	6		N	N	
19	Ž	27		N	N	
20	M	15		N	N	
21	Ž	44		N	N	
22	M	11		N	N	
23	Ž	7		N	N	
24	Ž	38	<i>Taenia sp.</i>	N	N	
25	M	1		N	N	
26	Ž	37		N	N	
27	M	49		N	N	
28	Ž	26		N	N	
29	Ž	3		N	N	
30	M	77		N	N	
31	M	89		N	N	
32	M	35		N	N	
33	Ž	95		N	N	
34	Ž	30		N	N	

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Rezultati testiranja in lastnosti zbranih vzorcev bolnikov z gastroenteritisom.

Zaporedna številka	Spol	Starost (leta)	Paraziti v blatu	Rezultat DIF	PCR v realnem času	
					Rezultat	C _T
35	M	1		N	N	
36	Ž	13		N	N	
37	M	3		N	N	
38	Ž	75		N	N	
39	Ž	40		N	N	
40	M	7		N	N	
41	Ž	41		N	N	
42	Ž	74		N	N	
43	Ž	2		N	N	
44	M	25		N	N	
45	M	17		N	N	
46	M	59		N	N	
47	M	16		N	N	
48	Ž	3		N	N	
49	Ž	81		N	N	
50	M	38		N	N	
51	M	74		N	N	
52	M	40		N	N	
53	Ž	34		N	N	
54	M	40		N	N	
55	M	62		N	N	
56	M	72		N	N	
57	Ž	68		N	N	
58	Ž	84		N	N	
59	Ž	42		N	N	
60	M	38		N	N	
61	M	38	<i>G. intestinalis</i>	P	P	30,46
62	Ž	37		N	N	
63	M	50	<i>G. intestinalis</i>	P	P	31,16
64	Ž	32		N	N	
65	M	8		N	N	
66	M	30		N	N	
67	M	29		N	N	
68	Ž	1		N	N	
69	M	2		N	N	
70	Ž	29	<i>G. intestinalis</i>	P	P (po redčenju)	38,97

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Rezultati testiranja in lastnosti zbranih vzorcev bolnikov z gastroenteritisom.

Zaporedna številka	Spol	Starost (leta)	Paraziti v blatu	Rezultat DIF	PCR v realnem času	
					Rezultat	C _T
71	Ž			N	N	
72	M	34		N	N	
73	Ž	36		N	N	
74	M	62		N	N	
75	Ž	39		N	N	
76	M	1		N	N	
77	M	5		N	N	
78	M	2		N	N	
79	Ž	17		N	N	
80	Ž	74		N	N	
81	M	8		N	N	
82	M	57		N	N	
83	M	37		N	N	
84	M	3		N	N	
85	M	4		N	N	
86	Ž	31	<i>G. intestinalis</i>	P	P	29,98
87	Ž	17	<i>Entamoeba coli</i>	N	N	
88	M	64	<i>G. intestinalis</i>	P	P	28,91
89	M	27	<i>G. intestinalis</i>	P	P	37,97
90	Ž	30		N	N	
91	M	3		N	N	
92	Ž	86		N	N	
93	Ž	82		N	N	
94	M	18	<i>Entamoeba coli</i>	N	N	
95	Ž	58		N	N	
96	M	25		N	N	
97	Ž	4		N	N	
98	Ž	55		N	N	
99	M	1		N	N	
100	M		<i>G. intestinalis</i>	N	P	38,96
101	Ž	43		N	N	
102	M	2		N	N	
103	Ž	1		N	N	
104	M	14		N	N	
105	Ž	1		N	N	
106	Ž		<i>G. intestinalis</i>	P	P	33,4

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Rezultati testiranja in lastnosti zbranih vzorcev bolnikov z gastroenteritisom.

Zaporedna številka	Spol	Starost (leta)	Paraziti v blatu	Rezultat DIF	PCR v realnem času	
					Rezultat	C _T
107	M	37	<i>G. intestinalis</i>	P	P	29,06
108	M	30	<i>G. intestinalis</i>	P	P	22,57
109	M	30	<i>Blastocystis spp.</i>	N	N	
110	M	3		N	N	
111	M	64	<i>Cryptosporidium spp.</i>	N	N	
112	M	26	<i>G. intestinalis</i> , <i>Cryptosporidium spp.</i>	N	P	38,01
113	Ž	29	<i>G. intestinalis</i>	P	P	38,97
114	M	35	<i>Entamoeba coli</i>	N	N	
115	M	29	<i>G. intestinalis</i>	P	P	35,83
116	M	16	<i>Blastocystis spp.</i>	N	N	
117	M	18	<i>G. intestinalis</i>	P	P	27,82
118	M	7	<i>Cryptosporidium spp.</i>	N	N	
119	M	2		N	N	
120	Ž	25	<i>Entamoeba coli</i>	N	N	
121	M	1		N	N	
122	M	6		N	N	
123	M	13	<i>Enterobius vermicularis</i>	N	N	
124	Ž	44		N	N	
125	M	10	<i>Entamoeba coli</i>	N	N	
126	M	46	<i>Strongyloides spp.</i>	N	N	
127	M	41		N	N	
128	Ž	77		N	N	
129	Ž	6		N	N	
130	Ž	26	<i>G. intestinalis</i>	P	P	26,98
131	M	35	<i>G. intestinalis</i>	P	P	31,97

^a Ž – ženski spol

^b M – moški spol

^c N – negativen rezultat

^d P – pozitiven rezultat

Vzorci, v katerih smo ugotovili prisotnost *G. intestinalis*, so označeni z rumeno barvo.