

**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

**PROTOZOONOK KIMUTATÁSA, AZONOSÍTÁSA ÉS SZEREPE AZ EMBERI  
KÖRNYEZETBEN**

**Orosz Erika**

**Gödöllő**

**2013**

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Környezettudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Környezettudomány

**vezetője:** Dr. Heltai György  
egyetemi tanár, D.Sc.  
Szent István Egyetem  
MKK Környezettudományi Intézet  
Kémia és Biokémia Tanszék

**Témavezető:** Dr. Füleky György  
egyetemi tanár, C.Sc.  
Szent István Egyetem  
MKK Környezettudományi Intézet  
Talajtani és Agrokémiai Tanszék

**Témavezető:** Dr. Bayoumi Hamuda Hosam  
egyetemi docens, C.Sc.  
Óbudai Egyetem  
RKK Környezettudományi Intézet

.....  
az iskolavezető jóváhagyása  
(Dr. Heltai György)

.....  
a témavezető jóváhagyása  
(Dr. Füleky György)

.....  
a témavezető jóváhagyása  
(Dr. Bayoumi Hamuda Hosam)

**AZ ÉRTEKEZÉSBEN ELŐFORDULÓ RÖVIDÍTÉSEK ÉS JELÖLÉSEK,  
VALAMINT FOGALMAK JEGYZÉKE**

ANOVA	Variancia-analízis, vagy szórásElemzés (angol: analysis of variance). A null-hipotézis szerint a vizsgált sokaságok (csoportok) várható értékei között nincs különbség. A null-hipotézist akkor utasíthatjuk el, ha a csoportok szórásnégyzeteinek aránya az F-próba kritikus értékénél nagyobb. Az F-próbát az egyes vizsgálatok során adott $\alpha$ szignifikancia szintre (általában $\alpha = 0,05$ ), azaz $1 - \alpha$ valószínűségű elfogadási tartományra számítottam ki.
ARA	ARDRA a mikrobiológiában gyakran alkalmazott RFLP (magyar: restrikciós fragmenthossz polimorfizmus; angol: restriction fragment length polymorphism), melyet PCR-rel felszaporított riboszomális DNS-szakaszon végeznek (angol: amplified ribosomal DNA restriction analysis)
ATCC	Amerikai Tipus Törzsgyűjtemény (angol: American Type Culture Collection)
bp	bázispár
CDC	Centers for Disease Control
DNS	dezoxiribonukleinsav
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENSZ	Egyesült Nemzetek Szervezete (angol: UN; United Nations)
<i>et al.</i>	és mások (latin: et alteri)
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
IHA	Indirect Haemagglutination Assay
<i>in situ</i>	helyben (latin)
M	egy mól anyagmennyiség, azaz $6 \times 10^{24}$ db atom, vagy molekula
m/v%	Tömegszázalék. Szilárd halmazállapotú reagenst folyadékban oldva a reagens tömegaránya az oldatban.
MLEE	Multi Locus Enzyme Electrophoresis
N	normalos oldat ( $1 \text{ M dm}^{-3}$ , adott elemre vonatkoztatva)
P	Probabilitás (angol: probability), valószínűség. E dolgozatban $P=1 - \alpha$ , vagyis a hipotézisvizsgálat elfogadási tartományának valószínűsége, más néven az $\alpha$ szignifikancia - szinthez tartozó megbízhatósági szint. Ha $\alpha = 0,05$ ; akkor $P = (1 - 0,05) = 0,95$ . P értékét %-ban fejeztem ki és adott P megbízhatósági szintre számított szignifikáns differenciát [ $SzD_{P\%}$ ]-kal jelöltem, pl. $SzD_{95\%}$ .
PCR	polimeráz láncreakció (angol: polymerase chain reaction)
r	riboszomális

RNS	ribonukleinsav
rpm	fordulatszám egy perc alatt (angol: round per minute)
sp., spp.	Faj, fajok (latin: species)
T <sub>m</sub>	Olvadáspont analízis
Törzsgyűjtemény	saját törzsgyűjtemény, mely nem azonos és nem áll kapcsolatban bármely nemzeti, vagy nemzetközi, jogi személyként elismert törzsgyűjteménnyel. E törzsgyűjtemény saját izolálásból származó, laboratóriumi módszerekkel szelektált
WB	Western-Blot
WHO	World Health Organization
$\alpha$	Az $\alpha$ valószínűséget a statisztikai próba szignifikancia-szintjének nevezzük (MANCZEL 1983, KEMÉNY és DEÁK 2000). Az elfogadási tartományba a próbastatisztika értékei $1 - \alpha$ valószínűséggel esnek, ha a null-hipotézis igaz. Másképpen, elfogadási tartomány az, melyben a próbastatisztika értékei a véletlenszerű ingadozás következtében $1 - \alpha$ valószínűséggel lehetnek.

## TARTALOMJEGYZÉK

AZ ÉRTEKEZÉS BEN ELŐFORDULÓ RÖVIDÍTÉSEK ÉS JELÖLÉSEK,.....	3
<b>1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS</b> .....	7
1.1 A téma aktualitása, jelentősége .....	7
1.2 Célkitűzés .....	8
<b>2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	9
2.1 Evolúció .....	9
2.2 A protozoonok elterjedése.....	11
2.3 A protozoonok elleni védekezés.....	12
2.4 A protozoonok diagnosztikai módszerei.....	12
2.4.1 A protozoonok mikroszkópos vizsgálata.....	12
2.4.2 A protozoonok tenyésztési vizsgálata.....	13
2.4.3 A protozoonok immunszerológiai vizsgálata.....	14
2.4.4 A protozoonok izoenzim vizsgálata.....	16
2.4.5 A protozoonok molekuláris biológiai vizsgálata.....	17
2.5 Epidemiológia.....	18
2.6 Protozoon faji szintű meghatározása, identifikálása.....	19
2.6.1 Új protozoon fajok leírása.....	19
2.6.2 <i>Entamoeba</i> genus.....	20
2.6.3 <i>Acanthamoeba</i> genus.....	29
2.6.4 <i>Giardia</i> genus.....	32
<b>3 ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	37
3.1 Mintavétel.....	37
3.1.1 Az <i>Entamoeba</i> sp. minták eredete.....	37
3.1.2 Az <i>Acanthamoeba</i> spp. minták eredete .....	37
3.1.3 A <i>Giardia intestinalis</i> minták eredete.....	37
3.2 Protozoonok izolálása, azonosítása.....	37
3.2.1 <i>Entamoeba histolytica</i> és <i>Giardia intestinalis</i> mikroszkopikusan meghatározása .....	37
3.2.2 Az <i>Acanthamoeba</i> spp. mikroszkopikusan meghatározása.....	38
3.3 Táptalajok.....	38
3.3.1 <i>Entamoeba histolytica</i> táptalaj .....	38
3.3.2 <i>Acanthamoeba</i> spp. táptalaj .....	40

3.3.3	<i>Giardia intestinalis</i> és <i>Entamoeba histolytica</i> táptalaj: .....	41
3.4	Rizoszférából történő izolálás .....	41
3.5	A protozoonok molekuláris biológiai vizsgálata .....	41
3.5.1	<i>Entamoeba histolytica</i> azonosítása real-time FRET PCR módszerrel .....	41
3.5.2	<i>Acanthamoeba</i> spp. azonosítása real-time FRET PCR módszerrel.....	45
3.5.3	<i>Giardia intestinalis</i> azonosítása PCR módszerrel.....	49
3.5.4	PCR-termékek tisztítása, szekvenálás.....	52
3.5.5	Filogenetikai analízis .....	53
3.5.6	Statisztikai elemzés.....	53
<b>4</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b> .....	<b>55</b>
4.1	<i>Entamoeba histolytica</i> azonosítása .....	55
4.1.1	<i>Entamoeba histolytica</i> jelenlétének kimutatása mikroszkópos és ELISA vizsgálattal ...	55
4.1.2	<i>Entamoeba histolytica</i> jelenlétének kimutatása real-time FRET PCR technikával .....	55
4.1.3	<i>Entamoeba histolytica</i> szekvencia analízis eredmény .....	59
4.1.4	<i>Entamoeba histolytica</i> szekvencia-illesztő program eredmény .....	60
4.1.5	<i>Entamoeba histolytica</i> filogenetikai analízis eredmény .....	61
4.2	<i>Acanthamoeba</i> spp. azonosítása .....	63
4.2.1	<i>Acanthamoeba</i> spp. jelenlétének kimutatása mikroszkópos és tenyésztési vizsgálattal..	63
4.2.2	<i>Acanthamoeba</i> spp. jelenlétének kimutatása real-time FRET PCR technikával .....	63
4.2.3	<i>Acanthamoeba</i> spp. szekvencia analízis eredménye .....	66
4.2.4	<i>Acanthamoeba</i> spp. szekvencia-illesztő program eredmény .....	67
4.2.5	<i>Acanthamoeba</i> spp. filogenetikai analízis eredménye .....	70
4.3	<i>Giardia intestinalis</i> azonosítása.....	73
4.3.1	<i>Giardia intestinalis</i> jelenlétének kimutatása mikroszkópos és ELISA vizsgálattal .....	73
4.3.2	<i>Giardia intestinalis</i> jelenlétének kimutatása nested PCR vizsgálattal .....	74
4.3.3	<i>Giardia intestinalis</i> szekvencia analízis eredmény, nested PCR .....	76
4.3.4	<i>Giardia intestinalis</i> szekvencia illesztő program eredmény, nested PCR-ral.....	79
4.3.5	<i>Giardia intestinalis</i> filogenetikai analízis eredménye, nested PCR-ral.....	81
<b>5</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK</b> .....	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</b> .....	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>88</b>
<b>10</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>105</b>

# 1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

## 1.1 A téma aktualitása, jelentősége

A protozoonok tudatos megismerését a mikroszkóp felfedezése tette lehetővé a XVII században. A környezetünkben igen nagy számmal vannak jelen az egysejtűek, de csak néhány okoz emberi és állati megbetegedést. Az emberben élősködő protozoonokkal az orvosi tudomány (orvosi mikrobiológia, parazitológia) foglalkozik (BOGITSZ et al. 2005). Az állatokban élősködő protozoonokkal az állatorvosi parazitológia foglalkozik. Mindkét tudomány szorosan együttműködik, mivel a környezet direkt bizonyítékot szolgáltat a zoonotikus átvitel lehetőségéről (FAYER et al. 2001, HAJDUSEK et al. 2004, THOMPSON 2004, GARCIA et al. 1999).

Egyes protozoonok képesek élni és szaporodni, illetve mindkét formájuk (trophozoit és cysta) megtalálható a környezetben, mint például az *Acanthamoeba* species tagjai, amelyek az emberi szervezetbe véletlenül kerülnek be. Nagyon jól lehet látni, hogy a környezetben az *Acanthamoeba* speciesek pozitív hatást tanúsítanak, mivel egyensúlyt tartanak a baktériumokkal, mind a föld felszínén, mind a rhizosferában (KREUZER et al. 2006). Az *Acanthamoeba* speciesek baktériumokkal táplálkoznak, vagyis szabályozzák a baktérium populációt.

A protozoonok többsége szabadon él a környezetben, talajban, vízben, és csak egy kis részük kerül hosszabb – rövidebb kapcsolatba a növényekkel, állatokkal és az emberrel. Számos tanulmány jelent meg, ahol leírták, hogy néhány protozoon cysta elegendő az emberi megbetegedés kialakulásához, azonban ez erősen függ az ember életkorától, immunállapotától (FARTING 1994).

A parazitológia volt az utolsó a szakterületek közül, ahol bevezették a molekuláris biológiai módszereket. Ennek többek között az volt a fő oka, hogy sok protozoon már mikroszkópos vizsgálattal is nagyon jól felismerhető. De a magas szenzitivitás és egyidejűleg a morfológiailag nehezen elkülöníthető fajok (vagy törzsek) differenciálási lehetősége miatt ma már a molekuláris biológiai módszerek, különösen a PCR, nagyon fontos részei a parazitológiai diagnosztikának. A molekuláris biológiai módszereknek nem csak a parazita diagnosztikájában, hanem az epidemiológiában, populációgenetikában, az új hatóanyagok és az oltóanyagok kifejlesztésében, és mindenekelőtt a filogenetikai vizsgálatokban van nagy jelentősége (MAHBUBANI et al. 1991, 1992, WEISS 1992).

Összességében az új tudományterületek, mint pl. a genomika, proteomika, bioinformatika módszereinek alkalmazásával, a gazda-parazita-kölcsönhatás jobban megérthető, és a fő cél, a parazitás megbetegedések megelőzése és ellenőrzése sokkal közelebb került.

## 1.2 Célkitűzés

- az *Entamoeba histolytica* kimutatása a vizsgálati anyagokból klasszikus és molekuláris (PCR) módszerrel a parazita genomjában kódolt 16S-rRNS génjének egy specifikus része segítségével
- kukorica és lucerna rhizospherából *Acanthamoeba* spp. kimutatása klasszikus és modern módszerrel
- a rhizospherából izolált *Acanthamoeba* spp. szekvenálása és species meghatározása
- a *Giardia intestinalis* kimutatása a vizsgálati anyagokból klasszikus, nested PCR módszerrel, a parazita genomjában kódolt 18S-rRNS génjének egy specifikus része segítségével



## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Evolúció

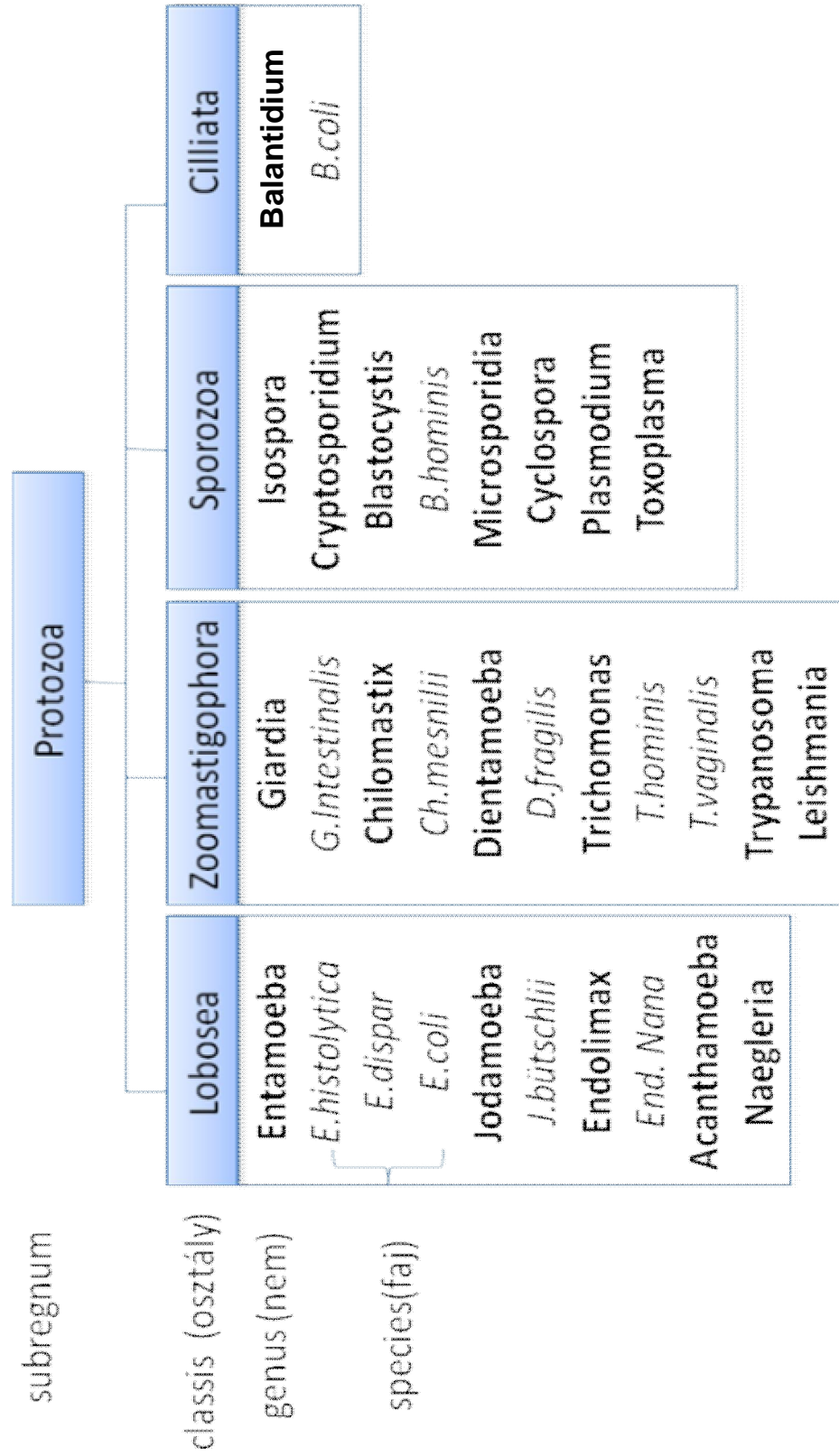
A protozoonok alkotják az állatvilág legprimitívebb törzsét. Állábakkal, ostorokkal vagy csillókkal mozognak. Többnyire egyszerű kettéosztódással (mitózissal) szaporodnak. Vannak köztük ártalmatlanok, csak egy részük patogén, vagy fakultatív patogén. Az 1.sz. táblázat foglalja össze az emberi szervezetre nézve patogén és fakultatív patogén protozoonokat.

Az emberben élő protozoon egysejtűek kivétel nélkül endoparaziták. A Földünkön mintegy 70 fajuk ismeretes (ASHFORD és CREWE 2003). Legtöbbjük a bélcsatornában élősöködik (bélprotozoon), de vannak olyanok is, amelyek a testüregekben (száj, hüvely), valamint vérben és szövetekben is élősöködnek. A protozoon által megtámadott szervezetet gazdaszervezetnek nevezzük. Életfeltételek biztosítása végett a protozoonok a gazdaszervezet sajátosságaihoz alkalmazkodnak. Számos protozoon esetében a fejlődés, szaporodás vagy táplálkozás céljából tartósan vagy átmenetileg a szervezetben tartózkodnak, és abból a szervezetből egyoldalú hasznot húznak önmaguk számára.

A protozoonok evolúciós kapcsolatának pontos megértése szintén fontos szereppel bír a biológiában. A molekuláris biológia a biológia azon ága, amely a molekulák struktúrájával és funkciójával foglalkozik (SCHLEGEL 1994). A molekuláris biológia kulcsmolekulája a DNS. A molekuláris biológia 1930-1960 között alakult önálló tudománnyá, és a huszadik század utolsó harmadában hatalmas fejlődésen ment keresztül. A molekuláris biológiai technikák ma már a parazitológiában is széles körben elterjedtek. Az eukarióta filogenetika például bemutatja, hogy a protozoonok nem primitívek, hanem épp ellenkezőleg, nagymértékben alkalmazkodóak a környezetükhöz (DACKS et al. 2008).

Az utóbbi években a különböző gének kutatása és a teljes genom szekvenálások számos parazita esetében messze előrehaladtak, miáltal új lehetőségek nyíltak meg a paraziták biológiájában, diagnosztikájában, és ellenőrzésükben. Mindenekelőtt az epidemiológiában, új anti-parazita szerek, és oltóanyagok kifejlesztésénél is a molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával új lehetőségek nyíltak.

1.sz. táblázat. Patogén és a fakultatív patogén protozoonok előfordulása az emberi szervezetben.



## 2.2 A protozoonok elterjedése

A protozoonok elterjedését nagymértékben befolyásolják a társadalmi és szociális tényezők, valamint az általános és személyi higiénia. A megfelelő higiéniai viszonyok között a legtöbb protozoon fertőzés terjedése csökken. Nedves közegben hetekig életképesek a cysták, tehát az ivóvízbe (ABBASZADEGAN et al. 1993) vagy talajba jutva hosszú ideig fertőzést idézhetnek elő. Terjedhetnek a cysták széklettel trágyázott, szennyvízzel locsolt és kellően nem mosott zöldségekkel, vagy piszkos kéz és legyek útján is. A klíma tényezői szintén meghatározzák a protozoonok terjedési mechanizmusát. Ezért például az *Entamoeba* genusba tartozó *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) esetében még ma sincs kialakult, egységes elképzelés sem apatogenitásról, sem a klinikai kép megítéléséről, sem az előfordulási lehetőségekről. Egyes kutatók véleménye szerint a patogén *Entamoeba histolytica* törzsek csak trópusi klíma alatt fordulnak elő (CLARK és DIAMOND 1991, SILBERMAN et al. 1999), míg a mérsékelt égöviek apatogének, mint például az *Entamoeba dispar* (*E. dispar*) (VÁRNAI 1987, HUSTON és PETRI 1999). Ezeket a protozoonokat hazánkba elsősorban endémiás területekről érkező turisták és bevándorlók hurcolják be (OROSZ et al. 2012).

A protozoonoknak hihetetlen mértékű alkalmazkodóképességük van. Általában nem pusztítják el a gazdaszervezetet közvetlenül, hanem próbálnak a gazda szervezettel együtt élni. Gyakran élősködnek észrevétlenül (JACOBS et al. 2001, ANDERSON et al. 2004, HITI et al. 2002, SCHUSTER et al. 2004), de amikor a gazdaszervezet általános ellenálló képessége csökken, megbetegedést vagy halált okozhatnak. Számos közlemény jelent meg ezzel kapcsolatban a csökkent immunvédekezésű betegekről (pl. AIDS), (JANOFF et al. 1988, FRIEDLAND et al. 1992, HELTON et al. 1993, CUGINO et al. 1995, ABOUD et al. 2001, LOLLO et al. 2003, PELLECCIA et al. 2010), valamint a kemoterápiában részesült betegekről (BOREHAM et al. 1992, ANDERLINI et al. 1994, CHUNG et al. 1998).

A *Giardia* az egyik legelterjedtebb bélprotozoon. A Föld minden részén előfordul, ahol nem megfelelőek a higiénias- és közegészségügyi körülmények, illetve túlszűfolttság van, ott gyakran epidemiák alakulnak ki. (WHO 1996). A *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*, szinonimák: *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*) a giardiosis nevű megbetegedést okozza. A fertőzöttek zöme 10 éves kor alatti. Kisgyermekek közösségébe behurcolva járványosan terjed (HEYWORTH et al. 1994). A klinikai tünetek változékonysága megnehezíti a diagnózist, ezen kívül a fertőzés gyakran tünetmentes (THOMPSON 1993, 1994, HELLARD et al. 2000, THOMPSON et al. 2000, THOMPSON 2004). A *Giardia* sp. trophozoit az élő szervezeten kívül nem marad életben, a székletben csak a hasmenéses tünetek alatt található meg. A *Giardia* sp. cysta kikerülve a gazda szervezetből a

környezetbe direkt bizonyítékot szolgáltat a zoonotikus átvitel lehetőségéről, járványok kitörésekor pedig fertőzés forrása lehet. (KEULEN et al. 2002, TRAUB et al. 2004).

A nagyon ritkán előforduló szabadon élő amoebák komoly megbetegedéseket is okozhatnak az emberi szervezetben. Egyes *Acanthamoeba* fajok emberi kórokozók, és két klinikailag jól elkülönülő kórképet okoznak, a granulomatozus amoeba encefalitiszt (GAE) (SCHUSTER et al. 2006, VISVESVARA et al. 2007, WALOCHNIK et al. 2008, PO-MIN et al. 2012) és a szaruhártya gyulladását (keratitis) okozhatja (KILVINGTON et al. 1994, NUPRASERT et al. 2010, RIVERA et al. 2009, PRASHANTH et al. 2011).

### **2.3 A protozoonok elleni védekezés**

A védekezés a terjedési módtól függ, mivel ennek leghatékonyabb eszköze a személyi- és környezethigiéna megfelelő betartása (BLACK et al. 1977, PICKERING és ENGELKIRK 1990, VAN DE BOSCH 1991).

Bélprotozoonok terjedése ellen az emberi és állati székletszóródás megakadályozása a legfontosabb (THOMPSON et al. 1988). Hasonlóan fontos a kutak és egyéb víznyerő berendezések közegészségügyi követelményeknek megfelelő működtetése (KORICH et al. 1990, FINCH et al. 1993b), a nyersen fogyasztható zöldségek gondos tisztítása (OSTERHOLM et al. 1981, ISLAM 1990, THOMPSON et al. 1990) és az étkezés előtti kézmosás (RABBANI és ISLAM 1994).

Egyes protozoon cysták érzékenyek a hőre és a kiszáradásra, de vegyszerekkel szemben meglehetősen ellenállóak. Itt figyelembe kell venni a különböző fertőtlenítőszer hatását, mivel a talajra került cysták ellen a leghatékonyabb a felmosás vagy permetezés 5%-os krezollal, amely 5-10 percen belül elpusztítja azokat.

### **2.4 A protozoonok diagnosztikai módszerei**

A laboratóriumi diagnosztika szempontjából elsősorban a protozoonok kimutatása és felismerése fontos. A feladatok ellátásához a klasszikus vizsgálati módszereken túl (mikroszkópos és tenyésztéses) az immunszerológiai (ELISA, IHA, WB) és molekuláris biológiai módszereket (nested, multiplex vagy real-time PCR) is rutinszerűen alkalmazzák.

#### **2.4.1 A protozoonok mikroszkópos vizsgálata**

A mikroszkópos kimutatás a protozoonok diagnosztikájában nélkülözhetetlen még akkor is, ha az érzékenysége alacsony (BOCKMAN és WINBORN 1968, BURKE 1977, GANGULY et al. 1985, ERLANDSEN et al. 1989). Krónikus megbetegedés esetén a kórokozók száma alacsony, ilyenkor a direkt mikroszkópos vizsgálatot ki kell egészíteni tenyésztéssel. A protozoonok általában szakaszosan ürülnek, ezért minden olyan esetben, amelyben a klinikai tünetek alapján protozoon-

fertőzés gyanúja áll fenn, és az első vizsgálat negatív eredményt adott, célszerű a vizsgálatot három, egymást követő napon megismételni (VÁRNAI 1978, 1987, RUIZ-PALACIOS et al. 1994, HAQUE et al. 1997). A protozoonokat mikroszkópos vizsgálattal, bizonyos gyakorlat után (szín és nagyság alapján) megközelítő pontossággal lehetséges identifikálni (SOLTYS és GUPTA 1994, SOLTYS et al. 1996). Egyes protozoon fajok morfológiai ismeretén túlmenően a vizsgálati anyag mintavétele, a vizsgálat előkészítési módja határozzák meg (HEHL et al. 2000). A magas szenzitivitás mellett és egyidejűleg a morfológiailag nehezen elkülöníthető fajok differenciálási lehetősége miatt a mikroszkópos vizsgálat nehézkes, specificitása alacsony, mert nem alkalmas a patogén *E. histolytica*, az apatogén *E. dispar* és az *E. moshkovskii* megkülönböztetésére (PROCTOR 1991, LI és STANLEY 1996). Az *E. histolytica* trofozoitáinak vizsgálatban, a vörösvérsejtek jelenlétét a citoplazmában még mindig diagnosztikus értékűnek tekintik (STRACHAN et al. 1988; GONZALEZ-RUIZ et al. 1994).

#### 2.4.2 A protozoonok tenyésztési vizsgálata

A táptalajoknak tartalmazniuk kell mindazokat az anyagokat, amelyekre a protozoonoknak szüksége van, mivel maguk nem képesek ezeket szintetizálni. A tenyésztési eljárással, nagyobb mennyiségű leoltott vizsgálati mintából a kis számban jelenlévő parazita is kimutathatóvá válik.

- *Entamoeba* genus

Az első tenyésztési eljárását az *Entamoeba* fajoknak már 88 évvel ezelőtt kidolgozták. A tenyésztéses módszerek egyrészt lehetőséget teremtenek protozoonok különböző célra történő fenntartására és elszaporítására, másrészt ezen eljárások segítségével megoldható egyes fajok jelenlétének kimutatása (CLARK és DIAMOND 2002). Boeck és Drbohlav 1925-ben először vezették be az *E. histolytica* tenyésztéses módszerét, melyet ma is használunk. Ezt követően különböző táptalajok lettek kidolgozva, úgy, mint a Balamuth (BALAMUTH 1946) vagy a Jones táptalaj (JONES 1946) és a TYSGM-9 típusú táptalaj (DIAMOND 1982). A tenyésztéses eljárások lehetnek több fázisúak (szilárd és folyékony fázis), mint például a Boeck és Drbohlav által kidolgozott tojásos táptalaj és a Robinson táptalaj (ROBINSON 1968), de lehetnek egyfázisúak, mint a TYSGM-9 táptalaj.

Megkülönböztetjük az axenic tenyésztés fogalmát, amely egyetlen faj szaporodását jelenti. Ezt a fajta tenyésztési módszert Diamond érte el 1961-ben az *E. histolytica*-nál. Ezt követően pedig az egyfázisú TP-S-1 táptalaj került kidolgozásra az *E. histolytica* számára, hogy megkönnyítse a faj tanulmányozását laboratóriumi közegben (DIAMOND 1968). Jelenleg a TYI-S-33 (DIAMOND et al. 1978) és az Yi-S (DIAMOND et al. 1995) típusok a legszélesebb körben használt táptalajok ennél a protozoonnál.

*E. dispart* szintén lehet axenicusan tenyésztetni, de nehéz, mivel ezek nehezen növekszenek a tiszta tenyészetben (CLARK 1995), erre jelenleg a legalkalmasabb táptalaj az YI-S. (KOBAYASHI et al. 1998).

*E. moshkovskii* tenyésztésére a szakirodalom ajánlja a TTY-SB-t (DIAMOND 1968), a TP-S-1-GM (DIAMOND és BARTGI 1970), a TYI-S-33 táptalajt 24°C-os tenyésztési hőmérsékleten (DIAMOND et al. 1978) és a TYSGM-9, 24 °C vagy 37°C (DIAMOND 1982).

A humán diagnosztikában az *E. histolytica* tenyésztéses eljárásának nincs jelentősége, mivel kevésbé érzékeny, mint mikroszkópos módszer és nagy költségekkel jár (CLARK és DIAMOND 2002), ezért nem ajánlatos a rutin vizsgálatokban.

- *Acanthamoeba* genus

Tenyésztéses vizsgálatoknak az a célja, hogy különböző mintákból ki lehessen tenyésztetni a axenicus protozoont. Az *Acanthamoeba* tenyésztésének sikeressége függ a jó mintavételtől. Az *Acanthamoeba* tenyésztéséhez leggyakrabban a PAGE agart (PAGE 1988) használják. A táptalajnak az az előnye, hogy nagyon könnyű axenicus törzset létrehozni. Az axenicus *Acanthamoeba* törzset ajánlatos a PYG vagy PPYG (NEFF 1957) táptalajon fenntartani. Több tanulmányban a táptalaj módosításról számoltak be a kutatók (JENSEN et al. 1970, DE JONCKHEERE 1980, GORDON et al. 1992, VISVESVARA és BALAMUTH 2007).

- *Giardia* genus

A *Giardia* genusnal a tenyésztés 1976-ban kezdődött el (MEYER 1976). A tenyésztés az volt, hogy az in vivo körülmények között könnyebben tudják megfigyelni és tanulmányozni a fajt (GILLIN és DIAMOND 1981, SMIT et al. 1982, ERLANDSEN 1989, FARTHING et al. 1983, MCINTYRE et al. 1986). A legelterjedtebb táptalaj a *Giardia* tenyésztésben a TYI-S-33, amely tartalmaz marhasavót, epesót, kazein kivonatot, élesztőkivonatot, ciszteint, dextróz-, vas-ammónium-citrátot és aszkorbinsavat is (KEISTER 1983).

### 2.4.3 A protozoonok immunszerológiai vizsgálata

A potozoon ellen a gazdaszervezet természetesen védőerőit állítja szembe. E védőerő forrásai mindazok a sejtek, amelyek a protozoon fajidegen fehérje anyagait (antigén) hatására specifikus ellenanyagokat termelnek. A vérkeringésbe jutó vagy a sejtekben maradó ellenanyagok az aktív védekezésben részt vevő sejtekkel együtt a szervezetbe behatoló protozoon megtelepedését megnehezítik, esetleg azokat el is pusztítják. Az immunszerológia vizsgálatnak alapja az antigén-

ellenanyag közötti kölcsönhatás, amelyeknek az a funkciója, hogy ez szolgálja a diagnosztikai eljárásoknál a protozoon meghatározást.

Számos protozoon fertőzés esetén, akár tüneti, akár tünetmentes formájában zajlik, az élő szervezetnek a vérben specifikus ellenanyagok képződnek. Az *E. histolytica* diagnosztikában ez inkább elterjedt, de az érzékenysége vitatott. ZENGZHU és munkatársai (1999) beszámoltak az immunszerológiai módszernek a 100% érzékenységről ALA (Amoebic Liver Abscess ALA) betegeknél, a Hue városba, Vietnámban már csak 82,6% érzékenységet állapították meg. A kapott eredményeket megerősítették real time PCR módszerrel (BLESSMANN et al. 2002, 2006, FOTEDAR et al. 2007). Ezen kívül az immunszerológiai vizsgálatoknak további nehézsége az, hogy nehéz eldönteni, hogy a fertőzés friss vagy átvészelt-e (CABALLERO-SALCEDO et al. 1994).

Legelterjedtebb szerológiai módszerek a protozoon diagnosztikában az Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), amikor specifikus antigénhez (Ag) kötjük a keletkezett antitestet (At), szigorúan meghatározott körülmények között (pl. hőmérséklet). Az agglutináció megléte igazolja a kórokozó jelenlétét a szervezetben. A vérben keringő protozoonnal szemben az emberi szervezet ellenanyagot termel, ezért, ha az ember savóját hígítva vizsgáljuk, megadhatjuk a fertőzés fokát. Például, végeztek egy tanulmányt *Giardia* fertőzötteknél, és azt állapították meg ELISA módszerrel, hogy jelenléte specifikus IgA és IgM a szervezetben, mert akadályozza a trophozoiták tapadását a nyálkahártyához (FARTHING és GOKA 1994).

Indirect Haemagglutination Assay (IHA), ha az állati vörösvérsejtek felszínét vonjuk be, pl. egér vérből nyert ellenanyaggal. Ha ehhez a rendszerhez más állatokban előállított egérintestek elleni ellenanyagot kevernek, az, vérrögök formájában kicsapódik, ezt a reakciót nevezik hemagglutinációnak (OHNISHI és MURATA 1997, WEINKE et al. 1990). A tanulmányok azt mutatják, hogy az antitestek títtere amoeba esetében évekig magas szintűek maradhatnak, így megkülönböztetni a jelenlegieket a múltbeli fertőzésektől nehéz (KROGSTAD et al. 1978, RAVDIN et al. 1990), és az érzékenységük alacsony mert (ZAMBRANO-VILLA et al. 2002, PARIJA és KHAIRNAR, 2005, ZEEHAIDA et al. 2009). Ezen kívül a IHA teszt gyártók csak a nagyobb mint 512 titert mondják specifikusnak és akkor is megerősítő vizsgálatot javasolnak.

Western-blot (WB), specifikus fehérje antigének kimutatására használható molekuláris biológiai technika, amellyel az adott fehérje specifikus, mono- vagy poliklonális ellenanyag segítségével azonosítható. A megjelent tanulmányokban szerológiai pozitív betegeket vizsgáltak WB módszerrel (TAYLOR és WENMAN 1987, JANOFF et al. 1989, SOLIMAN et al. 1998), de nem terjedt el a módszer csak néhány protozoonnál, mint például *Toxoplasma*. Így a *Giardia* is hasonló molekulatömegű fehérjeit azonosították számos különböző mintában: savóban, a bélváladékban és nyálban az embereknél és állatoknál egyaránt (REINER és GILLIN 1992, HEYWORTH és VERGARA 1994, ROSALES-BORJAS et al. 1998, YANKE et al. 1998; HASAN et al. 2002). Az elemzés azonban az

mutatta, hogy nem lehet közvetlenül értékelni WB módszerrel, mert egy adott sávban több fehérje is található (PALM et al. 2003).

#### 2.4.4 A protozoonok izoenzim vizsgálata

Elsőként, izoenzim vizsgálatot Multi Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE) Sargeant és munkatársai alkalmaztak az *Entamoeba* tenyészetben, amely lehetővé tette az *Entamoeba* faji megkülönböztetését (SARGEANT et al. 1978). Ez a módszer lehetővé tette egy nem belülről több faj azonosítását, amelyeket csoportokba osztották (SARGEANT et al. 1987), összesen 24 különböző zymodemet írtak le, amelyek közül 21 humán izolátum volt (9. *E. histolytica* és 12 az *E. dispar*). E módszernek az érzékenységről szintén jelentek meg tanulmányok, ahol leírták, hogy a keményítő jelenléte a közegben befolyásolja a zymodemekeket (GATHIRAM et al. 1987, BLANC és SARGEANT 1991, JACKSON és SUPARSAD 1997).

A zymodem vizsgálat hátránya az, hogy nagyon nehezen kivitelezhető. Hosszú folyamatból áll, amely az amoeba tenyésztésen alapszik, mivel nagyszámú sejt szükséges az enzim vizsgálatához. Az izoenzim láthatóvá tehető az ún. aktivitás-festés technikával, mivel az enzimreakció működése során oldhatatlan színes termék keletkezik a gélben, ott ahol a kérdéses fehérje található. Ez a folyamat azonban nem mindig sikeres. Ennek következtében, sok amoeba tenyészetben az izoenzim elemzések negatívak lettek, annak ellenére, hogy a mikroszkópos székletminták pozitívak. (GONZALEZ-RUIZ et al. 1994, STRACHAN et al. 1988). Így az izoenzim vizsgálatot most már inkább molekuláris módszerrel helyesítik az *Entamoeba* vizsgálat esetében.

Az izoenzim vizsgálati módszert, a *Giardia* faj azonosítására is alkalmazták MELONI és munkatársai (1988), ahol összehasonlítottak az emberből és a macskaféléktől 30 *Giardia* izolátumot, amelyeket két csoportra osztottak. Az egyik csoport, azonos földrajzi helyről való emberi izolátumokat tartalmazott, a másik csoport, emberi és macska törzsekből vett izolátumokat a világ minden részéről. Továbbá, egy földrajzi helyen, CEDILLO-RIVERA és munkatársai (1989) végeztek izoenzim vizsgálatot 19 *Giardia* mintán. Összehasonlítva a tüneti és tünetmentes betegek mintáit, megállapították, hogy nem volt következetes zymodem különbség a tünetmentes és tünetekkel járó csoportok között. Hasonlóképpen, MOSS és munkatársai (1992) vizsgáltak 11 *Giardia* törzset 6 tünetekkel járó és 3 tünetmentes emberi mintán, valamint állatokból vett 2 mintán, különböző földrajzi helyekről. Megállapították, hogy a törzsek genetikailag ugyan különbözőek, de mutattak bizonyos közös jellemzést.



## 2.4.5 A protozoonok molekuláris biológiai vizsgálata

### 2.4.5.1 PCR reakció

A Science folyóiratban, 1985-ben hozta nyilvánosságra Mullis a munkatársaival az első gyakorlati kísérleteket (SAIKI et al. 1988). A PCR módszer metodikáját 1987-ben publikálták. Kezdetben *E. coli*-ból nyert DNS-polimerázt használtak. Ez a polimeráz hőérzékeny, ezért minden denaturációs lépés után újra kellett adagolni a reakciómixhez. Ezenkívül a polimerizáció 37°C-on zajlott, és ezen a hőmérsékleten sok melléktermék is képződött. 1988-ban, Saiki és munkatársai izoláltak a *Thermus aquaticus* baktériumból hőstabil DNS-polimerázt. Ezért hívják az azóta alkalmazott polimerázt Taq-polimeráznak. 1985-ben fejlesztették ki az első automatizált thermocyclert. Ma már nemcsak teljesen automatikusan működő PCR gépek állnak rendelkezésünkre, hanem egyéb továbbfejlesztett módszerek is, mint például a real-time PCR. A PCR, mint a legfontosabb felfedezés a molekuláris biológiában, az egész diagnosztikát forradalmasította, és néhány protozoon esetében felbecsülhetetlen értékű. A PCR feltalálásával olyan magas szenzitivitás érhető el, hogy elméletileg, akár egy DNS is kimutatható.

A protozoon PCR-nek a kidolgozását több tényező is indokolta:

- Morfológiai megkülönböztethetatlensége
  - Hazai szóródás lehetősége
    - Terápia hatékonyságának megállapítása
      - Gyors, specifikus módszer (PCR) beállítása.

A PCR vizsgálat célja, hogy a parazita jelenlétét azzal igazolja, hogy kimutatja a parazitára specifikus DNS jelenlétét (THOMPSON et al. 2000, Rivera et al. 2009, TAMURA et al. 2011). A PCR direkt kimutatási módszer, az élő és már elpusztult parazitát is képes kimutatni. Először, 1997-ben alkalmazták *Giardia* ciszták detektálására specifikus PCR-módszert (ABBASZADEGAN et al. 1997).

### 2.4.5.2 DNS szekvenálás

A szekvenáláson egy bizonyos DNS darab nukleotid, illetve bázisrendjének megállapítását értjük. Alapvetően a szekvenálást két eltérő elv alapján végezhetjük. Az egyik módszer szerint minden lehetséges, különböző hosszúságú DNS darabra elhasítják (MAXAM és GILBERT módszere szerint), vagy szintetizálják az összes lehetséges, különböző hosszúságú DNS fragmentumot a szekvenálandó DNS szakaszhoz komplementertként (SANGER módszere alapján). A Maxam-Gilbert módszerrel ellentétben, ahol a szekvenálandó DNS fragmentumot először izolálnunk és tisztítanunk kell, a Sanger módszerrel akár közvetlenül biológiai mintából is szekvenálhatunk. Ezért a Sanger-féle módszert, amelyet didesoxynukleotid módszernek is neveznek, használják az utóbbi években.

Kiindulási anyagként 1-10 $\mu$ g egyszálú DNS szükséges. Mivel a DNS duplaszálú, ezért először 95°C-on denaturálják. A DNS szekvenálás lépései a következők: DNS izolálás, PCR, szekvenáló - PCR, futtatás és detektálás gélelektroforézissel. A szekvenáló - PCR abban különbözik a hagyományos PCR reakciótól, hogy csak egy primert használnak. Teljesen ismeretlen próbaszekvencia esetén lehetőség van egy enzim segítségével, az ismert DNS darabot a próbába integrálni. A dezoxiribonukleosid - trifoszfátok (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) mellett csekély mennyiségű radioaktív foszforral jelölt didesoxynukleosid - trifoszfátokat (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) is adnak a rendszerhez. Amennyiben egy didesoxynukleosid - trifoszfát épül be a szálszintézis során, akkor a DNS polimeráz, a C3 atomról hiányzó OH csoport miatt, nem tudja folytatni a szintézist. Így, körülbelül 30 ciklus alatt az összes lehetséges hosszúságú DNS fragment szintetizálódik, a teljes hosszúságú komplementer szál. Ezután a kapott fragmentumokat gélelektroforézissel elválasztják egymástól. Így, mivel mindig az utolsó bázis a megjelölt, a szekvencia egy röntgenfilm segítségével leolvasható. Manapság már fluoreszcensen jelölt nukleotidokkal dolgoznak, ami a lézerdetektálási módszerrel együtt, teljesen automatizált szekvenálást tesz lehetővé.

#### 2.4.5.3 Filogenetika

Egyike a molekuláris biológiai módszerek legfontosabb alkalmazási területeinek a parazitológiában, a filogenetika (THOMPSON et al. 2004, WALOCHNIK et al. 2008). A modern filogenetika, molekuláris biológiai technikák alkalmazása nélkül, nehezen képzelhető el. Azáltal, hogy a szubjektíven értékelhető morfológiai ismertetőjegyek helyett, az organizmus génjeit hasonlítják össze, olyan organizmusok is vizsgálhatók, melyek a csekély nagyságuk, vagy a kevésbé jellegzetes morfológiai jellemzőik miatt nehezen voltak klasszifikálhatók (MONIS et al. 2009, NUPRASERT et al. 2010). Éppen a sok parazita filogenetikájának vizsgálata miatt, a molekuláris biológia nagy jelentőségű, mivel számos parazita, mint pl. a legtöbb protozoon, csak kevés ténylegesen specifikus morfológiai jellemzővel rendelkezik, és mivel éppen a paraziták, gyakran a parazitikus életmódhoz alkalmazkodva, nagyon redukált morfológiával és fiziológiával rendelkeznek. Azért, azt le kell szögezni, hogy egy ilyen filogenetikai fa, annak megfelelően, hogy milyen gén vizsgálatával készült, csak a filogenetikai viszonyok egy részét tudja valójában visszatükrözni.

## 2.5 Epidemiológia

A protozoon cysták, igen gyakran, a szennyezett víz fogyasztása révén jutnak a szervezetbe. A fertőzött ember (THOMPSON et al. 1994, ABBOUD et al. 2001) vagy állat (FAYER et al. 2001, STEIN et al. 2003, LASEK-NESSELQUIST et al. 2010) cystákat ürít, ezek bejutnak a felszíni vizekbe (HOXIE et al. 1996), akár direkt széklet-szennyezéssel, vagy szennyvízzel, vagy mezőgazdasági

vízkielvezésekkel (OROSZ et al. 2013). A cysták nedves, hűvös környezetben hónapokig fertőzőképesek maradnak. Nagy közösségre kiterjedő fertőzés törhet ki, ha a központi vízellátó rendszer fertőződik protozoon cystákkal (XIAO et al. 2008, FENG et al. 2011). Turisták (CAVALLO et al. 2007, HERBINGER et al. 2011) kezeletlen víz ivása révén is fertőződhetnek. A lakatlan területeken, a felszíni vizeket a vadállatok is beszennyezhetik, pl. a kis patakokat (VERWEIJ et al. 2003).

A legnagyobb probléma az, hogy élelmiszerben is találtak protozoon cystákat, így gyakori a fertőzés átvitele élelemfélékkel (ERICKSON és ORTEGA 2006). Élelmiszer eredetű protozoon átvitel előfordulhat pl. széklettel vagy talajjal szennyezett zöldséggel vagy salátával. A direkt fekáliis-orális átvitel is gyakori a gyermekközösségekben. Népes területek, elégtelen higiénés állapota különleges kockázatot jelenthet. Fejlődő országokban, de a fejlett országok szegényebb területein végzett vizsgálatok is jól alátámasztják ezt (HAQUE et al. 1997, BLESSMANN et al. 2002). Szexuális úton is átvihető a protozoon, vagyis orális-anális kontaktussal járó közösülés, szintén oka lehet ennek (PETERS et al. 1986, JOKIPII et al. 1989).

A molekuláris epidemiológiában, biokémiai és molekuláris biológiai technikákat alkalmaznak a kórokozó genetikai variabilitásának meghatározására, a fertőző betegségek ellenőrzésére és az epidemiológiai összefüggések tisztázására (SAKLATVALA 1993). A genetikai és a környezeti faktorokat is figyelembe veszik a kapcsolódó statisztikai módszerekkel. Végül, a molekuláris tipizálással és a patogenitás kutatásával, a kórokozó hatóanyag rezisztenciájának megállapításával, valamint a népesség rizikócsoportjainak megállapításával a fertőző betegségek optimális terápiája és megelőzése a cél (MAGLIANO et al. 2012, HEREDERO et al. 2012, SIDDIQUI et al. 2012). Például, 1993-ban, a Milwaukee-i *Cryptosporidium* járvány esetén, amely 400 ezer embert érintett (FOX és LYTLE 1996), molekuláris epidemiológiai vizsgálatokkal tisztázható volt, hogy minden érintett személy ugyanazzal a *Cryptosporidium* törzssel volt fertőzött, és ez a törzs antropogén szennyezés útján került az ivóvízbe (HOXIE et al. 1996).

## **2.6 Protozoon faji szintű meghatározása, identifikálása**

### **2.6.1 Új protozoon fajok leírása**

Számos faj jelentős genetikai diverzitással rendelkezik, amelyet a betegség kitörését okozó törzs tipizálásánál fel lehet használni. Egyrészt, a PCR segítségével parazita génszekvenciák kis mennyiségben is kimutathatóak, másrészt, a szekvenálás segítségével nagymértékű specifitás érhető el (MONIS et al. 2009, MAGLIANO et al. 2012). Ezen a módon a fertőzési lánc mindhárom tagja, a kórokozó, a vektor és a gazda is pontosan identifikálható, a létrejövő járványok tisztázhatók, és a fertőző betegségek felügyelhetők.

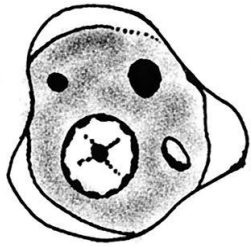

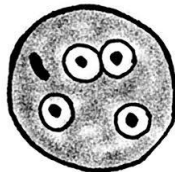
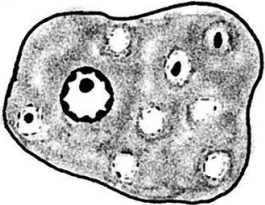
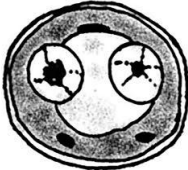
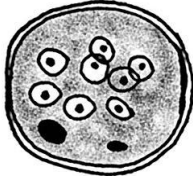
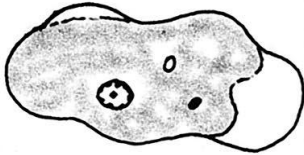


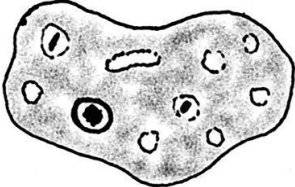
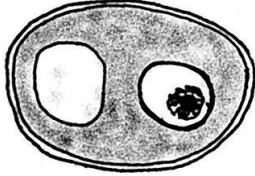
Egy következő kérdéskör, a genetikai variabilitás és a biológiai diverzitás közti összefüggés. Például, az még mindig tisztázatlan, hogy a *Trypanosoma brucei gambiense*, a nyugat-afrikai álmokör okozója, a *Trypanosoma brucei rhodesiense*, a kelet-afrikai álmokör okozója és a *T. brucei brucei*, a szarvasmarha tripanosomózis okozója, valójában ugyanabba a filogenetikai csoportba tartozik-e. A következő nagy figyelmet igénylő az *E.histolytica* virulenciának a kérdése, amelynek megértésében, sok kutatás történik ugyan, de még mindig vannak nyitott kérdések (WILSON et al. 2012).

### 2.6.2 *Entamoeba* genus

*Entamoeba* genusba 6 species található: *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. coli*, *E. hartmanni* és *Iodamoeba buetschlii* (CLARK 1998, GARCIA és BRUCKNER 1997, 1999, HAQUE et al. 1998, LEBER és NOVAK 1999). A fent felsoroltak közül csak az *E. histolytica* patogén, a többi apatogén (PETRI és SINGH 1999, FRITSCHÉ és SMITH 2001). Nagyon ritkán a *Iodamoeba buetschlii* is okoz emberi megbetegedést (PETERS et al. 1986, JOKIPII et al. 1989). 1993-ban újradefiniálták az *Entamoeba* fajt, biokémiai, immunológiai és genetikai alapon: két, morfológiailag megkülönböztethetetlen, de genetikailag eltérő faj létezik *E. histolytica*: az invazív intesztinális és extraintesztinális amoebosis okozója, amely patogén és *E. dispar* intesztinális egysejtű, amely nem patogén (TANNICH et al. 1989, CLARK és DIAMOND 1991, 1993, DA SILVA et al. 2003, QVARNSTROM et al. 2005).

Igy, az 1997. évi WHO rendelet szerint, ha a humán diagnózist csak mikroszkópos vizsgálattal állítják fel, akkor a két speciesnek megkülönböztethetlensége miatt, úgy kell jelenteni az epidemiológiai állomásoknak, mint *E. histolytica* / *E. dispar*. Korábban, minden *Entamoeba* fertőzést *E. histolytica*-ként jelentettek be, ezért jelentősen túlbecsülték a kórokozó prevalenciáját (WHO 1997).

2.sz. táblázat. A bél *Entamoeba* spp. morfológiai jellemzői  
(forrás: <http://cmr.asm.org/content/16/4/713.full.pdf+html> )

Organism	Trophozoite	Precyst	Cyst
<i>E. histolytica</i> <i>E. dispar</i> <i>E. moshkovskii</i>			
<i>E. coli</i>			
<i>E. hartmanni</i>			
<i>I. bütschlii</i>			

#### 2.6.2.1 *Entamoeba* spp. morfológiája

##### – *Entamoeba histolytica*

Az *E. histolytica* fajt, Les 1875-ban írta le, SzentPéterváron, Oroszországban, és Fritz Schaudinn 1903-ban nevezte el (SAKLATVALA 1993). Phagocytosis útján táplálkozik, álláb segítségével mozog, ivartalanul szaporodik. Két megjelenési formája ismert: a mozgó, táplálkozó, szaporodó trophozoita 12-17 $\mu$ m (1.ábra.A), valamint a kedvezőtlen környezeti tényezők hatására kialakuló, erős fallal körülvett cysta 10–15  $\mu$ m (1.ábra.B).

– *Entamoeba dispar*

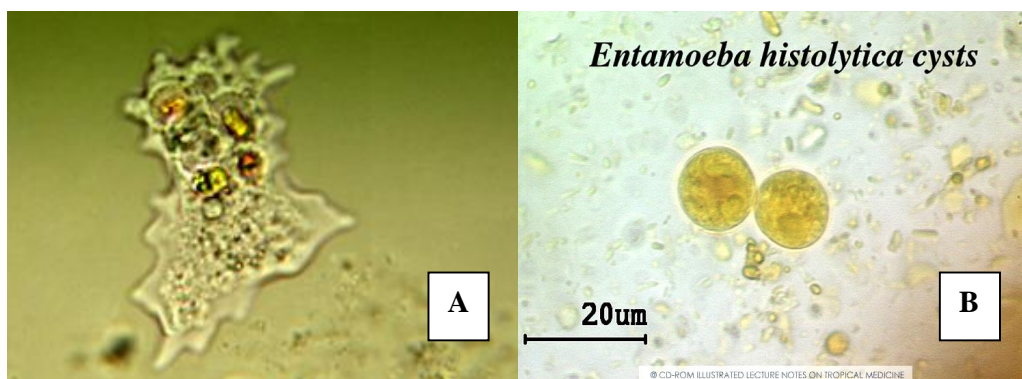
1925-ben, Brumpt elsőként megfogalmazott egy elméletet, ami szerint az *E. histolytica* morfológiailag megegyezik még egy fajjal. A két faj közül az *E. histolytica* patogén (ami képes invazív megbetegedéseket okozni), az *E. dispar* apatogén (ami soha nem okoz betegséget). Ezt a feltételezést akkoriban elutasították. 1993-ban, széles körű genetikai, immunológiai, biokémiai elemzések mégis alátámasztották (STAUFFER et al. 2003; TANYUKSEL et al. 2003).

Indiában, Parija és Khairnar (2005) munkájukban leírták, hogy az *E. dispar* *E. moshkovskii* okozhat enyhe gasztrointesztinális panaszokat (PARIJA és KHAIRNAR 2005), továbbá a vörösvérsejtek jelenléte az *E. dispar*ban csökkentette a mikroszkópos érzékenységet (HAQUE et al. 1995). Az *E. dispar* laboratóriumi körülmények között tanulmányozták, és szintén megerősítették, hogy a trofozoita képes bekebelezni a vörösvérsejteket (TRISSEL et al. 1978).

– *Entamoeba moshkovskii*

Az *Entamoeba* nemzetséghez tartozó *E. moshkovskii* morfológiailag megegyezik az *E. histolytica*-val és *E. dispar*. Először, Tshalaia 1941-ben írta le a szennyvízben az *E. moshkovskii*-t, és ezt követően több országból jelezték a faj létezését a folyók és tavak üledékében (CLARK és DIAMOND 1991).

2.sz. táblázat. TANYUKSEL és PETRI (2003) közleményükben bemutatják, hogy a mikroszkópos detektálás - szenzitivitása alacsony, mert nem alkalmas a patogén *E. histolytica* és az apatogén *E. dispar* vagy *E. moshkovskii* megkülönböztetésére (azért alkalmaztam ezt a táblázatot, mert ez reprezentálta leginkább a valóságnak megfelelő eredményeket).



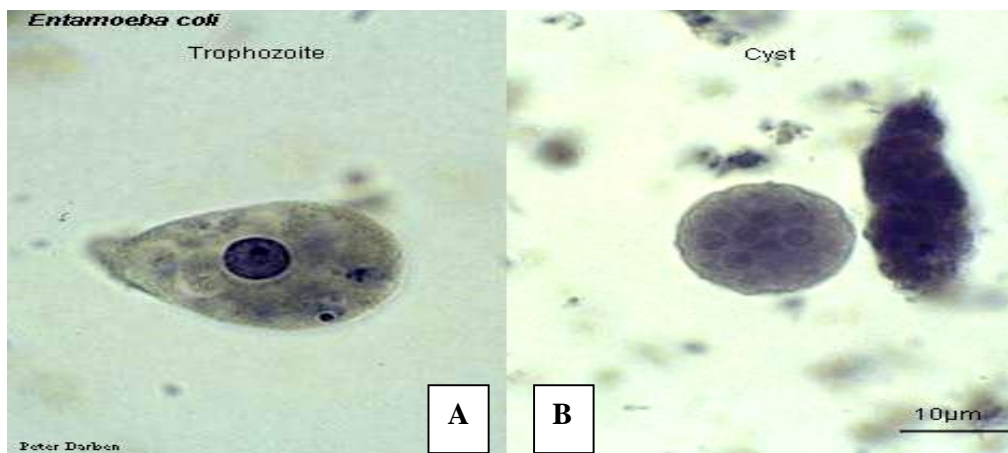
1.ábra. *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* vagy *Entamoeba moshkovskii* –trophozoite (A) és cysták (B)

– *Entamoeba coli* (Grassis, 1879)

Az *E. coli* apatogén, a második a leggyakrabban előforduló *E. histolytica*/ *E. dispar* után. Két megjelenési formája ismert:

A trophozoita 20-40 $\mu$ m (2.ábra.A) mozgó, szaporodó, táplálkozó, az endo- és ectoplasma különválása nem mindig észlelhető. Plazmájában lehet látni fagocitált szemcséket, vakuólákat és mag periferiás kromatinú a benne lévő magvacskák durvák, excentrikus elhelyezkedéssel. A trophozoita mozgása nagyon lassú, kifinomult (MILCH és JANKÓ 1990).

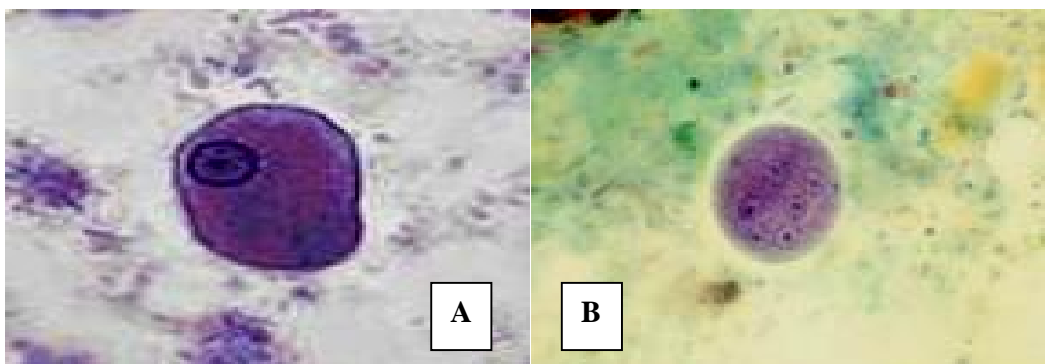
A cysta 15–30  $\mu$ m (2.ábra.B) erős fallal körülvett, amelybe magok száma általában négyenél több, rendszerint nyolc.



2.ábra. *Entamoeba coli* –trophozoita (A) és cysta (B)

– *Entamoeba hartmanni*

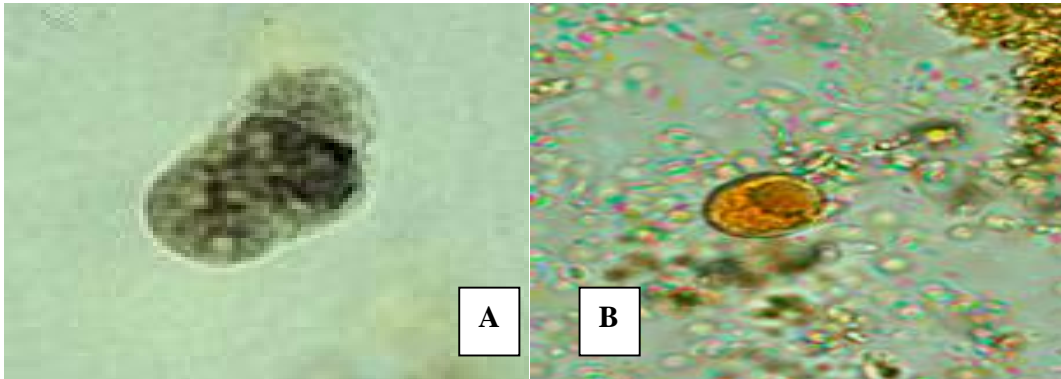
Ahogy az előzőknek, szintén két megjelenési formája ismert: a mozgó, táplálkozó, szaporodó trophozoita 10-15 $\mu$ m (3.ábra.A), és cysta 7-10 $\mu$ m (3.ábra.B). Apatogén, teljesen ártalmatlan, és még az immunkárosultaknál sem okoz megbetegedést.



3.ábra. *Entamoeba hartmanni* –trophozoita (A) és cysta (B)

– *Jodamoeba büttchli* (Prowazek, 1911)

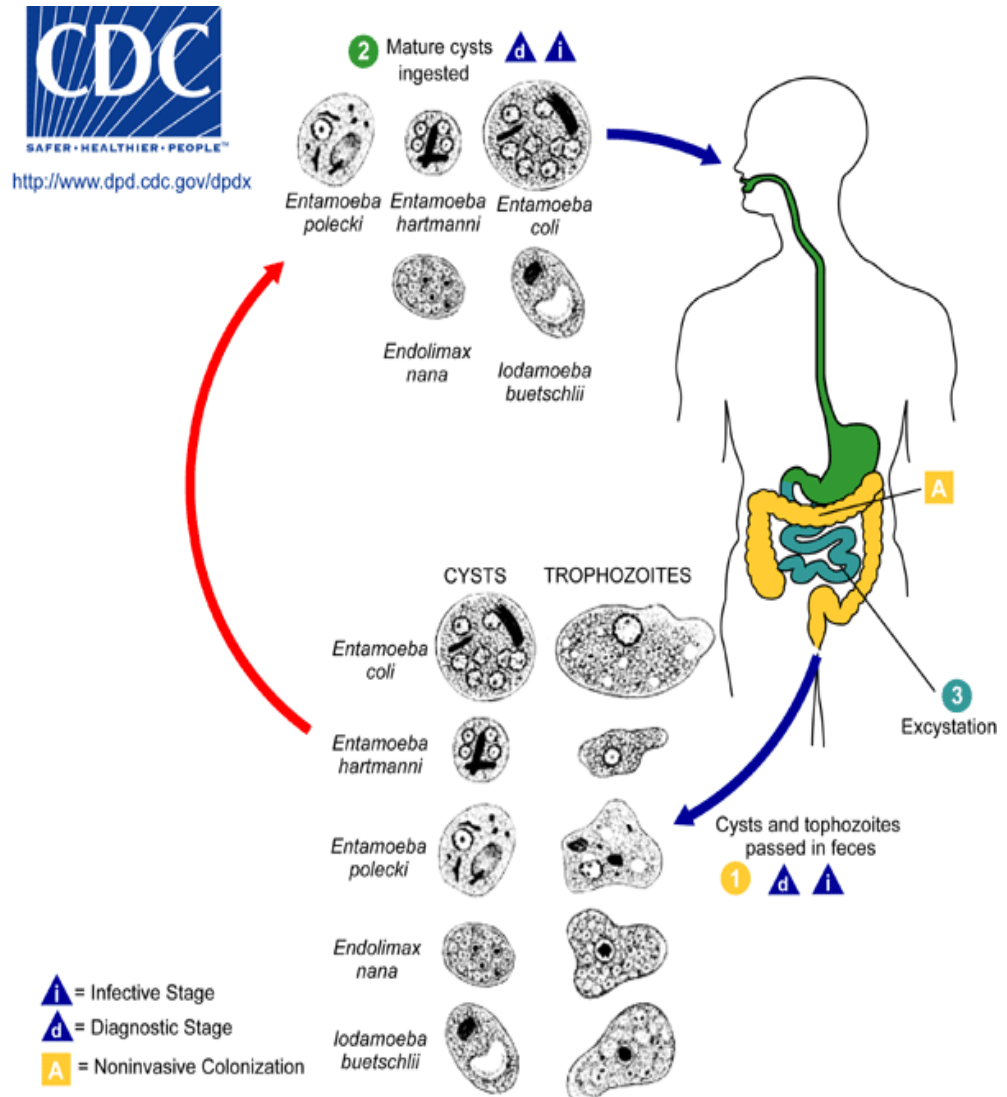
A vastagbélben élősök, apatogén trophozoita 10-20 $\mu$ m (4.ábra.A), hólyagos magjának hártáját a nagy nucleolussal, finom kromatinküllök kötik össze. Trophozoita mozgása progresszív jellegű, a plazmájában rendszerint éles szélű, glikogént tartalmazó vakuola látható, amely Lugol oldattal sötétbarnára festődik. A cystának 7-15 $\mu$ m (4.ábra.B) egy vagy két magja van, és mindig lehet látni a nagy glikogén vakuolát, amely Lugol oldattal sötétbarnára festődik (MILCH és JANKÓ 1990).



4.ábra. *Jodamoeba büttchli* –trophozoita (A) és cysta (B)

*Entamoeba* genusba tartozó ábrákon (1A,B; 2A,B; 3A, B; 4A,B), lehet tanulmányozni a CDC honlapon a specioseket (azért alkalmaztam az ábrákat, mert ez reprezentálta leginkább a valóságnak megfelelő eredményeket, források: <http://en.wikipedia.org> <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/IntestinalAmebae.htm>).



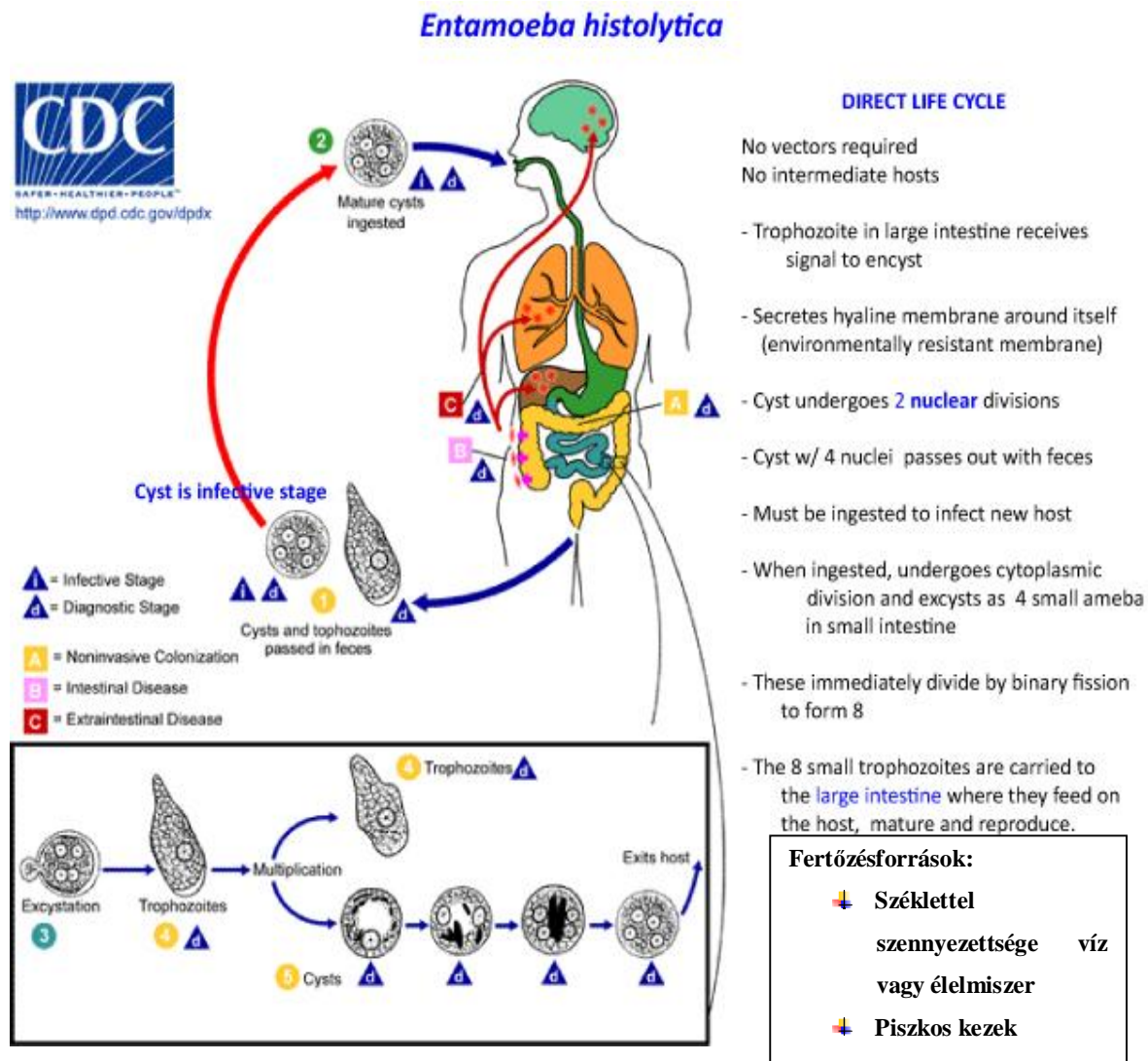
2.6.2.2 *Entamoeba* spp. életciklusa5. ábra. *Entamoeba* életciklusa (forrás: <http://en.wikipedia.org>)

Az *Entamoeba* spp. fertőzésforrások: a széklettel szennyezett víz vagy élelmiszer és a piszkos kezek (azért alkalmaztam ezt az 5 ábrát, mert ez reprezentálta leginkább a valóságnak megfelelő eredményeket).

2.6.2.3 *Entamoeba histolytica* életciklusa

A lenyelt cystákat (HAQUE et al. 2003) a gyomorsav nem károsítja, így könnyen bekerülnek a vékonybélbe, ahol trophozoittá alakulnak. A béltartalommal sodródva eljutnak a vastagbélbe, ahol megtelepednek a nyálkahártya felszínén, a galaktóz adhezinként ismert galaktóz N-acetyl-D-galaktózamint kötő lektin segítségével, majd szövetkárosító enzimekkel és fehérjékkel lizálják a nyálkahártya sejtjeit, a bélfalat, vastagbélgyulladást (colitis) okozva. Ez kezdetben ödémával és

tályogokkal jár, majd a nekrozis(szövetelhalás) következtében jellegzetes, mély, palack alakú fekélyek alakulnak ki.



6. ábra. *Entamoeba histolytica* életciklusa (forrás: <http://en.wikipedia.org>)

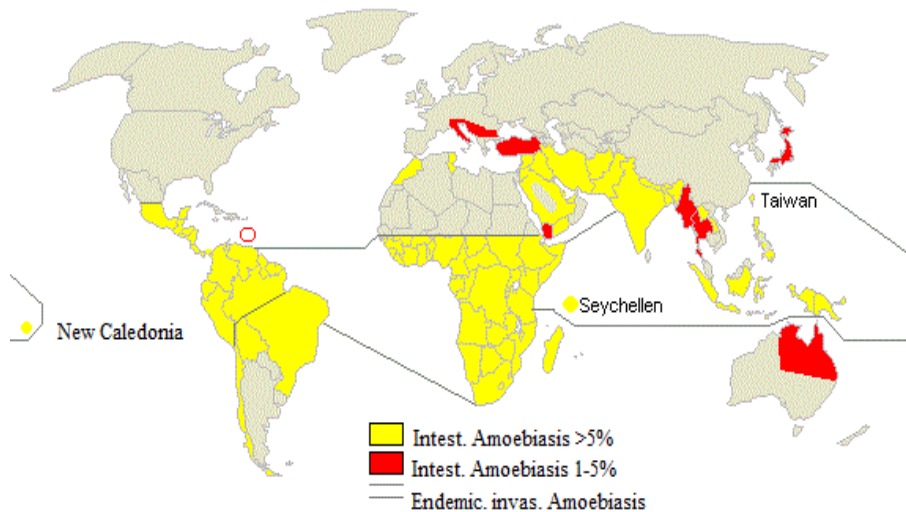
Az *E. histolytica* által okozott amoebiasis elsősorban a trópusi és mediterrán területeken jellemző (CAVALLO és GARRABÉ 2007, HERBINGER et al. 2011), egy invazív protozoon az emberi szervezetbe jutva okoz életveszélyes intestinalis és extra-intestinalis megbetegedést. Az extra-intestinalis formájában megtámadhatja a májat (HOFFNER et al. 1999, ACUNA-SOTO et al. 2000), a tüdőt és egyéb testi területekre is behatolhat, átjutva a bélnyálkahártya gáton (BADALAMENTI et al. 1999).

A patogén *E. histolytica* leggyakrabban mosatlan kézzel, cystákkal szennyezett vízzel, emberi széklettel szennyezett gyümölcssel, vagy orális-anális szexuális érintkezéssel (PHILLIPS et al. 1981, QUINN et al. 1981) kerül be az emberi szervezetbe.

2.6.2.4 *Entamoeba* spp. környezete

Az *Entamoeba* genusba tartozó *E. histolytica* esetében még ma sincs kialakult, egységes elképzelés az előfordulási lehetőségekről. 1997-ben, Mexico Cityben, elsősorban azért került sor fontos megbeszélésre, mert korábban minden *Entamoeba* fertőzést *E. histolytica*ként jelentettek be, ezért jelentősen túlbecsülték a kórokozó prevalenciáját (WHO 1997). Először is, ha összehasonlítjuk az 5. ábrát a 6. ábrával, látni lehet, hogy csak az *Entamoeba histolytica* okoz komoly megbetegedést az embernél, másodsor, mikroszkópos úton nem lehet megkülönböztetni a patogén *E. histolytica*t és az apatogén *E. dispar* egymástól, mert az rRNS-k akár 98%-ban megegyeznek (DIAMOND és CLARK 1993), de ezek teljesen más virulencia potenciáljukat in vivo (QUE és REED 2000). Azért alkalmaztam ezeket az ábrákat, mert ezek reprezentálták leginkább a valóságnak megfelelő eredményeket. A trópusi és a szubtrópusi területek endémiásak, évente kb. 50 000 000 ember fertőződik meg *E. histolytica*-val, és a kialakuló betegség évente 40 000 – 100 000 halálesetet okoz (DEBNATH et al. 2012) 7.ábra. A széklettel ürülő *E. histolytica* cysták életképesek maradnak a talajon, akár 8 napon keresztül, 28-34°C hőmérsékletnél. Viszonylag ellenáll a klórnak, ahhoz hogy elpusztítsuk 99,9 %-ban az *E. histolytica* cystákat, az ivóvízben 2-3mg/l Cl<sup>-</sup> szükséges (CLARK et al. 1989).

Cabrera és Porter (1958) megállapította, hogy az *E. histolytica* in vivo törzseinek legkedvezőbb tenyésztési hőmérséklete 41,0 és 41,3°C közt volt, és a minimális volt 32,0, és 31,7°C között. Endémiás területeken, a sertésben és a majomban szintén leírták a protozoont (VERWEIJ et al. 2003)



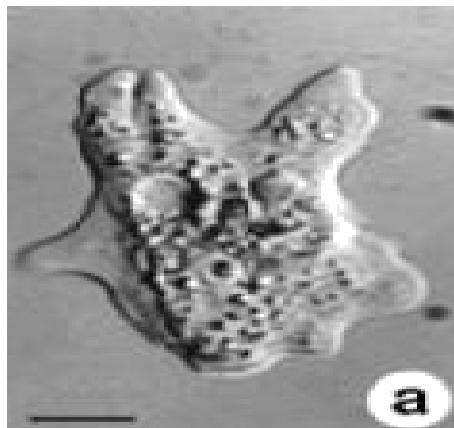
7.ábra. *Entamoeba histolytica* előfordulása  
(forrás: <http://www.med1.de/Laien/Krankheiten/Tropen/Amoebiasis/>).

Egyes kutatók véleménye szerint, a patogén *Entamoeba histolytica* törzsek csak trópusi vagy szubtrópusi klíma alatt fordulnak elő (CLARK és DIAMOND 1991, SILBERMAN et al. 1999, DEBNATH et al. 2012), míg a mérsékelt égöviek apatogének *E. dispar* (VÁRNAI 1987, HUSTON és PETRI 1999). Hazánkban, elsősorban az endémiás területekről érkező turisták és bevándorlók hurcolják be (OROSZ et al. 2012). A széklettel szennyezett gyümölcs, zöldség vagy az italban lévő cysták elfogyasztása során történik a fertőzés. (IDOWU ÉS ROWLAND 2006). Az akut hasmenésben szenvedő beteg sok cystát ürít ( $5 \times 10^7$  naponta).

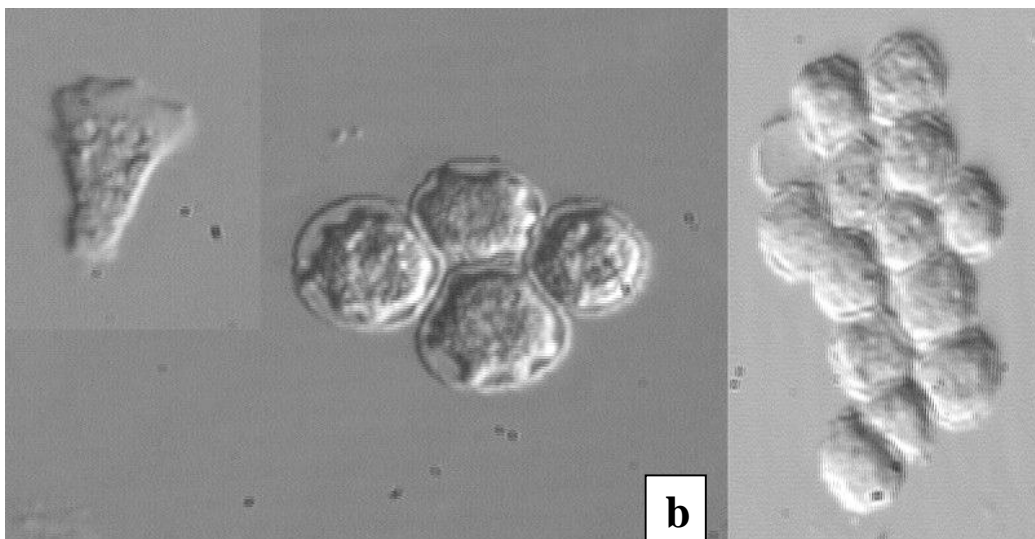
### 2.6.3 *Acanthamoeba* genus

#### 2.6.3.1 *Acanthamoeba* spp. morfológiája

Az *Acanthamoeba* genus tagjai a leggyakoribb szabadon élő amoeba fajok, amelynek a felszíne tüskés, és mozgása lassú a többi amoebához képest. Az *Acanthamoeba* trophozoita finom, kihegyesedő cytoplasmaticus nyúlványokat képez, amelyet acanthopodianak neveznek, és átlagos átmérője 25-40  $\mu\text{m}$  (8. ábra.a) és cystája 15-28  $\mu\text{m}$  kettős falú (8. ábra.b), csillagszerű formájú; mind a trophozoita, mind a cysta egymagvú, nagy centrálisan elhelyezkedő nucleolussal, azért alkalmaztam ezeket az ábrákat, mert ezek reprezentálták leginkább a valóságnak megfelelő eredményeket (LIU et al. 2005).



8. ábra.a. *Acanthamoeba* trophozoita (forrás <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/11278>)

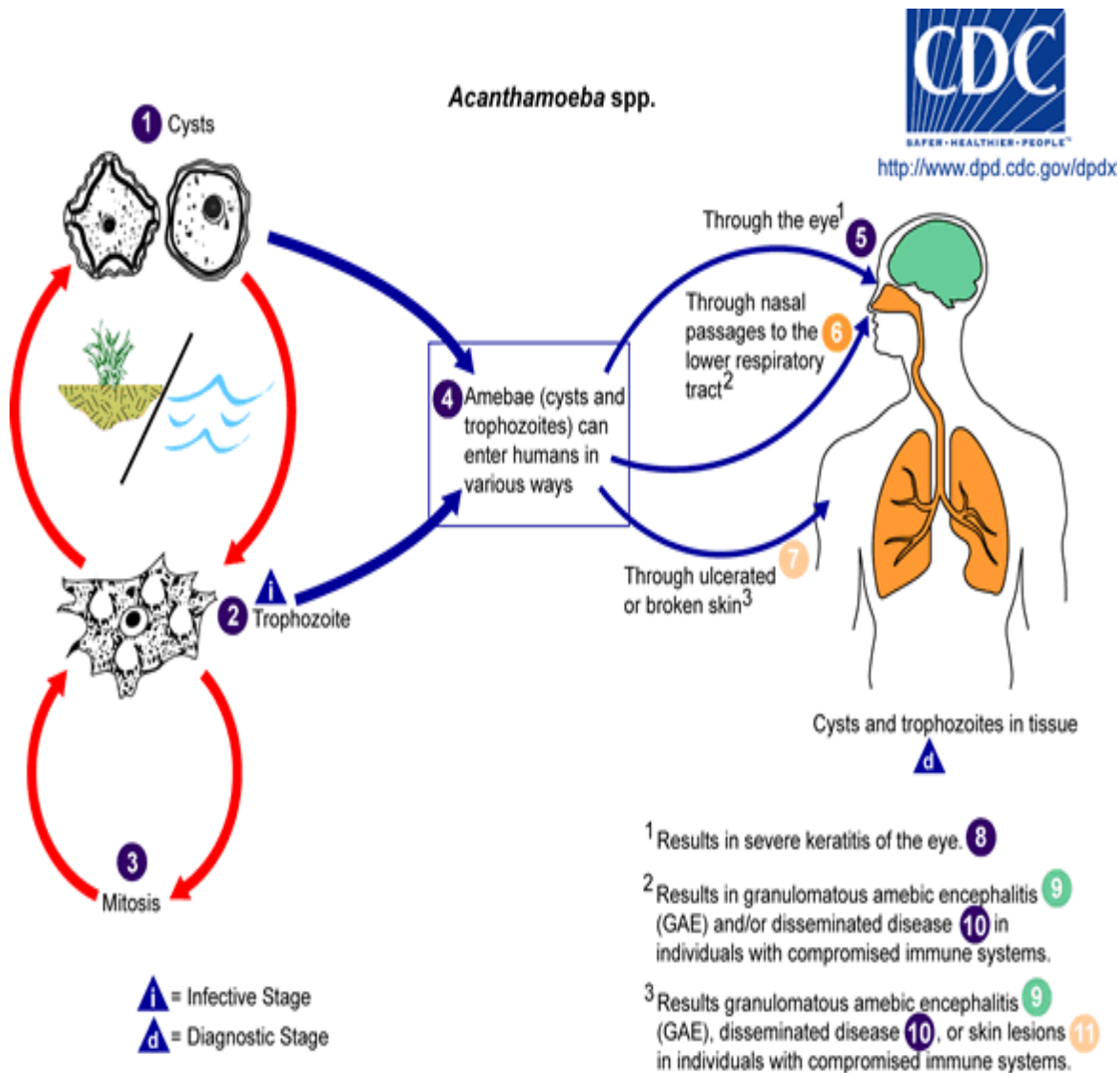


8. ábra.b. *Acanthamoeba* cysták (forrás [www.google.com/Acanthamoeba](http://www.google.com/Acanthamoeba) cyst)

Az *Acanthamoeba* genus jelenleg számos különböző speciesből áll:

*A. astronyxis\**, *A. castellanii\**, *A. comandoni*, *A. culbertsoni\**, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti\**, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. keratitis\**, *A. lenticulata*, *A. lugdunensis\**, *A. mauritaniensis*, *A. palestinensis\**, *A. pearcei*, *A. polyphaga\**, *A. pustulosa*, *A. quina\**, *A. rhysodes\**, *A. royreb*, *A. terricola* (\*jelöltek emberi megbetegedést okozhatnak).

### 2.6.3.2 *Acanthamoeba* spp. életciklusa



9. ábra. *Acanthamoeba* életciklusa (forrás: <http://en.wikipedia.org>)

*Acanthamoeba* specioseknek a környezetben kétféle biológiai formájuk van: cysta (9. ábra, 1) és trophozoita (9. ábra, 2). Az trophozoita a környezetben szaporodik sejtosztódással (9. ábra, 3.) (mitózissal). A fertőző forma a trophozoita, amely szaporodik, mozog és táplálkozik. A cysta tehát

nyugalmi állapotban nem mozog, de amikor belekerül a gazda szervezetbe szintén trophozoitává alakul. Behatolás előfordulhat a szemén (9. ábra, 5), az orrjáratokon (9. ábra, 6) vagy fekélyes vagy sérült bőrön (9. ábra, 7) keresztül (9. ábra), azért alkalmaztam az ábrát, mert ez reprezentálta leginkább a valóságnak megfelelő eredményeket.

### 2.6.3.3 *Acanthamoeba* spp. környezete

Az *Acanthamoeba* spp. a környezetünkben mindenütt megtalálható. Természetes vizekben, édesvízi tavakban, úszómedencék termálvizében és a talajban, ahol mind élni és szaporodni is képesek (PAGE 1988, SAYGI et al. 2000, TSVETKOVA et al. 2004, KILVINGTON et al. 2004, LIU et al. 2006, JEONG et al. 2007, ALVES et al. 2012).

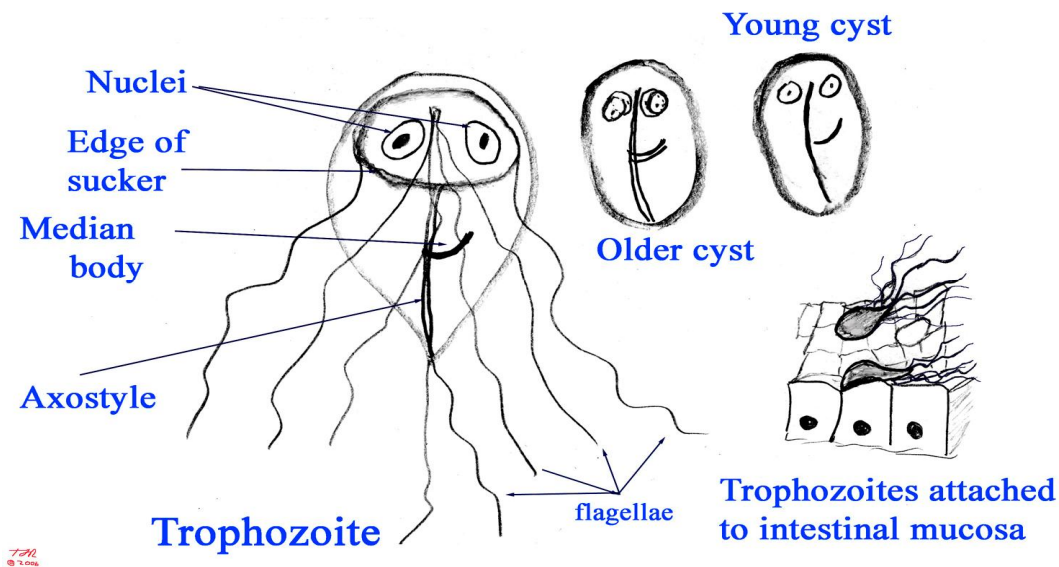
*Acanthamoeba* genus-nak morfológiai alapon történő elkülönítése nem lehetséges, csak genetikailag (KHAN et al. 2002, HEWETT et al. 2003). Amikor, biokémiai és immunológiai megvizsgálták az *Acanthamoeba* spp-t, akkor kiderült, hogy rendelkeznek Hsp70 fehérjével (LYASHKO et al. 1994), amely segítségével az *Acanthamoeba* könnyen képes alkalmazkodni a környezeti hőmérséklet-változásokhoz (PODLIPAEVA 2001, PLEKHANOV et al. 2006, PODLIPAEVA et al. 2006, PODLIPAEVA et al. 2008). Számos közlemény jelent meg a szabadon élő amoeba-ról. Ezek szerint képesek megőrizni az életképességet cysta formájukban, több évtizeden keresztül is, mind fagyasztott, mind kiszáradt állapotban, a jégben a Grönlandi- és a Balti-tengerekben (SHATILOVICH et al. 2005), a száraz talajmintákban (PAGE 1988, KILIC et al. 2004, REZAEIAN et al. 2008).

## 2.6.4 *Giardia* genus

A *Giardia* volt az elsőként megvizsgált emberi parazita - protozoont 1681-ben látta meg először Antonie van Leeuwenhoek (DOBELL 1920, 1932). 1859-ben az első pontos leírást Lambl adta (LAMBL 1859), ebből kifolyólag sokan még ma is használják a *Giardia lamblia* elnevezést. A hasmenéssel való oki összefüggését több kutató gyanította a 20. század első felében, de a protozoonnak és a hasmenésnek szoros oki összefüggését csak 1954-ben bizonyította be Rendtorff. Az utóbbi években a különböző gének kutatása és a teljes genom szekvenálások számos protozoon esetében messze előrehaladtak, miáltal új lehetőségek nyíltak még a *Giardia* biológiájában, diagnosztikájában és ellenőrzésükben. Mindenekelőtt az epidemiológiában, új antiparazita szerek, és oltóanyagok kifejlesztésénél (OLSON et al. 2000, STEIN et al. 2003) is a molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával (WEISS et al. 1992) új lehetőségek nyíltak.

### 2.6.4.1 *Giardia intestinalis* morfológiája

*Giardia* ostoros egysejtű, két formája ismert: a körte alakú trophozoita (10-20  $\mu\text{m}$  hosszú, 5-15  $\mu\text{m}$  széles és 2-4  $\mu\text{m}$  vastag) és az ovális cysta 10-15  $\mu\text{m}$  (HEYWORTH, 1996).



10. ábra. *Giardia intestinalis* trophozoita és cysták

(forrás: [http://cal.vet.upenn.edu/dxendopar/parasitepages/protozoa/g\\_lambliia.html](http://cal.vet.upenn.edu/dxendopar/parasitepages/protozoa/g_lambliia.html))

A trophozoita körte alakú, felső szélesebb részében helyezkedik el a 2 mag. A másik oldalon található a szívókorong, amelyek segítségével vékonybél falához tud tapadni. Középen húzódik a merevítőköteg, az axostyl, 4 pár ostora van, melyek a blepharoblastból indulnak ki. Cystás alakjában is megtalálható az axostyl, valamint kettő (young cyst) vagy négy (older cyst) sejtmag (azért alkalmaztam a 10. ábrát, mert ez reprezentálta leginkább a valóságnak megfelelő eredményeket).



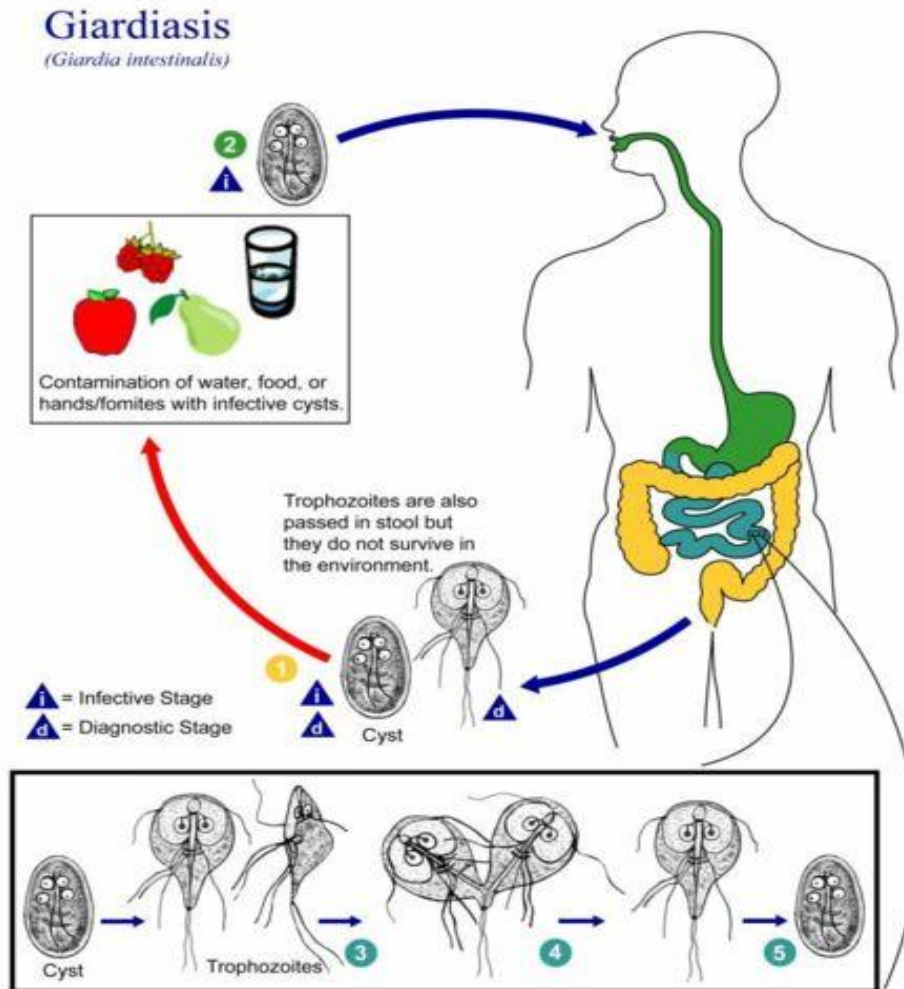
A *Giardia*-nak jelenleg öt speciese ismert, amelyet a morfológiai jellemzők alapján, de gazda-specificitás alapján sokkal több változatukat írtak le. A hat species a következő: *G. intestinalis* (elsőként Davaine leírta 1875-ben, az emlősökben, az embert is beleértve), *Giardia agilis* (elsőként Kunstler leírta 1882-ben, a kétélűekben), *Giardia muris* (elsőként Benson leírta, 1908-ban, a rágcsálókban), *G. psittaci* (elsőként leírta Erlandsen és Bemrick, 1987-ben, a madarakban), illetve *Giardia ardeae* (elsőként leírta Noller, 1920-ban, a madarakban) és *Giardia microti* (elsőként Benson leírta, 1908-ban, a rágcsálókban) (HEYWORTH 1994, 1996, THOMPSON et al. 2000, ADAM 2001). Leggyakrabban izolált faj a *G. intestinalis* az egész világon, amelynek hét genotípus-csoportja (A-H) ismert (MONIS et al. 2009). Az A és B csoportnak azért van nagy jelentősége, mert számos emlősökben, így az emberben is okoz megbetegedést (NASH et al. 1987, XIAO et al. 2008, SPRONG et al. 2009; ). A következő C, D, E, F, G és H csoportok leggyakrabban állatokban fordulnak elő (SZÉNÁSI et al. 2005, 2007, THOMPSON 2004, THOMPSON és MONIS 2004, APPELBEE et al. 2005), és nagyon ritkán okoz emberben a megbetegedést (SPRONG et al. 2009). Nemrég készült egy tanulmány, ahol a tengeri emlősöket vizsgálták, és új H-csoportot határozták meg (LASEK-NESSELQUIST et al. 2010).

3.sz. táblázat. *Giardia* fajokon belül a *Giardia intestinalis* csoport felsorolása és új species név ajánlása

Species	Genotípus	Ajánlott species név	Gazda
<i>G. intestinalis</i>	csoport A	<i>G. duodenalis</i>	számos emlős, beleértve az embert is
	csoport B	<i>G. enterica</i>	számos emlős, beleértve az embert is
	csoport C, D	<i>G. canis</i>	kutyák
	csoport E	<i>G. bovis</i>	patás állatok
	csoport F	<i>G. cati</i>	macskák
	csoport G	<i>G. simondi</i>	patkányok
	csoport H	-	tengeri emlősök
<i>G. muris</i>	-	-	rágcsálók
<i>G. agilis</i>	-	-	kétélűek
<i>G. microti</i>	-	-	rágcsálók
<i>G. ardeae</i>	-	-	gémfélék

A molekuláris módszerek fejlődésével egyre több protozoon válik ismertté. Monis és társai 2009-ben felajánlottak egy új rendszert, amelyet bemutatok, a 3.sz. táblázat.

#### 2.6.4.2 *Giardia intestinalis* életciklusa



11. ábra. *Giardia* életciklusa (forrás: <http://en.wikipedia.org>)

A cysták a bélsárral kerülnek a külvilágra, majd ha a fogékony ember vagy állat azt lenyeli, bekövetkezik a fertőződés (azért alkalmaztam a 11. ábrát, mert ez reprezentálta leginkább a valóságnak megfelelő eredményeket). A cysták épségben jutnak át gyomorsavon keresztül és vékonybélben egy cystából 2 trophozoit jön létre. A *Giardia* trophozoit a vékonybél kezdeti szakaszában, epicellulárisan található, ahol élősködik és szaporodik. Az optimális környezet a trophozoit szaporodáshoz pH 6,38-7,02 között van (HAIBA 1954). A gazdaszervezetből táplálékot von el, a szénhidrát, fehérje, zsír, A, D, K vitaminok és vas felszívódási zavarokat okozza (SOLOMONS 1982, LENGERICH et al. 1994, GARDNER ÉS HILL 2001). Különösen a zömében

vékonybélből felszívódó anyagok hiányát okozzák. Továbbá enteritis, máj és epebántalmak jelentkeznek (HELLARD et al. 2000). A tünetek elhúzódhatnak, fokozódhatnak, enyhülhetnek. Számos közleményben leírták a tünetmentes *Giardia* fertőzést is (MCGLADE et al. 2003, AL-MOHAMMED 2011, INABO et al. 2011).

#### 2.6.4.3 *Giardia intestinalis* környezete

A *G. intestinalis* cysták hűvös, nyirkos területeken maradnak fertőző képesek hónapokon keresztül, és gyorsan halmozódnak fel a környezetben (ALI et al. 2003). A talajon a cysták fertőzőképességet megőrzik 4°C-on, 49 napon keresztül, de elveszítik a fertőzőképességet 25°C-on, 7 nap után. Csapvízben a *G. intestinalis* cysták 56 napon keresztül fertőzőek maradnak 0- 4°C-nak és 14 nap-on keresztül, 20-28°C-on. Hasonló eredményeket szereztek tavak vízében: a túlélés 56 napjával, 0 - 4°C-on vagy 6-7°C-on, és 28 napig 17-20°C-on. A leghosszabb túlélést észlelték folyami vízben a 0- 4°C-on, 84 napig és 20-28°C-on, 28 napig. Tengerszintben a *G. intestinalis* cysták több mint 65 napon keresztül életben maradhatnak 4°C-nál. A tejtermékekben életben maradnak 114 napig. A *G. intestinalis* cysták elpusztulnak hideg hőmérsékleten: -13°C -tól és pár perces forralás esetén 100°C-on (ERICKSON ÉS ORTEGA 2006; FENG ÉS XIAO 2011).



### 3 ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1 Mintavétel

A munka során a célkitűzéseknek megfelelően, szakmai-tudományos munkát végeztem három ismert protozoonnal. A dolgozatban bemutatom az új módszereknek a kidolgozását és beállítását. A szakirodalomban szerzett információkat kiegészítve érzékenyebb módszereket fejlesztettem, amelyeknek az eredményét a 4. fejezetben mutatom be.

##### 3.1.1 Az *Entamoeba* sp. minták eredete

Az Országos Epidemiológiai Központba, a Parazitológia Osztályra 77 (75 széketminta és 2 májtályog) személytől vizsgálati minták érkeztek, feltételezett klinikai diagnózis importált *E. histolytica* fertőzés.

##### 3.1.2 Az *Acanthamoeba* spp. minták eredete

A kukorica és lucerna teszt növények a Növényvédelmi Intézet Ady-ligeti telepéről származnak.

- ❖ Az első mintavétel 2011. június 20-án 3 db. kukorica és 3 db. lucerna, amelyek a munkám során KUK1, KUK2, KUK3 és LUC1, LUC2, LUC3. elnevezést kapták.
- ❖ A második mintavétel 2012. május 21-én történt, ahol megvizsgáltuk az Intézetben az utak talaját, a gyeptalaját, az öntözőrendszert és a pocsolót. A minták Ut1, Ut2, Ut3, Gyept1, Gyept2, Gyept3, öntöző rendszer (öntözőrendszer-1liter víz bekoncentráva PVDF) és pocsoló (1liter víz).
- ❖ A harmadik mintavétel 2012.07.03-án az Intézetben, véletlenszerűen kinőtt lucerna egyedek és a P9494 kukorica, minták LUC4, LUC5, LUC6 és KUK4, KUK5, KUK6. elnevezést kapták.

##### 3.1.3 A *Giardia intestinalis* minták eredete

- ❖ 2006-2007-ig, kennelből 187 darab kutyától származó bélsár mintát *G. intestinalis*-ra vizsgáltunk, különböző korcsoportú és nemű állatoktól.
- ❖ 2008-ban, 2 kennelből 40 darab kutyától származó bélsár mintát *G. intestinalis*-ra vizsgáltunk, különböző korcsoportú és nemű állatoktól.

#### 3.2 Protozoonok izolálása, azonosítása

##### 3.2.1 *Entamoeba histolytica* és *Giardia intestinalis* mikroszkopikusan meghatározása

A protozoonok mikroszkopos diagnosztikája két módszeren alapszik: az egyszerű natív (NaCl-os oldat) és a Lugol-oldatos vizsgálaton. Amennyiben NaCl-, Lugol-oldat vizsgálata negatív

eredménnyel jár, akkor célszerű kiegészíteni a vizsgálatot cystadúsítási módszerrel (MILCH és JANKÓ 1990).

- 1) NaCl-os oldat:

NaCl	- 8,8g
Deszt. Víz	- 1000,0ml
- 2) Lugol-oldat:

Kristályos jód	- 5,0g
Káliumjodid	- 10,0g
Deszt. Víz	- 1000,0ml
- 3) Cystadúsítás:

Cinkszulfát oldat készítése:  
22%-os ZnSo<sub>4</sub> -os oldatot készítünk, fajsúlya 1180g/dm<sup>3</sup>

### 3.2.2 Az *Acanthamoeba* spp. mikroszkopikusan meghatározása

A különböző morfológiájú telepeket szélesztéssel tisztítottam. Ezt követően mikroszkóp segítségével azonosítottam a protozoonokat (PAGE 1988).

## 3.3 Táptalajok

### 3.3.1 *Entamoeba histolytica* táptalaj

A bélparazitákra jellemző, hogy a szaporodási formájuk székklettel ürül. Az ürülékben a jellegzetes szaporodási formák alacsony számban lehetnek jelen. A krónikus folyamatban a kórokozó száma alacsony, ilyenkor a direkt mikroszkópos vizsgálatot ki kell egészíteni tenyésztéssel. A számos táptalaj közül a Boeck-Drbohlav és a TYI-S-33 a legismertebb.

**Boeck-Drbohlav táptalaj** 2 fázisú (ASH et al. 1987, MILCH és JANKÓ 1990):

I. 4 darab tojás

II. 50 ml módosított Ringer-Locke oldat

Ringer-Locke oldat összetétele:

NaCl	- 9g
KCl	- 0,4g
CaCl <sub>2</sub>	- 0,2g
NaHCO <sub>3</sub>	- 0,2g
Glukóz	- 2,5g
Deszt.víz	- 1000ml

Sterilezni 115°C-on 15 percig.

Szilárd fázis:

1. 4 sterilen feltört tojást 50 ml Ringer – Locke oldattal, üveggyöngyöket tartalmazó porüvegben összerázzuk.
2. Rögzített üvegtölcsér használatával gézen átszűrve kémcsövekbe töltünk kb. 5 ml mennyiségben, és vattadugóval zárjuk.
3. Ferde helyzetben, 85°-on szilárdítjuk.
4. Tindalozva\* sterilezzük (\*Lányi B.: 412 oldal: bizonyos táptalajokat három egymást következő napon 80-85°C hőmérsékleten 1-2 óra hosszat vízfürdőben vagy Arnold készülékben tartjuk (tindalozás). A hőkezelés közötti idő alatt a táptalajokat a spórák germinációjának elősegítése céljából szobahőmérsékleten kell tartani)

Folyékony fázis (a táptalaj elkészítése):

- |  |          |
|--|----------|
| 1. Ringer- Locke oldatot                   | - 3 ml   |
| 2. Inaktivált szérum (bika-, ló-, humán-,) | - 1,5 ml |
| 3. Rizskeményítő                           | - 1 kacs |

### 3.3.2 *Acanthamoeba* spp. táptalaj

#### **PAGE agar** (ASH et al. 1987, MILCH és JANKÓ 1990)

##### I. Page oldat készítése:

4. NaCl	-120mg
5. MgSO <sub>4</sub> +7H <sub>2</sub> O	- 4mg
6. CaCl <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	- 4mg
7. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- 142mg
8. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- 136mg
9. Deszt. víz	- 1000ml

Autoklávozzunk 121° C-on 15 percig.

##### II. Page agar lemez készítése:

1. 1,5g agart 100ml Page oldatban feloldjuk, majd 121°C-on, 15 percig autoklávozzunk.
2. 60°C-ra hűtjük, és Petri-csészébe öntjük.

##### III. A hőkezelt baktérium szuszpenzió elkészítése:

3. *Escherichia coli* K-12 vagy *Enterobacter aerogenus* tiszta tenyészetet Muller-Hinton vagy agár lemezre dúsán szélesztve leoltjuk, 18-24 óráig, 37°C-on inkubáljuk. Az inkubálást követően sterilen a tenyészetre 10 ml PAGE oldatot pipettázunk, steril kaccsal a tenyészetet felkavarjuk, majd a baktérium szuszpenziót pipettával steril lombikba átviszük. A szuszpenziót tartalmazó lombikot 60 percig, 60°C –on vízfürdőben főzzük.

#### **Proteose Pepton-Yeast Extract-Glucose (PPYG) táptalaj** (GILLESPIE et al. 2002)

##### Reagensek:

1. Proteose pepton (Difco)	- 20 g
2. Élesztőgomba kivonat (Difco)	- 2 g
3. MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	- 0,98 g
4. Kalcium klorid	- 0,06 g
5. Nátrium citrát (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> . 2H <sub>2</sub> O)	- 1 g
6. Vas ammónium szulfát (Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O]	- 0,02 g
7. Kálium foszfát (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	- 0,34 g
8. Nátrium foszfát (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	- 0,36 g
9. Glukóz	- 18 g
10. Desztillált víz	- 900 ml



A táptalaj elkészítése

- |   |             |
|---|-------------|
| 1. PPYG táptalaj                        | - 15ml      |
| 2. Fetal Bovine Serum Inaktivált steril | - 1,5ml     |
| 3. Penicillin                           | - 400 IU/ml |
| 4. Streptomycin                         | - 400 µg/ml |

**3.3.3 Giardia intestinalis és Entamoeba histolytica táptalaj:****TYI-S-33 táptalaj** (DIAMOND et al. 1978, módosította Kollaritsch)

Biosate (Becton dickinson 211862)	- 20g
Yeast extract (Merck 1.03753.0500)	- 20g
Glucose	- 10g
NaCl	- 2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	- 1,31g
(vagy K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- 1.0g)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- 0,6g
L-Cystein.HCl	- 1g
Fe-ammonium citrate	- 22,8mg
Desztillált víz	- 800ml

Autoklávozzunk 120° C-on 15 percig

A táptalaj elkészítése: adjunk hozzá 0,2 g aszkorbinsavat (sterilizált szűrővel), 100ml inaktivált borjúsérumot és 30ml Diamond Tween 80 vitamin mixturát.

**3.4 Rizoszférából történő izolálás**

A Növényvédelmi Intézet Ady-ligeti telepének különböző parcelláiban termesztett kukorica, lucerna növények gyökérfelületéből, rizoszférájából izoláltam a mikroorganizmusokat. Ásóval kiemeltem 20 g gyökérmennyiséget, amelyet beleraktam steril 50 ml-es kupakos centrifugacsőbe.

**3.5 A protozoonok molekuláris biológiai vizsgálata****3.5.1 Entamoeba histolytica azonosítása real-time FRET PCR módszerrel**

A primereket ROY és munkatársai (2005) publikálták. A próbákat a Roche LC Probe Design program segítségével terveztük. A DNS szekvenciát az NCBI honlapról töltöttük le (Gene Bank Accession No.: X64142). A megtervezett oligonukleotidokat a BLAST szekvencia összehasonlító adatbázissal ellenőriztük (12. ábra).

```

      "
    ··1·TATCTAAGGTTGATCCCCAGTAGGGGATGCTGATGTTAAAAGATTAAGCCTAGCATGTGTA¶
    ····ATAGACCAACTAGGACGGTTACGGGATACGACTACAATTTCTAATTCGGTACGTACACAT¶
¶
    ·61·AGTATAAAGACCAAGGGCCCTTAAACTGCGGACGGCTCATTATATTAGTAATAGTTTCTT¶
    ····TCATATTTCTGGTTCATCCTACTTTGACGCCTGCCGAGTAATATTGTCATTATCAAAGAA¶
¶
    121·TGGTTCCTAGATACAAGGATAGGCCAATGAATGATAAAGATAATACCGGAGACGATCCA¶
    ····ACCAATCATTTTATGTTCCCTATCGAAACACTTACTATTTCTATTATGAACTCTGCTAGGT¶
¶
    181·GTCCCGAGTAGTACAAAATGGCCAATTCAATCAATGCCTAGAGAAATGACATTCTAAGTG¶
    ····CAAACATAATCATGTTTTACCGGTTAAGTAAGTTACTTAACCCATGTTAATAAGATTCAC¶
¶
    241·AGTTAGGATG¶
    ····TCAATCCTAC¶

```

12. ábra. *Entamoeba histolytica* 16s rRNS(Gene Bank No.: X64142) primerek

és próbák elhelyezkedése.

Az egyik próba 3' végén a gerjesztő molekula fluoreszcéinnel, a másik próba 5' végén LightCycler® Red 640 (vagy 705) festékkel jelölt. Ha a specifikus próbák bekötődnek az annealing folyamán (tehát a keresett szekvencia jelen van), akkor bekövetkezik az LC Red fluoreszcens emissziója, amelyet a műszer detektálni képes (OROSZ et al. 2012).

A 75 székletmintát előkészítettük a közösségi DNS kivonáshoz, a S.T.A.R.(Germany) pufferrel. Az előkészítésnek azért van jelentősége, mert nem mindig lehet a DNS-t közvetlenül kivonni széklet mintából. A fő ok az, hogy bizonyos növényi rostok nehezen emészthetőek, így előfordulhat, hogy azok akadályozzák a DNS kitapadását a szűrőre. A vizsgálati minta S.T.A.R. pufferes előkészítésével szám szerint tudjuk kifejezni a parazita kópia számát az adott mintában.

**S.T.A.R. pufferrel történő előkészítés folyamata:** töltsünk egy megfelelő tárolóedénybe (pl. széklettároló cső) 4,5 ml S.T.A.R. puffert, adjunk hozzá a székletmintából egyszer használatos spatulával 1,5g-ot. A széklet és a S.T.A.R. puffer aránya 1:3-hoz legyen (minimum),zárjuk le a csövet szorosan. Homogenizáljuk a székletmintát rázással rövid ideig, vagy vortexeléssel (15s), Az izolálás előtt adjunk 500 µl kloroformot, centrifugáljuk egy percre 1000g, és a felülúszót használjuk

a nukleinsav tisztításhoz (200 µl). A maradék felüliszót a későbbi nukleinsav tisztításig –15- -25°C-on tároljuk.

DNS kivonás 2 kittel végezhető:

- QIAamp DNA Stool Mini Kit-tel (Germany)
- High Pure PCR Template Preparation Kit-tel (Germany).

A real-time FRET PCR során minden esetben negatív, illetve pozitív kontrollt is használtunk, hogy a fals negatív, illetve fals pozitív eredményeket elkerüljünk. A real-time FRET PCR hő profilja (5.sz. táblázat.) és a „mastermix” (4. sz. táblázat.) összeállítása egy reakcióelegyre számolva:

4.sz. táblázat. Az *Entamoeba histolytica* 16s rRNA real-time FRET PCR-hoz használt mastermix” összetétele és mennyisége egy mintára számítva.

Reagens	1 minta esetén
LightCycler FastStart DNA Master Hybr. Probes	4 µl
Nukleázmentes víz	6 µl
Ehp1 5-Lcred640 (munkahígításban)	1 µl
Ehp2 3-FLO (munkahígításban)	1 µl
EhF primer SHPR (munkahígításban)	1 µl
EhR primer SHPR (munkahígításban)	1 µl
UNG 1U/µl	1 µl
Összesen	15 µl
DNS minta	5 µl

A PCR – eljárás 50 ciklus egymásutánjából áll (4. sz. táblázat.). Mindegyik ciklus három lépést tartalmaz:

1. Denaturáció: a két DNS – szálát összekötő hidrogénkötések felbomlása 94-95°C-on.
2. Anelláció: a megfelelő hőmérséklet, a primerek, próbák kötődnek a templáthoz
3. Elongáció: a kapcsolódott primernél kezd, és végigmegy a DNS – szálon, így 1 db. DNS-ből 2 DNS keletkezik.

5. sz. táblázat. Az *Entamoeba histolytica* real-time FRET PCR hő profilja.

## Programs

Program Name	denaturálás					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:10:00	20	0	0	0	None

Program Name	amplifikálás					
Cycles	55	Analysis Mode	Quantification			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:05	20	0	0	0	None
54	00:00:10	20	0	0	0	Single
72	00:00:15	20	0	0	0	None

Program Name	olvadáspont mérése					
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:05	20	0	0	0	None
51	00:00:05	20	0	0	0	None
90	00:00:00	0.1	0	0	0	Continuous

Program Name	hűtés					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
40	00:00:00	20	0	0	0	None

- Denaturáció: A kettős szálú DNS-t 94-96°C-ra hevítettük, hogy a szálak szétváljanak. A DNS szálak szeparálása után a hőmérsékletet csökkentettük, úgy, hogy a primerek és próbák hozzá tudjanak kapcsolódni a DNS - szálakhoz.
- Anelláció: ezt a lépést annealing vagy kapcsolódási lépésnek nevezzük. A hőmérséklet ebben a fázisban függ a primerektől, próbáktól, és általában 5 °C-kal van az olvadási hőmérsékletük alatt (45-60 ° C) (ha a hőmérséklet nem megfelelő, a primerek, próbák vagy egyáltalán nem kötődnek a templáthoz, vagy véletlenszerűen kötődnek).
- Elongáció: végül a DNS-polimeráz létrehozza a komplementer szálát. A szintézist a kapcsolódott primernél kezdi, és végigmegy a DNS-szálon. A meghosszabbítás hőmérséklete a DNS –polimeráztól függ (a lépés időigénye egyrészt függ magától a DNS – polimeráztól, másrészt az amplifikálandó DNS – szakasz hosszától).
- A DNS olvadási hőmérsékletének kiválasztásakor több dolgot kell megfontolni. A primer olvadási hőmérséklet– nem keverendő össze a DNS olvadási hőmérsékletével. A túl magas

olvadási hőmérsékletek, pl. 70-80°C feletti, gondot jelentenek, mert a DNS - polimeráz kevésbé aktív magas hőmérsékleten (a primer és próba hossza limitált az olvadási hőmérséklet által).

### 3.5.2 *Acanthamoeba* spp. azonosítása real-time FRET PCR módszerrel

*Acanthamoeba* spp. 18S rRNS gén kimutatása real-time FRET PCR reakcióval, közvetlenül a lucerna és kukorica rhizoszférájából DNS kivonást végeztünk PBS (pH 7.4; Sigma–Aldrich) puffer segítségével.

**Mintaelőkészítés PBS pufferrel:** 10 ml-es centrifugacsőbe 1 ml steril PBS-t töltünk, adunk hozzá 1 g talajmintát, és dúsító kanállal feltörjük a talajmintát (ha túl sűrű, a feltört talajminta akkor szükség szerint még 1-2 ml PBS-l kiegészítjük) steril centrifugacsőbe dupla steril gézzel kibélelt tölcséret állítunk, és átpipettázzuk a teljes térfogatot a gézre. Ha nem folyt át teljesen, akkor a dúsító kanállal átnyomkodjunk a gézen a felszuszpendált és átszűrt üledéket. Az ilyen módon előkészített talajmintából végezhetjük a DNS kivonást:

- QIAamp DNA Stool Mini Kit-tel (Germany)
- High Pure PCR Template Preparation Kit-tel (Germany).

A környezetből közvetlenül is izoláltunk DNS-t, hogy megbizonyosodjunk sikerült-e megfelelő DNS mintát megtisztítani, ezért a izolált telepek DNS-ét megmértük nanoDrop-1000 spectrophotometer készüléken. A célja a vizsgálatnak az izolált DNS minta DNS-koncentrációjának mérése ng/μl-ben, abszorbencián alapuló módszerrel, 260 nm-en ND-1000 spektrofotométer segítségével.

Az *Acanthamoeba* spp. kimutatására a célszekvencia általában a 18S rDNS, amivel egyidejűleg az identifikálás is lehetséges. Az *Acanthamoeba* gyors detektálását tehát molekuláris módszerrel lehet elérni. Molekuláris azonosítás, az *Acanthamoeba* esetében polimeráz láncreakcióval (PCR) végezhető (VODKIN et al. 1992, SCHROEDER et al. 2001, KHAN et al. 2001), mivel a szerológiai módszerek itt nem alkalmazhatóak, hiszen a környezetben szinte mindenhol előfordulnak, és a humán populációnak már vannak antitestjei.

A polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálat alapja, hogy a parazita jelenlétét azzal igazolja, hogy kimutatja a parazitára specifikus DNS jelenlétét. A PCR tehát direkt kimutatási módszer, az élő és már elpusztult parazitát is képes kimutatni.

A kórokozó kimutatása, a genomja egy fajspecifikus részletének sokszorozásával és detektálásával történik.

A real-time FRET PCR

A primereket és a próbákat a Roche LC Probe Design program segítségével terveztük. A DNS szekvenciát az NCBI honlapról töltöttük le (Gene Bank Accession No: AF325888) (OROSZ et al.

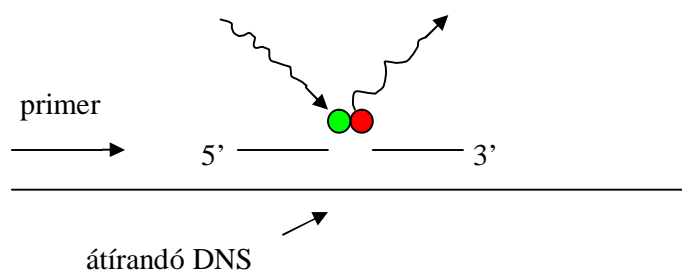
2013). A megtervezett oligonukleotidokat a BLAST szekvencia összehasonlító adatbázissal ellenőriztük (13. ábra.).

```

781 GGGGGCGCCTCGGGTGTGCTGTTCCACCCTTAGCCGGGTGGCAGTTGCATTCAGGGCACTT
    CCCCCGCGGAGCCCACACGACAAGTGGGAATCGGCCACCGTCAACGTAAGTCCCGTGAA
841 GTCCTTTAACCGGGGCAGGTGTTGAGACCCAGATCGTTTACCGTGAAAAAATTAGAGTGT
    CAGGAAATTGGCCCCGTCCACAACCTCTGGGTCTAGCAAATGGCACTTTTTTAAATCTCACA
901 TCAAAGCAGGCAGATATTTCTTTTACTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAAT
    AGTTTCGTCCGTCTATAAAGAAAATGACGGTGGCTTATGTAATCGTACCCTATTACCTTA
961 AGGACCCTGTCCCTTCATGTTTCGCGTTGGTTGTGTGTTAAGTGCCTGCGCAAGTCCCGTGG
    TCCTGGGACAGGAAGTACAAAAGCGCAACCACACACAATTCACGCACGCGTTCACGCACC
1021 CTGGCACATGGTTTTCGTCTGAAGGAGGACCAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGG
    GACCGTGTACCAAAGCAGACTTCCTCCTGGTCCCATTAATAATTATCCCTATCAACCCCC
1081 GCATTAATAATTTAATTGTCAGAGGTGAAAATTCCTTGGATTTATGAAAAGATTAACCTCTCGC
    CGTAATTATAAATTAACAGTCTCCACTTTAAGAACCTAAATACTTTCTAATTGAAGACGC
  
```

13. ábra. *Acanthamoeba* spp. 18s rRNS (Gene Bank No.: AF325888) primerek (kék szín) és próbák (piros szín) elhelyezkedése.

A real-time FRET PCR során a reakcióelegybe két hibridizációs próbát adunk, melyek az annealing során kapcsolódnak a templát DNS-hez. Az egyik próba 5' végén festékmolekula van, melynek kibocsátási hullámhosszát (640 nm) a LightCycler készülék érzékelni képes. A másik próba 3' végén egy az automata által gerjeszthető fluoreszcein molekula van. Ha a két próba beköt a templát DNS-hez, a két molekula egymás mellé kerül, és az automata által gerjesztett fluoreszcein molekula a felvett fényenergia egy részét átadja a festékmolekulának, ami az energia egy részét saját jellemző hullámhosszán (640 nm) bocsátja ki (14. ábra.).



14. ábra. *Acanthamoeba* spp. FRET PCR primerek és próbák menete

A vizsgálat első lépéseként a vizsgálati mintát lizáljuk, a nukleinsavat a mintából kivonjuk. A következő lépésben, a real-time PCR során, a megtisztított nukleinsavat olyan reakcióközegbe helyezük, mely tartalmazza a megsokszorozásához szükséges valamennyi reagenst és enzimet (dNTP-k, MgCl<sub>2</sub>, primerek, Taq-polimeráz) (6.sz. táblázat.).

6.sz. táblázat. Az *Acanthamoeba* spp18S rRNS real-time FRET PCR-hoz használt keverék mastermix összetétele mennyisége egy mintára számítva.

Reagens	1 minta esetén
LightCycler FastStart DNA Master Hybr. Probes	4 µl
Nukleázmentes víz	6 µl
AKp1 5-Lcred640 (munkahígításban)	1 µl
AKp2 3-FLO (munkahígításban)	1 µl
AKF primer SHPR (munkahígításban)	1 µl
AKR primer SHPR (munkahígításban)	1 µl
UNG 1U/µl	1 µl
Összesen	15 µl
DNS minta	5 µl

A reakcióelegy uracil-DNS-glükozilált tartalmaz, amely a korábbi amplifikálásból származó, kontamináns DNS-t lebontva csökkenti a fals pozitív reakció kialakulásának esélyét.

A real-time FRET PCR minden esetben negatív, illetve pozitív kontrollt is használtunk, hogy a fals negatív, illetve fals pozitív eredményeket elkerüljünk. A real-time FRET PCR mastermix (6.sz. táblázat.) összeállítását egy reakcióelegyre számolva és a hő profilja (7.sz. táblázat.).

A PCR folyamatában, 50 cikluson keresztül denaturálási, annealing és átírási lépések során a primerek által meghatározott DNS szakasz megsokszorozódik.

7.sz. táblázat. *Acanthamoeba* spp. real-time FRET PCR hő profilja program.

## Programs

Program Name		denaturalas				
Cycles	1	Analysis Mode		None		
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:10:00	20	0	0	0	None

Program Name		amplifikalas				
Cycles	50	Analysis Mode		Quantification		
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:01	20	0	0	0	None
53	00:00:05	20	0	0	0	Single
72	00:00:10	20	0	0	0	None

Program Name		olvadaspont meres				
Cycles	1	Analysis Mode		Melting Curves		
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:10	20	0	0	0	None
50	00:00:20	20	0	0	0	None
85	00:00:01	0.1	0	0	0	Continuous

A LightCycler készülék minden ciklusban egyszer, az annealing végén (tehát amikor a hibridizációs próbák a templát DNS-hez kötődve vannak jelen a rendszerben, és működik az energiaátadási folyamat gerjeszti a fluoreszcein molekulát, és detektálja a festékmolekula által kibocsátott fényt. A detektált fényenergia arányos a rendszerben adott időpontban jelen lévő amplitonok számával. Ha az automata által detektált fénykibocsátás meghaladja a küszöbértéket, a minta pozitív, ellenkező esetben negatív.

A real-time PCR vizsgálat során ismert kópiaszámú pozitív kontrollok segítségével egy kópiaszám-áttörési küszöb értékpárokból felállított, kalibrációs grafikon segítségével az ismeretlen minta kópiaszáma megállapítható.



### 3.5.3 *Giardia intestinalis* azonosítása PCR módszerrel

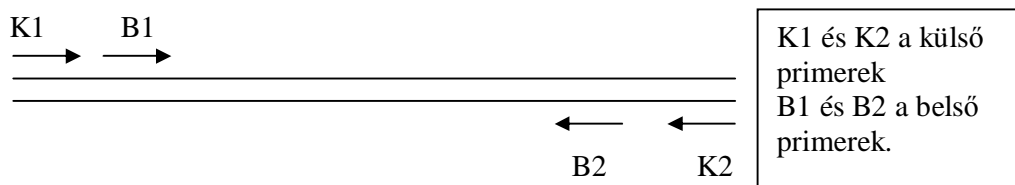
A *G.intestinalis* kimutatására a cél szekvencia általában a 18S rDNS, amivel egyidejűleg az identifikálás is lehetséges. Molekuláris azonosítást az *G. intestinalis* esetében nested PCR vizsgálatot végeztük, MCGLADE et al. 2003 módszerrel.

A PCR vizsgálatnak az az alapja, hogy függetlenül a típustól (nested vagy FRET), a parazita jelenlétét azzal igazolja, hogy kimutatja a parazitára specifikus DNS jelenlétét. A PCR tehát direkt kimutatási módszer, az élő és már elpusztult parazitát is képes kimutatni.

Vagyis a kórokozó kimutatása genomja egy fajspecifikus részletének sokszorozásával és detektálásával történik.

- ***Giardia intestinalis* azonosítása nested PCR módszerrel**

A PCR során, a kimutatandó DNS szakaszhoz specifikusan kötődő primerek segítségével a parazita genomjának egy, csak a saját fajára jellemző részét felszaporítjuk. Az érzékenység növelése érdekében a megsokszorozott specifikus DNS régió egy belső részét, egy második PCR lépésben tovább szaporítjuk (un. nested PCR-t végzünk) (15. ábra.).



15. ábra. *Giardia intestinalis* külső és belső PCR\_primerek menete.

*Giardia intestinalis* nested PCR-hez szükséges anyagok, reagensek

8.sz. táblázat. *Giardia intestinalis* 18SrRNS nested PCR szükséges anyagok

Anyagok/reagensek megnevezése	Gyártási eljárás azonosítója/hivatkozása
PCR Mix (felhasználásra kész)	Prod. No.: M7505
Nukleázmentes víz (felhasználásra kész)	Prod. No.: P119C
primer: RH4	5' AGTCGAACCCTG ATTCTCCGCCAGG 3'
primer: RH11	5' CATCCGGTTCG ATCCTGCC 3'
primer: GIARF	5' GACGCTCTCC CCAAGGAC 3'
primer: GIARR	5' CTGCGTCAC GCTGCTCG 3'

A *Giardia intestinalis* PCR vizsgálat első lépéseként: a vizsgálati mintát lizáljuk, és a nukleinsavat kivonjuk QIAamp DNA Stool Mini Kit-el vagy a High Pure PCR Template Preparation Kit-el

használati utasítása szerint. A kórokozó kimutatása genomja egy fajspecifikus részletének sokszorozásával és detektálásával történik. A vizsgálat első lépéseként, a vizsgálati mintát lizáljuk, és a nukleinsavat kivonjuk.

A következő lépésben, a PCR során, a megtisztított nukleinsavat olyan reakcióközegbe helyezzük, mely tartalmazza a megsokszorozásához szükséges valamennyi reagenst és enzimet (dNTP-k, MgCl<sub>2</sub>, primerek, Taq-polimeráz) (8. és 9.sz. táblázat.).

9.sz. táblázat. A *Giardia intestinalis* 18S rRNS nested PCR-hoz külső PCR használt keverék mastermix összetétele mennyisége egy mintára számítva.

Reagens	Mennyiség µl-ben 1 mintára
Promega mix	25
Primer RH4 (munkahígításban)	5
Primer RH11 (munkahígításban)	5
Nukleázmentes víz	5
Összesen	40
DNS minta	10 µl

A PCR folyamatában, 51 cikluson keresztül denaturálási, annealing és átírási lépések során, a primerek által meghatározott DNS szakasz megsokszorozódik (10.sz. táblázat.).

10.sz. táblázat. *Giardia intestinalis* 18S rRNS nested PCR hő profilja program.

120 mp	94°C-on	1x
60 mp	53°C-on	
120 mp	72°C-on	
30 mp	94°C-on	49
20 mp	53°C-on	
30 mp	72°C-on	
30 mp	94°C-on	1x
20 mp	53°C-on	
7 perc	72°C-on	
tovább	4°C-on	

Giardia intestinalis külső PCR termék tisztítása: adjunk ötszörös mennyiségű Binding puffert a PCR termékhez (pl.: 35 µl amplifikátumhoz adjunk 175 µl Binding puffert) és keverjük össze alaposan. Helyezzük a filteres oszlopot a gyűjtőcsőbe, mérjük rá a minta teljes mennyiségét az oszlopra. Centrifugáljuk 30-60 sec-ig, teljes sebességen (13000 x g). Öntsük ki a gyűjtőcső tartalmát, és helyezzük vissza az oszlopot a gyűjtőcsőbe, mérjük 500 µl Wash puffert az oszlopra, és centrifugáljuk 1 percig teljes sebességen 13000 x g. Öntsük ki a gyűjtőcső tartalmát, és helyezzük vissza az oszlopot a gyűjtőcsőbe, mérjük 200 µl Wash puffert az oszlopra, és centrifugáljuk 1 percig teljes sebességen 13000 x g. (megjegyzés: ez a második mosási lépés biztosítja az optimális tisztaságot). Öntsük ki a gyűjtőcső tartalmát, helyezzük az oszlopot egy tiszta 1.5 ml-es mikrocentrifuga csőbe, mérjük 50-100 µl Elution puffert az oszlopra, centrifugáljuk egy percig, teljes sebességen 13000 x g-n. (megjegyzés: ne használjunk vizet az eluáláshoz, mivel lúgos pH szükséges az optimális mennyiségű DNS visszanyeréséhez). A tisztított DNS-t a mikrocentrifuga cső tartalmazza.

A Giardia intestinalis második lépésben: a PCR során, a megtisztított nukleinsavat olyan reakcióközegbe helyezzük, mely tartalmazza a megsokszorozásához szükséges valamennyi reagenst és enzimet (dNTP-k, MgCl<sub>2</sub>, primerek, Taq-polimeráz) (11.sz. táblázat.).

11.sz. táblázat. A *Giardia intestinalis* 18S rRNS nested PCR-hoz belső PCR használt keverék mastermix összetétele mennyisége egy mintára számítva.

Reagens	Mennyiség µl-ben 1 mintára
Promega mix	25
Primer GIARF (munkahígításban)	5
Primer GIARR (munkahígításban)	5
Nukleázmentes víz	13
Összesen	48
Külső PCR minta	2 µl

A PCR folyamatában, 51 cikluson keresztül denaturálási, annealing és átírási lépések során a primerek által meghatározott DNS szakasz megsokszorozódik. A PCR során, a kimutatandó DNS szakaszhoz specifikusan kötődő primerek segítségével a protozoon genomjának egy, csak a saját fajára jellemző részét, felszaporítjuk. Az érzékenység növelése érdekében a megsokszorozott specifikus DNS régió egy belső részét egy második PCR lépésben tovább szaporítjuk. A *G.intestinalis*. 18S rRNS nested PCR hő profil program a külső és belső PCR-hez azonos (10.sz. táblázat.).

A *Giardia intestinalis* harmadik lépésben: az így képződött, nagy mennyiségű amplikont 1,5 %-os agaróz gélen, elektromos erőterbe helyezve, méret szerint elválasztjuk a genomiális DNS-től, és más, aspecifikus nukleinsav elemektől. A gél etídium-bromidot tartalmaz, ami beépül a DNS kettős szálába, és a gélfuttatás után, UV fény alá helyezve a gél, fluoreszcenciája révén láthatóvá teszi. A parazita jelenlétét az támasztja alá, hogy a PCR reakció végtermékeként kb. 170 bp-os amplikon megjelenik a gélfuttatás eredményének leolvasásakor.

A *Giardia intestinalis* harmadik lépésben PCR termék tisztítása: mérjük le egy 1.5 ml-es (üres) eppendorf csövet, és jegyezzük fel az eredményt. Tiszta (lealkoholozott) borotvapengét vagy szikét használva vágjuk ki az agaróz gélből a tisztítani kívánt DNS csíkot. Olyan közel vágjuk a DNS csíkhöz, amennyire csak lehet. Daraboljuk fel a kivágott gél több apró darabra, és helyezük az előzőleg lemért eppendorf csöbe. Mérjük meg a csövet most már a géllal együtt, vonjuk ki az üres cső súlyát, így megkapjuk a géldarab saját mennyiségét, és adjunk 300 µl Binding puffert minden 100 mg agaróz gélhez, majd vortexeljük 15-30 sec-ig, azután inkubáljuk 10 percig (vagy amíg a gél felolvad) 56°C-on, közben 2-3 percenként vortexeljük. Miután a géldarab teljesen felolvad, adjunk 150 µl izopropanolt minden 100 mg gélhez, vortexeljük alaposan, és helyezzük a filteres oszlopot a gyűjtőcsöbe, azután mérjük rá a teljes minta mennyiségét az oszlopra (de max. 700 µl-t, ha több a minta, akkor osszuk ketté, és használjunk két oszlopot). Centrifugáljuk 30-60 sec-ig, teljes sebességen (13000 x g). Öntsük ki a gyűjtőcső tartalmát, és helyezzük vissza az oszlopot a gyűjtőcsöbe, mérjük 500 µl Wash puffert az oszlopra, centrifugáljuk 1 percig, teljes sebességen (13000 x g). Öntsük ki a gyűjtőcső tartalmát, és helyezzük vissza az oszlopot a gyűjtőcsöbe, mérjük 200 µl Wash puffert az oszlopra, centrifugáljuk 1 percig, teljes sebességen (13000 x g). Öntsük ki a gyűjtőcső tartalmát. Helyezzük az oszlopot egy tiszta 1,5 ml-es mikrocentrifuga csöbe, mérjük 50-100 µl Elution puffert az oszlopra, centrifugáljuk 1 percig, teljes sebességen (13000 x g). A tisztított DNS-t a mikrocentrifuga cső tartalmazza.

### 3.5.4 PCR-termékek tisztítása, szekvenálás

PCR-termékek, vagyis a nagy számban amplifikált DNS szakaszt High Pure PCR Product Purification Kit (Germany) segítségével tisztítottuk, a gyártó utasításai szerint. A gyártó két lehetőséget ajánl fel, az egyik a termék tisztítása az oldatból, hogy szebb képet kapjunk a futtatáskor. A másik, az agaróz gélből történő tisztítás, amikor egy konkrét terméket szeretnénk szekvenálni.

A nukleotidok sorrendjének meghatározása esetemben a MEGA 1000 készüléken történt. Leggyakrabban a szekvenálási kiindulási anyag a DNS, amely leggyakrabban a PCR terméke. Az interneten mindenki számára, ingyen hozzá férhető a nemzetközi szekvencia-adatbázis, mint a BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (ALTSCHUL et al. 1990) Kikereshetők az adatbázisból

az általunk kapotthoz legnagyobb hasonlóságot mutató szekvencia, ellenőrizhetjük azt is, hogy a kapott szekvencia valóban a vizsgálandó organizmus genomjának kívánt szakasza-e, és a PCR reakció megfelelő specifitású volt-e

Szekvencia illesztő program

A leggyakrabban használt illesztő program a Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>), ez az interneten ingyen hozzáférhető. Az illesztésben minden szekvencia külön sorban helyezkedik el úgy, hogy az összeillesztett bázis vagy aminosav pozíciók egy-egy oszlopot alkotnak (CORPET 1988).

### 3.5.5 Filogenetikai analízis

A filogenetikai fa alapja a szekvencia-illesztés. Elkészíthető a MEGA5 <http://www.megasoftware.net> programmal, amely szintén ingyenesen hozzáférhető az interneten. A filogenetikai fa olyan taxonómiai egységek közötti evolúciós kapcsolatok grafikus ábrázolására szolgál, amelyek feltételezhetően közös őstől származnak. Olyan családfára hasonlító diagramok ezek, ahol az ágak végein találhatóak a vizsgált organizmusok, az ágak hossza pedig arányos a közöttük becsült távolsággal (TAMURA et al. 2011).

### 3.5.6 Statisztikai elemzés

Az arányok összehasonlítására  $\chi^2$ -analízist alkalmaztunk, a 0,05-nél kisebb p értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. SPSS szoftvercsomagot használtunk ezekhez az elemzésekhez.

#### • Statisztikai elemzést befolyásoló tényezők

A vizsgálat eredményét hátrányosan befolyásolja, ha

- a kiindulási minta kevés,
- a kiindulási minta vagy a lizátum a vizsgálat megkezdése előtt huzamosabb ideig állt,
- a mintavétel és -szállítás nem előírás szerint történt,
- a vizsgálatot végző személy jártassága és elméleti ismerete a molekuláris biológiai vizsgálatokban nem megfelelő,
- a munkahelyiség hőmérséklete magas (>28°C, ekkor a gél lassabban szilárdul meg, a minősége romlik),
- a minták vagy reagensek külső forrásból származó DNS-sel szennyeződnek.

Ezen befolyásoló tényezők egy részét megelőzhetjük a MBL-ban végzett vizsgálatok, környezeti feltételekről szóló előírásainak betartásával.



## 4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 4.1 *Entamoeba histolytica* azonosítása

#### 4.1.1 *Entamoeba histolytica* jelenlétének kimutatása mikroszkópos és ELISA vizsgálattal

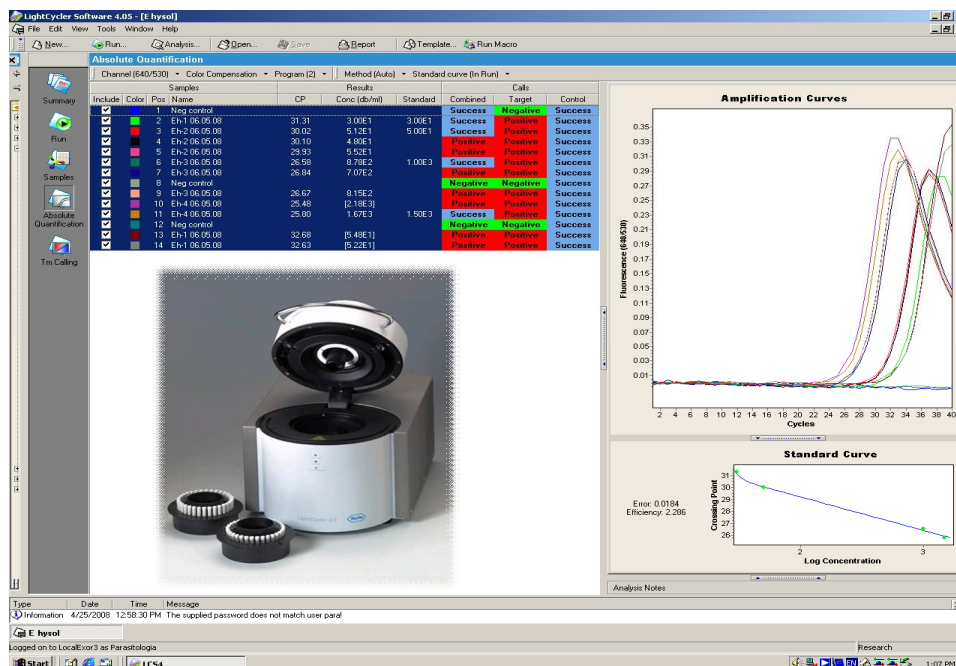
2003-2008-ig a OEK Parazitológiai Osztályra 77 (75 székletminta és 2 májtályog) vizsgálati minta érkezett, feltételezett amoebiasis diagnózissal. Erre a célra leggyakrabban mikroszkópos vizsgálatot végeznek, így 77 vizsgálati minta a feltételezett *E. histolytica* fertőzésre lett diagnosztizálva, mikroszkópon vizsgálva: natívan (0,88 % NaCl-os oldat), Lugol –oldatos és cysta dúsítási módszerrel, amelynek 3 mintája pozitív eredményt adott (1db székletminta és 2db. májtályog). A mikroszkópos vizsgálatnak szenzitivitása 3,89 % alacsony, és nem alkalmas a patogén *E. histolytica* és az apatogén *E. dispar* megkülönböztetésére. Mint azt a 2.6.2. fejezetben bemutattam, hogy a 1997-es WHO rendelet szerint a két faj megkülönböztetésére szolgáló laboratóriumi módszerek alkalmazása rendkívül fontos lenne, mind klinikai és terápiás, mind epidemiológiai szempontból. Továbbiakban a vizsgálati anyagból lehetőség nyílik ELISA alapú antigén kimutatásra, amelynek szenzitivitása és specificitása lényegesen meghaladja a mikroszkópos vizsgálatét. Így 75db. székletminta lett megvizsgálva *Entamoeba histolytica* Wampole™ Ag ELISA-val. Az ELISA szenzitivitása 4,0 %-os lett, és szintén 3 pozitív minta volt. A mikroszkópos és Ag ELISA vizsgálatnak a szenzitivitása alacsony volt, így sor került a molekuláris biológiai módszerre. A választásom a Roy és munkatársainak 2005-ben publikált primerekre esett, amelyet egy sima PCR segítségével felamplifikáltam és elektroorézissel értékeltem. Az Electrophoretic PCR-el 24 esetben pozitív eredményt adott a 77 vizsgálati mintából, amelynek a szenzitivitása 31,16 volt. Az elektroforetikus PCR egy hosszú eljárás volt, 24 órát vett igénybe, így ki kellett dolgozni egy gyors real-time FRET PCR-t (12.sz. táblázat.).

#### 4.1.2 *Entamoeba histolytica* jelenlétének kimutatása real-time FRET PCR technikával

Az *E. histolytica* kimutatásának, a magasabb költség és infrastruktúra-igénye miatt kevésbé elterjedt, de igen érzékeny és nagy specificitású módszere a nukleinsav kimutatás, PCR technikával (7.sz. táblázat.). A real-time PCR vizsgálat a hagyományos PCR technikánál lényegesen rövidebb idő alatt végezhető el, és kevesebb kontaminációs lehetőséget idéz elő (20 µl reakció-térfogat kvarckapillárisok hőkapacitása eredményezi az ultragyors fűtési sebességet, 20°C/sec). LighCycle készüléket fejlesztettek ki a gyors molekuláris vizsgálatokhoz. A LightCycler® ultragyors rendszer, amely specifikus és nem-specifikus detektálással működik, több mint egy egyszerű PCR készülék,

olvadáspont elemző programjával és magasan szofisztikált szoftverével a nagy precizitású és érzékenységu analitikai műszerek körébe tartozik.

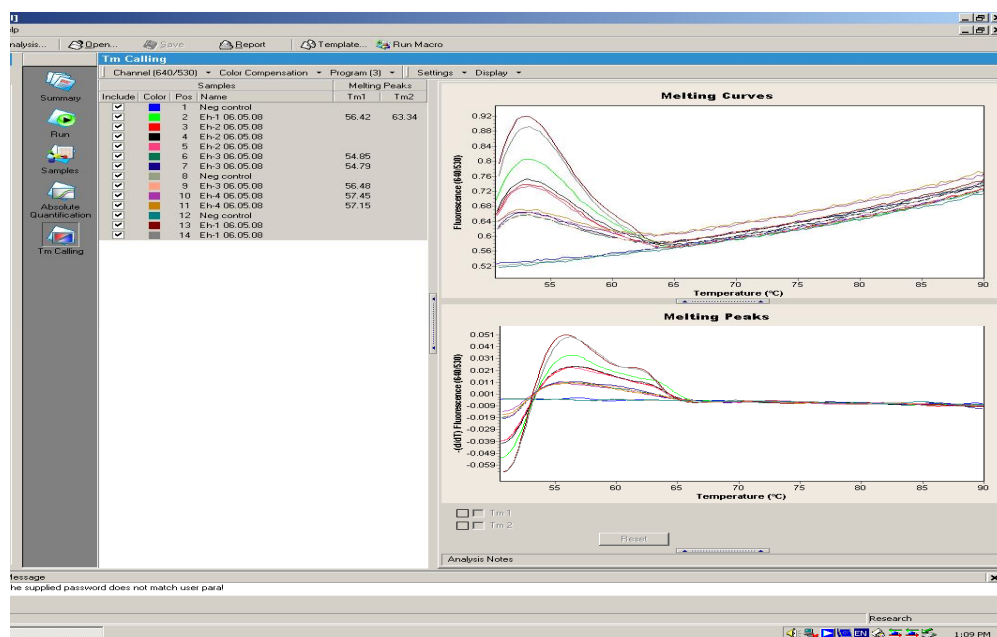
A diagnosztizálni kívánt *E. histolytica* génszakasz a LighCycler készülék segítségével FRET PCR-t alkalmaztunk. A rendszer szoftvere képes a görbe (és kalibráció) alapján a minta kiindulási mennyiségének automatikus kiszámolására. ATCC *E. histolytica* HM-1:IMSS törzsből készítettünk hígítási sorozatot, Bürker kamra segítségével: 1500 parazita/ml, 1000 parazita/ml, 50 parazita/ml, 30 parazita/ml (16. ábra.).



16. ábra. *E. histolytica* Absolute Quantification (minél magasabb a kiindulási targetek (kópiák) száma, annál korábbi ciklusban válik láthatóvá a kinetikus görbe).

Az olvadáspont mérését állítottam be. Erre lépésre azért volt szükség, hogy a kontroll mellett a primer-dimerek és egyéb mellékterméket könnyebben lehessen elkülöníteni, illetve a pontmutációk, deléciók mérése, genotipizálás és egyéb feladatok is elvégezhetők néhány perc (5-10) alatt (17. ábra.).



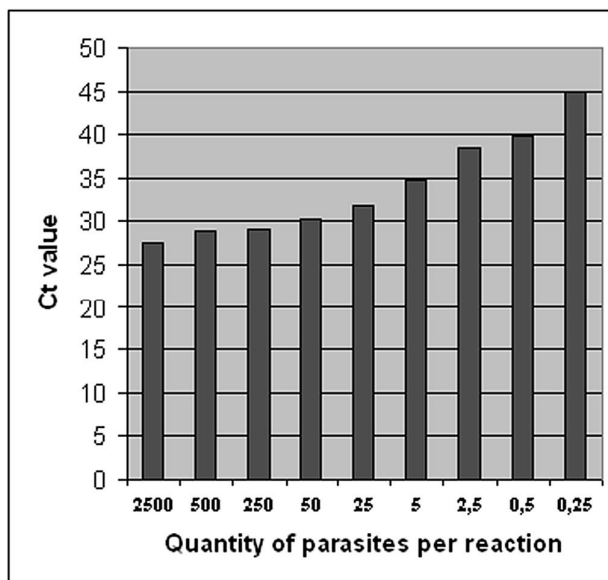


17. ábra. *Entamoeba histolytica* Tm (olvadáspont mérése) mérés LightCycler készüléken.

Az *E. histolytica* génjére tervezett LightCycler PCR fajspecifikusan azonosítja a parazitát. A vizsgálat laboratóriumunkban > 2,5 db/ml *E. histolytica* kimutatására képes.

#### 4.1.2.1 *Entamoeba histolytica* szenzitivitás

2 különböző napon 3 párhuzamosban végeztem el 2500db *E. histolytica* /ml és 0,05db *E. histolytica* /ml közötti standard hígítási sor (2500; 500,250;50; 25; 5; 2,5, 0,5; 0,25; 0,05 *E. histolytica* /ml) tesztelését a PCR módszerrel (18. ábra.). A kimutathatósági határ (az a koncentráció, amely mindhárom párhuzamosban pozitív eredményt adott) 2,5 kópia/ml volt. A szignifikáns koefficiens korreláció  $r = -0,98$  szinten szignifikáns.



18. ábra. *Entamoeba histolytica* /ml közötti standard hígítási sor (2500; 500,250;50; 25; 5; 2,5, 0,5; 0,25; 0,05 *Entamoeba histolytica* /ml) tesztelését a PCR módszerrel. A szignifikáns koefficiens korreláció  $r=-0,98$  szinten szignifikáns.

#### 4.1.2.2 *Entamoeba histolytica* specificitás

A módszer specificitását a primerek és próbák helyes megválasztása biztosítja. A primereket és a próbákat összehasonlító szekvenenciaanalízissel vettem egybe az ismert szekvenenciaadatokkal, az esetleges homológiák kiszűrésére.

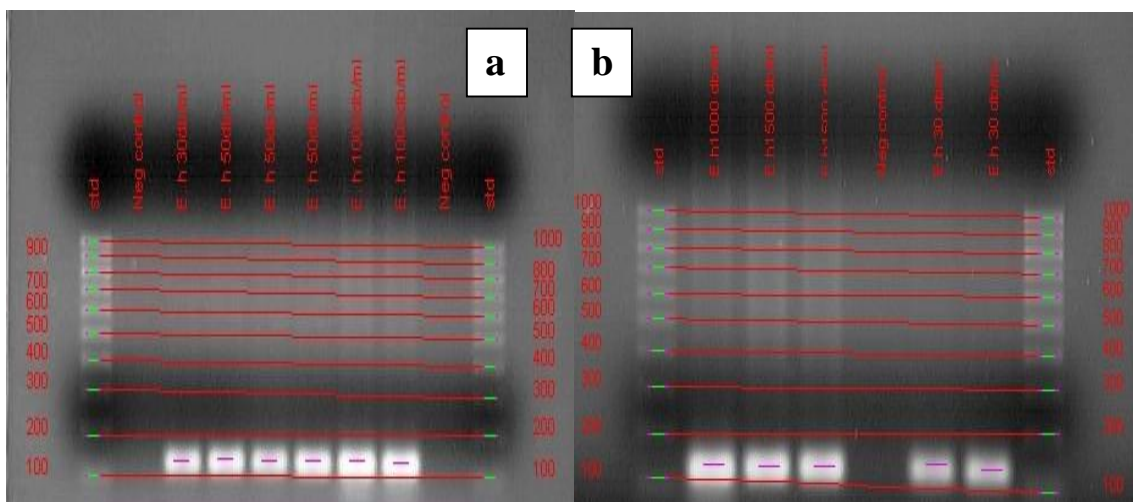
A real-time PCR vizsgálatot elvégeztem *E. histolytica* pozitív székletmintával, és *E. histolytica* tenyészetből nyert trophozoitokkal. Valamennyi minta és a tenyészetből nyert trophozoitok is pozitív eredményt adtak.

A real-time PCR vizsgálatot elvégeztem *E. histolytica* negatív székletmintával is. Valamennyi minta negatív eredményt adott.

#### 4.1.2.3 *Entamoeba histolytica* keresztreakció

A keresztreakciók kiszűrésére a következő, székletben előforduló kórokozókat tartalmazó mintákkal végeztem el a tesztet: *E. dispar*, *Blastocystis hominis*, *G. lamblia*. Valamennyi minta negatív eredményt adott a vizsgálatban, tehát keresztreakció a felsorolt fajokkal nem áll fenn.

Az *E. histolytica* Real-Time-PCR termékét gélelektroforézissel (futtatást 1,5% 1.30 óra) megvizsgáltam és 134 bp-nál minden pozitív mintában jelet kaptunk. Tehát az elektroforézissel is bizonyítottam, hogy a termékünk specifikus (19a. és 19b. ábra.).



19a. és 19b. ábra. *Entamoeba histolytica* real-time FRET PCR termékét gélelektroforézisen.

#### 4.1.3 *Entamoeba histolytica* szekvenálás eredmény

A gélből megtisztított mintákat a protokoll szerint a PCR termék-tisztító kittel újra tisztítottam:

- PCR-M és PCR Advanced Clean Up System (USA).

A mintákat a MegaBACE Kit protokoll szerint amplifikáltam, majd ismételen tisztítottam:

- DYEnamic ET Dye Terminator Kit MegaBACE (USA).

A szekvenált mintákat BLAST algoritmussal ellenőriztem, ezt a 20. és a 21. ábrán lehet látni.

20. ábra. *Entamoeba histolytica* szekvenálás azonosítása a NCBI BLAST programban

Distance tree of results **NEW**

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AB282660.1</a>	Entamoeba histolytica genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, cor	171	171	99%	6e-40	97%
<a href="#">AB282659.1</a>	Entamoeba histolytica genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, cor	171	171	99%	6e-40	97%
<a href="#">AB282658.1</a>	Entamoeba histolytica genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, cor	171	171	99%	6e-40	97%
<a href="#">X56991.1</a>	E.histolytica gene for small subunit ribosomal RNA (16S-like)	171	171	99%	6e-40	97%
<a href="#">Y11272.1</a>	E.histolytica ss13 gene	171	171	99%	6e-40	97%
<a href="#">X64142.1</a>	E.histolytica gene for small subunit rRNA	171	171	99%	6e-40	97%
<a href="#">X75434.1</a>	E.histolytica extrachromosomal 18S rRNA gene (partial)	171	171	99%	6e-40	97%
<a href="#">X61116.1</a>	E.histolytica mRNA for small subunit ribosomal RNA	171	171	99%	6e-40	97%
<a href="#">X65163.1</a>	E.histolytica rRNA	171	171	99%	6e-40	97%
<a href="#">L36807.1</a>	Entamoeba histolytica strain HK9 17S ribosomal RNA (17S rRNA) gene,	165	165	96%	3e-38	96%
<a href="#">M95498.1</a>	Entamoeba histolytica 17S ribosomal RNA (17S rRNA) precursor	165	165	96%	3e-38	96%
<a href="#">AB197936.1</a>	Entamoeba histolytica gene for 16S-like small subunit ribosomal RNA, p	159	159	99%	1e-36	95%
<a href="#">AB426549.1</a>	Entamoeba histolytica gene for 18S ribosomal RNA, complete sequence	154	154	99%	6e-35	94%

21. ábra. *Entamoeba histolytica* szekvencia eredménye a NCBI BLAST programban.

#### 4.1.4 *Entamoeba histolytica* szekvencia-illesztő program eredmény

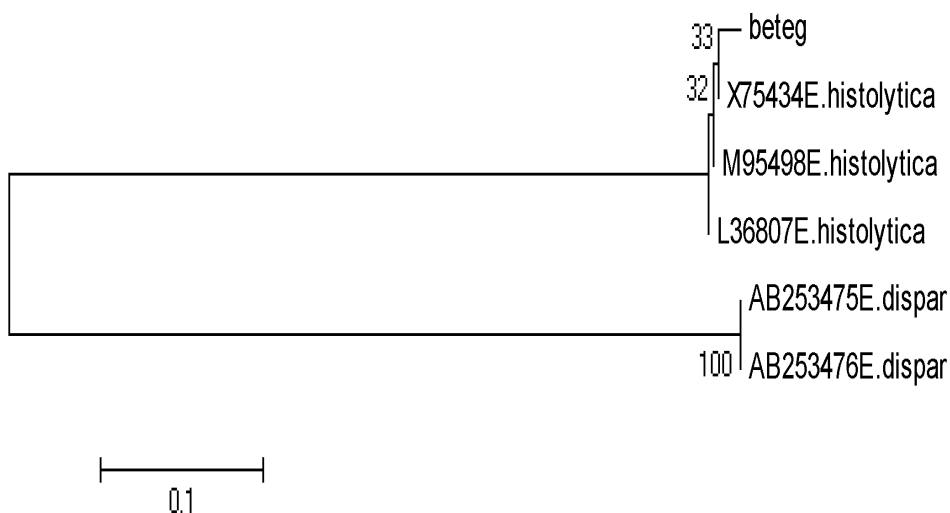
Az *E. histolytica* és *E. dispar* referencia szekvenciákat töltöttem le a Gene Bankból, (*E. histolytica* X75434; M95498; L36807 és *E. dispar* AB253475 és AB253476 és a MultAlin program segítségével összehasonlítottam általam megszekvenált pozitív mintákat. A 22. ábrán lehet látni, hogy a beteg minták az *E. histolytica*-val mutatnak egyezést, nem az *E. dispar*-ral.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
beteg	ATAGCTTTGTGACTGATAAATGATAAATCTTGGAGACGATCCAGTTTGTATTAGTACAAATG GCCAATTCATTCATGATTGAGAAATGACATT											
X75434E.histolytica	ATAGCTTTGTGAAATGATAAA-GATAAATCTTG-AGACGATCCAGTTTGTATTAGTACAAATG GCCAATTCATTCATGATTGAGAAATGACATT											
M95498E.histolytica	ATAGCTTTGTGAAATGATAAA-GATAAATCTTG-AGACGATCCAGTTTGTATTAGTACAAATG GCCAATTCATTCATGATTGAGAAATGACATT											
L36807E.histolytica	ATAGCTTTGTGAAATGATAAA-GATAAATCTTG-AGACGATCCAGTTTGTATTAGTACAAATG GCCAATTCATTCATGATTGAGAAATGACATT											
AB253475E.dispar	AAaAcTTGaaGaaAATAAA-GAAGATGAAaAAAGAAaAAAGTAGTTCATCAaACaCAGGTGATGAAcCAGaCAATATTTCGAAaCAAAATCAGATG											
AB253476E.dispar	AAaAacTTGaaGaaAATAAA-GAAGATGAAaAAAGAAaAAAGTAGTTCATCAaACaCAGGTGATGAAcCAGaCAATATTTCGAAaCAAAATCAGATG											
Consensus	101 I-I CTA CTA CTA CTA ATG aTg											

22. ábra. *Entamoeba histolytica* összehasonlítás referencia szekvenciákkal (Gene Bank *Entamoeba histolytica* No: X75434; M95498; L36807 és *Entamoeba dispar* No: AB253475 és AB253476) MultAlin program segítségével.

#### 4.1.5 *Entamoeba histolytica* filogenetikai analízis eredmény

A filogenetikai analízis eredmény szintén megerősítette, hogy a beteg minták egyeznek az *E. histolytica*-val nem pedig az *E. dispar*-ral, amelyet a 24. ábrán mutatok be.



23. ábra. Filogenetikai analízis beteg mintának és az *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* referencia szekvenciákkal (Gene Bank *Entamoeba histolytica* No: X75434; M95498; L36807 és *Entamoeba dispar* No: AB253475 és AB253476)

*E. histolytica* 16S RNS génjére Roy és munkatársai (2005) publikáltak primereket, ezek LightCycler PCR készülékre lettek tervezve, amely fajspecifikusan azonosítja a parazitát. Az eredményeket összefoglaltam a 20-23. ábrában és a 12. sz. táblázatban. A 12. sz. táblázatban az látszik, hogy a két PCR módszernek az eredménye is, szenzitivitása is egyezik.

12.sz. táblázat. *Entamoeba histolytica* szignifikáns eredmények mikroszkópiusan, *Entamoeba histolytica* Ag-specifikus ELISA-tesztel (Wampole™, Catalog No. 30404, USA) és PCR vizsgálat.

Vizsgálat típusa	Vizsgálat száma	Pozitív minták (%)	Negatív minták (%)
Mikroszkóp	77	3(3.89)	74(96.10)
<i>Entamoeba histolytica</i> Wampole™ ELISA	75	3(4.0)	72(96.0)
Electrophoretic PCR	77	24(31.16)	53(68.83)
FRET PCR	77	24(31.16)	53(68.83)

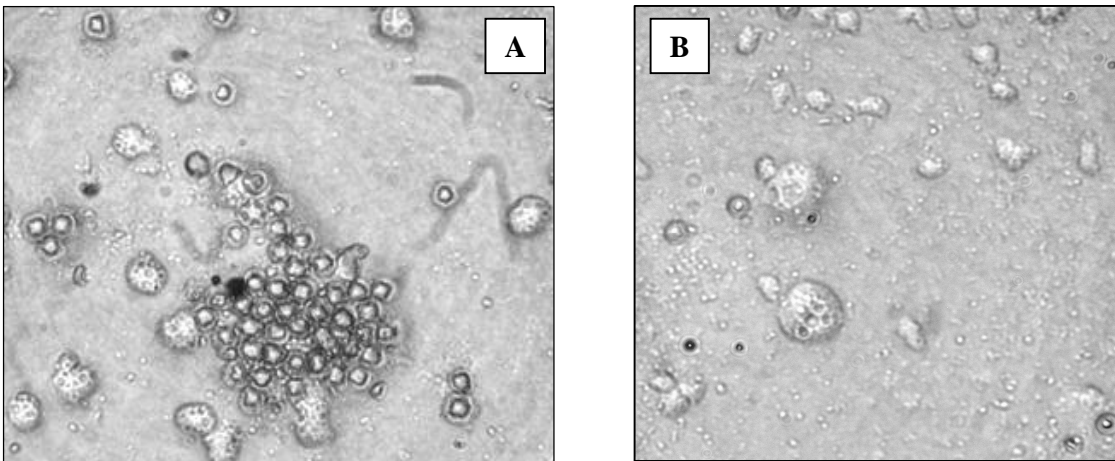
Tehát kidolgoztam egy magas specifitású és igen érzékeny, gyors módszert, amely 32 mintát 2 óra alatt tud értékelni és amely alkalmas bármilyen váladékból, tályogból, punktatumból a *E. histolytica* kimutatására.

## 4.2 *Acanthamoeba* spp. azonosítása

### 4.2.1 *Acanthamoeba* spp. jelenlétének kimutatása mikroszkópos és tenyésztési vizsgálattal

A mikrobiológiai vizsgálat során először a mintákból steril PBS oldattal sorozat hígítást készítettem meghatároztunk PAGE (hígítás sort  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) agar lemez a minták összes élő sejt számát tenyésztéses szelektív agaron, 37 és 28°C-on inkubáltam olyan inkubációs idővel (48, 72 és 96 óra) amelyek megfelel a mikrobák növekedésének. 44 különböző morfológiájú telep nőtt ki a hígított lemezeken, amelyekből saját törzsgyűjteményt kaptam.

A kukorica és lucerna rizoszférájából a baktériumon és gombán kívül sikerült kimutatni szabadon élő amoebákat tenyésztéses eljárással, a Page agaron. A táptalajon kitenyésztett amoebákat morfológiailag azonosítottam: *Naegleria* és *Acanthamoeba* speciesként (24. ábra.).



24. ábra. Mikroszkópos felvétel a rizoszférából izolált amoeba (*Naegleria* és *Acanthamoeba* spp.) trophozoita és cystának, 320x (A) és 400x (B) nagyítással.

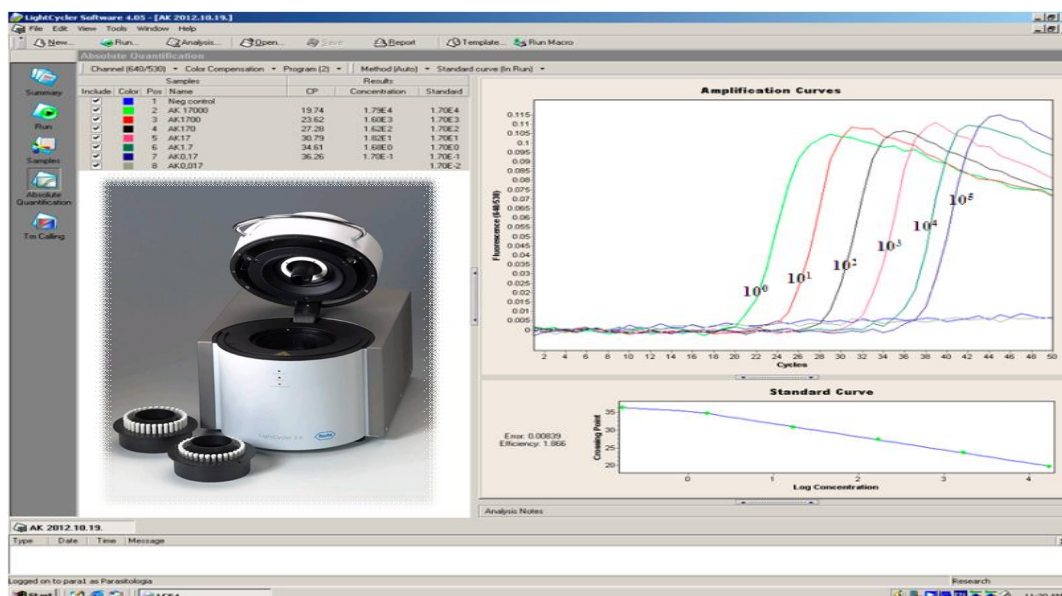
### 4.2.2 *Acanthamoeba* spp. jelenlétének kimutatása real-time FRET PCR technikával

A kukorica és lucerna rizoszférájából vett 1g mintát *Acanthamoeba* spp. real-time FRET PCR módszerrel, a kalibrációs görbe segítségével, absolute quantificatio-val sikerült meghatározni DNS koncentrációt. Tehát, a KUK1-264,0db/20 $\mu$ l, KUK2-1,0 db/20 $\mu$ l, KUK3-68,0 db/20 $\mu$ l, KUK4-1,3 db/20 $\mu$ l, KUK5-2,4 db/20 $\mu$ l, KUK6-4,1 db/20 $\mu$ l, LUC1-129,0 db/20 $\mu$ l, LUC2-74,0 db/20 $\mu$ l, LUC3-46,0 db/20 $\mu$ l, LUC4-1,6 db/20 $\mu$ l, LUC5-1,6 db/20 $\mu$ l, LUC6-4,0 db/20 $\mu$ l és öntöző rendszer (öntöző rendszer-1liter víz bekoncentrálva PVDF) 1,0 db/20 $\mu$ l az *Acanthamoeba* genus 13 pozitív minta volt. Az Ut1, Ut2, Ut3, Gyep1, Gyep2, Gyep3 és a pocsolya (1liter pocsolya bekoncentrálva PVDF) az *Acanthamoeba* genus real-time FRET PCR módszerrel negatív eredményt adott.

Az *Acanthamoeba* spp. génjére tervezett LightCycler PCR fajspecifikusan azonosítja a parazitát. A vizsgálat laboratóriumunkban > 0,017 db/20 $\mu$ l *Acanthamoeba* spp. kimutatására képes.

#### 4.2.2.1 *Acanthamoeba* spp. szenzitivitás

3 különböző napon 3 párhuzamosban végeztem el 1700db/20 $\mu$ l *Acanthamoeba* spp. közötti standard hígítási sor (17000; 1700; 170; 17; 1,7; 0,17; 0,017 *Acanthamoeba* spp /20 $\mu$ l) tesztelését a PCR módszerrel. A kimutathatósági határ (az a koncentráció, amely mindhárom párhuzamosban pozitív eredményt adott) 0,17 kópia/20 $\mu$ l volt (25. ábra.) A korreláció  $p=0,05$  szinten szignifikáns.



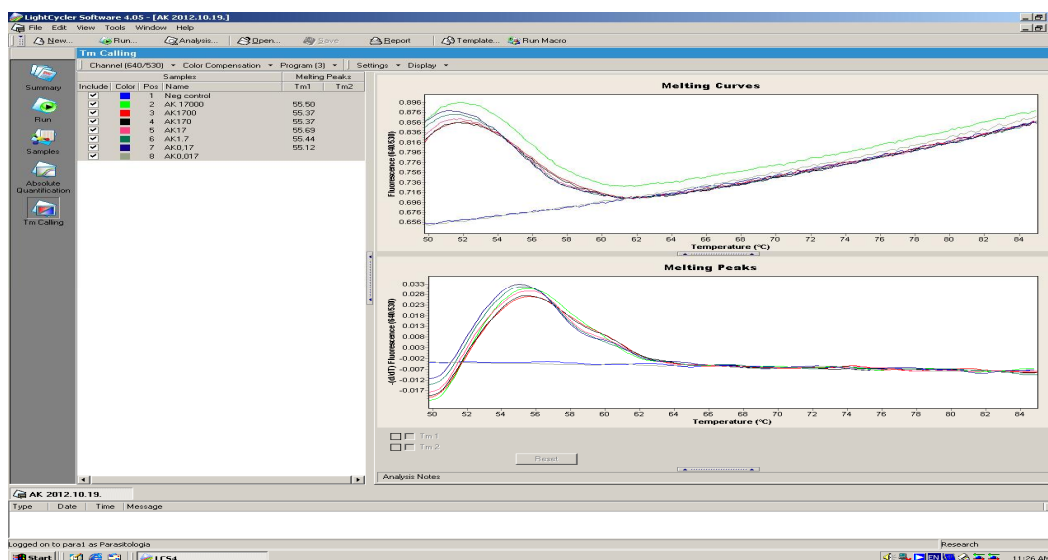
25. ábra. *Acanthamoeba* spp. szenzitivitás és specificitás-analízis hígítási sorozatának (17000 - 0.017 protozoon 20 $\mu$ l PCR reakció). A korreláció  $p=0,05$  szinten szignifikáns.

#### 4.2.2.2 *Acanthamoeba* spp. specificitás

A módszer specificitását a primerek és próbák helyes megválasztása biztosítja. A primereket és a próbákat összehasonlító szekvenenciaanalízissel vettem egybe az ismert szekvenenciaadatokkal, az esetleges homológiák kiszűrésére.

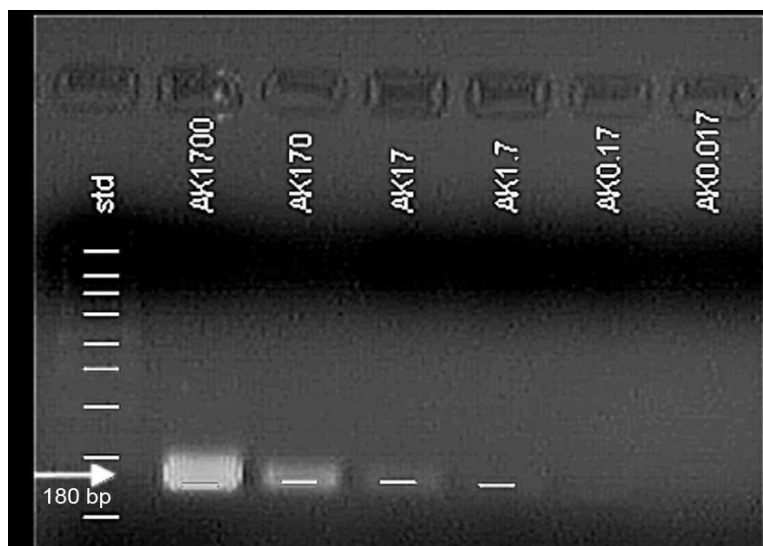
A real-time FRET PCR vizsgálatot elvégeztem *Acanthamoeba* spp. pozitív mintával, és *Acanthamoeba* spp. tenyészetből nyert trophozoitokkal. Valamennyi minta és a tenyészetből nyert trophozoitok pozitív eredményt adtak és az olvadási pont azonos volt 55°C (26. ábra.).





26. ábra. *Acanthamoeba* spp olvadáspont mérésének (Tm.)

Pozitív *Acanthamoeba* spp. FRET-Real-Time-PCR termékét gélelektroforézissel (kontrol futtatást 1,5% 1.30 óra) megvizsgáltam és 180 bp minden pozitív mintában jelet kaptam. Tehát az elektroforézissel is bizonyítottam, hogy termékünk specifikus



27. ábra. Pozitív *Acanthamoeba* DNS kontrollból (1700 - 0.017 protozoon PCR reakció) vizsgálatot végeztem, érzékenység céljából (vonal 1: Molekular Marker 100bp (Sigma-P1473); vonal 2: AK 1700/20 $\mu$ l; vonal 3: AK 170/20 $\mu$ l; vonal 4: AK 17/20 $\mu$ l; vonal 5: AK 1.7/20 $\mu$ l; vonal 6: AK 0.17/20 $\mu$ l; vonal 7: AK 0.017/20 $\mu$ l).

Az *Acanthamoeba* spp. vizsgálati módszer jellemzői a 18S rRNS génje az *Acanthamoeba* spp. genomjában nagyszámú kópiában van jelen, funkciója a riboszómális RNS kódolása. A PCR kimutatja akár az élő, akár az elpusztult parazitát.

Az *Acanthamoeba* spp. 18S rRNS génjére tervezett PCR fajspecifikusan azonosítja a parazitát. A vizsgálat laboratóriumunkban real-time FRET PCR 0,017 db/20 $\mu$ l és gélelektroforézissel 1,7 db/20 $\mu$ l *Acanthamoeba* spp. kimutatására képes (27. ábra.).

#### 4.2.2.3 *Acanthamoeba* spp. keresztreakció

A keresztreakciók kiszűrésére a következő, széleskörűen előforduló kórokozókat tartalmazó mintákkal végeztem el a tesztet: *E. histolytica*, *E. dispar*, *Blastocystis hominis*, *G. lamblia*. Valamennyi minta negatív eredményt adott a vizsgálatban, tehát keresztreakció a felsorolt fajokkal nem áll fenn.

#### 4.2.3 *Acanthamoeba* spp. szekvencia analízis eredménye

Az *Acanthamoeba* genus 13 pozitív mintákat tovább szekvenáltam, species meghatározás céljából.

>*Acanthamoeba*18SrRNA1KUK

AAATGATGTGTCAAATGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGG  
GATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCATGTTGGTTTTGGCATGCGCGAGGAC  
TAGGGTAATGATTAATAG

>*Acanthamoeba*18SrRNA2KUK

GAGCAGAGTGTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGG  
ATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGCACGCGAGGACCAGGT  
AATGATTATAGG

>*Acanthamoeba*18SrRNA3KUK

AAATAGAGTGTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGG  
GATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTA  
GGGTAATGATTAATAG

>*Acanthamoeba*18SrRNA4Kuk

AAATAGAGTGTCAAAGCACGGCAGATCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGG  
ATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGCACTA  
GGGTAATGATTAATAG

>*Acanthamoeba*18SrRNA5Kuk

AATAGAGTGTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGA  
TAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGG  
GTAATGATTAATAG

>*Acanthamoeba*18SrRNA6Kuk

AAATAGAGTGTCAAAGCACGGCAGATCTAATTTTCTATGCCACCGAATACATTAGCAT  
GGGATAATGGAATAAGGACCTGATCCTCTATTTTCAGATTGGTTTATGGCAGGCGAAG  
GACTAGGGTAGATTGATTAATAG

>*Acanthamoeba*18SrRNA1LUC

AAATAGAGTGTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGG  
GATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTA  
GGGTAATGATTAATAG

>*Acanthamoeba* 18S rRNA 2LUC

AAATAGAGTGTTC AAGCAGGCAGATCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGA  
TAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTCTTTTCAGTTGGTTAATTAGTAGTGAGGATCAGG  
TAATGATTAATAG

>*Acanthamoeba*18SrRNA3LUC

AGGCAGAGTGTTC AAGCAGGCAGATCAATTTTCTTGCCACCGAATACATTAGCATGG  
GATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATCTTCAGTTGGTTAACTTGTGAGAGAGATGC  
AGGGTGATTGATGA

>*Acanthamoeba*18SrRNA4Luc

GGGCAGAGTGTTC AAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGG  
ATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAG  
GGTAATGATTATAGA

>*Acanthamoeba*18SrRNA5Luc

GCATAGAGTGTTC AAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGG  
ATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAG  
GGTAATGATTATAGA

>*Acanthamoeba*18SrRNA6Luc

GGGACGGGCCTAGTCTCGCGCTGCCAAAACA ACTGAAAATAGGAGGACAGGTCCTATT  
CCATTATCCCATGCTAATGTATTCGGTGGCAGAAAATTGGATCTGCCTGCTTTGAACAC  
TCTAATTTTTTTCACGGTAACGAAATTTCTGGGA

>*Acanthamoeba*18SrRNAwateringsystemPVDFiltr

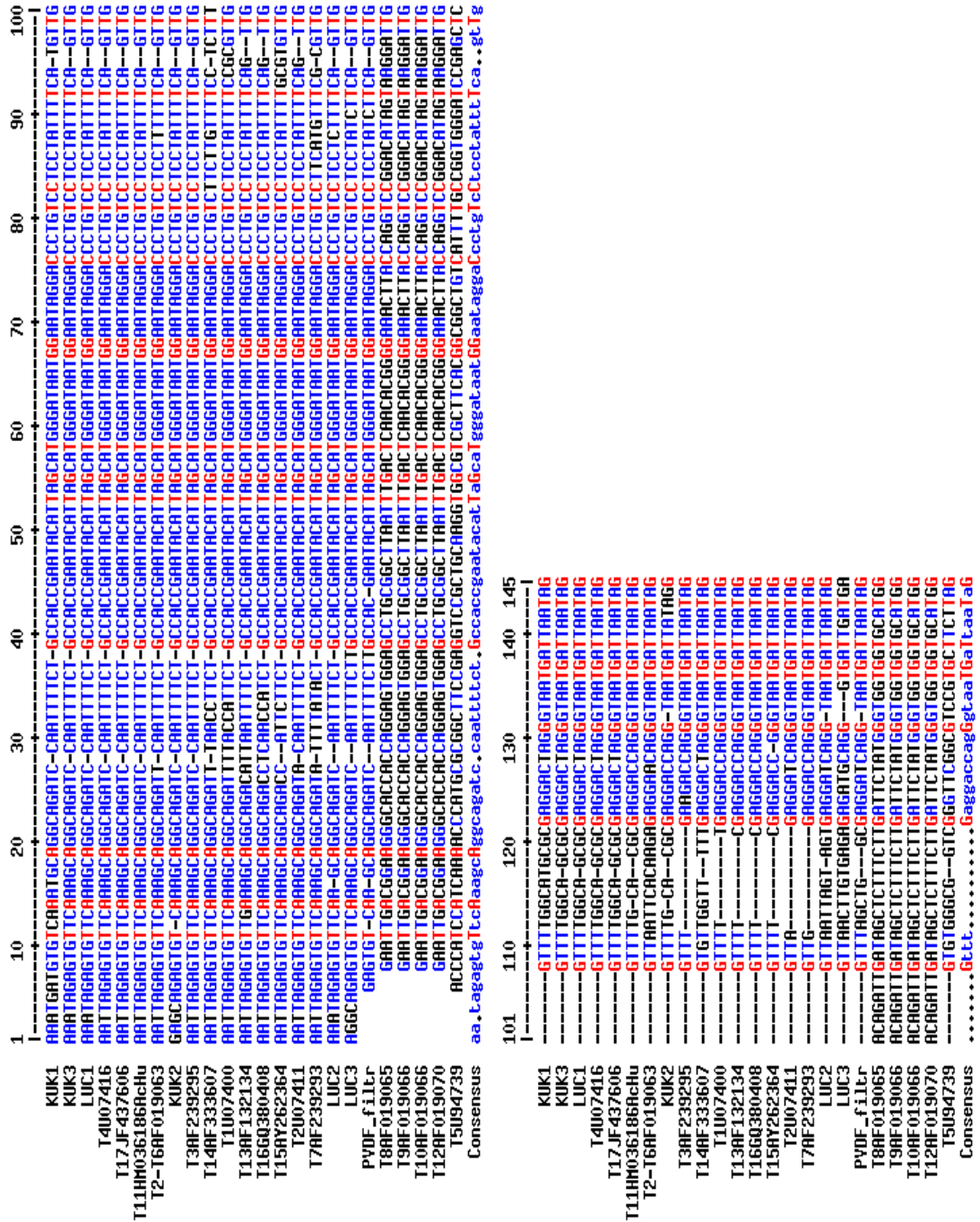
GAGTGTCAAGCAGGCAGATCAATTTTCTTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGG  
AATAGGACCCTGTCCTCCTATCTTCAGTTGGTTAGCTGGCGAGGATCAGGTAATGATT  
AATAG

#### 4.2.4 *Acanthamoeba* spp. szekvencia-illesztő program eredmény

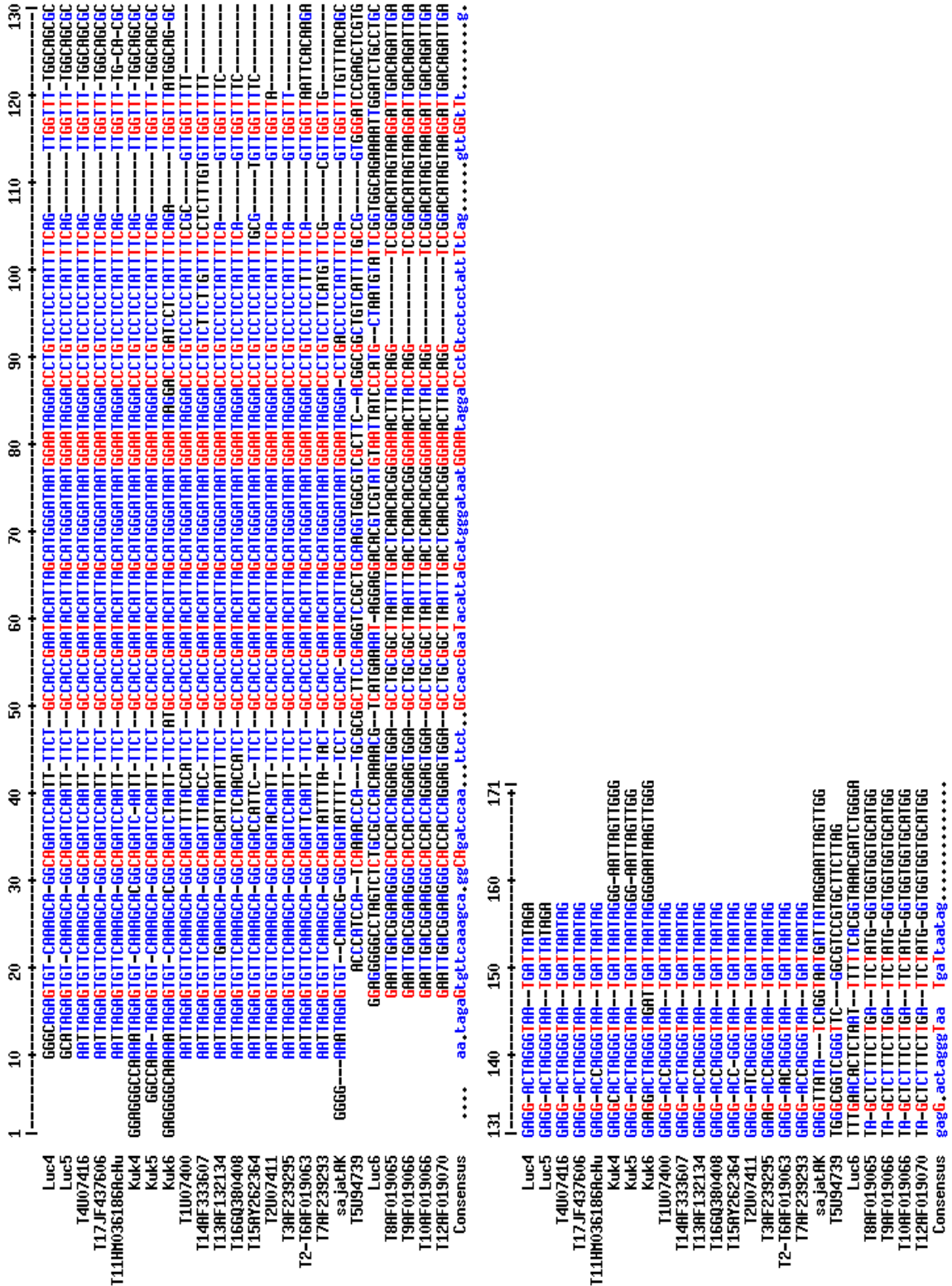
Ahhoz, hogy könnyebben tudjam meghatározni a csoportokat, először is letöltöttem a NCBI honlapról a referencia szekvenciákat (*Acanthamoeba* spp. jelenleg 17 genotípusa T1-T17.) és a MultAlin program segítségével illesztettem (28. ábra. és 29. ábra.).

NCBI *Acanthamoeba* spp. referencia szekvenciák 17 genotípusa:

NCBI\_T1U07400; NCBI\_T2U07411; NCBI\_T3AF239295; NCBI\_T4U07416;  
NCBI\_T5U94739; NCBI\_T2\_T6AF019063; NCBI\_T7AF239293; NCBI\_T8AF019065;  
NCBI\_T9AF019066; NCBI\_T10AF019066; NCBI\_T11HM036186AcHu; NCBI\_T12AF019070;  
NCBI\_T13AF132134; NCBI\_T14AF333607; NCBI\_T15AY262364; NCBI\_T16GQ380408 és  
NCBI\_T17JF437606.



28. ábra. MultAlin program segítségével, *Acanthamoeba* fajok PCR termék Kuk1, Kuk2, Kuk3, Luc1, Luc2, Luc3, öntözési PVDF és referencia törzsek NCBI GenBank (*Acanthamoeba* T1-T17) összehasonlítását végeztem el.



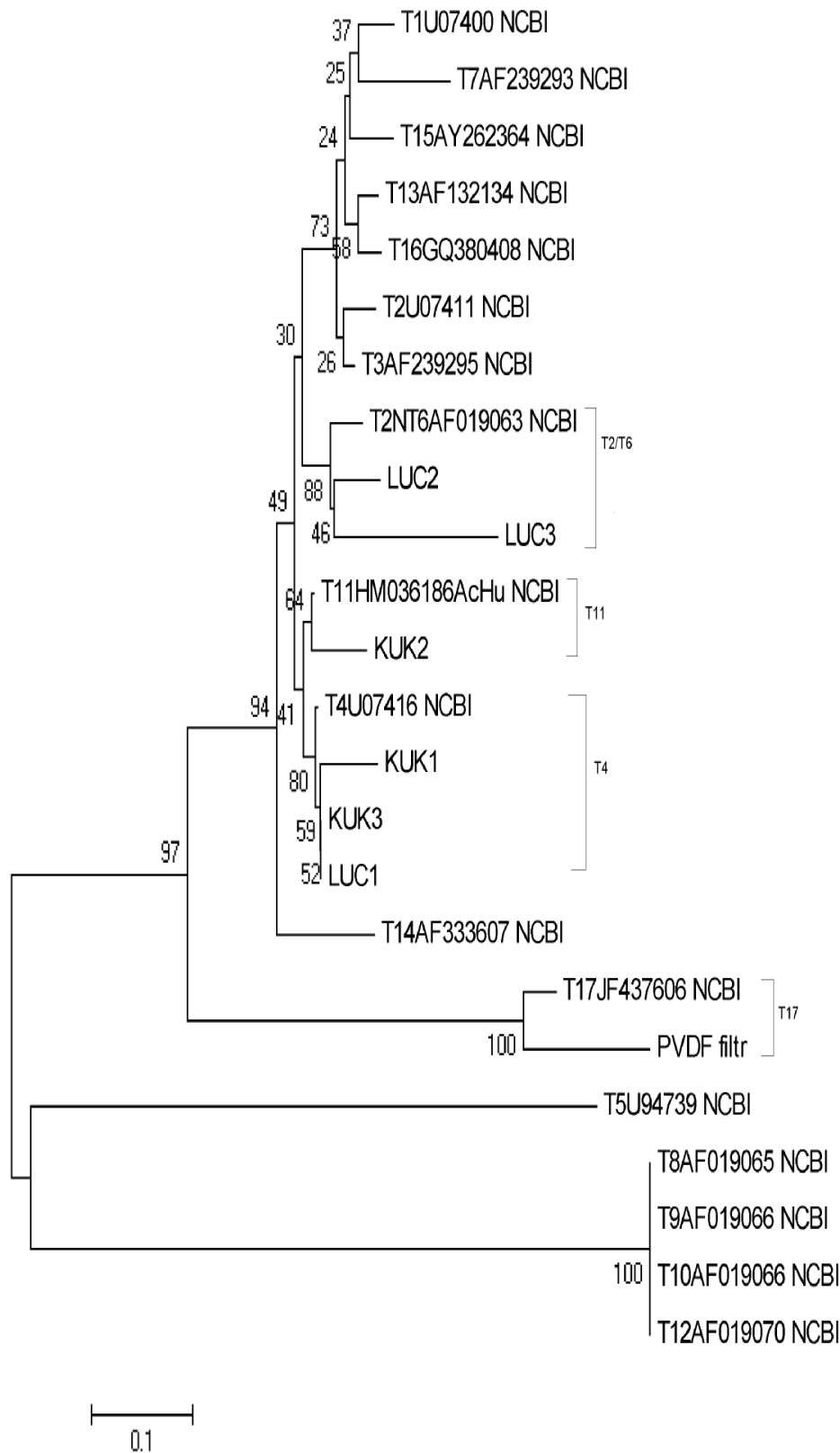
29. ábra. *Acanthamoeba* spp. LUC4, LUC5, LUC6, KUK4, KUK5 és KUK6 összehasonlítása referencia szekvenciákkal (Gene Bank *Acanthamoeba* T1-T17) MultAlin program segítségével.

#### 4.2.5 *Acanthamoeba* spp. filogenetikai analízis eredménye

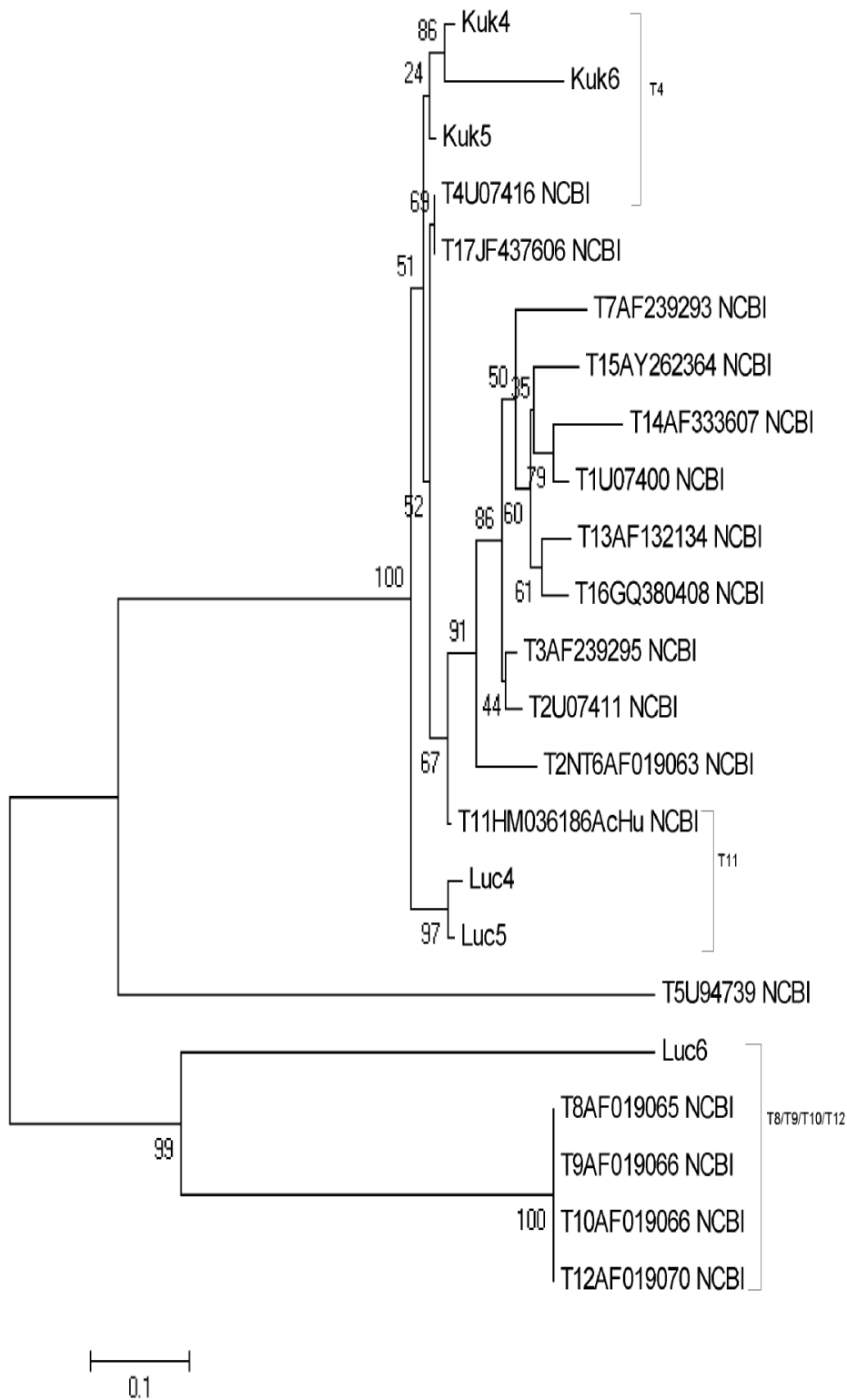
Gyökeres filogenetikai fa készítése segítségével megállapítottam, hogy a kukorica és lucerna rizoszférájában élő *Acanthamoeba*-k, taxonómiaiilag, melyik legközelebbi közös ősére mutatnak. A gyökér fán jól lehet látni (30. ábra.), hogy a PVD filter az *Acanthamoeba* T17JF437606-al van a legközelebbi rokonságban (amely jelenleg még nem okoz emberi megbetegedést). A LUC2 az *Acanthamoeba* T2NT6AFo19063-hoz (okoz emberi megbetegedést, mint keratitis, encephalitis); KUK1, KUK3 és a LUC1 az *Acanthamoeba* T4U07416 rokona (ez emberi megbetegedést okozhat, mint Keratitis, Encephalitis); KUK2 az *Acanthamoeba* T3AF239295 rokona (ez is okozhat emberi megbetegedést, mint a keratitis); LUC3 az *Acanthamoeba* T7AF239293-nak a legközelebbi rokona (amely jelenleg még nem okoz emberi megbetegedést).

Továbbá a 31. ábrán jól lehet látni, hogy a KUK4, KUK6 és KUK6 az *Acanthamoeba* T4U07416-nak; LUC 4 és a LUC5 az *Acanthamoeba* T11HM036186AcHu-nak; LUC6 az *Acanthamoeba* T8AF019065/T9AF019066/T10AF019066/T12AF019070-nek a legközelebbi rokona. Az *Acanthamoeba* T4 genotípus okozhat Keratitis és Encephalitis emberi megbetegedést, az *Acanthamoeba* T11 genotípus okozhat keratitis emberi megbetegedést, az *Acanthamoeba* T8 és T9 genotípus-ról egyelőre nincs publikálás, hogy okozhatott-e humán megbetegedést, de az *Acanthamoeba* T10 genotípus keratitis és encephalitis emberi megbetegedést okoz, és végül az *Acanthamoeba* T12 genotípus is okozhat encephalitist.

Az *Acanthamoeba* genus 13 pozitív mintákat leraktunk az NCBI BankIt1593841: KUK1 - KC434439, KUK2 - KC434440, KUK3 - KC434441, KUK4 - KC434442, KUK5 - KC434443, KUK6 - KC434444; LUC1 - KC434445, LUC2 - KC434446, LUC3 - KC434447, LUC4 - KC434448, LUC5 - KC434449, LUC6 - KC434450, Öntözés - KC434451.



30. ábra. Filogenetikai kapcsolatok *Acanthamoeba* fajok PCR termék Kuk1, Kuk2, Kuk3, Luc1, Luc2, Luc3, öntözési rendszer (PVDF) és referencia törzsek NCBI GenBank következtethet szomszéd-összekötő elemzés páronkénti összehasonlításokat (180-bp fragmentumokat).



31. ábra. Filogenetikai kapcsolatok *Acanthamoeba* fajok PCR termék Kuk4, Kuk5, Kuk6, Luc4, Luc5, Luc6, és referencia törzsek NCBI GenBank követeltethet szomszéd-összekötő elemzés páronkénti összehasonlításokat (180-bp fragmentumokat).



### 4.3 *Giardia intestinalis* azonosítása

#### 4.3.1 *Giardia intestinalis* jelenlétének kimutatása mikroszkópos és ELISA vizsgálattal

2006-2007-ban, 187 kutyától származó bélsár vizsgálatát végeztem el mikroszkóppal, ELISA coproantigén teszttel (ProSpect Remel, USA) és nested PCR módszerrel. A módszer érzékenysége nem egyezett az ELISA módszerével, ez látható a 13.sz. táblázatban. A 14.sz. táblázatban a nested PCR pozitív minták korcsoport szerinti eloszlását mutatom be.

13.sz. táblázat. A 2006-2007-ig *Giardia intestinalis* szignifikáns eredmények, mikroszkopikusan, *Giardia intestinalis* coproantigén -specifikus ELISA-teszttel (ProSpect Remel, USA) és nested PCR vizsgálat.

Vizsgálat típusa	Vizsgálat száma	Pozitív minták	%
Mikroszkóp	187	14	7,5
<i>Giardia intestinalis</i> coproantigen ELISA	187	100	58,8
nested PCR	187	11	5,8

14.sz. táblázat. A 2006-2007-ig, a *Giardia intestinalis* pozitív minták korcsoport szerinti eloszlása.



#### 4.3.2 *Giardia intestinalis* jelenléteinek kimutatása nested PCR vizsgálattal

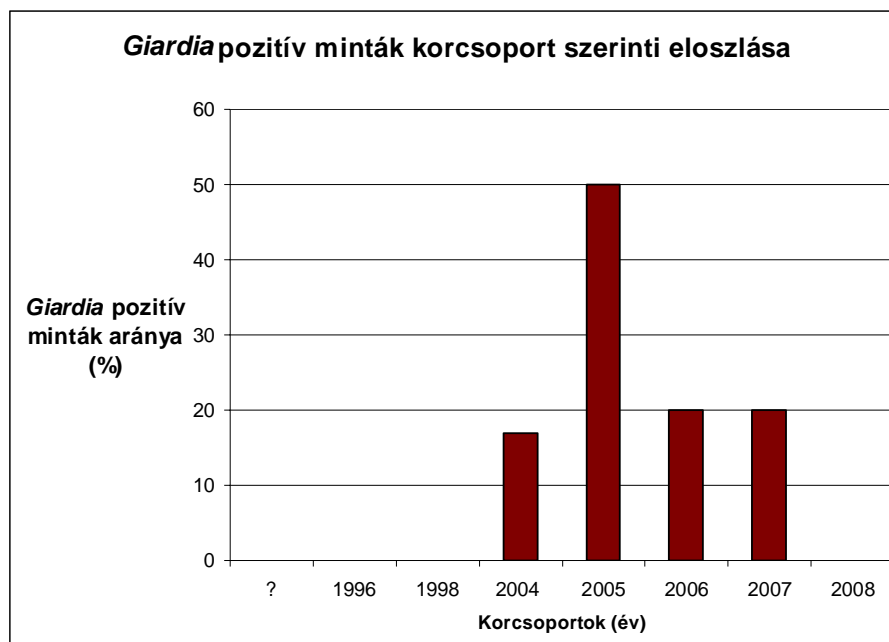
2006-2007-ig, az Országos Epidemiológiai Központ Parazitológiai Osztályára 187 (kennel ebminta) vizsgálati minta érkezett. Erre a célra, eddig leggyakoribb a mikroszkópos vizsgálat: natívan (0,88 % NaCl-os oldat), Lugol –oldatos és cysta dúsítási módszerrel, amelynek 14 mintája pozitív eredményt adott. A mikroszkópos vizsgálat szenzitivitása alacsony (7,5%). Továbbá a vizsgálati anyagból lehetőség nyílik ELISA alapú antigén kimutatásra, amelynek szenzitivitása és specificitása lényegesen meghaladja a mikroszkópos vizsgálatét. Így 187 db. székletmintát vizsgáltam meg *Giardia intestinalis* coproantigen ELISA –val (ProSpect Remel, USA). Az ELISA szenzitivitása 58,8 %-os lett, és 100 pozitív minta volt. A mikroszkópos Ag ELISA vizsgálatnak a szenzitivitása tehát nem egyezett, és a zoonotikus kockázat kizárás céljára sem alkalmas, ezért került sor a molekuláris biológiai módszerre. A választásom a McGlade et al. 2003-ban publikált nested PCR segítségével felamplifikáltam, és elektroforézissel értékeltem. A nested PCR 11 esetben pozitív eredményt adott a 187 vizsgálati mintából, amelynek a szenzitivitása rendkívül alacsony, 5,8% volt.

2008-ban, az Országos Epidemiológiai Központ Parazitológiai Osztályára 40 (kennel ebminta) vizsgálati minta érkezett. Erre a célra eddig leggyakoribb a mikroszkópos vizsgálat: natívan (0,88 % NaCl-os oldat), Lugol –oldatos és cysta dúsítási módszerrel, amelyből mindössze 1 minta lett pozitív. A mikroszkópos vizsgálat szenzitivitása alacsony (2,5%). Továbbá a vizsgálati anyagból lehetőség nyílik ELISA alapú antigén kimutatásra, amelynek szenzitivitása és specificitása lényegesen meghaladja a mikroszkópos vizsgálatét. Így 40 db. székletmintát vizsgáltam meg *Giardia intestinalis* coproantigen ELISA –val (ProSpect Remel, USA). Az ELISA szenzitivitása 52,8 %-os lett, és 21 pozitív minta volt. A mikroszkópos Ag ELISA vizsgálatnak a szenzitivitása tehát ismét nem egyezett, és a zoonotikus kockázat kizárás céljára sem alkalmas, ezért továbbra is került sor a molekuláris biológiai módszerre, a McGlade et al. 2003-ban publikált nested PCR-rel. A nested PCR 7 esetben pozitív eredményt adott a 40 vizsgálati mintából, amelynek a szenzitivitása rendkívül alacsony, 17,5% volt, ezt mutatom be a 15.sz. táblázatban. A 16. sz. táblázatban a nested PCR pozitív minták korcsoport szerinti eloszlását mutatom be.

15.sz. táblázat. A 2008 *Giardia intestinalis* szignifikáns eredmények mikroszkopikusan, *Giardia intestinalis* coproantigen -specifikus ELISA-tesztel (ProSpect Remel, USA) és nested PCR vizsgálat.

Vizsgálat típusa	Vizsgálat száma	Pozitív minták	%
Mikroszkóp	40	1	2,5
<i>Giardia intestinalis</i> coproantigen ELISA	40	21	52,8
nested PCR	40	7	17,5

16.sz. táblázat. A 2008-ban *Giardia intestinalis* pozitív minták korcsoport szerinti eloszlása.



### 4.3.3 *Giardia intestinalis* szekvencia analízis eredmény, nested PCR

A *G. intestinalis* pozitív mintákat tovább szekvenáltam, a csoport meghatározás céljából.

- A 2006-2007-ben nested PCR *G. intestinalis* pozitív mintáknak szekvenciák:

>gi|110676643|gb|**DQ112665.2**| *Giardia intestinalis* isolate HuNCE117d 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
 GACGCTCTCCTCAAGGACACAAGCCATGCATGCCGCACACCCGGGAGGCGGCGGACG  
 GCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCA  
 ACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGTGCGGGCGCCCGCGG

>gi|110676641|gb|**DQ118557.2**| *Giardia intestinalis* isolate HuNCE145d 18S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 ACGCTCTCCCAAGGACACAAGCCATGCATGCCCGCACACCCGGGAGGCGGCGGACG  
 GCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCA  
 ACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGTGCGGACGCCCGCGGGCGAGCAGCGTGACGC  
 AG

>gi|110676642|gb|**DQ118558.2**| *Giardia intestinalis* isolate HuNCE147d 18S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 GACGCTCTCCCAAGGACACAAGCCATGCATGCCCGCACACCCGGGAAGCGGCGGAC  
 GGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGC  
 AACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGTGCGGACGCCCGCGGGCGAGCAGCGTGACG  
 CAG

>gi|116241203|gb|**DQ890186.1**| *Giardia intestinalis* isolate HuNCE615d 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
 ACGCTCTCCCAAGGACACAAGCCATGCATGCCCGCACACCCGGGAAGCGGCGGACG  
 GCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCA  
 ACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGTGCGGACGCCCGCGGGCGAGCTAGCGTGACG  
 CAGAT

>gi|116241204|gb|**DQ890187.1**| *Giardia intestinalis* isolate HuNCE624d 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
 TGACGCTCTCCCAAGGACACAAGCCATGCATGCCCGCACACCCGGGAGGCGGCGGAC  
 GGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGC  
 AACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGTGCGGGCGCCCGCGGGCGAGCAGCGTGACG  
 CAG

>gi|116241205|gb|**DQ890188.1**| *Giardia intestinalis* isolate HuNCE635d 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
 GACGCTCTCCCAAGGACACAAGCCATGCATGCCCGCACACCCGGGAAGCGGCGGAC  
 GGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGC  
 AACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGTGCGGACGCCCGCGGGCGAGCAGCGTGACG  
 CAG

>gi|116241206|gb|**DQ890189.1**| *Giardia intestinalis* isolate HuNCE636d 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
 TATGACGCTCTCCCAAGGACACAAGCCATGCATGCCCGCACACCCGGGAAGCGGCGG  
 ACGGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTG

GCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGTGCGGACGCCCGCGGGCGAGCAGCGTGA  
CGCAGA

>gi|116241207|gb|**DQ890190.1**| Giardia intestinalis isolate HuNCE639d 18S small subunit  
ribosomal RNA gene, partial sequence

GACGCTCTCCCAAGGACACAAGCCATGCATGCCCCGCACACCCGGGAAGCGGCGGAC  
GGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGC  
AACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGTGCGGACGCTCGCGGGCGAGCTAGCGTGAC  
GCAG

>gi|116241208|gb|**DQ890191.1**| Giardia intestinalis isolate HuNCE646d 18S small subunit  
ribosomal RNA gene, partial sequence

ACGCTCTCCCAAGGACACAAGCCATGCATGCCCCGCACACCCGGGAGGCGGCGGACG  
GCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCA  
AACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGTGCGGGCGCCCGCGGGCGAGCAGCGTGACGC  
AG

>gi|116241209|gb|**DQ890192.1**| Giardia intestinalis isolate HuNCE651d 18S small subunit  
ribosomal RNA gene, partial sequence

GACGCTCTCCCAAGGACACAAGCCATGCATGCCCCGCACACCCGGGAGGCGGCGGAC  
GGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGC  
AACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGTGCGGGCGCCCGCGGGCGAGCAGCGTGACG  
CAG

>gi|116241210|gb|**DQ890193.1**| Giardia intestinalis isolate HuNCE911d 18S small subunit  
ribosomal RNA gene, partial sequence

GACGCTCTCCCAAGGACACAAGCCATGCATGCCCCGCACACCCGGGAGGCGGCGGAC  
GGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGC  
AACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGTGCGGGCGCCCGCGGGCGAGCTAGCGTGAC  
GCAG

- A 2008- ban nested PCR *G. intestinalis* pozitív mintáknak szekvenciák:

>*Giardia intestinalis* 18SrRNA\_1kutya

CGCATGCCCCGCACACCGGTGAAGCGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCG  
TCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAA  
GTGCGGACGCCCGCGGGCGAGCAGCGTTGAACGCAGAGT

>*Giardia intestinalis* 18SrRNA\_3kutya

GGCCGCACTNGCGCGCACGTCTTGCGCGGGTTCAGCGGTGTCCGGCTAGCAGGGA  
CGCCGCGGGGGGTGCAACCGTTGTCCTGAGCCGTCCGCGCTTCCCGGGTGTGCGGGC  
ATGCATGGCTTGTGTCCTTGGGGAAGAAGCGTCA

>*Giardia intestinalis* 18SrRNA\_6kutya

GGCGTGACTGNCGCGCACGTCTTGCGCGGGTTCAGCGGTGTCCGGCTAGCAGGGA  
CGCCGCGGGGGGTGCAACCGTTGTCCTGAGCCGTCCGCGCTTCCCGGGTGTGCGGGC  
ATGCATGGCTTGTGTCCTTGGGAGAGCGTCA

>*Giardia intestinalis* 18SrRNA\_10kutya

GGCTGCACTTGGCGCGCACGTCTTGCGCGGGTTCAGCGGTGTCCGGCTAGCAGTGAC  
GCCGCGGGGGGTGCAACCGTTGTCCTGAGCCGTCCGCGCTTCCCGGGTGTGCGGGCA  
TGCATGGCTTGTGTCCTTGGGGAAGAAGCGTCA

>*Giardia intestinalis* 18SrRNA\_17kutya

GGCGCACTTGCGCGCACGTCTTGCGCGGGTTGCAGCGGTGTCCGGCTAGCAGTGACG  
CCGCGGGGGGTGCAACCGTTGTCCTGAGCCGTCCGCCGCTTCCCGGGTGTGCGGGCAT  
GCATGGCTTGTGTCCTTGGGGAGAGCGTCA

>*Giardia intestinalis* 18SrRNA\_18kutya

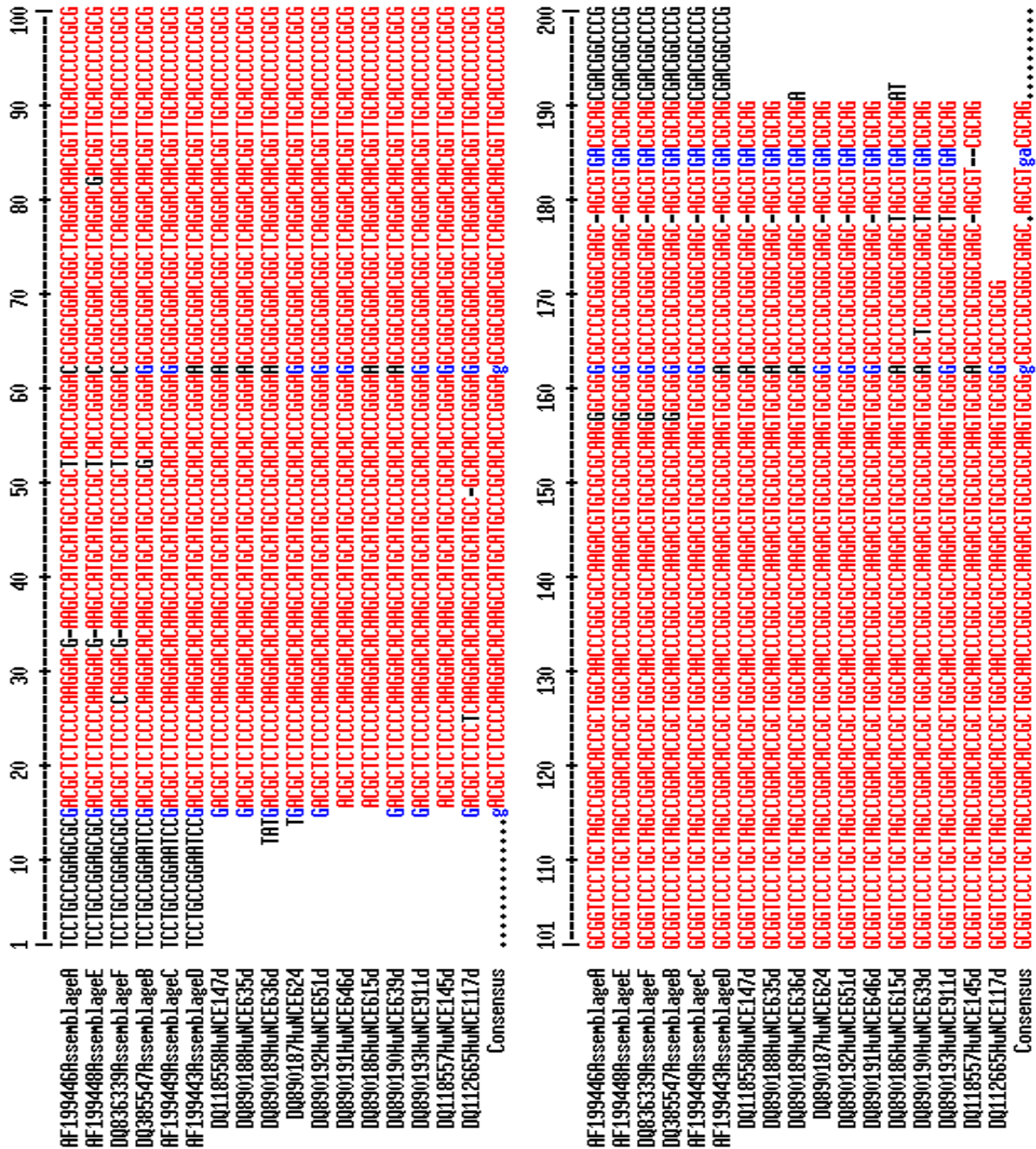
GTCCGCACACCGGGAAGCGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCGCGGCG  
GTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTTGCGCGCAAGTGCG  
GACGCCCCGCGGGCGAGCAGCGTTGAACGCAGA

>*Giardia intestinalis* 18SrRNA\_39kutya

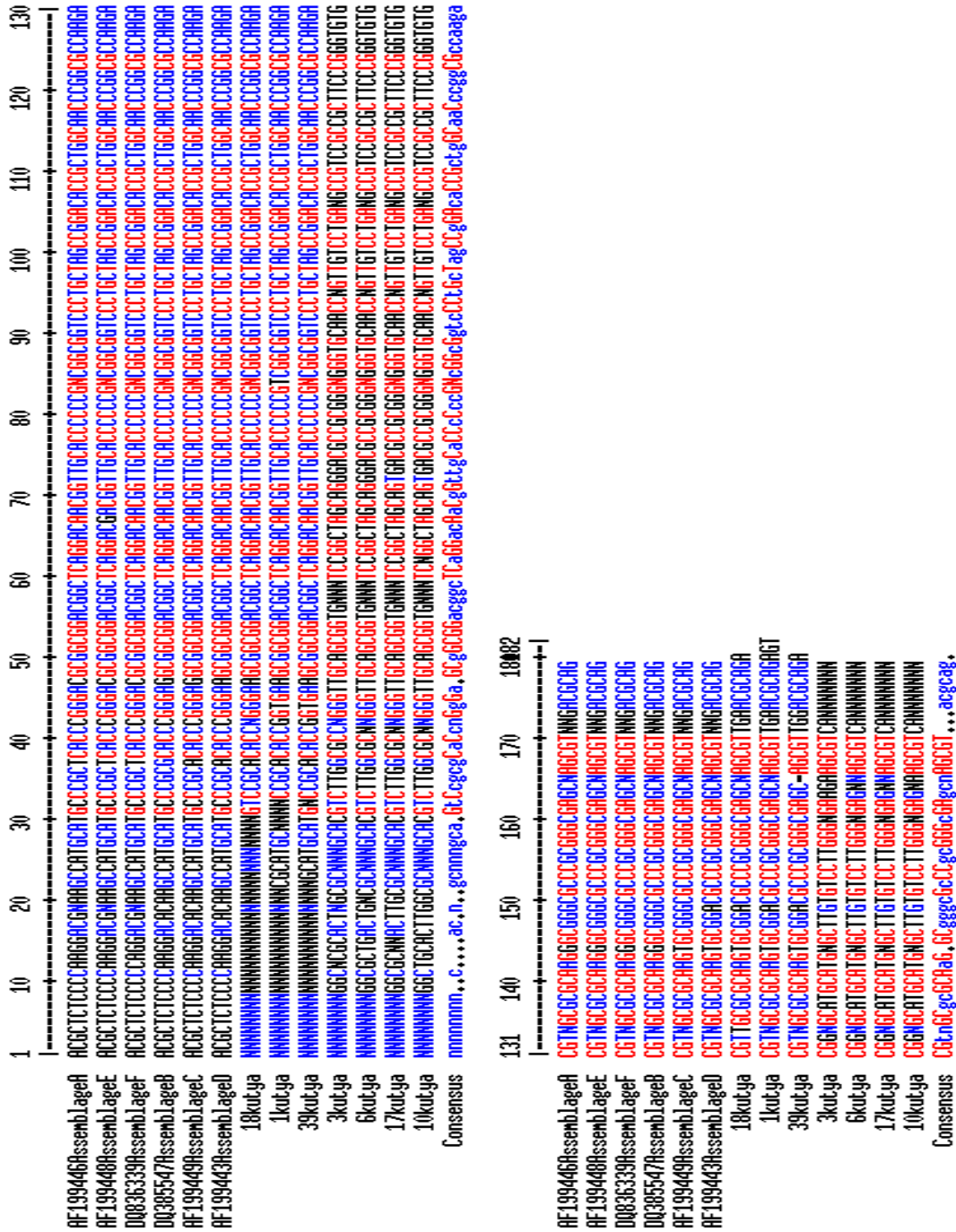
GCATGCATGCCGCACACCGGTGAAGCGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCC  
CGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCA  
AGTGCGGACGCCCGCGGGCGAGCAGCGTTGGACGCAGA

4.3.4 *Giardia intestinalis* szekvencia illesztő program eredmény, nested PCR-ral

Ahhoz, hogy könnyebben tudjam meghatározni a szekvenciákat, először is letöltöttem a NCBI honlapról referencia szekvenciákat (*G.intestinalis* jelenleg 6 csoportját) (32. ábra és 33. ábra).



32. ábra. A 2006-2007-ig *Giardia intestinalis* szekvencia DQ112665.2, DQ118557.2, DQ118558.2, DQ890186.1, DQ890187.1, DQ890188.1, DQ890189.1, DQ890190.1, DQ890191.1, DQ890192.1, DQ8901931 illesztőprogram eredménye összehasonlítás referencia szekvenciákkal (Gene Bank *Giardia intestinalis* Assemblage A - AF199446.1; Assemblage B - DQ385547.1; Assemblage C - AF199449.1; Assemblage D - AF199443.1; Assemblage E - AF199448.1; Assemblage F - DQ836339.1) MultAlin program segítségével.

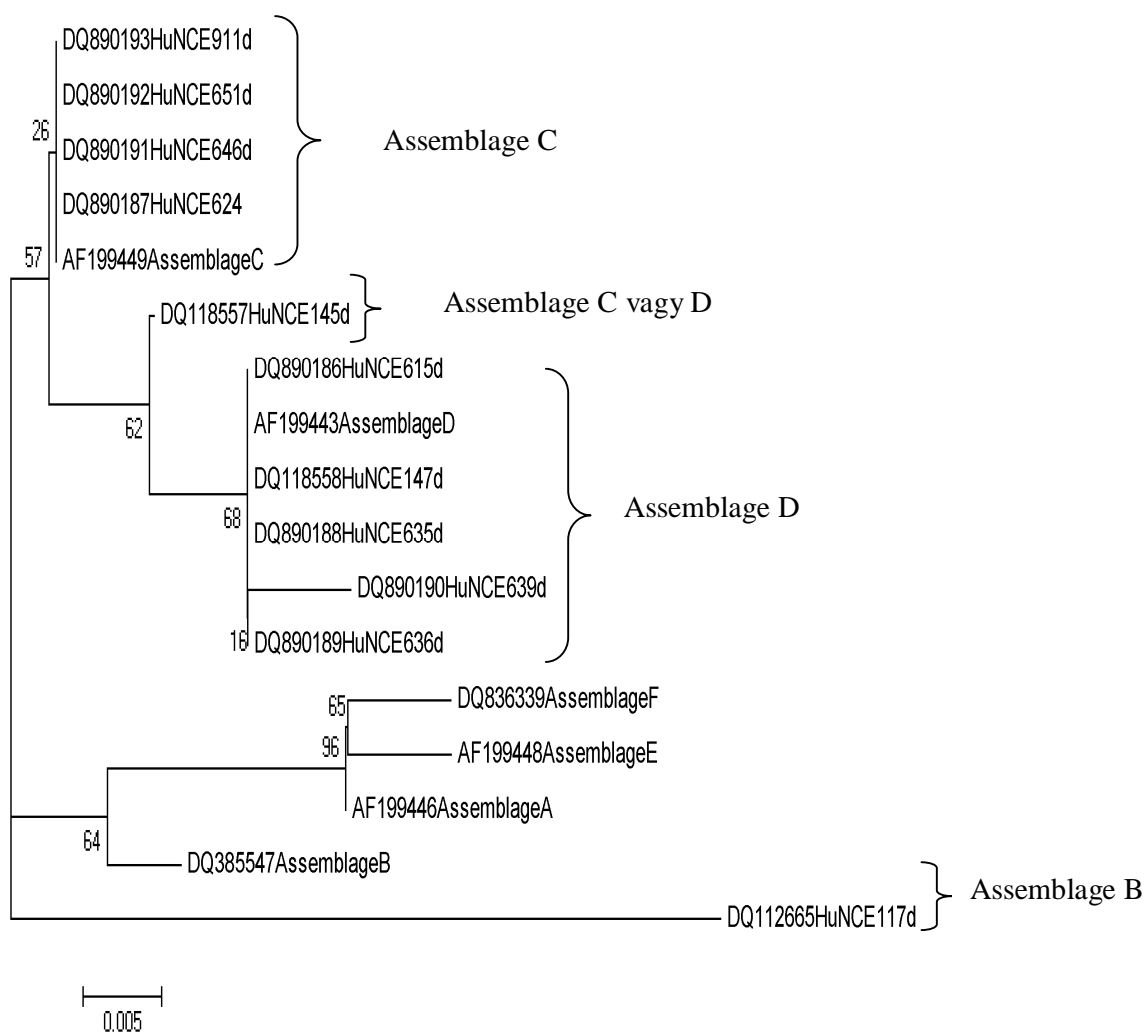


33. ábra. A 2008 *Giardia intestinalis* szekvenciák 1kutya, 3kutya, 6kutya, 10kutya, 17kutya, 18kutya, 39kutya illesztőprogram eredménye összehasonlítás referencia szekvenciákkal (Gene Bank *Giardia intestinalis* Assemblage A - AF199446.1; Assemblage B - DQ385547.1; Assemblage C- AF199449.1; Assemblage D - AF199443.1; Assemblage E - AF199448.1; Assemblage F - DQ836339.1) MultAlin program segítségével.



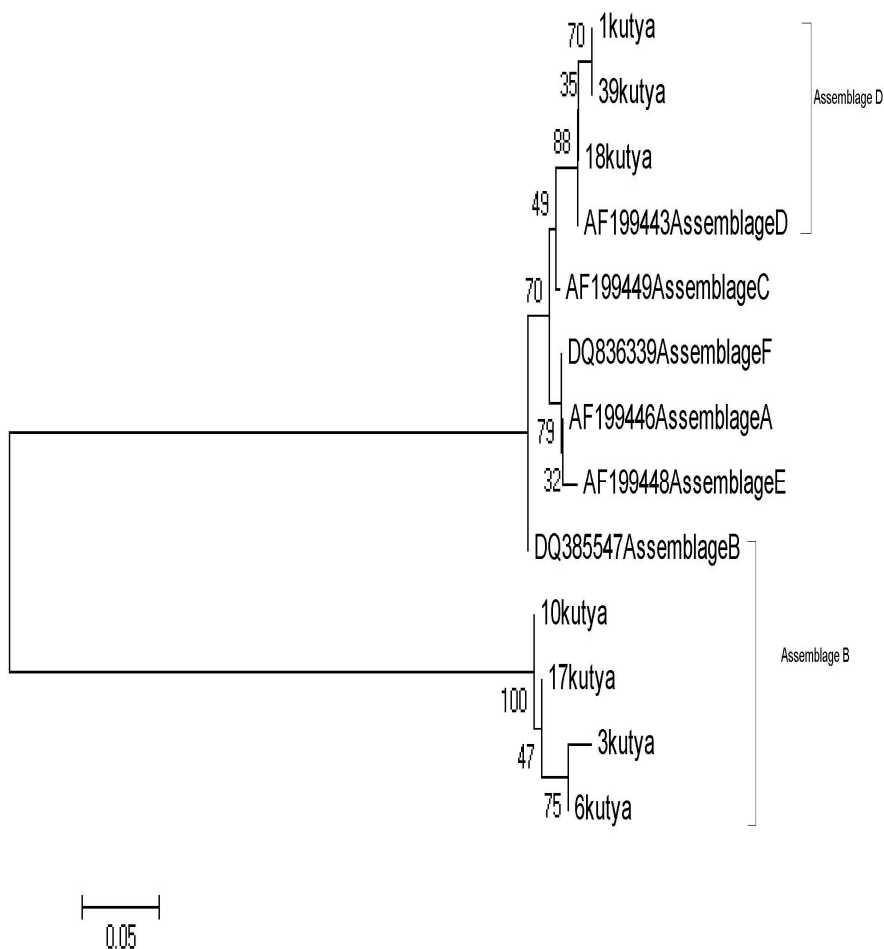
### 4.3.5 *Giardia intestinalis* filogenetikai analízis eredménye, nested PCR-ral

A *G. intestinalis* filogenetikai fa készítésének segítségével megállapítottam, hogy a kutya *Giardia* fajok PCR termékei melyik taxonómiailag legközelebbi referencia szekvenciákkal hozhatók kapcsolatba (AssemblageA\_AF199446.1; AssemblageB\_DQ385547.1; AssemblageC\_AF199449.1; AssemblageD\_AF199443.1; AssemblageE\_AF199448.1; AssemblageF\_DQ836339.1). A 34. ábrán lehet látni, hogy 11 pozitív mintából 5 minta hasonlít az Assemblage C-hez, 4 minta hasonlít az Assemblage D-hez, van 1 minta, amely egyformán hasonlít az Assemblage C és D-hez, és végül van 1 minta, amely hasonlít az Assemblage B-hez.



34. ábra. A 2006-2007-ig. filogenetikai kapcsolatok kutya *Giardia intestinalis* fajok PCR terméke DQ112665.2, DQ118557.2, DQ118558.2, DQ890186.1, DQ890187.1, DQ890188.1, DQ890189.1, DQ890190.1, DQ890191.1, DQ890192.1, DQ890193.1 és referencia törzsek *Giardia intestinalis* NCBI GenBank (AssemblageA\_AF199446.1; AssemblageB\_DQ385547.1; AssemblageC\_AF199449.1; AssemblageD\_AF199443.1; AssemblageE\_AF199448.1; AssemblageF\_DQ836339.1).

2008-ban a 40 vizsgálati mintából 7 pozitív minta volt, *G. intestinalis* nested PCR-el módszerrel. Filogenetikai fa készítése segítségével megállapítottam, hogy a kutya *Giardia* fajok PCR termékei melyik a taxonómiaiilag legközelebbi a referencia szekvenciákkal hozhatók kapcsolatba (AssemblageA\_AF199446.1; AssemblageB\_DQ385547.1; AssemblageC\_AF199449.1; AssemblageD\_AF199443.1; AssemblageE\_AF199448.1; AssemblageF\_DQ836339.1.). A 35 ábrán lehet jól látni, hogy 7 pozitív mintából, 4 minta hasonlított az Assemblage B-hez, és 3 minta hasonlított az Assemblage D-hez.



35. ábra. Filogenetikai kapcsolatok kutya *Giardia intestinalis* fajok PCR termékei. A 2008 1kutya, 3kutya, 6kutya, 10kutya, 17kutya, 18kutya, 39kutya és referencia törzsek *Giardia intestinalis* NCBI GenBank (AssemblageA\_AF199446.1; AssemblageB\_DQ385547.1; AssemblageC\_AF199449.1; AssemblageD\_AF199443.1; AssemblageE\_AF199448.1; AssemblageF\_DQ836339.1).

## 5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A célkitűzésnek megfelelően dolgozatomban ismertettem a protozoonok kimutatását, azonosítását és szerepét az emberi környezetben. Külön ki kell emelni, hogy a beteg szempontjából nagyon fontos a megbízható diagnózis, hiszen az akár halálos szövődmények elkerüléséhez szükség van a fertőzés korai felismerésére, a pontos és gyors laboratóriumi diagnózisra, valamint a terápia azonnali megkezdésére. A korai felismerés és a terápia felelőssége a klinikusokra hárul, a laboratóriumi dolgozók feladata, vagyis a mi feladatunk, a pontos és gyors laboratóriumi diagnózis biztosítása.

Mi várható el protozoon-diagnosztikai tesztől:

- Jó szenzitivitás
- Jó specificitás
- A humán patogén faj species szintű azonosítás
- Lehetőleg kvantifikálás
- Könnyű kivitelezhetőség
- Gyorsaságot és eredményességet, lehetőleg 1-2 órán belül

A protozoonok többsége szabadon él a környezetben, talajban, vízben, és csak egy kis részük kerül hosszabb – rövidebb kapcsolatba a növényekkel, állatokkal és az emberrel. Ahogy már említettem a parazitológia volt az utolsó a szakterületek közül, ahol bevezették a molekuláris biológiai módszereket, de mára igen fontos része lett a parazitológiai diagnosztikának. A molekuláris biológiai módszereknek nem csak a protozoonok diagnosztikájában, hanem az epidemiológiában is nagy a jelentősége. A három protozoon, amelyet magyarországi előfordulásban vizsgáltam, mintái között voltak hazai és behurcolt esetek.

Elsőként sikerült bemutatni az *E. histolytica* kimutatására alkalmazott módszereket, amelyek használatával lehetséges a mindennapi klinikai gyakorlatban gyors, specifikus real-time FRET PCR alkalmazni. Látható tehát, hogy az *E. histolytica* esetében még ma sincs kialakult, egységes elképzelés sem a patogenitásról, sem a klinikai kép megítélésről, sem az előfordulási lehetőségekről.

Korábban minden *Entamoeba* fertőzést *E. histolytica*-ként jelentettek be, ezért jelentősen túlbecsülték a kórokozó prevalenciáját. A trópusi és a szubtrópusi területek endémiásak, évente kb. 50 000 000 ember fertőződik meg *E. histolytica*-val, és a kialakuló betegség évente 40 000 – 100 000 halálesetet okoz.

A második és a harmadik célkitűzésként a kukorica és lucerna rhizospherából *Acanthamoeba* spp. kimutatása, klasszikus és modern módszerrel, eredményes volt. A nemzetközi irodalomban megjelentek adatok, hogy *Acanthamoeba* spp. izoláltak a rizs rizospherából. Nagyon jól lehet látni,

hogy a környezetben az *Acanthamoeba* specíesek pozitív hatást tanúsítanak, mivel egyensúlyt tartanak a baktériumokkal, mind a föld felszínén, mind a rhizoszférában. Az *Acanthamoeba* specíesek baktériumokkal táplálkoznak, vagyis szabályozzák a baktérium populációt.

Elsőként sikerül kimutatnom a kukorica és lucerna rizoszférából a protozoont. Meghatároztam az általunk kidolgozott real-time FRET PCR technikával és szekvenálással az *Acanthamoeba* spp. genotípusait. Ezen eredmények alapján a talált genotípusok komoly veszélyt jelentenek a mezőgazdaságban dolgozókra. A nagyon ritkán előforduló, szabadon élő amoebák komoly megbetegedéseket is okozhatnak az emberi szervezetben.

Az utóbbi években a különböző gének kutatása és a teljes genom szekvenálások, számos protozoon esetében messze előrehaladtak, miáltal új lehetőségek nyíltak meg a *Giardia* biológiájában, diagnosztikájában és ellenőrzésükben. A molekuláris epidemiológiában biokémiai és molekuláris biológiai technikákat alkalmaznak a kórokozó genetikai variabilitásának meghatározására, a fertőző betegségek ellenőrzésére és az epidemiológiai összefüggések tisztázására.

Negyedik célkitűzésként a *G. intestinalis* vizsgálata szerepelt. Céлом az volt, hogy beállítsak a *G. intestinalis*-nak egy molekuláris biológiai módszert, amellyel epidemiológiai összefüggéseket tudtam volna tisztázni. 2005-ben az általam beállított nested PCR nem volt eléggé specifikus és érzékeny.

Kidolgoztunk egy magas specifitású, igen érzékeny és gyors módszert, amely alkalmas bármilyen váladékból, tályogból, punktatumból az *E. histolytica*, *Acanthamoeba* és *G. intestinalis* kimutatására.

Többször hangsúlyoztam a dolgozatomban, hogy kézmosással és a higiéniai szabályok betartásával ezek a fertőzések jelentősen csökkenthetőek lennének.

## 6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- A 77 vizsgálati mintából 24 vizsgálati minta pozitív volt a 16S rRNS *Entamoeba histolytica* real-time FRET PCR módszerrel, a LighCycler készüléken és szekvencia alapján *Entamoeba histolytica*-nak bizonyult.
- Real-time FRET PCR módszerrel a különböző mintákban pontosan meghatározta az *Entamoeba histolytica* mennyiségét is.
- A 18S rRNS *Acanthamoeba* spp. kimutatására kidolgoztuk real-time FRET PCR módszert LighCycler készüléken Az *Acanthamoeba* genus 13 pozitív mintákat leraktunk az NCBI BankIt1593841.
- Elsőként sikerült kimutatnia az ökológiai egyensúlyban levő biotópokból, a kukorica és a lucerna rhizoszférájából az *Acanthamoeba* nemzetséghez tartozó fajok jelenlétét.
- Real-time FRET PCR módszerrel a különböző mintákban pontosan meghatározta az *Acanthamoeba* spp. mennyiségét is.
- Kutya bélsár mintákból való *Giardia intestinalis* kimutatására, a mikroszkópos és Ag ELISA módszerekhez képest nested PCR módszert szintén adaptálta.
- A 227 kutya bélsár mintákból sikerült kimutatni *Giardia intestinalis*, nested PCR módszerrel. Továbbá epidemiológiai összefüggéseket végeztünk.

## 7 ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk célja a protozoonok kimutatása, azonosítása és szerepe volt az emberi környezetben. Számos protozoon súlyos megbetegedést és halált okozhat az embereknél, ezek leggyakrabban a higiéniai szabályok nem megfelelő betartása esetén következhetnek be. A környezetben bizonyos protozoonok hosszú ideig is élnek és szaporodni is képesek (pl. *Acanthamoeba* spp.). A fogékony ember szervezetében infekciót okozhatnak. Fontos hangsúlyozni, hogy a kézmosással, a higiéniai szabályok betartásával ezeknek a fertőzéseknek a számát jelentősen le lehet csökkenteni.

A fertőzések eredetű betegségekre jellemző, hogy a biológiailag magasabb rendű gazdaszervezetben, sokkal alacsonyabb rendű szervezetek (pl. a protozoonok) idézik elő őket. A protozoonok behatolnak az emberi szervezetbe, majd ott megtelepedve, szaporodnak, és abban rövidebb-hosszabb ideig károsító hatást fejtenek ki. A protozoonok által okozott fertőződés és a betegség kitörése között az egyes betegségekre, különböző lappangási idő jellemző (pl. *G.intestinális* vagy *Acanthamoeba* spp.). A lappangási időt követően, a fertőzéstől függően jelentkezhetnek tünetek, de ezek elsősorban általános tünetek, a beteg csak a végső fázisban produkál olyan klinikai tüneteket, melyek alapján fel lehet állítani a diagnózist. Tehát a protozoonok pontos ismerete és az élő szervezetben vagy a környezetben való terjedésének megismerése, rendkívül fontos feladat.

Köztudott, hogy környezetünkben, továbbá az emberi szervezetben apatogén protozoonok is tartózkodhatnak, amelyek túlszaporodásuk esetén betegségeket is okozhatnak. Arra törekedtem, hogy egyidejűleg mutassam be a protozoonokat, azok hatását az emberi szervezetben, valamint a környezetben való túlélési mechanizmusait.

Sikerült *Acanthamoeba* spp.-t izolálnunk rizoszférából, valamint bemutatnunk, és felhívtuk a figyelmet a járványt okozó *G. intestinális-ra* és nem utolsósorban az *E. histolytica* által okozott komoly megbetegedésekre, melyek halálhoz vezethetnek. Jelen tanulmányban bemutattam a patogén és az apatogén protozoonokat az emberi szervezetben. Ennek a tudásnak a birtokában hatékony és gyors módszereket lehet kifejleszteni és alkalmazni a rutin diagnosztikában.

## 8 SUMMARY

The aim of our job was to detect and identify the role of the protozoans in the human environment. Several protozoa cause severe morbidity and mortality in both humans and animals worldwide, and these infection in most times caused by ignoring the important hygienic rules. Some of the protozoans can live long and multiply in the environment (e.g. *Acanthamoeba* spp.). They can cause infection in the susceptible human body. It important to emphasize that with handwashing and keeping the basic hygienic rules the number of these infections could be significantly reduced.

In the infection origin diseases specific that they were caused by biologically lower species in much higher ones. The protozoans invade the human body and after settling they start to multiply and for longer or shorter period damage it. The protozoan caused infection and between the outbreak of the disease each type of disease has different latency period (e.g. *G. intestinális* or *Acanthamoeba* spp.). After the latency period the patient shows some symptoms but in most cases they are general symptoms and only in the final phase produce the patient clinical symptoms that allows to make a diagnosis. So the cognition of the protozoans and their spreading in the environment or in the human body is a very important task.

It is well known that in the human body and in the environment there are apathogen protozoans too and if they overgrowing they cause diseases. I have tried to show the protozoans, their effect on the huma body and their surviving mechanizm at the same time.

We are succesfully isolated *Acanthamoeba* spp. from the rhizosphere, presented and drawn attention for the epidemic causing *G. intestinális* and for the *E. histolytica* that can cause terrible diseases wich are leading to death.

In this study I have shown the pathogene and apathogene protozoans in the human body. With this knowledge there could be faster and more effective methods developed in the rutin diagnosis.

## 9 IRODALOMJEGYZÉK

- ABBASZADEGAN M., HASAN M.N., Gerba C.P., Roessler P.F., Wilson B.R., Kuennen R., Van Dellen E. (1997): The disinfection efficacy of a point-of-use water treatment system against bacterial, viral and protozoan waterborne pathogens. *Water Research*, 31 (3) 574-582. p.
- ABBASZADEGAN M., HUBER M.S., GERBA C.P., PEPPER I.L. (1993): Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5) 1318–1324.p
- ABBOUD P., LEMÉE V., GARGALA G., BRASSEUR P., BALLEST J.J., BORSA-LEBAS F., CARON F., FAVENNEC L. (2001): Successful treatment of metronidazole- and albendazole-resistant giardiasis with nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (12) 1792–1794. p.
- ACUNA-SOTO R., MAGUIRE J.H., WIRTH D.F. (2000): Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis. *American Journal of Gastroenterology*, 95 (5) 1277-1283. p.
- ADAM R.D. (2001): Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (3) 447–475. p.
- ALI S.A., Hill D.R., (2003): *Giardia intestinalis*. *Current Opinion of Infectious Disease*, 16 (5) 453-60. p.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3) 403–410. p.
- ALVES D.S., MORAES A.S., NITZ N., de Oliveira M.G., Hecht M.M., Gurgel-Gonçalves R., Cuba C.A. (2012): Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* similar to genotypes T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasília. *Experimental Parasitology*, 131 (2) 239-44.p.
- AL-MOHAMMED H.I. (2011): Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitology Research*, 108 (6) 1375-1381. p.
- ANDERLINI P., PRZEPIORKA D., LUNA M., LANGFORD L., ANDREEFF M., Claxton D., Deisseroth A.B. (1994): *Acanthamoeba* meningoencephalitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 14 (3) 459–461.p.
- ANDERSON K.A., BROOKS A.S., MORRISON A.L., REID-SMITH R.J., MARTIN S.W., BENN D.M., PEREGRINE A.S., (2004): Impact of *Giardia* vaccination on asymptomatic *Giardia* infections in dogs at a research facility. *Canadian Veterinary Journal*, 45 (11) 924–930. p.
- APPELBEA A.J., Thompson R.C., Olson M. E. (2005): *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife—current status and future needs. *Trends in Parasitology*, 21 (8) 370–376. p.
- Ash L.R., Orihel T.C. (1987): Boeck and Drbohlav's medium, modified. *Parasites, a guide to Laboratory Procedures and Identification*, 121-122. p.
- ASHFORD R.W., CREWE W. (2003): The parasites of Homo sapiens: an annotated checklist of the protozoa, helminths and arthropods for which we are home. London: Taylor and Francis.



- BADALAMENTI S., JAMESON J.E., REDDY K.R. (1999): Amebiasis. *Curr Trea Options Gastroenterol*, 2 (2) 97-103. p.
- BALAMUTH W. (1946): Improved egg yolk medium for cultivation of *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa. *American Journal of Clinical Pathology*, 16(6) 380–384. p.
- BLACK R.E., DYKES A. C., SINCLAIR S. O., WELLS J.G. (1977): *Giardiasis* in day-care centers: evidence of person-to-person transmission. *Pediatrics*, 60 (4) 486–491. p.
- BLANC D., SARGEAUNT P. G. (1991): *Entamoeba histolytica* zymodemes: exhibition of gamma and delta bands only of glucose phosphate isomerase and phosphoglucomutase may be influenced by starch content in the medium. *Experimental Parasitology*, 72(1) 87–90. p.
- BLESSMANN J., ALI I.K., NU P.A., DINH B. T., VIET T.Q., VAN A.L., CLARK C.G., Tannich E. (2003): Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10) 4745–4750. p.
- BLESSMANN J., H. BUSS P.A.NU., DINH B.T., NGO Q.T., VAN A.L., ALLA M.D., JACKSON T.F., RAVDIN J.I., TANNICH E. (2002): Real-time PCR fordetection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (12) 4413–4417. p.
- BLESSMANN J., KHOA N.D., VAN A.L., TANNICH E. (2006): Ultrasound patterns and frequency of focal liver lesions after successful treatment of amoebic liver abscess. *Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 4 (4) 504-508. p.
- BLESSMANN J., Van A.L., Tannich E. (2006): Epidemiology and treatment of amebiasis in Hue, Vietnam. *Archives of Medical Research*, 37 (2) 270-272. p.
- BLESSMANN J., VAN LINH P., NU P.A., THI H.D., MULLER-MYHSOK B., BUSS H., TANNICH E. (2002): Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amoebic liver abscess in central Vietnam. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66 (5) 578–583. p.
- BOCKMAN D.E., WINBORN W.B. (1968): Electron microscopic localization of exogenous ferritin within vacuoles of *Giardia muris*. *Journal of Protozoology*, 15 (1) 26-30. p.
- BOGITSH B.J., CARTER C.E., OELTMANN T.N. (2005): *Human Parasitology*, 3rdEdition, Elsevier Academic Press, Oxford, United Kingdom, 459. p
- BOREHAM,P.F.L., UPCROFT J.A. (1992): Induction of metroni- dazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(5) 521-522. p.
- BURKE, J.A. (1977): The clinical and laboratory diagnosis of giardiasis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 7(4) 373-391. p.
- CABALLERO-SALCEDO A., VIVEROS-ROGEL M., SALVATIERRA B., TAPIA-CONYER R., SEPULVEDA-AMOR J., GUTIERREZ G., Ortiz-Ortiz L. (1994): Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50 (4) 412–419. p.
- CAVALLO J.D., GARRABÉ E. (2007): Infectious aetiologies of travelers diarrhoea. *Medical Malpractice and Infection*, 37(11) 722–727. p.
- CEDILLO-RIVERA R.E., ENCISO-MORENA J.A., MARTINEZ-PALOMO A., ORTEGA-PIRRES G. (1989): *Giardia lamblia*: Isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and

- asymptomatic patients in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83 (5) 644-646. p.
- CHADEE K., SMITH J.M., Meerovitch E. (1985): *Entamoeba histolytica*: electrophoretic isoenzyme patterns of strains and their virulence in the cecum of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34 (5) 870–878. p.
- CHUNG D.I., Yu H.S., Hwang M.Y., Kim T.H., Kim T.O., Yun H.C., Kong H.H. (1998): Subgenus classification of *Acanthamoeba* by riboprinting. *Korean Journal of Parasitology*, 36 (2) 69–80. p.
- CLARK C.G. (1995): Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42 (5) 590–593. p.
- CLARK C.G. (1998): *Entamoeba dispar*, an organism reborn. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92 (4) 361–364. p.
- CLARK C.G., Diamond L.S. (1991): Ribosomal RNA genes of “pathogenic” and “nonpathogenic” *Entamoeba histolytica* are distinct. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 49 (2) 297–302. p.
- CLARK C.G., Diamond L.S. (1991): The Laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46 (1) 11–18. p.
- CLARK C.G., DIAMOND L.S. (1993): *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Experimental Parasitology*, 77 (4) 450–455. p.
- CLARK C.G., DIAMOND L.S. (2002): Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (3) 329–341. p.
- CLARK R.M., READ E.J., HOFF J.C. (1989): Analysis of inactivation of *Giardia lamblia* by chlorine. *Journal of Environmental Engineering*, 115 (1) 80–90. p.
- CORPET F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16 (22) 10881-10890. p.
- CUGINO L., BUTCHER J., HOPPES W.L., DOYLE M., BOGDEN C. (1995): *Acanthamoeba* sinusitis in a patient with AIDS. *Clinical Infectious Disease*, 21(45) 795. p.
- DA SILVA A., PIENIAZEK N. (2003): Latest Advances and Trends in PCR-based Diagnostic Methods. In: Dionisio D, editor. *Textbook-Atlas of Intestinal Infections in AIDS*. Springer, 397-412. p.
- DACKS J.B., POON P.P., FIELD M.C. (2008): Phylogeny of endocytic components yields insight into the process of non endosymbiotic organelle evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (2) 588–593. p.
- DE Jonckheere J. (1980): Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 39 (4) 681–685. p.
- DEBNATH A., PARSONAGE D., ANDRADE R.M., HE C., COBO E.R., HIRATA K., CHEN S., GARCIA-RIVERA G., OROZCO E., MARTINEZ M.B., GUNATILLEKE S.S., BARRIOS A.M., ARKIN M.R.,

- POOLE L.B., MCKERROW J.H., REED S.L. (2012): A high-throughput drug screen for *Entamoeba histolytica* identifies a new lead and target. *Nature Medicine*, 18 (6) 956–960. p.
- DIAMOND L.S. (1961): Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science*, 134 (3475) 336–337. p.
- DIAMOND L.S. (1968): Improved method for the monoxenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae with trypanosomatids. *Journal of Parasitology*, 54 (4) 715–719. p.
- DIAMOND L.S. (1982): A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen dwelling protozoa. *Journal of Parasitology*, 68 (5) 958–959. p.
- DIAMOND L.S., Bartgis I.L. (1970): *Entamoeba moshkovskii*: axenic cultivation. *Experimental Parasitology*, 28 (2) 171–175. p.
- DIAMOND L.S., Clark C.G., Cunnick C.C. (1995): YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42 (3) 277–278. p.
- DIAMOND L.S., HARLOW D.R., CUNNICK C. C. (1978): A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72 (4) 431–432. p.
- DOBELL C. (1920): The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 13 (Sect Hist Med) 1-15.p.
- DOBELL C. (1932): Antony van Leeuwenhek and his “Little Animals”. London: John Bale, Sons and Danielsson, 224-225 p.
- ERICKSON M.C., Ortega Y. R. (2006). Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. *Journal of Food Protection*, 69 (11) 2786–2808. p.
- ERLANDSEN S.L., Bemrick W.J., Pawley J. (1989): High resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *Journal of Parasitology*, 75 (5) 787-797. p.
- ERLANDSEN S.L., BEMRICK W.J., WELLS C.L., FEELY D.E., KNUDSON L., CAMPBELL S.R., VAN KEULEN H., JARROLL E.L. (1990): Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *Journal of Parasitology*, 76 (5) 717-724. p.
- ESPINOSA-CANTELLANO M., CASTANON GUTIERREZ G., MARTI nez-PALOMO A. (1997): In vivo pathogenesis of *Entamoeba dispar*. *Archives of Medical Research*, 28 (Spec.) 204–206. p.
- FARTHING M. J. G., Varon S.R., Keusch G.T. (1983): Mammalian bile promotes growth of *Giardia lamblia* in axenic culture. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77 (4) 467-469.p.
- FARTHING M.J.G. (1994): *Giardiasis* as a disease. In RCA Thompson, JA Reynoldson, AL Lymberly (eds), *Giardia: from Molecules to Disease*, CAB International, Wallingford, Oxon UK, 15-39 p.
- FAYER R., TROUT J.M., XIAO L., MORGAN U.M., LAI A.A., DUBEY J.P. (2001): *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*, 87 (6) 1415–1422. p.

- FENG Y., XIAO L. (2011): Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24 (1) 110–40.p.
- FINCH G.R., BLACK E.K., LABATIUK C.W., GYÜRÉK L., BELOSEVIC M. (1993b): Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11) 3674–3680. p.
- FOTEDAR R., STARK D., BEEBE N., MARRIOTT D., ELLIS J., HARKNESS J. (2007): Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3) 511-532. p.
- FOX K., LYTLE D. (1996): Milwaukee's crypto outbreak: investigation and recommendations. *Journal American Water Works Association*, 88 (9) 87–94.p.
- FRIEDLAND L.R., Raphael S.A., Deutsch E.S., (1992): Disseminated *Acanthamoeba* infected patients with otolaryngological infections due to these infection. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 11 404–407. p.
- FRITSCHÉ T.R., Smith J. W. (2001): Medical parasitology, In J. B. Henry (ed.), Clinical diagnosis and management by laboratory methods. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa. 1196–1239. p.
- GANGULY N.K., MAHAJAN R.C., RADHAKRISHNA V., BHAGWAT A.G. (1985): Electron microscopic studies of jejunum of mice infected with *Giardia lamblia*. *Indian Journal of Medical Research*.81 102-110. p.
- GARCIA L.S., BRUCKNER D.A. (1997): Diagnostic medical parasitology, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C. 937. p.
- GARCIA L.S., Bruckner D.A. (1999): Taxonomy and classification of human parasites. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C. 1329–1335. p.
- GARDNER T.B., Hill D.R. (2001): Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (1) 114-128. p.
- GAST R. J., LEDEE D.R., FUERST P.A., Byers T.J. (1996): Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43 (6) 498-504. p.
- GATHIRAM V., Jackson T. F. (1987): A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *South African Medical Journal*,72(10) 669–672. p.
- GHOSH S., FRISARDI M., RAMIREZ-AVILA L., DESCOTEAUX S., STURM-RAMIREZ K., NEWTON-SANCHEZ O. A., SANTOS-PRECIADO J. I., GANGULY C., LOHIA A., REED S., SAMUELSON J. (2000): Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: evidence of a bottleneck (demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (10) 3815–3821. p.
- GILLIN F.D., DIAMOND L.S. (1981): *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. *Experimental Parasitology*, 52 (1) 9-17. p.
- GILLESPIE S. H., HAWKEY P.M. (2002): Medical Parasitology: a practical approach. Oxford University Press, 131-136. p.

- GONZALEZ-RUIZ A., HAQUE R., AGUIRE A., CASTANON G., HALL A., GUHL F., RUIZ-PALACIOS G., MILES M. A., WARHURST D. C. (1994): Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Pathology*, 47 (3) 236–239. p.
- GORDON S.M., STEINBERG J.P., DUPUIS M., KOZARSKY P. E., NICKERSON J. F., VISVESVARA G. S. (1992): Culture isolation of *Acanthamoeba* species and leptomyxid amebas from patients with amebic meningoencephalitis, including two patients with AIDS. *Clinical Infectious Disease* 15 (6) 1024–1030. p.
- HAIBA M.H. (1954): The pH of the alimentary tract in the normal and *Giardia* infected culture mice. *Parasitology*, 44 (3-4) 387–391. p.
- HAJDUSEK O., DITRICH O., SLAPETA J. (2004): Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 122 (3) 183–192. p.
- HAQUE R., ALI I.K., AKTHER S., PETRI Jr.W.A. (1998): Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (2) 449–452. p.
- HAQUE R., Ali I.K.M., Clark C.G., Petri Jr.W.A. (1998): A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladeshi child. *Parasitology International*, 47 (3) 201–202. p.
- HAQUE R., FARUQUE A.S.G., HAHN P., LYERLY D., PETRI Jr.W.A. (1997): *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *Journal of Infectious Diseases*, 175 (3) 734–736. p.
- HAQUE R., HUSTON C.D., HUGHES M., HOUP T. E., PETRI Jr.W.A. (2003): Amebiasis. *New England Journal of Medicine* 348 (16)1565-1573. p.
- HAQUE R., MOLLAH N.U., ALI I.K.M., ALAM K., EUBANKS A., LYERLY D., PETRI, Jr.W.A. (2000): Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (9) 3235–3239. p.
- HAQUE R., NEVILLE L.M., HAHN P., PETRI Jr.W.A. (1995): Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (10) 2558–2561. p.
- HASAN S.M., MAACHEE M., CORDOVA O.M., DIAZ DE LA GUARDIA R., MARTINS M., OSUNA A. (2002): Human secretory immune response to fatty acid-binding protein fraction from *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*, 70 (4) 2226–2229. p.
- HEHL A.B., Marti M., Kohler P. (2000): Stage-specific expression and targeting of cyst wall protein-green fluorescent protein chimeras in *Giardia*. *Molecular Biology of the Cell*, 11 (5) 1789–1800. p.
- HELLARD M.E., Sinclair M.I., Hogg G.G., Fairley C.K. (2000): Prevalence of enteric pathogens among community based asymptomatic individuals. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15 (3) 290–293. p.
- HELTON J., LOVELESS M., WHITE C.R. (1993): Cutaneous acanthamoeba infection associated with leukocytoclastic vasculitis in an AIDS patient. *American Journal of Dermatopathology*, 15 (2) 146–149. p.

- HERBINGER K.H., FLEISCHMANN E., WEBER C., PERONA P., LÖSCHER T., BRETZEL G. (2011): Epidemiological, clinical, and diagnostic data on intestinal infections with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* among returning travelers. *Infection*, 39 (6) 527-535. p.
- HEREDERO-BERMEJO I., SAN JUAN MARTÍN C., SOLIVERI DE CARRANZA J., COPA-PATIÑO J.L., PÉREZ-SERRANO J. (2012): *Acanthamoeba castellanii*: in vitro UAH-T17c3 trophozoite growth study in different culture media. *Parasitology Research*, 110 (6) 2563–2567. p.
- HEWETT M.K., ROBINSON B.S., MONIS P.T., SAINT C.P. (2003): Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozoologica*, 42 (4) 325–329. p.
- HEYWORTH M. F. (1992): Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Journal of Infectious Diseases*, 166 (3) 465-472.p.
- HEYWORTH M.F. (1996): *Giardia* infections. In: Paradise LJ, Bendinelli M, Friedman H (eds) Enteric Infections and Immunity. Plenum Press, New York, 227–238. p.
- HEYWORTH M.F., VERGARA J.A., (1994): *Giardia muris* trophozoite antigenic targets for mouse intestinal IgA antibody. *Journal of Infectious Diseases*, 169 (2) 395–398. p
- HITI K., WALOCHNIK J., Faschinger C., Haller-Schober E-M. Aspöck H. (2005): One- and two-step hydrogen peroxide contact lens disinfection solutions against *Acanthamoeba*: How effective are they? *Eye*, 19 (published online) 1301-1305. p.
- HITI K., WALOCHNIK J., HALLER-SCHOBER E.M., FASCHINGER C., ASPÖCK H. (2002): Viability of *Acanthamoeba* after exposure to a multipurpose disinfecting contact lens solution and two hydrogen peroxide systems. *British Journal of Ophthalmology*, 86 (2)144–146. p.
- HOFFNER R.J., KILAGHBIAN T., ESEKOGWI V.I., HENDERSON S.O. (1999): Common presentation of amebic liver abscess. *Annals of Emergency Medicine*, 34 (3) 351-355. p.
- HOXIE N., DAVIS J., VERGERONT J., NASHOLD R., BLAIR K. (1996): *Cryptosporidium* - Associated Mortality Following a Massive Waterborne Outbreak in Milwaukee. *American Journal of Public Health*, 87 (12) 2032–2035. p.
- HUSTON C.D., PETRI W.A. (1999): Amebiasis: clinical implications of the recognition of *Entamoeba dispar*. *Current Infectious Disease Reports*, 1 (5) 441-447. p.
- INABO H.I., YA'U B, YAKUBU S.E. (2011): Asymptomatic Giardiasis and Nutritional Status of Children in Two Local Government Areas in Kaduna State, Nigeria. *Sierra Leone Journal of Biomedical Research*, 3(3) 157-162.p.
- IDOWU O.A., ROWLAND S.A. (2006): Oral fecal parasites and personal hygiene of food handlers in Abeokuta, Nigeria. *African Health Sciences*, 6(3) 160-164. p.
- ISLAM A. (1990): Giardiasis in developing countries. In: Meyer EA, ed. Human parasitic diseases. Giardiasis. Amsterdam, Elsevier: 235–266.p.
- JACKSON, T.F., SUPARSAD S. (1997): Zymodeme stability of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *Archive Medical Research*, 28 (Spec.)304–305.p.

- JACOBS S.R., FORRESTER C.P., YANG J. (2001): A survey of the prevalence of *Giardia* in dogs presented to Canadian veterinary practices. *Canadian Veterinary Journal*, 42(1)45-46. p.
- JAISHREE P., Srivastava S., Bhattacharya S. (2007): Molecular methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* in a clinical setting: An overview. *Experimental Parasitology*, 116 (1) 35–43. p.
- JANOFF E. N., Smith P. D., Blaser M. J. (1988): Acute antibody responses to *Giardia lamblia* are depressed in patients with AIDS. *Journal of Infectious Diseases*, 157 (4) 798–804.p.
- JANOFF E.N., CRAFT J.C., PICKERING L.K., NOVOTHY T., BLASER J.M., KNISLEY C.V., RELLER L. B. (1989): Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by detection of parasite-specific antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 27 (3) 431–435. p.
- JENSEN T., BARNES W.G., MEYERS D. (1970): Axenic cultivation of large populations of *Acanthamoeba castellanii* (JBM). *J. Parasitol.* 56 (5) 904–906. p.
- JEONG H.J., LEE S.J., KIM J.H., XUAN Y.H., LEE K.H., PARK S.K., CHOI S.H., CHUNG D.I., KONG H.H., OCK M.S, YU H.S. (2007): *Acanthamoeba*: keratopathogenicity of isolates from domestic tap water in Korea. *Experimental Parasitology*, 117 (4) 357-367. p.
- JOKIPII L., SARGEAUNT P.G., JOKIPII A.M. (1989): Coincidence of deficient delayed hypersensitivity and intestinal protozoa in homosexual men. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 21 (5) 563–571. p.
- JONES W. R. (1946): The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 40:130–140. p.
- PO-MIN KAO., BING-MU HSU., NAI-HSIUNG CHEN., KUAN-HAO HUANG., SHIH-WEI HUANG., KUANG-LIANG KING., YI-CHOU CHIU. (2012): Isolation and identification of *Acanthamoeba* species from thermal spring environments in southern Taiwan. *Experimental Parasitology*, 130 (4) 354-358. p.
- KEISTER D.B. (1983): Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77 (4) 487-488.p.
- KHAN N.A., JARROLL E.L., PAGET T.A. (2001): *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Current Microbiology*, 43(3) 204– 208. p.
- KHAN.N.A., Jarroll E.L., Paget T.A. (2002): Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Current Microbiology* 45(3) 197-202. p.
- KILIC A., TANYUKSEL M., SISSONS J., JAYASEKERA S., KHAN N.A. (2004) Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitologica*, 49 (3) 246-252. p.
- KILVINGTON S., GRAY T., DART J., MORLET N., BEECHING J.R., FRAZER D.G., MATHESON M. (2004) *Acanthamoeba keratitis*: The role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Investigative Ophthalmology és Visual Science*, 45 (1) 165-169. p.
- KILVINGTON S., WHITE D.G. (1994). *Acanthamoeba*: biology, ecology and human disease. *Reviews in Medical Microbiology*, 5 (1) 12–20. p.

- KOBAYASHI S., IMAI E., TACHIBANA H., FUJIWARA T., TAKEUCHI T. (1998): *Entamoeba dispar*: cultivation with sterilized *Crithidia fasciculata*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45 (2) 3S–8S. p.
- KORICH D.G., Mead J.R., Madore M.S., Sinclair N.A., Sterling C.R. (1990): Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (5) 1423–1428. p.
- KREUZER K., ADAMCZYK J., IJIMA M., WAGNER M., SCHEU S., BONKOWSKI M. (2006): grazing of a common species of soil protozoa (*Acanthamoeba castellanii*) affects bacterial community composition and root architecture of rice (*Oryza sativa* L.). *Soil Biology és Biochemistry*, 38 (7) 1665-1672. p.
- KROGSTAD D.J., SPENCER H.C. Jr., HEALY G.R., GLEASON N.N., SEXTON D.J., HERRON C.A. (1978): Amebiasis: epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. *Annals of Internal Medicine*, 88 (1) 89–97. p.
- LAMBL V. (1859): Microscopische Untersuchungen der Darmexcrete. Beitrag zur Pathologie der Darmes und zur Diagnostik am Krankenbette. Prague: *Vierteljahr Praktikum Heilkd*, 61: 1-57. p.
- LASEK-NESSELQUIST E., WELCH D.M., SOGIN M.L. (2010): The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International Journal for Parasitology*, 40 (9) 1063–1074. p.
- LEBER A.L., NOVAK S.M. (1999): Intestinal and urogenital amebae, flagellates, and ciliates. In PR Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., ASM Press, Washington D.C., 1391-1405. p.
- LENGERICH E.J., ADDISS D.G., JURANEK D.D. (1994): Severe giardiasis in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 18 (5) 760-763.p.
- LI E., S.L. STANLEY Jr. (1996): Protozoa. Amebiasis. *Gastroenterology Clinics of North America*, 25 (3) 471–492. p.
- LIU H., HA Y.R., LEE S.T., HONG Y.C., KONG H.H., CHUNG D.I. (2006): Genetic diversity of *Acanthamoeba* isolated from ocean sediments. *Korean Journal of Parasitology*, 44 (2) 117-125. p.
- LIU H., MOON E.K., YU H.S., JEONG H.J., HONG Y.C., KONG H.H., CHUNG D.I. (2005): Evaluation of taxonomic validity of four species of *Acanthamoeba*: *A. divionensis*, *A. paradivionensis*, *A. mauritaniensis*, and *A. rhyodes*, inferred from molecular analyses. *Korean Journal of Parasitology*, 43 (1) 7–13. p.
- LOLLO S., TOZZINI Di.S., (2003): Pathology, in *Textbook-Atlas of Intestinal Infections in AIDS*, D. Dionisio, Ed., Milan, Italia *Springer*, 211–231 p.
- LOTTER H., JACKSON T.F.G.H., TANNICH E. (1995): Evaluation of three serological tests for the detection of antiamebic antibodies applied to sera of patients from an area endemic for amebiasis. *Tropical Medicine and Parasitology*, 71 (3) 401– 407. p.
- LYASHKO V.N., VIKULOVA V.K., CHERNICOV V.G, IVANOV V.I., ULMASOV Kh.A., ZATSEPINA O.G., EVGEN'EV M.B. (1994): Comparison of the heat shock response in ethnically and



- ecologically different human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States America*, 91 (26) 12492-12495. p.
- MAGLIANO A.C., TEIXEIRA M.M., ALFIERI S.C. (2012): Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterization of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences. *Parasitology* 139 (1) 45-52. p.
- MAHBUBANI M.H., BEJ A.K., PERLIN M., SCHAEFER III F.W., JAKUBOWSKI W., ATLAS R.M. (1991): Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12) 3456–3461. p.
- MAHBUBANI M.H., BEJ A.K., PERLIN M., SCHAEFER III F.W., JAKUBOWSKI W. and ATLAS R.M. (1992): Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* sp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (1) 74-78. p.
- MARCIANO-CABRAL F, CABRAL G. (2003): *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (2) 273-307. p.
- MARTINEZ A., VISVESVARA G. (1997): Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology*, 7 (1) 583–598. p.
- MCGLADE T.R., ROBERTSON I.D., ELLIOT A.D., THOMPSON R.C.A. (2003): High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Veterinary Parasitology*, 110 (3-4) 197-205. p.
- MCINTYRE P., BOREHAM P.F.L., PHILLIPS R.E., SHEPHERD R.W. (1986): Chemotherapy in giardiasis: clinical responses and in vitro drug sensitivity of human isolates in axenic culture. *Journal of Pediatrics*, 108 (6) 1005-1010. p.
- MELONI B.P., LYMBERY A.J., THOMPSON R.C.A. (1988): Isoenzyme electrophoresis of 30 162 isolates of *Giardia* from humans and felines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38 (1) 65-73. p.
- MEYER E.A. (1976): *Giardia lamblia*: isolation and axenic cultivation. *Experimental Parasitology*, 39 (1) 101-105. p.
- MILCH H., JANKÓ M. (1990): Parazitológia Laboratóriumi Vizsgálatok. *Modszertani Útmutató*, 211, 212, 246-250, 264-265. p.
- MONIS P.T., CACCIO S.M., THOMPSON R.C.A., (2009): Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*, 25 (2) 93–100.p.
- MOSS O.M., VISVESVARA G.S., MATTHEWS H.M., WARE O.A. (1992): Isoenzyme comparison of axenic *Giardia lamblia* strains. *Journal of Protozoology*, 39 (5) 559-564. p.
- NASH T.E., HERRINGTON D.A., LOSONKY G.A., LEVINE M.M. (1987): Experimental Human Infections with *Giardia-Lambli*a. *Journal of Infectious Diseases* 156 (6) 974-984. p.
- NEFF R.J. (1957): Purification, axenic cultivation, and description of a soil amoeba. *Acanthamoeba* spp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 4 (3) 176–182. p.
- NUPRASERT W., PUTAPORNTIP C., PARIYAKANOK L., JONGWUTIWES S. (2010): Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (12) 4636–4640. p.

- OHNISHI K., MURATA M. (1997): Present characteristics of symptomatic amebiasis due to *Entamoeba histolytica* in the east-southeast area of Tokyo. *Epidemiology and Infection*, 119 (3) 363–367. p.
- OLSON ME CERI H., MORCK D.W. (2000): *Giardia* vaccination. *Parasitology Today*, 16 (5) 213–217. p.
- OROSZ E., FARKAS Á., KÖDÖBÖCZ L., BECSÁGH P., DANKA J., KUCSERA I., FÜLEKY G. (2013): Isolation of *Acanthamoeba* from the rhizosphere of maize and lucerne plants. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 60 (1) 29-39.p.
- OROSZ E., PERKÁTAI K., KAPUSINSZKY B., FARKAS Á., KUCSERA I. (2012): Real-time PCR assay for rapid Qualitative and Quantitative detection of *Entamoeba histolytica*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 59 (4) 451–460. p.
- OSTERHOLM MT., FORFANG J.C., RISTINEN T.L., DEAN A.G., WASHBURN J.W., GODES J.R., RUDE R.A., MCCULLOUGH J.G. (1981): An outbreak of foodborne giardiasis. *New England Journal of Medicine*, 304 (1) 24–28.p.
- PAGE F.C. (1988): A new key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK., 122. p.
- PALM J.E., WEILAND M.E., GRIFFITHS W.J., LJUNGSTROM I., SVARD S.G. (2003): Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *Journal of infectious diseases*, 187 (12) 1849–1859. p.
- PARIJA S.C., KASINATHAN S., RAO R.S. (1989): RAPID indirect haemagglutination (Rapid-IHA) using sensitised chick cells for serodiagnosis of amoebiasis at primary health centre level. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92 (3) 221-226. p.
- PARIJA S.C., KHAIRNAR K. (2005): *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in Pondicherry, India. *Journal of Health, Population, and Nutrition*, 23 (3) 292–295. p.
- PELLECCHIA P., BRANDT L.J. (2010): Intestinal abnormalities in AIDS, in *Gastroenterological Endoscopy* M. Classen, G. N. J. Tytgat, and C. J. Lightdale, Eds., Thieme, Stuttgart, Germany, 2nd edition, 753–765, p.
- PETERS C.S., SABLE R., JANDA W. M., CHITOM A. L., KOCKA F. E. (1986): Prevalence of enteric parasites in homosexual patients attending an outpatient clinic. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(4) 684–685. p.
- PETRI Jr.W. A., SINGH U. (1999): Diagnosis and management of amebiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 29(5) 1117–1125. p.
- PHILLIPS S.C., MILDVAN D., WILLIAM D.C., GELB A.M., WHITE M. C. (1981): Sexual transmission of enteric protozoa and helminths in a venerealdisease-clinic population. *The New England Journal of Medicine*, 305(11) 603–606. p.
- PICKERING L.K., ENGELKIRK P.G. (1990): *Giardia* among children in day care. In: Meyer EA, ed. Human parasitic diseases. Vol. 3, Giardiasis. Amsterdam, Elsevier: 294–303. p.

- PLEKHANOV A.Yu., SMUROV A.O., PODLIPAEVA Yu.I., Ivanova L.O., Goodkov A.V. (2006): Heat shock proteins of freshwater protists and their involvement in adaptation to changes in salinity of environment. *Tsitologiia*, 48 (6) 350-354. p.
- PODLIPAEVA Ju.I., Shmakova L.A., Gilichinski D.A., Goodkov A.V. (2006): Heat shock protein of hsp70 family revealed in some contemporary freshwater amoebids and in *Acanthamoeba* sp. excysted from cysts isolated from permafrost samples. *Tsitologiia*, 48 (8) 691-694. p.
- PODLIPAEVA Y.I. (2001): Heat shock protein of 70 kDa in *Amoeba proteus*. *Protistology*, 2 (2) 123-129. p.
- PODLIPAEVA Yu.I., SMUROV A.O., GOODKOV A.V. (2008): Expression of heat-shock protein 70 kDa in *Tetrahymena pyriformis* during cell adaptation to salinity changes in the medium. *Cell and Tissue Biology*, 2 (4) 373-375. p.
- PRASHANTH K., GUNISHA PASRICHA, SAVITRI SHARMA (2011): Fluorescence amplified fragment length polymorphism for subtyping of genotypes of *Acanthamoeba* isolated from patients with keratitis. *Indian Journal of Medical Research*, 133 (1) 83-87. p.
- PROCTOR E.M. (1991): Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 11 (4) 829-859. p.
- QUE X., REED S.L. (2000): Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (2) 196-206.p.
- QUINN T.C., COREY L., CHAFFEE R.G., SCHUFNER M.D., BRANCATO F.P., Holmes K. K. (1981): The etiology of anorectal infections in homosexual men. *American journal of medicine*, 71 (3) 395-406. p.
- QVARNSTROM Y., JAMES C., XAYAVONG M., HOLLOWAY B., MOURA I., VISVESVARA G.S., SRIRAM R., da SILVA A.J. (2005): Comparison of real-time PCR rationales for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (11) 3014-3016. p.
- QVARNSTROM Y., VISVESVARA G.S., SRIRAM R., da SILVA A.J. (2006): Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10) 3589-3595. p.
- RABBANI G.H., ISLAM A. (1994): Giardiasis in humans: populations most at risk and prospects for control. In: Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery AJ, eds. *Giardia: from molecules to disease*. Wallingford, England, CAB International: 217-249. pp.
- RAVDIN J.I., JACKSON T.F., PETRI W.A .JR., MURPHY C.F., UNGAR B.L., GATHIRAM V., SKILOGIANNIS J., SIMJEE A.E. (1990): Association of serum antibody to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Journal of Infectious Diseases*, 162 (3) 768-772. p.
- REINER D.S., GILLIN F.D. (1992): Human secretory and serum antibodies recognize environmentally induced antigens of *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*, 60 (2) 637-43. p.
- RENDTORFF R.C. (1954): The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. 1. *Giardia* cysts given in capsules. *American Journal of Hygiene*, 59 (2) 209-220.p.
- REZAEIAN M., NIYYATI M., FARNIA S., HAGHI A.M. (2008): Isolation of *Acanthamoeba* spp. from Different Environmental Sources. *Iranian Journal of Parasitology*, 3(1) 44-47. p.

- REZAEIAN W.L., ADAO D.E.V. (2009): 18S ribosomal DNA genotypes of *Acanthamoeba* species isolated from contact lens cases in the Philippines. *Parasitology Research*, 105 (4) 1119–1124. p.
- RIVERA W.L., ADAO D.E.V. (2009): 18S ribosomal DNA genotypes of *Acanthamoeba* species isolated from contact lens cases in the Philippines. *Parasitology Research*, 105 (4) 1119–1124. p.
- ROBINSON G.L. (1968): The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62 (2) 285–294. p.
- ROSALES-BORJAS D.M., DIAZ-RIVADENEYRA J., DONA-LEYVA A., ZAMBRANO-VILLA S.A., MASCARÓ C., OSUNA A., ORTIZ-ORTIZ L. (1998): Secretory immune response to membrane antigens during *Giardia lamblia* infection in humans. *Infection and Immunity*, 66 (2) 756–759. p.
- ROY S., KABIR M., MONDAL D., ALI I.K., PETRI JR. W.A., HAQUE R. (2005): Real-Time-PCR Assay for Diagnosis of *Entamoeba histolytica* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (5) 2168–2172. p.
- RUIZ-PALACIOS M. MILES A., WARHURST D.C. (1994): Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Pathology*, 47 (3) 236–239. p.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839) 487–91. p.
- SAKLATVALA T. (1993): Milestones in parasitology. *Parasitology Today*, 9 (10) 347–348. p.
- SARGEAUNT P. G., WILLIAMS J.E., GRENE J. D. (1978): The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72 (5) 519–521. p.
- SARGEAUNT P.G., JACKSON T.F., WIFFEN S., BHOJNANI R., WILLIAMS J.E., FELMINGHAM D., GOLDMEIR D., ALLASON-JONES E., MINDEL A., PHILLIPS E. (1987): The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical laboratory diagnosis. *Archivos de Investigación Médica*, 18 (2) 69–75. p.
- SAYGI G., AKIN Z., TECER H. (2000): Isolation of *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. from soil and thermal water specimens in Sivas. *Acta Parasitologica Turcica*, 24 (3) 237–242. p.
- SCHLEGEL M. (1994): Molecular phylogeny of eukaryotes. *Trends in Ecology és Evolution*, 9 (9) 330–335. p.
- SCHROEDER J.M., BOOTON G.C., HAY J., NISZL I.A., SEAL D.V., MARKUS M.B., FUERST P.A., BYERS T.J. (2001): Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (5) 1903–1911. p.
- SCHUSTER F.L., HONARMAND S., VISVESVARA G.S., GLASER C.A. (2006): Detection of antibodies against free-living amoebae *Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* species in a population of patients with encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, 42 (9) 1260–1265. p.
- SCHUSTER F.L., VISVESVARA G.S. (2004): Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34 (9) 1–27. p.

- SHARIFI N., BOTERO-KLEIVEN S., OHMAN D., BARRAGAN A., WINIECKA-KRUSNELL J. (2010): Genotypic characterization of *Acanthamoeba* spp. causing ocular infections in Swedish patients: identification of the T15 genotype in a case of protracted keratitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 42 (10) 781-786.p.
- SHATILOVICH A.V., SHMAKOVA L.A., GUBIN S.V., GOODKOV A.V., GILICHINSKY D.A. (2005): Viable protozoa in late Pleistocene and Holocene permafrost sediments. *Doklady Biological Sciences*, 401 (1-6) 136-138. p.
- SHIRUMA T.M., OBATA H., KARASAWA E., HAYASHI N., YAMAURA H. (2000): A recurrent case of amebic liver abscess seventeen years after the first occurrence. *Kansenshogaku Zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 74 (7)585-588. p.
- SIDDIQUI R., KHAN N.A. (2012): Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites és Vectors* (Published online 2012 January 10) 5:6.
- SILBERMAN, J.D., CLARK C.G., DIAMOND L.S., SOGIN M.L. (1999): Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small-subunit ribosomal RNA sequences. *Molecular biology and evolution*, 16(12) 1740-51.p.
- SMITH P.D., GILLIN F.D., SPIRA W.M., NASH T.E. (1982): Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. *Gastroenterology*, 83 (4) 797-803. p.
- SOLIMAN M.M., TAGHI-KILANI R., Abou-Shady A.F. (1998): Comparison of serum antibody responses to *Giardia lamblia* of symptomatic and asymptomatic patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*,58 (2) 232–239. p.
- SOLOMONS N.W. (1982): Giardiasis: nutritional implications. *Reviews of Infectious Diseases*, 4(4) 859-869. p.
- SOLTYS B.J., FALAH M., GUPTA R.S. (1996): Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to Bip. *Journal of cell science*, 109 (Pt 7) 1909–1917.p.
- SOLTYS B.J., Gupta R.S. (1994): Immunoelectron microscopy of *Giardia lamblia* cytoskeleton using antibody to acetylated alpha tubulin. *Journal of Eukaryotes Eukaryotic Microbiology*, 41 (6) 625-632. p.
- SPRONG H., CACCIO S.M., VAN DER GIESSEN J.W. (2009): Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS neglected tropical diseases* 1;3(12) e558. p.
- STAUFFER W., RAVDIN J.I. (2003): *Entamoeba histolytica*: an update. *Current opinion in infectious diseases*,16 (5) 479–485.p.
- STEIN J.E., RADECKI S.V., LAPPIN M.R. (2003): Efficacy of Giardia vaccination in the treatment of giardiasis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222 (11) 1548–1551. p.
- STOTHARD D.R., SCHROEDER-DIEDRICH J.M., AWWAD M.H., GAST R.J., Ledee, D.R., RODRIGUEZ-ZARAGOZA S., DEAN C.L., FUERST P. A. BYERS T.J. (1998): The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45 (1) 45-54 p.

- STRACHAN W.D., CHIODINI P.L., SPICE W.M., Moody A.H., Ackers J.P. (1988): Immunological differentiation of pathogenic and nonpathogenic isolates of *E. histolytica*. *Lancet*, 1 (8585) 561–563. p.
- SZÉNÁSI Zs., KUCSERA I., HORVÁTH K., MÁRTON P., OROSZ E., DANKA J., MENYHÁRT K., SZEIDEMANN Zs. (2005): Egy zoonótikus protozoon, a *Giardia duodenalis*, emberi és állati előfordulási gyakorisága és molekuláris biológiai karakterizálása. *Állatorvosi Praxis*, 7(2) 18–21.p.
- SZÉNÁSI Zs., MARTON S., KUCSERA I., TÁNCZOS B., HORVÁTH K., OROSZ E., LUKÁCS Z., SZEIDEMANN Z. (2007): Preliminary investigation of the prevalence and genotype distribution of *Giardia intestinalis* in dogs in Hungary. *Parasitology Research*, 101 (1) 145-152. p.
- TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., KUMAR S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10) 2731–2739. p.
- TANNICH E., HORSTMANN R.D., KNOBLOCH J., ARNOLD H.H. (1989): Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (13) 5118–5122. p.
- TANYUKSEL M., Petri Jr.W.A. (2003): Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (4) 713–729. p.
- TAYLOR G.D., WENMAN W.M. (1987): Human immune response to *Giardia lamblia* infection. *Journal of Infectious Diseases*, 155 (1) 137–40.p.
- THOMPSON R.C. (2000): *Giardiasis* as are-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology*, 30 (12-13) 1259–1267.p
- THOMPSON R.C. (2004): The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary parasitology*, 126 (1-2) 15–35. p.
- THOMPSON R.C., HOPKINS R. M., HOMAN W.L. (2000): Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*, 16 (5) 210-213. p
- THOMPSON R.C., Monis P.T. (2004): Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology*, 58 69–137. p.
- THOMPSON R.C., Reynoldson J A., Mendis A.H.W. (1993): *Giardia* and giardiasis. *Advances in Parasitology*, 32 72-160. p.
- THOMPSON R.C.A., Lymbery A.J., Meloni B.P. (1990): Genetic variation in *Giardia*.Kunstler 1882: taxonomic and epidemiological significance. *ProtozoologyAbstracts*, 14 (1) 1–28.p.
- THOMPSON R.C.A., MELONI B.P., LYMBERY A.J. (1988): Humans and cats have genetically identical forms of *Giardia*: evidence of a zoonotic relationship. *Medical Journal of Australia*, 148 (4) 207-209. p.
- THOMPSON S.C. (1994): *Giardia lamblia* in children and the child care setting: a review of the literature. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 30 (3) 202-209. p.

- TRAUB R.J., MONIS P.T., ROBERTSON I., IRWIN P., MENCKE N., THOMPSON R.C. (2004): Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology* 128 (Pt 3) 253–262. p.
- TRISSEL D., MARTINEZ-PALOMO A., DE LA TORRE M., DE LA HOZ R., PEREZ DE SUAREZ E. (1978): Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *Journal of Experimental Medicine* 148 (5) 1137–1143.p.
- TSHALAI L.E. (1941): On a species of *Entamoeba* detected in sewage effluents. *Meditsinskaia Parazitologiya*, 10: 244–252.p.
- TSVETKOVA N., SCHILD M., PANAIOTOV S., KURDOVA-MINTCHEVA R., GOTTSTEIN B., WALOCHNIK J., ASPÖCK H., LUCAS M., MÜLLER N. (2004): The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitology Research*, 92 (5)405-413. p.
- VAN DE BOSCH D.A. (1991): Prevalentie van *Giardia lamblia* in peuterspeelzalen en kinderdagverblijven in Tilburg. *Infectieziekten Bulletin*, 2 (8) 2-6. p.
- VAN KEULEN H., MACECHKO P.T., WADE S., SCHAAF S., WALLIS P.M., ERLANDSEN S.L. (2002): Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 108 (2) 97–107.p.
- VÁRNAI F. (1978): Trópusi betegségek (Tropical Diseases). Medicina Könyvkiadó, Második, átdolgozott kiadás, Budapest. – in Hungarian, 190–192. pp.
- VÁRNAI F. (1987): Trópusi betegségek (Tropical Diseases). Medicina Könyvkiadó, harmadik átdolgozás, Budapest. – in Hungarian, 38,268-278. p.
- 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 and Cellular Probes*, 17(5) 223-225. p.
- VERWEIJ J.J., VERMER J., BRIENEN E.A., BLOTKAMP C., LAEIJENDECKER D., VAN LIESHOUT L., POLDERMAN A.M. (2003): *Entamoeba histolytica* infections in captive primates. *Parasitology Research*, 90 (2) 100-103. p.
- VISVESVARA G.S. BALAMUTH W. (2007): Comparative Studies on Related Free-Living and Pathogenic Amebae With Special Reference to *Acanthamoeba* *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 22 (2) 245-256. p.
- VISVESVARA G.S. (2007): Pathogenic and Opportunistic Amebae. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington DC: ASM Press 2082-2091. p.
- VISVESVARA G.S., MOURA H., SCHUSTER F.L. (2007): Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 50 (1) 1-26. p.
- VODKIN M.H., HOWE D.K., VISVESVARA G.S., MCLAUGHLIN G.L. (1992): Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. *Journal of Protozoology*, 39 (3) 378–385.p.

- VOHRA H., BHATTI H.S., GANGULY N.K., MAHAJAN R.C. (1989): Virulence of pathogenic and non-pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* (Indian strains) in guinea pigs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(5) 648–650.p.
- WALOCHNIK J., AICHELBURG A., ASSADIAN O., STEUER A., VISVESVARA G., VETTER N., ASPOCK H. (2008): Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (1) 338–340. p.
- WEINKE T., FRIEDRICH-JANICKE B., HOPP P., JANITSCHKE K. (1990): Prevalence and clinical importance of *Entamoeba histolytica* in two high-risk groups: travelers returning from the tropics and male homosexuals. *The Journal of Infectious Diseases*, 161 (5) 1029–1031.p.
- WEISS J.B., VAN KEULEN H., (1992): NASH T.E. Classification of subgroups of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequences using the polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54 (1) 73-86.p.
- WILSON I.W., WEEDALL G.D., HALL N. (2012): Host-Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: what have we learned from their genomes? *Parasite Immunology*, 34 (2-3) 90-99.p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1996): The World Health Report 1996, Fighting Disease Fostering Development, Geneva.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1997): Amoebiasis. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 72 (Epidemiol Bull):97–99.p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2003): Manual of basic techniques for a health laboratory. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- XIAO L., FAYER R. (2008): Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38 (11) 1239–1255. p.
- YANKE S.J., CERI H., TEMCALLIS T.A., MORCK D.W., OLSON M.E. (1998): Serum immune response to *Giardia duodenalis* in experimentally infected lambs. *Veterinary Parasitology*, 75 (1) 9–19. p.
- ZAMBRANO-VILLA S., ROSALES-BORJAS D., CÉSAR CARRERO J., ORTIZ-ORTIZ L. (2002): How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology*. 18 (2) 272–278.p.
- ZEEHAIDA M., BACHOK N, HASAN H (2009): Analysis of indirect hemagglutination assay results among patients with amoebic liver abscess. *International Medical Journal*, 16(3):195–199. p.
- ZENGZHU G., BRACHA R., NUCHAMOWITZ Y., CHENG W., MIRELMAN D. (1999): Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (9) 3034–3036. p.



## 10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném megköszönni korábbi témavezetőmnek, Prof. Dr. Kecskés Mihálynak, hogy elindított ezen az úton.

Másodszor, szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Füleky György hogy munkámat támogatta, és mindvégig tanácsokkal látott el. Nélküle nem készülhetett volna el ez a dolgozat.

Szeretném még megköszönni témavezetőmnek, Dr. Bayoumi Hamuda Hosamnak, hogy munkámat támogatta.

Köszönöm dr. Kődöböcz Lászlónak, hogy együtt dolgozhattunk, és sikeres csapatot alkothattunk az elmúlt években, és hogy mindig számíthattam rá a közös munkánkban.

Köszönöm az Országos Epidemiológiai Központnak, hogy biztosította a feltételeket a laboratóriumi munkákhoz, és Dr. Melles Mártának, hogy támogatta tanulmányaimat.

Köszönöm az Országos Epidemiológiai Központ, Parazitológia Osztálya dolgozóinak Dr. Kucsera Istvánnak, Tárjai Sándornénak és Molnár Mónikának, hogy segítettek munkámat.

Köszönöm az Országos Epidemiológiai Központ, Általános Vírusdiagnosztikai Osztályán Farkas Ágnesnek és Kapusinszky Beatrixnek, hogy észrevételeivel, tapasztalatával és tanácsaival segítette munkámat.

Köszönet az Országos Epidemiológiai Központ Könyvtárvezetőjének, Zólyomi Margitnak, aki segítette munkámat.

Köszönet az Országos Epidemiológiai Központ, Bakteriológiai Osztályán Dr. Borbás Klárának, akinek a segítségével végig tudtam vinni a munkámat.

És végül, de nem utolsó sorban köszönöm páromnak, hogy a legnehezebb helyzetekben is kitartott mellettem, és végigkísért szeretetével ezen az úton, és az egész családomnak a három fiamnak, hogy végig megértőek voltak a tanulmányaim és a munkám során.