

SZENT ISTVÁN EGYETEM

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZÉSEI

**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. Bayoumi Hamuda Hosam
egyetemi docens, C.Sc.
Óbudai Egyetem
RKK Környezetmérnöki Intézet

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

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

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

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

▪ A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

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 olyan tanulmány jelent meg, ahol leírták, hogy néhány protozoon cysta elegendő az emberi megbetegedés kialakulásához, azonban ez erősen függ az ember életkorától, immunállapotától.

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 részeivé váltak 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. Célkitűzésünk ennek megfelelően a következő volt:

- ✚ 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

▪ ANYAG ÉS MÓDSZER

A munka során a célkitűzéseknek megfelelően, szakmai-tudományos munkát végeztem három ismert protozoonnal. A dolgozatban bemutatom az új módszereknek a kidolgozását és beállítását.

- *Entamoeba histolytica* azonosítása real-time FRET PCR módszerrel a primereket Roy és munkatársai (2005) publikálták. A próbákat a Roche LC Probe Design program segítségével terveztem (Gene Bank Accession No.: X64142), különös tekintettel a feltételezett klinikai diagnózis szerinti importált *E. histolytica* fertőzésre.
- A kukorica és lucerna rizoszférában vizsgáltam az *Acanthamoeba* spp. új real-time FRET PCR módszerrel. A primereket és próbákat a Roche LC Probe Design program segítségével terveztem (Gene Bank Accession No.: AF325888). A pozitív eredményt BLAST, továbbá illesztő program (Multalin) segítségével a szekvencia-illesztés alapján filogenetikai fát készítettem (Filogenetikai analízis).
- A kennelel és tenyésztőtől származó kutyától bélsár mintát *Giardia intestinalis*ra vizsgáltam, különböző korcsoportú és nemű állatoktól. A vizsgálati anyagokból klasszikus, nested PCR módszerrel vizsgáltam, ezeket összehasonlítottam.
- A kísérleteket kontrollált körülmények között végeztem.
- Adataimat egy- és két-tényezős variancia-analízissel vizsgáltam, a korrelációs összefüggéseket pedig lineáris regresszió segítségével tártam fel.

▪ AZ ÉRTEKEZÉS EREDMÉNYEI

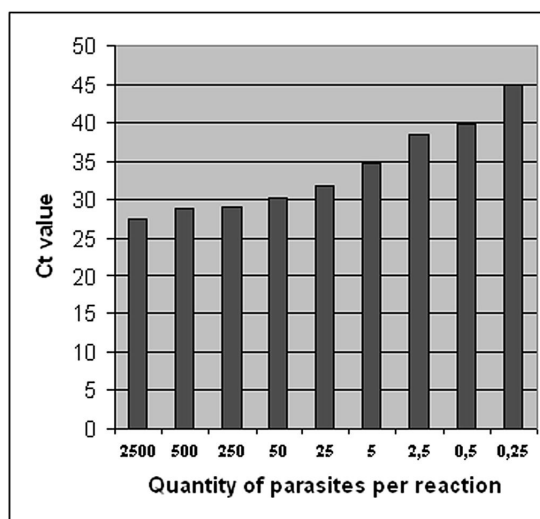
I. *Entamoeba histolytica* azonosítása

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 cystadúsítási 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 bemutatom, hogy WHO 1997 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 75 db. székletminta lett megvizsgálva *Entamoeba histolytica* WampoleTM Ag ELISA-val. Az ELISA szenzitivitása 4.0 %-os lett, és szintén 3 pozitív minta volt. A mikroszkópos és Ag ELISA vizsgálatnak a szenzitivitása is 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 amlifikáltam és electrophorezissel értékeltem. Az Electrophoretic PCR-el 24 esetben pozitív eredményt adott a 77 vizsgálati mintából, amelynek a szenzitivitása 31,16 volt. Az electrophoreticus PCR egy hosszú eljárás volt 24 órát vett igénybe, így ki kellett dolgozni egy gyors real-time FRET PCR-t (1.sz. táblázat.).

1.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)
PCR	77	24(31.16)	53(68.83)
FRET PCR	77	24(31.16)	53(68.83)

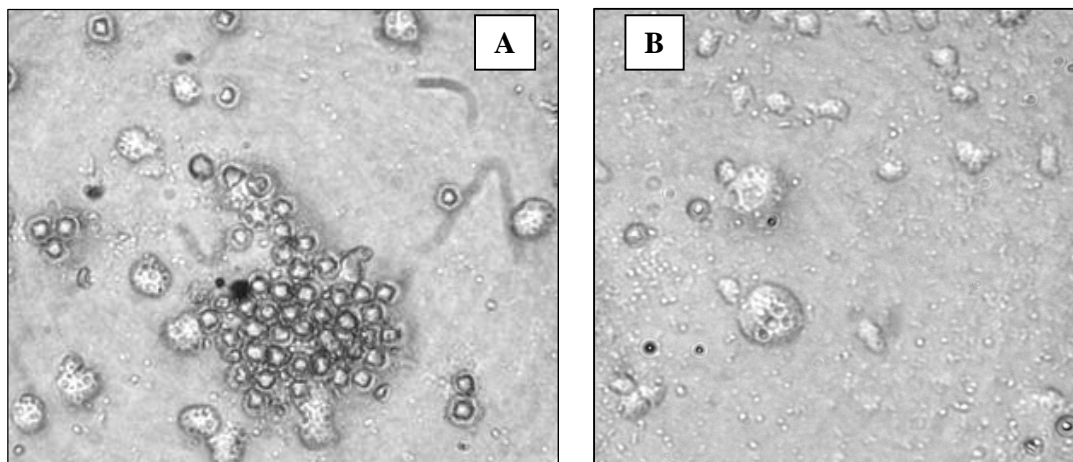
A 1. sz. táblázaton az látszik, hogy a két PCR módszernek az eredménye is, szenzitivitása is egyezik. Tehát kidolgoztam egy magas specificitású, és igen érzékeny, gyors módszert, amely 32 mintát 2 óra alatt tud értékelni és amely alkalmas bármilyen váladékból, tályogból, punktátumból a *E. histolytica* kimutatására. A *E. histolytica* génjére tervezett LightCycler PCR fajspecifikusan azonosítja a parazitát. A vizsgálat laboratóriumunkban > 2,5 db/ml *E. histolytica* kimutatására képes (1. ábra).



1. 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) tesztelése a PCR módszerrel. A szignifikáns koeficient korreláció $r = 0,98$ szinten szignifikáns.

II. *Acanthamoeba* spp. azonosítása

A kukorica és lucerna rizoszférájából a baktériumon és gombán kívül sikerült kimutatni szabadon élő amoebákat tenyésztéssel a Page agaron. A táptalajon kitenyésztett amoebákat morfológiailag azonosítottam: *Naegleria* és *Acanthamoeba* species-ként (2. ábra).

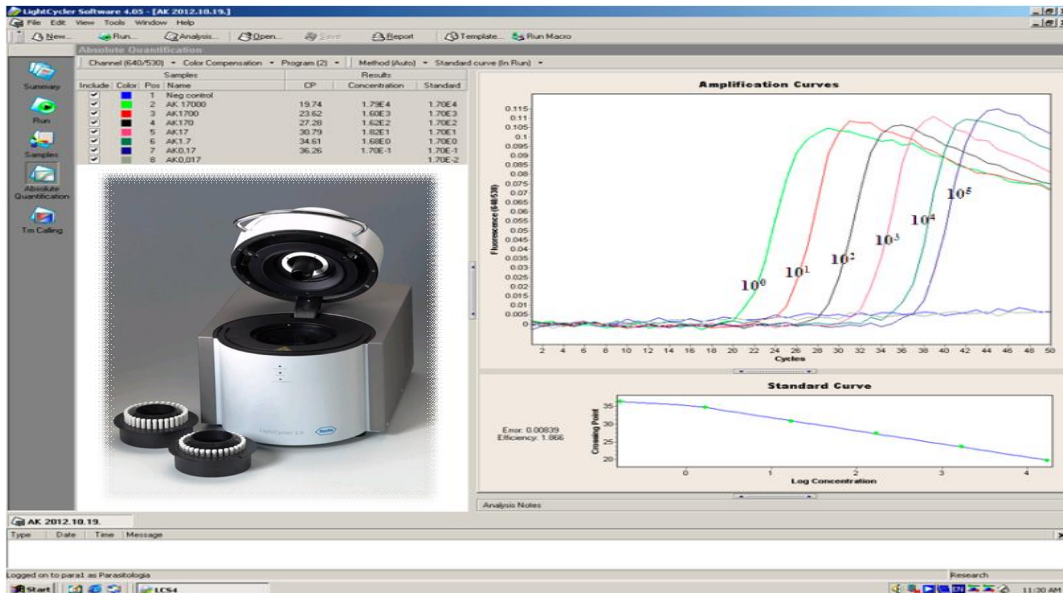


2. ábra. Mikroszkópos felvétel a rizoszférából izolált amoeba (*Naegleria* és *Acanthamoeba* spp.) trophozoita és cystának, 320x (A) és 400x (B) nagyítással.

A kukorica és lucerna rizoszférájából vett 1g mintában *Acanthamoeba* spp. real-time FRET PCR módszerrel a kalibrációs görbe segítségével absolute quantificatio-val sikerül meghatározni DNS koncentrációt. Tehát a KUK1-264,0db/20 μ l, KUK2-1,0 db/20 μ l, KUK3-68,0 db/20 μ l, KUK4-1,3 db/20 μ l, KUK5-2,4 db/20 μ l, KUK6-4,1 db/20 μ l, LUC1-129,0 db/20 μ l, LUC2-74,0 db/20 μ l, LUC3-46,0 db/20 μ l, LUC4-1,6 db/20 μ l, LUC5-1,6 db/20 μ l, LUC6-4,0 db/20 μ l és öntöző rendszer (öntöző rendszer-1liter víz bekoncentrálva PVDF) 1,0 db/20 μ 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.

Acanthamoeba sp. szenzitivitás

3 különböző napon 3 párhuzamosban végeztem el 1700db/20 μ l *Acanthamoeba* sp. közötti standard hígítási sor (17000; 1700; 170; 17; 1,7; 0,17; 0,017 *Acanthamoeba* sp /20 μ l) tesztelését a PCR módszerrel. A kimutathatósági határ (az a koncentráció, amely mindhárom párhuzamosban pozitív eredményt adott) 0,17 kópia/20 μ l volt (3. ábra.).



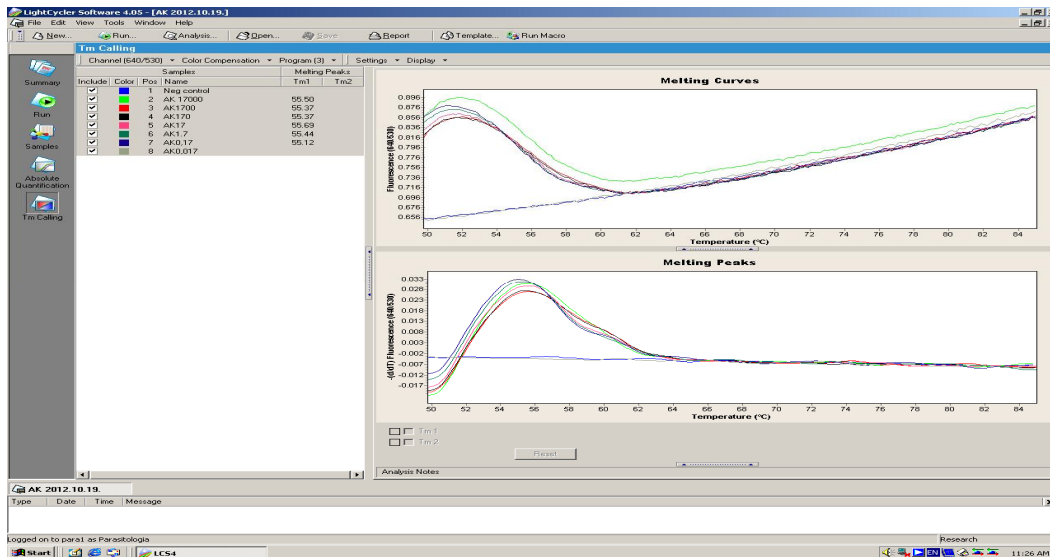
3. ábra. *Acanthamoeba* spp. szenzitivitás és specificitás analízis hígítási sorozatának (17000 - 0.017 protozoon 20 μ l PCR reakció). A korreláció p=0,05 szinten szignifikáns.

Az *Acanthamoeba* sp. génjére tervezett LightCycler PCR fajspecifikusan azonosítja a parazitát. A vizsgálat laboratóriumunkban > 0,017 db/20 μ l *Acanthamoeba* sp. kimutatására képes. A korreláció p=0,05 szinten szignifikáns.

Acanthamoeba sp. specificitás

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

A real-time FRET PCR vizsgálatot elvégeztem *Acanthamoeba* sp. pozitív mintával, és *Acanthamoeba* spp tenyészetből nyert trophozoitokkal. Valamennyi minta és a tenyészetből nyert trophozoitok pozitív eredményt adott, és az olvadási pont azonos volt 55°C (4. ábra.).

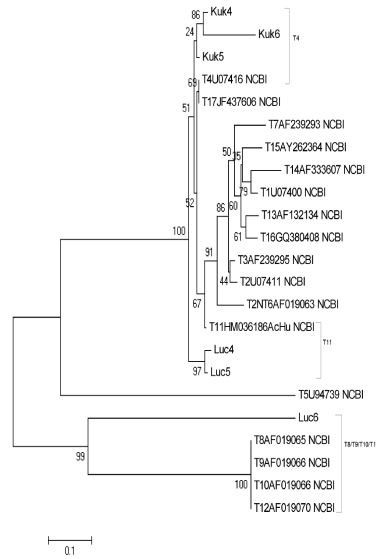


4. ábra. *Acanthamoeba* spp olvadáspont mérésének (Tm.)

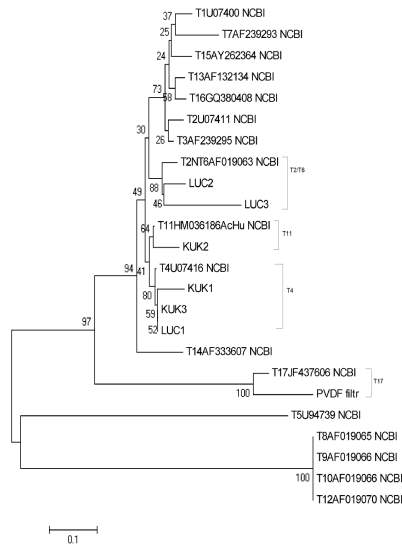
Acanthamoeba sp. szekvencia analízis és filogenetikai analízis eredmény

Gyökeres filogenetikai fa készítése segítségével megállapítottam, hogy a kukorica és lucerna rizoszférájában élő *Acanthamoeba*-k taxonómiaailag melyik legközelebbi közös ősére mutatnak. A gyöker fán jól lehet látni (5. ábra.), hogy a PVD filter az *Acanthamoeba* T17JF437606-al van a legközelebbi rokonságban (amelyről úgy tudjuk, hogy 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 Keratitis); LUC3 az *Acanthamoeba* T7AF239293-nak a legközelebbi rokona (amely jelenleg még nem okoz emberi megbetegedést).

Továbbá a 6. 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.



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



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

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.

III. *Giardia intestinalis* azonosítása

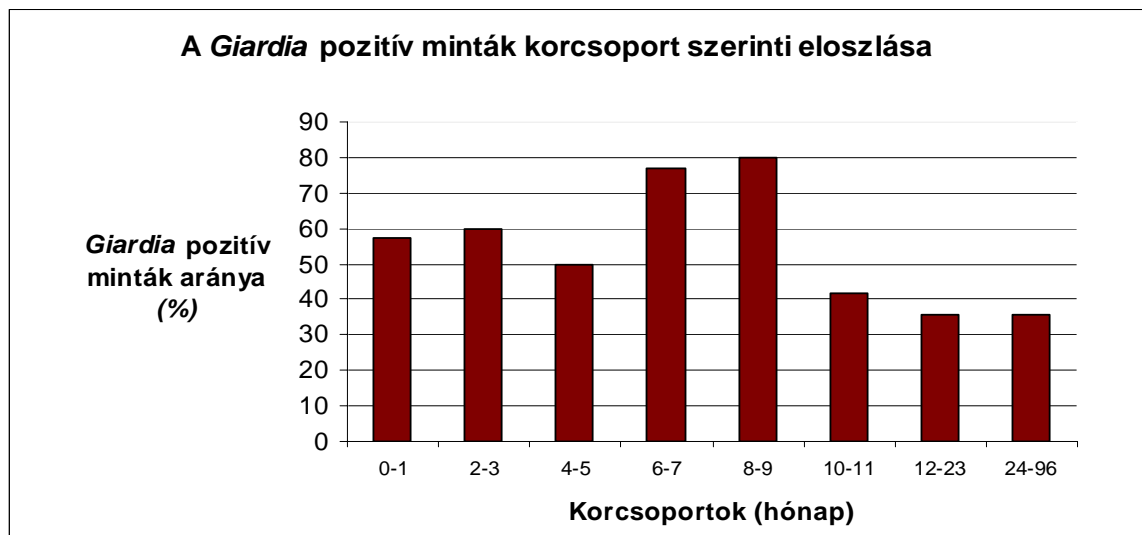
A *G.intestinalis* kimutatására a célszekvencia általában a 18S rDNS, amivel egyidejűleg az identifikálás is lehetséges. Molekuláris azonosítást *G. intestinalis* esetében nested PCR vizsgálatot végeztem MCGLADE et al. 2003 módszerrel.

2006-2007-ig az Országos Epidemiológiai Központ Parazitológiai Osztályra 187 (kennel ebminta) vizsgálati minta érkezett. Erre a célra eddig leggyakoribb a mikroszkópos vizsgálat: natívan (0,88 % NaCl-os oldat), Lugol –oldatos és cystadúsítási 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 felamlifikáltam, és electrophorezissel értékeltem. A nested PCR 11 esetben pozitív eredményt adott a 187 vizsgálati mintából, amelynek a szenzitivitása rendkívül alacsony 5,8% volt, volt amelyet bemutattam a 2.sz. táblázat-ban. A 8. ábra nested PCR-el pozitív minták korcsoport szerinti eloszlásba mutatóm be .

2.sz. táblázat. A 2006-2007-ig *Giardia intestinalis* szignifikáns eredmények mikroszkópikusan, *Giardia intestinalis* coproantigen - specifikus ELISA-tesztel (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

7. ábra. A 2006-2007-ig *Giardia intestinalis* nested PCR-el pozitív minták korcsoport szerinti eloszlása.

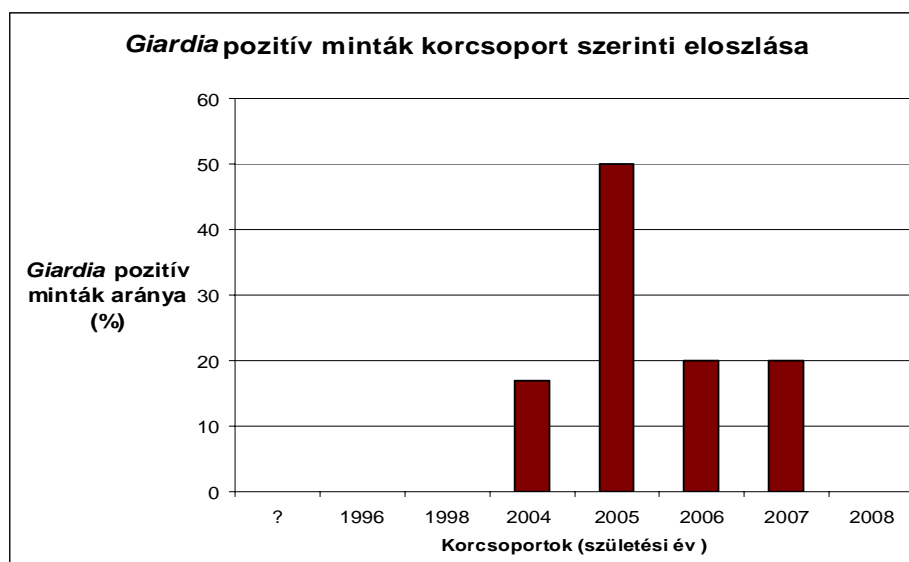


2008 - ban az Országos Epidemiológiai Központ Parazitológiai Osztályra 40 (kennel ebminta) vizsgálati minta érkezett. Erre a célra eddig leggyakoribb a mikroszkópos vizsgálat: natívan (0,88 % NaCl-os oldat), Lugol –oldatos és cystadúsítási módszerrel, amelyből mindössze 1 minta lett pozitív. A mikroszkópos 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 4.sz. táblázatban. A 8. ábra. a pozitív minták korcsoport szerinti eloszlását mutatom be.

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

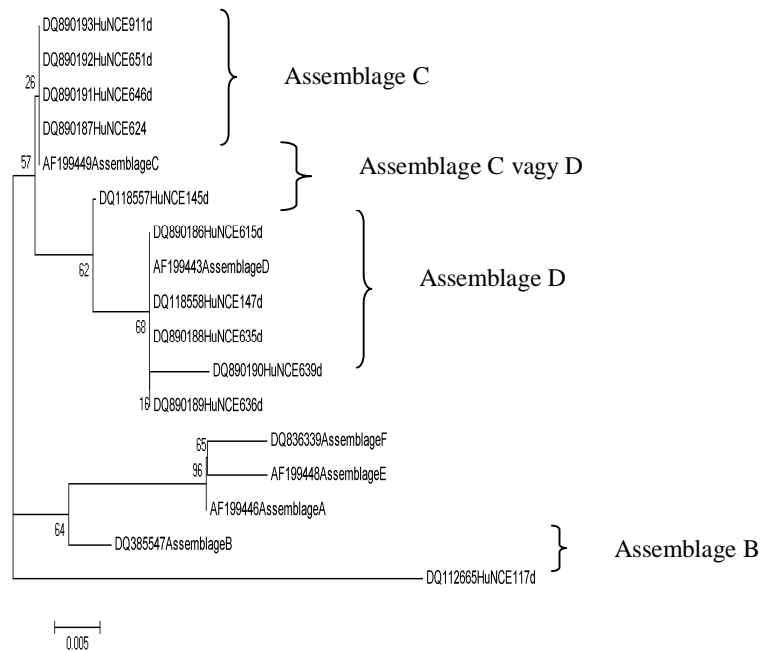
Vizsgálat típusa	Vizsgálat száma	Pozitív minták	%
Mikroszkóp	40	1	2,5
<i>Giardia intestinalis</i> coproantigen ELISA	40	21	52,8
nested PCR	40	7	17,5

8. ábra. A 2008 *Giardia intestinalis* nested PCR-el pozitív minták korcsoport szerinti eloszlása.



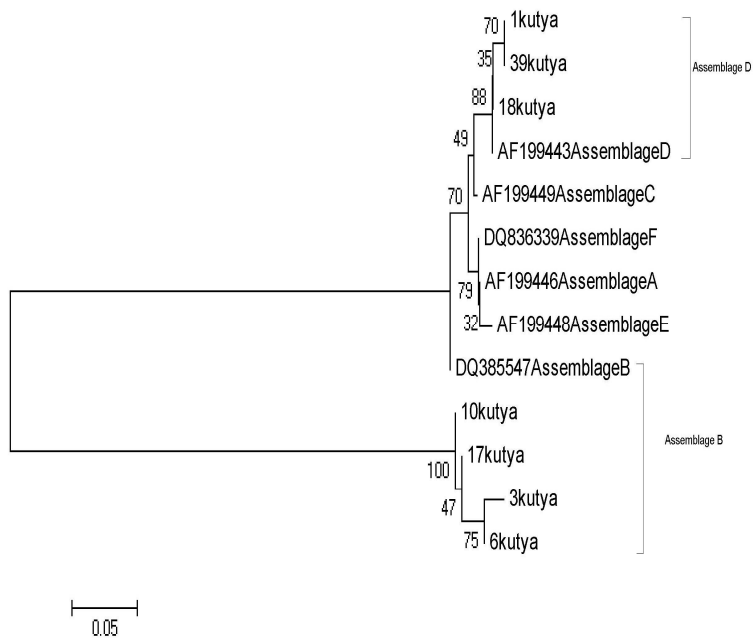
***Giardia intestinalis* szekvencia analízis és filogenetikai analízis eredmény**

A 2006-2007-ban nested PCR *G. intestinalis* 11 pozitív mintát filogenetikai fa készítése segítségével megállapítottam, hogy kapcsolatok kutya *Giardia* fajok PCR termék amelyik a taxonómiaailag legközelebbi a referencia szekvenciákkal AssemblageA_AF199446.1; AssemblageB_DQ385547.1; AssemblageC_AF199449.1; AssemblageD_AF199443.1; AssemblageE_AF199448.1; AssemblageF_DQ836339.1.(9. ábra.).



9. ábra. A 2006-2007-ig. filogenetikai kapcsolatok kutya *Giardia intestinalis* fajok PCR termék 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 amelyek a taxonómiailag legközelebbi a referencia szekvenciákkal hozhatók kapcsolatba: AssemblageA_AF199446.1; AssemblageB_DQ385547.1; AssemblageC_AF199449.1; AssemblageD_AF199443.1; AssemblageE_AF199448.1; AssemblageF_DQ836339.1.(10. ábra.).



10. ábra. A 2008 filogenetikai kapcsolatok kutya *Giardia intestinalis* fajok PCR termék 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).

▪ 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 pathogenitásról, 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 rhizoszférából *Acanthamoeba* spp. kimutatása klasszikus és modern módszerrel eredményes volt. A nemzetközi

irodalomban megjelent 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 rhizospherában. Az *Acanthamoeba* specíesek baktériumokkal táplálkoznak, vagyis szabályozzák a baktérium populációt.

Elsőként sikerül kimutatnom a kukorica és lucerna rizospherából a protozoot. 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, fertőző betegségek ellenőrzésére és az epidemiológiai összefüggések tisztázására.

Negyedik célkitűzésként a *G. intestinalis* vizsgálata szerepelt volt kitűzve. Célom 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, punktátumból a *E. histolytica*, *Acanthamoeba* és *G. intestinalis* kimutatására.

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

▪ **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 kidolgoztam real-time FRET PCR módszert LighCycler készüléken Az *Acanthamoeba* genus 13 pozitív mintáját beiktattuk az NCBI BankIt1593841.-ba
- ✚ Elsőként sikerült kimutatnom 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 meghatároztam az *Acanthamoeba* spp. mennyiségét is.
- ✚ Kutya bélsár mintákból való *Giardia intestinalis* kimutatását nested PCR módszert adaptálta.
- ✚ A 227 kutya bélsár mintákból sikerült kimutatni *Giardia intestinalis*, nested PCR módszerrel. Továbbá epidemiológiai összefüggéseket végeztünk.

▪ A TÉMÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Lektorált referált folyóiratban megjelent közlemények:

1. OROSZ E., FARKAS Á., KÖDÖBÖ CZ 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. [PUBMED: 23529297] (If: 0,787)
2. 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. [PUBMED: 23195553] (If: 0,787)
3. FÜZI M., PÁSZTI J., GYURIS Á., OROSZ E., MINÁROVITS J., SZÉNÁSI Z. (2008): Demonstration of a protein with enhanced resistance to proteinase K in transmissible cytopathic condition elicited by cell-free lysate of free-living amoeba *Naegleria gruberi*. *Structural Chemistry*, 19 (2) 203-208. p. (If: 1.433)
4. SZÉNÁSI Z., 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. (If: 1.511)

Rövid közlemények referált folyóiratban:

5. KUCSERA I., DANKA J., GLATZ K., OROSZ E. (2011): Laboratory diagnosis of human toxoplasmosis et the Department of Parasitology National Center for Epidemiology, Budapest, Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58 (Supplement) 62-63. p.
6. GLATZ K., DANKA J., OROSZ E., KUCSERA I. (2011): Foodborne human parasitoses in Hungary: diagnostic techniques at the Department of Parasitology, results from the last decade. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58 (Supplement) 31-32. p.
7. GLATZ K., DANKA J., OROSZ E., KUCSERA I. (2011): Leishmaniasis: topicalities and a review of cases detected in Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58 (Supplement) 145-146. p.
8. HORVÁTH P., KANIZSAI S., KAPÁS M., PÁSZTI J., OROSZ E., NAGY K., FÜZI M. (2009): Demonstration of a protein with enhanced resistance to proteinase-K in transmissible cytopathic condition elicited by cell-free lysate of free-living amoeba *Naegleria gruberi*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56 (Supplement) 170.p.

Nemzetközi Konferenciák:

9. OROSZ E., FARKAS Á., KÖDÖBÖ CZ L., BECSÁGH P., DANKA J., KUCSERA I., FÜLEKY G. (2013): ISOLATION of *Acanthamoeba* from the rhizosphere of maize and lucerne plants.

European Geosciences Union General Assembly 2013 (ápril 07 – 12.). (Absztrakt kötet).

10. KUCSERA I., DANKA J., SZÉNÁSI Z., OROSZ E., AUER H., GENCHI C. (2012): Human *Dirofilaria repens* infection in Hungary *Third European Dirofilaria Days, EDIS – European Dirofilaria Society, Olaszország, Parma* (június 21-22.) 44.p.
11. DANKA J., KUCSERA I., OROSZ E., SZÉNÁSI Z. (2012): Short history and review of relevant data of serodiagnosis of human toxocarosis in Hungary. *Toxocara2012 ESCCAP – European Scientific Counsel Companion Animal Parasites Budapest* (október 3-5) (Absztrakt kötet).
12. SZÉNÁSI Zs., FUENTES I., RUBIO J. M., MONTOYA M.A., HORVÁTH K., BECSÁGH P., OROSZ E., MARTON Sz., MÁRTON P., KUCSERA I., SZEIDEMÁNN Z. (2006): Prevalence and molecular biologic characterization of zoonotic protozoa (*Toxoplasma gondii*, *Giardia duodenalis*) in humans and animals. *International Conference of Industrial Hygiene and Occupational Medicine, The New Era of Occupational Health, Taipei, Taiwan* (ápril 28-29.) 42-43. p.

Hazai konferenciák:

13. OROSZ E., SZABÓ G., DANKA J., TAKÁCS I., KUCSERA I. (2012): *Entamoeba histolytica* infekció által okozott hasmenés. Esetismertetés. *A Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 40. Kongresszusa* (szeptember 20-22.) 57 p.
14. KUCSERA I., DANKA J., OROSZ E., GLATZ K., SZÉNÁSI Z. (2012): A maláriakérdés Magyarországon napjainkban. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi nagygyűlése, Keszthely* (október 24-26.) 26-27. p.
15. OROSZ E., TÓTH A., BABARCI E., GLATZ K., DANKA J., KUCSERA I. (2011): Giardiosis, mint lehetséges zoonotikus fertőzés egy esetbemutatás kapcsán. *A Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 39. Kongresszusa* (szeptember 22-24) p.
16. OROSZ E., TÓTH A., BABARCI E., GLATZ K., DANKA J., KUCSERA I. (2011): Giardiosis, mint lehetséges zoonotikus fertőzés egy esetbemutatás kapcsán. *Szent-Iványi-Binder Nap. A Magyar Zoonózis Társaság tudományos ülése* (szeptember 27.) 119-128p.
17. DANKA J., GLATZ K., POZIO E., OROSZ E., KUCSERA I. (2009): Trichinellosis helyzetkép Magyarországon a laboratórium szemszögéből. *SZENT-IVÁNYI-BINDER NAPOK, a Magyar Zoonózis Társaság Kiadványa, Kiadó: Korzenszky E., Szekszárd* 179-187.p.
18. SZÉNÁSI Zs., KUCSERA I., MENYHÁRT K., DANKA J., OROSZ E., HORVÁTH K. N., SZEIDEMANN Zs. (2005): Giardiosis: egy kevésbé (el) ismert zoonózis. *SZENT-IVÁNYI-BINDER NAPOK a Magyar Zoonózis Társaság Kiadványa, Kiadó: Korzenszky E., Szekszárd. (Sárospatak, 2005. június 8-10.)*
19. HORVÁTH K., SZÉNÁSI Zs., DANKA J., BECSÁGH P., KUCSERA I., OROSZ E. (2005): Real-time PCR alkalmazása a *Toxoplasma gondii* gyors és kvantitatív detektálására. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlés. 2004. október 7-9. Keszthely, Hungary. Előadásainak és posztereinek összefoglalója: 48. p.*

20. DANKA J., KUCSERA I., OROSZ E., Horváth K., Szénási Zs. (2004): A *Toxocara*-specifikus IgG ELISA érzékenységének és specificitásának vizsgálata a Western blot módszerhez képest. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlés, Keszthely, Hungary. Előadásainak és posztereinek összefoglalója (október 7-9.) 26. p.
21. SZÉNÁSI Zs., DANKA J., KUCSERA I., HORVÁTH K. N., OROSZ E. (2004). A humán toxoplazmosis, toxocarosis, echinococcosis és dirofilariosis gyakorisága Magyarországon 1999-2003 között. SZENT-IVÁNYI-BINDER NAPOK, a Magyar Zoonózis Társaság Kiadványa, Kiadó: Korzenszky E., Szekszárd 149-164.p.

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Lektorált referált folyóiratban megjelent közlemények:

22. 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.
23. DANKA J., KUCSERA I., OROSZ E., Horváth K., Szénási Zs. (2004): Comparative analysis of the anti-*Toxocara* IgG serological results obtained by a commercial ELISA and by a Western blot kit. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina*, 31 (3): 123-128. p.
24. HORVÁTH K., SZÉNÁSI Zs., DANKA J., KUCSERA I., OROSZ E. (2004): Possibilities for rapid and quantitative detection of *Toxoplasma gondii*; a comparative study of different PCR methods. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina*, 31(3): 117-122.p.

Bulletin publikációk listája:

25. GLATZ K., DANKA J., OROSZ E., KUCSERA I. (2011): Leishmaniasis in Hungary. *Bulletin of National Center for Epidemiology*, 2011. march, 3-6p.
26. GLATZ K., DANKA J., OROSZ E., KUCSERA I. (2011): Malaria in Hungary: a historical overview and the present situation. *Bulletin of National Center for Epidemiology*, 2011, november, 4-10p.