



A Magyar Parazitológusok Társasága

50 éves Jubileumi Emlékülése

SZIE Állatorvos-tudományi Kar,

Aula, 2015. június 3.

**HÁROM KÜLÖNBÖZŐ MÓDSZER ALKALMAZÁSA ÉS
ÖSSZEHASONLÍTÁSA A *BLASTOCYSTIS* SPP.
KIMUTATÁSÁBAN HUMÁN SZÉKLETBŐL**

**KUCSERA ISTVÁN, MOLNÁR MÓNICA, GÁLYÁSZ ESZTER,
DANKA JÓZSEF, OROSZ ERIKA**

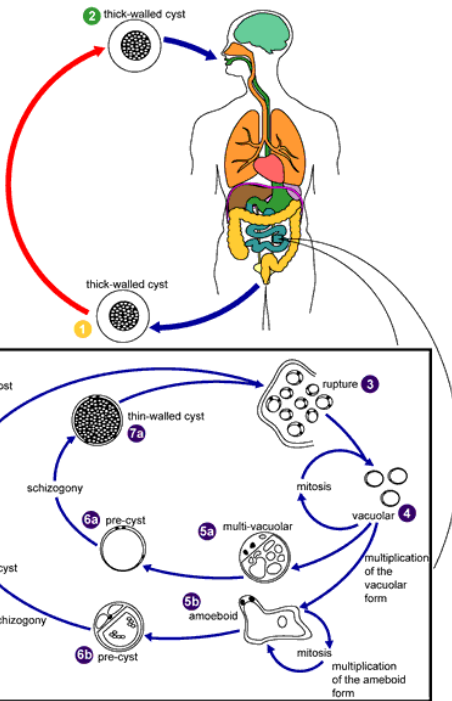
**Országos Epidemiológiai Központ,
Parazitológiai osztály
Gyáli út 2-6, 1097 Budapest,
E-mail: kucsera.istvan@oek.antsz.hu
www.oek.hu**

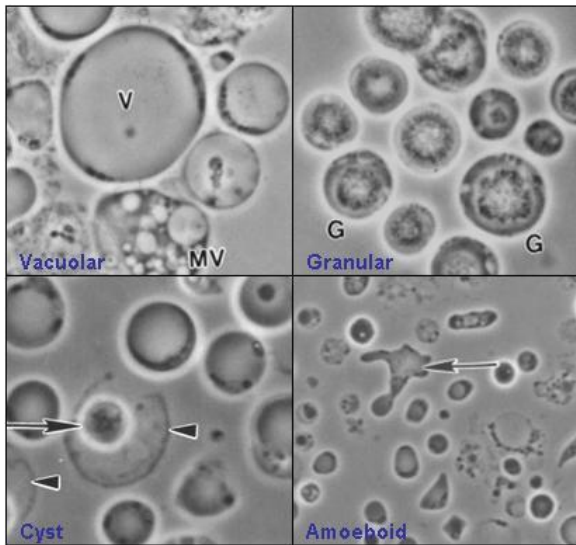


A *Blastocystis hominis*

A *Blastocystis hominis* már a XX. század előtt észlelték. 1912-ben Brumpt írta le először, és az élesztőgombák közé sorolta. Később Zierdt összehasonlítva az élesztőgombák és a *Blastocystis hominis* jellemzőit és élettani tulajdonságai miatt javasolta a rendszertani áthelyezését a protiszták közé, a Sporozoa subphylumba. Később viszont az apikális komplex hiánya, és egyéb tulajdonsága miatt a *Blastocystis hominis* a Sarcodina subphylumba tették (Zierdt 1991). Napjainkban a filogenetikai vizsgálatok alapján a Stramenopila csoportba sorolják (Adl és mtsai, 2005).

- A *Blastocystis* genetikailag több **altípusa** ismert, jelenleg kilenc altípust különböztetnek meg (RFLP analysis of *Blastocystis* small subunit rRNA gens). Az altípusok nem kizárólag az emberben, hanem különféle állatokban, így gerincesekben - például emlősökben és madarakban - is megtalálhatók. Ezért 2007-től az állati és humán mintákból nyert izolátumokat *Blastocystis hominis* helyett egyezményesen *Blastocystis* sp.-nek nevezik.





http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b9/Four_common_forms_of_Blastocystis_hominis_Valzn.jpg

B. hominis:

a) vakuolár form, culture, 500x

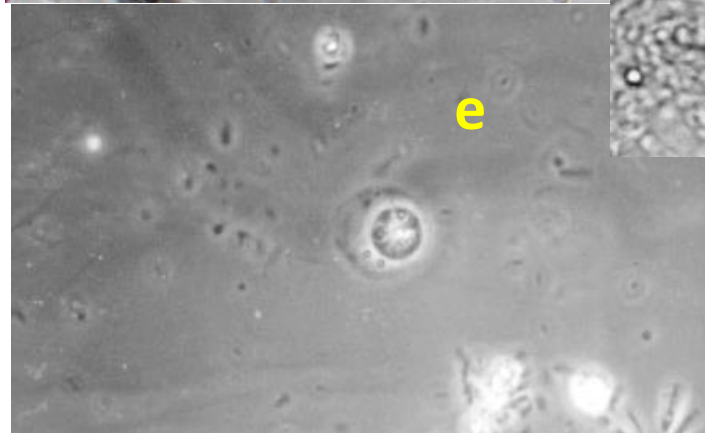
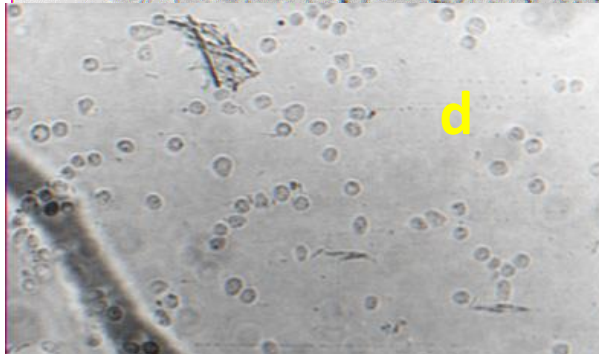
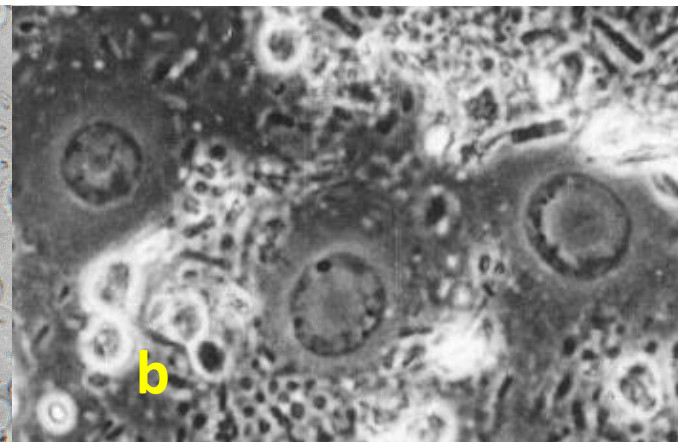
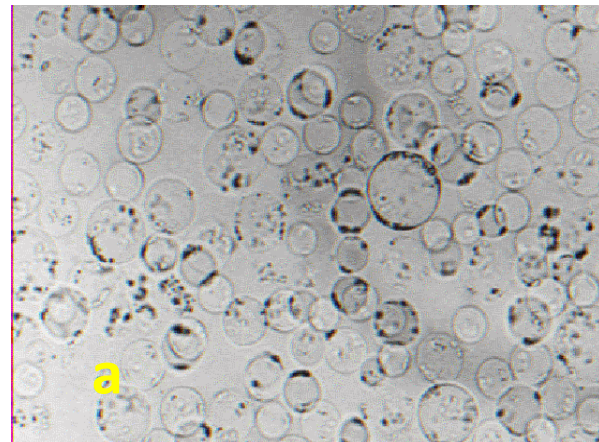
b) phase contrast microscopy, 500x

c) Indian ink, 1250x

d) cyst form, 500x

e) cyst form, 1250x

(Dr. István Kucsera, NCE)



A *Blastocystis* többféle alakban előforduló organizmus. Négy jellemző forma fordul elő: a vakuoláris, a granuláris, az amőboid és a ciszta forma.

- Humán mintáknál **kilenc *Blastocystis* altípust** mutattak ki, az eddigi vizsgálatok alapján globálisan a **leggyakrabban a 3-as altípus fordul elő**. Kutatások középpontjában ezen altípusok földrajzi megoszlását vizsgálják a humán közösségekben, hogy az embereknél megjelenő egyes altípusok mutatnak-e összefüggést az egyes betegségek tüneteivel (Alfellani és mtsai, 2013, Mehlhorn, 2012).
- Világszerte készített felmérések mutatják, hogy a laboratóriumi vizsgálatok során a *Blastocystis* gyakran megtalálható mikroorganizmus. Különböző országokban készült felmérések szerint a humán minták 0,6- 60 %-a (átlagban 23,85%) bizonyult pozitívnak.
- Az OEK Parazitológiai Osztályán 2012 - 2013-ban tenyésztéssel a minták 12%-a (47/391) bizonyult *Blastocystis* sp. pozitívnak.
- A *Blastocystis* fertőzés tünetmentesen és tünetekkel is járhat. A fertőzés eddig ismert emésztő-szervrendszeri tünetei változatosak lehetnek: émelygés, étvágytalanság, hasi fájdalom, puffadás, akut vagy krónikus hasmenés.
- Az OEK Parazitológiai osztályán a bélpаразитák, így a *Blastocystis* direkt kimutatására a **mikroszkópos, merthiolatos cystadúsításos és tenyésztéses** vizsgálati módszereket alkalmazzunk a rutin diagnosztika során. Ezek mellett teszteltük a *Blastocystis* kimutatására a **CoproELISA *Blastocystis* kitet is.**

Az alkalmazott diagnosztikai módszerek előnyei és hátrányai:

- Rutin vizsgálatban a Bh kimutatása natív készítmény és szedimentációs dúsítás mikroszkópos, valamint tenyésztéses vizsgálatával történik. Ezek a módszerek idő- és munkaigényesek, valamint jól képzett személyzetet igényelnek.
- A mikroszkópos diagnosztika nehézkes, mivel a Bh több morfológiai formája van: vakuoláris, amoeboid, cysta, granuláris, multivakuoláris, avakuoláris.
- A dúsítási módszerek rongálják feldolgozás közben, ezért nem megbízhatók.
- A tenyésztés 2 - 4 napot igényel, viszont standard módszernek számít.
- A *Blastocystis* antigén ELISA teszt székletből gyors, érzékeny, specifikus és megfelelő alternatíva a jelenleg használt módszereknek, elsősorban a mikroszkopos vizsgálatnak.
- Másrészt, csak egy kórokozót képes kimutatni, a *Blastocystis*-t.

Cél: Az elvégzett vizsgálatok célja a mikroszkópos, tenyésztéses és Ag ELISA vizsgálatok eredményeinek összehasonlítása volt.

CoproELISA Blastocystis

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) For the detection of *Blastocystis* spp. antigens in human feces

A vizsgálat elve

- A mikrotitráló lemez lyukait specifikus *Blastocystis* antigénjei elleni poliklonális antitestek fedik, a konjugátum *Blastocystis* elleni **poliklonális** antitestet tartalmaz.
- A teszt során hígított székletet mérünk a lyukakba. *Blastocystis* antigén jelenléte esetében az kötődik az immobilizált antitesthez.
- Minden nem kötődött anyagot mosással távolítunk el.
- Amikor a konjugátumot hozzáadjuk az kötődik az antigén/antitest komplexhez.
- Minden nem kötődött anyagot mosással távolítunk el.
- A *Blastocystis* antigén jelenlétében poliklonális At-Ag-jelzett (HRP) poliklonális At komplex képződik.
- A szubsztrát (tetra-metil-benzidin TMB) hozzáadásával az enzim jelenlétét detektáljuk. A szubsztrát eredetileg színtelen chromogénje az enzim által katalizált reakció következtében elszíneződik.
- A Stop oldat hozzáadását követően a kék szín sárgára vált, mely mérhető 450/620nm-en történő abszorbancia méréssel ELISA olvasóval.
- Az abszorbancia arányos a *Blastocystis* sejtek számával a mintában?

Minták

1. Friss székletminta

2. Tartósított székletminta: Alkalmazható 10% formalinnal vagy Sodium Acetate Formalin (SAF) tartósított minták esetében is. Ezek szobahőn is tárolhatók akár 24 hónapig. Nem alkalmazható Polyvinyl Alcohollal (PVA) tartósított minták esetében.

Kézi és automatizált kivitelezésre is alkalmas.

Test Validation

For the test to be valid the following criteria must be met. If these criteria are not met the test should be considered invalid and should be repeated.

- Positive Control:** The absorbance value should be ≥ 1.0 at 450/620 nm.
- Negative Control:** The absorbance value should be ≤ 0.20 at 450/620 nm.

Determination of Cut-Off Value

- The cut-off value (COV) is determined according to the following formula:

$$\text{COV} = \text{OD Negative control}_{450/620} + 0.15$$

Interpretation of Results

Absorbance (450/620nm)	Results
O.D < COV	Negative: no detectable <i>Blastocystis</i> antigen
O.D \geq COV	Positive: relevant levels of <i>Blastocystis</i> antigen



A **natív készítmény, MIF dúsítás és tenyésztés** folyamatosan került kivitelezésre a laboratórium rutin működésének megfelelően.

CoproELISA Blastocystis 4 fázisban került kivitelezésre:

2013.05.22., 2013.07.17., 2013.09.25.,
2013.10.10.

Anyag és módszer:

78 rutin vizsgálatra beérkezett mintát vizsgáltunk meg mikroszkóposan és CoproELISA *Blastocystis* teszttel .

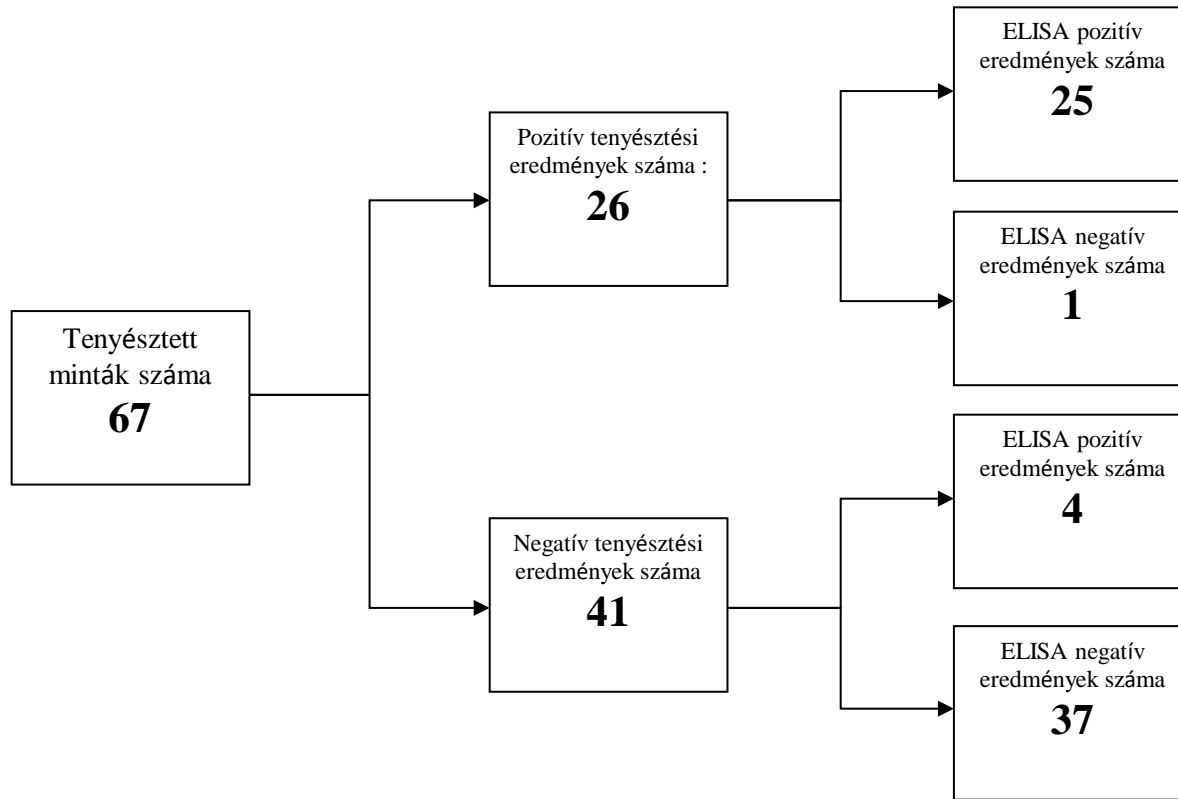
67 mintából végeztünk tenyésztést.

Mikroszkópos vizsgálatra a **natív preparátum** és a **szedimentációs cisztadúsítás (MIF)** vizsgálatot, **tenyésztésre** a módosított Boeck/Drbohlav kétfázisú tojás táptalajt alkalmaztuk.

A *Blastocystis* antigen kimutatására **CoproELISA Blastocystis (Savyon Diagnostics, Israel)** tesztet használtuk.



67 minta tenyésztéssel és CoproELISA Blastocystis tesztel is meg lett vizsgálva.



		Cultivation	
		positive	negative
ELISA	positive	25	4
	negative	1	37

Sensitivity: 96,2%

Specificity: 90.2%

$$\text{Szenzitivitás} = \frac{\text{valós pozitív}}{\text{valós pozitív} + \text{ál negatív}} \times 100(\%)$$

$$\text{Specifit ás} = \frac{\text{valós negatív}}{\text{valós negatív} + \text{ál pozitív}} \times 100(\%)$$

ÖSSZEGEZVE AZ EREDMÉNYEKET:

- Mikroszkóposan a minták 20,5% (16/78) detektáltunk *Blastocystis* sp.
- Tenyésztéssel a minták 38,8% (26/67)
- ELISA-val 39,7% (31/78).

- Összehasonlítva a tenyésztést és az ELISA-t: 26 tenyésztéssel pozitív mintából 96.2% (25/26) volt ELISA-val pozitív.
- A 41 tenyésztéssel negatív mintát ELISA-val tesztelve további 4 pozitív mintát detektáltunk (9.7%, 4/41).

8 mintában mikroszkóposan egyéb parazitát is detektáltunk

Parasite	No samples
<i>E. histolytica/dispar+Endolimax nana+Entamoeba coli</i>	1
<i>Entamoeba coli</i>	1
<i>Entamoeba coli+Endolimax nana+Trichuris trichiura</i>	1
<i>Entamoeba coli+Entamoeba histolytica/dispar</i>	1
<i>Entamoeba coli+Enterobius vermicularis</i>	1
<i>Trichuris trichiura</i>	1
<i>Giardia intestinalis</i>	2
Σ	8

A 16 mikroszkóposan *Blastocystis* pozitív mintában 13 esetben volt a *Blastocystis* az egyedüli parazita, 2 esetben *Giardia intestinalis* és 1 esetben *Entamoeba coli* és *Entamoeba histolytica /dispar* volt jelen a *Blastocystis* mellett.

78 mintából csak 11-hez fűződött megfelelő anamnesztikus adat, közülük 6 betegnek volt hasmenése vagy voltak hasi panaszai.

Következtetések:

- Az ELISA eredmények magas korrelációt mutattak a tenyésztéssel kapott eredményekkel, amely standard módszernek számít.
- Kisebb eltérések a tenyésztés és az Ag ELISA teszt között esetleg különböző Bh altípusok jelenlétével magyarázható.
- Az ELISA gyors és megbízható eredményt tud adni.
- Ezáltal a rutin laboratóriumban jól alkalmazható eljárás lehet a *Blastocystis* sp. diagnosztikájában.

A MEGTISZTELŐ FIGYELMET - THANK YOU FOR YOUR ATTENTION KÖSZÖNÖM SZÉPEN

